

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Gregor ZORN

**BIOLOŠKO AKTIVNE SNOVI V VODNIH EKSTRAKTIH IZBRANIH
LESNIH IN TRAVNIŠKIH GOB**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**BIOLOGICALY ACTIVE SUBSTANCES IN AQUEOUS EXTRACTS
FROM SELECTED WOOD-DECAYING AND MEADOW FUNGI**

GRADUATION THESIS
University Studies

Ljubljana, 2016

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija biologije. Opravljeno je bilo na Katedri za biokemijo Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani. Terensko delo je bilo opravljeno v okolici Idrije in Ljubljane v Sloveniji.

Študijska komisija Oddelka za biologijo je za mentorja diplomskega dela imenovala prof. dr. Kristino Sepčič in za recenzenta prof. dr. Franca Pohleven.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: doc. dr. Matej BUTALA

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: prof. dr. Kristina SEPČIČ

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član : prof. dr. Franc POHLEVEN

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za lesarstvo

Datum zagovora: 21. 9. 2016

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

Gregor Zorn

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
- DK UDK 579(043.2)
- KG gobe/naravni produkti /ekstrakti/hemoliza/inhibitor acetilholinesteraze/
protibakterijska aktivnost
- AV ZORN, Gregor
- SA SEPČIČ, Kristina (mentor)/POHLEVEN, Franc (recenzent)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
- LI 2016
- IN BIOLOŠKO AKTIVNE SNOVI V VODNIH EKSTRAKTIH IZBRANIH LESNIH
IN TRAVNIŠKIH GOB
- TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
- OP X, 55 str., 6 preg., 6 sl., 1 pril., 204 vir.
- IJ sl
- JI sl/en
- AI Gobe se poleg v prehrabne namene uporabljajo tudi v industriji, medicini in kot bioremediatorji. Njihovi primarni in sekundarni metaboliti so bogat vir farmakoloških učinkovin z različnimi terapevtskimi potenciali. V diplomski nalogi smo raziskali hemolitično, protibakterijsko in anti-acetilholinesterazno delovanje surovih in kuhanih vodnih ekstraktov 35 izbranih travniških in lesnih vrstah gob. Hemolitično aktivnih je bilo 5 od 70 (*Hydnum repandum*, *Lactarius torminosus*, *Hygrocybe coccinea*, *Hygrocybe fornicata* in *Oudemansiella mucida*). Protibakterijskega delovanja nismo zasledili pri nobenem vzorcu. Pri testu inhibicije acetilholinesteraze je bilo 8 vzorcev aktivnih in sicer štirje sveži (*Leccinum scabrum*, *Russula drimea*, *Panellus serotinus* in *Lactarius torminosus*) in štirje kuhani (*Bjerkandera adusta*, *Russula drimea*, *Panellus serotinus* in *Clytocybe geotropa*) ekstrakti testiranih gob. Največjo aktivnost smo zasledili pri svežem in kuhanem ekstraktu *Russula drimea*, 26,5% in 21,3%. Rezultati naših testov so pokazali biološko aktivnost do sedaj še neobjavljenih učinkovin iz ekstraktov gob, ki so lahko farmakološko zanimive.

KEY WORDS DOCUMENTATION

- DN Dn
- DC UDC 579(043.2)
- CX mushrooms/natural products/extracts/hemolysis/ acetylcholinesterase inhibitor
Antibacterial activity
- AU ZORN, Gregor
- AA SEPČIĆ, Kristina (supervisor)/POHLEVEN, Franc (reviewer)
- PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of biology
- PY 2016
- TI BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES IN AQUEOUS EXTRACTS FROM
SELECTED WOOD-DECAYING AND MEADOW FUNGI
- DT Graduation Thesis (University studies)
- NO X, 55 p., 6 tab., 6 fig., 1 ann., 204 ref.
- LA sl
- AL sl/en
- AB In addition to being a natural source of food, mushrooms are also used for industrial, medicinal and bioremediation purposes. Their primary and secondary metabolites are a rich source of pharmacological compounds with a broad therapeutic potential. In this thesis, we analyzed the hemolytic, antibacterial and anti-acetylcholinesterase activity of raw and cooked aqueous extracts of 35 selected species of meadow and wood mushrooms. We detected hemolytic activity in 5 out of our 70 extracts (*Hydnum repandum*, *Lactarius torminosus*, *Hygrocybe coccinea*, *Hygrocybe fornicata* and *Oudemansiella mucida*). We did not have antibacterial activity in any of the tested samples. We did however find acetylcholinesterase inhibition in 8 samples, of which four were from fresh (*Leccinum scabrum*, *Russula drimea*, *Panellus serotinus* and *Lactarius torminosus*) and four were from cooked (*Bjerkandera adusta*, *Russula drimea*, *Panellus serotinus* and *Clytocybe geotropa*) mushroom extracts. The greatest activity was observed in fresh and cooked extracts of *Russula drimea*, 26.5% and 21.3% respectively. The results of our tests have shown yet unpublished biological activity of active ingredients from extracts of mushrooms that can be potentially pharmacologically interesting.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....	III
KEY WORDS DOCUMENTATION.....	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO SLIK	VIII
KAZALO PRILOG	IX
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI.....	X
1 UVOD.....	1
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 MORFOLOŠKE ZNAČILNOSTI GOB.....	3
2.2 GOBE V PREHRANI.....	4
2.3 INDUSTRIJSKA UPORABA GOB.....	5
2.4 BIOREMEDIACIJA.....	6
2.5 BIOLOŠKO AKTIVNE SNOVI V GOBAH.....	7
2.5.1 Hemolitično delovanje	7
2.5.2 Inhibicija acetilholinesteraze	8
2.5.2.1 Acetilholin in acetilholinesteraza	8
2.5.2.2 Acetilholinesterazni inhibitorji	9
2.5.2.3 Alzheimerjeva bolezen	10
2.5.3 Protibakterijsko delovanje	11
2.5.4 Protivnetno delovanje	13
3 MATERIAL IN METODE	14
3.1 MATERIAL.....	14
3.2 METODE.....	15
3.2.1 Priprava in razdelitev vzorcev.....	15
3.2.2 Vodni ekstrakti.....	16
3.2.3 Izračun suhe teže ekstrahirane snovi v vzorcih	16
3.2.4 Določanje količine proteinov	16
3.2.6 Določanje protibakterijske aktivnosti z difuzijskim testom na trdnem gojišču	18
3.2.7 Test inhibicije acetilholinesteraze	19
4 REZULTATI.....	20

4.1 DOLOČANJE KOLIČINE SUHE SNOVI IN PROTEINOV V VODNIH EKSTRAKTIH	20
4.2 HEMOLITIČNA AKTIVNOST.....	22
5 RAZPRAVA IN SKLEPI.....	33
5.1 RAZPRAVA.....	33
5.2 SKLEPI.....	38
6 POVZETEK	40
7 VIRI	41
DRUGI VIRI	1
ZAHVALA	
PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

Pregl. 1: Seznam nabranih travniških gob uporabljenih pri diplomskem delu z latinskim in slovenskim imenom, datumu nabiranja, lokacijo najdbe in imenom osebe, ki jih je določila.	14
Pregl. 2: Količina suhe snovi in proteinov v surovih (s) in kuhanih (k) vodnih ekstraktih gob.	20
Pregl. 3: Hemolitična aktivnost v surovih (s) in kuhanih (k) vodnih ekstraktih gob.	22
Pregl. 4: Hemolitična aktivnost v surovih (s) in kuhanih (k) vodnih ekstraktih gob, ki so v preliminarnem testu povzročili hemolizo.	24
Pregl. 5: Rezultati protibakterijske aktivnosti surovih (s) in kuhanih (k) vodnih ekstraktov testiranih gob.	27
Pregl. 6: Rezultati delovanja vzorcev aktivnosti surovih (s) in kuhanih (k) vodnih ekstraktov testiranih gob na encim acetilholinesterazo.	29

KAZALO SLIK

Sl. 1: Splošna anatomija trosnjaka predstavnikov debla <i>Basidiomycota</i> . Prirejeno po Norris S.J., 2000	3
Sl. 2: Lokacije območja nabiranja lesnih in travniških gob	14
Sl. 3: Odvisnost recipročne vrednosti polovičnega časa hemolize ($1/t_{50}$) od koncentracije proteinov hemolitično aktivnih vzorcev vodnih ekstraktov lesnih gob <i>Hydnum repandum</i> (1s), <i>Lactarius torminosus</i> (7s), <i>Hygrocybe coccinea</i> (9s), <i>Hygrocybe fornicata</i> (11s) in <i>Oudemansiella mucida</i> (19s)	25
Sl. 4: Odvisnost recipročne vrednosti polovičnega časa hemolize ($1/t_{50}$) od koncentracije suhe snovi hemolitično aktivnih vzorcev vodnih ekstraktov lesnih gob <i>Hydnum repandum</i> (1s), <i>Lactarius torminosus</i> (7s), <i>Hygrocybe coccinea</i> (9s), <i>Hygrocybe fornicata</i> (11s) in <i>Oudemansiella mucida</i> (19s)	26
Sl. 5: Delež inhibicije acetilholinesteraze pri svežih vodnih ekstraktih testiranih travniških in lesnih gob. Nad stolpci je prikazana suha teža vzorca v testu	31
Sl. 6: Delež inhibicije acetilholinesteraze pri kuhanih vodnih ekstraktih testiranih travniških in lesnih gob. Nad stolpci je prikazana suha teža vzorca v testu	32

KAZALO PRILOG

Priloga A: Pregled objav

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AB	Alzheimerjeva bolezen
ACH	acetilholin
AChE	acetilholinesteraza
Ap	amiloid β -peptid
k	vzorec »kuhane« serije
s	vzorec »surove« serije

1 UVOD

Gobe so že od nekdaj igrale pomembno vlogo v mnogih civilizacijah. Užitarne gobe so bile masovno uporabljene v prehranske in tudi zdravilne namene. So bogat vir ogljikovih hidratov, proteinov, prostih aminokislin in vitaminov, kot tudi različnih pomembnih mineralov in elementov v sledovih (Colak in sod., 2009). Primer starodavne uporabe gob je odkritje izredno dobro ohranjene 5300 let stare mumije Otzija. Na njej so, poleg orodji in pripomočkov, našli tudi dve vrsti gob luknjičark, *Piptoporus betulinus* in *Fomes fomentarius*, povezanima z usnjenimi trakci. Ekstrakti iz *Piptoporus betulinus* so pokazali protivnetno, antioksidativno, anti-acetilholinestrazno, antiproliferativno in protibakterijsko delovanje (Wangun in sod., 2004; Cyranka in sod., 2011; Vunduk in sod., 2015). *Fomes fomentarius* je verjetno bila uporabljena za izdelavo amadouja, kresila za vnetenje ognja. Tudi ekstrakti te vrste so farmakološko aktivni, saj delujejo protivnetno, protibolečinsko, protivirusno, protirakavo in imunomodulatorno (Aoki in sod., 1993; Park in sod., 2004; Gao in sod., 2009; Kim in sod., 2015). V antičnih civilizacijah so uporabljali gobe tudi v verske namene. Pogosto so uporabljali halucinogene gobe iz rodov *Psilocybe*, *Panaeolus* in *Conocybe* v šamanskih obredih v Mehiki, v drugih srednjeameriških državah in na Karibskih otokih ter vrsto *Amanita muscaria* v severni Evropi in Sibiriji. Psilocibin je učinkovina, ki ima psihotropično in halucinogeno aktivnost, oziroma to učinkovino lahko smatramo kot predzdravilo, saj šele po defosforilaciji v psilocin postane aktiven. Psilocin učinkuje v glavnem preko vezave na serotoninergični receptor 5-HT_{2A}, čeprav deluje tudi na druge serotoninske, dopaminske in imidazolinske receptorje, ter na serotonin transportni protein. Psilocibin so že v šestdesetih letih prejšnjega stoletja uporabili v mnogih študijah na več kot 40 000 pacientih s pozitivnimi rezultati in praktično nobenimi stranskimi učinki. Novejše fMRI (funkcijska magnetna resonanca) študije so pokazale, da inhibira specifična področja v možganih, v talamusu, mediani prefrontalni skorji, sprednji in zadnji cingulusni skorji (Carhart-Harris in sod., 2012), kar nam bolj razjasni njegovo učinkovanje. Psilocibin se intenzivno proučuje za zdravljenje depresije, eksistencialne anksioznosti povezane z terminalnim rakom, odvajanje od alkohola, obsesivne kompulzivne motnje in glavobola v rafalih (Moreno in sod., 2006; Grob in sod., 2011; Bogenschutz in sod., 2015; Di Lorenzo in sod., 2015; Carhart-Harris in sod., 2016).

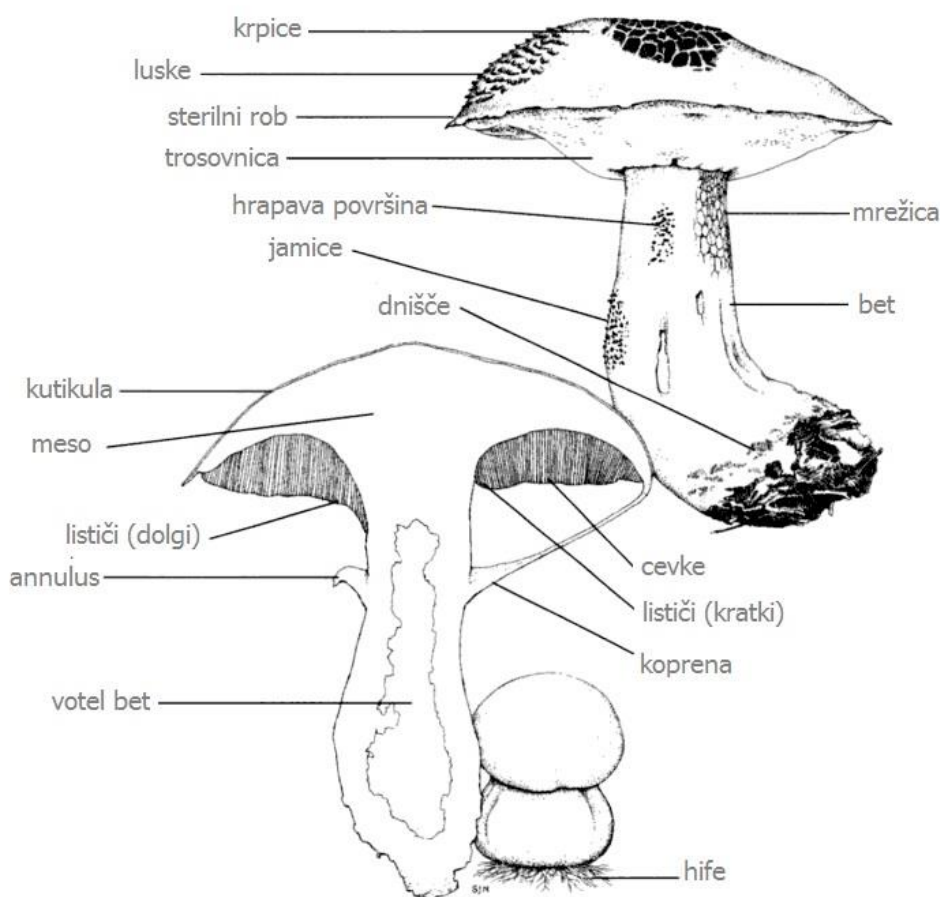
Od približno 15 000 odkritih višjih gliv, jih je le 650 vrst pokazal medicinsko vrednost (Minato, 2010). Poleg njihove visoke hranilne vrednosti so gobe bogat vir biološko aktivnih učinkovin, kot so lektini, polisaharidi, fenoli in polifenoli, terpenoidi, ergosteroli in hlapne organske spojine (Kalač, 2013). Večina raziskav o farmakološkem potencialu učinkovin iz gob, je bila narejenih na ekstraktih plodišč in micelijev ali na delno prečiščenih bioaktivnih spojinah. Izsledki mnogih raziskav so pokazali, da gobji ekstrakti delujejo imunomodulatorno, protitumorsko, protibakterijsko, protivirusno, antioksidativno in antihipoglikemično. Učinkoviti so tudi pri preventivi bolezni srca in ožilja, saj preprečujejo aterosklerozo (Zong in sod., 2012; Mu in sod., 2012).

Namen diplomske naloge je bil raziskati biološko aktivne snovi izbranih lesnih in mikoriznih gob nabranih v okolici Idrije in Vojskega ter na Šišenskem hribu v Ljubljani (Slovenija) in preveriti, če se v vodnih ekstraktih nahajajo nove in še neopisane učinkovine. Kuhane in surove vzorce ekstraktov smo testirali za hemolitično in protibakterijsko aktivnost ter na sposobnost inhibicije encima acetilholinesteraze. Glede na dejstvo, so gobe bogat vir primarnih in sekundarnih biološko aktivnih spojin, smo predvidevali, da bomo v ekstraktih odkrili še nepoznane bioaktivne učinkovine. Ker so večina gobjih sekundarnih metabolitov biološko manjše molekule topne v manj polarnih topilih, smo predvidevali, da bo aktivnost naših vzorcev manjša od aktivnosti ekstraktov v organskih topilih istih vrst, ki so bile paralelno testirane v okviru druge diplomske naloge.

2 PREGLED OBJAV

2.1 MORFOLOŠKE ZNAČILNOSTI GOB

Gobe niso taksonomska kategorija in so definirane kot glive, ki tvorijo s prostim očesom vidne trosnjake, ki jih lahko nabereimo. Trosnjaki so lahko nadzemna ali podzemna, po navadi mesnate narave (Chang in Miles, 2002). Vključujejo vrste iz dveh taksonomskih skupin: prostotrosnice (Basidiomycetes) in zaprtotrosnice (Ascomycetes). V naši diplomski nalogi smo se osredotočili na prostotrosnice, ki med glivami dosegajo največjo kompleksnost razvojnega kroga, zgradbe hif in strukture trosnjakov (Slika 1).



Slika 1: Splošna anatomija trosnjaka predstavnikov debla Basidiomycota. Prirejeno po Norris S.J., 2000

Razmnožujejo se lahko spolno ali nespolno. Pri spolnem razmnoževanju pride do srečanja dveh kompatibilnih micelijev, ki oblikujeta skupne celice z dvema jedri. Iz takega sekundarnega micelija nato nastane trosnjak s sporangiji, askusi pri zaprtotrosnicah in bazidij pri odprtotrosnicah. To vidno strukturo laično imenujemo goba. Na površini himenja

pride do združevanja jeder, kar pomeni, da vsaka terminalna celica vsebuje eno diploidno jedro, ki se nato mejotsko deli. Nastanejo štiri haploidna jedra, ki se pomaknejo v bazidije (pri prostotrosnicah) ali ostanejo v askusu (pri zaprtotrosnicah). V teh strukturah se nato razvijejo bazidiospore oziroma askospore, ki se raznašajo, predvsem s pomočjo vetra. Ko in če spore pristanejo na primerni podlagi, spora vzklije v primarni micelij in razvojni krog se sklene. Nespolno pa se nekatere vrste razmnožujejo s konidiji v zračnih hifah micelija.

Glede na način življenja delimo gobe na razkrojevalke (saprofiti), zajedalke (paraziti) in soživke (simbionti). Razkrojevalke so glavni reciklatorji kompleksnih organskih snovi listnega odpada in odmrlega lesa. Glive so edini organizmi s sposobnostjo razgradnje lignina, ki je najobilnejši aromatski polimer na zemlji, s pomočjo lignolitičnih ektoencimov v procesu opredeljenem kot encimsko »izgorevanje« (Kirk in Farrell, 1987). Zajedavske gobe lahko povzročijo ogromno ekološko in ekonomsko škodo, saj okužujejo rastoča drevesa. Soživke, kot že samo ime pove, živijo v sožitju z rastlinami, tako da tvorijo povezavo med glivnim micelijem in koreninami rastlin. Ta pojav imenujemo mikoriza in ima zelo pomembno ekološko funkcijo. Glive omogočijo rastlinam intenzivnejše sprejemanje vode, mineralov in drugih hranilnih snovi, rastline pa oskrbujejo glive z ogljikovimi hidrati, rastnimi dejavniki in vitamini. Poleg tega, pomagajo rastlinam pri obrambi pred patogeni in omogočajo neke vrste komunikacijski sistem med rastlinami (Jung in sod., 2012; Barto in sod., 2012; Babikova in sod., 2013). Ocenjujejo da 90% vseh rastlin živi v mikoriz z gobami (Anderson TF in Rasmussen HN., 1996).

2.2 GOBE V PREHRANI

Gobe imajo visoko hranilno vrednost, saj vsebujejo visok delež beljakovin, od katerih je pomemben delež esencialnih aminokislin, vlaknin in mali delež maščob. Vsebujejo tudi vitamine (B1, B2, B12, C, D in E) in minerale (Ca, Mg, K, Fe, Zn, Cu, Mn, Pb, Ni in Cd) (Heleno in sod., 2010; Uzun in sod., 2011). Užitne gobe so tudi nutraceutiki, saj vsebujejo veliko različnih biološko aktivnih sestavin, kot so nenasičene maščobne kisline, fenolne spojine, tokoferoli, askorbinska kislina in karotenoidi. Te sestavine delujejo sinergistično in so naravni spodbujevalci imunskega sistema in tudi primerna dietetska hranila (Barros in sod., 2007; Barros in sod., 2008; Ferreira in sod., 2009; Vaz in sod., 2010; Pereira in sod.,

2012).

Goba običajno vsebuje 90% vode in 10% suhe snovi. Vsebnost proteinov je med 27 in 48%, lipidov od 2 do 8%, ogljikovih hidratov pa manj kot 60% (Crisan in Sands, 1978). Gobe so dober vir visoko kakovostnih beljakovin. Vsebujejo 20-35% beljakovin/suho težo in so predvsem bogate z lizinom in triptofanom, dvema esencialnima aminokislinama, ki sta pomanjkljivi v žitaricah. Gobe veljajo za nizkokalorično hrano z zelo malo maščobe (4-6%) in so brez holesterola. Prevladujejo nenasičene maščobne kisline, v glavnem palmitinska, oleinska in linolna maščobna kislina (Dogan in Akbas, 2013). Gobe so eden najboljših virov vitaminov B kompleksa (tiamin, riboflavin, niacin in biotin), vsebujejo tudi vitamin C in so pomemben vir vitaminov D in A, zaradi prisotnosti prekursorja teh vitaminov, ergosterola in beta-karotena. Bogate so tudi z minerali predvsem kalij, fosfor, natrij in magnezij. V sledovih so prisotni tudi kalcij, baker, cink, železo in molibden (Pohleven, 1990). Žal imajo gobe tudi sposobnost bioakumulacije težkih kovin, kot sta kadmij in živo srebro (Širić in sod., 2016).

Od poznanih 20,000 višjih vrst jih je več kot 2000 užitnih, od katerih se jih le 100 vrst goji v komercialne namene in le 20 na industrijskem nivoju (Reis in sod., 2012). Njihova globalna ekonomska vrednost je v porastu, predvsem zaradi njihove prehranske vrednosti, kot živila, kot tudi zaradi zdravilnega in nutrocevskega delovanja vsebovanih učinkovin (Chang in Miles, 2004). Država z največjim deležem pridelanih saprofitskih gob je Kitajska (več kot 1,5 milijona ton v letu 2007), sledijo ZDA, Nizozemska, Poljska in Španija (Aida in sod., 2009). V svetovnem merilu se največ gojijo dvotrosni kukmak (*Agaricus bisporus*), sledijo užitni nazobčanec ali šitake (*Lentinula edodes*), ostrigarji (*Pleurotus spp.*) in zimska panjevka (*Flammulina velutipes*) (Chang in Miles, 2004; Aida in sod., 2009). V primerjavi z drugimi užitnimi gobami, imajo saprofitske vrste krajši čas frutifikacije in so manj zahtevne glede okoljskih dejavnikov, kar nam omogoča enostaven način gojenja (Bonatti in sod., 2004).

