

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Matej KALAR

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

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**BIOLOGICALLY ACTIVE COMPOUNDS IN AQUEOUS EXTRACTS  
OF SELECTED BASIDIOMYCETES**

GRADUATION THESIS  
University Studies

Ljubljana, 2008

Diplomsko delo je zaključek Univerzitetnega študija biologije. Opravljeno je bilo na katedri za biokemijo Oddelka za biologijo, Biotehniška fakulteta, Ljubljana.

Študijska komisija Oddelka za biologijo je za mentorja diplomskega dela imenovala prof. dr. Kristino Sepčič.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Nina Gunde-Cimerman

Član: prof. dr. Tom Turk

Član: prof. dr. Kristina Sepčič

Datum zagovora: 14.11.2008

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

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

Matej KALAR

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn  
DK 577.1:582.28(043.2)=163.6  
KG gobe / bazidiomicete / naravni produkti/ hemolitična aktivnost / hemaglutinacijska aktivnost / protibakterijska aktivnost / anti-acetilholinesterazna aktivnost  
KK  
AV KALAR, Matej  
SA SEPČIČ, Kristina  
KZ SI – 1000 Ljubljana, Večna pot 111  
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo  
LI 2008  
IN BIOLOŠKO AKTIVNE SNOVIV VODNIH EKSTRAKTIH NEKATERIH BAZIDIOMICET  
TD Diplomaska naloga  
OP  
IJ SI  
JI SI  
AI Vodne ekstrakte 28 vrst gob smo testirali s štirimi biološkimi testi in ugotavljali njihovo biološko aktivnost. V vodnih ekstraktih smo iskali hemolitično, hemaglutinacijsko, protibakterijsko delovanje in inhibitorno delovanje proti encimu acetilholinesterazi. Vsako od 28 vrst gob smo ekstrahirali v deionizirani vodi in vsaki ekstrakt razdelili na dva dela. Polovico ekstraktov smo izpostavili vrelišču. Tako smo imeli »svežo« serijo 28 vzorcev, ki so vsebovali beljakovine in 28 »kuhanih« vzorcev, katerim smo odstranili beljakovine. Ugotovili smo, da je hemolitično delovalo 13 vzorcev 11 vrst gob (*Agaricus arvensis*, *Amanita citrina*, *Hygrophorus agathosmus*, *Hygrophorus eburneus*, *Hygrophorus pudorinus*, *Lactarius deterrimus*, *Lactarius salmonicolor*, *Tricholoma aurantium*, *Tricholoma pardalotum*, *Tricholoma sulphureum*, *Tricholoma vaccinum*). Protibakterijsko delovanje smo zasledili pri 9 od 56 vzorcev, močna aktivnost je bila zabeležena le pri »svežem« in »kuhanem« ekstraktu vrste *Hygrophorus pudorinus*. Hemaglutinacijsko aktivnost smo zasledili pri 3 vzorcih 2 vrst gob (*Hygrophorus pudorinus* in *Lactarius scrobiculatus*). Močno antiacetilholinesterazno aktivnost sta imela »surovi« in »kuhani« ekstrakt vrste *Lactarius scrobiculatus*. V diplomski nalogi smo odkrili nekaj do sedaj neobjavljenih bioloških aktivnosti določenih vrst gob. Predvsem pomembna je inhibicija acetilholinesteraze, saj do sedaj v gobah ni bil odkrit še noben inhibitor tega encima.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn  
DC 577.1:582.28(043.2)=163.  
CX mushrooms / basidiomycetes / natural products / hemolytic activity /  
hemagglutination / antibacterial activity / anti-acetylcholinesterase activity  
CC  
AU KALAR, Matej  
AA SEPČIČ, Kristina (supervisor)  
PP SI – 1000 Ljubljana, Večna pot  
PB Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo  
PY 2008  
TI BIOLOGICALLY ACTIVE COMPOUNDS IN AQUEOUS EXTRACTS OF  
SELECTED BASIDIOMYCETES  
DT Graduation thesis  
NO  
LA SI  
AL sl / en  
AB We tested the aqueous extracts of 28 different basidiomycetes using 4 biological assays to detect the presence of biologically active compounds. We looked for hemolytic, hemagglutinating and antibiotic activity and possible inhibition of acetylcholinesterase. Each of the 28 basidiomycetes specimens was extracted with deionized water. Each extract was divided into two parts, and one part was boiled. Thus, 28 samples were assigned as to »fresh« (containing proteins), and 28 samples as »boiled« (proteins were removed from them by centrifuging the cooked samples). Our results showed that 13 extracts from 11 species (*Agaricus arvensis*, *Amanita citrina*, *Hygrophorus agathosmus*, *Hygrophorus eburneus*, *Hygrophorus pudorinus*, *Lactarius deterrimus*, *Lactarius salmonicolor*, *Tricholoma aurantium*, *Tricholoma pardalotum*, *Tricholoma sulphureum*, *Tricholoma vaccinum*) exhibited hemolytic activity. Antibacterial activity was present in 9 out of the 56 extracts, but strong activity was characteristic of only one "fresh" and one "cooked" extract from the species *Hygrophorus podorinus*. Hemagglutination was found in 3 extracts from the 2 species (*Hygrophorus pudorinus* in *Lactarius scrobiculatus*). We found strong acetylcholinesterase inhibition for "fresh" and "cooked" extract from the species *Lactarius scrobiculatus*. Several of the above-mentioned activities were yet not described in literature. Particularly, this is the first record of the presence of an acetylcholinesterase inhibitor in a mushroom.

## KAZALO VSEBINE

	str.
<b>Ključna dokumentacijska informacija (KDI).....</b>	<b>III</b>
<b>Key Words Documentation (KWD).....</b>	<b>IV</b>
<b>Kazalo vsebine .....</b>	<b>V</b>
<b>Kazalo preglednic .....</b>	<b>VII</b>
<b>Kazalo slik .....</b>	<b>VIII</b>
<b>Kazalo prilog .....</b>	<b>IX</b>
<b>Okrajšave in simboli.....</b>	<b>X</b>
<b>1 UVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>2 PREGLED OBJAV .....</b>	<b>2</b>
2.1 PREGLEDNICA OBJAVLJENIH RAZISKAV	2
2.2 SPLOŠNE MORFOLOŠKE ZNAČILNOSTI GOB	2
<b>3 MATERIAL IN METODE .....</b>	<b>5</b>
3.1 MATERIAL	5
<b>3.1.1 Vzorci gob</b>	<b>5</b>
3.1.1.1 Sortiranje materiala	5
3.1.1.2 Razdelitev vzorcev	7
<b>3.1.2 Priprava vodnih ekstraktov</b>	<b>8</b>
<b>3.1.3 Izračuni suhe teže ekstrahirane snovi v vzorcih</b>	<b>8</b>
<b>3.1.4 Določanje količine proteinov</b>	<b>8</b>
3.2 TESTI ZA DOLOČANJE BIOLOŠKE AKTIVNOSTI	9
<b>3.2.1 Hemolitični test</b>	<b>9</b>
<b>3.2.2 Določanje protibakterijske aktivnosti z difuzijskim testom na agarju</b>	<b>10</b>
<b>3.2.3 Hemaglutinacijski test</b>	<b>11</b>
<b>3.2.4 Test inhibicije acetilholinesteraze</b>	<b>12</b>
<b>4 REZULTATI.....</b>	<b>13</b>
4.1 DOLOČANJE KOLIČINE SUHE SNOVI IN PROTEINOV V EKSTRAKTIH	13
4.2 HEMOLITIČNA AKTIVNOST	16
4.3 PROTIBAKTERIJSKA AKTIVNOST	20

4.4	HEMAGLUTINACIJSKA AKTIVNOST	23
4.5	ANTIACETILHOLINESTERAZNA AKTIVNOST	26
<b>5</b>	<b>RAZPRAVA IN SKLEPI.....</b>	<b>30</b>
5.1	RAZPRAVA	30
<b>5.2</b>	<b>SKLEPI</b>	<b>36</b>
<b>6</b>	<b>POVZETEK.....</b>	<b>39</b>
<b>7</b>	<b>VIRI.....</b>	<b>39</b>
	<b>ZAHVALA</b>	
	<b>PRILOGE</b>	

## KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Vrste in oznake gob, nabranih v Mehkih Dolinah pri Idriji. ....	6
Preglednica 2: Vrste in oznake gob nabranih na Hudourniku pri Vojskem, Slovenija. ....	7
Preglednica 3: Količina suhe snovi in proteinov v surovih in kuhanih vodnih ekstraktih gob .....	14
Preglednica 4: Rezultati hemolitične aktivnosti vseh testiranih vzorcev gob .....	16
Preglednica 5: Rezultati hemolitične aktivnosti vzorcev 16s, 3s, 19s, 12s 6s, 6k, 11s, 17s, 5s, 21s, 14s, 14k po vnosu različnih količin vzorca v jamice mikrotitrne ploče .....	18
Preglednica 6: Rezultati protibakterijske aktivnosti vodnih ekstraktov testiranih gob. ...	20
Preglednica 7: Rezultati protibakterijske aktivnosti po redčenju petih aktivnih vzorcev v razmerjih 1:10, 1:100 in 1:1000. ....	22
Preglednica 8: Rezultati hemaglutinacijske aktivnosti testnih vzorcev gob.....	23
Preglednica 9: Rezultati hemaglutinacijske aktivnosti po redčenju treh aktivnih vzorcev v razmerjih 1:10, 1:100 in 1:1000. ....	25
Preglednica 10: Rezultati delovanja vzorcev testiranih gob na encim acetilholinesterazo. Prikazane so stopnje preostale acetilholinesterazne aktivnosti in stopnja inhibicije acetilholinesterazne aktivnosti glede na kontrolo. ....	26
Preglednica 11: Rezultati encimskega testa z acetilholinesterazo (AChE). Prikazane so redčitve 1:10, 1:20, 1:50, 1:100, 1:200, 1:500 in 1:1000 vzorcev 24s in 24k vrste <i>Cortinarius infractus</i> . Stopnja inhibicije AChE aktivnosti je prikazana glede na kontrolo.....	28

## KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Skica morfoloških značilnosti gobe .....	4
Slika 2: Mehke Doline pri Idriji, Slovenija. ....	5
Slika 3: Hudournik pri Vojskem, Slovenija .....	7
Slika 4: Koncentracije proteinskih standardov (BSA) in njihove absorpcije pri 562 nm. ....	9
Slika 5: Odvisnost recipročne vrednosti polovičnega časa hemolize ( $1/t_{50}$ ) od koncentracije suhe snovi hemolitično aktivnih vzorcev, dodane v testu. Testirali smo vzorce 16s, 19s, 12s, 6s, 11s, 17s, 5s, 2s, 14s in 6k. Skala na oseh x in y je logaritemska.....	19
Slika 6. Inhibicija acetilholinesteraze z vzorci 24s in 24k vrste <i>Cortinarius infractus</i> . Odvisnost stopnje inhibicije AChE od koncentracije suhe snovi v ekstraktu.....	29



## KAZALO PRILOG

Priloga A : Pregled objav.

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ACh	acetilholin
AChE	acetilholinesteraza
BSA	goveji serumski albumin
k	vzorec »kuhane« serije
MIK	minimalna inhibitorna koncentracija
OVER	vrednost absorpcije, ki je nismo mogli odčitati s spektrofotometrom (glej poglavje 4.1)
s	vzorec »sveže« serije
t <sub>50</sub>	polovični čas hemolize

## 1 UVOD

Višje prostotrosnice so postale predmet obsežnih raziskav zaradi njihovih hranilnih vrednosti in farmakoloških lastnosti. Gobe predstavljajo pomemben dejavnik v zdravi prehrani, saj vsebujejo malo maščob, večina teh je esencialnih maščobnih kislin, beljakovine, vitamine in minerale, poleg tega pa so še nizko kalorične (Agrahar-Murugkar in Subbulakshmi, 2005, Manzi in sod., 2001, Breene, 1990).

V preventivni medicini se večinoma uporabljajo zato, ker preprečujejo nastanek raznih bolezni kot so rakava obolenja, srčno-žilne bolezni ter znižujejo holesterol (Wasser in Weis, 1999). Pomembne so tudi pri premagovanju fizičnega in čustvenega stresa, osteoporoze, želodčnih čirov, krepitvi imunskega sistema in povečanju kvalitete življenja diabetikov ter imajo pomembno vlogo tudi kot antioksidanti.

V Azijskih državah ima uporaba gob v medicini že dolgo tradicijo, medtem ko se v Zahodnih državah uveljavlja šele v zadnjih letih. Trend povečevanja uporabe gob v preventivni medicini kažejo številne nove raziskave objavljene v znanstvenih revijah, npr. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, različnih knjigah in poročilih o zdravilnih gobah (Hobbs, 1995, Lelley, 1997, Lindequist in sod., 1998, Stamets, 2000) in njihovih biološko aktivnih komponentah (Zjawiony, 2004) ter prav tako tudi mednarodne konference na to temo. Zanimiv je tudi podatek, da je bila tržna vrednost gob, ki se uporabljajo za zdravstvene namene in njihovih derivatov za prehranske namene, leta 1991 okrog 1,2 milijarde dolarjev (Chang, 1996), v letu 1999 pa se je dvignila na 6 milijard dolarjev (Waser, 2000).

V diplomski nalogi smo se lotili raziskav vzorcev gob, nabranih oktobra 2007 v Mehkih Dolinah pri Idriji in na Hudourniku pri Vojskem (Slovenija), z namenom iskanja novih potencialno aktivnih snovi z različnimi biološkimi učinki. Osredotočili smo se na vodne ekstrakte, katere smo v nadaljevanju raziskovanja uporabili za testiranje hemolitične, protibakterijske in hemaglutinacijske aktivnosti ter sposobnosti inhibicije encima acetilholinesteraze.

## **2 PREGLED OBJAV**

### **2.1 PREGLEDNICA OBJAVLJENIH RAZISKAV**

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

### **2.2 SPLOŠNE MORFOLOŠKE ZNAČILNOSTI GOB**

Gobe se razlikujejo od rastlin po tem, da nimajo klorofila. Zato nimajo sposobnosti, da bi pod vplivom svetlobe asimilirale celo vrsto za življenje potrebnih snovi. Morajo se hraniti s snovmi, ki so jih že predelali drugi, višje razviti organizmi. Življenje gliv je torej odvisno od drugih organizmov; pravimo, da je heterotrofno.

Glede na način življenja ločimo parazitske, saprofitske in mikorizne vrste gob. Parazitske gobe živijo na račun drugih, saprofitske za svoje preživetje potrebujejo razkrajajoč organski substrat, mikorizne pa živijo v simbiozi z rastlinami (Lassoe, 2006).

Od rastlin se prave gobe razlikujejo tudi po strukturi celic: v njih ni tipičnega Golgijevega aparata, pogosto pa je razvit lomasom, vezikularna struktura, ki sodeluje pri sekreciji in nastanku glivne celične stene. Vakuole se pojavljajo le v starejših celicah. Jedro vsebuje razmeroma malo DNA (le okoli 10x toliko kot pri bakterijah, drugi evkarionti je imajo okoli tisočkrat več), kromosomov je malo (3-15) in med mitozo v glavnem ne pride do kontrakcije. (Jogan, 2001).

