

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Antonija BOGDAN

**BIOLOŠKO AKTIVNE SNOVI V ORGANSKIH
EKSTRAKTIH NEKATERIH BAZIDIOMICET**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Antonija BOGDAN

**BIOLOŠKO AKTIVNE SNOVI V ORGANSKIH EKSTRAKTIH
NEKATERIH BAZIDIOMICET**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**BIOLOGICALLY ACTIVE COMPOUNDS IN ORGANIC EXTRACS
OF SELECTED BASIDIOMYCETES**

GRADUATION THESIS
University Studies

Ljubljana, 2016

Diplomsko delo je zaključek Univerzitetnega študija biologije. Opravljeno je bilo na katedri za biokemijo Oddelka za biologijo, Biotehniška fakulteta, Ljubljana. Terensko delo je bilo opravljeno v okolici Idrije v Sloveniji.

Študijska komisija Oddelka za biologijo je za mentorico diplomskega dela imenovala prof. dr. Kristino Sepčić, za somentorja diplomskega dela prof. dr. Petra Mačka in za recenzenta prof. dr. Toma Turka.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: doc. dr. Polona ZALAR
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: prof. dr. Tom TURK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: prof. dr. Kristina SEPČIĆ
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: prof. dr. Peter Maček
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora: 13.9.2016

Podpisana izjavljam, da je diplomsko delo rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Antonija Bogdan

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 577(043.2)=163.6
KG	gobe/bazidiomicete/naravni produkti/ekstrakti/protibakterijska aktivnost/hemolitična aktivnost/anti-acetilholinesterazna aktivnost
AV	BOGDAN, Antonija
SA	SEPČIĆ, Kristina (mentorica)/MAČEK, Peter (somentor)/TURK, Tom (recenzent)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
LI	2016
IN	BIOLOŠKO AKTIVNE SNOVI V ORGANSKIH EKSTRAKTIH NEKATERIH BAZIDIOMICET
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	X, 46 str., 9 pregl., 6 sl., 1 pril., 37 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	V tej diplomski nalogi smo iskali snovi s protibakterijskim, hemolitičnim in inhibitornim delovanjem proti encimu acetilholinesterazi v organskih ekstraktih 28 vrst gob, nabranih v okolici Idrije. Pripravili smo metanolne in acetonske ekstrakte liofiliziranih gob in jih testirali. Ugotovili smo, da je na Gram negativno bakterijo <i>Escherichia coli</i> delovalo 22 gobjih ekstraktov, na Gram pozitivno bakterijo <i>Bacillus subtilis</i> pa iz 21 vrst. Protibakterijsko aktivnost na <i>E. coli</i> smo prvič odkrili pri vrstah <i>Amanita citrina</i> , <i>Cantharellus tubaeformis</i> , <i>Cordyceps capitata</i> , <i>Cortinarius balteatocumatilis</i> , <i>Cortinarius infractus</i> , <i>Cystoderma amianthinum</i> , <i>Entoloma rhodopolium</i> , <i>Hydnellum peckii</i> , <i>Hygrophorus pudorinus</i> , <i>Lactarius deterrimus</i> , <i>Lactarius scrobiculatus</i> , <i>Macrolepiota procera</i> , <i>Peziza badia</i> , <i>Pseudocolitocybe cyathiformis</i> , <i>Russula cavipes</i> , <i>Tremiscus helvelloides</i> , <i>Tricholoma aurantium</i> , <i>Tricholoma pardalotum</i> in <i>Tricholoma sulphureum</i> , za katere ni navedenih objav. Največjo aktivnost za <i>B. subtilis</i> pa kažejo vrste <i>Hygrophorus eburneus</i> , <i>Hygrophorus agathosmus</i> in <i>Hygrophorus pudorinus</i> . Hemolitično je delovalo 22 ekstraktov. Po hemolitičnem potencialu izstopajo vrste <i>Amanita citrina</i> (metanolni ekstrakt), <i>Cortinarius balteatocumatilis</i> (acetonski ekstrakt), <i>Hygrophorus eburneus</i> (acetonski ekstrakt) in <i>Hygrophorus pudorinus</i> (oba ekstrakta). Rezultati hemolitičnega testa so novost. Močno inhibicijo acetilholinesteraze smo opazili pri vrsti <i>Cortinarius infractus</i> . Metanolni ekstrakt je zelo močno inhibiral tudi pri 1000x redčenju. Rezultati so pokazali, da vsebujejo nekateri organski ekstrakti biološko aktivne spojine, ki so primerne za potencialno uporabo v farmakologiji.

KEY WORDS DOCUMENTATION

- DN** Dn
- DC** UDC 577(043.2)=1636
- CX** mushrooms/basidiomycetes/natural products/hemolytic activity/hemagglutination/antibacterial activity/anti-acetylcholinesterase activity
- AU** BOGDAN, Antonija
- AA** SEPČIČ, Kristina (supervisor)/MAČEK, Peter (co-supervisor)/TURK, Tom (reviewer)
- PP** SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- PB** Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
- PY** 2016
- TI** BIOLOGICALLY ACTIVE COMPOUNDS IN ORGANIC EXTRACTS OF SELECTED BASIDIOMYCETES
- DT** Graduation thesis
- NO** X, 46 p., 9 tab., 6 fig., 1 ann., 37 ref.
- LA** sl
- AL** sl/en
- AB** In this thesis, we have searched for antibacterial, and hemolytic effects, and inhibitory activity against the enzyme acetylholinesterase in organic extracts from 28 species of mushrooms collected in the vicinity of Idrija (Slovenija). Methanolic and acetonnic extracts were prepared from lyophilised mushrooms and tested. We have found that extracts from 22 species showed inhibitory activity against the Gram-negative bacterium *Escherichia coli* and 21 species against Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. This is the first record of the presence of antibacterial activity to *E. coli* in species *Amanita citrina*, *Cantharellus tubaeformis*, *Cordyceps capitata*, *Cortinarius balteatocumatis*, *Cortinarius infractus*, *Cystoderma amianthinum*, *Entoloma rhodopolium*, *Hydnellum peckii*, *Hygrophorus pudorinus*, *Lactarius deterrimus*, *Lactarius scrobiculatus*, *Macrolepiota procera*, *Peziza badia*, *Pseudoclitocybe cyathiformis*, *Russula cavipes*, *Tremiscus helvelloides*, *Tricholoma aurantium*, *Tricholoma pardalotum* and *Tricholoma sulphureum*. *Hygrophorus eburneus*, *Hygrophorus agathosmus* and *Hygrophorus pudorinus* showed the highest activity to *B. subtilis*. Hemolytic activity was present in 22 species. Hemolytic potential of *Amanita citrina* (methanolic extract), *Cortinarius balteatocumatis* (acetonnic extract), *Hygrophorus eburneus* (acetonnic extract) and *Hygrophorus pudorinus* (both extracts) exceeded others. Our results of the hemolytic assay is novel. Strong inhibition of acetylcholinesterase was observed in *Cortinarius infractus* extracts. Methanolic extract of *Cortinarius infractus* showed very strong inhibition even at 1000x dilution. The results showed that some examined organic extracts contain biologically active compounds that may be suitable for the potential use in pharmacology and are certainly worth further investigation.

KAZALO VSEBINE

str.

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO SLIK	VIII
KAZALO PRILOG	IX
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	X

1 UVOD	1
2 PREGLED OBJAV	2
2.1 SPLOŠNE MORFOLOŠKE ZNAČILNOSTI GOB	2
2.2 BIOLOŠKO AKTIVNE SNOVI V GOBAH	3
2.3 PREGLEDNICA OBJAVLJENIH RAZISKAV	4
3 MATERIAL IN METODE	5
3.1 MATERIAL	5
3.1.1 Vzorci gob	5
3.1.1.1 Sortiranje materiala	5
3.1.1.2 Razdelitev vzorcev	6
3.1.2 Priprava organskih ekstraktov	7
3.1.3 Določanje koncentracije suhe teže ekstrahiranih snovi v vzorcih	7
3.2 Metode - testi za določanje biološke aktivnosti	7

3.2.1	Določanje protibakterijske aktivnosti z difuzijskim testom na agarju	7
3.2.2	Določanje hemolitične aktivnosti	9
3.2.3	Test inhibicije acetilholinesteraze	10
4	REZULTATI.....	11
4.1	DOLOČANJE KONCENTRACIJE SUHE TEŽE EKSTRAHIRANE SNOVI	11
4.2	PROTIBAKTERIJSKA AKTIVNOST	12
4.3	HEMOLITIČNA AKTIVNOST	17
4.4	ANTIACETILHOLINESTERAZNA AKTIVNOST	22
5	RAZPRAVA IN SKLEPI.....	27
5.1	RAZPRAVA	27
5.2	SKLEPI	30
6	POVZETEK.....	32
7	VIRI	33

KAZALO PREGLEDNIC

str.

Preglednica 1: Seznam latinskih in slovenskih imen preučevanih gob, čas nabiranja, njihovo rastišče, ime osebe, ki jih je določila in oznaka vzorca.....	6
Preglednica 2: Koncentracija suhe teže snovi v organskih ekstraktih gob.....	11
Preglednica 3: Rezultati protibakterijske aktivnosti organskih ekstraktov vzorcev gob proti sevom <i>E. coli</i> in <i>B. subtilis</i>	13
Preglednica 4: Rezultati protibakterijske aktivnosti vzorcev, ki so pred redčenjem kazali najmočnejšo inhibicijo rasti bakterij <i>E. coli</i> in/ali <i>B. subtilis</i>	15
Preglednica 5: Hemolitična aktivnost organskih ekstraktov vseh testiranih vzorcev ..	18
Preglednica 6: Hemolitična aktivnost organskih ekstraktov vzorcev redčenih v razmerju 1:10	20
Preglednica 7: Hemolitična aktivnost organskih ekstraktov gob, predhodno redčenih v razmerju 1:10, ki so povzročili hemolizo	21
Preglednica 8: Rezultati delovanja vseh vzorcev testiranih gob na encim acetilholinesterazo	22
Preglednica 9: Rezultati encimskega testa z acetilholinesterazo (AChE)	26

KAZALO SLIK

str.

Slika 1: Osnovne morfološke značilnosti predstavnikov debla Basidiomycota.....	3
Slika 2: Zemljevid območja z označenimi rastišči preučevanih gob.....	5
Slika 3: Odvisnost recipročne vrednosti polovičnega časa hemolize od koncentracije testnih vzorcev, ki so kazali hemolitično aktivnost.....	22
Slika 4: Prikaz inhibicije AChE aktivnih vzorcev acetonskih ekstraktov posameznih gob	25
Slika 5: Prikaz inhibicije AChE aktivnih vzorcev metanolnih ekstraktov posameznih gob	25
Slika 6: Odvisnost stopnje inhibicije AChE od koncentracije suhe snovi v ekstraktih posameznih redčitev vzorca 24M vrste <i>Cortinarius infractus</i>	26

KAZALO PRILOG

Priloga A : Pregled objav

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

A	vzorec acetonske serije
ACh	acetilholin
AChE	acetilholinesteraza
BSA	goveji serumski albumin (ang. bovine serum albumin)
EE	encimska enota
M	vzorec metanolne serije
MIK	minimalna inhibitorna koncentracija
t ₅₀	polovični čas hemolize

1 UVOD

Gobe (višje prostotrosnice) so v zadnjih letih postale predmet obsežnih raziskav zaradi njihovih hranilnih vrednosti, predvsem pa farmakoloških lastnosti. Gobe imajo ugodno hranilno sestavo, saj so bogat vir prebavljivih beljakovin, katerih vsebnost je večja kot v večini zelenjave. Vsebujejo tudi veliko vlaknin, nekatere vitamine in minerale ter malo maščob (Kreft in sod., 2013). V preventivni medicini se večinoma uporablajo, ker preprečujejo nastanek raznih bolezni, kot so rakava obolenja, srčno–žilne bolezni ter znižujejo raven holesterola (Wasser in Weis, 1999). Poleg sestavin s hranilno vrednostjo najdemo v gobah tudi snovi, ki delujejo zdravilno. Na Dalnjem vzhodu so že pred več tisoč leti spoznali zdravilno moč mnogih užitnih in tudi nekaterih neužitnih gob. Največ teh sestavin spada med polisaharide, manjši delež pa predstavljajo produkti sekundarnega metabolizma, terpenoidi in pa proteini, ki so zaenkrat še najmanj poznani (Kreft in sod., 2013). Uporaba gob v preventivni medicini se povečuje, sploh v zadnjih letih.

Število vrst gliv na Zemlji je ocenjeno na 140 000, od tega je znanih le približno 10% vseh vrst. Če predvidevamo, da je za človeka kakorkoli uporabnih samo 5% vrst gliv, to pomeni 7000 uporabnih vrst (Lindequist in sod., 2005). Med poznanimi vrstami gliv je približno 20.000 gob, od teh je okrog dva tisoč vrst užitnih (Kreft in sod., 2013).

V naši nalogi smo se lotili raziskav gob, nabranih oktobra 2007 v Mehkih Dolinah pri Idriji, Za Robom (Vojsko) in na Hudourniku pri Vojskem z namenom iskanja novih potencialno aktivnih snovi z različnimi biološkimi učinki. Osredotočili smo se na ekstrakte gob z organskima topiloma (aceton in metanol), ki smo jih v nadaljevanju raziskovanja uporabili za testiranje protibakterijske aktivnosti na izbranih G^+ in G^- bakterijah, hemolitične aktivnosti in sposobnosti inhibicije encima acetilholinesteraze.

