

Univerza  
v Ljubljani *Medicinska*  
fakulteta



Mirjan ŠVAGELJ

# **Kultivacija in pridobivanje imunsko aktivnih sestavin glive *Grifola frondosa***

Imenovanje mentorja na seji senata dne XYZ

Imenovanje somentorja na seji senata dne XYZ

Komisija za oceno in zagovor imenovana na seji senata dne 21. 11. 2011

Datum zagovora:

Mentor:

Somentor:

Predsednik komisije:

Član:

Član:

Naloga je delo lastnega raziskovalnega dela.

Mirjan Švagelj

ZAHVALA

IZVLEČEK

Gliva *Grifola frondosa* (Dicks.: Fr.) S.F. Gray je užitna goba, ki vsebuje tudi fiziološko aktivne učinkovine izmed katerih so najboljše preučeni  $\beta$ -glukani. Zaradi vedno večjega povpraševanja po izdelkih iz gob in ker količina v naravi rastočih gliv ne zadošča za izolacijo biološko aktivnih učinkovin smo preverili možnost gojenja glivne biomase z uporabo sodobnih biotehnoloških postopkov in preverili aktivnost pripravkov, pridobljenih z novimi tehnologijami. Za pridobivanje biomase in pripravkov smo preverili večje število sevov, katere smo gojili po treh različnih bioprocenih postopkih. Gobo smo vzgojili na farmi gob (klasično pridelovanje) in z dvema sodobnima bioprocenima postopkoma – gojenju na trdnem gojišču in gojenju v tekočem gojišču. Pri gojenju na trdnem gojišču smo preverili in optimizirali različne kombinacije gojišč, različne produkcijske načine in bioprocen povečali v večje merilo. Pri gojenju v tekočem gojišču smo preverili različne izvedbe gojenja v tekočem gojišču in optimizirali gojišča ter bioprocen parametre. Med seboj smo nato primerjali produktivnosti posameznih bioprocenov. Iz biomase smo pripravili pripravke, katerim smo določili vsebnost polisaharidov ( $\alpha$ - in  $\beta$ -glukanov) in proteinov, ter preverili, kako vplivajo na indukcijo sinteze citokina TNF- $\alpha$  v humanih mononuklearnih celicah periferne krvi (PBMC). Preverili smo tudi, kako pripravki vplivajo na izražanje genov za receptorje, ki prepoznavajo komponente celičnih sten gliv (dektin-1, TLR2, TLR4 in MR). Ugotovili smo, da je najboljši način proizvodnje glivne biomase, gojenje v tekočem gojišču, saj smo uspeli dobiti velike količine biomase in zunajceličnih polisaharidov v relativno kratkem času in z dobro aktivnostjo. Pripravki, pridobljeni po različnih bioprocenih načinih proizvodnje med seboj razlikujejo. Ugotovili smo, da imajo pripravki iz gojenja v tekočem gojišču največjo sposobnost sproščanja citokina TNF- $\alpha$  iz PBMC in da ni pomembnih razlik med polisaharidi celične stene in zunajceličnimi polisaharidi. Sledijo jim pripravki iz gojenja na trdnem gojišču, za pripravke iz trosnjakov pa zaradi variabilnosti podatkov tega ne moremo trditi. Korelacija med vsebnostjo  $\beta$ -glukanov in sproščanjem citokina TNF- $\alpha$  je dobra, čeprav bi potrebno bilo raziskati tudi vpliv proteinov. Korelacija je bila boljša pri pripravkih iz gojenja v tekočem gojišču. Pripravki, pripravljene po različnih bioprocenih načinih, različno vplivajo na izražanje genov za receptorje, ki prepoznavajo komponente celičnih sten gliv. Pripravki, pridobljeni iz trosnjakov in gojenja v tekočem gojišču, vplivajo na zmanjšanje izražanja gena za

receptor dektin-1, kar kaže na njegovo aktivacijo. Pripravki iz gojenja na trdnem gojišču pa po drugi strani vplivajo na povečano izražanje genov za receptorja TLR2 in TLR4. Povečano izražanje gena za manozni receptor, pa smo ugotovili zgolj pri pripravkih, pridobljenih iz trosnjakov.

## ABSTRACT

*Grifola frondosa* (Dicks.: Fr.) S.F. Gray is a culinary-medicinal fungus rich with physiologically active compounds, mainly  $\beta$ -glucans. The market for nutritional supplements made from this mushroom is expanding and the amount of wild mushrooms is limited and not sufficient for the production of new products. We have evaluated three different production techniques – farming for the production of fruiting bodies, solid-state and submerged liquid fermentation for the production of mycelium. Solid-state fermentations were done in different bioreactor types on different substrates. We scaled up the solid-state fermentation from laboratory to the pilot scale. Submerged liquid fermentations were similarly conducted in different bioreactor types and we optimized the media composition and cultivation parameters. We compared the productivity between the production techniques. After we obtained sufficient biomass, we made extracts (MD-fraction) and analyzed them for protein and polysaccharide ( $\alpha$ - and  $\beta$ -glucans) content and tested them on human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) for their ability to induce the secretion of TNF- $\alpha$ . We also evaluated the extracts for their ability to influence the expression of several pattern-recognition receptors (Dectin-1, TLR2, TLR4, MR). Submerged liquid fermentation was considered superior to other production techniques as we were able to obtain large amounts of biomass in a short period of time and with good activity. We also demonstrated that extracts obtained from different production techniques are different in their composition and bioactivity. Extracts obtained from submerged liquid fermentations had higher capacities to induce TNF- $\alpha$  from PBMC and there were no differences in intracellular and extracellular polysaccharides. Extracts from solid-state fermentations had a lower capacity to induce TNF- $\alpha$  from PBMC. Extracts obtained from fruiting bodies had a very high variability in their activity. We established a correlation between the  $\beta$ -glucan content in extracts and their activity and this correlation was better in extracts from the submerged liquid fermentation. There was also evidence that proteins could be in part responsible for activity. Extracts obtained from different production techniques showed a different pattern in the expression of genes coding for pattern-recognition receptors. Extracts obtained from fruiting bodies or biomass obtained from

submerged liquid fermentations decreased the expression of Dectin-1 implying its activation. Extracts obtained from solid-state fermentations increased the expression of genes coding for TLR2 and TLR4. An increase in the expression of the gene coding for MR was only seen for extracts obtained from fruiting bodies.

**KAZALO VSEBINE**

	Str.
Izveček	III
Abstract	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	XI
Kazalo slik	XXV
Okrajšave in simboli	XXI
<b>1 UVOD</b>	<b>1</b>
<b>1.1 NAMEN DELA</b>	<b>31</b>
<b>1.2 RAZISKOVALNE HIPOTEZE</b>	<b>32</b>
<b>2 PREGLED LITERATURE</b>	<b>33</b>
<b>2.1 GOJENJE GLIVE <i>G. FRONDOSA</i></b>	<b>33</b>
<b>2.1.1 Gojenje trosnjakov glive <i>G. frondosa</i></b>	<b>33</b>
<b>2.1.2 Gojenje glive <i>G. frondosa</i> na trdnem gojišču</b>	<b>34</b>
<b>2.1.3 Gojenje glive <i>G. frondosa</i> v tekočem gojišču</b>	<b>35</b>
2.1.3.1 Sestavine tekočega gojišča	35
2.1.3.2 Optimizacije gojišč in parametrov za gojenje glive <i>G. frondosa</i>	37
2.1.3.3 Vpliv olja na rast glive v tekočem gojišču	39
2.1.3.4 Morfologija glive <i>G. frondosa</i> pri gojenju v tekočem gojišču	40

<b>2.2</b>	<b>BIOLOŠKO AKTIVNE KOMPONENTE GLIVE <i>G. frondosa</i></b>	<b>42</b>
<b>2.2.1</b>	<b>Pomen <math>\beta</math>-glukanov</b>	<b>42</b>
<b>2.2.2</b>	<b>Polisaharidi, proteoglikani in glikopeptidi izolirani iz glive <i>G. frondosa</i></b>	<b>44</b>
2.2.2.1	Polisaharidi izolirani iz trosnjakov	45
2.2.2.2	Polisaharidi izolirani iz micelija in fermentacijske brozge	46
2.2.2.3	D in MD frakcija	46
<b>2.2.3</b>	<b>Druge komponente</b>	<b>47</b>
<b>2.3</b>	<b>BIOLOŠKE AKTIVNOSTI KOMPONENT GLIVE <i>G. frondosa</i></b>	<b>47</b>
<b>3</b>	<b>MATERIALI IN METODE</b>	<b>50</b>
<b>3.1</b>	<b>APARATURE</b>	<b>50</b>
<b>3.3</b>	<b>ORGANIZEM</b>	<b>51</b>
<b>3.4</b>	<b>PRESEJALNI TESTI SEVOV</b>	<b>52</b>
<b>3.4.1</b>	<b>Presejalni test z gojenjem na trdnem gojišču</b>	<b>52</b>
<b>3.4.2</b>	<b>Presejalni test z gojenjem v tekočem gojišču</b>	<b>53</b>
<b>3.5</b>	<b>GOJENJE TROSNJAKOV</b>	<b>54</b>
<b>3.5.1</b>	<b>Sestave gojišč in priprava vcepkov</b>	<b>54</b>
<b>3.5.2</b>	<b>Sterilizacija in inkubacija</b>	<b>57</b>
<b>3.5.3</b>	<b>Določitev BE, dobitok pripravkov in produktivnosti bioprocesa</b>	<b>57</b>
<b>3.6</b>	<b>GOJENJE NA TRDNEM GOJIŠČU</b>	<b>58</b>
<b>3.6.1</b>	<b>Merjenje hitrosti rasti v steklenih tulcih</b>	<b>58</b>
<b>3.6.2</b>	<b>Gojenje v steklenih kozarcih</b>	<b>59</b>
3.6.2.1	Rast na PDA in metoda določevanja biomase	60
3.6.2.2	Gojenje v steklenih kozarcih	61
<b>3.6.3</b>	<b>Gojenje v laboratorijskem bioreaktorju</b>	<b>62</b>
3.6.3.1	Priprava vcepka	64

3.6.3.2	Gojišče in procesni parametri	65
3.6.3.3	Vzorčenje, določitev biomase in polisaharidov	65
<b>3.6.4</b>	<b>Gojenje v pilotnem horizontalnem mešalnem bioreaktorju</b>	<b>66</b>
3.6.4.1	Priprava vcepka	68
3.6.4.2	Potek sterilizacije in cepljenje	68
3.6.4.3	Gojišča in procesni parametri	68
3.6.4.4	Vzorčenje, določitev biomase in polisaharidov	69
<b>3.6.5</b>	<b>Metoda odzivnih ploskev za študij vpliva hranilnih komponent na rast in vsebnost <math>\beta</math>-glukanov na trdnem gojišču</b>	<b>69</b>
3.6.5.1	Metoda odzivnih ploskev	69
3.6.5.2	Priprava gojišča in zasnova eksperimenta	70
<b>3.7</b>	<b>GOJENJE V TEKOČEM GOJIŠČU</b>	<b>72</b>
<b>3.7.1</b>	<b>Izbira gojišča</b>	<b>72</b>
<b>3.7.2</b>	<b>Gojenje v mirujoči kulturi</b>	<b>73</b>
3.7.2.1	Vcepek	74
3.7.2.2	Gojišče, inkubacija in vzorčenje	74
3.7.2.3	Določevanje biomase	75
3.7.2.4	Določevanje polisaharidov	75
<b>3.7.3</b>	<b>Gojenje v mešalnem bioreaktorju</b>	<b>75</b>
3.7.3.1	Bioreaktorji	76
3.7.3.2	Vcepek	78
3.7.3.3	Gojišče	80
3.7.3.4	Poskusi v mešalnih bioreaktorjih	80
<b>3.7.3</b>	<b>Gojenje v bioreaktorju s polnili</b>	<b>82</b>
<b>3.7.4</b>	<b>Gojenje v koloni z mehurčki</b>	<b>84</b>
<b>3.8</b>	<b>PRIPRAVA IN (BIO)KEMIJSKA ANALIZA PRIPRAVKOV</b>	<b>86</b>

<b>3.8.1</b>	<b>Priprava grobih pripravkov</b>	<b>86</b>
<b>3.8.2</b>	<b>Določevanje vsebnosti celokupnih sladkorjev</b>	<b>87</b>
<b>3.8.3</b>	<b>Določevanje vsebnosti celokupnih glukanov, <math>\alpha</math>-glukanov in <math>\beta</math>-glukanov</b>	<b>87</b>
3.8.3.1	Določevanje vsebnosti celokupnih glukanov	88
3.8.3.2	Določevanje vsebnosti $\alpha$ -glukanov	88
3.8.3.3	Izračun vsebnosti $\beta$ -glukanov	89
<b>3.8.4</b>	<b>Določevanje vsebnosti proteinov</b>	<b>90</b>
<b>3.9</b>	<b>DOLOČEVANJE BIOLOŠKE AKTIVNOSTI</b>	<b>91</b>
<b>3.9.1</b>	<b>Določevanje indukcije sinteze vnetnega citokina TNF-<math>\alpha</math></b>	<b>91</b>
3.9.1.1	Aktivacija celic	91
3.9.1.2	Določevanje vnetnega citokina TNF- $\alpha$ s testom ELISA	94
<b>3.9.2</b>	<b>Določevanje ekspresije mRNA receptorjev za prepoznavo <math>\beta</math>-glukanov</b>	<b>94</b>
<b>4</b>	<b>REZULTATI</b>	<b>95</b>
<b>4.1</b>	<b>PRESEJALNI TESTI SEVOV</b>	<b>95</b>
4.1.1	Presejalni test z gojenjem na trdnem gojišču	95
4.1.2	Presejalni test z gojenjem v tekočem gojišču	95
<b>4.2</b>	<b>GOJENJE TROSNJAKOV</b>	<b>96</b>
<b>4.3</b>	<b>GOJENJE NA TRDNEM GOJIŠČU</b>	<b>101</b>
4.3.1	Merjenje hitrosti rasti v steklenih tulcih	101
4.3.2	Gojenje v steklenih kozarcih	103
4.3.3	Gojenje v laboratorijskem bioreaktorju	107
4.3.4	Gojenje v pilotnem mešalnem bioreaktorju	110
4.3.5	Metoda odzivnih ploskev za študij vpliva hranilnih komponent na rast in vsebnost $\beta$ -glukanov na trdnem gojišču	114
<b>4.4</b>	<b>GOJENJE V TEKOČEM GOJIŠČU</b>	<b>130</b>
4.4.1	Izbira gojišča	130

<b>4.4.2</b>	<b>Gojenje v tekočem gojišču brez mešanja</b>	<b>132</b>
<b>4.4.3</b>	<b>Gojenje v mešalnem bioreaktorju</b>	<b>134</b>
<b>4.4.4</b>	<b>Gojenje v bioreaktorju s polnili</b>	<b>138</b>
<b>4.4.5</b>	<b>Gojenje v koloni z mehurčki</b>	<b>139</b>
<b>4.5</b>	<b>BIOLOŠKA AKTIVNOST PRIPRAVKOV IZ GLIVE</b>	<b>145</b>
<b>4.5.1</b>	<b>Vpliv na indukcijo sinteze vnetnega citokina TNF-<math>\alpha</math></b>	<b>145</b>
4.5.1.1	Biološka aktivnost pripravkov iz trosnjakov	145
4.5.1.2	Biološka aktivnost pripravkov iz gojenja na trdnem gojišču	146
4.5.1.3	Biološka aktivnost pripravkov iz gojenja v tekočem gojišču	148
4.5.1.4	Korelacije med sestavo pripravkov in indukcijo sinteze TNF- $\alpha$	149
4.5.1.6	Primerjava pripravkov iz različnih načinov gojenja in njihov vpliv na indukcijo sinteze TNF- $\alpha$	154
<b>4.5.2</b>	<b>Vpliv na ekspresijo genov mRNA za receptorje, ki prepoznavajo dele celičnih sten gliv</b>	<b>156</b>
4.5.2.1	Primerjava pripravkov iz različnih načinov gojenja in njihov vpliv na ekspresijo genov receptorjev, ki prepoznavajo komponente celičnih sten gliv	163
<b>5</b>	<b>DISKUSIJA</b>	<b>168</b>
<b>5.1</b>	<b>PRESEJALNI TESTI SEVOV</b>	<b>168</b>
<b>5.2</b>	<b>GOJENJE TROSNJAKOV</b>	<b>169</b>
<b>5.3</b>	<b>GOJENJE NA TRDNEM GOJIŠČU</b>	<b>172</b>
<b>5.3.1</b>	<b>Merjenje hitrosti rasti v steklenih tulcih</b>	<b>172</b>
<b>5.3.2</b>	<b>Gojenje v steklenih kozarcih</b>	<b>173</b>
<b>5.3.3</b>	<b>Gojenje v laboratorijskem bioreaktorju</b>	<b>174</b>
<b>5.3.4</b>	<b>Gojenje v pilotnem mešalnem bioreaktorju</b>	<b>176</b>
<b>5.3.5</b>	<b>Metoda odzivnih ploskev za študij vpliva hranilnih komponent na rast in vsebnost <math>\beta</math>-glukanov na trdnem gojišču</b>	<b>177</b>

<b>5.4</b>	<b>GOJENJE V TEKOČEM GOJIŠČU</b>	<b>179</b>
<b>5.4.1</b>	<b>Izbira gojišča</b>	<b>179</b>
<b>5.4.2</b>	<b>Gojenje v mirujoči kulturi</b>	<b>181</b>
<b>5.4.3</b>	<b>Gojenje v mešalnem bioreaktorju</b>	<b>182</b>
<b>5.4.4</b>	<b>Gojenje v reaktorju s polnili</b>	<b>183</b>
<b>5.4.5</b>	<b>Gojenje v koloni z mehurčki</b>	<b>183</b>
<b>5.5</b>	<b>PRIMERJAVA PRIPRAVKOV IZ RAZLIČNIH NAČONOV GOJENJA NA BIOLOŠKO AKTIVNOST</b>	<b>160</b>
<b>5.6</b>	<b>PRIMERJAVA PRODUKTIVNOSTI POSAMEZNIH BIOPROCESOV</b>	<b>187</b>
<b>5.7</b>	<b>VPLIV NA IZRAŽANJE GENOV, KI PREPOZNAVAJO CELIČNE KOMPONENTE GLIV</b>	<b>189</b>
<b>6</b>	<b>SKLEPI</b>	<b>192</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURA</b>	<b>194</b>

**KAZALO PREGLEDNIC**

Preglednica 1: Pregled gojišč za gojenje glive <i>G. frondosa</i> v tekočem gojišču.	36
Preglednica 2: Optimizirana gojišča za glivo <i>G. frondosa</i> .	38
Preglednica 3: Vpliv koncentracije kisika ter dodatka olivnega olja pri gojenju glive <i>G. frondosa</i> na tvorbo biomase ter polisaharidov.	40
Preglednica 4 : Uporabljeni sev, vcepek in sestava gojišča za gojenje trosnjakov.	55
Preglednica 5: Sestava vcepkov uporabljenih pri prvem poskusu gojenja.	55
Preglednica 6 : Sestave gojišč pri drugem poskusu gojenja.	56
Preglednica 7: Sestava gojišč za določanje hitrosti rasti v steklenih tulcih.	59
Preglednica 8 : Sestava substratov za drugi poskus gojenja v kozarcih.	62
Preglednica 9: Sestava gojišč in pretok zraka pri gojenju v laboratorijskem bioreaktorju za gojenje na trdnem gojišču.	65
Preglednica 10: Shema poskusov v pilotnem bioreaktorju.	69
Preglednica 11: Sestave gojišč za metodo odzivnih ploskev.	70
Preglednica 12: Sestave preverjenih gojišč za gojenje v tekočem gojišču.	73
Preglednica 13: Prva faza poskusov v mešalnih bioreaktorjih.	81
Preglednica 14: Procesni parametri pri gojenju v mešalnem bioreaktorju KLF.	82
Preglednica 15: Procesni parametri in sestava gojišča za gojenje v koloni z mehurčki.	86

Preglednica 16: Pripravki iz trosnjakov, katerim smo določili sposobnost indukcije TNF- $\alpha$ .	92
Preglednica 17: Pripravki iz gojenja na trdnem gojišču, katerim smo določili sposobnost indukcije TNF- $\alpha$ .	92
Preglednica 18: Pripravki iz gojenja v tekočem gojišču, katerim smo določili sposobnost indukcije TNF- $\alpha$ .	93
Preglednica 19: Čas gojenja, BE, dobitok trosnjakov in vsebnost vode v trosnjakih pri prvem gojenju.	97
Preglednica 20: Masa ekstraktov, izkoristek ekstrakcije, vsebnost sladkorjev in proteinov v pripravkih pri prvem gojenju.	97
Preglednica 21: Vsebnost celokupnih glukanov, $\alpha$ -glukanov in $\beta$ -glukanov v pripravkih pri prvem gojenju.	98
Preglednica 22: Čas gojenja, BE, dobitok trosnjakov in vsebnost vode v trosnjakih pri drugem gojenju.	98
Preglednica 23: Masa ekstraktov, izkoristek ekstrakcije, vsebnost sladkorjev in proteinov v pripravkih pri drugem gojenju.	99
Preglednica 24: Vsebnost celokupnih glukanov, $\alpha$ -glukanov in $\beta$ -glukanov v pripravkih pri drugem gojenju.	99
Preglednica 25: Produktivnost gojenja trosnjakov.	100
Preglednica 26: Čas gojenja, količina biomase in vsebnost ergosterola.	104
Preglednica 27: Izkoristek ekstrakcije pri gojenju na trdnih gojiščih v steklenih kozarcih.	106
Preglednica 28: Produktivnost gojenja na trdnem gojišču v kozarcih.	106
Preglednica 29: Izkoristek ekstrakcije, vsebnost sladkorjev, proteinov in glukanov pri gojenju na trdnih gojiščih v laboratorijskem bioreaktorju.	109
Preglednica 30: Produktivnost gojenja na trdnem gojišču v laboratorijskem bioreaktorju.	110
Preglednica 31: Površina micelija na različnih gojiščih v odvisnosti od časa.	115

Preglednica 32: Linearne in eksponentne enačbe rasti različnih vzorcev na trdnih gojiščih.	116
Preglednica 33: Vsebnost celokupnih glukanov, $\alpha$ -glukanov in $\beta$ -glukanov v miceliju gojenem na različnih trdnih gojiščih.	117
Preglednica 34: Produktivnost gojenja v tekočem gojišču v erlenmajericah različnih volumnov.	134
Preglednica 35: Vsebnost sladkorjev, proteinov in glukanov polisaharidov celične stene in zunajceličnih polisaharidov pri najboljši fermentacij v mešalnem bioreaktorju.	137
Preglednica 36: Vpliv hitrosti mešanja v mešalnem bioreaktorju na produktivnost.	138
Preglednica 37: Vsebnost sladkorjev, proteinov in glukanov polisaharidov celične stene pri gojenju v tekočem gojišču v koloni z mehurčki.	143
Preglednica 38: Vsebnost sladkorjev, proteinov in glukanov zunajceličnih polisaharidov pri gojenju v tekočem gojišču v koloni z mehurčki.	143
Preglednica 39: Vpliv pretoka zraka na produktivnost pri gojenju v tekočem gojišču v koloni z mehurčki.	144
Preglednica 40: Vpliv gojišča na produktivnost pri gojenju v tekočem gojišču v koloni z mehurčki.	144
Preglednica 41: Indukcija sinteze citokina TNF- $\alpha$ s pripravki prve faze gojenja trosnjakov.	145
Preglednica 42: Indukcija sinteze citokina TNF- $\alpha$ s pripravki druge faze gojenja trosnjakov.	146
Preglednica 43: Indukcija sinteze citokina TNF- $\alpha$ s pripravki pridobljenimi z gojenjem na trdnem gojišču v različnih sistemih.	147
Preglednica 44: Indukcija sinteze citokina TNF- $\alpha$ s pripravki pridobljenimi z gojenjem na trdnem gojišču v laboratorijskem bioreaktorju na različnih gojiščih.	147

Preglednica 45: Indukcija sinteze citokina TNF- $\alpha$ s pripravki pridobljenimi z gojenjem v tekočem gojišču v koloni z mehurčki na različnih gojiščih.	148
Preglednica 46: Indukcija sinteze citokina TNF- $\alpha$ s pripravki pridobljenimi z gojenjem v tekočem gojišču v mešalnem bioreaktorju na različnih gojiščih.	149
Preglednica 47: Sestave pripravkov in vpliv na indukcijo sinteze TNF- $\alpha$ .	150
Preglednica 48: Korelacija med posameznimi komponentami in sposobnostjo indukcije sinteze TNF- $\alpha$ z upoštevanjem vseh pripravkov.	151
Preglednica 49: Korelacija med posameznimi komponentami in sposobnostjo indukcije sinteze TNF- $\alpha$ z upoštevanjem le pripravkov iz trosnjakov.	152
Preglednica 50: Korelacija med posameznimi komponentami in sposobnostjo indukcije sinteze TNF- $\alpha$ z upoštevanjem le pripravkov iz gojenja na trdnem gojišču.	153
Preglednica 51: Korelacija med posameznimi komponentami in sposobnostjo indukcije sinteze TNF- $\alpha$ z upoštevanjem le pripravkov iz gojenja v tekočem gojišču.	154
Preglednica 52: Korelacija med sposobnostjo sproščanja TNF- $\alpha$ in ekspresijo genov z upoštevanjem vseh pripravkov.	162
Preglednica 53: Korelacija med sposobnostjo sproščanja TNF- $\alpha$ in ekspresijo genov z upoštevanjem pripravkov dobljenih iz trosnjakov.	162
Preglednica 54: Korelacija med sposobnostjo sproščanja TNF- $\alpha$ in ekspresijo genov z upoštevanjem pripravkov dobljenih iz gojenja v trdnem gojišču.	162
Preglednica 55: Korelacija med sposobnostjo sproščanja TNF- $\alpha$ in ekspresijo genov z upoštevanjem pripravkov dobljenih iz gojenja v tekočem gojišču.	162
Preglednica 56: Sestave preverjenih gojišč za gojenje v tekočem gojišču.	179
Preglednica 57: Primerjava produktivnosti najboljših bioprosesov za posamezen način gojenja	188

**KAZALO SLIK**

SLIKA 1: SHEMA POTENCIALNE IN DEJANSKE UPORABE GLIV.	1
SLIKA 2: TROSNJAK GLIVE <i>G. FRONDOSA</i> .	4
SLIKA 3: MORFOLOGIJA GLIVE <i>G. FRONDOSA</i> PRI RAZLIČNIH PROCESNIH POGOJIH.	14
SLIKA 4: SLIKA MICELIJA GLIVE <i>G. FRONDOSA</i> Z ELEKTRONSKIM MIKROSKOPOM POD RAZLIČNIMI KULTIVACIJSKIMI POGOJI.	15
SLIKA 5: STRUKTURA B-GLUKANA KOT GA NAJDEMO PRI GLIVAH.	17
SLIKA 6: SHEMA STRUKTURE CELIČNE STENE GLIV.	17
SLIKA 7: BIOLOŠKE AKTIVNOSTI GLIVE <i>GRIFOLA FRONDOSA</i> .	21
SLIKA 8: PRESEJALNI TEST SEVOV NA GOJIŠČU PDA IN RAČUNALNIŠKA OBDELAVA SLIK.	25
SLIKA 9: ERLIENMAJERICE NAPOLNJENE Z GOJIŠČEM ZA PRESEJALNI TEST SEVOV V TEKOČEM GOJIŠČU.	26
SLIKA 10: RAST V STEKLENIH TULCIH.	31
SLIKA 11 : PRERAŠČENO TRDNO GOJIŠČE V STEKLENEM KOZARCU.	34
SLIKA 12: SHEMA LABORATORIJSKEGA BIOREAKTORJA LASTNE IZDELAVE ZA GOJENJE NA TRDNEM GOJIŠČU.	36
SLIKA 13: LABORATORIJSKI BIOREAKTOR ZA GOJENJE NA TRDNEM GOJIŠČU.	37
SLIKA 14: SHEMA PILOTNEGA MEŠALNEGA BIOREAKTORJA.	39
SLIKA 15: PILOTNI MEŠALNI BIOREAKTOR - HORIZONTALNA POZICIJA.	40
SLIKA 16: PILOTNI MEŠALNI BIOREAKTOR - VERTIKALNA POZICIJA.	40
SLIKA 17: RAST GLIVE <i>G. FRONDOSA</i> V MIRUJOČI KULTURI.	47
SLIKA 18: MEŠALNI BIOREAKTOR KLF Z DELOVNIM VOLUMNOM 2 L.	49
SLIKA 19: MEŠALNI BIOREAKTOR Z DELOVNIM VOLUMNOM 7 L.	50
SLIKA 20: MEŠALNI BIOREAKTOR Z DELOVNIM VOLUMNOM 10 L.	50
SLIKA 21: MEŠALNI BIOREAKTOR Z DELOVNIM VOLUMNOM 18 L.	51
SLIKA 22: PRVA VARIANTA VCEPKA ZA UPORABO V MEŠALNIH BIOREAKTORJIH (VCEPEK V OBLIKI PELETOV).	52

SLIKA 23: DRUGA VARIANTA VCEPKA ZA UPORABO V MEŠALNIH BIOREAKTORJIH (ZMLET VCEPEK).	53
SLIKA 24: SHEMA LABORATORIJSKEGA BIOREAKTORJA LASTNE IZDELAVE ZA GOJENJE V TEKOČEM GOJIŠČU NA TRDNIH NOSILCIH.	56
SLIKA 25: LABORATORIJSKI BIOREAKTOR ZA GOJENJE V TEKOČEM GOJIŠČU NA TRDNIH NOSILCIH.	57
SLIKA 26: BIOREAKTOR ZA GOJENJE V TEKOČEM GOJIŠČU - KOLONA Z MEHURČKI.	58
SLIKA 27: FILTRACIJA IN PRECIPITACIJA POLISAHARIDOV.	60
SLIKA 28: SPEKTROFOTOMETRIČNO DOLOČEVANJE B-GLUKANOV.	63
SLIKA 29: IZOLACIJA PBMC IZ KRVI.	66
SLIKA 30: RAST MICELIJA RAZLIČNIH SEVOV NA GOJIŠČU PDA V PETRIJEVKAH.	68
SLIKA 31: DOBITEK BIOMASE, POLISAHARIDOV CELIČNE STENE IN ZUNAJCELIČNIH POLISAHARIDOV PRI RAZLIČNIH SEVIH V TEKOČEM GOJIŠČU.	69
SLIKA 32 - 4.3.1: KRIVULJE RASTI PRI GOJENJU V STEKLENIH TULCIH.	74
SLIKA 33 - 4.3.2: MIKROSKOPSKA SLIKA MICELIJA PRERAŠČENEGA NA GOJIŠČU IZ SMREKOVEGA ŽAGANJA.	75
SLIKA 34: MIKROSKOPSKA SLIKA MICELIJA PRERAŠČENEGA NA GOJIŠČU IZ VINSKE TRTE.	75
SLIKA 35: MIKROSKOPSKA SLIKA MICELIJA PRERAŠČENEGA NA GOJIŠČU IZ KORUZNICE.	76
SLIKA 36: KRIVULJE RASTI PRI GOJENJU V STEKLENIH KOZARCIH.	77
SLIKA 37: VSEBNOST VODE PRI GOJENJU V STEKLENIH KOZARCIH.	78
SLIKA 38: KRIVULJE RASTI PRI GOJENJU V STEKLENIH KOZARCIH NA GOJIŠČU IZ KORUZNICE Z DODATKI OLJČNEGA OLJA.	78
SLIKA 39: VPLIV PRETOKA ZRAKA NA KOLIČINO BIOMASE NA TRDNEM GOJIŠČU V LABORATORIJSKEM BIOREAKTORJU.	80
SLIKA 40: VPLIV VSEBNOSTI OLJA V GOJIŠČU NA KOLIČINO BIOMASE NA TRDNEM GOJIŠČU V LABORATORIJSKEM BIOREAKTORJU.	81
SLIKA 41: VPLIV PRETOKA ZRAKA NA VSEBNOST VODE V TRDNEM GOJIŠČU V LABORATORIJSKEM BIOREAKTORJU.	82
SLIKA 42: GOJENJE V PILOTNEM MEŠALNEM BIOREAKTORJU.	84
SLIKA 43: RASTNE KRIVULJE ZA GOJENJE V PILOTNEM BIOREAKTORJU.	85
SLIKA 44: IZKORISTKI EKSTRAKCIJE PRI GOJENJU V PILOTNEM BIOREAKTORJU.	86

SLIKA 45: SESTAVA PRIPRAVKOV TEKOM FERMENTACIJE PRI PRVEM POSKUSU NA PILOTNEM MEŠALNEM BIOREAKTORJU.	86
SLIKA 46: ČASOVNI POTEK RASTI MICELIJA NA GOJIŠČU.	87
SLIKA 47: GRAFIČNI MODEL PROIZVODNJE BIOMASE NA TRDNEM GOJIŠČU V PRIMERU, DA SO VSI PARAMETRI NASTAVLJENI NA OPTIMALNO VREDNOST.	91
SLIKA 48: GRAFIČNI MODEL PROIZVODNJE BIOMASE NA TRDNEM GOJIŠČU V PRIMERU, DA SO VSI PARAMETRI NASTAVLJENI NA MINIMALNO MOŽNO VREDNOST.	92
SLIKA 49: GRAFIČNI MODEL LINEARNE HITROSTI RASTI NA TRDNEM GOJIŠČU V PRIMERU, DA SO VSI PARAMETRI NASTAVLJENI NA OPTIMALNO VREDNOST.	93
SLIKA 50: GRAFIČNI MODEL LINERNE HITROSTI RASTI NA TRDNEM GOJIŠČU V PRIMERU, DA SO VSI PARAMETRI NASTAVLJENI NA MINIMALNO MOŽNO VREDNOST.	94
SLIKA 51: GRAFIČNI MODEL EKSPONENTNE HITROSTI RASTI NA TRDNEM GOJIŠČU V PRIMERU, DA SO VSI PARAMETRI NASTAVLJENI NA OPTIMALNO VREDNOST.	95
SLIKA 52: GRAFIČNI MODEL EKSPONENTNE HITROSTI RASTI NA TRDNEM GOJIŠČU V PRIMERU, DA SO VSI PARAMETRI NASTAVLJENI NA MINIMALNO MOŽNO VREDNOST.	96
SLIKA 53: GRAFIČNI MODEL VSEBNOSTI CELOKUPNEGA GLUKANA NA TRDNEM GOJIŠČU V PRIMERU, DA SO VSI PARAMETRI NASTAVLJENI NA OPTIMALNO VREDNOST.	97
SLIKA 54: GRAFIČNI MODEL VSEBNOSTI CELOKUPNEGA GLUKANA NA TRDNEM GOJIŠČU V PRIMERU, DA SO VSI PARAMETRI NASTAVLJENI NA MINIMALNO MOŽNO VREDNOST.	98
SLIKA 55: GRAFIČNI MODEL VSEBNOSTI A-GLUKANA NA TRDNEM GOJIŠČU V PRIMERU, DA SO VSI PARAMETRI NASTAVLJENI NA OPTIMALNO VREDNOST.	99
SLIKA 56: GRAFIČNI MODEL VSEBNOSTI A-GLUKANA NA TRDNEM GOJIŠČU V PRIMERU, DA SO VSI PARAMETRI NASTAVLJENI NA MINIMALNO MOŽNO VREDNOST.	100
SLIKA 57: GRAFIČNI MODEL VSEBNOSTI B-GLUKANA NA TRDNEM GOJIŠČU V PRIMERU, DA SO VSI PARAMETRI NASTAVLJENI NA OPTIMALNO VREDNOST.	101
SLIKA 58: GRAFIČNI MODEL VSEBNOSTI B-GLUKANA NA TRDNEM GOJIŠČU V PRIMERU, DA SO VSI PARAMETRI NASTAVLJENI NA MINIMALNO MOŽNO VREDNOST.	102
SLIKA 59: DOBITEK BIOMASE, POLISAHARIDOV CELIČNE STENE IN ZUNAJCELIČNIH POLISAHARIDOV PRI PREVERJANJU RAZLIČNIH GOJIŠČ V TEKOČEM GOJIŠČU.	103
SLIKA 60: DOBITEK BIOMASE, POLISAHARIDOV CELIČNE STENE IN ZUNAJCELIČNIH POLISAHARIDOV PRI PREVERJANJU DODATKA OLIČNEGA OLJA V TEKOČEM GOJIŠČU.	104

SLIKA 61: VPLIV VOLUMNA GOJITVENE POSODE (ERLENMAJERICE) NA DOBITEK BIOMASE V TEKOČEM GOJIŠČU V MIRUJOČI KULTURI.	105
SLIKA 62: VPLIV VOLUMNA GOJITVENE POSODE (ERLENMAJERICE) NA DOBITEK POLISAHARIDOV CELIČNE STENE V TEKOČEM GOJIŠČU V MIRUJOČI KULTURI.	105
SLIKA 63: VPLIV VOLUMNA GOJITVENE POSODE (ERLENMAJERICE) NA DOBITEK ZUNAJCELIČNIH POLISAHARIDOV V TEKOČEM GOJIŠČU V MIRUJOČI KULTURI.	106
SLIKA 64: RAST MICELIJA V TEKOČEM GOJIŠČU V MEŠALNIH BIOREAKTORJIH.	107
SLIKA 65: VPLIV HITROSTI MEŠANJA NA DOBITEK BIOMASE V MEŠALNEM BIOREAKTORJU KLF.	108
SLIKA 66: VPLIV HITROSTI MEŠANJA NA VSEBNOST POLISAHARIDOV CELIČNE STENE V MEŠALNEM BIOREAKTORJU KLF.	108
SLIKA 67: VPLIV HITROSTI MEŠANJA NA VSEBNOST ZUNAJCELIČNIH POLISAHARIDOV V MEŠALNEM BIOREAKTORJU KLF 2.	109
SLIKA 68: VSEBNOST BIOMASE, POLISAHARIDOV CELIČNE STENE IN ZUNAJCELIČNIH POLISAHARIDOV PRI GOJENJU V BIOREAKTORJU S POLNILI.	111
SLIKA 69: VPLIV PRETOKA ZRAKA NA DOBITEK BIOMASE V KOLONI Z MEHURČKI.	112
SLIKA 70: VPLIV DODATKA OLJČNEGA OLJA NA DOBITEK BIOMASE V KOLONI Z MEHURČKI.	113
SLIKA 71: VSEBNOST POLISAHARIDOV CELIČNE STENE PRI RAZLIČNIH PRETOKIH ZRAKA V KOLONI Z MEHURČKI.	113
SLIKA 72: VSEBNOST ZUNAJCELIČNIH POLISAHARIDOV PRI RAZLIČNIH PRETOKIH ZRAKA V KOLONI Z MEHURČKI.	114
SLIKA 73: VPLIV DODATKA OLJČNEGA OLJA NA DOBITEK POLISAHARIDOV CELIČNE STENE V KOLONI Z MEHURČKI.	115
SLIKA 74: VPLIV DODATKA OLJČNEGA OLJA NA DOBITEK ZUNAJCELIČNIH POLISAHARIDOV V KOLONI Z MEHURČKI.	115
SLIKA 75: VPLIV PRIPRAVKOV IZ GLIVE <i>G. FRONDOSA</i> IZ RAZLIČNIH NAČINOV GOJENJA NA SINTEZO TNF-A V HUMANIH PBMC IN VITRO..	127
SLIKA 76: GRAF POMNOŽEVANJA TARČNEGA ZAPOREDJA Z METODO RT-PCR V REALNEM ČASU	128
SLIKA 77: VPLIV PRIPRAVKOV 1, 4 IN 8 IZ TROSNJAKOV GLIVE <i>G. FRONDOSA</i> NA IZRAŽANJE MRNA RECEPTORJEV DEKTINA-1, TLR2, TLR4 IN MR V HUMANIH PBMC..	129

SLIKA 78: VPLIV PRIPRAVKOV 17 (IZ KOZARCEV), 21 (IZ LABORATORIJSKEGA BIOREAKTORJA) IN 22 (IZ PILOTNEGA BIOREAKTORJA) IZ GOJENJA GLIVE <i>G. FRONDOSA</i> NA TRDNEM GOJIŠČU NA IZRAŽANJE MRNA RECEPTORJEV DEKTINA-1, TLR2, TLR4 IN MR V HUMANIH PBMC..	130
SLIKA 79: VPLIV PRIPRAVKOV IZ GOJENJA GLIVE <i>G. FRONDOSA</i> NA TRDNEM GOJIŠČU PRI RAZLIČNIH DODATKIH OLJA NA IZRAŽANJE MRNA RECEPTORJEV DEKTINA-1, TLR2, TLR4 IN MR V HUMANIH PBMC.	131
SLIKA 80: VPLIV PRIPRAVKOV IZ GOJENJA GLIVE <i>G. FRONDOSA</i> V KOLONI Z MEHURČKIH PRI RAZLIČNIH DODATKIH OLJA (ZUNAJCELIČNI POLISAHARIDI) NA IZRAŽANJE MRNA RECEPTORJEV DEKTINA-1, TLR2, TLR4 IN MR V HUMANIH PBMC.	131
SLIKA 81: VPLIV PRIPRAVKOV IZ GOJENJA GLIVE <i>G. FRONDOSA</i> V KOLONI Z MEHURČKIH PRI RAZLIČNIH DODATKIH OLJA (POLISAHARIDI CELIČNE STENE) NA IZRAŽANJE MRNA RECEPTORJEV DEKTINA-1, TLR2, TLR4 IN MR V HUMANIH PBMC.	132
SLIKA 82: VPLIV PRIPRAVKOV IZ GOJENJA GLIVE <i>G. FRONDOSA</i> V MEŠALNEM BIOREAKTORJU NA IZRAŽANJE MRNA RECEPTORJEV DEKTINA-1, TLR2, TLR4 IN MR V HUMANIH PBMC.	133
SLIKA 83: VPLIV PRIPRAVKOV IZ GLIVE <i>G. FRONDOSA</i> IN RAZLIČNIH NAČINOV GOJENJA NA IZRAŽANJE MRNA DEKTINA-1 V HUMANIH PBMC.	135
SLIKA 84: VPLIV PRIPRAVKOV IZ GLIVE <i>G. FRONDOSA</i> IN RAZLIČNIH NAČINOV GOJENJA NA IZRAŽANJE MRNA TLR2 V HUMANIH PBMC.	136
SLIKA 85: VPLIV PRIPRAVKOV IZ GLIVE <i>G. FRONDOSA</i> IN RAZLIČNIH NAČINOV GOJENJA NA IZRAŽANJE MRNA TLR4 V HUMANIH PBMC.	137
SLIKA 86: VPLIV PRIPRAVKOV IZ GLIVE <i>G. FRONDOSA</i> IN RAZLIČNIH NAČINOV GOJENJA NA IZRAŽANJE MRNA MR V HUMANIH PBMC.	138

**OKRAJŠAVE IN SIMBOLI**

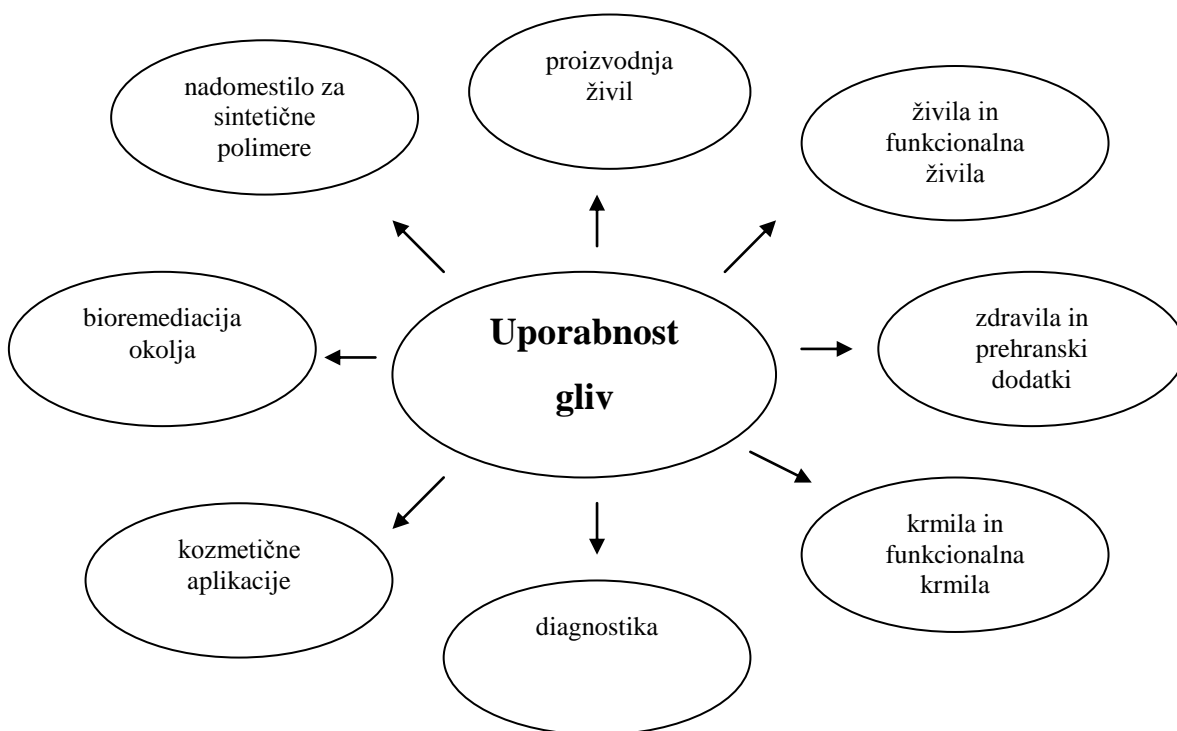
BE	biološka učinkovitost
BSA	goveji serumski albumin
ELISA	encimsko imunski test
GOPD	glukoza oksidaza-peroksidaza reagent
MR	manozni receptor
LPS	lipopolisaharid
obr./min	obrati na minuto
P <sub>Bp</sub>	produktivnost bioprocesa glede na tvorbo produkta
P <sub>Bb</sub>	produktivnost bioprocesa glede na tvorbo biomase
PBMC	mononuklearne celice periferne krvi
PCS	polisaharidi celične stene
PDA	krompirjev dekstrozni agar
PRR	angl. pattern recognition receptors
PSP/PSK	Polisaharid peptid, polisaharid-K
RPMI 1640	medij za gojenje celic (Roswell Park Memorial Institute medij)
RSM	metoda odzivnih ploskev
TLR	angl. Toll-like receptor
TNF- $\alpha$	dejavnik tumorske nekroze $\alpha$

vvm                      volumski pretok zraka na volumen gojišča na minuto

ZP                        zunajcelični polisaharidi

## 1 UVOD

Uporaba gliv, tako za prehranske kakor tudi v zdravilne namene, je poznana že več tisočletij. Uporaba v zdravilne namene je bila omejena na določene etnične skupine, katere uporabljajo le določene vrste gliv. Najbolj znana je uporaba v azijskih državah, kot so Kitajska, Japonska in Koreja (Wasser, 2005), čeprav njihova uporaba ni neznana v slovanskih državah (Pöder, 2005). Med najbolj pogosto uporabljene vrste gliv za zdravilne namene, kot so *Ganoderma lucidum* (W.Curf.: Fr.) Lloyd, *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler, *Trametes versicolor* (L.:Fr.) Pilat, *Cordyceps sinensis*, štejemo tudi glivo *Grifola frondosa* (Dicks.: Fr.) S.F. Gray, ki je bila predmet naših raziskav. Poleg svojih prehranskih in zdravilnih vrednosti, pa imajo glive še vrsto drugih uporab in so nepogrešljivi del naše biosfere (slika 1).



Slika 1: Shema potencialne in dejanske uporabe gliv.

Ocenjuje se, da poznamo le približno 10 odstotkov izmed približno 150.000 različnih vrst višjih gliv. Izmed teh desetih odstotkov, pa jih je raziskanih in karakteriziranih še bistveno manj. Večina, če ne celo vse, vsebujejo biološko aktivne polisaharide, katere lahko izoliramo iz trosnjakov, micelija ali fermentacijske brozge. Trenutno imamo podatke o

polisaharidih izoliranih iz 700 različnih vrst gliv (Wasser, 2011). Poleg polisaharidov, glive vsebujejo tudi druge bioaktivne komponente, kar pomeni, da predstavljajo še vedno zelo velik neizkoriščen potencial za proizvodnjo novih izdelkov.

Da glive predstavljajo zelo pomemben potencial za medicinske aplikacije, priča dejstvo, da je opisanih 126 različnih načinov, kako le-te vplivajo na fiziološke in biokemijske procese. Tako so opisani protitumorni učinki, imunomodulatorno delovanje, antioksidativno delovanje, vpliv na kardiovaskularni sistem, antihiperholesterolemičen učinek, protivirusni, protibakterijski, protiglivni in protiparazitni učinki, hepatoprotektivni učinki, detoksifikacijski učinki in protidiabetični učinki. Najbolj obetajoča vloga gliv za medicino je pa njihova sposobnost preprečitve onkogeneze in metastaziranja že obstoječih tumorjev (Wasser, 2011).

Imunsko aktivni pripravki, izolirani iz več kot 30 različnih vrst gliv, so pokazali dobro protitumorsko aktivnost na živalskih modelih. Raziskave so pokazale, da so imeli pripravki skupno to, da so vsebovali  $\beta$ -glukane oz.  $\beta$ -glukane povezane s peptidi oz. proteini. Številni pripravki iz gliv se uporabljajo klinično ali se proizvajajo komercialno in izmed teh so najbolj znani Krestin (PSK) in PSP iz glive *Trametes versicolor*, Lentitan iz glive *Lentinula edodes*, Schizophyllan iz glive *Schizophyllum commune* ter D in MD-frakcija, izolirani iz glive *Grifola frondosa*.

Za pripravke iz gliv se predvideva, da imajo svoj prostor med prehranskimi dodatki in danes je ta trg na leto vreden več kot 15 milijard ameriških dolarjev ter predstavlja približno 10 % celotnega trga s prehranskimi dodatki. Prehranski dodatki iz gliv imajo določene prednosti pred prehranskimi dodatki rastlinskega izvora; velika večina gliv, ki se uporabljajo za pripravo prehranskih dodatkov, so gojene komercialno v velikih količinah, kar omogoča varovanje narave in zmanjša tveganje zaradi napačne identifikacije. Ker se glive lahko razmnožuje vegetativno, to pomeni, da je možna uporaba enega organizma v daljših časovnih obdobjih, kar pomeni večjo konsistenco in kakovost izdelkov. Največja prednost gliv pa je, da se jih lahko z uporabo sodobnih biotehnoloških metod goji v bioreaktorjih pod striktno kontroliranimi pogoji (Wasser, 2011).

Gojenje trosnjakov so na Kitajskem poznali že pred več kot tisoč leti, v Evropi pa se je gojenje razširilo v 18. stoletju (Chang, 1999a; van Griensven, 2008). Prava revolucija pri gojenju gliv se je začela z uvedbo uporabe čistih kultur. Danes gojijo 35 različnih vrst trosnjakov gob, od tega 20 na industrijskem nivoju (Chang, 1999b). V Sloveniji gojimo predvsem dvotrosne kukmake ali šampinjone (*Agaricus bisporus*), šitake (*Lentinula edodes*) in bukove ostrigarje (*Pleurotus ostreatus*). Na manjšem nivoju in za raziskovalne namene pa se v Sloveniji goji še številne druge zdravilne gobe (Gregori, 2010). V začetku 20. stoletja se je začela biotehnološka revolucija, kjer se je prvič vpeljalo gojenje gliv v tekočem gojišču za proizvodnjo pekovskega kvasa, citronske kisline in antibiotikov. Ta način omogoča celoletno proizvodnjo, ki je lahko visoko standardizirana in ni odvisna od zunanjih okoljskih dejavnikov, zahteva pa večje energijske vložke. Ta način proizvodnje je zaradi višje cene prehranskih dodatkov tudi upravičen.

Viri gliv oz. micelijske biomase, z namenom priprave prehranskih dodatkov, so sledeči:

- gobe, nabrane v naravi,
- gobe, gojene v naravi,
- gobe, gojene na farmah pod kontroliranimi pogoji,
  - gojenje v vrečah,
  - gojenje v kozarcih,
  - gojenje z uporabo umetnih hlodov,
- micelijska biomasa proizvedena s pomočjo gojenja v tekočem gojišču,
- micelijska biomasa proizvedena s pomočjo gojenja na trdnem gojišču.



Slika 2: Trosnjak glive *G. frondosa* (Foto: A. Gregori).

Predmet naših raziskav na področju zdravilnih gliv je bila gliva *Grifola frondosa* (Dicks.: Fr.) S.F. Gray (slika 2), ki je užitna in vsebuje fiziološko aktivne učinkovine. Najbolj preučene komponente te glive so polisaharidi ( $\beta$ -glukani) (Shen in Royse, 2001; Zhou in Wasser, 2004), peptidi in proteini (Kawagishi s sod., 1990; Shimaoka s sod., 1993; Healy s sod., 1999; Choi s sod., 2001; Suzuki s sod. 2005) in tudi spojine z majhno molekularno maso (Lin in Liu, 2006). V naravi se pojavlja na odmrlih debelih listavcev in ima zelo omejeno področje rasti, ki je določeno s temperaturo, vlažnostjo in drugimi okoljskimi parametri. V glavnem se pojavlja v gozdovih zmernega podnebnega pasu t.j. Japonska, Združene države Amerike, Kitajska in Evropa. V Sloveniji je poznana pod imenom velika zraščanka. Količina v naravi rastočih gliv ne zadošča za izolacijo biološko aktivnih spojin za uporabo na trgu prehranskih dodatkov, zato je smiselno najti nove, moderne načine proizvodnje te glive.

## 1.1 NAMEN DELA

Namen doktorskega dela je bil:

- preveriti možnost gojenja glive *Grifola frondosa* z uporabo različnih postopkov in tehnik, tako klasičnega gojenja kakor tudi z uporabo sodobnih biotehnoloških metod,
- optimizirati sestavo substratov in proizvodne parametre pri najbolj primernih načinih proizvodnje,
- iz različnih produkcijskih postopkov s standardiziranimi izolacijskimi tehnikami pridobiti pripravke,
- pripravke ovrednotiti glede na vsebnost polisaharidov, proteinov in  $\beta$ -glukanov,
- pripravke testirati na človeških imunskih celicah.

## 1.2 RAZISKOVALNE HIPOTEZE

- predvidevamo, da je gojenje v tekočem gojišču za humano uporabo bolj primerno za proizvodnjo micelijske biomase in bioaktivnih učinkovin od gojenja na trdnem gojišču,
- pri proizvodnji trosnjakov na trdnem gojišču pričakujemo najdaljše proizvodne čase, a hkrati bolj aktivne pripravke,
- pri proizvodnji micelijske biomase na trdnih gojiščih pričakujemo najbolj intenzivno proizvodnjo, a razmeroma nečiste in posledično manj aktivne pripravke primerne za uporabo v veterini,
- pri proizvodnji micelijske biomase v tekočem gojišču pričakujemo hitro proizvodnjo aktivnih spojin in visoko aktivne pripravke,
- predvidevamo, da imajo pripravki, pridobljeni po različnih tehnoloških postopkih, drugačno vsebnost aktivnih spojin in posledično drugačno aktivnost,
- predvidevamo, da ima sestava gojišča pri vseh metodah gojenja vpliv na kemijsko sestavo ter aktivnost pripravkov,
- predvidevamo, da imajo pripravki, ki imajo večjo vsebnost  $\beta$ -glukanov, večjo biološko aktivnost (povečano sproščanje citokinov),
- predvidevamo, da pripravki, pridobljeni po različnih tehnoloških postopkih, različno vplivajo na ekspresijo genov mRNA za receptorje, ki prepoznavajo molekulske vzorce celičnih sten gliv.

## 2 PREGLED LITERATURE

### 2.1 GOJENJE GLIVE *G. FRONDOSA*

#### 2.1.1 Gojenje trosnjakov glive *G. frondosa*

Še pred kakšnimi dvajsetimi leti je bilo mogoče pridobivati glivo *Grifola frondosa* le iz naravnih habitatov. Zaradi velikega povpraševanja pa je bila prva gojitvena tehnika razvita leta 1979 (Hobbs, 1995) in leta 1981 je na Japonskem stekla prva komercialna proizvodnja trosnjakov (Takama s sod., 1981). Od takrat je Japonska tudi največja svetovna proizvajalka glive *G. frondosa* in je leta 1998 obsegala 98 % celotne svetovne proizvodnje (Chang, 1999b). Leta 1996 je ta proizvodnja obsegala 33100 ton svežih gob (Yamanaka, 1997). Rast proizvodnje glive *G. frondosa* je tudi večja od celotne rasti vseh kultiviranih gliv (Shen in Royse, 2001).

Trije glavni načini proizvodnje trosnjakov glive *G. frondosa* so gojenje v steklenicah, gojenje na prostem in gojenje v polietilenskih vrečah. Vsaka od naštetih metod ima svoje prednosti in slabosti. Gojenje v steklenicah je najbolj perspektiven način, saj omogoča skoraj popolno avtomatizacijo procesa, so pa zaradi majhnih volumnov uporabljenega gojišča pridelki nižji (Shen in Royse, 2001; Zhou in Wasser, 2004). Proizvodnja gliv na prostem se uporablja na Japonskem v zelo omejenem obsegu, saj daje slabe izkoristke ob dolgih proizvodnih časih (Mayuzumi in Mizuno, 1997; Stamets, 2000). Najbolj razširjena metoda proizvodnje trosnjakov je še vedno proizvodnja v polietilenskih vrečah, saj omogoča najboljše razmerje med hitrostjo rasti in obvladovanjem procesa (Chen s sod., 1999; Stamets, 2000; Shen in Royse, 2001; Stott in Mohammed, 2004; Gregori 2010).

Pri gojenju trosnjakov se najbolj pogosto uporablja žagovina različnih vrst listnatih dreves (Stamets, 2000; Shen in Royse, 2001; Kirchhoff, 2004), katerim se doda različne dodatke (Stamets, 2000; Shen in Royse, 2001; Kirchhoff, 2004). Dodatki žaganju lahko bistveno izboljšajo rast, biološki izkoristek in kvaliteto samih trosnjakov. Gojišču dodajo 60-65 % vode in prenesejo v vreče oz. steklenice. Gojenje glive *G. frondosa*, kakor tudi drugih gliv, pa je možno tudi na alternativnih substratih, kot so npr. oljčne tropine, pivovarske tropine, odpadni rožmarin, luščine bombaževih semen ipd. Gojenje na takšnih gojiščih predstavlja

možnost izkoriščanja odpadkov kot sekundarnih surovin in prispeva k varovanju okolja (Gregori, 2010).

### **2.1.2 Gojenje glive *G. frondosa* na trdnem gojišču**

Čeprav gojenje trosnjakov vključuje fazo gojenja na trdnem gojišču, je tam primarni namen proizvodnja trosnjakov in se surovine za gojišča izbira predvsem glede na njihovo sposobnost tvorbe trosnjakov. Če pa je primarni namen proizvodnja micelija oz. glivne biomase, govorimo o gojenju na trdnem gojišču (*solid-state cultivation* oz. *solid-state fermentation*).

Gojenje na trdnem gojišču lahko definiramo kot gojenje organizmov na vlažnih trdnih nosilcih, ki so lahko inertni ali služijo kot vir hranil (ogljika, dušika in mineralov). Gojenje se izvaja v popolni ali delni odsotnosti proste vode in je tako najbolj podobna naravnim pogojem, v katerih ti mikroorganizmi živijo v naravi (Mitchell s sod., 2000).

Pri gojenju na trdnem gojišču pride micelij v tesen stik z netopnimi delci, pri čemer je omogočena največja količina hranil za rast. Gojenje na trdnem gojišču ima določene pomanjkljivosti, med največjimi so spremljanje rasti biomase in spremljanje ter regulacija temperature, vrednosti pH, vlage in parcialnega tlaka kisika (Mitchell s sod., 2000).

Spremljanje rasti biomase je eden izmed poglavitnih razlogov, zakaj ni več podatkov o rasti na trdnem gojišču. Pri gojenju v tekočem gojišču je določanje biomase trivialno, saj lahko biomaso ločimo s pomočjo centrifugiranja ali filtracije, jo posušimo in stehtamo. Pri gojenju na trdnem gojišču, pa je micelij praktično nemogoče ločiti od gojišča in zato smo vezani na določitev komponent glive, ki so v določeni korelaciji z biomaso.

Ker je gojenje na trdnem gojišču, v primerjavi z gojenjem v tekočem gojišču, relativno kompleksno, je podatkov o takem načinu gojenja zelo malo.

Khandakar s sod. (2009) so naredili študijo rasti micelija glive *G. frondosa* na agarnih ploščah, kjer so preverili vpliv medija (vrednost pH in vir ogljika), temperature in svetlobe na rast. Barreto s sod. (2011) je predlagal matematičen model rasti micelija glive *G. frondosa* s študijem rasti na različnih substratih. Zhu (2006) pa v patentu opisuje

proizvodnjo glivne biomase na pšeničnih otrobih, z namenom uporabe v mlečnih izdelkih z dodano vrednostjo.

### **2.1.3 Gojenje glive *G. frondosa* v tekočem gojišču**

Čeprav so aktivne spojine izolirali tako iz trosnjakov kot iz micelija glive *G. frondosa*, je gojenje micelija v tekočem gojišču zanimivo zaradi svoje produktivnosti in možnosti večjega nadzora nad procesom. Gojenje v tekočem gojišču nudi možnosti velike produktivnosti v majhnem volumnu, krajše proizvodne čase in manjše možnosti kontaminacije. Prav tako nudi možnost standardizacije in posledično visoko kakovost izdelkov.

Veliko avtorjev se strinja, da predstavlja gojenje v tekočem gojišču prihodnost gojenja gliv za potrebe farmacevtske industrije in industrije prehranskih dopolnil (Boh in Berovič, 2007; Wasser, 2011).

Poleg naštetih lastnosti, pa so pri glivi *G. frondosa* našli v fermentacijski brozgi bioaktiven metabolit, ki je izkazoval citotoksično delovanje na tumorske celice. Prisotnosti tega metabolita niso odkrili pri trosnjakih (Lin in Liu, 2006).

