

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

TJAŠA UDIR

DIPLOMSKA NALOGA
UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2011

Univerza v Ljubljani
Fakulteta *za farmacijo*



TJAŠA UDIR

IZOLACIJA IN KARAKTERIZACIJA INTRACELULARNIH POLISAHARIDOV IZ
GLIV *Laetiporus sulphureus* in *Fomes fomentarius*

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF INTRACELLULAR
POLYSACCHARIDES FROM *Laetiporus sulphureus* and *Fomes fomentarius*

UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2011

Diplomsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo, Katedri za farmacevtsko biologijo, pod mentorstvom prof. dr. Boruta Štruklja, mag. farm. ter somentorstvom dr. Nataše Radić, mag. farm. NMR-študije so opravili na Kemijskem inštitutu.

Zahvaljujem se mentorju prof. dr. Borutu Štruklju za izkazano zaupanje, strokovno pomoč, nove izkušnje in pridobljeno znanje. Za koristne namige in praktične nasvete gre zahvala dr. Nataši Radić, še posebej njeni pripravljenosti za delo in pomoč ob katerikoli uri. Prijetno sodelovaje in NMR-študije so mi omogočili prof. dr. Plavec in sodelavci s Kemijskega inštituta. Za vse nasvete in prijetno vzdušje se zahvaljujem celotni Katedri za biologijo. Bredi Vidmar, prof. slov., se zahvaljujem za lektorsko delo.

Posebej bi se rada zahvalila svojim staršem in sestri Aniti za vse spodbudne besede in njihovo potrpežljivost med nastajanjem diplomske naloge.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Boruta Štruklja, mag. farm. in somentorstvom dr. Nataše Radić, mag. farm.

Tjaša Udir

Ljubljana, marec 2011

Predsednica diplomske komisije: izr. prof. dr. Saša Baumgartner, mag. farm.

Mentor: prof. dr. Borut Štrukelj, mag. farm.

Somentor: dr. Nataša Radić, mag. farm.

Član diplomske komisije: asist. dr. Matej Sova, mag. farm.

KAZALO VSEBINE

KAZALO VSEBINE	I
KAZALO GRAFOV	III
KAZALO TABEL	III
KAZALO SLIK	IV
ABSTRACT	VI
1 UVOD	1
1.1 MEDICINSKE GOBE	1
1.2 RAZISKOVANJE UČINKOV MEDICINSKIH GOB	2
1.3 ŽVEPLENI LEPOLUKNJIČAR ALI <i>LAETIPORUS SULPHUREUS</i>	3
1.3.1 Sekundarni metaboliti in njihovi učinki.....	4
1.4 BUKOVA KRESILKA ALI <i>FOMES FOMENTARIUS</i>	5
1.5 TERAPEVTSKI UČINKI MEDICINSKIH GOB	7
1.5.1 Terapevtski učinki nekaterih polisaharidov medicinskih gob	7
1.6 MEHANIZEM DELOVANJA BETA GLUKANOV	8
1.7 STRUKTURA IN VLOGA POLISAHARIDOV	11
1.8 SAR BETA GLUKANOV, VPLIV STRUKTURE NA UČINEK	12
1.9 RAZVOJNA POT NOVE UČINKOVINE IZ MEDICINSKIH GOB.....	13
1.9.1 Kultivacija gob in produkcija gobje biomase.....	13
1.9.2 Ekstrakcija polisaharidov iz celične stene	13
1.9.3 Izolacija in čiščenje vodotopnih polisaharidov.....	14
1.9.4 Preučevanje aktivnosti polisaharidov	14
1.9.5 Določevanje kemijske strukture aktivnih polisaharidov.....	15
1.9.5.1 Analiza monosaharidnih enot (HPLC, TLC, GC)	15
1.9.5.2 Metilacijska analiza polisaharidov	15
1.9.5.3 NMR- jedrna magnetna resonanca	16
1.9.6 Predklinične in klinične raziskave.....	17
1.10 ANALIZNE REAKCIJE ZA SLADKORJE IN PROTEINE	17
2 NAMEN DELA	20
3 MATERIALI IN METODE	21
3.1 KEMIKALIJE IN APARATURE.....	21
3.1.1 Laboratorijska oprema.....	21
3.1.2 Uporabljene kemikalije.....	22
3.1.3 Gojišče za <i>Fomes fomentarius</i>	23
3.2 EKSTRAKCIJA IN IZOLACIJA INTRACELULARNIH VODOTOPNIH POLISAHARIDOV IZ GOBE <i>LAETIPORUS SULPHUREUS</i>	24
3.3 PRIDOBIVANJE BIOMASE GOBE <i>FOMES FOMENTARIUS</i> V SUBMERZNI TEKOČI KULTURI	26
3.4 EKSTRAKCIJA IN IZOLACIJA EKSTRACELULARNIH IN INTRACELULARNIH VODOTOPNIH POLISAHARIDOV IZ GOBE <i>FOMES</i> <i>FOMENTARIUS</i>	27
3.5 ANALIZA IZOLIRANIH POLISAHARIDOV	28

3.5.1	Določitev vsebnosti polisaharidov in proteinov v izoliranih polisaharidih. ...	28
3.5.1.1	Metoda po Bradfordovu	28
3.5.1.2	Metoda za kvantitativno določanje ogljikovih hidratov	28
3.6	GELSKA FILTRACIJA OZIROMA KROMATOGRAFIJA	29
3.6.1	Osnovne značilnosti kolone	29
3.6.2	Priprava kolone	29
3.6.3	Učinkovitost kolone	30
3.6.4	Priprava vzorcev, mobilne faze in pufrov za gelsko filtracijo.....	30
3.6.5	Potek dela pri gelski filtraciji.....	31
3.6.6	Določitev velikostnega ranga izoliranih polisaharidov s pomočjo gelske filtracije	31
3.7	HPLC oz. TEKOČINSKA KROMATOGRAFIJA VISOKE LOČLJIVOSTI.....	33
3.7.1	Priprava vzorca za HPLC	33
3.7.2	Pogoji za merjenje HPLC.....	33
3.8	NMR.....	34
3.8.1	Priprava vzorcev za NMR.....	34
3.8.2	Pogoji meritev	34
4	REZULTATI.....	36
4.1	IZKORISTEK IZOLACIJE VODOTOPNIH POLISAHARIDOV.....	36
	<i>Izolacija intracelularnih polisaharidov iz gobe <i>Laetiporus sulphureus</i></i>	36
	<i>Izolacija intracelularnih polisaharidov iz gobe <i>Fomes fomentarius</i></i>	36
	<i>Izolacija ekstracelularnih polisaharidov iz gobe <i>Fomes fomentarius</i></i>	36
4.2	TEST ZA UGOTAVLJANJE UČINKOVITOSTI KOLONE	37
4.3	VELIKOSTNO OBMOČJE IZOLIRANIH POLISAHARIDOV	38
4.3.1	Umeritvene krivulje	38
4.3.2	Kolona HiPrep Sephacryl S200 HR	39
	Intracelularni polisaharidi gobe <i>Laetiporus sulphureus</i>	40
	Intracelularni polisaharidi gobe <i>Fomes fomentarius</i>	40
	Ekstracelularni polisaharidi gobe <i>Fomes fomentarius</i>	41
4.3.3	Kolona HiPrep Sephacryl S300 HR	42
	4.3.3.1 Intracelularni polisaharidi gobe <i>Laetiporus sulphureus</i>	44
	4.3.3.2 Intracelularni polisaharidi gobe <i>Fomes fomentarius</i>	46
	4.3.3.3 Ekstracelularni polisaharidi gobe <i>Fomes fomentarius</i>	48
4.4	HPLC	50
4.5	NMR	55
5	RAZPRAVA.....	58
5.1	IZKORISTEK EKSTRAKCIJE VODOTOPNIH POLISAHARIDOV	58
5.2	VELIKOSTNI RANG POLISAHARIDOV	59
5.3	DOLOČITEV MONOSAHARIDNE SESTAVE S POMOČJO HPLC	63
5.4	NMRA.....	65
6	SKLEP	67
7	LITERATURA	69

KAZALO GRAFOV:

Graf 1: Prikaz ekstrakcije polisaharidov	25
Graf 2: Prikaz izolacije vodotopnih polisaharidov	26
Graf 3: Umeritvena krivulja polisaharidov.....	38
Graf 4: Umeritvena krivulja proteinov.	39
Graf 6: Prikaz ločbe LasICP na koloni HiPrep 16/60 Sephacryl S200 HR.....	40
Graf 7: Prikaz ločbe FfICP na koloni HiPrep 16/60 Sephacryl S200 HR.....	40
Graf 8: Prikaz ločbe FfECP na koloni HiPrep 16/60 Sephacryl S200 HR.....	41
Graf 9: Grafična ocena molekulske mase izoliranih polisaharidov.	42
Graf 10 : Kromatografski standardi dekstranov na koloni Sephacryl S300 HR	43
Graf 11: Umeritvena krivulja standardov dekstranov.	43
Graf 12: Prikaz ločbe LasICP na koloni HiPrep 26/60 Sephacryl S300 HR.....	44
Graf 13: Grafična ocena molekulske mase vzorca LasICP.	45
Graf 14: Prikaz ločbe proteinov prisotnih v miceliju gobe <i>Laetiporus sulphureus</i>	46
Graf 15: Prikaz ločbe FfICP na koloni HiPrep 26/60 Sephacryl S300 HR.....	46
Graf 16: Grafična ocena molekulske mase vzorca FfICP.	47
Graf 17: Prikaz ločbe proteinov prisotnih v miceliju gobe <i>Fomes fomentarius</i>	48
Graf 18: Prikaz ločbe FfECP na koloni HiPrep 26/60 Sephacryl S300 HR.....	48
Graf 19: Grafična ocena molekulske mase vzorca FfECP	49
Graf 20: Prikaz ločbe proteinov prisotnih v fermentacijski brozgi <i>Fomes fomentarius</i>	50

KAZALO PREGLEDNIC:

Preglednica 1: Prikaz izkoristkov ekstrakcije, izolacije in dialize LasICP	36
Preglednica 2: Prikaz izkoristkov ekstrakcije, izolacije in dialize FfICP	36
Preglednica 3: Prikaz izkoristkov ekstrakcije, izolacije in dialize FfECP	36
Preglednica 4: Parametri in izračun učinkovitosti kolon.....	37
Preglednica 5: Izračun parametrov kromatografske ločbe standardov dekstrana na koloni Sephacryl S200.....	39
Preglednica 6: Izračun molekulske mase vzorcev LasICP, FfICP in FfECP.	41
Preglednica 7: Izračun parametrov kromatografske ločbe standardov dekstrana na koloni Sephacryl S300.....	43
Preglednica 8: Izračun parametrov in Mr polisaharidov izoliranih iz LasICP.....	44
Preglednica 9: Izračun parametrov in Mr polisaharidov izoliranih iz FfICP.	46
Preglednica 10: Izračun parametrov in Mr polisaharidov izoliranih iz FfECP.....	48

KAZALO SLIK

Slika 1: Prehranska dopolnila oz. zdravila brez recepta, iz medicinskih gob	3
Slika 2: Goba <i>Laetiporus sulphureus</i>	4
Slika 3: Polisaharid izoliran iz gobe <i>Laetiporus sulphureus</i>	5
Slika 4: <i>Fomes fomentarius</i>	6
Slika 5: Mehanizem delovanja lentinana	9
Slika 6: Celični odgovor na gobje beta-glukane preko receptorja Dektin-1	10
Slika 7: Osnovna struktura β -glukana s kombinacijo vezi (1 \rightarrow 3), ter β -(1 \rightarrow 4)	11
Slika 8: Enostavni primer metilacijske analize	16
Slika 9: Reakcija za kvantitativno določanje ogljikovih hidratov	18
Slika 10: Dokaz proteinov po Bradfordu	19
Slika 11: Gojišča glive <i>Laetiporus sulphureus</i> in ekstrakcija polisaharidov iz micelija	24
Slika 12: Trdno gojišče za <i>Fomes fomentarius</i>	27
Slika 12: Tekoče gojišče glive <i>Fomes fomentarius</i>	27
Slika 14: Teoretični kromatogram pri Visoko ločljivostni frakcionaciji	31
Slika 15: Območje frakcionacije glede na izbiro kolone	32
Slika 16: Na sliki je prikazan instrument Shimadzu LC-2010 za HPLC-metodo	34
Slika 17: Varian system 800MHz NMR spektrofotometer	34
Slika 18: Prikazan test učinkovitosti kolone	37
Slika 19: Prikaz absorbance pri 280 nm vzorca LasICP	45
Slika 20: Prikaz absorbance pri 280 nm vzorca FfICP	47
Slika 21: Prikaz absorbance pri 280 nm vzorca FfECP	49
Slika 22: Kromatogram standarda fukoze (5mg/ml)	51
Slika 23: Kromatogram standarda galaktoze (5mg/ml)	51
Slika 24: Kromatogram standarda manoze (5mg/ml)	52
Slika 25: Kromatogram standarda glukoze (5mg/ml)	52
Slika 26: Kromatogram mešanice standardov monosaharidov	53
Slika 27: Kromatogram standarda dekstrana velikosti 40000 Da (5mg/ml)	53
Slika 28: Kromatogram vzorca LasICP (5mg/ml)	54
Slika 29: Kromatogram vzorca FfICP (5mg/ml)	54
Slika 30: Kromatogram vzorca FfECP (5mg/ml)	54
Slika 31: ^1H NMR spekter LasICP	55
Slika 32: ^{13}C NMR spekter LasICP	55
Slika 33: Spekter ^1H - ^1H TOSCY vzorca LasICP	56
Slika 34: ^1H NMR spekter FfICP	57

POVZETEK

Gobe zaradi dobrega okusa in hranilne vrednosti že tisočletja uporabljamo v vsakodnevni prehrani. Prebivalci na področjih Azije pa so jih dolgo cenili zaradi številnih zdravilnih učinkov. Medicinske gobe so tako zavzele pomembno vlogo v tradicionalni kitajski medicini, ki je kmalu vzbudila pozornost zahodnega sveta. Priljubljenost prehranskih dopolnil iz medicinskih gob narašča, zato je preučevanje mehanizmov delovanja in strukture gobjih substanc izrednega pomena. V številnih študijah so klinične učinke gob pripisali polisaharidom, ki sestavljajo celično steno višjih gliv.

V diplomski nalogi smo želeli določiti strukturo polisaharidov izoliranih iz gliv žveplena lepoluknjičarja (*Laetiporus sulphureus*) in bukove kresilke (*Fomes fomentarius*). Osredotočili smo se na vodotopne intracelularne polisaharide iz gobe *Laetiporus sulphureus* ter vodotopne intra- in ekstracelularne polisaharide iz gobe *Fomes fomentarius*. Za karakterizacijo omenjenih polisaharidov smo se odločili na podlagi predhodnih raziskav na monocitni celični liniji THP1, v katerih so polisaharidi vplivali na izražanje genov, ki nosijo zapis za proinflamatorne citokine. V študiji smo preučevali le vodotopne polisaharide, saj se ti v praksi najlažje ekstrahirajo in pripravijo za uživanje.

Pri svojem delu smo uporabili gelsko izključitveno kromatografijo, s pomočjo katere smo polisaharide ločili in jim določili velikost. Velikostni razred intracelularnih polisaharidov, izoliranih iz gobe *Laetiporus sulphureus*, je zelo širok, in sicer od $5,7 \times 10^3$ do $5,15 \times 10^5$ Da. Podobnih velikosti so tudi intracelularni polisaharidi, izolirani iz gobe *Fomes fomentarius*, in sicer od $8,8 \times 10^3$ do $3,35 \times 10^5$ Da. Ekstracelularni polisaharidi, izolirani iz iste gobe, so nekoliko manjši. Njihove velikosti ne moremo potrditi zaradi slabe resolucije in frakcionacijskega območja kolone, kljub temu dobljena vrednost predstavlja dobro izhodišče za nadaljnje raziskave in izbiro kolone. Monosaharidno sestavo in tip glikozidne vezi smo želeli potrditi z metodo HPLC, vendar nismo bili uspešni, zato bo uporaba in optimizacija metode HPLC in GC cilj nadaljnjih raziskav. Z NMR-študijo smo uspeli potrditi prisotnost α -D-glukoze, β -D-manoze, β -D-fukoze in β -D-galaktoze v izoliranih intracelularnih polisaharidih gobe *Laetiporus sulphureus*. Rezultati NMR-študije intracelularnih polisaharidov gobe *Fomes fomentarius* so pokazali prisotnost proteoglikana.

ABSTRACT

Mushrooms have long been valued as tasty, nutritious food and have been used for thousands of years in the daily nourishment. Residents in the areas of Asia have long appreciated mushrooms for their numerous healthy effects. Medicinal mushrooms have played an important role in traditional Chinese medicine which soon attracted attention of the western world. Nowadays, the popularity of food supplements of medicinal mushrooms is growing quickly. Consequently, there is an increased interest in mechanisms of performance and structure of mushrooms compounds. In many studies, the clinical effects of mushrooms were attributed to polysaccharides consisting the cell walls of higher fungi. In this thesis we want to define the structure of polysaccharides isolated from fungi Sulphur Polypore (*Laetiporus sulphureus*) and Tinder Fungus (*Fomes fomentarius*). We have focused on soluble intracellular polysaccharides from mushroom *Laetiporus sulphureus*, and soluble intra- and extracellular polysaccharides from mushroom *Fomes fomentarius*. We have decided to do the characterization of above mentioned polysaccharides on the basis of previous research made on monocyte THP1 cell line in which the polysaccharides had influenced the expression of genes encoding pro-inflammatory cytokines. We have studied only water-soluble polysaccharides, since in practice they are more easily extracted and prepared for consumption. In our study we used gel exclusion chromatography which separates molecules according to differences in sizes. Size range of intracellular polysaccharides isolated from mushroom *Laetiporus sulphureus* is very broad, ranging from 5.7×10^3 do 5.15×10^5 Da. Similar molecular weights have got intracellular polysaccharides isolated from the fungus *Fomes fomentarius* 8.8×10^3 to 3.35×10^5 Da. Extracellular polysaccharides isolated from the same mushroom are slightly smaller. Their molecular weight can not be confirmed due to poor resolution and fractionation range of the column. However, it is a good starting point for further research and selection of the column. Our aim was to confirm monosaccharide composition and type of glycosidic linkage by the means of HPLC method. Unfortunately, we were not successful, so further research of use and optimisation of HPLC and GC methods will be required. With NMR study we have confirmed the presence of α -D-glucose, β -D-mannose, β -D-fucose and β -D-galactose in the isolated intracellular polysaccharides of mushroom *Laetiporus sulphureus*. The results of NMR analysis of intracellular polysaccharides *Fomes fomentarius* have shown the presence of proteoglycan.

SEZNAM OKRAJŠAV

Okrajšava	Pomen
Ac₂O	acetanhidrid
AP-1	aktivirajoči protein
AU	absorbanca
BCA	bikinkoninska kislina (ang. bicinchoninic acid)
BHA	butilirani hidroksianizol
BSA	goveji serumski albumin (ang. bovine serum albumin)
C3 komplement	komplement C3
COX	ciklooksigenazni receptor
CR (CD11b/CD18)	receptor komplementa
CSF	kolonije stimulirajoči dejavnik
D₂O	devterirana voda
DMSO	dimetilsulfoksid
DNA	deoksiribonukleinska kislina
ELISA	encimski imunski test (ang. enzyme-linked immunosorbent assay)
EtOH	etanol
FFECP	vodotopni ekstracelularni polisaharidi gobe <i>Fomes fomentarius</i>
FFICP	vodotopni intracelularni polisaharidi gobe <i>Fomes fomentarius</i>
GC	plinska kromatografija (ang. gas chromatography)
MS	masna spektroskopija (ang. mass spectroscopy)
HDL	lipoproteini visoke gostote (ang. high-density lipoprotein)
HIV-1-RT	reverzna transkriptaza virusa HIV
HMG-CoA	3-hidroksi-3-metilglutaril-koencim A
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (ang. high-performance liquid chromatography)
IL1, IL3, IL6, IL10, IL12	interlevkini 1,3,6,10,12
iNOS	inducibilna sintaza dušikovega oksida
ITS	regija notranjega distančnika (ang. intergenic transcribed spacer)
Kd	koeficient difuzije

LasICP	vodotopni intracelularni polisaharidi gobe <i>Laetiporus sulphureus</i>
LDL	lipoproteini nizke gostote (ang. low-density lipoprotein)
MeOH	metanol
MIP-2	makrofagni vnetni protein
Mr	molekulska masa
NF-κB	jedrni faktor, ojačevalec lahke verige kappa v limfocitih B
NK celice	naravne celice ubijalke
NMR	jedrska magnetna resonanca (ang. nuclear magnetic resonance)
PAMP	ligand oz. komponenta patogenega organizma (ang. Pathogen-associated molecular patterns)
PCR	polimerazna verižna reakcija (ang. polymerase chain reaction)
PDA	krompirjev dekstrozni agar
PPR	receptor za komponente patogenih organizmov (ang. patern recognition receptor)
RT-PCR	polimerazna verižna reakcija v realnem času (ang. real time PCR)
SAR	odnos med strukturo in delovanjem (ang. structure – activity relationship)
TFA	triflourocetna kislina
TLC	tankoplastna tekočinska kromatografija (ang. thin layer chromatography)
TLR	toll like receptor
TMSPA	(trimetilsilil)fenil)acetilen
TMS	tetrametilsilan, interni standard pri snemanju NMR spektrov
TNF-α	tumorsko nekrozni dejavnik
TOCSY	celotna korelacijska spektroskopija (ang. total correlation spectroscopy)
UV obsevanje	ultravijolično obsevanje

1 UVOD

1.1 MEDICINSKE GOBE

Tisočletja so bile gobe cenjene po svojem okusu v kulinariki in medicini (1). Antičnim Rimljanom so predstavljale 'hrano bogov', za Egipčane so bile 'darilo boga Ozirisa', Kitajci so jim pravili kar 'eliksir življenja' (2).

Današnja ocena števila vseh vrst gob na Zemlji je 150 000, od katerih jih poznamo le nekaj 10 % (3). Pol jih je užitnih, okoli 700 poznanih vrst ima značilne farmakološke lastnosti. Predvidevanja kažejo, da je gliv v resnici še veliko več. Razvijajo se nove metode, s katerimi ugotavljamo razlike med morfološko zelo podobnimi glivami (1). Glive predstavljajo velik, še neizkoriščen vir novih učinkovitih farmacevtskih produktov (3). Večino užitnih medicinskih gob, ki vsebujejo biološko aktivne polisaharide, najdemo v deblih Odprtotrošnic in Zaprtotrošnic (2).

Uporaba in znanje o medicinskih gobah izvirata z Daljnega vzhoda (1). V kitajski holistični medicini poznajo celo Fu Zheng terapijo, kjer imajo gobe vlogo modulatorjev imunskega sistema (2). Najbolj poznane gobe, ki so jih stoletja zbirali in uporabljali na področjih Koreje, Kitajske, Japonske, vzhodne Rusije, pa tudi Srednje Amerike, Afrike, Alžirije in Egipta, so: *Ganoderma lucidum* (Reishi), *Lentinus edodes* (Shiitake), *Inonotus obliquus* (Chaga), *Fomitopsis officinalis*, *Piptoporus betulinus*, *Trametes versicolor*, *Flammulina velutipes*, *Schizophyllum commune*, *Auricularia auricula* in *Fomes fomentarius* ter številne druge (1–3). Ravno izsledki epidemiološke uporabe medicinskih gob predstavljajo osnovo modernim znanstvenim študijam. Prvo znanstveno poročilo o antitumorni aktivnosti polisaharidov so objavili Ikekawa in sod. (1969) (4). Zadnjih 40 let se je področje raziskav zelo razširilo. Znanstveniki po celem svetu intenzivno preučujejo medicinske učinke s pomočjo *in vivo* / *in vitro* sistemov ter odkrivajo nove antitumorne in imunomodulatorne polisaharide (1). Prav tako se je močno povečal tudi trg s produkti medicinskih gob, ki se uporabljajo kot prehranski dodatki. Ocenjena vrednost tovrstnih produktov je 15 milijard ameriških dolarjev, kar prestavlja 10 % trga s prehranskimi dopolnili (3).

1.2 RAZISKOVANJE UČINKOV MEDICINSKIH GOB

Kljub temu da prvotnim podatkom o delovanju medicinskih gob ne moremo v celoti verjeti, obstajajo redke epidemiološke študije, ki nosijo trdne in zanesljive informacije o njihovih koristnih učinkih na zdravje ljudi (1).

Primer je epidemiološka študija v pokrajini Nagano (Japonska), ki so jo izvajali nekaj desetletij. Pri kmetih, ki so se ukvarjali z gojenjem gobe *Flammulina velutipes*, so dokazali manjšo smrtnost za različnimi vrstami raka. Podobna študija je potekala tudi na avtohtonih prebivalcih v Braziliji. Okusna užitna goba *Agaricus blazei* raste na zelo omejenem področju v gorah Brazilije blizu mesta São Paulo. Incidenca številnih bolezni, vključno z rakom, virusnimi ter bakterijskimi okužbami, je bila na tem področju zelo nizka. Nenavadno dolga življenjska doba tamkajšnjih prebivalcev se je ujemala z uživanjem gobe *Agaricus blazei*. V osemdesetih letih so dokazali, da ima goba zelo dobro imunostimulatorno delovanje, poveča naravne obrambne mehanizme ter brani pred infekcijami in rakom (1).

Večina današnjih študij se izvaja na živalih, ki jim umetno injicirajo tumorske celice. Okužene živali oz. tumorske celice nato izpostavijo ekstrahiranim gobjim polisaharidom ter spremljajo njihove učinke (1).

Dandanes se raziskave usmerjajo predvsem na preučevanje aktivnih metabolitov medicinskih gob in njihovega mehanizma delovanja. Največ pozornosti se v raziskavah namenja polisaharidom, saj so ti izkazali največjo učinkovitost. Klinični in komercialni nameni so pospešili razvoj pripravkov, ki vsebujejo aktivne polisaharide: Lentinan (*Lentinus edodes*), PSK (Krestin) in PSP (Polisaharid peptid) iz gobe *Trametes versicolor* ter shizofilan (*Schizophyllum commune*), befungin (*Inonotus obliquus*), prikazanih na Slika 1, ter D-frakcije (*Grifola fondosa*), GLPS-frakcije (*Ganoderma lucidum*) (3). Kljub velikemu napredku zadnjih 30 let ostaja veliko nerešenih vprašanj o delovanju in učinkih produktov medicinskih gob (3).



Slika 1: Nekatera prehranska dopolnila oziroma zdravila brez recepta iz medicinskih gob: (A) Krestin (PSK), izoliran iz gobe *Trametes versicolor*; (B) Lentinan, izoliran iz *Lentinus edodes*; (C) shizofilan, izoliran iz *Schizophyllum commune*, in (D) befungin, izoliran iz *Innonotus obliquus* (3)

1.3 ŽVEPLENI LEPOLUKNJIČAR ali *Laetiporus sulphureus*

Laetiporus sulphureus je užitna goba, predstavljena na Slika 2. Zaradi svoje žvepleno-rumene barve klobuka in značilnega okusa je znana pod imeni leseni piščanec (ang. chicken of the woods), piščančja goba (ang. chicken mushroom), žveplena polica (ang. sulphur shelf), žveplena kapa (ang. sulphur cap). Goba nima beta, na himeniju lahko opazimo cevaste pore, kjer nastaja bel trosni prah. Živi zelo dolgo. Starejše gobe izgubijo barvo in postanejo blede sive ali rjave (5). Gobo *Laetiporus sulphureus* najdemo na propadlih umrlih debelih ter lubju. Najpogosteje je to lubje hrasta (6), lahko tudi češnje, bukve in ostalih iglavcev. Razširjena je v Severni Ameriki in Evropi (7). Uvrščamo jo med gniloživke in parazite, saj v koreninah in strženu dreves povzroča rjavo gnilobo lesa. Les se najprej razbarva, kasneje postane drobljiv in krhek. Prvi je gobo opisal francoski mikolog Pierre Bulliard (1789) pod imenom *Boletus sulphureus* (8). Kasneje je ameriški mikolog William Murrill (1904) ustanovil rod *Laetiporus* ter vanj uvrstil *Laetiporus sulphureus* (1920). Današnje raziskave so usmerjene na razlikovanje vrst znotraj morfološko podobnih gob *L. sulphureus* s pomočjo modernih molekularnih tehnik: PCR, analize polimorfizmov, ITS-regij jedrne DNA ipd (6).



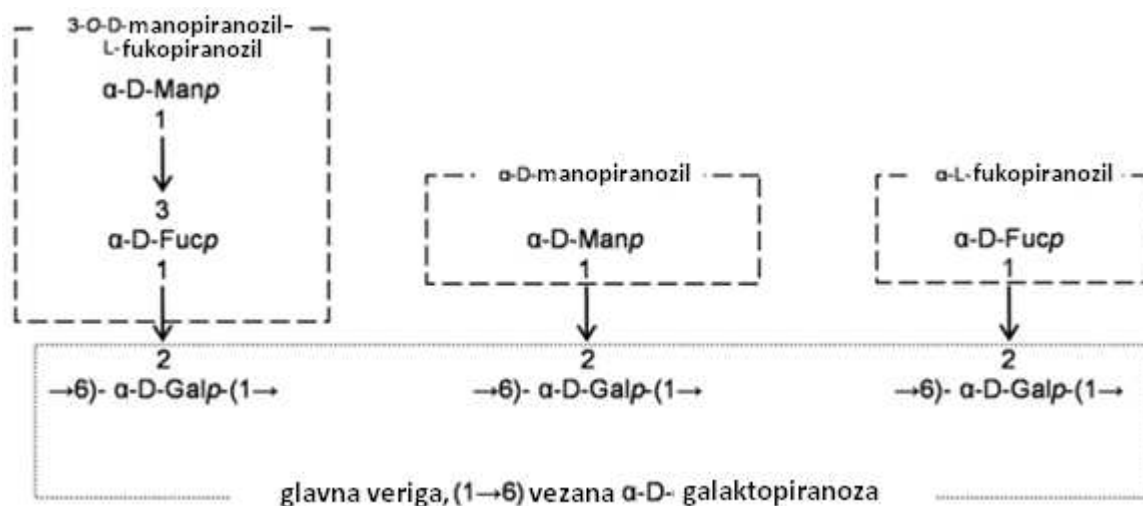
Slika 2: Goba *Laetiporus sulphureus*

1.3.1 Sekundarni metaboliti in njihovi učinki

Goba *L. sulphureus* predstavlja pomemben vir proteinov, esencialnih aminokislin, ogljikovih hidratov, mineralov, vitaminov ter drugih bioaktivnih naravnih snovi. Sekundarni metaboliti zavzemajo širok spekter pomembnih substanc, kot so: polisaharidi, (pomembni gradniki celične stene), pigmenti, hlapne snovi, lektini, hormoni in triterpeni. Pigmenti dajejo gobi rumeno barvo, hlapne snovi pa so odgovorne za značilen vonj, ki spominja na žveplo. Med raziskovanjem in ugotavljanjem pozitivnih učinkov gobe *L. sulphureus* so določili visoko vsebnost fenolnih in flavonoidnih derivatov ter glede na dobljene rezultate potrdili pomembno antioksidativno vlogo, primerljivo z že poznanimi antioksidanti BHA (butilirani hidroksianizol) ter α -tokoferolom (vitamin E). Turkoglu in sod. (9) so dokazali, da ima etanolni izvleček žveplenelega lepoluknjičarja močno antibiotično delovanje proti gram pozitivnim bakterijam in glivi *Candida albicans*. Mlinarič in sod. (10) so v svoji študiji potrdili antivirno delovanje preko inhibicije reverzne transkriptaze HIV-1-RT (6).

