

Struktur- og aktivitetsstudier av polysakkarider isolert fra fåresopp (*Albatrellus ovinus*)

Liubov Teveleva



Masteroppgave for graden Master i farmasi
Avdeling for farmasøytisk kjemi

45 studiepoeng
Farmasøytisk institutt

Det matematisk-naturvitenskaplige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

Mai 2017

Masteroppgave for graden Master i farmasi
Avdeling for farmasøytisk kjemi
Farmasøytisk institutt
Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

Universitetet i Oslo

Liubov Teveleva

Mai 2017

Veileder: Anne Berit Samuelsen

Lise Berven

Anna Armika Tussilago Nyman

© Lioubov Teveleva

2017

Struktur- og aktivitetsstudier av polysakkarider isolert fra fåresopp (*Albatrellus ovinus*)

Lioubov Teveleva

<http://www.duo.uio.no/>

Trykk: Representeren, Universitetet i Oslo

SAMMENDRAG

Bakgrunn: Sopp er kjent over hele verden på grunn av sine ernæringsmessige og farmasøytiske (antitumor, antioksidative, hypotensive, leverprotektive, kolesterolsenkende, antifibrotiske, antidiabetiske, antimikrobielle, antivirale og anty-inflomatoriske) egenskaper. Bioaktive forbindelser fra sopp med antitumor egenskaper er spesielt interessante. Disse egenskapene relateres vanligvis til beta-(1→3)(1→6)-bundne-glukaner. De virker via binding til beta-glukan-spesifikke reseptorer på makrofager, noe som fører til aktivering av adaptiv immunitet.

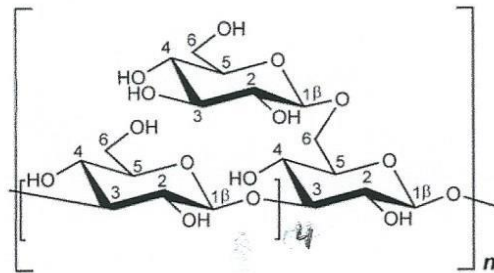
Albatrellus ovinus (fåresopp) er rik på celleveggmateriale, men lite studert fra før. En beslektet art av *Al. ovinus* (*Confluent polypore*) inneholder polysakkarider med antitumor aktivitet. Dermed er fåresopp en god kandidat til isolering av mulige bioaktive polysakkarider (inkludert beta-glukaner), karakterisering av deres struktur og undersøkelse av deres effekt på legumainaktivitet i RAW 264.7 makrofager.

Legumain er en asparginylendopeptidase som spalter spesifikt proteinsubstrater. Overekspressjon av legumain har blitt rapportert i flere krefttyper. På grunn av høye konsentrasjoner av legumain i svulstens mikromiljø, kan påvirkning av legumain være en mulig strategi for behandling av kreft. Derfor ble det testet i hvilken grad de isolerte polysakkarider fra *A. ovinus* påvirker legumainaktiviteten.

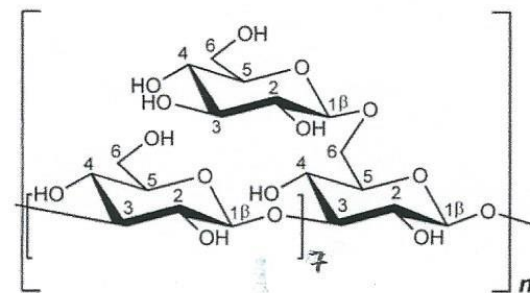
Metoder: Monosakkaridsammensetning, bindingsforhold og molekylvekt til vannekstrakt WAo (WAoF₁ og WAoF₂), samt alkaliekstrakter AAoS_w og AAoI_w ble bestemt ved metanalyse, NMR, GC MS, SEC kromatografi og affinitetskromatografi. For å forbedre løselighet av vannuløselig AAoI_w ble det forsøkt partiell syre hydrolyse. Begge alkali fraksjonene ble behandlet med alfa-amylase for å fjerne fra beta-glukaner alfa-(1→4)-bundne -D- glukoseenheter som ble oppdaget under strukturopklaring. I tillegg ble WAoF₁, AAoI_w, AAoS_w og deres alfa-amylase behandlede fraksjoner videre testet i hvilken grad de kan påvirke legumainaktivitet i RAW 264.7-makrofager som produserer legumain og uttrykker overflatereseptor Dectin-1, som spiller en viktig rolle i cellular respons for karbohydrater.

Resultater: Eksklusjonskromatografi av WAo viste to topper: WAoF₁ (M_w 251,0 kDa) som bestod av en alfa-(1 → 6)-bundet -D-galaktan med alfa-L-fukose i posisjon 2 på hver 3. galaktoseenhet og WAoF₂ (M_w 12,0 kDa) som inneholdt rester av fukogalaktan, beta - (1→ 3) -bundet D-glukan og alfa - (1→ 4)-bundet -D- glukkan med forgreningene i posisjon 6. Det

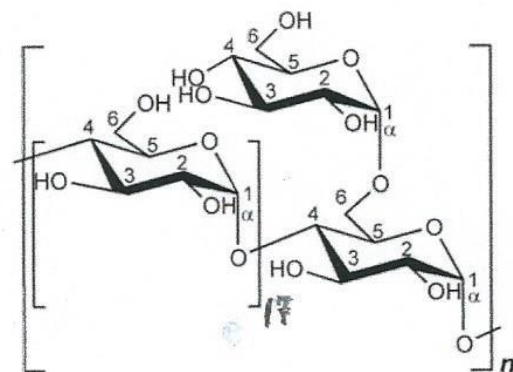
- beta-(1→3) bundet-D-glukan med enkle glukoseenheter (eller sidekjeder) i posisjon 6 på hver 5. glukoseenhet. Sidekjeder ikke vist.



- beta-(1→3) (1→6) bundet-D-glukan med enkle glukoseenheter (eller sidekjeder) i posisjon 6 på hver 8. glukoseenhet. Sidekjeder ikke vist.



- alfa-(1→4) (1→6) bundet -D-glukan med enkle glukoseenheter (eller sidekjeder) i posisjon 6 på hver 18. glukoseenhet. Sidekjeder ikke vist.



Det var nesten umulig å påvise i hvilken grad disse polysakkaridene fra *A. ovinus* kan påvirke legumainaktivitet i RAW 264.7-makrofager på grunn av mulig LPS kontaminasjon av analyserte prøver.

FORORD

Denne oppgaven ble utført ved Farmasøytisk institutt, det matematisk-naturvitenskapelige fakultet, Avdeling for farmasøytisk kjemi, faggruppe for farmakognosi under veiledning av Anne Berit Samuelsen, Lise Berven og Anna Armika Tussilago Nyman. Oppgaven ble startet august 2016 og avsluttet mai 2017.

Jeg vil først takke min hovedveileder Anne Berit Samuelsen for hennes inspirasjon, tålmodighet, moralsk støtte og god faglig veiledning gjennom helle oppgaven! Dette setter jeg veldig pris på! Jeg vil takke mitt andre veileder, Lise Berven, som også har vært en god veileder og gav meg en god erfaring med arbeid med cellelinjer. Jeg vil også takke min tredje veileder Anna Armika Tussilago Nyman for moralsk støtte, gode råd og hjelp på laben. De var alltid åpne for mine spørsmål, som var både gode og dumme. De svarte alltid s og de gav meg gode råd om hvordan jeg kan finne ut mer.

Jeg vil gjerne takke personalet fra hele tredje etasje for et utrolig godt forhold, godt humør, forståelse, vennlighet og involvering i det felles avdelingslivet.

Jeg vil spesielt takke:

Hoai Thi Nguyen for hennes hjelp med GC-analysen og GC-MS-analysen.

Sutajini Yogarajah for en god relasjon, hjelpsomhet på laben og for hennes gode humør.

Ellen Hanne Cohen: tusen takk for hjelpen gjennom hele masteroppgaven. Alle bestillinger som du tok for oss kom i tide, noe som var veldig viktig for ikke å bli stanset halvveis.

Kari Tvette Inngjerdingen for et utrolig godt forskningsforberedelseskurs som lettet det videre arbeidet. Du var alltid hjelpsom og snill!

Hilde Barsett som var utrolig hjelpsom og åpen til alle spørsmålene våre!

Jeg vil gjerne takke Margey Tadesse for hennes hjelp med GC, godt humør og ønske om å hjelpe!

Jeg vil takke Osamu Sekiguchi for hans hjelp med GC-MS-analysen og professor Frode Rise for hans hjelp med NMR analysen.

Jeg vil også takke min venn Wafa Subhi for hennes støtte, hjelp, vennskap, våre diskusjoner underveis og for et utrolig fint år sammen.

I tillegg vil jeg takke dere jeg delte kontorplass med.

Til slutt vil jeg takke min mann Kjell Bjørn Nordal som holdt ut med meg i denne perioden, støttet med, hjalp med råd og tålte min frustrasjon. Jeg vil også takke sønnen min Hans Kristian Nordal som gav meg mulighet til å utføre studien og å skrive masteroppgaven, for han smil og hans energi!

Takk til hele avdelingen for farmakognosi for at dere alle var gode mot meg og for at dere gjorde det siste året på farmasistudien til et utrolig interessant og erfaringsrikt år!

Mai, 2017

INNHOLDSFORTEGNELSE

SAMMENDRAG	5
FORORD.....	8
INNHOLDSFORTEGNELSE	10
1. FORKORTELSER	13
2. INNLEDNING	17
2.1. SOPP.....	17
2.1.1. Medisinske sopp og deres virkestoffer	18
2.1.2. Polysakkarider i soppcelleveggen	19
2.1.3. Polysakkarider i sopp	20
2.1.4. Struktur og biologisk aktivitet av sopp polysakkarider.....	23
2.2. IMMUNOLOGI.....	25
2.2.1. Makrofager	25
2.2.2. RAW 264.7.....	26
2.2.3. Legumain.....	26
2.2.4. Mekanismer av antitumor og immunomodulerende aktivitet av sopp polysakkarider.	27
2.3. <i>ALBATRELLUS OVINUS</i>	29
2.3.1. Taksonomisk klassifisering	29
2.3.2. Botanikk og habitat	30
2.3.3. Kjemiske forbindelser og polysakkarider	30
2.3.4. Tidligere studier av <i>Albatrellus ovinus</i>	32
3. OPPGAVENES MÅL	33
4. MATERIALER OG METODER	34
4.1. Isolering av polysakkarider fra <i>A.ovinus</i>	34
4.2. GENERELLE METODER.....	36
4.2.1. Vannkvalitet	36
4.2.2. Innveiing.....	36
4.2.3. Filtrering.....	36
4.2.4. Måling av pH.....	36
4.2.5. Frysetørking	37
4.2.6. Sentrifugering.....	37

4.2.7.	Inndamping av løsninger	38
4.2.8.	Avgassing av løsninger	38
4.2.9.	Oppbevaring av vandige løsninger av polysakkarider	38
4.2.10.	Syrevask av glassutstyr	38
4.3.	KVANTITATIV OG KVALITATIV MONOSAKKARID BESTEMMELSE	40
4.3.1.	Metanolyse og TMS-derivatisering	40
4.3.1.1.	Metanolyse	40
4.3.1.2.	TMS-derivatisering	41
4.3.1.3.	Gasskromatografi	43
4.4.	STRUKTUROPPKLARING	46
4.4.1.	Kjemisk derivatisering med følgende reduksjon og acetylering. Identifisering ved GC-MS.	46
4.4.1.1.	Metylering	46
4.4.1.2.	Hydrolyse	48
4.4.1.3.	Reduksjon	49
4.4.1.4.	Acetylering	50
4.4.1.5.	GC-MS	52
4.4.2.	Molekylvekt bestemmelse med tillegg av standardkurver	54
4.4.3.	Kjernemagnetisk resonansspektroskopi	59
4.4.4.	Affinitetskromatografi	60
4.4.4.1.	Con A Sepharose 4B	61
4.4.5.	Alfa-amylase behandling	64
4.4.5.1.	Alfa-Amylase	64
4.4.5.2.	Jod-jod-kalium test	65
4.4.6.	Partiell hydrolyse	66
4.5.	IMMUNOMODULERENDE AKTIVITET	68
4.5.1.	Celleforsøk	68
4.5.1.1.	Celledyrking	68
4.5.1.2.	Splitting av celler	69
4.5.1.3.	Celletelling	70
4.5.1.4.	Utsåing av celler	70
4.5.1.5.	Stimulering prøver med polysakkarider av <i>A. ovinus</i>	71
4.5.1.6.	Lysering av celler	71

4.5.1.7.	Måling av legumainaktivitet	72
4.5.1.8.	Måling av totalprotein	74
5.	RESULTATER	75
5.1.	STRUKTUROPPLARING	75
5.1.1.	Kvalitativ og kvantitativ monosakkaridbestemmelse	75
5.1.2.	Karakterisering av bindingsforhold	77
5.1.3.	Molekylvekt bestemmelse	80
5.1.3.1.	TSK-Gel® G3000PW _{XL}	83
5.1.3.2.	TSK-Gel® G5000PWXL	86
5.1.4.	Affinitetskromatografi	90
5.1.4.1.	Con A Sepharose 4B	90
5.1.5.	Alfa-amylase behandling	92
5.1.5.1.	TSK-Gel® G3000PW _{XL}	95
5.1.5.2.	TSK-Gel® G5000PWXL	101
5.1.6.	Partiell hydrolyse	106
5.1.6.1.	TSK-Gel® G5000PWXL	108
5.1.7.	Kjernemagnetisk resonansspektroskopi	111
5.2.	IMMUNOMODULERENDE AKTIVITET	113
5.2.1.	Stimulering av RAW 246.7-celler og måling av legumain aktivitet	113
6.	DISKUSJON	118
6.1.	WAoF ₁	118
6.2.	WAoF ₂	122
6.3.	AAoS _w	124
6.4.	AAoI _w	126
7.	KONKLUSJON	130
8.	MULIGHET TIL VIDERE STUDIER	131
9.	REAGENSELISTE	132
10.	LITTERATURLISTE	134

1. FORKORTELSER

AAoSw	Alkali Albatrellus ovinus Soluble water extract
AAoIw	Vannløselig alkali ekstrakt av <i>A. ovinus</i>
AAoSwAB	Alfa amylase behandlet fraksjon av AAoSw (bunnfall)
AAoSwAS	Alfa amylase behandlet fraksjon av AAoSw (supernatant)
AAoIwAB	Alfa amylase behandlet fraksjon av AAoIw (bunnfall)
AAoIwAS	Alfa amylase behandlet fraksjon av AAoIw (supernatant)
AAoIw 1-1	Partiell hydrolysert AAoIw etter 1 time
AAoSw 1-1	Partiell hydrolysert AAoSw etter 1 time (løselig og uløselig fraksjonene)
AG-II	Type II arabinogalaktan
Akt	Proteinkinase B
<i>A. ovinus</i>	<i>Albatrellus ovinus</i>
AEP	Asparginylendopeptidase
AHCC	Aktiv heksose korrelerte forbindeler
BSA	Bovin serum albumin
BRMs	Biological response modifiers
CD	Klaster av differensiering
CR1	Komplement reseptor 1
CR3	Komplement reseptor 3
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate hydrate
Con A	Concanavalin
CTL	Cytotoksiske T-lymfocytter
DCM	Diklormetan
DMSO	Dimetylsulfoksid
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle medium
DTT	Ditiotretiol
EAo	Et etanolekstakt av <i>A. ovinus</i>
EtOH	Etanol
ERK ½	Ekstracellulære signalregulert kinase ½
FID	Flammeionisasjonsdetektor
Fuc	Fukose

FBS	Fetal bovint serum
Gal	Galaktose
Gsk3	Glykogensyntase kinase 3- β
GM-CSF	Granulocytt-makrofag koloni stimulerende faktor
GC	Gasskromatografi
GC-MS	Gasskromatografi-massespektrometri
Glc	Glukose
GL	(1,3)(1,4)- β -Glukan ; Molecular Weight Standarts
HPLC	High pressure liquid chromatography (væskekromatografi)
H ₂ O ₂	Hydrogenperoksid
IFN- γ	Interferon γ
IFN-c	Interferon c
IL	Interleukin
Is	Internstandart
JNK	c-Jun N-terminal kinase
JNK 1/2	Jun N-terminal kinase 1/2
kV	Kolonnevolum
LAF-benk	Benk med vertikal laminær luftstrøm
LPS	Lipopolysakkarid
Man	Mannose
Mp	Toppmolekylvekt
Mw	Molekylvekt (størrelsen av polysakkaridkjeder), Da
Mn	Molekylvekt (lengden av polysakkaridkjeder), Da
M-CSF	Makrofag koloni stimulerende faktor
M ₁ makrofager	Klassisk aktiverte makrofager
M ₂ makrofager	Makrofager som involvert i stimulering av tumor utvikling (alternative aktiverte)
MAPK	p38mitogenaktivert protein kinase
MHC II	Major histocompatibility complex klasse II
MMP	Matrix metalloproteinase
NMR	Nuclear magnetic resonance

NFkappaB	Nuklear faktor – kB
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PMB	Polymyxin B
PAK	p21-aktivert kinase
PI3K	Phosphatidylinositol-3 kinase
PAMPs	Pathogen-associated molecular patterns
PTK	Protein-tyrosin-kinase
P ₂ O ₅	Fosfor(V)pentoksid
PS	Fosfatidylserine reseptor
PRR	Pattern recognition receptor
PBS	Natrium fosfat buffer
Pd	Polydispersitetsindeks
PL	Pullulanstandarder
PMAA	Partially methylated alditol acetates
P/S	Penicillin Streptomycin
ROS	Reaktive oksygen species
Rac 1	Ras-relaterte C3 botulinum toxin substrat 1
Rpm	Runder per minutt
ROS	Reaktive oksygen species
SEC	Size-exclusion chromatography, eksklusjonskromatografi
SR4	Scavenger reseptor 4
Src	Proto-onkogen protein kinase
TMS	Trimetylsilyll
TLR	Toll- like reseptor
TFA	Trifluoreddiksyre
TSP	Trimetylsilyl propanylsyre
TNF-alfa	Tumor nekrosefaktor alfa
VEGF	Vaskulær endotelial vekstfaktor
WAO	Water extract Albatrellus ovinus
WAO _{F1}	Water extract Albatrellus ovinus Fraction 1
WAO _{F2}	Water extract Albatrellus ovinus Fraction 2

W AoF ₂ AB	Water extract Albatrellus ovinus Fraction 2 Amylase treated (sediment)
W AoF ₂ AS	Water extract Albatrellus ovinus Fraction 2 (supernatant)
W AoAB	Water extract Albatrellus ovinus Amylase treated (sediment)
W AoAS	Water extract Albatrellus ovinus Amylase treated (supernatant)
Xyl	Xylose

2. INNLEDNING

2.1. SOPP

Det er anslått at det finnes rundt 140 000 sopparter på Jorden og bare 10 % av dem er studert (Hawksworth, 2001; Wasser, 2002).

Sopp, eller Fungi (Mycota) er et rike av heterotrofe eukaryote organismer som er avhengig av organisk næring og mangler klorofyll. Mange av dem er bygget opp av hyfer. Hyfeveggen består normalt av kitin og glukosan. Glykogen er oftest opplagsnæring. Hyfemasse danner ofte mycel (et forgrenet nettverk) (Dey *et al.*, 1996).

Ifølge utviklingshistorikken har soppriket felles rot med dyreriket. Det finnes noen likheter mellom sopp og dyr. Et eksempel glykogen (stivelse hos dyr) som opplagsnæring og kitin som strukturelt element i soppcelleveggen (Rayner *et al.*, 1987; Fambrough, 1994). Kollagen (et strukturprotein) er funnet både i sopp og i dyreriket (Celerin *et al.*, 1996).

Utrykket «sopp» i biologien inkluderer ikke bare storsopp, men også mugg, mikrosporidier, gjær, alge-, koblings- og trådsopesopp. Utrykket «sopp», som det brukes i det vanlige liv, er ikke en biologisk definisjon. I følge Chang og Miles kan sopp defineres som makrofungi med karakteristiske fruktlegemer som kan være epigeous (fruktlegemer over bakken) eller hypogeous (underjordiske fruktlegemer) og godt synlige for det blotte øye for å bli plukket for hånd (Chang & Miles, 1992). Makrofungi med karakteristiske fruktlegemer hører vanligvis til klassen av Basidiomyceter (stilksporesopper) og noen ganger Ascomyceter (sekksporesopper).

Sopp har lenge vært en svært velsmakende og næringsrik mat i mange samfunn over hele verden. For de gamle kinesere var sopp «livets eliksir». De gamle romerne betraktet sopp som «mat fra Guder» og de tidligere egypterne gav sopp navnet «Gave fra Gud Osiris». Mange gamle samfunn brukte de hallusinogene egenskapene fra enklere sopper (*Amanita muscaria* og *Psilocybe spp.*) i sin religiøse praksis (Samorini, 2001; Rogers, 2011). I våre dager benyttes sopp fortsatt som mat i ulike deler av verden på grunn av sitt innhold av karbohydrater, aminosyrer, mineraler og proteiner (Elsayed *et al.*, 2014; Hyde *et al.*, 2010; Kalač, 2013; Wang & Marcone, 2011).

Mange sopp brukes fortsatt i folkemedisin, spesielt i Kina, Japan, Afrika og Russland, siden de inneholder mange bioaktive metabolitter med høy medisinsk verdi (polysakkarider, proteoglykaner, terpenoider, fenoliske forbindelser, steroider og lektiner) (Hobbs, 1995;

Rogers, 2011; He *et al.*, 2012). Ekstrakter av sopp har blitt brukt i medisin på grunn av sine egenskaper: i) immunomodulatoriske (Enshasy, 2011; Yamanaka *et al.*, 2012; Han *et al.*, 2011; El Enshasy & Hatti-Kaul, 2013; Lee *et al.*, 2004; Chanput *et al.*, 2012; Leung *et al.*, 2006), ii) antitumor (Sliva *et al.*, 2012; Zong *et al.*, 2012; Moradali *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2007; Meng *et al.*, 2016; Singdevsachan *et al.*, 2016; Borchers *et al.*, 1999; Reshetnikov & Tan, 2001; Ren *et al.*, 2012), iii) antidiabetiske (Kim *et al.*, 2005), iv) antioksidative (Kao *et al.*, 2012; Mu *et al.*, 2012), v) antimikrobielle og antivirale (Janakat *et al.*, 2004) og vi) kolesterolsenkende (Guillamón *et al.*, 2010). På grunn av disse egenskapene brukes fortsatt sopp som en viktig komponent i mange tradisjonelle kinesiske medisiner og etter dem ble begrepet «medisinsk sopp» kjent over hele verden.

2.1.1. Medisinske sopp og deres virkestoffer

Kreft er en av hovedårsakene til død over hele verden. Sopp som er effektive i behandlingen av kreft tilhører klassen Basydiomyceter, og noen ganger Ascomyceter. Mest kjente av dem er *Ganoderma lucidum*, *Griflola frondosa*, *Lentinus edodes*, *Coriolus versicolor* (*Trametes versicolor*, *C. versicolor*, *T. versicolor*), *Pleurotus Ostreatus* (*P. ostreatus*), *Agaricus blazei* *Murrill*, *Flammulina velutiper* og *Inonotus obliquus*.

Polysakkarider representerer den største klassen av bioaktive forbindelser med antitumor egenskaper som finnes i sopp (Wasser, 2002; Reshetnikov & Tan, 2001). Modulering av immunforsvaret skjer gjennom aktivering av makrofager og T-celler som fører til produksjon av cytokiner inkludert interleukiner, som for eksempel tumornekrosefaktor-alfa (TNF-alfa) (Elsayed *et al.*, 2014; Zambonelli & Bonito, 2013; Borchers *et al.*, 1999).

Polysakkarider fra *G. lucidum* har forebyggende virkning mot kolon adenom, kolonadenokarsinom (Kashimoto *et al.*, 2006). Grifolan, som ble isolert fra *G. frondosa*, utviser antitumoraktivitet i gastrointestinale, lunge-, lever- og brystkreft (Kodama *et al.*, 2002; Poucheret *et al.*, 2006). Grifolan aktiverer makrofager og forsterker dermed cytokinproduksjon. I tillegg øker grifolan uttrykket av IL-6, IL-1 og TNF-alfa av makrofager (Adachi *et al.*, 1994). En annen viktig antitumor polysakkarid som er kjent i hele verden er letinan. Letinan ble isolert fra *L. edodes*. Letinan viser en sterk anti-kreft aktivitet via aktivering av det humane immunforsvaret (Zhang *et al.*, 2011).

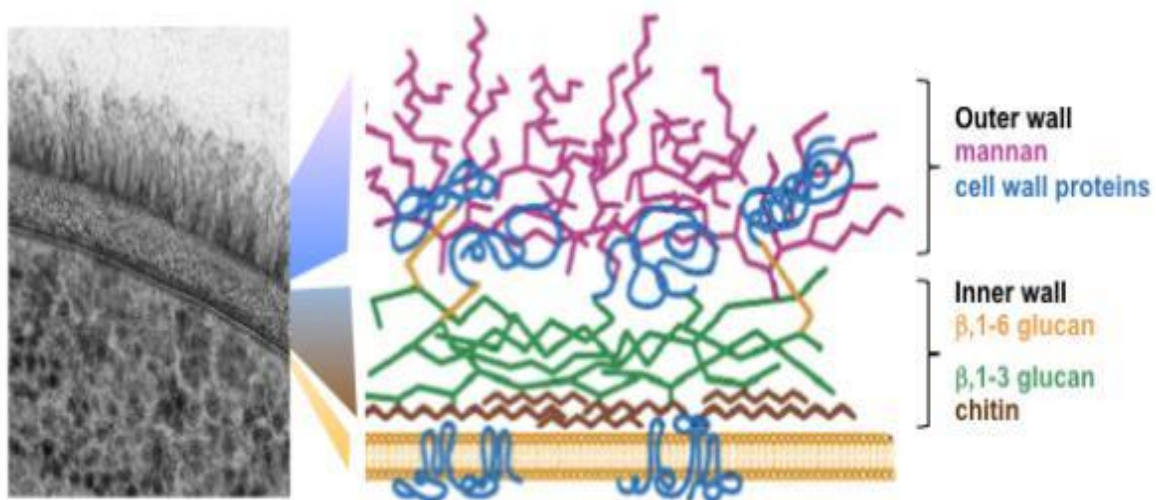
Schizophyllan, som ble isolert fra *S. commune*, virker mot S-180-svulster og forlenger overlevelse hos pasienter med hodekreft (Komatsu *et al.*, 1969; Borchers *et al.*, 1999).

Sekundære metabolitter fra sopp som laktoner, terpenoider, alkaloider og metallkelateringsmidler er også viktige for organismenes immunfunksjon. I tillegg inneholder medisinske sopp et antall enzymer som spiller en viktig rolle i kreftbehandling ved å forhindre oksidativt stress og ved å hemme cellevekst (Zaidman *et al.*, 2005)

2.1.2. Polysakkarider i soppcelleveggen

I sopp befinner størstedelen av polysakkaridene seg i celleveggen. Soppcelleveggen er et fysisk stivt lag som har en hovedfunksjon å beskytte soppcellen fra patogener og andre miljøfaktorer, mediere celle-interaksjon og danne cellens form (Fontaine *et al.*, 2000; Bowman & Free, 2006).

Soppcelleveggen består av glykoproteiner (mannoproteiner) og polysakkarider (glukan og kitin). Glukankomponenten består av lange lineære kjeder beta-(1 → 3) - bundne glukoseenheter (65 %) med noe beta-(1 → 6) -bundet glukose til stede. Kitin består av (1 → 4) beta bundet N-acetylglukosaminenheter og finnes i celleveggen i mindre grad enn glukan eller glykoprotein. Sammensetningen av celleveggen varierer for forskjellige sopparter og vekstfaser (Dalonso *et al.*, 2015; Bowman & Free, 2006; Zhang *et al.*, 2007).



Figur 1. Oppbygging av *Candida albicans* celleveggen (Gow *et al.*, 2011)

Figur 1 viser at det ytre laget av celleveggen i *Candida albicans* består av O- og N-bundne mannoproteiner. Det indre laget består av polysakkaridnettverket og kitin. Polysakkaridnettverket inneholder beta-(1 → 3) - bundne glukoseenheter og en del av heteroglykaner (mannaner, galaktaner, xylaner med forskjellige monosakkarider i forgreninger) (Wasser, 2011; Zhang *et al.*, 2007). Disse lagene kobles sammen ved hjelp av

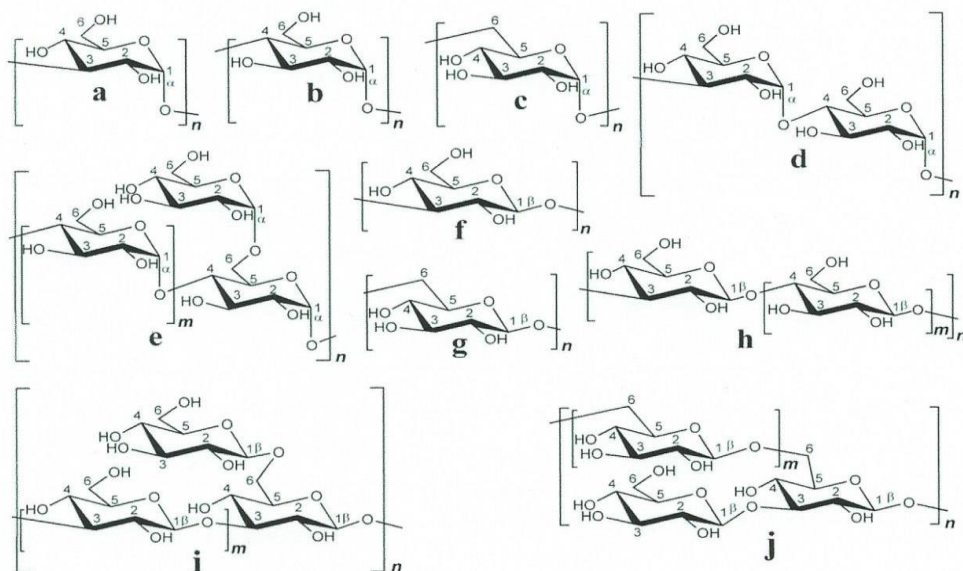
fleksible beta-(1→6) glukaner (Gow *et al.*, 2011; Hardison & Brown, 2012; Lee & Kim, 2014).

Det var også rapportert om tilstedeværelse av glykogen i cellevegg av *Saccharomyces cerevisiae* (Arvindekar & Patil, 2002). Glykogen er en alfa-glukan som består av alfa (1→4)- og (1→6) bundne -D- glukoseenheter. Den kan være vannløselig og vannuløselig avhengig av ekstraksjonsmetode (Trevelyan & Harrison, 1952). Vannuløselig glykogen er uløselig i vann på grunn av sin kovalente binding til beta-(1→3)-bundet-D-glukan i soppcellevegg gjennom beta- (1→6) bindingen. Dermed vil beta-(1→3)-bundet-D-glukan i soppcellevegg spille en rolle som basal matriks som holder kitin (Hartland *et al.*, 1994), mannan (Van Rinsum *et al.*, 1991) og glykogen gjennom kovalente bindinger (Arvindekar & Patil, 2002).

2.1.3. Polysakkarider i sopp

Polysakkarider er kondenserte polymerer hvor et stort antall monosakkarider er bundet sammen gjennom O-glykosid-bindinger (Ren *et al.*, 2012).

De viktige bioaktive polysakkarider i sopp er glukaner. Glukaner fra sopp er strukturelt forskjellige polymerer av D-glukopyranose (D-Glcp). Soppcelleveggen i mycel, fruktlegemer og andre deler av mikro- og makromycetter består av glukaner. Det finnes mange forskjellige



Figur 2. Struktur til glukaner fra sopp: **a**) (1 → 3)-α-D-glukan; **b**) (1 → 4)-α-D-glukan; **c**) (1 → 6)-α-D-glukan; **d**) blandede bundet (1 → 3) (1 → 4)-α-D-glukan; **e**) forgrenet (1 → 4) (1 → 4)-α-D-glukan; **f**) (1 → 3)-β-D-glukan; **g**) (1 → 6)-β-D-glukan; **h**) blandede bundet (1 → 3) (1 → 4)-β-D-glukan; **i**) forgrenet (1 → 3) (1 → 6)-β-D-glukan; **j**) forgrenet (1 → 6) (1 → 3)-β-D-glukan (Synytsya & Novák, 2013).

glukaner med forskjellige antall og konfigurasjon av D-glukoseenheter, forgreningsgrad og kjedekonfigurasjon og forskjellige posisjoner av glykosidbindinger langs polymerkjeden. Forgrenede glukaner kan inneholde forskjellige sidekjerder, som består av en eller flere monosakkaridenheter. Forgreningene kan være festet på hovedkjeden i forskjellige posisjoner. I henhold til anomerisk struktur av glukose finnes det alfa-D glukaner, beta-D glukaner og mikset alfa, beta-D – glukaner.

Alfa-D- glukaner fra sopp kan være lineære og forgrenede.

Lineære alfa-D-glukaner: Lineære alfa-D-glukaner ble funnet i gjær og høyere sopp. Lineære alfa D-glukaner kan bestå av alfa (1 → 3) -, (1 → 4) - eller (1 → 6) bindet -D-glukoseenheter eller inneholde bare en kombinasjon av disse bindingene (Grün et al., 2005). Lineær alfa-(1→3)-D-glukan (vanlig cellevegg glukan hos forskjellige sopp) ble isolert fra mycel *Aspergillus niger* (Horisberger et al., 1972) (figur 2 (a)). Lineær alfa-(1→4)-D-glukan (figur 2 (b)) ble isolert fra mycel av *Penicillium chrysogenum* (Wang et al., 2007), fruktleger og mycel av *Ganoderma tsugae* og *Ganoderma lucidum* (Peng et al., 2005; Chen et al., 1998), *Poria cocos* (Jin et al., 2004), *Lentinula edodes* (Wiater et al., 2011; Unursaikhan et al., 2006). Lineær alfa (1→6)-D-glukan (HCP) (figur 2 (c)) ble isolert fra *Sarcodon aspratus* (Han et al., 2011). Lineær alfa (1 → 3) og (1 → 4)-D glukan Nigeran (figur 2(d)) ble isolert fra mycel av *Aspergillus niger* og noen andre arter av *Aspergillus* og *Penicillium* (Bock et al., 1983).

