

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Jernej SMOLE

**SUBMERZNA KULTIVACIJA GLIVE *Trametes*  
*versicolor* V MEŠALNEM BIOREAKTORJU**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Jernej SMOLE

**SUBMERZNA KULTIVACIJA GLIVE *Trametes versicolor*  
V MEŠALNEM BIOREAKTORJU**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**SUBMERGED CULTIVATION OF MUSHROOM *Trametes versicolor*  
IN STIRRED-TANK BIOREACTOR**

GRADUATION THESIS  
University studies

Ljubljana, 2015

Diplomsko delo je zaključek Univerzitetnega študija biotehnologije. Opravljeno je bilo na Katedri za kemijsko, biokemijsko in ekološko inženirstvo Fakultete za kemijo in kemijsko tehnologijo Univerze v Ljubljani in v Laboratoriju za prehrabeno kemijo Kemijskega inštituta.

Po sklepu Študijske komisije dodiplomskega študija biotehnologije z dne 13.5.2014 je bil za mentorja diplomskega dela imenovan prof. dr. Marin Berovič.

Komisija za oceno in zagovor:

- Predsednik:      prof. dr. Branka Javornik  
                         Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo
- Član:              prof. dr. Marin Berovič  
                         Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo
- Član:              prof. dr. Franc Pohleven  
                         Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za lesarstvo

Datum zagovora:

Podpisni izjavljam, da je naloga rezultat lastnega 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.

Jernej Smole

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

|    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
|----|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ŠD | Dn                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| DK | UDK 602.42-7:604.2:547.458:606:61 (043.2)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| KG | biokemijsko inženirstvo / medicinske glive / <i>Trametes versicolor</i> / zunajcelični polisaharidi / znotrajcelični polisaharidi / biološko aktivni metaboliti / submerzna kultivacija / šaržni bioproces / mešalni bioreaktor / tenkoplastna kromatografija / masna spektrometrija / jedrska magnetna resonanca                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| AV | SMOLE, Jernej                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| SA | BEROVIČ, Marin (mentor)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| KZ | SI-1000, Ljubljana, Jamnikarjeva 101                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| ZA | Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| LI | 2015                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| IN | SUBMERZNA KULTIVACIJA GLIVE <i>Trametes versicolor</i> V MEŠALNEM BIOREAKTORJU                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| TD | Diplomsko delo (univerzitetni študij)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| OP | XII, 68, [4] str., 6 pregl., 30 sl., 3 pril., 71 vir.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| IJ | sl                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| JI | sl/en                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| AI | Raziskave smo osredotočili na preučevanje vzpostavitve lastnega tehnološkega postopka submerzne kultivacije višje glive <i>Trametes versicolor</i> Tv6, produkcije polisaharidov in ostalih produktov (terpenoidov, sterolov itn.). Da bi optimizirali vegetativno fazo procesa, smo glivo submerzno gojili kot stresano kulturo v štirih različnih tekočih gojiščih. Najprimernejše gojišče za pripravo vcepka je bilo gojišče s krompirjevo dekstrozo, sladnim ekstraktom in peptonom (PMP), saj je bil izplen biomase 3,87 g/L. Šaržni proces v bioreaktorju smo izvedli v gojišču, osnovanem na glukozi, peptonu in kvasnem ekstraktu (GPY) in v gojišču, osnovanem na glukozi, sladnem ekstraktu, peptonu in kvasnem ekstraktu (YM). V gojišču GPY smo pridobili več biomase micelija (18,5 g/L) in zunajceličnih polisaharidov (3,8 g/L) kot v gojišču YM, nismo pa zaznali produkcijo znotrajceličnih polisaharidov. Pri obeh procesih je bila razmeroma hitra poraba glukoze, dobra rast biomase micelija in biosinteza polisaharidov. Ekstrakte biomase micelija smo pripravili s petimi različnimi topili. Tenkoplastno kromatografska (TLC) analiza kloroform-metanolnega (2:1 (v/v)) ekstrakta biomase micelija z mobilno fazo n-heksan : etil acetat 8:2 (v/v) daje dobro ločbo metabolitov. Pri ekstraktu biomase micelija iz GPY se je razvila lisa v območju betulinske kisline, medtem ko so se pri ekstraktu biomase micelija iz YM razvile tri lise. S tenkoplastno kromatografsko in masno spektrometrijsko (TLC-MS) analizo YM ekstrakta smo ugotovili, da je v razvitih lisah veliko spojin z molskimi masami v razponu od 400 do 920 g/mol, ki jih gliva producira v majhnih količinah. Eno od teh spojin smo analizirali z jedrsko magnetno resonanco (NMR) in po spektroskopskih podatkih ugotovili, da gre za hipotetično nonakozadienoično kislino z molekulsko formulo C <sub>29</sub> H <sub>54</sub> O <sub>2</sub> . |

## KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn  
 DD UDC 602.42-7:604.2:547.458:606:61 (043.2)  
 CX biochemical engineering / medicinal mushrooms / *Trametes versicolor* / extracellular polysaccharides / intracellular polysaccharides / biologically active metabolites / submerged cultivation / batch bioprocess / stirred-tank bioreactor / thin-layer chromatography / mass spectrometry / nuclear magnetic resonance  
 AU SMOLE, Jernej  
 AA BEROVIČ, Marin (supervisor)  
 PP SI-1000, Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
 PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study in Biotechnology  
 PY 2015  
 TI SUBMERGED CULTIVATION OF MUSHROOM *Trametes versicolor* IN STIRRED-TANK BIOREACTOR  
 DT Graduation thesis (university studies)  
 NO XII, 68, [4] p., 6 tab., 30 fig., 3 ann., 71 ref.  
 LA sl  
 AL sl/en  
 AB We focused our research onto design of our technological process for submerged cultivation of higher fungi *Trametes versicolor* Tv6, production of polysaccharides and other products (terpenoids, sterols etc.). To optimize the vegetative phase, we cultivated fungi as submerged shake flask cultures in four different liquid media. Potato dextrose broth (PMP) was the most proper medium for inoculum preparation that yielded 3,87 g/L of biomass. Batch processes in bioreactors were performed on medium, based on glucose, peptone and yeast extract (GPY), and on medium, based on glucose, malt extract, peptone and yeast extract (YM). In GPY we got more mycelium biomass (18,5 g/L) and extracellular polysaccharides (3,8 g/L) than in YM, but we didn't detect any of intracellular polysaccharides. During submerged cultivation of mycelium there was fast glucose consumption, high growth of biomass and polysaccharides production in both processes. Mycelium biomass extracts were prepared with five different solvents. Thin-layer chromatographic (TLC) analysis of chloroform-methanol (2:1 (v/v)) mycelium biomass extracts with mobile phase n-hexane : ethyl acetate 8:2 (v/v) gives good separation of produced metabolites. On TLC with mycelium biomass extract from GPY medium developed one band in line with betulinic acid. On TLC with mycelium biomass extract from YM medium developed three bands. With thin-layer chromatographic and mass spectrometric (TLC-MS) analysis of YM extract we found that there is many compounds in those bands with molar masses in range from 400 to 920 g/mol, that fungi produced them in few milligrams. We analyzed one of this compounds with nuclear magnetic resonance (NMR) and found that it is a hypothetical nonacosadienoic acid with molecular formula C<sub>29</sub>H<sub>54</sub>O<sub>2</sub>.

## KAZALO VSEBINE

|                                          | str.      |
|------------------------------------------|-----------|
| Ključna dokumentacijska informacija      | III       |
| Key words documentation                  | IV        |
| Kazalo vsebine                           | V         |
| Kazalo preglednic                        | VIII      |
| Kazalo slik                              | IX        |
| Okrajšave in simboli                     | XI        |
| Slovarček                                | XII       |
| <b>1 UVOD</b>                            | <b>1</b>  |
| 1.1 OPREDELITEV PROBLEMA                 | 1         |
| 1.2 CILJ RAZISKOVANJA                    | 2         |
| 1.3 DELOVNE HIPOTEZE                     | 2         |
| <b>2 PREGLED OBJAV</b>                   | <b>3</b>  |
| 2.1 GLIVE                                | 3         |
| <b>2.1.1 Klasifikacija gliv</b>          | <b>3</b>  |
| <b>2.1.2 Nitaste glive</b>               | <b>4</b>  |
| <b>2.1.3 Medicinsko pomembne glive</b>   | <b>5</b>  |
| 2.2 BIOLOŠKO AKTIVNI METABOLITI          | 7         |
| <b>2.2.1 Polisaharidi</b>                | <b>8</b>  |
| <b>2.2.2 Terpenoidi</b>                  | <b>11</b> |
| 2.3 GLIVA <i>Trametes versicolor</i>     | 13        |
| <b>2.3.1 Taksonomska uvrstitev</b>       | <b>13</b> |
| <b>2.3.2 Opis</b>                        | <b>13</b> |
| <b>2.3.3 Sestava</b>                     | <b>14</b> |
| <b>2.3.4 Biološko aktivni metaboliti</b> | <b>14</b> |
| 2.3.4.1 Polisaharid-K (PSK)              | 15        |
| 2.3.4.2 Polisaharid-P (PSP)              | 16        |
| 2.3.4.3 Ekstracelularni polisaharidi     | 16        |
| 2.3.4.4 Terpenoidi                       | 17        |
| <b>2.3.5 Zdravilni učinki</b>            | <b>17</b> |
| 2.3.5.1 Učinki na imunski sistem         | 17        |
| 2.3.5.2 Protitumorske lastnosti          | 18        |
| 2.3.5.3 Protimikrobne lastnosti          | 18        |

|              |                                                                      |    |
|--------------|----------------------------------------------------------------------|----|
| 2.3.5.4      | Protivirusne lastnosti                                               | 18 |
| 2.3.5.5      | Antioksidativne lastnosti                                            | 18 |
| 2.4          | BIOSINTEZA V MEŠALNEM BIOREAKTORJU                                   | 19 |
| <b>2.4.1</b> | <b>Mešalni bioreaktor</b>                                            | 19 |
| <b>2.4.2</b> | <b>Morfologija nitastih gliv pri gojenju v mešalnem bioreaktorju</b> | 22 |
| <b>2.4.3</b> | <b>Submerzna kultivacija višjih gliv</b>                             | 24 |
| 2.4.3.1      | Temperatura                                                          | 25 |
| 2.4.3.2      | Mešanje in prezračevanje                                             | 25 |
| 2.4.3.3      | pH                                                                   | 26 |
| 2.4.3.4      | Substrat                                                             | 26 |
| 2.4.3.5      | Pregled submerznih kulturacij <i>Trametes versicolor</i>             | 27 |
| <b>3</b>     | <b>MATERIAL IN METODE</b>                                            | 31 |
| 3.1          | APARATURE                                                            | 31 |
| 3.2          | KEMIKAJIJE                                                           | 31 |
| <b>3.2.1</b> | <b>Sestavine gojišč</b>                                              | 31 |
| <b>3.2.2</b> | <b>Reagenti za analitske metode</b>                                  | 32 |
| 3.3          | ORGANIZEM                                                            | 32 |
| 3.4          | VZDRŽEVANJE KULTURE                                                  | 32 |
| 3.5          | IZBOR GOJIŠČA ZA PRIPRAVO VCEPKA                                     | 33 |
| 3.6          | SUBMERZNA KULTIVACIJA V BIOREAKTORJU                                 | 33 |
| <b>3.6.1</b> | <b>Priprava vcepka</b>                                               | 33 |
| <b>3.6.2</b> | <b>Priprava bioreaktorja</b>                                         | 34 |
| <b>3.6.3</b> | <b>Kontrola bioprocesa</b>                                           | 34 |
| 3.7          | ANALIZNE METODE                                                      | 35 |
| <b>3.7.1</b> | <b>Določevanje biomase</b>                                           | 35 |
| <b>3.7.2</b> | <b>Določevanje zunajceličnih polisaharidov</b>                       | 35 |
| <b>3.7.3</b> | <b>Določevanje znotrajceličnih polisaharidov</b>                     | 35 |
| <b>3.7.4</b> | <b>Določevanje koncentracije sladkorjev</b>                          | 35 |
| <b>3.7.5</b> | <b>Tenkoplastna kromatografija (TLC)</b>                             | 36 |
| 3.7.5.1      | Priprava vzorcev                                                     | 36 |
| 3.7.5.2      | Nanašanje vzorcev                                                    | 36 |
| 3.7.5.3      | Razvijanje                                                           | 36 |
| <b>3.7.6</b> | <b>TLC-MS analiza</b>                                                | 37 |
| 3.7.6.1      | Priprava vzorcev                                                     | 37 |
| 3.7.6.2      | Nanašanje vzorcev                                                    | 37 |

|              |                                                                                          |    |
|--------------|------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.7.6.3      | Razvijanje                                                                               | 37 |
| 3.7.6.4      | Določevanje mase z masnim spektrometrom                                                  | 37 |
| <b>3.7.7</b> | <b>Dodatne analize</b>                                                                   | 38 |
| 3.7.7.1      | Priprava vzorca                                                                          | 38 |
| 3.7.7.2      | Preparativna TLC                                                                         | 39 |
| 3.7.7.3      | Jedrska magnetna resonanca (NMR)                                                         | 40 |
| <b>4</b>     | <b>REZULTATI</b>                                                                         | 41 |
| 4.1          | IZBOR GOJIŠČA ZA PRIPRAVO VCEPKA                                                         | 41 |
| 4.2          | SUBMERZNA KULTIVACIJA V BIOREAKTORJU                                                     | 41 |
| <b>4.2.1</b> | <b>Submerzna kultura v gojišču GPY</b>                                                   | 41 |
| <b>4.2.2</b> | <b>Submerzna kultura v gojišču YM</b>                                                    | 43 |
| 4.3          | ANALIZE OSTALIH PRODUKTOV                                                                | 44 |
| <b>4.3.1</b> | <b>TLC brozge iz submerzne kulture v GPY gojišču</b>                                     | 44 |
| <b>4.3.2</b> | <b>TLC brozge iz submerzne kulture v YM gojišču</b>                                      | 46 |
| <b>4.3.3</b> | <b>Dodatne analize</b>                                                                   | 48 |
| 4.3.3.1      | NMR analiza                                                                              | 50 |
| <b>5</b>     | <b>RAZPRAVA IN SKLEPI</b>                                                                | 54 |
| 5.1          | RAZPRAVA                                                                                 | 54 |
| <b>5.1.1</b> | <b>Izbor gojišča za pripravo vcepka</b>                                                  | 54 |
| <b>5.1.2</b> | <b>Primerjava rasti glivine biomase in produkcije polisaharidov v gojiščih GPY in YM</b> | 54 |
| <b>5.1.3</b> | <b>Določevanje ostalih produktov</b>                                                     | 56 |
| 5.2          | SKLEPI                                                                                   | 58 |
| <b>6</b>     | <b>POVZETEK</b>                                                                          | 60 |
| <b>7</b>     | <b>VIRI</b>                                                                              | 62 |
|              | <b>ZAHVALA</b>                                                                           |    |
|              | <b>PRILOGE</b>                                                                           |    |

## KAZALO PREGLEDNIC

|                                                                                                                                                        | str. |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| Preglednica 1: Pregled nekaterih medicinsko pomembnih vrst gliv (Hobbs, 1995: 251).                                                                    | 5    |
| Preglednica 2: Biološko aktivni metaboliti medicinsko pomembnih gliv (Tang in Zhong, 2004: 27).                                                        | 8    |
| Preglednica 3: Biološko aktivni metaboliti glive <i>Trametes versicolor</i> (Stošić-Grujičić in sod., 2011: 268).                                      | 14   |
| Preglednica 4: Prednosti in slabosti kompleksnih in kemijsko definiranih gojišč.                                                                       | 27   |
| Preglednica 5: Izbrana gojišča za produkcijo biomase vcepka (Kim in sod., 2002; Tavares in sod., 2005; Elisashvili in sod., 2009; Wang in sod., 2012). | 33   |
| Preglednica 6: Povprečna suha teža biomase, zunajceličnih polisaharidov in povp. končna koncentracija vira ogljika pri gojenju na različnih gojiščih.  | 41   |

## KAZALO SLIK

|                                                                                                                                                                                                                      | str. |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| Slika 1: Klasifikacija pravih gliv (cit. po Bogen, 2015).                                                                                                                                                            | 4    |
| Slika 2: Celična stena višjih gliv (Chan in sod., 2009: 3).                                                                                                                                                          | 9    |
| Slika 3: Molekularna zgradba proteoglikana (Kidd, 2000:6).                                                                                                                                                           | 10   |
| Slika 4: Delovanje $\beta$ -glukanov na imunske celice (Chan in sod., 2009: 4).                                                                                                                                      | 11   |
| Slika 5: Izoprenska enota (Dewick, 2002: 168).                                                                                                                                                                       | 11   |
| Slika 6: Poenostavljena biosintezna pot terpenoidov (Terpenoid, 2015).                                                                                                                                               | 12   |
| Slika 7: Gliva <i>Trametes versicolor</i> – pisana ploskocevka (Pohleven, 2015b).                                                                                                                                    | 13   |
| Slika 8: Različni pripravki iz gobe <i>T. versicolor</i> .                                                                                                                                                           | 15   |
| Slika 9: Mešalni bioreaktor (Doran, 2004: 336).                                                                                                                                                                      | 20   |
| Slika 10: Tokovna profila v reaktorju s pregradami, ki ju povzročata propeler (levo) in diskasta (Rushtonova) turbina (desno) (Mixing ..., 2015).                                                                    | 20   |
| Slika 11: Shematski prikaz modela rasti peletov pri submerzni kultivaciji (Cui in sod., 1998: 218).                                                                                                                  | 23   |
| Slika 12: Peleti <i>T. versicolor</i> pri submerzni kult. na stresalniku (Arteiro in sod., 2012: 941).                                                                                                               | 30   |
| Slika 13: Stresana kultura <i>T. versicolor</i> po sedmih dneh kultivacije.                                                                                                                                          | 34   |
| Slika 14: Ločevanje vodnega sloja od organskega.                                                                                                                                                                     | 39   |
| Slika 15: Micelij <i>T. versicolor</i> pri submerzni kultivaciji na gojišču GPY (levo 40 $\times$ , desno 100 $\times$ povečava).                                                                                    | 42   |
| Slika 16: Micelij <i>T. versicolor</i> pri submerzni kultivaciji na gojišču GPY (400 $\times$ povečava).                                                                                                             | 42   |
| Slika 17: Rast biomase, poraba glukoze, produkcija EPS in realni pH med submerzno kultivacijo micelija <i>T. versicolor</i> v gojišču GPY.                                                                           | 43   |
| Slika 18: Gibanje <i>on-line</i> parametrov med submerzno kultivacijo micelija <i>T. versicolor</i> v gojišču YM.                                                                                                    | 44   |
| Slika 19: Rast biomase, realni pH, produkcija EPS, IPS in poraba glukoze med submerzno kultivacijo micelija <i>T. versicolor</i> v gojišču YM.                                                                       | 44   |
| Slika 20: Razviti ekstrakti biomase micelija <i>T. versicolor</i> hranjene v hladilniku (BH), filtrata lizata celic (FL), biomase hranjene v zmrzovalniku (BZ) in večje zatehte biomase hranjene v hladilniku (VBH). | 45   |
| Slika 21: Razviti ekstrakti biomase micelija <i>T. versicolor</i> pri uporabi različnih topil.                                                                                                                       | 46   |

|           |                                                                                                                                                             |    |
|-----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Slika 22: | Razviti ekstrakti biomase micelija <i>T. versicolor</i> v etanolu (1), metanolu (2), diklorometanu (3), kloroformu (4), mešanici kloroform:metanol 2:1 (5). | 47 |
| Slika 23: | TLC ekstrakta biomase micelija <i>T. versicolor</i> z mešanico kloroform : metanol 2:1 (v/v).                                                               | 48 |
| Slika 24: | Razvite TLC vzorcev lis. Od leve proti desni: vzorec celokupnega ekstrakta, vzorec lise I, vzorec lise II in vzorec lise III.                               | 49 |
| Slika 25: | TLC-MS spekter lise II. Vidni so vrhovi m/z 445, 453, 469, 889 in 921.                                                                                      | 49 |
| Slika 26: | <sup>1</sup> H-NMR spekter.                                                                                                                                 | 51 |
| Slika 27: | <sup>13</sup> C-NMR spekter.                                                                                                                                | 52 |
| Slika 28: | <sup>13</sup> CAPT-NMR spekter.                                                                                                                             | 52 |
| Slika 29: | Možni mol. fragmenti izpeljani iz <sup>1</sup> H-NMR in <sup>13</sup> C-NMR spektroskopije.                                                                 | 53 |
| Slika 30: | Predlagani strukturi neznane spojine z molekulsko formulo C <sub>29</sub> H <sub>54</sub> O <sub>2</sub> .                                                  | 53 |

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

|                      |                                                                           |
|----------------------|---------------------------------------------------------------------------|
| BAM                  | biološko aktivni metaboliti                                               |
| <i>T. versicolor</i> | <i>Trametes versicolor</i>                                                |
| PSP                  | polisaharopeptid                                                          |
| PSK                  | polisaharid-K oz. Krestin                                                 |
| EPS                  | zunajcelični (ekstracelularni) polisaharidi                               |
| IPS                  | znotrajcelični (intracelularni) polisaharidi                              |
| PDA                  | krompirjev dekstrozni agar                                                |
| TLC                  | tenkoplastna kromatografija                                               |
| MS                   | masna spektrometrija                                                      |
| NMR                  | jedrska magnetna resonanca                                                |
| YM                   | gojišče, osnovano na glukozi, sladnem ekstraktu, peptonu in kvasnem ekst. |
| GPY                  | gojišče, osnovano na glukozi, peptonu in kvasnem ekstraktu.               |
| PMP                  | gojišče, osnovano na krompirjevi dekstrozi, sladnem ekstraktu in peptonu. |
| MY                   | gojišče, osnovano na manitolu in kvasnem ekstraktu.                       |
| GY                   | gojišče, osnovano na glukozi in kvasnem ekstraktu.                        |
| TaK                  | Tien in Kirkovo gojišče                                                   |

## SLOVARČEK

|                    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
|--------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| adaptogen          | Spojina, substanca ali zelišče, ki uravnovesi fiziološke procese in vzdržuje homeostazo. Koncept adaptogenov ni znanstveno podprt.                                                                                                                                                                                        |
| adjuvans           | Imunološki agens, ki se uporablja pri stimuliranju imunskega odgovora. Večinoma se dodajajo vakcinom, da imunski sistem proizvede več protiteles. Sami po sebi niso aktivni v imunskem sistemu.                                                                                                                           |
| headspace          | Volumen nad tekočino v bioreaktorju. Ponavadi obsega od 25 do 35 % celotnega volumna bioreaktorja.                                                                                                                                                                                                                        |
| IHD                | Indeks manjka vodika oz. stopnja nenasičenosti, nam na podlagi molekulske formule, pomaga določiti število dvojnih oz. trojnih vezi in obročev v spojini.                                                                                                                                                                 |
| kemijski premik    | Pri NMR spektroskopiji resonančno frekvenco jedra $x$ podamo kot razliko med resonančnima frekvencama tega jedra in standarda. Če to razliko delimo z resonančno frekvenco standarda dobimo relativno skalo, ki jo imenujemo kemijski premik ( $\delta$ ). Podajamo ga v delih na milijon (ppm).                          |
| multiplet          | Skupina črt v NMR spektru, ki so blizu druga drugi, kar je posledica podobnih energijskih nivojev atomov, ki se samo malo razlikujejo v energiji. Take razcepljene spektralne vrhove pri NMR spektru imenujemo multipli, natančneje pa jih imenujemo po številu črt, ki jih sestavljajo (singlet, dublet, triplet, itn.). |
| Qi tonik           | V kitajski medicini Qi toniki oskrbijo telo z energijo, ki jo potrebuje za krepitev imunskega sistema.                                                                                                                                                                                                                    |
| TLC-MS             | Analiza, ki vključuje tenkoplastno kromatografijo za izolacijo spojin v vzorcu in masno spektrometrijo za določanje molske mase izoliranih spojin.                                                                                                                                                                        |
| sklopitvena konst. | Razdalja med spektralnima črtama, $J$ , ki jo merimo v Hz. Sklapljanje je posledica jedrskih spinov, zato je sklopitvena konstanta neodvisna od jakosti zunanega polja.                                                                                                                                                   |

## 1 UVOD

Medicinske glive že od prazgodovine človeku služijo za zdravljenje in lajšanje različnih obolenj. V zadnjih petdesetih letih se je iz medicinskih gliv izoliralo in identificiralo številne biološko aktivne metabolite (BAM) z mnogimi fiziološkimi učinki, kot so protitumorni, imunomodulatorni, srčno-žilni, protibakterijski, protivirusni, protiparazitski in protidiabetični učinki. Znanje o medicinsko pomembnih glivah izvira iz Daljnega vzhoda, kjer se tradicionalno uporablja ekstrakte iz vroče vode, ki vsebujejo večinoma polisaharide, za zdravljenje in lajšanje številnih obolenj. Zdravilne učinke iz medicinsko zanimivih gob imajo predvsem  $\beta$ -glukani, kot so krestin iz *Trametes versicolor* (*T. versicolor*), lentinan iz *Lentinus edodes* in šizofilan iz *Schizophyllum commune*. Poznani so še drugi BAM, kot so terpenoidi, steroli in ceramidi.

Glivini BAM se lahko potencialno proizvajajo v industriji s submerzno kultivacijo. Le-ta ima kar nekaj prednosti pred gojenjem na trdnem gojišču. Takšen način gojenja se da bolje nadzorovati, lažja je separacija produkta in boljša ponovljivost procesa, saj je mešanje učinkovitejše (Hölker in Lenz, 2005). Skrajša se čas produkcije in povečevanje procesa v večje merilo je bolj enostavno. Vendar se submerzna kultura višjih gliv, kljub več desetletnim prizadevanjem, še vedno sooča s številnimi biološkimi, fiziološkimi in inženirskimi ovirami.

Pri submerzni kultivaciji višjih gliv je značilno povišanje viskoznosti brozge. Med vzroke za te spremembe prištevamo več dejavnikov, kot so povečanje koncentracije celic v bioreaktorju, sprememb v morfologiji rasti celic in zaradi produkcije zunajceličnih produktov, ki spremenijo reološke lastnosti brozge. Taki pojavi so nezaželeni, saj povzročajo težave pri prenosu kisika, odvajanju ogljikovega dioksida in zagotavljanju zadostnega mešanja. Komercializacija take kulture je odvisna od primerjave stroškov z obstoječimi tehnologijami in v ekonomskem uspehu, ki je odvisen predvsem od povišanja izkoristkov produkta in razvoja novih produkcijskih sistemov (Tang in sod., 2007).

### 1.1 OPREDELITEV PROBLEMA

Medicinske glive predstavljajo v farmacevtski biosintezi izjemen potencial. Kultura medicinskih gliv poteka v današnjem času v glavnem s postopkom gojenja trosnjakov na farmah gliv. Submerzna kultura medicinskih gliv v bioreaktorjih je v bioprocesnem inženirstvu še slabo raziskano področje. Največji del raziskav biosinteze glivine biomase, polisaharidov in terpenoidov je narejenih z glivo *Ganoderma lucidum*, medtem ko so na področju submerzne kulture glive *Trametes versicolor* objave redkeje.

## 1.2 CILJ RAZISKOVANJA

V sklopu raziskav diplomskega dela smo se osredotočili na preučevanje možnosti vzpostavitve lastnega tehnološkega postopka submerzne kulture micelija glive *Trametes versicolor*, produkcije polisaharidov in ostalih produktov (npr. terpenoidov in sterolov).

Raziskave so potekale v naslednjih fazah:

- izbor optimalnega gojišča za pripravo vcepka na stresalniku glede na produkcijo biomase in polisaharidov;
- preizkus treh različnih gojišč v laboratorijskem mešalnem bioreaktorju;
- analiza biosinteze glivine biomase, polisaharidov in ostalih produktov.

