

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Mojca TAJNIK

**IZOLACIJA IN KARAKTERIZACIJA VODOTOPNIH
POLISAHARIDOV IZ MEDICINSKO POMEMBNIH
VIŠJIH GLIV**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

Ljubljana, 2009

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Mojca TAJNIK

**IZOLACIJA IN KARAKTERIZACIJA VODOTOPNIH
POLISAHARIDOV IZ MEDICINSKO POMEMBNIH VIŠJIH GLIV**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF WATER-SOLUBLE
POLYSACCHARIDES FROM MEDICINAL IMPORTANT
HIGHER FUNGI**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2009

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija biotehnologije. Vse analize so bile opravljene na Katedri za farmacevtsko biologijo, Fakultete za farmacijo, Univerze v Ljubljani. Izbrane glice smo gojili na Katedri za zaščito in patologijo lesa, Oddelka za lesarstvo, Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani.

Komisija za dodiplomski študij Študija biotehnologije je za mentorja diplomskega dela imenovala prof. dr. Boruta Štruklja.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Branka Javornik

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Član: prof. dr. Borut Štrukelj

Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Katedra za farm. biologijo

Član: doc. dr. Miha Humar

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za lesarstvo

Datum zagovora: 29. junij 2009

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

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Mojca Tajnik

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 582.284:615.011 (043.3)
KG	medicinsko pomembne višje glive/ imunomodulatorne lastnosti/ polisaharidi/ <i>Trametes versicolor/ Ganoderma lucidum/ Fomes fomentarius/ Schizophyllum commune/ Laetiporus sulphureus/</i> ekstrakcija/ gelska filtracija/ tankoplastna tekočinska kromatografija
AV	TAJNIK, Mojca
SA	ŠTRUKELJ, Borut (mentor)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije
LI	2009
IN	IZOLACIJA IN KARAKTERIZACIJA VODOTOPNIH POLISAHARIDOV IZ MEDICINSKO POMEMBNIH VIŠJIH GLIV
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	IX, 57 str., 5 pregl., 24 sl., 97 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Namen dela je bil izolacija in karakterizacija vodotopnih polisaharidov iz medicinsko pomembnih višjih gliv. Za gojenje gliv <i>Ganoderma lucidum</i> , <i>Trametes versicolor</i> , <i>Fomes fomentarius</i> , <i>Schizophyllum commune</i> in <i>Laetiporus sulphureus</i> smo izvedli kultivacijo v tekočih gojiščih različnih sestav. S topotno ekstrakcijo micelija ter s precipitacijo z etanolom smo izolirali intracelularne in ekstracelularne polisaharide. Karakterizacijo smo izvedli s tankoplastno tekočinsko kromatografijo ter z gelsko filtracijo. S prvo smo izvlečkom izoliranih polisaharidov določili monosaharidno sestavo in z drugo približni rang velikosti. V izvlečkih smo določili vsebnost proteinov ter vodotopnih polisaharidov, in sicer so vsebovali 21,0–69,7 % polisaharidov, večjih od 6–8 kDa ter 0,3–4,1 % proteinov. Izvlečki intracelularnih polisaharidov so vsebovali večji delež proteinov. Pri vseh izvlečkih, razen pri izvlečku intracelularnih polisaharidov <i>G. lucidum</i> , smo ugotovili, da gre za heteropolisaharide, ki vsebujejo več kot le eno različno monosaharidno enoto. Detektirali smo monosaharide glukozo, galaktozo, fukozo, manozo in arabinozo. Za določitev molekulskih mas smo uporabili kolono z nosilcem Sepharose CL-4B. Iz pridobljenih vrednosti elucijskih volumnov velikostnih standardov dekstranov smo pripravili krivuljo, iz katere smo vzorcem določili neznane molekulske mase. Vsi izolirani, tako ekstracelularni kot intracelularni polisaharidi, imajo molekulsko maso v območju od 27.000 do 85.000 Da. Z uporabo tovrstnih standardov nismo mogli določiti natančnejših vrednosti. Pri pregledu literature nismo zasledili enake sestave in velikosti do sedaj izoliranih polisaharidov iz izbranih gliv.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 582.284:615.011 (043.3)
CX Medicinal important higher fungi/ immunomodulating activities/ polysaccharides/
Trametes versicolor/ *Ganoderma lucidum*/ *Fomes fomentarius*/ *Schizophyllum commune*/ *Laetiporus sulphureus*/ extraction/ gel filtration/ thin-layer chromatography
AU TAJNIK, Mojca
AA ŠTRUKELJ, Borut (supervisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Study of Biotechnology
PY 2009
TI ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF WATER-SOLUBLE POLYSACCHARIDES FROM MEDICINAL IMPORTANT HIGHER FUNGI
DT Graduation thesis (university studies)
NO IX, 57 p., 5 tab., 24 fig., 97 ref.
LA sl
AL sl/en
AB In this study, water-soluble polysaccharides were isolated from mushrooms *Ganoderma lucidum*, *Trametes versicolor*, *Fomes fomentarius*, *Schizophyllum commune* and *Laetiporus sulphureus*, all cultivated by submerged fermentation. Hot-water extraction and ethanol precipitation was employed in order to isolate the polysaccharides. Chemical composition and molecular weight of the polysaccharides were investigated. The total water-soluble carbohydrate and protein content were determined by the phenol-sulfuric acid method and Bradford assay, respectively. For the determination of molecular weight gel filtration chromatography was used. The composition of monosaccharides was assessed by thin-layer chromatography (TLC). The extracts were composed of 21,0 – 69,7 % polysaccharides larger than 6-8 kDa and 0,3 – 4,1 % proteins. The extracts from the mycelia seemed to have higher protein content than the ones from the culture media. All the polysaccharides, except *Ganoderma lucidum* intracellular polysaccharides, were composed of more than one monosaccharide and can be determined as heteropolysaccharides. The molecular weights were determined using a Sepharose CL-4B column with a calibration curve made from a set of dextran standards ($2 \cdot 10^6$, $5 \cdot 10^5$ and $1 \cdot 10^5$ Da) and was estimated to be in range of 27.000 do 85.000 Da. Based on the results of monosaccharide composition and molecular weight determination, we propose that we have isolated new water-soluble polysaccharides from cultivated higher fungi

KAZALO VSEBINE

Ključna dokumentacijska informacija	III
Key words documentation	IV
Kazalo vsebine.....	V
Kazalo preglednic	VII
Kazalo slik	VIII
Seznam okrajšav	IX
1 UVOD	1
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 ZGODOVINA IN UPORABA MEDICINSKO POMEMBNIH VIŠJIH GLIV	3
2.1.1 Svetlikava pološčenka ali <i>Ganoderma lucidum</i> (Curtis) P. Karst.	4
2.1.2 Pisana ploskocevka ali <i>Trametes versicolor</i> (L.) Lloyd.....	5
2.1.3 Navadna cepilistka ali <i>Schizophyllum commune</i> Fr.	6
2.1.4 Žvepleni lepoluknjičar ali <i>Laetiporus sulphureus</i> (Bull.) Murrill	6
2.1.5 Bukova kresilka ali <i>Fomes fomentarius</i> (L.) J. J. Kickx	7
2.2 IMUNOMODULATORNE UČINKOVINE IZ MEDICINSKO POMEMBNIH VIŠJIH GLIV IN NJIHOVA STRUKTURA	7
2.2.1 β -D-glukani.....	7
2.2.2 Ostale učinkovine.....	9
2.3 IMUNOMODULATORNE AKTIVNOSTI GLIVNIH GLIKANOV IN NJIHOVIH KOMPLEKSOV S PROTEINI	10
2.3.1 <i>Ganoderma lucidum</i> in njeni imunomodulatorni učinki	11
2.3.2 Imunomodulatorni učinki polisaharidov PSP in PSK iz <i>Trametes versicolor</i>	12
2.3.3 Imunomodulatorne lastnosti schizophyllana iz <i>Schizophyllum commune</i>	12
3 MATERIALI IN METODE	14
3.1 KEMIKALIJE IN APARATURE	14
3.1.1 Uporabljene kemikalije.....	14
3.1.2 Uporabljene aparature.....	15
3.2 SUBMERZNI NAČIN GOJENJA IN PRODUKCIJA POLISAHARIDOV IZ MEDICINSKIH GLIV	15
3.2.1 Organizem	15
3.2.2 Gojišče za vzdrževanje kulture	16
3.2.3 Submerzna kultivacija z uporabo različnih substratov	16
3.3 EKSTRAKCIJA IN IZOLACIJA POLISAHARIDOV IZ GOJIŠČA IN MICELIJA GLIV	18

3.3.1 Ekstrakcija in izolacija ekstracelularnih vodotopnih polisaharidov	18
3.3.2 Ekstrakcija in izolacija intracelularnih vodotopnih polisaharidov	19
3.4 ANALIZA IZOLIRANIH POLISAHARIDOV	20
3.4.1 Določitev vsebnosti polisaharidov in proteinov v izoliranih izvlečkih.....	20
3.4.2 Določitev monosaharidne sestave polisaharidov s tankoplastno tekočinsko kromatografijo (TLC)	20
3.4.2.1 Priprava vzorcev za TLC	21
3.4.2.2 Postopek TLC in detekcija monosaharidov	21
3.4.3 Določitev velikostnega ranga vodotopnih polisaharidov z gelsko filtracijo	22
4 REZULTATI.....	25
4.1 VSEBNOST VODOTOPNIH POLISAHARIDOV IN PROTEINOV V IZOLIRANIH IZVLEČKIH.....	25
4.2 MONOSAHARIDNA SESTAVA POLISAHARIDOV	26
4.3 VELIKOSTNI RANG IZOLIRANIH POLISAHARIDOV	29
4.3.1 Frakcionacijski rang standardov dekstranov	29
4.3.2 Molekulska masa vzorcev intracelularnih in ekstracelularnih polisaharidov....	30
5 RAZPRAVA IN SKLEPI.....	36
5.1 RAZPRAVA.....	36
5.1.1 Vsebnost vodotopnih polisaharidov in proteinov v izoliranih izvlečkih.....	36
5.1.2 Monosaharidna sestava polisaharidov	37
5.1.3 Velikostni rang izoliranih vodotopnih polisaharidov.....	41
5.2 SKLEPI.....	45
6 POVZETEK (SUMMARY)	47
6.1 POVZETEK	47
6.2 SUMMARY	49
7 VIRI	51

ZAHVALA

KAZALO PREGLEDNIC

Pregl. 1: Sestava medijev za kultivacijo v tekočem gojišču.....	17
Pregl. 2: Sestava izvlečkov intracelularnih in ekstracelularnih polisaharidov ter preračunani deleži polisaharidov, proteinov in ostalih snovi.....	25
Pregl. 3: Sestava monosaharidov v izvlečkih ekstracelularnih in intracelularnih polisaharidov	28
Pregl. 4: Parametri kromatografske ločbe dekstranov standardnih molekulskih mas in izračunani porazdelitevni koeficienti (K_{av})	29
Pregl. 5: Izračunana molekulska masa intracelularnih (ICP) in ekstracelularnih (ECP) polisaharidov	35

KAZALO SLIK

Sl. 1: Poslikava iz jame Tassili, Alžirija.....	3
Sl. 2: Diagram strukture β -D-glukanov	8
Sl. 3: Model molekule desnosučne trojne vijačnice β -D-glukana	9
Sl. 4: Micelij gliv na gojišču iz krompirjevega dekstroznega agarja.....	16
Sl. 5: Kultivacija <i>Schizophyllum commune</i> v tekočem gojišču	17
Sl. 6: Shematski prikaz strukture celične stene gliv.	18
Sl. 7: Posušen micelij <i>Schizophyllum commune</i> na filter papirju	19
Sl. 8: Teoretični kromatogram separacije snovi različnih molekulskih mas z uporabo kolonske kromatografije visoke ločljivosti (SE-HPLC).....	23
Sl. 9: Uporabljena kolona z nosilcem Sepharose CL-4B, pufer za spiranje in zbrane 5 mL frakcije	23
Sl. 10: Sestava izvlečkov izoliranih ekstracelularnih in intracelularnih polisaharidov	26
Sl. 11: Kromatogram tankoplastne tekočinske kromatografije: <i>T. versicolor</i> ICP, <i>T. versicolor</i> ECP.....	27
Sl. 12: Kromatogram tankoplastne tekočinske kromatografije: <i>F. fomentarius</i> ICP, <i>F. fomentarius</i> ECP, <i>G. lucidum</i> ICP, <i>G. lucidum</i> ECP, <i>L. sulphureus</i> ICP, <i>L. sulphureus</i> ECP	27
Sl. 13: Kromatogram tankoplastne tekočinske kromatografije: <i>S. commune</i> ICP, <i>S. commune</i> ECP	28
Sl. 14: Frakcionacijski rang standardov dekstranov	29
Sl. 15: Kromatogram gelske filtracije intracelularnih polisaharidov <i>T. versicolor</i>	34
Sl. 16: Kromatogram gelske filtracije ekstracelularnih polisaharidov <i>T. versicolor</i>	34
Sl. 17: Kromatogram gelske filtracije intracelularnih polisaharidov <i>G. lucidum</i>	34
Sl. 18: Kromatogram gelske filtracije ekstracelularnih polisaharidov <i>G. lucidum</i>	34
Sl. 19: Kromatogram gelske filtracije intracelularnih polisaharidov <i>F. fomentarius</i>	34
Sl. 20: Kromatogram gelske filtracije ekstracelularnih polisaharidov <i>F. fomentarius</i>	34
Sl. 21: Kromatogram gelske filtracije intracelularnih polisaharidov <i>L. sulphureus</i>	34
Sl. 22: Kromatogram gelske filtracije ekstracelularnih polisaharidov <i>L. sulphureus</i>	34
Sl. 23: Kromatogram gelske filtracije intracelularnih polisaharidov <i>S. commune</i>	34
Sl. 24: Kromatogram gelske filtracije ekstracelularnih polisaharidov <i>S. commune</i>	34

SEZNAM OKRAJŠAV

AFM	mikroskopija na atomsko silo
BSA	goveji serumski albumin
CE	kapilarna elektroforeza
ECP	ekstracelularni polisaharidi
GC	plinska kromatografija
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti
ICP	intracelularni polisaharidi
IFN	interferon
IL	interlevkin
IR	infrardeča spektroskopija
K _{av}	porazdelitveni koeficient
MS	masna spektroskopija
MWCO	izključitvena molekulska masa
NMR	nuklearna magnetna resonanca
PDA	krompirjev dekstrozni agar
PDB	krompirjev ekstrakt z dodano glukozo
PSK	Krestin, polisaharid-K
PSP	polisaharid-P
R _f	retencijski faktor
TFA	trifluoroacetna kislina
TLC	tankoplastna tekočinska kromatografija
TNF- α	dejavnik tumorske nekroze- α
V ₀	prosti volumen kolone
V _e	elucijski volumen
V _t	celotni volumen kolone

1 UVOD

Goba oziroma plodišče predstavlja nadzemni in hkrati reprodukcijski del višje gline, ki v okolje sprosti spore z namenom tvorbe novih organizmov. Prenos proizvedenih spor z vodo in vetrom ter njihova ogromna količina omogočajo učinkovito razširjanje na zelo velike razdalje. V naravi je recikliranje ena izmed njihovih glavnih nalog. Za svoje lastno preživetje ter za pomoč rastlinam pri pridobivanju potrebnih hrani razkrojijo organski material do osnovnih, za rast potrebnih elementov. Brez njih ne bi bilo razkrajanja in svet bi bil preplavljen z mrtvimi rastlinami in živalmi.

Na Zemlji se nahaja okoli 1.500.000 različnih vrst gliv, od teh je po predvidevanjih manj kot 10 % višjih gliv, od katerih je do sedaj poznanih le desetina (Hawksworth, 1991). Ta dejstva nas opozarjajo, da v glivah obstaja potencial koristnosti za človeštvo in ne nazadnje tudi za bodoče raziskovalno delo.

Opisi številnih zdravilnih gob v najstarejših kitajskih medicinskih zapisih *Materia medica* dokazujojo, da sega njihova uporaba v obdobje več kot 5000 let p.n.š. Na Kitajskem je njihova uporaba del vsakdana in tako za vedno vpisana v njihovo tradicionalno medicino, katere elemente počasi asimiliramo tudi na Zahodu. Njeno razumevanje temelji na pojmovanju organizma kot celote, kot telesa in duše, ki sta med seboj neizbežno povezana. Zahodna medicina se osredotoča na simptome in preko njih določi bolezen, medtem ko kitajska medicina vidi simptom kot del neravnovesja v delovanju organizma. Oba modela – sicer z delno različnim pojmovanjem – vključujeta v svoj obseg funkcionalna živila. Neustrezne prehranjevalne navade predstavljajo v razvitem svetu nevarnost za razvoj srčno-žilnih bolezni, sladkorne bolezni tipa II, ateroskleroze, debelosti in verjetno tudi nekaterih vrst raka. Z zavedanjem povezave med prehrano in boleznijo se vse bolj uveljavlja pojem funkcionalne prehrane. Tovrstna živila morajo vsebovati komponento, ki pozitivno vpliva na eno ali več funkcij organizma. Prav sem lahko trenutno uvrstimo pripravke iz medicinsko pomembnih višjih gliv.

V diplomskem delu smo raziskovali vodotopne polisaharide, ki smo jih izolirali iz submerznih kultur micelija petih različnih višjih gliv. Vse te glive so že bile klasificirane kot medicinske, njihovi ekstrakti pa so na voljo kot prehranska dopolnila, katerih aktivne učinkovine kažejo imunomodulatorne aktivnosti in predstavljajo sekundarne metabolite. Vemo, da le-ti niso nujno potrebni za rast in razvoj organizmov, predstavljajo pa nekakšno seleksijsko prednost pri preživetju. Nekateri znanstveniki menijo, da je sposobnost razkrajanja organskega materiala povezana z njihovimi zdravilnimi učinki na ljudi. Živijo lahko praktično v vseh okoljih, kjer se bolj kot katerikoli organizmi srečujejo z različnimi patogeni – da preživijo, so morale razviti ustrezno obrambo in prav to naj bi bil razlog za njihovo uspešno imunomodulatorno aktivnost v človeškem organizmu (Halpern, 2007: 4).

Živimo v času, ko se vse bolj pojavlja zavest o zdravem načinu prehranjevanja. Vračamo se v preteklost in po zgledu naših prednikov iščemo tisto prvinsko povezavo med tem, kaj vstopa v naš organizem in kako je prišlo do mize, za katero sedimo. Na drugi strani se

srečujemo s posledicami dolgoletnega življenja brez zavesti o škodljivosti svojega početja, odkrivamo vedno nove bolezni, za katere je edina možna razlaga življenje v nevarnem okolju. Tako se svet vrti v svojem začaranem krogu in v mrzličnem iskanju rešitve znova naleti na medicinske glice. Ker rastejo iz zemlje, samega srca narave, nas približajo preteklosti in dajejo upanje za prihodnost. Moderna znanost se jim oddolžuje za čas, ko je niso pretirano zanimale, in z neslutenimi razsežnostmi odkriva vedno nove in nove zanimive vrste in učinkovine.

Do danes je aktivnost izoliranih polisaharidov iz medicinskih glice kot potencialnih imunomodulatornih učinkovin razmeroma dobro raziskana, medtem ko določanje njihove strukture in mehanizem delovanja še vedno zaostajata in predstavlja omejitev za študij njihove potencialne klinične uporabe in hkrati perspektivo za raziskovalno delo. Glavni izziv predstavlja določitev tridimenzionalne strukture učinkovin ter njihovo povezavo s pripadajočo funkcijo. Ob tem se je treba zavedati, da nobena učinkovina ne more pozdraviti vseh bolezni oz. omogočiti popolne imunosti. Kar lahko naredijo glice, je pomoč že obstoječim funkcijam organizma tako v preventivnem smislu kot v smislu zdravljenja že prisotnega obolenja. Strinjam se, da delujejo. Osrednji niti raziskav v laboratorijih kjerkoli po svetu pa sta vprašanji, kako in zakaj.

V diplomskem delu smo iz tekočih kultur micelija petih različnih glice izolirali vodotopne polisaharide, tako znotrajcelične kot zunajcelične. Polimerom smo določili sestavo monosaharidnih enot in približni rang velikosti molekul. V okviru raziskave bo njihova nadaljnja uporaba preverjanje imunomodulatorne aktivnosti na različnih celičnih linijah.

2 PREGLED OBJAV

2.1 ZGODOVINA IN UPORABA MEDICINSKO POMEMBNIH VIŠJIH GLIV

Za antične Rimljane so predstavljale »hrano bogov«, Egipčani so jih imenovali »darilo boga Osirisa«, medtem ko so na Kitajskem predstavljale »eliksir življenja« - uporaba gob, tako v prehranjevalne kot v medicinske namene, ima bogato zgodovino. V teknu zgodovine so ljudstva počasi razvila praktično znanje o tem, katere vrste so strupene in katere užitne. Veliko kultur, še posebej na območju Orienta, je ugotovilo, da imajo nekatere prav posebne zdravilne učinke (Hobbs, 1995).

Verjetno najbolj zanimiv pogled antične uporabe je povezan s psihoaktivnimi, halucinogenimi lastnostmi nekaterih takrat poznanih gob, ki so bile uporabljene v primitivnih oblikah verovanja. V Srednji Ameriki so našli kamnite skulpture v obliki gobe, ki segajo v obdobje Majevske civilizacije okoli 3000 let p.n.š. (Wasson, 1978). Najstarejši dokaz uporabe gob pa je jamska poslikava v Alžiriji iz obdobja okoli 5000 let p.n.š. (slika 1). Plesalec, verjetno gre za šamana, ima v obeh rokah več ponovljivih simbolov, najverjetneje halucinogenih gob (Samorini, 2001).



Slika 1: Poslikava iz jame Tassili, Alžirija (Smith in sod., 2002)

Ne dolgo tega so v italijanskih Alpah našli »*Ledenega moža z imenom Ötzi*«, za katerega verjamejo, da je umrl pred okoli 5.300 leti. Med svojimi potrebščinami je imel tudi plodišči gliv *Piptoporus betulinus* in *Fomes fomentarius* – glivi z imunostimulatornimi lastnostmi, ki med drugim pomagata pri zdravljenju vnetja (Hobbs, 1995; Stamets, 2000a).

Danes poznamo najmanj 270 vrst gliv, za katere so poznane različne terapevtske lastnosti (Ying in sod., 1987). Njihova široka uporaba je nedvomno posledica sposobnosti kontroliranega gojenja na različnih substratih in posledično večje dostopnosti. Čeprav so največ pozornosti pritegnile imunostimulatorne in protirakave aktivnosti, pa imajo te glive tudi potencialno pomembne lastnosti antioksidantov, nižajo holesterol in krvni pritisk, ščitijo jetra, delujejo protivnetno, imajo protivirusne in protimikrobe lastnosti ter pomagajo pri zdravljenju sladkorne bolezni tipa II.

2.1.1 Svetlikava pološčenka ali *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst.

Ganoderma lucidum in njene sorodne vrste imajo najdaljšo zgodovino uporabe za medicinske namene (Zhao in Zhang, 1994). Na Japonskem jo imenujejo *Reishi* ali *Mannetake* (»10 tisoč letna goba«), na Kitajskem in v Koreji pa ima različna imena: *Ling Chu*, *Ling Chih* in *Ling Zhi* (»goba nesmrtnosti«). V državah Orienta jo pogosto uporablajo kot talisman za zaščito oseb ali doma proti demonom. Raste na mnogih področjih sveta, na Japonskem predvsem na starih slivovih drevesih.

Plodišče in micelij vsebujeta steroide, laktone, alkaloide, polisaharide in triterpene. Farmakološko so najpomembnejši vodotopni polisaharidi s protitumorskimi in imunostimulatornimi učinki. Identificirali so več kot 100 v etanolu topnih različnih triterpenov, kot so: ganoderična, ganoderenična, lucidenična in ganolucidična kislina. Ti triterpeni sodelujejo v procesih adaptacije ter imajo antihipersenzitivne in antialergene lastnosti (Smith in sod., 2002: 27).

Naštete medicinske lastnosti so odvisne od stopnje rasti in okolja višje glive (Jong in Birmingham, 1992). Tradicionalno je bila široko v uporabi pri zdravljenju hepatopatijs, kroničnega hepatitis, hipertenzije, artritis, nespečnosti, bronhitisa, astme in čira na želodcu. Znanstvene raziskave so potrdile, da iz gliv ekstrahirane substance nižajo krvni tlak, vrednosti holesterola in glukoze v krvi ter inhibirajo zlepljanje trombocitov.

Glavni imunomodulatorni učinki izoliranih aktivnih substanc (polisaharidi, proteini in triterpeni) so mitogenost in aktivacija efektorskih celic imunskega sistema, tj. T-celic, makrofagov in celic naravnih ubijalk. Ta proces vodi v produkcijo citokinov – interlevkinov, TNF- α in interferonov, kar so povezali s protirakavim in protivnetnim delovanjem (Wang in sod., 1997). Čeprav tradicionalna zdravljenja s to medicinsko glivo še niso bila sprejeta z modernimi znanstvenimi standardi, so bila podrobno raziskana na Dalnjem vzhodu in v Združenih državah Amerike (Chang, 1995, 1999).