Raziskave na živalskih modelih so pokazale hipoglikemično, imunostimulacijo in protitumorno delovanje izoliranih in očiščenih polisaharidov. Najpomembnejšo vlogo pripisujemo izoliranim β -glukanom, katerih struktura je prikazana na Slika 3. Izvlečki *L.*

sulphureus učinkovito inhibirajo pankreatično lipazo, kar je ključnega pomena pri zdravljenju debelosti. Učinek lahko primerjamo s komercialno dostopnim zdravilom Orlistat. V gobah nastajajo metaboliti, ki inhibirajo HMG-CoA reduktazo. Gre za ključni encim pri endogeni sintezi holesterola. Lovastatin, inhibitor HMG-CoA reduktaze, so prvič izolirali iz glive *Aspergillus terreus* in je v manjših količinah prisoten tudi v *L. sulphureus*. Gobi se pripisuje antitrombotično aktivnost in citotoksično delovanje. Bioaktivna snov egonol deluje kot inhibitor melanogeneze in se uporablja za terapijo opečene kože. *L. sulphureus* vsebuje encime, ki se lahko uporabljajo v proizvodnji papirja ter zobozdravstvu. V kolikor bi uspeli učinkovito izolirati pigmente ali antioksidante, bi le-te lahko koristno uporabili v prehrabni industriji kot varna prehrabna barvila (6).



Slika 3: Polisaharid, izoliran iz gobe *Laetiporus sulphureus* (6); α -D-Manp = α -D-manopiranoza, α -D-Fucp = α -D-fukopiranoza; α -D-Galp = α -D-galaktopiranoza.

1.4 BUKOVA KRESILKA ali *Fomes fomentarius*

Goba *Fomes fomentarius* je prikazana na

Slika 4. Tudi zanjo v literaturi obstaja več poimenovanj: kresilna goba, kopitna goba (ang. Hoof fungus) (11) ali goba ledenega človeka (ang. Ice Man Fungus) (13). Prvi znanstveni opis gobe se v literaturi pojavi leta 1753 v *Species Plantarum*. Opisal jo je Carl Linnaeus in gobo poimenoval *Boletus fomentarius* (14).

Zanimivo je, da so štiri kose glive *Fomes fomentarius* našli v rokah 5000 let starega ledenega človeka Ötzi. Predvidevali so, da jih je uporabljal za netenje ognja. Goba je sicer neužitna, a so jo v preteklosti izkoriščali kot kresilo, iz nje so izdelovali tramo in amadou. Amadou predstavlja spužvasti del gobe, ki so mu dodali smodnik ali soliter ter dobili

močno gorivo. Kresilna goba ima obliko konjskega kopita, meso je trdno in olesenelo, cimetno rjave barve, trpkega okusa in sadnega vonja. Klobuk je trden z belim robom, barva niha od srebrno sive do črne, pogosto je rjava (12).



Slika 4: *Fomes fomentarius* (12)

Rastišča najdemo v Evropi, Aziji, Afriki in Severni Ameriki. Na severnih področjih je najpogostejši gostitelj breza, na južnih bukev, v mediteranskem okolju pa hrast. Poleg naštetih raste tudi na javorju, češnji, angleškem belem orehu, limoni, topolu, vrbi, jelši, egiptovski smokvi ter iglavecih. *Fomes fomentarius* navadno raste sam, kljub temu včasih na istem deblu opazimo več trosnjakov.

Fomes fomentarius uvrščamo med parazite in saprofite. Micelij prodira globoko preko poškodovanega lubja in počenih vej ter povzroča gnitje drevesa. Živi dolgo po odmrtnju gostitelja. Razpadajoče drevo prepoznamo po črnih oz. psevdosklerotičnih linijah, ki jih povzročajo encimi fenoloksidaze (12). *Fomes fomentarius* se priporoča za dekontaminacijo površin, okuženih z *E. coli* in vrstami *Bacillus* (12).

Poleg polisaharidov so aktivne substance tudi manjše molekule, ki prehajajo celično membrano in spreminjajo specifične celične odgovore z interferiranjem v določeno celično pot. Metanolni izvleček gobe *Fomes fomentarius* inhibira ekspresijo iNOS in COX zaradi zavrtja vezave NF- κ B na DNA (3).

Način, po katerem lahko ločimo gobo *Fomes fomentarius* od morfološko podobnih gob, je kemijska reakcija v raztopini KOH. Zaradi prisotne snovi fomentariol se raztopina obarva krvavo rdeče (12).

1.5 TERAPEVTSKI UČINKI MEDICINSKIH GOB

Gobe cenimo zaradi njihove hranilne vrednosti, vse bolj pa se širi njihova uporaba na področju medicine in farmacevtske industrije. Vedno več kliničnih študij kaže pozitivne učinke medicinskih gob, med njimi prevladujeta antikarcinogeno in imunomodulatorno delovanje (15). Izkazalo se je, da inhibirajo tako benigne kot maligne tumorje, preprečujejo onkogenezo in metastaziranje (16). Uživanje gobjih polisaharidov aktivira imunski odgovor, zato jih imenujemo biološki modifikatorji. Izvlečki medicinskih gob se uporabljajo kot dodatno zdravljenje ob kemoterapiji (1), radioterapiji ter monoklonskih protitelesih (16). Medicinska uporaba poleg že omenjenega temelji tudi na antioksidativnem, kardiovaskularnem, hepatoprotektivnem, antidiabetičnem, protivirusnem, protibakterijskem, antiparazitnem in protiglivičnem delovanju (3). Pomembno je, da organizmu ne škodujejo ter mu ne predstavljajo dodatnega stresa (1).

1.5.1 Terapevtski učinki nekaterih polisaharidov medicinskih gob

V kliničnih ter *in vitro* študijah so antineoplastično aktivnost dokazali pri polisaharidih: lentinanu, grifolanu, pleuranu (15). Zaradi protivirusnega, antimikrobnega in protiglivičnega delovanja se hkrati uporabljajo za zdravljenje infekcij (16). Grifolan na primer uspešno zavre okužbo s patogeno glivo *Candida albicans*, zavira tudi vnetje in infekcije. Shizofilan poveča produkcijo protiteles ter deluje bakteriostatično, podobno deluje Krestin.

Gobe imajo zaradi nizke kalorične vrednosti, nizke vsebnosti maščob, visokega števila proteinov, mineralov in nekaterih polisaharidov dietične lastnosti (15). Primerne so za diabetike, nekatere vrste gob dokazano znižujejo koncentracijo sladkorja v krvi. Tako grifolan poveča izločanje inzulina za 25 %. Poleg sladkorja nižajo nivo holesterola in trigliceridov v krvi (16). Pleuran zniža LDL-holesterol, celokupni holesterol ter nivo prostih maščobnih kislin, kar povzroči rahlo povečanje HDL-holesterola. Predvidevajo, da je mehanizem povezan z manjšo koncentracijo leptina v krvi, na katerega vplivajo β -glukani. Leptin je proteinu podobna substanca, ki ga proizvajajo maščobne celice podkožnega vezivnega tkiva. Receptorji zanj se nahajajo v hipotalamusu, kjer kontrolirajo občutek lakote in zadovoljstva.

Pleuran in lentinan, izoliran iz gobe Shiitake, sta trenutno najbolj uporabljena β -glukana. Oba kažeta pozitivne učinke na prebavni trakt, zmanjšujeta vnetje, kar je posebej

pomembno pri zdravljenju ulkusa. Medtem ko lentinan učinkuje na peristaltiko, pleuran zmanjšuje količino konjugiranih dienov v črevesju, jetrih in eritrocitih.

Posebej zanimiv je terapevtski učinek glive *Sparassis crispa*, ki pospeši obnavljanje kostnega mozga (15). Številni izvlečki medicinskih gob izkazujejo antioksidativno delovanje ter tako blažijo stres, zdravijo in ohranjajo mladosten videz kože (16).

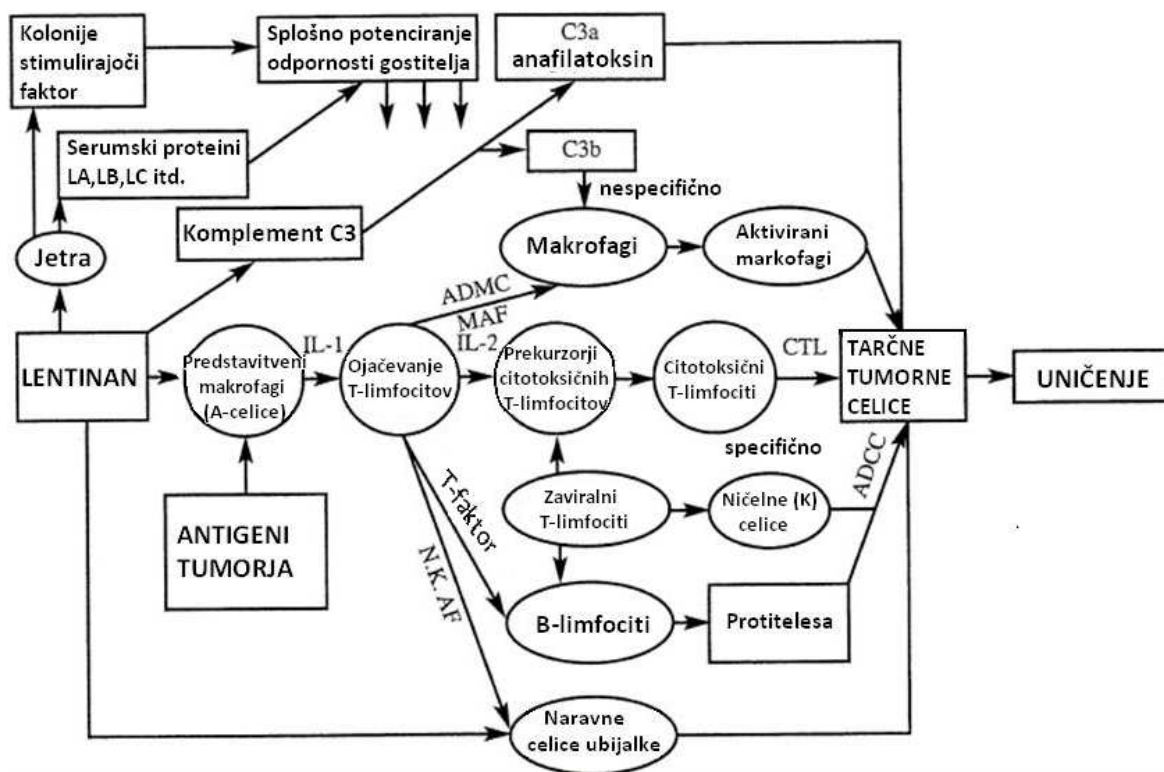
1.6 MEHANIZEM DELOVANJA BETA GLUKANOV

Polisaharidi predstavljajo strukturno komponento celične stene višjih gliv. Ta je v glavnem sestavljena iz dveh tipov polisaharidov: iz hitina ter β -glukanov, α -glukanov in glikoproteinov (17). V nadaljevanju se osredotočamo na polisaharide, saj so edini izkazali antitumorno aktivnost in ugodne učinke pri številnih boleznih (1). Ključni predstavniki so β -glukani (1 \rightarrow 3);(1 \rightarrow 4), molekule, relativno odporne na kislino v želodcu. Po peroralni aplikaciji potujejo v dvanajstnik, kjer jih zaradi narave glikozidne vezi (β -konformacija) encimi pankreasa ne morejo cepiti (15). V steni črevesja se aktivni β -glukani vežejo na makrofagne receptorje, nastale v kostnem mozgu. Takoj ko molekula β -glukana prepozna receptor, se celica aktivira in prične proizvajati baktericidne snovi, npr. lizocime, reaktivne kisikove radikale, vodikov peroksid (H_2O_2), N-oksid (NO) in druge. Celice proizvajajo številne citokine, ki nadalje aktivirajo fagocite in levkocite ter številne druge imunomodulatorne poti (15).

Polisaharidi ne napadejo rakavih celic direktno. Antitumorni učinek je posledica aktivacije različnih imunskih celic v gostitelju, zato zahteva intaktne limfocite T in makrofage. Limfociti ob stiku z antigeni tumorja proizvajajo citokine, ki po principu pozitivne povratne zanke aktivirajo limfocite T in makrofage. Na ta način stimulirajo tudi NK-celice (naravne celice ubijalke), makrofage, citotoksične limfocite T, limfocite B, produkcijo protiteles, ki vse vodijo k uničenju tumorske celice.

Druga pot delovanja polisaharidov je povečanje dejavnikov CSF (kolonije stimulirajoči dejavnik), IL-1, IL-3, ki pripomorejo pri zorenju, diferenciaciji ter proliferaciji celic imunskega sistema. Poveča se infiltracija eozinofilcev, nevtrofilcev in granulocitov. Sposobnost lentinana je, da lahko obnovi popolnoma zavrto aktivnost limfocitov T. Aktivirajo se tudi alternativne poti komplementa. Tako se C3-komponenta komplementa cepi v C3a, anafilaktični toksin, ki deluje direktno na tumorske celice, ter C3b, ki nespecifično aktivira makrofage (1). Slika 5 prikazuje shemo različnih mehanizmov delovanja lentinana.

S podobnim predstavljenim hipotetičnim mehanizmom delovanja lahko razložimo tudi protivirusno in protimikrobno delovanje. Za opsonizirane patogene, prekrute s fragmentom C3b, velja, da izkazujejo močno afiniteto do receptorjev CR3 (CD11b/CD18). Vezava povzroči citotoksično degranulacijo in fagocitozo (16).



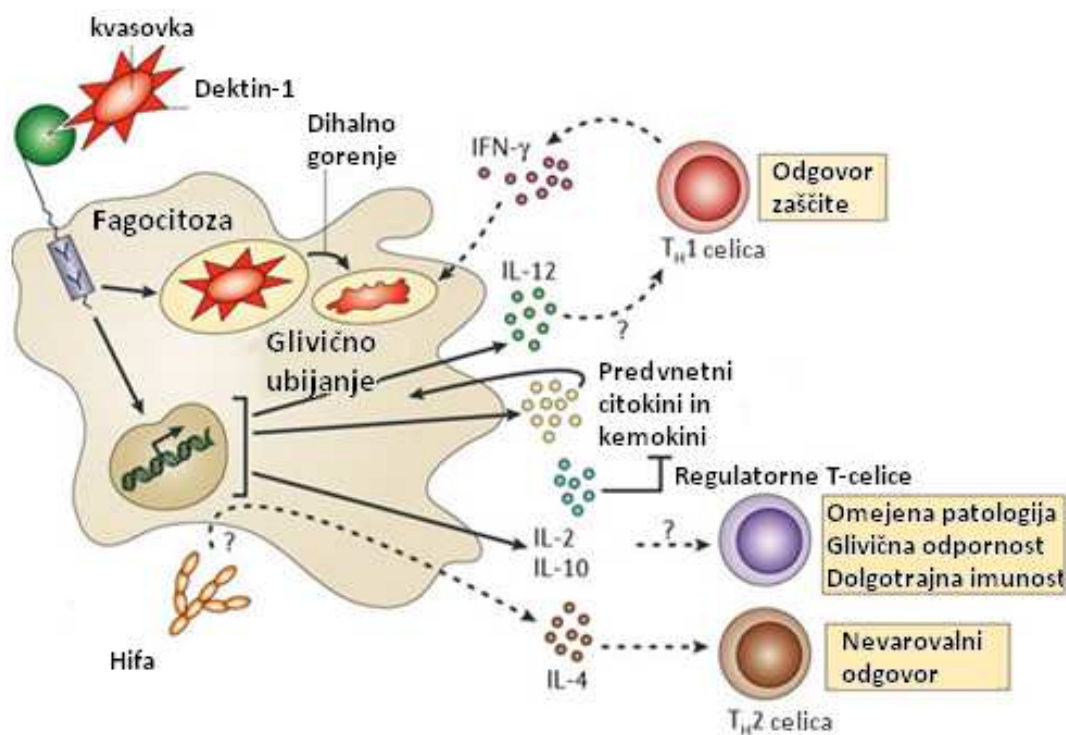
Slika 5: Mehanizem delovanja lentinana (1)

Da bi razjasnili mehanizem delovanja β -glukanov, so iskali njihove receptorje. Do sedaj so odkrili štiri možne kandidate. Poleg omenjenega **receptorja komplementa CR3**, ki se nahaja na nevtrofilcih, monocitih, NK-celicah, so pomembni še: glikosfinogolipid **laktozilceramid**, določeni **čistilni receptorji** (ang. scavenger receptor) in **dektin-1 (β GR)**. Ob vezavi β -glukana na laktozilceramid pride do povečanja proizvodnje MIP-2 (makrofagnega vnetnega proteina) ter aktivacije faktorja NF κ B. Kljub dobrem ujemanju rezultatov ne moremo posploševati, saj so afiniteto receptorjev preučevali izključno na β -glukanu zimosan (16).

Značilnost prirojenega imunskega odgovora je, da celice s pomočjo posebnih površinskih receptorjev PRR (kamor sodijo tudi TLR-receptorji) prepoznavajo ligande PAMP, komponente patogenih mikroorganizmov (16). Posamezni receptorji imajo različne poti signalizacije preko različnih vmesnih signalnih molekul. Končni izid signalizacijske

kaskade je vedno aktivacija transkripcijskih faktorjev. Aktivirata se bodisi NF κ B (jedrni faktor, ojačevalec lahke verige kappa v limfocitih B) bodisi AP-1 (aktivirajoči protein 1) (18). Posledice aktivacije transkripcijskih faktorjev so različne in vključujejo: diferenciacijo, proliferacijo, apoptozo in sproščanje različnih mediatorjev vnetja, kot so interferoni TNF- α , IL-1, IL-6, IL-10, IL-12. Prepoznavna patogenov s TLR-receptorji omogoča tri različna, a prepletajoča se delovanja: a) zaznavo prisotnosti in vrsto patogena, b) sprožitev takojšnjega odgovora na patogeni mikroorganizem in c) spodbujanje dolgo delujočega adaptivnega odgovora (18).

Po vsej verjetnosti glukani prevzamejo vlogo PAMP-molekul. Dektin-1 receptor predstavlja PRR-receptor na makrofagu, ki preko signalizacijske kaskade aktivira citosolno fosfolipazo A₂ ter povzroča akutno vnetje. Dokazali so, da čisti β -(1 \rightarrow 3) D-glukan preko vezave na receptor stimulira sproščanje arahidonske kisline in ekspresijo COX2 (ciklooksigenaze 2) (Slika 6) (16).



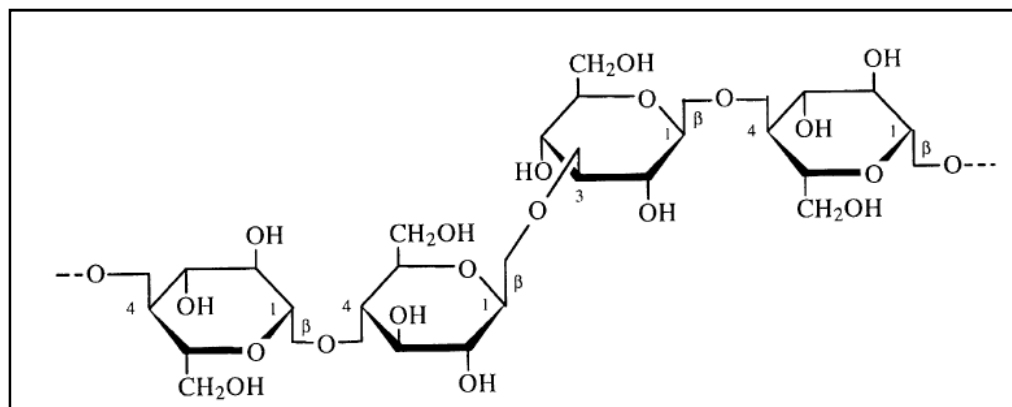
Slika 6: Celični odgovor na gobje beta glukane preko receptorja Dektin-1 (19)

Kljub velikim prizadevanjem, raziskavam in študijam na področju gobjih polisaharidov, celostni in natančni mehanizem delovanja β -glukanov ostaja uganka (3).

1.7 STRUKTURA IN VLOGA POLISAHARIDOV

Polisaharidi pripadajo strukturno najbolj raznolikemu razredu makromolekul. V primerjavi z drugimi biopolimeri, kot so proteini in nukleinske kisline, ki se med seboj povezujejo na en sam način, so polisaharidi kompleksnejši. Monosaharidne enote tvorijo glikozidne vezi z različnimi hidroksilnimi skupinami ter oblikujejo različno razvejane ali linearne strukture. Osnovno verigo sestavlja α - ali β -glikozidna vez. Poleg primarne strukture ter razvejanosti na delovanje močno vpliva terciarna struktura. Tako velika strukturna raznolikost polisaharidov omogoča prilagodljivost natančnim regulatornim mehanizmom v organizmu (1).

Polisaharidi, izolirani iz medicinskih gob, imajo zelo različne kemijske sestave. Najbolj razširjeni so β -glukani (Slika 7), katerih osnovna veriga je sestavljena izključno iz D-glukoznih enot (1). Splošna formula glukanov je $(C_6H_{12}O_5)_n$. Teoretično možnih kombinacij je veliko, medtem ko je število naravnih sladkorjev relativno omejeno, približno 300, npr. celuloza, glikogen, dekstran (15). Antitumorno aktivnost β -glukanov so dokazali pri β -(1 \rightarrow 3) vezi ter β -(1 \rightarrow 6) razvejani verigi. Aktivni so bili tudi α -(1 \rightarrow 3) glukani ter širok spekter drugih polisaharidov z različnimi kemijskimi strukturami: hetero- β -glukan, heteroglikan, proteo- β -glukan, proteo- α -glukan, α -manano- β -glukan, kompleks heteroglikana s proteinom idr. (1).



Slika 7: Osnovna struktura β -glukana s kombinacijo vezi (1 \rightarrow 3) ter β -(1 \rightarrow 4)

V gobah nastajajo tako heteroglukani kot heteroglikani. Prvi imajo osnovno verigo sestavljeno iz D-glukoznih enot, medtem ko je struktura stranske verige zelo raznolika. Vsebuje lahko glukuronsko kislino, ksilozo, galaktozo, manozo, arabinozo ali ribozo v različnih razmerjih. Heteroglikani imajo osnovno verigo sestavljeno iz različnih

monosaharidnih enot. Delimo jih na galaktane, fukane, ksilane in manane; njihova stranska veriga pa lahko vsebuje arabinozo, manozo, fukozo, galaktozo, ksilozo, glukuronsko kislino in glukozo (1).

1.8 SAR BETA GLUKANOV, vpliv strukture na učinek

Strukturne razlike β -glukanov, npr. velikost polisaharida, dolžina stranskih verig, obseg razvejanosti, topnost glukana, terciarna struktura, močno vplivajo na njihovo aktivnost (16). Za antitumorno delovanje naj bi bila potrebna glikozidna vez β -(1 \rightarrow 3) v glavni verigi ter dodatna β -(1 \rightarrow 6) stranska veriga. β -glukani, ki vsebujejo pretežno β -(1 \rightarrow 6), so manj učinkoviti (1).

Topnost β -glukanov je odvisna od izvora in strukture polisaharida ter dolžine stranskih verig. Gobji β -glukani so topni in jih lahko izoliramo z vročo vodo, medtem ko so β -glukani kvasovk netopne komponente celične stene (15, 16). Topnost naraste s povišanjem temperature. Vodotopni glukani so izkazali večjo antitumorno učinkovitost.

Aktivnost se poveča z višjo stopnjo substitucije. Najvišja stopnja biološke aktivnosti polimerov glukana je bila opažena pri stopnji razvejanosti od 0,2 do 0,33.

Obseg relativne molekulske mase β -glukanov je zelo velik: od nekaj 10–1000 kDa (3). β -glukani z veliko molekulsko maso so najučinkovitejši. Zelo majhni β -glukani (< 5000–10000 Mr, npr. laminarin) so neaktivni (16). Omenjeno pravilo pa ne velja za α -(1 \rightarrow 3) glukuronoksilomanane, izolirane iz želatinske gobe (ang. Jelly mushroom). Njihov učinek je neodvisen od molekulske mase.

Pri imunostimulatornem delovanju ima pomembno vlogo terciarna konformacija glukana, in sicer trojno vijačna struktura. Ko so lentinan, glukan iz gobe *Lentius edodes*, tretirali z DMSO (dimetilsulfoksidom), ureo ali NaOH, so izgubili terciarno strukturo, primarna je ostala nespremenjena. Odkrili so, da se s progresivno denaturacijo izgublja protitumorsko delovanje. Rezultate so potrdili s preučevanjem shizofilana (1).

Včasih so potrebne kemijske modifikacije, ki izboljšajo antitumorno aktivnost polisaharidov ali njihovo biološko učinkovitost, na primer topnost. Postopki, ki se jih pri kemijskih modifikacijah največkrat uporablja, so: Smithova degradacija (20), formoliza in karbometilacija (1).

1.9 RAZVOJNA POT NOVE UČINKOVINE IZ MEDICINSKIH GOB

Pot od odkritja nove spojine do njene terapevtske uporabnosti je dolga in vključuje številne korake. Pogledali si bomo biotehnološki postopek pridobivanja gobje biomase, ekstrakcijo in izolacijo vodotopnih polisaharidov, preverjanje biološke aktivnosti molekul ter določitev njihove kemične strukture.

1.9.1 Kultivacija gob in produkcija gobje biomase

Izbrane gobe sprva gojimo na trdnem agarju na Petrijevi plošči. Tako dobimo čisto micelijsko kulturo. Čas, v katerem bo goba razvila micelij, je odvisen od lastnosti vrste, pogojev kultivacije, vsebnosti hranljivih snovi v mediju, pH, temperature in faze zrelosti gobe. Glede na izbrano vrsto določimo optimalne pogoje (3). Najvišji nivo vodotopnih polisaharidov pri kultiviranih Bazidiomicetah najdemo na substratu s C/N-razmerjem 40 : 1 (15). Polisaharide pridobivamo iz plodišča ali kultiviranih micelijev. Gre za dva najpogosteje uporabljena biotehnološka postopka danes. Zavedati se moramo, da je količina polisaharidov, pridobljenih iz plodišča, bistveno večja kot pri kultiviranem miceliju (1). Navadno vzdržujemo trdna gojišča v inkubatorju pri 27° C, dokler ni Petrijeva plošča v celoti prekrita s svežim micelijem. Šele takrat se lotimo submerznega načina pridobivanja micelijske biomase. Svež micelij cepimo v tekoče gojišče z enako hranilno sestavo in stresamo na stresalniku. Inkubiramo toliko časa, dokler micelijski delci v celoti ne prekrijejo medija. Tudi ta korak je časovno zelo različen in odvisen od lastnosti vrste (3).

1.9.2 Ekstrakcija polisaharidov iz celične stene

Biomasa mora biti posušena in zmleta v fin prašek. Glede na snov, ki jo želimo ekstrahirati, izberemo primerno organsko topilo. Za izolacijo molekul lipidnega izvora, ki penetrirajo skozi celično steno, bomo izbrali v vodi netopna topila, npr. etilacetat. Kadar pa pričakujemo, da molekule delujejo na površini celice, se odločimo za vodotopna topila, npr. alkohol. Najpogosteje uporabljena topila za ekstrakcijo so: metanol, etilalkohol, etilacetat, dietileter, formaldehid ali nekatere kombinacije. Če se bioaktivni sekundarni metaboliti izločajo v gojišče, je smiselna tudi ekstrakcija iz tekoče brozge (3).

Po dveh dekadah intenzivnih raziskav medicinskih gob so Mizuno in sod. na Japonskem razvili zanesljiv postopek uspešne ekstrakcije, frakcionacije in čiščenja polisaharidov iz plodišč in kultiviranih micelijev (1, 21).

Majhnih molekul in nečistot se znebimo z dodatkom 80-odstotnega etanola. Sledi več zaporednih ekstrakcij z vodo (100 °C, 3h), lahko pa se odločimo za alkalno ekstrakcijo z 2-odstotnim amonijevim oksalatom (100 °C, 6h) ali 5-odstotnim NaOH. Pri prvi ekstrakciji dobimo v vodi topne polisaharide, pri drugih dveh ekstrahiramo v vodi netopne polisaharide (21, 22).

1.9.3 Izolacija in čiščenje vodotopnih polisaharidov

Vodotopne frakcije polisaharidov najpogosteje obarjamo z dodatkom etanola (3 : 1; v : v). Možno je tudi obarjanje s Fehlingovo raztopino in netopnim Cu^{2+} kompleksom (23). Nastala oborina ni čista, poleg polisaharidov so v njej prisotne tudi druge molekule. Dializa proti destilirani vodi je enostaven postopek, s pomočjo katerega se znebimo vseh soli, majhnih molekul, polisaharidov z nizko molekulsko maso ipd. (20, 23). Molekule prehajajo skozi dializno membrano na osnovi koncentracijskega gradienta, zato je pomembno konstantno mešanje in menjava vode. Nekateri se poslužujejo tudi ultrafiltracijske membrane (20, 24). Veliko težje se je znebiti proteinov, ki motijo nadaljnje analize. Proteinov so se poizkušali znebiti na različne načine: s pomočjo Sevage reagenta (1-butanol : kloroform = 1 : 4) (25, 26) dodatkom encima proteinaze ali z zamrzovanjem in odtaljevanjem vzorca (24).

Polisaharidne izvlečke najbolje očistimo z uporabo kombiniranih tehnik, kot so etanolno obarjanje, frakcionirana precipitacija, kislina precipitacija z očetno kislino, ionsko-izmenjevalno kromatografijo, gelsko filtracijo ali afinitetno kromatografijo.