Forgrenete alfa-D glukaner: Forgrenet alfa-(1 → 4), (1 → 6) bundet -D-glukan (figur 2 (e)) med enkelt alfa-D-glukoseenheter i forgreninger ble isolert fra forskjellige typer av sopp. (Smiderle et al., 2010) isolerte forgrenet alfa-D-glukan fra en varmtvannekstrakt av *Agaricus bisporus*. Dette polysakkaridet ble fullstendig nedbrutt av alfa-amylase.

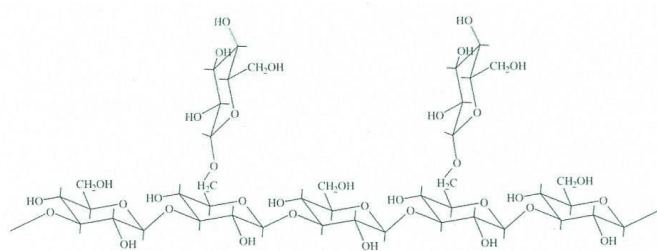
Biologisk aktivitet: Det var rapportert om glykogenlignende polysakkarider som kan aktivere makrofager, stimulere TNF-alfa-produksjonen og fagocytosen i RAW264.7-celler (Kojima et al., 2010). Tidligere studier viste at den biologiske aktiviteten til alfa-glukaner var relatert til deres molekylvekt. Glykogener med Mw mer enn 100000 Da kunne ikke fremme frigjøring av NO ved RAW264.7-celler, mens glykogener på 6500 Da kunne stimulere interferon-γ som førte til forsterket NO-, TNF-alfa- og Interleukin 6 produksjonen (Kakutani et al., 2007).

Beta-D- glukaner fra sopp kan også være lineære og forgrenede.

Lineære beta-D glukaner: Lineære beta- glukaner ble også funnet i mange forskjellige sopp, inkludert lav. Disse glukanene består av beta-(1 → 3) eller (1 → 6) bundne- D

glukoseenheter. Celluloselignende beta-(1 → 4) -D-glukaner er ikke funnet i sopp (Synytsya & Novák, 2013). Kombinasjon av lineære beta-(1 → 4) og (1 → 3) bundet- D-glukose ble funnet i noe lav- lignende sopp. Phachyman (**figur 2 (f)**) er lineær beta-(1 → 3) -D-glukan som ble isolert fra lav *Poria cocos* (Hoffmann *et al.*, 1971). Pustulan (**figur 2, (g)**), vannløselig beta-(1 → 6)-D-glukan, ble isolert fra lav *Lasallia pustulata* (Pereyra *et al.*, 2003). Lichenan (**figur 2 (h)**) er lineær blandede bundet beta-(1 → 3)(1 → 4)-bundet-D-glukan fra *Cetraria islandica*. Strukturen likner på den type beta-glukan man finner i korn (Honegger & Haisch, 2001).

Forgrenete beta-D glukaner: Forgrenete beta -D-glukaner består av beta-(1 → 3) og-(1 → 6) bundne -D-glukoseenheter og er den mest vanlige bestanddelen i soppens cellevegg. (Chen & Seviour, 2007; Wasser, 2002). De fleste forgrenete beta-glukaner har beta-(1 → 3) bundet-D-glukose i hovedkjeden og beta-(1 → 6) bundet-D-glukose i forgreninger (**figur 2 (i)**)(Chen & Seviour, 2007). Lentinan (beta glukan fra *Lentinula (Lentinus) edodes*) er en av de mest kjente polysakkaridene (Zhang *et al.*, 2011) (figur 3).



Figur 3. Struktur av lentinan fra *Lentinula edodes* (Zhang *et al.*, 2011).

Grifolan, schizophyllan og scleroglucan er de mest kjente polysakkaridene med lignende strukturer med litt forskjellige forgreningsratioer fra 0,25 til 0,36 (Synytsya & Novák, 2013).

Beta-glukan med lignende struktur men med høyere forgreningsgrad ble isolert fra *Aureobasidium pullulans* (Tada *et al.*, 2008). Mange andre (1 → 3)(1 → 6)-beta-D-glukaner med lignende struktur ble isolert fra *Boletus erythropus* (Chauveau *et al.*, 1996), *Hericiium erinaceum* (Dong *et al.*, 2006), *Pleurotus pulmonarius* (Smiderle, Olsen, Carbonero, Baggio, *et al.*, 2008) og mange andre kilder. I tillegg finnes beta-glukaner som består av beta-(1 → 6) -bundne – D-glukoseenheter i hovedkjeden og beta-(1 → 3) -bundet-D-glukose i forgreninger (**figur 2 (j)**) (Liu *et al.*, 2012; Dong *et al.*, 2002).

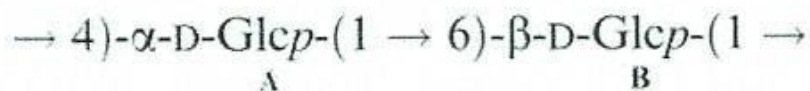
Pleuran som ble isolert fra *Pleurotus ostreatus* består av beta-(1 → 3) bundet– D-glukose i hovedkjeden som er substituert i O-6 på hver fjerde glukoseenhet med beta – D-Glcp som

inneholder små mengder av (1 → 6)- og (1 → 4)- bundne enheter i forgreningen (Karácsonyi & Kuniak, 1994). Krestin ble isolert fra medisinsk sopp *Trametes (Coriolus)* og består av (1→4)-beta-D-glukukose enheter i hovedkjeden med beta-(1→6)- og beta-(1→3)-bundet sidekjede som kobles til hver fjerde glukoseenhet i hovedkjeden. 25-38 % av beta-glukanet er kovalent bundet til forskjellige peptider (Tsukagoshi *et al.*, 1984).

Biologisk aktivitet: Immunmodulerende effektene av sopp relateres vanligvis til beta-(1 → 3)(1 → 6)-bundet-glukaner. En mulig mekanisme for deres virkning er via binding til beta-glukan-spesifikke reseptorer (Dectin-1, lektin-reseptorer og toll-like (TLR) reseptorene TLR-2 og TLR-6, og CR3) på medfødte immunceller, slik som monocytter eller makrofager, noe som fører til påfølgende aktivering av adaptiv immunitet (Akramiene *et al.*, 2007; Rop *et al.*, 2009).

Blandede alfa-, beta-D glukaner: I tillegg finnes informasjon om to lineære glukaner av sopp som består både av alfa (A)- og beta (B)- bundne glukoseenheter i hovedkjeden (figur 4)(Chakraborty *et al.*, 2004).

Piptoporan I er en forgrenet alfa-, beta- D-glukan som ble isolert fra *Piptoporus betulinus* (Olennikov *et al.*, 2012).



Figur 4. Struktur til glukan som er isolert av *Astraeus hygrometricus*.(Chakraborty *et al.*, 2004)

I motsetning til beta-glukaner fra havre og bygg som er beta-(1 → 3) (1 → 4)-bundet-D-glukaner og som senker kolesterol og blodsukker (Samuelsen, 2015), viser mange beta-glukaner fra sopp antitumor aktivitet (Wasser, 2002).

Andre viktige bioaktive polysakkarider i sopp er galaktaner, fukaner, xylaner og mannaner (Wasser, 2002; Synytsya & Novák, 2013; Ren *et al.*, 2012).

2.1.4. Struktur og biologisk aktivitet av sopp polysakkarider

Mange glukaner av sopp viser biologisk aktivitet som er spesielt knyttet til deres struktur og molekylvekt. Mange lineære og forgrenede glukaner som ble beskrevet ovenfor viser biologisk aktivitet. Novak (Novak & Vetvicka, 2008) klassifiserer beta-glukaner fra sopp som fysiologisk aktive forbindelser og angir dem som biologisk responsmodifiserende (BRMS). BRMS kan brukes i mange patologiske tilstander som bakterielle-, virus- eller

protozoainfeksjoner og er potente antitumor komponenter (Novak & Vetvicka, 2008; Rondanelli *et al.*, 2009; Wasser, 2002; Chen & Seviour, 2007; Meng *et al.*, 2016).

Biologisk aktivitet av polysakkarider avhengig av:

- ✓ **Sukkersammensetning:** Antitumor polysakkarider kan være heteroglykaner (Gao *et al.*, 1996), komplekser av beta-glukoproteiner (Kawagishi *et al.*, 1990), alfa-manno-beta-glukaner, komplekser av alfa-glukan-proteiner (Lemieszek & Rzeski, 2012) og komplekser av heteroglykan-proteiner (Zhuang *et al.*, 1993; Mizuno *et al.*, 1996). Sopp-polysakkarider som inneholder glukose og mannose kan også ha en antitumor aktivitet fordi det finnes en polysakkarid-reseptor på menneskelige makrofager med høy spesifisitet for glukose og mannose (Lombard *et al.*, 1994).
- ✓ **Molekylvekt:** Glukaner med høy molekylvekt er mer effektive enn de med lav molekylvekt (Rop *et al.*, 2009; Ferreira *et al.*, 2015).
- ✓ **Tertiær struktur:** Trippelheliks konformasjon er nødvendig for antitumor aktivitet (Zhang *et al.*, 2007).
- ✓ **Løselighet i vann:** Vannløselige glukaner har større aktivitet på grunn av bedre opptak i GI (Manzi & Pizzoferrato, 2000; Zekovic *et al.*, 2005).
- ✓ **Forgreningsgrad:** Den høyeste aktiviteten har glukaner hvor verdien av forgreningsgrad i forhold til molekylvekten er 0,20 til 0,33 (Bao *et al.*, 2001; Tao *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2007)
- ✓ **Tilstedeværelse av andre ligander:** Proteinligander øker antitumor aktivitet. Ligander, som galaktose, mannose, fruktose, xylose og arabinose øker også antitumor egenskaper av polysakkarider (Lemieszek & Rzeski, 2012).
- ✓ **Glykosidbindinger:** beta-(1 → 3) bindinger av glukaner i hovedkjeden med beta-(1→6) forgreininger er nødvendig for antitumor aktivitet og stimulering av immunsystemet; β-glukaner som inneholder bare beta- (1 → 6) bindinger har mindre aktivitet (Wasser, 2002);
- ✓ **Kjemisk modifisering:** Kjemisk modifisering utføres ofte for å forbedre anticancer aktivitet av polysakkarider. Dette skjer ved å øke deres vannløselighet og tilgjengelighet for passasje gjennom tarmveggen etter oral administrasjon (Wasser, 2002; Paulík *et al.*, 1996).
- ✓ **Partikkelstørrelse til uløselig polysakkarider:** Partikler med 1-2 µm diameter er optimale til fagocyttering av makrofager (Hunter *et al.*, 2002)

2.2. IMMUNOLOGI

2.2.1. Makrofager

Makrofager spiller en viktig rolle i det medfødte immunsystemet (Janeway & Medzhitov, 2002; Uthaisangsook *et al.*, 2002). De representerer den første linjen i vertens immunforsvar og fjerner (fagocytterer) bakterier, døde celler og fremmede partikler. De kan modulere adaptiv immunrespons ved å presentere antigener til T-lymfocytter (Birk *et al.*, 2001). Makrofager er også involvert i omforming av vev under embryogenesen, sårheling, fjerning av skadede celler, hematopoese og homeostase (Sica *et al.*, 2015; Lingen, 2001; Klimp *et al.*, 2002). I tillegg kan de forsvare mot mikrobiell infeksjon og gjenkjenne og drepe tumorceller. For å delta i immunforsvar må makrofager være aktivert. Bakterielle celleveggkomponenter og noen cytokiner kan aktivere makrofager til tumor cytotoxicitet. Komplement reseptor 1 (CR1), komplement reseptor 3 (CR3) og scavenger reseptor 4 (SR4), som finnes på makrofagens overflate, binder seg til komplementproteiner på bakterienes overflate, noe som fremmer endocytose av bakterien. Makrofager har mønstergjenkjennende reseptorer (PRR), som gjenkjenner patogen-assosierte molekulære struktur (PAMP) hos mikrobielle patogener og fremmede partikler. De mest kjente PRR er Dectin-1, lektin-reseptorer og toll-like (TLR) reseptorene TLR-2 og TLR-6. For eksempel lipopolysakkarid (LPS), som er den mest potente aktivatoren av makrofager, binder seg til CD14 eller TLR-2. Aktivering av makrofager med cytokiner som produseres av aktive T-lymfocytter (IFN- γ , granulocyt- og makrofagkolonistimulerende faktor (GM-CSF) og makrofagkolonistimulerende faktor (M-CSF) krever binding av cytokinet til en reseptor på overflaten av makrofagene. Dette fører til aktivering av intracellulære signalveier som til slutt fører til modulering av makrofagfunksjonen (Yagisawa *et al.*, 1999; Boehm *et al.*, 1997). Aktiverte makrofager kan virke direkte ved frigjøring av nitrogenmonoksid (NO), reaktive oksygenforbindelser (ROS) og tumor-nekrosefaktor-alfa (TNF-alfa) som er skadelig for kreftceller og mikroorganismer. De kan også virke indirekte ved sekresjon av cytokiner som aktiverer immunsystemet.

Makrofager (M1) kan være involvert i drap av kreftceller. Samtidig kan makrofager (M 2) stimulere av kreftutvikling. Denne avhenging av hvordan de blir aktivert. Makrofager stimuleres til M 1-makrofager av LPS og IFN- γ , og dette fører til frigjøring av TNF-alfa, interleukin-(IL)-6, IL-12, IL-1b, ROS og NO. Makrofager som stimuleres av IL- 4 aktiveres til M 2-makrofager som fører til frigjøring av vaskulær endotelial vekstfaktor (VEGF),

prostaglandin E₂ (PGE₂), IL-10, matrix metalloproteinaser (MMPs) og redusert nivå av TNF-alfa (Liu *et al.*, 2015; Sica *et al.*, 2015).

2.2.2. RAW 264.7

RAW 264.7-celler er en makrofagliggende, Abelson leukemivirus-transformert cellelinje fra mus. Denne cellelinjen brukes ofte *in vitro* til screening av naturlige produkter for bioaktivitet og for å forutsi deres potensielle virkning på primære celler *in vivo*.

Partikulære beta-glukaner kan bindes til reseptor Dectin-1 som finnes på overflaten av RAW 264.7 og redusere den cellulære aktiviteten av legumain (Gordon & Siamon, 2001; Berven *et al.*, 2015).

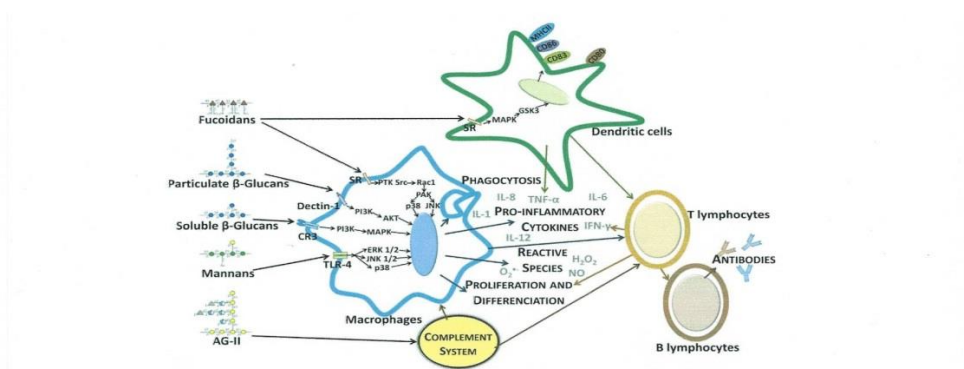
2.2.3. Legumain

Legumain er en asparginylendopeptidase (AEP) og tilhører C13 familien innenfor klan CD av cysteinproteaser. Legumain spalter proteinsubstrater spesifikt på karboksylterminalen av aminosyren asparagin (Asn). Denne spesifikke spaltningen er sjelden blant enzymer. (Kembhavi *et al.*, 1993) Denne proteasen har blitt identifisert i planter, parasitter (Dalton *et al.*, 1995) og pattedyr (Chen *et al.*, 1997). Legumain er hovedsakelig et lysosomalt enzym, men har også blitt funnet ekstracellulært og i cytosol og cellekjerne ved ulike kreftsykdommer (Dall & Brandstetter, 2016; Berven *et al.*, 2016). Høyt nivå av legumain ble funnet på overflaten av tumorassosierte makrofager (TAMs), tumorceller og omkringliggende endotelceller. Enzymaktivering skjer ved sur pH og er autokatalytisk. Hos pattedyr, spiller legumain en viktige roller i immunsystemet. Legumain kan hindre binding av antigen og MHC klasse II molekyler og delta i destruksjon av T-cellers epitoper (Watts *et al.*, 2003). I tillegg kan legumain proteolytisk aktivere TLR- reseptorer i det medfødte immunsystemet (Sepulveda *et al.*, 2009).

Legumain er involvert i patogenesen for en rekke sykdommer som multippel sklerose, Alzheimer's sykdom og aterosklerose. Overekspressjon av legumain har blitt rapportert i flere krefttyper, for eksempel i tykktarmskreft, brystkreft, eggstokkreft og prostatakreft (Liu *et al.*, 2003; Murthy *et al.*, 2005; Gawenda *et al.*, 2007; Dall & Brandstetter, 2016). I tillegg fremmer legumain cellemigrasjon, vevsinvasjon og metastase, noe som fører til dårlig prognose i forskjellige krefttyper (Liu *et al.*, 2003; Dall & Brandstetter, 2016). På grunn av høye konsentrasjoner av legumain i svulstens mikromiljø (spesielt bundet til overflaten av TAMs), kan påvirkning av legumain kan være en mulig strategi for behandling av kreft.

2.2.4. Mekanismer av antitumor og immunomodulerende aktivitet av sopp polysakkarider.

Forskjellige polysakkarider fra sopp og deres derivater har forskjellige virkningsmekanismer mot kreft. Disse mekanismene kan hovedsakelig fordeles til to grunnleggende mekanismer: direkte (inhibering av tumorcellevekst og stimulering av apoptose) og indirekte (immunstimulering) (Wasser, 2011; Tzianabos, 2000; Meng *et al.*, 2016) (figur 5).



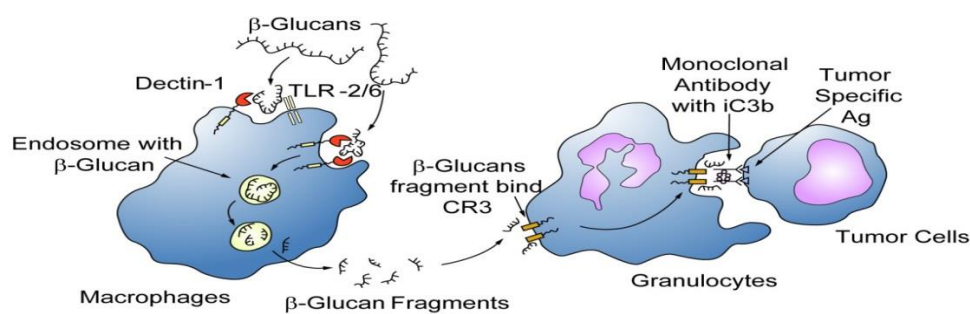
Figur 5. Aktivering av immunsystemet av immunstimulerende polysakkarider via flere molekylære / cellulære mekanismer (Ferreira *et al.*, 2015).

Indirekte virkning baseres på stimulering av vertens immunsystem (aktivering av T- og B - lymfocytter, makrofager og naturlige dreper (NK) celler. De fleste studier testet immunstimulerende aktivitet av polysakkarider på makrofag funksjon (Schepetkin & Quinn, 2006). Beta-glukaner fra sopp kan forbedre slike makrofag funksjoner som, for eksempel, produksjon av reaktive oksygenspesies (ROS) og nitrogenoksid (NO), sekresjon av proinflammatoriske cytokiner slik som av IFN- γ , IL-8, IL-1 β , IL-6, IL-12, TNF-alfa og andre cytokiner (Paterson, 2006; Brown & Gordon, 2005; Wasser, 2002; Cooi & Liu, 2000). TNF er et proinflammatorisk cytokin som aktiverer nuklearfaktor – kB (NF-kB) and c-Jun N-terminal kinase (JNK). NF-kB er anti-apoptosisk og JNK bidrar til celledød. I kreft, spiller TNF en dobbel rolle. Den kan virke som endogen tumor-promoter fordi den stimulerer vekst, invasjon og metastaseutvikling, men den kan også føre til TNF-indusert apoptose av kreftcellene via inhibering av NF-kB (Rogers, 2011).

Beta-glukaner, isolert fra sopp, fungerer som PAMPs som gjenkjennes av PRRs på cellemembranen av effektorceller, noe som fører til stimulering av immunforsvaret (Brown & Gordon, 2003). Beta-glukaner kan bindes til PRRs som scavenger, lactosyl-ceramidereseptorene og toll-like reseptorene (TLRs) og dermed mediere en del av signalveien som fører også til aktivering av immunrespons (Chen & Seviour, 2007; Chan *et al.*, 2009).

De kan også binde seg til Dectin-1, som er en reseptor på overflaten av makrofager og dermed aktivere antimikrobiell (fagocytose, produksjon av ROS) og inflammatorisk (cytokin og chemokin produksjon) medfødte immunrespons og påvirke utviklingen av adaptivimmunitet. (figur 6) (Meng *et al.*, 2016; Rogers, 2011; Chan *et al.*, 2009; Goodridge *et al.*, 2011).

Partikulære beta-glukaner (ikke løselig) blir internalisert i makrofager gjennom Dectin-1 aktivering (Goodridge *et al.*, 2011; Berven *et al.*, 2015), noe som fører til økt produksjon av TNF-alfa og redusert legumain aktiviteten (Berven *et al.*, 2015). Beta-glukaner kan polarisere M2 makrofager mot M1, noe som kan brukes i kreftbehandling (Liu *et al.*, 2015).



Figur 6. Beta-glukaner tas opp av makrofager via Dectin-1 reseptoren med eller uten TLR- 2/6. De store beta-glukan molekyler internaliseres og fragmenteres i mindre størrelse fragmenter av beta-glukan. Disse små beta-glukan-fragmentene kan tas opp av sirkulerende granulocytter, monocytter eller makrofager via komplement reseptor (CR)-3, noe som fører til fagocytose av monoklonalt antistoff-merkede kreftceller (Chan *et al.*, 2009)

En av de viktigste beta-glukan-reseptorer er CR3-reseptor som finnes på overflaten av granulocytter, makrofager og naturlige dreper celler (NK celler). Binding av beta-glukaner til den reseptoren assosieres med tumor cytotoxicitet (Lindequist *et al.*, 2005).

Samspillet mellom partikulær og løselig beta -(1 → 3) -D-glukan med Dectin-1 og CR3 henholdsvis aktiverer medfødte immunforsvaret (gjennom ROS) ved å overlape forskjellige signalveier (figur 5) (Bose *et al.*, 2014).

Direkte virkning baseres på polysakkaridenes evne å hemme tumor celleproliferasjon eller indukere død ved apoptose (Zhang *et al.*, 2007; Smith *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2002). Den anti- proliferative effekten av polysakkarider mot tumor celler in vitro er fortsatt uklar, men noen studie rapporterte at inkubasjon av polysakkarider sammen med tumorceller kan forandre signaler innen tumorceller og generere apoptose, noe som kan forklare den anti-proiferative effekten av polysakkarider in vitro (Chen & Chang, 2004; Li *et al.*, 2004; Lin *et al.*, 2003).

2.3. ALBATRELLUS OVINUS



Figur 7. Albatrellus ovinus (Wikipedia, 2016)

2.3.1. Taksonomisk klassifisering

(Dyntaxa, 2016; Wikipedia, 2016)

Tabell 1. Oversikt over taksonomisk klassifisering

Rot	Biota
Rike	Soppriket (fungi)
Rekke	Stilksporesopper (Basidiomycota)
Underrekke	Hymeniesopper (Agaricomycotina)
Klasse	Ekte hymeniesopper (Agaricomycetes)
Underklasse	Agaricomycetes, ordines incertae sedis
Orden	Kremleordenen (Russulales)
Familie	Albatrellaceae
Slekt	Albatrellus
Art	Fåresopp (<i>Albatrellus ovinus</i>)

Binomialt navn: *Albatrellus ovinus*

Synonymer:

- *Scutiger ovinus* Murrill
- *Polyporus ovinus* Schaeff. ex Fr.(Dyntaxa, 2016)

Lokale navn

Tabell 2. Oversikt over lokale navn for *Albatrellus ovinus* (Dyntaxa, 2016; Gry et al., 2012)

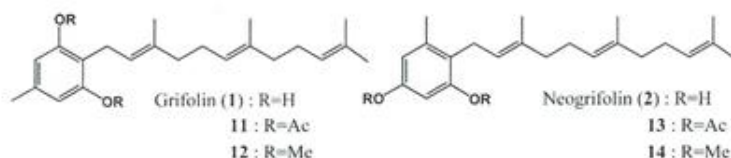
Engelsk	Sheep Polypore
Fransk	Polypore des brebis
Polsk	Naziemek bialawy
Russisk	Трутовик овечий, овечий гриб
Tysk	Echter Schafporling, Schafeuter
Tsjekkisk	Krasnoporka mlynarska
Svensk	Fårticka
Dansk	Hvidlig Fåreporesvamp
Finsk	Lampaankääpä

2.3.2. Botanikk og habitat

Albatrellus ovinus er en hvit sopp og har et hvitt tynt porelag når den er ung, men eldre eksemplarer kan få grå, gråbrune eller gulgrønne flekker. Fåresopp vokser i berglendt gammel granskog. *A. ovinus* finnes sjelden i Danmark og finnes ikke på Island, men den er vanlig i de andre nordiske landene i tempererte soner og taiga (Boertmann *et al.*, 1992). I Norge vokser den på Østlandet og i Trøndelag, men den er ikke funnet på Vestlandet. Det er ikke rapportert om noen intoksikasjoner etter inntak av fåresopp og derfor regnes den som den eneste spiselige. Ved steking blir den gul, noe som er karakteristisk for den. Det er påvist at *A. ovinus* inneholder en rekke bioaktive fenoliske forbindelser (Egeland *et al.*, 2011).

2.3.3. Kjemiske forbindelser og polysakkarider

Albatrellys ovinus inneholder en rekke triprenyl (farnesyl) fenoliske forbindelser, som er neogrifolinderivater: grifolin, scutigeral, ilicicolin B, ovinal og ovinol (Rogers, 2011; Vrkoč *et al.*, 1977; Dekermendjian *et al.*, 1997; Nukata *et al.*, 2002).

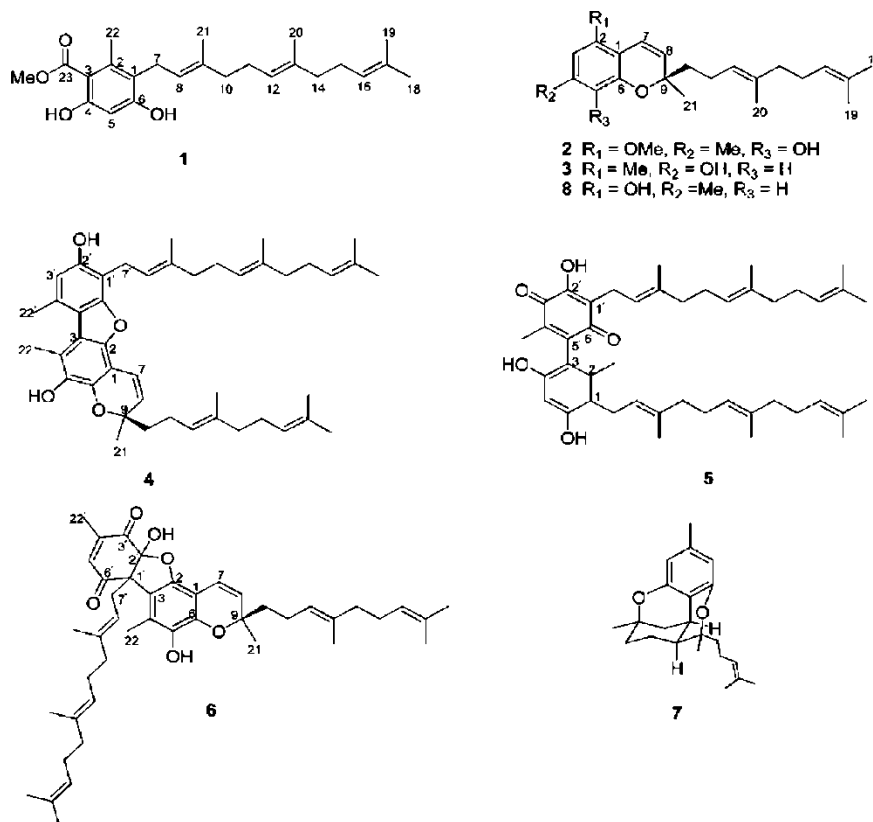


Figur 8. Grifolin og neogrifolin isolert fra *Albatrellus ovinus* (Nukata *et al.*, 2002).

Grifolin har vist seg å senke kolesterolnivået hos rotter (Sugiyama *et al.*, 1992) ved å oppregulere ekspresjonen av gener for farnesoid X reseptoren som kontrollerer gallesyrer og kolesterolmetabolismen (Suzuki *et al.*, 2006).

Scutigeral kan fungere som et oralt smertestillende stoff (Dekermendjian *et al.*, 1997).

Liu et al isolerte åtte grifolin derivater som inneholder tre nye monomerer, albatrelin A-C (figur 9, (1-3)), tre nye dimer (meroterpenoid pigmenter), albatrelins D-F (figur 9, (4-6)), og to kjente 6a, 7,8,9,10,10a-heksahydro -3,6,9-trimetyl-6- (4-metyl-3-penten-1-yl) -1,9-epoksy-6H-dibenzo [b, d] pyran (figur 9, (7)) og confluentin (figur 9, (8)) (Liu *et al.*, 2013).

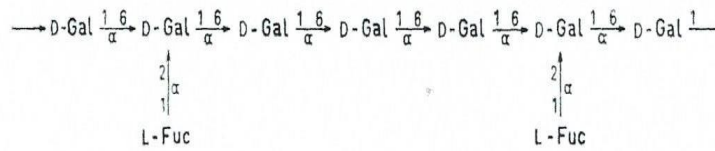


Figur 9. Meroterpenoid pigmenter fra Basidiomycete *Albatrellus ovinus* (Liu *et al.*, 2013).

A. ovinus inneholder minst tre neogrifolin derivater som har antioksidantaktivitet som er mer potent enn alfa-tokoferol og BHA (Nukata *et al.*, 2002). Neogrifolin og grifolin kan vise anti-inflammatorisk aktivitet gjennom inhibering av NO produksjon.

Forskjellige tilstander, inkludert reumatoid artritt, septisk sjokk osv. er resultatet av overproduksjon av NO, noe som tyder på at fåresopp kan være nyttig i behandlingen av disse smertefulle sykdommene (Rogers, 2011).

Akselson K (Axelsson & Björndal, 1969) isolerte fukogalaktan av fruktlegemer av *A.ovinus* (figur 10)



Figur 10. Mulig struktur av fukogalaktan av *A.ovinus* (Axelsson & Björndal, 1969).

2.3.4. Tidligere studier av *Albatrellus ovinus*

A.ovinus gitt oralt til mus (9g/kg/dag) medførte signifikant nedgang i LDL kolesterol. Det er ikke påvist levertoksisitet av *A. ovinus* etter oral administrasjon i mus. Det ble heller ikke funnet histologiske patologiske forandringer i muskler og lever (Nieminen *et al.*, 2006).

Det er ikke gjennomført humane studier relatert til toksiske eller farmakologiske effekter som følge av inntak av fåresopp.

3. OPPGAVENES MÅL

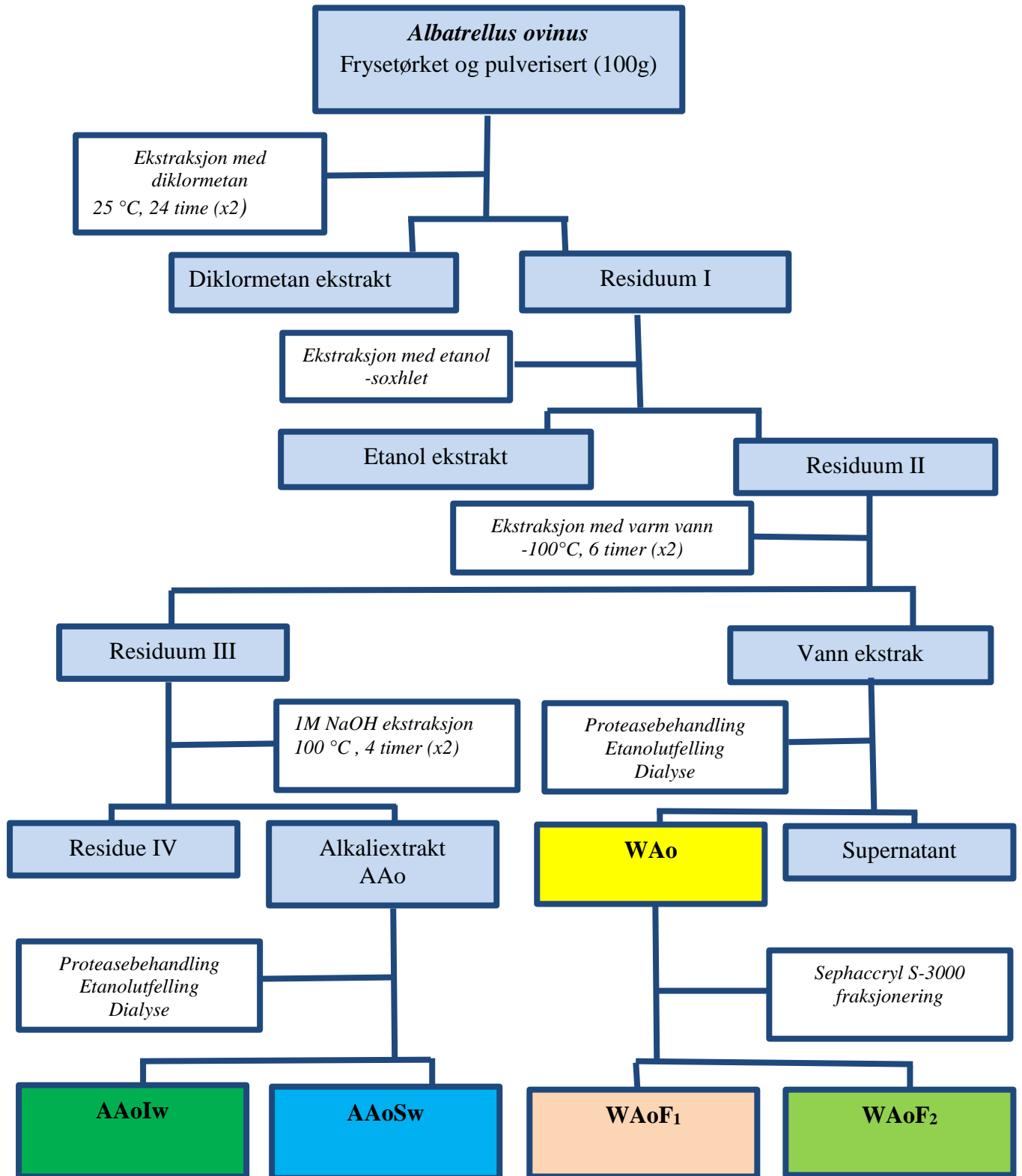
Isolering av mange verdifulle polysakkarider som finnes i sopp kan anvendes i forebygging og behandling av mange sykdommer, inkludert kreft. Fåresopp (*Albatrellus ovinus*) er rik på celleveggmateriale, men er lite studert fra før.

