

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ MIKROBIOLOGIJE

Saša REŽONJA, Nina SLUGA

**HEMOLITIČNA AKTIVNOST V EKSTRAKTIH
IZBRANIH ASKOMICETNIH GLIV**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij – 2. stopnja Mikrobiologija

Ljubljana, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ MIKROBIOLOGIJE

Saša REŽONJA, Nina SLUGA

**HEMOLITIČNA AKTIVNOST V EKSTRAKTIH IZBRANIH
ASKOMICETNIH GLIV**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij – 2. stopnja Mikrobiologija

**HEMOLYTIC ACTIVITY IN EXTRACTS OF SELECTED
ASCOMYCETES FUNGI**

M. SC. THESIS
Master Study Programmes: Field Microbiology

Ljubljana, 2014

Magistrsko delo je zaključek univerzitetnega študija 2. stopnje Mikrobiologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Opravljeno je bilo v laboratoriju za molekularno biologijo in nanobiotehnologijo Kemijskega inštituta v Ljubljani ter na Katedri za biokemijo Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje je za mentorja magistrskega dela imenovala prof. dr. Gregorja Anderluha, za somentorico dr. Nado Kraševac in za recenzentko prof. dr. Kristino Sepčič.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Romana MARINŠEK LOGAR

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: prof. dr. Gregor ANDERLUH

Kemijski inštitut v Ljubljani, Laboratorij za molekularno biologijo in nanobiotehnologijo

Članica: dr. Nada KRAŠEVEC

Kemijski inštitut v Ljubljani, Laboratorij za molekularno biologijo in nanobiotehnologijo

Članica: prof. dr. Kristina SEPČIČ

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora:

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Podpisani se strinjata z objavo magistrskega dela v polnem tisku na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljata, da je naloga, ki sva jo oddali v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Nina Sluga

Saša Režonja

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)

ŠD Du2
 DK UDK 579.22/.24:582.282.123.4:0577.122 (043) = 163.6
 KG glive/askomicetne glive/*Aspergillus*/kompletno gojišče/minimalno gojišče/glukoza/hemoliza/egerolizini/filtrati/vodni ekstrakti micelija/etanolni ekstrakti micelija/krvni agar/turbidimetrični test/pleurotolizin B
 AV REŽONJA, Saša, dipl. mikrobiol. (UN)/SLUGA, Nina, dipl. mikrobiol. (UN)
 SA ANDERLUH, Gregor (mentor)/KRAŠEVEC, Nada (somentorica)/SEPČIČ, Kristina (recenzentka)
 KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
 ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij mikrobiologije
 LI 2014
 IN HEMOLITIČNA AKTIVNOST V EKSTRAKTIH IZBRANIH ASKOMICETNIH GLIV
 TD Magistrsko delo (Magistrski študij – 2. stopnja Mikrobiologija)
 OP XIV, 121 str., 5 pregl., 60 sl., 4 pril., 76 vir.
 IJ sl
 JI sl/en
 AI Filamentozne glive rodu *Aspergillus* veljajo za učinkovite proizvajalke hemolitičnih proteinov. Leta 2002 so opredelili novo egerolizinsko družino proteinov (PF06355; IPR 009413), ki predstavlja največjo skupino glivnih hemolizinov, vendar njihova biološka funkcija še ni dobro poznana. V tej nalogi smo za 18 izbranih vrst rodu *Aspergillus* poskušali določiti prisotnost hemolitično aktivnih snovi v gojiščih ter vodnih in etanolnih ekstraktih. Z gojenjem gliv v minimalnem gojišču z in brez glukoze smo preverjali vpliv ogljika na produkcijo hemolizinov. Hemolitično aktivnost vzorcev smo testirali na ploščah s krvnim agarjem in s turbidimetričnim testom na čitalcu mikrotitrskih plošč. Predvsem smo se usmerili v iskanje proteinov egerolizinske družine, katerih aktivnost smo detektirali z dodajanjem minimalne količine proteina PlyB, ki bi naj v kombinaciji z egerolizinom sprožil lizo membrane. Na ploščah s krvnim agarjem smo ne glede na vir ogljika opazili prisotnost hemolitične učinkovine v filtratih štirih testiranih vrst gliv, čeprav s PAGE egerolizinov nismo detektirali. Pri vodnih ekstraktih hemolize nismo opazili, medtem ko smo jo s testom hemolize zaznali pri etanolnih ekstraktih 11 testiranih sevov, gojenih v minimalnem gojišču z glukozo in pri 13 testiranih sevov, gojenih brez glukoze. Analiza etanolnih ekstraktov z LC-MS je pokazala prisotnost velikih količin polinenasičenih maščobnih kislin, ki bi lahko bile odgovorne za hemolizo.

KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)

DN Du2
 DC UDC 579.22/.24:582.282.123.4:577.122 (043) = 163.6
 CX ascomycetes fungi/*Aspergillus spp.*/complete medium/ minimal medium/glucose/hemolysis/aegerolysins/filtrates/mycelial extracts/ethanolic extracts/blood agar/turbidimetric test/pleurotolysin B
 AU REŽONJA, Saša/SLUGA, Nina
 AA ANDERLUH, Gregor (supervisor)/KRAŠEVEC, Nada (co-advisor)/SEPČIĆ, Kristina (reviewer)
 PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
 PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study in Microbiology
 PY 2014
 TI HEMOLYTIC ACTIVITY IN EXTRACTS OF SELECTED ASCOMYCETES FUNGI
 DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes: Field Microbiology)
 NO XIV, 121 p., 5 tab., 60 fig., 4 ann., 76 ref.
 LA sl
 AL sl/en
 AB Filamentous fungi of the genus *Aspergillus* have been reported to produce hemolytically active proteins. In 2002, a new aegerolysin protein family (PF06355; IPR 009413) was established, which represents the largest group of the fungal hemolysins. However, their biological function is not yet well known. In this thesis, we have tried to determine the presence of hemolytically active substances in medium, mycelial extracts, and ethanolic extracts of 18 selected species of the genus *Aspergillus*. By cultivating the fungi in minimal medium with and without glucose, we tried to determine the influence of a carbon source on the production of hemolysins. The hemolytic activity was tested on blood agar plates, and by the turbidimetric test adapted for microplate readers. In particular, we have focused on searching for aegerolysin-like proteins, whose activity we tried to detect by adding low concentrations of protein PlyB. On blood agar plates, regardless of the source of carbon, we noticed the presence of hemolytic substances in the filtrates of the four species tested, even though the presence of aegerolysin was not detected using PAGE. Hemolysis was not detected in mycelium extracts, but we have found it in ethanol extracts of 11 tested strains grown in a minimal medium with glucose, and with 13 tested strains grown without the glucoses. Analysis of ethanolic extracts with LC-MS showed the presence of large amounts of polyunsaturated fatty acids, which could be responsible for hemolysis.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)	III
KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	IX
KAZALO SLIK	X
KAZALO PRILOG	XIII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XIV
1 UVOD	1
1.1 CILJI MAGISTRSKEGA DELA IN HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 GLIVE RODU <i>ASPERGILLUS</i>	3
2.1.1 Glavne lastnosti rodu <i>Aspergillus</i>	3
2.1.2 Klasifikacija	4
2.1.3 Biološko aktivne komponente rodu <i>Aspergillus</i>	7
2.1.3.1 Sekundarni metaboliti	7
2.1.3.2 Mikotoksini	7
2.1.3.3 Virulentni dejavniki	9
2.2 HEMOLIZINI GLIV	10
2.2.1 Mehanizem hemolize	11
2.2.2 Izločanje in lokalizacija hemolizinov	11
2.2.3 Vloga glivnih hemolizinov	12
2.3 EGEROLIZINSKA DRUŽINA PROTEINOV	14
2.3.1 Fizikalne in biokemijske lastnosti egerolizinov	16
2.3.2 Biološka aktivnost egerolizinov	16
2.3.2.1 Hemolitična aktivnost egerolizinskih proteinov	16
2.3.2.2 Citotoksična aktivnost in toksičnost za eksperimentalne živali	19
2.3.3 Vplivi različnih dejavnikov na hemolitično aktivnost egerolizinov	20
2.3.4 Možne aplikacije egerolizinskih proteinov	21
3 MATERIAL IN METODE	23
3.1 MATERIAL	23
3.1.1 Kemikalije in drobna oprema	23

3.1.2 Rastopine.....	24
3.1.3 Gojišča.....	25
3.1.4 Laboratorijska oprema.....	27
3.1.5 Glivni sevi.....	28
3.2 METODE.....	29
3.2.1 Potek dela.....	29
3.2.1.1 Prvo gojenje sevov.....	29
3.2.1.2 Drugo gojenje sevov.....	30
3.2.1.3 Tretje gojenje sevov.....	30
3.2.2 Gojenje sevov rodu <i>Aspergillus</i>	31
3.2.3 Priprava vzorcev filtratov.....	32
3.2.4 Priprava vodnih ekstraktov micelijev.....	33
3.2.5 Priprava etanolnih ekstraktov micelijev.....	34
3.2.5.1 Koncentriranje etanolnih ekstraktov in določanje teže suhe organske snovi.....	34
3.2.6 Nacepljanje/vcepljanje na/v plošče s krvnim agarjem in posnetim mlekom.....	35
3.2.6.1 Nacepljanje spor.....	35
3.2.6.2 Vcepljanje filtratov.....	35
3.2.6.3 Vcepljanje etanolnih ekstraktov micelijev.....	35
3.2.7 Merjenje hemolitične aktivnosti.....	36
3.2.7.1 Merjenje hemolitične aktivnosti filtratov.....	36
3.2.7.2 Merjenje hemolitične aktivnosti vodnih ekstraktov micelijev.....	37
3.2.7.3 Merjenje hemolitične aktivnosti etanolnih ekstraktov micelijev.....	37
3.2.8 Merjenje hemolitične aktivnosti brez in s komponento B.....	38
3.2.9 Merjenje koncentracije proteinov.....	38
4 REZULTATI GOJENJA GLIV V MINIMALNEM GOJIŠČU Z DODANIM VIROM OGLJIKOM (Magistrsko delo Nine Sluga).....	40
4.1 GOJENJE GLIV.....	40
4.1.1 Rast sevov na trdem gojišču MBFA.....	40
4.1.2 Rast sevov na ploščah s krvnim agarjem in posnetim mlekom.....	42
4.1.3 Gojenje v tekočem minimalnem gojišču z glukozo.....	44
4.1.3.1 Teže micelijev in pH gojišč.....	44
4.2 REZULTATI ANALIZE FILTRATOV.....	46
4.2.1 Rezultati hemolize na ploščah s krvnim agarjem.....	46
4.2.2 Rezultati proteolize na ploščah s posnetim mlekom.....	49

4.2.3 Merjenje koncentracije proteinov	52
4.2.4 Rezultati hemolitičnega testa.....	53
4.3 REZULTATI ANALIZE VODNIH EKSTRAKTOV MICELIJEV	55
4.3.1 Merjenje koncentracij proteinov	55
4.3.2 Rezultati hemolitičnega testa.....	56
4.4 REZULTATI ANALIZE ETANOLNIH EKSTRAKTOV MICELIJEV	57
4.4.1 Rezultati hemolize na ploščah s krvnim agarjem	57
4.4.2 Rezultati hemolitičnega testa.....	58
4.5 BIOINFORMATSKA ANALIZA EGEROLIZINSKIH PROTEINOV V IZBRANIH SEVIH RODU <i>ASPERGILLUS</i>	65
5 RAZPRAVA GOJENJA GLIV V MINIMALNEM GOJIŠČU Z VIROM OGLJIKA (Magistrsko delo Nine Sluga)	66
5.1 RAST GLIV RODU <i>ASPERGILLUS</i>	66
5.2 PRIPRAVA VZORCEV	68
5.3 HEMOLITIČNA AKTIVNOST VZORCEV	68
5.3.1 Hemolitična aktivnost filtratov	68
5.3.2 Hemolitična aktivnost vodnih ekstraktov micelijev	72
5.3.3 Hemolitična aktivnost etanolnih ekstraktov micelijev	72
6 REZULTATI GOJENJA GLIV V MINIMALNEM GOJIŠČU BREZ DODANEGA VIRA OGLJIKA (Magistrsko delo Saše Režonja).....	75
6.1 GOJENJE SEVOV RODU <i>ASPERGILLUS</i>	75
6.1.1 Rast sevov na trdem gojišču z MBFA.....	75
6.1.2 Rast sevov na ploščah s krvnim agarjem in posnetim mlekom.....	75
6.1.3 Gojenje v tekočem minimalnem gojišču brez glukoze	75
6.1.3.1 Teža micelijev in pH vrednosti gojišč.....	75
6.2 REZULTATI ANALIZE FILTRATOV	77
6.2.1 Rezultati hemolize na ploščah s krvnim agarjem	77
6.2.2 Rezultati proteolize na ploščah s posnetim mlekom.....	80
6.2.3 Rezultati merjenja koncentracije proteinov	81
6.2.4 Rezultati hemolitičnega testa.....	83
6.3 REZULTATI ANALIZE VODNIH EKSTRAKTOV MICELIJEV	86
6.3.1 Rezultati merjenja koncentracije proteinov	86
6.3.2 Rezultati hemolitičnega testa.....	88
6.4 REZULTATI ANALIZE ETANOLNIH EKSTRAKTOV MICELIJEV	89

6.4.1 Rezultati hemolize na ploščah s krvnim agarjem	89
6.4.2 Rezultati hemolitičnega testa.....	90
6.5 BIOINFORMATSKA ANALIZA EGEROLIZINSKIH PROTEINOV V IZBRANIH SEVIH RODU <i>ASPERGILLUS</i>	97
7 RAZPRAVA GOJENJA GLIV V MINIMALNEM GOJIŠČU BREZ VIRA OGLJIKA (Magistrsko delo Saše Režonja)	98
7.1 RAST GLIV RODU <i>ASPERGILLUS</i>	98
7.1.1 Teža micelijev in pH vrednost gojišč	99
7.2 PRIPRAVA FILTRATOV TER VODNIH IN ETANOLNIH EKSTRAKTOV	100
7.3 HEMOLITIČNA AKTIVNOST FILTRATOV	101
7.4 HEMOLITIČNA AKTIVNOST VODNIH EKSTRAKTOV MICELIJEV	105
7.5 HEMOLITIČNA AKTIVNOST ETANOLNIH EKSTRAKTOV MICELIJEV	105
8 SKUPNA RAZPRAVA IN SKLEPI	107
8.1 PRIMERJAVA REZULTATOV GLIV, GOJENIH V MEDIJU Z IN BREZ VIRA OGLJIKA.....	107
8.1.1 Teža micelijev in pH vrednosti gojišč	107
8.1.2 Hemolitična aktivnost vzorcev	108
8.1.2.1 Analiza filtratov gliv glede na prisotnost/odsotnost glukoze	108
8.1.2.2 Analiza vodnih ekstraktov micelijev gliv glede na prisotnost/odsotnost glukoze.....	109
8.1.2.3 Analiza etanolnih ekstraktov micelijev gliv glede na prisotnost/odsotnost glukoze ..	110
8.2 SKLEPI	111
9 POVZETEK.....	113
10 VIRI.....	117
ZAHVALA	
PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Asp-hemolizinu podobna aminokislinska zaporedja nekaterih predstavnikov iz egerolizinske družine proteinov	15
Preglednica 2: Seznam uporabljenih glivnih sevov.	29
Preglednica 3: Priprava vzorcev etanolnih ekstraktov micelijev.	38
Preglednica 4: Rezultati hemolitičnega testa etanolnih ekstraktov micelijev različnih vrst gliv rodu <i>Aspergillus</i> gojenih v MM+C	58
Preglednica 5: Rezultati hemolitičnega testa etanolnih ekstraktov micelijev različnih vrst gliv rodu <i>Aspergillus</i> gojenih v MM-C	90

KAZALO SLIK

Slika 1: Klasifikacija gliv rodu <i>Aspergillus</i> (Samson in Pitt, 2000).....	4
Slika 2: Filogenetska analiza družine <i>Trichocomaceae</i> na podlagi delnih genskih sekvenc (RPB1, RPB2, Tsr1, Cct8) za ugotavljanje povezav med člani družine, ki so bili v analizi uporabljeni (Houbraken in Samson, 2011).....	5
Slika 3: Virulentni dejavniki glive <i>A. fumigatus</i> (Rementeria in sod., 2005).....	10
Slika 4: Shema poteka dela pri drugem gojenju sevov.....	30
Slika 5: Shema poteka dela pri tretjem gojenju sevov.....	30
Slika 6: Shema drugega in tretjega gojenja sevov.....	32
Slika 7: Spore gliv rodu <i>Aspergillus</i> na ploščah z MBFA po 15 dneh gojenja.....	41
Slika 8: Spore na ploščah z ovčjim krvnim agarjem po petih dneh inkubacije in na ploščah s posnetim mlekom po štirih dneh inkubacije pri temperaturi 30 °C.....	43
Slika 9: Teža micelijev različnih vrst gliv rodu <i>Aspergillus</i> med gojenjem v MM+C.....	45
Slika 10: pH vrednosti gojišč različnih vrst rodu <i>Aspergillus</i> , glede na čas gojenja v MM+C.....	45
Slika 11: Filtrati različnih vrst gliv rodu <i>Aspergillus</i> na ploščah s krvnim agarjem (ovčji eritrociti).....	47
Slika 12: Filtrati gliv rodu <i>Aspergillus</i> , ki so po 24- urni inkubaciji na 30 °C lizirali ovčje eritrocite.....	48
Slika 13: Analiza filtratov s poliakrilamidno gelsko elektroforezo.....	49
Slika 14: Filtrati različnih vrst gliv rodu <i>Aspergillus</i> na ploščah s posnetim mlekom.....	51
Slika 15: Koncentracije proteinov v filtratih različnih vrst gliv rodu <i>Aspergillus</i> , glede na čas gojenja v MM+C.....	52
Slika 16: Delež hemolize filtratov vrst rodu <i>Aspergillus</i> , gojenih v MM+C, na govejih eritrocitih.....	53
Slika 17: Delež hemolize filtratov vrst rodu <i>Aspergillus</i> na ovčjih eritrocitih.....	54
Slika 18: Primerjava hemolize filtratov (temperaturno neobdelanih) gliv na ovčjih in govejih eritrocitih.....	55
Slika 19: Koncentracija proteinov v micelijih različnih vrst rodu <i>Aspergillus</i> med gojenjem v minimalnem gojišču z glukozo.....	56
Slika 20: Etanolni ekstrakti micelijev različnih vrst gliv rodu <i>Aspergillus</i> na ploščah s krvnim agarjem (ovčji eritrociti), ki so se inkubirale 24 ur na 30 °C.....	57
Slika 21: Negativne kontrole na krvnem agarju.....	58
Slika 22: Hemolitična aktivnost etanolnega ekstrakta micelija glive <i>A. versicolor</i> CBS 795.97 (gojene v minimalnem gojišču 48h in 72h) v odvisnosti od koncentracije organske snovi v ekstraktu, pri štirih različnih volumnih (5, 10, 20 in 30 µl) etanolnega ekstrakta micelija.....	61
Slika 23: Hemolitična aktivnost etanolnega ekstrakta glive <i>A. brasiliensis</i> CBS 101740 (gojene v minimalnem gojišču 48h in 72h) pri štirih različnih volumnih (5, 10, 20 in 30 µl) v odvisnosti od koncentracije organske snovi v ekstraktu.....	61
Slika 24: Hemolitična aktivnost etanolnega ekstrakta glive <i>A. oryzae</i> Rib40 (gojene v minimalnem gojišču 48h in 72h) pri štirih različnih volumnih (5, 10, 20 in 30 µl) v odvisnosti od koncentracije organske snovi v ekstraktu.....	62
Slika 25: Hemolitična aktivnost etanolnega ekstrakta glive <i>A. sydowii</i> CBS 593.65 (gojene v minimalnem gojišču 48h in 72h) pri štirih različnih volumnih (5, 10, 20 in 30 µl) v odvisnosti od koncentracije organske snovi v ekstraktu.....	62

Slika 26: Hemolitična aktivnost etanolnega ekstrakta glive <i>N. fischeri</i> CBS 544.65 (gojene v minimalnem gojišču 48h in 72h) pri štirih različnih volumnih (5, 10, 20 in 30 µl) v odvisnosti od koncentracije organske snovi v ekstraktu.....	62
Slika 27: Hemolitična aktivnost etanolnega ekstrakta glive <i>A. niger</i> CBS 113.46 (gojene v minimalnem gojišču 48h in 72h) pri štirih različnih volumnih (5, 10, 20 in 30 µl) v odvisnosti od koncentracije organske snovi v ekstraktu.....	63
Slika 28: Hemolitična aktivnost etanolnega ekstrakta glive <i>A. nidulans</i> FGSCA4 (gojene v minimalnem gojišču 48h in 72h) pri štirih različnih volumnih (5, 10, 20 in 30 µl) v odvisnosti od koncentracije organske snovi v ekstraktu.....	63
Slika 29: Hemolitična aktivnost etanolnega ekstrakta glive <i>A. niger</i> 513.88 (gojene v minimalnem gojišču 48h) pri štirih različnih volumnih (5, 10, 20 in 30 µl) v odvisnosti od koncentracije organske snovi v ekstraktu	63
Slika 30: Hemolitična aktivnost etanolnega ekstrakta glive <i>A. niger</i> N402 (gojene v minimalnem gojišču 48h) pri volumnu 30 µl v odvisnosti od koncentracije organske snovi v ekstraktu	64
Slika 31: Hemolitična aktivnost etanolnega ekstrakta glive <i>A. aculeatus</i> CBS 172.66 (gojene v minimalnem gojišču 48h in 72h) pri štirih različnih volumnih (5, 10, 20 in 30 µl) v odvisnosti od koncentracije organske snovi v ekstraktu.....	64
Slika 32: Hemolitična aktivnost etanolnega ekstrakta glive <i>A. terreus</i> NIH2624 (gojene v minimalnem gojišču 48h in 72h) pri štirih različnih volumnih (5, 10, 20 in 30 µl) v odvisnosti od koncentracije organske snovi v ekstraktu.....	64
Slika 33: Poravnava proteinov ortolognim egerolizinom in morebitne komponente B (Arnaud in sod., 2012).....	65
Slika 34: Prikaz teže micelijev za seve po prvem in tretjem gojenju, glede na čas gojenja	76
Slika 35: pH vrednosti filtratov gliv, gojenih 24, 48 in 72 ur v minimalnem gojišču brez glukoze.....	77
Slika 36: Filtrati štirih sevov rodu <i>Aspergillus</i> na ploščah s krvnim agarjem	78
Slika 37: Plošče s krvnim agarjem za filtrate seva <i>A. niger</i> CBS 513.88.....	79
Slika 38: Poliakrilamidna gelska elektroforeza za filtrate sevov, ki so na krvnem agarju pokazali hemolitično aktivnost.	79
Slika 39: Plošče s posnetim mlekom za filtrate (z nativno pH vrednostjo) testiranih 16 sevov rodu <i>Aspergillus</i>	81
Slika 40: Prikaz koncentracije proteinov (mg/ml) v filtratih sevov prvega in tretjega gojenja, po različnem času gojenja.	82
Slika 41: Delež hemolize s filtrati sevov drugega gojenja na ovčjih eritrocitih. Graf prikazuje temperaturno neobdelane filtrate z nativno pH vrednostjo. 48 ur/72 ur – čas gojenja v minimalnem gojišču brez glukoze; gojišče MM-C – čisto minimalno gojišče brez glukoze.....	83
Slika 42: Delež hemolize s filtrati sevov tretjega gojenja na govejih eritrocitih.....	84
Slika 43: Primerjava hemolize s filtrati petih sevov drugega in tretjega gojenja na govejih in ovčjih eritrocitih	85
Slika 44: Prikaz koncentracije proteinov v vodnih ekstraktih micelijev sevov prvega in drugega gojenja po različnem času gojenja	86
Slika 45: Koncentracija proteinov (mg/ml) za vodne ekstrakte sevov drugega gojenja po 48 urah.....	88
Slika 46: Koncentracija proteinov (mg/ml) za vodne ekstrakte sevov drugega gojenja po 72 urah.....	88
Slika 47: Plošče s krvnim agarjem z vcepljenimi vzorci etanolnih ekstraktov micelijev, pridobljenih po tretjem gojenju	90

Slika 48: Izražanje hemolitične učinkovine etanolnega ekstrakta micelija glive <i>A. brasiliensis</i> CBS 101740 v odvisnosti od koncentracije organske snovi vsebovane v ekstraktu pri štirih različnih volumnih (5, 10, 20, 30 µl) vzorca.....	93
Slika 49: Izražanje hemolitične učinkovine etanolnega ekstrakta micelija glive <i>A. niger</i> CBS 113.46 v odvisnosti od koncentracije organske snovi vsebovane v ekstraktu pri štirih različnih volumnih (5, 10, 20, 30 µl) vzorca.....	93
Slika 50: Izražanje hemolitične učinkovine etanolnega ekstrakta micelija glive <i>A. niger</i> CBS 513.88 v odvisnosti od koncentracije organske snovi vsebovane v ekstraktu pri štirih različnih volumnih (5, 10, 20, 30 µl) vzorca.....	94
Slika 51: Izražanje hemolitične učinkovine etanolnega ekstrakta micelija glive <i>A. oryzae</i> Rib40 v odvisnosti od koncentracije organske snovi vsebovane v ekstraktu pri štirih različnih volumnih (5, 10, 20, 30 µl) vzorca.....	94
Slika 52: Izražanje hemolitične učinkovine etanolnega ekstrakta micelija glive <i>A. aculeatus</i> CBS 172.66 v odvisnosti od koncentracije organske snovi vsebovane v ekstraktu pri štirih različnih volumnih (5, 10, 20, 30 µl) vzorca.....	94
Slika 53: Izražanje hemolitične učinkovine etanolnega ekstrakta micelija glive <i>A. terreus</i> NIH2624 v odvisnosti od koncentracije organske snovi vsebovane v ekstraktu pri štirih različnih volumnih (5, 10, 20, 30 µl) vzorca.....	95
Slika 54: Izražanje hemolitične učinkovine etanolnega ekstrakta micelija glive <i>A. foetidus</i> CBS 106.47 v odvisnosti od koncentracije organske snovi vsebovane v ekstraktu pri štirih različnih volumnih (5, 10, 20, 30 µl) vzorca.....	95
Slika 55: Izražanje hemolitične učinkovine etanolnega ekstrakta micelija glive <i>A. nidulans</i> FGSCA4 v odvisnosti od koncentracije organske snovi vsebovane v ekstraktu pri štirih različnih volumnih (5, 10, 20, 30 µl) vzorca.....	95
Slika 56: Izražanje hemolitične učinkovine etanolnega ekstrakta micelija glive <i>A. tubingensis</i> CBS 134.48 v odvisnosti od koncentracije organske snovi vsebovane v ekstraktu pri štirih različnih volumnih (5, 10, 20, 30 µl) vzorca.....	96
Slika 57: Izražanje hemolitične učinkovine etanolnega ekstrakta micelija glive <i>A. sydowii</i> CBS 593.65 v odvisnosti od koncentracije organske snovi vsebovane v ekstraktu pri štirih različnih volumnih (5, 10, 20, 30 µl) vzorca.....	96
Slika 58: Izražanje hemolitične učinkovine etanolnega ekstrakta micelija glive <i>A. niger</i> N402 v odvisnosti od koncentracije organske snovi vsebovane v ekstraktu pri štirih različnih volumnih (5, 10, 20, 30 µl) vzorca.....	96
Slika 59: Izražanje hemolitične učinkovine etanolnega ekstrakta micelija glive <i>A. carbonarius</i> DTO 115-B6 v odvisnosti od koncentracije organske snovi vsebovane v ekstraktu pri štirih različnih volumnih (5, 10, 20, 30 µl) vzorca.....	97
Slika 60: Izražanje hemolitične učinkovine etanolnega ekstrakta micelija glive <i>N. fischeri</i> CBS 544.65 v odvisnosti od koncentracije organske snovi vsebovane v ekstraktu pri štirih različnih volumnih (5, 10, 20, 30 µl) vzorca.....	97

KAZALO PRILOG

Priloga A: Preglednice s težami micelijev in izmerjenimi pH vrednostmi gojišč za glive rodu *Aspergillus*, gojene v MM+C ter MM-C.

Priloga A1: Teža micelijev (g) in pH vrednosti gojišč po prvem, drugem in tretjem gojenju sevov rodu *Aspergillus*, gojenih 24, 48 ter 72 ur v minimalnem gojišču z glukozo.

Priloga A2: Teža micelijev (g) in pH vrednosti gojišč po prvem, drugem in tretjem gojenju sevov rodu *Aspergillus*, gojenih 24, 48 ter 72 ur v minimalnem gojišču brez glukoze.

Priloga B: Preglednice s koncentracijami proteinov v filtratih, pridobljenih z gojenjem gliv rodu *Aspergillus* v MM+C ter MM-C.

Priloga B1: Koncentracija proteinov (mg/ml) v filtratih po prvem, drugem in tretjem gojenju sevov rodu *Aspergillus* v MM+C.

Priloga B2: Koncentracije proteinov (mg/ml) v filtratih po prvem, drugem in tretjem gojenju sevov v MM-C.

Priloga C: Preglednice s koncentracijami proteinov v vodnih ekstraktih micelijev, pridobljenih z gojenjem gliv rodu *Aspergillus* v MM+C ter MM-C.

Priloga C1: Koncentracija proteinov (mg/ml) v vodnih ekstraktih micelijev po prvem in drugem gojenju sevov v MM+C.

Priloga C2: Koncentracija proteinov (mg/ml) v vodnih ekstraktih micelijev po prvem in drugem gojenju sevov v MM-C.

Priloga D: Hemolitična aktivnost etanolnih ekstraktov gliv rodu *Aspergillus*, pridobljenih z gojenjem v MM+C ter MM-C.

Priloga D1: Hemolitična aktivnost etanolnih ekstraktov gliv rodu *Aspergillus*, ki smo jih v MM+C gojili 48 ur, pri štirih različnih koncentracijah (5, 10, 20 in 30 µl) v odvisnosti od koncentracije organske snovi v ekstraktu.

Priloga D2: Hemolitična aktivnost etanolnih ekstraktov gliv rodu *Aspergillus*, ki smo jih v MM+C gojili 72 ur, pri štirih različnih koncentracijah (5, 10, 20 in 30 µl) v odvisnosti od koncentracije organske snovi v ekstraktu.

Priloga D3: Izražanje hemolitičnih učinkovin etanolnih ekstraktov gliv rodu *Aspergillus*, pri pogoju MM-C/48 ur, v odvisnosti od koncentracije organske snovi vsebovane v ekstraktu pri štirih različnih volumnih (5, 10, 20, 30 µl) vzorca.

Priloga D4: Izražanje hemolitičnih učinkovin etanolnih ekstraktov gliv rodu *Aspergillus*, pri pogoju MM-C/72 ur v odvisnosti od koncentracije organske snovi vsebovane v ekstraktu pri štirih različnih volumnih (5, 10, 20, 30 µl) vzorca.

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

BSA	goveji serumski albumin
CH	holesterol
DRM	na detergent odporne membrane (ang. <i>detergent resistant membrane</i>)
HA	hemolitična aktivnost
kDa	kilodalton
KA	krvni agar
KG	kompletno gojišče
LC-MS	tekočinska kromatografija sklopljena z masno spektroskopijo
LDL	lipoproteini majhne gostote
MBFA	gojišče MBFA (ang. <i>Malt Extract Agar – Blakeslee's Formula</i>)
MEA	gojišče MEA (ang. <i>Malt Extract Agar</i>)
MM+C	minimalno gojišče z glukozo
MM-C	minimalno gojišče brez glukoze
Oly	ostreolizin
ox-LDL	oksidirani lipoproteini majhne gostote
PAGE	poliakrilamidna gelska elektroforeza
PM	posneto mleko
Ply	pleurotolizin
SM	sfingomielin

1 UVOD

Nitaste glive, predvsem iz rodov *Aspergillus* in *Penicillium*, veljajo za učinkovite proizvajalke beljakovin in sekundarnih metabolitov (Derlink, 2009). Slednji so lahko za ljudi koristni (npr. antibiotiki) ali pa toksični za ljudi in živali (Calvo in sod., 2002). Toksine gliv, ki pri ljudeh in živalih povzročajo akutne in kronične bolezenske znake, imenujemo mikotoksini (Reijula in Tuomi, 2003). Za glive rodu *Aspergillus* je še posebej značilna produkcija hemolizinov, ki jih definiramo kot eksotoksine, sposobne lize rdečih krvnih celic in celic z jedrom. Najdemo jih tudi pri bakterijah, živalih in rastlinah. Najbolje so preučeni hemolizini bakterij, medtem ko je o glivnih hemolizinih manj znanega. Leta 2002 so opredelili egerolizinsko družino proteinov (PF06355; IPR 009413), ki predstavlja največjo skupino znotraj glivnih hemolizinov (Nayak in sod., 2013) in trenutno šteje več kot 300 proteinov (Katedra za biokemijo, 2013). Njihova biološka funkcija še ni dobro poznana, vendar je znano, da imajo nekateri hemolitične, citotoksične in toksične lastnosti. Največ predstavnikov z egerolizinskimi geni znotraj kraljestva gliv spada v rod *Aspergillus* (Berne in sod., 2009).

Prvi izoliran in sekvenciran protein iz družine egerolizinov je Asp-hemolizin glive *A. fumigatus*. V omenjeno družino spadajo tudi ostreolizin in pleurotolizin, terelizin ter številni drugi. Gre za proteine z majhno molekulsko maso, nizko izoelektrično točko, stabilnostjo v širokem pH območju (3 – 10) in temperaturno stabilnostjo do temperature 60 °C ali 65 °C (Nayak in sod., 2013; Berne in sod., 2009). Pri večini egerolizinov prevladuje β -struktura (Donohue in sod., 2006). Lizo rdečih krvnih celic povzročajo z mehanizmom koloidne osmotske lize, ki se začne s prepoznavanjem lipidnega membranskega receptorja. Ugotovili so, da na hemolitično aktivnost egerolizinov vplivajo številni dejavniki, kot so temperatura, pH, kovinski ioni, prisotnost ali odsotnost različnih virov ogljika in drugi.

Zaradi različnih bioloških značilnosti in učinkov bi egerolizine lahko uporabili na številnih področjih: pri izdelavi cepiv, izboljšanju preventive in zdravljenju ateroskleroze, kot označevalce pri proučevanju strukturnih in funkcionalnih lastnosti bioloških membran (zaradi vezave na membranske domene, bogate s holesterolom) (Chowdury in sod, 2008),

zaradi sodelovanja pri razvojnih procesih za izboljšanje kulture in proizvodnje tržno zanimivih gob (Berne in sod., 2009).

1.1 CILJI MAGISTRSKEGA DELA IN HIPOTEZE

Namen magistrske naloge je bil za 18 izbranih vrst gliv rodu *Aspergillus* določiti prisotnost hemolitično aktivnih snovi v gojiščih ter vodnih in etanolnih ekstraktih micelijev in preveriti ali glive izločajo metabolite v okolico. Glive smo gojili v minimalnem gojišču z dodano glukozo (v okviru magistrskega dela Nine Sluga) in v minimalnem gojišču brez dodane glukoze (v okviru magistrskega dela Saše Režonja), s čimer smo želeli preveriti vpliv ogljika na produkcijo hemolizinov. Hemolitično aktivnost vzorcev smo testirali z nacepljanjem/vcepljanjem na/v plošče s krvnim agarjem in s turbidimetričnim testom na čitalcu mikrotitrskih plošč. Predvsem smo se usmerili v iskanje proteinov egerolizinske družine, katerih hemolitično aktivnost smo poskusili detektirati tudi z dodajanjem minimalne količine proteina PlyB, ki bi naj v kombinaciji z egerolizinom sprožil lizo membrane.

Askomicetne glive predstavljajo bogat in dokaj neraziskan vir biološko zanimivih spojin (Calvo in sod., 2002; Fox in Howlett, 2008), zato smo predpostavili, da:

- bomo v vzorcih našli hemolitično aktivne in še neopisane spojine,
- bomo detektirali proteine egerolizinske družine,
- bo sinteza hemolizinov večja pri gojenju gliv v pogojih stresa (pri gojenju glive v mediju s pomanjkanjem vira ogljika) (Wartenberg in sod., 2011).

2 PREGLED OBJAV

2.1 GLIVE RODU *ASPERGILLUS*

2.1.1 Glavne lastnosti rodu *Aspergillus*

Rod *Aspergillus* je bil prvič prepoznan in opisan leta 1729 (Mackenzie, 1987) in danes obsega približno 200 znanih vrst (Zalar in Gunde-Cimerman, 2002). So ubikvitarne, saprofitne glive, ki skupaj s plesnimi rodov *Penicillium* in *Fusarium* tvorijo dominantno skupino plesni na zemlji ter spadajo med najpogostejše kvarljivce živil (Jeršek, 2008). Nekatere vrste rodu *Aspergillus* izločajo mikotoksine in so tako patogene za ljudi in živali. Gliva *A. fumigatus* predstavlja najbolj patogeno vrsto tega rodu in je v več kot 90 % primerov povzročitelj okužb pri človeku, sledijo pa mu sevi *A. flavus*, *A. terreus*, *A. niger* in *A. nidulans* (Latge, 1999). Prav tako plesni rodu *Aspergillus* sodijo med industrijsko pomembne plesni (Zalar in Gunde-Cimerman, 2002), med katerimi se najpogosteje uporablja vrsta *A. niger* za pridobivanje organskih kislin (citronska kislina) in zunajceličnih encimov (amilaze, asparaginaze, beta-galaktozidaze, glikozidaze, lipaze, fosfolipaze, proteaze, fitaze, hemicelulaze, pektinaze) (Braaksma in sod., 2010; Dagenais in Keller, 2009).

Za glive rodu *Aspergillus* je značilen septiran in razvejan substratni micelij, ki je veliko tanjši od zračnega micelija (Jeršek, 2008). Kolonije so hitro rastoče in so lahko bele, rumene, rumenorjave, rjave do črne ali zelenkaste barve. Konidiofori niso septirani in so veliko močnejši ter debelejši od substratnega micelija. So pokončni, ponavadi v obliki nerazvejanega stebila, z apikalno zadebelitvijo (vezikulo) in dajejo koloniji videz zbite klobučevine (Zalar in Gunde-Cimerman, 2002). Na apikalnem delu se tvorijo keglaste celice fialide (konidiogene celice, ki tvorijo konidije), ki so radialno nameščene direktno na veziklu ali na vmesnih podpornih celicah, imenovanih metule. Na fialidah se tvorijo okrogli, enocelični, prosojni ali pigmentirani konidiji z gladko ali bolj ali manj ornamentirano celično steno. Nanizani so v suhe verižice in lahko tvorijo kompaktno stebričasto ali pahljačasto razvejano obliko nad oziroma okoli vezikla (Zalar in Gunde-Cimerman, 2002; Jeršek, 2008). Konidiji so specialne, proti izsušitvi odporne negibljive spore, s katerimi poteka nespolno razmnoževanje (za nastanek ni potrebna združitev gamet). Nekatere plesni imajo tudi spolno razmnoževanje, kjer glede na skupino gliv

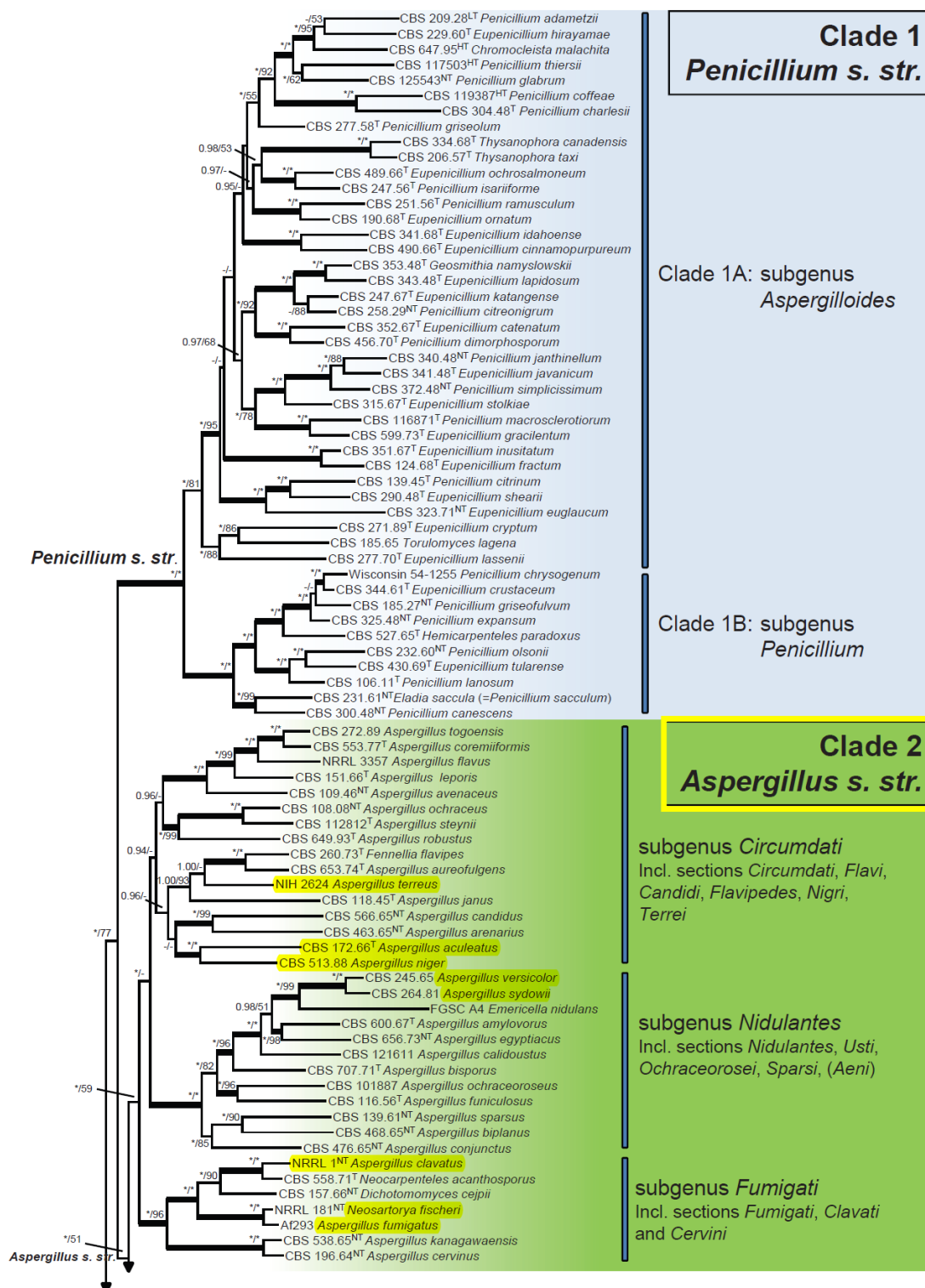
ločimo več tipov spolnih spor. V deblu *Ascomycota* nastajajo spolne spore endogeno, znotraj strukture, ki jo imenujemo askus. Askospore so generativne spore, ki se oblikujejo po fuziji jeder ter z mejozo in mitozo znotraj askusa. Spolne spore gliv so odporne proti segrevanju, izsuševanju, zamrzovanju in nekaterim kemijskim snovem. Spolna ali nespolna spora glive lahko kali ter se razvije v nove hife in micelij (Zalar in Gunde-Cimerman, 2002; Madigan in Martinko, 2006).

2.1.2 Klasifikacija

kraljestvo: FUNGI
deblo: ASCOMYCOTA
razred: EUROTOMYCETES
red: EUROTIALES
družina: TRICHOMACEAE
rod: *ASPERGILLUS*

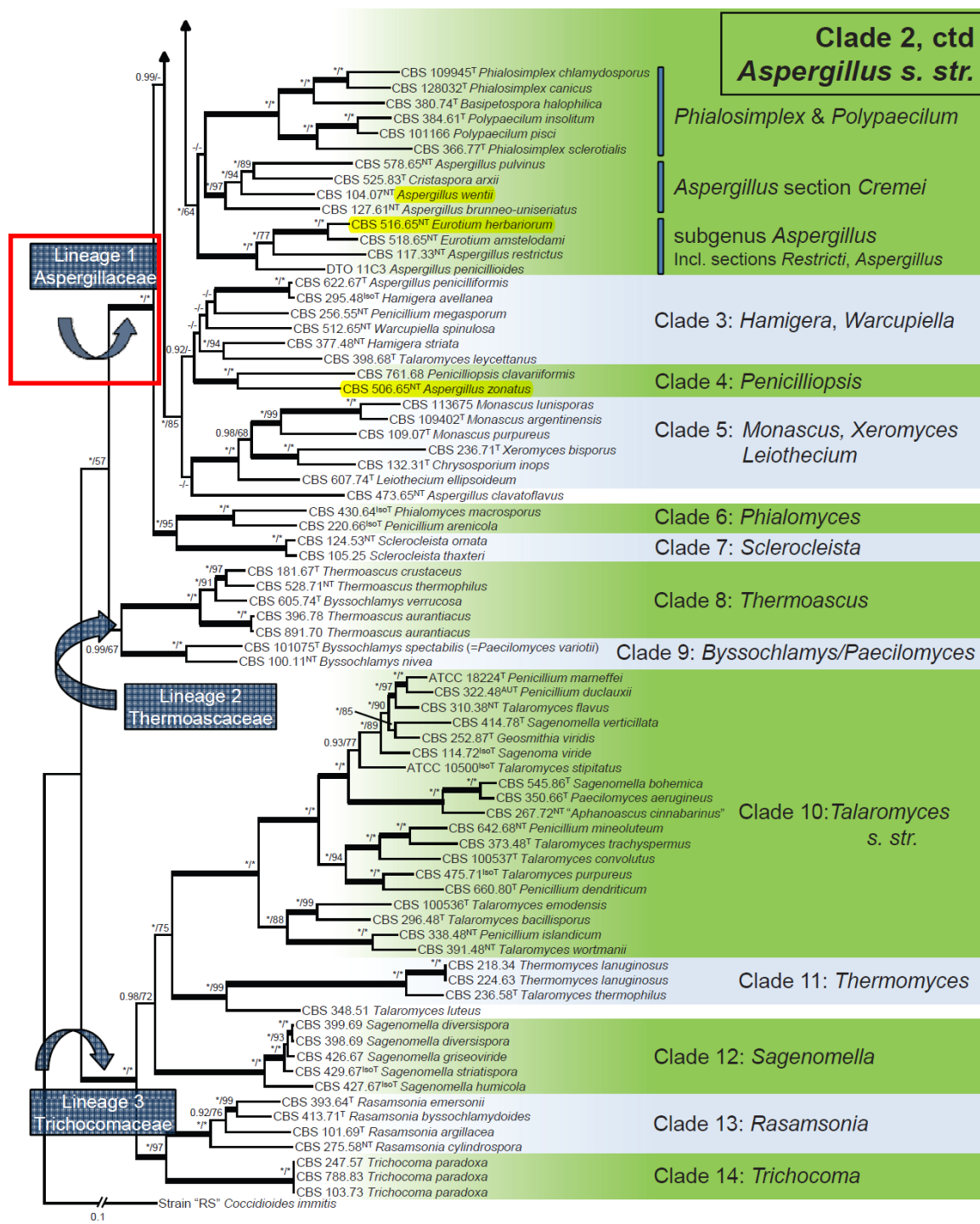
Slika 1: Klasifikacija gliv rodu *Aspergillus* (povzeto po Samson in Pitt, 2000).

Trichomaceae delimo v tri družine oziroma linije: *Aspergillaceae*, *Thermoascaceae* in *Trichomaceae*. Prvo linijo, *Aspergillaceae*, delimo v 7 skupin (od 1 do 7). Vrste rodu *Aspergillus* in teleomorfi rodu *Aspergillus* (*Eurotium*, *Emericella*, *Neosartorya* in drugi) spadajo večinoma v drugo skupino, imenovano *Aspergillus sensu stricto* (Houbraken in Samson, 2011).



Slika 2: Filogenetska analiza družine *Trichocomaceae* na podlagi delnih genskih sekvenc (RPB1, RPB2, Tsr1, Cct8) za ugotavljanje povezav med člani družine, ki so bili v analizi uporabljeni. Linija 1-*Aspergillaceae* (označena z rdečim okvirjem na naslednji strani) vključuje 7 skupin (skupine 1 – 7). Skupina 2 (*Aspergillus sensu stricto*) je označena z rumenim okvirjem. Od vseh sevov, uporabljenih v študiji, smo z rumeno označili za nas pomembne seve znotraj linije *Aspergillaceae* (Houbraken in Samson, 2011).

Nadaljevanje slike 2.



Slika 2: Filogenetska analiza družine *Trichocomaceae* na podlagi delnih genskih sekvenc (RPB1, RPB2, Tsr1, Cct8) za ugotavljanje povezav med člani družine, ki so bili v analizi uporabljeni. Linija 1- *Aspergillaceae* (označena z rdečim okvirjem na naslednji strani) vključuje 7 skupin (skupine 1 – 7). Skupina 2 (*Aspergillus sensu stricto*) je označena z rumenim okvirjem. Od vseh sevov, uporabljenih v študiji, smo z rumeno označili za nas pomembne seve znotraj linije *Aspergillaceae* (Houbraken in Samson, 2011).

Skupino 2 (*Aspergillus sensu stricto*) delimo na šest podskupin: podrod *Circumdati* (*A. terreus*, *A. aculeatus*, *A. niger*), podrod *Nidulantes* (*A. versicolor*, *A. sydowii*), podrod *Fumigati* (*A. clavatus*, *N. fischeri*, *A. fumigatus*), podrod *Aspergillus* (*Eurotium herbariorum*), rod *Phialosimplex* in *Polypaecilum* ter sekcija *Cremeri* (*A. wentii*). Določene predstavnike rodu *Aspergillus* najdemo tudi v drugih skupinah znotraj linije 1 (*Aspergillaceae*), npr. *A. zonatus* spada v skupino štiri (*Penicillioptosis*) (Houbraken in Samson, 2011).

2.1.3 Biološko aktivne komponente rodu *Aspergillus*

2.1.3.1 Sekundarni metaboliti

Glive izločajo veliko število naravnih produktov, imenovanih sekundarni metaboliti (Calvo in sod., 2002), ki niso nujni za normalno rast, razvoj in preživetje, lahko pa vplivajo na njihovo preživeljivost (komunikacija, zaviranje rasti kompetitorjev), morfologijo, sposobnost razmnoževanja ali pa na organizem sploh ne vplivajo (Brakhage, 2013). Nastajajo ob koncu rastne faze ali v stacionarni fazi rasti glive (Madigan in Martinko, 2006), organizmi pa za njihovo sintezo porabijo veliko energije (Calvo in sod., 2002; Fox in Howlett, 2008). Sintetizirajo se iz različnih spojin, najpogosteje so derivati ne-ribosomalnih peptidov (penicilin, cefalosporin, ciklosporin, gliotoksin) (Brakhage, 2013) in poliketidov (aflatoksin, fumonizin, lovastatin) (Fox in Howlett, 2008), lahko pa so tudi mešanica obeh omenjenih skupin molekul (aspiridoni) ali derivati drugih skupin, npr. terpenov (giberelini) ter maščobnih kislin (oksilipini) (Brakhage, 2013). Geni, potrebni za biosintezo glivnih sekundarnih metabolitov se v genomu v večini primerov nahajajo v skupinah oziroma klastrih (Fox in Howlett, 2008). Za učinkovite proizvajalke sekundarnih metabolitov veljajo predvsem nitaste glive, in sicer iz rodov *Aspergillus* in *Penicillium* (Derlink, 2009). Nekateri naravni produkti gliv so za ljudi koristni (npr. antibiotiki), medtem ko so nekateri za ljudi in živali toksični (Calvo in sod., 2002).

2.1.3.2 Mikotoksini

Mikotoksini so kemično raznolika skupina organskih substanc, ki jih producirajo številne vrste gliv (Abad in sod., 2010). Gre za nehlapne, strukturno heterogene molekule z nizko molekulsko maso (1500Da) (Nielsen, 2003), ki delujejo toksično pri nizkih koncentracijah (Kamei in Watanabe, 2005). Med njih uvrščamo od 300 do 400 spojin (Bennet in Klich,

2003). Večina mikotoksinov ni proteinov (Kamei in Watanabe, 2005). Nastajajo v hifah v času rasti in se lahko aktivno sproščajo s strani gliv ali pa se v okolju znajdejo kot posledica razpada hif. Prav tako menijo, da se lahko producirajo v času germinacije (Abad in sod., 2010). Mikotoksini pri ljudeh in živalih povzročajo akutne in kronične bolezenske znake. Ti so posledica zaužitja, inhalacije ali direktnega kontakta kože in sluznice z mikotoksini (Reijula in Tuomi, 2003).

Mikotoksine producirajo številne vrste rodu *Aspergillus*, in sicer glive *A. ochraceus* (ohratoksin A), *A. fumigatus* (gliotoksin, fumagilin, fumitremorgin, helvolična kislina, Asp-hemolizin), *A. flavus* (aflatoksin, sterigmatocistin), *A. nidulans* in *A. versicolor* (sterigmatocistin), *A. parasiticus* (aflatoksin) (Kamei in Watanabe, 2005; Reijula in Tuomi, 2003), *A. carbonarius* (ohratoksin), *A. glaucus* (ohratoksin), *A. niger* (ohratoksin), *A. terreus* in *A. oryzae* (citrinin) (Bennet in Klich, 2003). Veliko mikotoksinov je sekundarnih metabolitov (Abad in sod., 2010). Čeprav Asp-hemolizin večinoma uvrščajo med mikotoksine (Kamei in Watanabe, 2005), gre za protein, pri katerem so zadnje raziskave o pleiotropni funkciji egerolizinov pokazale, da ni nujno, da deluje kot toksin.

Namen njihovega izločanja je zaščita pred predatorji in kompetitorji v ekološki niši (Abad in sod., 2010). Številne študije so pokazale na povezavo med produkcijo mikotoksinov in sporulacijo gliv rodu *Aspergillus*. Izkazalo se je, da mutante, ki nimajo sposobnosti tvorbe spor, ne morejo producirati mikotoksinov. Mikotoksini tako tudi inducirajo tvorbo spor in povečujejo preživetje spor v okolju (Calvo in sod., 2002). Prav tako predvidevajo, da sodelujejo kot virulentni dejavniki pri razvoju aspergiloz, vendar direktne povezave med mikotoksini in patogenezo gliv *Aspergillus* kljub njihovi citotoksični aktivnosti na številne celične linije še niso potrdili (Kamei in Watanabe, 2005).