Gobe so znane tudi po produkciji številnih sekundarnih metabolitov, med katerimi so najbolj znani strupi (npr. amatoksin, faloidin, muskarin, psilocibin, giromitrin, ibotenska kislina) in antibiotiki.

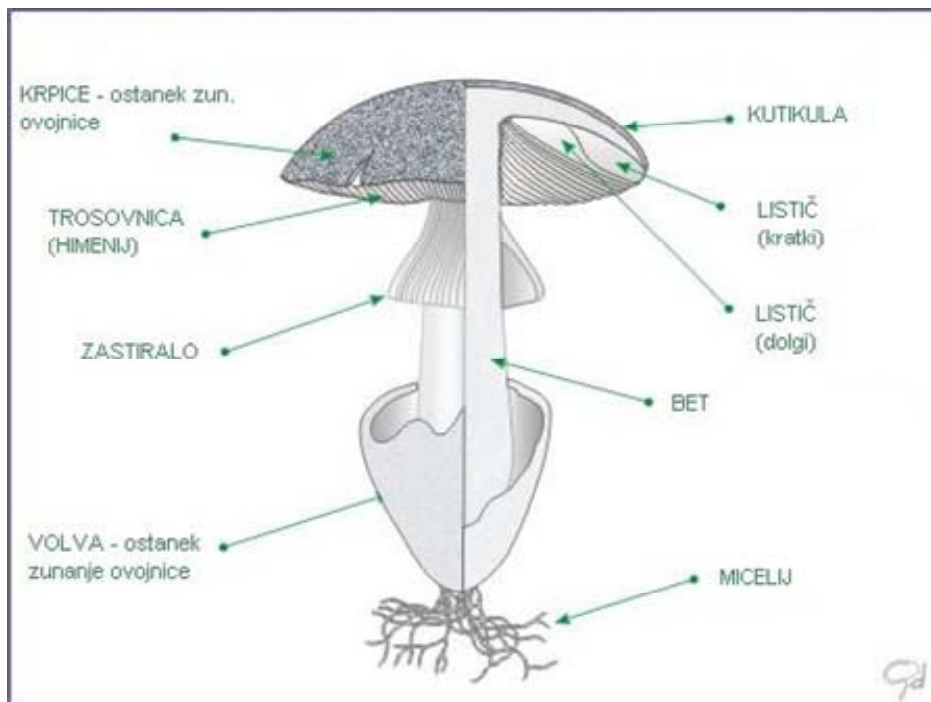
Goba je vsaka gliva, ki vsaj občasno razvije opazne trosnjake – ti so pogosto edini s prostim očesom vidni del gobe. Po obliki so trosnjaki zelo raznovrstni, od najbolj znanih z razločnim betom in klobukom, do drugih z manj razpoznavno morfologijo. Na trosnjakih ali v njih se razvijejo trosi spolnega razmnoževanja – po načinu nastanka trosov mikologi razvrščajo prave glive (deblo Mycota) v štiri razrede: jarmaste glive (Zygomycetes), kvasovkam sorodne glive (Endomycetes), zaprtotrosnice (Ascomycetes) in prototrosnice (Basidiomycetes). Mi smo se osredotočili le na prototrosnice.

Prototrosnice so samostojna skupina gliv, ki jih od ostalih lahko oddelimo celo na nivoju poddebla Basidiomycotina. Med glivami so dosegle največjo kompleksnost v zgradbi hif in plodišč po eni in v strukturi razvojnega kroga po drugi strani.

Vsako glivo in tudi njene trosnjake sestavlja množica tankih nitk, imenovanih hife. Te se razpredajo po tleh ali drugem substratu in sestavljajo podgobje ali micelij. V ugodnih razmerah se iz njega na površini substrata razvijejo trosnjaki. Na vsakem trosnjaku je trosovnica (himenij) – plodovno tkivo, v katerem se razvijajo trosi. Trosovnico pogosto nosijo mesnati deli klobuka ali beta.

Trosnjaki gliv so po obliki zelo raznovrstni in imajo na več različnih načinov nameščeno trosovnico (himenij). Trosi se lahko razvijejo v trosovnici na lističih, v cevkah, letvicah, bodicah ali na gladkih površinah trosnjaka, pri nekaterih vrstah pa celo znotraj trosnjaka. Ob zrelosti se trosi bodisi aktivno bodisi pasivno razsipajo. Pri pasivnem načinu raznašajo trose živali, veter ali voda, za aktivno razsipavanje pa poskrbijo posebni mehanizmi v trosnjaku, ki izvržejo ali izstrelijo zrele trose. Način razsipanja trosov lahko pogosto razberemo iz oblike trosnjaka.

Na klobuku je veliko pomembnih znakov za prepoznavanje različnih vrst gob. Značilne so tako njihova oblika kot posebnosti na njegovi kožici, npr. krpice ali resičast rob (ostanki trosnjakove ovojnice). Vrste se razlikujejo tudi po znakih na spodnji strani klobuka, zlasti po lističih ali cevkah ter njihovi priraslosti na bet (Lassoe, 2006). Osnovne morfološke značilnosti gobe so prikazane na sliki 1.



Slika 1: Skica morfoloških značilnosti gobe  
<http://www.funghiitaliani.it/micologia/images-tassonomia/basidiomycetes1.jpg> .

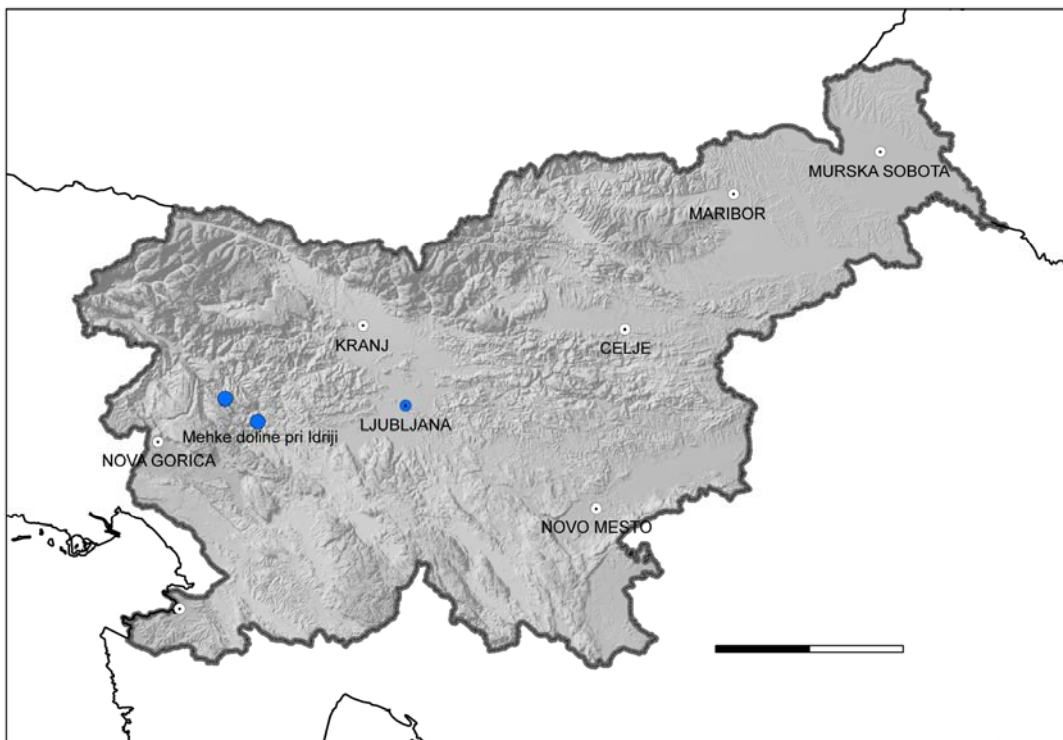
## 3 MATERIAL IN METODE

### 3.1 MATERIAL

#### 3.1.1 Vzorci gob

##### 3.1.1.1 Sortiranje materiala

Vzorci osemindvajsetih vrst gob so nabrali v Mehkih Dolinah pri Idriji in na Hudourniku pri Vojskem, Slovenija. Vzorce so nabrali in določili A. Piltaver, A. Jesenko, T. Grebenc, K. Sepčič, J. Kranjc, V. Jelen Sajn in S. Šerod, dne 19.10 in 21.10. 2007. Vzorce so nato liofilizirali in zamrznili.



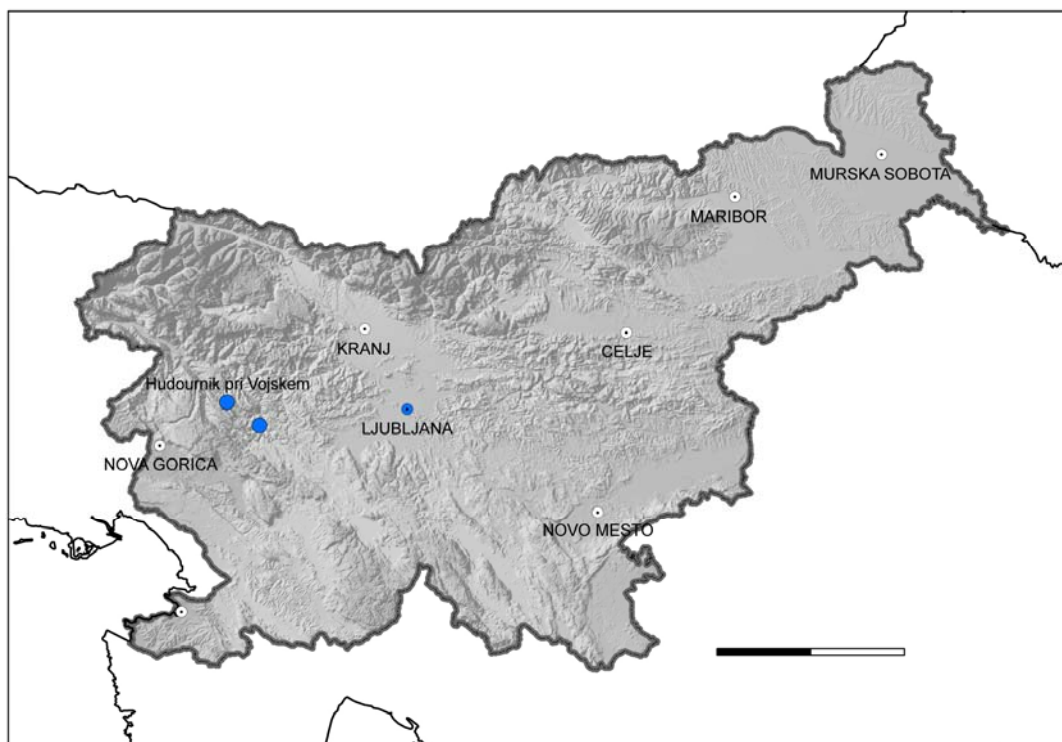
Slika 2: Mehke Doline pri Idriji, Slovenija.

V preglednici 1 so navedene vrste gob in oznake vzorcev z lokacije Mehke Doline pri Idriji, Slovenija.

Preglednica 1: Vrste in oznake gob, nabranih v Mehkih Dolinah pri Idriji.

<b>Vrsta gobe</b>	<b>Slovensko ime</b>	<b>Oznaka vzorca</b>
<i>Amanita citrina</i>	Citronasta mušnica	3
<i>Bovista nigrescens</i>	Jajčasti kadilček	13
<i>Cordyceps capitata</i>	Košutnični glavatec	8
<i>Cortinarius balteatocumatilis</i>	Sinjebetna koprenka	10
<i>Cortinarius infractus</i>	Scefrana koprenka	24
<i>Hydnellum peckii</i>	Peckova ježevka	20
<i>Hygrophorus agathosmus</i>	Dišeča polževka	19
<i>Hygrophorus eburneus</i>	Bela polževka	12
<i>Hygrophorus pudorinus</i>	Hojeva polževka	6
<i>Lactarius deterrimus</i>	Smrekova sirovka	11
<i>Lactarius salmonicolor</i>	Lososova sirovka	17
<i>Lactarius scrobiculatus</i>	Jamičasta mlečnica	28
<i>Lepista nuda</i>	Vijoličasta kolesnica	26
<i>Peziza badia</i>	Rjava skledica	9
<i>Pseudoclitocybe cyathiformis</i>	Latvičasta pálivka	23
<i>Russula cavipes</i>	Votlobetna golobica	22
<i>Tremiscus helvelloides</i>	Uhati drhtavež	4
<i>Tricholoma aurantium</i>	Zlatenkasta kolobarnica	5
<i>Tricholoma pardalotum</i>	Pegasta kolobarnica	21
<i>Tricholoma sulphureum</i>	Žveplena kolobarnica	2
<i>Tricholoma vaccinum</i>	Kocasta kolobarnica	14





Slika 3: Hudournik pri Vojskem, Slovenija.

V preglednici 2 so navedene vrste gob in oznake vzorcev na Hudourniku pri Vojskem, Slovenija.

Preglednica 2: Vrste in oznake gob nabranih iz Hudournika na Vojskem, Slovenija.

<i>Vrsta gobe</i>	<b>Slovensko ime</b>	<b>Oznaka vzorca</b>
<i>Agaricus arvensis</i>	Poljski kukmak	16
<i>Calvatia excipuliformis</i>	Visoka plešivka	18
<i>Cantharellus tubaeformis</i>	Lijasta lisička	1
<i>Craterellus cornucopioides</i>	Črna trobenta	15
<i>Cystoderma amianthinum</i>	Rjava zrnovka	27
<i>Entoloma rhodopolium</i>	Nizka rdečelistka	25
<i>Macrolepiota procera</i>	Orjaški dežnik	7

### 3.1.1.2 Razdelitev vzorcev

Liofilizirane vzorce gob (1-5 g) smo strli v terilnici, tako da smo dobili prah. Nato smo vzorec razdelili na dva približno enaka dela, enega sem ekstrahirala jaz (kot je opisano v

poglavju 3.1.2.). Preostalo je kolegica Antonija Bogdan uporabila za pripravo organskih ekstraktov, ki jih je analizirala v svoji diplomski nalogi.

### **3.1.2 Priprava vodnih ekstraktov**

Vsakemu vzorcu smo dodali toliko deionizirane vode, da je za približno 2 cm prekrila strto liofilizirano gobje tkivo. Nato smo vzorce v plastični centrifugirki ekstrahirali 12-24 ur na stresalniku pri 600 obratih/min in 4 °C.

Po končani ekstrakciji smo ekstrakte centrifugirali 30 min pri 15 000 obratih/min in 4 °C. Supernatante smo previdno odpipetirali in jih razdelili v dve plastični epici (po 2 ml). Eno epico z vzorcem smo označili z oznako »s« (surovi vzorec) in jo shranili pri -20 °C.

Drugo epico z isto vrsto vzorca smo 10 min segrevali na vodni kopeli pri 100 °C. Nato smo vzorce ohladili in centrifugirali 20 min pri 13 000 obratih/min na sobni temperaturi. Supernatant smo odpipetirali v epice, ki smo jih označili z oznako »k« (kuhani vzorec) in jih nato shranili pri -20 °C.