#### *2.1.3.1 Sestavine tekočega gojišča*

Tekoče gojišče je sestavljeno iz v vodi raztopljenih hranil in anorganskih komponent, ki so potrebne za rast glive. Ločimo med kemijsko definiranimi gojišči, kjer je sestava gojišča točna znana in kompleksnimi gojišči, kjer je sestava slabše definirana in vsebuje npr. hidrolizate ali ekstrakte različnih organizmov. V raziskovalnem delu večina raziskovalcev uporablja že pripravljena, kompleksna gojišča. Potrebno je poudariti, da minimalno gojišče, t.j. kemijsko definirano gojišče z minimalnim naborom komponent potrebnih za rast, za glivo *G. frondosa*, ni znano. Gojišča, ki so bila uporabljena za gojenje glive *G. frondosa* v tekočem gojišču, so podana v preglednici 1. Gojišča, ki so bila optimizirana z določenim namenom, pa so opisana v sledečem poglavju.

Sestava gojišča, vrednost pH in drugi procesni parametri (mešanje, prezračevanje, temperatura ipd.) pomembno vplivajo na rast glive in tvorbo metabolitov ter posledično določajo produktivnost procesa in vplivajo na sestavo končnega produkta.

Preglednica 1: Pregled gojišč za gojenje glive *G. frondosa* v tekočem gojišču.

Koncentracije makrohranil v g/L	koncentracije soli v g/L	pH	namen študije	referenca
glukoza 30; kvasni ekstrakt 6; polipepton 2	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,5; MgSO <sub>4</sub> x7H <sub>2</sub> O 0,5; MnSO <sub>4</sub> x5H <sub>2</sub> O 0,2	5,5	produkcija polisaharidov	Lee s sod. (2003)
Krompirjev dekstrozni bujon 24; sladni ekstrakt 10; pepton 1	brez dodatka	5,5	produkcija polisaharidov	Lee s sod. (2003)
glukoza 30; kvasni ekstrakt 6; polipepton 2	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,5 ; MgSO <sub>4</sub> x7H <sub>2</sub> O 0,5 ; MnSO <sub>4</sub> x5H <sub>2</sub> O 0,2	5,06	produkcija biomase	Lee s sod. (2004)
glukoza 30; kvasni ekstrakt 6; polipepton 2	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,5; MgSO <sub>4</sub> x7H <sub>2</sub> O 0,5; MnSO <sub>4</sub> x5H <sub>2</sub> O 0,2	5,5	produkcija polisaharidov	Bae s sod. (2005)
glukoza 1; kvasni ekstrakt 0,8	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,15 %; MgSO <sub>4</sub> x7H <sub>2</sub> O 0,02 %; (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,2 %	5,4	produkcija biomase	Wu s sod. (2006)
glukoza 2; kvasni ekstrakt 4; sladni ekstrakt 10; melasa 1; olivno olje 1 %	10 mL mineralne raztopine na 100 mL gojišča	np	določanje vpliva dodatka olivnega olja	Hsieh s sod. (2006)
glukoza 40; kvasni ekstrakt 5; sladni ekstrakt 10	brez dodatka	4,5	produkcija polisaharidov	Lin in Liu (2006)
glukoza 20; kvasni ekstrakt 2; pepton 2	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,46; K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1,0; MgSO <sub>4</sub> 0,5	5,0	produkcija polisaharidov	Yang s sod. (2007)
glukoza 10; kvasni ekstrakt 3; pepton 5	tiamin 1; KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1; MgSO <sub>4</sub> x7H <sub>2</sub> O 1	5,5	produkcija antioksidantov	Lin (2010)

### 2.1.3.2 Optimizacije gojišč in procesnih parametrov za gojenje glive *G. frondosa*

Za optimizacijo produkcije glivne biomase in metabolitov obstaja veliko različnih načinov in študij z uporabo različnih optimizacijski metod. Pri vsaki optimizaciji proučujejo vpliv različnih parametrov tako na količino kot tudi kakovost glivnih metabolitov in/ali biomase. Za dobre optimizacijske študije velja, da pridemo do uporabnih rezultatov s čim manj poskusi in v čim krajšem času.

Lee s sod. (2004) so uporabili t.i. samousmerjevalno optimizacijsko metodo (*self-directing optimization technique* oz. *rotating simplex method*) za optimizacijo produkcije glivne biomase in zunajceličnih polisaharidov. Metodo izvajajo z izvedbo zaporednih poskusov in je še posebej uporabna če imamo na razpolago omejeno opremo. Ugotovili so, da so za produkcijo biomase in zunajceličnih polisaharidov najbolj primerni: glukoza kot vir ogljika (30 g/L), kvasni ekstrakt kot vir dušika (6 g/L), delež vcepka 3 % (v/v), začetni pH 5,5 in temperatura 25 °C. Za največjo produkcijo biomase in polisaharidov v bioreaktorju so ugotovili, da je najbolje, če se pH vzdržuje na vrednosti 5,0; prezračevanje pri 1,16 vvm (pretok zraka na volumen gojišča na minuto) in hitrost mešanja pri 166 obr./min.

Drugačna metoda za optimizacijo gojišča in procesnih parametrov je metoda odzivnih ploskev - *response surface methodology* – RSM. Prednost te metode je, da lahko z minimalnim naborom poskusov hitro dobimo optimalne vrednosti. Cui s sod. (2006) so uporabili to metodo za optimizacijo produkcije biomase in zunajceličnih polisaharidov glive *G. frondosa* v tekočem gojišču. Preverili so vpliv različnih koncentracij vira ogljika (glukoza), vira dušika (pepton) in mineralov (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>). Optimizacijo parametrov so opravili v erlenmajericah in rezultate potrdili v mešalnem bioreaktorju z naslednjimi pogoji: volumen gojišča 10 L, vcepek 10 % (v/v), temperatura 25 °C, začetna vrednost pH 5,5, prezračevanje 8,0 vvm in mešanje 80 obr./min. Največjo produkcijo biomase (17,61 g/L) so dobili, če so uporabili gojišče z 45,2 g/L glukoze, 6,58 g/L peptona in 2,97 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Največjo produkcijo zunajceličnih polisaharidov (1,326 g/L) pa so dobili, če so uporabili gojišče z 58,6 g/L glukoze, 3,79 g/L peptona in 4,06 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Z gojenjem v bioreaktorju, so dobili največjo koncentracijo biomase (22,5 g/L) po 9 dnevih in največjo koncentracijo zunajceličnih polisaharidov (1,252 g/L) po 11 dnevih gojenja.

Bolj obsežno študijo optimizacije produkcije biomase in polisaharidov so opravili Shih s sod. (2008). Z gojenjem v erlenmajericah so preverili vpliv začetne vrednosti pH, različnih virov ogljika ter dušika. Ugotovili so, da je za največjo produkcijo biomase (2,72 g/L) najbolje uporabiti nižjo vrednost pH (4,0) in podaljšati čas gojenja, za največjo tvorbo zunajceličnih polisaharidov (0,82 g/L) pa uporabiti višji pH (5,0) in krajši čas gojenja. Zaključili so, da večja poraba glukoze privede do večje koncentracije biomase z nižjo vrednostjo pH brozge, kar lahko pripišemo večji produkciji organskih kislin. Kot vir ogljika sta se najbolj izkazali glukoza in maltoza, ki podpirata produkcijo visoke koncentracije biomase in polisaharidov. Njihova študija je tudi potrdila zaključke, da organski dušik bolj podpira rast in tvorbo polisaharidov kot anorganski viri dušika.

Rezultati vseh študij, ki so se ukvarjale z optimizacijo produkcije biomase in polisaharidov so našteje v preglednici 2.

Preglednica 2: Optimizirana gojišča za glivo *G. frondosa*.

<b>Optimizacija</b>	<b>način produkcije</b>	<b>koncentracija biomase ali polisaharidov</b>	<b>referenca</b>
biomasa	mešalni bioreaktor	16,8 g/L	Lee s sod. (2004)
biomasa	erlenmajerice	17,61 g/L	Cui s sod. (2006)
biomasa	mešalni bioreaktor	22,50 g/L	Cui s sod. (2006)
biomasa	mešalni bioreaktor	6,7 g/L	Shih s sod. (2008)
zunajcelični polisaharidi	mešalni bioreaktor	5,3 g/L	Lee s sod. (2004)
zunajcelični polisaharidi	erlenmajerice	1,326 g/L	Cui s sod. (2006)
zunajcelični polisaharidi	mešalni bioreaktor	1,252 g/L	Cui s sod. (2006)
zunajcelični polisaharidi	mešalni bioreaktor	3,3 g/L	Shih s sod. (2008)

### 2.1.3.3 Vpliv olja na rast glive v tekočem gojišču

Že dolgo časa je znano, da dodatek rastlinskih olj (in maščobnih kislin) stimulira rast biomase (Schisler in Volkoff, 1977) ter produkcijo pomembnih glivnih metabolitov (Reese in Maguire, 1969; Fukushima s sod., 1991). Prav tako je bilo dokazano, da lahko dodatek olj k substratu poveča tvorbo zunajceličnih polisaharidov pri nekaterih glivah (Stasinopoulos in Seviour, 1990; Yang s sod., 2000; Park s sod., 2002a). Olja in maščobne kisline lahko vplivajo na zmanjšanje, stimulacijo ali indukcijo tvorbe metabolitov. Vplivi so odvisni od vrste maščobnih kislin, kot tudi od koncentracije v substratu in imajo lahko pozitivni ali negativni vpliv na tvorbo metabolitov. Pomembna lastnost rastlinskih olj je tudi ta, da se lahko uporabljajo kot sredstva za regulacijo penjenja kultivacijske brozge (Shih s sod., 2008).

Za glivo *Ganoderma lucidum* se predvideva, da naj bi delna inkorporacija maščobnih kislin iz olj v membrano glivne celice povečala permeabilnost membrane za hranila, ter tako pospešila rast (Yang s sod., 2000). Mehanizem stimulacije rasti z rastlinskimi olji za glivo *G. frondosa* še ni dovolj raziskan.

Hseih s sod. (2006) so za gojenje glive *G. frondosa* v 5 litrskem mešalnem bioreaktorju uporabili gojišča z različnimi koncentracijami oljčnega in različnimi koncentracijami kisika. Rezultati študije so predstavljeni v preglednici 3. Ugotovili so, da dodatek oljčnega olja poveča končno koncentracijo biomase, še večji vpliv pa so opazili pri dobitku polisaharidov.

Preglednica 3: Vpliv koncentracije kisika ter dodatka olivnega olja pri gojenju glive *G. frondosa* na tvorbo biomase ter polisaharidov.

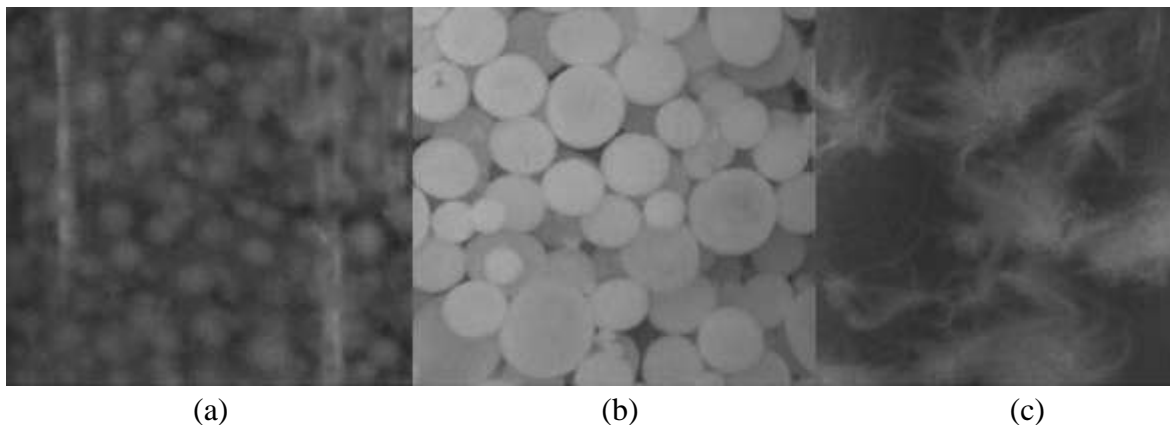
% O <sub>2</sub> v zraku (1 vvm)	% (v/v) olivnega olja	največja koncentracija biomase (po X dnevih fermentacije) (g/L)	največja koncentracija polisaharidov (po X dnevih fermentacije) (mg/g)	
			polisaharidi celične stene	zunajcelični polisaharidi
21	0	9,29 (9 dni)	19,5 (11 dni)	0,7-1,0 (13 dni)
30	0	4,2 (9 dni)	22,5 (8 dni)	0,7-1,0 (13 dni)
40	0	4,2 (7 dni)	9 (5 dni)	0,7-1,0 (13 dni)
21	1	10,1 (9 dni)	28,2 (7 dni)	2,24 (13 dni)
40	1	14,9 (9 dni)	7 (7 dni)	3,00 (13 dni)

Shih s sod. (2008) pa so ugotovili, da dodatki rastlinskih olj (arašidovo, oljčno in sojino) v koncentracijah 0,1 ter 1 % (v/v) za dva ali celo tri-krat povečajo produkcijo glivne biomase. Dodatek rastlinskih olj pa ni povečal koncentracije zunajceličnih polisaharidov, nekatera olja so tvorbo zunajceličnih polisaharidov celo inhibirala.

Vrsta rastlinskega olja ima tudi vpliv na molsko maso zunajceličnih polisaharidov (Shih s sod., 2008), kar pomeni, da imajo ti polisaharidi lahko različne biološke aktivnosti (Lee s sod., 2003). Za enkrat še ni znano kako se spremeni biološka aktivnost po dodatku rastlinskih olj.

#### 2.1.3.4 Morfologija glive *G. frondosa* pri gojenju v tekočem gojišču

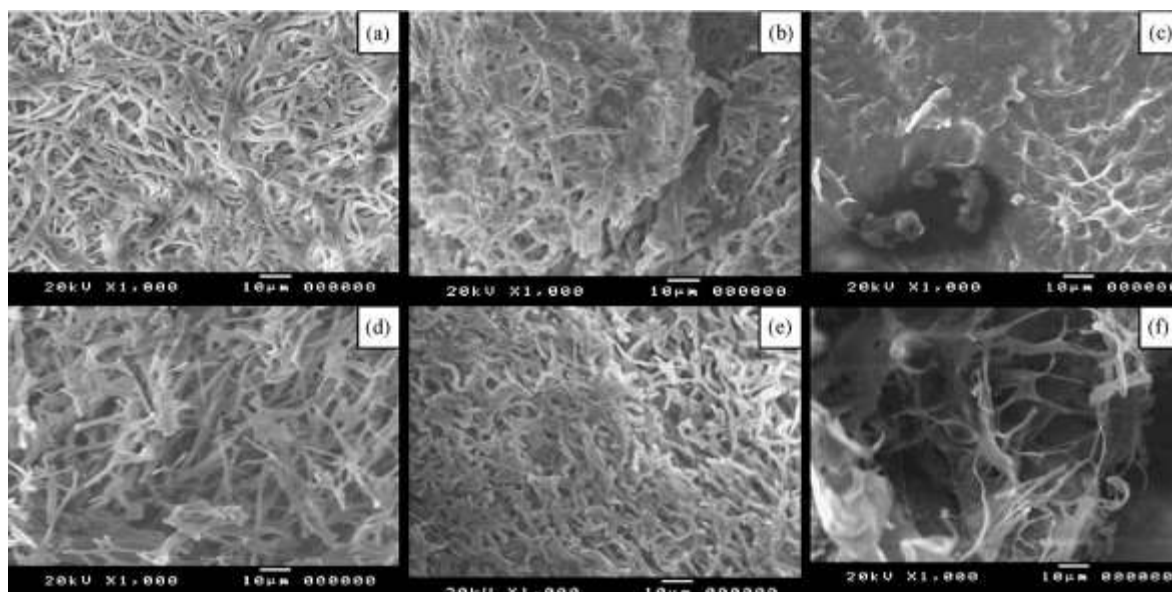
Morfologija glive med rastjo je pomemben faktor, saj vpliva na tvorbo metabolitov in reologijo kultivacijske brozge, kar vpliva na snovni prenos kisika in transportne procese odvajanja toplote in porabo energije. Morfologija glive je odvisna od številnih parametrov, od katerih so najpomembnejši: vrednost pH, velikost prezračevanja ter hidrodinamične lastnosti brozge (slika 3) (Lee s sod. 2004).



Slika 3: Morfologija glive *G. frondosa* pri različnih procesnih pogojih. (a) pH 6,0, prezračevanje 0,5 vvm, mešanje 100 obr./min; (b) pH 4,0, prezračevanje 0,5 vvm, mešanje 250 obr./min; (c) pH 5,06, prezračevanje 1,16 vvm, mešanje 166 obr./min (optimalni pogoji, povzeto po Lee s sod., 2004).

Lee s sod. (2004) je odkril, da je za produkcijo biomase in zunajceličnih polisaharidov pri submerznem gojenju v tekočem gojišču najbolj ugodna morfolologija glive *G. frondosa* v obliki rahlega skupka micelija z velikim številom izrastkov (slika 3c). To je v nasprotju z ugotovitvami večine avtorjev, ki so raziskovali produkcijo drugih glivnih metabolitov in navajajo, da je micelij v obliki peletov bolj primerna oblika (Sinha in Panda, 1998; Bae s sod., 2000; Park s sod., 2002b).

Hsieh s sod. (2006) so z uporabo elektronskega mikroskopa ugotovili, da prezračevanje s 40 % O<sub>2</sub> povzroči nagubanost oz. pospešeno staranje micelija. Po drugi strani so ugotovili, da dodatek olivnega olja prepreči prezgodnje staranje pri povečani koncentraciji kisika in ima tako zaščitno vlogo (slika 4).



Slika 4: Slika micelija glive *G. frondosa* z elektronskim mikroskopom pod različnimi kultivacijskimi pogoji. 1000x povečava; (a) 7 dnevna kultura pri 21 % O<sub>2</sub>; (b) 7 dnevna kultura pri 40 % O<sub>2</sub>; (c) 7 dnevna kultura pri 40 % O<sub>2</sub> in dodatkom oljčnega olja; (d) 9 dnevna kultura pri 21 % O<sub>2</sub>; (e) 9 dnevna kultura pri 40 % O<sub>2</sub>; (f) 9 dnevna kultura pri 40 % O<sub>2</sub> in dodatkom oljčnega olja (povzeto po Hsieh s sod., 2006).

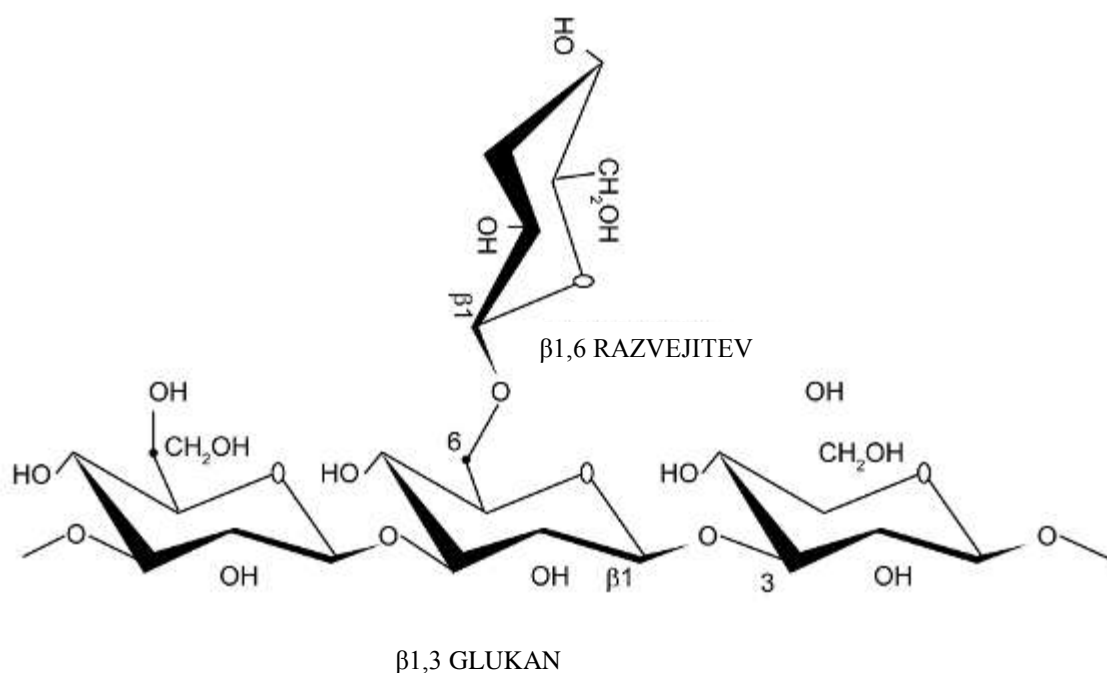
## 2.2 BIOLOŠKO AKTIVNE KOMPONENTE GLIVE *G. frondosa*

### 2.2.1 Pomen $\beta$ -glukanov

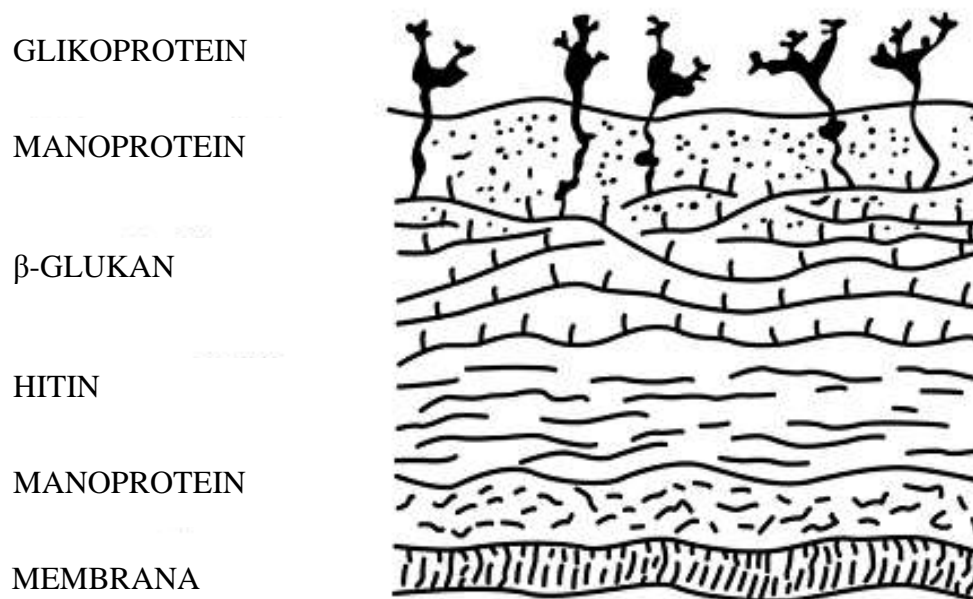
Večina raziskovalcev se strinja, da so prav  $\beta$ -glukani, izolirani iz gliv, ključni za aktivnosti gliv (Chen in Seviour, 2007; Akramiene s sod., 2007; Chan s sod., 2009; Wasser, 2011). Pod terminom  $\beta$ -glukan razumemo vsakršen polisaharid, ki vključuje glikozidne vezi v  $\beta$  konfiguraciji. V kontekstu zdravnih gliv, pa termin praviloma označuje polisaharide z (1-3)- in (1-6)- $\beta$ -glikozidnimi vezmi, ki so del celične stene (sliki 5 in 6).

Znano je, da  $\beta$ -glukani vplivajo na imunski sistem z delovanjem na specifične receptorje (dektin-1, CD3, TLR2/6, MR) in aktivirajo številne imunske celice (makrofagi, nevtrofilce, monocite, celice naravne ubijalke in dendritične celice) (Chan s sod., 2009). Značilno za glivne  $\beta$ -glukane, je tudi to, da se po zaužitju ne razgradijo. Največja težava in mogoče tudi

največja prednost  $\beta$ -glukanov, je ta, da je to zelo heterogena skupina spojin, kar po eni strani otežuje raziskovanje (težko je dobiti res čiste spojine), po drugi strani pa verjetno omogoča širši spekter bioloških odzivov.  $\beta$ -glukani kot skupina, se lahko razlikujejo glede na sestavo (homopolisaharidi, heteropolisaharidi), dodanimi skupinami (peptidi, proteini), načinom in stopnjo razvejanosti in ne nazadnje tudi po velikosti (od nekaj 1000 do več kot  $10^6$  Da). V literaturi, ki se ukvarja z glivami, sta termina  $\beta$ -glukani in polisaharidi pogosto prosto zamenljiva.



Slika 5: Struktura  $\beta$ -glukana kot ga najdemo pri glivah (povzeto po Chan s sod., 2009).



Slika 6: Shema strukture celične stene gliv (povzeto po Chan s sod., 2009).

### 2.2.2 Polisaharidi, proteoglikani in glikopeptidi izolirani iz glive *G. frondosa*

Raziskovalci navajajo vsaj 26 različnih polisaharidov, ki so jih izolirali iz glive *G. frondosa* s protitumornim delovanjem (Shen in Royse 2001; Zhou in Wasser, 2004; Boh in Berovič, 2007; Yang s sod., 2007; Cui s sod., 2007; Masuda s sod., 2009; Tada s sod., 2009; Radić s sod., 2010; Xu s sod., 2010) in nemogoče je vedeti, koliko je prekrivanja med njimi. Postopek pridobivanja zaobjema ekstrakcijo z vodo ali bazičnimi raztopinami pri višjih temperaturah, kateri sledi precipitacija z etanolom pri nizki temperaturi. Take pripravke se nato lahko prečisti z uporabo različnih kromatografij.

V nekaterih primerih gre za polisaharide, v drugih pa za proteoglikane in glikopeptide. Polisaharidni deli teh komponent imajo strukturo (1-6)- $\beta$ -razvejitev iz glavne verige (1-3)- $\beta$ -D-glukana ali obratno t.j. (1-3)- $\beta$ -razvejitev iz glavne verige (1-6)- $\beta$ -D-glukana. Na ta  $\beta$ -glukan je lahko pripeta tudi proteinska oz. peptidna komponenta. Namesto glukana pa se lahko pojavi tudi heteroglikan (Zhou in Wasser, 2004).

Zhang s sod. (2007) navaja, da so iz trosnjakov glive *G. frondosa* izolirali polisaharide, ki spadajo v skupino proteoglikanov, glukanov, galaktomananov in heteroglikanov in da imajo imunomodulatorno, protitumorsko, protivirusno in hepatoprotektivno aktivnost. Ko govorimo o polisaharidih gliv, te razumemo kot heterogen kompleks spojin s prej naštetimi lastnostmi.

Iz glive *G. frondosa* so bili pripravljene številni pripravki, ki se ločijo glede na postopke izolacije in vsebujejo različne vsebnosti polisaharidov ( $\beta$ -glukanov), proteinov in ostalih komponent. Raziskovalci so te grobe pripravke pridobivali in prečiščevali po različnih načinih in prišli do bolj ali manj prečiščenih pripravkov in jih preverjali za določene, mnogokrat zelo različne, biološke aktivnosti. Ker so  $\beta$ -glukani tako široka skupina, bi težko trdili koliko je prekrivanja med temi pripravki in kaj to pomeni za njihovo aktivnost.

Ker se večina pripravkov iz gliv uporablja kot prehranski dodatek, je smiselno uporabljati čim bolj grobe pripravke, da ne izgubimo posamičnih komponent. Prednost priprave posamičnih frakcij pa seveda obstaja v poslovnem smislu, saj jih je možno patentirati.

#### 2.2.2.1 Polisaharidi izolirani iz trosnjakov

Veliko različnih raziskovalcev (Kato s sod., 1983a, 1983b; Ohno s sod., 1984, 1985, 1986a, 1986b, 1986c; Suzuki s sod., 1984; Lino s sod., 1985; Mizuno s sod., 1985, 1986a, 1986b; Nanba s sod., 1987; Hishida s sod., 1988; Kato s sod., 1990; Kodama s sod., 2001; Kodama s sod., 2002; Masuda s sod., 2006; Masuda s sod., 2009; Lee s sod., 2010; Xu s sod., 2010; Lee s sod., 2011) je pripravilo polisaharide iz trosnjakov glive *G. frondosa*.

Glavni zaključek raziskav, ki so preverile strukturo in biološko aktivnost je, da je  $\beta$ -glukan tista komponenta, ki je odgovorna za biološko aktivnost, da imajo različni pripravki različno sestavo (velikost, sestavo, topnost ipd.) in da to vse vpliva na biološko aktivnost. Ena izmed ugotovitev, ki velja za  $\beta$ -glukane, izolirane iz različnih gliv je bila, da imajo večji polisaharidi večjo biološko aktivnost *in vitro* (Yan s sod., 2000).

#### 2.2.2.2 Polisaharidi izolirani iz micelija in fermentacijske brozge

Vzporedno z raziskovanjem polisaharidov iz trosnjakov so raziskovali tudi polisaharide pridobljene po novih biotehnoloških postopkih - gojenjem v tekočem gojišču. Gojenje v tekočem gojišču ima prednosti pred klasičnim gojenjem trosnjakov, saj se bistveno skrajša čas rasti in poveča možnost nadzora nad procesom. Poleg tega, pa je zanimivo še dejstvo, da pride pri gojenju v tekočem gojišču do sproščanja polisaharidov v tekoči medij. Najverjetneje je sproščanje polisaharidov v medij posledica strižnih sil med gojenjem a vprašanje ostaja odprto, če gliva polisaharide v medij sprošča tudi aktivno.

Proizvodnjo bioaktivnih polisaharidov izoliranih iz micelija in fermentacijske brozge opisujejo različni raziskovalci (Kato s sod. 1983a; Kato s sod. 1983b; Lino s sod., 1985; Ohno s sod. 1985; Ohno s sod. 1986a; Zhuang s sod., 1994; Lee s sod., 2003; Lee s sod., 2004, Bae s sod., 2005; Wu s sod., 2006; Yang s sod., 2007; Cui s sod., 2007; Shih s sod., 2008; Tada s sod., 2009).

Najbolj zanimiva ugotovitev je, da na biosintezo polisaharidov pri glivi *G. frondosa* vpliva vrsta gojišča. Tako dajo fermentacije z različnimi gojišči zunajcelične polisaharide z različno molsko maso. Lee s sod. (2003) je med drugim preveril, kako na sestavo polisaharidov vpliva vrsta medija (krompirjev ali glukozni medij). Polisaharidi izolirani iz micelija vzgojenega v glukoznem mediju so imeli povprečno molekulsko maso 500.000 Da; 66 ut. % ogljikovih hidratov in 34 ut. % proteinskega dela. Polisaharidi izolirani iz micelija vzgojenega v krompirjevem mediju pa so imeli povprečno molekulsko maso 470.000 Da; 82 ut. % ogljikovih hidratov in 18 ut. % proteinskega dela.

#### 2.2.2.3 D in MD frakcija

D in MD frakcija sta najbolj raziskana pripravka iz glive *G. frondosa*. Leta 1984 je Nanba prvič opisal postopek priprave D frakcije, za katerega je pridobil tudi patent. Z nadaljnjim prečiščevanjem D frakcije, pa je leta 1998 nastala MD frakcija, kateri je ponovno bil podeljen patent. Postopek priprave teh frakcij je standardiziran, kar omogoča boljše primerjavo takih pripravkov med seboj. D in MD frakcijo lahko pridobimo iz micelija ali trosnjakov s kuhanjem v vroči vodi, kateremu sledi precipitacija z etanolom. Po analizi

pripravkov, se je izkazalo, da vsebuje  $\beta$ -glukane z (1-3) in (1-6) razvejitevami in proteinsko komponento. Velikost proteoglikana je približno 1000 kDa. Pri MD frakciji se lahko razmerje med glukonom in proteinom giblje med 80:20 do 99:1. (Mayell, 2001).

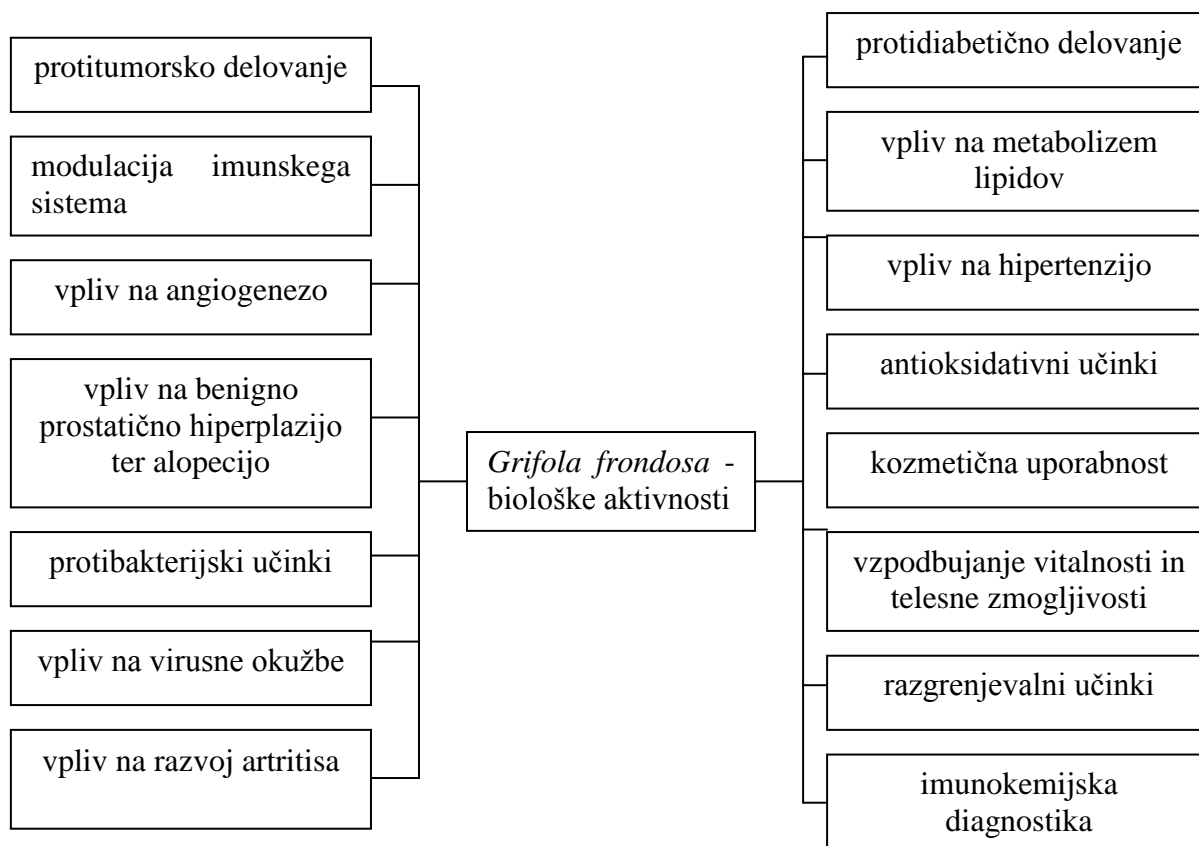
Z uporabo D in MD frakcije so bile opravljene številne *in vitro* in *in vivo* študije, veliko nekontroliranih in ena s placebom kontrolirana klinična študija (Deng s sod., 2009).

### 2.2.3 Druge komponente

Poleg polisaharidov so pri glivi *G. frondosa* našli še druge zanimive komponente, ki vključujejo proteine (Yokokawa s sod., 1980; Kawagishi s sod., 1990; Shimaoka s sod., 1993; Healy s sod., 1999; Choi s sod., 2001; Nishiwaki in Hayashi, 2001; Nishiwaki s sod., 2002; Suzuki s sod., 2005), lipide (Yokokawa s sod., 1980; Zaidman s sod., 2005; Nishiwaki s sod., 2009), nizkomolekularne spojine s citotoksičnim delovanjem (Lin in Liu, 2006) in antioksidativne komponente (Dubost s sod., 2007; Lin, 2010).

## 2.3 BIOLOŠKE AKTIVNOSTI KOMPONENT GLIVE *G. frondosa*

Za pripravke iz glive *G. frondosa* so določili številne biološke aktivnosti (slika 7), a največ raziskav je bilo opravljenih na protirakastih učinkih. Raziskave so pokazale, da imajo pripravki iz glive *G. frondosa* protirakaste učinke *in vivo* in *in vitro*. Opisana je inhibicija rasti, zmanjšanje incidence ali podaljšanje časa do nastopa tumorjev v živalskih modelih po intraperitonealni (Adachi s sod., 1987; Suzuki s sod., 1989; Masuda s sod., 2009) ali oralni (Hishida s sod., 1988; Nanba, 1995; Kurasige, 1997; Nanba in Kubo, 1997; Frank, 2006) administraciji pripravkov. Obstajajo tudi poročila o neposrednih toksičnih učinkih pripravkov (polisaharidov) na tumorske celice *in vitro* (Cui s sod., 2007; Shomori s sod., 2009), verjetno z vplivanjem na ubikvitinski sistem (Radič s sod., 2010).



Slika 7: Biološke aktivnosti glive *Grifola frondosa* (povzeto po Boh in Berovič, 2007).

Raziskovalci ugotavljajo, da so protirakasti učinki pripravkov iz gob (tudi iz glive *G. frondosa*), vezani na delovanje imunskih celic, ki jih polisaharidi aktivirajo oz. modulirajo njihovo aktivnost (Borchers s sod., 1999; Zhou in Wasser, 2004). Pripravki iz glive *G. frondosa* vplivajo na sintezo in izločanje različnih citokinov (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1, IL-2, IL-10, IL-12, IL-18) in s tem modulirajo imunski odziv (Suzuki s sod., 2001; Inoue s sod., 2002; Kodama s sod., 2002; Harada s sod., 2003; Kodama s sod., 2005; Radić s sod., 2010). Opravljena je bila tudi klinična študija (1. in 2. faza), kjer so ugotovili varnost uporabe pripravka iz glive *G. frondosa* in mešan vpliv na imunske odzive (stimulacija in inhibicija) (Deng s sod., 2009).

Poleg naštetih učinkov pa pripravki iz glive *G. frondosa* izkazujejo tudi protimikrobno aktivnost (Kodama s sod., 2001), protivirusno aktivnost (Wu s sod., 1994; Nanba s sod., 2000), vpliv na potek artritisa (Shigesue s sod., 2000), vpliv na diabetes (Kubo s sod., 1994; Kubo in Nanba, 1997; Manohar s sod., 2002; Talpur s sod., 2002) in vpliv na metabolizem lipidov (Kabir s sod., 1987; Adachi s sod., 1988; Kubo in Nanba, 1996; Kubo in Nanba, 1997; Fukushima s sod., 2001).

Znano je, da komponente celičnih sten gliv delujejo na določene receptorje celic prirojenega imunskega sistema. V glavnem so to receptorji, ki prepoznavajo določene molekulske vzorce (receptorji PRR - *pattern recognition receptors*). Za prepoznavanje gliv so najpomembnejši receptorji dektin-1, TLR2, TLR4 in manozni receptor. Poglavitni receptor za prepoznavanje  $\beta$ -glukanov je dektin-1. Ker so  $\beta$ -glukani izolirani iz različnih organizmov ali z različnimi postopki, lahko med seboj zelo različni, to lahko vpliva na vezavo z receptorjem in posledično odzive imunskih celic (Chan s sod., 2009).

### **3 MATERIALI IN METODE**

#### **3.1 APARATURE**

- ABI Prism 6100 Nucleic Acid PrepStation (Applied Biosystems)
- Avtoklav (Sutjeska, Jugoslavija)
- Bioreaktor 10 L (Bioengineering A.G., Švica)
- Bioreaktor 18 L (Bioengineering A.G., Švica)
- Bioreaktor 7 L (Bioengineering A.G., Švica)
- Bioreaktor KLM 2L (Bioengineering A.G., Švica)
- Bioreaktor s trdnimi nosilci (Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Slovenija)
- Centrifuga (Tehtnica, Slovenija)
- Fotoaparati (Canon, Japonska)
- GeneAmp Veriti (Applied Biosystems)
- Halogenski določevalci vlage HR83 (Mettler Toledo, Nemčija)
- Horizontalni mešalni bioreaktor (Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Slovenija)
- HPLC Varian ProStar (Varian, ZDA)
- Inkubator s stresalnikom Innova 4230 (New Brunswick Scientific, ZDA)
- Kolona z mehurčki (Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Slovenija)
- Laminarij PIO-LFVP 12 (Iskra, Slovenija)

- Magnetno mešalo 545 MMH (Tehtnica, Slovenija)
- Naprava za mletje (Waring, ZDA)
- pH meter MA-5730 (Iskra, Slovenija)
- Pilotni bioreaktor z mešalom (Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Slovenija)
- Precizna tehtnica (Sartorius, Nemčija)
- Spektrofotometer Cary 50 (Varian, ZDA)
- Spektrofotometer Synergy 2 (BioTek, ZDA)
- StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems)
- Sušilnik Sterimatic ST -11 (Instrumentaria Zagreb, Jugoslavija)
- Tehtnica ET-111 (Tehtnica, Slovenija)
- Vorteks mešalo (Tehtnica, Slovenija)

### **3.3 ORGANIZEM**

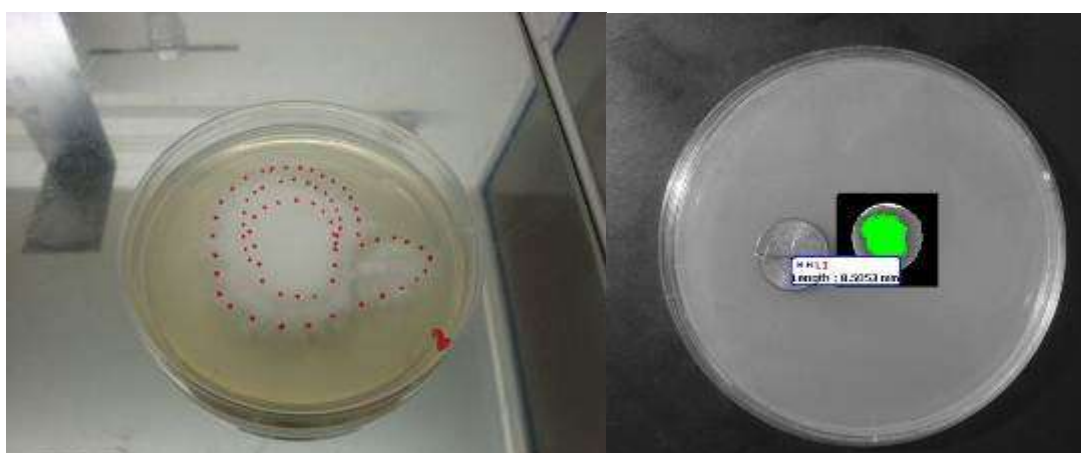
Pri naših poskusih smo uporabili glivo *Grifola frondosa* (Dicks.: Fr.) S.F. Gray, shranjeno v zbirki kultur Zavoda za naravoslovje in Oddelka za lesarstvo Biotehniške fakultete. Sevi so bili shranjeni pod oznakami: GF 1, GF 2, GF 3, GF 4, GF 5, GF 10, GF 11 in GF SH. Kulture smo vzdrževali na petrijevkah s krompirjevim dekstroznim agarjem pri temperaturi 25 °C in jih redno precepljali na 2-3 tedne.

### 3.4 PRESEJALNI TESTI SEVOV

Začetek raziskav je predstavljal presejalni test različnih sevov shranjenih v zbirkah gliv. S presejalnim testom smo skušali ugotoviti, kateri sev je najbolj primeren za nadaljnje delo. Izbrane seve smo testirali glede na njihovo rast (tvorbo biomase) in pri tekočih gojiščih še na proizvodnjo zunajceličnih polisaharidov.

#### 3.4.1 Presejalni test z gojenjem na trdnem gojišču

Za določevanje rasti različnih sevov, smo uporabili gojenje na gojišču PDA (krompirjev dekstrozni agar, Biolife, Italija). Gojišče PDA smo pripravili tako, da smo zatehtali 42 g gojišča in mu dodali 1000 mL deionizirane vode. Gojišče smo segreli, da se je agar raztopil in ga nato sterilizirali v avtoklavu 20 min pri temperaturi 121 °C. Po ohladitvi smo gojišče prelili v petrijevke in jih v centru petrijevke nacepili z majhnim koščkom micelija, ki smo ga z uporabo sterilizirane pincete vzeli iz vzdrževalne petrijevke (poglavje 3.3). Inkubacija je potekala 21 dni v temi pri temperaturi 25 °C. Petrijevke smo vsak tretji dan fotografirali (slika 8) in fotografije obdelali z računalniškim programom Motic Images Plus Motic China Group LTD, Kitajska), da smo dobili površino rasti micelija. Vse seve smo preverili v treh ponovitvah.



Slika 8: Presejalni test sevov na gojišču PDA in računalniška obdelava slik.

### 3.4.2 Presejalni test z gojenjem v tekočem gojišču

Presejalni test različnih sevov v tekočem gojišču je potekal z gojenjem različnih sevov v erlenmajericah z volumnom 100 mL (slika 9). V vsako erlenmajerico smo dodali 50 mL osnovnega tekočega gojišča (glukoza 30 g/L (Sigma-Aldrich, ZDA), kvasni ekstrakt 6 g/L (Biolife, Italija), pepton 2 g/L (Biolife, Italija),  $\text{MgSO}_4$  0,5 g/L (Kemika, Hrvaška),  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0,5 g/L (Kemika, Hrvaška),  $\text{MnSO}_4$  0,14 g/L (Kemika, Hrvaška)) in ga sterilizirali v avtoklavu 20 minut pri temperaturi 121 °C. Po ohladitvi smo gojišča nacepili z uporabo kolutka (luknjač premera 16 mm), izrezanega iz gojišča PDA preraščenega z izbranim sevom. Inkubacija je potekala 21 dni pri temperaturi 25 °C in mešanju 150 obr./min. Vse seve smo preverili v treh ponovitvah.

Biomaso smo določili tako, da smo iz vzorca s pomočjo staničevine najprej ločili velike dele biomase in nato še s pomočjo predhodno stehtanega filtra in vakuumske črpalke ločili manjše dele biomase. Ločeno biomaso smo nato še dva krat sprali z enakim volumnom deionizirane vode, da smo odstranili morebitne ostanke gojišča. Tako sprano biomaso smo nato sušili 24 ur pri 105 °C, ohladili v eksikatorju ter stehali.

Polisaharide smo določili kot je opisano v poglavju 3.8.1.



Slika 9: Erlenmajerice napolnjene z gojiščem za presejalni test sevov v tekočem gojišču.

### **3.5 GOJENJE TROSNJAKOV**

Da bi dobili referenčne materiale za primerjavo pripravkov pridobljenih z modernimi biotehnološkimi postopki, smo najprej vzgojili trosnjake in iz njih pripravili preparate za nadaljnjo testiranje. Gojenje gob je potekalo na eksperimentalni farmi gob Zavoda za naravoslovje v Podkorenu. Pri gojenju trosnjakov smo uporabili različne seve, različne kombinacije gojišč in načine nacepljanja.

Poskuse smo razdelili na dva dela, v prvem smo preverili različne seve in različne kombinacije gojišč. V drugem delu, pa smo preverili en sev in ga poskušali gojiti na različnih gojiščih z dodatki oljčnih tropin, ker smo v prvi seriji poskusov opazili, da oljčno olje vpliva na aktivnost pripravkov pridobljenih iz trosnjakov.

#### **3.5.1 Sestave gojišč in priprava vcepkov**

Sestava gojišč in uporabljenih sevov za prvi del poskusa je prikazana v preglednici 4. Sestava vcepkov pa je prikazana v preglednici 5. Vse surovine za gojišča je priskrbel Zavod za naravoslovje.

Preglednica 4: Uporabljeni sev, vcepki in sestava gojišča za gojenje trosnjakov.

Gojišče	sev	oznaka vcepka	sestava gojišča	masa gojišča (kg)	volumen/masa vcepka
1	GF 1	1	oljčne tropine 52,5 % koruzni drobljenec 14,8 % CaCO <sub>3</sub> 1,64 % voda 31,1 %	4	200 mL
2	GF 1	2	bukovo žaganje 53,6 % koruzni drobljenec 10,7 % CaSO <sub>4</sub> 0,13 % voda 35,5 %	2	200 mL
3	GF 1	3	bukovo žaganje 31,6 % konopljino seme 31,6 % CaSO <sub>4</sub> 1,27 % voda 35,5 %	2	200 mL
4	GF 5	1	oljčne tropine 52,5 % koruzni drobljenec 14,8 % CaCO <sub>3</sub> 1,64 % voda 31,1 %	4	200 mL
5	GF 5	2	bukovo žaganje 53,6 % koruzni drobljenec 10,7 % CaSO <sub>4</sub> 0,13 % voda 35,5 %	2	200 mL
6	GF 10	2	bukovo žaganje 53,6 % koruzni drobljenec 10,7 % voda 35,5 %	2	40 g

Preglednica 5: Sestava vcepkov uporabljenih pri prvem poskusu gojenja.

Oznaka vcepka	pšenična zrna (%)	rž (%)	konopljino seme (%)	bukova žagovina (%)	CaCO <sub>3</sub> (%)	CaSO <sub>4</sub> (%)	voda (%)
1	22,6	0	14,1	11,9	0,282	1,13	50,0
2	54,3	0	0	7,2	0	2,17	36,2
3	0	51,2	0	10,2	0	0,179	38,4

Vcepke smo pripravili tako, da smo zmešali vse sestavine v 720 mL kozaric in jih sterilizirali v avtoklavu 1 uro pri temperaturi 121 °C. Po ohladitvi smo jih nacepili s koščkom micelija, preraščenega na PDA. Vcepke smo inkubirali 3 tedne v temi pri temperaturi 24 °C.

Pri drugem delu poskusa, smo uporabili zgolj sev GF 3, ki se je izkazal kot najboljši v presejalnih testih. V tem poskusu smo uporabili enotno maso gojišč (3 kg). Sestave gojišč za drugi del gojenja so prikazane v preglednici 6.

Preglednica 6: Sestave gojišč pri drugem poskusu gojenja.

Gojišče	otrobi (%)	koruzni drobljenec (%)	oljčne tropine (%)	bukova žagovina (%)	CaSO <sub>4</sub> (%)	voda (%)
7	20	0	78	0	2	55
8*	20	0	78	0	2	65
9	20	0	45	33	2	65
10	20	0	35	45	2	65
11	20	0	0	78	2	65
12	0	20	80	0	2	65
13	0	20	78	0	2	50
14	0	20	35	43	2	65
15	0	20	0	78	2	65

\* gojišču je bil dodan Agrogel, ki je povečal sorpcijsko kapaciteto gojišča

Poleg naštetih gojišč (preglednica 6), smo pripravili tudi gojišča sestavljena iz koruznice, katera so je izkazala kot najboljša pri gojenju na trdnih gojiščih.

Pri drugem poskusu gojenja smo uporabili tekoč vcepek, ki smo ga pripravili tako, da smo 4 cm<sup>2</sup> veliki kos PDA preraščenega z micelijem homogenizirali v 200 mL sterilizirane destilirane vode. Homogeniziran micelij smo nato prenesli v tekoče krompirjevo dekstrozno gojišče (Biolife, Italija) in gojili v 500 mL steklenicah na stresalniku (120 obr./min) 25 dni pri temperaturi 24 °C.

### 3.5.2 Sterilizacija in inkubacija

Gojišča (preglednici 4 in 6) smo napolnili v polipropilenske vrečke (Mycelia, Belgija), opremljene s filtri za izmenjavo plinov in jih sterilizirali v avtoklavu 5 ur pri 121 °C. Po ohladitvi smo vrečke odprli, jih aseptično inokulirali ter premešali. Vrečke smo inkubirali v temnem prostoru pri temperaturi 24 °C. Ko so se začeli tvoriti primordiji, smo vrečke odprli in jih prestavili v gojitveni prostor, ki je imel temperaturo 17 °C, 85 - 90 % relativne vlažnosti in 10 ur svetlobe dnevno. Trosnjake smo pobrali ob polni dozorelosti.

Kot kontrolo gojenim trosnjakom smo uporabili trosnjake glive *G. frondosa* v liofilizirani obliki kupljene v Šanghaju, Kitajska.

### 3.5.3 Določitev BE, dobitok pripravkov in produktivnosti bioprocesa

Po določitvi časa rasti smo še določili težo trosnjakov, biološko učinkovitost, produktivnost bioprocesa in dobitok pripravka.

Biološka učinkovitosti gojenja (BE), ki je definirana kot masa svežih trosnjakov deljena z maso suhega gojišča v odstotkih (Gregori, 2010).

Pripravke smo pripravili, kot je opisano v poglavju 3.8.1.

Produktivnost bioprocesa glede na tvorbo produkta ( $P_{Bp}$ ), smo podali kot gram produkta, ki nastane v eni uri na gram suhega gojišča. Produktivnost bioprocesa glede na tvorbo biomase ( $P_{Bb}$ ), pa smo definirali kot gram suhe biomase, ki nastane v eni uri na gram suhega gojišča. Pri določevanju produktivnosti, se upoštevajo časi, ki niso povezani s samim gojenjem (priprava, sterilizacija, ohlajanje, mrtvi časi ipd.), ki smo jih pa zaradi enakega časa priprave (1 dan) in zelo dolgih proizvodnih časov (več kot 28 dni), lahko zanemarili (Jensen, 2006). Produktivnosti smo podali tudi pri drugih načinih gojenja (gojenje na trdnem in v tekočem gojišču).

### 3.6 GOJENJE NA TRDNEM GOJIŠČU

#### 3.6.1 Merjenje hitrosti rasti v steklenih tulcih

Za gojenje na trdnem gojišču smo izbrali sev GF 3, ki se je izkazal kot najbolj primeren za gojenje na trdnem gojišču pri presejalnem testu. Sev smo gojili na različnih gojiščih, z namenom, da najdemo najbolj primerne glede na dobitke biomase in polisaharidov. Gojenje v steklenih tulcih predstavlja način, kako določiti hitrost preraščanja gojišča, saj lahko vizualno spremljamo rast micelija (slika 10).



Slika 10: Rast v steklenih tulcih.

Rastni valji so bili izdelani iz stekla (valj, odprt iz obeh strani, dolžine 175 mm in premera 25 mm), katere smo napolnili z 28 g gojišča (preglednica 7). Vsa trdna gojišča so bila zmleta in presejana, tako da so imeli delci velikost med 0,125 in 0,5 mm. Vsem trdnim gojiščem smo dodali destilirano vodo, tako da je bila vlažnost na koncu 65 %. Rastne valje smo iz obeh strani zaprli s plastičnim pokrovčkom in jih sterilizirali (121 °C; 25 minut).

Vcepek za gojišče v steklenih tulcih je predstavljala 14 dni stara kultura micelija, ki je rasla na petrijevki s PDA. Vsak rastni valj smo nacepili na enem koncu z uporabo kolutka

(luknjač premera 16 mm), izrezanega iz gojišča PDA preraščenega z micelijem. Vse delo je potekalo pod aseptičnimi pogoji in v vsaj treh ponovitvah. Vsa gojišča smo dobili pri Zavodu za naravoslovje, oljčno olje pa v oljarni Gea, Slovenija.

Steklene valje smo inkubirali v temi pri 25 °C in s pomočjo lupe periodično merili dolžino preraščenega gojišča. Inkubacija je trajala 41 dni.

Preglednica 7: Sestava gojišč za določanje hitrosti rasti v steklenih tulcih.

Gojišče	1	2	3	4	5
komponenta					
bukovo žaganje	76				
smrekovo žaganje		76			
macesново žaganje			76		
zmleto trsje vinske trte				76	
zmleta cela rastlina koruze - koruznica					100
otrobi		20			0
oljčno olje		2			0
CaCO <sub>3</sub>		2			0

Rast glivinega micelija smo posneli s pomočjo emisijskega elektronskega mikroskopa (Carl Zeiss Supra 35 VP). Posneli smo rast glive na gojišču s smrekovim žaganjem, zmleto vinsko trto in koruznico.

### 3.6.2 Gojenje v steklenih kozarcih

Naslednja stopnja je bila gojenje na trdnih gojiščih v kozarcih, ki omogočajo gojenje v večji količini in boljše simulira rast v bioreaktorju. Ker pri gojenju v kozarcih ni možno spremljati hitrosti rasti vizualno, smo morali najprej vzpostaviti metodo določevanja biomase.

### 3.6.2.1 Rast na PDA in metoda določevanja biomase

Biomaso smo spremljali s pomočjo merjenja vsebnosti ergosterola, ki je sestavni del celične membrane gliv in se je izkazal kot dober indikator za vsebnost biomase v trdnih vzorcih (Martin s sod., 1990; Nyuland in Wallander, 1992; Klamer in Baath, 2004). Uporabili smo modificirano metodo po Martin s sod. (1990).

Prva stopnja določevanja ergosterola je bila določitev rasti na PDA gojišču in vsebnosti ergosterola v miceliju glive *G. frondosa*.

Petrijevke (višina 13 mm, premer 86 mm) smo napolnili s 35 mL steriliziranega gojišča PDA. Po ohladitvi smo petrijevke nacepili v centru z 10  $\mu$ L tekočega vcepka, ki smo ga pripravili tako, da smo zmleli (3-krat po 20 s) dva tedna staro kulturo glive *G. frondosa* na PDA v 200 mL sterilizirane deionizirane vode. Petrijevke smo nato inkubirali v temi pri 25 °C. Vsak teden smo vzeli tri petrijevke in jim iz površine pazljivo odstranili micelij, katerega smo posušili in stehtali.

Ergosterol smo ekstrahirali s pomočjo etanola (96 vol. %; Merck, Nemčija), kateremu smo dodali 10 ut. % polivinilpirolidona (PVPP; Sigma-Aldrich, ZDA). Za ekstrakcijo 10 mg micelija smo uporabili cca. 1 mL topila. Ekstrakcija je potekala 90 minut na stresalniku pri 200 obr./min in 4 °C.

Ergosterol smo spremljali s pomočjo sistema HPLC (Varian ProStar, ZDA), kjer smo kot mobilno fazo uporabili zmes metanola in acetonitrila v volumskem razmerju 1:1 s pretokom 1 mL/min. Za ločevanje smo uporabili kolono Phenomenex Synergi MAX-RP (C12 RP). Za kvantifikacijo in določitev retenzijskega časa ergosterola, smo uporabili umeritveno krivuljo pripravljenega s prečiščenim ergosterolom (Sigma-Aldrich, ZDA) raztopljenim v etanolu (96 vol. %) in spremljali pri valovni dolžini 254 nm.

Za analizo ergosterola v vzorcih trdnega gojišča preraščenega z micelijem smo uporabili enako topilo kot za določanje ergosterola v miceliju in uporabili smo razmerje 20 mL topilna na 2 grama suhega vzorca.

### 3.6.2.2 Gojenje v steklenih kozarcih

Gojenje je potekalo v steklenih kozarcih volumna 700 mL (slika 11), ki so imeli pokrove z luknjo (3 mm), zamašeno z vato, ki je omogočala izmenjavo plinov.



Slika 11: Preraščeno trdno gojišče v steklenem kozarcu.

Vcepki za gojišča v kozarcih smo pripravili tako, da smo v 250 mL predhodno steriliziranega gojišča (glukoza 30 g/L, kvasni ekstrakt 6 g/L, pepton 2 g/L,  $\text{MgSO}_4$  0,5 g/L,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0,5 g/L,  $\text{MnSO}_4$  0,14 g/L) dodali 30 mL vcepka, kot smo ga uporabili za nacepljanje petrijevk v prejšnjem poglavju. Erlenmajerice s kulturami smo inkubirali dva tedna pri 25 °C, jih nato zmleli (3-krat po 20 s) in uporabili kot vcepki (5 mL).

Kozarce smo napolnili s 40 grammi gojišča jim dodali toliko vode, da je bila vsebnost vode 65 %, jih zaprli s pokrovom in pokrili še z aluminijasto folijo. Kozarce z gojišči smo sterilizirali v avtoklavu 45 min pri 121 °C. Po ohladitvi smo kozarce nacepili s 5 mL tekočega vcepka in jih premešali pod aseptičnimi pogoji. Inkubacija je potekala 47 dni v temi pri temperaturi 25 °C. Vsi poskusi so bili opravljeni v treh ponovitvah.

Prvi poskus je vseboval enaka gojišča, kot so bila uporabljena pri določevanju hitrosti rasti v steklenih tulcih (poglavje 3.6.1), ker pa se je koruznica izkazala kot najboljše gojišče za gojenje, smo poizkušali to gojišče še izboljšati. Za drugi poskus smo pripravili gojišča s sestavo podano v preglednici 8. Odstotek vode v gojišču je znašal 65 %. Zmleto celo rastlino koruze - koruznico, smo pridobili od Zavoda za naravoslovje.

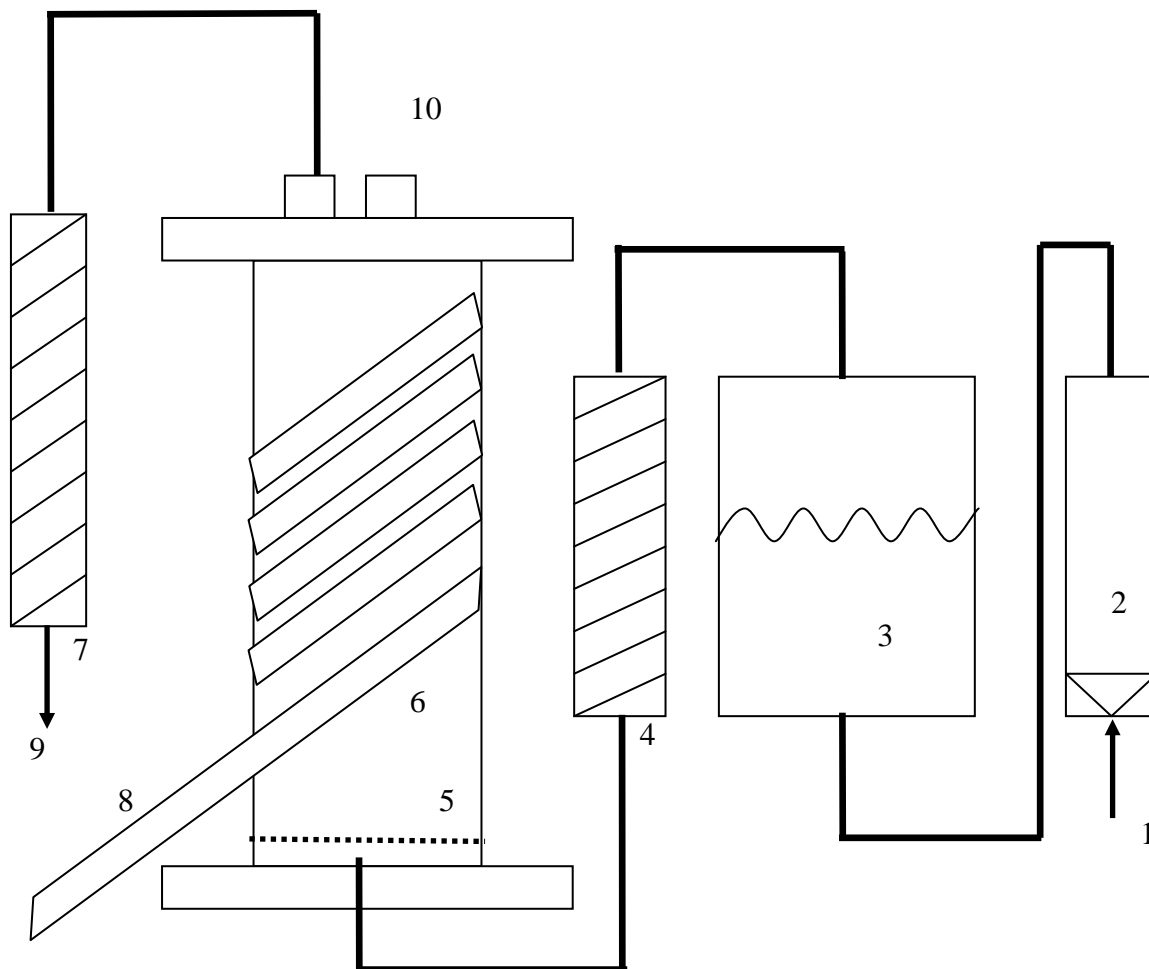
Preglednica 8: Sestava substratov za drugi poskus gojenja v kozarcih.