Z ionsko-izmenjevalno kromatografijo skozi DEAE-celulozne kolone ločimo nevtralne polisaharide od kislinskih, nevtralne pa naprej s pomočjo gelske filtracije ali afinitetne kromatografije na α -glukane (adsorbirana frakcija) ali β -glukane (neadsorbirana frakcija) (1).

1.9.4 Preučevanje aktivnosti polisaharidov

Vsi izolirani izvlečki niso aktivni. Obstajajo različne metode in poizkusi, ki jih izberemo glede na cilj študije. Poizkuse izvajamo na specifični liniji izbranih rakavih celic. Uporabimo lahko test celične proliferacije (ang. Cell Proliferation Assay.) Izvlečke, ki inhibirajo rast rakavih celic, za več kot 50 % obravnavamo kot aktivne izvlečke. Če želimo ugotoviti in potrditi mehanizem na intracelularni ravni delovanja, moramo celice tretirati s točno določenimi koncentracijami izvlečkov, celice zbrati in lizirati. Proteine, ki nas zanimajo, detektiramo z metodami Western blot ali ELISA. Ekspresijo specifičnih genov,

vklučenih v proces tumorigeneze, določamo s pomočjo PCR ter RT-PCR. V analize moramo vedno vključiti ustrezne kontrole in rezultate primerjati s kontrolnimi celicami (3).

1.9.5 Določevanje kemijske strukture aktivnih polisaharidov

Ekstrahiranim in izoliranim polisaharidom želimo določiti kemijsko sestavo. Prvi korak je ločevanje s pomočjo kromatografije (3). Gelska izključitvena kromatografija loči polisaharide glede na njihovo molekulsko maso. Metodo odlikujejo njena hitrost, visoka selektivnost in dobra ponovljivost. Polisaharidi se spirajo iz kolone po velikosti od največjih do najmanjših. Točna molekulska masa se kasneje določi z umeritveno krivuljo več velikostnih standardov (27).

1.9.5.1 Analiza monosaharidnih enot (HPLC, TLC, GC)

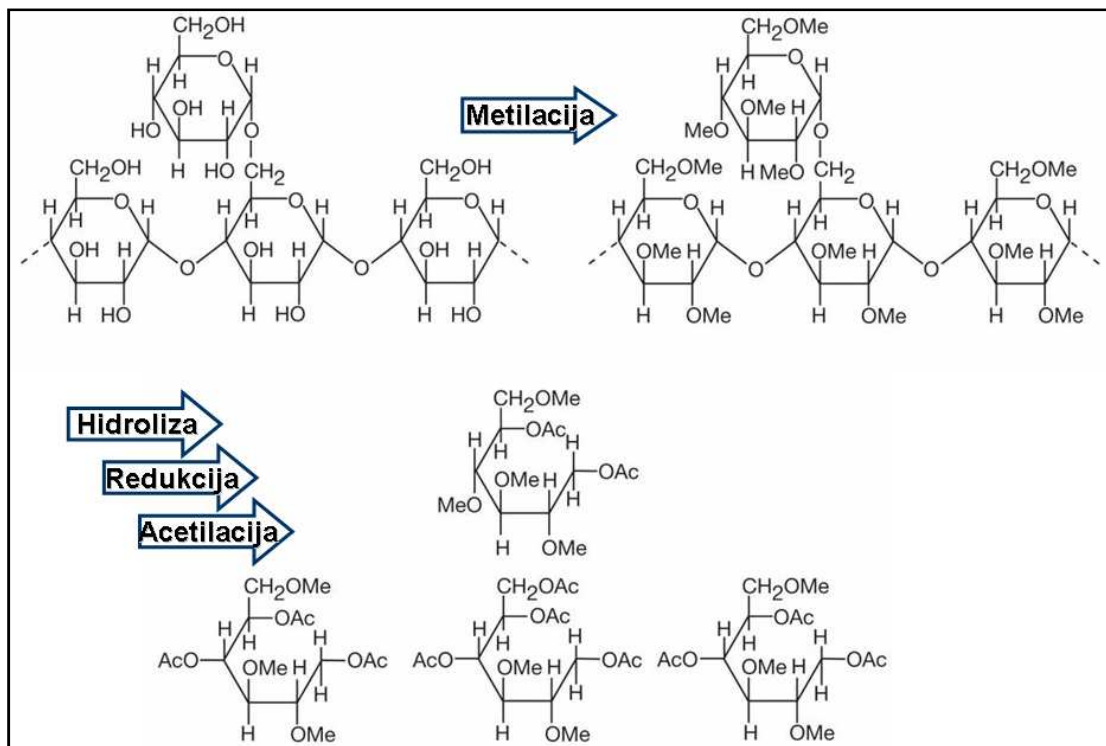
Če želimo določiti sestavo monosaharidnih enot, moramo polisaharid najprej hidrolizirati (23). Kislina TFA je primernejša od ostalih mineralnih kislin, saj jo zaradi večje hlapnosti lažje odstranimo (28).

Enostavnejša analizna metoda je tankoplastna kromatografija (TLC), za natančnejšo analizo uporabimo tekočinsko kromatografijo pod visokim tlakom (HPLC) oz. plinsko kromatografijo (GC). S pomočjo zadnje lahko določimo sestavo polisaharidov, osnovno verigo ter glikozidno vez. Ker polisaharidi nimajo maksimuma absorpcije v UV-območju, za detekcijo uporabimo refraktometrični detektor ali pa vzorce derivatiziramo. Priprava vzorcev za plinsko kromatografijo je zahtevnejša, saj morajo biti vzorci hlapni. Zaradi številnih korakov in reakcij je pomembno, da odstranimo vse reagente v presežku, vprašljiv je tudi izkoristek. Vzorci ne smejo vsebovati vlage (24, 28). V primeru rotavapiranja je potrebna posebna previdnost, saj so vzorci hlapni (23). Nastale alditolne acetate analiziramo s plinsko kromatografijo, možna je tudi analiza s kombiniranim sistemom GC-MS (25, 28–30).

1.9.5.2 Metilacijska analiza polisaharidov

S pomočjo metilacije polisaharidov lahko določimo osnovno verigo in glikozidno vez. Na začetku naredimo le delno hidrolizo, da dobimo osnovno verigo polisaharida. Za delno hidrolizo uporabimo manj koncentrirano 0,05 M TFA, nižjo temperaturo 95 °C in blage pogoje (20). Sledi per-O-metilacija vseh hidroksilnih skupin, ki ne sodelujejo pri osnovni glikozidni vezi. Kemijske reakcije so prikazane na Slika 8. Pri postopku metilacije ogljikovih hidratov sta Ciucan in Kerek uporabila reagente NaOH in DMSO-MeI (23, 24, 31, 32), medtem ko sta nekoliko modificirano metodo metilacije na polisaharidih

preizkusila Needs in Selvendran (33, 34). Zaradi slabe topnosti se včasih pojavi pomanjkljiva metilacija (31). Na koncu metilirane polisaharide v celoti hidroliziramo, reduciramo in acetiliramo, kot je v študiji opisal Sweet in sod. (20, 35). Ponovno dobimo dobro hlapne vzorce, ki jih analiziramo s pomočjo plinske kromatografije.



Slika 8: Enostavni primer metilacijske analize, prikazan s pomočjo strukturne enote polisaharida. Prikazani so koraki metilacije, hidrolize, redukcije in acetilacije, katerih končni produkt je nastanek hlapnih O-metiliranih alditol acetatnih derivatov (36).

1.9.5.3 NMR-jedrna magnetna resonanca

Metoda NMR je vedno bolj razširjena in uporabna. Današnje prednosti NMR tehnologije omogočajo natančno določitev strukture že pri nanomolarnih količinah očiščenega glikana. Od vseh analiznih metod ponuja NMR najbolj celostni pristop določevanja strukture sladkorjev, kar vključuje določitev stereokemije sladkorja, zaporedja, substituentov in konformacijo. Z NMR lahko preučujemo celo interakcije med sladkorji in proteini (37). Odvisno od tega, katero jedro atoma opazujemo, lahko posnamemo različne spektre. Splošno uporabna sta ¹³C in ¹H NMR. Pri snemanju spektrov sta pomembna parametra frekvenca in temperatura. Za študijo polisaharidov se uporablja 400 MHz in temperatura od 30 °C do 50 °C.

Vodik, prisoten v topilu, moti analizo NMR, zato ga moramo zamenjati z devterijem. Topilo za vzorce je navadno D₂O (devterirana voda), CDCl₃ (devteriran kloroform) ali

DMSO (23, 29). Uporabljajo se lahko tudi topila brez vodika, npr. CCl₄ (ogljikov tetraklorid) in CS₂ (ogljikov disulfid).

Rezultate podajamo kot kemijske premike, izražene v ppm (δ) glede na interni standard (29). Za interni standard se najpogosteje uporablja TMS (tetrametilsilan). TMS je tetrahedralna molekula, kjer so vsi protoni magnetno ekvivalentni. Signal je zato en sam in definira 0 ppm. (28, 38) Poznamo tudi dvodimenzionalne NMR-analize, na primer HSQC (ang. heteronuclear single quantum coherence), HSQC-DEPT (ang. HSQC distortionless enhancement by polarization transfer), HMQC (ang. heteronuclear multiple quantum coherence), in sklopljene ¹³C- in ¹H-analize TOSCY (ang. total correlation spectroscopy).

1.9.6 Predklinične in klinične raziskave

Aktivne frakcije, ki smo jim pripisali *in vitro* učinkovitost, moramo preveriti tudi *in vivo*. Učinkovitost in varnost sprva preverjamo na živalih, kot so miši in podgane. Raziskave potekajo tako, da v živali inducirajo tumorske celice, nato eno skupino tretirajo z gobjim izvlečkom, druga skupina pa služi za kontrolo. Tem študijam sledijo predklinične študije na *in vitro* modelih, kjer preučujejo metabolizem, toksičnost in farmakološke lastnosti. Klinično testiranje je zadnje, vključuje preučevanje varnosti na prostovoljcih, ocenjevanje učinkovitosti pri pacientih in ugotavljanje primerne odmerka in kliničnih vrednosti kandidatnega zdravila (3).

1.10 ANALIZNE REAKCIJE ZA SLADKORJE IN PROTEINE

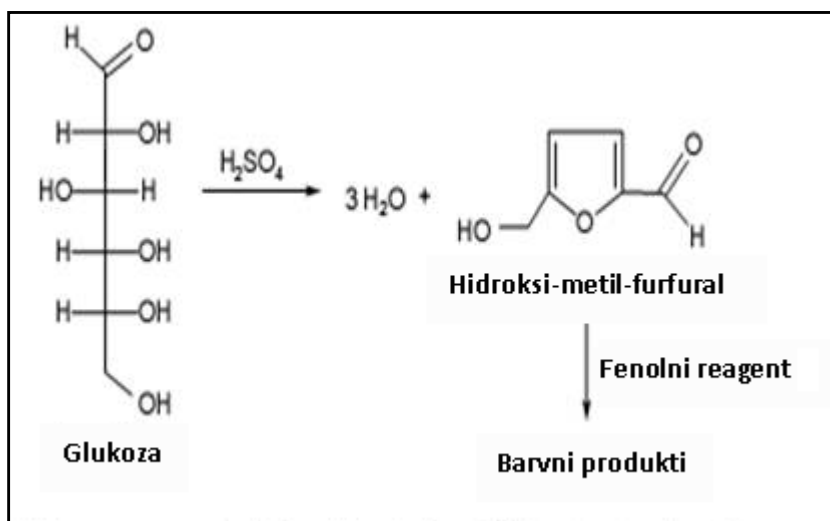
V raziskavah, ki vključujejo transformacijo ali izolacijo ogljikovih hidratov, je pomembno, da dobljeni produkt kvalitativno in kvantitativno ovrednotimo. Znanje o lastnostih ogljikovih hidratov nam omogoča uporabo številnih analiznih metod, tudi kolorimetričnih (39).

Najpogosteje uporabljena je metoda, ki so jo objavili Dubois in sod. (40, 41) Gre za reakcijo z žvepleno kislino in fenolom, ki jo lahko vedno uporabimo za sladkorje in polisaharide, tudi ob prisotnosti soli, proteinskih ostankov ipd. Problem nastane pri določenih deoksisladkorjih in aminosladkornih derivatih. Reakcija je primerna tako za reducirajoče kot tudi nereducirajoče sladkorje. Določevanje sladkorja s pomočjo te metode temelji na absorbanci obarvanega kompleksa pri 490 nm, ki nastane med fenolom in ogljikovim hidratom (Slika 9). Količino sladkorja določimo iz umeritvene krivulje.

Natančnost metode ocenjujejo na ± 2 %. Kvalitativno prisotnost sladkorja lahko potrdimo tudi vizualno (24, 29, 38, 39).

Specifično za reducirajoče sladkorje uporabljamo Smogyi-Nelson oz. kuproarzenatno metodo. Nastali obarvani kompleks med oksidiranim bakrom, sladkorjem in arzenomolibdatom ima maksimalno absorbanco pri 500 nm (39, 42). Smogyi-Nelsonovo metodo so zelo dolgo uporabljali za določevanje sladkorja v krvi (39).

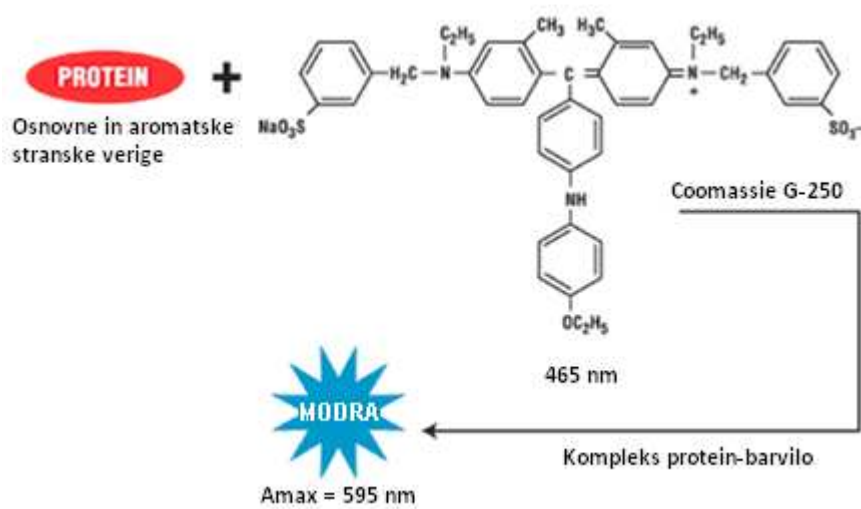
Včasih merimo tudi aminosladkorne derivate. Za *N*-acetil ali aminosladkorje uporabimo Morgan-Elsonovo metodo (39).



Slika 9: Kemijska reakcija za kvantitativno določanje ogljikovih hidratov

Proteine merimo s pomočjo številnih metod. Najbolj zanesljivi sta BCA-metoda (bikinkoninska kislina) in metoda po Bradfordu (20, 38). BCA-test povzroči nastanek stabilnega vijolično-modro obarvanega kompleksa z maksimalno absorbanco pri 562 nm. Alternativno določamo proteine s pomočjo metode po Lowryju. Zadnja se uporablja za kvantifikacijo in derivatizacijo N-terminalnih aminov (20, 25).

Bradfordov reagent vsebuje barvilo coomassie G-250, metanol, fosforno kislino in surfaktant v vodi (43). Ko se barvilo coomassie veže na protein v kislem mediju, ta premakne absorpcijski maksimum od 465 nm do 595 nm, kar s prostim očesom zaznamo kot spremembo barve iz rjave na modro (Slika 10) (43). Absorbanca je sorazmerna količini prisotnega proteina, kot standard se navadno uporablja goveji serumski albumin (BSA). Linearno koncentracijsko območje je 0,1–1,4 mg/ml proteina. Reducirajoče snovi ne motijo Bradfordovega reagenta, kar predstavlja njegovo prednost pred metodama po Lowryju in BCA. Metoda po Bradfordu je zelo hitra, reagent pa je primeren tako za mikro (1–10 mg/ml) kot za standardne (50–1400 mg/ml) koncentracije proteina.



Slika 10: Dokaz proteinov po Bradfordu (43)

2 NAMEN DELA

Zanimanje o učinkih in mehanizmih delovanja medicinskih gob se je iz tradicionalne vzhodne medicine preselilo v evropske laboratorije. Izvlečki nekaterih gob, kot na primer Reishi in Shiitake, so že na voljo kot prehranska dopolnila.

Odločili smo se za raziskovanje in preučevanje aktivnih snovi gob *Laetiporus sulphureus* in *Fomes fomentarius*. Kljub temu, da so se izvlečki omenjenih gob izkazali za učinkovite, so jim znanstveniki do sedaj neupravičeno namenjali manj pozornosti.

Namen našega dela bo določitev kemijske strukture vodotopnih intracelularnih polisaharidov žveplenega lepoluknjičarja ter intra- in ekstracelularnih polisaharidov bukove kresilke. Pripravili bomo submerzne micelijske kulture omenjenih vrst, da bi pridobili zadostno količino micelijske biomase. Iz micelijev obeh gob bomo izolirali polisaharide. Izvlečke bomo morali očistiti in se znebiti vseh nečistot, ki bi lahko motile analizo.

Prisotnost sladkorjev bomo detektirali s pomočjo metode po Dubois in sod. (40, 41), z reakcijo po Bradfordu pa ugotavljali prisotnost proteinov v vzorcih. Uporabili bomo gelsko izključitveno kromatografijo in polisaharide ločili po velikosti. Molekulsko maso polisaharidov bomo določili s pomočjo umeritvene krivulje kromatografskih standardov dekstrana.

Na osnovi TLC je bilo že ugotovljeno, da so v vzorcu prisotne D-glukoza, D-galaktoza, D-manoza, D-fukoza. D-glukoza naj bi prevladovala. Monosaharidno sestavo in razmerje bomo potrdili s pomočjo natančnejše metode HPLC. Z NMR-spektroskopijo pa želimo ugotoviti vrsto in anomerno konfiguracijo monosaharidnih enot, ki sestavljajo polisaharid.

3 MATERIALI IN METODE

Delo v laboratoriju je potekalo na Katedri za farmacevtsko biologijo Fakultete za farmacijo Univerze v Ljubljani v letu 2010. Študije NMR so izvajali na Kemijskem inštitutu.

3.1 KEMIKALIJE IN APARATURE

Rezultati analiz so v veliki meri odvisni od proizvajalcev in posledično od karakteristik uporabljenih snovi. Navajamo spisek uporabljenih kemikalij in laboratorijske opreme.

3.1.1 Laboratorijska oprema

Oprema	Proizvajalec
Elektronski parni avtoklav A-63CV	Kambrič, Slovenija
Avtoklav (celični)	CertoClav, Nemčija
Avtoklav – parni sterilizator	Systec, Anglija
Rotavapor nov	Büchi, Švica
Ultrazvočna kopel Sonis 3	Iskra Pio, Slovenija
HPLC	Shimadzu, Japonska
RID-10A refractive index detector	Shimadzu, Japonska
Tehtnica za kromatografske standarde	Metter toledo, Švica
Analizna tehtnica	Kern & Sohn GmbH, Nemčija
Analizna tehtnica	Tehtnica, Slovenija
LAF, Brezprašna komora	Iskra Pio, Slovenija
Stresalnik namizni MS3 digital	Ika MS3 digitalni, ZDA
Stresalnik/inkubator Vibromix	Tehtnica, Slovenija
pH meter	Metrohm, Švica
Centrifuga Sorvall RC5C	Thermo Fisher Scientific, ZDA
Centrifuga 5804R	Eppendorf, Nemčija
Centrifuga 5415R	Eppendorf, Nemčija
Sušilnik posode	WTB binder, Nemčija
Termoblok	Eppendorf AG, Nemčija
Vibracijsko mešalo/Vibromix	Tehtnica, Nemčija
Dializno črevo ServaPor, MWCO 6.000–8.000	Serva, Nemčija
Spektrofotometer Tecan Genius	Tecan, Švica
Magnetno mešalo, Rotamix	Tehtnica, Slovenija
ÄKTA	Ge Healthcare, Anglija
Liofilizator biotehnologija, Lio 2000	Kambrič, Slovenija
Liofilizator tehnologija, Beta 1-8H	Christ, Nemčija
Naprava za prečiščeno vodo Q vodo	Millipore, Francija

Varian NMR System 800MHz	Agilent Technologies, ZDA
Liofilizator Hetosicc	Heto Holten, Danska
Hladilnik (0–4 °C)	Gorenje, Slovenija
Zamrzovalnik (-20 °C)	Gorenje, Slovenija
Zamrzovalnik (-86 °C)	Sanyo, Japonska
Multikanalna pipeta	Biohit, Finska
Pipetni nastavki	Eppendorf, Nemčija
Mikrotiterska plošča s 96 vdolbinicami, 96-Well Optical Reaction Plate with Barcode 128	Applied Biosystems, ZDA
Polavtomatske pipete	Eppendorf, Nemčija

3.1.2 Uporabljene kemikalije

Kemikalije	Proizvajalec
Krompirjev dekstrozni agar (PDA)	Carl Roth, Nemčija
Glukoza, brezvodna (Glu)	Fluka, Steinheim, Francija
KH_2PO_4	Kemika, Zagreb
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	Alkaloid AD, Skopje, Makedonija
Tiamin	Sigma, St. Louis, ZDA
Etanol, 96 % (EtOH)	Kefo, Slovenija
Coomassie Plus Protein Assay Reagent Kit	Pierce Biotechnology, ZDA
Goveji serumski albumin (BSA)	Sigma, St. Louis, ZDA
H_2SO_4 za kromatografijo	Merck, Nemčija
Fenol (FeOH)	Merck, Nemčija
Ocetna kislina, 100 %	Merck, Švica
Trifluoroacetna kislina (TFA)	Carlo Erba Reagenti, Italija
Metanol (MeOH)	J. T. Baker, ZDA
NaCl	Scharlau, Španija
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	Sigma, St. Louis, Nemčija
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$	Kemika, Hrvaška
Dekstran 2.000.000 Da iz Leuconosta	Sigma, St. Louis, ZDA
Dekstran 500.000 Da iz Leuconosta	Fluka, Švedska
Dekstran 100.000 Da iz Leuconosta	Fluka, Kanada
Dekstran 40.000 iz Leuconosta	Sigma, St. Louis, ZDA
Dekstran 6.000 iz Leuconosta	Fluka, Kitajska
D-galaktoza (Glu)	Sigma, St. Louis, ZDA
D-manoza (Man)	Sigma, St. Louis, ZDA
D-fukoza (Fuc)	Sigma, St. Louis, ZDA
Tekoči dušik	Messer, Ljubljana, Slovenija
Trypton Bacto	BD, Francija
KOH	Sigma Aldrich, Češka

D ₂ O	Canbridge Isotope Laboratories, Inc., ZDA
DMSO	Canbridge Isotope Laboratories, Inc., ZDA
Visoko prečiščena voda	FFA, Slovenija
Dekstran 80kDa za GPC	Fluka, St. Louis, USA
Dekstran 270kDa za GPC	Fluka, St. Louis, USA
Dekstran 125kDa za GPC	Fluka, St. Louis, USA
Izopropanol	Carlo Erba Reagenti, Italija
HCl	Riedel de Haën, Nemčija
Acetonitril	Merck, Nemčija
Voda	Panreac, Španija
Aceton	Carlo Erba Reagenti, Italija
Toluen	Riedel de Haën, Italija
TMSPA	Canbridge Isotope Laboratories, Inc., ZDA

3.1.3 Gojišče gobe *Fomes fomentarius*

Gojišče gobe <i>Fomes fomentarius</i>	
Za gojenje micelija <i>Fomes fomentarius</i> smo uporabili sev iz banke gliv (BFWS) Biotehniške fakultete Univerze V Ljubljani, Oddelka za lesarstvo, Katedre za patologijo in zaščito lesa.	
Trdo gojišče za gobo <i>Fomes fomentarius</i>	
<ul style="list-style-type: none"> • <u>11,7 g dehidriranega gojišča PDA</u> • <u>300 mL destilirane vode</u> 	<p><i>Opombe:</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - avtoklaviramo 20 minut pri 121 °C; - po 10 dneh inkubacije na 26 °C smo micelij prenesli v tekoče gojišče.
Tekoče gojišče za <i>Fomes fomentarius</i>	
<ul style="list-style-type: none"> • <u>30 g/L glukoze</u> • <u>5 g/L triptona</u> • <u>1 g/L KH₂PO₄</u> • <u>0,5 g/l MgSO₄</u> • <u>0,5 mg tiamina</u> 	<p><i>Opombe:</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - začetni pH je 6,0; - avtoklaviramo 20 min pri 121°C; - na tekočem gojišču smo micelij gojili 21 dni pri temperaturi 26 °C in 121 obratih/min.

3.2 EKSTRAKCIJA IN IZOLACIJA INTRACELULARNIH VODOTOPNIH POLISAHARIDOV IZ GOBE *Laetiporus sulphureus*

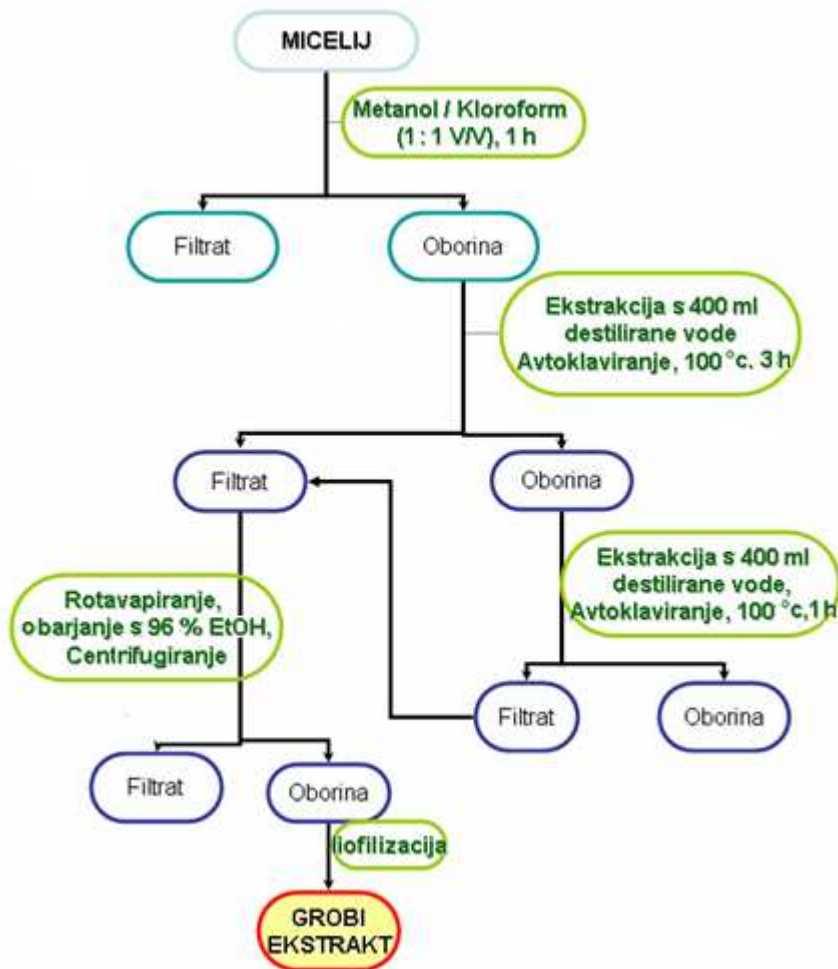
Suhi micelij gobe *Laetiporus sulphureus* smo hranili v eksikatorju. Za vsako izolacijo smo natančno natehtali približno 4 g micelija in ga nato eno uro segrevali v mešanici metanola/kloroforma (1 : 1 V/V, 300 ml) z mešanjem na magnetnem mešalu. Suspenzijo smo filtrirali pod znižanim tlakom in zavrgli filtrat. Filtrno pogačo smo postavili za 10 min v sušilnik. Sledila je ekstrakcija polisaharidov iz micelija. Ekstrakcijo smo izvajali dvakrat zaporedoma zaradi boljšega izkoristka (Slika 11).



Slika 11: Trdno gojišče glive *Laetiporus sulphureus* (levo) in ekstrakcija polisaharidov iz micelija *Laetiporus sulphureus* (desno)

Miceliju smo dodali 400 ml destilirane vode ter ekstrahirali vodotopne snovi v avtoklavu pri temperaturi 100 °C 3 ure. Sledili sta filtracija pod znižanim tlakom ter druga ekstrakcija s 400 ml destilirane vode v avtoklavu pri temperaturi 100 °C 1 uro. Filtrata prve in druge stopnje ekstrakcije smo združili, preostanek micelija pa shranili v petrijevki v zamrzovalniku pri -20 °C. Raztopino smo želeli koncentrirati, zato smo vodo uparili pod znižanim tlakom na rotavaporju pri temperaturi 50 °C in tlaku 60 mmHg. V merilnem valju smo izmerili volumen raztopine po rotavapiranju ter dodali 3-kratno količino 96-odstotnega etanola. Raztopino smo pustili obarjati v hladilniku pri temperaturi 4 °C čez noč. Belo oborino smo naslednji dan ločili od preostale raztopine s centrifugiranjem, pri tem smo uporabili Centrifugo Sorvall in rotor GS3 ter centrifugirali pri 4 °C, 8000 obratov/min, 15 min. Za boljši izkoristek centrifugiranja smo uporabili še Centrifugo 5804R. Usedlino smo liofilizirali. Liofilizirani grobi izvleček smo stehali (166 mg) in je

predstavljal prvo stopnjo ekstrakcije (Graf 1). Prisotnost polisaharidov smo v tej fazi preverili z metodo po Dubois in sod. (46).



Graf 1: Prikaz ekstrakcije polisaharidov

Grobi izvleček smo raztapljali v 50 ml destilirane vode 2 h ter mešali z magnetnim mešalom. Sledilo je centrifugiranje s Centrifugo 5804R pri sobni temperaturi, 8000 obratov/min, 15 min. Dobljeni supernatant smo dializirali na dializnem črevesu MWCO 6000–8000 proti 5 L destilirane vode. Dializa je potekala v hladilniku na 4 °C, destilirano vodo smo na 3 h trikrat zamenjali. Zaradi boljšega izkoristka smo preostalo usedlino še 2 h segrevali in raztapljali s pomočjo magnetnega mešala ter ponovili postopek dialize. Po končani dializi smo raztopino liofilizirali ter dobili končni produkt izolacije oz. zelene vodotopne polisaharide (95,4 mg) (Graf 2).