2.3 INDUSTRIJSKA UPORABA GOB

Lesne gobe so zanimive tudi za industrijsko uporabo, predvsem njihovi ektoencimi (lakaze,

lignin in mangan peroksidaze) imajo potencialne aplikacije v številnih industrijskih sektorjih vključno s kemijskim, prehrabnim, kmetijskim, papirnim, tekstilnim in kozmetičnim sektorjem, ter pri produkciji pogonskih goriv (Maciel in sod., 2010).

V prehranski industriji se lakaze uporabljajo v določenih procesih za poudarek ali spremembo videza hrane ali pijače, kot tudi za odstranjevanje nezaželenih fenolov, ki so odgovorni za porjavitev in motnost sadnih sokov, vina in piva (Rodríguez in Toca, 2006). V lesni industriji uporabljajo lakaze za depolimerizacijo lignina, delignifikacijo in v drugih procesih modifikacije lesne pulpe (Chandra in Ragauskas, 2002; Camarero in sod., 2004; Rodríguez in Toca, 2006; Vikineswary in sod., 2006). V tekstilni in papirni industriji imajo lakaze potencialno uporabo pri encimskih beljenjih tekstilov in barv (Abadulla in sod., 2000; Kunamneni in sod., 2008).

2.4 BIOREMEDIACIJA

Ena od glavnih okoljskih problemov, s katerimi se dandanes soočamo, je onesnaževanje tal, vode in zraka s strupenimi kemikalijami, kot posledica industrializacije in velike uporabe pesticidov v kmetijstvu. Glavni onesnaževalci našega okolja so policiklični aromatski ogljikovodiki, poliklorirani bifenoli in dioksini (Loske in sod., 1990). Alternativa klasičnim metodam remediacije je bioremediacija, ki predstavlja hitro, stroškovno učinkovito in ekološko odgovorno metodo odstranjevanja toksičnih snovi s pomočjo organizmov. Čeprav se pri bioremediaciji največkrat omenjajo bakterije, so zelo učinkoviti bioremediatorji tudi glive. Gobe iz skupine *Basidiomycetes* spadajo med največje naravne razkrojevalce. Kot vir energije potrebujejo ogljik, ki ga pridobijo z ektoencimi iz celuloze, lignina ali kakšne druge organskih snovi. Njihovi zunajcelični encimi, večinoma so to lignin in mangan peroksidaze ter lakaze, sodelujejo tudi pri razgradnji škodljivih snovi. Na ta način lahko glive uporabimo pri bio-transfromaciji pesticidov (Raj in sod., 1992), razgradnji naftnih ogljikovodikov (Cerniglia in sod., 1992) in širokega spektra drugih onesnaževalcev okolja (Isikhuemhen in sod., 2003). Primer gobe s širokim spektrom delovanja je *Trametes versicolor*, ki proizvede tri lignolitične encime s katerimi zelo učinkovito razgraja lignin, policiklične aromatske ogljikovodike, poliklorirano bifenilno mešanico in številna druga sintetična barvila (Tanaka in sod., 1999; Novotny in sod., 2004).

2.5 BIOLOŠKO AKTIVNE SNOVI V GOBAH

Gobe predstavljajo bogata vir biološko aktivnih snovi z visoko zdravilno vrednostjo, kot so polisaharidi, fenoli, terpenoidi, ergosteroli in hlapne organske spojine (El Enhasay in sod., 2010; Wang in sod., 2011; Villares in sod., 2012). Gobe proizvajajo tudi veliko število biološko aktivnih proteinov, kot so hemolizini (Berne in sod., 2002), protiglivični proteini (Lam in Ng, 2001), lakaze (Giardina in sod., 1999), proteaze (Wang in Ng, 2001), RNKaze (Guan in sod., 2007), hidrofobini (Wosten Han, 2001) in lektini (Wang in sod., 1995; Yagi in sod., 1997). Lakaze (Yaropolov in sod., 1994) in hidrofobini imajo biotehnoške aplikacije (Janssen in sod., 2002; Scholtmeijer in sod., 2004), gobji protiglivični proteini so potencialno uporabni v kmetijstvu (Wang in sod., 2004) in lektini in RNKaze zavirajo rast tumorjev in preprečujejo njihovo proliferacijo (Wang in sod., 1995; Guan in sod., 2007). V diplomski nalogi smo se osredotočili na biološko aktivne snovi s hemolitično, protibakterijsko in anti-acetilholinesterazno aktivnostjo.

2.5.1 Hemolitično delovanje

Pri hemolizi pride do razpada eritrocitov, zaradi vpliva membransko aktivnih snovi. Mehanizmi vpliva na membrano eritrocitov in vrste učinkovin so različne. Hemolizini so družina proteinov s hemolitično aktivnostjo. Ti proteini so definirani kot eksotoksini s sposobnostjo lize celične membrane rdečih krvnih teles. Iz dosedanjih študiji lahko sklepamo, da hemolizini tvorijo pore v membrani celic, z vezavo na specifične ligande na površini tarčnih celic (Gonzalez in sod., 2008). Mnogo raziskav je bilo narejenih na hemolizinih bakterijskega izvora (Bhakdi in sod., 1996), zaradi pomena pri patogenezi. Znani so tudi mehanizmi delovanja, njihova struktura, tarčne molekule na celicah in njihov diagnostični potencial (Callegan in sod., 1999; Wallace in sod., 2000; Nizet, 2002; Kaneko in sod., 2004; Kumar in sod., 2011). Poleg bakteriji in gliv so hemolizine odkrili tudi pri rastlinah (Sousa in sod., 1994), nevretenčarjih (Anderluh in sod., 2002; Sher in sod., 2005) in sesalcih (Pipkin in sod., 2007).

Hemolizine so v gobah prvič opisali leta 1907 in 1911, ko je W.W. Ford proučeval različne rodove prostotrošnic (*Amanita*, *Entoloma*, *Lactarius*, *Inocybe*) (Ford, 1907; 1911). Do danes

so izolirali in raziskali delovanje velikega števila različnih glivnih hemolizinov. Za razliko od bakterijskih, ostaja vloga glivnih hemolizinov še nejasna. Poznamo različne teorije o možnem pomenu teh učinkovin za glive. Toda nobena ni zadovoljivo razjasnila njihovega pomena in veliko študij kažejo nasprotno si rezultate.

Mehanizem delovanja hemolize teh učinkovin je bil ekstenzivno proučen v mnogih študijah. Ostreolizin, izoliran iz vrste *Pleurotus ostreatus*, se na primer veže na s holesterolom bogata področja na membrani (membranske rafte) eritrocitov in drugih celic (Sepčić in sod., 2004; Chowdhury in sod., 2008; Resnik in sod., 2011). Te mikrodomene imajo pomembno vlogo pri bioloških procesih, kot so kalitev konidijev, razširjanje hif, signalne transdukcije in interakcije s patogeni, kar nam omogoča uporabo teh učinkovin kot označevalcev dinamičnih struktur v celični membrani (Bagnat in sod., 2000; Martin in sod., 2004; Jin in sod., 2008; Rossard in sod., 2010). Določeni hemolizini imajo tudi protirakavo učinkovanje; shizolizin (*S. commune*), eringeolizin (*P. eryngii*), nebrodeolizin (*P. nebrodensis*) in falolizin (*A. phalloides*) so pokazali učinke proti retrovirusnem delovanju in citotoksičnosti za rakave celice (Lustik-Kordovsky in sod., 2001; Ngai in sod., 2006; Lv in sod., 2009; Han in sod., 2010).

2.5.2 Inhibicija acetilholinesteraze

2.5.2.1 Acetilholin in acetilholinesteraza

Acetilholin (ACh) je ena od glavnih spojin, ki prenašajo električne impulze iz ene živčne celice na drugo živčno celico ali na mišično tkivo. Prisoten je v vretenčarjih in členonožcih. Prvič so ga odkrili leta 1867, kot sintetično spojino. V človeškem tkivu pa je bil odkrit leta 1906 v ekstraktih nadledvične žleze (Hunt R in Taveau, 1906). ACh je ligand za dve obliki receptorjev; muskarinske in nikotinske.

Muskarinski receptorji so v glavnem povezani s perifernim živčnim sistemom in gladkimi mišicami ter srčno mišico. Vezava ACh na receptor je ponavadi povezana s stimulacijo parasimpatičnega živčevja. Stimulacija parasimpatičnega živčnega sistema privede do zmanjševanj srčnega utripa in krvnega tlaka, zoženja bronhijev, spodbujanja prebave in povečanja črevesne peristaltike, povečanje slinjenja, izločanje tekočin iz mehurja in krčenja

zenic.

Nikotinski receptorji so prisotni v centralnem živčnem sistemu (CŽS) in v sinaptičnih špranjah med motoričnimi živci in skeletnim mišičevjem. Vezava ACh na receptor povzroči kontrakcijo skeletne mišice, medtem ko v CŽS je ACh stimulacij povezan s spominom in kognitivnimi procesi.

ACh se shranjuje v živčnih končičih v veziklih. Ob depolarizaciji terminalnega dela živca, se vsebina vezikov sprosti v sinaptično špranjo in posledično se ACh veže na receptorje. Razpolovna doba ACh je, zaradi prisotnosti velikih količin encima acetilholinesteraze (AChE), kratka. AChE hidrolizira esterske vezi nevroprenašalca, kar vodi v izgubo stimulativnega delovanja le tega. Z inhibicijo AChE lahko podaljšamo učinek ACh in to je glavni koncept pri razvoju in identifikaciji različnih inhibitorjev AChE, ki so nam v pomoč pri bolezenskih stanjih, kjer je zmanjšano delovanje holineričnega sistema (Silmanand in sod., 2005).

Raziskave v zadnjih letih so pokazale, da ima AChE vlogo tudi pri drugih funkcijah v organizmu, poleg živčnega prenosa. Deluje tudi kot adhezijski protein, protein kostnega matirksa, vpliva na rast nevrinov in sodeluje v procesu tvorbe amiloidnih fibrilov, ki so ena od značilnosti Alzheimerjeve bolezni (Zhang, 2004).

2.5.2.2 Acetilholinesterazni inhibitorji

Acetilholinesterazni inhibitorji se uporabljajo predvsem kot farmacevtski izdelki in kot pesticidi za zatiranje insektov in drugih členonožcev.

V medicini se uporabljajo za vzpostavljanje ravnovesja pri boleznih, kjer imamo nezadostne količine ACh oziroma povečano delovanje AChE. Najprej so jih uporabljali v oftalmologiji za zdravljenje glavkoma. Glavkom povzroča zastajanje in kopičenje prevelike količine prekatne vode v očesu, zaradi nepravilnega delovanja drenažnega sistema. Prekatna voda, ki zapolnjuje sprednji očesni segment, je pomembna za ohranjanje oblike očesa in za prehrano leče in roženice. Nastaja v ciliarnem telesu v zadajšnjem prekatu, mimo leče prehaja v

sprednji prekat in se preko trabekularnega mrežja filtrira v Schlemmov kanal, od koder se vrne v krvni obtok. Neravnotežje med nastajanjem in odtekanjem prekatne vode lahko povzroči povišan znotraj očesni tlak, povezan z nastankom glavkoma. Holinergična stimulacija poveča dilatacijo odvajalnega omrežja in s tem omogoča hitrejšo odvajanje odvečne tekočine (Houghton in sod., 2006).

V preteklosti so AChE inhibitorje uporabili tudi pri zdravljenju avtoimunske bolezni miastnije gravis, za katero sta značilni šibkost mišic in hitra utrudljivost. Vzrok za nastanek te patologije je napačen imunski odziv protiteles proti acetilholinskim receptorjem na postsinaptični membrani živčno-mišičnega stika.

V današnjem času so AChE inhibitorji predvsem uporabljeni za zdravljenje simptomov AB. To potrjuje pojav hipoteze o povezavi AB z nizko ravno ACh v možganih (Perry in sod., 1979) in dokazov, da naj bi AChE pospešila nalaganje beta-amiloidnih plakov v določenih možganskih področjih značilnih za Alzheimerjevo bolezen (Roberson in sod., 1997).

2.5.2.3 Alzheimerjeva bolezen

Alzheimerjeva bolezen (AB) je leta 1907 prvi opisal dr. Alois Alzheimer, ko je v posmrtni histološki raziskavi našel in opisal dva tipa primarnih kardinalnih poškodb možganov; amiloidne plake in nevrofibrilarne pentlje.

AB je najpogostejši vzrok ireverzibilne demence in podatki iz leta 2012 kažejo da prizadene več kot 35 milijonov ljudi po vsem svetu. Samo v ZDA je po ocenah 5,5 milijona ljudi prizadetih s to boleznijo. Do sredine stoletja naj bi se ta številka povečala na 13,8 milijone bolnikov. Leta 2013 je bilo uradno zabeleženih 84,767 smrti zaradi AB, kar pomeni, da je bil šesti najpogostejši vzrok smrti v ZDA in peti vodilni vzrok smrti za Američane nad 65 let starosti. Med letoma 2000 in 2013 so se smrtni primeri zaradi kapi, bolezni srca in raka prostate zmanjšali za 23%, 14% in za 11%, medtem ko so se smrti zaradi AB povečale za 71% (Alzheimer's Association, 2016).

Amiloidni plaki so posledica nenormalne zunajcelične akumulacije in odlaganja

amiloidnega beta peptida. V nevronih sta prisotna encima β - in γ -sekretaze, ki cepita amiloidni prekursor protein na amiloidni β -peptid 40 in amiloidni β -peptid 42. Ta dva peptida se preko vodikovih vezi nato povezujeta izven celice in tvorita amiloidne plake.

Iz modificiranih tau proteinov pa nastanejo neurofibrilarne pentlje. Vloga tau proteinov v zdravi celici je stabilizacija mikrotubulov, pomembnih celičnih transporterjev hranil in drugih snovi. Pri AB se tau proteini spremenijo in odcepijo od mikrotubulov, kar posledično vodi do razpada teh. Posledično razpade transportni sistem, kar vodi v degradacijo nevrona. Odcepljeni modificirani tau proteini se nato združujejo v neurofibrilarne pentlje, ki se širijo po možganih pacienta in vodijo k cerebralni atrofiji (Serrano-Pozo in sod., 2011).

Čeprav patogeneza AB še ni popolnoma znana, nam je več kot stoletje raziskav podalo namige o njenih mehanizmih in možnih intervencijah. Poleg tipičnih znakov, kot so nepravilno zgubani amiloidni plaki in tau neurofibrilarne pentlje, zasledimo v možganih Alzheimerjevih bolnikov tudi znake obsežne nevronske degeneracije (Ballardi in sod., 2011). Upad kognitivnih funkcij je posledica selektivne izgube holinergičnih nevronov in sinaps v bazalnem delu prozencefalona. To je privedlo do „holinergične hipoteze“, ki predlaga povečanje nivoja acetilholina z uporabo AChE inhibitorjev, ki preprečijo hidrolizo acetilholina v holinergičnih sinapsah. Poleg klasične vloge naj bi AChE bile povezane tudi pri nevrotoksični kaskadi agregacije AB (Silman in sod., 2005).

Uradna medicina za zdravljenje AB uporablja dve vrsti licenciranih zdravil; acetilholinesterazne inhibitorje in memantina, N-metil-D-aspartat receptorski antagonist, ki omejuje eksitotoksičnost glutamata. V obeh primerih gre za simptomatsko zdravljenje, ki daje bolnikom le skromne in začasne koristi (Melnikova, 2007).

2.5.3 Protibakterijsko delovanje

Razvoj antibiotikov je bil eden izmed najpomembnejših znanstvenih dosežkov v zadnjih sedemdesetih letih. Antibiotiki delujejo tako, da ovirajo metabolne procese bakteriji ali napadajo strukturno celovitost organizma (Fuchs in sod., 2004). Mehanizem delovanja je predvsem povezan s posegi v sintezo celične stene, spremembami v plazemski prepustnosti

membrane, motnjami v podvajanje kromosomov, oziroma v sintezi beljakovin (Tenover, 2006). Celična stena daje bakterijski celici obliko in rigidnost, ter deluje kot osmotska pregrada (Koch, 2003). Vsebnost peptidoglikanov v celični steni je pri Gram-negativnih 10% in pri Gram-pozitivnih bakterijah 60% (Opal, 1999; Ginsburg, 2002).

Odpornost bakterij na antibiotike je zaskrbljujoča aktualna tematika, saj so nekoč lahko ozdravljive bolezni sedaj problematične (WHO, 2000; Peres-Bota in sod., 2003). Korelacija med multirezistentnimi mikroorganizmi in bolnišničnimi okužbami kaže na to težavo in potrebo po čimprejšnjih rešitvah (Pittet, 2005). Leta 2010 je Svetovna zdravstvena organizacija (WHO) urgirala vsem državam, naj izvajajo kontrolne postopke za preprečevanje razmnoževanja multirezistentnih bakterij na zdravila, s poudarkom na tveganjih, povezanih z pomanjkanjem alternativnih terapij proti tem mikroorganizmov (WHO, 2010).

Zaradi tega je odkrivanje novih učinkovitih protimikrobnih snovi, ki delujejo na rezistentne patogene mikroorganizme, ključnega pomena. V zadnjih letih se je iskanje novih učinkovin razširilo na mnoge različne skupine organizmov, med katerimi so tudi gobe, kot alternativne vire novih protibakterijskih učinkovin.

Tako užitne, kot neužitne gobe so pokazale protimikrobno delovanje proti patogenim mikroorganizmom, vključno z bakterijami povezanimi z bolnišničnimi okužbami (*Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas maltophilia*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Morganella morganii*, *Proteus mirabilis*, *Serratia marcescens*) in multirezistentimi sevi (MRSA - methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSE - methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis*, PRSP - penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*, VREF - vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*).

Iz gob izolirane aktivne protibakterijske učinkovine spadajo med primarne in sekundarne metabolite. Med primarnimi dobimo predvsem proteine, peptide in oksalno kislino, med sekundarnimi pa seskviterpene, steroide, antrakinone, derivate benzojske kisline in kinoline (Alves in sod., 2012).

Razpoložljivi podatki iz literature kažejo večjo protimikrobno aktivnost gobjih ekstraktov proti Gram-pozitivnim bakterijam. Med vsemi gobami je *Lentinus edodes* najbolj raziskana vrsta in raziskave so pokazale, da ima generalno protimikrobno delovanje proti Gram-pozitivnim in Gram-negativnim bakterijam (Hirasawa in sod., 1999; Ishikawa in sod., 2001; Hearst in sod., 2009). Peptid plektazin, pridobljen iz *Pseudoplectania nigrella* je izolirana spojina z najvišjo protimikrobno aktivnostjo proti Gram-pozitivnim bakterijam, medtem ko 2-aminokinolin, izoliran iz *Leucopaxillus albissimus*, ima najvišjo protimikrobno aktivnostjo proti Gram-negativnim bakterijam (Mygind in sod., 2005; Signoretto in sod., 2011).

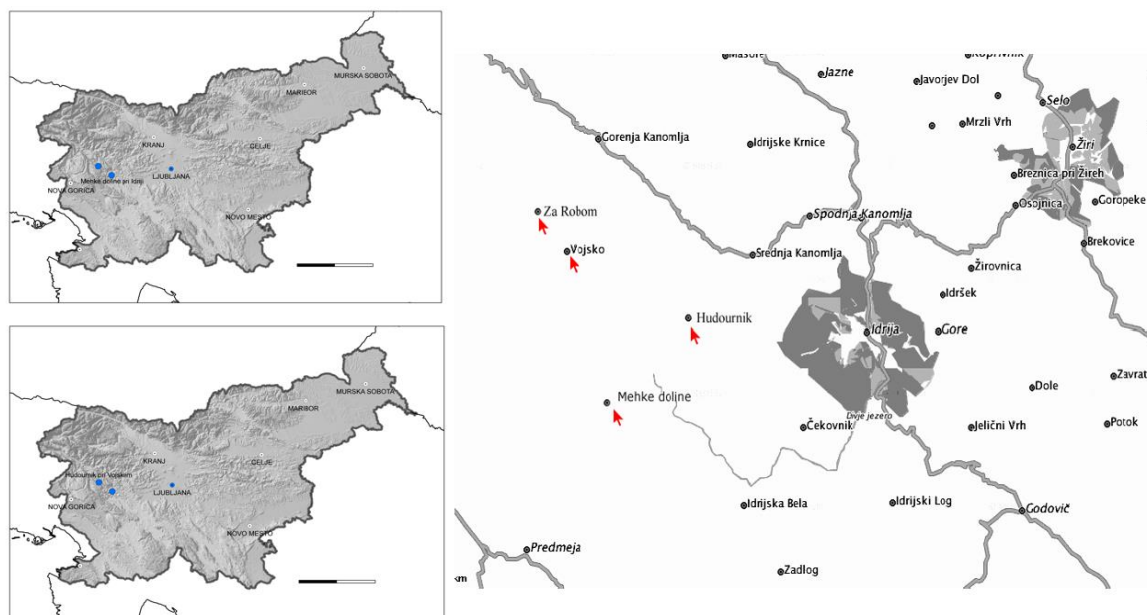
2.5.4 Protivnetno delovanje

Vnetje ima pomembno vlogo pri mnogih s starostjo povezanih kroničnih boleznih, kot so akutne in kronične nevrodegenerativne bolezni, degenerativne kostno-mišične bolezni, bolezni srca in ožilja, diabetes, astma, revmatoidni artritis in vnetne črevesne bolezni (Badolato in Oppenheim, 1996; Brod, 2000; Perry, 2004; Gu in sod., 2010;). Konvencionalna medicina za lajšanje vnetja uporablja nesteroidna protivnetna zdravila, ki pa imajo mnoge nezaželene stranske učinke in lahko povzročijo gastrointestinalno toksičnost. Povezane so tudi s povečanim krvnim tlakom, povečanim tveganjem kongestivnega srčnega popuščanja in pojavom tromboz (Aisen in sod., 2003; McMurray in Hardy, 2002). Užitarne gobe predstavljajo zanimivo alternativo, saj kot funkcionalna živila vsebujejo številne biološko aktivne snovi s protivnetnim delovanjem. To so v glavnem polisaharidi, terpeni, fenolne kisline, steroidi, maščobne kisline in drugi metaboliti. Med temi so najbolj aktivni polisaharidi (beta-glukani), terpenoidi in fenolne spojine (Wasser in Weis, 1999; Rai in sod., 2005; Taofiq in sod., 2016).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 MATERIAL

Nabiranje gob je potekalo oktobra in novembra 2007 v Mehki dolini pri Idriji, na dveh lokacijah pri Vojskem (Za Robom in na Hudourniku) in na Šišenskem hribu v Ljubljani. Nahajališča nabranih gob so prikazan na Sliki 2.