Det var rapportert at polysakkarider fra mycel av fåresopp kan inhibere Sarkoma 180 og Ehrlich karsinoma i nesten 100 % (Shigeto Ohtsuka). En beslektet art av *Albatrellus ovinus* (*Confluent polypore*) inneholder polysakkarider med antitumor aktivitet (Mizuno *et al.*, 1992). Dermed er fåresopp en god kandidat til isolering bioaktive polysakkarider inkludert beta-glukaner.

Målet med denne oppgaven er å karakterisere polysakkaridfraksjoner fra fåresopp med hensyn på molekylvekt, monosakkaridsammensetning og bindingsforhold og å studere deres effekt på legumainaktivitet i RAW 264.7 makrofager.

4. MATERIALER OG METODER

4.1. Isolering av polysakkarider fra *A.ovinus*



Figur 11. Isolering av polysakkarider fra *A.ovinus*.

Sopp ekstraksjon, opprensning av fraksjoner og fjerning av proteiner ble utført av Ms. Sc Pharm. Anna Armika Tussilago Nyman ved Avdeling for Farmakognosi, Farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo i (2015-2016) (figur 11). WAo (WAoF₁ og WAoF₂), AAoS_w og AAoI_w ble videre brukt for å karakterisere disse polysakkaridfraksjoner med hensyn på molekylvekt, monosakkarid sammensetning og bindingsforhold og å studere deres effekt på legumainaktivitet i RAW 264.7 makrofager.

4.2. GENERELLE METODER

4.2.1. Vannkvalitet

Det ble brukt rensset vann til alle metodene.

Springvann renses ved omvendt osmose etterfulgt av deionisering og UV-bestråling i et Elix[®] 10 Essential Water Purification system EMD (Millipore).

4.2.2. Innveiging

Til innveiging ble det brukt en analysevekt og presisjonsvekt.

Utstyr:

Analysevekt:	Sartorius Extend ED224S (Sartorius mechatronics)
Veieområde	0,0001 - 220 g
Presisjonsvekt:	Mettler BB2400 (Mettler Toledo)
Veieområde	0,01g - 12kg

4.2.3. Filtrering

En prøve for analytiske separasjoner som HPLC må være fullstendig oppløst og partikkelfri. En av de enkle prøveprepareringsteknikker som kan brukes før HPLC er mikrofiltrering gjennom membraner. Til mikrofiltrering brukes vanligvis membranfiltre med porestørrelse mellom 0,1 og 0,45 μm . Filtrering før HPLC kan utføres ved hjelp av sprøytefiltrering eller med Smplicity filtreringssystem fra EMD Millipore som er et alternativ til sprøytefiltre. I sistnevnte system kan åtte prøver filtreres samtidig direkte HPLC-vialer ved bruk av vakuüm. Filtrering av store væskemengder ble utført med nutsch og vakuümsugeoppsats ved bruk av membranfiltrer Nylon membranen 0,45 μm HNWP fra Millipore.

4.2.4. Måling av pH

Det finnes kjemiske stoffer (pH indikatorer) som kan skifte farge ved én bestemt pH-verdi. Dette prinsippet er brukt i pH-papir som ble anvendt for grovmålinger av pH-verdier (syrevask av gassutstyr). Vannets elektriske ledningsevne er proporsjonal med konsentrasjon av ioner og dette prinsippet er brukt i elektroniske pH-metere (tillaging av bufferløsninger til affinitetskromatografi).

Utstyr:

pH-meter	Seven Compact pH/ion-meter S220 (Mettler Toledo)
Kalibreringsutstyr:	
pH buffer 4, 7, 10	Hamilton Duracal Buffer (Hamilton Bonandus AG, Sweitzerland)
pH-papir:	pH-Fix 0-14 Fisherbrand (Fisher Scientific)

4.2.5. Frysetørking

Frysetørking er en dehydreringsmetode som utføres ved å fryse stoffene og deretter fjerne isen slik at den går direkte over til vanddamp ved sublimering. Dette oppnås gjennom nedkjøling under vakuum. Denne metoden benyttes for å øke holdbarhet, løselighet og oppbevaring av temperatursensitive stoffer (Martin-Christ, 2013).

Utstyr:

Metanolbad:	Hetofring (Heto Birkerød, Danmark)
Frysetørker:	Freeze Dryers Alpha 1-4 LD (Christ)
Vakuumpumpe:	Edwards RV5 Vacuum Pump (Edwards)
Drammeglass	
Parafilm	
Kanyle	
Pærekolbe, overgang med glasull	

Prosedyre:

Prøvene i pærekolber ble fryst på forhånd i metanolbad (-40°C). Deretter ble de festet på utsiden av frysetørker. For å feste dem ble det benyttet overgang med glassull. Prøver i drammeglass ble dekket av perforert parafilm og satt inni i apparatet. Når alt vann var fjernet, prøvene ble tatt av og utbytte ble veid opp.

4.2.6. Sentrifugering

Laboratorie-skala sentrifuger anvendes for isolering og separasjon av suspensjoner og ikke-blandbare væsker. De varierer mye i hastighet, kapasitet, temperaturkontroll. Det ble brukt

Multifuge 4 KR Heraeus 72 (VWR) som kan sentrifugere inntil 4 L av væsker (med plass til prøver fra 1,5-1000 ml) og Spectrafuge mini (Labnet International Inc) som kan separere inntil 9 mL (med plass til prøver 1,5 ml, 0,5 ml og 0,4 ml).

Prosedyre:

Tid og relativ sentrifugalkraft (g) varierer i forskjellige eksperimenter.

4.2.7. Inndamping av løsninger

Vakuumpumpe reduserer oppløsningsmidlets kokepunkt ved å skape et redusert trykk i systemet ved hjelp av en vannstråle eller vakuumpumpe. Denne fremgangsmåten fjerner oppløsningsmidlet fra oppløsningen ved en lavere temperatur for å unngå sidereaksjoner som kan oppstå ved oppvarming av blandingen.

Stort volum av væsker ble redusert ved bruk av vakuumpumpe med vannbad IKA RV10 basic (VWR) under trykk ved 40 °C.

4.2.8. Avgassing av løsninger

For å fortrenge luft i løsningene og på den måten fjerne luft som er løst ble de boblet med helium i 10-20 minutter.

4.2.9. Oppbevaring av vandige løsninger av polysakkarider

Vandige løsninger av karbohydrater er utsatt for bakterievekst og degradering. Derfor ble prøvene oppbevart ved lav temperatur (+4°C) i løpet av dagen.

Hvis løsningene skal oppbevares ut over en dag, må de helst fryses ned (-20°C).

Beta-glukan vil raskt aggregere i vandig løsning etter en stund. For å løse opp slike aggregater kan løsningen kokes opp og/eller sonikeres.

4.2.10. Syrevask av glassutstyr

Glassutstyr kan være forurenset med cellulose i løpet av oppbevaringen i papiresker. Cellulose er et polysakkarid og derfor kan påvirke analyseresultater.

For å kløyve cellulose ble alt glassutstyr vasket med konsentrert saltsyre (HCl).

Reagenser:

Saltsyre 37 % (HCl)

Springvann

Renset vann

Utstyr:

Metyleringsrør, centrifugerør, supelco-rør, glasspipetter

Varmeskap

Function line (Heraeus Instruments)

Prosedyre:

Glassutstyr ble dekket med konsentrert saltsyre og satt i avtrekkskap i 30 minutter. Etterpå ble all saltsyre hellet forsiktig tilbake i beholderen og brukt senere til syrevask igjen. Alt utstyr ble skylt grundig i springvann til pH 5,0 og 3 ganger med rensed vann etter på. Rent utstyr ble satt til tørk i 80⁰C varmeskap over natten. Ferdig tørket utstyr ble dekket med aluminiumfolie og lagt i plastbokser.

4.3. KVANTITATIV OG KVALITATIV MONOSAKKARID BESTEMMELSE

4.3.1. Metanolyse og TMS-derivatisering

4.3.1.1. Metanolyse

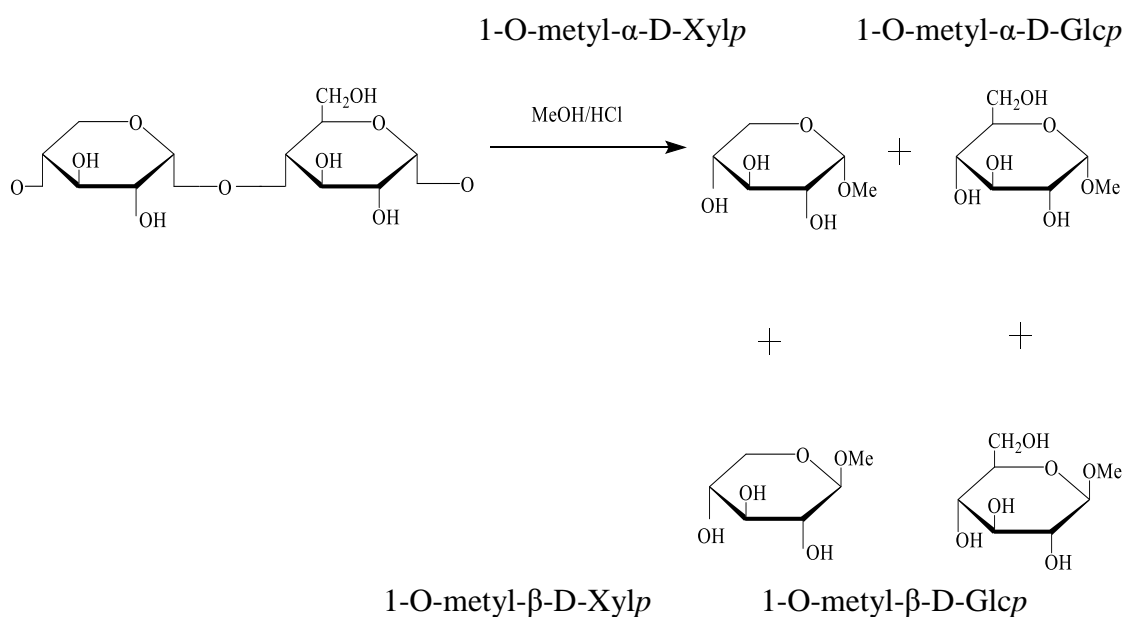
Prinsipp:

Sammensetningen av polysakkarider ble bestemt ved metanolyse (Chambers & Clamp, 1971). Metanolyse er en analysemetode som påviser hvilke monosakkarider polysakkaridet består av ved å kløve polysakkarider til enkelte monosakkarider.

Ved metanolyse i et vannfritt miljø blir glykosidbindingene mellom monomere i polysakkarider spaltet til metylglykosider på OH-gruppen ved C1 (figur 12).

Prosessen ble utført i et surt, vannfritt miljø av 3M HCL i metanol for å unngå hydrolyse av metylglykosidene som kan skje hvis det er noen vann tilstede.

Før monomerene ble analysert i gasskromatografi ble de derivatisert til flyktige forbindelser med TMS reagens.



Figur 12. Metanolyse av et polysakkarid der kjeden består av et surt og et nøytralt monosakkarid (Bräunlich, 2010).

Reagenser:

3M HCl i vannfritt metanol

Intern standard (1,0 mg/mL mannitol i vannfritt metanol)

Vannfri metanol

Utstyr:

Supelcorør med teflonbelagt skrukork

Parafilm og kanyl

Vakuumbokse med P_2O_5

Varmeskap Function line (Heraeus Instruments)

SMI-pipette 100 μ L

Glasspipetter med Peleus ballong 1 mL

Apparatur (nitrogengassoppsett med varmeenhet)

til tørking under N_2 -gass: Pierce, Reacti-Therm III TM, Heating Module (Thermo scientific)

Alt gassutstyr ble syrevasket.

Prosedyre:

Frysetørket polysakkarider (ca. 1 mg) av *A. ovinus* ble veid opp i syrevasket supelcorør.

Rørene ble dekket med parafilm som ble perforert ved hjelp av en kanyl. Prøvene ble tørket i vakuum under P_2O_5 i ca. 24 timer i varmeskap ved 40°C . Prøvene ble tilsatt 3M HCl i vannfritt metanol (1 mL) og mannitoløsning (100 μ L) som intern standart. Korkene ble satt på rørene og prøvene ble overført til et varmeskap ved 80°C i 20-24 timer. Etter 10 min ble overtrykk slept ut og korkene ble skrudd godt på igjen for å hindre fordampning. Prøvene ble tatt ut av varmeskapet og dampet til tørrhet med N_2 -gass ved 40°C . For å fjerne rester av saltsyre ble vannfri metanol (200 μ L) tilsatt hver prøve og prøvene ble igjen dampet på nytt med N_2 -gass. Denne prosedyren ble gjentatt to ganger til. Etterpå ble prøvene dekket med perforert parafilm og overført til tørking i P_2O_5 -evakuert vakuum eksikkator i minst 1 time for å tørke mer før TMS-derivatisering.

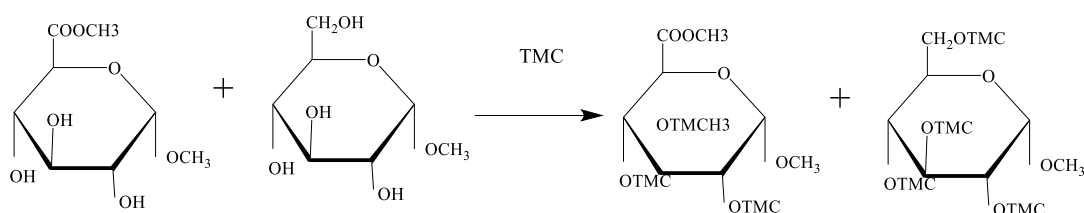
4.3.1.2. TMS-derivatisering

Prinsipp:

Forbindelsene som skal separeres med gasskromatografi (Egeland *et al.*) skal være flyktige. Monosakkarider er polare og derfor lite flyktige. Funksjonelle grupper som aminogrupeer, fenolgrupper, hydroksylgrupper, og karboksylsyregrupper nedsetter stoffenes flyktighet.

Derfor må man lage flyktige termisk stabile derivater av metylglykosidene og metylesterene slik at de kan separeres på en gasskromatografikolonne.

For å oppnå sårn effekt brukes det heksametyldisilazan og trimetyklorsilan (TMC) som reagerer med de frie hydroksylgruppene på monosakkaridene og danner flyktige og termisk stabile pertrimetylsilyleter (TMS derivater) (figur 13). Som løsemiddel anvendes vannfritt pyridin. Tilstedeværelse av vann kan føre til ufullstendig reaksjon.



Metylester

Metylglykosid

Figur 13. Derivatisering et metylesterer og et metylglykosider med TMS reagens for å gjøre de flyktige (Bräunlich, 2010)

Reagenser:

TMS-reagens:

Trimetyklorsilan (TMCS)	1 mL
Heksametyldisilasan (HMDS)	2 mL
Pyridin (vannfritt)	5 mL

Utstyr:

SMI-pipette	200µL
Minishaker:	MS3 Basic (IKA)
Sentrifuge:	Spectrafuge mini (Labnet International Inc)
Eppendorf-rør	

Prosedyre:

TMS-reagens (200 µL) ble tilsatt til de metanolyserte prøvene og blandet godt. Før gasskromatografisk analyse ble prøvene satt i henstand minst 30 minutter i romtemperatur. Etterpå ble prøvene overført til eppendorfrør og sentrifugert for å få en klar supernatant.

4.3.1.3. Gasskromatografi

Prinsipp:

Gasskromatografi er en separasjonsmetode for stoffer i gassform.

Prøven som skal analyseres introduseres ved hjelp av en sprøyte og føres inn i en oppvarmet injektor hvor den fordampes. Bæregassen bringer stoffene i gassform gjennom kolonnen til detektoren. Stoffene vil vandre gjennom kolonnen med forskjellige hastigheter som er bestemt av deres flyktighet, interaksjon med stasjonærfase og temperatur. Hastighetforskjellene vil føre til at hvert monosakkarid ble separert på GC-kolonnen, og separerte monosakkarider ble detektert i form av et karakteristisk mønster av topper.

Monosakkarider kan eksistere både i ringform og i åpenform. De kan være i pyranose- eller furanoseform. Begge formene kan ha alfa og beta- konfigurasjon. Når metanalyse har pågått er forholdet mellom alfa og beta- formene i en løsning det samme fra gang til gang og arealforholdene på GC mellom de ulike anomere formene den samme (figur 12). På en GC kolonne gir disse formene et ulikt mønster av topper med karakteristisk retensjonstid og arealforhold. Derfor gir GC mulighet til å utføre samtidig kvalitative og kvantitative analyser. (Pedersen-Bjergaard & Rasmussen, 2010; Biermann & McGinnis, 1989).

- **Kvalitative bestemmelse av monosakkarider i prøven**

Identifisering av monosakkaridene ble basert på standarder og deres relative retensjonstid og arealforhold.

Monosakkaridene i hvert prøve ble identifisert ved å sammenligne relative retensjonstider til hvert enkelte monosakkarid med relative retensjonstider til standarder, som ble kjørt tidligere. Det ble benyttet de samme forholdene og betingelsene.

Den relative retensjonstiden for hvert monosakkarid ble beregnet som forhold mellom R_t til enkelte topp og R_t til intern standard med kjente mengde og konsentrasjon.

Beregninger (Identifisering):

Retensjonstider: R_t

$$\text{Relativ } R_t = \frac{R_t (\text{enkelte topp})}{R_t (\text{Intern Standard})}$$

I bestemmelsen av monosakkaridsammensetningen ble også benyttet arealforholdene mellom toppene for hvert monosakkarid.

Mønster til toppene: Arealets andel til hver enkelt topp i forholdet til den største toppen som er satt til 1.

$$A \text{ (rel)} = \frac{A(\text{enkelte topp})}{A(\text{Den største toppen})}$$

- **Kvantitative bestemmelse av monosakkarider i prøven**

Det kan også gjøres kvantitative bestemmelser ved hjelp av toppareal fra kromatogrammet, forhånds lagde standardkurver og internstandarder som korrigerer for tap under prøveopparbeidelse.

Reagenser:

Metanol

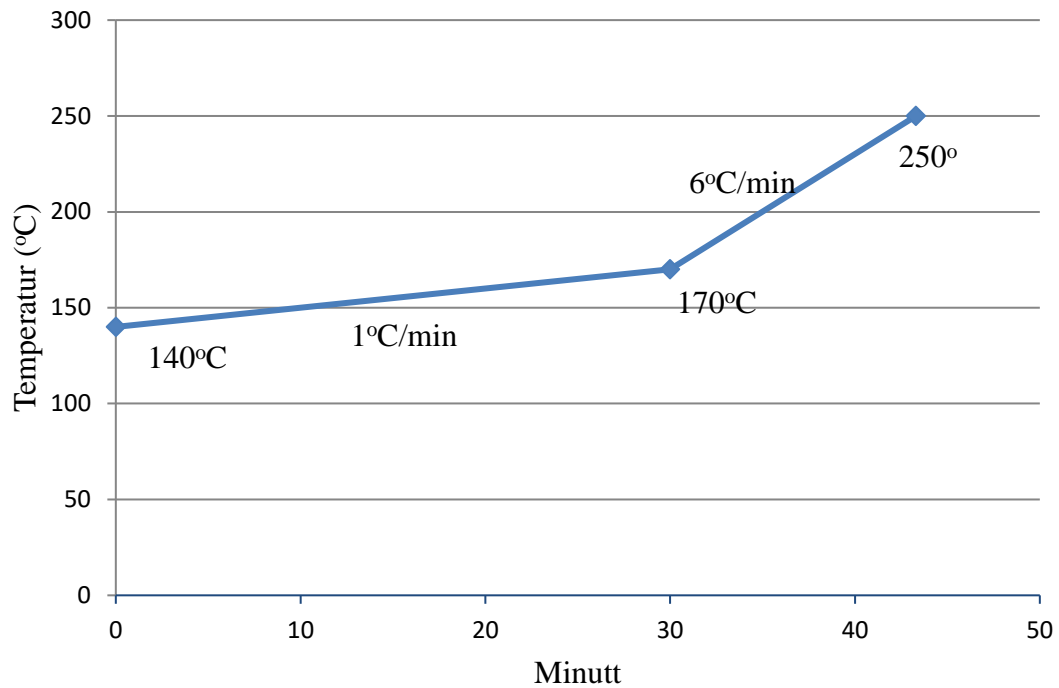
Heksan

Utstyr:

Gasskromatograf:	Focus™ GC (Thermo Scientific)
Detektor:	Flammeionisasjonsdetektor (FID) med H ₂ og luft til flammen
Injektor:	Spiltt: spilttless
Autosampler:	Fisons AS- 800
Styrings software:	Chromeleon 7.2 SR4
Kolonne:	Rxi 5MS (Restek); "Fused silica" kapillærkolonne.
Lengde: 30m. Indre diameter:	0,32 mm. Filmtykkelse: 0,25 µm
Bæregass:	Helium

Betingelser:

Flow kontroll:	Konstant trykk (0,70 bar)
Injeksjon mode:	Splitt Splittforhold=1:10
Injeksjonsvolum:	1,0 µl
Injektortemperatur:	260°C
Detektortemperatur:	310°C



Figur 14. Temperaturprogram GC.

Prosedyre:

Gass-strømmen ble åpnet, GC og integrator ble programmert. Sprøyten ble vasket med heksan. Etter det ble 1,0 µl av den TMS-derivatiserte prøven injisert. Analysen av en prøve tok ca. 50 minutter.

4.4. STRUKTUROPPKLARING

4.4.1. Kjemisk derivatisering med følgende reduksjon og acetylering. Identifisering ved GC-MS.

Metylering er en standard metode som hjelper å skille mellom hydroksylgrupper som ikke deltar i glykosidbinding og hydroksylgrupper som inngår i glykosidbindinger. Metoden gir dermed informasjon om polysakkariders struktur: ringform og bindingsmønster.

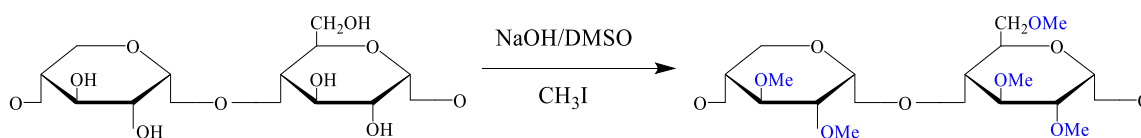
Analysen består av noen trinn: metylering, hydrolyse, reduksjon, acetylering og identifisering og kvantifisering ved GC-MS (Pettolino *et al.*, 2012).

4.4.1.1. Metylering

(Ciucanu & Kerek, 1984)

Prinsipp:

Polysakkarider inneholder frie OH-grupper og OH-grupper som inngår i glykosidbindinger. Ved bruk av dimetylsulfoksid (DMSO) i sterk basisk miljø (NaOH) dannes det DMSO-karbanion som sammen med OH-ionener deprotonerer de frie hydroksylgruppene. Deprotonerte OH-grupper er sterke nukleofiler og reagerer med metyljodid (CH_3I) med dannelse av O-metylte polysakkarider med O-metyl-grupper (figur 15).



Figur 15. Metylering av hydroksylgrupper i polysakkarider (Pettolino *et al.*, 2012)

Reagenser:

Dimetylsulfoksid (DMSO)

Pellets av NaOH, vannfri, tørket i eksikator

Metyljodid CH_3I

Metanol vannfri

Diklormetan

Natriumthiosulfat

Renset vann

Utstyr:

Metyleringsrør med teflonbelagt skrukork (store)

Metyleringsrør med teflonbelagt skrukork (små)

Vannbad ED Heating Immersion Circulator (JULABO GmbH)

Sonikereapparat Ultrasonic cleaning baths (VWR)

Ristestativ: Vibrax VXR (IKA Labortechnik)

Minishaker: MS3 Basic (IKA)

Finnpipetter 500 µL-5 mL

Sentrifuge: Multifuge 4 KR Heraeus 72 (VWR)

Apparatur (nitrogengassoppsett med varmeeenhet) til tørking under N₂-gass: Pierce,
Reacti-Therm III TM, Heating Module (Thermo scientific)

SMI-pipette med kapillærer (blå) 100 µl

Vakuums eksikator med P₂O₅

Agatmorter og pistill

Glasspipetter med gummismokk

Alt gassutstyr ble syrevasket

Prosedyre:

Frysetørked polysakkaridprøver (ca.1mg) av *A. ovinus* ble veid inn i syrevasket lange metyleringsrør. For å fjerne vann som kan være tilstede ble vannfri metanol (200 µL) tilsatt hver prøve og prøvene ble dampet med N₂-gass. Denne prosedyren ble gjentatt to ganger til. Etterpå ble prøvene dekket med perforert parafilm og satt på skrå i P₂O₅-evakuert vakuums eksikator over natten. For å løse opp prøvene ble det tilsatt DMSO (300 µL) og blåst med N₂-gass. Etterpå ble korkene strammet og dekket med parafilm. Prøvene ble varmet i vannbad med 80°C ca. 30 minutter, sonikert i ultralydbad 30 minutter og satt til henstand over natt i romtemperatur. Det ble laget en NaOH/DMSO- suspensjon (2 pelleter per 1 mL DMSO til konsentrasjonen ca. 120 mg/mL NaOH) ved å morte tørre pelleter av NaOH i DMSO med agatmorter med pistill. Suspensjonen av DMSO/NaOH (500 µL) ble tilsatt direkte til polysakkaridsløsningen uten å komme i kontakt med metyleringsrørene. Alle prøvene ble blåst med N₂-gass og ristet 30 minutter etterpå.

Metyljodid (400 µL) ble tilsatt i porsjoner: 100 µL+ 100 µL+200 µL. Etter den første tilsetningen ble prøvene ristet i ti minutter, etter den andre og den tredje tilsetningen ble prøvene ristet godt i 10 minutter og 20 minutter tilsvarende. Alle rørene ble blåst med N₂-

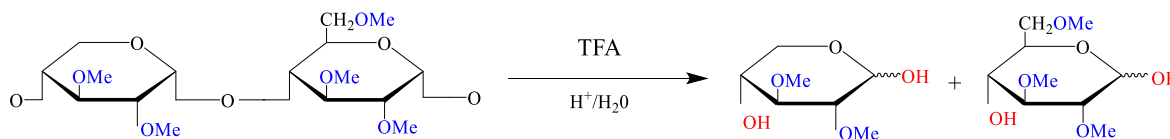
gass. Etter at ristingen var ferdig ble til hver prøve tilsatt nylaget løsning (10 mL) av 100 mg/mL natriumthiosulfat i vann og diklormetan (DCM) (2 mL). Det ble gjort for å vaske bort metyljodid og NaOH. Prøvene ble mikset godt (>40 sekunder) på minishaker. For å separere fasene ble alle prøvene sentrifugert ved 1000 g (relative sentrifugal force) i 3 minutter. Etter sentrifugeringen ble den øverste fasen (vannfasen) fjernet ved hjelp av syrevasket glasspipette. Den nederste fasen (DCM-fasen) ble vasket 4 ganger med 5 mL rensset vann. Hver gang før vannfasen ble fjernet ble prøvene mikset godt (>40 sekunder) og sentrifugert ved 1000 g i 3 minutter. Siste gang ble DCM-fasen overført med ny tørr glasspipette til små metyleringsrør med skrukork og tørket med N₂-gass.

4.4.1.2. Hydrolyse

(Pettolino *et al.*, 2012)

Prinsipp:

Syrekatalysert hydrolyse fører til spalting av glykosidbindinger mellom monomere i metylerte polysakkaridene med dannelse av delvis metylerte monosakkarider (figur 16).



Figur 16. Sur hydrolyse av metylerte polysakkarider (Pettolino *et al.*, 2012)

Reagenser:

2,5 M Trifluoreddiksyre (TFA)

Utstyr:

Finnpipetter: 100µL-1 mL

Varmeskap: Function line (Heraeus Instruments)

Apparatur

(nitrogengassoppsett med varmeenhet)

til flushing med N₂-gass: Pierce, Reacti-Therm III TM, Heating Module (Thermo scientific)

Speed Vacuum Concentrator:

Vapornet: Savant[®] VN100 (Thermo Scientific)

Refrigerated vapor Trap: RVT4104

Speed Vakum Dryer:

Savant® SPD121P (Thermo Scientific)

Vacuum pump:

OFP4000 OIL-FREE (Thermo Scientific)

Prosedyre:

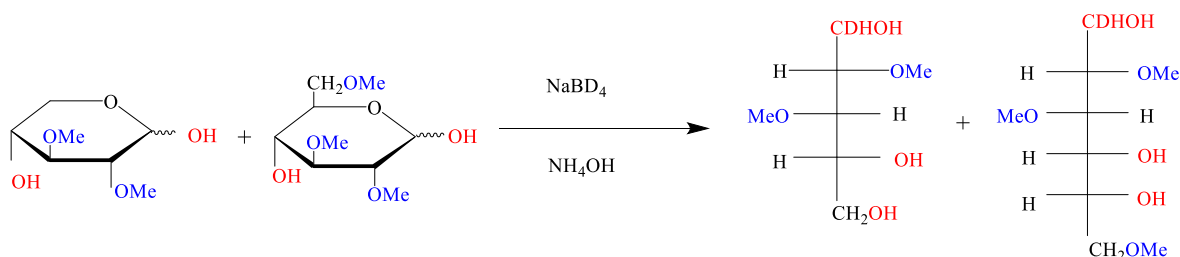
Trifluoreddiksyre (TFA) 2,5 M (500 µL) ble tilsatt til den metylerte polysakkaridprøven. Deretter ble prøven blåst med N₂-gass og satt i varmeskap (100-102°C) i 2 timer. Den hydrolyserte prøven ble avkjølt og tørket med Speed Vacuum Concentrator til gul oljeaktig væske.

4.4.1.3. Reduksjon

(Pettolino *et al.*, 2012)

Prinsipp:

Etter hydrolyse ble hemiacetal gruppen på C1 redusert til alditol med natrium-bordeuterid (NaBD₄) i basisk miljø. Det fører til at ringstrukturen brytes på de sykliske monosakkaridene. I tillegg koder NaBD₄ det anomeriske karbonet C1 med deuterium for skille mellom hydroksylgruppene ved C1 og C6 under GC-MS analyse (figur 17).



Figur 17. Reduksjon av aldehydgruppe med NaBD₄ med sukkers ringåpning og dannelse av delvis metylert aditol med markering av C1 atom med deuterium (Pettolino *et al.*, 2012)

Reagenser:

2M NH₄OH

1M NaBD₄, nylaget

Iseddiksyre

5 % eddiksyre i metanol

Vannfri metanol

Utstyr:

Finnpipetter:	100µL-1 mL
Finnpipetter:	10µL-100 mL
Minishaker:	MS3 Basic (IKA)
Sonikereapparat	Ultrasonic cleaning baths (VWR)
Speed Vacuum Concentrator:	
Vapornet:	Savant® VN100 (Thermo Scientific)
Refrigerated vapor Trap:	RVT4104
Speed Pressure Dryer:	Savant® SPD121P (Thermo Scientific)
Vacuum pump:	OFP4000 OIL-FREE (Thermo Scientific)

Prosedyre:

Residuet av prøvene (gul oljeaktig væske) etter hydrolyse ble løst i 2M NH₄OH (500 µL). Nylagde 1M NaBD₄ (500 µL) i 2M NH₄OH ble tilsatt hver prøve, sonikert i ultralydbad 1 minutt og satt til henstand over natten i kjøleskap (4°C). Overskudd av reduksjonsmiddel ble destruert ved å tilsette iseddiksyre (50 µL) 3 ganger. Etter hver tilsetning av eddiksyre ble prøvene blandet godt. Aktiv bobledannelse indikerer at reduksjonen var fullstendig. Mangel på bobledannelse tyder på at reduksjonen ble ikke fullstendig fullført eller natriumbordeuterid var inaktiv. I slike tilfeller er det nødvendig å redusere prøvene på nytt. Reduserte prøvene ble tørket i Speed Vakuum Dryer i ca. 3 timer (2,5 time med overheat). Dette trinnet kan ikke utsettes til neste dag på grunn av dannelse av borat komplekser. For å bryte komplekser med borat og dampe vekk reagenset ble det tilsatt 2 ganger til hver prøve:

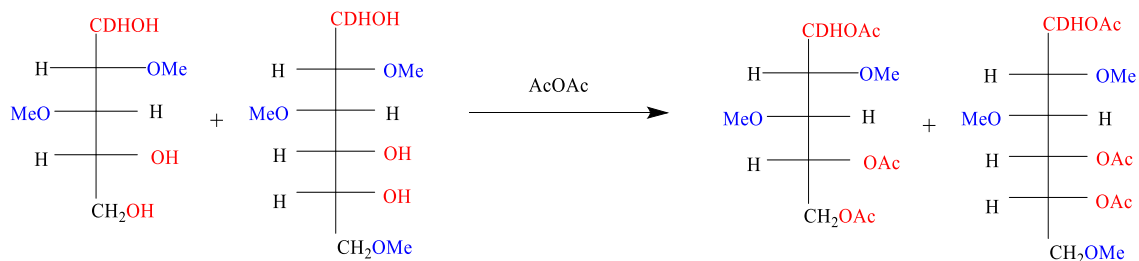
- 2,5 mL 5 % eddiksyre i metanol. Etter hver tilsetning ble prøvene tørket i Speed Vakuum Dryer 30 min med overheat den første gangen; 20 min med overheat den andre gangen;
- 2,5 mL metanol. Etter hver tilsetning ble prøvene tørket 40 min uten overheat. Det er viktig å dampe vekk borsyre siden tilstedeværelse av borat kan ødelegge analysen på GS-MS.