### **3.1.3 Izračuni suhe teže ekstrahirane snovi v vzorcih**

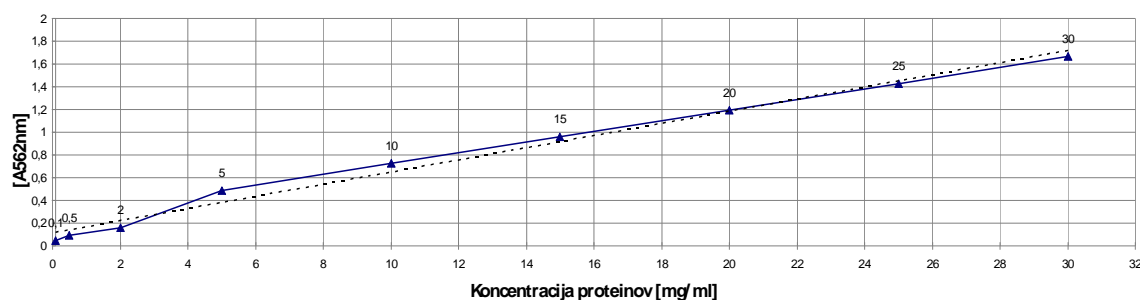
Suho težo vzorca smo določili s sušenjem 100 µl vzorca v stehtani in označeni posodici iz aluminijaste folije. Sušili smo v sterilizatorju 30 min pri 120 °C. Po sušenju smo posodice ponovno stehtali in preračunali suhe teže v mg/ml. Rezultati so prikazani v preglednici 3 (poglavje 4.1).

### **3.1.4 Določanje količine proteinov**

Količino proteinov smo merili samo pri surovih vzorcih, in sicer na podlagi primerjave izmerjene absorpcije z umeritveno krivuljo za znani goveji serumski albumin (BSA). Vzorce (po 2 µl) smo vbrizgali v jamice mikrotitrne plošče in jim dodali 8 µl deionizirane vode ter po 100 µl mešanice reagentov BCA protein reagent A (Pierce, 23223) in BCA protein reagent B (Pierce, 23224) v razmerju 1:20. Poleg vzorcev smo na isti način testirali

tudi predhodno pripravljene različne koncentracije standardnega govejega serumskega albumina (*ang. bovine serum albumin*, BSA) (10, 5, 1, 0.5, 0.1, 0.05 in 0.01 mg/ml). Mikrotitrno ploščo smo inkubirali 30 min v topli sobi pri 37°C. S čitalcem mikrotitrih plošč (Dynex Technologies, ZDA) smo nato določili absorpcijo proteinov pri valovni dolžini 562 nm. Prvih šest vrednosti absorpcij standardov smo dobili eksperimentalno, vrednosti nad 10 mg/ml pa tako, da smo predvideli naraščanje premice premosorazmerno glede na naklon premice med petim in šestim rezultatom (med 5 in 10 mg/ml). Po odčitavanju vrednosti s pomočjo standardizirane premice smo upoštevali še faktor razredčitve (vse rezultate še pomnožili s pet) in tako dobili koncentracijo proteinov v mg/ml.

**Slika 4** prikazuje koncentracije proteinov ter njihove absorpcije, na podlagi katerih smo naredili umeritveno krivuljo.



Slika 4: Koncentracije proteinskih standardov (BSA) in njihove absorpcije pri 562 nm.

## 3.2 TESTI ZA DOLOČANJE BIOLOŠKE AKTIVNOSTI

### 3.2.1 Hemolitični test

Eritrocite smo s centrifugiranjem izolirali iz sveže goveje krvi, ki smo ji pri odvzemu dodali citrat, da ni prišlo do strjevanja. Eritrocite smo trikrat sprali s fiziološko raztopino in uporabili za biološke teste ali pa spravili v Alseverjevem konzervansu v hladilnik. Tako pripravljene eritrocite lahko uporabljamo dokler se supernatant ne pobarva rdeče, kar nakazuje, da je prišlo do hemolize. Pred uporabo smo konzervirane eritrocite vedno dvakrat sprali s fiziološko raztopino. Za testiranje smo jih resuspendirali v pufru za

eritrocite (raztopina 0.13 M NaCl in 0.02 M TRIS.HCl), pH 7.4. Pripravili smo suspenzijo eritrocitov, ki je pri 650 nm imela navidezno absorpcijo  $1 \pm 0.01$ .

Hemolitično aktivnost smo zasledovali s pomočjo čitalca mikrotitrnih plošč (Dyner Technologies, ZDA), ki nam omogoča istočasno zasledovanje 96 časovnih potekov. Na mikrotitrni plošči smo napolnili 56 vdolbinic s po 100  $\mu$ l eritrocitnega pufru in 20  $\mu$ l vzorca (svežega ali kuhanega ekstrakta posameznih gob). Po končanem pipetiranju smo v vsako vdolbinico dodali še 100  $\mu$ l eritrocitov ter pričeli z meritvijo. Hemolizo smo opazovali kot padec absorpcije pri 650 nm. Kot kontrolo smo uporabili 100  $\mu$ l eritrocitnega pufru, 20  $\mu$ l deionizirane vode in 100  $\mu$ l eritrocitov. Hemolizo smo zasledovali 20 minut pri 25 °C.

Pri vzorcih, ki so bili aktivni, smo testirali tudi večje in manjše volumne ekstraktov in odčitali polovični čas hemolize ( $t_{50}$ ), oz. čas pri katerem absorpcija pade na polovico svoje začetne vrednosti. Testirali smo po 30  $\mu$ l, 20  $\mu$ l, 10  $\mu$ l in 5  $\mu$ l vzorca.

### **3.2.2 Določanje protibakterijske aktivnosti z difuzijskim testom na agarju**

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

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

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

Pred uporabo smo s pomočjo steriliziranega plutovrta v vsaki plošči zvrtili 7 jamic premera 1 cm. V vsako od njih smo za test dodali po 100  $\mu\text{l}$  vzorca (svežega ali kuhanega ekstrakta posameznih gob). Po 12-urni inkubaciji pri  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  smo odčitali polmere inhibicijskih con, ki so bile vidne okoli jamic.

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

### **3.2.3 Hemaglutinacijski test**

Goveje eritrocite smo trikrat sprali z 0.9% raztopino NaCl in dvakrat s pufrom, ki je vseboval 140 mM NaCl ter 20 mM TRIS/HCl, pH 7.4. V istem puftru smo pripravili 2% suspenzijo spranih eritrocitov.

Za test smo mikrotitrno ploščo, ki ima jamice z zaobljenim dnom, napolnili s po 100  $\mu$ l suspenzije eritrocitov ter s po 20  $\mu$ l vzorca. Po 60-minutni inkubaciji pri sobni temperaturi smo rezultate odčitali vizualno.

Pri vzorcih, ki so kazali pozitivne rezultate smo naredili še serijo redčenj v razmerjih 1:10 in 1:100. S tem smo določili okvirno minimalno koncentracijo, pri kateri je hemaglutinacija še potekla.

### **3.2.4 Test inhibicije acetilholinesteraze**

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

Nato smo v posamezno vdolbinico dodali po 20  $\mu$ l vsakega testnega vzorca (svežega ali kuhanega ekstrakta gobe) ter 50  $\mu$ l AChE. Pri kontroli smo namesto vzorca dodali 20  $\mu$ l vode. Vse vzorce, pri katerih smo ugotovili pozitiven rezultat, smo v nadaljevanju redčili v razmerjih 1: 10, 1:20, 1:50, 1:100, 1:200, 1:500 in 1:1000. Vse meritve smo izvajali 5 min pri 412 nm in 25 °C.

## 4 REZULTATI

### 4.1 DOLOČANJE KOLIČINE SUHE SNOVI IN PROTEINOV V EKSTRAKTIH

Preglednica 3 prikazuje koncentracije suhe snovi in koncentracije proteinov v vseh testiranih ekstraktih gob, ki smo jih uporabili pri preračunavanju količine snovi in proteinov v bioloških testih.

Pri merjenju koncentracije proteinov v vzorcih smo pri vzorcu 9s vrste *Peziza badia* naleteli na težavo, saj je vzorec tudi po tisočkratnem redčenju imel previsoko absorpcijo, ki jo spektrofotometer ni mogel odčitati. (napisal je OVER). Po pregledu navodil za uporabo kita (Pierce ® BCA Protein Assay Kit) smo se seznanili z možnimi vzroki za težave. Težavo bi lahko povzročala prevelika koncentracija proteinov v vzorcu. Ker se je težava pojavljala tudi po nekajkratnem redčenju smo predpostavljali, da je za to krivo nekaj drugega. Težavo bi lahko povzročala tudi vsebnost lipidov in lipoproteinov vzorcu.

Znane snovi, ki povzročajo motnje z BCA reagentom, so tiste z redukcijskim potencialom, kelatorji in močne kisline ter baze. Zato ker je znano, da motijo pri določevanju proteinske koncentracije že pri minimalni koncentraciji, predlagajo da se izogibamo prisotnosti askorbinske kisline, EGTA, železa, neprečiščene saharoze, kateholaminov, neprečiščene glicerola, lipidov, triptofana, kreatinina, vodikovega peroksida, melibioze, tirozina, cisteina, hidrazidov, fenol rdečega ali urične kisline.

Natančno kaj je povzročalo težavo nismo ugotovili, saj nismo našli nobenega članka, ki bi obravnaval natančno kemično sestavo omenjene vrste gobe.

Preglednica 3: Količina suhe snovi in proteinov v surovih in kuhanih vodnih ekstraktih gob.

s = surovi ekstrakti  
k = kuhani ekstrakti  
/ = "kuhana serija" vzorcev ni vsebovala proteinov, zato nismo opravljali meritev absorpcije teh ekstraktov  
OVER = prisotnost snovi, ki so motile meritev (glej poglavje 4.1)

Vrsta gobe	Oznaka vzorca	Suha teža [mg/ml]	A <sub>562nm</sub>	Koncentracija proteinov [mg/ml]
<i>Agaricus arvensis</i>	16 s	81,1	0,453	4,65
	16 k	33,3	/	/
<i>Amanita citrina</i>	3 s	74,7	1,663	29,50
	3 k	74,8	/	/
<i>Bovista nigrescens</i>	13 s	29,9	0,373	3,90
	13 k	21,5	/	/
<i>Calvatia excipuliformis</i>	18s	37,9	0,844	12,65
	18k	28,2	/	/
<i>Cantharellus tubaeformis</i>	1 s	77,8	1,109	18,20
	1 k	85,8	/	/
<i>Cordyceps capitata</i>	8 s	25,6	0,351	3,70
	8 k	25,1	/	/
<i>Cortinarius balteatocumatilis</i>	10 s	39,2	0,407	4,15
	10 k	39,3	/	/
<i>Cortinarius infractus</i>	24 s	40,7	0,393	4,10
	24 k	30,6	/	/
<i>Craterellus cornucopioides</i>	15 s	34,7	0,711	9,65
	15 k	38,1	/	/
<i>Cystoderma amianthinum</i>	27 s	37,4	0,229	2,60
	27k	7,1	/	/
<i>Entoloma rhodopolium</i>	25 s	57,8	0,502	5,20
	25 k	18,1	/	/
<i>Hydnellum peckii</i>	20 s	22,9	0,348	3,70
	20 k	7,1	/	/
<i>Hygrophorus agathosmus</i>	19 s	8,3	0,096	0,45
	19 k	183,2	/	/
<i>Hygrophorus eburneus</i>	12 s	15,8	0,149	1,70
	12 k	9,4	/	/
<i>Hygrophorus pudorinus</i>	6 s	165,6	0,27	3,00
	6 k	86,1	/	/
<i>Lactarius deterrimus</i>	11 s	31,3	0,285	3,10
	11 k	38,2	/	/
<i>Lactarius salmonicolor</i>	17 s	34,2	0,218	2,50
	17 k	33,5	/	/
<i>Lactarius scrobiculatus</i>	28 s	77,0	0,301	3,25



Vrsta gobe	Oznaka vzorca	Suha teža	$A_{562nm}$	Koncentracija proteinov
		[mg/ml]		[mg/ml]
	28 k	21,3	/	/
<i>Lepista nuda</i>	26 s	43,6	0,71	9,65
	26 k	74,2	/	/
<i>Macrolepiota procera</i>	7 s	176,2	1,231	20,70
	7 k	126,8	/	/
<i>Peziza badia</i>	9 s	60,5	19,236	OVER
	9 k	16,7	/	/
<i>Pseudoclitocybe cyathiformis</i>	23 s	54,8	0,938	12,70
	23 k	10,1	/	/
<i>Russula cavipes</i>	22 s	1,9	0,047	0,10
	22 k	1,2	/	/
<i>Tremiscus helvelloides</i>	4 s	77,3	0,165	8,40
	4 k	4,9	/	/
<i>Tricholoma aurantium</i>	5 s	65,6	0,29	3,15
	5 k	126,3	/	/
<i>Tricholoma pardalotum</i>	21 s	121,4	0,488	5,00
	21k	37,4	/	/
<i>Tricholoma sulphureum</i>	2 s	8,8	0,213	2,35
	2k	13,4	/	/
<i>Tricholoma vaccinum</i>	14 s	37,6	0,263	2,90
	14 s	26,6	/	/

## 4.2 HEMOLITIČNA AKTIVNOST

Preglednica 4 prikazuje rezultate hemolitične aktivnosti za vse vzorce. Hemolitično aktivnost smo zaznali pri enajstih »surovih« vzorcih ter pri dveh »kuhanih« vzorcih.

Pri vseh aktivnih vzorcih smo test hemolitične aktivnosti ponovili, in sicer tako, da smo ga izvedli z manjšimi količinami vzorca ter določili čas polovične hemolize ( $t_{50}$ ). Te rezultate smo prikazali v preglednici 5. Glede na te rezultate smo določili hitrost hemolize v odvisnosti od koncentracije suhe snovi dodane v testu ter rezultate prikazali na sliki 5.