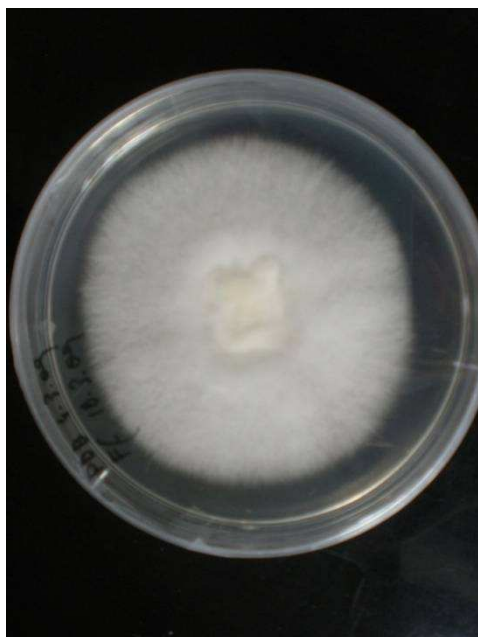


Graf 2: Prikaz izolacije vodotopnih polisaharidov

3.3 PRIDOBIVANJE BIOMASE GOBE *Fomes fomentarius* V SUBMERZNI TEKOČI KULTURI

Trajno micelijsko kulturo glive *Fomes fomentarius* hranimo na gojišču krompirjevega dekstroznega agarja (PDA), prekritega s parafinskim oljem pri temperaturi 4 °C. Za pridobivanje biomase gobe *Fomes fomentarius* lahko uporabimo kultivacijo na trdnem gojišču ali submerzno kultivacijo. Prednost submerznega gojenja je večja produkcija micelijske biomase ter posledično večja biosinteza polisaharidov. S tem skrajšamo proizvodni proces ter zmanjšamo možnosti kontaminacij (44).

Najprej smo pripravili trdno gojišče (Slika 12) tako, da smo 11,7 g dehidriranega gojišča PDA raztopili v 300 ml destilirane vode, avtoklavirali 20 min pri 121 °C ter razdelili na Petrijeve plošče. Te smo hranili v hladilniku pri 4 °C. Ohlajene plošče smo inokulirali v brezprašni komori, zatesnili s parafilmskim trakom, prekrili z aluminijasto folijo in inkubirali pri 26 °C. Za vzdrževanje aktivnosti kulture *Fomes fomentarius* smo kulturo čez 7 dni precepili na novo gojišče. Ko se je micelij razrasel do tri četrtine površine Petrijeve plošče, smo pripravili tekoče gojišče.



Slika 12: Trdno gojišče za *F. fomentarius*



Slika 13: Tekoče gojišče za *F. fomentarius*

Micelij glive, ki je rasel na trdnem gojišču PDA, smo narezali s sterilnim plutovnikom premera 5 mm. Za inokulacijo v erlenmajerico, ki je vsebovala 1 L steriliziranega tekočega substrata, smo porabili dve Petrijevi plošči z narezanim micelijem. Erlenmajerice smo inkubirali 21 dni na stresalniku pri 26 °C in 120 obratih/min (slika 13). Erlenmajerice s steriliziranim inokuliranim tekočim substratom so nam predstavljale bioreaktorje brez mešal. Konstanten pretok zraka ni bil zagotovljen, saj smo ga dovajali enkrat tedensko z odprtjem erlenmajeric v brezprašni komori in intenzivnem mešanju substrata.

3.4 EKSTRAKCIJA IN IZOLACIJA EKSTRACELULARNIH IN INTRACELULARNIH VODOTOPNIH POLISAHARIDOV IZ GOBE *Fomes fomentarius*

Izolacijo smo izvajali tri tedne po cepitvi gobe na submerzno tekoče gojišče. Micelij smo od fermentacijske brozge ločili s centrifugiranjem na Centrifugi Sorvall z rotorjem GS3 pri temperaturi 25 °C. Za izolacijo ekstracelularnih polisaharidov smo uporabili supernatant, za izolacijo intracelularnih polisaharidov pa usedlino micelija. Supernatant smo dodatno filtrirali pod znižanim tlakom, da bi se znebili možnih ostankov micelija, ter koncentrirali pod znižanim tlakom in temperaturi 50 °C do približnega volumna 200 ml. Dodali smo 3-kratni volumen 96-odstotnega etanola in pustili obarjati čez noč pri 4 °C. Iz grobega izvlečka je sledil postopek izolacije ekstracelularnih vodotopnih polisaharidov, ki je enak

postopku pridobivanja vodotopnih polisaharidov, opisanemu pri *Laetiporus sulphureus* (graf 2).

Istočasno smo iz micelija *Fomes fomentarius* izolirali intracelularne polisaharide. Micelij smo dvakrat spirali z destilirano vodo ter dvakrat s 85-odstotnim etanolom. S spiranjem smo odstranili nizkomolekularne snovi, topne v etanolu, oz. ostanke gojišča ter ekstracelularnih polisaharidov. Sledila je ekstrakcija z destilirano vodo.

Postopek pridobivanja vodotopnih polisaharidov iz grobega izvlečka je opisan pri gobi *Laetiporus sulphureus* (graf 2) in se ne razlikuje za intracelularne in ekstracelularne polisaharide gobe *Fomes fomentarius*.

3.5 ANALIZA IZOLIRANIH POLISAHARIDOV

3.5.1 Določitev vsebnosti polisaharidov in proteinov v izoliranih polisaharidih

Vmesnim in končnim produktom ekstrakcije in izolacije gliv *Laetiporus sulphureus* in *Fomes fomentarius* smo določevali vsebnost proteinov in vodotopnih polisaharidov. Prisotnost proteinov smo določali z reakcijo po Bradfordu (1976), vsebnost polisaharidov pa z modificirano metodo po Dubois in sod. (1976). Za izvedbo reakcij smo uporabili mikrotitrne ploščice (45).

3.5.1.1 Metoda po Bradfordu

Za določitev proteinov smo uporabili Coomassie Plus Protein Assay Reagent Kit, ki vsebuje barvilo coomassie G-250, metanol, fosforno kislino in surfaktant v vodi. Reagent shranjujemo v hladilniku pri 4 °C, pol ure pred uporabo ga postavimo na sobno temperaturo (43). Analize smo izvedli v mikrotitrski plošči s štirimi ponovitvami. Redčitveno vrsto govejega serumskega albumina (BSA) smo uporabili kot standard, s katerim smo pripravili umeritveno krivuljo. Z multikanalno pipeto smo v vsako vdolbinico pipetirali 150 µL vzorca oz. standarda ter dodali 150 µL reagenta. Ploščo smo 30 sekund rahlo stresali na sobni temperaturi. Moteče mehurčke, ki nastanejo pri reakciji, smo odstranili z vpihovanjem vročega zraka. S pomočjo spektrofotometra Tecan Genius smo izmerili absorpcijo pri 595 nm ter na osnovi umeritvene krivulje sklepali na koncentracijo proteinov.

3.5.1.2 Metoda za kvantitativno določanje ogljikovih hidratov

Prisotnost polisaharidov smo ugotavljali pri grobem izvlečku po dializi ter določevali frakcije pri gelski filtraciji. Analizo vsebnosti sladkorjev smo izvedli v mikrotitrskih

ploščah v štirih ponovitvah. Za standard smo uporabili redčitveno vrsto glukoze. V vsako vdolbinico smo odpipetirali 50 μL vzorca oz. standarda glukoze. Z multikanalno pipeto smo pipetirali 150 μL žveplene kisline ter ploščo 15 minut stresali na stresalniku pri sobni temperaturi. Po inkubaciji smo z multikanalno pipeto dodali 30 μL 5-odstotnega fenola. Ploščo smo 5 minut segrevali na vodni kopeli pri temperaturi 85 °C. Po 10 minutah ohlajanja smo s spektrofotometrom Tecan Genius izmerili absorbanco pri 492 nm. S pomočjo umeritvene krivulje standardnih raztopin glukoze smo vzorcem določili vsebnost vodotopnih polisaharidov oz. določili, v katerih frakcijah se polisaharidi nahajajo.

3.6 GELSKA FILTRACIJA OZIROMA KROMATOGRAFIJA

3.6.1 Osnovne značilnosti kolone

Ekstrahiranim in izoliranim vodotopnim polisaharidom smo želeli določiti velikost. V ta namen smo uporabili gelsko filtracijo oz. kromatografijo z ločevanjem po velikosti (ang. size-exclusion chromatography). Uporabili smo koloni visoke ločljivosti HiPrep 16/60 Sephacryl S-200 HR ter večjo kolono HiPrep 26/60 Sephacryl S-300 HR proizvajalca GE Healthcare. Omenjene kolone so namenjene čiščenju in ločevanju večjih molekul, npr. peptidov, proteinov, ogljikovih hidratov. Sephacryl High Resolution kolono sestavlja križno povezan kopolimer alilni dekstran in *N,N*-metilenbisakrilamid. Križna vezava daje ogrodju trdnost in kemično stabilnost. Povprečna velikost delcev stacionarne faze je 47 μm (25–75 μm). Velikost kolone izberemo glede na pričakovano velikost molekul ter želeno resolucijo. Kolona Sephacryl S-200 HR dobro loči dekstrane velikosti 1×10^3 – 8×10^4 Da, njen volumen je 120 ml; medtem ko kolona Sephacryl S-300 loči dekstrane velikosti 2×10^3 – 4×10^5 Da, njen volumen pa je 320 ml. Za razliko od ionske izmenjevalne oz. afinitetne kromatografije se molekule pri gelski filtraciji ne vežejo na nosilec, tako da izbor mobilne faze ne vpliva direktno na samo ločevanje in resolucijo. Pri naših poizkusih smo za mobilno fazo prvič izbrali visoko prečiščeno vodo, drugič 0,15 M NaCl.

3.6.2 Priprava kolone

Pred pričetkom dela smo kolono Sephacryl S-200 16/60 pripravili tako, da smo jo sprali s 60 ml 0,2 M NaOH ter hitrostjo pretoka 0,5 ml/min. Na ta način smo odstranili večino proteinov, ki se nespecifično vežejo na medij. Po končanem čiščenju smo kolono uravnotežili z dvema volumnoma visoko prečiščene vode.

Poleg rednega smo izvajali tudi grobo čiščenje. V tem primeru smo kolono čistili s hitrostjo pretoka 0,3 ml/min pri sobni temperaturi z naslednjimi raztopinami: (a) 1/4 volumna kolone z 0,5 M NaOH. Na ta način odstranimo vse hidrofobne proteine ali lipoproteine; (b) 1/2 volumna kolone smo spirali s 30-odstotnim izopropanolom. Ta odstrani lipide in zelo hidrofobne proteine; (c) zadnja faza je odstranjevanje oborjenih proteinov z volumnom pepsina v očetni kislini in NaCl, vendar zadnje faze nismo uporabili. Na koncu vsake faze čiščenja vedno sledijo štiri volumni visoko prečiščene vode.

3.6.3 Učinkovitost kolone

Pred uporabo se priporoča preverjanje učinkovitosti kolone. Preverjali smo učinkovitost obeh kolon, tako HiPrep 16/60 Sephacryl S-200 HR kot tudi HiPrep 16/60 Sephacryl S-300 HR. Vzorca smo pripravili po navodilih proizvajalca. V našem primeru smo aplicirali 200 µl 2-odstotnega acetona v 20-odstotnem etanolu. Za mobilno fazo smo uporabili 20-odstotni etanol. Hitrost pretoka smo nastavili na 0,8 ml/min, kot je predpisano v navodilih. Za detekcijo smo uporabili UV-detektor pri valovni dolžini 280 nm.

Učinkovitost kolone izračunamo po enačbi:

$$H^{-1} = 5,54 \left(\frac{V_R}{W_h} \right)^2 1000 / L$$

V_R = vrh retencijskega (elucijskega) volumna

W_h = širina vrha pri polovični višini

L = dolžina kolone (mm)

Enoti pri V_R in W_h izrazimo v enakih enotah.

3.6.4 Priprava vzorcev, mobilne faze in pufrov za gelsko filtracijo

Natehtali smo natančno približno 16 mg čistega vzorca vodotopnega polisaharida oz. standarda ter dodali raztopino mobilne faze do koncentracije 4 mg/ml. Premešali smo na vibracijskem mešalu ter 2 h raztapljali na vodni kopeli pri temperaturi 100 °C. Vzorec smo centrifugirali pri sobni temperaturi, 8000 obratih/min, 10 min ter ga filtrirali s pomočjo 0,22 µm mikrobiološkega filtra. Za analizo prisotnosti sladkorjev smo vzeli vzorec pred filtracijo in po njej ter izračunali izgubo polisaharidov na filtru.

Za mobilno fazo smo uporabljali visoko prečiščeno vodo. Pred uporabo smo s pomočjo ultrazvočne kopeli vodo degazirali. Mobilno fazo 0,15 M NaCl smo uporabili le na koloni Sephacryl S-300HR.

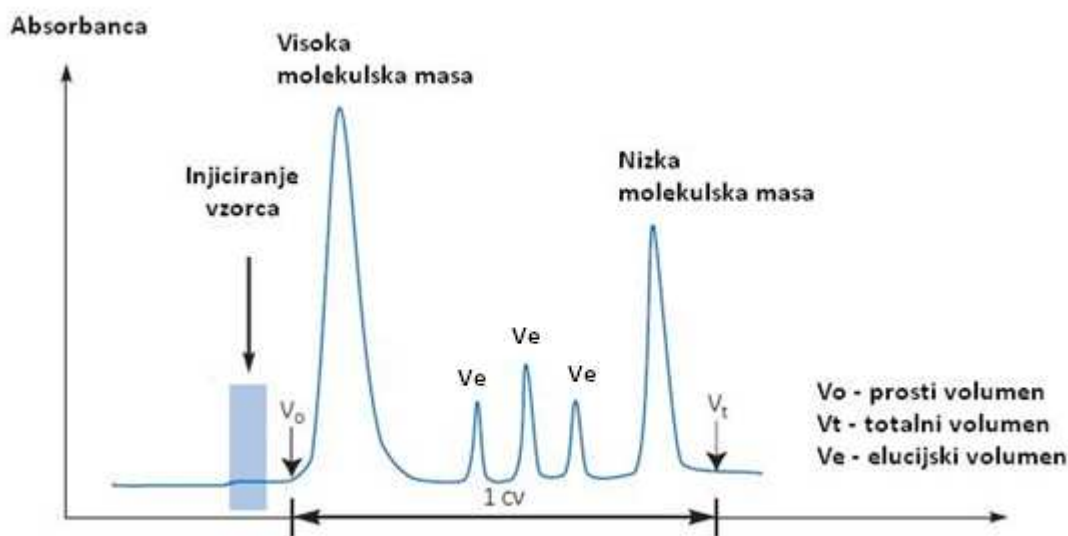
Za vmesno spiranje kolone smo uporabljali 20-odstotno raztopino etanola. Tako smo natehtali 174 g 96-odstotnega etanola, dodali do 1000 g visoko prečiščene vode, ga filtrirali in odzračili.

3.6.5 Potek dela pri gelski filtraciji

Pred začetkom dela smo kolono spirali s 4-kratnim volumnom visoko prečiščene vode. Nato smo na kolono HiPrep 16/60 Sephacryl S-200 HR injicirali 1 ml vzorca. Pazljivost je potrebna, saj v kolono ne smejo priti mehurčki zraka. Pretok smo nastavili na 0,5 ml/min in zbirali frakcije po 10 ml. Na kolono HiPrep 26/60 Sephacryl S-300 HR smo injicirali 2 ml vzorca, pretok pa nastavili na 1,3 ml/min in zbirali frakcije po 10 ml. Med gelsko izključitveno kromatografijo smo merili absorbanco z UV-detektorjem pri 280 nm. V vseh frakcijah smo naredili analizo vsebnosti sladkorjev ter proteinov. Na ta način smo določili, v katerih frakcijah se nahajajo polisaharidi in v katerih proteini. Izbrane frakcije smo združili ter liofilizirali. Te vzorce smo uporabili za nadaljnje analize NMR, HPLC in GC.

3.6.6 Določitev velikostnega ranga izoliranih polisaharidov s pomočjo gelske filtracije

Večje molekule se ne ujamejo v matriks kolone in se zato sperejo s prostim volumnom (V_0). Pri dobro poljnjeni koloni predstavlja prosti volumen približno 30 % celokupnega volumna. Molekule, ki se ujamejo v pore matriksa, se spirajo po padajoči molekularni masi. Majhne molekule, kot so npr. soli, se iz kolone sperejo zadnje, vendar jih med seboj ne moremo ločiti. Te molekule se sperejo tik pred totalnim volumnom kolone (V_t) (Slika 14).



Slika 14: Teoretični kromatogram pri visoko ločljivostni frakcionaciji

Dokazali so linearno odvisnost faktorja Kd (koeficient difuzije) in logaritma molekulske mase. Faktor Kd izračunamo po enačbi:

$$Kd = \frac{Ve - Vo}{Vt - Vo - V_{gel}} = \frac{Ve - Vo}{Vi}$$

Vo – prosti volumen

Ve – elucijski volumen

Vt – totalni volumen

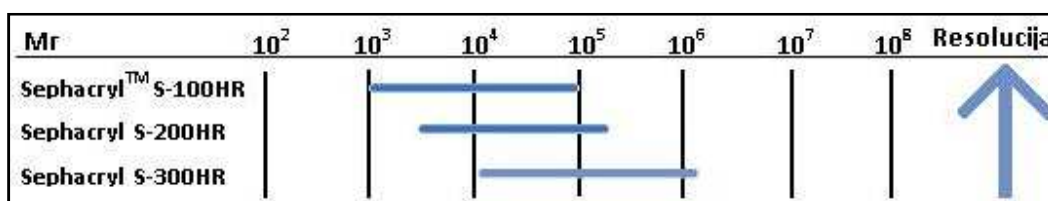
Vi – volumen stacionarne faze

Vgel – volumen gelskega matriksa

Ker je volumen stacionarne faze zelo težko določiti, v praksi uporabljamo porazdelitveni koeficient Kav. Volumen gelskega matriksa v tem primeru zanemarimo, saj sta konstanti sorazmerno enaki.

$$K_{av} = \frac{(Ve - Vo)}{(Vt - Vo)}$$

Prosti volumen (Vo) predstavlja sredino vrha molekul z najvišjo molekulkso maso. Celokupni volumen (Vt) smo določili kot konec vrha molekul z nizko molekulkso maso. Najprej smo skozi kolono spustili kromatografske standarde Dekstrana z znano molekulkso maso. Iz umeritvene krivulje standardov smo nato določili in izračunali še molekulkso maso izoliranih polisaharidov v vzorcu.



Slika 15: Območje frakcionacije glede na izbiro kolone

Kolona Sephacryl S-200 HR ločuje molekule velikosti 1000–80 000 Da, medtem ko s kolono Sephacryl S-300 HR ločimo dekstrane velikosti 2000–400 000 Da. Zavedati se moramo, da se z večanjem frakcionacijskega območja zmanjšuje resolucija in s tem natančnost (Slika 15).

3.7 HPLC oz. TEKOČINSKA KROMATOGRAFIJA VISOKE LOČLJIVOSTI

S pomočjo HPLC-kromatografije oz. tekočinske kromatografije pod visokim tlakom (slika 16) smo želeli ugotoviti natančno sestavo izoliranih polisaharidov. Izolirane in očiščene vzorce polisaharidov je bilo potrebno hidrolizirati na monosaharidne enote ter s pomočjo pripravljenih standardov ugotoviti in analizirati njihovo sestavo.

3.7.1 Priprava vzorca za HPLC

V epruveto z zamaškom smo natehtali natančno 1–5 mg standarda dekstrana oz. izvlečka vodotopnega polisaharida. Dodali smo 1 ml 2 M TFA (triflouroocetne kisline) ter vzorce hidrolizirali pri 100 °C na oljni kopeli čez noč. Po hidrolizi smo kislino spirali trikrat z 1 ml MeOH ter topilo uparili pod znižanim tlakom in temperaturi 40 °C. Sledilo je dvakratno spiranje z 1 ml destilirane vode ter hkratno rotavapiranje. Pri zadnjem spiranju smo vodo uparili do suhega ter ponovno dodali 1 ml destilirane vode. Za 1 min smo vzorec postavili na ultrazvočno kopel ter ga zamrznili pri temperaturi -20 °C.

3.7.2 Pogoji za merjenje HPLC

Pri meritvah smo uporabili instrument Shimadzu LC-2010 (Slika 16), ki je bil opremljen s črpalko LC-20AD in RI-detektorjem (RID-10A). Ločevanje je potekalo na koloni apHera™NH2 Polymer, velikosti (5 µm, L × I.D. 15 cm × 4.6 mm) Supelco Analytical. Za mobilno fazo smo uporabili vodo : acetonitril v razmerju 35 : 65. Hitrost pretoka smo nastavili na 0,6 ml/min ter nastavili temperaturo kolone na 30 °C. Pri vsakem poizkusu smo aplicirali 0,6 µl vzorca. Analiza je trajala 15 min.



Slika 16: Na sliki je prikazan instrument Shimadzu LC-2010, ki se uporablja pri metodi HPLC.

3.8 NMR

3.8.1 Priprava vzorcev za NMR

Natehtali smo približno 7,6 mg vzorca ter ga raztopili v 600 μL D_2O devterirane vode. Mešali smo na vibracijskem mešalu, ter raztapljali pri temperaturi 85 °C. Na koncu smo 1 min centrifugirali pri 750 rpm. Na kemijskem inštitutu so vzorce liofilizirali ter ponovno raztopili v devterijski vodi. Zaradi slabe topnosti smo želeli preizkusiti tudi topilo DMSO. Pripravili smo vzorce intracelularnih polisaharidov *Laetiporus sulphureus* in *Fomes fomentarius*. Izolirani ekstracelularni polisaharidi *Fomes fomentarius* so bili obarvani in kot taki neprimerni za NMR-analizo.

3.8.2 Pogoji meritev

Spektre smo posneli v sodelovanju s kemijskim inštitutom, in sicer na 800 MHz Varian NMR-spektrometru. Pri snemanju smo uporabili BB-sondo. Vzorec smo raztopili v D_2O ter snemali pri temperaturi 25 °C. Kemijski premik protonov so določili glede na interni standard TMSPA.

Pri vzorcu LasICP smo posneli spodaj naštete spektre:

- ^1H -spekter vzorca v D_2O pri $25\text{ }^\circ\text{C}$,
- ^{13}C -spekter vzorca D_2O pri $25\text{ }^\circ\text{C}$,
- ^1H - ^{13}C HSQC-spekter vzorca D_2O pri $25\text{ }^\circ\text{C}$,
- ^1H - ^{13}C HMBC-spekter (zaradi prenizke koncentracije v spektru nismo opazili jasnih znakov) vzorca D_2O pri $25\text{ }^\circ\text{C}$,
- ^1H - ^1H TOCSY-spekter (mix = 0,02 s) vzorca D_2O pri $25\text{ }^\circ\text{C}$,
- ^1H - ^1H TOCSY-spekter (mix = 0,08 s) vzorca D_2O pri $25\text{ }^\circ\text{C}$.

Pri vzorcu FfICP smo posneli spodnja dva spektra:

- ^1H -spekter vzorca v D_2O pri $25\text{ }^\circ\text{C}$,
- ^1H -spekter vzorca v DMSO pri $25\text{ }^\circ\text{C}$.



Slika 17: Na sliki je Varian 800 MHz NMR-spektrofotometer.

4 REZULTATI

4.1 IZKORISTEK IZOLACIJE VODOTOPNIH POLISAHARIDOV

Iz suhega izvlečka micelija smo izolirali vodotopne intracelularne polisaharide *Laetiporus sulphureus* ter intra- in ekstracelularne polisaharide gobe *Fomes fomentarius*. Te smo nato dializirali v dializnem črevesu proti destilirani vodi, ki prepušča molekule 6–8 kDa. Po 24 urah smo dializirno raztopino liofilizirali ter stehali dobljeno količino polisaharidov. Rezultati so predstavljeni v preglednicah 1, 2 in 3.

Izolacija intracelularnih polisaharidov iz gobe *Laetiporus sulphureus*

Preglednica 1: Prikaz izkoristkov grobega izvlečka in izoliranih intracelularnih polisaharidov, večjih 6–8 kDa, iz začetne suhe snovi micelija *Laetiporus sulphureus*. Prikazan je tudi izkoristek dialize.

	Začetna masa micelija	Masa grobega izvlečka	Masa polisaharidov, večjih 6–8 kDa	Izkoristek po dializi (%)
15. 3. 2010	4,37 g	129,2 mg 2,9 %	60,4 mg 1,2 %	46,7 %
30. 3. 2010	4,35 g	116,1 mg 2,7 %	95,4 mg 2,2 %	82,2 %
3. 5. 2010	3,975 g	140,1 mg 3,5 %	78,6 mg 2,0 %	56,1 %
17. 5. 2010	2,199 g	164,1 mg 7,5 %	123,5 mg 5,6 %	75,3 %

Izolacija intracelularnih polisaharidov iz gobe *Fomes fomentarius*

Preglednica 2: Prikaz izkoristkov grobega izvlečka in izoliranih intracelularnih polisaharidov, večjih od 6–8 kDa, iz začetne mase suhe snovi micelija *Fomes fomentarius*. Prikazan je tudi izkoristek dialize.

	Začetna masa micelija	Masa grobega izvlečka	Masa polisaharidov, večjih 6–8 kDa	Izkoristek po dializi (%)
19. 4. 2010	432,6 mg	70,0 mg 16,18 %	65,6 mg 15,16 %	93,7 %
25. 5. 2010	559,2 mg	83,0 mg 14,84 %	64,5 mg 11,53 %	77,7 %

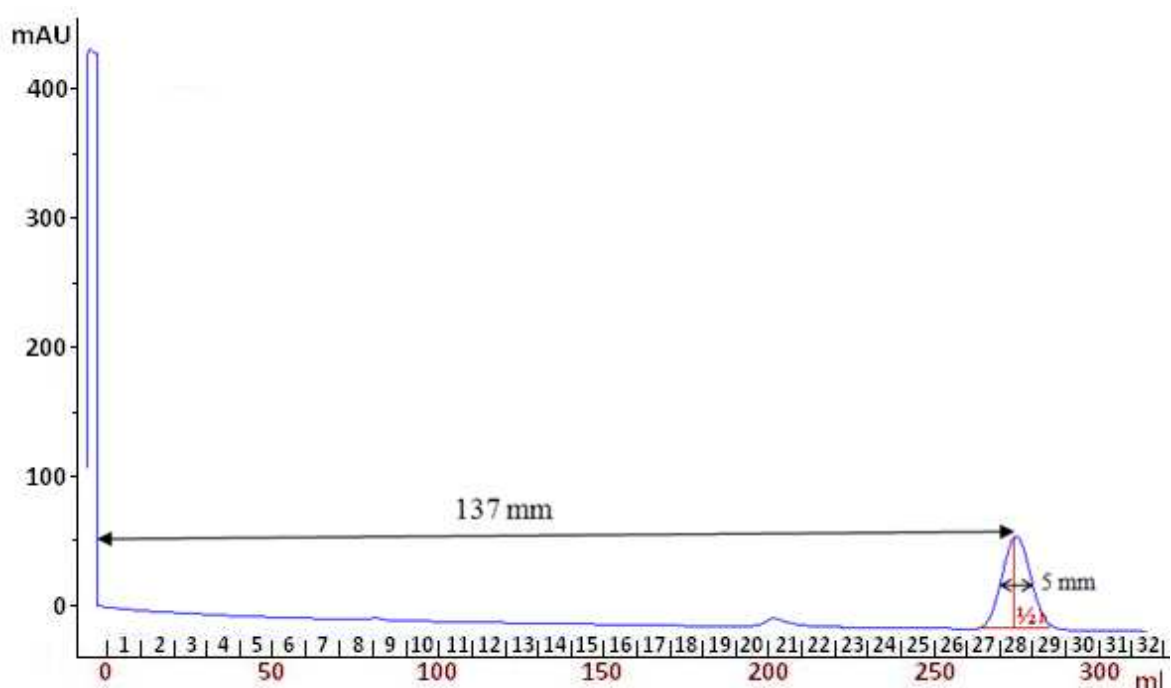
Izolacija ekstracelularnih polisaharidov iz gobe *Fomes fomentarius*

Preglednica 3: Prikaz izkoristkov obarjanja in izoliranih ekstracelularnih polisaharidov, večjih 6–8 kDa, iz tekoče brozge micelija *Fomes fomentarius*. Prikazan je tudi izkoristek dialize.

	Masa suhe oborine	Masa polisaharidov, večjih 6–8 kDa	Izkoristek po dializi (%)
19. 4. 2010	453,7 mg	86,3 mg	19,02 %
25. 5. 2010	13973,5 mg	494,6 mg	3,54 %

4.2 TEST ZA UGOTAVLJANJE UČINKOVITOSTI KOLONE

Pri preverjanju učinkovitosti smo nanесли 200 μl 2-odstotnega acetona v 20-odstotnem etanolu. Za mobilno fazo smo uporabili 20-odstotni etanol. Hitrost pretoka smo nastavili na 0,8 ml/min, kot je predpisano v navodilih. Za detekcijo smo uporabili UV-detektor pri 280 nm. Kromatogram je prikazan na Slika 18, medtem ko so parametri in izračun učinkovitosti predstavljeni v preglednici 4.



Slika 18: Kromatogram prikazuje test učinkovitosti kolone HiPrep 26/60 Sephacryl S300 HR z 2-odstotnim acetonom in meritvami.

Preglednica 4: Uporabljeni parametri in izračun učinkovitosti obeh kolon

Parametri:	HiPrep 16/60 Sephacryl S-200 HR	HiPrep 26/60 Sephacryl S-300 HR
L (dolžina kolone)	600 mm	600 mm
V_R (vrh retencijskega volumna)	73 mm	137 mm
W_h (širina vrha pri $\frac{1}{2}$ višini)	2,5 mm	5 mm
H^{-1} (učinkovitost)	7872,7 m^{-1}	6932,0 m^{-1}

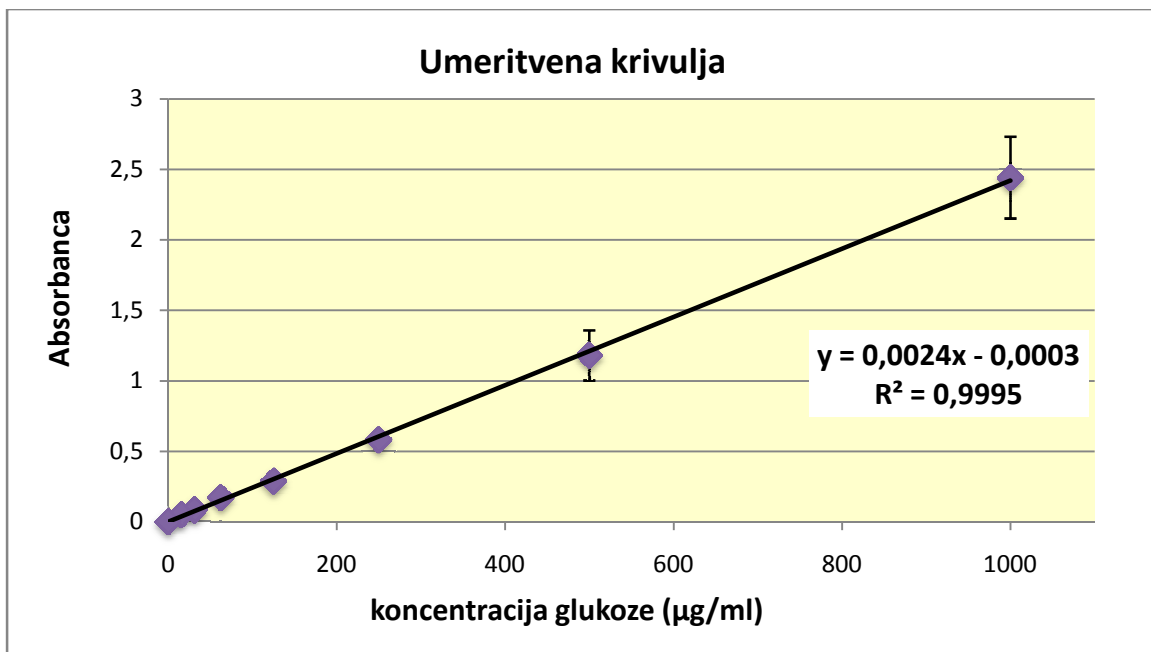
Vidimo, da je izračunana učinkovitost kolon Sephacryl S-200 HR, Sephacryl S-300 HR nad vrednostjo $\geq 5000 \text{ m}^{-1}$, ki jo določa proizvajalec. Zaključimo, da sta obe koloni učinkoviti.

