

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Iva RAPPL

**VPLIV GLUKOZE IN TEMPERATURE NA
PRODUKCIJO BIOLOŠKO AKTIVNIH SNOVI V
VODNIH EKSTRAKTIH NEKATERIH HALOFILNIH
IN HALOTOLERANTNIH GLIV REDU
DOTHIDEALES IN IZBRANIH KVASOVK**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2011

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Iva RAPPL

**VPLIV GLUKOZE IN TEMPERATURE NA PRODUKCIJO
BIOLOŠKO AKTIVNIH SNOVI V VODNIH EKSTRAKTIH
NEKATERIH HALOFILNIH IN HALOTOLERANTNIH GLIV REDU
DOTHIDEALES IN IZBRANIH KVASOVK**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**INFLUENCE OF GLUCOSE AND TEMPERATURE ON
PRODUCTION OF BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES IN
WATER EXTRACTS OF SOME HALOPHILIC AND
HALOTOLERANT FUNGI FROM ORDER DOTHIDEALES AND
CHOSEN YEASTS**

GRADUATION THESIS
University studies

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. Kristino Sepčić in somentorico prof. dr. Nino Gunde-Cimerman. Za recenzentko je študijska komisija imenovala doc. dr. Jernejo Ambrožič Avguštin.

Mentorica:	prof. dr. Kristina Sepčić
Somentorica:	prof. dr. Nina Gunde-Cimerman
Recenzentka:	doc. dr. Jerneja Ambrožič Avguštin

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:	prof. dr. Tom Turk, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
Članica:	doc. dr. Jerneja Ambrožič Avguštin, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
Članica:	prof. dr. Kristina Sepčić, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
Članica:	prof. dr. Nina Gunde-Cimerman, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora: 10. 02. 2011

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.

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Iva RAPPL

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	577.2:579:582.28(043.2)=163.6
KG	halofilne in halotolerantne glice/naravni produkti/vodni ekstrakti/hemoliza/inhibicija acetilholinesteraze/protibakterijska aktivnost/hemaglutinacija
AV	RAPPL, Iva
SA	SEPČIĆ, Kristina/GUNDE-CIMERMAN, Nina
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 REDU <i>DOTHIDEALES</i> IN IZBRANIH KVASOVK
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	X, 63 str., 8 pregl., 10 sl., 56 vir.
IJ	Sl
JI	sl/en
AI	Glice so pomemben vir biološko aktivnih snovi, ki so uporabne v različnih medicinskih in industrijskih panogah. Ker so halofilne in halotolerantne glice šele pred kratkim odkrili, so slabo raziskane. V tej diplomski nalogi smo se ukvarjali z iskanjem potencialno zanimivih biološko aktivnih vodotopnih snovi iz nekaterih izbranih halofilnih in halotolerantnih gliv. 43 sevov različnih gliv, ki so pripadale redu <i>Dothideales</i> in izbranim kvasovkam, je bilo izoliranih iz solin in arktičnega ledu, torej iz okolij z znižano vodno aktivnostjo. Osredotočili smo se na ugotavljanje vpliva stresnih dejavnikov (povečane koncentracije glukoze in nizke temperature) na sintezo protibakterijskih, hemolitičnih, hemaglutinacijskih in protiacetilholinesteraznih snovi v izbranih glicah. Rezultati so pokazali, da se glice na zmanjšano vodno aktivnost odzovejo s povečano metabolno aktivnostjo, ki jim omogoči, da se prilagodijo na spremenjene rastne razmere. Nizka temperatura pa morda ne predstavlja tolikšnega stresa, saj se količina suhe snovi in proteinov ni bistveno povečala. V vodnih ekstraktih so bili verjetno prisotni v glavnem primarni metaboliti (proteini, organske kisline), ki jih celica potrebuje za normalno delovanje. Od testov za ugotavljanje biološke aktivnosti je bil pozitiven le test hemaglutinacije, saj sta nizka temperatura in povisena koncentracija glukoze vplivali na povečano izločanje aglutininov. Glede na vrsto stresa nismo našli nobenih biološko aktivnih sekundarnih metabolitov, ker očitno niso vodotopni in jih glice ne izločajo v okolico.

KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)

DN	Dn
DC	577.2:579:582.28(043.2)=163.6
CX	halophile and halotolerant fungi/natural products/water extracts/hemolysis/acetylcholinesterase inhibition/antibacterial activity/hemagglutination
AU	RAPPL, Iva
AA	SEPČIĆ, Kristina/GUNDE-CIMERMAN, Nina
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 WATER EXTRACTS OF SOME HALOPHILIC AND HALOTOLERANT FUNGI FROM ORDER DOTHIDEALES AND CHOSEN YEASTS
DT	Graduation Thesis (University studies)
NO	X, 63 p., 8 tab., 10 fig., 56 ref.
LA	Sl
AL	sl/en
AB	Fungi are important source of bioactive substances that are used in different medical and industrial fields. Since halophilic and halotolerant fungi have been discovered only recently, they are poorly investigated. In this thesis, we have examined the biological activities of aqueous extracts of some of the halophilic and halotolerant fungi. 43 different strains from order Dothideales and chosen yeasts were isolated from the environments with reduced water activity; salterns or Arctic ice. We assessed the impact of stressful conditions (increased glucose concentration and low temperature) on the secretion of antibacterial, hemolytic, hemagglutinating and acetylcholinesterase-inhibitory compounds in chosen fungi. The results showed that fungi respond to the low water activity with increased metabolic activity and allowed them to adapt to changed growing conditions. Low temperatures are perhaps not so stressful, since the fungi did not show increased quantities of dry mass and proteins as before. In aqueous extracts only primary metabolites, that are necessary for normal cell functioning, are probably present. The hemagglutination test showed to be the only positive test of biological activity. Low temperature and increased glucose conditions increased the synthesis of agglutinins. According to a type of stress no biologically active secondary metabolites were found. They are probably not-soluble and fungi do not secrete them into the environment.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VI
KAZALO SLIK	VII
SLOVARČEK	VIII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	IX
1 UVOD	1
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 SPLOŠNE IN MORFOLOŠKE ZNAČILNOSTI GLIV	3
2.1.1 Črne kvasovke	4
2.1.1.1 KSEROFILNE IN HALOFILNE GLIVE	4
2.1.1.2 DOSEDANJE OBJAVE O IZBRANIH ČRNIH KVASOVKAH	5
3 MATERIALI IN METODE	9
3.1 PRIPRAVA GOJIŠČ	9
3.2 GOJENJE GLIV	10
3.3 EKSTRAKCIJA	13
3.4 UGOTAVLJANJE KONCENTRACIJE SUHE SNOVI V EKSTRAKTIH	14
3.5 UGOTAVLJANJE KONCENTRACIJE PROTEINOV V EKSTRAKTIH	14
3.6 TESTI ZA DOLOČANJE BIOLOŠKIH AKTIVNOSTI	15
3.6.1 Hemolitični test	15
3.6.2 Določanje protibakterijske aktivnosti	16
3.6.3 Hemaglutinacijski test	17
3.6.4 Test inhibicije acetilholinesteraze	17
4 REZULTATI	19
4.1 KONCENTRACIJE SUHE SNOVI IN PROTEINOV V EKSTRAKTIH	19
4.2 REZULTATI HEMOLITIČNEGA TESTA	34
4.3 REZULTATI TESTA PROTIBAKTERIJSKE AKTIVNOSTI	34
4.4 REZULTATI TESTA HEMAGLUTINACIJE	35
4.4.1 Rezultati testa hemaglutinacije svežih ekstraktov	35
4.4.2 Rezultati testa hemaglutinacije kuhanih ekstraktov	41
4.5 REZULTATI TESTA INHIBICIJE ACETILHOLINESTERAZE	47
5 RAZPRAVA IN SKLEPI	48
5.1 RAZPRAVA	48
5.1.1 Koncentracija suhe snovi in proteinov v ekstraktih	48
5.1.2 Hemolitična in protibakterijska aktivnost ter test inhibicije AchE	50
5.1.3 Hemaglutinacijski test	51
5.2 SKLEPI	52
6 POVZETEK	54
7 VIRI	56
8 ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Podatki iz literature o odkritih naravnih učinkovinah izoliranih iz izbranih rodov	5
Preglednica 2: Navodilo za pripravo gojišča.	9
Preglednica 3: Seznam halofilnih in halotolerantnih gliv iz Sečoveljskih solin in Arktike	10
Preglednica 4: Pogoji gojenja za posamezne seve gliv.	12
Preglednica 5: Koncentracije proteinskih standardov (BSA) in njihove absorpcije pri 562 nm.	15
Preglednica 6: Koncentracije suhe snovi in proteinov v ekstraktih gliv.	20
Preglednica 7: Rezultati testa hemaglutinacije svežih ekstraktov.	35
Preglednica 8: Rezultati testa hemaglutinacije kuhanih ekstraktov.	41

KAZALO SLIK

Slika 1: Suhe teže ekstraktov gliv gojenih pri nizki temperaturi.....	23
Slika 2: Suhe teže ekstraktov gliv gojenih v gojiščih z visoko koncentracijo Glc	25
Slika 3: Povprečja koncentracij suhe snovi svežih ekstraktov glede na rastne razmere gliv	27
Slika 4: Povprečja koncentracij suhe snovi v kuhanih ekstraktih glede na rastne razmere gliv	29
Slika 5: Koncentracije proteinov svežih ekstraktov gliv, ki so rasle pri nizki temperaturi, v odvisnosti od koncentracije suhe snovi v vzorcu	31
Slika 6: Koncentracija proteinov v svežih ekstraktih gliv, ki so rasle v gojišču z visoko koncentracijo Glc, v odvisnosti od koncentracije suhe snovi v vzorcu	33
Slika 7: Aktivnost hemaglutinacije svežih ekstraktov gliv, ki so rasle pri nizki temperaturi, v odvisnosti od koncentracije suhe snovi v vzorcu	38
Slika 8: Aktivnost hemaglutinacije svežih ekstraktov gliv, ki so rasle v gojišču z visoko koncentracijo Glc, v odvisnosti od koncentracije suhe snovi v vzorcu	40
Slika 9: Aktivnost hemaglutinacije kuhanih ekstraktov gliv, ki so rasle pri nizki temperaturi, v odvisnosti od koncentracije suhe snovi v vzorcu	44
Slika 10: Aktivnost hemaglutinacije kuhanih ekstraktov gliv, ki so rasle v gojišču z visoko koncentracijo Glc, v odvisnosti od koncentracije suhe snovi v vzorcu	46

SLOVARČEK

Halofil	organizem, ki bolje raste v okoljih z visoko koncentracijo soli, kot so morja, slana jezera, močvirja 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 in zmožen preživeti sušo
Psihrotolerant	organizem, ki lahko živi pri nizkih temperaturah

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AChE	acetilholinesteraza
a_w	aktivnost vode
c	koncentracija
celice BHK	celice ledvic mladih hrčkov
celice HeLa S3	celična linija človeškega epitelnega karcinoma
CV	koncentracija suhe snovi v poskusu
G	ekstrakti vzorcev, ki so rasli pri visoki koncentraciji glukoze
Glc	glukoza
HG	hemaglutinacija
K	ekstrakti vzorcev, ki so rasli v kontrolnih razmerah
Ku	kuhani ekstrakti vzorcev
MIC	minimalna inhibitorna koncentracija
NaCl	ekstrakti vzorcev, ki so rasli v razmerah povečane slanosti
NT	ekstrakti vzorcev, ki so rasli pri nizki temperaturi
P	koncentracija proteinov v ekstraktu
S	sveži ekstrakti vzorcev
SS	koncentracija suhe snovi ekstrakta
T	temperatura
YNB	kvasna dušikova osnova (yeast nitrogen base)

1 UVOD

Glive so pomemben vir biološko aktivnih snovi, ki so uporabne v različnih medicinskih in industrijskih panogah. Ker je njihova izdelava pomembna za prilagoditev na določeno funkcijo v naravi, so v zadnjih letih začeli iskati nove sekundarne metabolite organizmov, ki živijo v še neraziskanih biotopih.

Dolgo je veljalo mnenje, da v ekstremno slanih okolijih najdemo le alge, praživali, arheje in bakterije, ne pa tudi glive (Brock, 1979). Leta 2000 so Gunde-Cimerman in sodelavci dokazali nasprotno. Iz slanih okolij, kot so npr. soline, so izolirali glive, ki soli za preživetje sicer ne potrebujejo, vendar so se sposobne prilagoditi na širok razpon koncentracij soli, od sladke vode do skoraj nasičene raztopine natrijevega klorida (NaCl). Med halofilne so Gunde-Cimerman in sod. (2000, 2005) uvrstili glive, izolirane iz ekstremno slanih okolij, kjer je slanost nad 10 % *in vitro* so pa rasle na gojiščih s vsaj 17 % NaCl. Med halotolerantne pa so uvrstili glive, ki so jih izolirali iz manj slanih voda in so *in vitro* prav tako rasle na gojiščih s 17 % NaCl.

Halofilne in halotolerantne glive, obravnavane v tej nalogi, uvrščajo v debli Ascomycota in Basidiomycota. Izolirali so jih predvsem iz solin, nekaj pa jih je tudi z Arktike in drugih okolij. Za Arktična okolja so značilne ekstremno nizke temperature (do -50 °C). Voda v obliki ledu je organizmom nedostopna, zato v takšnih okoljih prihaja do znižane vodne aktivnosti, visokih pritiskov, nizkih temperatur in nizke koncentracije hrani (Sonjak, 2006). V ekstremno slanih habitatih, kakršne so soline, pa prihaja do nizke koncentracije kisika, nevtralnega pH in visoke koncentracije hrani v vodi, koncentracije morske soli v kristalizacijskih bazenih pa lahko dosežejo nasičenost (Gunde-Cimerman in sod., 2001). Povečana količina raztopljene soli v vodi zniža ozmotski potencial raztopine, kar povzroči oddajanje vode iz organizmov in posledično znižano vodno aktivnost.

V tej nalogi smo se ukvarjali z iskanjem potencialno zanimivih biološko aktivnih vodotopnih snovi iz nekaterih halofilnih in halotolerantnih gliv. Izbrane glive smo gojili na trdnih gojiščih z 2 % končno koncentracijo Glc in temperaturo inkubacije 4 °C ter na

gojišču s 40 % končno koncentracijo Glc in temperaturo inkubacije 30 °C. Pri nekaterih glivah smo koncentracijo sladkorja v gojišču in temperature inkubacije prilagodili rastnim potrebam. Glivne kulture smo nato liofilizirali in pripravili vodne ekstrakte. Izmerili smo hemolitično in hemaglutinacijsko aktivnost, inhibicijo encima acetilholinesteraze in ugotavljali protibakterijsko aktivnost. Ker sta povišana koncentracija sladkorja in nizka temperatura stresna dejavnika za glice, nas je zanimalo, kako to vpliva na izločanje sekundarnih metabolitov. S prekuhavanjem vodnih ekstraktov pa smo ugotavljeni, 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 glice predstavljajo 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 na gojiščih z različno koncentracijo sladkorja, kakor tudi pri različnih temperaturah, različna.

2 PREGLED OBJAV

2.1 SPLOŠNE IN MORFOLOŠKE ZNAČILNOSTI GLIV

Glive spadajo v nadkraljestvo evkarionti in so klasificirane 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 pa uvrščamo še v podkraljestvo Dikarya. Klasifikacija torej zajema 1 kraljestvo, 1 podkraljestvo, 7 debel, 10 poddebel, 35 razredov, 12 podrazredov in 129 rodov (Hibbet s sod., 2007).

Od preostalih evkariontov se glive na edinstven način razlikujejo v načinu prehranjevanja, strukturni organiziranosti, rasti in razmnoževanju. Za njih je značilno, da so heterotrofi brez plastidov, klorofilov in flavonoidov, imajo pa najrazličnejša druga barvila. Kot rezervno snov imajo glikogen, ki je prost v citoplazmi in olja, nikoli pa škrob kot višje rastline. Celična stena je iz hitina (polimera N-acetylglukozamina), polisaharidov (manan in glukan) ali beljakovin. Celice nimajo gibljivih oblik. Razmnoževanje je zelo raznovrstno: vegetativno z brstenjem in razraščanjem, nespolno predvsem s tvorbo konidijev ali spolno s somatogamijo (hifogamija), gametangiogamijo in gametogamijo. So paraziti in škodilo gostitelju, saprofiti (porabniki ogljika, ki ga proizvedejo drugi organizmi) ali simbionti. Najdemo jih predvsem na kopnem, nekaj pa tudi v sladkih in slanih vodah (Jogan, 2001). Glive so pomembni razkrojevalci in s tem v okolje vračajo anorganska hranila, nujna za rast rastlin in posledično preživetje živali, ki se hrani z njimi, ter tako zaključijo cikel kroženja snovi v naravi (Campbell, 2002). Razgrajujejo tudi v okoljih, kjer bakterije ne uspevajo (npr. kislo okolje). So skoraj edini razkrojevalci lesa in pomembni mikorizni organizmi, ki živijo v simbiozi s koreninami višjih rastlin. Industrijsko so pomembne predvsem plesni, ki tvorijo antibiotike in nekatere organske kisline. Številne glive sodelujejo pri procesih predelave hrane. Ekonomsko so pomembne tudi parazitske glive, ki povzročajo škodo na gojenih vrstah (Jogan, 2001).

2.1.1 Črne kvasovke

Kljub temu, da so črne kvasovke znane že od 19. stoletja, vemo le malo o njih (de Hoog, 2000). Razlog za to je počasna rast večine vrst in slaba kompeticijska sposobnost (de Hoog, 1999). Do sedaj je bilo opisanih 1500 vrst (Kurtzman, 2006). So polifiletske (Sterflinger in sod., 1999), vendar skupaj tvorijo biološko skupino (de Hoog in Hermanides-Nijhof, 1977). Najdemo jih med debli Ascomycota in Basidiomycota. Mnoge imajo tudi morske predstavnike, ki kljubujejo visokim pritiskom. (Bass, 2007).

Črne kvasovke so enocelične glive z debelo, melanizirano celično steno. Razmnožujejo se nespolno z brstenjem, nekaj se jih razmnožuje tudi s cepitvijo. Mnoge med njimi lahko pod določenimi pogoji tvorijo septirane hife in psevdohife (Samson, 2000).

Večina črnih kvasovk spada v deblo Ascomycota (de Hoog in McGinnis, 1987), kjer jih uvrščamo v dva redova *Chaetothyriales* in *Dothideales* (de Hoog in sod., 1997), dva redova *Moniliella* in *Trichosporonoides* pa se uvrščata v deblo Basidiomycota (Haase s sod., 1999). Medtem ko so pripadniki redu *Chaetothyriales* patogene za človeka, je večina vrst iz redu *Dothideales* nepatogenih, z nekaj oportunistično patogenih vrst (Zalar, 1999).

2.1.1.1 KSEROFILNE IN HALOFILNE GLIVE

Ekstremna okolja poseljujejo samo mikroorganizmi. To velja tako za naravne kot za umetno narejene soline. Glavne značilnosti slanih bazenov so evaporacija vode s slanostjo od 3 % do 35 % NaCl, nizka koncentracija kisika, visoka svetlobna intenziteta, nizka dostopnost hrani in nevtralen pH (Brock, 1979).

Za ekstremno slana okolja je dolgo veljalo mnenje, da v njih najdemo samo alge, protozoje, arheje in bakterije, ne pa tudi glive (Brock, 1979). Pojem halofilnosti gliv je bil prvič predstavljen leta 1975 za nekaj kserofilnih gliv, ki kontaminirajo hrano z visoko vsebnostjo NaCl (Pitt & Hocking, 1985). Kasneje so glive opisali tudi v naravnih srednjih slanih okoljih, kot so slana močvirja, slana tla in morska voda, velika diverziteta pa je bila opisana tudi v ekstremno slanih okoljih (Gunde-Cimerman s sod., 1997).

Kserofilne glice lahko tolerirajo 17 % NaCl ali 50 % Glc in rastejo pri vodni aktivnosti (a_w) 0,85 ali manj. Tiste, ki so izolirane iz okolja s slanostjo nad 10 % in rastejo *in vitro* pri vsaj 17 % NaCl, so halofilne (Gunde-Cimerman s sod., 2004, 2005). Halofilne glice ne rabijo soli za preživetje kot halofilni prokarioti, ampak so se sposobne prilagoditi na širok razpon slanosti, vse od sladke vode do ekstremno slane in skoraj nasičene raztopine NaCl. Med halotolerantne pa uvrščamo glice, ki so izolirane iz manj slanih voda in prav tako rastejo *in vitro* na gojiščih s 17 % NaCl (Butinar s sod., 2005).