## 1.3 DELOVNE HIPOTEZE

V laboratorijskem mešalnem bioreaktorju bomo dosegli produkcijo celokupnih polisaharidov nad 1,5 g/L. Biosinteza znotrajceličnih polisaharidov (IPS) bo verjetno višja od biosinteze zunajceličnih polisaharidov (EPS). Poleg polisaharidov glive izločajo tudi druge BAM, predvsem terpenoide in sterole. Domnevamo, da bodo pri vsaj enem poskusu zaznani tudi ostali metaboliti.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 GLIVE

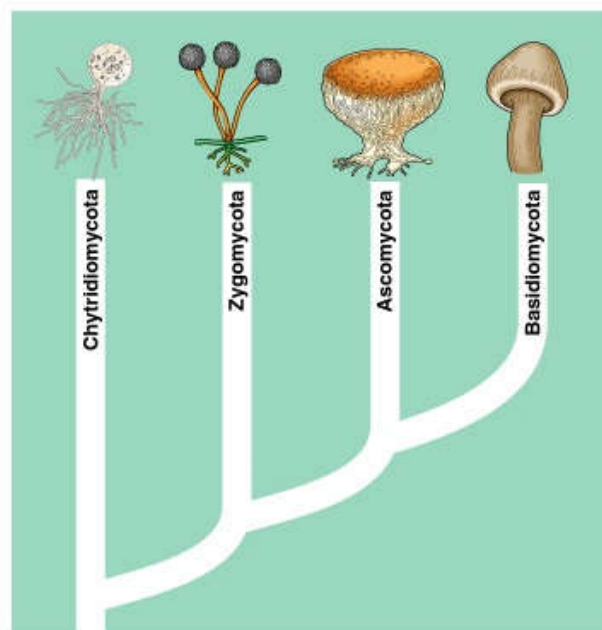
Glive so enocelični ali večcelični evkariontski organizmi, ki rastejo v zelo raznolikih habitatih, od ekstremnih do zmernejših predelov zemeljske oble. So heterotrofni organizmi in tvorijo za njih značilno celično steno iz hitina, kot rezervno snov pa uporabljajo glikogen. Do sedaj je v kraljestvu gliv poznanih okoli 350.000 vrst, čeprav je realna diverziteta gliv precej višja, po nekaterih ocenah celo 1,5 milijona vrst. Razmnožujejo se spolno ali nespolno. Nekateri glive izločajo ekstracelularne encime, ki razkrajajo organske molekule, katerih razgradne produkte potem vsrkavajo za poganjanje lastnega metabolizma. Po morfoloških lastnostih jih delimo na nitaste glive in kvasovke. Nitaste glive rastejo v obliki nitastih struktur - hif, ki se prepletajo v micelij, medtem ko so kvasovke enocelični vegetativni organizmi. V okolju se glive različno oskrbijo s hrano. Lahko imajo značilno vlogo razkrojevalcev, ki razgradijo rastlinske in živalske ostanke (saprofiti). Nekateri glive živijo v simbiozi z drugimi organizmi (mikoriza), medtem ko so druge lahko vzrok za bolezni rastlin, živali ali človeka (paraziti).

#### 2.1.1 Klasifikacija gliv

Kraljestvo gliv delimo na dva oddelka: *Eumycota* (prave glive) in *Myxomycota* (glive sluzavke). Prave glive so tiste vrste, ki tvorijo hife, imajo celične stene iz hitina skozi večji del življenjskega ciklusa ter se prehranjujejo izključno z absorpcijo. Taksonomsko so razvrščene v pet pododdelkov (Slika 1): *Mastigomycota*, *Zygomycota*, *Ascomycota*, *Basidiomycota* in *Deuteromycota*. Glive sluzavke nimajo celične stene iz hitina, temveč iz celuloze (brez prečnih sten). Tvorijo drobna trosišča izrazitih barv in se razmnožujejo z bički (zoosporami). Živijo kot gobice na listju, gozdnih tleh in trhljem lesu (Pohleven, 2015a).

*Mastigomycota* (glive z bički) imajo neseptiran micelij. Razmnožujejo se večinoma z bički (zoosporami). Najpogosteje so paraziti ali saprofiti v vodnih okoljih. Poznanih je okoli 800 vrst, najbolj znana razreda pa sta *Oomycetes* in *Chytridiomycetes*.

Prave glive imajo spolni življenjski cikel, ki je pomemben kriterij za klasifikacijo teh gliv. Različne skupine gliv v procesu spolnega razmnoževanja producirajo za njih značilne spore. Glive, ki tvorijo zigospore, uvrščamo v pododdelek *Zygomycota*, tiste, ki tvorijo askospore, v pododdelek *Ascomycota* (zaprtotrošnice) in tiste, ki tvorijo bazidiospore, v pododdelek *Basidiomycota* (prostotrošnice). Obstajajo pa tudi glive, ki imajo sicer septiran micelij ni pa znana spolna struktura za razmnoževanje. Le-te uvrščamo v pododdelek *Deuteromycota* oz. nepopolne glive (Gunde-Cimerman, 1996).



Slika 1: Klasifikacija pravih gliv (cit. po Bogen, 2015).

Izraz gobe se uporablja za višje glive, ki imajo viden trosnjak, in se jih opazi s prostim očesom. Wasser (2002a) ocenjuje, da je na Zemlji prisotnih okoli 140.000 različnih vrst gob, od tega je poznanih le okoli 10 %. Polovica vseh poznanih gob naj bi bilo užitnih, 2000 je varnih, okoli 700 pa jih poseduje pomembne farmakološke lastnosti. Gobe se po morfologiji uvrščajo med nitaste glive.

### 2.1.2 Nitaste glive

Nitaste glive so morfološko kompleksni organizmi, ki skozi svoj življenjski cikel tvorijo različne strukturne oblike (Papagianni, 2004). Najbolj značilna lastnost nitastih gliv je, da je njihov organizem sestavljen iz hif, osnovne vegetativne strukture. Hife nastanejo s kalitvijo spor, se med rastjo razvejujejo in tvorijo podgobje, t.i. micelij. Premeri hif se med posameznimi vrstami razlikujejo, kar je odvisno od okoljskih pogojev in starosti (Carlile in sod., 2001). Pri glivah so hife med seboj predeljene s prečnimi stenami oz. septi, ki so običajno perforirani (Gunde-Cimerman, 1996).

V naravi poteka rast gliv z razširjanjem hif po zraku in v notranjost substrata. Rast hif je omejena na apikalni del hife in preneha, ko hifa doseže dokončno širino. Rastoče hife višjih gliv imajo na konici apikalno telo oz. apeks. Njegova lega se spreminja glede na smer rasti hif in izgine, ko rast preneha. Do produkcije spor pride, ko se podgobje oskrbi z dovolj energije (Pohleven, 2015a). Spore nastajajo na hifah (nespolno) ali na kompleksno zgrajenih trosnjakih, sestavljenih iz hif, ki so se dvignile nad podlago in prepletle.

Sestava celične stene se razlikuje med posameznimi pododdelki gliv. Pri zaprtotrošnjakih in prostotrošnjakih je sestavljena iz polisaharidov, kot so hitin, glukani in manoproteini. Vsebuje tudi specifične proteine in glikoproteine. Nekatere glive v tekočem gojišču izločajo ekstracelularne polisaharide, ki prekrijejo celično steno hif in naredijo brozgo bolj viskozno (Carlile in sod., 2001).

Glive, kot ostali evkariontski organizmi, kot vir ogljika lahko akumulirajo lipide. Vendar je najbolj razširjena rezervna snov glikogen. V celici se nahaja v obliki netopnih zrn s kompleksno terciarno strukturo in molekulsko težo preko 100 milijonov. Lahko predstavlja več kot 10 % suhe teže gliv. Pogosti so tudi disaharid trehaloza in sladkorni poliol, ki lahko predstavljajo do 15 % suhe teže gliv. Trehaloza ima v sporah varovalno vlogo proti okoljskemu stresu. Ostale rezervne snovi so topni ogljikovi hidrati z nizko molekulsko težo. Monosaharidi se pojavljajo v zelo nizkih koncentracijah in so večinoma v fosforiliranem stanju.

### 2.1.3 Medicinsko pomembne glive

Med glive z medicinsko pomembnimi lastnostmi spadajo rodovi *Agaricus*, *Cordyceps*, *Lentinula*, *Hericium*, *Grifola*, *Flammulina*, *Pleurotus*, *Tremella*, *Ganoderma*, *Trametes* (*Coriolus*) in številne druge (Preglednica 1). Večinoma so to gobe, ki razgrajujejo lignocelulozno biomaso. Za zdravljenje se uporabljajo njihovi ekstrakti, ekstrahirani iz vroče vode, kot koncentracije ali prašek (Smith in sod., 2002). Dosedanje študije pripisujejo medicinskim glivam 126 zdravilnih funkcij, med njimi protitumorske, imunomodulatorne, antioksidativne, srčno-žilne, protihiperholesterolemične, protivirusne, protimikrobne, protiparazitske, protiglivne, detoksifikacijske, hepatoprotektivne in protidiabetične učinke (Wasser, 2011).

Preglednica 1: Pregled nekaterih medicinsko pomembnih vrst gliv (Hobbs, 1995: 251).

| Gliva                         | Učinki in uporaba                                                                                                            |
|-------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>Agaricus bisporus</i>      | <i>in vitro</i> protimutagenska aktivnost etanolnega ekstrakta; koncentrat posušenih trosnjakov se uporablja proti diabetesu |
| <i>Agaricus campestris</i>    | protibakterijski; protitumorski                                                                                              |
| <i>Amanita muscaria</i>       | protitumorski; zdravljenje epilepsije; besnilo                                                                               |
| <i>Armillaria mellea</i>      | prehranski tonik; odvajalo                                                                                                   |
| <i>Auricularia auricula</i>   | Qi tonik; proti bolečinam; hemostatični; zdravljenje vnetja ušes                                                             |
| <i>Cordyceps sinensis</i>     | adaptogen; Qi tonik; tonik za pljuča in in ledvice                                                                           |
| <i>Coriolus consors</i>       | stimulacija imunskega sistema; antibiotični                                                                                  |
| <i>Flammulina velutipes</i>   | protitumorski                                                                                                                |
| <i>Fomes fomentarius</i>      | protitumorski; zaustavlja krvavitve                                                                                          |
| <i>Fomitopsis officinalis</i> | protitumorski; hemostatični; tonik za pljuča                                                                                 |

se nadaljuje

## nadaljevanje

| Gliva                         | Učinki in uporaba                                                                                                                                               |
|-------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>Ganoderma lucidum</i>      | protitumorski; aktivacija imunskega sistema; Qi tonik; inhibicija histamina; antioksidativni; pomirja kašelj                                                    |
| <i>Grifola frondosa</i>       | stimulacija T-celic; protitumorski                                                                                                                              |
| <i>Hericum erinaceus</i>      | izboljša prebavo; priporočljivo za bolnike s črevesnimi razjedami in kroničnim gastritisom                                                                      |
| <i>Lentinula edodes</i>       | adaptogen; protitumorski; protivirusni; imunomodulatorni                                                                                                        |
| <i>Oudemansiella radicata</i> | protitumorski; zniževanje krvnega pritiska                                                                                                                      |
| <i>Piptoporus betulinus</i>   | protitumorski; lajšanje prebavnih motenj                                                                                                                        |
| <i>Pycnoporus cinnabarina</i> | na kitajskem se uporablja za pospeševanje cirkulacije krvi, proti vročini in revmatizmu; prašek se uporablja za zaustavljanje krvavitev; inhibicija sarkoma 180 |
| <i>Schizophyllum commune</i>  | adaptogen; protitumorski; povečuje vitalnost                                                                                                                    |
| <i>Stereum hirsutum</i>       | protitumorski; antibiotik proti <i>Micrococcus pyogenes</i> , <i>Diphtheria bacilli</i> , <i>Neisseria meningitidis</i> ; vsebuje ergosta-7,22-dien-3b-ol       |
| <i>Trametes versicolor</i>    | protitumorski; proti hepatitisu; antibiotski                                                                                                                    |
| <i>Tremella fuciformis</i>    | adaptogen; proti vročini; protitumorski                                                                                                                         |
| <i>Tremella mesenterica</i>   | blaži izkašljevanje; proti astmi in vnetju bronhijev                                                                                                            |
| <i>Wolfiporia cocos</i>       | diuretik; tonik za ledvice in vranico; sedativ; protitumorski                                                                                                   |

Biološko aktivno vlogo imajo predvsem polisaharidi, ki se nahajajo na celični steni prototrosov. Le-ti se razlikujejo po kemični sestavi, večinoma pa se jih uvršča med  $\beta$ -glukane, ki vsebujejo v glavni verigi enote glukoze, povezane z  $\beta$ -(1-3) glikozidnimi vezmi. Razvejujejo se z dodatnimi  $\beta$ -(1-6) stranskimi vezmi, katere posedujejo biološko aktivnost. Največ kliničnih dokazov o protitumorski aktivnosti medicinsko zanimivih gliv izhaja iz njihovih komercialnih polisaharidov, kot so lentinan (*Lentinula edodes*), PSK (polisaharid-K ali krestin) in PSP (polisaharo-peptid) iz *Trametes versicolor*, šizofilan (*Schizophyllum commune*) in grifon-D iz *Grifola frondosa* (Wasser, 2002a; Smith in sod., 2002).

Poleg  $\beta$ -glukanov so poznani tudi drugi glukani. Heteroglukani so prav tako iz glukoze, nanj pa se vežejo v različnih kombinacijah glukuronska kislina, ksiloza, galaktoza, manoza, arabinoza ali riboza (Wasser, 2002a).

Za razliko od glukanov, glikani v glavni verigi ne vsebujejo glukoze (Wasser, 2002a). Glede na glavno komponento v ogrodju, jih delimo na galaktane, fukane, ksilane in manane. V stranskih verigah v različnih kombinacijah vsebujejo polisaharide (glukoza, glukuronska kislina, arabinoza itn.).

Ostale terapevtsko zanimive kemijske spojine pri zdravljenju rakavih obolenj so tudi sekundarni metaboliti, kot so lektini, laktoni, terpenoidi, alkaloidi, antibiotiki in kelatorji. Medicinske glive vsebujejo tudi številne encime, kot so lakaze, superoksid dismutaze,

glukoza oksidaze in peroksidaze, ki imajo predvsem antioksidativne lastnosti (Wasser, 2011).

Smith in sod. (2002) navajajo, da so polisaharidi z zdravilnimi lastnostmi večinoma modifikatorji biološkega odgovora, ki regulirajo prirojeni in pridobljeni imunski odgovor. Aktivirajo različne imunske celice (makrofagi, monociti, nevtrofilci, celice naravne ubijalke, dendritične celice) in citokine (interlevkini, interferoni, kolonije stimulirajoči faktorji), ki sprožijo sistem komplementa in so pomembne pri vzdrževanju homeostaze. Protitumorski učinki se sprožijo z aktivacijo od T-celic odvisnega imunskega odgovora. Zato se uporabljajo kot adjuvantna terapija v sklopu kemoterapije, radioterapije in kirurških posegov. Izboljšajo kakovost življenja bolnikov z rakom, ker znatno zmanjšajo stranske učinke, ki nastanejo pri zdravljenju.

Produkti medicinsko pomembnih gliv so koristni tudi v obliki prehranskih dopolnil, funkcionalnih živil, nutracevtikov in mikofarmacevtikov, ki se uporabljajo za varno, zdravo dieto (Wasser, 2011). Vendar na tem področju še ni mednarodno priznanih protokolov in standardov za proizvodnjo in testiranje take vrste produktov, zato kvaliteta niha od proizvajalca do proizvajalca. Pod vprašajem je tudi dejanska učinkovitost takšnih proizvodov, saj so različno formulirani (npr. praški, vroče vodni ekstrakti, alkoholni ekstrakti itn.). Dokazov za terapevtsko učinkovitost pa je premalo.

## 2.2 BIOLOŠKO AKTIVNI METABOLITI

Iz medicinsko pomembnih gliv je bilo izoliranih in identificiranih veliko tipov uporabnih biološko aktivnih metabolitov (BAM). Znano je, da so pomemben vir protitumorskih in imunomodulatornih polisaharidov, ki preprečujejo onkogenezo. Polisaharidi ne učinkujejo direktno na rakaste celice, ampak sprožijo različne imunske odgovore v gostitelju. Pomembni produkti za medicinske namene so tudi terpenoidi, predvsem C30 lanostanski triterpenoidi. Največ raziskav je bilo opravljenih na izolaciji in farmakoloških aktivnostih ganoderskih kislin iz glive *Ganoderma lucidum*. Učinki teh kislin so inhibicija izločanja histamina, inhibicija sinteze holesterola, protihipertenzijski, protitumorski in proti-HIV učinki (Xu in sod., 2010). Poleg teh je bila iz medicinsko pomembnih gliv izolirana raznovrstna paleta kemijskih spojin, ki imajo potencialne medicinske učinke. To so glikolipidi (šizonelin), derivati šikiminske kisline (strobilurini in oudemanzini), aromatski fenoli (drozofilin, armilasirin, omfalon), derivati maščobnih kislin (filiboletska kislina), poliacetileni (agrocibin, kserulin), poliketidi (kaloporosid, hericenon A-H), nukleozidi (klitocin, nebularin), različni seskviterpeni (protoiludani, marasmani, hirsutani, kariofilani itn.), diterpeni (ciatin, striatal), sesterterpeni (alevrodiskal) in mnogo drugih substanc (Wasser, 2002b). Nekaj teh produktov je prikazanih v Preglednici 2.

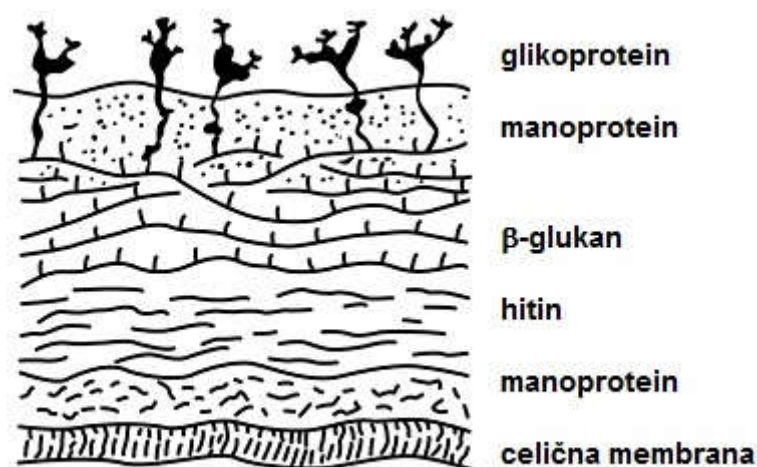
Preglednica 2: Biološko aktivni metaboliti medicinsko pomembnih gliv (Tang in Zhong, 2004: 27).

| Farmakološki učinek                    | Bioaktivni metaboliti                                                                   |
|----------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|
| protiglivni                            | adustin, alevrodiskal, anizaldehid, klavilaktoni, favolon, fimikolon, fomecini          |
| protibakterijski                       | anizaldehid, armilarin, basidalin, krinipelini, frustulozin, striatin, panelon          |
| citotoksični                           | aliakol, krinipelini, flaviduloli, hebelomske kisline, iludini, psatireloni             |
| protitumorski                          | basidalin, krestin, šizofilan                                                           |
| protivirusni                           | klitocin, kolibial, filoboletska kislina, nebularin                                     |
| proti-agregacijski                     | lagopodin, naematolon, omfalon, panudial                                                |
| možgansko-protektivni                  | AMG-1                                                                                   |
| fitotoksični                           | agrocibin, fascikuloli, hipnofilin, micenon, omfalodin, panelon, sikain                 |
| insekticidni in<br>nematocidni         | anizaldehid, beauvericin, heimonofiloni, ibotenska kislina, izoveleral, linolna kislina |
| inhibitorji:                           |                                                                                         |
| aminopeptidaz                          | tiromicin                                                                               |
| biosinteze holesterola                 | kserulini                                                                               |
| biosinteze levkotriena                 | alohedikariol, blenini, desozilaktarorufin A                                            |
| izocitrat liaze                        | micenon                                                                                 |
| reverzne transkriptaze                 | klavikoronska kislina, hifodontal, kuehneromicini, mniopetali, podoscifinska kislina    |
| signalne transdukcije                  | paneoksidon, tremediol                                                                  |
| fosfolipaz C ali A <sub>2</sub>        | kaloporoizid                                                                            |
| Na <sup>+</sup> -K <sup>+</sup> -ATPaz | koriolin, diketokoriolin B                                                              |
| glikozidaz                             | ciklofelitol                                                                            |

### 2.2.1 Polisaharidi

Polisaharidi so polimeri, sestavljeni iz monosaharidnih podenot, ki so med seboj povezane z glikozidnimi vezmi. So strukturno raznoliki, saj lahko ena sama vrsta monosaharidne podenote z različnim načinom povezovanja gradi različne polisaharide. V primerjavi z beljakovinami in nukleinskimi kisljinami, imajo polisaharidi večjo zmogljivost za izvajanje bioloških aktivnosti, saj imajo največji potencial za strukturno variabilnost. Takšna raznolikost omogoča boljšo prilagodljivost v natančno reguliranih mehanizmih v celicah višjih organizmov (Wasser, 2002a).

Polisaharidi iz gob so večinoma glukani z različnimi tipi glikozidnih vezi, kot so 1,3-, 1,6-β-glukani, 1,3-α-glukani, heteroglukani in glikani (Wasser, 2002a). Ostali se večinoma vežejo na proteine in tvorijo PSP komplekse. Glavna podenota β-glukanov je D-glukoza. Glivini protitumorski polisaharidi se večinoma nahajajo v celični steni (Slika 2). Komponenti celične stene hitin in hitozan ne posedujeta protitumorske aktivnosti.



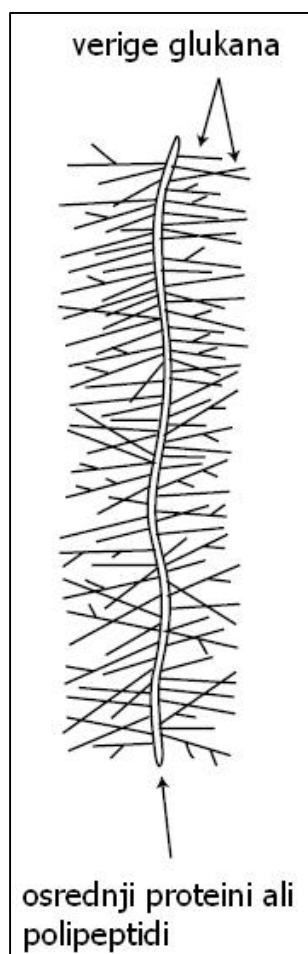
Slika 2: Celična stena višjih gliv (Chan in sod., 2009: 3).

Protitumorsko delovanje polisaharidov je povezano z:

- zaviranjem rasti rakastih celic,
- aktiviranjem T-celic, B limfocitov, makrofagov in celic naravnih ubijalk,
- povišanjem produkcije interleukina IL-2, IL-6, ki sta aktivatorja limfocitov,
- povišanjem produkcije interferonov.

Wasser (2002a) navaja, da je protitumorsko delovanje polisaharidov odvisno od njihovih fizikalnih lastnosti (vodotopnost, velikost molekul), kemijske sestave in konfiguracije (stopnja razvejanosti, oblika molekul). Protitumorsko delovanje je močnejše, če so v verigi  $\beta$ -glukanov prisotne 1,3- ali 1,6-glikozidne vezi. Glukani z visoko molekulsko težo so bolj aktivni, kot tisti z nizko molekulsko težo. K protitumorskemu delovanju pripomorejo tudi ostale kemijske strukture, kot so hetero- $\beta$ -glukani,  $\beta$ -glukan-protein,  $\alpha$ -mano- $\beta$ -glukan,  $\alpha$ -glukan-protein in heteroglikan-proteinski kompleksi (Slika 3) ter konformacijska kompleksnost  $\beta$ -glukanov (npr. trojni heliks).

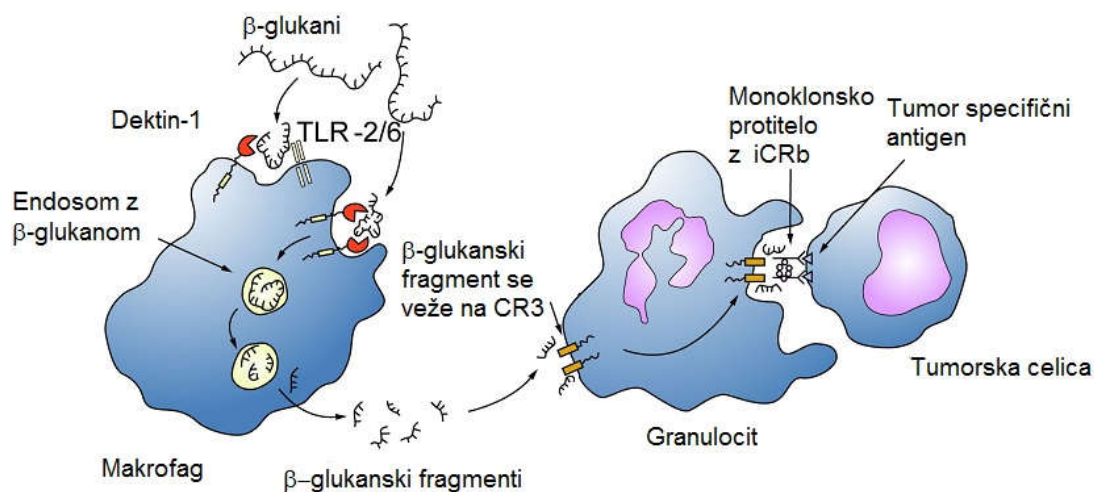
$\beta$ -glukani se direktno vežejo na specifične receptorje imunskih celic (predvsem dektin-1 in CR3), neodvisno od mikrobne razgradnje v črevesju (Chan in sod., 2009). Tarčne imunske celice  $\beta$ -glukanov so makrofagi, nevtrofilci, monociti, celice naravne ubijalke in dendritične celice. Imunomodulatorne funkcije  $\beta$ -glukanov inducirajo tako prirojeni kot pridobljeni imunski odgovor. Na osnovi *in vitro* in *in vivo* raziskav, ki so bile izvedene na živalih, je postavljena hipoteza delovanja  $\beta$ -glukanov na imunske celice.



Slika 3: Molekularna zgradba proteoglikana (Kidd, 2000:6).

Chan in sod. (2009) navajajo, da  $\beta$ -glukane prevzemajo makrofagi preko receptorja dektin-1, neodvisno od prisotnosti receptorja TLR-2/6. Znotraj makrofagov se  $\beta$ -glukani razcepijo na manjše fragmente in potujejo v kostni mozeg in endotelijski retikularni sistem. Fragmenti se nato sprostijo in preko receptorja CR3 vstopajo v granulocite, monocite in dendritične celice, kjer vršijo svojo imunomodulatorno funkcijo. Te imunske celice imajo namreč sposobnost fagocitoze, saj se s protitelesi vežejo na monoklonske antigene, ki so na tumorskih celicah in jih razgradijo (Slika 4).

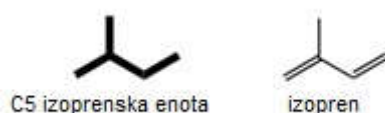
Zaradi svojih imunoterapevtskih lastnosti se polisaharidi iz gob uvrščajo med imunocevtike, ki širše spadajo v področje nutraceutikov in prehranskih dopolnil. Imunocevtiki aktivirajo celice imunskega sistema, kot so dendritične celice, celice naravne ubijalke, T-celice in makrofage ter pospešijo produkcijo citokinov (Kidd, 2000; Wasser, 2011).



Slika 4: Delovanje  $\beta$ -glukanov na imunske celice (Chan in sod., 2009: 4).

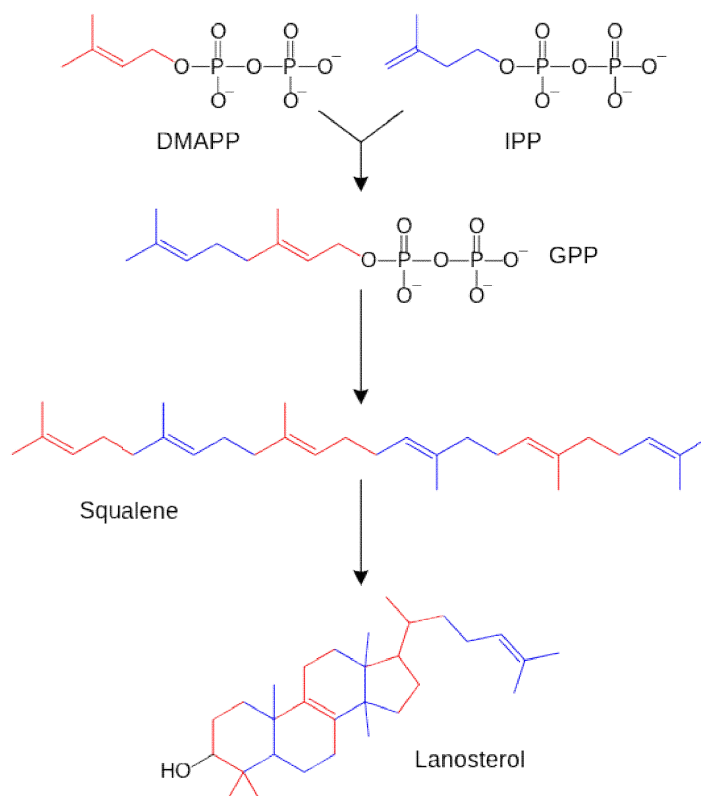
### 2.2.2 Terpenoidi

Terpenoidi predstavljajo veliko in strukturno raznoliko družino naravnih snovi, ki so sestavljene iz C5 izoprenskih enot, povezanih na način glava-rep (Slika 5). Glede na število izoprenskih enot v molekuli,  $(C_5)_n$ , terpenoide razvrščamo na: hemiterpene ( $C_5$ ), monoterpene  $(C_5)_2$ , seskviterpene  $(C_5)_3$ , diterpene  $(C_5)_4$ , sesterterpene  $(C_5)_5$ , triterpene  $(C_5)_6$ , tetraterpene  $(C_5)_8$  in višje terpenoide.