4.3 VELIKOSTNO OBMOČJE IZOLIRANIH POLISAHARIDOV

Velikostni rang izoliranih polisaharidov smo določevali s pomočjo gelske filtracije oz. gelske izključitvene kromatografije ter pri tem uporabili koloni HiPrep 16/60 Sephacryl S-200 HR in HiPrep 26/60 Sephacryl S-300 HR. Koloni sta bili napolnjeni s premreženim kopolimerom alildekstrana in N,N'-metilen bisakrilamida. Za analizo smo uporabili kromatografsko čiste standarde dekstranov z molekulskimi masami $2,5 \times 10^4$, 8×10^4 , $2,7 \times 10^5$. Kromatografsko ločevanje polisaharidov smo spremljali z metodo po Dubois in sod. (45), ločevanje proteinov pa z Bradfordovo reakcijo (46).

4.3.1 Umeritvene krivulje

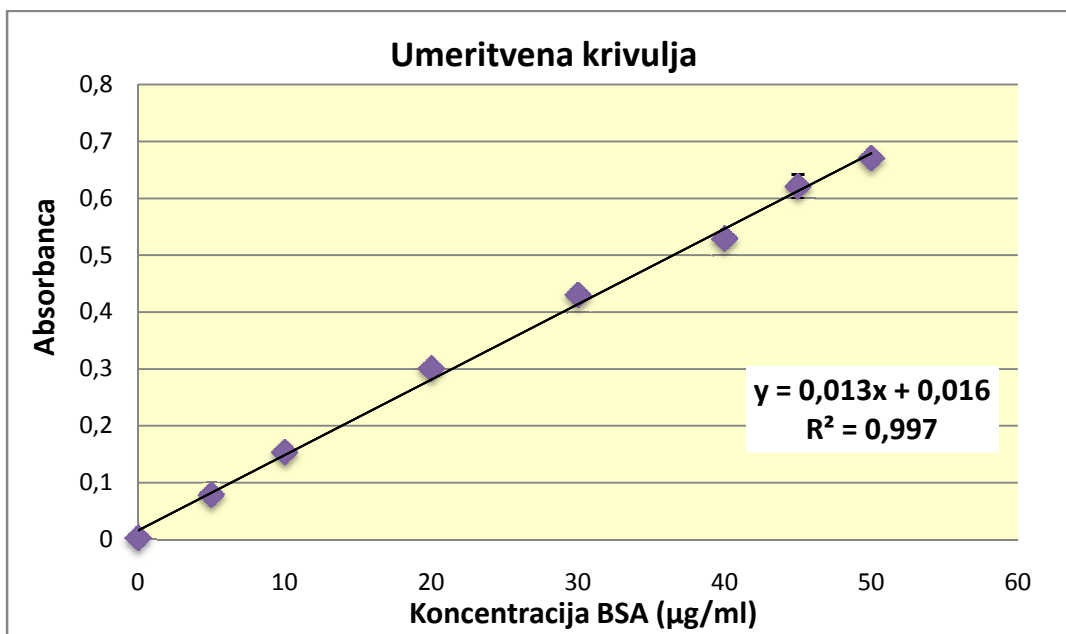
Polisaharidi ne absorbirajo UV-svetlobe, zato jih težko detektiramo. Da bi določili prisotnost polisaharidov v posamezni frakciji, je bilo potrebno izvesti reakcijo z žvepleno kislino in fenolom. Kot standard smo izbrali glukozo in iz podatkov o absorbanci pri 492 nm naredili umeritveno krivuljo ter dobili matematično enačbo za izračun koncentracije sladkorjev v vzorcih. Umeritvena krivulja je prikazana na Graf 3.



Graf 3: Umeritvena krivulja. Prikazan je graf absorbance, merjene pri 492 nm, v odvisnosti od koncentracije glukoze.

Proteine smo med gelsko izključitveno kromatografijo spremljali s pomočjo UV-svetlobe pri 280 nm. Ker vemo, da pri tej valovni dolžini absorbirajo tudi druge molekule, smo si izbrali še reakcijo po Bradfordu. Z njo smo želeli potrditi prisotnost proteinov. Za pripravo

umeritvene krivulje smo v tem primeru uporabili redčitveno vrsto BSA ter merili absorbanco pri 594 nm. Podobno kot pri polisaharidih smo naredili umeritveno krivuljo, ki je predstavljena na Graf 4. Proteine v izbranih frakcijah je bilo potrebno določiti, saj lahko motijo nadaljnje analize, npr. NMR.



Graf 4: Umeritvena krivulja za določanje vsebnosti proteinov. Predstavljene so absorbance, merjene pri 594nm, v odvisnosti od koncentracij BSA.

4.3.2 Kolona HiPrep Sephacryl S200 HR

Pričakovana velikost polisaharidov v naših vzorcih je bila 1000–80 000 Da, zato smo se odločili za uporabo kolone HiPrep 16/26 Sephacryl S200HR. Kot mobilno fazo smo uporabili visoko prečiščeno vodo ter pretok nastavili na 0,5 ml/min. Zbirali smo frakcije po 10 ml. Uporabili smo standarde glukoze in dekstranov velikosti: 8×10^4 , $2,7 \times 10^5$. Iz dobljenih podatkov smo izračunali konstanto K_{av} (preglednica 5) ter naredili graf umeritvene krivulje v odvisnosti od logaritma molekulskih mas.

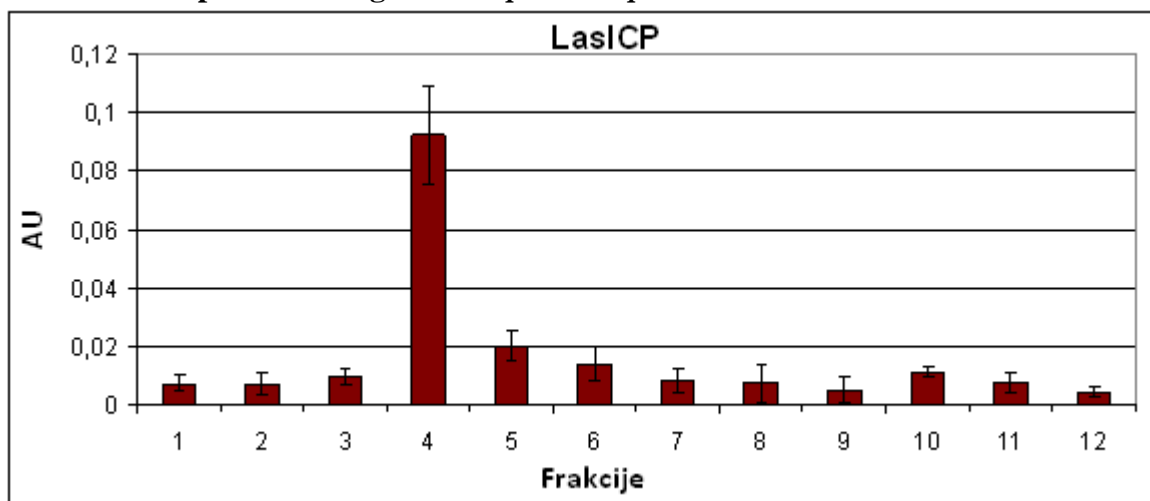
Določili smo prosti volumen $V_0 = 40$ ml in totalni volumen $V_t = 120$ ml.

Preglednica 5: Parametri kromatografske ločbe dekstranov standardnih molekulskih mas in izračunani porazdelitveni koeficienti (K_{av}) na koloni HiPrep 26/60 Sephacryl S200 HR

Standardi	MW (Da)	Log MW	V_e (ml)	K_{av}
Glukoza	180	2,26	110	0,88
Dekstran 80	80000	4,90	45	0,06
Dekstran 270	270000	5,43	40	0,00

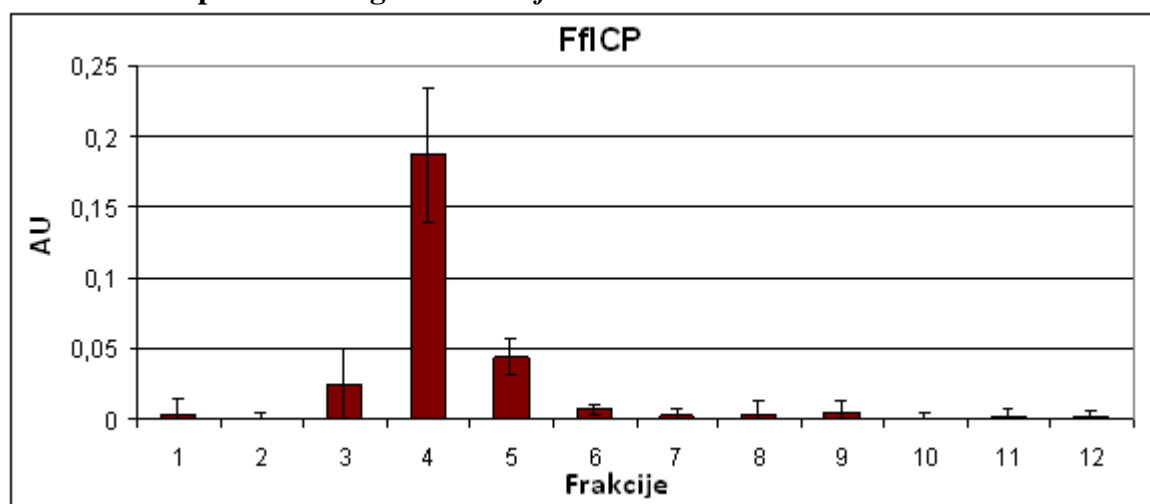
Na kolono HiPrep 16/60 Sephacryl S-200 HR smo ločeno nanесли vzorce intracelularnih polisaharidov gobe *Laetiporus sulphureus* ter intra- in ekstracelularnih polisaharidov gobe *Fomes fomentarius*. Pred nanosom na kolono smo vzorce filtrirali skozi mikrobiološki filter velikosti 20 µm. Za mobilno fazo smo uporabili visoko prečiščeno vodo ter nastavili pretok na 0,5 ml/min. Zbirali smo frakcije po 10 ml. Grafi 6, 7, 8 prikazujejo kromatografsko ločitev polisaharidov, ki smo jih spremljali z metodo po Dubois in sod.

Intracelularni polisaharidi gobe *Laetiporus sulphureus*



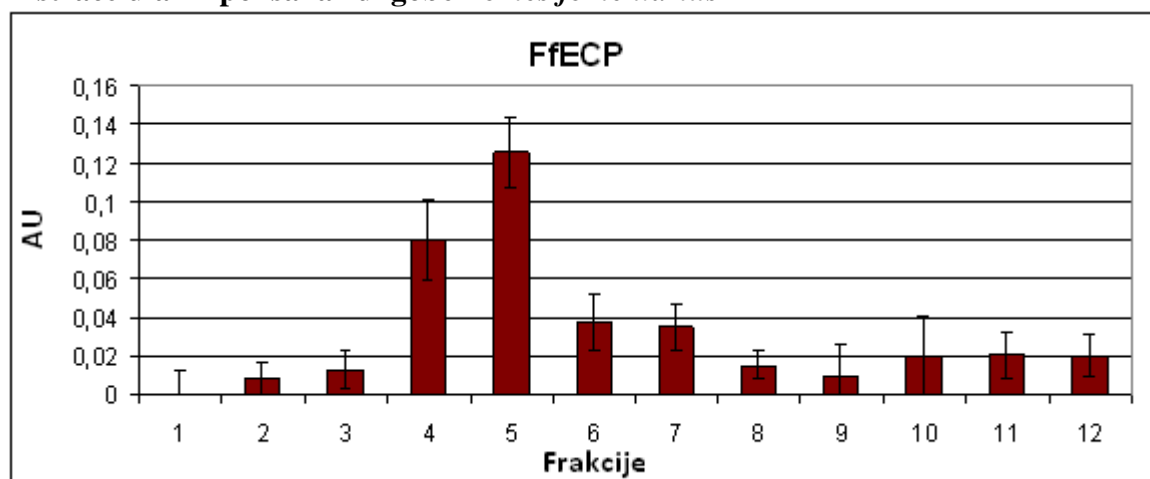
Graf 5: Prikaz ločitve intracelularnih polisaharidov *Laetiporus sulphureus* s pomočjo gelske izključitvene kromatografije na koloni HiPrep 16/60 Sephacryl S200-HR.

Intracelularni polisaharidi gobe *Fomes fomentarius*



Graf 6: Prikaz ločitve intracelularnih polisaharidov *Fomes fomentarius* s pomočjo gelske izključitvene kromatografije na koloni HiPrep 16/60 Sephacryl S200-HR.

Ekstracelularni polisaharidi gobe *Fomes fomentarius*

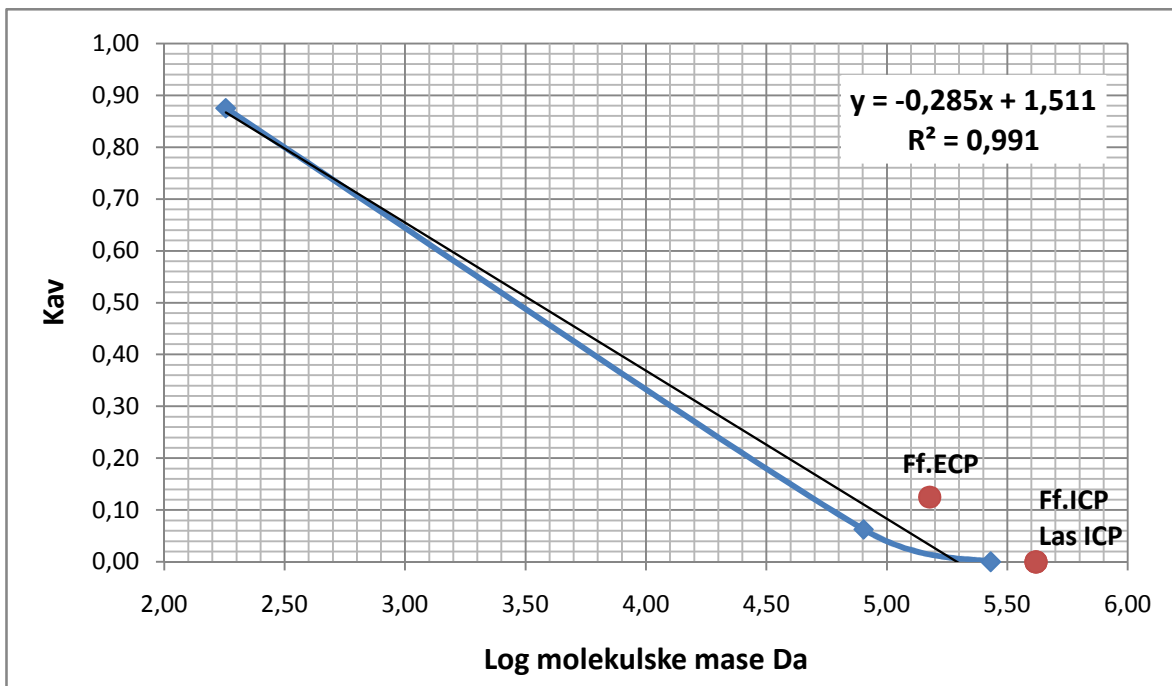


Graf 7: Prikaz ločitve ekstracelularnih polisaharidov *Fomes fomentarius* s pomočjo gelske izključitvene kromatografije na koloni HiPrep 16/60 Sephacryl S200-HR.

Iz dobljenih kromatogramov smo določili elucijske volumne (V_e) intra- in ekstracelularnih polisaharidov neznanih molekulskih mas. Tudi na osnovi teh vrednosti smo izračunali porazdelitvene koeficiente (K_{av}). Primerjali smo jih z enačbo umeritvene krivulje dekstranov standardnih molekulskih mas ter na ta način določili njihovo molekulsko maso. Rezultati so predstavljeni v preglednici 6 ter na Graf 8.

Preglednica 6: Parametri kromatografske ločitve vzorcev LasICP, FfICP in FfECP, izračunani porazdelitveni koeficienti (K_{av}) ter določena molekulska masa polisaharidov na podlagi enačbe umeritvene krivulje standardov na koloni HiPrep 16/60 Sephacryl S200 HR

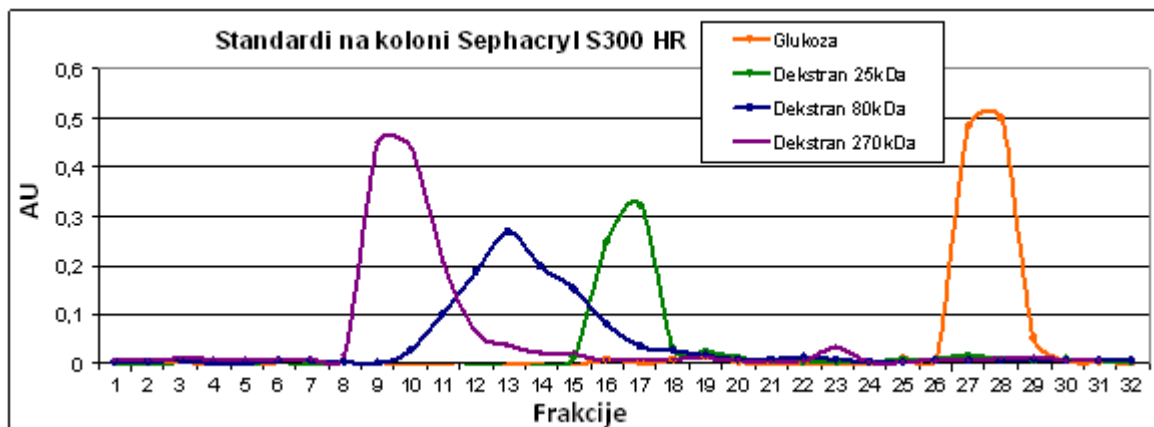
Las ICP	V_e (ml)	K_{av}	Log MW	MW (Da)	kDa
Las ICP	40	0,0	5,62	415650	415,65
Ff ICP	40	0,0	5,62	415650	415,65
Ff ECP	50	0,1	5,18	150325	150,33



Graf 8: Grafična določitev molekulske mase izoliranih polisaharidov s pomočjo umeritvene krivulje standardov. Prikaz odvisnosti porazdelitvenega koeficienta (K_{av}) od logaritma molekulske mase. Rezultati, pridobljeni s pomočjo kolone HiPrep 26/60 Sephacryl S200 HR.

4.3.3 Kolona HiPrep Sephacryl S300 HR

Ker so se pri gelski filtraciji na koloni Sephacryl S200 vsi vzorci sprali v prostem volumnu kolone, smo morali za določitev molekulske velikosti vzorcev uporabiti kolono z večjim frakcionacijskim območjem. Uporabili smo HiPrep 26/60 Sephacryl S300HR. Kot mobilno fazo smo tokrat izbrali 0,15M NaCl ter pretok nastavili na 1,3 ml/min. Zbirali smo frakcije po 10 ml. Uporabili smo standarde glukoze in dekstranov velikosti: $2,5 \times 10^4$, 8×10^4 , $2,7 \times 10^5$. Rezultati gelske filtracije standardov so predstavljeni na Graf 9. Iz dobljenih podatkov smo ponovno izračunali konstanto K_{av} ter narisali graf umeritvene krivulje v odvisnosti od logaritma molekulskih mas. Izračun je prikazan v preglednici 7, umeritvena krivulja dekstranov standardnih molekulskih mas pa na Graf 10.

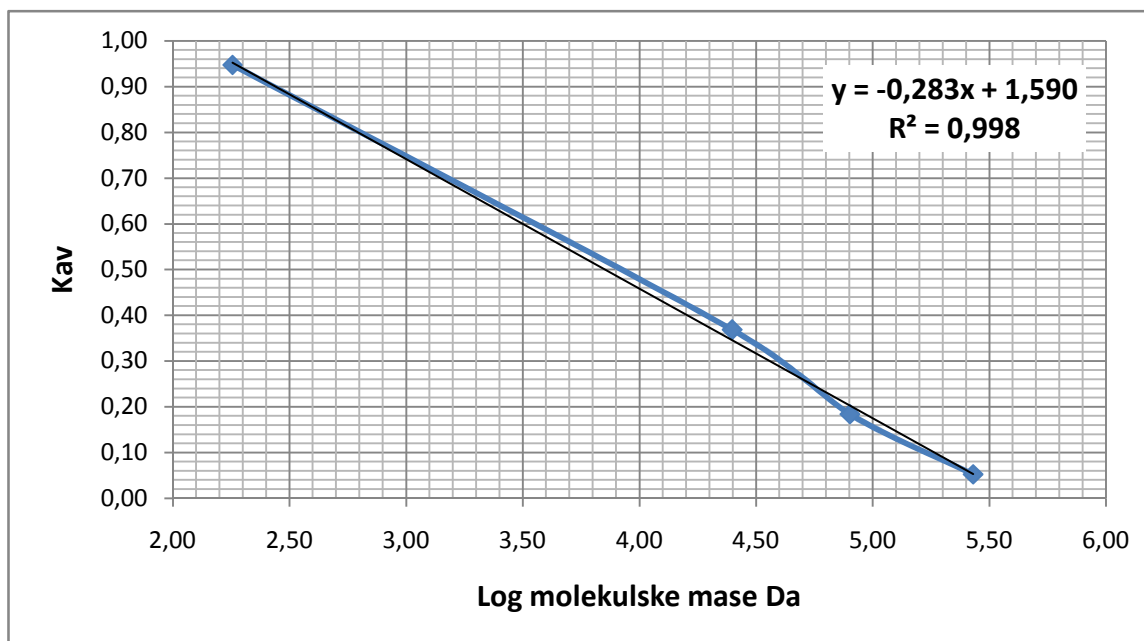


Graf 9 : Kromatografski standardi dekstranov na koloni HiPrep 26/60 Sephacryl S300 HR

Določili smo prosti volumen $V_0 = 100$ ml in totalni volumen $V_t = 290$ ml kolone.

Preglednica 7: Parametri kromatografske ločbe dekstranov standardnih molekulskih mas in izračunani porazdelitveni koeficienti (K_{av}) na koloni HiPrep 26/60 Sephacryl S300 HR

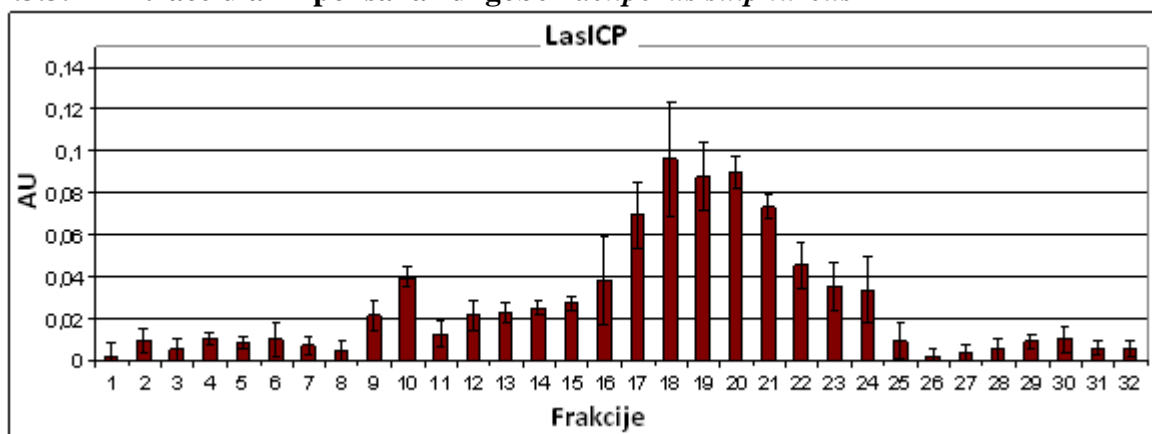
standardi	MW (Da)	Log MW	V_e (ml)	K_{av}
Glukoza	180	2,26	280	0,95
Dekstran 25	25000	4,40	170	0,37
Dekstran 80	80000	4,90	135	0,18
Dekstran 270	270000	5,43	110	0,05



Graf 10: Umeritvena krivulja standardov dekstranov. Prikazana je odvisnost porazdelitvenega koeficienta (K_{av}) od logaritma standardnih molekulskih mas dekstranov. Rezultate smo dobili s pomočjo kolone HiPrep 26/60 Sephacryl S300 HR.

Podobno kot pri prvem poizkusu smo na kolono HiPrep 26/60 Sephacryl S-300 HR ločeno nanesli vzorce intracelularnih polisaharidov gobe *Laetiporus sulphureus* ter intra- in ekstracelularnih polisaharidov gobe *Fomes fomentarius*. Pred nanosom na kolono smo vzorce filtrirali skozi mikrobiološki filter velikosti 20 µm. Za mobilno fazo smo uporabili 0,15 M NaCl ter nastavili pretok na 1,3 ml/min. Zbirali smo frakcije po 10 ml. Grafi 12, 15, 18 prikazujejo kromatografsko ločitev polisaharidov, ki smo jih analizirali s pomočjo reakcije po Dubois. Med gelsko filtracijo smo s pomočjo UV-detektorja pri 280 nm spremljali prisotnost proteinov, kar vidimo na kromatogramih: 19, 20, 21. Prisotnost proteinov smo dodatno potrdili z reakcijo po Bradfordu, prikazano na grafih: 14, 17, 20. Tudi v tem primeru smo določili elucijski volumen (V_e) ter izračunali K_{av} in s pomočjo enačbe oz. umeritvene krivulje standardov ocenili velikost polisaharidov v vzorcih. Izračuni so predstavljeni v preglednicah: 8, 9, 10; grafično oceno velikosti lahko razberemo iz grafov: 13, 16, 19.

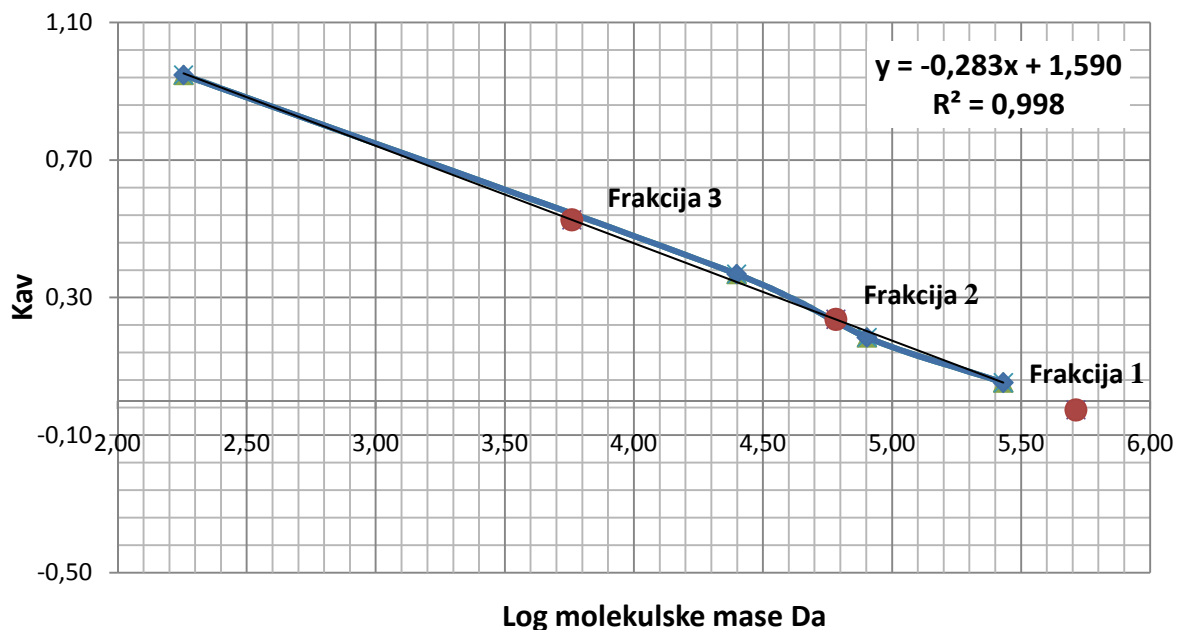
4.3.3.1 Intracelularni polisaharidi gobe *Laetiporus sulphureus*



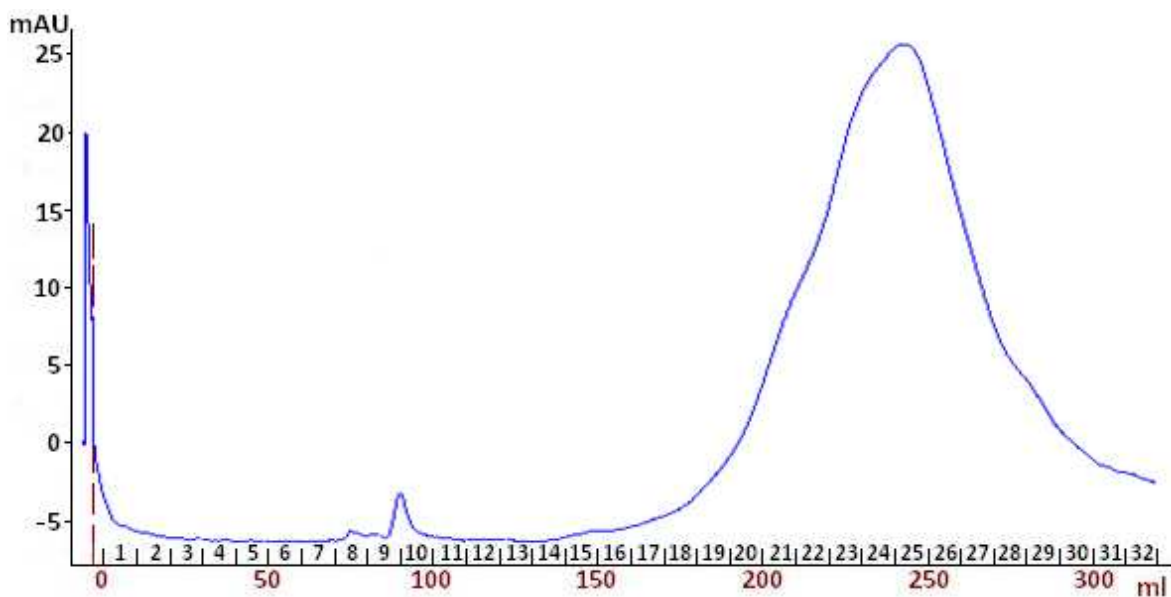
Graf 11: Prikaz ločitve intracelularnih polisaharidov gobe *Laetiporus sulphureus* s pomočjo gelske izključitvene kromatografije na koloni HiPrep 26/60 Sephacryl S300 HR.

