

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ MIKROBIOLOGIJE

Polona MEGUŠAR

**KARAKTERIZACIJA PROTIMIKROBNEGA IN
PROTIADHEZIVNEGA DELOVANJA VODNIH
IZVLEČKOV IZ VIŠJIH GLIV**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij – 2. stopnja Mikrobiologija

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ MIKROBIOLOGIJE

Polona MEGUŠAR

**KARAKTERIZACIJA PROTIMIKROBNEGA IN
PROTIADHEZIVNEGA DELOVANJA VODNIH IZVLEČKOV IZ
VIŠJIH GLIV**

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij – 2. stopnja Mikrobiologija

**CHARACTERISATION OF ANTIMICROBIAL AND ANTIADHESIVE
ACTIVITY OF MUSHROOMS AQUEOUS EXTRACTS**

M. Sc. THESIS
Master Study Programmes: Field Microbiology

Ljubljana, 2016

Magistrsko delo je zaključek študija 2. stopnje Mikrobiologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Delo je bilo opravljeno v Laboratoriju za živilsko mikrobiologijo Katedre za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil na Oddelku za živilstvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani in na Inštitutu »Jožef Stefan« na Odseku za biotehnologijo (B3).

Komisija za študij 1. in 2. stopnje je za mentorico magistrskega dela imenovala doc. dr. Anjo Klančnik, za somentorico dr. Jerico Sabotič in za recenzentko prof. dr. Kristino Sepčić.

Mentorica: doc. dr. Anja Klančnik

Somentorica: dr. Jerica Sabotič

Recenzentka: prof. dr. Kristina Sepčić

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Tom TURK

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: doc. dr. Anja KLANČNIK

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Članica: dr. Jerica SABOTIČ

Inštitut »Jožef Stefan«, Odsek za biotehnologijo

Članica: prof. dr. Kristina SEPČIĆ

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora:

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

Polona Megušar

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)

ŠD Du2
 DK UDK 582.284.51:577.112:547.96:579.67:543.544(043)=163.6
 KG višje glive/bukov ostrigar/*Pleurotus ostreatus*/vodni izvlečki/protimikrobeno delovanje/protiadhezivno delovanje/frakcjonacija/kromatografske metode/identifikacija /bioaktivni proteini
 AV MEGUŠAR, Polona, dipl. mikrobiol. (UN)
 SA KLANČNIK Anja (mentorica)/SABOTIČ Jerica (somentorica)/SEPČIĆ Kristina (recenzentka)
 KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
 ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij mikrobiologije
 LI 2016
 IN KARAKTERIZACIJA PROTIMIKROBNEGA IN PROTIADHEZIVNEGA DELOVANJA VODNIH IZVLEČKOV IZ VIŠJIH GLIV
 TD Magistrsko delo (Magistrski študij – 2. stopnja Mikrobiologija)
 OP XII, 70 str., 18 pregl., 36 sl., 81 vir.
 IJ SI
 JI sl/en
 AB Gobe oz. višje glive so nov in malo raziskan vir alternativnih bioaktivnih snovi naravnega izvora, zato so zanimive za raziskave novih protimikrobnih izvlečkov in komponent. Namen magistrskega dela je bila karakterizacija protimikrobnega in protiadhezivnega delovanja 23ih proteinских vodnih izvlečkov iz gob na bakterije *Listeria innocua*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* in *Campylobacter jejuni*, kvasovko *Candida albicans* in plesen *Aspergillus ochraceus*. Protimikrobeno delovanje smo ovrednotili preko določevanja minimalnih inhibitornih koncentracij. Vodni izvlečki iz gob so imeli boljše protimikrobeno delovanje proti Gram negativnim bakterijam kot proti Gram pozitivnim bakterijam ter dobro protimikrobeno delovanje na kvasovke in plesni. Adhezivnost mikroorganizmov smo ovrednotili preko barvanja biomase s kristal violetom. Izvlečki so imeli dobro protiadhezivno delovanje na preiskovane mikroorganizme. Izpostavili bi učinkovito protiadhezivno delovanje izvlečka gobe *Suillus granulatus* na kvasovko *C. albicans* in plesen *A. ochraceus*. Tudi izvleček iz gobe *Pleurotus ostreatus* je imel dobro protimikrobeno delovanje in ker je komercialno dostopen, smo raziskali njegovo sestavo. Po frakcjonaciji izvlečka z gelsko in ionsko kromatografijo smo potrdili dobro temperaturno obstojnost frakcij. Različne skupine frakcij imajo po gelski kromatografiji protimikrobeno delovanje. Iz tega lahko sklepamo na prisotnost več različnih bioaktivnih snovi v izvornem izvlečku. Zato smo razdelili frakcije v tri skupine in vsako analizirali s primerno metodo. V prvi skupini frakcij smo zaključili, da je protimikrobeno delovanje vsaj delno posledica L-aminokislinskih oksidaz. V drugi skupini frakcij smo uspeli določiti N-aminokislinsko zaporedje trenutno še neznanih proteinov. V tretji skupini frakcij smo našli nizkomolekularno snov, ki je nismo uspeli identificirati. Glede na naše rezultate lahko zaključimo, da so se gobe izkazale kot dober vir vodotopnih snovi s protimikrobnim in protiadhezivnim delovanjem in tako predstavljajo inovativni način za omejevanje kontaminacije in zdravljenje okužb ter zmanjšanje tveganja za zdravje potrošnika.

KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)

DN Du2
DC UDC 582.284.51:577.112:547.96:579.67:543.544(043)=163.6
DX higher fungi/oyster mushroom/*Pleurotus ostreatus*/aqueous extracts/antimicrobial activity/antiadhesive activity/fractionation/ chromatographic methods/identification/bioactive proteins
AU MEGUŠAR, Polona
AA KLANČNIK Anja (supervisor)/SABOTIČ Jerica (co-advisor)/SEPČIĆ Kristina (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study in Microbiology
PY 2016
TI CHARACTERISATION OF ANTIMICROBIAL AND ANTIADHESIVE ACTIVITY OF MUSHROOMS AQUEOUS EXTRACTS
DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes: Field Microbiology)
NO XII, 70 p., 18 tab., 36 fig., 81 ref.
LA Sl
AL sl/en
AB Mushrooms can be used as a source of alternative antimicrobial compounds to reduce microbial contamination and infections and also to confer microbial resistance and transfer of contamination to humans. The aim of this work was to determine the antimicrobial and antiadhesive activity of 23 mushroom water proteinaceous extracts against bacteria *Listeria innocua*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* in *Campylobacter jejuni*, yeast *Candida albicans* and mold *Aspergillus ochraceus*. Using microdilution method and determination of minimal inhibitory concentration, we determined that mushroom extracts exhibit higher antimicrobial activity against Gram negative bacteria, yeast and mold than Gram positive bacteria. Among all the mushrooms we have tested the extract from *Suillus granulatus* exhibited the highest antiadhesive activity against yeast *C. albicans* and mold *A. ochraceus* as determined by biomass staining with crystal violet. We have further studied the active components of edible and commercially available mushroom *Pleurotus ostreatus* for which we determine good antimicrobial activity and is commercially available. Fractionation was carried out using gel and ion-exchange chromatography and the most promising bioactive fractions were divided into three groups. These fractions were further examined for the presence of novel proteins. In the first group of fractions concluded that L-amino acid oxidases could be responsible for the observed antimicrobial activity. In the second group of fractions we determined N-terminal aminoacid termini of two unknown proteins. In the last, third group of fractions we found a low molecular weight compound, which we could not identify. In conclusion, we have showed that mushrooms are a good source of water soluble compounds with antimicrobial and antiadhesive activity, and represent a source of alternative antimicrobial compounds to reduce microbial contamination and infections and also to reduce microbial resistance and transfer of contamination to humans.

KAZALO VSEBINE

| | |
|------------------------------------------------------------------------|------------|
| KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)..... | III |
| KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)..... | IV |
| KAZALO VSEBINE | V |
| KAZALO SLIK | IX |
| KAZALO PREGLEDNIC..... | XI |
| OKRAJŠAVE IN SIMBOLI | XII |
| 1 UVOD..... | 1 |
| 1.1 CILJI IN HIPOTEZE MAGISTRSKE NALOGE..... | 2 |
| 2 PREGLED OBJAV..... | 3 |
| 2.1 GLIVE | 3 |
| 2.1.1 Bukov ostrigar (<i>Pleurotus ostreatus</i>)..... | 3 |
| 2.1.2 Hruškasta prašnica (<i>Lycoperdon pyriforme</i>) | 4 |
| 2.1.3 Grda mlečnica (<i>Lactarius necator</i>)..... | 4 |
| 2.1.4 Ustrojena golobica (<i>Russula alutacea</i>)..... | 4 |
| 2.1.5 Polstena mlečnica, poprovka (<i>Lactarius vellereus</i>)..... | 5 |
| 2.1.6 Velika tintnica (<i>Coprinus comatus</i>)..... | 5 |
| 2.1.7 Orjaški dežnik (<i>Macrolepiota procera</i>) | 6 |
| 2.1.8 Peščena lupljivka (<i>Suillus variegatus</i>)..... | 6 |
| 2.1.9 Ovčarska lupljivka (<i>Suillus granulatus</i>) | 6 |
| 2.1.10 Podaljšana mušnica (<i>Amanita excelsa</i>)..... | 7 |
| 2.1.11 Rdečkasta mušnica (<i>Amanita rubescens</i>)..... | 7 |
| 2.1.12 Smrekova kresilača (<i>Fomitopsis pinicola</i>) | 8 |
| 2.1.13 Poprhnjena livka, meglenka (<i>Clitocybe nebularis</i>) | 8 |
| 2.1.14 Pozna livka (<i>Clitocybe geotropa</i>)..... | 8 |
| 2.1.15 Žveplena kolobarnica (<i>Tricholoma sulphureum</i>)..... | 9 |
| 2.1.16 Rjavkasta livka (<i>Clitocybe gibba</i>) | 9 |
| 2.1.17 Žametasta podvihanka (<i>Tapinella atrotomentosa</i>)..... | 9 |
| 2.1.18 Rjavi zajček (<i>Lyophyllum decastes</i>)..... | 10 |
| 2.1.19 Borov glievec (<i>Sparassis crispa</i>) | 10 |
| 2.1.20 Kostanjasti goban (<i>Imleria badia</i>) | 10 |
| 2.1.21 Mala štorovka (<i>Kuehneromyces mutabilis</i>)..... | 11 |

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 2.1.22 Severnjaška mraznica (<i>Armillaria borealis</i>) | 11 |
| 2.2 BIOAKTIVNE KOMPONENTE IZOLIRANE IZ VIŠJIH GLIV | 12 |
| 2.3 BIOAKTIVNI PROTEINI IZOLIRANI IZ VIŠJIH GLIV | 13 |
| 2.4 PROTIMIKROBNO DELOVANJE IZVLEČKOV IZ VIŠJIH GLIV | 14 |
| 2.4.1 Gram pozitivne bakterije..... | 14 |
| 2.4.2 Gram negativne bakterije..... | 14 |
| 2.5 PROTIADHEZIVNO DELOVANJE IZVLEČKOV IZ VIŠJIH GLIV | 15 |
| 2.6 OPIS MIKROORGANIZMOV | 16 |
| 2.6.1 <i>Listeria innocua</i> in <i>Listeria monocytogenes</i> | 16 |
| 2.6.2 <i>Escherichia coli</i> | 16 |
| 2.6.3 <i>Campylobacter jejuni</i> | 16 |
| 2.6.4 <i>Bacillus cereus</i>..... | 17 |
| 2.6.5 <i>Candida albicans</i> | 17 |
| 2.6.6 <i>Aspergillus ochraceus</i> | 18 |
| 3 MATERIAL IN METODE | 19 |
| 3.1 SHEMA POTEKA DELA..... | 19 |
| 3.2 MATERIAL..... | 20 |
| 3.2.1 Laboratorijska oprema..... | 20 |
| 3.2.2 Pripomočki..... | 21 |
| 3.2.3 Kemikalije | 22 |
| 3.2.4 Mikroorganizmi..... | 23 |
| 3.2.5 Višje glive | 23 |
| 3.2.6 Pufri, raztopine, gojiča | 24 |
| 3.3 METODE..... | 26 |
| 3.3.1 Priprava vodnih izvlečkov iz gob | 26 |
| 3.3.1.1 Ultrafiltracija | 26 |
| 3.3.1.2 Dializa | 26 |
| 3.3.1.3 Sterilna filtracija..... | 26 |
| 3.3.1.4 Analiza proteinov s poliakrilamidno gelsko elektroforezo v prisotnosti natrijevega lavril sulfata – NaDS-PAGE | 27 |
| 3.3.1.5 Detekcija proteinov z barvanjem s koloidnim srebrom | 27 |
| 3.3.1.6 Prenos western in določitev N-končnih aminokislinskih zaporedij proteina z Edmanovo degradacijo | 28 |

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.3.2 Revitalizacija in pogoji rasti mikroorganizmov | 29 |
| 3.3.2.1 Priprava inokuluma za test protimikrobnega delovanja..... | 29 |
| 3.3.2.2 Priprava inokuluma za test protiadhezivnega delovanja..... | 29 |
| 3.3.3 Protimikrobno delovanje vodnih izvlečkov (metoda mikrodilucije)..... | 30 |
| 3.3.3.1 Potek metode (metoda mikrodilucije)..... | 30 |
| 3.3.4 Protiadhezivno delovanje vodnih izvlečkov (barvanje s kristal violetom).. | 31 |
| 3.3.4.1 Potek metode (barvanje s kristal violetom) | 31 |
| 3.3.5 Priprava fluorescentno označene bakterije <i>Listeria innocua</i> z elektrotransformacijo | 31 |
| 3.3.6 Frakcionalna izvedba izvlečka iz <i>Pleurotus ostreatus</i> z gelsko in ionsko izmenjevalno kromatografijo..... | 32 |
| 3.3.6.1 Gelska filtracija | 32 |
| 3.3.6.2 Ionsko izmenjevalna kromatografija..... | 33 |
| 3.3.6.3 Spektrofotometrično določanje koncentracije proteinov | 34 |
| 3.3.6.4 L- aminokislinska oksidazna aktivnost..... | 34 |
| 3.3.6.4.1 Minimalna inhibitorna koncentracija..... | 35 |
| 3.3.6.5 Analiza nizkomolekularnih frakcij (F58 - F68) po gelski kromatografiji .. | 35 |
| 3.3.7 Temperaturna obstojnost vodnih izvlečkov..... | 35 |
| 4 REZULTATI..... | 36 |
| 4.1 ANALIZA VSEBNOSTI PROTEINOV PRIDOBLEJENIH VODNIH IZVLEČKOV Z NaDS-PAGE | 36 |
| 4.2 PROTIMIKROBNO DELOVANJE VODNIH IZVLEČKOV | 37 |
| 4.3 PROTIADHEZIVNO DELOVANJE VODNIH IZVLEČKOV | 41 |
| 4.4 FRAKCIONACIJA | 46 |
| 4.4.1 Gelska kromatografija | 46 |
| 4.4.1.1 Protimikrobno delovanje frakcij po gelski kromatografiji..... | 47 |
| 4.4.1.2 Protiadhezivno delovanje frakcij po gelski kromatografiji..... | 49 |
| 4.4.1.3 Temperaturna obstojnost vodnega izvlečka in njegovih frakcij | 49 |
| 4.4.2 Identifikacija komponent frakcij po gelski kromatografiji..... | 50 |
| 4.4.2.1 Identifikacija komponent skupine frakcij 1 | 50 |
| 4.4.2.1.1 L-aminokislinska oksidazna aktivnost frakcij F24-F38..... | 50 |
| 4.4.2.1.2 Protimikrobno delovanje frakcij po gelski kromatografiji z dodatkom katalaze | 52 |

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 4.4.2.2 Identifikacija komponent skupine frakcij 2 | 52 |
| 4.4.2.2.1 Ionsko izmenjevalna kromatografija frakcij F43-F46 | 52 |
| 4.4.2.2.2 Protimikrobeno delovanje frakcij pridobljenih z ionsko izmenjevalno kromatografijo | 53 |
| 4.4.2.2.3 Analiza NaDS-PAGE frakcij pridobljenih z ionsko izmenjevalno kromatografijo | 54 |
| 4.4.2.2.4 Določanje N-terminalnega konca proteinov z Edmanovo degradacijo | 54 |
| 4.4.2.3 Identifikacija komponent skupine frakcij 3 | 55 |
| 5 RAZPRAVA | 56 |
| 5.1 PROTIMIKROBNO DELOVANJE VODNIH IZVLEČKOV IZ VIŠJIH GLIV | 57 |
| 5.2 PROTIADHEZIVNO DELOVANJE VODNIH IZVLEČKOV IZ VIŠJIH GLIV ... | 58 |
| 5.3 FRAKCIONACIJA IZVLEČKA IZ GOBE <i>Pleurotus ostreatus</i> (BUKOV OSTRIGAR) | 59 |
| 5.4 TEMPERATURNATA OBSTOJNOST | 61 |
| 6 SKLEPI..... | 62 |
| 7 VIRI..... | 63 |
| ZAHVALA | |

KAZALO SLIK

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Slika 1: Bukov ostrigar (<i>Pleurotus ostreatus</i>) (Šerod, 2014) | 3 |
| Slika 2: Hruškasta prašnica (<i>Lycoperdon pyriforme</i>) (Šerod S. in Šerod M., 2015a) | 4 |
| Slika 3: Grda mlečnica (<i>Lactarius necator</i>) (Šerod S. in Šerod M., 2015b) | 4 |
| Slika 4: Ustrojena golobica (<i>Russula alutacea</i>) (Poler in Šerod, 2013) | 4 |
| Slika 5: Polstena mlečnica (<i>Lactarius vellereus</i>) (Šerod S. in Šerod M., 2015c)..... | 5 |
| Slika 6: Velika tintnica (<i>Coprinus comatus</i>) (Šerod S. in Šerod M., 2012a)..... | 5 |
| Slika 7: Orjaški dežnik (<i>Macrolepiota procera</i>) (Klarič in Šerod, 2015) | 6 |
| Slika 8: Peščena lupljivka (<i>Suillus variegatus</i>) (Šerod S. in Šerod M., 2015d) | 6 |
| Slika 9: Ovčarska lupljivka (<i>Suillus granulatus</i>) (Mali in Šerod, 2015)..... | 6 |
| Slika 10: Podaljšana mušnica (<i>Amanita excelsa</i>) (Šerod S. in Šerod M., 2015e)..... | 7 |
| Slika 11: Rdečkasta mušnica (<i>Amanita rubescens</i>) (Šerod S. in Šerod M., 2015f)..... | 7 |
| Slika 12: Smrekova kresilača (<i>Fomitopsis pinicola</i>) (Šerod S. in Šerod M., 2015g)..... | 8 |
| Slika 13: Poprhnjena livka (<i>Clitocybe nebularis</i>) (Šerod S. in Šerod M., 2015h)..... | 8 |
| Slika 14: Pozna livka (<i>Clitocybe geotropa</i>) (Poler in Šerod, 2014) | 8 |
| Slika 15: Žveplena kolobarnica (<i>Tricholoma sulphureum</i>) (Šerod S. in Šerod M., 2015i)..... | 9 |
| Slika 16: Rjavkasta livka (<i>Clitocybe gibba</i>) (Poler in Šerod, 2012)..... | 9 |
| Slika 17: Žametasta podvihanka (<i>Tapinella atrotomentosa</i>) (Šerod S. in Šerod M., 2015j).... | 9 |
| Slika 18: Rjavi zajček (<i>Lyophyllum decastes</i>) (Šerod S. in Šerod M., 2015k)..... | 10 |
| Slika 19: Borov glicev (<i>Sparassis crispa</i>) (Šerod S. in Šerod M., 2012b) | 10 |
| Slika 20: Kostanji goban (<i>Imleria badia</i>) (Šerod S in Šerod M., 2014) | 10 |
| Slika 21: Mala štorovka (<i>Kuehneromyces mutabilis</i>) (Šerod S. in Šerod M., 2015l)..... | 11 |
| Slika 22: Severnjaška mraznica (<i>Armillaria borealis</i>) (Poler in Šerod, 2015) | 11 |
| Slika 23: Geli po NaDS-PAGE elektroforezi 22ih vodnih izvlečkov (10 % gel)..... | 36 |
| Slika 24: Protimikrobeno delovanje vodnih izvlečkov na Gram pozitivne bakterije, podano kot MIK vrednosti | 38 |
| Slika 25: Protimikrobeno delovanje vodnih izvlečkov na Gram negativne bakterije, podano kot MIK vrednosti | 39 |
| Slika 26: Protimikrobeno delovanje vodnih izvlečkov na kvasovko in plesen, podano kot MIK vrednosti | 40 |
| Slika 27: Protiadhezivno delovanje vodnih izvlečkov na izbrane mikroorganizme prikazano na šestih grafikonih (od a do f)..... | 45 |
| Slika 28: Spektrofotometrično določanje vsebnosti proteinov v frakcijah iz gobe <i>Pleurotus ostreatus</i> , pridobljenih z gelsko kromatografijo | 46 |
| Slika 29: NaDS-PAGE elektroforeza frakcij iz gobe <i>Pleurotus ostreatus</i> po gelski kromatografiji (12 % gel)..... | 47 |
| Slika 30: Minimalne inhibitorne koncentracije frakcij iz gobe <i>P. ostreatus</i> po gelski kromatografiji..... | 48 |
| Slika 31: Protiadhezivno delovanje frakcij iz gobe <i>P. ostreatus</i> pridobljenih z gelsko kromatografijo na bakterijo <i>Listeria innocua</i> | 49 |

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Slika 32: Detekcija L-aminokislinskih oksidaz v frakcijah skupine 1 iz gobe <i>P. ostreatus</i> na NaDS-PAGE gelu | 51 |
| Slika 33: Specifična L-aminokislinska oksidazna aktivnost v frakcijah skupine 1 iz gobe <i>P. ostreatus</i> , določena z merjenjem absorbance pri 280 nm | 51 |
| Slika 34: Spektrofotometrično določanje vsebnosti proteinov v frakcijah iz gobe <i>P. ostreatus</i> , pridobljenih z ionsko izmenjevalno kromatografijo | 53 |
| Slika 35: NaDS-PAGE frakcij iz gobe <i>P. ostreatus</i> , pridobljenih z ionsko izmenjevalno kromatografijo, obarvano s koloidnim srebrom (12 % gel) | 54 |
| Slika 36: NaDS-PAGE frakcij F43-F47, pridobljenih z gelsko kromatografijo iz gobe <i>P. ostreatus</i> , pred prenosom na PVDF membrano za določitev N-končnega aminokislinskega zaporedja | 55 |

KAZALO PREGLEDNIC

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Preglednica 1: Laboratorijska oprema | 20 |
| Preglednica 2: Pripomočki | 21 |
| Preglednica 3: Kemikalije | 22 |
| Preglednica 4: Mikroorganizmi | 23 |
| Preglednica 5: Seznam gob | 23 |
| Preglednica 6: Gojišča za mikroorganizme | 24 |
| Preglednica 7: Pufri in raztopine pri NaDS-PAGE | 24 |
| Preglednica 8: Puffri za ionsko izmenjevalno kromatografijo in gelsko filtracijo | 24 |
| Preglednica 9: Dializni pufer | 24 |
| Preglednica 10: Raztopine za barvanje s koloidnim srebrom | 25 |
| Preglednica 11: Pufri in raztopine pri prenosu western | 25 |
| Preglednica 12: Pufer za elektroporacijo | 25 |
| Preglednica 13: Metode merjenja minimalne inhibitorne koncentracije | 30 |
| Preglednica 14: Protimikrobeno delovanje vodnih izvlečkov na bakterije (<i>L. innocua</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>B. cereus</i> , <i>C. jejuni</i> in <i>E. coli</i>), kvasovko <i>C. albicans</i> in plesen <i>A. ochraceus</i> | 37 |
| Preglednica 15: Protiadhezivno delovanje vodnih izvlečkov na bakterije (<i>L. innocua</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>B. cereus</i> , <i>C. jejuni</i> in <i>E. coli</i>), kvasovko <i>C. albicans</i> in plesen <i>A. ochraceus</i> | 42 |
| Preglednica 16: Protimikrobeno delovanje frakcij iz gobe <i>P. ostreatus</i> , pridobljenih z gelsko kromatografijo, na bakterijo <i>L. innocua</i> | 48 |
| Preglednica 17: Temperaturna obstojnost vodnih izvlečkov | 49 |
| Preglednica 18: Test minimalne inhibitorne koncentracije z dodatkom katalaze na frakcije skupine 1 pridobljene iz gobe <i>P. ostreatus</i> | 52 |

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

| | |
|-------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| A | absorbanca |
| ATP | adenozin-5'-trifosfat |
| APS | amonijev persulfat |
| <i>A. ochraceus</i> | <i>Aspergillus ochraceus</i> |
| BHI | gojišče iz možganov in src (ang. Brain Hearth Infusion) |
| <i>B. cereus</i> | <i>Bacillus cereus</i> |
| <i>C. albicans</i> | <i>Candida albicans</i> |
| <i>C. jejuni</i> | <i>Campylobacter jejuni</i> |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| CFU | enote, ki tvorijo kolonije (ang. Colony Forming Units) |
| HRP | hrenova peroksidaza |
| INT | kromogeno barvilo (ang. p-Iodo-Nitro-Tetrazolium violet) |
| LAO | L-aminokislinske oksidaze |
| LC-PDA-ESI-MS | tekočinska kromatografija sklopljena z UV detektorjem z nizom fotodiod (ang. Photo Diode Array detector) v povezavi z masno spektrometrijo z ionizacijo z razprševanjem v električnem polju (ang. Electrospray Ionisation) |
| <i>L. innocua</i> | <i>Listeria innocua</i> |
| <i>L. monocytogenes</i> | <i>Listeria monocytogenes</i> |
| MIK | minimalna inhibitorna koncentracija |
| MRSA | na meticilin odporna bakterija <i>S. aureus</i> (ang. Meticilin Resistant <i>Staphylococcus aureus</i>) |
| NaDS | natrijev dodecil sulfat |
| OD | optična gostota (ang. Optical Density) |
| PAGE | poliakrilamidna gelska elektroforeza |
| <i>P. ostreatus</i> | <i>Pleurotus ostreatus</i> |
| PTFE | politetrafluoretilen oz. teflon |
| RPMI | Roswell Park Memorial Institute gojišče |
| TSB | triptični soja bujon (ang. Tryptone Soya Broth) |
| YPD | kvasni ekstrat, pepton in glukoza (ang. Yeast Extract Peptone Dextrose) |

1 UVOD

Z naraščanjem števila bakterij, odpornih na obstoječe antibiotike, se povečuje iskanje alternativnih virov bioaktivnih učinkovin iz naravnih virov ter uvajanje novih pristopov za učinkovito omejevanje kontaminacije in zdravljenje okužb. V industrijskih procesih ter tudi v medicini predstavlja velik problem preživetje patogenih mikroorganizmov v kompleksni formaciji biofilma. Biofilm tako predstavlja potencialni vir dolgotrajnih kontaminacij in onemogoča učinkovitost protimikrobnih sredstev.

Novi vir bioaktivnih snovi predstavljajo više gline iz debla *Basidiomycota* in *Ascomycota*, ki so kot funkcionalna hrana vključene v tradicionalno vzhodno medicino, a so identificirane in raziskane le v zelo majhnem deležu. Karakterizacija bioaktivnega delovanja novih vrst je torej zelo pomembna in kompleksna in zelo zahtevna. Dokazane komponente višjih gliv, kot so sekundarni metaboliti, (gliko)proteini ali polisaharidi delujejo protimikrobeno (Erjavec in sod., 2012; Alves in sod., 2012).

Raziskave so v veliki meri usmerjene v izolacijo polisaharidov; zelo malo pa je znano na področju proteinov, pridobljenih z vodno ekstrakcijo iz višjih gliv. Med proteini, ki so jih izolirali iz višjih gliv so encimi, inhibitorji proteaz, lektini, ribonukleaze, hidrofobini, ribosom-inaktivirajoči proteini, proteini, ki tvorijo pore, ter proteini, ki vežejo biotin. Nekatere študije že dokazujejo protimikrobeno delovanje proteinskih izvlečkov na bakterije kot so: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Streptococcus pneumonia*, *Streptococcus pyogenes*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella typhi*, *Pseudomonas aeruginosa* in *Klebsiella pneumoniae* (Alves in sod., 2012; Mygind in sod., 2005; Hearst in sod., 2008). Kljub tem manjka celovita študija, ki bi okarakterizirala protimikrobeno delovanje na Gram pozitivne in Gram negativne bakterije ter tudi na kvasovke in plesni.

V magistrski nalogi smo se usmerili v karakterizacijo protimikrobnega delovanja vodnih proteinskih izvlečkov iz višjih gliv. V boju proti odpornim celicam, ki so prisotne v biofilmu, pa smo izbrali nove tarčne mehanizme znotraj celice mikroorganizmov ter vplivali na njihovo adhezijo in posledično tvorbo biofilma. Bioaktivno delovanje proteinskih izvlečkov predstavlja inovativni način omejevanja kontaminacije in zdravljenja okužb ter zmanjšanja tveganja za zdravje potrošnika.

1.1 CILJI IN HIPOTEZE MAGISTRSKE NALOGE

V magistrski nalogi smo želeli pridobiti vodne izvlečke iz višjih gliv, določiti njihovo protimikrobeno in protiadhezivno delovanje ter preveriti katere aktivne snovi vsebujejo.

Cilji magistrske naloge so bili:

- Pridobiti vodne izvlečke iz 20 do 30 višjih gliv. Pridobljene izvlečke okarakterizirati in jim določiti protimikrobeno in protiadhezivno delovanje na izbrane vrste Gram negativnih bakterij (*Escherichia coli*, *Campylobacter jejuni*), Gram pozitivnih bakterij (*Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* in *Listeria innocua*), kvasovk (*Candida albicans*) ter plesni (*Aspergillus ochraceus*).
- Izbrani izvleček z dobro aktivnostjo frakcijonirati ter posameznim frakcijam določiti protimikrobeno delovanje, protiadhezivno delovanje na izbran mikroorganizem ter temperaturno obstojnost.