Preglednica 4: Rezultati hemolitične aktivnosti vseh testiranih vzorcev gob

- = ni aktivnosti
- + = rahla aktivnost (hemoliza poteče v času med 10 in 15 minutami)
- ++ = zmerna aktivnost (hemoliza poteče v času med 5 in 10 minutami)
- +++ = močna aktivnost (hemoliza poteče v času, krajšem od 5 minut)
- s = surovi ekstrakti
- k = kuhani ekstrakti
- / = »kuhana serija« ekstraktov ni vsebovala proteinov
- OVER = prisotnost snovi, ki so motile meritev (glej poglavje 4.1)

Vrsta glive	Oznaka vzorca	Koncentracija suhe snovi v testu	Koncentracija proteinov v testu	Hemoliza (+, ++, +++)
		[mg/ml]	[mg/ml]	
<i>Agaricus arvensis</i>	16 s	7,37	0,42	++
	16 k	3,03	/	/
<i>Amanita citrina</i>	3 s	6,79	2,68	+
	3 k	6,80	/	/
<i>Bovista nigrescens</i>	13 s	2,72	0,35	/
	13 k	1,95	/	/
<i>Calvatia excipuliformis</i>	18s	3,45	1,15	/
	18k	2,56	/	/
<i>Cantharellus tubaeformis</i>	1 s	7,07	1,65	/
	1 k	7,80	/	/
<i>Cordyceps capitata</i>	8 s	2,33	0,34	/
	8 k	2,28	/	/
<i>Cortinarius balteatocumatilis</i>	10 s	3,56	0,38	/
	10 k	3,57	/	/
<i>Cortinarius infractus</i>	24 s	3,70	0,37	/
	24 k	2,78	/	/
<i>Craterellus cornucopioides</i>	15 s	3,15	0,88	/
	15 k	3,46	/	/

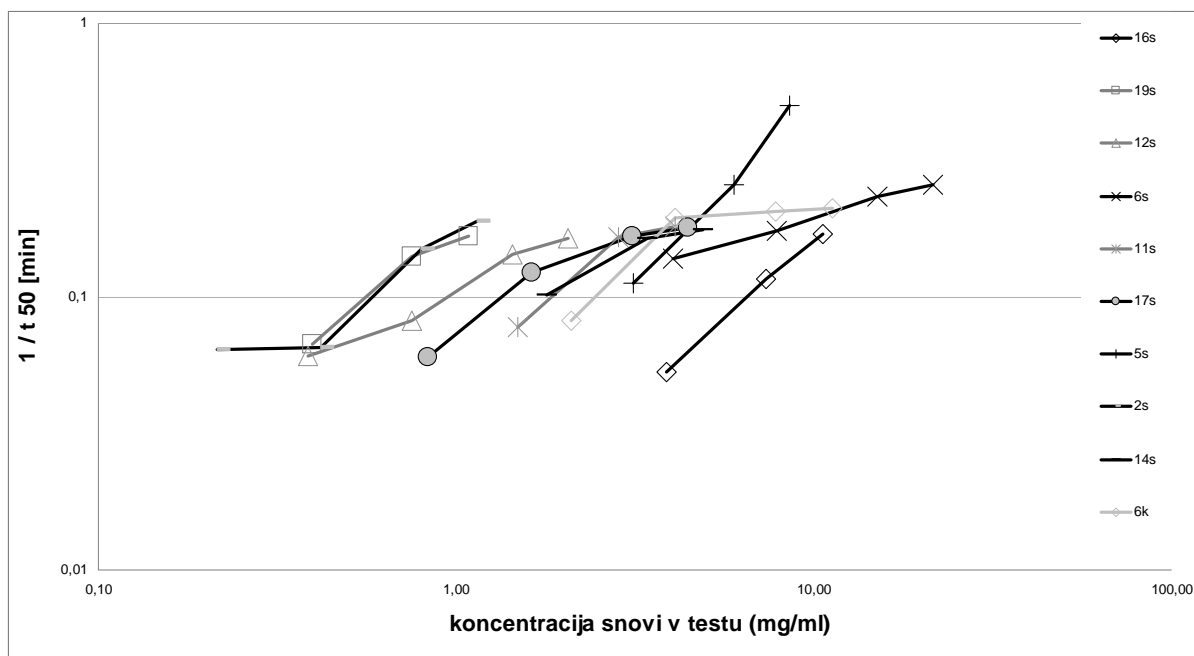
Vrsta glive	Oznaka vzorca	Koncentracija suhe snovi v testu	Koncentracija proteinov v testu	Hemoliza (+, ++, +++)
		[mg/ml]	[mg/ml]	
<i>Cystoderma amianthinum</i>	27 s	3,40	0,24	/
	27 k	0,65	/	/
<i>Entoloma rhodopolium</i>	25 s	5,25	0,47	/
	25 k	1,65	/	/
<i>Hydnellum peckii</i>	20 s	2,08	0,34	/
	20 k	0,65	/	/
<i>Hygrophorus agathosmus</i>	19 s	0,75	0,04	++
	19 k	16,65	/	/
<i>Hygrophorus eburneus</i>	12 s	1,44	0,15	++
	12 k	0,85	/	/
<i>Hygrophorus pudorinus</i>	6 s	15,05	0,27	++
	6 k	7,83	/	+
<i>Lactarius deterrimus</i>	11 s	2,85	0,28	++
	11 k	3,47	/	/
<i>Lactarius salmonicolor</i>	17 s	3,11	0,23	++
	17 k	3,05	/	/
<i>Lactarius scrobiculatus</i>	28 s	7,00	0,30	/
	28 k	1,94	/	/
<i>Lepista nuda</i>	26 s	3,96	0,88	/
	26 k	6,75	/	/
<i>Macrolepiota procera</i>	7 s	16,02	1,88	/
	7 k	11,53	/	/
<i>Peziza badia</i>	9 s	5,50	OVER	/
	9 k	1,52	/	/
<i>Pseudoclitocybe cyathiformis</i>	23 s	4,98	1,15	/
	23 k	0,92	/	/
<i>Russula cavipes</i>	22 s	0,17	0,01	/
	22 k	0,11	/	/
<i>Tremiscus helvelloides</i>	4 s	7,03	0,76	/
	4 k	0,45	/	/
<i>Tricholoma aurantium</i>	5 s	5,96	0,29	+++
	5 k	11,48	/	/
<i>Tricholoma pardalotum</i>	21 s	11,04	0,45	+
	21k	3,40	/	/
<i>Tricholoma sulphureum</i>	2 s	0,80	0,21	++
	2k	1,22	/	/
<i>Tricholoma vaccinum</i>	14 s	3,42	0,26	++
	14 k	2,42	/	+

Preglednica 5: Rezultati hemolitične aktivnosti vzorcev 16s, 3s, 19s, 12s 6s, 6k, 11s, 17s, 5s, 21s, 14s, 14k po vnosu različnih količin vzorca v jamice mikrotitrne plošče

s = surovi ekstrakti  
k = kuhani ekstrakti  
/ = »kuhana serija« ekstraktov ne vsebuje proteinov

Vrsta gobe	Oznaka vzorca	Volumen vzorca v testu [μl]	Koncentracija suhe snovi v testu [mg/ml]	Koncentracija proteinov v testu [mg/ml]	Čas polovične hemolize [min]
<i>Agaricus arvensis</i>	16 s	30	10,6	0,61	5,9
	16 s	20	7,37	0,42	8,63
	16 s	10	3,86	0,22	18,9
	16 s	5	1,98	0,11	/
<i>Amanita citrina</i>	3 s	30	9,7	3,85	7,25
	3 s	20	6,79	2,68	11,1
	3 s	10	3,56	1,40	/
	3 s	5	1,82	0,72	/
<i>Hygrophorus agathosmus</i>	19 s	30	1,1	0,06	6
	19 s	20	0,75	0,04	7,15
	19 s	10	0,40	0,02	14,9
	19 s	5	0,20	0,01	/
<i>Hygrophorus eburneus</i>	12 s	30	2,1	0,22	6,125
	12 s	20	1,44	0,15	7
	12 s	10	0,75	0,08	12,2
	12 s	5	0,39	0,04	16,5
<i>Hygrophorus pudorinus</i>	6 s	30	21,6	0,39	7,25
	6 s	20	15,05	0,27	5,75
	6 s	10	7,89	0,14	4,3
	6 s	0	4,04	0,07	3,9
	6 k	30	11,2	/	4,75
	6 k	20	7,83	/	12,3
	6 k	10	4,10	/	4,9
	6 k	5	2,10	/	5,15
<i>Lactarius deterrimus</i>	11 s	30	4,1	0,40	5,55
	11 s	20	2,85	0,28	6,07
	11 s	10	1,49	0,15	12,9
	11 s	5	0,76	0,08	/
<i>Lactarius salmonicolor</i>	17 s	30	4,5	0,33	5,6
	17 s	20	3,11	0,23	6
	17 s	10	1,63	0,12	8,2
	17 s	5	0,83	0,06	16,6
<i>Tricholoma aurantium</i>	5 s	30	8,6	0,00	2

		Volumen vzorca v testu [ $\mu$ l]	Koncentracija suhe snovi v testu [mg/ml]	Koncentracija proteinov v testu [mg/ml]	Čas polovične hemolize [min]
	5 s	20	5,96	0,29	3,9
	5 s	10	3,12	0,15	8,9
	5 s	5	1,60	0,08	/
<i>Tricholoma pardalotum</i>	21 s	30	15,8	0,65	7,6
	21 s	20	11,04	0,45	12,1
	21 s	10	5,78	0,24	/
	21 s	5	2,96	0,12	/
<i>Tricholoma sulphureum</i>	2 s	30	1,1	0,31	5,3
	2 s	20	0,80	0,21	6,7
	2 s	10	0,42	0,11	15,4
	2 s	5	0,21	0,06	15,6
<i>Tricholoma vaccinum</i>	14 s	30	4,9	0,38	5,7
	14 s	20	3,42	0,26	6,14
	14 s	10	1,79	0,14	9,9
	14 s	5	0,92	0,07	/
	14 k	30	3,5	/	10,4
	14 k	20	2,42	/	12,1
	14 k	10	1,27	/	/
	14 k	5	0,65	/	/



Slika 5: Odvisnost recipročne vrednosti polovičnega časa hemolize ( $1/t_{50}$ ) od koncentracije suhe snovi hemolitično aktivnih vzorcev, dodane v testu. Testirali smo vzorce 16s, 19s, 12s, 6s, 11s, 17s, 5s, 2s, 14s in 6k. Skala na oseh x in y je logaritemska.

### 4.3 PROTIBAKTERIJSKA AKTIVNOST

Preglednica 6 prikazuje rezultat protibakterijskega testa, oz. protibakterijska aktivnost vodnih ekstraktov gob. Proti sevu *Escherichia coli* (Gram-) sta aktivnost (inhibicijsko cono) kazala dva vzorca, »kuhani« in »surovi« vzorec gobe *Peziza badia*. Proti sevu *Bacillus subtilis* (Gram+) je bila inhibicijska cona zaznavna pri dvanajstih vzorcih. Pri vzorcu 9s vrste *Peziza badia* je bila aktivnost zaznavna proti obema bakterijskima sevoma. Vzorca z inhibicijsko cono označeno z ( - ) niso imeli protibakterijske aktivnosti. Vzorce z inhibicijsko cono 2 mm ali več smo dodatno redčili, kot je opisano v poglavju 3.2.2.

Preglednica 6: Rezultati protibakterijske aktivnosti vodnih ekstraktov testiranih gob.

- = ni aktivnosti
- s = surovi ekstrakti
- k = kuhani ekstrakti
- / = »kuhana serija« vzorcev ne vsebuje proteinov
- OVER = prisotnost snovi, ki so motile meritev (glej poglavje 4.1)

Vrsta gobe	Oznaka vzorca	Količina snovi v testu [mg]	Količina proteinov v testu [mg]	Širina inhibicijske cone [mm] ( <i>B. subtilis</i> )	Širina inhibicijske cone [mm] ( <i>E. coli</i> )
<i>Agaricus arvensis</i>	16 s	8,11	0,465	4	-
	16 k	3,33	/	-	-
<i>Amanita citrina</i>	3 s	7,47	2,950	-	-
	3 k	7,48	/	-	-
<i>Bovista nigrescens</i>	13 s	2,99	0,390	-	-
	13 k	2,15	/	-	-
<i>Calvatia excipuliformis</i>	18s	3,79	1,265	-	-
	18k	2,82	/	-	-
<i>Cantharellus tubaeformis</i>	1 s	7,78	1,820	-	-
	1 k	8,58	/	-	-
<i>Cordyceps capitata</i>	8 s	2,56	0,370	-	-
	8 k	2,51	/	-	-
<i>Cortinarius balteatocumatilis</i>	10 s	3,92	0,415	-	-
	10 k	3,93	/	-	-
<i>Cortinarius infractus</i>	24 s	4,07	0,410	-	-
	24 k	3,06	/	-	-

		Količina snovi v testu [mg]	Količina proteinov v testu [mg]	Širina inhibicijske cone [mm] ( <i>B. subtilis</i> )	Širina inhibicijske cone [mm] ( <i>E. coli</i> )
<i>Craterellus cornucopioides</i>	15 s	3,47	0,965	-	-
	15 k	3,81	/	-	-
<i>Cystoderma amianthinum</i>	27 s	3,74	0,260	-	-
	27k	0,71	/	-	-
<i>Entoloma rhodopodium</i>	25 s	5,78	0,520	-	-
	25 k	1,81	/	-	-
<i>Hydnellum peckii</i>	20 s	2,29	0,370	-	-
	20 k	0,71	/	-	-
<i>Hygrophorus agathosmus</i>	19 s	0,83	0,045	5	-
	19 k	18,32	/	4	-
<i>Hygrophorus eburneus</i>	12 s	1,58	0,170	4	-
	12 k	0,94	/	2	-
<i>Hygrophorus pudorinus</i>	6 s	16,56	0,300	7	-
	6 k	8,61	/	5	-
<i>Lactarius deterrimus</i>	11 s	3,13	0,310	1	-
	11 k	3,82	/	-	-
<i>Lactarius salmonicolor</i>	17 s	3,42	0,250	1	-
	17 k	3,35	/	-	-
<i>Lactarius scrobiculatus</i>	28 s	7,70	0,325	-	-
	28 k	2,13	/	-	-
<i>Lepista nuda</i>	26 s	4,36	0,965	-	-
	26 k	7,42	/	-	-
<i>Macrolepiota procera</i>	7 s	17,62	2,070	-	-
	7 k	12,68	/	-	-
<i>Peziza badia</i>	9 s	6,05	OVER	1	6
	9 k	1,67	/	-	4
<i>Pseudoclitocybe cyathiformis</i>	23 s	5,48	1,270	-	-
	23 k	1,01	/	-	-
<i>Russula cavipes</i>	22 s	0,19	0,010	-	-
	22 k	0,12	/	-	-
<i>Tremiscus helvelloides</i>	4 s	7,73	0,840	-	-
	4 k	0,49	/	-	-
<i>Tricholoma aurantium</i>	5 s	6,56	0,315	-	-
	5 k	12,63	/	-	-
<i>Tricholoma pardalotum</i>	21 s	12,14	0,500	-	-
	21k	3,74	/	-	-
<i>Tricholoma sulphureum</i>	2 s	0,88	0,235	2	-
	2k	1,34	/	3	-
<i>Tricholoma vaccinum</i>	14 s	3,76	0,290	-	-
	14 s	2,66	/	-	-

Preglednica 7: Rezultati protibakterijske aktivnosti po redčenju petih aktivnih vzorcev v razmerjih 1:10, 1:100 in 1:1000.

- = ni aktivnosti  
 x = nismo izvajali testa  
 s = surovi ekstrakti  
 k = kuhani ekstrakti  
 / = »kuhana serija« vzorcev ne vsebuje proteinov  
 MIK = minimalna inhibitorna koncentracija, oz. najmanjša koncentracija snovi, ki še vedno inhibira rast bakterij.