2 PREGLED OBJAV

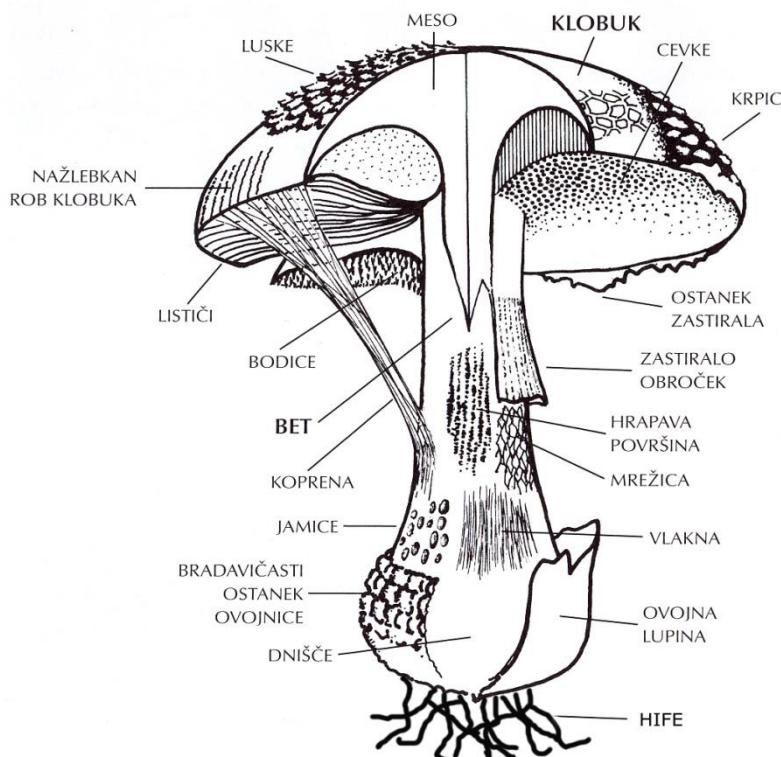
2.1 SPLOŠNE MORFOLOŠKE ZNAČILNOSTI GOB

Glive so prav tako kot protisti, rastline in živali del nadkraljestva Eukarya, ki se nadalje deli v nedefinirano taksonomsko kategorijo Opisthokonta in naprej v kraljestvo Fungi. Slednje ima naslednja debla: Chytridiomycota, Blastocladiomycota, Neocallimastigomycota, Microsporidia, Glomeromycota, Ascomycota in Basidiomycota (Hibbert in sod., 2007). Gobe, ki smo jih uporabili v nalogi spadajo v deblo Basidiomycota.

Glive se od rastlin ločijo po mnogih lastnostih, kot na primer po tem, da nimajo klorofila, flavonoidov in plastidov. Zaradi odsotnosti klorofila nimajo sposobnosti fotosinteze. Tako potrebujejo druge avtotrofne organizme, ki predelajo snovi, s katerimi se potem lahko hranijo. Temu načinu življenja, v odvisnosti od drugih organizmov, pravimo, da je heterotrofno. Ločimo parazitske (zajedalke), saprofitske (gniloživke) in mikorizne (soživke) vrste gliv. Zajedalke nujno potrebujejo rastline, gniloživke za preživetje potrebujejo razkrnjajoč organski substrat, soživke pa živijo v simbiozi z rastlinami (Lassoe, 2006). So glavni razkrojevalci lesa, saj imajo encime za razgradnjo celuloze in lignina. Simbiotske vrste gliv, predvsem tiste, ki živijo v simbiozi s koreninami višjih rastlin, so ključne pri ohranjanju ekosistemov. Gliva dobi od rastline ogljikove hidrate, vitamine in rastne dejavnike, ki uravnavajo njeno rast, sama pa rastlini omogoči intenzivnejše sprejemanje hraničnih snovi in mineralov iz tal, saj preplet glivnih hif poveča površino korenin (Kreft in sod., 2013). Glive v simbiozi z algami tvorijo lišaje.

Večino glivnih celic obdaja celična stena, skozi katero prehajajo vse hranične snovi v topni obliku. V tem se razlikujejo od živali, ki nimajo celičnih sten (Kreft in sod., 2013). Celična stena je iz hitina in glukana. V citoplazmi shranjujejo rezervne polisaharide, večinoma glikogen. Od rastlin se razlikujejo po celični strukturi. Imajo lomasome, vezikularne strukture med plazmalemo in celično steno. Vakuole se pojavljajo le v starejših celicah. Skozi pore v celični steni lahko prehajajo organeli (mitohondriji, jedra itd.) in citoplazma. Prostotrošnice (Basidiomycetes) so med glivami dosegle največjo kompleksnost v stopnjah razvojnega kroga, zgradbi hif in plodišč. Celice so sestavljene iz niza tankih nitk, ki jih

imenujemo hife. Spletu hif, ki se razpreda po substratu, pa pravimo micelij ali podgobje. Iz podgobja se v ugodnih življenjskih razmerah razvijejo trosnjaki s plodovnim tkivom (trosovnico), v katerem se razvijejo trosi. Trosnjaki so po obliki zelo raznovrstni, prav tako imajo lahko različno nameščeno trosovnico. V trosovnici se lahko na različne načine (na lističih, v cevkah, bodicah, letvicah ali na površini trosnjaka oziroma znotraj trosnjaka) razvijejo trosi, ki se ob zrelosti aktivno oz. pasivno razsipajo. Za pravilno prepoznavanje gob ponavadi najprej pogledamo klobuk, njegovo obliko in morebitne posebnosti na njegovi površini. Za razlikovanje med vrstami so lahko pomembni tudi znaki na spodnji strani klobuka, na primer njegova priraščenost na bet, oblika lističev ali cevk. Osnovne morfološke značilnosti predstavnikov debla Basidiomycota so prikazane na sliki 1.



Slika 1: Osnovne morfološke značilnosti predstavnikov debla Basidiomycota. Pritejeno po Arzenšek in sod., 2002

2.2 BIOLOŠKO AKTIVNE SNOVI V GOBAH

Gobe imajo ugodno hrnilno sestavo, predvsem zaradi velike vsebnosti vlaknin in majhne vsebnosti maščob. So bogat vir prebavljivih beljakovin. Vsebujejo vse esencialne

aminokisline, vendar imajo omejeno vsebnost aminokislin z žveplom (cisteina in metionina). V gobah je tudi večina mineralov, ki so prisotni v podlagi, na kateri rastejo. So odličen vir vitaminov (predvsem vitaminov B kompleksa) in prekurzorjev vitaminov (β -karotena in ergosterola). Vsebujejo tudi maščobe, vključno z maščobnimi kislinami, mono-, di- in triglyceride, sterole, sterolne estre in fosfolipide.

Poleg sestavin s hranilno vrednostjo najdemo v gobah tudi zdravilne učinkovine. Predvsem so to visokomolekulski polisaharidi, nekaj pa je tudi produktov sekundarnega metabolizma, terpenoidov in proteinov (Kreft in sod., 2013).

Nekatere gobe imajo tudi mnogo drugih terapevtskih lastnosti. Delujejo kot antioksidanti in znižujejo krvni tlak in ravni holesterola ter sladkorja v krvi. Delujejo hepatoprotективno, protivnetno, protivirusno in protibakterijsko. Imajo tudi adaptogene učinke, saj povečajo odpornost telesa na stres, utrujenost in tesnobnost (Kreft in sod., 2013).

2.3 PREGLEDNICA OBJAVLJENIH RAZISKAV

Preglednica objavljenih raziskav je prikazana v prilogi A in predstavlja iz literature zbrane podatke o dosedanjem iskanju bioloških aktivnosti v organskih in vodnih ekstraktih gob, ki so bile vključene v naše raziskovalno delo. Zanimalo nas je, če so aktivnosti v naših testih že bile opisane, oziroma če smo odkrili kakšno novo bioaktivno učinkovino. Prazno polje v tabeli pomeni, da v viru ta informacija ni bila navedena.

3 MATERIAL IN METODE

3.1 MATERIAL

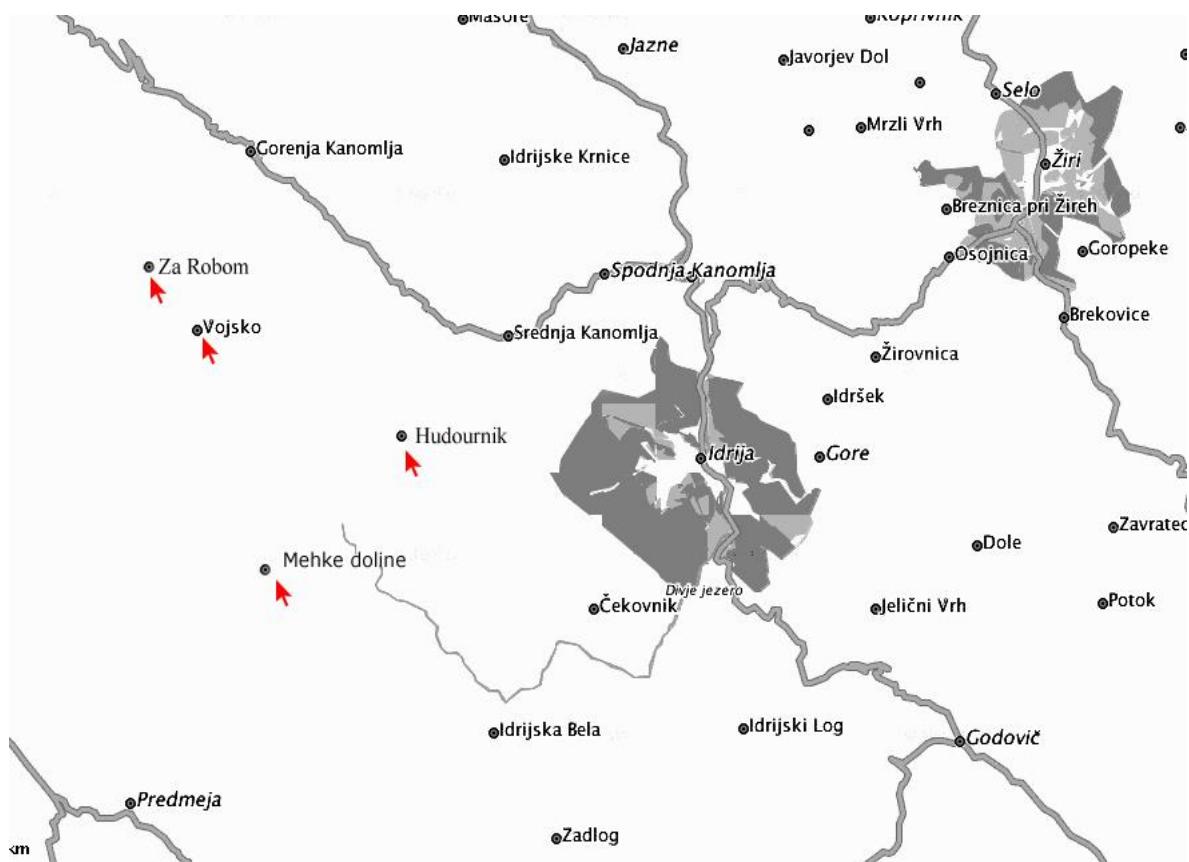
3.1.1 Vzorci gob

3.1.1.1 Sortiranje materiala

Vzorce osemindvajsetih vrst gob smo nabrali na treh lokacijah, 21 vrst v Mehkih Dolinah pri Idriji, 1 vrsta Za Robom (Vojsko) in 7 vrst na Hudourniku pri Vojskem.

Vzorce so nabrali in določili T. Grebenc, V. Jelen Šajn, A. Jesenko, J. Krajnc, A. Piltaver, K. Sepčić in S. Šerod, dne 19.10., 20.10. in 21.10. 2007. Vzorce so nato liofilizirali in zamrznili.

Natančna lokacija nahajališč preučevanih gob je označena na sliki 2, seznam preučevanih gob pa je v preglednici 1.



Slika 2: Zemljevid območja z označenimi rastišči preučevanih gob

Preglednica 1: Seznam latinskih in slovenskih imen preučevanih gob, čas nabiranja, njihovo rastišče, ime osebe, ki jih je določila in oznaka vzorca

Latinsko ime	Slovensko ime	Nabрано	Lokacija	Determiniral	Oznaka vzorca
<i>Agaricus arvensis</i>	Poljski kukmak	21.10.2007	Hudournik (Vojsko)	S. Šerod	16
<i>Amanita citrina</i>	Citronasta mušnica	19.10.2007	Mehke Doline pri Idriji	K. Sepčić	3
<i>Bovista nigrescens</i>	Jajčasti kadiček	19.10.2007	Mehke Doline pri Idriji	A. Jesenko	13
<i>Calvatia excipuliformis</i>	Visoka plešivka	21.10.2007	Hudournik (Vojsko)	J. Krajnc	18
<i>Cantharellus tubaeformis</i>	Lijasta lisička	21.10.2007	Hudournik (Vojsko)	A. Piltaver	1
<i>Cordyceps capitata</i>	Košutnični glavatec	19.10.2007	Mehke Doline pri Idriji	A. Piltaver	8
<i>Cortinarius balteatocumativis</i>	Sinjebetna koprenka	19.10.2007	Mehke Doline pri Idriji	V. Jelen Šajn	10
<i>Cortinarius infractus</i>	Scefrana koprenka	19.10.2007	Mehke Doline pri Idriji	A. Piltaver	24
<i>Craterellus cornucopioides</i>	Črna trobenta	21.10.2007	Hudournik (Vojsko)	J. Krajnc	15
<i>Cystoderma amianthinum</i>	Rjava zrnovka	21.10.2007	Hudournik (Vojsko)	J. Krajnc	27
<i>Entoloma rhodopolium</i>	Nizka rdečelistka	21.10.2007	Hudournik (Vojsko)	V. Jelen Šajn	25
<i>Hydnellum peckii</i>	Peckova ježevka	19.10.2007	Mehke Doline pri Idriji	A. Jesenko	20
<i>Hygrophorus agathosmus</i>	Dišeča polževka	19.10.2007	Mehke Doline pri Idriji	A. Jesenko	19
<i>Hygrophorus eburneus</i>	Bela polževka	19.10.2007	Mehke Doline pri Idriji	A. Jesenko	12
<i>Hygrophorus pudorinus</i>	Hojeva polževka	19.10.2007	Mehke Doline pri Idriji	A. Jesenko	6
<i>Lactarius deterrimus</i>	Smrekova sirovka	19.10.2007	Mehke Doline pri Idriji	J. Krajnc	11
<i>Lactarius salmonicolor</i>	Lososova sirovka	19.10.2007	Mehke Doline pri Idriji	K. Sepčić	17
<i>Lactarius scrobiculatus</i>	Jamičasta mlečnica	19.10.2007	Mehke Doline pri Idriji	A. Jesenko	28
<i>Lepista nuda</i>	Vijoličasta kolesnica	19.10.2007	Mehke Doline pri Idriji	A. Jesenko	26
<i>Macrolepiota procera</i>	Orjaški dežnik	21.10.2007	Hudournik (Vojsko)	V. Jelen Šajn	7
<i>Peziza badia</i>	Rjava skledica	20.10.2007	Za Robom (Vojsko)	K. Sepčić	9
<i>Pseudoclitocybe cyathiformis</i>	Latvičasta palivka	19.10.2007	Mehke Doline pri Idriji	A. Jesenko	23
<i>Russula cavipes</i>	Votlobetna golobica	19.10.2007	Mehke Doline pri Idriji	T. Grebenc	22
<i>Tremiscus helvelloides</i>	Uhati drhtavež	19.10.2007	Mehke Doline pri Idriji	A. Jesenko	4
<i>Tricholoma aurantium</i>	Zelenkasta kolobarnica	19.10.2007	Mehke Doline pri Idriji	A. Jesenko	5
<i>Tricholoma pardalotum</i>	Pegasta kolobarnica	19.10.2007	Mehke Doline pri Idriji	A. Piltaver	21
<i>Tricholoma sulphureum</i>	Žveplena kolobarnica	19.10.2007	Mehke Doline pri Idriji	A. Piltaver	2
<i>Tricholoma vaccinum</i>	Kocasta kolobarnica	19.10.2007	Mehke Doline pri Idriji	K. Sepčić	14

3.1.1.2 Razdelitev vzorcev

Liofilizirane vzorce gob (1-5 g) smo v terilnici strli v prah. Nato smo vzorec razdelili na dva približno enaka dela. Enega sem ekstrahirala jaz (kot je opisano v poglavju 3.1.2), preostalo je Matej Kalar uporabil za pripravo vodnih ekstraktov, ki jih je analiziral v svoji diplomski nalogi.

