



Povzetek projekta Po kreativni poti do znanja 2017 – 2020, 3. odpiranje, za namen objave in predstavitve na spletni strani sklada

1. Polni naslov projekta: **Razvoj in uporaba ekstraktov glive *Cordyceps militaris***

- V katero področje na prvi klasifikacijski ravni **KLASIUS-P-16** se uvršča projekt glede na vsebinsko zasnovo (neustrezno področje izbrišite):

05 - Naravoslovje, matematika in statistika

2. V sodelovanju z: (navede se univerza oz. samostojni visokošolski zavod, ki je prijavil projekt in članica, ki je nosilka projekta ter partner/ja – podjetje/ji oz. organizacija, ki je/sta bilo/i vključeno/i v projekt)

Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo

MycoMedica d.o.o.

3. Besedilo:

- Opredelite problem, ki se je razreševal tekom izvajanja projekta

Pri izolaciji in pripravi različnih tipov učinkovin glive *Cordyceps militaris* se kot glavni problem pojavlja predvsem relativno nizka vsebnosti kordicepina, kot tudi prisotnost neželenih nečistoč, ki imajo lahko negativni vpliv na delovanje bio-aktivnih učinkovin oz. lahko celo povzročajo strupenost. Zaradi tega so izolacijski postopki, ki jih uporabljajo podjetja dragi in časovno zahtevni, poleg tega pa se kot stranski produkt proizvede velika količina odpadnega podgobja ter odpadnih kemikalij, organskih topil ter ionskih izmenjevalcev, ki se uporabljajo pri postopkih izolacije. Pri obdelavi materiala je bistvenega pomena izbira prave ekstrakcijske metode in primernih eksperimentalnih parametrov, ki imajo pomemben vpliv na učinkovitost. Mednje sodijo predvsem izbor topil, temperatura, pH, čas ekstrahiranja, intenzivnost in način mešanja ter mehansko mletje, ki vpliva na velikost delcev. Poleg tega je pri izolaciji pomemben tudi postopek čiščenja, pri čemer smo v okviru projekta raziskali različne možnosti uporabe in regeneracije ionskih izmenjevalcev oz. smol, ter raziskali tudi nove načine detekcije za namene določevanja kordicepina v realnih vzorcih ekstraktov glive *Cordyceps militaris*.

- Opišite potek reševanja problema oz. kratek povzetek projekta

Aktivnosti projekta lahko v grobem razdelimo na: predpripravo materiala, ekstrakcije, testiranje antioksidativnega delovanja, potenciometrične titracije, ionsko-izmenjalna kromatografija, molekulska fluorescenčna spektroskopija, proizvodnja bioplina, ter testiranje strupenosti proizvedenih ekstraktov.

Predpriprava materiala je potekala najprej preko sušenja podgobja glive *Cordyceps militaris* pri povišani temperaturi, temu je sledilo mletje na ustrezno velikost delcev s pomočjo posebnih mešalnikov z rezili, ter naknadna homogenizacija suhih in zmeltih delcev. Ekstrakcije smo izvajali pod refluxom s pomočjo naprave z grelci in hladilniki z vodnim hlajenjem. Končne izvlečke smo dobili po koncentriranju s pomočjo odparevanja topila (20% raztopina etanola v vodi) na rotacijskem uparjalniku (t.i. rotavaporju) pri znižanem tlaku.