2.1.1.2 DOSEDANJE OBJAVE O IZBRANIH ČRNIH KVASOVKAH

Iz literature zbrani podatki o dosedanjem iskanju bioloških aktivnosti v ekstraktih gliv, ki so bile vključene v naše raziskovalno delo, so predstavljeni v preglednici 1. Prazno polje v tabeli pomeni, da informacija v viru ni bila navedena.

Preglednica 1: Podatki iz literature o odkritih naravnih učinkovinah izoliranih iz izbranih rodov morskih glic

IME MIKROORGANIZMA	VRSTA MOLEKULE	UČINKOVINA	AKTIVNOST	REFERENCA
<i>Alternaria sp.</i>	alternariol (AOH) alternariol monometil eter (AME) tenuazonična kislina altenuen (ALT)		citotoksični in mutageni učinki	Müller M., Zentralbl Mikrobiol. 1992;147(3-4):207-213
<i>Aureobasidium pullulans</i>	diketopiperazin in orcinotriol			Shigemori, H. in sod., J. Nat Prod., 1998, 61, 696 (v Blunt, J.W., Nat. Prod. Rep., 2000, 17, 7-55)
<i>Aureobasidium sp.</i>	aureobasidin	ester	obe spojini imata protibakterijsko aktivnost proti <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Escherichia coli</i> in <i>Staphylococcus aureus</i>	Abdel-Lateff, A., Elkhayat, E.S., Fouad, M.A. in Okino, T. Nat Prod Commun, 2009 4(3). pp389-94
	4,6-dihidroksi-decenoična kislina in (5R,3Z)-5-hidroksidec-3-enoična kislina			
<i>Fusarium sp.</i>	neofusapiron	piron	Zmerna antimikotična aktivnost proti glivi <i>Aspergillus clavatus</i> .	Evidente, A. in sod., Nat. Toxins, 1994, 2, 4. (v Blunt, J.W. in sod., Nat. Prod. Rep., 2008, 25, 35-94)
<i>Fusarium sp.</i>	fusapiron	piron	zmerna antimikotična aktivnost proti glivi <i>Aspergillus clavatus</i> .	Evidente, A. in sod., Nat. Toxins, 1994, 2, 4. (v Blunt, J.W. in sod., Nat. Prod. Rep., 2008, 25, 35-94)

IME MIKROORGANIZMA	VRSTA MOLEKULE	UČINKOVINA	AKTIVNOST	REFERENCA
<i>Fusarium sp.</i>	deoksiusapiron	piron	zmerna antimikotična aktivnost proti glivi <i>Aspergillus clavatus</i> .	Evidente, A. in sod., Nat. Toxins, 1994, 2, 4. (v Blunt, J.W. in sod., Nat. Prod. Rep., 2008, 25, 35–94)
<i>Fusarium sp.</i>	fusarielin E	polioksigeniran derivat dekalina	antimikotična aktivnost proti glivi <i>Pyricularia oryzae</i>	Gai, Y. in sod., Chin. Chem. Lett., 2007, 18, 954. (v Blunt, J.W., Nat. Prod. Rep., 2009, 26, 170–244)
<i>Fusarium sp.</i>	JM47	ciklični tetrapeptid	citotoksični učinki	Jiang, Z. in sod., Phytochemistry, 2002, 60, 33. (v Blunt, J.W., Nat. Prod. Rep., 2004, 21, 1-49)
<i>Fusarium sp.</i>	karotenoid glikozilni ester	ester		Sakaki, H. in sod. J. Nat. Prod., 2002, 65, 1683. (v Blunt, J.W., Nat. Prod. Rep., 2004, 21, 1-49)
<i>Fusarium sp.</i>	neomangikol A-C	sesterpenoid	citotoksični učinki	Renner, M. K. in sod., J.Org.Kem., 1998, 63. 8346 (v Blunt, J.W., Nat. Prod. Rep., 2000, 17, 7-55)
<i>Fusarium sp.</i>	sansalvamid	ciklični pentadepsipeptid	zavira virusno (MCV) topoizomerazo, citotoksičen	Belošky, G.N. in sod., Tetrahedron lett., 1999, 40, 2913 in Hwang, Y. in sod., Mol. Pharmacol., 1999, 55, 1049 (v Blunt, J.W., Nat. Prod. Rep., 2001, 18, 1-49)
<i>Fusarium sp.</i>	N-metilsansalvamid	ciklični pentadepsipeptid		Cueto, M. in sod., Phytochemistry, 2000, 55, 223 (v Blunt, J.W., Nat. Prod. Rep., 2002 19, 1-48)
<i>Fusarium sp.</i>	mangikol A-G	sesterterpenski poliol	citotoksični učinki	Renner, M.K. in sod., J. Org. Chem., 2000, 65, 4843 (v Blunt, J.W., Nat. Prod. Rep., 2002 19, 1-48)

IME MIKROORGANIZMA	VRSTA MOLEKULE	UČINKOVINA	AKTIVNOST	REFERENCA
<i>Fusarium sp.</i>	5'-hidroksizearalenol	makrolid	zavira sivo riževo pegasost (<i>Pyricularia oryzae</i>)	Zhao, L.L. in sod., Chin. Chem. Lett., 2008, 19, 1089.
<i>Fusarium clamydiosporum</i>	fusaperazin A in B	žveplo vsebujoč derivat diksopiperazina	citotoksični učinki	Chu, M. in sod., Tetrahedron Lett., 1993, 34, 7537. (v Blunt, J.W., Nat. Prod. Rep., 2004, 21, 1-49)
<i>Cladosporium sp.</i>	pandangolid 1a	heksaketid		Smith, J.C. in sod., J. Nat. Prod., 2000, 63, 142. (v Blunt, J.W. in sod, Nat. Prod. Rep., 2007, 24, 31-86)
<i>Cladosporium sp</i>	pandangalid 1	heksaketid		Smith, J.C. in sod., J. Nat. Prod., 2000, 63, 142. (v Blunt, J.W. in sod, Nat. Prod. Rep., 2007, 24, 31-86)
<i>Cladosporium sp</i>	izo-kladospolid B			Smith, J.C. in sod., J. Nat. Prod., 2000, 63, 142. (v Blunt, J.W. in sod, Nat. Prod. Rep., 2007, 24, 31-86)
<i>Cladosporium sp</i>	sporiolid A, sporiolid B	citotoksični makrolid	sporiolid A zmerno zavira rast več vrst gliv, oba sta aktivna proti G+ bakteriji <i>Micrococcus luteus</i>	Shigemori, H. in sod., Mar. Drugs, 2004, 2, 164. (v Blunt, J.W. in sod., Nat. Prod. Rep., 2006, 23, 26-78)
<i>Cldosporium cladosporioides</i>	peroksiergosterol	sterol	antioksidant, zavira nastanek tumorjev	San Martín, A. in sod., An. Asoc. Quím. Argent., 2005, 93, pp 46.
<i>Cldosporium cladosporioides</i>	kladosporin, monoacetil kladosporin	3, 4-dihidro-6, 8-dihidroksi-3-(tetrahidro-6-metil-2H-pira -2- il) metilizokumarin	inhibirata rast gliv	Scott, P.M. in sod.. The Journal of Antibiotics, 1971, 24 (11), pp 747-755.
<i>Cladosporium herbarum</i>	herbarin A in B	α -piron	citotoksičen za solinske rakce (<i>Artemia salina</i>)	Jadulco, R. in sod. J. Nat. Prod., 2002, 65, 730., (v Blunt, J.W., Nat. Prod. Rep., 2004, 21, 1-49)

IME MIKROORGANIZMA	VRSTA MOLEKULE	UČINKOVINA	AKTIVNOST	REFERENCA
<i>Cladosporium herbarum</i>	12-členski makrolid pandangolid 3	makrolid		Jadulco, R. in sod., J. Nat. Prod., 2001, 64, 527. (v Blunt, J.W., Nat. Prod. Rep., 2003, 20, 1-48)
<i>Cladosporium herbarum</i>	dimerni makrolid pandangolid	makrolid		Jadulco, R. in sod., J. Nat. Prod., 2001, 64, 527. (v Blunt, J.W., Nat. Prod. Rep., 2003, 20, 1-48)
<i>Cladosporium herbarum</i>	derivat acetila: 5-hidroksimetilfuranc-2-karboksilna kislina		inhibira rast G ⁺ bakterij <i>Bacillus subtilis</i> in <i>Staphylococcus aureus</i>	Jadulco, R. in sod., J. Nat. Prod., 2001, 64, 527. (v Blunt, J.W., Nat. Prod. Rep., 2003, 20, 1-48)
<i>Hortaea werneckii</i>	hortein	spojina z acenaftol (1', 2': 7,8) naftalenskim obročem		Brauers, G. in sod., J. Nat. Prod., 2001, 64, 651. (v Blunt, J.W., Nat. Prod. Rep., 2003, 20, 1-48)
<i>Wallemia sebi</i>	valeminol in valeminon	cis-zlit iso-kariofilen	valeminol: pri 80 µg/ml povzroča 41% smrtnost solinskih rakcev, pri 50 µg/ml povzroča smrt protozojev (<i>Tetrahymena pyriformis</i>), in je pri 50 µg/ml MIC citotoksičen za jetrne celice in celice BHK. Rast in produkcija toksina je bila večja pri ekstraktu iz gline, ki je rasla na gojišču z 20% saharozo.	Wood G.M., Mann P.J., Lewis D.F., Reid W.J., Moss M.O. (1990). Food Additives and Contaminants 7: 69-77.
<i>Wallemia sebi</i>	UCA 1064-B in UCA 1064-A	azasteroid	UCA 1064-A in B: zavirata rast glive <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (MIC = 50 in 390 ng/ml). Protibakterijska aktivnost proti G+ bakterijam (40 µg /ml), ne pa tudi proti G- bakterijam. Preprečuje proliferacijo celic HeLa S3 (12.7 in 14.8 µM)	Takahashi I., Maruta R., Ando K., Yoshida M., Iwasaki T., Kanazawa J., Okabe M., Tamaoki T. (1993). The Journal of Antibiotics 48: 1312-1313.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 PRIPRAVA GOJIŠČ

Preglednica 2: Navodilo za pripravo gojišča.

	YNB z 2 % Glc (1 l gojišča)	YNB z 40 % Glc (1 l gojišča)	YNB z 10 % NaCl (1 l gojišča)
YNB (g)	1,7	1,7	1,7
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_3$ (g)	5	5	5
Glc (g)	20	400	20
NaCl (g)	-	-	100
Agar (g)	13	13	13

V čaši z volumnom 1500 ml smo pripravili 1000 ml vodne raztopine gojišča tako, da smo zatehtali ustrezno količino gojišča YNB (Yeast Nitrogen Base), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_3$ in Glc. Dodali smo destilirano vodo do oznake 1 l. V čašo z raztopino smo dali magnet in raztopino na magnetnem mešalu mešali, dokler se sestavine niso raztopile. S pomočjo pH-metra smo izmerili pH raztopine. Ob mešanju smo dodali toliko 2 M NaOH, da je bil pH 7,0. Raztopino smo prelili v 2 l erlenmajerico, ji dodali agar in premešali na magnetnem mešalu.

Za pripravo poševnih gojišč smo uporabili steklene epruvete z zamaški iz vase. Pripravljeno gojišče smo segreli v mikrovalovni pečici, da se je agar stopil. V epruvete smo s pipeto odpipetirali po 7,3 ml gojišča, jih zaprli z zamaški in avtoklavirali. Po avtoklaviranju smo epruvete postavili na poševno stojalo. Po 24 urah smo poševna gojišča do nadaljnje uporabe shranili pri 5 °C.

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

3.2 GOJENJE GLIV

Preglednica 3: Seznam halofilnih in halotolerantnih gliv iz Sečoveljskih solin in Arktike

Št.	Vrsta	Sev	Oznaka	Habitat
1.	<i>Alternaria tenuissima</i> skupina C	EXF-2329	AltS	Soline
2.	<i>Alternaria tenuissima</i> skupina C	EXF-2318	AltS	Soline
3.	<i>Alternaria tenuissima</i> skupina X	EXF-2338	AltS	Soline
4.	<i>Alternaria infectoria</i>	EXF-2332	AliS	Soline
5.	<i>Alternaria aborescens</i>	EXF-2340	AlaS	Soline
6.	<i>Aureobasidium pullulans</i>	EXF 150	ApS	Soline
7.	<i>Aureobasidium sp.</i> skupina 5	EXF 922	AspA	Arktika
8.	<i>Aureobasidium pullulans</i> var. <i>melanogenum</i>	EX-F 3233 (275-1-1)	ApG	Japonsko morje, globina 4000 m
9.	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	EXF 381	CcS	Soline
10.	<i>Cladosporium oxysporum</i>	EXF 2246	CcA	Ledenik Staubauer
11.	<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	EXF 385	CsS	Soline
12.	<i>Cladosporium halotolerans</i>	EXF-2513	CsA	Arktika
13.	<i>Cladosporium dominicanum</i>	EXF 732	CdS	Soline
14.	<i>Cladosporium velox</i>	EXF 466	CvS	Soline
15.	<i>Cladosporium halotolerans</i>	EXF 572	ChS	Soline
16.	<i>Cladosporium salinae</i>	EXF 335	CsaS	Soline
17.	<i>Cladosporium langeronii</i>	EXF 1000	CIS	Nohti
18.	<i>Cladosporium psychrotolerans</i>	EXF 391	CpS	Soline
19.	<i>Cladosporium fusiforme</i>	EXF 449	CfS	Soline
20.	<i>Cladosporium spinulosum</i>	EXF 334	CsS	Soline
21.	<i>Hortaea werneckii</i>	EXF 225/MZKI B736	HwS	Soline
22.	<i>Phaeotheca triangularis</i>	EXF-206	PtS	Soline
23.	<i>Trimmatostroma salinum</i>	EXF 295/MZKI B734	TsS	Soline
24.	<i>Fusarium sp.1</i>	EXF 2254	F1S	Soline
25.	<i>Fusarium sp.2</i>	EXF 2276	F2S	Soline
26.	<i>Fusarium sp.3</i>	EXF 2275	F3S	Soline
27.	<i>Fusarium sp.4</i>	EXF 2277	F4S	Soline
28.	<i>Wallemia ichthyophaga</i>	EXF 994	WiS	Soline
29.	<i>Wallemia muriae</i>	EXF 951	Wm	Soline
30.	<i>Wallemia sebi</i>	EXF 958	Ws	Sončnično seme
31.	<i>Cryptococcus albidus</i>	MZKI K528	CaA	Arktika
32.	<i>Cryptococcus liquefaciens</i>	MZKI K428	ClA	Arktika
33.	<i>Filobasidium floriforme</i>	MZKI K560	FfA	Arktika
34.	<i>Pichia guilliermondii</i>	EXF 518	PgS	Soline
35.	<i>Pichia guilliermondii</i>	EXF 1496	PgA	Arktika
36.	<i>Rhodosporidium babjevae</i>	EXF 513	RbS	Soline
37.	<i>Rhodosporidium diobovatum</i>	MZKI K650	RdA	Arktika
38.	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	EXF 1630	RmA	Arktika
39.	<i>Trichosporon mucoides</i>	EXF 1444	TmS	Soline
40.	<i>Trichosporon mucoides</i>	EXF-3366	TmA	Arktika
41.	<i>Candida parapsilosis</i>	EXF 1574	CpA	Arktika
42.	<i>Candida parapsilosis</i>	EXF 517	CpS	Soline
43.	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	MZKI K86	ScK	Kontrola

Vsi v poskusu uporabljeni sevi so shranjeni v zbirki EXF na Katedri za molekularno genetiko in biologijo mikroorganizmov Oddelka za biologijo BF (oznaki EXF in AR) ali v Mikrobiološki zbirki Kemijskega inštituta (oznaka MZKI).

Izbrane seve gliv smo iz zbirke EXF prenesli na poševnike. Delo je potekalo v laminariju. Poševnik iz zbirke smo odprli in vrh epruvete obžgali nad plamenom. S cepilno zanko za enkratno uporabo smo previdno postrgali glivno kulturo. Vrh epruvete smo spet obžgali in jo zaprli.

Epruvete s sterilnimi poševniki smo odprli in obžgali ter razmazali glivno kulturo na poševnik. Vrh epruvete smo obžgali in epruveto zaprli. Za posamezen sev smo uporabili po tri poševnike vsakega gojišča.

Poševnike z nacepljenimi glivami smo inkubirali pri sobni temperaturi. Po dveh tednih inkubacije smo glivne kulture prenesli iz poševnikov na plošče. Pripravili smo fiziološke raztopine in sicer tako, da smo 0,9 g NaCl raztopili v 100 ml destilirane vode za gojišča z 2 % Glc, za gojišča s 40 % (30 %, 55 %) Glc pa smo 40 g (30 g, 55 g) Glc raztopili v 100 ml vode.

Poševnik smo odprli in vrh epruvete obžgali nad ognjem, nato pa smo dodali 1 ml raztopine z ustrezno koncentracijo Glc. S sterilno cepilno zanko za enkratno uporabo smo postrgali glive s površine gojišča. Epruveto smo obžgali nad plamenom in zaprli ter jo premešali na rotacijskem stresalniku. Pripravili smo 7 petrijevk z ustreznim gojiščem. Epruveto smo odprli in obžgali vrh nad plamenom, nato pa smo s pipeto prenesli po 100 ml tekočine na petrijevke z gojišči. S sterilno stekleno palčko smo raztopino razmazali po petrijevkah do suhega. Petrijevke z gojiščem YNB s 40 % Glc smo inkubirali pri 30 °C, petrijevke z gojišči YNB z 2 % Glc pa smo inkubirali pri 4 °C. Petrijevke z glivami smo inkubirali toliko časa, da smo dobili zadostno količino glivne kulture.

Pri nekaterih sevih smo koncentracijo sladkorja v gojiščih in inkubacijsko temperaturo prilagodili njihovim rastnim potrebam (Preglednica 4).

Preglednica 4: Pogoji gojenja za posamezne seve gliv.

		nizka temperatura		visoka koncentracija Glc	
		T(°C)	c(Glc) (g/l)	T(°C)	c(Glc) (g/l)
1.	<i>Alternaria tenuissima</i> skupina C	4	2	30	40
2.	<i>Alternaria tenuissima</i> skupina C	4	2	30	40
3.	<i>Alternaria tenuissima</i> skupina X	4	2	30	40
4.	<i>Alternaria infectoria</i>	10	2	30	30
5.	<i>Alternaria aborescens</i>	4	2	30	40
6.	<i>Aureobasidium pullulans</i>	4	2	30	40
7.	<i>Aureobasidium</i> sp. skupina 5	4	2	30	40
8.	<i>Aureobasidium pullulans</i> var. <i>melanogenum</i>	4	2	30	40
9.	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	10	2	30	40
10.	<i>Cladosporium oxysporum</i>	4	2	30	40
11.	<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	10	2	30	40
12.	<i>Cladosporium halotolerans</i>	10	2	30	40
13.	<i>Cladosporium dominicanum</i>	10	2	30	40
14.	<i>Cladosporium velox</i>	4	2	30	40
15.	<i>Cladosporium halotolerans</i>	10	2	30	40
16.	<i>Cladosporium salinae</i>	10	2	30	40
17.	<i>Cladosporium langeronii</i>	10	2	30	40
18.	<i>Cladosporium psychrotolerans</i>	4	2	30	40
19.	<i>Cladosporium fusiforme</i>	4	2	30	40
20.	<i>Cladosporium spinulosum</i>	10	2	30	40
21.	<i>Hortaea werneckii</i>	10	2	30	40
22.	<i>Phaeotheca triangularis</i>	4	2	30	40
23.	<i>Trimmatostroma salinum</i>	10	2	30	40
24.	<i>Fusarium</i> sp. 1	4	2	30	40
25.	<i>Fusarium</i> sp. 2	10	2	30	40
26.	<i>Fusarium</i> sp. 3	10	2	30	40
27.	<i>Fusarium</i> sp. 4	4	2	30	30
28.	<i>Wallemia ichthyophaga</i>	10	55*	30	55*
29.	<i>Wallemia muriae</i>	10	40*	30	40
30.	<i>Wallemia sebi</i>	sobna	2	30	40
31.	<i>Cryptococcus albidus</i>	4	2	30	40
32.	<i>Cryptococcus liquefaciens</i>	4	2	30	40
33.	<i>Filobasidium floriforme</i>	4	2	30	30
34.	<i>Pichia guilliermondii</i>	4	2	30	40
35.	<i>Pichia guilliermondii</i>	4	2	30	40
36.	<i>Rhodosporidium babjevae</i>	4	2	30	40
37.	<i>Rhodosporidium diobovatum</i>	4	2	30	40
38.	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	4	2	30	40
39.	<i>Trichosporon mucoides</i>	10	2	30	30
40.	<i>Trichosporon mucoides</i>	10	2	30	40
41.	<i>Candida parapsilosis</i>	10	2	30	40
42.	<i>Candida parapsilosis</i>	10	2	30	40
43.	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	10	2	30	40

Legenda: * gliva ni rasla pri nižjih koncentracijah sladkorja.