3.1.2 Priprava organskih ekstraktov

Vsak vzorec (1/2 celotnega vzorca) smo najprej približno enakovorno razdelili v dve epruveti. Epruvete smo označili s številko vzorca ter črkama A in M glede na uporabljeno topilo za ekstrakcijo (A=aceton, M=metanol). V vsako epruveto smo dodali toliko topila, da je prekrilo homogeniziran vzorec gobjega tkiva za približno 2 cm. Epruvete smo zamašili s kovinskimi zamaški in oblepili s parafilmom, s čimer smo preprečili izhlapevanje topila. Vzorce smo vstavili v stresalnik in pustili čez noč pri 37 °C in 250 obratih/min. Naslednji dan smo vzorce prefiltrirali preko filtrirnih papirjev v erlenmajerice in jih pustili v digestoriju, dokler ni topilo popolnoma izhlapelo. Nato smo vsakemu vzorcu dodali po 1 ml 96% etanola, s katerim smo raztopili preostalo suho snov in ekstrakte prenesli v centrifugirke po Ependorfu, ki smo jih ustrezno označili, oblepili s parafilmom in do testiranja shranili pri – 20 °C.

3.1.3 Določanje koncentracije suhe teže ekstrahiranih snovi v vzorcih

Iz aluminijaste folije smo naredili posodice s premerom približno 1,5 cm, jih označili in stehtali, nato pa nanje nanesli 100 µl ekstrakta in jih sušili v sterilizatorju 10 min pri 100 °C. Po sušenju smo posodice ponovno stehtali in preračunali suhe teže v mg/ml ekstrakta. Koncentracijo suhe teže ekstrahirane snovi v vzorcih prikazuje preglednica 2 (poglavlje 4.1).

3.2 METODE - TESTI ZA DOLOČANJE BIOLOŠKE AKTIVNOSTI

3.2.1 Določanje protibakterijske aktivnosti z difuzijskim testom na agarju

Protibakterijsko aktivnost vzorcev smo testirali s standardnim difuzijskim testom na agarju. Kot testne seve smo uporabili en po Gramu pozitiven (*Bacillus subtilis*) in en po Gramu negativen (*Escherichia coli*) bakterijski sev. Oba seva sta v zbirkri Katedre za genetiko in biologijo mikroorganizmov Oddelka za Biologijo na Biotehniški Fakulteti Univerze v Ljubljani.

Zgoraj naštete bakterije smo sterilno nacepili v 100 ml erlenmajerice, ki so vsebovale po 10 ml avtoklaviranega tekočega gojišča (Luria Broth). Gojišče smo predhodno pripravili tako, da smo v 100 ml deionizirane vode raztopili 2.5 g medija Luria Broth (Sigma, ZDA) in raztopino razdelili v erlenmajerice. Le-te smo z nacepljenim gojiščem preko noči stresali pri 250 obratih/minuto in pri temperaturi 37 °C. Naslednji dan smo določili število bakterij tako, da smo 1 ml gojišča sterilno prenesli v plastično kiveto in na dvožarkovnem spektrofotometru (Shimadzu, Japonska) izmerili optično gostoto pri 600 nm. Kot slepi poskus smo uporabili sterilno tekoče gojišče Luria Broth. Število bakterij smo določili iz optične gostote raztopine s pomočjo standardiziranih umeritvenih krivulj za ustrezna bakterijska seva.

Sledila je priprava agarja, ki smo ga naredili z raztplavljanjem 25 g gojišča Luria Broth in 15 g agarja v 1 l deionizirane vode v vsako od dveh sterilnih 2 l erlenmajeric, ki smo jih nato pokrili z aluminijasto folijo in jih avtoklavirali. Vroč medij smo pustili, da se je ohladil na primerno temperaturo (~ 42 °C). Medtem smo izračunali volumen tekoče bakterijske kulture tako, da je bila končna koncentracija enaka 5×10^5 bakterijskih kolonij na 1 l gojišča. Ker je bila izmerjena koncentracija prekonočnih bakterijskih kultur 2×10^8 v gojišču, je to pomenilo, da moramo dodati 2.5 ml inokuluma na 1 l avtoklaviranega gojiščnega medija. Preračunane volumne smo sterilno prenesli v ohlajeni medij ter dobro premešali. Sledilo je razlivanje, pri čemer smo po 20 ml agarja z vcepljeno bakterijsko kulturo razlili na vsako od šestinpetdesetih Petrijevih plošč. Na ta način smo pripravili 28 plošč z bakterijskim sevom *Bacillus subtilis* in 28 plošč z bakterijskim sevom *Escherichia coli*. Le-te smo do uporabe hranili pri 4 °C.

Pred uporabo smo s pomočjo steriliziranega plutovrta v vsaki plošči zvrtali 8-9 lukenj premera 1 cm. V vsako od njih smo za test dodali po 100 µl vzorca (acetonskega ali metanolnega ekstrakta posameznih gob). Po 12-urni inkubaciji pri 37 °C smo odčitali polmre inhibicijskih con, ki so bile vidne okoli lukenj. Kot kontrolo smo testirali 100 µl 96% etanola, ki ni imel bistvenega učinka na rast obeh testiranih bakterijskih sevov (cone inhibicije v nobenem primeru niso presegale 0.5 mm).

Tiste vzorce, ki so kazali protibakterijsko aktivnost smo redčili do koncentracije, ko inhibicijska cona ni bila več vidna. Vzorce, ki so imeli sprva inhibicijsko cono 0-2 mm nismo redčili, tiste z inhibicijsko cono 2-3 mm smo redčili 1:10, tiste z inhibicijsko cono 3-5 mm smo redčili 1:10 in 1:100 ter tiste, ko so imeli inhibicijsko cono > 5 mm smo redčili 1:10, 1:100 in 1:1000. Za redčenje smo uporabili 96% etanol. Na ta način smo določili okvirno minimalno inhibitorno koncentracijo (MIK), oz. najnižjo koncentracijo, pri kateri protibakterijska snov še vedno zavira rast bakterij.

3.2.2 Določanje hemolitične aktivnosti

S hemolitičnim testom spremljamo sposobnost snovi, da poškoduje membrane eritrocitov in s tem potencialno tudi drugih celic.

Eritrocite smo s centrifugiranjem izolirali iz sveže goveje krvi, ki smo ji pri odvzemu dodali citrat, da ni prišlo do strjevanja. Eritrocite smo trikrat sprali s fiziološko raztopino in uporabili za biološke teste ali pa spravili v Alseverjevem konzervansu v hladilnik. Tako pripravljene eritrocite lahko uporabljam, dokler se supernatant ne pobarva rdeče, kar nakazuje, da je prišlo do hemolize. Pred uporabo smo konzervirane eritrocite vedno dvakrat sprali s fiziološko raztopino. Za testiranje smo jih resuspendirali v pufru za eritrocite (raztopina 0.13 M NaCl in 0.02 M TRIS.HCl), pH 7.4. Pripravili smo suspenzijo eritrocitov, ki je pri 650 nm imela navidezno absorpcijo 1 ± 0.01 .

Hemolitično aktivnost smo zasledovali s pomočjo čitalca mikrotitrnih plošč (Dynex Technologies, ZDA), ki nam omogoča istočasno zasledovanje 96 časovnih potekov reakcij. Na mikrotitrni plošči smo napolnili 56 vdolbinic s po 100 μl eritrocitnega pufra in 20 μl vzorca (acetonskega ali metanolnega ekstrakta posameznih gob). Po končanem pipetiranju smo v vsako vdolbinico dodali še 100 μl eritrocitov ter pričeli z meritvijo. Hemolizo smo opazovali kot padec absorpcije pri 630 nm. Kot kontrolo smo uporabili 100 μl eritrocitnega pufra, 20 μl 96% etanola in 100 μl eritrocitov. Hemolizo smo zasledovali 20 minut pri 25 °C. Čisti etanol v testiranem volumnu ni imel hemolitičnega učinka.

Pri vzorcih, ki so bili aktivni, smo odčitali polovični čas hemolize (t_{50}), oz. čas pri katerem navidezna absorpcija suspenzije eritrocitov pade na polovico svoje začetne vrednosti. Pri

hemolitično aktivnih vzorcih smo teste ponovili še z manjšim volumnom vzorca ($10 \mu\text{l}$, $5 \mu\text{l}$, $2 \mu\text{l}$ in $1 \mu\text{l}$), da smo lahko določili koncentracijsko odvisnost hemolize.

3.2.3 Test inhibicije acetilholinesteraze

Aktivnost acetilholinesteraze (AChE) in njeni inhibicijski testni vzorci smo zasledovali z Ellmanovo metodo (Ellman in sod., 1961) s pomočjo čitalca mikrotitrnih plošč (Dynex Technologies, ZDA). Kot encim smo uporabili AChE iz električne jegulje (Sigma, ZDA), ki smo jo raztopili v 100 mM fosfatnem pufru, pH 7.3 v koncentraciji 50 encimskih enot (EE)/ml. Pred začetkom testa smo encim redčili tako, da smo k 8 ml fosfatnega pufra dodali $8 \mu\text{l}$ encima AChE. Mikrotitrno ploščo smo napolnili s po $150 \mu\text{l}$ mešanice Ellmanovega reagenta (ki smo ga pripravili z raztopljanjem 5,5-ditiobis-2-nitrobenzojske kisline (91 mg) in natrijevega hidrogen karbonata (37.5 mg) v 1 litru 25 mM fosfatnega pufra, pH 7.0) in substrata acetilholina v končni koncentraciji 1 mM). To mešanico smo predhodno pripravili tako, da smo zmešali 50 ml Ellmanovega reagenta s $50 \mu\text{l}$ 1 M acetilholina.

Nato smo v posamezno vdolbinico dodali po $10 \mu\text{l}$ vsakega testnega vzorca (acetonskega ali metanolnega ekstrakta posameznih gob) in tik pred začetkom meritve še $50 \mu\text{l}$ AChE. Pri kontroli smo namesto vzorca dodali $10 \mu\text{l}$ 96% etanola. Vse vzorce, pri katerih smo ugotovili pozitiven rezultat smo v nadaljevanju testirali še z različnimi količinami ($1 \mu\text{l}$, $2 \mu\text{l}$, $5 \mu\text{l}$ in $10 \mu\text{l}$) in jih nato še redčili z etanolom v razmerjih 1:10, 1:100 in 1:1000. Vse meritve smo izvajali 5 min pri 405 nm in 25°C .

4 REZULTATI

4.1 DOLOČANJE KONCENTRACIJE SUHE TEŽE EKSTRAHIRANE SNOVI

V preglednici 2 so prikazane koncentracije suhe teže snovi v posameznih ekstraktih gob, ki smo jih uporabili pri preračunavanju količine snovi v bioloških testih. Opazimo lahko, da je v večini primerov količina ekstrahirane suhe snovi večja v metanolnih kot v acetonskih ekstraktih.

Preglednica 2: Koncentracija suhe teže snovi v organskih ekstraktih gob

A = acetonski ekstrakt, M = metanolni ekstrakt.

Vrsta gobe	Oznaka vzorca	Koncentracija suhe snovi (mg/ml)
<i>Agaricus arvensis</i>	16A	4,6
	16M	5,4
<i>Amanita citrina</i>	3A	8,3
	3M	8,5
<i>Bovista nigrescens</i>	13A	5,5
	13M	8,4
<i>Calvatia excipuliformis</i>	18A	1,3
	18M	3,2
<i>Cantharellus tubaeformis</i>	1A	8,0
	1M	10,2
<i>Cordyceps capitata</i>	8A	1,8
	8M	5,3
<i>Cortinarius balteatocumatis</i>	10A	9,3
	10M	3,4
<i>Cortinarius infractus</i>	24A	5,2
	24M	5,5
<i>Craterellus cornucopioides</i>	15A	6,3
	15M	8,3
<i>Cystoderma amianthinum</i>	27A	1,2
	27M	6,1
<i>Entoloma rhodopolium</i>	25A	4,0
	25M	6,2
<i>Hydnellum peckii</i>	20A	8,1
	20M	11,6

se nadaljuje

nadaljevanje preglednice 2: Koncentracija suhe teže snovi v organskih ekstraktih gob

Vrsta gobe	Oznaka vzorca	Koncentracija suhe snovi (mg/ml)
<i>Hygrophorus agathosmus</i>	19A	4,2
	19M	4,5
<i>Hygrophorus eburneus</i>	12A	5,6
	12M	3,6
<i>Hygrophorus pudorinus</i>	6A	7,9
	6M	5,9
<i>Lactarius deterrimus</i>	11A	6,2
	11M	3,9
<i>Lactarius salmonicolor</i>	17A	11,8
	17M	13,3
<i>Lactarius scrobiculatus</i>	28A	9,7
	28M	11,6
<i>Lepista nuda</i>	26A	5,5
	26M	5,6
<i>Macrolepiota procera</i>	7A	4,0
	7M	6,7
<i>Peziza badia</i>	9A	2,2
	9M	2,2
<i>Pseudoclitocybe cyathiformis</i>	23A	3,2
	23M	3,7
<i>Russula cavipes</i>	22A	3,1
	22M	3,9
<i>Tremiscus helvelloides</i>	4A	3,0
	4M	6,0
<i>Tricholoma aurantium</i>	5A	5,4
	5M	6,4
<i>Tricholoma pardalotum</i>	21A	3,3
	21M	1,9
<i>Tricholoma sulphureum</i>	2A	1,7
	2M	4,1
<i>Tricholoma vaccinum</i>	14A	12,4
	14M	4,7

4.2 PROTIBAKTERIJSKA AKTIVNOST

Protibakterijsko aktivnost na Gram-negativne bakterije *E. coli* je pokazalo 26 od 56 testiranih vzorcev, medtem ko je bila protibakterijska aktivnost precej bolj izražena na

Gram-pozitivne bakterije *B. subtilis*, saj le 4 testirani vzorci niso inhibirali rasti teh bakterij (preglednica 3). Najbolj aktivne vzorce smo dodatno redčili v razmerjih 1:10, 1:100, 1:1000 in ugotavljali približna območja minimalnih inhibitornih koncentracij (MIK). Rezultate dodatnih redčenj prikazuje preglednica 4.