Slika 5: Izoprenska enota (Dewick, 2002: 168).

Osnovna prekurzorja v metabolni poti tvorbe terpenoidov sta razvejani, nenasičeni difosfatni izoprenski enoti, izopentenil pirofosfat (IPP) in dimetilalil pirofosfat (DMAPP), ki nastaneta po mevalonatni poti ali deoksiksiluloza fosfatni poti (oz. mevalonat-neodvisni poti) preko intermediatov mevalonske kisline (MVA) ali deoksiksiluloze fosfata (DXP). Pri živalih, glivah, arhejah in nekaterih evbakterijah poteka biosinteza po mevalonatni poti (Slika 6), medtem ko sta pri rastlinah značilni obe poti (Naumoska, 2011).



Slika 6: Poenostavljena biosintezna pot terpenoidov (Terpenoid, 2015).

Triterpenoidi so sestavljeni iz šestih izoprenskih enot. Nastanejo z združitvijo dveh molekul farnezil pirofosfata (rep-rep), ki tvorijo enostavno linearno molekulo skvalen (prvič izoliran iz jetrnega olja morskega psa). Modifikacije in/ali ciklizacije skvalena tvorijo lanosterol, ki gradi lanostanski obroč pri ganoderskih kislinah. Nadaljnje stopnje biosinteze ganoderskih kislin so slabo raziskane, vključujejo pa serijo oksidacij, redukcij in acilacij (Xu in sod., 2010).

Znano je, da glive vrste *Ganoderma* producirajo triterpenoide. Ganoderske kisline, visoko oksigenirani C30 lanostanski triterpenoidi, posedujejo farmakološke lastnosti, kot so inhibicija sproščanja histamina, inhibicija sinteze holesterola, protihipertenzijske, protitumorske in proti-HIV učinke (Xu in sod., 2010). V nasprotju s polisaharidi, delujejo direktno citotoksično na rakaste celice (Russell in Paterson, 2006). Song in Yen (2002) sta odkrila visoko korelacijo med inhibicijo peroksidacije lipidov in količino triterpenoidov pri metanolnem in etil acetatnem ekstraktu micelija glive *Antrodia camphorata*.

## 2.3 GLIVA *Trametes versicolor*

### 2.3.1 Taksonomska uvrstitev

|                |                              |
|----------------|------------------------------|
| Kraljestvo:    | <i>Fungi</i>                 |
| Oddelek:       | <i>Eumycota</i>              |
| Pododdelek:    | <i>Basidiomycota</i>         |
| Razred:        | <i>Agaricomycetes</i>        |
| Red:           | <i>Polyporales</i>           |
| Družina:       | <i>Polyporaceae</i>          |
| Rod:           | <i>Trametes</i>              |
| Vrsta:         | <i>Trametes versicolor</i>   |
| Slovensko ime: | Pisana ploskocevka (Slika 7) |



Slika 7: Gliva *Trametes versicolor* – pisana ploskocevka (Pohleven, 2015b).

### 2.3.2 Opis

Gliva *Trametes versicolor* (starejše lat. ime *Coriolus veriscolor*) je pri nas poznana pod imenom pisana ploskocevka, na Kitajskem pa jo imenujejo »yun-zhi«. Mnogobarvni klobuk spominja na rep divjega petelina, zato je znana v Veliki Britaniji in ZDA pod imenom »turkey tail«. Je lesna gliva bele trohnobe, ki razgrajuje lignin in deloma tudi celulozo. Raste na odpadlih vejah, podrlih ali stoječih odmrlih deblih in tudi panjih

listavcev (Arzenšek in sod., 2010). Je zelo pogosta razkrojevalka in hitro preraste vso lesno maso. Trosnjak je pahljačaste oblike, polmera 1 do 4 cm, debel okoli 0,2 cm in s strani priraščen na leseno podlago. Iz narastišča poganja več trosnjakov, tako po višini kot širini. Zgornja stran je dlakava, žametasta in pisana. Barve so zelo spremenljive in vsak narastek je obarvan drugače, prevladujejo pa rjavi odtenki. Kolobarji so ponavadi obarvani modro, ob robovih pa so svetlejši. Trosovnica je sestavljena iz nešteto drobnih por, velikih le okoli tretjino milimetra.

Habitat *T. versicolor* je v zmernem gozdnem pasu Azije, Evrope in Severne Amerike in je ena od najbolj pogostih gob v severni polobli. Do sedaj je odkritih že več kot 120 sevov (Cui in sod., 2003) iz katerih so izolirali številne BAM (Preglednica 3).

Preglednica 3: Biološko aktivni metaboliti glive *T. versicolor* (Stošić-Grujičić in sod., 2011: 268).

| Glavna skupina spojin | Primeri                                                                                                                                                                     |
|-----------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| polisaharidi          | β-D-glukani, Versicolor polisaharid (VPS), heteropolisaharidi, prehranske vlaknine                                                                                          |
| gliko-konjugati       | polisaharidpeptid (PSP), polisaharid-K (PSK, Krestin, koriolan), proteoglikani                                                                                              |
| terpeni               | triterpenoidi, koriolin                                                                                                                                                     |
| fenolne spojine       | fenoli, fenolne kisline, polifenoli                                                                                                                                         |
| manjše molekule       | aktivna heksozam podobna spojina (AHCC), lipidi, vitamini, minerali in elementi v sledovih, proteini, polipeptidi, aminokisline, deoksikoriolinska kislina, nukleotidi itd. |

### 2.3.3 Sestava

Sestava suhe snovi gobe je sledeča (Stošić-Grujičić, 2011):

- proteini 4,2 %
- ogljikovi hidrati 65,1 %
- vlaknine 23,2 %
- maščobe 1,1 %
- soli in kovine 6,4 %

### 2.3.4 Biološko aktivni metaboliti

Biološka aktivnost *T. versicolor* je odvisna od seva, razvojne stopnje gobe in habitata, kjer raste (Stošić-Grujičić, 2011). Izvlečki *T. versicolor*, ki jih pridobijo z ekstrakcijo z vročo vodo se v tradicionalni kitajski medicini že dolgo časa uporabljajo za zdravljenje rakavih obolenj in obolenj, ki so posledica oslabiljenega imunskega sistema. »Yun-zhi« je v času dinastije Ming zapisana v Li Shinzen-ovem Kompendiju Materia Medica, kot koristna za

zdravje in da prinaša dolgo življenje, če se jo redno konzumira. V današnjem času so ekstrakti *T. versicolor* dostopni na trgu v obliki prehranskih dopolnil, kapsul, tablet, sirupov, čajev in tradicionalnih medicinskih pripravkov (Slika 8).



Slika 8: Različni pripravki iz gobe *T. versicolor*.

Na Kitajskem in Japonskem se učinkovine iz te glive uporabljajo za stimulacijo imunskega sistema in kot adjuvansi pri zdravljenju različnih rakavih obolenj (Cheng in Leung, 2008). Najpomembnejši učinkovini sta polisaharid-K (PSK) oz. krestin in polisaharidpeptid (PSP), ki imata podobne fiziološke učinke, strukturno pa se nekoliko razlikujeta. PSK/PSP nespecifično stimulirata imunski sistem. Spodbujata proliferacijo T limfocitov, aktivacijo makrofagov, celic naravnih ubijalk in T-celic pomagalk. Posredno tako inducirata produkcijo protiteles in interleukinov (Cheng in Leung, 2008). Izolira se ju iz globoke plasti (ang. deep-layer) micelijske kulture glive (Ng, 1998). Največ kliničnih raziskav PSK/PSP je bilo opravljenih na japonskem in kitajskem pri zdravljenju raka na prebavilih, pljučih, dojkah in nazofarinksu. Večino raziskav se je posvečalo evalvaciji učinkovitosti polisaharopeptidov pri obnovitvi imunskega sistema po kemoterapiji in radioterapiji (Stošić-Grujičić in sod., 2011).

#### 2.3.4.1 Polisaharid-K (PSK)

PSK je vodotopni kompleks proteina in polisaharida z molekularno težo 100 kDa. Vsebuje približno 62 %  $\beta$ -D-glukanskih enot in 38 % proteinov. Glukanski delež PSK je sestavljen iz  $\beta$ -1,4 glavne verige in  $\beta$ -1,3 stranske verige ter  $\beta$ -1,6 stranskih verig, ki pripenjajo polipeptid z O- ali N-glikozidnimi vezmi. Monosaharidne enote so sestavljene iz glukoze, manoze, ksiloze, galaktoze in fukoze. Proteinski del je bogat z glutaminsko kislino, asparaginsko kislino, levcinom, alaninom in valinom.

Prve klinične raziskave PSK so se začele leta 1970. Do sedaj so se pozitivni učinki izkazali pri raku na želodcu, dojkah, pljučih, debelega črevesja in danke, in pri levkemiji (Kidd, 2000; Cui in sod., 2003). Prvi komercialni pripravek je prišel v uporabo leta 1977 na japonskem (Japanese Kureha Chemical Industries Co. Ltd). Ekstrahiran je z izsoljevanjem z amonijevim sulfatom iz vročega vodnega ekstrakta. Pridobiva se ga iz seva CM-101 (ATCC 20547) vzgojenega s submerzno kultivacijo micelija. Leta 1985 je predstavljal devetnajsto najbolj uspešno zdravilo na svetu.

#### 2.3.4.2 Polisaharid-P (PSP)

PSP je vodotopni polisaharidpeptid (polisaharid povezan z majhno molekulo proteina ali polipeptida) z molekularno težo 100 kDa. Glukanski delež PSP je sestavljen iz  $\beta$ -1,3 glavne verige in  $\beta$ -1,4 ter  $\beta$ -1,6 stranskih verig. Od PSK se razlikuje v sestavi polisaharidov. Monosaharidne enote so poleg glukoze sestavljene še iz manoze, ksiloze, galaktoze, ramnoze in arabinoze. Proteinski del je bogat z asparaginsko in glutaminsko kislino. Pridobiva se ga iz seva Cov-1 z alkoholno precipitacijo ekstrakta iz vroče vode (Kidd, 2000; Cui in sod., 2003).

Klinične raziskave so začele potekati kmalu od njegove izolacije leta 1986 pri bolnikih z rakom na želodcu, požiralniku in pljučih (Stošić-Grujičić, 2011). Tako kot PSK, je tudi PSP netoksičen. PSP kot modifikator biološkega odgovora stimulira imunski sistem in izzove imunomodulatorne in protitumorske učinke (Kidd, 2000; Cui in sod., 2003). Zmanjša stranske učinke pri radioterapiji in kemoterapiji, ter tako izboljša preživetje in kakovost življenja bolnikov z rakom (Ng, 1998). Na trgu se je pojavil 10 let kasneje kot PSK.

#### 2.3.4.3 Ekstracelularni polisaharidi

Filtrat fermentacijske brozge je bogat z ekstracelularnimi polisaharidi (EPS), ki so še slabo raziskani. Znan je protitumorski polisaharid koriolan (Miyazaki in sod., 1974). Zadnja leta so zanimivi zaradi potencialnih zdravilnih učinkov. Monosaharidne enote so sestavljene iz glukoze in manjših količin galaktoze, manoze, arabinoze in ksiloze. Glavni del EPS je sestavljen iz  $\beta$ -1,3 in  $\beta$ -1,6 vezjo povezanimi enotami D-glukoze. Njihova vloga je adhezija hif na površino, imobilizacija ekstracelularnih encimov, preprečevanje dehidracije hif, skladiščenje hranil in vloga pri razgradnji lignina (Elisashvili, 2012). Vse vrste prostotrosov, ki producirajo več kot 2 g/L EPS, so dobre razkrojevalke lignina (Maziero in sod., 1999).

Rau in sod. (2009) so analizirali strukturo EPS, ki so ga pridobili z gojenjem *T. versicolor* ATCC 200801 v bioreaktorju na sintetičnem minimalnem gojišču z limitirajočo vsebnostjo kisika. Po strukturi in načinu pridobivanja je podoben skleroglukanu in šizofilanu. Od

drugih polisaharidov *T. versicolor* (predvsem PSK in PSP) se razlikuje v sestavi monosaharidov in proteinov, naravi glikozidnih vezi in molekularni teži.

Yang in sod. (2012) so raziskovali aktivnost EPS seva LH1 proti diabetesu na principu inhibicije  $\alpha$ -glukozidaze. Aktivnost inhibicije encima je bila pri fermentacijski brozgi in precipitatu skupnih EPS nižja kot pri PSK (Krestin) in zdravilu Glucobayu (Acarbose). Skupne EPS so frakcionirali z ionsko izmenjevalno kromatografijo. Tri frakcije, ePS-F2-1, ePS-F3-1 in ePS-F4-1, so imele, ločene od brozge in ostalih EPS, višjo inhibicijo  $\alpha$ -glukozidaze. ePS-F2-1 je sestavljen iz polisaharidov, proteinov in triterpenoidov, medtem ko sta ePS-F3-1 in ePS-F4-1 saponina, tj. mešanica polisaharidov in triterpenoidov. Slednja sta imela višjo inhibicijo encima kot PSK (Krestin). Študija je pokazala, da je za višjo inhibicijo encima pomembno manjše razmerje med polisaharidi in triterpenoidi. Podobna študija je bila opravljena tudi na intracelularnih polisaharidih (IPS) (Hsu in sod., 2012).

Lin in sod. (2008) so s kultivacijo na gojišču obogatenem z ekstraktom sadeža *Lycium barbarum* (goji jagode) pridobili EPS, ki so imeli 1,7-krat večji delež proteina kot v kontroli in drugačno sestavo polisaharidov (manj manoze in več ksiloze). S tem se je povečala tudi biološka aktivnost EPS.

#### 2.3.4.4 Terpenoidi

Iz prostotrosnic se je izoliralo številne terpenoide (predvsem triterpenoide), ki posedujejo zdravilne učinke. O terpenoidih *T. versicolor* pa je na splošno malo znanega. Takeuchi in sod. (1969) so izolirali seskviterpenoid koriolin in preverjali njegove protibakterijske lastnosti. Harhaji in sod. (2008) so proučevali protitumorsko aktivnost metanolnega ekstrakta *T. versicolor*, ki vsebuje večinoma terpenoide in polifenole, na mišje melanomske celice B16 *in vitro* in *in vivo*. Gao in sod. (2013) so z LC-MS analizo ekstrakta *T. versicolor* določili pet triterpenov (ganoderska kislina A, lucidumol A, ganoderiol D in F, ganodermanontriol).

### 2.3.5 Zdravilni učinki

#### 2.3.5.1 Učinki na imunski sistem

*In vitro* študije so pokazale, da ekstrakti *T. versicolor* aktivirajo B limfocite, T limfocite, monocite/makrofage, celice kostnega mozga, celice naravne ubijalke in z limfociti aktivirane celice ubijalke (Chu in sod., 2002). Spodbujajo tudi proliferacijo in izločanje protiteles in številnih citokinov (IL-2, IL-6, interferoni, TNF). *In vivo* študije so pokazale, da ekstrakti po kemoterapiji izboljšajo imunski sistem pri bolnikih s tumorjem.

Rezultati raziskave Cui-ja in sod. (2007) so pokazale, da manjše koncentracije EPS in IPS inducirajo več citokinov pri mišjih vraničnih celicah. Študija kaže, da je uporaba pravilne doze EPS/IPS pomembna za maksimiranje *in vitro* imunskega odgovora.

#### 2.3.5.2 Protitumorske lastnosti

Ekstrakti *T. versicolor* posedujejo citotoksično aktivnost proti določenim tumorskim celicam. Raziskave, ki kažejo zaviranje napredovanja raka so bile izpeljane na bolnikih z rakom na želodcu, pljučnim rakom, levkemijo in limfomom (Chu in sod., 2002). Inhibicija rasti tumorskih celic je bila dosežena tudi na človeški levkemični celični liniji, jetrni in želodčni tumorski celični liniji. Citotoksični mehanizmi, ki inhibirajo rast tumorskih celic še niso razvozlani.

*In vivo* študije so pokazale občutno zmanjšanje velikosti tumorja po dolgotrajnem uživanju ekstrakta pri pljučnem adenokarcinomu, nazofaringealnemu karcinomu in levkemiji. Učinkoviti naj bi bili tudi za profilakso proti raku na požiralniku, črevesju, dojkah, jetrih, pljučih in mehurju (Chu in sod., 2002).

#### 2.3.5.3 Protimikrobne lastnosti

Chu in sod. (2002) navajajo, da je bilo v *in vivo* živalskih študijah zaznati širok spekter protimikrobnega in protiglivnega delovanja ekstraktov *T. versicolor*, predvsem proti klasičnim patogenom, kot so *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Klebsiella pneumoniae*, *Listeria monocytogenes* in *Streptococcus pneumoniae*. Protimikrobne lastnosti verjetno izhajajo iz aktivacije celic imunskega sistema, ki vodi v povišano izločanje citokinov, kot so TNF in IL-1.

#### 2.3.5.4 Protivirusne lastnosti

Študije PSK kažejo potencialni protivirusni učinek proti virusu ektomelije, citomegalovirusnim infekcijam in HIV-u (Cheng in Leung, 2008). Collins in Ng (1997) sta testirala učinek PSP proti virusu HIV. Ugotovila sta inhibitorno aktivnost pri interakciji HIV-1 ovojničnega glikoproteina gp120 in imobiliziranim CD4 receptorjem, ki je ključna za vstop virusa v tarčno celico. Študija je pokazala tudi inhibitorno aktivnost proti HIV-1 reverzni transkriptazi in nekaterim glikohidrolaznim encimom. Potrebne so še nadaljnje *in vitro* in *in vivo* študije za potrditev teh testiranj.

#### 2.3.5.5 Antioksidativne lastnosti

Raziskave so pokazale več kot 20 % antioksidativno aktivnost *T. versicolor* pri inhibiciji oksidacije lipidov podganjega možganskega homogenata s prostimi radikali peroksida

(Badalyan, 2003). Arteiro in sod. (2012) so ugotovili varovalno vlogo ekstra- in intracelularnih protein-polisaharidnih kompleksov pri oksidaciji membran eritrocitov in zmožnost inhibicije hemolize in sinteze methemoglobina v eritrocitih. Ti bioaktivni kompleksi so lahko alternativa bolj toksičnim sinteznim antioksidantom v živilskih, farmacevtskih in kozmetičnih pripravkih.

## 2.4 BIOSINTEZA V MEŠALNEM BIOREAKTORJU

### 2.4.1 Mešalni bioreaktor

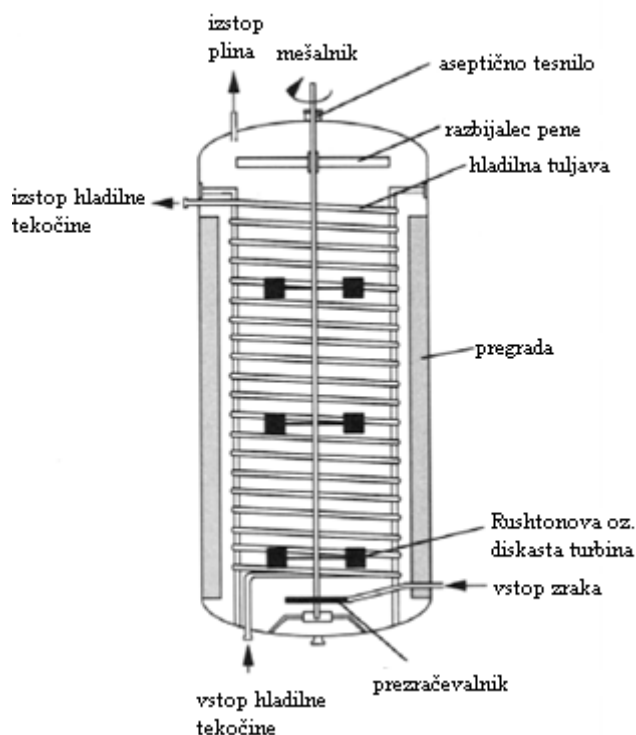
Bioreaktor je dimenzijsko nedefiniran prostor v katerem potekajo kontrolirane biokatalitske reakcije. Načrtovanje bioreaktorjev je zahtevna naloga, saj ga prilagajamo potrebam gojenega mikroorganizma.

Bioreaktorje delimo z ozirom na način mešanja na (Berovič, 1996):

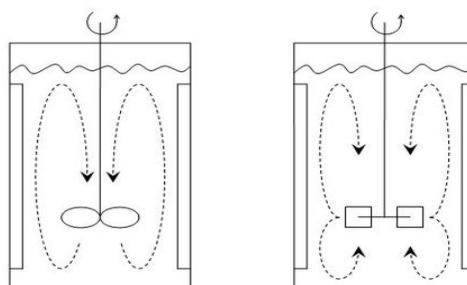
- bioreaktorje z mehanskim načinom mešanja,
- bioreaktorje z mešanjem s curkom vstopnega plina,
- bioreaktorje z obtočno črpalko.

Glavni parametri, ki vplivajo na izbiro bioreaktorja pri submerzni kultivaciji nitastih gliv, so viskoznost fermentacijske brozge, potreba po kisiku in sproščanje toplote. Po drugi strani je potrebno vzeti v obzir tudi ceno produkta, produktivnost delovnega mikroorganizma, velikost bioreaktorja, kontrolo procesnih parametrov in načine vodenja bioprocesa. Mešalni bioreaktor je primeren za viskozne medije, vendar nepraktičen pri prostornini večji od 500 m<sup>3</sup>, ker je vnos moči za mešanje previsok. Za večje velikosti so primerne kolone z mehurčki in bioreaktorji z notranjo zanko (Žnidaršič in Pavko, 2001).

Mešalni bioreaktorji se uporabljajo za večino submerznih bioprocesov (Slika 9). Tipični mešalni bioreaktor sestavlja cilindrična posoda ter eno ali več mešal, pritrjenih na os, ki jo poganja motor (Žnidaršič in Pavko, 2002). Na izbiro je veliko mešal različnih velikosti in oblik. Najbolj pogosta so Rushtonove ali diskaste turbine, turbine z ravnimi, s srpastimi ali z ukrivljenimi lopaticami, razni propelerji ali lopatičasta kombinirana mešala (Berovič, 1996). Število mešal je odvisno od višine tekočine v reaktorju. Vsako mešalo ima od dve do šest lopatic. Diskaste turbine nizkoviskozne kapljevine usmerja v radialni tok, medtem ko propelerji vodijo v aksialno kroženje kapljevine (Slika 10) (Žnidaršič in Pavko, 2002). Uporaba kombinacije več vrst mešal, npr. Rushtonove turbine v spodnjem delu bioreaktorja in propelersko mešalo na površini, izboljša disperzijo mehurčkov zraka ob prezračevalniku, recikliranje substrata in s tem vsesavanje nastale pene na površini substrata.



Slika 9: Mešalni bioreaktor (Doran, 2004: 336).



Slika 10: Tokovna profila v reaktorju s pregradami, ki ju povzročata propeler (levo) in diskasta (Rushtonova) turbina (desno) (Mixing ..., 2015).

Kot prezračevalnik se uporabljajo predvsem perforirani obroči (Berovič, 1996). V mešalnem bioreaktorju so običajno še pregrade, ki preprečujejo tvorbo lijaka, senzorji, ter v nekaterih primerih hladilne tuljave. Laboratorijske izvedbe bioreaktorjev so ponavadi iz stekla, medtem ko so pilotni in industrijski iz nerjavečega jekla. Te vrste material je najbolj primeren, ker imajo mnoge fermentacijske brozge korozivne lastnosti.

Velikost plinastih mehurčkov in njihova disperzija sta nadvse pomembna za dobro učinkovitost bioreaktorja (Žnidaršič in Pavko, 2002; Shuler in Kargi, 2008). Disperzija je večinoma odvisna od hitrosti vrtenja mešala, vendar pretiravanje v tem smislu lahko privede do lize celic zaradi njihove občutljivosti na strižne sile. Predvsem je to problem pri

diskastih turbinah, ki pri vrtenju povzročajo visoke strižne sile, a so zelo učinkovita pri dispergiranju. Bolj popularni za bolj občutljive celice in viskozne medije (npr. micelijske fermentacije) so propelerji, ki zahtevajo manjši vnos moči za vrtenje, zmanjšajo moč strižnih sil in ohranijo enako stopnjo prenosa plinov. Primerni so predvsem za homogeniziranje in suspendiranje trdnih delcev.

Bioreaktor ima delovni volumen in volumen nad tekočino (ang. headspace). Delovni volumen sestavljajo medij, biokultura in plinski mehurčki. Ponavadi predstavlja 70-80 % celotnega volumna mešalnega bioreaktorja. Tako se omogoči zadosten volumen nad površino tekočine (headspace), ki je pomemben za sproščanje porabljenih plinov in za določanje obsega nastajanja pene na površini tekočine. Prekomerno penjenje lahko povzroči težave, saj pena uide iz reaktorja in navlaži filtre, povzroči padec tlaka, zmanjša tok plina in povečuje možnost kontaminacije. Izrazito penjenje se lahko zmanjša z vstavitvijo dodatnega mešala, razbijalca pene, v prostoru nad tekočino. Alternativno se lahko uporabi tudi kemična sredstva proti penjenju, vendar le-ta zmanjšujejo prenos kisika (Doran, 2004). Penjenje povzročajo predvsem kompleksni mediji in visok delež ekstracelularnih polimerov v fermentacijski brozgi (Shuler in Kargi, 2008).

Sterilizacija je naslednji pomemben dejavnik za uspešnost izvedbe bioprocesa. Zaželeno je, da ima bioreaktor čim manj odprtin, kar pa pomeni tudi manj sond za kontrolo bioprocesa, zato je potrebno tu skleniti kompromis. Poseben problem so tesnila osi mešala.

Pri pogonu z dna bioreaktorja so obremenitve tesnil večje kot pri pogonu z vrha, zato prihaja hitreje do obrabe, kar lahko vodi tudi do kontaminacije z mikrobi iz okolja. Je pa sama sterilizacija tesnil ter prosta delovna površina na pokrovu bioreaktorja prednost tesnenja z dna bioreaktorja (Berovič, 1996). Vse površine bioreaktorja in cevi morajo biti gladke, da se v njih ne zadržujejo organske snovi in mikrobi, ki niso zaželeni med procesom (Shuler in Kargi, 2008).

Mešalne bioreaktorje običajno gradijo v standardnih velikostih (Mešalni reaktor standardne konfiguracije), ki jih določa Mednarodna organizacija za standardizacijo (ISO). Standardna geometrija oz. razmerja mešalnega bioreaktorja so:

- višina tekočine v bioreaktorju proti višini bioreaktorja  $H_L/H_t$  je 0,7 do 0,8;
- višina bioreaktorja proti premeru bioreaktorja  $H_t/D_t$  je 1 do 2;
- premer mešala proti premeru bioreaktorja  $D_a/D_t$  je  $1/3$  do  $1/2$ ;
- premer ovir proti premeru posode  $D_b/D_t$  je 0,08 do 0,1;
- višina lopat mešala proti premeru mešala  $W/D_a$  je 0,2;
- širina lopat mešala proti premeru mešala  $L/D_a$  je 0,25;
- razmak na polovici mešala in višina lopatic mešala je  $E/W$ .

Mešalni bioreaktor vsebuje naslednje komponente (Doran, 2004):

- mešalni sistem,
- sistem za oskrbo s kisikom,
- sistem za kontrolo penjenja,
- sistem za kontrolo temperature,
- sistem za uravnavanje pH,
- sistem za vzorčenje,
- sistem za čiščenje in sterilizacijo, cevi za praznjenje reaktorja.

## **2.4.2 Morfologija nitastih gliv pri gojenju v mešalnem bioreaktorju**

Nitaste glive rastejo v tekočem gojišču na površini. Stresanje, mešanje ali prezračevanje tekočega gojišča povzroča submerzno rast. Pri submerzni kultivaciji micelij nitastih gliv raste v filamentozni obliki, v skupkih (granulah) ali v obliki peletov.