Vrsta gobe	Oznaka vzorca	Redčenje	Količina snovi v testu [mg/ml]	Koncentracija proteinov [mg/ml]	Širina inhibicijske cone [mm] (B. subtilis)	Širina inhibicijske cone [mm] (E. coli)	MIK [mg]
<i>Agaricus arvensis</i>	16 s	1:10	0,811	0,0465	-	x	0,465
		1:100	0,08110	0,0047	-	x	
		1:1000	0,00811	0,0005	x	x	
<i>Hygrophorus agathosmus</i>	19 s	1:10	0,083	0,004500	-	x	0,045
		1:100	0,008	0,000450	-	x	
		1:1000	0,001	0,000045	x	x	
	19 k	1:10	1,83200	/	-	x	18,320
		1:100	0,18320	/	-	x	
		1:1000	0,01832	/	x	x	
<i>Hygrophorus eburneus</i>	12 s	1:10	0,15800	0,017000	-	x	1,580
		1:100	0,01580	0,001700	-	x	
		1:1000	0,00158	0,000170	x	x	
	12 k	1:10	0,09400	/	-	x	0,940
		1:100	0,00940	/	x	x	
		1:1000	0,00094	/	x	x	
<i>Hygrophorus pudorinus</i>	6 s	1:10	1,65600	0,03000	2	x	1,6560
		1:100	0,16560	0,00300	-	x	
		1:1000	0,01656	0,00030	-	x	
	6 k	1:10	0,86100	/	2	x	0,8610
		1:100	0,08610	/	-	x	
		1:1000	0,00861	/	x	x	
<i>Tricholoma sulphureum</i>	2 s	1:10	0,08800	0,02350	-	x	0,880
		1:100	0,00880	0,00235	x	x	
		1:1000	0,00088	0,00024	x	x	
	2k	1:10	0,13400	/	-	x	1,340
		1:100	0,01340	/	-	x	
		1:1000	0,00134	/	x	x	
<i>Peziza badia</i>	9 s	1:10	0,60500	OVER	x	-	6,050
		1:100	0,06050	OVER	x	-	
		1:1000	0,00605	OVER	x	-	
	9 k	1:10	0,16700	/	x	-	1,670
		1:100	0,01670	/	x	-	
		1:1000	0,00167	/	x	x	



#### 4.4 HEMAGLUTINACIJSKA AKTIVNOST

Preglednica 8 prikazuje rezultate hemaglutinacijske aktivnosti ekstraktov iz različnih vrst gob. Vzorci 6s, 28s in 28k so pokazali pozitiven rezultat za test hemaglutinacije, zato smo opravili še test redčitev v razmerjih 1:10 in 1:100. Preglednica 9 prikazuje rezultate po redčenju omenjenih vzorcev. Izkazalo se je, da so imeli po desetkratnem redčenju vsi trije vzorci vrst gob *Hygrophorus pudorinus* in *Lactarius scrobiculatus* pozitivno reakcijo, medtem ko so po stokratnem redčenju vsi izgubili hemaglutinacijsko aktivnost.

Preglednica 8: Rezultati hemaglutinacijske aktivnosti testnih vzorcev gob.

- = ni aktivnosti
- + = vzorec povzroča hemaglutinacijo
- s = surovi ekstrakti
- k = kuhani ekstrakti
- / = »kuhana serija« ekstraktov ne vsebuje proteinov
- OVER = prisotnost snovi, ki so motile meritev (glej poglavje 4.1)

Vrsta gobe	Oznaka vzorca	Koncentracija snovi v testu [mg/ml]	Koncentracija proteinov v testu [mg/ml]	Hemaglutinacija (+/-) (+/-)
<i>Agaricus arvensis</i>	16 s	13,5	0,775	-
	16 k	5,6	/	-
<i>Amanita citrina</i>	3 s	12,5	4,9167	-
	3 k	12,5	/	-
<i>Bovista nigrescens</i>	13 s	5,0	0,65	-
	13 k	3,6	/	-
<i>Calvatia excipuliformis</i>	18s	6,3	2,1083	-
	18k	4,7	/	-
<i>Cantharellus tubaeformis</i>	1 s	13,0	3,0333	-
	1 k	14,3	/	-
<i>Cordyceps capitata</i>	8 s	4,3	0,6167	-
	8 k	4,2	/	-
<i>Cortinarius balteatocumatilis</i>	10 s	6,5	0,6917	-
	10 k	6,5	/	-
<i>Cortinarius infractus</i>	24 s	6,8	0,6833	-
	24 k	5,1	/	-
<i>Craterellus cornucopioides</i>	15 s	5,8	1,6083	-
	15 k	6,3	/	-
<i>Cystoderma amianthinum</i>	27 s	6,2	0,4333	-
	27 k	1,2	/	-

		Koncentracija snovi v testu [mg/ml]	Koncentracija proteinov v testu [mg/ml]	Hemaglutinacija (+/-)
<i>Entoloma rhodopolium</i>	25 s	9,6	0,8667	-
	25 k	3,0	/	-
<i>Hydnellum peckii</i>	20 s	3,8	0,6167	-
	20 k	1,2	/	-
<i>Hygrophorus agathosmus</i>	19 s	1,4	0,075	-
	19 k	30,5	/	-
<i>Hygrophorus eburneus</i>	12 s	2,6	0,2833	-
	12 k	1,6	/	-
<i>Hygrophorus pudorinus</i>	6 s	27,6	0,5	+
	6 k	14,4	/	-
<i>Lactarius deterrimus</i>	11 s	5,2	0,5167	-
	11 k	6,4	/	-
<i>Lactarius salmonicolor</i>	17 s	5,7	0,4167	-
	17 k	5,6	/	-
<i>Lactarius scrobiculatus</i>	28 s	12,8	0,5417	+
	28 k	3,6	/	+
<i>Lepista nuda</i>	26 s	7,3	1,6083	-
	26 k	12,4	/	-
<i>Macrolepiota procera</i>	7 s	29,4	3,45	-
	7 k	21,1	/	-
<i>Peziza badia</i>	9 s	10,1	OVER	-
	9 k	2,8	/	-
<i>Pseudoclitocybe cyathiformis</i>	23 s	9,1	2,1167	-
	23 k	1,7	/	-
<i>Russula cavipes</i>	22 s	0,3	0,0167	-
	22 k	0,2	/	-
<i>Tremiscus helvelloides</i>	4 s	12,9	1,4	-
	4 k	0,8	/	-
<i>Tricholoma aurantium</i>	5 s	10,9	0,525	-
	5 k	21,1	/	-
<i>Tricholoma pardalotum</i>	21 s	20,2	0,8333	-
	21k	6,2	/	-
<i>Tricholoma sulphureum</i>	2 s	1,5	0,3917	-
	2k	2,2	/	-
<i>Tricholoma vaccinum</i>	14 s	6,3	0,4833	-
	14 k	4,4	/	-

Preglednica 9: Rezultati hemaglutinacijske aktivnosti po redčenju treh aktivnih vzorcev v razmerjih 1:10, 1:100 in 1:1000.

- = ni aktivnosti
- + = vzorec povzroča hemaglutinacijo
- s = surovi ekstrakti
- k = kuhani ekstrakti
- / = »kuhana serija« ekstraktov ne vsebuje proteinov

Vrsta gobe	Oznaka vzorca	redčitev	Količina snovi v testu [mg/ml]	Koncentracija proteinov [mg/ml]	Hemaglutinacija (+/-)
<i>Hygrophorus pudorinus</i>	6 s	1:10	2,760	0,050	+
		1:100	0,2760	0,0050	-
<i>Lactarius scrobiculatus</i>	28 s	1:10	1,283	0,054	+
		1:100	0,1283	0,0054	-
	28 k	1:10	0,355	/	+
		1:100	0,0355	/	-

#### 4.5 ANTIACETILHOLINESTERAZNA AKTIVNOST

V preliminarnem testu smo testirali vse vzorce in ugotavljali inhibitorno aktivnost na encim acetilholinesterazo (AChE). Pri vzorcih 24s in 24k vrste *Cortinarius infractus* smo zasledili največjo inhibicijo. Rezultati so prikazani v preglednici 10.

Test smo nadaljevali le z vzorcem 24s in 24k, in sicer z različnimi koncentracijami vzorcev. Sprva smo naredi redčitve 1:10, 1:20, 1:50 in 1:100. Pri 1:100 redčitvi je bila še vedno zaznavna inhibicija, zato smo naredili še redčitve do 1:1000. Rezultati so prikazani v preglednici 11.

Preglednica 10: Rezultati delovanja vzorcev testiranih gob na encim acetilholinesterazo. Prikazane so stopnje preostale acetilholinesterazne aktivnosti in stopnja inhibicije acetilholinesterazne aktivnosti glede na kontrolo.

- s = surovi ekstrakti  
 k = kuhani ekstrakti  
 / = »kuhana serija« vzorcev ne vsebuje proteinov  
 OVER = prisotnost snovi, ki so motile meritev (glej poglavje 4.1)

Vrsta gobe	Oznaka vzorca	Koncentracija suhe snovi v testu [mg/ml]	Koncentracija proteinov v testu [mg/ml]	Preostala aktivnost AChE aktivnost (%)	Inhibicija AChE aktivnosti (%)
<i>Agaricus arvensis</i>	16 s	7,3727	0,4227	88,57	11,43
	16 k	3,0272	/	77,14	22,86
<i>Amanita citrina</i>	3 s	6,7909	2,6818	68,57	31,43
	3 k	6,80	/	62,86	37,14
<i>Bovista nigrescens</i>	13 s	2,7181	0,3545	85,71	14,29
	13 k	1,9545	/	82,86	17,14
<i>Calvatia excipuliformis</i>	18s	3,4454	1,1500	74,29	25,71
	18k	2,5636	/	77,14	22,86
<i>Cantharellus tubaeformis</i>	1 s	7,0727	1,6545	68,57	31,43
	1 k	7,80	/	97,14	2,86
<i>Cordyceps capitata</i>	8 s	2,3272	0,3364	88,57	11,43
	8 k	2,2818	/	91,43	8,57
<i>Cortinarius balteatocumatilis</i>	10 s	3,5636	0,3773	60,0	40,0
	10 k	3,5727	/	60,0	40,0
<i>Cortinarius infractus</i>	24 s	3,70	0,3727	2,86	97,14

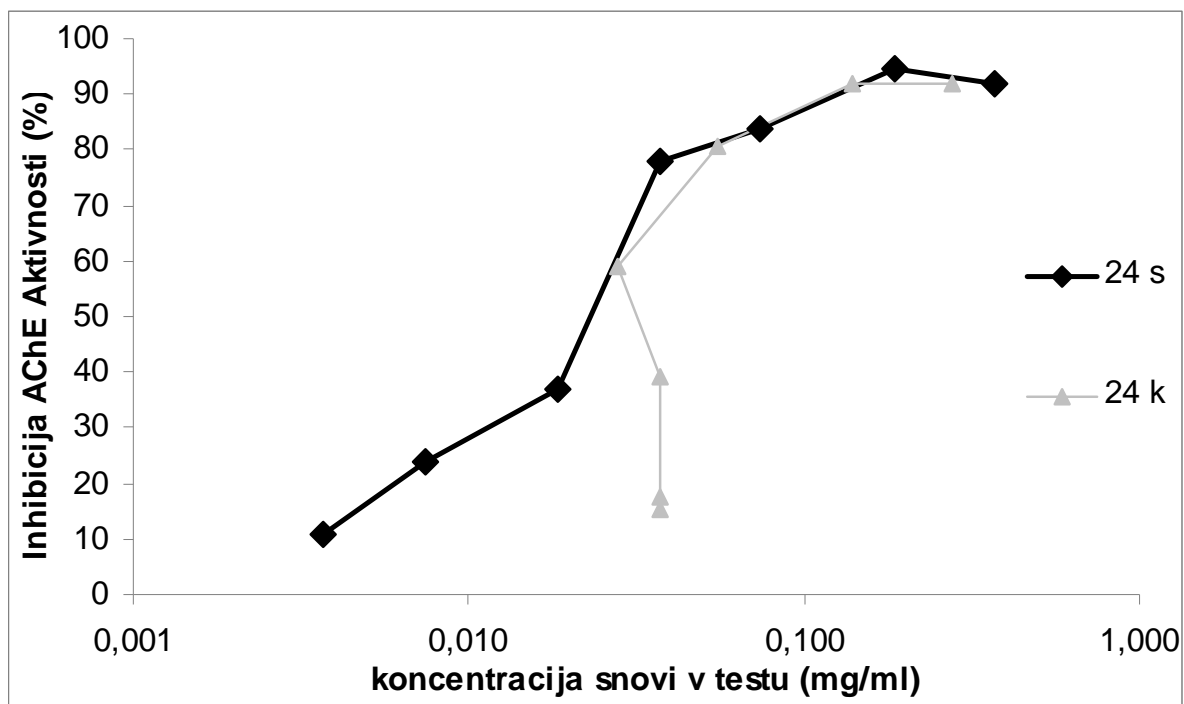
Vrsta gobe	Oznaka vzorca	Koncentracija suhe snovi v testu	Koncentracija proteinov v testu	Preostala aktivnost AChE aktivnost	Inhibicija AChE aktivnosti
		[mg/ml]	[mg/ml]	(%)	(%)
	24 k	2,7818	/	5,71	94,29
<i>Craterellus cornucopioides</i>	15 s	3,1545	0,8773	85,71	14,29
	15 k	3,4636	/	91,43	8,57
<i>Cystoderma amianthinum</i>	27 s	3,4000	0,2364	77,14	22,86
	27 k	0,6454	/	68,57	31,43
<i>Entoloma rhodopolium</i>	25 s	5,2545	0,4727	77,14	22,86
	25 k	1,6454	/	82,86	17,14
<i>Hydnellum peckii</i>	20 s	2,081818	0,3364	82,86	17,14
	20 k	0,645455	/	82,86	17,14
<i>Hygrophorus agathosmus</i>	19 s	0,754545	0,0409	94,229	5,714
	19 k	16,654545	/	88,57	11,43
<i>Hygrophorus eburneus</i>	12 s	1,436364	0,1545	97,14	2,86
	12 k	0,854545	/	97,14	2,86
<i>Hygrophorus pudorinus</i>	6 s	15,054545	0,2727	80,0	20,0
	6 k	7,827273	/	88,57	11,43
<i>Lactarius deterrimus</i>	11 s	2,845455	0,2818	80	20,0
	11 k	3,472727	/	85,71	14,29
<i>Lactarius salmonicolor</i>	17 s	3,109091	0,2273	82,856	17,14
	17 k	3,045455	/	85,711	14,29
<i>Lactarius scrobiculatus</i>	28 s	7,000000	0,2955	60	40,0
	28 k	1,936364	/	51,43	48,57
<i>Lepista nuda</i>	26 s	3,963636	0,8772	80	20,0
	26 k	6,745455	/	82,86	17,14
<i>Macrolepiota procera</i>	7 s	16,018182	1,8818	54,29	45,71
	7 k	11,527273	/	74,29	25,71
<i>Peziza badia</i>	9 s	5,500000	OVER	91,43	8,57
	9 k	1,518182	/	85,71	14,29
<i>Pseudoclitocybe cyathiformis</i>	23 s	4,981818	1,1545	77,14	22,86
	23 k	0,918182	/	77,14	22,86
<i>Russula cavipes</i>	22 s	0,172727	0,0090	97,14	2,86
	22 k	0,109091	/	100	0
<i>Tremiscus helvelloides</i>	4 s	7,027273	0,7636	85,71	14,29
	4 k	0,445455	/	88,57	11,43
<i>Tricholoma aurantium</i>	5 s	5,963636	0,2864	74,29	25,71
	5 k	11,481818	/	77,14	22,86
<i>Tricholoma pardalotum</i>	21 s	11,036364	0,4545	82,86	17,14
	21k	3,40	/	85,71	14,29
<i>Tricholoma sulphureum</i>	2 s	0,80	0,2136	100	0
	2k	1,218182	/	100	0

Vrsta gobe	Oznaka vzorca	Koncentracija suhe snovi v testu [mg/ml]	Koncentracija proteinov v testu [mg/ml]	Preostala aktivnost AChE aktivnost (%)	Inhibicija AChE aktivnosti (%)
<i>Tricholoma vaccinum</i>	14 s	3,418182	0,2636	91,43	8,57
	14 k	2,418182	/	91,43	8,57

Preglednica 11: Rezultati encimskega testa z acetilholinesterazo (AChE). Prikazane so redčitve 1:10, 1:20, 1:50, 1:100, 1:200, 1:500 in 1:1000 vzorcev 24s in 24k vrste *Cortinarius infractus*. Stopnja inhibicije AChE aktivnosti je prikazana glede na kontrolo.

s = surovi ekstrakti  
 k = kuhani ekstrakti  
 / = »kuhana serija« vzorcev ne vsebuje proteinov

Vrsta gobe	Oznaka vzorca	redčitev	Količina snovi v testu [mg/ml]	Koncentracija proteinov v testu [mg/ml]	AChE rezultati rezultati	Preostala AChE aktivnost (%)	Inhibicija AChE aktivnosti (%)
<i>Cortinarius infractus</i>	24 s	1:10	0,370	0,03727	3	8,22	91,78
		1:20	0,185	0,01864	2	5,48	94,52
		1:50	0,074	0,00745	6	16,44	83,56
		1:100	0,037	0,00373	8	21,92	78,08
		1:200	0,0185	0,001864	29	63,04	36,96
		1:500	0,0074	0,000745	35	76,09	23,91
		1:1000	0,0037	0,000373	41	89,13	10,87
	24 k	1:10	0,278	/	3	8,212	91,78
		1:20	0,139	/	3	8,22	91,78
		1:50	0,056	/	7	19,18	80,82
		1:100	0,028	/	15	41,10	58,90
		1:200	0,037	/	28	60,87	39,13
		1:500	0,037	/	39	84,78	15,22
		1:1000	0,037	/	38	82,61	17,39



Slika 6. Inhibicija acetilholinesteraze z vzorci 24s in 24k vrste *Cortinarius infractus*. Odvisnost stopnje inhibicije AChE od koncentracije suhe snovi v ekstraktu.