Preglednica 3: Rezultati protibakterijske aktivnosti organskih ekstraktov vzorcev gob proti sevom *E. coli* in *B. subtilis*

- = ni aktivnosti
- A = acetonski ekstrakt
- M = metanolni ekstrakt

Vrsta gobe	Oznaka vzorca	Količina suhe snovi v testu (mg)	Širina inhibicijske cone (mm) <i>E. coli</i>	Širina inhibicijske cone (mm) <i>B. subtilis</i>
<i>Agaricus arvensis</i>	16A	0,46	-	1,5
	16M	0,54	-	1
<i>Amanita citrina</i>	3A	0,83	-	1
	3M	0,85	0,5	1
<i>Bovista nigrescens</i>	13A	0,55	-	2
	13M	0,84	-	1
<i>Calvatia excipuliformis</i>	18A	0,13	-	1
	18M	0,32	-	1
<i>Cantharellus tubaeformis</i>	1A	0,8	-	4
	1M	1,02	0,5	2
<i>Cordyceps capitata</i>	8A	0,18	-	3
	8M	0,53	0,5	-
<i>Cortinarius balteatocumatilis</i>	10A	0,93	-	2
	10M	0,34	0,5	2
<i>Cortinarius infractus</i>	24A	0,52	-	2
	24M	0,55	0,5	2
<i>Craterellus cornucopioides</i>	15A	0,63	-	5
	15M	0,83	-	4
<i>Cystoderma amianthinum</i>	27A	0,12	-	1
	27M	0,61	0,5	1,5
<i>Entoloma rhodopolium</i>	25A	0,4	-	-
	25M	0,62	0,5	0,5
<i>Hydnellum peckii</i>	20A	0,81	-	3
	20M	1,16	0,5	3
<i>Hygrophorus agathosmus</i>	19A	0,42	-	10
	19M	0,45	1	11
<i>Hygrophorus eburneus</i>	12A	0,56	1	7
	12M	0,36	1	6
<i>Hygrophorus pudorinus</i>	6A	0,79	1	11
	6M	0,59	1	9

se nadaljuje

nadaljevanje preglednice 3: Rezultati protibakterijske aktivnosti organskih ekstraktov vzorcev gob proti sevom *E. coli* in *B. subtilis*

Vrsta gobe	Oznaka vzorca	Količina suhe snovi v testu (mg)	Širina inhibicijske cone (mm) <i>E. coli</i>	Širina inhibicijske cone (mm) <i>B. subtilis</i>
<i>Lactarius deterrimus</i>	11A	0,62	-	3
	11M	0,39	0,5	2
<i>Lactarius salmonicolor</i>	17A	1,18	-	3
	17M	1,33	-	1,5
<i>Lactarius scrobiculatus</i>	28A	0,97	-	2
	28M	1,16	0,5	2,5
<i>Lepista nuda</i>	26A	0,55	0,5	1
	26M	0,56	0,5	1
<i>Macrolepiota procera</i>	7A	0,4	-	-
	7M	0,67	0,5	1
<i>Peziza badia</i>	9A	0,22	-	1,5
	9M	0,22	0,5	1
<i>Pseudoclitocybe cyathiformis</i>	23A	0,32	-	3
	23M	0,37	0,5	2
<i>Russula cavipes</i>	22A	0,31	-	2
	22M	0,39	0,5	3
<i>Tremiscus helvelloides</i>	4A	0,3	0,5	-
	4M	0,6	1	0,5
<i>Tricholoma aurantium</i>	5A	0,54	-	2
	5M	0,64	1	1
<i>Tricholoma pardalotum</i>	21A	0,33	-	1
	21M	0,19	0,5	1
<i>Tricholoma sulphureum</i>	2A	0,17	-	8
	2M	0,41	0,5	7
<i>Tricholoma vaccinum</i>	14A	1,24	-	5
	14M	0,47	-	1

Preglednica 4: Rezultati protibakterijske aktivnosti vzorcev, ki so pred redčenjem kazali najmočnejšo inhibicijo rasti bakterij *E. coli* in/ali *B. subtilis*

- = ni aktivnosti
- x = nismo izvajali testa
- A = acetonski ekstrakt
- M = metanolni ekstrakt
- MIK = minimalna inhibitorna koncentracija, oz. najmanjša koncentracija snovi, ki še vedno inhibira rast bakterij.

Vrsta gobe	Oznaka vzorca	Redčenje	Količina suhe snovi v testu (mg)	Širina inhibicijske cone (<i>B. subtilis</i>) (mm)	Širina inhibicijske cone (<i>E. coli</i>) (mm)	MIK (mg/ml)
<i>Agaricus arvensis</i>	16A	1:10	0,046	2	x	Med 0,046 in 0,0046
		1:100	0,0046	x	x	
		1:1000	4,6E-4	x	x	
<i>Bovista nigrescens</i>	13A	1:10	0,055	3-4	x	Med 0,055 in 0,0055
		1:100	0,0055	x	x	
		1:1000	5,5E-4	x	x	
<i>Cantharellus tubaeformis</i>	1A	1:10	0,08	1	x	Med 0,008 in 8E-4
		1:100	0,008	0,5	x	
		1:1000	8E-4	x	x	
<i>Cordyceps capitata</i>	8A	1:10	0,102	-	x	Med 1,02 in 0,102
		1:100	0,0102	x	x	
		1:1000	0,00102	x	x	
<i>Cortinarius balteatocumatis</i>	10A	1:10	0,018	2	x	Med 0,018 in 0,0018
		1:100	0,0018	-	x	
		1:1000	1,8E-4	x	x	
<i>Cortinarius infractus</i>	24A	1:10	0,093	4	x	Med 0,093 in 0,0093
		1:100	0,0093	x	x	
		1:1000	9,3E-4	x	x	
<i>Craterellus cornucopoides</i>	15A	1:10	0,034	1,5-2	x	Med 0,034 in 0,0034
		1:100	0,0034	x	x	
		1:1000	3,4E-4	x	x	
<i>Craterellus cornucopoides</i>	15M	1:10	0,052	2	x	Med 0,052 in 0,0052
		1:100	0,0052	x	x	
		1:1000	5,2E-4	x	x	
<i>Craterellus cornucopoides</i>	15A	1:10	0,055	1,5	x	Med 0,055 in 0,0055
		1:100	0,0055	x	x	
		1:1000	5,5E-4	x	x	
<i>Craterellus cornucopoides</i>	15M	1:10	0,063	4	x	Med 0,0063 in 6,3E-4
		1:100	0,0063	2	x	
		1:1000	6,3E-4	x	x	
<i>Craterellus cornucopoides</i>	15M	1:10	0,083	4	x	Med 0,0083 in 8,3E-4
		1:100	0,0083	0,5-1	x	
		1:1000	8,3E-4	x	x	

se nadaljuje

nadaljevanje preglednice 4: Rezultati protibakterijske aktivnosti vzorcev, ki so pred redčenjem kazali najmočnejšo inhibicijo rasti bakterij *E. coli* in/ali *B. subtilis*

Vrsta gobe	Oznaka vzorca	Redčenje	Količina suhe snovi v testu (mg)	Širina inhibicijske cone (mm) <i>B. subtilis</i>	Širina inhibicijske cone (mm) <i>E. coli</i>	MIK (mg/ml)
<i>Cystoderma amianthinum</i>	27A	1:10	0,012	1,5	x	Med 0,012 in 0,0012
		1:100	0,0012	x	x	
		1:1000	1,2E-4	x	x	
	20A	1:10	0,081	3	x	Med 0,0081 in 8,1E-4
<i>Hydnellum peckii</i>	20M	1:100	0,0081	2-2,5	x	Med 0,116 in 0,0116
		1:1000	8,1E-4	x	x	
		1:10	0,116	0,5-1	x	
	19A	1:100	0,0116	x	x	Med 0,0042 in 4,2E-4
<i>Hygrophorus agathosmus</i>	19M	1:1000	0,00116	x	x	Med 0,0045 in 4,5E-4
		1:10	0,042	8	x	
		1:100	0,0042	4	x	
	12A	1:1000	4,2E-4	0,5-1	x	Med 0,0056 in 5,6E-4
<i>Hygrophorus eburneus</i>	12M	1:10	0,045	9	x	Med 0,0036 in 3,6E-4
		1:100	0,0045	5	x	
		1:1000	4,5E-4	1	x	
	6A	1:10	0,056	7	x	Med 0,0079 in 7,9E-4
<i>Hygrophorus pudorinus</i>	6M	1:1000	5,6E-4	0,5	x	Med 0,0059 in 5,9E-4
		1:10	0,036	4	x	
		1:100	0,0036	1	x	
	11A	1:1000	3,6E-4	-	x	Med 0,0062 in 6,2E-4
<i>Lactarius deterrimus</i>	11M	1:10	0,079	10	x	Med 0,039 in 0,0039
		1:100	0,0079	7	x	
		1:1000	7,9E-4	1	x	
	17A	1:10	0,059	7	x	Med 0,118 in 0,0118
<i>Lactarius salmonicolor</i>	17A	1:1000	6,2E-4	x	x	Med 0,039 in 0,0039
		1:10	0,039	2	x	
		1:100	0,0039	x	x	
	28A	1:1000	3,9E-4	x	x	Med 0,097 in 0,0097
<i>Lactarius scrobiculatus</i>	28A	1:10	0,118	2	x	Med 0,097 in 0,0097
		1:100	0,0118	1	x	
	28A	1:1000	0,00118	x	x	
		1:10	0,097	3	x	
	28A	1:100	0,0097	x	x	
		1:1000	9,7E-4	x	x	

se nadaljuje

nadaljevanje preglednice 4: Rezultati protibakterijske aktivnosti vzorcev, ki so pred redčenjem kazali najmočnejšo inhibicijo rasti bakterij *E. coli* in/ali *B. subtilis*

Vrsta gobe	Oznaka vzorca	Redčenje	Količina suhe snovi v testu (mg)	Širina inhibicijske cone (mm) <i>B. subtilis</i>	Širina inhibicijske cone (mm) <i>E. coli</i>	MIK (mg/ml)
<i>Lactarius scrobiculatus</i>	28M	1:10	0,116	2	x	Med 0,116 in 0,0116
		1:100	0,0116	x	x	
		1:1000	0,00116	x	x	
<i>Peziza badia</i>	9A	1:10	0,022	2	x	Med 0,022 in 0,0022
		1:100	0,0022	x	x	
		1:1000	2,2E-4	x	X	
<i>Pseudoclitocybe cyathiformis</i>	23A	1:10	0,032	2,5	x	Med 0,0032 in 3,2E-4
		1:100	0,0032	1	x	
		1:1000	3,2E-4	x	x	
	23M	1:10	0,037	2	x	Med 0,037 in 0,0037
		1:100	0,0037	x	x	
		1:1000	3,7E-4	x	x	
<i>Russula cavipes</i>	22A	1:10	0,031	2	x	Med 0,031 in 0,0031
		1:100	0,0031	x	x	
		1:1000	3,1E-4	x	x	
	22M	1:10	0,039	1	x	Med 0,039 in 0,0039
		1:100	0,0039	x	x	
		1:1000	3,9E-4	x	x	
<i>Tricholoma aurantium</i>	5A	1:10	0,054	2	x	Med 0,054 in 0,0054
		1:100	0,0054	x	x	
		1:1000	5,4E-4	x	x	
<i>Tricholoma sulphureum</i>	2M	1:10	0,041	6	x	Med 0,0041 in 4,1E-4
		1:100	0,0041	1,5	x	
		1:1000	4,1E-4	-	x	
<i>Tricholoma vaccinum</i>	14A	1:10	0,124	3	x	Med 0,0124 in 0,00124
		1:100	0,0124	1	x	
		1:1000	0,00124	x	x	

4.3 HEMOLITIČNA AKTIVNOST

Preglednica 5 prikazuje rezultate hemolitične aktivnosti za vse testirane vzorce. Hemolitično aktivnost je pokazalo 38 od 56 vzorcev, od tega 22 acetonskih vzorcev in 16 metanolnih vzorcev. Pri vseh aktivnih vzorcih smo test hemolitične aktivnosti ponovili, tako da smo vse vzorce redčili v razmerju 1:10. Te rezultate smo prikazali v preglednici 6.

Vse vzorce (redčene v razmerju 1:10) s hemolitično aktivnost smo nadalje testirali s še manjšimi volumeni vzorcev ($10\mu\text{l}$, $5\mu\text{l}$, $2\mu\text{l}$, in $1\mu\text{l}$) ter določili čas polovične hemolize (t_{50}). Te rezultate smo prikazali v preglednici 7.

Glede na te rezultate smo določili hitrost hemolize v odvisnosti od koncentracije suhe snovi dodane v testu in rezultate prikazali na sliki 3.

Preglednica 5: Hemolitična aktivnost organskih ekstraktov vseh testiranih vzorcev gob

- = ni aktivnosti
- + = rahla aktivnost (hemoliza poteče v času med 10 in 15 minutami)
- ++ = zmerna aktivnost (hemoliza poteče v času med 5 in 10 minutami)
- +++ = močna aktivnost (hemoliza poteče v času, krajšem od 5 minut)
- A = acetonski ekstrakt
- M = metanolni ekstrakt

Vrsta gobe	Oznaka vzorca	Koncentracija suhe snovi v testu (mg/ml)	Hemoliza (+, ++, +++, -)
<i>Agaricus arvensis</i>	16A	0,42	+
	16M	0,49	-
<i>Amanita citrina</i>	3A	0,75	+++
	3M	0,77	+++
<i>Bovista nigrescens</i>	13A	0,50	-
	13M	0,76	-
<i>Calvatia excipuliformis</i>	18A	0,12	-
	18M	0,29	-
<i>Cantharellus tubaeformis</i>	1A	0,73	-
	1M	0,93	-
<i>Cordyceps capitata</i>	8A	0,16	-
	8M	0,48	-
<i>Cortinarius balteatocumatis</i>	10A	0,85	+++
	10M	0,31	+
<i>Cortinarius infractus</i>	24A	0,47	+++
	24M	0,50	++
<i>Craterellus cornucopioides</i>	15A	0,57	+++
	15M	0,75	++
<i>Cystoderma amianthinum</i>	27A	0,11	+++
	27M	0,55	+

se nadaljuje

nadaljevanje preglednice 5: Hemolitična aktivnost organskih ekstraktov vseh testiranih vzorcev gob.