Plodišče glive ne spada k užitnim, saj je precej grenkega okusa in neprebavljive strukture, vendar ga lahko uživamo kot ekstrakt z vročo vodo. Na voljo pa so tudi ekstrakti polisaharidov ali spor v obliki tablet, kapsul ter ostali tekoči produkti (Stamets, 2000b).

Najpomembnejše farmakološke aktivnosti ekstraktov *G. lucidum*, nekatere znanstveno potrjene *in vivo* in *in vitro* (Hobbs, 1995):

- analgetik
- antialergene aktivnosti
- preventiva proti bronhitisu (tudi regeneracija bronhialnega epitelija)
- protivnetne aktivnosti
- antibakterijsko delovanje proti *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.* in *Bacillus pneumoniae* (verjetno zaradi povečane aktivnosti imunskega sistema)
- antioksidant (odstranitev hidroksilnih prostih radikalov)
- protitumorska aktivnost
- protivirusna aktivnost (povečanje produkcije interferonov)
- manjšanje krvnega pritiska
- povečanje proliferacije celic kostnega mozga
- kardiotoničnost, manjšanje koncentracije holesterola v serumu (brez vpliva na trigliceride), povečanje miokardialnega metabolizma ter izboljšanje heterodinamike koronarnih arterij
- vpliv na avtonomni živčni sistem (manjša afekte kofeina), sproščanje mišic
- povečanje aktivnosti celic naravnih ubijalk
- antitusik
- splošna ojačitev imunskega sistema
- anti-HIV aktivnost (*in vivo* in *in vitro*)
- izboljšanje funkcije adrenokortikoidov
- povečana produkcija interlevkina-1 in interlevkina-2 *in vitro*

Najpomembnejše aktivne substance so torej β -D-glukani in hetero- β -D-glukani z antitumorskimi in imunostimulatornimi aktivnostmi, Ling Zhi-8 protein (antialergene, imunomodulatorne aktivnosti) ter ganodermične kisline oz. triterpeni (antialergene aktivnosti, manjšanje holesterola in krvnega pritiska).

2.1.2 Pisana ploskocevka ali *Trametes versicolor* (L.) Lloyd

Ne gre za užitno gobo, vendar se v tradicionalni kitajski medicini izvlečki, pridobljeni z ekstrakcijo z vročo vodo, že zelo dolgo uporabljajo za zdravljenje najrazličnejših obolenj (Ying in sod., 1987). Novejše raziskave so v njenih ekstraktih odkrile dve zelo pomembni sestavini: PSK oz. krestin (vodotopni kompleks proteina in polisaharida, polisaharid-K) in PSP (na peptid vezan polisaharid, polisaharid-P). Oba β -glukanska proteina sta bila izolirana iz micelijskih kultur te zanimive glive in tako predstavljata intracelularna proteoglikana (Tsukagoshi, 1984).

PSK vsebuje približno 62-odstotni delež β -D-glukanskih enot, 38 % pa predstavlja delež proteina. Glukanski delež je sestavljen iz glavne verige z β -1,4 povezanimi glukoznimi enotami in stranske β -1,3 ter β -1,6 verige, preko katerih je polisaharidni del z glikozidnimi vezmi vezan na protein. Polipeptidni del je bogat z aminokislinskim aspartat in glutamat. Molekulska masa se giblje v intervalu 94-100 kDa (Sakagami in Aoki, 1991). Za PSK je

bilo dokazano, da deluje direktno na tumorske celice (citostatično in citotoksično) in indirektno z večanjem celične imunosti. Prav tako kaže protivirusno aktivnost preko stimulacije produkциje interferonov (Ikuzawa in Matsunaga, 1988; Kidd, 2000).

PSP se razlikuje od PSK po sestavi polisaharidnega dela, in sicer PSP ne vsebuje fukoze ter za razliko od PSK vsebuje tudi arabinozo in ramnozo. Njegove polisaharidne verige vsebujejo večinoma β -1,4, β -1,2 in β -1,3 vezi skupaj z majhnimi količinami β -1,4, β -1,6 in β -1,3 povezane galaktoze, β -1,3 in β -1,6 manoze ter β -1,3 in β -1,4 arabinoze. Molekulska masa je približno 100 kDa (Jong in Yang, 1999). Je močan imunostimulant ter deluje proti raku. Z njim je bilo izvedenih veliko kliničnih študij za različne vrste te bolezni. V večini primerov so proučevali zdravljenje skupaj s tradicionalno kemoterapijo in radioterapijo. Rezultati so pokazali opazno podaljšanje preživelosti pacientov (Yang in sod., 1993).

Na Japonskem je 1987. leta uporaba Krestina predstavljala 25 % vseh izdatkov za protirakave učinkovine (Fukushima, 1989), medtem ko sta Evropa in ZDA šele začeli z aplikacijami.

2.1.3 Navadna cepilstka ali *Schizophyllum commune* Fr.

Schizophyllum commune je majhna bela goba, brez beta, ki raste na odmrlih drevesih. Je zelo pogosta, najdemo jo po celem svetu (Hobbs, 1995). Farmakološko je zelo pomembna, saj producira β -glukanski polisaharid schizophyllan s precejšnimi antitumorskimi in imunostimulatornimi lastnostmi (Ooi in Liu, 2000). Gre za vodotopni ekstracelularni homopolisaharid z linearno verigo β -1,3 in β -1,6-D-glukopiranoznih skupin (Rau in sod., 1992). V zadnjih letih je še posebej zanimiv za farmacevtsko industrijo zaradi svojih imunomodulatornih in protivnetnih aktivnosti (Rau in Brand, 1994). Molekulska masa polimera se giblje v rangu od $6 \cdot 10^6$ do $12 \cdot 10^6$ g/mol (Rau in sod., 1990).

2.1.4 Žvepleni lepoluknjičar ali *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill

Užitna prostotrošnica *Laetiporus sulphureus* raste na drevesnih deblih. Zelo lahko je razpoznavna zaradi svoje značilne oranžne barve (Imazeki in Hongo, 1998). Vsebuje veliko polisaharidov, triterpenov, laetiporične kisline ter ostalih snovi (Weber in sod., 2004). V preteklih desetletjih so iz nje izolirali različne polisaharide ter njihove komplekse s proteini, ki so kazali z medicinskega stališča zanimive aktivnosti. Ta višja gliva še ni dobila veliko pozornosti pri raziskovalnih skupinah, ki proučujejo tako gojenje kot učinke izvlečkov na celičnih linijah, saj je do sedaj po svetu le malo ekip uporabilo submerzno kultivacijo micelija in na ta način pridobilo ekstracelularne izvlečke (Hwang in sod., 2008). Najpomembnejše imunomodulatorne učinkovine iz te glive so polisaharidi, pigmenti, hlapne komponente, proteoglikani in ostale snovi, kot npr. triterpeni. Njeno uporabnost v industrijske namene pa predstavlja tudi encimi – proizvaja namreč celulaze in hemicelulaze, ki so pomembno orodje pri bioremediaciji lignoceluloznih substratov (Radic in sod., 2009).

2.1.5 Bukova kresilka ali *Fomes fomentarius* (L.) J. J. Kickx

Prostotrosnica *Fomes fomentarius* je zelo razširjena lesna gliva. Na Kitajskem je pojmovana kot »Mudi«. V tradicionalni medicini se že več stoletij uporablja za zdravljenje različnih bolezni, med drugim ustnih razjed, težav s prebavili, jetrne ciroze, različnih vnetij in rakavih obolenj. Novejše študije so pokazale njen antioksidativni, protivnetni, protidiabetični in antitumorski vpliv (Ito in sod., 1976; Lee, 2005; Park in sod., 2004). Zaradi teh lastnosti je postala popularna in ena najbolj cenjenih medicinskih gliv na Kitajskem.

2.2 IMUNOMODULATORNE UČINKOVINE IZ MEDICINSKO POMEMBNIH VIŠJIH GLIV IN NJIHOVA STRUKTURA

Šele zadnjih 30 let je kemijska tehnologija začela izvajati izolacijo relevantnih učinkovin iz medicinskih gob in jih začela uporabljati v kontroliranih eksperimentih (Mizuno, 1999). Glavne protitumorske učinkovine, do danes izolirane iz medicinskih gob, so vodotopni β -D-glukani, vodotopni β -D-glikani s heterosaharidnimi verigami ksiloze, manoze, galaktoze ali uronskih kislin ter β -D-glukan-proteinski kompleksi oz. proteoglikani. Ugotovljeno je bilo, da je stopnja protirakave aktivnosti povezana z molekulsko maso, stopnje razvejanosti in topnosti v vodi (Bohn in BeMillar, 1995). V raziskavah Gao in sod. (1996) so ugotovili, da pri heteroglikanih ni povezave z molekulsko maso in njihovo aktivnostjo ter da imajo proteoglikani večjo imunostimulatorno aktivnost kot ustreznii glikani (Reshetnikov in sod., 2001).

Polisaharidi so strukturno zelo raznolika skupina bioloških makromolekul. Sestavljeni so iz ponovljivih strukturnih enot, ki so polimeri monosaharidnih ostankov, združenih med seboj z glikozidnimi vezmi. V tej smeri se razlikujejo od proteinov in nukleinskih kislin - ker imajo polisaharidi večji potencial strukturne variabilnosti, predstavljajo večjo kapaciteto za vsebnost biološke informacije. Aminokisline v proteinih in nukleotidi v nukleinskih kislinah se povezujejo le v eni smeri, medtem ko se lahko polisaharidne enote v oligo- in polisaharidih združujejo med seboj v več smereh, tako da tvorijo veliko različnih vrst razvejanih ali linearnih struktur (Sharon in Lis, 1993). Posledica te variabilnosti je fleksibilnost, ki je potrebna za natančne regulatorne mehanizme različnih celičnih interakcij v višjih organizmih (Smith in sod., 2002). Čeprav je bila večina študij izvedenih z uporabo β -D-glukanov posameznih vrst, se predpostavlja, da se doseže večja stimulacija imunskega sistema z uporabo mešanic polisaharidov iz različnih medicinskih gliv.

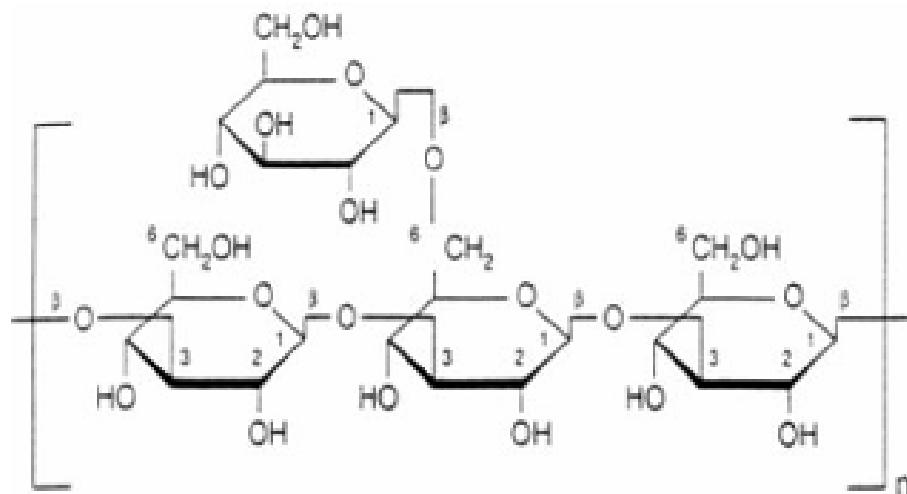
2.2.1 β -D-glukani

β -D-glukani so sestavljeni izključno iz glukoznih enot (slika 2). Njihova ponovljiva struktura je združena v linearne verige z β -glikozidnimi vezmi. Te lahko segajo od prvega C-atoma enega saharida do tretjega C-atoma drugega saharida (β -1,3), od prvega C-atoma do četrtega C-atoma (β -1,4) ali od prvega C-atoma do šestega (β -1,6). Ponavadi je prisotna glavna veriga, ki je β -1,3 ali β -1,4, oz. mešana veriga β -1,3 in β -1,4 z β -1,6 mesti.

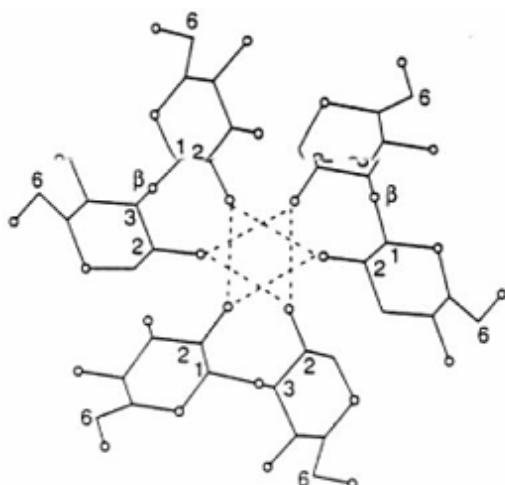
Lentinan iz medicinske glive *Lentinus edodes* (šitake) ter schizophyllan iz *Schizophyllum commune* sta dva najbolj raziskana komercialno uporabljena β -D-glukana, ki kažeta močne imunomodulatorne in protirakave lastnosti. Sestavljena sta iz glavne verige, ki se sestoji iz D-glukopiranozilnih enot, med seboj povezanih z β -1,3 vezmi, na katero so z β -1,6 vezmi vezane stranske verige β -D-glukopiranozilnih enot. Povprečna molekulska masa teh dveh β -D-glukanov se giblje med 450.000 ter 500.000 (Sasaki in Takasuka, 1976). Do odstopanja v velikosti molekul pride zaradi različne razvejanosti in dolžine stranskih verig – tudi med različnimi serijami prihaja do precejšnje variacije v molekulski masi. Ugotovljeno je bilo, da je struktura molekul β -D-glukanov individualno vrstno specifična ter da imajo β -D-glukani z bolj organiziranimi strukturami (trojne vijačnice) in višjo molekulsko maso večjo imunomodulatorno aktivnost (Maeda in sod., 1988). Trojne vijačnice pa lahko tvorijo le β -D-glukani z večjo molekulsko maso (Saito in sod., 1991).

Stopnja protirakave aktivnosti je povezana z njihovo molekulsko maso, razvejanostjo in stopnjo v vodi. Študija steričnih struktur z NMR analizo in difrakcijo z X-žarki je pokazala, da je struktura aktivnih β -D-glukanov troveržna desnosučna vijačnica (slika 3), kar naj bi bilo glavnega pomena pri njihovi imunostimulatorni aktivnosti (Bluhm in Sarco, 1977). To dejstvo so dokazali z denaturacijo lentinana (polisaharid iz šitak) z uporabo dimetil sulfoksida, sečnine ali natrijevega hidroksida, kar je imelo za posledico izgubo terciarne strukture. V teh primerih se primarna struktura sicer ohrani, vendar se imunostimulatorna aktivnost znatno zmanjša z naraščajočo stopnjo denaturacije (Maeda in sod., 1988). Enake rezultate so dobili z uporabo schizophyllana (Yanaki in sod., 1986).

Strukturne lastnosti imajo torej pri aktivnosti pomembno vlogo. β -glukani, ki vsebujejo pretežno β -1,6 vezi, kažejo manjšo aktivnost. To lahko pripišemo dejству, da lahko tvorijo preveč različnih konformacij (Zhang in sod., 2007). Koncept povezave aktivnosti s strukturo predpostavlja tudi, da je poleg strukture glikanskega ogrodja izrednega pomena prisotnost hidrofilnih skupin, lociranih na zunanjji površini vijačnice. Njihovo število določa stopnjo vodotopnosti posameznih molekul (Bohn in BeMillar, 1995).



Slika 2: Diagram strukture β -D-glukanov (Kidd, 2000)



Slika 3: Model molekule desnosučne trojne vijačnice β -D-glukana z imunomodulatornimi aktivnostmi
(Mizuno, 1999)

2.2.2 Ostale učinkovine

Medtem ko so vodotopni β -D-glukani široko zastopani pri različnih vrstah medicinskih gliv, pa veliko vrst vsebuje tudi β -D-glikane s heteropolisaharidnimi enotami ksiloze, manoze, galaktoze, arabinoze, fukoze, riboze in glukuronske kislino, ki se lahko pojavljajo v različnih kombinacijah (Zhang in sod., 2007). Lahko so prisotni tudi proteoglikani. Gre za polipeptidne verige oziroma majhne proteine, na katere so stabilno vezane polisaharidne verige β -D-glukanov (Boldizsar in sod., 1998).

Najbolj znan primer, ki spada tako v družino heteropolisaharidov kot proteoglikanov, sta na protein vezana polisaharida PSK (krestin) in PSP, izolirana iz medicinske glive *Trametes versicolor* (Tzianabos, 2000).

Iz plodišča *Ganoderma lucidum* je bilo izoliranih preko 100 različnih triterpenov s citotoksičnim delovanjem, kar so dokazali z aplikacijo na HL-60 celičnih linijah ter mnogih drugih. Sem uvrščamo ganoderično, ganoderenično, lucidenično kislino ter več ganederalov (Wasser in Weis, 1999). Danes je vse več poudarka na raziskavah molekularnega mehanizma, ki sproži nastanek raka. V tem pogledu se iščejo potencialne tarče, na katere bi lahko delovali z uporabo novih protitumorskih zdravil. Takšen primer je encim farnezil protein transferaza, za katerega je znano, da sodeluje pri transformaciji zdravih celic v rakave. Ugotovili so, da ganoderični kislini A in B delujeta kot njegova inhibitorja, kar potrjuje njuno antitumorsko delovanje (Lee in sod., 1998).

V literaturi je moč zaslediti tudi močno protivirusno delovanje triterpenov. Genoderiol, ganodermanontriol in ganoderična kislina so učinkoviti proti virusu HIV-1. Poročajo, da je minimalna koncentracija ganoderiola F in ganodermanontriola za popolno inhibicijo delovanja HIV-1 na MT-4 celice 7,8 mg/mL. Ganoderična kislina inhibira HIV-1 proetazo

pri najnižji inhibitorni koncentraciji 0,17 mM. Ganoderadiol, lucidadiol in aplanoksična kislina imajo *in vitro* protivirusno delovanje proti virusu gripe A, ganoderadiol pa je aktivен tudi proti virusu herpes simplex tipa 1 (Lindequist in sod., 2005). Nekateri triterpeni iz *G. lucidum* (ganoderična kislina C in njeni derivati) inhibirajo tudi biosintezo holesterola (Komoda in sod., 1989), ganoderični kislin F in S pa ščitita pred aterosklerozo (Morigiwa in sod., 1986; Su in sod., 1999).

Dokazano imunomodulatorno aktivnost imajo tudi proteini, izolirani iz medicinsko pomembnih višjih gliv. Med njimi naj omenimo protein Ling Zhi-8, izoliran iz glive *Ganoderma lucidum*. Ugotovljeno je bilo, da je njegova struktura podobna strukturi variabilne regije težkih verig imunoglobulinov, tako po aminokislinskem zaporedju kot po napovedani sekundarni strukturi (Tanaka in sod., 1989), kar je seveda povezano z njegovo imunomodulatorno aktivnostjo.

2.3 IMUNOMODULATORNE AKTIVNOSTI GLIVNIH GLIKANOV IN NJIHOVIH KOMPLEKSOV S PROTEINI

V današnjem svetu vse več ljudi posega po alternativnih možnostih zdravljenja. Le-te vključujejo tudi uporabo izvlečkov iz medicinsko pomembnih gliv. Tovrstno zdravljenje pojmujemo kot imunoterapija, kar pomeni, da izboljšamo imunsko obrambo organizma. Vemo, da rak deluje v obratni smeri. Prav tako pa imunsko obrambo zmanjšujejo tudi klasične oblike zdravljenja. Pripravki imunoterapije so naravno prisotne substance oz. »imunocevtiki«, ki so v obliki prehranskih dopolnil na voljo tudi iz medicinsko pomembnih višjih gliv. Te sestavine so iskane za terapijo raka, raznih imunskeih bolezni ter splošno za uporabo sočasno z ostalimi oblikami zdravljenja, kot je kemoterapija, kombinacija zdravljenja z antibiotiki, dodatki vakcinam.

Na Dalnjem vzhodu je zgodovinska raba medicinskih gob postala del tradicije. Moderna znanost šele zadnjih 30 let raziskuje izolirane sestavine posameznih gliv in njihove aktivnosti na človeški imunski sistem ter inhibicijo rasti tumorskih celic. Največ obetov kažejo ravno β-glukanski polisaharidi. Čeprav polisaharidi na splošno veljajo kot klasični T-celični antigeni in ne sprožajo celično usmerjenega imunskega odziva (obrambni mehanizem, ki je usmerjen z antigen-specifičnimi T-celicami in različnimi nespecifičnimi celicami imunskega sistema), pa nekateri polimeri kažejo tudi potencialno imunomodulatorno aktivnost. Takšne molekule so zmožne interakcij z imunskim sistemom v smislu povečevanja ali zmanjševanja različnih aktivnosti v okviru imunskega odgovora. Na tovrstno aktivnost ima vpliv doza, način aplikacije, časovna izpostavljenost in frekvenca uporabe (Tzianabos, 2000).

Imunski sistem predstavlja pomembno vlogo v obrambi organizma proti različnim infekcijam in tvorbi tumorjev. Pri obrambi gre za povezano delovanje med prirojenim in pridobljenim imunskim odgovorom. Prirojena imunost z makrofagi, nevtrofilci, celicami naravnimi ubijalkami in dendritičnimi celicami je regulirana s citokini in aktivacijo vnetnih odgovorov. Te celice omogočajo prepoznavo in uničenje nenormalnih celic. Stimulirani

makrofagi in celice naravne ubijalke producirajo citokine, kot so interferoni in interlevkini, ter postanejo usmerjeni k uničenju rakavih celic. Vse to sodi k prvi obrambi gostiteljevega imunskega odgovora.

Pridobljeni imunski sistem zagotavlja humorálni in celično posredovani imunski odgovor. Pri humorálmem se tvorijo specifična protitelesa, medtem ko celično posredovana imunost predstavlja protivnetne odgovore in uničenje infeciranih ali nenormalnih celic. Pri prepoznavi in odstranitvi tumorskih celic je uspešno le popolno delovanje imunskega sistema. K temu lahko pripomorejo izolirane učinkovine iz medicinskih gliv, ki stimulirajo tako prirojeno kot pridobljeno imunost in tako predstavljajo potencialno uspešno uporabo pri zdravljenju različnih vrst raka (Smith in sod., 2002).

Tumorji se lahko razvijejo, kadar se spremenjene celice izognejo imunkemu odgovoru gostitelja (Ooi in Liu, 2000). Povečana prisotnost spontanih tumorjev pri posameznikih z imunosupresiranim imunskim sistemom nakazuje, da predstavlja dobra imunost uspešno obrambo proti rakavim obolenjem (Jong in sod., 1983).

Sposobnost bioaktivnih polisaharidov in njihovih proteinskih kompleksov, da modulirajo imunski sistem, je posledica njihove strukturne raznolikosti in variabilnosti. Za razliko od proteinov in nukleinskih kislin, vsebujejo polisaharidi ponovljive strukturne enote, ki so polimeri monosaharidnih ostankov, združenih med seboj z glikozidnimi vezmi. Njihova struktorna variabilnost jim omogoča, da vsebujejo najvišjo kapaciteto za prenos bioloških informacij. Za primer naj navedem, da je s štirimi različnimi monosaharidi možno sestaviti 35.560 različnih tetrasaharidov. Z uporabo štirih različnih aminokislin je mogoče sestaviti le 24 različnih kompleksov, sestavljenih iz štirih aminokislinskih enot (Ooi in Liu, 2000). Ta ogromna variabilnost v polisaharidnih strukturah omogoča potrebno fleksibilnost za natančne regulatorne mehanizme različnih medceličnih interakcij v višjih organizmih.

2.3.1 *Ganoderma lucidum* in njeni imunomodulatorni učinki

Iz nje je bilo izoliranih veliko potencialnih imunomodulatornih učinkovin, med njimi polisaharidov (večinoma β -D-glukani), proteinov (Ling Zhi-8) in triterpenov (Jong in Birmingham, 1992). Glavna učinka teh substanc sta mitogenost in aktivacija efektorskih celic imunskega sistema (makrofagov, celic naravnih ubijalk in T celic). Stimulacija efektorskih celic vodi v produkcijo citokinov, kot so interferoni, interlevkini ter dejavnik tumorske nekroze- α (Gao in Zhou, 2001).

Raziskave so pokazale, da β -D-glukani sprožijo biološki odgovor z vezavo na membranski receptor komplementa 3 (CR3 ali CD11b/CD18), ki se nahaja na površini efektorskih celic imunskega sistema, kot so makrofagi. Kompleks med ligandom in receptorjem sproži različne znotrajcelične aktivnosti imunskega sistema in vodi v produkcijo citokinov in končno v apoptozo tumorskih celic (Battle in sod., 1998).

Ekstrakti polisaharidov in Ling Zhi-8 proteina delujejo mitogeno na človeške mononuklearne celice periferne krvi (Kino in sod., 1991). Tako *in vitro* kot *in vivo* študije na miših so pokazale, da vodotopni ekstrakti stimulirajo produkcijo interlevkina-2 (IL-2) (Zhang in sod., 1993) in preko povečanja produkcije citokinov IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ delujejo kot aktivatorji T-celic (Wang in sod., 1997). Obstajajo študije, ki kažejo, da ekstrakti *G. lucidum* vplivajo na celično posredovano oz. B-celično imunost (Kino in sod., 1991).