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

### 5.1 RAZPRAVA

Gobe imajo podobno kot rastline veliko sposobnost proizvodnje bioaktivnih sekundarnih metabolitov in tako predstavljajo potencialen vir za pridobivanje zdravil. Celotna vrsta gobe lahko vsebuje več kot sto različnih vrst bioaktivnih komponent. Pri znani zdravilni gobi *Ganoderma lucidum* prevladujejo predvsem različni triterpeni, veliko je tudi polisaharidov, proteinov in drugih bioaktivnih sestavin (Zhou in Gao, 2002, Kim in sod., 1999). Spekter poznanih farmakološko aktivnih snovi je zelo velik in se bo z razvojem kemije, biotehnologije, molekularne biologije ter z izboljšanimi metodami iskanja, zagotovo še zvečal.

Gobe za preživetje v naravnem okolju potrebujejo predvsem protibakterijsko in protiglivično zaščito. Zato ne preseneča, da lahko uporaba le-teh, bolj ali manj aktivnih, protimikrobnih izolatov prinese lahko korist tudi ljudem (Lindequist in sod., 1990).

Kljub obširnimi raziskavam, ki potekajo že od štiridesetih let prejšnjega stoletja (Benedict in Brady, 1972, Espanshade in Griffith, 1966, Broadbent, 1966, Conchran, 1978) ter mnogim novejšim raziskavam, ostaja identiteta mnogih metabolitov odgovornih za protimikrobno dejavnost še vedno v večini primerov neraziskana.

Pri iskanju novih zdravilnih učinkovin so znanstveniki preučili veliko število različnih gob. Pri tem so poleg snovi z protimikrobno aktivnostjo našli tudi različne druge aktivnosti kot so npr. protitumorska, protivnetna, imunostimulatorna in druge (Asford in Ley, 1993, Longvah in Deosthale, 1998).

Težo raziskavam, pri katerih iščemo nove aktivne snovi, daje potreba po novih učinkovinah, predvsem proti patogenim organizmom, saj so v zadnjih letih zaradi nepremišljene uporabe antibiotikov v zdravstvu, mnogi mikroorganizmi razvili multiplo odpornost proti mnogim antibiotikom. Ta situacija je znanstvenike prisilila v iskanje novih protimikrobnih substanc na različnih področjih, eno od teh so tudi metaboliti višjih bazidiomicet.



Prav zaradi prisotnosti velike količine različnih snovi v gobah, ki so večinoma še zelo slabo raziskane, smo se v tej nalogi odločili za iskanje potencialno zanimivih biološko aktivnih snovi v vodnih ekstraktih izbranih gob. V teh ekstraktih v glavnem pričakujemo proteine, ogljikove hidrate in druge vodotopne snovi. Za preverjanje bioloških aktivnosti smo izbrali hemolitični, protibakterijski in hemaglutinacijski test ter test inhibicije encima acetilholinesteraze.

Hemoliza je pojav, pri katerem pride do razpadanja rdečih krvničk pod vplivom membransko aktivnih snovi. Pri hemolitičnem testu smo preverjali prisotnost teh komponent (tvorcev membranskih por, detergentov, fosfolipaz in snovi s sorodnimi učinki) v vzorcih gob različnih vrst.

Rezultati hemolitičnega testa (preglednica 4) so pokazali pozitivno hemolitično aktivnost pri trinajstih gobah od osemindvajsetih. Največjo aktivnost smo zaznali pri surovem vzorcu gobe *Tricholoma aurantium*. Pri tem vzorcu je bil čas polovične hemolize krajši od 5 minut. Hemolize v kuhanem vzorcu iste vrste nismo zaznali. To nakazuje na to, da so za hemolizo najverjetneje odgovorni proteini, katerih v kuhanem vzorcu ni bilo. Ostalih osem vzorcev je imelo čas polovične hemolize med pet in deset minut. Prav tako se je tudi pri teh vzorcih večinoma hemoliza pojavila le v surovih vzorcih, razen pri vrsti *Tricholoma vaccinum* in *Hygrophorus pudorinus*, kjer je bila rahla hemolitična aktivnost prisotna tudi pri kuhanih vzorcih. O citotoksični aktivnosti metanolnega ekstrakta rodu *Tricholoma* na sesalčje celice (ki bi lahko bila posledica lize celičnih membran) poročajo tudi Simon in sod. (2004). Rahlo hemolitično aktivnost (čas polovične hemolize med deset in petnajst minut) smo zaznali tudi pri surovih vzorcih vrst *Amanita citrina* in *Tricholoma pardalotum*.

Pri testiranju petih vzorcev iz rodu *Amanita*, nabranih v Ukrajini je le vodni ekstrakt ene vrste, *Amanitha phalloides*, kazal hemolitično aktivnost, in sicer po 15 minutah inkubacije, medtem ko se je pri ostalih (*A. muscaria*, *A. rubescens*, *A. citrina* in *A. virosa*) rahla hemolitična aktivnost pokazala šele po eni uri inkubacije (Lustik-Kordovsky in sod., 2001). Rahlo hemolitično aktivnost je kazal tudi naš surovi vodni ekstrakt vrste *A. citrina*. Za druge vrste mušnic, razen *A. citrina*, v literaturi nismo zasledili poročila o hemolitični aktivnosti.

Rezultati testiranja protibakterijske aktivnosti (preglednici 6 in 7) proti Gram- bakteriji *E. coli* so pokazali protibakterijsko aktivnost obeh vzorcev vrste *Peziza badia*. V literaturi nismo zasledili podatka o protibakterijski aktivnosti pri tej vrsti gobe, našli pa smo podatek o njeni nematotoksični aktivnosti proti glisti vrste *Bursaphelenchus xylophilus* (Dong in sod., 2006). Ekstrakt te gobe ima vpliv na larve in odrasle osebkke.

Na gojišču z Gram+ bakterijo *B. subtilis* smo zasledili protibakterijsko aktivnost pri dvanajstih vzorcih osmih vrst gob. Močno aktivnost smo ugotovili le pri surovem in kuhanem vzorcu vrste *Hygrophorus pudorinus*. Tudi pri nekaterih drugih vrstah (*Hygrophorus agathosmus*, *H. eburneus* in *Tricholoma sulphureum*) se je protimikrobna aktivnost pojavila v obeh vzorcih, tako pri surovem kot pri kuhanem. Pri vrstah *Agaricus arvensis*, *Lactarius deterrimus*, *Lactarius salmonicolor* in *Peziza badia* je bila aktivnost prisotna le pri surovih vzorcih. Pojav inhibicijske aktivnosti tako surovega kot kuhanega vzorca kaže na to, da so bile v vzorcih prisotne aktivne snovi neproteinske narave, saj predpostavljamo, da v kuhanih vzorcih ni bilo prisotnih proteinov. Obratno pa velja za vrste, pri katerih se je inhibicija pojavila le pri surovih vzorcih. Pri desetkratnem redčenju sta protimikrobno aktivnost imela le še surovi in kuhani ekstrakt vrste *Hygrophorus pudorinus* na gojišču s Gram-pozitivno bakterijo *B. subtilis*.

V literaturi nismo zasledili nobenega podatka o protibakterijski aktivnosti obravnavanih bazidiomicet po ekstrakciji z vodo in vodnimi topili. Dejstvo, da je protibakterijska aktivnost redka med vodnimi ekstrakti ni presenetljivo, saj je znano, da imajo protibakterijsko aktivnost bolj pogosto organski ekstrakti (Dulger in sod., 2002, Simon in sod., 2004, Barros in sod., 2006, Yamaç in Bilgili, 2006, Dulger in sod., 2002, Yayli in sod., 2007, Mercan in sod., 2006, Teichert in sod., 2005). Glavno vlogo pri protibakterijski aktivnosti gob imajo predvsem v organskih ekstraktih prisotni fenoli in flavonoidi. Flavonoidi imajo dokazano protimikrobno, protitrombično, protimutageno in protirakotvorno aktivnost (Cook in Samman, 1996, Kandaswami in Middleton, 1997, Sahu in Green, 1997). Fenoli so antioksidanti, ki imajo vlogo reducentov, so donorji vodikovih protonov in uničevalci prostih radikalov (Ferreira in sod., 2006). Nekateri fenolne skupine imajo sposobnost različnih fizioloških aktivnosti kot so protivnetne, protialergijske, protirakotvorne, protihipertenzične, protirevmatične in protimikrobne sposobnosti (Vaquero in sod., 2005). Protimikrobno aktivnost organskih ekstraktov potrjujejo tudi rezultati iz istih gob kakor v tej diplomski nalogi, le z organskim topili (diplomska naloga

Antonije Bogdan, z naslovom »Biološko aktivne snovi v organskih ekstraktih nekaterih bazidiomicet«). Vse naše ugotovitve o protibakterijski aktivnosti vodnih ekstraktov pa so novost in niso bile do sedaj še nikoli opisane v literaturi.

Protibakterijska aktivnost organskih ekstraktov testiranih bazidiomicet je bila že velikokrat opisana v literaturi. Tako so etanolni ekstrakti vrste *Lepista nuda* pokazali protibakterijsko aktivnost proti Gram pozitivnim bakterijam *Micrococcus luteus* in *M. flavus*. Protimikrobna aktivnost etanolnih ekstraktov je bila prav tako opisana proti vrstam *Salmonella typhimurium* in *Staphylococcus aureus* (Suay in sod., 2000), podobno velja tudi za metanolne ekstrakte (Dulger in sod., 2002). Za organske ekstrakte vrste *L. nuda* je značilen tudi močen antioksidacijski potencial (Elmastas in sod., 2005). *L. nuda* ima sposobnost redukcije prostih radikalov (podobno velja tudi za mnoge druge gobe) in inhibicije rasti patogenih organizmov. Zaradi teh lastnosti bi jo lahko uporabljali v prehrabeni industriji (Mercan in sod., 2006).

V naših vodnih ekstraktih smo ugotovili protibakterijsko aktivnost kuhanega in surovega ekstrakta vrste *Tricholoma sulphureum* proti vrsti *B. subtilis*, medtem ko v literaturi nismo zasledili primerljivih podatkov (niti za organske ekstrakte). Protibakterijsko aktivnost proti omenjeni bakteriji je pokazal metanolni ekstrakt sorodne vrste *Tricholoma portentosum* (Barros in sod., 2006).

Iz rodu vlažnic (*Hygrophorus*) (vrste *Hygrophorus agahtosmus*, *H. eburneus* in *H. pudorinus*) je imelo vseh šest vzorcev vodnih ekstraktov, kuhanih in surovih, protimikrobno aktivnost proti bakteriji *B. subtilis*. Proti omenjeni bakteriji ima prav tako protimikrobno aktivnost kloroformni ekstrakt vrste *Hygrophorus agathosmus*. Protibakterijski učinek tega ekstrakta je primerljiv z antibiotikom streptomycinom (Yamaç in sod., 2006). Za to vrsto je sicer značilno, da ima njen vodni ekstrakt nizek antioksidativni potencial (Ribiero in sod., 2006). NaOH ekstrakt vrste *H. pudorinus* ima sposobnost inhibicije tripsina (Vetter, 2000), ter je odgovoren za odpornost proti bakterijam in insektom (Ryan in sod., 1989, Ryan, 1974, 1 in sod., 1985) in ima vpliv na prebavo sesalcev, ki ne sodijo v skupino prežvekovalcev.

Podatke o protimikrobni aktivnosti vodnih ekstraktov omenjenih predstavnikov rodu *Hygrophorus* v literaturi nismo zasledili. Za številne vrste iz tega rodu (*Hygrophorus personii*, *H. pustulatus*, *H. latitabundus* in *H. eburneus*) je značilna tudi protiglivna aktivnost organskih ekstraktov.

Pri vrstah *Agaricus arvensis* in *Peziza badia* smo v vodnih ekstraktih zasledili protibakterijsko aktivnost, medtem ko v literaturi za omenjeni vrsti nismo našli nič.

V predhodnih raziskavah rodu *Lactarius* so obravnavali šest vrst in ugotovili protimikrobno aktivnost proti nekaterim Gram+ in Gram– bakterijam, niso pa zaznali inhibitorne aktivnosti proti različnim vrstam kvasovk in plesni (Dulger in sod., 2002). Zanimivo je, da so pri metanolnem ekstraktu vrste *Lactarius salmonicolor* ugotovili protibakterijsko aktivnost proti *E. coli*, česar naš vodni ekstrakt ni pokazal. Smo pa za vodni ekstrakt ugotovili protimikrobno aktivnost proti *B. subtilis*, medtem ko tega podatka za metanolni ekstrakt nismo zasledili, je pa zanj značilna protibakterijska aktivnost proti sorodnima bakterijama (*Bacillus cereus* in *B. megaterium*) (Dulger in sod., 2002). Protimikrobno aktivnost proti *B. subtilis* je značilna tudi za vodne ekstrakte vrste *Lactarius deterrimus*, enako velja tudi za fenolne ekstrakte vrste *Lactarius delicious*, za katero pa je značilna tudi protibakterijska aktivnost proti Gram negativni vrsti *E. coli* (Barros in sod., 2006).

Hemaglutinacija je pojav aglutinacije eritrocitov, oz. zlepljanja krvničk. Navadno so za to zlepljanje odgovorni proteini – lektini. Lektini opravljajo različne biološke funkcije: od celične adhezije do regulacije glikoproteinske sinteze in kontrole količine proteinov prisotnih v krvi. Večina lektinov navadno nima encimske aktivnosti in niso imunskega izvora. Vežejo se lahko z raztopljenimi ogljikovimi hidrati ali na ogljikohidratne funkcionalne skupine, ki so del glikoproteinov ali glikolipidov. Pri rastlinah se lektini vežejo na glikoproteine na površini celic parazitov, pri živalih pa se poleg tega vežejo tudi na topne zunajcelične in znotrajcelične glikoproteine.