Vrsta gobe	Oznaka vzorca	Koncentracija suhe snovi v testu (mg/ml)	Hemoliza (+, ++, +++, -)
<i>Entoloma rhodopolium</i>	25A	0,36	+
	25M	0,56	-
<i>Hydnellum peckii</i>	20A	0,74	+++
	20M	1,05	-
<i>Hygrophorus agathosmus</i>	19A	0,38	++
	19M	0,41	+
<i>Hygrophorus eburneus</i>	12A	0,51	+++
	12M	0,33	+++
<i>Hygrophorus pudorinus</i>	6A	0,72	+++
	6M	0,54	+++
<i>Lactarius deterrimus</i>	11A	0,56	++
	11M	0,35	++
<i>Lactarius salmonicolor</i>	17A	1,07	+
	17M	1,21	++
<i>Lactarius scrobiculatus</i>	28A	0,88	+++
	28M	1,05	+++
<i>Lepista nuda</i>	26A	0,50	+++
	26M	0,51	+
<i>Macrolepiota procera</i>	7A	0,36	-
	7M	0,61	-
<i>Peziza badia</i>	9A	0,20	+++
	9M	0,20	-
<i>Pseudoclitocybe cyathiformis</i>	23A	0,29	+++
	23M	0,34	+++
<i>Russula cavipes</i>	22A	0,28	+++
	22M	0,35	+++
<i>Tremiscus helvelloides</i>	4A	0,27	+
	4M	0,55	-
<i>Tricholoma aurantium</i>	5A	0,49	+++
	5M	0,58	++
<i>Tricholoma pardalotum</i>	21A	0,30	-
	21M	0,17	-
<i>Tricholoma sulphureum</i>	2A	0,15	+++
	2M	0,37	++
<i>Tricholoma vaccinum</i>	14A	1,13	++
	14M	0,43	+

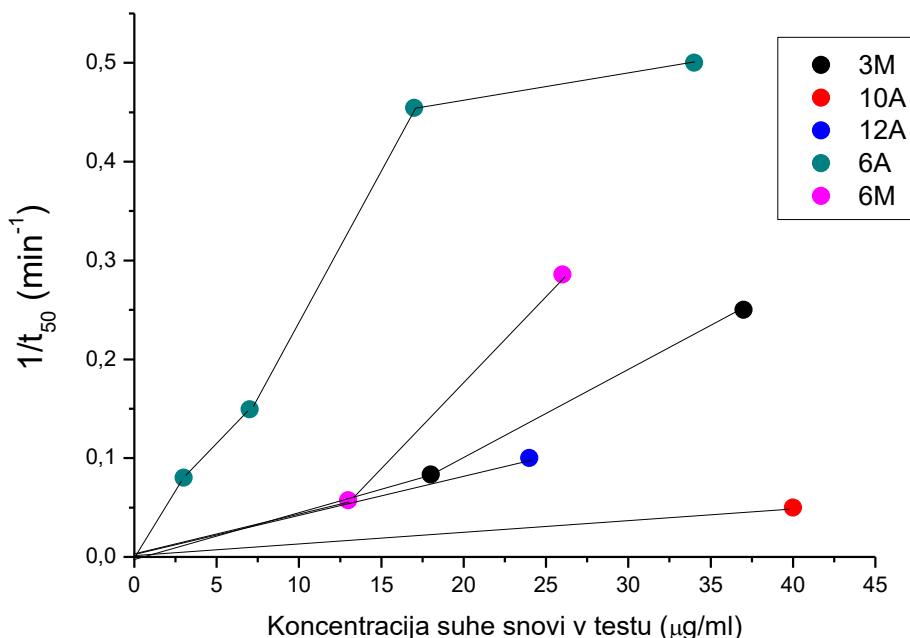
Preglednica 6: Hemolitična aktivnost organskih ekstraktov vzorcev redčenih v razmerju 1:10

Vrsta gobe	Oznaka vzorca	Redčenje	Koncentracija dodane snovi v testu (mg/ml)	Hemoliza (+, ++, +++, -)
<i>Agaricus arvensis</i>	16A	1:10	0,0418	-
	3A	1:10	0,0755	-
<i>Amanita citrina</i>	3M	1:10	0,0773	+++
	10A	1:10	0,0845	+++
<i>Cortinarius balteatocumatis</i>	10M	1:10	0,0309	-
	24A	1:10	0,0473	+
<i>Cortinarius infractus</i>	24M	1:10	0,0500	-
	15A	1:10	0,0573	-
<i>Craterellus cornucopoides</i>	15M	1:10	0,0755	-
	27A	1:10	0,0109	-
<i>Cystoderma amianthinum</i>	27M	1:10	0,0555	-
	25A	1:10	0,0364	-
<i>Hydnellum peckii</i>	20A	1:10	0,0736	-
	19A	1:10	0,0382	-
<i>Hygrophorus agathosmus</i>	19M	1:10	0,0409	-
	12A	1:10	0,0509	+++
<i>Hygrophorus eburneus</i>	12M	1:10	0,0327	+
	6A	1:10	0,0718	+++
<i>Hygrophorus pudorinus</i>	6M	1:10	0,0536	+++
	11A	1:10	0,0564	+
<i>Lactarius deterrimus</i>	11M	1:10	0,0355	-
	17A	1:10	0,1073	+
<i>Lactarius salmonicolor</i>	17M	1:10	0,1209	+
	28A	1:10	0,0882	++
<i>Lactarius scrobiculatus</i>	28M	1:10	0,1055	++
	26A	1:10	0,0500	++
<i>Lepista nuda</i>	26M	1:10	0,0509	-
	9A	1:10	0,0200	-
<i>Peziza badia</i>	23A	1:10	0,0291	+++
	23M	1:10	0,0336	-
<i>Russula cavipes</i>	22A	1:10	0,0282	+
	22M	1:10	0,0355	-
<i>Tremiscus helvelloides</i>	4A	1:10	0,0273	+
	5A	1:10	0,0491	++
<i>Tricholoma aurantium</i>	5M	1:10	0,0582	-
	2A	1:10	0,0155	++
<i>Tricholoma sulphureum</i>	2M	1:10	0,0373	-
	14A	1:10	0,1127	+
<i>Tricholoma vaccinum</i>	14M	1:10	0,0427	-

Preglednica 7: Hemolitična aktivnost organskih ekstraktov gob, predhodno redčenih v razmerju 1:10, ki so povzročili hemolizo

Vzorce smo redčili z etanolom v različnih razmerjih, kot je prikazano v tabeli. Aktivnim vzorcem smo določili polovični čas hemolize (t_{50}), to je čas, v katerem navidezna absorpcija suspenzije eritrocitov pri 630 nm pada za 50%.

Vrsta gobe	Oznaka vzorca	Količina vzorca v testu (µl)	Koncentracija suhe snovi v testu (mg/ml)	Čas polovične hemolize (min)
<i>Amanita citrina</i>	3M	10	0,0037	4
		5	0,0018	12
		2	0,0007	/
		1	0,0004	/
		10	0,0040	20
<i>Cortinarius balteatocumatilis</i>	10A	5	0,0020	/
		2	0,0008	/
		1	0,0004	/
		10	0,0024	10
		5	0,0012	/
<i>Hygrophorus eburneus</i>	12A	2	0,0005	/
		1	0,0002	/
		10	0,0034	2
		5	0,0017	2,2
		2	0,0007	6,7
<i>Hygrophorus pudorinus</i>	6A	1	0,0003	12,5
		10	0,0026	3,5
		5	0,0013	17,5
		2	0,0005	/
		1	0,0003	/
<i>Pseudoclitocybe cyathiformis</i>	23A	10	0,0014	/
		5	0,0007	/
		2	0,0003	/
		1	0,0001	/



Slika 3: Odvisnost recipročne vrednosti polovičnega časa hemolize od koncentracije testnih vzorcev, ki so kazali hemolitično aktivnost (3M, metanolni ekstrakt gobe *Amanita citrina*; 10A, acetonski ekstrakt gobe *Cortinarius balteatocumatis*; 12A, acetonski ekstrakt gobe *Hygrophorus eburneus*; 6A, acetonski ekstrakt gobe *Hygrophorus pudorinus*; 6M, metanolni ekstrakt gobe *Hygrophorus pudorinus*)

4.4 ANTIACETILHOLINESTERAZNA AKTIVNOST

V preliminarnem testu smo testirali vse vzorce in ugotavljali inhibitorno aktivnost na encim acetilholinesterazo (AChE). Največjo inhibicijo smo zasledili pri vzorcih 24A in 24M vrste *Cortinarius infractus*. Rezultati so prikazani v preglednici 8 in na sliki 4 ter sliki 5.

Test smo nadaljevali le z vzorcem 24M, testirali smo različne količine vzorca ($1\mu\text{l}$, $2\mu\text{l}$, $5\mu\text{l}$, $10\mu\text{l}$) in nato naredili še redčitve 1:10, 1:100, 1:1000. Rezultate smo prikazali v preglednici 9. Odvisnost stopnje inhibicije AChE od koncentracije suhe snovi posameznih redčitev vzorca 24M pa smo prikazali v sliki 6.

Preglednica 8: Rezultati delovanja vseh vzorcev testiranih gob na encim acetilholinesterazo. Prikazane so stopnje preostale acetilholinesterazne aktivnosti in stopnja inhibicije acetilholinesterazne aktivnosti glede na kontrolo.

A = acetonski ekstrakt

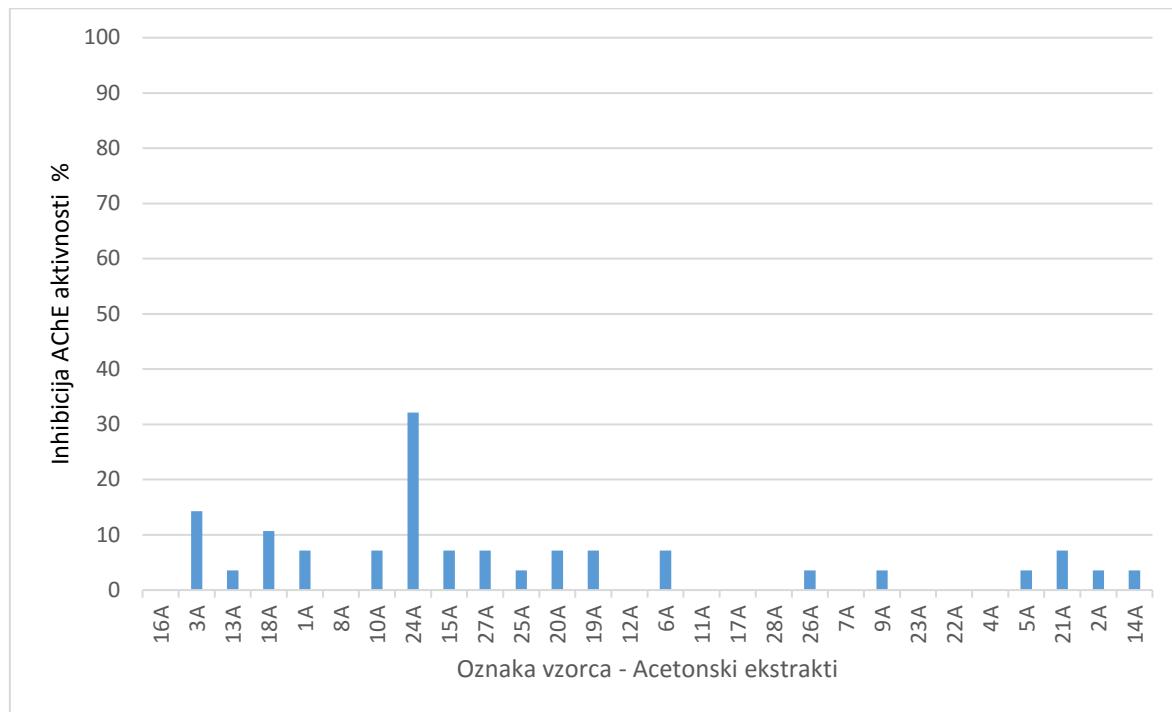
M = metanolni ekstrakt

Vrsta gobe	Oznaka vzorca	Koncentracija suhe snovi v testu (mg/ml)	Preostala aktivnost AChE aktivnost (%)	Inhibicija AChE aktivnosti (%)
<i>Agaricus arvensis</i>	16A	0,21905	100	0
	16M	0,25714	100	0
<i>Amanita citrina</i>	3A	0,39524	86	14
	3M	0,40476	100	0
<i>Bovista nigrescens</i>	13A	0,2619	96	4
	13M	0,4	100	0
<i>Calvatia excipuliformis</i>	18A	0,0619	89	11
	18M	0,15238	89	11
<i>Cantharellus tubaeformis</i>	1A	0,38095	93	7
	1M	0,48571	100	0
<i>Cordyceps capitata</i>	8A	0,08571	100	0
	8M	0,25238	100	0
<i>Cortinarius balteatocumatilis</i>	10A	0,44286	93	7
	10M	0,1619	100	0
<i>Cortinarius infractus</i>	24A	0,24762	68	32
	24M	0,2619	18	82
<i>Craterellus cornucopoides</i>	15A	0,3	93	7
	15M	0,39524	86	14
<i>Cystoderma amianthinum</i>	27A	0,05714	93	7
	27M	0,29048	93	7
<i>Entoloma rhodopolium</i>	25A	0,19048	96	4
	25M	0,29524	93	7
<i>Hydnellum peckii</i>	20A	0,38571	93	7
	20M	0,55238	100	0
<i>Hygrophorus agathosmus</i>	19A	0,2	93	7
	19M	0,21429	93	7
<i>Hygrophorus eburneus</i>	12A	0,26667	100	0
	12M	0,17143	100	0
<i>Hygrophorus pudorinus</i>	6A	0,37619	93	7
	6M	0,28095	100	0
<i>Lactarius deterrimus</i>	11A	0,29524	100	0
	11M	0,18571	100	0
<i>Lactarius salmonicolor</i>	17A	0,5619	100	0
	17M	0,63333	96	4
<i>Lactarius scrobiculatus</i>	28A	0,4619	100	0
	28M	0,55238	89	11
<i>Lepista nuda</i>	26A	0,2619	96	4
	26M	0,26667	89	11