2.3.2 Imunomodulatorni učinki polisaharidov PSP in PSK iz *Trametes versicolor*

PSK (Krestin) in PSP sta proteinsko vezana polisaharida, izolirana iz medicinske glive *Trametes versicolor*. Sta kemijsko zelo podobni molekuli z molsko maso okoli 100 kDa, razlikujeta pa se po monosaharidni sestavi. Dokazali so, da PSP poveča funkcijo fagocitov pri zdravih poskusnih živalih ter zviša izločanje IL-2, IL-6 ter IFN- γ . V humani periferni krvi PSP v različnih koncentracijah promovira proliferacijo T-limfocitov (Yang in sod., 1993). Prav tako poveča aktivacijo T-celic pomagalk (CD4+) (Li, 1999). Kot zdravilo ima največje potenciale v kombinaciji zdravljenja raka s kemoterapijo, saj izboljša stanje imunskega sistema pacientov.

Podobne lastnosti izraža tudi PSK. Poročali so, da PSK poveča gensko ekspresijo določenih citokinov, med njimi TNF- α , IL-1, IL-8 ter IL-6, tako *in vivo* kot *in vitro* (Kato in sod., 1995; Liu in sod., 1996). Te citokine producirajo monociti, makrofagi ter ostali tipi imunskih celic in delujejo kot direktni stimulatorji citotoksičnih T-celic proti tumorskim, povečajo proizvodnjo protiteles B-limfocitov in indukcijo receptorja za IL-2 na T-limfocitih. Nekatere študije kažejo, da je aktivnost PSK indukcija T-celic, ki prepozna PSK kot antigen in preko antigen specifičnega odgovora uničijo tumorske celice (Okazaki in sod., 1995).

Tako PSP kot PSK sta v različnih fazah kliničnih študij na Kitajskem. Klinične študije se izvajajo na raku želodca, debelega črevesa, požiralnika, pljuč, raku dojke in različnih levkemij. Običajno gre za oralno aplikacijo 3 g ekstrakta na dan. Iz rezultatov več kliničnih študij lahko sklepamo, da se napovedana 5-letna življenjska doba obolelih pacientov z uporabo PSK v povprečju podvoji, lahko pa se podaljša tudi na 15 let (Kidd, 2000).

2.3.3 Imunomodulatorne lastnosti schizophyllana iz *Schizophyllum commune*

Antitumorska aktivnost schizophyllana je usmerjena preko T-celičnega imunskega odgovora in zahteva za svojo biološko aktivnost funkcionalno T-celično komponento (Kraus in Franz, 1991). Tako lahko poveča produkcijo T-celic pomagalk, makrofagov ali stimulira produkcijo proteinov akutne faze, kar vodi v proliferacijo makrofagov, limfocitov in aktivacijo sistema komplementa (Bohn in BeMiller, 1995).

Indukcijo genskega izražanja citokinov s schizophyllanom je v *in vivo* in *in vitro* sistemih proučevalo več avtorjev. *In vivo* eksperiment z mišjimi celicami sarkoma 180, pri katerem so z ciklosporinom A inducirali supresijo T-celic, je pokazal, da schizophylan ne kaže nikakršne antitumorske aktivnosti. Na osnovi teh rezultatov so sklepali, da je za njegovo imunomodulatorno aktivnost nujno potrebna imunokompetentna T-celična komponenta (Kraus in Franz, 1991). Šele takrat je zagotovljena biološka aktivnost β -1,3-D-glukanov na gostiteljev imunski sistem. Z mišjimi celicami sarkoma 180 so tudi ugotovili, da schizophylan nima imunomodulatorne aktivnosti, kadar je njegova aplikacija le pred indukcijo tumorjev. Najboljša kombinacija je bila ob sočasni uporabi pred indukcijo in po njej oz. kadar je bil polisaharid uporabljen le po indukciji tumorjev (Wasser in Weis, 1999).

Na Japonskem je bilo izvedenih in še vedno poteka kar nekaj kliničnih študij s schizophyllanom. Na osnovi njihovih izsledkov je bil ta že odobren za klinično uporabo na Japonskem, kjer ga za komercialno uporabo uspešno proizvaja več farmacevtskih podjetij.

3 MATERIALI IN METODE

Delo v laboratoriju je potekalo na Katedri za farmacevtsko biologijo, Fakultete za farmacijo Univerze v Ljubljani, v letu 2009. Izbrane medicinsko pomembne višje glive smo gojili na Katedri za patologijo in zaščito lesa, Oddelka za lesarstvo, Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

3.1 KEMIKALIJE IN APARATURE

Rezultati analiz so v veliki meri odvisni od proizvajalcev in posledično karakteristik uporabljenih snovi. Navajamo spisek uporabljenih kemikalij tako v postopkih priprave izvlečkov kot v analiznih metodah. Delo v laboratoriju je odvisno od razpoložljivih aparatur, čemur se je potrebno prilagoditi že v zasnovi eksperimenta.

3.1.1 Uporabljene kemikalije

- krompirjev dekstrozni agar, PDA (Carl Roth, Nemčija)
- glukoza, brezvodna (Fluka, Švica)
- tripton kazein-pepton (Fluka, Švica)
- KH_2PO_4 (Merck, Nemčija)
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Alkaloid AD – Skopje, Makedonija)
- tiamin (Sigma, St. Louis, ZDA)
- krompirjev ekstrakt z glukozo, PDB (Carl Roth, Nemčija)
- kvasni ekstrakt (Difco – BD Biosciences, ZDA)
- $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Riedel-deHaën, Nemčija)
- saharoza (Sigma, St. Louis, ZDA)
- etanol, 96 % (Kefo, Slovenija)
- Coomassie Plus Protein Assay Reagent Kit (Pierce Biotechnology, ZDA)
- goveji serumski albumin, BSA (Sigma, St. Louis, ZDA)
- H_2SO_4 , konc. (Kemika, Hrvaška)
- fenol (Merck, Nemčija)
- etil acetat (Fluka, Švica)
- n-propanol (J.T. Baker, ZDA)
- ocetna kislina, 100 % (Merck, Švica)
- trifluorocetna kislina, TFA (Carlo Erba Reagenti, Italija)
- parafinsko olje (Rokib, Slovenija)
- metanol (Scharlau Chemie, Španija)
- natrijev klorid, NaCl (Riedel-deHaën, Nemčija)
- $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Merck, Nemčija)
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (Kemika, Hrvaška)
- dekstran 2.000.000 Da (Sigma, St. Louis, ZDA)
- dekstran 500.000 Da (Fluka, Švica)
- dekstran 100.000 Da (Fluka, Švica)
- D-galaktoza (Sigma, St. Louis, ZDA)

- D-manoza (Sigma, St. Louis, ZDA)
- D-fukoza (Sigma, St. Louis, ZDA)
- D-ksiloza (Sigma, St. Louis, ZDA)
- L-arabinoza (Sigma, St. Louis, ZDA)
- D-riboza (Fluka, Švica)
- L-ramnoza (Fluka, Švica).

3.1.2 Uporabljene aparature

- avtoklav (Kambič, Slovenija in CertoClav, Nemčija)
- brezprašna komora (Iskra Pio, Slovenija)
- stresalnik (Chemel, Švedska)
- pH meter (Metrohm, Švica)
- centrifuga Sorvall (Thermo Fisher Scientific, ZDA)
- vakuumski sušilnik Speed-Vac Plus (Savant, Thermo Fisher Scientific, ZDA)
- analizna tehnicka (Kern & Sohn, Nemčija)
- aplikator vzorcev za TLC, Linomat (Camag, Nemčija)
- keramični grelec kromatografskih plošč (Camag, Nemčija)
- inkubator (UniEquip, Nemčija)
- rotavapor (Büchi, Švica)
- dializno črevo ServaPor, MWCO 6.000-8.000 (Serva, Nemčija)
- spektrofotometer Tecan Genious (Tecan, Švica)
- plošče TLC Silica Gel 60 F₂₅₄ dimenzijs 10x20 cm (Merck, Nemčija).

3.2 SUBMERZNI NAČIN GOJENJA IN PRODUKCIJA POLISAHARIDOV IZ MEDICINSKIH GLIV

Prednost submerznega gojenja pred kultivacijo na trdnih gojiščih medicinsko pomembnih gliv je večja produkcija micelijske biomase ter posledično večji donos polisaharidov. Skrajša se čas proizvodnega procesa in zmanjša stopnja tveganja kontaminacij (Bae in sod., 2001; Berovic in sod., 2003; Cho in sod., 2006).

3.2.1 Organizem

Za gojenje micelija v submerznem načinu kultivacije smo kot prudukcijske organizme za pridobivanje vodotopnih polisaharidov uporabili glive iz banke gliv (BFWS) Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani, Oddelka za lesarstvo, Katedre za patologijo in zaščito lesa. Izbrali smo naslednje vrste medicinsko pomembnih višjih gliv:

- *Laetiporus sulphureus*
- *Fomes fomentarius*
- *Trametes versicolor*
- *Ganoderma lucidum*
- *Schizophyllum commune*

3.2.2 Gojišče za vzdrževanje kulture

Micelijsko kulturo, namenjeno inokulaciji tekočega substrata, smo vzdrževali na Petrijevih ploščah (slika 4). Za gojišče smo uporabili krompirjev dekstrozn agar (PDA). Pripravili smo ga tako, da smo 11,7 g dehidriranega gojišča PDA raztopili v 300 mL destilirane vode, avtoklavirali 20 minut pri 121 °C ter razdelili na petrijeve plošče. Ohlajene plošče smo inokulirali v brezprašni komori, zatesnili s parafilmskim trakom in inkubirali pri 26 °C. Za vzdrževanje njihove aktivnosti smo kulture vsakih 10 dni precepili na nova gojišča.



Slika 4: Micelij gliv *Schizophyllum commune* (levo zgoraj), *Ganoderma lucidum* (desno zgoraj), *Laetiporus sulphureus* (v sredini), *Trametes versicolor* (levo spodaj) in *Fomes fomentarius* (desno spodaj) na gojišču iz krompirjevega dekstroznega agarja (PDA)

3.2.3 Submerzna kultivacija z uporabo različnih substratov

Micelij glive, ki je rastel na trdem gojišču PDA, smo narezali z luknjačem premera 5 mm. Za inokulacijo vsake erlenmajerice, ki je vsebovala 1 L steriliziranega tekočega substrata, smo porabili dve Petrijevi plošči z narezanim micelijem. Erlenmajerice smo inkubirali 21 dni na stresalniku pri 26 °C in obratih 120 min^{-1} (slika 5). Erlenmajerice s steriliziranim inokuliranim substratom so tako predstavljale bioreaktorje brez mešal. Prav tako ni bil zagotovljen konstanten pretok zraka – dovajali smo ga enkrat tedensko z odprtjem erlenmajeric v brezprašni komori in intenzivnem premešanju substrata. Glede na izbrane vrste gliv smo za njihovo kultivacijo uporabili različne sestave tekočih substratov, ki so s pripadajočimi referencami predstavljene v preglednici 1.

Preglednica 1: Sestava medijev, uporabljenih za kultivacijo v tekočem gojišču s pripadajočimi referencami

Gliva	Sestava medija za kultivacijo	Reference
<i>Fomes fomentarius</i>	<ul style="list-style-type: none">▪ 30 g/L glukoze▪ 5 g/L peptona▪ 1 g/L KH_2PO_4▪ 0,5 g/L MgSO_4▪ 0,5 mg/L tiamina▪ začetni pH 6,0	Chen in sod. (2008)
<i>Schizophyllum commune</i>	<ul style="list-style-type: none">▪ 170 g/L saharoze▪ 2 g/L kvasnega ekstrakta▪ 1,08 g/L KH_2PO_4▪ začetni pH 5,3	Kumari in sod. (2008)
<i>Ganoderma lucidum</i>	PDB: <ul style="list-style-type: none">▪ 6,5 g/L krompirjevega ekstrakta▪ 20 g/L glukoze▪ začetni pH 5,6	-
<i>Trametes versicolor</i>	PDB: <ul style="list-style-type: none">▪ 6,5 g/L krompirjevega ekstrakta▪ 20 g/L glukoze▪ začetni pH 5,6	-
<i>Laetiporus sulphureus</i>	<ul style="list-style-type: none">▪ 40 g/L glukoze▪ 2 g/L kvasnega ekstrakta▪ 2 g/L tripton peptona▪ 2 mM $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$▪ začetni pH 2	Hwang in sod. (2008)

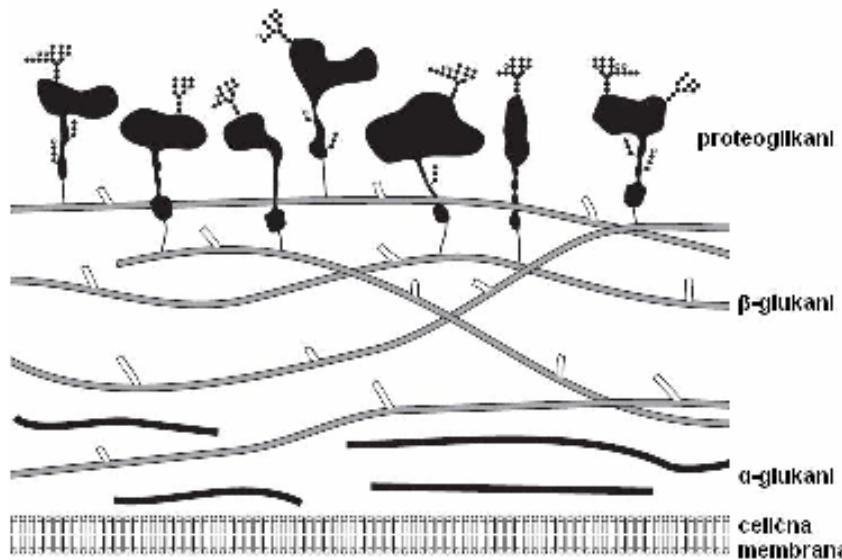


Slika 5: Kultivacija *Schizophyllum commune* v tekočem gojišču, micelij je tvoril sferične pelete

3.3 EKSTRAKCIJA IN IZOLACIJA POLISAHARIDOV IZ GOJIŠČA IN MICELIJA GLIV

Analiza sladkorjev iz tradicionalno uporabljenih medicinsko pomembnih višjih gliv ponavadi sestoji iz treh stopenj: ekstrakcija, čiščenje in karakterizacija. Za potek ekstrakcije se glede na želen namen uporablajo voda, redčene raztopine baz ali organskih topil. Za čiščenje polisaharidov je možno uporabiti multiprecipitacijo, izsoljevanje ter različne vrste kolonskih kromatografij, kot so ionsko izmenjevalna kromatografija, gelska filtracija, kapilarna elektroforeza in HPLC. Za določevanje same zgradbe polisaharidov pa se uporablja različne kromatografske metode s primernimi detektorji ter ostale tehnike za analizo struktur makromolekul (npr. MS, IR, NMR spektroskopija).

Polisaharidi predstavljajo strukturno komponento celične stene višjih gliv (slika 6). Ta je v glavnem sestavljena iz dveh tipov polisaharidov: iz hitina ter β -glukanov, α -glukanov in glikoproteinov (Grün, 2003). Iz micelija gliv, vzgojenih s submerznim načinom kultivacije, smo ekstrahirali in izolirali intracelularne polisaharide, iz fermentacijske brozge pa ekstracelularne polisaharide. Oba postopka sta v večini stopenj enaka, razlikujeta se le v začetni stopnji ekstrakcije, saj je potrebno micelij po ločitvi od fermentacijske brozge ustrezno toplotno obdelati, da se intracelularni polisaharidi lahko izločijo v ekstracijski medij.



Slika 6: Shematski prikaz strukture celične stene gliv. Stena je sestavljena iz zunanje plasti proteoglikanov in notranje plasti β - in α -glukanov (Grün, 2003)

3.3.1 Ekstrakcija in izolacija ekstracelularnih vodotopnih polisaharidov

Micelij smo ločili od fermentacijske brozge s filtracijo. Supernatant smo koncentrirali z odparevanjem na rotavaporju pri temperaturi 50 °C. Koncentrirane ekstracelularne polisaharide smo nadalje oborili z dodatkom 3-kratnega volumna 96 % etanola in pustili čez noč v hladilniku pri 4 °C, da je bil procesobarjanja čim bolj učinkovit.

Naslednji dan smo izoborjene polisaharide od raztopine ločili z 10-minutnim centrifugiranjem pri 9000 min^{-1} in temperaturo $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Izoborjeno frakcijo smo še 2-krat sprali s 85 % etanolom, da bi se v čim večji meri znebili nečistoč in ostalih nizkomolekularnih snovi. Polisaharide smo posušili vakuumskem sušilniku in jih čez noč pustili v zamrzovalniku pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, kar naj bi imelo za posledico izgubo proteinov in ostalih neželenih snovi ob kasnejšem raztplavljanju.

Sledilo je tehtanje posušenih izoborjenih polisaharidov, ki smo jih zdrobili v terilnici ter jih na osnovi dobljene vrednosti mase 4 ure raztplljali v približno 100-kratni količini demineralizirane vode. Zmes smo zopet centrifugirali in supernatant posušili v vakuumskem sušilniku. Tako smo med seboj ločili nevodotopne od vodotopnih polisaharidov, le-te pa smo uporabili za nadaljnje analize.

3.3.2 Ekstrakcija in izolacija intracelularnih vodotopnih polisaharidov

Micelij smo ločili od fermentacijske brozge s filtracijo. Supernatant smo uporabili za izolacijo ekstracelularnih polisaharidov, medtem ko smo micelij sprali z demineralizirano vodo ter centrifugirali 10 minut pri 9000 min^{-1} . Postopek smo ponovili 3-krat, s tem da smo namesto vode v tretji stopnji uporabili 85 % etanol. Tako smo odstranili vse ekstracelularne polisaharide, ki bi motili nadaljnje analize, in se znebili nizkomolekularnih ter ostalih motečih snovi.

Očiščeni micelij smo prestavili v steklenice, primerne za uporabo v avtoklavu, dodali približno 400 mL demineralizirane vode in 3 ure kuhalni v avtoklavu pri $100\text{ }^{\circ}\text{C}$. Sledilo je ohlajanje na sobno temperaturo in filtracija micelija od ekstrakcijskega medija. Istemu miceliju smo zopet dodali demineralizirano vodo in izvedli drugo ekstrakcijo v avtoklavu pri $121\text{ }^{\circ}\text{C}$, 1 uro. Po končanem postopku in ohlajanju na sobno temperaturo smo micelij filtrirali, posušili in ga stehtali (slika 7), združena filtrata ekstrahiranih intracelularnih polisaharidov pa koncentrirali z odparevanjem na rotavaporju pri temperaturi $50\text{ }^{\circ}\text{C}$. Koncentrirane intracelularne polisaharide smo nadalje oborili z dodatkom 3-kratnega volumna 96 % etanola in pustili čez noč v hladilniku pri $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, da je bil procesobarjanja čim bolj učinkovit. Nadaljnje stopnje izolacije so bile identične kot v primeru ekstracelularnih polisaharidov.



Slika 7: Posušen micelij *Schizophyllum commune* na filter papirju

3.4 ANALIZA IZOLIRANIH POLISAHARIDOV

3.4.1 Določitev vsebnosti polisaharidov in proteinov v izoliranih izvlečkih

Izvlečkom smo določili vsebnost proteinov in vodotopnih polisaharidov. Vsebnost proteinov smo določili z reakcijo po Bradfordu (1976), za vsebnost sladkorjev pa smo uporabili modifikacijo reakcije po Dubois in sod. (1956) v izvedbi v mikrotitrski ploščici (Masuko in sod., 2005). Predvsem za določitev vrednosti polisaharidov smo vzorce predhodno ločeno dializirali 48 ur v dializnem črevesu z izključitveno molekulsko maso 6-8 kDa. Tako smo zagotovili, da se v našem vzorcu nahajajo le polisaharidi z molekulsko maso, večjo od 6-8 kDa.

Za določitev proteinov smo uporabili Coomassie Plus Protein Assay Reagent Kit (proizvajalec Pierce Biotechnology). Analize smo izvedli s tremi ponovitvami vzorcev v mikrotitrskih ploščah ter prav tako s tremi ponovitvami standardnih raztopin govejega serumskega albumina (BSA), s katerimi smo pripravili umeritveno krivuljo. Na osnovi vrednosti iz krivulje oz. enačbe premice smo sklepali o vsebnosti proteinov v vzorcih. V vsako vdolbinico mikrotitrsko ploščo smo odpipetirali 150 µL vzorca oz. standarda ter dodali 150 µL reagenta. Ploščo smo rahlo pretresli in inkubirali 10 minut na sobni temperaturi. Izmerili smo absorpcijo pri 595 nm.

Analizo vsebnosti sladkorjev smo prav tako izvedli v mikrotitrskih ploščah. Tako vzorci kot standardne raztopine glukoze za umeritveno krivuljo so bili nanešeni v treh ponovitvah. V vsako vdolbinico smo odpipetirali 50 µL vzorca oz. standarda glukoze. Z močnim curkom smo dodali 150 µL koncentrirane žveplene kisline ter inkubirali ploščo z rahlim stresanjem približno pol ure. Po inkubaciji smo hitro dodali 30 µL raztopine 5 % fenola v vodi in ploščo segrevali 5 min v vodni kopeli na 90 °C. Po ohlajanju na sobni temperaturi smo izmerili absorpcijo pri 492 nm. Z umeritveno kruvuljo standardnih raztopin glukoze smo vzorcem določili vsebnost vodotopnih polisaharidov.

3.4.2 Določitev monosaharidne sestave polisaharidov s tankoplastno tekočinsko kromatografijo (TLC)

Pri analizi sladkorjev iz naravnih izvlečkov se največ uporablja papirna (PC) in tankoplastna tekočinska kromatografija (TLC). TLC analiza predstavlja hitro in ponovljivo metodo tako za kvalitativne kot kvantitativne analize ogljikovih hidratov, je enostavna za uporabo in cenovno bolj ugodna od ostalih podobnih tehnik, kot so HPLC in GC. Kvalitativna metoda sestoji iz razvitja TLC plošč z ustreznimi topili in orositvenimi reagenti. Na plošče so poleg analiznih vzorcev naneseni ustrezni standardi, s katerimi preko vrednosti retencijskih faktorjev (R_f) sklepamo na njihovo prisotnost v vzorcu. Če uporabimo posebne orositvene reagente, se za identifikacijo lahko poslužimo tudi barvnih reakcij, tako standardov kot vzorcev. Za standarde monosaharidov smo uporabili: D-glukozo, D-galaktozo, D-manozo, D-fukozo, D-ribozo, L-ramnozo, D-ksilozo ter L-arabinozo.

Analize TLC ni mogoče izvesti direktno s polisaharidi. Pred izvedbo je torej potrebna hidroliza polisaharidov z močnimi kislinami do monosaharidnih enot. Ker so ogljikovi hidrati zelo hidrofilne snovi, se zaradi tega močno vežejo na plošče z nanesenim silika gelom. Zato je kot mobilno fazo nujno potrebno uporabiti močno polarna topila. Kot sestavine za ustrezeno mobilno fazo za identifikacijo monosaharidov lahko v literaturi najdemo različne snovi, različne kombinacije le-teh, tudi v različnih razmerjih. Največkrat se zaradi hitre separacije in visoke resolucije uporablja mešanica topil etil acetat: n-propanol: ocetna kislina: H_2O (4:2:2:1, v/v), ki smo jo uporabili tudi v naši analizi (Sassaki in sod., 2008: 255).

Za samo barvno reakcijo in posledično detekcijo posameznih monosaharidov je na voljo več možnosti orositvenih reagentov. Največ se uporablajo pripravljene raztopine orcinola v H_2SO_4 , raztopina anilina, difenilamina in fosforne kisline v acetonu ali metanolu ter 10 do 40 % H_2SO_4 v metanolu in mnoge druge (Sassaki in sod., 2008: 269). Po orositvi se plošče razvijejo s segrevanjem v razponu 80-140 °C in poslikajo pod ustreznimi detektorji s filteri različnih valovnih dolžin ali pa pregledajo na vidni svetlobi.

3.4.2.1 Priprava vzorcev za TLC

Ker analiza TLC ni mogoča neposredno s polisaharidnimi vzorci, smo izvedli popolno hidrolizo do monosaharidnih enot s trifluorocetno kislino (TFA). Protokol hidrolize smo privedli po Goubet in sod. (2002). V stekleno epruveto smo natehtali 1-5 mg vzorca in dodali 1 mL 2M TFA. Vzorce smo hidrolizirali najmanj 12 h v oljni kopeli pri 100 °C. Po ohlajanju na sobno temperaturo smo vzorce posušili z odparevanjem na rotavaporju pri 50 °C. Posušenim vzorcem smo še 3-krat dodali po 1 mL metanola in tekočino znova odparili z namenom, da odstranimo čim več preostale TFA, ki bi lahko motila nadaljnjo analizo. Vzorce smo resuspendirali v 1 mL demineralizirane vode. Končna koncentracija vzorcev pred nanosom je bila približno 1 mg/mL. Pripravljene vzorce smo do analize shranili v zamrzovalniku pri -20 °C.

3.4.2.2 Postopek TLC in detekcija monosaharidov

Za določanje sestave izoliranih polisaharidov smo uporabili plošče TLC Silica Gel 60 F₂₅₄ dimenzij 10 x 20 cm (proizvajalec Merck, Nemčija).