4.4.1.4. Acetylering

(Pettolino *et al.*, 2012)

Prinsipp:

Etter hydrolyse og reduksjon dannes hydroksylgrupper (som ble tidligere involvert i glykosidbindingene). For å gjøre de delvis metylerte aditolene mer flyktige til GS-MS analyse ble disse hydroksylgrupper acetylerert med eddiksyreanhydrid (figur 18).



Figur 18. Acetylering av delvis metylerte aditoler med eddiksyreanhydrid med dannelse av delvis metylerte aditolacetater (Pettolino et al., 2012)

Reagenser:

1-metylimidazol

Eddiksyreanhydrid

Diklormetan

Renset vann

Utstyr:

Metyleringsrør med teflonbelagt skrukork (store)

Metyleringsrør med teflonbelagt skrukork (små)

Supelcorør med teflonbelagt skrukork (SUPELCO)

Finnpipetter: 100µL-1 mL

Finnpipetter: 500µL-5 mL

Glasspipetter 1 mL, med Peleus ballong

Sonikereapparat Ultrasonic cleaning baths (VWR)

Minishaker: MS3 Basic (IKA)

Sentrifuge: Multifuge 4 KR Heraeus 72 (VWR)

Apparatur (nitrogengassoppsett med varmeenhet) til flushing med N₂-gass: Pierce,

Reacti-Therm III TM, Heating Module (Thermo scientific)

Vialer til GS-MS Chromacol 03-FISV (300µL) (Thermo scientific)

Skrukork til vialer Solid Cap with PTFE, 13mm, for 4 mL vialer (SUPELCO)

Prosedyre:

Residuet av prøvene ble løst i 1-metylimidazole (200µL) og eddiksyreanhydrid (2 mL). Løsningene ble blandet godt, sonikert i 5 min og deretter ble de satt til henstand i 10 minutter ved romtemperatur. For destruere overskudd av eddiksyreanhydrid ble løsningene overført til store metyleringsrør, blandet godt med rensset vann (tilsatt 10 mL) og satt til henstand i 10

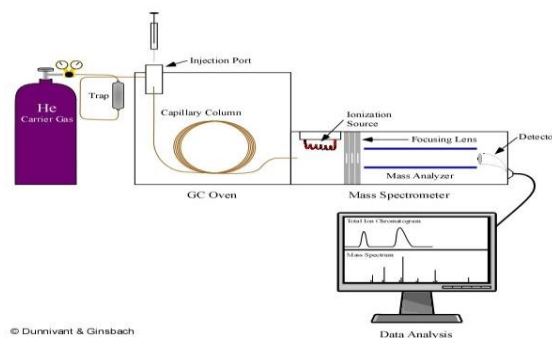
minutter (prøvene ble varme). De delvis metylerte alditolacetater ble ekstrahert over i diklormetan (1mL), ristet godt (>30 sekunder) og sentrifugert ved 1000 g i 3 minutter. Diklormetanfase ble suget opp med en glasspipette og overført til nye små metyleringsrør. Prosedyren ble gjentatt. Den andre diklormetanfasen ble suget opp med glasspipet og tilsatt til den første diklormetanfasen i små metyleringsrør. Samlet diklormetanfasen ble vasket ved å tilsette rensset vann (5mL), blande godt (>30 sekunder) og sentrifugere ved 1000 g i 3 minutter. Den første vannfasen ble fjernet og diklormetanfasen ble vasket på nytt med de samme betingelsene. Ny tørr glasspipette ble tatt helt ned, diklormetanfasen ble suget opp og overført til supelcorør. Prøvene ble tørket med N₂-gass og fryste ned på kjøleskapet (-20⁰C). Rett før GC-MS analysen ble residuene løst i passende mengde av diklormetan (150-350 µL), overført til GC-MS analyserør og analysert.

4.4.1.5. GC-MS

Prinsipp:

Gasskromatografi massespektrometri (GC-MS) kombinerer to effektive teknikker for å identifisere forbindelser med lave påvisningsgrenser. I Gasskromatografi (GC) blir stoffene først separert ved passasje gjennom en kromatografisk kolonne. Den tid det tar for en bestemt forbindelse å passere gjennom kolonnen til en detektor kan brukes for identifikasjon i forhold til en referanse. Detektoren gir en elektronisk respons av stoffene som bearbeider den gjennom datamaskinen med egnet programvare til kromatogrammer.

Etterpå elueres stoffene hver på seg inn i massespektrometeret og ioniseres (fragmenteres). Molekylionene/ fragmentene akselereres inn i en masseanalysator hvor de blir separert etter forholdet mellom masse og ladning (m/z). De ladede fragmentene blir detektert, og det etterfølgende spekteret kan brukes til å identifisere molekylene ([figur 19](#)).



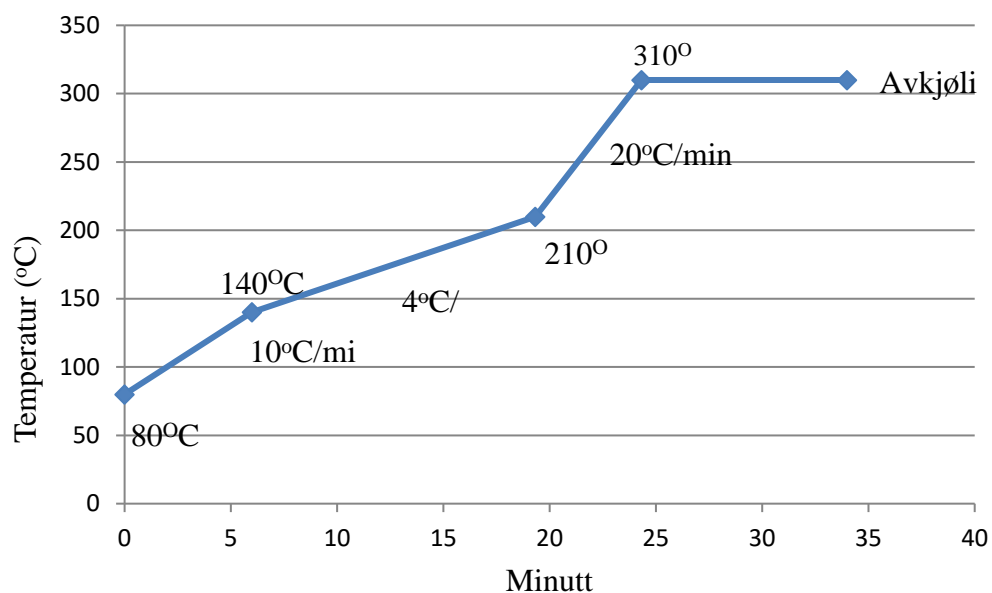
Figur 19. Skjematisk tegning av GC-MS instrument (Frank M. Dunnivant 2008)

Utstyr:

Gasskromatograf-massepektrometer:	GC-2010 med GCMS-QP2010 (Shimadzu Corporation)
Programvare:	GCMS Analysis
Bæregass:	Helium
Kolonne:	Restek Rtx-5 Lengde: 30 m, indre diameter: 0,25 mm, filmtykkelse: 0,25 μm

Betingelser:

Injektor temperatur:	280 °C
Interface detektor temperatur:	280 °C
Initial flow	1 mL/min
Ionekilde temperatur:	200 °C
Injeksjonssystem:	Splitt (1:10)
Injeksjonsvolum:	1 μl (automatisk)
Flow-modus:	Konstant trykk (77 kPa)
Temperaturprogram:	Se figur 20
GC-MS solution software	Version 2.10 (Shimadzu Corporation).



Figur 20. Temperaturprogram til GC MS.

Prosedyre:

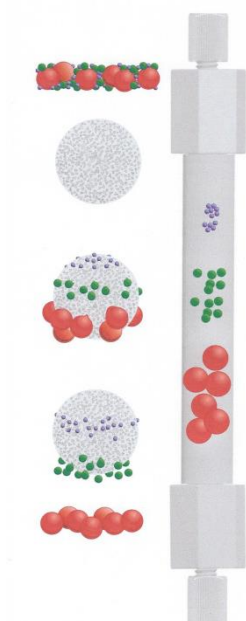
GC-MS-analysene ble utført av Hoai Thi Nguyen Aas ved Avdeling for farmasøytisk kjemi, Farmasøytisk institutt, Universitet i Oslo.

4.4.2. Molekylvekt bestemmelse med tillegg av standardkurver

Molekylvekt av polysakkaridene kan bli angitt som:

- M_n (antallsgjennomsnittet), som er et mål på lengden av polysakkaridkjeder og som kan bestemmes ved membrane osmometric, endegruppe analyse eller SEC.
- M_w (vektgjennomsnittet), som er mål på størrelsen av polysakkaridkjeder og kan bestemmes ved Lysspredning (SLS), Sedimentation likevekt og SEC.
- P_d (M_w/M_n) (polydispersitet), som er mål på molekylvektsheterogenitet (Fried, 2003; Polymer Molecular Weight Measurement, 2013).

Vektgjennomsnittet (M_w) av forskjellige fraksjoner av *A.ovinus* ble bestemt ved bruk av eksklusjonskromatografi (SEC).

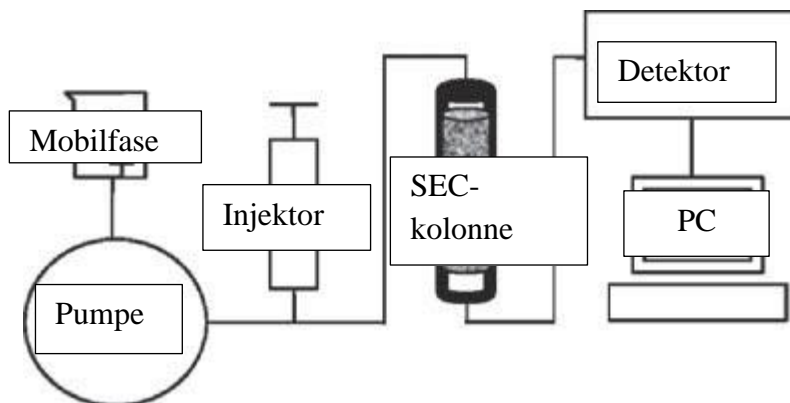


Prinsipp:

SEC (Size-exclusion chromatography) er en separasjonsmetode som separerer stoffene i løsningen etter molekylstørrelse. SEC- kolonne ble brukt for HPLC.

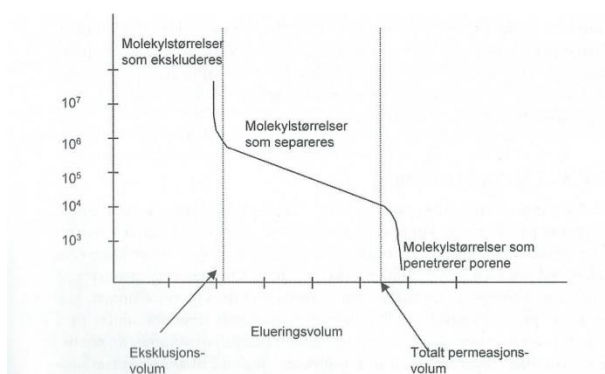
Eksklusjonskromatografi kolonnen er pakket med porøse partikler med bestemt porestørrelse. Separasjon skjer ved at mobilfase pumpes med konstant hastighet gjennom kolonnen. Store molekyler ekskluderes fra porene og transporteres gjennom kolonnen med samme hastighet som mobilfasen. Detektoren gir en elektronisk respons av stoffene som bearbejder den gjennom datamaskinen med egnet programvare til kromatogrammer (figur 22).

Figur 21. Oppbygning av SEC-kolonne (Tosoh Bioscience LLC, 2016)



Figur 22. Oppbygning av en HPLC-systemet (*Polymer Molecular Weight Measurement, 2013*)

Store molekyler som ikke går inn i porene og små molekyler som alle går inn i porene, kan ikke separeres fra hverandre. Eksklusjonsvolum er volumet av mobilfase som har transportert dem gjennom kolonnen. Små molekyler setter seg i porene og retarderes på kolonnen. Totale permeasjonsvolum er volumet av mobilfase som brukes til å eluere disse molekylene ut av kolonnen (figur 23).



Figur 23. Sammenheng mellom molekylstørrelse og volum av mobilfase som eluerer stoffene (*Pedersen-Bjergaard & Rasmussen, 2010*)

Eksklusjonskromatografi kan bare separere stoffer med molekylstørrelse som elueres (elueringsvolum) mellom eksklusjonsvolum og det totale permeasjonsvolum. (Pedersen-Bjergaard & Rasmussen, 2010). Elueringsvolum tilsvarer separasjonsområde som er oppgitt av produsenten til hver type av kolonnen.

Molekylvekts fordeling for de ulike fraksjonene ble bestemt ved hjelp av standardkurver av standarder med kjent molekylvekt.

Reagenser:

Renset vann

0,05M Na₂SO₄

EtOH 20 %

Luftbobler i kolonnen kan påvirke elueringen og derfor ble løsningene filtrert gjennom 0,45 µm og avgasset med Helium (metode 4.2.3 og metode 4.2.8).

Standarder:

Tabell 3. *Beta-(1→3)(1→4)--Glukan, Molekylvekt standarder (Megazyme)*

Standarter	Mp (kDa)	Mw (kDa)	Mn (kDa)	Pd
A	667	650	481	1,35
B	375	391	307	1,27
C	247	265	192	1,38
D	160	229	187	1,44
E	67,1	70,6	56	1,26
F	33,6	35,6	30,2	1,18

Tabell 4. *Pullulanstandarder (PL), Polymer Laboratories LTD*

Standarder	Mp (kDa)	Pd
1	853	1,14
2	380	1,12
3	186	1,13
4	100	1,1
5	48	1,09
6	23,7	1,07
7	12,2	1,06
8	5,8	1,07

Utstyr:

HPLC: Hitachi LaChrom Elite Chrom med pumpe, autosamler og programvare (Hitachi High Technologies America, Inc.)
 Pump: PUMP L-2130 med (Hitachi High Technologies America, Inc.)
 Autosamler: AUTOSAMPLER L-2200 (Hitachi High Technologies America, Inc.)
 Detektor: RI Detector L-2490 EZ
 Programvare: EZChrom Elite

Kolonne:

TSK-Gel® G5000PW_{XL} (Tosoh Bioscience LLC)

- Kolonnemateriale: sfæriske, hydrofile polymetakrylat kuler
- Volum 14,3 mL
- Partikkel størrelse: 10µm
- Pore størrelse: 1000 Å
- 7,8 mm x 30 cm (D x L)
- Max kolonnetrykk: 20 bar
- Separasjonsområde:
 - Dextraner med molekylvekt 50-700 kDa
- Max flow: 1mL/min
- pH:2,0-12,0
- Temperatur: 80°C

TSK-Gel® G3000PW_{XL}, (Tosoh Bioscience LLC)

- Kolonnemateriale: sfæriske, hydrofile polymetakrylat kuler
- Volum 14,3 mL
- Partikkel størrelse: 7 µm
- Pore størrelse: 200 Å
- 7,8 mm x 30 cm (D x L)
- Max kolonnetrykk: 40 bar
- Separasjonsområde:
 - Dextraner med molekylvekt <60 kDa
- Max flow: 1mL/min
- pH:2,0-12,0
- Temperatur: 80°C

Førkolonne:

TSK-GEL® PW_{XL} Guardcolumn Products (6,0 mm x 4,0 cm), (Tosoh Bioscience LLC)

- Max kolonnetrykk: 40 bar
- 6,0 mm x 4,0 cm
- Partikkel størrelse: 12 µm
- pH:2,0-12,0
- Temperatur: 10-80°C

Mobilfase:	0,05M Na ₂ SO ₄ filtrert med 0,45µm, avgasset med Helium (metode 4.2.3 og metode 4.2.8.).
Flow:	0,5 mL/min
Injeksjonsvolum:	95 µL
Vortex:	Lab Dancer (IKA)
Vannbad	ED Heating Immersion Circulator (JULABO GmbH)
Eppendorf-rør	
Falconrør	
HPLC vialer:	0,3mL (BROWN)
Filter:	Samplicity™ Filtration system with Milles Samlicity™ Filters, 0, 45 µm (EMD Millipore)

For å beskytte HPLC kolonne fra mulige partikler som kunne tette den ble:

- alle løsninger filtrert gjennom 0,45 μm membranfiltre ved hjelp av SmplicityTM Filtration system with Milles SamlicityTM Filters. Denne filtreringssystem kan brukes til å filtrere 8 antall prøver samtidig ved hjelp av en vakuumpumpe.

- systemet utstyrt med en førkolonne som ble plassert før SEC- kolonnen.

For å finne Mw som funksjon av Mp ble brukt programmet PSS WinGPC Scientific V6.20. Analysen ble utført ved Nofima mat i Ås.

Prosedyre:

Ved oppstart av analyse ble kolonnen vasket med vann 0,25 mL/min i 1 time (tilsvarer 1 kolonnevolum, kV) og etterpå 0,5 ml/min i 30 min for å vaske ut 20 % EtOH. Deretter ble den vasket med elueringsmiddel 0,05M Na₂SO₄ 0,5 ml/min i 1 time.

Frysetørkede polysakkarider ble veid opp i eppendorf-rør. Prøvene ble løst i elueringsmiddel (0,05M Na₂SO₄) 1 mg/mL, mikset godt på vortex og satt i vannbad (80⁰C) for å bli oppløst. Før injisering i kolonnen ble alle prøvene filtrert gjennom 0,45 μm i åpne vialer. Analysen av en prøve tok 30 minutter.

HPLC analyse ble avsluttet med å vaske kolonnen med vann 0,5 mL/min i 1 time og deretter med 20 % EtOH i 0,25 mL/min i 2 time.

Kolonner og førkolonne skal oppbevares i 20 % EtOH.

Tillagging av standardkurver:

Molekylvekt (Mw) for de ulike fraksjonene ble bestemt ved hjelp av høypunkt metode (peak position method) (Cui, 2005) med tillagging av standardkurver. Standardkurver ble lagt av standarder med kjent molekylvekt.

Standardkurver ble brukt til å estimere en regresjonslinje. Funksjonen til regresjonslinjen ble brukt til å beregne molekylvekt for de ulike fraksjonene.

Prinsipp:

Det ble laget lineær semilogaritmisk standardkurver ved å plote logaritmen Mp mot retensjonstid til utvalgte beta-(1 \rightarrow 3)(1 \rightarrow 4)-bundet glukano- og pullulanstandarder med forskjellige molekylvekt.

For å bestemme molekylvekt til alle polysakkaridene i prøvene ble det brukt en lineær regresjonsmodell.

For å finne linjen brukes minste kvadraters metode (least-squares).

Ligningen for en rett linje $Y = aX + b$

Y: Målt kromatografisk respons (retensjon tid)

X: Ln_Mp

a: Stigningstall

b: Skjærepunkt

Bestemmelse av a og b: Kalibrerings standarder / Kalibrerings kurve

Prosedyre:

Det ble brukt standarder av beta-(1→3)(1→4)-glukaner og pullulaner med kjent molekylvekt. Analysen av standarder skjer under de samme betingelsene som testen selv.

4.4.3. Kjernemagnetisk resonansspektroskopi

Kjernemagnetisk resonansspektroskopi (NMR, nuclear magnetic resonance) ble anvendt i ytterligere strukturoppklaring av polysakkaridene av *A. ovinus*.

Princip:

(Xia *et al.*, 2005)

Kjernemagnetisk resonansspektroskopi (NMR) er basert på at atomkjernene har en magnetisk egenskap (spinn). Elektromagnetisk stråling i radiobølgeområdet med den rette frekvensen kan vekselvirke med atomkjernene og gi et spekter. Spekteret viser det magnetiske fingeravtrykket til molekylet og også gir informasjon om hvilke omgivelser molekylet befinner seg i.

Reagenser:

Deuteriom oxide, 99,9 atom % D (D₂O)

5 % trimetylsilyl propanylsyre (TSP) i D₂O

Utstyr:

NMR tuber til automatisk sample tube systemet

med korker: SVCP-5-178-96PK (Norell)

Lenge 178mm

Diameter 5 mm

Prosedyre:

Frysetørkede polysakkaridprøver (5-10 mg) av *A. ovinus* ble løst i D₂O (550 µL). Det ble tilsatt 5 % trimetylsilyl propanylsyre (TSP) i D₂O (1 µL) som referanse. H₂O kommer ved 4,8 ppm. Opptak ved 300 K.

NMR-analysene ble utført på et AVIII HD 800MHz Bruker instrument av professor Frode Rise ved Avdeling for farmasøytisk kjemi, Farmasøytisk institutt, Universitet i Oslo. Resultatene ble beregnet av veileder 1. am. Anne Berit C. Samuelsen ved bruk av TopSpin versjon 3.2.

4.4.4. Affinitetskromatografi

Biomolekyler kan renses ved hjelp av spesielle opprensende teknikker som er basert på forskjellige bestemte egenskaper.

Prinsipp:

Affinitetskromatografi separerer polymerer på basis av en reversibel interaksjon mellom polymer og en spesifikk ligand koblet til en kromatografisk matrise.

Affinitetsopprensing består av noen trinn:

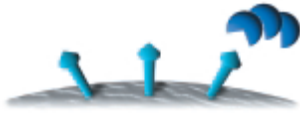
- valg av media;
- pakking av kolonne;
- aktivering av media med bindingsbuffer;



- preparasjon av prøven og applikasjon: Prøven påføres under spesielle betingelser som favoriserer spesifikk binding av målmolekylet til en spesifikk ligand. Da blir det målmolekylene reversibelt bundet til liganden og ubundet materiale blir vasket bort gjennom kolonnen.



- eluering: Målmolekyler elueres ved å endre betingelsene for å favorisere eluering av de bundne molekylerne. Eluering kan bli utført spesifikt, ved hjelp av en konkurrerende ligand, eller ikke-spesifikt, etter endring av pH-verdien, ionestyrke eller polariteten. Målmolekyler blir samlet i en rensert og konsentrert form.



- re-aktivering av media med bindingsbuffer;



Polysakkarider reagerer reversibelt, via spesifikke sukkerenheter, med en gruppe av proteiner som er lektiner. Derfor brukes lektiner som ligander for å isolere og separere polysakkarider.

4.4.4.1. Con A Sepharose 4B

Concanavalin A (Con A) er en tetramerisk metalloprotein isolert fra *Canavalia ensiformis*.

Con A binder molekyler som inneholder alfa-D-mannose, alfa-D-glukose, og sterisk beslektede rester med tilgjengelige C3, C4 eller C5 hydroksylgrupper. Derfor brukes ConA for binding av forgrenede mannoses, karbohydrater med terminal mannose eller glukose (Amersham pharmacia biotech, 2016).

Con A Sepharose[®] 4B med immobilisert Concanavalin A er en affinitet kromatografi media som har sterk affinitet for alfa-D-glukose (i mindre grad til alfa-D-mannose) (GE Healthcare, 2016).

Reagenser:

Con A Sepharose 4B (GE Healyhcare)

Bindingsbuffer (pH 7,4):

- 20mM Tromethane hydrochloride (Tris-HCl)
- 0,5 M Natrium klorid (NaCl₂)
- 1mM Mangan (II) klorid (MnCl₂)
- 1mM Kalsiumklorid (CaCl₂)
- Destillert vann

Elueringsbuffer (pH 7,4):

- 0,1-0,5 M methyl- α -mannopyranoside
- 20mM Tromethane hydrochloride (Tris-HCl)
- 0,5 M Natrium klorid (NaCl₂)
- Destillert vann

Rensingsbuffer

(1) *pH* 8,5:

-20mM Tromethane hydrochloride (Tris-HCl)

-0,5 M Natrium klorid (NaCl₂)

-Renset vann

(2) *pH* 4,5:

-0,5 M Natrium klorid (NaCl₂)

-20 mM Natriumacetat (NaC₂H₃O₂)

-Renset vann

Oppbevaringsbuffer (pH6):

-0,1M Natriumacetat (NaC₂H₃O₂)

-1 M Natrium klorid (NaCl₂)

-1mM Mangan(II)klorid (MnCl₂)

-1mM Kalsiumklorid (CaCl₂)

-1mM Magnesium(II)klorid (MgCl₂)

-20% etanol

Natriumazid (NaN₃)

Utstyr:

Kolonne 6 ml

Drammeglass

Eppendorfrør

Metanolyserør

Amicon[®] Ultra sentrifugal filter tube: Ultra-4 10K (Millipore)

Materiale

- polyethylene cap
- polypropylene tube
- Millipore Ultracel[®] lav binding regenerert

cellulose membraner

- konsentreringsvolum 50–100 µL

Minishaker: MS3 Basic (IKA)

Vannbad ED Heating Immersion Circulator (JULABO GmbH)

Sentrifuge:

Multifuge 4 KR Heraeus 72 (VWR)

Prosedyre:

Aktivering av kolonnemateriale og pakking av kolonnen:

Suspensjon av Con A Sepharose 4B ble overført til et drammeglass. For å fjerne konserveringsmiddel ble Con A Sepharose 4B vasket 10 ganger med bindingsbuffer. Etterpå ble kolonnematerialet overført til kolonnen med filter og outlet. Con A Sepharose 4B bør ha romtemperatur før pakking av kolonnen. Kolonnematerialet bør vaskes og overføres forsiktig for å unngå luftbobler dannelsen. Pakket kolonnen ble vasket 2 ganger til pakkematerialehøyden i kolonnen blir konstant.

Påføring og eluering av prøve:

Frysetørkede polysakkarider (ca.15 mg) av vannekstrakt WAO av *A. ovinus* ble veid inn i eppendorfrør. Prøven ble løst i bindingsbuffer (2 mL, til ca. 5 mg/mL), mikset godt på vortex og satt i vannbad (80°C). Etterpå ble prøveløsningen overført til kolonnen. Forventet glukosefraksjon ble først eluert med 5-10 kolonne volumer av bindingbufferen (fraksjon1). Forventet mannose fraksjon ble deretter eluert med 5 kolonnevolumer av elueringsbuffer.

Regenerasjon og oppbevaring av kolonnematerialet:

Kolonnematerialet ble først vasket med rensingsbuffer 1. Væsken ble tatt bort og etterpå ble materialet vasket med rensingsbuffer 2. Dette trinnet ble gjentatt 3 ganger. Regenerert Con A Sepharose 4B ble overført til sluttbeholderen med oppbevaringsbuffer og satt i kjøleskapet.

Oppkonsentrering av polysakkaridsfraksjoner:

For å vaske Amicon® Ultra sentrifugal filter tube av konserveringsmiddelet (Na-azid) ble det tilsatt 5 mL vann og sentrifugert ved 4000g i 10 min.

Første porsjon (4mL) av forventet glukosefraksjon ble overført til tube og sentrifugert med 4000 g i 20 min. Etter sentrifugering ble supernatant fjernet av røret og filteret ble fylt opp med ny porsjon av fraksjon 1 inntil det ikke er mer igjen. Oppkonsentrert prøven ble vasket med vann for å fjerne salter og ioner ved sentrifugering 4000g i 5 min. Prosedyren ble gjentatt 2 ganger. Konsentrat av fraksjon 1 ble overført til metyleringsrør, dekket av perforert parafilm, fryst ned i kjøleskapet og frysetørket for videre bruk (metode 4.2.5.).

Amicon® Ultra sentrifugal filter tube ble vasket 3 ganger med rensing vann ved å sentrifugere med 4000g i 20 min. Etterpå ble operasjon gjentatt med fraksjon 2. Konsentrat av fraksjon 2

ble overført til metyleringsrør, dekket av perforert parafilm, fryst ned i kjøleskapet og frysetørket for videre bruk (metode 4.2.5.).

Karbohydratsammensetning i begge fraksjonene ble bestemt ved metanalyse (metode 4.3.1.).

Til slutt ble Amicon[®] Ultra sentrifugal filter tube ble vasket 3 ganger med rensset vann ved å sentrifugere med 4000g i 20 min, fult opp med konserveringsmiddel (Na-azid) og satt i kjøleskapet.

4.4.5. Alfa-amylase behandling

4.4.5.1. Alfa-Amylase

Prinsipp:

Alfa- amylase (alfa-1,4-D-Glucan-glucanohydrolase) fra bygg malt (3.2.1.1, 1961) er et protein enzym som hydrolyserer alfa -(1 → 4) -D-glykosidbindingene i polysakkarider som består av tre eller flere alfa- (1 → 4)-bundne D-glukoseenheter. Enzymet påvirker stivelse, glykogen og relaterte polysakkarider og oligosakkarider slik at de brytes ned i mindre enheter på en tilfeldig måte; reduserende grupper frigjøres i den alfa-konfigurasjon. Samtidig blir ikke alfa -(1 → 6) bindinger hydrolysert (Sigma Aldrich Co, 2016).

Aktiviteten og stabiliteten av alfa-amylase er temperaturavhengig (MacGregor, 1978).

1 mg av pulver inneholder 1,5 U alfa-amylase (Sigma Aldrich Co, 2016).

Reagenser:

Alfa-amylase (EC 3.2.1.1):

- type VIII-A, pulver
- 1,5U α -amylase/mg stoff
- Molekylvekt 45kDa
- pH-aktivitets optimum mellom 5 og 6,1

Toluen

96 % etanol

70 % etanol

Rensset vann

Utstyr:

Varmeskap

Function line (Heraeus Instruments)

Vannbad

ED Heating Immersion Circulator (JULABO GmbH)

Sentrifuge:

Multifuge 4 KR Heraeus 72 (VWR)

Prosedyre:

Frysetørkede polysakkarider (20-100 mg) ble veid inn i Falconrør. Prøvene ble løst i rensset vann (ca. 2 mg/mL). Det ble tilsatt alfa – amylase fra bygg malt (0,5U/mg polysakkarider) og 3 dråper av toluen (for å hindre bakterievekst). Prøvene ble mikset godt på vortex og satt i varmeskap med: 20⁰C i 20 timer og 37⁰C i 2 timer. Deretter ble reaksjonen stoppet ved å koke løsningsene i 5 min (proteinet ble denatureert). Etter koking ble tilsatt til hver prøve 3 volum etanol for felling av vannløselig polysakkarider. Prøvene ble satt til henstand over natt i kjøleskapet (4⁰C) og etterpå sentrifugert ved 2000 g i 10 minutter.

Bunnfallet:

Bunnfallet ble vasket 3 ganger med 70 % etanol for å fjerne rester av monosakkaridene. Prøvene ble sentrifugert ved 2000 g i 10 minutter mellom hver gang. Tørre stoffer ble løst på nytt i rensset vann (til ca.1 mg/ ml), overført til en liten rundkolbe, fryst ned på metanolbad og frysetørket for videre bruk (metode 4.2.5.). Rundkolben ble veid før og etter frysetørking for å bestemme utbytte.

Deretter ble karbohydratsammensetning og struktur bestemt ved metanalyse (metode 4.3.1), Molekylvekt ble undersøkt ved SEC-HPLC (metode 4.4.2.). Prøvene ble også testet for biologisk aktivitet (metode 4.5.).

Alfa-glukaner i frysetørket polysakkaridfraksjon av *A.ovinus* kan også påvises ved hjelp av jod-jod-kalium testen (metoden 4.4.5.2).

4.4.5.2. Jod-jod-kalium test

Prinsipp:

Jod-jod kalium test brukes for å påvise stivelse og glykogen. Løsning av jod-jod kalium reagerer med alfa-glukaner og gir en mørkeblå farge. Uten alfa-glukaner er løsningen fortsatt gul (Rundle *et al.*, 1944).

Reagenser:

Jod-jod-kalium (3,3 % jod og 6,7 % Kaliumjodid løst i deionisert vann)

Utstyr:

Porselensplate med flere små brønner

Pipetter

Rørespatel

Prosedyre:

En liten mengde av prøve ble dryppet i hver brønn på porselensplate og blandet med en liten mengde av løsning av jod-jod-kalium. Fargeendring ble notert.

4.4.6. Partiell hydrolyse**Prinsipp:**

(Nyman *et al.*, 2016; Zakaria Boual & Hadj, 2012)

Polysakkarider kan partiell hydrolyseres (uten å spalte alle bindinger til monomerer) i surt miljø. Dette ble gjort med alkali-ekstrakter av *A.ovinus* for å øke løselighet i vann (for om mulig å få bedre resultater ved metylering (metode 4.4.1.), NMR (metode 4.4.3.) og SEC-HPLC (metode 4.4.2.).

Partiell syrehydrolyse ble forsøkt med 0,1M trifluoreddiksyre (TFA) etter 1 time hydrolyse ved temperatur 100⁰C.

Reagenser:

Renset vann

0,1 M Trifluoreddiksyre (TFA)

96 % etanol

70 % etanol

Utstyr:

Falconrør med skrukork

Rundkolbe 250 mL

Finnpipetter: 100µL-1 mL

Finnpipetter: 500µL-5 mL

Minishaker: MS3 Basic (IKA)

Varmeskap Function line (Heraeus Instruments)

Vakuumporotavapor med vannbad IKA RV10 basic (VWR)

Sentrifuge:

Multifuge 4 KR Heraeus 72 (VWR)

Prosedyre:

Frysetørkede polysakkarider (ca.30 mg) av alkaliekstrakten av *A. ovinus* ble veid inn i Falconrør. Prøven ble løst i 0,1 M TFA (6 mL), mikset godt på vortex og satt i vannbad (100°C). Etter 1 time ble prøven ble raskt avkjølt på is for å stoppe hydrolysen.

Etter avkjøling ble prøven (6 mL) tilsatt etanol (18 mL) for felling av vannløselig polysakkarider. Prøven ble satt til henstand over natt i kjøleskapet og etterpå sentrifugert ved 1000 g i 10 minutter.