Po inkubaciji smo glivno kulturo postrgali z gojišča. Delo je potekalo v laminariju. Uporabili smo po dve mikrocentrifugirki z volumnom 2 ml za vsak sev glice in ju označili z alkoholnim flomastrom. Spatulo smo obžgali nad plamenom, nato pa smo s petrijevk postrgali glivno kulturo in jo enakomerno porazdelili v mikrocentrifugirki. Mikrocentrifugirke smo zaprli in zamrznili v tekočem dušiku. Shranili smo jih pri -80 °C do nadaljnje uporabe.

Za kontrolne vzorce smo uporabili podatke kolegic Miše Mojce Cajnko in Sandre Žulič. Konrolne glice so rasle na gojiščih YNB z 2 % Glc pri temperaturi 30 °C. Postopki gojenja, ekstrakcije, določanja suhe mase, kvantifikacije proteinov ter testov biološke aktivnosti pri kontrolah so bili enaki kot je opisano v poglavju Materiali in metode. Poleg kontrol so v preglednicah v poglavju Rezultati prikazani še rezultati kolegice Sandre Žulič (stolpci označeni s sivo barvo), ki je glice gojila na gojiščih s povečano slanostjo (10 % NaCl) pri 30 °C.

3.3 EKSTRAKCIJA

Mikrocentrifugirke z zamrznjenimi glivnimi kulturami smo postavili v stojalo in odprli pokrovčke. Stojalo z odprtimi mikrocentrifugirkami smo postavili v liofilizer in jih čez noč posušili do suhega.

Po liofilizaciji smo dodali deionizirano vodo do 2 mm pod robom mikrocentrifugirke. Mikrocentrifugirke smo označili z etiketami, na katere smo s kemičnim svinčnikom napisali številko seva, temperaturo pri kateri smo sev gojili in topilo. Etikete smo prelepili z lepilnim trakom. Pokrovčke zaprtih mikrocentrifugirk smo oblepili s parafilmom. Tako pripravljene mikrocentrifugirke smo čez noč dali na stresalnik pri 4 °C. Stresali smo jih minimalno 12 ur.

Po stresanju smo mikrocentrifugirke centrifugirali 10 min pri 13000 obratih/min in 4 °C. Po centrifugiranju smo supernatant s pipeto prenesli v čiste označene mikrocentrifugirke. Mikrocentrifugirke smo zaprli in polovico mikrocentrifugirk shranili pri -20 °C do nadaljnje uporabe. To je bila »sveža serija« in vzorci so bili označeni z oznako »S«.

Drugo polovico zaprtih mikrocentrifugirk smo najprej preluknjali z ožgano iglo. Nato smo jih kuhalili 10 min v vreli vodi tako, da je bil pokrovček mikrocentrifugirke nad vodo in ni bilo pritiska v mikrocentrifugirki. Po kuhanju smo mikrocentrifugirke ponovno centrifugirali 10 min pri 13000 obratih/min. Po centrifugiranju smo supernatant s pipeto prenesli v sterilne označene mikrocentrifugirke ter jih shanili na -20 °C. To pa je bila »kuhana serija« in vzorci so bili označeni z oznako »Ku«.

3.4 UGOTAVLJANJE KONCENTRACIJE SUHE SNOVI V EKSTRAKTIH

Pripravili smo posodice premera 1,5 cm iz aluminijaste folije. Posodice smo označili in stehtali. V stehtane posodice smo odpipetirali 100 µl ekstrakta in jih posušili v sušilniku pri 100 °C. Nato smo posodice ponovno stehtali in izračunali neto vrednost suhe snovi v vzorcu. Za ugotavljanje koncentracije (mg/ml) smo dobljeno vrednost pomnožili z 10.

3.5 UGOTAVLJANJE KONCENTRACIJE PROTEINOV V EKSTRAKTIH

Količino proteinov smo merili samo pri »sveži seriji« vzorcev. 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 µl ekstrakta vsakega vzorca dodali 8 µl deionizirane vode. K temu smo dodali 200 µl mešanice reagentov A in B. Pripravili smo še kontrolo, v kateri je bilo 10 µl deionizirane vode in 200 µl mešanice reagentov A in B. S čitalcem mikrotitrskih plošč smo po 30 minutni inkubaciji pri 37 °C določili absorpcijo proteinov pri valovni dolžini 562 nm. Iz umeritvene krivulje za znane koncentracije govejega serumskega albumina smo odčitali koncentracije proteinov.

Preglednica 5 prikazuje koncentracije proteinov ter njihove absorpcije, na podlagi katerih smo naredili umeritveno krivuljo.

Preglednica 5: Koncentracije proteinskih standardov (BSA) in njihove absorpcije pri 562 nm.

Standardi	Absorbcija pri 562 nm [A _{562nm}]	Koncentracija proteinov [mg/ml]
1	0.687	5
2	0.136	1
3	0.075	0.5
4	0.012	0.1
5	0	0

3.6 TESTI ZA DOLOČANJE BIOLOŠKIH AKTIVNOSTI

3.6.1 Hemolitični test

Eritrocite smo s centrifugiranjem izolirali iz sveže goveje krvi. Pri odvzemu smo ji dodali citrat, da ni prišlo do strjevanja. Eritrocite smo trikrat sprali s fiziološko raztopino (0,9 % NaCl). Do nadaljne uporabe smo jih shranili v Alseverjevem konzervansu v hladilniku. Tako pripravljene eritrocite lahko uporabljamо dokler ne pride do hemolize, to je dokler se supernatant ne obarva rdeče.

Pred uporabo smo konzervirane eritrocite dvakrat sprali s fiziološko raztopino (0,9 % NaCl). Za testiranje smo jih resuspendirali v pufru za eritrocite (raztopina 0,13 M NaCl in 0,02 M TRIS.HCl), pH 7,4. Pripravili smo suspenzijo eritrocitov, ki je imela pri 650 nm navidezno absorpcijo $1,0 \pm 0,01$.

Hemolitično aktivnost smo spremljali s pomočjo čitalca mikrotitrskih plošč (Dynex Technologies, ZDA). Mikrotitrskе plošče so imele 12x8 vdolbinic, kar nam je omogočilo spremeljanje hemolitične aktivnosti 96 vzorcev naenkrat.

Na mikrotitrski plošči smo z multikanalno pipeto napolnili vdolbinice s $100 \mu\text{l}$ eritrocitnega pufra in z navadno pipeto še s po $20 \mu\text{l}$ vodnega ekstrakta glivne kulture. Nato smo tik pred začetkom meritve v vsako vdolbinico z multikanalno pipeto dodali $100 \mu\text{l}$ suspenzije eritrocitov.

Hemolizo smo opazovali kot padec absorpcije pri 650 nm. Kot kontrolo smo uporabili 100 µl eritrocitnega pufra, 20 µl vode in 100 µl eritrocitov. Hemolizo smo zasledovali 20 minut pri 25 °C. Odčitali smo polovični čas hemolize (t_{50}), to je čas pri katerem je navidezna absorpcija suspenzije eritrocitov padla na polovico svoje začetne vrednosti.

Ker vzorci niso bili hemolitično aktivni, nadaljnje redčenje ni bilo potrebno.

3.6.2 Določanje protibakterijske aktivnosti

Protibakterijsko aktivnost vzorcev gliv smo testirali s standardnim difuzijskim testom na agarju. Kot testna seva smo uporabili sev po Gramu negativne bakterije *Escherichia coli* in sev po Gramu pozitivne bakterije *Bacillus subtilis*. Oba seva sta v zbirki Katedre za molekularno genetiko in biologijo mikroorganizmov Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Bakterijska seva smo sterilno nacepili v 10 ml avtoklaviranega tekočega gojišča LB (Luria - Bertani broth), ki smo ga pripravili tako, da smo v 100 ml deionizirane vode raztopili 2,5 g gojišča LB (Sigma, ZDA) in raztopino razdelili v erlenmajerici. Erlenmajerici z nacepljenim gojiščem smo preko noči stresali pri 250 obratov/minuto pri 37 °C. Naslednji dan smo določili število bakterij tako, da smo 1 ml gojišča sterilno prenesli v plastično kiveto in na dvožarkovnem spektrofotometru (Shimadzu, Japonska) izmerili optično gostoto pri 600 nm. Kot slepi poskus smo uporabili sterilno LB tekoče gojišče. Število bakterij smo določili iz optične gostote raztopine s pomočjo standardiziranih umeritvenih krivulj za ustrezna bakterijska seva.

Trdna gojišča smo pripravili z raztplavljanjem in mešanjem 25 g gojišča LB in 15 g agarja (Merck, Nemčija) v 1 l deionizirane vode. Tako pripravljeno gojišče smo nalili v 2 l erlenmajerice in jih pokrili z aluminijasto folijo ter avtoklavirali. Po avtoklaviranju smo vroče gojišče pustili, da se je ohladilo na primerno temperaturo (~42 °C).

Med ohlajanjem smo izračunali volumen tekoče bakterijske kulture. Dodali smo toliko inokulata, da je bila končna koncentracija enaka 5×10^5 bakterijskih kolonij na 1 l gojišča.

Preračunane volumne smo sterilno prenesli v ohlajeno gojišče ter dobro premešali. Po 20 ml agarja z vcepljeno bakterijsko kulturo smo razlili v petrijevke. Le te smo do uporabe hranili pri 4 °C.

S pomočjo steriliziranega plutovrta smo v vsako ploščo zvrtali 10 vdolbin premera 1 cm. Na spodnjo stran petrijevke smo označili, kateri vzorec je v posamezni vdolbini. V vsako vdolbino smo za test vnesli po 100 µl posameznega vzorca. Kot kontrolo smo vnesli 100 µL vode. Po 12-urni inkubaciji pri 37 °C smo odčitali širino inhibicijske cone, ki naj bi bila vidna kot prozoren kolobar okoli vdolbine.

3.6.3 Hemaglutinacijski test

Goveje eritrocite smo trikrat sprali s fiziološko raztopino (0,9 % NaCl) 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.

Test hemaglutinacije smo izvedli na mikrotitrski plošči z vdolbinicami z zaobljenim dnom. Vdolbinice smo napolnili s 100 µl suspenzije spranih eritrocitov in z 20 µl ekstrakta vzorcev gliv. Po 1-urni inkubaciji pri sobni temperaturi smo rezultate odčitali vizualno. Pozitiven rezultat je predstavljal mrežasta struktura zlepljenih eritrocitov, negativen rezultat pa skupek posedlih eritrocitov na dnu jamice.

3.6.4 Test inhibicije acetilholinesteraze

Acetilholinesteraza (AChE) je encim, ki v sinaptičnih špranjah med dvema živčnima celicama in na motorični ploščici hidrolizira nevrotransmiter acetilholin do holina in acetata. Acetilholin je pomemben nevrotransmiter, ki z vezavo na receptor odpre Na^+/K^+ kanalčke in depolarizira celico. Inhibicija AChE povzroči neprestano proženje postsinaptičnih potencialov, kar paralizira mišice in povzroči smrt organizma. Spojine, ki preprečujejo delovanje acetilholinesteraze, lahko zato uvrščamo med nevrotoksin.

Aktivnost acetilholinesteraze in njeni inhibiciji s testnimi vzorci smo zasledovali z Ellmanovo metodo (Ellman in sod., 1961) s pomočjo čitalca mikrotitrskih plošč (Dynex

Technologies, ZDA). Kot encim smo uporabili AChE iz električne jegulje (Sigma, ZDA), ki smo ga raztopili v 100 mM fosfatnem pufru, pH 7,3 v koncentraciji 500 encimskih enot (EE)/mL. Pred testom smo ga stokrat redčili v fosfatnem pufru. Mikrotitrsko ploščo smo napolnili s 150 µL mešanice Ellmanovega reagenta (raztopina 5,5-ditiobis-2-nitrobenzojske kisline (91 mg) in natrijevega hidrogen karbonata (37,5 mg) v 25 mM fosfatnem pufru, pH 7,0) in substrata (acetiltioholin jodid s končno koncentracijo 1 mM).

Potem smo v posamezne vdolbinice dodali 20 µL vsakega testnega vzorca. Tik pred začetkom meritve smo dodali še 50 µL encima AChE. Kontrola je namesto vzorca vsebovala 20 µL vode. Vse meritve smo izvajali 12 min pri 412 nm pri 25 °C.

4 REZULTATI

Rezultati testov so predstavljeni v preglednicah in grafih. V preglednicah smo zaradi večje preglednosti uporabili barvno označevanje glede na okolje iz katerega je bil sev izoliran. Z zeleno smo označili seve izolirane iz solin, z modro seve izolirane iz Arktike ter z vijolično seve izolirane iz drugih okolij. Rezultati označeni s sivo barvo, so pa primerjalni rezultati kolegice Sandre Žulič (Žulič, 2010), ki je gline gojila na gojiščih z 10 % NaCl pri 30 °C.

4.1 KONCENTRACIJE SUHE SNOVI IN PROTEINOV V EKSTRAKTIH

Izmerjene koncentracije suhe snovi in proteinov v posameznih ekstraktih testiranih gliv so prikazane v Preglednici 6. Kuhani ekstrakti gliv proteinov niso vsebovali, zato nismo opravljali meritev absorpcije teh ekstraktov.

Večina kuhanih ekstraktov gliv, ki so gojene pri nizki temperaturi in z visoko koncentracijo Glc, ima nekoliko višje koncentracije suhe snovi kot sveži ekstrakti. To je razvidno tudi iz primerjalnih rezultatov (Žulič, 2010), kjer so gojili gline v gojiščih s povečano koncentracijo NaCl. Ravno obratno se je pokazalo le pri ekstraktih gliv, ki so jih gojili pri kontrolnih razmerah, kjer ima večina svežih ekstraktov gliv večje koncentracije suhe snovi kot kuhami ekstrakti. Najvišje vrednosti najdemo pri kuhamih ekstraktih gojenih v gojišču z visoko koncentracijo Glc. Najnižje vrednosti pa imajo sveži ekstrakti gojeni pri nizki temperaturi.

Najvišje vrednosti koncentracij proteinov smo izmerili pri ekstraktih gliv, ki so bili gojeni v gojišču z visoko koncentracijo Glc. Najbolj izstopa glivni sev *Aureobasidium pullulans* var. *melanogenum* z oznako EXF-3233 (275-1-1) izoliran iz Japonskega morja, ki ima najvišje koncentracije proteinov pri vseh gojitvenih pogojih. Najnižje vrednosti pa imajo gline gojene pri kontrolnih razmerah. Eden takšnih je glivni sev *Cladosporium sphaerospermum* z oznako EXF 385, ki je izoliran iz solin.

Rapp I. Vpliv glukoze in temp. na produkcijo biološko aktivnih snovi v ekstraktih gliv redu *Dothideales* in izbranih kvasovk.

Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Odd. za biologijo, 2010

Preglednica 6: Koncentracije suhe snovi in proteinov v ekstraktih gliv.

Št.	Vrsta	Sev	SS-S-K (mg/ml)	P-K (mg/ml)	SS-Ku-K (mg/ml)	SS-S-NaCl (mg/ml)	P-NaCl (mg/ml)	SS-Ku-NaCl (mg/ml)	SS-S-NT (mg/ml)	P-NT (mg/ml)	SS-Ku-NT (mg/ml)	SS-S-G (mg/ml)	P-G (mg/ml)	SS-Ku-G (mg/ml)
1.	<i>Alternaria tenuissimum</i> skupina C	EXF-2329	46,0	2,2	106,3	22,8	4,6	86,9	7,8	3,4	8,0	59,0	4,1	58,4
2.	<i>Alternaria tenuissimum</i> skupina C	EXF-2318	4,7	0,9	3,8	7,3	1,0	4,6	3,0	0,6	6,2	3,4	0,2	142,4
3.	<i>Alternaria tenuissimum</i> skupina X	EXF-2338	1,9	0,6	1,3	41,0	1,7	34,7	7,0	0	7,4	21,0	1,8	66,8
4.	<i>Alternaria infectoria</i>	EXF-2332*							5,4	0,6	10,2	18,2	2,6	88,2
5.	<i>Alternaria aborescens</i>	EXF-2340	20,3	1,6	14,4	12,2	2,8	16,9	2,4	0,4	6,0	95,4	8,8	65,4
6.	<i>Aureobasidium pullulans</i>	EXF 150	166,9	1,0	3,2	109,1	6,0	100,4	6,4	1,2	12,8	108,4	9,6	113,6
7.	<i>Aureobasidium sp.</i> skupina 5	EXF 922	8,9	0,5	5,7	62,2	3,4	60,4	81,1	9,4	23,4	169,8	8,1	184,2
8.	<i>Aureobasidium pullulans</i> var. <i>melanogenum</i>	EXF-3233 (275-1-1)	37,2	5,7	23,2	126,6	6,5	76,7	23,4	10,2	26,6	126,8	14,4	137,8
9.	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	EXF 381	55,8	1,6	3,4	28,1	3,7	25,7	4,6	1,0	11,2	3,6	0,6	56,2
10.	<i>Cladosporium oxysporum</i>	EXF 2246**	6,8	0,4	13,9	15,8	1,8	10,1	6,4	1,2	11,2	52,0	9,2	121,0
11.	<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	EXF 385	3,6	0,4	7,3	29,8	0,9	41,5	4,4	0,4	5,8	54,6	0,4	79,4
12.	<i>Cladosporium halotolerans</i>	AR 297*							3,8	0,7	8,8	64,8	0,3	118,8
13.	<i>Cladosporium dominicanum</i>	EXF 732	4,0	0,4	2,2	24,0	2,5	31,2	5,4	2,0	6,0	20,8	2,2	85,0
14.	<i>Cladosporium velox</i>	EXF 466	47,6	0,5	3,6	35,8	1,9	44,0	7,6	0,7	6,8	65,6	1,6	95,6
15.	<i>Cladosporium halotolerans</i>	EXF 572	2,2	0,4	0,8	55,3	0,3	39,9	8,4	1,6	7,6	70,8	3,1	33,4
16.	<i>Cladosporium salinae</i>	EXF 335	7,6	0,9	1,7	27,3	3,9	160,8	3,4	0,7	4,6	97,0	9,7	110,8
17.	<i>Cladosporium langeronii</i>	EXF 1000	26,7	0,4	0,4	8,3	1,0	3,4	5,0	0,5	8,4	39,4	4,9	118,2
18.	<i>Cladosporium psychrotolerans</i>	EXF 391	47,4	0,6	16,7	39,6	1,1	21,4	3,0	0,8	3,4	17,6	4,1	27,0
19.	<i>Cladosporium fusiforme</i>	EXF 449	34,3	0,3	1,0	9,1	0,8	27,1	1,4	0,3	5,6	96,8	9,0	60,2
20.	<i>Cladosporium spinulosum</i>	EXF 334*	9,8	0,8	24,3	15,6	1,3	51,5	2,8	0,4	4,4	13,0	3,4	125,8
21.	<i>Hortea werneckii</i>	EXF 225/ MZKI B736	25,4	0,4	8,8	47,2	1,1	92,4	4,4	0,7	4,4	16,2	0,8	130,0
22.	<i>Phaeotheca triangularis</i>	EXF-206	3,4	0,4	4,2	107,2	6,0	123,4	4,0	0,5	2,4	21,2	6,7	146,0
23.	<i>Trimmastroma salinum</i>	EXF 295/ MZKI B734	4,4	0,8	41,2	8,7	2,5	64,3	5,0	0,3	7,2	6,8	0,8	29,4
24.	<i>Fusarium</i> sp. 1	EXF 2254*							8,4	1,3	7,8	8,2	0,8	118,8
25.	<i>Fusarium</i> sp. 2	EXF 2276	125,1	1,0	213,5	133,7	4,8	73,2	3,8	0	4,2	7,8	2,2	87,2
26.	<i>Fusarium</i> sp. 3	EXF 2275	8,2	2,2	50,4	52,4	5,3	52,5	7,4	2,2	8,8	71,0	11,5	115,2

RappI I. Vpliv glukoze in temp. na produkcijo biološko aktivnih snovi v ekstraktih gliv redu *Dothideales* in izbranih kvasovk.

Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Odd. za biologijo, 2010

Št.	Vrsta	Sev	SS-D-K (mg/ml)	P-K (mg/ml)	SS-B-K (mg/ml)	SS-D-S (mg/ml)	P-S (mg/ml)	SS-B-S (mg/ml)	SS-D-NT (mg/ml)	P-NT (mg/ml)	SS-B-NT (mg/ml)	SS-D-G (mg/ml)	P-G (mg/ml)	SS-B-G (mg/ml)
27.	<i>Fusarium sp. 4</i>	EXF 2277*							4,2	1,5	7,2	24,0	1,2	94,4
28.	<i>Wallemia ichthyophaga</i>	EXF 994	15,0	2,2	12,2	34,0	0,9	31,2	33,2	8,7	51,2	7,2	0,7	115,0
29.	<i>Wallemia muriae</i>	EXF 951	6,2	4,6	10,0	28,4	1,0	35,9	53,8	9,4	35,6	86,6	12,1	100,4
30.	<i>Wallemia sebi</i>	EXF 958	55,3	0,3	5,0	14,9	0,4	3,5	52,4	6,7	115,8	23,6	7,9	4,8
31.	<i>Cryptococcus albidus</i>	MZKI K528	4,0	1,0	7,2	15,1	1,2	12,1	9,4	2,1	4,6	11,2	3,8	31,2
32.	<i>Cryptococcus liquefaciens</i>	MZKI K428	42,3	0,7	7,7	10,1	0,4	21,4	4,6	0,2	7,6	12,4	0,9	9,4
33.	<i>Filobasidium floriforme</i>	MZKI K560	29,1	2,2	34,7	17,0	2,3	20,2	21,8	4,1	21,6	9,8	2,7	23,4
34.	<i>Pichia guilliermondii</i>	EXF 518	16,2	1,4	16,4	14,4	0,6	41,3	21,4	4,3	13,4	6,4	1,8	30,2
35.	<i>Pichia guilliermondii</i>	EXF 1496	3,4	0,4	26,1	25,2	0,9	25,0	3,8	0,3	11,2	19,8	1,6	41,4
36.	<i>Rhodosporidium babjevae</i>	EXF 513	0,8	0,1	4,0	14,0	1,2	19,5	2,0	0,4	19,2	24,6	7,0	46,0
37.	<i>Rhodosporidium diobovatum</i>	MZKI K650	7,8	0,8	3,3	44,2	1,0	60,7	2,8	0,9	6,4	3,4	0,4	17,6
38.	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	EXF 1630*							7,0	3,1	13,0	12,4	3,3	58,0
39.	<i>Trichosporon mucoides</i>	EXF 1444*							25,0	5,4	9,4	8,0	2,5	18,6
40.	<i>Trichosporon mucoides</i>	EXF-3366*							2,8	0,9	7,2	2,4	0,7	32,6
41.	<i>Candida parapsilosis</i>	EXF 1574	5,4	0,8	3,7	57,2	1,2	67,1	7,6	0,7	7,0	9,6	1,2	40,4
42.	<i>Candida parapsilosis</i>	EXF 517	32,5	2,7	54,7	68,5	2,5	166,9	13,8	2,0	13,2	3,6	0,4	47,4
43.	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	MZKI K86	10,3	2,0	5,4	1,5	3,1	7,1	4,0	0,6	4,2	13,0	2,3	13,8

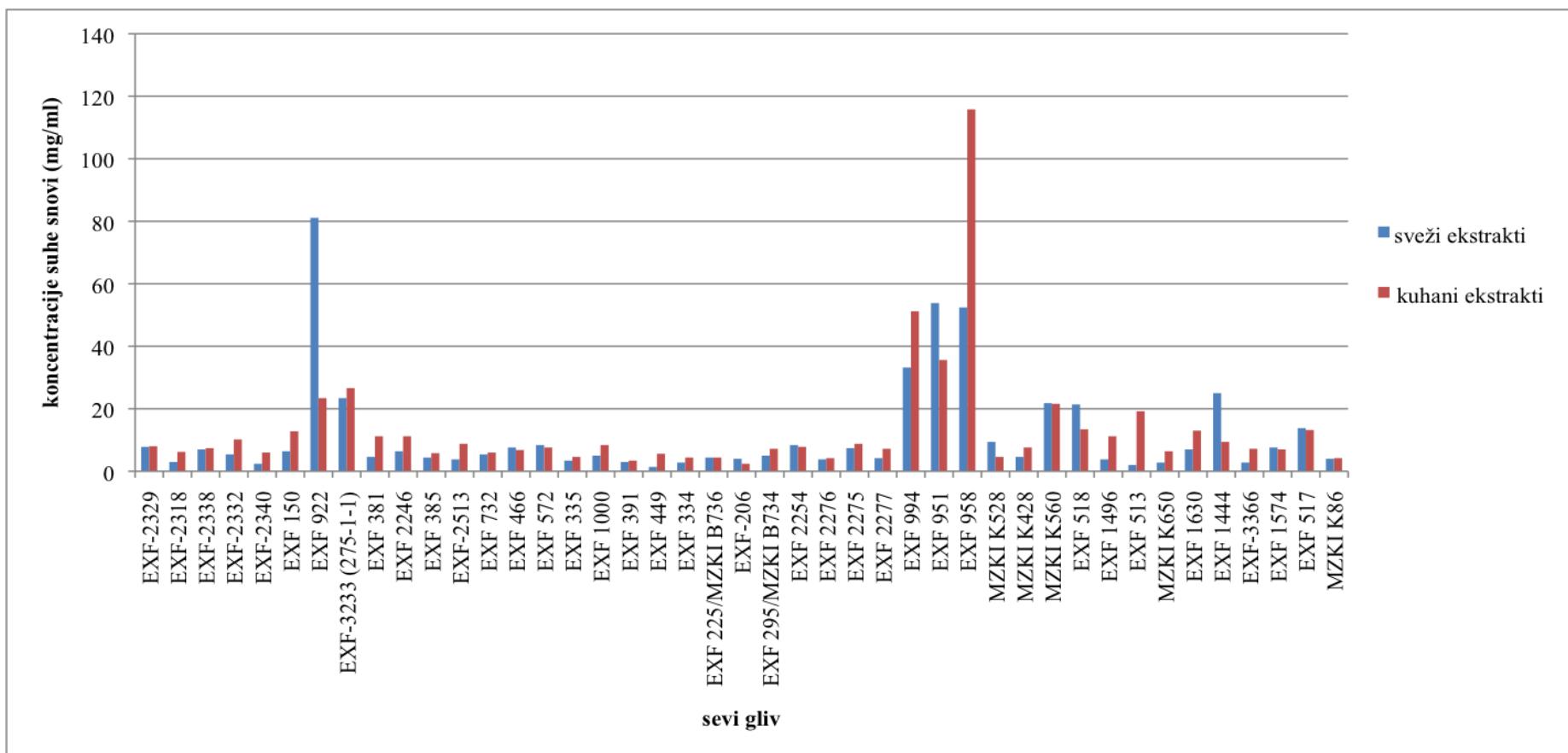
Legenda: prva črka v tabeli je oznaka za koncentracijo suhe snovi (SS) ali koncentracijo proteina (P), druga črka je oznaka za način priprave vzorca (S-sveži, Ku-kuhan), tretja črka je oznaka za razmere pri katerih je bila gliva gojena (K-kontrolne razmere, NaCl-rast na gojišču s povečano slanostjo, NT-rast pri nizki temperaturi, G-rast na gojišču z visoko koncentracijo Glc). Z zeleno so označeni sevi izolirani iz solin, z modro sevi izolirani iz Arktike ter z vijolično sevi izolirani iz drugih okolij. Prazna polja v preglednici pomenijo, da gliva v razmerah ni bila testirana. * ni podatkov za kontrolo, ** podatki za kontrolo se nanašajo na sev EXF 2504, za sev EXF 2246 ni podatkov.

Slika 1 prikazuje suhe teže ekstraktov gliv gojenih pri nizki temperaturi. Modri stolpci prikazujejo sveže ekstrakte gliv, rdeči stolpci pa kuhané ekstrakte gliv.

Višje koncentracije suhe snovi imajo kuhaní ekstrakti, pri katerih najbolj izstopa ekstrakt gliche *Wallemia sebi* z oznako EXF 958 (115,8 mg/ml). Pri svežih ekstraktih pa ima najvišjo koncentracijo ekstrakt gliche *Aureobasidium sp.* skupina 5 z oznako EXF 922 (81,1 mg/ml). Najnižjo koncentracijo kuhaných ekstraktov ima *Phaeotheca triangularis* z oznako EXF-206 (2,4 mg/ml), pri svežih ekstraktih pa *Cladosporium fusiforme* z oznako EXF 449 (1,4 mg/ml).

Rapp I. Vpliv glukoze in temp. na produkcijo biološko aktivnih snovi v ekstraktih gliv reda *Dothideales* in izbranih kvasovk.

Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Odd. za biologijo, 2010

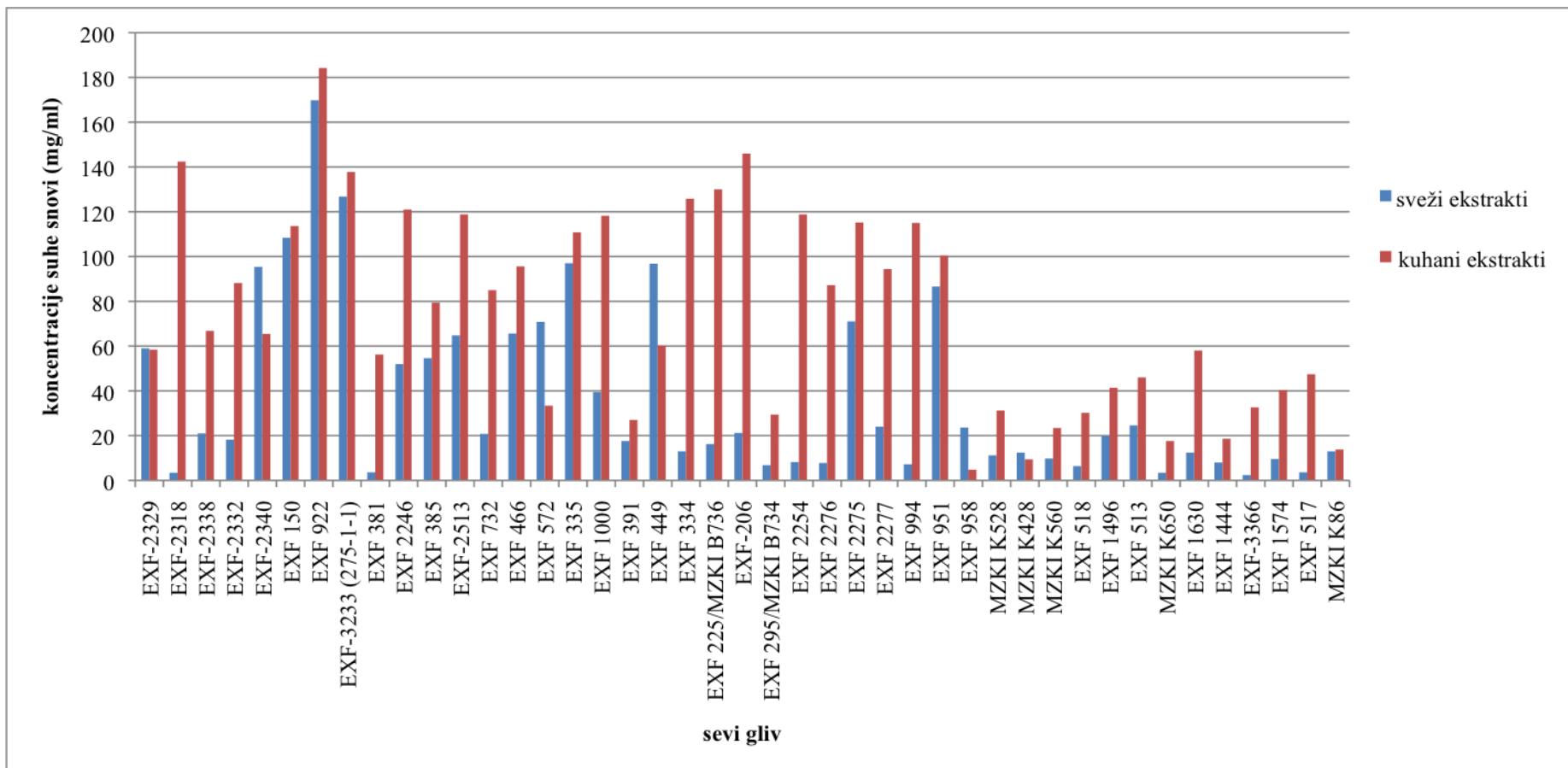


Slika 1: Suhe teže ekstraktov gliv gojenih pri nizki temperaturi

Slika 2 prikazuje suhe teže ekstraktov gliv gojenih na gojišču z visoko koncentracijo Glc. Modri stolpci prikazujejo sveže ekstrakte gliv, rdeči stolpci pa kuhané ekstrakte gliv.

Višje koncentracije suhe snovi imajo kuhaní ekstrakti gliv. Najvišjo vrednost med kuhanimi ekstrakti gliv ima *Aureobasidium sp.* skupina 5 z oznako EXF 922 (184,2 mg/ml) in prav tako pri svežih ekstraktih gliv (169,8 mg/ml). Najnižjo vrednost kuhanih ekstraktov gliv ima *Wallemia sebi* z oznako EXF 958 (4,8 mg/ml), med svežimi ekstrakti gliv pa *Trichosporon mucoides* z oznako EXF-3366 (2,4 mg/ml).

Glive gojene na gojišču z visoko koncentracijo Glc imajo v povprečju vsaj 4-krat višje koncentracije suhe snovi od gliv gojenih pri nizki temperaturi.

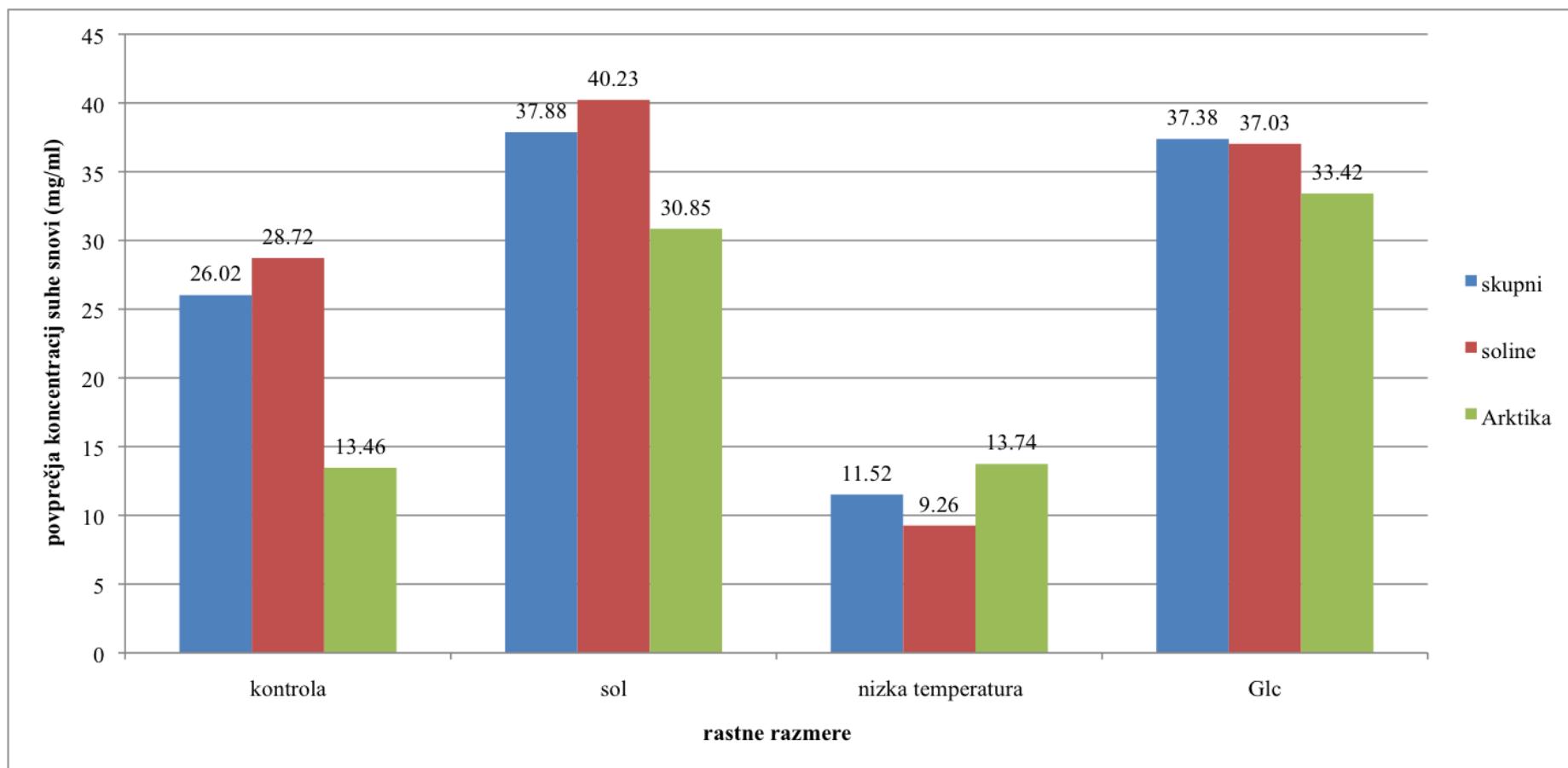


Slika 2: Suhe teže ekstraktov gliv gojenih v gojiščih z visoko koncentracijo Glc

Slika 3 prikazuje povprečja koncentracij suhe snovi svežih ekstraktov glede na razmere rasti gliv. V grafu so trije barvno ločeni stolpci: moder prikazuje povprečja koncentracij suhe snovi vseh svežih ekstraktov gliv, rdeči prikazuje povprečja koncentracij suhe snovi svežih ekstraktov gliv izoliranih iz solin in zeleni stolpec povprečja koncentracij suhe snovi svežih ekstraktov gliv izoliranih iz Arktike.

V kontrolnih razmerah in v gojišču z 10 % NaCl imajo najvišja povprečja koncentracij suhe snovi tisti ekstrakti, ki so izolirani iz solin (K: 28,72 mg/ml , NaCl: 40,23 mg/ml) sledijo jim skupni ekstrakti gliv (K: 26,02 mg/ml, NaCl: 37,88 mg/ml) najmanjša povprečja koncentracij suhe snovi pa imajo ekstrakti, izolirani iz arktičnega ledu (K: 13,46 mg/ml , NaCl: 30,85 mg/ml). Ekstrakti gliv, ki so bile gojene pri nizki temperaturi, imajo najnižja povprečja koncentracij suhe snovi. Najvišje povprečje pri njih imajo ekstrakti izolirani iz Arktike (13,74 mg/ml), sledijo jim skupni ekstrakti gliv (11,52 mg/ml) in nato ekstrakti, izolirani iz solin (9,26 mg/ml). Ekstrakti gliv gojeni v gojišču z visoko koncentracijo Glc imajo visoka povprečja koncentracij suhe snovi. Najvišje povprečje imajo skupni ekstrakti gliv (37,38 mg/ml), sledijo jim ekstrakti izolirani iz solin (37,03 mg/ml), najnižje povprečje pa imajo ekstrakti izolirani iz arktičnega ledu (33,42 mg/ml).

Povprečna koncentracija suhe snovi vseh svežih ekstraktov gliv, ne glede na razmere rasti, je 28,20 mg/ml.