Hipoteze magistrske naloge:

- Pridobljeni vodni izvlečki višjih gliv bodo imeli protimikrobeno delovanje na izbrane Gram negativne in Gram pozitivne patogene bakterije, kvasovke in plesni.
- Pridobljeni vodni izvlečki višjih gliv bodo imeli protiadhezivno delovanje na izbrane Gram negativne in Gram pozitivne patogene bakterije, kvasovke in plesni.
- Aktivne substance v frakcijah izvlečka z največjo protimikrobeno / protiadhezivno aktivnostjo se razlikujejo med seboj v omenjenih aktivnostih ter temperaturni stabilnosti.

2 PREGLED OBJAV

2.1 GLIVE

Glive spadajo v domeno Eukarya in so eno izmed kraljestev živih bitij. Kraljestvo gliv sestavlja dve skupini, glive sluzavke (*Myxomycota*) in prave glive (*Eumycota*). Prave glive ločimo na štiri debla po načinu tvorbe spolnih spor. *Chytridiomycota* (gibljive spolne in nespolne spore), *Zygomycota* (negibljive spolne spore z debelo steno – zigospore), *Ascomycota* (spolne spore, ki nastajajo endogeno v vrečki, ki jo imenujemo askus) in *Basidiomycota* (spolne spore nastajajo eksogeno na strukturi, ki jo imenujemo bazidij). Poznamo še deblo *Deuteromycota*, kjer poznamo samo nespolno razmnoževanje (Erjavec in sod., 2012).

Glive lahko delimo na plesni, kvasovke (enocelična oblika gliv) in gobe (višje glive). Večina je nitastih (plesni), ki rastejo v obliki hif, ki se podaljšujejo na konici. Hife se med seboj prepletajo v micelij. Miceliji lahko rastejo prosto ali pa se združujejo v tako imenovana psevdotkiva, v katera uvrščamo tudi pojavnobliko gliv, plodišče ali gobo. Plodišča tvorijo glive iz debel *Ascomycota* in *Basidiomycota* (Zalar in sod., 2013).

Glive so heterotrofni organizmi. Večina je saprofitnih (hranijo se z odmrlim organskim materialom), lahko pa so tudi paraziti, simbionti in patogeni. Slednje povzročajo bolezni rastlin, živali in ljudi. Najpogosteji primer simbioze v naravi so lišaji in mikoriza. Mikorizne glive živijo v simbiozi z rastlinami. Rastlinam zagotavljajo mineralne snovi v zameno za ogljikove hidrate ali druge snovi, ki jih glive ne morejo sintetizirati. Lišaj pa je simbiotska povezava glivnih hif s fotosintetskim partnerjem, ki je običajno zelena alga ali cianobakterija (Zalar in sod., 2013).

2.1.1 Bukov ostrigar (*Pleurotus ostreatus*)

DEBLO: *Basidiomycota*

RAZRED: *Agaricomycetes*

RED: *Agaricales*

DRUŽINA: *Pleurotaceae*



*Slika 1: Bukov ostrigar (*Pleurotus ostreatus*)
 (Šerod, 2014)*

Bukov ostrigar je lesna goba, ki pri nas raste dokaj pogosto. Je zelo priljubljena goba za gojenje in je tudi komercialno dostopna, saj ga je možno kupiti v trgovinah ali na tržnici. Je užitna, vsestranska goba, za uživanje so primerne le mlade gobe. Ima sladek, blag okus in ga v tradicionalni vzhodnjaški medicini uporabljajo za krepitev ven, sprostitev kit ter odpravo zraka in hladnih stanj iz telesa. Ostrigar je bogat z beljakovinami in vsebuje veliko aminokislin (vendar ne triptofana), različne vitamine B (vendar ne B12), nenasicene

maščobne kisline (zlasti oleinsko) ter nekatere minerale in vlaknine. Pomembna prednost te gobe je, da zaradi velike vsebnosti železa koristi nastajanju krvi (Šerod, 2014).

2.1.2 Hruškasta prašnica (*Lycoperdon pyriforme*)

DEBLO: *Basidiomycota*

RAZRED: *Agaricomycetes*

RED: *Agaricales*

DRUŽINA: *Agaricaceae*



*Slika 2: Hruškasta prašnica (*Lycoperdon pyriforme*) (Šerod S. in Šerod M., 2015a)*

Hruškasta prašnica je saprofitna gliva. Raste šopasto na trhlem lesu, v nižinah najraje na bukovih štorih, v višjih predelih pa tudi na macesnovem in smrekovem lesu, poleti in jeseni ter vse do zime, dokaj pogosto. Je neužitna (Šerod S. in Šerod M., 2015a).

2.1.3 Grda mlečnica (*Lactarius necator*)

DEBLO: *Basidiomycota*

RAZRED: *Agaricomycetes*

RED: *Russulales*

DRUŽINA: *Russulaceae*



*Slika 3: Grda mlečnica (*Lactarius necator*) (Šerod S in Šerod M, 2015b)*

Grda mlečnica raste pod iglavci in listavci, pogosto pod brezami, v velikih skupinah, od poletja do pozne jeseni, zelo pogosta. Je neužitna vendar ni zelo strupena. Povzroča sindrom surovih gob - zastrupitev prebavil. Prekuhana ni škodljiva, na različne načine pripravljeno jo jedo v severovzhodni Evropi (Šerod S. in Šerod M., 2015b).

2.1.4 Ustrojena golobica (*Russula alutacea*)

DEBLO: *Basidiomycota*

RAZRED: *Agaricomycetes*

RED: *Russulales*

DRUŽINA: *Russulaceae*



*Slika 4: Ustrojena golobica (*Russula alutacea*) (Poler in Šerod, 2013)*

Ustrojena golobica raste v listnatih, mešanih in redko tudi iglastih gozdovih, zlasti na robu gozda, poleti in jeseni. Je užitna. Ustrojeno golobico zamenjujejo s pogojno užitno olivno golobico (*Russula olivacea*), od katere se razlikuje po malce svetlejših barvah klobuka, ki je škrlatno do rahlo vijoličasto okrast ali do zelenkasto rjavkast, pri čemer je po navadi najbolj svetlo osredje klobuka (Poler in Šerod, 2013).

2.1.5 Polstena mlečnica, poprovka (*Lactarius vellereus*)

DEBLO: *Basidiomycota*

RAZRED: *Agaricomycetes*

RED: *Russulales*

DRUŽINA: *Russulaceae*



Slika 5: Polstena mlečnica (*Lactarius vellereus*) (Šerod S. in Šerod M., 2015c)

Je skoraj v celoti bela goba, ki pušča mleček poprovega okusa, v gozdu pa jih že od daleč opazimo in hitro določimo, še posebej stare orjaške primerke z lijasto obliko, ki rastejo v velikih in strnjениh skupinah. Raste skupinsko pod listavci in iglavci, od poletja do pozne jeseni, zelo pogosto. Je pogojno užitna. Stare in surove gobe niso užitne. V Sloveniji običajno poprovk ne uživamo, saj v tem letnem času uspeva veliko drugih, bolj okusnih gob (Šerod S. in Šerod M., 2015c).

2.1.6 Velika tintnica (*Coprinus comatus*)

DEBLO: *Basidiomycota*

RAZRED: *Agaricomycetes*

RED: *Agaricales*

DRUŽINA: *Agaricaceae*



Slika 6: Velika tintnica (*Coprinus comatus*) (Šerod S. in Šerod M., 2012a)

Ima izredno luskat, jajčasto podolgovat, belkast klobuček, ki je sprva skoraj pri tleh, vendar se kmalu visoko dvigne na dolgem betu, ki se zvonasto razpre, od roba pa kaplja črn sok. Uspeva na bogatih, organsko polnih tleh, skupinsko, na travnikih, vrtovih, v parkih ali ob poteh, povsod, kjer razpadajo organske snovi, od pomladi do pozne jeseni, zelo pogosto. Užitna je le mlada; odlična je predvsem dokler so lističi še beli (Šerod S. in Šerod M., 2012a).

2.1.7 Orjaški dežnik (*Macrolepiota procera*)

DEBLO: *Homobasidiomycetes*

RAZRED: *Homobasidiomycetidae*

RED: *Agaricales*

DRUŽINA: *Lepiotaceae*



Slika 7: Orjaški dežnik (*Macrolepiota procera*) (Klarič in Šerod, 2015)

Med podobno velikimi dežniki ga spoznamo po rjavu marogastemu betu in po mesu, ki na ranjenih mestih ne rdeči, je pa tudi največji med dežniki in od tod ime orjaški. Raste v gozdovih, zlasti ob robovih v travi, na gozdnih travnikih, pogost, od sredine poletja pa vse do pozne jeseni. Je pogojno užiten, surov je škodljiv. Pri nas je že v navadi, da ga cvremo z drobtinami na dunajski način (Klarič in Šerod, 2015).

2.1.8 Peščena lupljivka (*Suillus variegatus*)

DEBLO: *Basidiomycota*

RAZRED: *Agaricomycetes*

RED: *Agaricales*

DRUŽINA: *Suillaceae*



Slika 8: Peščena lupljivka (*Suillus variegatus*) (Šerod S. in Šerod M., 2015d)

Je največja med lupljivkami in ima rumeno rjav, suh in zrnat klobuk, katerega rumenkasto meso na zraku pomordri in nima prijetnega okusa. Ker so zrnca na klobuku kot peščena zrnca, je lupljivka dobila po njih ime. Raste pod iglavci, najraje pod bori, skupinsko ali posamično, poleti in pozno v jeseni, zelo pogosto. Je užitna, a ne zbuja teka (Šerod S. in Šerod M., 2015d).

2.1.9 Ovčarska lupljivka (*Suillus granulatus*)

DEBLO: *Basidiomycota*

RAZRED: *Agaricomycetes*

RED: *Bolales*

DRUŽINA: *Suillaceae*



Slika 9: Ovčarska lupljivka (*Suillus granulatus*) (Mali in Šerod, 2015)

Je srednje velika goba. Ima rjavo kožico na klobuku, ki jo zlahka olupimo. Nima obročka na betu. Proti vrhu beta in na luknjicah pa izloča belkaste kapljice. Raste pod bori, skupinsko, pogosto v travi ob robu gozda, poleti in jeseni. Je užitna, zelo dobra in vsestranska (Mali in Šerod, 2015).

2.1.10 Podaljšana mušnica (*Amanita excelsa*)

DEBLO: *Basidiomycota*

RAZRED: *Agaricomycetes*

RED: *Agaricales*

DRUŽINA: *Amanitaceae*



Slika 10: Podaljšana mušnica (*Amanita excelsa*) (Šerod S. in Šerod M., 2015e)

Raste že pred drugimi mušnicami, pozno spomladi pa vse do zime in je podaljšana oblika čokate mušnice (*Amanita spissa*), ki je bolj šibka in na klobuku sivorjava, enake barve so tudi kosmiči (na betu pod obročkom), gladko in zadebeljeno dnišče pa se korenasto konča. Raste v bukovem ali mešanem gozdu, posamično ali po dve skupaj, kar precej pogosto, od pozne pomladi do zime. Je užitna in za mnoge zelo cenjena (Šerod S. in Šerod M., 2015e).

2.1.11 Rdečkasta mušnica (*Amanita rubescens*)

DEBLO: *Basidiomycota*

RAZRED: *Homobasidiomycetae*

RED: *Agaricales*

DRUŽINA: *Amanitaceae*



Slika 11: Rdečkasta mušnica (*Amanita rubescens*) (Šerod S. in Šerod M., 2015f)

Spoznamo jo po sivih krpicah na klobučku, gladkem obrobju, nažlebkanem zastiralcu, predvsem pa po rdečem mesu, zlasti v dnišču beta. Raste pod iglavci in listavci, zlasti v mešanem gozdu, od pozne pomladi pa vse do zime, je zelo pogosta. Je pogojno užitna, dobro pečena ali kuhanja je vsestransko uporabna, okusna in cenjena. Surova je strupena (Šerod S. in Šerod M., 2015f).

2.1.12 Smrekova kresilača (*Fomitopsis pinicola*)

DEBLO: *Basidiomycota*

RAZRED: *Agaricomycetes*

RED: *Polyporales*

DRUŽINA: *Fomitopsidaceae*



Slika 12: Smrekova kresilača (*Fomitopsis pinicola*)
(Šerod S. in Šerod M., 2015g)

Je zanimiva, pisano obarvana in na površini pasasta lesna goba, ki raste na živih in odmrlih delih iglavcev, najraje na smrekah, po čemer je tudi imenovana. Raste, kot vsaka trajna vrsta, skoraj vse leto na živih in odmrlih vejah, deblih in štorih iglavcev. Najraje na smreki, pa tudi na jelkah in borovcih, raste tudi na listavcih, in sicer na brezi, češnji, jelši, bukvah. Ni pogosta in je neužitna (Šerod S. in Šerod M., 2015g).

2.1.13 Poprhnjena livka, meglenka (*Clitocybe nebularis*)

DEBLO: *Basidiomycota*

RAZRED: *Agaricomycetes*

RED: *Agaricales*

DRUŽINA: *Tricholomataceae*



Slika 13: Poprhnjena livka (*Clitocybe nebularis*)
(Šerod S. in Šerod M., 2015h)

Precej zajetna in velika goba, površino klobuka ima poprhnjeno in žametno. Raste najpogosteje na preperelem listju, v velikih skupinah, pozno v jesen. Je pogojno užitna in ni nevarna. Surova povzroča sindrom surovih gob - zastrupitev prebavil. Če jo zaužijemo v večjih količinah je tudi prekuhana škodljiva (Šerod S. in Šerod M., 2015h).

2.1.14 Pozna livka (*Clitocybe geotropa*)

DEBLO: *Basidiomycota*

RAZRED: *Agaricomycetes*

PODRAZRED: *Hymenomycetes*

RED: *Agaricales*

DRUŽINA: *Tricholomataceae*



Slika 14: Pozna livka (*Clitocybe geotropa*)
(Poler in Šerod, 2014)

Pozna livka ima na dolgem in proti vrhu zoženem betu lijast klobuk, kateremu običajno v osredju ostane grbica. Goba močno diši po sivki in je belkasto rjavkastih odtenkov. Uspeva v redkem gozdu, na gozdnih jasah in na travnatih obronkih. Raste samo pozno jeseni (Poler in Šerod, 2014).

2.1.15 Žveplena kolobarnica (*Tricholoma sulphureum*)

DEBLO: *Basidiomycota*

RAZRED: *Agaricomycetes*

RED: *Agaricales*

DRUŽINA: *Tricholomataceae*



Slika 15: Žveplena kolobarnica (*Tricholoma sulphureum*) (Šerod S. in Šerod M., 2015i)

Ime ima po žvepleno rumenem klobuku. Je spremenljiva, včasih s trebušastim ali betičastim betom, ki pa je tudi valjast in ukrivljen. Zlahka jo je določiti zaradi izredno zoprnega vonja. Raste v listnatem in iglastem gozdu, od poletja do pozne jeseni. Najdemo jo pogosto. Jestrupena, nevarna in povzroča gastrointestinalni sindrom. Škoduje tudi prekuhana (Šerod S. in Šerod M., 2015i).

2.1.16 Rjavkasta livka (*Clitocybe gibba*)

DEBLO: *Basidiomycota*

RAZRED: *Agaricomycetes*

RED: *Agaricales*

DRUŽINA: *Tricholomataceae*



Slika 16: Rjavkasta livka (*Clitocybe gibba*) (Poler in Šerod, 2012)

Spoznamo jo po gladkem, usnjeno rjavem klobučku. Ko je star postane močno lijast, na osredju pa ima običajno grbico. Bet je bledo rjavkaste barve in ne rumeni. Najraje raste v bližini iglavcev, poleti in v jeseni. Najdemo jo razmeroma pogosto, vendar ne v velikih količinah. Je užitna (Poler in Šerod, 2012).

2.1.17 Žametasta podvihanka (*Tapinella atrotomentosa*)

DEBLO: *Basidiomycota*

RAZRED: *Agaricomycetes*

RED: *Boletales*

DRUŽINA: *Tapinellaceae*



Slika 17: Žametasta podvihanka (*Tapinella atrotomentosa*) (Šerod S. in Šerod M., 2015j)

Spoznamo jo po bolj ali manj školjkasti obliki rjavega klobuka, po črnem žametastem betu in po okrasto rumenkastih lističih, ki se spuščajo na bet. Rob klobuka ima močno podvit. Raste v iglastih gozdovih, na koreninah ali na štorih, poleti in jeseni. Najdemo jo razmeroma pogosto, vendar v malih količinah. Pogojno užitna, uporaben je le klobuk, bet pa je preveč žilav. Surova je strupena (Šerod S. in Šerod M., 2015j).

2.1.18 Rjavi zajček (*Lyophyllum decastes*)

DEBLO: *Basidiomycota*

RAZRED: *Agaricomycetes*

RED: *Agaricales*

DRUŽINA: *Lyophyllaceae*



*Slika 18: Rjavi zajček (*Lyophyllum decastes*)
(Šerod S. in Šerod M., 2015k)*

Rastejo v velikih šopih, kot večina vrst zajčkov, le klobučke imajo rjave. Beti so dolgi in ukrivljeni ter zraščeni v dnišču. Najdemo jih v gozdovih, parkih in ob poteh v travi. Je užitna in vsestranska goba (Šerod S. in Šerod M., 2015k).

2.1.19 Borov glivec (*Sparassis crispa*)

DEBLO: *Basidiomycota*

RAZRED: *Agaricomycetes*

RED: *Polyporales*

DRUŽINA: *Sparassidaceae*



*Slika 19: Borov glivec (*Sparassis crispa*)
(Šerod S. in Šerod M., 2012b)*

Je svojevrstna, grmičasta in s ploščatimi vejami močno nakodrana tvorba, podobna cvetači, ki zajedalsko uspeva na borovih koreninah in doseže do četrte metra višine ali celo več. Raste posamično, na zemlji ob borovih deblih in koreninah, redko na požaganah štorih. Goba je nevaren koreninski zajedalec. Raste poleti in jeseni, razmeroma pogosto. Je užitna (Šerod S. in Šerod M., 2012b).

2.1.20 Kostanjasti goban (*Imleria badia*)

DEBLO: *Basidiomycota*

RAZRED: *Homobasidiomycetes*

RED: *Boletales*

DRUŽINA: *Boletaceae*



*Slika 20: Kostanjasti goban (*Imleria badia*)
(Šerod S. in Šerod M., 2014)*

Goba ima kostanjevo rjav klobuk, rjavkast bet in rumeno trosovnico, ki na pritisk močno pozeleni. Meso je prijetnega vonja in okusa. Raste najraje pod smrekami, posamično ali v skupinah, tudi v mešanih gozdovih, od poletja do pozne jeseni. Najdemo ga kar pogosto. Je užiten (Šerod S. in Šerod M., 2014).

2.1.21 Mala štorovka (*Kuehneromyces mutabilis*)

DEBLO: *Basidiomycota*

RAZRED: *Agaricomycetes*

RED: *Agaricales*

DRUŽINA: *Strophariaceae*



Slika 21: Mala štorovka (*Kuehneromyces mutabilis*)
(Šerod S. in Šerod M., 2015l)

Raste šopasto na listnatem in iglastem drevju. Ima gladek, vodenast klobuček, razmeroma trden obroček na betu, pod njim pa luskice do temnorjavega dnišča. Raste na lesu listavcev in iglavcev, od pomlad do zime in je precej pogosta. Možna je tudi umetna gojitev. Je užitna (Šerod S. in Šerod M., 2015l).

2.1.22 Severnjaška mraznica (*Armillaria borealis*)

DEBLO: *Basidiomycota*

RAZRED: *Agaricomycetes*

RED: *Agaricales*

DRUŽINA: *Physalacriaceae*



Slika 22: Severnjaška mraznica (*Armillaria borealis*)
(Poler in Šerod, 2015)

Rastejo v šopih na lesu listavcev ali iglavcev kot parazit ali saprofit. Naseljuje ležeča debla ali štore in odmrla ali poškodovana še stoječa drevesa. Uspeva poleti in jeseni, je razširjena. Je pogojno užitna (Poler in Šerod, 2015).

2.2 BIOAKTIVNE KOMPONENTE IZOLIRANE IZ VIŠJIH GLIV

Z naraščanjem števila bakterij, odpornih na obstoječe antibiotike, se je povečalo zanimanje za iskanje alternativnih virov protimikrobnih snovi. Tako so pozornost raziskovalcev pritegnile tudi višje glive iz debla *Basidiomycota* in *Ascomycota*, ki se že dolga leta uporabljajo v tradicionalni kitajski medicini in na Japonskem. Užitne gobe z zdravilnimi in s funkcionalnimi lastnostmi vključujejo vrste rodov strnjenk (*Lentinula*), uhljark (*Auricularia*), bradovcev (*Hericium*), zraščenk (*Grifola*), panjevk (*Flammulina*), ostrigarjev (*Pleurotus*) in drhtavk (*Tremella*). Redno uživanje tekočih koncentratov iz teh gob naj bi imelo ugoden vpliv na imunski odziv posameznika, saj povečajo odpornost proti boleznim in v določenih primerih povzročijo tudi nazadovanje bolezenskega stanja. Med predvidenimi 140 000 vrstami gob na Zemlji jih poznamo največ 20 000. Ker imajo nizko vsebnost maščob ter nimajo holesterola, so odličen vir proteinov. Predstavljajo neraziskan vir potencialnih protimikrobnih snovi (Erjavec in sod., 2012; Lindequist in sod., 2005). Dosedanje raziskave kažejo, da imajo učinkovine iz gob protibakterijske, protivirusne, imunosupresivne, protitumorske, protivnetne in druge lastnosti. Kar nekaj bioaktivnih snovi je že bilo izoliranih iz gob; sekundarni metaboliti, polisaharidi, proteini in kompleksi polisaharid-protein. Do sedaj so najbolj raziskani polisaharidi (predvsem beta glukani), nekateri med njimi so že v fazi kliničnih poskusov in so jih že uporabljali pri zdravljenju raka v Aziji (Xu in sod., 2011). Zaradi njihovih edinstvenih metabolnih aktivnosti, so gobe uporabne v medicini, pa tudi v biotehnologiji kot vir encimov in sekundarnih metabolitov (Erjavec in sod., 2012; Younis in sod., 2015; Lavanya in Subhashini, 2013).

Bioaktivne snovi višjih gliv razdelimo v tri skupine:

- Sekundarni metaboliti (kisline, terpenoidi, polifenoli, seskviterpeni, alkaloidi, laktoni, steroli, nukleotidni analogi in vitamini),
- (Gliko)proteini ter polisaharidi z visoko molekularno maso, vključno s polisaharopeptidi,
- Proteoglikani (Erjavec in sod., 2012; Xu in sod., 2011).

Proteini, ki jih najdemo v višjih glivah imajo zelo raznolike aktivnosti in so lahko uporabni v biotehnologiji, kmetijstvu ter pri razvoju novih zdravil (Erjavec in sod., 2012; Xu in sod., 2011). Kljub temu, da so gobe bogat vir proteinov, jih je le majhen delež identificiran in okarakteriziran. Najverjetneje zaradi dolgotrajnih postopkov izolacije in čiščenja čistega proteina iz vodnega izvlečka ter tudi nadaljnje karakterizacije.

2.3 BIOAKTIVNI PROTEINI IZOLIRANI IZ VIŠJIH GLIV

Gobe so bogat vir visoko kvalitetnih proteinov. 20-25 % suhe teže gobe predstavljajo proteini. Vsebujejo vse za odraslega človeka esencialne aminokisline, predvsem pa imajo veliko lizina in triptofana (Kakon in sod., 2012). Glavna prednost proteinov iz višjih gliv je njihova unikatnost – razlikujejo se od bakterijskih, živalskih in rastlinskih. Kljub temu, da niso izolirani iz ekstremofilnih organizmov, je veliko od njih temperaturno stabilnih in neobčutljivih na spremenjanje pH-ja. Zaradi dolgoletne uporabe gob v prehrani, se smatrajo proteini izolirani iz užitnih gob za varne (Erjavec in sod., 2012).

Proteine, ki so jih znanstveniki do sedaj izolirali iz gob lahko razdelimo v več skupin: lignocelulaze (oksidoreduktaze, celulaze, hemicelulaze), proteolitične encime, peptidaze (metaloproteaza, serinska proteaza, asparginaza), lektine, lakaze, imunomodulatorne proteine, ribonukleaze (RNaze), inhibitorje cisteinskih in serinskih proteaz, proteine, ki inaktivirajo ribosome in hidrofobine (Erjavec in sod., 2012; Xu in sod., 2011; Lavanya in Subhashini, 2013).

Lektini so široko preučevana skupina proteinov, izoliranih iz višjih gliv. Imajo zelo unikatne molekulske in fiziološke značilnosti. So zelo raznoliki po strukturi, vzorcu glikozilacije in specifičnosti za vezavo na ogljikove hidrate. To so beljakovine, ki povratno vežejo specifičen monosaharid oziroma oligosaharid. Ker so slednji navadno zastopani v membranah različnih mikrobnih celic, se lektini na njih vežejo in povzročijo aglutinacijo celic. Posebno pri gibljivih bakterijah je aglutinacija pomemben obrambni mehanizem, saj se s tem njihova gibljivost močno zmanjša, posledično pa tudi patogenost (Erjavec in sod., 2013; Sabotič in sod., 2016; Žurga in sod., 2014).

Poleg lektinov med inhibitorne učinkovine iz gob spadajo tudi inhibitorji proteaz. Njihove tarče so proteolitični virulenčni faktorji rastlinskih patogenih bakterij, gliv, parazitov in virusov, ki tako preprečijo delovanje mikrobnih proteaz pri pridobivanju hrani in izogibanju obrambnemu mehanizmu. Prav tako delujejo tudi na prebavne encime drugih škodljivcev (npr. žuželk, polžev, pršic) in tako negativno vplivajo na njihovo rast in razvoj (Erjavec in sod., 2012).

Proteine iz gliv lahko uporabimo za aplikacije v biotehnologiji kot so industrijski encimi in biosenzorji. Najbolj preučena skupina proteinov iz višjih gliv so encimi, vključeni v razgradnjo lignoceluloze (kombinacija oksidaz in hidrolitičnih encimov) – lakaze, peroksidaze, (hemi)celulaze ter različne glikozidaze. Primer proteina, ki je izoliran iz višje glive ter je že v širši uporabi, je 6-fitaza iz vrste *Peniophora lycii*. Uporablja ga kot prehranski dodatek, ki poveča vnos fosforja in mineralov pri monogastričnih živalih (Erjavec in sod., 2012).

2.4 PROTIMIKROBNO DELOVANJE IZVLEČKOV IZ VIŠJIH GLIV

Za ugotavljanje protimikrobine aktivnosti določenih komponent uporabljajo znanstveniki različne metode. Med njimi sta najpogosteji metoda mikrodilucije ter metoda difuzije v agarju z diskami. Pri mikrodiluciji z dvojnim razredčevanjem dobimo minimalno inhibitorno koncentracijo (MIK) (Alves in sod., 2012; Erjavec in sod., 2013).

Izmed vseh gob je goba *Lentinula edodes* najbolje preučena in ima visoko protimikrobono delovanje proti Gram pozitivnim in Gram negativnim bakterijam. Vsebuje tudi v vodi topni polisaharid lentinan, ki deluje protitumorno, protivirusno in protimikrobono (Hearst in sod., 2008; Imtiaz in Lee, 2007). Za nadaljnje študije so se izkazale obetavne tudi gobe iz rodu *Boletus*, *Ganoderma* in *Lepista* (Alves in sod., 2012). Dosedanje raziskave na tem področju kažejo, da so na protimikrobono delovanje izvlečkov iz gob bolj dovetne Gram pozitivne kot Gram negativne bakterije, med njimi najbolj vrste *S. aureus*, *B. cereus* in *B. subtilis* (Alves in sod., 2012; Imtiaz in Lee, 2007).

2.4.1 Gram pozitivne bakterije

Metanolni izvleček iz vrste *Agaricus bisporus*, ki je najpogosteje kultivirana goba na svetu, je zavrl rast bakterije *Bacillus subtilis* pri $5 \mu\text{g}/\text{ml}$, kar je še nižje od koncentracije, pri kateri je učinkovit ampicilin. Poleg tega je zavrl tudi rast bakterij *Bacillus cereus*, *Micrococcus luteus*, *Micrococcus flavus*, *Staphylococcus aureus* in *Staphylococcus epidermidis* (Barros in sod., 2008). Vodni izvleček iz gobe *Ganoderma lucidum*, ki je najbolj poznana goba v tradicionalni medicini, je deloval protimikrobono na 15 različnih vrst Gram pozitivnih in Gram negativnih bakterij, med njimi najmočneje na *Micrococcus luteus* (Gao in sod., 2007). Raziskave kažejo, da so na protimikrobono delovanje različnih izvlečkov iz gob najbolj dovetne bakterije *S. aureus*, *B. cereus* in *B. subtilis*. Gobe, ki so imele največji inhibitorni učinek na mikroorganizme so bile *Agaricus bisporus*, *Agaricus bitorquis*, *Boletus edulis* in *Lentinus edodes* (Alves in sod., 2012; Barros in sod., 2008; Hearst in sod., 2008).

2.4.2 Gram negativne bakterije

Proti Gram negativnim bakterijam deluje manj izvlečkov iz gob, vendar pa so nekateri vseeno učinkoviti. Acetonski izvleček iz gobe *Ganoderma lucidum* je imel močno protimikrobono delovanje proti bakteriji *Klebsiella pneumonia*. Etanolni in kloroformni izvleček iz gobe *Clitocybe geotropa* je deloval protimikrobono na več Gram negativnih bakterij, od teh najbolj močno na bakterijo *Proteus vulgaris* (Kalyoncu in Oskay, 2010). Vodni izvleček gobe *Lentinus edodes* je deloval protimikrobono proti bakteriji *Pseudomonas* sp., celo bolj učinkovito kot antibiotik ciprofloksacin (Hearst in sod., 2008). Dosedanje raziskave kažejo, da sta *Escherichia coli* in *Klebsiella pneumoniae* najbolj dovetni na protimikrobono delovanje izvlečkov iz gob *Agaricus bisporus*, *Lentinus edodes*, *Ganoderma lucidum* in *Lepista nuda* (Hearst in sod., 2008; Erjavec in sod., 2012).