Bunnfallet:

Bunnfallet (blanding av vannløselig og vannuløselig polysakkarider) ble vasket 2 ganger med 70 % etanol (6 mL) for å fjerne TFA rester. Prøven ble sentrifugert ved 1000 g i 10 minutter mellom hver gang. Tørre stoffer ble løst på nytt i destillertvann (30 mL, til ca.1 mg/ml), overført til en liten rundkolbe, fryst ned på metanolbad og frysetørket for videre bruk (metode 4.2.5.). Rundkolben ble veid før og etter frysetørking for å bestemme utbytte.

Supernatant:

Supernatantene ble overført til en liten rundkolbe og dampet inn til tørrhet på rotavapor ved 40°C (metode 4.2.7.). Etterpå ble residuaene vasket flere ganger med etanol (5 mL) og dampet på nytt til TFA ble fjernet. Tørre stoffer ble løst på nytt i destillertvann (2 mL), overført til et lite drammeglass, fryst ned på metanolbad og frysetørket (metode 4.2.5.).

Drammeglasset ble veid før og etter frysetørking for å bestemme utbytte.

Deretter ble karbohydratsammensetning og struktur bestemt ved metanolyse (metode 4.3.1.), NMR (metode 4.4.3.). Molekylvekt ble undersøkt ved SEC-HPLC (metode 4.4.2.). Prøvene ble også testet for biologisk aktivitet (metode 4.5.).

4.5. IMMUNOMODULERENDE AKTIVITET

4.5.1. Celleforsøk

4.5.1.1. Celledyrking

Prinsipp:

RAW 264.7 celler er en makrofagliggende leukemisk cellelinje fra mus. Disse cellene kan dyrkes i kultur (in vitro) i et laboratorium. For å kunne dyrke celler utenfor kroppens naturlige miljø skal cellene være omgitt av et vekstmedium som inneholder nødvendige næringsstoffer. Cellene skal dyrkes ved riktig temperatur og pH. Dette oppnås ved å dyrke cellene i sterile cellkulturflasker i en CO₂ inkubator med temperatur 37⁰C. Den riktige CO₂ konsentrasjon (5 %) bidrar til å opprettholde en fysiologisk pH (ca.7,2). Vekstmedie inneholder også nødvendige næringsstoffer som for eksempel glukose, glutmin og blodserum. I tillegg til næringsstoffer skal mediet inneholde en riktig mengde av uorganiske salter (for eksempel natrium bikarbonat) som kan fungere som buffer og antibiotika.

Reagenser:

Dulbecco's Modified Eagle medium (DMEM):

4,5g/L D-glukose

4mM L-glutamine

Penicillin (10 Units/mL)

Streptomycin (10 µg/mL)

Natrium bikarbonat (7,5 %)

Føtalt bovint serum (FBS)

Utstyr:

Pipetter (sterile) 5 og 10 mL

Vannbad SUB Aqua 12 Plus (Grant Instrument)

LAF-benk Class II Biological Safety Cabinet Sentinel Gold
(ESCO World Glass)

Prosedyre:

Det ble laget vekstmedium ved å tilsette natrium bikarbonat (10 mL), føtalt bovint serum (FBS;50 mL) og penicillin (100 U/mL) /streptomycin (10 mg/mL;5 mL) til Dulbecco's Modified Eagle medium (DMEM).

4.5.1.2. Splitting av celler

Prinsipp:

I kultur gjennomgår celler vanligvis 3 vekstfaser. Den første fasen er lag-fasen (1-2 dager). I denne fasen tilvenner cellene seg sitt nye miljø og fester seg på bunnen av celledyrkingsflasken. Deretter kommer en log-fase hvor cellene deler seg. Til slutt følger en plata-fase hvor dyrkingsarealet i flasken er tilnærmet fullt. Cellene vil da ikke lenger dele seg og det er derfor nødvendig å splitte dem (overføre en liten mengde celler til nytt vekstmedium (dag 4 etter inokulering).

Reagenser:

DMEM med FBS

RAW 264,7-celler (ATCC[®] TIB-71[™])

Utstyr:

Cellekulturflaske (sterill)	Corning [®] cell culture flasks (Corning Incorporated, USA)
Sentrifugerør (50mL)(sterill)	Corning [®] 50mL Centrifuge Tube (Corning Incorporated, USA)
Pipetter (sterile)	5 og 10 mL
Celleskraper (sterile)	Cell scraper S (TPP, Sveits)
-lengde 240 mm	
-svingbare blad, bredde 13 mm	
Inkubator	Esco CelCulture [®] CO ₂ (ESCO World Glass)
LAF-benk	Class II Biological Safety Cabinet Sentinel Gold (ESCO World Glass)

Prosedyre:

Splitting ble gjennomført 2 ganger i uken i en LAF-benk med vertikal laminær luftstrøm for å hindre kontaminasjon av cellene. Gammelt vekstmedium ble fjernet ved hjelp av en pipette. Nytt medium (20 mL) ble tilsatt celledyrkingsflasken. Cellene ble løsnet fra bunnen av celledyrkingsflasken ved bruk av celleskrape. Nylaget cellesuspensjon ble suget opp og ned 10-15 ganger med en pipette for å løse opp mulige celleaggregater. Deretter ble cellesuspensjon (1 mL) overført til en ny dyrkingsflaske med nytt medium (20 mL). Cellene ble inkubert ved 37⁰C og 5 % CO₂.

4.5.1.3. Celletelling

Celletelling er nødvendig for å bestemme celletettheten før et celleforsøk. Cellene ble telt i en automatisert celledetektor.

Reagenser:

Trypanblått (0,4 %)

Utstyr:

Automatisk celledetektor	Countess™ (Invitrogen)
Chamber Slide (glassplate)	Countess™ (Invitrogen)

Prosedyre:

Cellesuspensjon (15 µL) ble blandet med trypanblått (15 µL). Blandingen ble overført til en spesiell glassplate som ble plassert i celledetektoren. Resultatet ble vist på display som:

- Konsentrasjon av levende og døde celler pr ml
- Total cellekonsentrasjon/mL
- Mengde levende celler angitt i % av total mengde celler

4.5.1.4. Utsåing av celler

Reagenser:

DMEM med FBS

RAW 264.7-cellesuspensjon

Utstyr:

6-brønners cellekulturplater (sterile) (Corning Incorporated, USA)	Corning® cell culture plate non-pyrogenic
Sterile finpipetter	100µL-1 mL
Pipetter (steril)	5 og 10 mL

Prosedyre:

Etter celletelling ble den opprinnelige celsuspensjonen fortynnet med vekstmedie med serum til cellekonsentrasjonen 1000 000 celler/mL. Nylaget celsuspensjon ble suget opp og ned 10-15 ganger ved hjelp av pipette for å løse opp mulige celleaggregater. Deretter ble

cellesuspensjon (1mL) og vekstmedie med serum (1mL) sådd ut i i 6-brønners brett slik at antall celler per brønn ble 1000 000 celler. Cellene ble inkubert ved 37⁰C og 5 % CO₂ i 24 timer.

Alle arbeidene ble utført i LAF-benken med krav til sterilitet.

4.5.1.5. Stimulering prøver med polysakkarider av *A. ovinus*

Reagenser:

Dulbecco's Modified Eagle medium (DMEM):

4,5g/L D-Glukose

4mM L-glutamine

Partikulært beta-glukan (sterilt) fra gjær (Biotec Pharmacon, Tromsø)

Utstyr:

Sentrifugerør (steril) Fisherbrand[®] 15 mL Centrifuge Tube (Fisher scientific)

Finnpipetter 100µL-1mL

Pipetter (sterile) 5 og 10 mL

Prosedyre:

Frysetørkede polysakkaridprøver av *A. ovinus* ble veid inn i sentifugerør og løst i serumfritt medium til konsentrasjon 1 mg/mL. Løsningen ble videre fortynnet til 0,5 mg/mL og 0,25 mg/mL. Gammelt vekstmedie fra de inkuberte cellene ble suget av med pipette og kastet. Cellene ble deretter vasket med serumfritt vekstmedium (1mL). Serumfritt medie var negativ kontroll. beta-glukan fra gjærsopp (1 mg/mL) ble brukt som positiv kontroll. Oppløste prøver i forskjellige konsentrasjoner (1 mL) ble tilsatt til de andre brønnene. Prøvesuspensjoner ble suget opp og ned ca.3 ganger på forhånd for å løse opp mulige polysakkaridaggregater. Cellene ble inkubert ved 37⁰C og 5 % CO₂ i 48 timer.

Alle arbeidene ble utført i LAF-benken for å hindre kontaminering av cellene.

4.5.1.6. Lysering av celler

Reagenser:

Lysisbuffer (500 ml) (pH 5.8):

100 mM natriumcitrat

1 mM Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dihydrate (Na₂EDTA)

1 % (5 g) n-oktyl- β -D-glukopyranosid (detergent)
Fosfat-buffer (PBS) (pH 7,2)

Utstyr:

Eppendorf rør	1,5 mL (Eppendorg AG)
Finnpipetter	100 μ L-1 mL
Pipetter (sterile)	10 mL
Sentrifugerør (sterile)	Corning [®] 50mL Centrifuge Tube (Corning Incorporated)
Celleskraper (sterile)	Cell scraper S (TPP, Sveits)
-lengde 240 mm	
-svingbare blad, bredde 13 mm	
Varmeblokk	Dri-Block [®] DB-2D (Techne)
Mikrosentrifuge	Fresco 21 (Thermo scientific)

Prosedyre:

Etter inkubasjon (48 timer) ble mediet pipettert av. Cellene ble vasket ved å tilsette PBS (1 mL) til hver brønn. Brettene ble vippet litt frem og tilbake og all PBS ble tatt av. Etterpå ble cellene tilsatt lysisbuffer (500 μ L) bestående av 1 mM Na₂EDTA, 100 mM natriumcitrat og 1 % n-oktyl- β -D-glukopyranosid. Cellene ble deretter skrapet løs fra brønnene ved bruk av celleskraper, og lysatene ble overført til merkede eppendorfrør. Lysatene ble frosset ned (-70⁰C) i ca.- 15 min og tint raskt opp på varmeblokk (30⁰C) for å oppnå bedre lyseringsgrad. Denne fryse-tine prosessen ble gjentatt 2 ganger. Lysatene ble så sentrifugert ved 10 000 g (4⁰C) i 10 min., og supernatante ble overført til nye merkede eppendorfrør. Prøvene ble oppbevart ved - 20 °C.

4.5.1.7. Måling av legumainaktivitet

Prinsipp:

RAW 264.7 celler produserer cysteinproteasen legumain. Cellelysaten vil dermed inneholde dette proteinet, og ved å tilsette en assaybuffer som inneholder reduksjonsmiddelet ditiotretiol (DDT) vil legumain aktiveres. I tillegg tilsettes en substratløsning som inneholder en fluorescerende gruppe (NHMeC) karboksylterminal for asparagin (Asn) (Z-Ala-Ala-Asn-NHMeC). Da legumain spalter proteiner spesifikt etter Asn vil den fluorescerende gruppen

frisettes når legumain er tilstede. Fluorescensen som måles i en mikroplateleser (Wallac 1420 Viktor³ multilabel counter) (Johansen *et al.*, 1999).

Reagenser:

0,9 % NaCl

Assaybuffer (pH 5,8):

Sitronsyre

Dinatriumfosfat (Na₂HPO₄)

Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dihydrate (Na₂EDTA)

3-[(3-Cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propanesulfonate hydrate (CHAPS)

Assaybuffer skal oppbevares kjøleskap

Ditiotretiol (DTT) tilsettes rett før bruk

Bruksløsning: 10 ml assaybuffer + 20 µl 0,5 M ditiotretiol (DTT)

Substratløsning: 200 µl 2,5 mM substrat (Z-Ala-Ala-Asn-NHMec) + 14,5 ml assaybuffer

Utstyr:

Mikroplateleser Wallac 1420 Victor³ Microplate Reader (Perkin Elmer Life and Analytical Sciences)

Programvare: Workout

96-brønners mikroplate Corning[®] Costar[®] 96-Well Cell Culture Plates (Corning Incorporated)

Finnpipetter

Prosedyre:

20 µL) av hver prøve ble pipettert i paralleller til en 96-brønners mikroplate. Buffer (100 µL) ble deretter tilsatt, og etter 10 min, umiddelbart før målingen startet, ble det tilsatt 50 µl substratløsning til hver brønn. Årsaken til at det måtte gå minst 10 minutter fra tilsetting av reduksjonsmiddel (DTT) til måling av legumainaktivitet var for å sikre aktivering av enzymet. Som negativ kontroll ble 0,9 % NaCl (20 µL) brukt. Etter tilsetning av substratløsning

ble mikroplaten satt i mikroplateleseren for å måle kinetikk (økning i fluorescens per tidsenhet; $\Delta F/\text{sek.}$).

4.5.1.8. Måling av totalprotein

For å korrigere for eventuelle differanser i antall celler per brønn, ble den målte legumainaktiviteten dividert på den totale mengden protein som ble produsert i hver brønn.

Reagenser:

Bio-Rad Protein Assay

Dye reagent Concentratum

Utstyr:

Mikroplateleser Wallac 1420 Victor³ Microplate Reader (Perkin Elmer Life and Analytical Sciences)

Finnpipetter 10-100 μL og 20-300 μL

96-brønners microplate Nunc TM MicroWell plate 96F PS (Thermo ScientificTM)

Prosedyre:

For å måle den totale mengden protein i cellelysaten ble BioRad Protein Assay benyttet. I dette assayet vil det forekommefargeendring som en respons på forskjellige proteinkonsentrasjoner. Fargereagens ble laget ved å fortynne Dye Reagent Concentrate (10 mL) med 4 deler sterilt vann. Det ble brukt 7 fortynninger av en proteinstandard (Bovint serumalbumin (BSA)) for å lage en standardkurve slik at total mengde protein i prøvene kunne beregnes. Standarder (10 μL) og cellelysate (10 μL) ble overført i paralleller til en 96-brønners microplate. Fortynnet Dye Reagent Concentrate (200 μL) ble tilsatt hver prøve og inkubert ved romtemperatur i omtrent 1 time. Absorbansen ble målt i en mikroplateleser (Wallac 1420 Viktor³ multilabel counter) ved bølglengde 595 nm.

5. RESULTATER

5.1. STRUKTUROPPKLARING

5.1.1. Kvalitativ og kvantitativ monosakkaridbestemmelse

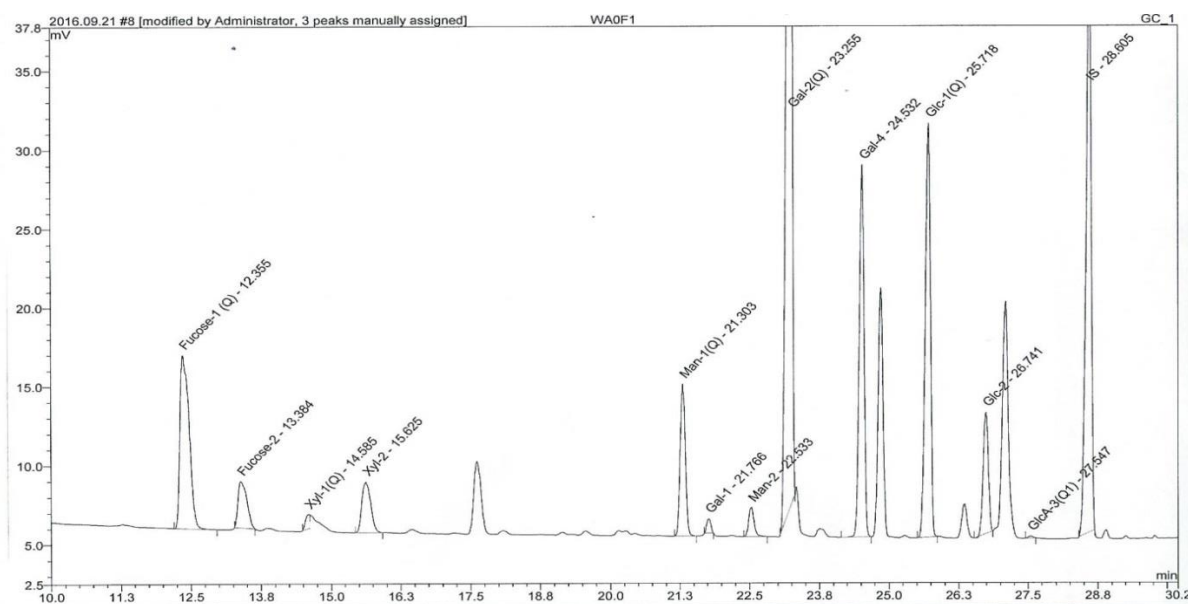
Monosakkaridsammensetning og totalt monosakkaridinnhold av vannekstrakt: WAo, WAoF₁, WAoF₂-og alkaliekstrakt: AAoSw og AAoIw fra *Albatrellus ovinus* ble bestemt ved hjelp av GC som ble gjennomført etter metanolyse og TMS-derivatisering.

- **Kvalitativ bestemmelse av monosakkarider i prøven**

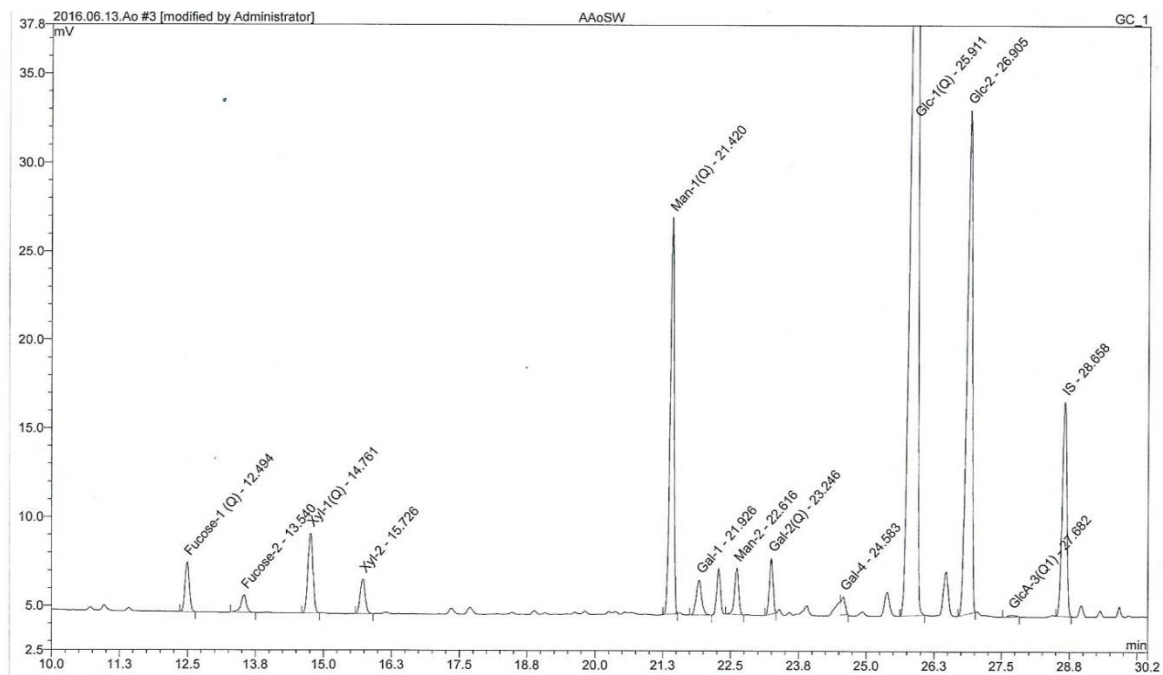
Mannitol ble brukt som internstandard og den kommer ut ved 28,6 min.

Figur 24 og 25 viser eksempler på kromatogrammene til vann (WAoF₁)- og alkali (AAoSw) - ekstrakter av *A. ovinus*.

Figur 24 viser at vannekstrakt av *A. ovinus* (WAoF₁) inneholdt store mengder av Fuc (fukose), Gal (galaktose), Glc (glukose) og Is (intern standard). De største toppene tilsvarer fukose (Rt 12,35 og 13,36), galaktose (Rt.21,76, 23,25 og 24,52) og glukose (Rt.25,71 og 26,74). Den siste toppen ved Rt 26,61 er fra interstandard (Is).



Figur 24. Et eksempel på GC-kromatogram av WAoF₁ fraksjon av vannekstrakt WAo. Mannitol er interstandard.



Figur 25. Et eksempel på GC-kromatogram av alkaliekstrakt AAoSw. Mannitol er interstandard.

Alkali (AAoSw og AAoIw)- og vannekstrakter (WAo: WAoF₁ og WAoF₂) fra *A. ovinus* inneholdt både glukose, galaktose, mannose, xylose, fukose og rester av glukuronsyre.

- **Kvantitativ bestemmelse av monosakkarider i prøven**

For å kunne beregne total mengde av monosakkarider i metanolyseprøver ble det tilsatt 100 µl av (1,0 µg/µl) mannitol som en intern standard. Mannitol ble brukt som intern standard fordi den ikke finnes naturlig i polysakkarider. Det forutsettes at internstandard oppfører seg som stoffet som skal bestemmes under prøveopparbeidelsen. Dermed vil den korrigere for tilfeldige endringer som skjer under prøveopparbeidelsen.

Tabell 5. Monosakkaridsammensetning i vann og alkali rå-ekstrakter; prosent av totalt karbohydratinhold.

Monosakkarid	WAo	WAoF ₁	WAoF ₂	AAoS _w	AAoI _w
Glc	41,1	19,1	69	78,8	77,9
Gal	40,7	59,8	22,3	2,4	0,7
Fuc	13,6	15,1	6,0	2,5	2,2
Xyl	0,8	0,7	0,4	4,1	6,4
Man	3,2	4,9	1,5	11,7	12,7
GlcA	0,6	0,4	0,8	0,5	-
Sum %	100	100	100	100	100

Tabell 5 viser at dominante sukkere i fraksjonen WAoF₁ var galaktose (58,8 %), fukose (15,1 %) og mannose (4,9 %). Proporsjonen mellom fukose og galaktose var 1:3,9. Disse resultatene stemmer med resultatene av analysene av vannekstrakt av *Polyporus ovinus* (*Allbatrellus ovinus*) som allerede er beskrevet i litteraturen (Axelsson & Björndal, 1969).

Predominante sukkere i fraksjonen WAoF₂ var glukose (69 %) og galaktose (22,3 %).

Begge to alkali ekstraktene inneholdt D- glukose som dominant sukker sammen med små mengder av D- galaktose, D- mannose, L- fucose, D- xylose.

5.1.2. Karakterisering av bindingsforhold

Bindingsmønster ble bestemt ved gaskromatografi-massespektroskopi (GC-MS) etter metylering (metode 4.4.1). Det var analysert rå-ekstrakter: WAo, WAoF₁, WAoF₂, AAoI_w og AAoS_w (tabell 6); partiell hydrolyserte (I) rå-ekstrakter: AAoI_w 1-1 og AAoS_w1-1 (tabell 36); alfa-amylase behandlet rå-ekstrakter: AAoI_wAB og AAoS_wAB (tabell 17). Det var også analysert WAo etter separasjon på Con A Sepharose 4B: WAo (fraksjonen 1) og WAo (fraksjonen 2) (tabell 15).

Tabell 6. Bindingsforhold i vann og alkali rå-ekstrakter, % av total karbohydrat

Monosakkarider og deres bindingstyper		Vann ekstrakter			Alkali ekstrakter	
		WAO	WAOF ₁	WAOF ₂	AAoS _w	AAOI _w
Fucp	1→	13,5	14,6	5,6	2,4	1,3
	1→3	0,1	0,5	0,4	0,1	0,9
Sum %		13,6	15,1	6,0	2,5	2,2
Xylp	1→	0,6	0,5	0,30	3,3	3,2
	1→2	0,1	0,2	-	0,6	0,8
	1→3	0,1		-	0,2	2,4
		0,8	0,7	0,4	4,1	4,0
Man	1→	3,2	4,9	1,5	11,7	12,7
Sum %		3,2	4,9	1,5	11,7	12,7
Gal	1→	1,5	2,2	0,3	0,2	0,1
	1→6	26,9	38,8	14,5	1,6	0,3
	1→2,6	12,7	17,8	7,4	0,8	0,3
Sum %		40,7	59,8	22,3	2,4	0,7
Glc p	1→	8,7	3,0	17,6	10,6	10,8
	1→3	6,3	6,9	6,0	35,6	37,6
	1→4	16,6	1,6	24,9	14,7	22,0
	1→6	2,1	1,2	5,1	5,5	1,3
	1→3,4	1,3	0,9	0,4	2,9	1,5
	1→2,3	0,2	0,7	0,6	0,6	2,9
	1→4,6	3,5	2,6	11,8	1,8	1,3
	1→3,6	2,1	2,6	2,5	9,6	5,2
Sum %		41,1	19,1	69	78,8	77,4

Tabell 6 viser at metylert WAOF₁ inneholdt 2,3,4,6-Tetra -O-Methyl -L- fukose (14,6 %) (tilsvarer 1→), 2,3,4,6-Tetra-O – Methyl -D- galaktose (2,2 %) (tilsvarer 1→), 2,3,4- Tri -O-Methyl- D -galaktose (38,8 %) (tilsvarer 1→6) og 3,4-Di- O-Methyl- D- galaktose (17,8 %) (tilsvarer 1→2,6). Metanolyse avdekket at WAOF₁ inneholdt nærmere 60 % galaktose mens metyleringsanalyse viste at ca 2/3 av galaktoseenhetene var (1→6) bundne og i underkant av 1/3 (1→2,6)-bundne, mens bare en liten andel (2,2 % av total karbohydrat) var bundet i ikke reduserende ende (1→).

En fullstendig reaksjon ved metylering av et forgreinet polysakkarid vil gi forholdet 1:1 mellom terminale enheter og forgreiningspunkter. Det er 59,8 % galaktoseenheter totalt. 17,8 % tilsvarende (1 → 2,6)-bundne galaktoseenheter. Det ser ut at hver tredje galaktoseenhet har forgreninger i posisjon 2. Antall forgreiningspunkter stemmer bra med andel fukose bundet i ikke-reduserende ende (17,8 og 14,6 %).

I tillegg ble det funnet små mengder av 2,4-Di -O- methyl- L- Fukose (tilsvarer 1→3) og 2,3,4,6 – tetra -O-Methyl- D- mannose (tilsvarer 1→).

Tabell 6 viser at metylert WAO_{F2} bestod stort sett av 24,9 % av 2,3,6- Tri -O-Methyl- D - glukose (tilsvarer 1→4) og 11,8 % av 2,3-Di- O-Methyl- D- glukose (tilsvarer 1→4,6). Den inneholdt også 17,6 % av 2,3,4,6-Tetra -O – Methyl –D- glukose (tilsvarer 1→), 6,0 % av 2,4,6- Tri -O-Methyl- D- glukose (tilsvarer 1→3). Galaktosedelen bestod av 0,3 % 2,3,4,6-Tetra- O – Methyl D galaktose (tilsvarer 1→), 14,5 % av 2,3,4- Tri -O-Methyl- D- galaktose (tilsvarer 1→6) og 7,4 % av 3,4-Di- O-Methyl- D- galaktose (tilsvarer 1→2,6). Det ser ut som at WAO_{F2} var heterogen og inneholdt en (1→4) bundet- og en (1→3)-bundet glukose med forgreninger i posisjon 6 og i tillegg rester av fukogalaktan.

Den største delen av den metylerte prøven AAoSw (tabell 6) inneholdt glukose 78,8 % og var hovedsakelig representert av 2,3,4,6 – Tetra -O – Methyl –D- glukose (10,6 %) (tilsvarer 1→), 2,4,6- Tri -O-Methyl- D- glukose (35,6 %) (tilsvarte 1→3), 2,3,4 Tre -O-Methyl -D glukose (5,5 %) (tilsvarer 1→6) og 2,4-Di- O-Methyl- D- glukose (9,6 %)(tilsvarer 1→3,6). Funn av (1→ 3) og (1→ 3,6) -bundne glukoseenheter indikerte innhold av et glukose med en 1→ 3-bundet hovedkjede og forgreninger i posisjon 6. Det ble også oppdaget 14,7 % av 2,3,6- Tri -O-Methyl- D- glukose (tilsvarer 1→4) og 1,8 % av 2,3-Di- O-Methyl- D- glukose (tilsvarer 1→4,6). Funn av (1→ 4) og (1→ 4,6)-bundne glukoseenheter indikerte innhold av mindre mengder av et glukose med en (1→ 4)-bundet hovedkjede og forgreining i posisjon 6.

Den største delen av metylert AAoIw (tabell 6) inneholdt glukose 77,4 % som var hovedsakelig representert av 2,3,4,6-Tetra-O – Methyl –D - glukose (10,8 %)(tilsvarer 1→), 2,4,6- Tri -O-Methyl- D- glukose (37,6 %)(tilsvarer 1→3), 2,3,6- Tri -O-Methyl- D glukose (22,0 %) (tilsvarer 1→4), 2,3-Di- O-Methyl- D- glukose (1,3 %) (tilsvarer 1→4,6) og 2,4-Di-O-Methyl- D- glukose (5,2 %)(tilsvarer 1→3,6). Funn av (1→ 3) og (1→ 3,6)-bundne glukoseenheter og (1→ 4) og (1→ 4,6)-bundne glukoseenheter indikerte innhold av to glukoser. Ett glukose hadde en (1→ 4)-bundet hovedkjede, mens det andre hadde (1→ 3)-bundet hovedkjede. Begge glukosene hadde forgreninger i posisjon 6.

Tabell 6 viser at vannløselig AAoSw inneholdt 9,6 % av (1→ 3,6)-bundne glukoseenheter mens vannuløselig AAoIw inneholdt bare 5,2 %, noe som kan forklare bedre løseligheten av AAoSw i vann.

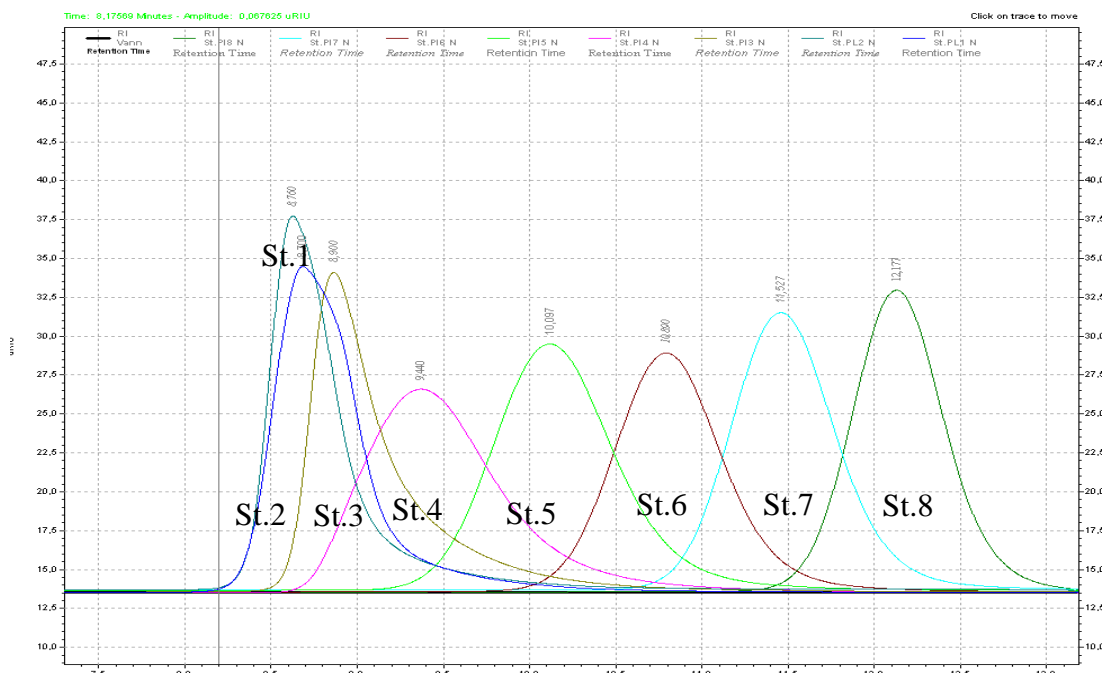
5.1.3. Molekylvekt bestemmelse

Biologisk aktivitet av polysakkarider er avhengig blant annet av molekylvekt (Lam & Chi-Keung Cheung, 2013).

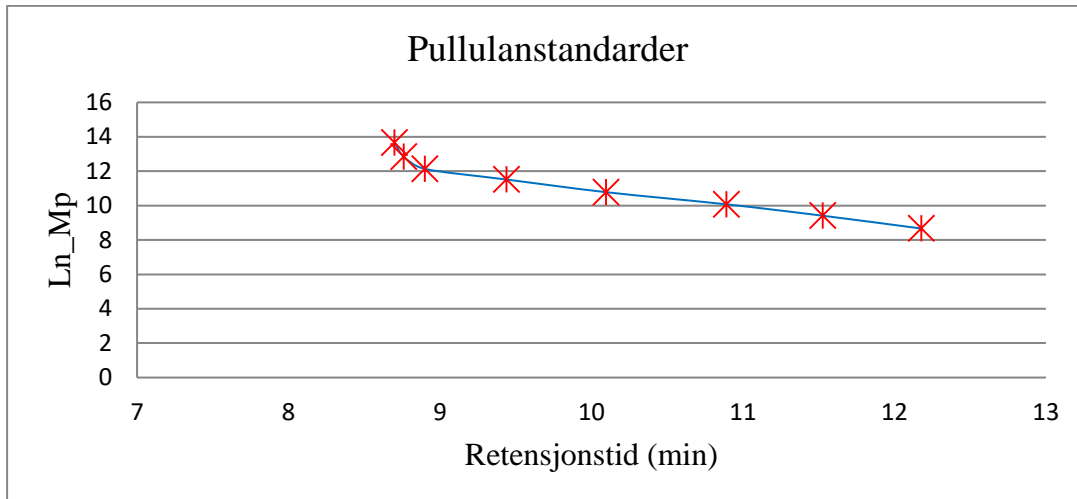
Vektgjennomsnittet (M_w) av forskjellige fraksjoner av *A.ovinus* ble bestemt ved bruk av eksklusjonskromatografi (SEC) (metode 4.4.2).