Gojišče	zmleto cela rastlina koruze (ut. %)	CaCO <sub>3</sub> (ut. %)	oljčno olje (ut. %)
6	98	2	0
7	97,5	2	0,5
8	97	2	1
9	96	2	2

Vsak teden smo vzeli vzorec, mu določili vsebnost vlage in ergosterola (in posledično biomase). Vsebnost vlage smo določevali s pomočjo naprave Mettler Toledo HR83-Moisure Analyzer pri temperaturi 105 °C. Ergosterol smo določevali, kot je opisano v prejšnjem poglavju. Dobitek pripravkov smo določili le na koncu gojenja, saj smo za določitev potrebovali več vzorca (poglavje 3.8.1).

### 3.6.3 Gojenje v laboratorijskem bioreaktorju

Tretja faza poskusov je vključevala prenos v laboratorijski bioreaktor, kjer smo imeli možnost vlaženja in kontrole dodatnega procesnega parametra - prezračevanja. Shema bioreaktorja za trdno gojišče je prikazana na sliki 12, sam bioreaktor pa je prikazan na sliki 13. Bioreaktor smo izdelali na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo. Bioreaktorska posoda je visoka 500 mm in ima premer 100 mm (volumen znaša 3,925 litra).



Slika 12: Shema laboratorijskega bioreaktorja lastne izdelave za gojenje na trdnem gojišču. (1 - vstop zraka, 2 - merilec pretoka zraka, 3 - vlažilec zraka, 4 - vstopni filter, 5 - mrežica za substrat, 6 - bioreaktor, 7 - izstopni filter za zrak, 8 - zunanja grelna kača, 9 - izstop zraka, 10 - mesto za vnos vcepka).



Slika 13: Laboratorijski bioreaktor za gojenje na trdnem gojišču (slikan brez zunanje grelne kače).

### 3.6.3.1 Priprava vcepka

Vcepek smo pripravili tako, da smo v 250 mL predhodno steriliziranega gojišča (glukoza 30 g/L, kvasni ekstrakt 6 g/L, pepton 2 g/L,  $\text{MgSO}_4$  0,5 g/L,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0,5 g/L,  $\text{MnSO}_4$  0,14 g/L) dodali 30 mL predvcepka, ki smo ga pripravili tako, da smo zmleli (3-krat po 20 s) dva tedna staro kulturo glive *G. frondosa* na PDA v 200 mL sterilizirane deionizirane vode. Erlenmajerico s kulturo glive smo inkubirali dva tedna pri 25 °C in jo nato zmleli (3-

krat po 20 s) in uporabili kot vcepki. Količina vcepka je bila proporcionalna količini, ki smo jo uporabili pri gojenju v kozarcih, t.j. 50 mL.

### 3.6.3.2 Gojišče in procesni parametri

Sestava gojišč in procesni parametri, katere smo preverili v laboratorijskem bioreaktorju za gojenje na trdnem gojišču so prikazani v preglednici 9. Pri laboratorijskem bioreaktorju smo imeli možnost spreminjati hitrost prezračevanja in preverili smo rast pri pretoku zraka 1, 5 in 10 L/h. Vpliv pretoka zraka smo preverili le pri gojišču z dodatkom 2 % olja.

Preglednica 9: Sestava gojišč in pretok zraka pri gojenju v laboratorijskem bioreaktorju za gojenje na trdnem gojišču.

Gojišče	zmleta cela rastlina koruze (ut. %)	CaCO <sub>3</sub> (ut. %)	oljčno olje (ut. %)	pretok zraka (L/h)
1	98	2	0	5
2	97,5	2	0,5	5
3	97	2	1	5
4	96	2	2	1
5	96	2	2	5
6	96	2	2	10

Bioreaktor smo napolnili s 400 g gojišča in mu dodali toliko vode, da je vlažnost bila 65 %. Bioreaktor smo zaprli in mu priklopili vstopni iz izstopni filter za zrak ter ga celotnega sterilizirali 3 ure pri 121 °C. Po ohladihvi smo na vstopni filter priklopili vlažilec za zrak (5 litrska steklenica s sterilizirano deionizirano vodo) in merilec pretoka zraka ter bioreaktor ovili z zunanjo grelno kačo. Bioreaktor smo nacepili z dodatkom 50 mL vcepka ob ognju in nastavili temperaturo inkubacije na 25 °C. Fermentacija je trajala 47 dni.

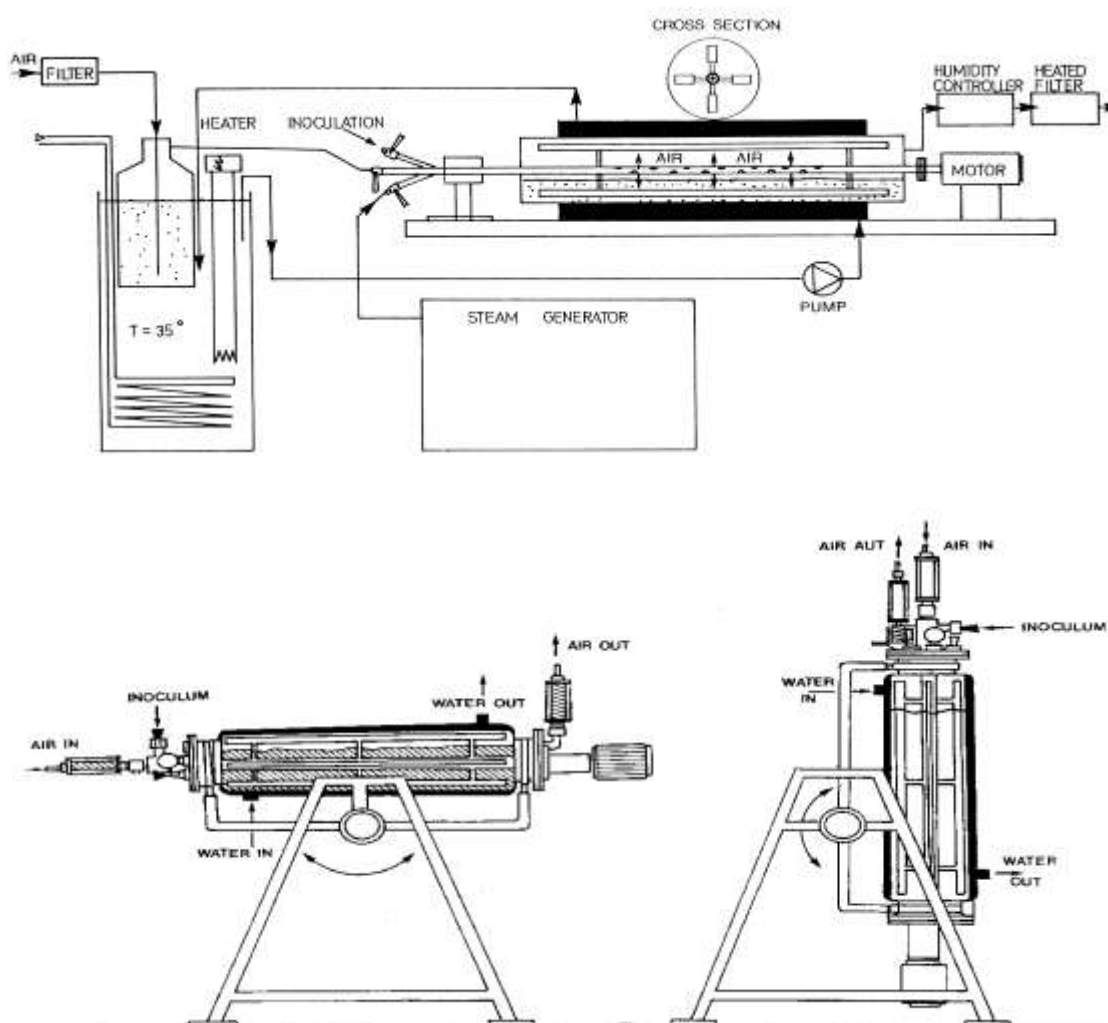
### 3.6.3.3 Vzorčenje, določitev biomase in polisaharidov

Ker pri laboratorijskem bioreaktorju ni mogoče sproti jemati vzorcev (in ni mešanja za zagotavljanje homogenosti) smo poskuse razdelili na dva vzorčenja - na polovici (23. dan) in ob koncu (47. dan). Reprezentativen vzorec smo dobili tako, da smo celotno vsebino bioreaktorja spraznili in posušili. Celotno maso smo nato razdelili na šest enakih delov in naključno izbrali dva, katera smo nato ponovno združili in ponavljali, dokler nismo dobili primerne količine vzorca za ekstrakcijo ergosterola in določitev vsebnosti polisaharidov.

Določevanje vsebnosti vode in biomase je potekalo enako kot pri gojenju na trdnem gojišču v kozarcih (poglavje 3.6.2), vsebnost polisaharidov pa smo določevalo kot je opisano v poglavju 3.8.1.

### 3.6.4 Gojenje v pilotnem horizontalnem mešalnem bioreaktorju

Zadnja faza naših poskusov je bila prenos v pilotni bioreaktor, kjer smo imeli poleg možnosti vlaženja in prezračevanja še možnost mešanja. Shema bioreaktorja je prikazana na sliki 14, bioreaktor v horizontalni poziciji je prikazan na sliki 15, v vertikalni pa na sliki 16. Bioreaktorju lahko poljubno spreminjamo kot nagiba, notranji premer je 140 mm, notranja dolžina pa 1000 mm (volumen znaša 15,39 litra). Bioreaktor je bil po lastni zasnovi izdelan na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo.



Slika 14: Shema pilotnega mešalnega bioreaktorja.



Slika 15: Pilotni mešalni bioreaktor - horizontalna pozicija.



Slika 16: Pilotni mešalni bioreaktor - vertikalna pozicija.

#### 3.6.4.1 Priprava vcepka

Vcepek smo pripravili kot je opisano v poglavju gojenja v laboratorijskem bioreaktorju (poglavje 3.6.3.1). Zaradi pogostih bakterijskih okužb smo v pripravljen vcepek dodali koncentrirano (10 mg/mL) raztopino antibiotika (oksitetraciklin HCl; Krka, Slovenija), tako da je bila končna koncentracija antibiotika v vcepku 10 mg/L. Raztopino antibiotika smo sterilno filtrirali skozi filter s porami 0,2 µm. Volumen vcepka je bil 750 mL. Večji volumen vcepka smo uporabili zaradi manjšega tveganja okužb.

#### 3.6.4.2 Potek sterilizacije in cepljenje

Prazen bioreaktor smo pred uporabo sterilizirali 1-2 uri pri 121 - 131 °C. Po ohladitvi smo iz bioreaktorja izpustili kondenzirano vodo in ga napolnili s pripravljenim gojiščem. Sterilizacija gojišča je potekala 1,5 ure pri temperaturi 121 - 131 °C v več stopnjah. Najprej smo, da bi preprečili nastajanje kondenzata pare in njegovo adsorpcijo v trdnem matriksu, s paro segrevali zunanji plašč bioreaktorja, ko pa se je temperatura v notranjosti bioreaktorja dvignila čez 100 °C smo pričeli z direktnim uvajanjem pare v gojišče. Po eni uri smo prenehali z uvajanjem pare v gojišče in zunanji plašč, zaprli ventile, ki vodijo do notranjosti bioreaktorja ter odprli dotok hladilne vode v zunanji plašč. Ko se je bioreaktor ohladil pod 30 °C smo vklopili temperaturno regulacijo in počakali, da se je temperatura ustalila na 25 °C. Po ohladitvi smo bioreaktor nagnili v pozicijo +45° ter iz njega odlili odvečno vodo. Vcepek smo ob ognju dodali v poziciji +45° in mešali 5 minut ob obračanju bioreaktorja med kotoma -45° in +45°. Po dodatku vcepka smo bioreaktor postavili v končno pozicijo ter ustavili mešanje.

#### 3.6.4.3 Gojišča in procesni parametri

Na pilotnem mešalnem bioreaktorju smo opravili vrsto fermentacij z, različnimi pogoji mešanja, različnim prezračevanjem in različnimi koti nagiba bioreaktorja (horizontalno, pod kotom 45° in vertikalno). Za poskuse smo uporabili najboljše gojišče, ki je pri poskusih iz laboratorijskega bioreaktorja (koruznica 96 %, CaCO<sub>3</sub> 2 % in oljčno olje 2 %) dalo najboljše rezultate. Masa uporabljenega gojišča je bila 2000 g.

Seznam opravljenih poskusov je prikazan v preglednici 10.

Preglednica 10: Shema poskusov v pilotnem bioreaktorju.

Poskus	čas gojenja	režim mešanja	pretok zraka	pozicija
1	42 dni	2 minuti vsake 4 dni	5 L/h	0°
2	35 dni	2 minuti vsake 4 dni	5 L/h	45°
3	38 dni	2 minuti vsake 4 dni	5 L/h	90°
4	28 dni	brez	5 L/h	0°
5	35 dni	2 minuti vsake 4 dni	brez	0°

#### 3.6.4.4 Vzorčenje, določitev biomase in polisaharidov

Pri pilotnem mešalnem bioreaktorju smo odprli kontrolno steklo in ob ognju aseptično vzeli vzorec. Vzorce smo prenesli v čašo, jih posušili v sušilniku pri 105 °C in reprezentativen vzorec dobili, kot je opisano v poglavju 3.6.3.3.

Določevanje vsebnosti vode, biomase in polisaharidov je potekalo enako kot pri gojenju na trdnem gojišču v kozarcih (poglavje 3.6.2).

### 3.6.5 Metoda odzivnih ploskev za študij vpliva hranilnih komponent na rast in vsebnost $\beta$ -glukanov na trdnem gojišču

Po zaključku poskusov, smo želeli še preveriti optimizacijsko metodo (metoda odzivnih ploskev - *response surface methodology* - RSM) in ugotoviti kako hranila v trdnem gojišču vplivajo na rast in vsebnost  $\beta$ -glukanov glive *G. frondosa*.

#### 3.6.5.1 Metoda odzivnih ploskev

Metoda odzivnih ploskev je statistična metoda optimizacije in je pogosto orodje industrijskih raziskav, saj omogoča pridobitev uporabnih podatkov z najmanjšim možnim naborom poskusov. Uporablja se za razvoj novih proizvodov in za optimizacijo procesov. Metoda temelji na statističnem modelu in omogoča sledenju večjega števila odzivov, kar je v nasprotju s klasičnimi načini optimizacije, kjer spreminjamo zgolj en parameter (Bhak s sod., 2005; Cui s sod., 2006).

Uporabili smo matematični model Box-Behnken, kjer smo pet spremenljivk (sestavine trdnega gojišča), razvrstili v tri stopnje (najmanjšo, srednjo in največjo koncentracijo) in jih uredili v matriko.

### 3.6.5.2 Priprava gojišča in zasnova eksperimenta

V petrijevkah smo pripravili 46 gojišč z različno sestavo. V erlenmajericah smo pripravili gojišča s sledečimi komponentami: glukoza (10, 30 ali 50 g/L), kvasni ekstrakt (1, 4 ali 7 g/L), pepton (1, 4 ali 7 g/L), oljčno olje (1, 4 ali 7 g/L) in  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (1, 3 ali 5 g/L) kot je prikazano v preglednici 11. V vsako erlenmajerico smo dodali še 0,6 g agarja in segreli v mikrovalovni pečici, dokler se agar ni popolnoma raztopil.

Končni volumen posameznega gojišča je bil 30 mL. Erlenmajerice z gojišči smo zaprli z zamaški in jih sterilizirali v avtoklavu 25 min pri 121 °C.

Vroč agar smo prelili v petrijevke in po ohladitvi nacepili v centru z 10  $\mu\text{L}$  vcepka (poglavje 3.6.2.1). Sledila je inkubacija 24 dni v temi pri 25 °C.

Rast micelija na površini gojišča smo spremljali s pomočjo fotografiranja in računalniške obdelave, kot je opisano v poglavju 3.6.2.1.

Po 24. dneh inkubacije smo micelij previdno odstranili iz površine gojišča, ga posušili na zraku, stehali in mu določili vsebnost  $\beta$ -glukanov (poglavje 3.8.3). Pri tem poskusu nismo določevali vsebnosti  $\beta$ -glukanov v pripravkih ampak v miceliju.

Podatke smo obdelali s pomočjo programa Design-Expert v 7.0.1 (Stat-Ease, ZDA). Ugotavljali smo vpliv sestave gojišča na hitrost rasti, količino biomase in vsebnost celokupnih glukanov,  $\alpha$ -glukanov in  $\beta$ -glukanov.

Preglednica 11: Sestave gojišč za metodo odzivnih ploskev.

Petrijevka	sestava gojišča				
	glukoza (g/L)	pepton (g/L)	kvasni ekstrakt (g/L)	$\text{KH}_2\text{PO}_4$ (g/L)	o. olje (g/L)

1	30	4	4	3	4
2	10	4	1	3	4
3	30	4	1	3	1
4	50	4	4	3	7
6	50	4	1	3	4
7	10	4	4	3	1
8	30	1	7	3	4
9	30	7	4	5	4
10	30	4	4	3	4
11	30	4	7	5	4
12	30	7	4	3	1
13	10	4	4	5	4
14	30	4	4	5	7
15	10	1	4	3	4
17	30	7	4	1	4
19	10	7	4	3	4
20	30	4	1	5	4
21	30	4	4	5	1
22	30	4	4	1	1
23	30	4	4	3	1
24	10	4	4	3	7
25	30	4	4	3	4
26	10	4	7	3	4
27	10	1	4	3	1
28	30	4	7	3	7
30	10	4	4	1	4
31	30	4	4	1	7
32	30	4	7	1	4
34	30	7	4	3	4
36	50	4	7	3	4
37	30	7	1	3	4
38	50	7	4	3	4
39	30	4	1	1	4
40	50	4	4	3	1
41	30	1	4	1	4
42	30	4	1	3	7
43	50	4	4	5	4
44	30	4	4	3	4
45	30	1	1	3	4
46	30	1	4	3	7

### 3.7 GOJENJE V TEKOČEM GOJIŠČU

Gojenje micelijske biomase v tekočem gojišču je potekalo v več fazah. Prva stopnja je bila preverjanje različnih gojišč ter njihova optimizacija v stresanih kulturah. Preverili smo možnost gojenja v najbolj preprostem načinu – gojenju v mirujoči kulturi, nato pa še različne bolj kompleksne načine gojenja, kot so gojenje v mešalnem reaktorju, reaktorju s trdnimi nosilci in koloni z mehurčki. Pri vsakem načinu gojenja smo preverili različne parametre (hitrost mešanja, prezračevanje, recikliranje substrata ipd.), ki po navedbah vplivajo na produkcijo biomase ter polisaharidov (Lee s sod., 2003; Lee s sod., 2004; Hsieh s sod., 2006; Shih s sod., 2008). Pri gojenju v tekočem gojišču smo pridobili dve vrsti polisaharidov, (1) polisaharide, ki se izločajo v tekoče gojišče (t.i. zunajcelični polisaharidi) in (2) polisaharide, ki so del micelijske biomase (t.j. polisaharidi celične stene, v literaturi opisani tudi kot intracelularni polisaharidi). Iz najboljših produkcijskih sistemov smo pridobili pripravke za nadaljnjo (bio)kemijsko analizo in testiranje biološke aktivnosti.

#### 3.7.1 Izbira gojišča

Za določitev najbolj primerne gojišča smo preverili objavljena gojišča, katerih sestavo so objavili drugi raziskovalci in ki so bila pripravljena z namenom optimizacije proizvodnje biomase in/ali polisaharidov za gojenje glive *G. frondosa*. Preverili smo še nekaj variacij podobnih gojišč.

Poskus je potekal z gojenjem izbranega seva v erlenmajericah z volumnom 500 mL. V vsako erlenmajerico smo dodali 100 mL tekočega gojišča (sestava je podana v preglednici 12) in jih sterilizirali v avtoklavu 20 minut pri temperaturi 121 °C. Po ohladitvi smo gojišča nacepili z 10 mL vcepka (opisano v poglavju 3.6.3.1). Inkubacija je potekala 28 dni pri temperaturi 25 °C in mešanju 150 obr./min. Po končani inkubaciji smo določili vsebnost biomase in polisaharidov, kot je opisano v sledečem poglavju.

Preglednica 12: Sestave preverjenih gojišč za gojenje v tekočem gojišču.

Gojišče	sestava gojišča	referenca
1	glukoza 30 g/L; kvasni ekst. 6 g/L; polipepton 2 g/L; K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,5 g/L; MgSO <sub>4</sub> 0,5 g/L; MnSO <sub>4</sub> 0,2 g/L	Lee s sod. (2004), Bae s sod. (2005)
2	glukoza 45,2 g/L; pepton 6,58 g/L; KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 2,97 g/L	Cui s sod. (2006)
3	glukoza 40 g/L; kvasni ekst. 4 g/L; sladni ekst. 6 g/L; (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 1 g/L	Shih s sod. (2008)
4	glukoza 20 g/L; kvasni ekst. 4 g/L; sladni ekst. 10 g/L; melasa 1 g/L; minerali	Hsieh s sod. (2008)

Ker je po preliminarnih poskusih gojišče, ki ga opisujejo Cui s sod. (2006), dalo najboljše rezultate, smo mu glede na podatke sestave gojišča po Hsieh s sod. (2008) dodali še različne koncentracije oljčnega olja, da bi še povečali donos biomase in polisaharidov. Preverili smo dodatek oljčnega olja v koncentracijah 0, 0,5, 1, 2, 3 in 4 % (w/v).

### 3.7.2 Gojenje v mirujoči kulturi

Po določitvi najboljšega gojišča in temperature rasti smo naredili serijo poskusov gojenja v mirujoči kulturi. Preverili smo, kako poteka gojenje v najmanjši 50 mL erlenmajerici, srednji 500 mL erlenmajerici in veliki, 5000 mL erlenmajerici. Vse smo napolnili z gojiščem, zaprli z vatastim zamaškom in aluminijasto folijo ter sterilizirali 25 minut pri temperaturi 121 °C (slika 17).



Slika 17: Rast glive *G. frondosa* v mirujoči kulturi.

### 3.7.2.1 Vcepek

Vcepek za gojišča v mirujočih kulturah smo pripravili tako, da smo v 250 mL predhodno steriliziranega gojišča (glukoza 30 g/L, kvasni ekstrakt 6 g/L, pepton 2 g/L,  $\text{MgSO}_4$  0,5 g/L,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0,5 g/L,  $\text{MnSO}_4$  0,14 g/L) dodali 30 mL predvcepka, ki smo ga naredili tako, da smo v 200 mL sterilizirane deionizirane vode zmleli dva tedna staro kulturo na PDA. Vcepek smo inkubirali dva tedna pri 25 °C in ga nato zmleli (3-krat po 20 s).

### 3.7.2.2 Gojišče, inkubacija in vzorčenje

Uporabili smo tisto gojišče, ki je dalo najboljše rezultate pri prejšnjih poskusih t.j. gojišče, ki je bilo sestavljeno iz glukoze 45,2 g/L; peptona 6,58 g/L;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2,97 g/L z 2 % dodatkom oljčnega olja. Gojišču smo vrednost pH uravnali na 4,5 s pomočjo koncentrirane  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (Merck, Nemčija). Volumen gojišča za 50 mL erlenmajerico je bil 15 mL, za 500 mL erlenmajerico 150 mL in za 5 litrsko erlenmajerico 1500 mL. Količine vcepka so bile

1,5, 15 in 150 mL (= 10 %). Ker nismo imeli zadosti velikega inkubatorja je inkubacija potekala 28 dni pri sobni temperaturi 20-23 °C. Vzorčili smo tako, da smo vsakih 7 dni fermentacijo prekinili in kot vzorec uporabili celotno vsebino erlenmajerice. Poskus smo opravili v treh ponovitvah.

#### *3.7.2.3 Določevanje biomase*

Biomaso smo določili tako, da smo iz vzorca s pomočjo staničevine najprej ločili velike dele biomase in nato še s pomočjo predhodno stehtanega filtra in vakuumske črpalke ločili manjše dele biomase. Ločeno biomaso smo nato še dva krat sprali z enakim volumnom deionizirane vode, da smo odstranili ostanke gojišča. Tako sprano biomaso smo sušili 24 ur pri 105 °C, ohladili v eksikatorju ter stehtali. Iz znanega volumna vzorca smo izračunali koncentracijo biomase.

#### *3.7.2.4 Določevanje polisaharidov*

Polisaharide celične stene (t.i. intracelularne polisaharide) smo izolirali kot je opisano v patentu za MD frakcijo (Nanba s sod., 1998) in kot je opisano v poglavju 3.8.1 s to razliko, da smo vlažnemu miceliju najprej določili vsebnost vode in nato priredili količino dodane vode s katero smo ekstrahirali polisaharide, saj je micelij vseboval več vode kot trosnjaki (95 % naproti 85 %).

Zunajcelične polisaharide smo določili, kot je opisano v poglavju 3.8.1.

### **3.7.3 Gojenje v mešalnem bioreaktorju**

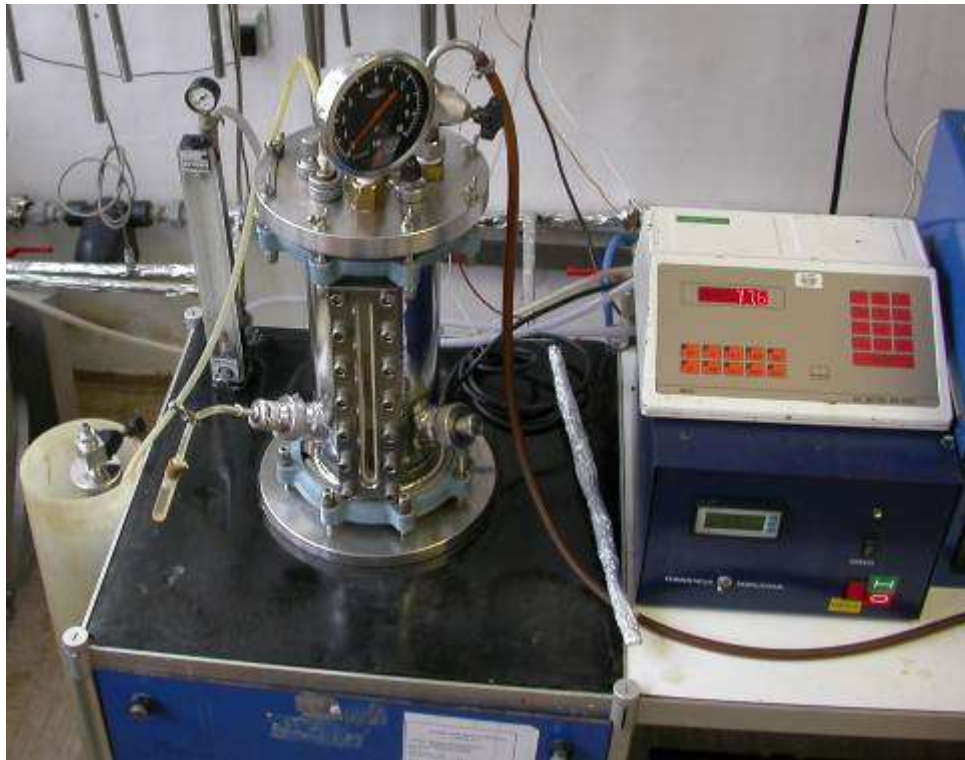
Gojenje v mešalnih bioreaktorjih nam je predstavljalo največ težav, saj nikakor nismo uspeli replicirati poskusov, ki so opisani v literaturi (Lee s sod., 2004, Bae s sod., 2005, Cui s sod., 2006, Hsieh s sod., 2006). Zaradi suma, da težave povzroča sev, smo dodatno še preizkusili sev GF10.

### 3.7.3.1 Bioreaktorji

Za gojenje v mešalnem bioreaktorju smo uporabili štiri različne bioreaktorje. Prvi je bil model KLF (Bioengineering, Švica) z delovnim volumnom 2,1 L (slika 18). Drugi trije pa prav tako od podjetja Bioengineering a z delovnimi volumni 7 - (STR 7L), 10 (STR 10L) in 18 (STR 18L) litrov (slika 19, 20, 21). Vsi bioreaktorji so bili opremljeni z regulacijo temperature in hitrosti mešanja ter merilcem vrednosti pH.



Slika 18: Mešalni bioreaktor Bioengineering KLF z delovnim volumnom 2 L.



Slika 19: Mešalni bioreaktor z delovnim volumnom 7 L.



Slika 20: Mešalni bioreaktor z delovnim volumnom 10 L.



Slika 21: Mešalni bioreaktor z delovnim volumnom 18 L.

### 3.7.3.2 Vcepek

Vcepek za uporabo v mešalnih bioreaktorjih smo pripravili na dva načina in pri vsaki fermentaciji je bila količina uporabljenega vcepka enaka (10 % (v/v)). Vcepek smo v bioreaktor dodali pod aseptičnimi pogoji (ob ognju).

Prvo način priprave vcepka smo pripravili tako, da smo v 250 mL predhodno steriliziranega gojišča (glukoza 30 g/L, kvasni ekstrakt 6 g/L, pepton 2 g/L,  $\text{MgSO}_4$  0,5 g/L,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0,5 g/L,  $\text{MnSO}_4$  0,14 g/L) dodali 30 mL predvcepka, ki smo ga naredili tako,

da smo v 200 mL sterilizirane deionizirane vode zmleli dva tedna staro kulturo na PDA. Vcepek smo inkubirali dva tedna pri 25 °C. Priprava vcepka je zelo podobna pripravi vcepka opisanega v poglavju 3.7.2.1 s to razliko, da vcepka na koncu ne zmeljemo. Po takem načinu priprave, imamo po inkubaciji v erlenmajerici veliko število peletov (slika 22). Ta način priprave vcepka je zelo podoben pripravi vcepka kot ga opisujejo Lee s sod. (2004).



Slika 22: Prva varianta vcepka za uporabo v mešalnih bioreaktorjih (vcepek v obliki peletov).

Drugi način priprave vcepka je identičen, kot je opisano v poglavju 3.7.2.1 in se od zgornjega loči po tem, da na koncu gojišče s peleti zmeljemo (slika 23). Ta način priprave vcepka je zelo podoben pripravi vcepka kot ga opisujejo Hsieh s sod. (2006).



Slika 23: Druga varianta vcepka za uporabo v mešalnih bioreaktorjih (zmlet vcepek).

### 3.7.3.3 Gojišče

Uporabili smo gojišče, ki je dalo najboljše rezultate pri prejšnjih poskusih t.j. gojišče, sestavljeno iz glukoze 45,2 g/L; peptona 6,58 g/L;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2,97 g/L in 2 % dodatkom oljčnega olja. Gojišču smo vrednost pH uravnali na 4,5 s pomočjo koncentrirane  $\text{H}_3\text{PO}_4$ .

### 3.7.3.4 Poskusi v mešalnih bioreaktorjih

Ker so se pri gojenju v mešalnih bioreaktorjih pojavljale težave zaradi sprijemanja biomase in bakterijskih okužb v vseh bioreaktorjih razen v bioreaktorju KLF, smo poskuse razdelili v dve fazi. V prvi seriji poskusov smo preverili gojenje v različnih mešalnih bioreaktorjih in preverili možnost vpliva oblike vcepka in izbire seva na gojenje. Gojenje je trajalo od 25 do 40 dni.

Vrsta uporabljenega bioreaktorja, oblika vcepka, izbira seva in procesni parametri so prikazani v preglednici 13.

Preglednica 13: Prva faza poskusov v mešalnih bioreaktorjih.

<b>Bioreaktor</b>	<b>oblika vcepka</b>	<b>sev</b>	<b>hitrost mešanja (obr./min)</b>	<b>pretok zraka (L/h)</b>
KLF	zmlet vcepek	GF 3	200	50
KLF	peleti	GF 3	200	50
KLF	zmleti vcepek	GF 10	200	50
KLF	peleti	GF 10	200	50
STR 7L	zmleti vcepek	GF 3	300	100
STR 7L	peleti	GF 3	300	100
STR 10L	zmleti vcepek	GF 3	300	100
STR 10L	peleti	GF 3	300	100
STR 18L	zmleti vcepek	GF 3	300	100

Ker smo v prvi fazi ugotovili, da reprezentativnega vzorca ni mogoče pridobiti (zaradi specifične rasti biomase), smo se odločili za delo v bioreaktorju KLF in spremenili način vzorčenja. Tako smo opravili drugo serijo poskusov, v kateri smo preverili vpliv različnih procesnih parametrov na potek fermentacije.

Pri vseh nadaljnjih fermentacijah smo uporabili zmlet vcepek. Način vzorčenja je bil enak pri gojenju v mirujoči kulturi (poglavje 3.7.2.2) t.j. fermentacijo smo vsakih sedem dni prekinili in kot vzorec uporabili celotno vsebino bioreaktorja. Določevanje biomase in zunajceličnih polisaharidov je opisano v poglavju 3.7.2.3 in 3.7.2.4. Vrednost pH smo spremljali kontinuirano t.j. *on-line*. Procesni parametri, uporabljeni pri fermentacijah so predstavljeni v preglednici 14.

Preglednica 14: Procesni parametri pri gojenju v mešalnem bioreaktorju KLF.

Serijska fermentacija	hitrost mešanja (obr./min)	pretok zraka (L/h)	število ponovitev	čas gojenja (dni)
1	100	50	2	28
2	300	50	2	28
3	600	50	2	28
4	900	50	3	28

### 3.7.3 Gojenje v bioreaktorju s polnili

Ker smo pri poskusih v mešalnih bioreaktorjih opazili tendenco micelija, da se prijema na površine, smo preverili možnost gojenja v bioreaktorju, ki je napolnjen s trdnimi nosilci, kjer bi se micelij lahko prosto razraščal. Izdelali smo lastni bioreaktor, ki je prikazan na slikah 24 in 25.

Bioreaktor je visok 400 mm in ima premer 100 mm (volumen je 3,14 litra). Polnilo so predstavljali stekleni valjasti obročki z višino in premerom 10 mm ter debelino stene 1 mm. Volumen polnila je bil 2 litra. Majhno velikost polnil smo izbrali z namenom zmanjšanja tvorbe večjih skupkov micelija, kar bi olajšalo difuzijo hranil in plinov.

Priprava gojišča in vcepka sta opisana v poglavjih 3.7.2.1 in 3.7.2.2. Volumen gojišča je bil 1500 mL in vcepka 150 mL. Bioreaktor z gojiščem smo sterilizirali 45 minut v avtoklavu pri 121 °C. Temperatura inkubacije je bila 25 °C, pretok zraka pa 50 L/h.

Čas gojenja je bil 28 dni in vzorčili smo na enak način kot pri gojenju v mirujoči kulturi in pri mešalnih bioreaktorjih t.j. na vsakih 7 dni smo prekinili fermentacijo in kot vzorec uporabili celotno vsebino bioreaktorja. Določevanje biomase in zunajceličnih polisaharidov je opisano v poglavju 3.7.2.3 in 3.7.2.4. Vrednost pH smo spremljali ob vsakem vzorčenju t.j. *off-line*. Največjo težavo pri točnem določevanju biomase je predstavljalo čiščenje steklenih valjev. Poskus smo opravili v dveh ponovitvah.





Slika 25: Laboratorijski bioreaktor za gojenje v tekočem gojišču na trdnih nosilcih (slikan brez zunanje grelne kače).

#### 3.7.4 Gojenje v koloni z mehurčki

Četrty način gojenja v tekočem gojišču je potekal v koloni z mehurčki (26 - 3.x+15). Bioreaktor je lastne konstrukcije in shema bioreaktorja je identična bioreaktorju prikazanemu na sliki 12, s to razliko, da v njem ni bilo mrežice za zadrževanje trdega gojišča, kot distributor zraka pa je služil cevni obroč premera 5 cm z luknjami.



Slika 26 - 3.x+15: Bioreaktor za gojenje v tekočem gojišču - kolona z mehurčki.

Priprava gojišča in vcepka sta opisana v poglavjih 3.7.2.1 in 3.7.2.2. Volumen gojišča je bil 3000 mL in vcepka 300 mL. Bioreaktor z gojiščem smo sterilizirali 45 minut pri temperaturi 121 °C. Temperatura inkubacije je bila 25 °C. Čas inkubacije je bil 28 dni in vzorce smo jemali vsake 3-4 dni. Določevanje biomase in zunajceličnih polisaharidov je opisano v poglavju 3.7.2.3 in 3.7.2.4. Vrednost pH smo spremljali ob vsakem vzorčenju t.j. »off-line«.

Z gojenjem v koloni z mehurčki smo želeli še preveriti, kako sestava substrata vpliva na sestavo pripravkov in biološko aktivnost, zato smo poleg optimiziranega gojišča (glukoza 45,2 g/L; pepton 6,58 g/L;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2,97 g/L, oljčno olje 2 %) uporabili še gojišča z različno vsebnostjo oljčnega olja (0 - 2 %).

Shema eksperimentov je prikazana v preglednici 15, fermentacije so bile opravljene v treh ponovitvah.

Preglednica 15: Procesni parametri in sestava gojišča za gojenje v koloni z mehurčki.

Serijska fermentacija	Vsebnost olja v gojišču (%)	pretok zraka (L/h)
1	2	20
2	2	50
3	2	100
4	0	50
5	0,5	50
6	1	50

### 3.8 PRIPRAVA IN (BIO)KEMIJSKA ANALIZA PRIPRAVKOV

#### 3.8.1 Priprava grobih pripravkov

Polisaharide celične stene (intracelularne) smo izolirali kot je opisano v patentu za MD frakcijo (Nanba s sod., 1998). Ekstrakcija polisaharidov je potekala z kuhanjem zmletega micelija v deionizirani vodi (100 °C, 1 ura). Razmerje med micelijem in vodo je bilo 1:1,5. Ekstrakcija je potekala dva-krat pod istimi pogoji z dodatkom svežega topila. Po ohladitvi smo ekstrakt filtrirali s pomočjo vakuumske črpalke.

Filtratu smo dodali etanol (96 vol. %) do koncentracije 45 vol. %. in pustili, da precipitira prva frakcija (4 °C, 12-24 ur). Izoborjene snovi smo ločili s ponovnim filtriranjem. Filtratu smo ponovno dodali etanol (96 vol. %) do končne koncentracije 90 vol. %. in ponovno pustili 12-24 ur pri temperaturi 4 °C. Končni precipitat smo na koncu ločili s 5-10 minutnim centrifugiranjem pri 3500 obr./min ter polisaharide posušili v sušilniku (slika 27).

Vsebnost zunajceličnih polisaharidov smo določili tako, da smo filtrirano gojišče tretirali kot vodno raztopino polisaharidov celične stene po ekstrakciji (glej prejšnje poglavje). Na kratko, filtriranemu gojišču smo najprej dodali toliko etanola, da je bila končna koncentracija le-tega 45 % (v/v), pustili, da precipitirajo prvi polimeri in nato dodali še toliko etanola, da je bila končna koncentracija 90 % (v/v). Polisaharide smo nato ločili s centrifugiranjem pri 3500 obr./min, posušili in stehali.



Slika 27: Filtracija in precipitacija polisaharidov.

### 3.8.2 Določevanje vsebnosti celokupnih sladkorjev

Vsebnost celokupnih sladkorjev smo določili s fenol-sulfurično metodo po Dubois s sod. (1956). Na kratko, vzorce smo raztopili v deionizirani vodi in k 0,5 mL vzorca smo v močnem curku dodali 1,5 mL koncentrirane žveplene kisline (Sigma-Aldrich, ZDA). Po inkubaciji (30 minut, sobna temperatura) smo vzorcem dodali 0,3 mL 5 % raztopine fenola (Kemika, Hrvaška) in inkubirali 5 minut pri temperaturi 90 °C. Po ohladitvi smo vzorcem s pomočjo spektrofotometra izmerili absorbanco pri 492 nm. Vrednosti smo kvantificirali z uporabo umeritvene krivulje pripravljene z glukozo. Analize smo izvedli v treh ponovitvah.

### 3.8.3 Določevanje vsebnosti celokupnih glukanov, $\alpha$ -glukanov in $\beta$ -glukanov

$\beta$ -glukane smo določevali z metodo, katere načelo je raztapljanje le-teh v koncentrirani klorovodikovi kislini. Po nevtralizaciji je sledila hidroliza aktivnih komponent z dodatkom visoko prečiščenih ekso-1,3- $\beta$ -glukanaz in  $\beta$ -glukozidaze. Koncentracijo  $\beta$ -glukanov smo izračunali s pomočjo izmerjenih absorbanc raztopin celokupnih glukanov in  $\alpha$ -glukanov. Reagente, potrebne za določevanje, smo pridobili v kompletu za določevanje  $\beta$ -glukanov v glivah in kvasovkah (Megazyme, Irska). Za hidrolizo in pripravo pufrov smo potrebovali še HCl (Merck, Nemčija), KOH (Merck, Nemčija), NaOH (Riedel-de Haën, Nemčija) ter ocetno kislino (Sigma-Aldrich, ZDA).

### 3.8.3.1 Določevanje vsebnosti celokupnih glukanov

Na analitski tehtnici smo v steklene epruvete zatehtali približno 50 mg vzorca. Vzorcem smo dodali 0,75 mL koncentrirane HCl, jih zaprli ter dobro premešali. Sledila je 45 minutno termostatiranje pri temperaturi 30 °C. Vzorce smo vsakih 15 minut premešali, da smo zagotovili popolno raztapljanje. Po koncu smo vzorcem dodali 5 ml destilirane vode in jih ponovno premešali. Vzorce smo nato termostatirali pri temperaturi 100 °C in jim po ohladitvi na sobno temperaturo dodali 5 mL 2M KOH. Vzorce smo nato kvantitativno prenesli v 50 mL bučke, jih dopolnili do 50 mL z 200 mM natrijevim acetatom (pH 5,0) in jih premešali. Vzorce smo prenesli v centrifugirke in jih centrifugirali 10 minut pri 3500 obr./min. Po centrifugiranju smo odpipetirali 50 µL (dve paralelki ) in dodali 50 µL pripravka  $\alpha$ -1,3- $\beta$ -glukanaze (20 U/mL),  $\beta$ -glukozidaze (4 U/mL) v 200 mM natrijevem acetatu (pH 5,0) ter 60 minut termostatirali pri temperaturi 40 °C. Po inkubaciji smo vzorcem dodali 1,5 mL GOPD reagenta (glukoza oksidaza/peroksidaza reagent) ter ponovno termostatirali 20 minut pri 40 °C. Vzorcem smo z uporabo spektrofotometra izmerili absorbanco pri 510 nm.

### 3.8.3.2 Določevanje vsebnosti $\alpha$ -glukanov

Na analitski tehtnici smo v steklene epruvete zatehtali približno 50 mg vzorca, mu dodali magnetno mešalo in 1 mL 2M KOH. Epruvete z vzorci smo termostatirali 20 minut v ledeni kopeli ob mešanju (300 obr./min). Vzorcem smo med mešanjem dodali 4 mL 1,2 M raztopine natrijevega acetata (pH 3,8) ter 0,1 mL amiloglukozidaze (1630 U/mL) z invertazo (500 U/mL). Vzorce smo inkubirali 30 minut pri temperaturi 40 °C. Po končani inkubaciji smo jih kvantitativno prenesli v 50 mL bučke, dopolnili z destilirano vodo, jih premešali in prenesli v centrifugirke ter centrifugirali 10 minut pri 3500 obr./min. Po centrifugiranju smo odpipetirali 50 µL (dve paralelki ) in dodali 50 µL 200 mM natrijevega acetata (pH 5,0) in 1,5 mL GOPD reagenta (glukoza oksidaza/peroksidaza reagent) ter termostatirali 20 minut pri 40 °C. Vzorcem smo na spektrofotometru izmerili absorbanco pri 510 nm (slika 28).

### 3.8.3.3 Izračun vsebnosti $\beta$ -glukanov

Vsebnost utežnih deležev  $\beta$ -glukanov smo izračunali tako, da smo od utežnega deleža celokupnih glukanov odšteli utežni delež  $\alpha$ -glukanov s pomočjo enačb:

$$\text{celotni glukan} \left[ \% \frac{w}{w} \right] = \Delta E \times F \times \frac{100}{0.1} \times \frac{1}{1000} \times \frac{100}{W} \times \frac{162}{180} = \Delta E \times \frac{F}{W} \times 90 \quad (1)$$

$$\alpha - \text{glukan} \left[ \% \frac{w}{w} \right] = \Delta E \times F \times 103 \times \frac{1}{1000} \times \frac{100}{W} \times \frac{162}{180} = \Delta E \times \frac{F}{W} \times 9,27 \quad (2)$$

$$\beta - \text{glukan} = \text{celotni glukan} - \alpha - \text{glukan} \quad (3)$$

$\Delta E$ = absorbanca vzorca - absorbanca slepega vzorca

$F$ = faktor s katerim spremenimo absorbanco v  $\mu\text{g}$  D-glukoze

$1000/0,1$ = faktor razredčitve

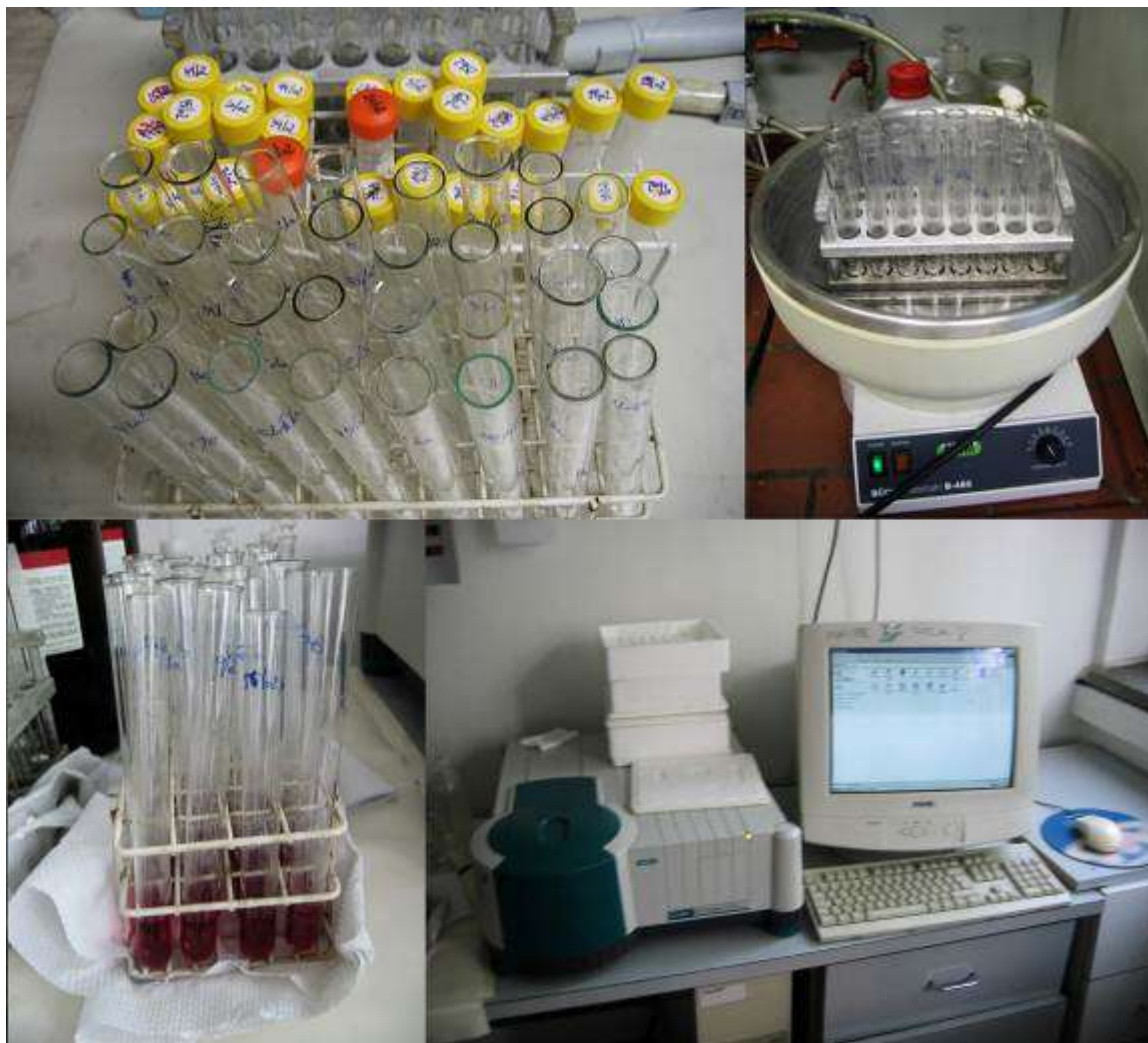
$103$ = faktor razredčitve

$1/1000$ = sprememba enote iz  $\mu\text{g}$  v  $\text{mg}$

$100/W$ = faktor, s katerim je potrebno pomnožiti vrednost, da dobimo 100 mg vzorca

$W$ = masa vzorca

$162/180$ = faktor, s katerim spremenimo koncentracijo proste D-glukoze (kot anhidrid)



Slika 28: Spektrofotometrično določevanje  $\beta$ -glukanov.

### 3.8.4 Določevanje vsebnosti proteinov

Vsebnost proteinov v vzorcih smo določili s kolorimetrično metodo po Bradford (1976). Na kratko, vzorec smo raztopili v deionizirani vodi, ga segreli in pripravili primerno razredčitev. Vzorcju (100  $\mu$ L) smo dodali reagent, ki vsebuje barvilo Coomassie brilijantno modro (5 mL; Sigma-Aldrich, ZDA) in inkubirali 10 minut na sobni temperaturi. Absorbanco smo izmerili s pomočjo spektrofotometra pri 595 nm. Kot standard smo uporabili goveji serumski albumin (BSA) s katerim so pripravili umeritveno krivuljo v 0,15 M NaCl. Analize smo izvedli v treh ponovitvah.

### 3.9 DOLOČEVANJE BIOLOŠKE AKTIVNOSTI

#### 3.9.1 Določevanje indukcije sinteze vnetnega citokina TNF- $\alpha$

##### 3.9.1.1 Aktivacija celic

Določanje sposobnosti indukcije citokinov *in vitro* na mononuklearnih celicah iz venske krvi (PBMC) smo povzeli po že objavljenih modelih (Simčič s sod., 2000; Berovič s sod., 2003; Švigelj s sod., 2008; Stopinšek s sod., 2011).

Vse, razen posebej naštetih kemikalij, ki smo jih uporabili za določevanje indukcije sinteze TNF- $\alpha$ , smo kupili pri podjetju Sigma-Aldrich (ZDA) in so bile po zagotovilih proizvajalca preizkušene na celičnih linijah (vsebovale so manj kot 1 EU/mL endotoksina).

PBMC smo iz venske krvi zdravih darovalcev izolirali na gostotnem gradientu z uporabo medija Ficoll-Paque (GE HealthCare, Velika Britanija). Izolirane celice smo obarvali z barvilom (tripan modro) in jim z uporabo števne celice določil koncentracijo. Za gojenje celic PBMC in pripravo aktivatorjev smo uporabili medij RPMI 1640 z dodatkom L-glutamina (2 mM), penicilina (100 U/mL), streptomocina (100  $\mu$ g/mL) in toplotno inaktiviranega fetalnega telečjega serumu (10 %).

Celice smo gojili na ploščah za celične kulture (24 luknjic). V vsako vdolbinico smo odpipetirali 1 mL celične suspenzije s koncentracijo  $10^6$  celic/mL in 0,5 mL dodatkov. Da bi preprečili indukcijo sinteze TNF- $\alpha$  zaradi možne kontaminacije z LPS, smo dodali polimiksin B (50  $\mu$ g/mL).

Izbrane polisaharide smo raztopili v mediju RPMI 1640 v koncentraciji 30 mg/mL. Polisaharidi iz trosnjakov so se slabše raztapljali in smo jih zato segreli v vodni kopeli (20 minut pri 60 °C in 20 minut pri 80 °C). Po raztapljanju smo pripravke centrifugirali in sterilno filtrirali (0,2  $\mu$ m).

Pripravke, smo testirali pri končni koncentraciji 200  $\mu$ g/mL. Kot pozitivno kontrolo smo uporabili LPS, kot negativno kontrolo hranilni medij, kot kontrolo delovanja polimiksina B pa raztopino lipopolisaharida.

Inkubacija celic je potekala 4 ure v inkubatorju pri temperaturi 37 °C in 5 % CO<sub>2</sub>. Po inkubaciji smo celice ločili od gojišča in supernatant zmrznili.

Sposobnost indukcije sinteze TNF- $\alpha$  smo določili pripravkom dobljenim iz trosnjakov (preglednica 16), določenim pripravkom iz gojenja na trdnem gojišču (preglednica 17) in določenim pripravkom iz gojenja v tekočem gojišču (preglednica 18).

Preglednica 16: Pripravki iz trosnjakov, katerim smo določili sposobnost indukcije TNF- $\alpha$ .

Oznaka vzorca	pripravek iz gojišča	opomba
1	1	preglednica 4 - 3.5.1
2	2	
3	3	
4	4	
5	5	
6	6	
7	7	preglednica 6 - 3.5.3
8	8	
9	9	
10	10	
11	11	
12	12	
13	13	
14	14	
15	15	
16	komercialni izdelek	poglavje 3.5

Preglednica 17: Pripravki iz gojenja na trdnem gojišču, katerim smo določili sposobnost indukcije TNF- $\alpha$ .

Oznaka vzorca	pripravek	opomba
17	biomasa iz kozarcev, gojišče 9	preglednica 8 - 3.x+1
18	biomasa iz laboratorijskega bioreaktorja, gojišče 1	preglednica 9 - 3.x+1_a
19	biomasa iz laboratorijskega bioreaktorja, gojišče 2	
20	biomasa iz laboratorijskega bioreaktorja, gojišče 3	
21	biomasa iz laboratorijskega bioreaktorja, gojišče 5	
22	biomasa iz pilotnega mešalnega bioreaktorja, poskus 1	preglednica 10 - 3.x+2

Preglednica 18: Pripravki iz gojenja v tekočem gojišču, katerim smo določili sposobnost indukcije TNF- $\alpha$ .

Oznaka vzorca	pripravek	opomba
23	polisaharidi celične stene iz gojenja v koloni z mehurčki, serija 4, 0% olja	preglednica 15
24	polisaharidi celične stene iz gojenja v koloni z mehurčki, serija 5, 0,5 % olja	
25	polisaharidi celične stene iz gojenja v koloni z mehurčki, serija 6, 1 % olja	
26	polisaharidi celične stene iz gojenja v koloni z mehurčki, serija 2, 2 % olja	
27	zunajcelični polisaharidi iz iz gojenja v koloni z mehurčki, serija 4, 0 % olja	
28	zunajcelični polisaharidi iz iz gojenja v koloni z mehurčki, serija 5, 0,5 % olja	
29	zunajcelični polisaharidi iz iz gojenja v koloni z mehurčki, serija 6, 1 % olja	
30	zunajcelični polisaharidi iz iz gojenja v koloni z mehurčki, serija 2, 2 % olja	
31	polisaharidi celične stene iz gojenja v mešalnem bioreaktorju, serija 4	
32	zunajcelični polisaharidi iz gojenja v mešalnem bioreaktorju, serija 4	



Slika 29: Izolacija PBMC iz krvi.

### 3.9.1.2 Določevanje vnetnega citokina TNF- $\alpha$ s testom ELISA

Koncentracijo vnetnega citokina TNF- $\alpha$  v supernatantih smo določevali z encimskoimunskim testom ELISA (Milenia Biotec, Nemčija). Občutljivost testa je bila 6 pg/mL. Določevanje je potekalo po navodilih proizvajalca. Na kratko, vzorce smo prenesli na mikrotitrne ploščice s 96 vdolbinicami, v katerih so vezana primarna protitelesa za TNF- $\alpha$ . V drugi stopnji smo dodali protitelesa z encimi za primarni konjugat in dodali reagent za razvijanje barve. Nato smo dodali reagent, ki ob reakciji spremeni barvo. Intenzivnost obarvanja je bila sorazmerna koncentraciji citokina in smo jo spremljali z uporabo spektrofotometra pri 450 nm. Za kvantifikacijo vsebnosti TNF- $\alpha$  smo uporabili umeritveno krivuljo.

### 3.9.2 Določevanje ekspresije mRNA receptorjev za prepoznavo $\beta$ -glukanov

Določevanje ekspresije mRNA receptorjev za prepoznavo  $\beta$ -glukanov smo opravili po objavljeni metodi (Stopinsek s sod., 2011). Vse potrebne reagente in kemikalije za določanje izražanja ekspresije mRNA receptorjev smo kupili pri podjetju Applied Biosystems (ZDA).

PBMC smo izolirali in aktivirali z enakimi pripravki, kot je opisano v prejšnjem poglavju. Po aktivaciji, smo supernatant odlili in celicam izolirali celokupno RNA. Izolirano RNA smo nato prepisali v cDNA s pomočjo reverzne transkriptaze. Na pridobljeni cDNA smo z verižno reakcijo s polimerazo v realnem času (rt-PCR) določili relativno razliko izražanja genov, ki kodirajo receptorje za prepoznavo  $\beta$ -glukanov (dektin-1 Hs00224028\_m1, TLR2 Hs00610101\_m1, TLR4 Hs01060206\_m1 in MR Hs00267207\_m1). Za primerjavo ekspresije smo uporabili gen za 18S rRNA. Za kvantifikacijo izražanja genov pa smo uporabili metodo  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ . Rezultate smo normalizirali na kontrolni vzorec, ki je vseboval medij za gojenje celic z dodatkom polimiksina B.

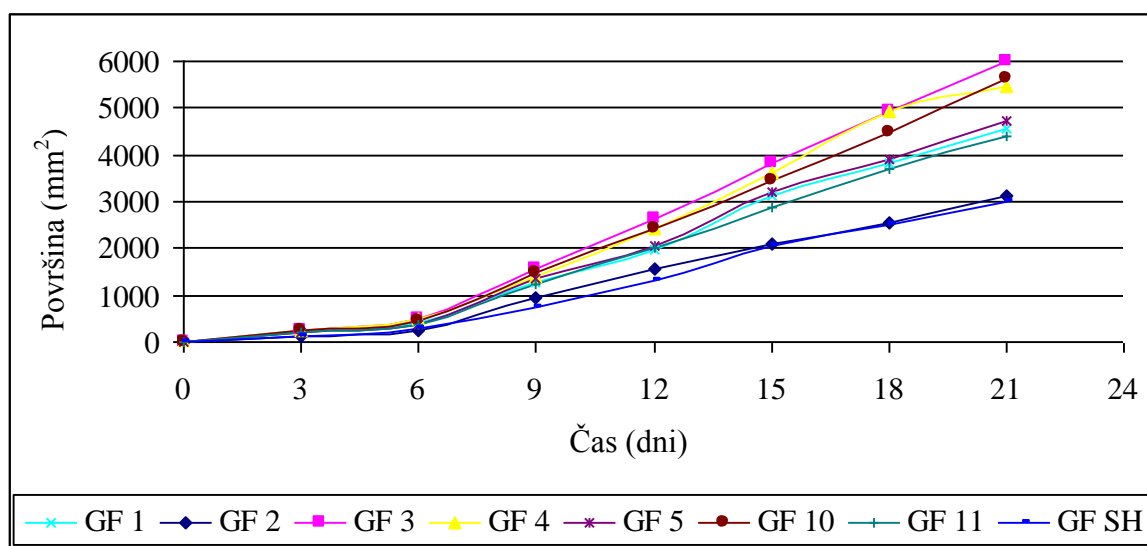
Oznake vzorcev so enake kot pri preglednicah 16, 17 in 18.

## 4 REZULTATI

### 4.1 PRESEJALNI TESTI SEVOV

#### 4.1.1 Presejalni test z gojenjem na trdnem gojišču

Za izbiro seva za gojenje na trdnem gojišču smo naredili presejalni test sevov na gojišču PDA v petrijevkah. Med inkubacijo smo petrijevke fotografirali, računalniško obdelali in kot rezultat podali površino micelija na gojišču v odvisnosti od časa. Ugotovili smo, da je sev GF 3 najhitreje prerasel celotno površino petrijevke, drugi najhitrejši je bil sev GF 10 in tretji GF 4. Seva z najpočasnejšo rastjo sta bila GF 2 in GF SH (slika 30). Največje hitrosti rasti so bile 278 mm<sup>2</sup>/dan (GF 1), 191 mm<sup>2</sup>/dan (GF 2), 367 mm<sup>2</sup>/dan (GF 3), 332 mm<sup>2</sup>/dan (GF 4), 291 mm<sup>2</sup>/dan (GF 5), 345 mm<sup>2</sup>/dan (GF 10), 269 mm<sup>2</sup>/dan (GF 11) in 182 mm<sup>2</sup>/dan (GF SH).