Preglednica 8: Parametri kromatografske ločitve vzorcev intracelularnih polisaharidov *Laetiporus sulphureus*, izračunani so porazdelitveni koeficienti (K_{av}) ter določena molekulska masa s pomočjo enačbe umeritvene krivulje standardov dekstranov na koloni HiPrep 26/60 Sephacryl S300 HR

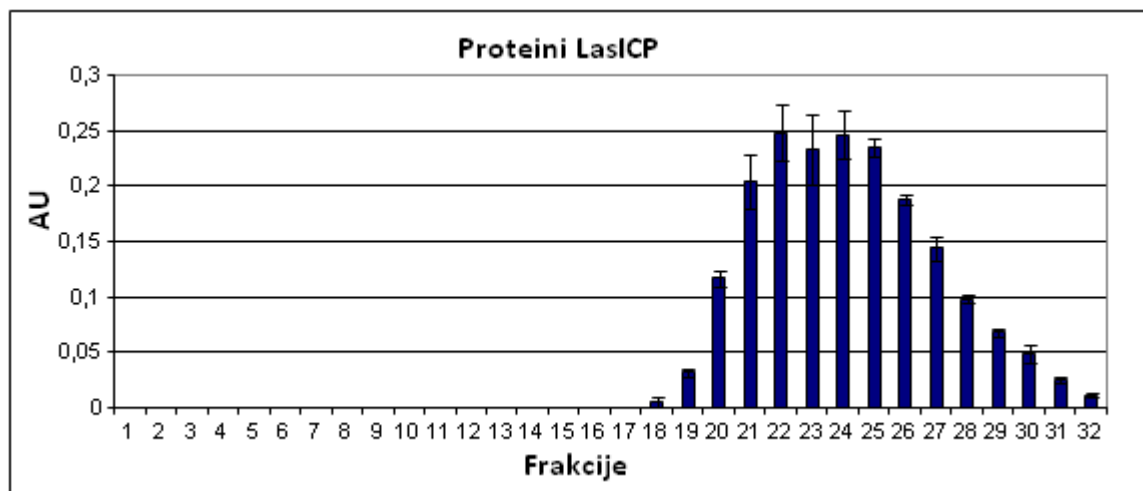
Las ICP	V_e (ml)	K_{av}	Log MW	MW (Da)	kDa
Frakcija 1	95	0,0	5,71	514893	514,89
Frakcija 2	145	0,2	4,78	60510	60,51
Frakcija 3	200	0,5	3,76	5741	5,74



Graf 12: Grafična ocena velikosti intracelularnih polisaharidov gobe *Laetiporus sulphureus* s pomočjo umeritvene krivulje standardov dekstranov na koloni HiPrep 26/60 Sephacryl S300 HR. Prikazana je odvisnost porazdelitvenega koeficienta (K_{av}) od logaritma molekulske mase.

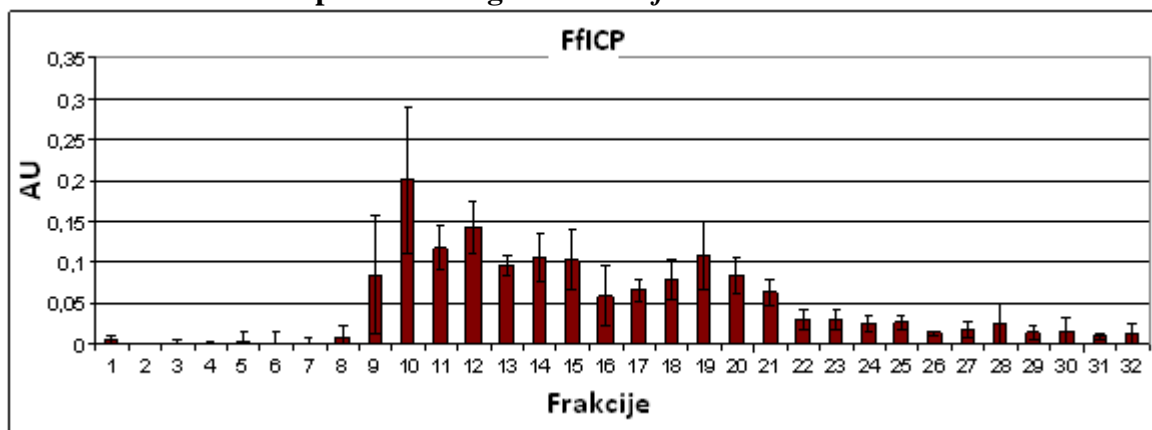


Slika 19: Kromatogram prikazuje absorbanco vzorca pri 280 nm, ekstrahiranega iz micelija gobe *Laetiporus sulphureus* med gelsko izključitveno kromatografijo na koloni HiPrep 26/60 Sephacryl S300 HR.



Graf 13: Prikaz ločitve proteinov, prisotnih v miceliju gobe *Laetiporus sulphureus*, na koloni HiPrep 26/60 Sephacryl S300 HR. Proteine smo detektirali s pomočjo Bradfordove reakcije.

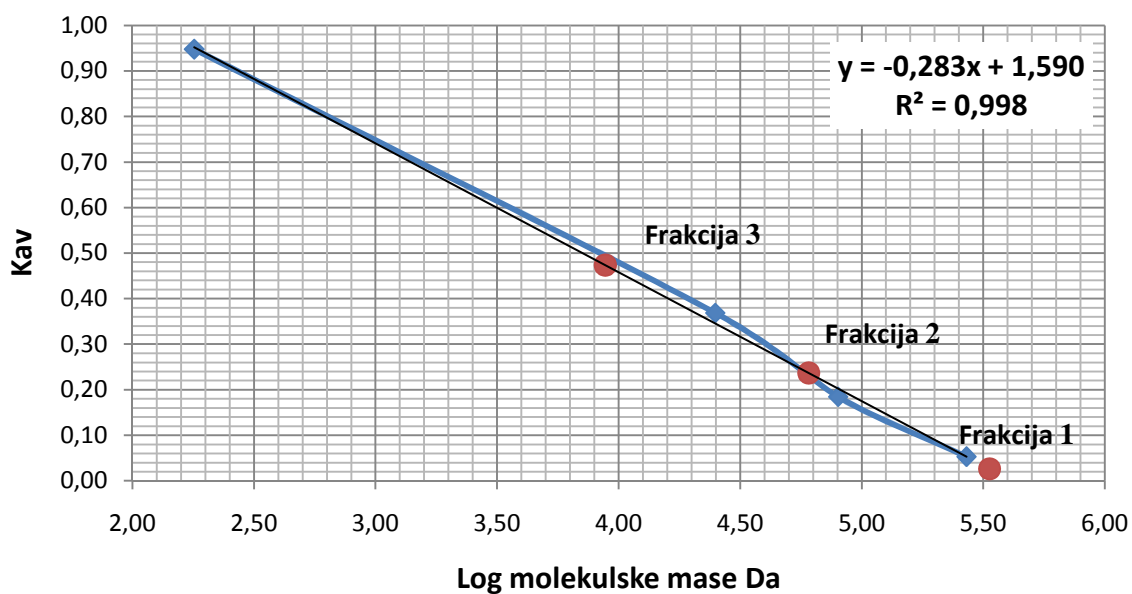
4.3.3.2 Intracelularni polisaharidi gobe *Fomes fomentarius*



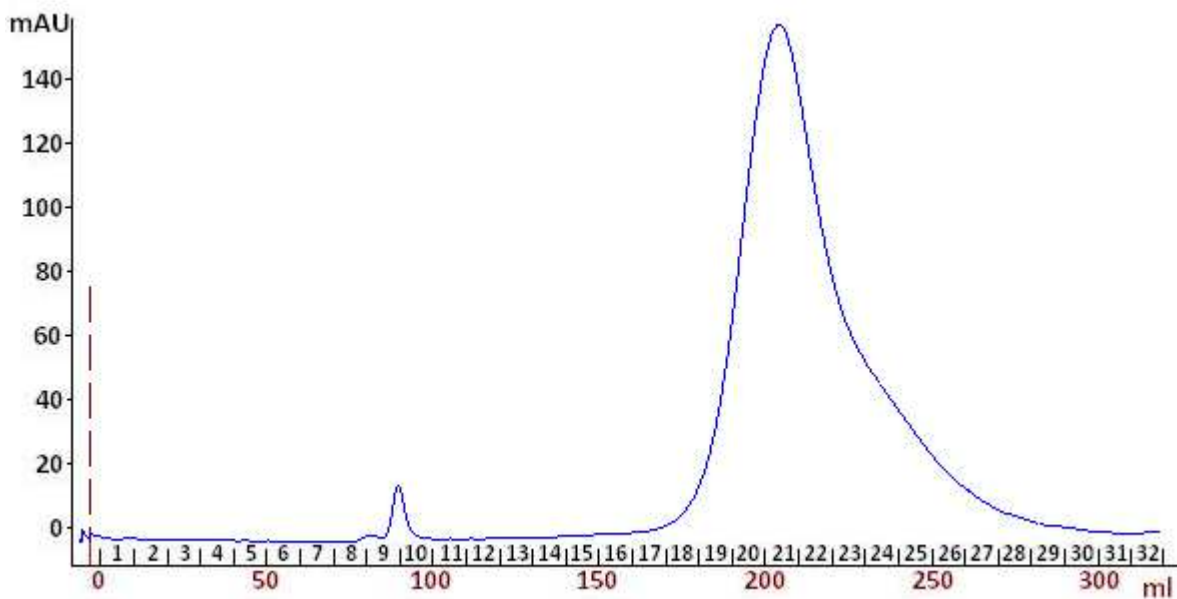
Graf 14: Prikaz ločitve intracelularnih polisaharidov gobe *Fomes fomentarius* s pomočjo gelske izključitvene kromatografije na koloni HiPrep 26/60 Sephacryl S300 HR.

Preglednica 9: Parametri kromatografske ločbe vzorcev intracelularnih polisaharidov *Fomes fomentarius*, izračunani so porazdelitveni koeficienti (K_{av}) ter določena molekulska masa s pomočjo umeritvene krivulje standardov dekstranov na koloni HiPrep 26/60 Sephacryl S300 HR.

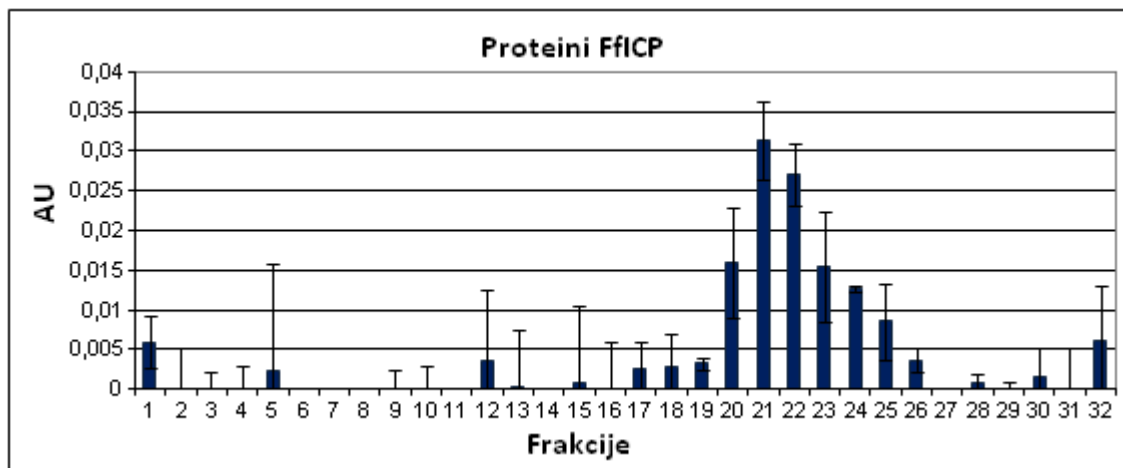
Ff ICP	Ve (ml)	K_{av}	Log MW	MW (Da)	kDa
Frakcija 1	105	0,0	5,53	335536	335,54
Frakcija 2	145	0,2	4,78	60510	60,51
Frakcija 3	190	0,5	3,94	8809	8,81



Graf 15: Grafična ocena velikosti intracelularnih polisaharidov gobe *Fomes fomentarius* s pomočjo umeritvene krivulje standardov dekstranov na koloni HiPrep 26/60 Sephacryl S300 HR. Prikazana je odvisnost porazdelitvenega koeficienta (K_{av}) od logaritma molekulske mase.

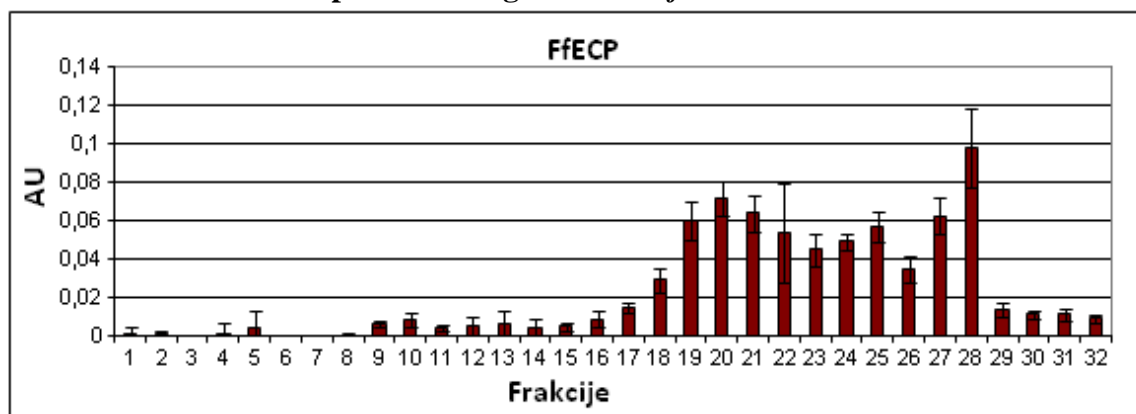


Slika 20: Kromatogram prikazuje absorbanco vzorca pri 280 nm, ekstrahiranega iz micelija gobe *Fomes fomentarius* med gelsko filtracijo na koloni HiPrep 26/60 Sephacryl S300 HR.



Graf 16: Prikaz ločitve proteinov, prisotnih v miceliju gobe *Fomes fomentarius*, na koloni HiPrep 26/60 Sephacryl S300 HR. Proteine smo detektirali s pomočjo Bradfordove reakcije.

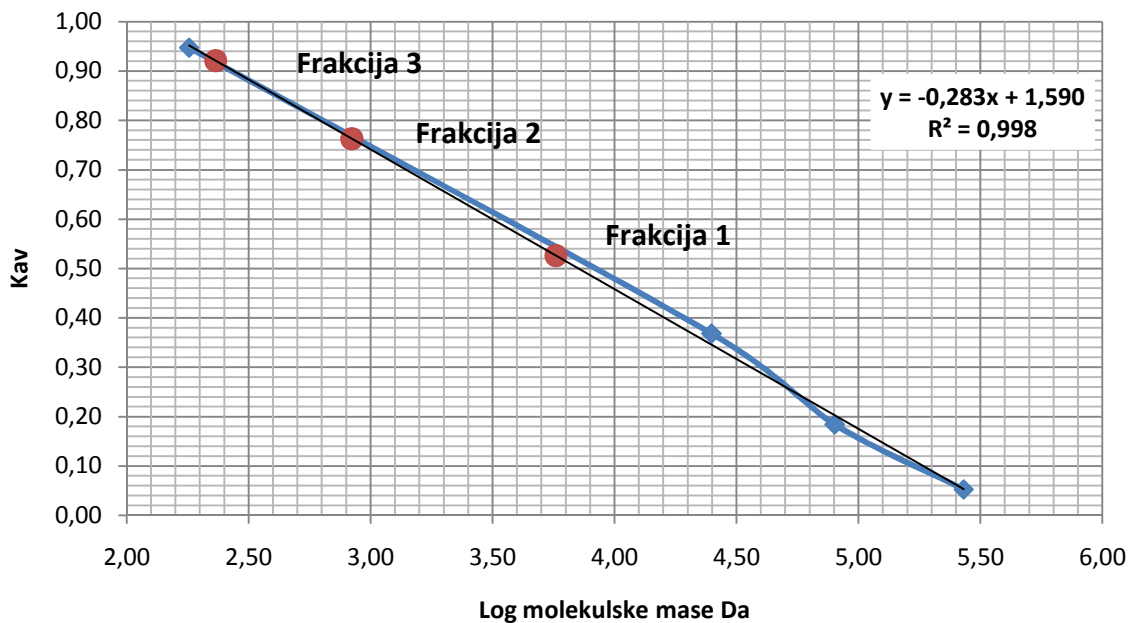
4.3.3.3 Ekstracelularni polisaharidi gobe *Fomes fomentarius*



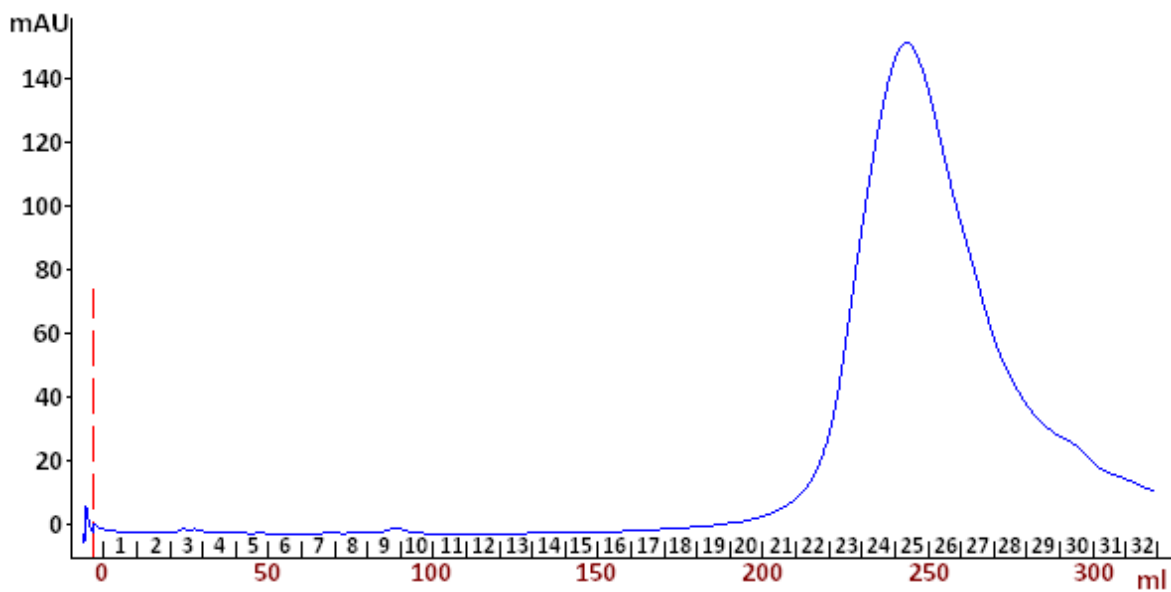
Graf 17: Prikaz ločitve ekstracelularnih polisaharidov gobe *Fomes fomentarius* s pomočjo gelske izključitvene kromatografije na koloni HiPrep 26/60 Sephacryl S300 HR

Preglednica 10: Parametri kromatografske ločitve vzorcev ekstracelularnih polisaharidov *Fomes fomentarius*, izračunani so porazdelitveni koeficienti (K_{av}) ter določena molekulska masa s pomočjo umeritvene krivulje standardov dekstranov na koloni HiPrep 26/60 Sephacryl S300 HR

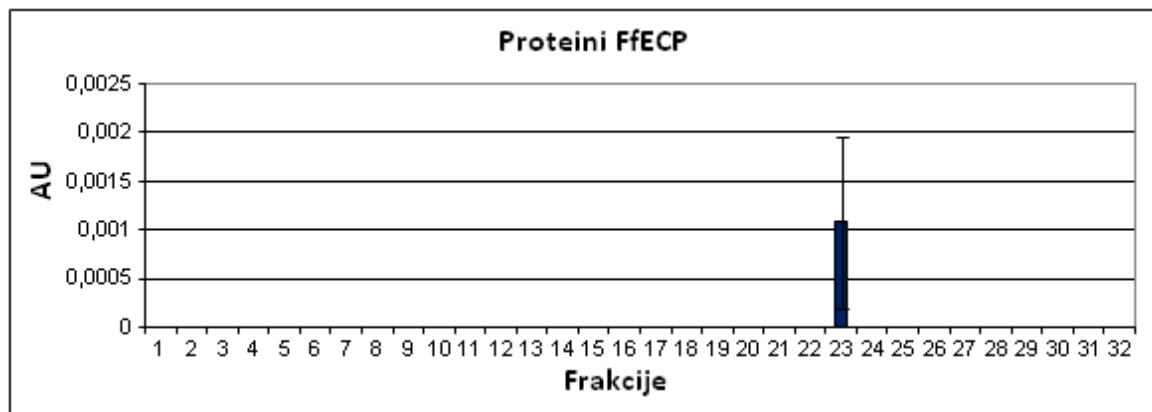
Ff ECP	V_e (ml)	K_{av}	Log MW	MW (Da)	kDa
Frakcija 1	200	0,5	3,76	5741	5,74
Frakcija 2	245	0,8	2,92	836	0,84
Frakcija 3	275	0,9	2,26	231	0,23



Graf 18: Grafična ocena velikosti ekstracelularnih polisaharidov gobe *Fomes fomentarius*, pridobljena s pomočjo umeritvene krivulje standardov dekstranov na koloni HiPrep 26/60 Sephacryl S300 HR. Prikazana je odvisnost porazdelitvenega koeficienta (K_{av}) od logaritma molekulske mase.



Slika 21: Kromatogram prikazuje absorbanco vzorca pri 280 nm, ekstrahiranega iz fermentacijske brozge *Fomes fomentarius* med gelsko izključitveno kromatografijo na koloni HiPrep 26/60 Sephacryl S300 HR.

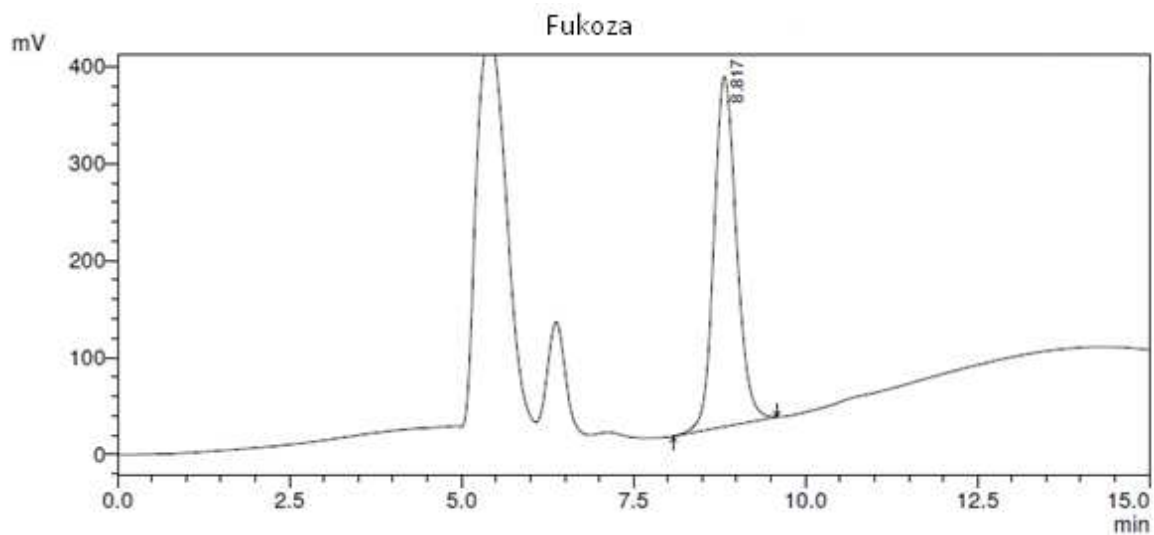


Graf 19: Prikaz ločitve proteinov, prisotnih v fermentacijski brozgi *Fomes fomentarius*, na koloni HiPrep 26/60 Sephacryl S300 HR. Proteine smo detektirali s pomočjo Bradfordove reakcije.

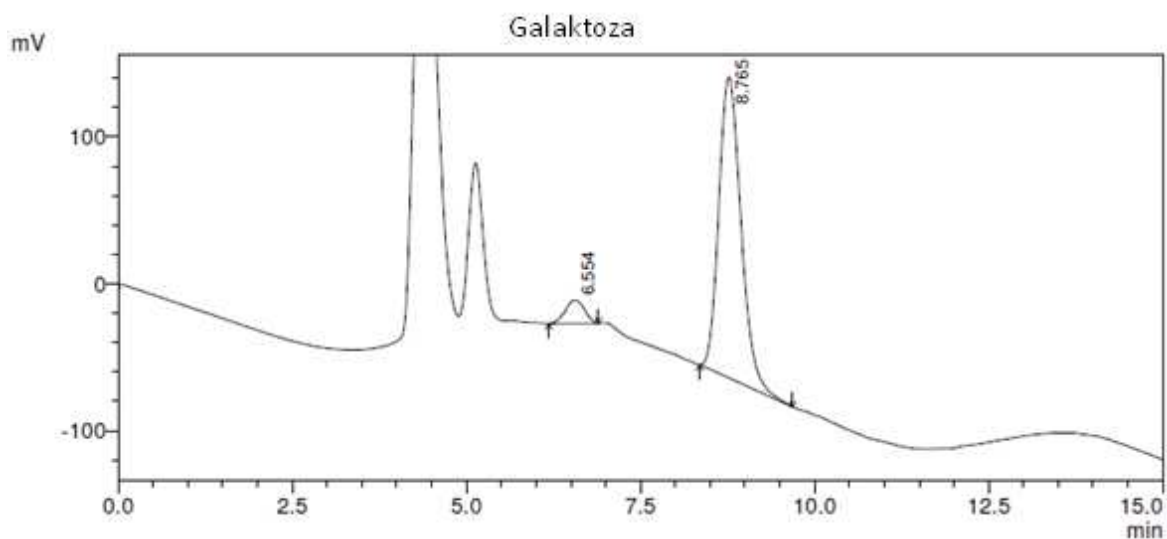
4.4 HPLC

Monosaharidno sestavo smo želeli določiti z uporabo metode HPLC (tekočinske kromatografije pod visokim tlakom). Kromatogrami so posneti na instrumentu Shimadzu LC-2010, opremljenem s črpalko LC-20AD in detektorjem za merjenje refrakcijskega indeksa (RID-10A). Pri ločevanju smo uporabili kolono apHera™NH2 Polymer velikosti (5 µm, L × I.D. 15 cm × 4.6 mm) Supelco Analytical. Za mobilno fazo smo uporabili vodo : acetonitril v razmerju 35 : 65. Hitrost pretoka smo nastavili na 0,6 ml/min in temperaturo kolone na 30 °C. Analiza je potekala 15 min. Pri vsakem poizkusu smo na kolono injicirali 0,6 µl vzorca.

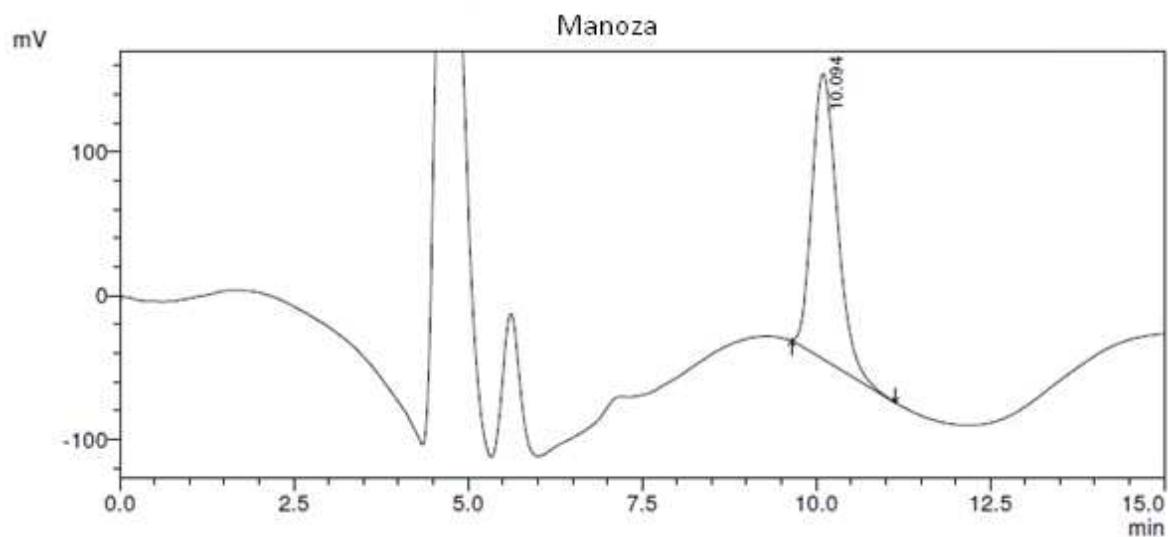
Za standarde smo uporabili monosaharide: glukozo, galaktozo, fukozo in manozo. Njihovi kromatogrami so prikazani na slikah 22–25. Ker smo v vzorcih polisaharidov pričakovali več različnih monosaharidnih enot, smo posneli tudi kromatogram mešanice monosaharidnih standardov, ki je prikazan na Slika 26.