TSK-Gel® G3000PWXL

Separasjonsområde til kolonnen er angitt i dextraner. Pullulanstandarder og beta-(1→3)(1→4)-glukanstandarder har annerledes hydrodynamiske karakteristiker enn dextraner. Derfor ble det testet forskjellige pullulanstandarder og beta-(1→3)(1→4)-glukanstandarder for å finne separasjonsområdet (angitt i pullulaner og glukaner) som kan anvendes for tillaging av standardkurver.

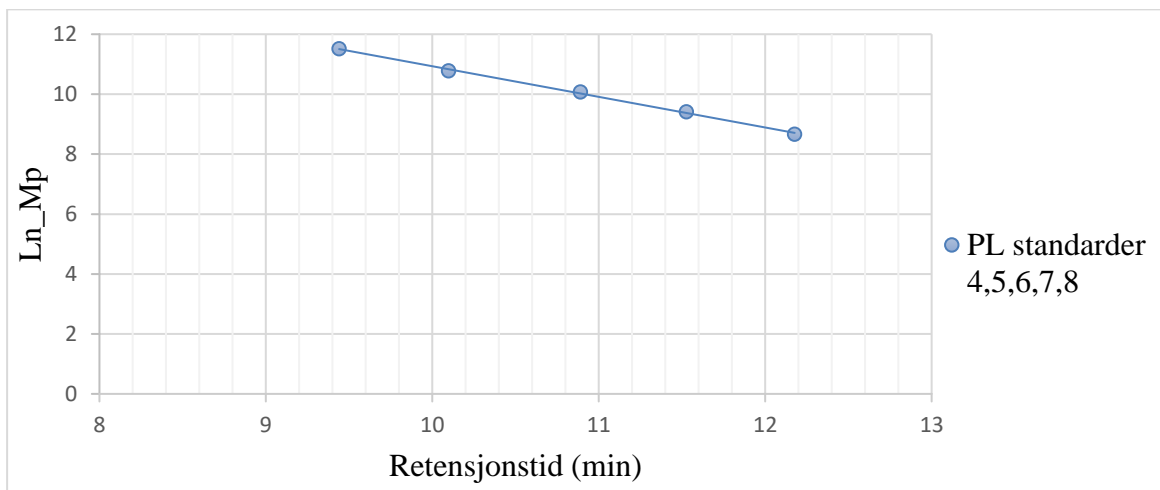


Figur 26. Kromatogram fra SEC-HPLC analyse av pullulanstandarder til SEC kolonne TSK-Gel® G3000PWXL.



Figur 27. Standardkurve av pullulanstandarder (1,2,3,4,5,6,7,8) til SEC kolonne TSK-Gel® G3000PWXL.

Store molekyler (standarder 1, 2 og 3) gikk ikke inn i porene og ble ikke separert fra hverandre. De ble eluert ut med eksklusjonsvolumet. Derfor ble det for tillaging av standardkurver bruk en del av pullulanstandarder (4,5,6,7,8) tilsvarende standardkurvens lineære område.

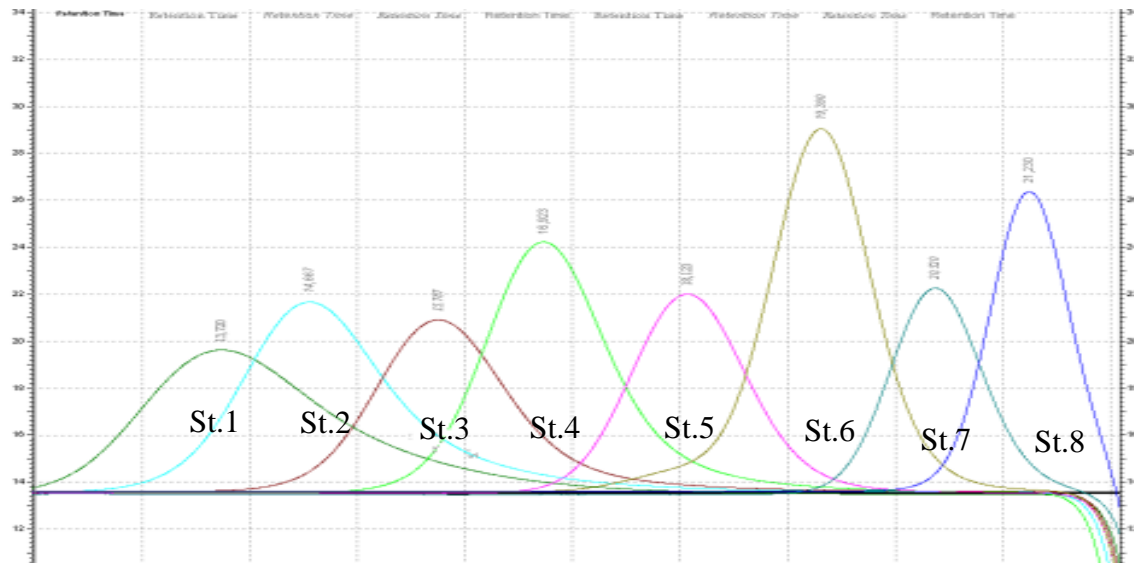


Figur 28. Standardkurve av pullulanstandarder (4,5,6,7,8) til SEC kolonne TSK-Gel® 3000PWXL.

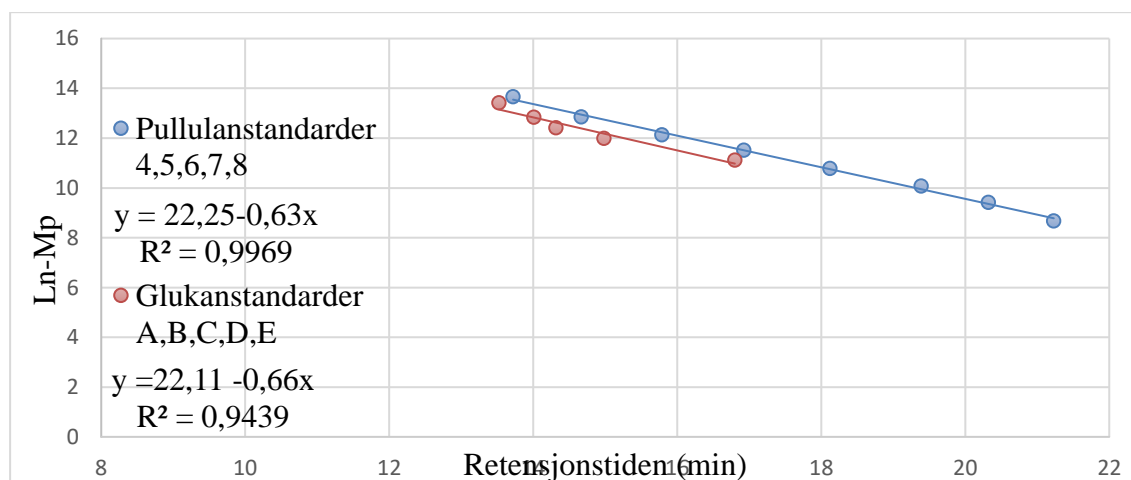
TSK-Gel® G5000PW_{XL}

Separasjonsområdet til denne typen av kolonnen er også angitt i dextraner. Derfor ble det brukt de samme pullulanstandardene (1,2,3,4,5,6,7,8) og beta-(1→3)(1→4)-glukanstandarder

(A, B, C,D, E) for å finne separasjonsområdet (angitt i pullulaner og glukaner) som kan anvendes for tillaging av standardkurver.



Figur 29. Kromatogram fra SEC-HPLC analyse av pullulanstandarder (1,2,3,4,5,6,7,8) til SEC- kolonne TSK-Gel® G5000PWXL.



Figur 30. Standardkurver av pullulanstandarder (1,2,3,4,5,6,7,8) og beta-(1→3)(1→4)-glukanstandarder (A, B, C, D, E) til SEC kolonne TSK-Gel® G5000PWXL.

R^2 -verdien til pullulanstandardene er på 0,9969 mens R^2 -verdien til beta-(1→3)(1→4)-glukanstandarder er på 0,9439. Tilpasning for regresjonslinjen for pullulanstandarder er altså bedre enn for glukanstandardene. Molekylvektfordelingen ble derfor bestemt for de ulike fraksjonene ved hjelp av standardkurver av pullulanstandarder.

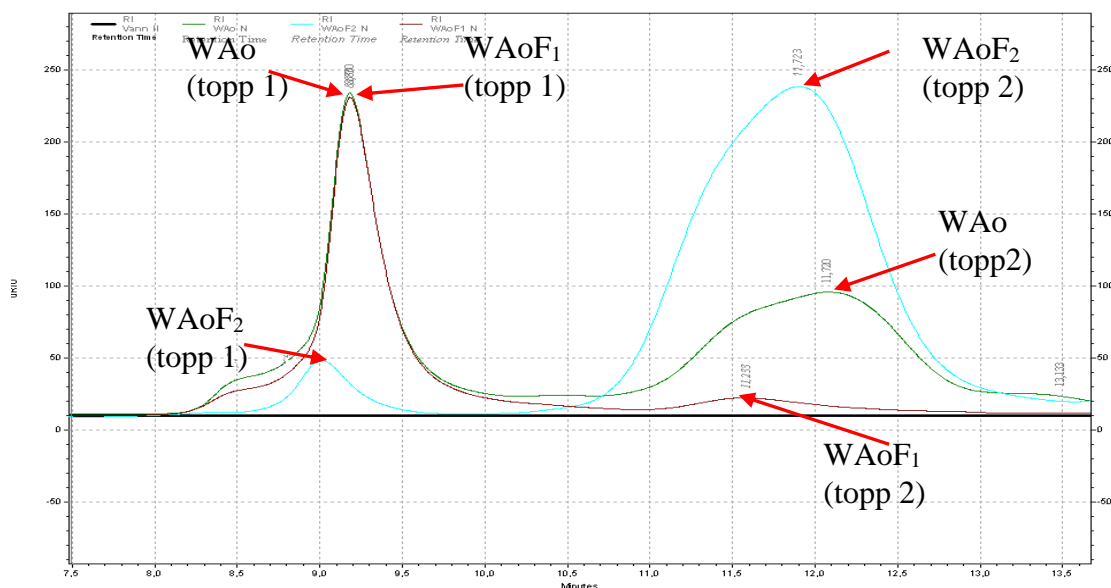
Det må tas i betraktning at siden eksklusjonsvolum av SEC er avhengig av det hydrodynamiske volumet mer enn M_w , kan bruk av kuleformede spiral-type

pullulanstandarder føre til en overestimering av M_w til polysakkarider med fleksibel kjedekonformasjon (Putus Macromolecular Sci. & Tech. Ltd, 2009).

Bestemmelse av molekylvekt

5.1.3.1. TSK-Gel® G3000PW_{XL}

➤ Vannekstrakt WAo (fraksjon WAoF₁ og WAoF₂)



Figur 31. Kromatogram fra SEC-HPLC analyse av WAo, WAoF₁ og WAoF₂. TSK-Gel® G3000PW_{XL}.

Figur 31 viser at vannekstrakt WAo inneholdt to molekylvektspopulasjoner. Polysakkaridsfraksjon 1 bestod av store molekyler som ble eluert i eksklusjonsvolum og ble derfor ikke separert på TSK-Gel® G3000PW_{XL}.

Polysakkaridfraksjonene som tilsvare topp 2 ble eluert i elueringsvolum. Derfor kunne molekylvektfordeling til dem bli bestemt ved bruk av standardkurve (figur 28).

Polysakkaridfraksjoner som tilsvarte WAo (topp 2), WAoF₁ (topp 2) og WAoF₂ (topp 2), ble transportert gjennom kolonnen nesten med samme hastighet (har nesten den samme retensjonstid). Dette er det samme stoffet, derfor hadde det også samme molekylvekt.

Fraksjon som tilsvare WAoF₁ (topp 2) inneholdt bare rester av polysakkaridfraksjonen WAoF₂.

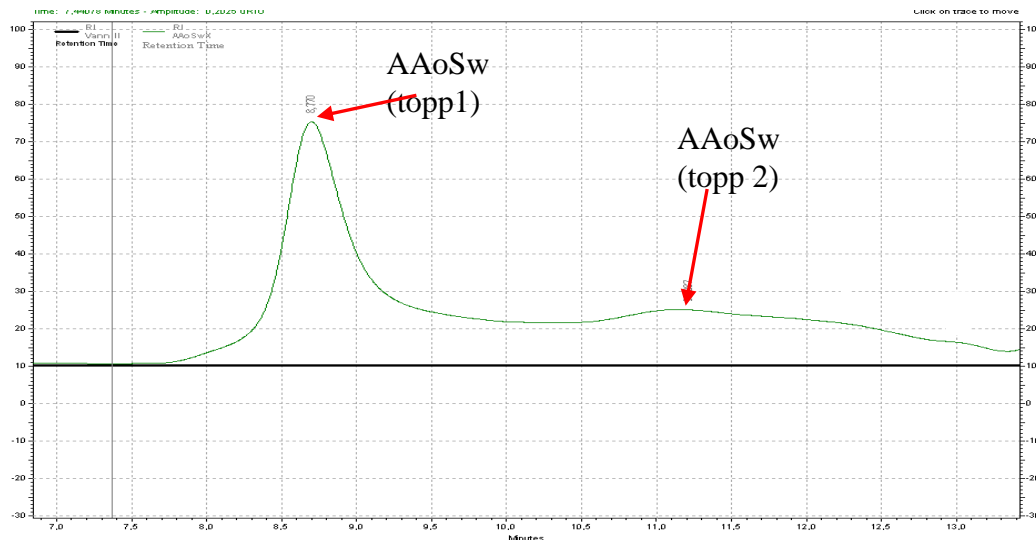
Tabell 7. Estimert molekylvektfordeling til fraksjon WAo, WAoF₁ og WAoF₂ -(topp 2)

Fraksjon	Mw pullulanekvivalent, kDa	Mp, kDa	Pd
WAo (topp 2)	12,0	9,58	1,20
WAoF ₁ (topp 2)	12,1	10,1	1,08
WAoF ₂ (topp 2)	12,1	9,58	1,25

Høy Pd indikerer større molekylvekt distribusjon. Tabell 7 viser at WAoF₁ hadde mindre polydispersitet enn WAo og WAoF₂.

Mp viser det høyeste toppunktet på SEC-HPLC kurven og Mw viser gjennomsnittlig molekylvekt av polysakkaridene i prøven.

➤ **Vannløselig alkaliekstrakt AAoS_w**



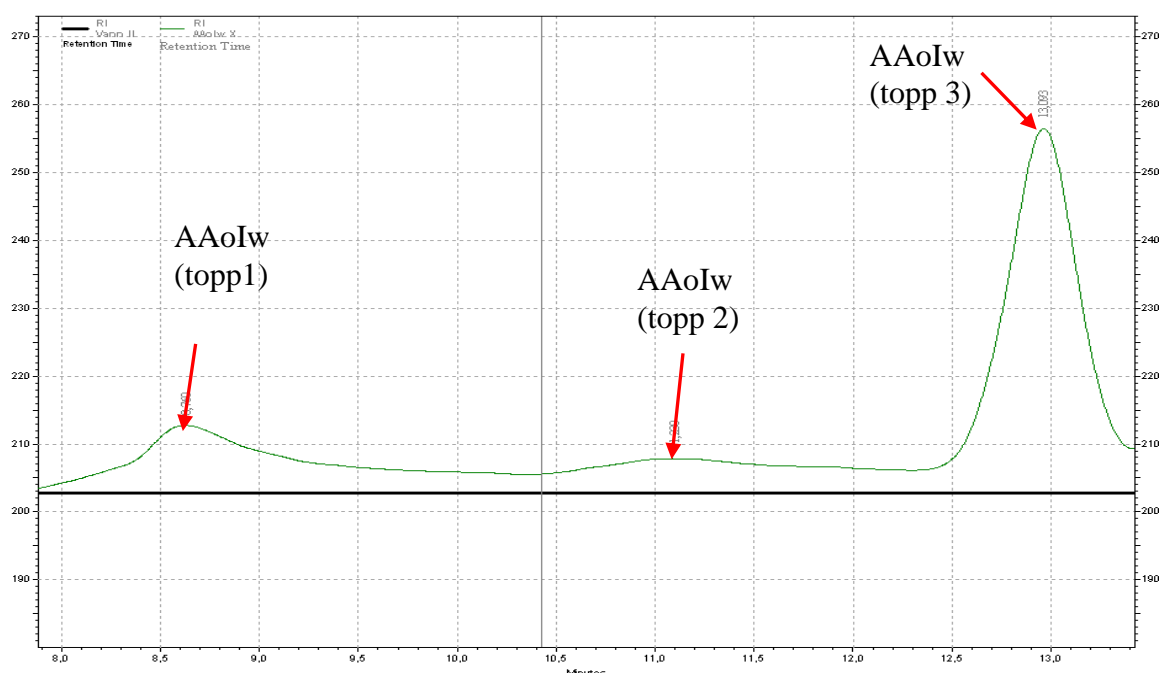
Figur 32. Kromatogram fra SEC-HPLC analyse av AAoS_w. TSK-Gel® G3000PWXL.

Figur 32 viser at vannløselig alkaliekstrakt AAoS_w av *A. ovinus* hadde to topper på kromatogrammet som tilsvarte to polysakkaridfraksjoner med forskjellig molekylvekt. Polysakkaridsfraksjonen som tilsvarte topp 1 bestod av store molekyler som ble eluert i eksklusjonsvolum og ble derfor ikke separert på TSK-Gel® G3000PW_{XL}.

Tabell 8. Estimert molekylvektfordeling til fraksjon AAoS_w (topp 2)

Fraksjon	Mw pullulanekvivalent, kDa	Mp, kDa
AAoS _w (topp 2)	11,7	14,9

➤ **Vannuløselig alkaliekstrakt AAoIw (den delen som inngikk i løsningen)**



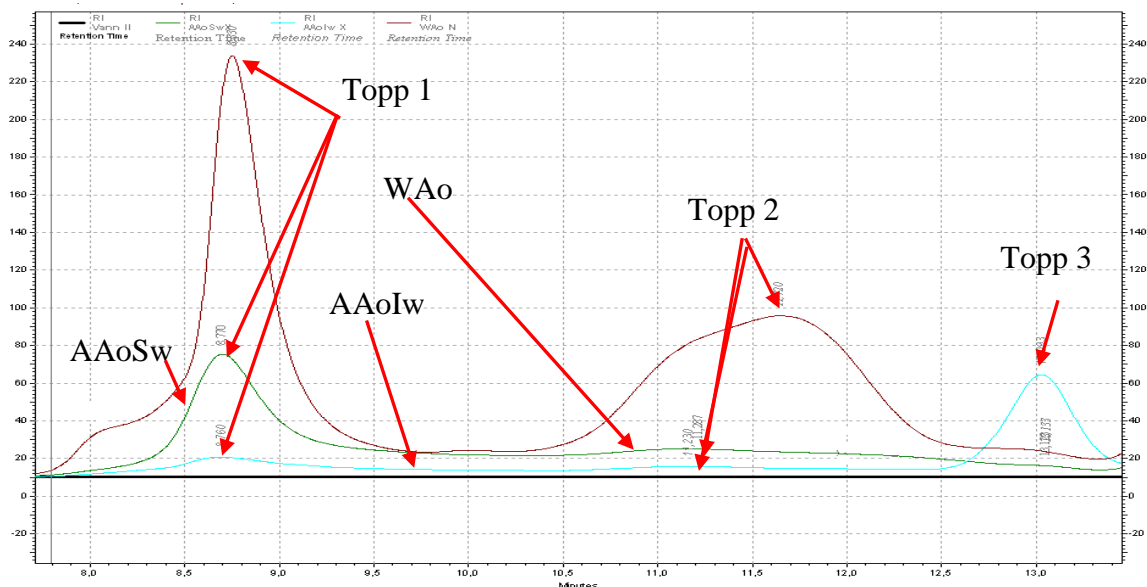
Figur 33. Kromatogram fra SEC-HPLC analyse av AAoIw. TSK-Gel® G3000PW_{XL}

Figur 33 viser at vannuløselig alkaliekstrakt AAoIw av *A. ovinus* hadde tre topper på kromatogrammet som tilsvarte tre polysakkaridfraksjoner med forskjellig molekylvekt. Polysakkaridsfraksjonen som tilsvarte topp 1 bestod av store molekyler som ble eluert i eksklusjonsvolum og ble derfor ikke separert på TSK-Gel® G3000PW_{XL}.

Molekylvekten til AAoIw (topp 3) lå utenfor standardkurven, og ble dermed beregnet med stor usikkerhet.

Tabell 9. Estimert molekylvektfordeling til fraksjon AAoIw (topp 2 og 3).

Fraksjon	Mw pullulanekvivalent, kDa	Mp, kDa
AAoIw (topp 2)	16,7	16,2
AAoIw (topp 3)	2,4	2,3



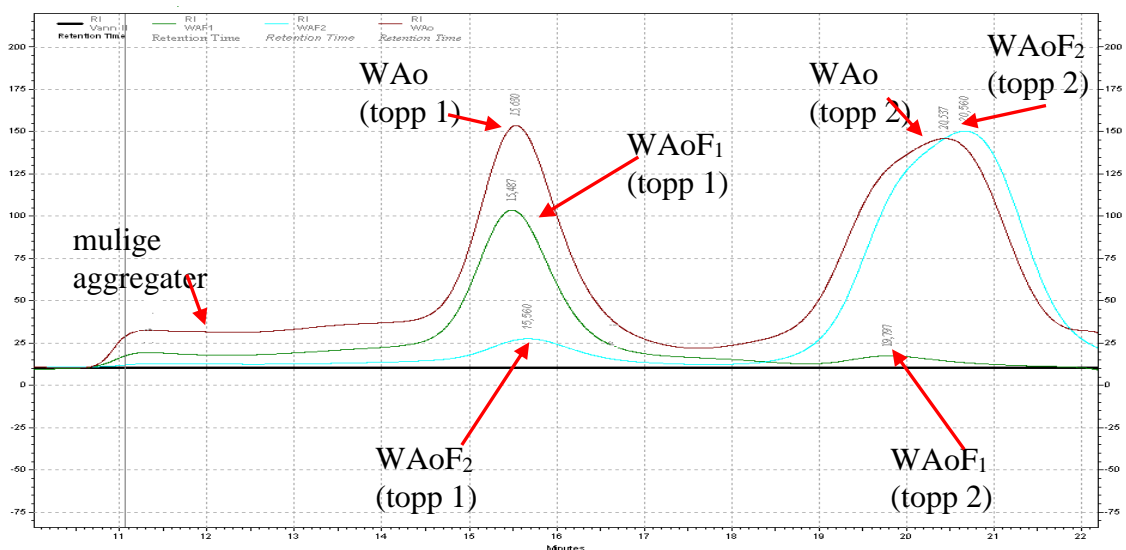
Figur 34. Kromatogram fra SEC-HPLC analyse av WAO, AAOIw og AAOsw. TSK-Gel® G3000PW_{XL}

Figur 34 viser at WAO (topp 2), WAO_{F2} (topp 2) AAOsw (topp2) inneholdt polysakkaridpopulasjoner med Mw ca.12-16 kDa (tabell 7-9).

AAOIw hadde dominerende mengde av polysakkaridpopulasjoner med Mw 2,3 kDa som tilsvarte topp 3 på kromatogrammet (tabell 9) (denne falt utenfor standardkurven og er derfor beheftet med stor usikkerhet).

5.1.3.2. TSK-Gel® G5000PW_{XL}

➤ Vannekstrakt WAO (fraksjon WAO_{F1} og WAO_{F2})



Figur 35. Kromatogram fra HPLC analyse av WAO, WAO_{F1} og WAO_{F2}. TSK-Gel® G5000PW_{XL}.

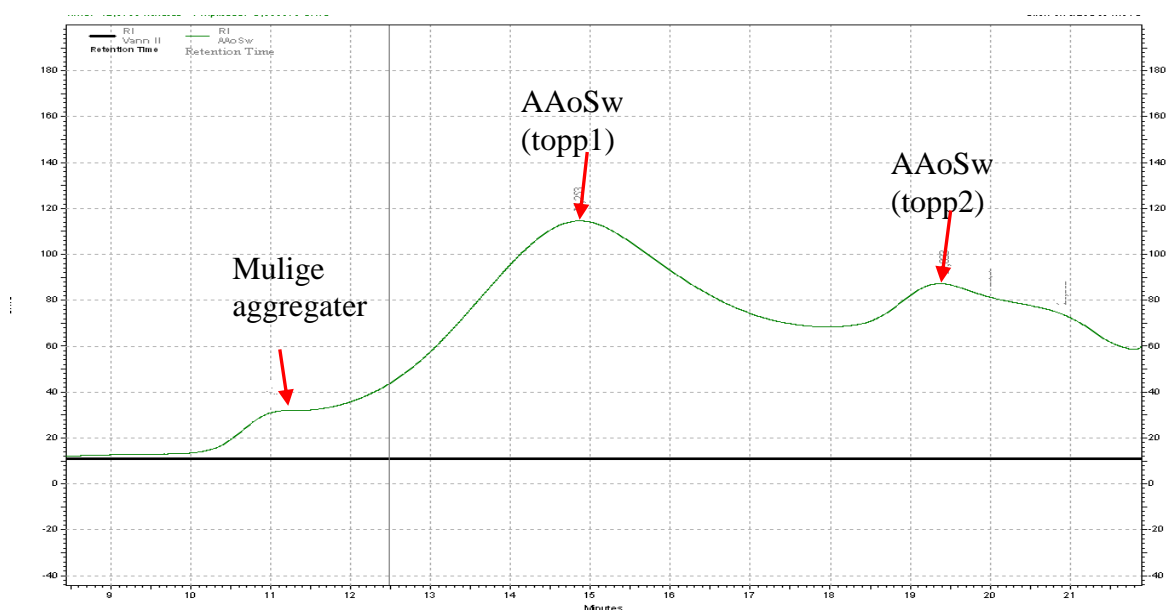
Separasjonsområdet som ble funnet med Pullulanstandarder viste at alle polysakkaridsfraksjoner i vannekstrakt (WAO; WAO_{F1} og WAO_{F2}) kunne separeres på TSK-Gel® G5000PWXL og at molekylvekten til disse fraksjonene kunne bestemmes ved bruk av standardkurven (figur 30).

Tabell 10. Estimert molekylvektfordeling til fraksjon WAO, WAO_{F1} og WAO_{F2} (Pullulanekvivalent).

Fraksjon	Mw pullulanekvivalent, kDa	Mp, kDa	Pd
WAO(topp 1)	224,5	225,2	1,07
WAO (topp 2)	12,2	10,4	1,15
WAO _{F1} (topp 1)	251,0	248,4	1,07
WAO _{F1} (topp 2)	15,6	16,1	1,05
WAO _{F2} (topp 1)	237,2	236,1	1,10
WAO _{F2} (topp 2)	12,4	10,5	1,18

Tabell 7 og 10 viser at topp 2 til alle fraksjonene hadde høyre polydispersitet. Pd til topp 2 på TSK-Gel® G5000PW_{XL} var mindre enn til TSK-Gel® G3000PW_{XL}, noe som tyder på at topp 2 ble bedre separert på TSK-Gel® G3000PW_{XL}.

➤ Vannløselig alkaliekstrakt AAoS_w



Figur 36. Kromatogram fra SEC-HPLC analyse av AAoS_w. TSK-Gel® G5000PWXL.

Tabell 11. Estimert molekylvektfordeling til fraksjon AAoS_w (Pullulanekvivalent).

Fraksjon	M _w pullulanekvivalent, kDa	M _p , kDa
AAoS _w (topp 1)	324,5	299,8
AAoS _w (topp 2)	16,7	17,2

➤ **Vannløselig alkaliekstrakt AAoI_w** (den delen som inngikk i løsningen)

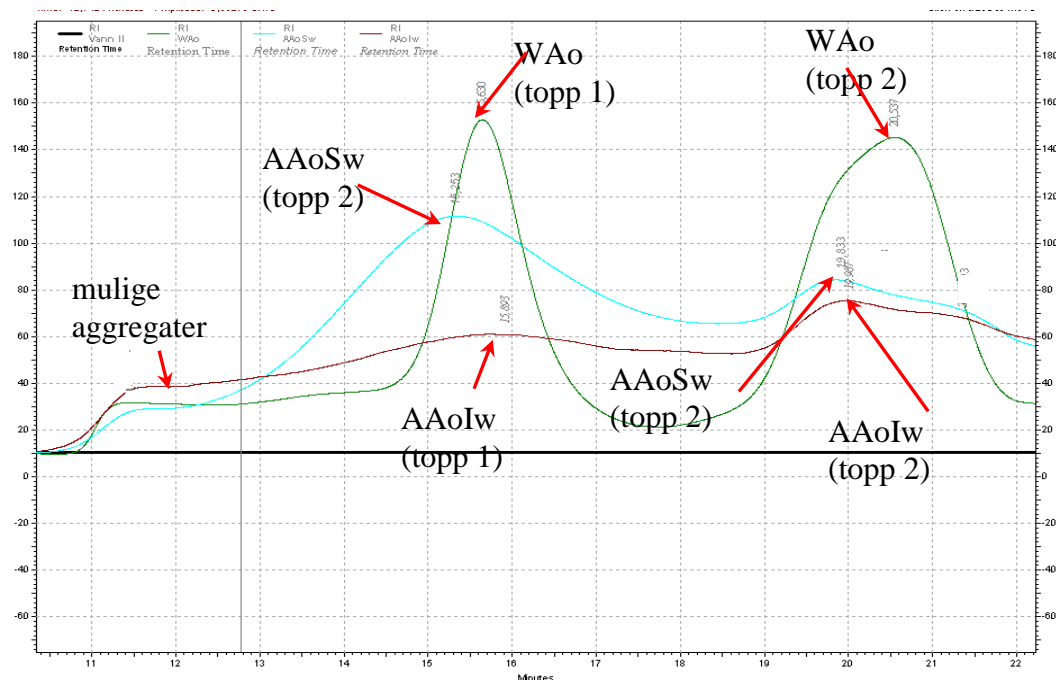


Figur 37. Kromatogram fra SEC-HPLC analyse av AAoI_w. TSK-Gel® G5000PW_{XL}.

Det var problematisk å måle M_p for AAoI_w på grunn dårlig løselighet i vann, noe som gir begrenset verdi av målingen. AAoI_w (topp 3) ble bedre separert på TSK-Gel® G3000PW_{XL} (figur 33).

Tabell 12. Estimert molekylvektfordeling til fraksjon AAoS_w (Pullulanekvivalent).

Fraksjon	M _w pullulanekvivalent, kDa	M _p , kDa
AAoI _w (topp 1)	286,5	239,6
AAoI _w (topp 2)	15,9	15,75



Figur 38. Kromatogram fra HPLC analyse av W Ao, AAoSv og AAoIw. TSK-Gel® G5000PW_{XL}

Figur 38 viser at W Ao, AAoSv og AAoIw inneholdt i hovedsak to polysakkaridpopulasjoner hver.

Topp 1 fra W Ao, AAoSv og AAoIw tilsvarte Mw 200-250 kDa mens topp 2 inneholdt mer lavmolekylære polysakkarider i området ca.10-16 kDa (tabell 10-12).

AAoIw hadde dominerende mengde av polysakkaridfraksjoner med Mw 2,3 kDa som tilsvarte topp 3 på kromatogrammet (figur 33) etter separasjon på TSK-Gel® G3000PW_{XL}, men den ble dårlig separert på TSK-Gel® G5000PW_{XL}.

Tabell 13. Estimert molekylvektfordeling til fraksjoner AAoSv og AAoIw (Pullulanekvivalent).

Mw, pullulanekvivalent, kDa	AAoIw	AAoSv
Topp 1	286,5	324,5
Topp 2	15,9	16,7

Det så ut som at begge to rå- alkaliekstraktene bestod av to polysakkaridfraksjoner med nesten lik molekylvekt.

5.1.4. Affinitetskromatografi

5.1.4.1. Con A Sepharose 4B

Metanolyseresultater av vannekstrakt av *A. ovinus* (WAo) viste relativt mye innhold av (1→4) - og (1→4,6)-bindete glukoseenheter (henholdsvis 16,6 % og 3,5 %) (tabell 6). Det ble benyttet affinitetskromatografi kolonne med Con A Sepharose[®] 4B (metode 4.4.4.1) siden immobilisert Concanavalin A har sterk affinitet for alfa-D-glukose og i mindre grad alfa-D-mannose (GE Healthcare, 2016). Derfor kunne vi undersøke om glukose i WAo hadde alfa-konfigurasjon.

Det ble samlet to fraksjoner (fraksjon 1 og fraksjon 2). Fraksjon 1 inneholdt molekyler som ikke ble bundet til kolonnen, mens fraksjon 2 bestod av molekyler som festet seg på kolonnen. Monosakkaridsammensetning og totalt monosakkaridinnhold ble bestemt ved GC etter metanolyse og TMS-derivatisering (metode 6.5.1) (tabell 14).

Det var samtidig separert alfa-(1 → 6)-mannan og beta-glukan fra fruktlegemer fra *Cantharellus cibarius*. Alfa -(1 → 6)-mannan ble festet på kolonnen og eluert som andre fraksjon (resultatene ikke vist). Dette bekreftet at kolonnen virket som den skal.

- **Kvantitativ bestemmelse av monosakkarider i prøven**

Tabell 14. Monosakkaridsammensetning i vannekstrakt WAo etter separering på Con A Sepharose 4 B; prosent av totalt karbohydratinnhold.

Monosakkarid	Opprinnelig WAo	Fraksjon 1 WAo	Fraksjon 2 WAo
Glc	41,1	30,1	77,6
Gal	40,7	49,8	15,7
Fuc	13,6	13,71	4,5
Xyl	0,8	1,7	0,4
Man	3,2	4,7	1,6
Sum %	100	100	100

Tabell 14 viser at fraksjon 2 inneholdt mer glukose (77,6 %) enn fraksjon 1 (30,1 %), mens fraksjon 1 inneholdt mer galaktose, fukose, mannose og xylose enn fraksjon 2. Dette kan være på grunn av at glukose i fraksjon 2 kunne ha alfa-konfigurasjon (dette ble også bekreftet ved NMR), mens glukose i fraksjon 1 kunne ha beta-konfigurasjon. Mannose kunne tenkes å være lite tilgjengelig for binding til kolonnen, men det er også svært lite av den (sees ikke på NMR

spekteret). Mannose kunne være en del av total polymer som hadde beta-glukose i hovedkjeden som ble eluert i første fraksjon.