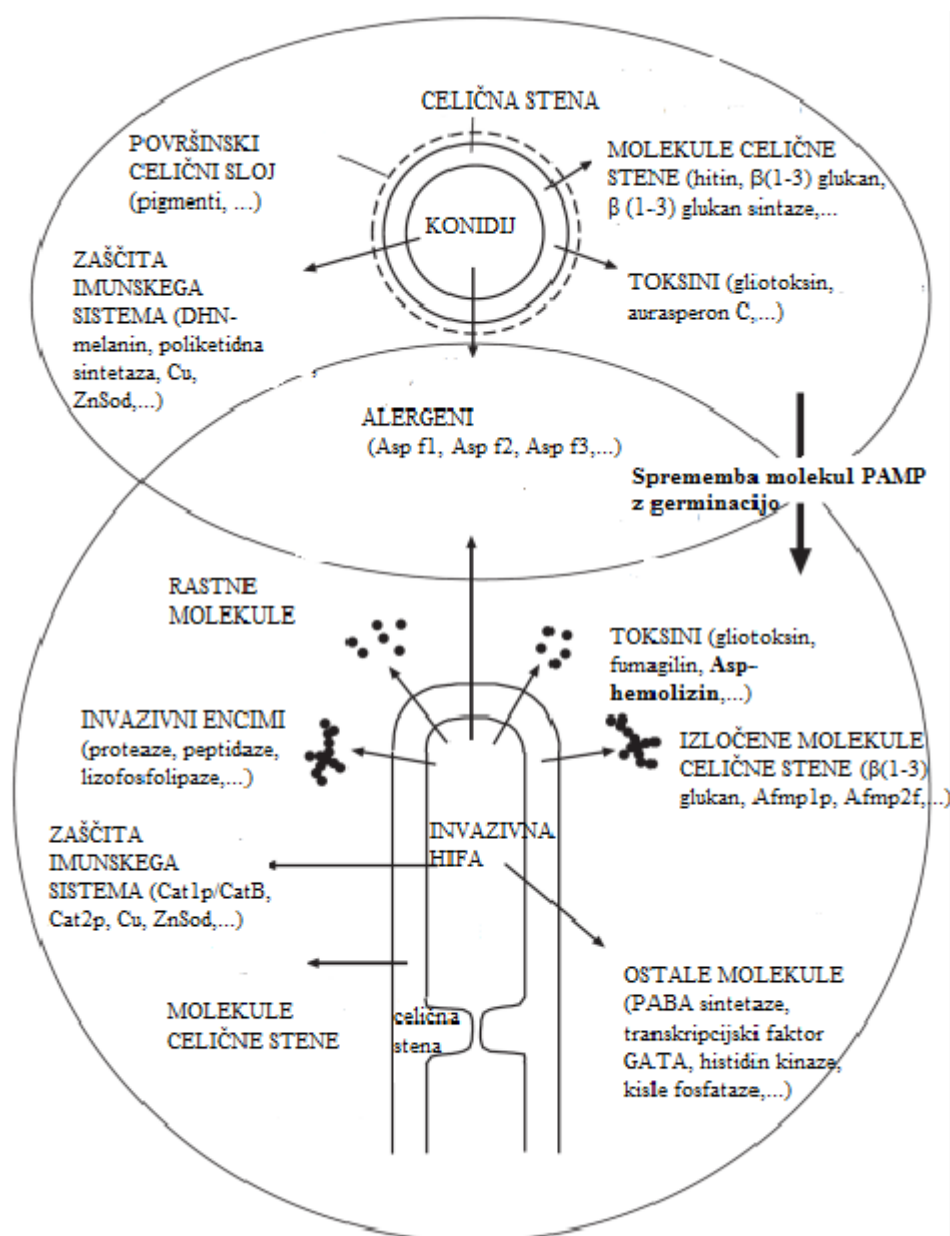
Sinteza mikotoksinov je kompleksna in odvisna od okoljskih razmer (Derlink, 2009). Pomembni dejavniki za njihovo produkcijo so temperatura (optimalna temperatura med 20 °C in 30 °C), pH, kisik, sestava medija ter vodna aktivnost (Bennet in Klich, 2003; Calvo in sod., 2002; Nielsen, 2003). V splošnem je produkcija mikotoksinov počasna, po čemer se razlikujejo od virulentnih faktorjev, zaznaven nivo mikotoksinov pa je dosežen po daljšem času gojenja (Kamei in Watanabe, 2005).

2.1.3.3 Virulentni dejavniki

Latge in sod. (1999) so s tem izrazom označili gene ali molekule, katerih odsotnost odpravi virulenco organizma, vendar ne vpliva na njegovo normalno rast ali *in vitro* morfogenezo. Ostali geni, povezani z virulenco, kot so npr. katalaze ali sekretorne proteaze, ne spadajo v to definicijo, saj je odstranitev vseh genov neke družine proteinov iz seva otežena. Kakorkoli, vsi geni, ki pomagajo in sodelujejo pri rasti organizma, so vpleteni v patogenezo aspergiloz (Abad in sod., 2010).

Gene in molekule glive *A. fumigatus*, ki so povezani z virulenco, lahko glede na procese, v katere so vpleteni, klasificiramo v naslednje skupine: **alergeni** (Asp f1 – Asp f23); **toksini** (gliotoksin, fumagilin, Asp-hemolizin, helvolična kislina, aflatoksin, ribotoksin ipd.); **geni, ki sodelujejo pri termotoleranci** (Hsp1/Asp f12, CgrA ipd.); **komponente celične stene** (β (1-3)-glukan, hitin, galaktomanan ipd.); **komponente, povezane z rezistenco pred imunskim odzivom** (DHN-melanin, katalaze, superoksid dismutaze, hidrofobina RodAp in RodBp, peroksidaze); **geni in molekule povezane z vnosom hranil in invazivno rastjo** (alkalna serinska proteaza-Alp, metaloproteaza-Mep, fosfolipaze, siderofor transportni protein ipd.) in **molekule povezane z signalizacijo, regulacijo metabolizma ter odzivom na stresne dejavnike** (kinaze MAP, G-proteini, kinaze His ipd.) (Abad in sod., 2010).

Poznanih je veliko molekul ali genov, za katere menijo, da sodelujejo pri virulenci, vendar za nobenega od teh še ni niso dokazali, da je nujno pomemben za patogenezo. Vpliv posameznega virulentnega dejavnika so večinoma ugotavljali s pomočjo mutant, v katerih so odstranili gen preučevane molekule ali samo molekulo, ki naj bi sodelovala pri virulenci. Rezultat večine raziskav je bil le ta, da se je zmanjšala virulentnost mutante, ali da preučevana molekula ni bila nujna za virulenco. Vse to kaže, da virulentnost ni odvisna samo od enega faktorja, temveč od usklajenega delovanja več virulentnih dejavnikov. Za boljšo preučitev virulentnih dejavnikov bi tako potrebovali multiple mutante, vendar je take mutante težko ustvariti (Rementaria in sod., 2005).



Slika 3: Virulentni dejavniki glive *A. fumigatus* (povzeto po Rementeria in sod., 2005).

2.2 HEMOLIZINI GLIV

Hemolizini predstavljajo razred proteinov, ki jih definirajo kot eksotoksine, sposobne tako lize rdečih krvnih celic kot tudi celic z jedrom (Nayak in sod., 2013). Zaradi sposobnosti lize različnih celic, ne samo rdečih krvničk, bi jih bolj točno lahko opisali kot citolizine (Vesper S.J. in Vesper M.J., 2004). Odkrili so jih pri bakterijah, glivah, živalih in rastlinah. Najbolje so preučeni hemolizini bakterij (α -toksin, aerolizin, AB toksin, streptolizin O ipd.), medtem ko je o glivnih hemolizinih manj znanega.

Glivne hemolizine so najprej odkrili pri bazidiomicetah rodov *Amanita*, *Entoloma*, *Lactarius* in *Inocybe*. Z nadaljnjimi študijami so jih odkrili tudi pri patogenih askomicetnih vrstah, kot sta glivi *Aspergillus fumigatus* in *Aspergillus flavus*, pri endemičnih patogenih glivah *Histoplasma capsulatum* in *Blastomyces dermatidis*, pri oportunističnih glivah, kot sta *Candida albicans* in *Cryptococcus neoformans*, ter pri številnih drugih (Nayak in sod., 2013). Pri glivnih hemolizinih prevladuje β -struktura (Nayak in sod., 2013), z izjemo nigerlizina, ki se nahaja v obliki α -heliksa (Donohue in sod., 2006).

2.2.1 Mehanizem hemolize

Glede na strukturo hemolizinov ločimo dva tipa hemolize, in sicer delno (α) ter popolno (β) hemolizo. Alfa hemolizini povzročajo delno lizo eritrocitov, ki jo lahko na ploščah s krvnim agarjem opazimo kot temno cono okoli kolonij, medtem ko je za β hemolizo zaradi popolne lize eritrocitov v okolici kolonije značilna popolna zbistritev krvnega agarja (Vesper S.J. in Vesper M.J., 2004).

Proteini, ki tvorijo membranske pore, imajo v glavnem enak mehanizem delovanja, ki poteka v več stopnjah: vezava topnega monomera na membrano, oligomerizacija, vgradnja v membrano in oligomerizacija v končno poro. Temu sledi postopen influks vode in ionov, kar vodi v otekanje celic in njihovo lizo. Proces nastanka pore je odvisen od konformacije proteina in njegovega odvijanja (Berne in sod., 2002; Sepčić in sod., 2003). Pomemben mehanizem hemolize pri glivnih hemolizinih predstavlja koloidno-osmotski mehanizem, za katerega je značilna sigmoidna krivulja hemolize, kjer začetni lag fazi sledi hitra liza tarčnih celic. Lag faza najverjetneje predstavlja čas, potreben za vezavo monomerov in oligomerizacijo na površini tarčnih celic (Nayak in sod., 2013).

2.2.2 Izločanje in lokalizacija hemolizinov

Sekrecija in lokalizacija glivnih hemolizinov še ni dobro preučena. S proteomsko analizo glive *A. fumigatus* so pokazali, da se Asp-hemolizin izloča iz rastočih hif v gojišče. Gre za četrti najbolj pogost protein v sekretumu glive *A. fumigatus*, čeprav pri njem niso zaznali signalnega peptida (Wartenberg in sod., 2011). Tudi Braaksma in sod. (2010) so v filtratu kulture *A. niger* v signifikantnih količinah zaznali Asp-hemolizinu podoben protein, ki prav tako nima signalnega peptida in se verjetno izloča iz celice z aktivnim transportnim

mehanizmom. To kaže na neklasične poti sekrecije pri glivi *A. niger*. Podobno je pokazala tudi študija z glivo *A. terreus*, kjer so terelizin z uporabo specifičnih monoklonskih protiteles zaznali v gojišču, kot tudi v ekstraktu micelija (Nayak in sod., 2012). Glede na to, da terelizin nima signalnega peptida, obstajajo možnosti, da difundira iz apikalnega dela hife, se aktivno izloča med začetno rastjo hife (apikalnim podaljševanjem) preko še neznanega procesa (Nayak in sod., 2013), da se izloča med degradacijo hife ali pa je vpleten edinstven sekretorni proces. Na drugi strani so proteomske študije gliv *A. flavus* in *A. terreus* pokazale, da se hemolizini ne izločajo. Za to neskladje je verjetno krivo to, da proteomske analize niso tako občutljive kot testi, ki temeljijo na osnovi monoklonskih protiteles (Han in sod., 2010; Nayak in sod., 2013).

S študijami imunolokalizacije pa so opazili, da se terelizin ne nahaja samo v hifni citoplazmi glive *A. terreus*, ampak je predvsem lokaliziran na sami konici hife. V končnih delih hif poteka obsežna metabolna aktivnost in tu so koncentracije proteinov višje kot v ostalih območjih teh apikalnih razširitev (Nayak in sod., 2013).

2.2.3 Vloga glivnih hemolizinov

Na podlagi številnih študij ugotavljajo, da naj bi hemolizini bili virulentni dejavniki, ki igrajo pomembno vlogo pri patogenezi in virulenci mikroorganizmov (Nayak in sod., 2013). Z lizo rdečih krvnih celic se sprošča železo, ki je esencialen element za rast mikroorganizmov, saj sodeluje pri številnih metabolnih poteh in biokemijskih procesih (Donohue in sod., 2006; Nayak in sod., 2013). Ker so koncentracije železa v višjih organizmih omejene, igra hemoliza pomembno vlogo pri patogenezi gliv (Nayak in sod., 2013). Na drugi strani pa so nekatere študije pokazale, da hemolizini nimajo relevantne vloge pri infekciji. Wartenberg in sod. (2011) so naredili delecije mutante glive *A. fumigatus* z delecijo Asp-hemolizina, hemolizinu podobnega proteina in dvojno mutanto, z delecijo genov za oba proteina. Pokazali so, da v primerjavi z divjim tipom pri nobeni od mutant ne pride do bistvenega zmanjšanja hemolitične in citotoksične aktivnosti glive. Mutanta z delecijo obeh genov se je izkazala celo za hipervirulentno (Wartenberg in sod., 2011). Prav tako je večina gliv saprofitnih in le v nekaterih primerih rastejo na ali v tkivu, zato je malo verjetno, da je hemoliza glavna vloga hemolizinov (Nayak in sod., 2013).

Proteini iz egerolizinske družine bi naj bili vpleteni pri razvojnem ciklu gliv in bakterij (Berne in sod., 2005), čeprav njihova natančna biološka funkcija še ni točno pojasnjena (Berne in sod., 2007). V študiji bazidiomicetnih gliv *Pleurotus ostreatus* in *Agrocybe aegerita* so produkcijo ostreolizina in egerolizina zaznali v času formacije primordijev in plodišč, medtem ko hemolize in hemolizinov v času rasti micelija niso zaznali (Berne in sod., 2002). Z imunolokalizacijo so pokazali, da se oba proteina koncentrirata v rastočih območjih bazidiokarpa, posebno v bazidiju in bazidiosporah (Vidic in sod., 2005). Opazili so celo, da ostreolizin, ki so ga dodali v medij z bukovim ostrigarjem, rahlo inhibira rast micelija, vendar močno pospeši tvorbo primordijev in razvoj v plodna telesa (Berne in sod., 2007). Prav tako so dokazali, da sta hemolizina identična domnevemu proteinu Aa-Pri1, ki bi naj bil vpleten v fruktifikacijo gliv (Berne in sod., 2002; Berne in sod., 2007). Pri sporulaciji gliv ostreolizin verjetno ni vpleten, saj so ga v velikih količinah zaznali tudi pri nesporulirajočem sevu bukovega ostrigarja (Berne in sod., 2007).

Glede izražanja hemolizinov pri filamentoznih glivah pa obstaja malo informacij. Pri glivi *A. fumigatus* so opazili večje izražanje hemolizina v času mirovanja konidijev in maksimalne rasti glive, med germinacijo pa je bilo izražanje manjše. Delecija pri mutantah glive *A. fumigatus* ni vplivala na spremembo fenotipa (mikroskopsko ali makroskopsko) ali na rastne značilnosti glive (Wartenberg in sod., 2011). Pri glivi *A. terreus* so opazili, da je prisotnost terelizina največja v zgodnji fazi rasti (kalitev konidija, rast hif). V stacionarni fazi se prisotnost terelizina signifikantno zmanjša (Nayak in sod., 2013). Pri bakteriji *Pseudomonas aeruginosa* so opazili, da je izražanje hemolizina PA0122 največje v času stacionarne faze (Berne in sod., 2007).

Hemolizini bi naj imeli vlogo pri kompeticiji z drugimi organizmi. Eringeolizin iz glive *P. eryngii* deluje antibakterijsko proti bakterijam rodu *Bacillus*, ne pa tudi proti drugim bakterijam. Pri nekaterih hemolizinih bazidiomicet in bakterijskih vrst, kot je *Clostridium bifermentans*, so opazili tudi insekticidno delovanje. Hemolizini imajo verjetno vlogo tudi pri rastlinski patogenezi, zaradi specifičnosti za določene lipide. Egerolizinski protein ostreolizin se lahko veže in lizira tudi vezikle s sitosterolom (fitosterol, ki je večinoma prisoten v rastlinah). To bi lahko bil razlog za občutljivost nekaterih rastlinskih vrst, npr.

arašidov, na okužbe z vrstami rodu *Aspergillus*, ki ravno tako vsebujejo egerolizine (Nayak in sod., 2013).

2.3 EGEROLIZINSKA DRUŽINA PROTEINOV

Egerolizini so družina proteinov (Sepčić in Frangež, 2010), katerih biološka funkcija še ni dobro poznana, vendar je znano, da imajo nekateri hemolitične, citotoksične in toksične lastnosti (Berne in sod., 2005). Proteini te družine predstavljajo največjo skupino glivnih hemolizinov (Nayak in sod., 2013). Najdemo jih pri glivah, bakterijah (skupini Firmicutes in gama proteobakterije), rastlinah, nekaterih insektih in pri enem od virusnih predstavnikov (*Trichoplusia ni ascovirus 2c*) (Berne in sod., 2009; Nayak in sod., 2013). Večino vrst, ki vsebujejo gene za egerolizine, najdemo znotraj kraljestva gliv, in sicer znotraj debel *Ascomycetes* in *Basidiomycetes*, od katerih največ predstavnikov z egerolizinskimi geni spada ravno v rod *Aspergillus*. Vse glivne vrste z egerolizinskimi geni so ali nitaste ali dimorfne (Berne in sod., 2009).

V egerolizinsko družino proteinov (PF06355; IPR 009413) spada nekaj izoliranih in sekvenciranih proteinov ter številni, na osnovi transkriptov in zaporedij EST (ang. *expressed sequence tag*), predvideni proteini (Berne in sod., 2005; 2009). Prvi protein te družine, ki so ga izolirali in sekvencirali, je bil Asp-hemolizin glive *A. fumigatus*. V to družino uvrščamo tudi druge proteine, kot so ostreolizin in pleurotolizin A glive *Pleurotus ostreatus*, egerolizin glive *Agrocybe aegerita*, terelizin iz glive *A. terreus*, dva domnevna proteina iz bakterije *Clostridium bifermentans* (Cbm17.1 in Cbm17.2), domnevni protein PA0122 iz bakterije *Pseudomonas aeruginosa*, domnevni protein iz plesni *Neurospora crassa*, hemolizin iz bazidiomicete *Moniliophthora perniciosa* ter številne druge proteine ali cDNA prepise z zelo podobnimi zaporedji (Nayak in sod., 2010; Berne in sod., 2009).

Preglednica 1: Asp-hemolizinu podobna aminokislinska zaporedja nekaterih predstavnikov iz egerolizinske družine proteinov. AK I (%) - delež aminokislin, identičnih Asp-hemolizinu, AK P (%) - delež aminokislin, podobnih Asp-hemolizinu.

Vrsta seva	Ime proteina	Koda proteina	Molekulska masa (Da)	AK	AK I (%)	AK P (%)	Referenca
<i>A. fumigatus</i> AF293 / FGSC A1100	Prekurzor Asp-hemolizina	ASPH_ASPFU	15199	139	100	100	The UniProt..., 2013
<i>A. fumigatus</i> FGSC A1163	Domnevni egerolizinski protein AFUB_047850	B0XX60_ASPFC	15199	139	100	100	The UniProt..., 2013; Nayak in sod., 2013
<i>A. niger</i> CBS 113.46 / ATCC 1015	Hipotetični protein ASPNIDRAFT_205662	G3XTV2_ASPNA	16259	145	51	72	The UniProt..., 2013; Berne in sod., 2009
<i>A. niger</i> CBS 513.88 / FGSC A1513	Hipotetični protein An01g09980	A2QA29_ASPNC	16259	145	51	72	The UniProt..., 2013; Berne in sod., 2009
<i>A. oryzae</i> Rib40 / ATCC 42149	Domnevni protein AO090701000257	Q2U8X3_ASPOR	16294	144	42	58	The UniProt..., 2013
<i>A. terreus</i> NIH2624	Domnevni protein ATEG_03556 (terelizin)	TERL_ASPTN	15805	141	29	55	The UniProt..., 2013; Nayak in sod., 2010, 2013
<i>A. oryzae</i> Rib40 / ATCC 42149	Domnevni protein AO090023000032	Q2UIJ5_ASPOR	15571	139	34	55	The UniProt..., 2013
<i>A. flavus</i>	Domnevni protein AFLA_104640	B8N7M1_ASPFN	22874	205	34	55	The UniProt..., 2013
<i>A. flavus</i>	Domnevni protein AFLA_094130	B8NLV7_ASPFN	11365	104	36	50	The UniProt..., 2013
<i>A. oryzae</i> Rib40 / ATCC 42149	Domnevni protein AO090010000018	Q2TXT6_ASPOR	16359	134	25	49	The UniProt..., 2013
<i>A. clavatus</i> CBS 513.65	Domnevni protein ACLA_066510	A1CGD5_ASPCL	15644	139	27	51	The UniProt..., 2013; Berne in sod., 2009
<i>A. aegerita</i>	Prekurzor egerolizina Aa-Pri1	AAPR1_AGRAE	16104	145	45	59	The UniProt..., 2013; Berne in sod., 2009
<i>P. ostreatus</i>	Ostreolizin	Q56QW9_PLEOS	14855	137	44	61	The UniProt..., 2013; Berne in sod., 2005, 2009
<i>P. ostreatus</i>	Pleurotolizin A	Q8X1M9_PLEOS	15136	138	42	63	The UniProt..., 2013; Berne in sod., 2009; Shibata in sod., 2010
<i>C. immitis</i>	Hipotetični protein CIMG_06184 (pleurotolizin A)	J3K846_COCIM	14840	134	42	62	The UniProt..., 2013
<i>P. eryngii</i>	Erilizin	D0FZZ2_PLEER	15090	138	43	59	The UniProt..., 2013; Nayak in sod., 2013
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 15692	Domnevni protein PA0122	Q9I710_PSEAE	14579	136	43	59	The UniProt..., 2013; Berne in sod., 2009
<i>C. bifermentans</i>	Hemolizinu podoben protein cbm17.1	O32337_CLOBI	17200	153	36	55	The UniProt..., 2013; Berne in sod., 2009
<i>C. bifermentans</i>	Hemolizinu podoben protein cbm17.2	O32338_CLOBI	17463	152	38	59	The UniProt..., 2013; Berne in sod., 2009
<i>Trichoplusia ni</i> ascovirus 2c	Domnevni protein TNAV2c_gp029	Q06VQ2_TNAVC	23777	222	28	46	The UniProt..., 2013; Berne in sod., 2009

2.3.1 Fizikalne in biokemijske lastnosti egerolizinov

Za proteine egerolizinske družine je značilna nizka molekulska masa (15-20 kDa), nizka izoelektrična točka, stabilnost v širokem razponu pH (pH 3 – 10) in temperaturna stabilnost do temperature 60 °C ali 65 °C (Nayak in sod., 2013; Berne in sod., 2009). Pri večini egerolizinov prevladuje β -struktura; izjema je nigerlizin, pri katerem prevladuje α -struktura in ne spada med egerolizine (Donohue in sod., 2006). Egerolizinska proteinska domena je bogata z aromatskimi in negativno nabitimi aminokislinami, kjer prevladujejo intaktne cisteinske in triptofanske regije (Berne in sod., 2009).

Za egerolizine velja, da bi naj večina delovala v monomerni obliki, razen pleurotolizina, za katerega je znano, da je dvokomponenten protein, sestavljen iz komponente A (17 kDa) in komponente B (59 kDa) (Tomita in sod., 2004). Novejše študije pa so pokazale na možnost, da so tudi drugi egerolizini dvokomponentni in da so lahko sestavljeni tudi iz večih komponent (Sakurai in sod., 2004; Nayak in sod., 2013). Primeri dvokomponentnih egerolizinov so pleurotolizin in ostreolizin iz glive *Pleurotus ostreatus* (Ota in sod., 2013). Prav tako so dvokomponentno delovanje odkrili tudi pri erilizinu (EryA in EryB) iz glive *P. eryngii*, kjer obe komponenti izkazujeta visoko podobnost s pleurotolizinom (PlyA, PlyB) glive *P. ostreatus* (Shibata in sod., 2010). Za omenjene egerolizine velja, da za hemolitično delovanje potrebujejo še drugo, večjo komponento, s katero tvorijo aktiven dvokomponentni encim.

2.3.2 Biološka aktivnost egerolizinov

2.3.2.1 Hemolitična aktivnost egerolizinskih proteinov

Nekateri egerolizini so sposobni lize rdečih krvnih teles s t. i. koloidno ozmotsko lizo. Liza se začne s prepoznavanjem specifičnih membranskih komponent na površini eritrocitov, sledi vezava v monomerni obliki, agregacija (Sepčić in sod., 2003) ter vstavljanje in translociranje polipeptidnega segmenta čez lipidni dvosloj. S tem oblikujejo transmembransko poro, ki vodi v lizo eritrocitov (Sepčić in Frangež, 2010). Izkazalo se je, da je za vezavo na površino membrane pomembna β -struktura proteina. FTIR spektroskopija ostreolizina je namreč pokazala, da je večji del proteina v času vezave v β -strukturi. Po vezavi pride do majhnih konformacijskih sprememb, kjer delež β -strukture na račun α -strukture pade. Menijo, da so te spremembe, ki jih sproži vezava na membrano,

pomembne za insercijo proteina v membrano in za tvorbo por (Sepčič in sod., 2003, 2004). Pri Asp-hemolizinu so s presežno elektronsko mikroskopijo pokazali, da ta protein na površini eritrocitnih membran tvori obroče in zaplate. Pri pleurotolizinu, kjer se na membrano najprej veže sfingomielin-vezavna komponenta, pleurotolizin A (17 kDa) in kasneje pleurotolizin B (59 kDa), pa se oblikuje stabilni, 700 kDa velik kompleks v obliki prstana. Vsi omenjeni egerolizini so hemolitični v nanomolarnem območju (Tomita in sod., 2004; Ota in sod., 2013).

Na področju iskanja ustreznega membranskega receptorja za egerolizine je bilo narejenih veliko raziskav. Ugotovili so, da ti prepoznavajo značilne membranske komponente, ki so lipidne narave, pri čemer kažejo precejšnjo variabilnost (Sepčič in Frangež, 2010; Sepčič in sod., 2003). Pomembna značilnost vseh egerolizinov je, da se lahko vežejo na naravne in umetne lipidne membrane (Sepčič in Frangež, 2010). Pri študiji Sepčič in sod. (2003, 2004) ter Tomita in sod. (2004) so naredili vezikle z različno lipidno sestavo in ugotovili, da so liposomi, sestavljeni iz ovčjega sfingomieline (SM) in holesterola (CH) (1:1), občutljivi na permeabilizacijo z Oly in Ply. Ker v primeru liposomov, sestavljenih iz CH v kombinaciji z drugimi lipidi, tega niso opazili, so predvidevali, da se Ply specifično povezuje s SM (Tomita in sod., 2004), medtem ko za Oly predvidevajo, da se povezuje z specifičnimi mikrodomenami obogatenimi s CH, ki se nahajajo v t. i. tekoči urejeni lipidni fazi in jih poznamo tudi pod imenom lipidni rafti. Domene v tej fazi so bolj odporne na raztapljanje z detergenti kot lipidi v tekočih neurejenih domenah, zato lipidne rafte imenujemo tudi za detergent odporne membrane (DRM, ang. *detergent-resistant membranes*). Te membranske domene so vpletene pri številnih pomembnih bioloških funkcijah, kot je endocitoza in eksocitoza, prenos signala (Sepčič in Frangež, 2010) ter pritrjanje ali vstop celičnih patogenov, toksinov in drugih ligandov (Sepčič in sod., 2004).

Interakcije ostreolizina z mikrodomenami so potrdili z detekcijo Oly v DRM, izoliranih iz SM:CH (1:1) veziklov in celic ovarijev kitajskega hrčka. Poleg tega se Oly veže in permeabilizira v SM:CH (1:1) membranah le, če te vsebujejo 30 mol % ali več holesterola (Sepčič in sod., 2004), ker pri teh koncentracijah sterol sproži oblikovanje tekoče urejene faze (Berne in sod., 2009). Ostreolizin se ne more vezati s čistim holesterolom, vendar pa je ta komponenta izrednega pomena za njegovo membransko aktivnost, ki je zelo odvisna

od koncentracije membranskega holesterola. Za membransko aktivnost citolizinov ni pomembna sama prisotnost holesterola, ampak porazdelitev holesterolnih molekul na membrani in specifični oblikovani vzorci (Berne in sod., 2009).

Interakcije ostreolizina s holesterolom bogatimi domenami lahko zmanjšamo ali prekinemo z dodatkom mono- in di-nenasičenega fosfatidilholina, z zamenjavo holesterola z drugimi naravnimi steroli ali holesterolnimi derivati (Berne in sod., 2009), z dodatkom mikromolarnih koncentracij lizofosfolipidov (posebno lizofosfatidilinozitola in sfingozin-1-fosfata) in maščobnih kislin (Sepčič in sod., 2003), ter s predhodnim tretiranjem membrane z metil- β -ciklodekstrinom, ki veže holesterol (Berne in sod., 2009).

Na podlagi raziskav Asp-hemolizina pa predvidevajo, da se Asp-HS specifično povezuje z lizofosfatidilholinom, ki predstavlja glavno komponento ox-LDL (oksidiranega lipoproteina majhne gostote). Asp-HS je podoben prekursorju za človeški LDL receptor, zato se veže s številnimi lipoproteinskimi komponentami človeške plazme, še posebej z ox-LDL (Berne in sod., 2009). Enako kot pri ostreolizinu tudi pri egerolizinu in terelizinu ne pride do vezave s serumskimi lipidi oziroma LDL (Nayak in sod., 2013).

Številne študije so pokazale na pomembno vlogo aminokislin pri hemolitični aktivnosti egerolizinov. Opazili so, da bi naj regije cisteina, triptofana, metionina in arginina sodelovale pri hemolizi Asp-hemolizina, medtem ko histidin pri tem naj ne bi igral vloge (Yokota in sod., 1985, 1984a, 1984b). Pomen cisteinskih regij pri hemolizi so opazili tudi pri ostreolizinu (Berne in sod., 2002). S triptofanom bogate regije imajo tudi drugi proteini, ki v membrani tvorijo pore, kjer naj bi triptofan imel pomembno vlogo pri vezavi na membrane tarčnih celic, prav tako pa pri vzdrževanju strukture in stabilnosti proteinov. Aromatske in cisteinske regije od holesterola odvisnih bakterijskih toksinov pa sodelujejo pri tvorbi por (Berne in sod., 2002).

Eritrociti iz različnih vrst so različno občutljivi na egerolizine (Sepčič in Frangež, 2010). Ostreolizin je enako litičen za ovčje, goveje in človeške eritrocite (Sepčič in sod., 2003), vendar pa je manj učinkovit na eritrocitih iz glodavcev, psa in dvoživk (Sepčič in Frangež, 2010). Asp-hemolizin je bolj litičen za človeške in kokošje eritrocite, kot za eritrocite glodavcev (Sakaguchi in sod., 1975). Različno občutljivost eritrocitov na egerolizine so

opazili Tomita in sod. (2004), ki so ugotovili, da je membranska aktivnost Ply odvisna od vsebnosti sfingomielina v membrani eritrocitov, zaradi česar je Ply bolj litičen za ovčje in človeške eritrocite, kot za eritrocite glodavcev.

2.3.2.2 Citotoksična aktivnost in toksičnost za eksperimentalne živali

Toksičnost egerolizinov za poskusne živali je verjetno posledica njihovih citolitičnih vplivov (Berne in sod., 2009). Egerolizini so citotoksični za različne celične linije pri sub-mikromolarnih koncentracijah (Sepčič in Frangež, 2010). Ostreolizin je citotoksičen za tumorske celice, saj so z direktnim mikroskopskim opazovanjem tumorskih celičnih linij fibrosarkoma in sesalskih tumorskih celic, izpostavljenih ostreolizinu odkrili tipične znake koloidne osmotske lize (Sepčič in sod., 2003), kot so sprememba oblike celic, mehurjenje celične membrane (Sepčič in sod., 2004), napihovanje in degranulacija celic (Sepčič in Frangež, 2010). Asp-hemolizin je citotoksičen za nevtrofilce in makrofage (Kamei in Watanabe, 2005). Letalen je za miši in kokoši (Fukuchi in sod., 1998), kjer ocenjujejo, da je njegova polovična letalna doza (LD_{50}) 750 μg za miši in 350 $\mu\text{g/kg}$ za kokoši (Sakaguchi in sod., 1975). Gre za sekretorni protein, ki so ga zaznali med *in vivo* eksperimentalno okužbo miši s sporami *A. fumigatus* (Ebina in sod., 1982) ter povzroča perivaskularne lezije v ledvicah, srcu, jetrih, možganih, poveča prepustnost kapilar, krčenje ileuma in citotoksičnost (Ebina in sod., 1983, 1984).

Po zaužitju velikega števila svežih gob bukovega ostrigarja so pri ljudeh in živalih opazili sporadične lokalne intoksikacije, pri čemer bi naj bila toksičnost povezana s termolabilnimi proteinskimi molekulami (Al-Deen in sod., 1987). Študije ostreolizina so razkrile, da povzroča kardiorespiratorne in toksične učinke pri glodavcih ter smrt po intravenoznem injiciranju z LD_{50} , ki je pri miših 1170 $\mu\text{g/kg}$ (Žužek in sod., 2006). Oly povzroči povečanje tenzije aorte in lizo endotelijskih celic, kar se kaže kot hiperkaliemija (Rebolj in sod., 2007). Preučili so tudi histopatološke vplive ostreolizina pri podganah in pri tem odkrili številne lezije v pljučih in srcu, medtem ko v ostalih organih (jetra, ledvice, možgani, vranica, priželjc) lezij niso opazili (Juntos in sod., 2009).

2.3.3 Vplivi različnih dejavnikov na hemolitično aktivnost egerolizinov

Na hemolizo egerolizinov vplivajo naslednji dejavniki:

a) Temperatura

Večina egerolizinov je termostabilna do temperature 60 °C ali 65 °C (Nayak in sod., 2013). Izstopa eringeolizin iz glive *Pleurotus eryngi*, ki je neobstoječ nad temperaturo 40 °C (Han in sod., 2010). Segrevanje na 50 °C za 40 minut ali na 45 °C za 100 minut uniči hemolitično aktivnost Asp-HS (Sakaguchi in sod., 1975). Študije rekombinantnega terelizina so pokazale, da med 20 °C in 65 °C prevladuje β -struktura proteina, z naraščanjem na 75 °C β -struktura na račun α -heliksa upada, nad 75 °C pa je protein pretežno v obliki α -heliksa. Z naraščanjem temperature protein prehaja iz β v α obliko (Nayak in sod., 2010), zaradi česar se hemolitični potencial zmanjša. Termostabilnost proteina predstavlja prednost pri kolonizaciji tal s povišano temperaturo ali znotraj človeškega telesa (Nayak in sod., 2010).

b) Vrednost pH

Optimalen pH egerolizinov za vezavo na eritrocitno membrano se običajno giblje med 5 in 7, kot je značilno za Asp-hemolizin in ostreolizin. Maksimalna pH vrednost, kjer so zaznali hemolizo, je med 7 in 8 (Berne in sod., 2005). Izjemi sta egerolizin glive *A. aegerita* in eringeolizin, ki ohranita membransko aktivnost v širokem razponu pH, in sicer od 4 do 10, eringeolizin celo do 12 (Han in sod., 2010; Berne in sod., 2005). Raziskave ostreolizina so pokazale, da je med pH 6 in 9 protein v stabilni terciarni strukturi s prevlado β -strukture. To mu omogoča vezavo in lizo eritrocitov. Pri kisli pH-vrednosti (med 2 in 3) pride do konformacijske spremembe proteina z dominacijo α -strukture, kar proteinu onemogoča vezavo na membrano eritrocitov. Pri močno alkalni pH vrednosti (nad 12) pa pride do izgube terciarne strukture in ostankov sekundarne strukture, kar odgovarja popolni izgubi funkcije proteina (Berne in sod., 2005). Zmanjšanje β -strukture pri alkalni in kisli pH vrednosti so opazili tudi pri rekombinantnem terelizinu (Nayak in sod., 2010). Vrednost pH prav tako vpliva na topnost proteinov. Ostreolizin se v pH območju od 3,6 do 6,5 obori, kar je najverjetneje posledica izoelektrične precipitacije. Odvijanje proteina, ki vodi do lipidne insercije ali spodbujanja oligomerizacije lahko izzove nizki pH, lahko pa tudi kemični denaturanti, detergenti, elektrostatske in hidrofobne interakcije proteina s površino

lipidnih membran, omejena proteoliza ali vezava na specifični membranski receptor (Berne in sod., 2005).

c) Kovinski ioni

Številne študije so pokazale, da kovinski ioni vplivajo na hemolitično delovanje egerolizinov. Ti na aktivnost različnih egerolizinov delujejo različno. Zn^{2+} spodbudi hemolitično aktivnost Asp-hemolizina, medtem ko na hemolizo eringeolizina ne vpliva, ostreolizin pa je nanj občutljiv (Han in sod., 2010). Hg^{2+} , Cu^{2+} in Fe^{2+} inhibirajo hemolizo, povzročeno z Oly (Berne in sod., 2002), eringeolizinom in Asp-HS (Berne in sod., 2009; Han in sod., 2010). Na Asp-HS inhibitorno deluje tudi Pb^{2+} , vendar se njegova HA lahko obnovi ob uporabi β merkaptetoetanol ali cisteina (Berne in sod., 2009). Menijo, da ioni inhibirajo hemolizo tako, da stabilizirajo eritrocitne membrane, ali pa preko vezave s toksinom preprečijo njihovo vezavo na membrane (Sanguineti in sod., 2012).

d) Različni viri ogljika

Sekretom glive *A. niger* se različno odzove na spremembe v viru ogljika (Braaksma in sod., 2010). Braaksma in sod. (2010) so pri glivi *A. niger*, gojeni v odsotnosti ogljika, v primerjavi z rastjo na sorbitolu in galakturonski kislini opazili povečano produkcijo proteinov, homolognih Asp-hemolizinu. S stradanjem se poveča tudi količina nekaterih drugih izločenih proteinov, kot so zunajcelične proteaze. Lu in sod. (2010) so v zunajceličnem proteomu glive *A. niger* odkrili proteine, homologne Asp-hemolizinu v primeru, kadar je bila kot edini vir ogljika na voljo ksiloza. Pri kvasovki *Candida albicans* pa v primeru, ko v agarju ni bila prisotna glukoza ali maltoza kot edini vir ogljika, niso opazili hemolize. Hemolize prav tako ni bilo v primeru saharoze, laktoze in galaktoze (Manns in sod., 1994).

2.3.4 Možne aplikacije egerolizinskih proteinov

Egerolizine bi zaradi njihovih bioloških značilnosti in učinkov lahko uporabili na številnih področjih. i) Poskusi na živalih so pokazali, da protitelesa tipa IgG proti Asp-hemolizinu uspešno zaščitijo miši pred infekcijo s spori *A. fumigatus* (Ebina in sod., 1982). Uporaba protiteles bi lahko poleg klasične terapije z amfotericinom predstavljala dobro strategijo za zaščito oseb z oslabljenim imunskim sistemom pred okužbo z glivo *A.*

fumigatus. ii) Oksidiran LDL ima vlogo pri razvoju in napredovanju ateroskleroze (Kudo in sod., 2001). Ker se Asp-hemolizin veže na ox-LDL, bi lahko njegova nehemolitična mutanta ali sintetična oblika inhibirala delovanje ox-LDL (Berne in sod., 2009; Kudo in sod., 2001), kar bi lahko predstavljalo uporabno orodje za ugotavljanje patofiziološke pomembnosti ox-LDL (Kudo in sod., 2001). S tem bi lahko izboljšali preventivo in zdravljenje ateroskleroze. iii) Nekateri egerolizini delujejo protitumorsko, protibakterijsko in kot zaviralci celičnih delitev (Berne in sod., 2009). iv) Poleg omenjenih aplikacij bi egerolizine lahko uporabili za preučevanje membranskih domen, bogatih z holesterolom, imenovanih DRM. Študije so namreč pokazale, da se egerolizini povezujejo in permeabilizirajo lipidne vezikle sestavljene iz CH in SM v razmerju 1:1 (Sepčić in sod., 2004). v) Pomembna lastnost egerolizinov je tudi specifično izražanje v zgodnjih fazah nastajanja plodišč. S komercialnega in biotehnološkega vidika velik pomen pripisujejo ostreolizinu (Berne in sod., 2009), ki močno pospeši nastajanje primordijev ter plodišč bukovega ostrigarja in verjetno tudi drugih gliv, če ga eksogeno dodamo v gojišče (Berne in sod., 2007). Boljše poznavanje genov, poti in celičnih procesov, ki omogočajo razvoj plodnih teles, bi tako izboljšalo kultivacijo gliv. To bi igralo predvsem pomembno vlogo pri proizvodnji komercialnih in biotehnološko pomembnih gliv (Berne in sod., 2009).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 MATERIAL

3.1.1 Kemikalije in drobna oprema

absolutni etanol (100 %)	Merck, Nemčija
agar	Merck, Nemčija
Bacto Casamino acids	Becton, Dickinson and Company, Francija
Bacto yeast extract	Becton, Dickinson and Company, Francija
denaturiran etanol (96 %)	Merck, Nemčija
dinatrijev hidrogenfosfat (Na_2HPO_4)	Sigma-Aldrich, Japonska
etanol (70 % in 96 %)	Kefo, Slovenija
filtrirni papir	Sartorius, Nemčija
glukoza	Sigma-Aldrich, Francija
goveji eritrociti	Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo, Katedra za biokemijo
goveji serumski albumin (BSA)	Sigma, ZDA
kalijev dihidrogenfosfat (KH_2PO_4)	Merck, Nemčija
kalijev hidroksid (KOH)	Merck, Nemčija
kalijev klorid (KCl)	Sigma, ZDA
klorovodikova kislina (HCl)	Merck, Nemčija
kontrola Oly (Ostreoli, 7.2.07, 0,5ml)	Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo, Katedra za biokemijo
komponenta B (rHis6 Plyb7 13/12/11)	Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo, Katedra za biokemijo
magnezijev sulfat (MgSO_4)	Sigma-Aldrich, Nemčija
mikrotitrne plošče	Brand, Nemčija
mononatrijev fosfat (NaH_2PO_4)	Sigma-Aldrich, Japonska
natrijev hidroksid (NaOH)	Merck, Nemčija
natrijev klorid (NaCl)	Sigma, ZDA
natrijev nitrat (NaNO_3)	Sigma, ZDA
ovčji eritrociti	Inštitut za patološko fiziologijo in toksikologijo, Veterinarska fakulteta

Pierce BCA Protein Assay reagent A (23228)	Thermo Fisher Scientific, ZDA
Pierce BCA Protein Assay reagent B (23224)	Thermo Scientific, ZDA
posneto mleko v prahu	Pomurske mlekarne
tablete z inhibitorji (Sigmafast protease inhibitor cocktail tablets, EDTA-free)	S8830, Sigma-Aldrich, ZDA
tkanina Miracloth	Merck milipore, ZDA
Tris-HCl	Merck, Nemčija
Triton X-100	Merck, Nemčija

3.1.2 Raztopine

Fiziološka raztopina

0,9-odstotni NaCl

Pufer za eritrocite 1 (pH 7,4)

130 mM NaCl

20 mM Tris-HCl

Pufer za eritrocite 2 (pH 7,4)

140 mM NaCl

20 mM Tris NaCl

AspA (50 x; pH 5,5)

3,5 M NaNO₃

0,35 M KCl

0,55 M KH₂PO₄

Vitamini (1000 x raztopina)

tiamin 100 mg/ml

riboflavin 100 mg/ml

nikotinamid 100 mg/ml

piridoksin 50 mg/ml

pantotenska kislina 10 mg/ml

biotin 0,2 mg/ml

Elementi v sledovih (1000 x raztopina)

2,2 % ZnSO₄·7H₂O

1,1 % H₃BO₄

0,5 % MnCl₂·4H₂O

0,5 % FeSO₄·7H₂O

0,17 % CoCl₂·6H₂O

0,16 % CuSO₄·5H₂O

0,15 % Na₂MoO₄·2H₂O

5 % EDTA

S KOH umerimo na pH 6,5 in avtoklaviramo.

3.1.3 Gojišča

Tekoče minimalno gojišče (MM+C) (500 ml)

10 ml	50 x AspA
1 ml	1 M MgSO ₄
10 ml	50 % glukoza
500 µl	1000 x raztopina elementov v sledovih

Tekoče minimalno gojišče (MM-C) (500 ml)

10 ml	50 x AspA
1 ml	1 M MgSO ₄
500 µl	1000 x raztopina elementov v sledovih

Destilirano vodo smo avtoklavirali tri ure pri temperaturi 121°C in nato zraven sterilno dodali navedene raztopine ter dopolnili z destilirano vodo do 500 ml.

Tekoče kompletno gojišče (KG) (500 ml)

2,5 g	Bacto kvasni ekstrakt (ang. <i>Yeast Extract</i>) (BD)
5 ml	10 % Bacto kazamino kisline (BD)
500 µl	1000 x vitamini
10 ml	50 x AspA
1 ml	1 M MgSO ₄
10 ml	50 % glukoza
500 µl	1000 x raztopina elementov v sledovih

Destilirana voda (do 500 ml)

Posebej smo v steklenico zatehtali ustrezno količino kvasnega ekstrakta, dolili 450 ml destilirane vode ter avtoklavirali tri ure pri temperaturi 121 °C. Po avtoklaviranju smo sterilno dodali ostale sestavine in dopolnili z destilirano vodo.

Trdno gojišče s posnetim mlekom (500 ml)

5 g	agar
0,250 ml	Triton X-100
10 ml	50 % glukoza
1 ml	1 M MgSO ₄
0,5 ml	1000 x raztopina elementov v sledovih
24,5 ml	1 M NaH ₂ PO ₄
0,25 ml	1 M Na ₂ HPO ₄
3,3 ml	3 M KCl
50 ml	10 % posneto mleko
Destilirana voda (do 500 ml)	

V steklenico smo zatehtali agar, dodali 400 ml destilirane vode in Triton X-100 ter vse skupaj avtoklavirali tri ure pri 121 °C. Po avtoklaviranju smo mešanico ohladili v vodni kopeli na 60 °C in nato sterilno dodali ostale sestavine ter dopolnili z destilirano vodo.

Krvni agar (SBA, ang. *Sheep blood agar*)

Tripsinski sojin II agar (BD):

14,5 g	pankreatično razgrajen kazein
5 g	s papainom razgrajena sojina moka
5 g	NaCl
14 g	agar
1,5 g	rastni faktorji
5 % defibrinirana ovčja kri	
Destilirana voda (do 1000 ml)	

Gojišče MBFA (Malt extract agar – Blakeslee's Formula)

Raztopina 1:

20 g	Bacto sladni ekstrakt (ang. <i>Malt extract</i>) (BD)
1 g	BBL fiton pepton – s papainom razgrajena sojina moka (BD)
20 g	agar
900 ml	destilirana voda

Raztopina 2:

20 g	glukoza
100 ml	destilirana voda

V prvo steklenico smo zatehtali ustrezno količino sestavin za raztopino 1, v drugo pa sestavine za raztopino 2. V vsako steklenico smo dolili ustrezno količino destilirane vode in obe steklenici avtoklavirali tri ure pri 121 °C. Pred uporabo smo zmešali 900 ml raztopine 1 in 100 ml raztopine 2.

3.1.4 Laboratorijska oprema

Accu-jet pro:	Brand, Nemčija
pripomoček za pipetiranje	
analitska tehtnica MC210P	Sartorius, Nemčija
avtomatske pipete	Gilson, ZDA
	HTL, Poljska
centrifuge	Centrifuge 5415D, Eppendorf, Nemčija
	Centric 322A, Tehnica, Slovenija
	Rotina 35R, Hettich Zentrifugen, Nemčija
centrifugirke	Techno plastic products (TPP), Švica
čitalec mikrotitrskih plošč	MRX, Dynex Technologies, Nemčija
filtri za sterilno filtracijo (0, 22 µm)	Millex syringe driven filter unit, Millipore, Nemčija
hladilna omara (+4 °C)	LTH Škofja Loka, d.d., Slovenija
stresalnik za gojenje kultur IS-200K	Kambič, Slovenija
inkubator za plošče	Termomedicinski aparati, Hrvaška
laminarij	MC12-2, Iskra PIO, Slovenija
	Lamin Air HVR2448, Heraeus Instruments, Nemčija
ledomat MF 26	Scotsman, Italija
magnetno mešalo	Rotamix 550 MMH Tehnica, Slovenija
	MM-540 Tehnica, Slovenija
multikanalna pipeta	Biohit, Finska

pH meter	Mettler Toledo, Nemčija
rotavapor in vodna kopel	R-134, Büchi, Švica
	B480, Büchi, Švica
serološke pipete (1, 5, 10, 25 ml)	Techno plastic products (TPP), Švica
tehnica	Kern, Nemčija
tehnica Exacta 610EB	Tehtnica, Slovenija
termični blok CH-100	Biosan, Latvija
topla soba	Smeva, Nizozemska
vodna kopel s stresalnikom GFL-1086	GFL, Nemčija
vibracijski stresalnik Vibromix	Tehtnica, Slovenija
104 EV	
zamrzovalnik (-20 °C)	Electrolux, Švedska
	Gorenje, Slovenija
zamrzovalnik (-70 °C)	Forma scientific, ZDA

3.1.5 Glivni sevi

Testirali smo hemolitično aktivnost za 18 različnih sevov rodu *Aspergillus*, ki so naštetih v preglednici. Sevi iz preglednice so del zbirke gliv Centra za glivno biodiverzitet (Fungal Biodiversity Centre – CBS), v okviru Inštituta kraljeve nizozemske akademije za umetnost in znanost (Institute of the Royal Netherlands Academy of Arts and Sciences – KNAW). Seve smo dobili v tubah, ki so vsebovale čepke, izrezane iz plošče MEA s spori. Priskrbela jih je dr. Nada Kraševac z Laboratorija za molekularno biologijo in nanobiotehnologijo Kemijskega inštituta v Ljubljani.

Seve različnih vrst gliv rodu *Aspergillus* smo prejeli v okviru konzorcija EUFGN (EUrotiales Functional GENomics consortium), katerega namen je s primerjalnimi študijami in z različnih aspektov izboljšati razumevanje biologije rodu *Aspergillus* ter gliv na splošno. Veliko število aspergilnih vrst z določenim celotnim genomskim zaporedjem in njihova pomembnost za družbo je v kombinaciji z bioinformacijskimi orodji, razvitimi prav v ta namen, namreč vzrok, da je ta skupina gliv idealna za primerjalne funkcijske post-genomske raziskave.

Preglednica 2: Seznam uporabljenih glivnih sevov.

Številka seva	Sev	Oznaka seva
1	<i>A. glaucus</i> (teleomorf <i>Eurotium herbariorum</i>)	CBS 516.65
2	<i>Aspergillus zonatus</i>	CBS 506.65
3	<i>Aspergillus versicolor</i>	CBS 795.97
4	<i>Aspergillus tubingensis</i>	CBS 134.48
5	<i>Aspergillus brasiliensis</i>	CBS 101740
6	<i>Aspergillus sydowii</i>	CBS 593.65
7	<i>Neosartorya fischeri</i>	CBS 544.65
8	<i>Aspergillus foetidus</i>	CBS 106.47
9	<i>Aspergillus niger</i>	CBS 113.46
10	<i>Aspergillus niger</i>	CBS 513.88
11	<i>Aspergillus niger</i>	N402
12	<i>Aspergillus oryzae</i>	Rib40
13	<i>Aspergillus nidulans</i>	FGSCA4
14	<i>Aspergillus aculeatus</i>	CBS 172.66
15	<i>Aspergillus terreus</i>	NIH2624
16	<i>Aspergillus clavatus</i>	CBS 513.65 (NRRL1)
17	<i>Aspergillus wentii</i>	DTO 134-E9
18	<i>Aspergillus carbonarius</i>	DTO 115-B6

3.2 METODE

3.2.1 Potek dela

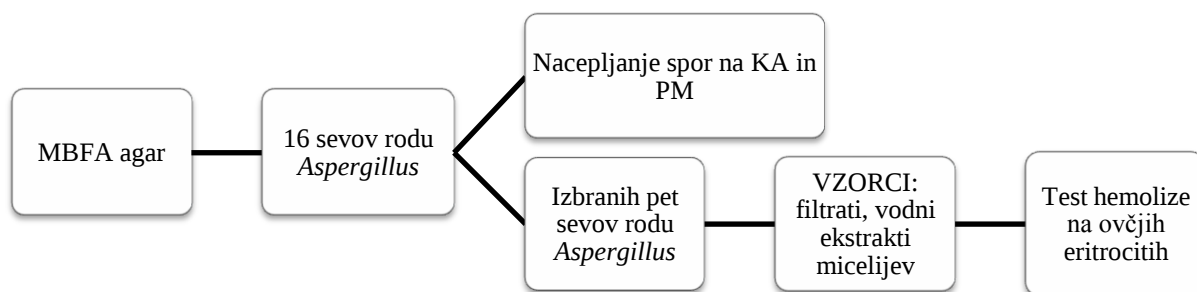
Seve, omenjene v preglednici 2, smo gojili trikrat, kar v nadaljevanju poimenujemo kot prvo, drugo in tretje gojenje sevov. Sam postopek gojenja, način priprave vzorcev in uporabljene metode testiranja so se med posameznimi gojenji sevov razlikovali, kot je opisano v nadaljevanju.

3.2.1.1 Prvo gojenje sevov

Pri teh sevih smo testirali hemolitično aktivnost filtratov ter vodnih ekstraktov micelijev, z in brez dodane komponente B (Ply B).

3.2.1.2 Drugo gojenje sevov

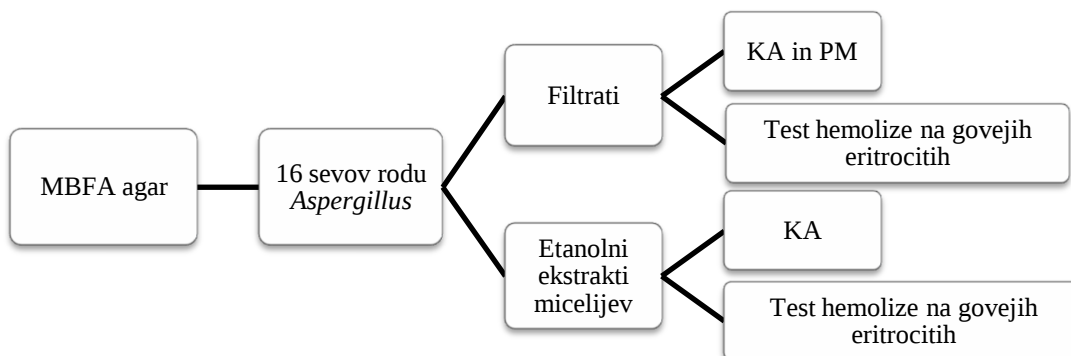
Spore vseh sevov smo nacepili na plošče s krvnim agarjem in posnetim mlekom, da bi opazovali pojav hemolize oz. proteolize. Izmed teh sevov smo spore petih sevov rodu *Aspergillus*, in sicer spore *A. niger* CBS 113.46, *A. niger* CBS 513.88, *A. niger* N402, *A. oryzae* Rib40 in *A. terreus* NIH2624, precepili v tekoče kompletno gojišče in jih gojili po postopku, opisanem v točki 3.2.2. Za njih smo se odločili na podlagi predhodnih raziskav, saj so pri teh glivah hemolizine že identificirali in opisali (Nayak in sod., 2013). Za vseh pet sevov smo kasneje pripravili vzorce filtratov in vodnih ekstraktov micelijev, pri katerih smo merili hemolitično aktivnost vzorcev s turbidimetrično metodo na ovčjih eritrocitih.



Slika 4: Shema poteka dela pri drugem gojenju sevov.

3.2.1.3 Tretje gojenje sevov

Pri teh sevih smo pripravili vzorce filtratov ter etanolnih ekstraktov micelijev. Vzorce filtratov smo vcepljali v KA in v agar s PM, vzorce etanolnih ekstraktov micelijev pa samo v KA. Pri vseh vzorcih smo merili HA s testom hemolize na govejih eritrocitih.



Slika 5: Shema poteka dela pri tretjem gojenju sevov.

3.2.2 Gojenje sevov rodu *Aspergillus*

Različne seve iz rodu *Aspergillus* smo najprej gojili na trdnem gojišču MBFA. Po približno 15 dneh, ko so glive začele sporulirati, smo v laminariju pripravili suspenzijo spor na ploščah MBFA in jih precepili v tekoče kompletno gojišče.

a) Prvo gojenje sevov

Za vsak sev smo pripravili sterilno erlenmajerico in z merilnim valjem vanjo odmerili po 100 ml prej pripravljenega tekočega KG. V laminariju smo nato za vsak sev pripravili suspenzijo spor in to tako, da smo posamezno MBFA ploščo s spori prelili s 13 ml fiziološke raztopine in s sterilno bombažno palčko postrgali spore po celotni plošči. S pomočjo serološke pipete smo po 1 ml suspenzije vcepili v pripravljeno erlenmajerico s kompletnim gojiščem, ostanek pa porazdelili v falkonko za začasno kulturo in v epico kot trajno kulturo.