2.5 PROTIADHEZIVNO DELOVANJE IZVLEČKOV IZ VIŠJIH GLIV

Mikroorganizmi lahko kolonizirajo različne površine. V naravi je kar 99 % mikroorganizmov prisotnih v obliki biofilma. Biofilm je strukturirana združba mikrobnih celic ujetih v polimerni matriks pripet na abiotiske ali biotske površine. Sestavljen je iz mešanice bioloških komponent kot so voda, mikrobne celice, zunajcelični polisaharidi, zunajcelični proteini, nukleinske kisline in vezani ter prosti ioni (Alves in sod., 2014).

Problem predstavlja pojav biofilmov na medicinskih pripomočkih (npr. katetri, proteze), ker lahko preko njih pride do lokalne ali celo sistemsko okužbe. Bakterije *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *MRSA* in *Enterococcus* spp. predstavljajo prav zaradi velike sposobnosti tvorbe biofilma veliko tveganje pri okužbah urinalnega trakta. Biofilmi prispevajo h kroničnim okužbam z mikroorganizmi, saj bakterije postanejo manj občutljive na delovanje antibiotikov (Alves in sod., 2014).

Biofilmi so lahko prisotni tudi v različnih industrijah, kjer zaradi prisotnosti na cevovodih, strojih ali orodju povzročijo biorazgradnjo (pride do korozije in razpada struktur), zamašitev cevi in filtrov. Mikroorganizmi lahko tvorijo biofilm na različnih površinah prisotnih v industriji, kot so nerjaveče jeklo, kovina, keramika, umetne snovi, plastika, in guma. Biofilmi so odgovorni za večino bakterij, ki jih najdemo v pitni vodi (Alves in sod., 2014).

Kot smo lahko ugotovili, je bila objavljena le ena raziskava uporabe metanolno-vodnih izvlečkov iz gob za zaviranje rasti biofilmov bakterij. V tej raziskavi so se usmerili le na bioaktivnost fenolnih komponent in ne proteinov. Ti fenolni izvlečki so zavrli rast biofilma tudi pri bakterijah odpornih proti antibiotikom. Preko določevanja citotoksičnosti so fenolne izvlečke okarakterizirali tudi kot varne za aplikacijo. Uporabili so jih na medicinskih pripomočkih za preprečitev nastanka biofilma (Alves in sod., 2014; Signoretto in sod., 2014).

Polifenoli so nizkomolekularne snovi, ki jih lahko ekstrahiramo iz gob, ter imajo sposobnost, da se zelo močno vežejo na proteine. Znanstveniki ugotavljajo, da so tarče polifenolov molekule, ki so na površini bakterije. To so proteini v celični steni, teihohjska kislina, lipoteihohjska kislina in lipopolisaharidi. Frakcija izvlečka iz gobe *Lentinus edodes* je vezala 15 od 16-ih proteinov celične stene v bakteriji *Streptococcus mutans* (Signoretto in sod., 2014). Znanstveniki so opazili, da lahko fenoli prekinejo komunikacijo med bakterijami (»quorum sensing«), ki je ključna pri nastajanju biofilma (Alves in sod., 2014). Odkrili so, da so fenoli, terpeni, flavonoidi in usninska kislina učinkoviti pri zmanjšanju rasti biofilma bakterije *Pseudomonas aeruginosa*, ki je sicer mikroorganizem z zelo visoko sposobnostjo rasti v biofilmu (Alves in sod., 2014). Metanolni izvleček gobe *Pleurotus florida* zavira rast biofilma glive *Candida albicans*. Znanstveniki so odkrili, da ta komponenta (3,5-di-tert-butilfenol (3,5-DTB)) poškoduje celično membrano in poveča kopiranje reaktivnih kisikovih spojin, kar zmanjša rast biofilma (Rathna in sod., 2016).

2.6 OPIS MIKROORGANIZMOV

2.6.1 *Listeria innocua* in *Listeria monocytogenes*

Bakteriji *Listeria innocua* in *Listeria monocytogenes* uvrščamo v deblo *Firmicutes*, razred *Bacilli*, red *Bacillales* in družino *Listeriaceae*. Njihova DNA ima malo G+C parov (36-42 %), zato so sorodne z bakterijami rodu *Clostridium*, *Bacillus*, *Enterococcus*, *Streptococcus* in *Staphylococcus* (Khelef in sod., 2006).

Bakterije rodu *Listeria* so majhne, fakultativno anaerobne, Gram pozitivne palčke, lahko tvorijo kratke verižice in so zelo razširjene v naravnem okolju. Najdemo jih v zemlji, vodi, odplakah, iztrebkih ljudi, domačih in divjih živalih, pa tudi v številnih živilih. Gibljive so predvsem pri nizkih temperaturah (od 20 °C do 25 °C) (Khelef in sod., 2006). Listerije se razmnožuje pri temperaturah od 4 °C do 44 °C. Ker so odporne na visoke temperature, sušenje, povišano koncentracijo soli (do 10 % NaCl) in pH med 4,5 in 9, spadajo med najodpornejše nesporogene bakterije (Khelef in sod., 2006; Favaro in sod., 2014).

L. innocua ni hemolitična in ni patogena. Po sekveniranju genoma so ugotovili, da nima dela genoma z zapisom za virulenco (Favaro in sod., 2014; Buchriser in sod., 2003). *L. monocytogenes* je patogena bakterija. Povzroči okužbo (listeriozo) tako pri živalih kot tudi pri ljudeh. Za listeriozo pri človeku je značilno, da se pojavi pri posameznikih in ne kot epidemija. Najpogosteji vir okužbe so živila. Nekatera živila predstavljajo veliko tveganje za okužbo z listerijo, kot so npr. okuženo surovo mleko, mlečni izdelki iz nepasteriziranega mleka ter živila namenjena za neposredno uživanje z daljšim rokom uporabe. Problem predstavlja predvsem to, da so listerije sposobne preživetja in rasti tudi pri temperaturah hladilnika in se v dolgotrajno shranjenih živilih lahko razmnožujejo (CDC, 2016).

2.6.2 *Escherichia coli*

Escherichia coli je fakultativno anaeroben, Gram negativen bacil, ki je lahko gibljiv ali negibljiv. Sodi v družino enterobakterij – *Enterobacteriaceae*, deblo *Proteobacteria*. Optimalne pogoje rasti ima med 10 °C in 46 °C, rastejo pa tudi pri 4 °C. Minimalna aktivnost vode, ki jo rabijo za preživetje, je med 0,93 in 0,96. Najnižji pH, ki ga preživijo je 4,3. Pomembna je za javno zdravstvo, saj je pokazatelj fekalnega onesnaženja hrane in vode (Adamič in sod., 2003). *E. coli* je del normalne črevesne flore prebavnega trakta pri človeku in živalih. Nekateri sevi lahko povzročajo oportunistične okužbe pri človeku in bolezni sečil, diarejo, neonatalni meningitis in bolnišnično pljučnico. Patogeni sevi *E. coli* se lahko prenašajo z okuženo vodo in hrano ali preko stika z živalmi ali ljudmi (Coia in Cubie, 1995a).

2.6.3 *Campylobacter jejuni*

Bakterije iz rodu *Campylobacter* so Gram negativne patogene *Proteobacterie*, ki lahko povzročajo bolezni pri človeku in živali. Povzročajo kampilobakteriozo. Je zoonoza, ki se kaže kot diareja, vročina, krči in bolečine v trebušni votlini. Študije so pokazale, da je 80 % piščančjega mesa, prodanega končnim kupcem, kontaminiranega s *C. jejuni*, kar poudarja pomembnost piščančjega mesa kot rezervoarja in vira okužbe s *C. jejuni*. Bakterije so spiralne

oblike, in rastejo najbolje v temperaturnem območju med 37 °C in 42 °C. Povprečna temperatura ptic, ki so asimptomatske nosilke te bakterije, je od 41 °C do 42 °C. Bakterije rastejo počasi, v mikraerofilnih območjih, so gibljive (na enem, ali na obeh polih imajo flagele), nesporogene ter pozitivne na oksidazo. Čeprav jih je večina mikraerofilnih (3-10 % kisika), nekatere lahko rastejo pod anaerobnimi pogoji ali aerobnimi pogoji. Kampilobakterioza je ena od vodilnih bakterijskih bolezni, ki se prenašajo s hrano v razvitih državah ter tudi v državah v razvoju. Uživanje okuženega perutninskega mesa ter stranskih proizvodov je glavni vzrok bolezni. Kampilobaktri se ne razmnožujejo v hrani, vendar pomnoževanje ni potrebno, saj je potreben le majhen odmerek, da povzroči okužbo (NIJZ, 2015).

2.6.4 *Bacillus cereus*

Bacillus cereus je aeroben, Gram pozitiven, katalaza pozitiven bacil, ki tvori endospore. Spore bakterije *B. cereus* so razširjene v zemlji. Vegetativne celice rastejo posamično ali pa v kratkih verigah. Sodi v družino *Bacillaceae*, deblo *Firmicutes*. Je gibljiv in povzroča hemolizo na krvnem agarju. Najbolje raste pri 37 °C. Vegetativne celice ubije temperatura 55 °C, spore pa preživijo višje temperature. Bakterije iz rodu *Bacillus* so široko razširjene v okolju. Prisoten je tudi v različnih ekstremnih življenjskih okoljih, npr. morskem mulju in gejzirjih ter v človeških in živalskih iztrebkih. V nizkih koncentracijah je pogosto prisoten v surovi, sušeni in kuhanih hrani. Najdemo ga v vodi, mleku, stročnicah, žitaricah in drugih živilih. *B. cereus* je velikokrat povzročitelj zastrupitve s hrano. Tvori dva različna enterotoksina: prvi (emetični) povzroča bruhanje – emetični sindrom, drugi (diarealni) pa drisko – diarealni sindrom (NIJZ, 2013; Coia in Cubie, 1995b). Vir okužbe so lahko: topotno neobdelana živila, onesnažena živila, ki so deloma pripravljena, a premalo topotno obdelana oziroma niso bila sterilizirana ter neprimerno shranjene topotno že obdelane jedi, ki niso bile sterilizirane, zato se spore ne uničijo in iz njih vzkajijo vegetativni bacili, ki izdelujejo strup (enterotoksin) (NIJZ, 2013).

2.6.5 *Candida albicans*

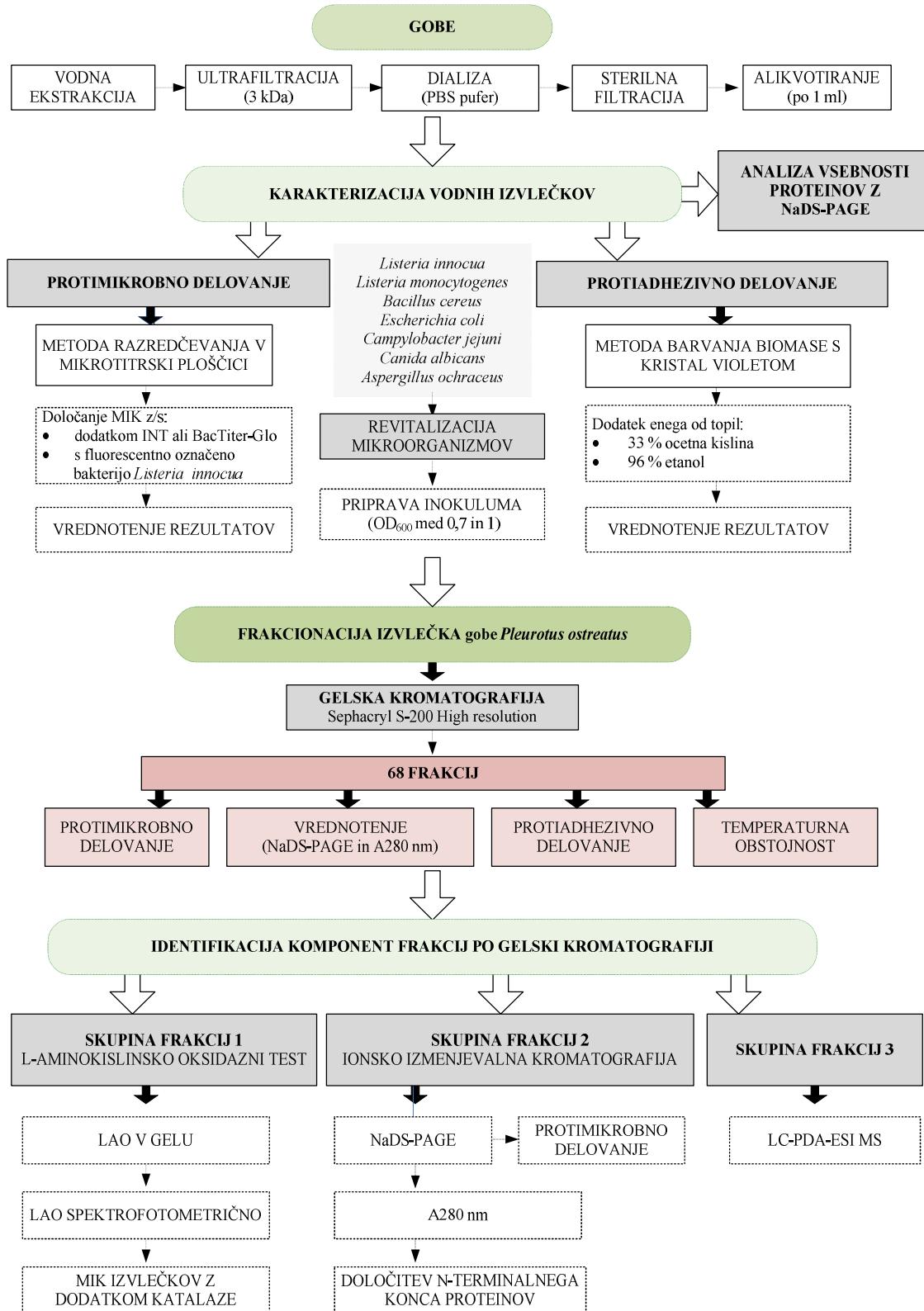
Candida albicans spada v kraljestvo gliv, deblo *Ascomycota*, družina *Saccharomycetaceae*. Je sestavni del človeške naravne mikroflore. Zanjo je značilen dimorfizem, ki je večinoma odvisen od temperature, pH in prisotnosti hranil v okolju. Najpogosteje se nahaja v obliki kvasovke in tvori okrogle, gladke in bele kolonije, premera 2-4 mm. Poznamo 150 vrst gliv iz rodu *Candida*, od teh je 10 takšnih, ki lahko povzročijo bolezensko stanje pri človeku. Najbolj pogosta je *Candida albicans* - povzroča kandidozo. Gre za oportunistično okužbo, kar pomeni, da se bolezen pojavlja le pri osebah z zmanjšano imunsko odpornostjo. Okužba prizadene zlasti usta in spolovila. Sposobnost spremembe morfologije pri *C. albicans* se je izkazala za močno povezano s patogenim potencialom. Ko se spremeni v obliko plesni, se začne širiti preko hif in izločati encime (proteinaze, fosfolipaze). Ti encimi razgrajujejo epitelne celice in povzročajo globlje rane (Zalar in sod., 2013).

2.6.6 *Aspergillus ochraceus*

Aspergillus ali glavičaste plesni spadajo v deblo *Ascomycota*. Poznanih je 185 vrst, od tega jih je 20 nevarnih za zdravje človeka in živali. Spadajo med najpogosteje kvarljivce živil in skupaj s plesnimi rodov *Penicillium* in *Fusarium* tvorijo dominantno skupino plesni na zemlji (Jeršek, 2014). So rod ubikvitarnih plesni, z značilnim konidijem. Spore gliv najdemo v gozdovih v kupih odpadlega listja, kompostih na vrtu, skladiščih žit, na gnijoči zelenjavi, v vlažnih kleteh, v iztrebkih ptic in tam, ker potekajo kakršnakoli gradbena in vzdrževalna dela (Zver in sod., 2012). Kolonije *A. ochraceus* so rumeno-rjave (Bennett, 2010). Plesni rodu *Aspergillus* delajo septiran substratni micelij. Konidiofor ni septiran, je veliko močnejši in debelejši od substranega micelija. Na vrhu se konidiofor razširi v apeks. Na apeksu se tvorijo fialide in metule skupaj in so radialno razvrščene. Na fialidah se tvorijo konidiji (negibljive spore), ki so okrogli in brez ovojnice (Jeršek, 2014). Zaradi takšne moroflogije imenujemo plesni iz rodu *Aspergillus* čopičaste ali glavičaste plesni (Zalar in sod., 2013). *Aspergillus ochraceus* tvori ohratoksin A, ki kontaminira grozdje, žitarice in kavna zrna. Je karcinogen, teratogen, imunosupresiven, nefrotoksičen in nevrotoksičen toksin. *A. ochraceus* lahko povzroča tudi alergično bronhopulomarno aspergilizo (Bennett, 2010).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 SHEMA POTEKA DELA



3.2 MATERIAL

3.2.1 Laboratorijska oprema

Preglednica 1: Laboratorijska oprema

| OPREMA | PROIZVAJALEC | DODATEN OPIS |
|--------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Tehtnica | Vibra AJ, Japonska | 5 g - 4200 g, odstopanje < 100 g: ± 0,01 g, odstopanje > 100 g: ± 0,1 g |
| Analitska tehtnica | ANG GH-252 (prodaja ALBA), Slovenija | |
| Komplet za ultrafiltracijo | Amicon 8400, ZDA | plastična posoda z merilno skalo, mešalo, pokrov, podstavek, jekleni primež, cev za iztek, cev za dotok dušika |
| Celulozna membrana | Omega, PALL Corporation, ZDA | 3 kDa in 1 kDa |
| Orbitacijski stresalnik | Vibromix 10, Tehnica, Slovenija | |
| Centrifugirke | Sarstedt, Nemčija Eppendorf, ZDA | |
| Dializna membrana | Membra-cel MWCO3500 SERVA, Nemčija | |
| Gene pulser za elektroporacijo | BioRad, ZDA | |
| Magnetno mešalo | Rotamix SHP-10, Tehnica, Slovenija | |
| Kamera za črno-belo slikanje v vidnem in ultravijoličnem spektru s tiskalnikom | UVI Tec, Velika Britanija | |
| Hladilnik, zamrzovalnik | Gorenje, Slovenija | + 4 °C, -20 °C |
| Barvni optični čitalec | BioRad, ZDA | |
| Mikrotitrskra ploščica | Nunclon Delta SI, Nunc, Danska | |
| Komora z laminarnim pretokom zraka | SC-R Labcaire, Velika Britanija | |
| Digestorij | Wesemann, Nemčija | |
| 0,2 µm filter za sterilno filtracijo | Minisart, Sartorius, Nemčija | |
| Set za NaDS-PAGE | BioRad, ZDA | kadička, elektroda, primež za dva gela, pokrov s kablom, izvir napetosti: Power basic, 300 V, 400 mA, 75 W |
| Pipete | Eppendorf Research, ZDA | 0,5-10,0 µl, 2- 20 µl, 10-100 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl, 500- 5000 µl |
| pH meter | Mettler Toledo Seven Easy, ZDA | |
| Vibracijski stresalnik | Vibromix 10, Tehnica, Slovenija | 300 rpm = max |
| Čitalec mikrotitrskih ploščic | Tecan, Švica | |

3.2.2 Pripromočki

Preglednica 2: Pripromočki

| |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Debela stekla z distančniki: 1,5 mm, Mini protean 3, 1656612, Bio Rad F107, ZDA |
| Tanka stekla: Mini protean 3, 1653308, Bio Rad, ZDA |
| Zeleni primeži za gele: Bio Rad, ZDA |
| Glavnički: 10 žepkov, 1,5 mm, Bio Rad, ZDA |
| Mikrocentrifugirke: plastične, 1,5 ml, Sarstedt, Nemčija |
| Nastavki za pipetiranje: 10 µl, 200 µl, 1000 µl, 5000 µl, 200 µl s podaljšano konico za nanašanje v žepek v gelu (Sarstedt), Nemčija |
| Mikrotitrská plošča s pokrovom: 96 mest, Nunc, Thermo Fisher, ZDA |
| Merilni valji: 100 ml, 500 ml, 1000 ml, plastični |
| Magneti, obdani s PTFE |
| Plastične čaše: 1000 ml, 2000 ml, 5000 ml, ISO LAB, Nemčija |
| Steklene čaše: 50 ml, 100 ml, 250 ml, 500 ml |
| Steklene petrijevke s pokrovom: premer 150 mm |
| Centrifugirke s pokrovčki: 15 ml in 50 ml, ISO LAB, Nemčija |
| Plastične petrijevke s pokrovom: premer 80 mm |
| Plastično stojalo za mikrocentrifugirke |
| Plastične ladjice za tehtanje |
| Sterilne cepilne zanke |
| Kovinska pinceta |
| Celulozni robčki (Špar) |
| Papirnate brisače |
| Parafilm |
| Škarje |
| Štoparica |
| Alkoholni flomaster |
| Aluminijasta folija za živila (Mercator) |
| Plastična folija za živila (Mercator) |
| Cedilo |

3.2.3 Kemikalije

Preglednica 3: Kemikalije

| KEMIKALIJE | PROIZVAJALEC | DODATEN OPIS |
|-----------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Na ₂ S ₂ O ₃ | Sigma-Aldrich, 72049, ZDA | Natrijev tiosulfat, brezvodni, ≥ 98,0 % |
| NaCl | Carlo Erba, 479687, Francija | Natrijev klorid |
| NaOH | Merck, B0964298339, Nemčija | Natrijev hidroksid, Mr = 40 |
| K ₂ HPO ₄ | Fluka Biochemica, 60354, ZDA | Kalijev fosfat, dibazični, brezvodni, Mr = 174,18, ≥ 99,0 % |
| KCl | Fluka Biochemica, 2312118, ZDA | Kalijev klorid, ≥ 99,5 %, Mr = 74, 56 |
| KH ₂ PO ₄ | Riedel-de Haën, 70100, Nemčija | Kalijev fosfat (monobazičen), Mr = 136,09 |
| DEAE nosilec za ionsko kromatografijo | GE Healthcare, Velika Britanija | |
| Akrilamid/bis (40 %) | Fluka Analytical, ZDA | Akrilamid, N, N'-Metilenbisakrilamid 37,5 : 1 raztopina, 40 % in H ₂ O |
| APS: amonijev persulfat, za elektroforezo (≥ 98 %) | Sigma-Aldrich, A3678-25G, ZDA | |
| TEMED | Serva, Nemčija | N, N, N', N'-Tetrametilendiamin, za raziskave, min 99 %, M = 116,2, C ₆ H ₁₀ N ₂ |
| NaDS | Sigma-Aldrich, L4509-1KG, ZDA | Natrijev dodecil sulfat, ReagentPlus, ≥ 98,5 % |
| Coomassie brilliant blue | GE Healthcare, Life Sciences, 17-0517-01, Velika Britanija | PhastGel® Blue R 250 |
| Antibiotiki (ampicilin, kloramfenikol, eritromicin) | Roche, Švica Calbiochem, Sigma-Aldrich, ZDA | |
| OPD | Aldrich Chemistry, P23983, ZDA | O-fenilendiamin, 99,5 %, 108,1 g/mol |
| HRP: Hrenova peroksidaza | Sigma Life Science, P8125-5KU, ZDA | Tip I, essentially salt-free, liofiliziran prah, 52 enot/mg trden, 96,2 mg trden |
| H ₂ SO ₄ | Fluka Biochemica, 410301, ZDA | Žveplova kisina, 96 %, za analizo, ρ = 1,835 |
| Katalaza | Sigma-Aldrich, C9322-5G, ZDA | Katalaza iz jeter goveda, liofiliziran prah, 2000-5000 enot/mg proteina |
| INT | Sigma, ZDA | Kromogena sestavina (p-iodo-nitro-tetrazolium violet) |
| BacTiter-Glo | Promega, Slovenija | |
| Barvilo kristal violet | Merc, Nemčija | |
| STD prestained | Thermo Scientific, 26619, ZDA | PageRulerTM Plus, Prestained Protein Ladder |
| Etanol 96 % | Merc, Nemčija | |
| Pufer TRIS | Serva, 120745, ZDA | Tris(hidroksimetil)aminometan, C ₄ H ₁₁ NO ₃ , Mr 121,1 |
| Pufer BIS-TRIS | Sigma Life Science, ZDA | Bis(2-hidroksimetil)aminotris(hidroksimetil) methan, ≥ 98 %, C ₈ H ₁₉ NO ₅ , MW:209,24g/mol |

3.2.4 Mikroorganizmi

Preglednica 4: Mikroorganizmi

| OZNAKA SEVA | VIR SEVA | IZVOR SEVA |
|------------------------------------|----------------------------------------------|--------------------------------------------|
| <i>Listeria innocua</i> ŽM39 | Laboratorij za ŽM, BF, Ljubljana | Toplotno obdelano piščanče meso |
| <i>Listeria monocytogenes</i> ŽM58 | Laboratorij za ŽM, BF, Ljubljana | IHM, Wuerzburg, Nemčija, Referenčni sev 4b |
| <i>Escherichia coli</i> ŽM370 | Laboratorij za ŽM, BF, Ljubljana | ATCC11229 |
| <i>Campylobacter jejuni</i> K49/4 | Laboratorij za ŽM, BF, Ljubljana | Piščanče meso |
| <i>Bacillus cereus</i> ŽMJ91 | Zbirka ZIM, Laboratorij za ŽM, BF, Ljubljana | S1 (RZS) |
| <i>Candida albicans</i> ATCC10261 | Laboratorij za ŽM, BF, Ljubljana | Obnohtno tkivo ob vnetju |
| <i>Aspergillus ochraceus</i> | Laboratorij za ŽM, BF, Ljubljana | Neznan |

3.2.5 Višje glive

Preglednica 5: Seznam gob

| LATINSKO IME | SLOVENSKO IME | DRUŽINA | OZNAKA | RAST |
|--------------------------------|-----------------------------|-------------------------|--------|-------------------------|
| <i>Lycoperdon pyriforme</i> | hruškasta prašnica | <i>Agaricaceae</i> | P01 | saprofitna |
| <i>Lactarius necator</i> | grda mlečnica | <i>Russulaceae</i> | P14 | mikorizna |
| <i>Russula alutacea</i> | ustrojena golobica | <i>Russulaceae</i> | P07 | mikorizna |
| <i>Lactarius vellereus</i> | polstena mlečnica, poprovka | <i>Russulaceae</i> | P02 | mikorizna |
| "purpen" gliva iz komposta | / | / | P03 | / |
| <i>Coprinus comatus</i> | velika tintnica | <i>Agaricaceae</i> | P16 | saprofitna |
| <i>Macrolepiota procera</i> | orjaški dežnik | <i>Agaricaceae</i> | P04 | saprofitna |
| <i>Suillus variegatus</i> | peščena lupljivka | <i>Suillaceae</i> | P08 | mikorizna |
| <i>Suillus granulatus</i> | ovčarska lupljivka | <i>Suillaceae</i> | P05 | mikorizna |
| <i>Amanita excelsa</i> | podaljšana mušnica | <i>Amanitaceae</i> | P17 | mikorizna |
| <i>Amanita rubescens</i> | rdečkasta mušnica | <i>Amanitaceae</i> | P06 | mikorizna |
| <i>Fomitopsis pinicola</i> | smrekova kresilača | <i>Fomitopsidaceae</i> | P09 | saprofitna in parazitna |
| <i>Clitocybe nebularis</i> | poprhnjena livka, meglenka | <i>Tricholomataceae</i> | P10 | saprofitna |
| <i>Clitocybe geotropa</i> | pozna livka (martinovka) | <i>Tricholomataceae</i> | P11 | saprofitna |
| <i>Tricholoma sulphureum</i> | žveplena kolobarnica | <i>Tricholomataceae</i> | P19 | mikorizna |
| <i>Clitocybe gibba</i> | rjavkasta livka | <i>Tricholomataceae</i> | P12 | saprofitna |
| <i>Tapinella atrotomentosa</i> | žametasta podvihanka | <i>Tapinellaceae</i> | P13 | saprofitna |
| <i>Lyophyllum decastes</i> | rjavi zajček | <i>Lyophyllaceae</i> | P15 | saprofitna |
| <i>Sparassis crispa</i> | borov glichec | <i>Sparassidaceae</i> | P18 | saprofitna in parazitna |
| <i>Imleria badia</i> | kostanjasti goban | <i>Boletaceae</i> | P20 | mikorizna |
| <i>Kuehneromyces mutabilis</i> | štorovka | <i>Strophariaceae</i> | P21 | saprofitna |
| <i>Armillaria borealis</i> | severnjaška mravnica | <i>Physalacriaceae</i> | P22 | saprofitna in parazitna |
| <i>Pleurotus ostreatus</i> | bukov ostrigar | <i>Pleurotaceae</i> | J01B | saprofitna |

3.2.6 Pufri, raztopine, gojišča

Gojišča:

Preglednica 6: Gojišča za mikroorganizme

| GOJIŠČE | OPIS | PROIZVAJALEC |
|---------|----------------------|------------------------------------|
| TSB | gojišče za bakterije | Biolife, 4021552, ZDA |
| YPD | gojišče za kvasovke | Sigma Life Science, SLBM2848V, ZDA |
| RPMI | gojišče za plesni | Sigma Life Science, RNBD7303, ZDA |
| BHI | gojišče za bakterije | Biolife, 4021952, ZDA |