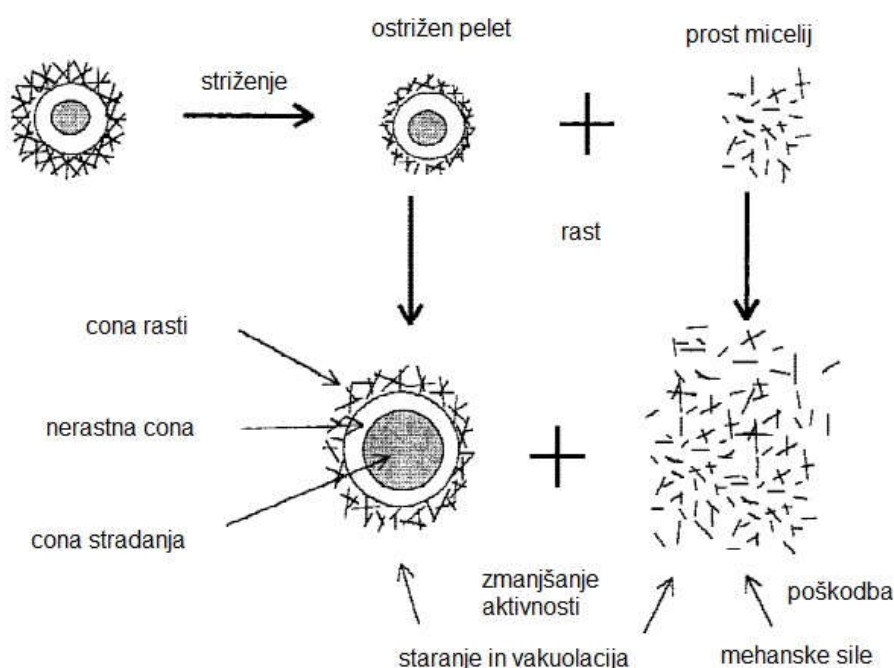
Kakšna je oblika, je odvisno od več dejavnikov, kot so genetika mikroorganizma, narave vcepka, kemičnih in fizikalnih pogojev rasti, strižnih sil pri mešanju (Tišma in sod., 2010). Bioprocesna brozga je običajno visokoviskozna zaradi suspendirane filamentozne biomase in ekstracelularnih polimerov (Cui in sod., 2003).

Dispergirani micelij (filamentozna rast) nastane z mešanjem suspenzije razvejanih hif. Ta suspenzija ima nenewtonsko obnašanje, njena viskoznost pa narašča s hitrostjo vrtenja mešala, kar posledično vodi v zmanjšan prenos hranil, kisika in toplote. Mešanje nadalje ni več učinkovito, kar samo povečuje stroške (Moreira in sod., 2003).

Peleti se oblikujejo z agregacijo micelija. Lahko so sferične ali ovalne oblike, različnih premerov in velikosti, odvisno od delovanja strižnih sil oz. mešanja v bioprocesni brozgi. Glavni dejavniki, ki vplivajo na oblikovanje peletov, so velikost in tip vcepka, mešanje, sestava medija, temperatura in pH (Žnidaršič in Pavko, 2001; Moreira in sod., 2003). Iz vidika ekonomičnosti procesa ima peletna morfologija nekatere prednosti pred filamentozno rastjo. Izboljša se reologija brozge in s tem zmanjšanje vnosa energije za prenos toplote in snovi. Micelij se v manjši meri prirašča na stene bioreaktorja in na mešalo. Poleg tega je možna ponovna uporaba biomase.

Tipični pelet je sestavljen iz treh slojev: rastne regije na zunanji strani peleta, nerastne regije v notranjosti peleta in votlega centra v središču peleta (avtoliza). Ko peleti dosežejo kritični radij, lahko v gostem jedru peleta začne primanjkovati hranil, kar privede do avtolize celic. Obstajata dva tipa peletov: koagulativni tip, ki nastane z agregacijo večih spor v zgodnji fazi razvoja glive, in nekoagulativni tip, ko posamezen pelet nastane iz ene same spore (Žnidaršič in Pavko, 2001; Moreira in sod., 2003).

Cui in sod. (1998) so razvili matematični model, ki predvideva, da pri submerzni kultivaciji nitastih gliv hife v rastni coni odpadejo od peleta zaradi delovanja hidrodinamičnih sil (Slika 11). Hife v nerastni coni postanejo aktivne, ker se izboljša dostopnost kisika. Fermentacijska brozga tako vsebuje mešanico peletov in prostega micelija. Razmerje peletov in prostega micelija je odvisno od intenzivnosti delovanja hidrodinamičnih sil. Na rast prostega micelija vplivajo predvsem mehanske sile (intenzivnost mešanja) in ne dostopnost kisika in hranil. Med fermentacijo se zmanjša specifična hitrost rasti peletov in prostega micelija, ker se vakuole v hifah povečajo. Poleg mehanskih sil in staranja hif, je pomemben tudi vpliv prenosa kisika, ki je odvisen od vnosa moči, koncentracije kisika v vstopnem zraku in reologije fermentacijske brozge.



Slika 11: Shematski prikaz modela rasti peletov pri submerzni kultivaciji (Cui in sod., 1998: 218).

Kakšna bo rast, vpliva tudi velikost vcepka. Če je gojišče inokulirano z zelo velikim številom propagul (spore ali fragmenti hif), bo prišlo do velike produkcije biomase in porabe hranil. Inokulacija z majhnim številom propagul vodi v ekstenzivno rast hif in njihovo razvejanje, preden se začne opazna poraba hranil. Nekatere glive (npr. *Penicillium chrysogenum*) bodo rastle v obliki peletov pri majhnem vcepku in filamentozno pri velikem vcepku. Nekatere glive imajo raje samo peletno rast (npr. *Aspergillus nidulans*) ali samo filamentozno rast (npr. *Geotrichum candidum*). Oblika rasti pri submerzni kultivaciji pomembno vpliva na prezračevanje, hitrost rasti, porabo moči pri mešanju in na separacijo biomase od produkta (Carlile in sod., 2001).

### 2.4.3 Submerzna kultivacija višjih gliv

Gojenje medicinsko pomembnih gliv omogoča biosintezo širokega spektra učinkovin, ki imajo protirakaste, protitumorne, protimikrobne in imunostimulatorne lastnosti, lajšajo težave, ki so povezane s povišanim krvnim tlakom in imajo zdravilne učinke pri številnih bolezenskih stanjih. Nabiranje gob v naravi za ta namen je zamudno in komercialno nerentabilno, zato se medicinsko zanimive gobe goji na trdnih gojiščih ali s submerzno kultivacijo v tekočem gojišču. Na ta način se pridobi večjo količino glivine biomase in željenega produkta.

Trenutno se od 80 do 85 % vseh produktov medicinskih gliv proizvede iz trosnjakov gob, ki jih pridobijo z gojenjem na farmah gliv ali nabiranjem v naravi. Le 15 % vseh produktov je ekstrahiranih iz micelija submerzno kultiviranih gliv in nekaj malega iz filtratov teh kultur (Elisashvili, 2012). Gojenje trosnjakov vzame veliko časa in ob upoštevanju nepredvidljivosti vremena in škodljivcev je težko kontrolirati kvaliteto končnega produkta (Tang, 2007). Submerzna kultivacija medicinskih gliv ima torej izjemen potencial v biosintezi farmacevtsko zanimivih učinkovin, ker zagotavlja uniformnost procesa. Z dobrim premešanjem in prezračevanjem deluje kot homogen sistem, ki je podprt s procesno kontrolo. Prednost te tehnologije pred gojenjem na trdnem gojišču je večja produkcija biomase in s tem tudi večja količina polisaharidov in ostalih produktov. Skrajša se čas proizvodnega procesa in zmanjša stopnja tveganja kontaminacij (Cho in sod., 2006). Njena komercializacija zavisi od povečanja izkoristkov produkta in razvoja novih produkcijskih sistemov, ki odpravljajo težave takega načina kultivacije (Elisashvili, 2012). Čeprav je bilo vloženega že veliko truda v raziskave submerzne biosinteze biološko aktivnih metabolitov gliv v bioreaktorjih, to še vedno ni dovolj raziskano področje za uspešen prenos v industrijo.

Večina raziskav submerzne kultivacije medicinsko pomembnih gliv je na stopnji šaržne kultivacije v stresanih kulturah in laboratorijskih bioreaktorjih. Prednost bioreaktorja je v enostavnejši kontroli pogojev kultivacije, kot so temperatura, mešanje, raztopljeni kisik in pH. Vendar ima rast glivine biomase negativne vplive na prenos snovi, produkcijo in sekrecijo metabolitov. Micelij se lahko ovije okrog mešala, nalepi na stene bioreaktorja in povzroči blokade vzorčnega sistema ter cevki za dohranjevanje. Poviša se viskoznost brozge, kar onemogoča dober prenos snovi in kisika. Micelij in peleti so občutljivi na strižne sile. Vse te težave časovno omejujejo kultivacijo v bioreaktorju in otežujejo povečevanje bioprocesov v večje merilo.

Problemi, ki se pojavljajo pri submerzni kultivaciji višjih gliv, so nizka rast micelija v primerjavi z bakterijami, kvasovkami in nižjimi nitastimi glivami. Eden od razlogov je ta, da so medicinsko pomembne glive večinoma v dikariontskem stanju, ki je dolgoživeča oblika življenjskega ciklusa prostotrosov. Z uporabo višjih strižnih sil se doseže pretvorba

iz dikariontskega stanja v monokariontsko, kar vodi v povečano produkcijo biomase in EPS (Smith, 2002). Pretiravanje v to smer pa je lahko škodljivo, ker previsoke strižne sile lahko raztrgajo občutljive skupke glivinih celic, zato se za biosintezo uporabljajo bioreaktorji s posebnimi mešali, običajno z aksialnimi tokovnimi mešali z zaobljenimi lopaticami ali vibracijskimi mešali, ki ustvarjajo nizko strižno polje. Moč, ki je potrebna za mešanje pa se zmanjšuje glede na to, kako intenzivno prezračujemo bioreaktor in kakšen tip mešala uporabljamo.

Pravilna izbira sestave gojišča in parametrov kulture je ključnega pomena za optimalno produkcijo glivine biomase ali metabolitov in za razvoj bioprosesov na industrijskem nivoju (Elisashvili, 2012). Upoštevati je potrebno fizikalne (temperatura, mešanje in prezračevanje) in kemijske dejavnike (pH, substrat), ki so v medsebojni odvisnosti in vplivajo na produkcijo željenega produkta. V nadaljevanju je naštetih nekaj teh dejavnikov in splošnih ugotovitev kako vplivajo na gojenje medicinsko pomembnih gliv z ozirom na posebne značilnosti kulture glive *T. versicolor*.

#### 2.4.3.1 Temperatura

Vpliv temperature na rast glivine biomase in produkcijo BAM za glivo *T. versicolor* ni bil sistematično raziskan. Jo in sod. (2010) so za kultivacijo na PDA ploščah določili temperaturno območje med 25 in 30 °C. V tem temperaturnem razponu so bile izvedene tudi raziskave submerzne kulture (Kim in sod., 2002; Tavares in sod., 2005; Cui in sod., 2007).

#### 2.4.3.2 Mešanje in prezračevanje

Za uspešno aerobno kultivacijo micelijske kulture je potrebno zagotoviti dober snovni prenos hranil, produktov in kisika. Premočno mešanje lahko povzroči poškodbe hif in penjenje gojišča. Optimalno mešanje je torej kompromis med prenosom kisika in negativnim stresom zaradi strižnih sil (Elisashvili, 2012). Običajno je mešanje takih kultur v razponu od 100 do 300 obr./min. Pri submerzni kulturi glive *Ganoderma lucidum* je bila zaznana višja rast micelija pri nizkih hitrostih mešanja, medtem ko je bila produkcija EPS povečana pri višjih hitrostih mešanja (Tang in Zhong, 2004). Možna razlaga za višjo produkcijo EPS pri višjih obratih je v tem, da se zmanjša adsorpcija EPS na celično steno, kar stimulira nadaljnjo biosintezo EPS.

Tang in Zhong (2004) sta pri *G. lucidum* ugotovila, da je limitacija kisika vodila v povečano biosintezo EPS, IPS in ganoderskih kislin. Zaradi manjše rasti biomase pri nizki koncentraciji kisika, pa je končni izplen produktov nižji, kot pri višjem prezračevanju. Podoben fenomen so pri produkciji EPS *T. versicolor* odkrili Rau in sod. (2009).

#### 2.4.3.3 pH

pH vpliva na funkcionalnost celične membrane, sprejem hranil v celico, celično morfologijo in strukturo, topnost soli, ionsko stanje substrata, encimsko aktivnost in biosintezo produkta. Večina študij zajema le vpliv začetnega pH na rast in produkcijo metabolitov (Elisashvili, 2012). Med kultivacijo pH pade, saj poraba glukoze ali drugega vira ogljika vodi v sintezo organskih kislin. Prisotnost amonijevih soli in šibkih pufrov pravtako povzroča padec pH (Borràs in sod., 2008). Pri večini raziskav se začetni pH pri submerzni kultivaciji *T. versicolor* giblje v razponu od 5,00 do 6,00 (Wang in sod., 1996; Kim in sod., 2001; Tavares in sod., 2005; Cui in sod., 2007; Bolla in sod., 2010; Wang in sod., 2012).

Que in sod. (2014) so raziskovali koprodukcijo lakaz in EPS *T. versicolor* v bioreaktorju. Prvih pet dni fermentacije so držali pH 4,0, ki je bil bolj ugoden za sekrecijo lakaz. Nato so pH povišali na 6,0, ki je bil bolj ugoden za sekrecijo EPS. Tako so pridobili 7680 U/L lakaz in 8,2 g/L EPS. Morfologija celic se je pri povišanju pH-ja spremenila iz peletne oblike v dispergirani micelij. Visok delež dispergirane micelije je lahko povezan z visoko produkcijo EPS. Izločeni EPS so bili večinoma po strukturi kisli proteoglikani. Po sestavi monosaharidov, deleža proteinov in povprečne molekularne teže so bili različni od znanih PSP in PSK.

#### 2.4.3.4 Substrat

Prehranske zahteve za rast organizma se razlikujejo od zahtev, ki so potrebne za produkcijo sekundarnih metabolitov. Tako razlikujemo gojišče, ki se uporablja za rast vcepka (vegetativno gojišče) od produkcijskega gojišča. Oba tipa gojišč vsebujeta vir ogljika in dušika in elemente v sledovih (magnezij, natrij, kalij, cink, vitamini itn.). Ponavadi so v obeh tipih gojišč tudi različne sestavine.

Vire hranilnih snovi lahko delimo na kompleksne in kemijsko definirane. Prva so se začela uporabljati v zgodnjem obdobju razvoja fermentacij, ko še ni bilo veliko znanja o metabolizmu mikroorganizmov. So mešanica številnih snovi rastlinskega ali živalskega izvora, od katerih poznamo identičnost in vsebnost le nekaterim. Pri kemijsko definiranih podrobno poznamo njihovo kemično sestavo (Perdih, 1996). V Preglednici 4 so napisane prednosti in slabosti obeh virov hranilnih snovi (Masurekar, 2008).

Pri razvoju nizko-stroškovnih in konkurenčnih bioprosesov za produkcijo BAM se kot potencialni vir organskih snovi širi uporaba kmetijskih in industrijskih lignoceluloznih odpadkov. Primer je submerzna kultura glive *Inonotus obliquus* z dodatkom koruzne slame in moke, ki učinkoviteje proizvaja aktivne fenolne snovi, ki imajo antioksidativni učinek (Xu in Zhu, 2011).

Preglednica 4: Prednosti in slabosti kompleksnih in kemijsko definiranih gojišč.

| Kompleksna |                                                                                                                    | Kemijsko definirana |                                                                                                                                |
|------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| +          | so poceni<br>vsebujejo neznano kritično komponento<br>omogočajo dobro rast<br>njihov razvoj je hiter               | +                   | ni variabilnosti pri sestavinah<br>lažji prenos v večje merilo<br>lažja kontrola procesa<br>manj težav pri zaključnih procesih |
| –          | variabilnost vsebnosti sestavin<br>težji prenos v večje merilo<br>lahko otežijo separacijo pri zaključnih procesih | –                   | višja cena<br>donosi produkta so večinoma nižji                                                                                |

Različni viri ogljika imajo različen vpliv na katabolno represijo celičnega sekundarnega metabolizma. Na splošno pri prostotrošnicah višje začetne koncentracije glukoze vodijo v rast biomase in EPS. Fang in Zhong (2002) sta ugotovila, da izkoristek biomase *G. lucidum* po glukozi pade, ko se poveča začetna koncentracija glukoze od 20 do 65 g/L. Začetna koncentracija glukoze vpliva tudi na velikost peletov. Pri nižjih koncentracijah glukoze so peleti večji, kar je povezano z višjo produkcijo ganoderskih kislin in IPS. Vendar skupni izkoristek željenega produkta ni odvisen samo od njegove vsebnosti v biomasi, ampak tudi od končnega izplena biomase.

Vir dušika se dodaja gojiščem v obliki amonijevih in nitratnih ionov ali kot organsko snov (aminokisline in proteini). Pri prostotrošnicah se pogosto uporabljata kvasni ekstrakt in pepton v koncentracijah od 1 do 5 g/L. Rast micelija je ponavadi stimulirana z organskimi viri dušika, vendar to nujno ne vodi v višjo produkcijo EPS. Dodatek anorganskih virov dušika lahko izboljša produkcijo polisaharidov.

#### 2.4.3.5 Pregled submerznih kultur *Trametes versicolor*

Po Wang in sod. (1996) tipično gojišče za submerzno kultivacijo *T. versicolor* vsebuje na liter destilirane vode naslednje komponente:

- 24 g raztopine krompirjeve dekstroze
- 5 g peptona
- 0,46 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$
- 1,0 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$
- 0,5 g  $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$
- 20 mg vitamina B1

pH gojišča je 6,00. Stresane kulture so gojili sedem dni pri 150 obr./min in 27 °C.

Kim in sod. (2002) so v stresanih kulturah preizkušali vpliv sintetičnega gojišča na rast micelija in produkcijo EPS pri različnih višjih glivah. *T. versicolor* je najbolje rastla in tvorila EPS na gojišču s krompirjevo dekstrozo (PMP). Izplen biomase je bil po desetih dneh kulture 5,26 g/L, izplen EPS pa 1105,2 mg/L. Ugotovili so, da produkcija EPS in kinetika rasti micelija variira glede na vrsto glive. So pa vse glive skozi kultivacijo rastle v obliki peletov.

Cui in Chisti (2003) navajata, da se pri kultivaciji *T. versicolor* za vir ogljika uporabljata glukoza in saharoza. Viri dušika so pepton, kvasni ekstrakt, kvasni prašek, kikirikijeva moka, sojina moka ali sojina omaka (shoyu). Kot pufer se uporablja fosfat, običajno pa je dodan še magnezijev sulfat. Fermentacija poteka med 24 °C in 28 °C pri aerobnih pogojih. pH se med kultivacijo zniža iz 6,5 na 2,5. Fermentacijska brozga postane visoko viskozna zaradi suspendirane filamentozne biomase in ekstracelularnih polimerov.

Tavares in sod. (2005) so preučevali rast *T. versicolor* za produkcijo EPS v stresanih kulturah na petih različnih gojiščih. Največja produkcija EPS (700 mg/L) je bila zaznana na gojišču iz sladno-kvasnega ekstrakta (gojišče YM) pri začetni koncentraciji glukoze 15 g/l in pH 5,5 po sedmih dneh kulture. Visoke začetne koncentracije sladkorjev (40 g/l) so se izkazale inhibitorne za rast glive. Modificirano Tien - Kirk-ovo gojišče (TaK) je bilo najbolj ugodno za rast biomase (4,4 g/L po sedmih dneh kulture).

Študija Lee-ja in sod. (2006) kaže, da je pri submerzni kultivaciji glive za povišano aktivnost PSP pomembna optimizacija časa kulture. Med kultivacijo se je namreč delež proteinov v PSP povečal bolj izrazito, kot delež polisaharidov. Povišana biološka aktivnost in delež proteina v PSP sta verjetno v korelaciji. V pozni fazi kulture, pomanjkanje hranil in kisika spremeni strukturo celične stene, kar se sintetizira manj glukana, kar vpliva na aktivnost PSP.

Cui in sod. (2007) so izvedli kultivacijo sevov ATCC-20545 (CM-103) in Wr-74 na gojišču z mlečnim permeatom v bioreaktorju. Pridobili so od 8,9 do 10,6 g/L biomase, od 1132 do 1150 mg/L EPS in od 85 do 95 mg/L IPS po sedmih dneh kulture.

Lin in sod. (2008) so gojili sev LH1 v bioreaktorju sedem dni na gojišču obogatenem z ekstraktom sadeža rastline *Lycium barbarum* (ekstrakt goji jagod). Karakterizirali so kemijske lastnosti in imunomodulatorno aktivnost EPS. Ekstrakt je stimuliral rast micelija (3,71 g/L) in EPS (1,66 g/L), čeprav bioaktivno komponento, ki stimulira rast, niso določili. Spremenil pa se ni samo izkoristek ampak tudi kemijske karakteristike EPS.

Elisashvili in sod. (2009) so izvedli študijo vpliva različnih virov ogljika in dušika na produkcijo EPS pri osmih prostotrošnicah. Glede na produkcijo biomase in EPS je bilo za *T. versicolor* najbolj ugodno gojišče z maltozo in amonijevim sulfatom.

Rau in sod. (2009) so z gojenjem seva ATCC 200801 na sintetičnem minimalnem gojišču pridobili 4,1 g/L EPS. Njihova študija je pomembna, ker so ugotovili, da se produkcija EPS poveča v fazi pomanjkanja kisika. To razlagajo z delovanjem glukon sintaze, ki ni odvisna od vsebnosti kisika. Polisaharidi se prek lizinskih mostičkov vežejo na hitin, ki pa ga je manj zaradi nižje tenzije kisika. Zato se poveča sekrecija polisaharidov, ker jih encim kljub pomanjkanju kisika stalno izdeluje, dokler ne zmanjka hranil.

Bolla in sod. (2010) so preučevali vpliv vira ogljika in dušika na produkcijo biomase in EPS. Na gojišču s fruktozo je *T. versicolor* v sedmih dneh proizvedla najvišjo koncentracijo EPS (8 g suhe teže/l), na gojišču z želatino pa je v 14 dneh proizvedla najvišjo koncentracijo biomase (11 g suhe teže/l).

Tišma in sod. (2010) so postavili matematični model rasti za *T. versicolor*. Glivo so submeržno gojili kot stresano kulturo v erlenmajericah na substratih glukoze, fruktoze in saharoze. Hitrost konverzije substrata saharoze z encimom glive (invertaza) so opisali z Michaelis-Mentenovo enačbo, specifično hitrost rasti glive na substratih glukoze in fruktoze pa z Monod-ovo enačbo. Postavljen model zadovoljivo opiše eksperimentalne rezultate, saj se ob različnih koncentracijah substrata matematični in eksperimentalni rezultati dobro ujemajo.

Arteiro in sod. (2012) so s stresanimi kulturami preučevali različne vire ogljika na produkcijo glivine biomase, EPS in IPS. Največ biomase (6,45 g/L) so pridobili na gojišču z odpadnim materialom predelave sladkorne pese. Najvišjo koncentracijo EPS in IPS (550,5 mg/L in 25 mg/L) so pridobili na gojišču s paradižnikovo mezgo. Ugotovili so, da rahlo mešanje (150 obr./min) omogoči boljši prenos kisika in hranil. Peleti so manjši in sferične oblike (Slika 12). Rezultati produkcije potrjujejo, da so EPS in IPS primarni metaboliti, saj jih gliva najbolj producira v eksponentni fazi rasti.

Wang in sod. (2012) so optimizirali gojišče za rast glivine biomase in EPS v stresanih kulturah. Optimizirano gojišče je vsebovalo glukozo 30 g/L, kvasni ekstrakt 7 g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2 g/L,  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  0,5 g/L. Začetni pH gojišča je bil 6,00, temperatura gojenja 27 °C, 8 % vcepek in razmerje med gojiščem in volumnom erlenmajerice 150 mL/500 mL. Po šestih dneh kultivacije so pridobili 5,18 g/L biomase in 0,64 g/L EPS. Poizkus so izvedli še v 5-L bioreaktorju, kjer je bil izplen višji (8,55 g/L biomase in 0,75 g/L EPS).



Slika 12: Peleti *T. versicolor* pri submerzni kultivaciji na stresalniku (Arteiro in sod., 2012: 941).

### 3 MATERIAL IN METODE

#### 3.1 APARATURE

- Avtomatski nanašalec vzorcev na TLC ATS4 (Camag, Švica)
- Avtoklav (Sutjeska, Jugoslavija)
- Bioreaktor KLF200, 3L (Bioengineering, Švica)
- Centrifuga Rotina (Hettich, Nemčija)
- Grelec (CAMAG, Švica)
- Visokoločljivostna tekočinska kromatografija (Thermo separation products, ZDA)
- Imerzijski aparat (Camag, Švica)
- Jedrsko magnetno resonančni spektroskop (Varian, ZDA)
- Kamera CAMAG reprostar 3 (Camag, Švica)
- Laminarij Iskra Pio LFVP 12 (Iskra, Slovenija)
- Masni spektrometer (MS-LCQ; Thermo Filter Scientific, ZDA)
- Mešalnik (Warning Commercial, ZDA)
- pH meter Iskra MA-5730 (Iskra, Slovenija)
- Precizna tehtnica (Sartorius, Nemčija)
- Rotavapor (Büchi, Švica)
- Stresalnik IKA KS4000i (IKA, Nemčija)
- Stresalnik Innova 4230 (New Brunswick Scientific, ZDA)
- Sušilnik Sterimatic ST-11 (Instrumentaria Zagreb, Jugoslavija)
- Tehtnica ET 111 (Tehtnica Železniki, Slovenija)
- TLC-MS vmesnik (Camag, Švica)
- Ultrazvočna kopel (Tehtnica Železniki, Slovenija)
- Vorteks mešalo (Tehtnica Železniki, Slovenija)

#### 3.2 KEMIKA LIJE

##### 3.2.1 Sestavine gojišč

- Asparagin monohidrat (Merck, Nemčija)
- D-manitol (Merck, Nemčija)
- Dekstroza monohidrat (Roquette, Francija)
- $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Merck, Nemčija)
- Krompirjev dekstrozni agar (Biolife, Italija)
- Krompirjeva dekstroza (Difco, Francija)
- Kvasni ekstrakt (Biolife, Italija)
- $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$  (Riedel-De Häen, Nemčija)

- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (Merck, Nemčija)
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$  (Merck, Nemčija)
- Pepton (Biolife, Italija)
- Sladni ekstrakt (Biolife, Italija)
- Tiamin diklorid (Merck, Nemčija)

### 3.2.2 Reagenti za analitske metode

- Anizaldehid
- Diklorometan
- Etanol absolutni
- Etil acetat
- Kloroform
- Metanol
- Mravljična kislina
- Ocetna kislina
- Toluen
- Žveplena kislina

## 3.3 ORGANIZEM

Uporabljali smo glivo *Trametes versicolor* (L. ex Fr.) Pilát Tv6 iz glivine banke (BFWS) Biotehniške fakultete, Oddelka za lesarstvo, Katedre za patologijo in zaščito lesa. Gliva je bila izolirana 23.9.1998 iz štora bukve v Strugu (Občina Makole).

## 3.4 VZDRŽEVANJE KULTURE

Micelijsko kulturo smo vzdrževali na poševnem gojišču (poševnik) iz krompirjevega dekstroznega agarja (PDA). Gojišče smo pripravili tako, da smo 42 g dehidriranega pripravka rehidrirali v enem litru destilirane vode in ga sterilizirali v avtoklavu 20 minut pri 121 °C oz. 1,2 bar-a. Ohlajenega smo v laminariju pipetirali v 15 ml sterilne centrifugirke. Centrifugirke smo dali v pol ležeč položaj, da se je agar poševno strdil.

Tako pripravljene poševnike smo inokulirali pod sterilnimi pogoji v laminariju, tako da smo z luknjačem prenesli en kolut, premera 0,5 cm, originalne kulture iz petrijeve plošče. Kulturo smo inkubirali en teden v inkubatorju pri 28 °C. Po enem tednu smo v laminariju poševnike s kulturo prelili s sterilnim parafinskim oljem in jih shranili v hladilnik.

Revitalizacijo kulture smo opravili en teden pred inokulacijo stresanih kultur. Kulturo smo nacepili pod sterilnimi pogoji v laminariju iz poševnika na petrijevko s PDA in

inkubirali en teden pri 28 °C. Na ploščo PDA se je vedno nacepilo tri kolute razraščene kulture.

### 3.5 IZBOR GOJIŠČA ZA PRIPRAVO VCEPKA

Izbrali smo štiri gojišča (Preglednica 5), ki so primerna za produkcijo biomase *T. versicolor*. Posameznemu gojišču smo umerili pH na 5,5 in ga razdelili v štiri erlenmajerice v razmerju 150 mL / 500 mL. Pri pripravi gojišča PMP smo krompirjevo dekstrozo prekuhali 1 minuto v vreli vodi, da se je popolnoma raztopila. Sterilizacija gojišč je potekala 20 minut v avtoklavu pri 121 °C oz. 1,2 bar-a.