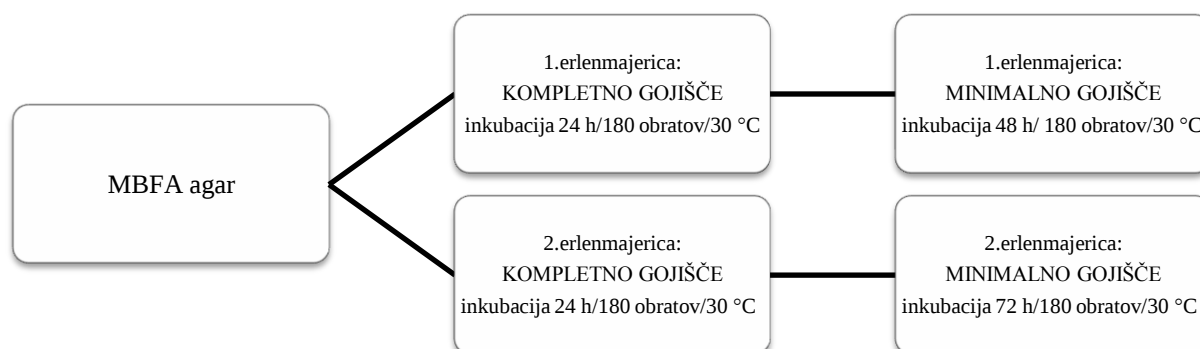
Erlenmajerice z nacepljenimi glivami smo inkubirali 24 ur na stresalniku, pri temperaturi 30 °C in 180 obratih. Falkonke smo do nadaljnje uporabe shranili v hladilniku pri temperaturi 4 °C, epice pa v zamrzovalniku.

Po 24 urah inkubacije smo seve iz KG precepili v tekoče minimalno gojišče z glukozo (MM+C), v okviru magistrske naloge Nine Sluga, oziroma v tekoče minimalno gojišče brez glukoze (MM-C), v okviru magistrske naloge Saše Režonja. Za vsak sev smo spet pripravili sterilno erlenmajerico, vendar tokrat s 50 ml tekočega MM+C/MM-C. Seve smo precepljali s pomočjo filtrirnega papirja, pripravljenega iz aluminijaste folije in tkanine miracloth, na sledeč način: steklen lijak smo vstavili v manjšo steklenico, vanj sterilno položili filter ter prefiltrirali vsebino erlenmajerice. Micelij je tako ostal na filtru, gojišče pa se je zbralo v steklenici. Micelij smo sprali s približno 50 ml tekočega MM+C/MM-C in ga s sterilno žličko prenesli v pripravljeno erlenmajerico z MM+C/MM-C.

Erlenmajerice s sevi, nacepljenimi v MM+C/MM-C, smo inkubirali 24 ur na stresalniku pri temperaturi 30 °C in 180 obratih.

b) Drugo in tretje gojenje sevov

Postopek gojenja je bil podoben, kot je opisano zgoraj, z nekaterimi razlikami. Za vsak sev smo namesto ene pripravili po dve erlenmajerici s KG. Po 24 urah inkubacije smo vsak sev v obeh erlenmajericah s KG precepili v dve sterilni erlenmajerici s tekočim MM+C/MM-C, od katerih se je ena stresala 48 ur, druga pa 72 ur pri enakih pogojih.



Slika 6: Shema drugega in tretjega gojenja sevov.

3.2.3 Priprava vzorcev filtratov

Po inkubaciji sevov v MM+C/MM-C smo s filtriranjem ločili micelij od filtrata. Za vsak sev smo v manjšo čašo postavili sterilni lijak, vanj položili filtrirni papir in nanj zlili vsebino erlenmajerice. Tako je na filtru ostal micelij, v čaši pa se je zbral filtrat. Lijak z micelijem smo prestavili v drugo čašo in ga sprali s približno 50 ml fiziološke raztopine. Micelij smo nato zapakirali v aluminijasto folijo, stehali in zamrznili v tekočem dušiku.

V primeru priprave filtratov drugega gojenja sevov, smo filtrat v čaši še enkrat prefiltrirali v drugo čašo s pomočjo brizgalke in 0,22 µm filtra za sterilizacijo, da smo pridobili bolj čist filtrat. Izmerili smo pH filtrata v čaši in ga po 2 ml prenesli v šest ustrezno označenih mikrocentrifugirk. Prvi dve mikrocentrifugirki z neobdelanim filtratom smo takoj shranili v posodo s tekočim dušikom, ostale štiri pa segrevali v termobloku 15 minut na temperaturi 60 °C. Od tega smo dve mikrocentrifugirki, ki sta se segrevali na 60 °C, nato segrevali še 15 minut na temperaturi 100 °C. Preostalemu filtratu v čaši smo nato z dodajanjem 1 M NaOH uravnali pH-vrednost na nevtrarno. Filtrat z umerjeno pH-

vrednostjo smo prav tako po 2 ml prenesli v šest ustrezno označenih mikrocentrifugirk in ponovili zgoraj opisan postopek. Preostali filtrat smo shranili v falkonke.

V primeru prvega in tretjega gojenja sevov je bil postopek podoben, le da v primeru tretjega gojenja nismo izvedli dodatne filtracije in smo segrevali samo po 200 µl vzorca v mikrocentrifugirkah, v primeru prvega gojenja pa nismo izvedli dodatne filtracije, vzorce pa smo segrevali samo na 100 °C, ne pa tudi na 60 °C.

Po končanem delu smo filtrate v falkonkah in mikrocentrifugirkah do nadaljnje uporabe shranili v zamrzovalniku na -20 °C, micelije pa na -70 °C.

3.2.4 Priprava vodnih ekstraktov micelijev

Micelije po prvem in drugem gojenju sevov smo vzeli iz zamrzovalnika (-70 °C) in jih predstavili v posodo s tekočim dušikom. Za vsak micelij smo pripravili sterilno terilnico. Micelij smo vzeli iz tekočega dušika, odvili iz folije in ga dali v terilnico, kjer smo ga z dolivanjem tekočega dušika strli oziroma homogenizirali. Postopek zamrznitve in trenja smo večkrat ponovili.

Zdrobljen micelij sevov drugega gojenja smo s spatulo porazdelili v dve ustrezno označeni mikrocentrifugirki, z namenom da bomo kasneje k miceliju v eni mikrocentrifugirki dodali eritrocitni pufer 2, z dodanimi inhibitorji, k miceliju v drugi mikrocentrifugirki pa pufer brez inhibitorjev. Na 750 mg micelija smo dodali 1 ml eritrocitnega pufra. V primeru, da je zraslo manj micelija, smo v mikrocentrifugirki dali ves micelij, ki smo ga imeli na voljo, in ustrezno količino pufra. Po dodatku pufra smo mikrocentrifugirke s homogeniziranim micelijem premešali na vibracijskem stresalniku in nato centrifugirali 15 minut pri temperaturi 4 °C in 12500 obratih. Po centrifugiranju smo supernatant iz vsake mikrocentrifugirke enakomerno porazdelili v tri nove, sediment pa zavrgli. Eno mikrocentrifugirko s supernatantom smo takoj shranili v tekočem dušiku, ostali dve pa segrevali 15 minut, in sicer eno na temperaturi 60 °C, drugo pa na temperaturi 100 °C. Med delom smo jih shranjevali v tekočem dušiku.

V primeru prvega gojenja sevov je bil postopek podoben, le da smo zdrobljenemu miceliju v mikrocentrifugirki dodajali ustrezno količino pufra z inhibitorjem. Po centrifugiranju

smo supernatant porazdelili v dve mikrocentrifugirki: eno smo takoj dali v tekoči dušik (neobdelan vzorec), drugo pa segrevali samo 15 min na 100 °C, ne pa tudi na 60 °C.

Po končanem delu smo mikrocentrifugirke z vodnimi ekstrakti micelijev do nadaljnje uporabe shranili v zamrzovalniku pri temperaturi -20 °C.

3.2.5 Priprava etanolnih ekstraktov micelijev

Micelije sevov tretjega gojenja smo predstavili iz -70 °C v posodo s tekočim dušikom. Za vsak micelij smo pripravili sterilno terilnico, vzeli micelij iz tekočega dušika in ga v terilnici s prilivanjem le-tega zamrznili in strli. V ustrezno označeno falkonko smo zatehtali maksimalno 1 g homogeniziranega micelija, odvisno od razpoložljive količine in temu dodali 10 ml 96 % etanola. Falkonke smo sproti dajali v stresalnik in jih inkubirali 24 ur pri temperaturi 30 °C in 180 obratih.

Po 24 urah inkubacije smo etanolne ekstrakte do nadaljnje uporabe shranili v hladilniku pri temperaturi 4 °C.

3.2.5.1 Koncentriranje etanolnih ekstraktov in določanje teže suhe organske snovi

Vzorci etanolnih ekstraktov micelijev smo najprej filtrirali čez filtrirni papir v manjšo erlenmajerico. Za vsak etanolni ekstrakt smo predhodno natančno stehtali stekleno bučko, vanjo prelili prefiltriran etanolni ekstrakt iz erlenmajerice in vzorec evaporirali na rotavaporju z vodno kopeljo. Pri tem je tekočina zaradi toplote in pritiska izhlapela, na stenah čaše pa je ostal tanek sloj suhe organske snovi, tako da smo bučko ponovno stehtali in izračunali suho težo po naslednji enačbi:

$$m \text{ (suhe snovi)/ml ekstrakta (mg/ml)} = m \text{ (bučke po koncentriranju)} - m \text{ (bučke pred koncentriranjem)} \quad \dots(1)$$

V bučko smo nato dodali 1 ml absolutnega etanola in premešali, da smo s sten pobrali suho snov. Celotno vsebino smo s pipeto prenesli v novo mikrocentrifugirko in jo zalepili s parafilmom, da etanol ne bi izhlapeval. Mikrocentrifugirke smo do nadaljnje uporabe shranili pri temperaturi -20 °C.

3.2.6 Nacepljanje/vcepljanje na/v plošče s krvnim agarjem in posnetim mlekom

3.2.6.1 Nacepljanje spor

Spore smo po 15 dneh pobrali s plošč MBFA in jih nacepili na plošče s KA in PM. To smo naredili za vse seve iz preglednice, razen za seva *A. glaucus* (teleomorf: *Eurotium herbariorum* CBS 516.65) in *A. clavatus* CBS 513.65, ki nista zrasla. Ko so glive začele sporulirati, smo na ploščo MBFA s posameznim sevom dodali 13 ml fiziološke raztopine ter z bombažno palčko postrgali spore. S serološko pipeto smo suspenzije posrkali in jih shranili v falkonke. Nato smo za vsak sev odpipetirali po 10 µl suspenzije iz falkonke na sredino plošče s PM ter plošče s KA.

Nacepljene plošče smo pet dni inkubirali na 30 °C in vsak dan opazovali pojav hemolize in proteolize.

3.2.6.2 Vcepljanje filtratov

V plošče smo vcepljali samo filtrate sevov tretjega gojenja. Pred samim vcepljanjem smo želeli preveriti, ali bi lahko bila povzročena hemoliza oziroma proteoliza posledica MM+C/MM-C, ne pa samih vzorcev, zato smo v plošče s KA in PM vcepili po 50 µl MM+C/MM-C in eritrocitnega pufra 2 ter plošče inkubirali 24 ur pri 30 °C.

Naslednji dan smo agar posamezne plošče razdelili na polovico in v luknjice prve polovice vcepili filtrate gliv, gojenih 48 ur/72 ur v MM+C, v luknjice druge polovice pa filtrate gliv, gojenih 48 ur/72 ur v MM-C. Iz vsake mikrocetrifugirke smo v ustrezno luknjico vcepili po 50 µl filtrata (temperaturno neobdelan, obdelan na 60 °C, obdelan na 100 °C) in plošče inkubirali 24 ur pri 30 °C.

3.2.6.3 Vcepljanje etanolnih ekstraktov micelijev

Pred vcepljanjem etanolnih ekstraktov smo želeli preveriti, ali bi lahko hemolizo oziroma proteolizo povzročil sam etanol, ne pa etanolni ekstrakti. Na ploščo s KA smo dali po 50 µl 96 % etanola in eritrocitnega pufra 2 ter ploščo inkubirali 24 ur, pri 30 °C.

Etanolne ekstrakte micelijev smo vzeli iz hladilnika (4 °C) in jih centrifugirali 15 minut pri temperaturi 4 °C in maksimalnih obratih (5000 rpm). Plošče s KA smo vizualno razdelili na 2 polovici. V agar smo na eni polovici naredili 4 luknjice za vzorce enega seva in štiri

luknjice na drugi polovici plošče za vzorce drugega seva. Na vsaki polovici smo namreč zraven dveh etanolnih ekstraktov micelijev, ki sta bila 48 ur/72 ur gojena v MM+C, vcepili tudi dva vzorca etanolnih ekstraktov micelijev istega seva, ki pa sta bila gojena 48 ur/72 ur v MM-C. V vsako luknjico smo vcepili po 50 µl vzorca.

Plošče smo po končanem delu inkubirali 24 ur na temperaturi 30 °C.

3.2.7 Merjenje hemolitične aktivnosti

Hemolitično aktivnost vzorcev smo merili s turbidimetrično metodo na čitalcu mikrotitrskih plošč pri sobni temperaturi.

3.2.7.1 Merjenje hemolitične aktivnosti filtratov

Filtrate sevov drugega gojenja smo testirali na ovčjih eritrocitih, filtrate sevov po prvem in tretjem gojenju pa na govejih eritrocitih.

Goveje eritrocite smo pred uporabo vzeli iz citratnega pufra, v katerem so bili shranjeni, jih prenesli v novo epruveto, dodali fiziološko raztopino ter centrifugirali 5 minut pri 2500 obratih. Med centrifugiranjem so se čisti eritrociti posedli, popokani pa ostali v supernatantu. Supernatant smo nato odstranili in postopek spiranja s fiziološko raztopino ponovili še dvakrat, dokler supernatant ni postal bister. Na koncu smo centrifugiranje ponovili še z eritrocitnim pufrom 1. Pri ovčjih eritrocitih postopek spiranja ni bil potreben, saj smo z Veterinarske fakultete dobili že sprane eritrocite. Očiščene eritrocite smo za testiranje umerili z eritrocitnim pufrom tako, da smo pripravili suspenzijo eritrocitov, ki je imela pri valovni dolžini 630 nm absorbcijo 1,0.

V obeh primerih testiranja (na ovčjih in govejih eritrocitih) smo vdolbinice na mikrotitrski plošči najprej napolnili z 80 µl eritrocitnega pufra in 20 µl vzorca. Tik pred začetkom merjenja smo z multikanalno pipeto dodali še 100 µl eritrocitne suspenzije. Kot negativno kontrolo smo uporabili 100 µl eritrocitnega pufra ter 100 µl eritrocitne suspenzije. Na obojih eritrocitih smo testirali tudi MM+C/MM-C. V tem primeru smo namesto vzorca nanesti 20 µl in 50 µl gojišča ter zraven dodali 80 µl oziroma 50 µl pufra. Pri testiranju na ovčjih eritrocitih smo uporabili še pozitivno kontrolo, in sicer 2 µl ostreolizina, čemur smo dodali 98 µl pufra.

S čitalcem mikrotitrskih plošč smo hemolizo opazovali 50 minut kot padec absorbcije pri 630 nm. Iz dobljenih rezultatov smo nato odčitali absorbanco pri 20 minutah ter izračunali delež hemolize po naslednji enačbi:

$$\text{Delež hemolize (\%)} = 100 - (A_{\text{vzorca}} / A_{\text{negativne kontrole}}) \times 100 \quad \dots(2)$$

3.2.7.2 Merjenje hemolitične aktivnosti vodnih ekstraktov micelijev

Merjenje hemolitične aktivnosti vodnih ekstraktov micelijev je potekalo po enakem postopku, kot je opisan v točki 3.2.7.1. Test hemolize ekstraktov sevov po prvem gojenju smo izvedli na govejih eritrocitih, ekstrakte drugega gojenja sevov pa na ovčjih eritrocitih.

3.2.7.3 Merjenje hemolitične aktivnosti etanolnih ekstraktov micelijev

Hemolitično aktivnost etanolnih ekstraktov micelijev smo prav tako merili s čitalcem mikrotitrskih plošč. Pri testiranju smo uporabili goveje eritrocite, ki smo jih pripravili po postopku, opisanem v točki 3.2.7.1.

S pomočjo podatkov o teži suhe organske snovi smo izračunali koncentracijo organske snovi pri štirih različnih volumnih (5, 10, 20 in 30 µl) vzorca po naslednji enačbi:

$$C2 (\mu\text{g/ml}) = (C1 \times V1) / V2 \quad \dots(3)$$

C1 suha teža (mg/ml)

V1 volumen vzorca dodanega v testu (5, 10, 20 ali 30 µl)

V2 celoten volumen v luknjici mikrotitrške plošče (200 µl)

Vsak vzorec smo na mikrotitrsko ploščo nanegli v štirih različnih volumnih, kot je prikazano v tabeli spodaj. Temu primerno smo predhodno dodali tudi ustrezno količino eritrocitnega pufru 1. Pred testiranjem smo z multikanalno pipeto dodali še 100 µl eritrocitne suspenzije. Kot negativno kontrolo smo namesto vzorca k eritrocitnemu pufru dodali ustrezne volumne etanola (5, 10, 20, 30 µl).

Preglednica 3: Priprava vzorcev etanolnih ekstraktov micelijev.

Volumen eritrocitnega pufra	Volumen vzorca
95 µl	5 µl
90 µl	10 µl
80 µl	20 µl
70 µl	30 µl

Hemolizo smo opazovali 30 minut pri absorbanci 630 nm. Iz dobljenih rezultatov smo odčitali t_{50} oziroma čas, ki je potreben, da pride do 50-odstotne hemolize.

3.2.8 Merjenje hemolitične aktivnosti brez in s komponento B

Testirali smo filtrate in vodne ekstrakte micelijev sevov prvega gojenja na govejih eritrocitih. Test hemolize brez komponente B je potekal enako, kot je opisano v točki 3.2.7.1, le da smo dodajali po 50 µl eritrocitnega pufra in enak volumen vzorca. Čistega MM+C/MM-C nismo testirali.

Pri testiranju hemolize z dodano komponento B smo v luknjice na mikrotitrski plošči nanесли po 20 µl vzorca (filtrati in ekstrakti micelijev) ter 20 µl negativne kontrole (eritrocitni pufer 1). Nato smo pripravili mešanico pufra in B komponente (8 ml pufra in 250 µl komponente B) ter v vsako luknjico dodali 80 µl mešanice. Pred testiranjem smo dodali še 100 µl eritrocitne suspenzije.

3.2.9 Merjenje koncentracije proteinov

Koncentracijo proteinov v vzorcu smo določali spektrofotometrično s pomočjo BCA proteinskega testa. Test smo izvedli na vzorcih vodnih ekstraktov micelijev (iz prvega in drugega gojenja) ter filtratov (iz prvega, drugega in tretjega gojenja).

V vdolbinice mikrotitrške plošče smo najprej odpipetirali po 10 µl vsakega vzorca, 10 µl govejega serumskega albumina (BSA) v različnih koncentracijah (1, 3, 5 in 8 mg/ml) in negativno kontrolo, kjer smo namesto vzorca uporabili 10 µl destilirane vode. Nato smo k vsakemu dodali 190 µl mešanice reagentov A in B v razmerju 50:1. Mikrotitrške plošče smo inkubirali 30 minut v topli sobi (pri 37 °C) in nato na čitalcu mikrotitrskih plošč izmerili absorbcijo vzorcev pri valovni dolžini 550 nm.

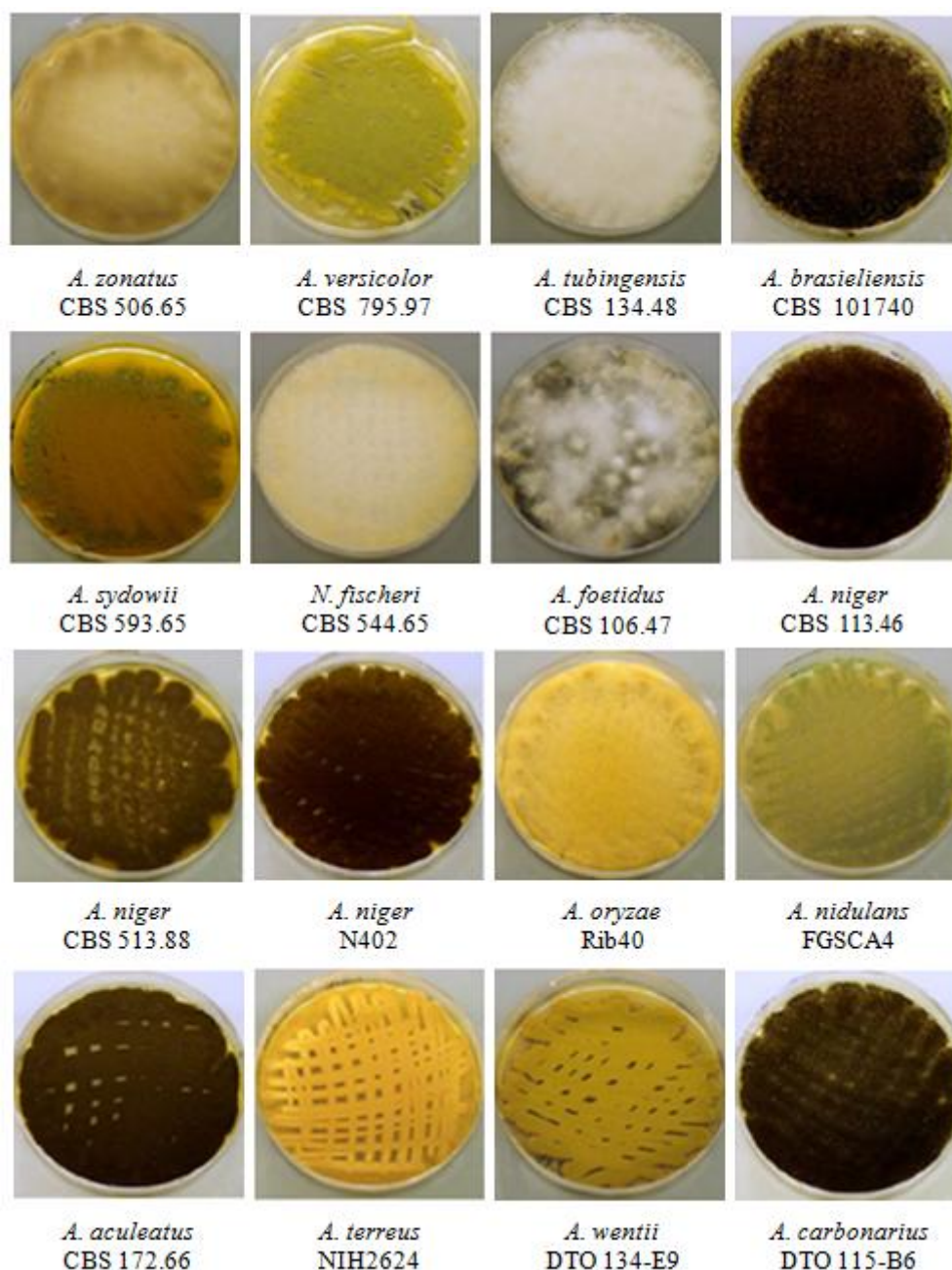
S pomočjo absorbcije vzorcev govejega serumskega albumina z znanimi koncentracijami smo izdelali umeritveno krivuljo (A_{550} v odvisnosti od koncentracije BSA) in iz nje odčitali koncentracije proteinov v ostalih vzorcih.

4 REZULTATI GOJENJA GLIV V MINIMALNEM GOJIŠČU Z DODANIM VIROM OGLJIKA (Magistrsko delo Nine Sluga)

4.1 GOJENJE GLIV

4.1.1 Rast sevov na trdem gojišču MBFA

V vseh treh primerih gojenja sevov smo čepke s sporami, izrezane iz MEA gojišč, nacepili na plošče z MBFA in jih gojili približno 15 dni. Slika 7 prikazuje spore 16 sevov rodu *Aspergillus* na trdem gojišču MBFA.

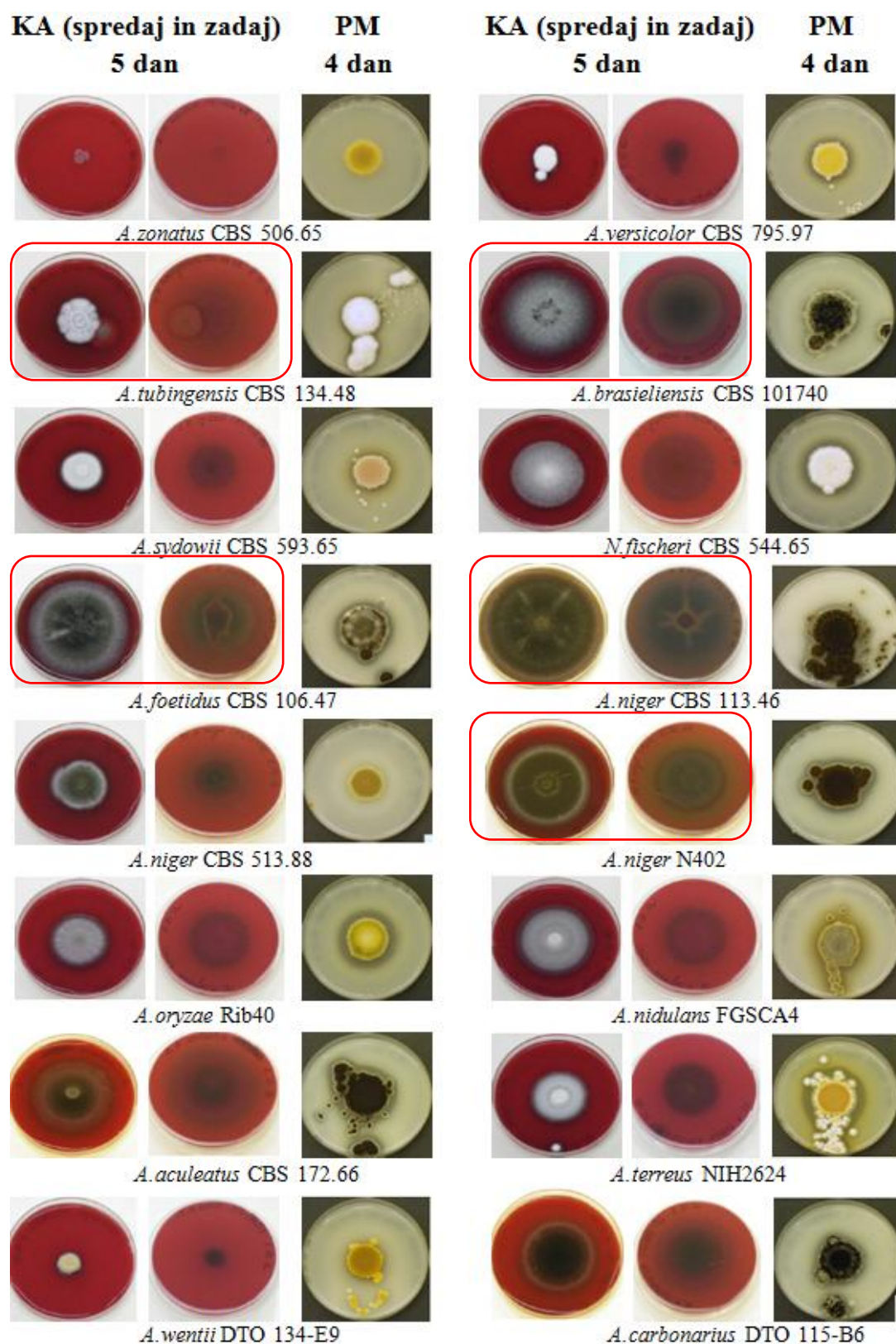


Slika 7: Spore gliv rodu *Aspergillus* na ploščah z MBFA po 15 dneh gojenja.

Na ploščah z MBFA nista zrasla dva seva: *A. glaucus* (telomorf *Eurotium herbariorum* CBS 516.65) in *A. clavatus* CBS 513.65. Ko so sevi sporulirali, smo na ploščah z MBFA pripravili suspenzije spor, ki smo jih uporabili pri nadaljnjem delu (nacepljanje na plošče s KA ter PM – glej 3.2.6.1, gojenje v KG in MM gojišču z glukozo – glej 3.2.2 a in 3.2.2 b).

4.1.2 Rast sevov na ploščah s krvnim agarjem in posnetim mlekom

Pri drugem gojenju smo suspenzijo spor (10 μ l) vseh sevov, razen seva *A. glaucus* in seva *A. clavatus* CBS 513.65, nacepljali na plošče s KA in PM. Opazovali smo rast kolonij ter pojav motne in bistre cone hemolize oziroma proteolize. Rezultate hemolize in proteolize prikazuje slika 8.



Slika 8: Spore na ploščah z ovčjim krvnim agarjem po petih dneh inkubacije in na ploščah s posnetim mlekom po štirih dneh inkubacije pri temperaturi 30 °C. Rdeči okvirji označujejo seve, ki so pokazali hemolitično aktivnost. KA- krvni agar; PM- agar z posnetim mlekom.

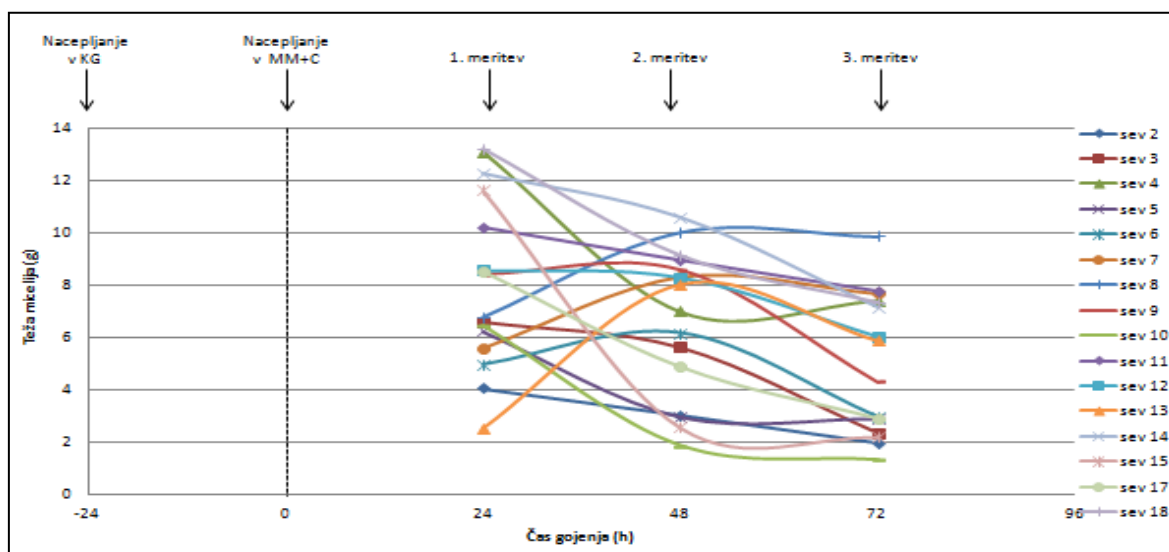
Večina vrst je na ploščah z ovčjim krvnim agarjem imela dobro rast. Pri nekaterih glivah smo pod kolonijami opazili delno (α) hemolizo, z značilnim rumenozelenim obarvanjem (Vesper, 2004). Pri ostalih glivah prisotnosti hemolize ne moremo potrditi. Proteoliza je vidna na ploščah s sevi, ki so predhodno pokazali tudi hemolitično aktivnost na krvnem agarju, izkazuje pa jo tudi večina ostalih sevov, ki na KA niso pokazali hemolize. Izstopa sev *A. zonatus* CBS 506.65, ki ni pokazal ne hemolitične in ne proteolitične aktivnosti (slika 8).

4.1.3 Gojenje v tekočem minimalnem gojišču z glukozo

Glive smo po 24 urni inkubaciji v tekočem KG precepili v tekoče MM+C. Pri prvem gojenju smo seve v MM+C gojili 24 ur, pri drugem in tretjem gojenju pa 48 in 72 ur (glej 3.2.2). Po inkubaciji smo s filtriranjem ločili micelije od filtratov (gojišč), micelije stehali in izmerili pH vrednosti gojišč. Filtrate in micelije smo shranili in jih uporabili pri nadaljnjem delu. Z različnimi metodami (vcepljanje v plošče s KA in PM - glej 3.2.6, test hemolize – glej 3.2.7 in 3.2.8) smo preverjali prisotnost hemolitične učinkovine v gojiščih/filtratih, vodnih in etanolnih ekstraktih micelijev, saj so preliminarne študije pokazale prisotnost hemolitične učinkovine v vseh treh tipih vzorcev (Sakaguchi in sod., 1975).

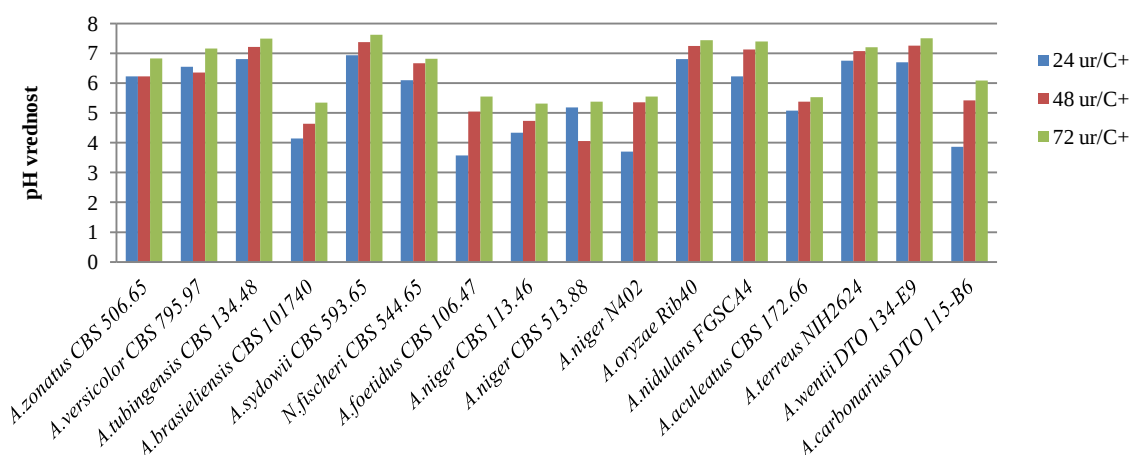
4.1.3.1 Teže micelijev in pH gojišč

Teže micelijev in pH vrednosti gojišč smo izmerili po 24, 48 in 72 urah gojenja gliv v MM+C. Rezultate prikazuje priloga A1. Opazili smo, da se je pri večini sevov, z nekaterimi izjemami, teža micelijev s časom gojenja v MM+C zmanjševala. Največje teže micelijev smo natehtali po 24 urah, manjše po 48 urah in najmanjše po 72 urah gojenja. Pri nekaterih izjemah, kot so *A. foetidus* CBS 106.47, *A. nidulans* FGSCA4, *A. sydowii* CBS 593.65 in *N. fischeri* CBS 544.65 smo padec teže micelija zasledili šele po 48 urah (slika 9).



Slika 9: Teža micelijev različnih vrst gliv rodu *Aspergillus* med gojenjem v MM+C. KG - kompletno gojišče; MM+C – minimalno gojišče z glukozo; 1./2./3. meritev – čas meritev teže micelijev. Legenda: sev 2 – *A. zonatus* CBS 506.65; sev 3 – *A. versicolor* CBS 795.97; sev 4 – *A. tubingensis* CBS 134.48; sev 5 – *A. brasiliensis* CBS 101740; sev 6 – *A. sydowii* CBS 593.65; sev 7 – *N. fischeri* CBS 544.65; sev 8 – *A. foetidus* CBS 106.47; sev 9 – *A. niger* CBS 113.46; sev 10 – *A. niger* CBS 513.88; sev 11 – *A. niger* N402; sev 12 – *A. oryzae* Rib40; sev 13 – *A. nidulans* FGSCA4; sev 14 – *A. aculeatus* CBS 172.66; sev 15 – *A. terreus* NIH2624; sev 17 – *A. wentii* DTO 134-E9; sev 18 – *A. carbonarius* DTO 115-B6.

V večini primerov se je pH vrednost gojišča s časom gojenja v MM+C zviševala, čeprav so bile ponekod razlike majhne. Izjema so bila gojišča sevov *A. zonatus* CBS 506.65, *A. versicolor* CBS 795.97 in *A. niger* CBS 513.88, kjer smo po 24 urah gojenja namerili višje pH vrednosti kot po 48 urah gojenja. Pri polovici vzorcev smo namerili nevtralne pH vrednosti (med 6 in 7), pri drugi polovici pa so bile vrednosti nižje in so se gibale med 3 in 6 (slika 10).



Slika 10: pH vrednosti gojišč različnih vrst rodu *Aspergillus*, glede na čas gojenja v MM+C. 24/48/72 ur – čas gojenja; MM+C - minimalno gojišče z glukozo.

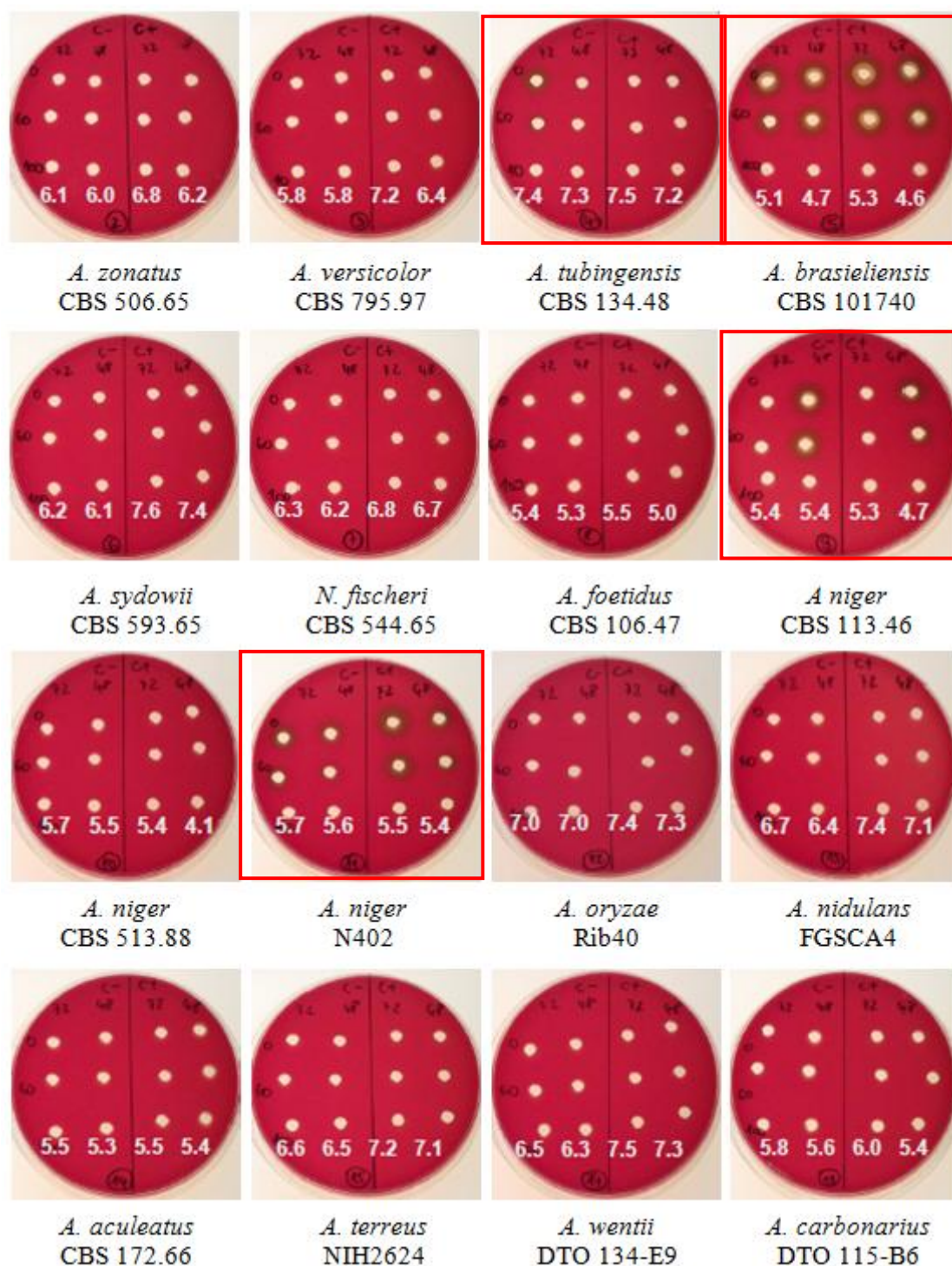
4.2 REZULTATI ANALIZE FILTRATOV

Po vsakem gojenju smo pridobljene filtrate nadalje testirali. V vseh primerih smo HA preverjali s turbidimetričnim testom hemolize, pri filtratih sevov tretjega gojenja pa še s vcepljanjem v plošče s KA.

4.2.1 Rezultati hemolize na ploščah s krvnim agarjem

V plošče s krvnim agarjem smo vcepili filtrate 16 sevov, brez filtratov seva *A. glaucus* in seva *A. clavatus* CBS 513.65, saj na trdem gojišču MBFA nista zrasla. Testirali smo temperaturno neobdelane filtrate z nativnimi in nevtralnimi pH vrednostmi (pH 7) ter temperaturno obdelane (15 min na 60 °C in 100 °C) filtrate z nativnimi in nevtralnimi pH vrednostmi, po 48 in 72 urah gojenja v MM+C. Predhodne raziskave so pokazale, da je večina hemolizinov termostabilnih do 65 °C, medtem ko je večina proteolitičnih encimov filamentoznih gliv termolabilna pri približno 60 °C. Če bi se pri teh vzorcih pojavila hemoliza, bi lahko trdili, da je ta najverjetneje posledica hemolizinov. Vzorci, obdelani na 100 °C, so nam služili kot negativna kontrola, saj hemolizini in ostali proteini pri tej temperaturi denaturirajo. Hkrati smo preverjali še vpliv pH vrednosti gojišča na HA. Testirali smo tudi čisto MM+C. Opazovali smo cono lize v okolici vcepka. Hemoliza je na ploščah s krvnim agarjem vidna kot bistra cona (v primeru popolne ali β -hemolize) ali kot motna (rumenozelena) cona v primeru delne ali α -hemolize.

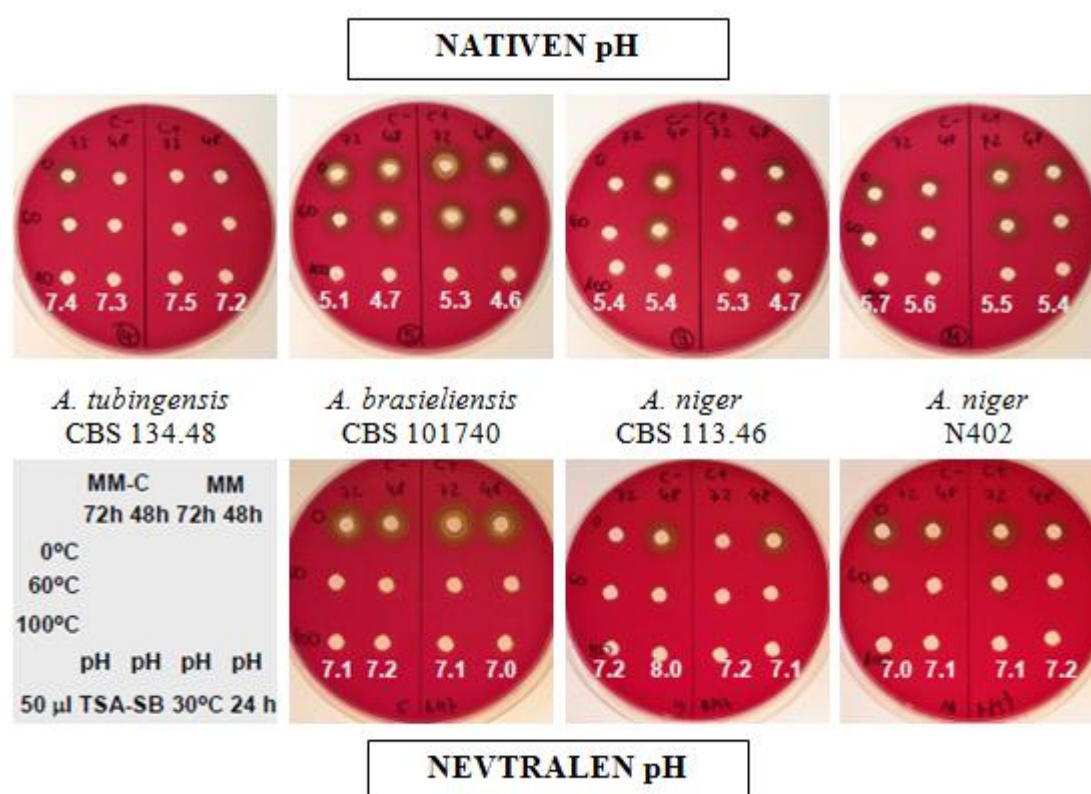
Hemolitično aktivnost smo na ploščah s krvnim agarjem zasledili pri filtratih štirih testiranih sevov, in sicer pri sevu *A. tubingensis* CBS 134.48, sevu *A. brasiliensis* CBS 101740, sevu *A. niger* CBS 113.46 in sevu *A. niger* N402 (slika 11; rdeče označeni). Isti sevi so HA pokazali tudi po nacepljanju spor na KA. Glede na barvo cone lize (rumena barva) smo opazili, da gre za delno ali α -hemolizo. Filtrat seva *A. niger* CBS 513.88 je edini od filtratov treh testiranih sevov vrste *A. niger*, ki HA ni pokazal. Slednji je industrijski sev z naborom različnih mutacij, med katerimi je tudi nesposobnost sinteze aminokisline levцин. Zato so v laboratoriju kasneje testirali njegovo HA ob dodatku levcina in nikotinamida (ni prikazano). Tudi v tem primeru HA niso zaznali. MM+C ni bilo HA (ni prikazano).



Slika 11: Filtrati različnih vrst gliv rodu *Aspergillus* na ploščah s krvnim agarjem (ovčji eritrociti). Z rdečim okvirjem so označeni sevi, katerih filtrati so bili HA. Na desni polovici plošče so vcepljeni vzorci gliv gojeni v MM+C 48 ur (drugi stolpec) in 72 ur (prvi stolpec). Zraven je označena pH vrednost gojišča. Plošče so bile inkubirane 24 ur na 30 °C. Prva vrstica – neobdelani filtrati; druga vrstica – filtrati, obdelani na 60 °C; tretja vrstica – filtrati, obdelani na 100 °C.

Gojiščem, ki so pokazala HA, smo kasneje pH vrednosti umerili na nevtralno vrednost (pH 7), razen sevu *A. tubingensis* CBS CBS 134.48, saj je njegovo gojišče že imelo nevtralne

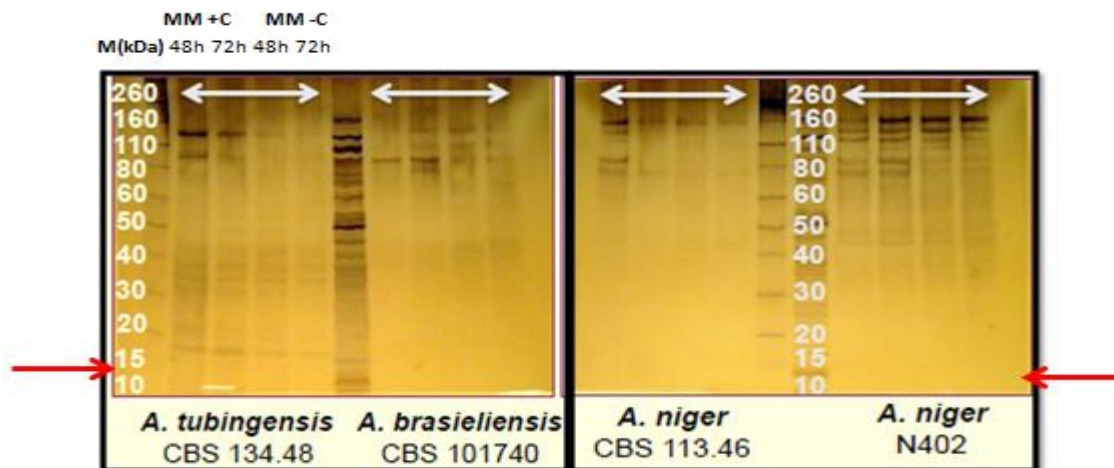
pH vrednosti. Opazili smo, da pri vzorcih z nativno pH vrednostjo temperaturna obdelava na 60 °C hemolize ne uniči, medtem ko jo pri vzorcih z nevtralno pH vrednostjo popolnoma uniči, razen pri gojišču seva *A. niger* N402, kjer je bila HA le nekoliko inhibirana, vendar še vedno opazna. Vzorci, ki smo jih temperaturno obdelali na 100 °C, niso bili HA pri nobenem od primerov. Povezave med HA filtratov in časom inkubacije v MM+C nismo opazili. HA filtratov različnih vrst je bila pri različnih časih inkubacije različna (slika 12).



Slika 12: Filtrati gliv rodu *Aspergillus*, ki so po 24-urni inkubaciji na 30 °C lizirali ovčje eritrocite. V zgornji vrstici so prikazani filtrati z nativnimi pH vrednostmi, v spodnji pa filtrati z nevtralnim pH vrednostmi. Za sev *A. tubingensis* rezultati z nevtralnimi filtrati niso prikazani, saj ga zaradi že nevtralnih vrednosti nismo umerjali. Na desni polovici plošče so vcepljeni filtrati gliv gojenih v MM+C 48 ur (drugi stolpec) in 72 ur (prvi stolpec). Zraven je označen pH gojišča. Prva vrstica – neobdelani filtrati; druga vrstica – filtrati, obdelani na 60 °C; tretja vrstica – filtrati, obdelani na 100 °C.

V laboratoriju so kasneje pri filtratih, ki so pokazali HA, preverjali prisotnost hemolizinov oz. egerolizinov še s poliakrilamidno gelsko elektroforezo, s srebrovim barvanjem. Opazovali so prisotnost proteinov v velikosti približno 15 – 20 kDa, saj je to približna

velikost proteinov egerolizinske družine. Proteinov v pričakovanem velikostnem razredu niso zasledili (slika 13).



Slika 13: Analiza filtratov s poliakrilamidno gelsko elektroforezo: rdeča puščica – mesto, kjer smo pričakovali prisotnost proteinov v velikosti približno 15 kDa; M (kDa) – proteinski markerji; MM+C – minimalno gojišče z glukozo; MM-C – minimalno gojišče brez glukoze; 48 h/72 h – čas gojenja v MM.

4.2.2 Rezultati proteolize na ploščah s posnetim mlekom

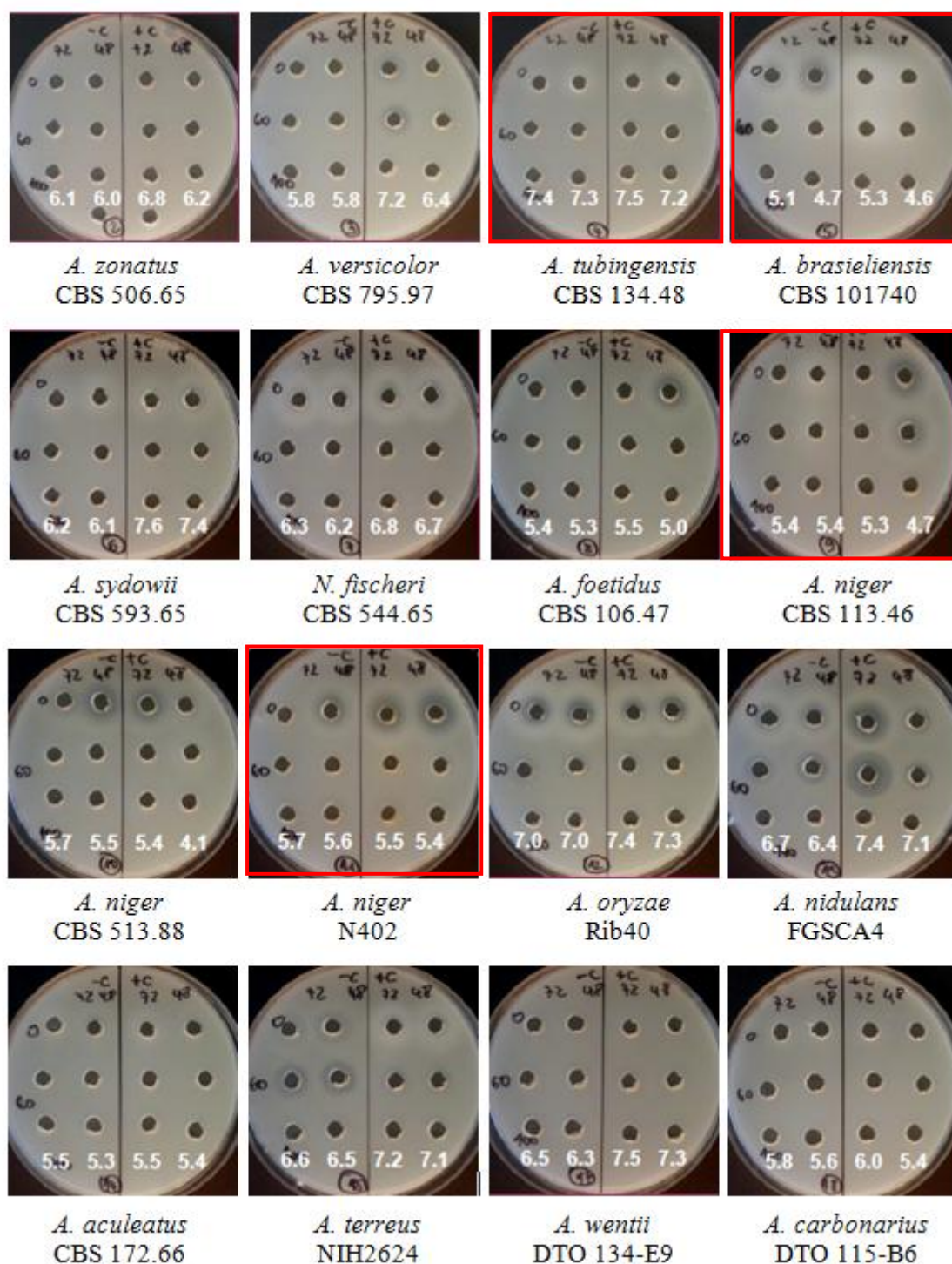
Filtrate, ki smo jih vcepljali v KA, smo na enak način vcepljali tudi v agar s PM in spremljali proteolizo, ki je vidna kot bistra cona v okolici vcepka.

Proteolitični so bili filtrati naslednjih vrst (slika 14): *A. versicolor* CBS 795.97 (0 °C/72 ur, 60 °C/72 ur; bistra cona lize), *A. tubingensis* CBS 134.48 (0 °C/48 ur in 72 ur; motna cona lize), *A. brasiliensis* CBS 101740 (0 °C/72 ur, 60 °C/72 ur; motna cona lize), *A. sydowii* (0 °C/48 ur in 72 ur; motna cona lize), *N. fischeri* (0 °C/48 ur in 72 ur; motna cona lize), *A. foetidus* CBS 106.47(0 °C/48 ur; bistra cona lize), *A. niger* CBS 113.46 (0 °C/48ur, 60 °C/48 ur; bistra cona lize), *A. niger* CBS 513.88 (0 °C/72 ur; bistra cona lize), *A. niger* N402 (0 °C/48 ur in 72 ur; bistra cona lize), *A. oryzae* Rib40 (0 °C/48 ur in 72 ur; bistra cona lize), *A. nidulans* FGSCA4 (0 °C/72 ur, 60 °C/72 ur; bistra cona lize) in *A. terreus* NIH2624 (0 °C/48 ur in 72 ur gojenja; motna cona lize).