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

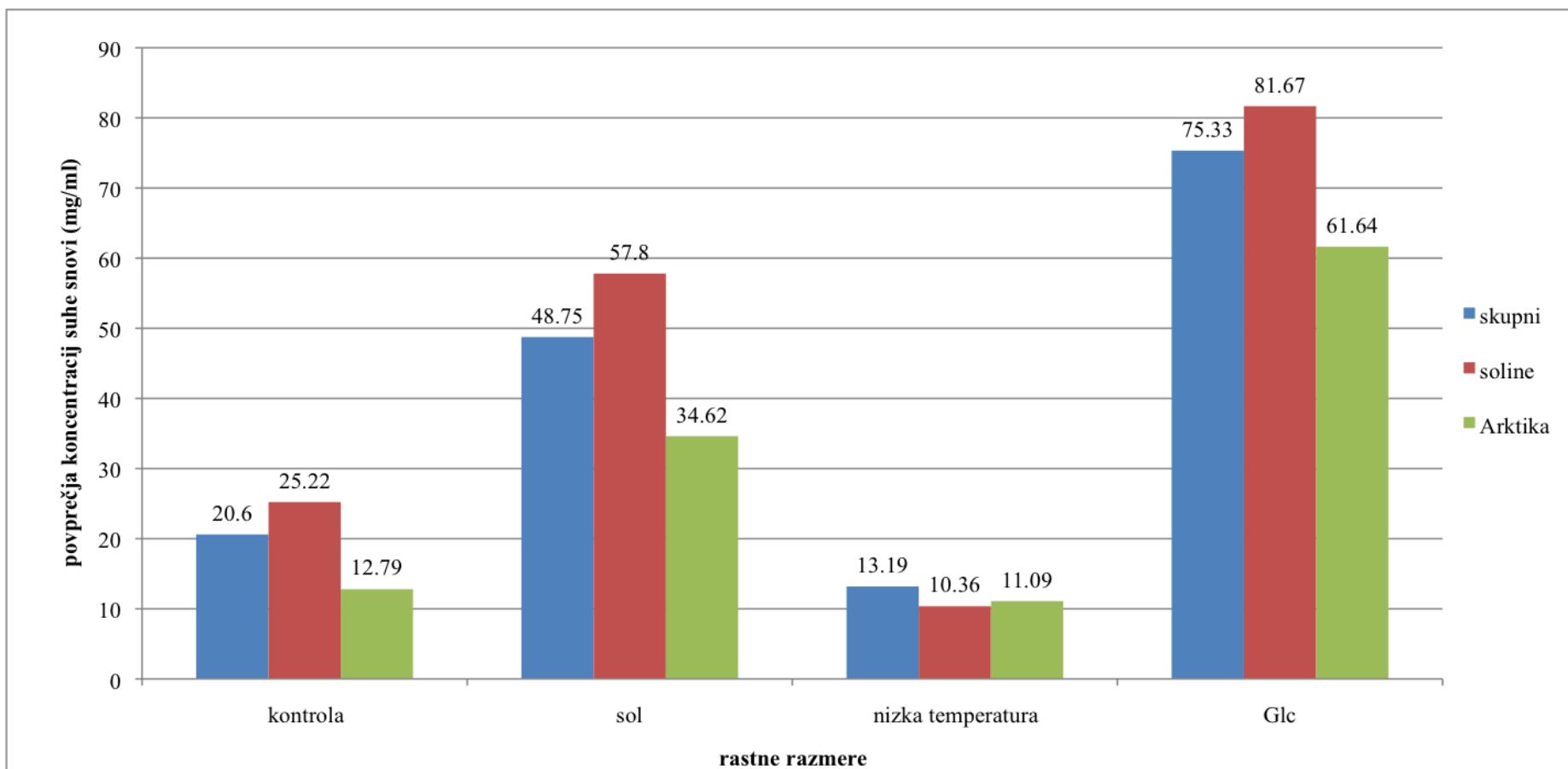
Slika 4 prikazuje povprečja koncentracij suhe snovi kuhanih ekstraktov glede na razmere rasti gliv. V grafu so trije barvno ločeni stolpci: moder prikazuje povprečja koncentracij suhe snovi vseh svežih ekstraktov gliv, rdeči prikazuje povprečja koncentracij suhe snovi svežih ekstraktov gliv izoliranih iz solin in zeleni stolpec povprečja koncentracij suhe snovi svežih ekstraktov gliv izoliranih iz Arktike.

Pri kontrolnih razmerah in v gojišču z 10% NaCl imajo najvišja povprečja koncentracij suhe snovi ekstrakti gliv, ki so izolirani iz solin (K: 25,22 mg/ml, NaCl: 57,80 mg/ml) sledijo jim skupni ekstrakti gliv (K: 20,60 mg/ml, NaCl: 48,75 mg/ml) in nato ekstrakti izolirani iz arktičnega ledu (K: 12,79 mg/ml, NaCl: 34,62 mg/ml). Ekstrakti gliv gojeni pri nizki temperaturi imajo nizke vrednosti povprečij in sicer najvišja imajo skupni ekstrakti gliv (13,19 mg/ml), sledijo jim ekstrakti izolirani iz Arktike (11,09 mg/ml), najnižja povprečja pa imajo ekstrakti izolirani iz solin (10,36 mg/ml). Pri ekstraktih gliv gojenih v gojišču z visoko koncentracijo Glc imajo najvišje vrednosti povprečij ekstrakti izolirani iz solin (81,67 mg/ml), sledijo jim skupni ekstrakti gliv (75,33 mg/ml) in nato ekstrakti izolirani iz Arktike (61,64 mg/ml).

Če povzamemo povprečja vseh skupnih kuhanih ekstraktov gliv, ne glede na razmere rasti, je povprečna koncentracija suhe snovi 39,47 mg/ml.

Rappi I. Vpliv glukoze in temp. na produkcijo biološko aktivnih snovi v ekstraktih gliv redu *Dothideales* in izbranih kvasovk.

Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Odd. za biologijo, 2010



Slika 4: Povprečja koncentracij suhe snovi v kuhanih ekstraktih glede na rastne razmere gliv

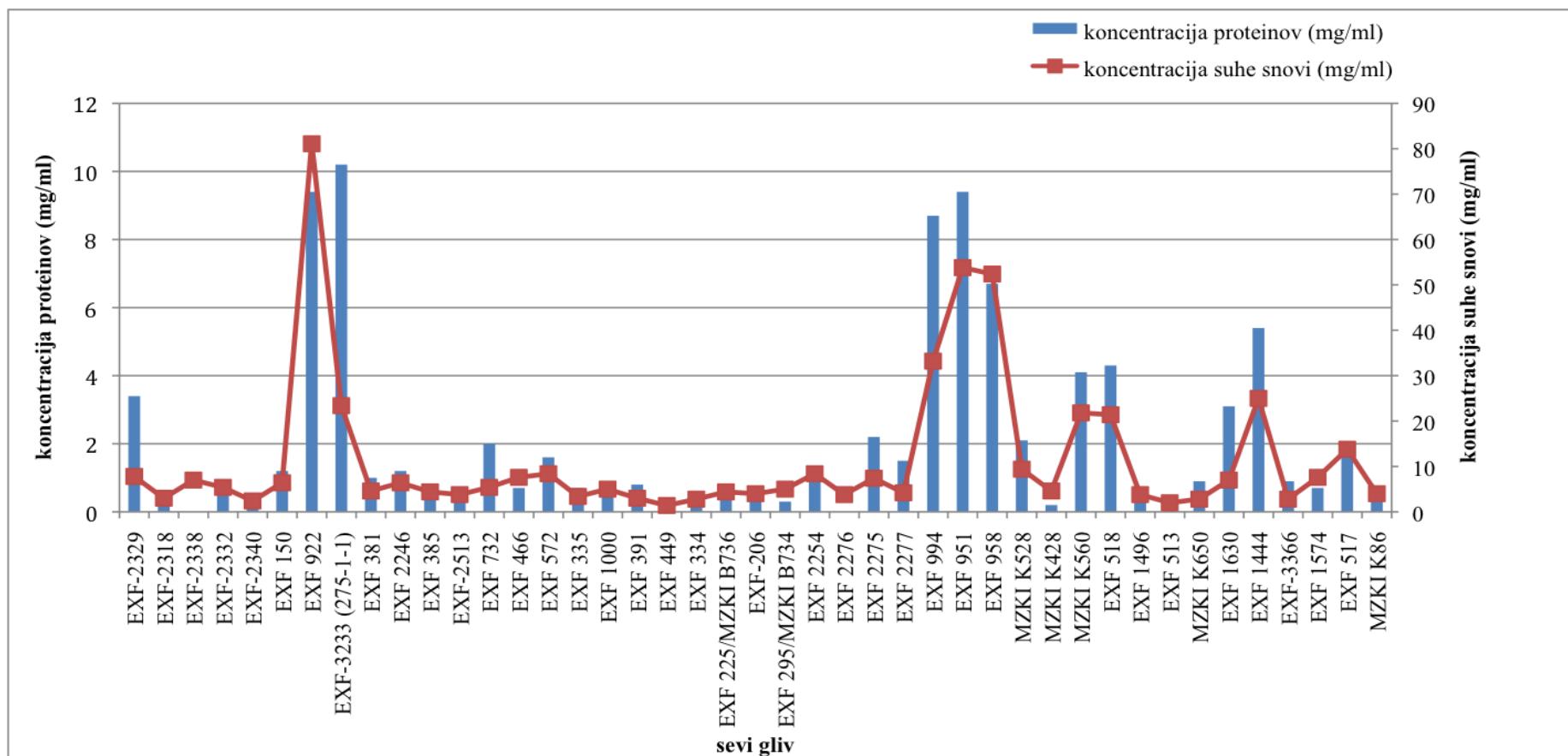
Slika 5 prikazuje koncentracije proteinov iz svežih ekstraktov gliv, ki so rasle pri nizki temperaturi, v odvisnosti od koncentracije suhe snovi v vzorcu. Modri stolpci prikazujejo koncentracijo proteinov (mg/ml), rdeča krivulja pa koncentracijo suhe snovi v vzorcu (mg/ml).

Najvišje koncentracije proteinov so imeli naslednji glivni sevi: *Aureobasidium pullulans* var. *melanogenum* z oznako EXF-3233 (275-1-1) izoliran iz Japonskega morja (P: 10,2 mg/ml, SS: 23,4 mg/ml), *Aureobasidium* sp. skupina 5 z oznako EXF 922 izoliran iz Arktike (P: 9,4 mg/ml, SS: 81,1 mg/ml), *Wallemia muriae* z oznako EXF 951 (P: 9,4 mg/ml, SS: 53,8 mg/ml) in *Wallemia ichthyophaga* z oznako EXF 994 (P: 8,7 mg/ml, SS: 33,2 mg/ml), ki sta izolirana iz solin, ter *Wallemia sebi* z oznako EXF 958 izolirana iz sončničnega semena (P: 6,4 mg/ml, SS: 52,4 mg/ml) (Preglednica 6).

Opažamo, da količina suhe snovi v večini primerov leposovпадa s koncentracijo proteinov v vzorcu.

Rapp I. Vpliv glukoze in temp. na produkcijo biološko aktivnih snovi v ekstraktih gliv reda *Dothideales* in izbranih kvasovk.

Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Odd. za biologijo, 2010



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

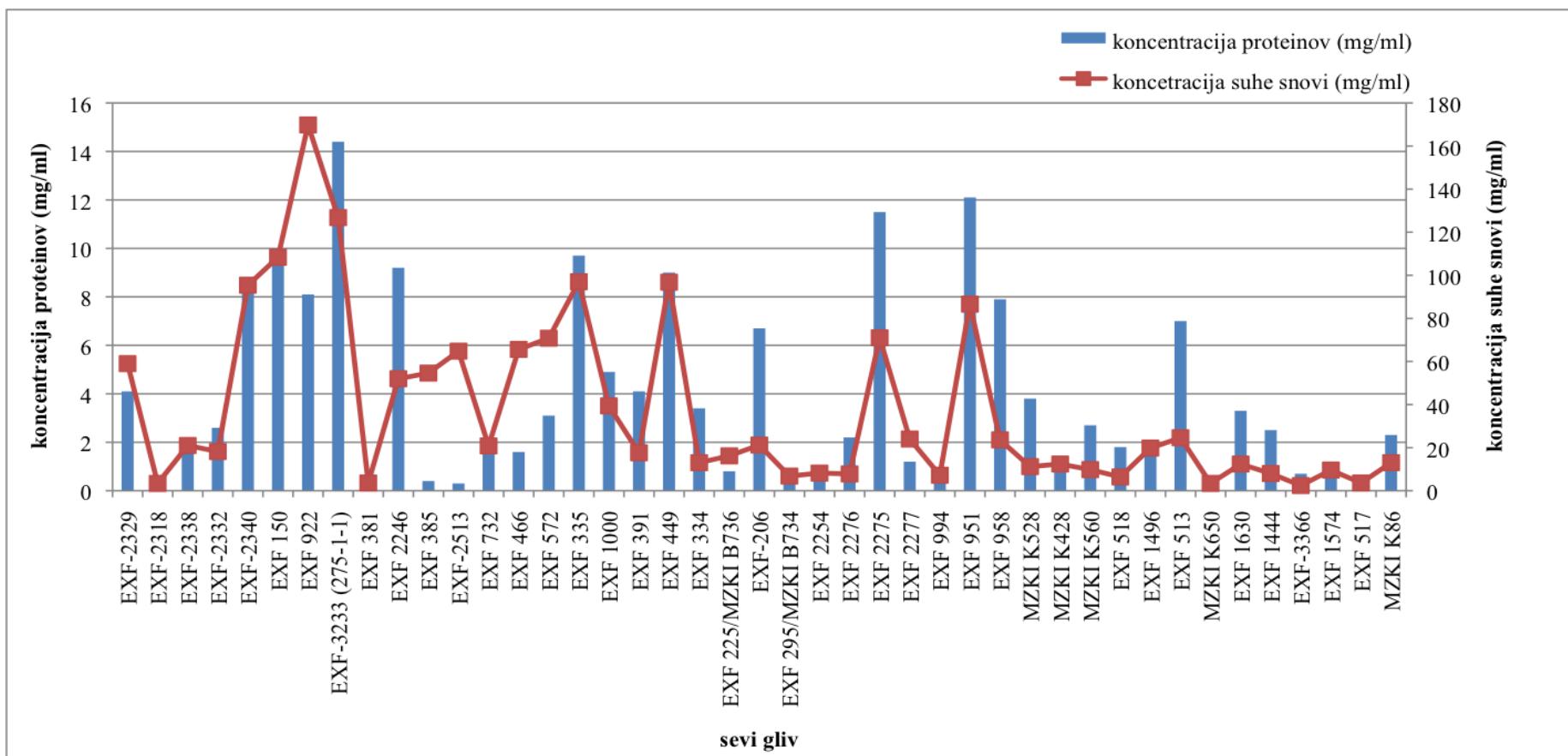
Slika 6 prikazuje koncentracije proteinov v svežih ekstraktih gliv, ki so rasle v gojišču z visoko koncentracijo Glc, v odvisnosti od koncentracije suhe snovi v vzorcu.

Iz slike je razvidno, da so imeli ekstrakti gliv nekoliko višje koncentracije proteinov in suhih snovi kot ekstrakti, ki so rasli pri nizki temperaturi. Najvišje koncentracije proteinov so imeli naslednji sevi: *Aureobasidium pullulans var. melanogenum* z oznako EXF-3233 (275-1-1) izoliran iz Japanskega morja (P: 14,4 mg/ml, SS: 126,8 mg/ml), *Wallemia muriae* z oznako EXF 951 (P: 12,1 mg/ml, SS: 86,6 mg/ml), *Fusarium sp.* 3 z oznako EXF 2275 (P: 11,5 mg/ml, SS: 71,0 mg/ml), *Cladosporium salinae* z oznako EXF 335 (P: 9,7 mg/ml, SS: 97,0 mg/ml) in *Aureobasidium pullulans* z oznako EXF 150 (P: 9,6 mg/ml, SS: 108,4 mg/ml), ki so vsi izolirani iz solin (Preglednica 6).

Tudi pri teh vzorcih opazimo sovpadanje med količino proteinov in količino suhe snovi v ekstraktih.

Rapp I. Vpliv glukoze in temp. na produkcijo biološko aktivnih snovi v ekstraktih gliv redu *Dothideales* in izbranih kvasovk.

Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Odd. za biologijo, 2010



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

4.2 REZULTATI HEMOLITIČNEGA TESTA

Pri vzorcih, ki smo jih testirali, nismo zasledili hemolitične aktivnosti.

4.3 REZULTATI TESTA PROTIBAKTERIJSKE AKTIVNOSTI

Pri vzorcih, ki smo jih testirali, nismo zasledili protibakterijske aktivnosti.

4.4 REZULTATI TESTA HEMAGLUTINACIJE

4.4.1 Rezultati testa hemaglutinacije svežih ekstraktov

Preglednica 7: Rezultati testa hemaglutinacije svežih ekstraktov.

Št.	Vrsta	Sev	CV-K (mg/ml)	K	CV-NaCl (mg/ml)	NaCl	CV-NT (mg/ml)	NT	CV-G (mg/ml)	G
1.	<i>Alternaria tenuissima</i> skupina C	EXF-2329	7,67	-	3,80	-	1,30	++	9,83	-
2.	<i>Alternaria tenuissima</i> skupina C	EXF-2318	0,78	-	1,22	-	0,50	++	0,57	++
3.	<i>Alternaria tenuissima</i> skupina X	EXF-2338	0,32	-	6,83	-	1,17	++	3,50	-
4.	<i>Alternaria infectoria</i>	EXF-2332*					0,90	++	3,03	++
5.	<i>Alternaria aborescens</i>	EXF-2340	3,38	-	2,03	-	0,40	++	15,90	-
6.	<i>Aureobasidium pullulans</i>	EXF 150	27,82	-	18,18	-	1,07	++	18,07	-
7.	<i>Aureobasidium</i> sp. skupina 5	EXF 922	1,48	-	10,37	-	13,52	++	28,30	++
8.	<i>Aureobasidium pullulans</i> var. <i>melanogenum</i>	EXF 3233 (275-1-1)	6,20	-	21,10	-	3,90	++	21,13	-
9.	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	EXF 381	9,30	-	4,68	-	0,77	++	0,60	-
10.	<i>Cladosporium oxysporum</i>	EXF 2246**	1,13		2,63		1,07	++	8,67	-
11.	<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	EXF 385	0,60	-	4,97	-	0,73	++	9,10	-
12.	<i>Cladosporium halotolerans</i>	EXF-2513*					0,63	++	10,80	-
13.	<i>Cladosporium dominicanum</i>	EXF 732	0,67	-	4,00	-	0,90	++	3,47	+
14.	<i>Cladosporium velox</i>	EXF 466	7,93	-	5,97	-	1,27	++	10,93	++
15.	<i>Cladosporium halotolerans</i>	EXF 572	0,37	-	9,22	-	1,40	++	11,80	-
16.	<i>Cladosporium salinae</i>	EXF 335	12,67	-	4,55	-	0,57	++	16,17	+
17.	<i>Cladosporium langeronii</i>	EXF 1000	4,45	-	1,38	-	0,83	++	6,57	-
18.	<i>Cladosporium psychrotolerans</i>	EXF 391	7,90	-	6,60	-	0,50	++	2,93	++
19.	<i>Cladosporium fusiforme</i>	EXF 449	5,72	-	1,52	-	0,23	++	16,13	+
20.	<i>Cladosporium spinulosum</i>	EXF 334	1,63	-	2,60	-	0,47	++	2,17	-
21.	<i>Horaea werneckii</i>	EXF 225/MZKI B736	4,23	-	7,87	-	0,73	++	2,70	-
22.	<i>Phaeotheca triangularis</i>	MZKI-206	0,57	-	17,87	-	0,67	++	3,53	-
23.	<i>Trimmatostroma salinum</i>	EXF 295/MZKI B734	0,73	-	1,45	-	0,83	++	1,13	-

Rapp I. Vpliv glukoze in temp. na produkcijo biološko aktivnih snovi v ekstraktih gliv redu *Dothideales* in izbranih kvasovk.

Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Odd. za biologijo, 2010

Št.	Vrsta	Sev	CV-K (mg/ml)	K	CV-NaCl (mg/ml)	NaCl	CV-NT (mg/ml)	NT	CV-G (mg/ml)	G
24.	<i>Fusarium</i> sp. 1	EXF 2254*					1,40	++	1,37	+
25.	<i>Fusarium</i> sp. 2	EXF 2276	20,85	++	22,28	-	0,63	++	1,30	-
26.	<i>Fusarium</i> sp. 3	EXF 2275	1,37	-	8,73	-	1,23	++	11,83	-
27.	<i>Fusarium</i> sp. 4	EXF 2277*					0,70	++	4,00	-
28.	<i>Wallemia ichthyophaga</i>	EXF 994	2,50	-	5,67	-	5,53	-	1,20	-
29.	<i>Wallemia muriae</i>	EXF 951	1,03	-	4,73	-	8,97	-	14,43	-
30.	<i>Wallemia sebi</i>	EXF 958	9,22	-	2,48	-	8,73	-	3,93	++
31.	<i>Cryptococcus albidus</i>	MZKI K528	0,67	-	2,52	-	1,57	++	1,87	++
32.	<i>Cryptococcus liquefaciens</i>	MZKI K428	7,05	++	1,68	-	0,77	++	2,07	-
33.	<i>Filobasidium floriforme</i>	MZKI K560	4,85	-	2,83	-	3,63	++	1,63	++
34.	<i>Pichia guilliermondii</i>	EXF 518	2,70	-	2,40	-	3,57	-	1,07	-
35.	<i>Pichia guilliermondii</i>	EXF 1496	0,57	-	4,20	-	0,63	++	3,30	++
36.	<i>Rhodosporidium babjevae</i>	EXF 513	0,13	-	2,33	-	0,33	++	4,10	-
37.	<i>Rhodosporidium diobovatum</i>	MZKI K650	1,3	-	7,37	-	0,47	++	0,57	++
38.	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	EXF 1630*					1,17	++	2,07	-
39.	<i>Trichosporon mucoides</i>	EXF 1444*					4,17	++	1,33	-
40.	<i>Trichosporon mucoides</i>	EXF 3366*					0,47	++	0,40	++
41.	<i>Candida parapsilosis</i>	EXF 1574	0,90	-	9,53	-	1,27	++	1,60	++
42.	<i>Candida parapsilosis</i>	EXF 517	5,42	-	11,42	-	2,30	++	0,60	++
43.	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	MZKI K86	1,72	-	0,25	-	0,67	++	2,17	++

Legenda: ++ močna hemaglutinacija, + šibka hemaglutinacija, - hemaglutinacije nismo zasledili (CV-koncentracija suhe snovi v poskusu, K-kontrolne razmere, NaCl-gojišče s povečano slanostjo, NT-nizka temperatura, G-gojišče z visoko koncentracijo Glc), * ni podatkov za kontrolo, ** podatki za kontrolo se nanašajo na sev EXF 2504, za sev EXF 2246 ni podatkov. Z zeleno so označeni sevi izolirane iz solin, z modro sevi izolirane iz Arktike ter z rožnato sevi izolirane iz drugih okolij.

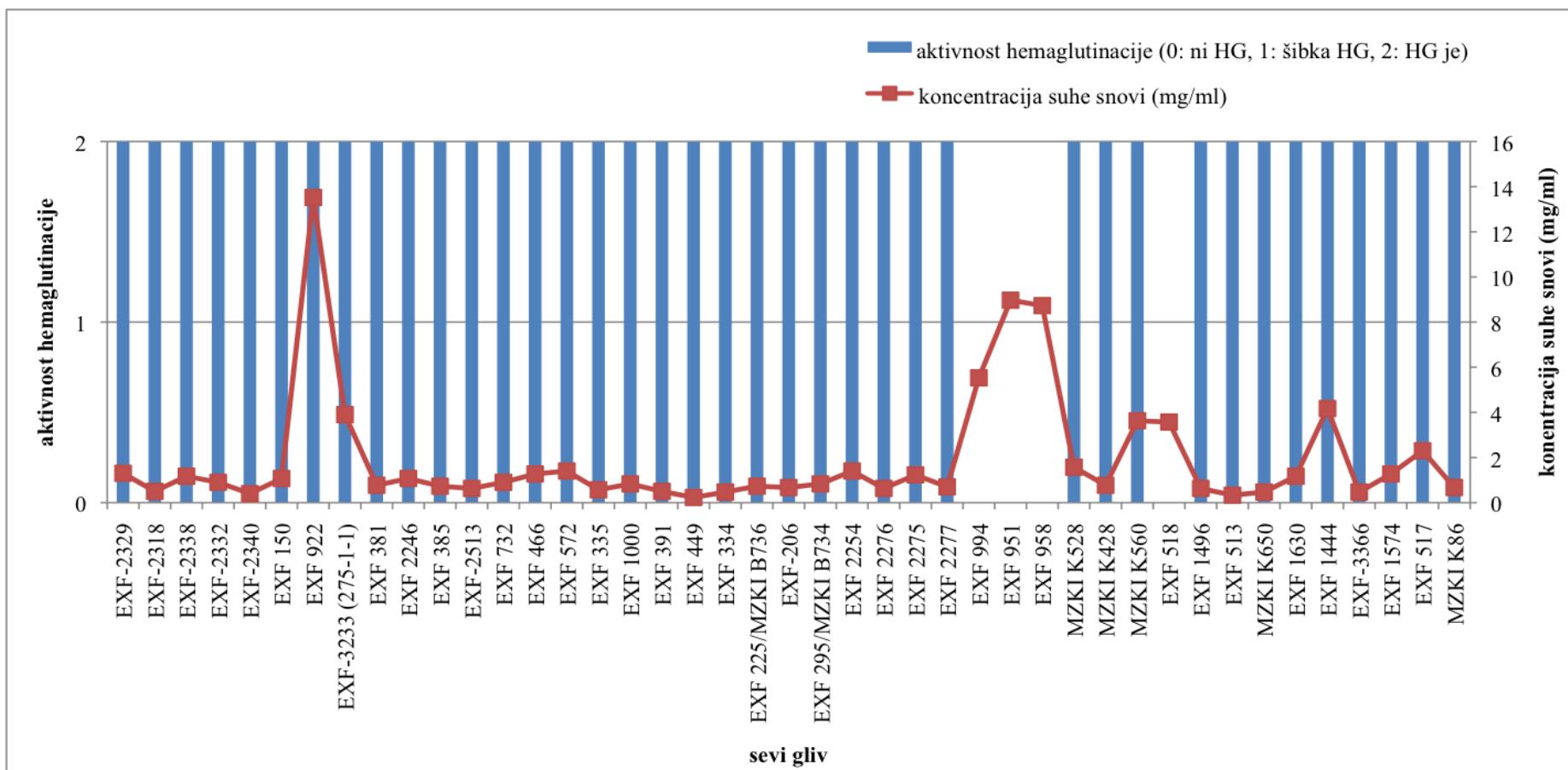
Slika 7 prikazuje rezultate testa hemaglutinacije svežih ekstraktov gliv, ki so rasle pri nizki temperaturi, v odvisnosti od koncentracije suhe snovi v vzorcu. Modri stolpci označujejo aktivnost hemaglutinacije (HG) in sicer vrednost 0 pomeni, da ni HG, vrednost 1 pomeni šibka HG in vrednost 2 pomeni močna HG. Rdeča krivulja pa prikazuje koncentracijo suhe snovi v vzorcih (mg/ml).

Hemaglutinacijo smo zasledili pri večini ekstraktov gliv, razen pri redkih izjemah. Izjeme, ki so imele dokaj visoke koncentracije suhe snovi v primerjavi z drugimi, so bile tri vrste rodu *Wallemia* (*Wallemia ichthyophaga* z oznako EXF 994 in *Wallemia muriae* z oznako 951 izolirani iz solin, ter *Wallemia sebi* z oznako EXF 958 izolirana iz sončničnega semena) in pri vrsti *Pichia guilliermondii* z oznako EXF 518, ki je bila izolirana iz solin.

Pri ekstraktih gliv gojenih pri kontrolnih razmerah smo hemaglutinacijo zasledili le pri uporabi ekstraktov gliv in sicer pri *Fusarium* sp. 2 z oznako EXF 2276 izoliran iz solin in *Cryptococcus liquefaciens* z oznako MZKI K428 izoliran iz Arktike (Preglednica 7).

Rappi I. Vpliv glukoze in temp. na produkcijo biološko aktivnih snovi v ekstraktih gliv redu *Dothideales* in izbranih kvasovk.

Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Odd. za biologijo, 2010



Slika 7: Aktivnost hemagglutinacije svežih ekstraktov gliv, ki so rasle pri nizki temperaturi, v odvisnosti od koncentracije suhe snovi v vzorcu

Slika 8 prikazuje rezultate testa hemaglutinacije svežih ekstraktov gliv, ki so rasle v gojišču z visoko koncentracijo Glc, v odvisnosti od koncentracije suhe snovi v vzorcu.

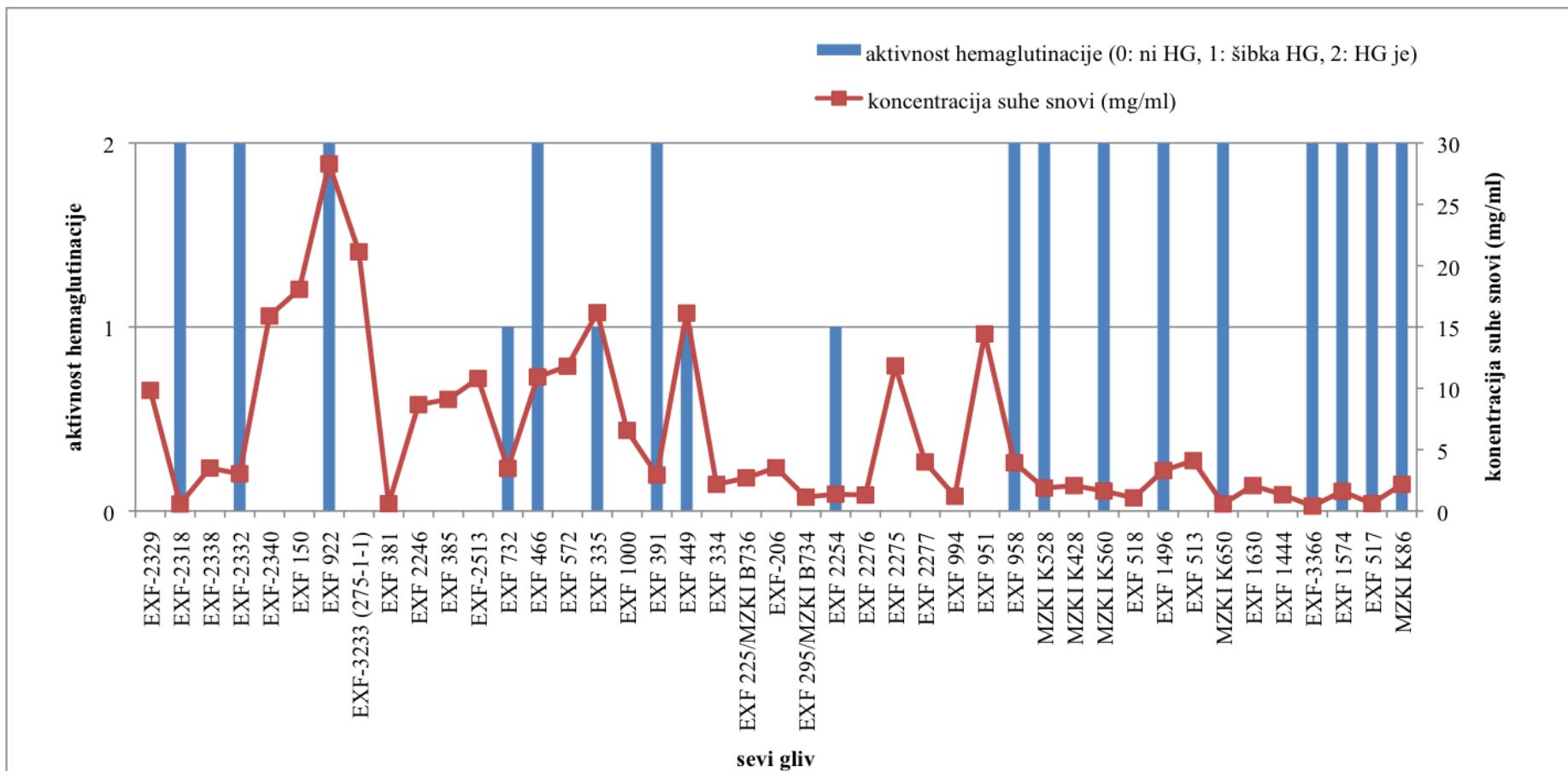
Koncentracije suhe snovi svežih ekstraktov gliv, ki so rasle na gojišču z visoko koncentracijo Glc so bile nekajkrat višje od koncentracij suhe snovi svežih ekstraktov gliv, ki so rasle pri nizki temperaturi.

Hemaglutinacijo smo zasledili le pri 18 ekstraktih gliv od skupno 43. Od teh 18 so imeli širje ekstrakti gliv, ki so bili izolirani iz solin, šibko hemaglutinacijo in sicer ekstrakti gliv *Cladosporium dominicanum* z oznako EXF 732, *Cladosporium salinae* z oznako EXF 335, *Cladosporium fusiforme* z oznako EXF 449 in *Fusarium* sp. 1 z oznako EXF 2254.

Če primerjamo s hemaglutinacijo svežih ekstraktov gliv, ki so rasle pri nizki temperaturi, smo pri svežih ekstraktih gliv, ki so rasle na gojišču z visoko koncentracijo Glc, hemaglutinacijo zasledili pri manjšem številu glivnih ekstraktov.

Rapp I. Vpliv glukoze in temp. na produkcijo biološko aktivnih snovi v ekstraktih gliv redu *Dothideales* in izbranih kvasovk.

Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Odd. za biologijo, 2010



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

4.4.2 Rezultati testa hemaglutinacije kuhanih ekstraktov

Preglednica 8: Rezultati testa hemaglutinacije kuhanih ekstraktov.

Št.	Vrsta	Sev	CV-K (mg/ml)	K	CV-NaCl (mg/ml)	NaCl	CV-NT (mg/ml)	NT	CV-G (mg/ml)	G
1.	<i>Alternaria tenuissima</i> skupina C	EXF-2329	17,72	-	14,48	-	1,33	++	9,73	++
2.	<i>Alternaria tenuissima</i> skupina C	EXF-2318	0,58	-	0,77	-	1,03	++	23,73	+
3.	<i>Alternaria tenuissima</i> skupina X	EXF-2338	0,22	-	5,78	-	1,23	-	11,13	-
4.	<i>Alternaria infectoria</i>	EXF-2332*					1,70	++	14,70	++
5.	<i>Alternaria aborescens</i>	EXF-2340	2,40	-	2,82	-	1,00	++	10,90	+
6.	<i>Aureobasidium pullulans</i>	EXF 150	0,53	-	16,73	++	2,13	++	18,93	++
7.	<i>Aureobasidium</i> sp. skupina 5	EXF 922	0,95	-	10,07	-	3,90	++	30,70	+
8.	<i>Aureobasidium pullulans</i> var. <i>melanogenum</i>	EXF 3233 (275-1-1)	3,87	-	12,78	-	4,43	++	22,97	++
9.	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	EXF 381	0,57	-	4,28	-	1,87	++	9,37	-
10.	<i>Cladosporium oxysporum</i>	EXF 2246**	2,32		1,68		1,87	-	20,17	++
11.	<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	EXF 385	1,22	-	6,92	-	0,97	++	13,23	+
12.	<i>Cladosporium halotolerans</i>	EXF-2513*					1,47	++	19,80	-
13.	<i>Cladosporium dominicanum</i>	EXF 732	0,37	-	5,20	-	1,00	++	14,17	-
14.	<i>Cladosporium velox</i>	EXF 466	0,60	-	7,33	-	1,13	++	15,93	+
15.	<i>Cladosporium halotolerans</i>	EXF 572	0,13	-	6,65	-	1,27	++	5,57	-
16.	<i>Cladosporium salinae</i>	EXF 335	0,28	-	26,80	-	0,77	++	18,47	++
17.	<i>Cladosporium langeronii</i>	EXF 1000	0,07	-	0,57	-	1,40	++	19,70	-
18.	<i>Cladosporium psychrotolerans</i>	EXF 391	2,78	-	3,57	-	0,57	++	4,50	+
19.	<i>Cladosporium fusiforme</i>	EXF 449	0,17	-	4,52	-	0,93	++	10,03	-
20.	<i>Cladosporium spinulosum</i>	EXF 334	4,05	-	8,58	-	0,73	++	20,97	-
21.	<i>Hortaea werneckii</i>	EXF 225/MZKI B736	1,47	-	15,40	-	0,73	++	21,67	-
22.	<i>Phaeotheca triangularis</i>	MZKI-206	0,70	-	20,57	-	0,40	++	24,33	-
23.	<i>Trimmastroma salinum</i>	EXF 295/MZKI B734	6,87	-	10,72	-	1,20	++	4,90	-

Rappi I. Vpliv glukoze in temp. na produkcijo biološko aktivnih snovi v ekstraktih gliv redu *Dothideales* in izbranih kvasovk.

Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Odd. za biologijo, 2010

Št.	Vrsta	Sev	CV-K (mg/ml)	K	CV-NaCl (mg/ml)	NaCl	CV-NT (mg/ml)	NT	CV-G (mg/ml)	G
24.	<i>Fusarium</i> sp. 1	EXF 2254*					1,30	++	19,80	+
25.	<i>Fusarium</i> sp. 2	EXF 2276	35,58	-	12,20	-	0,70	++	14,53	+
26.	<i>Fusarium</i> sp. 3	EXF 2275	8,4	-	8,75	-	1,47	++	19,20	+
27.	<i>Fusarium</i> sp. 4	EXF 2277*					1,20	++	15,73	-
28.	<i>Wallemia ichthyophaga</i>	EXF 994	2,03	-	5,20	-	8,53	-	19,17	+
29.	<i>Wallemia muriae</i>	EXF 951	1,67	-	5,98	-	5,93	-	16,73	-
30.	<i>Wallemia sebi</i>	EXF 958	0,83	-	0,58	-	19,30	++	0,80	++
31.	<i>Cryptococcus albidus</i>	MZKI K528	1,20	-	2,02	-	0,77	++	5,20	++
32.	<i>Cryptococcus liquefaciens</i>	MZKI K428	1,28	-	3,57	-	1,27	++	1,57	++
33.	<i>Filobasidium floriforme</i>	MZKI K560	5,78	-	3,37	-	3,60	++	3,90	++
34.	<i>Pichia guilliermondii</i>	EXF 518	2,73	-	6,88	-	2,23	++	5,03	++
35.	<i>Pichia guilliermondii</i>	EXF 1496	4,35	-	4,17	-	1,87	++	6,90	+
36.	<i>Rhodosporidium babjevae</i>	EXF 513	0,67	-	3,25	-	3,20	++	7,67	-
37.	<i>Rhodosporidium diobovatum</i>	MZKI K650	0,55	-	10,12	-	1,07	++	2,93	++
38.	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	EXF 1630*					2,17	++	9,67	++
39.	<i>Trichosporon mucoides</i>	EXF 1444*					1,57	++	3,10	++
40.	<i>Trichosporon mucoides</i>	EXF 3366*					1,20	++	5,43	+
41.	<i>Candida parapsilosis</i>	EXF 1574	0,62	-	11,18	-	1,17	++	6,73	+
42.	<i>Candida parapsilosis</i>	EXF 517	9,12	-	27,82	-	2,20	++	7,90	+
43.	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	MZKI K86	0,90	-	1,18	-	0,70	++	2,30	++

Legenda: ++ močna hemaglutinacija, + šibka hemaglutinacija, - hemaglutinacije nismo zasledili (CV-koncentracija suhe snovi v poskusu, K-kontrolne razmere, NaCl-gojišče s povečano slanostjo, NT-nizka temperatura, G-gojišče z visoko koncentracijo Glc), * ni podatkov za kontrolo, ** podatki za kontrolo se nanašajo na sev EXF 2504, za sev EXF 2246 ni podatkov. Z zeleno so označeni sevi izolirane iz solin, z modro sevi izolirane iz Arktike ter z rožnato sevi izolirane iz drugih okolij.