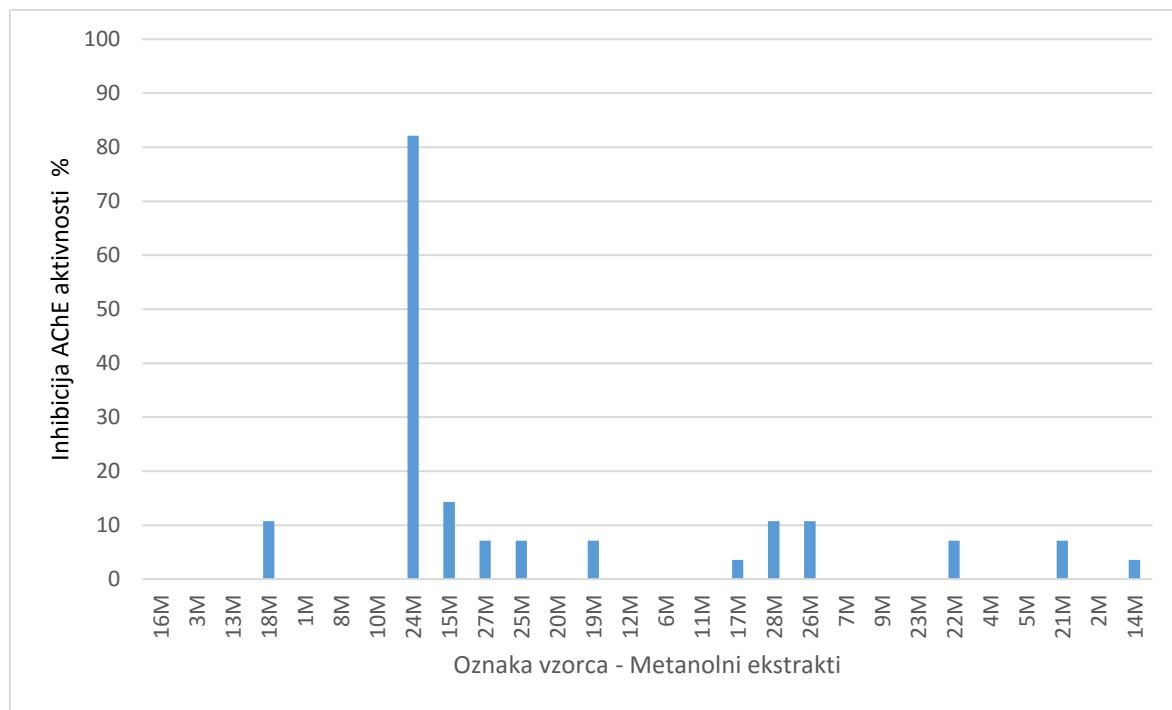
se nadaljuje

nadaljevanje preglednice 8: Rezultati delovanja vseh vzorcev testiranih gob na encim acetilholinesterazo

Vrsta gobe	Oznaka vzorca	Koncentracija suhe snovi v testu (mg/ml)	Preostala aktivnost AChE aktivnost (%)	Inhibicija AChE aktivnosti (%)
<i>Macrolepiota procera</i>	7A	0,19048	100	0
	7M	0,31905	100	0
<i>Peziza badia</i>	9A	0,10476	96	4
	9M	0,10476	100	0
<i>Pseudoclitocybe cyathiformis</i>	23A	0,15238	100	0
	23M	0,17619	100	0
<i>Russula cavipes</i>	22A	0,14762	100	0
	22M	0,18571	93	7
<i>Tremiscus helvelloides</i>	4A	0,14286	100	0
	4M	0,28571	100	0
<i>Tricholoma aurantium</i>	5A	0,25714	96	4
	5M	0,30476	100	0
<i>Tricholoma pardalotum</i>	21A	0,15714	93	7
	21M	0,09048	93	7
<i>Tricholoma sulphureum</i>	2A	0,08095	96	4
	2M	0,19524	100	0
<i>Tricholoma vaccinum</i>	14A	0,59048	96	4
	14M	0,22381	96	4



Slika 4: Prikaz inhibicije AChE aktivnih vzorcev acetonskih ekstraktov posameznih gob

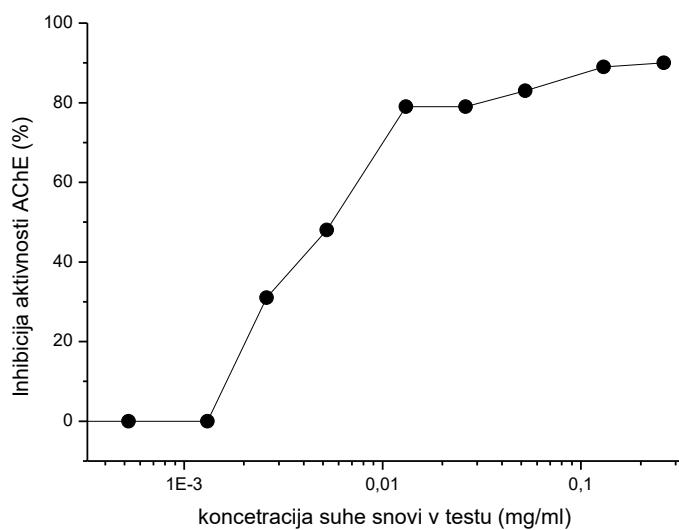


Slika 5: Prikaz inhibicije AChE aktivnih vzorcev metanolnih ekstraktov posameznih gob

Preglednica 9: Rezultati encimskega testa z acetilholinesterazo (AChE)

Prikazane so različne količine vzorca 24M vrste *Cortinarius infractus* in posamezne redčitve 1:10, 1:100 in 1:1000. Stopnja inhibicije AChE aktivnosti je prikazana glede na kontrolo.

Vrsta gobe in oznaka vzorca	Količina vzorca v testu µl	Redčenje	Koncentracija dodane snovi v testu mg/ml	Preostala AChE aktivnost %	Inhibicija AChE aktivnosti %
<i>Cortinarius infractus, 24M</i>	1	1:10	0,026190	31	69
	2		0,052381	17	83
	5		0,13	14	86
	10		0,2619	10	90
	1	1:100	0,002619	69	31
	2		0,005238	52	48
	5		0,013095	21	79
	10		0,026190	21	79
	1	1:1000	0,000262	100	0
	2		0,000524	100	0
	5		0,001310	100	0
	10		0,002619	90	10

Slika 6: Odvisnost stopnje inhibicije AChE od koncentracije suhe snovi v ekstraktih posameznih redčitev vzorca 24M vrste *Cortinarius infractus*

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Gobe vsebujejo različne bioaktivne snovi, ki so še zelo slabo raziskane. Dosedanji rezultati različnih raziskav zadnjih dvajset let pa nakazujejo velik potencial naravnih spojin izoliranih iz gob. Zato smo se v tej nalogi odločili za iskanje potencialno zanimivih biološko aktivnih spojin v organskih ekstraktih izbranih gob iz okolice Idrije in Vojskega. Liofilizirane vzorce smo ekstrahirali v acetonu in metanolu, ki sta organski topili z različno polarnostjo. Za preverjanje bioloških aktivnosti smo izbrali tri teste. Iskali smo protibakterijsko in hemolitično aktivnost vzorcev ter izvedli test inhibicije encima acetilholinesteraze.

Vseh 56 vzorcev gob smo testirali s protibakterijskim testom, in sicer na Gram-počitivne bakterije vrste *Bacillus subtilis* in Gram-negativne bakterije vrste *Escherichia coli*. Šestindvajset testiranih vzorcev je kazalo protibakterijsko aktivnost na vrsto *E. coli*, medtem ko je proti *B. subtilis* bilo aktivnih kar 52 testiranih vzorcev. Le 4 vzorci niso bili aktivni (*Cordyceps capitata*, *Entoloma rhodopolium*, *Macrolepiota procera* in *Tremiscus helvelloides*). Najaktivnejše vzorce, to je z večjo inhibicijsko cono glede na njeno velikost, smo tudi redčili 1:10, 1:100 in 1:1000 ter ugotavliali minimalno inhibitorno koncentracijo za posamezen vzorec.

Inhibicijo rasti *E. coli* smo zasledili večinoma pri metanolnih vzorcih (vrste *Amanita citrina*, *Cantharellus tubaeformis*, *Cordyceps capitata*, *Cortinarius balteatocumatis*, *Cortinarius infractus*, *Cystoderma amianthinum*, *Entoloma rhodopolium*, *Hydnellum peckii*, *Hygrophorus agathosmus*, *Hygrophorus eburneus*, *Hygrophorus pudorinus*, *Lactarius deterrimus*, *Lactarius scrobiculatus*, *Lepista nuda*, *Macrolepiota procera*, *Peziza badia*, *Pseudoclitocybe cyathiformis*, *Russula cavipes*, *Tremiscus helvelloides*, *Tricholoma aurantium*, *Tricholoma pardalotum* in *Tricholoma sulphureum*) in le dveh acetonskih vzorcih (vrsti *Lepista nuda* in *Tremiscus helvelloides*). Pri nadaljnjih redčenjih protibakterijske aktivnosti na *E. coli* nismo zaznali.

Rast *B. subtilis* je zavrlo 20 acetonskih in 13 metanolnih vzorcev. Največjo aktivnost tako metanolnega kot acetonskega ekstrakta smo zaznali pri vrstah rodu vlažnic (*Hygrophorus eburneus*, *Hygrophorus agathosmus* in *Hygrophorus pudorinus*), zaznavno tudi pri največji

redčitvi (1:1000). Vzorci vrst *Craterellus cornucopioides* (acetonski in metanolni), *Hydnellum peckii* (acetonski), *Lactarius deterrimus* (acetonski), *Lactarius salmonicolor* (acetonski), *Pseudoclitocybe cyathiformis* (acetonski), *Tricholoma sulphureum* (metanolni) in *Tricholoma vaccinum* (acetonski) so bili aktivni pri 1:100 redčenju.

V objavah smo zasledili opisano protibakterijsko aktivnost pri vrstah *Hygrophorus agathosmus*, *Hygrophorus eburneus* (Teichert in sod., 2005), *Lepista nuda* (Dulger in sod., 2002) in *Tricholoma* (Simon in sod., 2004), kar smo s testom potrdili tudi mi. Protibakterijsko aktivnost na *E.coli* smo ugotovili še pri vrstah *Amanita citrina*, *Cantharellus tubaeformis*, *Cordyceps capitata*, *Cortinarius balteatocumatilis*, *Cortinarius infractus*, *Cystoderma amianthinum*, *Entoloma rhodopolium*, *Hydnellum peckii*, *Hygrophorus pudorinus*, *Lactarius deterrimus*, *Lactarius scrobiculatus*, *Macrolepiota procera*, *Peziza badia*, *Pseudoclitocybe cyathiformis*, *Russula cavipes*, *Tremiscus helvelloides*, *Tricholoma aurantium*, *Tricholoma pardalotum* in *Tricholoma sulphureum*, za katere ni objav. Protibakterijsko aktivnost za *B. subtilis* smo v literaturi zasledili le pri vrsti *Hygrophorus agathosmus* (Yamac in sod., 2006) in *Lepista nuda* (Dulger in sod., 2002). Mi pa smo protibakterijsko aktivnost za *B. subtilis* ugotovili še pri vrstah *Hygrophorus eburneus*, *Hygrophorus pudorinus*, *Craterellus cornucopioides*, *Hydnellum peckii*, *Lactarius deterrimus*, *Lactarius salmonicolor*, *Pseudoclitocybe cyathiformis*, *Tricholoma sulphureum* in *Tricholoma vaccinum*.

Protibakterijska aktivnost vodnih ekstraktov istih gob je opisana v diplomski nalogi Mateja Kalarja, z naslovom »Biološko aktivne snovi v vodnih ekstraktih nekaterih bazidiomicet«, 2008. Protibakterijsko aktivnost na *E.coli* sta pokazala le »kuhani« in »surovi« vzorec vrste *Peziza badia*, protibakterijsko aktivnost na *B. subtilis* pa vrste *Agaricus arvensis*, *Hygrophorus agathosmus*, *Hygrophorus eburneus*, *Hygrophorus pudorinus*, *Lactarius deterrimus*, *Lactarius salmonicolor*, *Peziza badia* in *Tricholoma sulphureum*.

V literaturi smo zasledili, da je protibakterijska aktivnost bolj pogosta v organskih ekstraktih (Dulger in sod., 2002, Simon in sod., 2004, Barros in sod., 2006, Yamac in Bilgili, 2006, Mercan in sod., 2006, Teichert in sod., 2005). Enako so pokazali tudi naši testi, saj bistvno več organskih vzorcev kot vodnih kaže protibakterijsko aktivnost. Protibakterijska aktivnost organskih ekstraktov je velikokrat posledica prisotnosti fenolov in flavonoidov. Za te spojine

je znano, da delujejo protimikrobeno, protitrombično, protimutageno, protivnetno, protialergijsko, protihipertenzično, protirevmatično, reducentsko in protirakovorno (Cook in Samman, 1996, Kandaswami in Midleton, 1997).

Hemolitičnih je bilo 38 od 56 vzorcev, od tega 22 acetonskih in 16 metanolnih vzorcev. Pri vseh aktivnih vzorcih smo test hemolitične aktivnosti ponovili, tako da smo vse vzorce nadalje redčili. Po dodatnih redčenjih smo ugotovili, da po hemolitičnem potencialu izstopajo vrste *Amanita citrina* (metanolni ekstrakt), *Cortinarius balteatocumatilis* (acetonski ekstrakt), *Hygrophorus eburneus* (acetonski ekstrakt) in *Hygrophorus pudorinus* (metanolni in acetonski ekstrakt). Predvsem acetonski ekstrakt vrste *Hygrophorus pudorinus* je aktiven tudi pri največjih redčitvah.