Opazili smo, da se je pri večini hemolitično aktivnih filtratov (slika 14) vzorec proteolize razlikoval od njihovega vzorca hemolize. Pri filtratu glive *A. niger* N402 (gojene 48 ur in 72 ur) smo proteolizo zaznali samo pri neobdelanih filtratih, medtem ko so HA tudi filtrati, ki smo jih segrevali 15 min na 60 °C. Pri nekaterih filtratih glive *A. tubingensis* CBS

134.48 (0 °C/48 ur) in glive *A. brasiliensis* CBS 101740 (0 °C/48 ur in 60 °C/48 ur), ki so bili HA, proteolize nismo opazili, medtem ko je bil vzorec proteolize filtratov pri sevu *A.niger* CBS 113.46 enak vzorcu hemolize.

Prav tako smo opazili, da segrevanje filtratov (15 min na 60 °C) nekaterih vrst gliv, in sicer glive *A. nidulans* FGSCA4, glive *A. versicolor* CBS 765.97, glive *A. brasiliensis* CBS 101740 in glive *A. niger* CBS 113.46, ne uniči proteolize, medtem ko je ta v vseh primerih po 15 minutnem segrevanju na 100 °C uničena.

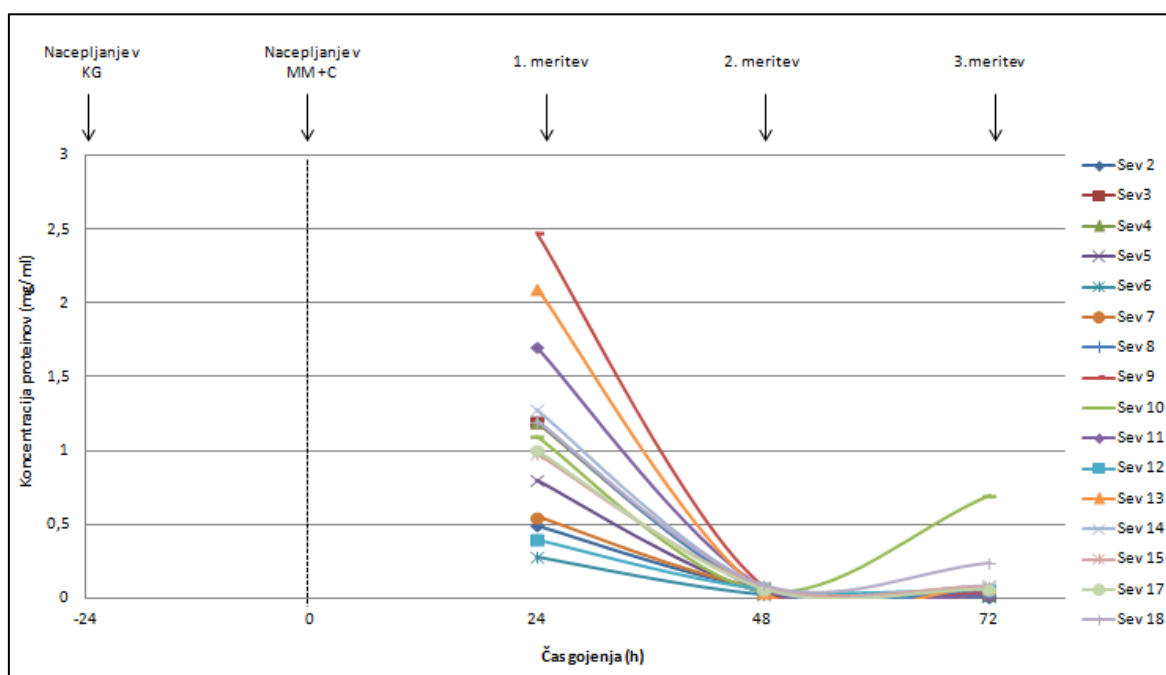


Slika 14: Filtrati različnih vrst gliv rodu *Aspergillus* na ploščah s posnetim mlekom. Na desni polovici plošče so vcepljeni filtrati gliv gojenih v MM+C 48 ur (drugi stolpec) in 72 ur (prvi stolpec). Z rdečim okvirjem so označeni sevi, katerih filtrati so pokazali HA. Zraven je označena pH vrednost gojišča. Plošče so bile inkubirane 24 ur na 30 °C. Prva vrstica – neobdelani filtrati; druga vrstica – filtrati, obdelani na 60 °C; tretja vrstica – filtrati, obdelani na 100 °C.

4.2.3 Merjenje koncentracije proteinov

Koncentracijo proteinov smo merili v vseh filtratih. Filtratov, ki smo jih obdelali v vodni kopeli 15 min na 100 °C, nismo uporabili, saj proteini pri tej temperaturi denaturirajo. Rezultate prikazuje priloga B1.

Proteine smo izmerili v vseh vzorcih. S primerjavo koncentracij filtratov prvega in tretjega gojenja smo opazili, da so bile koncentracije proteinov vseh primerih največje po 24 urah gojenja v MM+C. Po 48 urah gojenja so močno padle in nato pri večini sevov po 72 urah spet malo narasle. Pri ostalih primerih smo po treh dneh gojenja zaznali še manjše koncentracije, vendar je bilo zmanjšanje koncentracije zelo malo (slika 15). Koncentracije zunajceličnih proteinov so se med vrstami razlikovale, smo pa najvišje koncentracije namerili pri sevu *A. niger* CBS 113.46, najnižje pa pri sevu *A. sydowii* CBS 593.65.



Slika 15: Koncentracije proteinov v filtratih različnih vrst gliv rodu *Aspergillus*, glede na čas gojenja v MM+C. KG - kompletno gojišče; MM+C – minimalno gojišče z glukozo; 1./2./3. meritev – čas meritev koncentracije proteinov. Legenda: sev 2 – *A. zonatus* CBS 506.65; sev 3 – *A. versicolor* CBS 795.97; sev 4 – *A. tubingensis* CBS 134.48; sev 5 – *A. brasiliensis* CBS 101740; sev 6 – *A. sydowii* CBS 593.65; sev 7 – *N. fischeri* CBS 544.65; sev 8 – *A. foetidus* CBS 106.47; sev 9 – *A. niger* CBS 113.46; sev 10 – *A. niger* CBS 513.88; sev 11 – *A. niger* N402; sev 12 – *A. oryzae* Rib40; sev 13 – *A. nidulans* FGSCA4; sev 14 – *A. aculeatus* CBS 172.66; sev 15 – *A. terreus* NIH2624; sev 17 – *A. wentii* DTO 134-E9; sev 18 – *A. carbonarius* DTO 115-B6.

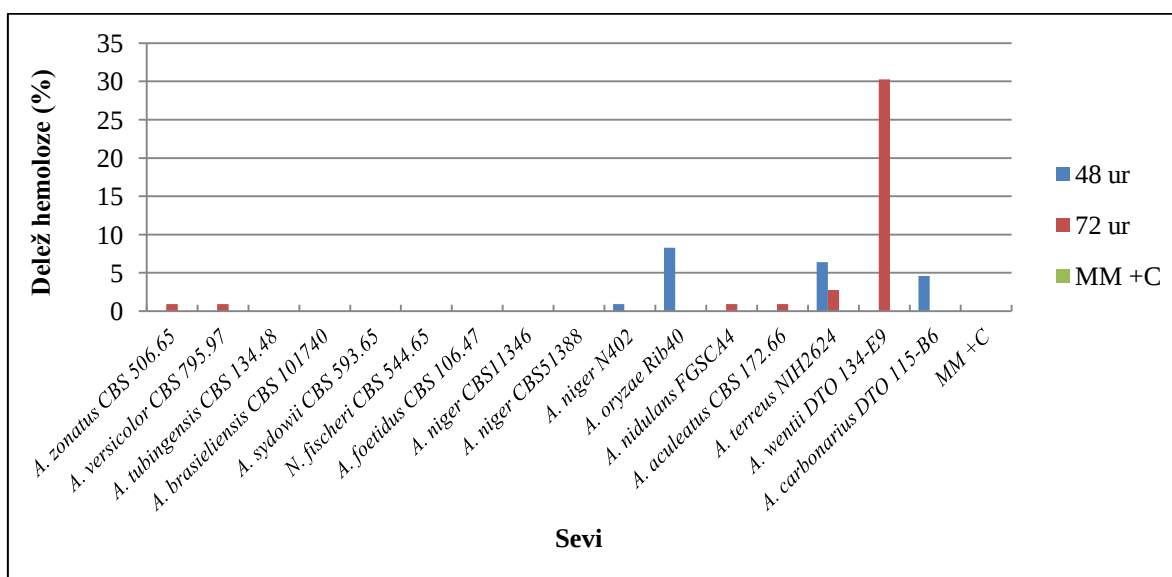
Med koncentracijami proteinov v filtratih z nevtralno in nativno pH vrednostjo nismo opazili večjih razlik. V večini primerov so bile koncentracije proteinov v filtratih z

nevtralno pH vrednostjo manjše, vendar so bile te razlike majhne. Temperaturna obdelava filtratov na 60 °C ni povzročila denaturacije zunajceličnih proteinov, saj se njihova koncentracija po segrevanju ni bistveno zmanjšala; v nekaterih primerih se je celo povečala.

4.2.4 Rezultati hemolitičnega testa

Hemolizo smo merili pri vseh filtratih, le da smo pri testiranju filtratov prvega in tretjega gojenja uporabili goveje eritrocite, pri filtratih drugega gojenja pa poleg govejih še ovčje eritrocite.

Turbidimetrični test hemolize na govejih eritrocitih je bil pri obeh skupinah filtratov negativen. Slika 16 prikazuje rezultate merjenja HA filtratov tretjega gojenja.

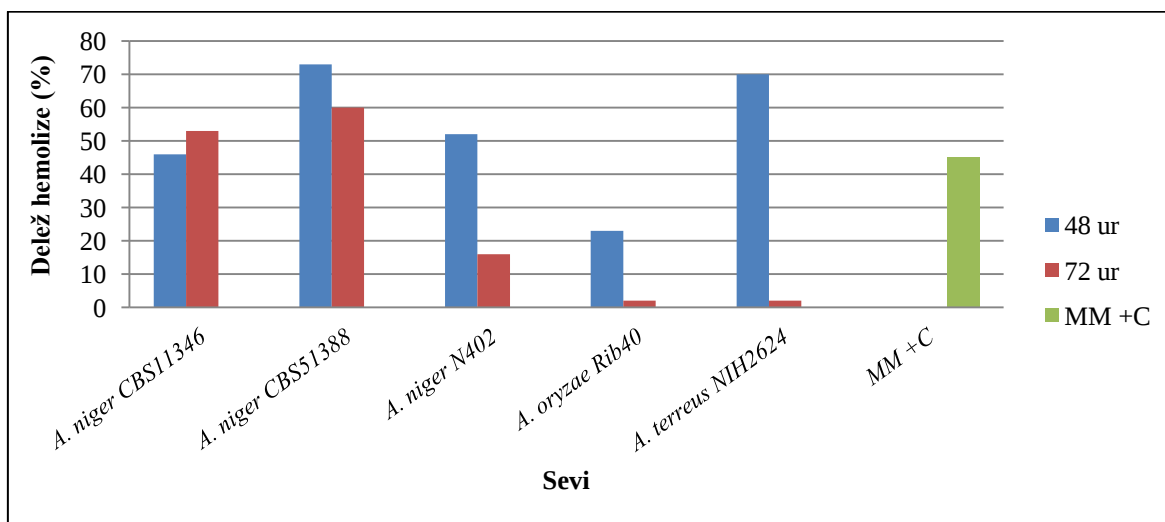


Slika 16: Delež hemolize filtratov vrst rodu *Aspergillus*, gojenih v MM+C, na govejih eritrocitih. 48 ur/72 ur – čas gojenja v MM+C; MM +C – minimalno gojišče z glukozo.

Pri filtratih sevov, ki smo jih pridobili z drugim gojenjem, smo izvedli tudi turbidimetrični test hemolize z dodano komponento B (protein pleurotolizin B) (glej 3.2.8). Dobili smo pozitivne rezultate pri filtratih vseh sevov (ni prikazano). Da bi se prepričali, ali je HA posledica delovanja komponente B, smo v mikrotitrski luknjice nanесли šest različnih volumnov (0, 5, 10, 20, 25 in 50 µl) temperaturno neobdelanega filtrata, ki je pokazal največjo HA (gliva *A. zonatus* CBS 506.65) in dodali ustrezen volumen pufra. V vseh primerih smo dodali enako količino (40 µl) komponente B. Opazili smo, da večja kot je bila koncentracija oz. volumen vzorca, hitreje je prišlo do hemolize (ni prikazano).

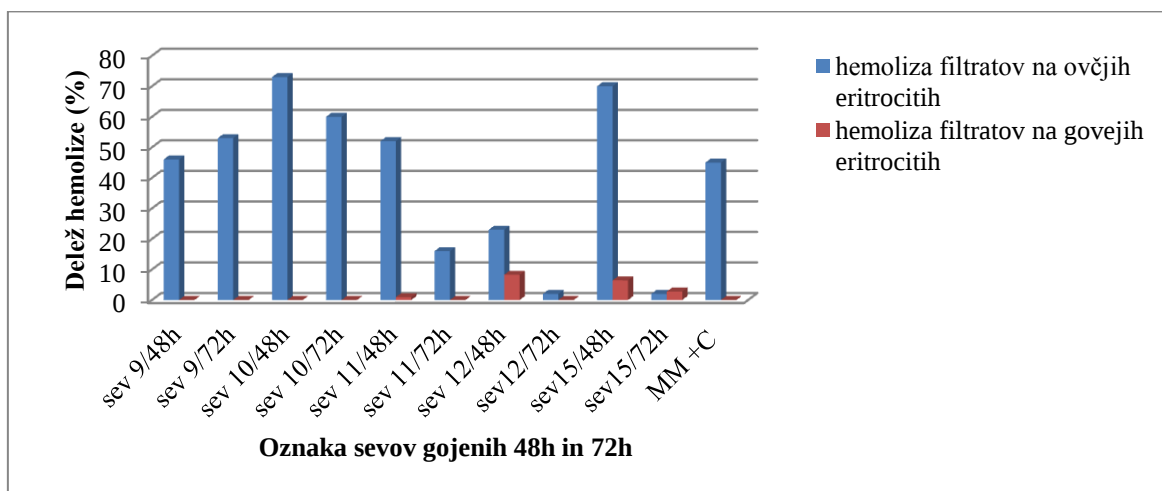
Postopek smo kasneje ponovili, vendar samo s filtrati sevov, pri katerih so hemolizine že dokazali (vsi trije sevi *A. niger* in sev *A. terreus* NIH2624). Tudi v tem primeru smo izmerili hemolizo. Da bi preprečili možnost vezave proteinov (komponente A in B) na stene mikrotitrne luknjice, zaradi česar ne bi mogli delovati, smo ploščico predhodno tretirali z govejim serumskim albuminom (BSA). Tudi v tem primeru so bili rezultati vzorcev, ki smo jim dodali komponento B, pozitivni, vzorcev, katerim komponente B nismo dodali, pa negativni. Kasneje smo ugotovili, da so bili rezultati lažno pozitivni, saj je bila komponenta B kontaminirana z minimalnimi količinami komponente A (ostreolizin A), kar je bil vzrok za pozitivne rezultate.

Hemolitično aktivnost filtratov smo merili tudi na ovčjih eritrocitih. Testirali smo filtrate sevov drugega gojenja, tako temperaturno obdelane kot tudi neobdelane filtrate z nativno in nevtralno pH vrednostjo. Rezultati testa so bili pozitivni. Kasneje smo opravili še test hemolize čistega MM+C, v katerem so sevi rasli. Opazili smo, da je gojišče samo po sebi liziralo eritrocite v isti meri kot enak volumen filtrata glive. Tako smo prišli do zaključka, da so bili rezultati lažno pozitivni in da je bila hemoliza ovčjih eritrocitov posledica MM+C in ne prisotnosti hemolitične učinkovine v filtratih (slika 17). Zaradi tega vpliva temperature, pH vrednosti gojišča in časa gojenja na hemolizo nismo mogli preučiti.



Slika 17: Delež hemolize filtratov vrst rodu *Aspergillus* na ovčjih eritrocitih. Graf prikazuje temperaturno neobdelane filtrate z nativnim pH. 48 ur/72 ur – čas gojenja v MM z glukozo; MM+C – minimalno gojišče z glukozo.

Kljub temu, da so bili rezultati hemolitičnega testa z ovčjimi eritrociti lažno pozitivni, smo opazili, da so ovčji eritrociti v primerjavi z govejimi eritrociti bistveno bolj občutljivi na izpostavljenost vzorcem in čistemu MM+C (slika 18).



Slika 18: Primerjava hemolize filtratov (temperaturno neobdelanih) gliv na ovčjih in govejih eritrocitih. Legenda: sev 9 – *A. niger* CBS 113.46; sev 10 – *A. niger* CBS 513.88; sev 11 – *A. niger* N402; sev 12 – *A. oryzae* Rib40; sev 15 – *A. terreus* NIH2624; MM+C minimalno gojišče z glukozo; 48 h/72 h – čas gojenja v MM gojišču z glukozo.

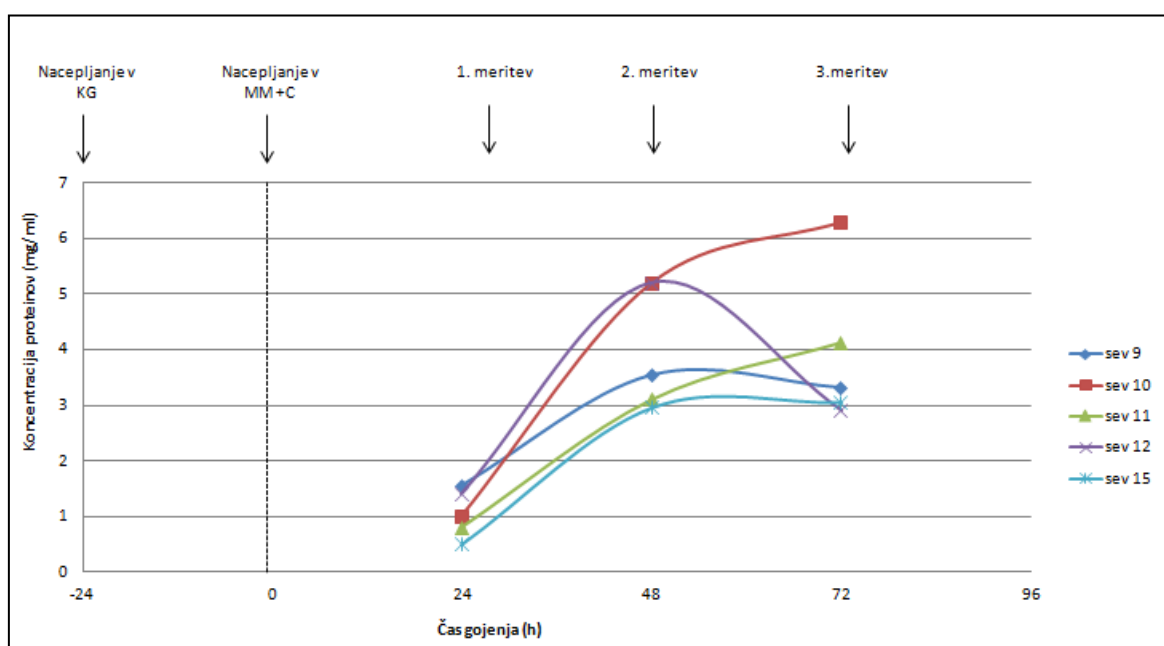
4.3 REZULTATI ANALIZE VODNIH EKSTRAKTOV MICELIJEV

Vodne ekstrakte micelijev smo pripravljali iz micelijev sevov po prvem in drugem gojenju. K ekstraktom micelijev smo dodajali eritrocitni pufer s proteaznim inhibitorjem, v primeru micelijev drugega gojenja pa tudi pufer brez inhibitorja (glej 3.2.4). S proteaznim inhibitorjem, ki inhibira delovanje proteaz, smo želeli zaščititi iskan protein in v primeru hemolize izključiti možnost, da je hemoliza lahko posledica proteaz, kot se je pokazalo v preliminarnih raziskavah (Sharon in sod., 2009). Prav tako so raziskave na Oly pokazale, da se kljub dodatku inhibitorja njegova HA ohrani (Kavčič, 2009). Tako kot filtrate smo tudi vodne ekstrakte micelijev drugega gojenja v vodni kopeli temperaturno obdelali 15 min na 60 °C in 100 °C. Vzorcem smo določili koncentracijo proteinov in HA merili s turbidimetričnim testom hemolize.

4.3.1 Merjenje koncentracij proteinov

Testirali smo vse vzorce, razen tistih, ki smo jih termično obdelali na 100 °C, saj smo s tem proteine denaturirali. Rezultate prikazuje priloga C1.

Proteine smo izmerili v vseh vzorcih. Koncentracije proteinov so bile v primerjavi s filtrati večje. Najvišje koncentracije smo zaznali v filtratu seva *A. niger* CBS 513.88 in seva *A. oryzae* Rib40, najmanjše pa v filtratu seva *A. terreus* NIH2624. Da bi preverili vpliv časa gojenja na koncentracijo proteinov v miceliju, smo med seboj primerjali rezultate petih sevov prvega in drugega gojenja z dodanim inhibitorjem. Opazili smo, da se koncentracija proteinov v vodnih ekstraktih micelija s časom gojenja spreminja. Koncentracija je bila najmanjša po 24-urnem gojenju v MM+C. Po 48 urah gojenja je močno narasla in nato pri treh primerih po 72 urah padla, pri dveh primerih pa narasla (slika 19).



Slika 19: Koncentracija proteinov v micelijih različnih vrst rodu *Aspergillus* med gojenjem v minimalnem gojišču z glukozo. KG – kompletno gojišče; MM+C – minimalno gojišče z glukozo. Legenda: sev 9 – *A. niger* CBS 113.46; sev 10 – *A. niger* CBS 513.88; sev 11 – *A. niger* N402; sev 12 – *A. oryzae* Rib40; sev 15 – *A. terreus* NIH2624.

4.3.2 Rezultati hemolitičnega testa

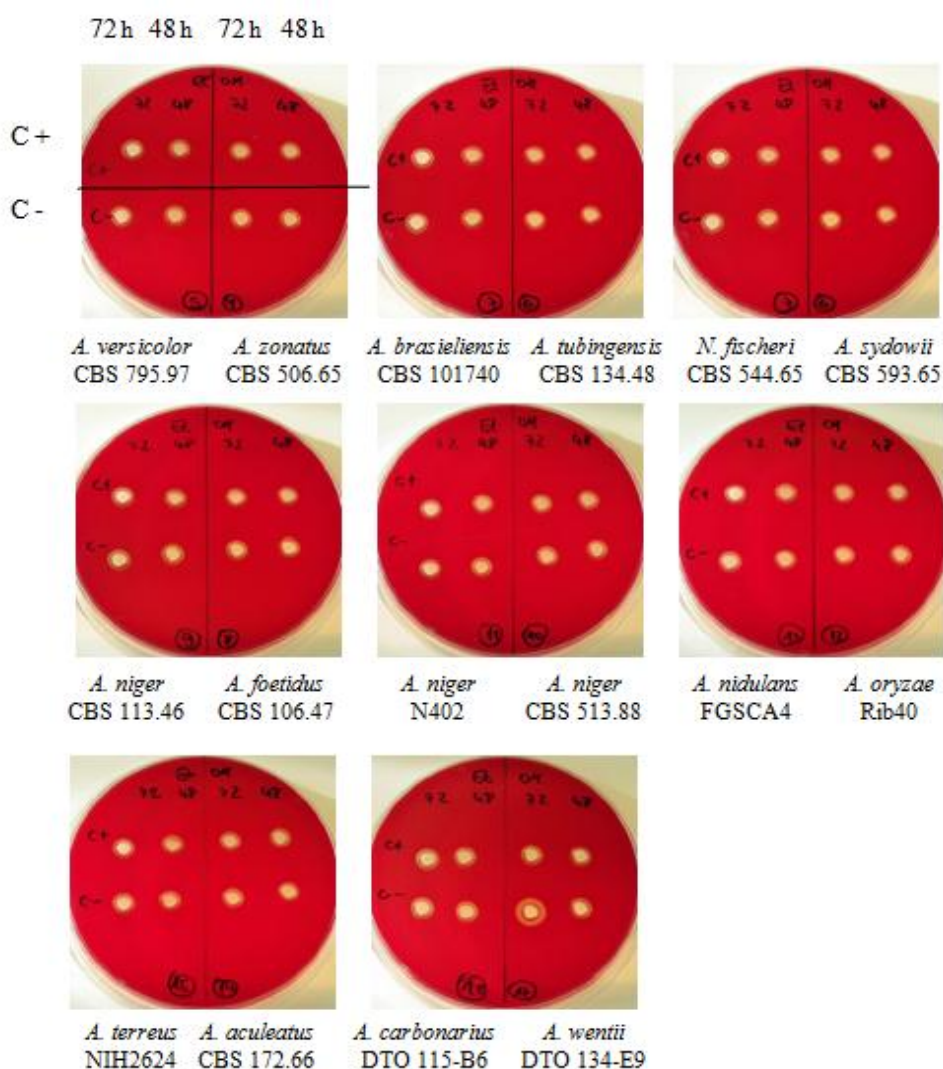
Test hemolize je bil pri vseh testiranih vodnih ekstraktih micelijev negativen (ni prikazano). Tako kot pri filtratih smo tudi pri ekstraktih izvedli test hemolize, pri čemer smo vzorcem predhodno dodali komponento B (glej 3.2.8) in dobili pozitivne rezultate. Ker smo se tudi tukaj želeli prepričati, ali je HA posledica dodane komponente B, smo na enak način kot pri filtratih izvedli dodatne teste, ki so opisani v točki 4.2.4. Prav tako je bil razlog za naše pozitivne rezultate kontaminacija komponente B s komponento A.

4.4 REZULTATI ANALIZE ETANOLNIH EKSTRAKTOV MICELIJEV

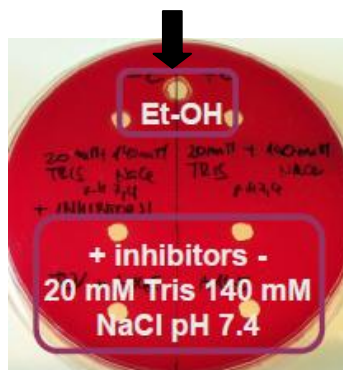
Hemolizo etanolnih ekstraktov micelijev smo preverjali z vcepljanjem v plošče s KA in s turbidimetričnim testom hemolize. Testirali smo etanolne ekstrakte micelijev sevov tretjega gojenja.

4.4.1 Rezultati hemolize na ploščah s krvnim agarjem

Rezultati hemolize vseh etanolnih ekstraktov micelijev (sevov gojenih 48 in 72 ur v MM+C), ki jih prikazuje slika 20, so bili pozitivni, vendar smo podobno opazili tudi pri kontroli in sicer pri 96 % etanolu (slika 21).



Slika 20: Etanolni ekstrakti micelijev različnih vrst gliv rodu *Aspergillus* na ploščah s krvnim agarjem (ovčji eritrociti), ki so se inkubirale 24 ur na 30 °C. Na vsaki plošči so vcepljeni etanolni ekstrakti dveh vrst gliv (SEV A/SEV B). 48 h/72 h – čas gojenja v minimalnem gojišču z glukozo; C+ – minimalno gojišče z glukozo; C- – minimalno gojišče brez glukoze.



Slika 21: Negativne kontrole na krvnem agarju. Et-OH – čisti etanol; +/- inhibitors – pufer z dodanim inhibitorjem/pufer brez inhibitorja proteaz; 20mM Tris, 140mM NaCl (pH 7,4) – sestava pufra; puščica – mesto hemolize etanola.

4.4.2 Rezultati hemolitičnega testa

Pri testu hemolize etanolnih ekstraktov micelijev smo uporabili goveje eritrocite. Preglednica 4 prikazuje seve, katerih etanolni ekstrakti micelijev so bili in niso bili hemolitično aktivni.

Preglednica 4: Rezultati hemolitičnega testa etanolnih ekstraktov micelijev različnih vrst gliv rodu *Aspergillus* gojenih v MM+C. ČG – čas gojenja v MM+C (h); HA – hemolitična aktivnost; + – hemoliza; - – ni hemolize.

ŠT.	VRSTA	SEV	ČG	HA
2.	<i>A. zonatus</i>	CBS 506.65	48 h	-
			72 h	-
3.	<i>A. versicolor</i>	CBS 795.97	48 h	+
			72 h	+
4.	<i>A. tubingensis</i>	CBS 134.48	48 h	-
			72 h	-
5.	<i>A. brasiliensis</i>	CBS101740	48 h	+
			72 h	+
6.	<i>A. sydowii</i>	CBS 593.65	48 h	+
			72 h	+
7.	<i>N. fischeri</i>	CBS 544.65	48 h	+
			72 h	+

Se nadaljuje.

Nadaljevanje preglednice 4. Rezultati hemolitičnega testa etanolnih ekstraktov micelijev različnih vrst gliv rodu *Aspergillus* gojenih v MM+C. ČG – čas gojenja v MM+C; HA – hemolitična aktivnost; + – hemoliza; - – ni hemolize.

ŠT.	VRSTA	SEV	ČG	HA
8.	<i>A. foetidus</i>	CBS 106.47	48 h	-
			72 h	-
9.	<i>A. niger</i>	CBS 113.46	48 h	+
			72 h	+
10.	<i>A. niger</i>	CBS 513.88	48 h	+
			72 h	-
11.	<i>A. niger</i>	N402	48 h	+
			72 h	-
12.	<i>A. oryzae</i>	Rib40	48 h	+
			72 h	+
13.	<i>A. nidulans</i>	FGSCA4	48 h	+
			72 h	+
14.	<i>A. aculeatus</i>	CBS 172.66	48 h	+
			72 h	+
15.	<i>A. terreus</i>	NIH2624	48 h	+
			72 h	+
17.	<i>A. wentii</i>	DTO 134-E9	48 h	-
			72 h	-
18.	<i>A. carbonarius</i>	DTO 115-B6	48 h	-
			72 h	-

HA smo od 16 testiranih sevov zaznali pri etanolnih ekstraktih micelijev 11 sevov, razen pri sevih *A. zonatus* CBS 506.65 (48 in 72 ur gojenja), *A. tubingensis* CBS 134.48 (48 in 72 ur gojenja), *A. foetidus* CBS 106.47 (48 in 72 ur gojenja), *A. wentii* DTO 134-E9 (48 in 72 ur gojenja), *A. carbonarius* DTO 115-B6 (48 in 72 ur gojenja) ter pri sevih *A. niger* CBS 513.88 in *A. niger* N402, ki smo ju v MM+C gojili 72 ur. Hemolitične aktivnosti pri 96 % etanolu nismo izmerili.

Da bi ugotovili, ali je hemoliza posledica prisotne organske snovi v vzorcih, smo testirali štiri različne volumne (5, 10, 20 in 30 µl) etanolnih ekstraktov micelijev, v katerih smo

kasneje izračunali koncentracijo organske snovi. Predhodno smo testirali tudi ustrezne volumne čistega topila (96-odstotni etanol), ki so ustrezali volumnom vzorcev (5, 10, 20 in 30 μ l). Učinek topila smo izključili, saj topilo samo po sebi ni bilo HA. Vzorce smo tako dodajali v volumnih, ki so bili znotraj tega nehemolitičnega ranga. Slike 22 – 32 prikazujejo hemolizo govejih eritrocitov, v odvisnosti od volumna vzorca oz. koncentracije organske snovi, prisotne v etanolnih ekstraktih micelijev testiranih sevov.

S primerjanjem rezultatov HA etanolnih ekstraktov vseh sevov smo opazili, da večja kot je bila koncentracija organske snovi v vzorcu, krajši je bil čas, potreben za 50-odstotno hemolizo.

HA etanolnih ekstraktov micelijev smo izmerili pri sevih, ki smo jih gojili tako 48 kot 72 ur, razen v primeru seva *A. niger* CBS 513.88 in seva *A. niger* N402, kjer smo hemolizo izmerili samo pri ekstraktih sevov, ki smo jih gojili 48 ur.

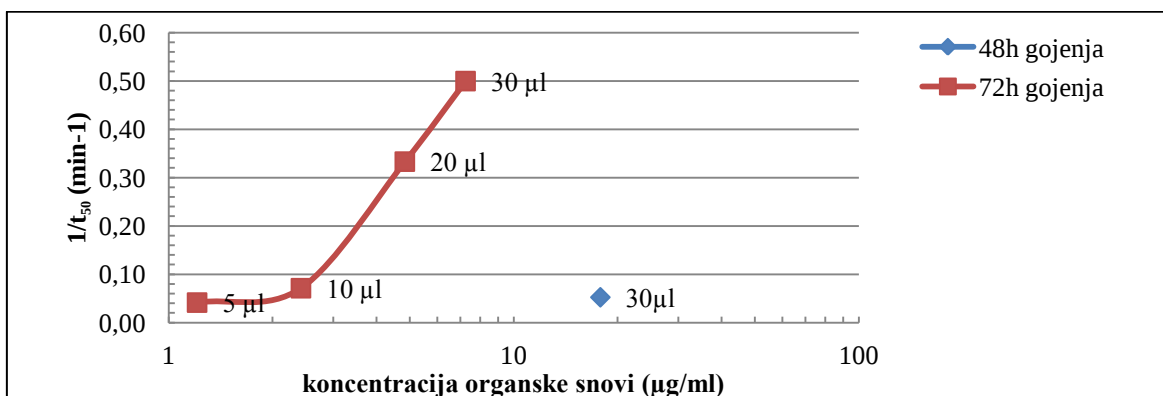
Vzorci istih sevov so bili HA pri različnih koncentracijah. Oba vzorca seva *A. brasiliensis* CBS101740 (48 ur in 72 ur) sta bila HA pri vseh štirih koncentracijah. Poleg tega je bil pri vseh koncentracijah HA tudi etanolni ekstrakt seva *A. versicolor* CBS 795.97 in seva *N. fischeri* CBS 544.65, ki smo ju v MM+C gojili 72 ur ter vzorec seva *A. terreus* NIH2624, ki smo ga v MM +C gojili 48 ur. Pri vzorcu seva *A. terreus* NIH2624, ki smo ga gojili 72 ur, in vzorcu seva *N. fischeri* CBS 544.65, ki smo ga gojili 48 ur, smo HA izmerili le pri treh koncentracijah. Vzorec seva *A. versicolor* CBS 795.97, ki smo ga gojili 48 ur, pa je bil HA le pri največji testirani koncentraciji (slika 22, 23, 26, 32).

Vzorca glive *A. oryzae* Rib40 in glive *A. sydowii* CBS 593.65 sta bila HA aktivna pri treh najvišjih testiranih koncentracijah, razen pri najmanjši koncentraciji (slika 24 in 25). Vzorec glive *A. nidulans* FGSCA4, ki smo jo v MM+C gojili 48 ur, je bil prav tako HA pri treh najvišjih koncentracijah, medtem ko je bil vzorec istega seva, ki smo ga gojili 72 ur, HA le pri dveh koncentracijah (slika 28). Podobno smo opazili pri vzorcih glive *A. niger* CBS 113.46 (slika 27).

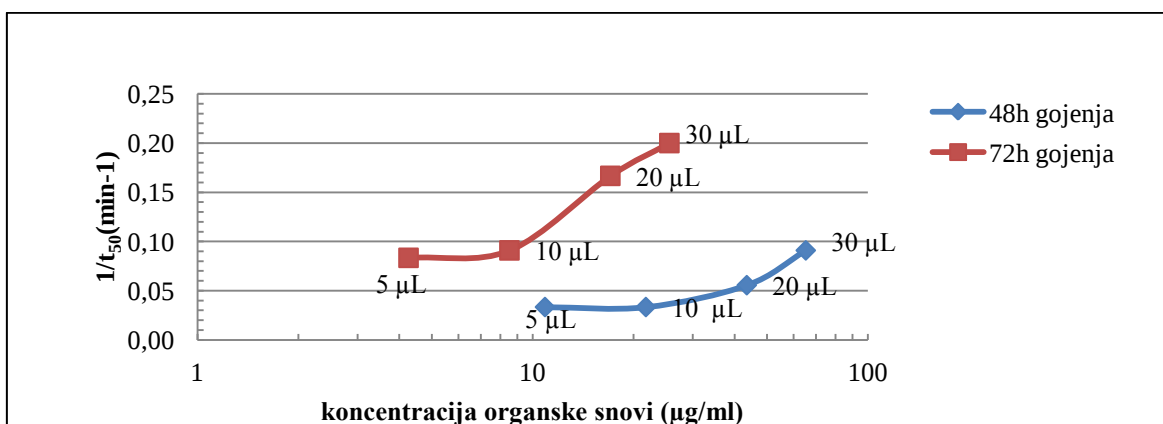
HA smo pri sevu *A. niger* N402 in sevu *A. niger* CBS 513.88 izmerili le pri ekstraktih sevov, ki smo jih v MM+C gojili 48 ur, in sicer je bil vzorec seva *A. niger* CBS 513.88 HA pri dveh koncentracijah, vzorec seva *A. niger* N402 pa le pri najvišji koncentraciji (slika 29 in 30). Etanolni ekstrakt seva *A. aculeatus* CBS 172.66, ki smo ga gojili 48 ur, je bil

aktiven pri dveh najvišjih koncentracijah, etanolni ekstrakt istega seva, ki pa smo ga gojili 72 ur, pa samo pri najvišji koncentraciji (slika 31).

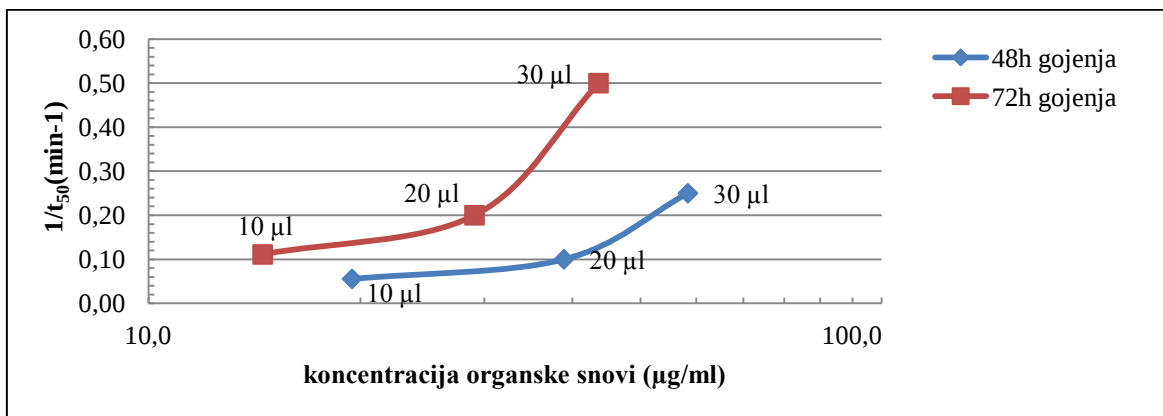
Pri večini sevov (6 od 9), brez upoštevanja vzorcev sevov *A. niger* N402 in *A. niger* CBS 513.88, kjer smo HA izmerili samo pri vzorcih sevov, gojenih 48 ur, smo opazili, da so bile višje koncentracije organske snovi prisotne v ekstraktih sevov, ki smo jih v MM+C gojili 48 ur. S primerjanjem koncentracij organske snovi pri določenem volumnu etanolnega ekstrakta seva, gojenega 48 ur z istim sevom, gojenim 72 ur, smo opazili, da tudi če je ekstrakt vseboval višje koncentracije organske snovi, do 50-odstotne hemolize ni vedno prišlo hitreje.



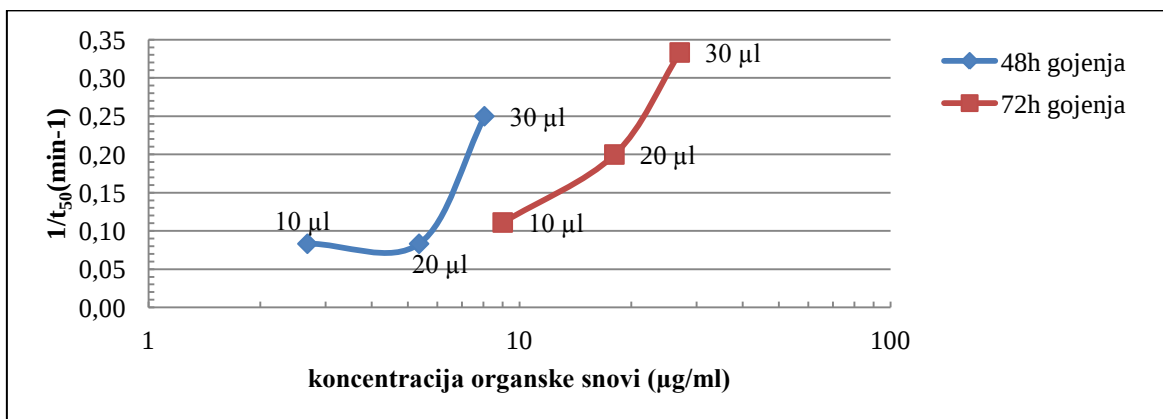
Slika 22: Hemolitična aktivnost etanolnega ekstrakta micelija glive *A. versicolor* CBS 795.97 (gojene v minimalnem gojišču 48h in 72h) v odvisnosti od koncentracije organske snovi v ekstraktu, pri štirih različnih volumnih (5, 10, 20 in 30 µl) etanolnega ekstrakta micelija. Prikazane so tisti volumni etanolnega ekstrakta, pri katerih je prišlo do hemolize. t_{50} – čas, ki je potreben, da pride do 50-odstotne hemolize.



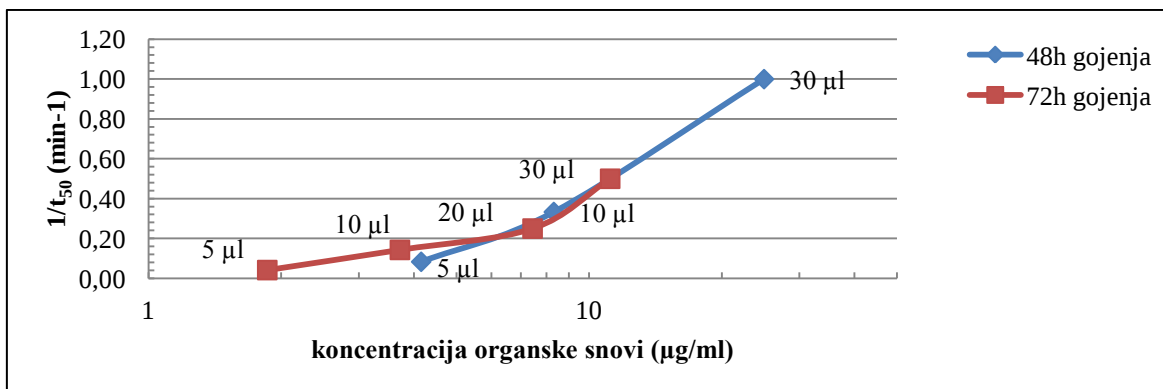
Slika 23: Hemolitična aktivnost etanolnega ekstrakta glive *A. brasiliensis* CBS 101740 (gojene v minimalnem gojišču 48h in 72h) pri štirih različnih volumnih (5, 10, 20 in 30 µl) v odvisnosti od koncentracije organske snovi v ekstraktu. Prikazane so tisti volumni etanolnega ekstrakta, pri katerih je prišlo do hemolize. t_{50} – čas potreben, da pride do 50-odstotne hemolize.



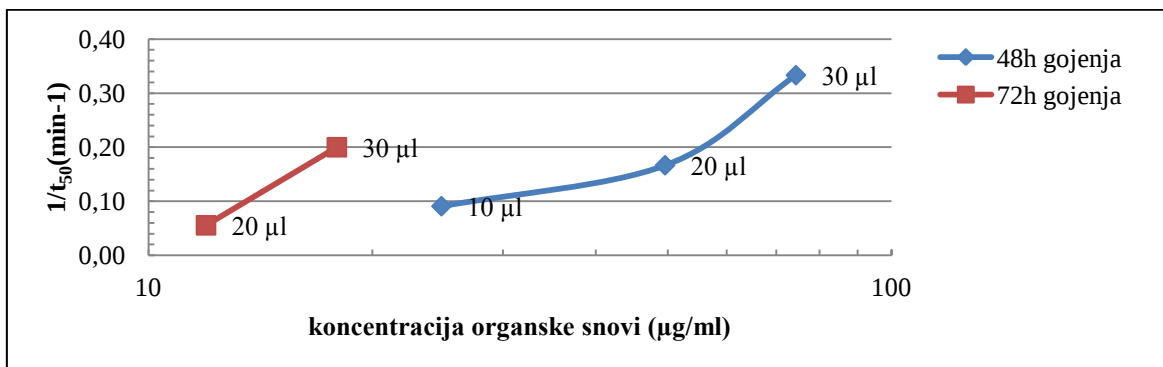
Slika 24: Hemolitična aktivnost etanolnega ekstrakta glive *A. oryzae* Rib40 (gojene v minimalnem gojišču 48h in 72h) pri štirih različnih volumnih (5, 10, 20 in 30 µl) v odvisnosti od koncentracije organske snovi v ekstraktu. Prikazane so tisti volumni etanolnega ekstrakta, pri katerih je prišlo do hemolize. t_{50} – čas, ki je potreben, da pride do 50-odstotne hemolize.



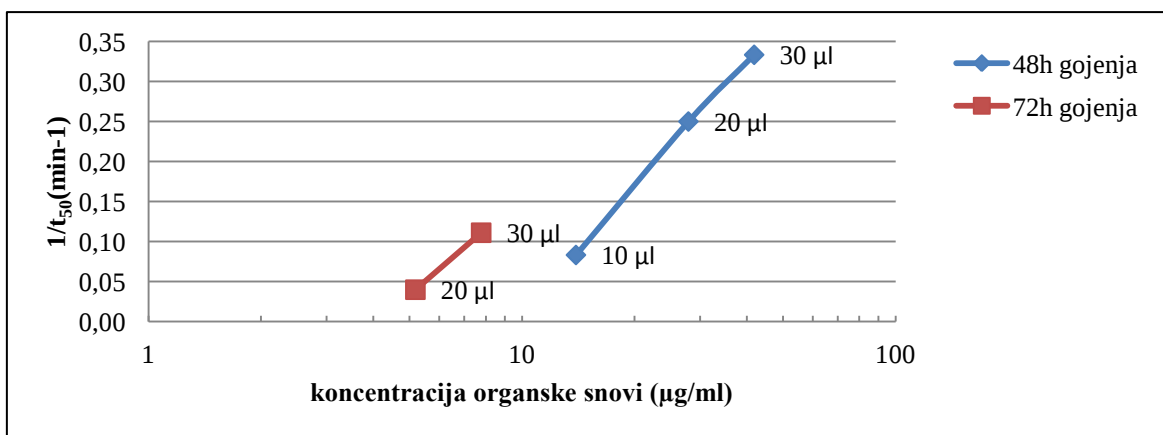
Slika 25: Hemolitična aktivnost etanolnega ekstrakta glive *A. sydowii* CBS 593.65 (gojene v minimalnem gojišču 48h in 72h) pri štirih različnih volumnih (5, 10, 20 in 30 µl) v odvisnosti od koncentracije organske snovi v ekstraktu. Prikazane so tisti volumni etanolnega ekstrakta, pri katerih je prišlo do hemolize. t_{50} – čas, ki je potreben, da pride do 50-odstotne hemolize.



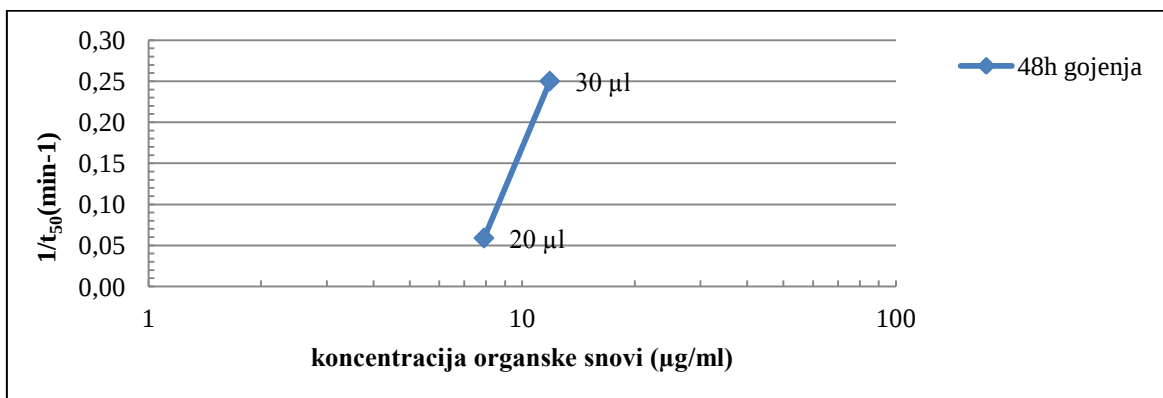
Slika 26: Hemolitična aktivnost etanolnega ekstrakta glive *N. fischeri* CBS 544.65 (gojene v minimalnem gojišču 48h in 72h) pri štirih različnih volumnih (5, 10, 20 in 30 µl) v odvisnosti od koncentracije organske snovi v ekstraktu. Prikazane so tisti volumni etanolnega ekstrakta, pri katerih je prišlo do hemolize. t_{50} – čas, ki je potreben, da pride do 50-odstotne hemolize.



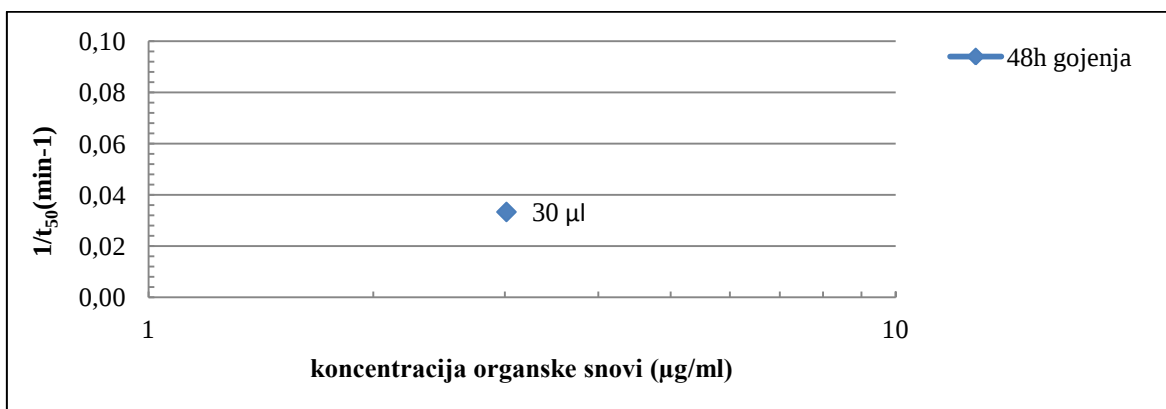
Slika 27: Hemolitična aktivnost etanolnega ekstrakta glive *A. niger* CBS 113.46 (gojene v minimalnem gojišču 48h in 72h) pri štirih različnih volumnih (5, 10, 20 in 30 μl) v odvisnosti od koncentracije organske snovi v ekstraktu. Prikazane so tisti volumni etanolnega ekstrakta, pri katerih je prišlo do hemolize. t_{50} – čas, ki je potreben, da pride do 50-odstotne hemolize.



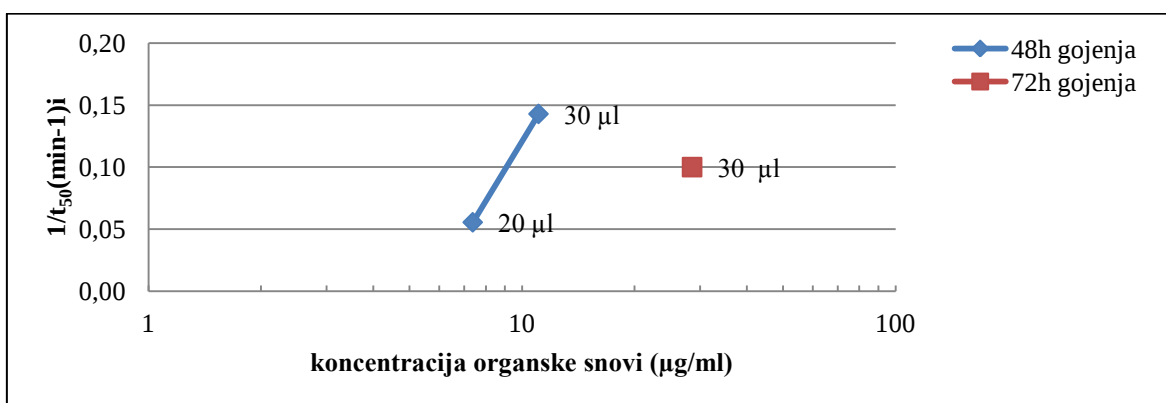
Slika 28: Hemolitična aktivnost etanolnega ekstrakta glive *A. nidulans* FGSCA4 (gojene v minimalnem gojišču 48h in 72h) pri štirih različnih volumnih (5, 10, 20 in 30 μl) v odvisnosti od koncentracije organske snovi v ekstraktu. Prikazane so tisti volumni etanolnega ekstrakta, pri katerih je prišlo do hemolize. t_{50} – čas, ki je potreben, da pride do 50-odstotne hemolize.



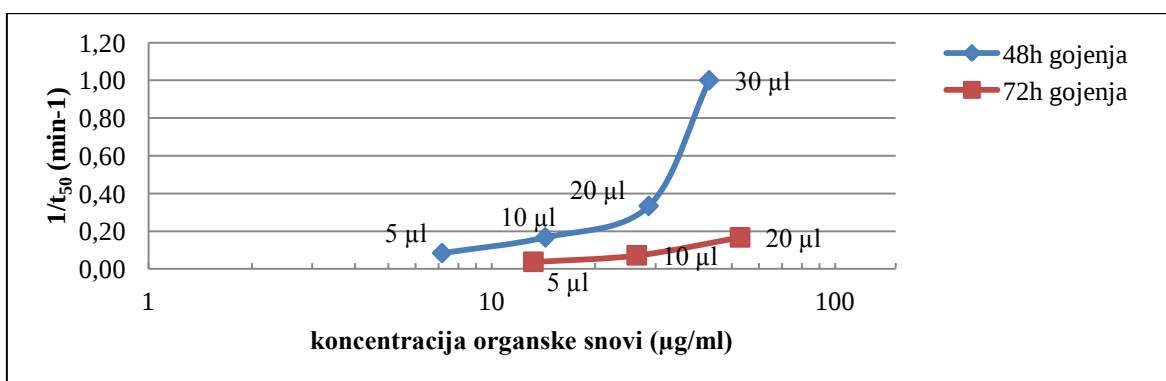
Slika 29: Hemolitična aktivnost etanolnega ekstrakta glive *A. niger* 513.88 (gojene v minimalnem gojišču 48h) pri štirih različnih volumnih (5, 10, 20 in 30 μl) v odvisnosti od koncentracije organske snovi v ekstraktu. Prikazane so tisti volumni etanolnega ekstrakta, pri katerih je prišlo do hemolize. t_{50} – čas, ki je potreben, da pride do 50-odstotne hemolize.



Slika 30: Hemolitična aktivnost etanolnega ekstrakta glive *A. niger* N402 (gojene v minimalnem gojišču 48h) pri volumnu 30 µl v odvisnosti od koncentracije organske snovi v ekstraktu. t_{50} – čas, ki je potreben, da pride do 50-odstotne hemolize.