Preglednica 5: Izbrana gojišča za produkcijo biomase vcepka (Kim in sod., 2002; Tavares in sod., 2005; Elisashvili in sod., 2009; Wang in sod., 2012). Vse vrednosti sestavin so v g/L.

| MY                                              |     | GY                                    |     | PMP              |    | modificiran TaK                       |       |
|-------------------------------------------------|-----|---------------------------------------|-----|------------------|----|---------------------------------------|-------|
| D-manitol                                       | 20  | glukoza                               | 30  | kromp. dekstroza | 24 | glukoza                               | 10    |
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | 2   | kvasni ekstrakt                       | 7   | sladni ekstrakt  | 10 | sladni ekstrakt                       | 10    |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                 | 0,8 | KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>       | 2   | pepton           | 1  | pepton                                | 2     |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>                | 0,4 | MgSO <sub>4</sub> × 7H <sub>2</sub> O | 0,5 |                  |    | kvasni ekstrakt                       | 2     |
| MgSO <sub>4</sub> × 7H <sub>2</sub> O           | 0,5 |                                       |     |                  |    | asparagin                             | 1     |
| kvasni ekstrakt                                 | 3   |                                       |     |                  |    | KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>       | 2     |
|                                                 |     |                                       |     |                  |    | MgSO <sub>4</sub> × 7H <sub>2</sub> O | 1     |
|                                                 |     |                                       |     |                  |    | tiamin                                | 0,001 |

Pri vsakem gojišču smo pod sterilnimi pogoji v laminariju nacepili tri erlenmajerice, ena pa je služila za kontrolo. Vsako erlenmajerico (razen kontrol) se je nacepilo s petimi koluti (premer 0,5 cm) en teden stare kulture iz plošče s PDA. Po nacepljanju smo jih inkubirali na stresalniku šest dni pri 27 °C in 150 obr./min.

### 3.6 SUBMERZNA KULTIVACIJA V BIOREAKTORJU

#### 3.6.1 Priprava vcepka

Za pripravo vcepka pred kultivacijo v bioreaktorju, smo izbrali gojišče PMP. Za kultivacijo smo potrebovali 10 % vcepek (~200 mL), zato smo vedno pripravili tri erlenmajerice vcepka. Postopek priprave in nacepljanja je bil enak kot pri izboru gojišč (Podpoglavje 3.5). Inkubirali smo sedem dni pri 27 °C in 150 obr./min (Slika 13).

Po inkubaciji smo pripravili tekoči vcepek. V laminariju smo vsebino dveh en teden starih stresanih kultur prelili v mešalnik in mešali približno 5 sekund. 200 mL tako homogeniziranega vcepka smo prelili v sterilno steklenico in ga prečrpali v bioreaktor.



Slika 13: Stresana kultura *T. versicolor* po sedmih dneh kulture.

### 3.6.2 Priprava bioreaktorja

Priključke za bioreaktor (vstopni filter, vzorčilnik, protipenilec, steklenica za vcepek) smo sterilizirali 20 minut v avtoklavu pri temperaturi 121 °C oz. tlaku 1,2 bar-a. Pripravljeno gojišče smo umerili na pH 5,5. Bioreaktor z gojiščem smo nato sterilizirali 20 minut pri temperaturi 121 °C. Ko se je reaktor začel ohlajati in je temperatura padla pod 100 °C, smo ob ognju priključili vse sterilne priključke. Bioreaktor smo inokulirali z vcepkom pri začetnih pogojih 28 °C, mešanje z 200 obr./min in pretokom zraka 0,5 vvm.

Kultivacija je potekala v naslednjih gojiščih:

- GPY: glukoza 35 g/L, kvasni ekstrakt 5 g/L, pepton 5 g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1 g/L,  $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$  0,5 g/L, tiamin 0,05 g/L.
- YM: glukoza 15 g/L, sladni ekstrakt 3 g/L, pepton 5 g/L, kvasni ekstrakt 5 g/L.

### 3.6.3 Kontrola bioprocesa

Med kultivacijo smo vzdrževali  $\text{pO}_2$  nad 50 %, tako da smo dvigovali prepihanje z zrakom do 1 vvm in mešanje do maksimalno 400 obr./min. Po potrebi smo ročno dodajali protipenilec. Vsak dan smo vzorčili približno 40 mL, izmerili pH vzorca in ga za nadaljnje analize shranili v zmrzovalniku na -20 °C.

### 3.7 ANALIZNE METODE

#### 3.7.1 Določevanje biomase

Vzorci brozge smo filtrirali pod znižanim tlakom z Büchnerjevim lijem in vakuumsko črpalko (nučiranje) čez predhodno stehtane filter papirje tipa 388 (Sartorius Stedim, Nemčija). Filtrne papirje z biomaso smo sušili pri 100 °C do konstantne mase, jih postavili v eksikator, ter ponovno stehtali.

#### 3.7.2 Določevanje zunajceličnih polisaharidov

V predhodno stehtane centrifugirke smo zatehtali 5 g filtrata, ki je ostal po filtraciji brozge. Nato smo jim dodali tri kratni volumen absolutnega etanola (15 mL), dobro premešali in postavili čez noč v hladilnik na 4 °C. Oborjene polisaharide v vzorcih smo ločili s centrifugiranjem 20 minut pri 4500 obr./min. Po končanem centrifugiranju smo supernatant odlili in dodali 15 ml 75 % etanola ter jih dobro premešali. Sledilo je ponovno centrifugiranje 20 minut pri 4500 obr./min. Po drugem centrifugiranju smo prav tako odlili supernatant. Centrifugirke z oborjenimi polisaharidi smo sušili pri 100 °C do konstantne mase, jih postavili v eksikator, ter ponovno stehtali.

#### 3.7.3 Določevanje znotrajceličnih polisaharidov

Vzorci brozge smo centrifugirali 20 minut pri 4500 obr./min in odlili supernatant. Dodali smo jim 10 mL dH<sub>2</sub>O in jih avtoklavirali eno uro pri 121 °C in 1,2 bar-a. Po avtoklaviranju smo vzorce dobro premešali in centrifugirali 20 minut pri 4500 obr./min. Nadaljnji postopek je enak kot pri določanju zunajceličnih polisaharidov (Podpoglavje 3.7.2), le da smo zatehtali 5 g supernatanta in ne filtrata.

#### 3.7.4 Določevanje koncentracije sladkorjev

V epice smo pipetirali 2 mL filtrata, ki je ostal po filtraciji brozge, in jih centrifugirali 10 minut pri 14000 obr./min. V vialah smo pripravili pet krat redčene vzorce supernatantov in jih analizirali z visokoločljivostno tekočinsko kromatografijo (HPLC). Poleg naših vzorcev smo merili tudi standarde (10 g/L) v treh ponovitvah. Merilo se je glavni vir ogljika, kar je v večini primerov bila glukoza. Koncentracijo sladkorja (g/L) smo izračunali z enačbo (1):

$$C = \frac{A}{A_s} \times C_s \times R \quad \dots (1)$$

|                |                                             |
|----------------|---------------------------------------------|
| A              | površina vzorca                             |
| A <sub>s</sub> | povprečna površina treh standardnih vzorcev |
| C <sub>s</sub> | koncentracija standardnega vzorca (10 g/L)  |
| R              | faktor redčitve (5)                         |

### 3.7.5 Tenkoplastna kromatografija (TLC)

Določevali smo prisotnost ostalih neznanih spojin v biomasi *T. versicolor*. Po končani kultivaciji smo pridobili biomaso micelija s centrifugiranjem brozge 20 minut pri 4500 obr./min. Supernatant in biomaso smo shranili v zmrzovalniku na -20 °C.

Ostale neznane spojine smo določevali s tenkoplastno kromatografijo na HPTLC silika gelu 60. Plošče s silika gelom smo predsprali v mešanici kloroform : metanol 1:1 (v/v) v kadički s prekatom. Po predspiranju smo jih sušili 30 minut pri 110 °C.

#### 3.7.5.1 Priprava vzorcev

Zamrznjeno biomaso micelija smo pustili stati pri sobni temperaturi, da se je odtalila. V vialo smo zatehtali 100 mg biomase in ji dodali 1 mL topila. Za boljšo vidljivost vzorcev smo pri enem poskusu zatehtali 500 mg biomase in ji dodali 1 mL topila. Kot topilo smo uporabili kloroform, etanol, diklorometan, metanol in mešanico kloroform : metanol 2:1 (v/v). Tako pripravljene vzorce smo postavili v ultrasonično kopel za 5 minut. Tekočino iz vsakega vzorca smo prefiltrirali skozi 0,45 mikronski filter PVDF v vialo. Po istem postopku smo analizirali tudi supernatant in filtrat lizata celic.

#### 3.7.5.2 Nanašanje vzorcev

Vzorci smo nanašali na plošče s pomočjo avtomatskega nanašalca vzorcev na TLC. Glede na izvedeno analizo in število vzorcev smo jih nanašali na 10 × 10 cm ali 20 × 10 cm plošče. Razmak od spodnjega roba plošče je bil 15 mm, od levega roba pa 10 mm. Razmak med nanešenimi vzorci je bil odvisen od števila nanosov na plošči. Nanos posameznega vzorca na ploščo je bil 10 µL.

#### 3.7.5.3 Razvijanje

Vzorci na plošči smo trojno razvijali v kadički s prekatom. Za mobilno fazo smo uporabili mešanico toluen : etil acetat : metanol : mravljična kislina 15 : 15 : 1 : 0,1. Razvijali smo do 30, 60 in 80 mm. Za vsako razvijanje smo uporabili 15 ml sveže mobilne faze.

Vzorci smo razvijali do 80 mm tudi v horizontalni kadički. Za razvijanje smo uporabili 3 mL mobilne faze n-heksan : etil acetat 5:1 (v/v). Po vsakem razvijanju smo ploščo sušili približno 1 minuto s sušilnikom za lase. Ploščo smo derivatizirali tako, da smo jo z imerzijsko aparaturo za 2 sekundi potopili v anizaldehid in jo potem z grelcem sušili 5 minut pri 110 °C. Vzorce smo slikali in dokumentirali s kamero pod UV in vidno svetlobo.

### 3.7.6 TLC-MS analiza

Določevali smo maso neznanih spojin v biomasi micelija *T. versicolor*, ki smo jih pridobili s TLC analizo. Po končani kultivaciji smo pridobili biomaso s centrifugiranjem brozge 20 minut pri 4500 rpm. Supernatant in biomaso smo shranili v zmrzovalniku pri -20 °C.

Spojine smo razvili s tenkoplastno kromatografijo na HPTLC silika gelu 60. Plošče s silika gelom smo predsprali v mešanici kloroform : metanol 1:1 (v/v) v kadički s prekatom. Po predspiranju smo jih sušili 30 minut pri 110 °C.

#### 3.7.6.1 Priprava vzorcev

Zamrznjeno biomaso smo pustili stati pri sobni temperaturi, da se je odtalila. V vialo smo zatehtali 1 g biomase micelija in ji dodali 10 mL mešanice kloroform : metanol 2:1 (v/v). Tako pripravljen vzorec smo postavili v ultrasonično kopel za 5 minut in ga postavili na stresalnik s stresanjem 220 obr./min za eno uro. Vzorec smo centrifugirali 3 minute pri 4500 obr./min. 1,5 mL supernatanta smo centrifugirali 10 minut pri 14000 obr./min. V vialo smo pipetirali 600 µL supernatanta.

#### 3.7.6.2 Nanašanje vzorcev

Vzorci smo nanašali na plošče s pomočjo avtomatskega nanašalca vzorcev na TLC na 10 × 10 cm plošče. Razmak od spodnjega roba plošče je bil 15 mm, od levega roba pa 10 mm. Na ploščo smo nanosili 7 nanosov po 10 µL istega vzorca.

#### 3.7.6.3 Razvijanje

Vzorci na plošči smo razvijali v kadički s prekatom. Za mobilno fazo smo uporabili mešanico n-heksan : etil acetat 5:1 (v/v). Razvijali smo do 80 mm. Za vsako razvijanje smo uporabili 5 ml sveže mobilne faze.

Po razvijanju smo ploščo sušili približno 1 minuto s sušilnikom za lase. Ploščo smo derivatizirali tako, da smo z imerzijsko aparaturo za 2 sekundi potopili v anizaldehid le prvi nanos in jo potem z grelcem sušili 5 minut pri 110 °C. Vzorci smo slikali in dokumentirali s kamero pod UV in vidno svetlobo.

#### 3.7.6.4 Določevanje mase z masnim spektrometrom

Na razvito ploščo smo s svinčnikom in ravnilom narisali črte vodoravno in navpično za prepoznavo lokacije razvitih spojin. Orientirali smo se na podlagi derivatiziranega nanosa in razmaka med nanosi vzorca.

Za elucijo spojin iz TLC plošč v ionsko past LCQ smo uporabili TLC-MS vmesnik. Kot eluent smo uporabili acetonitril pri pretoku 0,3 mL/min. Masni spekter smo pridobili z ionizacijo molekul s kemijsko ionizacijo pri atmosferskem pritisku (APCI) v pozitivnem stanju. Za ločitev ozadja od razvitih spojin smo uporabili mobilno fazo na neuporabljenem delu silikagela TLC plošče. Pridobljene spektre smo pregledali in ločili šum od potencialnih spojin, ki so se razvile na plošči. Maso potencialne spojine smo izračunali z enačbo (2):

$$m/z = [m_s + H]^+ \quad \dots (2)$$

in ob upoštevanju mase vode z enačbo (3):

$$m/z = [m_s + H - H_2O]^+ \quad \dots (3)$$

|                  |                                              |
|------------------|----------------------------------------------|
| m/z              | razmerje med maso spojine in ionskim nabojem |
| m <sub>s</sub>   | molska masa spojine                          |
| H                | molska masa vodikovega iona (1 Da)           |
| H <sub>2</sub> O | molska masa vode (18 Da)                     |

Za vsako potencialno spojino na spektru smo izračunali dve molski masi. Po literaturi smo iskali katere spojine bi hipotetično lahko bile.

### 3.7.7 Dodatne analize

#### 3.7.7.1 Priprava vzorca

Zmrznjeno biomaso iz submerzne kultivacije micelija v gojišču YM smo pustili stati pri sobni temperaturi, da se je odtalila. V erlenmajerico smo zatehtali 31,76 g biomase in ji dodali 300 mL mešanice kloroform : metanol 2:1 (v/v). Tako pripravljen vzorec smo postavili v ultrasonično kopel za 5 minut in ga postavili na stresalnik s stresanjem 220 obr./min za eno uro. Ostanke biomase smo odstranili tako, da smo vzorec filtrirali v bučko skozi frito s pomočjo vakuumske črpalke. Ekstrakt smo evaporirali, da smo odstranili kloroform in metanol.

Da bi čim bolj odstranili ostanke vode, smo evaporiranemu vzorcu dodali etil acetat in z lijem ločnikom ločili vodni sloj od organskega (Slika 14). Ločbo smo opravili tri krat. Zbranemu organskemu sloju smo dodali slanico in ponovno ločili z lijem ločnikom organski del od vodnega. V organski sloj smo dodali natrijev sulfat in filtrirali vzorec z vakuumsko črpalko. Tako pripravljen vzorec smo evaporirali, ga sprali z diklorometanom in ponovno evaporirali ter stehali.



Slika 14: Ločevanje vodnega sloja od organskega.

#### 3.7.7.2 Preparativna TLC

Pripravljen vzorec iz Podpoglavja 3.7.7.1 smo raztopili v etil acetatu in ga razvijali na majhnih TLC ploščah z mobilno fazo n-heksan : etil acetat v različnih razmerjih, da smo določili zadovoljivo ločbo, tj. n-heksan : etil acetat 8:2 (v/v). Ves preostali vzorec smo nanесли na preparativno TLC ploščo in ga pet krat razvijali v kadički s prekatom z mobilno fazo n-heksan : etil acetat 8:2 (v/v).

Razvite lise smo izluščili s skalpelom in jih strli v terilnici do praškaste oblike. Prašek smo nanесли na frito in ga spirali z etil acetatom s pomočjo vakuumске črpalke. Za vsako liso smo v bučko zbrali približno 250 ml raztopine.

Z evaporiranjem raztopin smo izločili etil acetat. Suha snov je bila v obliki rumenega olja. Evaporate smo nato raztopili v manjši količini etil acetata in ga prenesli v stehtane vialе. Raztopine v vialah smo ponovno evaporirali, da smo dobili skupno težo snovi v lisah. Vse evaporate smo do analize z jedrsko magnetno resonanco (NMR) shranili v hladilnik. Pred analizo smo evaporate raztopili v etil acetatu. Vzorce posameznih lis smo analizirali tudi z MS.

### 3.7.7.3 Jedrska magnetna resonanca (NMR)

Za NMR analizo smo uporabili vzorec lise II (Slika 24), ker je vseboval dovolj suhe snovi. Vzorec smo evaporirali. 15 mg vzorca smo raztopili v devteriranem kloroformu ( $\text{CDCl}_3$ ) in pripravili raztopino za  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  in  $^{13}\text{C}$ -APT (ang. attached proton test) NMR analizo. NMR spekter smo posneli na 300 MHz Varian spektrometru.  $^1\text{H}$  (300 MHz, notranji standard tetrametilsilan oz.  $\text{Me}_4\text{Si}$ ),  $^{13}\text{C}$  (75 MHz, notranji standard  $\text{CDCl}_3$ ) in  $^{13}\text{C}$ -APT (75 MHz, notranji standard  $\text{CDCl}_3$ ) smo posneli za raztopine v  $\text{CDCl}_3$ . S pregledom spektrov smo pridobili podatke o številu C in H atomov in sklepali o kategoriji spojine. Število dvojnih ali trojnih vezi in prisotnost obročev smo izračunali z indeksom manjka kisika (IHD).

Indeks manjka kisika (IHD) za molekulo z generično molekularno formulo  $\text{C}_c\text{H}_h\text{N}_n\text{O}_o\text{X}_x$  smo izračunali s spodnjo enačbo:

$$IHD = \frac{(2c + 2 - h - x + n)}{2} \quad \dots (4)$$

c = število C atomov

h = število H atomov

n = število N atomov

o = število O atomov

x = število halogenih atomov

## 4 REZULTATI

### 4.1 IZBOR GOJIŠČA ZA PRIPRAVO VCEPKA

Po šestih dneh kultivacije na stresalniku je največ glivine biomase nastalo v gojišču PMP (3,87 g/L), kar je približno za 2 g/L več kakor v gojišču z manitolom (MY). Produkcija EPS je bila pri vseh gojiščih v območju od 450 do 600 mg/L (Preglednica 6). Poraba vira ogljika v šestih dneh kultivacije je bila 4,26 g/L v gojišču GY, 1,11 g/L v gojišču TaK in 0,77 g/L v gojišču MY. Pri gojišču PMP se ni dalo oceniti porabo glukoze, ker je kompleksno gojišče in je koncentracija glukoze verjetno nihala zaradi sprotne razgradnje krompirjeve dekstroze.

Za rast biomase je bilo najbolj ugodno PMP gojišče, zato smo ga izbrali za pripravo vcepka za kultivacijo v bioreaktorju. Pri gojišču GY in TaK je poraba glukoze šla bolj v smer produkcije EPS.

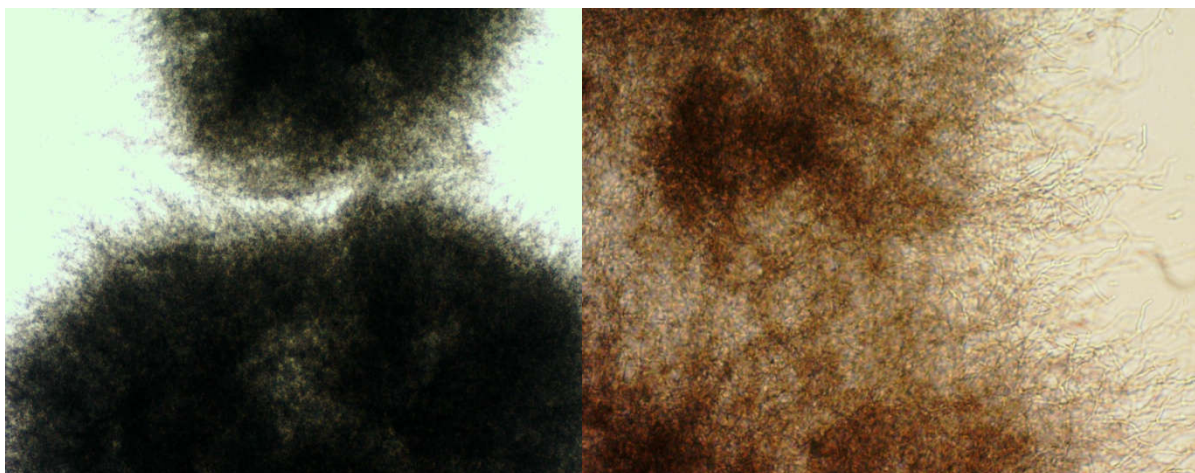
Preglednica 6: Povprečna suha teža biomase, zunajceličnih polisaharidov in povprečna končna koncentracija vira ogljika pri gojenju na različnih gojiščih.

| Gojišče      | Suha teža biomase<br>[g/L] | Suha teža zunajcel.<br>polisaharidov<br>[mg/L] | Vir ogljika<br>[g/L] |         |
|--------------|----------------------------|------------------------------------------------|----------------------|---------|
| PMP          | 3,87                       | 460                                            | 9,92                 | glukoza |
| PMP kontrola |                            |                                                | 8,83                 | glukoza |
| GY           | 3,29                       | 593,33                                         | 11,30                | glukoza |
| GY kontrola  |                            |                                                | 15,56                | glukoza |
| MY           | 1,97                       | 513,33                                         | 10,40                | manitol |
| MY kontrola  |                            |                                                | 11,17                | manitol |
| TaK          | 3,76                       | 593,33                                         | 3,03                 | glukoza |
| TaK kontrola |                            |                                                | 4,14                 | glukoza |

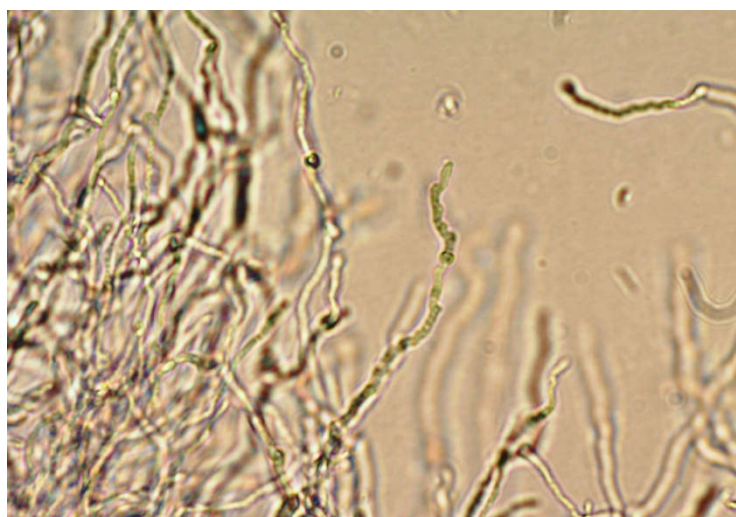
### 4.2 SUBMERZNA KULTIVACIJA V BIOREAKTORJU

#### 4.2.1 Submerzna kultivacija v gojišču GPY

Proces smo ustavili po 193 urah, ko je bila porabljena glukoza. Na Slikah 15 in 16 je viden micelij glive, fotografiran v eksponencialni fazi.

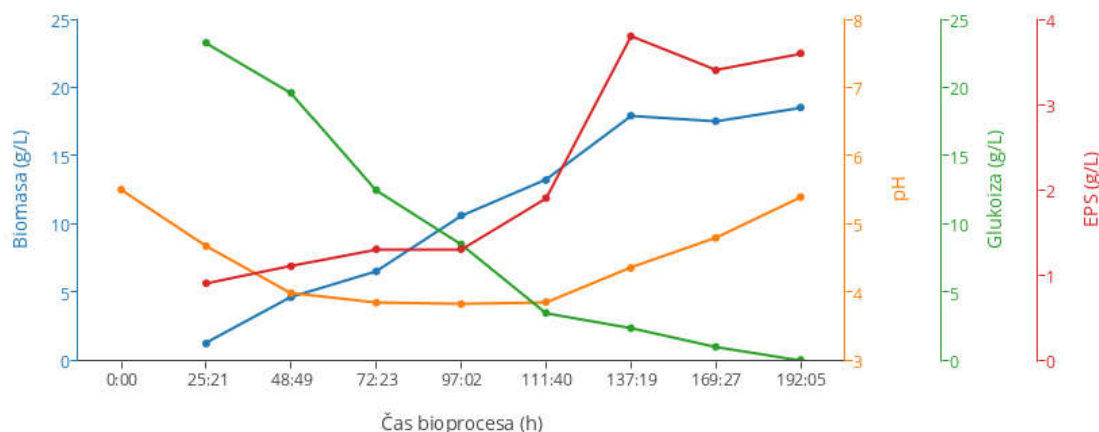


Slika 15: Micelij *T. versicolor* pri submerzni kultivaciji na gojišču GPY (levo 40×, desno 100× povečava).



Slika 16: Micelij *T. versicolor* pri submerzni kultivaciji na gojišču GPY (400× povečava).

Volumen gojišča se je zmanjšal iz začetnih 2,2 L na približno 1,2 L, zato je bila brozga zelo viskozna. Meritve  $pO_2$  so bile po drugem dnevu nezanesljive, ker se je membrana  $pO_2$  elektrode preveč zamazala z brozgo. Končni izplen biomase je bil 18,5 g/L, verjetno pa še več, ker jo je nekaj ostalo na stenah in mešalih bioreaktorja. Produkcijo znotrajceličnih polisaharidov ni bilo zaznati, medtem ko je produkcija zunajceličnih polisaharidov narasla po 110 urah kultivacije in se ustalila na končni koncentraciji 3,8 g/L. pH je v 72 urah kultivacije padel iz 5,50 na 3,82. Po porabi glukoze, zaradi povečane produkcije zunajceličnih polisaharidov, se je začel višati do 5,39. Višanje pH je dober indikator dogajanja med kultivacijo, saj se je podobno dogajalo tudi pri gojišču YM. Grafikon gibanja *off-line* meritev tekom procesa je prikazan na Sliki 17.

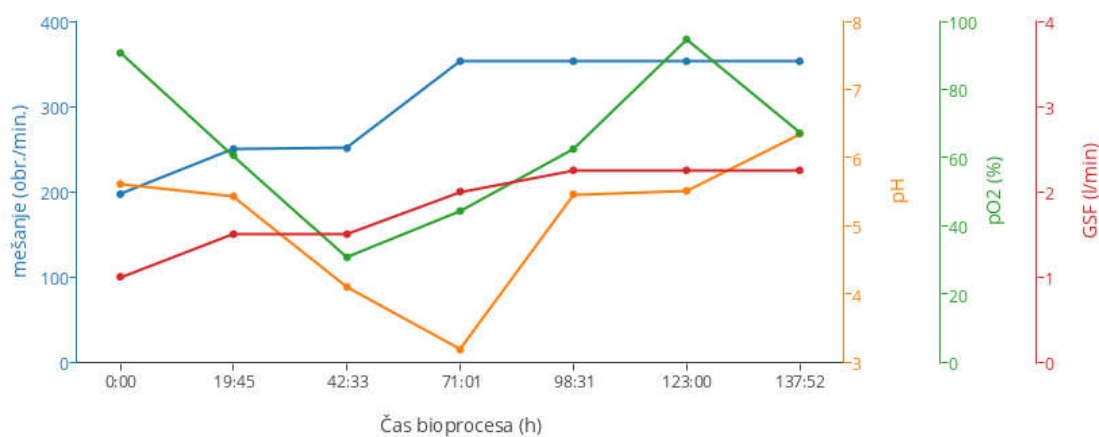


Slika 17: Rast biomase, poraba glukoze, produkcija EPS in realni pH med submerzno kultivacijo micelija *T. versicolor* v gojišču GPY.