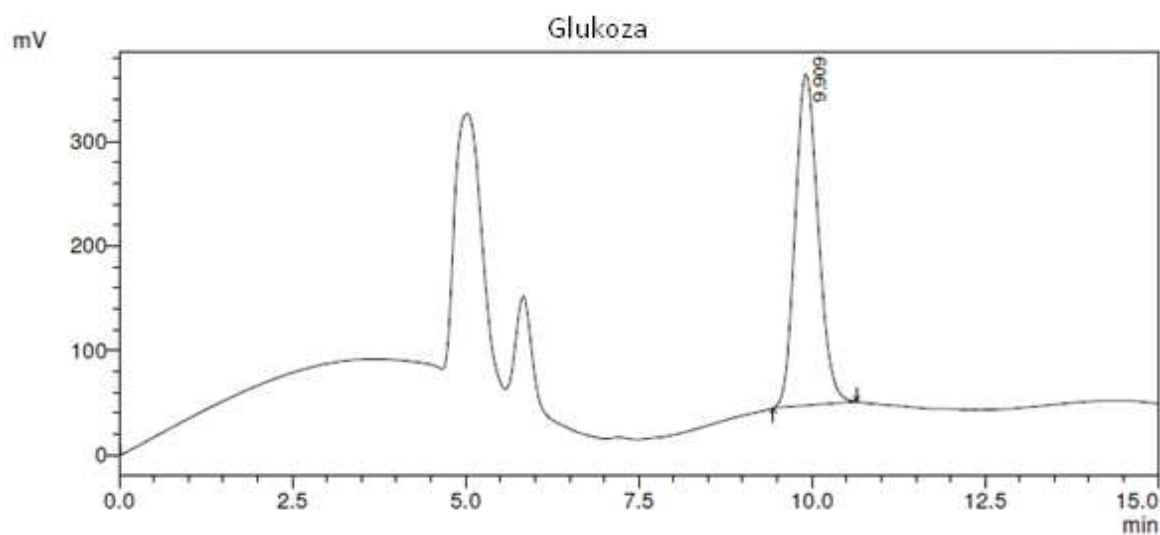
Slika 22: Kromatogram standarda fukoze (5 mg/ml) z retencijskim časom $t_R = 8,817$ min



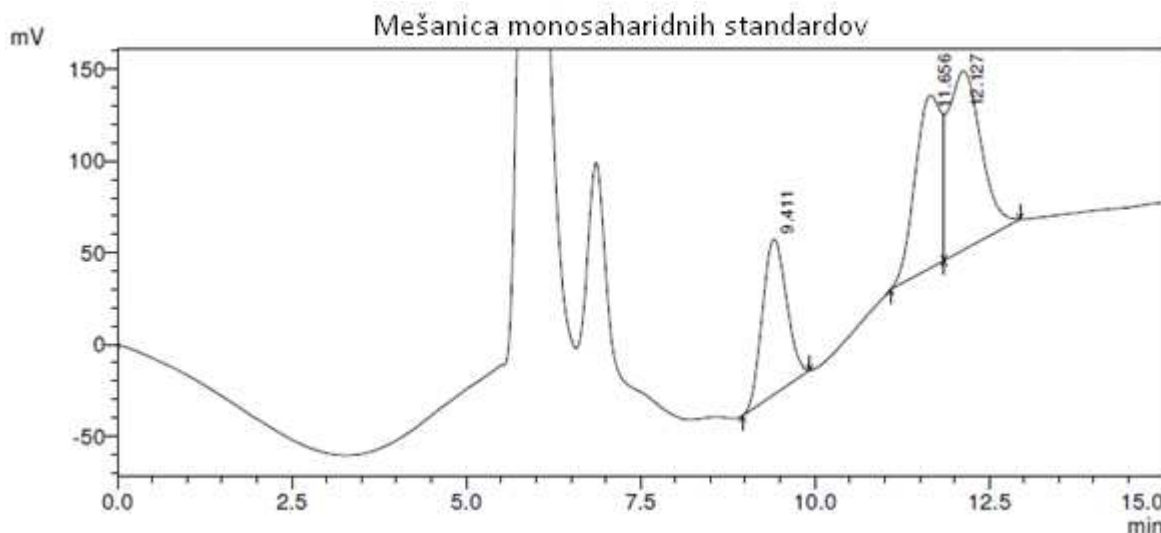
Slika 23: Kromatogram standarda galaktoze (5 mg/ml), ki smo mu določili naslednje retencijske čase: $t_R = 6,554$ min, $t_R = 8,765$ min.



Slika 24: Kromatogram standarda manoze (5mg /ml) z retencijskim časom $t_R = 10,094$ min

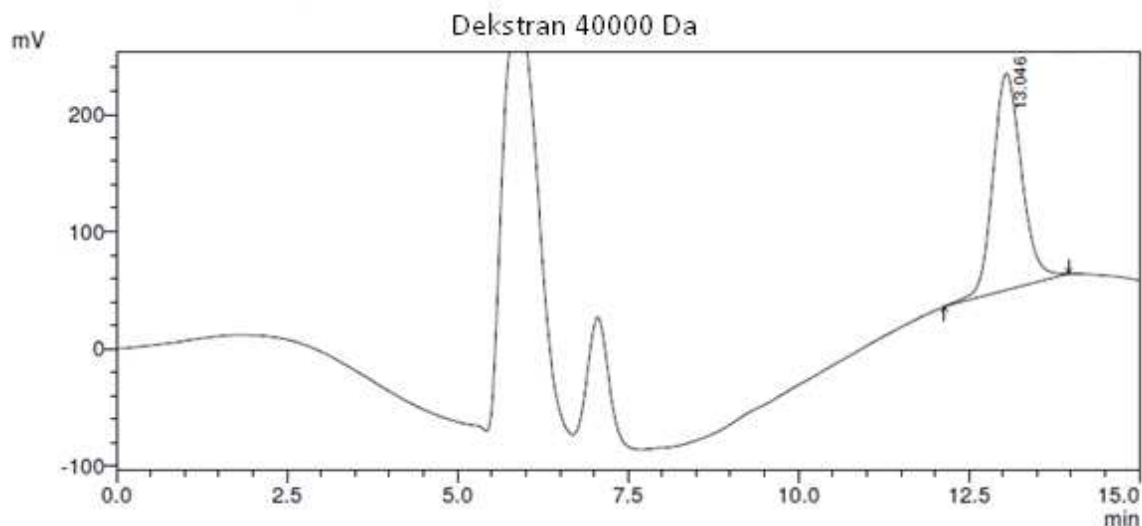


Slika 25: Kromatogram standarda glukoze (5mg /ml) z retencijskim časom $t_R = 9,909$ min

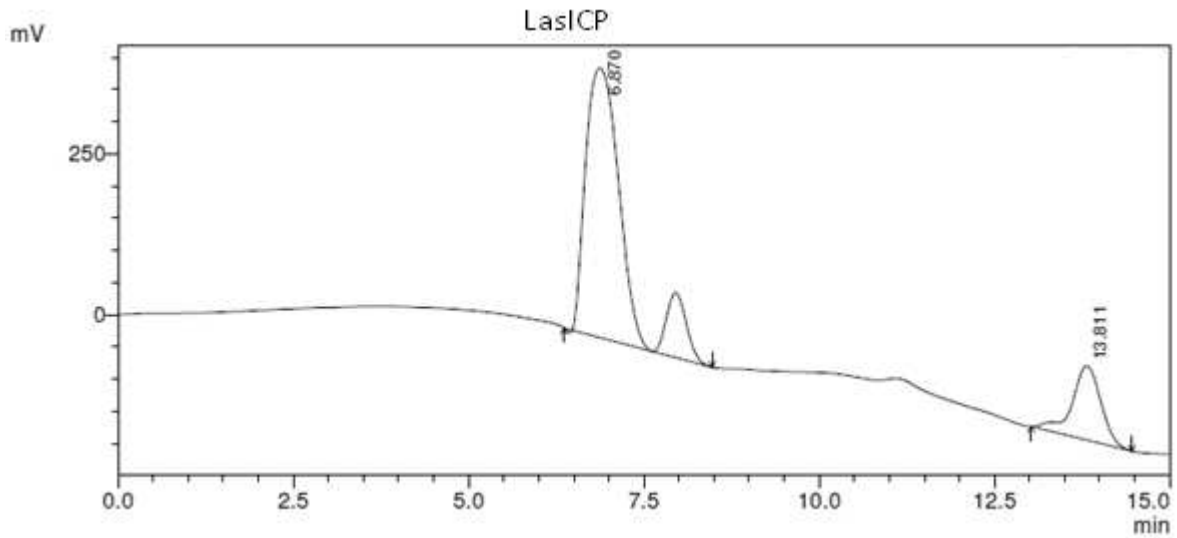


Slika 26: Kromatogram mešanice standardov monosaharidov fukoze (5 mg/ml), galaktoze (5 mg/ml), manoze (5 mg/ml) in glukoze (5 mg/ml). Določimo naslednje retencijske čase: $t_R = 9,411$ min, $t_R = 11,656$ min, $t_R = 12,127$ min.

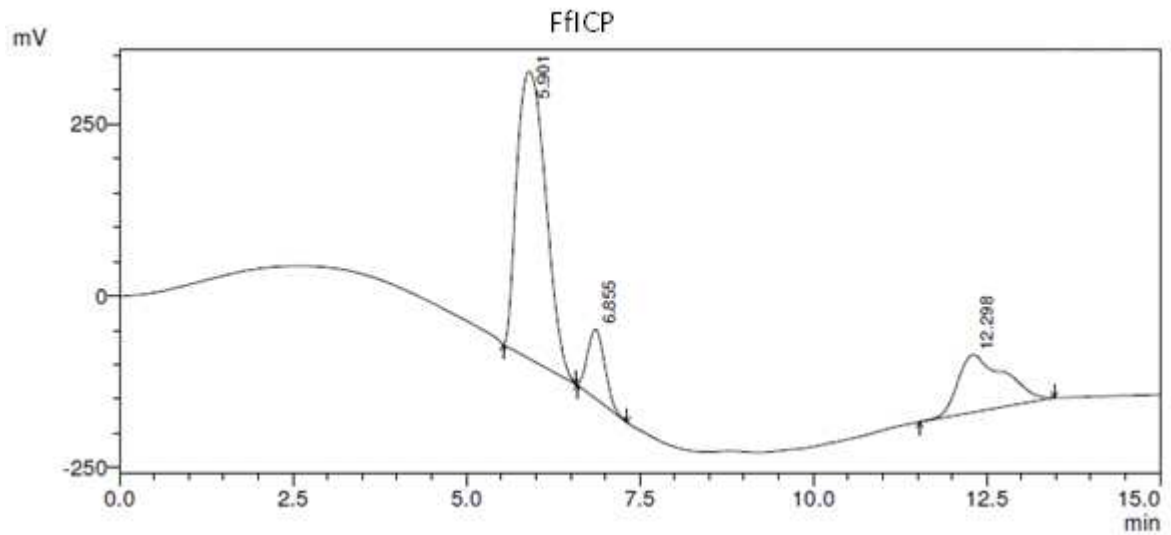
Za določitev razmerja monosaharidnih enot v polisaharidu je bila potrebna HPLC-analiza standardov dekstranov različnih velikosti. Kromatogram standarda dekstrana 40 kDa je prikazan na Slika 27. Na enak način kot dekstrane smo pripravili tudi vzorce LasICP, FfICP in FfECP. Kromatogrami vzorcev so predstavljeni na slikah 28, 29, 30.



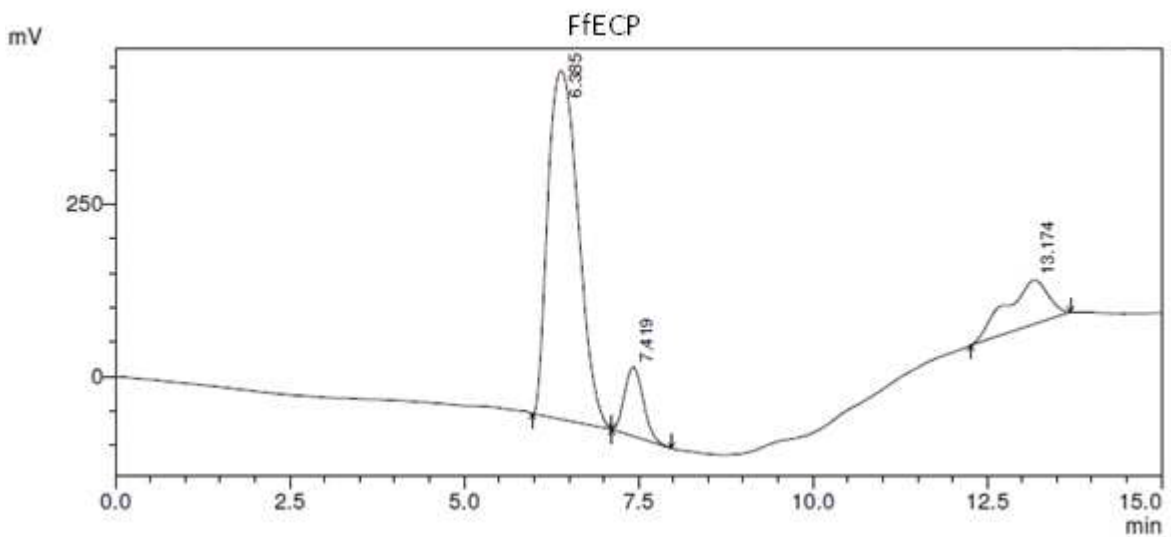
Slika 27: Kromatogram standarda dekstrana velikosti 40000 Da (5 mg/ml) z retencijskim časom $t_R = 13,046$ min



Slika 28: Kromatogram vzorca LasICP (5 mg/ml) z retencijskim časom $t_R = 13,811$ min



Slika 29: Kromatogram vzorca FfICP (5 mg/ml) z retencijskim časom $t_R = 12,298$ min

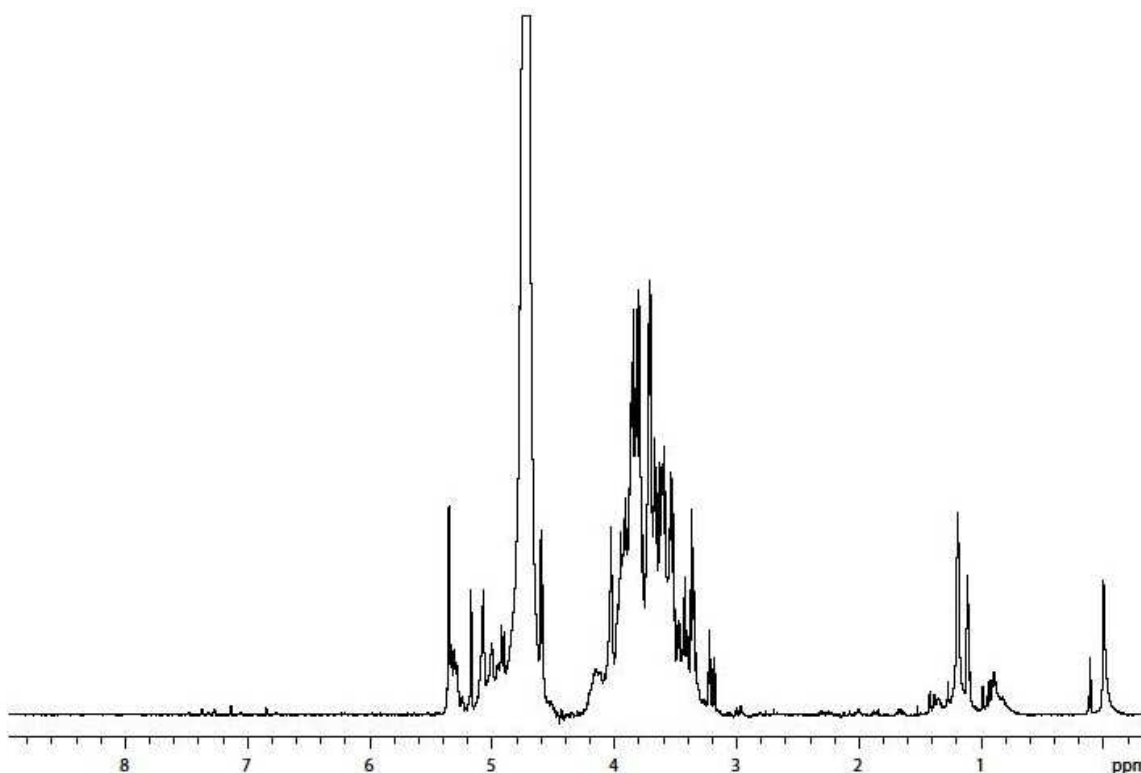


Slika 30: Kromatogram vzorca FfECP (5mg/ml) z retencijskim časom $t_R = 13,174$ min

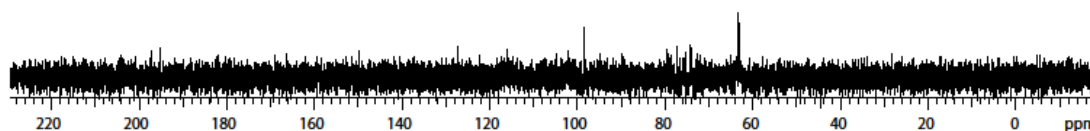
4.5 NMR

Vse omenjene NMR-študije so opravili na Kemijskem inštitutu. Spektri so posneti na 800 MHz Varian NMR-spektrometru. Vzorec je raztopljen v D₂O. Spektekter je posnet pri temperaturi 25° C.

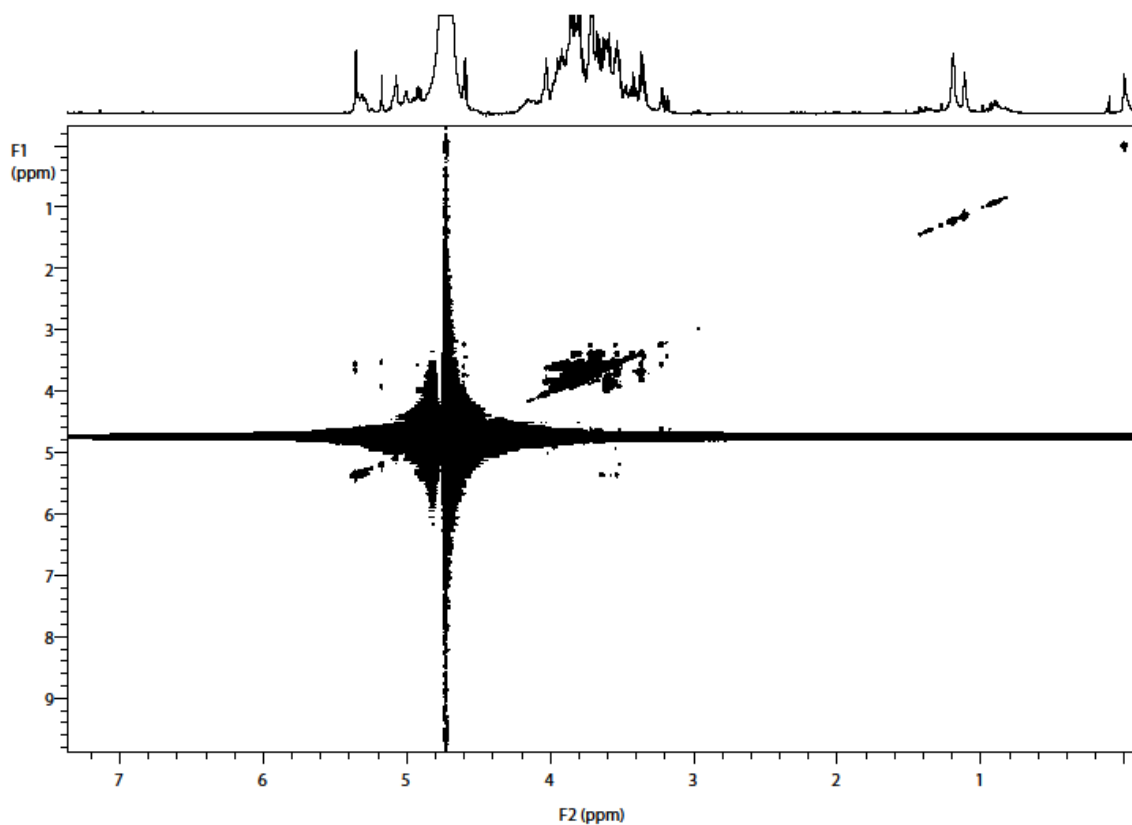
Spektri *Laetiporus sulphureus* so predstavljeni na slikah: 31, 32, 33.



Slika 31: ¹H NMR-spektekter vzorca v D₂O pri 25 °C



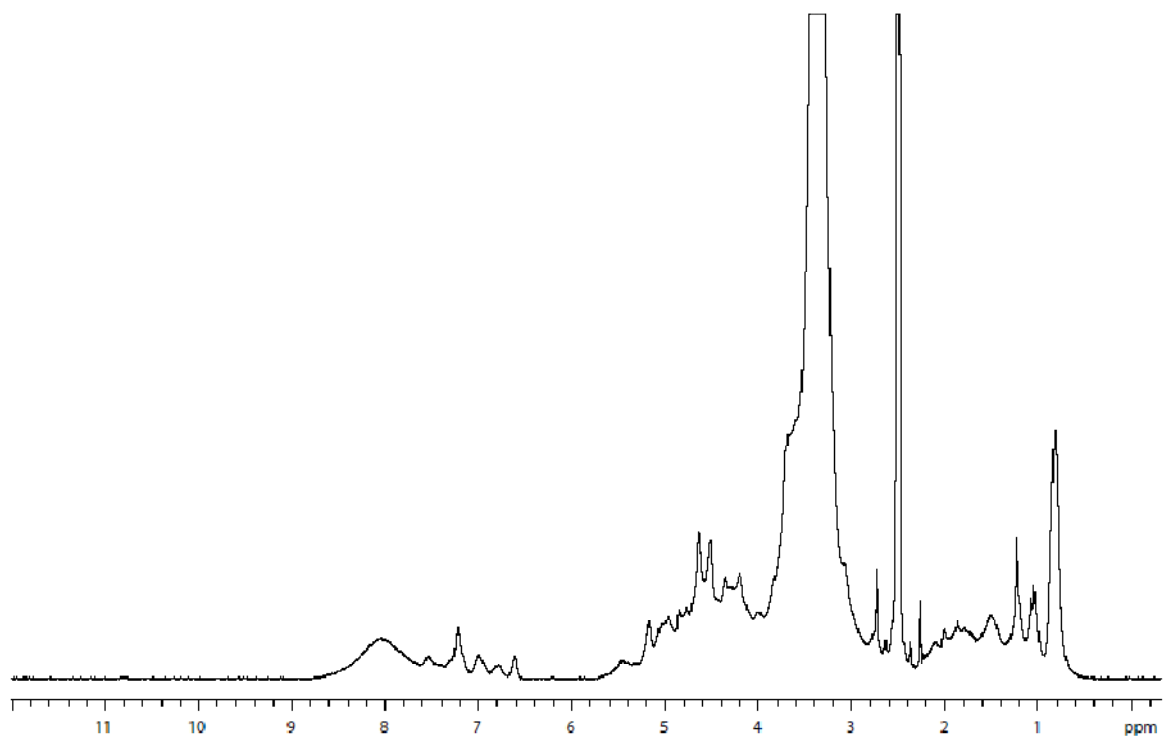
Slika 32: ¹³C NMR-spektekter vzorca v D₂O pri 25 °C



Slika 33: Povečano območje ^1H - ^1H TOSCY-spektra (mix = 0,08 s) vzorca v D_2O pri 25 °C.

Za predvidene monosaharide smo na podlagi sklopitvenih konstant v ^1H NMR-spektru in korelacij v ^1H - ^1H TOSCY-spektru določili naslednje anomerne konfiguracije: α -D-glukoza (δ_{H1} 5.36 ppm), β -D-manoza (δ_{H1} 5.17 ppm), β -D-fukoza (δ_{H1} 4.60 ppm) in β -D-galaktoza (δ_{H1} 4.59 ppm).

NMR-spekter *Fomes fomentarius* je bil posnet v topilu DMSO, vidimo ga na Slika 34.



Slika 34: ^1H NMR-spekter vzorca v topilu DMSO pri 25 °C

5 RAZPRAVA

5.1 IZKORISTEK EKSTRAKCIJE VODOTOPNIH POLISAHARIDOV

Izkoristke ekstrahiranih in izoliranih polisaharidov smo določili na podlagi tehtanja končnega produkta ekstrakcije in vmesnih stopenj. Ekstrakcijo smo začeli s suho micelijsko maso oz. tekočo brozgo v primeru ekstracelularnih polisaharidov. Naš namen je bil izolirati čiste frakcije vodotopnih polisaharidov. Lipofilnih snovi smo se znebili z ekstrakcijo v MeOH in kloroformu (v/v; 1 : 1), nato pa z ekstrakcijo v destilirani vodi pridobili grobi izvleček polisaharidov.

Tega smo najprej dializirali v dializnem črevesu z izključitveno molekulsko maso 6–8 kDa. Dializa proti demineralizirani vodi je potekala najmanj 24 h. Tako smo zagotovo odstranili vse manjše sladkorje oz. druge manjše vodotopne molekule, ki bi lahko bile prisotne zaradi same sestave medijev in kultivacije micelija, manjše proteine in ostale nizkomolekularne snovi. Podoben potek ekstrakcije in izolacije so uporabili pri študijah Alquini in sod., Y.Sun in sod. (23, 25).

Pri gobi *Laetiporus sulphureus* smo v povprečju iz mase 3,7 g suhega micelija dobili 137,4 mg oz. 4,15 % grobega izvlečka. Izkoristek dialize je bil zelo dober, običajno nad 67,22 %. Končna povprečna ocena vodotopnih intracelularnih polisaharidov je bila 89,46 mg. Čeprav predpostavljamo, da naš končni vzorec vsebuje izključno polisaharide, smo s pomočjo gelske filtracije dokazali, da ni tako, saj smo v več frakcijah s pomočjo Bradfordove reakcije potrdili tudi prisotnost proteinov.

V diplomskem delu M. Tajnik so po enakem postopku ekstrakcije določili delež intracelularnih polisaharidov 21 %, medtem ko je bil delež intracelularnih proteinov le 1,2 % (44). V študiji Kang in sod. (47) so izvlečki *L. sulphureus* vsebovali 84 % polisaharidov in 5 % proteinov.

Pri gobi *Fomes fomentarius* je bil izkoristek pridobivanja intracelularnih polisaharidov nekoliko višji, okoli 15,5 %. Izkoristek dialize je bil zelo dober, in sicer 87,5 %. Kljub temu da smo ekstrakcijo pričeli z manjšo maso suhega micelija, to je 495,9 mg, smo na koncu dobili kar 65,1 mg vodotopnih intracelularnih polisaharidov. Pri metodi izolacije intracelularnih polisaharidov *F. fomentarius* smo imeli težave s filtracijo. Pomislili smo, da

filter papir zadrži polisaharide z veliko molekulsko maso. To bi bilo potrebno potrditi z nadaljnjimi raziskavami.

Pri ekstrakciji ekstracelularnih polisaharidov gobe *Fomes fomentarius* smo pridobili najmanj 453,7 mg grobega izvlečka. Gre za polisaharide, ki jih je goba *Fomes fomentarius* med rastjo izločila v tekoče gojišče. Zaradi dialize izgubimo nad 81 % polisaharidov, zaradi česar sklepamo, da goba v tekoče gojišče izloča pretežno polisaharide manjših molekulskih mas.

Kljub enakim postopkom in pogojem ekstrakcije in izolacije ekstracelularnih in intracelularnih polisaharidov *Fomes fomentarius* se rezultati med seboj zelo razlikujejo. To lahko pojasnimo s časom kultivacije v submerznem gojišču. V prvem primeru smo gobo gojili 32 dni, pri drugi izolaciji le 14 dni. Vidimo, da se največje razlike pojavijo v količini ekstracelularnih polisaharidov, medtem ko na količino intracelularnih polisaharidov ne vplivajo. Optimalni čas gojenja gobe *F. fomentarius* je 14 dni, saj goba največ ekstracelularnih polisaharidov izloča v času rasti. Pri diplomskem delu M. Tajnik so določili 34,4 % polisaharidov, večjih 6–8 kDa in 0,8 % proteinov pri ekstracelularnih izvlečkih ter 33,2 % polisaharidov in 1,8 % proteinov pri intracelularnih izvlečkih (44). Tudi mi smo v obeh vzorcih dokazali prisotnost proteinov.

5.2 VELIKOSTNI RANG POLISAHARIDOV

Pričakovali smo, da bo molekulska masa izoliranih intra- in ekstracelularnih polisaharidov iz gliv *L. sulphureus* in *F. fomentarius* v območju od 27.000 do 85.000 Da. Velikost smo določili s pomočjo gelske izključitvene kromatografije in zato smo izbrali kolono HiPrep 16/60 Sephacryl S-200 HR, ki ločuje polisaharide v območju od 1000 do 80 000 Da. Tudi kromatografske standarde dekstrana smo izbrali na omenjenem območju, in sicer: $2,5 \times 10^4$, 8×10^4 , $2,7 \times 10^5$.

Pri izbiri mobilne faze smo najprej poizkusili s predpisanim 0,05 M fosfatnim pufrom. Ker bi soli, vnešene skupaj z mobilno fazo, lahko motile nadaljnje analize HPLC in NMR, smo poizkusili še visoko prečiščeno vodo. Dobili smo podobne rezultate in s tem potrdili ustreznost metode, zato smo v nadaljnjih poizkusih za mobilno fazo izbrali visoko prečiščeno vodo.

Prosti volumen kolone (V_0) smo določili na podlagi elucijskega vrha dekstrana $2,7 \times 10^5$, saj vemo, da njegova molekulska masa presega frakcionacijsko območje kolone, in se zato eluira prvi. Pojavil se je v 4. frakciji, kar pomeni 40 ml. To ustreza specifikacijam kolone, ki pravi, da prosti volumen predstavlja 30 % celotnega volumna kolone, ki je v našem primeru 120 ml. Totalni volumen (V_t) smo določili na podlagi elucijskega vrha glukoze. Ker gre za molekulo z majhno molekulsko maso, se eluira zadnja. V našem poizkusu se je pojavila v 12. frakciji, kar pomeni 120 ml.