Kot mobilno fazo smo uporabili več kombinacij različnih organskih topil in kot optimalno določili sestavo mobilne faze etil acetat: n-propanol: ocetna kislina: H_2O (8:4:4:1, v/v). Na plošče smo z aplikatorjem vzorcev Linomat nanesli po 5 µL vzorcev in 5 µL izbranih standardov monosaharidov. Ploščo smo postavili v kadičko z mobilno fazo in počakali, da poteče proces ločevanja oz. da fronta potovanja pride skoraj do roba plošče. Ploščo smo posušili na zraku in jo orosili z orositvenim reagentom 20 % H_2SO_4 v metanolu. Še mokro smo za 20 minut postavili na keramični grelec plošč na 100 °C. Razvite plošče smo posneli z detektorjem s svetlobnim filtrom 366 nm in analizirali dobljene kromatograme.

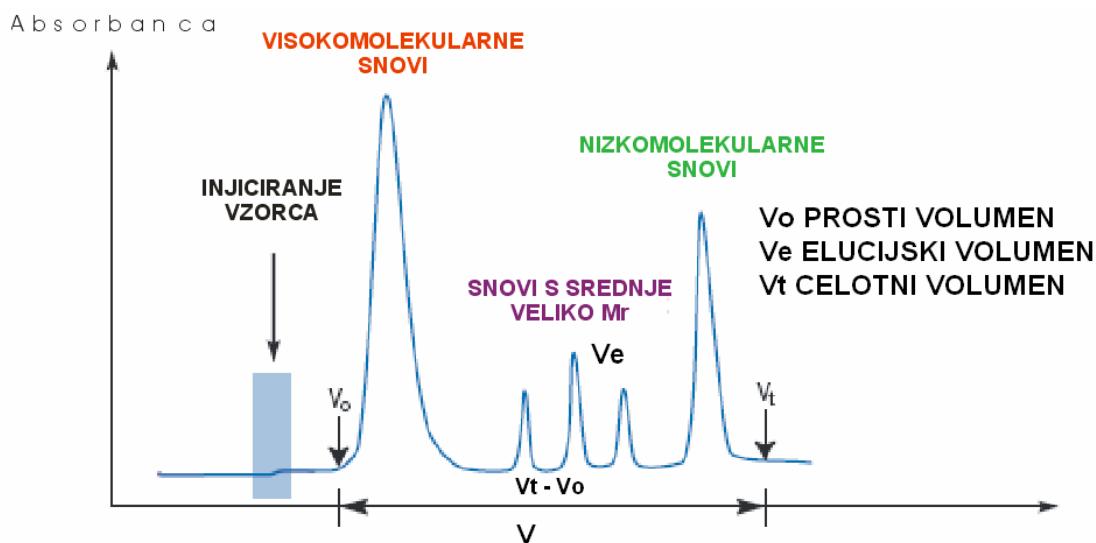
3.4.3 Določitev velikostnega ranga vodotopnih polisaharidov z gelsko filtracijo

Gelska filtracija oz. kromatografija z ločevanjem po velikosti (ang. »size-exclusion chromatography«) ločuje molekule po njihovi molekulski masi preko potovanja skozi kolono s stacionarno fazo. Za razliko od ionsko izmenjevalne oz. afinitetne kromatografije se pri gelski filtraciji molekule ne vežejo na nosilec, tako da izbor mobilne faze ne vpliva direktno na samo ločevanje in resolucijo.

Pri analizi različnih naravnih izvlečkov polisaharidov se gelska filtracija večinoma uporablja za čiščenje ter določanje molekulske mase polisaharidov. Pri določanju molekulske mase odlikuje metodo predvsem njena hitrost, visoka selektivnost in dobra ponovljivost. Polisaharidi se spirajo iz kolone glede na velikost, in sicer od večje do manjše molekulske mase. Točna vrednost se kasneje določi s kalibracijsko krivuljo več velikostnih standardov (Wang in Fang, 2004).

Velikost kolone izberemo glede na želeno resolucijo in jo napolnimo z ustrezno stacionarno fazo (nosilcem), ki je običajno porozno polnilo z okroglimi delci, katerih zahteva je kemijska in fizikalna stabilnost ter inertnost. Pripravljena kolona se ekvilibriira s pufrom, ki zapolni pore in prazen prostor med delci. Po nanosu vzorca se molekule izokratsko eluirajo skozi kolono in ko swoji steče volumen, ki je enak volumnu kolone, je separacija končana - kolona se spere s pufrom in je pripravljena za nanos naslednjega vzorca.

Slika 8 prikazuje teoretični profil elucije oz. kromatogram visoko ločljive frakcionacije z gelsko filtracijo. Molekule, ki so prevelike, da bi vstopile v matriks, se eluirajo v prostem volumnu kolone (V_0). Iz kolone se izločijo z enako hitrostjo, kot je hitrost samega pufra. Običajno je prosti volumen približno enak 30 odstotkom celotnega volumna kolone (V_t). Molekule s srednje veliko molekulsko maso se delno ujamejo v pore in se eluirajo v zaporedju padajočih molekulskih mas. Majhne molekule, kot so npr. soli, lahko vstopajo v vse pore v koloni in se zato v njej zadržijo najdlje. Eluirajo se malenkost pred celotnim oz. totalnim volumnom kolone (V_t).



Slika 8: Teoretični kromatogram separacije snovi različnih molekulskega mas z uporabo kolonske kromatografije visoke ločljivosti (SE-HPLC)

Vsaka komponenta, ki se eluira iz kolone, ima svoj elucijski volumen oz. V_e , ki ga določimo iz posameznega kromatograma. Pri določanju molekulske mase iz dobljenih vrednosti elucijskih volumnov velikostnih standardov pripravimo krivuljo porazdelitvenih koeficientov v odvisnosti od logaritemske vrednosti molekulske mase. Z enačbo premice določimo vzorcem molekulsko maso. Porazdelitveni koeficient K_{av} se izračuna po enačbi 1 (Preneta, 1989: 294).

$$K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0} \dots (1)$$

Za določitev molekulskih mas intracelularnih in ekstracelularnih polisaharidov smo uporabili kolono dimenzij $1,2 \times 63$ cm, napolnjeno z nosilcem Sepharose CL-4B, za katerega je značilno, da ločuje dekstrane molekulskih mas od $3 \cdot 10^4$ do $5 \cdot 10^6$. Za spiranje smo uporabili 0,05M fosfatni pufer z 0,15M NaCl (končni pH 7,2). Pretok mobilne faze je bil 1 kaplja/10 sekund. Zbirali smo frakcije volumna 5 mL (slika 9).



Slika 9: Uporabljena kolona z nosilcem Sepharose CL-4B, pufer za spiranje in zbrane 5 mL frakcije

Izvedli smo 13 kromatografskih ločb, in sicer 10 za vzorce in 3 z velikostnimi standardi. Uporabili smo standarde dekstranov velikosti $2 \cdot 10^6$, $5 \cdot 10^5$ in $1 \cdot 10^5$ Da. Pred nanosom na kolono smo vse vzorce filtrirali skozi filter, ki prepušča delce, manjše od 20 μm . Kromatografsko ločevanje smo spremljali z metodo po Masuko in sod., 2005. Analizo vsebnosti sladkorjev smo izvedli v mikrotitrskih ploščah. Vzorci posameznih frakcij so bili nanešeni v treh ponovitvah. V vsako vdolbinico smo odpipetirali 50 μL vzorca in dodali 150 μL koncentrirane žveplene kislino. Ploščo smo inkubirali pol ure. Po inkubaciji smo dodali 30 μL 5 % fenola v vodi in ploščo segrevali 5 min v vodni kopeli na 90 °C. Po ohlajanju na sobni temperaturi smo izmerili absorpcijo pri 492 nm.

Iz dobljenih vrednosti elucijskih volumnov (V_e) dekstranov standardnih molekulskega maso smo pripravili krivuljo, iz katere smo določili neznane molekulske mase vzorcem intracelularnih in ekstracelularnih polisaharidov.

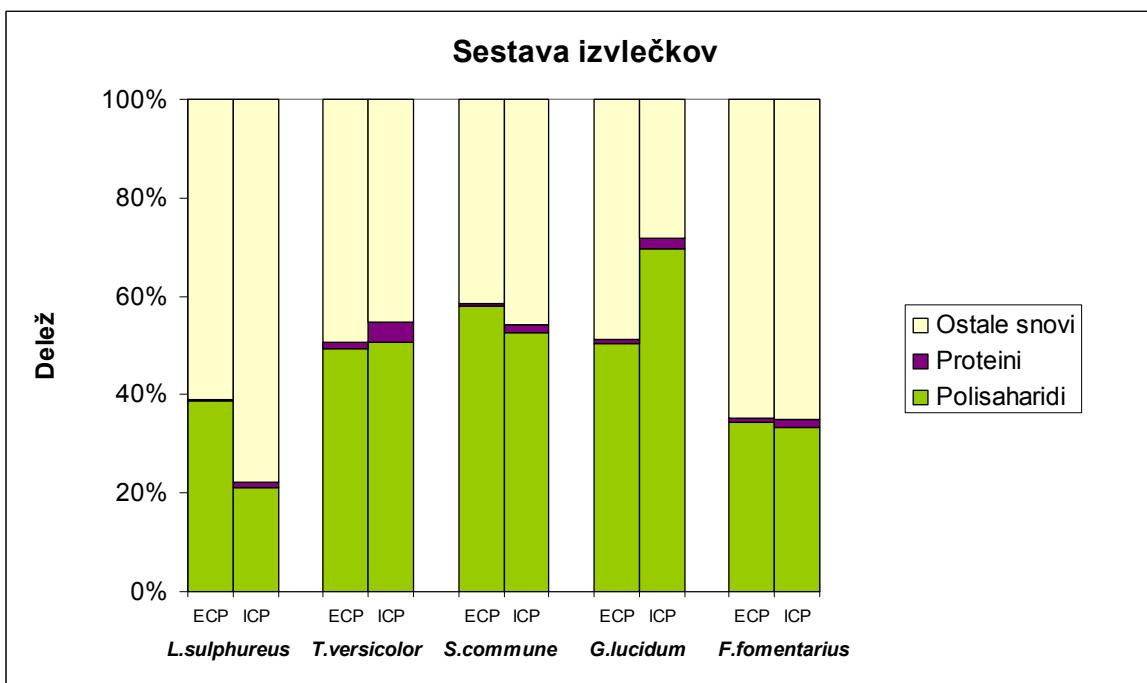
4 REZULTATI

4.1 VSEBNOST VODOTOPNIH POLISAHARIDOV IN PROTEINOV V IZOLIRANIH IZVLEČKIH

Vodotopne izvlečke posameznih medicinsko pomembnih višjih gliv (ekstra in intracelularne) smo ločeno dializirali v dializnem črevesu, ki prepušča molekule manjše od 6-8 kDa. Po 48. urah smo dializirani raztopini določili koncentracijo proteinov po Bradfordu (1976) ter koncentracijo polisaharidov po Masuko in sod. (2005). Rezultati so predstavljeni v preglednici 2 ter na sliki 10.

Preglednica 2: Sestava izvlečkov intracelularnih in ekstracelularnih polisaharidov ter preračunani deleži polisaharidov večjih od 6-8 kDa, proteinov in ostalih snovi. ECP – izvleček ekstracelularnih polisaharidov, ICP – izvleček intracelularnih polisaharidov. Vse analize so bile izvedene v treh ponovitvah (n=3).

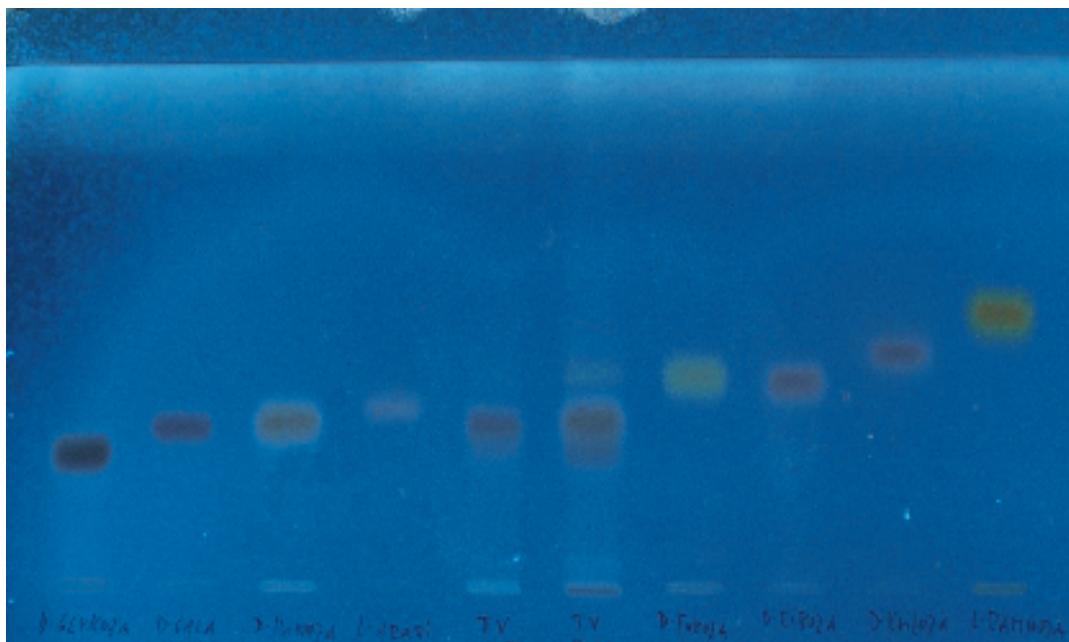
	Začetna konc. suhe snovi ekstrakta [mg/mL]	Konc. polisaharidov večjih od 6-8 kDa [mg/mL] %		Konc. proteinov [mg/mL] %		Konc. ostalih snovi, polisaharidov manjših od 6-8 kDa [mg/mL] %	
<i>L. sulphureus</i>							
ECP	8,50	3,29	38,7	0,029	0,3	5,18	61,0
ICP	5,00	1,05	21,0	0,059	1,2	3,89	77,8
<i>T. versicolor</i>							
ECP	3,50	1,72	49,2	0,048	1,4	1,73	49,4
ICP	1,60	0,81	50,8	0,065	4,1	0,72	45,2
<i>S. commune</i>							
ECP	7,00	4,06	58,0	0,039	0,6	2,90	41,5
ICP	2,50	1,31	52,5	0,044	1,7	1,14	45,7
<i>G. lucidum</i>							
ECP	5,67	2,86	50,5	0,034	0,6	2,77	48,9
ICP	2,33	1,63	69,7	0,049	2,1	0,66	28,2
<i>F. fomentarius</i>							
ECP	6,00	2,06	34,4	0,045	0,8	3,89	64,8
ICP	3,67	1,22	33,2	0,065	1,8	2,38	65,0



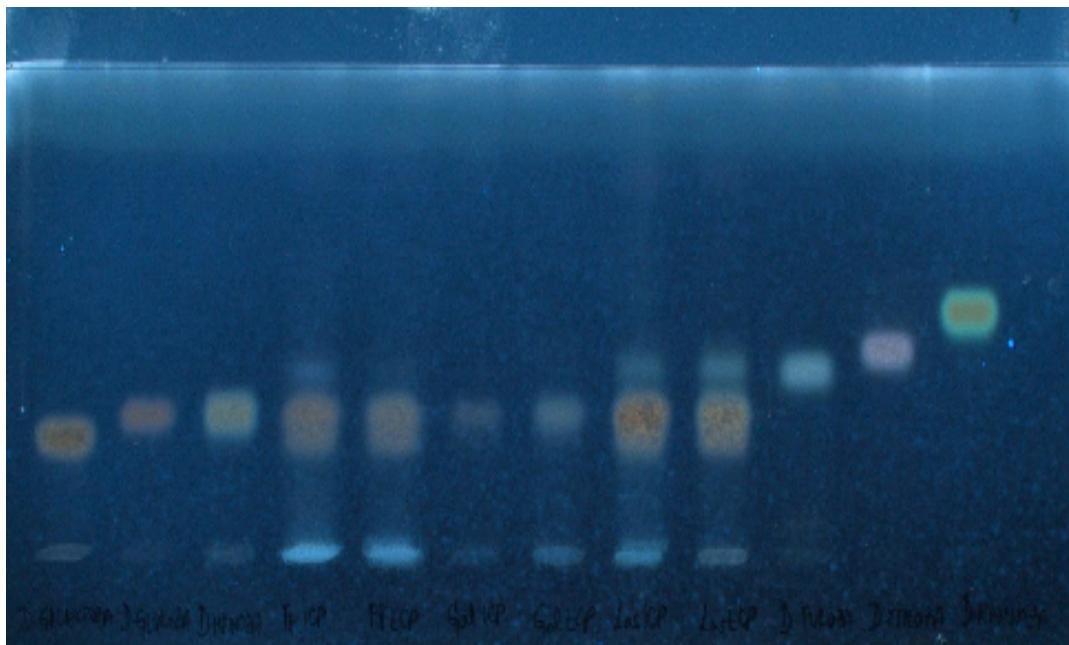
Slika 10: Sestava izvlečkov izoliranih ekstracelularnih in intracelularnih polisaharidov gliv *Laetiporus sulphureus*, *Trametes versicolor*, *Schizophyllum commune*, *Ganoderma lucidum* in *Fomes fomentarius*. Prikazane so povprečne vrednosti ($n=3$) deležev vodotopnih polisaharidov večjih od 6-8 kDa, proteinov ter ostalih snovi, kamor spadajo tudi polisaharidi manjši od 6-8 kDa. ECP – izvleček ekstracelularnih polisaharidov, ICP – izvleček intracelularnih polisaharidov.

4.2 MONOSAHARIDNA SESTAVA POLISAHARIDOV

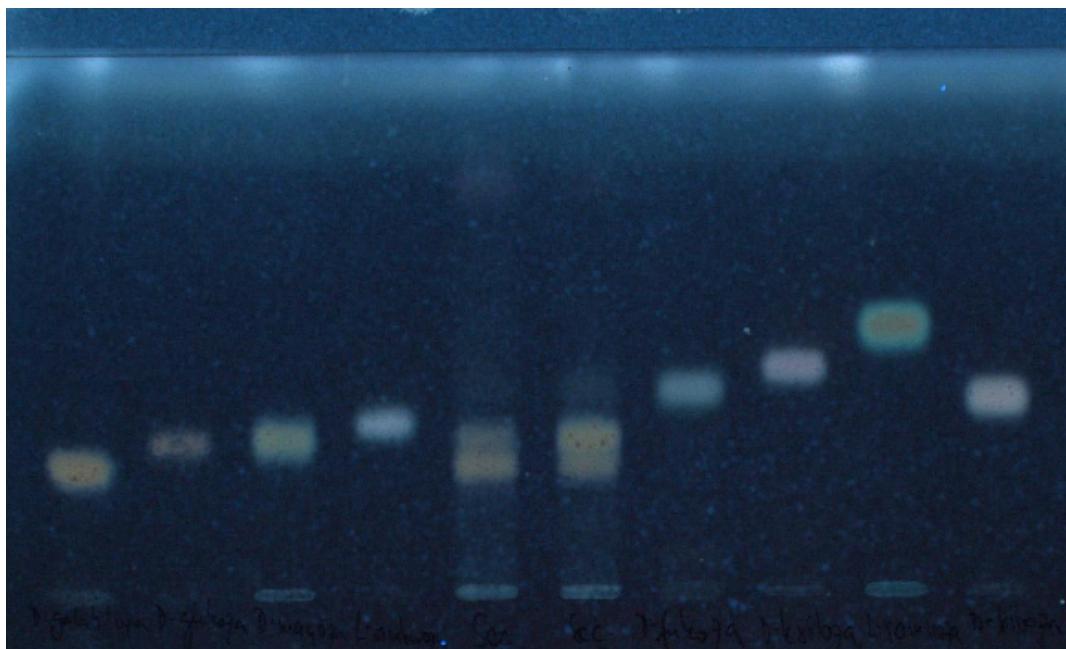
Monosaharidno sestavo polisaharidov smo določili z uporabo tankoplastne tekočinske kromatografije (TLC). Analizo smo izvedli s hidroliziranimi vzorci koncentracije 1-5 mg/mL. Uporabili smo plošče TLC Silica Gel 60 F₂₅₄, dimenzijs 10 x 20 cm, na katere smo nanesli po 5 µL standardov koncentracije 1 mg/mL in po 5 µL vzorcev koncentracije 1-5 mg/mL. Kot mobilno fazo smo uporabili etil acetat: n-propanol: ocetna kislina: H₂O (8:4:4:1, v/v). Plošče smo orosili s raztopino 20 % H₂SO₄ v metanolu in jih segrevali 20 min na 100 °C ter dobljene kromatograme dokumentirali z detektorjem s svetlobnim filtrom 366 nm. Slike 11, 12 in 13 prikazujejo dobljene kromatograme analiziranih izvlečkov s pripadajočimi standardi monosaharidov.



Slika 11: Kromatogram tankoplastne tekočinske kromatografije. Vzorci nanešeni po vrstnem redu od leve proti desni: 1: D-galaktoza, 2: D-glukoza, 3: D-manoza, 4: L-arabinoza, 5: *T. versicolor* ICP, 6: *T. versicolor* ECP, 7: D-fukoza, 8: D-riboza, 9: D-ksiloza, 10: L-ramnoza. ICP- intracelularni polisaharidi, ECP- ekstracelularni polisaharidi.



Slika 12: Kromatogram tankoplastne tekočinske kromatografije. Vzorci nanešeni po vrstnem redu od leve proti desni: 1: D-galaktoza, 2: D-glukoza, 3: D-manoza, 4: *F. fomentarius* ICP, 5: *F. fomentarius* ECP, 6: *G. lucidum* ICP, 7: *G. lucidum* ECP, 8: *L. sulphureus* ICP, 9: *L. sulphureus* ECP, 10: D-fukoza, 11: D-ksiloza, 12: L-ramnoza. ICP- intracelularni polisaharidi, ECP- ekstracelularni polisaharidi.



Slika 13: Kromatogram tankoplastne tekočinske kromatografije. Vzorci nanešeni po vrstnem redu od leve proti desni: 1: D-galaktoza, 2: D-glukoza, 3: D-manoza, 4: L-arabinoza, 5: *S. commune* ICP, 6: *S. commune* ECP, 7: D-fukoza, 8: D-ksiloza, 9: L-ramnoza, 10: D-riboza. ICP- intracelularni polisaharidi, ECP- ekstracelularni polisaharidi.

Vzorcem intracelularnih in ekstracelularnih polisaharidov smo z ekstrapolacijo kromatogramov s subjektivno vizualizacijo brez kvantificirane denzitometrije določili monosaharidno sestavo in približne deleže posameznih monosaharidnih enot. Rezultati so predstavljeni v preglednici 3.

Preglednica 3: Sestava monosaharidov v izvlečkih ekstra- in intracelularnih polisaharidov. – ni prisotno, + prisotno v zelo majhni meri, ++ prisotno v srednji meri, +++ prisotno v veliki meri. . ICP- intracelularni polisaharidi, ECP- ekstracelularni polisaharidi.

	D-glukoz	D-galaktoz	D-manoz	L-arabinoz	D-fukoza	D-riboza	D-ksiloza	L-ramnoza
<i>L. sulphureus</i>								
ECP	+++	++	+	-	++	-	-	-
ICP	+++	++	+	-	++	-	-	-
<i>T. versicolor</i>								
ECP	+++	++	++	+	+	-	-	-
ICP	+++	+	-	-	-	-	-	-
<i>S. commune</i>								
ECP	+++	++	-	-	+	-	-	-
ICP	++	+++	-	-	-	-	-	-
<i>G. lucidum</i>								
ECP	++	-	+	-	-	-	-	-
ICP	++	-	-	-	-	-	-	-
<i>F. fomentarius</i>								
ECP	+++	+++	-	-	-	-	-	-
ICP	+++	+++	-	-	+	-	-	-

4.3 VELIKOSTNI RANG IZOLIRANIH POLISAHARIDOV

Za določitev molekulskih mas intracelularnih in ekstracelularnih polisaharidov smo uporabili kolono dimenzijs 1,2 x 63 cm, ki je bila napolnjena z nosilcem Sepharose CL-4B. Za spiranje smo uporabili 0,05M fosfatni pufer z 0,15M NaCl (končni pH 7,2). Pretok mobilne faze je bil 1 kaplja/10 sekund. Zbirali smo frakcije volumna 5 mL. Za analizo smo uporabili standarde dekstranov z molekulskimi masami $2 \cdot 10^6$, $5 \cdot 10^5$ in $1 \cdot 10^5$. Kromatografsko ločevanje smo spremljali z metodo po Masuko in sod. (2005).