V diplomski nalogi smo zasledili hemaglutinacijsko aktivnost v treh vzorcih dveh vrst gliv (preglednica 8), v kuhanem in surovem vzorcu vrste *Lactarius scrobiculatus* in v surovem vzorcu vrste *Hygrophorus pudorinus*. Pri vseh treh vzorcih se po desetkratnem redčenju še pojavi aglutinacija govejih eritrocitov, pri stokratnem redčenju pa so vzorci izgubili aktivnost (preglednica 9). V literaturi nismo našli navedb o hemaglutinacijski aktivnosti, ne vodnih in tudi ne organskih ekstraktov vrste *Lactarius scrobiculatus* ali katerokoli druge vrste iz tega rodu. Znotraj rodu *Lactarius* so v metanolnih ekstraktih vrste *Lactarius salmonicolor* ugotovili le protibakterijsko aktivnost (proti *E. coli*), pri vrsti *Lactarius*

*delicious* pa protibakterijsko aktivnost proti vrstam *B. subtilis* in *P. aeruginosa* in protiglivno aktivnost proti glivam *Candida albicans* in *C. neoformans* (Barros in sod., 2006).

Glede na to, da poročil o hemaglutinacijski aktivnosti vodnih ekstraktov *Lactarius scrobiculatus* in *Hygrophorus pudorinus* v objavah nismo našli, aktivnost vseh treh vzorcev, ki so pri testiranju pokazali sposobnost hemaglutinacije izgleda kot novost. Na splošno lahko ugotovimo, da je raziskanost hemaglutinacijske aktivnosti ekstraktov gliv zelo slaba.

Pri antiacetilholinesteraznem testu smo iskali spojine, ki bi inhibirale delovanje acetilholinesteraze (AChE). Acetilholinesteraza je encim, ki v sinaptičnih špranjah med dvema živčnima celicama in na motorični ploščici hidrolizira acetilholin do holina in acetata. Acetilholin je pomemben nevrottransmitter, odgovoren za odpiranje  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  kanalov in depolarizacijo celice. Če je acetilholinesteraza inhibirana, je postsinaptična membrana nenehno vzdružena, kar pripelje do paralize dihalnih mišic in smrti organizma. Spojine s sposobnostjo inhibicije tega encima spadajo med nevrotoksine. Hidroliza acetilholina poteka na dnu aktivnega žepa, globokega 2 nm (Sussman in sod., 1991), kjer ležita esterazno mesto z aktivnim serinom ter t.i. katalitično anionsko mesto s številnimi negativno nabitimi aminokislinskimi ostanki (Quinn, 1987). Anionski lokus stabilizira pozitivno nabiti, holinski del nevrottransmitterja, za samo hidrolizo pa je odgovoren serin v katalitični triadi Ser-Glu-His (Rosenberry, 1975). Na samem vhodu v aktivni žep obstaja še eno vezavno mesto za substrat in druge ligande - periferno anionsko mesto. Acetilholinesterazni inhibitorji so lahko modelne snovi za študij delovanja samega encima. Za preučevanje njegovih aktivnih mest so do zdaj uporabili številne reverzibilne inhibitorje, kot so edrofonij, ki se veže na katalitično anionsko mesto, propidij, ki se veže na periferno anionsko mesto, ali dekametnij, ki ima dva kvartarna dušikova atoma, s pomočjo katerih se veže na obe mesti hkrati. Na serin v esteraznem lokusu se s fosforilacijo ali karbamoilacijo vežejo v glavnem sintetični ireverzibilni inhibitorji, kot so bojni strupi ali insekticidi (organofosfati in karbamati). Inhibitorji acetilholinesteraze pa so tudi uporabni farmakološki pripomočki za zdravljenje ali blaženje simptomov nekaterih bolezni, povezanih z disfunkcijo encima ali s pomanjkanjem acetilholina, na primer Alzheimerjeve bolezni, *myastheniae gravis* ali očesnega glavkoma.

Od naravnih acetilholinesteraznih inhibitorjev so najbolj znani protein fascikulin iz strupa mamb (Karlsson in sod., 1984), alkaloida fizostigmin iz afriške rastline *Physostigma venenosum* (Fraser, 1863) in huperzin iz kitajskega maha *Huperzia serrata* (Ashani in sod., 1992), organofosfat anatoksin iz modrozelenne alge *Anabeana flos-aquae* (Hyde in Carmichael, 1991), glikoalkaloid – čakonin iz krompirja (Wierenga in Hollingworth, 1992), lipoidni alkaloid onhidal iz polža *Oncidella binneyi* (Abramson in sod., 1989), pseudozoantoksantinu podobna snov iz koralnjaka *Parazoanthus axinellae* (Turk in sod., 1995) in polimerne 3-alkilpiridinijeve soli iz morske spužve *Reniera sarai* (Sepčić in sod., 1997).

Do sedaj iz gob še niso izolirali nobenega inhibitorja AChE. V ekpmerimetalnem delu naše naloge smo ugotovili izrazitejšo AChE-inhibicijsko aktivnost pri eni gobi iz razreda prostotrošnic, vrsti *Cortinarius infractus*. Pri tej vrsti je bila inhibicija skoraj več kot sedemindeset odstotna, pri drugih vrstah je bila inhibicija manjša od petdeset odstotkov, zato smo se odločili, da z njimi ne bomo nadaljevali preizkusa (preglednica 10). Pri vrsti *C. infractus* sta imela veliko aktivnost že mikrogramske koncentracije obeh vodnih ekstraktov, surovega in kuhanega. Podobno velja tudi za metanolni ekstrakt iste gobe (diplomska naloga Bogdan A.). Domnevamo, da gre za isto, polarno snov (metanol je po polarnosti najbolj blizu vodi), ki verjetno ni protein.

Pri obeh vzorcih je bila inhibicija po sto kratnem redčenju še vedno večja od petdeset procentov, zato smo se odločili da bomo redčili do tisočkratne redčitve. Pri tej redčitvi je imel surov vzorec še vedno več kot deset odstotno inhibicijo, kuhani pa še malce večjo, in sicer sedemnajst odstotno (preglednica 11).

V literaturi nismo zasledili objav na temo acetilholinesterazne inhibicije s snovmi, izoliranimi iz gob, tako je v tej diplomi ugotovljena inhibicijska aktivnost vrste *C. infractus* popolna novost. V nadaljnjih raziskavah bi bilo zanimivo ugotoviti bolj natančno, katera snov povzroča inhibicijo.

## 5.2 SKLEPI

V diplomskem delu smo opazovali biološko aktivnost surovih in kuhanih vodnih ekstraktov iz 28 različnih vrst bazidiomicet s pomočjo štirih testov. Ugotovili smo, da je

hemolitično delovalo trinajst vzorcev, enajstih vrst gob. Hemolitično aktivnost vodnih ekstraktov smo odkrili pri enajstih novih vrstah.

Protibakterijsko aktivnost proti *E. coli* sta kazala oba vzorca gobe *Peziza badia*, proti *B. subtilis* pa dvanajst vzorcev, osmih vrst. Močno aktivnost smo zabeležili pri surovem in kuhanem vzorcu vrste *Hygrophorus pudorinus*. Po desetkratnem redčenju je protimikrobna aktivnost pri vrsti *Hygrophorus pudorinus* prisotna le še na gojišču z bakterijo *B. subtilis*, pri stokratnem in tisočkratnem redčenju ni bilo več zaznati aktivnosti. Pri tem testiranju smo prvič odkrili protibakterijsko aktivnost vodnih ekstraktov pri petih vrstah, izmed katerih je pri treh vrstah le-ta že bila opisana za organske ekstrakte. Za vodne ekstrakte pa so vse ugotovitve novost in niso bile še nikoli prej opisane.

Hemaglutinacijsko aktivnost smo zasledili pri treh vzorcih iz 2 vrst gob, pri surovem vzorcu *Hygrophorus pudorinus* in pri surovem in kuhanem vzorcu *Lactarius scrobiculatus*. Po desetkratnem redčenju je aktivnost bila zaznavna še pri vseh treh vzorcih, pri stokratnem pa ne več.

Test antiacetilholinesterazne aktivnosti je pokazal močno aktivnost v surovih in kuhanih ekstraktih vrste *Cortinarius infractus*. Inhibicija je bila zaznavna tudi po tisočkratnem redčenju pri obeh vzorcih.

Iz zgoraj navedenih podatkov sklepamo, da sta od testiranih aktivnosti prevladovala hemolitična in protibakterijska aktivnost. V primerjavi s poznanimi učinki vodnih ekstraktov iz literature smo opazili, da je za vse vrste s pozitivno reakcijo, hemolitična aktivnost novost, razen za vrsto *Amanita citrina*, ki pa je že bila opisana v literaturi.

Tudi protibakterijsko delovanje vseh vrst (*Agaricus arvensis*, *Hygrophorus agathosmus*, *H. eburneus*, *H. pudorinus*, *Lactarius deterrimus*, *L. salmonicolor*, *Peziza badia* in *Tricholoma sulphureum*) še ni bilo opisano, saj v literaturi ni bilo podatkov o protimikrobni aktivnosti vodnih ekstraktov obravnavanih gob. Prav tako v literaturi še ni bila opisana hemaglutinacijska aktivnost vodnih ekstraktov vrst *Lactarius scrobiculatus* (surovi in kuhani vzorec) in *Hygrophorus pudorinus* (surovi vzorec).

Rezultati bioloških aktivnosti v vseh vodnih ekstraktih so praktično novost, saj smo samo pri dveh vrstah gliv (*Amanita citrina* in *Hygrophorus agathosmus*), našli članke o raziskavah vodnih ekstraktov, pa še pri slednjem so testirali samo antioksidacijsko aktivnost. Večina raziskav gliv do sedaj, so opravili z organskimi ekstrakti. Zato bi naši rezultati utegnili biti zelo zanimivi, saj so popolna novost. Z nadaljnjim raziskovanjem bi lahko odkrili natančneje, katere snovi v ekstraktih povzročajo ugotovljene aktivnosti.



## 6 POVZETEK

Sekundarni metaboliti omogočajo gobam kemijsko obrambo pred mikroorganizmi, kot so bakterije in glive, pred obžiranjem in zaščito pred predatorji in jim s tem omogočajo preživetje v njihovem naravnem okolju. Njihova biološka aktivnost je lahko tudi osnova za razvoj novih zdravil, insekticidov, in ostalih snovi potencialno uporabnih na različnih področjih človeške aktivnosti. Vodne ekstrakte 28 vrst bazidiomicet nabranih v Mehkih Dolinah pri Idriji in v Hudourniku pri Vojskem (Slovenija), smo testirali na morebitno prisotnost biološko aktivnih snovi. Izbrali smo hemolitični, hemaglutinacijski in protibakterijski test in test inhibicije encima acetilholinesteraze. Rezultati so pokazali, da vsebujejo vodni ekstrakti nekaterih gob še neraziskane biološko aktivne sestavine, katere bi bile lahko zanimive za uporabo v biomedicini.

## 7 VIRI

Abramson S. N., Radić, Z., Manker D., Faulkner D. J. in Taylor P. 1989. Onchidal: a naturally occurring irreversible inhibitor of acetylcholinesterase with a novel mechanism of action. *Mol. Pharmacol.* 36: 349-354.

Agrahar-Murugkar D., Subbulakshmi G. 2005. Nutritional value of edible wild mushrooms and Metabolism, 35 : 191 –195.

Alvarez-Parrilla E., de la Rosa L. A., Martínez N.R., González Aguilar, G.A. 2007. Totalphenols and antioxidant activity of commercial wild mushrooms from Chihuahua, Mexico. *Cienc. Tecnol. Aliment.* 5: 329-334.

Asford K. E., Ley K. 1993. Sulfated polysaccharides in inflammation. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 121: 201-202.

Ashani Y., Peggins J. O. in Doctor B. P. 1992. Mechanism of inhibition of cholinesterases by huperzine A. *Biochem. Bioph. Res. Co.*, 184: 719-726.

Barak D., Ordentlich A., Bromberg A., Kronman C., Marcus D., Lazar A., Ariel N., Velan B. in Shaffermann A. 1995. Allosteric modulation of acetylcholinesterase activity by peripheral ligands involves a conformational transition of the anionic subsite. *Biochemistry* 34: 15444-15452.

Barros L., Calhelha R. C., Vaz J. A., Ferreira I. C. F. R., Baptista P., Estevinho L.M. 2006. Antimicrobial activity and bioactive compounds of Portuguese wild edible mushrooms methanolic extracts. *Eur Food Res Technol*, 225:151–156.

Benedict R. G., Brady L. R. 1972. Antimicrobial activity of mushroom metabolites. *J Pharm Sci* 61: 1820–1821.

Breene W.M.. Nutritional and medicinal value of specially mushrooms. Journal of Food collected from the Khasi hills of Meghalaya. *Food Chemistry*, 89 (4): 599 –603

Broadbent D. 1966. Antibiotics produced by fungi. *The Botanical Rev.* 32: 219–517.

Chang S. T. 1996. Mushroom research and development – equality and mutual benefit. *In Italy. Food Chemistry*, 73 : 321 –325.

Colak A., Sahin E., Yildirim M., Sesli E. 2006. Polyphenol oxidase potentials of three wild mushroom species harvested from Lişer High Plateau, Trabzon, *Food Chemistry* 103: 1426 –1433.

Conchran K. W. 1978. Medicinal effect. In: The biology and cultivation of edible mushroom (Ed. Chung S.T. and Hayes W.A.). *Academic Press, New York*.

Cook N.C., Samman S. 1996. Flavonoids-chemistry, metabolism, cardioprotective effects and dietary sources. *Journal of Nutrition Biochemistry*, 7: 66-76.

Deckler E. A. 1997. Phenolics: prooxidants or antioxidants? *Nutrition reviews*, 55: 396-407.

Dong J. J., Li X. P., Li L., Li G. H., Liu Y. J., Zhang K. Q. 2006. Preliminary results on nematicidal activity from culture filtrates of Basidiomycetes against the pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus* (Aphelenchiodidae). *Annals of Microbiology*, 56, 2: 163-166.

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

Dulger B., Yilmaz F., Gucin F. 2002. Antimicrobial Activity of Some Lactarius Species. *Pharmaceutical Biology*, 40, 4: 304–306.

Ellman G. L., Courtney D., Andres V., Featherstone R. M. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.*, 7: 88–95.

Elmastas M., Isildaka O., Turkecul I., Temur N. 2005. Determination of antioxidant activity and antioxidant compounds in wild edible mushrooms. *Journal of Food Composition and Analysis* 20: 337–345.

Espanshade M. A., Griffith E. W. 1966. Tumor-inhibiting basidiomycetes: Isolation and cultivation in the laboratory. *Mycologia* 58: 511–517.

Ferreira I. C. F. R., Baptista P., Vilas-Boas M., Barros L. 2006. *Food Chem (in press)*

Ferreira I.C.F.R., Baptista P., Vilas-Boas M., Barros L. 2006. *Food Chem (in press)*.