Slika 2: Lokacije območja nabiranja lesnih in travniških gob

V Preglednici 1 je seznama proučevanih saprofitnih in mikoriznih gob z točnimi lokacijami in datumi nabranih primerkov. Poleg slovenskega in latinskega imena posamezne gobe je navedeno tudi ime osebe, ki je vzorce določila.

Preglednica 1: Seznam nabranih travniških gob uporabljenih pri diplomskem delu z latinskim in slovenskim imenom, datumu nabiranja, lokacijo najdbe in imenom osebe, ki jih je določila.

latinsko ime	slovensko ime	nabrano	lokacija	determiniral
<i>Hydnum repandum</i>	Rumeni ježek	20. 10. 2007	Za Robom (Vojsko)	T. Grebenc
<i>Bjerkandera adusta</i>	Osmojena bjerkandera	20. 10. 2007	Za Robom (Vojsko)	S. Šerod
<i>Leccinum scabrum</i>	Brezov ded	20. 10. 2007	Za Robom (Vojsko)	J. Kosec
<i>Trametes hirsuta</i>	Kosmata ploskocevka	20. 10. 2007	Za Robom (Vojsko)	J. Kosec
<i>Suillus bovinus</i>	Prožna lupljivka	20. 10. 2007	Za Robom (Vojsko)	A. Jesenko
<i>Armillaria ostoyae</i>	Črnomekinasta mraznica	19. 10. 2007	Mehke Doline pri Idriji	A. Jesenko
<i>Lactarius torminosus</i>	Kosmata mlečnica	20. 10. 2007	Za Robom (Vojsko)	T. Grebenc

se nadaljuje

Nadaljevanje Preglednice 1: Seznam nabranih travniških gob uporabljenih pri diplomskem delu z latinskim in slovenskim imenom, datumu nabiranja, lokacijo najdbe in imenom osebe, ki jih je določila.

latinsko ime	slovensko ime	nabrano	lokacija	determiniral
<i>Neobulgaria pura</i>	Čedna novobolgarka	19. 10. 2007	Mehke Doline pri Idriji	A. Piltaver
<i>Hygrocybe coccinea</i>	Škrlatna vlažnica	19. 10. 2007	Mehke Doline pri Idriji	A. Piltaver
<i>Pseudohydnum gelatinosum</i>	Navadna ledenka	20. 10. 2007	Za Robom (Vojsko)	V. Jelen Šajn
<i>Hygrocybe fornicata</i>	Oblokasta vlažnica	20. 10. 2007	Za Robom (Vojsko)	A. Piltaver
<i>Clytocybe geotropa</i>	Pozna livka	20. 10. 2007	Za Robom (Vojsko)	A. Jesenko
<i>Hygrophorus lucorum</i>	Macesnova polževka	20. 10. 2007	Za Robom (Vojsko)	J. Kosec
<i>Piptoporus betulinus</i>	Brezova odpadljivka	20. 10. 2007	Za Robom (Vojsko)	A. Piltaver
<i>Hypholoma capnoides</i>	Sivolistna žveplenjača	21. 10. 2007	Hudournik (Vojsko)	A. Piltaver
<i>Gymnopilus penetrans</i>	Predirna plamenka	22. 11. 2007	Šišenski hrib (Ljubljana)	V. Jelen Šajn
<i>Flammulina velutipes</i>	Zimska panjevka	22. 11. 2007	Šišenski hrib (Ljubljana)	V. Jelen Šajn
<i>Amanita muscaria</i>	Rdeča mušnica	20. 10. 2007	Za Robom (Vojsko)	K. Sepčič
<i>Oudemansiella mucida</i>	Sluzasta širokolostka	21. 10. 2007	Hudournik (Vojsko)	A. Piltaver
<i>Panellus serotinus</i>	Pozni zgručevac	20. 10. 2007	Za Robom (Vojsko)	J. Kosec
<i>Hypoxylon fragiforme</i>	Jagodasti skorjoder	19. 10. 2007	Mehke Doline pri Idriji	K. Sepčič
<i>Russula drimea</i>	Lomljiva golobica	20. 10. 2007	Za Robom (Vojsko)	A. Piltaver
<i>Schizophyllum commune</i>	Navadna cepilistka	19. 10. 2007	Mehke Doline pri Idriji	A. Jesenko
<i>Tricholomopsis rutilans</i>	Rdečkasta trhlenka	20. 10. 2007	Za Robom (Vojsko)	J. Kosec
<i>Trametes versicolor</i>	Pisana ploskocevka	19. 10. 2007	Mehke Doline pri Idriji	A. Piltaver
<i>Tricholoma pseudonictitans</i>	Varljiva kolobarnica	20. 10. 2007	Za Robom (Vojsko)	J. Kosec
<i>Trichaptum abietinum</i>	Jelkova apnenka	20. 10. 2007	Za Robom (Vojsko)	J. Kosec
<i>Trametes gibbosa</i>	Grbasta ploskocevka	19. 10. 2007	Mehke Doline pri Idriji	A. Piltaver
<i>Polyporus brumalis</i>	Zimski luknjičar	20. 10. 2007	Za Robom (Vojsko)	J. Kosec
<i>Lasiochlaena benzoina</i>	Smrekova irhovka	21. 10. 2007	Hudournik (Vojsko)	J. Kosec
<i>Cystoderma carcharias</i>	Gorska zrnovka	20. 10. 2007	Za Robom (Vojsko)	V. Jelen Šajn
<i>Daedaleopsis confragosa</i>	Rdečeča zvitocjevka	20. 10. 2007	Za Robom (Vojsko)	J. Kosec
<i>Stereum hirsutum</i>	Dlakava slojevka	19. 10. 2007	Mehke Doline pri Idriji	A. Piltaver
<i>Fomes fomentarius</i>	Bukova kresilka	19. 10. 2007	Mehke Doline pri Idriji	T. Grebenc
<i>Pseudocraterellus undulatus var. crispus</i>	Nagubana patrobenta	20. 10. 2007	Za Robom (Vojsko)	T. Grebenc

3.2 METODE

3.2.1 Priprava in razdelitev vzorcev

Za pripravo vzorcev liofiliziranih gob smo najprej razrezali trdnejše strukture plodišč na manjše koščke. Nato smo tako pripravljeno vsebino strli v terlnici, da smo dobili fin prah. Vzorce smo nato enakomerno razdelili na dva dela. Prvo polovico material smo uporabili

pri tej diplomski nalogi, drugo polovico je pa Lovro Rozman uporabil za diplomsko nalogo »Biološko aktivne snovi v organskih ekstraktih nekaterih lesnih in travniških gob«.

3.2.2 Vodni ekstrakti

Za pripravo vodnih ekstraktov smo naprej vzorcem liofiliziranih trosnjakov dodali deionizirano vodo, da je za nekaj centimetrov prekrivala suhi material. V plastični centrifugirki smo nato vzorce ekstrahirali 12 do 24 ur na stesalniku pri 4 °C in 600 obratih/min. Ob zaključeni ekstrakciji smo ekstrakte ponovno centrifugirali za 30 minut pri 4 °C, tokrat pri 15000 obratih/min. Previdno smo odpipetirali supernatante in nato naše vzorce razdelili v dve 2-ml plastični epici. Prvo epico smo segrevali na vodni kopeli za 10 minut pri 100 °C. Po ohladitvi vzorcev smo jih še centrifugirali pri sobni temperaturi za 20 minut pri 13000 obratih/min. Nato smo supernatante odpipetirali v epice, katere smo označili s črko »k« (kuhani vzorec) in jih shranili pri -20°C. Drugo epico smo označili s črko »s« (surovi vzorec) in jo pri -20°C shranili.

3.2.3 Izračun suhe teže ekstrahirane snovi v vzorcih

Za izračun suhe teže vzorca smo uporabili 2-centimetrske posodice iz aluminijaste folije, ki smo jih predhodno stehali, nato smo po 100 µl vzorca odpipetirali v posodice in 30 minut sušili v sterilizatorju pri 120 °C. Po končanem sušenju smo posodice ponovno stehali, preračunali suhe teže v mg/ml in si zapisali rezultate. V Preglednici 3 so prikazani teže suhih vzorcev.

3.2.4 Določanje količine proteinov

Za določanje količine proteinov v suhih vzorcih smo primerjali umiritveno krivuljo za znane koncentracije govejega serumskega albumina (BSA) z izmerjeno absorpcijo naših vzorcev. V jamice mikrotitrirne plošče smo vbrizgali po 2 µl vzorca in mu dodali 190 µl mešanice reagentov BCA protein reagent (Pierce, 23223) in BCA protein reagent B (Pierce, 23224) v razmerju 1:20. Dodali smo še 8 µl deionizirane vode in nato vzorce inkubirali za 30 minut pri temperaturi 37 °C. Na isti način smo testirali tudi predhodno pripravljene različne koncentracije standardnega govejega serumskega albumina (BSA) (10, 5, 1, 0.5, 0.1, 0.05 in

0.01 mg/ml). Nato smo določili absorpcijo proteinov pri valovni dolžini 550 nm s čitalcem mikrotitrnih plošč (Dynex Technologies, ZDA). Absorpcijske vrednosti prvih šest standardov smo dobili eksperimentalno, vrednosti nad 10 g/ml pa s predvidevanjem premosorazmernega naraščanja premice glede na naklon premice med 5 in 10 mg/ml. S standardizirano premico smo odčitali vrednosti in pri tem tudi upoštevali faktor razredčitve, kar nam je podalo koncentracijo proteinov v mg/ml.

3.2.5 Določanje hemolitične aktivnosti

Hemolitični test nam pokaže sposobnost učinkovin v vzorcih, da poškodujejo membrane eritrocitov in posledično z veliko verjetnostjo tudi drugih vrst celic.

S centrifugiranjem smo izolirali eritrocite iz sveže goveje kriv, ki so jim dodali citrat, da ni prišlo do strjevanja. Eritrocite smo trikrat sprali s fiziološko raztopino in jih nato uporabili za biološke teste ali shranili v hladilniku v Alseverjevem konzervansu. Uporaba tako pripravljenih eritrocitov je možna dokler se supernatant ne obarva rdeče, kar nakazuje na pojav hemolize. Pred uporabo smo eritrocite v konzervansu dvakrat sprali s fiziološko raztopino. Za uporabo v testiranju smo eritrocite resuspendirali v pufru za eritrocite (raztopina 0,13 M NaCl in 0,02 M TRIS.HCL, pH 7,4). Pripravljena suspenzija eritrocitov je imela navidezno absorpcijo 1 ± 0.01 pri 650 nm.

S čitalcem mikrotitrirnih plošč (Dynex Technologies, ZDA) smo spremljali hemolizo, saj nam ta omogoča sočasno spremljanje 96 časovnih potekov reakciji. 70 vdolbinic smo na mirotitrirni plošči napolnili s po 100 μ l eritrocitenga pufra in 20 μ l svežega ali kuhanega ekstrakta posameznih gob. Nato smo v vsako vdolbinico dodali še po 100 μ l eritrocitov in pričeli z meritvijo. Hemolitično aktivnost vzorcev smo zaznali kot padec absorpcije pri 650 nm. Kontrola nam je bila 100 μ l eritrocitnega pufra z dodanimi 20 μ l deionizirane vode in 100 μ l eritrocitov. Hemolizo smo zasledovali 20 minut pri 25°C.

Pri hemolitično aktivnih vzorcih smo odčitali polovični čas hemolize (t_{50}); to je čas pri katerem navidezna absorpcija suspenzije eritrocitov pade na polovico začetne vrednosti. Da smo lahko določili koncentracijsko odvisnost hemolize, smo pri hemolitično aktivnih vzorcih teste ponovili še z manjšim volumnom vzorca (10 μ l, 5 μ l, 2 μ l in 1 μ l).

3.2.6 Določanje protibakterijske aktivnosti z difuzijskim testom na trdnem gojišču

S standardnim difuzijskim testom smo testirali protibakterijsko aktivnost vzorcev naših gob. Uporabili smo dva testna seva in sicer sev *Escherichia coli* kot Gram-negativen sev in *Bacillus subtilis* za Gram-pozitiven sev. Ob seva sta iz zbirke Katedre za genetiko in biologijo mikroorganizmov Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

V 100 ml erlenmajerici smo sterilno nacepili oba omenjena seva bakteriji. V erlenmajerici smo predhodno dodali 10 ml avtoklaviranega tekočega gojišča, ki smo ga predhodno pripravili. Za pripravo gojišča smo 2,5 g gojišča Luria broth (Sigma, ZDA) raztopili v 100 ml deionizirane vode in to raztopino razdelili v erlenmajerici. Preko noči smo erlenmajerici z nacepljenimi gojiščem stresali pri 250 obratih/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 Luria broth tekoče gojišče. Število bakterij smo določili iz optične gostote raztopine primerjane s standardiziranimi umeritvenimi krivuljami za ustrezna bakterijska seva.

Nato je sledila priprava trdega gojišča z mešanjem in raztapljanjem 15 g agarja (Meck, Nemčija) in 25 g gojišča Luria broth v enem litru deionizirane vode. V dvolitrski erlenmajerici smo nalili tako pripravljene medij in pokrite z aluminijasto folijo jih avtoklavirali. Vroč mediji smo po avtoklaviranju ohladili na primerno temperaturo (~42°C). Preračunati smo morali volumen tekoče bakterijske kulture in sicer tako, da bo končna koncentracija okoli 5×10^5 bakterijskih kolonij na 1 l gojišča. Izmerjena koncentracija prekonočnih bakterijskih kultur v gojišču je bila okoli 2×10^8 , kar je pomenil, da smo morali dodati 2,5 ml inokulata v 1 l avtoklaviranega gojiščnega medija. Volumne, ki smo jih preračunali, smo sterilno prenesli v ohlajen medij in vse skupaj dobro premešali. Nato smo 20 ml gojišča z vcepljenim bakterijskim sevom razlili na vsako od 72 Petrijevih plošč. Tako pripravljenih 36 plošč z bakterijskim sevom *Escherichia coli* in 36 plošč z bakterijskim sevom *Bacillus subtilis* smo nato shranili do uporabe pri 4 °C.

V vsako ploščo smo s steriliziranim plutovrtom zvrtili po tri luknje premera 1 cm. To smo naredili tik pred uporabo in nato dodali v vsako izmed lukenj 100 µl surovega ali kuhanega

vzorca. Kontrola nam je bila 100 μ l deionizirane vode. Vzorce smo čez noč inkubirali pri 37 °C in nato izmerili polmere inhibicijskih con, ki so bile vidne okoli lukenj.

3.2.7 Test inhibicije acetilholinesteraze

Aktivnost acetilholinesteraze in njeno inhibicijo s testnimi vzorci smo zasledovali z Ellmanovo metodo (Ellman in sod., 1961) s čitalcem mikrotitrnih plošč (Dynex Technologies, ZDA). Kot encim smo uporabili AChE iz električne jegulje (Sigma, ZDA), ki smo jo raztopili v 100 mM fosfatnem pufri, pH 7.3 v koncentraciji 500 encimskih enot (EE)/ml. Pred začetkom testa smo encim redčili tako, da smo k 8 ml fosfatnega pufra dodali 8 μ l encima AChE. Mikrotitrno ploščo smo napolnili s po 150 μ l mešanice Ellmanovega reagenta (raztopina 5,5-ditiobis-2-nitrobenzojske kisline (91 mg) in natrijevega hidrogen karbonata (37.5 mg) v 25 mM fosfatnem pufri, pH 7.0) in substrata (acetilholin, 1 mM). To mešanico smo predhodno pripravili tako, da smo zmešali 50 ml Ellmanovega reagenta s 50 μ l 1 M acetilholina. Nato smo v posamezno vdolbinico mikrotitrne plošče dodali po 20 μ l testnega vzorca (svežega ali kuhanega ekstrakta gobe) ter 50 μ l AChE. Pri kontroli smo namesto vzorca dodali 20 μ l vode. Vse meritve smo izvajali 5 min pri 405 nm in 25 °C s čitalcem mikrotitrskih plošč (Dynex, ZDA).

4 REZULTATI

4.1 DOLOČANJE KOLIČINE SUHE SNOVI IN PROTEINOV V VODNIH EKSTRAKTIH

Največje koncentracije suhe snovi smo dobili pri vzorcih *Leccinum scabrum*, *Lactarius torminosus*, *Amanita muscaria*, *Oudemansiella mucida*, *Armillaria ostoyae* in *Clytocybe geotropa*. Koncentracija proteinov je pa bila največja pri vzorcih *Trametes gibbosa*, *Hygrocybe coccinea*, *Bjerkandera adusta*, *Leccinum scabrum*, *Clytocybe geotropa* in *Tricholomopsis rutilans*. Koncentracije suhih snovi so delno sovpadale s koncentracijami proteinov (Preglednica 2).

Preglednica 2: Količina suhe snovi in proteinov v surovih (s) in kuhanih (k) vodnih ekstraktih gob.

Vrsta gobe	Oznaka vzorca	Koncentracija suhe snovi (mg/ml)	Koncentracija proteinov (mg/ml)
<i>Hydnum repandum</i>	1s	5,9	0,195
	1k	6,8	
<i>Bjerkandera adusta</i>	2s	1,6	0,398
	2k	0,8	
<i>Leccinum scabrum</i>	3s	29,3	0,399
	3k	20,5	
<i>Trametes hirsuta</i>	4s	5,9	0,169
	4k	5,5	
<i>Suillus bovinus</i>	5s	9,9	0,240
	5k	4,4	
<i>Armillaria ostoyae</i>	6s	12,7	0,185
	6k	11,5	
<i>Lactarius torminosus</i>	7s	16,5	0,335
	7k	8,3	
<i>Neobulgaria pura</i>	8s	9,4	0,120
	8k	2,8	
<i>Hygrocybe coccinea</i>	9s	3,1	0,565
	9k	2,7	
<i>Pseudohydnum gelatinosum</i>	10s	1,7	0,113
	10k	1,6	
<i>Hygrocybe fornicata</i>	11s	3,4	0,230
	11k	2,9	
<i>Clytocybe geotropa</i>	12s	11,3	0,392
	12k	9,8	
<i>Hygrophorus lucorum</i>	13s	6,7	0,127
	13k	5,3	

se nadaljuje

Nadaljevanje Preglednice 2: Količina suhe snovi in proteinov v surovih (s) in kuhanih (k) vodnih ekstraktih gob.

Vrsta gobe	Oznaka vzorca	Koncentracija suhe snovi (mg/ml)	Koncentracija proteinov (mg/ml)
<i>Piptoporus betulinus</i>	14s	2,7	0,228
	14k	1,5	
<i>Hypholoma capnoides</i>	15s	8,8	0,127
	15k	3,4	
<i>Gymnopilus penetrans</i>	16s	5,7	0,370
	16k	2,6	
<i>Flammulina velutipes</i>	17s	7,6	0,150
	17k	7,5	
<i>Amanita muscaria</i>	18s	14,9	0,272
	18k	11,4	
<i>Oudemansiella mucida</i>	19s	17,9	0,275
	19k	14,1	
<i>Panellus serotinus</i>	20s	8,1	0,207
	20k	7,4	
<i>Hypoxylon fragiforme</i>	21s	2,8	0,131
	21k	1,5	
<i>Russula drimea</i>	22s	9,3	0,192
	22k	7,9	
<i>Schizophyllum commune</i>	23s	2,9	0,129
	23k	2,4	
<i>Tricholomopsis rutilans</i>	24s	9,1	0,399
	24k	6,4	
<i>Trametes versicolor</i>	25s	5,3	0,186
	25k	3,8	
<i>Tricholoma pseudonictitans</i>	26s	2	0,218
	26k	1,4	
<i>Trichaptum abietinum</i>	27s	3,3	0,120
	27k	2,5	
<i>Trametes gibbosa</i>	28s	2,2	0,592
	28k	1,6	
<i>Polyporus brumalis</i>	29s	2	0,117
	29k	1,2	
<i>Lasiochlaena benzoina</i>	30s	3	0,130
	30k	1,4	
<i>Cystoderma carcharias</i>	31s	3,6	0,224
	31k	1,9	
<i>Daedaleopsis confragosa</i>	32s	1,6	0,148
	32k	1,3	
<i>Stereum hirsutum</i>	33s	1,1	0,128
	33k	0,8	
<i>Fomes fomentarius</i>	34s	1,5	0,249
	34k	1,5	
<i>Pseudocraterellus undulatus</i>	35s	2,1	0,123
	35k	1,1	

4.2 HEMOLITIČNA AKTIVNOST

Hemolitično aktivnih vodnih ekstraktov je bilo pet od sedemdesetih vzorcev. To so bili sveži ekstrakti *Hydnum repandum*, *Lactarius torminosus*, *Hygrocybe coccinea*, *Hygrocybe fornicata* in *Oudemansiella mucida*. Močno hemolitično aktivnost (pod 5 minut) sta pokazala sveža ekstrakta gob *Hydnum repandum* in *Oudemansiella mucida*, zmerno aktivnost (med 5 in 10 minutami) je pokazal ekstrakt *Hygrocybe coccinea* in rahlo aktivnost (med 10 in 30 minutami) sta pokazala ekstrakta *Lactarius torminosus* in *Hygrocybe fornicata* (Preglednica 3).

Vse vzorce, ki so prikazali hemolitično aktivnost, smo v nadaljevanju redčili in testirali polovični čas hemolize.

Preglednica 3: Hemolitična aktivnost v surovih (s) in kuhanih (k) vodnih ekstraktih gob.

prazno = ni aktivnosti

+ = rahla aktivnost (hemoliza poteče v času med 10 in 30 minutami)

++ = zmerna aktivnost (hemoliza poteče v času med 5 in 10 minutami)

+++ = močna aktivnost (hemoliza poteče v času, krajšem od 5 minut)

Vrsta gobe	Oznaka vzorca	Koncentracija suhe snovi v testu (mg/ml)	Koncentracija proteinov v testu (mg/ml)	Hemoliza (-, +, ++, +++)
<i>Hydnum repandum</i>	1s	0,536	0,018	+++
	1k	0,618		
<i>Bjerkandera adusta</i>	2s	0,145	0,036	
	2k	1,891		
<i>Leccinum scabrum</i>	3s	2,664	0,036	
	3k	1,864		
<i>Trametes hirsuta</i>	4s	0,536	0,015	
	4k	0,5		
<i>Suillus bovinus</i>	5s	0,9	0,022	
	5k	1,309		
<i>Armillaria ostoyae</i>	6s	1,155	0,017	
	6k	1,045		
<i>Lactarius torminosus</i>	7s	1,5	0,03	+
	7k	0,755		
<i>Neobulgaria pura</i>	8s	0,855	0,011	
	8k	0,255		
<i>Hygrocybe coccinea</i>	9s	0,282	0,051	++
	9k	0,336		

se nadaljuje

Nadaljevanje Preglednice 3: Hemolitična aktivnost v surovih (s) in kuhanih (k) vodnih ekstraktih gob.