Pufri in raztopine pri NaDS-PAGE

Preglednica 7: Pufri in raztopine pri NaDS-PAGE

| | |
|------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Pufer za ločevalni gel | 1,5 M Tris-HCl pH 8,8: za 100 ml v vodi raztopimo 18,15 g Tris, pH uravnamo s koncentrirano HCl na 8,8, avtoklaviramo ter hranimo v hladilniku pri 4 °C. |
| Pufer za koncentrirni gel | 0,5 M Tris-HCl pH 6,8: za 100 ml raztopimo 6,05 g Tris, pH uravnamo s koncentrirano HCl na 6,8, avtoklaviramo ter hranimo v hladilniku pri 4 °C. |
| Nanašalni pufer | 2,5 ml 0,5 M Tris-HCl pH 6,8, 2 ml glicerola, 4 ml 10 % SDS, bromfenol modro, 1,5 ml destilirane vode. Omogoča, da se vzorci posedejo na dno žepka v gelu in se ne raztopijo v elektrolitu pri elektroforezi. |
| Pufer za elektroforezo (10x) | 29 g Tris, 144 g glicina, 10 g NaDS, do 1 l destilirana voda. pH je približno 8,3 in ga ne uravnavamo s kislino ali bazo. Hranimo ga pri sobni temperaturi. |
| 0,1 % raztopina Coomassie Brilliant Blue | 5 uprašenih tablet Coomassie Brilliant Blue PhastGel Blue R-350, 200 ml dH ₂ O, 800 ml etanol. Raztopino filtriramo. |
| 10 % razbarvalna raztopina | 10 % (v/v) etanol, 5 % (v/v) ocetna kislina |
| 30 % razbarvalna raztopina | 30 % (v/v) etanol, 10 % (v/V) ocetna kislina |

Pufri za ionsko izmenjevalno kromatografijo in gelsko filtracijo

Preglednica 8: Pufri za ionsko izmenjevalno kromatografijo in gelsko filtracijo

| | |
|--------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| Pufer TRIS | Tris(hidroksimetil)aminometan, 0,1 M, pH 7,5 in 1,5 M NaCl |
| Raztopine za čiščenje DEAE | 300 ml 2 M NaCl, 300ml 0,1 M NaOH, 250 ml, 0,1 M ocetne kisline, 400 ml 0,1 M NaOH |
| Pufer BIS-TRIS | Bis (2-hidroksimetil)amino-tris(hidroksimetil)metan, 0,02 M, pH 6,5 |
| Pufri z gradientom za spiranje | 600 ml pufra BIS-TRIS z 0,3 M NaCl, 300 ml pufra z 0,5 M NaCl, 500 ml pufra z 1M NaCl |

Dializni pufer, pufer v katerem so shranjeni vodni izvlečki

Preglednica 9: Dializni pufer

| | |
|-----------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| PBS pufer (20x) | 135 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O, 18 mM KH ₂ PO ₄ , destilirana voda do 1 l. |
|-----------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

Raztopine za barvanje s koloidnim srebrom

Preglednica 10: Raztopine za barvanje s koloidnim srebrom

| | |
|------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|
| Fiksativna raztopina za barvanje s koloidnim srebrom | 50 % etanol, 50 µl 37 % formaldehida |
| Raztopina za povečanje občutljivosti | 0,02 % Na-tiosulfat |
| Raztopina za barvanje s srebrom | 0,2 % Ag-nitrat in 37 % formaldehid |
| Raztopina za razvijanje | 6 % Na-karbonat, 0,02 % Na-tiosulfat in 37 % formaldehid |

Pufri in raztopine pri prenosu western

Preglednica 11: Pufri in raztopine pri prenosu western

| | |
|-------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|
| Pufer za prenos western | 100 ml WB, 3,75 ml 10 % SDS, 200 ml metanola, do 1 l dH ₂ O |
| Barva za določanje N konca proteina | 500 µl ocetne kisline, 0,05 g Coomassie G250, 20 ml metanola in 30 ml deionizirane vode |
| Razbarvalna raztopina | 50 % (v/v) metanol |

Pufer za elektroporacijo

Preglednica 12: Pufer za elektroporacijo

| | |
|-----------|---------------------------------------------------------------------------|
| Pufer SMP | 272 mM saharoze, 1 mM MgCl ₂ , 7 mM natrijevega fosfata pH 7,4 |
|-----------|---------------------------------------------------------------------------|

3.3 METODE

3.3.1 Priprava vodnih izvlečkov iz gob

Pripravili smo vodne izvlečke iz triindvajsetih različnih gob, ki smo jih hrаниli v zamrzovalniku pri -20 °C. Odmrznjene gobe smo iztisnili skozi gazo in tlačilko za pire krompir ter takoj dodali 0,1 g/100 ml natrijevega tiosulfata ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) in ustrezeno količino pufra 20 X PBS. Celoten postopek priprave izvlečkov je potekal z vzorci na ledu. Nato smo vzorec centrifugirali pri 4 °C in 10 000 g, 10 min in supernatant desetkrat koncentrirali z ultrafiltracijo na filtru z velikostjo por 3 kDa. Tako skoncentriran vzorec smo dializirali trikrat v 5 l pufra 1 x PBS za vsaj tri ure oziroma preko noči. Nato smo vzorec ponovno centrifugirali pri 4 °C in 16 000 g, 5min. Temu je sledila sterilna filtracija vzorca s filtrom velikosti 0,02 µm in alikvotiranje vzorca po 1 ml v sterilne mikrocentrifugirke. Tako pripravljeni vzorce izvlečkov smo hrаниli pri -20 °C.

3.3.1.1 Ultrafiltracija

Ultrafiltracija je vrsta membranske filtracije, kjer lahko z delno prepustno membrano vzorec skoncentriramo ali pa ga očistimo. Z ultrafiltracijo ločimo med sabo snovi z visoko molekulsko maso od tistih z majhno. Primerna je, ko imamo opravka z molekulami velikosti od 500 do 1 000 000 Da (1-10 nm) in se pogosto uporablja za koncentriranje in čiščenje makromolekul kot so beljakovine. Uporabili smo ultrafiltracijsko celico in membrano, ki prepušča molekule manjše od 3 kDa, večje pa zadrži v celici. Celico smo v hladni sobi priklopili na nadtlak dušika in njen vsebino mešali na magnetnem mešalu (Ibarz in Barbosa-Cánovas, 2003; IDTI, 2016).

3.3.1.2 Dializa

Dializa je ločevalna tehnika, ki temelji na odstranitvi majhnih, nezaželenih komponent od makromolekul v vzorcu. Deluje po principu pasivne difuzije skozi pol-prepustno membrano. Torej molekule potujejo od višje proti nižji koncentraciji, dokler ni doseženo ravnotežje na obeh straneh membrane. Ker ima membrana pore, večje molekule ne potujejo skozi njo, in tako ostanejo v dializnem črevesu, manjše molekule in nečistoče pa preidejo iz črevesa. Ko je doseženo ravnotežno stanje, difuzija ne poteka več, zato vzorec v dializnem črevesu večkrat zaporedoma dializiramo. Volumen pufra v katerem poteka dializa naj bi bil od 100 do 1000 krat večji od volumena vzorca (Thermo Fisher Scientific, 2015). Dializa je potekala v 5 l pufra 1 x PBS v hladni sobi (4 °C), ob mešanju z magnetnim mešalom. Uporabili smo dializno membrano premera 22mm z velikostjo por 3,5 kDa.

3.3.1.3 Sterilna filtracija

Vodne izvlečke smo po tem, ko smo jih iztisnili, centrifugirali, ultrafiltrirali in dializirali, še sterilno filtrirali. Sterilne pogoje smo zagotovili z delom v laminariju. Filtrirali smo skozi filter za enkratno uporabo, ki ima 0,2 µm velike pore. Ta zadržuje bakterije in večje mikroorganizme.

3.3.1.4 Analiza proteinov s poliakrilamidno gelsko elektroforezo v prisotnosti natrijevega lavril sulfata – NaDS-PAGE

S to metodo ločimo proteine izključno glede na njihovo velikost. Proteine kuhamo 10 min pri 100 °C v prisotnosti anionskega detergenta NaDS in jih s tem denaturiramo ter dodamo enakomerno razporejen negativen naboj. Zaradi različnih velikosti proteinov manjši potujejo dalj časa skozi zamrežen gel, v katerem se večji ustavijo že bolj na začetku (Georgia Institute of Technology, 2001).

Poliakrilamidni gel je sestavljen iz dveh delov; koncentrirni in ločevalni del. Koncentrirni gel je običajno 4 %, ločevalni pa je lahko od 6 % do 20 %, odvisno od potreb po natančnosti ločitve. Mi smo uporabljali 10 % in 12 % ločevalni gel (Davidson College, 2011; Georgia Institute of Technology, 2001; Kang in sod., 2002).

Z dodatkom polimerizacijskega sredstva APS (amonijevega persulfata) k mešanici akrilamida in bisakrilamida ustvarimo zamreženost polimera. TEMED katalizira polimerizacijsko reakcijo s spodbujanjem nastajanja prostih radikalov iz amonijevega persulfata (Davidson College, 2011).

Elektroforeza je potekala pri konstantnem toku 35 mA/gel približno 70 min. Ker so proteini brezbarvni, smo jih vizualizirali z barvanjem s Comassie modrilm ali pa s srebrom. Barvanje s srebrom je 100x bolj občutljivo, kot barvanje s Coomassie modrilm. Uporabljamo ga takrat, ko imamo v vzorcu nižjo koncentracijo proteinov. Gel smo barvali v 50 % mešanici ocetne kislina in barvila Coomassie Brilinat Blue eno uro. Nato smo ga razbarvali v 30 % razbarvalni raztopini (vsebuje 30 % ocetno kislino) za pol ure ter ga za tem prestavili v 10 % razbarvalno raztopino. Razbarvalno raztopino smo zamenjali tolikokrat, da je gel postal prozoren, modre lise pa lepo vidne. Gel smo nato slikali z optičnim čitalcem.

Za določanje molekulskih mas proteinov v našem vzorcu smo uporabili standardno lestvico LMW (nizkomolekularni proteinski standard) (GE Healthcare, 2016).

3.3.1.5 Detekcija proteinov z barvanjem s koloidnim srebrom

S koloidnim srebrom smo barvali NaDS-PAGE za analizo frakcij po ionsko izmenjevalni kromatografiji.

Po NaDS-PAGE elektroforezi smo dali gel v fiksirno raztopino (50 % etanol, 12 % ocetna in 37 % formaldehid) za najmanj eno uro. S tem smo odstranili kislino, pufre in komponente, ki bi motile nadaljnje delo. Sledilo je spiranje 3 x 20 min v 50 % etanolu. Nato smo gel obdelali z 0,02 % natrijevim tiosulaftom za 1 min. Ta korak imenujemo senzitizacija, ker smo dodali reagente, ki omogočajo, da bodo proteini bolje reagirali s srebrom. Pomembno je, da ni predolga in da gel po njej speremo z vodo. Spirali smo trikrat po 20 s z deionizirano vodo. Nato smo dodali 0,02 % srebrov nitrat in 37 % formaldehida. Formaldehid je reduciral Ag^+ do Ag^0 . V tej raztopini smo inkubirali gel 20 min, nato pa ga spirali v deionizirani vodi 3 x 20 s. Sledilo je razvijanje v 6 % natrijevem karbonatu z dodatkom 0,02 % natrijevega tiosulfata in

37 % formaldehida. Reakcija je potekala pri visokem pH-ju. Ko so se proteini dovolj obarvali, smo reakcijo nadaljnje redukcije srebra ustavili v raztopini 50 % etanola in 12 % ocetne kisline. Na koncu je sledilo še spiranje v 50 % etanolu za 20 min (Chevallent in sod., 2006).

3.3.1.6 Prenos western in določitev N-končnih aminokislinskih zaporedij proteina z Edmanovo degradacijo

Proteine lahko prenesemo iz gela na membrano na več načinov. Najbolj pogosti sta elektroforezni prenos in mikrofiltracija. Elektroforezni prenos oziroma prenos western uporabljamo po tem, ko smo proteine ločili po velikosti z NaDS-PAGE elektroforezo. Mikrofiltracijo pa za proteine v raztopini.

Vzorce proteinov smo ločili v 12 % NaDS-PAGE in nato gel in membrano vstavili med tri plasti filter papirja, vse ekvilibrirano v pufru za prenos western (100 ml WB, 3,75 ml 10 % SDS, 200 ml metanola ter 696,25 ml destilirane vode). Izbrali smo PVDF (poliviniliden diflourid), ki je hidrofobna, ima visoko afiniteto za proteine in aminokisline in je kemijsko odporna ne reagente in topila Edmanove degradacije (Resinex, 2016; Thermo Fisher Scientific, 2016). Pred uporabo jo je potrebno zmočiti v metanolu in destilirani vodi, ter nato šele v pufru. V aparatu smo dodali pufer za prenos western in prenos izvajali dve uri pri 200 mA v ledeni kopeli (Biorad, 2016).

Po končanem prenosu smo membrano preko noči stresali v sterilni dH₂O na orbitacijskem stresalniku pri 20 obratih/ minuto. Membrano smo nato barvali približno 1 min s svežo prefiltrirano barvo za določanje N-terminalnega konca proteina. Sestavljena je iz 500 µl ocetne kisline, 0,05 g Comassie G250, 20 ml metanola in 30 ml deionizirane vode. Nato smo membrano razbarvali v 50 % metanolu toliko časa, da so lise proteinov lepo vidne. Izbrane lise proteinov smo izrezali in jih določili N-končna aminokislinska zaporedja z avtomatizirano Edmanovo razgradnjo z uporabo aparature Procise Protein Sequencing System 492 (PE Applied Biosystems, ZDA).

Sukcesivna razgradnja peptidov z N-terminalnega konca po Edmanovi metodi temelji na reakciji α-amino skupine peptida s PITC (fenilizotiocianat) v alkalnem in selektivni cepitvi nastalega PTC (feniltiocarbamoil)-peptida z brezvodno trifluorocetno kislino (TFA). Odcepi se anilinotiazolinon (ATZ) N-terminalne aminokisline, skrajšan peptid pa v naslednjem ciklusu ponovno reagira s PITC (Križaj, 2015).

3.3.2 Revitalizacija in pogoji rasti mikroorganizmov

Kolonijo bakterije *E. coli*, *L. innocua*, *L. monocytogenes* in *B. cereus* smo iz plošče (glej izvor v sekciji 3.2.4) nacepili v 5 ml TSB gojišča. To smo inkubirali 24 h pri 37 °C s stresanjem. *Campylobacter jejuni* smo prav tako gojili v TSB gojišču, vendar v mikroaerofilnih pogojih na 42 °C.

Za revitalizacijo kvasovke *Candida albicans* smo uporabili gojišče YPD. Eno kolonijo smo nacepili v 5 ml YPD gojišča ter inkubirali pri 28 °C s stresanjem, manj kot 24 h, ker je zrasla zelo hitro do visokega OD₆₀₀.

Gojišče RPMI smo uporabili za revitalizacijo plesni *Aspergillus ochraceus*. S cepilno zanko smo iz poševnika vzeli nekaj spor ter jih nacepili v gojišče. Nato smo s pomočjo števne komore pod mikroskopom prešteli število spor in tako pripravili ustrezeno koncentracijo. Zaradi počasne rasti, smo plesen inkubirali 5 dni pri 22 °C.

3.3.2.1 Priprava inokuluma za test protimikrobnega delovanja

Koncentracija bakterij, na katerih smo testirali protimikrobeno delovanje vodnega izvlečka, je bila približno 10⁶ CFU/ml. Pripravo inokuluma smo optimizirali na bakteriji *Listeria innocua*, s katero smo kasneje naredili največ testov za določanje minimalne inhibitorne koncentracije. Isti sistem merjenja optične gostote pa smo potem uporabili tudi pri ostalih mikroorganizmih.

Optimizacija na bakteriji *Listeria innocua*:

Prekonočni kulturi smo izmerili OD₆₀₀. Razredčili smo jo z gojiščem do različnih OD₆₀₀. Testirali smo OD₆₀₀ od 0,5 do 1. Iz prvotne razredčitve za pripravo ustrezne optične gostote smo naredili nove razredčitve od 10⁻³ do 10⁻⁹. Te smo nacepili na trdno gojišče in inkubirali 24 h pri 37 °C. Po inkubaciji smo prešteli zrasle kolonije in za vsako razredčitev izračunali CFU/ml. Rezultati so pokazali, da koncentracija 10⁶ CFU/ml ustreza OD₆₀₀ med 0,7 in 0,9.

3.3.2.2 Priprava inokuluma za test protiadhezivnega delovanja

Priprava inokuluma je v prvem delu enaka, kot za test protimikrobnega delovanja. Ko imamo koncentracijo mikroorganizmov 10⁶ CFU/ml, 1 ml te koncentracije damo v 80 ml ustreznega gojišča. Tako dobimo koncentracijo okoli 10⁵ CFU/ml.

3.3.3 Protimikrobeno delovanje vodnih izvlečkov (metoda mikrodilucije)

Za določanje protimikrobnega delovanja smo uporabili metodo razredčevanja v tekočem gojišču v mikrotitrski ploščici (oz. metodo mikrodilucije). Določili smo minimalno inhibitorno koncentracijo (MIK), ki je v naši nalogi predstavljala 10 % inhibicijo rasti mikroorganizmov.

3.3.3.1 Potek metode (metoda mikrodilucije)

Vsek izvleček smo testirali v dveh ponovitvah na izbranem mikroorganizmu. Pripravili smo 20 % za začetno koncentracijo vodnega izvlečka v destilirani vodi. Nato smo 100 µl 20 % vodnega izvlečka odpipetirali v prvo vrstico mikrotitrsko ploščico. V vse ostale smo dodali 50 µl gojišča. Nato smo prenašali po 50 µl iz prve jamice do zadnje. Pri vsakem prenosu smo s pipeto osemkrat premešali gojišče in vodni izvleček. Iz zadnje jamice smo 50 µl zavrgli. Tak način priprave redčitev nam je zagotovil, da se je koncentracija proteinov v vodnem izvlečku zmanjševala za polovico v vsaki vrstici ploščice. Tako smo analizirali vsak izvleček v koncentraciji do 10 % do 0,156 %. Na koncu smo v vse jamice dodali 50 µl inokuluma. Pripravili smo tudi negativno in pozitivno kontrolo, tako, da smo v eno vrstico odpipetirali le 100 µl gojišča ter v drugo 100 µl inokuluma. Ploščico smo 1 min stresali pri 600 tresljajih na minuto. Nato smo jo inkubirali pri 37 °C 24 h in nato izmerili rezultate.

Preživele mikroorganizme smo merili na tri različne načine:

- s fluorescentno označeno bakterijo *Listeria innocua*,
- z dodatkom rastnega indikatorja INT (p-iodo-nitro-tetrazolium violet),
- z dodatkom reagenta BacTiter-Glo.

Preglednica 13: Metode merjenja minimalne inhibitorne koncentracije

| METODA | POTEK |
|--------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Fluorescentno (690/713) označena bakterija <i>Listeria innocua</i> | Po 24 urni inkubaciji pri 37 °C izmerimo intenziteto fluorescence. Eksitacija pri 690 nm, emisija pri 713 nm. |
| Rastni indikator INT | V vsako luknjico dodamo 20 µl INT-ja s koncentracijo 0,2 g/ml. Inkubiramo v temi 1 h in nato izmerimo absorbanco pri 584 nm. INT se veže na dihalno verigo in obarva gojišče z bakterijo vijolično, če je bakterija živa. Kjer ni živosti, ne pride do spremembe barve. Kontrola z gojiščem ne spremeni barve, kontrola z bakterijo brez vodnega izvlečka pa se mora obarvati vijolično. |
| Reagent BacTiter-Glo | V vsako luknjico dodamo 80 µl reagenta BacTiter-Glo, premešamo in takoj izmerimo bioluminiscenco. S tem reagentom lahko zelo natančno določimo živost celic na podlagi merjenja ATP-ja. Reagent povzroči lizo celic s čimer ekstrahira ATP iz celic. Signal je proporcionalen količini ATP-ja. Ob prisotnosti kisika in ATP-ja, luciferaza pretvori luciferin v oksiluciferin, AMP, PP in CO ₂ . Pri reakciji nastane tudi svetloba, ki jo lahko izmerimo (Promega, 2015). |

3.3.4 Protiadhezivno delovanje vodnih izvlečkov (barvanje s kristal violetom)

Adhezijo mikroorganizmov smo spremljali v mikrotitrski ploščici preko barvanja s kristal violetom ter merjenja absorbkcije vezanega barvila na celice. Protiadhezivno delovanje smo preverili s subinhibitornimi koncentracijami vodnih izvlečkov (0,1 % in 0,01 %), ki ne vplivajo na rast mikroorganizmov.

3.3.4.1 Potek metode (barvanje s kristal violetom)

Na mikrotitrsko ploščico smo nanesli 200 µl pripravljene koncentracije vodnega izvlečka v inkokulumu. Mikrotitrsko ploščico smo pokrili s pokrovom in inkubirali pri 37 °C 24 h. Po inkubaciji mikrotitske ploščice smo najprej s sterilno destilirano vodo (200 µl) trikrat sprali nepritrjene celice z izpiralcem mikrotitrskih ploščic.

Nato smo celice, ki so ostale v biofilmu na mikrotitrski ploščici, fiksirali s sušenjem z vročim zrakom 10 min in jih barvali s kristal violetom. V vsako luknjico mikrotitrsko ploščico smo dodali 200 µl 1 % raztopine kristal violeta, inkubirali 15 min pri sobni temperaturi in nato odstranili barvilo s spiranjem z vodo. Obarvane celice v biofilmu smo nato ponovno fiksirali s sušenjem s toplim zrakom 10 min.

Pred merjenjem absorbance pri 584 nm smo fiksiranim celicam dodali topilo. Gram negativnim bakterijam smo dodali v vsako luknjico 200 µl 96 % etanola, Gram pozitivnim bakterijam pa 200 µl 33 % ocetne kisline (Jeršek, 2016).

3.3.5 Priprava fluorescentno označene bakterije *Listeria innocua* z elektrotransformacijo

Bakterijo *Listeria innocua* smo namnožili do srednje logaritemske faze (OD_{600} okoli 0,5) in dodali penicilin/ampicilin in inkubirali s stresanjem 1 h pri 37 °C. Nato smo celice centrifugirali pri 6000 g 15min, gojišče odlili in celice trikrat spirali z mrzlim pufom SMP, ki vsebuje 272 mM saharoze, 1 mM $MgCl_2$, and 7 mM natrijevega fosfata pH 7,4. Nato smo celice smo resuspendirali v tolikšnem volumnu pufra SMP, da smo jih 100x skoncentrirali.

Suspenzije celic (100 µl) smo nato dodali plazmide v več kombinacijah:

- 2 µl plazmida MPZ (vsebuje rezistenco proti eritromicinu),
- 6 µl plazmida MPZ (vsebuje rezistenco proti eritromicinu),
- 2 µl mešanice plazmidov MPZ8148 + IrPP2210 (vsebuje rezistenco proti kloramfenikolu),
- 6 µl mešanice plazmidov MPZ8148 + IrPP2210 (vsebuje rezistenco proti kloramfenikolu),
- eritromicin,
- kloramfenikol.

Tako po elektroporaciji (25 kV, 200 Ω , 25 μF) posameznih mešanic smo dodali 1 ml ledeno hladnega gojišča BHI, ter inkubirali dve uri pri 37 °C. Nato smo jih nacepili na BHI agar z ustreznim antibiotikom, ter inkubirali pri 37 °C en ali dva dni.

Za analizo izražanja infrardečega fluorescentnega proteina (IRFP) zapisanega na plazmidih smo iz posameznih kolonij pripravili prekonočne kulture v 5 ml BHI gojišča z ustreznim antibiotikom.

Naslednji dan smo jih redčili 1:50 v 5 ml gojišča z antibiotikom in dodali še biliverdin. Sledila je inkubacija pri 37 °C preko noči. Biliverdin služi kot kofaktor za IRFP in mora biti prisoten med samo ekspresijo, da se lahko vgradi v protein. Lahko ga dodamo naknadno, vendar je test manj občutljiv.

Po inkubaciji (OD_{600} mora biti med 0,7 in 1) smo dodali transformantam, ki vsebujejo plazmid MPZ, še nizin (10 $\mu\text{l}/10 \text{ ml}$), inkubirali 3 h pri 37 °C in šele nato izmerili fluorescenco (ex/em 690/713) z uporabo optičnega čitalca mikrotitrskih plošč (Ma in sod., 2011; Filonov in sod., 2011).

3.3.6 Frakcionacija vodnega izvlečka iz *Pleurotus ostreatus* z gelsko in ionsko izmenjevalno kromatografijo

Frakcionacijo smo naredili na vodnem izvlečku iz gobe *Pleurotus ostreatus* (Gobarstvo Jožica Zorko s.p.) z metodama gelske in ionske kromatografije. Ta izvleček je imel dobro protimikrobnino in protiadhezivno delovanje, zato smo preverili njegovo sestavo ter aktivnost 22ih frakcij.

3.3.6.1 Gelska filtracija

Prvo frakcionacijo smo izvedli z gelsko filtracijo, kjer se proteini v vzorcu ločijo glede na velikost in obliko.

Za nosilec se običajno uporablja gel - poliakrilamid, dekstran ali agarozo, ki predstavlja stacionarno fazo in je sestavljen iz zamreženih sferičnih delcev. Proteini različnih velikosti se skozi stacionarno fazo izločijo z različno hitrostjo - velike molekule ne morejo vstopiti v sistem por in se izločijo prej kot male molekule, ki vstopajo v sistem in se izločijo kasneje.

Uporabili smo kolono dolžine 116 cm in premera 4,5 cm in nosilec Sephadryl S-200 High resolution, ki je prečno povezan kopolimer, sestavljen iz alil dekstrana in N, N'-metilen bisakrilamida. Velikost delcev v tem matriksu je od 25 μm do 75 μm . Takšna velikost je primerna za frakcionacijo globularnih proteinov z relativno molekulsko maso od 5000 Da do 250 kDa. Stabilen je v pH območju med 3 in 11 (GE Healthcare Life Sciences, 2016).

Kromatografija je potekala v hladni sobi pri 4 °C. Pred nanosom vzorca smo stacionarno fazo 24 h spirali s pufrom Tris-HCl, pH 7,5. Vzorec izvlečka *P. ostreatus* smo 10 x skoncentrirali z ultrafiltracijo na filtru z velikostjo por 3 kDa in centrifugirali 15 min pri 20 000 x g in 4 °C ter

ga 30 ml nanesli na kolono. Gelska kromatografija je potekala s pretokom 42,60 ml/h in zbiranjem frakcij vsakih 25 min.

S spektrofotometrom Lambda 25 smo izmerili absorbanco posamezne frakcije pri 280 nm, ter s tem določili količino proteinov v posamezni frakciji. Ločbo smo ocenili z analizo NaDS-PAGE, kamor smo nanesli 35 µl frakcije, ki smo ji dodali 15 µl nanašalnega pufra.

Posameznim frakcijam smo tudi določili minimalno inhibitorno koncentracijo z uporabo fluorescentno označene bakterije *Listeria innocua*.

3.3.6.2 Ionsko izmenjevalna kromatografija

Ionsko izmenjevalna kromatografija je tehnika, ki temelji na reverzibilni vezavi nabitih molekul na imobilizirano nasprotno nabito ionsko skupino na nosilcu. Temelji na privlačnih elektrostatskih interakcijah med nasprotno nabitimi delci.

Uporabili smo nosilec DEAE (dietil aminoethyl) celulozo, ki je šibek anionski izmenjevalec. Ta je pozitivno nabit in ohranja visoko kapaciteto v pH območju med 2 in 9. Nase veže anione oz. negativno nabite proteine. Ker se nosilec večkrat uporabi, smo ga pred ponovno uporabo očistili s spiranjem z raztopino 300 ml 2 M NaCl in zaporednim spiranjem z raztopinama 300 ml 0,1 M NaOH in 250 ml 0,1 M ocetne kisline (odstrani precipitirane in hidrofobno vezane lipoproteine), kar smo ponovili dvakrat.

Ionsko izmenjevalno kromatografijo smo uporabili za analizo frakcij od 43-47, ki smo jih po gelski kromatografiji združili in skoncentrirali z ultrafiltracijo na filtru z velikostjo por 1 kDa.

Vzorec smo trikrat dializirali v 1 l 0,02 M pufra Bis-Tris pH 6,5. Pomembno je, da sta vzorec in nosilec ekvilibrirana v istem pufru.

Po tem, ko se proteini vežejo na nosilec, jih moramo tudi eluirati iz nosilca. To lahko naredimo na več načinov. Prvi je s povečanjem ionske jakosti, kar povzroči tekmovanje za vezavo na nosilec. Ionsko jakost lahko povečujemo stopenjsko ali pa gradientno. Drugi način elucije proteina z nosilca je s spremembo pH pufra. To povzroči spremembo nabojev in zato spremembo moči vezave (Pavšič, 2011; HA, 2016).

Ionsko izmenjevalna kromatografija je potekala v hladni sobi pri 4 °C. Pretok skozi kolono je bil 19,2 ml/h, kolektor pa je zbiral frakcije na 30 min. Nanesli smo dodali 11 ml vzorca in nato spirali s 500 ml 0,02 M pufra Bis-Tris pH 6,5. Elucijo smo izvedli z gradientnim povečevanjem ionske jakosti do 0,3 M NaCl v pufru 0,02 M Bis-Tris, pH 6,5 s skupnim volumenom 1200 ml in še dodatno s spiranjem z 0,5 M NaCl (500 ml) ter nato še z 1 M NaCl (500 ml).

3.3.6.3 Spektrofotometrično določanje koncentracije proteinov

Večina raztopin proteinov ima zaradi vsebnosti aromatskih aminokislin (tirozin, triptofan in fenilalanin) absorpcijski maksimum v UV področju pri 280 nm. To lastnost izkoriščamo za merjenje absorbance pri tej valovni dolžini (Križaj, 2015).

