

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Žana KOVAČEC

VPLIV GLUKOZE IN TEMPERATURE NA PRODUKCIJO BIOLOŠKO
AKTIVNIH SNOVI V VODNIH EKSTRAKTIH NEKATERIH
HALOFILNIH IN HALOTOLERANTNIH GLIV

DIPLOMSKO DELO

INFLUENCE OF GLUCOSE AND TEMPERATURE ON PRODUCTION
OF BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES IN AQUEOUS
EXTRACTS OF SOME HALOPHILIC AND HALOTOLERANT FUNGI

GRADUATION THESIS

univerzitetni študij

Ljubljana 2011

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija biologije. Opravljeno je bilo na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani, na Oddelku za biologijo in sicer na Katedri za molekularno genetiko in biologijo mikroorganizmov in Katedri za biokemijo.

Študijska komisija Oddelka za biologijo je za mentorico imenovala prof. dr. Nino Gunde-Cimerman in somentorico prof. dr. Kristino Sepčič. Za recenzentko je študijska komisija imenovala doc. dr. Jernejo Ambrožič Avguštin.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Tom Turk, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Recenzentka: doc. dr. Jerneja Ambrožič Avguštin, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Mentorica: prof. dr. Nina Gunde-Cimerman, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Somentorica: prof. dr. Kristina Sepčič, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora:

Podpisana se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Žana KOVAČEC

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA**ŠD** Dd**DK** 577.15:582.28(043.2)=163.6**KG** halofilne in halotolerantne glive / naravni produkti / ekstrakti / hemoliza / inhibicija acetilholinesteraze / protibakterijska aktivnost / hemaglutinacija**AV** KOVAČEC, Žana**SA** GUNDE-CIMERMAN, Nina / SEPČIČ, Kristina**KZ** SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111**ZA** Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo**LI** 2010**IN** VPLIV GLUKOZE IN TEMPERATURE NA PRODUKCIJO BIOLOŠKO AKTIVNIH SNOVI V VODNIH EKSTRAKTIH NEKATERIH HALOFILNIH IN HALOTOLERANTNIH GLIV**TD** Diplomsko delo (univerzitetni študij)**OP** IX, 57 strani, 5 preglednic, 12 slik, 1 pril., 36 vir.**IJ** sl**JI** sl/en

AI Glive sintetizirajo veliko bioaktivnih snovi. Prav zaradi tega so pomembne za človeka, saj so uporabne v različnih industrijah, najbolj v prehrabeni industriji ter v medicini. Ker so bile halofilne in halotolerantne glive odkrite šele pred kratkim, so slabo raziskane, zato smo v tej diplomski nalogi ugotavljali vpliv stresnih razmer (koncentracija glukoze in nizke temperature) na sintezo protibakterijskih, hemolitičnih, hemaglutinirajočih in protiacetilholinesteraznih snovi. Obravnavali smo 38 sevov različnih halofilnih in halotolerantnih gliv, ki so bile izolirane iz različnih okolij Arktike in solin. Uporabili smo vodne ekstrakte liofiliziranih vzorcev gliv. Ugotovili smo, da stresne razmere, znižajo vodno aktivnost, povzročijo povečano sintezo proteinov in ostalih vodotopnih snovi, ter spodbudijo produkcijo snovi, ki zlepljajo celice. Dvojno aktivnost (inhibicija AChE in hemaglutinacija) sta pokazali vrsti *Penicillium antarcticum* in *Penicillium brevicompactum*, hemolitičen pa ni bil noben ekstrakt. Opazili smo, da je bila večina sevov z biološko aktivnostjo izolirana iz solin.

KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)**DN** Dd**DC** 577.15:582.28(043.2)=163.6**CX** halophile and halotolerant fungi / natural products / extracts / hemolysis / acetylcholinesterase inhibition / antibacterial activity /hemagglutination**AU** KOVAČEC, Žana**AA** GUNDE-CIMERMAN, Nina / SEPČIČ, Kristina**PP** SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111**PB** University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Biology**PY** 2010**TI** INFLUENCE OF GLUCOSE AND TEMPERATURE ON PRODUCTION OF BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES IN AQUEOUS EXTRACTS OF SOME HALOPHILIC AND HALOTOLERANT FUNGI**DT** Graduation Thesis (University studies)**NO** IX, 57 p., 5 tab., 12 fig., 1 ann., 36 ref.**LA** sl**AL** sl/en

AB Fungi synthesize a number of bioactive substances. Therefore they are significant for human beings, due to their useage in various industries, specially in food industry and medicine. Since halophilic and halotolerant fungi have been discovered only recently, they are poorly investigated. In this graduation thesis, we assesed the impact of stressful conditions (increased glucose concentration and low temperature) on the synthesis of antibacterial, hemolytic, hemagglutinating and acetylcholinesterase-inhibitory compounds from 38 different strains of halophilic and halotolerant fungi, which had been isolated from different environments in Arctic and salterns. Aqueous extracts from lyophilised fungal samples were used. We found out that in conditions with low water activity the production of proteins and other thermolabile compounds is increased and the production of cell-gluing substances is stimulated. Double activity (inhibition of AchE and hemagglutination) was presented by *Penicillium antarcticum* and *Penicillium brevicompactum*, while no hemolytic activity was detected. We have noticed that the majority of biologically active strains were isolated from salterns.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VII
SLOVARČEK	VIII
SEZNAM OKRAJŠAV	IX
1. UVOD	1
2. PREGLED OBJAV	3
3. MATERIALI IN METODE	6
3.1. SEZNAM GLIV	6
3.2. PRIPRAVA GOJIŠČ, RAZTOPIN IN PUFROV	7
3.2.1. GOJIŠČA	7
3.2.2. FIZIOLOŠKA RAZTOPINA (0,9% NaCl)	8
3.2.3. SSS (raztopina za raztapljanje spor, ang. Spore solution suspension).....	8
3.3. PRIDOBIVANJE GLIVNE BIOMASE.....	9
3.4. PRIPRAVA VODNIH EKSTRAKTOV	9
3.5. DOLOČANJE KONCENTRACIJE EKSTRAHIRANE SUHE SNOVI V VZORCIH.....	10
3.6. TESTI ZA DOLOČANJE BIOLOŠKIH AKTIVNOSTI.....	10
3.6.1. DOLOČANJE KONCENTRACIJE EKSTRAHIRANIH PROTEINOV V VZORCIH	10
3.6.2. HEMAGLUTINACIJSKI TEST.....	11
3.6.3. TEST PROTIBAKTERIJSKE AKTIVNOSTI	11
3.6.4. TEST INHIBICIJE ENCIMA ACETILHOLINESTERAZE	12
3.6.5. HEMOLITIČNI TEST.....	13
4. REZULTATI	14
4.1. KONCENTRACIJA SUHE SNOVI IN PROTEINOV V VZORCIH	14
4.2. REZULTATI HEMAGLUTINACIJSKEGA TESTA.....	29
4.3. REZULTATI TESTA PROTIBAKTERIJSKE AKTIVNOSTI.....	33
4.4. REZULTATI TESTA INHIBICIJE ENCIMA ACETILHOLINESTERAZE	33
4.5. REZULTATI HEMOLITIČNEGA TESTA.....	43
5. RAZPRAVA	44
5.1. KONCENTRACIJA SUHE SNOVI IN PROTEINOV V EKSTRAKTIH	44
5.2. HEMAGLUTINACIJSKI TEST	46
5.3. HEMOLITIČNA AKTIVNOST	47
5.4. PROTIBAKTERIJSKA AKTIVNOST.....	47
5.5. TEST INHIBICIJE ACETILHOLINESTERAZE.....	48
6. SKLEPI	50
7. POVZETEK	51
8. VIRI	53

ZAHVALA**PRILOGA A: PREGLED NARAVNIH PRODUKTOV OBRAVNAVANIH RODOV GLIV, IZOLIRANIH IZ MORJA**

KAZALO SLIK

Slika 1: Koncentracije suhe snovi ekstraktov gliv, gojenih pri nizki temperaturi.....	18
Slika 2: Koncentracije suhe snovi ekstraktov gliv, gojenih v gojiščih z visoko koncentracijo Glc	20
Slika 3: Povprečja koncentracij suhe snovi svežih ekstraktih glede na razmere rasti gliv.....	22
Slika 4: Povprečja koncentracij suhe snovi v kuhanih ekstraktih glede na razmere rasti gliv	24
Slika 5: Koncentracije proteinov v svežih ekstraktov gliv, ki so rasle pri nizki temperaturi, v odvisnosti od koncentracije suhe snovi v vzorcu.....	26
Slika 6: Koncentracija proteinov v svežih ekstraktih gliv, ki so rasle v razmerah z visoko koncentracijo Glc, v odvisnosti od koncentracije suhe snovi v vzorcu.....	28
Slika 7: Hemaglutinacijska aktivnost svežih ekstraktov gliv, ki so rasle pri nizki temperaturi, v odvisnosti od koncentracije suhe snovi v vzorcu.....	30
Slika 8: Hemaglutinacijska aktivnost svežih ekstraktov gliv, ki so rasle v gojišču z visoko koncentracijo Glc, v odvisnosti od koncentracije suhe snovi v vzorcu.....	32
Slika 9: Odstotek inhibicije encima acetilholinesteraze v svežih ekstraktih gliv, ki so rasle v razmerah z dodano glukozo, v odvisnosti od koncentracije suhe snovi v vzorcu	36
Slika 10: Odstotek inhibicije encima acetilholinesteraze v svežih ekstraktih gliv, ki so rasle v razmerah z nizko temperaturo, v odvisnosti od koncentracije suhe snovi v vzorcu.....	38
Slika 11: Odstotek inhibicije encima acetilholinesteraze v kuhanih ekstraktih gliv, ki so rasle v razmerah z dodano glukozo, v odvisnosti od koncentracije suhe snovi v vzorcu	40
Slika 12: Odstotek inhibicije encima acetilholinesteraze v kuhanih ekstraktih gliv, ki so rasle v razmerah z nizko temperaturo, v odvisnosti od koncentracije suhe snovi v vzorcu.....	42

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Seznam halofilnih in halotolerantnih gliv iz solin in Arktike	6
Preglednica 2: Recept za pripravo gojišča	7
Preglednica 3: Koncentracija suhe snovi in proteinov v vzorcih	14
Preglednica 4: Rezultati testa hemaglutinacije	29
Preglednica 5: Rezultati testa inhibicije encima acetilholinesteraze	33

SLOVARČEK

Halofil: organizem, ki bolje raste v okoljih z visoko koncentracijo soli, kot so slana jezera in soline

Halotolerant: organizem, ki lahko živi v slanih okoljih, vendar za preživetje ne potrebuje soli

Kserofil: organizem, prilagojen na omejen dostop proste vode v okolju, zmožen preživeti sušo

Psihrotolerant: organizem, ki lahko živi pri nizkih temperaturah

SEZNAM OKRAJŠAV

a_w	vodna aktivnost
A. I.	preostala acetilholinesterazna aktivnost
Glc	glukoza
Ha.	hemaglutinacija
Hl.	hemoliza
I.C.	širina inhibicijske cone pri protibakterijskem testu
NaCl	sol
NaDS	natrijev dodecil sulfat
P.	koncentracija proteinov, uporabljena v testu
S. S.	koncentracija suhe snovi, uporabljena v testu
YNB_S	sveži ekstrakti gliv, ki so rasle na YNB gojišču
YNB_K	kuhani ekstrakti gliv, ki so rasle na YNB gojišču
Y+10_S	sveži ekstrakti gliv, ki so rasle na YNB gojišču z 10-odstotnim natrijevim kloridom
Y+10_K	kuhani ekstrakti gliv, ki so rasle na YNB gojišču z 10-odstotnim natrijevim kloridom

1. UVOD

Glive so pomemben vir biološko aktivnih snovi, ki kažejo vrsto zanimivih bioloških učinkov, kot so npr. citotoksičnost, hemaglutinacija, protibakterijska in protivirusna aktivnost. Za nas so zanimive in uporabne predvsem v različnih medicinskih in industrijskih panogah.

Dolgo je prevladovalo mnenje, da v ekstremnih okoljih gliv ni, v zadnjih letih pa so raziskave pokazale, da so nekatere skupine gliv sposobne živeti in se razmnoževati tudi v ekstremnih razmerah. Našli so jih v izjemno slanah vodah, na suhih površinah hladnih in vročih skal, v vodi z zelo nizko pH-vrednostjo in v globinah oceanov (Sonjak, 2006).

Pojem halofilnih gliv je bil prvič uporabljen leta 1975 za nekaj kserofilnih vrst (vrste, ki so sposobne preživeti pri zelo nizki vodni aktivnosti), ki kontaminirajo hrano z visoko vsebnostjo soli (Pitt&Hocking, 1985). Nato so bile glive najdene in opisane tudi v morski vodi, v slanah močvirjih ter v slanih tleh, velika pestrost gliv pa je bila opisana tudi v ekstremno slanah okoljih, kot so soline (Gunde-Cimerman in sod., 1997). Med halofilne oz. ekstremno halotolerantne so uvrščene pogosto izolirane glive iz naravnih ekstremno slanah okolij ter tiste, ki so med gojenjem v laboratoriju rasle na gojiščih s slanostjo nad 10% in *in vitro* pri 17% NaCl. Med halotolerante spadajo tiste, ki so izolirane iz manj slanah okolij, *in vitro* pa prav tako rastejo na gojiščih s 17% NaCl (Gunde-Cimerman in sod., 2000, 2005).

Glive, ki sem jih uporabila v diplomski nalogi, so bile izolirane predvsem iz solin ter različnih okolij Arktike. Za Arktiko so značilne skrajno nizke temperature (do -50°C) ter nastajanje in kopičenje ledu. Ker voda v zamrznjeni obliki ni dostopna organizmom, v takšnih okoljih prihaja do znižane vodne aktivnosti, visokih pritiskov, nizkih temperatur in nizke koncentracije hranil (Sonjak, 2006). Za soline, ki so naravno ekstremno slano okolje, so značilne visoke koncentracije morske soli, ki v kristalizacijskih bazenih dosežejo nasičenost, nizke koncentracije kisika, pH-vrednost okoli nevtralnega in relativno visoke koncentracije hranil v vodi (Gunde-Cimerman in sod., 2001). Prav tako kot v ekstremno mrzlem tudi v ekstremno slanem okolju pride do znižanja vodne aktivnosti, saj količina

raztopljene soli v vodi zniža osmotski potencial raztopine, kar povzroči oddajanje vode iz organizmov in posledično znižano vodno aktivnost.

Biološki potencial morskih gliv je slabo raziskan (Saleem in sod., 2007), zato smo se v tej nalogi ukvarjali z iskanjem potencialno zanimivih biološko aktivnih vodotopnih snovi iz nekaterih halofilnih in halotolerantnih gliv. V okviru diplomskega dela sem se osredotočila na vpliv stresnih razmer (nizka temperatura in povišana koncentracija glukoze v gojišču) na produkcijo vodotopnih biološko aktivnih snovi v glivah iz rodov *Aspergillus*, *Penicillium*, *Emericella* in *Eurotium* ter v izbranih kvasovkah. Glive smo gojili na trdnih gojiščih brez soli pri nizki temperaturi in na gojiščih z dodatkom 30% glukoze ter na ta način vzpostavili stresne razmere z nižjo vodno aktivnostjo. Glivne kulture smo nato liofilizirali in pripravili vodne ekstrakte. Biološko aktivnost ekstraktov smo ugotavljali z merjenjem hemolitične aktivnosti, protibakterijske aktivnosti, inhibicije encima acetilholinesteraze ter s hemaglutinacijskim testom. S prekuhavanjem vodnih ekstraktov smo ugotavljali, ali so biološko aktivne snovi beljakovinskega izvora.

Pridobljene rezultate smo primerjali z že objavljenimi podatki s področja kemije naravnih substanc iz izbranih halofilnih in halotolerantnih gliv. Glede na to, da halofilne in halotolerantne glive predstavljajo še relativno neraziskan vir strukturno novih in biološko aktivnih spojin, smo predvidevali, da bomo v pripravljenih vodnih ekstraktih našli potencialno zanimive in še neopisane učinkovine, ki jih bo v prihodnosti mogoče izolirati. Pričakovali smo tudi, da bo produkcija bioaktivnih spojin v glivah, ki so rasle tako na gojiščih z različno koncentracijo sladkorja kakor tudi pri različnih temperaturah, različna.

2. PREGLED OBJAV

1.1.1. SPLOŠNE IN MORFOLOŠKE ZNAČILNOSTI GLIV

Glive spadajo v nadkraljestvo Eukarya. Klasificirane so kot samostojno kraljestvo poleg protistov, rastlin in živali. Kraljestvo gliv zajema naslednja debla: Ascomycota, Basidiomycota, Chytridiomycota, Neocallimastigomycota, Zygomycota, Blastocladiomycota in Glomeromycota. Debli Ascomycota in Basidiomycota uvrščamo še v podkraljestvo Dikarya. Klasifikacija torej zajema 1 kraljestvo, 1 podkraljestvo, 7 debel, 10 poddebel, 35 razredov, 12 podrazredov in 129 rodov (Hibbett s sod., 2007).

Glive so pogosto spregledani organizmi, ki pa imajo v ekosistemu nepogrešljivo vlogo. So večinoma večcelični, pa tudi enocelični evkariontski heterotrofni organizmi. Z izjemo enoceličnih gliv, kot so na primer kvasovke, vegetativno obliko večine gliv sestavljajo nitasti nizi celic (hife), ki imajo v premeru 5 do 10 μm . Vedno se delijo samo končne celice vsake hife, kar omogoča dolžinsko rast glive.

Po načinu prehranjevanja so paraziti na človeku, živalih in rastlinah, simbionti ter saprofiti (Eaton in Hale, 1993).

Za glive je značilno, da imajo najrazličnejša barvila. Rezervna snov je glikogen, ki je prost v citoplazmi, ter olja. Celična stena je iz hitina (polimera N-acetilglukozamina), polisaharidov (manana in glukana) ali beljakovin. Celice praviloma nimajo gibljivih oblik (izjema so npr. hitride, ki imajo gibljivo fazo). Razmnoževanje je zelo raznovrstno: vegetativno z brstenjem in razraščanjem, nespolno predvsem s tvorbo konidijev ali spolno s somatogamijo (hifogamija), gametangiogamijo in gametogamijo. Množijo se s sporami, ki se najpogosteje prenašajo po zraku, glede na vrsto in razmere rasti pa proizvajajo spolne in nespolne spore. Pred združenjem pri spolnem razmnoževanju posamezne glive komunicirajo z drugimi preko feromonov (<http://www.tolweb.org/Fungi>). Najdemo jih predvsem na kopnem, nekaj se jih pojavlja tudi v sladkih in slanih vodah (Jogan, 2001). So pomemben del kroženja snovi v naravi, saj v okolje vračajo anorganska hranila ter jih naredijo dostopna rastlinam, da lahko rastejo in posledično prehranjujejo živali (Campbell, 2002). Razgrajujejo tudi v okoljih, kjer bakterije ne uspevajo (npr. kislo okolje). Glive so

edini organizmi, ki so sposobni razgradnje lignina. Izmed vseh gliv so to sposobnost tekom evolucije najbolj razvile lesne glive, povzročiteljice bele trohnobe. Pomembne so tudi mikorizne vrste, ki živijo v simbiozi s koreninami višjih rastlin. Glive uporabljamo za industrijsko pridobivanje antibiotikov, vitaminov, kortikosteroidov in spolnih hormonov, alkohola, citronske kisline in še nekaterih drugih snovi (Petauer, 1993). Številne glive sodelujejo pri procesih predelave hrane. Ekonomsko so pomembne tudi parazitske glive, ki povzročajo škodo na gojenih vrstah rastlin (Jogan, 2001).

1.1.2. SEKUNDARNI METABOLITI

Sekundarni metabolit je kemična spojina, ki jo producira omejeno število vrst gliv v rodu, redu ali celo deblu. Te spojine so lahko kemično zelo različne, npr. toksini, antibiotiki ter ostale snovi, ki se sproščajo iz organizma v okolico (http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B7XMR-4PJM9W3-8&_user=10&_coverDate=02%2F29%2F2008&_alid=1594805974&_rdoc=8&_fmt=high&_orig=search&_origin=search&_zone=rslt_list_item&_cdi=29677&_sort=r&_st=13&_docanchor=&view=c&_ct=15405&_acct=C000050221&_version=1&_urlVersion=0&_user_id=10&md5=9609038e65355e56a1ac919b7c1181fb&searchtype=a).

Sekundarni metaboliti so snovi, ki jih proizvajajo rastline ali mikrobi in niso nujno potrebne za rast in preživetje organizma v normalnih okoliščinah. Za njihovo sintezo je potrebna energija. To so večinoma nepolarne majhne molekule, ki se sintetizirajo, ko je organizem izpostavljen stresu, in najpogosteje sodelujejo pri obrambi (pred herbivori, virusi, mikrobi, kompetitivnimi organizmi) ter kot signalne snovi, ki privabljajo npr. živali, ki prenašajo semena. Lahko delujejo kot virulenčni dejavniki in pomenijo kompetitivno prednost (Calvo in sod., 2002), ki glivi omogočajo preživetje v ekološki niši. Številne glive žive saprofitsko v zemlji, kjer tekmujejo z drugimi organizmi. Glivni toksini zaščitijo glivo pred plenilci, kot so amebe in gliste, ter pred drugimi nevretenčarji, ki se hranijo z njimi. Simbiotske glive na rastlinah s sekundarnimi metaboliti odganjajo rastlinojede žuželke (Fox in Howlett, 2008).

Mikotoksini so sekundarni metaboliti nitastih gliv in so lahko toksični za vretenčarje že v majhni koncentraciji, če pridejo v telo preko naravne poti (Bennett in Klich, 2003).

Ker je biotska diverziteteta mikrobov v morju izjemna in morajo biti metaboliti zelo učinkoviti, saj se sicer v morski vodi prehitro razredčijo, so raziskovalci prepričani, da je v morskih organizmih še veliko število naravnih produktov z biološko aktivnostjo, ki bi jih lahko s pridom uporabili kot farmacevtske učinkovine (Haefner, 2003, Mayer in Lehmann, 2000, Proksch in sod., 2002). V iskanju novih zdravil postajajo tako morski viri pomembno raziskovalno področje. Preko 15 sekundarnih metabolitov morskih organizmov je v kliničnih preizkušanjih (Saleem in sod., 2007), nekaj pa jih je že na tržišču, npr. citarabin (Haefner, 2003). Mikokemija morskih gliv je zacvetela po letu 1990, število poročil o naravnih produktih morskih gliv pa se je povečalo predvsem po letu 1998 (Saleem in sod., 2007). Do leta 2006 so opisali več kot 272 učinkovin morskih gliv (Bugni in Ireland, 2004, Bhadury in sod., 2006). Te vključujejo poliketide, terpene, steroide, alkaloidne in peptide. Za učinkovite proizvajalke sekundarnih metabolitov veljajo predvsem filamentozne glive, po kemični iznajdljivosti sta še posebej znana rodova *Penicillium* in *Aspergillus* (Frisvad, 2005), ki naseljujeta ne samo talna, temveč tudi morska in izjemno slana okolja.