Vrsta gobe	Oznaka vzorca	Koncentracija suhe snovi v testu (mg/ml)	Koncentracija proteinov v testu (mg/ml)	Hemoliza (-,+,++,+++)
<i>Pseudohydnum gelatinosum</i>	10s	0,155	0,01	
	10k	0,145		
<i>Hygrocybe fornicata</i>	11s	0,309	0,021	+
	11k	0,264		
<i>Clytocybe geotropa</i>	12s	1,027	0,036	
	12k	0,891		
<i>Hygrophorus lucorum</i>	13s	0,609	0,012	
	13k	0,482		
<i>Piptoporus betulinus</i>	14s	0,245	0,021	
	14k	0,5		
<i>Hypholoma capnoides</i>	15s	0,8	0,012	
	15k	0,309		
<i>Gymnopilus penetrans</i>	16s	0,518	0,034	
	16k	0,782		
<i>Flammulina velutipes</i>	17s	0,691	0,014	
	17k	0,682		
<i>Amanita muscaria</i>	18s	1,355	0,025	
	18k	1,036		
<i>Oudemansiella mucida</i>	19s	1,627	0,025	+++
	19k	1,827		
<i>Panellus serotinus</i>	20s	0,736	0,019	
	20k	0,673		
<i>Hypoxylon fragiforme</i>	21s	0,255	0,012	
	21k	0,409		
<i>Russula drimea</i>	22s	0,845	0,017	
	22k	0,718		
<i>Schizophyllum commune</i>	23s	0,264	0,012	
	23k	0,218		
<i>Tricholomopsis rutilans</i>	24s	0,827	0,036	
	24k	0,581		
<i>Trametes versicolor</i>	25s	0,482	0,017	
	25k	0,345		
<i>Tricholoma pseudonictitans</i>	26s	0,182	0,02	
	26k	0,218		
<i>Trichaptum abietinum</i>	27s	0,3	0,011	
	27k	0,277		
<i>Trametes gibbosa</i>	28s	0,2	0,054	
	28k	0,145		
<i>Polyporus brumalis</i>	29s	0,182	0,011	
	29k	0,2		

se nadaljuje

Nadaljevanje Preglednice 3: Hemolitična aktivnost v surovih (s) in kuhanih (k) vodnih ekstraktih gob.

Vrsta gobe	Oznaka vzorca	Koncentracija suhe snovi v testu (mg/ml)	Koncentracija proteinov v testu (mg/ml)	Hemoliza (-,+,++,+++)
<i>Lasiochlaena benzoina</i>	30s	0,273	0,012	
	30k	0,764		
<i>Cystoderma carcharias</i>	31s	0,327	0,02	
	31k	0,172		
<i>Daedaleopsis confragosa</i>	32s	0,145	0,013	
	32k	0,118		
<i>Stereum hirsutum</i>	33s	0,1	0,012	
	33k	0,164		
<i>Fomes fomentarius</i>	34s	0,136	0,023	
	34k	0,136		
<i>Pseudocraterellus undulatus</i>	35s	0,191	0,011	
	35k	0,1		

Preglednica 4 prikazuje rezultate testiranih vzorcev, ki so bili hemolitično aktivni v preliminarnem testu. Razredčenim vzorcem na 10 μ l, 5 μ l in 2 μ l, smo določili koncentracijo proteinov in suhe snovi in si zabeležili čas polovične hemolize (t_{50}). Pri sveži ekstraktih *Hydnum repandum*, *Lactarius torminosus*, *Hygrocybe coccinea* in *Hygrocybe fornicata* smo zaznali hemolizo le pri 10 μ l volumnu vzorca. Sveži ekstrakt *Oudemansiella mucida* je pokazal največjo hemolitično aktivnost in sicer polovični čas hemolize je bil 180 sekund pri 10 μ l, 600 sekund pri 5 μ l in 720 sekund pri 2 μ l razredčitvi (Preglednica 4).

Preglednica 4: Hemolitična aktivnost v surovih (s) in kuhanih (k) vodnih ekstraktih gob, ki so v preliminarnem testu povzročili hemolizo.

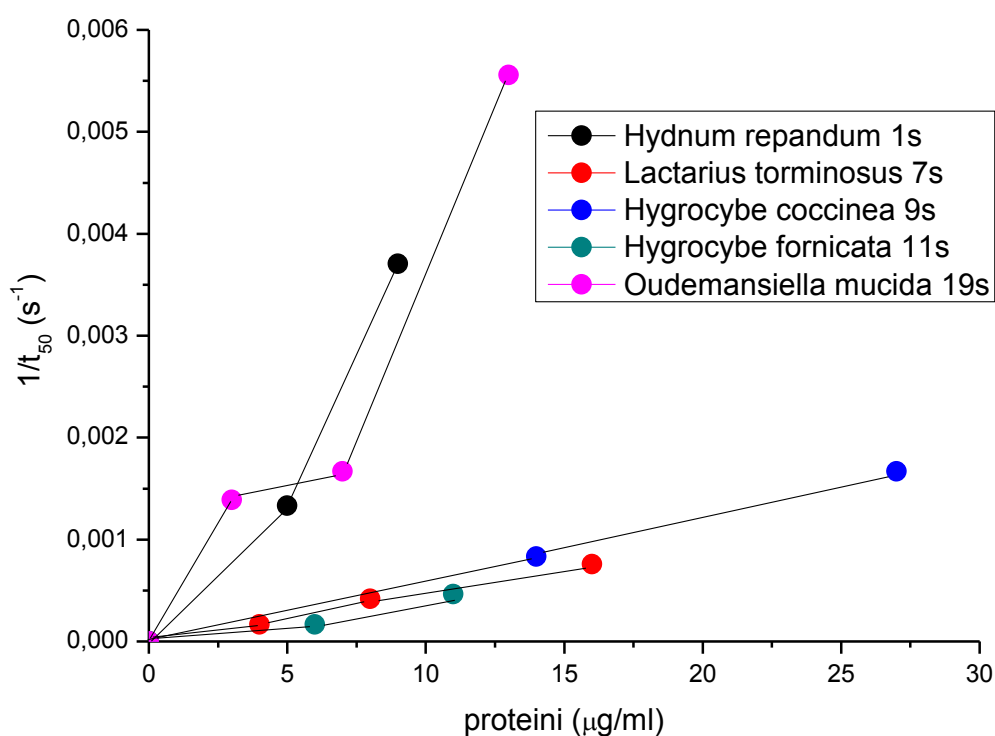
Vrsta gobe	Oznaka vzorca	Volumen vzorca v testu	Koncentracija suhe snovi v testu (mg/ml)	Koncentracija proteinov v testu (mg/ml)	Čas polovične hemolize (t_{50}) (s)
<i>Hydnum repandum</i>	1s	10 μ l	0,281	0,009	270
		5 μ l	0,144	0,005	ni hemolize
		2 μ l	0,058	0,002	ni hemolize
<i>Lactarius torminosus</i>	7s	10 μ l	0,786	0,016	1320
		5 μ l	0,402	0,008	ni hemolize
		2 μ l	0,163	0,003	ni hemolize
<i>Hygrocybe coccinea</i>	9s	10 μ l	0,148	0,027	600
		5 μ l	0,076	0,014	ni hemolize
		2 μ l	0,031	0,006	ni hemolize

se nadaljuje

Nadaljevanje Preglednice 4: *Hemolitična aktivnost v surovih (s) in kuhanih (k) vodnih ekstraktih gob, ki so v preliminarnem testu povzročili hemolizo.*

<i>Hygrocybe fornicata</i>	11s	10µl	0,162	0,011	2160
		5µl	0,083	0,006	ni hemolize
		2µl	0,034	0,002	ni hemolize
<i>Oudemansiella mucida</i>	19s	10µl	0,852	0,013	180
		5µl	0,437	0,007	600
		2µl	0,177	0,003	720

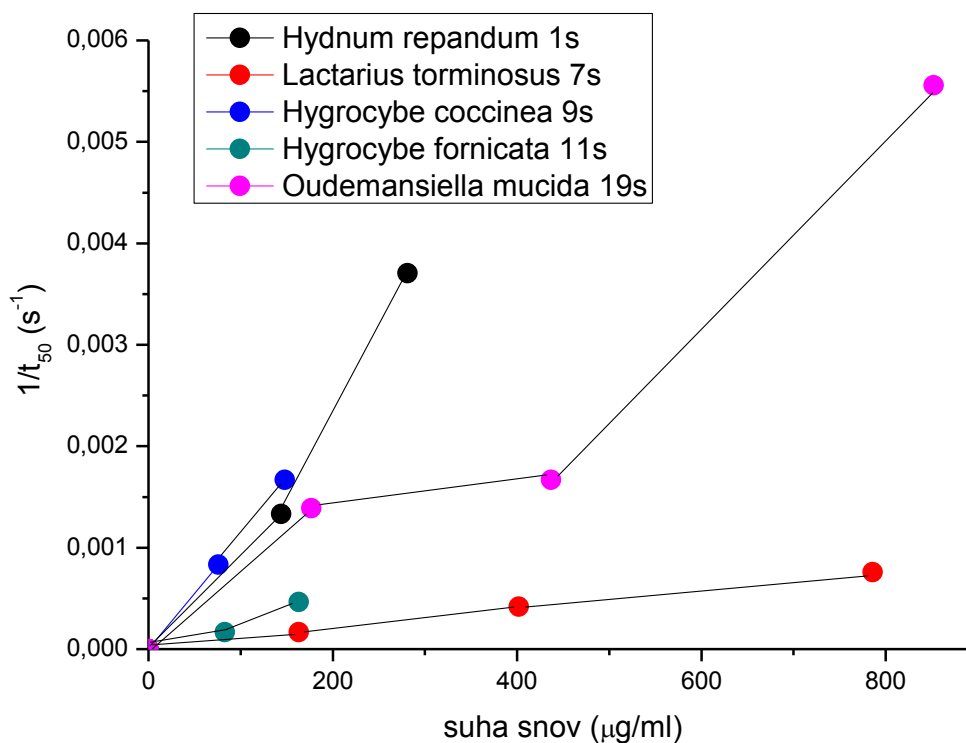
Največjo odvisnost recipročnega polovičnega časa hemolize od koncentracije proteinov sta pokazala ekstrakta *Oudemansiella mucida* in *Hydnum repandum*, najmanjšo pa *Hygrocybe fornicata* in *Lactarius torminosus* (Slika 3).



Slika 3: Odvisnost recipročne vrednosti polovičnega časa hemolize ($1/t_{50}$) od koncentracije proteinov hemolitično aktivnih vzorcev vodnih ekstraktov lesnih gob *Hydnum repandum* (1s), *Lactarius torminosus* (7s), *Hygrocybe coccinea* (9s), *Hygrocybe fornicata* (11s) in *Oudemansiella mucida* (19s).

Zasledili smo korelacijo med koncentracijo suhe snovi in koncentracijo proteinov z odvisnostjo recipročne vrednosti polovičnega časa hemolize. Ekstrakti z največjo

(*Oudemansiella mucida*, *Hydnum repandum*) in njamanjšo (*Hygrocybe fornicata*, *Lactarius torminosus*) aktivnostjo so bili isti v obeh primerih (Slika 4).



Slika 4: Odvisnost recipročne vrednosti polovičnega časa hemolize ($1/t_{50}$) od koncentracije suhe snovi hemolitično aktivnih vzorcev vodnih ekstraktov lesnih gob *Hydnum repandum* (1s), *Lactarius torminosus* (7s), *Hygrocybe coccinea* (9s), *Hygrocybe fornicata* (11s) in *Oudemansiella mucida* (19s).

4.3 PROTIBAKTERIJSKA AKTIVNOST

Nobeden od svežih ali kuhanih vzorcev naših gliv ni pokazal protibakterijske aktivnosti na Gram-pozitivno bakterijo *B. subtilis* ali na Gram-pozitivno bakterijo *E. coli*. Zato sklepamo, da testirane glive nimajo bakteriocidne aktivnosti (Preglednica 5).

Preglednica 5: Rezultati protibakterijske aktivnosti surovih (s) in kuhanih (k) vodnih ekstraktov testiranih gob.

Vrsta gobe	Oznaka vzorca	Koncentracija suhe snovi v testu (mg/ml)	Koncentracija proteinov v testu (mg/ml)	Širina inhibicijske cone <i>B. subtilis</i> (mm)	Širina inhibicijske cone <i>E. coli</i> (mm)
<i>Hydnum repandum</i>	1s	0,59	0.0195	0	0
	1k	0,68		0	0
<i>Bjerkandera adusta</i>	2s	0,16	0.0398	0	0
	2k	0,08		0	0
<i>Leccinum scabrum</i>	3s	2,93	0.0399	0	0
	3k	2,05		0	0
<i>Trametes hirsuta</i>	4s	0,59	0.0169	0	0
	4k	0,55		0	0
<i>Suillus bovinus</i>	5s	0,99	0.0240	0	0
	5k	0,44		0	0
<i>Armillaria ostoyae</i>	6s	1,27	0.0185	0	0
	6k	1,15		0	0
<i>Lactarius torminosus</i>	7s	1,65	0.0335	0	0
	7k	0,83		0	0
<i>Neobulgaria pura</i>	8s	0,94	0.0120	0	0
	8k	0,28		0	0
<i>Hygrocybe coccinea</i>	9s	0,31	0.0565	0	0
	9k	0,27		0	0
<i>Pseudohydnum gelatinosum</i>	10s	0,17	0.0113	0	0
	10k	0,16		0	0
<i>Hygrocybe fornicata</i>	11s	0,34	0.0230	0	0
	11k	0,29		0	0
<i>Clytocybe geotropa</i>	12s	1,13	0.0392	0	0
	12k	0,98		0	0
<i>Hygrophorus lucorum</i>	13s	0,67	0.0127	0	0
	13k	0,53		0	0
<i>Piptoporus betulinus</i>	14s	0,27	0.0228	0	0
	14k	0,15		0	0
<i>Hypholoma capnoides</i>	15s	0,88	0.0127	0	0
	15k	0,34		0	0
<i>Gymnopilus penetrans</i>	16s	0,57	0.0370	0	0
	16k	0,26		0	0
<i>Flammulina velutipes</i>	17s	0,76	0.0150	0	0
	17k	0,75		0	0
<i>Amanita muscaria</i>	18s	1,49	0.0272	0	0
	18k	1,14		0	0
<i>Oudemansiella mucida</i>	19s	1,79	0.0275	0	0
	19k	1,41		0	0
<i>Panellus serotinus</i>	20s	0,81	0.0207	0	0
	20k	0,74		0	0

se nadaljuje

Nadaljevanje Preglednice 5: Rezultati protibakterijske aktivnosti surovih (s) in kuhanih (k) vodnih ekstraktov testiranih gob.

Vrsta gobe	Oznaka vzorca	Koncentracija suhe snovi v testu (mg/ml)	Koncentracija proteinov v testu (mg/ml)	Širina inhibicijske cone <i>B. subtilis</i> (mm)	Širina inhibicijske cone <i>E. coli</i> (mm)
<i>Hypoxylon fragiforme</i>	21s	0,28	0.0131	0	0
	21k	0,15		0	0
<i>Russula drimea</i>	22s	0,93	0.0192	0	0
	22k	0,79		0	0
<i>Schizophyllum commune</i>	23s	0,29	0.0129	0	0
	23k	0,24		0	0
<i>Tricholomopsis rutilans</i>	24s	0,91	0.0399	0	0
	24k	0,64		0	0
<i>Trametes versicolor</i>	25s	0,53	0.0186	0	0
	25k	0,38		0	0
<i>Tricholoma pseudonictitans</i>	26s	0,2	0.0218	0	0
	26k	0,14		0	0
<i>Trichaptum abietinum</i>	27s	0,33	0.0120	0	0
	27k	0,25		0	0
<i>Trametes gibbosa</i>	28s	0,22	0.0592	0	0
	28k	0,16		0	0
<i>Polyporus brumalis</i>	29s	0,2	0.0117	0	0
	29k	0,12		0	0
<i>Lasiochlaena benzoina</i>	30s	0,3	0.0130	0	0
	30k	0,14		0	0
<i>Cystoderma carcharias</i>	31s	0,36	0.0224	0	0
	31k	0,19		0	0
<i>Daedaleopsis confragosa</i>	32s	0,16	0.0148	0	0
	32k	0,13		0	0
<i>Stereum hirsutum</i>	33s	0,11	0.0128	0	0
	33k	0,08		0	0
<i>Fomes fomentarius</i>	34s	0,15	0.0249	0	0
	34k	0,15		0	0
<i>Pseudocraterellus undulatus</i>	35s	0,21	0.0123	0	0
	35k	0,11		0	0

4.4 ANTIACETILHOLINESTERAZNA AKTIVNOST

Pri testiranju naših vzorcev na inhibicijo acetilholinesteraze smo zaznali aktivnost pri štirih svežih in štirih kuhanih ekstraktih testiranih gob. Največjo aktivnost smo zasledili pri svežem in kuhanem ekstraktu gobe *Russula drimea*, 26,5% in 21,3%. Sveži ekstrakt *Leccinum scabrum* je imel 20% stopnjo inhibicije AChE aktivnosti. Kuhani ekstrakti

Bjerkandera adusta, *Clytocybe geotropa* in *Panellus serotinus* in sveža ekstrakta *Panellus serotinus* in *Lactarius torminosus* so vsi imeli pod 20% antiacetilholinesterazno aktivnost (Preglednica 6).

Preglednica 6: Rezultati delovanja vzorcev aktivnosti surovih (s) in kuhanih (k) vodnih ekstraktov testiranih gob na encim acetilholinesterazo.

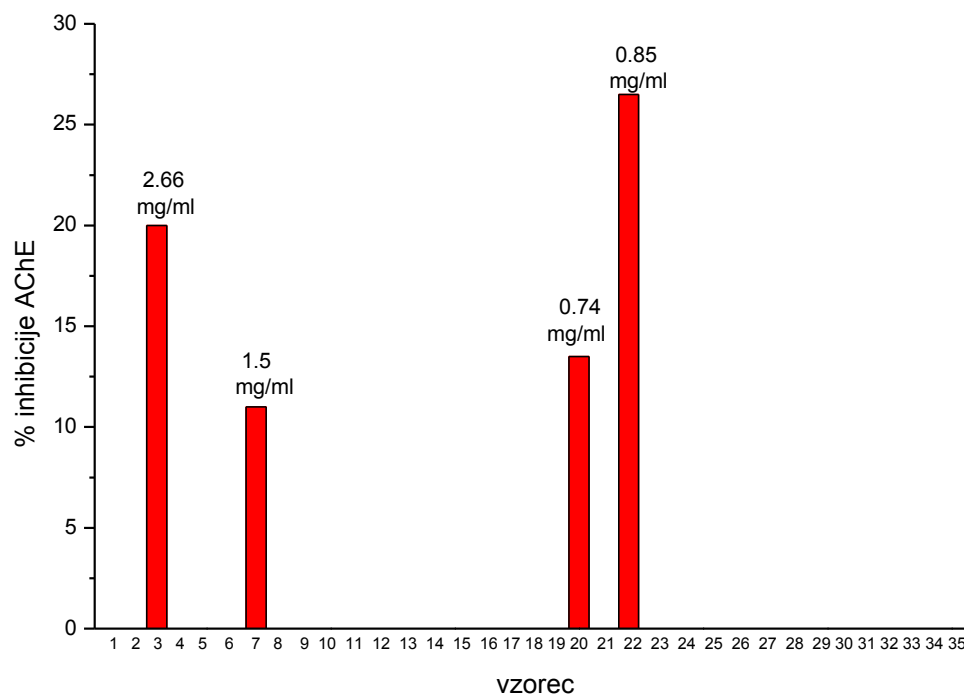
Vrsta gobe	Oznaka vzorca	Koncentracija suhe snovi v testu (mg/ml)	Koncentracija proteinov v testu (mg/ml)	Stopnja aktivnosti AChE glede na kontrolo (%)	Inhibicija AChE aktivnosti (%)
<i>Hydnum repandum</i>	1s	0,536	0,018	100	0
	1k	0,618		100	0
<i>Bjerkandera adusta</i>	2s	0,145	0,036	100	0
	2k	0,073		88,8	11,2
<i>Leccinum scabrum</i>	3s	2,664	0,036	80	20
	3k	1,864		100	0
<i>Trametes hirsuta</i>	4s	0,536	0,015	100	0
	4k	0,5		100	0
<i>Suillus bovinus</i>	5s	0,9	0,022	100	0
	5k	0,4		100	0
<i>Armillaria ostoyae</i>	6s	1,155	0,017	100	0
	6k	1,045		100	0
<i>Lactarius torminosus</i>	7s	1,5	0,03	89	11
	7k	0,755		100	0
<i>Neobulgaria pura</i>	8s	0,855	0,011	100	0
	8k	0,255		100	0
<i>Hygrocybe coccinea</i>	9s	0,282	0,051	100	0
	9k	0,245		100	0
<i>Pseudohydnum gelatinosum</i>	10s	0,155	0,01	100	0
	10k	0,145		100	0
<i>Hygrocybe fornicata</i>	11s	0,309	0,021	100	0
	11k	0,264		100	0
<i>Clytocybe geotropa</i>	12s	1,027	0,036	100	0
	12k	0,891		86,5	13,5
<i>Hygrophorus lucorum</i>	13s	0,609	0,012	100	0
	13k	0,482		100	0
<i>Piptoporus betulinus</i>	14s	0,245	0,021	100	0
	14k	0,136		100	0
<i>Hypholoma capnoides</i>	15s	0,8	0,012	100	0
	15k	0,309		100	0
<i>Gymnopilus penetrans</i>	16s	0,518	0,034	100	0
	16k	0,236		100	0
<i>Flammulina velutipes</i>	17s	0,691	0,014	100	0
	17k	0,682		100	0

se nadaljuje

Nadaljevanje Preglednice 6: Rezultati delovanja vzorcev aktivnosti surovih (s) in kuhanih (k) vodnih ekstraktov testiranih gob na encim acetilholinesterazo.