3.3.6.4 L- aminokislinska oksidazna aktivnost

L-aminokislinske oksidaze (LAO) so homodimerni flavoproteini, ki katalizirajo stereospecifično oksidativno deaminacijo L-aminokislin do alfa keto kislin. Nastane amonijak in vodikov peroksid. So razširjene med različnimi organizmi. Imajo funkcijo v bazalnem aminokislinskem katabolizmu ali pa pri nastajanju reaktivnih kisikov spojin – vodikovega peroksida (Žun in sod., 2014). Zaradi produkcije vodikovega peroksida jim pripisujemo protibakterijsko delovanje. Naša hipoteza je bila, da imajo frakcije 24-38 po gelski filtraciji izvlečka iz gobe *P. ostreatus* protibakterijsko delovanje zaradi vsebnosti L-aminokislinskih oksidaz (Hossain in sod., 2014).

Za detekcijo LAO smo uporabili dve metodi: spektrofotometrično metodo in metodo za detekcijo LAO v gelu. Metoda temelji na detekciji vodikovega peroksida s hrenovo peroksidazo. Reakcija je sklopljena z *o*-fenilendiaminom (OPD). Hrenova peroksidaza porablja vodikov peroksid, ki nastane pri L-aminokislinskem delovanju. Vodikov peroksid je donor elektronov, s katerim lahko hrenova peroksidaza oksidira OPD do DAP. Ker se DAP obarva rumeno-rjavo, ga vidimo na gelu oziroma zaznamo spektrofotometrično.

Za detekcijo LAO aktivnosti v gelu smo vzorce izbranih frakcij ločili v 10 % gelu NaDS-PAGE ne da bi jih predhodno kuhalili. Po končani elektroforezi smo gel pri sobni temperaturi 10 min inkubirali v 0,1 M pufru BisTris-HCl, pH 5,5. Nato smo ga inkubirali 24 ur v mešanici 50 mM L-levcina, 20 mM OPD, 50 U/ml hrenove peroksidaze ter 0,1 M pufru BisTris pH 5,5. Po 24 urni inkubaciji smo dodali 2 M H₂SO₄, inkubirali 10 min in gel dokumentirali z optičnim čitalcem.

Po metodi za detekcijo L- aminokislinskih oksidaz v gelu smo naredili še spektrofotometrično metodo v mikrotitrski ploščici. V jamice smo odpipetirali 20 µl posamezne frakcije in nato dodali 80 µl mešanice 50 mM levcina, 20 mM OPD, 50 U/ml hrenove peroksidaze ter 0,1 M pufer BisTris, pH 5,5. Potek reakcije smo merili 1 h z uporabo čitalca mikrotitrskih plošč pri 30 °C, tako da se je na vsako minuto izmerila absorbanca pri 420 nm. Na podlagi teh rezultatov smo potem lahko izračunali specifično aktivnost, ki nam je dala rezultat o aktivnosti L-aminokislinskih oksidaz neodvisno od količine proteina. Ta metoda je sicer bolj občutljiva od metode z detekcijo v gelu.

3.3.6.4.1 Minimalna inhibitorna koncentracija

Frakcijam, ki so imele najvišjo L-aminokislinsko oksidazno aktivnost, smo še enkrat testirali minimalno inhibitorno koncentracijo z uporabo bakterije *Listeria innocua*, ki izraža infrardeči fluorescentni protein IRFP. Testirali smo pet koncentracij frakcije: 5 %, 4 %, 3 %, 2 % in 1 %. Pri vsaki frakciji smo naredili štiri ponovitve; dve brez dodane katalaze ter dve z dodatkom katalaze 10 µl 1000-5000 U/ml katalaze. Mešanice gojišča, bakterije in frakcije smo inkubirali preko noči pri 37 °C in naslednji dan izmerili intenziteto fluorescence.

3.3.6.5 Analiza nizkomolekularnih frakcij (F58 - F68) po gelski kromatografiji

Za analizo teh frakcij smo poslali vzorec prof. dr. Franzu Bucarju na Karl-Franzens univerzo v Gradec. Tam so naredili LC-PDA-ESI MS analizo vzorca.

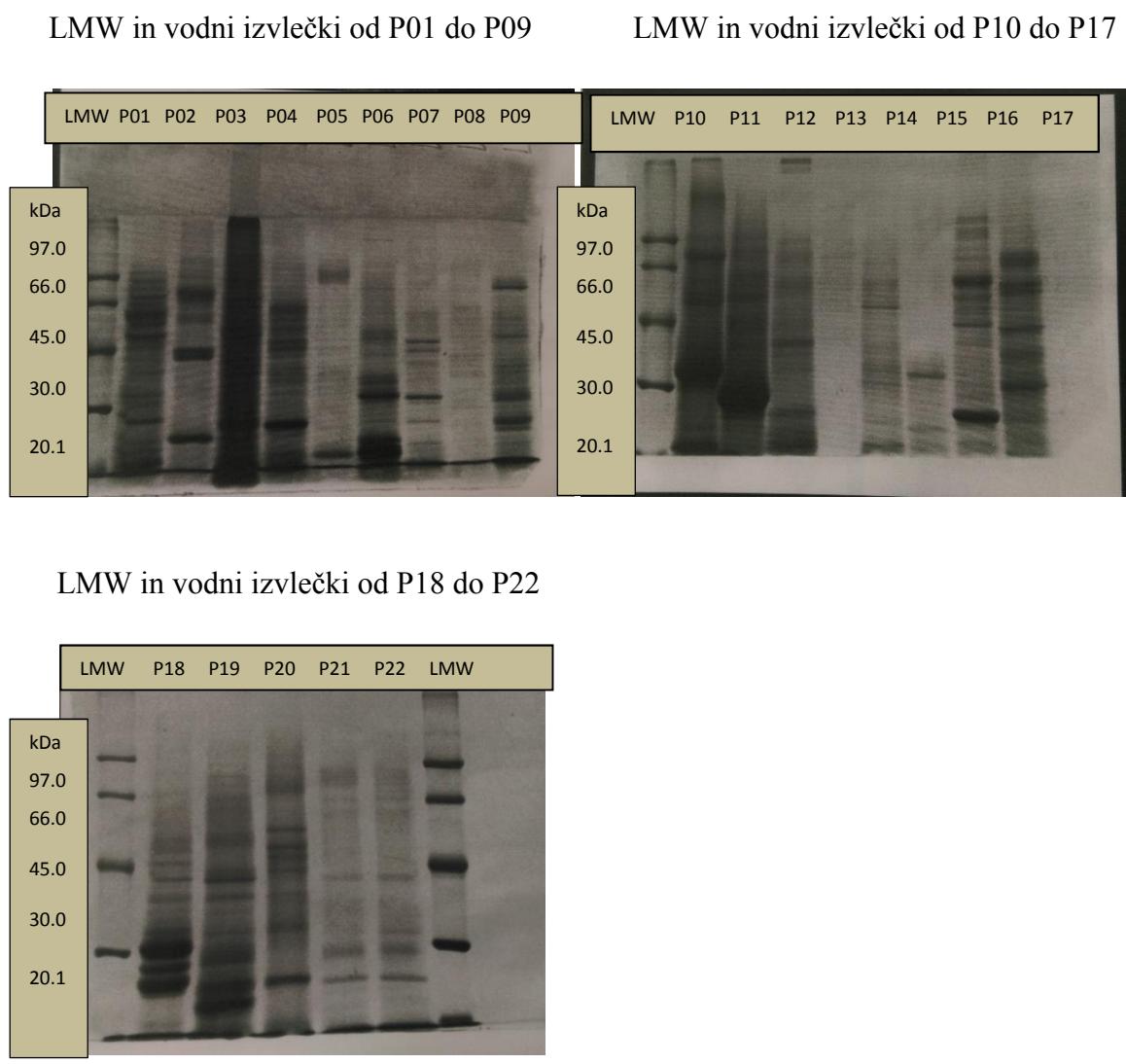
3.3.7 Temperaturna obstojnost vodnih izvlečkov

Izvlečku in frakcijam gobe *P. ostreatus* smo preverili temperaturno obstojnost. Proteini so slabo obstojni, pri višjih temperaturah se s kuhanjem denaturirajo in tako bi izgubili protimikroben delovanje vodnega izvlečka. Izvleček smo razdelili na pet delov in jih inkubirali 20 min pri 25 °C (kontrola), pri 40 °C, 60 °C, 80 °C in 100 °C. Nato smo jih uporabili v metodi mikrodilucije in analizirali protimikroben aktivnost z uporabo fluorescentno označene bakterije *Listeria innocua*, in sicer od začetne koncentracije izvlečka/frakcije 10 % do končne koncentracije 0,3125 %.

4 REZULTATI

4.1 ANALIZA VSEBNOSTI PROTEINOV PRIDOBLEJENIH VODNIH IZVLEČKOV Z NaDS-PAGE

Pripravili smo vodne izvlečke 23ih gob (preglednica 5) in jih analizirali z NaDS-PAGE (slika 23). Analiza je pokazala, da se vsebnost proteinov v posameznih izvlečkih razlikuje, čeprav so bili pripravljeni iz enake količine gob in po enakem postopku. Največ proteinov vsebujejo izvlečki P3 (»purpen« gliva), P10 (*Clitocybe nebularis*) in P11 (*Clitocybe geotropa*), medtem ko je vsebnost proteinov najnižja v vzorcu P13 (*Tapinella atrotomentosa*).



Slika 23: Geli po NaDS-PAGE elektroforezi 22ih vodnih izvlečkov (10 % gel)

4.2 PROTIMIKROBNO DELOVANJE VODNIH IZVLEČKOV

Glede na učinkovitost protimikrobnega delovanja vodnih izvlečkov na bakterije *L. innocua*, *L. monocytogenes*, *B. cereus*, *C. jejuni*, *E. coli*, kvasovke *C. albicans* in plesni *A. ochraceus* smo jih razdelili v štiri skupine. Skupina A, ki je imela MIK večji ali enak 10 %, skupina B, ki je imela MIK med 1 in 10 %, skupina C, ki je imela MIK med 0,2 % in 1 % ter skupino D, kjer je bil MIK nižji od 0,2 %.

Preglednica 14: Protimikrobno delovanje vodnih izvlečkov na bakterije (*L. innocua*, *L. monocytogenes*, *B. cereus*, *C. jejuni* in *E. coli*), kvasovko *C. albicans* in plesen *A. ochraceus*

| IZVLEČKI | <i>L. innocua</i> | <i>L. monocytogenes</i> | <i>B. cereus</i> | <i>C. jejuni</i> | <i>E. coli</i> | <i>C. albicans</i> | <i>A. ochraceus</i> |
|----------|-------------------|-------------------------|------------------|------------------|----------------|--------------------|---------------------|
| P01 | B | B | B | D | B | C | D |
| P02 | B | B | C | D | B | B | C |
| P03 | B | B | B | D | B | B | D |
| P04 | B | B | C | D | B | C | D |
| P05 | A | A | B | B | B | B | B |
| P06 | B | B | D | B | B | C | C |
| P07 | A | A | C | B | B | B | B |
| P08 | A | A | C | B | B | C | C |
| P09 | A | A | D | B | B | B | C |
| P10 | D | C | C | D | C | C | C |
| P11 | B | B | C | D | C | C | C |
| P12 | B | B | D | D | C | C | D |
| P13 | B | B | B | C | C | B | C |
| P14 | D | D | C | C | C | C | C |
| P15 | C | C | B | D | C | C | C |
| P16 | C | C | C | D | C | C | D |
| P17 | C | C | C | C | C | C | C |
| P18 | B | B | B | B | C | C | C |
| P19 | B | B | D | B | C | C | C |
| P20 | B | B | D | B | C | C | C |
| P21 | C | C | C | D | C | C | C |
| P22 | C | C | C | C | C | C | C |
| J01B | B | B | C | C | B | B | C |

Legenda:

Skupina A: MIK \geq 10 % vodnega izvlečka

Skupina B: MIK od 1% do 10 % vodnega izvlečka

Skupina C: MIK od 0,2 % do 1 % vodnega izvlečka

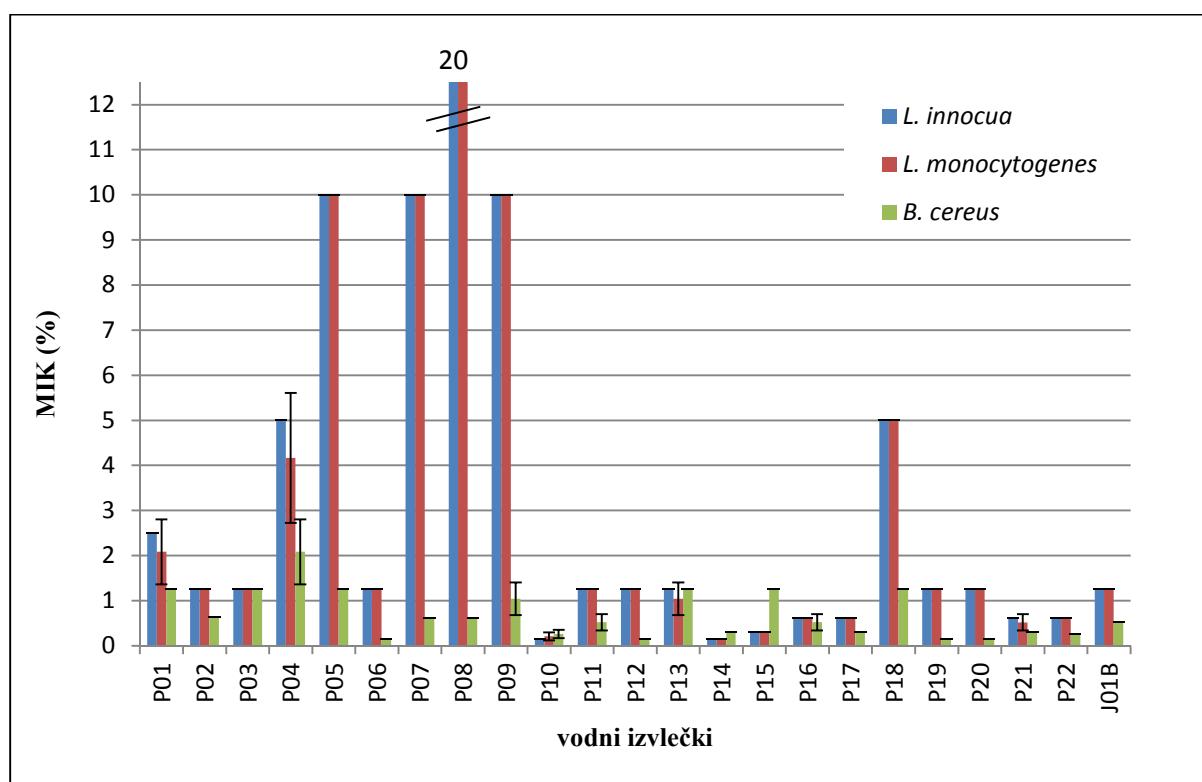
Skupina D: MIK < 0,2 % vodnega izvlečka

P01 – *Lycoperdon pyriforme*, P02 – *Lactarius vellerus*, P03 – “purpen” gliva, P04 - *Macrolepiota procera*, P05 - *Suillus granulatus*, P06 - *Amanita rubescens*, P07 - *Russula alutacea*, P08 - *Suillus variegatus*, P09 - *Fomitopsis pinicola*, P10 - *Clitocybe nebularis*, P11 - *Clitocybe geotropa*, P12 - *Clitocybe gibba*, P13 - *Tapinella atrotomentosa*, P14 - *Lactarius necator*, P15 - *Lyophyllum decastes*, P16 - *Coprinus comatus*, P17 - *Amanita excelsa*, P18 - *Sparassis crispa*, P19 - *Tricholoma sulphureum*, P20 - *Boletus badius*, P21 - *Kuehneromyces mutabilis*, P22 - *Armillaria borealis*, J01B - *Pleurotus ostreatus*

Iz preglednice 14 je razvidno, da imajo vsi vodni izvlečki iz gob protimikrobeno delovanje na bakterije, kvasovko in plesen, vendar pa ne delujejo vsi enako dobro. Glede na rezultate bi lahko posamezne skupine opredelili na D -zelo učinkoviti, C-učinkoviti, B- zmerno učinkoviti in A-slabo učinkoviti.

V nadaljevanju smo primerjali protimikrobeno delovanje na posamezne skupine mikroorganizmov (Gram pozitivne bakterije, Gram negativne bakterije, kvasovka in plesen), ki smo ga ovrednotili tako, da smo določili vrednost MIK. Grafi prikazujejo MIK, pri čemer nižji stolpec pomeni delovanje vodnega izvlečka pri nižji koncentraciji, kar pomeni večjo protimikrobeno aktivnost.

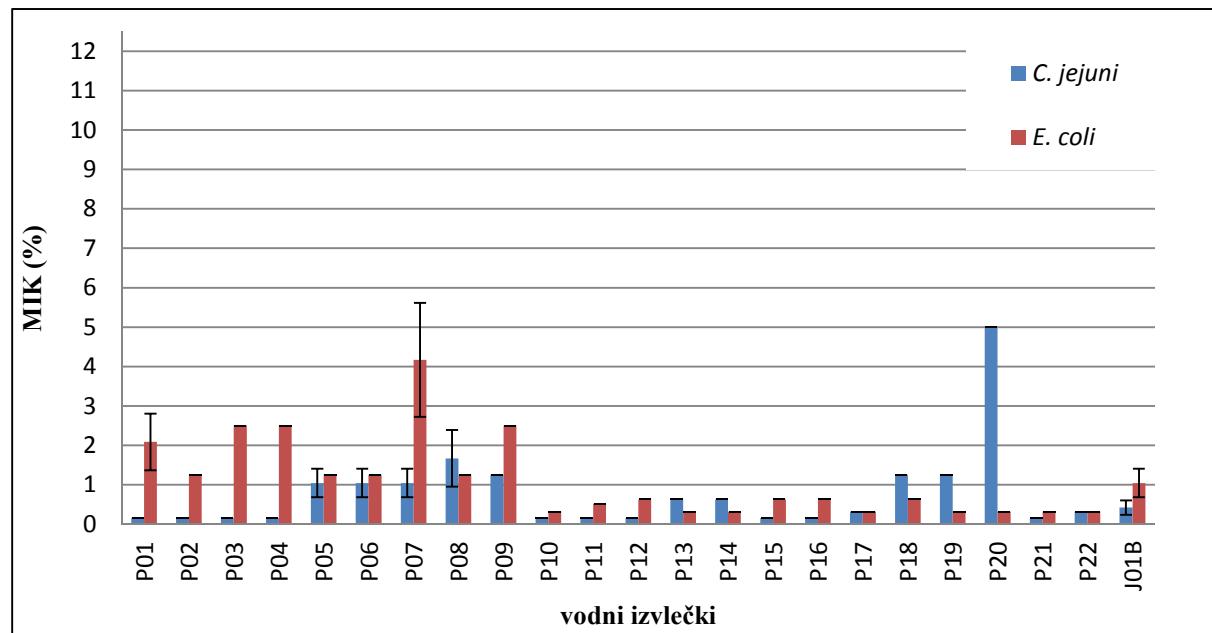
Večina vodnih izvlečkov je učinkovala protimikrobeno na Gram pozitivne bakterije pod koncentracijo 2,5 %, le šest jih je bilo manj učinkovitih in eden (P08 - *Suillus variegatus*) neučinkovit oz. slabo učinkovit (slika 24).



Slika 24: Protimikrobeno delovanje vodnih izvlečkov na Gram pozitivne bakterije, podano kot MIK vrednosti

Legenda: P01 – *Lycoperdon pyriforme*, P02 – *Lactarius vellerus*, P03 – “purpen” gliva, P04 - *Macrolepiota procera*, P05 - *Suillus granulatus*, P06 - *Amanita rubescens*, P07 - *Russula alutacea*, P08 - *Suillus variegatus*, P09 - *Fomitopsis pinicola*, P10 - *Clitocybe nebularis*, P11 - *Clitocybe geotropa*, P12 - *Clitocybe gibba*, P13 - *Tapinella atrotomentosa*, P14 - *Lactarius necator*, P15 - *Lyophyllum decastes*, P16 - *Coprinus comatus*, P17 - *Amanita excelsa*, P18 - *Sparassis crispa*, P19 - *Tricholoma sulphureum*, P20 - *Boletus badius*, P21 - *Kuehneromyces mutabilis*, P22 - *Armillaria borealis*, J01B - *Pleurotus ostreatus*

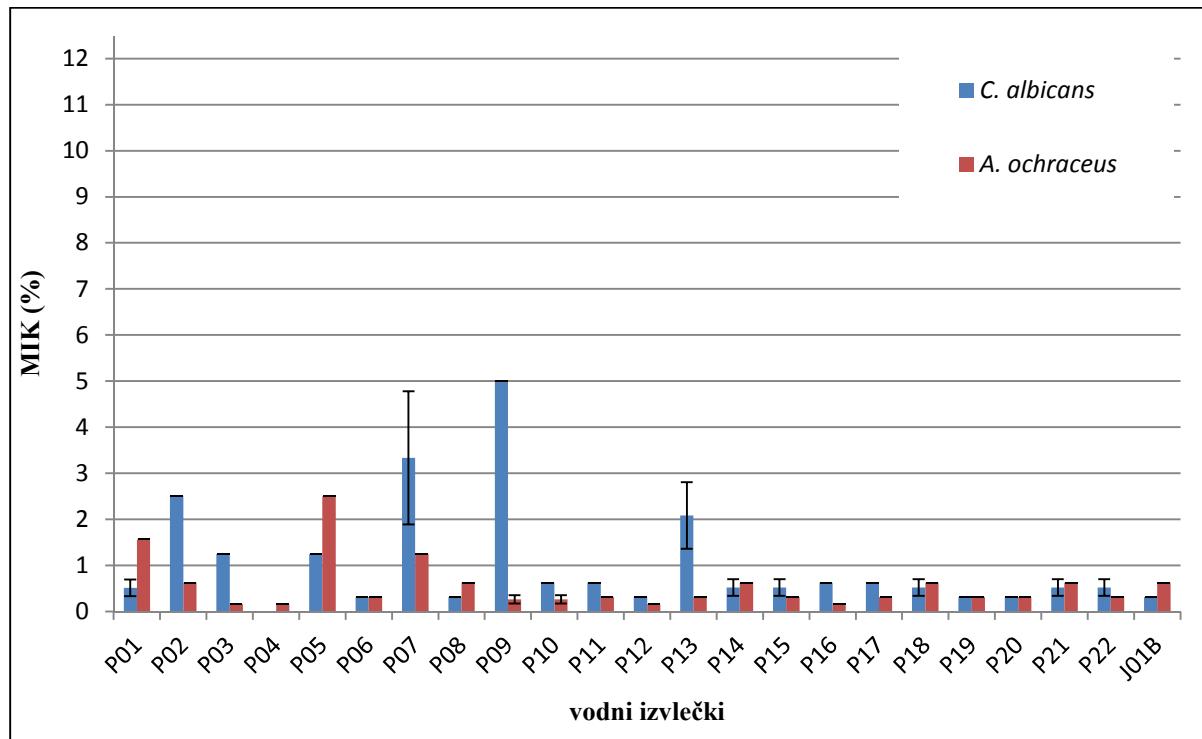
Na sliki 25 lahko vidimo, da imajo vodni izvlečki še nižje MIK pri Gram negativnih bakterijah (*C. jejuni* in *E. coli*), kot pri Gram pozitivnih. Kar nekaj jih ima MIK pod 1,25 %, ter le dva nad 2,5 % vodnega izvlečka.



Slika 25: Protimikrobrobno delovanje vodnih izvlečkov na Gram negativne bakterije, podano kot MIK vrednosti

Legenda: P01 – *Lycoperdon pyriforme*, P02 – *Lactarius vellerus*, P03 – “purpen” gliva, P04 - *Macrolepiota procera*, P05 - *Suillus granulatus*, P06 - *Amanita rubescens*, P07 - *Russula alutacea*, P08 - *Suillus variegatus*, P09 - *Fomitopsis pinicola*, P10 - *Clitocybe nebularis*, P11 - *Clitocybe geotropa*, P12 - *Clitocybe gibba*, P13 - *Tapinella atrotomentosa*, P14 - *Lactarius necator*, P15 - *Lyophyllum decastes*, P16 - *Coprinus comatus*, P17 - *Amanita excelsa*, P18 - *Sparassis crispa*, P19 - *Tricholoma sulphureum*, P20 - *Boletus badius*, P21 - *Kuehneromyces mutabilis*, P22 - *Armillaria borealis*, J01B - *Pleurotus ostreatus*

Podobni rezultati kot pri Gram negativnih bakterijah so tudi pri kvasovki in plesni. Večina MIK je pod 1,25 %. Rast kvasovke zavirajo še bolj učinkovito kot rast plesni (slika 26).



Slika 26: Protimikrobro delovanje vodnih izvlečkov na kvasovko in plesen, podano kot MIK vrednosti

Legenda: P01 – *Lycoperdon pyriforme*, P02 – *Lactarius vellerus*, P03 – “purpen” gliva, P04 - *Macrolepiota procera*, P05 - *Suillus granulatus*, P06 - *Amanita rubescens*, P07 - *Russula alutacea*, P08 - *Suillus variegatus*, P09 - *Fomitopsis pinicola*, P10 - *Clitocybe nebularis*, P11 - *Clitocybe geotropa*, P12 - *Clitocybe gibba*, P13 - *Tapinella atrotomentosa*, P14 - *Lactarius necator*, P15 - *Lyophyllum decastes*, P16 - *Coprinus comatus*, P17 - *Amanita excelsa*, P18 - *Sparassis crispa*, P19 - *Tricholoma sulphureum*, P20 - *Boletus badius*, P21 - *Kuehneromyces mutabilis*, P22 - *Armillaria borealis*, J01B - *Pleurotus ostreatus*

4.3 PROTIADHEZIVNO DELOVANJE VODNIH IZVLEČKOV

Protiadhezivno delovanje vodnih izvlečkov smo določali z metodo barvanja biomase s kristal violetom. Glede na protimikrobeno delovanje smo izbrali dve subinhibitorni koncentraciji, ki ne vplivata na rast mikroorganizmov. Ti dve koncentraciji smo izbrali glede na predhodne rezultate protimikrobnega delovanja vodnih izvlečkov na vse mikroorganizme. Izbrali smo koncentraciji 0,1 % in 0,01 % vodnega izvlečka in jih uporabili pri testiranju protiadhezivnega delovanja izvlečkov (od P01 do P22, J01B) na bakterije *L. innocua*, *L. monocytogenes*, *E. coli*, *C. jejuni* in *B. cereus*, kvasovko *C. albicans* in plesen *A. ochraceus*.

Na začetku smo razdelili vodne izvlečke v štiri skupine (A, B, C in D) glede na to, kako učinkovito so zavirali rast biofilma izbranih mikroorganizmov. Skupina A, ki je zavirala rast biofilma od 0 % do 20 %, skupina B, ki je zavirala rast biofilma od 20 % do 50 %, skupina C, ki je zavirala rast biofilma od 50 % do 80 %, ter skupina D, ki je zavirala rast biofilma nad 80 %.