Za študijo protimikrobnega učinka ekstraktov smo uporabili standardizirane teste za določevanje vrednosti MIK (minimalne inhibitorne koncentracije), in MBK (minimalne baktericidne koncentracije), ki smo jo testirali na različnih vrstah bakterij: *S. aureus*, *E. coli*, *L. monocytogenes*, *C. jejuni* in *B. subtilis* preko dodatka ravnega indikatorja, stresanja, inkubacije in vizualnega določanja vrednosti MIK ter MBK. Za določanje vrednosti MIK smo poleg tega uporabili tudi spektrofotometrično metodo z merjenjem absorbance pri valovni dolžini 600 nm. Potenciometrične titracije standarda kordicepina smo izvajali s pomočjo avtomatsko-vodenega titratorja proizvajalca Metrohm preko programske opreme Tinet. Za postopno dodajanje raztopin NaOH in HCl smo uporabljali birete z različnimi nominalnimi volumni – od 1 mL do 50 mL. Izbor smo prilagajali zahtevani natančnosti in pričakovani porabi reagentov pri posameznih eksperimentih. Ionsko izmenjavo smo izvajali na 100 mL stekleni koloni, ki smo jo napolnili z ustreznim ionskim izmenjevalcem, pri čemer smo testirali Dowex 50W-X8 ter smolo tipa NKA-II. Za spiranje in regeneracijo kolon smo uporabljali raztopini HCl in NH₃ ustreznih koncentracij. Teste z molekularno fluorescenčno spektroskopijo smo izvajali v 1 cm kvarčnih kivetah na fluorescenčnem spektrometru Cary Eclipse, proizvajalca Varian, medtem ko smo teste strupenosti ekstraktov glive *Cordyceps militaris* določili na vodnih bolhah vrste *Daphia magna*.

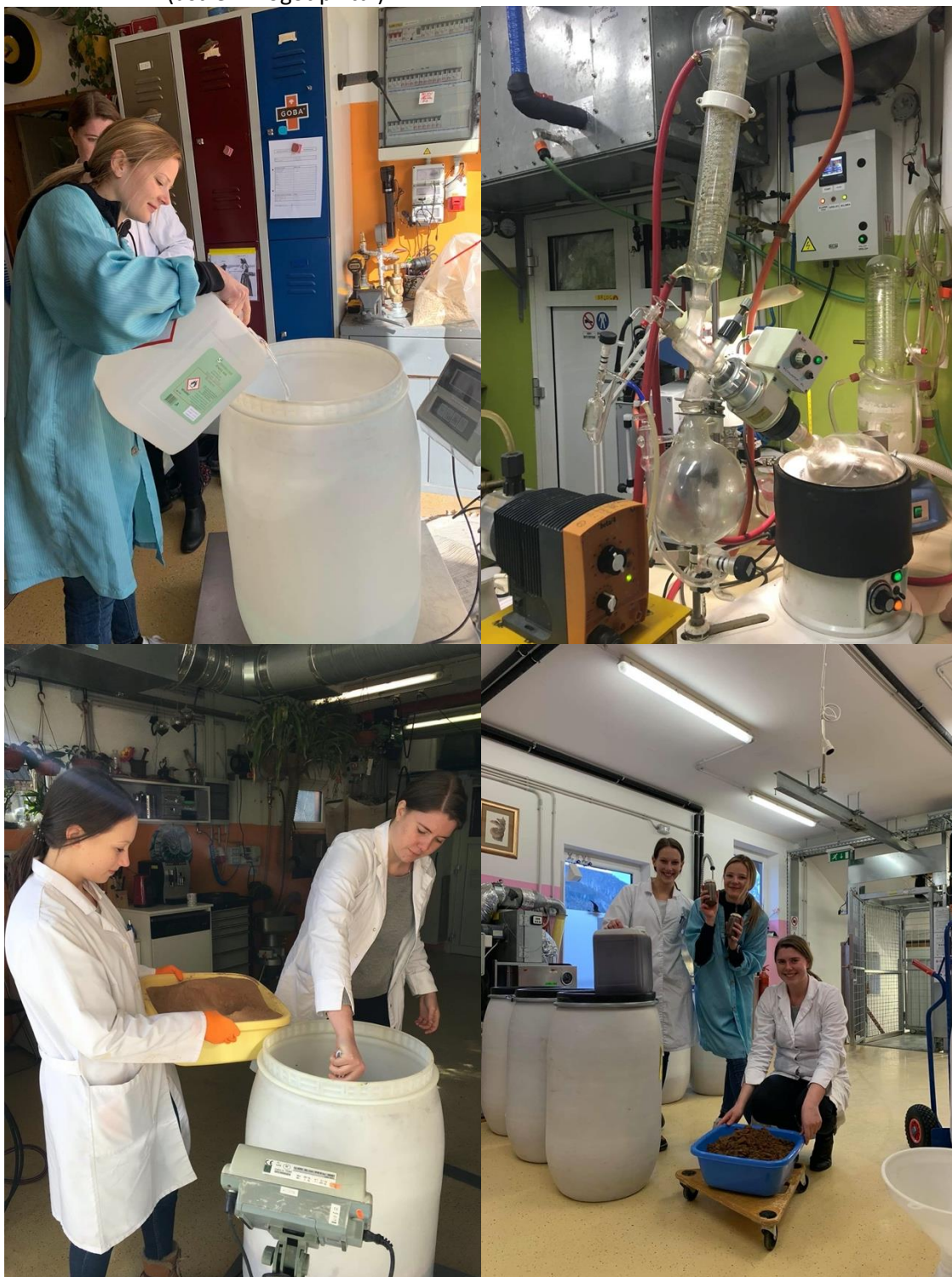
- Navedite in opišite rezultate projekta ter njihov doprinos k družbeni koristnosti