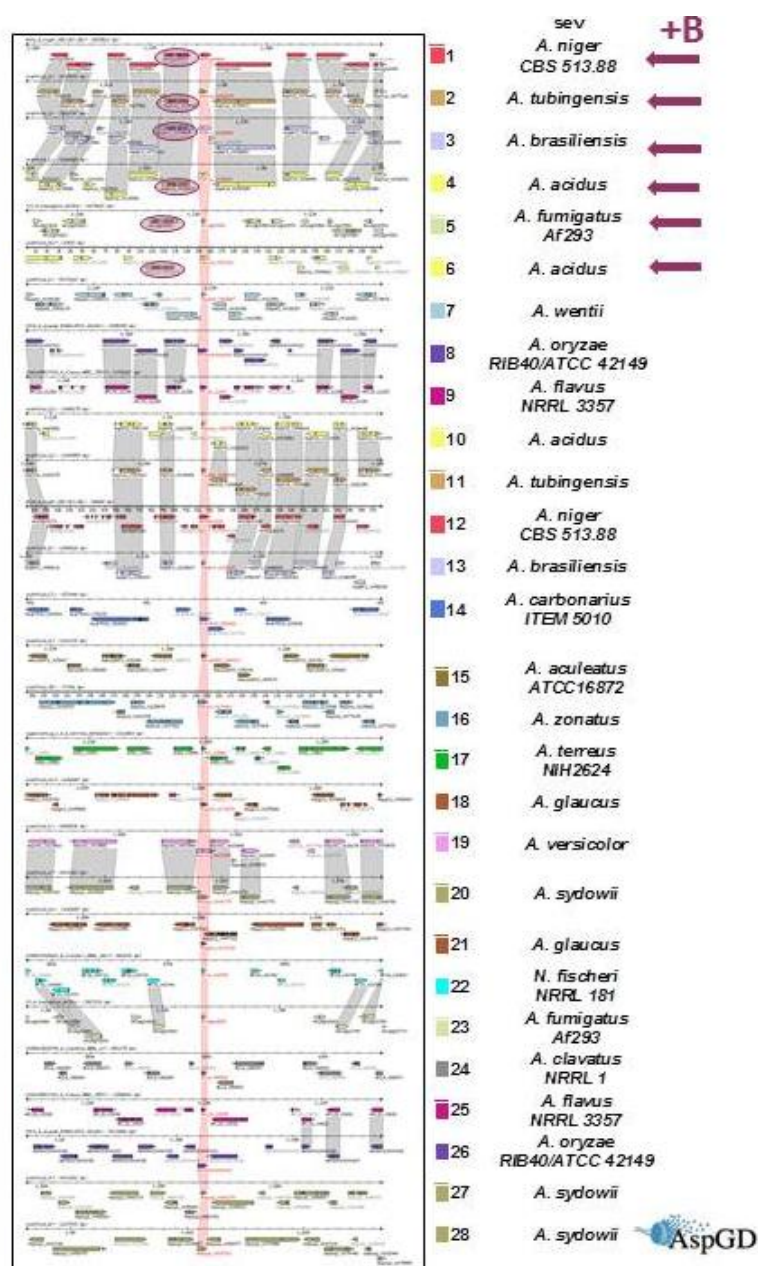
Slika 31: Hemolitična aktivnost etanolnega ekstrakta glive *A. aculeatus* CBS 172.66 (gojene v minimalnem gojišču 48h in 72h) pri štirih različnih volumnih (5, 10, 20 in 30 µl) v odvisnosti od koncentracije organske snovi v ekstraktu. Prikazane so tisti volumni etanolnega ekstrakta, pri katerih je prišlo do hemolize. t_{50} – čas, ki je potreben, da pride do 50-odstotne hemolize.



Slika 32: Hemolitična aktivnost etanolnega ekstrakta glive *A. terreus* NIH2624 (gojene v minimalnem gojišču 48h in 72h) pri štirih različnih volumnih (5, 10, 20 in 30 µl) v odvisnosti od koncentracije organske snovi v ekstraktu. Prikazane so tisti volumni etanolnega ekstrakta, pri katerih je prišlo do hemolize. t_{50} – čas, ki je potreben, da pride do 50-odstotne hemolize.

4.5 BIOINFORMATSKA ANALIZA EGEROLIZINSKIH PROTEINOV V IZBRANIH SEVIH RODU *ASPERGILLUS*

Poravnavo ortolognih egerolizinskih proteinov smo naredili s programom Sybill, znotraj baze AspGD (Arnaud in sod., 2012). Poravnani ortologi so označeni z roza barvo, morebitne komponente B pa z vijoličnim okvirjem (na sliki 33) in z oznako +B (ob strani slike 33).



Slika 33: Poravnava proteinov ortolognim egerolizinom in morebitne komponente B (Arnaud in sod., 2012).

5 RAZPRAVA GOJENJA GLIV V MINIMALNEM GOJIŠČU Z VIROM OGLJIKA (Magistrsko delo Nine Sluga)

Pri izbranih 18 vrstah gliv rodu *Aspergillus* smo želeli preveriti prisotnost že znanih in neznanih hemolitičnih učinkovin, ki bi jih v prihodnosti lahko izolirali in preučevali. Prisotnost teh smo preverjali v gojiščih ter v vodnih in etanolnih ekstraktih micelijev. Z gojenjem gliv v MM+C smo želeli preveriti vpliv glukoze na produkcijo hemolitičnih učinkovin, saj so številne raziskave pokazale, da različni viri ogljika lahko vplivajo na hemolizo (Manns in sod., 1994; Braaksma in sod., 2010). Hemolizo smo spremljali z vcepljanjem na plošče s KA in s turbidimetričnim testom hemolize. Pri tem smo se usmerili predvsem v iskanje proteinov egerolizinske družine, katerih hemolitično aktivnost smo detektirali z dodajanjem minimalne količine proteina PlyB (pleurotolizin B).

5.1 RAST GLIV RODU *ASPERGILLUS*

Trdo gojišče MBFA (ang. »*Malt extract agar – Blakeslee's Formula*«), na katerem smo glive gojili najprej, je medij, ki se uporablja za preučevanje morfologije micelija gliv, sporulacije in identifikacije gliv (zaradi specifičnega obarvanja micelija). Vsebuje vire ogljika (glukoza), dušika (pepton) in ostale nutriende, s katerimi dosežemo tipično rast in sporulacijo gliv. Seve smo predhodno gojili tudi na gojišču MEA, ki kot glaven vir energije vsebuje maltozo, vendar je bila rast v tem primeru slabša. Po inokulaciji spor se je pojavil micelij, ki se je enakomerno razširjal do roba kolonij. Micelij se je tako od roba do sredine diferenciral v 4 cone: i) zunanja (ang. »*extending*«) cona, kjer se hife razširjajo po novem mediju, ii) produktivna (ang. »*productive*«) cona, kjer prihaja do največjega povečanja biomase, iii) fruktifikacijska (ang. »*fruiting*«) cona, kjer prihaja do tvorbe spor in iv) ostarela (ang. »*aged*«) cona, kjer so hife prazne in avtolizirajo (Moore in sod., 2011).

Zrasli so vsi sevi razen seva *A. glaucus* (telomorf: *Eurotium herbariorum* CBS 516.65) in seva *A. clavatus* CBS 513.65. *A. glaucus* je slabo rasel kljub dodatku 1 M NaCl, vendar je slaba rast zanj pogosta.

Na krvnem agarju je večina vrst gliv (*A. brasiliensis* CBS 101740, *N. fischeri* CBS 544.65, *A. foetidus* CBS 106.47, *A. niger* CBS 113.46, *A. niger* N402, *A. oryzae* Rib40, *A. nidulans* FGSCA4, *A. aculeatus* CBS 172.66, *A. carbonarius* DTO 115-B6) po 5 dneh

gojenja imela dobro rast. Pri petih sevih, in sicer sevu *A. brasiliensis* CBS 101740, sevu *A. niger* N402, sevu *A. niger* CBS 113.46, sevu *A. tubingensis* CBS 134.48 in sevu *A. nidulans* FGSCA4, smo pod kolonijami opazili rumenozeleno obarvanje krvnega agarja, ki je značilno za delno oziroma α -hemolizo. Na podlagi tega smo sklepali, da glive izločajo hemolitične učinkovine v medij. Sevi, ki so na KA pokazali HA, so prav tako hidrolizirali kazein v agarju s posnetim mlekom, kar je bilo vidno kot bistra oziroma motna cona v okolici micelija, zaradi česar nismo mogli izključiti možnosti, da so za hemolizo krivi proteolitični encimi. Proteolizo smo opazili tudi pri drugih sevih, z izjemo seva *A. zonatus* CBS 506.65, ki ni pokazal ne hemolitične in ne proteolitične aktivnosti. Produkcijo proteolitičnih encimov smo pričakovali pri večini sevov, saj glive rodu *Aspergillus* veljajo za dobre proizvajalke proteaz.

Tekoče KG nam je služilo za gojenje predkulture, saj poleg istih sestavin, ki jih najdemo v MM, KG vsebuje še aminokisline in dodaten vir dušika (kvasni ekstrakt; ang. »yeast extract«). S tem smo zagotovili čim boljšo rast sevov. Rast gliv v tekočem MM+C je bila dobra, z izjemo sevov *A. niger* CBS 513.88 in *A. zonatus* CBS 506.65, pri katerih je bila rast nekoliko slabša, saj smo v vseh primerih gojenja natehtali majne količine micelija. Pri večini sevov (z nekaterimi izjemami) je bila teža micelijev največja po 24 urah gojenja, manjša po 48 in najmanjša po 72 urah gojenja. Micelijev po 24-urnem gojenju v KG nismo tehtali, vendar predvidevamo, da so bile teže micelijev še večje, saj so glive imele poleg ogljika (glukoze) na voljo še dodatna hranila (aminokisline in kvasni ekstrakt). Po prenosu v MM+C so glive še nekaj časa rasle, dokler niso mediju porabile vse glukoze, nato pa je njihova biomasa zaradi pomanjkanja hranil, upočasnitve metabolizma in porabe kisika začela upadati. Sklepamo, da je do tega prišlo še preden smo po 24 urah gojenja v MM+C opravili prvo meritev. Kot je razvidno iz rezultatov se je rast gliv med različnimi vrstami gliv rodu *Aspergillus* razlikovala. Pri nekaterih izjemah, kot so sev *A. foetidus* CBS 106.47, sev *A. nidulans* FGSCA4, sev *A. sydowii* CBS 593.65 in sev *N. fischeri* CBS 544.65, zmanjšanje teže micelija nismo opazili, temveč smo najvišje teže micelijev izmerili po 48 urah, po 72 urah pa nekoliko manjše.

pH vrednost gojišča se je pri večini sevov (z izjemo gojišč sevov *A. zonatus* CBS 506.65, *A. versicolor* CBS 795.97 in *A. niger* CBS 513.88, kjer smo po 24 urah gojenja namerili

višje pH vrednosti kot po 48 urah gojenja) z daljšim časom gojenja zviševala, kar bi lahko bila posledica produkcije amonijaka. V primeru pomanjkanja hranil začnejo filamentozne glive razgrajevati in katabolizirati znotrajcelične peptide in proteine ter proteine, ki se sprostijo pri avtolizi. Stranski produkt te razgradnje je amonijak, ki zviša pH vrednost medija (Emri in sod., 2009). Potrebno je poudariti, da so bile ponekod razlike v rasti pH vrednosti majhne ter da uporabljen ročni pH meter ne omogoča natančnih meritev. Znano je, da se pH vrednost medija med rastjo gliv spreminja, in sicer se lahko poviša ali zmanjša, kar je odvisno od posamezne vrste gliv. pH vrednost gojišča se je pri polovici testiranih sevov gibal okoli nevtralnih vrednosti (pH 6 – 7), pri drugi polovici pa smo namerili nizke pH vrednosti gojišč (pH 3 – 6). Kot je razvidno iz rezultatov so gojišča vseh treh testiranih sevov *A. niger* imela nizke pH vrednosti, kar je pričakovano, saj ti sevi izločajo številne organske kisline (npr. citronsko kislino), ki zakisajo pH medija tudi do 2.

5.2 PRIPRAVA VZORCEV

Pri pripravi vzorcev smo opazili, da so bila nekatera gojišča značilno obarvana. Gojišča sevov *A. zonatus* CBS 506.65 (48 in 72 ur gojenja), *A. carbonarius* DTO 115-B6 (72 ur gojenja) in *A. niger* N402 (72 ur gojenja) so bila rdeče obarvana, gojišča ostalih dveh sevov *A. niger* pa rahlo rumenorjavo obarvana. To je najverjetneje posledica pigmentov, ki se lahko vgrajujejo v celične stene ali pa se izločajo v gojišče (Brown W.D in Salvo J.J., 1994). Pri sevih *A. niger* je rumena obarvanost gojišč najverjetneje posledica produkcije melanina ali melanoidnih pigmentov (Shaaban in sod., 2013).

5.3 HEMOLITIČNA AKTIVNOST VZORCEV

Glede na pregled preliminarne študij, kjer so hemolizine že identificirali in analizirali, ter glede na bazo podatkov gliv rodu *Aspergillus*, imenovano AspGD (Arnaud in sod., 2012), kjer vseh 18 testiranih vrst *Aspergillus* vsebuje gene ortologne egerolizinom, smo predvidevali, da bomo hemolitično aktivnost zaznali pri vseh oz. pri večini testiranih vrst.

5.3.1 Hemolitična aktivnost filtratov

Hemolitično aktivnost smo na ploščah s KA zasledili pri filtratih 4 od 16 testiranih sevov, in sicer pri sevu *A. tubingensis* CBS 134.48, sevu *A. brasiliensis* CBS 101740, sevu *A. niger* CBS 113.46 in sevu *A. niger* N402. Gre za seve, katerih HA smo zaznali tudi v

primeru nacepljanja spor na KA, zaradi česar smo sklepali, da se hemolitična učinkovina sprošča v medij. Segrevanje v termobloku 15 min na 100 °C je uničilo HA vseh filtratov (ne glede na pH vrednost gojišča), medtem ko termična obdelava na 60 °C ni uničila HA filtratov z nativno pH vrednostjo, pri filtratih z nevtralno pH vrednostjo pa je bila popolnoma uničena (v primeru seva *A. brasiliensis* CBS 101740 in seva *A. niger* CBS 113.46) oziroma le delno inhibirana (v primeru seva *A. niger* N402). Sklepamo, da smo z dodatkom NaOH, s katerim smo zvišali pH vrednost filtratov na nevtralno pH vrednost, uničili temperaturno obstojnost hemolitične učinkovine. Izjema so filtri seva *A. tubingensis* CBS 134.48, vendar v tem primeru zaradi že nevtralnih pH-vrednosti gojišča NaOH nismo dodajali.

Filtrat seva *A. niger* CBS 513.88, ki ni sposoben sinteze levcina, je bil edini od filtratov treh testiranih sevov vrste *A. niger*, ki ni pokazal HA. Filtrat seva ni bil HA aktiven tudi v primeru dodatka levcina in nikotinamida v KA.

Iste filtrate smo na enak način vcepljali tudi v gojišče s PM, s čimer smo želeli preveriti prisotnost zunajceličnih proteolitičnih encimov in ali so morda te odgovorne za hemolizo, kot se je pokazalo v nekaterih preliminarne raziskavah. Sharon in sod. (2009) so opazili, da so filtri glive *A. fumigatus* z delecijo gena za transkripcijski faktor PrtT, ki je pomemben za ekspresijo številnih proteaz, v primerjavi s filtri divjega tipa *A. fumigatus* eritrocite slabše lizirali. Slednje ob dodatku proteaznih inhibitorjev skoraj niso več opazili. Opazili smo, da se je vzorec proteolize hemolitično aktivnih filtratov (z izjemo filtratov seva *A. niger* CBS 113.48) razlikoval od njihovega vzorca hemolize, vendar smo kljub temu pri nekaterih hemolitičnih vzorcih opazili prisotnost proteaz. Pri filtratih nekaterih vrst, in sicer vrst *A. nidulans* FGSCA4, *A. versicolor* CBS 765.97, *A. brasiliensis* CBS 101740 in *A. niger* CBS 113.46 so proteolitični encimi ohranili svojo aktivnost tudi po 15 minutnem segrevanju na 60 °C. Ti rezultati kažejo na prisotnost termostabilnih proteolitičnih encimov, ki so jih pri vseh teh vrstah, razen pri vrsti *A. brasiliensis*, že dokazali (Choudhary, 2012; Corav in sod., 2003; Emri in sod., 2009). Proteolitičnih encimov, ki bi ohranili svojo aktivnost tudi pri 100 °C, nismo zaznali. Glive iz rodu *Aspergillus* veljajo za zelo dobre proizvajalke zunajceličnih proteaz, katerih produkcija, aktivnost in temperaturna stabilnost od vrste do vrste zelo variirajo.

Kasneje smo pri filtratih, ki so bili HA, s PAGE želeli preveriti ali so za hemolizo odgovorni egerolizini, katerih velikost se giblje med 15 in 17 kDa. Fragmentov v pričakovanem velikostnem razredu nismo zaznali. Glede na rezultate hemolize na KA, proteolize na ploščah s PM in PAGE smo sklepali, da hemoliza ni bila posledica produkcije hemolizinov oz. egerolizinov, vendar so bile zanjo pri nekaterih vzorcih poleg proteaz odgovorne tudi neke druge hemolitične učinkovine.

Filtrate smo nato testirali še s turbidimetričnim testom hemolize. Pred testiranjem smo izvedli proteinski test, s katerim smo izmerili skupno količino proteinov v filtratih po 24, 48 in 72 urah gojenja sevov v MM+C. Koncentracija proteinov je bila pri filtratih vseh sevov najvišja pri 24 urah gojenja v MM+C. Po 48 urah gojenja je koncentracija proteinov močno padla, po 72 urah gojenja pa je pri nekaterih vzorcih še padla (vendar je bil padec v koncentraciji zelo majhen), pri ostalih pa je nekoliko narasla. Opazili smo, da so koncentracije proteinov korelirale z rastjo gliv oziroma s težami micelijev tekom gojenja v MM+C. S padcem teže micelijev je padala tudi koncentracija zunajceličnih proteinov v mediju. Menimo, da so glive v času, ko so imele na voljo še dovolj hranil, izločale številne encime za vnos in razgradnjo hranil. Ko so glive porabile ves vir energije (glukozo) in prišle v fazo stradanja, se je njihov metabolizem upočasnil, kar je vodilo v zmanjšano izločanje zunajceličnih proteinov v medij. Najnovejše raziskave so pokazale, da se z daljšim časom stradanja pojavlja vedno več praznih kompartmentov hif, hife se stanjšajo in izraščati se začnejo nove, vendar tanjše hife (na račun pridobivanja vira energije z recikliranjem starih delov znotraj hif). Biomasa se posledično manjša in sčasoma lahko (odvisno od vrste) pride do fragmentacije oz. avtolize hif (Nitsche in sod., 2012), kar je najverjetneje razlog, da se je po 72 urah pri nekaterih primerih koncentracija proteinov v filtratu povečala, biomasa pa padla. Prav tako menimo, da bi bile koncentracije proteinov v filtratih tako kot biomasa po 24-urnem gojenjem v KG še višje, vendar koncentracije proteinov v tem času nismo merili.

S primerjavo koncentracij proteinov v filtratih z nativnimi in nevtralnimi pH vrednostmi ter neobdelanih in temperaturno obdelanih filtratov nismo opazili večjih razlik. V večini primerov so bile koncentracije proteinov pri filtratih z nevtralnimi pH vrednostmi manjše, vendar so bile te razlike majhne in so lahko posledica napak pri odčitavanju. Prav tako temperaturna obdelava na 60 °C ni povzročila večje denaturacije zunajceličnih proteinov,

saj se njihova koncentracija po segrevanju ni signifikantno zmanjšala – v nekaterih primerih se je celo povečala. Slednje je prav tako najverjetneje posledica nenatančnosti pri odčitavanju koncentracij iz umeritvene krivulje.

Za razliko od rezultatov na ploščah s KA s testom hemolize na govejih eritrocitih hemolize nismo opazili pri nobenem od testiranih filtratov. Test hemolize smo izvedli tudi na ovčjih eritrocitih, kjer se je izkazalo da so bili rezultati lažno pozitivni, saj smo hemolizo iste intenzitete zaznali tudi pri enakih volumnih čistega MM+C. Kljub lažno pozitivnim rezultatom smo opazili večjo občutljivost tako ovčjih kot govejih eritrocitov.

Test hemolize smo izvedli tudi z dodano komponento B (pleurotolizin B glive *P. ostreatus*). Nekateri študije so pokazale na možnost, da so tako kot bakterijski tudi nekateri glivni hemolizini dvokomponentni citolizini. To je že dokazano za hemolitičen protein Ply glive *P. ostreatus*, ki je sestavljen iz dveh komponent, PlyA (17 kDa) in PlyB (59 kDa), potrebnih za njegovo hemolitično delovanje. Tako obstaja možnost, da bi se naj nekateri egerolizini, kot so Asp-hemolizin in homologni proteini, povezovali z večjo komponento in tvorili aktiven dvokomponenten citolizin, ki je nujen za hemolizo (Tomita in sod., 2004; Ota in sod., 2013). Na podlagi tega smo k vzorcem dodali pleurotolizin B (PlyB) in opazovali, ali bo morda induciral hemolitično aktivnost egerolizinskega partnerja. Za PlyB smo takrat vedeli, da je komponenta, ki je nujna za delovanje pleurotolizina A in tudi ostreolizina A, nismo pa vedeli, ali je komponenta navzkrižno reaktivna tudi z egerolizini drugih vrst. Prav tako smo v bazi AspGD (Arnaud in sod., 2012) poiskali gene, ortologne egerolizinom, in njihove potencialne komponente B testiranih vrst rodu *Aspergillus* (slika 34). Domnevno komponento B smo zasledili pri naslednjih sevih: *A. niger* CBS 513.88, *A. tubingensis* CBS 134.48, *A. brasiliensis* CBS 101740, *A. acidus*, *A. fumigatus*.

Kot je opisano v točki 4.2.4, smo pri filtratih vseh testiranih sevov dobili pozitivne rezultate tudi po predhodnem tretiranju mikrotitrne ploščice z BSA, vendar so kasnejše raziskave v laboratoriju pokazale, da je bila PlyB kontaminirana z minimalnimi količinami PlyA, kar je bil vzrok za pozitivne rezultate. Prišli smo do zaključka, da so bili rezultati lažno pozitivni, zaradi česar prisotnosti dvokomponentnih citolizinov in navzkrižne reaktivnosti komponente B nismo mogli potrditi.

5.3.2 Hemolitična aktivnost vodnih ekstraktov micelijev

Pred testom hemolize smo izmerili koncentracijo proteinov v vodnih ekstraktih micelijev. Koncentracije proteinov so bile v primerjavi s koncentracijami proteinov v filtratih večje. Najvišje koncentracije smo zaznali pri dveh sevih *A. niger* CBS 513.88 in *A. oryzae* Rib40, najmanjše koncentracije pa pri sevu *A. terreus* NIH2624. Razlike med koncentracijami so pričakovane, saj je znano, da se koncentracije med vrstami istega rodu lahko razlikujejo. Koncentracije proteinov v miceliju so se s časom gojenja spreminjale. Najmanjše koncentracije smo namerili po 24 urah gojenja v MM+C. Po 48 urah so te močno narasle in nato po 72 urah gojenja pri treh sevih nekoliko padle, pri dveh pa narasle. Menimo, da je povečanje koncentracije zunajceličnih proteinov posledica pridobivanja endogenega ogljika z recikliranjem starih delov micelija, zaradi pomanjkanja glukoze (avtofagija). K dodatnemu povečanju proteinov po treh dneh je pa najverjetneje doprinesla tudi fragmentacija hif oz. avtoliza.

Turbidimetrični test hemolize je bil pri vseh testiranih vodnih ekstraktih micelijev, tako na govejih kot na ovčjih eritrocitih, negativen. Tudi pri teh vzorcih smo iz enakih razlogov kot pri filtratih (glej točko 5.1.3.1) k vzorcem dodali komponento B (PlyB). Dobili smo pozitivne rezultate, vendar je bil tudi tukaj razlog zanje kontaminacija komponente B z minimalnimi koncentracijami komponente A.

5.3.3 Hemolitična aktivnost etanolnih ekstraktov micelijev

Hemolizo etanolnih ekstraktov smo zaznali tako na ploščah s krvnim agarjem kot s testom hemolize. Hemolitično aktivnost na KA so izkazovali etanolni ekstrakti micelijev vseh 16 testiranih sevov (gojeni v MM+C 48 in 72 ur), vendar je bila hemoliza prisotna tudi, kadar smo v KA vcepili samo čisti 96% etanol. Zaradi tega smo sklepali, da gre za lažno pozitivne rezultate.

Hemolitično aktivnost smo s turbidimetričnim testom hemolize zaznali pri etanolnih ekstraktih 11 sevov (od skupno 16 testiranih sevov), in sicer pri etanolnih ekstraktih sevov *A. versicolor* CBS 795.97, *A. brasiliensis* CBS101740, *A. sydowii* CBS 593.65, *A. nidulans* FGSCA4, *A. aculeatus* CBS 172.66, *A. terreus* NIH2624, *A. clavatus* CBS513.65, *A. oryzae* Rib40, *N. fischeri* CBS 544.65, *A. niger* CBS 113.46, ki smo jih v MM+C gojili

48 in 72 ur, ter pri ekstraktih sevov *A. niger* CBS 513.88 in *A. niger* N402, ki smo ju v MM+C gojili 48 ur. Za razliko od plošč s KA pa hemolize pri čistem 96 % etanolu s testom hemolize nismo zaznali. Glede na rezultate smo sklepali, da etanol, ki smo ga dodajali k ekstraktom micelija, ni vplival na HA vzorcev, ki smo jo izmerili s hemolitičnim testom, saj bi v tem primeru HA zaznali pri vseh vzorcih. Zakaj je do hemolize prišlo na KA, ni čisto jasno. Vse kaže na to, da je vcepljanje/nacepljanje v/na KA veliko bolj občutljiva metoda, saj smo s to metodo HA zaznali tudi pri filtratih, medtem ko je s testom hemolize nismo.

Z določitvijo koncentracije suhe organske snovi pri različnih volumnih etanolnih ekstraktov smo pri vseh hemolitičnih vzorcih opazili, da večji, kot je bil volumen ekstrakta, večja je bila koncentracija organske snovi v ekstraktu, čas, ki je bil potreben za 50-odstotno hemolizo, pa krajši. Ker je z večanjem volumna oz. z večanjem koncentracije organske snovi do hemolize prišlo hitreje, smo potrdili, da je hemoliza posledica prisotnosti neke organske hemolitične učinkovine v vzorcih.

Pri večini sevov (9 od 11) čas gojenja v MM gojišču ni imel vpliva na hemolizo etanolnih ekstraktov, saj smo HA zaznali pri ekstraktih sevov, ki smo jih v MM+C gojili tako 48 kot 72 ur. Izjema sta bila seva *A. niger* N402 in *A. niger* CBS 513.88, ki smo jih gojili 48 ur, saj smo HA aktivnost zaznali samo pri teh ekstraktih in ne pri ekstraktih sevov, ki smo ju gojili 72 ur. Smo pa opazili, da čas gojenja vpliva na koncentracijo organske snovi. Če ne upoštevamo sevov *A. niger* N402 in *A. niger* CBS 513.88, kjer smo HA zaznali samo pri ekstraktih sevov, ki smo ju v MM+C gojili 48 ur, smo opazili, da je bila pri večini primerov (6 od 9) večja koncentracija organske snovi prisotna v etanolnih ekstraktih sevov, ki smo jih v MM+C gojili 48 ur. Tudi če je ekstrakt vseboval višje koncentracije organske snovi od ekstrakta istega seva, ki smo ga gojili manj ali dlje časa, pa do 50-odstotne hemolize ni vedno prišlo hitreje. Vse kaže na to, da je čas gojenja vplival na koncentracijo organske snovi, ne pa na koncentracijo hemolitične učinkovine v vzorcu in s tem na hemolizo.

Etanolne ekstrakte so nadalje testirali z LC-MS (tekočinska kromatografija sklopljena z masno spektroskopijo) in ugotovili, da so vzorci vsebovali velike količine polinenasičenih maščobnih kislin, ki bi lahko bile odgovorne za hemolitično aktivnost naših vzorcev. O

hemolitični aktivnosti etanolnih ekstraktov so poročali tudi Botić in sod. (2011), ki so v etanolnih ekstraktih kserotolerantne glive *Wallemia sebi*, z GC-MS (plinska kromatografija sklopljena z masno spektroskopijo) prav tako zaznali prisotnost sterolov in nenasičenih maščobnih kislin, med katerimi sta prevladovali linolna in oleinska kislina. Vpletenosti maščobnih kislin pri lizi eritrocitov so opazili tudi pri ekstraktih morskih gliv in ostalih morskih organizmih kot so alge, dinoflagelati, morska trava in ribe. Menijo da je povečana vsebnost nenasičenih maščobnih kislin v halofilnih glivah posledica prilagoditve na okolje z visoko slanostjo. Pri *W. sebi* so opazili, da se je z povečanjem slanosti povečala tudi hemolitična aktivnost ekstraktov (Botić in sod., 2011).

Glede na dobljene rezultate bi lahko organska snov, prisotna v etanolnih ekstraktih, igrala pomembno vlogo pri nastanku kožnih in pljučnih lezij, ki so posledice okužb z glivami rodu *Aspergillus*. Ali so polinenasičene maščobne kisline v etanolnih ekstraktih testiranih gliv rodu *Aspergillus* res odgovorne za lizo eritrocitov in vpletene v razvoj aspergiloz je vprašanje, ki bi lahko bilo izhodišče nadaljnjih raziskav.

6 REZULTATI GOJENJA GLIV V MINIMALNEM GOJIŠČU BREZ DODANEGA VIRA OGLJIKA (Magistrsko delo Saše Režonja)

6.1 GOJENJE SEVOV RODU *ASPERGILLUS*

6.1.1 Rast sevov na trdem gojišču z MBFA

Sklicujem se na rezultate, pridobljene v okviru magistrskega dela Nine Sluga.

6.1.2 Rast sevov na ploščah s krvnim agarjem in posnetim mlekom

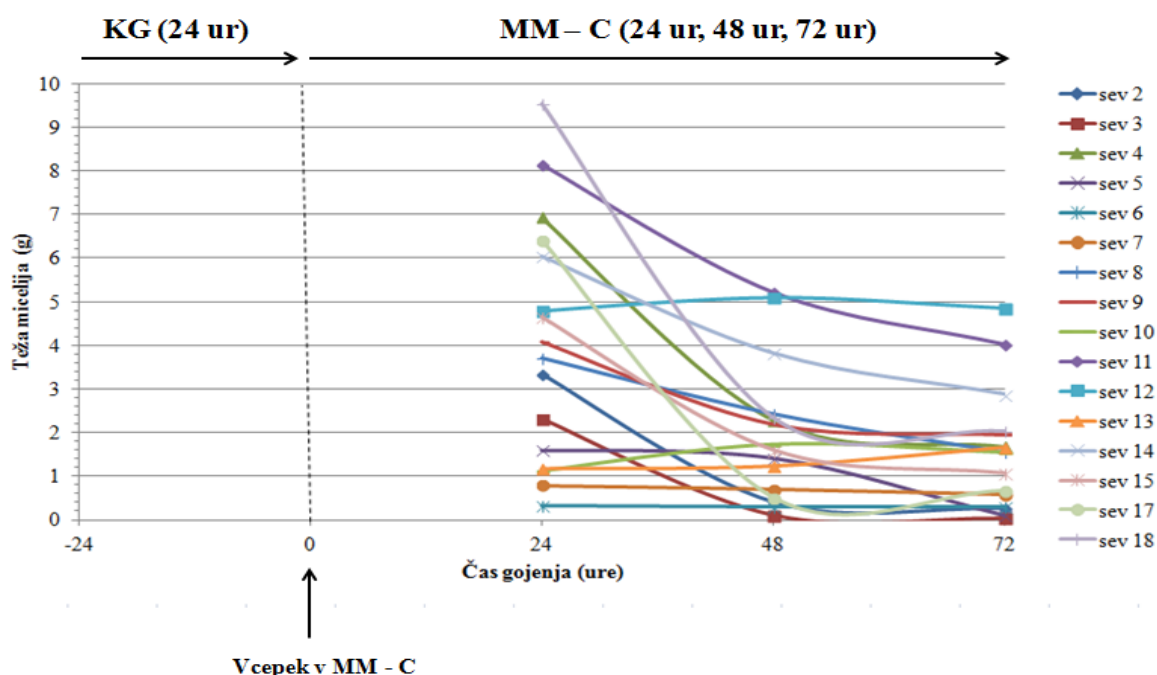
Sklicujem se na rezultate, pridobljene v okviru magistrskega dela Nine Sluga.

6.1.3 Gojenje v tekočem minimalnem gojišču brez glukoze

Izbrane glive rodu *Aspergillus* smo po 24-urni inkubaciji v KG precepili v MM brez dodane glukoze, v katerem so se sevi, ki smo jih gojili prvič, inkubirali 24 ur, sevi drugega in tretjega gojenja pa 48 ter 72 ur, pri enakih pogojih kot v KG (30 °C, 180 obratov). Ves čas gojenja so se erlenmajerice s vcepljenimi gojišči stresale ločeno na stresalniku. Po inkubaciji v MM-C smo za posamezni sev s filtracijo ločili micelij od gojišča in nato izmerili nativni pH gojišča ter določili težo micelija, da bi ugotovili, kako je čas gojenja vplival na rast gliv in pH vrednost gojišča oz. filtrata. Filtrate ter micelije smo shranili in jih uporabili pri nadaljnjem delu za ugotavljanje prisotnosti hemolitične učinkovine v vzorcih filtratov/gojišč ter vodnih in etanolnih ekstraktov micelijev (vcepljanje v plošče s KA in PM - glej 3.2.6, hemolitični test - glej 3.2.7 in 3.2.8).

6.1.3.1 Teža micelijev in pH vrednosti gojišč

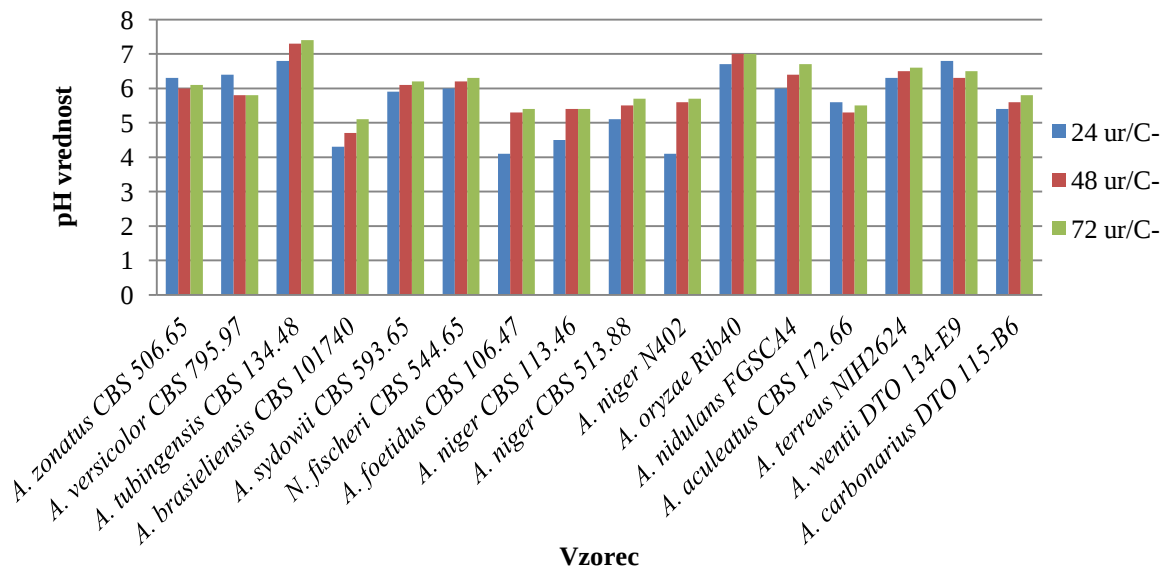
Rezultati s težami micelijev in pH vrednostjo gojišč so prikazani v prilogi A2 ter na sliki 34. Težo micelija po 24 urah gojenja (prvo gojenje sevov) smo primerjali s težo po 48 in 72 urah (drugo in tretje gojenje sevov) ter ugotovili, da je bila pri večini sevov teža največja po 24 urah, manjša po 48 in najmanjša po 72 urah, kar pomeni, da je z daljšim časom gojenja upadala. Najslabšo rast smo opazili pri glivi *A. sydowii* CBS 593.65, kjer smo po vseh treh časih gojenja dobili zelo majhne vrednosti micelijev. Obstajajo izjeme, kjer je bila teža micelija po 24 urah manjša v primerjavi s težo po daljšem času gojenja (sev *A. oryzae* Rib40 – le pri primerjanju prvega s tretjim gojenjem, sev *A. nidulans* FGSCA4 in sev *A. niger* CBS 513.88), ter izjeme, kjer je bila teža po 48 urah manjša, kot po 72 urah (sev *A. nidulans* FGSCA4 in sev *A. wentii* DTO 134-E9).



Slika 34: Prikaz teže micelijev za seve po prvem in tretjem gojenju, glede na čas gojenja. KG (24 ur) – čas gojenja gliv v kompletnem gojišču; MM-C (24 ur, 48 ur, 72 ur) – čas gojenja gliv v minimalnem gojišču brez glukoze. Legenda: Sev 2 – *A. zonatus* CBS 506.65; sev 3 – *A. versicolor* CBS 795.97; sev 4 – *A. tubingensis* CBS 134.48; sev 5 – *A. brasiliensis* CBS 101740; sev 6 – *A. sydowii* CBS 593.65; sev 7 – *N. fischeri* CBS 544.65; sev 8 – *A. foetidus* CBS 106.47; sev 9 – *A. niger* CBS 113.46; sev 10 – *A. niger* CBS 513.88; sev 11 – *A. niger* N402; sev 12 – *A. oryzae* Rib40; sev 13 – *A. nidulans* FGSCA4; sev 14 – *A. aculeatus* CBS 172.66; sev 15 – *A. terreus* NIH2624; sev 17 – *A. wentii* DTO 134-E9; sev 18 – *A. carbonarius* DTO 115-B6.

Slika 35 prikazuje pH vrednosti filtratov, ki so se pri večini sevov z daljšim časom gojenja povečevale. Izjemo predstavljajo filtrati štirih sevov (sevi *A. zonatus* CBS 506.65, *A. versicolor* CBS 795.97, *A. aculeatus* CBS 172.66 in *A. wentii* DTO 134-E9), kjer je bila pH vrednost po 24 urah višja kot po daljših časih gojenja. Pri večini gliv je po 24 urah gojenja v MM-C prevladoval nižji pH kot po daljših časih gojenja in se je gibal od 4,1 do 6,8. Po daljšem času gojenja (48 in 72 ur) so se pH vrednosti gibale med 4,7 ter 7,4 in so bile večinoma malo višje po 72 urah. Pri dveh sevih se je pH gojišč po vseh treh časih gojenja gibal okoli nevtralnih vrednosti (seva *A. tubingensis* CBS 134.48 in *A. oryzae* Rib 40), medtem, ko so pH vrednosti pri vseh ostalih sevih bile kisle oziroma pod 7. Glede na ugotovitve Sakaguchi in sod. (1975) ter Berne in sod. (2005), so egerolizini stabilni v širokem pH območju (v glavnem od 4 do 10), izmerjen pH gojišč pa v nobenem primeru ni bil manjši od 4 ali višji od 10, zato smo pričakovali, da jih bomo pri nadaljnjem delu detektirali.

Rezultati so pokazali, da čas gojenja vpliva na rast in s tem na težo micelija ter tudi na pH gojišča.



Slika 35: pH vrednosti filtratov gliv, gojenih 24, 48 in 72 ur v minimalnem gojišču brez glukoze. 24 ur/48 ur/72 ur – čas gojenja v MM-C; MM-C – minimalni medij brez glukoze.

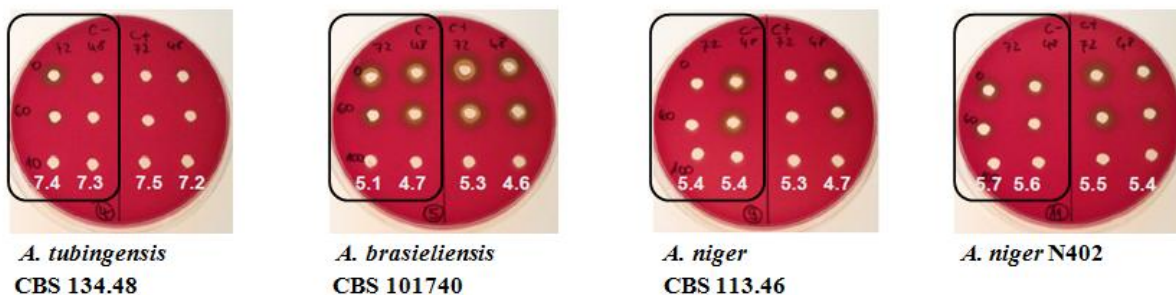
6.2 REZULTATI ANALIZE FILTRATOV

6.2.1 Rezultati hemolize na ploščah s krvnim agarjem

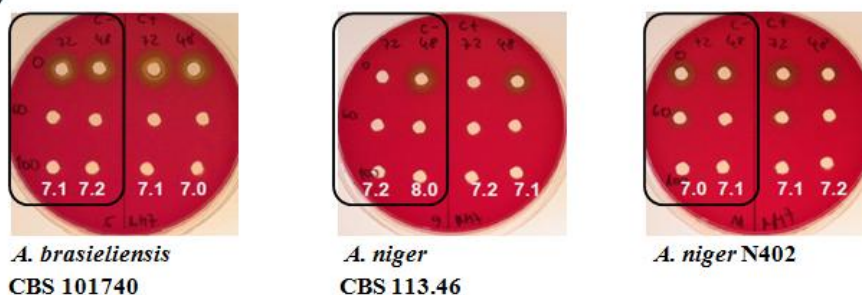
Na krvnem agarju smo testirali vcepljene filtrate 16 sevov (tretje gojenje sevov), brez filtratov gliv *A. glaucus* (teleomorf *Eurotium herbariorum* CBS 516.65) in *A. clavatus* CBS 513.65, ki že na ploščah z MBFA nista zrasla. Pri kontrolnem testiranju za ugotavljanje, ali bi lahko bila morebitna hemoliza oz. proteoliza na ploščah s KA in PM posledica aktivnosti MM-C ali eritrocitnega pufra 2, smo opazili, da so bili rezultati na ploščah negativni. Sklepali smo, da lahko morebitni pojav hemolize oz. proteolize na ploščah pripišemo biološkim učinkovinam v samih vzorcih filtratov. Testirali smo temperaturno neobdelane (0 °C) in temperaturno obdelane (na 60 °C in 100 °C) filtrate z nativno in umerjeno pH vrednostjo. Zanimala nas je prisotnost hemolizinov oz. egerolizinov, zato smo vzorce segrevali, saj so egerolizini temperaturno stabilni do temperature 60 ali 65 °C (Nayak in sod., 2013), medtem, ko ostali proteini pri 60 °C denaturirajo. Vzorci, obdelani na 100 °C so predstavljali negativno kontrolo, pri kateri ne bi smelo priti do hemolize. Hemolitično aktivnost na KA smo opazili pri filtratih štirih od skupno 16 testiranih sevov (sevi *A. tubingensis* CBS 134.48, *A. brasiliensis* CBS 101740,

A. niger CBS 113.46 in *A. niger* N402), kot pojav rumenozelene cone okoli vcepka (delna ali α - hemoliza).

A)



B)



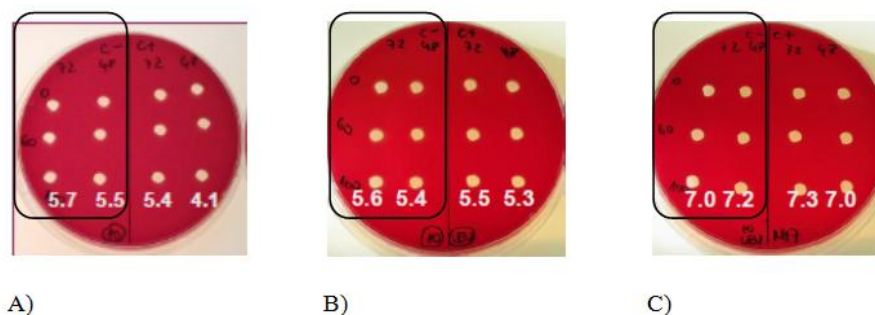
Slika 36: Filtrati štirih sevov rodu *Aspergillus* na ploščah s krvnim agarjem. Z okvirjem so označeni filtrati gliv, gojenih 48 ur (drugi stolpec) in 72 ur (prvi stolpec) v MM-C. Prva vrstica – neobdelani filtrati (0 °C); druga vrstica – filtrati po 15-minutnem segrevanju na 60 °C; tretja vrstica – filtrati po 15-minutnem segrevanju na 100 °C. A) Vzorci z nativno pH vrednostjo; B) Vzorci z uravnano pH vrednostjo. Plošča z vzorci glive *A. tubingensis* manjka, ker je bil pH filtratov enak kot v točki A.

Pri filtratih z nativno pH vrednostjo smo opazili hemolizo tako pri neobdelanih kot tudi pri obdelanih vzorcih (na 60 °C), vendar po različnih časih gojenja, kar je verjetno odvisno od različnega časovnega izražanja hemolitične učinkovine pri posamezni vrsti glive. Pri vzorcih sevov *A. brasiliensis* CBS 101740 in *A. niger* N402 se je pojavila v primeru obeh časov gojenja (72 in 48 ur), pri sevu *A. tubingensis* CBS 134.48 samo po 72 urah in pri sevu *A. niger* CBS 113.46 samo po 48 urah. Segrevanje filtratov na 60 °C za 15 minut ni uničilo HA filtratov z nativno (kislo) pH vrednostjo (slika 36 A).

Pri filtratih z umerjeno pH vrednostjo smo opazili hemolizo samo pri temperaturno neobdelanih vzorcih, v dveh primerih (seva *A. niger* N402 in *A. tubingensis* CBS 134.48) pa tudi po obdelavi na 60 °C. S termično obdelavo vzorcev na 60 °C za 15 minut, smo večinoma uničili HA filtratov z umerjeno (nevtralno) pH vrednostjo (slika 36 B).

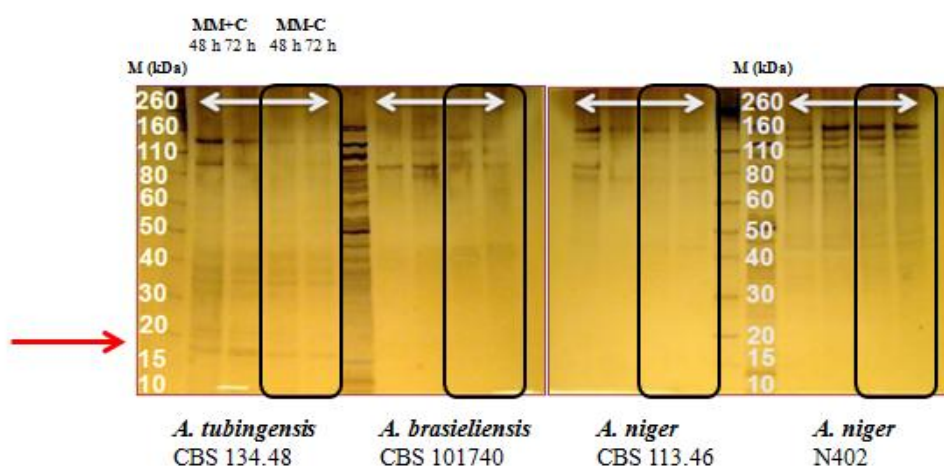
S kuhanjem filtratov (100 °C) za 15 minut smo popolnoma uničili HA filtratov z nativno in umerjeno pH vrednostjo (Slika 36 A in B).

Do hemolize ni prišlo le pri vzorcih enega izmed treh sevov *A. niger*, in sicer pri filtratih glive *A. niger* CBS 513.88. Gre za industrijski sev z večkratnimi mutacijami, med drugim tudi z mutacijo gena za sintezo levцина. Iz tega razloga smo v medij dodali levцин in nikotinamid, da bi preverili, ali bi lahko to bil vzrok hemolitične neaktivnosti filtratov. Kljub dodatku levцина in nikotinamida so rezultati bili negativni (slika 37).



Slika 37: Plošče s krvnim agarjem za filtrate seva *A. niger* CBS 513.88. Z okvirjem so označeni filtrati glive, gojene 48 ur (drugi stolpec) in 72 ur (prvi stolpec) v MM-C. Prva vrstica – neobdelani filtrati (0 °C); druga vrstica – filtrati po 15-minutnem segrevanju na 60 °C; tretja vrstica – filtrati po 15-minutnem segrevanju na 100 °C. A) Vzorci z nativno pH vrednostjo; B) Vzorci z nativno pH vrednostjo ter dodatkom levцина in nikotinamida v medij; C) Vzorci z umerjeno pH vrednostjo in dodatkom levцина ter nikotinamida v medij.

V laboratoriju so za hemolitično aktivne filtrate prej omenjenih sevov, ki so na KA izkazovali HA, s pomočjo PAGE elektroforeze preverili prisotnost iskanih hemolitičnih proteinov (egerolizinov) v velikosti od 15 do 20 kDa (Nayak in sod., 2013). Rezultati so bili negativni, saj proteinska analiza ni pokazala pričakovane velikosti proteinskih fragmentov, značilnih za egerolizinsko družino (slika 38).

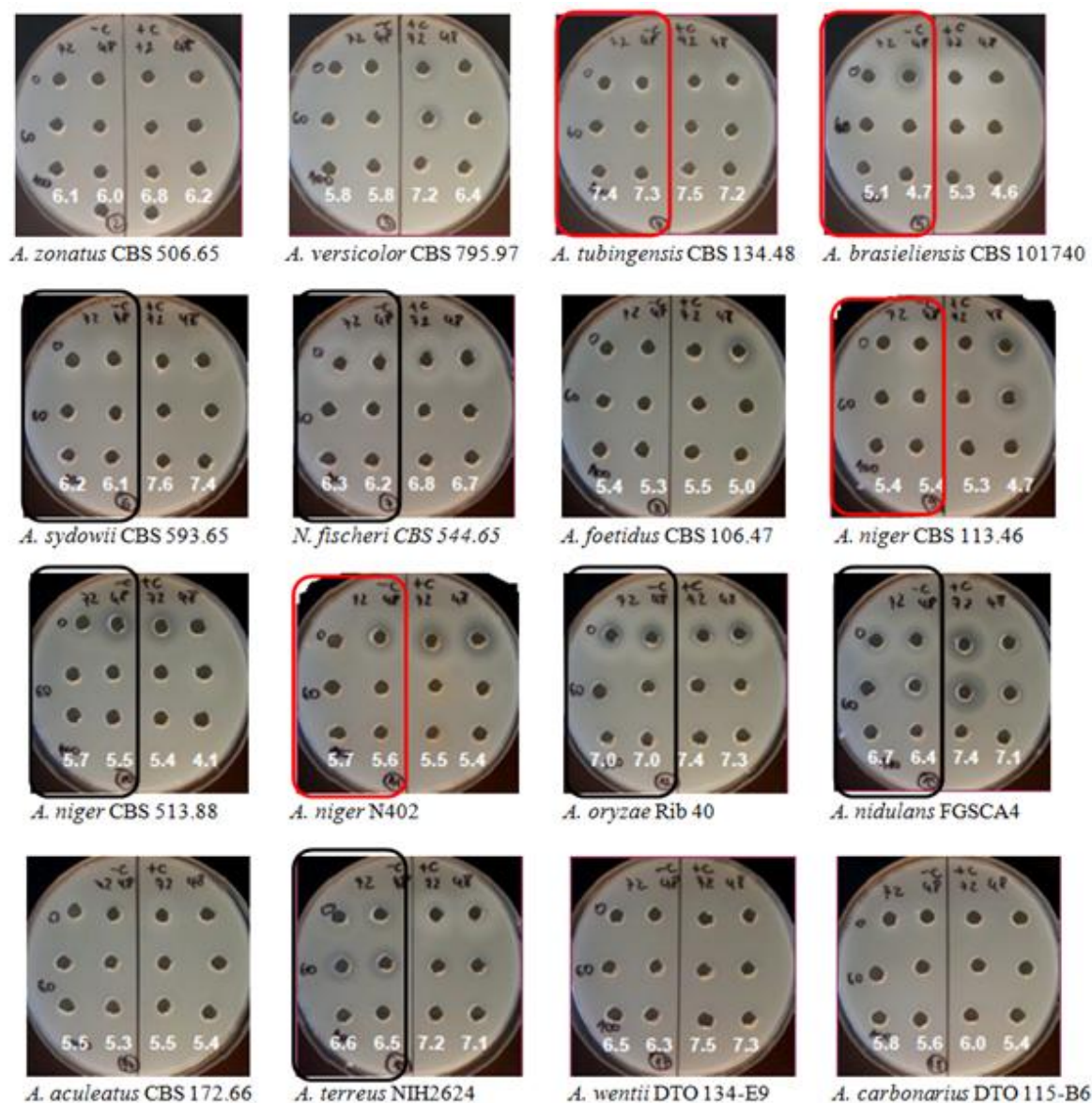


Slika 38: Poliakrilamidna gelska elektroforeza za filtrate sevov, ki so na krvnem agarju pokazali hemolitično aktivnost. Za detekcijo proteinov v gelu je bila uporabljena tehnika barvanja s srebrom. M (kDa) – proteinski markerji; MM+C- minimalno gojišče z glukozo; MM-C – minimalno gojišče brez glukoze. Z okvirjem so označeni filtrati gliv, gojenih 48 in 72 ur v MM-C, rdeča puščica pa označuje pričakovano velikost proteinov.

6.2.2 Rezultati proteolize na ploščah s posnetim mlekom

Filtrate sevov tretjega gojenja, ki smo jih vcepljali v KA, smo vcepljali tudi v plošče s PM, da bi spremljali proteolizo (bistro ali motno cono) okoli vcepka (slika 39). Testirali smo samo filtrate z nativno pH vrednostjo. Z vcepljanjem v plošče s PM smo želeli preveriti, ali je bila hemoliza s filtrati na KA posledica hemolitičnih učinkovin ali pa so zanjo odgovorni proteolitični encimi. Proteolitično aktivni so bili filtratih vseh štirih sevov (sevi *A. tubingensis* CBS 134.48, *A. brasiliensis* CBS 101740, *A. niger* CBS 113.46 in *A. niger* N402), pri katerih smo predhodno opazili tudi HA na KA. Vzorec proteolize se je razlikoval od vzorca hemolize na KA, saj smo na vseh štirih ploščah opazili cone proteolize le pri neobdelanih filtratih (0 °C) in pri enakih ali drugačnih časih gojenja, kot pri hemolizi na KA. Pri vzorcu glive *A. tubingensis* CBS 134.48 in glive *A. niger* CBS 113.46 smo opazili motno cono po 48 urah gojenja, v primeru filtrata glive *A. brasiliensis* CBS 101740 se je pojavila bistra cona po obeh časih (48 ter 72 ur), pri filtratu glive *A. niger* N402 pa smo bistro cono zaznali po 48 urah gojenja. Proteolitični so bili tudi filtrati večine ostalih sevov, pri katerih HA na KA predhodno nismo zasledili. Taki so bili filtrati sevov *A. sydowii* CBS 593.65, *N. fischeri* CBS 544.65, *A. niger* CBS 513.88, *A. oryzae* Rib 40, *A. nidulans* FGSCA4 in *A. terreus* NIH2624. Pri vseh naštetih so se pojavile cone samo pri neobdelanih filtratih (0 °C) in po obeh časih gojenja (48 ter 72 ur), pri filtratih dveh sevov (seva *A. nidulans* FGSCA4 in *A. terreus* NIH 2624) pa smo cono proteolize zasledili tudi po obdelavi na 60 °C. Pri šestih sevih (sevi *A. zonatus* CBS 506.65, *A. versicolor* CBS 795.97, *A. foetidus* CBS 106.47, *A. aculeatus* CBS 172.66, *A. wentii* DTO 134-E9, *A. carbonarius* DTO 115-B6) nismo zaznali niti hemolize na KA, niti proteolize na PM.