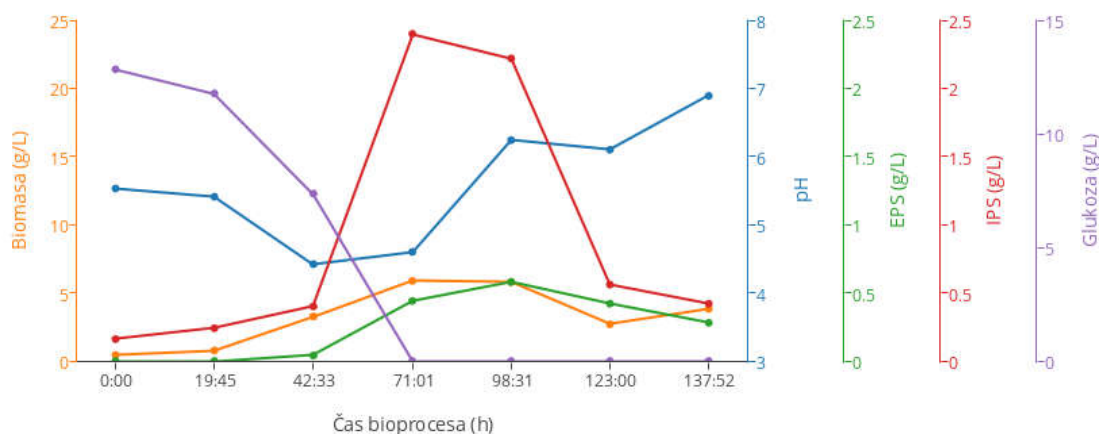
#### 4.2.2 Submerzna kultivacija v gojišču YM

Bioproces v gojišču YM je potekal hitreje, zato smo ga ustavili po 140 urah. Mešanje in prezračevanje smo uravnavali glede na *on-line* meritev  $pO_2$ . Po 42 urah smo mešanje in prezračevanje povišali, ker je  $pO_2$  padel na 30 %. Po približno 80 urah ter do konca fermentacije smo  $pO_2$  držali nad 50 %. Volumen gojišča se je, tako kot pri bioprocesu v GPY gojišču, zmanjšal za polovico. Po 70 urah je nastalo 5,88 g/L biomase, potem pa je po meritvah začela upadati. Proti koncu fermentacije je veliko biomase ostalo na stenah in mešalih bioreaktorja, brozga pa je bila zelo nehomogena in posledično tudi nadaljnje meritve ne odražajo pravega stanja.

Produkcija IPS in EPS je naraščala do 98 ure kultivacije, nato je koncentracija polisaharidov začela naglo upadati. Najvišja koncentracija IPS v brozgi je bila 2,22 g/L, najvišja koncentracija EPS pa 0,58 g/L. pH gojišča je v prvih 70 urah fermentacije padel iz 5,61 na 3,18, nato pa začel naraščati do 6,35. Naraščanje pH je sovpadalo s porabo glukoze v gojišču. Tudi za skokovit padec koncentracije glivinih polisaharidov je možno pomanjkanje glukoze v gojišču. Grafikona gibanja *on-line* parametrov in *off-line* meritev tekom procesa sta prikazana na Slikah 18 in 19.



Slika 18: Gibanje *on-line* parametrov med submerzno kultivacijo micelija *T. versicolor* v gojišču YM.



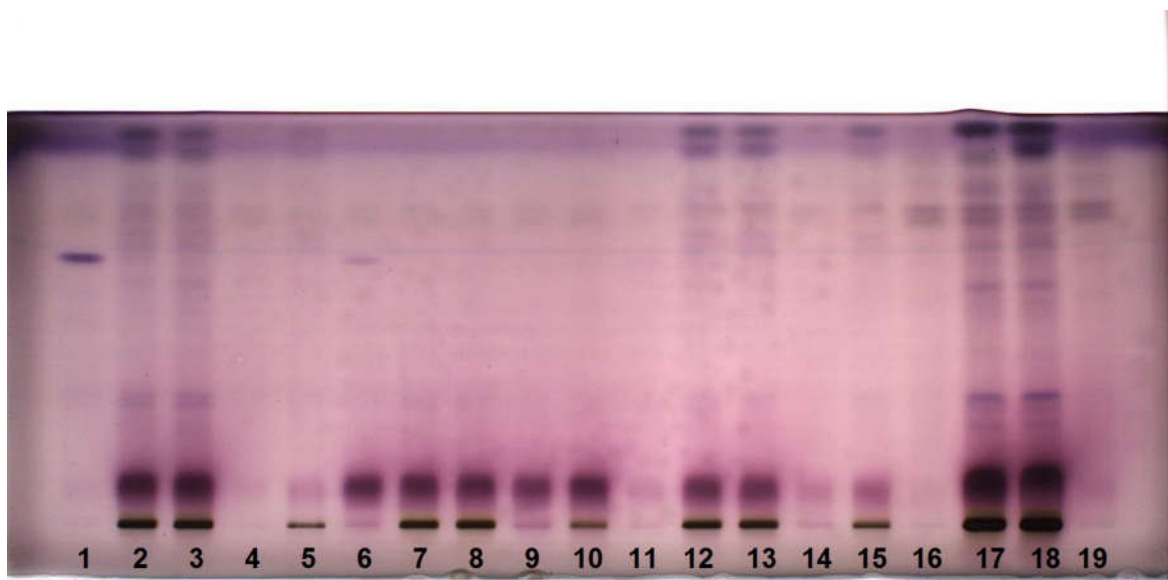
Slika 19: Rast biomase, realni pH, produkcija EPS, IPS in poraba glukoze med submerzno kultivacijo micelija *T. versicolor* v gojišču YM.

#### 4.3 ANALIZE OSTALIH PRODUKTOV

##### 4.3.1 TLC brozge iz submerzne kulture v GPY gojišču

Pri razvijanju ekstraktov biomase micelija so se pojavile težave, kot so slaba vidnost ali popolna odsotnost lis, zaradi lize celic med prehodnim hranjenjem v hladilniku. Da bi ugotovili vzrok, smo v analizo vključili večje zatehte biomase in lizat celic iz vzorca hranjenega v hladilniku. Lizat celic smo predhodno filtrirali skozi filtrni papir.

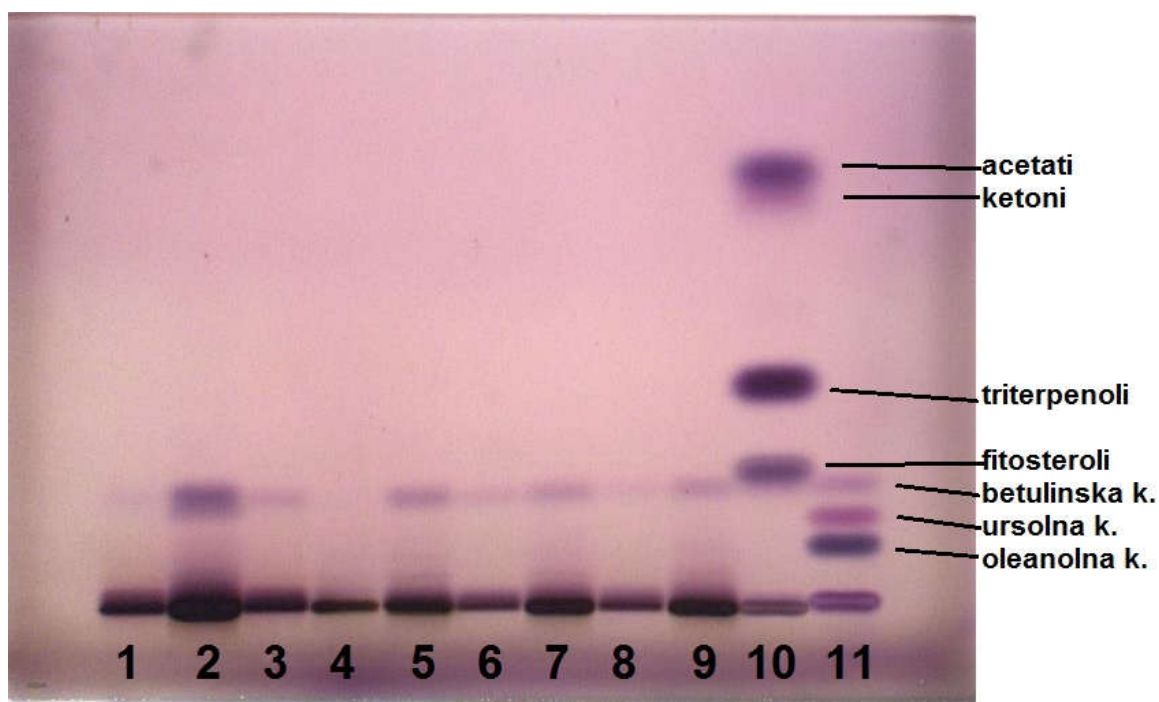
Na Sliki 20 so razviti ekstrakti biomase iz hladilnika in zmrzovalnika ter ekstrakt filtrata lizata celic. Razvili smo jih v kadički s prekatom. Razvijanje je potekalo 31 minut.



Slika 20: Razviti ekstrakti biomase micelija *T. versicolor* hranjene v hladilniku (BH), filtrata lizata celic (FL), biomase hranjene v zmrzovalniku (BZ) in večje zatehte biomase hranjene v hladilniku (VBH). (1) BH-Chl, (2) BH-MeOH, (3) BH-EtOH, (4) BH-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, (5) BH-Chl:MeOH 2:1, (6) FL-Chl, (7) FL-MeOH, (8) FL-EtOH, (9) FL-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, (10) FL-Chl:MeOH 2:1, (11) BZ-Chl, (12) BZ-MeOH, (13) BZ-EtOH, (14) BZ-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, (15) BZ-Chl:MeOH 2:1, (16) VBH-Chl, (17) VBH-MeOH, (18) VBH-EtOH, (19) VBH-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>.

Iz razvitih plošč je razvidno, da način shranjevanja biomase ne vpliva na razvitje ekstraktov te biomase. Pri ekstraktih filtrata lizata celic ni bilo zaznati posebnih lis. Višja koncentracija biomase (500 mg/mL topila) je bistveno izboljšala vidnost lis.

Razvijanje smo poskusili tudi v mobilni fazi z n-heksanom in etil acetatom. Na Sliki 21 so vzorci različnih ekstraktov biomase micelija, ki smo jih razvili v horizontalni kadički. Razvijanje je potekalo 10 minut. Poleg vzorcev smo nanesti še mešanico za določevanje položaja lis za sterole, triterpenole, ketone in acetate, in mešanico za določevanje položaja betulinske, ursolne in oleanolne kisline.



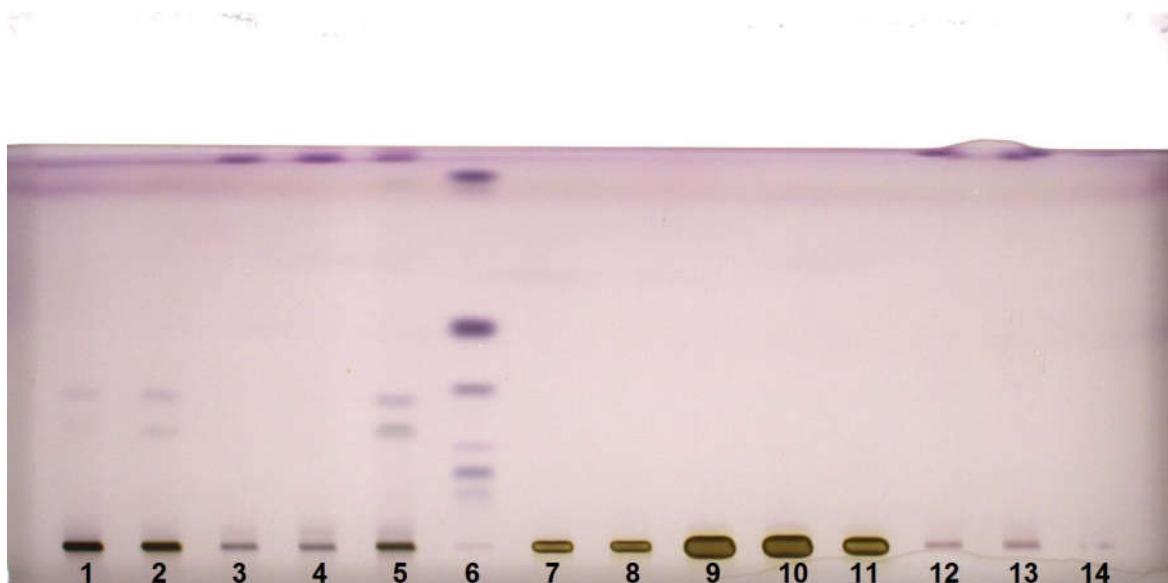
Slika 21: Razviti ekstrakti biomase micelija *T. versicolor* pri uporabi različnih topil. Od 1 do 5 so ekstrakti biomase micelija *T. versicolor* 500 mg/mL v kloroformu (1), etanolu (2), diklorometanu (3), metanolu (4) in mešanici kloroform:metanol 2:1 (v/v). Od 6 do 9 so ekstrakti biomase 100 mg/mL v kloroformu (6), etanolu (7), diklorometanu (8) in metanolu (9). Dodani sta mešanici za določevanje sterolov, triterpenolov, ketonov in acetatov (10) in določevanje kislin (11).

Lise ekstraktov so se razvile v podobnem položaju kot betulinska kislina. Možno je, da gre za razgradne produkte betulinske kisline. Strukturo tega produkta nismo uspeli določiti. Lisa je bila najbolj vidna v etanolnem ekstraktu.

#### 4.3.2 TLC brozge iz submerzne kulture v YM gojišču

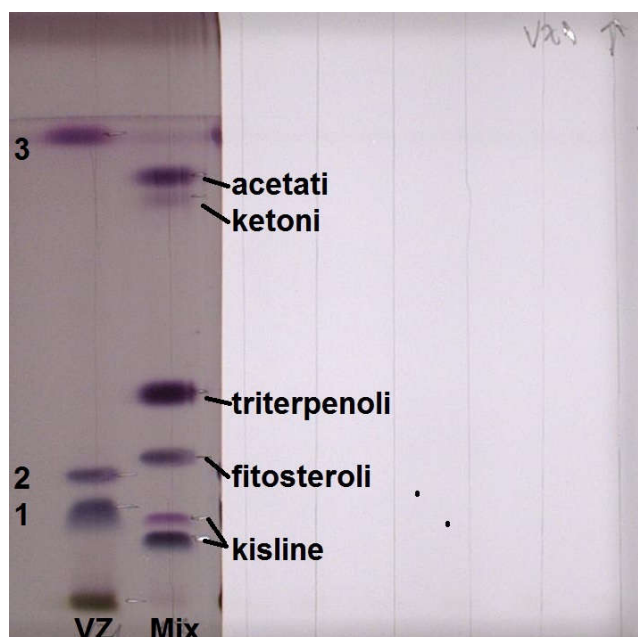
Pri ekstrakciji supernatanta z diklorometanom, kloroformom in mešanico kloroform : metanol 2:1 (v/v) sta se razvili dve fazi. Obe fazi smo vključili v TLC. Na plošči smo ekstrakte biomase in supernatanta razvili v mobilni fazi z n-heksanom in etil acetatom. Razvijanje je potekalo 23 minut.

Iz Slike 22 je razvidno, da se na plošči pri vzorcih supernatanta ni razvila nobena lisa. Pri vzorcih biomase micelija, ekstrahirane z metanolom, etanolom in mešanico kloroform : metanol 2:1 (v/v), so se razvile tri lise. Glede na standard gre za kisline in sterole.



Slika 22: Razviti ekstrakti biomase micelija *T. versicolor* v etanolu (1), metanolu (2), diklorometanu (3), kloroformu (4), mešanici kloroform:metanol 2:1 (5). Sledi mešanica za določevanje sterolov, triterpenolov, ketonov in acetatov (6) in ekstrakti supernatanta v etanolu (7), metanolu (8), diklorometanu (9), kloroformu (10), mešanici kloroform:metanol 2:1 (11), ekstrakti supernatanta spodnje faze v diklorometanu (12), kloroformu (13) in mešanici kloroform:metanol 2:1 (14).

Z masnim spektrometrom smo določili mase spojin v razvitih lisah. Mase smo izračunali s pomočjo enačb 2 in 3. Iz spektra prve lise (Slika 23) nismo zaznali nobenega produkta. V drugi lisi se je nahajal produkt z molsko maso 480 Da oz. 498 Da. Iz spektra tretje lise smo zaznali tri produkte z molsko maso 606 Da oz. 624 Da, 646 Da oz. 664 Da in 662 Da oz. 680 Da. Po pregledu literature nismo našli za katere spojine bi hipotetično lahko šlo. Spektri vseh treh lis so priloženi temu diplomskemu delu (Priloga A, B in C).



Slika 23: TLC ekstrakta biomase micelija *T. versicolor* z mešanico kloroform : metanol 2:1 (v/v).

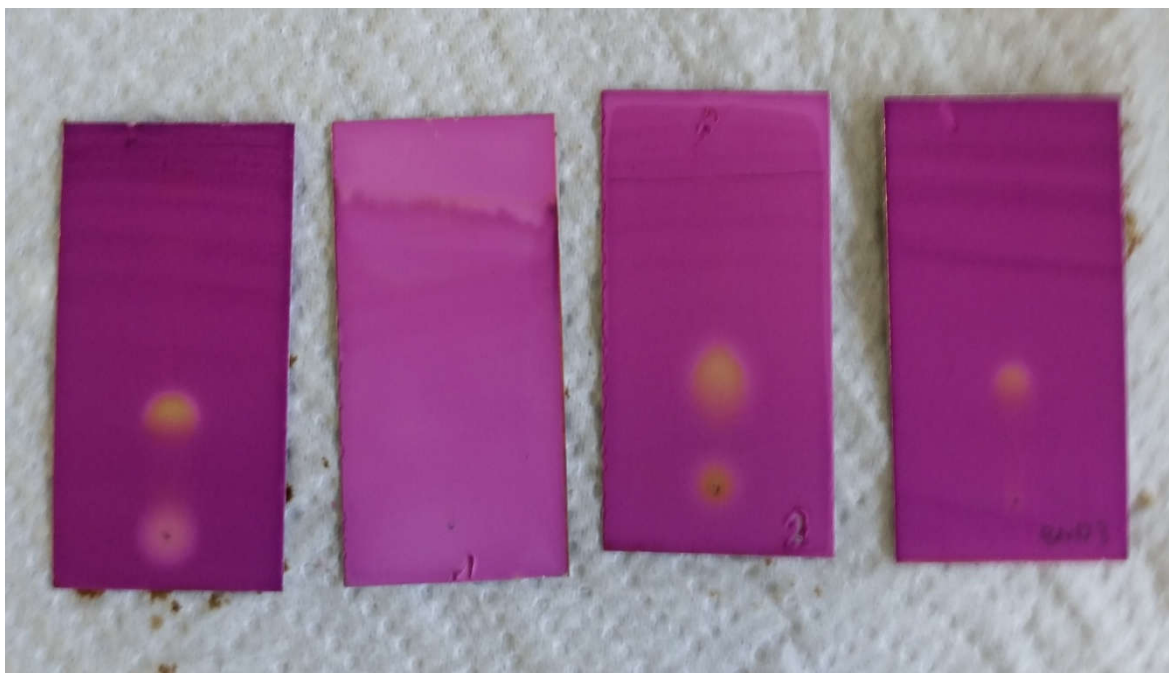
#### 4.3.3 Dodatne analize

Masa evaporiranega vzorca, ki smo ga dali na preparativno TLC ploščo je bila 103,9 mg. Na preparativni plošči z mobilno fazo n-heksan : etil acetat 8:2 (v/v) so se razvile tri lise iz katerih smo pridobili tri vzorce z maso (lise si sledijo od spodaj navzgor v smeri razvitja plošče):

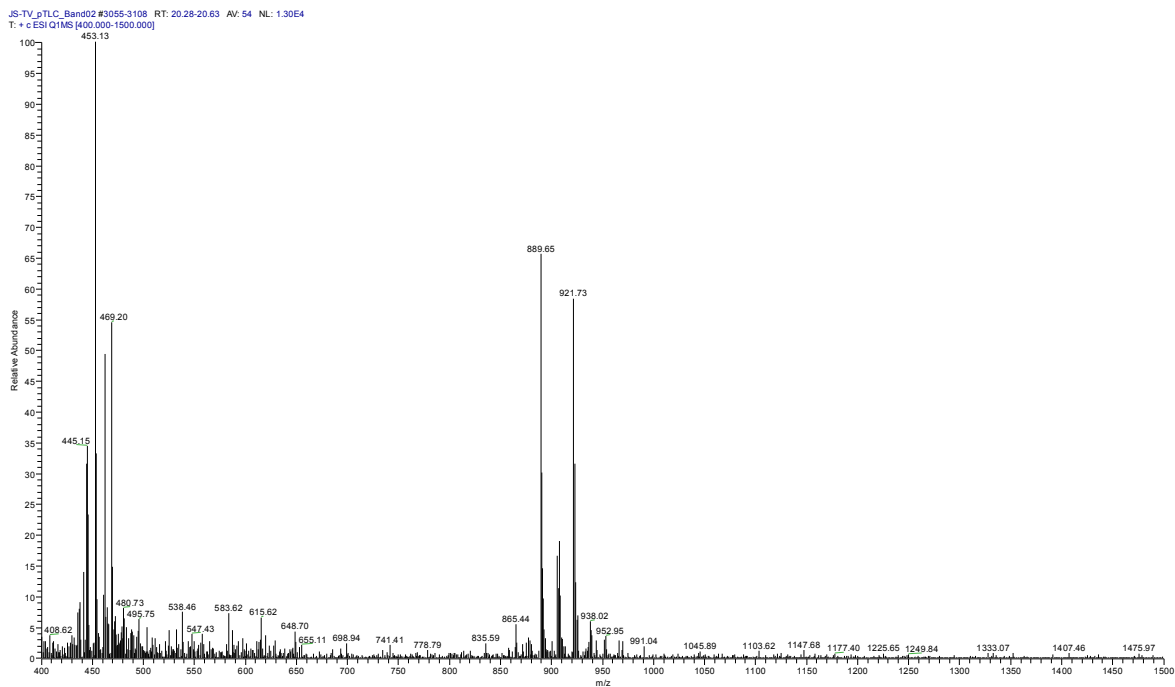
|          |          |
|----------|----------|
| Lisa III | 49,2 mg  |
| Lisa II  | 125,0 mg |
| Lisa I   | 10,8 mg  |

Pri lisi II je masa nerealna, ker je masa celokupnega vzorca nižja od mase lise. Verjetno so v vzorcih ostali ostanki silikagela. Mase so zgolj približek, da smo dobili občutek, kje se nahaja največ razvitih spojin.

Iz Slike 24 je razvidno, da lisa I vsebuje zelo majhno količino razvitih spojin, zato se na plošči ni vidilo razvitja. Lisa II je bila najbolj vidna, kar je v skladu s pomerjeno maso vzorcev. Razvitje lise III je bilo podobno kot pri lisi II, vendar je bila vidljivost slabša. Vzorec lise II analizirali s TLC-MS in pridobili spekter (Slika 25).



Slika 24: Razvite TLC vzorcev lis. Od leve proti desni: vzorec celokupnega ekstrakta, vzorec lise I, vzorec lise II in vzorec lise III.



Slika 25: TLC-MS spekter lise II. Vidni so vrhovi  $m/z$  445, 453, 469, 889 in 921.

#### 4.3.3.1 NMR analiza

Spektroskopski podatki so naslednji:

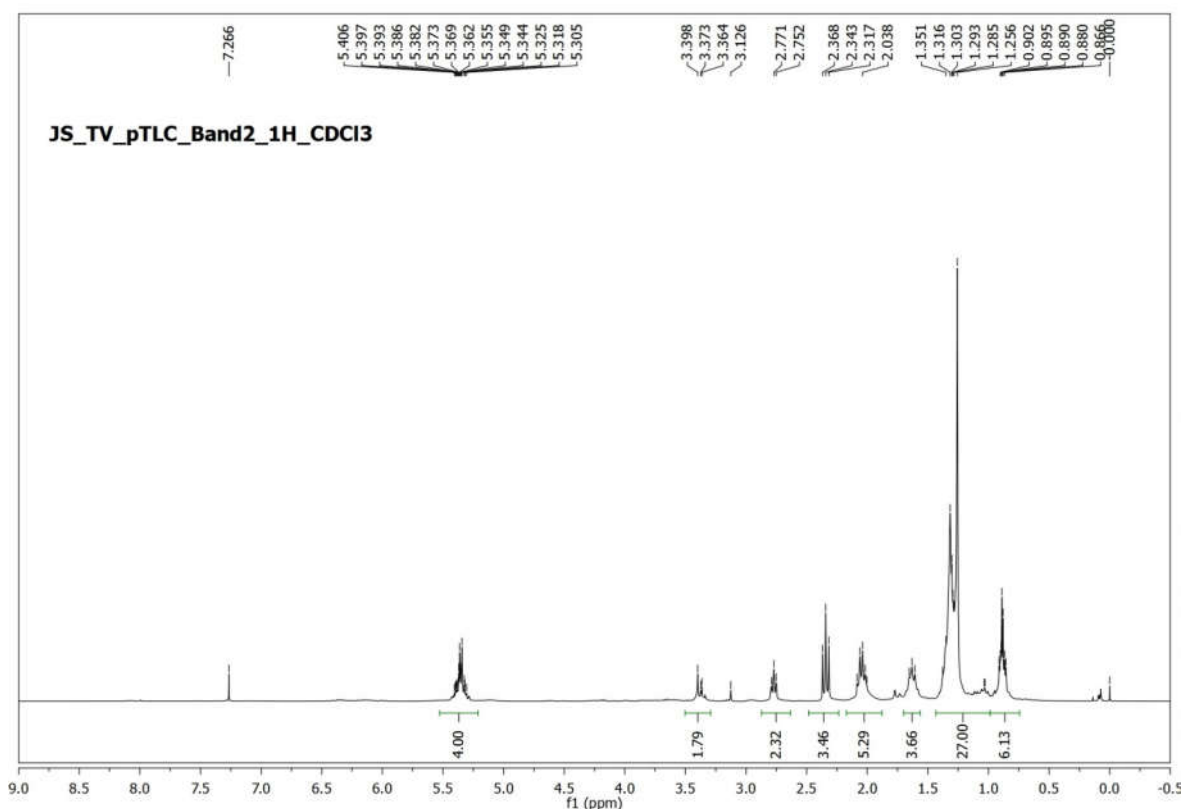
$^1\text{H}$  NMR  $\delta$  0.81-0.96 (m, 6H), 1.01-1.40 (m, 27 H), 1.63 (m, 4H), 2.04 (m, 5H), 2.34 (t,  $J = 7.5$  Hz, 4H), 2.77 (t,  $J = 5.7$  Hz, 2H), 3.33-3.40 (m, 2H), 5.28-5.43 (m, 4H) ppm;

$^{13}\text{C}$  NMR  $\delta$  14.04, 14.09, 22.55, 22.66, 24.64, 25.60, 27.15, 27.18, 29.01, 29.05, 29.12, 29.22, 29.29, 29.32, 29.41, 29.49, 29.56, 29.63, 29.64, 29.65, 29.74, 31.50, 31.90, 34.02, 127.87, 128.03, 129.98, 130.17, 179.83 ppm.

|          |                            |
|----------|----------------------------|
| $\delta$ | kemijski premik (ppm)      |
| $J$      | sklopitvena konstanta (Hz) |
| m        | multiplet                  |
| t        | triplet                    |

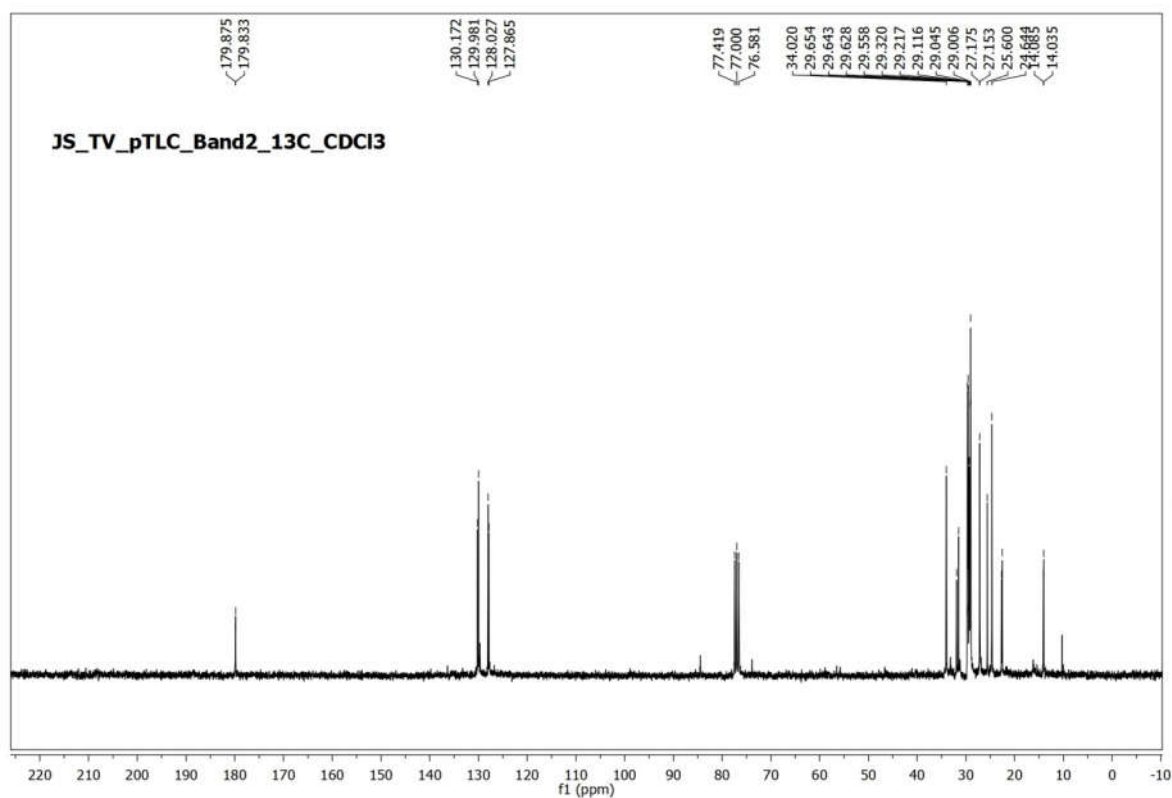
Z natančnim pregledom  $^1\text{H}$ -NMR spektra (Slika 26) smo zaključili, da spojina vsebuje 54 protonov. Spektar prikazuje odsotnost aromatskih protonov, tako da neznana spojina ne vsebuje aromatskih obročev. Protonski signal, ki je prikazan kot multiplet, integriran za štiri H v razponu med 5.28 in 5.43 ppm, je indikativen za štiri alkeneske protone (dve dvojni verigi). Zaradi slabe ločljivosti alkeneskega signala (multiplet), je, glede na vrednosti sklopitvenih konstant, nemogoče trditi kateri tip dvojne verige (*E* ali *Z*) je prisoten v molekuli.