V prilogi A smo prikazali do sedaj opisane naravne produkte obravnavanih rodov gliv, izoliranih iz morja.

3. MATERIALI IN METODE

3.1. SEZNAM GLIV

Taksonomska uvrstitev obravnavanih rodov gliv (De Hoog in sod., 2000) je naslednja:

Kraljestvo: *Eumycota*

Deblo: *Ascomycota*

Razred: *Euascomycetes*

Red: *Eurotiales*

Družina: *Trichocomaceae*

Rodovi: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Emericella*, *Eurotium*

Razred: *Hemiascomycetes*

Red: *Saccharomycetales*

Družina: *Endomycetaceae*

Rod: *Debaryomyces*

Družina: *Metschnikowiaceae*

Rod: *Metschnikowia*

Sevi iz preglednice 1 so del zbirke ekstremofilnih gliv EX F ki pripada infrastrukturnemu centru (MYCOSMP) Katedre za molekularno genetiko in biologijo mikroorganizmov (Oddelek za biologijo, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani).

Preglednica 1: Seznam halofilnih in halotolerantnih gliv iz solin in Arktike

Št.	Vrsta	Oznaka seva	Mesto vzorčenja
1.	<i>Aspergillus flavus</i>	EXF 1751	soline
2.	<i>Aspergillus niger</i>	EXF 799	soline
3.	<i>Aspergillus niger</i>	EXF-2130	Arktika, morski led
4.	<i>Aspergillus ochraceus</i>	EXF 618	soline
5.	<i>Aspergillus sydowii</i>	EXF 405	soline
6.	<i>Aspergillus tubingensis</i>	EXF 401	soline
7.	<i>Aspergillus terreus</i>	EX F-312	prst (Ljubljana)
8.	<i>Aspergillus fumigatus</i>	EXF 3370	soline
9	<i>Emericella stella-maris</i>	EXF 349	soline
10.	<i>Emericella filifera</i>	EXF 348	soline
11.	<i>Emericella olivicola</i>	EXF 2650	soline
12.	<i>Emericella discophora</i>	EXF2680	prst
13.	<i>Eurotium amstelodami</i>	MZKI – A570 = EXF 66??	soline
14.	<i>Eurotium amstelodami</i>	EXF-2134	Arktika, morski led
14.	<i>Eurotium herbariorum</i>	EXF -1041	Arktika, morski led
16.	<i>Eurotium herbariorum</i>	EXF 3369	soline (Slovenija)
17.	<i>Penicillium nordicum</i>	EXF-1363	Arktika, morski led
18.	<i>Penicillium nordicum</i>	EXF-3196	soline
19.	<i>Penicillium chrysogenum</i>	EXF 426	soline (Slovenija)

20.	<i>Penicillium chrysogenum</i>	EXF-1030	Arktika, morski led
21.	<i>Penicillium corylophilum</i>	EXF-1325	Arktika, ledeniški led
22.	<i>Penicillium corylophilum</i>	EXF 1778	soline
23.	<i>Penicillium brevicompactum</i>	EXF 417	soline
24.	<i>Penicillium brevicompactum</i>	EXF-1300	Arktika, ledeniški led
25.	<i>Penicillium crustosum</i>	EXF 763	soline
26.	<i>Penicillium crustosum</i>	EXF-1329	Arktika, CREA +, ledeniški led
27.	<i>Penicillium crustosum</i>	EXF-904	Arktika, CREA -, ledeniški led
28.	<i>Penicillium expansum</i>	EXF 1813	soline
29.	<i>Penicillium expansum</i>	EXF-1195	Arktika, ledeniški led
30.	<i>Penicillium polonicum</i>	EXF 503	soline
31.	<i>Penicillium polonicum</i>	EXF-1140	Arktika, ledeniški led
32.	<i>Penicillium citrinum</i>	EXF 792	soline
33.	<i>Penicillium antarcticum</i>	EXF 793	soline
34.	<i>Penicillium sizovae</i>	EXF 424	soline
35.	<i>Penicillium steckii</i>	EXF 416	soline
36.	<i>Debaryomyces hansenii</i>	EXF 589	soline
37.	<i>Debaryomyces hansenii</i>	EXF 1590	Arktika
38.	<i>Metschnikowia bicuspidata</i>	EXF 1509	Arktika

Op.: *E. discophora* ni zrasla (2680), *E. herbariorum* (1041) ni zrasel

3.2. PRIPRAVA GOJIŠČ, RAZTOPIN IN PUFROV

3.2.1. GOJIŠČA

Preglednica 2: Navodilo za pripravo gojišč.

	YNB s 30% Glc (1L gojišča)	YNB (1L gojišča)	MEA (1L gojišča)
YNB (g)	1,7	1,7	-
(NH ₄) ₂ SO ₃ (g)	5	5	-
Glc (g)	300	20	10
Agar (g)	13	20	20
Sladni ekstrakt (g)	-	-	20
Pepton (g)	-	-	1

V čašo z volumnom 1500 ml smo zatehtali ustrezno količino gojišča YNB, (NH₄)₂SO₃ in glukoze. Nato smo dolili destilirano vodo do končnega volumna 1L. Raztopino smo z magnetnim mešalom mešali, dokler se sestavine niso raztopile. S pH metrom smo izmerili pH raztopine in ob mešanju dodali toliko 2M NaOH, da je bil končni pH 7,0. Raztopino

smo prelili v 2-litersko erlenmajerico in dodali ustrezno količino agarja. Mešanico smo premešali na magnetnem mešalu.

Za pripravo poševnih gojišč (poševnikov) smo uporabili steklene epruvete z zamaški iz vate. Pripravljeno gojišče smo segreli v mikrovalovni pečici, da se je agar stopil. V epruvete smo z pipeto odpipetirali po 7,3ml gojišča, jih zaprli z zamaški in avtoklavirali. Po avtoklaviranju smo epruvete postavili na poševno površino. Po 24 urah smo poševna gojišča do nadaljnje uporabe shranili pri 4°C.

Za pripravo plošč smo erlenmajerico z gojiščem zaprli z aluminijasto folijo in avtoklavirali. Po avtoklaviranju smo erlenmajerico z gojiščem postavili v toplo kopel (55°C), da se je nekoliko ohladilo. Nato smo gojišče premešali in v laminariju razlili v označene petrijevke. Petrijevke z gojišči smo čez noč pustili na sobni temperaturi, nato pa smo jih shranili pri 4°C do nadaljnje uporabe.

Pripravili smo poševnike in plošče z definiranim gojiščem YNB (Yeast Nitrogen Base) brez in z 30% glukozo (Glc) ter poševnike in petrijevke z nedefiniranim gojiščem MEA (Malt Extract Agar). Na plošče z gojiščem smo položili plast celofana, da smo kasneje lažje odstranili micelij. Plošče s celofanom smo pred nacepljanjem glivnih kultur inkubirali en teden pri 4°C.

3.2.2. FIZIOLOŠKA RAZTOPINA (0,9% NaCl)

Fiziološko raztopino smo pripravili tako, da smo v čašo zatehtali 9 g NaCl in dolili destilirano vodo do končnega volumna 1000 ml, ter raztopino avtoklavirali.

3.2.3. SSS (raztopina za raztapljanje spor, ang. spore solution suspension)

Raztopino za raztapljanje spor smo pripravili tako, da smo v čašo zatehtali 0,5 g Tween 80 in 0,5 g agarja ter dolili destilirano vodo do končnega volumna 1000 ml. Raztopino smo avtoklavirali.

3.3. PRIDOBIVANJE GLIVNE BIOMASE

Uporabili smo seve 36 različnih vrst gliv iz preglednice 1. Sevi so bili shranjeni na poševnikih pri 4 °C. Posamezni sev iz originalne zbirke smo s plastično cepilno zanko za enkratno uporabo in ob uporabi raztopine za suspendiranje spor (SSS) precepili na eno poševno gojišče YNB brez Glc, eno poševno gojišče YNB s 30% Glc ter na nedefinirano gojišče MEA (za lastno knjižnico). Nacepljene poševnike z 30% Glc smo nato inkubirali pri sobni temperaturi, poševnike z gojiščem YNB brez Glc pa pri temperaturi 4°C oz. 8°C do stacionarne faze (1 do 3 tedni). Po inkubaciji smo glivne kulture na poševnikih YNB suspendirali v 5 ml fiziološke raztopine (0,9% NaCl). Po 100 µl glivne suspenzije smo s pipeto prenašali na plošče z gojiščem YNB z ali brez Glc. Da bi pridobili dovolj biomase, smo za vsak sev uporabili po 7 plošč. Plošče smo ovili s plastično folijo in glivne kulture inkubirali pri sobni temperaturi do stacionarne faze (1 do 3 tedni). Poševnike YNB smo pred okužbo s pršicami zaščitili s cigaretinimi papirčki, tako da smo papirčke prilepili čez odprtino poševnika in jih shranili pri sobni temperaturi. Uporabljene poševnike YNB smo zavrgli.

Po inkubaciji smo vse glive v stacionarni fazi rasti postrgali iz plošč. Ves micelij posameznega seva iz sedmih plošč z gojiščem YNB, ki smo jih inkubirali pri nizki temperaturi, smo s spatulo enakomerno razdelili v dve mikrocentrifugirki z oznakama "YNB_S" (YNB, sveže) in "YNB_K" (YNB, kuhano). Micelij posameznega seva iz sedmih plošč z gojiščem YNB s Glc smo prav tako enakomerno razdelili v dve mikrocentrifugirki z oznakama "Y+30_S" (YNB z 30% Glc, sveže) in "Y+30_K" (YNB z 30% Glc, kuhano). Mikrocentrifugirke smo zamrznili v tekočem dušiku in jih shranili pri -80°C.

Pri nekaterih sevih gliv smo inkubacijsko temperaturo prilagodili njihovim ravnim potrebam (Preglednica 3). Kot kontrolne vzorce smo uporabili podatke, ki jih je v svoji diplomski nalogi dobila Maja Derlink (Derlink, 2009).

3.4. PRIPRAVA VODNIH EKSTRAKTOV

Mikrocentrifugirke smo vzeli iz tekočega dušika in jih odprte sušili 48 ur. Do uporabe smo jih hranili pri 4 °C. V mikrocentrifugirke smo dodali od 500 do 1000 µl deionizirane vode (odvisno od količine in strukture micelija). Micelij smo homogenizirali s stekleno palčko ter ga premešali na rotacijskem stresalniku. Mikrocentrifugirke smo nato ovili s parafilmom in jih v erlenmajericah dali na stresalnik. Ekstrakcija je potekala 24 ur pri 600 obratih/minuto in 4 °C. Nato smo jih centrifugirali 20 min. pri 1300 obratih/minuto in 4 °C. Supernatant smo odpipetirali v nove mikrocentrifugirke z enako oznako. Supernatant in preostali micelij v starih mikrocentrifugirkah smo do uporabe shranili v zamrzovalniku. Supernatante iz posameznih sevov, pridobljenih z enakih gojišč, smo združili in jih ponovno razdelili v čiste mikrocentrifugirke na kuhane in sveže vzorce. Svežim vzorcem smo glede na to, koliko ekstrakta smo kasneje potrebovali za teste, dodali različno količino deionizirane vode. Do uporabe smo jih hranili v zamrzovalniku. Mikrocentrifugirke s supernatantom z oznakami "YNB_K" ter "Y+30 %_K" smo kuhali 10 min. v vreli vodi. Nato smo jih centrifugirali 20 min. pri 1300 obratih/minuto in 4 °C. Supernatante smo prenesli v nove mikrocentrifugirke in jih shranili pri 4 °C.

3.5. DOLOČANJE KONCENTRACIJE EKSTRAHIRANE SUHE SNOVI V VZORCIH

Suho težo ekstrahirane snovi v vzorcih smo določili s tehtanjem posušenega supernatanta. Po 100 µl supernatanta posameznega vzorca smo odpipetirali v označene in stehtane skodelice iz aluminijaste folije in jih sušili 30 min. pri 100 °C. Potem smo skodelice ponovno stehtali in preračunali suho težo. Za določanje koncentracije (mg/ml) smo dobljeno vrednost pomnožili z 10.

3.6. TESTI ZA DOLOČANJE BIOLOŠKIH AKTIVNOSTI

3.6.1. DOLOČANJE KONCENTRACIJE EKSTRAHIRANIH PROTEINOV V VZORCIH

Koncentracijo proteinov smo določili le pri svežih, nekuhanih vzorcih. Na podlagi znanih koncentracij govejega serumskega albumina (BSA) smo pripravili umeritveno krivuljo. Pripravili smo mešanico reagentov BCA protein reagent A in BCA protein reagent B v razmerju 50:1. Vzorce smo redčili v razmerju 1:5, tako da smo v mikrotitrsko ploščo k 2 μ l ekstrakta vsakega vzorca dodali 8 μ l deionizirane vode. K temu smo dodali 200 μ l mešanice reagentov A in B. Pripravili smo še kontrolo, v kateri je bilo 10 μ l deionizirane vode in 200 μ l mešanice reagentov A in B. S čitalcem mikrotitrskih plošč smo po 30-minutni inkubaciji pri 37°C ugotovili absorpcijo proteinov pri valovni dolžini 550 nm. S pomočjo umeritvene krivulje za znane koncentracije govejega serumskega albumina smo odčitali koncentracije proteinov.

3.6.2. HEMAGLUTINACIJSKI TEST

Goveje eritrocite smo trikrat sprali s fiziološko raztopino in dvakrat z eritrocitnim pufrom, ki je vseboval 140 mM NaCl in 13 mM Tris-HCl (pH 7.4). V enakem pufru smo pripravili 2% suspenzijo spranih eritrocitov. Biološki test hemaglutinacije smo izvedli na mikrotitrski plošči z vdolbinicami z zaobljenim dnom. Vdolbinice smo napolnili s 100 μ l suspenzije spranih eritrocitov in z 20 μ l ekstrakta vzorcev gliv iz preglednice 1. Po 1-urni inkubaciji pri sobni temperaturi smo rezultate odčitali vizualno.

3.6.3. TEST PROTIBAKTERIJSKE AKTIVNOSTI

Protibakterijsko aktivnost vzorcev smo ugotavljali s standardnim difuzijskim testom na agarju. Uporabili smo po Gramu pozitiven (*Bacillus subtilis*) in po Gramu negativen (*Escherichia coli*) bakterijski sev. Bakterije smo nagojili preko noči v 10 ml gojišča LB (Luria Broth) pri 250 obratih/minuto in 37°C. Naslednji dan smo število bakterij določili s pomočjo dvožarkovnega spektrofotometra. Optično gostoto smo izmerili pri 600 nm. Za kontrolo smo uporabili sterilno tekoče gojišče LB. Število bakterij smo določili s standardiziranimi umeritvenima krivuljama za bakterijska seva. Nato smo pripravili plošče s trdnim gojiščem LB. Še vroče avtoklavirano gojišče LB z agarjem smo ohladili na približno 42°C in mu dodali toliko prekonočne kulture, da je bila končna koncentracija

enaka 5×10^5 bakterijskih kolonij/liter. V pripravljene sterilne petrijevke smo vlili po 20 ml LB gojišča z agarjem z vcepljeno bakterijsko kulturo. Do uporabe smo jih shranili pri 4°C. S pomočjo steriliziranega plutovrta smo v gojišče v vsaki plošči zvrtili 8 lukenj premera 1 cm. V vsako smo dodali po 100 µl ekstrakta vzorcev gliv iz preglednice 2. Po 48-urni inkubaciji pri 37 °C smo odčitali širino inhibicijske cone, ki je bila vidna kot prozoren kolobar okoli vdolbine.

3.6.4. TEST INHIBICIJE ENCIMA ACETILHOLINESTERAZE

Inhibicijo encima acetilholinesteraze (AChE) z učinkovinami iz gliv iz preglednice 1 smo zasledovali z Ellmanovo metodo (Ellman in sod., 1961) s pomočjo čitalca mikrotitskih plošč. Uporabili smo AChE iz električne jegulje, ki smo jo raztopili v 100 mM fosfatnem puftru (pH 7.3) v koncentraciji 500 encimskih enot (EE)/ml. Tik pred začetkom testa smo encim 200-krat redčili v enakem puftru. V vdolbinice mikrotitrne plošče smo vnesli 140 µl Ellmanovega reagenta (raztopina 5,5-ditiobis-2-nitrobenzojske kisline (91 mg) in NaHCO₃ (37.5 mg) v 25 mM fosfatnem puftru, pH 8) in 10 µl substrata 1 mM acetiltioholina. Nato smo v posamezne jamice dodali 10 µl posameznega ekstrakta vzorcev gliv in tik pred začetkom meritve še 50 µl encima AChE. Kontrola je namesto vzorca vsebovala 10 µl vode. Vse meritve smo izvajali 12 minut pri 412 nm in 25°C.

3.6.5. HEMOLITIČNI TEST

Iz sveže goveje krvi smo s centrifugiranjem izolirali eritrocite. V kri smo dodali citrat, da ne bi prišlo do strjevanja le-te. Eritrocite smo trikrat sprali s fiziološko raztopino (0,9% NaCl) in jih do uporabe shranili v Alseverjevem konzervansu v hladilniku. Tako pripravljene eritrocite smo uporabljali, dokler se zaradi hemolize supernatant ni pobarval rdeče. Pred uporabo smo konzervirane eritrocite dvakrat sprali s fiziološko raztopino. Pripravili smo pufer za eritrocite, ki je vseboval 0.13 M NaCl in 0.02 M Tris-HCl, pH 7.4. Suspenzija eritrocitov v pufru je imela pri 630 nm absorpcijo $1,0 \pm 0.01$.

Test hemolize smo izvedli na mikrotitrski plošči. Vdolbinice smo napolnili s po 100 μ l eritrocitnega pufra in 20 μ l ekstrakta vsakega vzorca gliv iz preglednice 1. Po končanem pipetiranju smo v vsako vdolbinico dodali še 100 μ l eritrocitov ter pričeli z meritvijo. Hemolizo smo opazovali kot znižanje absorpcije pri 630 nm. Za kontrolo smo uporabili 100 μ l eritrocitnega pufra, 20 μ l deionizirane vode in 100 μ l eritrocitov. Hemolizo smo zasledovali 20 minut pri 25°C. Pri vzorcih, kjer smo opazili aktivnost, smo odčitali polovični čas hemolize (t_{50}), to je čas, pri katerem absorpcija pade na polovico svoje začetne vrednosti (0,25).

4. REZULTATI

4.1. KONCENTRACIJA SUHE SNOVI IN PROTEINOV V VZORCIH

Podatki o koncentracijah suhe snovi in proteinov v vzorcih testiranih gliv so prikazani v Preglednici 3. Podatke o kontrolnih vzorcih in vzorcih, gojenih na gojišču s povečano koncentracijo soli, sem povzela po diplomski nalogi Maje Derlink (Derlink, M. 2009) in so v preglednici označeni s svetlo sivo bravo.