Ugotovili smo, da 15-minutno segrevanje pri 60 °C ni popolnoma uničilo proteolitične aktivnosti filtratov z nativno pH vrednostjo, s segrevanjem na 100 °C pa smo proteolitično aktivnost filtratov popolnoma uničili.

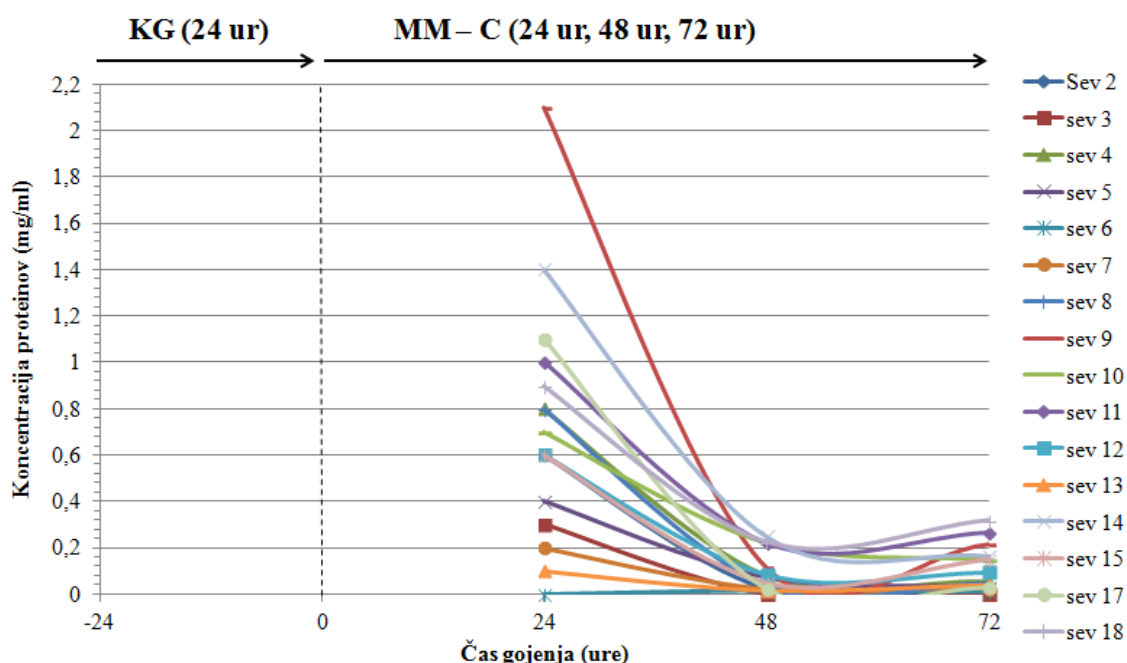


Slika 39: Plošče s posnetim mlekom za filtrate (z nativno pH vrednostjo) testiranih 16 sevov rodu *Aspergillus*. Prikazani so filtrati gliv, gojenih 48 ur (drugi stolpec) in 72 ur (prvi stolpec) v MM-C. Prva vrstica – neobdelani filtrati (0 °C); druga vrstica – filtrati po 15-minutnem segrevanju na 60 °C; tretja vrstica – filtrati po 15-minutnem segrevanju na 100 °C. Z rdečim okvirjem so označeni filtrati sevov, ki so predhodno na krvnem agarju povzročili hemolizo, s črnim okvirjem pa filtrati sevov, ki so pokazali proteolitično aktivnost, ne pa tudi hemolitično aktivnost na krvnem agarju.

6.2.3 Rezultati merjenja koncentracije proteinov

Določali smo koncentracije proteinov v vzorcih filtratov po vseh treh gojenjih sevov. Pri testu smo uporabili samo vzorce, ki niso bili termično obdelani na 100 °C. Rezultati s koncentracijami proteinov v filtratih so prikazani v prilogi B2 ter na sliki 40.

Primerjali smo koncentracije proteinov v filtratih sevov prvega in tretjega gojenja, da bi ugotovili, kako se količina proteinov spreminja glede na čas gojenja. Ugotovili smo, da je bila koncentracija povsod največja po 24 urah in manjša po daljših časih gojenja v MM-C. Pri več kot polovici sevov je bila količina proteinov v filtratih po 72 urah večja kot po 48 urah gojenja. Pri manjšem številu sevov so bile koncentracije najvišje po 24 urah, manjše po 48 ter najmanjše po 72 urah gojenja. Izstopala sta dva seva (seva *A. sydowii* CBS 593.65 in *A. versicolor* CBS 795.97), kjer so bile koncentracije po vseh treh časih zelo nizke, blizu nič.



Slika 40: Prikaz koncentracije proteinov (mg/ml) v filtratih sevov prvega in tretjega gojenja, po različnem času gojenja. KG (24 ur) – čas gojenja v kompletnem gojišču; MM-C (24 ur; 48 ur; 72 ur) – čas gojenja v minimalnem mediju brez glukoze. Legenda: Sev 2 – *A. zonatus* CBS 506.65; sev 3 – *A. versicolor* CBS 795.97; sev 4 – *A. tubingensis* CBS 134.48; sev 5 – *A. brasiliensis* CBS 101740; sev 6 – *A. sydowii* CBS 593.65; sev 7 – *N. fischeri* CBS 544.65; sev 8 – *A. foetidus* CBS 106.47; sev 9 – *A. niger* CBS 113.46; sev 10 – *A. niger* CBS 513.88; sev 11 – *A. niger* N402; sev 12 – *A. oryzae* Rib40; sev 13 – *A. nidulans* FGSCA4; sev 14 – *A. aculeatus* CBS 172.66; sev 15 – *A. terreus* NIH2624; sev 17 – *A. wentii* DTO 134-E9; sev 18 – *A. carbonarius* DTO 115-B6.

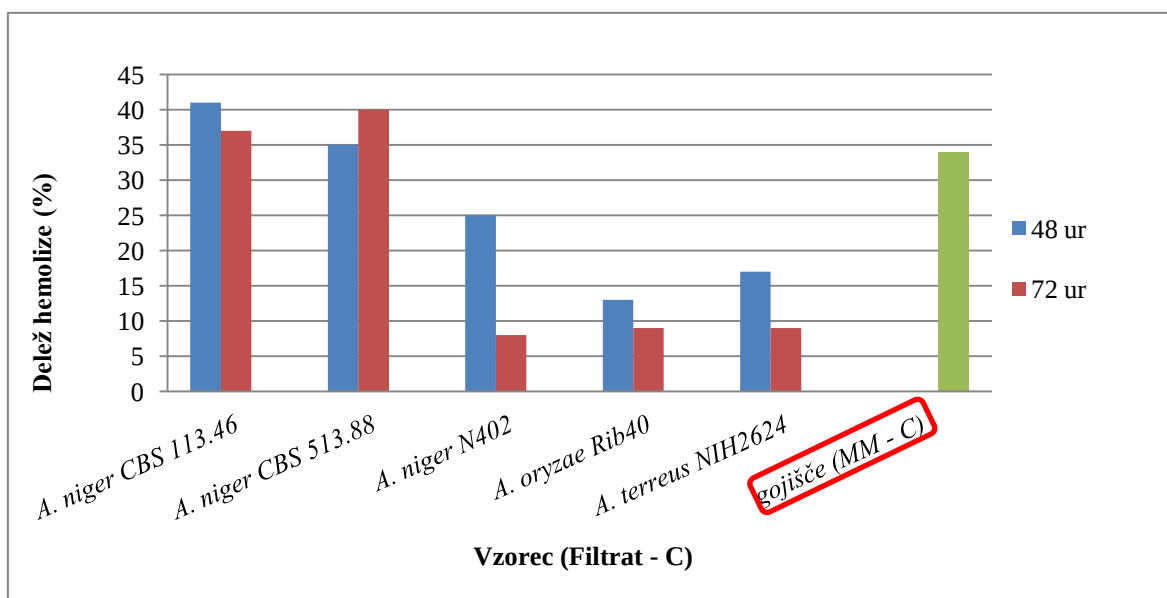
Z merjenjem koncentracije proteinov v filtratih sevov drugega gojenja smo želeli ugotoviti, kako na koncentracijo proteinov vpliva temperaturna obdelava in pH vrednost gojišča. Pri vseh vzorcih, razen pri sevu *A. niger* CBS 113.46, je ne glede na pH vrednost in temperaturno obdelavo bila koncentracija proteinov večja po 72 kot po 48 urah gojenja, kar so pokazali tudi rezultati večine vzorcev tretjega gojenja (ob primerjavi s prvim gojenjem

sefov). Nismo opazili povezave med temperaturo in koncentracijo proteinov, saj so bile ponekod koncentracije vzorcev, obdelanih na 60 °C, celo večje kot pri neobdelanih vzorcih. Prav tako glede na rezultate nismo zaznali, da bi kislina ali nevtralna pH vrednost vplivala na koncentracijo proteinov. Temperatura obdelave in pH vrednost gojišča očitno ne vplivata na koncentracijo proteinov v vzorcih, medtem ko čas gojenja vpliva.

6.2.4 Rezultati hemolitičnega testa

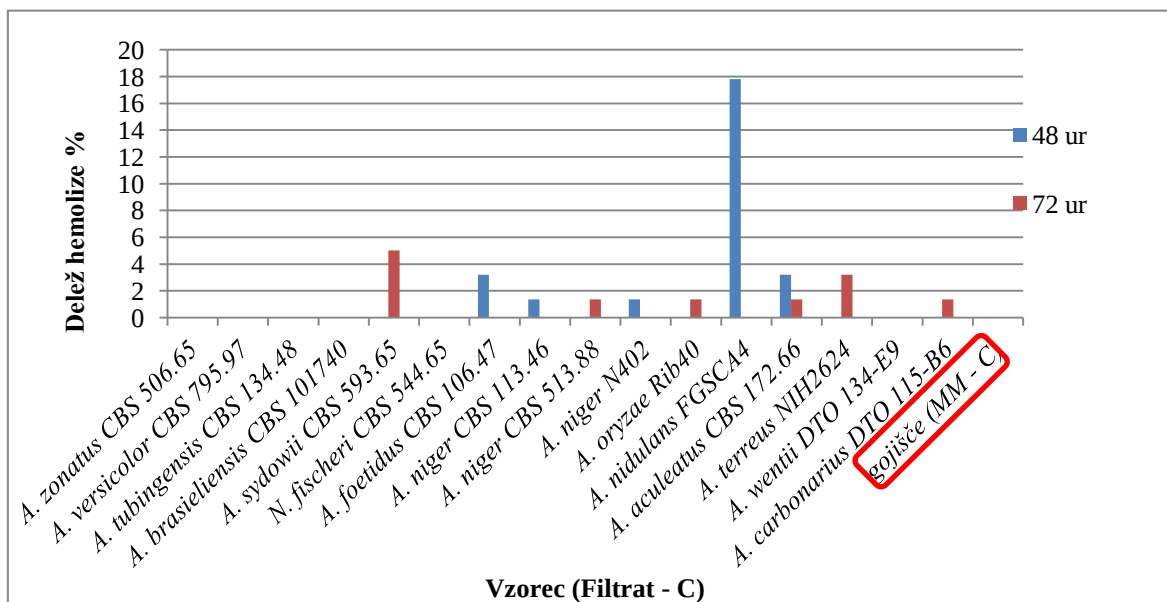
Testirali smo hemolitično aktivnost filtratov po vseh treh gojenjih sevov. Filtrate, pridobljene po prvem in tretjem gojenju, smo testirali na govejih eritrocitih, filtrate po drugem gojenju pa na ovčjih eritrocitih.

Na ovčjih eritrocitih smo testirali filtrate, ki so bili temperaturno neobdelani ter temperaturno obdelani (na 60 °C in 100 °C), z nativno in nevtralno pH vrednostjo, ter pri testiranju dobili pozitivne rezultate. Slika 41 prikazuje, da so bili rezultati hemolitičnega testa lažno pozitivni in je tako HA na ovčjih eritrocitih bila posledica vpliva čistega MM-C, ne pa hemolitičnih učinkovin v samih vzorcih. Posledično nismo mogli ugotoviti, kako bi čas gojenja, temperaturna obdelava in pH vrednost lahko vplivali na hemolizo.



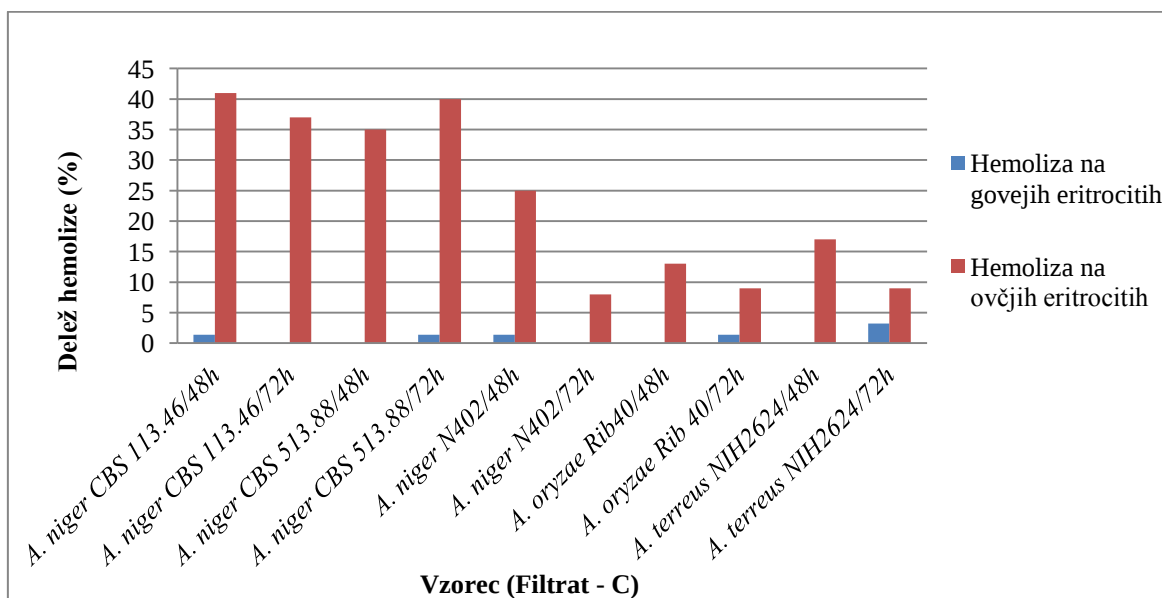
Slika 41: Delež hemolize s filtrati sevov drugega gojenja na ovčjih eritrocitih. Graf prikazuje temperaturno neobdelane filtrate z nativno pH vrednostjo. 48 ur/72 ur – čas gojenja v minimalnem gojišču brez glukoze; gojišče MM-C – čisto minimalno gojišče brez glukoze.

Na govejih eritrocitih smo testirali filtrate sevov tretjega gojenja, ki so bili temperaturno neobdelani (0 °C) in z nativno pH vrednostjo. Gojišče (MM-C) v tem primeru ni izkazovalo hemolitične aktivnosti, filtrati testiranih sevov pa so bili večinoma negativni, le pri nekaterih se je pokazala nizka hemoliza (slika 42).



Slika 42: Delež hemolize s filtrati sevov tretjega gojenja na govejih eritrocitih. Graf prikazuje temperaturno neobdelane filtrate z nativno pH vrednostjo. 48 ur/72 ur – čas gojenja v minimalnem gojišču brez glukoze; gojišče MM-C – čisto minimalno gojišče brez glukoze.

Zanimala nas je razlika v občutljivosti govejih in ovčjih eritrocitov, pri čemer smo primerjali HA filtratov (neobdelanih, z nativno pH vrednostjo) petih sevov drugega z enakimi petimi sevi tretjega gojenja. Kljub lažno pozitivnim rezultatom na ovčjih eritrocitih smo ugotovili, da so le ti bolj občutljivi na učinkovine, prisotne v filtratih in MM-C, v primerjavi z govejimi eritrociti (slika 43).



Slika 43: Primerjava hemolize s filtrati petih sevov drugega in tretjega gojenja na govejih in ovčjih eritrocitih. Graf prikazuje temperaturno neobdelane filtrate z nativno pH vrednostjo. 48 ur/72 ur – čas gojenja v minimalnem gojišču brez glukoze.

Filtrate, pridobljene po prvem gojenju sevov smo uporabili za testiranje HA brez in z dodano komponento B (pleurotolizin B) na govejih eritrocitih. Testirali smo neobdelane vzorce in vzorce, obdelane na 100 °C (kjer smo pričakovali negativne rezultate). Kadar vzorcem nismo dodali komponente B, so se rezultati hemolitičnega testa izkazali za negativne. Pri izvedbi testa hemolize z dodano komponento B pa smo dobili pozitivne rezultate pri vseh testiranih vzorcih in tudi kontroli (eritrocitni pufer 1). Predvidevali smo, da je prišlo do hemolize zaradi samega delovanja komponente B in ne dvokomponentnega hemolizina. Da bi to potrdili, smo testirali le filtrate štirih sevov (sevi *A. niger* CBS 113.46, *A. niger* CBS 513.88, *A. niger* N402 in *A. terreus* NIH2624), kjer so s predhodnimi raziskavami že identificirali hemolizine (Arnaud in sod., 2012; Nayak in sod., 2013). V luknjice na mikrotitrski plošči smo dali različne volumne vzorca (0, 5, 10, 20, 25 in 50 µl) ter ustrezen volumen pufra, kot kontrolo pa različne koncentracije BSA. V vseh primerih smo dodali še enako količino (40 µl) mešanice (pufra s komponento B). Dobili smo pozitivne rezultate pri vseh vzorcih ter kontroli in opazili podoben potek krivulje pri vseh testiranih filtratih, kjer je z večanjem koncentracije vzorca prišlo do hemolize prej. Glede na to, da se komponenta A lahko veže na stene luknjic, komponenta B pa ostane prosta v raztopini in povzroča hemolizo, smo po enakem postopku ponovno testirali filtrate enakih štirih sevov, vendar smo pred testiranjem luknjice najprej tretirali z BSA in tako

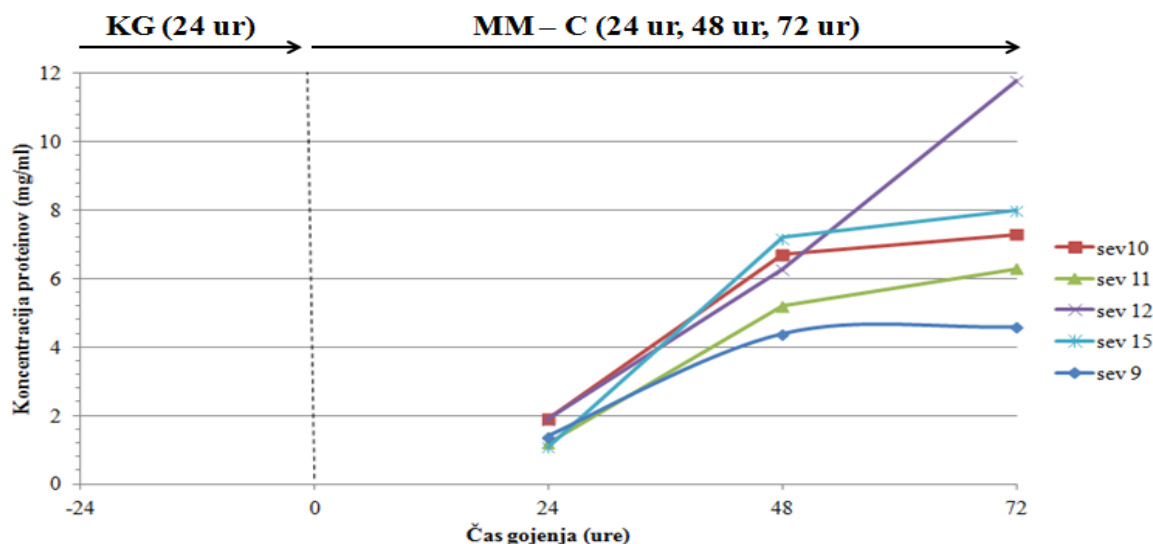
onemogočili zlepljanje proteinov na stene. Tudi v tem primeru so bili rezultati testa pozitivni, krivulje pa so bile pri vseh vzorcih podobne. Prišli smo do zaključka, da so bili rezultati merjenja lažno pozitivni in tako posledica delovanja same komponente B v raztopini, ne pa hemolitičnih učinkovin v vzorcih filtratov.

6.3 REZULTATI ANALIZE VODNIH EKSTRAKTOV MICELIJEV

Želeli smo ugotoviti prisotnost hemolitične učinkovine v vodnih ekstraktih micelijev iz prvega in drugega gojenja sevov. K homogeniziranemu miceliju smo dodajali pufer z mešanico proteaznih inhibitorjev (P+I), pri micelijih iz drugega gojenja pa tudi pufer brez dodanih inhibitorjev (P-I). Inhibitorje proteaz smo uporabili, ker v ekstraktih iz gliv inhibirajo proteolitično aktivnost in tako omogočijo zaščito tarčnega proteina pred degradacijo.

6.3.1 Rezultati merjenja koncentracije proteinov

Rezultati s koncentracijami proteinov v vodnih ekstraktih micelijev so prikazani v prilogi C2 ter na sliki 44. Testirali smo samo vzorce, ki niso bili termično obdelani na 100 °C.



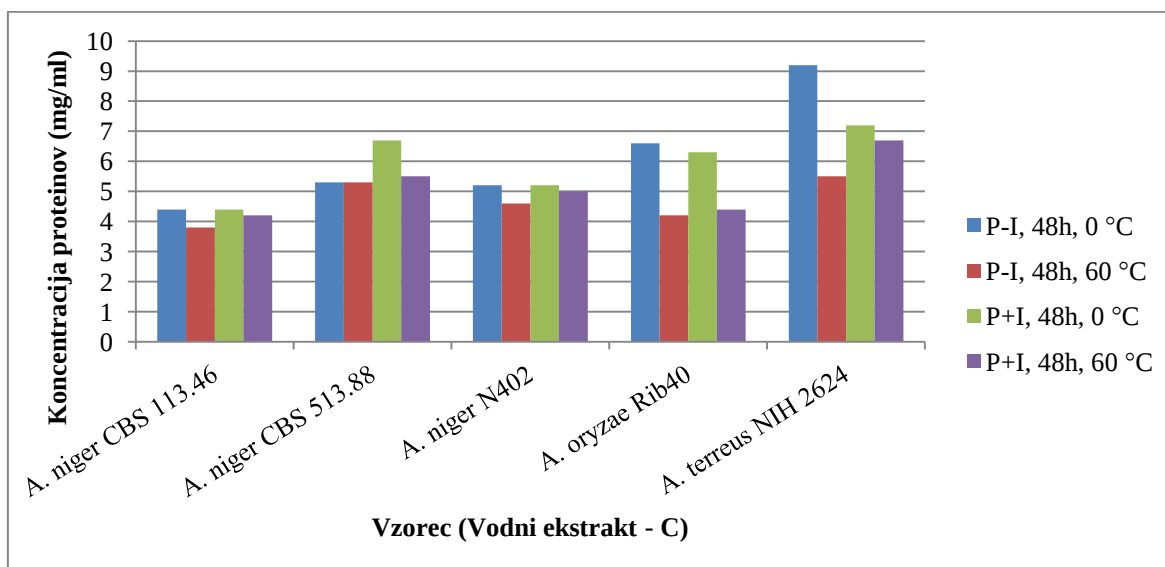
Slika 44: Prikaz koncentracije proteinov v vodnih ekstraktih micelijev sevov prvega in drugega gojenja po različnem času gojenja. KG (24 ur) – čas gojenja v kompletnem gojišču; MM-C (24 ur; 48 ur; 72 ur) – čas gojenja v minimalnem mediju brez glukoze. Prikazani so temperaturno neobdelani vzorci, z dodanim proteaznim inhibitorjem. Sev 9 – *A. niger* CBS 113.46; sev 10 – *A. niger* CBS 513.88; sev 11 – *A. niger* N402; sev 12 – *A. oryzae* Rib40; sev 15 – *A. terreus* NIH2624.

Primerjali smo koncentracijo proteinov v ekstraktih petih sevov, gojenih 24 ur (prvo gojenje) ter 48 in 72 ur (drugo gojenje) v MM-C, da bi videli kakšna je količina proteinov

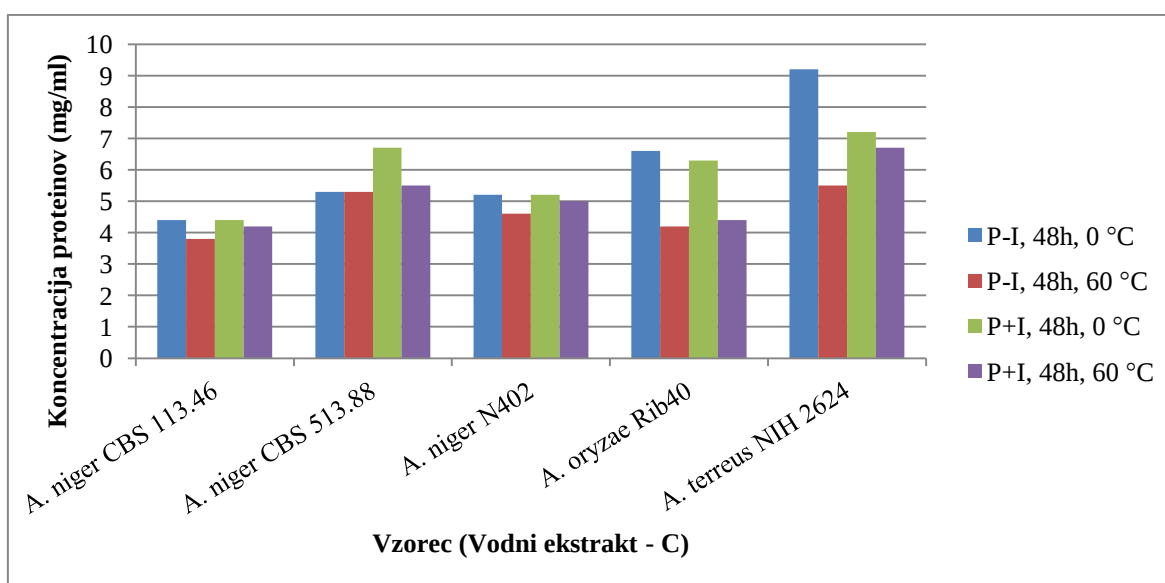
v miceliju glive po različnem času gojenja. Primerjali smo le temperaturno neobdelane vzorce z dodanimi inhibitorji. Ugotovili smo, da je bila koncentracija najmanjša po 24 urah, večja po 48 in največja po 72 urah gojenja sevov.

V ekstraktih sevov drugega gojenja smo primerjali koncentracijo proteinov glede na čas gojenja, prisotnost inhibitorja (P+I) /odsotnost inhibitorja (P-I) ter termično obdelavo (60 °C), kar prikazujeta sliki 45 in 46. Ugotovili smo, da je bila koncentracija proteinov povsod, ne glede na P+I/P-I ali temperaturno obdelavo, manjša po 48 in večja po 72 urah, kar se ujema z zgornjimi rezultati o vplivu časa gojenja. Pri večini sevov je tako pri P+I kot P-I bila koncentracija proteinov v temperaturno neobdelanih ekstraktih višja kot pri vzorcih, obdelanih na 60 °C. Izjeme so bili vzorci glive *A. niger* CBS 113.46 in glive *A. terreus* NIH2624 po 72 urah gojenja ter P+I, kjer je bila koncentracija proteinov večja pri temperaturno obdelanem kot pri neobdelanem vzorcu. Pri večini vzorcev s P-I se je pri obdelanih/neobdelanih vzorcih pojavila manjša koncentracija proteinov v primerjavi z obdelanimi/neobdelanimi vzorci s P+I, kar kaže na delovanje inhibitorja.

Iz spodnjih slik je razvidno, da izstopa sev *A. oryzae* Rib 40, kjer je bilo po 48 urah več proteinov v neobdelanem vzorcu s P-I kot s P+I, po 72 urah pa je bila večja koncentracija proteinov v vzorcu obdelanem na 60 °C s P-I kot pri obdelanem vzorcu s P+I. Izstopa tudi sev *A. terreus* NIH 2624, kjer je bila po 48 urah koncentracija večja pri neobdelanem vzorcu s P-I v primerjavi z neobdelanim vzorcem s P+I, po 72 urah pa je bila koncentracija v obeh primerih vzorcev (neobdelan/obdelan) večja tam, kjer ni bilo inhibitorja.



Slika 45: Koncentracija proteinov (mg/ml) za vodne ekstrakte sevov drugega gojenja po 48 urah. 48 ur – čas gojenja v MM-C; 0 °C – temperaturno neobdelani ekstrakti; 60 °C – ekstrakti po 15-minutnem segrevanju na 60 °C; P+I – eritrocitni pufer s proteaznim inhibitorjem; P-I – eritrocitni pufer brez proteaznega inhibitorja.



Slika 46: Koncentracija proteinov (mg/ml) za vodne ekstrakte sevov drugega gojenja po 72 urah. 72 ur – čas gojenja v MM-C; 0 °C – temperaturno neobdelani ekstrakti; 60 °C – ekstrakti po 15-minutnem segrevanju na 60 °C; P+I – eritrocitni pufer s proteaznim inhibitorjem; P-I – eritrocitni pufer brez proteaznega inhibitorja.

6.3.2 Rezultati hemolitičnega testa

Testirali smo HA vodnih ekstraktov sevov prvega in drugega gojenja. Vzorce iz prvega gojenja smo testirali na govejih eritrocitih (z in brez komponente B), vzorce drugega gojenja pa na ovčjih eritrocitih. Na ovčjih eritrocitih smo testirali ekstrakte, ki so bili

neobdelani, s P-I/P+I ter temperaturno obdelani na 60 °C, s P-I/P+I. Pri testiranju smo dobili negativne rezultate.

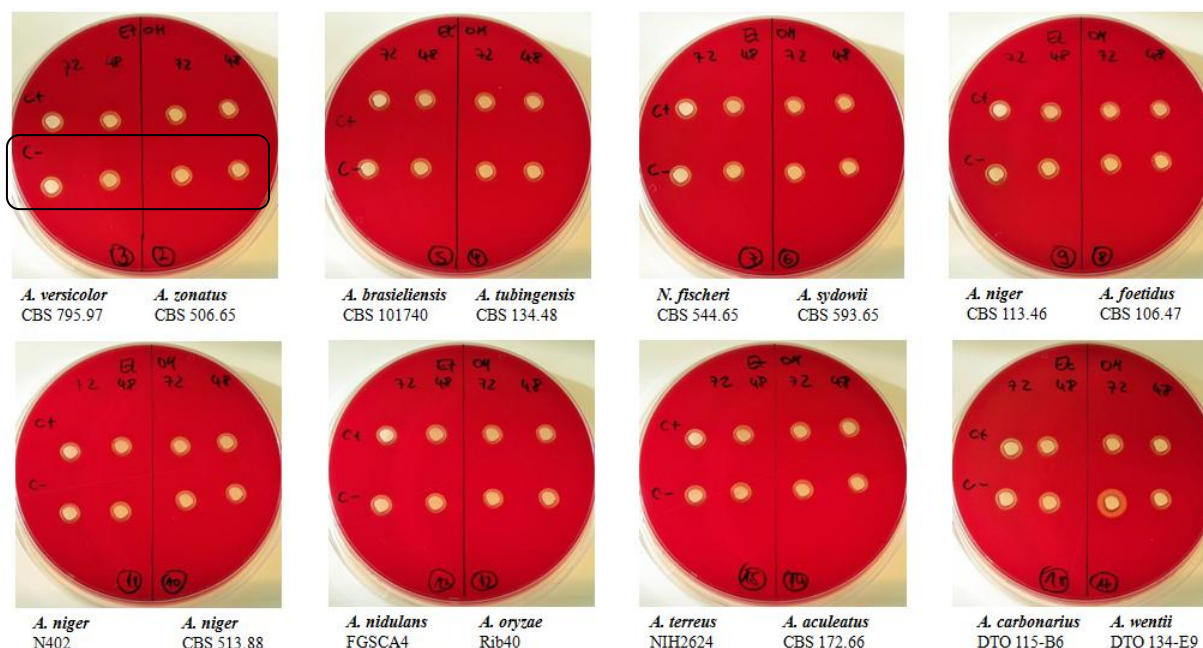
Na govejih eritrocitih smo testirali ekstrakte, ki so bili neobdelani ter temperaturno obdelani na 100 °C. Kadar komponente B ekstraktom nismo dodali, smo povsod dobili negativne rezultate. Z dodatkom komponente B smo pri vzorcih (obdelanih in neobdelanih) večine sevov dobili negativne rezultate, pri kontroli (pufer) ter vzorcih (obdelanih, neobdelanih) nekaterih izjem pa lažno pozitivne (sevi *A. zonatus* CBS 506.65, *A. oryzae* Rib 40, *A. terreus* NIH 2624 in *A. wentii* DTO 134-E9). Tako kot pri vzorcih filtratov smo tudi tu različne koncentracije (0, 5, 10, 20, 25, 50 µl) neobdelanih ekstraktov štirih sevov (sevi *A. niger* CBS 113.46, *A. niger* CBS 513.88, *A. niger* N402 in *A. terreus* NIH2624) ter kontrole BSA testirali z dodatkom komponente B. Povsod smo dobili negativne rezultate (pri vzorcih in kontroli), razen pri ekstraktu seva *A. terreus* NIH 2624. Luknjice smo nato predhodno tretirali z BSA in testirali vzorce istih sevov (sevi *A. terreus* NIH2624, *A. niger* CBS 113.46, *A. niger* CBS 513.88 in *A. niger* N402), pri čemer smo dobili negativne rezultate. Podobno kot pri filtratih smo tudi tukaj pri testiranju s komponento B prišli do zaključka, da so bili rezultati merjenja HA lažno pozitivni in tako posledica vpliva komponente B, ne pa prisotnosti hemolitičnih učinkovin v samih vodnih ekstraktih.

6.4 REZULTATI ANALIZE ETANOLNIH EKSTRAKTOV MICELIJEV

Želeli smo ugotoviti prisotnost biološko aktivnih snovi v etanolnih ekstraktih micelijev. Testirali smo HA vzorcev tretjega gojenja sevov z vcepljanjem v plošče z ovčjim KA ter testom hemolize na govejih eritrocitih.

6.4.1 Rezultati hemolize na ploščah s krvnim agarjem

Pri kontrolnem testiranju, ali bi lahko bila morebitna hemoliza na ploščah posledica 96 % etanola ali eritrocitnega pufru 2 in ne etanolnih ekstraktov, smo dobili pozitivne rezultate. Pri vseh testiranih etanolnih ekstraktih smo na ploščah s KA dobili cone hemolize, saj se je le ta pojavila zaradi hemolitične aktivnosti samega etanola, ne pa zaradi hemolitičnih učinkovin v vzorcih ekstraktov (slika 47).



Slika 47: Plošče s krvnim agarjem z vcepljenimi vzorci etanolnih ekstraktov micelijev, pridobljenih po tretjem gojenju. Na vsaki plošči so vcepljeni filtrati dveh vrst sevov. 48/72 ur – čas gojenja v MM-C; C- – minimalno gojišče brez glukoze. Okvir označuje vzorce gliv, ki so se 48 ter 72 ur inkubirale v MM-C.

6.4.2 Rezultati hemolitičnega testa

Preglednica 5: Rezultati hemolitičnega testa etanolnih ekstraktov micelijev različnih vrst gliv rodu *Aspergillus* gojenih v MM-C. ČG – čas gojenja v MM-C; HA – hemolitična aktivnost; +/- – prisotnost/odsotnost hemolize.

ŠT.	VRSTA	SEV	ČG	HA
2.	<i>A. zonatus</i>	CBS 506.65	48 h	-
			72 h	-
3.	<i>A. versicolor</i>	CBS 795.97	48 h	-
			72 h	-
4.	<i>A. tubingensis</i>	CBS 134.48	48 h	+
			72 h	+
5.	<i>A. brasiliensis</i>	CBS 101740	48 h	+
			72 h	+
6.	<i>A. sydowii</i>	CBS 593.65	48 h	+
			72 h	+

Se nadaljuje.

Nadaljevanje preglednice 5. Rezultati hemolitičnega testa etanolnih ekstraktov micelijev različnih vrst gliv rodu *Aspergillus* gojenih v MM-C. ČG – čas gojenja v MM-C; HA – hemolitična aktivnost; +/- – prisotnost/odsotnost hemolize.

ŠT.	VRSTA	SEV	ČG	HA
7.	<i>N. fischeri</i>	CBS 544.65	48 h	+
			72 h	+
8.	<i>A. foetidus</i>	CBS 106.47	48 h	+
			72 h	+
9.	<i>A. niger</i>	CBS 113.46	48 h	+
			72 h	+
10.	<i>A. niger</i>	CBS 513.88	48 h	+
			72 h	+
11.	<i>A. niger</i>	N402	48 h	+
			72 h	+
12.	<i>A. oryzae</i>	Rib40	48 h	+
			72 h	+
13.	<i>A. nidulans</i>	FGSCA4	48 h	+
			72 h	+
14.	<i>A. aculeatus</i>	CBS 172.66	48 h	+
			72 h	+
15.	<i>A. terreus</i>	NIH2624	48 h	+
			72 h	+
17.	<i>A. wentii</i>	DTO 134-E9	48 h	-
			72 h	-
18.	<i>A. carbonarius</i>	DTO 115-B6	48 h	+
			72 h	+

Na govejih eritrocitih smo testirali HA za vse seve tretjega gojenja, razen za seva *A. glaucus* in *A. clavatus* CBS 513.65. Delali smo po postopku, opisanem v točki 3.2.7.3. Hemolitično aktivnost smo od 16 testiranih sevov zaznali pri etanolnih ekstraktih micelijev 13 sevov, razen v primeru treh sevov (sevi *A. zonatus* CBS 506.65, *A. versicolor* CBS 795.97 in *A. wentii* DTO 134-E9), kjer pri nobenem od vzorcev ni prišlo do hemolize niti pri največjem testiranem volumnu (30 µl).

Slike 48 – 60 prikazujejo hemolizo na govejih eritrocitih v odvisnosti od volumna testiranega vzorca (vzorec po 48 in 72 urah) oziroma koncentracije organske snovi, prisotne v etanolnih ekstraktih testiranih sevov. Učinek topila smo izključili s testiranjem različnih volumnov čistega topila, ki ustrezajo volumnom dodanega vzorca (5, 10, 20, 30 μ l), saj topilo samo po sebi do določenega volumna ni bilo HA. Vse vzorce smo dodajali v volumnih, ki so bili znotraj tega nehemolitičnega ranga. Opazili smo, da je z naraščanjem volumna posameznega vzorca naraščala koncentracija suhe snovi in večja kot je bila koncentracija organske snovi v vzorcu, hitreje je prišlo do 50-odstotne hemolize.

Pri etanolnih ekstraktih nekaterih gliv se je hemolitična aktivnost pokazala pri vseh štirih koncentracijah suhe snovi v vzorcu. Pri glivah *A. brasiliensis* CBS 101740, *A. niger* CBS 113.46, *A. niger* CBS 513.88, *A. oryzae* Rib40, *A. aculeatus* CBS 172.66 in *A. terreus* NIH2624, sta bila hemolitično aktivna oba vzorca (48 h in 72 h) pri vseh štirih koncentracijah. Pri ekstraktih gliv *A. foetidus* CBS 106.47 in *A. nidulans* FGSCA4 pa smo le pri vzorcu po 48 urah zaznali hemolitično aktivnost pri vseh štirih koncentracijah, medtem ko se je pri vzorcu po 72 urah HA pojavila le pri višjih koncentracijah (slike 48 – 55).

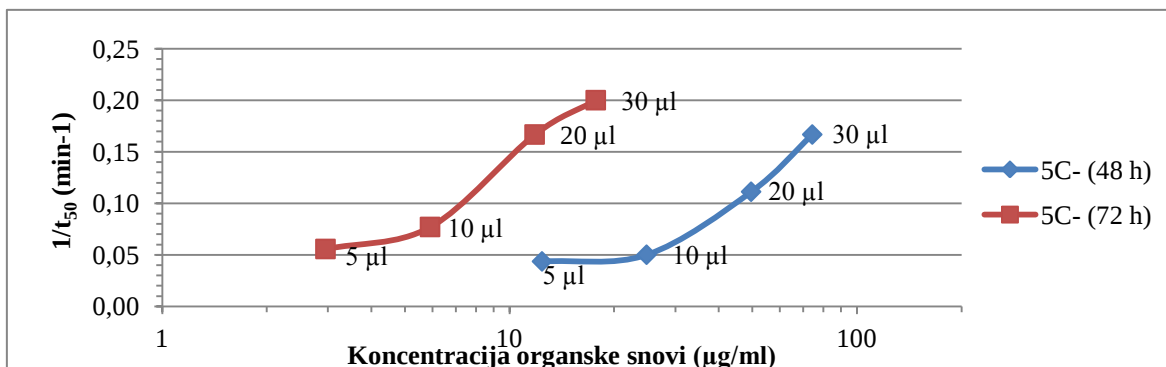
Pri etanolnih ekstraktih gliv *A. tubingensis* CBS 134.48 in *A. sydowii* CBS 593.65 smo HA vzorcev po 72 urah zaznali le pri največji koncentraciji suhe snovi, HA vzorcev po 48 urah pa pri vseh koncentracijah, razen pri najmanjši (sliki 56 – 57).

Oba vzorca (48 in 72 ur) gliv *A. niger* N402 ter *A. carbonarius* DTO 115-B6 sta izkazala hemolitično aktivnost le pri dveh največjih koncentracijah organske snovi (sliki 58 – 59).

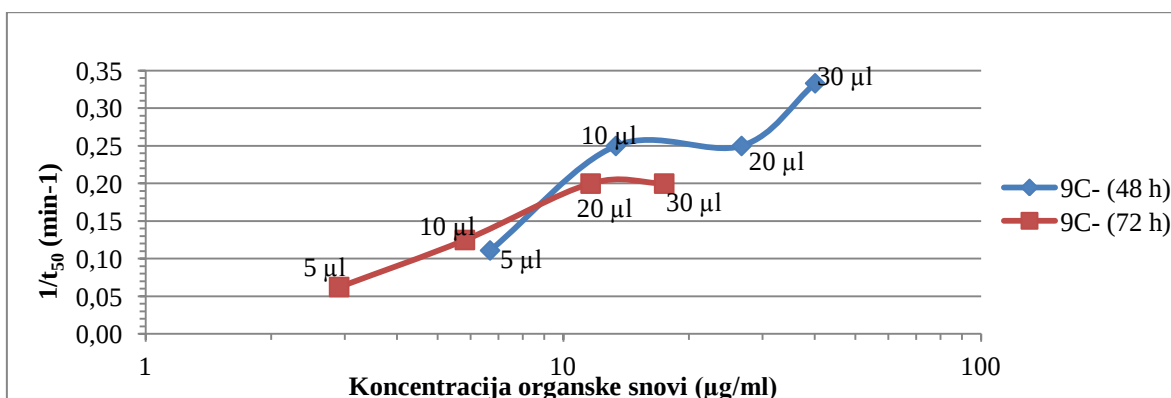
Oba etanolna ekstrakta (48 in 72 ur) glive *N. fischeri* CBS 544.65 sta bila hemolitično aktivna pri vseh koncentracijah organske snovi v vzorcu, razen pri najmanjši (slika 60).

Na podlagi slik 48 – 60 ter prilog D3 – D4 smo opazili, da je do 50-odstotne hemolize pri večini sevov prišlo hitreje z etanolnimi ekstrakti po 48 urah gojenja, z izjemo seva *A. brasiliensis* CBS 101740, kjer je hemoliza bila hitrejša v primeru ekstrakta po 72 urah gojenja. Prav tako so po 48 urah gojenja v vzorcih ekstraktov prevladovala večje koncentracije organske snovi, z izjemo treh sevov (sevi *N. fischeri* CBS 544.65, *A. foetidus* CBS 106.47 in *A. aculeatus* CBS 172.66), kjer so bile koncentracije večje v vzorcih po 72 urah. Prišli smo do zaključka, da večji kot je bil volumen testiranega vzorca (5, 10, 20, 30 μ l), večja je bila vsebnost oz. koncentracija organske snovi, pri večji koncentraciji pa je

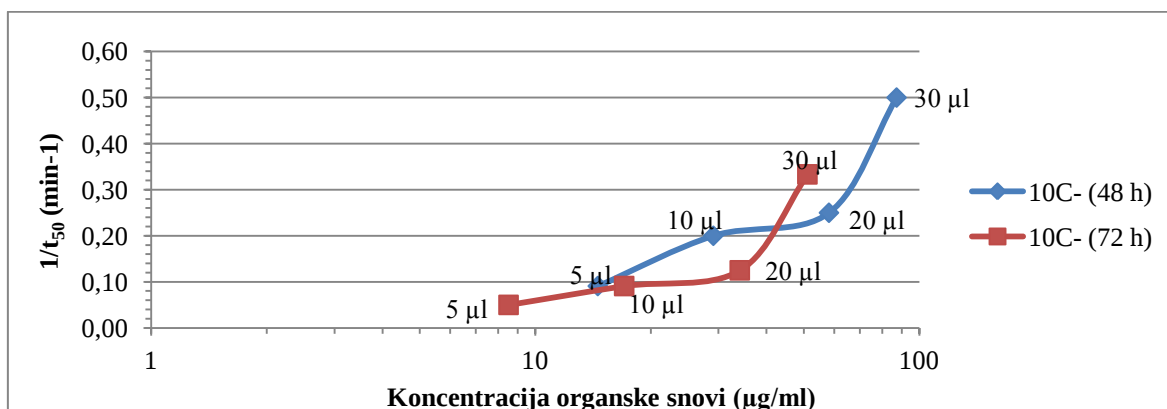
hitreje prišlo do 50-odstotne hemolize. V večini primerov so bile koncentracije organske snovi višje v ekstraktih po 48 urah, prav tako je s temi vzorci (48 ur) hitreje prišlo do 50-odstotne hemolize, v primerjavi z vzorci (72 ur), kar pomeni, da je po 48 urah bilo močno izločanje hemolitične učinkovine. V nekaterih primerih kljub višjim koncentracijam organske snovi v vzorcih (48 ur) v primerjavi z vzorci (72 ur) do hemolize ni prišlo hitreje.



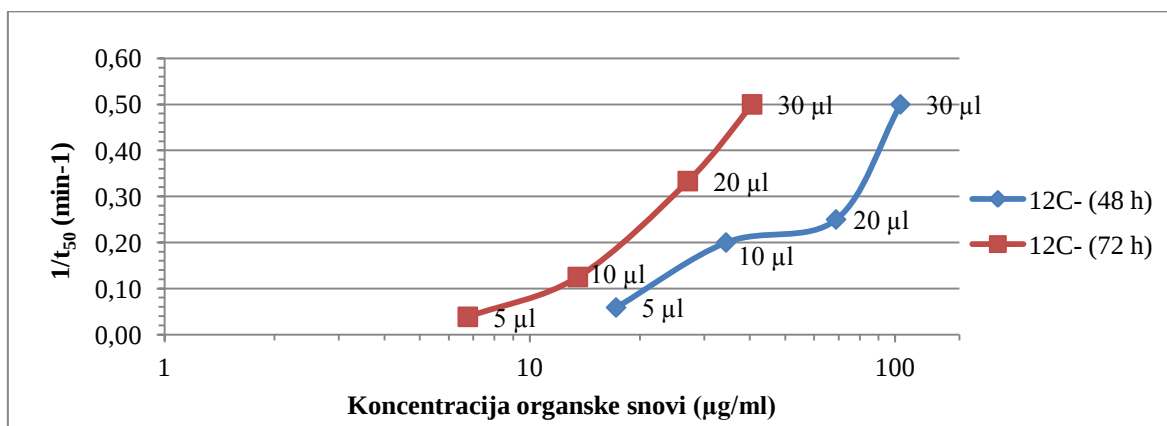
Slika 48: Izražanje hemolitične učinkovine etanolnega ekstrakta micelija glive *A. brasiliensis* CBS 101740 v odvisnosti od koncentracije organske snovi vsebovane v ekstraktu pri štirih različnih volumnih (5, 10, 20, 30 µl) vzorca. t_{50} – čas, ki je potreben, da pride do 50-odstotne hemolize. 48 h/72 h – čas gojenja v MM-C.



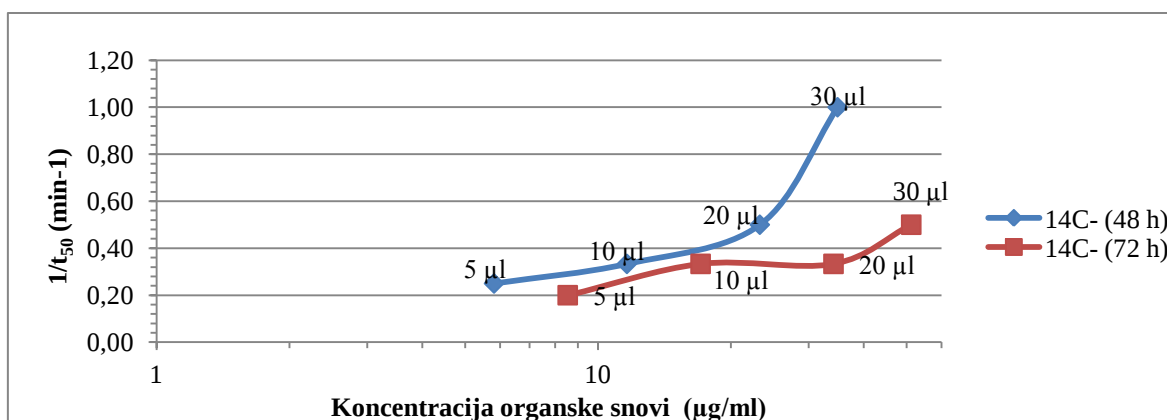
Slika 49: Izražanje hemolitične učinkovine etanolnega ekstrakta micelija glive *A. niger* CBS 113.46 v odvisnosti od koncentracije organske snovi vsebovane v ekstraktu pri štirih različnih volumnih (5, 10, 20, 30 µl) vzorca. t_{50} – čas, ki je potreben, da pride do 50-odstotne hemolize. 48 h/72 h – čas gojenja v MM-C.



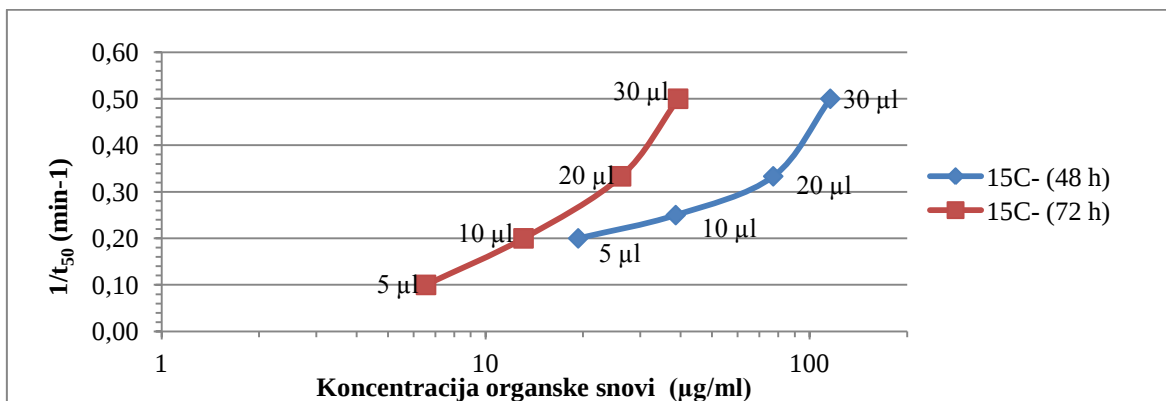
Slika 50: Izražanje hemolitične učinkovine etanolnega ekstrakta micelija glive *A. niger* CBS 513.88 v odvisnosti od koncentracije organske snovi vsebovane v ekstraktu pri štirih različnih volumnih (5, 10, 20, 30 µl) vzorca. t_{50} – čas, ki je potreben, da pride do 50-odstotne hemolize. 48 h/72 h – čas gojenja v MM-C.



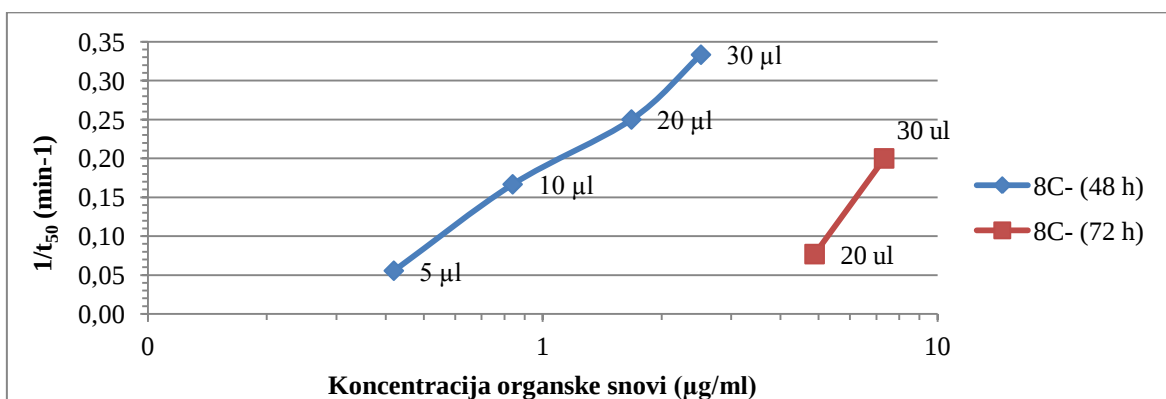
Slika 51: Izražanje hemolitične učinkovine etanolnega ekstrakta micelija glive *A. oryzae* Rib40 v odvisnosti od koncentracije organske snovi vsebovane v ekstraktu pri štirih različnih volumnih (5, 10, 20, 30 µl) vzorca. t_{50} – čas, ki je potreben, da pride do 50-odstotne hemolize. 48 h/72 h – čas gojenja v MM-C.



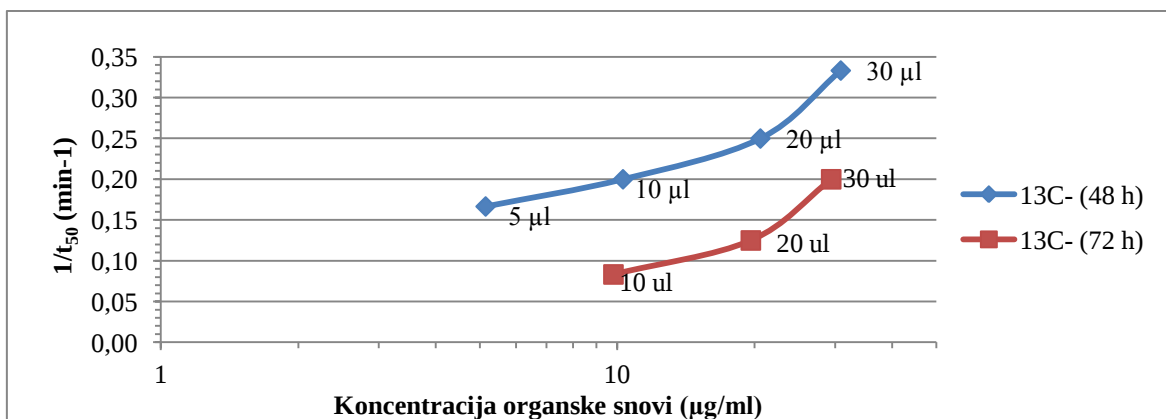
Slika 52: Izražanje hemolitične učinkovine etanolnega ekstrakta micelija glive *A. aculeatus* CBS 172.66 v odvisnosti od koncentracije organske snovi vsebovane v ekstraktu pri štirih različnih volumnih (5, 10, 20, 30 µl) vzorca. t_{50} – čas, ki je potreben, da pride do 50-odstotne hemolize. 48 h/72 h – čas gojenja v MM-C.