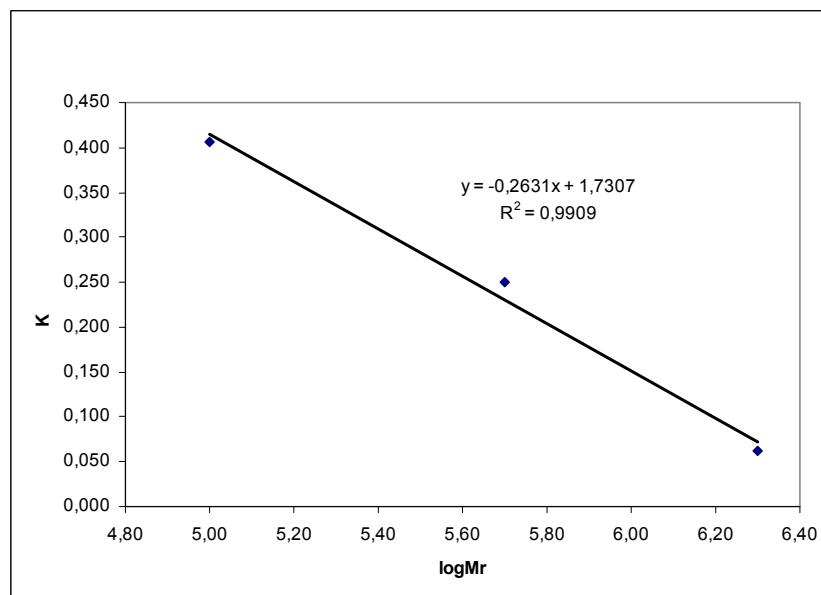
4.3.1 Frakcionacijski rang standardov dekstranov

Določili smo prosti volumen (V_o), celotni volumen (V_t) ter posamezne elucijske volumne (V_e) standardov znanih molekulskih mas. Na osnovi teh vrednosti smo standardom izračunali porazdelitvene koeficiente K_{av} , kar prikazuje preglednica 4.

Preglednica 4: Parametri kromatografske ločbe dekstranov standardnih molekulskih mas ($Mr 2 \cdot 10^6$, $5 \cdot 10^5$ in $1 \cdot 10^5$) in izračunani porazdelitveni koeficienti (K_{av}). V_t , V_0 in V_e vizualno določeni iz kromatogramov, K_{av} določen z izračunom po enačbi $K_{av} = (V_e - V_0) / (V_t - V_0)$.

Dekstran	logMr	V_e [mL]	V_0 [mL]	V_t [mL]	K_{av}
2.000.000	6,30	30,0	25	105	0,063
500.000	5,70	45,0	25	105	0,250
100.000	5,00	57,5	25	105	0,406

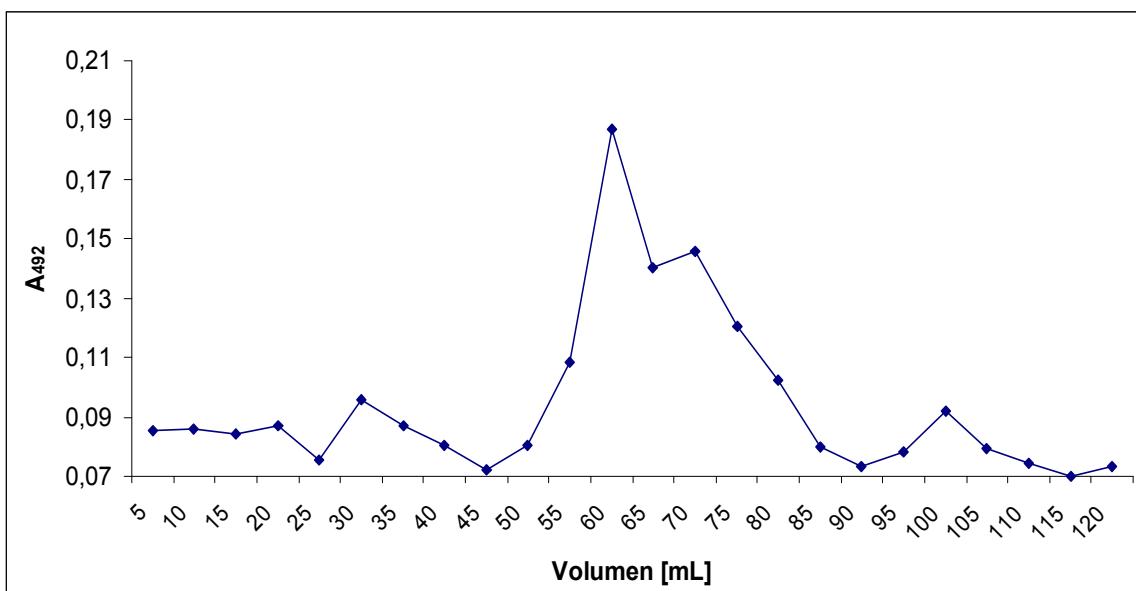
Iz dobljenih vrednosti K_{av} dekstranov standardnih molekulskih mas smo pripravili krivuljo, iz katere smo določili neznane molekulske mase vzorcem intracelularnih in ekstracelularnih polisaharidov. Slika 14 prikazuje krivuljo porazdelitvenih koeficientov (K_{av}) v odvisnosti od logaritemsko vrednosti molekulske mase standardov dekstranov.



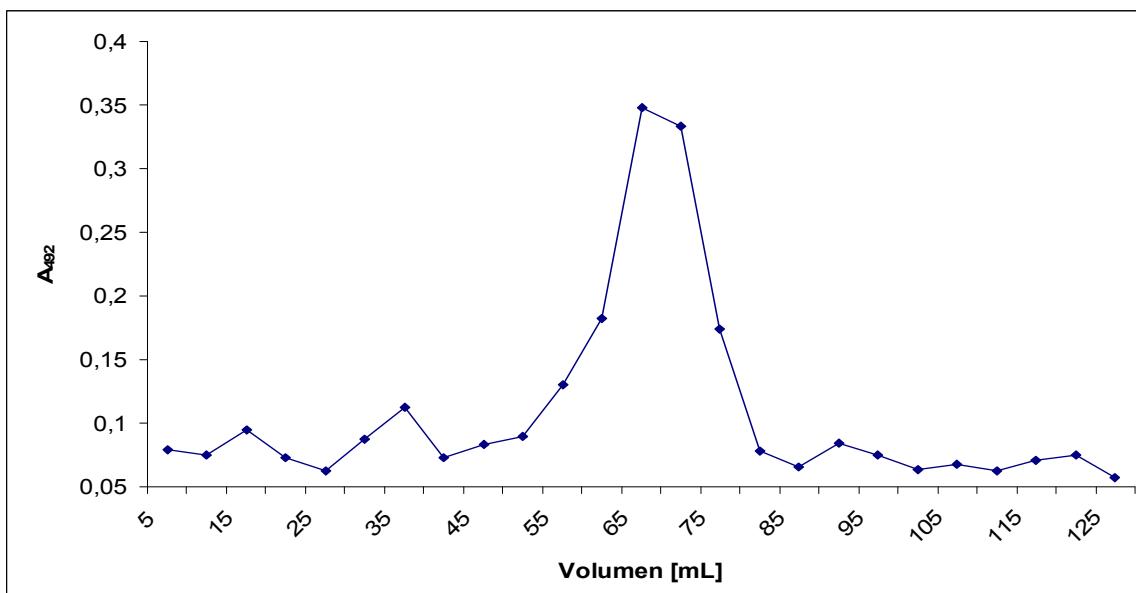
Slika 14: Frakcionacijski rang standardov molekulskih mas $2 \cdot 10^6$, $5 \cdot 10^5$ in $1 \cdot 10^5$. Graf prikazuje vrednosti porazdelitvenih koeficientov v odvisnosti od logMr in pripadajočo enačbo premice.

4.3.2 Molekulska masa vzorcev intracelularnih in ekstracelularnih polisaharidov

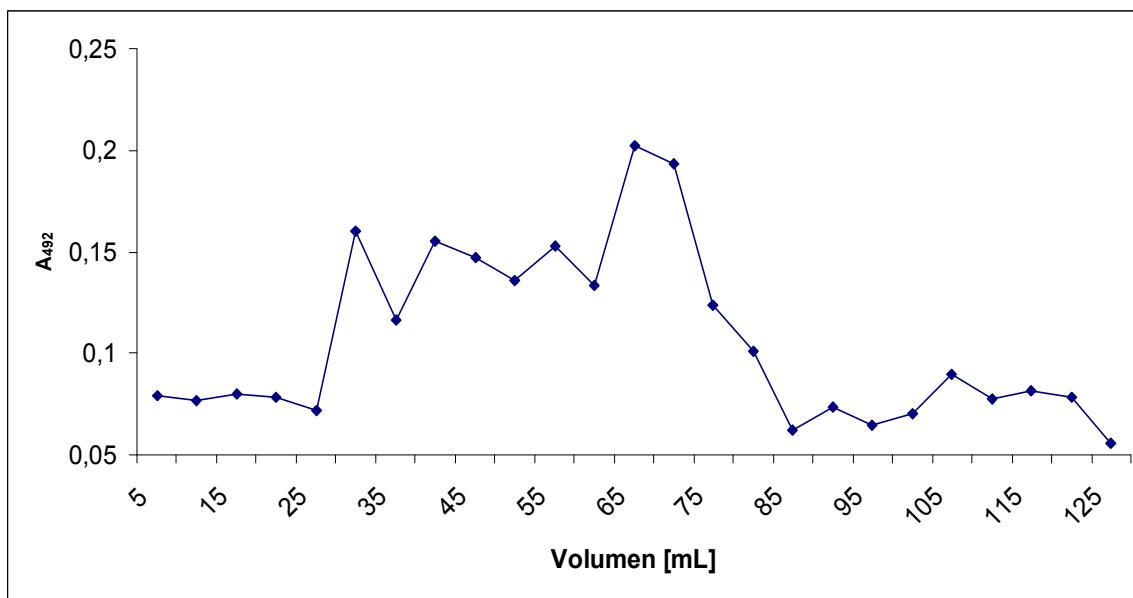
Na kolono z nosilcem Sepharose CL-4B smo ločeno nanesli vzorce izvlečkov intracelularnih in ekstracelularnih polisaharidov posameznih medicinsko pomembnih višjih gliv. Pred nanosom smo vzorce filtrirali skozi filter, ki zadrži delce, večje od 20 μm . Zbirali smo frakcije volumna 5 mL. Slike 15-24 prikazujejo kromatografsko ločbo vzorcev. Spremljali smo spremembo vrednosti absorpcije pri 492 nm.



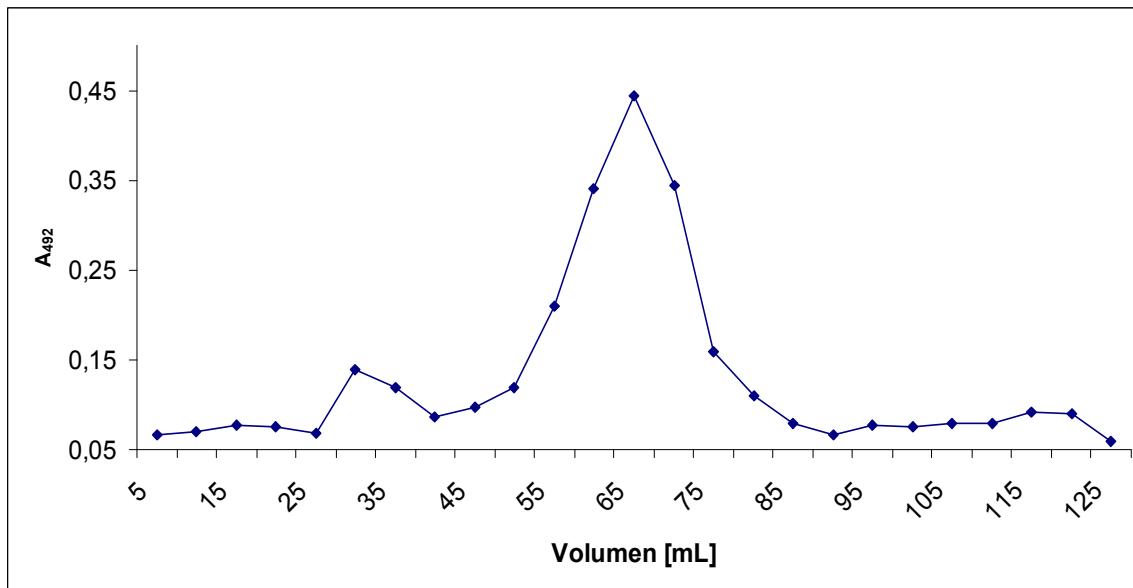
Slika 15: Kromatogram poteka gelske filtracije z izvlečkom intracelularnih polisaharidov *T. versicolor*: merjenje absorpcije pri 492 nm v posameznih 5 mL frakcijah



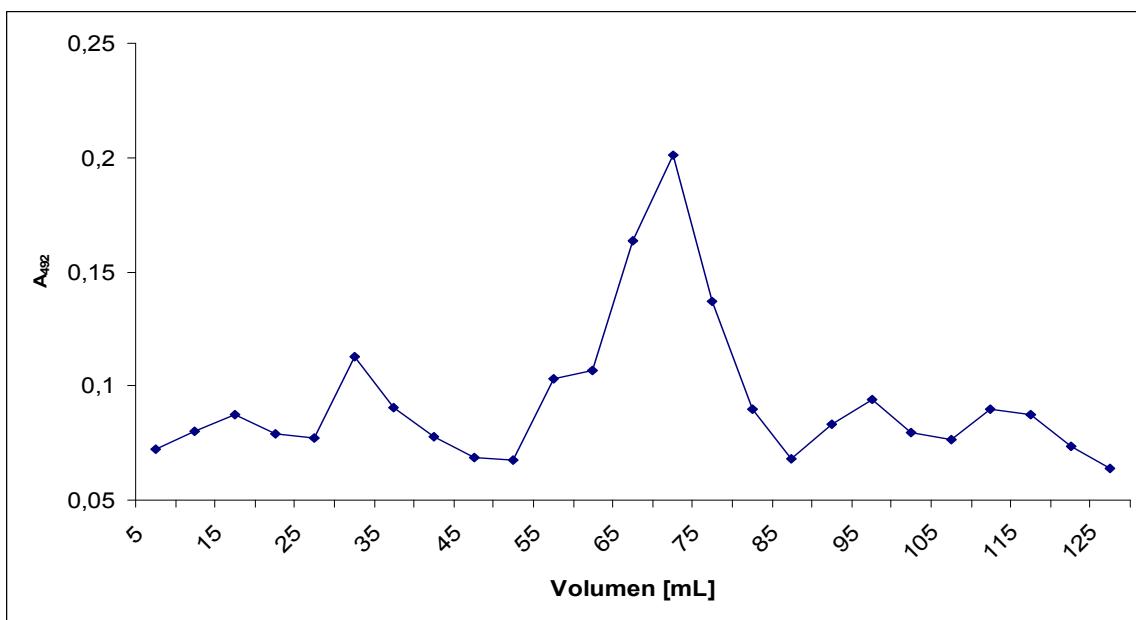
Slika 16: Kromatogram poteka gelske filtracije z izvlečkom ekstracelularnih polisaharidov *T. versicolor*: merjenje absorpcije pri 492 nm v posameznih 5 mL frakcijah



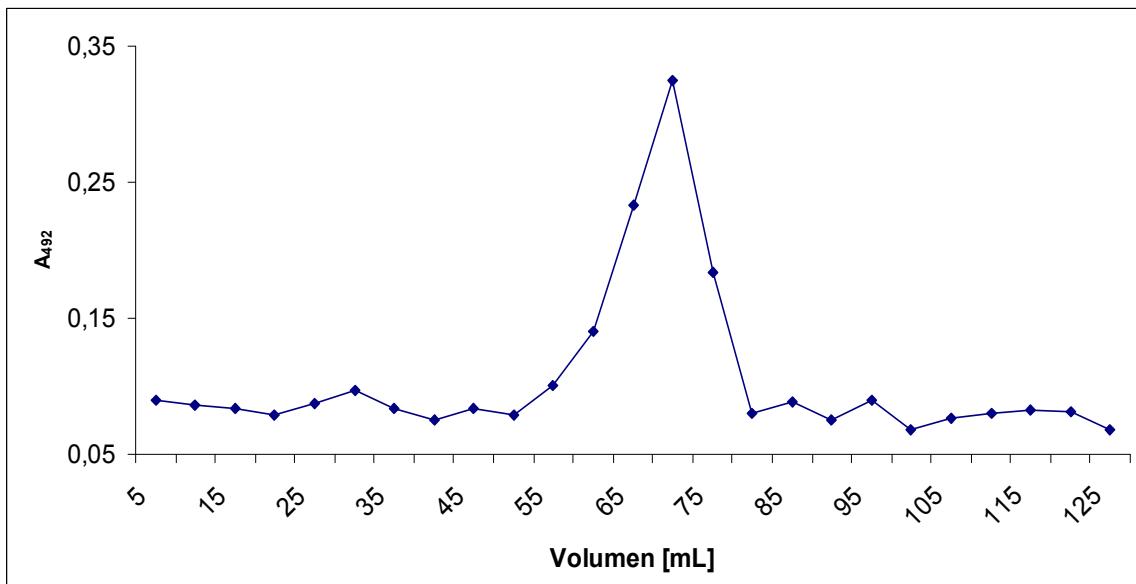
Slika 17: Kromatogram poteka gelske filtracije z izvlečkom intracelularnih polisaharidov *G. lucidum*: merjenje absorpcije pri 492 nm v posameznih 5 mL frakcijah



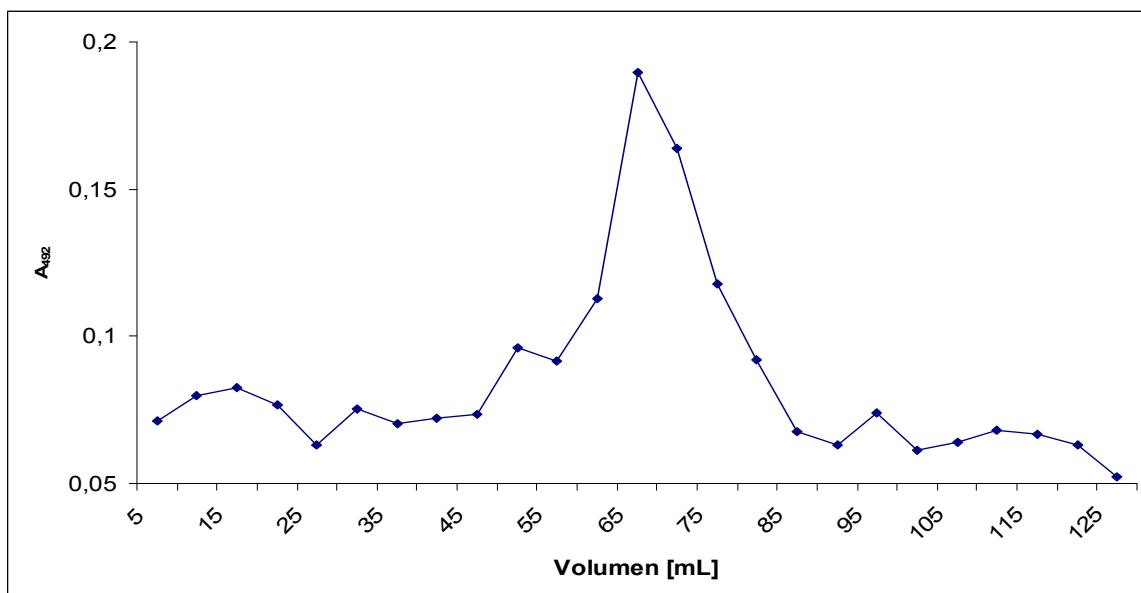
Slika 18: Kromatogram poteka gelske filtracije z izvlečkom ekstracelularnih polisaharidov *G. lucidum*: merjenje absorpcije pri 492 nm v posameznih 5 mL frakcijah



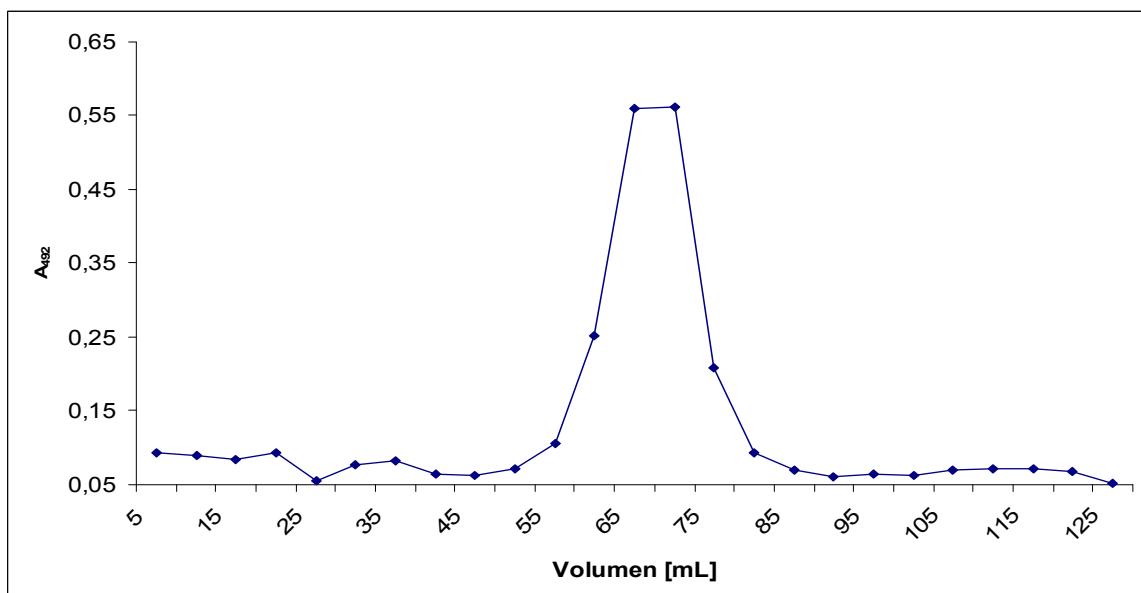
Slika 19: Kromatogram poteka gelske filtracije z izvlečkom intracelularnih polisaharidov *F. fomentarius*: merjenje absorpcije pri 492 nm v posameznih 5 mL frakcijah



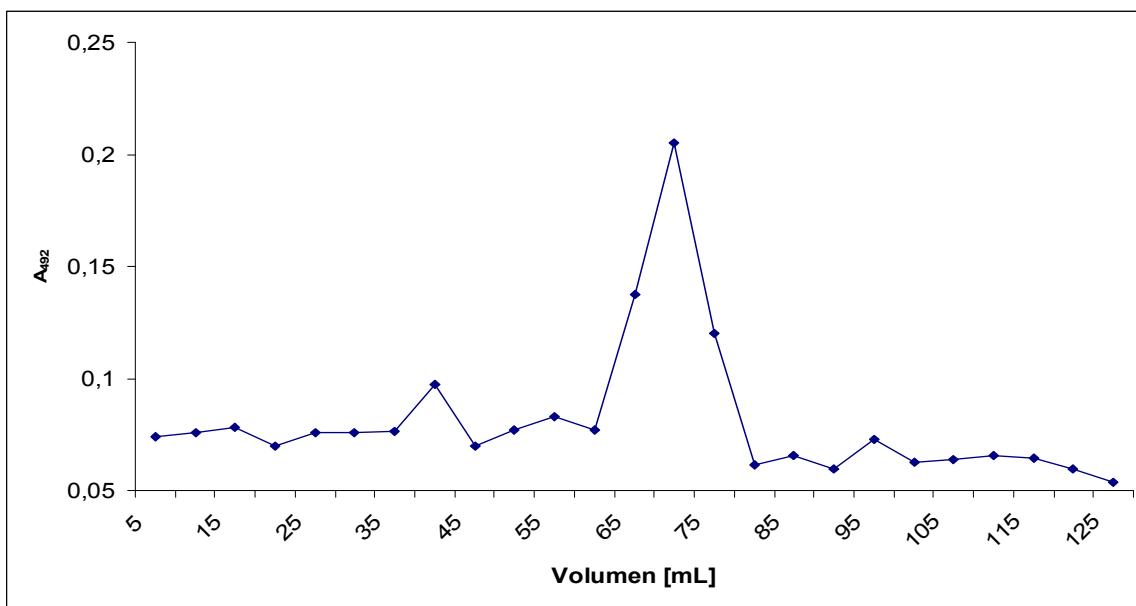
Slika 20: Kromatogram poteka gelske filtracije z izvlečkom ekstracelularnih polisaharidov *F. fomentarius*: merjenje absorpcije pri 492 nm v posameznih 5 mL frakcijah



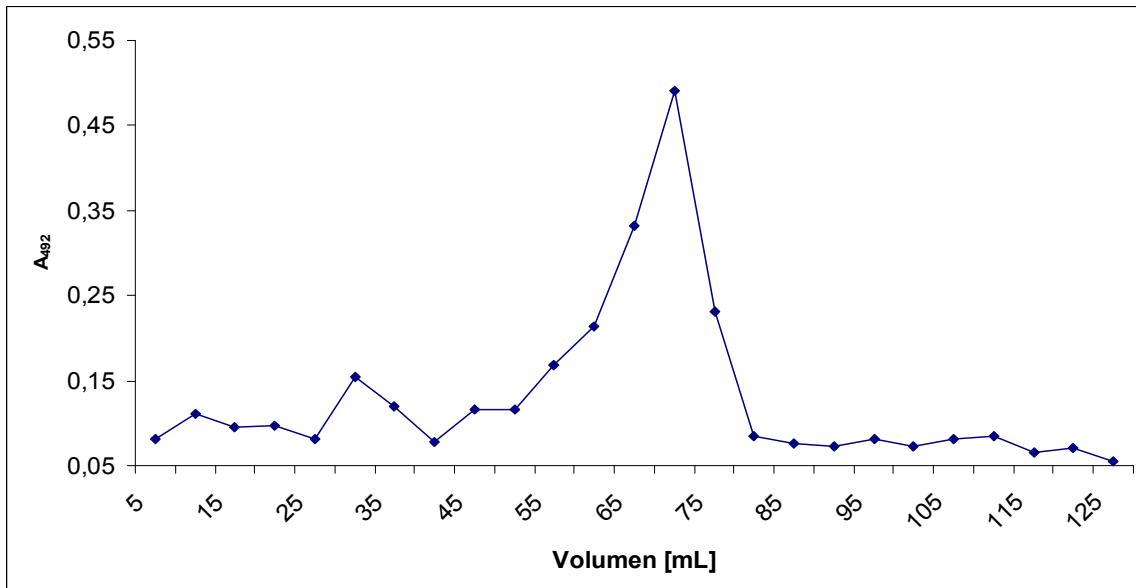
Slika 21: Kromatogram poteka gelske filtracije z izvlečkom intracelularnih polisaharidov *L. sulphureus*: merjenje absorpcije pri 492 nm v posameznih 5 mL frakcijah



Slika 22: Kromatogram poteka gelske filtracije z izvlečkom ekstracelularnih polisaharidov *L. sulphureus*: merjenje absorpcije pri 492 nm v posameznih 5 mL frakcijah



Slika 23: Kromatogram poteka gelske filtracije z izvlečkom intracelularnih polisaharidov *S. commune*: merjenje absorpcije pri 492 nm v posameznih 5 mL frakcijah



Slika 24: Kromatogram poteka gelske filtracije z izvlečkom ekstracelularnih polisaharidov *S. commune*: merjenje absorpcije pri 492 nm v posameznih 5 mL frakcijah

Iz dobljenih kromatogramov smo določili elucijske volumne (V_e) intracelularnih in ekstracelularnih polisaharidov neznanih molekulskih mas. Na osnovi teh vrednosti smo izračunali porazdelitvene koeficiente (K_{av}) za vsak vzorec posebej. Primerjali smo jih z enačbo krivulje frakcionacijskega ranga dekstranov standardnih molekulskih mas, iz katere smo določili vrednost molekulske mase. Izračune prikazuje preglednica 5.