Preglednica 3: Koncentracija suhe snovi in proteinov v vzorcih

Legenda:

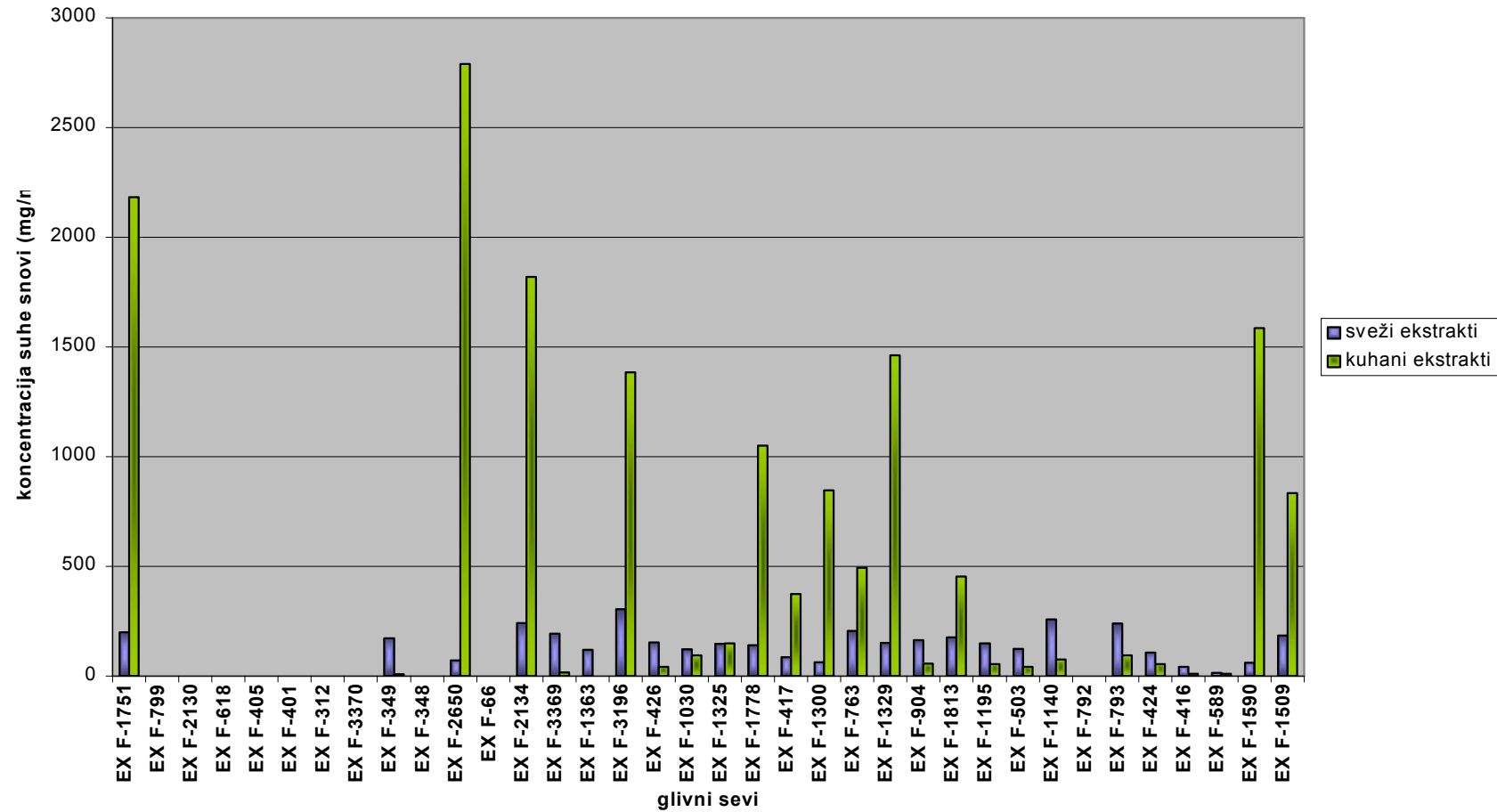
YNB_NZ_S	sveži ekstrakti gliv, ki so rasle na YNB gojišču pri nizki temperaturi
Y+30_S	sveži ekstrakti gliv, ki so rasle na gojišču z 30% glukozo
YNB_NZ_K	kuhani ekstrakti gliv, ki so rasle na YNB gojišču pri nizki temperaturi
Y+30_K	kuhani ekstrakti gliv, ki so rasle na gojišču z 30% glukozo
S.S.	suha snov v vzorcu
P.	koncentracija proteinov v vzorcu
YNB_kon_S	sveži ekstrakti gliv, ki so rasle na YNB gojišču pri sobni temperaturi-kontrola
Y+10_S	sveži ekstrakti gliv, ki so rasle na gojišču z 10% NaCl
YNB_kon_K	kuhani ekstrakti gliv, ki so rasle na YNB gojišču pri sobni temperaturi-kontrola
Y+10_K	kuhani ekstrakti gliv, ki so rasle na gojišču z 10% NaCl

Vrsta	Sev	YNB_NZ_S		Y+30_S		YNB_NZ_K		Y+30_K		YNB_kon_S		Y+10_S		YNB_kon_K		Y+10_K	
		S. S.	P.	S. S.	P.	S. S.	S. S.	S. S.	P.	S. S.	P.	S. S.	P.	S. S.	S. S.		
		[mg/ml]	[mg/ml]	[mg/ml]	[mg/ml]	[mg/ml]	[mg/ml]	[mg/ml]	[mg/ml]	[mg/ml]	[mg/ml]	[mg/ml]	[mg/ml]	[mg/ml]	[mg/ml]		
<i>Aspergillus flavus</i>	EX F-1751	199,8	30,8	247,2	19	2183,3	903,4	7,5	0,59	38,1	0,47	4,2	25				
<i>Aspergillus niger</i>	EX F-799	-	-	301,0	52,4	-	136,6	3,8	0,83	271,6	20,19	2,3	99,7				
<i>Aspergillus niger</i>	EX F-2130	-	-	328,2	49,2	-	633,0	1,8	0,5	129,6	6,92	2	78,4				
<i>Aspergillus ochraceus</i>	EX F-618	-	-	380,3	23,2	-	116,6	4,3	1,13	1,2	0,27	7,2	2,5				
<i>Aspergillus sydowii</i>	EX F-405	-	-	151,0	21,6	-	119,6	1,6	0,65	2,7	0,54	2	2,8				
<i>Aspergillus tubingensis</i>	EX F-401	-	-	118,8	34,8	-	164,3	5,9	1,74	89,1	6,08	8	101,9				
<i>Aspergillus terreus</i>	EX F-312	-	-	288,2	52,8	-	99,5	2,8	0,4	11,4	1,09	1,6	5,6				
<i>Aspergillus fumigatus</i>	EX F-3370	-	-	248,8	20	-	2379,7	-	-	-	-	-	-				
<i>Emericella stella-maris</i>	EX F-349	173,0	2,4	251,8	29,6	08,4	125,8	4,7	0,38	20	1,24	3,1	9				
<i>Emericella filifera</i>	EX F-348	-	-	168,8	27,6	-	118,4	4,8	0,79	25,2	2,65	2,6	15,8				
<i>Emericella olivicola</i>	EX F-2650	70,6	3,4	447,4	31,2	2790,1	4339,5	6,1	2,12	75,5	6,53	9,4	15,9				
<i>Eurotium amstelodami</i>	EX F-66	-	-	202,6	18,4	-	3193,6	2,9	0	19,7	2,45	0,3	6,2				
<i>Eurotium amstelodami</i>	EX F-2134	241,2	23	106,2	7,6	1820,2	2010,1	12,4	2,99	54,9	4,47	7,4	43,2				
<i>Eurotium herbariorum</i>	EX F-3369	193,2	6	133,8	11,8	17,1	1830	9	3,36	67,9	5,69	6,9	62,6				
<i>Penicillium nordicum</i>	EX F-1363	119,2	14,2	238,0	16,4	0,1	1652	2,1	0,69	17,7	5,48	1,8	13,1				
<i>Penicillium nordicum</i>	EX F-3196	304,0	20,4	190,6	32	1385,4	2014,2	3,5	1,01	99,6	10,35	4,9	22,5				
<i>Penicillium chrysogenum</i>	EX F-426	152,4	14,8	135,2	27,6	41,7	47,5	4,8	0,62	16	0,74	1,9	11				
<i>Penicillium chrysogenum</i>	EX F-1030	120,8	18,8	300,2	28,4	94,7	120,7	2,4	0,32	61,5	5,36	2,9	36				

<i>Penicillium corylophilum</i>	EX F-1325	147	19,2	301,8	34,6	149,2	0,1	23,8	4,02	37	3,08	19	21,2
<i>Penicillium corylophilum</i>	EX F-1778	140,8	23,6	253,4	39,6	1051,2	1945,7	14,4	3,87	76,2	7,53	11,8	25,8
<i>Penicillium brevicompactum</i>	EX F-417	86,4	23,6	128,4	21,6	375,0	95,4	11,7	1,83	64,7	5,93	7,7	44,5
<i>Penicillium brevicompactum</i>	EX F-1300	62,2	19,6	193,8	48,8	8460	101,9	2,1	1,55	15,1	2,93	5,2	6,5
<i>Penicillium crustosum</i>	EX F-763	206,0	19,2	210	24,4	494,0	117,0	2,3	0,14	9,4	0,65	2,6	7,5
<i>Penicillium crustosum</i>	EX F-1329	152,2	23,2	252,0	35,8	1461,3	611	7	0,06	100,6	5,10	2,1	38,7
<i>Penicillium crustosum</i>	EX F-904	164,2	29,2	191,2	20	55,9	63,7	2,4	0,21	14,5	0,16	1,8	9,9
<i>Penicillium expansum</i>	EX F-1813	175,8	32,2	204,8	25,2	454,4	1221	4,3	1,56	112,1	6,3	5,9	73,5
<i>Penicillium expansum</i>	EX F-1195	148,2	21,4	156,0	23,2	55,6	0,1	-	-	-	-	-	-
<i>Penicillium polonicum</i>	EX F-503	124,2	18,4	225,0	32	41,8	122,9	3,2	0,63	101,1	5,22	1,6	14,4
<i>Penicillium polonicum</i>	EX F-1140	258,	30,4	388,2	40	76,0	149,1	11,1	2,54	6,5	1,58	3,5	4,6
<i>Penicillium citrinum</i>	EX F-792	-	-	261,6	35,2	-	70,6	29,2	0,09	82,5	2,3	2,1	61,9
<i>Penicillium antarcticum</i>	EX F-793	239,0	27,2	266,8	32,4	94,1	34,5	17,6	1,94	423,7	3,8	11,5	3,9
<i>Penicillium sizovae</i>	EX F-424	106,4	25,2	190,4	22	53,9	69,2	2,9	0,62	14,3	2,43	3,3	9,9
<i>Penicillium steckii</i>	EX F-416	42,4	12,8	94,0	32,4	11,3	104,9	5,4	1,11	30,3	3,41	3,7	18,3
<i>Debaryomyces hansenii</i>	EX F-589	15,4	5,2	187,6	9,4	10	48,9	2,8	0,74	56,2	3,09	7,8	124,6
<i>Debaryomyces hansenii</i>	EX F-1590	61,4	9,2	94,6	3	1585,1	1858,4	2,6	0,24	6,7	1,07	9,2	20,1
<i>Metschnikowia bicuspidata</i>	EX F-1509	185,0	12,8	146,6	14,2	833,4	550,8	3,9	0,18	28,7	0,57	1,9	11,3

Slika 1 prikazuje koncentracije suhe snovi ekstraktov gliv, gojenih pri nizki temperaturi. Modri stolpci označujejo sveže ekstrakte gliv, zeleni stolpci pa predstavljajo koncentracije suhe snovi kuhanih ekstraktov gliv.

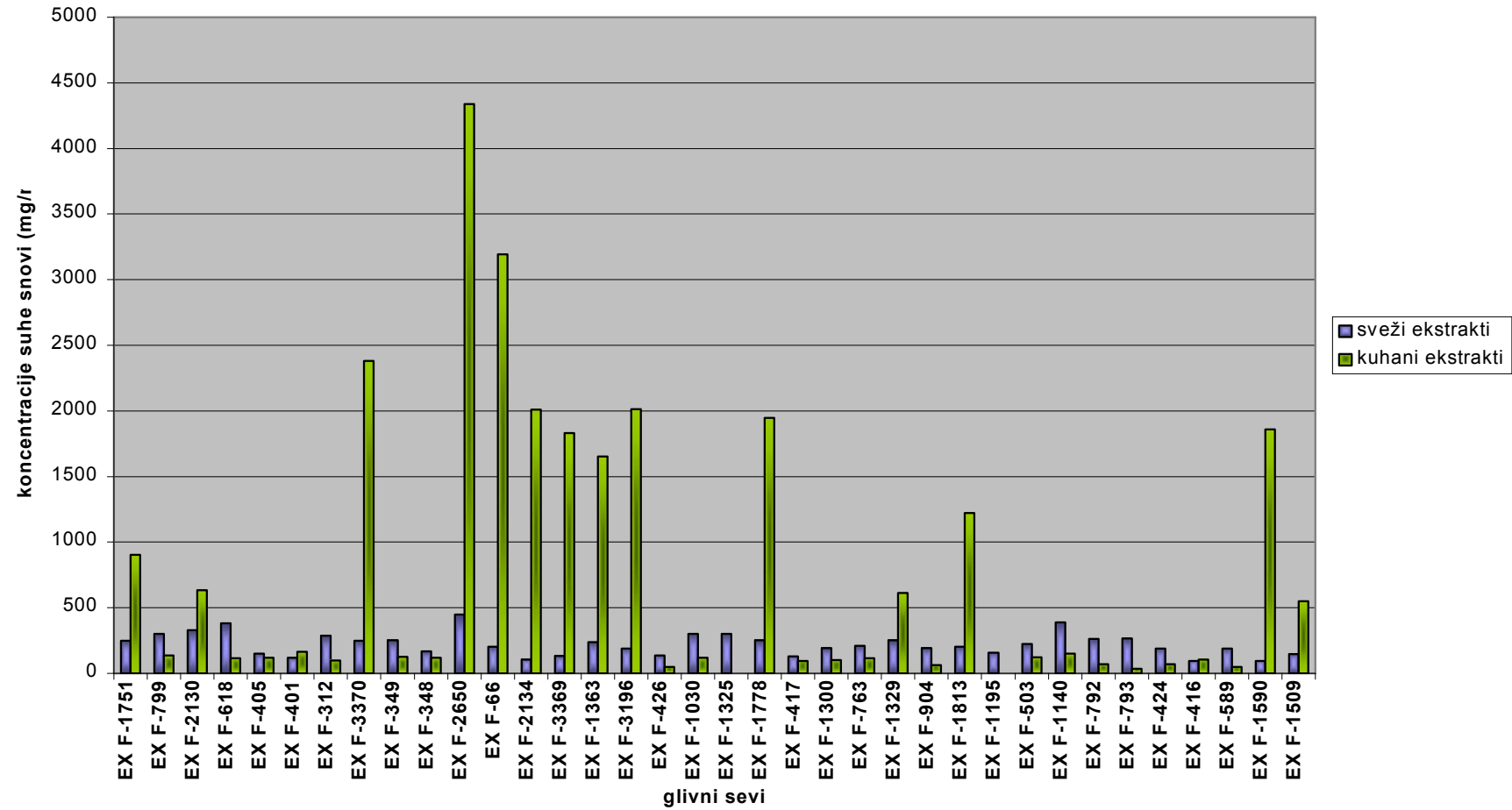
Kuhani ekstrakti vsebujejo veliko več suhe snovi kot sveži, v povprečju kar 4,2-krat več. Med kuhanimi najbolj iztopata ekstrakt glive *Emericella olivicola* z oznako EXF 2650 z največjo izmerjeno koncentracijo (2790,1 mg/ml) ter ekstrakt glive *Penicillium nordicum* z oznako EXF 1363 z najnižjo izmerjeno koncentracijo (0,1mg/ml). Pri svežih ekstraktih je razpon med največjo in najmanjšo koncentracijo suhe snovi bistveno manjši. Največjo koncentracijo suhe snovi pri svežih ekstraktih smo izmerili pri ekstraktu glive *Penicillium nordicum* z oznako EXF 3196 (304,0 mg/ml), najnižjo vrednost pa je vseboval ekstrakt glive *Debaryomyces hansenii* z oznako EXF 589 (15,4 mg/ml).



Slika 1: Koncentracije suhe snovi ekstraktov, gljiv gojenih pri nizki temperaturi

Slika 2 prikazuje koncentracije suhe snovi ekstraktov gliv, gojenih na gojišču z visoko koncentracijo Glc. Modri stolpci označujejo sveže ekstrakte gliv, zeleni stolpci pa predstavljajo koncentracije suhe snovi kuhanih ekstraktov gliv.

Kuhani ekstrakti gliv vsebujejo veliko več suhe snovi kot sveži ekstrakti, v povprečju 3,4-krat več. Med kuhanimi ekstrakti je bila najvišja vrednost izmerjena pri ekstraktu glive *Emericella olivicola* z oznako EXF 2650 (4339,5 mg/ml), najnižja pa pri ekstraktu glive *Penicillium expansum* z oznako EXF 1195 (0,1 mg/ml). Najvišja vrednost koncentracij suhe snovi v svežih ekstraktih je bila izmerjena pri ekstraktu glive *Emericella olivicola* z oznako EXF 2650 (447,4 mg/ml), najnižja vrednost pa pri ekstraktu glive *Penicillium steckii* z oznako EXF 416 (94,0 mg/ml).

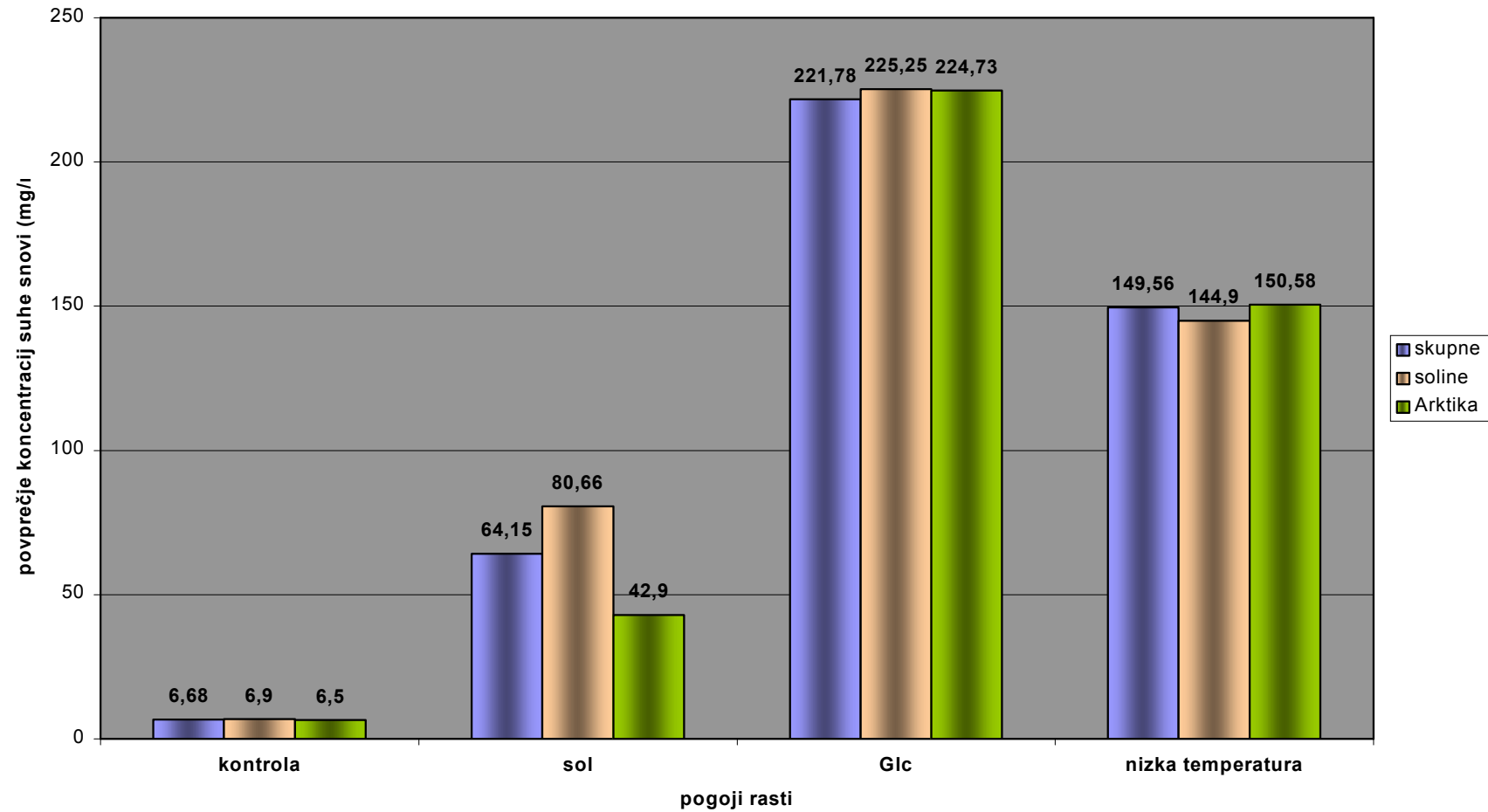


Slika 2: Koncentracije suhe snovi ekstraktov gliv, gojenih v gojiščih z visoko koncentracijo Glc

Slika 3 prikazuje povprečja koncentracij suhe snovi svežih ekstraktov glede na razmere rasti gliv. Razmere za rast so v grafu prikazane z barvnimi stolpci: moder prikazuje povprečja koncentracij suhe snovi vseh svežih ekstraktov gliv, rjav prikazuje povprečja koncentracij suhe snovi svežih ekstraktov gliv, izoliranih iz solin, in zeleni stolpec povprečja koncentracij suhe snovi svežih ekstraktov gliv, izoliranih iz Arktike.

Pri kontrolnih razmerah je povprečna koncentracija suhe snovi v ekstraktih približno enaka (skupne: 6,68 mg/ml; soline: 6,9 mg/ml; Arktika: 6,5 mg/ml). Pri sevih, ki so rasli na gojišču s povečano slanostjo, največjo vrednost povprečne koncentracije suhe snovi dosežejo glive, izolirane iz solin (80,66 mg/ml), sledi jim skupna koncentracija suhe snovi vseh ekstraktov gliv, ki so rasle na gojiščih s povečano slanostjo (64,15 mg/ml), najnižjo vrednost pa smo izmerili pri ekstraktih gliv, ki so bile izolirane iz Arktike (42,9 mg/ml). V razmerah z dodano glukozo prav tako najvišje povprečje dosežejo glive, izolirane iz solin (225,25 mg/ml), sledi jim povprečje sevov, izoliranih iz Arktike (224,73 mg/ml), še malo manjša pa je skupna koncentracija (221,78 mg/ml). Pri sevih, ki so bili izpostavljeni stresnim razmeram in so rasli pri nizki temperaturi, najvišje povprečje dosežejo glive, ki so bile izolirane iz Arktike (150,58 mg/ml), sledi jim skupno povprečje (149,56 mg/ml), najnižje pa so koncentracije suhe snovi gliv, ki so bile izolirane iz solin (144,9 mg/ml).

Če povzamemo povprečja vseh skupnih svežih ekstraktov gliv, ne glede na razmere rasti, je povprečna koncentracija suhe snovi 110,38 mg/ml.