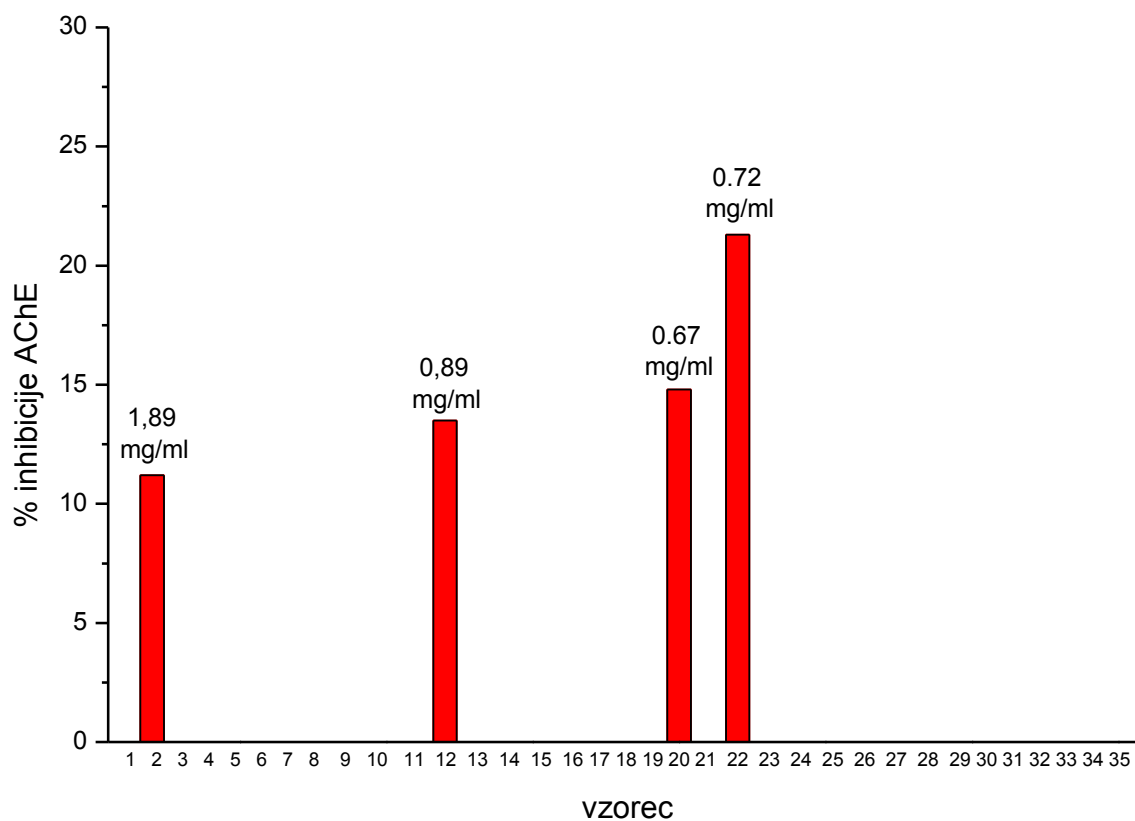
Vrsta gobe	Oznaka vzorca	Koncentracija suhe snovi v testu (mg/ml)	Koncentracija proteinov v testu (mg/ml)	Stopnja aktivnosti AChE glede na kontrolo (%)	Inhibicija AChE aktivnosti (%)
<i>Amanita muscaria</i>	18s	1,355	0,025	100	0
	18k	1,036		100	0
<i>Oudemansiella mucida</i>	19s	1,627	0,025	100	0
	19k	1,281		100	0
<i>Panellus serotinus</i>	20s	0,736	0,019	86,5	13,5
	20k	0,673		85,2	14,8
<i>Hypoxyylon fragiforme</i>	21s	0,255	0,012	100	0
	21k	0,409		100	0
<i>Russula drimea</i>	22s	0,845	0,017	73,5	26,5
	22k	0,718		78,7	21,3
<i>Schizophyllum commune</i>	23s	0,264	0,012	100	0
	23k	0,218		100	0
<i>Tricholomopsis rutilans</i>	24s	0,827	0,036	100	0
	24k	0,581		100	0
<i>Trametes versicolor</i>	25s	0,482	0,017	100	0
	25k	0,345		100	0
<i>Tricholoma pseudonictitans</i>	26s	0,182	0,02	100	0
	26k	0,218		100	0
<i>Trichaptum abietinum</i>	27s	0,3	0,011	100	0
	27k	0,277		100	0
<i>Trametes gibbosa</i>	28s	0,2	0,054	100	0
	28k	0,145		100	0
<i>Polyporus brumalis</i>	29s	0,182	0,011	100	0
	29k	0,127		100	0
<i>Lasiochlaena benzoina</i>	30s	0,273	0,012	100	0
	30k	0,127		100	0
<i>Cystoderma carcharias</i>	31s	0,327	0,02	100	0
	31k	0,172		100	0
<i>Daedaleopsis confragosa</i>	32s	0,145	0,013	100	0
	32k	0,118		100	0
<i>Stereum hirsutum</i>	33s	0,1	0,012	100	0
	33k	0,073		100	0
<i>Fomes fomentarius</i>	34s	0,136	0,023	100	0
	34k	0,136		100	0
<i>Pseudocraterellus undulatus</i>	35s	0,191	0,011	100	0
	35k	0,1		100	0

Inhibicija AChE pri svežih vodnih ekstraktih ni bila odvisna od suhe teže vzorcev. Ekstrakt *Russula drimea* (22), z 26,5% inhibicijo, je imel manjšo suho težo od ekstrakt *Leccinum scabrum* (3), z 20%, in *Lactarius torminosus* (7), z 11% inhibicijo (Slika 5).



Slika 5: Delež inhibicije acetilholinesteraze pri svežih vodnih ekstraktih testiranih travniških in lesnih gob. Nad stolpcije prikazana suha teža vzorca v testu.

Neodvisnost suhe teže od deleža inhibicije, lahko zasledimo tudi pri kuhanih ekstraktih. Teža zvorca kuhanega ekstrakta *Russula drimea* (22) z največjo inhibicijo, je bila manjša od suhe teže od ekstrakt *Bjerkandera adusta* (2) in *Clytocybe geotropa* (12) (Slika 6).



Slika 6: Delež inhibicije acetilholinesteraze pri kuhanih vodnih ekstraktih testiranih travniških in lesnih gob. Nad stolpcije prikazana suha teža vzorca v testu.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Cilj naloge je bil testirati vodne ekstrakte (surove in kuhane) 35 vrst mikoriznih in saprofitskih gob na tri vrste bioloških aktivnosti: hemolizo, inhibicijo rasti Gram-pozitivnih in Gram-negativnih bakterij ter inhibicijo encima acetilholinesteraze.

Hemoliza je proces, pri katerem pride do razpada rdečih krvnih telesc zaradi vpliva membransko aktivnih učinkovin. Ker gre za nezaželen učinek je zaželeno testirati vse potencialne terapevtske učinkovine tudi za hemolitično aktivnost. Pri testiranju hemolitično aktivnih vodnih ekstraktov imamo velikokrat opravka s skupino proteinov imenovanih hemolizini (Nayak in sod., 2012). Te proteine so intenzivno proučevali pri bakterijah, v zadnjih nekaj desetletji tudi pri glivah (Bhakdi in sod., 1996). Glivni hemolizini so raznolika skupina beljakovin, ki ima sposobnost lezije celične membrane eritrocitov (in drugih celic), imajo pa tudi druge pleiotropične funkcije (Callegan in sod., 1999; Wallace in sod., 2000; Nizet, 2002).

Hemolitično aktivnih je bilo pet od sedemdesetih vzorcev gob. To so bili surovi ekstrakti pri *Hydnum repandum*, *Lactarius torminosus*, *Hygrocybe coccinea*, *Hygrocybe fornicata* in *Oudemansiella mucida*. Vse ekstrakte, ki so bili hemolitično aktivni v preliminarnem testu, smo nato testirali še pri 10 μ l, 5 μ l in 2 μ l volumnih vzorca. Največjo hemolitično aktivnost sta imela surova ekstrakta *Hydnum repandum* in *Oudemansiella mucida*. Oba ekstrakta sta imela polovični čas hemolize pri 10 μ l, krajši od 5 minut je bil pri *Hydnum repandum* 4,5 minut, pri *Oudemansiella mucida* pa 3 minute. Surovi ekstrakt *Oudemansiella mucida* je imel aktivnost tudi pri 5 μ l in 2 μ l volumnu vzorca ter polovični čas hemolize (t_{50}) smo zabeležili pri 10 in 12 minutah. 10 μ l ekstrakti *Hygrocybe coccinea*, *Lactarius torminosus* in *Hygrocybe fornicata* so imel t_{50} pri 10, 22 in 36 minutah.

Hemolitično aktivnost smo zaznali samo v surovih ekstraktih, kar nam nakazuje, da verjetno gre za proteine ali druge temperaturno občutljive polarne molekule. Pri organskih ekstraktih istih vrst smo zasledili večjo hemolitično aktivnost in sicer sedemnajst vzorcev od

sedemdesetih je imelo hemolitično aktivnost (9 acetonskih in 8 metanolnih ekstraktov). Štiri vrste so bile hemolitično aktivne, tako v organskih kot v vodnih ekstraktih in sicer *Hydnum repandum*, *Lactarius torminosus*, *Hygrocybe fornicata* in *Oudemansiella mucida*. Acetonski ekstrakt *Hydnum repandum* je bil izredno hemolitičen saj je pri 10 µl je potekla polovična hemoliza že v 15 sekundah, medtem ko je pri vodnem ekstraktu potekla v 4,5 minutah. Tudi pri manjših volumnih je bila hemolitičan aktivnost acetonskega ekstrakta zelo močna (5 µl 45, 2 µl 165 in 1 µl 195 sekund). V literaturi smo zasledili študijo Takahashija in sodelavcev, kjer so iz metanolnega ekstrakta gobe *Hydnum repandum* izolirali repandiol ((2R,3R,8R,9R)-4,6-dekadiin-2,3:8,9-diepoksi-1,10-diol), ki je imel močno citotoksično aktivnost proti različnim rakavim celicam, kar bi lahko bila posledica lizije celične membrane le teh (Takashi in sod., 1992). Sklepamo lahko, da bi repandiol lahko bila tista učinkovina, ki je povzročila tako izrazito hemolitično delovanje v organskih ekstraktih naših gob. Za hemolitično aktivnost smo v vodnih ekstraktih te glive potrebovali bistveno večje koncentracije. Iz teh podatkov lahko postavimo dve hipotezi. Lahko je šlo za isto hemolitično snov, ki se je deloma razporedila tudi v vodno fazo, saj vedno obstaja možnost, da se del snovi ekstrahira tudi v fazo z drugačno polarnostjo. Lahko pa gre za dve različni učinkovini. Vsekakor je vodotopna učinkovina v našem vzorcu bila termolabilna, saj aktivnosti v kuhanih vzorcih nismo zaznali.

Polovični čas hemolize pri etanolnemu ekstraktu *Oudemansiella mucida* je bil tudi krajši (10 µl 75, 5 µl 255 in 2 µl 210 sekund) v primerjavi z vodnim ekstraktom (10 µl 170, 5 µl 600 in 2 µl 720 sekund). Pri acetonskem ekstraktu iste vrst pa so dobil daljše t_{50} (10 µl 315 in 5 µl 960 sekund). Tako acetonski (10 µl 120, 5 µl 315 in 2 µl 840 sekund) kot metanolni (10 µl 300, 5 µl 780 in 2 µl 900 sekund) ekstrakta *Lactarius torminosus* sta imel krajši čas polovične hemolize kot je imel vodni ekstrakt (10 µl 1320 sekund). Vodni ekstrakt *Hygrocybe fornicata* je imel najdaljši čas polovičen hemolize (10 µl 2160 sekund), acetonska (10 µl 330 in 5 µl 900 sekund) in metanolna ekstrakta sta pokazala precej hitrejšo hemolizo (10 µl 915 sekund).

Hemolitičan aktivnost vrst *Hydnum repandum*, *Lactarius torminosus*, *Hygrocybe coccinea*, *Hygrocybe fornicata* in *Oudemansiella mucida* je novost, saj v pregledu literature nismo zasledili omembe njunih hemolitičnih aktivnosti. Od vseh naših proučevanih gob smo v

literaturi zasledili opis hemolitične aktivnosti samo za vrsti *Flammulina velutipes* in *Schizophyllum commune*. Iz gobe *Flammulina velutipes* so leta 1974 izolirali flammutoksin, ki je imel karditoksično aktivnost (Lin in sod., 1974; 1975). Flammutoksin je citolitičen in karditoksičen 31 kDa protein, ki naredi dve različni obliki napetostno odvisnih ionski kanalčkov v fosfolipidnem dvosloju membrane prizadete celice (Tadjibaevain sod., 2000). Iz *Schizophyllum commune* so pa izolirali shizolizin (monomerični 29 kDa protein), temperaturno labilen hemolizin z inhibicijsko aktivnostjo proti HIV-1 reverzni transkriptazi (Han in sod., 2010). Zanimivo je, da v naši raziskavi hemolitične aktivnosti pri omenjenih vrstah gob nismo zasledili. Razlog morda leži v dejstvu, da omenjeni hemolizini za vzdrževanje native konformacije in posledično za biološko aktivnost potrebujejo določeno ionsko jakost, ki jo v naših ekstraktih niso imeli, saj so ti bili pripravljani v deionizirani vodi in ne v pufru.

Človek se že od nekdaj sooča s problemom širjenja nalezljivih bolezni. Dandanes imamo v našem protimikrobnem arzenalu več kot 150 učinkovin, ki jih uporabljamo pri zdravljenju infekcijskih bolezni (Fuchs in sod., 2004). Antibiotiki so definirani kot naravne nizko molekularne substance, ki so v manjših koncentracijah aktivne proti drugim organizmom (Tenover, 2006). Med 12000 znanimi antibiotiki, jih približno 55% proizvajajo bakterije iz rodu *Streptomyces*, 11% *Actinomycetes*, 12% druge bakterije in 22% glive (Inouye in sod., 2004). Gobe potrebujejo protibakterijske učinkovine za preživetje v kompetitivnem naravnem okolju. Tako glive kot ljudje imamo enake mikrobnе povzročitelje bolezni (npr. *E. coli*, *S. aureus* in *P. aeruginosa*). Zato lahko uporabimo protimikrobne snovi, ki jih glive proizvajajo, v obrambi proti tem patogenom tudi ljudje. Posebno zanimive so učinkovine, ki imajo protibakterijsko učinkovanje zoper multirezistentnim bakterijskim sevom (Pittet, 2005).

Vsi naši testi protibakterijske aktivnosti na Gram-pozitivne bakterije vrste *Bacillus subtilis* in Gram-negativne bakterije vrste *Escherichia coli* so bili negativni. Vzroki za dobljene rezultate so lahko različni. Večina snovi s protimikrobno aktivnostjo sodi med manjše organske molekule in se po navadi nahajajo v organskih, ne pa v vodnih ekstraktih. Lahko so tudi bile količine učinkovin premajhne, da bi izkazale protibakterijsko aktivnost. Potrebno pa je poudariti, da fizikalni faktorji rasti gliv, kot so temperatura, vlaga, pH in substrat, imajo

izredno pomembno vlogo pri produkciji primarnih in sekundarnih metabolitov (Manzi in sod., 2001; Puttaraju in sod., 2006; Guillamón IN SOD., 2010). Iste vrste gob lahko imajo zelo velika odstopanja v teh učinkovinah in posledično tudi različne učinke. Pri organskih ekstraktih istih vrst so pa pokazali protibakterijsko aktivnost pri osmih ekstraktih na *Escherichia coli* in pri 45 ekstraktih na *Bacillus subtilis*. Največjo aktivnost je na inhibicijo *B. subtilis* imel ekstrakt lesne gobe *Piptoporus betulinus*, na inhibicijsko aktivnost *E. coli* pa ekstrakt lesne gobe *Fomes fomentarius*. Ekstrakti so imeli veliko večjo inhibitorno dejavnost pri Gram-pozitivnih bakterijah, kot pri Gram-negativnih, kar nas ni presenetilo, saj smo tudi v literaturi zasledili veliko večje število aktivnih ekstraktov in učinkovin proti Gram-pozitivnim bakterijam (Alves in sod., 2012; Karaman in sod., 2012).

Inhibitorji acetilholinesteraze predstavljajo pomembno paliativno terapevtsko strategijo pri Alzheimerjevi bolezni (AB), kar vodi do prizadevanja v iskanju novih molekul z anti-AChE aktivnostjo.

AB je kronična progresivna nevrodegenerativna motnja, povezane z slabšanjem spominskih sposobnosti in kognitivnega deficita (Ballardi in sod., 2011). Ena od značilnost AB je nizka raven acetilholina v možganih bolnikov (Silman in sod., 2005). Glede na holinergično hipotezo, zaviranje acetilholinesteraze, encima, ki katalizira hidrolizo acetilholina, poveča koncentracijo acetilholina v možganih, s čimer izboljšuje holinergične funkcije pri bolnikih. Inhibitorji AChE lahko ublažijo simptome AB, vendar ne morejo zaustaviti ali izboljšati poteka bolezni. Večina zdravil, ki se trenutno predpisujejo za zdravljenje AB so AChE inhibitorji (takrin, donepezil, rivastigmin in galantamin) ter imajo omejeno učinkovitost in različne nezaželene stranske učinke (Chopra in so., 2011). Takrin in donepezil sta bili prvi zdravili odobreni za zdravljenje kognitivne izgube pri bolnikih z AB in sta sintetičnega izvora. Rivastigmin je bil zasnovan iz spojine fizostigmina, naravnega AChE-inhibitornega alkaloida. Alkaloida galantamin in huperzin A sta bil najprej izolirana iz rastlin *Galanthus* spp. in *Huperzia* spp. Huperzin A prodajajo na Kitajskem kot prehransko dopolnilo za izboljšanje spomina in se uporablja za zdravljenje simptomov AB. Rezultati mnogih raziskav so zelo obetavni, predvsem pri oceni izboljšanja kognitivnih sposobnosti pri živalih kot tudi učinkovitost, tolerabilnosti in varnosti tega alkaloida. Glede na to, da so rivastigmin, galantamin in huperzin A bili pridobljeni iz naravnih virov, obstaja velik interes odkrivanja

novih AChE inhibitorjev iz naravnega izvora. Kot smo že omenili, imajo ta zdravila le vpliv na zmanjšanje simptomov. Terpenofenol (delta-9-tetrahidrokanabinol) iz rastline *Cannabis sativa* L. se je izkazal kot potencialno zdravilo, ki lahko prepreči nastanek, napredovanje in celo povrne določene kognitivne funkcije AB (Eubanks in sod., 2006; Cao in sod., 2014; Curraris in sod., 2016).

Dejstvo, da so naravne biološko aktivne spojine lahko vir novih potencialnih inhibitorjev AChE je privedlo do odkritja pomembnega števila sekundarnih metabolitov in izvlečkov iz različnih organizmov (bakterij, modro-zelenih alg, rastlin, morskih spužv in gliv) s sposobnostjo inhibicije tega encima. Kot primer lahko navedemo 260 naravnih molekule iz rastlin, ki so bile v literaturi navedene kot inhibitorji AChE. Testirane spojine, ki so bile izolirane in identificirane, spadajo v razred alkaloidov (139), monoterpenov (27), kumarinov (18), triterpenov (17), flavonoidov (14), benzenoidov (13), diterpenov (8), heterocikličnih oksidov (5), seskviterpenov (5), stilbenov (3), ligninov (2), žveplovih spojin (2), proteidov (2), kvinoidov (1), benzoksazinonov (1), karotenoidov (1) in acikličnih (1) in policikličnih (1) spojin (Barbosa in sod., 2006). Iz seznama je razvidno, da je največ prav alkaloidov z AChE-inhibitorno aktivnostjo. Pri gobah je število izoliranih in identificiranih AChE inhibitorjev precej manjše, kar predstavlja priložnost za ugotavljanje novih uporabnih učinkovin.

Testirali smo sedemdeset vzorcev na inhibicijo AChE in osem je bilo pozitivnih. To so bili surovi vzorci gob *Leccinum scabrum*, *Lactarius torminosus*, *Panellus serotinus* in *Russula drimea* in kuhani vzorci *Bjerkandera adusta*, *Clytocybe geotropa*, *Panellus serotinus* in *Russula drimea*. Največjo inhibitorno učinkovanje sta imela sveži in kuhan ekstrakt vrste *Russula drimea*, kjer smo zabeležili 26,5% in 21,3% inhibicije AChE. Podobne rezultate so izkazali tudi pri organskih ekstraktih iste vrste, ker je bila inhibicija AChE pri acetonskem vzorcu 27,2% in pri metanolnem vzorcu 28%. To sta bila tudi edina organska vzorca, pri katerih so zaznali inhibitorno delovanje na AChE. Iz dobljenih podatkov lahko sklepamo, da pri gobi *Russula drimea* gre za manjšo, temperaturno stabilno vodotopno organsko molekulo. Tudi surovi in kuhani ekstrakt *Panellus serotinus* sta imela inhibitorno delovanje vendar precej nižjo, 13,5% (s) in 14,8% (k). Surovi vzorec *Leccinum scabrum* je imel 20% pri *Lactarius torminosus* pa le 11% inhibitornost. Kuhana vzorca *Bjerkandera adusta* in *Clytocybe geotropa* sta imela 11,2% ter 13,5% inhibitorno delovanje. Zadnja dva rezultata

sta presenetljiva, saj je bila AChE-inhibicijska aktivnost izmerjena iz kuhanih vzorcev, ne pa iz surovih. Iz tega lahko sklepamo, da je morda prišlo do eksperimentalne napake ali pa, da je postopek kuhanja odstranil kakšno snov, ki je preprečevala inhibicijsko aktivnost ekstrahirane učinkovine.

Za inhibitorno delovanje *Leccinum scabrum*, *Lactarius torminosus*, *Bjerkandera adusta*, *Clytocybe geotropa*, *Panellus serotinus* in *Russula drimea* nismo v literaturi zasledili podatkov, tako da je to novost. Od vseh proučevanih gob smo v literaturi našli opis šibkega AChE-inhibitornega delovanja ($IC_{50} = 0.320 \pm 0.070$ mg/mL) ekstrakta gobe *Schizophyllum commune* (Abdullah in sod., 2011).

5.2 SKLEPI

V diplomski nalogi smo določili aktivnost vodnih ekstraktov mikoriznih in lesnih gob na inhibicijo acetilholinesteraze ter rasti bakterij in njihovo hemolitično delovanje. Ugotovitve opravljenih testov so sledeče:

Hemolitično aktivnih je bilo 5 od 70 vzorcev. Vsi aktivni vzorci so bili surovi. Kuhanih vzorcev niso pokazali hemolitične aktivnosti. Največjo aktivnost smo zaznali pri gobi *Oudemansiella mucida*, kjer je hemoliza potekal v 3 minutah. Ta vzorec smo naprej redčili na 5 in 2 mikrolitra ter zabeležili 10 in 12 minutni polovični čas hemolize. Drugi najbolj aktiven je bil vzorec *Hydnum repandum*, kjer je hemoliza potekla v 4.5 minutah. Pri ekstraktu *Hygrocybe coccinea* je hemoliza potekla v 10 minutah, pri *Lactarius torminosus* pa v 22 minutah. Najdaljši čas hemolize smo zabeležili pri ekstraktu *Pseudohydnum gelatinosum* kjer je hemoliza potekla v 36 minutah.

Protibakterijsko delovanje proučevanih gob nismo zaznali.

Inhibicijo AChE smo zaznali pri 8 vzorcih. Največjo inhibicijo AChE smo ugotovili pri ekstraktu *Russula drimea* in sicer tako surovem (26,5%), kot kuhanem (21,3%) ekstraktu. 20% inhibicijo je pokazal tudi surovi ekstrakt *Leccinum scabrum*. Pri ekstraktu *Panellus serotinus* smo izmerili 13,5% inhibicijo pri surovem in 14,8% pri kuhanem ekstraktu. Surovi

ekstrakt *Lactarius torminosus* je imel 11% inhibicijo medtem ko sta kuhana ekstrakta *Bjerkandra adusta* in *Clytocybe geotropa* izkazala 11,2% oz. 13,5% inhibicijo AchE.

6 POVZETEK

Gobe so, zaradi sesilnega načina življenja, razvile različne obrabne strategije za zaščito pred predatorji, paraziti in patogenimi mikroorganizmi in s tem dosegle kompetitivno prednost. Človek s pridom izkorišča njihove učinkovine v prehrani, farmaciji, kot bioremediatorje in v predelavi lesa. Mnogo učinkovin je pokazalo protibakterijsko, protivirusno, protivnetno, protirakavo, antioksidativno in imunomodulatorno delovanje. Izkazalo se je, da imajo gobe in njihovih učinkovine izreden potencial pri zdravljenju različnih oblik raka, sladkorne bolezni, bolezni srca in ožilja, hepatitisa, astme, zaprtja in možganskih degenerativnih bolezni.

V diplomski nalogi smo preverili biološko aktivnost surovih in kuhanih ekstraktov 35 vrst saprofitskih in mikoriznih gob, nabranih v okolici Idrije in Vojskega ter na Šišenskem hribu v Ljubljani. Opravili smo teste za hemolitično in protibakterijsko aktivnost ter test inhibicije na delovanje encima acetilholinesteraze.