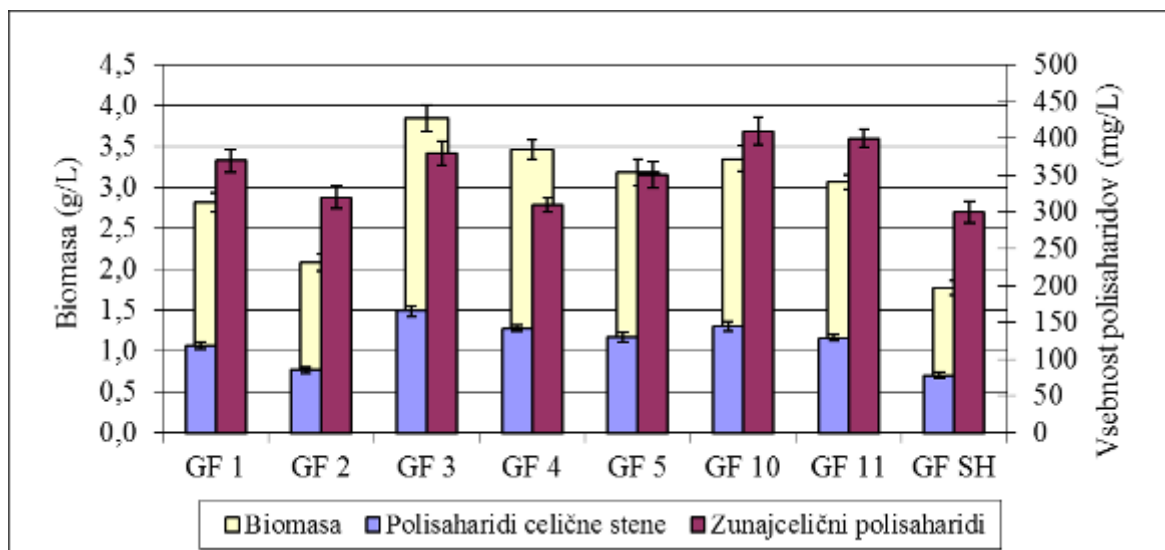


Slika 30: Rast micelija različnih sevov na gojišču PDA v petrijevkah.

#### 4.1.2 Presejalni test z gojenjem v tekočem gojišču

Za izbiro seva za gojenje v tekočem gojišču smo naredili presejalni test sevov v tekočem gojišču v erlenmajericah. Erlenmajerice z različni sevi smo v istem gojišču gojili 21 dni pri temperaturi 25 °C. Po koncu inkubacije smo določili vsebnost biomase, polisaharidov

celične stene in zunajceličnih polisaharidov. Največji dobitok biomase smo dobili pri sevu GF 3 (3,8 g/L), najmanj pa pri sevu GF SH (1,8 g/L). Podobno je bilo z vsebnostjo polisaharidov celične stene (170 mg/L in 80 mg/L). Največji dobitok zunajceličnih polisaharidov smo dobili pri sevu GF 10, kjer smo dobili 410 mg/L, najmanj pa pri sevu GF SH, kjer smo jih dobili 300 mg/L (slika 31).



Slika 31: Dobitek biomase, polisaharidov celične stene in zunajceličnih polisaharidov pri različnih sevih v tekočem gojišču.

## 4.2 GOJENJE TROSNJAKOV

Pri gojenju trosnjakov smo preverili, kako različni sevi in različni substrati vplivajo na biološko učinkovitost gojenja (BE), čas gojenja, dobitok pripravka (polisaharidov), sestavo pripravkov in biološko aktivnost.

Pri prvem gojenju smo preverili, kako različni substrati in sevi vplivajo na našete parametre. Izkazalo se je, da je sev GF 10 na substratu iz bukove žagovine in dodatka koruznega drobljenca najbolj primeren v smislu biološke učinkovitosti t.j. dobili smo največjo maso trosnjakov glede na enoto gojišča (30,2 %). Dodatek oljčnih tropin pa je negativno vplival na BE. Preglednica 19 prikazuje čas gojenja (t.j. čas od nacepitve do pobiranja trosnjakov), BE, maso svežih trosnjakov in vsebnost vode.

Preglednica 19: Čas gojenja, BE, dobitok trosnjakov in vsebnost vode v trosnjakih pri prvem gojenju.

Gojišče	sev	čas gojenja (dni)	masa svežih trosnjakov (g)	BE (%)	Vsebnost vode (%)
1	GF 1	129	266	9,7	86,3
2	GF 1	104	123	9,5	89,6
3	GF 1	110	222	17,2	80,3
4	GF 5	135	419	15,2	89,2
5	GF 5	95	186	14,4	81,5
6	GF 10	141	389	30,2	87,3

Največji dobitok polisaharidov, smo dobili pri sevu GF 1 in gojišču, ki je vsebovalo le bukovo žagovino in koruzni drobljenec (103,8 mg/g). Pri ostalih smo dobili dobitke okoli 50 mg/g. Vsebnosti polisaharidov in proteinov, pa so se gibale med 39,5-70,3 % in 7,2-13,2 %. Masa ekstraktov, izkoristek ekstrakcije, vsebnost sladkorjev in vsebnost proteinov je prikazana v preglednici 20.

Preglednica 20: Masa ekstraktov, izkoristek ekstrakcije, vsebnost sladkorjev in proteinov v pripravkih pri prvem gojenju.

Trosnjak	masa ekstrakta (g)	izkoristek ekstrakcije (mg/g suhega trosnjaka)	vsebnost sladkorjev (%)	vsebnost proteinov (%)
1	0,69	50,4	70,3	13,2
2	10,9	104,8	42,3	9,5
3	1,25	63,5	39,5	7,2
4	0,71	65,7	75,9	12,4
5	0,87	47	41,9	9,1
6	0,57	44,5	41,8	9,4

Vsebnosti celokupnih glukanov,  $\alpha$ -glukanov in  $\beta$ -glukanov so podobno, kot vsebnost celokupnih sladkorjev, zelo nihale. Vsebnost celokupnih glukanov in  $\beta$ -glukanov je dobro sledila vsebnosti celokupnih sladkorjev, vsebnost  $\alpha$ -glukanov pa je bila relativno stabilna pri približno 1 odstotku (preglednica 21).

Preglednica 21: Vsebnost celokupnih glukanov,  $\alpha$ -glukanov in  $\beta$ -glukanov v pripravkih pri prvem gojenju.

Trosnjak	vsebnost celokupnih glukanov (%)	vsebnost $\alpha$ -glukanov (%)	vsebnost $\beta$ -glukanov (%)
1	65,4	1,1	64,3
2	33,6	1,0	32,6
3	17,2	0,8	16,4
4	69,3	1,2	68,1
5	19,2	0,9	18,3
6	35,6	0,9	34,7

Pri drugem gojenju smo gojili sev GF 3, ki se je izkazal kot dober za gojenje tako v tekočih kot tudi na trdnih gojiščih. Sev smo gojili na različnih gojiščih in preverili enake parametre, kot pri prvem gojenju.

Kot najboljša sta se izkazala gojišči, brez dodatka oljčnih tropin. Izkazalo se je tudi, da so otrobi boljši dodatek od koruznega drobljenca, saj je bila najvišja BE pri gojišču z dodanimi otrobi 61,9 %, pri gojišču z dodanim koruznim drobljencem pa 48,0 %. (preglednica 22).

Preglednica 22: Čas gojenja, BE, dobitok trosnjakov in vsebnost vode v trosnjakih pri drugem gojenju.

Gojišče	čas gojenja (dni)	masa svežih trosnjakov (g)	BE (%)	Vsebnost vode (%)
7	154	157	13,4	83,4
8	152	147	10,0	85,7
9	209	140	13,3	85,9
10	203	380	36,2	82,3
11	177	650	61,9	84,2
12	183	317	31,2	84,5
13	179	490	32,7	84,3
14	194	396	37,7	86,0
15	177	504	48,0	82,4

Vsebnosti proteinov se je gibala med 7 in 11 odstotki, vsebnost celokupnih glukanov,  $\alpha$ -glukanov in  $\beta$ -glukanov pa je zelo nihala. Vsebnost celokupnih glukanov in  $\beta$ -glukanov je dobro sledila vsebnosti celokupnih sladkorjev, vsebnost  $\alpha$ -glukanov pa je bila relativno stabilna pri približno 1 odstotku (preglednici 23 in 24).

Preglednica 23: Masa ekstraktov, izkoristek ekstrakcije, vsebnost sladkorjev in proteinov v pripravkih pri drugem gojenju.

Trosnjak	masa ekstrakta (g)	izkoristek ekstrakcije (mg/g suhega trosnjaka)	vsebnost sladkorjev (%)	vsebnost proteinov (%)
7	0,33	39,8	40,2	9,4
8	0,54	75,5	67,8	11,5
9	0,3	42,6	62,7	9,8
10	0,38	42,9	43,1	7,5
11	0,26	32,9	61,4	9,1
12	0,35	45,2	60,4	8,8
13	0,26	33,1	36,2	7,5
14	0,25	35,7	66,7	8,3
15	0,16	18,2	68,1	9,2

Preglednica 24: Vsebnost celokupnih glukanov,  $\alpha$ -glukanov in  $\beta$ -glukanov v pripravkih pri drugem gojenju.

Trosnjak	vsebnost celokupnih glukanov (%)	vsebnost $\alpha$ -glukanov (%)	vsebnost $\beta$ -glukanov (%)
7	20,3	1,0	19,3
8	67,2	0,9	66,3
9	62,0	1,2	60,8
10	17,5	1,2	16,3
11	59,5	0,9	58,6
12	58,3	1,2	57,1
13	18,9	1,2	17,7
14	57,2	1,1	56,1
15	61,8	1,0	60,8

Trosnjake smo želeli gojiti tudi na gojišču pripravljenem iz koruznice, ki se je izkazalo kot najboljše za gojenje glivne biomase na trdnem gojišču. Micelij se je v vrečah, napolnjenih s substratom, zelo hitro razrastle, ko smo pa vrečke odprli in jih prestavili v gojitveni prostor, se je na površini gojišč pojavila okužba, zaradi česar nam gob ni uspelo vzgojiti.

Pri analizi trosnjaka, ki smo ga kupili v liofilizirani obliki, smo ugotovili, da je bil izkoristek ekstrakcije 43,8 mg/g suhega trosnjaka, vsebnost celokupnih sladkorjev v pripravku je bila 40,1 %, vsebnost proteinov 8,8 %, vsebnost celokupnih glukanov 27,8 %,  $\alpha$ -glukanov 1,1 % in  $\beta$ -glukanov 26,7 %. Vsi parametri so primerljivi s parametri trosnjakov, ki smo jih vzgojili sami.

Najboljšo produktivnost za pridobivanje pripravka, smo dosegli na gojišču 3 (gojišče z dodanimi semeni konoplje s sevom GF 1), ki je znašala  $8,2 \times 10^{-7}$  gramov pripravka na gram suhega gojišča na uro, drugo najboljšo produktivnost pa na gojišču 11 (gojišče brez dodatkov oljčnih tropin in sevom GF 3). Na tem gojišču smo dobili tudi najboljšo produktivnost za pridobivanje biomase. Najslabšo produktivnost za pridobivanje pripravkov in biomase pa smo dobili na gojišču 9 (gojišče s 45 % dodanih oljčnih tropin) (preglednica 25).

Preglednica 25: Produktivnost gojenja trosnjakov.

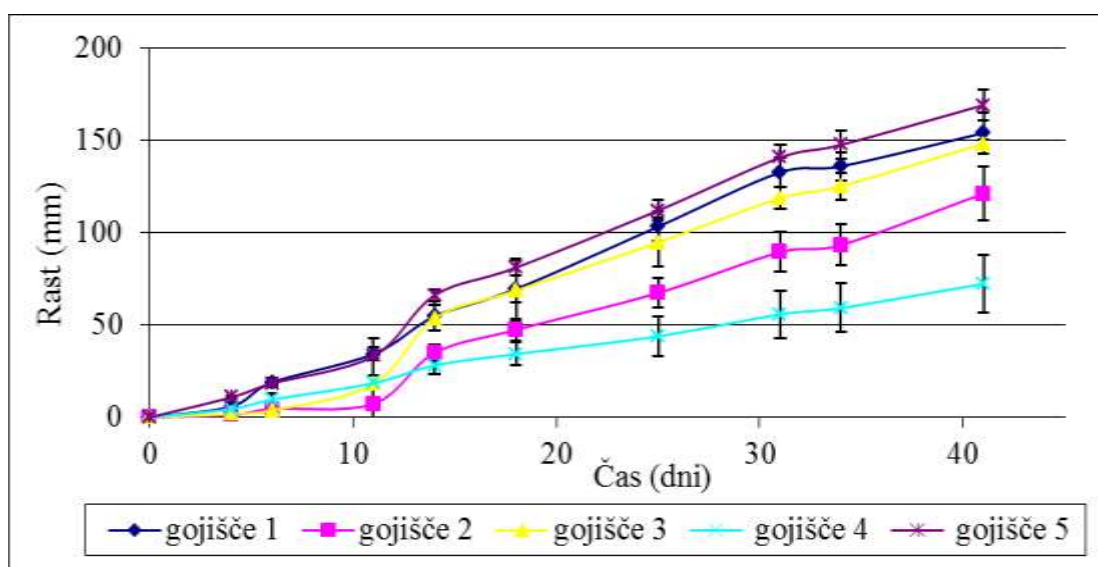
Gojišče	$P_{Bp}$ ( $\frac{g_{\text{pripravka}}}{g_{\text{gojišča}} h} \times 10^{-7}$ )	$P_{Bb}$ ( $\frac{g_{\text{biomase}}}{g_{\text{gojišča}} h} \times 10^{-5}$ )
1	2,2	0,4
2	4,1	0,4
3	8,2	1,3
4	3,3	0,5
5	5,5	1,2
6	5,0	1,1
7	2,4	0,6
8	3,0	0,4
9	1,6	0,4
10	5,6	1,3
11	7,6	2,3
12	5,0	1,1
13	4,0	1,2
14	4,0	1,1
15	3,6	2,0

### 4.3 GOJENJE NA TRDNEM GOJIŠČU

#### 4.3.1 Merjenje hitrosti rasti v steklenih tulcih

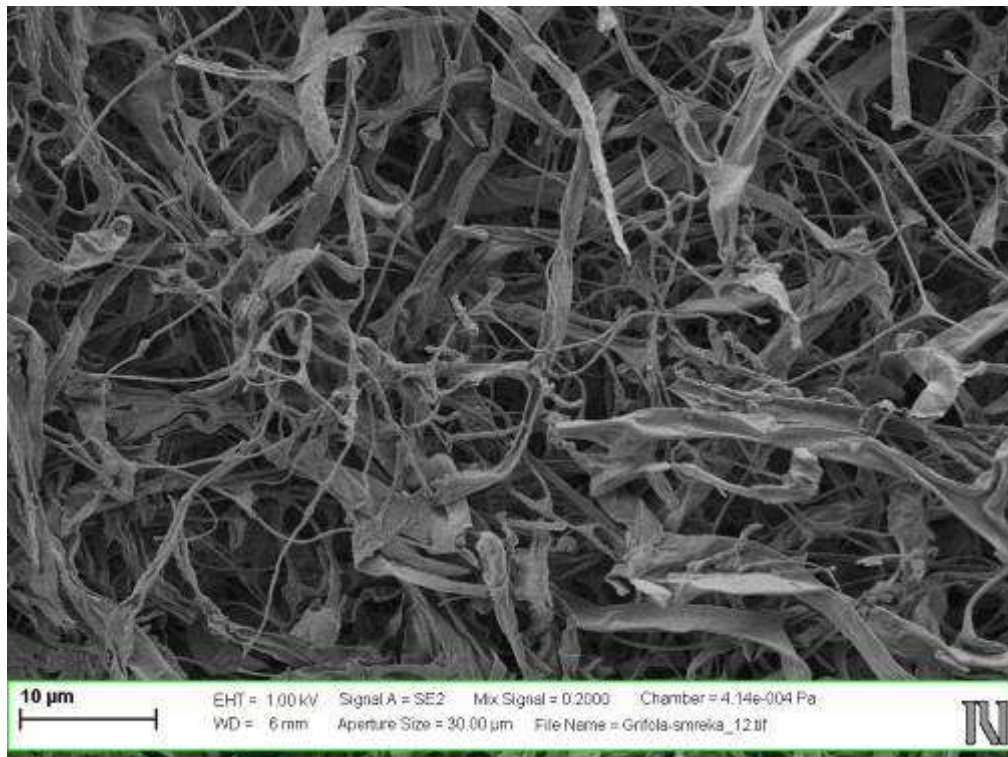
Merjenje hitrosti rasti v steklenih tulcih predstavlja enostaven in hiter način spremljanja rasti na izbranih gojiščih.

Kot najboljše gojišče se je izkazala koruznica, pri kateri je dolžina micelijske fronte rasti dosegla 169 mm v 41 dnevih, sledilo je gojišče z bukovim žaganjem (154 mm), macesnovim žaganjem (148 mm), smrekovim žaganjem (121 mm), kot najslabše se je izkazalo gojišče pripravljeno iz zmletih stebel vinske trte (72 mm). Krivulje rasti so prikazane na sliki 32.

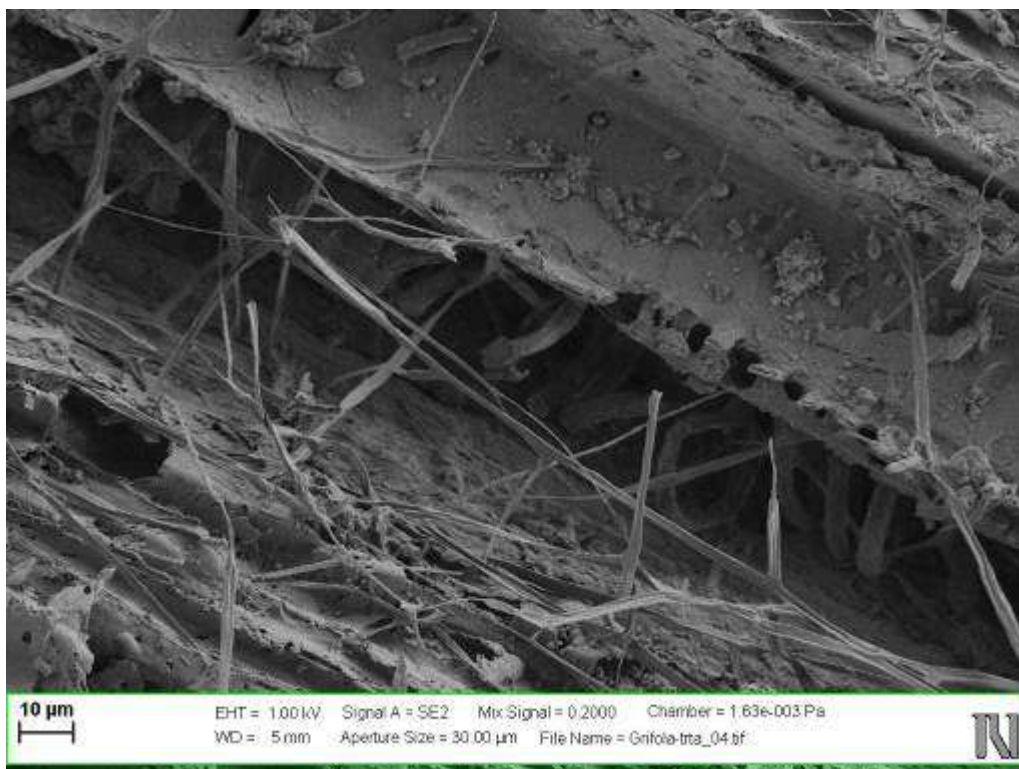


Slika 32: Krivulje rasti pri gojenju v steklenih tulcih (1-5, sestave gojišča prikazane v preglednici 7).

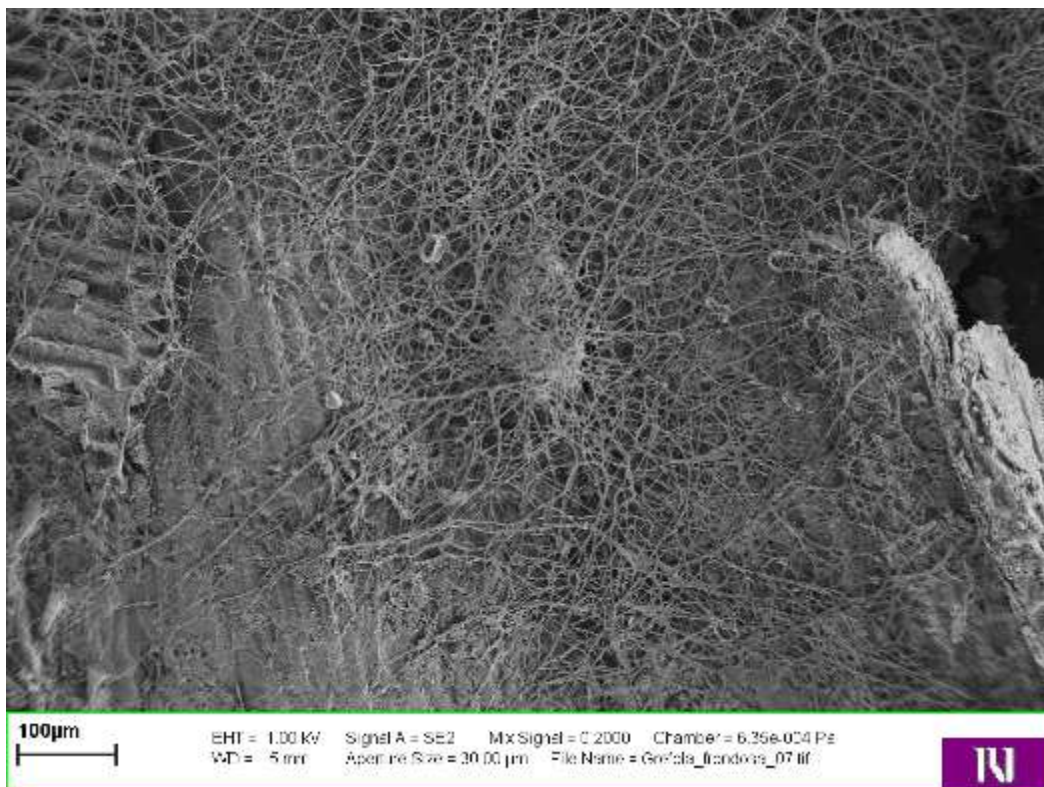
Med raziskavami smo s pomočjo emisijskega elektronskega mikroskopa posneli slike rasti glivne biomase na gojišču s smrekovim žaganjem (slika 33), zmletimi stebli vinske trte (slika 34) in s koruznico (slika 35).



Slika 33: Mikroskopska slika micelija preraščenega na gojišču iz smrekovega žaganja.



Slika 34: Mikroskopska slika micelija preraščenega na gojišču iz vinske trte.



Slika 35: Mikroskopska slika micelija preraščenega na gojišču iz koruznice.

#### 4.3.2 Gojenje v steklenih kozarcih

Gojenje v steklenih kozarcih boljše simulira rast v bioreaktorju in za določitev vsebnosti biomase smo morali vzpostaviti posredno metodo določevanja biomase s pomočjo ergosterola.

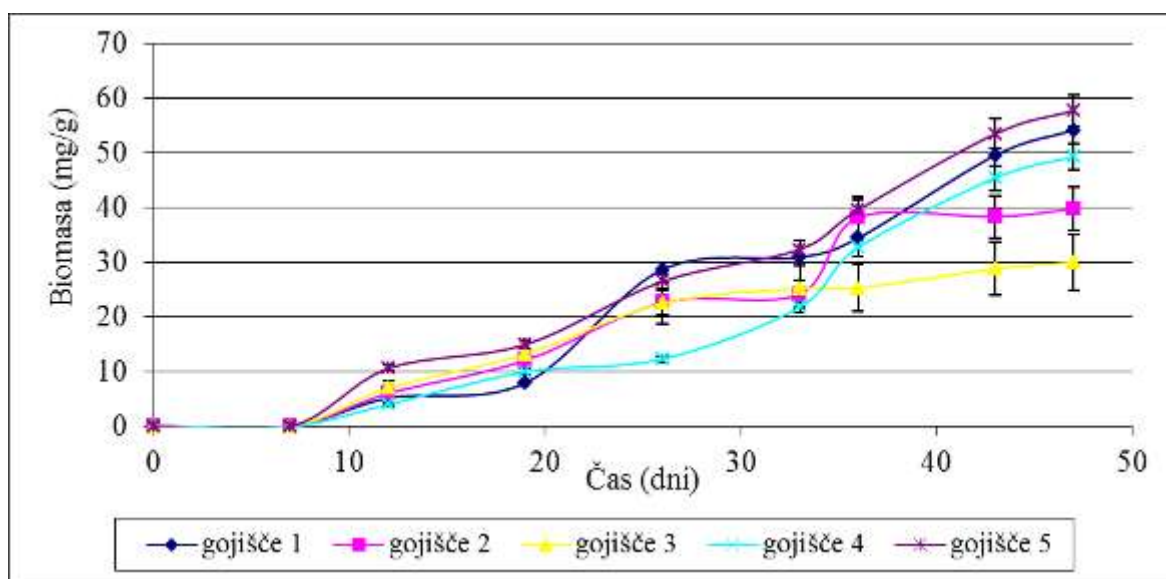
Za določitev vsebnosti biomase s pomočjo ergosterola smo uporabili gojenje na petrijevkah napolnjenih z gojiščem PDA in določili vsebnosti ergosterola v biomasi (preglednica 26).

Ugotovili smo, da se vsebnost ergosterola s časom rasti micelija ne spreminja in v povprečju znaša 5,80 mg/g suhega micelija. Ta podatek smo uporabili za določevanje vsebnosti biomase v trdnih gojiščih.

Preglednica 26: Čas gojenja, količina biomase in vsebnost ergosterola.

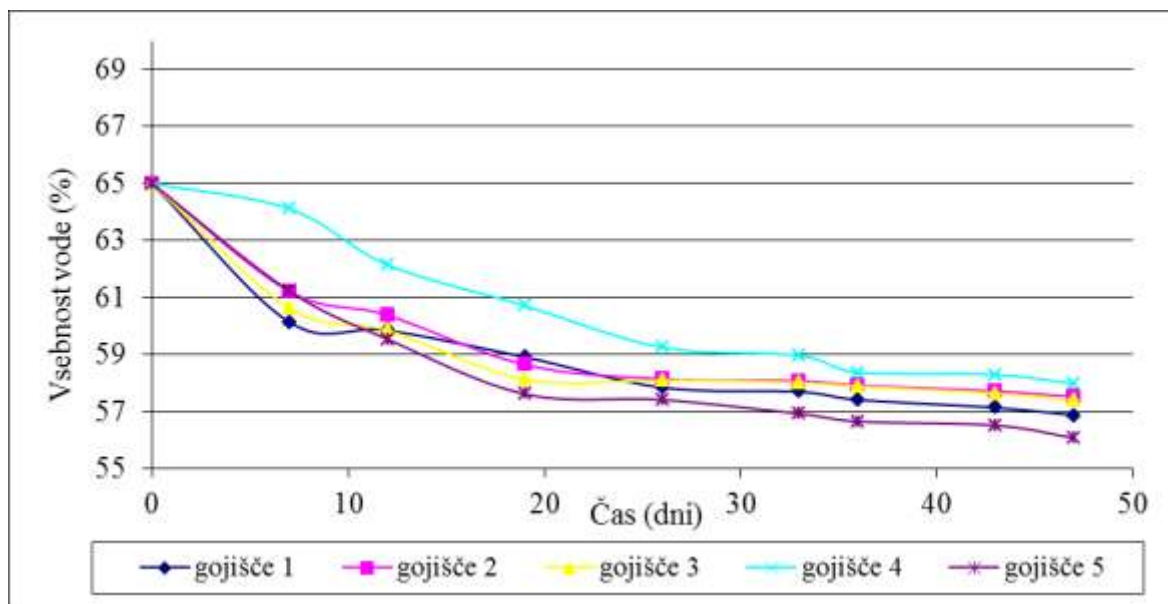
Čas (dni)	povprečna masa biomase (mg)	povprečje vsebnost ergosterola (mg/g suhe biomase)
0	pod mejo detekcije	pod mejo detekcije
7	1	pod mejo detekcije
14	25,1 ± 2,1	5,80 ± 0,04
21	80,1 ± 3,6	5,78 ± 0,04
28	122 ± 7,4	5,81 ± 0,04

Sledilo je gojenje na enakih substratih, kot so bili uporabljeni pri gojenju v steklenih valjih (preglednica 7). Tudi tukaj se je koruznica izkazala kot najprimernejše za gojenje na trdnem gojišču, sledilo ji je gojišče z bukovim žaganjem in gojišče z zmletimi stebli vinske trte. Gojišče, ki je vsebovalo smrekovo žaganje in gojišče z macesnovim žaganjem, pa nista dali tako dobrih rezultatov (slika 36).



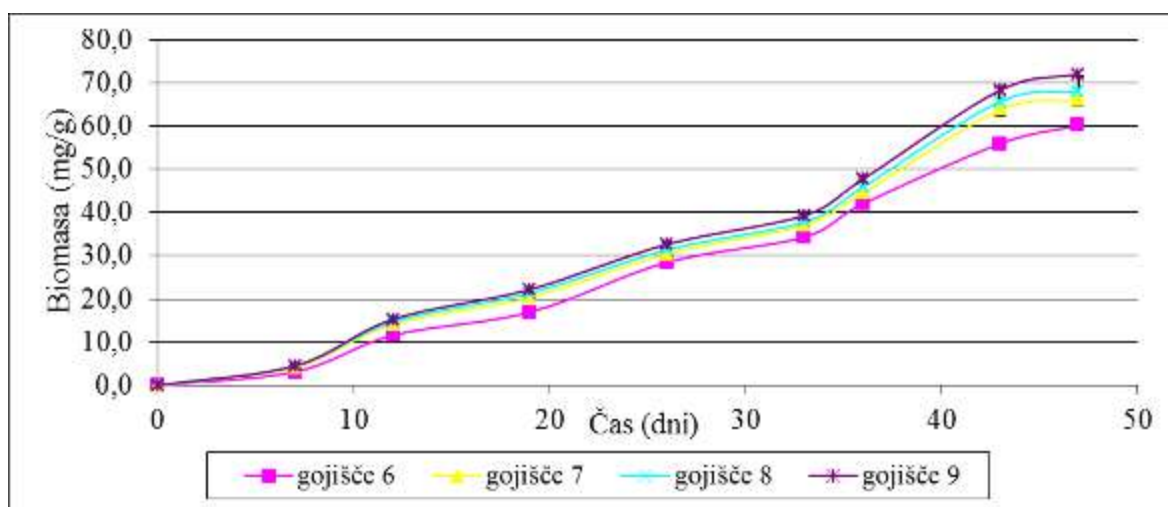
Slika 36: Krivulje rasti pri gojenju v steklenih kozarcih (1-5, sestave gojišča prikazane v preglednici 7).

Vzorcem pri gojenju v steklenih kozarcih smo določevali tudi vsebnost vode. Izguba vlage med postopkom gojenja je prikazana na sliki 37.



Slika 37: Vsebnost vode pri gojenju v steklenih kozarcih (1-5, sestave gojišča prikazane v preglednici 7).

V drugem delu smo nato želeli preveriti, če lahko gojišče s koruznico še izboljšamo. Gojišču smo dodali  $\text{CaCO}_3$  in različne vsebnosti oljčnega olja (0 - 2 %). Izkazalo se je, da  $\text{CaCO}_3$  in olje stimulirata rast micelija (slika 38).



Slika 38: Krivulje rasti pri gojenju v steklenih kozarcih na gojišču iz koruznice z dodatki oljčnega olja (6-9, sestave gojišča prikazane v preglednici 8).

Preverili smo tudi izgubo vode iz gojišč, ki pa je bila pri vseh gojiščih enaka. Končna vsebnost vode je bila enaka kot v prvem poskusu, kjer smo kot gojišče uporabili koruznico brez dodatkov (t.j 56 %). Na koncu gojenja smo pri vseh vzorcih določili tudi izkoristek ekstrakcije (preglednica 27).

Preglednica 27: Izkoristek ekstrakcije pri gojenju na trdnih gojiščih v steklenih kozarcih.

Gojišče	izkoristek ekstrakcije (mg/g suhega gojišča)
1	64
2	71
3	66
4	75
5	87
6	86
7	84
8	84
9	81

Najboljšo produktivnost za pridobivanje pripravka, smo dosegli na gojišču 5 (koruznica brez dodatkov), ki je znašala  $771 \times 10^{-7}$  gramov pripravka na gram suhega gojišča na uro. Najboljšo produktivnost za pridobivanje biomase pa na gojišču 9 (koruznica z 2 % dodatkom oljčnega olja). Vpliv oljčnega olja (gojišča 6-9) poslabšuje produktivnost glede na dobiček pripravka, po drugi strani pa povečuje produktivnost za dobiček biomase. Najslabšo produktivnost za pridobivanje pripravkov in biomase pa smo dobili na gojišču 3 (gojišče z macesnovim žaganjem) (preglednica 28).

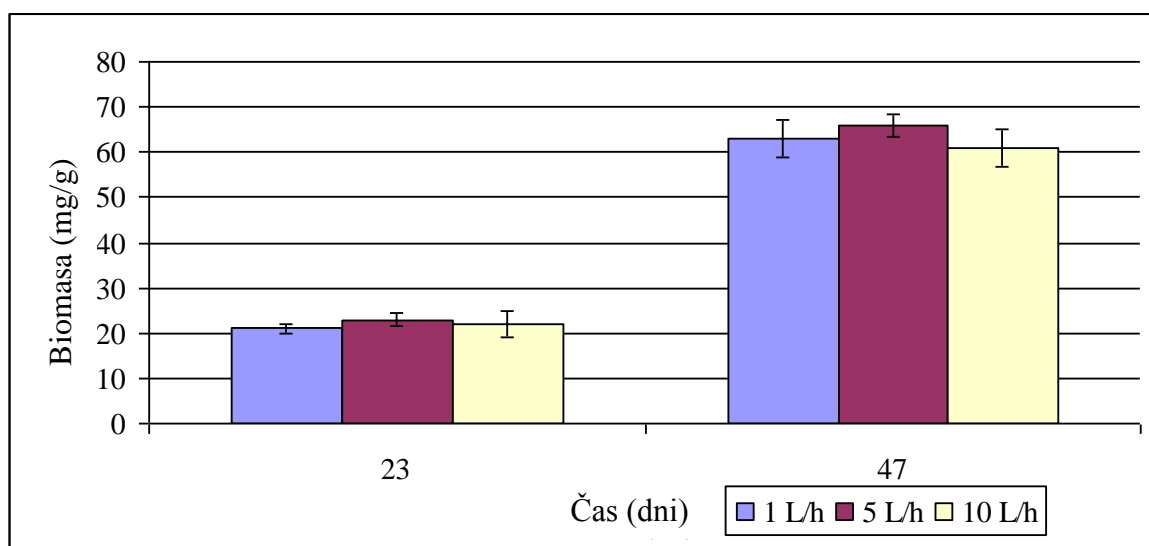
Preglednica 28: Produktivnost gojenja na trdnem gojišču v kozarcih.

Gojišče	$P_{Bp}$ ( $\frac{g_{\text{pripravka}}}{g_{\text{gojišča h}}} \times 10^{-7}$ )	$P_{Bb}$ ( $\frac{g_{\text{biomase}}}{g_{\text{gojišča h}}} \times 10^{-5}$ )
1	567	4,8
2	629	3,5
3	585	2,7
4	665	4,4
5	771	5,1
6	762	5,3
7	745	5,9
8	745	6,0
9	718	6,4

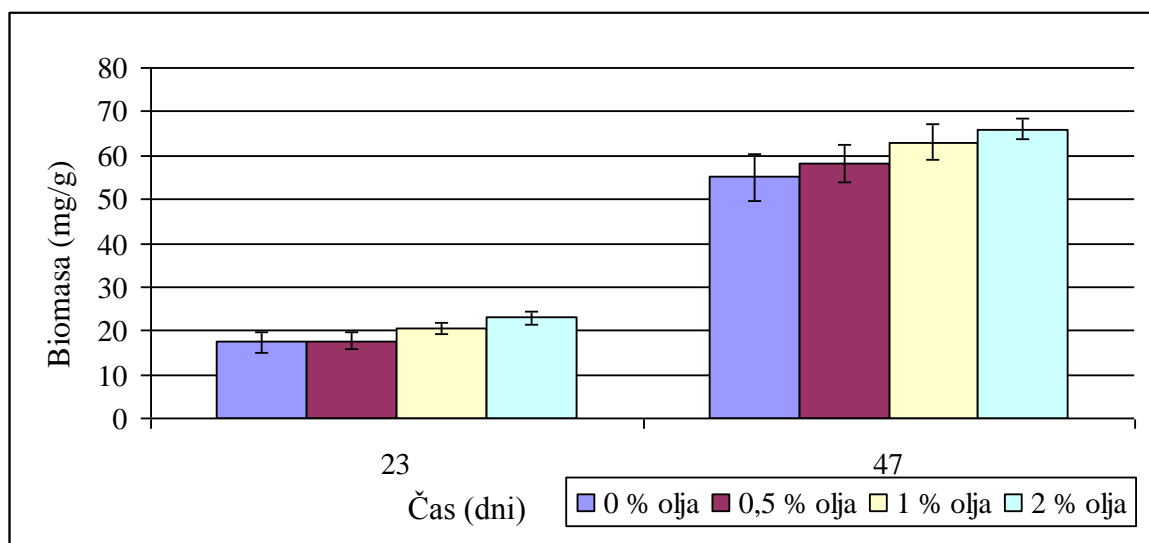
### 4.3.3 Gojenje v laboratorijskem bioreaktorju

Za gojenje v laboratorijskem reaktorju smo uporabili gojišča prikazana v preglednici 9. Najprej smo na najboljšemu gojišču (2 % oljčnega olja) preverili vpliv pretoka zraka (1, 5 in 10 L/h) na rast biomase. Po določitvi najbolj primernega pretoka zraka, smo poskus ponovili z gojišči z različno vsebnostjo olja, kar nam je omogočilo pripravo večjih količin pripravkov za nadaljnje analize.

Izkazalo se je, da je najbolj primeren pretok zraka skozi gojišče 5 L/h (slika 39). Pri ponovitvi poskusov z različno vsebnostjo oljčnega olja smo ugotovili podoben trend, kot se je pokazal pri gojenju v steklenih kozarcih (slika 40). Pri vseh poskusih, smo dobili nižje vrednosti od gojenja v steklenih kozarcih.

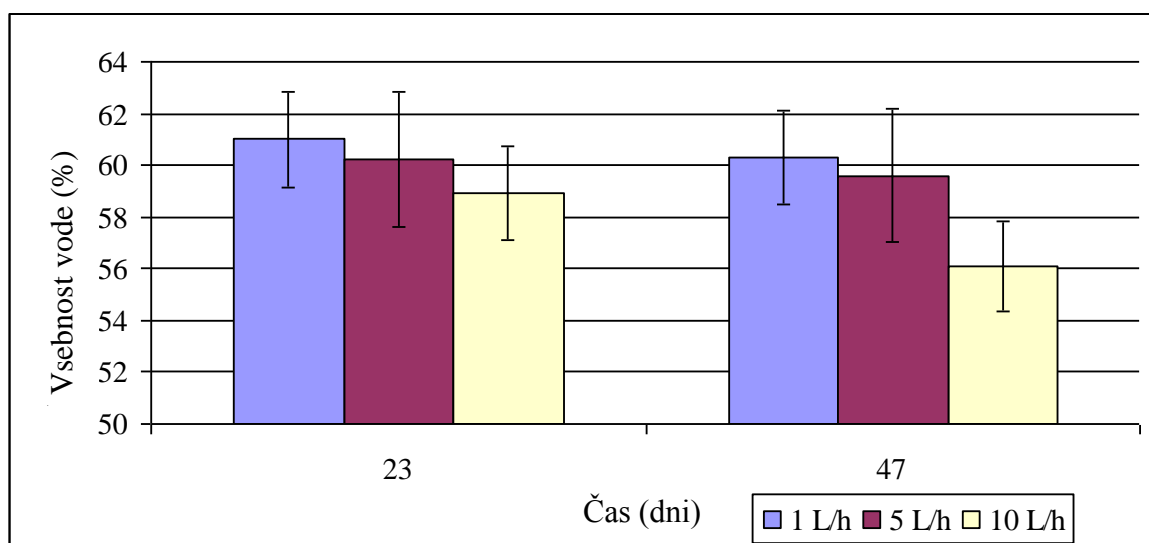


Slika 39: Vpliv pretoka zraka na količino biomase na trdnem gojišču v laboratorijskem bioreaktorju.



Slika 40: Vpliv vsebnosti olja v gojišču na količino biomase na trdnem gojišču v laboratorijskem bioreaktorju.

Z uporabo laboratorijskega bioreaktorja smo v primerjavi z gojenjem v kozarcih lahko rahlo zmanjšali izgube vode, razen pri pretoku zraka 10 L/h. Izguba vlage iz gojišča je bila odvisna od pretoka zraka (slika 41).



Slika 41: Vpliv pretoka zraka na vsebnost vode v trdnem gojišču v laboratorijskem bioreaktorju.

Na koncu gojenja smo iz vzorcev izolirali tudi polisaharide in jim določili vsebnost sladkorjev, proteinov, celokupnih glukanov,  $\alpha$ -glukanov in  $\beta$ -glukanov (preglednica 29). Rezultati kažejo, da smo navkljub velikemu izkoristku ekstrakcije pri prvem gojišču (gojišče s koruznico brez dodatka oljčnega olja) dobili najmanjše vsebnosti sladkorjev, proteinov in glukanov v pripravku.

Preglednica 29: Izkoristek ekstrakcije, vsebnost sladkorjev, proteinov in glukanov pri gojenju na trdnih gojiščih v laboratorijskem bioreaktorju.

Gojišče	izkoristek ekstrakcije (mg/g suhega gojišča)	vsebnost sladkorjev (%)	vsebnost proteinov (%)	vsebnost celokupnih glukanov (%)	vsebnost $\alpha$ -glukanov (%)	vsebnost $\beta$ -glukanov (%)
1	87	56,0	12,2	51,2	8	43,2
2	86	78,8	13,2	74,2	6	68,2
3	84	74,3	15,5	71,2	5,9	65,3
4	79	76,3	14,3	np	np	np
5	82	77,9	14,5	74,8	6,1	68,7
6	80	75,4	13,7	np	np	np

np - ni podatka

Najboljšo produktivnost za pridobivanje pripravka, smo dosegli na gojišču 1 (koruznica brez dodatkov in najboljšim pretok zraka), ki je znašala  $771 \times 10^{-7}$  gramov pripravka na gram suhega gojišča na uro. Najboljšo produktivnost za pridobivanje biomase pa na gojišču 5 (koruznica z 2 % dodatkom oljčnega olja in najboljšim pretokom zraka). Vpliv oljčnega olja (gojišča 1,2,3 in 5) poslabšuje produktivnost glede na dobiček pripravka, po drugi strani pa povečuje produktivnost za dobiček biomase. Najslabšo produktivnost za pridobivanje pripravkov smo dobili na gojišču 4 (koruznica z 2 % dodatkom oljčnega olja in najboljšim pretokom zraka in pretokom zraka 1 L/h), za pridobivanje biomase pa na gojišču 1 (preglednica 30).

Preglednica 30: Produktivnost gojenja na trdnem gojišču v laboratorijskem bioreaktorju.

Gojišče	$P_{Bp}$ ( $\text{g}_{\text{pripravka}}/\text{g}_{\text{gojišča h}} \times 10^{-7}$ )	$P_{Bb}$ ( $\text{g}_{\text{biomase}}/\text{g}_{\text{gojišča h}} \times 10^{-5}$ )
1	771	4,9
2	762	5,1
3	745	5,6
4	700	5,6
5	727	5,9
6	709	5,4

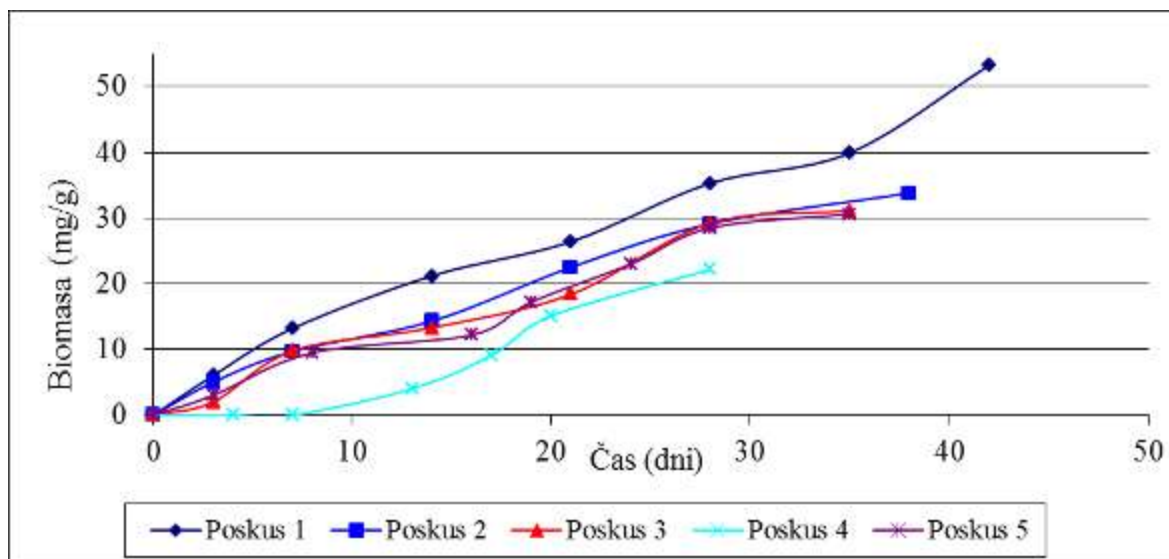
#### 4.3.4 Gojenje v pilotnem mešalnem bioreaktorju

Na pilotnem mešalnem bioreaktorju smo opravili vrsto fermentacij pod različnimi pogoji mešanja, različnim prezračevanjem in različnimi koti nagiba bioreaktorja (horizontalno, pod kotom  $45^\circ$  in vertikalno). Gojenje v pilotnem bioreaktorju bi moralo biti bolj učinkovito od gojenja v laboratorijskem bioreaktorju, saj imamo poleg kontrole prezračevanja še možnost mešanja. Zaradi pojava okužb so časi fermentacij drugačni, a še vedno primerljivi z gojenjem v pilotnem bioreaktorju. S pomočjo pilotnega bioreaktorja smo uspeli pridobiti večje količine biomase, kot pri gojenju v kozarcih in laboratorijskem bioreaktorju (slika 42).



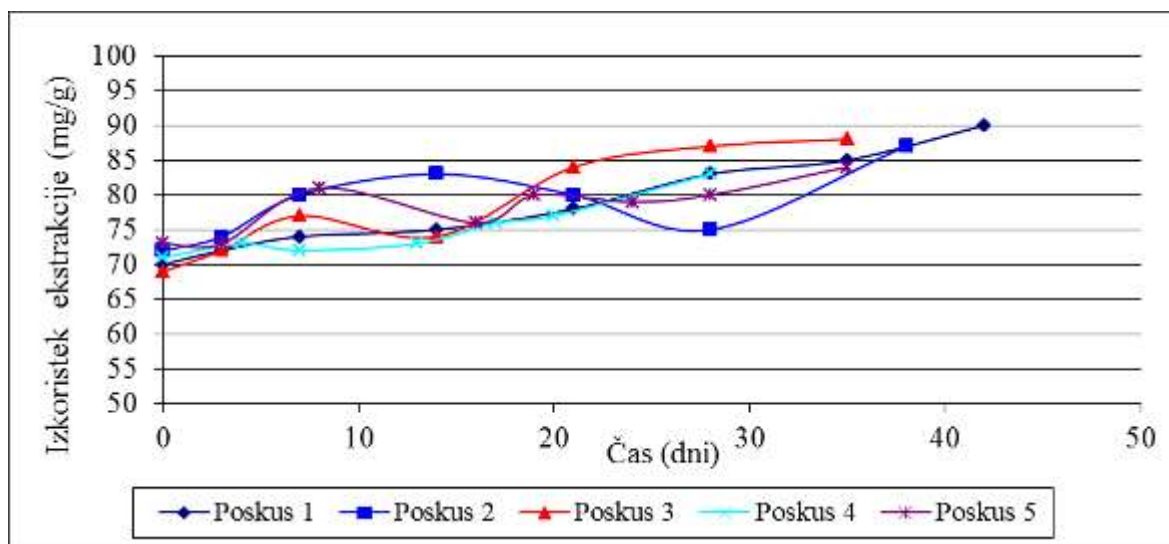
Slika 42: Gojenje v pilotnem mešalnem bioreaktorju.

Potek rasti biomase pri različnih poskusih opisanih v preglednici 10 je prikazan na sliki 43. Najboljšo proizvodnjo biomase smo imeli pri prvem poskusu, ki je edini, kjer na koncu nismo opazili okužbe. Pri vseh ostalih fermentacijah, pa smo ob prvem sumu okužbe fermentacijo prekinili (zato krajši čas gojenja).



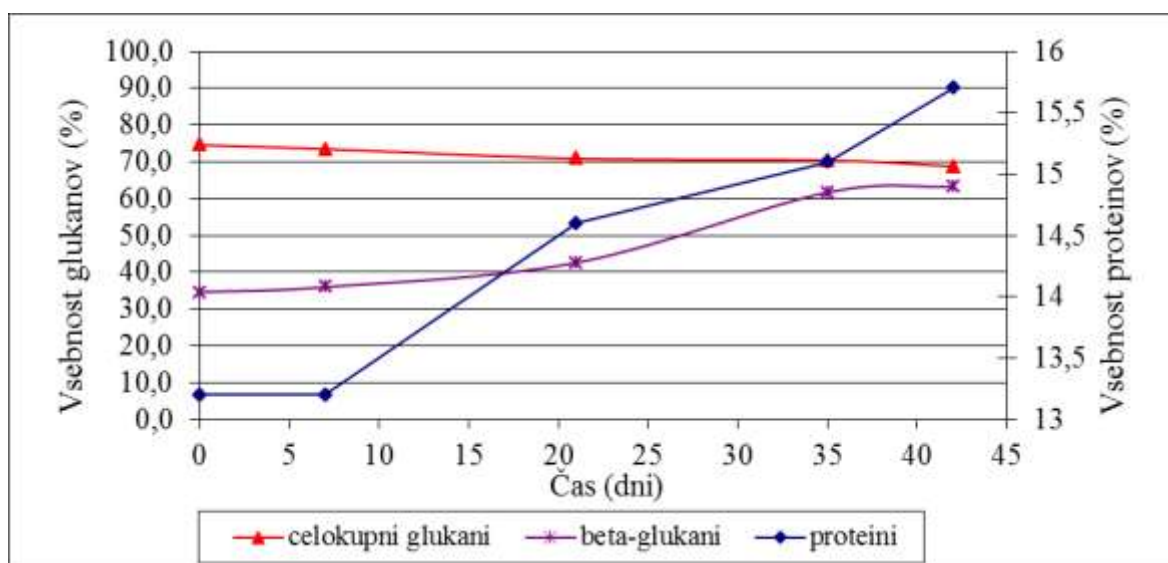
Slika 43: Rastne krivulje za gojenje v pilotnem bioreaktorju (opisi poskusov so prikazani v preglednici 10).

Pri gojenju v pilotnem bioreaktorju smo prišli do podobnih rezultatov, kot pri gojenju v laboratorijskem bioreaktorju za trdno gojišče (slika 44). Pri izolaciji polisaharidov pride do ekstrakcije komponent trdnega gojišča, zato imamo že na začetku, ko še ni micelija, velik izkoristek ekstrakcije. Pri vseh poskusih pa je prišlo do časovnega povečanja izkoristka ekstrakcije.



Slika 44: Izkoristki ekstrakcije pri gojenju v pilotnem bioreaktorju (opisi poskusov so prikazani v preglednici 10).

Pripravke, dobljene v prvem poskusu, smo tudi analizirali za vsebnost sladkorjev, proteinov, celokupnih glukanov,  $\alpha$ -glukanov in  $\beta$ -glukanov. Pri analizi sestave pripravkov smo ugotovili, da se je vsebnost celokupnih glukanov znižala iz začetnih 75 % na končnih 70 %, pri tem pa je bila velika razlika v vsebnosti  $\alpha$ -glukanov, ki so tekom fermentacije padali (iz začetnih 40 % na končnih 5,5 %) in temu primerno je naraščala vsebnost  $\beta$ -glukanov (iz začetnih 34,6 % na končnih 63,3 %). Vsebnost proteinov v pripravku, pa se je dvignila iz začetnih 13,2 % na končnih 15,7 % (slika 45).



Slika 45: Sestava pripravkov tekom fermentacije pri prvem poskusu na pilotnem mešalnem bioreaktorju.

Za prvi poskus, smo izračunali produktivnost za pridobivanje pripravka ( $P_{Bp}$ ), ki je znašala  $893 \times 10^{-7}$  gramov pripravka na gram suhega gojišča na uro in produktivnost za pridobivanje biomase ( $P_{Bb}$ ), ki je znašala  $5.3 \times 10^{-5}$  gramov suhe biomase na gram suhega gojišča na uro.

#### 4.3.5 Metoda odzivnih ploskev za študij vpliva hranilnih komponent na rast in vsebnost $\beta$ -glukanov na trdnem gojišču

Metoda odzivnih ploskev nam omogoča vizualizacijo vpliva komponent na določene odzive. Pri našem poskusu smo preverili, kako vplivajo komponente gojišča (glukoza, kvasni ekstrakt, pepton,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  in oljčno olje) na hitrost rasti in vsebnost glukanov v biomasi.

S fotografiranjem micelija na petrijevkah in računalniško obdelavo slik, smo dobili podatke o povečanju površine micelija časom (preglednica 31). Primer časovnega poteka spremembe površine rasti je prikazan na sliki 46. Kovanec na petrijevki služi za kalibracijo pri merjenju površine.



Slika 46: Časovni potek rasti micelija na gojišču.

Preglednica 31: Površina micelija na različnih gojiščih v odvisnosti od časa.

Vzorec čas (h)	Površina (mm <sup>2</sup> )					
	144	216	310	385	504	576
1	280,5	704,6	1439,3	2442,5	4511,1	5448,1
2	215,4	932,9	2062,3	3117,9	4972,4	5790,9
3	323,0	829,5	1735,9	3171,9	4337,9	5371,5
4	275,1	647,8	1366,1	2369,9	4599,8	5783,1
6	284,6	589,9	1520,7	3020,7	5117,0	5769,5
7	322,8	929,2	1635,1	2549,3	4736,5	5157,7
8	224,2	708,7	1321,9	2582,4	3967,1	4941,3
9	168,1	798,9	1331,0	2142,6	3697,2	4532,2
10	404,6	797,1	1705,6	3073,7	4714,8	5457,1
11	390,1	926,4	1525,2	2252,4	3341,8	4444,2
12	321,7	784,7	1591,9	2975,5	3629,9	4831,0
13	352,6	787,6	1576,3	2840,4	4248,3	5152,3
14	198,5	498,5	1467,9	2641,4	4695,9	5912,0
15	185,8	693,5	1535,0	2678,4	4549,5	5662,1
17	380,6	819,4	1788,9	2721,9	4079,3	5173,5
19	199,3	677,8	1541,1	2671,4	3959,8	5097,5
20	180,8	835,2	1395,0	2539,7	4733,2	5843,7
21	237,1	583,9	1471,9	2465,6	3525,2	5135,1
22	285,3	847,1	1650,9	2787,0	3782,6	4839,3
23	361,0	676,3	1464,3	2657,2	4425,0	5537,4
24	386,1	974,0	2061,1	2297,9	3773,9	5076,5
25	122,3	696,9	1637,8	2801,4	4769,5	5144,7
26	230,2	685,5	1431,2	2299,4	3374,1	4488,7
27	219,7	661,6	1380,9	2807,5	4490,0	5565,6
28	335,0	740,0	1522,6	2483,0	4287,0	5188,3
30	343,7	841,8	1828,2	2564,0	3979,2	4542,1
31	403,7	962,9	1792,3	2862,5	4274,5	5426,1
32	328,3	929,9	1648,4	2758,1	3937,3	5051,3
34	331,7	953,3	1652,3	2499,3	3783,9	5095,0
36	251,8	570,8	1193,0	2008,1	4012,5	4980,7
37	350,5	994,1	1624,0	2645,6	4561,1	5254,8
38	238,8	630,1	1393,7	2467,7	4024,8	5467,0
39	313,7	936,9	1996,9	2464,8	3698,6	5607,6
40	195,7	611,0	1210,6	2068,2	4884,7	5169,4
41	322,8	890,1	1713,9	2625,5	4656,1	5874,4
42	352,7	764,0	1726,8	3291,0	4857,0	5875,3
43	155,8	514,5	1069,0	1829,6	4077,0	5491,4
44	288,5	703,8	1388,9	3039,9	4417,7	5423,2
45	195,9	825,0	1663,1	3148,0	5214,2	5838,9
46	236,9	771,9	1529,9	2657,7	4711,2	5668,0

Iz dobljenih podatkov o površini rasti micelija, smo nato z uporabo linearne in eksponentne aproksimacije določili koeficiente in podali enačbe za hitrost rasti (preglednica 32). Pri nekaterih vzorcih se je izkazalo, da je bolj primerna linearna aproksimacija, pri drugih pa eksponentna.

Preglednica 32: Linearne in eksponentne enačbe rasti različnih vzorcev na trdnih gojiščih.

vzorec	enačba aproksimacij linearne hitrosti biomase	k [mm <sup>2</sup> /h]	enačba aproksimacij eksponentne hitrosti biomase	k [h <sup>-1</sup> ]
1	$y = 12,447x - 1957,9$	12,4	$y = 147,63e0,0067x$	0,0067
2	$y = 13,295x - 1882$	13,3	$y = 153,47e0,007x$	0,007
3	$y = 12,002x - 1642,3$	12	$y = 194,97e0,0063x$	0,0063
4	$y = 13,152x - 2173$	13,2	$y = 133,03e0,0069x$	0,0069
6	$y = 13,817x - 2199,5$	13,8	$y = 133,78e0,0071x$	0,0071
7	$y = 11,889x - 1675,6$	11,9	$y = 198,89e0,0061x$	0,0061
8	$y = 11,203x - 1695,6$	11,2	$y = 132,36e0,0068x$	0,0068
9	$y = 10,158x - 1502,9$	10,2	$y = 118,9e0,0069x$	0,0069
10	$y = 12,441x - 1734,6$	12,4	$y = 217,08e0,0061x$	0,0061
11	$y = 9,1231x - 1099,6$	9,1	$y = 252,2e0,0052x$	0,0052
12	$y = 10,431x - 1355,8$	10,4	$y = 198,61e0,006x$	0,006
13	$y = 11,535x - 1611,7$	11,5	$y = 198,71e0,0061x$	0,0061
14	$y = 13,754x - 2325,2$	13,8	$y = 93,366e0,0078x$	0,0078
15	$y = 13,005x - 2076,8$	13	$y = 110,13e0,0074x$	0,0074
17	$y = 11,216x - 1497,2$	11,2	$y = 222,84e0,0058x$	0,0058
19	$y = 10,742x - 1539,6$	10,7	$y = 94,227e0,0081x$	0,0081
20	$y = 13,374x - 2170,8$	13,4	$y = 112,96e0,0074x$	0,0074
21	$y = 11,07x - 1702,5$	11,1	$y = 129,01e0,0068x$	0,0068
22	$y = 10,541x - 1385,5$	10,5	$y = 188,84e0,0061x$	0,0061
23	$y = 12,439x - 1905,9$	12,4	$y = 174,76e0,0064x$	0,0064
24	$y = 10,387x - 1267,9$	10,4	$y = 259,11e0,0054x$	0,0054
25	$y = 12,501x - 1919,4$	12,5	$y = 86,207e0,0079x$	0,0079
26	$y = 9,7604x - 1388,2$	9,8	$y = 144,41e0,0064x$	0,0064
27	$y = 12,845x - 2049,9$	12,8	$y = 119,16e0,0072x$	0,0072
28	$y = 11,652x - 1720,1$	11,7	$y = 180,44e0,0062x$	0,0062
30	$y = 10,087x - 1239,6$	10,1	$y = 222,8e0,0057x$	0,0057
31	$y = 11,677x - 1534,8$	11,7	$y = 247,05e0,0057x$	0,0057
32	$y = 10,891x - 1433,2$	10,9	$y = 213,32e0,0059x$	0,0059
34	$y = 10,711x - 1425,4$	10,7	$y = 217,05e0,0058x$	0,0058
36	$y = 11,334x - 1863,4$	11,3	$y = 121,08e0,0068x$	0,0068
37	$y = 11,772x - 1617,1$	11,8	$y = 219,01e0,0059x$	0,0059
38	$y = 12,114x - 1940,3$	12,1	$y = 125,94e0,007x$	0,007
39	$y = 11,36x - 1539,3$	11,4	$y = 210,67e0,006x$	0,006
40	$y = 12,625x - 2135,9$	12,6	$y = 99,663e0,0074x$	0,0074
41	$y = 12,978x - 1937,5$	13	$y = 188,18e0,0064x$	0,0064
42	$y = 13,414x - 1961,9$	13,4	$y = 187,5e0,0065x$	0,0065
43	$y = 12,427x - 2232,5$	12,4	$y = 74,927e0,0079x$	0,0079
44	$y = 12,438x - 1882,3$	12,4	$y = 152,97e0,0067x$	0,0067
45	$y = 13,91x - 2135,4$	13,9	$y = 124,84e0,0074x$	0,0074
46	$y = 13,027x - 2039,6$	13	$y = 137,28e0,007x$	0,007

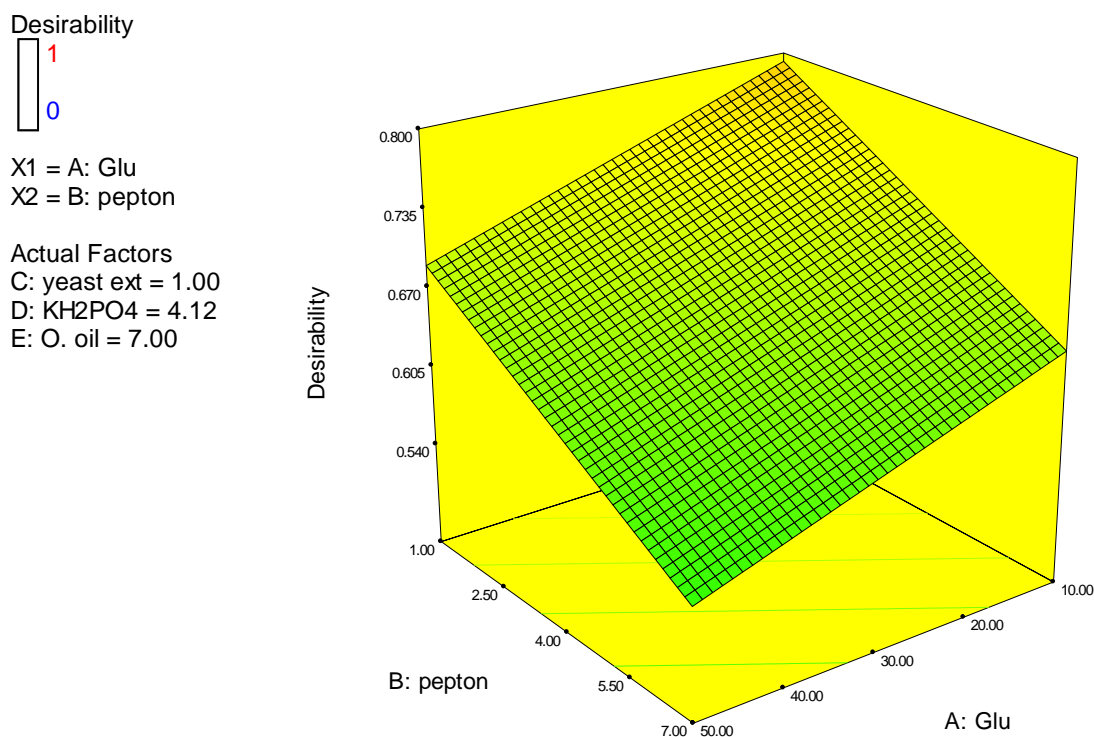
Po izolaciji biomase iz petrijevk, smo le-to stehali in jim določili vsebnost celokupnih glukanov,  $\alpha$ -glukanov in  $\beta$ -glukanov (preglednica 33).