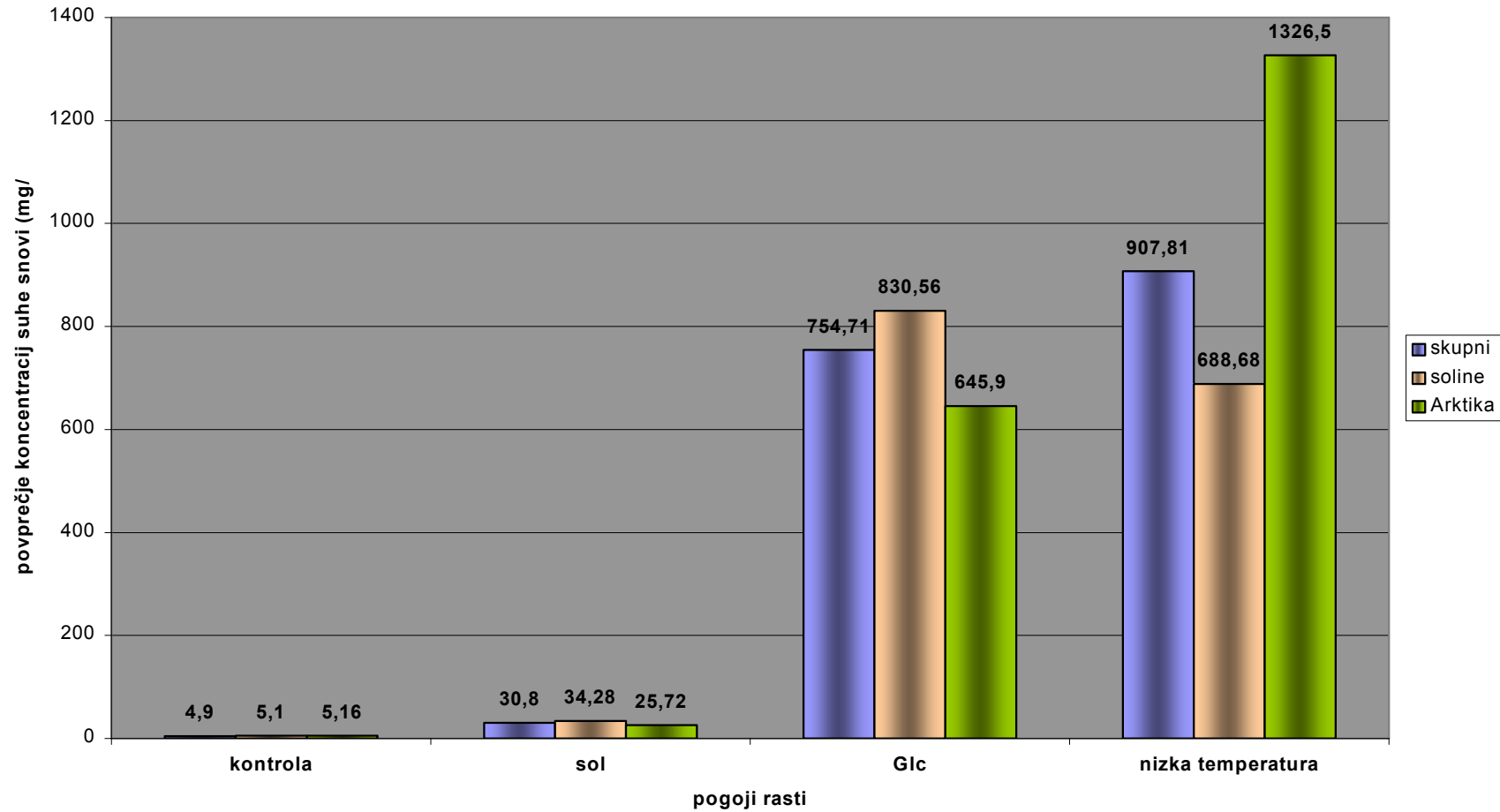


Slika 3: Povprečja koncentracij suhe snovi svežih ekstraktov glede na razmere rasti gliv

Slika 4 prikazuje povprečja koncentracij suhe snovi kuhanih ekstraktov glede na razmere rasti gliv. Pogoji rasti so v grafu prikazani kot barvni stolpci: moder prikazuje povprečja koncentracij suhe snovi vseh kuhanih ekstraktov gliv, rjav prikazuje povprečja koncentracij suhe snovi kuhanih ekstraktov gliv, izoliranih iz solin, in zeleni stolpec povprečja koncentracij suhe snovi kuhanih ekstraktov gliv, izoliranih iz Arktike.

Pri kontrolnih razmerah so vrednosti povprečij koncentracije suhe snovi zopet približno enake (skupne: 4,9 mg/ml; soline: 5,1 mg/ml; Arktika: 5,16 mg/ml). Na gojišču s povečano slanostjo so najvišje povprečje dosegle glive, izolirane iz solin (34,28 mg/ml), nato sledi skupno povprečje (30,8 mg/ml), glive, izolirane iz Arktike, pa so dosegle najnižjega (25,7 mg/ml). Enak vrstni red smo ugotovili tudi pri glivah, ki smo jih gojili v razmerah z dodano glukozo, in sicer smo pri ekstraktih gliv, izoliranih iz solin, izmerili najvišje povprečje (830,56 mg/ml), sledi skupno povprečje (754,71 mg/ml), najnižjo vrednost povprečja pa smo izmerili pri ekstraktih sevov, izoliranih iz Arktike (645,9 mg/ml). V razmerah z nizko temperaturo smo najvišje povprečje ugotovili pri ekstraktih sevov, izoliranih iz Arktike (1326,5 mg/ml), sledi jim skupno povprečje (907,81 mg/ml), najnižjo vrednost pa imajo ekstrakti, izolirani iz solin (688,68 mg/ml).

Če povzamemo povprečja vseh skupnih kuhanih ekstraktov gliv, ne glede na razmere rasti, je povprečna koncentracija suhe snovi 438,34 mg/ml.



Slika 4: Povprečna koncentracij suhe snovi v kuhanih ekstraktih glede na razmere rasti gliv

Slika 5 prikazuje koncentracije proteinov svežih ekstraktov gliv, ki so rasle pri nizki temperaturi, v odvisnosti od koncentracije suhe snovi v vzorcu. Oranžni stolpci prikazujejo koncentracijo proteinov (mg/ml), modra krivulja pa koncentracijo suhe snovi v vzorcu (mg/ml).

Navjše koncentracije proteinov so bile izmerjene pri naslednjih sevih:

Penicillium expansum z oznako EXF 1813, izoliran iz solin (P: 32,2 mg/ml; SS: 175,8 mg/ml);

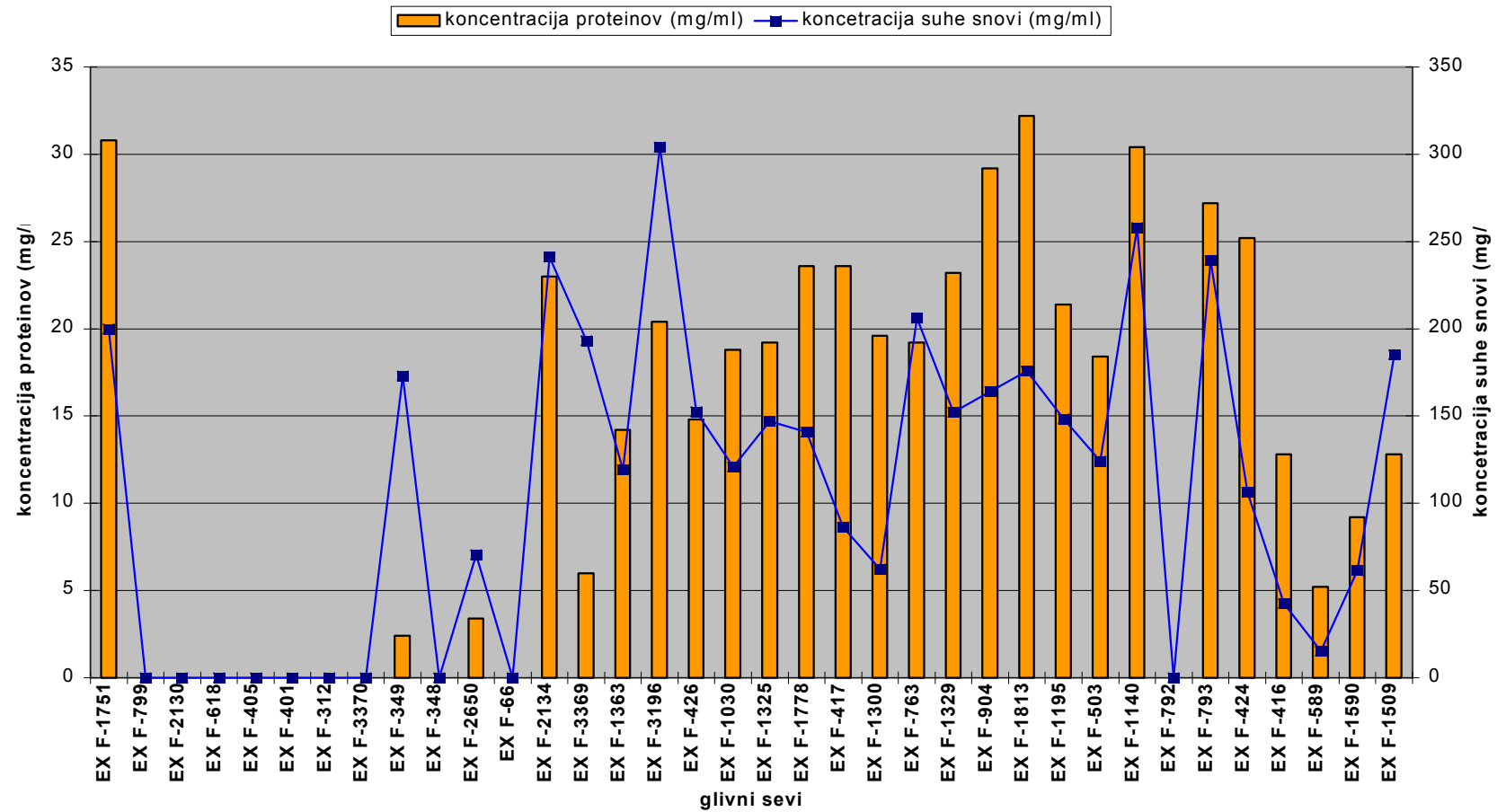
Aspergillus flavus z oznako EXF 1751, izoliran iz solin (P: 30,8 mg/ml; SS: 199,8 mg/ml);

Penicillium polonicum z oznako EXF 1140, izoliran iz Arktike (P: 30,4 mg/ml; SS: 258 mg/ml);

Penicillium crustosum z oznako EXF 904, izoliran iz Arktike (P: 29,2 mg/ml; SS: 164,2 mg/ml);

Penicillium antarcticum z oznako EXF 793, izoliran iz solin (P: 27,2 mg/ml; SS: 239 mg/ml);

Penicillium sizovae z oznako EXF 424, izoliran iz solin (P: 25,2 mg/ml; SS: 106,4 mg/ml) (preglednica 1).



Slika 5: Koncentracije proteinov svežih ekstraktov gljiv, ki so rastle pri nizki temperaturi, v odvisnosti od koncentracije suhe snovi v vzorcu

Slika 6 prikazuje koncentracije proteinov v svežih ekstraktih gliv, ki so rasle v razmerah z visoko koncentracijo Glc, v odvisnosti od koncentracije suhe snovi v vzorcu. Oranžni stolpci prikazujejo koncentracijo proteinov (mg/ml), modra krivulja pa koncentracijo suhe snovi v vzorcu (mg/ml).

Navjše koncentracije proteinov so bile izmerjene pri naslednjih sevih:

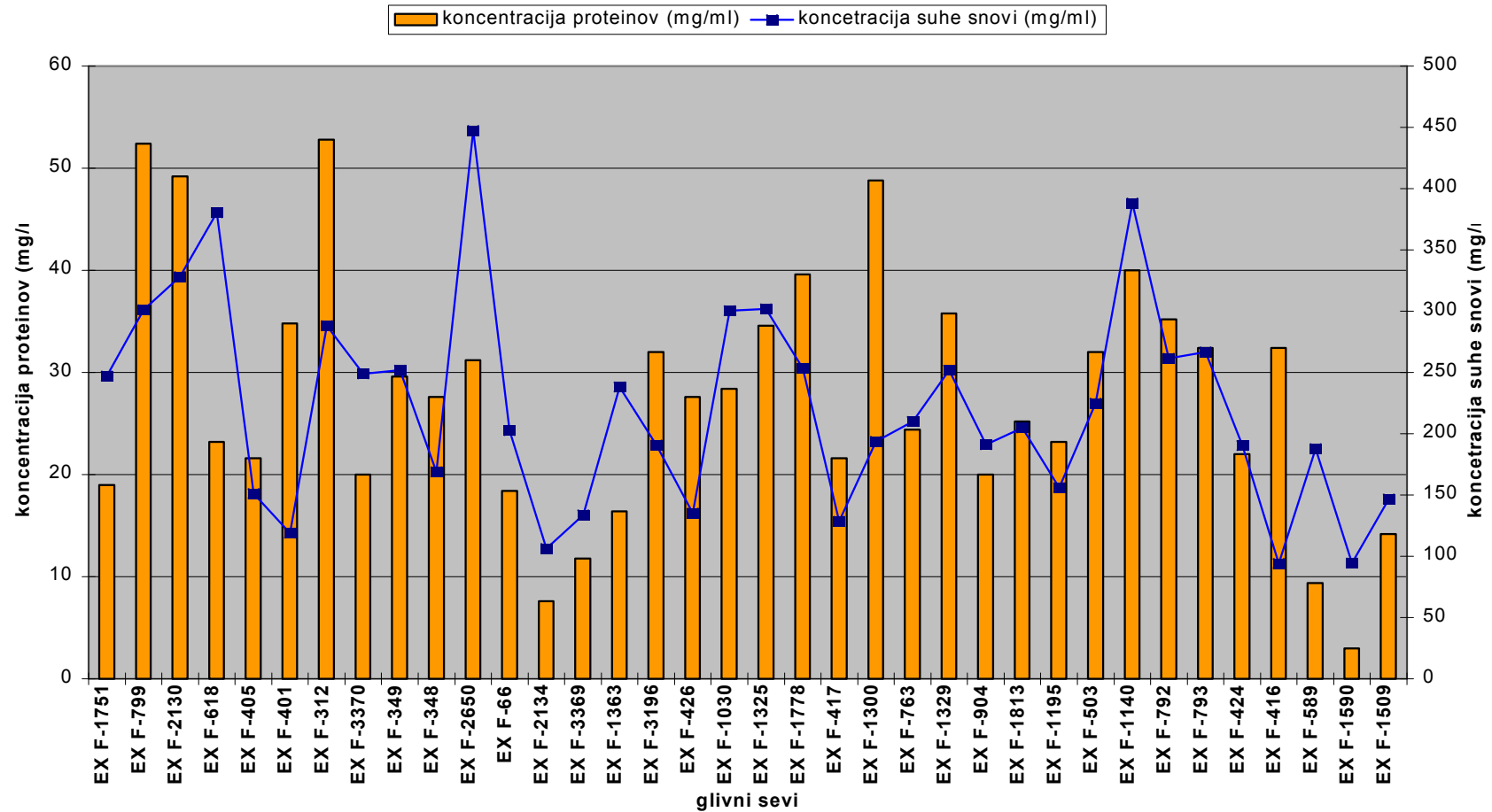
Aspergillus terreus z oznako EXF 312 (P: 52,8 mg/ml; SS: 288,2 mg/ml)

Aspergillus niger z oznako EXF 799, izoliran iz solin (P: 52,4 mg/ml; SS: 301 mg/ml)

Aspergillus niger z oznako EXF 2130, izoliran iz Arktinke (P: 49,2 mg/ml; SS: 328,2 mg/ml)

Penicillium brevicompactum z oznako EXF 1300, izoliran iz Arktike (P: 48,8 mg/ml; SS: 193,8 mg/ml)

Penicillium polonicum z oznako EXF 1140, izoliran iz Arktike (P: 40 mg/ml; SS: 38,82 mg/ml)



Slika 6: Koncentracija proteinov v svežih ekstraktih gliv, ki so rasle v razmerah z visoko koncentracijo Glc, v odvisnosti od koncentracije suhe snovi v vzorcu

4.2. REZULTATI HEMAGLUTINACIJSKEGA TESTA

Hemaglutinacijo smo zaznali pri treh svežih ekstraktih: *Penicillium antarcticum* z oznako EXF 793 (YNB), *Penicillium brevicompactum* z oznako EXF 1300 (Y+30) in *Eurotium amstelodamii* z oznako EXF 2134 (YNB). Aktivne vzorce smo redčili 10x in test ponovili. Ponovno aktiven je bil le en vzorec, *Penicillium brevicompactum* (Y+30) (preglednica 4).

Preglednica 4: Rezultati testa hemaglutinacije.

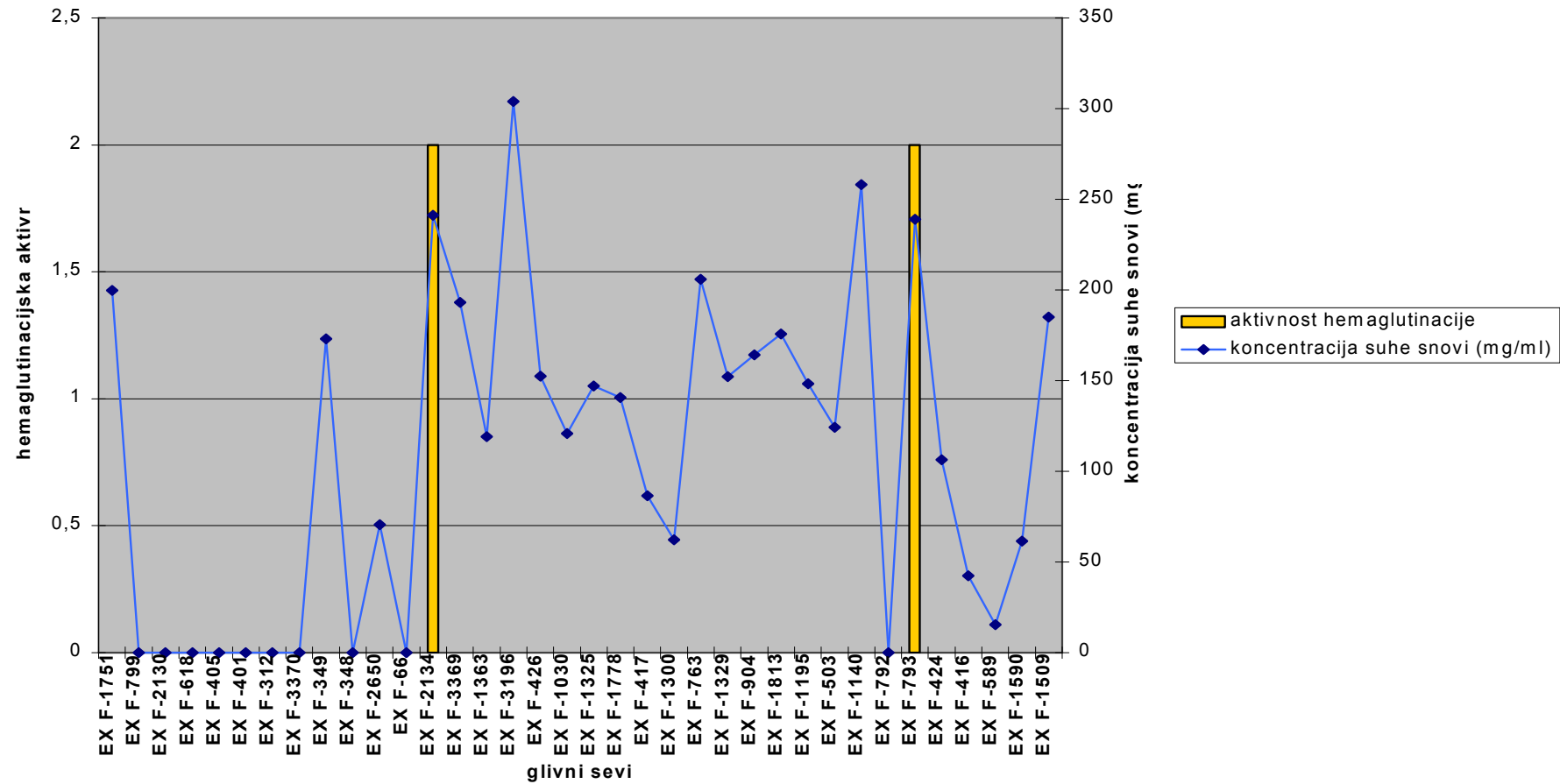
Legenda:

+	hemaglutinacija je potekla
-	hemaglutinacija ni potekla
YNB_NZ	gojeno pri nizkih temperaturah
Y+30	gojeno z dodano glukozo

vrsta	sev	področje izolacije	hemaglutinacija	
			2% suspenzija spranih eritrocitov	10x redčenje
<i>Penicillium antarcticum</i> (YNB_NZ)	EXF 793	soline	+	-
<i>Penicillium brevicompactum</i> (Y+30)	EXF 1300	Arktika, ledeniški led	+	+
<i>Eurotium amstelodami</i> (YNB_NZ)	EXF 2134	Arktika, morski led	+	-

Slika 7 prikazuje rezultate testa hemaglutinacije svežih ekstraktov gliv, ki so rasle pri nizki temperaturi, v odvisnosti od koncentracije suhe snovi v vzorcu. Oranžni stolpci označujejo aktivnost hemaglutinacije (Ha) in sicer vrednost 0 pomeni, da Ha nismo zaznali, vrednost 2 pa pomeni, da je Ha potekla. Modra krivulja prikazuje koncentracijo suhe snovi v vzorcih (mg/ml).

Rezultati hemaglutinacijskega testa so bili negativni, razen pri dveh vzorcih, in sicer pri vrstah *Penicillium antarcticum* z oznako EXF 793 (YNB) in *Eurotium amstelodamii* z oznako EXF 2134 (YNB). V obeh primerih je bila koncentracija suhe snovi dokaj visoka (239-241,2 mg/ml).

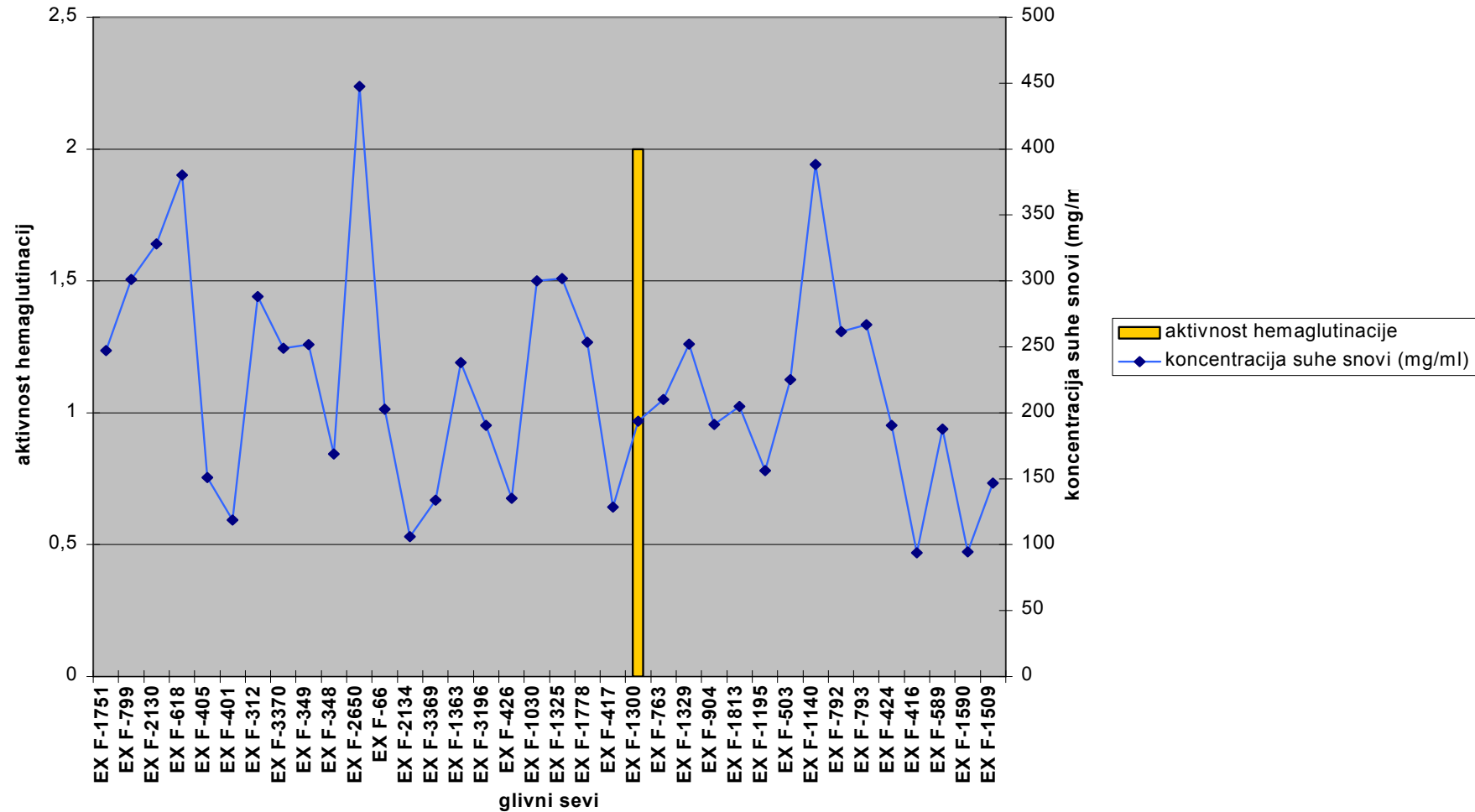


Slika 7: Hemaglutinacijska aktivnost svežih ekstraktov gljiv, ki so rasle pri nizki temperaturi, v odvisnosti od koncentracije suhe snovi v vzorcu

Slika 8 prikazuje rezultate hemaglutinacijske aktivnosti svežih ekstraktov gliv, ki so rasle v gojišču z visoko koncentracijo Glc, v odvisnosti od koncentracije suhe snovi v vzorcu. Hemaglutinacije pri kuhanih ekstraktih nismo zasledili.