Rezultati izboljšane predpriprave materiala in izolacije ekstraktov kažejo na mnogokratno zmanjšanje količine materiala, ki ga dobimo po ekstrakciji in odparevanju topila, s čimer pripomoremo k večji učinkovitosti in poenostavitvi iz zmanjšanju stroškov transporta in shranjevanja materiala v primerjavi z izhodnim podgobjem glive *Cordiceps militaris*. Testi protimikrobnega učinkovanja MIK ter MBK so pokazali različne rezultate na različnih vrstah bakterij, in sicer je zaznati najnižje vrednosti in najvišjo učinkovitost delovanja pri vrsti *C. jejuni* (MIK = 3,75 mg/mL, MBK = 7,5 mg/mL), medtem ko smo najvišje vrednosti in posledično najmanjši vpliv ekstraktov določili pri vrsti *B. subtilis* (MIK > 80 mg/mL, MBK > 80 mg/mL). Iz titracijskih krivulj, pridobljenih s potenciometričnimi titracijami, sta za kordicepin razvidna dva intenzivna prehoda, in sicer pri pH 3,5 in pH 12. Pri prvi ekvivalentni točki poteka detekcija brez težav, medtem ko se pri drugi zaradi relativno visokega pH že pojavljajo težave z detekcijo, ki pa je vsaj delno možno rešiti s pomočjo izbire alkalijevega hidroksida z višjo koncentracijo. Rezultati eksperimentov na ionski kromatografiji kažejo velik potencial za uporabo v realnih proizvodnjah, kjer je cilj izolacija kordicepina. Pri tem je z uporabo pravilnega postopka čiščenja uporabljena kolono oz. izmenjevalec/smolo možno regenerirati in stem znižati stroške ter količino odpadnega materiala. Raziskave z molekularno fluorescenčno spektroskopijo kažejo potencialne možnosti za uporabo kot alternativo dražji tekočinski kromatografiji, vendar je pred tem potrebno znižati meje detekcije. Medtem ko proizvodnja bioplina ni dala obetajočih rezultatov in uporaba podgobja za proizvodnjo bioplina ne kaže večjega potenciala, pa so se je na drugi strani testi strupenosti ekstraktov glive *Cordyceps militaris* izkazali za relativno visoko, kar kaže na to, da so v ekstraktih prisotne primesi, ki lahko delujejo toksično na izbrane vodne organizme in je zato potrebna previdnost pri rokovanju z odpadnim materialom, ki nastane v okviru proizvodnje ekstraktov.

4. Priloge:

- Slikovno gradivo: Priložite vsaj dve sliki npr. sliko končnega produkta, sliko študentov pri delu na projektu, sliko s sestankov ipd. Pri pošiljanju slik bodite pozorni, v kolikor

gre za končni produkt, da bo zadoščeno zahtevam glede informiranja in obveščanja (ustrezni logotipi itd.).



Slika 1. Delov študentov v laboratoriju podjetja Mycomedica d.o.o. – Izvajanje ekstrakcije glive *Cordyceps militaris*.



Slika 2. Končni ekstrakti glive *Cordyceps militaris*.



Slika 3. Delo študentov v analitskem laboratoriju (levo) in centrifugiranje vodnih suspenzij ekstraktov (desno).