I litteraturen er det tidligere beskrevet mannener fra både Ascomycota og Basidiomycota med alfa konfigurasjon: galaktomannaner fra *Aspergillus*-arter (Gómez-Miranda *et al.*, 2003), glucogalactomannan fra *Cordyceps militaris* (Smiderle *et al.*, 2013), alfa-mannaner fra cellevegg i gjær (Křížková *et al.*, 2001; Kogan *et al.*, 1990), xylomannan fra *Flammulina velutipes* (Smiderle *et al.*, 2013) og glucuronoxylomannan fra *Tremella mesenterica* (Vinogradov & Wasser, 2005).

Tabell 15. Bindingsforhold i WAo etter separasjon på Con A Sepharose 4B: fraksjon 1 WAo og fraksjon 2 WAo.

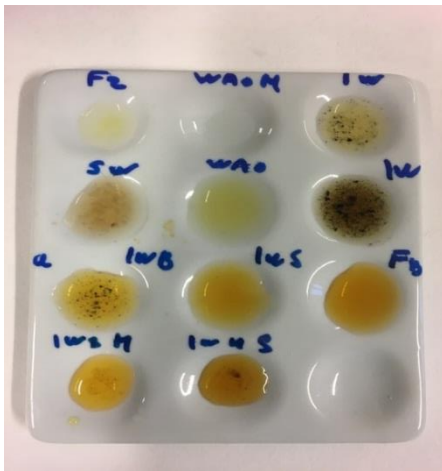
Monosakkarider og deres bidingstyper		Con A Sepharose 4B	
		WAo fraksjon 1	WAo fraksjon 2
Fuc	Terminal	11,2	2,6
	1→3	2,5	1,9
Sum %		13,7	4,5
Xyl	Terminal	1,7	0,2
	1→2 p	-	0,1
	1→3 p	-	0,1
Sum %		1,7	0,4
Man	Terminal	4,7	1,6
		4,7	1,6
Gal	Terminal	4,1	7,3
	1→6	32,5	8,4
	1→2,6	13,2	-
Sum %		49,8	15,7
Glc	Terminal	2,5	2,2
	1→3	15,8	2,5
	1→4	2,6	46,3
	1→6	1,4	5,7
	1→3,4 p	1,0	3,6
	1→2,3	1,0	0,1
	1→4,6	0,3	11,9
	1→3,6	5,5	5,3
Sum %		30,1	77,6

Tabell 15 viser at fraksjon 1 WAo inneholdte mer (1→3)- (1→3,6)-bundne glukoseenheter enn fraksjon 2 WAo, mens fraksjon 2 WAo inneholdt mer (1→4)- (1→4,6)- bundne glukoseenheter. Man kan forutsi at det kunne være alfa (1→4)- glukose siden Con A

Sepharose® 4B med immobilisert Concanavalin A har sterk affinitet for alfa-D-glukose. (GE Healthcare, 2016).

5.1.5. Alfa-amylase behandling

Det var undersøkt at fraksjonene WAo, WAoF₂, AAoSw og AAoIw har en del (1→4) glukoseenheter (henholdigvis 16,6 %; 24,9 %; 14,7 % og 22,0 %) (metode 4.4.1). Separasjon av WAo på Con A Sepharose 4B har vist mulig tilstedeværelse av glukose i alfa-konfigurasjon i fraksjon WAo (metode 4.4.4.1).



Figur 39. Jod-jod-kalium-test (metode 4.4.5.2) viser tilstedeværelse av alfa-(1 → 4)-bundne -glukoseenheter i analyserte prøver: AAoIw, AAoIwAB og AAoSw.

Det var også påvist med jod-jod-kalium-test (metode 4.4.5.2) at det var alfa-(1→4) bundne -- glukoseenheter i polysakkaridfraksjoner AAoSw, AAoIwAB og det meste i AAoIw.

NMR har også vist tilstedeværelse av alfa-glukose enheter i AAoIw, AAoIwAB og AAoSw.

For å isolere mest mulig rene beta-(1 → 3)-glukaner ved å fjerne alfa-glukose fra prøver, ble de behandlet med alfa-amylase. I tillegg ble det undersøkt hvordan de endringene som skjer i en karbohydratprøve under varierende betingelser (20°C i 20 timer og 37°C i 2 timer) av enzymatisk degradering påvirker biologisk aktivitet.

Monosakkaridsammensetning og totalt monosakkaridinnhold av amylase-behandlede vannekstrakter (20°C): WAoAB, WAoF₂AB, -og alkali- ekstrakt: AAoSwAB og AAoIwAB av *A. ovinus* ble bestemt ved hjelp av GC som ble gjennomført etter metanolyse og TMS-derivatisering (metode 4.3).

Tabell 16. Monosakkaridsammensetning i vannekstrakter WAo og WAoF₂ (før og etter alfa-amylase behandling); prosent av totalt karbohydratinnhold.

Monosakkarid	WAo	WAoAB	WAoF ₂	WAoF ₂ AB
Glc	41,1	29,6	69,0	65,8
Gal	40,7	50,7	22,3	24,0
Fuc	13,6	15,41	6,0	7,0
Xyl	0,8	0,4	0,4	-
Man	3,2	3,9	1,5	2,1
GlcA	0,6	spor	0,8	spor
Sum %	100	100	100	100

Det var observert nedgang i inneholdt av glukose i fraksjon WAo (fra 41,1 % til 29,6 %) og i fraksjon WAoF₂ (fra 69,0 til 65,8 %). Grunnen til dette kan være at begge fraksjonene inneholdt alfa-(1 → 4)-glykosidbindingene som ble brutt ned. De mindre glukoseenheterne ble vasket bort med 70 % etanol, noe som førte til reduksjon av glukoseinnholdet.

Jod-jod-kalium testen påviste ikke tilstedeværelse av alfa-glukaner i fraksjonene WAo, WAoF₁ og WAoF₂. En forklaring kan være at delen av alfa-(1 → 4) – glukose i disse fraksjonene var ubetydelig.

Tabell 17. Monosakkaridsammensetning i alkali ekstrakter AAoS_w og AAoI_w (før og etter alfa- amylase behandling); prosent av totalt karbohydratinnhold.

Monosakkarid	AAoS _w	AAoS _w AB	AAoI _w	AAoI _w AB
Glc	78,8	67,8	77,9	77,9
Gal	2,4	3,1	0,7	0,7
Fuc	2,5	4,1	2,2	2,6
Xyl	4,1	7,4	6,6	7,7
Man	11,7	17,6	12,7	11,1
Sum %	100	100	100	100

Det var observert nedgang i innhold av glukose (fra 78,8 % til 67,8 %) bare i fraksjon AAoS_w. Monosakkaridsammensetning i fraksjon AAoI_w har ikke vist noen forandring etter behandling med alfa-amylase. Grunnen til dette kan være at amylase kan ha hatt begrenset virkning på fraksjonen som har begrenset løselighet i vann.

Bindingsmønster i de alfa –amylase behandlede fraksjonene ble bestemt ved gaskromatografi-massespektroskopi (GC-MS) etter karboksylsyre-reduksjon, metylering, hydrolyse, reduksjon og acetylering (metode 4.4.1).

Tabell 18. Bindingsforhold i alkali ekstraktene før og etter alfa-amylasebehandling: AAoS_w, AAoI_w, AAoS_wAB og AAoI_wAB.

Monosakkarider og deres bindingstyper		Før alfa-amylasebehandling		Etter alfa-amylasebehandling	
		AAoS _w	AAoI _w	AAoS _w AB	AAoI _w AB
Fuc	Terminal	2,4	1,3	4,1	2,6
	1→3 p	0,1	0,9	-	-
		2,5	2,2	4,1	2,6
Xyl	Terminal	3,3	3,2	7,4	4,0
	1→2 p	0,6	0,8	-	0,9
	1→3 p	0,2	2,4	-	2,9
		4,1	4,0	7,4	7,7
Man	Terminal	11,7	12,7	17,6	11,1
		11,7	12,7	17,6	11,1
Gal	Terminal	0,2	0,1	0,4	
	1→6	1,6	0,3	1,0	0,2
	1→2,6	0,8	0,3	1,7	0,5
		2,4	0,7	3,1	0,7
Glc	Terminal	10,6	10,8	7,6	9,2
	1→3	35,6	37,6	35,6	36,6
	1→4	14,7	22,0	7,5	8,1
	1→6	5,5	1,3	1,5	1,9
	1→3,4 p	2,9	1,5	2,7	1,5
	1→2,3	0,6	2,9	2,2	2,1
	1→4,6	1,8	1,3	2,7	1,6
	1→3,6	9,6	5,2	8,0	15,1
		78,8	77,4	67,8	77,9

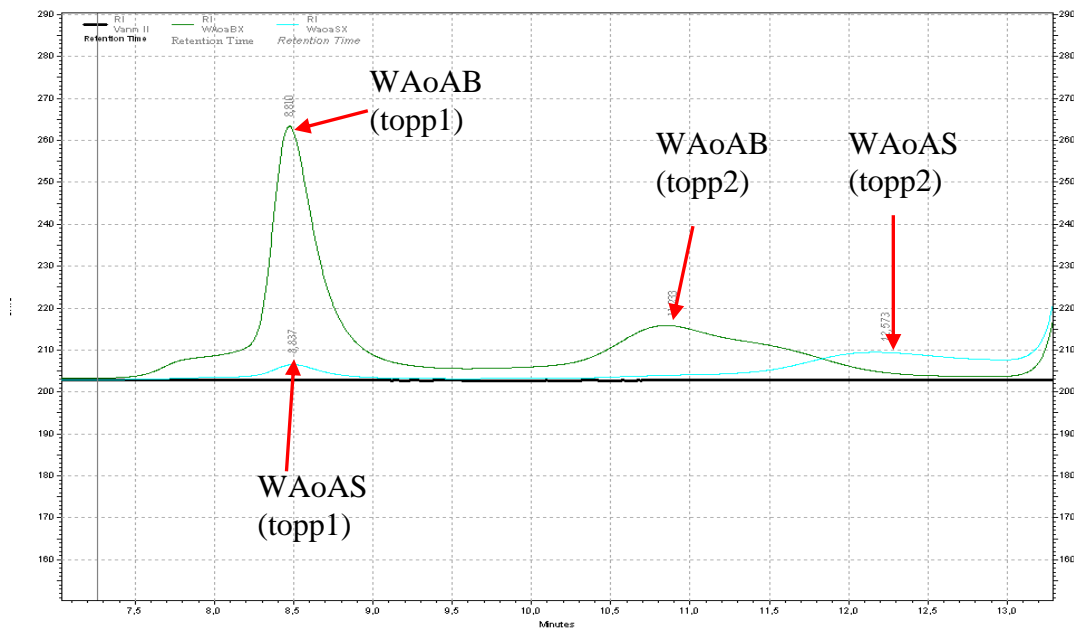
Tabell 18 viser at AAoS_w og AAoI_w hadde (1 → 4) bundne glukoseenheter.

Det ble observert en stor nedgang av (1→4) bundne glukoseenheter i begge alkaliekstraktene AAoI_wAB (13,9 %) og AAoS_wAB (7,2 %), noe som kan tyde på tilstedeværelse av (1→ 4)-alfa – glykosidbindinger i begge ekstraktene. Slike glykogen -type glukaner er blitt påvist i en rekke Basidiomyceter og gjær, og er anerkjent som komponenter av celleveggen i sopp (Usui *et al.*, 1983; Misaki *et al.*, 1986; Smiderle *et al.*, 2010).

Molekylvekt (Mw) av alfa-amylase behandlede vannekstrakter: WAOAB, WAOF2AB, -og alkali- ekstrakt: AAOswAB og AAOIwAB av *Albatrellus ovinus* ble bestemt ved eksklusjonskromatografi (SEC) (metode 4.4.2).

5.1.5.1. TSK-Gel® G3000PW_{XL}

➤ Alfa-amylase behandlet WAO (bunnfall WAOAB og supernatant WAOAS)



Figur 40. Kromatogram fra SEC-HPLC analyse av alfa-amylase behandlet WAO (bunnfall WAOAB og supernatant WAOAS).

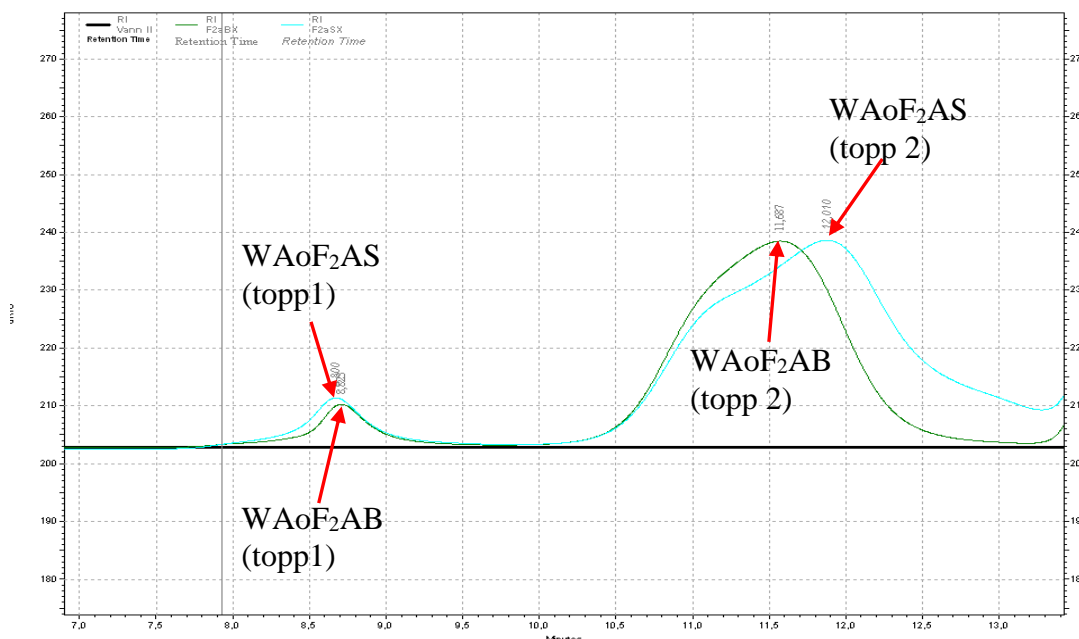
Tabell 19. Estimert molekylvektfordeling til fraksjon WAOAB.

Fraksjon	Mw pullulanekvivalent, kDa	Mp, kDa
WAOAB (topp 2)	15,3	15,7
WAOAS (topp 2)	4,1	4,2

Molekylvekten til WAOAS (topp 2) lå utenfor standardkurven, og ble dermed beregnet med stor usikkerhet.

Molekylvekt av WAO (før alfa-amylase behandling) var nesten lik molekylvekt av WAOAB (etter alfa-amylase behandling). I tillegg ble det funnet lavmolekylære polysakkarider (oligosakkarider) i supernatanten. Dette kan forklares med tilstedeværelse av alfa-(1 → 4) - glykosidbindingene som ble brutt ned i mindre glukoseenheter, noe som kan påvise tilstedeværelse av alfa-glukaner.

➤ Alfa-amylase behandlet WAoF₂ (bunnfall WAoF₂AB og supernatant WAoF₂AS)



Figur 41. Kromatogram fra SEC-HPLC analyse av WAoF₂.

WAoF₂AB (topp 1) og WAoF₂AS (topp 1) tilsvarte molekyler som ikke går inn i porene og ble eluert i eksklusjonsvolum og ble derfor ikke separert på TSK-Gel[®] G3000PW_{XL}.

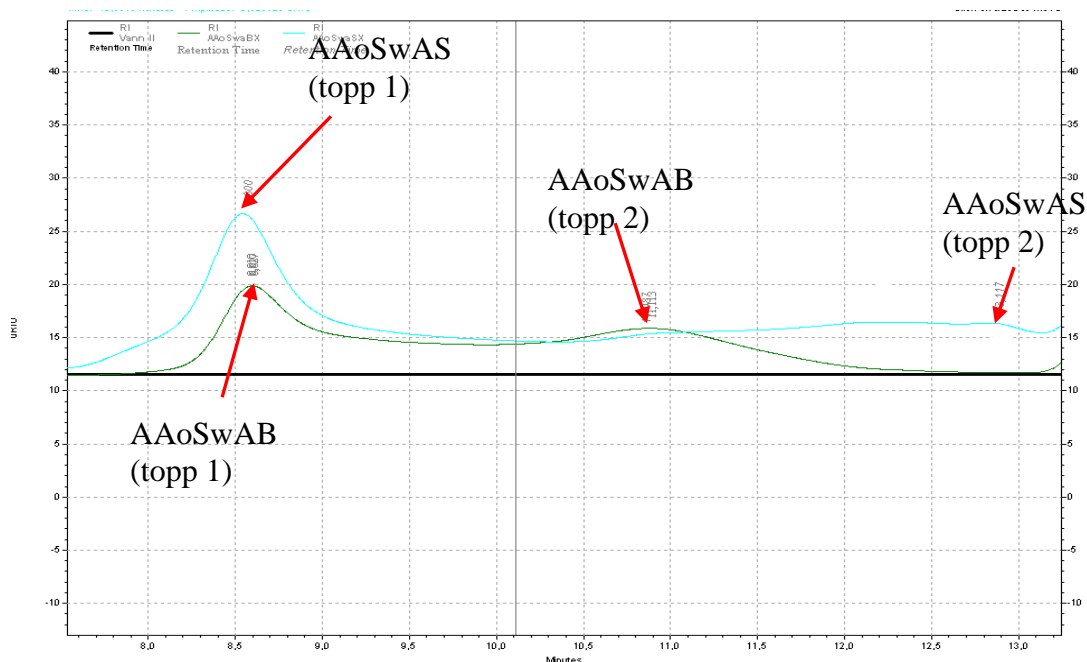
Tabell 20. Estimert molekylvektfordeling til fraksjon WAoF₂ (bunnfall WAoF₂AB og supernatant WAoF₂AS)

Fraksjon	Mw pullulanekvivalent, kDa	Mp, kDa
WAoF ₂ AB (topp2)	10,3	9,7
WAoF ₂ AS (topp 2)	6,8	6,5

Figurer 40-41 viser at WAo og WAoF₂ inneholdt alfa-(1 → 4) -glykosidbindingene som ble brutt ned i mindre glukoseenheter på en tilfeldig måte.

WAoAB (topp 2) og WAoF₂AB (topp 2) bestod av polysakkarider med Mw 10-16 kDa, mens supernatant inneholder polysakkarider med Mw 4,1-6,8 kDa.

➤ Alfa-amylase behandlet AAOsw (bunnfall AAOswAB og supernatant AAOswAS)



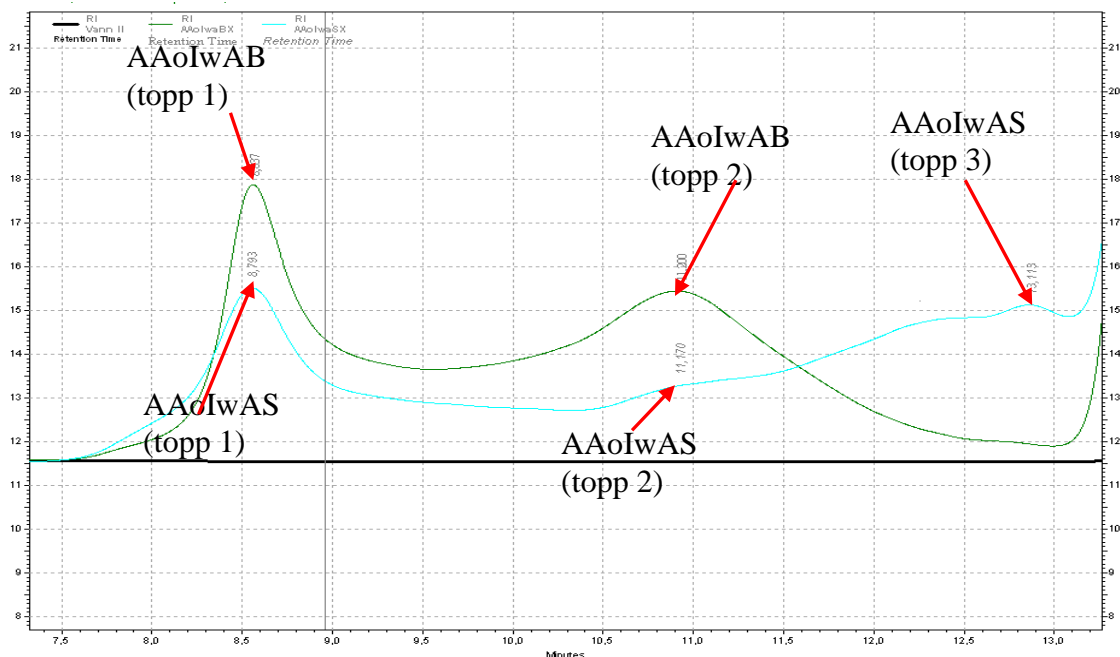
Figur 42. Kromatogram fra SEC-HPLC analyse av AAOswAB.

AAOswAB (topp 1) og AAOswAS (topp 1) tilsvarte molekyler som ikke går inn i porene og ble eluert i eksklusjonsvolum og ble derfor ikke separert på TSK-Gel® G3000PW_{XL}.

Tabell 21. Estimert molekylvektfordeling til fraksjon AAOswA.

Fraksjon	Mw pullulanekvivalent, kDa	Mp, kDa
AAOswAB (topp 2)	18,1	17,4
AAOswAS (topp 2)	6,8	6,5

➤ Alfa-amylase behandlet AAoIw (bunnfall AAoIwAB og behandlet supernatant AaoIwAS)



Figur 43. Kromatogram fra SEC-HPLC analyse av AAoIwA.

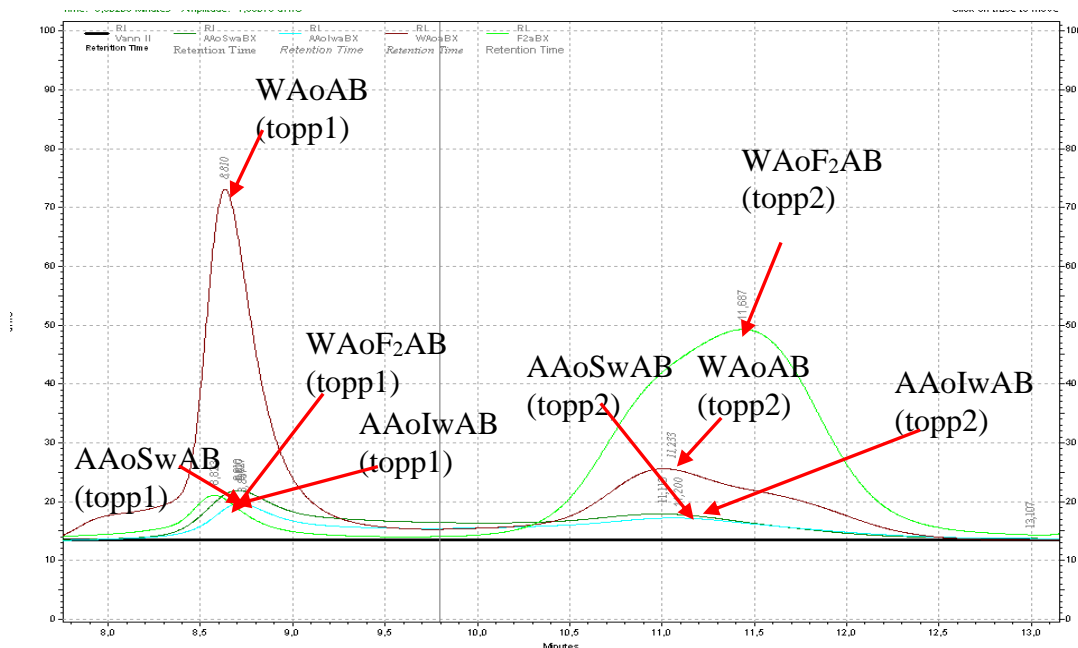
AAoIwAB (topp 1) og AAoIwAS (topp 1) tilsvarte molekyler som ikke går inn i porene og ble eluert i eksklusjonsvolum og ble derfor ikke separert på TSK-Gel® G3000PW_{XL}.

Tabell 22. Estimert molekylvektfordeling til fraksjon AAoIwA.

Fraksjon	Mw pullulanekvivalent, kDa	Mp, kDa
AAoIwAB (topp 2)	18,1	17,4
AaoIwAS (topp 2)	15,3	15,7
AaoIwAS (topp 3)	2,5	2,3

Figurer 40-43 viser at det ble funnet lavmolekylære polysakkarider (oligosakkarider) i supernatanten etter alfa-amylase behandlingen av WAO, WAO_{F2}, AAoSw og AAoIw.

Molekylvekt av topp 2 til WAO, WAO_{F2} og AAoSw før alfa-amylase behandlingen ble nesten lik molekylvekt av disse ekstraktene etter alfa-amylase behandling, men dette kunne skje også på grunn av aggregat dannelse. Lavmolekylære polysakkarider i supernatanten tyder på at alfa-(1 → 4)-glykosidbindingene finnes i alle ekstraktene. Polysakkaridfraksjonen som tilsvarte topp 3 (beregnet med stor usikkerhet) til AAoIw (2,3-2,5 kDa) ble funnet helt i supernatanten. Dette kan tyde på at topp 3 i AAoIw bestod av lavmolekylære alfa- glukaner.



Figur 44. Kromatogram fra SEC-HPLC analyse av WAOAB, WAOF₂AB, AAOLWAB og AAOLWAS.

Figur 44 viser at vann- og alkaliekstrakter av *A. ovinus* hadde to topper på kromatogrammet etter behandling med alfa-amylase. Disse toppene tilsvarte to polysakkaridfraksjoner med forskjellig molekylvekt.

Polysakkaridfraksjonene som tilsvarte topp 2 ble transportert gjennom kolonnen nesten med den samme hastighet (hadde den samme retensjonstid), hadde nesten lik molekylvekt 10-20 kDa, men hadde forskjellig molekylvektfordeling.

Polysakkaridfraksjonen med Mw ca. 10-20 kDa var dominerende hos WAOAB (topp 2) og WAOF₂AB og nesten lik hos AAOLWAB og AAOSWAB.

Tabell 23. Estimert molekylvektfordeling til fraksjon WAO etter alfa-amylase behandling.

Polysakkaridfraksjonen	WAO (topp 2)	WAOAB (topp 2)	WAOAS (topp 2)
Mw pullulanekvivalent, kDa	11,9	15,3	4,1

Tabell 24. Estimert molekylvektfordeling til fraksjon WAoF₂ etter alfa-amylase behandling.

Polysakkaridfraksjonen	WAoF ₂ (topp 2)	WAoF ₂ AB (topp 2)	WAoF ₂ AS (topp 2)
Mw pullulanekvivalent, kDa	12,1	10,3	6,8

Tabell 25. Estimert molekylvektfordeling til fraksjon AAoS_w etter alfa-amylase behandling.

Polysakkaridfraksjonen	AAoS _w (topp 2)	AAoS _w AB (topp 2)	AAoS _w AS (topp 2)
Mw pullulanekvivalent, kDa	11,7	18,1	6,8

Tabell 26. Estimert molekylvektfordeling til fraksjon AAoI_w etter alfa-amylase behandling.

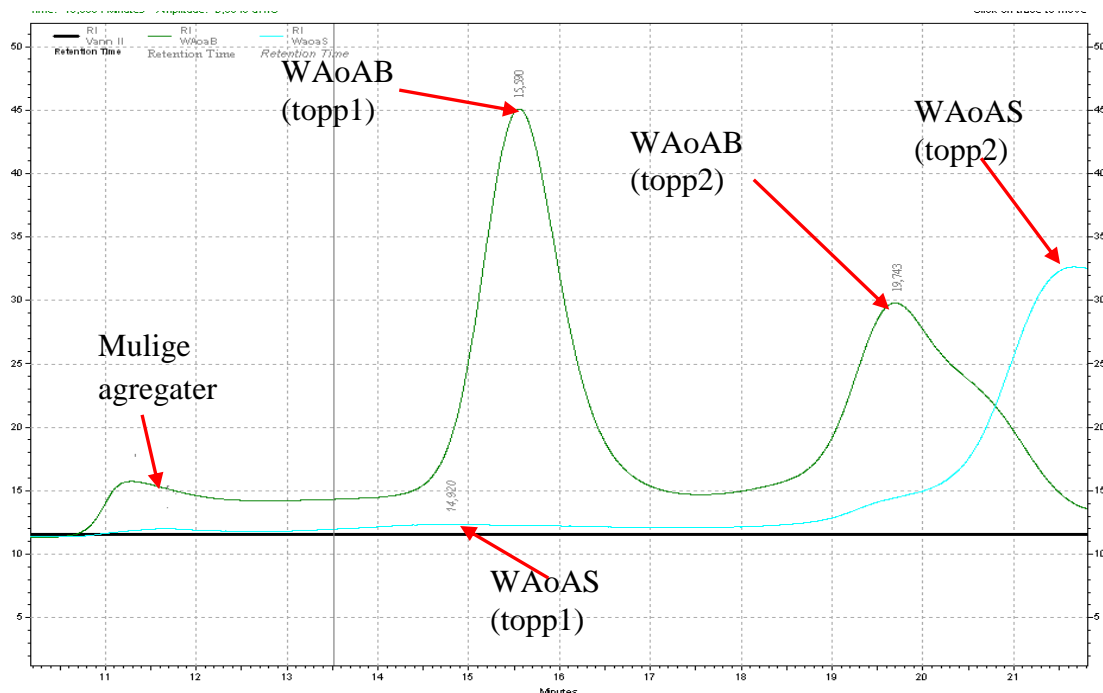
Polysakkaridfraksjonen	AAoI _w (topp 2)	AAoI _w (topp 3)	AAoI _w AB (topp 2)	AAoI _w AS (topp 2)	AAoI _w AS (topp 3)
Mw pullulanekvivalent, kDa	16,7	2,4	18,1	15,3	2,5

Tabeller **23-26** viser at Mw til alle ekstraktene før alfa-amylase behandlingen var høyere enn i de opprinnelige ekstraktene. Grunnen til dette kan være:

- ✓ Alle ekstraktene inneholdt bare en del alfa-(1 → 4) -glykosidbindinger som ble spaltet etter alfa- amylase behandlingen og den andre delen bestod fortsatt av opprinnelige molekyler som aggregerte med spaltede monosakkarider.
- ✓ Forskjellen i Mw før alfa-amylase behandling og etter var ikke signifikant.
- ✓ Lavmolekulære mono-og oligo-polysakkarider dannet aggregater med høyre Mw.
- ✓ Mulige aggregater som er løst opp.

5.1.5.2. TSK-Gel® G5000PWXL

Alfa-amylase behandlet WAO (bunnfall WAOAB og supernatant WAOAS)



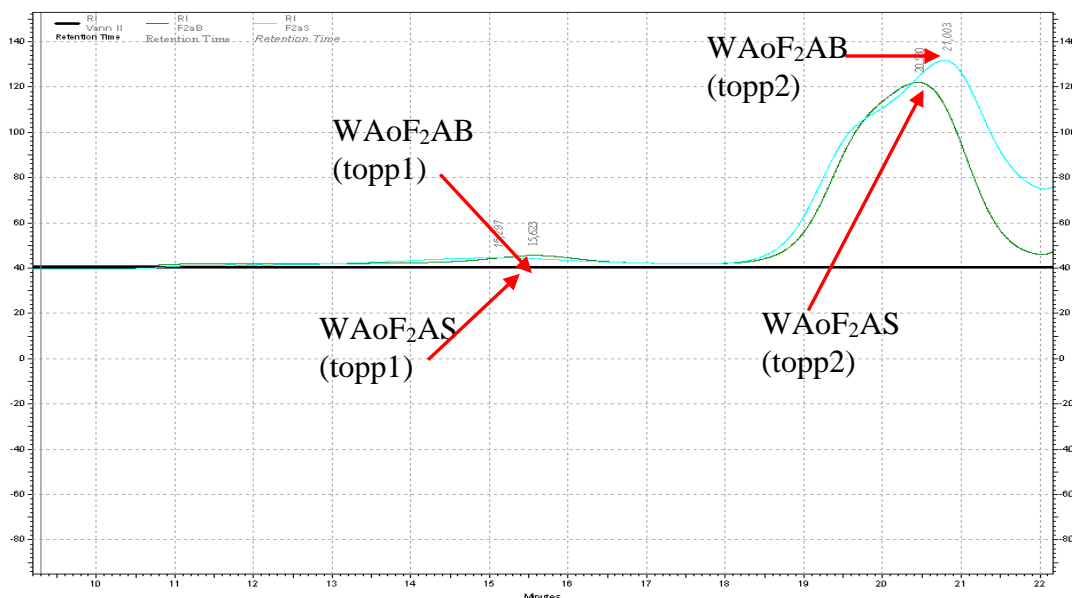
Figur 45. Kromatogram fra SEC-HPLC analyse av WAOA.

Molekylvekten til WAOAS (topp 2) lå utenfor standardkurven, og ble dermed beregnet med stor usikkerhet.

Tabell 27. Estimert molekylvektfordeling til fraksjon WAOA (Pullulanekvivalent).