Preglednica 5: Iz enačbe krivulje frakcionacijskega ranga standardov izračunana molekulska masa intracelularnih (ICP) in ekstracelularnih (ECP) polisaharidov, izoliranih iz medicinsko pomembnih višjih gliv. V_0 , V_t in V_e določeni vizualno iz kromatogramov, K_{av} izračunan po enačbi 1 ($K_{av} = (V_e - V_0)/(V_t - V_0)$). Vrednosti logMr smo pridobili iz enačbe premice frakcionacijskega ranga $y = -0,2631x + 1,7307$, iz tega sledi enačba $\log Mr = (1,7307 - K_{av})/0,2631$.

Vzorec	V_0 [mL]	V_t [mL]	V_e [mL]	K_{av}	logMr	Mr [Da]
<i>L. sulphureus</i>						
ECP	25	105	65	0,50	4,68	47609
ICP	25	105	65	0,50	4,68	47609
<i>T. versicolor</i>						
ECP	25	105	65	0,50	4,68	47609
ICP	25	105	60	0,44	4,92	82270
<i>S. commune</i>						
ECP	25	105	70	0,56	4,44	27551
ICP	25	105	70	0,56	4,44	27551
<i>G. lucidum</i>						
ECP	25	105	65	0,50	4,68	47609
ICP	25	105	65	0,50	4,68	47609
<i>F. fomentarius</i>						
ECP	25	105	70	0,56	4,44	27551
ICP	25	105	70	0,56	4,44	27551

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

5.1.1 Vsebnost vodotopnih polisaharidov in proteinov v izoliranih izvlečkih

V izvlečkih intracelularnih in ekstracelularnih polisaharidov smo določili delež proteinov po Bradfordu (1976) ter delež polisaharidov, večjih od 6-8 kDa, z merjenjem koncentracije sladkorjev v izvedbi v mikrotitski ploščici (Dubois in sod., 1956; Masuko in sod., 2005). Polisaharide in ostale manjše dekstrane, disaharide ter monosaharide smo odstranili z metodo dialize. Vsak polisaharid smo ločeno dializirali v dializnem črevesu z izključitveno molekulsko maso 6-8 kDa. Dializa proti demineralizirani vodi je potekala najmanj 48 ur, pri čemer smo vodo zamenjali vsakih nekaj ur. Tako smo zagotovo odstranili tudi vse manjše sladkorje, ki bi se v izvlečkih lahko nahajali zaradi same sestave medijev, uporabljenih pri submerzni kultivaciji. Prav tako smo na ta način odstranili vse manjše proteine in ostale nizkomolekularne snovi.

V povprečju smo najvišje koncentracije polisaharidov pridobili v izvlečkih medicinske glive *Ganoderma lucidum*, in sicer je izvleček ekstracelularnih polisaharidov vseboval 50,5 % polisaharidov večjih od 6-8 kDa ter zanemarljiv delež proteinov (0,6 %), izvleček intracelularnih pa kar 69,7 % polisaharidov večjih od 6-8 kDa ter 2,1 % proteinov. Scherba in Babitskaya (2008) v svoji analizi polisaharidov *G. lucidum*, pridobljenih s submerznim načinom gojenja, navajata, da so tako v ekstracelularnih kot intracelularnih vodotopnih polisaharidih dobili 1,2–8,2 % proteinov. Z infrardečo (IR) spektroskopijo so dokazali, da gre v njihovem primeru za proteoglikane. Tega dejstva, čeprav smo dobili dosti nižje vrednosti proteinov, v našem primeru ne moremo ne potrditi ne ovreči, saj nismo izvedli analiz strukture molekul.

Izvlečki *Trametes versicolor* vsebujejo podoben delež polisaharidov, večjih od 6-8 kDa, in sicer jih vsebuje izvleček ekstracelularnih 49,2 %, izvleček intracelularnih polisaharidov pa 50,8 %. V tem primeru smo večji delež proteinov določili v izvlečku intracelularnih polisaharidov (4,1 %) kot v izvlečku ekstracelularnih polisaharidov (1,4 %). Do podobnih rezultatov so prišli Rau in sod. (2009), ki so z gojenjem *T. versicolor* na minimalnem mediju in pri podobnih postopkih izolacije, kot smo jih uporabili v naši raziskavi, določili vsebnost proteinov v izvlečku ekstracelularnih polisaharidov od 2 do 3,6 % glede na maso izvlečka. Običajno izvlečki najbolj poznanih proteoglikanov iz *T. versicolor*, PSP in PSK, vsebujejo 34–35 % vodotopnih polisaharidov in 28–35 % proteinov (Ueno in sod., 1980). Iz teh podatkov lahko sklepamo, da zagotovo nismo izolirali katerega od omenjenih intracelularnih polisaharidov, saj bi v tem primeru moral biti delež proteinov najmanj 10-krat večji.

Najnižji delež polisaharidov, večjih od 6-8 kDa, smo določili v izvlečku *Laetiporus sulphureus*, in sicer 38,7 % v izvlečku ekstracelularnih polisaharidov in 21 % v izvlečku

intracelularnih. Tudi deleži proteinov so bili občutno nižji, v primeru ekstracelularnih polisaharidov le 0,3 % ter pri intracelularnih 1,2 %. Hwang in sod. (2008) so izvedli analizo ekstracelularnih polisaharidov *L. sulphureus*. Njihovi izvlečki so vsebovali 95,15 % polisaharidov in 4,85 % proteinov. V študiji Kanga in sod. (1982) so izvlečki *L. sulphureus* vsebovali 84 % polisaharidov in 5 % proteinov. Iz tega lahko sklepamo, da se v izvlečkih, ki smo jih pridobili z uporabljenim načinom izolacije, nahaja več polisaharidov manjših molekulskih mas, ki smo jih odstranili v postopku dialize. V vseh primerih smo uporabili enake postopke izolacije, kar bi ob enaki sestavi moralno imeti za logično posledico tudi podobne deleže polisaharidov.

Manjši delež smo določili tudi pri glivi *Fomes fomentarius*, pri kateri so izvlečki ekstracelularnih polisaharidov vsebovali 34,4 % polisaharidov večjih od 6-8 kDa in 0,8 % proteinov ter izvleček intracelularnih polisaharidov 33,2 % polisaharidov in 1,8 % proteinov. Izvleček ekstracelularnih polisaharidov *Schizophyllum commune* je vseboval 58 % polisaharidov in 0,6 % proteinov ter izvleček intracelularnih 52,5 % polisaharidov večjih od 6-8 kDa in 1,7 % proteinov.

Iz vseh navedenih podatkov lahko nedvoumno sklepamo, da izvlečki intracelularnih polisaharidov vsebujejo več proteinov v primerjavi z izvlečki ekstracelularnih polisaharidov. To dejstvo ni presenetljivo, saj vemo, da se intracelularni polisaharidi nahajajo v sami celični steni gliv in kot taki potrebujejo določen delež proteinov za namestitev med ostale komponente celične stene, proteinski del pa naj bi predstavljal tudi nekakšno ogrodje, okoli katerega je nameščena veriga polisaharida. Hitin, hitozan in β -glukani tvorijo fibrile, ki so odgovorne za raztezljivost in rigidnost strukture celične stene (Griffin, 1994).

5.1.2 Monosaharidna sestava polisaharidov

Monosaharidno sestavo hidroliziranih vzorcev ekstracelularnih in intracelularnih polisaharidov smo določili z uporabo tankoplastne tekočinske kromatografije (TLC). Uporabili smo plošče TLC Silica Gel 60 F₂₅₄ dimenzij 10 x 20 cm, na katere smo nanesli po 5 μ L standardov koncentracije 1 mg/mL in po 5 μ L vzorcev koncentracije 1-5 mg/mL. Kot mobilno fazo smo uporabili kombinacijo topil etil acetat: n-propanol: ocetna kislina: H₂O (8:4:4:1, v/v). Plošče smo orosili z raztopino 20 % H₂SO₄ v metanolu in jih segrevali 20 min na 100 °C.

Rezultat so bili kromatogrami, ki kažejo jasno ločitev standardov monosaharidov. Ločimo jih lahko na osnovi njihovih retencijskih faktorjev (R_f) ter prav tako vizualno. Po orositvi z raztopino 20 % H₂SO₄ v metanolu se posamezni monosaharidi značilno obarvajo in to lastnost smo uporabili tudi pri analizi naših vzorcev. Omeniti velja, da med glukozo in manozo nismo dobili značilne razlike med njunimi retencijskimi faktorji, vendar smo analizo delno izvedli zaradi njunega različnega obarvanja. Tako v obstoječi literaturi kot z lastnimi analizami nismo uspeli najti ustrezne mobilne faze, ki bi med seboj popolnoma ločila ta dva monosaharida. Zato smo izvedli analizo z več kombinacijami mobilnih faz:

- aceton: etilmetyl keton: 3 % borova kislina (8:8:5, v/v),
- etil acetat: n-propanol: ocetna kislina: H₂O (4:2:2:1, v/v),
- etil acetat: n-propanol: ocetna kislina: H₂O (8:4:4:1, v/v),
- etil acetat: n-propanol: ocetna kislina, 3 % borova kislina (4:2:2:1, v/v) ter
- aceton: kloroform: H₂O (17:2:1, v/v).

Kot najustreznejšo mobilno fazo glede na dobljeno ločljivost med standardi monosaharidov smo tako z zmanjšanjem deleža vode izbrali kombinacijo etil acetat: n-propanol: ocetna kislina: H₂O (8:4:4:1, v/v).

Za detekcijo smo iskali najustreznejši orositveni reagent, ki bi med seboj čim bolj jasno ločil standarde monosaharidov, še posebej glukoze in manoze. Uporabili smo orositveni reagent, sestavljen iz 0,5 g difenilamina, 0,5 mL anilina, 2,5 mL 85 % fosforne kisline in 25 mL metanola (segrevanje plošče 10min na 120 °C), orositveni reagent iz 4 g difenilamina, 4 mL anilina, 20 mL 85 % fosforne kisline in 200 mL acetona (segrevanje 10 min, 85 °C) ter 250 mg orcinola v 95 mL etanola in 5 mL konc. žveplene kisline (segrevanje 10 min, 100 °C). Za najustreznejši reagent smo izbrali 20 % žvepleno kislino v metanolu s segrevanjem plošče 20 min na 100 °C, saj smo pridobili najboljšo barvno reakcijo in posledično vizualno ločitev standardov monosaharidov.

Splošno gledano so skoraj vsi polisaharidi, ki smo jih izolirali iz izbranih medicinsko pomembnih višjih gliv, v osnovi heteropolisaharidi. To pomeni, da so sestavljeni iz več različnih monosaharidnih enot. Homopolisaharide smo detektirali le pri glivi *G. lucidum*.

V primeru *G. lucidum* lahko sklepamo, da gre pri intracelularnih polisaharidih za β-D-glukane, sestavljene izključno iz glukoze, pri ekstracelularnih polisaharidih pa smo opazili še manjši delež manoze. Kot smo že omenili, med glukozo in manozo nismo dobili ustrezne ločbe, zato gre mogoče pri ekstracelularnih polisaharidih *G. lucidum* prav tako za homopolisaharide β-D-glukanov. V preteklosti je bilo izvedenih kar nekaj raziskav o sestavi polisaharidov *G. lucidum*, ki pa se večinoma nanašajo na polisaharide, izolirane iz plodišča glive, in ne na polisaharide, pridobljenje z gojenjem micelija na trdnih ali v tekočih gojiščih. Za primer naj navedemo raziskavo Baa in sod. (2002), ki je določil monosaharidno sestavo treh polisaharidov, pridobljenih iz plodišča *G. lucidum*. Polisaharid PL-1 poleg največjega deleža D-glukoze (73 %) vsebuje tudi L-ramnozo (6 %) in D-galaktozo (21 %). Ta polisaharid ima molekulsko maso $8,3 \cdot 10^3$. PL-3 je polisaharid velikosti $6,3 \cdot 10^4$ in je sestavljen izključno iz D-glukoze. $2,0 \cdot 10^5$ velik polisaharid PL-4 vsebuje poleg večinskega deleža D-glukoze (93 %) tudi 7 % D-manoze. Po velikosti molekul oz. njihovi molski masi ter prav tako monosaharidni sestavi je našim polisaharidom najbližje β-D-glukan PL-3. Bao in sod. (2001) so analizirali tudi polisaharide iz spor *G. lucidum*. Ugotovili so, da je njihov polisaharid s povprečno molekulsko maso $1,26 \cdot 10^5$ sestavljen izključno iz D-glukoze. Ti podatki se torej ujemajo z rezultati naše analize, saj smo pri intracelularnih polisaharidih detektirali samo D-

glukozo, pri ekstracelularnih pa poleg večinskega deleža D-glukoze še manjši delež D-manoze. Avtorja Scherba in Babitskaya (2008) omenjata v svojem znanstvenem članku monosaharidno sestavo polisaharidov *G. lucidum*, pridobljenih s submerznim načinom gojenja. Vodotopni ekstracelularni polisaharidi so vsebovali 95 % glukoze in 5 % galaktoze, medtem ko so intracelularni vodotopni polisaharidi vsebovali 92 % glukoze, 5 % galaktoze ter 3 % manoze. Pri naši analizi sicer nismo detektirali galaktoze, vendar pa lahko vseeno zasledimo podobnost med zgornjimi rezultati. V njihovi študiji se intracelularni polisaharidi ločijo od ekstracelularnih le po deležu manoze, kar se ujema z rezultati, ki smo jih pridobili z analizo polisaharidov *G. lucidum*. Ker smo kvalitativno sestavo polisaharidov določevali z vizualnim pregledom kromatogramov, ne moremo z gotovostjo trditi, da polisaharidi *G. lucidum* ne vsebujejo galaktoze. Prav tako nismo preverili občutljivosti analizne metode. Obstaja verjetnost, da monosaharidov, ki so bili zastopani v manjših koncentracijah s tovrstno analizo nismo mogli detektirati. V nadaljevanju študije se bo z uporabo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti (HPLC) in z vzporedno analizo s tekočinsko kromatografijo dobilo bolj jasno, nedvoumno monosaharidno sestavo izoliranih izvlečkov.

Pri karakterizaciji polisaharidov *T. versicolor* smo dobili drugačno monosaharidno sestavo. Intracelularni polisaharidi so vsebovali največji delež glukoze in malo manjši delež galaktoze. Pri ekstracelularnih polisaharidih smo poleg glukoze in galaktoze detektirali še manozo (z dokaj močnim signalom) ter arabinozo in fukozo. Wang in sod. (1996) ter Cheng in sod. (1998) so z analizo komercialno uporabljenih proteoglikanov PSP in PSK iz *T. versicolor* ugotovili, da so le-ti sestavljeni večinoma iz glukoze, PSP vsebuje tudi arabinozo in ramnozo ter PSK fukozo. Prisotni so bili tudi monosaharidi galaktoza, manoza in ksiloza. V našem primeru sicer nismo detektirali ramnoze in ksiloze, vendar pa smo dokazali prisotnost vseh ostalih monosaharidov, ki jih omenjajo avtorji. Zanimivo je, da se monosaharida arabinosa in fukoza, sicer značilna za PSP in PSK, v našem primeru pojavljata v ekstracelularnih polisaharidih in ne v intracelularnih, kot je to značilno pri sami komercialni produkciji. Tudi glede na zgradbo izvlečka, ki vsebuje neprimerljivo manj proteinov, kot je zahtevano pri PSP in PSK, lahko trdimo, da naši izolirani polisaharidi iz *T. versicolor* kljub podobni molski masi niso proteoglikani PSP in PSK. Bolj podobne rezultate so dobili Rau in sod. (2009), ki so z gojenjem *T. versicolor* na minimalnem mediju in pri podobnih postopkih izolacije dobili ekstracelularne polisaharide, sestavljene večinoma iz glukoze, detektirali pa so tudi majhne količine galaktoze, manoze, arabinoze in ksiloze. Manjši deleži monosaharidov manoze, ksiloze, galaktoze, ramnoze, arabinoze in fukoze so bili detektirani v izvlečkih *T. versicolor* pri Leeju in sod., 2006. Jeong in sod. (2004) je v izvlečkih, pridobljenih iz plodišča *T. versicolor*, ki niso bili proteoglikani PSP in PSK, dobil identično monosaharidno sestavo polisaharidov, vendar so bili ti različnih molskih mas, kot smo jih določili v naši študiji. Njihovi polisaharidi so vsebovali največji delež glukoze, sledili so galaktoza, manoza, fukoza in arabinosa. Prav takšne rezultate lahko razberemo tudi iz naših kromatogramov. Lin in sod. (2008) je v ekstracelularnih polisaharidih iste glive detektiral glukozo, galaktozo, manozo ter ksilozo. Največjo podobnost z rezultati naše študije zasledimo v analizah Tavaresa in sod. (2005).

Navedeno je, da so ekstracelularni polisaharidi, pridobljeni s submerznim gojenjem na različnih substratih, vsabovali večinski delež glukoze (88–98 %), prav tako pa delež manoze (1,2–7,4 %), ksiloze (0,8–1,6 %), v sledovih pa so opazili tudi ramnozo, arabinozo, galaktozo in fukozo. Nobena od navedenih študij tako ne zadosti popolnoma primerjavi z našimi rezultati. Sklepamo, da smo izolirali nov ekstracelularni polisaharid, ki s svojo kompleksno monosaharidno sestavo zahteva nadaljnje študije svoje zgradbe, tako v smislu organizacije posameznih monosaharidnih enot med seboj kot bolj natančno določitev deleža posameznih monosaharidov, npr. z uporabo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti (HPLC).

Do sedaj še ni bilo izvedenih veliko študij monosaharidne sestave polisaharidov medicinske glive *L. sulphureus*. Omeniti velja raziskavo Alquinija in sod. (2004), v kateri so določali sestavo polisaharidom, izoliranim iz plodišča glive. Njihovi rezultati kažejo na prisotnost heteroglukanov s stranskimi verigami galaktoze, fukoze in manoze, kar se ujema z detektiranimi monosaharidi v naši raziskavi. S tankoplastno tekočinsko kromatografijo smo namreč tako v izvlečkih ekstracelularnih kot intracelularnih polisaharidov *L. sulphureus* detektirali največji delež glukoze, manjši delež galaktoze in fukoze ter tudi manozo. V študiji Kanga in sod. (1982) so polisaharidi iz *L. sulphureus* presenetljivo vsebovali kar 84,5 % fukoze, 3,2 % glukoze in 2,3 % galaktoze ter niso vsebovali manoze. Iz tega lahko sklepamo, da je monosaharid fukoza značilen gradnik polisaharidov iz te zanimive medicinske glive. Pri dobljenih rezultatih v naši raziskavi je prav tako presenetljivo, da je zgradba ekstracelularnih enaka zgradbi intracelularnih polisaharidov. Vendar pa iz teh podatkov ne moremo sklepati na njihovo zgradbo v smislu glavne in stranskih verig, zato bi bilo vredno raziskati, ali se obe vrsti polisaharidov ujemata tudi v tem pogledu.

Pri obeh vrstah polisaharidov iz *F. fomentarius* smo dobili močne signale tako pri glukozi kot pri galaktozi. Pri intracelularnih polisaharidih smo opazili tudi manjši delež fukoze. Wasser in Weis (1999) sicer navajata, da imajo polisaharidi *F. fomentarius*, ki so bili izolirani tako iz gob kot iz submerznega gojenja micelija, obliko β -D-glukanov, ki so sestavljeni izključno iz glukoze. Za ekstracelularne polisaharide, izolirane iz fermentacijske brozge, sestave ne navajata. Boldizsar in sod. (1998) so v polisaharidih *F. fomentarius* detektirali največji delež glukoze (18,9 %), galaktoze (10,4 %), fukoze (1,17 %) in riboze (1,83 %). Ti podatki se, z izjemo riboze, ujemajo z rezultati, pridobljenimi v naši študiji.

Shizophyllan iz medicinske glive *Schizophyllum commune* je homopolisaharid, ki je sestavljen le iz glukoznih enot (Rau in Brandt, 1994). Leathers in sod. (2006) so v svoji raziskavi uporabe različnih substratov pri gojenju te glive opazili drugačno sestavo ekstracelularnih polisaharidov. Ugotovili so, da je sestava odvisna od količine etanola, uporabljenega pri precipitaciji polisaharidov. V frakciji, kjer so dodali supernatantu enak volumen etanola (50 %, v/v) so dobili polisaharid, sestavljen iz 80 % glukoze, 10 % ksiloze, 5 % arabinoze ter 4 % galaktoze. Ob dodatku dvakratnega volumna etanola (67 %,

v/v) se je sestava polisaharida spremenila, in sicer je tak polisaharid vseboval 58 % ksiloze, 29 % arabinoze, 13 % galaktoze ter 0,2 % glukoze. Pri prvi frakciji so ugotovili, da gre za schizophyllan, medtem ko je polisaharid druge frakcije predstavljal arabinoksilan. Pri analizi naših vzorcev iz *S. commune* smo pri ekstracelularnih polisaharidih določili največji delež glukoze, malo manjši galaktoze, opazili pa smo tudi prisotnost fukoze. Intracelularni polisaharidi so vsebovali več galaktoze ter malo manj glukoze.

Po zgoraj navedenih rezultatih vidimo, da ne obstaja študija, v kateri bi v posameznih izvlečkih polisaharidov dobili enake vrste in deleže monosaharidnih enot, kot v primeru izvlečkov, uporabljenih v naši analizi. Primerjava prav tako ni mogoča v celoti, saj se v analizah uporablja različni sevi gliv, različne morfološke oblike, različni pogoji kultivacije, različni substrati, različne priprave izvlečkov za analize in nenazadnje različne metode njihove detekcije. Vse to seveda vpliva na sam potek izgradnje polimerov, pri katerih je še posebej pomembno izpostaviti sestavo medija, uporabljenega za submerzno kultivacijo.

5.1.3 Velikostni rang izoliranih vodotopnih polisaharidov

Za določitev molekulskih mas intracelularnih in ekstracelularnih polisaharidov smo z namenom čim boljše ločbe uporabili dolgo in ozko kolono dimenzij 1,2 x 63 cm. Za zagotovitev čim bolj podobnih pogojev kromatografske ločbe med posameznimi vzorci smo za spiranje uporabili pufer 0,05 M natrijev fosfat z 0,15 M NaCl, pH 7,2. Pretok mobilne faze skozi kolono je bil 1 kaplja/10 sekund. Zbirali smo frakcije volumna 5 mL. Po predhodnem pregledu objav smo se odločili uporabiti nosilec Sepharose CL-4B. Certifikat proizvoda namreč zagotavlja, da nosilec ob ustrezni uporabi ločuje dekstrane molekulskih mas $3 \cdot 10^4$ do $5 \cdot 10^6$. Avtorji več člankov navajajo, da se molekulske mase izoliranih polisaharidov iz ekstraktov izbranih medicinsko pomembnih višjih gliv nahajajo ravno v območju ločevanja tega nosilca.