Koncentracije suhe snovi svežih ekstraktov gliv, ki so rasle na gojišču z visoko koncentracijo Glc, so bile višje od koncentracij suhe snovi svežih ekstraktov gliv, ki so rasle pri nizki temperaturi.

Hemaglutinacijsko aktivnost smo zasledili le pri ekstraktu *Penicillium brevicompactum*, ki je bil izoliran iz ledeniškega ledu Arktike.



Slika 8: Hemaglutinacijska aktivnost svežih ekstraktov gliv, ki so rasle v gojišču z visoko koncentracijo Glc, v odvisnosti od koncentracije suhe snovi v vzorcu

4.3. REZULTATI TESTA PROTIBAKTERIJSKE AKTIVNOSTI

V vzorcih nismo zaznali nobene protibakterijske aktivnosti.

4.4. REZULTATI TESTA INHIBICIJE ENCIMA ACETILHOLINESTERAZE

Rahlo inhibicijo encima acetilholinesteraze (Preglednica 5) so pokazale vrste:

Penicillium chrysogenum, EX F-1030, (Y+30_S, Y+30_K) izoliran iz morskega ledu na Arktiki;

Penicillium polonicum, EX F-1140, (YNB_NT_S, YNB_NK_K, Y+30_K) izoliran iz glacialnega ledu na Arktiki;

Penicillium polonicum, EX F-503, (YNB_NT_K) izoliran iz solin;

Penicillium sizoviae, EX F-424, (YNB_K) izoliran iz solin;

Penicillium crustosum, EX F-763, (YNB_K) izoliran iz solin;

Penicillium crustosum, EX F-904 (YNB_K) izoliran iz solin;

Penicillium antarcticum, EX F-793, (YNB_K, Y+30_K) izoliran iz solin;

Aspergillus niger, EX F-799, (Y+30_K) izoliran iz solin;

Penicillium expansum, EX F-1195, (YNB_K) izoliran iz glacialnega ledu na Arktiki;

Penicillium brevicompactum, EX F-1300, (Y+30_K) izoliran iz glacialnega ledu na Arktiki;

Penicillium corylophyllum, EX F-1778, (YNB_K) izoliran iz solin;

Penicillium nordicum, EX F-3196, (Y+30_K) izoliran iz solin.

Preglednica 5: Rezultati testa inhibicije encima acetilholinesteraze

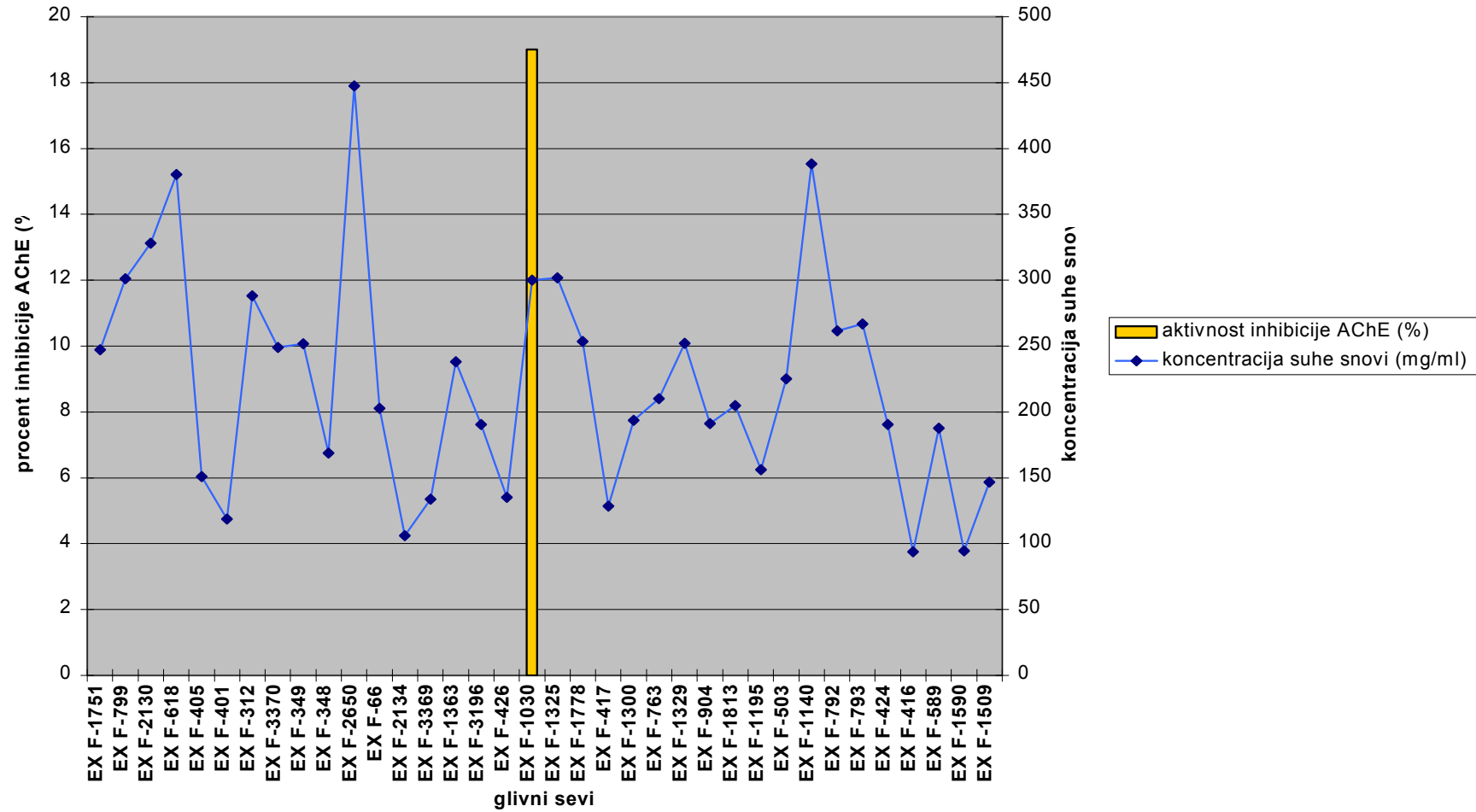
Vrsta	Sev	Gojišče	% inhibicije
<i>Penicillium chrysogenum</i>	EX F-1030	Y+30_S	19
		Y+30_K	22
<i>Penicillium polonicum</i>	EX F-1140	YNB_NT_S	20
		YNB_NT_K	25
		Y+30_K	12
<i>Penicillium polonicum</i>	EX F-503	YNB_NT_K	23
<i>Penicillium sizoviae</i>	EX F-424	YNB_NT_K	20,5

<i>Penicillium crustosum</i>	EX F-763	YNB_NT_K	19
<i>Penicillium crustosum</i>	EX F-904	YNB_NT_K	11
<i>Penicillium antarcticum</i>	EX F-793	YNB_NT_K	22
		Y+30_K	20
<i>Aspergillus niger</i>	EX F-799	Y+30_K	38
<i>Penicillium expansum</i>	EX F-1195	YNB_NT_K	20
<i>Penicillium brevicompactum</i>	EX F-1300	Y+30_K	17
<i>Penicillium corylophylum</i>	EX F-1778	YNB_NT_K	26
<i>Penicillium nordicum</i>	EX F-3196	Y+30_K	26

Slika 9 prikazuje odstotek inhibicije encima acetilholinesteraze (AChE) v svežih ekstraktih gliv, ki so rasle v razmerah z dodano glukozo. Oranžni stolpci označujejo odstotek inhibicije, modra krivulja pa koncentracijo suhe snovi.

Inhibicijo encima acetilholinesteraze smo zaznali le pri enem sevu:

Penicillium chrysogenum z oznako EXF 1030 (S.S: 300,2 mg/ml; AI: 19%)

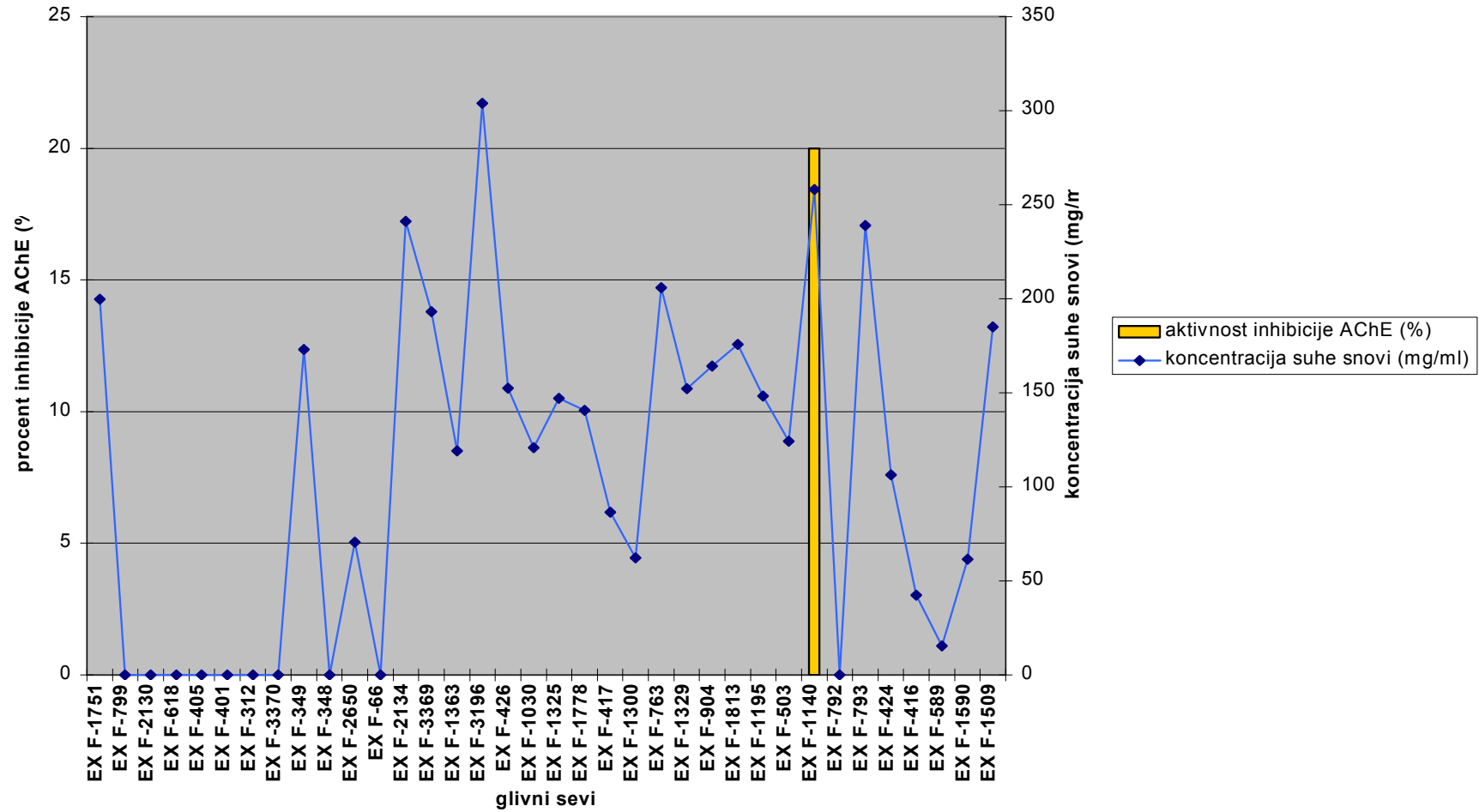


Slika 9: Odstotek inhibicije encima acetilholinesteraze v svežih ekstraktih gliv, ki so rasle v razmerah z dodano glukozo, v odvisnosti od koncentracije suhe snovi

Slika 10 prikazuje odstotek inhibicije encima acetilholinestrase (AChE) v svežih ekstraktih gliv, ki smo jih gojili pri nizki temperaturi. Oranžni stolpci označujejo odstotek inhibicije, modra krivulja pa koncentracijo suhe snovi.

Inhibicijo encima acetilholinesteraze smo zaznali le pri enem sevju:

Penicillium polonicum z oznako 1140 (S.S: 25,8 mg/ml; AI: 20%).



Slika 10: Odstotek inhibicije encima acetilholinesteraze v svežih ekstraktih gliv, ki so rasle v razmerah z nizko temperaturo, v odvisnosti od koncentracije suhe snovi

Slika 11 prikazuje odstotek inhibicije encima acetilholinestereaze (AChE) v kuhanih ekstraktih gliv, ki smo jih gojili v razmerah z dodano glukozo. Oranžni stolpci označujejo odstotek inhibicije, modra krivulja pa koncentracijo suhe snovi.

Inhibicijo encima acetilholinesteraze smo zaznali pri 6 sevih:

Aspergillus niger z oznako EXF 799 (S.S: 136,6 mg/ml; AI: 38%);

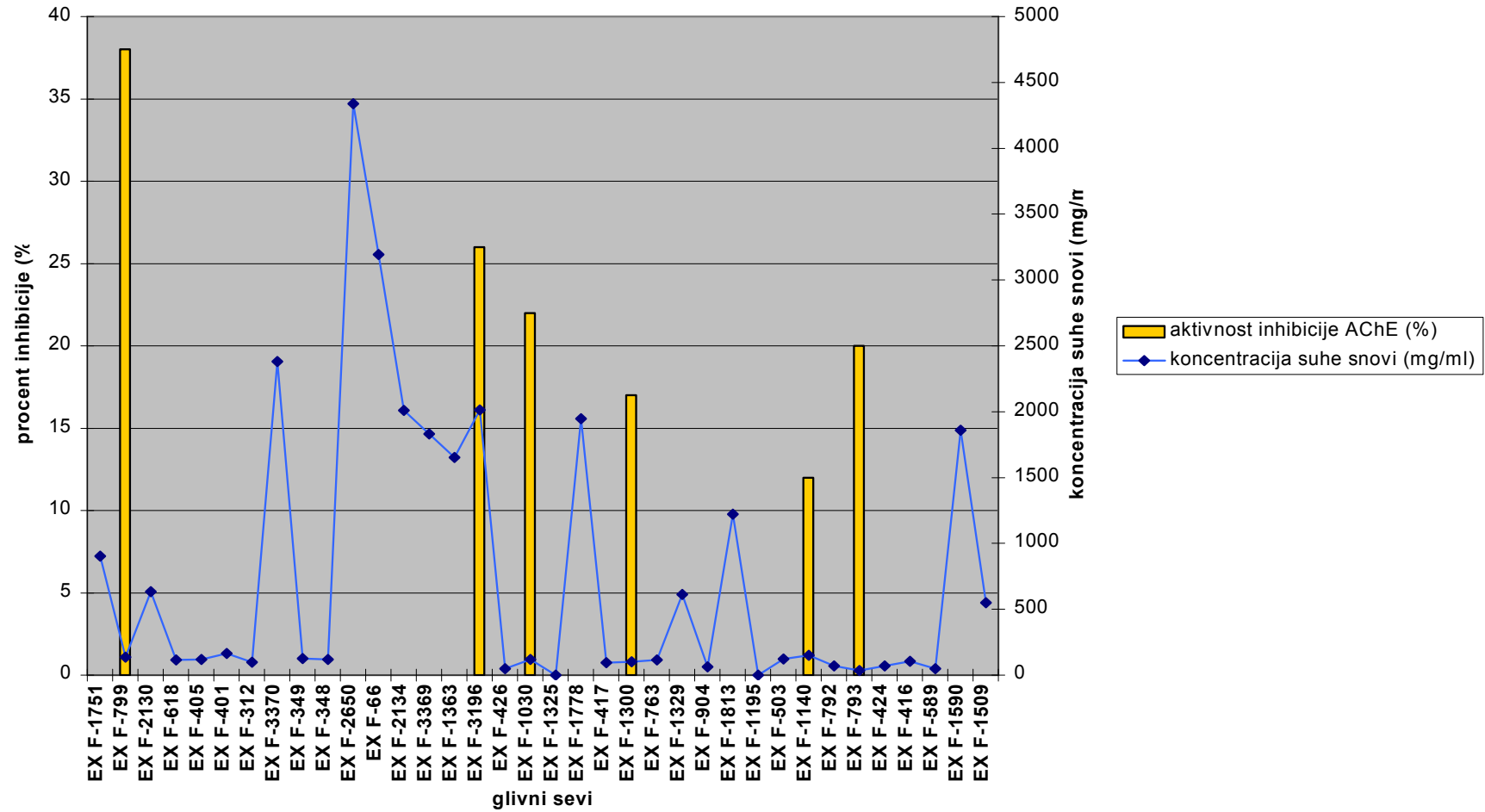
Penicillium nordicum z oznako EXF 3196 (S.S: 2014,2 mg/ml; AI: 26%);

Penicillium chrysogenum z oznako EXF 1030 (S.S: 120,7 mg/ml; AI: 22%);

Penicillium brevicompactum z oznako EXF 1300 (S.S: 101,9 mg/ml; AI: 17%);

Penicillium polonicum z oznako EXF 1140 (S.S: 149,1 mg/ml; AI: 12%);

Penicillium antarcticum z oznako EXF 793 (S.S: 34,5 mg/ml; AI: 20%).



Slika 11: Odstotek inhibicije encima acetilholinesteraze v kuhanih ekstraktih gliv, ki so rasle v razmerah z dodano glukozo, v odvisnosti od koncentracije suhe snovi

Slika 12 prikazuje odstotek inhibicije encima acetilholinestereaze (AChE) v kuhanih ekstraktih gliv, ki so rasle v razmerah z nizko temperaturo. Oranžni stolpci označujejo procent inhibicije, modra krivulja pa koncentracijo suhe snovi.

Inhibicijo encima acetilholinesteraze smo zaznali pri 8 sevih:

Penicillium corylophilum z oznako EXF 1778 (S.S: 1051,2 mg/ml; AI: 26%);

Penicillium crustosum z oznako EXF 763 (S.S: 49,4 mg/ml; AI: 19%);

Penicillium crustosum z oznako EXF 904 (S.S: 55,9 mg/ml; AI: 11%);

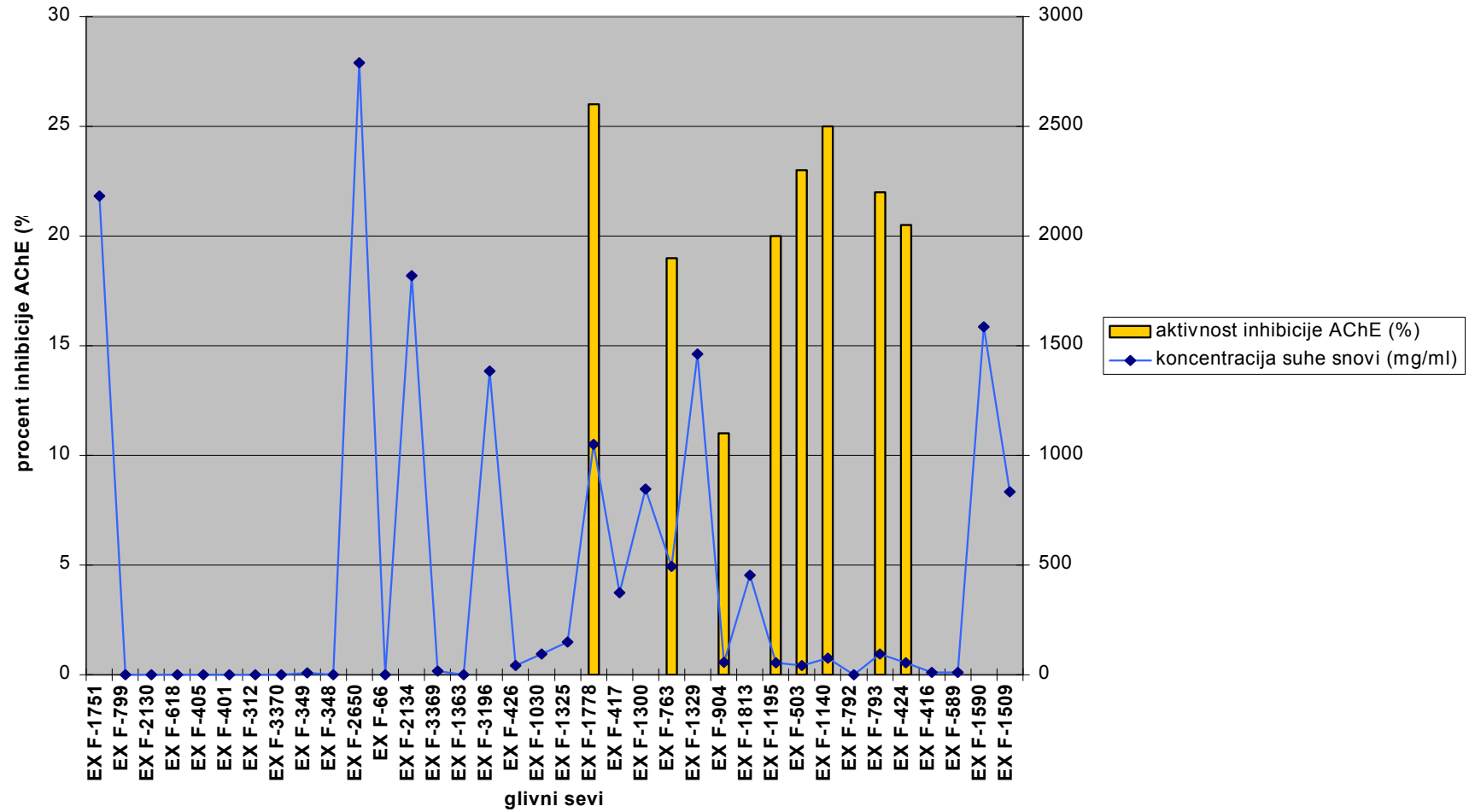
Penicillium expansum z oznako EXF 1195 (S.S: 55,6 mg/ml; AI: 20%);

Penicillium polonicum z oznako EXF 503 (S.S: 41,8 mg/ml; AI: 23%);

Penicillium polonicum z oznako EXF 1140 (S.S: 76,0 mg/ml; AI: 25%);

Penicillium antarcticum z oznako EXF 793 (S.S: 94,1 mg/ml; AI: 22%);

Penicillium sizovae z oznako EXF 424 (S.S: 53,9 mg/ml; AI: 20,5%).