Problem bi lahko razrešili z uporabo višjega polja NMR (600 ali 800 MHz), ki izboljša ločljivost protonskih signalov. Pomembno je omeniti, da dve dvojni verigi nista v konjugaciji, kar bi povzročilo cepitev signala. Resonanca pri 2.34 ppm, ki se pojavi kot triplet, integriran za dva H, najverjetneje ustreza  $\text{CH}_2$  skupini v bližini karbnilne in ostale  $\text{CH}_2$  skupine. Triplet pri 2.77 ppm, integriran za dva H, spada v  $\text{CH}_2$  skupino med dve dvojni verigi. Ostali signali v  $^1\text{H}$ -NMR spektru ustrezajo alifatskim protonom ( $\text{CH}_2$  in  $\text{CH}_3$  skupine).

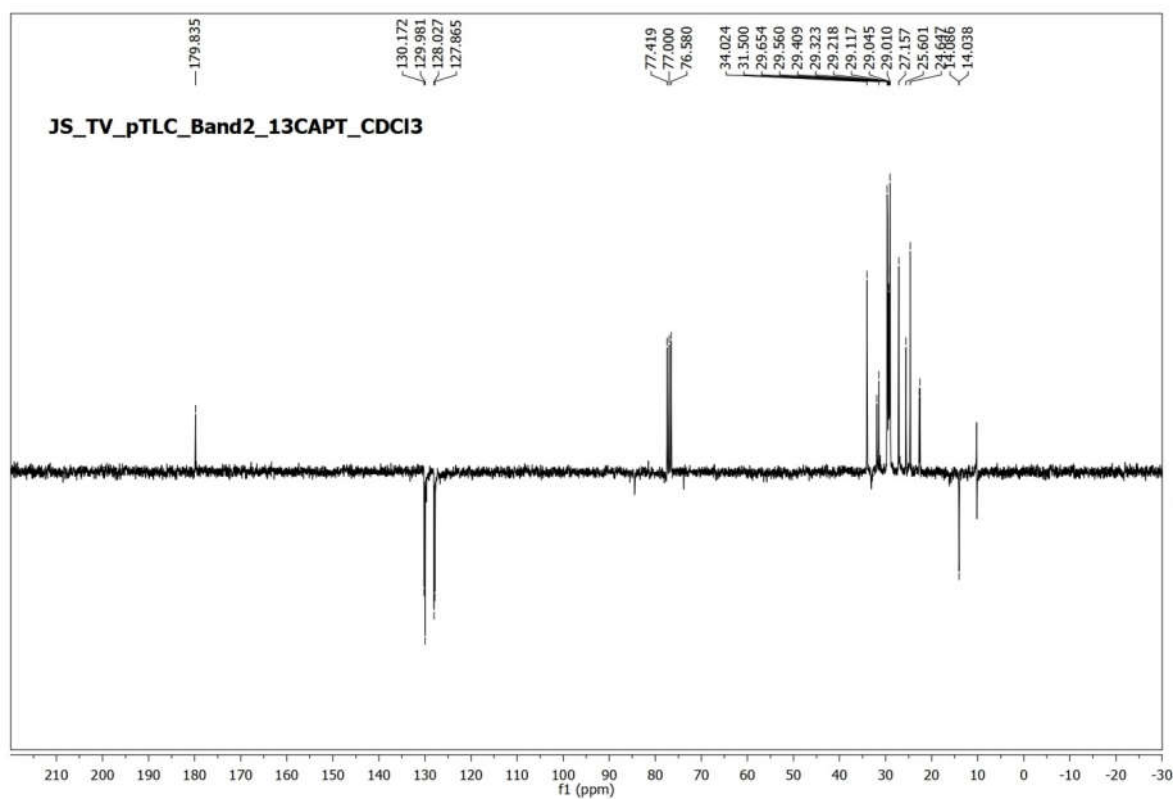


Slika 26:  $^1\text{H}$ -NMR spekter.

Z natančnim pregledom  $^{13}\text{C}$ -NMR spektra (Sliki 27 in 28) smo zaključili, da spojina vsebuje 29 ogljikov. Nadaljnja analiza  $^{13}\text{C}$ -NMR spektra kaže na prisotnost karbonilne skupine pri 179.83 ppm. Ta karbonilna skupina ne ustreza ketonu, ampak bolj estru ali karboksilni kislini. Prisotnost aldehida je izključena zaradi pomanjkanja ogljikovega signala, ki je vezan na kisik in ki ponavadi resonira med 50 in 60 ppm. Funkcionalna skupina, ki vsebuje kisik v karbonilni skupini, je po vsej verjetnosti karboksilna kislina. Vendar proton karboksilne kisline, ki pogosto resonira pri 11-12 ppm, ni opažen v  $^1\text{H}$ -NMR spektru z uporabljenim devteriranim kloroformom ( $\text{CDCl}_3$ ), zaradi izmenjave devterija s topilom. Mnogo boljša izbira za opazovanje kislinskega protona bi bil poskus v  $\text{d}_6\text{-DMSO}$ . Signali pri 127.87, 128.03, 129.98 in 130.17 ppm ustrezajo ogljikom z dvojnimi verigami. Ostali signali med 14 in 34 ppm ustrezajo alifatskim  $\text{CH}_2$  in  $\text{CH}_3$  skupinam.

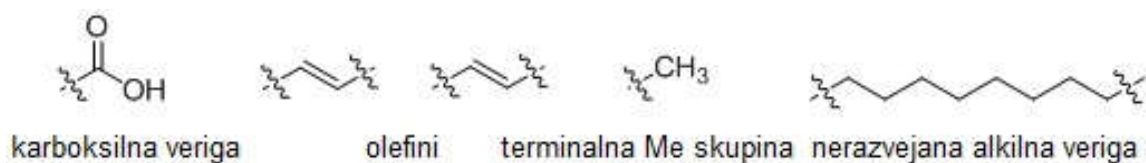


Slika 27:  $^{13}\text{C}$ -NMR spekter.

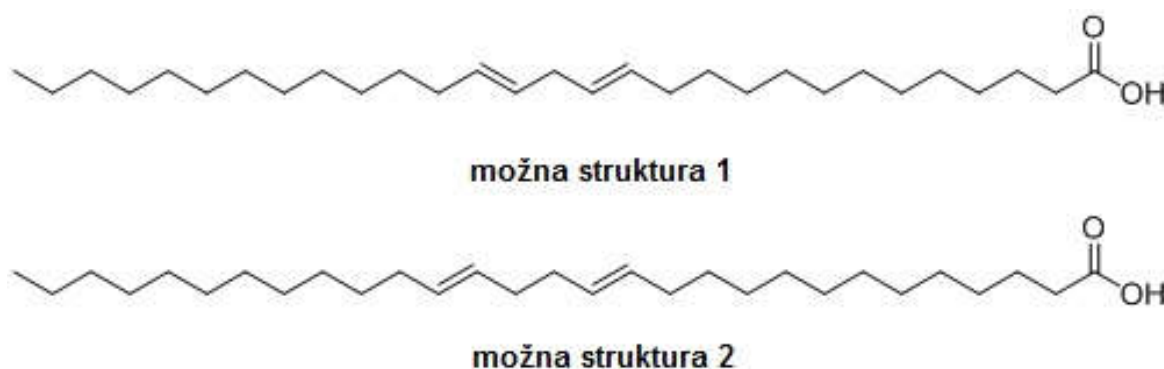


Slika 28:  $^{13}\text{CAPT}$ -NMR spekter.

Infrardeča spektroskopija bi priskrbela dodatne informacije o funkcionalnih skupinah v neznani molekuli. Lista možnih molekularnih fragmentov je prikazana na Sliki 29. Glede na našo analizo, smo zaključili, da ima naša neznana spojina sledečo molekulsko formulo:  $C_{29}H_{54}O_2$ . Računanje indeksa manjka vodika (enačba 4) je dalo vrednost 3. To pomeni, da naša molekula vsebuje dve dvojni verigi in eno karbonylni funkcionalno skupino. Predlagani strukturi, izpeljani iz  $^1H$ -NMR in  $^{13}C$ -NMR spektroskopije, sta prikazani na Sliki 30.



Slika 29: Možni molekularni fragmenti izpeljani iz  $^1H$ -NMR in  $^{13}C$ -NMR spektroskopije (olefini so drug izraz za alkene).



Slika 30: Predlagani strukturi neznane spojine z molekulsko formulo  $C_{29}H_{54}O_2$ .

Na podlagi enačbe 4, je IHD za molekulsko formulo  $C_{29}H_{54}O_2$  izračunan naslednje:

$$IHD = \frac{(2 \cdot 29 + 2 - 54 - 0 + 0)}{2} = \frac{58 + 2 - 54 - 0 + 0}{2} = \frac{6}{2} = 3$$

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

### 5.1 RAZPRAVA

#### 5.1.1 Izbor gojišča za pripravo vcepka

Pri gojenju glive *T. versicolor* na gojiščih PMP, GY in modificiran TaK ni bilo večjih odstopanj (ob upoštevanju krajšega časa gojenja) pri rasti biomase in produkcije EPS glede na podatke iz literature (Kim in sod., 2002; Tavares in sod., 2005; Wang in sod., 2012). Bistveno nižjo rast biomase smo opazili pri gojišču MY, ki je vsebovalo manitol, kot vir ogljika. Elisashvili in sod. (2009) so, nasprotno, dosegli najvišjo rast biomase prav na tem gojišču ( $12,5 \pm 1,4$  g/L). Rezultata se verjetno razlikujeta zaradi seva, temperature gojenja in uporabljenih metod pri analizi količine biomase. Biomaso so namreč določili s sušenjem pri 70 °C, zato je meritev višja, kot če bi jo sušili pri 100 °C.

Velikost peletov se ni bistveno razlikovala glede na uporabljeno gojišče. Bili so sferične oblike od 0,5 do 1,5 cm premera. Po izkušnjah sodeč, je velikost peletov odvisna od hitrosti stresanja in velikosti kolotov ob inokulaciji. Pri nadaljnjih raziskavah bi se inokulacije stresanih kultur lotili tako, da bi razraščeni micelij na plošči suspendirali v fiziološki raztopini. S tem bi pridobili več prostega micelija, kar bi pomenilo več drobnih peletov.

Vzdrževanje kulture na poševnikih ni bilo povsem primerno, saj je po nacepiti na plošče večkrat prišlo do kontaminacije. Možna alternativa bi bila shranitev kolotov razraščene micelija v 15 % raztopini glicerola v kriovialah v zmrzovalniku na -80 °C. Ta postopek je enostavnejši, zato je tudi manjša možnost kontaminacije.

Za pripravo vcepka smo izbrali gojišče PMP v katerem je v šestih dneh kultivacije zraslo največ biomase. Razlog za primernost tega gojišča je tudi v enostavni pripravi. Uporabljali smo sicer kupljeno krompirjevo dekstrozo, ki je bila relativno draga, zato bi bilo v prihodnje bolj ekonomično pripraviti svojo brozgo s prekuhavanjem krompirja.

#### 5.1.2 Primerjava rasti glivine biomase in produkcije polisaharidov v gojiščih GPY in YM

Biomasa je v bioreaktorju začela eksponentno rasti po enem dnevu kultivacije. V stacionarno fazo je prešla med četrtem in šestim dnevom kultivacije, kot so opazili že Tavares in sod. (2005). Produkcija EPS in IPS se je višala v eksponentni fazi rasti biomase in se umirila, ko je gliva prešla v stacionarno fazo. Zanimivo je, da pri kultivaciji na gojišču GPY nismo zaznali produkcije IPS. Znano je, da se pri višjih koncentracijah glukoze (višje C : N razmerje), metabolizem višjih gliv preusmeri bolj v produkcijo EPS

(Fang in Zhong, 2002). Produkcija IPS je bila bolj vidna v YM gojišču, ki ima nižje C : N razmerje od gojišča GPY.

Tavares in sod. (2005) so z meritvami viskoznosti brozge opazili newtonsko obnašanje tekočin prve štiri dni kultivacije, pred začetkom občutne produkcije EPS. Ko so se izločali v gojišče polimeri, kot so polisaharidi, je obnašanje tekočine postalo psevdoplastično. V našem primeru se je viskoznost brozge, čeprav samo na podlagi ocene, poviševala hitreje, ker je produkcija EPS potekala med rastjo biomase. Bi pa bilo v prihodnje smiselno meriti še viskoznost brozge, ki je v korelaciji s produkcijo biopolimerov (Tavares in sod., 2005).

Vzrok za povišanje viskoznosti je tudi v izhlapevanju gojišča, saj se je tekom obeh fermentacij volumen brozge zmanjšal skoraj za polovico. Hladilnik izstopnega zraka ni v zadostni meri hladil, zato se je v gojišče vračalo manj kondenzata kot je bilo izhlapevanja. Zaradi tega se je veliko biomase prilepilo na stene in mešalo bioreaktorja. Pogoji v gojišču tako nismo bili več homogeni ampak je nastal večfazni sistem (brozga, biofilm ob stenah in mešalu).

Izplen biomase se je bistveno razlikoval od tipa gojišča. Pri GPY gojišču, ki je vsebovalo več glukoze (35 g/L) je nastalo trikrat več biomase kot pri kultivaciji na gojišču YM. Podobno GPY gojišče s 40 g/L začetne koncentracije glukoze so uporabili tudi Tavares in sod. (2005) in opazili inhibicijo rasti glive, kar pa v našem primeru ne drži. Meritve glivine biomase so pri submerzni kultivaciji višjih gliv problematične, ker se gliva prilepi na stene in mešala bioreaktorja, zato ne odražajo realne koncentracije znotraj bioreaktorja. Izplen je na koncu fermentacije višji, kot pokažejo meritve. Ker rastejo v peletih, ne vemo koliko je pri biomasi liziranih celic. Pri ocenjevanju produkcije biomase micelija in biopolimerov je potrebno vzeti v obzir, da so EPS prilepljeni na hife in ujeti v pelete, ki se oblikujejo med submerzno kultivacijo. To pomeni, da se suha teža biopolimera, ki se precipitira iz filtrata brozge ne ujema z vrednostjo skupnih EPS in da je lahko suha teža biomase micelija precenjena (Maziero in sod., 1999). Za zmanjšanje tega problema smo biomaso sprali vsaj dvakrat z destilirano H<sub>2</sub>O.

Mešanje pri kultivaciji višjih gliv je ponavadi v razponu od 100 do 300 obr./min. V večini primerov se uporablja Rushtonove turbine, ki so v industriji najbolj prisotne. Pri naših kultivacijah je bilo mešanje močnejše, saj smo predvidevali, da se bodo EPS hitreje izločali v gojišče namesto da se zadržujejo na površini peletov. S tem smo hoteli onemogočiti pritrjevanje biomase na površino in stimulirati produkcijo EPS. V prvih dneh je produkcija EPS naraščala, potem pa je začela celo upadati, kar je povezano z upadom biomase. Močnejše mešanje verjetno škodljivo vpliva na rast micelija zaradi strižnih sil. Nekatere vrste gliv ob pomanjkanju vira ogljika izločajo  $\beta$ -glukanaze, ki razgrajujejo  $\beta$ -glukane in s tem zmanjšajo viskoznost brozge (Rau, 2004). Torej je za dober izkoristek in kvaliteto EPS

bolj primeren dohranjevalni bioproces ali pa je potrebno pravi čas (ko zmanjka vira ogljika) ustaviti šaržni bioproces (Fazenda in sod., 2008).

Z uporabo enostavne alkoholne precipitacije polisaharidov smo določili le približno vrednost celokupnih polisaharidov (upoštevati je potrebno še ostanke soli in proteinov). Maziero in sod. (1999) so filtrat pred precipitacijo polisaharidov shranili v zmrzovalniku in opazili tvorbo gela. Polisaharide bi se torej lahko precipitiralo tudi brez uporabe organskih topil. Za podkrepitev rezultatov bi v prihodnje uporabili še kolorimetrično metodo (metodo s fenolom in žvepleno kislino) za določevanje sladkorjev po Dubois-u in sod. (1956) oz. dodelano za manjše merilo (uporaba mikrotiterskih plošč) in hitrejšo različico te metode (Masuko in sod., 2005). Velikosti in strukture polisaharidov tako ostajajo neznane, pa tudi literatura je v tem pogledu bolj skopa. V prihodnje bi bilo smiselno določati distribucijo teže polisaharidov in njihovo sestavo glede na vodenje bioprocasa v bioreaktorju.

Na splošno višje glive rastejo v širokem pH območju, priporočljivo pri takšnih kultivacijah pa je, da je začetni pH nizek, saj se tako znižuje tveganje bakterijske kontaminacije. Optimalni pH je odvisen od vrste organizma in željenega produkta. V fazi rasti in porabljanja substrata se je v našem primeru pH nižal, po porabi glukoze pa smo pri obeh kultivacijah zaznali nagel dvig pH. Padec pH je povezan s produkcijo organskih kislin, medtem ko se pH dviguje zaradi sekrecije proteaz, ki razgrajujejo kompleksne vire dušika (pepton in kvasni ekstrakt), avtolize celic ali pa deaminacije aminokislin (Fazenda in sod., 2008).

Glivo smo poskušali gojiti tudi v optimiziranem gojišču za produkcijo biomase in ganoderskih kislin glive *Ganoderma lucidum* (Xu in sod., 2008). Poleg kontaminacije smo imeli težave tudi s tem, da se je koruzna moka po sterilizaciji bioreaktorja strdila, sojina moka pa povzročila prekomerno penjenje. To gojišče smo uporabili pri kultivaciji stresanih kultur, kjer se koruzna moka sicer ni povsem raztopila. Po 14 dneh smo pridobili 10,71 g/L biomase. Rezultati niso vključeni v to delo, ker kasneje poskus ni šel po načrtih.

### 5.1.3 Določevanje ostalih produktov

Višje glive poleg izločajo še ostale BAM, kot so steroli, terpenoidi, fenolne spojine itn. Za razliko od polisaharidov, so količine teh metabolitov precej manjše (do 100 mg). Pri glivi *Ganoderma lucidum* so določili strukturo pestre palete BAM (ganoderske kisline, ganodermanontriol, ganoderioli, lucidenične kisline itn.), medtem ko je pri *T. versicolor* literatura skopa (Podpoglavje 2.3.4.4). Glavna težava je optimalna ločba neznanih spojin s tenkoplastno kromatografijo, saj je potrebno ugotoviti v katerih topilih in v kakšnem razmerju mešanice topil se posamezni metabolit optimalno loči. Poleg tega si je potrebno zagotoviti ustrezne standarde, ki so dragi. Nadalje je potrebno zagotoviti dovolj materiala (brozge ali biomase) za razvitje preparativnih TLC plošč, da gredo vzorci na masno

spektrometrijo. Če je ločba dobra, je vsaka lisa na TLC plošči ena spojina, ponavadi pa se zgodi, da je v lisi precej več neznanih spojin s podobnimi molskimi masami.

Gojišče GPY je primerno za biosintezo polisaharidov in ganoderskih kislin pri glivi *Ganoderma lucidum* (Fang in Zhong, 2002a). Iz razvitja ekstrakta biomase in filtrata lizata celic *T. versicolor* (gojene na gojišču GPY) na TLC plošči smo ugotovili, da je ločba najboljša v metanolnem in etanolnem ekstraktu, shranjevanje biomase pa ne vpliva na ločbo. Pri TLC analizi supernatanta brozge nismo opazili nobene razvite lise. Iz teh dejstev lahko sklepamo, da se BAM, kot so steroli, terpenoidi, fenolne spojine itn., ne izločajo v gojišče, razen pri lizi celic. Pri ekstraktu biomase je bila vidna lisa, ki se je razvila podobno kot betulinska kislina, ki je znan naravni terpenoid. Zaradi pomanjkanja biomase micelija, ekstrakta nismo analizirali s TLC-MS. Sklepali smo namreč, da se bo produkt pojavil tudi pri gojenju na gojišču YM.

Iz ekstrakta biomase iz kulture na gojišču YM so se razvile tri lise, ki so bile najbolj vidne v ekstraktu kloroform : metanol 2:1 (v/v). Lisa I (Slika 25) se je razvila v območju kislin, tako kot je bilo to vidno pri TLC analizi ekstrakta biomase iz gojišča GPY. Vidni pa sta bili še dve lisi. S TLC-MS analizo lis smo ugotovili, da se v teh lisah nahaja več potencialnih metabolitov, ki bi jih morali v prihodnje bolj ločevati med seboj na TLC plošči. Po pregledu literature nismo našli za katere metabolite bi lahko šlo. Iz merjenih mas v območju od 450 do 500 Da in na podlagi standarda na TLC plošči domnevamo, da gre za kisline in sterole (npr. betulinska kislina, trametenolična kislina itn.). Povsem možno je tudi, da se v lisah nahajajo dimeri, saj so bile nekatere vrednosti  $m/z$  polovične od ostalih izmerjenih vrednosti  $m/z$  (npr. pojavili so se vrhovi na TLC-MS spektru z  $m/z$  445 in 889).

Z NMR analizo smo raziskovali najbolj potencialno neznano spojino, ki smo jo zaznali s TLC-MS. Ta spojina je bila izločena v zadostni količini, da smo jo lahko preiskovali (nad 100 mg). Ugotovili smo, da gliva izloča hipotetično nonakozadienoično kislino z molekulsko formulo  $C_{29}H_{54}O_2$ , kar je v skladu z razvitimi lisami na TLC, ki so se nahajale v območju standarda kislin (Slika 23). Za potrditev obstoja karboksilne skupine v spojinah bi bilo potrebno opraviti  $^1H$ -NMR analizo z vzorcem, ki bi bil raztopljen v devteriranem DMSO-ju ( $d_6$ -DMSO). Dodatne informacije o funkcionalnih skupinah bi pridobili še z izvedbo infrardeče spektroskopije (FTIR). Več kot bi pridobili informacij iz različnih raziskovalnih analiz, bolj zagotovo bi lahko sestavili končno strukturo neznane spojine. Ker so takšne analize drage, zamudne, poleg tega pa je bilo na voljo premalo biomase za analize, nadaljevanje ni bilo smotno. Zaradi enakih razlogov nismo opravili analiz drugih neznanih spojin. So pa naši zaključki lahko izhodišče za novo diplomsko delo.

## 5.2 SKLEPI

- Gojišče s krompirjevo dekstrozo (PMP) je primerno za pripravo vcepka, ker v razmeroma kratkem času zraste dovolj biomase, da proces v bioreaktorju hitreje poteka zaradi krajše lag faze. Poleg tega je enostavna tudi njegova priprava.
- V prihodnje bi bilo potrebno raziskati rast in velikost peletov pri stresanih kulturah, ki bi bile inokulirane s suspenzijo micelija s trdnega hranilnega gojišča.
- Pri kultivaciji v gojišču GPY je bil boljši izplen biomase (18,5 g/L), zaznali pa nismo produkcije IPS, medtem ko je bila produkcija EPS visoka (3,8 g/L). Začetna koncentracija glukoze, ki je bila pri tem procesu visoka, igra pomembno vlogo pri metabolizmu produkcije IPS in EPS.
- Pri kultivaciji v gojišču YM je nastalo manj biomase, kot pri gojenju v gojišču GPY. Delež IPS je bil višji od deleža EPS, verjetno zaradi nižje začetne koncentracije glukoze. Produkcija EPS (približno 600 mg/L) je primerljiva s podatki iz literature.
- Poraba glukoze je bila pri kultivaciji v gojišču GPY počasnejša, kot pri YM. Proces YM je potekal bistveno hitreje.
- Dvig pH-ja je dober indikator, da se je porabila glukoza in da gre proces proti koncu (avtoliza, razgradnja polisaharidov). Dohranjevanje v točki dviga pH-ja oziroma ustavitev procesa lahko bistveno izboljša izplen polisaharidov.
- Hipoteza o celokupni produkciji polisaharidov nad 1,5 g/L drži, razmerje IPS : EPS pa je odvisno od tipa gojišča. Hipotezo bi bilo potrebno v prihodnje podkrepiti še z dodatnimi analitičnimi metodami, ker imajo pri alkoholni precipitaciji nekaj deleža v teži še proteini in soli.
- Primerna ekstrakcija ostalih neznanih spojin iz biomase glive za TLC analizo je z mešanico kloroform : metanol 2:1 (v/v).
- Pri submerzni kultivaciji micelija glive *T. versicolor* je pričakovati pestro paleto ostalih produktov, ki so producirani v zelo majhnih količinah. Za uspešno ločbo in določevanje teh spojin je pomembna primerna izbira standardov in pomembno je ugotoviti optimalno mešanico topil mobilne faze. V našem primeru smo dobro ločbo dobili z mešanico n-heksan : etil acetat 8:2 (v/v). Določevanje strukture teh produktov presega to diplomsko delo.

- S TLC-MS analizo smo zaznali več produktov z molskimi masami od 400 do 920 g/mol. Na podlagi uporabljenih splošnih standardov sklepamo, da spadajo v skupino sterolov in kislin.
- Glede na pridobljene podatke iz NMR analize vzorca lise II, sklepamo, da gre za kislino z molekulsko formulo  $C_{29}H_{54}O_2$ . Predlagamo tudi dve možni strukturi te neznane spojine, ki bi hipotetično lahko bila nonakozadienoična kislina.
- Gliva *Trametes versicolor* Tv6 je zelo primerna za submerzno kultivacijo v bioreaktorju, saj raste hitro in izloča razmeroma veliko polisaharidov. Sklepamo, da sprotno dvigovanje mešanja do 400 obr./min in prezračevanja do 1 vvm zagotovi dober prenos hranil in kisika.

## 6 POVZETEK

Medicinsko pomembne glive so na Daljnem vzhodu sestavni del tradicionalne medicine kot zdravila za lajšanje različnih obolenj. Med njimi je tudi *Trametes versicolor* oz. pisana ploskoceвка, ki je poleg *Lentinus edodes* in *Schizophyllum commune* (lentinan in šizofilan), pomemben vir  $\beta$ -glukanov. Na trgu sta zdravilni učinkovini PSK in PSP, ki se uporabljata kot adjuvansa, da se bolnikom stimulira imunski sistem in lajša stranske učinke po kemoterapiji. Na zahodu se pripravke medicinsko pomembnih gliv še ne uporablja kot zdravila.

Polisaharidi višjih gliv so večinoma glukani z različnimi tipi glikozidnih vezi, kot so 1,3-, 1,6- $\beta$ -glukani, 1,3- $\alpha$ -glukani, heteroglukani in glikani. Ostali se večinoma vežejo na proteine in tvorijo PSP komplekse. Protitumorsko delovanje polisaharidov je povezano z zaviranjem rasti rakastih celic, aktiviranjem T-celic, B limfocitov, makrofagov in celic naravnih ubijalk, povišanjem produkcije interleukina IL-2, IL-6, ki sta aktivatorja limfocitov in povišanjem produkcije interferonov. Poleg  $\beta$ -glukanov in ostalih EPS in IPS, višje glive v manjših količinah izločajo pestro paleto drugih spojin, kot so triterpenoidi, steroli, fenolne spojine, vitamini, lipidi itd. O potencialnih učinkih le-teh je malo znanega. Večino raziskav je narejenih na polisaharidih in ganoderskih kislinah glive *Ganoderma lucidum*, ki lahko služi kot model za submerzno kultivacijo višjih gliv.

Mešalni bioreaktor je najbolj v uporabi za submerzno kultivacijo. Pri višjih glivah je potrebno narediti kompromis med prenosom snovi in kisika ter strižnimi silami, ki lahko poškodujejo micelij. Z izborom gojišča (C:N razmerje), spremljanjem pH-ja in  $pO_2$  lahko usmerjamo biosintezo v smer produkcije biomase, EPS ali IPS. Pri submerzni kultivaciji *T. versicolor* smo poskušali čim več teh dognanj upoštevati z ozirom na naš produkcijski organizem.