Preglednica 15: Protiadhezivno delovanje vodnih izvlečkov na bakterije (*L. innocua*, *L. monocytogenes*, *B. cereus*, *C. jejuni* in *E. coli*), kvasovko *C. albicans* in plesen *A. ochraceus*

| | <i>L. innocua</i> | | <i>B. cereus</i> | | <i>C. jejuni</i> | | <i>E. coli</i> | | <i>C. albicans</i> | | <i>A. ochraceus</i> | |
|----------|-------------------|--------|------------------|--------|------------------|--------|----------------|--------|--------------------|--------|---------------------|--------|
| Izvlečki | 0,10 % | 0,01 % | 0,10 % | 0,01 % | 0,10 % | 0,01 % | 0,10 % | 0,01 % | 0,10 % | 0,01 % | 0,10 % | 0,01 % |
| P01 | B | B | B | A | A | A | B | B | C | C | A | A |
| P02 | C | C | B | B | A | A | B | B | C | C | C | C |
| P03 | B | B | A | A | A | A | B | B | C | B | B | B |
| P04 | B | B | A | A | A | A | B | B | D | D | A | B |
| P05 | C | B | A | A | D | D | B | B | C | C | D | A |
| P06 | C | C | B | A | A | A | B | B | C | C | B | A |
| P07 | A | B | A | A | A | A | B | B | C | C | A | D |
| P08 | B | B | A | B | A | A | B | B | B | B | A | A |
| P09 | B | B | B | A | A | A | B | B | B | C | A | A |
| P10 | B | B | B | A | B | A | B | B | B | B | A | B |
| P11 | A | B | B | A | A | A | B | B | B | C | B | A |
| P12 | B | B | B | B | A | A | B | B | B | B | A | B |
| P13 | B | B | A | A | A | A | B | B | C | B | B | B |
| P14 | B | B | B | A | A | A | B | B | C | C | B | C |
| P15 | B | B | B | A | A | A | B | B | C | C | A | B |
| P16 | B | B | A | B | A | A | B | B | C | C | A | B |
| P17 | B | B | B | A | A | A | B | B | C | C | A | C |
| P18 | B | B | A | A | A | B | B | B | C | C | C | B |
| P19 | B | B | A | A | B | A | B | B | C | B | B | C |
| P20 | B | C | A | A | A | A | B | B | B | C | B | A |
| P21 | B | B | A | A | A | A | B | B | C | B | C | D |
| P22 | B | B | B | A | A | A | B | B | C | C | C | D |
| J01B | B | B | B | B | B | B | B | B | C | C | C | C |

Legenda:

Skupina A: 0 – 20 % inhibicija adhezije

Skupina B: 20 – 50 % inhibicija adhezije

Skupina C: 50 – 80 % inhibicija adhezije

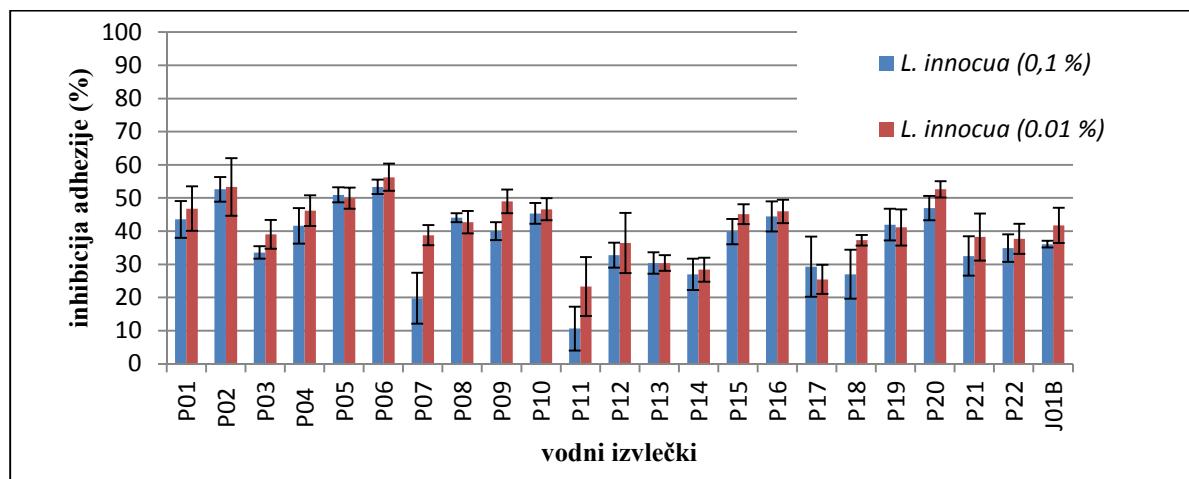
Skupina D: Nad 80 % inhibicija adhezije

P01 – *Lycoperdon pyriforme*, P02 – *Lactarius vellerus*, P03 – “purpen” gliva, P04 - *Macrolepiota procera*, P05 - *Suillus granulatus*, P06 - *Amanita rubescens*, P07 - *Russula alutacea*, P08 - *Suillus variegatus*, P09 - *Fomitopsis pinicola*, P10 - *Clitocybe nebularis*, P11 - *Clitocybe geotropa*, P12 - *Clitocybe gibba*, P13 - *Tapinella atrotomentosa*, P14 - *Lactarius necator*, P15 - *Lyophyllum decastes*, P16 - *Coprinus comatus*, P17 - *Amanita excelsa*, P18 - *Sparassis crispa*, P19 - *Tricholoma sulphureum*, P20 - *Boletus badius*, P21 - *Kuehneromyces mutabilis*, P22 - *Armillaria borealis*, J01B - *Pleurotus ostreatus*

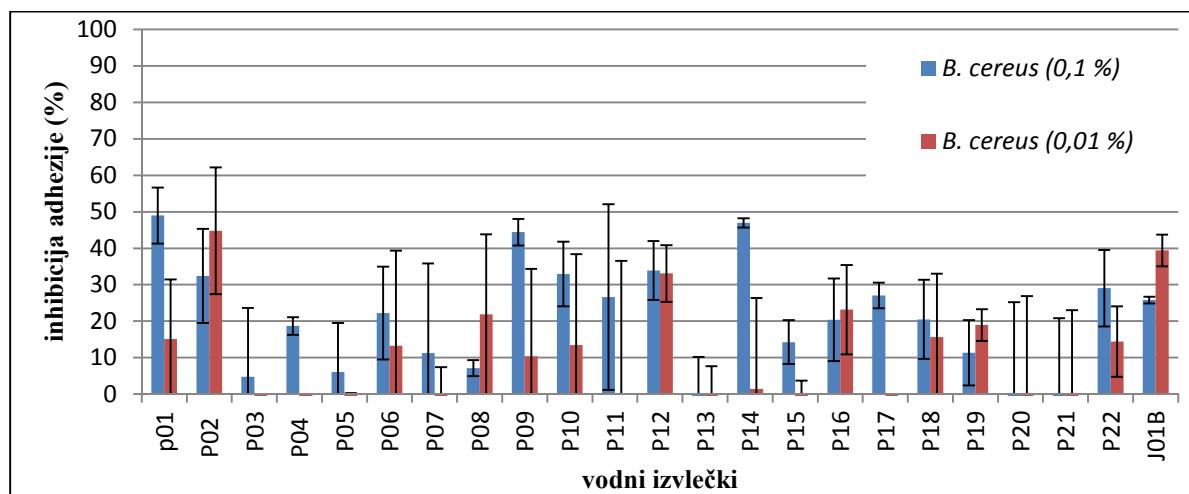
Iz preglednice 15 je razvidno, da skoraj vsi izvlečki zavirajo rast biofilma. Najbolj učinkovito pri *C. albicans*, najmanj učinkovito pa pri *B. cereus* in *C. jejuni*.

V nadaljevanju smo prikazali inhibicijo adhezije vodnih izvlečkov na posamezni mikroorganizem. Rezultati so prikazani na sliki 27 (grafikoni A, B, C, D, E in F) za vsak mikroorganizem posebej.

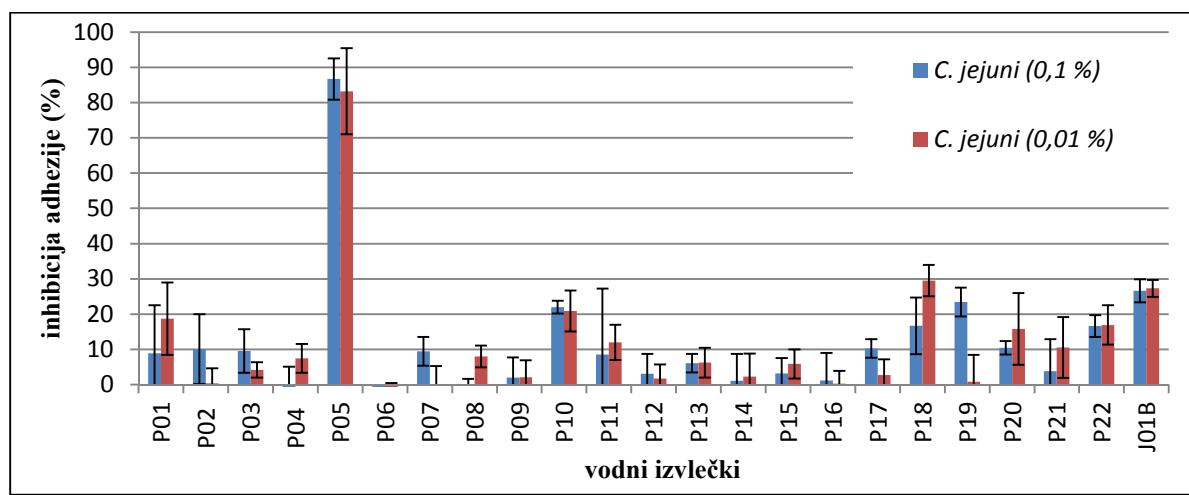
a) *L. innocua*



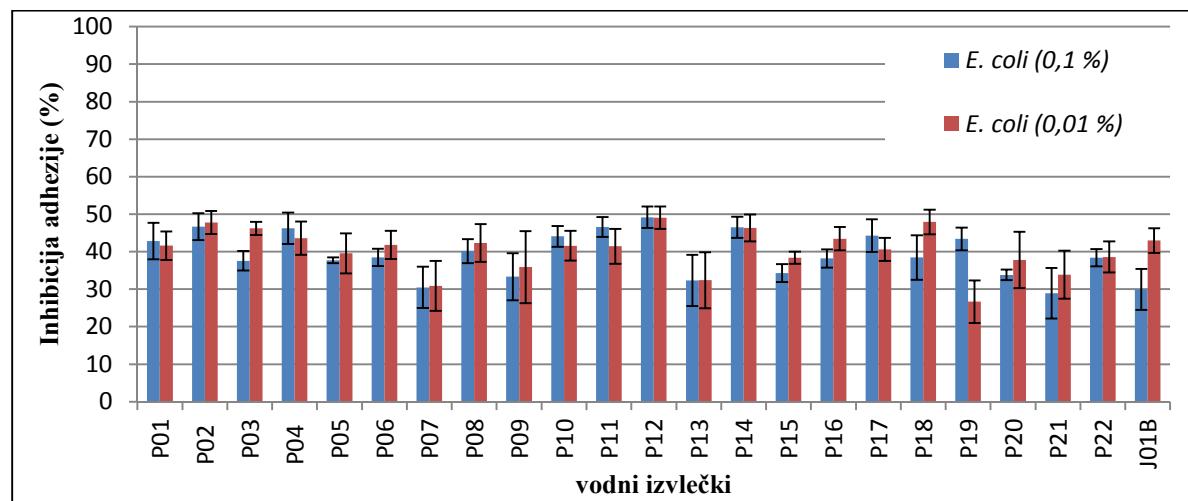
b) *B. cereus*



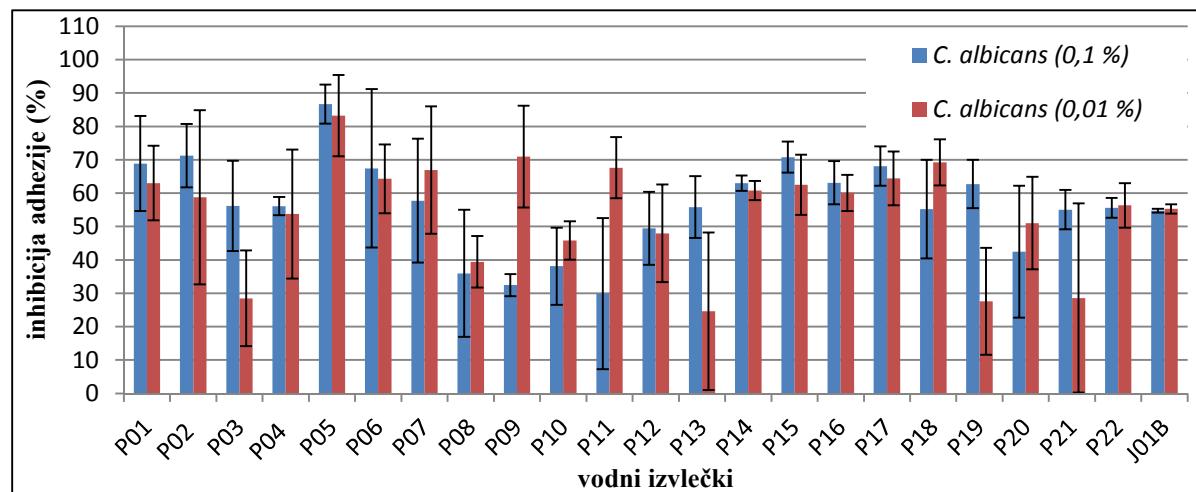
c) *C. jejuni*



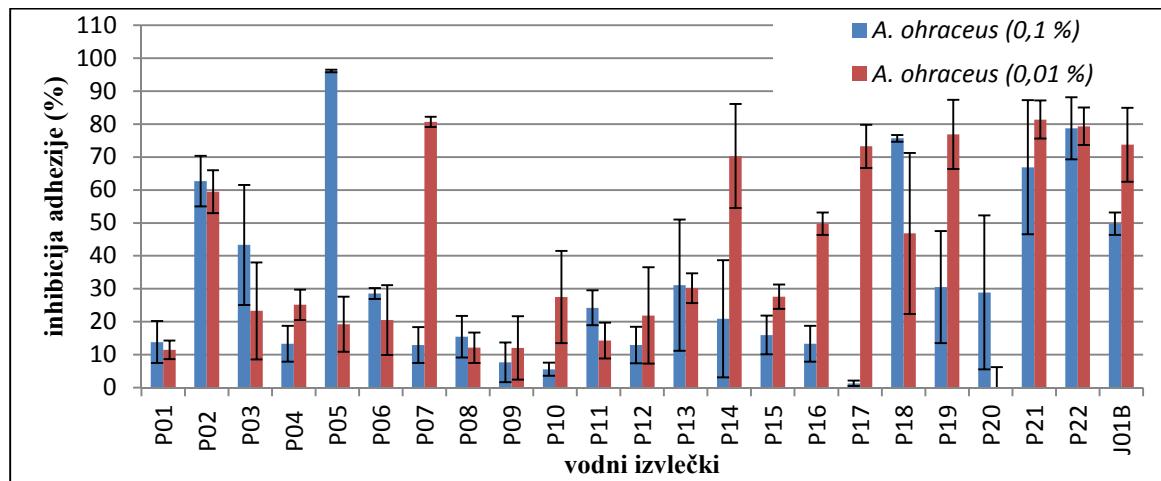
d) *E. coli*



e) *C. albicans*



f) *A. ochraceus*



Slika 27: Protiadhezivno delovanje vodnih izvlečkov na izbrane mikroorganizme prikazano na šestih grafikonih (od a do f)

Legenda: P01 – *Lycoperdon pyriforme*, P02 – *Lactarius vellerus*, P03 – “purpen” gliva, P04 - *Macrolepiota procera*, P05 - *Suillus granulatus*, P06 - *Amanita rubescens*, P07 - *Russula alutacea*, P08 - *Suillus variegatus*, P09 - *Fomitopsis pinicola*, P10 - *Clitocybe nebularis*, P11 - *Clitocybe geotropa*, P12 - *Clitocybe gibba*, P13 - *Tapinella atrotomentosa*, P14 - *Lactarius necator*, P15 - *Lyophyllum decastes*, P16 - *Coprinus comatus*, P17 - *Amanita excelsa*, P18 - *Sparassis crispa*, P19 - *Tricholoma sulphureum*, P20 - *Boletus badius*, P21 - *Kuehneromyces mutabilis*, P22 - *Armillaria borealis*, J01B - *Pleurotus ostreatus*

Na sliki 27 (grafikoni od a do f) lahko vidimo, da vsi vodni izvlečki delujejo tudi protiadhezivno na izbrane mikroorganizme. Pri bakterijah *E. coli* in *L. innocua* so si bili rezultati precej podobni med sabo – izvlečki so inhibirali adhezijo za približno 50 %. Tudi med posameznimi izvlečki ni bilo veliko variabilnosti. Najbolj učinkovito so izvlečki zavirali adhezijo pri kvasovki *C. albicans* (od 50 % do 80 % inhibicija), najmanj učinkovito pa pri bakterijah *C. jejuni* in *B. cereus*. Rezultati pri plesni *A. ochraceus* so tudi pokazali dobro protiadhezivno delovanje.

4.4 FRAKCIJACIJA

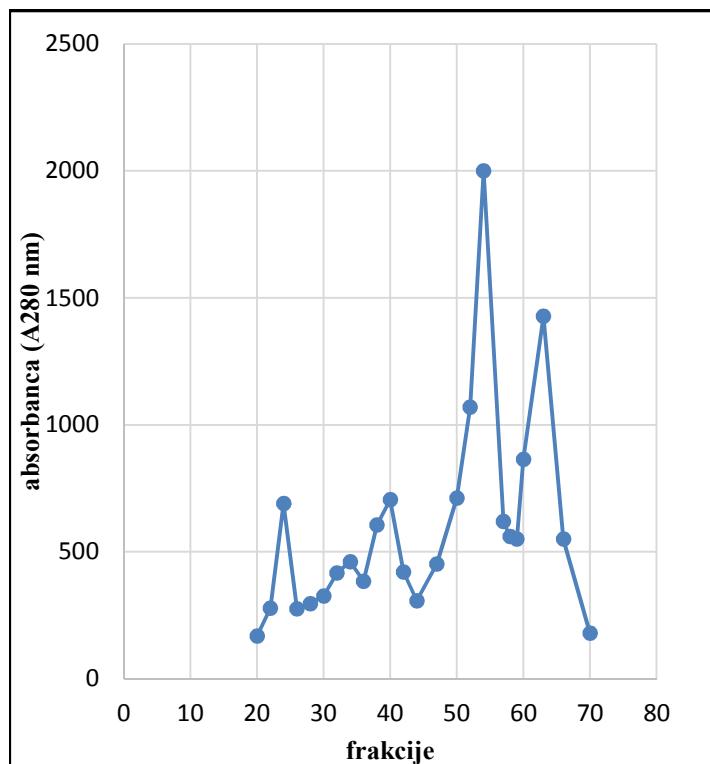
Ker je vodni izvleček iz gobe *Pleurotus ostreatus* (J01B) pokazal dobro protimikrobeno in protiadhezivno delovanje in ker je goba komercialno dostopna, smo ta izvleček izbrali za frakcijacijo, s katero smo želeli podrobnejše videti v sestavo izvlečka. Posameznim frakcijam smo izmerili absorbanco pri 280 nm ter preverili vsebnost in velikost proteinov v posamezni frakciji z NaDS-PAGE elektroforezo. Nato smo testirali protimikrobeno in protiadhezivno delovanje posameznih frakcij z uporabo fluorescentno označene bakterije *Listeria innocua*.

Frakcijacijo izbranega izvlečka smo naredili na dva načina:

- Na osnovi molekulske mase z uporabo gelske kromatografije z ločevanjem po velikosti.
- Na osnovi naboja z ionsko izmenjevalno kromatografijo.

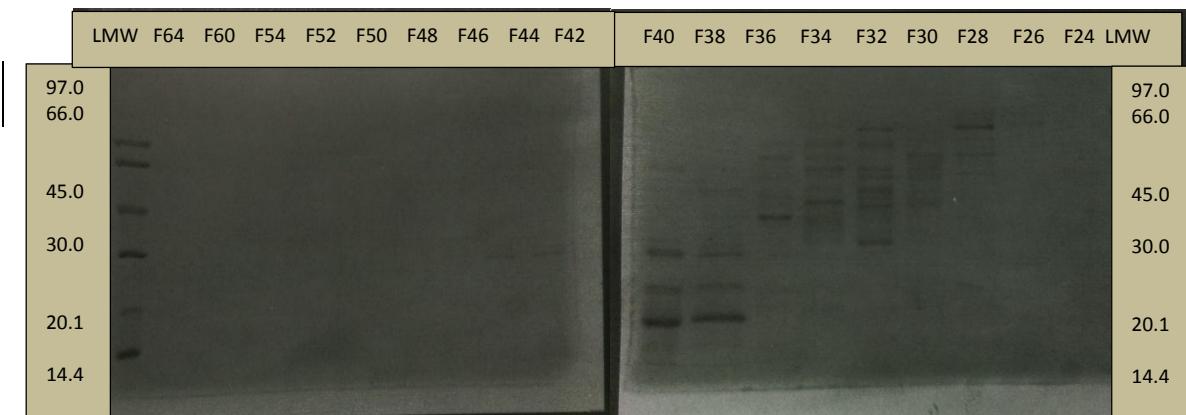
4.4.1 Gelska kromatografija

Z gelsko filtracijo smo ločili proteine v izvlečku gobe *P. ostreatus* po velikosti, pri čemer so se razporedili v 5 vrhov. Analiza NaDS-PAGE z barvanje z barvilom Comassie je pokazala prisotnost proteinov v frakcijah od 24 do 48. Zadnja dva vrhova verjetno vsebujejo manjše proteine in peptide.



Slika 28: Spektrofotometrično določanje vsebnosti proteinov v frakcijah iz gobe *Pleurotus ostreatus*, pridobljenih z gelsko kromatografijo

Na sliki 28 lahko vidimo katere frakcije vsebujejo več proteinov – večja kot je absorbanca pri 280 nm, več je proteina.



Slika 29: NaDS-PAGE elektroforeza frakcij iz gobe *Pleurotus ostreatus* po gelski kromatografiji (12 % gel)

Frakcije smo ločili tudi z NaDS-PAGE elektroforezo (slika 29), da smo lahko ocenili njihovo sestavo. Naredili smo 12 % NaDS-PAGE gel ter gaobarvali s Commassie barvilom. Na slikah gelov (slika 24) lahko vidimo, da začetne frakcije (od F24 do F36) vsebujejo večje proteine, kasnejše frakcije (F38, F40) pa manjše. Frakciji F42 in F44 imata le še eno rahlo liso. Pri frakcijah od 46 naprej ne vidimo ničesar. Po vsej verjetnosti so imele manjše proteine, ki se niso ujeli v zamreženost tega gela.

Naslednji korak je bil, da smo okarakterizirali protimikrobeno in protiadhezivno delovanje frakcij na fluorescentno označeni bakteriji *Listeria innocua*.

4.4.1.1 Protimikrobeno delovanje frakcij po gelski kromatografiji

Izbranim frakcijam gelske kromatografije (vsaka druga od 22 do 68) smo preverili minimalno inhibitorno koncentracijo z uporabo fluorescentno označene bakterije *Listeria innocua*. Zanimalo nas je, če imajo frakcije še vedno protimikrobeno delovanje in v kateri od frakcij je aktivna komponenta s protimikrobnim delovanjem. Zato smo frakcijam določili vrednosti MIK s fluorescentno označeno bakterijo *Listeria innocua* z metodo razredčevanja v mikrotitrski ploščici. Rezultat smo ovrednotili z intenziteto fluorescence.

V spodnji preglednici smo razdelili frakcije v tri skupine (A, B in C) glede na to, kako učinkovito so zavirale rast bakterije. Skupina A je imela MIK večji ali enak 7,5 %, skupina B je imela MIK med 2,5 % in 7,5 % in skupina C je imela MIK manjši od 2,5 %.

Preglednica 16: Protimikrobeno delovanje frakcij iz gobe *P. ostreatus*, pridobljenih z gelsko kromatografijo, na bakterijo *L. innocua*

| Frakcije | <i>L. innocua</i> | Frakcije | <i>L. innocua</i> |
|----------|-------------------|----------|-------------------|
| F22 | C | F46 | C |
| F24 | B | F48 | C |
| F26 | C | F50 | A |
| F28 | C | F52 | C |
| F30 | C | F54 | A |
| F32 | C | F56 | A |
| F34 | C | F58 | C |
| F36 | C | F60 | C |
| F38 | A | F62 | C |
| F40 | A | F64 | C |
| F42 | A | F66 | C |
| F44 | C | F68 | C |

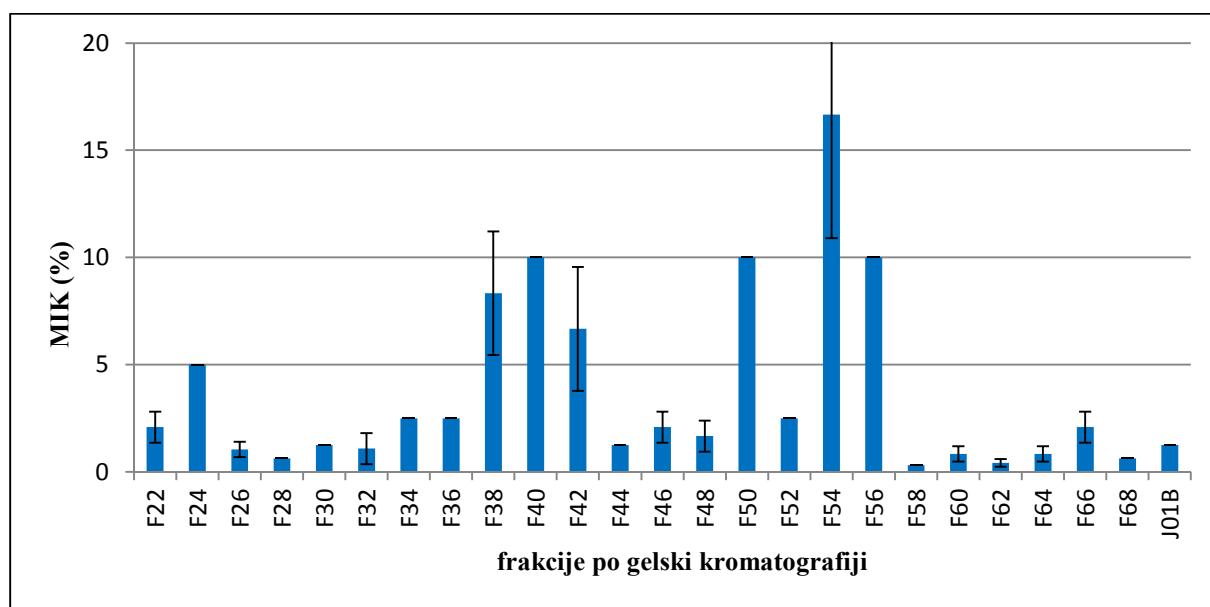
Legenda:

Skupna A: MIK $\geq 7,5\%$ frakcije

Skupina B: MIK od 2,5 % do 7,5 % frakcije

Skupina C: MIK < 2,5 % frakcije

Iz preglednice 16 lahko vidimo, da vse frakcije delujejo protimikrobeno, najboljše med njimi pa so frakcije od F24-f36, od F44-F48 in od F58-F68.



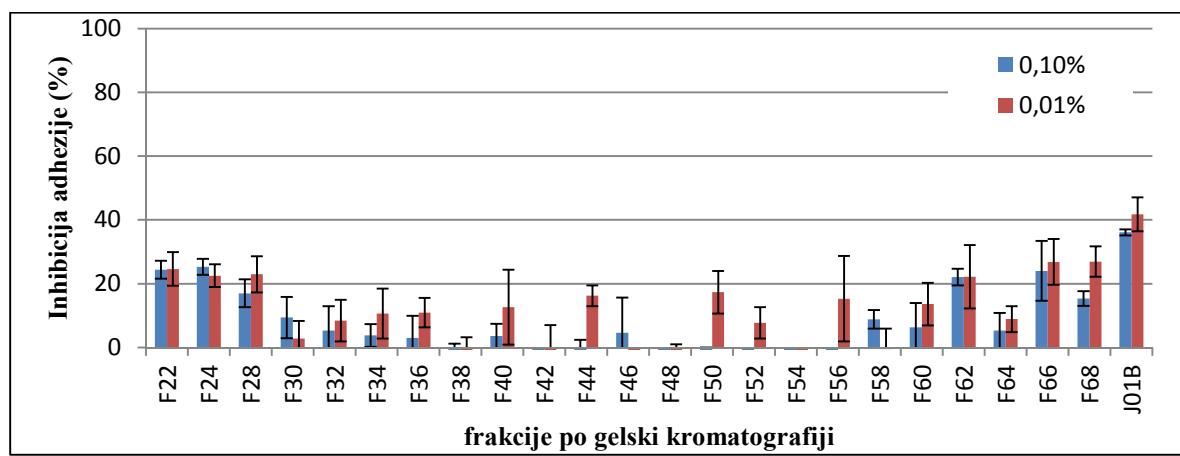
Slika 30: Minimalne inhibitorne koncentracije frakcij iz gobe *P. ostreatus* po gelski kromatografiji

Glede na protimikrobeno delovanje smo v nadaljevanju frakcije razdelili po skupinah (glej poglavje 4.4.2 Identifikacija komponent frakcij po gelski kromatografiji).

4.4.1.2 Protiadhezivno delovanje frakcij po gelski kromatografiji

Izbranim frakcijam po gelski kromatografiji (vsaka druga od 22 do 68) smo preverili protiadhezivno delovanje z uporabo fluorescentno označene bakterije *Listeria innocua* in koncentracijo frakcij 0,1 % in 0,01 %. Dodatek 1 % frakcije se je izkazal za inhibitorno in je zato nismo uporabili v testu protiadhezivnega delovanja.

Frakcije so delovale slabše protiadhezivno kot pritimikrobeno, vendar pa smo vseeno opazili protiadhezivni učinek. Najuspešnejše so bile frakcije od 22 do 28 ter od 60 do 68, ki so dosegle 20 % inhibicijo adhezije (slika 31).



Slika 31: Protiadhezivno delovanje frakcij iz gobe *P. ostreatus* pridobljenih z gelsko kromatografijo na bakterijo *Listeria innocua*

4.4.1.3 Temperaturna obstojnost vodnega izvlečka in njegovih frakcij

Nazadnje smo vodnem izvlečku iz gobe *Pleurotus ostreatus* in nekaterim njegovim frakcijam po gelski kromatografiji preverili še temperaturno obstojnost.

Preglednica 17: Temperaturna obstojnost vodnih izvlečkov

| TEMPERATURA | SOBNA | 40 °C | 60 °C | 80 °C | 100 °C |
|-------------|----------|----------|----------|---------|---------|
| | Frakcije | MIK [%] | MIK [%] | MIK [%] | MIK [%] |
| J01B | 0,625 | 0,625 | 0,3125 | 1,25 | 0,1635 |
| F30 | 10 | 2,5 | 10 | 10 | 2,5 |
| F32 | 10 | 2,5 | 10 | 10 | 5 |
| F34 | 10 | 2,5 | 10 | 10 | 2,5 |
| F44 | 10 | 10 | 10 | 5 | 2,5 |
| F46 | 1,25 | 0,625 | 10 | 5 | 5 |
| F48 | 1,25 | 0,625 | 0,625 | 0,625 | 1,25 |
| F58 | 10 | 10 | 10 | 0,1635 | 5 |
| F60 | pod 0,16 | pod 0,16 | pod 0,16 | 0,1635 | 1,25 |
| F62 | pod 0,16 | pod 0,16 | pod 0,16 | 0,3125 | 0,3125 |
| F64 | pod 0,16 | pod 0,16 | pod 0,16 | 0,625 | 0,1635 |
| F66 | pod 0,16 | pod 0,16 | 2,5 | 0,1635 | 0,1635 |

Ekstrakt JO1B in frakcije F30, F32, F34 in F44 so bile temperaturno obstojne oz. so imele še večje protimikrobno delovanje po segrevanju pri 100 °C. Temperaturno neobstojna je bila le frakcija F46, kjer se je protimikrobno delovanje po segrevanju občutno zmanjšalo. Nizkomolekularne frakcije od F60 naprej so temperaturno obstojne, le nekoliko se zniža učinek (preglednica 17).

4.4.2 Identifikacija komponent frakcij po gelski kromatografiji

Na podlagi rezultatov MIK ter na podlagi absorbance pri 280 nm smo naše frakcije razdelili v tri skupine. Vzeli smo skupine frakcij, ki so imele dobro protimikrobno delovanje ter so hkrati pripadale istemu vrhu na grafu po absorbanci pri 280 nm.