Rezultati naših testov so pokazali, da nekateri vodni ekstrakti lesnih in travniških gob vsebujejo učinkovine, ki bi potencialno lahko bile uporabne v farmaciji. Kot smo predvidevali, je bila aktivnost vodnih vzorcev manjša od aktivnosti ekstraktov v organskih topilih istih vrst. Ugotovili smo neopisane hemolitične in AChE-inhibitorne aktivnosti nekaterih vrst gob, kot na primer vodnega ekstrakta gobe *Russula drimea*, ki je imela največjo inhibicijsko aktivnost encima AChE. Zaradi vodotopnega in termorezistentnega značaja te učinkovine, bi bilo smotno nadaljevati raziskave in ugotoviti za katero učinkovino gre.

7 VIRI

- Abadulla E. Tzantov T., Costa S., Robra K.H., Cavaco-Paulo A., Gubitz, G.M. 2000. Decolorization and detoxification of textile dyes with a laccase from *Trametes hirsuta*. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 8: 3357-3362
- Abdullah N., Ismail S.M., Aminudin N., Shuib A.S., Lau B.F. 2012. Evaluation of Selected Culinary-Medicinal Mushrooms for Antioxidant and ACE Inhibitory Activities. *Evidence Based Complementary Alternative Medicine*, 2012, 2012: 464238, doi: 10.1155/2012/464238: 12 str.
- Agerer R., Schloter M., Hahn C. 2000. Fungal enzymatic activity in fruitbodies. *Nova Hedwigia*, 71, 3-4: 315-336
- Aida F.M.N.A., Shuhaimi M., Yazid M., Maaruf A.G. 2009. Mushroom as a potential source of prebiotics: a review. *Trends in Food and Science Technology*, 20: 567-575
- Aisen P. S., Schafer K., Grundman M., Thomas R., Thal, L. J. 2003. NSAIDs and hypertension. *Archives of Internal Medicine*, 163, 9: 1115–1116
- Alves M.J., Ferreira I.C., Dias J., Teixeira V., Martins A., Pintado M. 2012. A review on antimicrobial activity of mushroom (Basidiomycetes) extracts and isolated compounds. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 13, 21: 2648-2659
- Alzheimer's Association. 2016. Alzheimer's disease facts and figures Alzheimer's & Dementia, 2016. *Alzheimer and Dementia*, 12, 4: 459-509
- Anderluh G., Macek P. 2002. Cytolytic peptide and protein toxins from sea anemones (Anthozoa: *Actiniaria*). *Toxicon* 2002, 40: 111-124
- Anderson T.F., Rasmussen H.N. 1996. Rhizoctonia species: Taxonomy, Molecular Biology, Ecology, Pathology and Disease Control. Dordrecht, Kluwer Academic: 379-390
- Aoki M., Tan M., Fukushima A., Hieda T., Kubo S., Takabayashi M., Ono K., Mikami Y. 1993. Antiviral Substances with Systemic Effects Produced by Basidiomycetes such as *Fomes fomentarius*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 57, 2: 278-282

- Arteiro J.M.S., Martins M.R., Salvador C., Candeias F., Karmali A., Caldeira T. 2012. Protein-polysaccharides of *Trametes versicolor*: production and biological activities. *Medicinal Chemistry Research*, 21, 6: 937-943
- Arun G., Eyini M., Gunasekaran P. 2015. Characterization and biological activities of extracellular melanin produced by *Schizophyllum commune* (Fries). *Indian Journal of Experimental Biology*, 53, 6: 380-387
- Babikova Z., Gilbert L., Bruce T.J.A., Birkett M., Caulfield J.C., Woodcock C., John A., Pickett J.A., Johnson D. 2013. Underground signals carried through common mycelial networks warn neighbouring plants of aphid attack. *Ecology letters*, 16, 7: 835-843
- Badolato R., Oppenheim J. J. 1996. Role of cytokines, acute-phase proteins, and chemokines in the progression of rheumatoid arthritis. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, 26, 2: 526-538
- Bagnat M., Keranen S., Shevchenko A., Shevchenko A., Simons K. 2000. Lipid rafts function in biosynthetic delivery of proteins to the cell surface in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97, 7: 3254-3259
- Ballard C., Gauthier S., Corbett A., Brayne C., Aarsland D., Jones E. 2011. Alzheimer's disease. *Lancet*, 377, 9770: 1019-1031
- Barbosa F., José M.M., Karina C. P., Fátima F. M; Batista M, Athayde-Filho F., Silva S., Cunha V. L., Almeida, Jackson R. G. S., Quintans J. 2006. Natural products inhibitors of the enzyme acetylcholinesterase. *Revista brasileira de farmacognosia*, 16, 2: 258-285
- Barros L., Baptista P., Ferreira I.C.F.R. 2007. Effect of *Lactarius piperatus* fruiting body maturity stage on antioxidant activity measured by several biochemical assays. *Food and Chemical Toxicology*, 45, 9: 1731-1737
- Barros L., Correia D.M., Ferreira I.C.F.R., Baptista P., Santos-Buelga C. 2008. Optimization of the determination of tocopherols in *Agaricus* sp. Edible mushrooms by a normal phase liquid chromatographic method. *Food Chemistry*, 110, 4: 1046-1050
- Barto K.E., Weidenhamer J.D., Cipollini D., Rillig M.C. 2012. Fungal superhighways: do common mycorrhizal networks enhance below ground communication? *Trends in plant science*, 17, 11: 633-637

- Berne S., Krizaj I., Pohleven F., Turk T., Maček P., Sepčič K., 2002. Pleurotus and Agrocybe hemolysins, new proteins hypothetically involved in fungal fruiting. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1570, 3: 153–159
- Bhakdi S., Bayley H., Valeva A. 1996. Staphylococcal alpha-toxin, streptolysin-O, and *Escherichia coli* hemolysin: prototypes of pore-forming bacterial cytolysins. *Archives of Microbiology*, 165, 2: 73-79
- Bogenschutz M. P., Forcehimes A. A, Pomny J. A., Wilcox C. E., Barbosa P. C. R., Strassman R. J. 2015. Psilocybin-assisted treatment for alcohol dependence: A proof-of-concept study. *Journal of Psychopharmacology*, 29, 3: 289-299
- Bonatti M., Karnopp P., Soares H.M., Furlan S.A. 2004. Evaluation of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotu ssajor-caju* nutritional characteristics when cultivated in different lignocellulosic wastes. *Food Chemistry*, 88, 3: 425-428
- Brod S. A. 2000. Unregulated inflammation shortens human functional longevity. *Inflammation Research*, 49, 11: 561–570
- Callegan M.C., Jett B.D., Hancock L.E., Gilmore M.S. 1999. Role of hemolysin BL in the pathogenesis of extraintestinal *Bacillus cereus* infection assessed in an endophthalmitis model. *Infection and Immunity*, 67, 7: 3357-3366
- Camarero S., Garcia O., Vidal T., Colom J., Del Rio J.C., Guitierrez A., Gras J.M., Monje R., Martinez M.J., Martinez A.T. 2004. Efficient bleaching of non-wood high-quality paper pulp using laccase-mediator system. *Enzyme and Microbial Technology*, 35, 2-3: 113-120
- Cao C., Li Y., Liu H., Bai G., Mayl J., Lin X., Sutherland K., Nabar N., Cai J. 2014. The potential therapeutic effects of THC on Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 42, 3: 973-984
- Carhart-Harris R.L., Erritzoe D., Williams T., Stone J.M., Reed L.J., Colasanti A., Tyacke R.J., Leech R., Malizia A.L., Murphy K., Hobden P., Evans J., Feilding A., Wise R.G., Nutt D.J. 2012. Neural correlates of the psychedelic state as determined by fMRI studies with psilocybin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109, 6: 2138-2143

- Carhart-Harris R. L., Bolstridge M., Rucker J., Day C. M., Erritzoe D., Taylor K.D. 2016. Psilocybin with psychological support for treatment-resistant depression: an open-label feasibility study. *The Lancet Psychiatry*, 3, 7: 619–627
- Cateni F., Doljak B., Zacchigna M., Anderluh M., Piltaver A., Scialino G., Banfi E. 2007. New biologically active epidioxysterols from *Stereum hirsutum*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 17, 22: 6330-6334
- Cerniglia C.E., Sutherland J.B., Crow S.A. 1992. Fungal metabolism of aromatic hydrocarbons. V: *Microbial Degradation of Natural products*. Winkelmann G. (ed.) Weinheim, VCH press: 193-217
- Chakraborty S., Chakraborty N., Jain D., Salunke D.M., Datta A. 2002. Active site geometry of oxalate decarboxylase from *Flammulina velutipes*: Role of histidine-coordinated manganese in substrate recognition. *Protein Science*, 11, 9: 2138-2147
- Chandra R.P., Ragauskas A.J. 2002. Evaluating laccase-facilitated coupling of phenolic acids to high-yield kraft pulps. *Enzyme and Microbial Technology*, 30, 7: 855-861
- Chang Y.C., Hsiao Y.M., Wu M.F., Ou C.C., Lin Y.W., Lue K.H., Ko J.L. 2013. Interruption of lung cancer cell migration and proliferation by fungal immunomodulatory protein FIP-fve from *Flammulina velutipes*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 49: 12044-12052
- Chang S.T., Miles P.G. 2004. *Mushrooms: cultivation, nutritional value, medicinal effect, and environmental impact*. 2nd ed.; Boca Raton, CRC Press: 431 str.
- Chen L., Yi X., Deng F., Fang W., Zhang X., Wang X., Fang Z., Xiao Y. 2016. A novel ethanol-tolerant laccase, Tvlac, from *Trametes versicolor*. *Biotechnological letters*, 38, 3: 471-476
- Chopra K., Misra S., Kuhad A. 2011. Current perspectives on pharmacotherapy of Alzheimer's. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 12, 3: 335–350
- Chowdhury H.H., Rebolj K., Kreft M. 2008. Lysophospholipids prevent binding of a cytolytic protein ostreolysin to cholesterol-enriched membrane domains. *Toxicon*, 51, 8: 1345-1356

- Colak A., Sesli Ö., Sesli E. 2009. Nutritional composition of some wild edible mushrooms. *Turkish Journal of Biochemistry*, 34, 1: 25–31
- Colak A., Sahin E., Yildirim M., Sesli E. 2007. Polyphenol oxidase potentials of three wild mushroom species harvested from Liser High Plateau, Trabzon. *Food Chemistry*, 103, 4: 1426-1433
- Crisan E.V., Sands A. 1978. *The biology and cultivation of edible mushrooms*. London, Academic Press Inc.: 137-165
- Currais A., Quehenberger O., Armando A.M., Daugherty D., Maher P., Schubert D. 2016. Amyloid proteotoxicity initiates an inflammatory response blocked by cannabinoids. *npj Aging and Mechanisms of Disease*, 2, 6; 16012, doi:10.1038/npjamd.2016.12: 11 str.
- Cyranka M., Graz M., Kaczor J., Kandefér-Szerszeń M., Walczak K., Kapka-Skrzypczak L., Rzeski W. 2011. Investigation of antiproliferative effect of ether and ethanol extracts of birch polypore medicinal mushroom, *Piptoporus betulinus* (Bull.:Fr.) P. Karst. (higher Basidiomycetes) in vitro grown mycelium. *Intional Journal of Medicinal Mushrooms*, 13, 6: 525-533
- Daniewski W., Gumulka M., Przesmycka D., Ptaszynska K., Bloszyk E., Drozd B. 1995. Sesquiterpenes of lactarius origin, antifeedant structure-activity-relationships. *Phytochemistry*, 38, 5: 1161-1168
- Di Lorenzo C., Coppola G., Di Lorenzo G., Bracaglia M., Rossi P., Pierelli F. 2015. The use of illicit drugs as self-medication in the treatment of cluster headache: Results from an Italian online survey. *Cephalalgia*, 36, 2: 194-198
- Dogan H.H., Akbas G. 2013. Biological activity and fatty acid composition of Caesar's mushroom. *Pharmaceutical Biology*, 51, 7: 863–71
- Doljak B., Cateni F., Anderluh M., Procida G., Zilic J., Zacchigna M. 2006. Glycerolipids as selective thrombin inhibitors from the fungus *Stereum hirsutum*. *Drug development and industrial pharmacy*, 32, 5: 635-643
- Doskocil I., Havlik J., Verlotta R., Tauchen J., Vesela L., Macakova K., Opletal L., Kokoska L., Rada V. 2016. In vitro immunomodulatory activity, cytotoxicity and chemistry of some central European polypores. *Pharmaceutical Biology*, 17: 1-8

- Dresch P., D'Aguanno M.N., Rosam K., Grienke U., Rollinger J.M., Peintner U. 2015. Fungal strain matters: colony growth and bioactivity of the European medicinal polypores *Fomes fomentarius*, *Fomitopsis pinicola* and *Piptoporus betulinus*. *AMB Express*, 5, 1: 1-4
- Eubanks L.M., Rogers C.J., Beuscher A.E., Koob G.F., Olson A.J., Dickerson T.J., Janda K.D. 2006. A molecular link between the active component of marijuana and Alzheimer's disease pathology. *Molecular Pharmaceutics*, 3, 6: 773-777
- Ferreira I.C.F.R., Barros L., Abreu R.M.V. 2009. Antioxidants in wild mushrooms. *Current Medicinal Chemistry*, 16, 12: 1543-1560
- Fons F., Rapior S., Eyssartier G., Bessiere J.M. 2003. Volatil compounds in the *Cantharellus*, *Craterellus* and *Hydnum* genera. *Cryptogamie Mycologie*, 24, 4: 367-376
- Ford W.W. 1907. On the presence of hemolytic substances in edible fungi. *The Journal of Infectious Diseases*, 4: 434-439
- Ford W.W. 1911. The distribution of haemolysins, agglutinins, and poisons in fungi, especially the amanitas, the entolomas, the lactarius and the inocybes. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2: 285-318
- Fuchs F., Wannamacher L., Ferreira M. 2004. *Princípios Gerais do Uso de Antimicrobianos. Farmacologia Clínica. Fundamentos da terapêutica Racional*, 3rd edition. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan: 342 str.
- Gao H.L., Lei L.S., Yu C.L., Zhu Z.G., Chen N.N., Wu S.G. 2009. Immunomodulatory effects of *Fomes fomentarius* polysaccharides: an experimental study in mice. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*, 29, 3: 458-461
- Giardina P., Palmieri G., Scaloni A., Fontanella B., Faraco V., Cennamo G., Sannia G. 1999. Protein and gene structure of a blue laccase from *Pleurotus ostreatus*. *Biochemical Journal*, 341, 3: 655-663
- Ginsburg I. 2002. Role of lipoteichoic acid in infection and inflammation. *Lancet Infectious Diseases*, 2, 3: 171-179
- Gonzalez M.R., Bischofberger M., Pernot L., Van der Goot F.G., Freche B. 2008. Bacterial pore-forming toxins: the (w)hole story? *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65, 3: 493-507

- Grob C. S., Danforth A. L., Chopra G. S., Hagerty M., McKay C. R., Halberstadt A. L., Greer G. R. 2011. Pilot study of psilocybin treatment for anxiety in patients with advanced-stage cancer. *Archives of general psychiatry*, 68, 1: 71-78
- Gu Y., Luchsinger J. A., Stern Y., Scarmeas N. 2010. Mediterranean diet, inflammatory and metabolic biomarkers, and risk of Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 22, 2: 483-492
- Guan G.P., Wang H.X., Ng T.B. 2007. A novel ribonuclease with antiproliferative activity from fresh fruiting bodies of the edible mushroom *Hypsizigus marmoreus*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1770, 12: 1593-1597
- Guillamón E., García-Lafuente A., Lozano M. 2010. Edible mushrooms: role in the prevention of cardiovascular diseases. *Fitoterapia*, 81, 7: 715-723
- Gunawardena D., Bennett L., Shanmugam K., King K., Williams R., Zabarás D., Head R., Ooi L., Gyengesi E., Münch G. 2014. Anti-inflammatory effects of five commercially available mushroom species determined in lipopolysaccharide and interferon- γ activated murine macrophages. *Food Chemistry*, 148, 4: 92-96
- Han C.H., Zhang G.Q., Wang H.X., Ng T.B. 2010. Schizolysin, a hemolysin from the split gill mushroom *Schizophyllum commune*. *FEMS Microbiol Letters*, 309, 2: 115-21
- Han G., Feng X., Jia Y., Wang C., He X., Zhou Q., Tian X. 2011. Isolation and evaluation of terrestrial fungi with algicidal ability from Zijin Mountain, Nanjing, China. *Journal of Microbiology*, 49, 4: 562-567
- Han C.H., Zhang G.Q., Wang H.X., Ng T.B. 2010. Schizolysin, a hemolysin from the split gill mushroom *Schizophyllum commune*. *FEMS Microbiol Letters*, 309, 2: 115-121
- Hearst R., Nelson D., McCollum G., Millar B.C., Maeda Y., Goldsmith C.E., Rooney P.J., Heleno S.A., Barros L., Sousa M.J., Martins A., Ferreira I.C.F.R. 2010. Tocopherols composition of Portuguese wild mushrooms with antioxidant capacity. *Food Chemistry*, 119, 4: 1443-1450
- Hirasawa M., Shouji N., Neta T., Fukushima K., Takada K. 1999. Three kinds of antibacterial substances from *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. (Shiitake, an edible mushroom). *International Journal of Antimicrobial Agents*, 11, 2: 151-157

- Houghton P.J., Ren Y., Howes M.J. 2006. Acetylcholinesterase inhibitors from plants and fungi. *Natural Product Reports*, 23, 2: 181-199
- Hu Q., Yu J., Yang W., Kimatu B.M., Fang Y., Ma N., Pei F. 2016. Identification of flavonoids from *Flammulina velutipes* and its neuroprotective effect on pheochromocytoma-12 cells. *Food Chemistry*, 204, 8: 274-282
- Hunt R., Taveau R. 1906. *British Medical Journal*, 2: 1788–1791
- Inafuku M., Nagao K., Nomura S., Shirouchi B., Inoue N., Nagamori N., Nakayama H., Toda T., Yanagita T. 2012. Protective effects of fractional extracts from *Panellus serotinus* on non-alcoholic fatty liver disease in obese, diabetic db/db mice. *British Journal of Nutrition*, 107, 5: 639-46
- Inouye S., Abe S.h., Yamagushi H. 2004. Fungal terpenoid antibiotics and enzyme inhibitors. V: *Handbook of fungal Biotechnology*. Arora D. (ed.), 2nd ed., New York, Marcel Dekker: 379-400
- Ishikawa N.K., Kasuya M.C.M., Vanetti M.C.D. 2001. Antibacterial activity of *Lentinula edodes* grown in liquid medium. *Brazilian Journal of Microbiology*, 32, 3: 206-210
- Ishikawa N.K., Fukushi Y., Yamaji K., Tahara S., Takahashi K. 2001. Antimicrobial cuparene-type sesquiterpenes, enokipodins C and D, from a mycelial culture of *Flammulina velutipes*. *Journal of Natural Products*, 64, 7: 932-934
- Isikhuemhen O.S., Anoliefo G., Oghale O. 2003. Bioremediation of crude oil polluted soil by the white rot fungus, *Pleurotus tuber-regium*. *Environmental Science and Pollution Research*, 10, 2: 108-112
- Janssen M.I., Van Leeuwen M.B.M., Scholtmeijer K., Van Kooten T.G., Dijkhuizen L., Wösten H.A.B. 2002. Coating with genetic engineered hydrophobin promotes growth of fibroblasts on a hydrophobic solid. *Biomaterials*, 23, 24: 4847–4854
- Jia Y., Du J., Fang H., Zhao G., Tian X. 2013. Inhibition of freshwater algal species by co-culture with two fungi. *Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications*, 33, 4: 2451-2454

- Jin H., McCaffery J.M., Grote E. 2008, Ergosterol promotes pheromone signaling and plasma membrane fusion in mating yeast. *The Journal of Cell Biology*, 180, 4: 813-826
- Jung S.C., Martinez-Medina A., Lopez-Raez J.A., Pozo M.J. 2012. Mycorrhiza-induced resistance and priming of plant defenses. *Journal of Chemical Ecology*, 38, 6: 651-664
- Kalač P. 2013. A review of chemical composition and nutritional value of wild-growing and cultivated mushrooms. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93, 2: 209–218
- Kaneko J., Kamio Y. 2004. Bacterial two-component and hetero-heptameric pore-forming cytolytic toxins: structures, pore-forming mechanism, and organization of the genes. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 68, 5: 981-1003
- Karaman M., Stahl M., Vulić J., Vesić M., Canadanović-Brunet J. 2014. Wild-growing lignicolous mushroom species as sources of novel agents with antioxidative and antibacterial potentials. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 65, 3: 311-319
- Kashina S., Villavicencio F.L.L., Balleza M., Sabanero .GB., Tsutsumi V., López M.S. 2016. Extracts from *Flammulina velutipes* inhibit the adhesion of pathogenic fungi to epithelial cells. *Pharmacognosy Research*, 8, 1: 56-60
- Kashina S., Villavicencio L.L., Zaina S., Ordaz M.B., Sabanero G.B., Fujiyoshi V.T., Lopez M.S. 2016. Activity of extracts from submerged cultured mycelium of winter mushroom, *Flammulina velutipes* (Agaricomycetes), on the immune system in vitro. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 18, 1: 49-57
- Kasuga A., Aoyagi Y., Sugahara T. 1995. Antioxidant activity of fungus *Suillus-bovinus* (l, fr) Kuntze O. *Journal Of Food Science*, 60, 5: 1113-1115
- Kim S.H., Jakhar R., Kang S.C. 2015. Apoptotic properties of polysaccharide isolated from fruiting bodies of medicinal mushroom *Fomes fomentarius* in human lung carcinoma cell line. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 22, 4: 484-490
- Kim M.Y., Seguin P., Ahn J.K., Kim J.J., Chun S.C., Kim E.H., Seo S.H., Kang E.Y., Kim S.L., Park Y.J., Ro H.M., Chung I.M. 2008. Phenolic compound concentration and antioxidant activities of edible and medicinal mushrooms from Korea. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 16: 7265-7270

- Klausa A., Kozarskia M., Niksica M., Jakovljevič D., Todorovič N., Van Griensven L. J.L.D. 2011. Antioxidative activities and chemical characterization of polysaccharides extracted from the basidiomycete *Schizophyllum commune*. *LWT - Food Science and Technology*, 44, 10: 2005–2011
- Knežević A., Živković L., Stajić M., Vukojević J., Milovanović I., Spremo-Potparević B. 2015. Antigenotoxic Effect of *Trametes* spp. Extracts against DNA Damage on Human Peripheral White Blood Cells. *Scientific World Journal*, 2015, 146378: doi: 10.1155/2015/146378: 10 str.
- Koch A. 2003. Bacterial wall as target for attack: past, present, and future research. *Clinical Microbiology Reviews*, 16, 4: 673-687
- Koch J., Witt S., Liberra K., Lindequist U. 1998. The influence of extracts of *Tricholomopsis rutilans* (Schff.Ex fr.) Sing. on the binding of LPS to CD14(+)-cells and on the release of inflammatory mediators. *Phytotherapy Research*, 12, 1: 27-29
- Konno K. 1995. Biologically-active components of poisonous mushrooms. *Food Reviews International*, 11, 1: 83-107
- Kumar B.K., Raghunath P., Devegowda D. 2011. Development of monoclonal antibody based sandwich ELISA for the rapid detection of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in seafood. *International Journal of Food Microbiology*, 145, 1: 244-249
- Kunamneni A., Ghazi I., Camarero S., Ballesteros A., Plou F.J., Alcalde M. 2008. Decolorization of synthetic dyes by laccase immobilized on epoxy-activated carriers. *Process Biochemistry*, 43, 2: 169-178
- Kupčik R., Zelená M., Řehulka P., Bílková Z., Česlová L. 2016. Selective isolation of hydrophobin SC3 by solid-phase extraction with polytetrafluoroethylene microparticles and subsequent mass spectrometric analysis. *Journal of Separation Science*, 39, 4: 717-724
- Lam S.K., Ng T.B. 2001. First simultaneous isolation of a ribosome inactivating protein and an antifungal protein from a mushroom (*Lyophyllum shimeji*) together with evidence for synergism of their antifungal effects. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 393, 2: 271–280