Za organske ekstrakte preučevanih vrst gob poročila o hemolitični aktivnosti nismo zasledili. Lustik-Kordovsky in sod. (2001) poročajo o hemolitični aktivnosti vodnih ekstraktov rodu *Amanita*. Največjo aktivnost kaže vodni vzorec vrste *Amanita phalloides* (15-minutna inkubacija), medtem ko vodni vzorci ostalih vrst (*A. muscaria*, *A. rubescens*, *A. citrina* in *A. virosa*) kažejo rahlo hemolitično aktivnost šele po eni uri inkubacije. Rahlo hemolitično aktivnost je pokazal tudi surovi vodni ekstrakt vrste *A. citrina* (diplomska naloga Mateja Kalarja). Sicer pa od vodnih ekstraktov kažejo največjo aktivnost še vrste *Tricholoma aurantium*, *Tricholoma vaccinum* in *Hygrophorus pudorinus*.

Rezultati hemolitičnega testa potrjujejo, da je prisotnost membransko aktivnih snovi pričakovana kemična obramba gob pred zajedalci in predatorji.

Poleg protibakterijske in hemolitične aktivnosti smo izvedli še test inhibicije delovanja encima acetilholinesteraze (AChE). Od 56 vzorcev smo izrazito AChE-inhibicijsko aktivnost zaznali le pri eni gobi, vrsti *Cortinarius infractus*. Z metanolnim ekstraktom je bila inhibicija kar 82 odstotna, z acetonskim pa le 32 odstotna. Drugi vzorci so imeli šibko aktivnost, dosegli so največ 14 odstotno inhibicijo encima, zato poskusov z njimi nismo nadaljevali. Metanolni ekstrakt vrste *Cortinarius infractus* je kazal aktivnost (10 odstotna inhibicija) še pri tisočkratni redčitvi. Podobno velja tudi tako kuhan kakor surov vodni ekstrakt iste gobe (diplomska naloga Kalar M.). Pri tisočkratni redčitvi je imel surovi vzorec več kot deset odstotno inhibicijo, kuhan vzorec pa sedemnajst odstotno inhibicijo. Iz tega

sklepamo, da gre najverjetnejše za isto, polarno snov (metanol je po polarnosti najbolj blizu vodi), ki pa ni protein.

Do leta 2008, ko smo izvajali ta test, v literaturi nismo zasledili objav na temo acetilholinesterazne inhibicije s snovmi, izoliranimi iz gob, tako je bila takrat ugotovljena inhibicijska aktivnost vrste *Cortinarius infractus* popolna novost. Letos, ob pregledu objav pa smo zasledili članek (Geissler in sod., 2010), kjer navajajo ugotovljeno aktivnost omenjene gobe. Kot pomembni učinkovini so izolirali dva alkaloida, infraktopikrin in 10-hidriksi infraktopikrin z AChE-inhibicijsko aktivnostjo. Inhibicija AChE in preprečevanje degradacije acetilholina je namreč danes ena izmed najbolj sprejetih možnosti terapije za Alzheimerjevo bolezen. Zaradi pomanjkanja inhibitorjev AChE z dovolj veliko selektivnostjo, Alzheimerjevi bolniki trpijo zaradi stranskih učinkov, kot so slabost in bruhanje. Ti novo odkriti učinkovini pa kažeta večjo selektivnost kot galantamin, ki kot omenjeno povzroča stranske učinke.

Po opravljenih testiranjih 28 vzorcev gob smo ugotovili, da je vrsta *Hygrophorus pudorinus*, ki je kazala močno hemolitično in protibakterijsko aktivnost, zanimiva za nadaljne raziskave. Tudi drugi dve vrsti rodu *Hygrophorus* (*H. agathosmus* in *H. eburneus*) s protibakterijsko aktivnostjo sta obetavni za nadaljne raziskave.

5.2 SKLEPI

V diplomski nalogi smo opazovali biološko aktivnost organskih ekstraktov iz 28 različnih vrst bazidiomicet iz okolice Idrije in Vojskega s pomočjo treh bioloških testov.

Pri protibakterijskem testu je bilo 24 organskih ekstraktov iz 22 vrst inhibitornih za Gram-negativne bakterije *E.coli*, za Gram-pozitivne bakterije *B. subtilis* pa je bilo inhibitornih 33 ekstraktov iz 21 vrst gob. Inhibicijo rasti *E. coli* smo zasledili večinoma pri metanolnih vzorcih in le pri dveh acetonskih vzorcih (vrsti *Lepista nuda* in *Tremiscus helvelloides*). V objavah smo zasledili protibakterijsko aktivnost pri vrstah *Hygrophorus agathosmus*, *Hygrophorus eburneus*, *Lepista nuda* in *Tricholoma*, kar smo s testom potrdili tudi mi. Protibakterijsko aktivnost smo prvič odkrili pri vrstah *Amanita citrina*, *Cantharellus tubaeformis*, *Cordyceps capitata*, *Cortinarius balteatocumatis*, *Cortinarius infractus*,

Cystoderma amianthinum, *Entoloma rhodopolium*, *Hydnellum peckii*, *Hygrophorus pudorinus*, *Lactarius deterrimus*, *Lactarius scrobiculatus*, *Macrolepiota procera*, *Peziza badia*, *Pseudoclitocybe cyathiformis*, *Russula cavipes*, *Tremiscus helvelloides*, *Tricholoma aurantium*, *Tricholoma pardalotum* in *Tricholoma sulphureum*, za katere ni navedenih objav. Inhibicijo rasti *B. subtilis* smo zasledili pri 20 acetonskih in 13 metanolnih vzorcih. Največjo aktivnost obeh vrst ekstraktov smo zaznali pri treh vrstah rodu vlažnic *Hygrophorus* (*Hygrophorus eburneus*, *Hygrophorus agathosmus* in *Hygrophorus pudorinus*).

Hemolitičnih je bilo 38 od 56 vzorcev, od tega 22 acetonskih vzorcev in 16 metanolnih vzorcev 22 vrst gob. Izstopajo vrste *Amanita citrina* (metanolni ekstrakt), *Cortinarius balteatocumatilis* (acetonski ekstrakt), *Hygrophorus eburneus* (acetonski ekstrakt) in *Hygrophorus pudorinus* (metanolni in acetonski ekstrakt). Predvsem acetonski ekstrakt vrste *Hygrophorus pudorinus* povzroči hemolizo še po največjih redčitvah. Za organske ekstrakte preučevanih vrst gob poročila o hemolitični aktivnosti nismo zasledili, zato so vsi rezultati tega testa novost.

Proti encimu acetilholinesterazi sta močno inhibitorno delovala le oba ekstrakta vrste *Cortinarius infractus*. Inhibicija je bila zaznavna tudi po tisočkratnem redčenju metanolnega vzorca.

Naši rezultati kažejo, da so organski ekstrakti gob delovali predvsem protibakterijsko in hemolitično. V literaturi smo zasledili protibakterijsko aktivnost pri vrstah *Hygrophorus agathosmus*, *Hygrophorus eburneus*, *Lepista nuda* in *Tricholoma* sp., kar smo s testom potrdili tudi mi. Drugi protibakterijsko aktivni vzorci so novost. Hemolitične aktivnosti organskih ekstraktov nismo zasledili v nobeni predhodni objavi, zato naši podatki predstavljajo novost in so posledica verjetno še neraziskanih snovi s potencialno uporabnimi biološkimi aktivnostmi.

6 POVZETEK

Gobe imajo v vsakdanjem življenju človeka velik pomen. Že dolgo jih uporabljamo za prehrano, v vzhodnih deželah tudi v zdravstvene namene, nekatere so tudi škodljive. Iz njih smo začeli proizvajati tudi vitamine, encime, hormone in antibiotike. Njihove raznolike biološko aktivne spojine se izkoriščajo v industriji. Vse to so razlogi zaradi katerih so potrebne in pomembne raziskave pri iskanju teh spojin.

S tremi različnimi testi smo testirali 28 vzorcev gob (bazidiomicet) nabranih v okolici Idrije in Vojskega. Pripravili smo acetonske in metanolne organske ekstrakte, preverili njihovo protibakterijsko in hemolitično aktivnost ter inhibicijo delovanja encima acetilholinesteraze.

Rezultati so pokazali, da vsebujejo nekateri organski ekstrakti biološko aktivne spojine, ki so potencialno primerne za uporabo v farmakologiji in bi jih bilo smotrno podrobnejše raziskati.

7 VIRI

- Akata I., Ergönül B., Kalyoncu F. 2012. Chemical Compositions and Antioxidant Activities of 16 Wild Edible Mushroom Species Grown in Anatolia. International Journal of Pharmacology, 8: 134-138
- Alvarez-Parrilla E., de la Rosa L. A., Martínez N. R., González A. 2007. Totalphenols and antioxidant activity of commercial wild mushrooms from Chihuahua, Mexico. Ciência e Tecnologia de Alimentos, 5: 329-334
- Arzenšek B., Tratnik B., Malovrh B. 2002. Naše gobe. 1. izdaja. Ljubljana, Modrijan: 363 str.
- Barros L., Calhelha R. C., Vaz J. A., Ferreira I. C. F. R., Baptista P., Estevinho L.M. 2006. Antimicrobial activity and bioactive compounds of Portuguese wild edible mushrooms methanolic extracts. European Food Research and Technology, 225: 151-156
- Berger K. J., Guss D. A. 2005. Mycotoxins revisited. The Journal Of Emergency Medicine, 28: 53-62
- Coetzee Johannes C. and van Wyk Abraham E. 2009. The genus *Calvatia* ('Gasteromycetes', Lycoperdaceae): A review of its ethnomycology and biotechnological potential. African Journal of Biotechnology, 8: 6007-6015
- Colak A., Sahin E., Yildirim M., Sesli E. 2007. Polyphenol oxidase potentials of three wild mushroom species harvested from Liser High Plateau, Trabzon. Food Chemistry, 103: 1426-1433
- Cook N.C., Samman S. 1996. Flavonoids-chemistry, metabolism, cardioprotective effects and dietary sources. Journal of Nutrition Biochemistry, 7: 66-76

Dinić S., Uskoković A., Mihailović M., Grdović N., Arambašić J., Marković J., Poznanović G. and Vidaković M. 2012. Ameliorating effects of antioxidative compounds from four plant extracts in experimental models of diabetes. *Journal of Serbian Chemical Society*, 78: 365-380

Dong J. J., Li X. P., Li L., Li G. H., Liu Y. J., Zhang K. Q. 2006. Preliminary results on nematicidal activity from culture filtrates of Basidiomycetes against the pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus* (Aphelenchiodidae). *Annals of Microbiology*, 56: 163-166

Dulger B., Ergul C. C. , Gucin C. 2001. Antimicrobial activity of the macrofungus *Lepista nuda*. *Fitoterapia*, 73: 695-697

Dulger B., Yilmaz F., Gucin F. 2002. Antimicrobial Activity of Some *Lactarius* Species. *Pharmaceutical Biology*, 40: 304-306

Elmastaş M., Isıldaka O., Turkekul I., Temur N. 2005. Determination of antioxidant activity and antioxidant compounds in wild edible mushrooms. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20: 337-345

Geissler T., Brandt W., Porzel A., Schlenzig D., Kehlen A., Wessjohann L., Arnold N. 2010. Acetylcholinesterase inhibitors from the toadstool *Cortinarius infractus*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 18: 2173-2177

Gramss G. and Mascher R. 2011. Mutual influence of soil basidiomycetes and white mustard plants on their enzymatic and catabolic activities. *Journal of Basic Microbiology*, 51: 40-51

Heleno S. A., Barros L., Sousa M. J., Martins A., Ferreira C.F.R.I. 2009. Tocopherols composition of Portuguese wild mushrooms with antioxidant capacity. *Food Chemistry*, 119: 1443-1450

Hibbett D.S., Binder M., Bischoff J. F., Blackwell M., Cannon P.F., Eriksson O. E., Huhndorf S., James T., Kirk P.M., Lucking R., Thorsten Lumbsch H., Lutzoni F., P. Matheny B., McLaughlin D. J., Powell M. J., Redhead S., Schoch C.L., Spatafora J. W., Stalpers J.A., Vilgalys R., Aime M.C., Aptroot A., Bauer R., Begerow D., Benny G.L., Castlebury L.A., Crous P.W., Dai Y., Gams W., Geiser D.M., Griffith G.W., Gueidan C., Hawksworth D.L., Hestmark G., Hosaka K., Humber R.A., Hyde K.D., Ironside J.E., Koljalg U., Kurtzman C.P., Larsson K., Lichtwardt R., Longcore J., Miadlikowska J., Miller A., Moncalvo J., Mozley-Standridge S., Oberwinkler F., Parmasto E., Reeb V., Rogers J.D., Roux C., Ryvarden L., Sampaio J. P., Schüßler A., Sugiyama J., Thorn R. G., Tibell L., Untereiner W. A., Walker C., Wang Z., Weir A., Weiss M., White M. M., Winka K., Yao Y., Zhang N. 2007. A Higher-Level Phylogenetic Classification of The Fungi. *Mycological Research*, 111: 509-547

Kandaswami C., Midleton E. 1997. Flavonoids as antioxidants. V: Natural antioxidants. Chemistry health effects and practical applications. Shahidi F. (ed.). Champaign, American Oil Chemists' Society Press: 174-194

Konno K. 1995. Biologically active components of poisonous mushrooms. *Food Reviews International*, 11: 83-107

Kreft S., Kočevar Glavač N., Stojilkovski K., Mlinarič A., Injac R., Novak A., Doljak B., Štrukelj B., Slanc Može P., Umek A., Lunder M., Kristl J., Janeš D., Berlec A., Sabotič J., Glavač I. 2013. Sodobna fitoterapija: z dokazi podprtta uporaba zdravilnih rastlin. Ljubljana, Slovensko farmacevtsko društvo: 692 str.

Lassoe T. 2006. Gobe. Ljubljana, Prešernova družba: 304 str.

Lindequist U., Teuscher E., Narbe G. 1990. Neue Wirkstoffe aus Basidiomyceten. *Z Phytother*, 11: 139-149

Lustik-Kordovsky M. D., Stasyk T. V., Stoika R. S. 2001. Analysis of Cytotoxicity of Lectin and Non-lectin Proteins from *Amanita* mushrooms. Experimental Oncology, 23: 43-45

Lübken T., Schmidt J., Porzel A., Arnold N., Wessjohann L. 2003. Hygrophorones A–G: fungicidal cyclopentenones from *Hygrophorus* species (Basidiomycetes). Phytochemistry, 65: 1061-1071

Mihailović M., Arambašić Jovanović J., Uskoković A., Grdović N., Dinić S., Vidović S., Poznanović G., Mujić I., Vidaković M. 2015. Protective Effects of the Mushroom *Lactarius deterrimus* Extract on Systemic Oxidative Stress and Pancreatic Islets in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. Journal of Diabetes Research, 2015: 576726, doi: 10.1155/2015/576726: 10 str.