- Skupina frakcij 1:
Frakcije od 24 do 38. Preverili smo jim L-aminokislinsko oksidazno aktivnost (LAO).
- Skupina frakcij 2:
Frakcije od 43 do 47 smo združili in skoncentrirali z ultrafiltracijo (velikost por 1 kDa). Ponovno smo jim preverili minimalno inhibitorno koncentracijo in jih nadalje frakcionirali z ionsko izmenjevalno kromatografijo.
- Skupina frakcij 3:
Frakcije od 58 do 68, ki zelo verjetno vsebujejo nizkomolekularne snovi in smo jih v sodelovanju s prof. dr. Franzom Bucarjem poslali na analizo na Univerzo v Gradcu.

4.4.2.1 Identifikacija komponent skupine frakcij 1

Skupini frakcij 1 smo preverili če imajo:

- L-aminokislinsko oksidazno aktivnost (LAO)
- protimikrobno delovanje z dodatkom katalaze

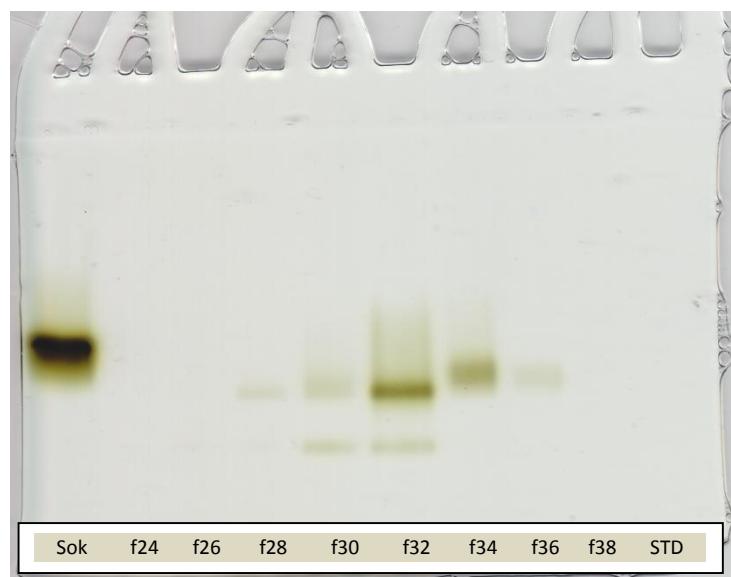
4.4.2.1.1 L-aminokislinska oksidazna aktivnost frakcij F24-F38

Visoko molekularnim frakcijam od F24 do F38 smo preverili L-aminokislinsko oksidazno aktivnost. To smo naredili na dva načina:

- z detekcijo L-aminokislinskih oksidaz (LAO) v gelu NaDS-PAGE
- s spektrofotometrično metodo merjenja absorbance pri 420 nm v mikrotitrski ploščici

Detekcija L-aminokislinskih oksidaz (LAO) v gelu

Frakcije od F24 do F38 smo nanesli na gel NaDS-PAGE, kot je opisano v poglavju metod 3.3.6.4. Rumeno-rjave lise na gelu pomenijo prisotnost L-aminokislinskih oksidaz v frakciji.

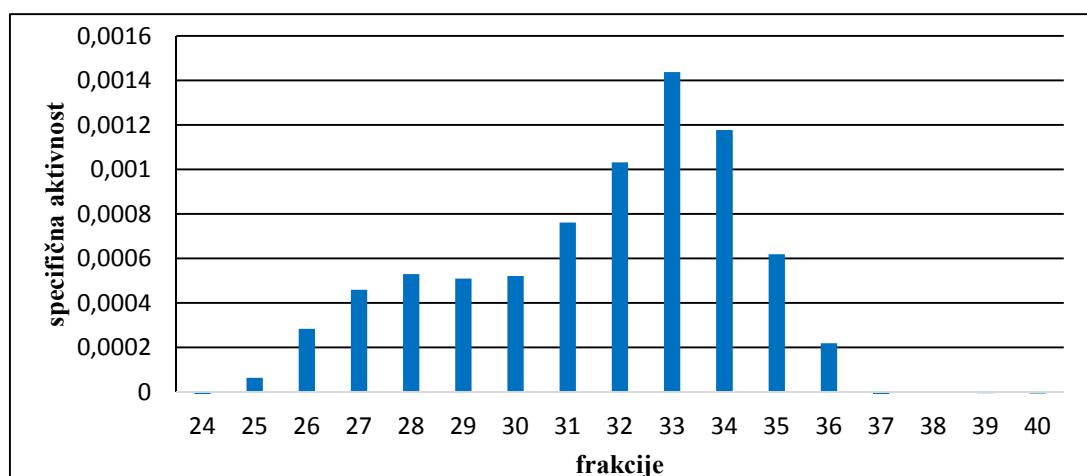


Slika 32: Detekcija L-aminokislinskih oksidaz v frakcijah skupine 1 iz gobe *P. ostreatus* na NaDS-PAGE gelu

Analiza LAO aktivnosti v gelu (slika 32) je pokazala L- aminokislinsko oksidazno aktivnost frakcij od F28 do F36, pri čemer ima najmočnejšo LAO aktivnost frakcija F32.

Spektrofotometrična detekcija

Test L-aminokislinske oksidazne aktivnosti smo preverili še s spektrofotometrično metodo merjenja absorbance pri 420 nm. Frakcija F33 je imela najvišjo specifično L-aminokislinsko oksidazno aktivnost (slika 33).



Slika 33: Specifična L-aminokislinska oksidazna aktivnost v frakcijah skupine 1 iz gobe *P. ostreatus*, določena z merjenjem absorbance pri 280 nm

4.4.2.1.2 Protimikrobeno delovanje frakcij po gelski kromatografiji z dodatkom katalaze

Visoko molekularnim frakcijam smo preverili protimikrobeno delovanje v odsotnosti in tudi prisotnosti encima katalaze z metodo na fluorescentno označeni bakteriji *L. innocua*. Pričakovali smo, da bodo frakcije brez dodatka katalaze delovale protimikrobeno na bakterijo *L. innocua*, frakcije z dodatkom katalaze pa bodo to sposobnost izgubile.

V preglednici 18 smo z rumeno obarvali kvadratke, kjer je prišlo do inhibicije rasti. Vidimo lahko, da ima le frakcija F33 tak vzorec, kot smo pričakovali.

*Preglednica 18: Test minimalne inhibitorne koncentracije z dodatkom katalaze na frakcije skupine 1 pridobljene iz gobe *P. ostreatus**

| mg/ml | F30 | F30 + K | F31 | F31 + K | F32 | F32 + K | F33 | F33 + K | F34 | F34 + K | F35 | F35 + K |
|-------|-------|---------|-------|---------|-----|---------|-------|---------|--------|---------|-------|---------|
| 50 | MIC10 | / | MIC10 | / | / | / | / | MIC10 | MIC 10 | / | MIC10 | MIC10 |
| 40 | / | / | / | / | / | / | MIC10 | / | / | / | / | / |
| 30 | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / |
| 20 | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / |
| 10 | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / |

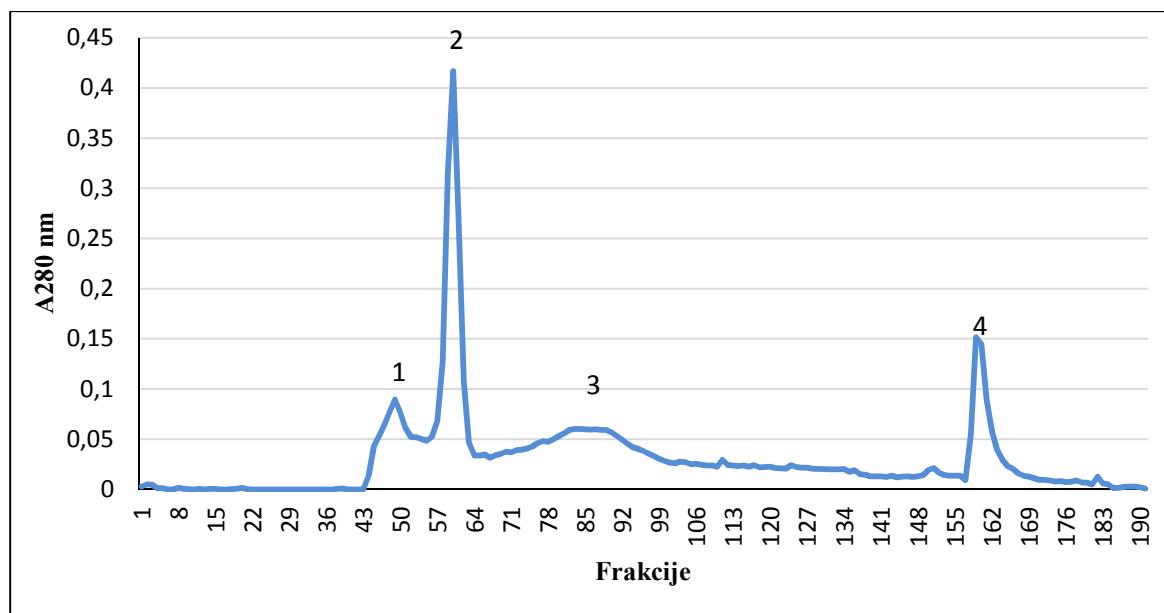
4.4.2.2 Identifikacija komponent skupine frakcij 2

Frakcije v skupini 2 (43 do 47) smo najprej združili v en vzorec in koncentrirali (10 krat) z ultrafiltracijo na filtru z velikostjo por 1 kDa. Nato smo komponente v tem vzorcu ponovno ločili na frakcije glede na osnovi naboja z ionsko izmenjevalno kromatografijo. Frakcijam po ionsko izmenjevalni kromatografiji smo:

- Preverili vsebnost proteinov s spektrofotometrično metodo merjenja absorbance pri 280 nm.
- Določili protimikrobeno delovanje na fluorescentno označeni bakteriji *L. innocua*.
- Pogledali sestavo posamezne frakcije z metodo NaDS-PAGE.
- Določili N-terminalni konec proteinov z Edmanovo degradacijo.

4.4.2.2.1 Ionsko izmenjevalna kromatografija frakcij F43-F46

Novo pridobljenim frakcijam z ionsko izmenjevalno kromatografijo smo izmerili absorbanco pri 280 nm (slika 34). Na tem grafu višja absorbanca pomeni večjo vsebnost proteinov. Razvidno je, da so se proteini razporedili v štiri vrhove. Določili smo, da ima frakcija 61 največjo vsebnost proteinov.



Slika 34: Spektrofotometrično določanje vsebnosti proteinov v frakcijah iz gobe *P. ostreatus*, pridobljenih z ionsko izmenjevalno kromatografijo

4.4.2.2.2 Protimikrobeno delovanje frakcij, pridobljenih z ionsko izmenjevalno kromatografijo

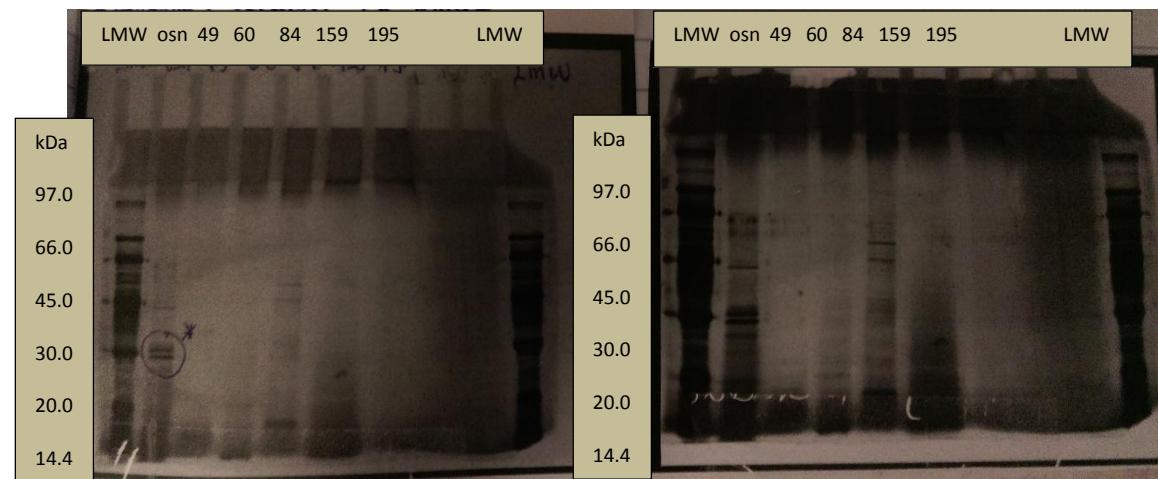
Novo pridobljenim frakcijam z ionsko izmenjevalno kromatografijo smo določili vrednosti MIK z metodo na fluorescentno označeni bakteriji *L. innocua*. Nobena od frakcij ni imela protimikrobnega delovanja na bakterijo *L. innocua*. Predvidevali smo, da so bile frakcije po frakcionaciji z ionsko kromatografijo preveč razredčene. Da bi to preverili, smo jih združili in koncentrirali. Pri tem smo se nanašali na rezultate absorbance frakcij pri 280 nm, s katero smo določili prisotnost proteinov (slika 34). Glede na štiri vrhove (slika 34) smo frakcije združili v štiri skupine in koncentrirali z ultrafiltracijo na filtru z velikostjo por 1 kDa.

- Vrh 1: od frakcije 45 do frakcije 51 (70 ml) → koncentrirali s 70 ml na 5 ml
- Vrh 2: od frakcije 57 do frakcije 63 (70 ml) → koncentrirali s 70 ml na 5 ml
- Vrh 3: od frakcije 70 do frakcije 95 (260 ml) → koncentrirali z 260 ml na 10 ml
- Vrh 4: od frakcije 158 do frakcije 164 (70 ml) → koncentrirali s 70 ml na 5 ml

Zanimalo nas je, ali imajo te združene frakcije večje protimikrobeno delovanje kot frakcije pred dodatnim koncentriranjem. Vrednosti MIK združenih frakcij so bile višje od 10 %, zato lahko zaključimo, da so izgubile protimikrobeno delovanje.

4.4.2.2.3 Analiza NaDS-PAGE frakcij pridobljenih z ionsko izmenjevalno kromatografijo

Novo pridobljenim frakcijam z ionsko izmenjevalno kromatografijo smo določili sestavo proteinov z metodo NaDS-PAGE z barvilo Coomassie. Na gelu se proteini v frakcijah niso videli, zato predvidevamo, da so bile frakcije po frakcionaciji z ionsko izmenjevalno kromatografijo preveč razredčene. Gel smo zato barvali s koloidnim srebrom (slika 35) ter dokazali prisotnost proteinov v frakcijah.



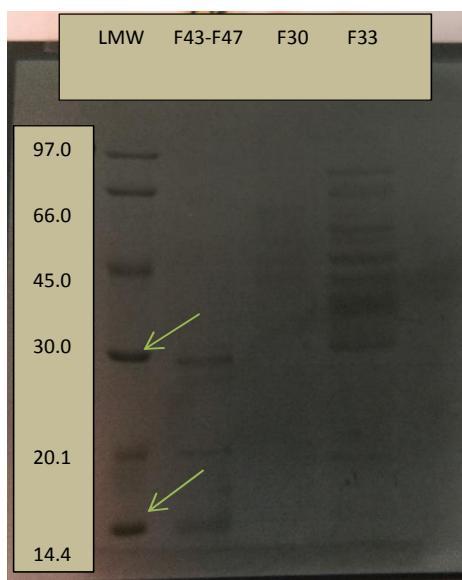
Slika 35: NaDS-PAGE frakcij iz gobe *P. ostreatus*, pridobljenih z ionsko izmenjevalno kromatografijo, obarvano s koloidnim srebrom (12 % gel)

4.4.2.2.4 Določanje N-terminalnega konca proteinov z Edmanovo degradacijo

Frakcije 43-47 gelske kromatografije, katerim smo potrdili protimikrobeno delovanje, smo nanesli na NaDS-PAGE. Analiza (slika 36) je pokazala prisotnost treh lis, kar nakazuje dobro očiščen vzorec teh frakcij. Zato smo se odločili, da jim določimo N-končno aminokislinsko zaporedje z metodo Edmanove degradacije. Izbrali smo dve najmočnejši lis na membrani po prenosu western (na sliki 36 sta označeni s puščicama). Tema dvema lisama smo ocenili molekulsko maso 30 kDa in 14 kDa ter jima določili N-končno zaporedje.

- PSVRVQD - - je zaporedje za 14 kDa liso
- VGQ-NAP-GLSY je zaporedje za 30 kDa liso

V podatkovnih bazah NCBI in JGI nismo našli več informacij o proteinu glede na N-končno zaporedje.



Slika 36: NaDS-PAGE frakcij F43-F47, pridobljenih z gelsko kromatografijo iz gobe *P. ostreatus*, pred prenosom na PVDF membrano za določitev N-končnega aminokislinskega zaporedja

4.4.2.3 Identifikacija komponent skupine frakcij 3

Nizkomolekularnim frakcijam od F58 do F68, pridobljenim z gelsko kromatografijo, smo v sodelovanju s prof. Bucar Franzem (Univerza Karl-Franzes, Gradec, Avstrija) naredili kemijsko analizo s kombinacijo metod LC-PDA-ESI-MS. Rezultat je pokazal prisotnost različnih komponent, med katerimi so bile večinoma aminokisline. Mase in UV spektri ustrezajo tirozinu, fenilalaninu in triptofanu. Analiza je pokazala še prisotnost vrha z zelo nizkim retencijskim časom na koloni z reverzno fazo (acetonitril – voda (+ 0,1 % mravljične kisline), 2:98 (v/v)), ki pa ga z osnovno analizo ni bilo mogoče identificirati.

5 RAZPRAVA

Gobe potrebujejo protibakterijske in protiglivne komponente za preživetje v okolju, zato dejstvo, da lahko iz njih izoliramo antimikrobne komponente, ne preseneča (Lavanya in Subhashini, 2013; Lindequist in sod., 2005). Vodni izvlečki iz gob vsebujejo mešanico proteinov, polisaharidov ter drugih makromolekul in snovi z nizko molekularno maso. Iz gob jih lahko ekstrahiramo z različnimi topili – etil acetatom, kloroformom, metanolom, etanolom in vodo (Alves in sod., 2012). Raziskovalci se v veliki meri osredotočajo na bioaktivnost polisaharidnih izvlečkov iz gob, manj pa na proteinske izvlečke (Erjavec in sod., 2012; Barros in sod., 2008; Ren in sod., 2014). Predvidoma zato, ker je priprava in delo s proteini zahtevnejše. Zato smo predvidevali, da bi podatki o bioaktivnem delovanju proteinskih izvlečkov in prikaz morebitnih aktivnih proteinov prispevali k razvoju na tem področju. Ker so proteini topni v vodi smo izbrali vodno ekstrakcijo. Pridobljenim vodnim izvlečkom smo želeli določiti protimikrobeno in protiadhezivno delovanje na izbrane mikroorganizme. Namen magistrske naloge je bil tako karakterizacija bioaktivnega delovanja vodnih izvlečkov različnih gob na izbrane bakterije, kvasovke in plesni.

Identifikacija posameznih bioaktivnih komponent iz izvlečkov pridobljenih iz naravnih virov je zelo pomemben korak pri odkrivanju novih bioaktivnih snovi. V vsakem izvlečku je prisotnih več aktivnih substanc, zato moramo izvesti več korakov, s katerimi očistimo in izoliramo željeno bioaktivno snov iz začetne mešanice komponent v izvlečku. Najpogosteje za čiščenje proteinov uporabljamo kromatografske metode v kombinaciji z dializo, ultrafiltracijo in ultracentrifugiranjem (Tehrani in sod., 2012; Petrovska in sod., 2004). Tekom čiščenja moramo spremljati, če je protein še aktiven. Po čiščenju proteinu določimo aminokislinsko zaporedje in ga primerjamo z zaporedji v podatkovnih bazah. Če podobnega proteina še ni v bazah moramo narediti celotno karakterizacijo. To vključuje določevanje molekulske mase, izoelektrične točke, post-translacijskih modifikacij, 3D strukture ter bioloških aktivnosti. Takšno karakterizacijo običajno delamo z rekombinantnimi proteini, ker se tako izognemo težavam z omejeno količino materiala (Erjavec in sod., 2012). Ker je identifikacija novih snovi pomembna, sem v magistrski nalogi podrobneje pogledala v sestavo vodnega izvlečka iz gobe *Pleurotus ostreatus*.

5.1 PROTIMIKROBNO DELOVANJE VODNIH IZVLEČKOV IZ VIŠJIH GLIV

Pripravili smo triindvajset vodnih izvlečkov in jih okarakterizirali tako, da smo jim določili protimikroben delovanje na Gram pozitivne bakterije *L. innocua*, *L. monocytogenes*, *B. cereus*, Gram negativne bakterije *C. jejuni*, *E. coli* ter kvasovke *C. albicans* in plesni *A. ochraceus*. Vsi izvlečki so pokazali protimikroben aktivnost. Vpliv izvlečkov na bakterijo *L. innocua* in bakterijo *L. monocytogenes* je primerljiv (MIK pod 2,5 %) in pričakovani, saj sta obe bakteriji iz istega rodu. Vsi izvlečki so imeli protimikroben aktivnost na bakterije *B. cereus* (MIK pod 2,5 %). Zanimivo je, da so vsi izvlečki protimikroben učinkovali tudi na preiskovane Gram negativne bakterije vrste *C. jejuni* in *E. coli* (MIK pod 1,25 %). Primerjava z literaturnimi podatki je sicer težka zaradi različnega izbora metod, topil in koncentracij izvlečkov. Če kljub temu naše rezultate primerjamo z drugimi raziskavami (Alves in sod., 2012) pa ugotovimo, da so naši izvlečki bolj učinkoviti, saj so pokazali protimikroben učinkovanje tako na Gram pozitivne kot na Gram negativne bakterije. V literaturi manjkajo podatki o delovanju na ostale mikroorganizme, dokazano pa je primerljivo delovanje proteinskih izvlečkov na bakterije, kvasovke in plesni (Hearst in sod., 2008; Imtiaz in Lee, 2007). Tako lahko ponovno ugotovimo, da so bili naši izvlečki bolj učinkoviti tudi na kvasovke *C. albicans* in plesni *A. ochraceus* (MIK pod 1,25 %).

Po statistični analizi, narejeni s programom IBM SPSS Statistics 20, lahko zaključimo, da je statistično značilna razlika med MIK pri Gram pozitivnimi in Gram negativnimi bakterijami. Prav tako se statistično razlikujejo rezultati med Gram pozitivnimi bakterijami in glivami/kvasovkami. Ni pa statistično značilne razlike med MIK za Gram negativne bakterije in plesni/kvasovk. Če statistično primerjamo protimikroben delovanje posameznih izvlečkov na vse mikroorganizme hkrati lahko zaključimo, da je večina izvlečkov imela dobro protimikroben delovanje (MIK med 1,2 % in 2,5 %). Najbolj učinkovita sta izvlečka iz gob *Clitocybe nebularis* (P10) in *Lactaris necator* (P14), kjer MIK pri nobenem preiskovanem mikroorganizmu ni presegel 1 % vodnega izvlečka. Učinkovitost je bila na bakterije *L. monocytogenes* in *L. innocua* celo večja z MIK pod 0,2 %. Med vsemi izvlečki so najslabše inhibirali rast izvlečki iz gob *Russula alutacea* (P07), *Suillus variegatus* (P08) in *Fomitopsis pinicola* (P09), kje je MIK pri vseh testiranih mikroorganizmih bil vsaj 2,5 % vodnega izvlečka, ponekod celo 10 in 20 %.

Težko primerjamo naše rezultate z rezultati podobnih raziskav, ki so jih naredili drugi raziskovalci, ker so metode in pristopi, ki jih uporabljamo zelo različni. Zato bi v prihodnosti potrebovali standardizacijo metod in postavitev mejnih vrednosti, kjer lahko rečemo, da je neka snov učinkovita. Veliko raziskav je narejenih le na presejalnih testih, malo pa je izoliranih in identificiranih komponent iz višjih gliv, ki delujejo protimikrobeno. Po tem, ko izoliramo komponento in pojasnimo njen mehanizem delovanja, jo lahko uporabimo v razvoju nutraceutikov ali zdravil. Na koncu je seveda nujno, da naredimo teste citotoksičnosti, da ocenimo tudi kakšen vpliv ima na človeške celice, ne samo na mikrobne (Alves in sod., 2012).

5.2 PROTIADHEZIVNO DELOVANJE VODNIH IZVLEČKOV IZ VIŠJIH GLIV

Pripravljenim triindvajsetim vodnim izvlečkom smo določil tudi protiadhezivno delovanje na Gram pozitivne bakterije *L. innocua*, *L. monocytogenes*, *B. cereus*, Gram negativne bakterije *C. jejuni*, *E. coli* ter kvasovke *C. albicans* in plesni *A. ochraceus*. Glede na rezultate protimikrobnega delovanja smo izbrali subinhibitorne koncentracije 0,1 % in 0,01 %.

Dobro protiadhezivno delovanje so izvlečki pokazali pri bakterijah *L. innocua* (inhibicija adhezije med 40 % in 50 %). Tudi adhezijo bakterij *E. coli* so vsi izvlečki inhibirali v območju med 40 in 50 %. Vodni izvlečki so imeli šibkejše protiadhezivno delovanje na bakterije *C. jejuni* in *B. cereus*, saj so inhibirali adhezijo le za 10 % do 30 %. Najboljše protiadhezivno delovanje je pokazal izvleček iz gobe *Suillus granulatus* (P05) (inhibicija adhezije 85 %), dva izvlečka pa nista vplivala na adhezivne lastnosti *C. jejuni* in *B. cereus*.

Zanimivo je, da je bila protiadhezivna aktivnost izvlečkov zelo dobra pri kvasovki *Candida albicans* (inhibicija adhezije okrog 70 %), kjer bi izpostavili izvleček iz gobe *Suillus granulatus* (P05) (inhibicija adhezije 85 %).

Protiadhezivna aktivnost izvlečkov na plesni *Aspergillus ochraceus* je bila zelo variabilna. Nekateri so adhezijo inhibirali do 95 %, kot npr. *Suillus granulatus* (P05). Medtem ko je bila inhibicija adhezije zelo nizka, in sicer pod 10 %, kot npr. v dodatku izvlečka iz gob *Suillus variegatus* (P08). Dva izvlečka pa nista vplivala na adhezivne lastnosti plesni.

Če statistično primerjamo protiadhezivno delovanje posameznih izvlečkov na vse mikroorganizme lahko predvidevamo, da mehanizem delovanja ni pri vseh enak oz. isti, saj se je vpliv izvlečkov na adhezijo mikroorganizmov razlikoval. Statistična analiza je pokazala, da je ta razlika signifikantna. Prav tako je razvidno, da sta bili obe testirani protiadhezivni koncentraciji učinkoviti, v nekaterih primerih je nižja koncentracija izvlečkov še učinkoviteje inhibirala adhezijo. To nakazuje na aplikativno uporabnost tudi majhnih koncentracij vodnih izvlečkov, saj so izvlečki, ki se lahko dodajajo v majhnih količinah ekonomsko dostopnejši. Omenili bi še, da metoda barvanja biomase s kristal violetom morda ni najprimernejša, kar nakazujejo visoke standardne deviacije rezultatov. V skladu z ugotovitvami mnogih raziskovalcev je metoda določevanja biomase uporabna le kot presejalna metoda.

V literaturi ni veliko podatkov o protiadhezivnem delovanju proteinskih izvlečkov. Zasledili smo raziskavo, v kateri so dokazali protifilmotvorno delovanje metanolno-vodnih izvlečkov in nizkomolekularne frakcije iz gobe *Lentinus edodes* s polifenoli kot aktivnimi komponentami. Njihovo raziskovanje mehanizmov tega delovanja je zelo zanimivo, saj protifilmotvorno delovanje povezujejo z vezavo polifenolne komponente na molekule, ki jih najdemo na površini bakterijske celice. Na ta način motijo komunikacijo med bakterijami, poškodujejo membrano mikroorganizmov ter povečajo kopiranje reaktivnih kisikovih spojin v celici (Signoretto in sod., 2014; Alves in sod., 2014; Rathna in sod., 2016).

5.3 FRAKCIJONACIJA IZVLEČKA IZ GOBE *Pleurotus ostreatus* (BUKOV OSTRIGAR)

Pri iskanju novih protimikrobnih snovi iz alternativnih virov je pomembno, da se osredotočamo tudi na identifikacijo bioaktivne komponente. Mi smo s tem namenom frakcionirali izvleček iz gobe *Pleurotus ostreatus* in frakcijam okarakterizirali protimikrobeno in protiadhezivno delovanje z metodo fluorescentno označene bakterije *Listeria innocua*.

Goba *Pleurotus ostreatus* oz. bukov ostrigar je zanimiva tako iz kulinaričnega vidika – prehranski dodatek (vir mikro – in makro elementov kot so K, Mg, P, Zn, Fe in vir proteinov) kot iz medicinskega. Je užitna in lahko jo je gojiti. Z medicinskega vidika je pomembna, ker niža nivo holesterola in nivo glukoze pri bolnikih z diabetesom, znižuje krvni tlak in pozitivno vpliva na imunski sistem (Hearst in sod., 2008; Regula in Siwulski, 2007).

Prvo frakcionacijo izvlečka iz gobe *Pleurotus ostreatus* smo naredili z gelsko filtracijo in dobljenim frakcijam preverili protimikrobeno in protiadhezivno delovanje. Ker je bilo protiadhezivno delovanje tega izvlečka zelo šibko, smo se kasneje osredotočili le na testiranje protimikrobnega delovanja. Na podlagi rezultatov MIK, smo frakcije po gelski kromatografiji razdelili v tri skupine, kot je opisano v rezultatih.

V prvi skupini smo preverili vsebnost L-aminokislinskih oksidaz. Gobe so namreč bogat vir L-aminokislinskih oksidaz in ker te tvorijo vodikov peroksid, bi zaradi njega lahko imele protimikrobeno delovanje (Žun in sod., 2014). Testi so pokazali, da frakcije vsebujejo L-aminokislinske oksidaze, med njimi največ frakcija F33. Če so za protimikrobeno delovanje frakcij na bakterijo *Listeria innocua* odgovorne L-aminokislinske oksidaze v teh frakcijah, to najlažje preverimo tako, da frakciji dodamo katalazo. Ta bo porabljala vodikov peroksid, ki nastaja zaradi L-aminokislinskih oksidaz in zato frakcija ne bo več imela zaviralnega učinka na rast bakterije. Ko smo frakcijam dodali katalazo, jih je imelo nekaj še vedno zaviralni učinek na rast, pri frakciji F33 pa smo opazili zmanjšanje protimikrobnega delovanja po dodatku katalaze. Zaključimo lahko, da je protimikrobeno delovanje v teh frakcijah vsaj delno posledica L-aminokislinskih oksidaz.