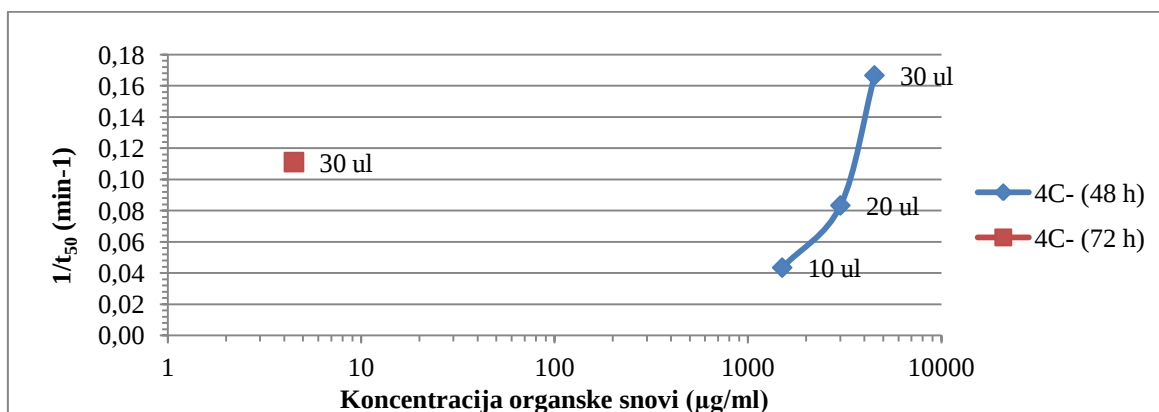
Slika 53: Izražanje hemolitične učinkovine etanolnega ekstrakta micelija glive *A. terreus* NIH2624 v odvisnosti od koncentracije organske snovi vsebovane v ekstraktu pri štirih različnih volumnih (5, 10, 20, 30 µl) vzorca. t₅₀ – čas, ki je potreben, da pride do 50-odstotne hemolize. 48 h/72 h – čas gojenja v MM-C.



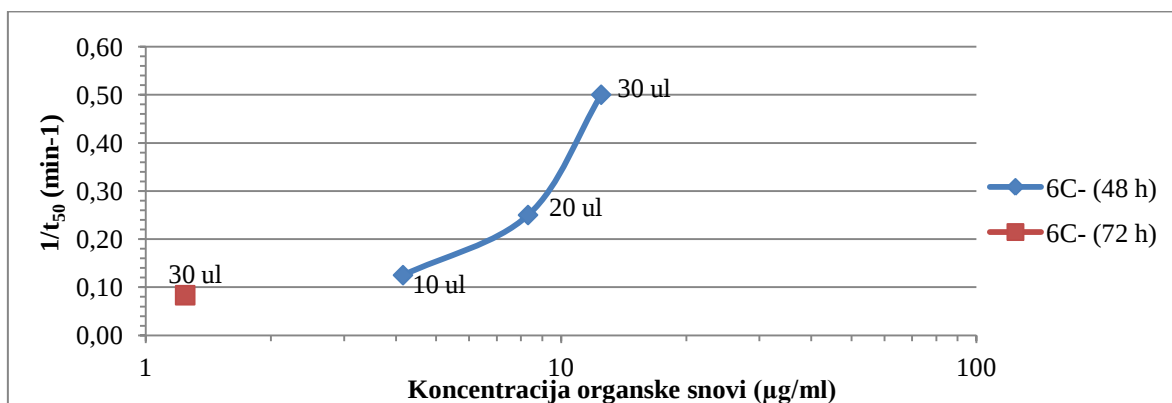
Slika 54: Izražanje hemolitične učinkovine etanolnega ekstrakta micelija glive *A. foetidus* CBS 106.47 v odvisnosti od koncentracije organske snovi vsebovane v ekstraktu pri štirih različnih volumnih (5, 10, 20, 30 µl) vzorca. t₅₀ – čas, ki je potreben, da pride do 50-odstotne hemolize. 48 h/72 h – čas gojenja v MM-C.



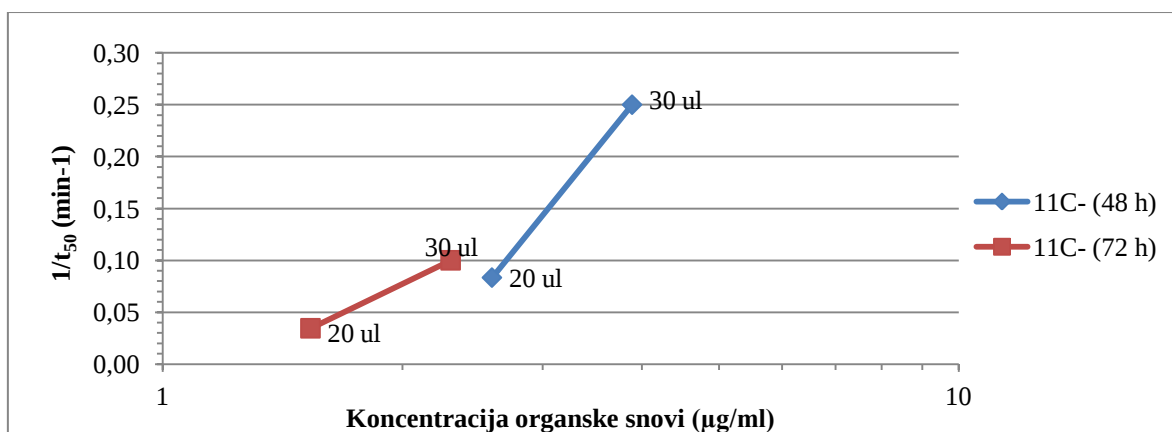
Slika 55: Izražanje hemolitične učinkovine etanolnega ekstrakta micelija glive *A. nidulans* FGSCA4 v odvisnosti od koncentracije organske snovi vsebovane v ekstraktu pri štirih različnih volumnih (5, 10, 20, 30 µl) vzorca. t₅₀ – čas, ki je potreben, da pride do 50-odstotne hemolize. 48 h/72 h – čas gojenja v MM-C.



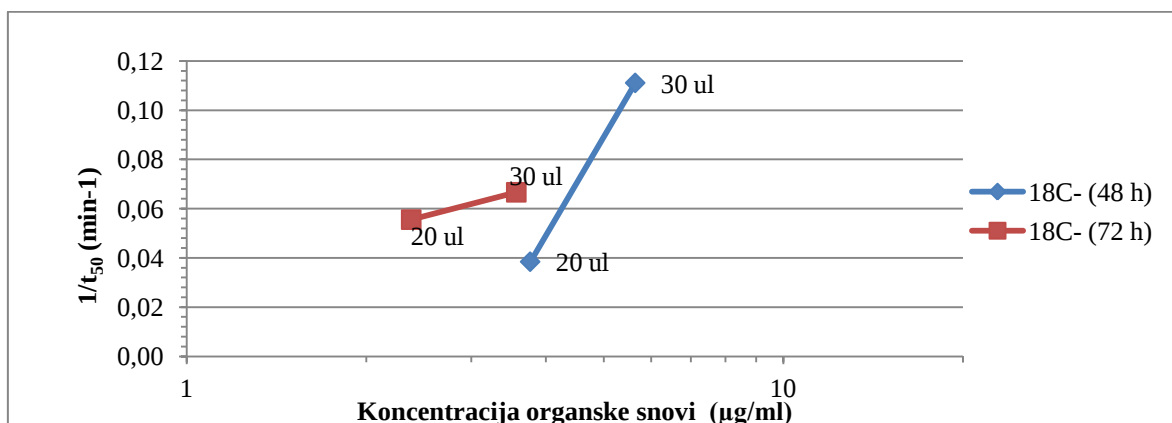
Slika 56: Izražanje hemolitične učinkovine etanolnega ekstrakta micelija glive *A. tubingensis* CBS 134.48 v odvisnosti od koncentracije organske snovi vsebovane v ekstraktu pri štirih različnih volumnih (5, 10, 20, 30 µl) vzorca. t₅₀ – čas, ki je potreben, da pride do 50-odstotne hemolize. 48 h/72 h – čas gojenja v MM-C.



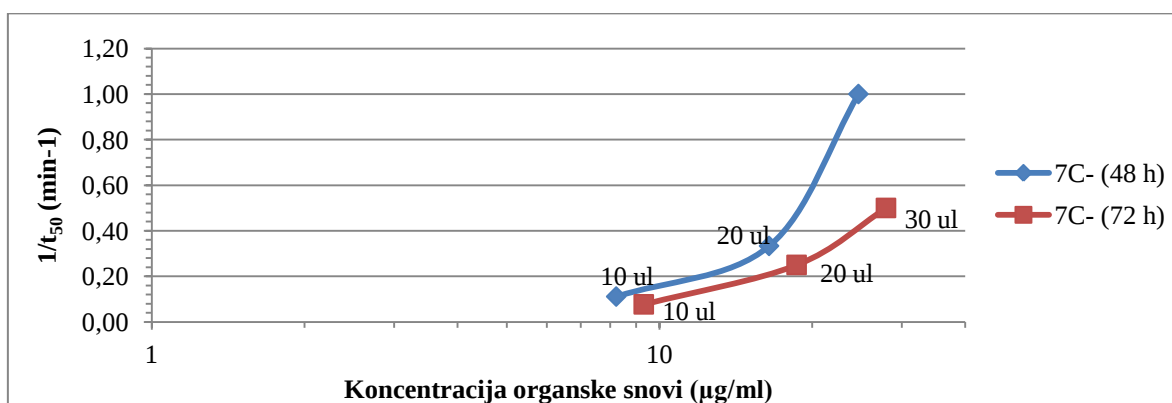
Slika 57: Izražanje hemolitične učinkovine etanolnega ekstrakta micelija glive *A. sydowii* CBS 593.65 v odvisnosti od koncentracije organske snovi vsebovane v ekstraktu pri štirih različnih volumnih (5, 10, 20, 30 µl) vzorca. t₅₀ – čas, ki je potreben, da pride do 50-odstotne hemolize. 48 h/72 h – čas gojenja v MM-C.



Slika 58: Izražanje hemolitične učinkovine etanolnega ekstrakta micelija glive *A. niger* N402 v odvisnosti od koncentracije organske snovi vsebovane v ekstraktu pri štirih različnih volumnih (5, 10, 20, 30 µl) vzorca. t₅₀ – čas, ki je potreben, da pride do 50-odstotne hemolize. 48 h/72 h – čas gojenja v MM-C.



Slika 59: Izražanje hemolitične učinkovine etanolnega ekstrakta micelija glive *A. carbonarius* DTO 115-B6 v odvisnosti od koncentracije organske snovi vsebovane v ekstraktu pri štirih različnih volumnih (5, 10, 20, 30 µl) vzorca. t_{50} – čas, ki je potreben, da pride do 50-odstotne hemolize. 48 h/72 h – čas gojenja v MM-C.



Slika 60: Izražanje hemolitične učinkovine etanolnega ekstrakta micelija glive *N. fischeri* CBS 544.65 v odvisnosti od koncentracije organske snovi vsebovane v ekstraktu pri štirih različnih volumnih (5, 10, 20, 30 µl) vzorca. t_{50} – čas, ki je potreben, da pride do 50-odstotne hemolize. 48 h/72 h – čas gojenja v MM-C.

6.5 BIOINFORMATSKA ANALIZA EGEROLIZINSKIH PROTEINOV V IZBRANIH SEVIH RODU *ASPERGILLUS*

Sklicujem se na rezultate, pridobljene v okviru magistrske naloge Nine Sluga, ki so prikazani na sliki 33.

7 RAZPRAVA GOJENJA GLIV V MINIMALNEM GOJIŠČU BREZ VIRA OGLJIKA (Magistrsko delo Saše Režonja)

Za izbranih 18 vrst gliv rodu *Aspergillus*, gojenih v minimalnem gojišču s pomanjkanjem vira ogljika (glukoze), smo z različnimi metodami testirali hemolitično aktivnost filtratov (gojišč) ter vodnih in organskih izvlečkov micelijev, z namenom odkriti morebitne hemolitične učinkovine in določiti ali jih gliva izloča v okolico. Za rod *Aspergillus* je značilna produkcija hemolitičnih in domnevno hemolitičnih proteinov, pri čemer smo se usmerili predvsem v iskanje proteinov egerolizinske družine. Njihova biološka vloga še ni točno pojasnjena, vendar je znano, da nekateri sodelujejo pri tvorbi transmembranskih por, kar se posledično odraža v citolitičnih in citotoksičnih učinkih na živalskih celicah, domnevajo tudi, da so udeleženi v razvoju gobjega plodišča, pri nekaterih patogenih glivah rodu *Aspergillus* pa bi naj bili virulenčni dejavniki. Njihovo hemolitično aktivnost smo poskušali detektirati z dodajanjem minimalne količine proteina pleurotolizina B (PlyB), ki bi naj v kombinaciji z egerolizinom sprožil lizo membrane. Preliminarni poskusi so pokazali, da se produkcija hemolitično aktivnih snovi poveča, če glivo gojimo v razmerah brez vira ogljika (glukoze) (Braaksma in sod., 2010), zato smo želeli ovrednotiti vpliv takega gojišča na proizvodnjo hemolitičnih učinkovin. Ugotovitve naših raziskav bi omogočile, da bi potencialno zanimive in še neopisane učinkovine lahko v prihodnosti izolirali in preučevali.

7.1 RAST GLIV RODU *ASPERGILLUS*

Seve rodu *Aspergillus* smo najprej gojili na trdem MBFA (Blackeslee's Malt Extract Agar) gojišču. Rast izbranih sevov na tem gojišču je bila dobra, saj medij vsebuje visoko količino maltoze in drugih saharidov kot virov energije, kar je ugodno za rast glive. Nekaterih gliv, kot sta glivi *A. glaucus* (teleomorf *Eurotium herbariorum* CBS 516.65) in *A. clavatus* CBS 513.65, nam ni uspelo nagojiti. Sev *A. glaucus* je namreč halofilna gliva in za rast potrebuje višje koncentracije soli. Iz tega razloga na gojišču z MBFA ni zrasla, saj mediju nismo dodali NaCl, poskušali pa smo jo nagojiti še na gojišču MEA z dodanim 1M NaCl, vendar tudi v tem primeru do rasti ni prišlo. Za ta sev velja, da ima težave pri rasti, kljub prisotnosti NaCl v gojišču. Ni znano, zakaj sev *A. clavatus* CBS 513.65 ni zrasel na gojišču z MBFA. Po inokulaciji gojišča MBFA s sporami, se je rast micelija enakomerno razširila do roba petrijevke. Na agarju se je micelij od roba do sredine diferenciral v štiri cone:

zunanja (extending) cona, kjer se hife razširjajo v svež medij in se na konicah eksponentno podaljšujejo, produktivna (productive) cona, kjer pride do največjega povečanja biomase, cona fruktifikacije (fruiting), ki predstavlja stacionarno fazo, z omejenimi hranili, na hifah izhajajočih iz micelija pa se tvorijo spore, ter cona staranja (ageing), kjer pride do zmanjšane metabolizma in avtolize hif (Carlile in sod., 2001).

Suspenzije spor vseh sevov (razen spore *A. glaucus* in spore *A. clavatus* CBS 513.65) smo poleg nacepljanja v KG uporabili tudi za nacepljanje na plošče z ovčjim KA in PM ter spremljali, ali pride do sproščanja hemolitičnih učinkovin oz. proteolitičnih encimov v medij. Pri gojenju na KA je imela večina gliv dobro rast. Pri rasti petih sevov (sevi *A. tubingensis* CBS 134.48, *A. brasiliensis* CBS 101740, *A. foetidus* CBS 106.47, *A. niger* CBS 113.46 in *A. niger* N402) smo pod kolonijami opazili delno (α) hemolizo, z značilnim zelenkastim obarvanjem, torej je pri teh glivah prišlo do izločanja hemolitičnih učinkovin v medij. Na ploščah s PM smo testirali vse seve kot predhodno na KA, da bi preverili prisotnost proteolitičnih encimov. Pri skoraj vseh sevih smo opazili motno ali bistro cono proteolize, ki je posledica pretvorbe kazeina v topne dušikove komponente (Marcy in Pruett, 2001). Pri že omenjenih petih sevih smo zaznali HA na KA in kasneje proteolizo na PM, zato smo sklepali, da so v teh primerih poleg proteolitičnih encimov za hemolizo odgovorne tudi neznane hemolitične učinkovine. Pri večini ostalih sevov smo zaznali samo proteolizo na PM, brez predhodne HA na KA, kar pomeni, da v teh primerih ni prišlo do sproščanja hemolitičnih učinkovin. Vesper in sod. (2004) so preučevali izločanje hemolizinov pri nekaterih glivnih vrstah po petih dneh inkubacije na ovčjem KA in pri temperaturi 37 °C. Hemolitično aktivnost so zaznali pri sevih *A. versicolor*, *A. sydowii*, *A. niger* in *A. terreus*. Pri sevu *A. wentii* so jo zaznali le po inkubaciji plošče na 23 °C, medtem ko je pri sevu *A. carbonarius* sploh niso zaznali (ne pri inkubaciji na 37 °C, niti na 23 °C). V našem primeru smo plošče s sporami inkubirali pri 30 °C in ne 37 °C, vendar se nam nižja temperatura ni zdela bistvena, zato smo HA pričakovali tudi pri teh sevih.

7.1.1 Teža micelijev in pH vrednost gojišč

Suspenzijo spor na MBFA smo precepljali naprej v KG, ki je glivam zagotavljalo vse nujne komponente, potrebne za rast. Po inkubaciji v KG smo glive prenesli in jih naprej gojili v minimalnem gojišču, ki je vsebovalo minimalne komponente, potrebne za rast gliv.

V našem primeru je MM vseboval anorganske soli in vodo, ni pa vseboval vira ogljika (glukoze). Po koncu gojenja v KG teže micelija nismo določali, vendar predvidevamo, da je v tem času biomasa eksponentno naraščala, zaradi prisotnega vira ogljika (glukoze) v mediju. Po precepljanju v MM-C so glive najverjetneje še malo rasle, dokler niso porabile glukoze, ki so jo pridobile v KG in ki je pri prenosu micelija nismo dovolj sprali. S pomanjkanjem glukoze in verjetno tudi kisika se je metabolna aktivnost kulture zmanjšala, rast biomase pa ustavila in začela upadati. Biomasa gliv v MM-C je bila največja po 24 urah in je z daljšim časom gojenja (48 ur, 72 ur) upadala na račun staranja hif, avtofagije ter avtolitičnih procesov. Pri dveh sevih (seva *A. niger* CBS 513.88 in *A. oryzae* Rib40) se je količina micelija najbolj povečala po 48 urah gojenja in je nato začela upadati, pri sevu *A. nidulans* FGSCA4 pa se je s časom gojenja celo povečevala. Rast gliv se med posameznimi vrstami razlikuje, teže micelijev, ki ponekod odstopajo od tipičnega vzorca, pa so morda tudi posledica nezadostno odcejene tekočine (fiziološke raztopine), ki je po spiranju micelija nismo povsem odstranili in je določen vzorec pri tehtanju pridobil na teži.

V gojiščih večine gliv so se pH vrednosti z daljšim časom gojenja povečevale. Med stradanjem z ogljikom so začele celice razgrajevati aminokisline in nukleotide (kot endogen vir ogljika), pri čemer se je sproščal amonijak, ki je vplival na spremembo pH vrednosti gojišča (Szilágyi in sod., 2013), k povečanju amonijaka pa je prispevala tudi avtoliza (Nitsche in sod., 2012). Pri nekaterih izjemah so bile pH vrednosti najvišje po 24 urah gojenja, kar je verjetno odvisno od vrste glive, lahko pa je tudi posledica nenatančnih meritev s pH-metrom.

7.2 PRIPRAVA FILTRATOV TER VODNIH IN ETANOLNIH EKSTRAKTOV

Nitaste glive gredo skozi rastni cikel, ki vključuje diferenciacijo, kompartmentalizacijo ter staranje kulture. Posledično so določeni proteini lahko prisotni samo v določenem času rastnega cikla, na primer pri sporulaciji ali pri avtolizi starejših gliv. Pri pripravi grobih ekstraktov iz nitastih gliv je za ekstrakcijo proteinov potrebno učinkovito razbijanje celic, saj so le-te zaščitene z rigidno celično steno. Z našim postopkom bi morda lahko z grobo ekstrakcijo izgubili proteine, ki so znotraj celic povezani s celično steno in membrano ter membranskimi organeli. Zaradi mehanske obdelave celic se sprostijo tudi proteaze, ki lahko povzročijo degradacijo iskanih

proteinov. Do izgub tarčnih proteinov lahko pride tudi zaradi termalne denaturacije vzorcev, adsorpcije proteinov na stene mikrocentrifugirki in luknjic na mikrotitrski plošči ter zaradi tvorjenja kompleksov z inhibitorji, kjer smo jih dodali vzorcu (Bridge, 1996). V primeru vodnih ekstraktov smo dodajali ustrezno količino pufru glede na količino micelija v mikrocentrifugirki. Pri nekaterih vzorcih nismo uspeli pridobiti zadostnih količin micelija, zato je bila tudi količina supernatanta po centrifugiranju majhna in posledično majhna količina vzorca. Tako pri pripravi vodnih kot tudi etanolnih ekstraktov, kompaktnih struktur nekaterih micelijev, kljub mletju in centrifugiranju nismo uspeli zdrobiti na manjše koščke. Pri prenosu v novo mikrocentrifugirko smo posledično prenesli še delce micelija, ki so pri nadaljnjem delu morda motili meritve.

7.3 HEMOLITIČNA AKTIVNOST FILTRATOV

Na ploščah s KA smo HA opazili pri filtratih štirih od 16 testiranih sevov (sevi *A. tubingensis* CBS 134.48, *A. brasiliensis* CBS 101740, *A. niger* CBS 113.46 in *A. niger* N402) z nativno in umerjeno pH vrednostjo. Pri filtratih z nativno pH vrednostjo 15-minutno segrevanje na 60 °C ni uničilo HA, saj so se cone hemolize pojavile pri temperaturno neobdelanih vzorcih ter po segrevanju vzorcev na 60 °C.

Pri filtratih z umerjeno pH vrednostjo se je hemoliza pojavila samo pri temperaturno neobdelanih vzorcih, razen v primeru sevu *A. niger* N402, kjer je bila prisotna tudi po obdelavi na 60 °C. Filtratom seva *A. tubingensis* CBS 134.48 nismo umerjali pH vrednosti, ker so pH vrednosti gojišča že bile nevtralne. Z umerjanjem pH vrednosti smo želeli doseči optimalni pH (5 – 7) za delovanje egerolizinov, saj smo sklepali na njihovo prisotnost v filtratih. S 15-minutnim segrevanjem na 60 °C smo HA filtratov z nevtralno pH vrednostjo popolnoma uničili pri vseh sevih, razen pri sevu *A. tubingensis* CBS 134.48 in sevu *A. niger* N402. Predvidevamo, da je bila hemolitična učinkovina filtrata z nativno pH vrednostjo stabilna tudi po segrevanju na 60 °C in je obdržala HA, pri čemer smo sklepali, da gre za predstavnika iz egerolizinske družine. Z dodatkom NaOH smo pH vrednost umerili na nevtralno, kjer je hemolitična učinkovina po segrevanju na 60 °C verjetno postala nestabilna in aktivnosti nismo zaznali, v primeru seva *A. niger* N402 pa se je aktivnost samo zmanjšala. Glede na to, da filtratov seva *A. tubingensis* CBS 134.48, ki so že imeli nevtralno pH vrednost, z NaOH nismo umerjali in se je HA ohranila tudi po

segrevanju na 60 °C, sklepamo, da je na stabilnost hemolitične učinkovine vplival dodan NaOH. S 15-minutnim segrevanjem na 100 °C se je HA popolnoma uničila pri filtratih z nativnimi in umerjenimi pH vrednostmi, kar se ujema z našimi pričakovanji. Pri omenjenih štirih sevih smo tudi pri gojenju spor na KA dokazali HA.

Proteolizo na ploščah s PM smo prav tako opazili pri filtratih štirih sevov, kjer smo predhodno zasledili tudi HA pri testiranju filtratov in pri gojenju spor na KA (sevi *A. tubingensis* CBS 134.48, *A. brasiliensis* CBS 101740, *A. niger* CBS 113.46 in *A. niger* N402). Vzorec proteolize s hemolitično aktivnimi filtrati se je razlikoval od vzorca hemolize na KA. Pri omenjenih sevih so bile motne oz. bistre cone proteolize vidne le pri 0 °C, saj smo s 15-minutnim segrevanjem na 60 °C proteaze uničili. Pri treh sevih (sevi *A. brasiliensis*, *A. niger* CBS 113.46 in *A. niger* N402) so se ponekod cone proteolize na PM prekrivale s conami hemolize na KA, kar kaže na to, da so k hemolizi dodatno prispevali proteolitični encimi. Nayak in sod. (2013) namreč trdijo, da lahko tudi samim proteazam pripišemo hemolitično aktivnost. Pri filtratih glive *A. tubingensis* CBS 134.48 se cona proteolize na PM in cona hemolize na KA nista prekrivali, pri čemer smo sklepali samo na prisotnost hemolitične učinkovine brez vpliva proteaz. Proteolitično aktivnost smo zaznali tudi pri filtratih nekaterih ostalih sevov, pri katerih predhodno nismo zasledili hemolize na KA. Opazili smo jo pri temperaturno neobdelanih vzorcih, v primeru dveh sevov (seva *A. nidulans* FGSCA4 in *A. terreus* NIH2624) pa tudi po segrevanju na 60 °C. V tem primeru 15-minutno segrevanje pri 60 °C ni popolnoma uničilo proteolitične aktivnosti filtratov z nativno pH vrednostjo, kar kaže na prisotnost termostabilnih proteaz. Aktivnost proteolitičnih encimov smo povsod popolnoma uničili s 15-minutno obdelavo na 100 °C.

V filtratih štirih sevov, za katere smo domnevali, da so hemolitično aktivni, so v laboratoriju s PAGE elektroforezo preverili prisotnost iskanih hemolitičnih proteinov velikosti 15 do 20 kDa, vendar pričakovanih fragmentov te velikosti niso našli. Glede na proteinsko analizo očitno ne gre za prisotnost egerolizinov v filtratih, ampak nekih drugih neznanih hemolitičnih komponent.

Pred izvajanjem testa hemolize smo izmerili še koncentracijo proteinov v filtratih po treh različnih časih gojenja (24, 48 in 72 ur) v MM-C. Takoj po prenosu v MM-C so glive vsebovale še nekaj glukoze iz KG, zato je bila verjetno koncentracija proteinov takrat višja

in je po porabi glukoze začela upadati. Po 24 urah gojenja v MM-C je bila koncentracija proteinov v gojišču največja in je po 48 urah zelo upadla, z daljšim časom gojenja (72 ur) pa se v filtratih večine sevov spet povečala. Glive so se metabolno prilagodile na pogoje stradanja z ogljikom, tako da so začele izkoriščati endogeni ogljik (Pollack in sod., 2007). Pomanjkanje hranil (ogljika, dušika) je močno spodbudilo avtofagijo (znotrajcelične procese degradacije organelov in druge citoplazemske vsebine) kot zgodnji odziv na stradanje, kjer se citoplazemska vsebina ni sprostila v medij, ampak so se hranila prenesla od starejših delov micelija do apikalnih delov hif (Nitsche in sod. 2012). Posledično je koncentracija proteinov v gojišču po 24 urah začela upadati zaradi izpraznjenih starejših delov hif, ki niso bili več metabolno aktivni. Po dveh dneh gojenja je verjetno začela naraščati koncentracija zunajceličnih proteinov v filtratih na račun avtolize starejših delov micelija (oslabitev celične stene in fragmentacija) (Nitsche in sod., 2012). V filtratih nekaterih sevov je koncentracija proteinov padala tudi po daljšem času gojenja (72 ur) in bi verjetno do sproščanja zunajceličnih encimov prišlo komaj kasneje, v primeru da bi glive gojili dlje časa. V primeru nekaterih sevov morda do razgradnje celične stene in fragmentacije sploh ni prišlo, zato se proteini niso sproščali v gojišče, kar je odvisno od vrste do vrste gliv (Nitsche in sod., 2012). V filtratu seva *A. sydowii* CBS 593.65 smo izmerili zelo nizke koncentracije proteinov, ki so bile blizu nič, saj je bila tudi sama rast te glive po vseh treh časih gojenja zelo slaba.

V filtratih sevov drugega gojenja nismo opazili, da bi temperaturna neobdelanost/obdelava (0 °C in 60 °C) vplivala na koncentracijo proteinov, prav tako nismo opazili povezave med koncentracijo proteinov in pH vrednostjo (nevtralni pH, umerjen pH). Sklepali smo, da na koncentracijo proteinov v gojišču vpliva čas gojenja, ne pa tudi temperaturna obdelava ali sprememba pH vrednosti.

Pri testiranju hemolitične aktivnosti filtratov s testom hemolize smo na ovčjih eritrocitih dobili lažno pozitivno hemolizo, ki je bila posledica vpliva minimalnega gojišča brez glukoze. V primeru testiranja filtratov na govejih eritrocitih ni prišlo do hemolize v nobenem primeru, MM-C pa ni izkazovalo HA. Hemolitičnih učinkovin v filtratih nismo zaznali, smo pa ugotovili, da ovčji eritrociti izkazujejo večjo občutljivost v primerjavi z

govejimi. Glede na to, da ovčji eritrociti vsebujejo več sfingomielina v primerjavi z govejimi, bi morda lahko ravno to bil razlog za večjo občutljivost (Rouser in sod., 1968).

Na govejih eritrocitih smo testirali hemolitično aktivnost tudi z dodatkom očiščene komponente B (pleurotolizin B), ki v kombinaciji z egerolizinom sproži lizo membrane. S pomočjo programa Sybill v AspGD (Arnaud in sod., 2012) smo predvidevali, da egerolizini nekaterih gliv, kot so glive *A. niger* CBS 513.88, *A. tubingensis*, *A. brasiliensis*, *A. fumigatus* Af293 in *A. acidus*, za delovanje potrebujejo dodatno, večjo komponento, s katero oblikujejo aktivni dvokomponentni hemolizin. Nayak in sod. (2013) k dvokomponentnim egerolizinom prištevajo tudi ostreolizin, terelizin in druge homologne proteine. Kadar vzorcem filtratov nismo dodali minimalne količine komponente B, smo s testom hemolize dobili negativne rezultate. Pri testiranju vzorcev z dodatkom komponente B so se rezultati izkazali za lažno pozitivne kot posledica samega delovanja dodane komponente B, ne pa HA binarnih citolizinov v filtratih. Sklepali smo, da pri manjši koncentraciji komponente A v vzorcu v primerjavi s komponento B pride do vezave obeh proteinov na stene luknjic mikrotitrne plošče. V primeru večje koncentracije komponente A bi se naj le-ta protein vezal na stene, komponenta B pa bi posledično ostala v sredini raztopine in povzročala hemolizo. Za potrditev smo testirali le filtrate štirih sevov (sevi *A. niger* CBS 113.46, *A. niger* CBS 513.88, *A. niger* N402 in *A. terreus* NIH2624), pri katerih so glede na bazo podatkov AspGD (Arnaud in sod., 2012) in predhodne raziskave Nayak in sod. (2013) hemolizini že identificirani. Lažno pozitivne rezultate smo dobili pri vzorcih filtratov in kontroli (BSA), prav tako pa tudi v primeru, ko smo ploščo predhodno tretirali z BSA (govejim serumskim albuminom), ki onemogoča vezavo proteinov na stene luknjic. Ota in sod. (2013) so iz bukovega ostrigarja izolirali komponento B (Ply B), protein, ki smo ga mi uporabili pri našem testiranju, da bi preverili, če deluje samo z OlyA ali lahko navzkrižno reagira tudi z drugimi egerolizini. Razlog, da je pri nas prišlo do hemolize v primeru dodane komponente B, je ta, da je bil izolat PlyB, ki smo ga pri testiranju uporabili, kontaminiran z minimalnimi količinami OlyA, od koder je izhajala njegova aktivnost (Ota in sod., 2013). OlyA in PlyB sama po sebi nista aktivna, temveč samo v kombinaciji, PlyB pa ni navzkrižno reagiral z drugimi egerolizini, ampak je bila hemoliza posledica njegove kontaminacije.

7.4 HEMOLITIČNA AKTIVNOST VODNIH EKSTRAKTOV MICELIJEV

Pred izvajanjem hemolitičnega testa smo izmerili koncentracijo proteinov v vzorcih vodnih ekstraktov, pri čemer smo mešanico proteaznih inhibitorjev dodali samo z namenom, da bi v ekstraktih iz gliv inhibirali proteolitično aktivnost in tako omogočili zaščito tarčnega proteina (hemolizina oz. egerolizina) pred degradacijo.

Po 24 urah gojenja v MM-C je koncentracija proteinov naraščala, po 48 urah pa se le malo povečevala, z izjemo ekstrakta glive *A. oryzae* Rib 40, kjer je ves čas gojenja naraščala. K večanju znotrajcelične koncentracije proteinov po daljšem času gojenja (48 in 72 urah) je doprinesla avtofagija in mlajši deli hif, kjer do avtolize še ni prišlo, saj le ta v koloniji ne poteka sinhrono (Isaac, 1996).

Kadar vodnim ekstraktom micelijev nismo dodali komponente B, smo s testom hemolize na govejih eritrocitih dobili negativne rezultate. Podobno kot pri filtratih, smo v primeru dodane komponente B pri vzorcih nekaterih sevov dobili lažno pozitivno hemolizo, ki je bila posledica kontaminiranega izolata PlyB.

Glede na to, da hemolitičnih proteinov v vzorcih filtratov ter vodnih ekstraktov micelijev s testom hemolize nismo zaznali, smo se usmerili v iskanje nepolarne hemolitične učinkovine v etanolnih ekstraktih.

7.5 HEMOLITIČNA AKTIVNOST ETANOLNIH EKSTRAKTOV MICELIJEV

Na podlagi preliminarne študij se je izkazalo, da so za hemolizo lahko odgovorne tudi organske biološko aktivne snovi v etanolnih ekstraktih, zato smo se odločili tudi za testiranje teh vzorcev. S testom hemolize smo ugotovili, da je večina etanolnih ekstraktov micelijev izkazovala hemolitično aktivnost, razen v primeru treh sevov (sevi *A. zonatus* CBS 506.65, *A. versicolor* CBS 795.97 in *A. wentii* DTO 134-E9), kjer do hemolize ni prišlo niti v primeru največjega testiranega volumna (30 µl) vzorca. HA etanolnih ekstraktov v primeru stradanja smo zaznali pri 13 od skupno 16 testiranih sevov. Opazili smo, da se je z večjim volumenom testiranega vzorca povečevala vsebnost oz. koncentracija organske snovi in hitreje je prišlo do 50-odstotne hemolize. V ekstraktih večine sevov je bilo po 48 urah močno izločanje hemolitične učinkovine, prevladovala pa so tudi večje koncentracije organske snovi v primerjavi z vzorci po 72 urah. Kljub višjim

koncentracijam organske snovi v vzorcih po 48 urah pa do hemolize ni vedno prišlo hitreje, kar lahko v teh primerih kaže na manjšo vsebnost hemolitičnih učinkovin v primerjavi z deležem ostalih, nehemolitičnih učinkovin v vzorcu, ki doprinesejo k večji koncentraciji suhe snovi. V organskih ekstraktih proteinov nismo pričakovali, zato je bila hemolitična aktivnost verjetno posledica še neznane nepolarne snovi. Naše rezultate so analizirali z LC-MS (tekoča kromatografija sklopljena z masno spektroskopijo), pri čemer se je pokazala prisotnost velikih količin polinenasičenih maščobnih kislin, ki bi lahko bile odgovorne za hemolizo. Etanolni ekstrakti so izkazovali od koncentracije odvisno lizo govejih eritrocitov, saj je do 50-odstotne hemolize najhitreje prišlo ob dodatku največjega volumna ekstrakta (30 μ l), pri manjših volumnih pa počasneje, kar je zaradi prisotnosti višjih vrednosti MK v večjem volumnu ekstrakta. Vlogo maščobnih kislin pri lizi eritrocitov so odkrili tudi v ekstraktih morskih gliv, ter drugih morskih organizmov (alge, morska trava, dinoflagelati in ribe). V vodnem ekosistemu imajo pomembno citotoksično vlogo, s čimer vplivajo na rast alg, fitoplanktona ter cianobakterij (Botic in sod., 2011).

8 SKUPNA RAZPRAVA IN SKLEPI

8.1 PRIMERJAVA REZULTATOV GLIV, GOJENIH V MEDIJU Z IN BREZ VIRA OGLJIKA

Številne študije so pokazale, da na produkcijo in delovanje glivnih hemolizinov vplivajo številni dejavniki, kot so temperatura, pH vrednost, kovinski ioni, hranila in drugi. Med pomembne dejavnike spada prisotnost različnih virov ogljika, kot so dokazali že Lu in sod. (2010) ter drugi. Prav tako bi naj na produkcijo vplivali tudi stresni pogoji, kot je stradanje z ogljikom. Braaksma in sod. (2010) so v sekretumu glive *A. niger* zaznali prisotnost proteina, homolognega Asp-hemolizinu le v primeru gojenja glive v odsotnosti ogljika, medtem ko v primeru vira ogljika (sorbitol, galakturonska kislina) proteina niso zaznali. Iz tega razloga smo primerjali produkcijo hemolizinov izbranih 18 vrst gliv rodu *Aspergillus*, ki smo jih gojili v MM+C in v MM-C, kot je opisano v točki 3.2.2.

8.1.1 Teža micelijev in pH vrednosti gojišč

Teža micelijev je bila po vseh časih gojenja (24, 48, 72 ur) manjša v MM-C kot v primeru gojenja v MM+C. Glive so v primeru prenosa v MM-C imele na voljo le endogen vir ogljika, ki so ga pridobile z recikliranjem starejših delov micelija, medtem ko so v nasprotnem primeru sprva uporabljale še eksogen vir ogljika, zaradi česar je bila biomasa večja (Pollack in sod., 2007). V obeh primerih gojenja (MM+C/MM-C) je bila biomasa pri večini sevov največja po 24 urah, manjša po 48 urah in najmanjša po 72 urah gojenja.

V obeh primerih gojenja (MM-C, MM+C), z nekaterimi izjemami, se je z daljšim časom gojenja pH vrednost gojišč zviševala. Pri sevih, ki so izstopali, smo opazili, da pH vrednost ni naraščala s časom, ampak je bila po 24 urah večja, kot po daljšem času gojenja v MM. V obeh primerih gojenja (MM+C/MM-C) sta bili ti izjemi seva *A. zonatus* CBS 506.65 in *A. versicolor* CBS 795.97. Poleg teh dveh je v MM+C izstopal še sev *A. niger* CBS 513.88, v MM-C pa seva *A. aculeatus* CBS 172.66 in *A. wentii* DTO 134-E9. Do naraščanja pH vrednosti je najverjetneje prišlo zaradi pomanjkanja hranil (glukoze) in s tem posledične razgradnje aminokislin (kot vira energije), pri čemer se je sproščal amonijak in prispeval k dvigu pH.

8.1.2 Hemolitična aktivnost vzorcev

8.1.2.1 Analiza filtratov gliv glede na prisotnost/odsotnost glukoze

V obeh primerih gojenja (MM+C/MM-C) se je hemoliza na ploščah s KA pojavila le pri filtratih štirih od 16 testiranih sevov (*A. tubingensis* CBS 134.48, *A. brasiliensis* CBS 101740, *A. niger* CBS 113.46 in *A. niger* N402). Pri istih sevih smo hemolizo predhodno zaznali tudi pri gojenju spor na KA. Pri filtratih z nativno pH vrednostjo je bil, tako pri gojenju v MM+C kot v MM-C, vzorec hemolize enak, z izjemo filtratov glive *A. tubingensis* CBS 134.48. Pri gojenju te glive v MM+C se je hemoliza pojavila le v primeru, kadar smo sev gojili 48 ur in vzorec ni bil temperaturno obdelan. V primeru stradanja pa se je hemoliza pojavila samo, kadar smo sev gojili 72 ur, pri neobdelanem vzorcu in vzorcu, ki smo ga termično obdelali na 60 °C. Opazili smo, da pri hemolitično aktivnih filtratih z nativno pH vrednostjo, hemolize s termično obdelavo na 60 °C nismo uničili.

Vzorec hemolize je bil prav tako, ne glede na to, v katerem gojišču smo gojili glive, enak tudi v primeru, kadar smo filtratom pH umerili na nevtralno vrednost. S termično obdelavo filtratov na 60 °C smo ne glede na prisotnost/odsotnost ogljika popolnoma uničili HA filtratov pri vseh sevih, razen pri sevu *A. niger* N402, kjer je bila HA zmanjšana. Glede na to, da se je po termični obdelavi filtratov z nativno pH vrednostjo na 60 °C HA ohranila, smo sklepali, da zanjo niso odgovorne proteaze. Zakaj se je po dodatku NaOH filtratov z umerjeno pH vrednostjo in obdelavo na 60 °C HA uničila (sevi *A. brasiliensis* 101740, *A. niger* CBS 113.46) oziroma zmanjšala (sev *A. niger* N402) ni čisto jasno. Glede na to, da filtratov seva *A. tubingensis* z NaOH nismo umerjali in se je HA ohranila tudi po 60 °C, sklepamo, da je NaOH vplival na stabilnost hemolitične učinkovine.

Ne glede na prisotnost/odsotnost glukoze, proteolize nismo opazili pri naslednjih sevih: *A. zonatus* CBS 506.65, *A. aculeatus* CBS 172.66, *A. wentii* DTO 134-E9 in *A. carbonarius* DTO 115-B6. Pri sevu *A. versicolor* CBS 795.97 in *A. foetidus* CBS 106.47 smo proteolizo opazili samo v primeru gojenja z glukozo. S segrevanjem filtratov z nativno pH vrednostjo na 60 °C proteolitičnih encimov pri nekaterih sevih nismo popolnoma uničili. Rezultati proteolize na ploščah s PM so pokazali, da se je vzorec proteolize hemolitično aktivnih filtratov razlikoval od vzorca hemolize na KA, tako v primeru gojenja sevov v MM+C kot

v MM-C. S primerjavo rezultatov proteolize z rezultati hemolize HA filtratov smo opazili, da so poleg neznane hemolitične učinkovine k hemolizi dodatno prispevali tudi proteolitični encimi. PAGE elektroforeza prisotnosti egerolizinov ni pokazala.

Ne glede na gojenje v MM+C/MM-C do HA na KA ni prišlo le pri enem izmed treh sevov *A. niger*, in sicer pri filtratu glive *A. niger* CBS 513.88 (levcinska mutanta), kljub dodatku levcina in nikotinamida v medij.

Z merjenjem koncentracije proteinov v filtratih smo opazili, da se koncentracija proteinov glede na način gojenja (MM+C, MM-C) od vrste do vrste gliv rodu *Aspergillus* razlikuje, saj so nekatere vrste vsebovale višje koncentracije proteinov v MM-C, nekatere pa v MM+C. Koncentracija je v obeh primerih (MM+C, MM-C) s časom gojenja padala in pri nekaterih sevih po 72 urah spet nekoliko narasla.

Z bioinformatiko analizo smo zaznali morebitne komponente B pri sevih *A. niger* CBS 513.88, *A. tubingensis*, *A. brasiliensis*, *A. acidus*, *A. fumigatus* Af293, zato smo pričakovali, da jih bomo detektirali tudi v naših vzorcih v obliki pojava HA. Ne glede na to, ali smo glive gojili v MM+C ali MM-C, nismo zaznali HA filtratov na (ovčjih in govejih) eritrocitih ter prisotnosti dvokomponentnih egerolizinov.

8.1.2.2 Analiza vodnih ekstraktov micelijev gliv glede na prisotnost/odsotnost glukoze

Opazili smo, da so bile koncentracije proteinov v vodnih ekstraktih micelijev večje v primeru gojenja brez glukoze. V tem primeru so glive že zelo hitro prišle v pogoje stradanja, zaradi česar se je prej povečala znotrajcelična aktivnost na račun avtofagije in s tem pridobivanja endogenega vira ogljika. V primeru MM+C pa so zaradi prisotnosti glukoze glive prišle v pogoje stradanja kasneje, zaradi česar smo izmerili nižje koncentracije proteinov. V obeh primerih gojenja (MM+C, MM-C) pa so se koncentracije proteinov s časom gojenja povečevale.

Podobno kot pri filtratih tudi pri vodnih ekstraktih micelijev nismo zaznali HA na nobenih od testiranih eritrocitov, prav tako tudi ne prisotnosti binarnih egerolizinov.

8.1.2.3 Analiza etanolnih ekstraktov micelijev gliv glede na prisotnost/odsotnost glukoze

V obeh primerih testiranja na ploščah s KA se je sprva pokazalo, da so bili hemolitično aktivni čisto vsi testirani vzorci, vendar smo HA opazili tudi pri testiranju čistega 96 % etanola, na podlagi česar smo sklepali, da so rezultati lažno pozitivni. Razlog za HA etanola na KA ni znan. S testom hemolize pa smo HA etanolnih ekstraktov v primeru gojenja z glukozo zaznali pri 11 od skupno 16 testiranih sevov, v primeru stradanja pa pri 13 od 16 testiranih sevov. S to metodo testiranja HA samega 96 % etanola nismo zaznali. Glede na to, da s testom hemolize nismo zaznali HA pri vseh vzorcih, sklepamo, da etanol ni vplival na aktivnost vzorcev. Predvidevamo, da je analiza hemolize s KA bolj občutljiva metoda kot hemolitični test, kot se je predhodno izkazalo že pri vzorcih filtratov.

HA v obeh primerih gojenja (MM+C/MM-C) nismo zaznali pri etanolnih ekstraktih dveh sevov, in sicer pri sevu *A. zonatus* CBS 506.65 ter sevu *A. wentii* DTO 134-E9, ki smo ju gojili 48 ter 72 ur. Glede na rezultate smo opazili vpliv ogljika na HA etanolnih ekstraktov, saj smo pri stradanju z ogljikom zaznali HA pri večjem številu sevov. Etanolni ekstrakti, ki so imeli HA samo v primeru gojenja brez glukoze, so pripadali naslednjim sevom: *A. tubingensis* CBS 134.48, *A. foetidus* CBS 106.47, *A. niger* CBS 513.88 (po 72 urah), *A. niger* N402 (po 72 urah), *A. carbonarius* DTO 115-B6. Samo en sev (*A. versicolor* CBS 795.97) je HA izkazoval samo v primeru, kadar smo mediju dodali glukozo.

Kot smo že omenili, smo opazili, da večji kot je bil volumen testiranega vzorca (5, 10, 20, 30 µl), večja je bila koncentracija organske snovi in hitreje je prišlo do hemolize. Ker je z večanjem koncentracije organske snovi v vzorcu do hemolize prišlo hitreje, smo potrdili, da je hemoliza posledica prisotnosti neznane organske hemolitične učinkovine. S primerjavo vzorcev istega seva pa smo opazili, da je čas gojenja (48 ur, 72 ur) vplival na celotno koncentracijo organske snovi, ne pa na delež hemolitične učinkovine in s tem hemolizo.

Analiza LC-MS vseh vzorcev je pokazala prisotnost velikih količin polinenasičenih maščobnih kislin, ki bi lahko bile odgovorne za hemolizo. Dobljeni rezultati predstavljajo pomembno odkritje, saj bi lahko organska snov, ki smo jo zaznali, igrala pomembno vlogo pri nastanku okužb, povezanih z glivami rodu *Aspergillus*.

8.2 SKLEPI

Miceliji:

- Prisotnost glukoze v minimalnem mediju vpliva na rast gliv. Teža micelijev vseh testiranih vrst rodu *Aspergillus* je bila večja v primeru gojenja v minimalnem gojišču z glukozo kot v primeru stradanja.

Filtrati:

- Ne glede na prisotnost/odsotnost glukoze v mediju so bili na KA hemolitično aktivni filtrati naslednjih vrst: *A. tubingensis* CBS 134.48, *A. brasiliensis* CBS 101740, *A. niger* CBS 113.46 in *A. niger* N402.
- Hemolitična aktivnost na KA je bila poleg nekih hemolitičnih učinkovin tudi posledica proteaz.
- PAGE analiza pri hemolitično aktivnih filtratih sevov, gojenih tako v MM+C kot v MM-C, ni potrdila prisotnosti hemolizinov oz. egerolizinov v dovolj veliki koncentraciji, da bi jih lahko določili v nekoncentriranem vzorcu.
- Hemolitični test testiranih filtratov gliv rodu *Aspergillus* na govejih oz. ovčjih eritrocitih ni pokazal prisotnosti hemolitičnih učinkovin.
- Ovčji eritrociti so bolj občutljivi v primerjavi z govejimi eritrociti.

Vodni ekstrakti micelijev:

- Vodni ekstrakti micelijev v nobenem primeru gojenja (MM+C/MM-C) niso bili hemolitično aktivni.

Glede na kontaminiran izolat Ply B z Oly A ne moremo sklepati na navzkrižno reaktivnost komponente B z drugimi egerolizinimi in s tem na prisotnost dvokomponentnih egerolizinov v filtratih in vodnih ekstraktih micelijev gliv rodu *Aspergillus*.

Etanolni ekstrakti micelijev:

- Etanolni ekstrakti micelijev vsebujejo organsko snov, ki izkazuje hemolitično aktivnost.
- Stradanje spodbudi produkcijo organskih hemolitičnih učinkovin, saj smo hemolizo zaznali pri večjem številu sevov, gojenih v minimalnem mediju brez dodane glukoze.
- V primeru gojenja sevov v minimalnem mediju brez glukoze so bili hemolitično aktivni etanolni ekstrakti 13 od 16 testiranih sevov, in sicer sevi *A. tubingensis* CBS 134.48, *A. brasiliensis* CBS 101740, *A. sydowii* CBS 593.65, *N. fischeri* CBS 544.65, *A. foetidus* CBS 106.47, *A. niger* CBS 113.46, *A. niger* CBS 513.88, *A. niger* N402, *A. oryzae* Rib 40, *A. nidulans* FGSCA4, *A. aculeatus* CBS 172.66, *A. terreus* NIH2624, *A. carbonarius* DTO 115-B6, gojeni tako 48 kot 72 ur.
- V primeru gojenja sevov v minimalnem mediju z glukozo so bili hemolitično aktivni etanolni ekstrakti 11 od 16 testiranih sevov, in sicer sevi *A. versicolor* CBS 795.97, *A. brasiliensis* CBS 101740, *A. sydowii* CBS 593.65, *N. fischeri* CBS 544.65, *A. niger* CBS 113.46, *A. oryzae* Rib 40, *A. nidulans* FGSCA4, *A. aculeatus* CBS 172.66, *A. terreus* NIH2624, gojeni 48 in 72 ur ter seva *A. niger* CBS 513.88 in *A. niger* N402, gojena 48 ur.
- Etanolni ekstrakti dveh sevov (*A. zonatus* CBS 506.65 in *A. wentii* DTO 134-E9) v nobenem primeru gojenja (MM+C/MM-C) niso izkazovali hemolitične aktivnosti.
- Z večanjem testiranega volumna etanolnega ekstrakta se povečuje koncentracija organske snovi in krajši je čas, ki je potreben, da pride do 50-odstotne hemolize.
- Čas gojenja (48 ur in 72 ur) v MM+C/MM-C vpliva na koncentracijo organske snovi v etanolnih ekstraktih, ne pa na delež hemolitične učinkovine. Koncentracije organske snovi so bile višje v primeru 48-urnega gojenja sevov.
- Analiza LC-MS je pokazala na vsebnost velikih količin polinenasičenih maščobnih kislin, ki bi lahko bile odgovorne za hemolizo etanolnih ekstraktov.

9 POVZETEK

Rod *Aspergillus* obsega približno 200 znanih vrst (Zalar in Gunde-Cimerman, 2002), ki skupaj s plesnimi rodov *Penicillium* in *Fusarium* tvorijo dominantno skupino plesni na zemlji ter spadajo med najpogostejše kvarljivce živil (Jeršek, 2008). Prav tako sodijo med industrijsko pomembne plesni, med katerimi se najpogosteje uporablja gliva *A. niger* za pridobivanje organskih kislin in zunajceličnih encimov. Številne nitaste glive iz rodu *Aspergillus* producirajo hemolizine, ki jih definiramo kot eksotoksine, sposobne lize rdečih krvnih celic in tudi celic z jedrom (Nayak in sod., 2013). Najbolje so preučeni hemolizini bakterij, medtem ko je o glivnih hemolizinih manj znanega.

Največjo skupino znotraj glivnih hemolizinov predstavlja egerolizinska družina proteinov (Berne in sod., 2009; Nayak in sod., 2013), ki jih poleg gliv najdemo tudi pri bakterijah, rastlinah, nekaterih insektih in pri enem od virusnih predstavnikov. Največ predstavnikov z egerolizinskimi geni spada ravno v rod *Aspergillus*. V to družino poleg Asp-hemolizina uvrščamo tudi druge proteine, kot so ostreolizin, pleurotolizin A, egerolizin, terelizin, dva domnevna proteina iz bakterije *C. bifermentans*, domnevni protein PA0122 iz bakterije *P. aeruginosa*, domnevni protein iz plesni *N. crassa* ter številne druge proteine ali cDNA prepise z zelo podobnimi zaporedji (Nayak in sod., 2010; Berne in sod., 2009). Gre za proteine z majhno molekulsko maso (15-20 kDa), nizko izoelektrično točko, stabilnostjo v širokem razponu pH in temperaturno stabilnostjo do 60 °C oziroma 65 °C (Nayak in sod., 2013, Berne in sod., 2009). Pri večini egerolizinov prevladuje β -struktura. Biološka vloga glivnih egerolizinov še ni točno pojasnjena, vendar je znano, da sodelujejo pri tvorbi transmembranskih por, ter domnevajo, da so udeleženi pri razvoju gliv (gobjega plodišča) in virulenci patogenih vrst rodu *Aspergillus* (virulentni dejavniki).

Novejše študije so pokazale, da bi naj poleg pleurotolizina (PlyA, PlyB) tudi nekateri drugi glivni hemolizini za hemolitično delovanje potrebovali še drugo, večjo komponento, s katero oblikujejo dvokomponentni hemolizin (Sakurai in sod., 2004). Taki primeri egerolizinov so ostreolizin in erilizin (EryA in EryB) ter verjetno tudi drugi homologni proteini (Ota in sod., 2013; Shibata in sod., 2010).

V tej nalogi smo za 18 izbranih vrst rodu *Aspergillus* poskušali določiti prisotnost hemolitično aktivnih snovi v gojiščih ter vodnih in etanolnih ekstraktih micelijev. Z

gojenjem gliv v minimalnem gojišču z in brez glukoze smo preverjali vpliv ogljika na produkcijo hemolizinov. Predvsem smo se usmerili v iskanje proteinov egerolizinske družine, katerih aktivnost smo detektirali z dodajanjem minimalne količine proteina B (PlyB), ki bi naj v kombinaciji z egerolizinom sprožil lizo membrane.

Glive smo najprej gojili 24 ur v KG in jih nato precepili v MM+C/MM-C, kjer smo jih ločeno stresali 24, 48 ter 72 ur. Po posameznem času inkubacije smo stehali težo micelija in izmerili pH vrednost filtrata. Teža biomase je bila pri vseh treh meritvah večja v primeru gojenja z glukozo, kot v primeru stradanja. Ne glede na prisotnost/odsotnost ogljika v mediju je biomasa s časom gojenja upadala. Po prenosu gliv iz KG v MM so glive rasle, dokler so imele na voljo dovolj ogljika, nato pa je biomasa zaradi pomanjkanja hranil in porabe kisika začela upadati. Do padca je verjetno prišlo kasneje v MM+C, saj so glive imele na voljo še glukozo iz medija. Vrednosti pH gojišč so v obeh primerih (MM+C/MM-C) s časom naraščale, zaradi sproščanja amonijaka.