Za standarde smo uporabili dekstrane z molekulskimi masami $2 \cdot 10^6$ (proizvajalec Sigma-Aldrich), $5 \cdot 10^5$ (proizvajalec Sigma-Aldrich) in $1 \cdot 10^5$ (proizvajalec Fluka). Vsi so bili izolirani iz bakterije *Leuconostoc spp.* V sami specifikaciji ni navedeno, da so namenjeni za uporabo pri gelski filtraciji. Ko smo spremljali njihovo kromatografsko ločbo v posameznih frakcijah, smo opazili, da njihova velikostna sestava ni enotna. V več frakcijah smo namreč dobili neuniformne vrhove različnih višin. Ker se je vseeno dalo videti nekakšen vzorec porazdelitve standardov različnih velikosti po posameznih frakcijah, smo na osnovi višine vrhov določili elucijske volumne ter izračunali porazdelitvene koeficiente K_{av} . Le na osnovi tega smo izoliram polisaharidom s konstrukcijo premice frakcionacijskega ranga lahko približno določili velikostno območje njihovih molekulskih mas. Zavedati se je potrebno, da ti standardi niso primerni za točno določevanje molekulskih mas z gelsko filtracijo. Predlagamo, da se za nadaljnje analize uporabi sicer občutno dražje, vendar bolj zanesljive standarde dekstranov z ustreznimi certifikati analize, ki so posebej primerni kot velikostni standardi pri gelski filtraciji. Vrednosti molskih mas

vseh analiziranih vzorcev so bile manjše od najmanjšega velikostnega standarda, uporabljenega pri določitvi velikosti, tj. $1 \cdot 10^5$ Da.

Z uporabo standardov dekstranov smo torej preko njihovih porazdelitvenih koeficientov določili približne molekulske mase tako ekstracelularnim kot intracelularnim izoliranim polisaharidom. Iz kromatogramov je razvidno, da smo dobili lepe, jasno vidne uniformne vrhove. Le pri intracelularnih polisaharidih *T. versicolor* smo dobili dvojni vrh. V tem primeru smo zaradi majhnih odstopanj, ki so možna posledica le analiznih napak pri merjenju absorpcije oz. same izvedbe določanja koncentracije polisaharidov z žvepleno kislino, za izračun porazdelitvenega koeficiente uporabili samo najvišji vrh. Prav tako smo naredili pri izvlečku intracelularnih polisaharidov *G. lucidum*, pri katerem smo dobili več manjših vrhov. V tem primeru je vzrok najverjetnejše prenizka začetna koncentracija vzorca, ki smo ga nanesli na kolono. Vrednosti absorpcije pri 492 nm so pri tem vzorcu namreč nižje kot pri vseh ostalih vzorcih, prav tako je v primerjavi z bazno linijo najnižja višina vrha. Tako pri intracelularnih polisaharidih *T. versicolor* kot *G. lucidum* sta bili začetni koncentraciji vzorca 2 mg/mL, medtem ko so koncentracije pri ostalih vzorcih variirale v območju od 3 do 8,5 mg/mL. Da bi ugotovili ali je v primeru intracelularnih polisaharidov *G. lucidum* res prisotnih več frakcij različnih molskih mas, bi morali uporabiti drugačen nosilec oz. izboljšati resolucijo z izborom najustreznejše koncentracije in volumna vzorca. Pri vseh ostalih vzorcih smo dobili jasne, dovolj visoke vrhove in tako posledično dobro resolucijo za nadaljnje analize.

Vsem vzorcem smo iz pripadajočih kromatogramov določili elucijske volumne V_e in izračunali porazdelitvene koeficiente K_{av} . Iz enačbe premice frakcionacijskega ranga dekstranov standardnih molekulske mas smo jim določili neznane molekulske mase. Prišli smo do zanimivih zaključkov, da imajo vsi izolirani tako ekstracelularni kot intracelularni polisaharidi molekulsko maso v območju od 27.000 do 85.000 Da. Vrh absorpcije smo pri vseh vzorcih namreč dobili v frakcijah št. 12, 13 ali 14 oz. po 60, 65 ali 70 mL eluiranega volumna mobilne faze. Pri eksperimentu je bila prisotna napaka analitika, saj smo vse korake izvedli manualno. Sem sodi tako nanos vzorca, zbiranje 5 mL frakcij kot tudi analiza vsebnosti koncentracije polisaharidov z žvepleno kislino. Iz samih kromatogramov lahko opazimo tudi rahlo odstopanje pri določitvi celotnega volumna kolone (V_t), ki smo ga zaradi računanja molekulske mas iz enačbe premice frakcionacijskega ranga morali poenotiti na 105 mL. Do tega odstopanja je po vsej verjetnosti prišlo zaradi neenakomerne pretoka skozi kolono, ki je v povprečju sicer znašal 1 kapljo/10 sekund, vendar smo pri postopku opazili rahla odstopanja, še posebej v primerih, ko smo v istem dnevu izvedli dve kromatografski ločbi. Pomemben vpliv na pretok imajo namreč fizikalno-kemijski pogoji v koloni, ki so bistvenega pomena za obnašanje nosilca in posledično za kromatografsko ločbo. V tem smislu predstavlja limitni faktor temperatura kolone oz. nosilca. Temu smo se v največji meri žeeli izogniti, vendar brez avtomatsko regulirane temperature nismo mogli zagotoviti popolnoma homogenega temperaturnega profila v času kromatografske ločbe. Med posameznimi analizami smo kolono z nosilcem shranjevali na + 4 °C, da bi se izognili kontaminacijam. Pred nanosom vzorca smo jo

najmanj 1 uro pustili stati na sobni temperaturi in kasneje sprali z najmanj enim volumnom za kasnejšo analizo uporabljenega pufra. Še vseeno menimo, da je bila v danih pogojih analiza izvedena zelo uspešno, vendar se je vseh teh dejstev potrebno zavedati pri interpretaciji rezultatov. Za nadaljnje analize predlagamo, da se uporabi avtomatizirani način gelske filtracije oz. vsaj kontrolirano zbiranje frakcij z ustreznim lovilcem.

Za rezultat lahko navedemo, da imajo izolirani intracelularni in ekstracelularni polisaharidi molekulske maso med 27.000 in 85.000 Da. Čeprav smo pričakovali bolj pestro distribucijo kromatografskih vrhov, imajo tudi ti rezultati smisel. Pri vseh izvlečkih iz petih medicinsko pomembnih višjih gliv smo namreč uporabili enake pogoje kultivacije, ekstrakcije, izolacije in nenazadnje tudi analize. Sklepamo torej, da vse višje glive, ki jih gojimo, iz njih ekstrahiramo in izoliramo snovi na omenjeni način, producirajo polisaharide, katerih molekulska masa sodi v interval velikosti 27.000–85.000 Da. Prav tako dobimo s tovrstnimi postopki v posameznih izvlečkih polisaharide homogenih velikosti.

PSP in PSK, proteoglikana iz *T. versicolor*, imata molsko maso približno 100 kDa (Yang in sod., 1992; Ng, 1998). Vendar pa ta zanimiva medicinska gliva ne proizvaja samo teh dveh proteoglikanov. Omeniti velja študijo Cuija in sod. (2007), v kateri so analizirali sestavo in velikost tako intracelularnih kot ekstracelularnih polisaharidov dveh različnih sevov *T. versicolor*. V obeh primerih sevov tako pri intracelularnih kot ekstracelularnih polisaharidih poročajo o treh frakcijah različnih velikosti. Pri sevu ATCC-20545 so dobili velikost ekstracelularnih polisaharidov $2,1 \cdot 10^6$ (3,8 % delež), $2,4 \cdot 10^4$ (30 %), $2,7 \cdot 10^3$ (66,2 %) ter velikost intracelularnih polisaharidov $2 \cdot 10^6$ (3,5 % delež), $1,4 \cdot 10^5$ (15 %), $7,1 \cdot 10^3$ (81,5 %). Pri sevu Wr-74 so bile vrednosti malo različne, in sicer za ekstracelularne $2,3 \cdot 10^6$ (2 % delež), $2,6 \cdot 10^4$ (16,8 %), $3 \cdot 10^3$ (82 %) ter za intracelularne polisaharide $2,3 \cdot 10^6$ (2 %), $1,5 \cdot 10^5$ (13 %), $1,2 \cdot 10^4$ (85 %). Največji odstotek v njihovi raziskavi predstavljajo frakcije z najnižjo molekulsko maso. Skoraj v vseh primerih so le-te manjše od 6-8 kDa, kot je bila vrednost izključitvene molekulske mase dializnega črevesa, ki smo ga uporabili v postopku izolacije. Če torej odštejemo frakcijo z najnižjo molekulsko maso, lahko sklepamo, da so vrednosti iz njihove študije ter naše raziskave zelo primerljive. Podobno lahko rečemo za študijo Tavaresa in sod. (2005), v kateri so z gelsko filtracijo določili molsko maso ekstracelularnih polisaharidov *T. versicolor* približno $6,7 \cdot 10^4$ Da. Do primerljivih rezultatov je prišel tudi Wang in sod. (1996), ki je v svoji analizi določil dve visokomolekularni frakciji, in sicer $2,8 \cdot 10^4$ Da za intracelularne ter $1,5 \cdot 10^4$ za ekstracelularne polisaharide *T. versicolor*.

Avtorja Huie in Di (2004) v preglednem članku o *G. lucidum* navajata, da so iz te glive in njenih spor izolirali že več kot 200 različnih polisaharidov. Njihove molekulske mase se gibljejo v razponu od $5,8 \cdot 10^3$ do $7,18 \cdot 10^5$. Po velikosti sta izoliranim polisaharidom v naši raziskavi morda še najbližje polisaharida, izolirana iz plodišča *G. lucidum* PL-3 z molekulske maso $6,3 \cdot 10^4$ (Bao in sod., 2002) ter GL-1 z molekulske maso $4 \cdot 10^4$ (Ukai in sod., 1982). Bao in sod. (2001) so analizirali polisaharide iz spor *G. lucidum*. Ugotovili so,

da so le-te vsebovale polisaharid s povprečno molekulsko maso $1,26 \cdot 10^5$. Mizuno (1998) je v svoji študiji določil sestavo polisaharida iz *G. lucidum*, in sicer gre za β -1,3-glukuronoglukan z molekulsko maso $5,3 \cdot 10^4$. Iz teh podatkov vidimo, da se rang velikosti polisaharidov iz analiziranih izvlečkov *G. lucidum* v veliki meri ujema s podatki predhodnih študij.

Pri *L. sulphureus* je le malo znanega o velikosti njenih polisaharidov. Hwang in sod. (2008) je izvedel analizo z ekstracelularnimi polisaharidi *L. sulphureus*, med drugim tudi študijo molekulske mase z gelsko filtracijo. Tako kot pri nas, so tudi v njihovi raziskavi uporabili nosilec Sepharose CL-4B. Dobili so štiri frakcije, ki so jim s standardi dekstranov določili molekulske mase 263, 43, 5,7 ter 0,6 kDa. Verjetno lahko kot relevantne podatke upoštevamo samo prvi dve frakciji, saj vemo, da Sepharose CL-4B po zagotovilih proizvajalca uspešno ločuje dekstrane od velikosti $3 \cdot 10^4$ do $5 \cdot 10^6$. Zaradi uporabljenega postopka dialize z vrednostjo izključitvene molekulske mase dializnega črevesa 6-8 kDa bi v našem primeru lahko detektirali samo prvi dve frakciji, dejansko pa se z našimi rezultati ujema le druga frakcija. Žal ni na voljo več študij, s katerimi bi lahko izvedli bolj relevantno primerjavo z dobljenimi rezultati naše analize.

Mizuno (1999) navaja, da je molekulsa masa schizophyllana iz medicinske glive *Schizophyllum commune* 450.000 Da. Po monosaharidni sestavi smo ugotovili, da naši izvlečki ne vsebujejo tega polisaharida, kar potrjuje tudi analiza z gelsko filtracijo. V primeru schizophyllana gre za homopolissaharid, sestavljen izključno iz glukoznih enot. Izolirali smo torej manjši in monosaharidno bolj heterogen polisaharid.

Iz navedenih podatkov lahko sklepamo, da se v vsaki raziskavi pridobi polisaharide različnih molskih mas. To je najverjetnejše posledica uporabe različnih sevov, postopkov gojenja, sestave medijev ter kasneje uporabe različnih metod za določitev molske mase. Da se z enakimi postopki izolacije pridobi polisaharide podobnih molskih mas, so ugotovili tudi drugi avtorji. Pacheco-Sanchez in sod. (2006) so preučevali velikost polisaharidov iz dvajsetih različnih višjih gliv, katerim so določili molekulske mase v rangu $6 \cdot 10^5$ do $1,4 \cdot 10^6$. V vseh primerih so uporabili enak postopek izolacije in karakterizacije.

Pridobili smo vodotopne polisaharide, ki so večinoma precej unikatni tako v sestavi monosaharidnih enot, njihovih deležev kot po velikosti molekul. Upamo, da bodo vsaj nekateri med njimi pokazali imunomodulatorno aktivnost na celičnih linijah, kar je logično nadaljevanje zastavljenega eksperimenta. V tem primeru je za kasnejšo aplikacijo nujna bolj zanesljiva določitev monosaharidne sestave in karakterizacija strukture. To omogoča več metod, med drugim plinska kromatografija (GC), tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC), masna spektroskopija (MS), kapilarna elektroforeza (CE), za določitev strukture polimerov in njihove prostorske oblike pa bi lahko uporabili nuklearno magnetno resonanco (NMR), mikroskopijo na atomsko silo (AFM), infrardečo (IR) spektroskopijo in mnoge druge.

5.2 SKLEPI

- Submerzna kultivacija vseh izbranih medicinsko pomembnih višjih gliv (*Ganoderma lucidum*, *Trametes versicolor*, *Fomes fomentarius*, *Laetiporus sulphureus*, *Schizophyllum commune*) je bila uspešna v izbranih gojiščih. V vseh primerih smo pridobili tako ekstra- kot intracelularne polisaharide.
- Z ekstrakcijo in izolacijo smo pridobili izvlečke, ki so vsebovali od 21,0 do 69,7 % polisaharidov, večjih od 6-8 kDa, ter 0,3 – 4,1 % proteinov. Večji delež proteinov so vsebovali izvlečki intracelularnih polisaharidov.
- Vsi izolirani vodotopni polisaharidi vsebujejo več kot eno vrsto monosaharidnih enot, zato spadajo v skupino heteropolisaharidov. Izjema so intracelularni polisaharidi iz glive *Ganoderma lucidum*, ki so sestavljeni izključno iz glukoznih enot.
- Izvleček ekstracelularnih polisaharidov ter prav tako izvleček intracelularnih polisaharidov *Laetiporus sulphureus* vsebuje monosaharidne enote glukoze, galaktoze, fukoze in manoze.
- Ekstracelularni polisaharidi *Trametes versicolor* so sestavljeni iz glukoze, galaktoze, manoze, fukoze in arabinoze. Intracelularni vodotopni polisaharidi pa iz glukoze in galaktoze.
- Izvleček vodotopnih ekstracelularnih polisaharidov *Schizophyllum commune* vsebuje enote glukoze, galaktoze in fukoze, intracelularnih polisaharidov pa enote galaktoze in glukoze.
- Ekstracelularni polisaharidi glive *Ganoderma lucidum* so sestavljeni iz monosaharidnih enot glukoze in manoze, medtem ko so intracelularni polisaharidi zgrajeni izključno iz glukoze.
- Iz glive *Fomes fomentarius* smo pridobili izvlečke ekstracelularnih polisaharidov, sestavljenih iz glukoze in galaktoze, ter izvlečke intracelularnih polisaharidov iz glukoze, galaktoze in fukoze.
- Vsi izolirani, tako ekstracelularni kot intracelularni polisaharidi, imajo molekulsko maso v območju od 27.000 do 85.000 Da. Natančnejših vrednosti z uporabo tovrstnih standardov dekstranov ne moremo določiti.
- Vse medicinsko pomembne višje glive, ki jih gojimo, iz njih ekstrahiramo in izoliramo polisaharide z načinom uporabljenim v naši študiji, producirajo polisaharide približno enakih molekulskih mas, vendar različnih monosaharidnih sestav.

- V do sedaj objavljenih znanstvenih analizah karakterizacije vodotopnih polisaharidov iz medicinsko pomembnih višjih gliv, v primeru vseh v naši raziskavi uporabljenih vrst, ni zaslediti identične monosaharidne sestave in velikosti izoliranih ekstracelularnih in intracelularnih polisaharidov.
- Za kasnejšo aplikacijo je nujna natančnejša določitev monosaharidne sestave ter kvantifikacija posameznih vsebovanih monosaharidov. Prav tako je potrebno izvesti karakterizacijo strukture v smislu velikosti in pripadajočih konformacij polisaharidov v posameznih izvlečkih.

6 POVZETEK (SUMMARY)

6.1 POVZETEK

Višje glive iz rodu prostotrosnic se uporabljajo v medicinske namene že več tisočletij. V zadnjih letih se s tem namenom komercialno goji več vrst višjih gliv (Wasser in Weis, 1999). Veliko študij je s proučevanjem delovanja njihovih aktivnih učinkovin, še posebej polisaharidov, pokazalo, da lahko le-te vplivajo na več komponent imunskega sistema, kot so antigen-predstavljivne celice, celice naravne ubijalke ter T in B celice.

V diplomskem delu smo izolirali in karakterizirali vodotopne polisaharide iz medicinsko pomembnih višjih gliv *Ganoderma lucidum*, *Trametes versicolor*, *Fomes fomentarius*, *Schizophyllum commune* in *Laetiporus sulphureus*, pridobljenih s submerznim postopkom kultivacije. Namen dela je bil določiti monosaharidno sestavo ter molekulsko maso posameznim polisaharidom, tako ekstracelularnim kot intracelularnim. Za določitev molekulske mase smo uporabili gelsko filtracijo oz. kromatografijo z ločevanjem po velikosti. Monosaharidno sestavo smo v izvlečkih določili s tankoplastno tekočinsko kromatografijo (TLC).

Po treh tednih kultivacije smo micelij s filtriranjem ločili od fermentacijske brozge. To smo najprej koncentrirali in polisaharide precipitirali z dodatkom 3-kratnega volumna etanola. Intracelularne polisaharide smo ekstrahirali v dodano vodo s toplotno obdelavo micelija. Prvo ekstrakcijo smo izvedli s triurnim kuhanjem na 100 °C. Micelij smo znova filtrirali in izvedli drugo ekstrakcijo pri 121 °C in 1h. Po filtraciji smo ob tekočini z vsebovanimi intracelularnimi polisaharidi združili, koncentrirali in izvedli enak postopek precipitacije kot za ekstracelularne polisaharide. Naslednji dan smo oborjene polisaharide očistili z uporabo 85 % etanola ter jih posušili z vakuumskim sušilnikom. Čez noč smo jih shranili na -20 °C, s čimer smo do neke mere odstranili proteine. Naslednji dan smo izvlečke stehtali in jih 4 ure raztopljal v 100-kratni količini vode. Da smo pridobili le vodotopne polisaharide, smo raztopino centrifugirali in supernatant znova posušili na vakuumskem sušilniku. Do analiz smo izvlečke shranili na -20 °C.

Izvlečkom smo določili vsebnost proteinov in vodotopnih polisaharidov. Vsebnost proteinov smo določili z reakcijo po Bradfordu (1976), pri kateri smo kot standard uporabili goveji serumski albumin (BSA). Za določitev vsebnosti sladkorjev smo uporabili modifikacijo reakcije po Duboisu in sod. (1956) v izvedbi v mikrotitrski ploščici (Masuko in sod., 2005), kot standard smo uporabili raztopine glukoze. Predvsem za določitev vrednosti polisaharidov smo vzorce predhodno ločeno dializirali 48 ur v dializnem črevesu z izključitveno molekulsko maso 6-8 kDa. Tako smo zagotovili, da se v našem vzorcu nahajajo le polisaharidi z večjo molekulsko maso od 6-8 kDa. Vse analize smo izvedli v treh ponovitvah. Izvlečki so vsebovali od 21,0 do 69,7 % polisaharidov, večjih od 6-8 kDa, ter 0,3–4,1 % proteinov. Ker intracelularni polisaharidi predstavljajo struktorno komponento celične stene, so ti izvlečki vsebovali večje količine proteinov kot izvlečki ekstracelularnih polisaharidov.

Monosaharidno sestavo smo določili s tankoplastno tekočinsko kromatografijo predhodno hidroliziranih vzorcev z uporabo standardov monosaharidov (glukoza, manoza, galaktoza, fukoza, ksiloza, ramnoza, arabinoza in riboza). Pri vseh izvlečkih, razen pri izvlečku intracelularnih polisaharidov *G. lucidum*, smo ugotovili, da gre za heteropolisaharide, saj vsebujejo več kot le eno različno monosaharidno enoto. Oba izvlečka polisaharidov *Laetiporus sulphureus* vsebujeta monosaharidne enote glukoze, galaktoze, fukoze in manoze. Ekstracelularni polisaharidi *Trametes versicolor* so sestavljeni iz glukoze, galaktoze, manoze, fukoze in arabinoze. Intracelularni vodotopni polisaharidi pa iz glukoze in galaktoze. Izvleček vodotopnih ekstracelularnih polisaharidov *Schizophyllum commune* vsebuje enote glukoze, galaktoze in fukoze, intracelularnih polisaharidov pa enote galaktoze in glukoze. Ekstracelularni polisaharidi gline *Ganoderma lucidum* so sestavljeni iz monosaharidnih enot glukoze in manoze, medtem ko so intracelularni polisaharidi zgrajeni izključno iz glukoze. Iz gline *Fomes fomentarius* smo pridobili izvlečke ekstracelularnih polisaharidov, sestavljenih iz glukoze in galaktoze, ter izvlečke intracelularnih polisaharidov iz glukoze, galaktoze in fukoze. Po pregledu do sedaj objavljenih monosaharidnih struktur polisaharidov, razen v primeru *G. lucidum*, nismo našli identičnih podatkov za izbrane višje gline. Predvidevamo, da smo izolirali nove vrste polisaharidov, kar potrjujejo tudi podatki iz analize določevanja molekulske mase.

Za določitev molekulske mas intracelularnih in ekstracelularnih polisaharidov smo uporabili kolono dimenzijs $1,2 \times 63$ cm, ki je bila napolnjena z nosilcem Sepharose CL-4B, za katerega je značilno, da ločuje dekstrane molekulske mas od $3 \cdot 10^4$ do $5 \cdot 10^6$. Za spiranje smo uporabili 0,05M fosfatni pufer v 0,15M NaCl (končni pH 7,2). Pretok mobilne faze je bil 1 kaplja/10 sekund. Zbirali smo frakcije volumna 5 mL. Uporabili smo standarde dekstranov velikosti $2 \cdot 10^6$, $5 \cdot 10^5$ in $1 \cdot 10^5$ ter iz pridobljenih vrednosti njihovih elucijskih volumnov pripravili krivuljo, iz katere smo vzorcem določili neznane molekulske mase. Vsi izolirani, tako ekstracelularni kot intracelularni polisaharidi, imajo molekulsko maso v območju od 27.000 do 85.000 Da. Natančnejših vrednosti z uporabo tovrstnih standardov dekstranov ne moremo določiti, vendar pa sklepamo, da s tovrstnimi postopki izolacije in karakterizacije v vseh primerih pridobimo polisaharide, ki sodijo v omenjeni velikostni interval. Da se z enakimi postopki izolacije pridobi polisaharide podobnih molskih mas, so ugotovili tudi drugi avtorji (Pacheco-Sanchez in sod., 2006).

Rezultat diplomske naloge so izvlečki vodotopnih polisaharidov, ki bodo uporabljeni v kasnejših študijah imunomodulatorne aktivnosti na različnih celičnih linijah. Ker so unikatne monosaharidne sestave in pripadajočih velikosti, morda obetajo novo možnost za uporabo v terapevtske namene. V tem primeru je potrebna bolj natančna karakterizacija tako strukture kot konformacije teh zanimivih polimerov.

6.2 SUMMARY

Higher *Basidiomycete* mushrooms have been used in traditional folk medicine throughout the world since ancient times. In the past decade, several medicinal active Basidiomycetes were developed commercially (Wasser and Weis, 1999). Numerous studies have shown that their polysaccharide extracts modulate many components of the immune system such as the antigen-presenting cells, NK cells, T and B lymphocytes.

In this study we isolated and characterized water-soluble polysaccharides from mushrooms *Ganoderma lucidum*, *Trametes versicolor*, *Fomes fomentarius*, *Schizophyllum commune* and *Laetiporus sulphureus*, cultivated by submerged fermentation. We investigated the chemical composition and molecular weight of the polysaccharides in the water extracts isolated from the mycelia (intracellular polysaccharides, ICP) and from the cultivation media (extracellular polysaccharides, ECP). Gel filtration was used for molecular weight determination. In order to analyze the polysaccharide compounds, the monosaccharides were detected by Thin-Layer Chromatography (TLC).

After three weeks of cultivation, mycelia was separated from the culture media by filtration. Media was concentrated under reduced pressure and polysaccharides were isolated through ethanol precipitation by adding three times of volume of 96% ethanol. Filtered mycelia was extracted twice with water, first at 100°C for 3 hours and then at 121°C for 1 hour. After removal of mycelia by vacuum filtration, both extraction liquids were combined and concentrated by rotary evaporation under reduced pressure at 50 °C. The subsequent precipitation protocol was then the same as for the extracellular fraction. The next day, the precipitated polysaccharides were centrifuged (9000 rpm, 10min) and washed with 85 % ethanol to remove low-molecular substances. The extracts were then dried using a vacuum dryer and stored overnight at -20°C, for removal of free proteins. The extracts were weighed and dissolved in 100 volumes of water in order to obtain the water-soluble fraction. Insoluble fraction was removed by centrifugation (9000 rpm, 10 min). Supernatant was dried again using the vacuum dryer and stored at -20°C for further analyses.