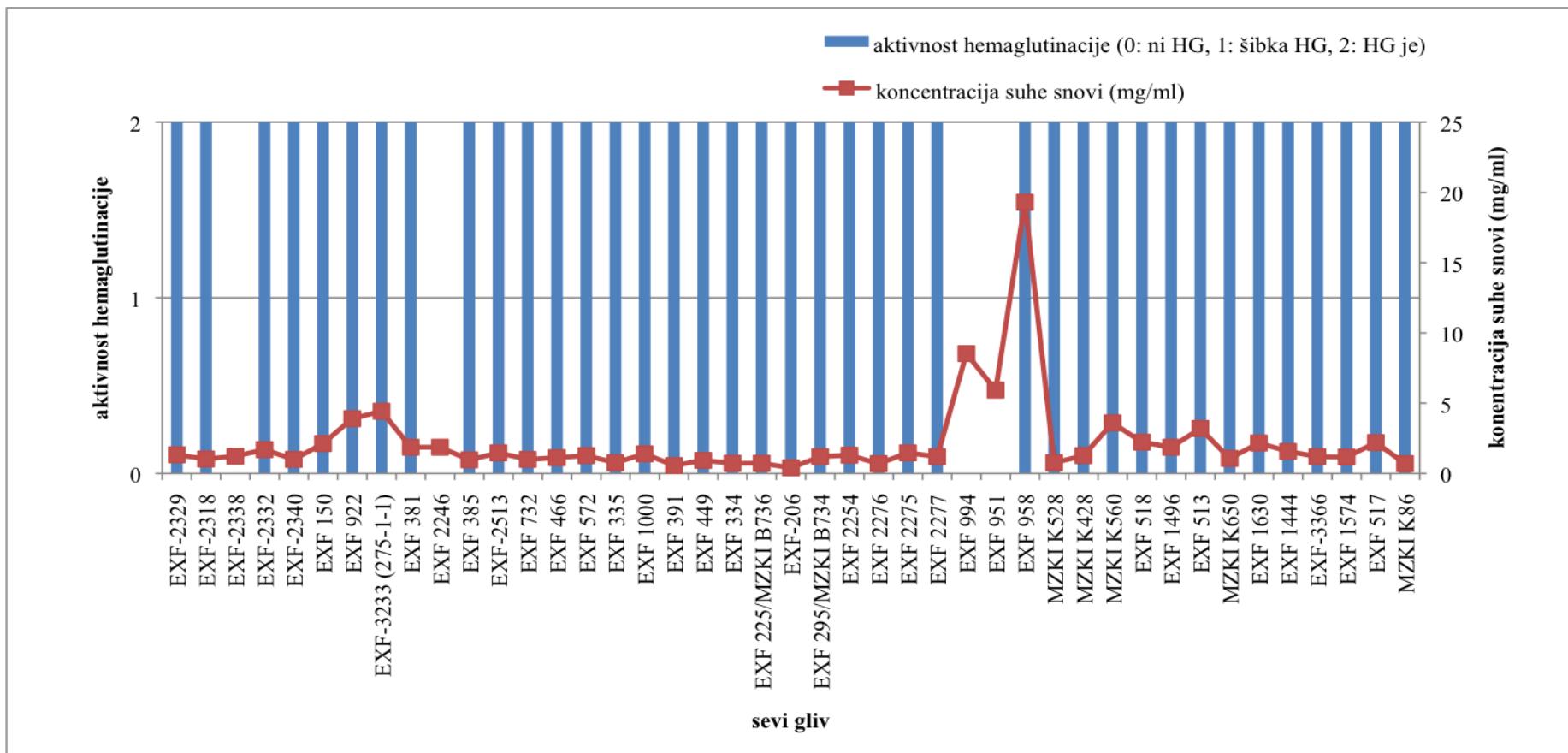
Slika 9 prikazuje rezultate testa hemaglutinacije kuhanih ekstraktov gliv, ki so rasle pri nizki temperaturi, v odvisnosti od koncentracije suhe snovi v vzorcu.

Iz slike je razvidno, da je hemaglutinacija potekla pri večini ekstraktov gliv. Tako je bilo tudi pri svežih ekstraktih, ki so rasli v pogojih nizke temperature. Hemaglutinacije nismo zasledili pri naslednjih vrstah: *Alternaria tenuissima* skupina X z oznako EXF-2338, izolirana iz solin, *Cladosporium oxysporum* z oznako EXF 2246, izoliran iz ledenika Staubauer v Avstriji in ekstrakta sevov *Wallemia ichthyophaga* z oznako EXF 994 in *Wallemia muriae* z oznako EXF 951, ki nista pokazala hemaglutinacijske aktivnosti tudi kot sveža ekstrakta v razmerah nizke temperature.

Kuhani ekstrakti gliv, ki so rasli pri kontrolnih razmerah niso pokazali hemaglutinacijske aktivnosti (Preglednica 8).

Rappi I. Vpliv glukoze in temp. na produkcijo biološko aktivnih snovi v ekstraktih gliv redu *Dothideales* in izbranih kvasovk.

Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Odd. za biologijo, 2010



Slika 9: Aktivnost hemagglutinacije kuhanih ekstraktov gliv, ki so rasle pri nizki temperaturi, v odvisnosti od koncentracije suhe snovi v vzorcu

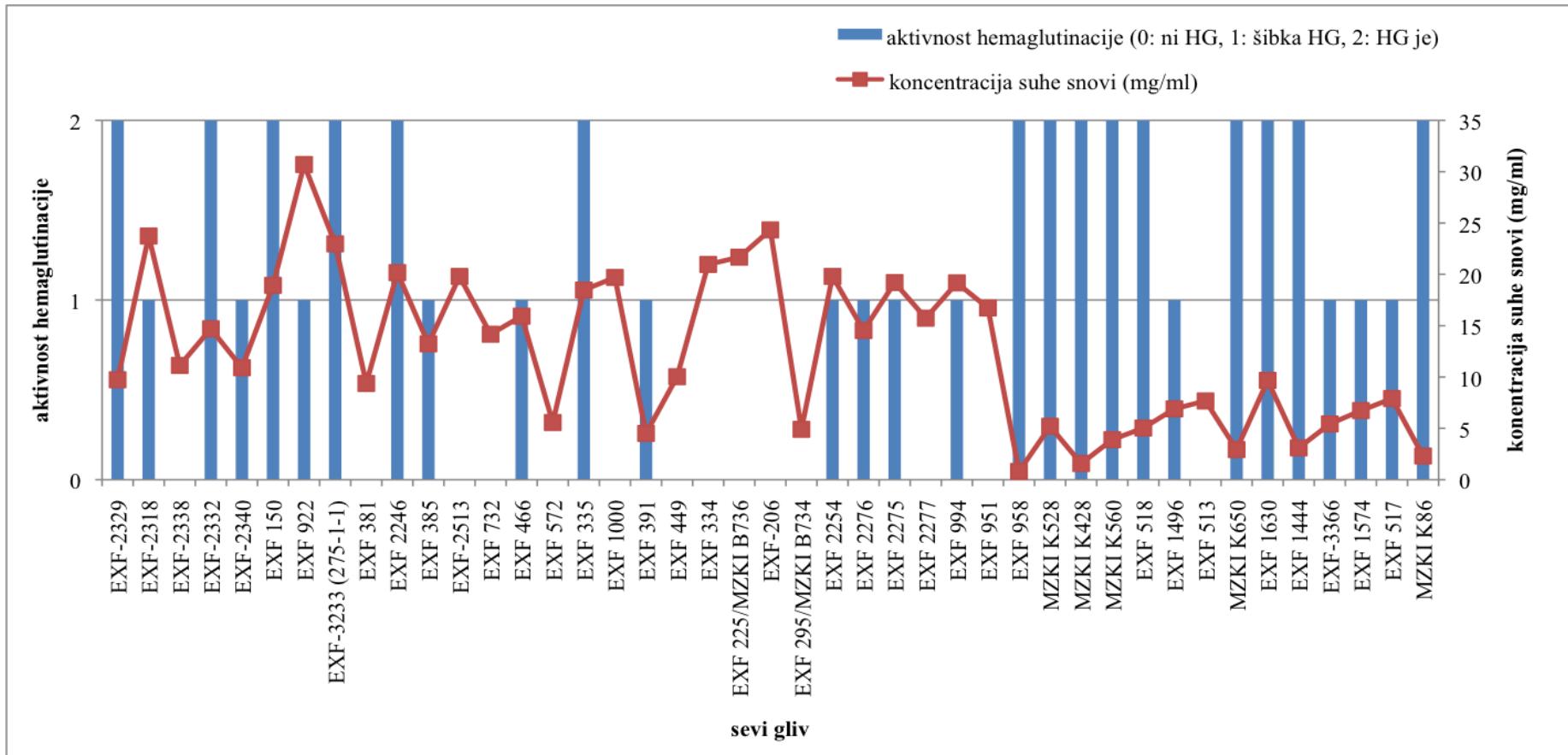
Slika 10 prikazuje rezultate testa hemaglutinacije kuhanih ekstraktov gliv, ki so rasle v gojišču z visoko koncentracijo Glc, v odvisnosti od koncentracije suhe snovi v vzorcu.

Koncentracije suhe snovi kuhanih ekstraktov gliv, ki so rasle na gojišču z visoko koncentracijo Glc so bile nekajkrat višje od koncentracij suhe snovi kuhanih ekstraktov gliv, ki so rasle pri nizki temperaturi. Enake rezultate smo dobili tudi pri svežih ekstraktih gliv.

Hemaglutinacijo smo zasledili pri 29 ekstraktih od skupno 43, od tega je imelo 14 ekstraktov šibko hemaglutinacijo. Kuhan ekstrakt seva *Cladosporium oxysporum* z oznako EXF 2246 v razmerah nizke temperature ni bil hemaglutinacijsko aktiven, v gojišču z visoko koncentracijo Glc pa smo zasledili hemaglutinacijo. Podobne rezultate je pokazal kuhan ekstrakt seva *Wallemia ichthyophaga* z oznako EXF 994, pri katerem smo v gojišču z visoko koncentracijo Glc opazili šibko hemaglutinacijo.

Rapp I. Vpliv glukoze in temp. na produkcijo biološko aktivnih snovi v ekstraktih gliv redu *Dothideales* in izbranih kvasovk.

Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Odd. za biologijo, 2010



Slika 10: Aktivnost hemagglutinacije kuhanih ekstraktov gliv, ki so rasle v gojišu z visoko koncentracijo Glc, v odvisnosti od koncentracije suhe snovi v vzorcu

4.5 REZULTATI TESTA INHIBICIJE ACETILHOLINESTERAZE

Pri vzorcih, ki smo jih testirali, nismo zasledili inhibicije AChE.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Diverziteta gliv v ekstremnih habitatih, predvsem v slanih vodah in arktičnem ledu, je mnogo večja kot so do nedavnega predvidevali. Zato je raziskovanje njihovih še neopisanih bioaktivnih metabolitov postalo zelo pomembno, saj bi jih lahko uporabili kot potencialna zdravila, industrijske reagente, bioremediacijsko pomembne snovi in drugo.

Biološko aktivne snovi so večinoma sekundarni metaboliti. Nekateri med njimi so toksični za vretenčarje, žuželke in mikroorganizme. To so večinoma nepolarne majhne molekule, ki se sintetizirajo, ko je organizem izpostavljen stresnim razmeram in delujejo velikokrat kot obramba organizma. Večino sekundarnih metabolitov gliva izloča v okolje, le redki so skladiščeni v sami glivi. Do sedaj je znanih več kot 400 biološko aktivnih sekundarnih metabolitov izoliranih iz gliv in njihovo število še močno narašča. Med njimi so aflatoksini, poliketidi, terpeni, steroidi, ciklopeptidi, alkaloidi, karotenoidi in kumarini (Samson, 2000). Podatki o do danes odkritih učinkovinah iz gliv, testiranih v tej nalogi, so prikazani v Preglednici 1.

V okviru diplomskega dela 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 dejavnika, ki omogočata življenje: vodno aktivnost in temperaturo. Pripravili smo vodne ekstrakte izbranih gliv in testirali njihovo biološko aktivnost s štirimi izbranimi testi.

5.1.1 Koncentracija suhe snovi in proteinov v ekstraktih

Poleg različnih bioloških aktivnosti nas je zanimalo, kako nizka temperatura in povišana koncentracija glukoze (Glc) vplivata na biomaso in koncentracijo proteinov izbranih gliv. Ugotovili smo, da imajo sveži in kuhanji ekstrakti gliv, ki so bili gojeni v gojišču z visoko koncentracijo Glc v povprečju najvišje vrednosti suhe snovi. Pri primerjavnih rezultatih Sandre Žulič (Žulič, 2010), ki je glive gojila v gojišču s povečano koncentracijo NaCl, se je koncentracija suhe snovi prav tako povečala v primerjavi s kontrolo. Podatki kažejo na

to, da bi lahko povišana koncentracija Glc in NaCl oziroma zmanjšana vodna aktivnost na glive vplivala tako, da se odzovejo s povečano metabolno aktivnostjo in jim omogočila, da se prilagodijo na spremenjene rastne razmere. Poznamo različne strategije za obvladovanje stresa zaradi povišane koncentracije topljencev. Najpomembnejše so: spremembe v sestavi membrane in njenih lastnosti, bolj učinkoviti transportni sistemi za izločanje ionov kakor tudi založni sistemi za ione, ki zmanjšajo toksične učinke v citosolu, akumulacija majhnih organskih molekul, tako imenovanih kompatibilnih topljencev, ter posebnih signalnih transduksijskih sistemov, ki zaznavajo in se odzivajo na povečane koncentracije soli oziroma Glc (Plemenitaš in Gunde-Cimerman, 2005).

Kuhani in sveži ekstrakti gliv, ki so bile gojene pri nizki temperaturi, so imeli v povprečju nižje koncentracije suhe snovi v primerjavi z glivami gojenimi v kontrolnih razmerah. Morda bi lahko sklepala, da nizka temperatura ne predstavlja tolikšnega stresa, da bi glive sintetizirale večjo količino snovi potrebnih za obrambo in/ali adaptacijo. Nizka temperatura povzroča tvorbo ledenih kristalov v celici in posledično zmanjšanje vodne aktivnosti. Povišana koncentracija topljencev in nizka temperatura povzročata podobne odzive celice, vendar povišana koncentracija topljenca povzroča ionski in osmotski stres, nizka temperatura pa le osmotskega. Nizka temperatura povzroča dehidracijo celice, zaradi zmanjšane vodne absorpcije in transporta, visoka koncentracija topljencev pa povzroča podobne učinke zaradi osmotskega neravnovesja (Gunde-Cimerman in sod., 2003). Če primerjamo kuhanje in svežje ekstrakte gliv, je imela večina kuhanih ekstraktov gliv gojenih v gojišču z visoko koncentracijo Glc, s povečano koncentracijo NaCl in gojenih pri nizki temperaturi, višje koncentracije suhe snovi kot sveži ekstrakti gliv. Pričakovali bi ravno obratno, kot se je izkazalo v kontrolnih razmerah, saj se pri kuhanju, zaradiobarjanja proteinov suha teža preostalega supernatanta zmanjša. Možna razloga je ta, da je pri kuhanju prišlo le do delnega izhlapevanja vode skozi luknjice, ki smo jih naredili v pokrovčkih mikrocentrifugirk.

V diplomskem delu Mojce Horvat (Horvat, 2010) in Miše Mojce Cajnko (Cajnko, 2010), ki sta uporabljali organski topili aceton (manj polaren, dielektrična konstanta je 20,7) in metanol (bolj polaren, dielektrična konstanta je 33,6), je bilo zanimivo odkritje, da je koncentracija suhe snovi narasla v gojišču s povišano koncentracijo soli in tudi s povišano

koncentracijo Glc. To je bilo najbolj opazno pri metanolnih ekstraktih. Iz tega sta sklepali, 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 kuhanih in svežih ekstraktov glede na razmere rasti. Zanimivo je, da imajo sveži in kuhami ekstrakti gliv izolirani iz solin in gojeni v gojišču z 10 % NaCl (Žulič, 2010) najvišja povprečja koncentracij suhe snovi. Pri svežih ekstraktih gojenih pri nizki temperaturi pa imajo najvišja povprečja koncentracij suhe snovi tisti ekstrakti, ki so izolirani iz Arktike. Tudi kuhami ekstrakti gliv, ki so bile gojene pri nizki temperaturi, imajo dokaj visoka povprečja koncentracij suhe snovi pri tistih sevih, ki so izolirani iz Arktike. To dokazuje, da so se glice razmeram v katerih živijo tudi v naravi prilagodile in jim omogočajo najvišji nivo sinteze lastnih metabolitov.

Za ekstrakcijo proteinov iz gliv so pomembne rastne razmere in čas inkubacije pri gojenju, saj so določeni proteini prisotni le v določenem obdobju rastnega cikla. Ekstrakcija je bila do neke mere težavna tudi zaradi tega, ker je bila struktura micelija ponekod rigidna in fizično razbitje micelija ni imelo vidnega učinka. Drugod je bila količina supernatanta po centrifugiranju majhna ali neznatna zaradi močne higroskopičnosti micelija. Tako se nismo mogli v celoti izogniti delcem micelija v ekstraktih, ki so morda motili meritve. Rezultati so nam vselej pokazali, da koncentracija proteinov v večini primerov lepo sovpada s koncentracijo suhe snovi v vzorcu. Zanimiv je halotoleranten sev glice *Aureobasidium pullulans var. melanogenum* z oznako EXF-3233 (275-1-1) izoliran iz Japonskega morja, ki ima v vseh razmerah gojenja najvišjo koncentracijo proteinov in visoke koncentracije suhe snovi (Preglednica 6). Ekstrakcija proteinov zaradi zgoraj naštetih razlogov gotovo ni dala popolnega vpogleda v bioaktivne molekule, vendar so nam splošni rezultati pokazali, da biološka aktivnost na račun proteinskih komponent gliv ni pogosta.

5.1.2 Hemolitična in protibakterijska aktivnost ter test inhibicije AchE

Glivni ekstrakti, ki smo jih testirali, niso pokazali nobene aktivnosti. Do podobnih ugotovitev je prišla Sandra Žulič (Žulič, 2010), ki je analizirala vodne ekstrakte istih gliv,

gojenih pri višji koncentraciji soli. Rezultati diplomantk Mojce Horvat (Horvat, 2010) in Miše Mojce Cajnko (Cajnko, 2010), ki sta delali z organskimi ekstrakti istih gliv, pa so pokazali pozitivno hemolitično aktivnost in sicer pri Mojci Horvat (Horvat, 2010) je delež hemolitično aktivnih ekstraktov bil 51 %, pri Miši Mojci Cajnko (Cajnko, 2010) pa 28 %. Iz tega bi lahko sklepali, da so snovi s hemolitično aktivnostjo nepolarne. Hemolitično aktivne snovi, ki se sintetizirajo v določenih razmerah, bi lahko kazale ekofiziološki pomen (Frisvad in sod., 2006), saj rezultati Mojce Horvat (Horvat, 2010) kažejo, da se je delež ekstraktov, ki so povzročali močno hemolizo najbolj povečal pri glivah izoliranih iz Arktike in gojenih pri nizkih temperaturah.

Test protibakterijske aktivnosti je bil prav tako pozitiven le pri primerjavnih rezutatih (Cajnko, 2010 in Horvat, 2010). Pri Mojci Horvat (Horvat, 2010) je rast po Gramu pozitivne bakterije *Bacillus subtilis* inhibiralo 33 % ekstraktov, pri Miši Mojci Cajnko (Cajnko, 2010) pa kar 58 % ekstraktov. Rast po Gramu negativne bakterije *Escherichia coli* pa je inhibiralo pri Mojci Horvat (Horvat, 2010) 20 % ekstraktov, pri Miši Mojci Cajnko (Cajnko, 2010) pa le 10 % ekstraktov. Glede na to, da je bila inhibicija rasti pogostejša pri Gram pozitivnih bakterijah, bi lahko sklepali na selektivno delovanje ekstrahiranih učinkovin proti bakterijam. V preglednici 1 so opisane biološko aktivne snovi testiranih gliv, ki bi mogoče lahko bile odgovorne za inhibicijo rasti bakterije *B. subtilis*.

Iskali smo tudi spojine, ki bi inhibirale delovanje AChE, encima, ki se pojavlja v sinaptičnih špranjah in hidrolizira nevrotransmiter acetilholin. Pri nobenemu od naših vzorcev ter primerjavnih vzorcev (Cajnko, 2010, Horvat, 2010 in Žulič, 2010) nismo zasledili inhibicije encima AChE. Tudi v literaturi ni podatkov o nevrotoksičnih sekundarnih metabolitih izbranih gliv.

5.1.3 Hemaglutinacijski test

Od vseh testov za določanje bioloških aktivnosti je bila opazna le aktivnost hemaglutinacije. Pozitivna je bila pri 91 % ekstraktov gliv, ki so rasle pri nizki temperaturi in 55 % ekstraktov gliv, ki so rasle v gojišču z visoko koncentracijo Glc. Hemaglutinacija je torej potekla v manjšem številu pri svežih in kuhanih ekstraktih gliv, ki so rasle v

gojišču z visoko koncentracijo Glc. Zanimivo je, da so ekstrakti gliv, ki jih je gojila Sandra Žulič (Žulič, 2010) v kontrolnih razmerah imeli le 3 % aktivnost, tiste, ki so bile gojene v gojišču z 10 % NaCl pa so pokazale le 1 % aktivnost. Iz tega lahko sklepamo, da sta nizka temperatura in povišana koncentracija Glc spodbudila izločanje snovi, ki zlepljajo eritrocite. Te snovi oziroma hemaglutinini so večinoma lektini. Lektini so biološko aktivni proteini neimunskega izvora, ki imajo vsaj eno nekatalitično domeno, s katero reverzibilno vežejo specifične ogljikove hidrate, ne da bi jih pri tem modificirali (Pohleven s sod., 2008). Mnogi so tesno zviti globularni proteini in zato zelo odporni tudi na topotno denaturacijo. Za vse lektine je značilna tudi visoka rezistenza na proteolizo in stabilnost 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). Žal v literaturi ni podatkov, da se sinteza lektinov inducira pri nizki temperaturi oziroma pri visoki koncentraciji Glc.