Slika 12: Odstotek inhibicije encima acetilholinesteraze v kuhanih ekstraktih gliv, ki so rasle v razmerah z nizko temperaturo, v odvisnosti od koncentracije suhe snovi

4.5. REZULTATI HEMOLITIČNEGA TESTA

Hemoliza ni potekla pri nobenem vzorcu.

5. RAZPRAVA

Dognanja, da glive poseljujejo tudi ekstremna okolja, so precej nova. Šele leta 1997 so Gunde-Cimerman in sodelavci po vzorčenju različnih ekoloških niš v Sečoveljskih solinah ugotovili, da glive poseljujejo ekstremne habitate ter da je njihova diverziteteta tam presenetljivo visoka. Glive producirajo biološko aktivne metabolite, ki so za človeka izjemnega pomena, znanje o glivnih učinkovinah ima ogromno uporabno vrednost. Raziskave gliv iz ekstremnih habitatov in njihovih bioaktivnih učinkovin so zelo pomembne za razumevanje njihovih adaptacijskih mehanizmov, za preživetje v ekstremnih razmerah ter za uporabo gliv v industrijske namene (Bass, 2007). Podatki o do danes odkritih učinkovinah iz gliv, testiranih v tej nalogi, so prikazani v prilogi A.

Nas je zanimal predvsem vpliv ekološke niše na sintezo vodotopnih biološko aktivnih snovi v izbranih halofilnih in halotolerantnih glivah. Osredotočili smo se na dva ključna okoljska dejavnika: vodno aktivnost in temperaturo. Pripravili smo vodne ekstrakte izbranih gliv in testirali njihovo biološko aktivnost s štirimi izbranimi testi. Ker je verjetno, da metaboliti delujejo kot potencialni inhibitorji fizioloških procesov plena, predatorja ali kompetitorja (Haefner, 2003), smo pričakovali, da bomo s testiranjem bioloških aktivnosti vodnih ekstraktov halofilnih in halotolerantnih gliv tudi mi odkrili podobne ali nove bioaktivne učinkovine.

5.1. KONCENTRACIJA SUHE SNOVI IN PROTEINOV V EKSTRAKTIH

Zanimalo nas je, kako nizka temperatura in povišana koncentracija glukoze (Glc) vplivata na biomaso in koncentracijo proteinov v ekstraktih izbranih gliv. Naši rezultati so pokazali, da na različne koncentracije suhe snovi bolj vpliva dejstvo, ali so ekstrakti sveži ali kuhani, kot pa razmere gojenja. Izkazalo se je, da je najvišja vrednost koncentracije suhe snovi pri kuhanih vzorcih, kar je bilo proti pričakovanjem, saj bi praviloma morali sveži vzorci vsebovati več suhe snovi (na račun obarjanja proteinov pri kuhanju). Da je tako, se je pokazalo pri kontrolnem poskusu, kjer so imele koncentracije svežih vzorcev najvišje vrednosti, prav tak trend pa se je pokazal tudi pri glivah, gojenih pri povečani slanosti (Derlink, M. 2009). Ker smo kuhane ekstrakte pripravili tako, da smo mikrocentrifugirke

kuhali 10 minut v vreli vodi, je verjetno prišlo do izparevanja vode, zaradi česar rezultati odstopajo od pričakovanih. Pri Mateji Pustovrh, ki je delala z organskimi ekstrakti in je kot topili uporabljala aceton (manj polaren, dielektrična konstanta je 20,7) in metanol (bolj polaren, dielektrična konstanta je 33,6), so rezultati prav tako pokazali najvišje koncentracije suhe snovi v ekstraktih gliv, ki so rasle pri dodani glukozi, ter malo nižje koncentracije pri ekstraktih gliv, ki so rasle pri nizki temperaturi. Iz njenih rezultatov je lepo razvidno, da zmanjšana vodna aktivnost vpliva na povečano sintezo snovi, ki se ekstrahirajo z bolj polarnimi topili (metanol).

Iz Slik 3 in 4 je razvidna povprečna koncentracija suhe snovi v kuhanih in svežih ekstraktih glede na razmere rasti. Pri kontrolnem poskusu so koncentracije suhe snovi tako pri kuhanih kot pri svežih ekstraktih približno enake glede na to, kje so bile glive izolirane (Arktika, soline). Pri glivah, ki so rasle v razmerah povišane slanosti, je najvišja izmerjena koncentracija, tako za kuhane kot sveže ekstrakte, pri glivah, izoliranih iz solin, ter najnižja pri glivah, izoliranih iz Arktike. Pri glivah, ki so rasle v razmerah z nizko temperaturo, imajo najvišjo koncentracijo suhe snovi glive, izolirane iz Arktike, ter najnižjo tiste, ki so bile izolirane iz solin. To dokazuje, da so naravne razmere, v katerih živijo glive, res optimalne in jim omogočajo najvišji nivo sinteze lastnih metabolitov. Med glivami, ki so rasle v razmerah z dodano glukozo, imajo najvišjo koncentracijo suhe snovi glive, izolirane iz solin, ter najnižjo glive, izolirane iz Arktike. Ker je tako v slanem okolju kot v okolju z dodano glukozo vodna aktivnost znižana, lahko sklepamo, da v obeh okoljih živijo podobne vrste, ki so prilagojene na nizko vodno aktivnost.

Na splošno so za ekstrakcijo proteinov iz glivnega materiala pomembne rastne razmere in čas vzorčenja, saj so različni proteini prisotni v le določenem obdobju ravnega cikla. Rastni cikel filamentoznih gliv vključuje diferenciacijo in kompartmentizacijo. Posledica je, da so določeni proteini lahko prisotni samo v določenem času ravnega cikla, npr. pri sporulaciji ali avtolizi starejših gliv. V glivah se lahko pojavi močna aktivnost proteinaz, ki se lahko okrepi s staranjem kulture. Prisotnost ali odsotnost encimov med rastjo je lahko posledica indukcije ali represije s substratom. Nekateri glivni proteini so znotraj celic povezani s celično steno in membrano ter membranami organelov in jih zato z grobo

ekstrakcijo lahko izgubimo. Poleg tega je za ekstrakcijo proteinov iz filamentoznih gliv potrebno učinkovito razbitje celic, ki so zaščitene s celično steno (Bridge in sod., 2004).

Koncentracija proteinov je bila največja pri glivah, ki so rasle pri dodani glukozi. Sledi koncentracija proteinov gliv, ki so rasle pri nizki temperaturi, ter tistih, ki so rasle pri povečani koncentraciji soli. Najnižjo koncentracijo proteinov smo izmerili pri glivah, ki so rasle v kontrolnih razmerah. Rezultati tako nakazujejo, da znižana vodna aktivnost povzroči povečano produkcijo proteinov, kar glivi omogoči preživetje oz. lažjo prilagoditev na spremenjene okoljske razmere.

5.2. HEMAGLUTINACIJSKI TEST

Hemaglutinacija je potekla pri treh svežih ekstraktih. Dva ekstrakta sta bila dobljena iz sevov, ki sta rasla pri razmerah z nizko temperaturo, ter en ekstrakt iz seva, ki je rasel pri razmerah z dodano glukozo. Po redčenju aktivnih vzorcev za faktor 10 je ponovno aktivnost pokazal le sev, ki je rasel na gojišču z dodano glukozo, in sicer *Penicillium brevicompactum*. Rezultati Maje Derlink kažejo hemaglutinacijsko aktivnost le pri enem sevu, in sicer pri svežem ekstraktu vrste *Penicillium corylophilum*, ki je rasla pri povečani slanosti. Pri kontrolnem poskusu ni bilo zaznati hemaglutinacijske aktivnosti.

Ker pri kuhanih ekstraktih ni bilo hemaglutinacijske aktivnosti, lahko sklepamo, da so aktivne učinkovine verjetno glikoproteini lektini. Lektini so različna skupina biološko aktivnih proteinov neimunskega izvora, ki imajo vsaj eno domeno, s katero reverzibilno vežejo specifične ogljikove hidrate, ne da bi jih pri tem modificirali (Pohleven s sod., 2008). Mnogi so tesno zvitih globularni proteini in zato zelo odporni tudi na toplotno denaturacijo. Vsi lektini so tudi odporni na proteolizo, in so stabilni v širokem območju pH, tudi ko so izolirani iz svojega naravnega okolja. Najdemo jih v vseh živih bitjih, njihova vloga pa še zdaleč ni razjasnjena (Perillo s sod., 1998). Ker so bili aktivni le sevi, ki so rasli v razmerah povečane slanosti, dodane glukoze ali pri nizki temperaturi, je verjetno, da spremenjeno okolje spodbudi produkcijo snovi, ki zlepljajo celice.

5.3. HEMOLITIČNA AKTIVNOST

Hemolitični testi na glivah, ki sem jih testirala, niso dali pozitivnih rezultatov.

Hemolitični testi, ki jih je izvedla Maja (Derlink, 2009) na istih glivah, ki pa so rasle v drugačnih razmerah, so dali samo en pozitiven rezultat, in sicer se je hemolitična aktivnost pokazala pri svežem ekstraktu glive *Aspergillus fumigatus*, ki je bila gojena v razmerah z dodano soljo. Pri kuhanem vzorcu glive, ki je rasla na soli s približno enako količino suhe snovi, hemoliza ni potekla. Zato lahko predvidevamo, da je hemolitična učinkovina proteinskega izvora.

Rezultati hemolitičnega testa Mateje Pustovrh (Pustovrh M. 2010) na organskih ekstraktih istih gliv, ki so rasle pri dodani glukozi oz. pri nizki temperaturi, so pokazali, da je bilo aktivnih 86% ekstraktov. Iz tega bi lahko sklepali, da so snovi s hemolitično aktivnostjo nepolarne. Hemolitično aktivne snovi, ki se sintetizirajo v spremenjenih razmerah bi lahko nakazovale ekofiziološki pomen (Frisvad in sod., 2006), saj Matejini (Pustovrh, 2010) rezultati prikazujejo močno hemolitično aktivnost ekstraktov gliv, ki so rasle v spremenjenem okolju (z dodano glukozo in nizkimi temperaturami), medtem ko je aktivnost hemolize organskih ekstraktov gliv, ki so rasle pri dodani soli in kontrolnih razmerah, bistveno manjša, in sicer 59%.

5.4. PROTIBAKTERIJSKA AKTIVNOST

Rezultati testa protibakterijske aktivnosti so bili negativni. Rezultati testa Maje Derlink (Derlink, 2009) pa so pokazali inhibicijo rasti le po Gramu pozitivne bakterije *Bacillus subtilis*, medtem ko na vzorcih na ploščah s po Gramu negativno bakterijo *Escherichia coli* inhibicije niso zaznali. Protibakterijsko aktivnost so pokazali vodni ekstrakti naslednjih sevov: *Aspergillus fumigatus*, EX F-3381, *Eurotium amstelodami*, EX F-66, *Eurotium amstelodami*, EX F-2134, *Eurotium herbariorum*, EX F-3369, in *Penicillium brevicompactum*, EX F-417. Razlike med navedenimi in našimi rezultati so morda nastale zato, ker smo imeli za ta test premalo vzorca za določene seve, in sicer za *Eurotium herbariorum*, EX F-3369, ter *Penicillium brevicompactum*, EX F-417. Test protibakterijske aktivnosti je bil prav tako pozitiven pri ekstraktih Mateje Pustovrh (Pustovrh, 2010). Rast po Gramu pozitivne bakterije *Bacillus subtilis* je inhibiralo 100%

acetonskih in 97% metanolnih ekstraktov, rast po Gramu negativne bakterije *Escherichia coli* pa je inhibiralo 53% acetonskih in 44% metanolnih ekstraktov.

Inhibicija rasti z nepolarnimi ekstrakti je bila torej pogostejša pri Gram pozitivnih bakterijah. Sklepamo lahko, da ekstrahirane učinkovine selektivno delujejo na bakterije. Biološko aktivne snovi testiranih gliv, ki bi bile morda lahko odgovorne za inhibicijo rasti bakterije *B. subtilis*, so opisane v prilogi A.

5.5. TEST INHIBICIJE ACETILHOLINESTERAZE

Šibko aktivnih je bilo 12 sevov, od tega 9 takih, pri katerih je bil aktiven le po en vzorec. Med sevi, ki so rasli na gojišču z glukozo je bilo aktivnih 7, med tistimi, ki so rasli pri nizkih temperaturah, pa 8. Aktivni so bili v glavnem kuhani ekstrakti (14), pa tudi 2 sveža. Izpostavimo lahko 3 seve: sev *Penicillium polonicum*, EX F-1140, kjer sta bila aktivna oba vzorca, ki sta rasla pri nizkih temperaturah (sveži in kuhani), ter samo kuhani vzorec glive, ki je rasla na gojišču z dodano glukozo sev *Penicillium chrysogenum*, EX F-1030, pri katerem sta bila aktivna oba vzorca, ki sta rasla na gojišču z dodano glukozo (sveži in kuhani); sev *Penicillium antarcticum*, EX F-793, kjer sta bila aktivna kuhana ekstrakta (glive, ki je rasla pri nizki temperaturi, ter glive, ki je rasla pri dodani glukozii). Stopnja inhibicije AChE v nobenem primeru ni bila pretirano visoka, zato je možno, da gre namesto za pravo inhibicijo le za nespecifične učinke. Pri rezultatih Maje Derlink se je pokazalo, da je od 12 aktivnih sevov 9 takih, ki so rasli na gojiščih s povečano slanostjo. eva *Penicillium chrysogenum*, EX F-1030, in *Aspergillus niger*, EX F-799, sta pokazala aktivnost tako na gojišču s soljo kot tudi na gojišču z dodano glukozo. Sveži ekstrakt seva *Eurotium repens*, EX F-2132 je pokazal aktivnost samo na gojišču brez soli, sveži in kuhani ekstrakti sevov *Eurotium amstelodami*, EX F-2134, ter *Eurotium herbariorum*, EX F-3369, pa so pokazali aktivnost na gojišču brez in s soljo. Sevi, ki so inhibirali encim AChE tudi v organskih ekstraktih (Pustovrh, 2010), so *Penicillium polonicum*, EX F-503 (acetonski ekstrakt seva, gojenega pri nizki temperaturi), *Penicillium crustosum*, EX F-763 (acetonski ekstrakt seva, ki smo ga gojili na gojišču z dodano glukozo. *Penicillium antarcticum*, EX F-793 (metanolni ekstrakt seva, gojenega pri nizki temperaturi), ter *Penicillium expansum*, EX F-1195 (acetonski ekstrakt seva, gojenega na gojišču z dodano

glukozo, in metanolna ekstrakta sevov, gojenih v razmerah povišane slanosti ter nizke temperature).

Poročil o inhibiciji AChE v morskih izolatih teh rodov nismo našli (priloga A). Talni izolati rodov *Penicillium* in *Aspergillus* ter izolati endofitskih gliv rodu *Penicillium* pa so že prepoznani kot potencialni vir novih učinkovin s sposobnostjo inhibicije acetilholinesteraze (Kuno in sod., 1996, Rodrigues in sod., 2005, Yoo in sod., 2005).

6. SKLEPI

- Znižana vodna aktivnost povzroči povečano produkcijo proteinov in ostalih vodotopnih snovi, kar glivi verjetno omogoči preživetje oz. lažjo prilagoditev na spremenjene okoljske razmere.

- Ekstremno okolje spodbudi produkcijo snovi, ki zlepljajo celice.

- V organskih ekstraktih testiranih gliv je bilo odkritih več biološko aktivnih metabolitov kot pri vodnih ekstraktih, kar pomeni, da so le-ti večinoma nepolarni.

- Dodatek 30% Glc na definiranem gojišču YNB je pospešil rast glivnih kultur bolj, kot so ga nizke temperature. Ravno tako so bile na gojiščih z dodano 30% Glc koncentracije suhe snovi in proteinov višje od koncentracij, dobljenih iz ekstraktov gliv, ki so rasle na gojišču z nizko temperaturo.

- Inhibicijo encima acetilholinesteraze so pokazale vrste *Aspergillus niger*, *Penicillium antarcticum*, *Penicillium brevicompactum*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium corylophylum*, *Penicillium crustosum*, *Penicillium expansum*, *Penicillium nordicum*, *Penicillium polonicum*, *Penicillium sizoviae*.

- Hemolitičen ni bil noben ekstrakt.

- Večina sevov z biološko aktivnostjo je bila izolirana iz solin.

- Dvojno aktivnost v bioloških testih sta pokazali vrsti: *Penicillium antarcticum* in *Penicillium brevicompactum* (inhibicija AChE in hemaglutinacija). Kvasovki *Debaryomyces hansenii* in *Metschnikowia bicuspidata* nista pokazali nobene biološke aktivnosti.

7. POVZETEK

Nedavno je bilo odkrito, da glive uspevajo v ekstremno slanih okoljih. V naravnih solinah je bila opisana velika diverzitetna vrsta. Opisane so bile tako halotolerantne vrste, ki za preživetje sicer ne potrebujejo soli, so se pa sposobne prilagoditi na širok razpon koncentracij soli in v takšnem okolju uspešno preživijo, kot tudi halofilne vrste, ki pa so bolj uspešne prav v slanem okolju. Glive sintetizirajo bogat spekter različnih spojin, ki kažejo vrsto zanimivih bioloških učinkov. Še ne dolgo nazaj se je izkazalo, da imajo halofilne in halotolerantne glive tudi sposobnost proizvodnje potencialno zanimivih sekundarnih metabolitov, in prav zaradi tega so glive iz ekstremnih okolij pomembne za proučevanje, saj predstavljajo še neraziskan vir biološko aktivnih snovi, ki bi jih lahko s pridom izkoristili.

V tej nalogi smo se ukvarjali z iskanjem potencialno zanimivih biološko aktivnih vodotopnih snovi iz nekaterih izbranih halofilnih in halotolerantnih gliv. Testirali smo 38 sevov gliv, ki so bili izolirani predvsem iz različnih okolij Arktike in solin. Izbrane glive smo gojili na trdnih gojiščih z dodatkom 30% glukoze ter na trdnih gojiščih pri nizki temperaturi in nato pripravili vodne ekstrakte. Izmerili smo hemolitično in hemaglutinacijsko aktivnost, inhibicijo encima acetilholinesteraze in ugotavljali protibakterijsko aktivnost. Ker visoka koncentracija topljenca (npr. soli ali sladkorja) in nizke temperature nižajo vodno aktivnost v okolju, smo želeli ugotoviti, kako različne ekstremne razmere in znižana vodna aktivnost vplivajo na rast gliv ter na produkcijo sekundarnih metabolitov, s prekuhavanjem vodnih ekstraktov pa smo ugotavljali, ali so biološko aktivne snovi beljakovinskega izvora

Pridobljene rezultate smo primerjali z rezultati biološko aktivnih vodnih ekstraktov gliv, ki so rasle v kontrolnih razmerah, v razmerah z dodano soljo ter z že objavljenimi podatki s področja kemije naravnih substanc iz izbranih gliv. Pričakovali smo, da bomo našli potencialno zanimive in še neopisane biološke učinkovine, glede na slabo raziskanost tega področja.

Izkazalo se je, da dodatek 30% Glc na definiranem gojišču YNB bolj pospeši rast glivnih kultur kot nizke temperature. Ugotovili smo tudi, da znižana vodna aktivnost povzroči povečano produkcijo proteinov in ostalih vodotopnih snovi, saj so glive, ki so rasle pri razmerah z dodano glukozo, vsebovale največje koncentracije proteinov, le tem pa so sledile koncentracije proteinov, ekstrahiranih iz sevov, ki so rasli pri nizkih temperaturah. Prav tako se je izkazalo, da ekstremno okolje spodbudi produkcijo snovi, ki zlepjajo celice. Kljub nekaterim pozitivnim rezultatom so vodni ekstrakti izbranih gliv vsebovali manj biološko aktivnih snovi kot njihovi organski ekstrakti, kar pomeni, da so te snovi večinoma napolarne. Sklepamo, da biološko aktivnih sekundarnih metabolitov glive ne izločajo, ampak jih najverjetneje kopičijo v membrani. Inhibicijo encima acetilholinesteraze so pokazale vrste *Aspergillus niger*, *Penicillium antarcticum*, *Penicillium brevicompactum*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium corylophylum*, *Penicillium crustosum*, *Penicillium expansum*, *Penicillium nordicum*, *Penicillium polonicum* ter *Penicillium sizoviae*. Hemolitičen ni bil noben ekstrakt, dvojno aktivnost (inhibicija AChE in hemaglutinacija) v bioloških testih pa sta pokazali vrsti *Penicillium antarcticum* in *Penicillium brevicompactum*.

Opazili smo, da je bila večina sevov z biološko aktivnostjo izolirana iz solin. Kvasovki *Debaryomyces hansenii* in *Metschnikowia bicuspidata* nista pokazali biološke aktivnosti.