Na kolono smo nanašali naše vzorce, približne koncentracije 4 mg/ml, ki smo jih predhodno filtrirali skozi mikrobiološki filter 20 μm . Iz dobljenih grafov, že na prvi pogled opazimo, da so elucijski volumni (V_e) približno enaki (40 ml) za vse naše vzorce. Sklepamo, da se eluirajo v prostem volumnu kolone in jih zato nismo uspeli ločiti. Nekoliko izstopajo ekstracelularni polisaharidi glive *F. fomentarius*, ki se pojavijo v 4. in 5. frakciji, kar pomeni, da je elucijski volumen približno 45 ml. Kljub temu smo izračunali porazdelitvene koeficiente (K_{av}) in naredili graf v odvisnosti od logaritma molekulske mase. Ocenjena velikost intracelularnih polisaharidov *L. sulphureus* in *F. fomentarius* je okoli 415,7 kDa; nekoliko manjši so ekstracelularni polisaharidi *F. fomentarius*, ki so veliki 150,3 kDa. Ker so polisaharidi bistveno večji od pričakovane molekulske mase, se na koloni HiPrep 16/26 Sephacryl S-200 HR niso uspeli ločiti.

Prvi poizkus nas je pripeljal do odločitve, da uporabimo nekoliko večjo kolono, in sicer HiPrep 26/60 Sephacryl S-300 HR, s katero ločimo dekstrane velikosti od 2000 do 400 000 Da. Zavedati se moramo, da s povečanjem frakcionacijskega območja nekoliko zmanjšamo resolucijske oz. ločitvene sposobnosti kolone in s tem vplivamo na natančnost. Za mobilno fazo smo tokrat uporabili 0,15 M NaCl. Kromatografski standardi dekstrana so ostali enaki.

Prosti volumen kolone (V_0) smo določili teoretično na 100 ml, kar predstavlja 30 % celotnega volumna kolone 320 ml. Totalni volumen (V_t) smo določili na podlagi elucijskega vrha glukoze. V našem poizkusu se je pojavila v 29. frakciji, kar pomeni 290 ml.

Zopet smo skozi kolono spustili naše vzorce in zbirali frakcije po 10 ml. Tokrat so bili elucijski vrhovi bolj razpotegnjeni, kar kaže, da vzorci vsebujejo polisaharide različnih velikosti. Iz elucijskih volumnov vzorcev smo izračunali porazdelitveno konstanto K_{av} .

Gledali smo odvisnosti Kav od logaritma molekulske mase ter s pomočjo umeritvene krivulje standardov sklepali na velikosti polisaharidov v vzorcu.

Intracelularne polisaharide gobe *L. sulphureus* smo ločili v tri frakcije. Največji polisaharidi v frakcijah 9 in 10 imajo povprečno Mr 514,9 kDa. Srednji polisaharidi, prisotni v frakcijah 13, 14, 15, 16, so veliki Mr 60,5 kDa. Glede na velikost vrha sklepamo, da največji delež predstavljajo najmanjši polisaharidi gobe *L. sulphureus*, ki so velikostnega razreda Mr 5,7 kDa. Iz dobljenih rezultatov lahko ugotovimo, da so najbolj verodostojni polisaharidi molekulske mase 60500 Da. Pri največjih določenih polisaharidih se zopet pojavi vprašanje frakcionacijskega območja, zato bi za natančno določitev potrebovali še večjo kolono. Naši polisaharidi so se izkazali za bistveno večje od tistih, ki so jih preučevali v študiji Alquini in sod., kjer so molekulsko maso ene vrste polisaharidov gobe *L. sulphureus* določili na Mr 28 kDa. (23) Podobno so bili polisaharidi, izolirani iz micelija *Polyporus albicans*, manjši, veliki približno 37 kDa (25). Tudi pri najmanjših izoliranih polisaharidih ni znano, zakaj se jih nismo znebili z dializo. Edino razlago vidimo v približku in ekstrapolaciji standardov dekstrana.

S pomočjo UV-detektorja smo s spremljanjem absorbance pri 280 nm določili prisotnost proteinov v vzorcu in jih dodatno potrdili z Bradfordovo reakcijo. Med obema grafoma obstaja zelo dobro ujemanje, zato sklepamo, da je bila naša metoda uspešna. Proteine najdemo v frakcijah 20–29. Verjetno so proteini v povprečju manjši od prisotnih polisaharidov, vendar njihove natančne velikosti ne moremo oceniti brez proteinskih standardov.

Kljub temu da se nekatere frakcije polisaharidov in proteinov med seboj prekrivajo, lahko izberemo tudi take, ki vsebujejo čiste polisaharide: 9.–19. frakcije. To je zelo pomembno za nadaljnjo NMR-analizo, saj bi prisotni proteini motili določanje strukture polisaharida.

Tudi pri intracelularnih polisaharidih gobe *Fomes fomentarius* je bil vrh zelo razpotegnen, kar pomeni, da so prisotni polisaharidi zelo različnih velikosti. Zopet smo jih razdelili v tri skupine: 9., 10., 11., 12. frakcija vsebujejo polisaharide velikosti 335,5 kDa; srednje frakcije 13, 14, 15, 16 zavzemajo polisaharide s povprečno Mr 60,5 kDa, medtem ko najmanjše prisotne frakcije 17, 18, 19, 20, 21 vsebujejo polisaharide z Mr 8,8 kDa. Ker vrhovi niso strogo ločeni, so naše skupine le navidezne, v resnici so v vzorcu prisotni polisaharidi na celotnem frakcionacijskem območju 8,8 kDa–335,5 kDa.

Tudi v primeru intracelularnih proteinov *F. fomentarius* vidimo zelo dobro ujemanje elucijskih volumnov in velikosti vrhov med detektorjem UV pri 280 nm in Bradfordovim reagentom. Prisotnost proteinov lahko potrdimo v frakcijah 20–26.

Najmanjše polisaharide izloča *F. fomentarius* v tekoče gojišče. Pri gelski filtraciji na koloni HiPrep 26/60 Sephacryl S300 HR smo jih razdelili na tri skupine, in sicer v frakcijah 18–22 najdemo polisaharide s povprečno molekulsko maso 5,7 kDa. V vzorcu so prisotni tudi manjši polisaharidi, ki se eluirajo v frakcijah od 23 do 28. Z enačbo, pridobljeno na podlagi kromatografskih standardov dekstranov, ocenimo, da je povprečna molekulska masa polisaharidov od 23. do 26. frakcije 800 Da, v 27. in 28. frakciji pa 200 Da. Pri gelski filtraciji na koloni HiPrep 16/60 Sephacryl S200 HR se je celotni vzorec eluiral v 4. in 5. frakciji. Po lastnostih kolone, ki jih predpisuje proizvajalec, naj bi se v teh frakcijah spirali polimeri velikosti 80 kDa. Sklepamo, da na določevanje molekulske velikosti naših vzorcev močno vpliva izbira velikosti standardov dekstrana, saj z njihovo pomočjo pridobimo enačbo za izračun molekulskih mas polisaharidov v vzorcu. Pomembna sta tudi frakcionacijsko območje in resolucija kolone, ki sta med seboj obratnosorazmerna, zato jih nismo uspeli zadovoljivo ločiti s kolono HiPrep 26/60 Sephacryl S-300 HR.

Velikostne standarde dekstranov vedno izbiramo na podlagi pričakovanih velikosti analiziranega vzorca ter jim prilagodimo molekulsko velikost. Pri našem delu smo imeli opravka z novimi polisaharidi, izoliranimi iz celične stene gob. Že sam proces izolacije lahko bistveno vpliva na velikost končnega produkta, npr. topilo ali temperatura ekstrakcije, velikost por dializnega črevesja, filtracija, vmesno ohlajanje med shranjevanjem vzorca, zato podatkov o pričakovani molekulski masi nismo imeli. V nadaljnjem raziskovalnem delu bomo na podlagi ocenjene velikosti ekstracelularnih polisaharidov *Fomes Fomentarius* izbrali kolono za gelsko filtracijo, ki bo imela ustrezno filtracijsko območje in resolucijo. Napake pri izbiri standardov se zavedamo, vendar lahko pravilno velikost standardov izberemo šele na podlagi informacije o približni velikosti polisaharida.

V vzorcu so zopet prisotni proteini. Kromatogram prikazuje, da se večina proteinov spere v 23. frakciji (Graf 19: Prikaz ločitve proteinov, prisotnih v fermentacijski brozgi *Fomes fomentarius*, na koloni HiPrep 26/60 Sephacryl S300 HR. Proteine smo detektirali s pomočjo Bradfordove reakcije.. Kljub uspešni ločitvi proteinov in polisaharidov pa vemo, da vzorec

FfECP ni čist, saj je bil rahlo rumenkasto obarvan, zaradi česar sklepamo na prisotnost drugih molekul v vzorcu.

Proteini so predstavljali nečistote pri nadaljnjih analizah NMR in HPLC. Motijo analizo in dajejo napačne podatke, zato smo se jih želeli znebiti. Obstaja več načinov:

- 1) uporaba pepsina,
- 2) dializa,
- 3) uporaba Sevage reagenta,
- 4) zamrzovanje in odtajevanje vzorca,
- 5) gelska filtracija.

Uporaba pepsina ali drugega encima v našem primeru ni bila zaželena, saj s tem v vzorec vnašamo dodatne proteine. Približno 22,06 % proteinov smo uspeli odstraniti z dializo. Vendar se je potrebno zavedati, da na ta način odstranimo le proteine manjših molekularnih mas 6–8 kDa, medtem ko večji ostanejo v vzorcu. V nekaterih študijah so proteine odstranili z uporabo Sevage reagenta, a v naših poizkusih ni izkazal uspeha (24–26). Zanimiv predlog je zamrzovanje in odtajevanje vzorca, ki so ga uporabili v študiji Alquini in sod. (23). Z omenjeno metodo se proteini denaturirajo ter oborijo, medtem ko polisaharidi ostanejo nespremenjeni. Proteine zato odstranimo s centrifugiranjem. Metodo smo preverili tudi v našem laboratoriju, vendar smo se v povprečju znebili le 7,02 % proteinov, kar je zanemarljivo malo. Proteine in polisaharide najučinkoviteje ločimo na osnovi molekularne mase s pomočjo gelske filtracije. Problem nastane, če se molekule zaradi podobne molekularne mase ali drugih razlogov ne ločijo med seboj.

5.3 DOLOČITEV MONOSAHARIDNE SESTAVE S POMOČJO HPLC

Do sedaj še ni bilo izvedenih veliko študij o monosaharidni sestavi polisaharidov medicinskih gliv *L. sulphureus* in *F. fomentarius*. Eno prvih je izvedel Alquini in sod. (23), ki je v plodišču gobe dokazal prisotnost heteroglukanov s stranskimi verigami galaktoze, fukoze, manoze.

S tankoplastno tekočinsko kromatografijo, ki so jo izvedli v našem laboratoriju v izvlečkih intra- in ekstracelularnih polisaharidov *L. sulphureus*, so detektirali največji delež glukoze, manjši delež galaktoze, fukoze in manoze (44). S pomočjo iste metode so določili, da intracelularni polisaharidi *F. fomentarius* vsebujejo glukozo, galaktozo in fukozo, medtem ko ekstracelularni polisaharidi vsebujejo le glukozo in galaktozo (44). V svoji študiji so

Kang in sod. (47) določili, da polisaharidi glive *L. sulphureus* vsebujejo kar 84,5 % fukoze, le 3,2 % glukoze in 2,3 % galaktoze, vendar niso potrdili prisotnosti manoze. Sestavo polisaharidov smo želeli določiti in potrditi z natančnejšo metodo HPLC, s katero lahko določimo tudi razmerje monosaharidov v vzorcu. Razlika med literaturnimi podatki in rezultati, pridobljenimi v našem laboratoriju, je lahko posledica nekoliko drugačne metode izolacije, ne izključujemo pa niti razlik zaradi različnih sevov ali celo vrst. V zadnjem času se zato vedno zahteva tudi molekularna identifikacija vrste gobe, iz katere so izolirani polisaharidi oziroma ostali primarni in sekundarni metaboliti.

Za HPLC-analizo smo morali polisaharide hidrolizirati, da smo dobili monosaharidne enote. Ker sladkorji ne absorbirajo na področju UV-svetlobe, smo za detekcijo uporabili RI-detektor. Za hidrolizo polisaharida smo uporabili TFA. Kislina TFA je primernejša od ostalih mineralnih kislin, saj jo zaradi večje hlapnosti lažje odstranimo (28).

Pri HPLC-analizi posameznih standardov monosaharidov smo pridobili naslednje retencijske čase: fukoza (8,817 min), galaktoza (8,765 min), manoza (10,094 min) in glukoza (9,909 min). Prva dva vrhova pri vseh kromatogramih predstavljata topilo. V kromatogramu galaktoze je prisoten še en manjši vrh pri 6,554 min.

Po hidrolizi naših vzorcev smo pričakovali različne monosaharidne enote, zato je bilo potrebno posneti tudi kromatogram mešanice monosaharidnih standardov, ki je prikazan na Slika 26. Dobili smo kromatogram z vrhovi retencijskih časov 9,411 min, 11,656 min in 12,127 min, od katerih sta zadnja dva slabo ločena. Retencijski čas prvega vrha ne ustreza pričakovanemu za fukozo, ki je imela pri analizi posameznih standardov najkrajši retencijski čas. Tudi vrhovi topila med različnimi kromatogrami nimajo enakega retencijskega časa, na podlagi česar smo sklepali, da je metoda slabo ponovljiva in bi jo morali optimizirati.

Dekstran je polimer glukoze, zato bi na HPLC-kromatogramu hidroliziranega dekstrana pričakovali en sam vrh, ki ustreza glukozi. Retencijski čas (13,046 min) se ne ujema z retencijskim časom, ki smo ga dobili po HPLC-analizi samega standarda glukoze (9,909 min).

Pri hidroliziranem vzorcu intracelularnih polisaharidov *Laetiporus sulphureus* smo dobili vrh z retencijskim časom 13,811 min, ki ne ustreza nobenemu od pridobljenih standardov, zato ne moremo potrditi njegove monosaharidne sestave. Hidroliziran vzorec intracelularnih polisaharidov *Fomes fomentarius* je imel vrh pri 12,298 min, vzorec

ekstracelularnih polisaharidov iste gobe pa pri 13,174 min, kar podobno kot pri vzorcu *Laetiporus sulphureus* ne ustreza nobenemu standardu.

Zaradi slabe ponovljivosti, nestabilne bazne linije in nespecifičnosti detekcije nam s pomočjo opisane metode ni uspelo določiti monosaharidne sestave vzorca.

5.4 NMR

Pri študiji strukture polisaharida, izoliranega iz gobe *L. sulphureus*, smo se osredotočili predvsem na ^1H ter oba ^1H - ^1H TOCSY NMR-spektra. Najprej smo v ^1H NMR-spektru v območju od 4,5 do 5,5 ppm poiskali signale, ki ustrezajo anomernim protonom. Primerjava intenzitet signalov ne potrjuje podatka, da v vzorcu prevladuje glukoza, kar se ujema s študijo Alquini in sod., ki pravi, da v vzorcu prevladuje fukoza (23). V tem območju ^1H NMR-spektra smo opazili večje število signalov, ki ne ustrezajo predlaganim monosaharidom. S pomočjo ^1H - ^1H TOCSY NMR-spektrov smo preko korelacij določili še kemijske premike ostalih vodikovih atomov. Na podlagi sklopitvenih konstant med atomi H1, H2 in H3 smo ugotovili, kakšna je konfiguracija na anomernem ogljiku v posameznih monosaharidih. Alquini in sod. so iz trosnjaka gobe *L. sulphureus* izolirali dva polisaharida ter njuno strukturo določili s pomočjo NMR-študije. Izkazalo se je, da gre za polisaharida fukomanogalaktan in (1→3) β -glukan, poimenovan laminarin (23). Predvidevamo da naš vzorec, izoliran iz micelija iste gobe, vsebuje α -D-glukozo, β -D-manozo, β -D-fukozo in β -D-galaktozo, vendar bi za nedvoumno določitev strukture polisaharidov potrebovali dodatne analize.

Pri vzorcu intracelularnih polisaharidov *F. fomentarius* smo posneli ^1H NMR, sprva v topilu D_2O . Ker je vrh topila prekrival večino anomernih vrhov sladkorjev, na njem nismo uspeli določiti posameznih monosaharidnih enot. Zato smo posneli še drugi ^1H NMR-spekter, le da smo vzorec tokrat raztopili v DMSO (Slika 34). Na spektru opazimo vrhove pri 8 ppm. Na omenjenem delu navadno zaznamo aromatske molekule, zaradi česar sklepamo na prisotnost proteinov. Ker smo proteine in polisaharide uspešno ločili že pri gelski filtraciji, sklepamo, da smo v našem vzorcu detektirali proteoglikan. V proteoglikanu sta polisaharid in protein povezana s kovalentno vezjo in se zato nista uspela ločiti.

Vzorec ekstracelularnih polisaharidov, izoliranih iz glive *F. fomentarius*, je bil rahlo rumenkasto obarvan. Sklepali smo, da vzorec ni čist ter da so v njem prisotne druge molekule. Za NMR-analizo se v tem primeru nismo odločili, saj je bistvenega pomena, da vzorec ne vsebuje nečistot.

Tudi pri NMR-analizi bi za natančnejšo analizo potrebovali večjo koncentracijo vzorca, hkrati pa bi pri določitvi strukture zelo pomagali podatki o monosaharidni sestavi, pridobljeni s pomočjo HPLC ali GC.

6 SKLEP

Za določevanje in preučevanje strukture intracelularnih polisaharidov gliv *L. sulphureus* in *F. fomentarius* ter ekstracelularnih polisaharidov glive *F. fomentarius* smo se odločili na podlagi predhodnih raziskav, ki so dokazale *in vitro* vpliv na izražanje pomembnih genov v celični liniji monocitov THP-1. Polisaharidi so zelo široka in raznolika skupina biomakromolekul z različnimi lastnostmi. Ker so za uživanje najprimernejši pripravki v obliki čajev, kjer se aktivni polisaharidi ekstrahirajo enostavno z vročo vodo, smo se osredotočili predvsem za proučevanje strukture vodotopnih polisaharidov.

Metoda ekstrakcije in izolacije vseh izbranih polisaharidov, tako intra- kot ekstracelularnih iz gliv *L. sulphureus* in *F. fomentarius*, je bila uspešna. Tako v grobih kot v končnih izvlečkih smo uspeli dokazati prisotnost polisaharidov s pomočjo metode po Dubois in sod. Pred analizo vzorcev smo jih vedno filtrirali z mikrobiološkim filtrom 20 μm ter opazili, da se tudi v tej stopnji nekaj vzorca izgubi. Ocenili smo, da se zaradi filtracije izgubi okoli 77,03 %.

Največji izkoristek ekstrakcije, to je 15,5 %, smo dobili pri intracelularnih polisaharidih *F. fomentarius*, ki smo jih kultivirali na submerznem gojišču. Količinsko smo pridobili največ ekstracelularnih polisaharidov (453,7 mg), izoliranih iz *F. fomentarius*. Intracelularne polisaharide *L. sulphureus* smo pridobili iz suhe micelijske mase, kjer smo imeli povprečni izkoristek 4,15 %. V vseh primerih smo pridobili dovolj polisaharidov za nadaljnje analize.

Uspešna je bila tudi submerzna kultivacija glive *Fomes fomentarius*. Pridobili smo tako intra- kot ekstracelularne polisaharide. Ugotovili smo, da čas kultivacije gobe vpliva predvsem na količino ekstracelularnih polisaharidov. Optimalen čas kultivacije je bil v našem primeru 14 dni, saj goba v času rasti izloča največ snovi v svoje okolje oz. gojišče.

Velikostni rang izoliranih intracelularnih polisaharidov iz glive *Laetiporus sulphureus* je zelo širok, in sicer od $5,7 \times 10^3$ do $5,15 \times 10^5$ Da. Ker so polisaharidi višjih molekularnih mas izven frakcionacijskega območja kolone, bi bila za natančnejšo analizo smiselna uporaba kolone z večjim frakcionacijskim območjem. Velikost izoliranih intracelularnih polisaharidov iz glive *Fomes fomentarius* je prav tako razpotegnjena od $8,8 \times 10^3$ do $3,35$

$\times 10^5$ Da. Najmanjši polisaharidi pripadajo ekstracelularnim polisaharidom glive *Fomes fomentarius*. Ocenjujemo, da so večji od 80 kDa, vendar rezultati niso dovolj natančni, da bi z njimi določili molekulsko maso. Kljub temu je ocena velikosti zelo pomembna za nadaljnje raziskave, saj nam bo v veliko pomoč pri izbiri kolone za gelsko filtracijo. Od kolone pričakujemo ustrezno frakcionacijsko območje in resolucijo. Prav tako se bomo z izbiro standardov dektranov lažje približali velikosti samega polisaharida.

S HPLC-metodo nam ni uspelo določiti monosaharidne sestave polisaharidov.

S pomočjo NMR-študije smo pri glivi *Laetiporus sulphureus* potrdili prisotnost α -D-glukoze, β -D-manoze, β -D-fukoze in β -D-galaktoze. Za nedvoumno določitev teh monosaharidov bi bilo potrebno še dodatno čiščenje ter koncentriranje vzorca. S pomočjo NMR-študije smo pri glivi *Fomes fomentarius* potrdili prisotnost proteoglikana. Za določitev celotne sestave bi bile nujne študije HPLC in GC. Vzorec ekstracelularnih polisaharidov glive *Fomes fomentarius* bi bilo za NMR-študijo potrebno očistiti nečistot.

Za določitev natančne strukture polisaharida ne obstaja ena sama metoda, temveč je potrebno uporabiti več komplementarnih analiznih metod, ki na koncu podajo celotno sliko o zelo kompleksni strukturi.

Pri nadaljnjih študijah je nujna uporaba metode GC z namenom določitve monosaharidne sestave in kvantifikacije vsebovanih monosaharidov. Zelo dobre rezultate daje tudi sklopljena študija plinske kromatografije in masne spektroskopije GC-MS.

7 LITERATURA

1. **Wasser S.P.** Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2002, 60(3): 258–274.
2. **Smith J, Rowan N, Sullivan R.** Medicinal Mushrooms: Their therapeutic properties and current medical usage with special emphasis on cancer treatments. *Cancer Research UK*, University of Strathclyde, 2002, 1–23.
3. **Wasser S.P.** Medicinal Mushroom Science: History, Current Status, Future Trends, and Unsolved Problems. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 2010, 12(1): 1–16.
4. **Ikekawa T, Uehara N, Maeda Y, Nakanishi M, Fukuoka F.** Antitumor activity of aqueous extracts of edible mushrooms. *Cancer Research*, 1969, 29: 734–735.
5. **Kuo. M.** *Laetiporus sulphureus*: The chicken of the woods, (elektronski vir). Dostopno na naslovu: http://www.mushroomexpert.com/laetiporus_sulphureus.html (citirano 28. feb. 2011)
6. **Radić N, Injac R, Štrukelj B.** Sulphur Tuft Culinary-Medicinal Mushroom, *Laetiporus sulphureus* (Bull.:Fr.) Murill (Aphyllphoromycetidae): Bioactive Compounds and Pharmaceutical Effects (Review). *International journal of medicinal mushrooms*, 2009, 11(2): 103–116
7. **Spahr D.L.** Edible and Medicinal Mushrooms of New England and Eastern Canada, North Atlantic Books, Berkeley, 2009, 15: 123–128.
8. **Hanchett SA, S.Weber N.** The mushroom hunter's field guide. *University of Michigan Press*, 1980, 33: 63–64.
9. **Turkoglu A, Duru ME, Mercan N, Kivrak I, Gezer K.** Antioxidant and antimicrobial activity of *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill. *Food Chemistry*, 2007, 101: 267–273.
10. **Mlinaric A, Kac J, Pohleven F.** Screening of selected wood-damaging fungi for the HIV-1 reverse transcriptase inhibitors. *Acta pharmaceutica*, 2005, 55: 69–79.
11. MycoBank: Fungal Databases, Nomenclature and Species Banks, (elektronski vir). Dostopno na naslovu: <http://www.mycobank.org/MycoTaxo.aspx?Link=T&Rec=194860> (citirano 20. Jan. 2011).
12. *Fomes fomentarius*, (elektronski vir). Dostopno na naslovu: http://en.wikipedia.org/wiki/Fomes_fomentarius (citirano 20. feb. 2011).
13. **Linnaeus C.** Species Plantarum. *Stockholm: ImpensisLaurentii Salivii.*(elektronski vir) Dostopno na naslovu: <http://biodiversitylibrary.org/page/359197> (citirano 20.feb.2011).
14. **Carleton R.** British Basidiomycetaceae: A Handbook to the Larger British Fungi. *Cambridge:Cambridge University Press*, 1922.
15. **Otakar R, Jiri M, Tunde J.** Beta-glucans in higher fungi and their health effects. *Nutrition Reviews*, 2009, 67(11): 624–631.
16. **Akramiene D, Kondrotas A, Didžiapetriene J, Kevelaitis E.** Effects of beta-glucans on the immune system. *Medicina (Kaunas)*, 2007, 43(8): 597–606.
17. **Grun D.H.** Structure and biosynthesis of fungal alfa-glucans. *Doktorska disertacija, Utrecht University*, 2003, 144.
18. **Kveder M.** Uporaba agonistov toll-like receptorjev pri razvoju cepiv. *Seminar pri predmetu Mikrobiologija*, 2009.
19. **Brown GD.** Dectin-1: a signaling non-TLR pattern-recognition receptor. *Nature Reviews, Immunology*, 2006, 6: 33–43.

20. **Yongxu S, Jincheng L.** Structural characterization of a water-soluble polysaccharide from the Roots of *Codonopsis pilosula* and its immunity activity. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2008, 43: 279–282.
21. **Mizuno T.** The extraction and development of antitumour-active polysaccharides from medicinal mushrooms in Japan. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 1999, 1: 9–29.
22. **Mizuno T.** Bioactive substances in Yamabushitake, the *Hericium erinaceum* fungus, and its medicinal utilization. *Food and Food Ingredient Japanese Journal*, 1998, 167: 69–81.
23. **Alquini G, Carbonero E, Rosado F, Cosentino C, Iacomini M.** Polysaccharides from the fruit bodies of the basidiomycete *Laetiporus sulphureus* (Bull.: Fr.) Murr. *FEMS Microbiology Letters*, 2004, 47–52.
24. **Zhang YJ, Zhang LX, Yang JF, Liang ZY.** Structure analysis of water-soluble polysaccharide CPPS3 isolated from *Codonopsis pilosula*. *Fitoterapia*, 2010, 81:157–161.
25. **Sun Y, Wang S, Li T, Li X, Jiao L, Zhang L.** Purification, structure and immunobiological activity of a new water-soluble polysaccharide from the mycelium of *Polyporus albicans* (Imaz.) Teng. *Bioresource technology*, 2008, 99: 900–904.
26. **Staub AM.** Removal of proteins (Sevag method) *Methods Carbohydrate Chemistry*. 1965, 5:5–6. Staub AM
27. **Wang Q, Fang Y.** Analysis of sugars in traditional Chinese drugs. *Journal of Chromatography B*, 2004, 812: 309–324.
28. **Osborn H, Lochey F, Mosley L, Read D.** Analysis of polysaccharides and monosaccharides in the root mucilage of maize (*Zea mays L.*) by gas chromatography. *Journal of chromatography A*, 1999, 831: 267–276.
29. **Corradi da Silva M, Fukuda E, Vasconcelos A, Dekker R, Matias A, Monteiro N, Cardoso M, Barbosa A, Silveira J, Sasaki G, Carbonero E.** Structural characterization of the cell wall D-glucans isolated from the mycelium of *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05., *Carbohydrate Research*, 2008, 343: 793–798.
30. **Hsu C, Ganong A, Reinap B, Mourelatos Z, Huebner J, Wang J.** Immunochemical characterization of polysaccharide antigens from six clinical strains of Enterococci. *BMC Microbiology*, 2006, 6: 62.
31. **Musliarakathbacker J, Azadi P.** Glycosyl composition of polysaccharide from *Tinospora cordifolia*. II. Glycosyl linkages. *Acta pharmaceutica, India*, 2004, 54: 73–78.
32. **Ciucanu I, Kerek F.** A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. *Carbohydrate Research*, 1984, 13: 209–217.
33. **Needs P.W., Selvendran R.R.** Avoiding oxidative degradation during sodium hydroxide/ methyl iodide-mediated carbohydrate methylation in dimethyl sulfoxide. *Carbohydrate Research*, 1993, 245: 1–10.
34. **Zheng Y, Liu L, Fang JN.** A Novel Polysaccharide from *Chrysanthemum morifolium*. *Acta Botanica Sinica*, 2004, 46 (8): 997-1001.
35. **Sweet DP, Shapiro RH, Albersheim P.** Quantitative analysis by various GLC response factor theories for partially methylated and partially ethylated alditol acetate. *Carbohydrate Research*, 1975, 40: 217–225.
36. **Mulloy B, Hart G, Stanley P.** Structural Analysis of Glycans. Cold Spring Harbor (NY). *Essentials of Glycobiology*, 2009, 47.
37. **Brisson JR, Vinogradov E, McNally D, Khieu N, Schoenhofen I, Logan S, Jarrell H.** *Functional Glycomics: The Application of NMR Spectroscopy to Functional Glycomics*. 2010, 600: 155–173.

38. **Leung M, Liu C, Zhu L, Hui Y, Yu B, Fung K.** Chemical and biological characterization of a polysaccharide biological response modifier from *Aloe vera* L.var.chinesis (Haw.) Berg. *Glycobiology*, 2004, 14: 501–510.
39. Colorimetric Quantification of Carbohydrates. *Curent Protocols in Food Analytical Chemistry*, 2001.
40. **Dubois M, Gilles K, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F.** A calorimetric method for the determination of sugars. *Nature*, 1951, 168: 167–168.
41. **Koch RB, Geddes WF, Smith F.** The carbohydrates of gramineae.I. The sugars of the flour of wheat. (*Triticum vulgare*). *Cereal Chemistry Journal*, 1951, 28: 424–431.
42. **Ali T, Weintraub A, Widmalm G.** Structural determination of the O-antigenic polysaccharide from the Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O171. *Carbohydrate Research.*, 2006, 341: 1878–1883.
43. Thermo Scientific, Pierce Protein Research Products, (elektronski vir). Dostopno na naslovu: <http://www.qcbio.com/pierce/23236.htm> (citirano 20.feb.2011).
44. **Tajnik M.** Izolacija in karakterizacija vodotopnih polisaharidov iz medicinsko pomembnih višjih gliv. *Diplomsko delo, Univerza v Ljubljani*, 2009.
45. **Masuko T, Minami A, Iwasaki N, Majima T, Nishimura SI, Lee YC.** Carbohydrate analysis by a phenol-sulfuric acid method in microplate format. *Analytical Biochemistry*, 2005, 339: 69–72.
46. **Dubois N, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F.** Colorimetric method for the determination of sugars and related substances. *Analitical Chemistry*, 1956, 28: 350–356.
47. **Kang C, Lee C, Chung K, Choi E, Kim B.** An Antitumor Component of *Laetiporus sulphureus* and its Immunostimulating Activity. *Archives of Pharmacal Research*, 5, str. 2: 39–43.