Iz zgoraj navedenih podatkov vidimo, da je bilo v okviru diplomskega dela z uporabljeno metodologijo v acetonskih in metanolnih ekstraktih odkritih več biološko aktivnih metabolitov, kot pri vodnih ekstraktih, kar pomeni, da so le ti večinoma nepolarni. Poglavitne snovi, ki so prisotne v vodnih vzorcih so primarni metaboliti, kot so proteini, ogljikovi hidrati, nukleinske in organske kisline, ki jih celica potrebuje za normalno delovanje. Če povzamem, nismo glede na vrsto stresa našli nobenih pomembnejših bioloških aktivnosti. Ena od možnosti je, da biološko aktivne sekundarne metabolite glice ne izločajo, ker niso vodotopni, ampak jih najverjetneje kopičijo v membrani.

Raziskave gliv iz ekstremnih habitatov so zelo pomembne za razumevanje njihovih adaptacijskih mehanizmov, za preživetje mikroorganizmov v ekstremnih pogojih, za uporabo gliv v industrijske namene (Bass, 2007) in tudi kot pomoč pri adaptaciji ljudi na klimatske spremembe sveta (Gunde-Cimerman s sod., 2009).

5.2 SKLEPI

- povišana koncentracija Glc v gojišču je vplivala na povečanje koncentracije suhe snovi v svežih in kuhanih ekstraktih gliv;

- nizka temperatura gojenja je vplivala na zmanjšanje koncentracije suhe snovi v svežih in kuhanih ekstraktih gliv;
- koncentracija proteinov v večini primerov sovpada s koncentracijo suhe snovi v ekstraktih gliv, vendar biološka aktivnost na račun proteinskih komponent ni pogosta;
- hemolitične in protibakterijske aktivnosti ter inhibicije AChE nismo zasledili pri nobenem izmed testiranih vodnih ekstraktov;
- v vodnih ekstraktih so verjetno prisotni le primarni metaboliti, ki jih celica potrebuje za normalno delovanje;
- nizka temperatura in Glc vplivata na povečano izločanje hemaglutininov;
- v svežih in kuhanih ekstraktih gojenih pri nizki temperaturi in v ekstraktih gojenih v gojišču z visoko koncentracijo Glc nismo našli nobenih biološko aktivnih sekundarnih metabolitov; ena od možnosti je, da jih glice ne izločajo, ker niso vodotopni.

6 POVZETEK

Glive so pomemben vir biološko aktivnih snovi, ki so uporabne v različnih medicinskih in industrijskih panogah. Ker je njihova izdelava pomembna za prilagoditev na določeno funkcijo v naravi, so v zadnjih letih začeli iskati nove sekundarne metabolite organizmov, ki živijo v še neraziskanih biotopih.

Dolgo je veljalo mnenje, da v ekstremno slanih okoljih najdemo le alge, praživali, arheje in bakterije, ne pa tudi glive (Brock, 1979). Leta 2000 so Gunde-Cimerman in sodelavci dokazali nasprotno. Iz slanih okolij, kot so npr. soline, so izolirali glive, ki soli za preživetje sicer ne potrebujejo, vendar so se sposobne prilagoditi na širok razpon koncentracij soli, od sladke vode do skoraj nasičene raztopine natrijevega klorida. Halofilne so tiste glive, ki so jih izolirali iz ekstremno slanih okoljih. Poleg ekstremno slanih okolij pa so bile glive izolirane tudi iz izjemno hladnih okolij, kot je na primer arktični led. V takšnih okoljih najdemo psihrotolerantne organizme, ki so sposobni rasti pri nizkih temperaturah. Visoka koncentracija topljenca (npr. soli ali sladkorja) in nizke temperature nižajo vodno aktivnost v okolju. Glive, ki živijo v okoljih z nizko vodno aktivnostjo imenujemo kserofilne ali kserotolerantne glive.

Ker je potencial halofilnih in halotolerantnih gliv iz skrajno slanih in skrajno hladnih okolij slabo raziskan, smo se v tej nalogi ukvarjali z iskanjem potencialno zanimivih biološko aktivnih vodotopnih snovi iz nekaterih izbranih halofilnih in halotolerantnih gliv. 43 sevov različnih gliv, ki pripadajo redu *Dothideales* in izbranim kvasovkam, je bilo izoliranih iz solin ali arktičnega ledu, torej iz okolij z znižano vodno aktivnostjo. Testirali smo hemolitično in hemaglutinacijsko aktivnost, inhibicijo encima acetilholinesteraze in protibakterijsko aktivnost na izbranih po gramu pozitivnih in po gramu negativnih bakterijskih sevih. Glive smo gojili na gojišču YNB z 40 % glukoze (izjemoma z 30 % ali 55 % glukoze) pri 30 °C ter na gojišču YNB z 2 % glukoze pri 4 °C (oz. 10 °C pri glivah, ki po treh tednih na 4 °C niso rasle). Povišana koncentracija sladkorja in nizka temperatura predstavlja stres za glive, zato nas je zanimalo, kako to vpliva na izločanje sekundarnih metabolitov. S prekuhavanjem vodnih ekstraktov pa smo ugotavljali, ali so biološko aktivne snovi beljakovinskega izvora.

Pridobljene rezultate smo primerjali z rezultati biološke aktivnosti ekstraktov gliv, ki smo jih gojili v kontrolnih razmerah ter z že objavljenimi podatki s področja kemije naravnih substanc iz izbranih gliv. Nekaj primerjav smo naredili tudi z rezultati organskih (acetonskih in metanolnih) ekstraktov gliv diplomantk Mojce Horvat (Horvat, 2010) in Miše Mojce Cajnko (Cajnko, 2010), ki sta prav tako gojile glive pri znižani vodni aktivnosti (visoka koncentracija Glc oziroma 10% NaCl).

Ugotovili smo, da je povišana koncentracija Glc vplivala na povečanje koncentracije suhe snovi svežih in kuhanih ekstraktov, nizka temperatura pa na zmanjšanje koncentracije suhe snovi svežih in kuhanih ekstraktov. Sklepali bi lahko, da zmanjšana vodna aktivnost vzpodbudi metabolno aktivnost in glivam omogoči, da se prilagodijo na spremenjene rastne razmere, nizka temperatura pa morda ne predstavlja tolikšnega stresa, da bi glive sintetizirale snovi potrebne za obrambo in/ali adaptacijo. Vselej pa zmanjšana vodna aktivnost in nizka temperatura povzročata podobne odzive celice. Koncentracija proteinov je v večini primerov lepo sovpadala s koncentracijo suhe snovi v ekstraktih gliv, vendar biološka aktivnost na račun proteinskih komponent ni bila pogosta. V vodnih ekstraktih so bili najbrž prisotni v glavnem primarni metaboliti, ki jih celica potrebuje za normalno delovanje. Od testov biološke aktivnosti je bil pozitiven le test hemaglutinacije, iz česar bi lahko sklepali, da nizka temperatura in povišana koncentracija Glc vplivata na povečano izločanje aglutininov, vendar tega nismo dokazali. Glede na vrsto stresa nismo dobili nobenih biološko aktivnih sekundarnih metabolitov, ti najverjetneje niso vodotopni in jih celica ne izloča v okolico.

7 VIRI

- Abdel-Lateff A., Elkhayat E.S., Fouad M.A. in Okino T. 2009. Aureobasidin, new antifouling metabolite from marine-derived fungus *Aureobasidium sp.* Nat Prod Commun 4(3). pp 389-94
- 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
- Belofsky G.N., Jensen P.R. and Fenical W. 1999. Sansalvamide: A new cytotoxic cyclic depsipeptide produced by a marine fungus of the genus *Fusarium*. Tetrahedron Letters 40, 15, pp 2913-2916
- Brauers G., Ebel R., Edrada R., Wray V., Berg A., Gräfe U. and Proksch P. 2001. Hortein, a New Natural Product from the Fungus *Hortaea werneckii* Associated with the Sponge *Aplysina aerophoba*. J. Nat. Prod., 64 (5), pp 651–652
- Brock T.D. 1979. Ecology of saline lakes. Strategies of Microbial Life in Extreme Environments (Shilo, M., Ed.). Dahlem Konferenzen. Berlin: 29-47
- Butinar L., Sonjak S., Zalar P., Plemenitaš A., Gunde-Cimerman N. 2005. Population dynamics of melanized halophilic fungi in solar salterns. Bot. Mar.
- Cajnko M. M. 2010. Biološko aktivne snovi v organskih ekstraktih nekaterih halofilnih in halotolerantnih gliv redu Dothideales in izbranih kvasovk. Diplomsko delo, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani, Ljubljana
- Campbell N. A., Reece J. B. 2002. Biology. 6. Izdaja. San Francisco. Kalifornija. Pearson Education. Inc.: 1247 str.
- Chu M., Mierzwa R., Trumees I., Gentile F., Petel M., Gullo V., Chan T.M. and Puar M.S. 1993. Two novel diketopiperazines isolated from the fungus *Tolypocladium* sp. Tetrahedron Lett., 34, pp 7537-7540
- Cueto M., Jensen P. R. and Fenical W. 2000. N-Methylsansalvamide, a cytotoxic cyclic depsipeptide from a marine fungus of the genus *Fusarium*. Phytochemistry, 55, pp 223-226
- De Hoog S., Beguin H., Batenburg-van de Vegte W. H. 1997. Phaeotheca triangularis, a new meristematic black yeast from a humidifier. Antonie van Leeuwenhoek 71: 289-295

- De Hoog S., Hermanides-Nijhof E. J. 1977. The black yeasts and allied Hyphomycetes. *Studies in mycology* 15: 222 str.
- De Hoog S., McGinnis M.R. 1987. Ascomycetous black yeasts. In: The expanding realm of yeast-like fungi, eds. de Hoog, Smith, Weijman. CBS. Baarn: 188-199
- De Hoog S., Zalar P., Urzi C., Yurlova N.A., Sterflinger K. 1999. Relationships of dotideaceous black yeasts and meristematic fungi based on 5.8S and ITS2 rDNA sequence comparison. *Studies in mycology*, 43: 31-37
- De Hoog G.S., Queiroz-Telles F., Haase G., Fernandez-Zeppenfelds G., Attili Angelis D., Gerrits van den Ende A. H. G., Matos T., Peltroche-Llacsahuangal H., Pizzirani-Kleiner A. A., Rainer J., Richard-Yegres N., Vicente V., Yegres F. 2000. Black fungi: clinical and pathogenic approaches. *Medical Mycology*, 38: 243 – 250
- Ellman G.L., Courtney D., Andres V., Featherstone R.M. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7: 88-95
- Evidente A., Conti L., Altomare C., Bottalico A., Sindona G., Segre A.L. and Logrieco A. 1994. Fusapyrone and deoxifusapyrone two antifungal-a-pyrones from *Fusarium semitectum*. *Natural Toxins*, 2, pp 4-13
- 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
- Gai Y., Zhao L.L., Hu C.Q. and Zhang H.P. 2007. Fusarielin E, a new antifungal antibiotic from *Fusarium* sp., *Chin. Chem. Lett.* 18, 8, pp 954-956
- 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., Sonjak S., Zalar P., Frisvad J.C., Diderichsen B., Plemenitaš A. 2003. Extremophilic fungi in arctic ice: a relationship between adaptation to low temperature and water activity. Physics and Chemistry of the Earth 28 (2003): 1273-1278
- Gunde-Cimerman N., Zalar P., Petrovič U., Turk M., Kogej T., De Hoog S., Plemenitaš A. 2004. Fungi in the salterns. Halophilic microorganisms. Ventosa A. (ur.), Springer-Verlag, Berlin: 103-111
- 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
- Gunde-Cimerman N., Ramos J., Plemenitaš A. 2009. Halotolerant and halophilic fungi. Mycological research 113: 1231-1241
- Haase G., Sonntag L., Melze-Krick B., De Hoog S. 1999. Phylogenetic interference by SSUgene analysis of members of the Herpotrichelaceae with special reference to human pathogenic species. Studies in mycology, 43: 80-97
- Hibbett D.S., Binder M., Bischoff J.F., Blackwell M., Cannon P.F., Eriksson O.E., Huhndorf S., James T., Kirk P.M., Lucking R., Thorsten Lumbsch H., Lutzoni F.P., Matheny B., McLaughlin D.J., Powell M.J., Redhead S., Schoch C.L., Spatafora J.W., Stalpers J.A., Vilgalys R., Aime M.C., Aptroot A., Bauer R., Begerow D., Benny G.L., Castlebury L.A., Crous P.W., Dai Y., Gams W., Geiser D.M., Griffith G.W., Gueidan C., Hawksworth D.L., Hestmark G., Hosaka K., Humber R.A., Hyde K.D., Ironside J.E., Koljalg U., Kurtzman C.P., Larsson K., Lichtwardt R., Longcore J., Miadlikowska J., Miller A., Moncalvo J., Mozley-Standridge S., Oberwinkler F., Parmasto E., Reeb V., Rogers J.D., Roux C., Ryvarden L., Sampaio J.P., Schüßler A., Sugiyama J., Thorn R.G., Tibell L., Untereiner W.A., Walker C., Wang Z., Weir A., Weiss M., White M.M., Winka K., Yao Y., Zhang N. 2007. A Higher-Level Phylogenetic Classification Of The Fungi. Mycological Research, 111, 509 - 547
- Horvat M. 2010. Vpliv glukoze in temperature na produkcijo biološko aktivnih snovi v organskih ekstraktih nekaterih halofilnih in halotolerantnih gliv redu *Dothideales* in izbranih kvasovk. Diplomsko delo, biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani, Ljubljana

- Jadulco R., Brauers G., Edrada R.A., Ebel R., Wray V., Sudarsono and Proksch P. 2002. New Metabolites from Sponge-Derived Fungi *Curvularia lunata* and *Cladosporium herbarum*. *J. Nat. Prod.*, 65 (5), pp 730–733
- Jadulco R., Proksch P., Wray V., Sudarsono, Berg A. and Gräfe U. 2001. New Macrolides and Furan Carboxylic Acid Derivative from the Sponge-Derived Fungus *Cladosporium herbarum*. *J. Nat. Prod.*, 64 (4), pp 527–530
- Jiang Z., Barret M.O., Boyd K.G., Adams D.R., Boyd A.S.F. and Grant Burgess J. 2002. JM47, a cyclic tetrapeptide HC-toxin analogue from a marine *Fusarium* species. *Phytochemistry*, 60, pp 33-38
- Jogan N. 2001. Navodila za vaje iz sistematske botanike. 3. Izdaja delovne verzije. Ljubljana: 25 str.
- Kurtzman C.P., Fell J.W. 2006. Yeast Systematics and Phylogeny-Implications of Molecular Identification Methods for Studies in Ecology. Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts, The Yeast Handbook, Springer
- Müller M. 1992. Toxin-producing ability of molds of the genus *Alternaria*. *Zentralbl Mikrobiologie*, 147 (3-4), pp 207-13
- 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
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?CMD=search&DB=pubmed> (12. maj 2010)
- Pohleven J., Obermajer N., Sabotič J., Anžlovan S., Sepčić 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
- Plemenitaš A., Gunde-Cimerman N. 2005. Cellular responses in the halophilic black yeast *Hortaea werneckii* to high environmental salinity. V: Adaptation to Life at High Salt Concentrations in Archaea, Bacteria, and Eukarya. Gunde-Cimerman N., Oren A., Plemenitaš A. (ur.). Nizozemska, Springer: 453-470
- Renner M.K., Jensen P.R. and Fenical W. 1998. Mangicols: structures and biosynthesis of A new class of sesterterpene polyols from a marine fungus of the genus *Fusarium*. *J.Org.Kem.*, 63, pp 4843-52

- Renner M.K., Jensen P.R. and Fenical W. 2000. Mangicols: Structures and Biosynthesis of A New Class of Sesterterpene Polyols from a Marine Fungus of the Genus *Fusarium*. *J. Org. Chem.*, 65, pp 4843–4852
- Sakaki H., Kaneno H., Sumiya Y., Tsushima M., Miki W., Kishimoto N., Fujita T., Matsumoto S., Komemushi S. and Sawabe A. 2002. A New Carotenoid Glycosyl Ester Isolated from a Marine Microorganism, *Fusarium* Strain T-1 *J. Nat. Prod.*, 65, pp 1683–1684
- 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
- Samson R.A., Hoekstra E.S., Frisvad J.C. and Filtenborg O. 2000. Introduction to Food- and Airborne Fungi. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht: 389 str.
- San Martín A., Painemal K., Díaz Y., Martínez C., Rovirosa J. 2005. Metabolites From The Marine Fungus *Cladosporium cladosporioides*. *An. Asoc. Quím. Argent.* 93, pp 46
- Scott P.M., van Walbeek W., Maclean W.M. 1971. Cladosporin, a new antifungal metabolite from *Cladosporium cladosporioides*. *The Journal of Antibiotics*, 24 (11), pp 747-755
- Shigemori H., Tenma M., Shimazaki K. and Kobayashi J. 1998. Three New Metabolites from the Marine Yeast *Aureobasidium pullulans*. *J. Nat. Prod.*, 61 (5), pp 696–698
- Shigemori H., Kasai Y., Komatsu K., Tsuda M., Mikami Y. and Kobayashi J. 2004. Sporiolides A and B, New Cytotoxic Twelve-Membered Macrolides from a Marine-Derived Fungus *Cladosporium* Species *Mar. Drugs*, 2(4), pp. 164-169
- Smith J.C., Abbanat D., Bernan V.S., Maiese W.M., Greenstein M., Jompa J., Tahir A. and Ireland C.M. 2000. Novel Polyketide Metabolites from a Species of Marine Fungi. *J. Nat. Prod.*, 63, pp 142-145
- Sonjak S. 2006. Biološka raznovrstnost rodu *Penicillium* v ledeniškem ledu Arktike (Svalbard) in genomska variabilnost najpogostejše vrste *P.crustosum*: doktorska disertacija. Ljubljana
- Sterflinger K., De Hoog S., Haase G. 1999. Phylogeny and ecology of meristematic ascomycetes. *Studies in mycology*, 43: 5-22
- Pitt J.I. and Hocking A.D. 1985. *Fungi and Food Spoilage*, 1st edn. Academic Press, Sydney

- Takahashi I., Maruta R., Ando K., Yoshida M., Iwasaki T., Kanazawa J., Okabe M., Tamaoki T. 1993. UCA 1064-B, a new antitumor antibiotic isolated from *Wallemia sebi*: production, isolation and structural determination. The Journal of Antibiotics 48, pp 1312-1313
- Wood G.M., Mann P.J., Lewis D.F., Reid W.J., Moss M.O. 1990. Studies on a toxic metabolite from the mould *Wallemia*. Food Additives and Contaminants 7, pp 69-77
- Zalar P., 1999. Halofilne črne kvasovke v vodah solin. Magistersko delo, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani, Ljubljana
- Zhao L.L., Gai Y., Kobayashi H., Hu C.Q. and Zhao H.P. 2008. Chin. Chem. Lett. 19, 1089
- Žulič S., 2010. sundra666@gmail.com (osebni vir, 11. april 2010)

8 ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem mentorici prof. dr. Kristini Sepčić in somentorici prof. dr. Nini Gunde-Cimerman za strokovno vodenje, spodbudo ter nasvete pri izdelavi diplomske naloge.

Hvala tudi doc. Dr. Jerneji Ambrožič Avguštin za korekten pregled diplomske naloge in uporabne nasvete.

Hvala vsem asistentom in tehnikom iz laboratorijev Katedre za molekularno genetiko in biologijo mikroorganizmov ter Katedre za biokemijo Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete za pomoč in vodenje pri praktičnem delu diplomske naloge.

Velika zahvala je namenjena mojim staršem, sestri ter babici in dedku za potrpežljivost, zaupanje in finančno podporo v času študija.

Hvala prijateljem, ki so mi vedno stali ob strani in me spodbujali na moji poti.

Rappl I. Vpliv glukoze in temp. na produkcijo biološko aktivnih snovi v ekstraktih gliv redu *Dothideales* in izbranih kvasovk.

Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Odd. za biologijo, 2010