Fraser, T. R. 1863. On the characters, actions and therapeutical uses of the ordeal bean of Calabar (*Physostigma venenosum*, Balfour). *Edin. Med. J.* 9: 36-56, 123-132, 235-248.

Graham J.S., Pearce G., Merryweather J., Titani K., Ericsson L. 1985. *J Biol Chem* 260: 6555-6561.

Hobbs C. 1995. *Medicinal Mushrooms. Santa Cruz: Botanica Press.*

Hyde, E. G. in Carmichael, W. W. 1991. Anatoxin-a(s), a naturally occurring organophosphate, is an irreversible active site-directed inhibitor of acetylcholinesterase (EC 3.1.1.7.). *J. Biochem. Toxicol.* 6: 195-201.

Jogan N. 2001. Navodila za vaje iz sistematske botanike. 3.izdaja delovne verzije. Ljubljana, različica .pdf 28 str.

Kandaswami C., Middleton E. 1997. Flavonoids as antioxidants. In: Shahidi F., Ed., Natural Antioxidants. *Chemistry, Health Effect and Practical Application*, Champign, Illiois' AOCS Press: 174-194 .

Karlsson, E., Mbugua, P. M. in Rodriguez-Ithurralde, D. J. 1984. Fasciculins, anticholinesterase toxins from the venom of the green mamba, *Dendroaspis angusticeps*. *J. Physiol.-Paris* 79: 232-240.

Kim H .W. , Kim B. K. 1999. Biomedicinal triterpenoids of *Ganoderma lucidum* (Curt.: Fr.) P.Karst (Aphyllphoromycetidae). *Int J Med Mushrooms*, 1: 121–38.

Kitz, R.J., Braswell, L.M. in Ginsburg, S. 1970. On the question: is acetylcholinesterase an allosteric protein? *Mol. Pharmacol.* 6: 108-121.

Konno K. 1995. Biologically active components of poisonous mushrooms. *Food Reviews International* 11, 1: 83-107.

Lassoe T. 2006. Gobe. Ljubljana, Prešernova družba d.d.: 25-30 str.

Lelley J. 1997. Die Heilkraft der Pilze. Berlin: ECON-Verlag.

Lindequist U., Ganoderma in Schneider G., Hänsel R, Blaschek W (eds). 1998. HAGERs Handbuch der Pharmazeutischen Praxis. Berlin, Heidelberg, New York, Springer-Verlag, 750–61 (in German).

Lindequist U., Lentinula in Schneider G., Hänsel R., Blaschek W. (eds). 1998. HAGERs Handbuch der Pharmazeutischen Praxis. *Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag, 61–71 (in German).*

Lindequist U., Schizophyllum in: Schneider G., Hänsel R., Blaschek W. (eds). 1998. HAGERs Handbuch der Pharmazeutischen Praxis. *Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag, 528–34 (in German).*

Lindequist U., Teuscher E., Narbe G. 1990. Neue Wirkstoffe aus Basidio-myceten. *Z Phytother, 11:139–49 (in German).*

Longvah T., Deosthale Y.G. 1998. Compositional and nutritional studies on edible wild mushroom from northeast India. *Food Chemistry, 63: 331-334.*

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

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

Manzi P., Aguzzi A., Pizzoferrato L. 2001. Nutritional value of mushrooms widely consumed mushroom *Pleurotus ostreatus* in hereditary hypercholesterolemic rats. *Annals of Nutrition Mushroom Products. Pennsylvania State University: 1-10*

Mercan N., Duru M.E., Turkoglu A., Gezer K., Kirkav I., Turkoglu H. 2006. Antioxidant and antimicrobial properties of ethanolic extract from *Lepista nuda* (Bull.) Cooke, *Annals of Microbiolog 56,4: 339-344.*

Mooser, G. in Sigman, D.S. 1974. Ligand binding properties of acetylcholinesterase determined with fluorescent probes. *Biochemistry* 13: 2299-2307.

Yamaç M. and Bilgili F. 2006. Antimicrobial Activities of Fruit Bodies and/or Mycelial Cultures of Some Mushroom Isolates. *Pharmaceutical Biology* 44, 9: 660–667.

Pilgrim H., Haasmann S., Schröder K. 1992. *Zentralb Mikrobiol*, 147: 400-404.

Pilgrim H., Haasmann S., Schröder K. 1992. *Zentralb Mikrobiol* , 147: 400 – 404.

Quinn, D. M. 1987. Acetylcholinesterase: enzyme structure, reaction dynamics, and virtual transition states. *Chem. Rev.* 87: 955-979.

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

Rosenberry, T.L. 1975. Acetylcholinesterase. *Adv. Enzymol. Relat. Areas. Mol. Biol.* 43: 103-218.

Royse D. J. (ed). *Proceedings of the 2nd International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products. Pennsylvania State University: 1-10*

Ryan C.A., Green T.R. 1974. *Recent Adv Phyrochem* 8: 23-140.

Ryan C.E. 1989. *BioEssaya* 10: 20-24.

Sahu S. C., Green S. 1997. Food antioxidants: Their dual role in carcinogenesis. In: Baskin S., Salem H., Eds, Oxidants, Antioxidants and Free Radicals, *Taylor and Francis, Washington*, 329-330.

Sepčić, K., Batista, U., Vacelet, J., Maček, P. in Turk, T. 1997a. Biological activities of aqueous extracts from marine sponges and cytotoxic effects of 3-alkylpyridinium polymers from *Reniera sarai*. *Comp. Biochem. Phys. C 117*: 47-53.

Sepčić, K., Guella, G., Mancini, I., Pietra, F., Dalla Serra, M., Menestrina, G., Tubbs, K., Maček, P. in Turk, T. 1997b. Characterization of anticholinesterase-active 3-alkylpyridinium polymers from the marine sponge *Reniera sarai* in aqueous solutions. *J. Nat. Prod.* 60: 991-996.

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

Sidorova I.I., Velikanov L.L. 2000. Bioactive substances of Agaricoid basidiomycetes and their possible role in regulation of myco- and microbiota structure in soils of forest ecosystems. II. Antibiotic activity in cultures of litter saprotrophic mushroom *Lepista nuda*. *Mikologiya i fitopatologiya* 34: 10-16.

Simon P. B., Ovenden Yu J., Bernays J., Wan S. S., Christophidis L. J., Sberna G., Murray Tait R., Wildman H. G., Lebeller D., Platel D., May M.W., Meurer-Grimes B. M. 2004. Trichomycins A and B: Antibacterial Triterpenes from the New Species *Tricholoma* sp. AU1. *J. Nat. Prod.*, 68: 409-412.

Stamets P. 2000. Growing Gourmet and Medicinal Mushrooms. *Berkely: Ten Speed Press*.



Suay I., Arenal F., Asensio F.J., Basilio A., Cabello M. A., Diez M. T., Garcia J. B., Val A. G., Gorrochategui J., Hernandez P., Peláez F., Vicente M.F. 2000. Screening of Basidiomycetes for antimicrobial activities. *Antonie Van Leeuwenhoek* 78: 129–139.

Sussman, J. L., Harel, M., Frolow, F., Oefner, C., Goldman, A., Toker, L. in Silman, I. 1991. Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholine-binding protein. *Science* 253: 872-879.

Teichert A., Lübken T., Schmidt J., Porzel A., Arnold N., Wessjohann L. 2005. Unusual Bioactive 4-oxo-2-alkenoic Fatty Acids from *Hygrophorus eburneus*. *Department of Bioorganic Chemistry, Leibniz-Institute of Plant Biochemistry, Weinberg 3, D-06120 Halle (saale), Germany*.

Tsukamoto S., Abdulgafor D. Macabalang, Nakatani K., Obara Y., Nakahata N. in Ohta T. 2003. Tricholomalides A-C, New Neurotrophic Diterpenes from the Mushroom *Tricholoma* sp.. *J. Nat. Prod.*, 66, 1578-1581.

Turk, T. 1996b. Spužve - kemične tovarne. *Proteus* 58: 208 - 213.

Vaquero M. J. R., Alberto M. R., Nadra M. C. M. 2005. *Food Control (in press)*.

Vetter J. 1999. Trypsin inhibitor activity of basidiomycetous mushrooms, *Eur Food Res Technol*, 211: 246-348.

Wasser S. P., Weis A. L. 1999. Therapeutic effects of substances occurring in higher Basidiomycetes mushrooms: modern perspective. *Critical Reviews in Immunology* 19: 65–96.

Wasser S.P., Nevo E., Sokolov D., Reshetnikov S., Timot-Tismenetsky M. 2000. Dietary supplements from medicinal mushrooms: diversity of types and variety of regions. *Int J Med Mushrooms*, 2: 1-19

Wierenga, J. M. in Hollingworth, R. M. 1992. Inhibition of insect acetylcholinesterase by the potato glucoalkaloid-chaconine. *Nat. Toxins* 1: 96-99.

Yayli N., Yailmaz N., Ocak M., Sevim A., Sesli E. in Yayli N. 2007. *Asian Journal of Chemistry*, 19, 5: 4102-4106.

Zhou S., Gao Y. 2002. The immunomodulating effects of *Ganoderma lucidum* (Curt.:Fr.) P.Karst (LingZhi, Reishi Mushroom) (Aphylloromycetidae). *Int J Med Mushrooms*, 4: 1-11.

Zjawiony J. 2004. Biologically active compounds from Aphylophorales (Polypore) fungi. *J Nat Prod.*, 67: 300-10.

## **ZAHVALA**

Moji mentorici prof. dr. Kristini Sepčič za pomoč in spodbudo pri delu. Brez nje bi bila pot do cilja veliko daljša.

Moji kolegici Antoniji Bogdan za korektno timsko delo.

Maji Zagmajster za pomoč pri izdelavi slik.

Ter seveda svojim staršem za vso podporo v času študija.

## PRILOGE

### Priloga A

#### Pregled objav

IME GOBE	UČINKOVINA	VRSTA MOLEKULE	VODNA / ORGANSKA FAZA	ORGANSKO TOPILO	AKTIVNOST	REFERENCA
<i>Agaricus sp.</i>		zmes fenolov	organska faza	80% raztopina metanola	antioksidativna aktivnost	Alvarez-Parrilla in sod., 2007.
<i>Amanita citrina</i>		grobi ekstrakt	Vodna faza	amonijev sulfat	rahla hemoliza po eni uri inkubacije	Lustik-Kordovsky in sod., 2001.
	bufotenin	alkaloid			domnevajo da deluje na serotoninске (5-hidroksitriptamin; 5-HT) receptorje v centralnem živčnem sistemu, ker je struktura in aktivnost podobna doslej znanim halocinogenim LSDjem. Ta alkaloid gradi poseben podtip 5-HT receptorja.	Konno, 1995.
<i>Cordyceps sp. (Paecilomyces japonica)</i>		grobi ekstrakt	organska faza	MeOH	antioksidacijska in imunostimulatorna aktivnost v jetrnih celicah podgan	Shin in sod., 2001

		grobi ekstrakt	vodna faza	voda	antioksidacijska in imunostimulatorna aktivnost v jetrnih celicah podgan	
<i>Craterellus cornucopioides</i>		anorganski ekstrakt		NaOH	inhibicija tripsina	Vetter, 2000.
<i>Hygrophorus agathosmus</i>		organski ekstrakt	organska faza	aceton	protimikrobna aktivnost proti vrstam <i>Salmonella typhimurium</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Bacillus subtilis</i>	Mustafa Yamaç in sod., 2006
				diklorometan	protimikrobna aktivnost proti vrstam <i>Salmonella typhimurium</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i>	
				etanol	protimikrobna aktivnost proti vrstam <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella typhimurium</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Bacillus subtilis</i>	

				kloroform	protimikrobna aktivnost proti vrstam <i>Enterobacter aerogenes</i> , <i>Salmonella typhimurium</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
		vodni ekstrakti	vodna faza	deinizirana voda	antioksidacijska aktivnost	Ribiero in sod., 2006.
<i>Hygrophorus eburneus</i>	(2E,9E)-4-oksaoftadekatrienojska kislina	maščobne kisline	organska faza	etilni acetat	protibakterijska in protiglivna aktivnost	Teichert in sod., 2005.
	(2E,11Z)-4-oksaoftadeka-2,11,17-trienojska kislina					
	(E)-4-oksaoftadeka-2,15-dienojska kislina					
	(E)-4-oksaoftadeka-2,17-dienojska kislina					
	(2E,9E)-4-oksaoftadekadinojska kislina					
	(2E,11Z)-4-oksaoftadeka-2,11-dienojska kislina					

	(E)-4-oksahaksadek-2-enojska kislina					
	(E)-4-oksaoktadec-2-enojska kislina					
<i>Hygrophorus pudorinus</i>		anorganski ekstrakt		NaOH	inhibicija tripsina	Vetter, 2000.
<i>Lactarius salmonicolor</i>		organski ekstrakti	organska faza	MeOH	Antibaktrijska aktivnost proti vrsti <i>Escherichia coli</i> ATCC 11230	Dulger in sod., 2002.
<i>Lepista nuda</i>		halogeni	organska faza	MeOH	protimikrobna aktivnost proti vrstam <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>	Dulger in sod., 2002.
		steroli			protimikrobna aktivnost proti vrstam <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>	

	terpeni				protimikrobna aktivnost proti vrstam <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>	
	anorganski ekstrakt	anorganska faza	NaOH		inhibicija tripsina	Vetter, 2000.
	organski ekstrakt	organska faza	MeOH		antioksidacijski potencial (inhibicija 97.9%)	Elmastas. in sod., 2007.
	zmes fenolov	organska faza	MeOH		antioksidacijski potencial	
$\alpha$ -tokoferol	izoprenoidi	organska faza	MeOH		antioksidacijski potencial	
$\beta$ -karoten	karotenoidi	organska faza	MeOH		antioksidacijski potencial	
	kuhani etanolni ekstrakt	organska	EtOH		protimikrobna aktivnost proti patogenim bakterijam ( <i>E.coli</i> , <i>E. enteroclitica</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. enteritidis</i> )	Mercan in sod., 2006.
					antioksidacijska aktivnost	
	grobi vodni ekstrakt	vodna faza	fosfatni pufer		encimska aktivnost (polifenolna oksidaza)	Colak in sod., 2007.



					protimikrobna aktivnost	Sidorova in Velikanov, 2000.
<i>Macrolepiota procera</i>		anorganski ekstrakt	anorgansko	NaOH	inhibicija tripsina	Vetter, 2000.
		zmes fenolov	organska faza	80% raztopina metanola	antioksidativna aktivnost	Alvarez-Parrilla in sod., 2007.
<i>Peziza sp.</i>		ekstrakt			nematotoksična aktivnost (odrasli osebki, larve)	Dong in sod., 2006.
<i>Tricholoma sp.</i>	triholomalidi A-C (C <sub>20</sub> H <sub>28</sub> O <sub>5</sub> )	diterpeni	organska faza	MeOH	inducira rast neuritnih izrastkov pri PC-12 celicah	Tsukamoto in sod., 2003.
<i>Tricholoma sp. AU1</i>	triholomicin A (C <sub>31</sub> H <sub>48</sub> O <sub>5</sub> )	triterpeni	organska faza	MeOH	protibakterijska in citotoksična aktivnost	Simon in sod., 2004.
	triholomicin B (C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O <sub>4</sub> )					

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Matej KALAR

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

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2008