Preglednica 33: Vsebnost celokupnih glukanov,  $\alpha$ -glukanov in  $\beta$ -glukanov v miceliju gojenem na različnih trdnih gojiščih.

vzorec	masa biomase (g)	celokupni glukani (%)	$\alpha$ -glukani (%)	$\beta$ -glukani (%)
1	0,0787	22,3	8,9	13,4
2	0,1019	8,7	3	5,7
3	0,027	29,2	12,8	16,4
4	0,0682	24,1	14,2	10
6	0,0617	26,7	10	16,7
7	0,0684	24,7	9,7	15
8	0,0488	34,3	14,3	20,1
9	0,059	32,8	13,3	19,6
10	0,0622	26,1	12,6	13,5
11	0,0671	26,4	10,5	15,9
12	0,0461	29,8	13,3	10
13	0,07	20,2	7,9	12,3
14	0,0301	22,2	11,6	10,7
15	0,063	27,2	10,5	16,7
17	0,0729	20,2	9,5	10,7
19	0,0282	29,9	6,5	23,3
20	0,0821	21,3	9,8	11,5
21	0,0551	28,3	13,3	15,1
22	0,0499	31,3	9,2	22,1
23	0,0565	30,7	7,9	22,9
24	0,0573	28,2	13,4	14,8
25	0,0518	30	13,3	16,7
26	0,0384	23,5	12,6	10,8
27	0,0887	16,1	6,7	9,4
28	0,1092	16,1	10,4	5,8
30	0,0827	29,7	6,2	23,5
31	0,0619	18,4	13,9	4,6
32	0,0282	38,1	12,6	10,8
34	0,0771	30,9	11,6	19,3
36	0,0657	25,7	8,7	17
37	0,0756	29,7	6	23,8
38	0,0619	26,3	12,8	13,5
39	0,056	28,3	12,4	15,9
40	0,0086	25	10,5	14,5
41	0,0592	23,2	12,9	10,3
42	0,0711	27,2	7,9	19,3
43	0,056	31,6	11,6	20
44	0,039	27,7	9,2	18,5
45	0,1304	9,7	2	7,6
46	0,0946	29,2	12,9	16,3

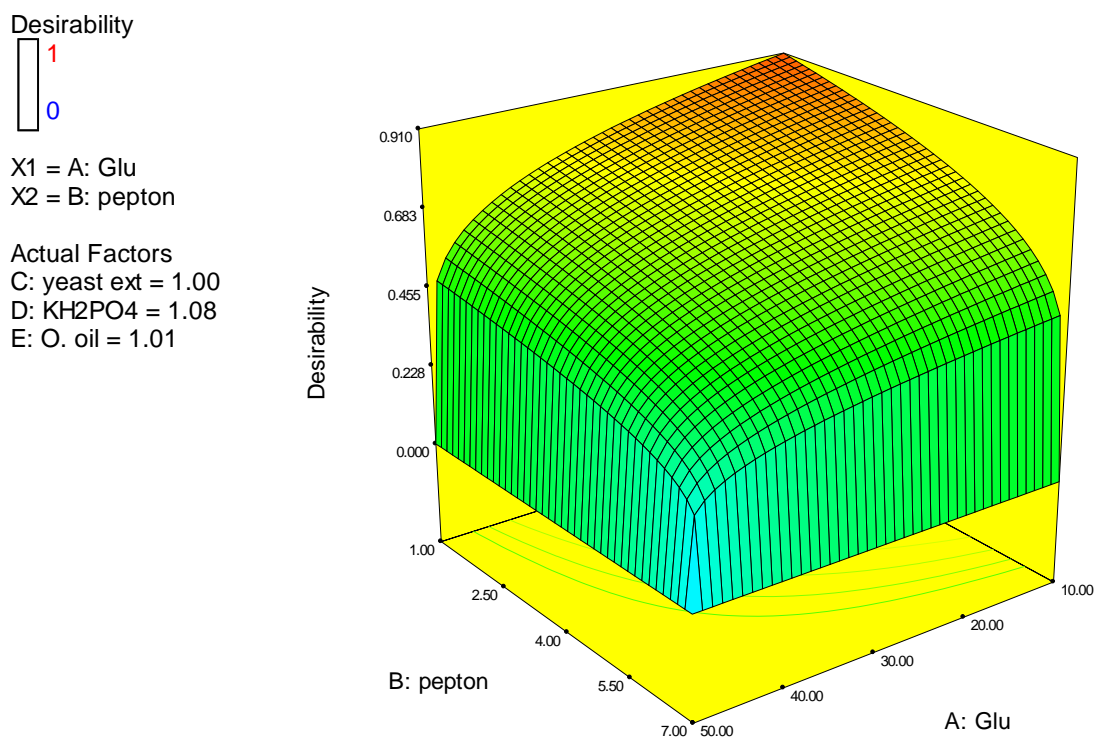
S pomočjo pridobljenih podatkov, smo z uporabo programa Design-Expert 7.0.1 (Stat-Ease Inc., ZDA) podali enačbe in pripadajoče optimizacijske grafe, ki opisujejo odvisnost tvorbe biomase, hitrosti rasti, vsebnosti celokupnih glukanov,  $\alpha$ -glukanov in  $\beta$ -glukanov od Produkcijo biomase lahko opišemo z enačbo 4 in na sliki 47 je prikazan model proizvodnje biomase, če so parametri za koncentracijo kvasnega ekstrakta,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  in oljčnega olja nastavljeni na optimalno vrednost. Iz grafa lahko vidimo, da z manjšanjem koncentracije glukoze in peptona, dobimo večjo produkcijo biomase. Optimalne koncentracije (v okviru našega poskusa) so torej 10 g/L glukoze, 1 g/L peptona, 1,01 g/L kvasnega ekstrakta, 3,98 g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  in 7 g/L oljčnega olja. Količina biomase, pridobljena na takem gojišču, je 0,097 g (= 97 mg).

$$\begin{aligned} \text{biomasa} = & +0,077535 - 2,85974E - 0,04 * \text{glukoza} - \\ & -2,69414E - 0,03 * \text{pepton} - 3,15817E - 0,03 * \text{kvasni ekstrakt} + \\ & +8,00068E - 0,04 * \text{KH}_2\text{PO}_4 + 3,58922E - 0,03 * \text{oljčno olje} \end{aligned} \quad (4)$$



Slika 47: Grafični model proizvodnje biomase na trdnem gojišču v primeru, da so vsi parametri nastavljeni na optimalno vrednost.

Program nam omogoča še možnost optimizacije gojišča, ob predpostavki, da želimo izbrati najmanjšo možno koncentracijo posamezne komponente. Model proizvodnje biomase v tem načinu je prikazan na sliki 48 in lahko vidimo, da so koncentracije komponent gojišča bistveno nižje od prejšnjih (10 g/L glukoze, 1 g/L peptona, 1,01 g/L kvasnega ekstrakta, 1,08 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in 1,01 g/L oljčnega olja) z njihovo uporabo pa dobimo 0,094 g (=94 mg) biomase, kar predstavlja zgolj 3 % manj biomase.



Slika 48: Grafični model proizvodnje biomase na trdnem gojišču v primeru, da so vsi parametri nastavljeni na minimalno možno vrednost.

Hitrost linearne rasti biomase lahko opišemo z enačbo 5 in podobno lahko prikažemo grafični model ob predpostavkah da so parametri optimalni ali minimalni.

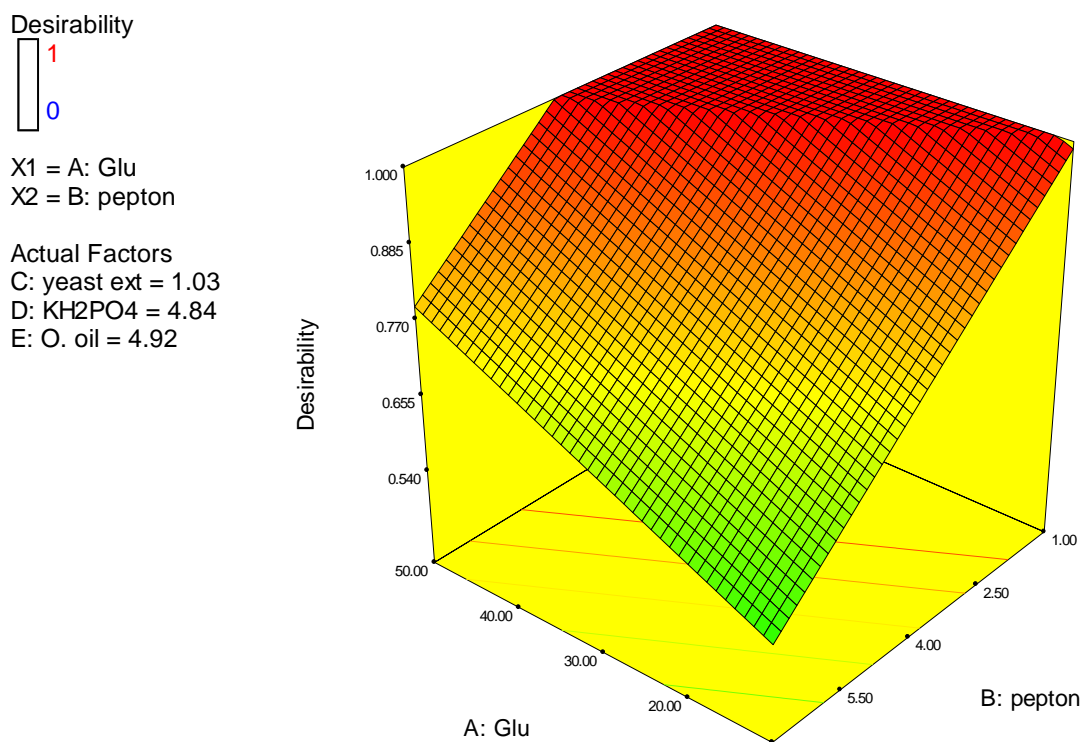
*Linearna hitrost rasti biomase* =  $+13,22829 + 0,030752 * \text{glukoza} -$

$-0,35953 * \text{pepton} - 0,39503 * \text{kvasni ekstrakti} +$

$+0,11298 * \text{KH}_2\text{PO}_4 + 0,10885 * \text{olivno olje}$

(5)

Če izberemo optimalne parametre za vsebnost komponent v gojišču (45,14 g/L glukoze, 1,08 g/L peptona, 2,86 g/L kvasnega ekstrakta, 1,2 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in 6,98 g/L oljčnega olja) dobimo največji koeficient linearne hitrosti rasti 13,99 h<sup>-1</sup> (slika 49).



Slika 49: Grafični model linearne hitrosti rasti na trdnem gojišču v primeru, da so vsi parametri nastavljeni na optimalno vrednost.

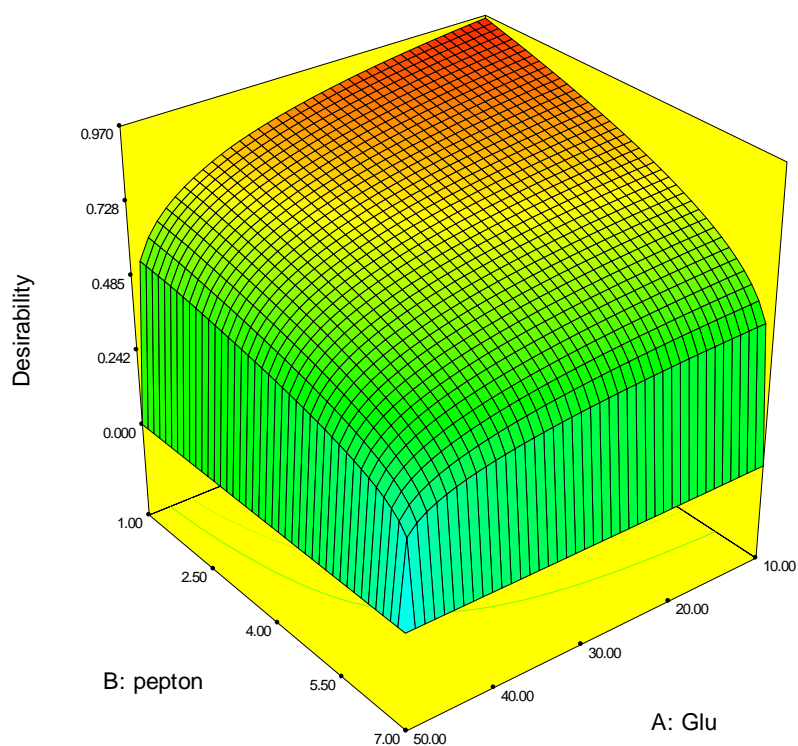
Če izberemo minimalne parametre za vsebnost komponent v gojišču (10,03 g/L glukoze, 1,07 g/L peptona, 1,01 g/L kvasnega ekstrakta, 1 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in 7,0 g/L oljčnega olja), dobimo največji koeficient linearne hitrosti rasti 13,63 h<sup>-1</sup>, ki je od optimalnega manjši za 2,6 % (slika 50).

Desirability



X1 = A: Glu  
X2 = B: pepton

Actual Factors  
C: yeast ext = 1.00  
D: KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> = 1.15  
E: O. oil = 1.00

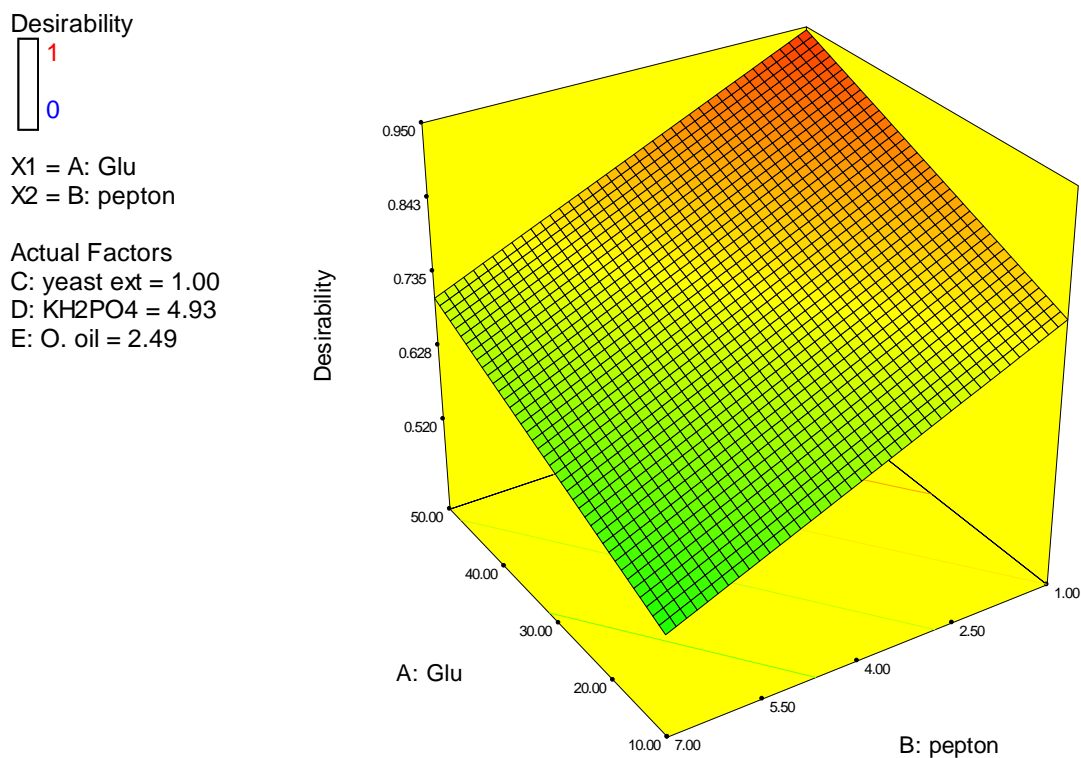


Slika 50: Grafični model linearne hitrosti rasti na trdnem gojišču v primeru, da so vsi parametri nastavljeni na minimalno možno vrednost.

Hitrost eksponentne rasti biomase lahko opišemo z enačbo 6 in podobno lahko prikažemo grafični model ob predpostavkah da so parametri optimalni ali minimalni.

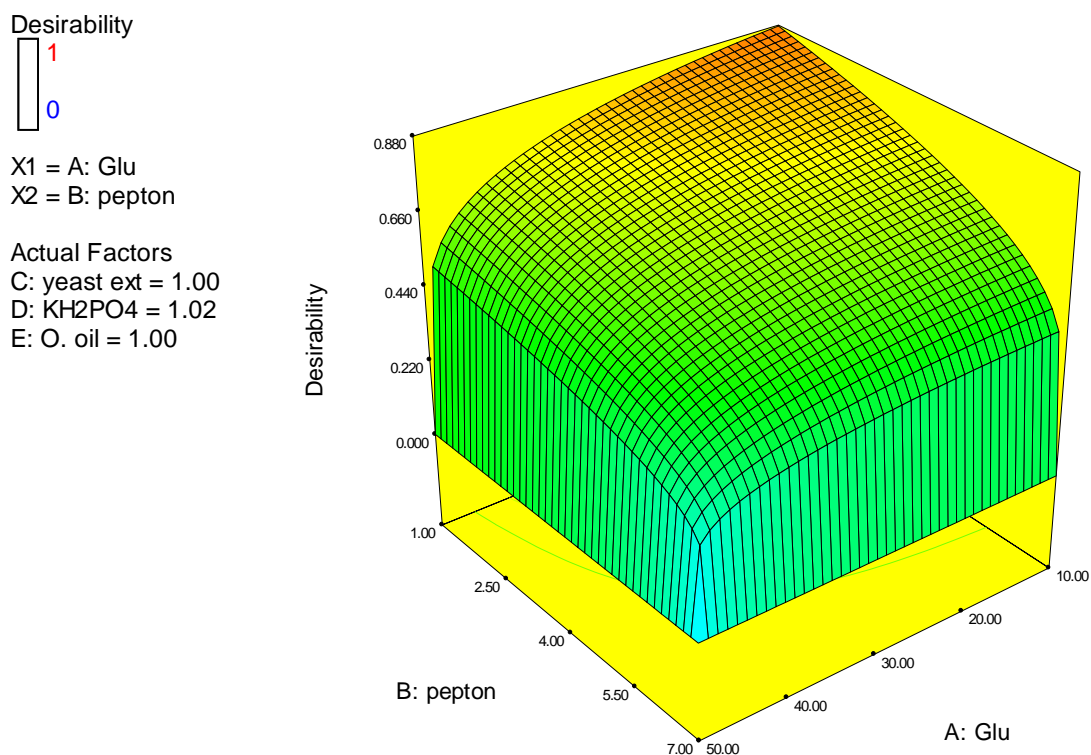
$$\begin{aligned}
 \text{eksponentna hitrost rasti micelija} = & +6,36997 + 0,012766 * \text{glukoza} - \\
 & -0,11742 * \text{pepton} - 0,080378 * \text{kvasni ekstrakt} + \\
 & +0,23561 * \text{KH}_2\text{PO}_4 - 0,012143 * \text{oljivno olje}
 \end{aligned}
 \tag{6}$$

Če izberemo optimalne parametre za vsebnost komponent v gojišču (50 g/L glukoze, 1 g/L peptona, 1 g/L kvasnega ekstrakta, 4,94 g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  in 1,21 g/L oljčnega olja), dobimo največji koeficient eksponentne hitrosti rasti 7,96  $\text{mm}^2/\text{h}$  (slika 51).



Slika 51: Grafični model eksponentne hitrosti rasti na trdnem gojišču v primeru, da so vsi parametri nastavljeni na optimalno vrednost.

Če izberemo minimalne parametre za vsebnost komponent v gojišču (10 g/L glukoze, 1 g/L peptona, 1,01 g/L kvasnega ekstrakta, 1,12 g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  in 1 g/L oljčnega olja), dobimo največji koeficient eksponentne hitrosti rasti 6,55  $\text{mm}^2/\text{h}$ , ki je od optimalnega manjši za 17,7 % (slika 52).



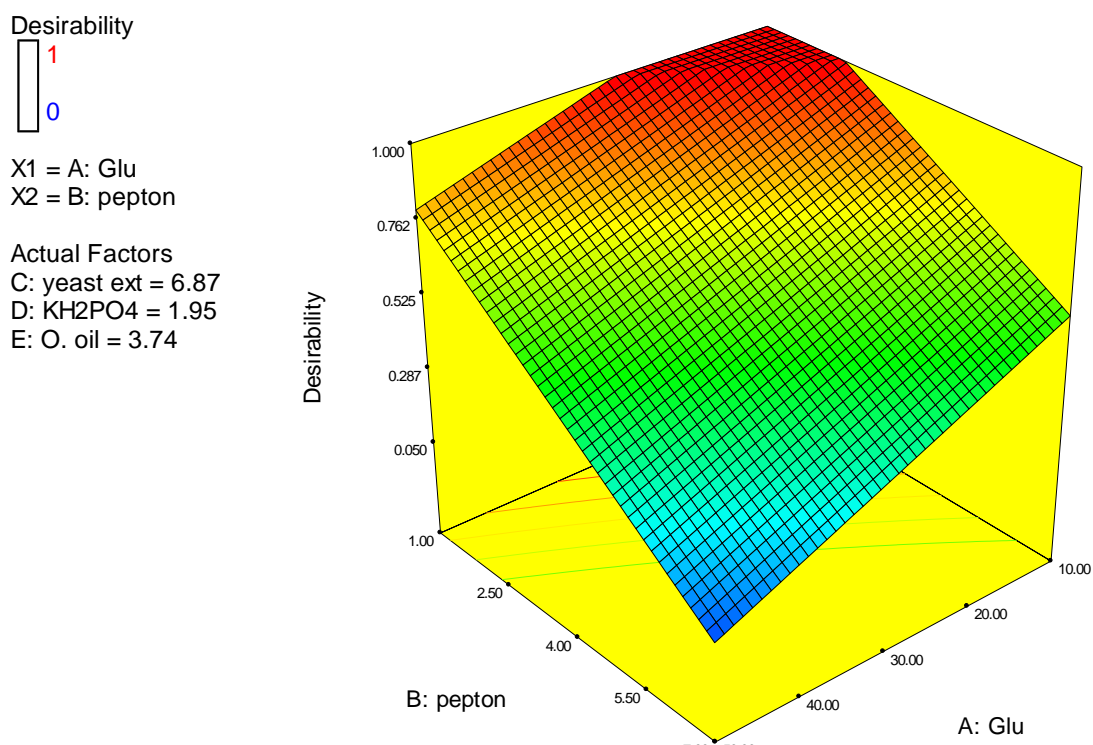
Slika 52: Grafični model eksponentne hitrosti rasti na trdnem gojišču v primeru, da so vsi parametri nastavljeni na minimalno možno vrednost.

Proizvodnjo celokupnih glukanov lahko opišemo z enačbo 7 in podobno lahko prikažemo grafični model ob predpostavkah da so parametri optimalni ali minimalni.

$$\begin{aligned}
 \text{celokupni glukan} = & +6,86269 + 0,067702 * \text{glukoza} + \\
 & +5,22355 * \text{pepton} + 6,60162 * \text{kvasni ekstrakt} - \\
 & -9,09414 * \text{KH}_2\text{PO}_4 + 2,97469 * \text{olivno olje} - \\
 & -0,013646 * \text{glukoza} * \text{pepton} - 0,065833 * \text{glukoza} * \text{kvasni ekstrakt} - \\
 & +0,13121 * \text{glukoza} * \text{KH}_2\text{PO}_4 - 0,024693 * \text{glukoza} * \text{olivno olje} + \\
 & -0,98937 * \text{pepton} * \text{kvasni ekstrakt} + 0,64503 * \text{pepton} * \text{KH}_2\text{PO}_4 - \\
 & -0,58314 * \text{pepton} * \text{olivno olje} + 0,43016 * \text{kvasni ekstrakt} * \text{KH}_2\text{PO}_4 - \\
 & -0,39036 * \text{kvasni ekstrakt} * \text{olivno olje} + 0,28333 * \text{KH}_2\text{PO}_4 * \text{olivno olje}
 \end{aligned}$$

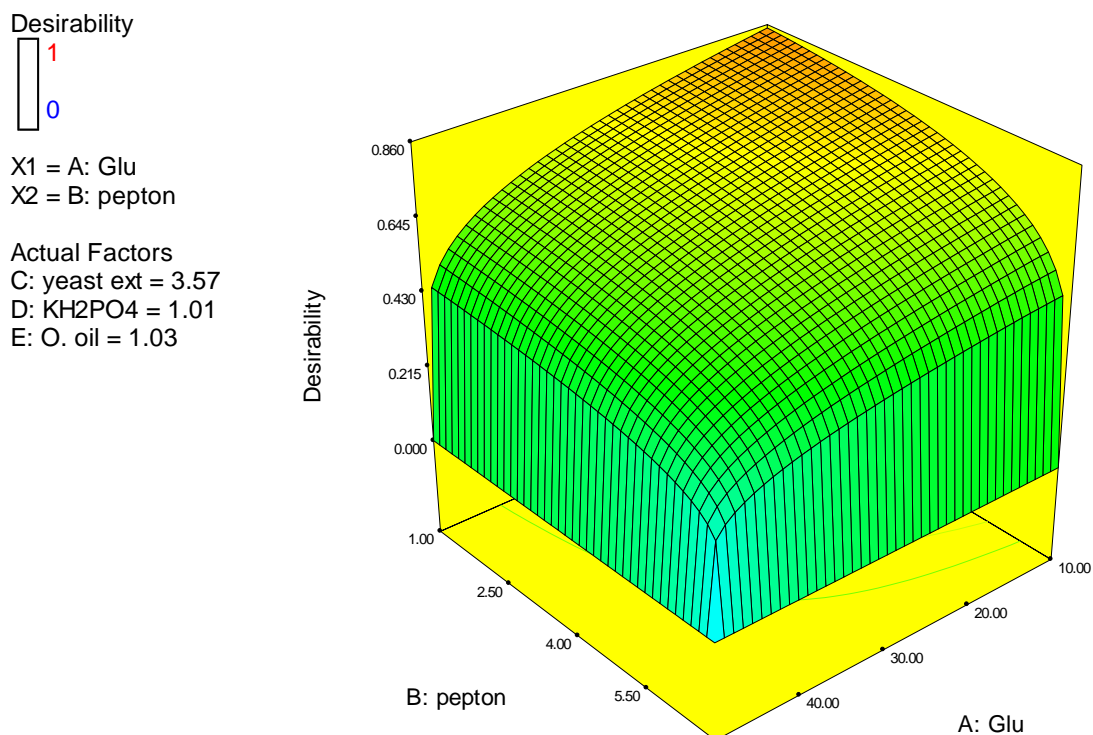
(7)

Če izberemo optimalne parametre za vsebnost komponent v gojišču (24,76 g/L glukoze, 6,85 g/L peptona, 1,24 g/L kvasnega ekstrakta, 3,04 g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  in 1,91 g/L oljčnega olja), dobimo največji dobiček celokupnega glukana 34,7 % (slika 53).



Slika 53: Grafični model vsebnosti celokupnega glukana na trdnem gojišču v primeru, da so vsi parametri nastavljeni na optimalno vrednost.

Če izberemo minimalne parametre za vsebnost komponent v gojišču (10 g/L glukoze, 1 g/L peptona, 3,07 g/L kvasnega ekstrakta, 1g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  in 1 g/L oljčnega olja), dobimo največji dobiček celokupnega glukana 23,6 % oz 32,9 % manj kot pri optimalnih pogojih (slika 54).

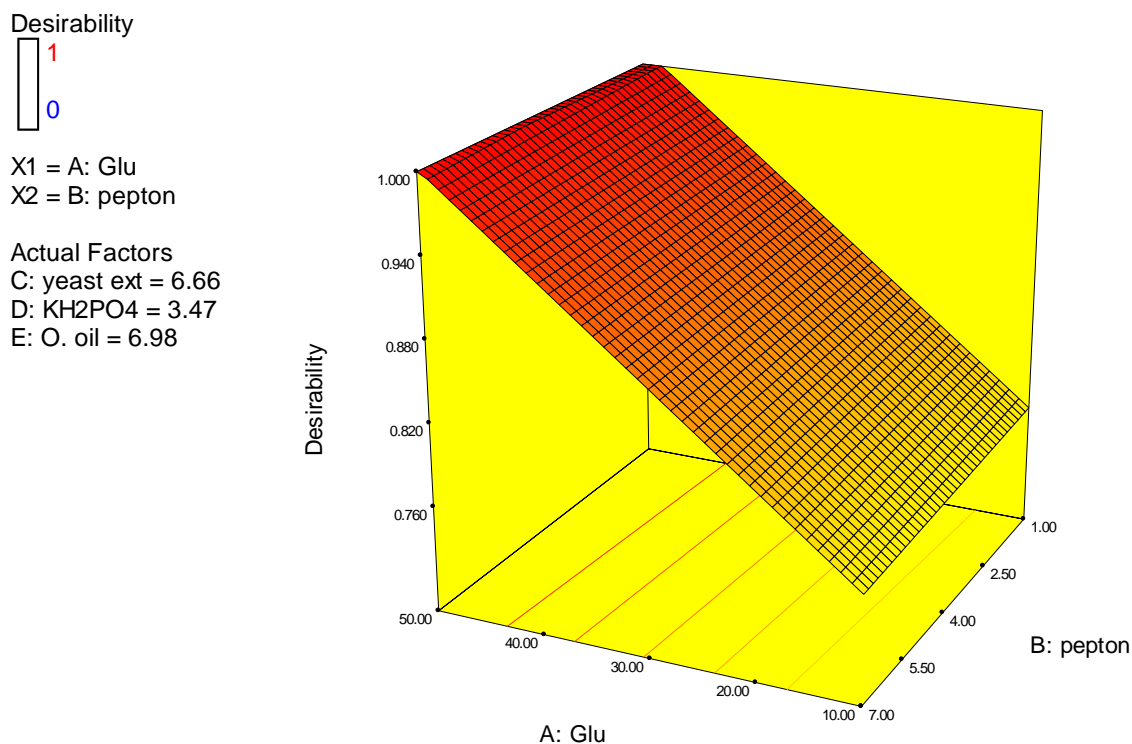


Slika 54: Grafični model vsebnosti celokupnega glukana na trdnem gojišču v primeru, da so vsi parametri nastavljeni na minimalno možno vrednost.

Proizvodnjo  $\alpha$ -glukana lahko opišemo z enačbo 8 in podobno lahko prikažemo grafični model ob predpostavkah da so parametri optimalni ali minimalni.

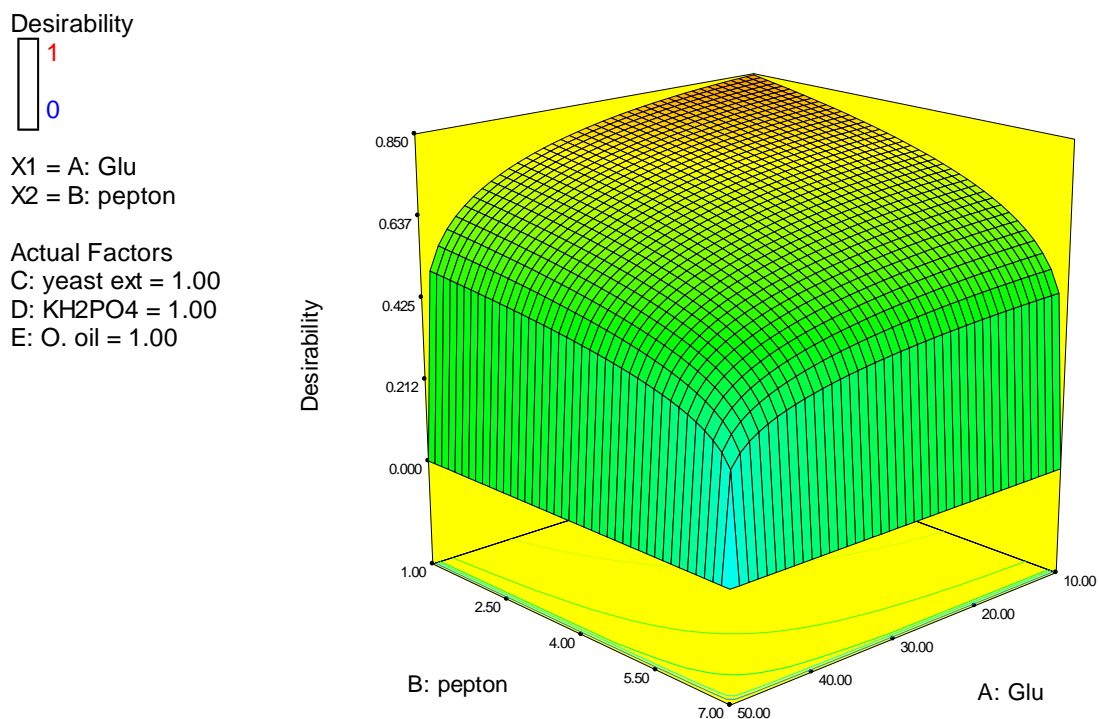
$$\begin{aligned} \alpha - \text{glukan} = & +4,94516 + 0,074144 * \text{glukoza} - \\ & -0,021706 * \text{pepton} + 0,59866 * \text{kvasni ekstrakt} + \\ & +5,82295E - 0,03 * \text{KH}_2\text{PO}_4 + 0,26003 * \text{olivno olje} \end{aligned} \quad (8)$$

Če izberemo optimalne parametre za vsebnost komponent v gojišču (49,38 g/L glukoze, 1,07 g/L peptona, 6,74 g/L kvasnega ekstrakta, 4,64 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in 6,98 g/L oljčnega olja), dobimo največji dobiček  $\alpha$ -glukana 14,5 % (slika 55).



Slika 55: Grafični model vsebnosti  $\alpha$ -glukana na trdnem gojišču v primeru, da so vsi parametri nastavljeni na optimalno vrednost.

Če izberemo minimalne parametre za vsebnost komponent v gojišču (10 g/L glukoze, 1 g/L peptona, 1,06 g/L kvasnega ekstrakta, 1 g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  in 1 g/L oljčnega olja), dobimo največji dobiček  $\alpha$ -glukana 6,6 % oz 45,5 % manj kot pri optimalnih pogojih (slika 56).

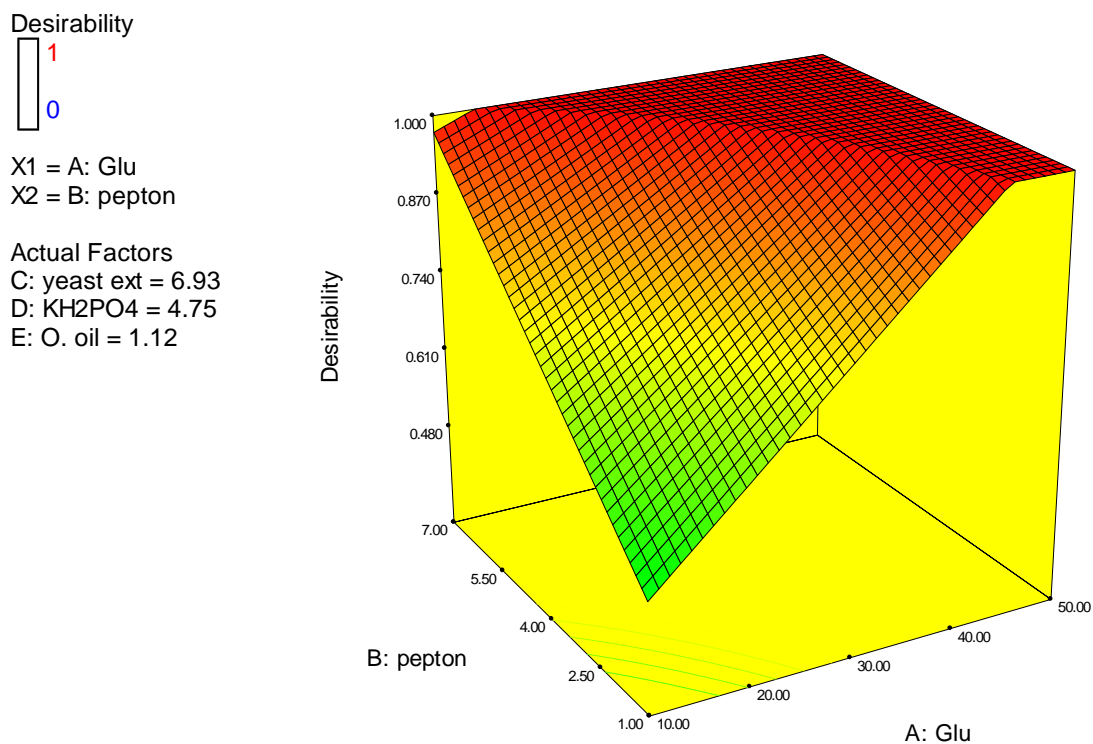


Slika 56: Grafični model vsebnosti  $\alpha$ -glukana na trdnem gojišču v primeru, da so vsi parametri nastavljeni na minimalno možno vrednost.

Proizvodnjo  $\beta$ -glukana lahko opišemo z enačbo 9 in podobno lahko prikažemo grafični model ob predpostavkah da so parametri optimalni ali minimalni.

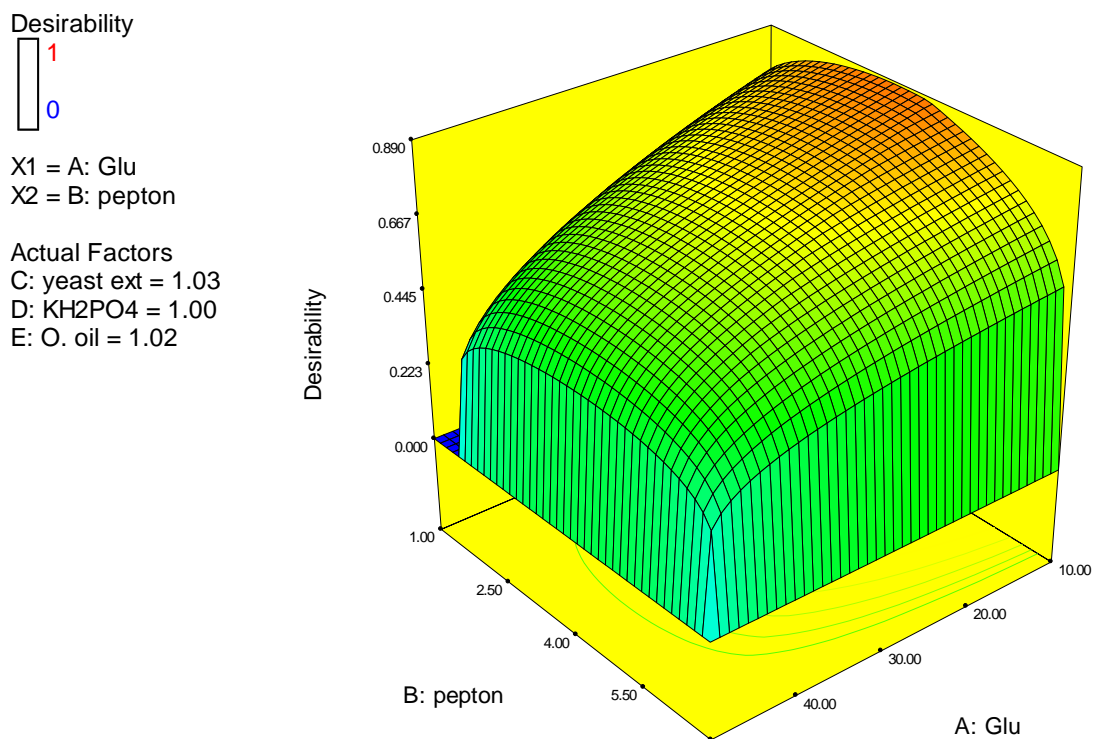
$$\begin{aligned}
 \beta - \text{glukan} = & +5,54957 - 0,22294 * \text{glukoza} + \\
 & +6,21627 * \text{pepton} + 4,78532 * \text{kvasni ekstrakt} - \\
 & -8,87097 * \text{KH}_2\text{PO}_4 + 2,66043 * \text{olivno olje} - \\
 & -0,026690 * \text{glukoza} * \text{pepton} - 0,020000 * \text{glukoza} * \text{kvasni ekstrakt} + \\
 & +0,14652 * \text{glukoza} * \text{KH}_2\text{PO}_4 - 0,014763 * \text{glukoza} * \text{olivno olje} - \\
 & -0,73283 * \text{pepton} * \text{kvasni ekstrakt} + 0,30711 * \text{pepton} * \text{KH}_2\text{PO}_4 - \\
 & -0,70278 * \text{pepton} * \text{olivno olje} + 0,34429 * \text{kvasni ekstrakt} * \text{KH}_2\text{PO}_4 - \\
 & -0,57988 * \text{kvasni ekstrakt} * \text{olivno olje} + 0,54583 * \text{KH}_2\text{PO}_4 * \text{olivno olje} \quad (9)
 \end{aligned}$$

Če izberemo optimalne parametre za vsebnost komponent v gojišču (48,01 g/L glukoze, 6,65 g/L peptona, 1,95 g/L kvasnega ekstrakta, 4,14 g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  in 3,13 g/L oljčnega olja), dobimo največji dobiček  $\beta$ -glukana 24,3 % (slika 57).



Slika 57: Grafični model vsebnosti  $\beta$ -glukana na trdnem gojišču v primeru, da so vsi parametri nastavljeni na optimalno vrednost.

Če izberemo minimalne parametre za vsebnost komponent v gojišču (10 g/L glukoze, 1 g/L peptona, 1,06 g/L kvasnega ekstrakta, 1 g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  in 1 g/L oljčnega olja), dobimo največji dobiček  $\beta$ -glukana 6,6 % oz 48,5 % manj kot pri optimalnih pogojih (slika 58).

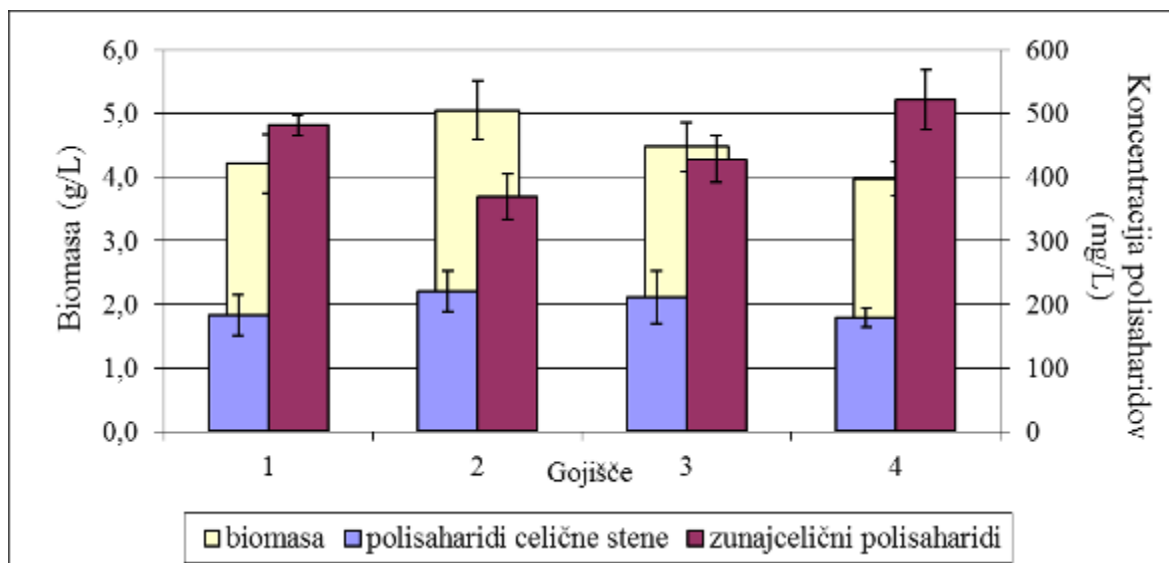


Slika 58: Grafični model vsebnosti  $\beta$ -glukana na trdnem gojišču v primeru, da so vsi parametri nastavljeni na minimalno možno vrednost.

## 4.4 GOJENJE V TEKOČEM GOJIŠČU

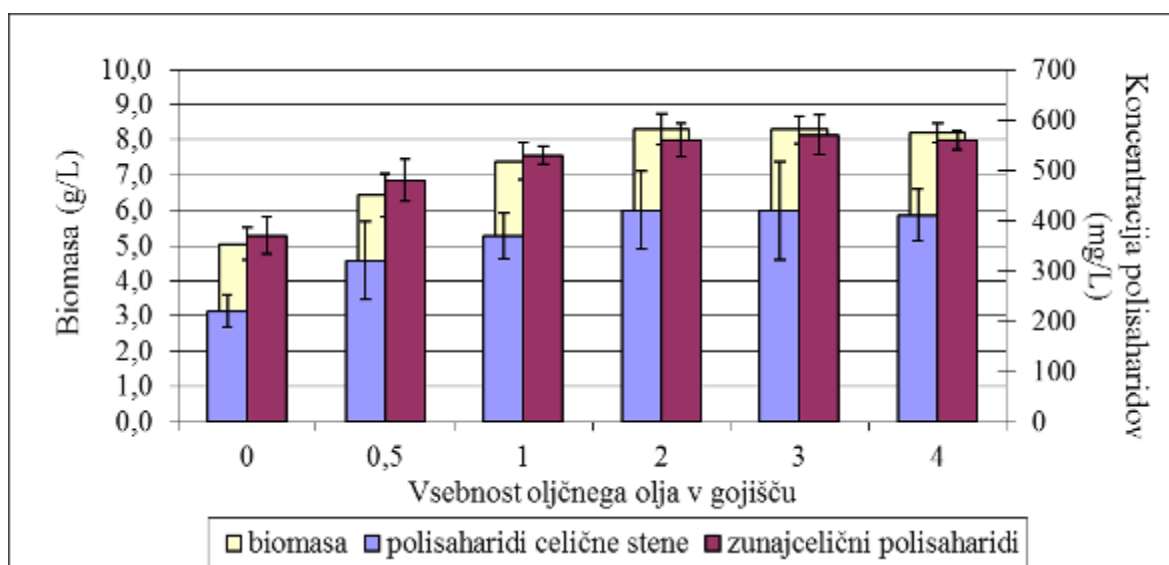
### 4.4.1 Izbira gojišča

Pri izbiri primerne gojišča za gojenje v tekočem gojišču, smo preverili različna gojišča, katerih sestave (preglednica 12) so objavljene v poskusih optimizacije gojišča za produkcijo biomase in/ali polisaharidov. Glede tvorbe biomase in polisaharidov celične stene, se je kot najboljše izkazalo drugo gojišče, kjer je bil dobiček biomase 5,1 g/L, polisaharidov celične stene pa 220 mg/L. Glede tvorbe zunajceličnih polisaharidov, pa se je kot najboljše izkazalo četrto gojišče, kjer je bil dobiček 522 mg/L (slika 59).



Slika 59: Dobitek biomase, polisaharidov celične stene in zunajceličnih polisaharidov pri preverjanju različnih gojišč (preglednica 12) v tekočem gojišču.

Domnevali smo, da bi lahko z uporabo oljčnega olja še izboljšali drugo gojišče, zato smo naredili še serijo poskusov in preverili, kako dodatek oljčnega olja vpliva na dobitek biomase, polisaharidov celične stene in zunajceličnih polisaharidov (slika 60).



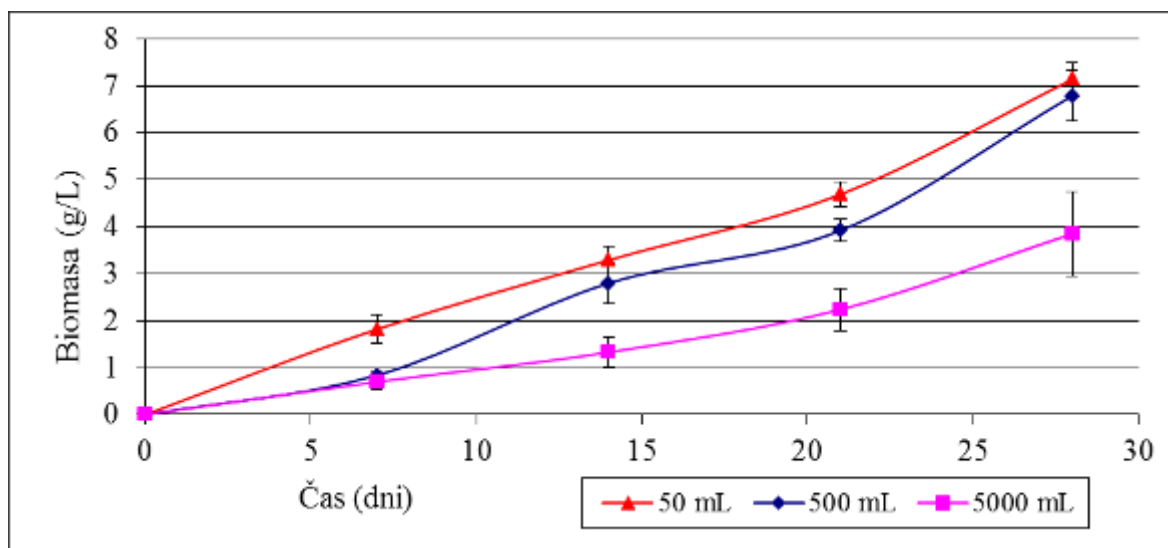
Slika 60: Dobitek biomase, polisaharidov celične stene in zunajceličnih polisaharidov pri preverjanju dodatka oljčnega olja (%) v tekočem gojišču.

Ugotovili smo, da dodatek olja poveča donos biomase in zunajceličnih polisaharidov. Pozitiven učinek oljčnega olja je opazen vse do koncentracije 2 %. Z uporabo večjih koncentracij oljčnega olja se donos biomase in zunajceličnih polisaharidov ne poveča.

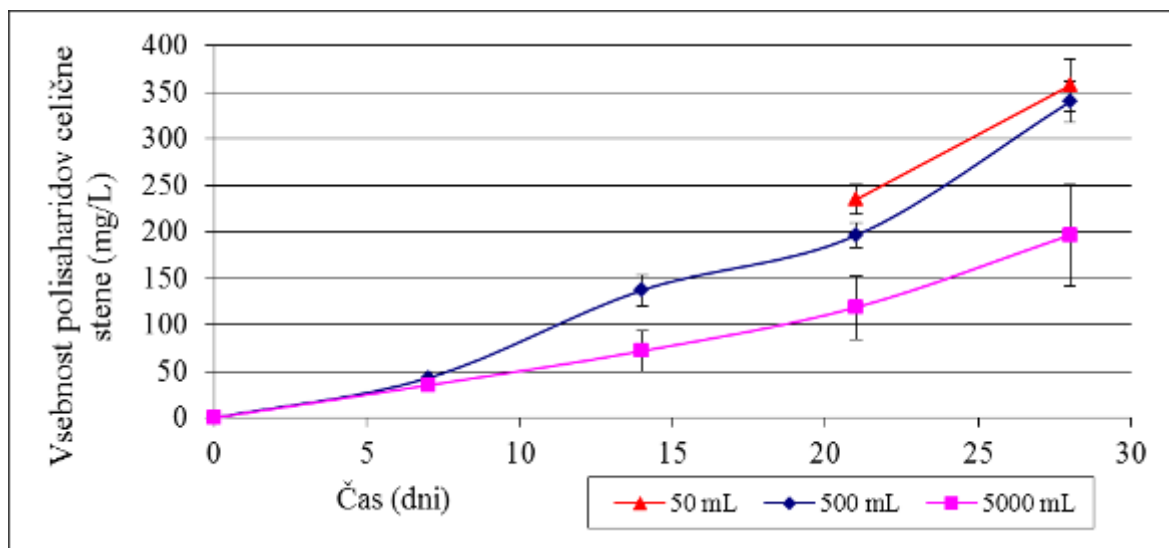
#### 4.4.2 Gojenje v tekočem gojišču brez mešanja

Pri gojenju v mirujoči kulturi smo želeli preveriti, kako gliva raste brez mešanja v najbolj osnovnem in preprostem načinu v tekočem gojišču.

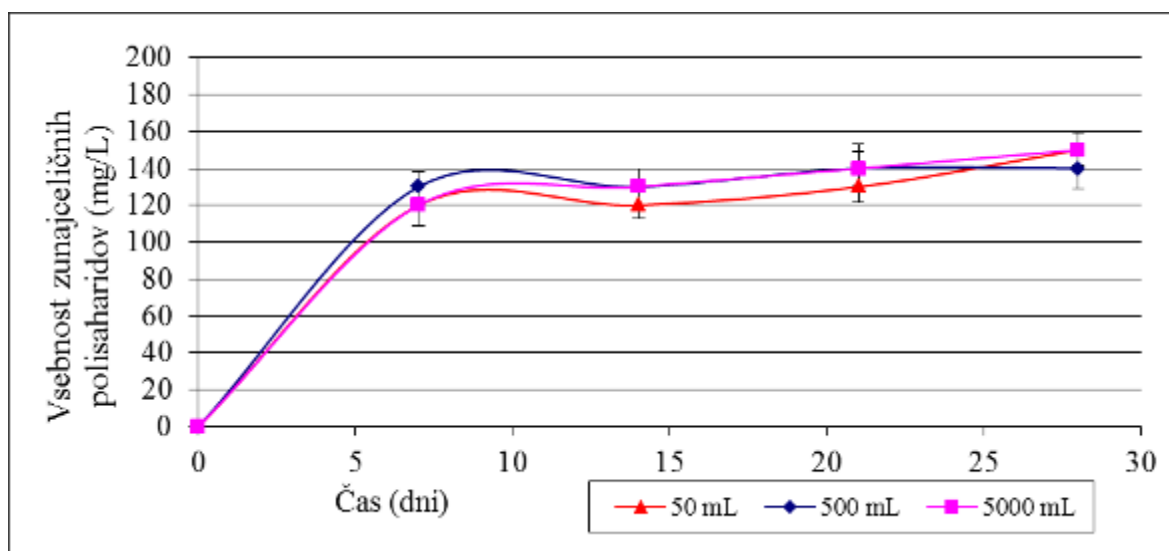
Ugotovili smo, da je za prirast biomase zelo pomemben volumen erlenmajerice (slika 61). Najboljše rezultate smo dobili v erlenmajerici z volumnom 50 mL (7,1 g/L), nato v erlenmajerici z volumnom 500 mL (6,8 g/L) in najslabše v erlenmajerici z volumnom 5000 mL (3,9 g/L). Dobitek polisaharidov celične stene je podoben in sledi trendu dobitka biomase (slika 62). Pri najmanjšem volumnu so imeli na začetku premalo vzorca za določitev vsebnosti polisaharidov celične stene. Volumen pa nima vpliva na dobitek zunajceličnih polisaharidov (slika 63), saj so pri vseh volumnih ti skoraj identični. Dobitki zunajceličnih polisaharidov so tudi bistveno nižji, kot dobitki pri gojenju v bioreaktorjih.



Slika 61: Vpliv volumna gojitvene posode (erlenmajerice) na dobitek biomase v tekočem gojišču v mirujoči kulturi.



Slika 62: Vpliv volumna gojitvene posode (erlenmajerice) na dobiček polisaharidov celične stene v tekočem gojišču v mirujoči kulturi.



Slika 63: Vpliv volumna gojitvene posode (erlenmajerice) na dobiček zunajceličnih polisaharidov v tekočem gojišču v mirujoči kulturi.

Volumen v katerem gojimo micelij v mirujoči kulturi je pomemben tudi iz vidika produktivnosti. Iz preglednice 34 je razvidno, da so manjši produkcijski volumni boljši za produktivnost.

Preglednica 34: Produktivnost gojenja v tekočem gojišču v erlenmajericah različnih volumnov.

<b>Volumen erlenmajerice</b>	<b><math>P_{Bp}</math> (<math>\frac{g_{pripravka}}{g_{gojišča}}</math> h) <math>\times 10^{-7}</math></b>	<b><math>P_{Bp}</math> (<math>\frac{g_{pripravka}}{g_{gojišča}}</math> h) <math>\times 10^{-7}</math></b>	<b><math>P_{Bp}</math> (<math>\frac{g_{pripravka}}{g_{gojišča}}</math> h) <math>\times 10^{-7}</math></b>	<b><math>P_{Bb}</math> (<math>\frac{g_{biomase}}{g_{gojišča}}</math> h) <math>\times 10^{-5}</math></b>
opomba	glede na polisaharide celične stene	glede na zunajcelične polisaharide	glede ne skupne polisaharide	
50 mL	94	39	133	18,7
500 mL	89	37	126	17,8
5000 mL	51	39	91	10,1

#### 4.4.3 Gojenje v mešalnem bioreaktorju

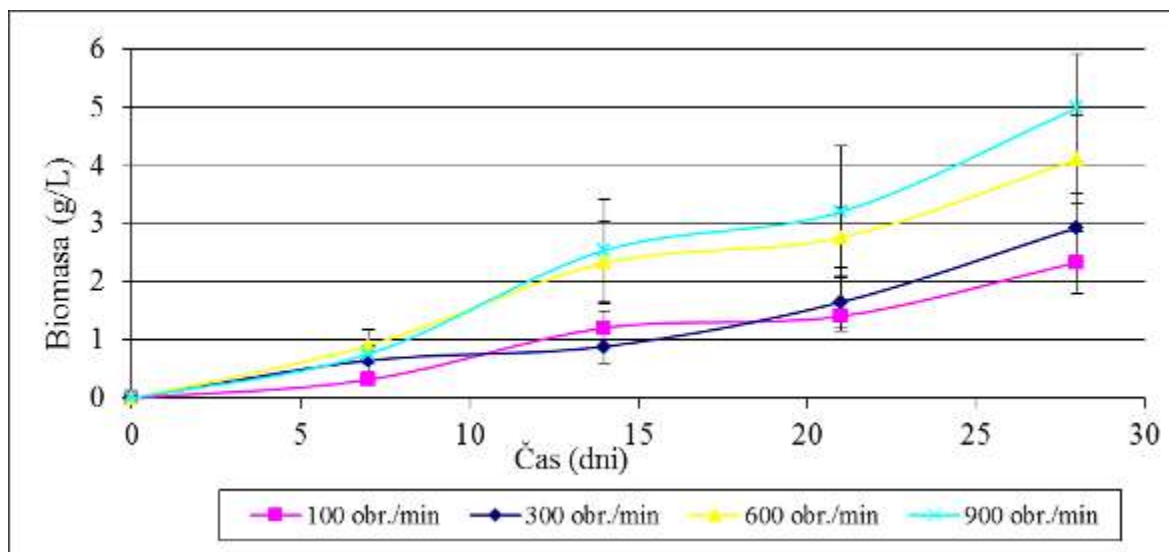
Ko smo pričeli z gojenjem v mešalnem bioreaktorju, smo ugotovili, da se micelij prijema na vse kovinske dele bioreaktorja t.j. stene, pregrade, mešalo in sonde. Biomaso smo gojili v različnih bioreaktorjih, pri različnih pogojih in uporabili smo tudi dva različna seva (preglednica 13). Ker se nam je zdelo, da bi lahko tudi priprava vcepka igrala pomembno vlogo pri obliki rasti, smo preverili še dva načina priprave vcepka. Pri vseh poskusih se je izkazalo, da ni bilo možno vzgojiti biomase, ki bi rasla v obliki peletov in nam omogočila normalno vzorčenje (slika 64).



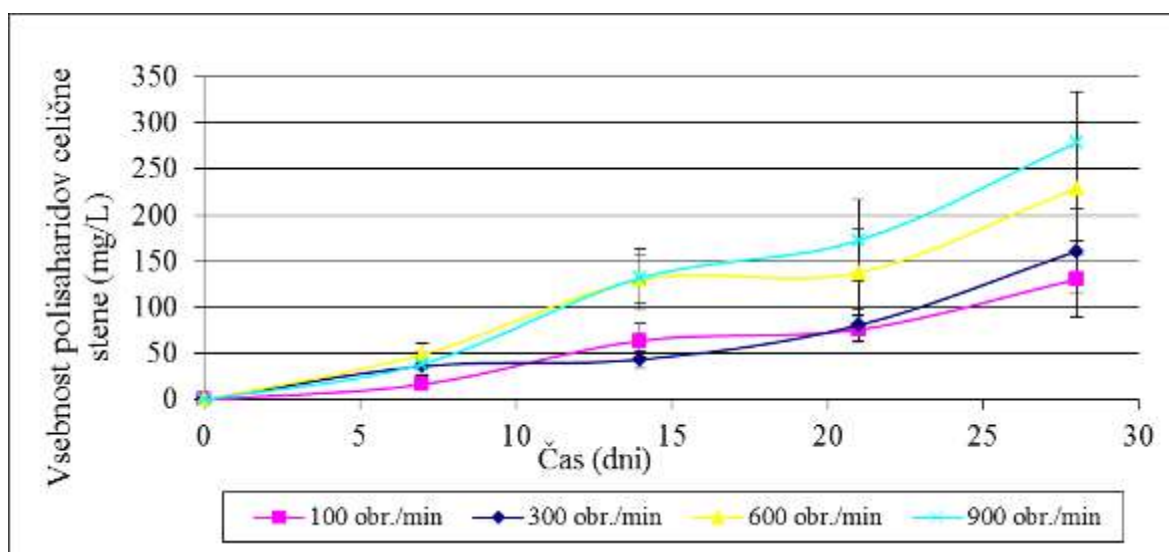
Slika 64: Rast micelija v tekočem gojišču v mešalnih bioreaktorjih.