Namen diplomskega dela je bilo vzpostaviti lasten tehnološki postopek za gojenje glive *T. versicolor* v mešalnem bioreaktorju, produkcijo glivinih polisaharidov in preučevanje produkcije ostalih produktov. Delo je bilo opravljeno v treh sklopih. Najprej je bilo potrebno optimizirati vegetativno fazo za pripravo vcepka, sledila je biosinteza v laboratorijskem bioreaktorju, zadnji sklop pa je bil analitičen. Določevali smo produkcijo biomase, polisaharidov in preučevali ostale neznane spojine, ki so prisotne v biomasi glive.

Revitalizacija kulture na PDA ploščah je potekala en teden, da se je gliva povsem razrastla po površini. Nadalje je bila priprava vcepka z dobrim donosom biomase (3,87 g/L v šestih dneh kultivacije) hitra z gojiščem PMP, ki je poceni in enostavno.

Submerzno kultivacijo glive *Trametes versicolor* smo izvedli v mešalnem bioreaktorju na YM gojišču, ki je preverjeno za kultivacijo te glive in GPY gojišču, ki je bilo postavljeno

za višji donos EPS, IPS in ganoderskih kislin glive *Ganoderma lucidum*. Za produkcijo IPS smo ugotovili, da je bolj primerno gojišče YM (2,2 g/L po treh dneh kulture), medtem ko je za produkcijo biomase in EPS bolj primerno gojišče GPY (18,5 g/L biomase in 3,8 g/L EPS v šestih dneh kulture). Vzdrževanje  $pO_2$  nad 50 % in relativno močno mešanje (400 obr./min), nista negativno vplivala na rast glive in produkcijo polisaharidov. Proces smo lahko zaključili pri 150. do 200. urah, saj je gliva porabila vso glukozo, težave pa so nastale tudi s pojavom povišane viskoznosti.

Ker so raziskave na področju produkcije glivinih BAM, ki niso polisaharidi zelo redke in se o njihovi strukturi ne ve veliko, smo opravili TLC in TLC-MS analize. Biomaso micelija smo ekstrahirali s petimi različnimi topili. Dobro vidljivost lis na TLC plošči daje ekstrakt biomase v mešanici kloroform : metanol 2:1 (v/v). Mobilni fazi n-heksan : etil acetat 5:1 (v/v) ali 8:2 (v/v) omogočata dobro ločbo raznovrstnih spojin na TLC. Po masnih spektrih sodeč smo zaznali vsaj pet hipotetičnih produktov, ki se nahajajo v biomasi v zelo majhnih količinah. Vzorec ene od lis (lisa II) iz TLC plošče, v kateri je bilo dovolj veliko produkta, smo analizirali z jedrsko magnetno resonanco za določanje števila vodikovih in ogljikovih atomov, števila dvojnih vezi in morebitnih obročev. Na podlagi pridobljenih spektroskopskih podatkov sklepamo, da gre za nonakozadienoično kislino z molekulsko formulo  $C_{29}H_{54}O_2$  z dvema možnima strukturama. Za natančnejšo določitev strukture, bi bilo potrebno pridobiti podatke še drugih analitičnih metod (npr. 2D-NMR, FTIR itn.), kar pa presega to diplomsko delo.

V diplomskem delu smo poskušali standardizirati postopek hranjenja glive, priprave vcepka, produkcije biomase v več različnih gojiščih z namenom ugotoviti kako posamezni parametri vplivajo na obnašanje glive med kultivacijo. Naše delo je bilo bolj preliminarne in deskriptivne narave in manj v razlaganju pojavov, ki so se dogajali med procesom kulture. Pomembno je, da smo s temi ugotovitvami spoznali, kako bi se bilo bolje v prihodnje lotiti submerzne kulture glive *Trametes versicolor*.

## 7 VIRI

- Arteiro J.M.S., Martins M.R., Salvador C., Candeias M.F., Karmali A., Caldeira A.T. 2012. Protein-polysaccharides of *Trametes versicolor*: production and biological activities. *Medicinal Chemistry Research*, 21, 6: 937-943
- Arzenšek B., Tratnik B., Malovrh B. 2010. Slovenski gobarski vodnik. Ljubljana, Modrijan založba: 363 str.
- Badalyan S.M. 2003. Edible and medicinal higher basidiomycetes mushrooms as a source of natural antioxidants. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 5, 2: 153-162
- Berovič M. 1996. Bioreaktorji za aerobne bioprocese. V: *Biotehnologija. Osnovna znanja*. Raspor P. (ur.). Ljubljana, Bia: 437-458
- Bogen M. 2015. Fungi. Sharon High School.  
<https://shsapbiop2-taxa.wikispaces.com/fungi> (23.mar 2015)
- Bolla K., Gopinath B.V., Zeenat Shaheen S., Singara Charya M.A. 2010. Optimization of carbon and nitrogen sources of submerged culture process for the production of mycelial biomass and exopolysaccharides by *Trametes versicolor*. *International Journal for Biotechnology and Molecular Biology*, 1, 2: 15-21
- Borràs E., Blánquez P., Sarrà M., Caminal G., Vicent T. 2008. *Trametes versicolor* pellets production: low-cost medium and scale-up. *Biochemical Engineering Journal*, 42, 1: 61-66
- Carlile M.J., Watkinson S.C., Gooday G.W. 2001. *The Fungi*. San Diego, Academic Press: 588 str.
- Chan G.C.-F., Chan W.K., Sze D.M.-Y. 2009. The effects of  $\beta$ -glucan on human immune and cancer cells. *Journal of Hematology & Oncology*, 2, 25: 1-11  
<http://www.jhoonline.org/content/2/1/25> (18. avg. 2014).
- Cheng K.-F., Leung P.-C. 2008. General review of polysaccharopeptides (PSP) from *C. versicolor*: Pharmacological and Clinical Studies. *Cancer Therapy*, 6: 117-130
- Cho E.J., Oh J.Y., Chang H.Y., Yun J.W. 2006. Production of exopolysaccharides by submerged mycelia culture of a mushroom *Tremella fuciformis*. *Journal of Biotechnology*, 127, 1: 129-140

- Chu K.K.W., Ho S.S.S, Chow A.H.L. 2002. *Coriolus versicolor*: a medicinal mushroom with promising immunotherapeutic values. *Journal of Clinical Pharmacology*, 42, 9: 976-984
- Collins R.A., Ng T.B. 1997. Polysaccharopeptide from *Coriolus versicolor* has potential for use against Human immunodeficiency virus type I infection. *Pharmacology Letters*, 60, 25: 383-387
- Cui Y.Q., Okkerse W.J., van der Lans R.G.J.M, Luyben K.Ch.A.M. 1998. Modeling and measurements of fungal growth and morphology in submerged fermentations. *Biotechnology and Bioengineering*, 60, 2: 216-229
- Cui J., Chisti Y. 2003. Polysaccharopeptides of *Coriolus versicolor*: physiological activity, uses, and production. *Biotechnology Advances*, 21, 2: 109-122
- Cui J., Goh K.K.T., Archer R., Singh H. 2007. Characterisation and bioactivity of protein-bound polysaccharides from submerged-culture fermentation of *Coriolus versicolor* Wr-74 and ATCC-20545 strains. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 34, 5: 393-402
- Dewick P.M. 2002. The mevalonate and deoxyxylulose phosphate pathways: terpenoids and steroids. V: Medicinal natural products. 2nd edition. Dewick P.M. (ur.). Nottingham, John Wiley & Sons: 167-289
- Doran P. M. 2004. Bioprocess engineering principles. Amsterdam, Elsevier Academic Press: 439 str.
- Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A., Smith F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28, 3: 350-356
- Elisashvili V.I., Kachlishvili E.T., Wasser S.P. 2009. Carbon and nitrogen source effects on basidiomycetes exopolysaccharide production. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 45, 5: 531-535
- Elisashvili V.I. 2012. Submerged cultivation of medicinal mushrooms: bioprocesses and products (review). *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 14, 3: 211-239
- Fang Q.-H., Zhong J.J. 2002. Submerged fermentation of higher fungus *Ganoderma lucidum* for production of valuable bioactive metabolites – ganoderic acid and polysaccharide. *Biochemical Engineering Journal*, 10, 1: 61-65

- Fazenda M.L., Seviour R., McNeil B., Harvey L.M. 2008. Submerged culture fermentation of »higher fungi«: The macrofungi. *Advances in Applied Microbiology*, 63: 33-103
- Gao J., Sato N., Hattori M., Ma C.-M. 2013. The simultaneous quantification of *Ganoderma* acids and alcohols using ultra high-performance liquid chromatography-mass spectrometry in dynamic selected reaction monitoring mode. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 74: 246-249
- Gunde – Cimerman N. 1996. Nitaste glive. V: *Biotehnologija. Osnovna znanja*. Raspor P. (ur.). Ljubljana, Bia: 95-111
- Harhaji Lj., Mijatović S., Maksimović-Ivanić D., Stojanović I., Momčilović M., Maksimović V., Tufegdžić S., Marjanović Ž., Mostarica-Stojković M., Vučinić Ž., Stošić-Grujičić S. 2008. Anti-tumor effect of *Coriolus versicolor* methanol extract against mouse B16 melanoma cells: *In vitro* and *in vivo* study. *Food and Chemical Toxicology*, 46, 5: 1825-1833
- Hobbs C. 1995. *Medicinal mushrooms: an exploration of tradition, healing & culture*. Summertown, Botanica Press: 327 str.
- Hölker U., Lenz J. 2005. Solid-state fermentation – are there any biotechnological advantages? *Current Opinion in Microbiology*, 8, 3: 301-306
- Hsu W., Hsu T., Lin F., Cheng Y., Yang J. 2012. Separation, purification, and  $\alpha$ -glucosidase inhibition of polysaccharides from *Coriolus versicolor* LH1 mycelia. *Carbohydrate Polymers*, 92, 1: 297-306
- Jo W., Kang M., Choi S., Yoo Y., Seok S., Jung H. 2010. Culture conditions for mycelial growth of *Coriolus versicolor*. *Mycobiology*, 38, 3: 195-202
- Kidd P.M. 2000. The use of mushroom glucans and proteoglycans in cancer treatment. *Alternative Medicine Review*, 5, 1: 4-27
- Kim S.W., Hwang H.J., Park J.P., Cho Y.J., Song C.H., Yun J.W. 2002. Mycelial growth and exo-biopolymer production by submerged culture of various edible mushrooms under different media. *Letters in Applied Microbiology*, 34, 1: 56-61
- Lee C., Yang X., Wan J.M. 2006. The culture duration affects the immunomodulatory and anticancer effect of polysaccharopeptide derived from *Coriolus versicolor*. *Enzyme and Microbial Technology*, 38, 1-2: 14-21

- Lin F., Lai Y., Yu H., Chen N., Chang C., Lo H., Hsu T. 2008. Effects of *Lycium barbarum* extract on production and immunomodulatory activity of the extracellular polysaccharopeptides from submerged fermentation culture of *Coriolus versicolor*. Food Chemistry, 110, 2: 446-453
- Masuko T., Minami A., Iwasaki N., Majima T., Nishimura S.-I., Lee Y.C. 2005. Carbohydrate analysis by a phenol-sulphuric acid method in microplate format. Analytical Biochemistry, 339, 1: 69-72
- Masurekar P.S. 2008. Nutritional and engineering aspects of microbial process development. V: Progress in drug research, vol. 65. Petersen F., Amstutz R. (ur.). Basel, Birkhäuser: 292-328
- Maziero R., Cavazzoni V., Ramos Bononi V.L. 1999. Screening of basidiomycetes for the production of exopolysaccharide and biomass in submerged culture. Revista de Microbiologia, 30, 1: 77-84
- Mixing (process engineering). 2015. Wikipedia, the free encyclopedia (17.mar.2015). [http://en.wikipedia.org/wiki/Mixing\\_\(process\\_engineering\)](http://en.wikipedia.org/wiki/Mixing_(process_engineering)) (24.mar.2015)
- Miyazaki T., Yadomae T., Sugiura M., Ito H., Fujii K., Naruse S., Kunihiya M. 1974. Chemical structure of antitumor polysaccharide, Coriolan, produced by *Coriolus versicolor*. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 22, 8: 1739-1742
- Moreira M. T., Feijoo G., Lema J. M. 2003. Fungal bioreactors: Applications to white-rot fungi. Reviews in Environmental Science and Bio/Technology, 2, 2-4: 247-259
- Naumoska K. 2011. Triterpenoids in medicinal mushrooms. Seminar pri predmetu Biotehnologija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo: 24 str. (neobjavljeno)
- Ng T.B. 1998. A review of research on the protein-bound polysaccharide (polysaccharopeptide, PSP) from the mushroom *Coriolus versicolor* (*Basidiomycetes: Polyporaceae*). General Pharmacology, 30, 1: 1-4
- Papagianni M. 2004. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. Biotechnology Advances, 22, 3: 189-259
- Perdih A. 1996. Izbor in priprava substratov. V: Biotehnologija. Osnovna znanja. Raspor P. (ur.). Ljubljana, Bia: 367-382

- Pohleven F. 2015a. »Lesne glive«. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za lesarstvo (osebni vir, 3.9.2015)
- Pohleven F. 2015b. »Fotografija glive *Trametes versicolor*«. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za lesarstvo (osebni vir, 3.9.2015)
- Que Y., Sun S., Xu L., Zhang Y., Zhu H. 2014. High-level coproduction, purification and characterisation of laccase and exopolysaccharides by *Coriolus versicolor*. Food Chemistry, 159: 208-213
- Rau U. 2004. Glucans secreted by fungi. Turkish Electronic Journal of Biotechnology, 2: 30-36
- Rau U., Kuenz A., Wray V., Nimtz M., Wrenger J., Cicek H. 2009. Production and structural analysis of polysaccharide secreted by *Trametes (Coriolus) versicolor* ATCC 200801. Applied Microbiology and Biotechnology, 81, 5: 827-837
- Russell R., Paterson M. 2006. *Ganoderma* – A therapeutic fungal biofactory. Phytochemistry, 67, 18: 1985-2001
- Shuler M., Kargi F. 2008. Bioprocess engineering. Basic concepts. 2. izdaja. Upper Saddle River, Prentice Hall: 553 str.
- Smith J.E., Rowan N.J., Sullivan R. 2002. Medicinal Mushrooms: a rapidly developing area of biotechnology for cancer therapy and other bioactivities. Biotechnology Letters, 24, 22: 1839-1845
- Song T., Yen G. 2002. Antioxidant properties of *Antrodia camphorata* in submerged culture. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50, 11: 3322-3327
- Stošić-Grujičić S., Mijatović S., Maksimović-Ivanić D. 2011. An evidence-based perspective of *Coriolus versicolor* (multicolored polypore mushroom) for cancer patients. V: Evidence-based Anticancer Materia Medica. Cho W.C.S. (ur.). Heidelberg, Springer-Verlag: 265-302
- Takeuchi T., Iinuma H., Iwanaga J., Takahashi S., Takita T., Umezawa H. 1969. Coriolin, a new basidiomycetes antibiotic. The Journal of Antibiotics, 22, 5: 215-217
- Tang Y.-J., Zhong J.-J. 2004. Submerged cultivation of medicinal mushrooms for production of valuable bioactive metabolites. V: Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology 87: Biomanufacturing. Zhong J.-J. (ur.). Berlin, Springer-Verlag: 25-59

- Tang Y.-J., Zhu L.-W., Li H.-M., Li D.-S. 2007. Submerged culture of mushrooms in bioreactors – Challenges, current state-of-the-art, and future prospects. *Food Technology and Biotechnology*, 45, 3: 221-229
- Tavares A.P.M., Agapito M.S.M., Coelho M.A.Z., Lopes da Silva J.A., Barros-Timmons A., Coutinho J.A.P., Xavier A.M.R.B. 2005. Selection and optimization of culture medium for exopolysaccharide production by *Coriolus (Trametes) versicolor*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 21, 8-9: 1499-1507
- Terpenoid. 2015. Wikipedia, the free encyclopedia (17.nov.2014). <http://en.wikipedia.org/wiki/Terpenoid> (24.mar.2015)
- Tišma M., Sudar M., Vasić-Rački Đ., Zelić B. 2010. Mathematical model for *Trametes versicolor* growth in submerged cultivation. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 33, 6: 749-758
- Wang H.X., Ng T.B., Ooi V.E.C., Liu W.K., Chang S.T. 1996. Polysaccharide – peptide complexes from the cultured mycelia of the mushroom *Coriolus versicolor* and their culture medium activate mouse lymphocytes and macrophages. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 28, 5: 601-607
- Wang F., Zhang J., Hao L., Jia S., Ba J., Niu S. 2012. Optimization of submerged culture conditions for mycelial growth and extracellular polysaccharide production by *Coriolus versicolor*. *Journal of Bioprocessing & Biotechniques*, 2, 4: 1-5  
<http://dx.doi.org/10.4172/2155-9821.1000124> (25.feb.2014)
- Wasser S.P. 2002a. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60, 3: 258-274
- Wasser S.P. 2002b. Review of medicinal mushrooms advances: Good news from old allies. *HerbalGram*, 56: 28-33
- Wasser S.P. 2011. Current findings, future trends, and unsolved problems in studies of medicinal mushrooms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89, 5: 1323-1332
- Xu P., Ding Z.-Y., Qian Z., Zhao C.-X., Zhang K.-C. 2008. Improved production of mycelial biomass and ganoderic acid by submerged culture of *Ganoderma lucidum* SB97 using complex media. *Enzyme and Microbial Technology*, 42, 4: 325-331

- Xu J.-W., Zhao W., Zhong J.-J. 2010. Biotechnological production and application of ganoderic acids. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87, 2: 457-466
- Xu X., Zhu J. 2011. Enhanced phenolic antioxidants production in submerged cultures of *Inonotus obliquus* in a ground corn stover medium. *Biochemical Engineering Journal*, 58-59: 103-109
- Yang J.P., Hsu T., Lin F., Hsu W., Chen Y. 2012. Potential antidiabetic activity of extracellular polysaccharides in submerged fermentation culture of *Coriolus versicolor* LH1. *Carbohydrate Polymers*, 90, 1: 174-180
- Žnidaršič P., Pavko A. 2001. The morphology of filamentous fungi in submerged cultivations as a bioprocess parameter. *Food Technology and Biotechnology*, 39, 3: 237-252
- Žnidaršič P., Pavko A. 2002. Praktikum iz biokemijskega inženirstva. Ljubljana, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo: 90 str.

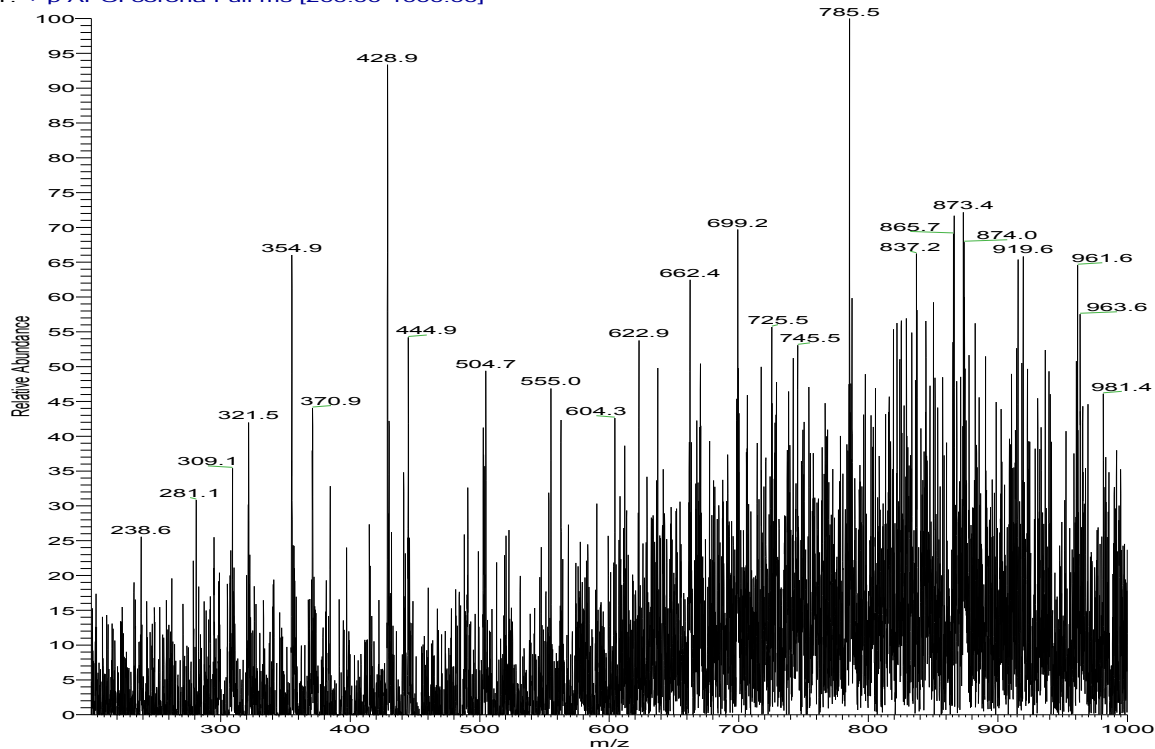
## **ZAHVALA**

Za posredovano znanje, pomoč in nasvete pri opravljanju diplomskega dela se lepo zahvaljujem Alenu Čusaku, Katerini Naumoski, Klemenu Birtiču in vsem zaposlenim v podjetju Acies Bio d.o.o.

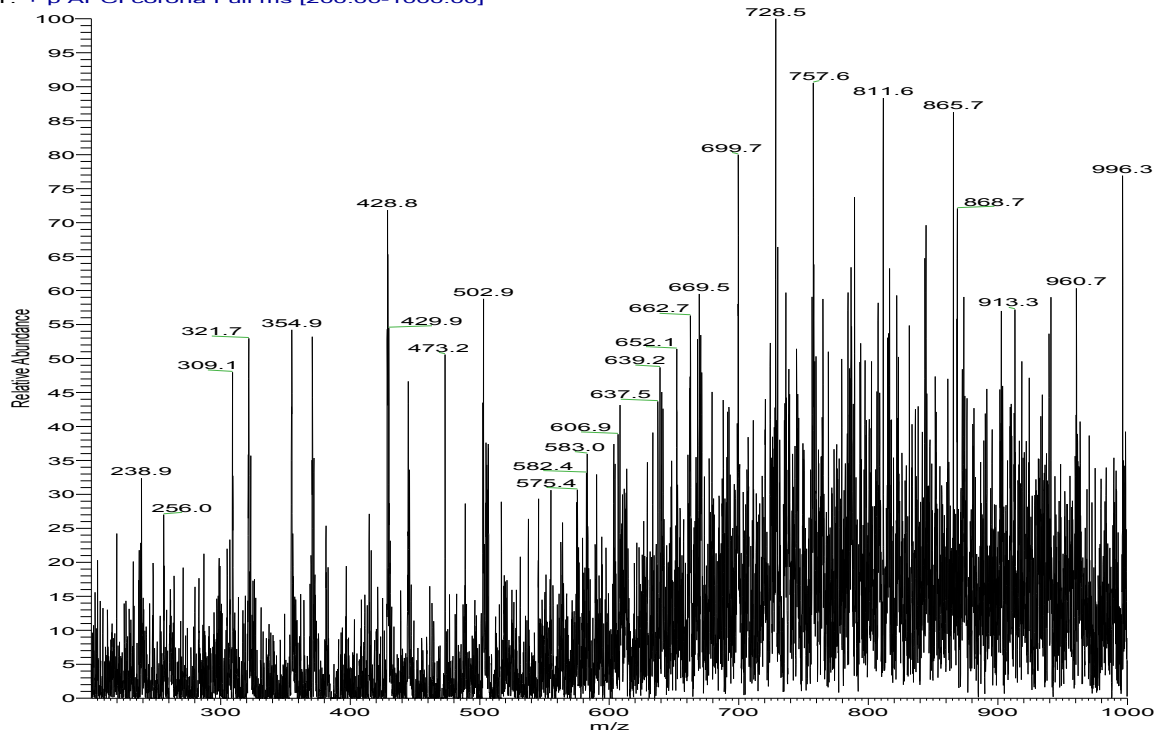
## PRILOGA A

Spekter prve lise (Slika 23) v primerjavi z ozadjem silikagel plošče. Priložen je samo eden od šestih spektrov, ker se med seboj bistveno ne razlikujejo.

2014\_12\_19-vz1\_s1 #1-53 RT: 0.00-1.00 AV: 53 NL: 1.38E3  
T: + p APCI corona Full ms [200.00-1000.00]

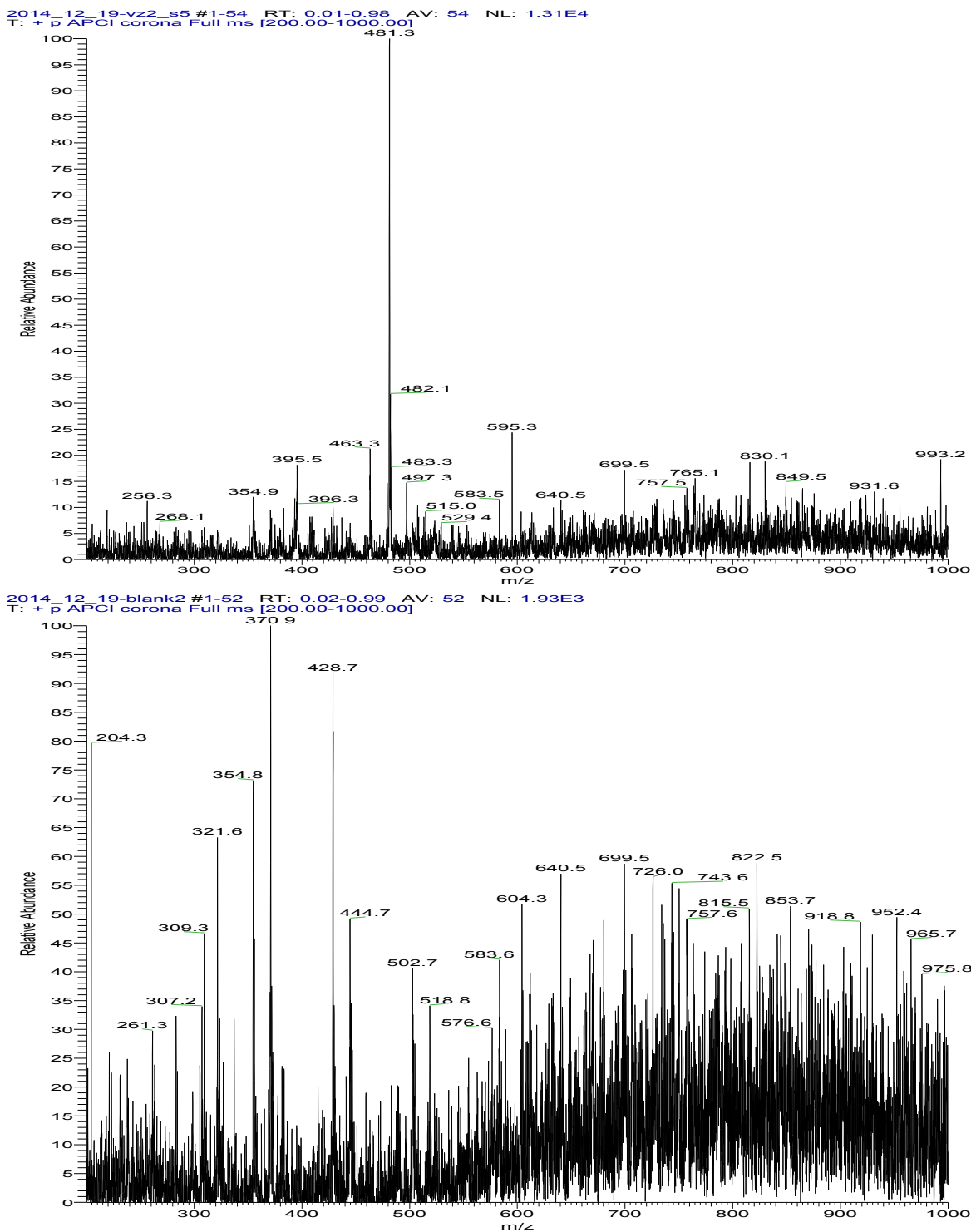


2014\_12\_19-blank1 #1-54 RT: 0.01-1.00 AV: 54 NL: 2.02E3  
T: + p APCI corona Full ms [200.00-1000.00]



## PRILOGA B

Spekter druge lise (Slika 23) v primerjavi z ozadjem silikagel plošče. Priložen je samo eden od šestih spektrov, ker se med seboj bistveno ne razlikujejo.



## PRILOGA C

Spekter tretje lise (Slika 23) v primerjavi z ozadjem silikagel plošče. Priložen je samo eden od šestih spektrov, ker se med seboj bistveno ne razlikujejo.