8. VIRI

Bass D., Howe A., Brown N., Barton H., Demidova M., Michelle H., Li L., Sanders H., Watkinson S.C., Willcock S., Richards T.A. 2007. Yeast forms dominate fungal diversity in the deep oceans. *Proc. Biol. Sci.* 274: 3069-77

Bennett J.W., Klich M. 2003. Mycotoxins. *Clinical microbiology reviews*, 16, 3: 497-516

Bhadury P., Mohammad B.T., Wright P.C. 2006. The current status of natural products from marine fungi and their potential as anti-infective agents. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 33, 5: 325-337

Blackwell, Meredith, Rytas Vilgalys, Timothy Y. James, and John W. Taylor. 2009. Fungi. Eumycota: mushrooms, sac fungi, yeast, molds, rusts, smuts, etc.. Version 10 April 2009. <http://tolweb.org/Fungi/2377/2009.04.10> in The Tree of Life Web Project, <http://tolweb.org/>

Bridge P.D., Kokubun T., Simmonds M.S.J. 2004. Protein extraction from fungi.V: Protein purification protocols. Cutler P. (ur.) Totowa, Humana Press: 484 str.

Bugni T.S., Ireland C.M. 2004. Marine derived fungi: a chemically and biologically diverse group of microorganisms. *Natural Product Reports*, 21:143-163

Calvo A.M., Wilson R.A., Bok J.W., Keller N.K. 2002. Relationship between Secondary Metabolism and Fungal Development. *Microbiology and molecular biology reviews*, 66, 3: 447-459

Campbell N. A., Reece J. B. 2002. *Biology*. 6. Izdaja. San Francisco. Kalifornija. Pearson Education. Inc.: 1247 str

De Hoog G.S., Guarro J., Gené J., Figueras M.J. 2000. *Atlas of Clinical Fungi*. 2. izdaja. Utrecht, Centraalbureau voor Schimmelcultures: 1160 str.

Derlink M. 2009. "Biološko aktivne snovi v vodnih ekstraktih nekaterih halofilnih in halotolerantnih gliv" maja.derlink@nib.si (osebni vir, 22.09.2010)

Eaton R.A., Hale M.D.C. 1993. Wood - decay, pests and protection. London, Chapman and Hall: 554

Fox E.M., Howlett B.J. 2008. Secondary metabolism: regulation and role in fungal biology. *Current Opinion in Microbiology*, 11: 481-487

Frisvad J.C. 2005. Halotolerant and Halophilic Fungi and their Extracellular Production. V: *Adaptation to Life at High Salt Concentrations in Archaea, Bacteria, and Eukarya*. Gunde-Cimerman N., Oren A., Plemenitaš A. (ur.). Nizozemska, Springer: 425-439

Frisvad J.C., Larsen T.O., Dalsgaard P.W., Seifert K.A., Louis-Seize G., Lyhne E.K., Jarvis B.B., Fettinger J.C. and Overy D.P. (2006) Four psychrotolerant species with high chemical diversity consistently producing cycloaspeptide A, *Penicillium jamesonlandense* sp. nov., *Penicillium ribium* sp. nov., *Penicillium soppii* and *Penicillium lanosum*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 56, pp 1427-1437.

Gunde-Cimerman N., Zalar P., Cimerman A. 1997. Diversity of fungal community in high salt marine environments. *Proceedings Int. Symp. Environ. Biotech. (ISEB)*, Oostende, 189-191

Gunde-Cimerman N., Zalar P., de Hoog G.S., Plemenitaš A. 2000. Hypersaline water in salterns - natural ecological niches for halophilic black yeasts. *Fems Microbiology Ecology* 32, 235-240

Gunde-Cimerman N., Cerovac S., Zalar P. 2001. Biotska pestrost gliv Sečoveljskih solin. *Acta biologica Slovenica*, 44,1-2: 25-30

Gunde-Cimerman N., Frisvad J.C., Zalar P., Plemenitaš A. 2005. Halotolerant and halophilic fungi. V: The biodiversity of fungi: Their Role in Human Life. Deshmukh S.K., Rai M.K. (ur.). New Delhi, Oxford & IBH Publishing Cp. Pvt. Ltd.: 69-127

Haefner B. 2003. Drugs from the deep: marine natural products as drug candidates. *Drug Discovery Today*, 8, 12: 536-544

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., Schuëbler 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, pp 509 -547.

Horvat M. 2009. “ Vpliv glukoze in temperature na podukcijo biološko aktivnih snovi v organskih ekstraktih nekaterih halofilnih in halotolerantnih gliv iz rodu Dothideales in izbranih kvasovk” mojcka.horvat@gmail.com (osebni vir, 27.maj 2009)

Jens C. Frisvad, Birgitte Andersen and Ulf Thrane. The use of secondary metabolite profiling in chemotaxonomy of filamentous fungi. 2007. Center for Microbial Biotechnology, BioCentrum-DTU, Søtofts Plads, Building 221, Technical University of Denmark, DK-2800 Kgs. Lyngby, Denmark.

http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B7XMR-4PJM9W3-8&_user=10&_coverDate=02%2F29%2F2008&_alid=1594805974&_rdoc=8&_fmt=high

&_orig=search&_origin=search&_zone=rslt_list_item&_cdi=29677&_sort=r&_st=13&_docanchor=&view=c&_ct=15405&_acct=C000050221&_version=1&_urlVersion=0&_userid=10&md5=9609038e65355e56a1ac919b7c1181fb&searchtype=a

(marec 2010)

Jogan N. 2001. Navodila za vaje iz sistematske botanike. 3. Izdaja delovne verzije. Ljubljana: 25

Kuno F., Otaguro K., Shiomi K., Iwai Y., Omura S. 1996. Arisugacin A and B, novel and selective acetylcholinesterase inhibitors from *Penicillium* sp. FO-4259. *Journal of Antibiotics*, 49, 742-747

Mayer A.M.S., Lehmann V.K.B. 2000. Marine pharmacology. *The Pharmacologist*, 42, 2: 62-69

Perillo N.L., Marcus M.E., Baum L.G. 1998. Galectins: versatile modulators of cell adhesion, cell proliferation and cell death. *J mol med.* Vol 76, (6): 402-412

Petauer T. 1993. Leksikon rastlinskih bogastev. 1. izdaja. Ljubljana, Tehniška založba Slovenije: 233str.

Pitt, J.I. and Hocking, A.D. (1985) *Fungi and Food Spoilage*, 1st edn. Academic Press, Sydney.

Pohleven J., Obermajer N., Sabotič J., Anžlovar S., Sepčič K., Koj J., Kralj B., Štrukelj B., Brzin J. 2008. Purification, characterization and cloning of ricin B-like lectin from mushroom *Clitocybe nebularis* with antiproliferative activity against human leukemic T cells. *Biochimica et Biophysica Acta* 1790 (2009): 173-181

Proksch P., Edrada R.A., Ebel R. 2002. Drugs from the sea - current status and microbiological implications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59, 2,3: 125-134

Pustovrh M. 2010. "Vpliv glukoze in temperature na produkcijo biološko aktivnih snovi v organskih ekstraktih nekaterih halofilnih in halotolerantnih gliv" matejapustovrh@gmail.com (osebni vir, 6.maj 2010)

Rodrigues K.F., Costa G.L, Carvalho M.P., Epifanio R.A. 2005. Evaluation of extracts produced by some tropical fungi as potential cholinesterase inhibitors. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21:1617–1621

Saleem M., Shaiq Ali M., Hussain S., Jabbar A., Ashraf M., Lee Y.S. 2007. Marine natural products of fungal origin. *Natural Product Reports*, 24, 1142-1152

Sonjak S. 2006. Biološka raznovrstnost rodu *Penicillium* v ledeniškem ledu Arktike (Svalbard) in genomska variabilnost najpogostejše vrste *P.crustosum*: doktorska disertacija. Ljubljana.

Yoo I., Cho K., Lee C., Kim W. 2005. Isoterreulactone A, a novel meroterpenoid with anti-acetylcholinesterase activity produced by *Aspergillus terreus*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 15, 353-356

ZAHVALA

Moja diplomska naloga je plod mojega dela ter ogromno pomoči, dobronamernih nasvetov, koristnih popravkov ter spodbujanja s strani drugih.

Zahvalila bi se sošolki in prijateljici Mateji Pustovrh, s katero sva sočasno opravljali laboratorijsko delo najnih diplomskih nalog, si pomagali in se spodbujali.

Zahvaljujem se tudi dr. Poloni Zalar, ter vsem ostalim, ki so me vodili pri delu v laboratoriju ter svoje znanje, nasvete in pomoč delili z mano.

Posebna zahvala gre somentorici prof.dr. Kristini Sepčič, za vse spodbudne besede s katerimi me je spremljala čez celotno nastajane diplomske naloge, za strokovno pomoč in bdenje nad mojim napredkom, kljub temu, da je na porodniškem dopustu.

Zahvaljujem se tudi mentorici prof.dr. Nini Gunde-Cimerman za pregled diplomskega dela, dodatne koristne nasvete ter posojeno literaturo.

Prof. Jerneji Avguštin Ambrožič se zahvaljujem za zelo skrbno končno recenzijo diplomske naloge, za pomoč pri strokovnem izražanju, ter za nasvete, s katerimi je moja diplomsko delo postalo še boljše.

Nenazadnje gre ogromna zahvala vsem mojim bližnjim, mami, očetu, sestri Evi in fantu Urošu, za vsako spodbudno besedo in za vsako dobro namero "brco v rit", ko sem jo potrebovala.

Hvala tudi prijateljem Nives, Katji, Barbari in ostalim sošolkam, ki so me spodbujale, mirile, podpirale in z mano delile svoje izkušnje "diplomiranja", zahvaljujem pa se tudi Andreju za pomoč pri oblikovanju diplome, saj bi mi brez tvoje pomoči Word še nekaj časa delal preglavice.

PRILOGA A: PREGLED NARAVNIH PRODUKTOV OBRAVNAVANIH RODOV GLIV, IZOLIRANIH IZ MORJA

Ime mikroorganizma	Učinkovina	Vrsta molekule	Aktivnost	Referenca
<i>Aspergillus</i> sp.	Aspermitin A	Poliketid	Inducira rast nevrinov v podganjih feokromocitomskih celicah	Tsukamoto, S. in sod. <i>Bioorg. Med.Chem. Lett.</i> , 2004, 14 , 417 (v Blunt, J.W. in sod. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2006, 23 , 26-78)
<i>Aspergillus</i> sp.	Golmenon	Diketopiperazinski alkaloid	Antioksidant, lovilec radikalov	Li, Y. in sod. <i>Chem. Pharm. Bull.</i> , 2004, 52 , 375 (v Blunt, J.W. in sod. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2006, 23 , 26-78)
<i>Aspergillus</i> sp.	Himeične kisline A-C		Himeična kislina A inhibira ubikvitinsko aktivacijo encima E1	Tsukamoto, S. in sod. <i>Bioorg. Med. Chem. Lett.</i> , 2005, 15 , 191 (v Blunt, J.W. in sod. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2007, 24 , 31-86)
<i>Aspergillus</i> sp.	(+)-Epoksidon (+)-Epoksidon monoacetat Gentzil alkohol 3-Klorogentzil alkohol Metilhidrokinon	Poliketidi	Protibakterijska aktivnost proti MRSA (methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> in MDRSA (multi-drug-resistant <i>S.aureus</i>) Lovilec radikalov, antioksidant	Closse, A. in sod. <i>Helv. Chim. Acta</i> , 1965, 49 , 204 Assante, G. in sod. <i>Phytopathol. Mediterr.</i> , 1980, 19 , 163 Sequin-Frey, M. in Tamm, C. <i>Helv. Chim. Acta</i> , 1971, 54 , 851. Burnett, A.R. in Thomson, R.H. <i>J. Chem. Soc. C</i> , 1968, 857. Li, Y in sod. <i>Nat. Prod. Sci.</i> , 2005, 11 , 136. (vsi članki v Blunt, J.W. in sod. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2007, 24 , 31-86)
<i>Aspergillus</i> sp.	Aspergilamid A Aspergilamid B	Tripeptid	Citotoksičnost	Toske, S.G. in sod. <i>Tetrahedron</i> , 1998, 54 , 13459 (v Faulkner, D.J. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2000, 17 , 7-55)
<i>Aspergillus</i> sp.	Maktanamid	Diketopiperazin	Fungistatično učinkovanje	Lorenz, P. <i>Nat. Prod. Lett.</i> , 1998, 12 , 55 (v Faulkner, DJ <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2000, 17 , 7-55)
<i>Aspergillus</i> sp.	Aspergiloksid	Sesterterpenski epoksi-diol		Cueto, M. in sod. <i>Org. Lett.</i> , 2002, 4 , 1583 (v Blunt, J.W. in sod. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2004, 21 , 1-49)
<i>Aspergillus</i> sp.	Asperiamid A	Cerebrozid		Ouyang MA <i>J. Asian Nat. Prod. Res.</i> , 2005, 7 , 761 (v Blunt, J.W. in sod. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2007, 24 , 31-86)
<i>Aspergillus</i> sp.	Tropolaktoni A-D	Meroterpenoidi	Tropolaktona A in C sta	Cueto, M. in sod. <i>Phytochemistry</i> , 2006, 67 , 1826 (v Blunt, J.W. in sod. <i>Nat.</i>

			šibko citotoksična proti HCT-116 celicam	<i>Prod. Rep.</i> , 2008, 25 , 35-94)
<i>Aspergillus</i> sp.	Dimetil 2, 3 - dimetilozoat		Citotoksičen za humani kronični mieloični levkemiji (celični liniji K5672) preko blokade S-faze in apoptoze	Liu, R. in sod. <i>J. Antibiot.</i> , 2006, 59 , 362 (v Blunt, J.W. in sod. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2008, 25 , 35-94)
<i>Aspergillus</i> sp.	Dehidrosiklorofusarielin B	Polioksigenatni dekalinski derivat	Zmerna aktivnost proti <i>Staphylococcus aureus</i> , MRSA in MDRSA	Kobayashi, H. in sod. <i>J. Antibiot.</i> , 1995, 48 , 42 Nguyen, H.P. in sod., <i>J. Nat. Prod.</i> , 2007, 70 , 1188 (v Blunt, J.W. in sod. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2009, 26 , 170-244)
	Fusarielin A (znan) Fusarielin B (znan)			
<i>Aspergillus</i> sp.	Notoamidi A-D	Dvojno prenilirani indolni alkaloidi	Zmerna citotoksičnost (proti HeLa in L1210 celicam)	Kato, H. in sod. <i>Angew. Chem., Int. Ed.</i> , 2007, 46 , 2254 (v Blunt, J.W. in sod. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2009, 26 , 170-244)
<i>Aspergillus candidus</i>	Prenilterfenilin 4``-Deoksiprenilterfenilin 4``-Deoksiizoterprenin 4``-Deoksiterprenin (znan)		Citotoksični za človeške epidermalne rakave KB (KB3-1) celice	Wei, H. in sod. <i>J. Antibiot.</i> , 2007, 60 , 586 (v Blunt, J.W. in sod. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2009, 26 , 170-244)
<i>Aspergillus carbonarius</i>	Karbonaron A Karbonaron B		Zmerna citotoksičnost (K562)	Zhang, Y. in sod. <i>J. Antibiot.</i> , 2007, 60 , 153 (v Blunt, JW in sod. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2009, 26 , 170-244)

<i>Aspergillus carneus</i>	Aspergicini A–E	Depsipeptidi	Citotoksičnost proti nematodu <i>Haemonchus contortus</i>	Capon, R.J. in sod. <i>Org. Biomol. Chem.</i> , 2003, 1 , 1856. (v Blunt, J.W. in sod. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2005, 22 , 15-61)
<i>Aspergillus glaucus</i>	Aspergiolid A	Antrakinonski derivat	Citotoksičen proti vrsti sesalskih celičnih linijah	Du, L. in sod., <i>Tetrahedron</i> , 2007, 63 , 1085 (v Blunt, J.W. in sod. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2009, 26 , 170–244)
<i>Aspergillus flavus</i>	Piron 87	Derivat 5-hidroksi-2-pirona	Inducira produkcijo cikličnega adenazin monofosfata v transfeciranih celicah CHO in HEK293.	(v Blunt J.W. in sod. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2010, 27 , 165–237)
<i>Aspergillus flavipes</i>	Flavicerebrozid A Flavicerebrozid B	Cerebrozidni analogi	Aktivnost proti KB celični liniji	Jiang, T. in sod. <i>J. Asian Nat. Prod. Res.</i> , 2004, 6 , 249. (v Blunt, JW in sod. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2006, 23 , 26-78)
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Fumikvinazolini A-C		Zmerna citotoksičnost	Numata, A. in sod. <i>Tetrahedron Lett.</i> , 1992, 33 , 1621 (v Faulkner, DJ <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 1994-)
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Fumikvinazolini D-G	Alkaloid		Numata, A. in sod. <i>Tetrahedron Lett.</i> , 1992, 33 , 1621 (v Faulkner, D.J. <i>Nat. Prod. Rep.</i>)
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Fumitremorgin B	Alkaloid	Delujejo proti nekaterim rakastim celicam	(v Blunt J.W. in sod. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2010, 27 , 165–237)
	spirotrprostatin C–E 90–92			
	and 13- oksiverukulogen 95			
<i>Aspergillus fumigatus</i> BM 939	Triprostatin A Triprostatin B	Diketopiperazin	Citotoksičnost	Cui, C.B. in sod. <i>J. Antibiot.</i> , 1995, 48 , 1382 Depew, K.M. <i>J. Am. Chem. Soc.</i> , 1996, 118 , 12463 (v Faulkner, D.J. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 1999, 16 , 155-198)
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Triptokvivaline J			Yamazaki, M. <i>Chem. Pharm. Bull.</i> , 1978, 26 , 111. (v Blunt, J.W. in sod. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2007, 24 , 31-86)
<i>Aspergillus fumigatus</i>	11-O-Metilpseurotin A		Selektivna inhibicija Hofl seva kvasovke <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Boot, C.M. in sod. <i>J. Nat. Prod.</i> , 2007, 70 , 1672 (v Blunt, JW in sod. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2009, 26 , 170–244)
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Cefalimizin A		Opazna citotoksičnost (proti P388 in HL-60 celicam)	Yamada, T. in sod. <i>Tetrahedron Lett.</i> , 2007, 48 , 6294 (v Blunt, J.W. in sod. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2009, 26 , 170–244)

<i>Aspergillus insulicola</i>	Insulikolid	Nitrobenzoiloksi - substituiran sesterterpen		Rahbæk, L. <i>J. Nat. Prod.</i> , 1997, 60 , 811 (v Faulkner, D.J. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 1999, 16 , 155-198)
<i>Aspergillus niger</i>	Asperazin	Dimerni diketopiperazinski alkaloid	Citotoksičnost	Varoglu, M. <i>J. Org. Chem.</i> , 1997, 62 , 7078 (v Faulkner, D.J. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 1999, 16 , 155-198)
<i>Aspergillus niger</i>	Asperinska kislina			Varoglu, M. in Crews, P. <i>J. Nat. Prod.</i> 2000, 63 , 41 (v Faulkner, D.J. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2002, 19 , 1-48)
<i>Aspergillus niger</i>	Janutoni A-E 1-hidroksi januton A 1-hidroksi januton C 22-deacetiljanuton A	Meroterpenoidi		Bugni, T.S. in sod. <i>J. Org. Chem.</i> , 2000, 65 , 7195 (v Faulkner, D.J. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2002, 19 , 1-48)
<i>Aspergillus niger</i>	Nafuredin		Inhibitor anaerobnega elektronskega transporta (inhibitor NADH fumarat -reduktaze)	Ohta, E. in sod. <i>Tetrahedron</i> , 2001, 57 , 8463 (v Blunt, J.W. in sod. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2003, 20 , 1-48)
<i>Aspergillus niger</i>		Diketopiperazinski dimer		Ovenden, S.P.B. in sod. <i>J. Nat. Prod.</i> , 2004, 67 , 2093 (v Blunt, J.W. in sod. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2006, 23 , 26-78)
<i>Aspergillus niger</i>	Averufin132 Nidurufin133	Aflatoksina	Inhibicija množenja tobačnega mozaičnega virusa	(v Blunt J.W. in sod. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2010, 27 , 165-237)
<i>Aspergillus niger</i>	Bikumanigrin			Jagers, E. in sod. <i>Z. Naturforsch., B: Chem. Sci.</i> , 1987, 42 , 1354;
	Aspernigrin A Aspernigrin B	4-benzil-1Hpiridin- 6-on derivati	Aspernigrin B je močno živčno zaščitno sredstvo	Jagers, E. in sod. <i>Z. Naturforsch., B: Chem. Sci.</i> , 1987, 42 , 1349; Hiort, J. in sod. <i>J. Nat. Prod.</i> , 2004, 67 , 1532
	Piranonigrini A-D			(v Blunt, J.W. in sod. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2006, 23 , 26-78)

	Cikloleukomelon		Citotoksičen <i>in vitro</i> proti celičnim linijam humanega raka	
<i>Aspergillus niger</i>	Nigerasperoni A–C	Nafto- γ -pironi	Nigerasperon C ₂ šibka aktivnost proti glivi <i>Candida albicans</i> in zmerna antioksidacijska aktivnost	Zhang, Y. in sod. <i>J. Antibiot.</i> , 2007, 60 , 204 (v Blunt, J.W. in sod. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2009, 26 , 170–244)
	Asperamid A Asperamid B	Sfingolipidi	Asperamid A in naftokvinoneimin ₂ zmerno aktivna proti glivi <i>Candida albicans</i>	
	Ergosterimid	Naravni Diels–Alder adukt ergosteroida in maleimida		
	Naftokvinoneimin			
<i>Aspergillus ochraceus</i>	Cirkumdatin G	Alkaloid		He, H. in sod. <i>J. Am. Chem. Soc.</i> , 2001, 123 , 5362 (v Blunt, J.W. in sod. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2003, 20 , 1–48)
<i>Aspergillus cf. ochraceus</i>	Klorokarolid A Klorokarolid B	Kloriran poliketid		Abrell, L.M. <i>Tetrahedron Lett.</i> , 1996, 37 , 2331 (v Faulkner, D.J. <i>Nat. Prod. Rep.</i>)
<i>Aspergillus ostianus</i>	2 Asperlaktonska derivata	Klorirani antibiotiki	Inhibicija rasti bakterij <i>Ruegeria atlantica</i> , <i>Escherichia coli</i> in <i>Staphylococcus aureus</i>	Namikoshi, M. in sod. <i>J. Antibiot.</i> , 2003, 56 , 755 (v Blunt, J.W. in sod. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2005, 22 , 15–61)
	Aspironski derivat			
<i>Aspergillus ostianus</i>	Aspinotriol A Aspinotriol B Aspinonediol	Pentaketidi		Fuchser, J. in Zeeck, A. <i>Liebigs Annalen/Recueil</i> , 1997, 87 Kito, K. in sod., <i>J. Nat. Prod.</i> , 2007, 70 , 2022. (v Blunt, J.W. in sod. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2009, 26 , 170–244)
<i>Aspergillus parasiticus</i>	Parasitenon	Gabozinski derivat		Son, B.W. in sod. <i>J. Nat. Prod.</i> , 2002, 65 , 794 (v Blunt, J.W. in sod. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2004, 21, 1–49)
<i>Aspergillus pseudodeflectus</i>	Psevdodeflektuzin	Isokroman	Citotoksičen za celične linije humanega raka	Ogawa, A. in sod. <i>Bioorg. Med. Chem. Lett.</i> , 2004, 14 , 3539 (v Blunt, J.W. in sod. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2006, 23 , 26–78)
<i>Aspergillus</i>	Sidovin A	Ciklopentanoida		Teuscher, F. in sod. <i>Nat. Prod. Commun.</i> , 2006, 1 , 927 (v Blunt, J.W. in sod.