Drugo skupino frakcij po gelski kromatografiji (F43-F47) smo združili in komponente v frakciji ločili med seboj z ionsko izmenjevalno kromatografijo. Ker smo izbrali pozitivno nabiti anionski izmenjevalec, so se na kolono vezali negativno nabiti proteini. Glede na graf po absorbanci pri 280 nm smo dobili štiri vrhove. Frakcije, ki so pripadale istemu vrhu smo združili, koncentrirali in jim ponovno testirali protimikrobeno delovanje na fluorescentno označeni bakteriji *Listeria innocua*. Frakcije po ionsko izmenjevalni kromatografiji niso imele protimikrobnega delovanja. Sklepamo lahko, da smo z ionsko izmenjevalno kromatografijo ločili dve ali več komponent, ki so skupaj delovale protimikrobeno, vsaka posebej pa ne. To je tudi razvidno iz analize NaDS-PAGE (slika 35), kjer opazimo, da nekaterih lis v izvornem vzorcu združenih frakcij po gelski kromatografiji ne opazimo v nobeni od analiziranih frakcij ionsko izmenjevalne kromatografije.

Ker smo na NaDS-PAGE gelu pri združenih frakcijah od F43 do F47 po gelski kromatografiji videli le še tri lise, smo se odločili, da z Edmanovo degradacijo določimo N-končno aminokislinsko zaporedje in mogoče ugotovimo, kateri protein je v vzorcu. Proteinu pri velikosti 14 kDa smo določiti zaporedje prvih deset aminokislin. Rezultat je bil: -PSVRVQD - - (črtica pomeni, da aminokisline nismo mogli določiti). Proteinu velikosti 29 kDa smo določili prvih 12 aminokislin N-konca: VGQ-NAP-GLSY. V bazah JGI ali NCBI nismo našli podobnih proteinov. Ker veliko genomov gliv še ni anotiranih, mi nismo imeli sreče, da bi na podlagi N-končnega zaporedja izvedeli, katera sta ta dva proteina.

Tretjo skupino frakcij oz. nizkomolekularni vrh po gelski kromatografiji smo analizirali v sodelovanju s prof. Franzem Bucarjem iz Univerze v Gradcu. Ta vrh je zelo učinkovito zaviral rast fluorescentno označene bakterije *Listeria innocua*. Po analizi so ugotovili, da mase in UV spektri ustrezajo aminokislinam - tirozinu, fenilalaninu in triptofanu. Identificirati niso mogli enega vrha. Predvidevamo, da je to komponenta, ki deluje protimikrobno.

Znanstveniki so že dokazali protimikrobno delovanje vodnega izvlečka iz bukovega ostrigarja na bakterije *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *B. megateriu*, *B. thuringiensis*, *Escherichia coli*, *Klebsiela pneumoniae*, *Shigella dysenteriae*, *Salmonella enterica*, *Pseudomonas sp.*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Candida albicans*, *C. dubliniensis*, *Cryptococcus humicola*, *Trichosporon cutaneum*, *Geotrichum candidum*, *Aspergillus flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. terreus*, *Penicillium expansum*, *Eupenicillium ludwigii*, *Trichoderma viride*, *Drechslera rostrata*, *Curvularia clavata*, *Altenaria chlamydospora* in *Fusarium moniliforme* (Younis in sod., 2015; Hearts in sod., 2008; Alves in sod., 2012; Skariachan in sod., 2016). Metanolni izvleček iz bukovega ostrigarja protimikrobno učinkuje na bakterije *B. subtilis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, ter kvasovke *C. albicans* in *S. cerevisiae*, in sicer v koncentracijah med 4 in 8 mg/ml (Chowdhury in sod., 2015). Komponente, ki jih ekstrahiramo iz gob z metanolom, so flavonidi, fenoli in askorbinska kislina (Chowdhury in sod., 2015). Znanstveniki ugotavljamajo, da ima metanolni izvleček iz bukovega ostrigarja tudi protimikrobno delovanje na večkratodporne seve bakterij, ki imajo odpornost proti meticilinu in vankomicinu (*S. aureus*, *S. typhi*, *Acinetobacter sp.*, in *P. mirabilis*), in sicer v koncentraciji od 50 do 100 µg/ml (Reguła in Siwulski, 2007).

Glede na naše rezultate, ki so pokazali dobro protimikrobno in proadiadhezivno delovanje; ter tudi glede na literaturne podatke je proteinski izvleček gobe *Pleurotus ostreatus* dober kandidat za nadaljnje raziskovanje in identifikacijo novih bioaktivnih snovi.

5.4 TEMPERATURNA OBSTOJNOST

Vodnemu izvlečku iz gobe *Pleurotus ostreatus* in nekaj frakcijam iz gelske kromatografije smo določili temperaturno obstojnost. Naša hipoteza je bila, da bodo izvlečki in visokomolekularne frakcije s povečevanje temperature izgubili protimikroben delovanje, kajti proteini pri višjih temperaturah denaturirajo. Izvleček gobe *Pleurotus ostreatus* (izvleček JO1B), ter frakcije F30, F32, F34, F44 in F58 so bile temperaturno obstojne oz. se jim je protimikroben delovanje proti bakteriji *L. innocua* še povečalo po segrevanju pri 100 °C. Predvidevamo, da se je pri segrevanju sprostila učinkovina, ki je bila pri sobni temperaturi vezana na druge snovi in zato ni mogla delovati.

Temperaturno neobstojna je bila le frakcija F46, kjer se je učinkovanje po segrevanju občutno zmanjšalo iz MIK 1,25 % na MIK 5,0 %.

Nizkomolekularne frakcije od F60 naprej so temperaturno obstojne, protimikroben delovanje pa je le delno zmanjšano. To smo pričakovali, kajti v nizkomolekularnih frakcijah ni proteinov, ki so občutljivi na povišanje temperature.

6 SKLEPI

Gobe oz. višje glice iz debla *Basidiomycota* in *Ascomycota* predstavljajo alternativni vir novih bioaktivnih učinkovin v boju proti naraščajočemu številu odpornih bakterij proti antibiotikom. Zato smo pripravili vodne izvlečke gob, jim okarakterizirali protimikrobeno in protiadhezivno delovanje ter poskusili identificirati bioaktivne snovi v izvlečku gobe *Pleurotus ostreatus* po frakcionalnosti z gelsko ter ionsko izmenjevalno kromatografijo.

Rezultati karakterizacije so pokazali, da vodni izvlečki iz višjih gliv delujejo protimikrobeno in protiadhezivno na vse preiskovane mikroorganizme. Izvlečki imajo protimikrobeno delovanje na Gram negativne bakterije, kvasovke in plesni v koncentraciji od 0,1 % do 1 %, ter na Gram pozitivne bakterije v koncentraciji od 2,5 % do 10 %. Za nadaljnje raziskave protimikrobnega delovanja sta zanimivi gobi *Clitocybe nebularis* in *Lactarius necator*, s protimikrobnim delovanjem na vse preiskovane mikroorganizme. Vodni izvlečki so zelo učinkovito inhibirali adhezijo bakterij *Escherichia coli* in *Listeria innocua* (inhibicija adhezije okoli 50 %) in kvasovke *Candida albicans* (inhibicija adhezije okoli 75 %). Za nadaljnje raziskave protiadhezivnega delovanja je zanimiva goba *Suillus granulatus* z inhibicijo adhezije za 80 % pri kvasovki *Candida albicans* ter za 90 % pri plesni *Aspergillus ochraceus*.

Iзвлек из гобе *Pleurotus ostreatus* in njegove frakcije so temperaturno stabilne z nespremenjenim oz. pri nekaterih celo povečanim protimikrobnim delovanjem. Predvidevamo, da v frakcijah z nespremenjenim protimikrobnim delovanjem po segrevanju, nimamo proteinov. V frakcijah s povečanim delovanjem, pa je segrevanje sprostilo vezano komponento z aktivnim učinkom in tako omogočilo njeno aktivnost.

Identifikacija bioaktivnih proteinov v vodnem izvlečku iz gobe *Pleurotus ostreatus* je potekala s frakcijom (gelska ter ionska kromatografija) ter različnimi biokemijskimi testi (NaDS-PAGE, LAO). Ugotovili smo, da je v vodnem izvlečku več različnih komponent s protimikrobnim delovanjem, med njimi najverjetneje proteini ter nizkomolekularna komponenta, ki je nismo uspeli določiti in zato zahteva nadaljnje raziskave.

Do sedaj pridobljeni rezultati nakazujejo, da je goba *Pleurotus ostreatus* zanimiva kot alternativni vir novih protimikrobnih snovi. Ker so imele nizkomolekularne komponente po gelski kromatografiji visoko protimikrobeno delovanje, bi se lahko v nadalnjih raziskavah usmerili v identifikacijo te komponente. Nadaljevali bi lahko tudi s karakterizacijo dveh proteinov, ki smo jima določili N-terminalni konec.

7 VIRI

- Adamič J., Smole Možina S., Jeršek B. 2003. Vloga in pomen mikroorganizmov v živilih in taksonomija. V: Mikrobiologija živil živalskega izvora. Bem Z., Adamič J., Žlender B., Smole Možina S., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 1-42
- Alves M. J., Ferreira I.C.F.R., Dias J., Teixeira V., Martins A., Pintado M. 2012. A review on antimicrobial activity of mushroom (*Basidiomycetes*) extracts and isolated compounds. *Planta Medica*, 78:1707-1718
- Alves M. J., Ferreira I.C.F.R., Lourenço I., Costa E., Martins A., Pintado M. 2014. Wild mushroom extract as inhibitors of bacterial biofilm formation. *Pathogens*, 3, 3: 667-679
- Barros L., Cruz T., Baptista P., Estevinho L. M., Ferreira I. C. 2008. Wild and commercial mushrooms as source of nutrients and nutraceuticals. *Food and Chemical Toxicology*, 46: 2742-2747
- Bennett J. W. 2010. An overview of the genus *Aspergillus*. V: *Aspergillus*: molecular biology and genomics. Machida M., Gomi K. (eds.). Norwich, Caister Academic Press: 1-18
- Biorad. 2016. A guide to transfer and detection: introduction to protein blotting. Hercules, Biorad: 78 str.
http://www.bio-rad.com/LifeScience/pdf/Bulletin_2895.pdf (2. 2. 2016)
- Buchrieser C., Rusniok C., Kunst F., Cossart P., Glaser P. 2003. Comparison of the genome sequences of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*: clues for evolution and pathogenicity. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 25: 2017-2013
- CDC. 2016. *Listeria*. Atlanta, Centers for Disease Control and Prevention: 5 str.
<http://www.cdc.gov/listeria/> (25. 5. 2016)
- Chevallent M., Luche S., Rabilloud T. 2006. Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. *Nature Protocols*, 1: 1852-1858
- Chowdhury M. M. H., Kubra K., Ahmed S. R. 2015. Screening of antimicrobial, antioxidant properties and bioactive compounds of some edible mushrooms cultivated in Bangladesh. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 14, 8: 10.1186/s12941-015-0067-3: 6 str.
- Coia J., Cubie H. 1995a. *Escherichia coli*. V: The Immunoassays kit directory. Vol. 2. Coia J., Cubie H. (eds.). Norwell, Kluwer Academic Press: 757-761
- Coia J., Cubie H. 1995b. *Bacillus cereus*. V: The immunoassay kit directory. Vol. 2. Coia J., Cubie H. (eds.). Norwell, Kluwer Academic Press: 648-649

- Davidson College. 2011. SDS-PAGE. Davidson, North Carolina, Department of Biology:
2 str.
<http://www.bio.davidson.edu/courses/genomics/method/sdsspage/sdsspage.html>
(19. 1. 2016)
- Erjavec J., Kos J., Ravnikar M., Dreö T., Sabotič J. 2012. Proteins of higher fungi – from forest to application. Trends in Biotechnology, 30, 5: 259-273
- Erjavec J., Dreö T., Brzin J., Sabotič J., Ravnikar M. 2013. Naravne protimikrobne snovi in mikroorganizmi kot sredstva za varstvo rastlin. V: Zbornik predavanj in referatov 11. slovenskega posvetovanja o varstvu rastlin z mednarodno udeležbo, Bled, 5. – 6. 3. 2013. Trdan S., Maček J. (ur.). Ljubljana, Društvo za varstvo rastlin: 132-137
- Favaro M., Sarmati L., Sancesario G., Fontana C. 2014. First case of *Listeria innocua* meningitis in a patient on steroids and eternecept. JMM Case Reports, doi: 10.1099/jmmcr.0.003103: 5 str.
- Filonov G. S., Piatkevich K. D., Ting LM., Zhang J., Kim K., Verkhusha V. V. 2011. Bright and stable near-infrared fluorescent protein for *in vivo* imaging. Nature Biotechnology, 29: 757-761
- Gao Y., Tang W., Gao H., Chang E., Lan J., Li X., Zhou S. 2007. Antimicrobial activity of the medicinal mushroom *Ganoderma*. Food Reviews International, 21: 211-229
- GE Healthcare. 2016. Low molecular weight calibration kit for SDS electrophoresis. Chicago, GE Healthcare: 1 str.
http://www.blossombio.com/pdf/products/UG_17_0446_01.pdf (19.5.2016)
- GE Healthcare Life Sciences. 2016. Sephadryl S-200 HR. Chicago, GE Healthcare Life Sciences: 2 str.
<http://www.gelifesciences.com/webapp/wcs/stores/servlet/ProductDisplay?categoryId=11515&catalogId=10101&productId=21284&storeId=11779&langId=-1>
(16. 5. 2016)
- Georgia Institute of Technology. 2001. SDS page gel electrophoresis. Atlanta, Georgia Institute of Technology: 6 str.
https://ww2.chemistry.gatech.edu/~lw26/bCourse_Information/4581/techniques/gel_elect/page_protein.html (21. 1. 2016)
- HA. 2016. Ion-exchange chromatography. Massachusetts, Harvard Apparatus: 15 str.
<https://www.harvardapparatus.com/downloads/Ion%20Exchange%20Chroma%20Spin%20Column%20Guide.pdf> (22. 1. 2016)
- Hearst R., Nelson D., McCollum G., Millar B. C., Maeda Y., Goldsmith C. E., Rooney P. J., Loughrey A., Rao J. R., Moore J. E.. 2008. An examination of antibacterial and antifungal properties of constituents of shiitake (*Lentinula edodes*) and oyster (*Pleurotus ostreatus*) mushrooms. Complementary Therapies in Clinical Practise, 15: 5-7

- Hossain, G.S., Li J., Shin H.D., Du G., Liu L., Chen, J. 2014. L-amino acid oxidases from microbial sources: types, properties, functions, and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98: 1507-15
- Ibarz A., Barbosa-Cánovas G. V. 2003. Unit operations in food engineering. Boca Raton, CRC Press: 287-293
- Imtiaz A., Lee T.S. 2007. Screening of antibacterial and antifungal activities from Korean wild mushrooms. *World Journal of Agricultural Sciences*, 3: 316-321
- IDTI. 2016. Ultrafiltration, microfiltration. In Depth Tutorials and Information: 4 str.
<http://what-when-how.com/molecular-biology/ultrafiltration-microfiltration-molecular-biology/> (19. 1. 2016)
- Jeršek B. 2014. Osnovni princip identifikacije plesni, kvasovk in bakterij v živilih. Skripta in delovni zvezek za laboratorijske vaje pri predmetu Živilska mikrobiologija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 79 str.
- Jeršek B. 2016. Mikrobiologija in biotehnologija hrane. Navodila in delovni zvezek za laboratorijske vaje. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 31 str.
- Kakon A. J., Choudhury B. K., Saha S. 2012. Mushroom is an ideal food supplement. *Journal of Dhaka National Medical College and Hospital*, 18: 58-62
- Kalyoncu F., Oskay M. 2010. Antimicrobial and antioxidant activities of mycelia of 10 wild mushroom species. *Journal of Medicinal Food*, 13, 2: 415-419
- Kang D., Gho Y. S., Suh M., Kang C. 2002. Highly sensitive and fast protein detection with Coomassie brilliant blue in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 11: 1511-1512
- Khelef N., Lecuit M., Buchrieser C., Cabanes D., Dussurget O., Cossart P. 2006. *Listeria monocytogenes* and the genus *Listeria*. V: The Prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria. Vol. 4. 3rd ed. Dworkin M. (ed.). New York, Springer: 404-476
- Klarič G., Šerod M. 2015. *Macrolepiota procera*. Maribor, Gobarsko društvo Lisička Maribor: 1 str.
<http://www.gobe.si/Gobe/MacrolepiotaProcera> (23. 5. 2016)
- Križaj I. 2015. Struktura proteinov (primarna struktura). Skripta za vaje. Ljubljana, Inštitut Jožef Stefan, Odsek za biokemijo in molekularno biologijo: 46 str.
- Lavanya J., Subhashini S. 2013. Therapeutic proteins and peptides from edible and medicinal mushrooms – review. *European Scientific Journal*, 9: 1857 – 7881
- Lindequist U., Niedermeyer T. H. J., Juelich W-D. 2005. The pharmacological potential of mushrooms. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2: 285-299

- Ma L., Zhang G., Doyle P. M. 2011. Green fluorescent protein labeling of *Listeria*, *Salmonella*, and *Escherichia coli* O157:H7 for safety-related studies. PLoS One, 6, 4: e18083, doi: 10.1371/journal.pone.0018083: 27 str.
- Mali S., Šerod M. 2015. *Suillus granulatus*. Maribor, Gobarsko društvo Lisička Maribor: 1 str.
<http://www.gobe.si/Gobe/SuillusGranulatus> (23. 5. 2016)
- Mygind P.H., Fischer R.L., Schnorr K.M., Hansen M.T., Soensken C.P., Ludvingsen S., Raventos D., Buskov S., Christensen B., De Maria L., Taboureau O., Yaver D., Elvig-Jorgensen S.G., Sorensen M.V., Christensen B.E., Kjoerulff S., Frimodt-Moller N., Lehrer R.I., Zasloff M., Kristensen H-H. 2005. Plectasin is a peptide antibiotic with therapeutical potential from saprophytic fungi. Nature, 437: 975-980
- NIJZ. 2013. *Bacillus cereus*. Ljubljana, Nacionalni inštitut za javno zdravje: 1 str.
http://www.nijz.si/sites/www.nijz.si/files/uploaded/bcereus_04082015.pdf
(27. 5. 2016)
- NIJZ. 2015. Kampilobakterioza (okužba s kampilobaktri). Ljubljana, Nacionalni inštitut za javno zdravje: 1 str.
<http://www.nijz.si/sl/kampilobakterioza-okuzbe-s-kampilobaktri> (7. 9. 2016)
- Pavšič M. 2011. Kromatografske metode: biokemijski praktikum. Ljubljana, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo: 12 str.
http://web.fkkt.uni-lj.si/biokemija/biokem_praktikum/04-Ionsko-izmenjevalna-Afinitetna_kromatografija.pdf (21. 1. 2016)
- Petrovska B. B., Panov S., Roganovic Zafirovska D., Kulevanova S. 2004. Electrophoretic study of mushroom proteins. Journal of Food, Agriculture and Environment (JFAE), 2: 148-152
- Poler A., Šerod M. 2012. *Clitocybe gibba*. Maribor, Gobarsko društvo Lisička Maribor: 1 str.
<http://www.gobe.si/Gobe/ClitocybeGibba> (23. 5. 2016)
- Poler A., Šerod M. 2013. *Russula alutacea*. Maribor, Gobarsko društvo Lisička Maribor: 1 str.
<http://www.gobe.si/Gobe/RussulaAlutacea> (23. 5. 2016)
- Poler A., Šerod M. 2014. *Clitocybe geotropa*. Maribor, Gobarsko društvo Lisička Maribor: 1 str.
<http://www.gobe.si/Gobe/ClitocybeGeotropa> (23. 5. 2016)
- Poler A. in Šerod M. 2015. *Armillaria borealis*. Maribor, Gobarsko društvo Lisička Maribor: 1 str.
<http://www.gobe.si/Gobe/ArmillariaBorealis> (24. 5. 2016)

- Promega. 2015. BacTiter-Glo™ microbial cell viability assay. Madison, Promega: 18 str.
<https://worldwide.promega.com/~media/files/resources/protocols/technical%20bulletins/101/bactiter-glo%20microbial%20cell%20viability%20assay%20protocol.pdf> (9. 2. 2016)
- Reguła J., Siwulski M. 2007. Dried shiitake (*Lentinula edodes*) and oyster (*Pleurotus ostreatus*) mushrooms as a good source of nutrients. Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria, 6: 135-142
- Ren L., Hemar Y., Perera C. O., Lewis G., Krisaansesn G. W., Buchanan P.K. 2014. Antibacterial and antioxidant activities of aqueous extracts of eight edible mushrooms. Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre, 3: 41-51
- Resinex. 2016. PVDF – Poliviniliden fluorid. Ilirska Bistrica, Resinex: 1 str.
<http://www.resinex.si/polimeri/pvdf.html> (2. 2. 2016)
- Rathna J., Bakkiyaraj D., Pandian S. K. 2016. Anti-biofilm mechanisms of 3,5-di-tert-butylphenol against clinically relevant fungal pathogens. Biofouling, 32, 9: doi: 10.1080/08927014.2016.1216103: 16 str.
- Sabotič J., Ohm A. R., Kuenzler M. 2016. Entomotoxic and nematotoxic lectins and protease inhibitors from fungal fruiting bodies. Applied Microbiology and Biotechnology, 100: 91-111
- Signoretto C., Marchi A., Bertoncelli A., Burlacchini G., Papetti A., Pruzzo C., Zaura E., Lingstroem P., Ofek I., Pratten J., Spratt D. A., Wilson M., Canepari P. 2014. The anti-adhesive mode of action of a purified mushroom (*Lentinus edodes*) extract with anticaries and antigingivitis properties in two oral bacterial pathogens. BMC Complementary and Alternative Medicine, 14, 75: doi: 10.1186/1472-6882-14-75: 9 str.
- Skariachan S., Prasanna A., Manjunath S. P., Karanth S. S., Nazre A. 2016. Exploring the medicinal potential of the fruit bodies of oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus* (*Agaricomycetes*), against multidrug-resistant bacterial isolates. International Journal of Medicinal Mushrooms, 18: 245-52
- Šerod S., Šerod M. 2012a. *Coprinus comatus*. Maribor, Gobarsko društvo Lisička Maribor: 1 str.
<http://www.gobe.si/Gobe/CoprinusComatus> (23. 5. 2016)
- Šerod S., Šerod M. 2012b. *Sparassis crispa*. Maribor, Gobarsko društvo Lisička Maribor: 1 str.
<http://www.gobe.si/Gobe/SparassisCrispa> (24. 5. 2016)
- Šerod S. 2014. *Pleurotus osteratus*. Maribor, Gobarsko društvo Lisička Maribor: 1 str.
<http://www.gobe.si/Gobe/ZdravilneGobeBukovOstrigar> (18. 5. 2016)

- Šerod S., Šerod M. 2014. *Xerocomus badius*. Maribor, Gobarsko društvo Lisička Maribor: 1 str.
<http://www.gobe.si/Gobe/XerocomusBadius> (24. 5. 2016)
- Šerod S., Šerod M. 2015a. *Lycoperdon pyriforme*. Maribor, Gobarsko društvo Lisička Maribor: 1 str.
<http://www.gobe.si/Gobe/LycoperdonPyriforme> (23. 5. 2016)
- Šerod S., Šerod M. 2015b. *Lactarius necator*. Maribor, Gobarsko društvo Lisička Maribor: 1 str.
<http://www.gobe.si/Gobe/LactariusNecator> (23. 5. 2016)
- Šerod S., Šerod M. 2015c. *Lactarius vellereus*. Maribor, Gobarsko društvo Lisička Maribor: 1 str.
<http://www.gobe.si/Gobe/LactariusVellereus> (23. 5. 2016)
- Šerod S., Šerod M. 2015d. *Suillus variegatus*. Maribor, Gobarsko društvo Lisička Maribor: 1 str.
<http://www.gobe.si/Gobe/SuillusVariegatus> (23. 5. 2016)
- Šerod S., Šerod M. 2015e. *Amanita excelsa*. Maribor, Gobarsko društvo Lisička Maribor: 1 str.
<http://www.gobe.si/Gobe/AmanitaSpissaVarExcelsa> (23. 5. 2016)
- Šerod S., Šerod M. 2015f. *Amanita rubescens*. Maribor, Gobarsko društvo Lisička Maribor: 1 str.
<http://www.gobe.si/Gobe/AmanitaRubescens> (23. 5. 2016)
- Šerod S., Šerod M. 2015g. *Fomitopsis pinicola*. Maribor, Gobarsko društvo Lisička Maribor: 1 str.
<http://www.gobe.si/Gobe/FomitopsisPinicola> (23. 5. 2016)
- Šerod S., Šerod M. 2015h. *Clitocybe nebularis*. Maribor, Gobarsko društvo Lisička Maribor: 1 str.
<http://www.gobe.si/Gobe/ClitocybeNebularis> (23. 5. 2016)
- Šerod S., Šerod M. 2015i. *Tricholoma sulphureum*. Maribor, Gobarsko društvo Lisička Maribor: 1 str.
<http://www.gobe.si/Gobe/TricholomaSulfureum?from=Gobe.TricholomaSulphureum> (23. 5. 2016)
- Šerod S., Šerod M. 2015j. *Paxillus atrotomentosus*. Maribor, Gobarsko društvo Lisička Maribor: 1 str.
<http://www.gobe.si/Gobe/PaxillusAtrotomentosus> (23. 5. 2016)

- Šerod S., Šerod M. 2015k. *Lyophyllum decastes*. Maribor, Gobarsko društvo Lisička Maribor: 1 str.
<http://www.gobe.si/Gobe/LyophyllumDecastes> (23. 5. 2016)
- Šerod S., Šerod M. 2015l. *Kuehneromyces mutabilis*. Maribor, Gobarsko društvo Lisička Maribor: 1 str.
<http://www.gobe.si/Gobe/KuehneromycesMutabilis> (24. 5. 2016)
- Tehrani M. H. H., Fakhreholseini E., Nejad M. K., Mehregan H., Hakemi-Vala M. 2012. Search for proteins in the liquid extract of edible mushroom, *Agaricus bisporus*, and studying their antibacterial effects. Iranian Journal of Pharmaceutical Research, 11:145-150
- Thermo Fisher Scientific. 2015. Dialysis method for protein research. Massachusets, Thermo Fisher Scientific: 4 str.
<https://www.thermofisher.com/si/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/dialysis-methods-protein-research.html> (19. 1. 2016)
- Thermo Fisher Scientific. 2016. PVDF membranes for western blotting. Massachusets, Thermo Fisher Scientific: 1 str.
<https://www.thermofisher.com/si/en/home/life-science/protein-biology/protein-assays-analysis/western-blotting/transfer-proteins-western-blot/membranes-transfer-buffers-western-blotting/membranes-western-blotting/pvdf-membranes-western-blotting.html> (2. 2. 2016)
- Zalar P., Jenčič S., Gunde Cimerman N. 2013. Izbrana poglavja pri predmetu Mikologija: priročnik za vaje s teoretičnimi osnovami pri izbranem predmetu za študente Biologije. Ljubljana, Biotehniška fakulteta: 46 str.
- Zver S., Herman D., Skopec B. 2012. Preprečevanje in zdravljenje invazivne aspergiloze v Sloveniji: podatki, pridobljeni z opazovalno klinično raziskavo "OSPIA". Zdravniški vestnik, 81: II-143-II-152
- Žun G., Kos J., Sabotič J. 2014. Mushrooms are a rich source of L-amino acid oxidases. Ljubljana, Inštitut »Jožef Stefan«, Odsek za biotehnologijo: 14 str. (osebni vir)
- Žurga S., Pohleven J., Renko M., Bleuler-Martinez S., Sosnowski P., Truk D., Kuenzler M., Kos J., Sabotič J. 2014. A novel β-trefoil lection from the parasol mushroom (*Macrolepiota procera*) is nematotoxic. The Federation of European Biochemical Societies, 281: 3489-3506
- Xu X., Yan H., Chen J., Zhang X. 2011. Bioactive proteins from mushrooms. Biotechnology Advances, 29: 667-674

Younis A. M., Wu F. S., El Shikh H. H. 2015. Antimicrobial activity of extract of the oyster culinary medicinal mushroom *Pleurotus ostreatus* (higher basidiomycetes) and identification of a new antimicrobial compound. International Journal of Medicinal Mushroom, 17: 579-590

ZAHVALA

Najlepša hvala mentorici doc. dr. Anji Klančnik in somentorici dr. Jerici Sabotič za strokovno vodenje, spodbude, pomoč in potrpežljivost. Hvala tudi za vse priložnosti, izkazano zaupanje in znanja, ki sta mi jih dali tekom izvajanja magistrske naloge.

Hvala dr. Adrijani Leonardi iz Inštituta »Jožef Stefan«, Odseka za molekularne in biomedicinske znanosti (B2) za določitev aminokislinskih zaporedij z Edmanovo metodo razgradnje.

Hvala dr. Jožetu Brzinu iz Inštituta »Jožef Stefan«, Odseka za biotehnologijo (B3), ki je priskrbel vzorce gob.

Hvala tudi vsem sodelavcem, tako na Inštitutu »Jožef Stefan«, kot na Biotehniški fakulteti, ki ste s svojo dobro voljo, ki ste jo prinesli v laboratorij, olajšali delo.

Največja zahvala gre mojim staršem, ki so mi tekom vseh let študija nudili velikansko podporo in so vedno verjeli vame. Hvala.