Ker se je micelij razraščal na notranjih površinah bioreaktorja, smo uporabili drugačno strategijo vzorčenja - po določenem času smo fermentacijo prekinili in kot vzorec uporabili celotno vsebino bioreaktorja. Pri drugi seriji poskusov smo ugotavljali, ali s spreminjanjem hitrosti mešanja lahko vplivamo na razraščanje micelija. Izkazalo se je, da pri vseh hitrostih mešanja pride do enakega tipa rasti. Hitrost mešanja je vplivala na dobitok biomase in posledično na dobitok polisaharidov celične stene ter na dobitok zunajceličnih polisaharidov.

Povečanje mešanja je pozitivno vplivalo na tvorbo biomase in tako smo iz najmanjšega dobitka 2,3 g/L pri 100 obr./min prišli do največjega dobitka 5 g/L pri 900 obr./min (slika 65). Podobno lahko trdimo tudi za dobitok polisaharidov celične stene (slika 66), ki je dobro sledil tvorbi biomase. Pri najnižji hitrosti mešanja smo dobili 130 mg/L polisaharidov celične stene, pri največji pa približno 280 mg/L.

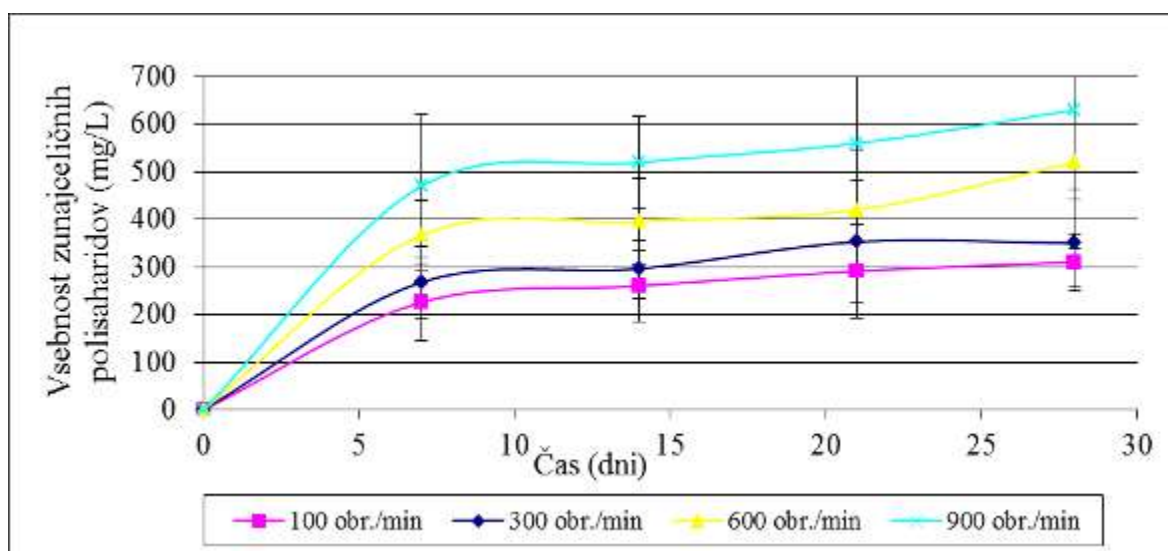


Slika 65: Vpliv hitrosti mešanja na dobitok biomase v mešalnem bioreaktorju KLF.



Slika 66: Vpliv hitrosti mešanja na vsebnost polisaharidov celične stene v mešalnem bioreaktorju KLF.

Dobitek zunajceličnih polisaharidov, se je spreminjal glede na hitrost mešanja in dobili smo večje razlike kot pri drugih poskusih gojenja v tekočem gojišču (slika 67). Pri najnižji hitrosti mešanja smo dobili 310 mg/L zunajceličnih polisaharidov, pri največji pa kar 100 % več (630 mg/L).



Slika 67: Vpliv hitrosti mešanja na vsebnost zunajceličnih polisaharidov v mešalnem bioreaktorju KLF 2.1.

Sestava pripravkov, dobljenih iz fermentacij pri 900 obr./min je prikazana v preglednici 35.

Preglednica 35: Vsebnost sladkorjev, proteinov in glukanov polisaharidov celične stene in zunajceličnih polisaharidov pri najboljši fermentacij v mešalnem bioreaktorju.

Pripravek	vsebnost sladkorjev (%)	vsebnost proteinov (%)	vsebnost celokupnih glukanov (%)	vsebnost $\alpha$ -glukanov (%)	vsebnost $\beta$ -glukanov (%)
polisaharidi celične stene	64,4	9,8	63,7	1,6	62,1
zunajcelični polisaharidi	65,1	8,2	61,8	1,2	60,6

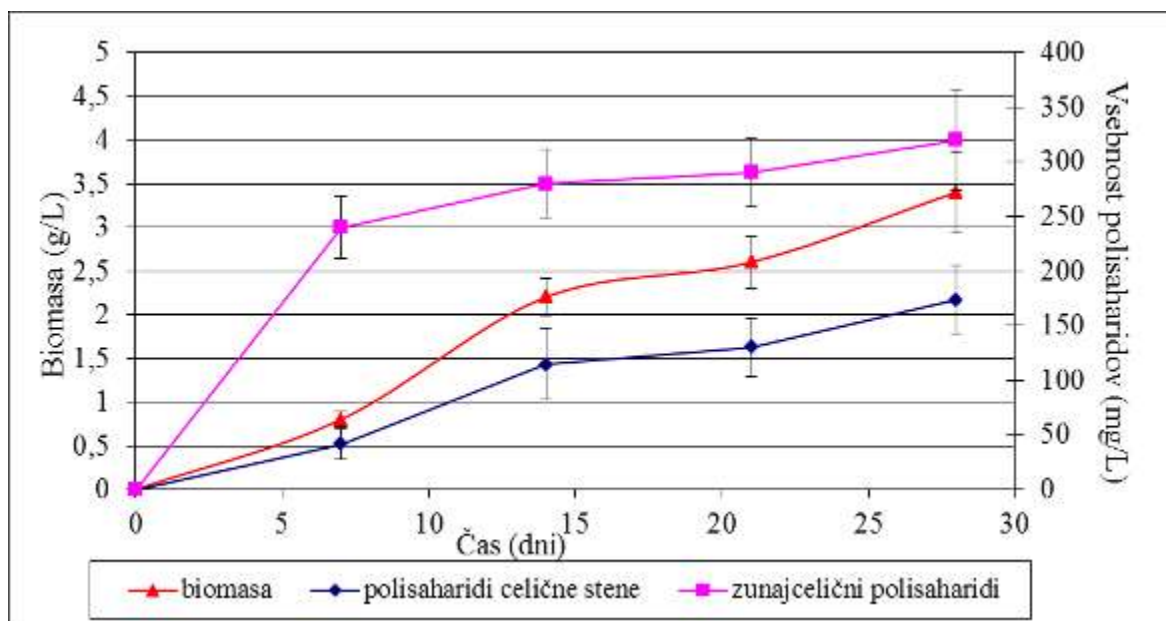
Vpliv mešanja na produktivnost bioprocesa je prikazana v preglednici 36. Ugotovili smo, da z višanjem hitrosti mešanja vplivamo na produktivnost in da razlika med najmanjšo in najvišjo hitrostjo mešanja povzroči več kot 100-odstotno razliko v produktivnosti.

Preglednica 36: Vpliv hitrosti mešanja v mešalnem bioreaktorju na produktivnost.

<b>Hitrost mešanja (obr./min)</b>	<b><math>P_{Bp}</math> (gpripravka/ggojišča h) x 10<sup>-7</sup></b>	<b><math>P_{Bp}</math> (gpripravka/ggojišča h) x 10<sup>-7</sup></b>	<b><math>P_{Bp}</math> (gpripravka/ggojišča h) x 10<sup>-7</sup></b>	<b><math>P_{Bb}</math> (gbiomase/ggojišča h) x 10<sup>-5</sup></b>
opomba	glede na polisaharide celične stene	glede na zunajcelične polisaharide	glede ne skupne polisaharide	
100	34	81	116	6,1
300	42	92	134	7,7
600	60	136	197	10,8
900	73	165	238	13,1

#### 4.4.4 Gojenje v bioreaktorju s polnili

V mešalnem bioreaktorji, smo opazili, da je praktično nemogoče vzgojiti biomaso, brez da bi se prijemala na stene, pregrade in mešala bioreaktorja. Pri gojenju v bioreaktorju s polnili smo dobili najslabše rezultate od vseh preverjenih načinov gojenja, celo gojenja v mirujoči kulturi, kjer ni niti mešanja, niti prezračevanja. Dobitek biomase je bil 3,4 g/L, polisaharidov celične stene 173 mg/L in zunajceličnih polisaharidov 320 mg/L (slika 68). Poleg slabih rezultatov pri takem načinu gojenja, je bilo problematično tudi čiščenje bioreaktorja, saj je bilo potrebno ročno odstraniti micelij iz vsakega steklenega tulca posebej.



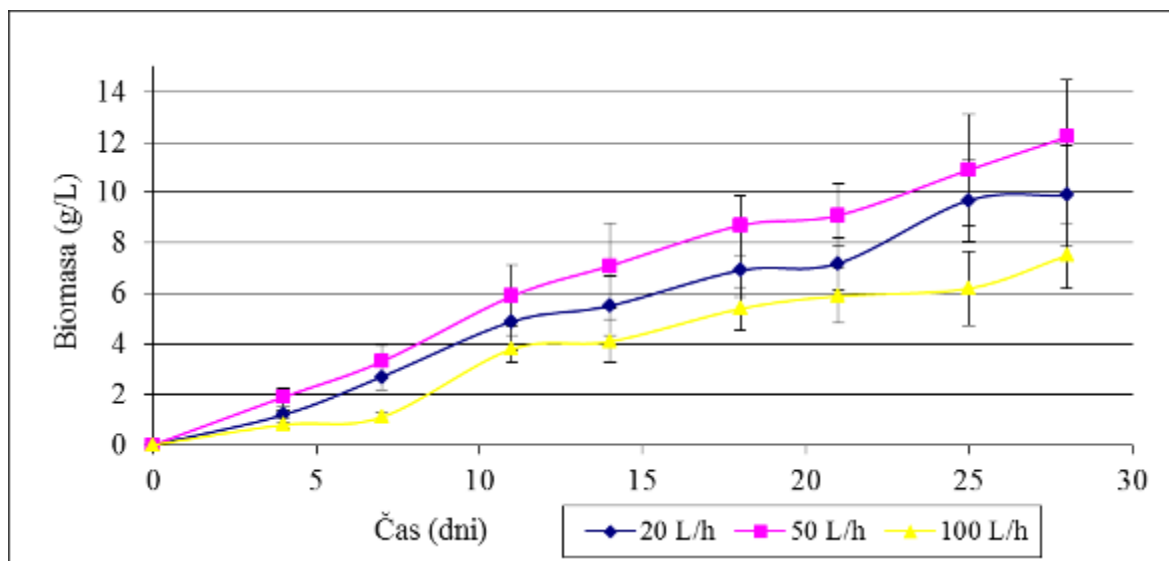
Slika 68: Vsebnost biomase, polisaharidov celične stene in zunajceličnih polisaharidov pri gojenju v bioreaktorju s polnili.

Pri gojenju v bioreaktorju s polnili smo izračunali produktivnost za pridobivanje pripravka ( $P_{Bp}$ ), ki je znašala  $45 \times 10^{-7}$  gramov pripravka polisaharidov celične stene na gram suhega gojišča na uro,  $84 \times 10^{-7}$  gramov pripravka zunajceličnih polisaharidov na gram suhega gojišča na uro,  $129 \times 10^{-7}$  gramov pripravka skupnih polisaharidov na gram suhega gojišča na uro in produktivnost za pridobivanje biomase ( $P_{Bb}$ ), ki je znašala  $9 \times 10^{-5}$  gramov suhe biomase na gram suhega gojišča na uro.

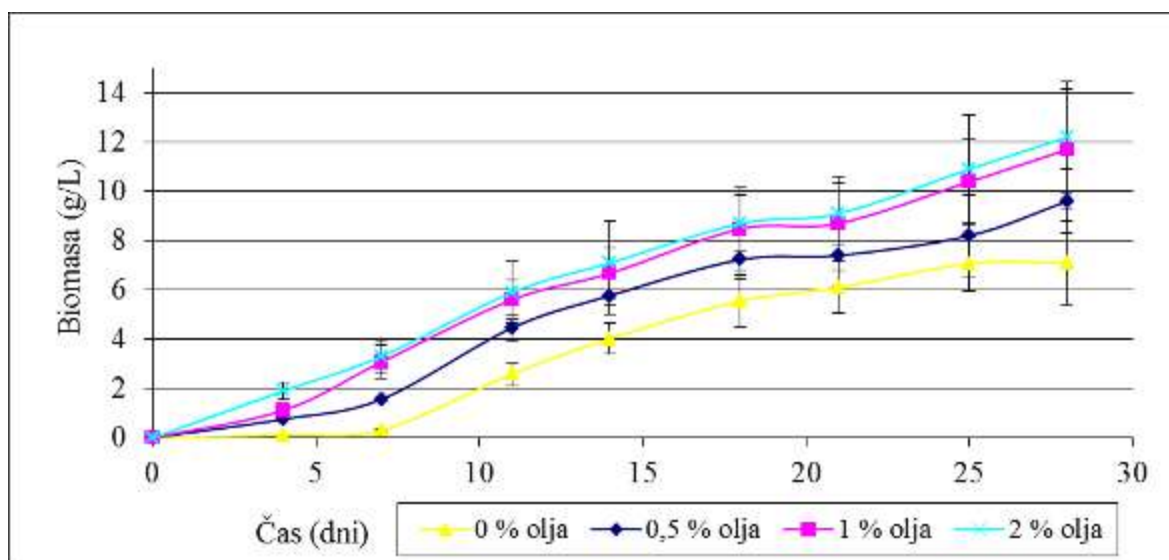
#### 4.4.5 Gojenje v koloni z mehurčki

Četrty način gojenja v tekočem gojišču je bilo gojenje v koloni z mehurčki. Kolona z mehurčki omogoča gojenje pri velikih intenzivnostih prezračevanja, homogeni porazdelitvi in nizkih strižnih silah mešanja. Pri gojenju v koloni z mehurčki smo preverili vpliv pretoka zraka na dobitke biomase in polisaharidov, nato pa smo pri najboljšem pretoku zraka gojili biomaso pri različnih vsebnostih oljčnega olja v gojišču. V nasprotju z gojenjem v mešalnem bioreaktorju, pri gojenju v koloni z mehurčki ni prišlo do prijemanja micelija na stene bioreaktorja.

Pri preverjanju vpliva pretoka zraka na dobitke biomase, smo ugotovili, da je izmed preverjenih pretokov, najboljši pretok zraka 50 L/h (slika 69). Prisotnost oljčnega olja, podobno kot pri gojenju na trdnem gojišču, prav tako stimulira produkcijo biomase (slika 70). Med fermentacijo smo spremljali tudi vrednost pH, ki pa ni dala koristnih informacij. Vrednost pH se je iz začetne vrednosti 4,5 linearno zniževala na končno vrednost 4,0-4,2.

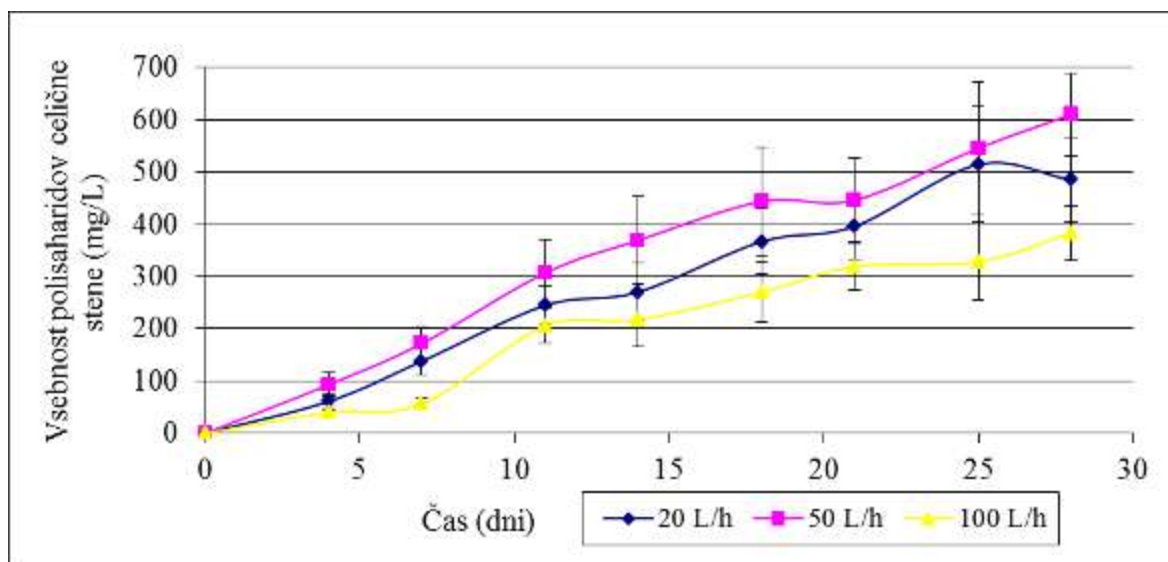


Slika 69: Vpliv pretoka zraka na dobitke biomase v koloni z mehurčki.

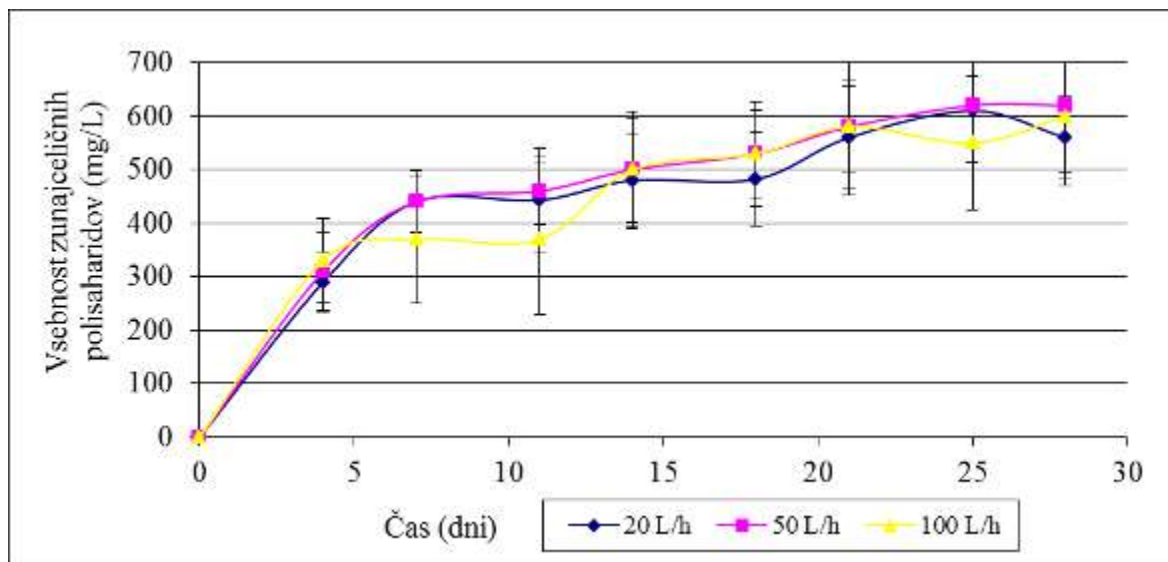


Slika 70: Vpliv dodatka oljčnega olja na dobitke biomase v koloni z mehurčki.

Vsebnost polisaharidov celične stene, preračunanih na volumen gojišča, se je po pričakovanjih povečevala s povečevanjem vsebnosti biomase (slika 71). Vsebnost zunajceličnih polisaharidov pa zelo hitro naraste in se počasi povečuje. Pri različnih pretokih zraka ni večjih razlik v koncentraciji zunajceličnih polisaharidov (slika 72).

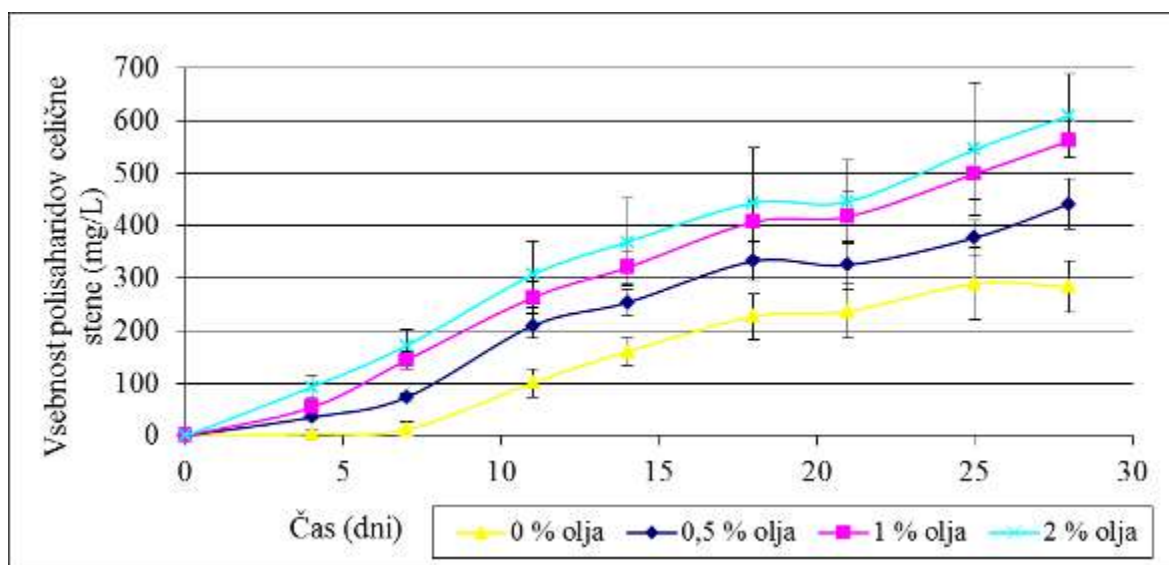


Slika 71: Vsebnost polisaharidov celične stene pri različnih pretokih zraka v koloni z mehurčki.

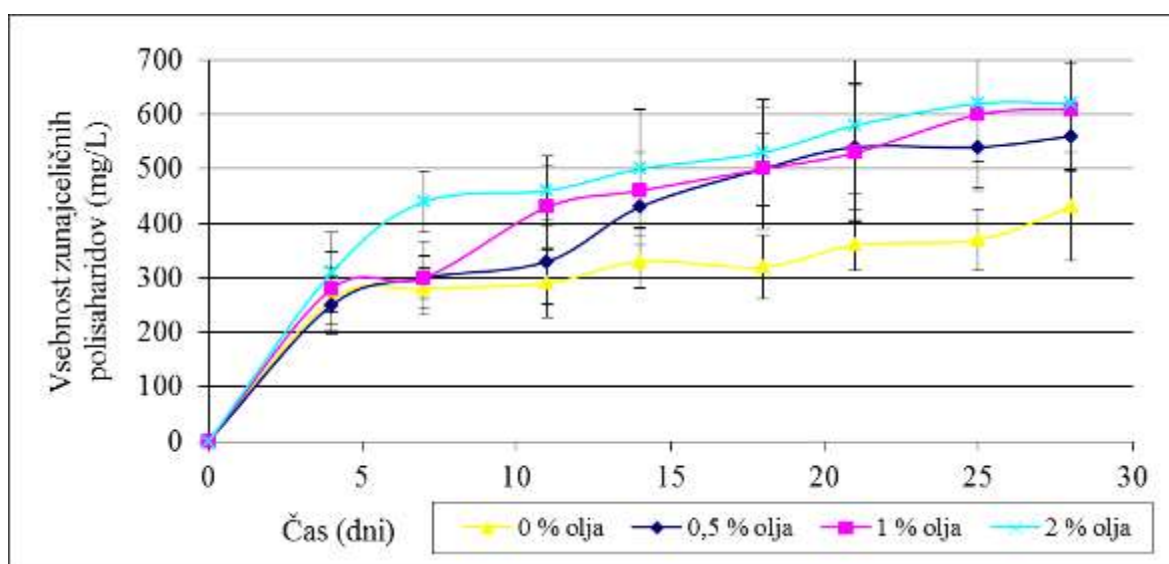


Slika 72: Vsebnost zunajceličnih polisaharidov pri različnih pretokih zraka v koloni z mehurčki.

Drugače je bilo, ko smo preverili vpliv gojišča na dobitok polisaharidov celične stene in zunajceličnih polisaharidov. Tukaj se je izkazalo, da vsebnost oljčnega olja vpliva na dobitok celičnih polisaharidov (slika 73) in na dobitok zunajceličnih polisaharidov (slika 74). Največji skok smo opazili pri prvem dodatku oljčnega olja (0,5 %), medtem ko pri večjih dodatkih oljčnega olja ni bilo tako velikega učinka.



Slika 73: Vpliv dodatka oljčnega olja na dobitok polisaharidov celične stene v koloni z mehurčki.



Slika 74: Vpliv dodatka oljčnega olja na dobitok zunajceličnih polisaharidov v koloni z mehurčki.

Po končanih fermentacijah, smo določili še vsebnost proteinov, skupnih sladkorjev, celokupnih glukanov,  $\alpha$ -glukanov in  $\beta$ -glukanov v polisaharidih celične stene (preglednica 37) in zunajceličnih polisaharidih (preglednica 38)

Preglednica 37: Vsebnost sladkorjev, proteinov in glukanov polisaharidov celične stene pri gojenju v tekočem gojišču v koloni z mehurčki.

<b>Gojišče in pretok zraka</b>	<b>vsebnost sladkorjev (%)</b>	<b>vsebnost proteinov (%)</b>	<b>vsebnost celokupnih glukanov (%)</b>	<b>vsebnost <math>\alpha</math>-glukanov (%)</b>	<b>vsebnost <math>\beta</math>-glukanov (%)</b>
0 % olja, 50 L/h	80,7	10,9	75,9	1,7	70,2
0,5 % olja, 50 L/h	77,4	10,1	74,1	1,3	72,8
1 % olja, 50 L/h	67,2	10,5	62,7	1,7	61,0
2 % olja, 50 L/h	69,2	8,6	66,7	1,6	65,2

Preglednica 38: Vsebnost sladkorjev, proteinov in glukanov zunajceličnih polisaharidov pri gojenju v tekočem gojišču v koloni z mehurčki.

<b>Gojišče in pretok zraka</b>	<b>vsebnost sladkorjev (%)</b>	<b>vsebnost proteinov (%)</b>	<b>vsebnost celokupnih glukanov (%)</b>	<b>vsebnost <math>\alpha</math>-glukanov (%)</b>	<b>vsebnost <math>\beta</math>-glukanov (%)</b>
0 % olja, 50 L/h	72,3	6,5	71,1	0,9	70,2
0,5 % olja, 50 L/h	76,7	6,2	75,9	1,0	74,9
1 % olja, 50 L/h	75,4	8,2	74,6	1,1	73,5
2 % olja, 50 L/h	82,2	8,0	78,8	0,9	77,9

Vpliv pretoka zraka na produktivnost pri gojenju v koloni z mehurčki je prikazan v preglednici 39. Največjo produktivnost smo dosegli pri pretoku zraka 50 L/h, nato pri pretoku 20 L/h in najslabšo pri pretoku zraka 100 L/h.

Preglednica 39: Vpliv pretoka zraka na produktivnost pri gojenju v tekočem gojišču v koloni z mehurčki.

<b>Pretok zraka</b>	$P_{Bp}$ ( $\frac{g_{pripravka}}{g_{gojišča}}$ h) $\times 10^{-7}$	$P_{Bp}$ ( $\frac{g_{pripravka}}{g_{gojišča}}$ h) $\times 10^{-7}$	$P_{Bp}$ ( $\frac{g_{pripravka}}{g_{gojišča}}$ h) $\times 10^{-7}$	$P_{Bb}$ ( $\frac{g_{biomase}}{g_{gojišča}}$ h) $\times 10^{-5}$
opomba	glede na polisaharide celične stene	glede na zunajcelične polisaharide	glede na ne skupne polisaharide	
20 L/h	127	147	274	26
50 L/h	160	163	323	32
100 L/h	100	157	258	20

Dodatek oljčnega olja pozitivno vpliva na produktivnost in največjo produktivnost smo dosegli pri gojišču z 2-odstotnim dodatkom (preglednica 40).

Preglednica 40: Vpliv gojišča na produktivnost pri gojenju v tekočem gojišču v koloni z mehurčki.

<b>Vsebnost oljčnega olja v gojišču</b>	$P_{Bp}$ ( $\frac{g_{pripravka}}{g_{gojišča}}$ h) $\times 10^{-7}$	$P_{Bp}$ ( $\frac{g_{pripravka}}{g_{gojišča}}$ h) $\times 10^{-7}$	$P_{Bp}$ ( $\frac{g_{pripravka}}{g_{gojišča}}$ h) $\times 10^{-7}$	$P_{Bb}$ ( $\frac{g_{biomase}}{g_{gojišča}}$ h) $\times 10^{-5}$
opomba	glede na polisaharide celične stene	glede na zunajcelične polisaharide	glede na ne skupne polisaharide	
0 %	77	117	194	19
0,5 %	119	151	270	26
1 %	150	163	313	31
2 %	160	163	323	32

## 4.5 BIOLOŠKA AKTIVNOST PRIPRAVKOV IZ GLIVE

### 4.5.1 Vpliv na indukcijo sinteze vnetnega citokina TNF- $\alpha$

Za določanje biološke aktivnosti smo preverili, kako različni načini gojenja (gojenje trosnjakov, gojenje na trdnem gojišču in gojenje v tekočem gojišču) in sestave gojišč vplivajo na indukcijo sinteze citokina TNF- $\alpha$  v humanih PBMC.

#### 4.5.1.1 Biološka aktivnost pripravkov iz trosnjakov

V prvi fazi gojenja trosnjakov (preglednica 4), smo preverili, kako različna gojišča in različni sevi vplivajo na sestavo pripravkov (preglednica 21) in kakšno biološko aktivnost izkazujejo (preglednica 16). Izkazalo se je, da je koncentracija izločenega TNF- $\alpha$  zelo nihala glede na uporabljen sev in gojišče.

Odzive smo dobili le pri vzorcu 1 in 4, kjer so bile prisotne oljčne tropine. Koncentracija sproščenega citokina TNF- $\alpha$  je bila relativno visoka in je znašala pri vzorcu 1 233 pg/mL in pri vzorcu 4 467 pg/mL (preglednica 41).

Preglednica 41: Indukcija sinteze citokina TNF- $\alpha$  s pripravki prve faze gojenja trosnjakov.

Oznaka vzorca	sev	komponente gojišča	koncentracija TNF- $\alpha$ (pg/mL)
1	GF 1	oljčne tropine 52,5 % koruzni drobljenec 14,8 %	233
2	GF 1	bukovo žaganje 53,6 % koruzni drobljenec 10,7 %	0
3	GF 1	bukovo žaganje 31,6 % konopljino seme 31,6 %	0
4	GF 5	oljčne tropine 52,5 % koruzni drobljenec 14,8 %	467
5	GF 5	bukovo žaganje 53,6 % koruzni drobljenec 10,7 %	0
6	GF 10	bukovo žaganje 53,6 % koruzni drobljenec 10,7 %	0

V drugi fazi gojenja trosnjakov (preglednica 6), smo preverili, kako različna gojišča vplivajo na sestavo pripravkov (preglednica 24) in kakšno biološko aktivnost imajo (preglednica 16). Pripravili smo dve seriji substratov z različnimi dodatki oljčnih tropin (0 - 80 %) in različnima dodatkoma (koruzni drobljenec ali pšenični otrobi). Izkazalo se je, da oljčne tropine niso ključne za tvorbo biološko aktivnih pripravkov. Podobno kot pri poskusih iz prve faze gojenja, je prišlo do velikih razlik med samimi trosnjaki, ki so bili vzgojeni na različnih gojiščih, brez kakršne koli povezave med sestavo gojišča in aktivnostjo pripravka iz trosnjaka. Največjo sproščeno koncentracijo TNF- $\alpha$  smo določili v 8. vzorcu (195 pg/mL), kjer je bil gojišču dodan Agrogel za zadrževanje vode. Določili smo pa, čeprav zelo nizke, aktivnosti pri skoraj vseh pripravkih (preglednica 42). Pripravek iz komercialnega trosnjaka ni izkazoval sposobnosti indukcije sinteze citokina TNF- $\alpha$ .

Preglednica 42: Indukcija sinteze citokina TNF- $\alpha$  s pripravki druge faze gojenja trosnjakov.

Oznaka vzorca	vsebnost oljčnih tropin (%)	vsebnost otrobov (%)	vsebnost koruznega drobljenca (%)	koncentracija TNF- $\alpha$ (pg/mL)
7	78	20	0	0
8	78+Agrogel	20	0	195
9	45	20	0	13
10	35	20	0	0
11	0	20	0	6
12	80	0	20	9
13	78	0	20	0
14	35	0	20	7
15	0	0	20	24
16	pripravek iz komercialnega trosnjaka			0

#### 4.5.1.2 Biološka aktivnost pripravkov iz gojenja na trdnem gojišču

Pri gojenju na trdnem gojišču smo za testiranje biološke aktivnosti preverili najbolj obetavne produkcijske sisteme in gojišča. Preverili smo aktivnost pripravkov iz najboljšega gojišča (koruznica z dodatkom oljčnega olja), ki smo jih dobili iz gojenja v kozarcih, gojenja v laboratorijskem bioreaktorju in pilotnem mešalnem bioreaktorju. Ugotovili smo,

da je imel pripravek iz gojenja v pilotnem mešalnem bioreaktorju največjo sposobnost indukcije sinteze TNF- $\alpha$ , sledil mu je pripravek iz gojenja v kozarcih in nato pripravek iz gojenja v laboratorijskem bioreaktorju (preglednica 43).

Preglednica 43: Indukcija sinteze citokina TNF- $\alpha$  s pripravki pridobljenimi z gojenjem na trdnem gojišču v različnih sistemih.

Vzorec	produkcijski sistem	gojišče	koncentracija TNF- $\alpha$ (pg/mL)
17	gojenje v kozarcih	koruznica (96%),	52
21	gojenje v laboratorijskem bioreaktorju	oljčno olje (2 %), CaCO <sub>3</sub> (2 %)	42
22	gojenje v pilotnem mešalnem bioreaktorju		66

Želeli smo preveriti, kako dodatek oljčnega olja gojišču (0 - 2 %) v laboratorijskem bioreaktorju vpliva na aktivnost pripravkov. Izmerili smo koncentracijo TNF- $\alpha$  v supernatantih dveh celičnih kultur in podali povprečje obeh meritev. Pri gojišču, kateremu ni bilo dodano oljčno olje, smo dobili pripravek, ki ima manjšo sposobnost indukcije sinteze TNF- $\alpha$ . V gojiščih, kjer pa smo oljčno olje dodali, pa smo dobili pripravke z večjo sposobnostjo indukcije sinteze TNF- $\alpha$ . Učinkovitost pa ni bila sorazmerna dodatku oljčnega olja, saj smo največji odziv izmerili pri gojišču z 1 % dodanega oljčnega olja (preglednica 44).

Preglednica 44: Indukcija sinteze citokina TNF- $\alpha$  s pripravki pridobljenimi z gojenjem na trdnem gojišču v laboratorijskem bioreaktorju na različnih gojiščih.

Vzorec	Vsebnost oljčnega olja v trdnem gojišču	koncentracija TNF- $\alpha$ (pg/mL)
18	0 %	33
19	0,5 %	45
20	1 %	49
21	2 %	42

#### 4.5.1.3 Biološka aktivnost pripravkov iz gojenja v tekočem gojišču

Pri gojenju v tekočem gojišču smo za testiranje biološke aktivnosti preverili pripravke pridobljene iz gojenja v koloni z mehurčki, kjer smo dobili najboljše rezultate glede proizvodnje. Preverili smo, kako dodatek oljčnega olja vpliva na sestavo in biološko aktivnost in kakšne so razlike med polisaharidi celične stene in zunajceličnimi polisaharidi. Preverili smo tudi pripravka (polisaharidi celične stene in zunajcelični polisaharidi) iz gojenja v mešalnem bioreaktorju (pri najboljšem gojišču in najboljših pogojih), ker je gojenje v mešalnem bioreaktorju najbolj pogosto uporabljeno v literaturi. Izmerili smo koncentracijo TNF- $\alpha$  v supernatantih dveh celičnih kultur in podali povprečje obeh meritev.

Pri pripravkih, ki smo jih dobili pri gojenju v koloni z mehurčki smo ugotovili, da se je z dodatkom oljčnega olja aktivnost pripravkov spreminjala. Pri polisaharidih celične stene je aktivnost z dodajanjem oljčnega olja padala, pri zunajceličnih polisaharidih pa naraščala (preglednica 45). Pri pripravkih, ki smo jih dobili pri gojenju v mešalnem bioreaktorju, pa ni razlik med aktivnostjo (preglednica 46).

Preglednica 45 - 4.5.1.5: Indukcija sinteze citokina TNF- $\alpha$  s pripravki pridobljenimi z gojenjem v tekočem gojišču v koloni z mehurčki na različnih gojiščih.

Vzorec		dodatek oljčnega olja	koncentracija TNF- $\alpha$ (pg/mL)	
			polisaharidi celične stene	zunajcelični polisaharidi
23	27	0 %	63	57
24	28	0,5 %	60	59
25	29	1 %	52	67
26	30	2 %	52	68

Preglednica 46: Indukcija sinteze citokina TNF- $\alpha$  s pripravki pridobljenimi z gojenjem v tekočem gojišču v mešalnem bioreaktorju na različnih gojiščih.

Vzorec		gojišče/pogoji	koncentracija TNF- $\alpha$ (pg/mL)	
			polisaharidi celične stene	zunajcelični polisaharidi
31	32	2 % oljčnega olja in mešanje 900 obr./min	56	56

#### 4.5.1.4 Korelacije med sestavo pripravkov in indukcijo sinteze TNF- $\alpha$

Preglednica 47 prikazuje zbrane podatke sestave pripravkov (preglednice 16, 17 in 18) in njihovega vpliva na indukcijo sinteze TNF- $\alpha$ . Za statistično obdelavo podatkov smo uporabili računalniški program SPSS za Windows, verzija 19 (IBM, ZDA). Stopnjo korelacije med posameznimi sestavinami in sintezo TNF- $\alpha$ , smo izračunali s Spearmannovim koeficientom korelacije. Statistična značilnost je bila določena s statistično vrednostjo  $p < 0,05$  (\*) ali  $p < 0,01$  (\*\*). Pripravki št. 1-16 so bili pripravljene iz trosnjakov na različnih gojiščih, pripravki št. 17-22 so bili pripravljene iz vzorcev gojenja na trdnem gojišču in vzorci št. 23-32 so bili pripravljene iz vzorcev gojenja v tekočem gojišču.

Preglednica 47: Sestave pripravkov in vpliv na indukcijo sinteze TNF- $\alpha$ .

Pripravek	vsebnost sladkorjev (%)	vsebnost proteinov (%)	vsebnost celokupnih glukanov (%)	vsebnost $\alpha$ -glukanov (%)	vsebnost $\beta$ -glukanov (%)	konc. TNF- $\alpha$ (pg/mL)
1	70,3	13,2	65,4	1,1	64,3	233
2	42,3	9,5	33,6	1,0	32,6	0
3	39,5	7,2	17,2	0,8	16,4	0
4	75,9	12,4	69,3	1,2	68,1	467
5	41,9	9,1	19,2	0,9	18,3	0
6	41,8	9,4	35,6	0,9	34,7	0
7	40,2	9,4	20,3	1,0	19,3	0
8	67,8	11,5	67,2	0,9	66,3	195
9	62,7	9,8	62,0	1,2	60,8	13
10	43,1	7,5	17,5	1,2	16,3	0
11	61,4	9,1	59,5	0,9	58,6	6
12	60,4	8,8	58,3	1,2	57,1	9
13	36,2	7,5	18,9	1,2	17,7	0
14	66,7	8,3	57,2	1,1	56,1	7
15	68,1	9,2	61,8	1,0	60,8	24
16	38,8	8,7	20,6	0,9	19,7	0
17	78,1	14,8	74,0	5,6	68,4	52
18	56,0	12,2	51,2	8,0	43,2	33
19	78,8	13,2	74,2	6,0	68,2	45
20	74,3	15,5	71,2	5,9	65,3	49
21	77,9	14,5	74,8	6,1	68,7	42
22	71,2	15,7	68,8	5,5	63,3	66
23	80,7	10,9	75,9	1,7	74,3	63
24	77,4	10,1	74,1	1,3	72,8	60
25	67,2	10,5	62,7	1,7	61,0	52
26	69,2	8,6	66,7	1,6	65,2	52
27	72,3	6,5	71,1	0,9	70,2	57
28	76,7	6,2	75,9	1,0	74,9	59
29	75,4	8,2	74,6	1,1	73,5	67
30	82,2	8,0	78,8	0,9	77,9	68
31	64,4	9,8	63,7	1,6	62,1	56
32	65,1	8,2	61,8	1,2	60,6	56

Pri korelaciji z upoštevanjem vseh pripravkov (preglednica 48), smo ugotovili, da imamo dobro korelacijo med vsebnostjo sladkorjev in vsebnostjo celokupnih glukanov (0,957), vsebnostjo  $\beta$ -glukanov (0,941) in sproščanjem TNF- $\alpha$  (0,779). Dobro korelacijo smo ugotovili tudi med vsebnostjo proteinov in vsebnostjo  $\alpha$ -glukanov (0,618), med vsebnostjo celokupnih glukanov in vsebnostjo  $\alpha$ -glukanov (0,363) ter  $\beta$ -glukanov (0,988) ter

sproščanjem TNF- $\alpha$  (0,804). Pričakovano smo tudi ugotovili tudi dobro korelacijo med vsebnostjo  $\beta$ -glukanov in sproščanjem TNF- $\alpha$  (0,835).

Preglednica 48: Korelacija med posameznimi komponentami in sposobnostjo indukcije sinteze TNF- $\alpha$  z upoštevanjem vseh pripravkov.

	Vsebnost sladkorjev (%)	vsebnost proteinov (%)	vsebnost celokupnih glukanov (%)	vsebnost $\alpha$ -glukanov (%)	vsebnost $\beta$ -glukanov (%)	koncentracija TNF- $\alpha$ (pg/mL)
vsebnost sladkorjev (%)	1	0,356*	0,957**	0,411*	0,941**	0,779**
vsebnost proteinov (%)	0,046	.	0,073	0	0,172	0,096
vsebnost celokupnih glukanov (%)	0,957**	0,321	1	0,363*	0,988**	0,804**
vsebnost $\alpha$ -glukanov (%)	0,411*	0,618**	0,363*	1	0,274	0,24
vsebnost $\beta$ -glukanov (%)	0,941**	0,248	0,988**	0,274	1	0,835**
koncentracija TNF- $\alpha$ (pg/mL)	0,779**	0,3	0,804**	0,24	0,835**	1

\* statistično značilno pri  $p < 0,05$

\*\* statistično značilno pri  $p < 0,01$

Naredili smo tudi korelacije med posameznimi komponentami in sproščanjem TNF- $\alpha$ , če za analizo vzamemo posamične vire za pripravke. Če upoštevamo zgolj pripravke iz trošnjakov (preglednica 49), lahko vidimo, da pride do izboljšanja korelacije med vsebnostjo  $\beta$ -glukanov in sproščanjem TNF- $\alpha$  (0,923).

Preglednica 49: Korelacija med posameznimi komponentami in sposobnostjo indukcije sinteze TNF- $\alpha$  z upoštevanjem le pripravkov iz trosnjakov.

	Vsebnost sladkorjev (%)	vsebnost proteinov (%)	vsebnost celokupnih glukanov (%)	vsebnost $\alpha$ -glukanov (%)	vsebnost $\beta$ -glukanov (%)	koncentracija TNF- $\alpha$ (pg/mL)
vsebnost sladkorjev (%)	1	0,622*	0,856**	0,318	0,846**	0,917**
vsebnost proteinov (%)	0,622*	1	0,789**	0,095	0,779**	0,624**
vsebnost celokupnih glukanov (%)	0,856**	0,789**	1	0,215	0,996**	0,920**
vsebnost $\alpha$ -glukanov (%)	0,318	0,095	0,215	1	0,166	0,341
vsebnost $\beta$ -glukanov (%)	0,846**	0,779**	0,996**	0,166	1	0,923**
koncentracija TNF- $\alpha$ (pg/mL)	0,917**	0,624**	0,920**	0,341	0,923**	1

\* statistično značilno pri  $p < 0,05$ \*\* statistično značilno pri  $p < 0,01$ 

Če upoštevamo zgolj pripravke iz gojenja na trdnem gojišču (preglednica 50), lahko vidimo, da ni korelacije med vsebnostjo  $\beta$ -glukanov in sproščanjem TNF- $\alpha$  (0,029). Pri teh pripravkih je najboljša in edina dobra korelacija glede na sproščanje TNF- $\alpha$  z vsebnostjo proteinov v pripravku (0,886).

Preglednica 50: Korelacija med posameznimi komponentami in sposobnostjo indukcije sinteze TNF- $\alpha$  z upoštevanjem le pripravkov iz gojenja na trdnem gojišču.

	Vsebnost sladkorjev (%)	vsebnost proteinov (%)	vsebnost celokupnih glukanov (%)	vsebnost $\alpha$ -glukanov (%)	vsebnost $\beta$ -glukanov (%)	koncentracija TNF- $\alpha$ (pg/mL)
vsebnost sladkorjev (%)	1	-0,086	0,829*	-0,143	0,771	0,143
vsebnost proteinov (%)	-0,086	1	-0,086	-0,886*	0,029	0,886*
vsebnost celokupnih glukanov (%)	0,829*	-0,086	1	0,086	0,943**	-0,086
vsebnost $\alpha$ -glukanov (%)	-0,143	-0,886*	0,086	1	-0,029	-1,000**
vsebnost $\beta$ -glukanov (%)	0,771	0,029	0,943**	-0,029	1	0,029
koncentracija TNF- $\alpha$ (pg/mL)	0,143	0,886*	-0,086	-1,000**	0,029	1

\* statistično značilno pri  $p < 0,05$ \*\* statistično značilno pri  $p < 0,01$ 

Če pa upoštevamo samo pripravke iz gojenja v tekočem gojišču (preglednica 51), pa lahko vidimo, da imamo ponovno dobro korelacijo med vsebnostjo  $\beta$ -glukanov in sproščanjem TNF- $\alpha$  (0,835) in nimamo statistično značilne korelacije z vsebnostjo proteinov.

Preglednica 51: Korelacija med posameznimi komponentami in sposobnostjo indukcije sinteze TNF- $\alpha$  z upoštevanjem le pripravkov iz gojenja v tekočem gojišču.

	Vsebnost sladkorjev (%)	vsebnost proteinov (%)	vsebnost celokupnih glukanov (%)	vsebnost $\alpha$ -glukanov (%)	vsebnost $\beta$ -glukanov (%)	koncentracija TNF- $\alpha$ (pg/mL)
vsebnost sladkorjev (%)	1	-0,091	0,918**	-0,312	0,903**	0,823**
vsebnost proteinov (%)	-0,091	1	-0,268	0,914**	-0,322	-0,211
vsebnost celokupnih glukanov (%)	0,918**	-0,268	1	-0,408	0,997**	0,850**
vsebnost $\alpha$ -glukanov (%)	-0,312	0,914**	-0,408	1	-0,447	-0,477
vsebnost $\beta$ -glukanov (%)	0,903**	-0,322	0,997**	-0,447	1	0,835**
koncentracija TNF- $\alpha$ (pg/mL)	0,823**	-0,211	0,850**	-0,477	0,835**	1

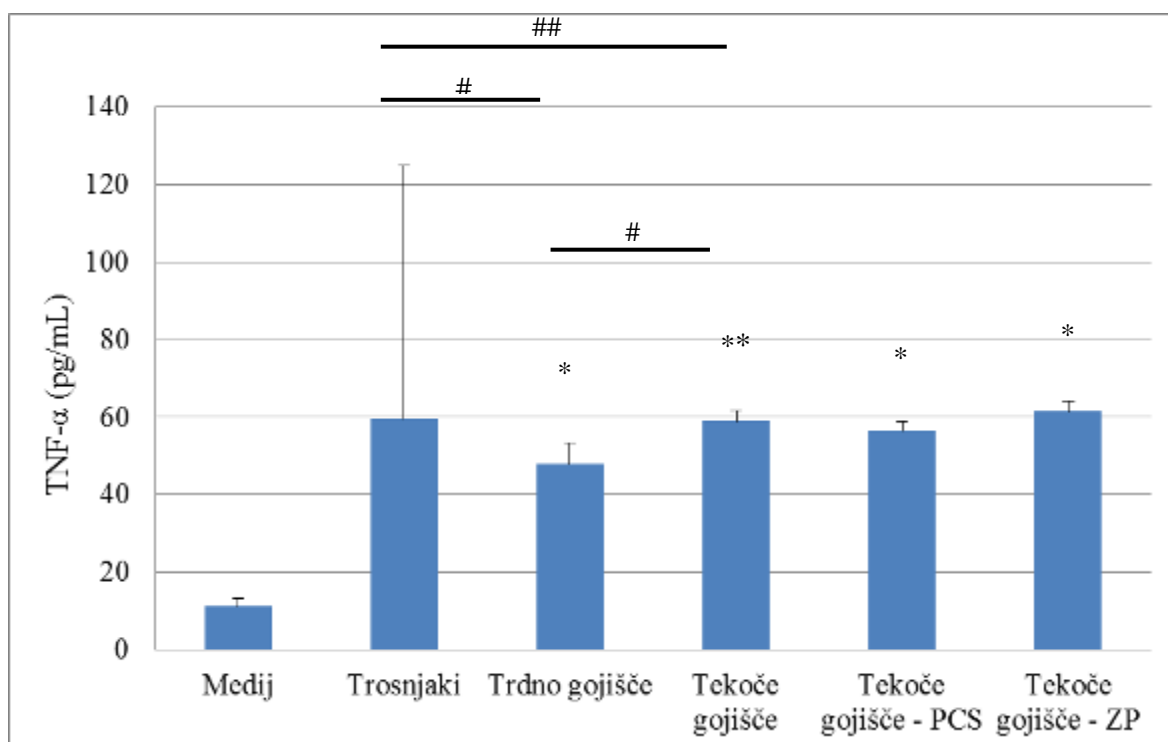
\* statistično značilno pri  $p < 0,05$ \*\* statistično značilno pri  $p < 0,01$ 

#### 4.5.1.6 Primerjava pripravkov iz različnih načinov gojenja in njihov vpliv na indukcijo sinteze TNF- $\alpha$

Izračunali smo srednje vrednosti ( $\bar{x}$ ) in standardne napake (SEM) koncentracije TNF- $\alpha$  vzorcev, pridobljenih po različnih načinih gojenja (iz trosnjakov, iz gojenja na trdnem gojišču in iz gojenja v tekočem gojišču). Ker so podatki večinoma odstopali od normalne porazdelitve, smo jih analizirali z neparametričnim testom in za ugotavljanje statistično značilnih razlik med skupinami uporabili Mann-Whitneyev test. Za statistično obdelavo podatkov smo uporabili računalniški program SPSS za Windows, verzija 19 (IBM, ZDA). Statistična značilnost je bila določena s statistično vrednostjo  $p < 0,05$  (\*) ali  $p < 0,01$  (\*\*).

Ugotovili smo, da pripravki iz trosnjakov niso statistično značilno različni od kontrolnega medija (medij brez dodatka pripravka). Pripravki, ki smo jih pridobili iz gojenja na trdnem in v tekočem gojišču pa so statistično značilno različni od kontrolnega medija. Ugotovili smo tudi, da se pripravki med seboj razlikujejo (slika 75). Med seboj smo primerjali tudi

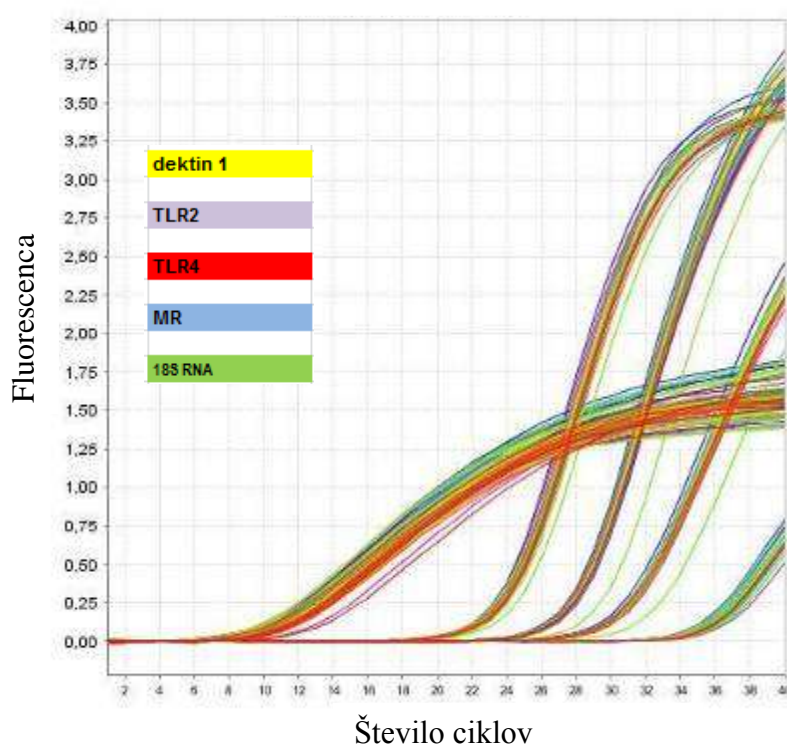
polisaharide celične stene (PCS), zunajcelične polisaharide (ZP) in vse pripravke iz gojenja v tekočem gojišču. Ugotovili smo, da ni statistično značilnih razlik med temi termi skupinami pripravkov.



Slika 75: Vpliv pripravkov iz glive *G. frondosa* iz različnih načinov gojenja na sintezo TNF- $\alpha$  v humanih PBMC *in vitro*. Rezultati so povprečje koncentracije TNF- $\alpha$  v pg/mL  $\pm$  SEM v celičnih kulturah enega preizkusa. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,001$ : statistično značilno različna koncentracija TNF- $\alpha$  v primerjavi s koncentracijo v mediju. # $p < 0,05$ ; ## $p < 0,01$ : statistično značilno različna sinteza TNF- $\alpha$  med pripravki iz različnih načinov gojenja.

#### 4.5.2 Vpliv na ekspresijo genov mRNA za receptorje, ki prepoznajo dele celičnih sten gliv

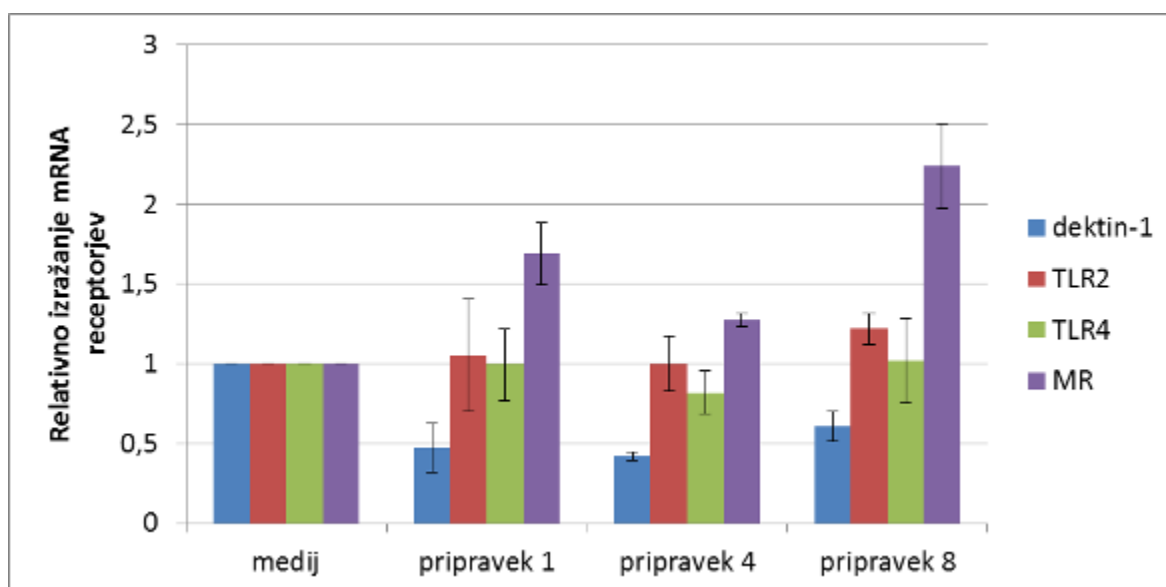
Primer pomnoževalnega grafa, ki ga dobimo pri verižni reakciji s polimerazo v realnem času (rt-PCR) po predhodni reakciji z reverzno transkriptazo je prikazan na sliki 76. Na sliki je prikazana količina posameznega pomnožka PCR v odvisnosti od števila pomnoževalnih ciklov.



Slika 76: Graf pomnoževanja tarčnega zaporedja z metodo RT-PCR v realnem času

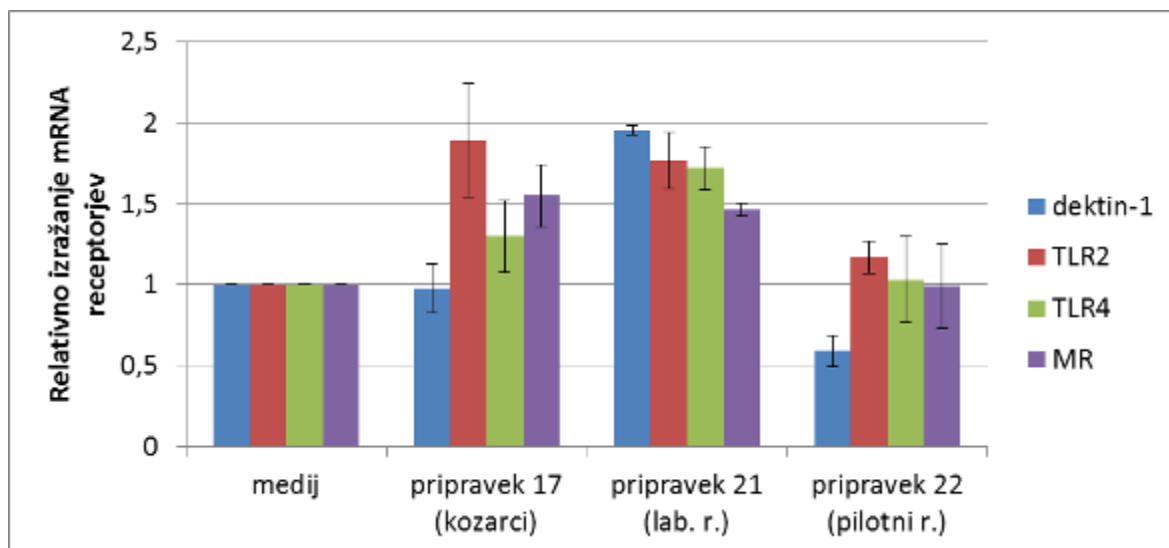
Podatke smo normalizirali na rezultate, kjer smo celice inkubirali ob prisotnosti polimiksina B, ki je služil za preprečitev vpliva LPS na imunski odziv (vzorec "medij" na grafih). Izračunali smo srednje vrednosti ( $\bar{x}$ ) in standardne napake (SEM) indeksov izražanja mRNA receptorjev treh meritev glede na kontrolno vrednost medija.

Pri pripravkih, pridobljenih iz trosnjakov, smo preverili le tri vzorce, ki so izkazovali največjo sposobnost sproščanja TNF- $\alpha$  pri PBMC. Preverili smo pripravke 1, 4 in 8 (preglednica 47). Največje razlike so opazne pri receptorju dektin-1, kjer pride do zmanjšane ekspresije in receptorju MR, kjer se ekspresija gena poveča (slika 77).



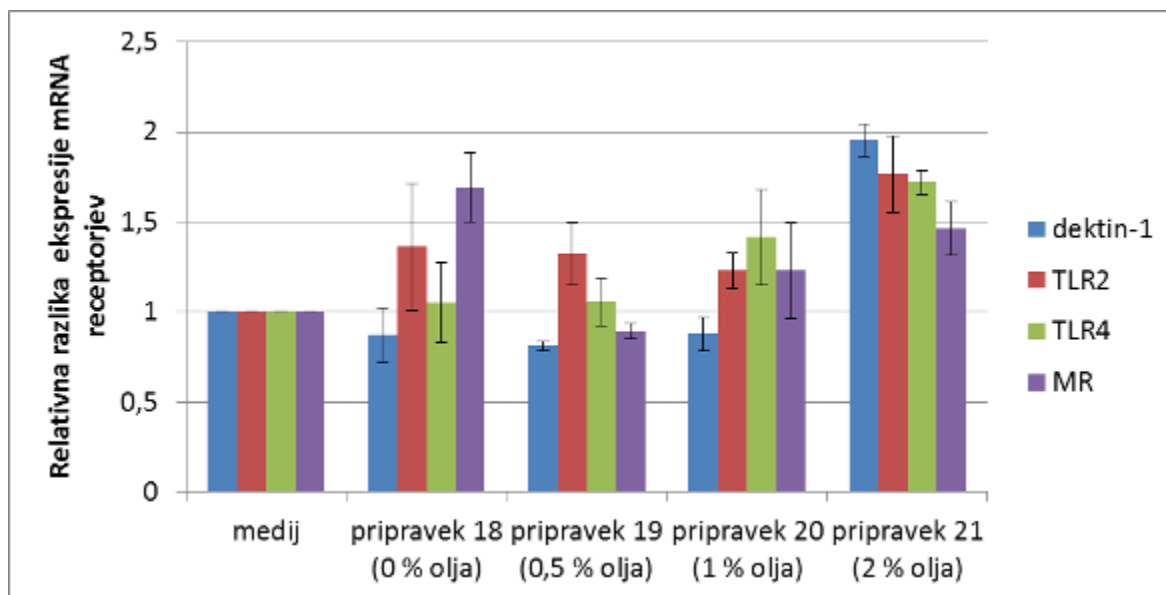
Slika 77: Vpliv pripravkov 1, 4 in 8 iz trosnjakov glive *G. frondosa* na izražanje mRNA receptorjev dektina-1, TLR2, TLR4 in MR v humanih PBMC. Rezultati so povprečje treh meritev  $\pm$  SEM v enem preizkusu, ki smo jih uravnali na izražanje mRNA 18S mRNA.