- Lee D.H., Kim J.H., Park J.S., Choi Y.J., Lee J.S. 2004. Isolation and characterization of a novel angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide derived from the edible mushroom *Tricholoma giganteum*. *Peptides*, 25, 4: 621-627
- Lee S.M., Koo B.W., Choi J.W., Choi D.H., An B.S., Jeung E.B., Choi I.G. 2005. Degradation of bisphenol A by white rot fungi, *Stereum hirsutum* and *Heterobasidium insulare*, and reduction of its estrogenic activity. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 28, 2: 201-207
- Lemieszek M., Langner E., Kaczor J., Rzeski W. 2009. Anticancer effect of fraction isolated from medicinal birch polypore mushroom, *Piptoporus betulinus* (Bull.: Fr.) P. Karst. (*Aphyllphoromycetidae*): in vitro studies. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 11, 4: 351-364
- Lin J.Y., Wu H.L., Shi G.Y. 1975. Toxicity of the cardiotoxic protein flammutoxin, isolate from edible mushroom *Flammulina velutipes*. *Toxicon*, 13, 5: 323-331
- Lin L., Cui F., Zhang J., Gao X., Zhou M., Xu N., Zhao H., Liu M., Zhang C., Jia L. 2016. Antioxidative and renoprotective effects of residue polysaccharides from *Flammulina velutipes*. *Carbohydrate Polymers*, 146, 3: 388-395
- Lin J.Y., Lin Y.J., Chen C.C. 1974. Cardiotoxic protein from edible mushrooms. *Nature*, 252: 235-237
- Lin J.Y., Wu H.L., Shi G.Y. 1975. Toxicity of the cardiotoxic protein flammutoxin, isolate from edible mushroom *Flammulina velutipes*. *Toxicon*, 13: 323-331
- Lingham R.B., Hsu A., Silverman K.C., Bills G.F., Dombrowski A., Goldman M.E., Darke P.L., Huang L., Koch G., Ondeyka J.G., Goetz M.A. 1992. A novel cytochalasin as an inhibitor of hiv-1 protease .3. biological-activity. *Journal Of Antibiotics*, 45, 5: 686-691
- Linke D., Leonhardt R., Eisele N., Petersen L.M., Riemer S., Nimtze M., Berger R.G. 2015. Carotene-degrading activities from *Bjerkandera adusta* possess an application in detergent industries. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 38, 6: 1191-1199
- Liu X., Frydenvang K., Liu H., Zhai L., Chen M., Olsen C.E., Christensen S.B. 2015. Iminolactones from *Schizophyllum commune*. *Journal of Natural Products*, 78, 5: 1165-1168

- Liu Y., Zhang B., Ibrahim S.A., Gao S.S., Yang H., Huang W. 2016. Purification, characterization and antioxidant activity of polysaccharides from *Flammulina velutipes* residue. *Carbohydrate Polymers*, 145: 71-77
- Loske D., Huttermann A., Majerczk A., Zadrazil F., Lorsche H., Waldinger P. 1990. Use of white rot fungi for the clean-up of contaminated sites. V: *Advances in biological treatment of lignocellulosic materials*. Coughlan MP, Collaco (eds.), London, Elsevier: 311-321
- Loughrey A., Rao J.R., Moore J.E. 2009. An examination of antibacterial and antifungal properties of constituents of Shiitake (*Lentinula edodes*) and Oyster (*Pleurotus ostreatus*) mushrooms. *Complementary Therapies in Clinical Practice*, 15, 1: 5-7
- Lubken T., Arnold N., Wessjohann L., Bottcher C., Schmidt J. 2006. Analysis of fungal cyclopentenone derivatives from *Hygrophorus* spp. by liquid chromatography/electrospray-tandem mass spectrometry. *Journal Of Mass Spectrometry*, 41, 3: 361-371
- Lutsik-Kordovsky M.D., Stasyk T.V., Stoika R.S. 2001. Analysis of cytotoxicity of lectin and non-lectin proteins from *Amanita* mushrooms. *Experimental Oncology*, 23, 1: 43-45
- Lv H., Kong Y., Yao Q. 2009. Nebrodeolysin, a novel hemolytic protein from mushroom *Pleurotus nebrodensis* with apoptosis-inducing and anti-HIV-1 effects. *Phytomedicine*, 16, 2-3: 198-205
- Ma K., Bao L., Han J., Jin T., Yang X., Zhao F., Li S., Song F., Liu M., Liu H. 2014. New benzoate derivatives and hirsutane type sesquiterpenoids with antimicrobial activity and cytotoxicity from the solid-state fermented rice by the medicinal mushroom *Stereum hirsutum*. *Food Chemistry*, 143: 239-245
- Ma R., Yang R., Liu X., Chen Z., Yang C., Wang S. 2015. Chemical composition and immunomodulatory activity of mycelia of the hairy bracket mushroom, *Trametes hirsuta* (higher *Basidiomycetes*). *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 17, 3: 267-76
- Ma Y., Mao D., Geng L., Wang Z., Xu C. 2013. Production, fractionation, characterization of extracellular polysaccharide from a newly isolated *Trametes gibbosa* and its hypoglycemic activity. *Carbohydrate Polymers*, 96, 2: 460-465

- Ma Z., Cui F., Gao X., Zhang J., Zheng L., Jia L. 2015. Purification, characterization, antioxidant activity and anti-aging of exopolysaccharides by *Flammulina velutipes* SF-06. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 107, 1: 73-82
- Maciel M.J.M., Ademir Castro e Silva A.C., Ribeiro H.C.T. 2010. Industrial and biotechnological applications of ligninolytic enzymes of the basidiomycota: A review. *Electronic Journal of Biotechnology*, 13, 6, doi: 10.2225/vol13-issue6-fulltext-2: 13 str.
- Manzi P., Aguzzi A., Pizzoferrato L., 2001. Nutritional value of mushrooms widely consumed in Italy. *Food Chemistry*, 73, 3: 321–325
- Martin S.W., Konopka J.B. 2004. Lipid raft polarization contributes to hyphal growth in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell*, 3, 3: 675-684
- McMurray R.W., Hardy K. J. 2002. Cox-2 inhibitors: Today and tomorrow. *American Journal of the Medical Sciences*, 323, 4: 181–189
- Melnikova I. 2007. Therapies for Alzheimer's disease. *Nature Reviews Drug Discovery*, 6, 5: 341–342
- Michelot D., Melendez-Howell L.M. 2003. *Amanita muscaria*: chemistry, biology, toxicology, and ethnomycology. *Mycological Research*, 107, 2: 131-146
- Minato K. 2010. Mushrooms: immunomodulating activity and role in health promotion. V: *Dietary Components and Immune Function*. Watson, R.R. et al., (eds), New York, Springer Science+Business Medium: 529-539
- Mircea C., Bild V., Zavastin D., Cioancă O. 2013. The protective effect of mushrooms in experimentally induced diabetes in mice. *Farmacia*, 61, 2: 268-275
- Monro J.A. 2003. Treatment of cancer with mushroom products. *Archives Of Environmental Health*, 58, 8: 533-537
- Moreno F.A., Wiegand C.B., Taitano E.K., Delgado P.L. 2006. Safety, tolerability, and efficacy of psilocybin in 9 patients with obsessive-compulsive disorder. *Journal of Clinical Psychiatry*, 67, 11: 1735-1740
- Mu H., Zhang A., Zhang W., Cui G., Wang S., Duan J. 2012. Antioxidative properties of crude polysaccharides from *Inonotus obliquus*. *International Journal of Molecular Sciences*, 13, 7: 9194–9206

- Mueller L.A., Hinz U., Zryd J.P. 1997. The formation of betalamic acid and muscaflavin by recombinant dopa-dioxygenase from *Amanita*. *Phytochemistry*, 44, 4: 567-569
- Mygind P.H., Fischer R.L., Schnorr K.M., Hansen M.T., Sönksen C.P., Ludvigsen S., Raventós D., Buskov S., Christensen B., De Maria L., Taboureau O., Yaver D., Elvig-Jørgensen S.G., Sørensen M.V., Christensen B.E., Kjærulff S., Frimodt-Møller N., Lehrer R.I., Zasloff M., Kristensen H.H. 2005. Plectasin is a peptide antibiotic with therapeutic potential from a saprophytic fungus. *Nature*, 437, 7061: 975-980
- Nayak A.P., Green B.J., Beezhold D.H. 2012. Fungal hemolysins. *Oxford Journals Medicine & Health Medical Mycology*, 51, 1: 1-16
- Ngai P.H., Ng T.B. 2006. A hemolysin from the mushroom *Pleurotus eryngii*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 72, 6: 1185-1191
- Nizet V. 2002. Streptococcal beta-hemolysins: genetics and role in disease pathogenesis. *Trends in Microbiology*, 10, 12: 575-580
- Novotny C., Svobodova K., Erbanova P., Cajthaml T., Kasinath A., Lange E., Sasek V. 2004. Ligninolytic fungi in bioremediation: extracellular enzyme production and degradation rate. *Soil Biology and Biochemistry*, 36, 10: 1545-1551
- Nowacka N., Nowak R., Drozd M., Olech M., Los R., Malm A. 2015. Antibacterial, antiradical potential and phenolic compounds of thirty-one Polish mushrooms. *PLoS One*, 2015;10(10):e0140355. doi:10.1371/journal.pone.0140355: 9 str.
- Opal S., Cohen J. 1999. Clinical gram-positive sepsis: does it fundamentally differ from gram-negative bacterial sepsis? *Critical Care Medicine*, 27, 8: 1608-1616
- Ozen T., Darcan C., Aktop O., Turkekul I. 2011. Screening of antioxidant, antimicrobial activities and chemical contents of edible mushrooms wildly grown in the black sea region of Turkey. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, 14, 2: 72-84
- Park K.M., Kwon K.M., Lee S.H. 2015. Evaluation of the antioxidant activities and tyrosinase inhibitory property from mycelium culture extracts. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, eCAM*, 2015;2015:616298. doi:10.1155/2015/616298. 2015, 616298: 7 str.

- Park Y.M., Kim I.T., Park H.J., Choi J.W., Park K.Y., Lee J.D., Nam B.H., Kim D.G., Lee J.Y., Lee K.T. 2004. Anti-inflammatory and anti-nociceptive effects of the methanol extract of *Fomes fomentarius*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 27, 10: 1588-1593
- Pereira E., Barros L., Martins A., Ferreira I.C.F.R. 2012. Towards chemical and nutritional inventory of Portuguese wild edible mushrooms in different habitats. *Food Chemistry*, 130, 2: 394-403
- Peres-Bota D., Rodriguez H., Dimopoulos G., DaRos A., Mélot C., Struelens M.J., Vincent J.L. 2003. Are infections due to resistant pathogens associated with a worse outcome in critically ill patients? *Journal of Infection*, 47, 4: 307-316
- Perry E.K., Tomlinson E., Blessed G. 1978. Correlation of cholinergic abnormalities with senile plaques and mental test scores in senile dementia. *British Medical Journal*, 2, 6150: 1457-1459
- Perry V. H. 2004. The influence of systemic inflammation on inflammation in the brain: Implications for chronic neurodegenerative disease. *Brain, Behavior, and Immunity*, 18, 5: 407-413
- Pipkin M.E., Lieberman J. 2007. Delivering the kiss of death: progress on understanding how perforin works. *Current Opinion in Immunology*, 19, 3: 301-308
- Pittet D. 2005. Infection control and quality health care in the new millennium. *American Journal of Infection Control*, 33, 5: 258-267
- Puttaraju N.G., Venkateshaiah S.U., Dharmesh S.M., Urs S.M.N., Somasundaram R. 2006. Antioxidant activity of indigenous edible mushrooms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 26: 9764-9772
- Qi Q.Y., Ren J.W., Sun L.W., He L.W., Bao L., Yue W., Sun Q.M., Yao Y.J., Yin W.B., Liu H.W. 2015. Structurally diverse sesquiterpenes produced by a Chinese Tibet fungus *Stereum hirsutum* and their cytotoxic and immunosuppressant activities. *Organic Letters*, 17, 12: 3098-3101
- Rahman M.A., Abdullah N., Aminudin N. 2016. Antioxidative effects and inhibition of human low density lipoprotein oxidation in vitro of polyphenolic compounds in *Flammulina velutipes* (Golden Needle Mushroom). *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, 22, (21): 4999-5011

- Rai M., Tidke G., Wasser S.P. 2005. Therapeutic potential of mushrooms. *Natural product radiance*, 4, 4: 246-257
- Raj H.G., Saxena M., Allameh A., Mukerji K.G. 1992. Metabolism of foreign compounds by fungi. V: *Handbook of Applied Mycology*, 4 edition. Arora KK, Elander RP in Kukerji KG (eds.), New York, Fungal Biotechnology Marcel Dekker, Inc: 881-904
- Reis F.S., Barros L., Martins A., Ferreira I.C. 2012. Chemical composition and nutritional value of the most widely appreciated cultivated mushrooms: an inter-species comparative study. *Food and chemical toxicology*, 50, 2: 191-197
- Resnik N., Sepcic K., Plemenitas A, Windoffer R., Leube R., Veranic P. 2011. Desmosome assembly and cell-cell adhesion are membrane raft-dependent processes. *The Journal of Biological Chemistry*, 286, 2: 1499-1507
- Roberson M.R., Harrell L.E. 1997. Cholinergic activity and amyloid precursor protein metabolism. *Brain Research Reviews*, 25, 1: 50–69
- Rodakiewicz-Nowak J., Jarosz-Wilkolazka A., Luterek J. 2006. Catalytic activity of versatile peroxidase from *Bjerkandera fumosa* in aqueous solutions of water-miscible organic solvents. *Applied Catalysis A-General*, 308: 56-61
- Rodriguez S., Toca J.L. 2006. Industrial and biotechnological applications of laccases: a review. *Biotechnology Advances*, 24, 5: 500-513
- Rosa L.H., Cota B.B., Machado K.M.G., Rosa C.A., Zani C.L. 2005. Antifungal and other biological activities from *Oudemansiella Canarii* (Basidiomycota). *World Journal Of Microbiology & Biotechnology*, 21, 6-7: 983-987
- Rösecke J., König W.A. 2000. Constituents of the fungi *Daedalea quercina* and *Daedaleopsis confragosa* var. *tricolor*. *Phytochemistry*, 54, 8: 757-762
- Rossard S., Roblin G., Atanassova R. 2010. Ergosterol triggers characteristic elicitation steps in *Beta vulgaris* leaf tissues. *Journal of Experimental Botany*, 61, 6: 1807-1816
- Rozman L. 2008. Biološko aktivne snovi v organskih ekstraktih nekaterih lesnih in travniških gob. *Diplomska naloga*, Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, oddelek za biologijo, 53 str.

- Ruthes A.C., Carbonero E.R., Córdova M.M., Baggio C.H., Sasaki GL, Gorin PA, Santos AR, Iacomini M. 2013. Fucomannogalactan and glucan from mushroom *Amanita muscaria*: structure and inflammatory pain inhibition. *Carbohydrate Polymers*, 98, 1: 761-769
- Schalchlia H., Hormazabala E., Becerrab J., Birkettc M., Alveard M., Vidald J., Quiroza A. 2011. Antifungal activity of volatile metabolites emitted by mycelial cultures of saprophytic fungi. *Chemistry and Ecology*, 27, 6: 503-513
- Scholtmeijer K., Janssen M.I., Van Leeuwen M.B., Van Kooten T.G., Hektor H., Wösten H.A.B. 2004. The use of hydrophobins to functionalize surfaces. *Bio-Medical Materials and Engineering*, 14, 4 : 447–454
- Seniuk O.F., Gorovoj L.F., Beketova G.V., Savichuk H.O., Rytik P.G., Kucherov I.I., Prilutskay A.B., Prilutsky A.I. 2011. Anti-infective properties of the melanin-glucan complex obtained from medicinal tinder bracket mushroom, *Fomes fomentarius* (L.: Fr.) Fr. (*Aphyllphoromycetidae*). *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 13, 1: 7-18
- Sepcic K., Berne S., Rebolj K., Batista U., Plemenitas A., Sentjurc M., Macek P. 2004. Ostreolysin, a pore-forming protein from the oyster mushroom, interacts specifically with membrane cholesterol-rich lipid domains. *FEBS Letters*, 575, 1-3: 81-85
- Serrano-Pozo A., Frosch M.P., Masliah E., Hyman B.T. 2011. Neuropathological Alterations in Alzheimer Disease. *Cold Spring Harbour Perspectives in Medicine*, 1, 1: 1-23
- Sher D., Fishman Y., Zhang M. 2005. Hydralysins, a new category of beta-pore-forming toxins in cnidaria. *The Journal of Biological Chemistry*, 280, 24: 22847-22855
- Signoretto C., Marchi A., Bertoncilli A., Burlacchini G., Tessarolo F., Caola I., Pezzati E., Zaura E., Papetti A., Lingström P., Pratten J., Spratt D.A., Wilson M., Canepari P. 2011. Effects of mushroom and chicory extracts on the physiology and shape of *Prevotella intermedia*, a periodontopathogenic bacterium. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2011, doi: 10.1155/2011/635348: 8 str.
- Silman I., Sussman J.L. 2005. Acetylcholinesterase: 'classical' and 'non-classical' functions and pharmacology. *Current Opinon Pharmacology*, 5, 3: 293–302

- Smiderle F.R., Carbonero E.R., Sasaki G.L., Gorin P.A.J., Iacomini M. 2008. Characterization of a heterogalactan: Some nutritional values of the edible mushroom *Flammulina velutipes*. *Food Chemistry*, 108, 1: 329-333
- Solak M.H., Kalmis E., Sağlam H., Kalyoncu F. 2006. Antimicrobial activity of two wild mushrooms *Clitocybe alexandri* (Gill.) Konr. and *Rhizopogon roseolus* (Cords) T.M. Fries collected from Turkey. *Phytotherapy Research*, 20, 12: 1085-1087
- Sousa M.V., Richardson M., Fontes W., Morhy L. 1994. Homology between the seed cytolysin enterolobin and bacterial aerolysins. *The Protein Journal*, 13, 8: 659-667
- Stadler M., Hellwig V., Mayer-Bartschmid A., Denzer D., Wiese B., Burkhardt N. 2005. Novel analgesic triglycerides from cultures of *Agaricus macrosporus* and other basidiomycetes as selective inhibitors of neurolysin. *Journal Of Antibiotics*, 58, 12: 775-786
- Tadjibaeva G., Sabirov R., Tomita T. 2000. Flammutoxin, a cytolysin from the edible mushroom *Flammulina velutipes*, forms two different types of voltage-gated channels in lipid bilayer membranes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1467, 2: 431-443
- Takahashi A., Endo T., Nozoe S. 1992. Repandiol, a new cytotoxic diepoxide from the mushrooms *Hydnum-repandum* and *H-repandum varalbum*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 40, 12: 3181-3184
- Tanaka H., Itakura S., Enoki A. 1999. Hydroxyl radical generation by an extracellular low- molecular-weight substance and phenol oxidase activities during wood degradation by the white-rot basidiomycetes *Trametes versicolor*. *Journal of Biotechnology*, 75, 1: 57-70
- Taofiq O., Martins A., Barreiros M.F., Ferreira I. 2016. Anti-inflammatory potential of mushroom extracts and isolated metabolites. *Trends in Food Science & Technology*, 50: 193-210
- Tenover F. 2006. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *American Journal of Infection Control*, 34, 5: 3-10
- Teoh Y.P., Don M.M. 2013. In vitro antifungal activities and phytochemical analysis of filamentous white-rot fungi, *Schizophyllum commune*. *Sains Malaysiana*, 42, 9: 1267-1272

- Teplyakova T.V., Psurtseva N.V., Kosogova T.A., Mazurkova N.A., Khanin V.A., Vlasenko V.A. 2012. Antiviral activity of polyporoid mushrooms (higher Basidiomycetes) from Altai Mountains (Russia). *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 14, 1: 37-45
- Tong S., Zhong H., Yi C., Cao X., Firempong C.K., Zheng Q., Feng Y., Yu J., Xu X. 2014. Simultaneous HPLC determination of ergosterol and 22,23-dihydroergosterol in *Flammulina velutipes* sterol-loaded microemulsion. *Biomedical Chromatography*, 28, 2: 247-254
- Uzun Y., Genccelep H., Kaya A., Akacay M.E. 2011. The mineral contents of some wild edible mushrooms. *Ekoloji*, 20, 80: 6-12
- Vaz J.A., Heleno S.A., Martins A., Almeida G.M., Vasconcelos M.H., Ferreira I.C.F.R. 2010. Wild mushrooms *Clitocybe alexandri* and *Lepista inversa*: In vitro antioxidant activity and growth inhibition of human tumour cell lines. *Food and Chemical Toxicology*, 48, 10: 2881-2884
- Venturini M.E., Rivera C.S., Gonzalez C., Blanco D. 2008. Antimicrobial activity of extracts of edible wild and cultivated mushrooms against foodborne bacterial strains. *Journal of Food Protection*, 71, 8: 1701-1706
- Vidari G., Vitafinzi P., Zanocchi A., Noy G. 1995. A bioactive tetraprenylphenol from *Lactarius lignyotus*. *Journal Of Natural Products-Lloydia*, 58, 6: 893-896
- Vikineswary S., Abdullah N., Renuvathami M., Sekaran M., Pandey A., Jones G.E.B. 2006. Productivity of laccase in solid substrate fermentation of selected agro-residues by *Pycnoporus sanguineus*. *Bioresource Technology*, 97, 1: 171-177
- Vitecek J., Kasparovsky T., Mikesova M., Mikes V. 2005. Nonspecific elicitation of defense reaction in suspension tobacco cells by elicitors from *Armillaria*. *Folia Microbiologica*, 50, 2: 128-132
- Vunduk J., Klaus A., Kozarski M., Petrovic P., Zizak Z., Niksic M., Van Griensven L.J. 2015. Did the Iceman Know Better? Screening of the Medicinal Properties of the Birch Polypore Medicinal Mushroom, *Piptoporus betulinus* (Higher Basidiomycetes). *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 17, 12: 1113-1125