<i>sydowii</i>	Sidovin B			<i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2008, 25 , 35-94)
<i>Aspergillus tamarii</i>	Speradin A	Pentaciklični oksindolni alkaloid	Inhibitorna aktivnost proti histonski deacetilazi in antibakterijska aktivnost proti bakteriji <i>Micrococcus luteus</i>	Tsuda, M. in sod. <i>Tetrahedron</i> , 2003, 59 , 3227 (v Blunt, J.W. in sod. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2005, 22 , 15-61)
<i>Aspergillus terreus</i>	Tereusinon	Kiralni dipirolbenzokinonski derivat		Lee, S.M. in sod. <i>Tetrahedron Lett.</i> , 2003, 44 , 7707 (v Blunt, J.W. in sod. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2005, 22 , 15-61)
<i>Aspergillus varians</i>	Patulin 4- <i>epi</i> -izomer patulina		Aktivnost proti morski mu ježku <i>Strongylocentrus intermedius</i> , citotoksični za zarodke in spermatoksični	Waksman, S.A. in sod. <i>Science</i> , 1942, 96 , 202 Tatsuta, K. in sod. <i>J. Antibiot.</i> , 1974, 27 , 579 Smetanina, O.F. in sod. <i>Chem. Nat. Compd.</i> , 2005, 41 , 243 (v Blunt, J.W. in sod. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2007, 24 , 31-86)
<i>Aspergillus versicolor</i>	9 α , 14-dihidroksi-6 β -p-nitrobenzoilcinamolid	Štirje sesterterpenski nitrobenzoilni estri	Močna citotoksičnost za celične linije HCT-116 in zmerna selektivna citotoksičnost za renalne tumorske celične linije	Belofsky, G.N. In sod. <i>Tetrahedron</i> , 1998, 54 , 7335 (v Faulkner, D.J. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2000, 17 , 7-55)
<i>Aspergillus versicolor</i>	Aspergioni A–F	Šest kromonskih derivatov		Lin, W.H. in sod. <i>Chin. Chem. Lett.</i> , 2001, 12 , 235 (v Blunt, J.W. in sod. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2003, 20 , 1-48)
	Aspergilon Aspergilodiol Aspergilol 12-Acetilaspergilol			
<i>Emericella</i> sp. gojena v kulturi z aktinomyceto <i>Salinispora arenicola</i>	Emericelamid A Emericelamid B	Ciklična depsipeptida	Šibka aktivnost proti na MRSA, šibka citotoksičnost	Oh, D.C. in sod. <i>J. Nat. Prod.</i> , 2007, 70 , 515 (v Blunt, J.W. in sod. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2009, 26 , 170–244)
<i>Emericella nidulans</i>	Arugozin G Arugosin H	Prenilirani poliketidi	Arugozin H aktiven proti glivi <i>Mycotypha microspora</i> in zeleni algi	Hatsuda, Y. in Kuyama, S. <i>Nippon Nogei Kagaku Kaishi</i> , 1954, 28 , 989 (v Blunt, J.W. in sod. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2008, 25 , 35-94)

			<i>Chlorella fusca</i>	
<i>Emericella unguis</i>	Guizinol	Kloriran depsid	Blago antibakterijsko učinkovanje	Nielson, J. in sod. <i>Phytochemistry</i> , 1999, 50 , 263 (v Faulkner, D.J. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2001, 18 , 1-49)
<i>Emericella unguis</i>	Unguzin A Unguzin B	GABA vsebujoč ciklični heptapeptid		Malmstrøm, J. <i>J. Nat. Prod.</i> , 1999, 62 , 787 (v Faulkner, D.J. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2001, 18 , 1-49)
<i>Emericella varicolor</i>	Varitriol		Močna citotoksičnost proti nekaterim ledvičnim, živčnim celicam in proti celičnim linijam raka dojke in NCI60 celični liniji	Malmstrøm, J. in sod. <i>J. Nat. Prod.</i> , 2002, 65 , 364 (v Blunt, J.W. in sod. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2004, 21 , 1-49)
	Varioksiran			
	Dihidroterein			
	Variksanton		Protimikrobna aktivnost proti vrsti bakterij	
<i>Emericella varicolor</i>	Evarikinon	Antrakinon	Protiproliferacijska aktivnost za KB in NCI-H460 celice	Hopmann, C. in sod. <i>PCT Int. Appl.</i> , WO 01/44264 A2, 2001 (v Blunt, J.W. in sod. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2005, 22 , 15-61)
	Izoemericelelin	Prenilksanton		
	Stromemicin	C-glikozidni depsid		
<i>Emericella varicolor</i>	6- <i>epi</i> -Ofiobolin G 6- <i>epi</i> -Ofiobolin N (in še 6 drugih znanih ofiobolinov)	Sesterterpeni	Citotoksičnost proti neuroblastomski celični liniji	Wei, H. in sod. <i>Tetrahedron</i> , 2004, 60 , 6015 (v Blunt, J.W. in sod. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2006, 23 , 26-78)
<i>Emericella varicolor</i>	Šimalakton A	Poliketid	V manjših koncentracijah spodbudi nevroitogenezo v nevroblastomskih nevro-2a celicah, v višjih koncentracijah je citotoksičen	Wei, H. <i>Tetrahedron</i> , 2005, 61 , 8054 (v Blunt, J.W. in sod. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2007, 24 , 31-86)
<i>Emericella varicolor</i>	Šimalakton B	Poliketid	V nizkih koncentracijah inducira nevroitogenezo v	Wei, H. in sod. <i>Heterocycles</i> , 2006, 68 , 111 (v Blunt, J.W. in sod. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2008, 25 , 35-94)

			nevroblastomskih neuro 2a celicah	
<i>Penicillium</i> sp.	Penohalazini D–H		Citotoksičnost proti P388 mišjim levkocitom	McDonald, L.A. in sod. <i>Tetrahedron Lett.</i> , 1999, 40 , 2489; Wang, T. in sod. <i>Can. J. Chem.</i> , 2001, 79 , 1786 ; Cueto, M. in sod. <i>J. Nat. Prod.</i> , 2001, 64 , 1444; Chinworrungsee, M. in sod. <i>Bioorg. Med. Chem. Lett.</i> , 2001, 11 , 1965 Miljkovic, A. in sod. <i>J. Nat. Prod.</i> , 2001, 64 , 1251. (v Blunt, J.W. in sod. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2003, 20 , 1-48)
<i>Penicillium</i> sp.	Komunezin B (znan), Komunezin C Komunezin D	Alkaloid	Zmerna protiproliferatna aktivnost proti nekaj celičnim linijam humane levkemije in aktivnost proti solinskim rakcem	Numata, A. in sod. <i>Tetrahedron Lett.</i> , 1993, 34 , 2355. Jadlovnik, P. in sod. <i>J. Nat. Prod.</i> , 2004, 67 , 78 (v Blunt, J.W. in sod. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2006, 23 , 26-78)
<i>Penicillium</i> sp.	Komunezin A Komunezin B	Alkaloid	Citotoksičnost	Numata, A. in sod. <i>Tetrahedron Lett.</i> , 1993, 34 , 2355 (v Faulkner, D.J. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 1995-)
<i>Penicillium</i> sp. BM 1689-P	Epolakten		Spodbuja nevrítogenezo	Takeya, H. in sod. <i>J. Antibiotics</i> , 1995, 48 , 733 (v Faulkner, D.J. <i>Nat. Prod. Rep.</i>)
<i>Penicillium</i> sp. BM 923	Acetofalidin		Zaustavi celični cikel v fazi G2	Cui, C.B. in sod. <i>J. Antibiotics</i> , 1996, 49 , 216 (v Faulkner, D.J. <i>Nat. Prod. Rep.</i>)
<i>Penicillium</i> sp.	Penohalazini A-C		Citotoksičnost	Numata, A. in sod. <i>J. Chem. Soc., Perkin Trans. I</i> , 1996, 239 (v Faulkner, D.J. <i>Nat. Prod. Rep.</i>)
<i>Penicillium</i> sp.	Penostatini A-E		Citotoksičnost (A-C) za celice P338	Takahashi, C. <i>Tetrahedron Lett.</i> , 1996, 37 , 655. (v Faulkner, D.J. <i>Nat. Prod. Rep.</i>)
<i>Penicillium</i> sp. OUPS-79	Penostatini F-I		Citotoksičnost	Iwamoto, C. in sod. <i>J. Chem. Soc., Perkin Trans. I</i> , 1998, 449 (v Faulkner, D.J. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2000, 17 , 7-55)
<i>Penicillium</i> sp. N115501	N115501A	Antranilamidni derivat	Protimikrobno učinkovanje	Onuki, H. in sod. <i>J. Antibiot.</i> , 1998, 51 , 442 (v Faulkner, D.J. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2000, 17 , 7-55)
<i>Penicillium</i> sp.	Piranolakton	Lakton		Shao, Z. in sod. <i>Zhongsan Daxue Xuebao Ziran Kexueban</i> , 1999, 38 , 131 (v Faulkner, D.J. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2001, 18 , 1-49)
<i>Penicillium</i> sp.	Piranolakton	Lakton		Shao, Z. in sod. <i>Zhongsan Daxue Xuebao Ziran Kexueban</i> , 1999, 38 , 131 (v Faulkner, D.J. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2001, 18 , 1-49)

<i>Penicillium</i> sp. CNC-350	11,11'- Dideoksiverticilin 11'-Deoksiverticilin	Diketopiperazinska dimera	<i>In vitro</i> citotoksičnost proti HCT-113 celični liniji	Son, B. W. In sod. <i>Nat. Prod. Lett.</i> , 1999, 13 , 213 (v Faulkner, D.J. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2001, 18 , 1-49)
<i>Penicillium</i> sp.	Koruskol A	1,3-Dioksan		Kagata, T. in sod. <i>J. Nat. Prod.</i> 2000, 63 , 886 (v Faulkner, D.J. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2002, 19 , 1-48)
<i>Penicillium</i> sp.	Skulezonon A Skulezonon B			Komatsu, K. in sod. <i>J. Nat. Prod.</i> , 2000, 63 , 408 (v Faulkner, D.J. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2002, 19 , 1-48)
<i>Penicillium</i> sp.	Penacilazin	Kinolinski derivat		Lin, Y. in sod. <i>Tetrahedron</i> , 2000, 56 , 9607 (v Faulkner, D.J. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2002, 19 , 1-48)
<i>Penicillium</i> sp.	Griseuzin	Kinon	Aktivnost proti 3 α - hidroksisteroid dehidrogenazi (3 α -HSD)	Li, X. in sod. <i>Arch. Pharm. Res.</i> , 2006, 29 , 942 (v Blunt, J.W. in sod. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2008, 25 , 35-94)
<i>Penicillium</i> sp.	Cefalosporolid H Cefalosporolid I		Inhibitorja ksantin oksidaze in 3 α -hidroksisteroid dehidrogenaze	Li, X. in sod., <i>Arch. Pharm. Res.</i> , 2007, 30 , 812. (v Blunt, J.W. in sod. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2009, 26 , 170–244)
<i>Penicillium</i> sp.	Šearinini D–K	Indol triterpeni	Šearinin D in E ter v manjši meri G kažejo aktivnost blokiranja visoko prevodnih natrij-kalijevih kanalčkov Šearinin D inducira apoptozo v HL-60 celicah	Xu, M. in sod. <i>Tetrahedron</i> , 2007, 63 , 435 Smetanina, O.F. in sod. <i>J. Nat. Prod.</i> , 2007, 70 , 906 (v Blunt, J.W. in sod. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2009, 26 , 170–244)
<i>Penicillium</i> sp.	Penisporolid A Penisporolid B			Li, X. in sod. <i>J. Antibiot.</i> , 2007, 60 , 191 (v Blunt, J.W. in sod. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2009, 26 , 170–244)
<i>Penicillium aurantiogriseum</i>	Aurantiomidi A–C	Kvinazolinski alkaloidi	Citotoksični proti tumorskim celičnim linijam	Xin, Z.H. in sod. <i>J. Nat. Prod.</i> , 2007, 70 , 853 (v Blunt, J.W. in sod. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2009, 26 , 170–244)
<i>Penicillium auratiogriseum</i>	Benzoat		Citotoksičen proti tsFT210 celicam	Xin, Z.H. in sod. <i>Chin. Chem. Lett.</i> , 2005, 16 , 1227 (v Blunt, J.W. in sod. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2007, 24 , 31-86)

<i>Penicillium bilaii</i>	(-)-2,3-Dihidrocitromicetid	Aromatični poliketidi		Capon, R.J. in sod. <i>J. Nat. Prod.</i> , 2007, 70 , 1746 (v Blunt, J.W. in sod. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2009, 26 , 170-2)
	Bilaini A-C	Diketopiperazini		
<i>Penicillium brevicompactum</i>	Petrosifungin A Petrosifungin B	Ciklopeptida		Bringmann, G. in sod. <i>J. Nat. Prod.</i> , 2004, 67 , 311 (v Blunt, J.W. in sod. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2006, 23 , 26-78)
<i>Penicillium brocae</i>	Brokaenoli A-C	Poliketidi	Citotoksični (aktivnost proti HCT-116 celični liniji)	Bugni, T.S. in sod. <i>J. Org. Chem.</i> , 2003, 68 , 2014. Bugni, T.S. in sod. <i>J. Org. Chem.</i> , 2003, 68 , 6846. (v Blunt, J.W. in sod. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2005, 22 , 15-61)
<i>Penicillium citrinum</i>	Izociklocitrinol A Acetilisociklocitrinol A	Steroidi	Protibakterijska aktivnost proti vrstam <i>Staphylococcus epidermidis</i> in <i>Enterococcus durans</i>	Amagata, T. <i>Org. Lett.</i> , 2003, 5 , 4393 (v Blunt, J.W. in sod. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2005, 22 , 15-61)
<i>Penicillium citrinum</i>	Citrinadin A		Citotoksičen proti L1210 in KB celičnim linijam	Tsuda, M. in sod. <i>Org. Lett.</i> , 2004, 6 , 3087 (v Blunt, J.W. in sod. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2006, 23 , 26-78)
<i>Penicillium citrinum</i>	Skaluzamidi A-C	Pirolidinski alkaloidi	Skaluzamid A kaže rahlo protiglivno aktivnost za <i>Cryptococcus neoformans</i> in antibakterijsko aktivnost proti <i>Micrococcus luteus</i>	Tsuda, M. in sod. <i>J. Nat. Prod.</i> , 2005, 68 , 273 Sasaki, M. in sod. <i>Org. Lett.</i> , 2005, 7 , 4261 (v Blunt, J.W. in sod. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2007, 24 , 31-86)
	Perinadin A	Tetraciklični alkaloid	Rahlo aktiven proti L1210 celicam in protibakterijska aktivnost za vrste <i>M. luteus</i> and <i>B. subtilis</i>	
<i>Penicillium</i>	Citrinadin B		Citotoksičen za L1210	Tsuda, M. in sod. <i>Org. Lett.</i> , 2004, 6 , 3087

<i>citrinum</i>			celice	Mugishima, T. in sod. <i>J. Org. Chem.</i> , 2005, 70 , 9430 (v Blunt, J.W. in sod. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2007, 24 , 31-86)
<i>Penicillium chrysogenum</i>	Sorbicillakton A in Sorbicillakton B	Alkaloidi sorbicilinskih derivatov	Sorbicillakton A aktiven proti HIV, z živčno-zaščitnim potencialom in selektivno aktiven proti L5178y celicam	Bringmann, G. in sod. <i>Tetrahedron</i> , 2005, 61 , 7252 (v Blunt, J.W. in sod. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2007, 24 , 31-86)
<i>Penicillium corylophilum</i> (mešana kultura dveh sevov <i>P. corylophilum</i>)	Anserinon A (znan) Anserinon B (znan)	Glivna pigmenta	Anserinon B aktiven proti vrsti tumorskih celičnih linij	Wang, H. in sod. <i>J. Nat. Prod.</i> , 2004, 67 , 163
	(+)-Formilanserion B, (-)- Epoksiserinon A, (+)-Epoksiserinon A	Pentaketidi	(+)-Formilanserion B aktiven proti vrsti tumorskih celičnih linij	Wang, H. in sod. <i>J. Nat. Prod.</i> , 2004, 67 , 163 Gautschi, J.T. in sod. <i>J. Nat. Prod.</i> , 2004, 67 , 362. Wang, H. in sod. <i>J. Nat. Prod.</i> , 2004, 67 , 1637. Gautschi, J.T. in sod. <i>J. Nat. Prod.</i> , 2004, 67 , 1638
	Hidroksimetilanserion B Deoksianserinon B			Wang, H. in sod. <i>J. Nat. Prod.</i> , 2004, 67 , 163 (vsi članki v Blunt, JW in sod. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2006, 23 , 26-78)
<i>Penicillium fellutanum</i>	Felutamid A Felutamid B	Peptid	Citotoksičnost	Shigemori H. in sod. <i>Tetrahedron</i> , 1991, 47 , 8529 (v Faulkner, D.J. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 1993-)

<i>Penicillium janczewskii</i>	2 Kvinolinona (diastereoizomerna)		Citotoksični za vrsto humanih tumorskih celičnih linij (močno proti SKOV-3 celicam)	He, J. in sod. <i>J. Nat. Prod.</i> , 2005, 68 , 1397 (v Blunt, JW in sod. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2007, 24 , 31-86)
<i>Penicillium janthinellum</i>	Jantinolid A in Jantinolid B	2,5-Piperazindionski alkaloidi		Xue, C. in sod. <i>Pharmazie</i> , 2006, 61 , 1041 (v Blunt, JW in sod. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2008, 25 , 35-94)
<i>Penicillium janthinellum</i>	Šerinin E		Inducira apoptozo v HL-60 celicah in inhibira EGF-inducirano maligno spremembo mišjih	Smetanina, O.F. in sod., <i>J. Nat. Prod.</i> , 2007, 70 , 906 (v Blunt, J.W. in sod. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2009, 26 , 170-244)

			epidermalnih JB6 P+ C1 41 celic	
<i>Penicillium cf. montanense</i>	Ksestodekalaktoni A–C	10-Členski makrolid z 1,3-dihidroksibenzensk im obročem	Aktivnost proti glivi <i>Candida albicans</i> (Ksestodekalakton B)	Edrada R.A. in sod. , <i>J. Nat. Prod.</i> , 2002, 65 , 1598 (v Blunt, J.W. in sod. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2004, 21 , 1-49)
<i>Penicillium rugulosum</i>	Prugozeni A1–A3, B1, B2, C1, C2	Poliketidi		Lang, G. in sod. <i>Tetrahedron</i> , 2007, 63 , 11844 (v Blunt, J.W. in sod. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2009, 26 , 170–244)
<i>Penicillium steckii</i>	Tanzavaična kislina 3,7-dimetil-1,8-dihidroksi-6-metoksiizohroman			Malmström, J. In sod. <i>Phytochemistry</i> , 2000, 54 , 301(v Faulkner, D.J. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2002, 19 , 1-48)
<i>Penicillium stoloniferum</i>	Stoloniferol A	Izokumarinski derivat		Xin, Z.H. in sod. <i>Arch. Pharm. Res.</i> , 2007, 30 , 816 (v Blunt, J.W. in sod. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2009, 26 , 170–244)
	Stoloniferol B			
	(3b,5a,8a,22E)-5,8-Epidioksi-23-metil-ergosta-6,22-dien-3-ol (znan)	Sterol	Citotoksičen (P388)	
<i>Penicillium terrestre</i>	Penicilon A Penicilon B	Poliketida	Rahla citotoksičnost proti P388 in A-549 celičnim linijam (penicillon B le proti A-549 celični liniji)	Liu, W. in sod. <i>Tetrahedron Lett.</i> , 2005, 46 , 4993 (v Blunt J.W. in sod. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2007, 24 , 31-86)
	2 snovi	Benzokinonska derivata		
	2 snovi	Bisorbicilinoida	Antiproliferativna aktivnost za za P388 in A-549 celične linije	Liu, W. in sod. <i>J. Antibiot.</i> , 2005, 58 , 441 (v Blunt J.W. in sod. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2007, 24 , 31-86)
	Dihidrotrihodimerol	Bbisorbicilinoid	Citotoksičen za P388 in A-549 celične linije	

	Tetrahidrotriadimerol	Bisorbicilinoid	Citotoksičen za P388 in A-549 celične linije	Liu, W. in sod. <i>J. Antibiot.</i> , 2005, 58 , 621 Andrarde, R. <i>Can. J. Chem.</i> , 1992, 70 , 2526 Abe, N. in sod. <i>Biosci., Biotechnol., Biochem.</i> , 1998, 62 , 661
	9 snovi	Alkoholni derivati	Citotoksičnost za nekatere linije rakastih celic	Warr, G.A. in sod. <i>J. Antibiot.</i> , 1996, 49 , 234 (vsi članki v Blunt J.W. in sod. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2007, 24 , 31-86) (v Blunt J.W. in sod. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2010, 27 , 165–237)
	Terestrol G 72		Moderira aktivnost proti DPPH	
<i>Penicillium waksmanii</i> OUPS-N133	Pirenocin D Pirenocin E		E inhibira P388 levkemijske celice	Amagata, T. in sod. <i>J. Antibiot.</i> , 1998, 51 , 532 (v Faulkner, D.J. <i>Nat. Prod. Rep.</i> , 2000, 17 , 7-55)