Preverili smo tudi kako pripravki, ki smo jih dobili pri različnih sistemih gojenja na trdnem gojišču, ki je imelo enako sestavo gojišča, vplivajo na izražanje genov. Med samimi pripravki so velike razlike v vzorcu izražanja genov za receptorje. Največjo razliko smo opazili pri izražanju gena za receptor dektin-1, ki je enkrat ostal nespremenjen (pripravek 17, iz gojenja v kozarcih), enkrat se je ekspresija povečala (pripravek 21, iz gojenja v laboratorijskem bioreaktorju), enkrat pa zmanjšala (pripravek 22, iz gojenja v pilotnem bioreaktorju) (slika 78).



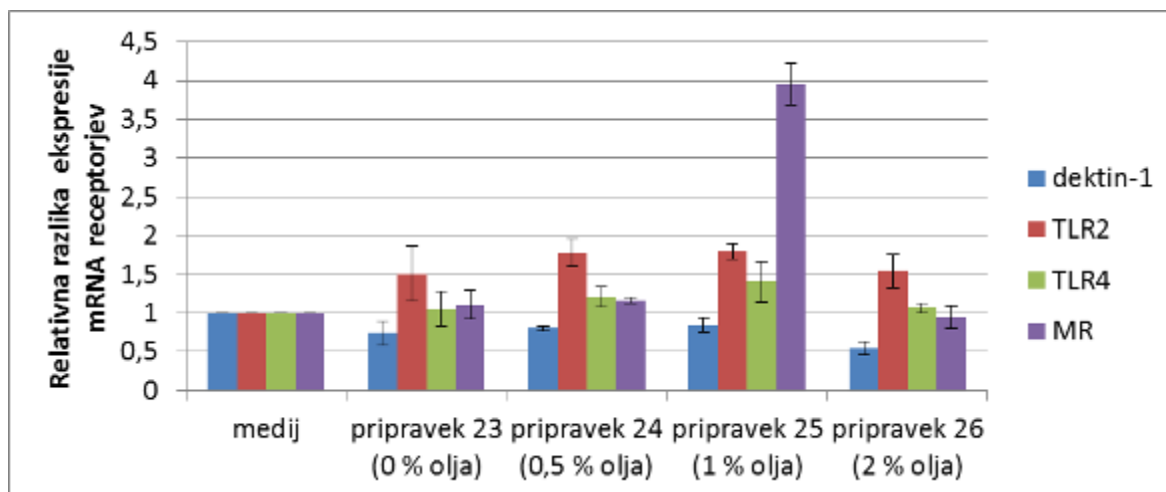
Slika 78: Vpliv pripravkov 17 (iz kozarcev), 21 (iz laboratorijskega bioreaktorja) in 22 (iz pilotnega bioreaktorja) iz gojenja glive *G. frondosa* na trdnem gojišču na izražanje mRNA receptorjev dektina-1, TLR2, TLR4 in MR v humanih PBMC. Rezultati so povprečje treh meritev  $\pm$  SEM v enem preizkusu, ki smo jih uravnali na izražanje mRNA 18S mRNA.

Na sliki 79 je prikazan vpliv oljčnega olja pri gojenju na trdnem gojišču v laboratorijskem bioreaktorju. Pri koncentracijah olja v trdnem gojišču od 0 do 1 % med vzorci ni razlik večjih razlik. Pri pripravku, ki je bil pripravljen iz trdnega gojišča, ki je vsebovalo 2 % olja pa smo ugotovili povečano izražanje genov za vse receptorje.

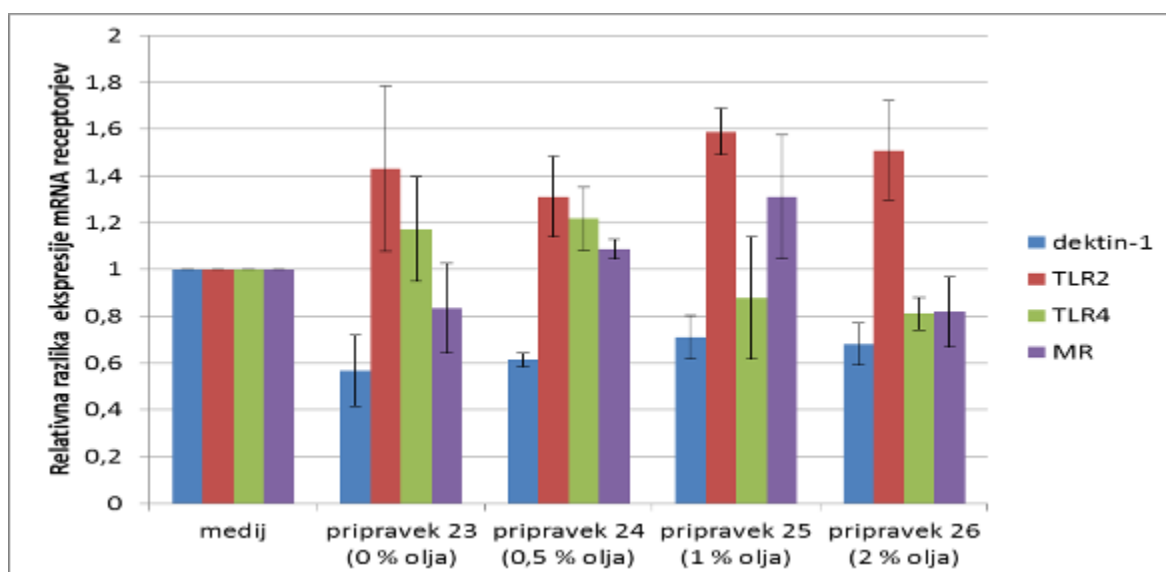


Slika 79: Vpliv pripravkov iz gojenja glive *G. frondosa* na trdnem gojišču pri različnih dodatkih olja na izražanje mRNA receptorjev dektina-1, TLR2, TLR4 in MR v humanih PBMC. Rezultati so povprečje treh meritev  $\pm$  SEM v enem preizkusu, ki smo jih uravnali na izražanje mRNA 18S mRNA.

Pri pripravkih, ki smo jih dobili pri gojenju v koloni z mehurčki, nismo opazili večjih razlik med pripravki. Pri vseh pripravkih (polisaharidi celične stene in zunajcelični polisaharidi), ki so bili pridobljeni iz gojišč z različno vsebnostjo olja, smo opazili zmanjšano izražanje gena za receptor dektin-1 in povečano izražanje gena za receptor TLR2 (sliki 80 in 81).

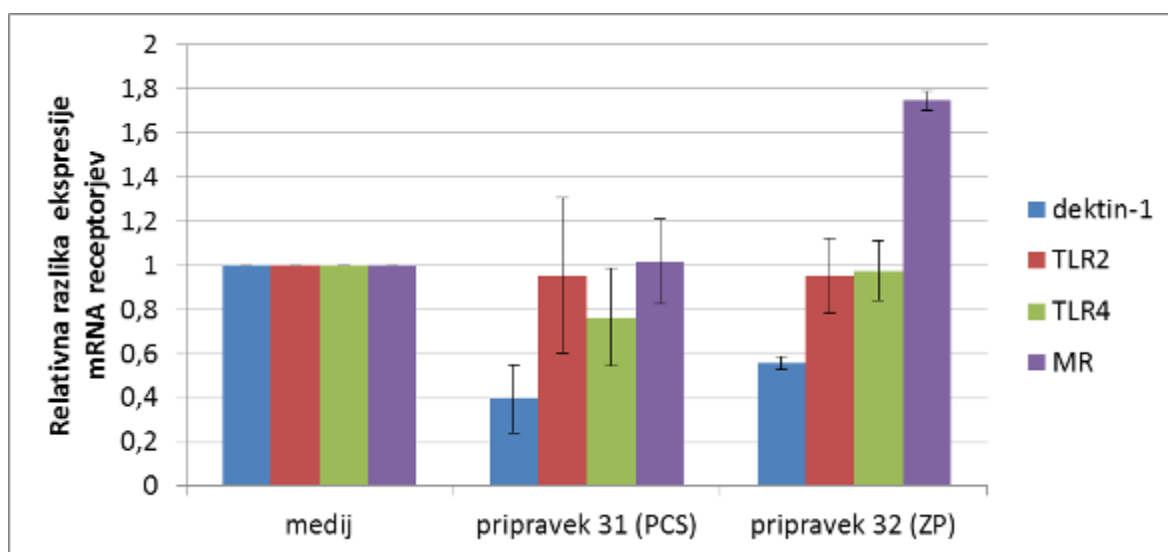


Slika 80: Vpliv pripravkov iz gojenja glive *G. frondosa* v koloni z mehurčkih pri različnih dodatkih olja (zunajcelični polisaharidi) na izražanje mRNA receptorjev dektina-1, TLR2, TLR4 in MR v humanih PBMC. Rezultati so povprečje treh meritev  $\pm$  SEM v enem preizkusu, ki smo jih uravnali na izražanje mRNA 18S mRNA.



Slika 81: Vpliv pripravkov iz gojenja glive *G. frondosa* v koloni z mehurčkih pri različnih dodatkih olja (polisaharidi celične stene) na izražanje mRNA receptorjev dektina-1, TLR2, TLR4 in MR v humanih PBMC. Rezultati so povprečje treh meritev  $\pm$  SEM v enem preizkusu, ki smo jih uravnali na izražanje mRNA 18S mRNA.

Pri pripravkih iz gojenja v mešalnem bioreaktorju nismo ugotovili večjih razlik med pripravki, ki so vsebovali polisaharide celične stene in zunajceličnih polisaharidov (slika 82). Vzorec izražanja genov za receptorje je podoben, kot smo ga dobili pri gojenju v tekočem gojišču – koloni z mehurčki.



Slika 82: Vpliv pripravkov iz gojenja glive *G. frondosa* v mešalnem bioreaktorju na izražanje mRNA receptorjev dektina-1, TLR2, TLR4 in MR v humanih PBMC. Rezultati so povprečje treh meritev  $\pm$  SEM v enem preizkusu, ki smo jih uravnali na izražanje mRNA 18S mRNA.

Iz dobljenih podatkov smo naredili tudi korelacijsko analizo med sproščanjem TNF- $\alpha$  in relativno ekspresijo genov za receptorje dektin-1, TLR2, TLR4 in MR, pri čemer smo upoštevali vse testirane pripravke (preglednica 52), zgolj pripravke dobljene iz trosnjakov (preglednica 53), pripravke dobljene iz gojenja na trdnem gojišču (preglednica 54) ali pripravke iz gojenja v tekočem gojišču (preglednica 55). Za statistično obdelavo podatkov smo uporabili računalniški program SPSS za Windows, verzija 19 (IBM, ZDA). Stopnjo korelacije med sintezo TNF- $\alpha$  in izražanjem genov za receptorje, smo izračunali s Spearmannovim koeficientom korelacije. Statistična značilnost je bila določena s statistično vrednostjo  $p < 0,05$  (\*) ali  $p < 0,01$  (\*\*).

Preglednica 52: Korelacija med sposobnostjo sproščanja TNF- $\alpha$  in ekspresijo genov z upoštevanjem vseh pripravkov.

	<b>konc. TNF-<math>\alpha</math> (pg/mL)</b>	<b>dektin-1 (%)</b>	<b>TLR2 (%)</b>	<b>TLR4 (%)</b>	<b>MR (%)</b>
<b>konc. TNF-<math>\alpha</math> (pg/mL)</b>	1	-0,600**	-0,316	-0,608**	-0,055
<b>dektin-1 (%)</b>	-0,600**	1	0,672**	0,696**	0,237
<b>TLR2 (%)</b>	-0,316	0,672**	1	0,572*	0,007
<b>TLR4 (%)</b>	-0,608**	0,696**	0,572*	1	0,116
<b>MR (%)</b>	-0,055	0,237	0,007	0,116	1

\* statistično značilno pri  $p < 0,05$ \*\* statistično značilno pri  $p < 0,01$ Preglednica 53: Korelacija med sposobnostjo sproščanja TNF- $\alpha$  in ekspresijo genov z upoštevanjem pripravkov dobljenih iz trosnjakov.

	<b>konc. TNF-<math>\alpha</math> (pg/mL)</b>	<b>dektin-1 (%)</b>	<b>TLR2 (%)</b>	<b>TLR4 (%)</b>	<b>MR (%)</b>
<b>konc. TNF-<math>\alpha</math> (pg/mL)</b>	1	-0,802	-0,774	-1,000**	-0,889
<b>dektin-1 (%)</b>	-0,802	1	0,999*	0,795	0,986
<b>TLR2 (%)</b>	-0,774	0,999*	1	0,767	0,978
<b>TLR4 (%)</b>	-1,000**	0,795	0,767	1	0,884
<b>MR (%)</b>	-0,889	0,986	0,978	0,884	1

\* statistično značilno pri  $p < 0,05$ \*\* statistično značilno pri  $p < 0,01$ Preglednica 54: Korelacija med sposobnostjo sproščanja TNF- $\alpha$  in ekspresijo genov z upoštevanjem pripravkov dobljenih iz gojenja v trdnem gojišču.

	<b>konc. TNF-<math>\alpha</math> (pg/mL)</b>	<b>dektin-1 (%)</b>	<b>TLR2 (%)</b>	<b>TLR4 (%)</b>	<b>MR (%)</b>
<b>konc. TNF-<math>\alpha</math> (pg/mL)</b>	1	-0,314	-0,371	-0,257	-0,429
<b>dektin-1 (%)</b>	-0,314	1	0,771	0,886*	0,543
<b>TLR2 (%)</b>	-0,371	0,771	1	0,486	0,657
<b>TLR4 (%)</b>	-0,257	0,886*	0,486	1	0,143
<b>MR (%)</b>	-0,429	0,543	0,657	0,143	1

\* statistično značilno pri  $p < 0,05$ Preglednica 55: Korelacija med sposobnostjo sproščanja TNF- $\alpha$  in ekspresijo genov z upoštevanjem pripravkov dobljenih iz gojenja v tekočem gojišču.

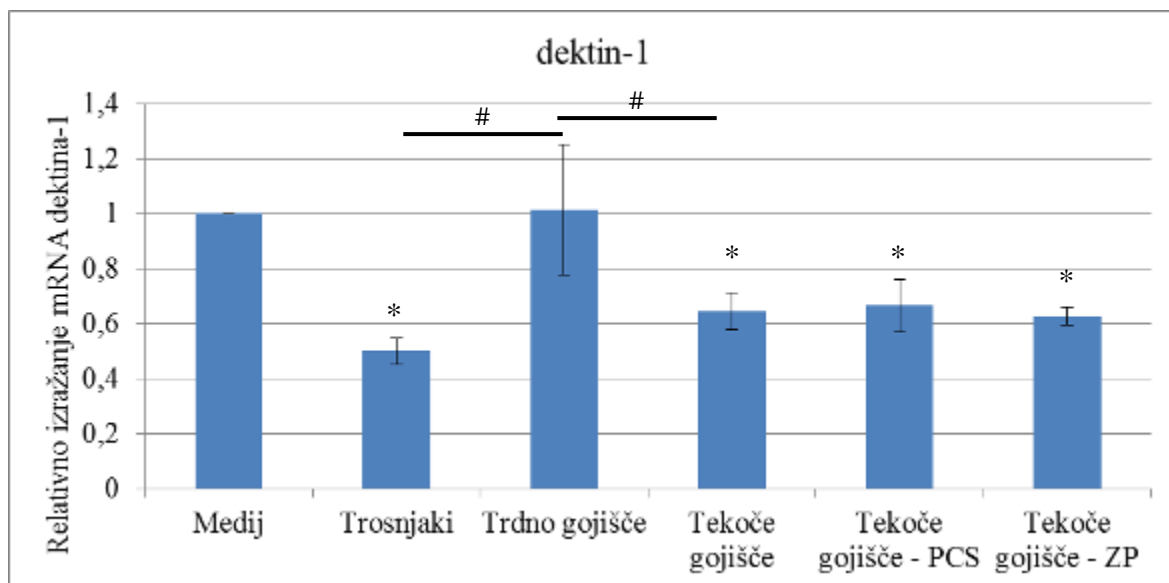
	<b>konc. TNF-<math>\alpha</math> (pg/mL)</b>	<b>dektin-1 (%)</b>	<b>TLR2 (%)</b>	<b>TLR4 (%)</b>	<b>MR (%)</b>
<b>konc. TNF-<math>\alpha</math> (pg/mL)</b>	1	0,36	0,079	-0,354	-0,226
<b>dektin-1 (%)</b>	0,36	1	0,733*	0,491	0,491
<b>TLR2 (%)</b>	0,079	0,733*	1	0,406	0,261
<b>TLR4 (%)</b>	-0,354	0,491	0,406	1	0,321
<b>MR (%)</b>	-0,226	0,491	0,261	0,321	1

\* statistično značilno pri  $p < 0,05$

#### *4.5.2.1 Primerjava pripravkov iz različnih načinov gojenja in njihov vpliv na ekspresijo genov receptorjev, ki prepoznajajo komponente celičnih sten gliv*

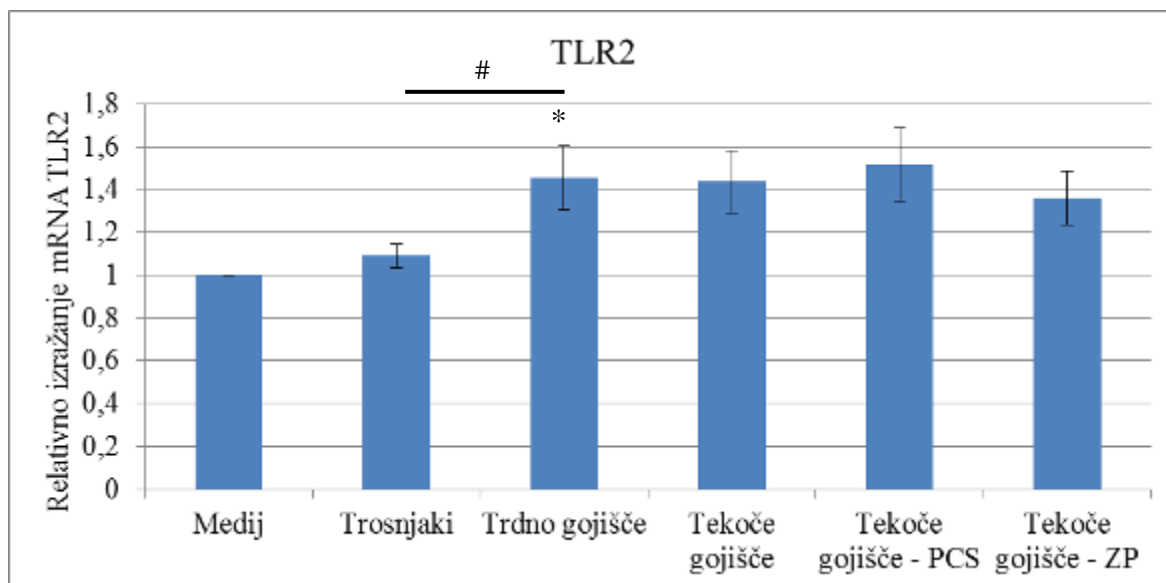
Izračunali smo srednje vrednosti ( $\bar{x}$ ) in standardne napake (SEM) relativne ekspresije genov za receptorje dektin-1, TLR2, TLR4 in MR pri vzorcih, pridobljenih po različnih načinih gojenja (iz trosnjakov, iz gojenja na trdnem gojišču in iz gojenja v tekočem gojišču). Podatke smo analizirali z neparametričnim testom in za ugotavljanje statistično značilnih razlik med skupinami uporabili Mann-Whitneyev test. Za statistično obdelavo podatkov smo uporabili računalniški program SPSS za Windows, verzija 19 (IBM, ZDA). Statistična značilnost je bila določena s statistično vrednostjo  $p < 0,05$  (\*).

Za relativno izražanje gena za receptor dektin-1 smo ugotovili, da se pripravki iz trosnjakov in tekočega gojišča, vključno z polisaharidi celične stene in zunajceličnimi polisaharidi, statistično značilno razlikujejo od kontrolnega vzorca (medij z dodanim polimiksinom B). Pri vseh pripravkih je prišlo do zmanjšane relativne ekspresije gena za receptor dektin-1. Za pripravke, pridobljene iz vzorcev gojenja na trdnem gojišču pa ta razlika ni bila statistično značilna. Ugotovili smo tudi, da se statistično značilno med seboj razlikujejo pripravki iz trosnjakov in pripravki iz trdnega gojišča ter pripravki iz tekočega gojišča in pripravki iz trdnega gojišča (slika 83).



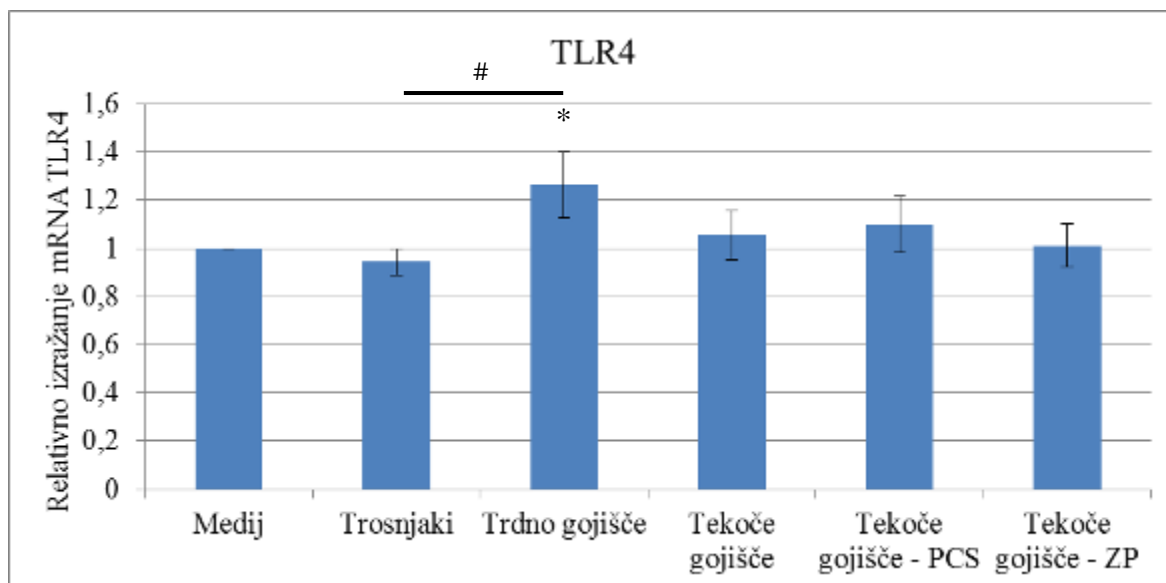
Slika 83: Vpliv pripravkov iz glive *G. frondosa* in različnih načinov gojenja na izražanje mRNA dektina-1 v humanih PBMC. Rezultati so povprečje izražanja mRNA  $\pm$  SEM v enem preizkusu, ki smo jih uravnali na izražanje mRNA 18S mRNA. \*  $p < 0,05$ ; statistično značilno različno izražanje mRNA dektina-1 v primerjavi z nevspodbujenimi PBMC (medij). #  $p < 0,05$ : statistično značilno različno izražanje mRNA dektina-1 med pripravki iz različnih načinov gojenja.

Za relativno izražanje gena za receptor TLR2 smo ugotovili, da se od medija z dodanim polimiksinom B, statistično značilno razlikujejo zgolj pripravki, pridobljeni iz gojenja na trdnem gojišču. Za pripravke iz trosnjakov, tekočega gojišča, vključno s polisaharidi celične stene in zunajceličnimi polisaharidi, pa nismo ugotovili statistično značilnih razlik. Med seboj, se glede na relativno izražanje gena za receptor TLR2, statistično značilno razlikujejo zgolj pripravki iz trosnjakov in pripravki iz trdnega gojišča (slika 84).



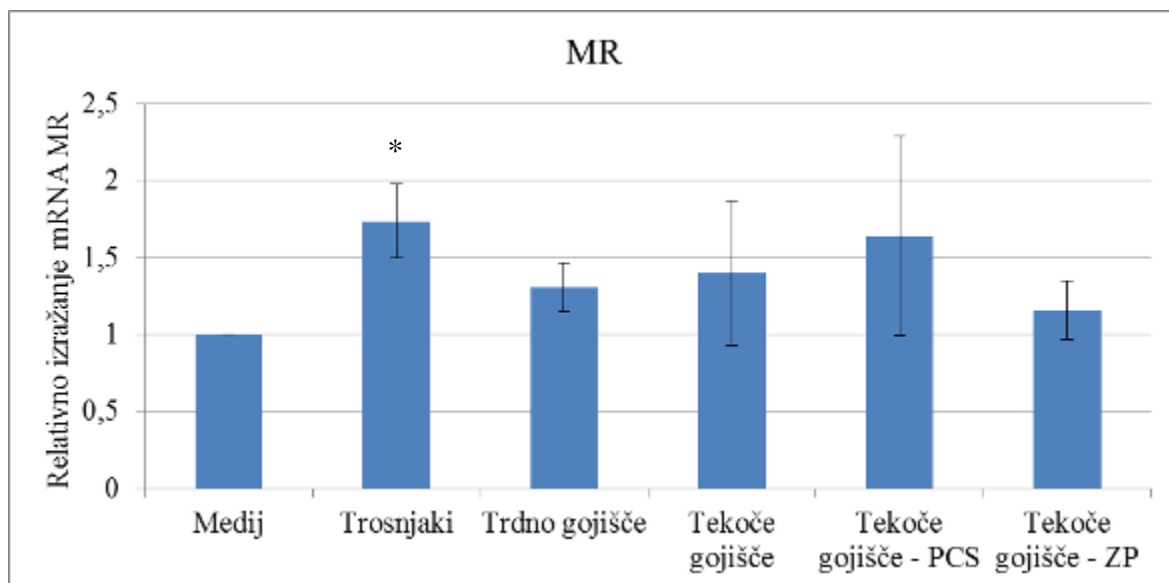
Slika 84: Vpliv pripravkov iz glive *G. frondosa* in različnih načinov gojenja na izražanje mRNA TLR2 v humanih PBMC. Rezultati so povprečje izražanja mRNA  $\pm$  SEM v enem preizkusu, ki smo jih uravnali na izražanje mRNA 18S mRNA. \*  $p < 0,05$ ; statistično značilno različno izražanje mRNA TLR2 v primerjavi z nevspodbujenimi PBMC (medij). #  $p < 0,05$ : statistično značilno različno izražanje mRNA TLR2 med pripravki iz različnih načinov gojenja.

Za relativno izražanje gena za receptor TLR4 smo, ugotovili, da se od medija z dodanim polimiksinom B, statistično značilno razlikujejo le pripravki, pridobljeni iz gojenja na trdnem gojišču. Za pripravke iz trosnjakov, tekočega gojišča, vključno s polisaharidi celične stene in zunajceličnimi polisaharidi, pa nismo ugotovili statistično značilnih razlik. Med seboj, se glede na relativno izražanje gena za receptor TLR4, statistično značilno razlikujejo zgolj pripravki iz trosnjakov in pripravki iz trdnega gojišča (slika 85).



Slika 85: Vpliv pripravkov iz glive *G. frondosa* in različnih načinov gojenja na izražanje mRNA TLR4 v humanih PBMC. Rezultati so povprečje izražanja mRNA  $\pm$  SEM v enem preizkusu, ki smo jih uravnali na izražanje mRNA 18S mRNA. \*  $p < 0,05$ ; statistično značilno različno izražanje mRNA TLR4 v primerjavi z nevspodbujenimi PBMC (medij). #  $p < 0,05$ : statistično značilno različno izražanje mRNA TLR4 med pripravki iz različnih načinov gojenja.

Za relativno izražanje gena za receptor MR smo, ugotovili, da se od medija z dodanim polimiksinom B, statistično značilno razlikujejo le pripravki, pridobljeni iz trosnjakov. Za pripravke iz trdnega gojišča, tekočega gojišča, vključno s polisaharidi celične stene in zunajceličnimi polisaharidi, pa nismo ugotovili statistično značilnih razlik. Med seboj, se glede na relativno izražanje gena za receptor MR, pripravki statistično značilno ne razlikujejo (slika 86).



Slika 86: Vpliv pripravkov iz glive *G. frondosa* in različnih načinov gojenja na izražanje mRNA MR v humanih PBMC. Rezultati so povprečje izražanja mRNA  $\pm$  SEM v enem preizkusu, ki smo jih uravnali na izražanje mRNA 18S mRNA. \*  $p < 0,05$ ; statistično značilno različno izražanje mRNA MR v primerjavi z nevspodbujenimi PBMC (medij).

## 5 DISKUSIJA

### 5.1 PRESEJALNI TESTI SEVOV

S presejalnimi testi smo želeli ugotoviti, kateri sev je najbolj primeren za gojenje na trdnem gojišču in v tekočem gojišču.

Za določevanje rasti na trdnem gojišču smo uporabili metodo preraščanja na gojišču PDA. Ugotovili smo, da so razlike med posameznimi sevi zelo velike. Razlika med najboljšim sevom (GF 3) in najslabšim sevom (GF SH) je večja od 100 % (slika 30). Naši rezultati so skladni s rezultati, ki jih je objavil Shen (2002) v svojem doktorskem delu. Opisuje namreč gojenje glive *G. frondosa* na trdnem gojišču, z namenom pridobivanja trosnjakov, za 23 različnih sevov in ugotavlja, da ima izbira seva zelo velik vpliv na hitrost preraščanja trdnega gojišča.

Za določevanje rasti v tekočem gojišču smo uporabili gojenje v erlenmajericah na osnovnem gojišču. Podobno kot pri rezultatih za gojenje na trdnem gojišču, smo ugotovili, da je najbolj primeren sev GF 3 in najmanj primeren sev GF SH. Razlike so bile ponovno večje od 100 %. Pri tem presejalnem testu, smo ugotavljali še vsebnost zunajceličnih polisaharidov, kjer so pa razlike med sevi bile manjše. Ugotovili smo tudi, da je sev GF 10 malo boljši pri proizvodnji zunajceličnih polisaharidov (slika 31).

V literaturi je zelo malo podatkov glede vpliva seva na rast in tvorbo metabolitov in iz naših podatkov lahko vidimo, da s pravilno izbiro seva, lahko povečamo donos za več kot 100 %. Za takšne razlike med posamičnimi sevi je lahko več vzrokov, prvi vzrok je lahko prilagojenost seva GF 3 za gojišče (PDA), saj je znano, da se gliva lahko prilagodi na določeno sestavo gojišča (Ruan s sod., 2006). Drugi vzrok, da smo dobili boljše rezultate za sev GF 3, pa je ta, da smo glivo GF 3 imeli že dlje časa v laboratoriju in smo njeno aktivnost vzdrževali z rednim precepljanjem, med tem, ko smo druge seve precepili le 3 krat preden smo pričeli s presejalnimi testi.

Za izbiro pravilnega seva bi bilo potrebno še narediti dodatne poskuse, ki bi razjasnili vpliv aktivnosti kulture t.j. kako hranjenje kulture micelija pri hladnih temperaturah vpliva na rast in koliko časa je potrebno, da se gliva vrne v optimalno stanje. Prav tako bi bilo

potrebno preveriti večje število sevov iz različnih zbirk in jih primerjati med seboj in po čem se ločijo.

Iz rezultatov presejalnega testa smo se odločili, da bomo sledeče poskuse izvajali s sevom GF 3.

## 5.2 GOJENJE TROSNJAKOV

Trosnjake smo gojili predvsem z namenom, da smo dobili referenčne materiale za pripravke in da smo bioproces lahko primerjali z modernimi metodami gojenja. V prvi fazi poskusa, smo vzgojili trosnjake različnih sevov na različnih substratih, v drugi fazi poskusa pa smo preverili en sev na različnih substratih. Iz trosnjakov smo naredili pripravke, katerim smo določili kemijsko sestavo in jih testirali na biološko aktivnost.

Časi gojenja v prvi fazi poskusa so bili zelo različni in so trajali od najmanj 95 dni za sev GF 5 do največ 141 dni za sev GF 10. Podobna variacija je bila tudi v biološki učinkovitosti, ki je segala od 9,5 % pri sevu GF 1 na gojišču 2 do 30,2 % pri sevu GF 10 na gojišču 6. Manjša nihanja smo določili pri vsebnosti vode v trosnjakih (80,3-89,6 %) (preglednica 19). Časi gojenja v drugem poskusu so bili daljši od gojenja pri prvem poskusu in so segali od najmanj 152 dni do največ 209 dni. Biološka učinkovitost je bila prav tako zelo raznolika in je segala od 10,0 % do 61,9 %. Variacija v vsebnosti vode v trosnjakih je bila tudi v tem primeru manjša (82,3 - 86 %) (preglednica 22).

V drugem poskusu smo ugotavljali vpliv oljčnih tropin na BE. Izkazalo se je, da prisotnost oljčnih tropin negativno vpliva na BE in najboljše BE smo dobili pri gojiščih, ki so vsebovala le bukovo žaganje z dodatkom pšeničnih otrobov ali koruznega drobljenca. Za dodatek oljčnih tropin smo se odločili zaradi podatka o stimulaciji proizvodnje polisaharidov (Hsieh s sod., 2006) in zaradi podatkov iz naših poskusov na indukcijo citokinov iz prve faze gojenja. V Gregori s sod. (2009) smo bolj podrobno komentirali vpliv oljčnih tropin na gojenje glive *G. frondosa* in dobljene pripravke iz trosnjakov smo testirali na proliferacijo splenocitov iz vranice miši BALB/c *in vitro*.

Shen (2002) v svojem doktorskem delu navaja podatke o gojenju 23 različnih sevov in ugotavlja velike razlike med posamičnimi sevi. Izbira seva lahko vpliva na hitrost

preraščanja gojišča, sposobnost in hitrost tvorbe primordijev, sposobnost in hitrost tvorbe trosnjakov in ne nazadnje tudi na biološko učinkovitost in kvaliteto samih trosnjakov.

Predvidevali smo, da bomo našli povezavo med posameznimi gojišči (dodatkom oljčnih tropin) in sestavo pripravkov. Izkazalo se je, da vsebnost oljčnih tropin ne vpliva na kemijsko sestavo pripravka (preglednici 23 in 24).

Pri testiranju sproščanja TNF- $\alpha$  iz PBMC pri prvem poskusu smo ugotovili, da sta bila aktivna zgolj dva pripravka (preglednica 41). Pripravka sta bila izolirana iz različnih sevov (GF 1 in GF 5) in oba sta bila vzgojena na gojiščih, kjer so bili dodane oljčne tropine. Če pogledamo sestavo pripravkov (preglednica 47, pripravki 1-6), lahko vidimo, da je sestava teh dveh aktivnih pripravkov drugačna od drugih pripravkov. Pri teh dveh pripravkih smo izmerili večjo vsebnost sladkorjev, proteinov in  $\beta$ -glukanov. Pri pripravkih, ki niso izkazovali sposobnosti sproščanja TNF- $\alpha$  iz PBMC so verjetno prisotne snovi, ki jih ne določimo kot sladkorji in proteini ali pa niso topni, saj smo pri pripravkih iz trosnjakov imeli tudi težave z raztapljanjem.

Za načrt poskusa pri drugem gojenju smo se odločali tudi na podlagi rezultatov prvega poskusa. Zaradi domneve, da olje lahko vpliva na tvorbo bioaktivnih metabolitov, smo se odločili za poskus gojenja na gojiščih z različno vsebnostjo oljčnih tropin. Aktivnost smo določili šestim pripravkom in aktivnosti so bile nižje od pripravkov, ki smo jih dobili pri prvem gojenju (preglednica 42). Izkazalo se je tudi, da oljčne tropine niso bile ključne za dobro aktivnost. Zanimiva je ugotovitev, da smo največjo aktivnost določili pripravku, ki smo ga dobili iz trosnjakov vzgojenih na gojišču z dodanim Agrogelom. Če pogledamo sestavo pripravkov (preglednica 47, pripravki 7-15), lahko ponovno vidimo razlike med sestavo pripravkov, ki so izkazovali aktivnost in tistimi, ki je niso. Pripravki, ki so imeli boljšo aktivnost, so vsebovali večjo vsebnost  $\beta$ -glukanov in proteinov od tistih, kjer aktivnosti nismo zaznali. Komerčni izdelek (pripravek 16) tudi ni izkazoval aktivnosti in kemijska sestava pripravkov je podobna našim pripravkom, ki niso izkazovali aktivnosti.

Pripravke (7-15) smo v drugi študiji (Gregori s sod., 2009), ki je bila opravljena v okviru bilateralnega sodelovanja s Kitajsko, ovrednotili glede na sposobnost proliferacije splenocitov. Pripravke smo za ta poskus še dodatno dializirali in preverili, kako vplivajo na

proliferacijo splenocitov vranice miši BALB/c *in vitro*. Največjo proliferacijo smo določili pripravkoma 13 (185 % proliferacije) in 11 (183 % proliferacije). Pri naših poskusih sta ta dva pripravka izkazovala zelo nizko aktivnost (0 pg/mL sproščenega TNF- $\alpha$  in 7 pg/mL sproščenega TNF- $\alpha$ ). Rezultati niso direktno primerljivi, saj so bili pripravki dializirani in pri poskusih na mišjih splenocitih nismo uporabili polimiksina B za preprečitev vpliva LPS na imunski odziv. Povezava med sproščanjem TNF- $\alpha$  in proliferacijo imunskih celic pa še ni dobro raziskana (Baseta in Stutman, 2000).

Zaradi nekontroliranih pogojev in narave gojenja trosnjakov (v fazi, ko vrečke z micelijem prenesemo v gojitveni prostor ter jih odpremo), obstaja tudi možnost, da je prišlo do kontaminacije določenih trosnjakov. Na trosnjakih bi se lahko začele razmnoževati bakterije ali plesni, kar bi lahko privedlo do tako variabilnih rezultatov glede sestave in biološke aktivnosti.. Kontaminacijo z bakterijami bi težko pojasnili, saj smo pri aktivnih pripravkih določili večjo vsebnost  $\beta$ -glukanov v pripravkih. To bi se lahko zgodilo, če bi imeli prisotne bakterije, ki razgrajujejo celične stene gliv in bi tako ekstrahirali večjo količino  $\beta$ -glukanov iz samega trosnjaka. Bolj verjetna bi bila kontaminacija s plesnimi, ki vsebujejo encime, ki lahko razgrajujejo celične stene gliv ali pa so same prispevale k porasti vsebnosti  $\beta$ -glukanov, saj jih tudi same vsebujejo v celični steni. Po drugi strani pa se takšno okužbo razmeroma enostavno opazi. V vsakem primeru bi bilo zanimivo izvesti študijo mikrobiološke obremenjenosti površine trosnjakov med samim gojenjem.

Podatkov o vsebnosti  $\beta$ -glukanov v miceliju, trosnjakih ali pripravkih iz gob je še vedno malo, čeprav so  $\beta$ -glukani že dolgo priznani kot aktivne komponente gliv. Lee s sod. (2011) so testirali številne pripravke iz gliv in ugotovili, da je pripravek iz glive *G. frondosa* vseboval 33,5 %  $\beta$ -glukanov. Kot pripravek so uporabili liofiliziran supernatant, ki so ga dobili pri kuhanju trosnjakov (brez precipitacije z etanolom). Vsebnost  $\beta$ -glukanov je nižja od naših pripravkov, ki izkazujejo sposobnost sproščanja TNF- $\alpha$ , a višja od nekaterih drugih pripravkov, ki pa niso izkazovali te sposobnosti. Pripravke so testirali tudi na sposobnost sproščanja TNF- $\alpha$  iz limfocitov *laminae propriae* (izoliranih iz črevesja podgan) v ko-kulturi YAC-1 celic (tumorske celice). Po 10 urni inkubaciji s pripravki (10 mg/mL) so ugotovili koncentracijo TNF- $\alpha$  okoli 15 pg/mL. Ugotovili so tudi, da imajo  $\beta$ -glukani direktni citotoksični učinek na YAC-1 celice, kar je

bilo potrjeno v manj primerih (Radić s sod., 2010). Lee s sod. (2011) tudi zaključujejo da za aktivnost niso odgovorni zgolj  $\beta$ -glukani, kar je skladno z našimi rezultati. V tem delu smo ugotovili zelo dobro in statistično značilno korelacijo med vsebnostjo  $\beta$ -glukanov in aktivnostjo t.j. indukcijo sinteze TNF- $\alpha$  (preglednica 49). Ugotovili smo tudi statistično značilno povezavo med vsebnostjo proteinov in indukcijo sinteze TNF- $\alpha$ . Vse kaže, da so za aktivnost pripravkov izoliranih iz trosnjakov pomembni tudi proteini oz. proteini vezani na polisaharide.

V *in vivo* poskusih se je izkazalo (za D-frakcijo, intraperitonealno), da je bila koncentracija TNF- $\alpha$  v plazmi miši višja kot pri kontrolnem vzorcu. Vzporedno s povišanjem koncentracije TNF- $\alpha$  pa so zaznali tudi zmanjšanje tumorja (Matsui s sod., 2001). Ti rezultati kažejo na pomen indukcije TNF- $\alpha$  za protirakasto delovanje, naši poskusi pa kažejo na potencialno pomembnost vira trosnjakov, saj smo določili zelo različne aktivnosti pri pripravkih. Za D-frakcijo so povečano sproščanje TNF- $\alpha$  pri celicah vranice izoliranih iz miši, ugotovili tudi Inoue s sod. (2002), Kodama s sod. (2002) in Masuda s sod. (2009). V preliminarni klinični študiji na ljudeh, se je izkazalo, da oralno zaužit pripravek iz glive *G. frondosa*, poveča koncentracijo TNF- $\alpha$  v krvi (Deng s sod., 2009).

### **5.3 GOJENJE NA TRDNEM GOJIŠČU**

#### **5.3.1 Merjenje hitrosti rasti v steklenih tulcih**

Merjenje hitrosti rasti v steklenih tulcih, smo izvedli za določitev najbolj primerne gojišča za nadaljnje delo. Izbrali smo gojišča, ki so vsebovala različne vrste lesa (bukev, smreka, macesen, vinska trta in zmleta cele rastlina koruze - koruznica). Predvidevali smo, da bo rast najboljša pri gojišču z bukovo žagovino, saj glivo v naravi najbolj pogosto zasledimo na bukovih drevesih (Zhuang in Wasser, 2004). Izkazalo se je, da smo najhitrejšo rast določili na gojišču s koruznico (gojišče 5, slika 32). Gojišče, kjer smo zasledili najpočasnejšo rast, pa je vsebovalo zmleto trsje vinske trte.

Razlog za tako velike razlike (več kot 100 %) med najboljšim in najslabšim gojiščem so lahko izključno posledica sestave gojišča, saj smo poroznost in granulacijo gojišča poenotili s tem, da smo gojišča pripravili po enotnem postopku. Poleg samih hranil, ki so

prisotna v gojišču, bi lahko na hitrost rasti vplivala tudi kislost gojišča, katere nismo določili. V prihodnjih raziskavah bi bilo smiselno preveriti vpliv vrednosti pH v kompleksnem gojišču (sestavljene iz lesa oz. lesnih ostankov), saj je znano, da vrednost pH vpliva na hitrost rasti tudi pri gojenju na trdnem gojišču (Khandakar s sod., 2009).

Slike narejene s pomočjo emisijskega elektronskega mikroskopa (slike 33, 34 in 35) nam dajo vpogled kako hifni sistem micelija prerašča trdno gojišče. Na slikah so hife videti sploščene, kar je artefakt priprave vzorca in postopka mikroskopiranja.

### 5.3.2 Gojenje v steklenih kozarcih

Po gojenju v steklenih tulcih, smo ugotovili, da je koruznica predstavljala eno izmed najboljših gojišč za gojenje na trdnem gojišču. Naslednja faza poskusov pa je predstavljala prehod iz steklenih tulcev v kozarce, kjer smo glivo lahko gojili v večjem merilu in se bolj približali gojenju v bioreaktorju.

Največji problem študija rasti gliv na trdnem gojišču predstavlja določanje biomase, saj je micelij praktično nemogoče ločiti od gojišča. Biomase na/v trdnem gojišču se lahko določa posredno, z določevanjem komponent glive. V našem primeru smo za določevanje biomase izbrali ergosterol, ki naj bi bil dober indikator žive biomase.

Prva faza je bila določitev ergosterola v miceliju, ki je bil vzgojen na gojišču PDA. Pri določevanju vsebnosti ergosterola v miceliju smo ugotovili, da je le-ta neodvisna od časa in predstavlja 5,8 mg/g suhega micelija. Podatka o vsebnosti ergosterola v miceliju glive *G. frondosa* ni v dostopni literaturi, je pa vsebnost ergosterola skladna z ugotovitvami drugih raziskovalcev, kjer so ugotovili vsebnost ergosterola pri različnih glivah bele trohnobe med 6,0 in 6,8 mg/g (Mattila s sod., 2002). Pri glivi *Cordyceps sinensis* so ugotovili manjšo vsebnost ergosterola - 1,8 - 2,8 mg/g (Yuan s sod., 2007), pri glivi *Agaricus brasiliensis* pa so določili vsebnost ergosterola v miceliju 20 mg/g (Zou, 2006).

V prvem delu poskusa smo v kozarcih gojili glivo na enakih gojiščih kot pri gojenju v steklenih tulcih. Najboljše gojišče je bilo ponovno gojišče s koruznico (gojišče 5, slika 36). Drugo najboljše je bilo gojišče z bukovim žaganjem (gojišče 1), katero je bilo tudi drugo najboljše pri gojenju v steklenih tulcih. Pri drugih gojiščih pa smo ugotovili, da je hitrost

preraščanja v steklenih tulcih drugačna od rasti v kozarcih. Pri gojenju v steklenih tulcih je tretje najboljše gojišče vsebovalo macesново žaganje (gojišče 3), ki je pri gojenju v kozarcih bilo najslabše. Obratno smo ugotovili pri gojišču, ki je vsebovalo žaganje vinske trte (gojišče 4). Te razlike v rasti lahko interpretiramo na dva načina. Prvič je lahko vzrok za razliko težka dostopnost hranil glivi, ki je primorana rasti hitreje, da kolonizira celotno gojišče in še-le kasneje začne povečevati gostoto samega micelija. V drugem primeru, pa so hranila lažje dostopna in gliva raste bolj lokalno z večjo gostoto.

V drugem delu poskusa smo želeli gojišče s koruznico še izboljšati. Gojišču smo dodali še  $\text{CaCO}_3$  in oljčno olje (0 - 2 %) in preverili odziv glive na te dodatke. Izkazalo se je, da sta dodatek  $\text{CaCO}_3$  in oljčno olje stimulirala rast in dobili smo večjo količino biomase kot pri osnovnem gojišču (slika 38).

Ugotovili smo tudi, da izbira gojišča vpliva na izkoristek ekstrakcije (preglednica 27). Zaradi zelo različne sestave gojišč ne moremo posploševati izkoristka ekstrakcije, a lahko vidimo, da z dodatkom oljčnega olja pri gojišču s koruznico izkoristek ekstrakcije pada. Vzrok za padanje izkoristka ekstrakcije bi lahko iskali v dodatku olja, ki se tekom priprave pripravka v večini izloči (olje je delno topno v etanolu).

### **5.3.3 Gojenje v laboratorijskem bioreaktorju**

Naslednja stopnja gojenja na trdnem gojišču je bila prenos v laboratorijsko merilo. Za ta namen smo uporabili laboratorijski bioreaktor (sliki 12 in 13). Prednost tega reaktorja je poleg večjega volumna tudi možnost regulacije prezračevanja. Slaba stran tega tipa bioreaktorja, pa je nezmožnost mešanja vsebine.

Prvi del poskusa je vključeval gojenje glive na najboljšem gojišču, ki smo ga določili pri gojenju v kozarcih (koruznica s  $\text{CaCO}_3$  in 2 % oljčnega olja), pri različnih pretokih zraka. Ugotovili smo, da je pretok zraka vplival na količino vzgojene biomase (slika 39) in tudi na vsebnost vode v gojišču (slika 41). Najmanj biomase smo pridelali pri pretoku zraka 10 L/h, kjer smo določili tudi največjo izgubo vode. Verjetno sta ta dva parametra povezana, lahko pa je povezano tudi z izganjanjem ogljikovega dioksida, za katerega je znano, da vpliva na rast micelija (San Antonio in Thomas, 1972).

Drugi del poskusa pa je bilo gojenje pri najboljšem pretoku zraka (5 L/h) na gojišču iz koruznice z različnimi dodatki oljčnega olja (0 - 2 %), z namenom, da bi pridobili zadostne količine pripravkov za analize in testiranje biološke aktivnosti. Dobitki biomase so bili približno 10 % manjši, kot pri gojenju v kozarcih (sliki 38 in 40). Vzrok za slabšo rast in dobiček biomase je lahko v že prej omenjenem vplivu CO<sub>2</sub> na rast micelija, bolj verjetno pa zaradi tega, ker gojišča v laboratorijskem bioreaktorju po nacepiti nismo mogli premešati. Pri nacepiti je vcepek padel na površino gojišča in počasi in naključno pronical skozi gojišče. Posledica takšne nacepiti pa je nehomogena porazdelitev micelija in rasti.

Glede na dobljene rezultate, bi bilo dobro v prihodnosti še izboljšati način vlaženja substrata. V našem primeru je vlažilnik bil na nižji (sobni) temperaturi od vsebine bioreaktorja (25 °C) in smo tako izgubljali vodo iz gojišča. Sistem vlaženja, bi lahko izboljšali z dvigom temperature v vlažilniku in bi s tem mogoče dosegli, da bi navlažen zrak kondenziral v gojišču in tako ohranjal optimalno oz. zadostno vsebnost vode. Na zadrževanje vode v gojišču, bi bilo tako potrebno optimizirati intenzivnost prezračevanja, čas zadrževanja zraka v vlažilniku in temperaturo vode v vlažilniku.

Po gojenju smo iz vzorcev naredili pripravke in jim določili sestavo ter jim preverili sposobnost sproščanja TNF- $\alpha$  iz PBMC. Dodatek oljčnega olja osnovnemu gojišču iz koruznice je zmanjšal izkoristek ekstrakcije, a je hkrati povzročil dvig vsebnosti sladkorjev, proteinov in glukanov (preglednica 29). Razlog za manjši izkoristek ekstrakcije bi lahko bila posledica boljše rasti glive, ki je z povečanjem rasti povečala razgradnjo drugih polimerov. Najboljši kandidat za tak polimer je škrob (ki je  $\alpha$ -glukan) in ga je v pripravku iz osnovnega gojišča (8 %) več kot pri ostalih (~ 6 %).

Pri testiranju pripravkov na sposobnost sproščanja TNF- $\alpha$  iz PBMC smo ugotovili, da so pripravki bistveno bolj konsistentni glede njihove aktivnosti, ker smo pri vseh pripravkih določili aktivnost. Pripravki so bili pripravljene iz vzorcev po koncu gojenja (47. dan) in dodatek oljčnega olja je povzročil, da je bila aktivnost višja (preglednica 44). Iz preglednice 29 je razvidno, da je bil največji skok pri vsebnosti  $\beta$ -glukanov med gojiščema brez in z dodatkom oljčnega olja in prav tako je bil največji skok pri sproščanju TNF- $\alpha$  iz PBMC pri teh istih gojiščih. Ko pa smo naredili korelacijo med sproščanjem TNF- $\alpha$  in

vsebnostjo določenih komponent, smo najboljšo korelacijo določili za vsebnost proteinov (preglednica 50).

### 5.3.4 Gojenje v pilotnem mešalnem bioreaktorju

Zadnja stopnja gojenja na trdem gojišču je bila prenos v pilotno merilo. Za gojenje smo uporabili pilotni mešalni bioreaktor lastne konstrukcije.

Ugotovili smo, da je za najhitrejšo rast in največ biomase najboljša horizontalna pozicija bioreaktorja ob hkratnem mešanju in pretoku zraka 5 L/h (poskus 1). Slabšo rast in manj biomase smo dobili pri naklonu gojenja - 45° in 90° (poskus 2 in 3) in pri poskusu, kjer vsebine bioreaktorja nismo prezračevali (poskus 5). Najslabše rezultate smo dobili pri poskusu, kjer nismo uporabili mešanja (poskus 4) (slika 43). Slabšo rast pri različnih naklonih gojenja bi lahko pojasnili s porazdelitvijo vcepka po inokulaciji, saj obstaja verjetnost, da se je vcepek nehomogeno porazdelil po straneh vsebine bioreaktorja.

Pri poskusu, kjer vsebine bioreaktorja nismo prezračevali, možnost izmenjave plinov ni izključena, saj so se plini lahko izmenjevali na izstopnem filtru (glej sliko 14). Za določitev vpliva koncentracije kisika, bi morali narediti poskus s popolno regulacijo izmenjave plinov.

Zelo dobro je viden vpliv mešanja pri gojenju na trdnem gojišču in potrjuje naše domneve pri gojenju v laboratorijskem reaktorju (glej prejšnje poglavje), da je mešanje vsebine ključnega pomena za enakomerno porazdelitev vcepka in hitro ter homogeno preraščanje micelija. Tako smo dobili pri prvem poskusu v pilotnem mešalnem bioreaktorju več biomase, kot pri gojenju v laboratorijskem bioreaktorju, kjer ni bilo mešanja.

Izkoristki ekstrakcije za pripravo pripravkov so med fermentacijami zelo nihali (slika 44), a so bili primerljivi z izkoristki ekstrakcij pri gojenju v laboratorijskem bioreaktorju.

Iz vzorcev prvega gojenja v mešalnem bioreaktorju smo naredili tudi pripravke, katerim smo določili vsebnost glukanov in proteinov. Iz rezultatov je lepo viden porast vsebnosti proteinov, kar bi lahko bilo zanimivo predvsem z vidika uporabe takega bioprocesa za pripravo krmnih dodatkov. Seveda bi bilo predhodno potrebno preveriti, če enak porast

vsebnosti proteinov opazimo tudi v samem gojišču preraščenim z micelijem (in ne zgolj v pripravkih). Zanimiv je tudi podatek o vsebnosti celokupnih glukanov, ki se le minimalno zmanjšajo, vidimo pa lahko, da se sestava celokupnih glukanov zelo spremeni. Na račun zmanjšanja vsebnosti  $\alpha$ -glukanov (škroba) pride do povečanja vsebnosti  $\beta$ -glukanov.

### **5.3.5 Metoda odzivnih ploskev za študij vpliva hranilnih komponent na rast in vsebnost $\beta$ -glukanov na trdnem gojišču**

Metoda odzivnih ploskev je statistična metoda, ki lahko spremlja korelacije med posameznimi spremenljivkami. Pri tem poskusu smo merili vpliv koncentracije hranil (glukoza, kvasni ekstrakt, pepton,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  in oljčno olje) na hitrost rasti in vsebnost glukanov v biomasi. Rezultate smo podali v obliki tridimenzionalnih grafov, ki prikazujejo vpliv dveh posameznih parametrov hkrati.

Glavni namen metode je optimizacija gojišča za maksimiranje (oz. minimiziranje) določenih odzivov. Optimizacijo lahko izvedemo na dva načina. V prvem načinu lahko optimiziramo določen odziv pod pogojem, da so spremenljivke v optimalnih mejah (t.j. koncentracija hranil je lahko poljubna med izbranimi mejami). Pri drugemu načinu optimizacije pa lahko odziv optimiziramo pod pogojem, da so spremenljivke v čim manjši koncentraciji (t.j. kjer je le mogoče, se koncentracijo hranil nastavi na minimalno vrednost).

Zanimivi so predvsem rezultati optimizacij, kjer smo uporabljali optimalne parametre oz. koncentracije hranil v gojišču.

Pri optimizaciji za dobitok biomase, smo ugotovili, da ima najboljše gojišče minimalno vsebnost glukoze (10 g/L) in maksimalno vsebnost oljčnega olja (7 g/L) (slika 47), kar je v delnem nasprotju z rezultati gojenja v tekočem gojišču (Cui s sod., 2006), kjer so z enako metodo ugotovili, da je najbolj primerna koncentracija glukoze za pridobivanje biomase 42,5 g/L. Iz podatkov o hitrosti rasti na optimalnem gojišču (sliki 49 in 51) pa lahko vidimo, da je za največjo hitrost rasti najbolj ugodno gojišče, kjer je koncentracija glukoze blizu maksimuma. Cui s sod. (2006) niso ugotavljali hitrosti rasti na različnih gojiščih in ki

bi lahko pojasnila razlike. Seveda bi za dokončno potrditev rezultatov bilo potrebno ugotoviti maksimalen doprinos biomase po koncu gojenja in ne po 24 dneh inkubacije. Podoben fenomen smo opazili že pri gojenju v steklenih tulcih in v steklenih kozarcih, kjer smo ugotovili, da na nekaterih gojiščih gliva raste hitreje a proizvaja manj biomase, pri nekaterih pa počasneje in proizvaja več biomase (poglavje 5.3.2).

Pri optimizaciji parametrov za dobitok celokupnih glukanov smo ugotovili, da je najboljše gojišče tisto, ki je vsebovalo srednjo koncentracijo glukoze (24,76 g/L), maksimalno koncentracijo peptona (6,58 g/L) in nizko koncentracijo oljčnega olja. Tudi tukaj so rezultati v nasprotju z ugotovitvami pri gojenju v tekočem gojišču, kjer je znano, da oljčno olje stimulira nastanek polisaharidov v tekočem gojišču (Hsieh s sod., 2006; Hsieh s sod., 2008). Rezultati pa so v skladu z našimi ugotovitvami pri gojenju na trdnem gojišču (poglavje 5.3.3), kjer smo ugotovili, da dodatek oljčnega olja zmanjša izkoristek ekstrakcije.

Pri vplivu različnih koncentracij komponent gojišča na vsebnost  $\alpha$ -glukanov (slika 55) lahko vidimo, da je vsebnost  $\alpha$ -glukanov neodvisna od koncentracije peptona in da jih pri večjih koncentracijah glukoze nastane več. Tako kot rastline in živali, tudi glive lahko shranjujejo energijo v obliki  $\alpha$ -glukanov. Za glivo *G. frondosa* je znano, da vsebuje glikogenu podobne polisaharide v trosnjakih (Kato s sod., 1990). Pri vplivu na vsebnost  $\beta$ -glukanov (slika 57), pa je vidno, da pepton pozitivno vpliva na vsebnost  $\beta$ -glukanov. Pozitiven vpliv peptona je lahko zaradi osnovne sestave  $\beta$ -glukanov, za katere je znano, da vsebujejo tudi proteinsko komponento (Nanba in Kubo, 1998) in lahko večja koncentracija aminokislin iz peptona vpliva na povečan obseg biosinteze  $\beta$ -glukanov.

Z uporabo metode odzivnih ploskev, smo ugotovili, da so lahko zahteve za največje dobitke biomase, celokupnih glukanov,  $\alpha$ -glukanov in  $\beta$ -glukanov ter najhitrejšo rast glive zelo različne in se med seboj lahko tudi izključujejo. Ugotovili smo tudi, da se rast na trdnem gojišču bistveno razlikuje od rasti v tekočem gojišču.

## 5.4 GOJENJE V TEKOČEM GOJIŠČU

Gojenje v tekočem gojišču predstavlja tretji način gojenja (poleg gojenja trosnjakov in gojenja na trdnem gojišču). Zaradi svojih številnih prednosti bo gojenje v tekočem gojišču v prihodnosti verjetno predstavljalo enega izmed poglavitnih postopkov za potrebe farmacevtske industrije in industrije prehranskih dodatkov (Boh in Berovič, 2007; Wasser, 2011).

### 5.4.1 Izbira gojišča

V prvi fazi smo se lotili izboljšave samega gojišča in rezultate primerjali s tistimi, ki so objavljeni v literaturi. Gojišča, ki smo jih izbrali za poskuse so bila po podatkih iz literature že optimizirana za največji donos biomase in/ali polisaharidov. Primerjava naših rezultatov in rezultatov, objavljenih v literaturi je prikazana v preglednici 56.

Preglednica 56: Sestave preverjenih gojišč za gojenje v tekočem gojišču.

Gojišče	naši rezultati	rezultati iz literature	referenca
1	biomasa: 4,2 g/L ZP: 183 mg/L PCS: 481 mg/L	biomasa: 16,8 g/L (bioreaktor) ZP: 5,3 g/L PCS: np	Lee s sod. (2004)
1	biomasa: 4,2 g/L ZP: 183 mg/L PCS: 481 mg/L	biomasa: 24,8 g/L ZP: 7,2 g/L PCS: np	Bae s sod. (2005)
2	biomasa: 5,1 g/L ZP: 220 mg/L PCS: 369 mg/L	biomasa: 17,61 g/L ZP: 1,326 g/L PCS: np	Cui s sod. (2006)
3	biomasa: 4,5 g/L ZP: 211 mg/L PCS: 428 mg/L	biomasa: 6,7 g/L ZP: 3,3 g/L PCS: np	Shih s sod. (2008)
4	biomasa: 4,0 g/L ZP: 179 mg/L PCS: 522 mg/L	biomasa: 10,1 g/L ZP: np PCS: np	Hsieh s sod. (2008)

ZP - zunajcelični polisaharidi; PCS. - polisaharidi celične stene; np - ni podatka

Primerjava naših in objavljenih rezultatov kaže na zelo velike razlike v dobitkih biomase in zunajceličnih polisaharidov. Pri vseh preverjenih gojiščih smo dobili manjše dobitke biomase kot tudi zunajceličnih polisaharidov. Najbolj primerljiv rezultat glede biomase smo dobili pri tretjem gojišču (Shih s sod., 2008), pri čemer pa je razlika v dobitku

zunajceličnih polisaharidov še vedno zelo velika. Razliko v dobitkih bi lahko pripisali vrsti seva in verjetno je optimizacija gojišča potrebna za vsak sev posebej.

Nekateri podatki iz literature tudi vzbujajo dvom o njihovi pravilnosti. Bae s sod. (2005) poročajo o zelo visokih dobitkih biomase (24,8 g/L) in zunajceličnih polisaharidov (7,2 g/L). Uporabili so gojišče, ki je bilo sestavljeno iz glukoze (30 g/L), kvasnega ekstrakta (6 g/L), polipeptona (2g/L) in mineralov. Iz približno 38 g/L suhe snovi v gojišču so uspeli dobiti 32 g/L biomase in zunajceličnih polisaharidov. Iz teh podatkov je gliva torej porabila zgolj 6 gramov suhe snovi za svoj metabolizem. Za primerjavo lahko vzamemo visoko optimiziran industrijski proces proizvodnje biomase (pekovskega kvasa), kjer je izkoristek vira ogljika za tvorbo biomase približno 50 % (npr. iz 100 gramov glukoze dobimo 50 gramov biomase in še manj, če bi zraven upoštevali še vir dušika) (Babel s sod., 1983). Tako veliki izkoristek je glede na podobne procese z glivami po našem mnenju praktično nemogoč.