Hemolitično aktivnost pridobljenih filtratov smo nato testirali z vcepljanjem v KA in PM ter s testom hemolize. Na KA so bili HA filtrati štirih sevov (*A. tubingensis* CBS 134.48, *A. brasiliensis* CBS 101740, *A. niger* CBS 113.46 in *A. niger* N402), gojenih v MM+C in v MM-C. Pri istih sevih smo hemolizo predhodno zaznali tudi pri gojenju spor na KA, pri čemer smo sklepali, da se je hemolitična učinkovina sproščala v medij. Glede na rezultate plošč s PM smo opazili, da so k hemolizi poleg neznanih hemolitičnih učinkovin dodatno prispevale tudi proteaze. S PAGE smo izključili možnost, da je HA filtratov posledica izločenih hemolizinov oz. egerolizinov, saj nismo zaznali fragmentov ustrezne velikosti (15-20 kDa). Za razliko od hemolize na KA s testom hemolize HA filtratov (na ovčjih in govejih eritrocitih) nismo zaznali v primeru gojenja z glukozo, niti v primeru stradanja, čeprav bi naj stresni dejavniki spodbudili produkcijo hemolizinov. Prisotnost morebitnih dvokomponentnih hemolizinov, ki smo jih preverjali z dodatkom komponente B (PlyB), se je izkazala za lažno pozitivno in je bila posledica kontaminacije komponente B s komponento A (OlyA). Na tem področju so Novak in sod. (2013) naredili nadaljnje raziskave. V bakteriji *Escherichia coli* jim je uspelo izraziti rekombinantna proteina glive *A. niger* (komponenti A: A145 in A142), kar bo omogočilo lažje preučevanje strukture egerolizinov in pridobivanje protiteles, kar se bo uporabilo pri imunolokalizacijskih

študijah in pri določanju vezavnih komponent. Menijo, da ima lahko komponenta A različne funkcije in da njihova primarna funkcija ni nujno povezana s sposobnostjo permeabilizacije membran. Prav tako bodo izražanje egerolizinov in homologov z vsebovano MACPF domeno glive *A. niger* N402 določali pri različnih pogojih z uporabo QPCR. V prihodnje želijo izraziti tudi tisto komponento B, ki se v genomu nahaja poleg komponente A.

HA vodnih ekstraktov micelijev na ovčjih in govejih eritrocitih nismo zasledili niti v primeru gojenja sevov v MM+C, niti v MM-C. Iz istega razloga kot pri filtratih smo tudi tukaj dobili lažno pozitivne rezultate, v primeru dodatka komponente B.

S preliminarnimi študijami se je izkazalo, da so za hemolizo lahko odgovorne tudi biološko aktivne snovi v ekstraktih micelijev, zato smo zaradi predhodno negativnih rezultatov testirali tudi etanolne ekstrakte micelijev. Njihovo HA smo prav tako preverjali z vcepljanjem v KA in s testom hemolize. Ne glede na prisotnost/odsotnost ogljika v gojišču so bili na ploščah s KA hemolitično aktivni čisto vsi testirani vzorci, vendar smo HA opazili tudi pri testiranju čistega 96 % etanola, na podlagi česar smo sklepali, da so rezultati lažno pozitivni. S testom hemolize pa smo HA etanolnih ekstraktov opazili pri 13 od 16 testiranih sevov v primeru stradanja, v primeru gojenja z glukozo pa pri 11 od skupno 16 testiranih sevov, vendar pri dveh sevih (*A. niger* CBS 513.88 in *A. niger* N402) samo po 48 urah gojenja. Glede na to, da s testom hemolize nismo zaznali HA pri vseh vzorcih, sklepamo, da etanol ni vplival na aktivnost vzorcev. Predvidevamo, da je analiza s KA bolj občutljiva metoda kot hemolitični test. V obeh primerih gojenja HA ekstraktov nismo zaznali pri sevu *A. wentii* DTO 134-E9 in *A. zonatus* CBS 506.65. V nekaterih primerih (sevi *A. tubingensis* CBS 134.48, *A. foetidus* CBS 106.47, *A. niger* CBS 513.88/72 ur, *A. niger* N402/72 ur in *A. carbonarius* DTO 115-B6) je do hemolize prišlo samo pri gojenju sevov v pogojih stradanja, s čimer smo potrdili, da bi naj pomanjkanje vira ogljika spodbudilo produkcijo organskih hemolitičnih učinkovin.

Opazili smo, da večji kot je bil volumen testiranega vzorca (5, 10, 20, 30 µl), večja je bila koncentracija organske snovi in hitreje je prišlo do 50-odstotne hemolize. Ker je z večanjem koncentracije organske snovi do hemolize prišlo hitreje, smo potrdili, da je le-ta posledica prisotnosti neznane organske hemolitične učinkovine. Naše rezultate so kasneje

analizirali z LC-MS, pri čemer se je pokazala prisotnost velikih količin polinenasičenih maščobnih kislin, ki bi lahko bile odgovorne za hemolizo, tako v primeru gojenja v minimalnem mediju z glukozo, kot v primeru stradanja z ogljikom. Ti rezultati predstavljajo pomembno odkritje, saj bi lahko organska snov, ki smo jo zaznali, igrala pomembno vlogo pri nastanku okužb, povezanih z glivami rodu *Aspergillus*.

10 VIRI

- Abad A., Fernández-Molina J. V., Bikandi J., Ramírez A., Margareto J., Sendino J., Hernando F. L., Pontón J., Garaizar J., Rementeria A. 2010. What makes *Aspergillus fumigatus* a successful pathogen? Genes and molecules involved in invasive aspergillosis. *Revista Iberoamericana de Micología*, 27, 4: 155-182.
- Al-Deen I. H. S., Twaij H. A. A., Al-Badr A. A., Istarabad T. A. W. 1987. Toxicologic and histopathologic studies of *Pleurotus ostreatus* mushroom in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 21: 297-305.
- Arnaud M.B., Cerqueira G.C., Inglis D.O., Skrzypek M.S., Binkley J., Chibucos M.C., Crabtree J., Howarth C., Orvis J., Shah P., Wymore F., Binkley G., Miyasato S.R., Simison M., Sherlock G., Wortman J.R. 2012. The *Aspergillus* Genome Database (AspGD): recent developments in comprehensive multispecies curation, comparative genomics and community resources. *Nucleic Acids Research*, 40, Database Issue: D653-D659.
- Bennet J. W., Klich M. 2003. Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*, 16, 3: 497-516.
- Berne S., Križaj I., Pohleven F., Turk T., Maček P., Sepčič K. 2002. *Pleurotus* and *Agrocybe* hemolysins, new proteins hypothetically involved in fungal fruiting. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1570, 3: 153-159.
- Berne S., Lah L., Sepčič K. 2009. Aegerolysins: structure, function, and putative biological role. *Protein Science*, 18, 4: 694-706.
- Berne S., Pohleven J., Vidic I., Rebolj K., Pohleven F., Turk T., Maček P., Sonnenberg A., Sepčič K. 2007. Ostreolysin enhances fruiting initiation in the oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*). *Mycological Research*, 111, 12: 1431-1436.
- Berne S., Sepčič K., Anderluh G., Turk T., Maček P., Poklar Urlih N. 2005. Effect of pH in the pore forming activity and conformational stability of ostreolysin, a lipid raft-binding protein from the edible mushroom *Pleurotus ostreatus*. *Biochemistry*, 44, 33:11137-11147.
- Botić T., Kunčič M. K., Sepčič K., Knez Ž., Gunde-Cimerman N. 2012. Salt induces biosynthesis of hemolytically active compound in the xerotolerant food-borne fungus *Wallemia sebi*. *FEMS Microbiology Letters*, 326, 1: 40-46.
- Brakhage A. A. 2013. Regulation of fungal secondary metabolism. *Nature Reviews. Microbiology*, 11, 1: 21-32.
- Braaksma M., Martens-Uzunova E. S., Punt P. J., Schaap P. J. 2010. An inventory of the *Aspergillus niger* secretome by combining in silico predictions with shotgun proteomics data. *BMC Genomics*, 11: 584, doi:10.1186/1471-2164-11-584: 11 str.
- Bridge P. D., Kokubun T., Simmonds M. S. J. 2004. Protein extraction from fungi. V: Protein purification protocols. Vol. 244. Cutler P. (ed.). 2nd ed. Totowa, Humana Press: 37-46.
- Brown D. W., Salvo J. J. 1994. Isolation and characterization of sexual spore pigments from *Aspergillus nidulans*. *Applied and Environmental Microbiology*, 60, 3: 979-983.
- Calvo A. M., Wilson R. A., Bok J. W., Keller N. P. 2002. Relationship between secondary metabolism and fungal development. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66, 3: 447-459.
- Carlile M. J., Watkinson S. C., Gooday G. W. 2001. The fungi. 2nd ed. San Diego, Academic Press: 588 str.

- Choudhary V. 2012. Production, isolation and characterization of alkaline protease from *Aspergillus versicolor* PF/F/107. *Journal of Academia and Industrial Research*, 1, 5: 272-277.
- Chowdhury H. H., Rebolj K., Kreft M., Zorec R., Maček P., Sepčič K. 2008. Lysophospholipids prevent binding of a cytolytic protein ostreolysin to cholesterol-enriched membrane domains. *Toxicon*, 51: 1345-1356.
- Coral G., Arikan B., Ünalı M. N., Güvenmez H. 2003. Thermostable alkaline protease produced by an *Aspergillus niger* strain. *Annals of Microbiology*, 53, 4: 491-498.
- Dagenais T. R. T., Keller N. P. 2009. Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* in invasive aspergillosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 22, 3: 447-465.
- Derlink M. 2009. Biološko aktivne snovi v vodnih ekstraktih nekaterih halofilnih in halotolerantnih gliv. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo: 61 str.
- Donohue M., Wei W., Wu J., Zawia N. H., Hud N., Jesus V. D., Schmechel D., Hettick J. M., Beezhold D. H., Vesper S. 2006. Characterization of nigerlysin, hemolysin produced by *Aspergillus niger*, and effect on mouse neuronal cells *in vitro*. *Toxicology*, 219: 150-155.
- Ebina K., Ichinowatari S., Yokota K., Sakaguchi O. 1984. Studies on toxin of *Aspergillus fumigatus* XIX. Biochemical alteration of sera after Asp-hemolysin inoculation of *Aspergillus* infection in mice. *Japanese Journal of Medical Mycology*, 25: 236-243.
- Ebina K., Yokota K., Sakaguchi O. 1982. Studies on toxin of *Aspergillus fumigatus* XIV. Relationship between Asp-hemolysin and experimental infection of mice. *Japanese Journal of Medical Mycology*, 23: 246-252.
- Ebina K., Yokota K., Sakaguchi O. 1983. Studies on toxin of *Aspergillus fumigatus* XVI. Biological properties of Asp-hemolysin as a parasite factor. *Japanese Journal of Medical Mycology*, 24: 245-252.
- Emri T., Szilágyi M., László K., M-Hamvas M., Pósci I. 2009. PepJ is a new extracellular proteinase of *Aspergillus nidulans*. *Folia Microbiologica*, 54, 2: 102-109.
- Fox E. M., Howlett B. J. 2008. Secondary metabolism: regulation and role in fungal biology. *Current Opinion in Microbiology*, 11: 481-487.
- Fukuchi Y., Kudo Y., Kumagai T., Ebina K., Yokota K. 1998. Oxidized low density lipoprotein inhibits the hemolytic activity of Asp-hemolysin from *Aspergillus fumigatus*. *FEMS Microbiology Letters*, 167, 2: 275-280.
- Han C.-H., Zhang G.-Q., Wang H.-X., Ng T. B. 2010. Schizolysin, a hemolysin from the split gill mushroom *Schizophyllum commune*. *FEMS Microbiology Letters*, 309, 2: 115-121.
- Houbraken J., Samson R. A. 2011. Phylogeny of *Penicillium* and the segregation of *Trichocomaceae* into three families. *Studies in Mycology*, 70: 1-51.
- Isaac S. 1996. What are the factors that contribute to the onset of autolysis in fungal hyphae and does the process confer any ecological advantage? *Mycologist*, 10, 4 : 158-159.
- Jeršek B. 2008. Osnovni principi identifikacije plesni, kvasovk in bakterij v živilih: skripta in delovni zvezek za laboratorijske vaje pri predmetu Živilska mikrobiologija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 75 str.

- Juntas P., Rebolj K., Sepčič K., Maček P., Žužek M. C., Cestnik V., Frangež R. 2009. Ostreolysin induces sustained contraction of porcine coronary arteries and endothelial dysfunction in middle- and large-sized vessels. *Toxicon*, 54: 784-792.
- Kamei K., Watanabe A. 2005. *Aspergillus* mycotoxins and their effect on the host. *Medical Mycology*, 43, Suppl. 1: S95-S99.
- Katedra za biokemijo. 2013. Struktura in funkcija membransko aktivnih proteinov egerolizinov. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani, Oddelek za biologijo: 1 str.
<http://web.bf.uni-lj.si/bi/biokemija/Raziskave.html> (avgust, 2013)
- Kavčič I. 2009. Hemolitične učinkovine v vodnem ekstraktu bukovega ostrigarja (*Pleurotus ostreatus*). Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo: 89 str.
- Kudo Y., Fukuchi Y., Kumagai T., Ebina K., Yokota K. 2001. Oxidized low-density lipoprotein-binding specificity of Asp-hemolysin from *Aspergillus fumigatus*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1568: 183-188.
- Latge J. P. 1999. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 12, 2: 310 – 350.
- Lu X., Sun J., Nimtz M., Wissing J., Zeng A.-P., Rinas U. 2010. The intra-and extracellular proteome of *Aspergillus niger* growing on defined medium with xylose or maltose as carbon substrate. *Microbial Cell Factories*, 9: 23, doi: 10.1186/1475-2859-9-23: 13 str.
- Mackenzie D. W. R. 1988. *Aspergillus* in man. V: *Aspergillus* and aspergillosis: Proceedings of the Second International Symposium on Topics in Mycology, June 28 – July 1, 1987, Antwerp. Bossche H. V., Mackenzie D.W.R., Cauwenbergh G. (eds.). Antwerp, University of Antwerp: 1-8.
- Madigan M. T., Martinko J. M. 2006. Brock biology of microorganisms. 11th ed. Upper Saddle River, Pearson Prentice Hall: 992 str.
- Manns J. M., Mosser D. M., Buckley H. R. 1994. Production of a hemolytic factor by *Candida albicans*. *Infection and Immunity*, 62, 11: 5154-5156.
- Marcy J. A., Pruett W. P. 2001. Proteolytic microorganisms. V: *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. Downes F.P., Ito K. (eds.). 4th ed. Washington, American Public Health Association: 183-186.
- Moore D., Robinson G. D., Trinci A. P. J. 2011. Twenty first century guidebook to fungi. New York, Cambridge University Press: 627 str.
- Nayak A. P., Green B. J., Beezhold D. H. 2013. Fungal hemolysins. *Medical Mycology*, 51, 1: 1-16.
- Nayak A. P., Blacher F. M., Hettick J. M., Lukomski S., Schmechel D., Beezhold D. H. 2010. Characterization of recombinant terrelysin, a hemolysin of *Aspergillus terreus*. *Mycopathologia*, 171, 1: 23-24.
- Nayak A. P., Green B. J., Friend S., Beezhold D. H. 2012. Development of monoclonal antibodies to recombinant terrelysin and characterization of expression in *Aspergillus terreus*. *Journal of Medical Microbiology*, 61: 489-499.
- Nielsen K. F. 2003. Mycotoxin production by indoor molds. *Fungal Genetics and Biology*, 39: 103-117.
- Nitsche B. M., Jørgensen T. R., Akeroyd M., Meyer V., Ram A. F. J. 2012. The carbon starvation response of *Aspergillus niger* during submerged cultivation: Insights from the transcriptome and secretome. *BMC Genomics*, 13, 1: 380-402.

-
- Novak M. 2009. Hemolitične učinkovine v ekstraktu plesni *Aspergillus fumigatus*. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo: 54 str.
- Novak M., Kraševac N., Sluga N., Režonja S., Lenarčič T., Podobnik M., Maček P., Anderluh G., Sepčič K. 2013. Aegerolysin in filamentous fungus *Aspergillus niger*. V: 10. srečanje Slovenskega Biokemijskega Društva, Ljubljana, 15. – 18. september 2013. Ljubljana, SBD: 1 str. (poster).
- Pollack J. K., Li Z. J., Marten M. R. 2007. Fungal mycelia show lag time before re-growth on endogenous carbon. *Biotechnology and Bioengineering*, 100, 3: 458-465.
- Rebolj K., Batista U., Sepčič K., Cestnik V., Maček P., Frangež R. 2007. Ostreolysin affects rat aorta ring tension and endothelial cells viability *in vitro*. *Toxicon*, 49: 1211-1213.
- Reijula K., Tuomi T. 2003. Mycotoxins of aspergilli: exposure and health effects. *Frontiers in Bioscience*, 8: 232-235.
- Rementeria A., López-Molina N., Ludwig A., Vivanco A. B., Bikandi J., Pontón J., Garaizar J. 2005. Genes and molecules involved in *Aspergillus fumigatus* virulence. *Revista Iberoamericana de Micología*, 22: 1-23.
- Rouser G., Nelson G. J., Fleischer S., Simon G. 1968. Lipid composition of animal cell membranes, organelles and organs. V: *Biological membranes*. Chapman D. (ed.). London, Academic Press: 5-64.
- Sakaguchi O., Shimada H., Yokota K. 1975. Purification and characteristics of hemolytic toxin from *Aspergillus fumigatus*. *Japanese Journal of Medical Science and Biology*, 28, 5-6: 328-331.
- Sakurai N., Kaneko J., Kamio Y., Tomita T. 2004. Cloning, expression, and pore-forming properties of mature and precursor forms of pleurotolysin, a sphingomyelin-specific two-component cytolysin from the edible mushroom *Pleurotus ostreatus*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1679, 1: 65-73.
- Samson R.A., Pitt J. I. 2000. Nomenclature of *Penicillium* and *Aspergillus* and their teleomorphs: types of *Aspergillus* and *Penicillium* and their teleomorphs in current use. V: *Integration of modern taxonomic methods for Penicillium and Aspergillus classification*. Samson R.A., Pitt J.I. (eds.). Abingdon, Harwood Academic Publishers: 51-72.
- Sanguineti E., Cosulich M. E., Salis A., Damonte G., Mariotti M. G., Zotti M. 2012. A hemolytic peptide from the mycophilic fungus *Sepedonium chrysospermum* (Bull.) Fr. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 94, 4: 987-994.
- Sepčič K., Berne S., Potrich C., Turk T., Maček P., Menestrina G. 2003. Interaction of ostreolysin, a cytolytic protein from the edible mushroom *Pleurotus ostreatus*, with lipid membranes and modulation by lysophospholipids. *European Journal of Biochemistry*, 270, 6: 1199-1210.
- Sepčič K., Berne S., Rebolj K., Batista U., Plemenitaš A., Šentjerc M., Maček P. 2004. Ostreolysin, a pore-forming protein from the oyster mushroom, interacts specifically with membrane cholesterol-rich lipid domains. *FEBS Letters*, 575, 1-3: 81-85.
- Sepčič K., Frangež R. 2010. Cytolytic and toxic effects of ostreolysin, a protein from the oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*). V: *Comprehensive bioactive natural products*. Vol. 2, Efficacy, safety & clinical evaluation I. Gupta V.K. (ed.). Texas, Stadium Press: 251-264.
- Shaaban M. T., El-Sabbagh S. M. M., Alam A. 2013. Studies on actinomycete producing a melanin pigment inhibiting aflatoxin B₁ production by *Aspergillus flavus*. *Life Science Journal*, 10, 1: 1437-1448.

- Sharon H., Hagag S., Oshero N. 2009. Transcription factor PrtT controls expression of multiple secreted proteases in the human pathogenic mold *Aspergillus fumigatus*. *Infection and Immunity*, 77, 9: 4051-4060.
- Shibata T., Kudou M., Hoshi Y., Kudo A., Nanashima N., Miyairi K. 2010. Isolation and characterization of a novel two-component hemolysin, erylsin A and B, from an edible mushroom, *Pleurotus eryngii*. *Toxicon*, 56, 8: 1436-1442.
- Szilágyi M., Miskei M., Karányi Z., Lenkey B., Pócsi I., Emri T. 2013. Transcriptome changes initiated by carbon starvation in *Aspergillus nidulans*. *Microbiology*, 159, 1: 176-190.
- Tomita T., Noguchi K., Mimuro H., Ukaji F., Ito K., Sugawara-Tomita N., Hashimoto Y. 2004. Pleurotolysin, a novel sphingomyelin-specific two-component cytolysin from the edible mushroom *Pleurotus ostreatus*, assembles into a transmembrane pore complex. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 26: 26975-26982.
- The UniProt Consortium. 2013. Update on activities at the Universal Protein Resource (UniProt) in 2013. *Nucleic Acids Research*, 41, Database Issue: D43-D47.
- Vesper S. J., Vesper M. J. 2004. Possible role of fungal hemolysins in sick building syndrome. *Advances in Applied Microbiology*, 55: 191-213.
- Vidic I., Berne S., Drobne D., Maček P., Frangež R., Turk T., Štrus J., Sepčič K. 2005. Temporal and spatial expression of ostreolysin during development of the oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*). *Mycological Research*, 109, 3: 377-382.
- Wartenberg D., Lapp K., Jacobsen I. D., Dahse H. M., Kniemeyer O., Heinekamp T., Brakhage A. A. 2011. Secretome analysis of *Aspergillus fumigatus* reveals Asp-hemolysin as a major secreted protein. *International Journal of Medical Microbiology*, 301, 7: 602-611.
- Yokota K., Ichinowatari S., Ebina K., Wakabayashi N. 1985. Studies on the toxin of *Aspergillus fumigatus* XXI. Site of binding of Asp-hemolysin to erythrocytes and mechanism of inhibition of hemolysis. *Japanese Journal of Medical Mycology*, 26: 332-339.
- Yokota K., Kamaguchi A., Sakaguchi O. 1984a. Studies on the toxin of *Aspergillus fumigatus* XVIII. Photooxidation of asp-hemolysin in the presence of various dyes and its relation to the site of hemolytic activity. *Microbiology and Immunology*, 28: 385-91.
- Yokota K., Ichinowatari S., Ebina K. 1984b. Studies on the toxin of *Aspergillus fumigatus* XX. Chemical modification of Asp-hemolysin. *Japanese Journal of Medical Mycology*, 25: 332-339.
- Zalar P., Gunde-Cimerman N. 2002. Taksonomija in identifikacija gliv. Ljubljana, Študentska založba: 92 str.
- Žužek M. C., Maček P., Sepčič K., Cestnik V., Frangež R. 2006. Toxic and lethal effects of ostreolysin, a cytolytic protein from edible oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*), in rodents. *Toxicon*, 48, 3: 264-271.

ZAHVALA

Zahvaljujema se najinemu mentorju prof. dr. Gregorju Anderluhu za pomoč pri izdelavi magistrske naloge.

Somentorici dr. Nadi Kraševac, ki naju je vodila in usmerjala pri delu, priskrbelala glivne seve, pomagala pri pripravi gojišč, vcepljanju in gojenju gliv ter pri izdelavi magistrske naloge. Hvala za ves trud in pomoč. Zahvalili bi se tudi njenim sodelavcem, ki so pri tem sodelovali.

Recenzentki prof.dr. Kristini Sepčič, ki nama je pomagala pri eksperimentalnem in teoretičnem delu naloge. Hvala za številne nasvete, odgovore in razlage na najina vprašanja, vzpodbudne besede ter pomoč tekom izdelave magistrske naloge. Zahvaljujema se tudi njenim sodelavcem na katedri za biokemijo Oddelka za biologijo, za vso praktično pomoč pri nalogi.

Hvala viš. strok. sod. Vesni Golob, univ. dipl. biol., ki nama je priskrbelala plošče s krvnim agarjem.

Hvala prof. dr. Robertu Frangežu, ki nama je priskrbel ovčje eritrocite.

Zahvaljujema se tudi predsednici komisije za zagovor, prof. dr. Romani Marinšek Logar za sodelovanje pri najini magistrski nalogi.

Velika zahvala gre moji družini, ki mi je študij omogočila, predvsem pa vame verjela in me spodbujala. Zahvalila bi se tudi fantu in vsem prijateljem, ki so me pri tem podpirali, še posebej pa Sari za vso moralno podporo tekom študija. Na koncu pa se zahvaljujem še soavtorici Saši Režonja za res odlično sodelovanje pri izvedbi in izdelavi magistrske naloge (Nina Sluga).

Zelo sem hvaležna moji družini, fantu in prijateljem za vso razumevanje, zaupanje in podporo tekom celotnega študija. Posebej bi se zahvalila tudi soavtorici Nini Sluga za vso potrpežljivost, razumevanje in res odlično sodelovanje pri celotnem postopku opravljanja magistrske naloge (Saša Režonja).

PRILOGE

Priloga A: Preglednice s težami micelijev ter izmerjenimi pH vrednostmi gojišč, za glive rodu *Aspergillus*, gojene v MM+C ter MM-C

Priloga A1: Teža micelijev (g) in pH vrednosti gojišč po prvem, drugem in tretjem gojenju sevov rodu *Aspergillus*, gojenih 24, 48 ter 72 ur v minimalnem gojišču z glukozo.

		TEŽA MICELIJA (g)		pH GOJIŠČA	
ŠT. SEVA	IME SEVA				
1. gojenje sevov		24 ur gojenja			
2.	<i>A. zonatus</i> CBS 506.65	4,050		6,23	
3.	<i>A. versicolor</i> CBS 795.97	6,586		6,55	
4.	<i>A. tubingensis</i> CBS 134.48	13,047		6,80	
5.	<i>A. brasiliensis</i> CBS 101740	6,233		4,14	
6.	<i>A. sydowii</i> CBS 593.65	4,963		6,93	
7.	<i>N. fischeri</i> CBS 544.65	5,587		6,10	
8.	<i>A. foetidus</i> CBS 106.47	6,771		3,57	
9.	<i>A. niger</i> CBS 113.46	8,412		4,34	
10.	<i>A. niger</i> CBS 513.88	6,450		5,18	
11.	<i>A. niger</i> N402	10,200		3,70	
12.	<i>A. oryzae</i> Rib40	8,550		6,80	
13.	<i>A. nidulans</i> FGSCA4	2,530		6,22	
14.	<i>A. aculeatus</i> CBS 172.66	12,268		5,08	
15.	<i>A. terreus</i> NIH2624	11,600		6,75	
17.	<i>A. wentii</i> DTO 134-E9	8,510		6,70	
18.	<i>A. carbonarius</i> DTO 115-B6	13,215		3,86	
2. gojenje sevov		48 ur gojenja	72 ur gojenja	48 ur gojenja	72 ur gojenja
9.	<i>A. niger</i> CBS 113.46	8,353	6,278	5,65	5,56
10.	<i>A. niger</i> CBS 513.88	3,400	2,348	3,68	4,71
11.	<i>A. niger</i> N402	9,135	5,246	5,48	5,20
12.	<i>A. oryzae</i> Rib40	7,967	5,627	7,30	7,55
15.	<i>A. terreus</i> NIH2624	5,697	3,914	7,01	7,10
3. gojenje sevov		48 ur gojenja	72 ur gojenja	48 ur gojenja	72 ur gojenja
2.	<i>A. zonatus</i> CBS 506.65	3,025	1,943	6,23	6,83
3.	<i>A. versicolor</i> CBS 795.97	5,613	2,343	6,35	7,16
4.	<i>A. tubingensis</i> CBS 134.48	6,988	7,415	7,21	7,49
5.	<i>A. brasiliensis</i> CBS 101740	2,932	2,868	4,64	5,34
6.	<i>A. sydowii</i> CBS 593.65	6,158	2,971	7,37	7,62
7.	<i>N. fischeri</i> CBS 544.65	8,304	7,668	6,67	6,82
8.	<i>A. foetidus</i> CBS 106.47	10,028	9,855	5,04	5,55
9.	<i>A. niger</i> CBS 113.46	8,572	4,300	4,73	5,31
10.	<i>A. niger</i> CBS 513.88	1,855	1,309	4,06	5,38
11.	<i>A. niger</i> N402	8,935	7,741	5,35	5,55
12.	<i>A. oryzae</i> Rib40	8,279	6,033	7,25	7,44
13.	<i>A. nidulans</i> FGSCA4	8,026	5,862	7,13	7,40
14.	<i>A. aculeatus</i> CBS 172.66	10,579	7,121	5,38	5,53
15.	<i>A. terreus</i> NIH2624	2,553	2,187	7,07	7,20
17.	<i>A. wentii</i> DTO 134-E9	4,872	2,906	7,26	7,50
18.	<i>A. carbonarius</i> DTO 115-B6	9,131	7,328	5,42	6,08

Priloga A2: Teža micelijev (g) in pH vrednosti gojišč po prvem, drugem in tretjem gojenju sevov rodu *Aspergillus*, gojenih 24, 48 ter 72 ur v minimalnem gojišču brez glukoze.

		TEŽA MICELIJA (g)		pH GOJIŠČA	
ŠT. SEVA	IME SEVA				
1. gojenje sevov		24 ur gojenja			
2.	<i>A. zonatus</i> CBS 506.65	3,33		6,3	
3.	<i>A. versicolor</i> CBS 795.97	2,31		6,4	
4.	<i>A. tubingensis</i> CBS 134.48	6,93		6,8	
5.	<i>A. brasiliensis</i> CBS 101740	1,59		4,3	
6.	<i>A. sydowii</i> CBS 593.65	0,32		5,9	
7.	<i>N. fischeri</i> CBS 544.65	0,79		6,0	
8.	<i>A. foetidus</i> CBS 106.47	3,71		4,1	
9.	<i>A. niger</i> CBS 113.46	4,07		4,5	
10.	<i>A. niger</i> CBS 513.88	1,13		5,1	
11.	<i>A. niger</i> N402	8,13		4,1	
12.	<i>A. oryzae</i> Rib40	4,79		6,7	
13.	<i>A. nidulans</i> FGSCA4	1,18		6,0	
14.	<i>A. aculeatus</i> CBS 172.66	6,04		5,6	
15.	<i>A. terreus</i> NIH2624	4,65		6,3	
17.	<i>A. wentii</i> DTO 134-E9	6,40		6,8	
18.	<i>A. carbonarius</i> DTO 115-B6	9,53		5,4	
2. gojenje sevov		48 ur gojenja	72 ur gojenja	48 ur gojenja	72 ur gojenja
9.	<i>A. niger</i> CBS 113.46	3,93	2,08	5,1	5,8
10.	<i>A. niger</i> CBS 513.88	1,49	0,59	5,5	5,3
11.	<i>A. niger</i> N402	1,41	0,75	5,6	5,7
12.	<i>A. oryzae</i> Rib40	2,87	1,75	7,1	7,1
15.	<i>A. terreus</i> NIH 2624	0,91	0,90	6,4	6,5
3. gojenje sevov		48 ur gojenja	72 ur gojenja	48 ur gojenja	72 ur gojenja
2.	<i>A. zonatus</i> CBS 506.65	0,42	0,27	6,0	6,1
3.	<i>A. versicolor</i> CBS 795.97	0,12	0,05	5,8	5,8
4.	<i>A. tubingensis</i> CBS 134.48	2,29	1,68	7,3	7,4
5.	<i>A. brasiliensis</i> CBS 101740	1,41	0,09	4,7	5,1
6.	<i>A. sydowii</i> CBS 593.65	0,29	0,29	6,1	6,2
7.	<i>N. fischeri</i> CBS 544.65	0,70	0,57	6,2	6,3
8.	<i>A. foetidus</i> CBS 106.47	2,43	1,55	5,3	5,4
9.	<i>A. niger</i> CBS 113.46	2,19	1,95	5,4	5,4
10.	<i>A. niger</i> CBS 513.88	1,73	1,55	5,5	5,7
11.	<i>A. niger</i> N402	5,21	4,02	5,6	5,7
12.	<i>A. oryzae</i> Rib40	5,09	4,85	7,0	7,0
13.	<i>A. nidulans</i> FGSCA4	1,24	1,66	6,4	6,7
14.	<i>A. aculeatus</i> CBS 172.66	3,82	2,88	5,3	5,5
15.	<i>A. terreus</i> NIH2624	1,60	1,07	6,5	6,6
17.	<i>A. wentii</i> DTO 134-E9	0,51	0,67	6,3	6,5
18.	<i>A. carbonarius</i> DTO 115-B6	2,35	2,04	5,6	5,8

Priloga B: Preglednice s koncentracijami proteinov v filtratih, pridobljenih z gojenjem gliv rodu *Aspergillus* v MM+C ter MM-C

Priloga B1: Koncentracija proteinov (mg/ml) v filtratih po prvem, drugem in tretjem gojenju sevov rodu *Aspergillus* v MM+C. Prvo gojenje – filtrati gliv, gojenih 24 ur v MM+C; drugo in tretje gojenje – filtrati gliv, gojenih 48 in 72 ur v MM+C; 0 °C – temperaturno neobdelani filtrati; 60 °C – filtrati po 15-minutnem segrevanju na 60 °C.

ŠT. SEVA	IME SEVA		PRVO GOJENJE		TRETJE GOJENJE	
			24 h		48 h	72h
2.	A. zonatus CBS 506.65		1,550		0,049	0,019
3.	A. versicolor CBS 795.97		0,490		0,060	0,005
4.	A. tubingensis CBS 134.48		1,190		0,059	0,030
5.	A. brasiliensis CBS 101740		0,800		0,039	0,015
6.	A. sydowii CBS 593.65		0,280		0,025	0,019
7.	N. fischeri CBS 544.65		0,550		0,070	0,049
8.	A. foetidus CBS 106.47		1,200		0,050	0,049
9.	A. niger CBS 113.46		2,480		0,081	0,039
10.	A. niger CBS 513.88		1,100		0,045	0,700
11.	A. niger N402		1,700		0,070	0,019
12.	A. oryzae Rib40		0,400		0,065	0,060
13.	A. nidulans FGSCA4		2,100		0,039	0,075
14.	A. aculeatus CBS 172.66		1,280		0,079	0,090
15.	A. terreus NIH2624		0,980		0,079	0,080
17.	A. wentii DTO 134-E9		1,000		0,060	0,059
18.	A. carbonarius DTO 115-B6		1,200		0,090	0,240
			DRUGO GOJENJE			
			NATIVNI pH		NEVTRALNI pH	
			0 °C	60 °C	0 °C	60 °C
9.	A. niger CBS 113.46	48 h	1,900	1,760	1,120	1,090
		72 h	1,800	1,770	1,690	1,897
10.	A. niger CBS 513.88	48 h	0,400	0,400	0,350	0,330
		72 h	0,890	0,840	1,260	0,980
11.	A. niger N402	48 h	1,300	1,250	1,190	1,297
		72 h	1,050	1,100	1,044	1,038
12.	A. oryzae Rib40	48 h	0,740	0,630	0,630	0,750
		72 h	1,300	1,120	1,500	1,502
15.	A. terreus NIH2624	48 h	0,700	0,500	0,490	0,503
		72 h	1,790	1,790	1,299	1,790

Priloga B2: Koncentracije proteinov (mg/ml) v filtratih po prvem, drugem in tretjem gojenju sevov v MM-C. Prvo gojenje – filtrati gliv, gojenih 24 ur v MM-C; drugo in tretje gojenje – filtrati gliv, gojenih 48 in 72 ur v MM-C; 0 °C – temperaturno neobdelani filtrati; 60 °C – filtrati po 15-minutnem segrevanju na 60 °C.

ŠT. SEVA	IME SEVA		PRVO GOJENJE		TRETJE GOJENJE	
			24 h		48 h	72 h
2.	A. zonatus CBS 506.65		0,6		0,02	0,015
3.	A. versicolor CBS 795.97		0,3		0	0
4.	A. tubingensis CBS 134.48		0,8		0,08	0,055
5.	A. brasiliensis CBS 101740		0,4		0,07	0,03
6.	A. sydowii CBS 593.65		0		0,015	0,01
7.	N. fischeri CBS 544.65		0,2		0,02	0,025
8.	A. foetidus CBS 106.47		0,8		0,04	0,05
9.	A. niger CBS 113.46		2,1		0,115	0,215
10.	A. niger CBS 513.88		0,7		0,22	0,145
11.	A. niger N402		1		0,22	0,265
12.	A. oryzae Rib40		0,6		0,085	0,095
13.	A. nidulans FGSCA4		0,1		0,015	0,04
14.	A. aculeatus CBS 172.66		1,4		0,25	0,165
15.	A. terreus NIH2624		0,6		0,05	0,15
17.	A. wentii DTO 134-E9		1,1		0,025	0,03
18.	A. carbonarius DTO 115-B6		0,9		0,225	0,320
			DRUGO GOJENJE			
			NATIVNI pH		NEVTRALNI pH	
			0 °C	60 °C	0 °C	60 °C
9.	A. niger CBS 113.46	48 h	1,90	1,30	0,80	1,2
		72 h	1,10	1,10	0,90	0,9
10.	A. niger CBS 513.88	48 h	0,40	0,50	0,60	0,4
		72 h	0,50	0,50	0,80	0,6
11.	A. niger N402	48 h	0,70	0,80	0,60	0,6
		72 h	1,0	1,0	1,20	1,0
12.	A. oryzae Rib40	48 h	1,0	0,70	0,50	0,6
		72 h	1,20	0,80	1,40	0,9
15.	A. terreus NIH2624	48 h	0	0	0	0
		72 h	0,30	0,4	0,30	0,3

Priloga C: Preglednice s koncentracijami proteinov v vodnih ekstraktih micelijev, pridobljenih z gojenjem gliv rodu *Aspergillus* v MM+C ter MM-C

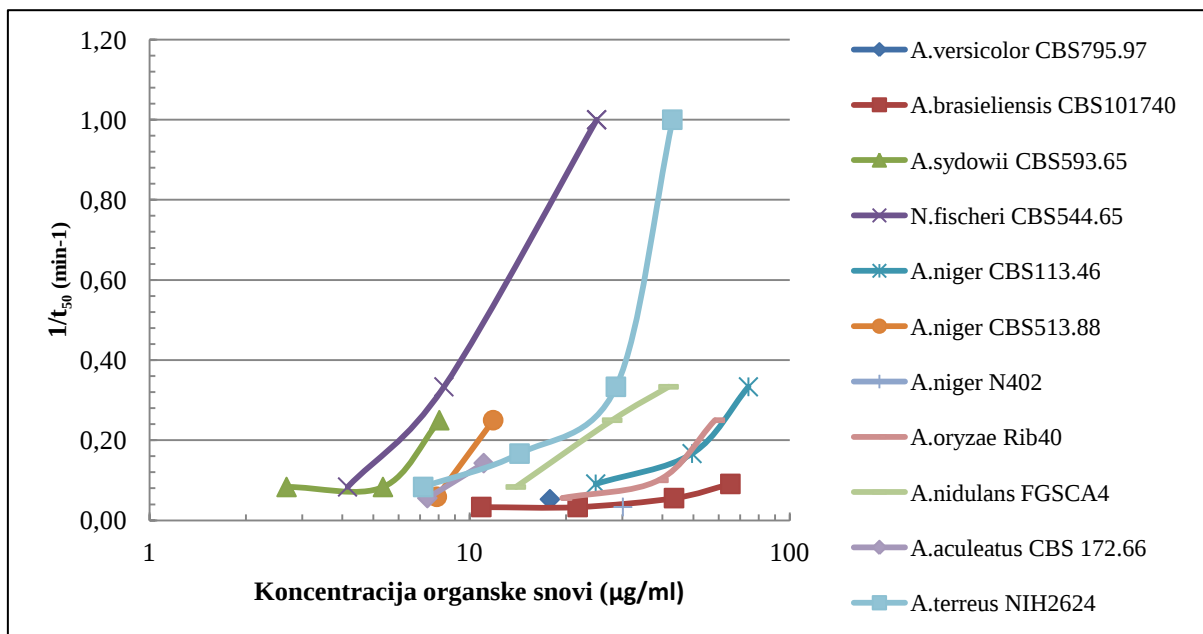
Priloga C1: Koncentracija proteinov (mg/ml) v vodnih ekstraktih micelijev po prvem in drugem gojenju sevov v MM+C. Prvo gojenje – vodni ekstrakti gliv, gojenih 24 ur v MM+C; drugo gojenje – vodni ekstrakti gliv, gojenih 48 in 72 ur v MM+C; 0 °C – temperaturno neobdelani ekstrakti; 60 °C – ekstrakti po 15-minutnem segrevanju na 60 °C; P+I – eritrocitni pufer s proteaznim inhibitorjem; P-I – eritrocitni pufer brez proteaznega inhibitorja.

ŠT.	VRSTA	SEV		PRVO GOJENJE			
				P + I / 0 °C			
2.	<i>A. zonatus</i>	CBS 506.65	24 h	1,150			
3.	<i>A. versicolor</i>	CBS 795.97	24 h	1,500			
4.	<i>A. tubingensis</i>	CBS 134.48	24 h	0,790			
5.	<i>A. brasiliensis</i>	CBS 101740	24 h	0,780			
6.	<i>A. sydowii</i>	CBS 593.65	24 h	1,300			
7.	<i>N. fischeri</i>	CBS 544.65	24 h	0,500			
8.	<i>A. foetidus</i>	CBS 106.47	24 h	0,800			
9.	<i>A. niger</i>	CBS 113.46	24 h	1,550			
10.	<i>A. niger</i>	CBS 513.88	24 h	1,000			
11.	<i>A. niger</i>	N402	24 h	0,800			
12.	<i>A. oryzae</i>	Rib40	24 h	1,400			
13.	<i>A. nidulans</i>	FGSCA4	24 h	0,750			
14.	<i>A. aculeatus</i>	CBS 172.66	24 h	1,100			
15.	<i>A. terreus</i>	NIH2624	24 h	0,490			
17.	<i>A. wentii</i>	DTO 134-E9	24 h	0,590			
18.	<i>A. carbonarius</i>	DTO 115-B6	24 h	0,800			
				DRUGO GOJENJE			
				P - I		P + I	
				0 °C	60 °C	0 °C	60 °C
9.	<i>A. niger</i>	CBS 113.46	48 h	3,400	4,070	3,550	4,100
			72 h	3,300	3,297	3,324	3,570
10.	<i>A. niger</i>	CBS 513.88	48 h	5,200	8,900	5,200	11,950
			72 h	6,800	7,300	6,300	5,800
11.	<i>A. niger</i>	N402	48 h	4,290	6,080	3,100	3,700
			72 h	3,700	0,001	4,130	4,070
12.	<i>A. oryzae</i>	Rib40	48 h	5,650	13,900	5,200	9,500
			72 h	2,760	3,600	2,900	2,898
15.	<i>A. terreus</i>	NIH2624	48 h	4,080	6,550	2,950	2,890
			72 h	3,580	3,500	3,050	2,899

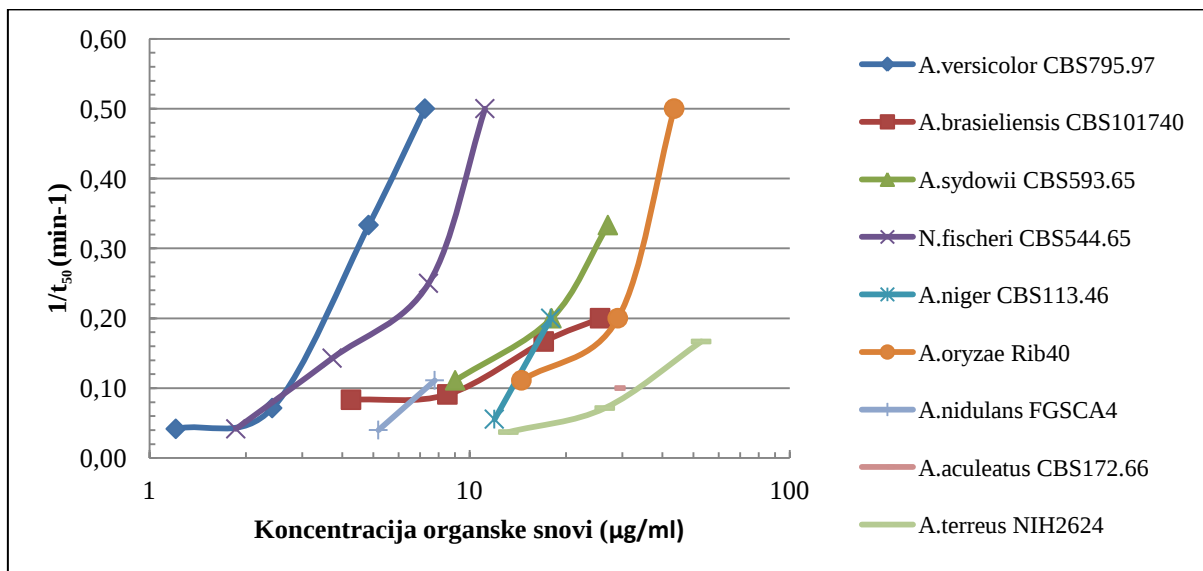
Priloga C2: Koncentracije proteinov (mg/ml) v vodnih ekstraktih micelijev po prvem in drugem gojenju sevov v MM-C. Prvo gojenje – vodni ekstrakti gliv, gojenih 24 ur v MM - C; drugo gojenje – vodni ekstrakti gliv, gojenih 48 in 72 ur v MM-C; 0 °C – temperaturno neobdelani ekstrakti; 60 °C – ekstrakti po 15-minutnem segrevanju na 60 °C; P+I – eritrocitni pufer s proteaznim inhibitorjem; P-I – eritrocitni pufer brez proteaznega inhibitorja.

ŠT. SEVA	VRSTA	SEV		PRVO GOJENJE			
				P + I / 0 °C			
2.	<i>A. zonatus</i>	CBS 506.65	24 h	2,4			
3.	<i>A. versicolor</i>	CBS 795.97	24 h	1,4			
4.	<i>A. tubingensis</i>	CBS 134.48	24 h	0,8			
5.	<i>A. brasiliensis</i>	CBS 101740	24 h	1,2			
6.	<i>A. sydowii</i>	CBS 593.65	24 h	0,8			
7.	<i>N. fischeri</i>	CBS 544.65	24 h	1,2			
8.	<i>A. foetidus</i>	CBS 106.47	24 h	1,8			
9.	<i>A. niger</i>	CBS 113.46	24 h	1,4			
10.	<i>A. niger</i>	CBS 513.88	24 h	1,9			
11.	<i>A. niger</i>	N402	24 h	1,2			
12.	<i>A. oryzae</i>	Rib40	24 h	1,9			
13.	<i>A. nidulans</i>	FGSCA4	24 h	1,3			
14.	<i>A. aculeatus</i>	CBS 172.66	24 h	1,5			
15.	<i>A. terreus</i>	NIH2624	24 h	1,1			
17.	<i>A. wentii</i>	DTO 134-E9	24 h	0,6			
18.	<i>A. carbonarius</i>	DTO 115-B6	24 h	1,2			
				DRUGO GOJENJE			
				P - I		P + I	
				0 °C	60 °C	0 °C	60 °C
9.	<i>A. niger</i>	CBS 113.46	48 h	4,40	3,80	4,40	4,20
			72 h	5,0	4,60	4,60	5,20
10.	<i>A. niger</i>	CBS 513.88	48 h	5,30	5,30	6,70	5,50
			72 h	6,80	6,80	7,30	7,10
11.	<i>A. niger</i>	N402	48 h	5,20	4,60	5,20	5,0
			72 h	5,50	5,50	6,30	5,80
12.	<i>A. oryzae</i>	Rib40	48 h	6,60	4,20	6,30	4,40
			72 h	9	9	11,8	7,4
15.	<i>A. terreus</i>	NIH2624	48 h	9,20	5,50	7,20	6,70
			72 h	12,6	11,8	8	9,8

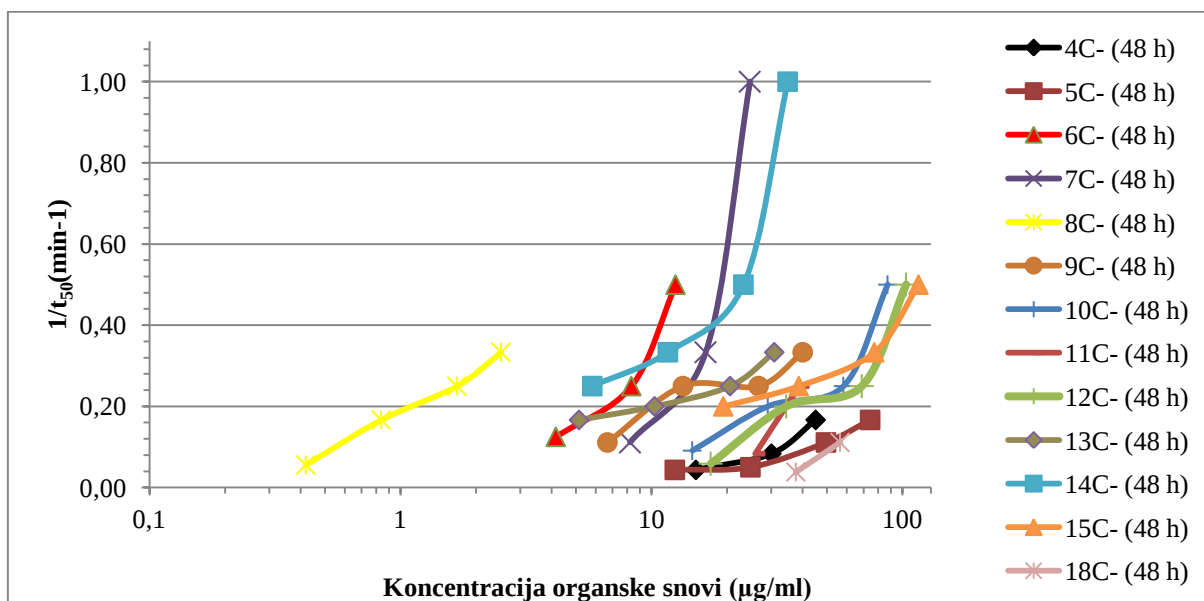
Priloga D: Hemolitična aktivnost etanolnih ekstraktov gliv rodu *Aspergillus*, pridobljenih z gojenjem gliv v MM+C in MM-C



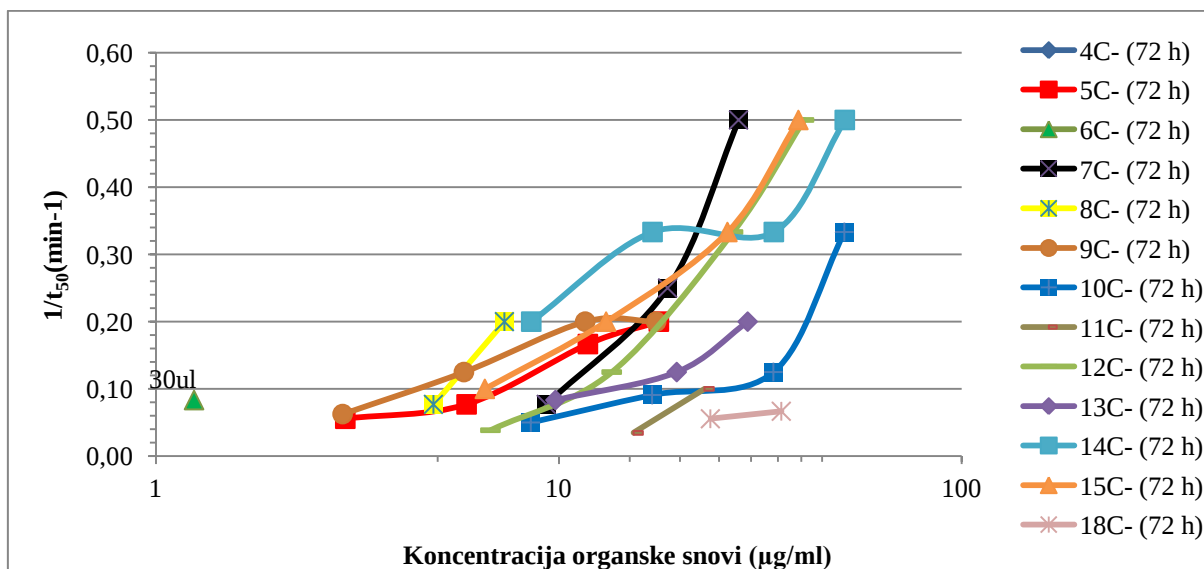
Priloga D1: Hemolitična aktivnost etanolnih ekstraktov gliv rodu *Aspergillus*, ki smo jih v MM+C gojili 48 ur, pri štirih različnih koncentracijah (5, 10, 20 in 30 μl) v odvisnosti od koncentracije organske snovi v ekstraktu. Prikazane so tisti volumni etanolnega ekstrakta, pri katerih je prišlo do hemolize. t_{50} – čas, ki je potreben, da pride do 50-odstotne hemolize.



Priloga D2: Hemolitična aktivnost etanolnih ekstraktov gliv rodu *Aspergillus*, ki smo jih v MM +C gojili 72 ur, pri štirih različnih koncentracijah (5, 10, 20 in 30 μl) v odvisnosti od koncentracije organske snovi v ekstraktu. Prikazane so tisti volumni etanolnega ekstrakta, pri katerih je prišlo do hemolize. t_{50} – čas, ki je potreben, da pride do 50-odstotne hemolize.



Priloga D3: Izražanje hemolitičnih učinkovin etanolnih ekstraktov gliv rodu *Aspergillus*, pri pogoju MM-C/48 ur v odvisnosti od koncentracije organske snovi vsebovane v ekstraktu pri štirih različnih volumnih (5, 10, 20, 30 µl) vzorca. t₅₀ - čas, ki je potreben, da pride do 50-odstotne hemolize. 48 h – čas gojenja v MM-C. 4-C – *A. tubingensis* CBS 134.48; 5-C – *A. brasiliensis* CBS 101740; 6-C – *A. sydowii* CBS 593.65; 7-C – *N. fischeri* CBS 544.65; 8-C – *A. foetidus* CBS 106.47; 9-C – *A. niger* CBS 113.46; 10-C – *A. niger* CBS 513.88; 11-C – *A. niger* N402; 12-C – *A. oryzae* Rib40; 13-C – *A. nidulans* FGSCA4; 14-C – *A. aculeatus* CBS 172.66; 15-C – *A. terreus* NIH2624; 18-C – *A. carbonarius* DTO 115-B6.



Priloga D4: Izražanje hemolitičnih učinkovin etanolnih ekstraktov gliv rodu *Aspergillus*, pri pogoju MM-C/72 ur v odvisnosti od koncentracije organske snovi vsebovane v ekstraktu pri štirih različnih volumnih (5, 10, 20, 30 µl) vzorca. t₅₀ – čas, ki je potreben, da pride do 50-odstotne hemolize. 72 h – čas gojenja v MM-C. 4-C – *A. tubingensis* CBS 134.48; 5-C – *A. brasiliensis* CBS 101740; 6-C – *A. sydowii* CBS 593.65; 7-C – *N. fischeri* CBS 544.65; 8-C – *A. foetidus* CBS 106.47; 9-C – *A. niger* CBS 113.46; 10-C – *A. niger* CBS 513.88; 11-C – *A. niger* N402; 12-C – *A. oryzae* Rib40; 13-C – *A. nidulans* FGSCA4; 14-C – *A. aculeatus* CBS 172.66; 15-C – *A. terreus* NIH2624; 18-C – *A. carbonarius* DTO 115-B6.

Režonja S., Sluga N. Hemolitična aktivnost v ekstraktih izbranih askomicetnih gliv.

Mag. delo (Du2). Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij mikrobiologije, 2014