- Wallace A.J., Stillman T.J., Atkins A., Jamieson S.J., Bullough P.A., Green J., Artymiuk P.J. 2000. *E. coli* hemolysin E (HlyE, ClyA, SheA): X-ray crystal structure of the toxin and observation of membrane pores by electron microscopy. *Cell*, 100, 2: 265-276
- Wang H., Ng T.B.. 2001. Pleureryn, a novel protease from fresh fruiting bodies of the edible mushroom *Pleurotus eryngii*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 289, 3: 750–755
- Wang H.X., Ng T.B., Liu Q.H. 2004. Alveolarin, a novel antifungal polypeptide from the wild mushroom *Polyporus alveolaris*. *Peptides*, 25, 4: 693–696
- Wang H.X., Ng T.B., Liu W.K., Ooi V.E., Chang S.T. 1995. Isolation and characterization of two distinct lectins with antiproliferative activity from the cultured mycelium of the edible mushroom *Tricholoma mongolicum*. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 46, 6: 508–513
- Wang S.R., Zhang L., Chen H.P., Li Z.H., Dong Z.J., Wei K., Liu J.K. 2015. Four new spiroaxane sesquiterpenes and one new rosenonolactone derivative from cultures of Basidiomycete *Trametes versicolor*. *Fitoterapia*, 105, 9: 127-131
- Wang Y.Q., Bao L., Yang X.L., Dai H.Q., Guo H., Yao X.S., Zhang L.X., Liu H.W.. 2012. Four New Cuparene-Type Sesquiterpenes from *Flammulina velutipes*. *Helvetica Chimica Acta*, 95, 2: 261–267
- Wang Y.X., Vazquez-Duhalt R., Pickard M.A. 2003. Manganese-lignin peroxidase hybrid from *Bjerkandera adusta* oxidizes polycyclic aromatic hydrocarbons more actively in the absence of manganese. *Canadian Journal Of Microbiology*, 49, 11: 675-682
- Wangun H.V., Berg A., Hertel W., Nkengfack A.E., Hertweck C. 2004. Anti-inflammatory and anti-hyaluronate lyase activities of lanostanoids from *Piptoporus betulinus*. *Journal of Antibiotics*, 57, 11: 755-758
- Wasser S.P., Weis A.L. 1999. Medicinal properties of substances occurring in higher *Basidiomycetes* mushrooms: current perspectives (review). *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 1, 1: 31-62
- Wosten Han A.B. 2001. Hydrophobins: multipurpose proteins. *Annual Review of Microbiology*, 55: 625–646

- Xu L., Wang Q., Wang G., Wu J.Y. 2015. Contents and antioxidant activities of polysaccharides in 14 wild mushroom species from the forest of northeastern China. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 17, 12: 1161-1170
- Yagi .F, Miyamoto M., Abe T., Minami Y., Tadera K., Goldstein I.J. 1997. Purification and carbohydrate-binding specificity of *Agrocybe cylindracea* lectin. *Glycoconjugate Journal*, 14, 2: 281–288
- Yamac M., Bilgili F. 2006. Antimicrobial activities of fruit bodies and/or mycelial cultures of some mushroom isolates. *Pharmaceutical Biology*, 44, 9: 660-667
- Yaropolov A.I., Skrobogat'ko O.V., Vartanov S.S., Varfolomeyev S.D. 1994. Laccase properties, catalytic mechanism, and applicability. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 49, 3: 257–280
- Yi C., Sun C., Tong S., Cao X., Feng Y., Firempong C.K., Jiang X., Xu X., Yu J. 2013. Cytotoxic effect of novel *Flammulina velutipes* sterols and its oral bioavailability via mixed micellar nanoformulation. *International Journal of Pharmaceutics*, 448, 1: 44-50
- Yin H., Wang Y., Wang Y., Chen T., Tang H., Wang M. 2010. Purification, characterization and immuno-modulating properties of polysaccharides isolated from *Flammulina velutipes* mycelium. *The American Journal of Chinese Medicine*, 38, 1: 191-204
- Zapata-Castillo P., Villalonga-Santana L., Islas-Flores I., Rivera-Muñoz G., Ancona-Escalante W., Solís-Pereira S. 2015. Synergistic action of laccases from *Trametes hirsuta* Bm2 improves decolourization of indigo carmine. *Letters in Applied Microbiology*, 61, 3: 252-258
- Zhang X. 2004. *Current Drug Targets: CNS Neurological Disorders*, 2004, 3, 137–152

DRUGI VIRI

WHO. 2000. World Health Organization report on infectious diseases 2000 – Overcoming antimicrobial resistance. <http://www.who.int/infectious-disease-report> (12. mar. 2016)

WHO. 2010. World Health Organization report – Antimicrobial resistance (AMR). http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2010/amr_20100820/en/index.html (26. feb. 2016)

ZAHVALA

Najlepše bi se zahvalil mentorici prof. dr. Kristina Sepčič za pomoč, strokovno svetovanje, potrpežljivost in spodbudo pri nastajanju diplomske naloge.

Zahvaljujem se recenzentu, prof. dr. Francu Pohleven, za hiter in temeljit pregled diplomske naloge in predsedniku komisije za zagovor, doc. dr. Mateju Butala.

Zahvaljujem se tudi mojim staršem in prijateljem za vso podporo in potrpljenje.

Hvala vsem, ki so kakorkoli pripomogli pri nastanku te diplomske naloge.

PRILOGE

Priloga A: Pregled objav

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

IME GOBE	UČINKOVINA	VRSTA MOLEKULE	VODNA/ ORGANSKA FAZA	ORGANSKO TOPILO	AKTIVNOST	REFERENCA
<i>Hydnum repandum</i>			organska in vodna	kloroform, diklorometan, etilacetat, aceton, etanol	protimikrobna aktivnost	Yamac in sod., 2006
<i>Hydnum repandum</i>	(2R,3R,8R,9R)-4,6-dekadiin-2,3:8,9-diepoksi-1,10-diol	diepoksid	organska	metanol	citotoksična aktivnost na tumorske celice	Takahashi in sod., 1992
<i>Hydnum repandum</i>	1-okten-3-ol in (E)-2-oketenol	C8 derivat	organska	etileter	snov s sadnim okusom	Fons in sod., 2003
<i>Hydnum repandum</i>	celoten ekstrakt		organska	metanol	protibakterijsko in antioksidativno delovanje	Ozen in sod., 2011
<i>Bjerkandera adusta</i>	raznolika peroksidaza	encim	vodna		katalitična aktivnost oksidacije Mn in razgradnja lignina	Rodakiewicz-Nowak in sod., 2006
<i>Bjerkandera adusta</i>	lakaze, lipaze	encimi	vodna		razkroj kuminskih kislin	Belcarz A, in sod., 2005
<i>Bjerkandera adusta</i>	manganova lignin peroksidaza	encim	organska	diklorometan, etilacetat	oksidacija policikličnih	Wang in sod., 2003

					aromatskih ogljikovodikov (ksenobiotikov)	
<i>Bjerkandera adusta</i>	štiri zunajcelične peroksidaze	encimi	vodna		katalitična aktivnost proti beta-karotena	Linke in sod., 2015
<i>Leccinum scabrum</i>						Ni objav
<i>Trametes hirsuta</i>			organska in vodna	kloroform, diklorometan, etilacetat, aceton, etanol	protimikrobna aktivnost	Yamac in sod., 2006
<i>Trametes hirsuta</i>					aktivnost proti algam	Han in sod., 2011
<i>Trametes hirsuta</i>		celoten ekstrakt	organska	etanol	aktivnost proti poškodbam DNK	Knežević in sod., 2015
<i>Trametes hirsuta</i>		celoten ekstrakt			spodbujanje imunskih funkcij	Ma in sod., 2015
<i>Trametes hirsuta</i>	lakazni izoencimi (1,2,3)	encimi	vodna		biremediacija	Zapata- Castillo in sod., 2015
<i>Trametes versicolor</i>			organska in vodna	kloroform, diklorometan, etilacetat, aceton, etanol	protimikrobna aktivnost	Yamac in sod., 2006

<i>Trametes versicolor</i>	β -bisabolol	alkoholni seskviterpen	vodna	acetonnitril:voda	aktivnost proti glivam	Schalchli in sod., 2011
<i>Trametes versicolor</i>	TVC	protein	vodna		imunomodulativna aktivnost	Feng in sod., 2011
<i>Trametes versicolor</i>					aktivnost proti algam	Han in sod., 2011
<i>Trametes versicolor</i>	E-PPS, I-PPS	proteinski polisaharidi	organska	etanol	antioskidativna aktivnost	Arteiro in sod., 2012
<i>Trametes versicolor</i>		celoten ekstrakt	vodni		protivirusna aktivnost	Teplyakova in sod., 2012
<i>Trametes vesicolor</i>		celoten ekstrakt	organska	etanol	aktivnost proti poškodbam DNK	Knežević in sod., 2015
<i>Trametes vesicolor</i>	Tvlac (lakaza, rezistentna na etanol)	encim	organska	etanol	rezistentnost na etanol	Chen in sod., 2016
<i>Trametes vesicolor</i>	tramspiroin (A-D), 15,16-acetonid	terpene, rosenolakton	<u>organska</u>	<u>etilacetat</u>	citotoksičnost proti rakavim celicam	Wang in sod., 2015
<i>Suillus bovinus</i>	3,3',4,4'-tetrahidroksi puluvinična kislina in dibovikvinon-4,4.	organska kislina	organska	etanol	antioksidativna aktivnost	Kasuga in sod., 1995
<i>Armillaria ostoyae</i>	ergosterolni in hitinski oligomeri	polisaharidi	vodna	fosfatni puffer	kelatorji	Vitecek in sod., 2005

<i>Armillaria ostoyae</i>		polisaharidi	vodna		antioksidativno delovanje, inhibitorji tirozinaze	Xu in sod., 2015
<i>Armillaria mellea</i>			organska in vodna	kloroform, diklorometan, etilacetat, aceton, etanol	protimikrobna aktivnost	Yamac in sod., 2006
<i>Lactarius torminosus</i> na <i>L. lignoyotus</i>	2-geranilgerani-1,4-dihidroksibenzen	fenol	organska	diklorometan	inhibitorna aktivnost na DNA, RNA in sintezo proteinov pri HeLa in HL-60 celicah, protimikrobna aktivnost	Vidari in sod., 1995
<i>Lactarius</i>	13-C norketon, furaneter, 4,8-diketo-furanol	seskviterpeni	organsak	etanol	zaščita pred obžiranjem	Daniewski in sod., 1995.
<i>Lactarius</i>	hitinaze, eksoglukanaze	encimi	vodna		peroksidazna aktivnost	Agerer in sod., 2000
<i>Neobulgaria pura</i>						Ni objav
<i>Hygrocybe coccinea</i>						Ni objav

<i>Pseudohydnum gelatinosum</i>						Ni objav
<i>Hygrocybe formicata</i>						Ni objav
<i>Clytocybe geotropa</i>	celoten ekstrakt		organska in vodna	kloroform, diklorometan, etilacetat, aceton, etanol	protimikrobna aktivnost	Yamac in sod., 2006
<i>Clytocybe geotropa C. alexandri</i>	celoten ekstrakt		organska vodna	etanol, methanol, dietileter, n-heksan, etilacetat	protimikrobna aktivnost	Solak in sod., 2006
<i>Clytocybe geotropa</i>	celoten ekstrakt		organska in vodna	methanol, heksan, etilacetat	protimikrobna aktivnost	Venturini in sod., 2008
<i>Hygrophorus lucorum, delal so na agnathomus, nemoreus, poetarum pustulatus inkorhoneni</i>	higroforoni	ciklopentenoni in derivati	organska	petroleter	nedefinirana biološka aktivnost	Lubken in sod., 2006
<i>Piptoporus betulinus</i>			organska	metanol	protirakavo delovanje	Lemieszek in sod., 2009

<i>Piptoporus betulinus</i>	celoten ekstrakt		organska	etanol, eter	protirakavo delovanje	Cyranka in sod., 2011
<i>Piptoporus betulinus</i>	celoten ekstrakt		organska	etanol	protibakterijsko in kativnost proti glivam	Dresch in sod., 2015
<i>H. fasciculare</i>	polifenoIna oksidaza	encim	vodna		aktivna na 4-metilkatehol	Colak in sod., 2007
<i>Hyplophoma marginatum</i> in <i>H. subviride</i>	agarikoglicerid A	ester klorirane 4-hidroksi benzojske kisline in glicero la	organska	acetona	inhibira nevrolizin	Stadler in sod., 2005
<i>Gymnopilus penetrans</i> in <i>G. spectabilis</i>					nevrotoksičnost, halucinogeni učinki	Konno, 1995
<i>Flammulina velutipes</i>	flamutoksin	protein	vodna		hemolitično delovanje, kardiotoksično delovanje	Lin in sod., 1974
<i>Flammulina velutipes</i>	enokipodin C in D	seskviterpeni	vodna		protibakterijsko delovanje, protiglivično delovanje	Ishikawa in sod., 2001
<i>Flammulina velutipes</i>	manofukogalaktan	heterogalaktan	vodna	deionizirana voda		Smiderle in sod., 2008

<i>Flammulina velutipes</i>					deluje proti rakavim celicam, spodbuja imunski sistem	Monro, 2003
<i>Flammulina velutipes</i>	oksalatna dekarboksilaza	encim	vodna		katalizira pretvorbo oksalata v mravljično kislino in CO ₂	Chakraborty in sod., 2002
<i>Flammulina velutipes</i>	FVP2A, FVP2B, FVP2C	polisaharidi	vodna		imunomodulatorno delovanje	Yin in sod., 2010
<i>Flammulina velutipes</i>	sterpurol A, sterpurlo B, 2,5-kuparadien 1,4-dion, enokipodin B, enokipodin D, strpurična kislina	seskviterpeni	organska	etilacetat	aktivnost proti glivam, citotoksičnost za rakave celice, antioksidativna aktivnost	Wang in sod., 2012
<i>Flammulina velutipes</i>	celoten ekstrakt		vodna		protivnetno delovanje, inhibicija TNF α	Gunawarden in sod., 2013
<i>Flammulina velutipes</i>	ergosterol, 22,23-dihidresterol, ergost-8(14)-en-3beta-ol	steroli	organska	etanol	proti rakavo delovanje	Yi in sod., 2013
<i>Flammulina velutipes</i>	FIP-fve	protein	vodna		proti rakavo delovanje	Chang in sod., 2013

<i>Flammulina velutipes</i>	FvP-3, FvP-2	polisaharidi	vodna		proti rakavo in antioksidativno delovanje	Zhao in sod., 2013
<i>Flammulina velutipes</i>		glikoproteini	vodna		spodbujanje imunskega sistema	Kashina in sod., 2016
<i>Flammulina velutipes</i>	ekstrakt		vodna		inhibicija adhezije patogenih bakterij na gostiteljeve celice	Kashina in sod., 2016
<i>Flammulina velutipes</i>	En-RPS	polisaharid	<u>organska</u>	<u>etanol</u>	antioksidativno delovanje	Lin in sod., 2016
<i>Flammulina velutipes</i>	FVRP-1, FVRP-2 in FVRP-3	polisaharidi	<u>organsk</u>	<u>eter</u>	antioksidativno delovanje	Liu in sod., 2016
<i>Flammulina velutipes</i>	arbutin, epikatehin, filirin, apigenin, kaemferol in formononetin	flavonoidi	<u>organska</u>	<u>etanol</u>	antioksidativno in nevroprotektivno delovanje	Hu in sod., 2016
<i>Flammulina velutipes</i>	protokathoična, p-kumarinska in elagična kislina	polifenoli	vodan, organska	diklorometan, metanol, etilniacetat,	antioksidativno delovanje	Rahman in sod., 2016
<i>Flammulina velutipes</i>	heteropolisaharidi,	polisaharidi			antioksidativno delovanje,	Ma in sod., 2015

					delovanje proti staranju	
<i>Amanita muscaria</i>	DOPA-dioksidgenaza	encim	vodna		katalizator biosinteze betalina in muskaflavina	Mueller in sod., 1997
<i>Amanita muscaria</i>	ibotenska kislina in muscimol	alkaloid /ekscitatorna aminokislina	vodna		delujeta kot nevrottransmitterja v sesalčjih mozganih in imata psihotropičen efekt. Iboteinska k. vpliva na senzitivnost GABA receptorjev ter povzroča učne in spominske defekte ob daljši izpostavitvi. Muscimol pri mlajših sesalcih zmoti razvoj hipotalamično-	Michelot in sod., 2003

					noradrenalinskega sistema	
<i>Amanita muscaria</i>	R-4-hidroksiprolidon	organska kislina	vodna		aktivnost proti bakterijam in drugim gobam	Michelot in sod., 2003
<i>Amanita muscaria</i>	celoten ekstrakt		vodna		Pri intra peritonealnem injeciranju ekstrakta podganam povzroča inhibicijo acetilholinesteraze in porast glukoze v krvi.	Michelot in sod., 2003
<i>Amanita muscaria</i>	Ibotenska kislina	alkaloid/eksцитatorna aminokislina	vodna		agonist glutamata, insekticid, halucinogeni učinki	Konno, 1995
<i>Amanita</i>			organska in vodna	kloroform, diklorometan, etilacetat, aceton, etanol	protimikrobna aktivnost	Yamac in sod., 2006

<i>Amanita muscaria</i>	heterogalktan, beta-d-glukan	fumaroglaktan, glukan	vodna		protibolečinsko in protivnetno delovanje	Ruthes in sod., 2013
<i>Oudemansiella mucida</i> <i>O. canarii</i>	oudemansin A	akrilat	organska	etilacetat	inhibira rast UACC-62 celic (človeški melanom) in encim tripanotioin reduktazo. Fungicidno in citostatično delovanje.	Rosa in sod., 2005
<i>Panellus serotinus</i>			organska	alkohol	zaščita pri nealkoholnem zamaščenju jeter	Inafuku in sod., 2012
<i>Panellus serotinus</i>			organska	etanol	inhibicija encima tirozinaze	Park in sod., 2015
<i>Hypoxylon fragiforme</i>	C ₃₀ H ₃₉ NO ₄	citohalazin			inhibicija HIV-1 proteaze	Lingham in sod., 1992
<i>Russula drimea</i>						Ni objav
<i>Schizophyllum commune</i>	Shizolizin	protein	vodna		hemolitično delovanje, inhibicija HIV-1	Han in sod., 2010

					reverzne transkriptaze	
<i>Schizophyllum commune</i>	etanol, β -bisabolol, β -bisabolen	alcohol, terpenoidi	organski	etanol	aktivnost proti glivam	Schalchli in sod., 2011
<i>Schizophyllum commune</i>	celoten ekstrakt		vodni		antioksidativno delovanje, inhibicija AChE	Abdullah in so., 2012
<i>Schizophyllum commune</i>		flavonoidi, fenoli, saponini	vodni in organski	metanol	aktivnost proti glivam	Teoh in sod., 2013
<i>Schizophyllum commune</i>	a-glukan b-glukan	polisaharidi, polifenoli	vodni in organski	etanol	antioksidativno delovanje	Klaus in sod., 2011
<i>Schizophyllum commune</i>	melanin	pigment	vodni		antioksidativno delovanje, protirakavo delovanje, aktivnost proti glivam, aktivnost proti bakterijam,	Arun in sod., 2015
<i>Schizophyllum commune</i>	shizin A in shizin B	alkaloidi			protirakavo delovanje	Liu in sod., 2015
<i>Schizophyllum commune</i>	hidrofobin SC3	proteini				Kupčik in sod., 2016
<i>Tricholomopsis rutilans</i>	celotni ekstrakt		organska	etanol	inhibira vezavo lipopolisaharida	Koch in sod., 1998

					(LPS) na endotoksinski receptor CD14 in vpliva na sproščanje mediatorjev	
<i>Tricholoma pseudonictitans</i> <i>T. giganteum</i>	Gly-Glu-Pro	tripeptid	vodna in organska	etanol in metanol	totalna inhibicija encima, ki razgrajuje angiotenzin (ACE)	Lee in sod., 2004
<i>Trichaptum abietinum</i>					inhibicija rasti sladkovodnih alg	Jia in sod., 2013
<i>Trametes gibbosa</i>	celoten ekstrakt		vodna		protivirusna aktivnost	Teplyakova in sod., 2012
<i>Trametes gibbosa</i>		polisaharidi	vodna		hipoglikemični efekt (zamnajšanje glukoze, holesterola in triaglicerola v krvi)	Ma in sod., 2013
<i>Trametes gibbosa</i>	celoten ekstrakt		organska	etanol	aktivnost proti poškodbam DNK	Knežević in sod., 2015
<i>Trametes gibbosa</i>	celoten ekstrakt		organska	etanol	imunomodulatorna aktivnost	Doskocil in sod., 2016

<i>Polyporus brumalis</i>						Ni objav
<i>Lasiochlaena benzoina</i>						Ni objav
<i>Cystoderma carcharias</i>						Ni objav
<i>Daedaleopsis confragosa</i>	3-alfa- karboksiaacetoksik vercinska kislina, 3-alfa- karboksiaacetoksi- 24-metilen-23- oksolanost-8-en-2 6-oična kislina in 5alfa,8alfa- epidioksiergosta- 6,22-dien-3beta-ol	terpeni	organska	n-heksan, diklorometan, metanol		Rosecke in sod., 2000
<i>Daedaleopsis confragosa</i>	celoten ekstrakt		vodni		protivirusna aktivnost	Teplyakova in sod., 2012
<i>Stereum hirsutum</i>	epidioksisteroli 1, 4	sterol	organska	metanol	aktivnost proti bakteriji Mycobacterium tuberculosis	Cateni in sod., 2007
<i>Stereum hirsutum</i>	mešanica diacilglicero fosfoli- pidov (DAGP) in	fosfolipidi, glicero li	organska	metanol	inhibicija trombina	Doljak in sod., 2006

	diacilglicerolov (DG)					
<i>Stereum hirsutum</i>	lignolitični encimi(lakaza in mangan peroksidaza)	encimi	vodna		razgradnja bisfenola A (BPA)	Lee in sod., 2005
<i>Stereum hirsutum</i>	2 benzoata, 3 seskviterpeni	terpeni	organska	etilacetat	Aktivnost proti bakterijam, protivnetno delovanje, protirakavo delovanje	Ma in sod., 2013
<i>Stereum hirsutum</i>	sterhirsutini C (1), D (2), E--L (3-10)	terpeni	organska	etilacetat	citiotoksično in imunosupresivno delovanje	Qi in sod., 2015
<i>Fomes fomentarius</i>	melanin-glukan, hitin-melanin-glukan		vodna		delovanje proti okužbam	Seniuk in sod., 2011
<i>Fomes fomentarius</i>					zmanjšanje glukoze in celokupnega holesterola v plazmi	Mircea in sod., 2013
<i>Fomes fomentarius</i>	celoten ekstrakt		organska	etanol, metanol	protibakterijsko in antioksidativno delovanje	Karaman in sod., 2013

<i>Fomes fomentarius</i>	celoten ekstrakt		organska	etanol	protibakterijsko in aktivnost proti glivam	Dresch in sod., 2015
<i>Fomes fomentarius</i>	fenolne kisline	fenoli	organska	etanol	protibakterijsko in antioksidativno delovanje	Nowacka in sod., 2015
<i>Fomes fomentarius</i>	MFKF-AP1 β	polisaharid	vodna		protirakavo delovanje	Kim in sod., 2015
<i>Pseudocraterellus undulatus</i> var. <i>crispus</i>						Ni objav

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Gregor ZORN

**BIOLOŠKO AKTIVNE SNOVI V VODNIH
EKSTRAKTIH IZBRANIH LESNIH IN TRAVNIŠKIH
GOB**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

Ljubljana, 2016