Iz literature je prav tako razvidno, da dodatek rastlinskih olj pozitivno vpliva na donos biomase in polisaharidov, zato smo gojišču, kjer smo dobili najboljše rezultate dodali še različne koncentracije oljčnega olja. Po dodatku olja smo dobili bistveno višje koncentracije biomase in polisaharidov (slika 60). Koncentracija biomase in zunajceličnih polisaharidov se je povečevala dokler nismo dosegli 2 % oljčnega olja v gojišču. Koncentracija biomase se je povečala iz 5,1 g/L na 8,3 g/L (+60 %), koncentracija zunajceličnih polisaharidov pa iz 370 mg/L na 560 mg/L (+50 %).

Pozitiven učinek olja v gojišču lahko razlagamo na različne načine. Pri glivi *G. lucidum* se predvideva, da dodatek olja vpliva na permeabilnost celične membrane, kar povzroči lažjo absorpcijo ostalih hranil in posledično boljšo rast in produkcijo polisaharidov (Yang s sod., 2000). Glede na to, da obe glivi sodita v rod luknjark, je ta mehanizem možen tudi pri glivi *G. frondosa*. Drugi, bolj verjeten, mehanizem pozitivnega učinka olja, pa je lahko zgolj alternativna uporaba vira ogljika z uporabo hidrolize in  $\beta$ -oksidacije maščob. Pri hidrolizi trigliceridov olja nastanejo glicerol in proste maščobne kisline, ki se lahko direktno uporabijo kot komponente celične membrane in tako *de novo* sinteza ni potrebna, po drugi strani pa maščobne kisline predstavljajo visokoenergijsko hranilo za potrebe celičnega

dihanja. Zaradi enega ali obeh predlaganih pojavov je tako na voljo več glukoze za sintezo drugih celičnih komponent in tvorbo polisaharidov. Za potrditev predlaganih mehanizmov uporabe olja kot vira celičnih komponent ali vira energije, bi bilo potrebno opraviti poskuse z uporabo označenega olja (olje s spremenjenimi izotopi ogljika).

#### 5.4.2 Gojenje v mirujoči kulturi

Gojenje v mirujoči kulturi je zelo nezahtevno, saj po inokulaciji gojišča praktično ni dela in vnosa energije. V primerjavi z gojenjem v bioreaktorjih, ima gojenje v mirujoči kulturi nekatere prednosti. Porabi se manj energije, obstaja manjši potencial okužb in praviloma bi se tako gojenje lahko izvajalo v velikem številu paralelnih kultivacij, kar bi onemogočilo širjenja okužb. Pomanjkljivost takega gojenja pa je ogromna količina dela, če povečamo število vzorcev za gojenje. V primeru avtomatizacije in robotizacije takega načina gojenja, bi pa odpadla še ta pomanjkljivost. V literaturi gojenje glive *G. forndosa* v mirujoči kulturi ni nikjer opisano, verjetno zaradi boljših rezultatov pri gojenju v stresani kulturi.

Dobitek biomase je zelo odvisen od volumna erlenmajerice (slika 61) in s povečevanjem volumna je dobiček biomase padal. Vzrok za slabše dobitke biomase bi lahko bila različna površina, ki je na voljo za izmenjavo plinov. Pri podobnih oblikah erlenmajerice se razmerje med površino gojišča, ki je v stiku z zrakom in volumnom gojišča, spreminja glede na njihovo velikost. Volumen se povečuje s kubikom, pri čemer pa se površina povečuje s kvadratom, kar pomeni, da imamo pri večjih volumnih manjšo površino, kjer lahko pride do izmenjave plinov. Razmerje med površino in volumnom pri erlenmajerici z volumnom 50 mL je  $19,2 \text{ cm}^{-1}$ , pri erlenmajerici z volumnom  $41,4 \text{ cm}^{-1}$ , pri erlenmajerici z volumnom 5000 mL pa  $89,2 \text{ cm}^{-1}$ .

Da je prenos plinov verjetno zelo pomemben za rast biomase, lahko vidimo tudi iz primerjave gojenja v mirujoči kulturi (500 mL erlenmajerica s 150 mL gojišča – slika 61) in gojenja v stresani kulturi (500 mL erlenmajerica s 100 mL gojišča, mešanje 150 obr./min - slika 60), kjer smo z mešanjem uspeli dobiti bistveno večje koncentracije biomase.

Zanimivi so tudi podatki o dobitkih zunajceličnih polisaharidov, ker se ti tekom gojenja ne spreminjajo po času, niti ne opazimo učinka velikosti erlenmajerice. Dobitki zunajceličnih polisaharidov so bili med 110 in 160 mg/L (slika 63), kar je v primerjavi s stresanimi kulturami bistveno manj (cca. 580 mg/L – slika 60). Vse kaže na to, da je mehanični stres pri gojenju v tekočem gojišču nujen za dobro produkcijo zunajceličnih polisaharidov in prvo potrditev te domneve lahko vidimo tudi pri rezultatih gojenja v mešalnem bioreaktorju (sledеče poglavje).

### 5.4.3 Gojenje v mešalnem bioreaktorju

V literaturi je nekaj podatkov o gojenju glive *G. frondosa* v mešalnem bioreaktorju (Lee s sod., 2004, Bae s sod., 2005, Cui s sod., 2006, Hsieh s sod., 2006) in nikjer niso opisane težave pri gojenju. Vsi avtorji so bili sposobni vzorčiti biomaso direktno iz bioreaktorja in nikjer ni omenjeno prijemanje biomase na površine bioreaktorja. Ko smo opravili prve poskuse gojenja v mešalnem bioreaktorju smo opazili skoraj popolno prijemanje biomase na trdnih površinah, kar je onemogočilo vzorčenje in pridobitev reprezentativnih vzorcev (slika 64). Preverili smo različna gojišča, različne načine nacepljanja (zmlet vcepek in vcepek s peleti), različne procesne parametre, različne bioreaktorje, preverili smo še en dodaten sev in vedno smo opazili enako morfologijo rasti. Gliva se je preferenčno vezala na kovinske dele bioreaktorjev in negladka površina (v primerjavi s steklom), bi lahko bila vzrok za tak način rasti. Ker je največ poročil o gojenju glive *G. frondosa* prav v mešalnih bioreaktorjih, smo se vseeno odločili, da naredimo serijo poskusov v mešalnem bioreaktorju in spremenimo strategijo vzorčenja. Tako smo bioreaktor vsakih sedem dni izpraznili in celotno vsebino uporabili kot vzorec, ki je bil skoraj reprezentativen (imeli smo težave pri popolnem odstranjevanju biomase od trdnih površin, še posebej mešala). Rezultati gojenja v mešalnem bioreaktorju so v primerjavi z drugimi načini gojenja zelo slabi, saj smo dobili zelo nizke dobitke biomase in polisaharidov. Ugotovili smo, da so večje hitrosti mešanja bolj ugodne za produkcijo biomase in polisaharidov. Boljši rezultati pri višjih hitrostih mešanja so verjetno zaradi povečanega spiranja biomase iz trdnih površin bioreaktorja in/ali zaradi oteženega prijemanja na trdne površine. Slabe izkoristke gojenja pa lahko pripišemo slabšemu prenosu hranil, saj si gliva s tvorjenjem filmov in skupkov micelija otežuje difuzijo. Naši rezultati so v nasprotju z objavljenimi

ugotovitvami (Lee s sod., 2004), kjer navajajo, da je mešalni bioreaktor učinkovitejši v primerjavi z *air-lift* reaktorjem, ki je zelo podoben koloni z mehurčki.

Za biokemijsko analizo in biološko aktivnost smo izbrali le vzorce iz gojenja pri hitrosti mešanja 900 obr./min, ki so nam služili za primerjavo pripravkov, katere smo dobili pri gojenju v koloni z mehurčki.

#### **5.4.4 Gojenje v reaktorju s polnili**

Reaktor s polnili smo si zamislili po tem, ko smo pri gojenju v mešalnem bioreaktorju opazili, da se micelij prijema na trdne površine in bi mogoče s spremembo načina gojenja, ki bi favorizirala prijemanje, mogoče lahko dobili boljši sistem za gojenje te glive. Tak način gojenja ni opisan za nobeno vrsto glive. Izkazalo se je, da je tak način gojenja zelo neprimeren v dveh pogledih. Prvič, dobili smo zelo nizke dobitke biomase in polisaharidov, še slabše od tistih pri gojenju v mirujoči kulturi in drugič, izolacija in čiščenje biomase iz steklenih nosilcev je zelo težavna. Pri takem načinu gojenja je difuzija plinov in hranil še slabša kot pri gojenju v mešalnem bioreaktorju. Čeprav je tak sistem neprimeren za proizvodnjo micelijske biomase, pa bi ga prav zaradi svoje slabe difuzivnosti, uporabili kot sistem za mikofiltracijo, ki ima lahko zelo pomembne aplikacije za bioremediacijo (Stamets, 2005).

#### **5.4.5 Gojenje v koloni z mehurčki**

Gojenje v koloni z mehurčki je v našem primeru bilo najbolj uspešno, saj smo dobili zelo velike donose biomase in polisaharidov.

Pri določevanju najbolj primerne pretoka zraka smo ugotovili, da je najbolj primeren pretok zraka med preverjenima ekstremoma. Razlike v dobitkih biomase pri različnih pretokih se razlikujejo tudi za 50 % in podoben, a manj izrazit, učinek lahko opazimo tudi pri gojenju na trdnem gojišču (poglavje 5.3.3).

Pri študiranju vpliva oljčnega olja na dobitke biomase in polisaharidov smo dobili podobne rezultate, kot pri določevanju vpliva olja pri stresanih kulturah (poglavje 5.4.1), s to razliko, da je produkcija v koloni z mehurčki boljša. Vzrok za boljše dobitke bi lahko

pojasnili z bolj intenzivno izmenjavo plinov (v koloni z mehurčki dovajamo svež zrak) ali pa boljšem mešanju. Povečana proizvodnja zunajceličnih polisaharidov je v skladu z ugotovitvami Stasinopoulos in Seviour (1990), Yang s sod. (2000) in Park s sod. (2002). Hsieh s sod. (2006) pa tudi poročajo o povečani produkciji tako biomase kot zunajceličnih polisaharidov.

Lee s sod. (2004) so ugotovili, da je morfološka oblika rahlih skupkov (slika 3c) najbolj primerna oblika za največjo produkcijo biomase in polisaharidov glive *G. frondosa*. Drugi avtorji (Sinha in Panda, 1998; Bae s sod., 2000; Park s sod., 2002b) so ugotovili, da je oblika peletov primernejša za te namene. Mi v primeru gojenja v mešalnem bioreaktorju peletov micelija nismo uspeli pridobiti in imeli smo zelo nizke dobitke tako biomase kot polisaharidov. Pri uporabi kolone z mehurčki smo uspeli vzgojiti micelij v obliki peletov (slika 26) in dosegli smo zelo visoke donose v primerjavi z drugimi načini gojenja.

Shih s sod. (2008) so ugotovili, da dodatek olja v gojišče spremeni molsko maso izoliranih polisaharidov. Mi smo ugotovili, da dodatek oljčnega olja v gojišče spremeni sestavo polisaharidov celične stene (preglednica 37) in zunajceličnih polisaharidov (preglednica 38). S povečevanjem koncentracije olja smo pri polisaharidih celične stene opazili zmanjšanje vsebnosti proteinov, celokupnih glukanov in  $\beta$ -glukanov. Zmanjšanje vsebnosti  $\beta$ -glukanov, bi lahko pripisali spremenjeni površinski napetosti zaradi vpliva olja, kar bi lahko povečalo sproščanje  $\beta$ -glukanov v gojišče in ta učinek je dobro viden pri povečani vsebnosti  $\beta$ -glukanov pri zunajceličnih polisaharidih. Jasno je vidna razlika v vsebnosti  $\alpha$ -glukanov v celičnih polisaharidih in zunajceličnih polisaharidih, ki je skladna z dejstvom, da glive vključno z glivo *G. frondosa*, uporabljajo glikogenu podobne polimere kot energijsko rezervo.

Pri gojenju v mešalnem bioreaktorju smo iz najboljšega produkcijskega sistema izolirali dva pripravka (polisaharide celične stene in zunajcelične polisaharide). Pri kemijski analizi smo ugotovili, da ni bistvenih razlik med polisaharidi celične stene in zunajceličnimi polisaharidi. Ker je izolacija teh dveh pripravkov bila narejena iz vzorca, kjer smo uporabili zelo veliko hitrost mešanja, je lahko prišlo do mehanskega uničenja micelija in

sproščanja polisaharidov celične stene v gojišče, kar je tudi vidno na primerljivi vsebnosti  $\alpha$ -glukanov v pripravku zunajceličnih polisaharidov (preglednica 35).

Prav tako smo pokazali, da sprememba gojišča vpliva na, poleg že omenjene kemijske sestave, tudi na biološko aktivnosti pripravkov. S spreminjanjem sestave gojišča (z dodatkom olja), je pri polisaharidih celične stene prišlo do zmanjšanja vsebnosti  $\beta$ -glukanov in prav tako je prišlo do zmanjšanja biološke aktivnosti. Obratno, pri zunajceličnih polisaharidih pa je prišlo do povečanja vsebnosti  $\beta$ -glukanov in tudi biološke aktivnosti (preglednica 45). Naredili smo tudi korelacijsko analizo med vsebnostjo posamičnih komponent pripravkov, pridobljenih iz gojenja v tekočem gojišču in ugotovili, obstaja dobra statistično značilna korelacija (0,835) med vsebnostjo  $\beta$ -glukanov in koncentracijo sproščenega TNF- $\alpha$  (preglednica 51). Pri pripravkih iz mešalnega bioreaktorja ni bilo velikih razlik pri kemijski sestavi in tudi ne pri biološki aktivnosti (preglednica 46). Ponovno je razlog lahko poškodba micelija in sproščanje celičnih polisaharidov v gojišče.

Iz rezultatov lahko vidimo, da je gojenje v koloni z mehurčki dalo najboljše rezultate in da dodatki olja pozitivno vplivajo na dobitke biomase in polisaharidov, ter spremembo sestave polisaharidov celične stene in zunajceličnih polisaharidov. V primerjavi z gojenjem v mešalnem bioreaktorju, ki se najbolj pogosto uporablja za študij proizvodnje biomase in polisaharidov, je kolona z mehurčki, vsaj za naše sev glive *G. frondosa*, bistveno bolj primeren sistem, saj smo dosegli več kot 200 % večje dobitke biomase in celičnih polisaharidov.

## **5.5 PRIMERJAVA PRIPRAVKOV IZ RAZLIČNIH NAČINOV GOJENJA NA BIOLOŠKO AKTIVNOST**

Po vseh poskusih smo želeli preveriti, ali se pripravki, pridobljeni po različnih bioprocenih postopkih med seboj razlikujejo. Ugotovili smo, da pripravki, pridobljeni iz trošnjakov, niso statistično značilno različni od kontrolnega medija. Čeprav smo pri določenih pripravkih zaznali zelo velik učinek na sproščanje TNF- $\alpha$  iz PBMC, so bili ti

odzivi preglašeni z velikim številom pripravkov, kjer nismo zaznali nobenega odziva. Za pravo primerjavo, bi torej morali najprej določiti kateri pogoji privedejo do pripravkov, ki imajo aktivnost, seveda ob upoštevanju možnosti, da so aktivni pripravki zgolj posledica kontaminacije s tujimi organizmi.

Ugotovili smo pa, da so pripravki, pridobljeni iz gojenja na trdnem gojišču in gojenja v tekočem gojišču, statistično značilno različni od kontrolnega medija. Ugotovili smo tudi, da so si statistično značilno med seboj različni vsi pripravki med seboj. Tukaj lahko zaključimo, da smo z uporabo sodobnih biotehnoloških postopkov uspeli pripraviti pripravke, ki izkazujejo sposobnost sproščanja TNF- $\alpha$  iz PBMC.

Ugotovili smo, da so pripravki, pridobljeni iz gojenja na trdnem gojišču statistično značilno različni od pripravkov, pridobljenih iz gojenja v tekočem gojišču. Iz grafa (slika 75) lahko tudi vidimo, da smo pri gojenju na trdnem gojišču, dobili pripravke, ki imajo manjšo sposobnost sproščanja TNF- $\alpha$  iz PBMC od pripravkov, pridobljenih iz tekočega gojišča. Ko smo ugotavljali korelacije med sestavo pripravkov in sproščanjem TNF- $\alpha$ , smo ugotovili, da imamo pri pripravkih iz gojenja na trdnem gojišču statistično značilno dobro korelacijo med vsebnostjo proteinov in sproščanjem TNF- $\alpha$  (preglednica 50). Pri pripravkih, pridobljenih iz gojenja v tekočem gojišču pa smo ugotovili, da imamo statistično značilno dobro korelacijo med vsebnostjo  $\beta$ -glukanov in sproščanjem TNF- $\alpha$  (preglednica 51). Takšne razlike bi lahko razlagali s samo sestavo pripravkov, saj smo pri gojenju v tekočem gojišču imeli izključno glivne polisaharide, pri pripravkih iz gojenja na trdnem gojišču, pa smo poleg glivnih polisaharidov izolirali tudi polisaharide osnovnega gojišča.

Predpostavljali smo tudi, da se polisaharidi celične stene in zunajcelični polisaharidi med seboj razlikujejo, a po primerjavi teh dveh skupin pripravkov, smo ugotovili, da med njimi ni statistično značilnih razlik. V preglednicah 37, 38 in 45 smo prikazali, da vsebnost oljčnega olja vpliva na sestavo in sproščanje TNF- $\alpha$  iz PBMC, bi bilo smiselno še dodatno narediti dodatne poskuse, kjer bi ugotavljali vpliv spremembe gojišča (npr. še večje koncentracije olja) na razlike v polisaharidih celične stene in zunajceličnih polisaharidov.

Glede na dostopno literaturo, je to prva primerjava pripravkov, pridobljenih po različnih bioprocenih postopkih (trosnjaki, gojenje na trdnem gojišču in gojenje v tekočem gojišču).

## 5.6 PRIMERJAVA PRODUKTIVNOSTI POSAMEZNIH BIOPROCESOV

Produktivnost je pomemben parameter za evalvacijo posameznih bioprocsov za proizvodnjo dobrin. Produktivnost nam pove, koliko produkta dobimo glede na količino surovin v enoti časa. Bolj produktivni procesi so tisti, ki uspejo iz manjše količine vhodnih surovin, dobiti večjo količino produkta v krajšem času. Da bi bili rezultati za produktivnost primerljivi glede na vhodne surovine, smo za izračun produktivnosti uporabili suho snov gojišč (t.j. suho trdno gojišče in suha snov pri gojenju v tekočem gojišču).

Produktivnosti pri gojenju trosnjakov so za produkcijo pripravkov segale od  $1,6 \times 10^{-7}$  do  $7,6 \times 10^{-7}$  grama pripravka na gram suhega gojišča na uro. Za produkcijo biomase pa od  $0,4 \times 10^{-5}$  do  $2,3 \times 10^{-5}$  grama biomase na gram suhega gojišča na uro.

Produktivnosti pri gojenju micelijske biomase na trdnem gojišču v laboratorijskem bioreaktorju so za produkcijo pripravkov segale od  $700 \times 10^{-7}$  do  $771 \times 10^{-7}$  grama pripravka na gram suhega gojišča na uro. Za produkcijo biomase pa od  $4,9 \times 10^{-5}$  do  $5,9 \times 10^{-5}$  grama biomase na gram suhega gojišča na uro. Z uporabo pilotnega mešalnega bioreaktorja pa je produktivnost za produkcijo pripravka bila  $893 \times 10^{-7}$  grama pripravka na gram suhega gojišča na uro. Za produkcijo biomase pa od  $5,3 \times 10^{-5}$  grama biomase na gram suhega gojišča na uro.

Pri gojenju v tekočem gojišču, se je kolona z mehurčki, izkazala kot najboljši produkcijski sistem. Produktivnost za produkcijo pripravkov je segala od  $194 \times 10^{-7}$  do  $323 \times 10^{-7}$  grama pripravka na gram suhe snovi v gojišču na uro. Za proizvodnjo biomase pa od  $19 \times 10^{-5}$  do  $32 \times 10^{-5}$  grama biomase na gram suhe snovi v gojišču na uro.

Primerjava produktivnosti pokaže, da je gojenje trosnjakov bistveno manj produktivno od gojenja na trdnem gojišču in gojenja v tekočem gojišču. Produktivnosti proizvodnje

pripravkov iz trosnjakov so v primerjavi z gojenjem na trdem gojišču nižje za približno 100 do 700-krat, v primerjavi z gojenjem v tekočem gojišču pa za približno 25 do 200-krat. Primerjava produktivnosti za najboljše bioprocese za posamezen način gojenja je prikazana v preglednici 57.

Preglednica 57: Primerjava produktivnosti najboljših bioprocsov za posamezen način gojenja

<b>Način gojenja</b>	<b>produktivnost bioprocasa glede na tvorbo produkta - <math>P_{Bp}</math> (g<sub>pripravka</sub>/g<sub>gojišča</sub> h)</b>	<b>produktivnost bioprocasa glede na tvorbo biomase <math>P_{Bb}</math> (g<sub>biomase</sub>/g<sub>gojišča</sub> h)</b>
gojenje trosnjakov	$8,2 \times 10^{-7}$	$2,3 \times 10^{-5}$
gojenje na trdnem gojišču	$893 \times 10^{-7}$	$6,4 \times 10^{-5}$
gojenje v tekočem gojišču	$323 \times 10^{-7}$	$32 \times 10^{-5}$

Gojenje na trdnem gojišču je bolj produktivno od gojenja v tekočem gojišču in pripravki imajo primerljivo biološko aktivnost, smo pa pri gojenju na trdnem gojišču imeli več težav zaradi okužb in kontrole bioprocasa.

Zaključimo lahko, da je uporaba modernih biotehnoških metod za proizvodnjo glivne biomase bistveno bolj primerna od gojenja trosnjakov. Prednosti uporabe teh metod so številne. Kontrola procesa je izboljšana, konsistentnost pripravkov je boljša, produktivnosti so večje in dela je manj. Glede na to, da je glavnina proizvodnje gliv še vedno pri gojenju trosnjakov, to področje prava biotehnoška revolucija, še čaka.

## 5.7 VPLIV NA IZRAŽANJE GENOV, KI PREPOZNAVAJO CELIČNE KOMPONENTE GLIV

Dektin-1, TLR2, TLR4 in MR so glavni receptorji, ki prepoznavajo komponente celičnih sten gliv in njihova aktivacija ima za posledico številne fiziološke odzive, med njimi tudi sproščanje citokinov, kot je TNF- $\alpha$ . Vpliv pripravkov, ki vsebujejo  $\beta$ -glukane iz drugih virov, je že raziskan. Ugotovili so, da kurdlan (linearen 1,3- $\beta$ -glukan) in zimosan (1,3- $\beta$ -glukan, izoliran iz kvasovke *Saccharomyces cerevisiae*) zmanjšata ekspresijo genov za receptorje dektin-1, TLR2 in TLR4 in povečata ekspresijo genov za MR (Stopinšek s sod., 2011).

Mi smo ugotovili, da pripravki iz trosnjakov glive *G. frondosa*, vplivajo predvsem na zmanjšanje izražanja genov za receptor dektin-1 in povečanje izražanja genov za MR, pri čemer pa take razlike ne vidimo pri receptorjema za gene TLR2 in TLR4 (slika 77). Znano je, da so netopni  $\beta$ -glukani nezmožni stimulacije makrofagov, brez hkratne stimulacije receptorjev iz družine TLR (Dennehy s sod., 2008), kar kaže na to, če smo pri pripravkih iz trosnjakov imeli opravka predvsem s topnimi  $\beta$ -glukani. Po drugi strani, pa je tudi znano, da je za tvorbo vnetnih citokinov (kot je TNF- $\alpha$ ) potrebno sodelovanje med receptorjema dektin-1 in receptorji iz družine TLR (Tsoni in Brown, 2008). Če pogledamo korelacijsko analizo (preglednica 53), lahko vidimo, da imamo zelo dobro korelacijo med spremembo izražanja genov za izbrane receptorje in sproščanjem vnetnega citokina TNF- $\alpha$ , pri čemer je statistično značilna povezava med sproščanjem TNF- $\alpha$  in receptorjem TLR4. Glede na omejeno število podatkov, pa ni znano, če je za sodelovanje z receptorjem dektin-1 potreben receptor TLR2 (korelacija 0,99) ali receptor TLR4 (korelacija 0,79) ali morda celo oba.

Zelo zanimivi so rezultati od pripravkov, pridobljenih iz gojenja na trdnem gojišču na enakem gojišču (koruznica z 2-odstotnim dodatkom oljčnega olja), ki smo jih pridobili na različne načine (gojenje v kozarcih, gojenje v pilotnem bioreaktorju in gojenje v pilotnem bioreaktorju; slika 78). Glede na to, da smo vedno uporabili enako gojišče, smo pričakovali, da bodo vsaj profili, če že ne stopnje, izražanja genov za receptorje podobni. Pri preverjanju vpliva na izražanje genov receptorjev pri pripravkih, ki smo jih dobili pri

gojenju na trdem gojišču z različnimi dodatki oljčnega olja (slika 79), pa smo dobili pri koncentracijah do 2 % dodanega olja profil izražanja genov, ki je podoben tistemu, ki smo ga dobili pri pripravkih iz trosnjakov. Vpliv oljčnega olja na izražanje mRNA za receptorje, ki prepoznavajo komponente celičnih sten gliv, ni raziskan, a je verjeten. Pri pripravku, ki je bil pridobljen iz gojišča z 2-odstotnim dodatkom olja, pa smo dobili profil, ki ni skladen s pripravki iz trosnjakov. Vzrok za različno izražanje genov receptorjev, bi mogoče lahko iskali v delovanju oljčnega olja, ki se pri tej koncentraciji mogoče ni metaboliziralo zaradi rasti aktivnosti glive. Iz korelacijske analize (preglednica 54) je razvidno, da imamo zmerno in statistično neznačilno korelacijo med sproščanjem TNF- $\alpha$  in ekspresijo receptorjev, imamo pa dobro in statistično značilno korelacijo med izražanjem gena za receptor dektin-1 in TLR4 (0,886).

Med pripravki, ki smo jih dobili z gojenjem v tekočem gojišču v koloni z mehurčki (sliki 80 in 81), ni bilo večjih razlik. Pri vseh smo dobili profil izražanja genov, ki je podoben pripravkom iz trosnjakov, razen pri pripravkih, kjer smo dodali 2 % olja, kjer smo določili zmanjšano ekspresijo gena za MR. Pri pripravkoma, ki smo jih dobili pri gojenju v mešalnem bioreaktorju (gojišče z 2-odstotnim dodatkom olja), pa smo zaznali večjo izražanje gena za MR pri vzorcu zunajceličnih polisaharidov. Korelacijska analiza (preglednica 55) je ponovno pokazala, da imamo zmerno in statistično neznačilno korelacijo med sproščanjem TNF- $\alpha$  in ekspresijo receptorjev, imamo pa dobro in statistično značilno korelacijo med izražanjem gena za receptor dektin-1 in TLR2 (0,733).

Naredili smo tudi primerjavo pripravkov iz različnih bioprocenjskih proizvodnih metod (iz trosnjakov, iz gojenja na trdnem gojišču in iz gojenja na tekočem gojišču), glede na njihov vpliv na ekspresijo receptorjev za gene, ki prepoznavajo komponente celičnih sten gliv.

Pripravki iz vseh proizvodnih metod, razen gojenja na trdnem gojišču, vplivajo na zmanjšanje izražanja gena za receptor dektin-1. Nismo pa zaznali razlike med pripravki pridobljenih iz trosnjakov in pripravkov iz gojenja v tekočem gojišču (vključno s polisaharidi celične stene in zunajceličnimi polisaharidi), kar kaže na to, da se pripravki iz gojenja na trdnem gojišču razlikujejo od ostalih dveh skupin pripravkov. Podobno smo ugotovili pri sposobnosti pripravkov za sproščanje TNF- $\alpha$  (poglavje 5.5) in tudi tukaj bi

lahko ključno vlogo igrale primesi iz osnovnega gojišča (koruznice), ki so odgovorne za drugačno aktivnost pripravkov.

Podobno razliko lahko vidimo tudi pri ugotavljanju vpliva na ekspresijo receptorjev TLR2 in TLR4, kjer smo za pripravke, pridobljene iz gojenja na trdnem gojišču dobili statistično značilno razliko od kontrole. Za pripravke, pridobljene iz trosnjakov in gojenja v tekočem gojišču (vključno s polisaharidi celične stene in zunajceličnimi polisaharidi), pa nismo ugotovili statistično značilnih razlik. Tudi tukaj je potencialen vpliv lahko zaradi prisotnosti komponent trdnega gojišča v pripravku. Te komponente so lahko del naravne sestave gojišča (koruznice), ali pa so del metabolizma drugih gliv, ki so uspele prerasti koruznico, preden se je ta dokončno posušila. Prisotnost drugih gliv, bi tako lahko pojasnila vpliv na različno ekspresijo genov pri receptorjih dektin-1, TLR2 in TLR4. Za pripravo komercialnih pripravkov, bi tako bilo potrebno dobro kontrolirati vhodne surovine.

Statistično značilno povečanje izražanja gena za MR, smo opazili zgolj pri pripravkih pridobljenih iz trosnjakov (slika 86). Stopinšek s sod. (2011) so preverili vpliv različnih pripravkov iz gliv na ekspresijo genov za receptorje, ki prepoznavajo komponente celičnih sten gliv. Povečanje izražanja gena za MR določili zgolj pri enem pripravku – topnem  $\beta$ -1-3-glukanu – kurdlanu, ki je linearen in brez stranskih razvejitev. Pri bolj kompleksnih  $\beta$ -glukanih, pa povečanje izražanja niso zaznali. Rezultati kažejo, da imajo pripravki iz trosnjakov mogoče prisotne linearne  $\beta$ -glukane, ki so prisotni tudi v trosnjakih, ali pa se pojavijo tekom postopka ekstrakcije.

Iz rezultatov lahko zaključimo, da pripravki iz glive *G. frondosa* vplivajo na izražanje genov za receptorje, ki prepoznavajo komponente celičnih sten gliv. Iz rezultatov, pa je vidno tudi, da obstajajo pomembne razlike med pripravki, ki so bili dobljeni tako iz različnih produkcijskih sistemov na istem gojišču, kot tudi pri istem gojišču na različnih produkcijskih sistemih.

## 6 SKLEPI

- Ugotovili smo, da je iz vidika produktivnosti najbolj primerno gojenje na trdnem gojišču na gojišču iz koruznice. Zaradi težje kontrole bioprocesa, pa je za biotehnološko proizvodnjo po našem mnenju, bolj primerna uporaba gojenja v tekočem gojišču.
- Gojenje trosnjakov je iz vidika produktivnosti, t.j. časa in dela potrebnega za proizvodnjo pripravkov, nekonkurenčno. Pri pripravkih iz trosnjakov smo dobili zelo variabilne rezultate glede biološke aktivnosti, kar bo v prihodnosti še potrebno preučiti. Pri pripravkih iz trosnjakov smo določili najmočnejši biološki odziv.
- Proizvodnja pripravkov, z uporabo gojenja na trdnem gojišču, je glede biološke aktivnosti bila primerljiva s pripravki, dobljenih iz tekočega gojišča, ne glede na to, da smo pri ekstrakciji uporabili micelijsko biomaso v asociaciji s trdnim gojiščem.
- Pripravki, pridobljeni iz gojenja v tekočem gojišču, so izkazovali konsistentno biološko aktivnost. Bioprocen je tudi visoko produktiven in bolj primeren od gojenja trosnjakov.
- Ugotovili smo, da so si pripravki, pridobljeni iz različnih produkcijskih sistemov zelo različni, ugotovili smo pa tudi, da so pripravki pridobljeni iz enega produkcijskega sistema različni pri uporabi različnih gojišč in procesnih parametrov.
- Korelacija med vsebnostjo  $\beta$ -glukanov in biološko aktivnostjo (sproščanje citokina TNF- $\alpha$ ) je dobra, čeprav bi potrebno bilo raziskati tudi vpliv proteinov. Korelacija je bila boljša pri pripravkih iz gojenja v tekočem gojišču. Vsebnost  $\beta$ -glukanov, bi lahko služila kot parameter kakovosti za pripravke iz glive *G. frondosa*.
- Ugotovili smo, da se pripravki, pridobljeni po različnih bioprocenih načinih proizvodnje med seboj razlikujejo. Ugotovili smo, da imajo pripravki iz gojenja v tekočem gojišču največjo sposobnost sproščanja TNF- $\alpha$  iz PBMC in da ni pomembnih razlik med polisaharidi celične stene in zunajceličnimi polisaharidi.

Sledijo jim pripravki iz gojenja na trdnem gojišču, za pripravke iz trosnjakov pa zaradi variabilnosti podatkov tega ne moremo trditi.

- Ugotovili smo, da pripravki iz različnih produkcijskih metod, različno vplivajo na izražanje genov, ki prepoznavajo komponente celičnih sten gliv, v PBMC. Pripravki, pridobljeni iz trosnjakov in gojenja v tekočem gojišču, vplivajo na zmanjšanje izražanja gena za receptor dektin-1, kar kaže na njegovo aktivacijo. Pripravki iz gojenja na trdnem gojišču pa po drugi strani vplivajo na povečano izražanje genov za receptorja TLR2 in TLR4. Povečano izražanje gena za manozni receptor, pa smo ugotovili zgolj pri pripravkih, pridobljenih iz trosnjakov, kar kaže ne potencialno prisotnost linearnih  $\beta$ -glukanov.
- Glede na širitev proizvodnje in uporabe medicinsko pomembnih gliv, smo uspeli pokazati, da je način proizvodnje biomase zelo pomemben kar se tiče produktivnosti in biološke aktivnosti. Z uporabo sodobnih biotehnoloških postopkov (predvsem gojenja v tekočem gojišču) lahko hitro pripravimo večje količine biomase in polisaharidov, ki so bolj uniformne sestave in ki izkazujejo aktivnost. Za standardizacijo pripravkov, pridobljenih iz gojenja glive *G. frondosa* v tekočem gojišču, bi lahko kot parameter uporabili vsebnost  $\beta$ -glukanov.

## 7 LITERATURA

- Adachi K., Nanba H., Kuroda H. 1987. Potentiation of host-mediated antitumor activity in mice by beta-glucan obtained from *Grifola frondosa* (Maitake). *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 35, 262-270.
- Akramiene D., Kondrotas A., Didziapetriene J., Kevelaitis E. 2007. Effects of beta-glucans on the immune system. *Medicina (Kaunas)*, 43, 597-606.
- Babel W., Muller R.H., Markuske K.D. 1983. Improvement of growth yield of yeast on glucose to the maximum by using an additional energy source. *Archives of Microbiology*, 136, 203-208.
- Badger T.M., Simmen F.A. 2006. Effect of Shiitake mushroom dose on colon tumorigenesis in azoxymethane treated male sprague-dawley rats. *Nutrition Research*, 26, 138-145.
- Bae J.T., Sinha J., Park J.P., Song C.H., Yun J.W. 2000. Optimization of submerged culture conditions for exo-biopolymer production by *Paecilomyces japonica*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 10, 482-487.
- Bae J.T., Sim G.S., Lee D.H., Lee B.C., Pyo H.B., Choe T.B., Yun, J.W. 2005. Production of exopolysaccharide from mycelial culture of *Grifola frondosa* and its inhibitory effect on matrix metalloproteinase-1 expression in UV-irradiated human dermal fibroblasts. *FEMS Microbiology Letters*, 251, 347-54.
- Baseta J.G., Stutman O. 2000. TNF regulates thymocyte production by apoptosis and proliferation of the triple negative (CD3-CD4-CD8-) subset. *Journal of Immunology*, 15, 5621-5630.
- Barreto S.M., Alzate C.E.O., Levin L. 2011. Modeling *Grifola frondosa* fungal growth during solid-state fermentation. *Engineering in Life Sciences*, 11, 316-321.
- Berovič M., Habijanič J., Zore I., Wraber B., Hodzar D., Boh B., Pohleven F. 2003. Submerged cultivation of *Ganoderma lucidum* biomass and immunostimulatory effects of fungal polysaccharides. *Journal of Biotechnology*, 103, 1, 77-86.
- Bhak G., Song M., Lee S., Hwang, S. 2005. Response Surface Analysis of Solid State Growth of *Pleurotus ostreatus* Mycelia utilizing Whey Permeate. *Biotechnology Letters*, 27, 1537-1541.
- Boh B., Berovic M. 2007. *Grifola frondosa* (Dicks.: Fr.) S. F. Gray (Maitake Mushroom): medicinal properties, active compounds, and biotechnological cultivation. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 9, 89-108.

- Borchers A.T., Stern J.S., Hackman R.M., Keen C.L., Gershwin M.E. 1999. Mushrooms, tumors, and immunity. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 221, 281–293.
- Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- Chan G.C.F., Chan W.K., Sze D.M.Y. 2009. The effects of  $\beta$ -glucan on human immune and cancer cells. *Journal of Hematology & Oncology*, 2, 11-25.
- Chang S.T. 1999a. Global impact of edible and medicinal mushrooms on human welfare in the 21st century – non-green revolution. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 1, 1-7.
- Chang S.T. 1999b. World production of cultivated and medicinal mushrooms in 1997 with emphasis on *Lentinus edodes* (Berk) Sing, China. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 1, 291–300.
- Chen A., Stamets P., Huang H.L., Han S.H. 1999. Maitake cultivation at a glance - Parts I, II. The Mushroom Growers' Newsletter - Oregon, ZDA.
- Chen J., Seviour R. 2007. Medicinal importance of fungal beta-(1 $\rightarrow$ 3), (1 $\rightarrow$ 6)-glucans. *Mycological Research*, 111, 635-652.
- Choi H.S., Cho H.Y., Yang H.C., Ra K.S., Suh H.J. 2001. Angiotensin 1-converting enzyme inhibitor from *Grifola frondosa*. *Food Research International*, 34, 177-182.
- Cui F.J., Li Y., Xu Z.H., Xu H.Y., Sun K., Tao W.Y. 2006. Optimization of the medium composition for production of mycelial biomass and exo-polymer by *Grifola frondosa* GF9801 using response surface methodology. *Bioresource Tecnology*, 10, 1209-1216.
- Cui F.J., Li Y., Xu Y.Y., Liu Z.Q., Muang D.M., Zhang Z.C., Tao W.T. 2007. Induction of apoptosis in SGC-7901 cells by polysaccharide-peptide GFPS1b from the cultured mycelia of *Grifola frondosa* GF9801. *Toxicology in vitro*, 21, 417-427.
- Deng G., Lin H., Sidman A., Fornier M., D'Andrea G., Wesa K., Yeung S., Cunningham-Rundles S., Vickers A.J., Cassileth B. 2009. A phase I/II trial of a polysaccharide extract from *Grifola frondosa* (Maitake mushroom) in breast cancer patients: immunological effects. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 135, 1215-1221.
- Dennehy K.M., Ferwerda G., Faro-Trindade I. 2008. Syk kinase is required for collaborative cytokine production induced through Dectin-1 and Toll-like receptors. *European Journal of Immunology*, 38, 500–506.

- Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A., Smith F. 1956. A Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*, 28: 350-356.
- Dubost N.J., Ou B., Beelman R.B. 2007. Quantification of polyphenols and ergothioneine in cultivated mushrooms and correlation to total antioxidant capacity. *Food Chemistry*, 105, 727-735.
- Frank J.A., Xiao R., Yu S., Ferguson M., Hennings L.J., Simpson P.M. Ronis M.J.J., Fang N. 2006. Effect of Shiitake mushroom dose on colon tumorigenesis in azoxymethane-treated male Sprague-Dawley rats. *Nutrition Research*, 26, 138-145.
- Fukushima M., Ohashi T., Fujwara Y., Sonoyama K., Nakano M. 2001. Cholesterol-lowering effects of Maitake (*Grifola frondosa*) fiber, Shiitake (*Lentinula edodes*) fiber and Enokitake (*Flammulina velutipes*) fiber in rats. *Experimental Biology and Medicine*, 226, 758-765.
- Fukushima Y., Itoh H., Fukase T., Motai H. 1991. Stimulation of protease production by *Aspergillus oryzae* with oils in continuous culture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 34, 586-590.
- Gregori A., Švigelj M., Berovic M., Liu Y., Zhang Y., Pohleven F., Klinar D. 2009. Cultivation and bioactivity assessment of *Grifola frondosa* fruiting bodies on olive oil press cakes substrates. *New Biotechnology*, 26, 260-262.
- Gregori A. 2010. Vpliv novih tehnologij gojenja na pridelek gob in vsebnost zdravnih učinkovin. Doktorska disertacija. Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani.
- Harada N., Kodama N., Nanba H. 2003. Relationship between dendritic cells and the D-fraction-induced Th-1 dominant response in BALB/c tumor-bearing mice. *Cancer Letters*, 192, 181-187.
- Healy V., O'Connell J., McCarthy V., Doonan S. 1999. The lysine-specific proteinase from *Armillaria mellea* is a member of a novel class of metalloendopeptidases located in Basidiomycetes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 262, 60-63.
- Hishida I., Nanba H., Kuroda, H. (1988) Antitumor activity exhibited by orally administered extract from fruit body of *Grifola frondosa* (Maitake). *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 36, 1819-1827.
- Hobbs C. 1995. Medicinal Mushrooms: An Exploration of Tradition, Healing & Culture, Botanica Press.
- Hsieh C., Liu C.J., Tseng M.H., Lo C.T., Yang Y.C. 2006. Effect of olive oil on the production of mycelial biomass and polysaccharides of *Grifola frondosa* under high oxygen concentration aeration. *Enzyme and Microbial Technology*, 39, 434-439.

- Inoue A., Kodama N., Nanba H. 2002. Effect of Maitake (*Grifola frondosa*) on the control of the T lymph node Th-1/Th-2 proportion. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 25, 536-540.
- Kabir Y., Yamaguchi M., Kimura S. 1987. Effect of shiitake (*Lentinus edodes*) and maitake (*Grifola frondosa*) mushrooms on blood pressure and plasma lipids of spontaneously hypertensive rats (SHR). *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 35, 91-94.
- Kato K., Inagaki T., Shibagaki H., Yamauchi R., Okuda K., Sano T., Ueno Y. 1983a. Structural analysis of the Beta-D-glucan extracted with aqueous zinc chloride from the fruit body of *Grifola frondosa*. *Carbohydrate Research*, 123, 259-265.
- Kato K., Inagaki T., Teranishi T., Yamauchi R., Okuda K., Sano T., Ueno Y. 1983b. Structural analysis of the alkali soluble Beta-D-glucan from the fruit body of *Grifola frondosa*. *Carbohydrate Research*, 124, 247-252.
- Kato K., Kawaguchi M., Kumada K., Yamauchi R., Ueno Y. 1990. An alkali-soluble  $\alpha$ -D-glucan from the fruiting body of *Grifola frondosa*. *Carbohydrate research*, 198, 149-152.
- Kawagishi H., Nomura A., Mizuno T., Kimura A., Chiba S. 1990. Isolation and characterization of lectin from *Grifola frondosa* fruiting bodies. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1034, 247-252.
- Khandakar J., Uddin M.N., Sarker N.C., Basunia M.A., Khan A., Khan A.S. 2009. Effect of Culture Media and Environmental Factors on the Mycelial Growth of *Grifola frondosa*. *Bangladeshi Journal of Mushrooms*, 3, 15-20.
- Kirchhoff B. 1996. Investigations of genotypes and substrates for the fruitbody production of *Grifola frondosa* (Dicks.: Fr.) V: Mushroom Biology and Mushroom Products. Royse D.J. (Ur.). State College, Penn State University press.
- Klamer M., Baath E. 2004. Estimation of conversion factors for fungal biomass determination in compost using ergosterol and PLFA 18:2v6,9. *Soil Biology & Biochemistry*, 36, 57-65.
- Kodama N., Yamada M., Nanba H. 2001. Addition of Maitake D-fraction reduces the effective dosage of vancomycin for the treatment of *Listeria*-infected mice. *Japanese Journal of Pharmacology*, 87, 327-332.
- Kodama N., Harada M., Nanba H. 2002. A polysaccharide extract from *Grifola frondosa* induces Th-1 dominant responses in carcinoma-bearing BALB/c mice. *Japanese Journal of Pharmacology*, 90, 357-360.

- Kodama N., Murata Y., Asakawa A., Inui A., Hayashi M., Sakai N., Nanba H. 2005. Maitake D-fraction enhances antitumor effects and reduces immunosuppression by mitomycin-C in tumor-bearing mice. *Nutrition*, 21, 624-629.
- Kubo K., Aoki H., Nanba H. 1994. Antidiabetic activity present in the fruit body of *Grifola frondosa* (Maitake). *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 17, 1106-1110.
- Kubo K., Nanba H. 1996. The effect of Maitake mushroom on liver and serum lipids. *Alternative Therapies In Health And Medicine*, 2, 62-66.
- Kubo K., Nanba H. 1997. Anti-hyperliposis effect of Maitake fruit body (*Grifola frondosa*). *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 20, 781-785.
- Kurasige S., Akazawa Y., Endo F. 1997. Effects of *Lentinula edodes*, *Grifola frondosa* and *Pleurotus ostreatus* administration on cancer outbreak, and activities of macrophages and lymphocytes in mice treated with a carcinogen, N-butyl-N-butanolnitrosamine. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 19, 175-183.
- Lee B.C., Bae J.T., Pyo H.B., Choe T.B., Kim S.W., Hwang H.J., Yun J.W. 2003. Biological activities of the polysaccharides produced from submerged culture of the edible Basidiomycete *Grifola frondosa*. *Enzyme and Microbial Technology*, 32, 574-581.
- Lee B.C., Bae J.T., Pyo H.B., Choe T.B., Kim S.W., Hwang H.J. Won J., Yun J.W. 2004. Submerged culture condition for the production of mycelial biomass and exopolysaccharides by the edible Basidiomycete *Grifola frondosa*. *Enzyme and Microbial Technology*, 35, 369-376.
- Lee J.S., Park S.Y., Thapa D., Choi M.K., Chung I.M., Park Y.J., Yong C.S., Choi H.G., Kim J.A. 2010. *Grifola frondosa* water extract alleviates intestinal inflammation by suppressing TNF-alpha production and its signaling. *Experimental Molecular Medicine*, 42, 143-154.
- Lee J.S., Kohsuke O., Watanabe O., Hara H., Ishizuka S. 2011. Immunomodulatory effect of mushrooms on cytotoxic activity and cytokine production of intestinal lamina propria leukocytes does not necessarily depend on  $\beta$ -glucan contents. *Food Chemistry*, 126, 1521-1526.
- Lin E.S. 2010. Submerged Culture Medium Composition for the Antioxidant Activity by *Grifola frondosa* TFRI1073. *Food Science and Biotechnology*, 19, 917-922.
- Lin J.T., Liu W.H. 2006. O-orsellinaldehyde from the submerged culture of the edible mushroom *Grifola frondosa* exhibits selective cytotoxic effect against Hep 3B cells through apoptosis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 7564-7569.

- Lino K., Ohno N., Suzuki I., Miyazaki T., Yadomae T. 1985. Structural characterization of a neutral antitumor Beta-glucan extracted with hot sodium hydroxide from cultured fruit bodies of *Grifola frondosa*. *Carbohydrate Research*, 141, 111-119.
- Manohar V., Talpur N.A., Echard B.W., Liberman S., Preuss H.G. 2002. Effects of a water-soluble extract of Maitake mushroom on circulating glucose/insulin concentration in KK mice. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 4, 43-48.
- Martin F., Delaruelle C., Hilbert J.L. 1990. An improved ergosterol assay to estimate fungal biomass in ectoycorrhizas. *Mycological Research*, 94,1059-1064.
- Masuda Y., Kodama N., Nanba H. 2006. Macrophage J774.1 cell is activated by MZ-Fraction (Klasma-MZ) polysaccharide in *Grifola frondosa*. *Mycoscience*, 6, 360-366.
- Masuda Y., Matsumoto A., Toida T., Oikawa T., Ito K., Nanba H. 2009. Characterisation and antitumor effect of a novel polysaccharide from *Grifola frondosa*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 10143-10149.
- Matsui K., Kodama N., Nanba H. 2001. Effects of Maitake (*Grifola frondosa*) D-Fraction on the carcinoma angiogenesis. *Cancer Letters*, 172, 193-198.
- Mattila P., Lampi A.M., Ronkainen R., Tovio J., Piironen V. 2002. Sterol and Vitamin D<sub>2</sub> contents in some wild and cultivated mushrooms. *Food Chemistry*, 76, 293-298.
- Mayell M. 2001. Maitake extracts and their therapeutic potential-a review. *Alternative Medicine Review*, 6, 48-60.
- Mayuzumi Y., Mizuno T. 1997. Cultivation Methods Of Maitake (*Grifola Frondosa*). *Food Review International*, 13, 357-364.
- Mitchell D.A., Berovic M., Krieger N. 2000. Biochemical Engineering Aspects Of Solid State Bioprocessing. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 68, 61-138.
- Mizuno T., Ohsawa K., Hagiwara N., Kuboyama R. 1985. Fractionation, chemical structure, chemical modification and antitumor activity of homo- and hetero-glucans isolated from "Maitake", the fruiting body of *Grifola frondosa*. *Bulletin of the Faculty of Agriculture, Shizuoka University*, 35, 49-61.
- Mizuno T., Ohsawa K., Hagiwara N., Kuboyama R. 1986a. Fractionation and characterization of antitumor polysaccharides from Maitake *Grifola frondosa*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 50, 1679-1688.
- Mizuno T., Kawagishi H., Mizuno K. 1986b. Fractionation, characterization and formolysis of antitumor fibrous polysaccharides (non-cellulose) from "Maitake", the fruiting body of *Grifola frondosa*. *Bulletin of the Faculty of Agriculture, Shizuoka University*, 36, 85-91.

- Nanba H., Hamaguchi A., Kuroda H. 1987. The chemical structure of an antitumor polysaccharide in fruit bodies of *Grifola frondosa* (Maitake). *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 35, 1162–1168.
- Nanba H. 1995. Activity of maitake D-fraction to inhibit carcinogenesis and metastasis, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 768, 243-245.
- Nanba H., Kubo K. 1997. Effect of Maitake D-fraction on cancer prevention. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 833, 204-207.
- Nanba H., Kubo K. 1998. Antitumor substance extracted from *Grifola*. US Patent #5854404.
- Nanba H., Kodama N., Schar D., Turner D. 2000. Effects of *G. frondosa* (*Grifola frondosa*) glucan in HIV-infected patients. *Mycoscience*, 41, 293-295.
- Nielsen J. 2006. Microbial process kinetics. V: Basic biotechnology 3rd edition, Ratledge C., Kristiansen B. (Ur.). Cambridge University Press, Anglija.
- Nishiwaki T., Asano S., Ohyama T. 2009. Properties and substrate specificities of proteolytic enzymes from the edible basidiomycete *Grifola frondosa*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 107, 605-609.
- Nishiwaki T., Hayashi K. 2001. Purification and Characterization of an Aminopeptidase from the Edible Basidiomycete *Grifola frondosa*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2, 424-427.
- Nishiwaki T., Yoshimizu S., Furuta M., Hayashi K. 2002. Debitting of enzymatic hydrolysates using an aminopeptidase from the edible basidiomycete *Grifola frondosa*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 93, 60-63.
- Nyuland J.E., Wallander H. 1992. Ergosterol analysis as a means of quantifying mycorrhizal biomass. *Methods in Microbiology*, 24, 77-88.
- Ohno N., Suzuki I., Oikawa S., Sato K., Miyazaki T. & Yadomae T. 1984. Antitumor activity and structural characterization of glucans extracted from cultured fruit bodies of *Grifola frondosa*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 32, 1142–1151.
- Ohno N., Suzuki I., Sato K., Oikawa S., Miyazaki T., Yadomae T. 1985. Purification and structural characterization of an antitumor Beta-1,3-glucan isolated from hot water extract of the fruit body of cultured *Grifola frondosa*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 33, 4522-4527.
- Ohno N., Adachi Y., Suzuki I., Sato K., Oikawa S., Yadomae T. 1986a. Characterization of the antitumor glucan obtained from liquid-cultured *Grifola frondosa*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 34, 1709–1715.

- Ohno N., Adachi Y., Suzuki I., Oikawa S., Sato K., Suzuki Y., Ohsawa M., Yadomae T. 1986b. Two different conformations of antitumor glucans from *Grifola frondosa*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 34, 2555–2560.
- Ohno N., Hayashi M., Lino K., Suzuki I., Oikawa S., Sato K., Suzuki Y., Yadomae T. 1986c. Effect of glucans on the antitumor activity of Grifolan. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 34, 2149–2154.
- Park J.P., Kim S.W., Hwang H.J., Cho Y.J., Yun J.W. 2002a. Stimulatory effect of plant oils and fatty acids on the exo-biopolymer production in *Cordyceps militaris*. *Enzyme and Microbial Technology*, 31, 250-255.
- Park J.P., Kim Y.M., Hwang H.J., Cho Y.J., Lee Y.S. 2002b. Effect of aeration rate on the mycelial morphology and exo-biopolymer production in *Cordyceps militaris*. *Process Biochemistry*, 37, 1257-1262.
- Pöder R. 2005. The Ice man's fungus: facts and mysteries. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 7, 3, 357-359.
- Radic N., Jevnikar Z., Obermajer N., Kristl J., Kos J., Pohleven F., Strukelj B. 2010. Influence of Culinary-Medicinal Maitake Mushroom, *Grifola frondosa* (Dicks.: Fr.) S.F. Gray (Aphyllophoromycetidae) Polysaccharides on Gene Expression in Jurkat T Lymphocytes. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 12, 245-255.
- Reese E., Maguire A. 1969. Surfactants as stimulants of enzyme production by microorganisms. *Applied microbiology*, 17, 242-245.
- Ruan R.G., Ding L.C., Pan X.H., Chen H., Luo Y.F. 2006. Domestication and cultivation of *Pleurotus citrinopileatus* strain Ninghuang No. 16 on a substrate containing pine and fir sawdust. *Acta Edulis Fungi*, 13, 36-38.
- San Antonio J.P., Thomas R.L. 1972. Carbon dioxide stimulation of hyphal growth on the cultivated mushroom, *Agaricus bisporus* (Lange.) Sing. *Mushroom Science*, 8, 623-629.
- Schisler L.C., Volkoff O. 1997. The effects of Safflower oil on mycelial growth of Boletaceae in submerged liquid cultures. *Mycologia*, 69, 118-125.
- Shen Q., Royse D. 2001. Effects of nutrient supplements on biological efficiency, quality and crop cycle time of maitake (*Grifola frondosa*). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57, 74-78.
- Shen Q. 2002. Molecular phylogenetic analysis of *Grifola frondosa* (Maitake) and related species and the influence of selected nutrient supplements on mushroom yield, PhD Thesis. Pennsylvania State University, ZDA.

- Shigesue K., Kodama N., Nanba H. 2000. Effects of maitake (*Grifola frondosa*) polysaccharide on collagen-induced arthritis in mice. *Japanese Journal of Pharmacology*, 84, 293-300.
- Shih I.L., Chou B.W., Chen C.C., Wu J.Y., Hsieh C. 2008. Study of mycelial growth and bioactive polysaccharide production in batch and fed-batch culture of *Grifola frondosa*. *Bioresource Tecnology*, 99, 785-793.
- Shimaoka I., Kodama J., Nishino K., Itokawa Y. 1993. Purification of a copper binding peptide from the mushroom *Grifola frondosa* and its effects on copper absorption. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 4, 33-38.
- Shomori K., Yamamoto M., Arifuku I., Teramachi K., Ito H. 2009. Antitumor effects of a water-soluble extract from Maitake (*Grifola frondosa*) on human gastric cancer cell lines. *Oncology Reports*, 22, 615-620.
- Simčič S., Wraber B., Sollner M., Urleb U., Gobec S. 2000. Modulation of tumour necrosis factor production with desmuramyldipeptide analogues. *Pflügers Archiv*, 440, 64-66.
- Sinha J., Panda T. 1998. Comparative analysis of optimal endoglucanase production by *Trichoderma reesei* and intergeneric fusants of *Trichoderma reesei/Saccharomyces cerevisiae*. *Bioprocess Engineering*, 18, 261-265.
- Stamets P. 2000. Growing gourmet and medicinal mushrooms, Berkeley, California, Ten Speed Press.
- Stamets P. 2005. Mycelium running: How mushrooms can help save the world, Berkeley, California, Ten Speed Press.
- Stasinopoulos S., Seviour R. 1990. Stimulation of exopolysaccharide production in the fungus *Acremonium persicinum* with fatty acids. *Biotechnology and Bioengineering*, 36, 778-82.
- Stopinšek S., Ihan A., Wraber B., Tercej M., Salobir B., Rylander R., Simcic S. 2011. Fungal cell wall agents suppress the innate inflammatory cytokine responses of human peripheral blood mononuclear cells challenged with lipopolysaccharide *in vitro*. *International Immunopharmacology*, 11, 939-947.
- Stott K., Mohammed C. 2004. Speciality mushroom production systems: Maitake and morels. A report for the Rural Industries Research and Development Corporation, RIRDC Publication No. 04/024.
- Suzuki I., Hashimoto K., Oikawa S., Sato K., Osawa M., Yadomae T. 1989. Antitumor and immunomodulating activities of a beta-glucan obtained from liquid cultured *Grifola frondosa*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 37, 410-413.

- Suzuki Y., Adachi Y., Ohno N., Yadomae T. 2001. Th1/Th2-balancing immunomodulating activity of gel-forming (1-3)- $\beta$ -glucans from fungi. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 24, 811-819.
- Suzuki Y., Nishibori K., Oodaira Y., Kitamura S., Michigami K., Nagata K., Tatara Y., Lee B.R., Ichishima E. 2005. Grifolizin, a member of the sedolisin family produced by the fungus *Grifola frondosa*. *Phytochemistry*, 66, 983-990.
- Švigelj M., Berovič M., Boh B., Menard A., Simčič S., Wraber B. 2008. Solid-state cultivation of *Grifola frondosa* (Dicks: Fr) S.F. Gray biomass and immunostimulatory effects of fungal intra- and extracellular beta-polysaccharides. *New Biotechnology*, 25, 150-156.
- Tada R., Adachi Y., Ishibashi K., Ohno N. 2009. An unambiguous structural elucidation of a 1,3-[beta]-d-glucan obtained from liquid-cultured *Grifola frondosa* by solution NMR experiments. *Carbohydrate Research*, 344, 400-404.
- Takama F., Ninomiya S., Yoda R., Ishii H., Muraki, S. 1981. Parenchyma cells, chemical components of maitake mushroom (*Grifola frondosa* SF Gray) cultured artificially, and their changes by storage and boiling. *Mushroom Science*, 11, 767-779.
- Talpur N.A., Echard B.W., Fan A.Y., Jaffari O., Bagchi D., Preuss H.G. 2002. Antihypertensive and metabolic effects of whole Maitake mushroom powder and its fractions in two rat strains. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 237, 129-136.
- Tsoni S.V., Brown G.D. 2008. B-glucans and Dectin-1. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1143, 45-60.
- Van Griensven L. 2008. Mushrooms: Cause and cure. V: Proceedings of 6th International Conference of Mushroom Biology and Mushroom Products, Bonn, Nemčija.
- Wasser S.P. 2005. The Importance of Culinary-Medicinal Mushrooms from Ancient Times to the Present. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 3, 363-364.
- Wasser S.P. 2011. Current findings, future trends, and unsolved problems in studies of medicinal mushrooms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 5, 1323-32.
- Wu S., Zou D., Han S.H. 1994. Therapeutic effect of *Grifola* polysaccharides in chronic hepatitis B. V: International symposium on production and products of *Lentinus* mushroom, Zhejiang, Kitajska.
- Wu M.J., Cheng T.L., Cheng S.Y., Lian T.W., Wang L., Chiou S.Y. 2006. Immunomodulatory properties of *Grifola frondosa* in submerged culture. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 2906-14.
- Xu H., Liu J., Shen Z., Fei Y., Chen X.D. 2010. Analysis of chemical composition, structure of *Grifola frondosa* polysaccharides and its effect on skin TNF- $\alpha$  levels,

- IgG content, T lymphocytes rate and caspase-3 mRNA. *Carbohydrate Polymers*, 82, 687-691.
- Yamanaka K. 1997. Production Of Cultivated Edible Mushrooms. *Food Reviews International*, 13, 327-334.
- Yan J., Vetvicka V., Xia Y., Hanikyrova M., Mayadas T., Ross G.D. 2000. Critical role of Kupffer cell CR3 CD11b/CD18 in the clearance of IgM-opsonized erythrocytes or soluble  $\beta$ -glucan. *Immunopharmacology*, 46, 39-54.
- Yang F.C., Ke Y.F., Kuo S.S. 2000. Effect of fatty acids on the mycelial growth and polysaccharide formation by *Ganoderma lucidum* in shake flask cultures. *Enzyme and Microbial Technology*, 27, 295-301.
- Yang B.K., Gu Y.A., Jeong Y.T., Jeong H., Song C.H. 2007. Chemical characteristics and immuno-modulating activities of exo-biopolymers produced by *Grifola frondosa* during submerged fermentation process. *International Journal of Biological Macromolecules*, 41, 227-33.
- Yokokawa H. 1980. Fatty acid and sterol compositions in mushrooms of ten species of polyporaceae. *Phytochemistry*, 19, 2615-2618.
- Yuan J.P., Wang J.H., Liu X., Kuang H.C., Zhao S.Y. 2007. Simultaneous determination of free ergosterol and ergosteryl esters in *Cordyceps sinensis* by HPLC. *Food Chemistry*, 105, 1755-1759.
- Zaidman B.Z., Yassin M., Mahajna J., Wasser S.P.. 2005. Medicinal mushroom modulators of molecular targets as cancer therapeutics, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 67, 453-468.
- Zhang M., Cui S.W., Cheung P.C.K., Wang Q. 2007. Antitumor polysaccharides from mushrooms: a review on their isolation process, structural characteristics and antitumor activity. *Trends in Food Science & Technology*, 18, 4-19.
- Zhu Y. 2006. Health promoting diary and food products containin mushroom glucan produced through fermentation of *Grifola frondosa*. Patent EP 1709969 A1.
- Zhuang C., Mizuno T., Ito H., Shimura K. 1994. Chemical modification and antitumor activity of polysaccharides from the mycelium of liquid-cultured *Grifola frondosa*. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkai-Shi*, 41, 733-740.
- Zhuang C., Wasser S.P. 2004. Medicinal value of culinary-medicinal maitake mushroom *Grifola frondosa* (Dicks.:Fr.) S.F. Gray (*Aphyllphoromycetidae*). Review. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 6, 287-313.
- Zou X. Fed-batch fermentation for hyperproduction of polysaccharide and ergosterol by medicinal mushroom *Agaricus brasiliensis*. *Process Biochemistry*, 41, 970-974.