The total water-soluble carbohydrate and protein content were quantified by the phenol-sulfuric acid method in microplate format with glucose as a standard (Masuko et al., 2005) and Bradford assay with bovine serum albumin (BSA) as the standard (Bradford, 1976), respectively. Before the analyses, the resulting aqueous fraction was extensively dialyzed against distilled water for 48 hours (M_w cut-off 6-8 kDa). All measurements were carried out in triplicates. The extracts were composed of 21,0 – 69,7 % polysaccharides larger than 6-8 kDa and 0,3 – 4,1 % of proteins. The water-soluble extracts from mycelia seemed to have higher protein content than the ones from the culture media due to their structural function in the fungi cell wall.

Monosaccharide composition analysis was carried out by thin-layer chromatography (TLC) using hydrolyzates of polysaccharides and standard monosaccharides (glucose,

xylose, galactose, fucose, manose, arabinose, rhamnose and ribose). All the extracts, except *Ganoderma lucidum* intracellular polysaccharides, were composed of more than one monosaccharide and can be determined as heteropolysaccharides. Both extracts of *Laetiporus sulphureus* were composed of four monosaccharides: glucose, galactose, fucose and manose. Extracellular polysaccharides of *Trametes versicolor* were composed of glucose, galactose, manose, fucose and arabinose and the intracellular were composed of glucose and galactose. The water-soluble extracellular polysaccharides of *Schizophyllum commune* contained glucose, galactose and fucose while the intracellular were comprised of galactose and glucose. TLC of the *Ganoderma lucidum* extracts had showed that extracellular polysaccharides contained glucose and manose, while intracellular are composed only of glucose. *Fomes fomentarius* extracellular polysaccharides were composed of glucose and galactose and the intracellular of glucose, galactose and fucose. In comparison with other researchers, we have not found identical monosaccharide composition in any of analysed extracts except of intracellular polysaccharides from *Ganoderma lucidum*. Considering the results of monosaccharide composition and molecular weight determination, we propose that we have isolated new water-soluble polysaccharides from cultivated higher fungi.

The molecular weights of intracellular (ICP) and extracellular polysaccharides (ECP) were determined by gel-filtration chromatography on a Sepharose CL-4B column (1,2 x 63 cm), eluted with 0,05M sodium phosphate buffer with 0,15M NaCl, pH 7,2, at a flow rate of 1 drop/10 seconds. We were collecting 5 mL fractions, using the same phenol-sulphuric method to monitor the polysaccharide content. The Sepharose CL-4B separates dextrans by molecular size over a range of $3 \cdot 10^4$ to $5 \cdot 10^6$ daltons. The molecular mass was estimated by reference to a calibration curve made from a set of dextran standards of known molecular mass ($2 \cdot 10^6$, $5 \cdot 10^5$ and $1 \cdot 10^5$ Da). The molecular weight of all the polysaccharides was estimated to be in range of 27.000 to 85.000 Da. We can assume that, as a result of the same procedure being used for the extraction of water-soluble polysaccharides and subsequently, their isolation and characterization, all the extracts will show a single peak with highly similar estimated molecular weight. Indeed, the polysaccharides showed a homogeneous weight distribution (a single narrow peak). Similar result was found also in other studies (Pacheco-Sánchez et al., 2006).

Our goal was to isolate and to characterize water-soluble extracts containing extracellular and intracellular polysaccharides from several different medical important higher fungi. Further research will characterize those extracts to provide additional evidence of immunomodulatory activity using different cell lines. Moreover, the isolated polysaccharides differ in terms of monosaccharide composition, protein content, and average molecular weight in comparison to the well-known mushroom-derived commercially produced polysaccharides. If there would be evidence of biological activity, it is necessary to determine more accurately their molecular mass, the degree of branching as well as the ultrastructure and conformation, using other more sophisticated methods.

7 VIRI

- Alquini G., Carbonero E.R., Rosado F.R., Cosentino C., Iacomini, M. 2004. Polysaccharides from the fruit bodies of the basidiomycete *Laetiporus sulphureus* (Bull.: Fr.) Murr. *FEMS Microbiology Letters*, 230: 47-52
- Bae J.T., Park J.P., Song C.H., Yu C.B., Park M.K., Yun J.W. 2001. Effect of carbon source on the mycelial growth and exo-biopolymer production by submerged culture of *Paecilomyces japonica*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 91: 522–524
- Bao X., Fang J., Li X. 2001. Structural Characterization and Immunomodulating Activity of a Complex Glucan from Spores of *Ganoderma lucidum*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 65, 11: 2384-2391
- Bao X.F., Wang X.S., Dong Q., Fang J.N., Li X.Y. 2002. Structural features of immunologically active polysaccharides from *Ganoderma lucidum*. *Phytochemistry*, 59: 175-181
- Battle J., Ha T.Z., Li C.F. 1998. Ligand binding to the (1-3)-beta-D-glucan receptor stimulates NF-kappa B activation, but not apoptosis in U937 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 2149: 499-504
- Berovic M., Habijanic J., Zore I., Wraber B., Hodzar D., Boh B., Pohleven F. 2003. Submerged cultivation of *Ganoderma lucidum* biomass and immunostimulatory effects of fungal polysaccharides. *Journal of Biotechnology*, 103: 77–86
- Bluhm T.L., Sarco A. 1977. The triple helical structure of lentinan, a β -(1-3)-D-glucan. *Canadian Journal of Chemistry*, 55: 293-299
- Bohn J.A., BeMiller J.N. 1995. (1-3)- β -D-glucans as biological response modifiers: a review of structure-functional activity relationships. *Carbohydrate Polymers*, 28: 3-14
- Boldizsar I., Horvath K., Szedlay G., Molnar-Perl I. 1998. Simultaneous GC-MS quantitation of acids and sugars in the hydrolyzates of immunostimulants, water soluble polysaccharides of *Basidiomycetes*. *Chromatographia*, 47: 413-419
- Bradford M.M. 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analitical Biochemistry*, 72: 248-254
- Chang R.Y. 1995. Effective dose of *Ganoderma* in humans. V: *Ganoderma: Systematics, Phytopathology and Pharmacology: Proceedings of Contributed Symposium 59 A,B.. 5th International Mycological Congress, Vancouver*: 101-113
- Chang R.Y. 1999. Role of *Ganoderma* supplementation in cancer management. V: *Advanced Research in PSP*. Yang Q.Y. (ur.). Hong Kong, The Hong Kong Association for Health Care Ltd.: 346-350
- Chen W., Zhao Z., Chen S.F., Li Y.-Q. 2008. Optimization for the production of exopolysaccharide from *Fomes fomentarius* in submerged culture and its antitumor effect in vitro. *Bioresource Technology*, 99: 3187–3194
- Cheng G.Y., Wu G.R., Zhou Y.Z., Cheng S.L. 1998. Extraction and characterization of proteoglycan from the mycelium of *Polystictus versicolor* (L.) Fr. by submerged culture. *Zhiwu Ziyuan Yu Huanjing*, 7, 4:19–23

- Cho E.J., Oh J.Y., Chang H.Y., Yun J.W. 2006. Production of exopolysaccharides by submerged mycelial culture of a mushroom *Tremella fuciformis*. Journal of Biotechnology, 127: 129–140
- 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 and Biotechnology, 34: 393–402
- Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A., Smith F. 1956. A Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. Analytical Chemistry, 28: 350-356
- Fukushima M. 1989. The overdose of drugs in Japan. Nature, 342: 850-851
- Gao Q.P., Seljelid R., Chen H.Q., Jiang R. 1996. Characterization of acidic heteroglycans from *Tremella fuciformis* Berk. with cytokine stimulating activity. Carbohydrate Research, 228: 135-142
- Gao Y., Zhou S. 2001. The immuno-modulating effects of *Ganoderma lucidum*. International Journal of Medicinal Mushrooms, 4: 1-11
- Goubet F., Jackson P., Deery M.J., Dupree P. 2002. Polysaccharide Analysis Using Carbohydrate Gel Electrophoresis: A Method to Study Plant Cell Wall Polysaccharides and Polysaccharide Hydrolases. Analytical Biochemistry, 300: 53-68
- Griffin D.H. 1994. Fungal Physiology. 2. izdaja. New York, Wiley-Liss Inc.: 468 str.
- Grün D.H. 2003. Structure and biosynthesis of fungal α -glucans. Doktorska disertacija. Utrecht University: 144 str.
- Halpern G.M. 2007. Healing Mushrooms: ancient wisdom for better health. New York, Square One Publishers: 182 str.
- Hawksworth D.L. 1991. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. Mycological Research, 95: 641–655
- Hobbs C. 1995. Medicinal Mushrooms: An Exploration of Tradition, Healing and Culture. Santa Cruz, CA, Botanica Press, 251 str.
- Huie C.W., Di X. 2004. Chromatographic and electrophoretic methods for Lingzhi pharmacologically active components. Journal of Chromatography B, 812: 241–257
- Hwang H.S., Lee S.H., Baek Y.M., Kim S.W., Jeong Y.K., Yun J.W. 2008. Production of extracellular polysaccharides by submerged mycelial culture of *Laetiporus sulphureus* var. *miniatus* and their insulinotropic properties. Applied Microbiology and Biotechnology, 78, 3: 419-42
- Ikuzawa M., Matsunaga K. 1988. Fate and distribution of an antitumour protein-bound polysaccharide PSK (Krestin). International Journal of Immunopharmacology, 10: 415-423
- Imazeki R., Hongo T. 1998. V: Colored illustrations of mushrooms of Japan. Japonska, Osaka, Hoikusha: 141-142
- Ito H., Sugiura M., Miyazaki T. 1976. Antitumor polysaccharide fraction from the culture filtrate of *Fomes fomentarius*. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 24: 2575

- Jeong S.C., Yang B.K., Ra K.S., Wilson M.A., Cho Y., Gu Y.A., Song C.H. 2004. Characteristics of anti-complementary biopolymer extracted from *Coriolus versicolor*. Carbohydrate Polymers, 55:255–263
- Jong S.C., Birmingham J.M., Pai S.H. 1983. Immunomodulatory substances of fungal origin. Journal of Immunological Immunopharmacology, 11: 115-122
- Jong S.C., Birmingham, J.M. 1992. Medicinal benefits of the mushroom *Ganoderma*. Advances in Applied Microbiology, 37: 101-134
- Jong S., Yang X. 1999. PSP – a powerful biological response modifier from the mushroom *Coriolus versicolor*. V: Advanced Research in PSP. Yang Q. (ur.). Kitajska, Hong Kong Association for Health Care Ltd.: 16-28
- Kang C.Y., Lee C.O., Chung K.S., Choi E.C., Kim B.K. 1982. An Antitumor Component of *Laetiporus sulphureus* and its Immunostimulating Activity. Archives of Pharmacal Research, 5, 2: 39-43
- Kato M., Hirose K., Hakozaki M., Ohno M., Saito Y., Ixutani R., Noguchi J., Hori Y., Okumoto S., Kuroda D., Nomura H., Nishimatsu S., Ohyanagi H. 1995. Induction of gene expression for immunomodulating cytokines in peripheral blood mononuclear cells in response to orally administered PSK, an immunomodulating protein-bound polysaccharide. Cancer Immunology and Immunotherapy, 40: 152-156
- Kidd P.M. 2000. The use of mushroom glucans and proteoglycans in cancer therapy. Alternative Medicine Review, 5: 4-17
- Kino K., Sone T., Watanabe J. 1991. Immunomodulator, LZ-8, prevents antibody production in mice. International Journal of Immunopharmacology, 13: 1109-1115
- Komoda Y., Shimizu M., Sonoda Y., Sato Y. 1989. Ganoderic acid and its derivatives as cholesterol synthesis inhibitors. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 37: 531–533
- Kraus J., Franz G. 1991. β (1-3) Glucans: anti-tumour activity and immunostimulation. V: In Fungal Wall and Immune Response, NATO ASI Series H53. Latge J.P., Boucias D. (ur.). Berlin, Springer: 39-42
- Kumari M., Survase S.A., Singhal R.S. 2008. Production of schizophyllan using *Schizophyllum commune* NRCCM. Bioresource Technology, 99: 1036–1043
- Leathers T.D., Nunnally M.S., Price N.P. 2006. Co-production of schizophyllan and arabinoxylan from corn fiber. Biotechnology Letters, 28: 623–626
- Lee S., Park S., Oh J.W., Yang C. 1998. Natural inhibitors for protein prenyltransferase. Planta Medica, 64: 303–308
- Lee J.S. 2005. Effects of *Fomes fomentarius* supplementation on antioxidant enzyme activities, blood glucose, and lipid profile in streptozotocin-induced diabetic rats. Nutrition Research Reviews, 25: 187–195
- Lee C.L., Yang X., Wan J.M.F. 2006. The culture duration affects the immunomodulatory and anticancer effect of polysaccharopeptide derived from *Coriolus versicolor*. Enzyme and Microbial Technology, 38:14–21
- Li K.Y. 1999. Advances in immunomodulating studies of PSP. V: Advanced Research in PSP 1999. Yang Q.Y. (ur.). Hong Kong, Hong Kong Association for Health Care Ltd.: 39-46

- Lin F.Y., Lai Y.K., Yu H.C., Chen N.Y., Chang C.Y., Lo H.C., Hsu T.H. 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: 446–453
- Lindequist U., Niedermeier T.H.J., Julich W.D. The Pharmacological Potential of Mushrooms. 2005. Evidence-based Complementary and Alternative Medicine, 2, 3: 285–299
- Liu F., Ooi V.E.C., Liu W.K., Chang S.T. 1996. Immunomodulation and antitumor activity of polysaccharide-protein complex from culture filtrates of a local edible mushroom, *Tricholoma lobayense*. *General Pharmacology*, 27: 621-624
- Maeda Y.Y., Watanabe S.T., Chihara C., Rokutanda M. 1988. Denaturation and renaturation of a β -1,6;1,3-glucan, lentinan, associated with expression of T-cell-mediated responses. *Cancer Research*, 48: 671-675
- Masuko T., Minami A., Iwasaki N., Majima T., Nishimura S.I., Lee Y.C. 2005. Carbohydrate analysis by a phenol-sulfuric acid method in microplate format. *Analytical Biochemistry*, 339: 69–72
- Mizuno T. 1998. Bioactive substances in Yamabushitake, the *Hericium erinaceum* fungus, and its medicinal utilization. *Food and Food Ingredient Japanese Journal*, 167: 69-81
- Mizuno T. 1999. The extraction and development of antitumour-active polysaccharides from medicinal mushrooms in Japan. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 1: 9-29
- Morigiwa A., Kitabatake K., Fujimoto Y., Ihekawa N. 1986. Angiotensin converting enzyme inhibitory triterpenes from *Ganoderma lucidum*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 34: 3025–3028
- Ng T.B. 1998. A review of research on the protein-bound polysaccharide (polysaccharopeptide, PSP) from the mushroom *Coriolus versicolor* (*Basidiomycetes: Pyporaceae*). *General Pharmacology*, 30: 1-4
- Okazaki M., Adachi Y., Ohno N., Yadomae T. 1995. Structure-activity relationship of (1-3)- β -D-glucan in the induction of cytokine production from macrophages in vitro. *Biological Pharmacological Bulletin*, 18: 1320-1327
- Ooi V.E.C., Liu F. 2000. Immunomodulation and anticancer activity of polysaccharide-protein complexes. *Current Medicinal Chemistry*, 7: 715-728
- Pacheco-Sanchez M., Boutin Y., Angers P., Gosselin A., Tweddell R.J. 2006. A bioactive (1→3)-, (1→4) β -D-glucan from *Collybia dryophila* and other mushrooms. *Mycologia*, 98, 2:180–185
- Park Y.M., Kim I.T., Park H.J., Choi J.W., Park K.Y., Lee J.D., Nam B.H., Kim D.G., Lee J.Y., Lee K.T. 2004. Anti-inflammatory and anti-nociceptive effects of the methanol extract of *Fomes fomentarius*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 27: 1588–1593
- Preneta A.Z. 1989. Separation on the basis of size: gel permeation chromatography. V: Protein purification methods – a practical approach. Harris E.L.V., Angal S. (ur.) UK, IRL Press: 293-306
- Radic N., Injac R., Strukelj B. 2009. Sulphur Tuft Culinary-Medicinal Mushroom, *Laetiporus sulphureus* (Bull.: Fr.) Murrill (Aphyllophoromycetideae): Bioactive

- Compounds and Pharmaceutical Effects (Review). International Journal of Medicinal Mushrooms, 11, 2: 103–116
- Rau U., Muller R.J., Cordes K., Klein J. 1990. Process and molecular data of branched 1,3- β -D glucans in comparison with xanthan. Bioprocess Engineering, 5: 89–93
- Rau U., Gura E., Oleszewski E., Wagner F. 1992. Enhanced glucan formation of filamentous fungi by effective mixing, oxygen limitation and fed-batch processing. Journal of Industrial Microbiology, 9: 19–26
- Rau U., Brandt C. 1994. Oxygen controlled batch cultivation of *Schizophyllum commune* for enhanced production of branched b-1,3- glucans. Bioprocess Engineering, 11: 161–165
- Rau U., Kuenz A., Wray V., Nimtz M., Wrenger J., Cicek H. 2009. Production and structural analysis of the polysaccharide secreted by *Trametes (Coriolus) versicolor* ATCC 200801. Applied Microbiology and Biotechnology, 81: 827–837
- Reshetnikov S.V., Wasser S.P., Tan K.K. 2001. Higher Basidiomycetes as a source of antitumour and immunostimulating polysaccharides (Review). International Journal of Medicinal Mushrooms, 3: 361-394
- Saito H., Yoshioka Y., Uchara N., Aketagawa J., Tanaka S., Shibata Y. 1991. Relationship between conformation and biological response for (1->3)- β -D-glucans in the activation of coagulation Factor G from limulus amebocyte lysate and host-mediated antitumour activity. Demonstration of single-helix conformation as a stimulant. Carbohydrate Research, 217: 181- 190
- Sakagami H., Aoki T. 1991. Induction of immunopotentiation activity by a protein-bound polysaccharide. PSK (review). Anticancer Research, 11: 993-1000
- Samorini G. 2001. New data on the ethnomycology of psychoactive mushrooms. International Journal of Medicinal Mushrooms, 3: 257-278
- Sassaki G.L., de Souza L.M., Cipriani T.R., Iacomini M. 2008. TLC of Carbohydrates. V: Thin Layer Chromatography in Phytochemistry. Waksmundzka-Hajnos M. in sod. (ur.). ZDA, CRC Press: 255-276
- Sasaki T., Takasuka N. 1976. Further study of the structure of lentinan, an antitumour polysaccharide from *Lentinus edodes*. Carbohydrate Research, 47: 99-104
- Scherba V.V., Babitskaya V.G. 2008. Polysaccharides of Xylotrophic Basidiomycetes. Applied Biochemistry and Microbiology, 44, 1: 78–83
- Sharon N., Lis H. 1993. Carbohydrates in cell recognition. Scientific American Journal, 74-81
- Smith J.E., Rowan N.J., Sullivan R. 2002. Medicinal Mushrooms: Their therapeutic properties and current medical usage with special emphasis on cancer treatments. Special Report Commissioned by Cancer Research, UK.
http://sci.cancerresearch.org/labs/med_mush.html (12. nov. 2008)
- Stamets P. 2000a. Growing gourmet and medicinal mushrooms. 3. izdaja. ZDA, Kalifornija, Ten Speed Press: 574 str.
- Stamets P. 2000b. MycoMedicinals, an informative booklet on medicinal mushrooms. 3. izdaja. Washington, MycoMedia, Olympia: 46 str.

- Su C.Y., Shiao M.S., Wang C.T. 1999. Predominant inhibition of ganodermic acid S on the thromboxane A2-dependent pathway in human platelets response to collagen. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1, 437: 223–234
- Tanaka S., Ko K., Kino K., Tsuchiya K., Yamashita A., Murasugi A., Sakuma S., Tsunoo H. 1989. Complete amino acid sequence of an immunomodulatory protein, ling zhi-8 (LZ-8). An immunomodulator from a fungus, *Ganoderma lucidum*, having similarity to immunoglobulin variable regions. *Journal of Biological Chemistry*, 264: 16372-16377
- Tavares A., Agapito M., Coelho M., Lopes da Silva J., Barros-Timmons A., Coutinho J., Xavier A. 2005. Selection and optimization of culture medium for exopolysaccharide production by *Coriolus (Trametes) versicolor*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21:1499–1507
- Tsukagoshi S. 1984. Krestin (PSK). *Cancer Treatment Reviews*, 11: 131-155
- Tzianabos A. 2000. Polysaccharide immunomodulators as therapeutic agents: structural aspects and biologic function. *Clinical Microbiology Reviews*, 13: 523-533
- Ueno S., Yoshikumi C., Hirose F., Omura Y., Wada T., Fujii T. 1980. Method of producing nitrogen-containing polysaccharides. US Patent, 4 202 969
- Ukai S., Yokoyama S., Hara C., Kiho T. 1982. Structure of an alkalisoluble polysaccharide from the fruit body of *Ganoderma japonicum* Lloyd. *Carbohydrate Research*, 105, 2: 237–24
- Wang H.X., Ng T.B., Liu W.K., Ooi V.E.C., 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 & Cell Biology*, 28: 601–607
- Wang S.Y., Hsu M.L., Hsu H.C., Tzeng, S.S., Lee, S.S., Shiao, M.S., Ho, C.R. 1997. The antitumour effect of *Ganoderma lucidum* is mediated by cytokines released from activated macrophages and T-lymphocytes. *International journal of cancer*, 70, 6: 669-705
- Wang Q., Fang Y. 2004. Analysis of sugars in traditional Chinese drugs. *Journal of Chromatography B*, 812: 309–324
- Wasser S.P., Weis A.L. 1999. Medicinal properties of substances occurring in higher *Basidiomycete* mushrooms: current perspectives (review). *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 1: 31-62
- Wasson R.G. 1978. The wondrous mushroom: mycolatry to Mesoamerica. New York, McGraw-Hill: 248 str.
- Weber R.W.S., Mucci A., Davoli P. 2004. Laetiporic acid, a new polyene pigment from the wood-rotting basidiomycete *Laetiporus sulphureus* (*Polyporales*, *Fungi*). *Tetrahedron Letters*, 45: 1075–1078
- Yanaki T., Ito W., Tabata K. 1986. Correlation between antitumor activity of schizophyllan and its triple helix. *Agriculture & Biological Chemistry*, 509: 2415-2416
- Yang Q.Y., Jong S.C., Li X.Y., Zhou J.X., Chen R.T., Xu L.Z. 1992. Antitumor and immunomodulating activities of the polysaccharide– peptide (PSP) of *Coriolus versicolor*. *Journal of Immunology and ImmunoPharmacology*, 2: 29– 34

- Yang Q.Y., Hu Y.H., Li X.Y., Yang S.X., Liu J.X., Liu T.F., Xu G.M., Liao M.L. 1993. A new biological response modified substance – PSP. V: *Mushroom Biology and Mushroom Products*. Chang S.T., Buswell J.A., Chiu S.W. (ur.). Hong Kong, Chinese University Press: 247-259
- Ying J.Z., Mao X.L., Ma Q.M., Zong Y.C., Wen H.A. 1987. *Icons of Medicinal Fungi from China*. 1. izdaja. Kitajska, Beijing, Science Press: 575 str.
- Zhang L.X., Mong H., Zhou X.B. 1993. Effect of Japanese *Ganoderma lucidum* on production of interleukin-2 from murine splenocytes. Chung-Kuo Chung His Chieh Ho Tsa Chih, 13: 613- 615
- Zhang M., Cui S.W., Cheung P.C.K., Wang Q. 2007. Antitumour polysaccharides from mushrooms: a review on their isolation process, structural characteristics and antitumor activity. *Trends in Food Science and Technology*, 18: 4-19
- Zhao J.D., Zhang X.Q. 1994. Resources and taxonomy of Lingzhi (*Ganoderma*) in China. International Symposium in Ganoderma Research, Beijing, Bejing Medical University, 24.-25. okt. 1994

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem mentorju prof. dr. Borutu Štruklju, da mi je omogočil izdelavo diplomskega dela na želenem področju in vso pomoč tekom dela in priprave besedila. Največja zahvala gre Nataši Radić, mag. farm., za ves čas ter znanje, ki mi ga je posredovala. Prav tako za vse življenske nasvete in pozitivno energijo. Celotni Katedri za farmacevtsko biologijo, Fakultete za farmacijo, se zahvaljujem za vso pomoč, ki sem jo mnogokrat potrebovala. Hvala tudi Katedri za zaščito in patologijo lesa, Oddelka za lesarstvo, Biotehniške fakultete.

Tega diplomskega dela ne bi bilo brez mojih najboljših staršev in sester. Iskrena hvala za vso podporo, nasvete ter pomoč v času študija! Hvala tudi nečaku Boru za vse iskrene nasmehe in svaku Tiborju.

Zahvaljujem se tudi vsem profesorjem, sošolcem in prijateljem.

Vsem vam, hvala!