Mercan N., Duru M.E., Turkoglu A., Gezer K., Kirkav I., Turkoglu H. 2006. Antioxidant and Antimicrobial Properties of Ethanolic Extract from *Lepista nuda* (Bull.) Cooke. Annals of Microbiology, 56: 339-344

Ribiero B., Rangel J., Valentão P., Baptista P., Seabra R.M., Andrade P.B. 2006. Contents of Carboxylic Acids and Two Phenolics and Antioxidant Activity of Dried Portuguese Wild Edible Mushrooms. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54: 8530-8537

Shin K. H., Lim S. S., Lee S. H., Lee Y. S. in Cho S. Y. 2001. Antioxidant and Immunostimulating Activities of the Fruting Bodies of *Paecilomyces japonica*, a New Type of *Cordyceps* sp. Annals of the New York Academy of Sciences, 928: 261-273

Sidorova I.I., Velikanov L.L. 2000. Bioactive substances of Agaricoid basidiomycetes and their possible role in regulation of myco- and microbiota structure in soils of forest

- ecosystems. II. Antibiotic activity in cultures of litter saprotrophic mushroom *Lepista nuda*. Mikologiya i fitopatobiya, 34: 10-16
- Simon P. B., Ovenden Yu J., Bernays J., Wan S. S., Christophidis L. J., Sberna G., Murray Tait R., Wildman H. G., Lebeller D., Platel D., May M.W., Meurer-Grimes B. M. 2004. Trichomycins A and B: Antibacterial Triterpenes from the New Species *Tricholoma* sp. AU1. Journal of Natural Products, 68: 409-412
- Teichert A., Lübken T., Schmidt J., Porzel A., Arnold N., Wessjohann L. 2005. Unusual Bioactive 4-oxo-2-alkenoic Fatty Acids from *Hygrophorus ebureus*. Zeitschrift für Naturforschung, 60b: 25-32
- Tsukamoto S., Abdulgafor D. Macabalang, Nakatani K., Obara Y., Nakahata N. in Ohta T. 2003. Tricholomalides A-C, New Neurotrophic Diterpenes from the Mushroom *Tricholoma* sp. Journal of Natural Products, 66: 1578-1581
- Vetter J. 1999. Trypsin inhibitor activity of basidiomycetous mushrooms. European Food Research and Technology, 211: 246-348
- Wasser S. P., Weis A. L. 1999. Therapeutic effects of substances occurin in higher Basidiomycetes mushrooms: modern perspective. Critical Reviews in Immunology, 19: 65-96
- Wasser S. P., Nevo E., Sokolov D., Reshetnikov S., Timot-Tismenetsky M. 2000. Dietary supplements from medicinal mushrooms: diversity of types and variety of regions. International Journal of Medicinal Mushrooms, 2: 1-19
- Yamaç M. and Bilgili F. 2006. Antimicrobial Activities of Fruit Bodies and/or Mycelial Cultures of Some Mushroom Isolates. Pharmaceutical Biology, 44: 660-667

Zavastin D. E., Miron A., Petronela Gherman S., Boerescu C. M., Breaban I. G., Gavrilescu
C. M. 2014. Antioxidant Activity, Total Phenolic And Metals Contents Of *Lactarius*
salmonicolor (R. Heim & Leclair). Farmacia, 63: 755-756

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem tebi Kristina, kot izjemno pozorni mentorici in nadvse srčni osebi.

Hvala za vso pomoč, prijaznost, razumevanje in pozornost. Še posebej pa hvala za vzpodbudo, podporo in vero v trenutkih, ko nisem bila prepričana, da mi bo uspelo.

Posebna zahvala gre tebi Tomaž, moj čudovit partner. Hvala za vso potrpežljivost, razumevanje, prijaznost, vztrajno spodbudo in tudi ogromno pomoč ter podporo. Hvala, da verjameš vame in mi vedno stojiš ob strani. Iz srca hvala za vso ljubezen in toplino.

Zahvaljujem se svojemu sinku Maticu za vso ljubezen in sprejemanje, da sem si na račun najinih skupnih trenutkov lahko ukradla potreben čas za dokončanje diplome.

Draga starša, hvala vama, da sta mi omogočila študij in me vedno z brezpogojno ljubeznijo podpirala tekom celega študija. Hvala vama tudi za vse skupne užitke ob nabiranju rastlin za herbarij, lovljenju kačjih pastirjev, popisu ptičev in spremeljanju netopirjev ter sov... No, pa sem le prišla do konca ☺.

Hvala somentorju prof. dr. Petru Mačku in recenzentu prof. dr. Tomu Turku za hitro odzivnost, pomembne napotke in tehten pregled naloge.

Hvala kolegu Mateju Kalarju za korektno timsko delo.

Hvala Zdenki Repanšek za prijaznost, razumevanje in pomoč.

Hvala knjižničarkama Lučki Glavač in Petri Writzl za prijaznost in pomoč pri oblikovanju.

Obenem pa hvala tudi mojim sošolcem in prijateljem za vse lepe skupne trenutke in dogodivščine, zaradi katerih se vedno je in bo lepo spomniti na naša študijska leta.

PRILOGA A

Pregled objav

Prazno polje v preglednici pomeni, da v literaturi ni bilo možno zaslediti podatka.

IME GOBE	UČINKOVINA	VRSTA MOLEKULE	VODNA / ORGANSKA FAZA	ORGANSKO TOPLJO	AKTIVNOST	REFERENCA
<i>Agaricus arvensis</i>					oksidativna in peroskidazna aktivnost	Gramss in sod., 2011.
<i>Agaricus sp.</i>	zmes fenolov	organska	80% raztopina metanola		Antioksidativna aktivnost	Alvarez-Parrilla in sod., 2007.
<i>Amanita citrina</i>	grob ekstrakt	vodna	amonijev sulfat		rahla hemoliza po eni uri inkubacije	Lustik-Kordovsky in sod., 2001.
bufotenin	alkaloid				domnevajo da deluje na serotoninske (5-hidroksitriptamin; 5-HT) receptorje v centralnem živčnem sistemu, ker je struktura in aktivnost podobna doslej znanim halocinogenim LSD-jem	Konno, 1995.
<i>Bovista nigrescens</i>						Ni objav
<i>Calvatia excipuliformis</i>	ergosterol, steroidi					Coetzee in sod., 2009.
<i>Cantharellus tubaeformis</i>						Ni objav
<i>Cordyceps capitata</i>						Ni objav
						se nadaljuje

nadaljevanje preglednice Pregled objav

IME GOBE	UČINKOVINA	VRSTA MOLEKULE	VODNA / ORGANSKA FAZA	ORGANSKO TOPILLO	AKTIVNOST	REFERENCA
<i>Cordyceps sp. (Paecilomyces japonica)</i>		grobi ekstrakt	organska	metanol	antioksidacijska in imunostimulatorna aktivnost v jetrnih celicah podgan	Shin in sod., 2001.
<i>Cortinarius balteatocumatilis</i>	infraktopikrin	grobi ekstrakt	vodna	voda	antioksidacijska in imunostimulatorna aktivnost v jetrnih celicah podgan	Ni objav
<i>Cortinarius fractus</i>	10-Hidroksi infraktopikrin		organska	metanol	inhibicija AChE	Geissler in sod., 2010.
<i>Craterellus cornucopioides</i>	anorganski ekstrakt	organska	metanol	inhibicija AChE	inhibicija tripsina	Vetter, 2000.
<i>Cystoderma amianthinum</i>						Ni objav
<i>Entoloma rhodopodium</i>						Ni objav
<i>Hydnellum peckii</i>						Ni objav
<i>Hygrophorus agathosmus</i>		organski ekstrakt	aceton	Protimikrobnia aktivnost proti vrstam <i>Salmonella typhimurium</i> , <i>Staphylococcus epidemidis</i> , <i>Bacillus subtilis</i>	Mustafa Yamaç in sod., 2006.	se nadaje

nadaljevanje preglednice Pregled objav

IME GOBE	UČINKOVINA	VRSTA MOLEKULE	VODNA / ORGANSKA FAZA	ORGANSKO TOPILLO	AKTIVNOST	REFERENCA
<i>Hygrophorus agathosmus</i>	organski ekstrakt	organska	diklorometan	Protimikrobnna aktivnost proti vrstam <i>Salmonella typhimurium</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> .	Mustafa Yamaç in sod., 2006.	
			Etanol	Protimikrobnna aktivnost proti vrstam <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella typhimurium</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Bacillus subtilis</i>		
			kloroform	Protimikrobnna aktivnost proti vrstam <i>Enterobacter aerogenes</i> , <i>Salmonella typhimurium</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Ribiero in sod., 2006.	se nadaljuje
	vodni ekstrakti	vodna	deinizirana voda	Antioksidacijska aktivnost		

nadaljevanje preglednice Pregled objav

IME GOBE	UČINKOVINA	VRSTA MOLEKULE	VODNA / ORGANSKA FAZA	ORGANSKO TOPILLO	AKTIVNOST	REFERENCA
<i>Hygrophorus eburneus</i>	(2E,9E)-4-oksaoktadekatrien ojska kislina (2E,11Z)-4-oksaoktadeka-2,11,17-trienojska kislina (E)-4-oksaoktadeka-2,15-dienojska kislina (E)-4-oksaoktadeka-2,17-dienojska kislina (2E,9E)-4-oksaoktadeka-2,17-dienojska kislina	maščobne kisline organska	etilini acetat	protibakterijska in protiglivna aktivnost	Teichert in sod., 2005.	
<i>Hygrophorus pudorinus</i>	(2E,11Z)-4-oksaoktadeka-2,11-dienojska kislina (E)-4-oksahaksadek-2-enojska kislina (E)-4-oksaoktadec-2-enojska kislina	anorganski ekstrakt	NaOH	inhibicija tripsina	Vetter, 2000.	
<i>Lactarius deterrimus</i>	α -lipoična kislina (LA) fenoli			antioksidativna aktivnost 50% etanol	Dinić in sod., 2012 Mihailović in sod., 2015	
					se nadajuje	

nadaljevanje preglednice Pregled objav

IME GOBE	UČINKOVINA	VRSTA MOLEKULE	VODNA / ORGANSKA FAZA	ORGANSKO TOPILLO	AKTIVNOST	REFERENCE
<i>Lactarius deterrimus</i>	flavonoidi			50% etanol	antioksidativna in antidiabetična aktivnost	Mihailović in sod., 2015
<i>Lactarius salmonicolor</i>		organiski ekstrakti	organiska	metanol	Antibakterijska aktivnost proti vrsti <i>Escherichia coli</i> ATCC 11230	Dulger in sod., 2002.
α-tokoferol			organiska	metanol	antioksidativna aktivnost	Heleno in sod., 2009.
β-tokoferol			organiska	metanol	antioksidativna aktivnost	Akata in sod., 2012.
2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH)				etanol	antioksidativna aktivnost	Lavastin in sod., 2014
2,2'-Azinobis (3etilbenzotiazolin-6-sulfonska kislina) (ABTS)				etanol		
<i>Lactarius scrobiculatus</i>					Ni objav	
<i>Lepista nuda</i>	halogeni	organiska	metanol	Protimikrobna aktivnost proti vrstam <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>	Dulger in sod., 2002.	
		steroli		Protimikrobna aktivnost proti vrstam <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>		se nadaljuje

nadaljevanje preglednice Pregled objav

IME GOBE	UČINKOVINA	VRSTA MOLEKULE	VODNA / ORGANSKA FAZA	ORGANSKO TOPILLO	AKTIVNOST	REFERENCE
<i>Lepista nuda</i>	terpeni	organska		metanol	Protimikrobnna aktivnost proti vrstam <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> inhibicija tripsina	Dulger in sod., 2002.
anorganski ekstrakt					Antioksidacijski potencial (inhibicija 97.9%)	Elmastaš, in sod., 2007.
organski ekstrakt	organska	organska		metanol	Antioksidacijski potencial (inhibicija 97.9%)	Vetter, 2000.
zmes fenolov izoprenoidi	organska	organska		metanol	Antioksidacijski potencial	
α -tokoferol	izoprenoidi	organska		metanol	Antioksidacijski potencial	
β -karoten	karotenoidi	organska		metanol	Antioksidacijski potencial	
kuhanji etanolni ekstrakt	organska	organska		etanol	Protimikrobnna aktivnost proti patogenim bakterijam (<i>E.coli</i> , <i>E. enterocitica</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. enteritidis</i>)	Mercan in sod., 2006.
grobji vodni ekstrakt	vodna			fosfati pufer	Encimska aktivnost (polifenolna oksidaza)	Colak in sod., 2007.
					Protimikrobnna aktivnost	Sidorova in Velikanov, 2000.
<i>Macrolepiota procera</i>	anorganski ekstrakt	anorganska	NaOH	inhibicija tripsina		Vetter, 2000.
	zmes fenolov	organska	80% raztopina metanola	Antioksidativna aktivnost	Alvarez-Parrilla in sod., 2007.	
				se nadaljuje		

nadaljevanje preglednice Pregled objav

IME GOBE	UČINKOVINA	VRSTA MOLEKULE	VODNA / ORGANSKA FAZA	ORGANSKO TOPILLO	AKTIVNOST	REFERENCE
<i>Peziza badia</i>		ekstrakt			Nematotoksična aktivnost (odrasli osebki, larve)	Ni objav Dong in sod., 2006.
<i>Pseudoclitocybe cyathiformis</i>						Ni objav
<i>Russula cavipes</i>						Ni objav
<i>Tremiscus helvelloides</i>						Ni objav
<i>Tricholoma aurantium</i>						Ni objav
<i>Tricholoma pardalotum</i>	fenol	organiska	metanol	antioksidativna aktivnost		Ni objav
<i>Tricholoma sulphureum</i>		organiska	metanol	antioksidativna aktivnost		Heleno in sod., 2009.
	α -tokoferol	organiska	metanol	antioksidativna aktivnost		
	β -tokoferol	organiska	metanol	antioksidativna aktivnost		
	γ -tokoferol	organiska	metanol	antioksidativna aktivnost		
<i>Tricholoma vaccinum</i>						Ni objav
<i>Tricholoma</i> sp.	triholomalidi A-C (C20H28O5)	diterpeni	organiska	metanol	inducira rast neuritnih izrastkov pri PC-12 celicah	Tsukamoto in sod., 2003.
<i>Tricholoma</i> sp. AUI	triholomicin A (C31H48O5)	triterpeni	organiska	metanol	protibakterijska in citotoksična aktivnost	Simon in sod., 2004.
	triholomicin B (C30H48O4)					