Fraksjon	Mw pullulanekvivalent, kDa	Mp, kDa
WAOAB (topp 1)	238,1	236,1
WAOAB (topp 2)	15,0	16,9
WAOAS (topp 1)	225,0	226,1
WAOAS (topp 2)	4,4	4,51

➤ Alfa-amylasebehandlet W_{AoF}₂ (bunnfall W_{AoF}₂AB og supernatant W_{AoF}₂AS)

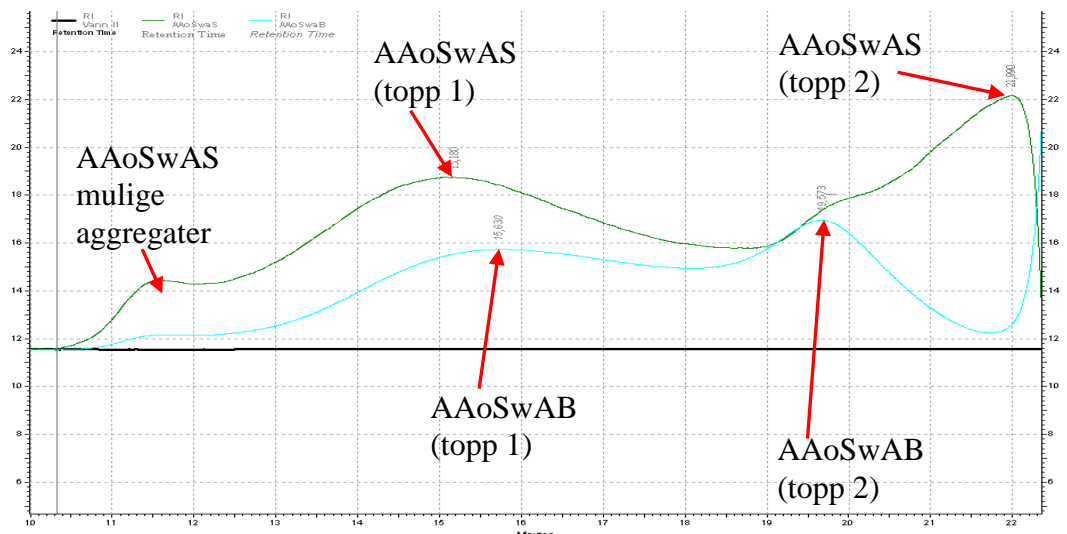


Figur 46. Kromatogram fra SEC-HPLC analyse av W_{AoF}₂A.

Tabell 28. Estimert molekylvektfordeling til fraksjon W_{AoF}₂A (Pullulanekvivalent).

Fraksjon	Mw pullulanekvivalent, kDa	Mp, kDa
W _{AoF} ₂ AB (topp 1)	226,1	226,3
W _{AoF} ₂ AB (topp 2)	12,4	10,3
W _{AoF} ₂ AS (topp 1)	299,6	280,1
W _{AoF} ₂ AS (topp 2)	8,4	7,9

➤ Alfa amylase behandlet AAoS_w (bunnfall AAoS_wAB og supernatant AAoS_wAS)

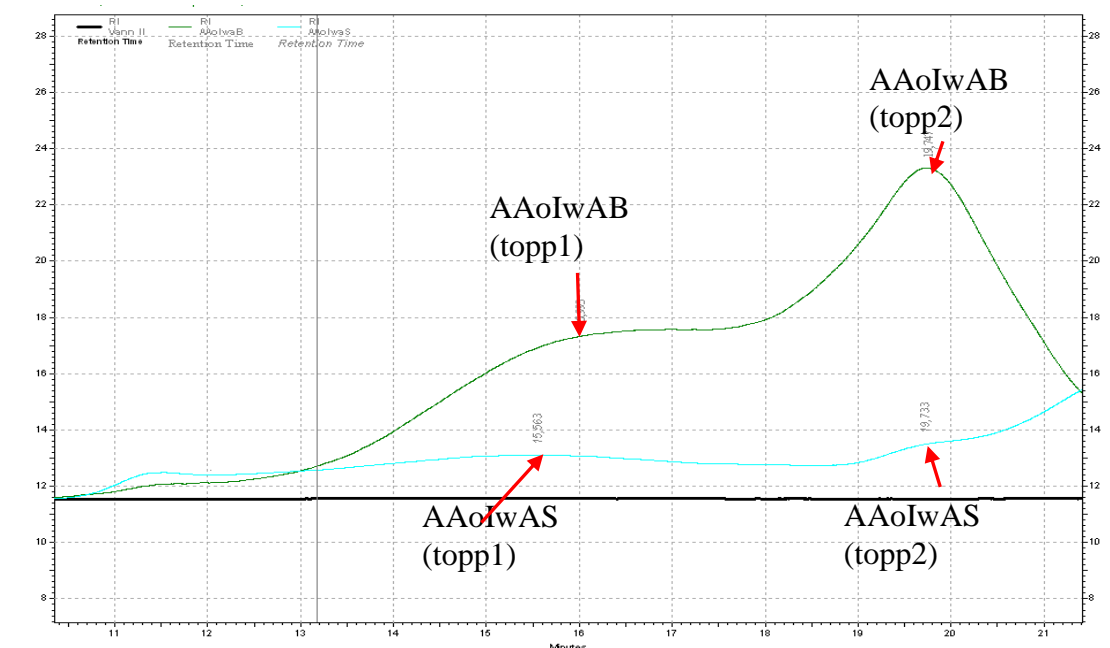


Figur 47. Kromatogram fra SEC-HPLC analyse av AAoS_wA.

Tabell 29. Estimert molekylvektfordeling til fraksjon AAoSwa (Pullulanekvivalent).

Fraksjon	Mw pullulanekvivalent, kDa	Mp, kDa
AAoSwaAB (topp 1)	328,6	293,6
AAoSwaAB (topp 2)	18,1	17,9
AAoSwaAS (topp 1)	339,4	336,1
AAoSwaAS (topp 2)	9,4	8,5

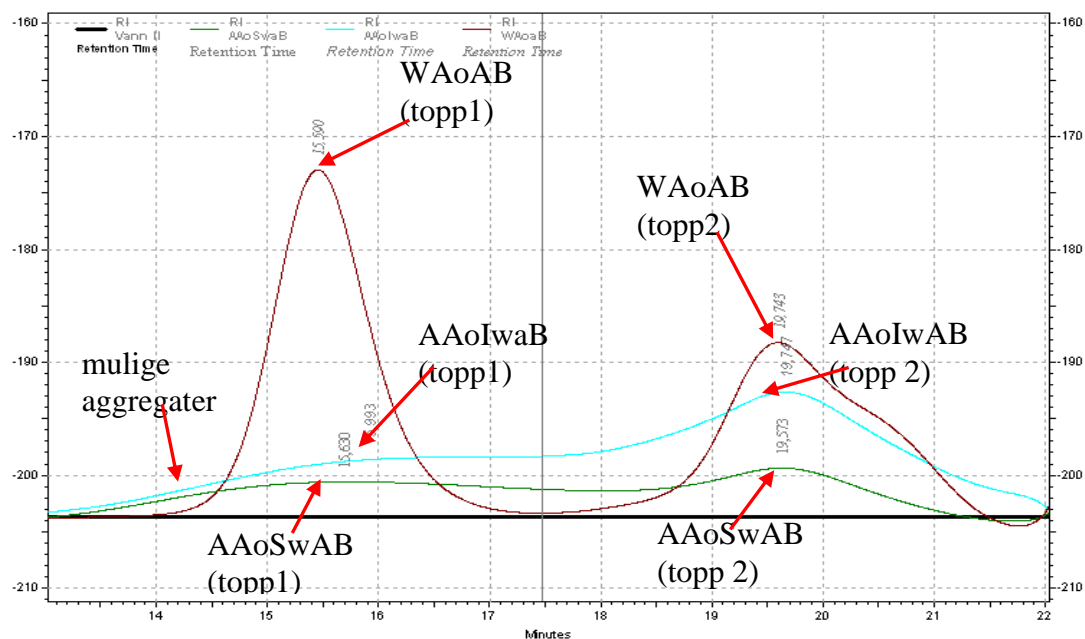
➤ **Alfa amylase behandlet AAoIw (bunnfall AAoIwAB og supernatant AAoIwAS)**



Figur 48. Kromatogram fra SEC-HPLC analyse av AAoIwA.

Tabell 30. Estimert molekylvektfordeling til fraksjon AAoIwA (Pullulanekvivalent).

Fraksjon	Mw pullulanekvivalent, kDa	Mp, kDa
AAoIwAB (topp 1)	198,2	191,5
AAoIwAB (topp 2)	15,0	16,9
AAoIwAS (topp 1)	278,9	231,6
AAoIwAS (topp 2)	14,8	16,6



Figur 49. Kromatogram fra SEC-HPLC analyse av AAoIwAB, AAoSwAB og WAoAB.

Figur 49 viser at bunnfall av vann (WAoAB)- og vannløselig alkali (AAoSwAB)- ekstrakter etter alfa-amylase behandling hadde to topper på kromatogrammet som tilsvarte to polysakkaridfraksjoner med forskjellig molekylvekt. Det ser ut til at små molekyler som ble spaltet av opprinnelige ekstrakter kunne aggregere i aggregater med høy Mw.

Vannløselig alkali ekstrakt (AAoIwAB) fikk bedre løselighet etter alfa-amylase behandling (dannet suspensjoner). Den hadde også to topper på kromatogrammet med dominerende topp 2 som tilsvarende Mw 15kDa. Det ser ut til at små partikler i AAoIwAB med lav Mw, som ble dannet etter alfa-amylase behandlingen, aggregerte seg i store aggregater med høy Mw. Det stemmer med tidligere studier som har vist at partikler av beta-glukaner kan danne aggregater når de er suspendert i vandige medier (Hunter *et al.*, 2002).

Topp 1 med Mw ca. 200-300 kDa var dominerende hos WAoAB. Topp 2 var dominerende hos AAoIw og AAoSw, noe som kan også forklare med at polysakkarider i prøven ble degradert av bakterier. Alfa-amylasen som ble brukt var ikke steril, noe som kunne føre til bakteriell kontaminasjon av behandlede prøver.

Tabell 31. Estimert molekylvektfordeling til fraksjon WAO etter alfa-amylase behandling.

Polysakkarid fraksjonen	WAO (topp 1)	WAO (topp 2)	WAOAB (topp 1)	WAOAB (topp 2)	WAOAS (topp 1)	WAOAS (topp 2)
Mw PL, kDa	224,5	12,2	238,1	15,0	225,0	4,4

Tabell 31 viser at Mw til WAOAB (238,1 kDa) var høyre en i opprinnelig (22,4 kDa) AAOIw fraksjonen. Det kan være av den samme grunn som ble nevnt før.

Tabell 32. Estimert molekylvektfordeling til fraksjon WAOF₂ etter alfa-amylase behandling.

Polysakkarid fraksjonen	WAOF ₂ (topp 1)	WAOF ₂ (topp 2)	WAOF ₂ AB (topp 1)	WAOF ₂ AB (topp 2)	WAOF ₂ AS (topp 1)	WAOF ₂ AS (topp 2)
Mw PL, kDa	237,2	12,1	226,1	12,4	299,6	8,4

Tabell 33. Estimert molekylvektfordeling til fraksjon AAOsw etter alfa-amylase behandling.

Polysakkarid fraksjonen	AAOSw (topp 1)	AAOSw (topp 2)	AAOSwAB (topp 1)	AAOSwAB (topp 2)	AAOSwAS (topp 1)	AAOSw AS (topp 2)
Mw PL, kDa	324,5	16,7	328,6	18,1	339,4	18,3

Tabell 33 viser at Mw AAOswAB (328,6kDa) var høyre en i opprinnelig (324,5 kDa) AAOsw fraksjon. Grunnen til dette kan være:

- ✓ Det var mest mulig at alfa-(1 → 4)-glukose befant seg i polysakkaridfraksjonen som tilsvarer topp 1, siden Mw til AAOsw (topp2), AAOswAB (topp 2) og AAOswAS (topp 2) er nesten like. Bare AAOsw (topp 2) kunne kommet seg i løsningen nesten uforandret.
- ✓ Forskjellen i Mw mellom AAOsw og AAOswAB var ikke signifikant.
- ✓ Lavmolekulære mono-og oligo-polysakkarider dannet aggregater med høyre Mw.

Tabell 34. Estimert molekylvektfordeling til fraksjon AAoIw etter alfa-amylase behandling.

Polysakkarid fraksjonen	AAoIw (topp 1)	AAoIw (topp 2)	AAoIwAB (topp 1)	AAoIwA B (topp 2)	AAoIwAS (topp 1)	AAoIwAS (topp 2)
Mw PL, kDa	286,5	15,9	198,2	15,0	278,9	14,8

Tabell 39 viser at AAoIw (286,5kDa) ble spaltet til AAoIwAB (198,2 kDa) som hadde lavere Mw. Det var størst forandring i Mw for alle de fire enzymdegraderte rå- ekstraktene som ble analysert. Signifikant nedgang i molekylvekt kan være en av de ukjente årsakene som førte til forandring etter enzymdegradering i de fysikalske egenskapene til AAoIw (økt løselighet).

Mw til AAoIw (topp2), AAoIwAB (topp 2) og AAoIwAS (topp 2) er nesten like. Bare AAoIw (topp 2) kunne komme seg i løsningen nesten uforandret. Det kan tyde på alfa-(1 → 4) bundet-glukose befant seg i fraksjonen som tilsvarer AAoIw (topp1).

5.1.6. Partiell hydrolyse

Delvis nedbrytning av polysakkarider ved partiell syre hydrolyse baseres på at noen glykosidbindinger er mer labile for syre enn andre. Det er kjent at beta-(1 → 3) -glukaner med en høy grad av polymerisering (DP > 100) er helt uoppløselige i vann. På grunn av polymerkjedekonformasjon blir det sterkere interaksjoner mellom kjedene enn mellom kjedene og vannmolekyler. Løseligheten øker når graden av polymerisering av beta-(1 → 3) -glukaner og deres molekylvekt senkes. Derfor ble det bestemt å utføre partiell syre hydrolyse av vannløselige alkali ekstrakt AAoIw fra av *A.ovinus* for å øke løseligheten.

I tillegg ble vannløselig alkali ekstrakt partiell hydrolysert for om mulig å få bedre resultater ved metylering (metode 5.6.1), NMR, SEC-HPLC (metode 5.6.3). Partiell syrehydrolyse ble forsøkt med 0,1M trifluoreddiksyre (TFA) etter 1 time hydrolyse ved temperatur 100°C. TFA er en sterk syre som er flyktig og derfor er det ikke nødvendig med nøytralisering av den. Syren kan fjernes ved fordampning.

Monosakkaridsammensetning og totalt monosakkaridinnhold av partiell hydrolyserte alkaliekstrakter (AAoSW og AAoIw) (metode 4.4.6.1) av *Albatrellus ovinus* ble bestemt ved GC som ble gjennomført etter metanolyse og TMS-derivatisering (metode 4.3).

Tabell 35. Monosakkaridsammensetning i alkaliekstrakt AAoS_w og AAoI_w før og etter partiell hydrolyse; prosent av totalt karbohydratinnhold.

Monosakkarid	AAoS _w	AAoS _w 1-1	AAoI _w	AAoI _w 1-1
Glc	78,8	74,1	77,9	77,26
Gal	2,4	2,5	0,7	0,95
Fuc	2,5	1,0	2,2	1,27
Xyl	4,1	5,2	6,6	7,04
Man	11,7	17,2	12,7	13,48
Sum %	100	100	100	100

Siden det ikke ble foretatt en fraksjonering etter hydrolysen, endret ikke innholdet av monosakkaridsammensetning seg i de to alkali ekstraktene, som forventet.

Bindingsmønster ble bestemt ved gasskromatografi-massespektroskopi (GC-MS) etter metylering (metode 4.4.1).

Tabell 36. Bindingsforhold i AAoS_w og AAoI_w før og etter partiell hydrolyse .

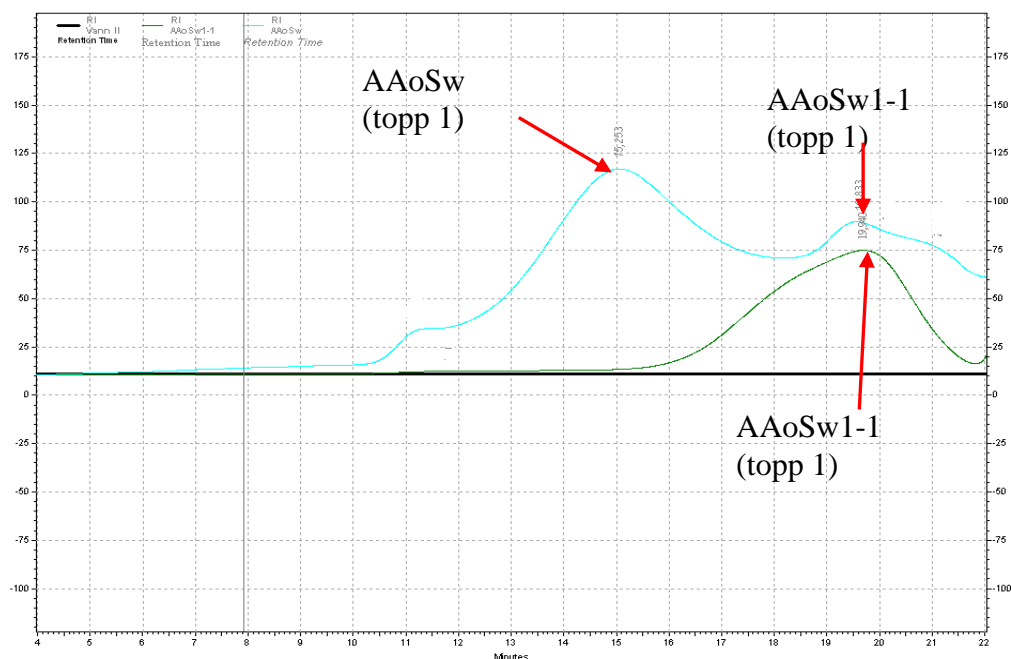
Monosakkarider og deres bindingstyper		Rå- alkali ekstrakter		Partiell hydrolysert	
		AAoS _w	AAoI _w	AAoS _w 1-1	AAoI _w 1-1
Fuc	Terminal	2,4	1,3	1,9	1,5
	1→3 p	0,1	0,9	0,6	0,5
		2,5	2,2	1,0	1,3
Xyl	Terminal	3,3	3,2	3,5	3,4
	1→2 p	0,6	0,8	0,2	0,2
	1→3 p	0,2	2,4	0,4	0,4
		4,1	4,0	5,2	7,0
Man	Terminal	11,7	12,7	11,2	8
		11,7	12,7	11,2	8
Gal	Terminal	0,2	0,1	0,2	0,2
	1→6	1,6	0,3	1,9	0,7
	1→2,6	0,8	0,3	0,4	0,1
		2,4	0,7	2,5	1
Glc	Terminal	10,6	10,8	8,4	8,9
	1→3	35,6	37,6	30,5	34,9
	1→4	14,7	22,0	13,9	8,0
	1→6	5,5	1,3	5,4	3,4
	1→3,4 p	2,9	1,5	3,2	4,2
	1→2,3	0,6	2,9	6,4	9,0
	1→4,6	1,8	1,3	1,4	0,5
	1→3,6	9,6	5,2	12,5	15,2
		78,8	77,4	74,1	77,3

Ingen store endringer i bindingsforhold til (1→3)- bundne glukoseenheter ble observert. Løseligheten av AAoSw ble forverret. Det skulle kanskje vært forsøkt med hardere betingelser, for eksempel kunne man forsøkt med et enzym som bryter ned noe av det mist løselige materialet, nemlig beta-(1→3)-bundet-glukan.

Løseligheten til AAoIw ble ikke forbedret og det ble observert en stor nedgang i (1→4)- (1→4,6)- bundne glukoseenheter. Noe som tydet på at mulige bindinger mellom (1→3)- og (1→4)- kjeder ble brutt ned og en del av (1→4)-glukoseenheter ble vasket bort med etanol.

Vektgjennomsnittet (Mw) av alkaliekstrakter av *Albatrellus ovinus* etter partiell hydrolyse (AAoSw1-1 og AAoIw1-1) ble bestemt med eksklusjonskromatografi (SEC) (metode 4.4.2).

5.1.6.1. TSK-Gel® G5000PWXL



Figur 50. Kromatogram fra SEC-HPLC analyse av AAoSw (1-1) (bunfall)) partiell hydrolysert og AAoSw. TSK-Gel® G5000PW_{XL}.

Figur 50 viser at AAoSw er delvis degradert. Det er litt diffust hva som er toppunktet ettersom denne har svært bred Mw fordeling med høy polydispersitet (Pd 1,7). Etter partiell hydrolyse ble løseligheten av AAoSw verre.

Forgrenede polysakkarider har vanligvis god vannoppløselighet. Vanligvis vil eventuelle strukturer som inneholder spesielt fleksible enheter som (1 → 6) forgreninger føre til lettere

oppløselighet i vann. Nedgang i løseligheten til vannløselig alkaliekstrakt kan forklares med tilstedeværelse av slike (1 → 6) forgreninger som ble delvis tatt bort etter hydrolyse.

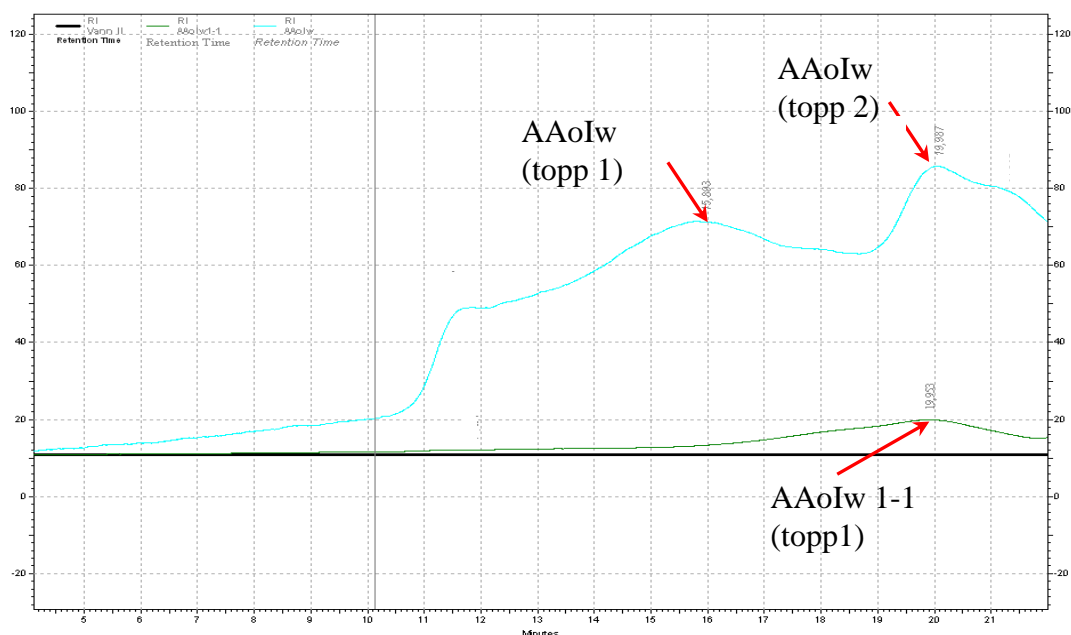
Tabell 37. Estimert molekylvektfordeling til fraksjon AAoS_w før og etter partiell hydrolyse. TSK-Gel® G5000PWXL. (Pullulanekvivalent).

Polysakkarid fraksjonen	AAoS _w (topp 1)	AAoS _w (topp 2)	AAoS _w 1-1 (topp 1)
M _w PL, kDa	324,5	16,7	29,3

Tabell 37 viser at opprinnelige polysakkaridfraksjoner av AAoS_w med høy M_w (324,5 kDa) ble nesten helt hydrolysert til polysakkarider med lav M_w (29,3 kDa). Det ser ut til at den høymolekylære delen av prøven ble hydrolysert. For å finne dette kunne en fraksjonere opprinnelige ekstrakter til fraksjonen (topp1) og (topp2) først, så utføre en partiellhydrolyse på hver en av dem og så undersøke nedgangen i molekylvekt.

Det er kjent at polymerkjedene er tverrbundet via kovalente eller ikke kovalente bindinger slik at de danner et tredimensjonal polymernetverk som inneholder vannmolekyler. For å danne gel må polysakkaridene forstyrre de fleste hydrogenbindingene i den faste tilstanden (reducere intramolekylære og øke intermolekylære interaksjoner). Dette kan for eksempel skje med forandring av pH eller hydrolyse av store polymerkjeder (Cui, 2005). Det kan tenkes at polysakkarider i AAoS_w 1-1 med lav molekylvekt (29,3 kDa) delvis dannet gel på grunn av økte intermolekylære interaksjoner.

➤ AAoIw1-1



Figur 51. Kromatogram fra SEC-HPLC analyse av partiell hydrolysert AAoIw1-1 og AAoIw. TSK-Gel® G5000PWXL.

Det ser ut til at prøven har blitt delvis hydrolysert. Etter partiell hydrolyse var AAoIw (1-1) fortsatt uløselig i vann.

Løseligheten av polysakkarider avhengig av deres molekylvekt og struktur. Figur 51 viser at det ikke var nok å redusere molekylvekt av AAoIw for å forbedre løseligheten og tyder på at strukturen til polysakkariden kan være ansvarlig for dette. Det kan tenkes at polysakkarider i AAoIw 1-1 med lav molekylvekt (16,5 kDa) dannet gel på grunn av økte intermolekulære interaksjoner, som beskrevet ovenfor.

Tabell 38. Estimert molekylvektfordeling til fraksjon AAoIw etter partiell hydrolyse. TSK-Gel® G5000PWXL.

Polysakkarid Fraksjonen	AAoIw (topp 1)	AAoIw (topp 2)	AAoIw1-1 (topp 1)
Mw PL, kDa	286,5	15,9	16,5

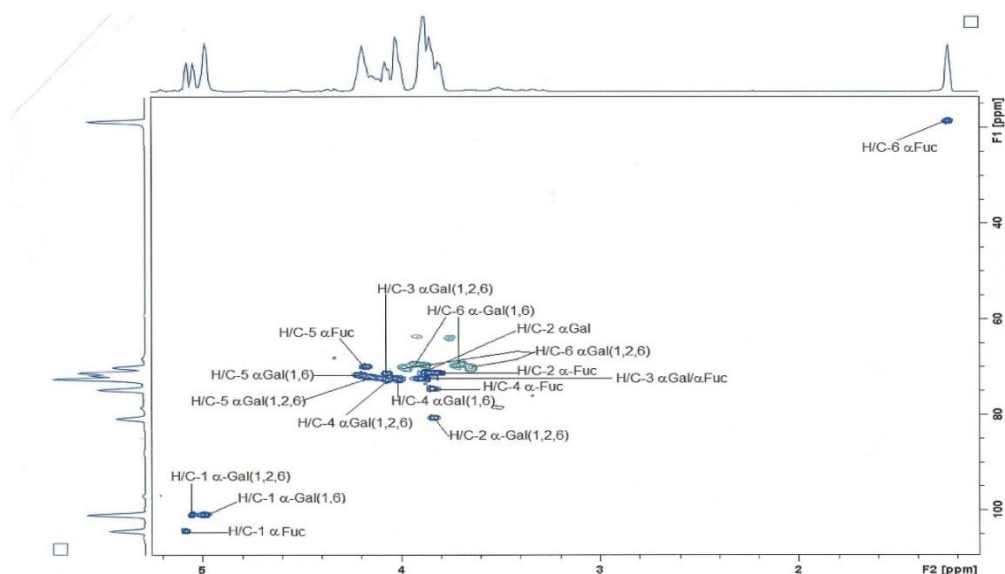
Tabell 38 viser at opprinnelige polysakkaridfraksjoner av AAoIw (Mw 286,5) ble nesten helt hydrolysert til polysakkarider med lav Mw (16,5 kDa).

Som nevnt tidligere dannet begge to polysakkaridfraksjonene (AAoS_w (1-1) og AAoI_w(1-1)) gel etter oppløsning i vann. Geldannelse vanskeliggjorde prøveforberedelsen til NMR analyse.

Det har blitt foreslått at lavmolekylære polysakkaridkjeder utviser høyere mobilitet i løsninger, noe som øker sannsynligheten for å interagere med hverandre og dermed danne faste strukturer (krysssoner). Disse prosessene kan til slutt føre til dannelsen av gel (Böhm & Kulicke, 1999; Vaikousi *et al.*, 2004; Lazaridou & Biliaderis, 2004; Tosh *et al.*, 2004).

5.1.7. Kjernemagnetisk resonansspektroskopi

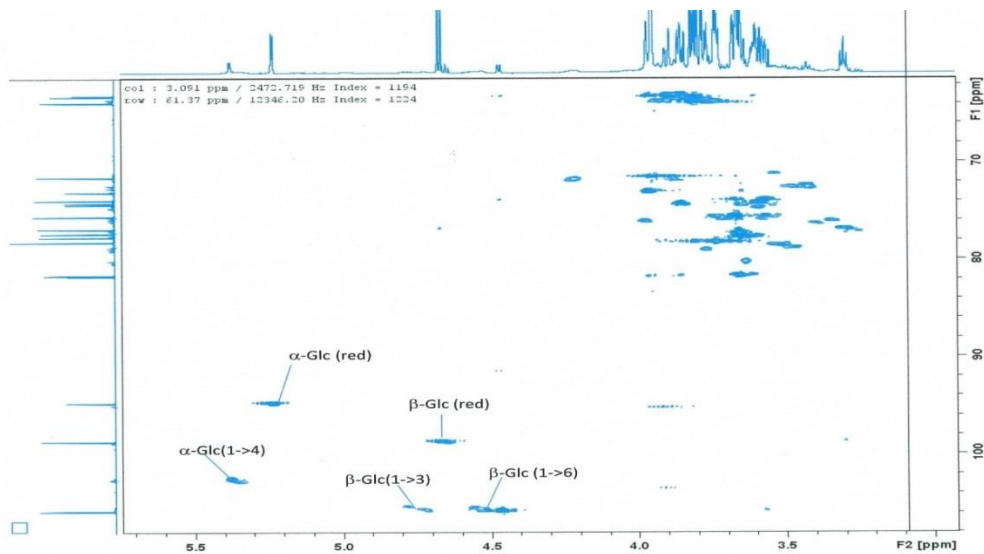
Den anomerisk struktur (alfa eller beta) til hver sukkerenhet kan bli bestemt ved NMR spektroskopi.



Figur 52. HSQC spekter av WAO_{F1}.

Figur 52 viser at H/C krysspunkter i det anomeriske området nederst til venstre inneholder tre signaler tilsvarende alfa-(1→6)-galaktose, alfa-(1→2,6)-galaktose og alfa-(1→) fukose.

Fukose, som er et 6-deoksysukker, har en metylgruppe i C-6, og krysspunkt for denne sees øverst til høyre i spekteret. Spekteret viser ingen signaler fra mannose eller beta-glukaner. HMBC-spekteret av WAO_{F1} viser kobling mellom H1 i fukose og C2 i (1→2,6)-bundet galaktose. Dette bekrefter at fukose er bundet til posisjon 2 på galaktose.



Figur 53. HSQC NMR spekter av AAOIwAB.

Figur 53 viser at prøven inneholder noe alfa-glukaner også etter behandling med amylase; signalet tilsvarende H/C-1 av alfa-(1→4)-glukose sees nedest til venstre i figuren. Identifikasjonen av denne er gjort ved sammenligning med tilsvarende spekter fra stivelse (ABCS). H/C-1-signalene fra reduserende ender av alfa-glukaner tyder på at disse er brutt mye ned. Slike signaler sees også fra beta-glukan. Spekteret viser også signaler fra H/C-1 fra beta-(1→3)- og beta-(1→6)-glukaner.

NMR analyse viste også tilstedeværelse av:

- beta-(1→ 3) bundne-glukoseenheter og alfa-(1→ 4) bundne-D-glukoseenheter i WAO_{F2} (figurene ikke vist).
- alfa-(1→ 4) bundne-D-glukoseenheter i AAO_{Sw} (figuren ikke vist).

5.2. IMMUNOMODULERENDE AKTIVITET

I denne undersøkelsen ble RAW 264.7- celler brukt til screening av *A.ovinus* polysakkarider for bioaktivitet *in vitro*.

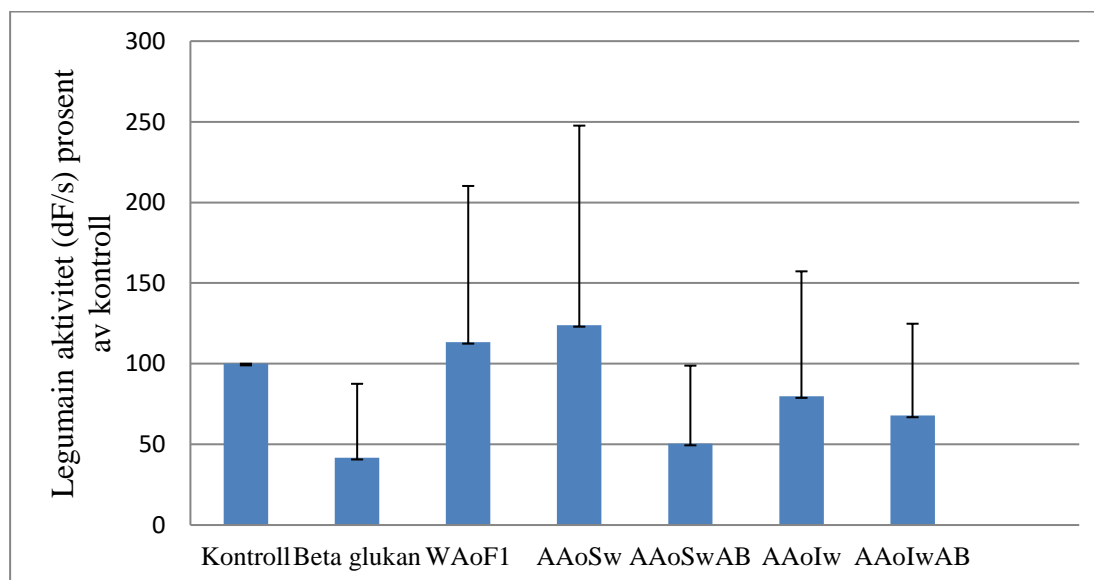
De polysakkaridfraksjonene som viste reduksjon av legumainaktivitet ved konsentrasjon 1 mg/mL ble videre testet ved lavere konsentrasjoner (1mg/mL; 0,5 mg/mL og 0,25 mg/mL).

Dessverre er det imidlertid ikke mulig å kartlegge et forhold mellom struktur og aktivitet av analyserte polysakkarider siden undersøkelsene ble gjennomført ved anvendelse av polykomponente polysakkaridfraksjoner.

5.2.1. Stimulering av RAW 246.7-celler og måling av legumain aktivitet.

For å undersøke i hvilken grad forskjellige polysakkaridfraksjoner fra *A. ovinus* kan påvirke legumainaktivitet ble RAW 264.7-makrofager stimulert med rå-ekstrakter (W AoF₁, AAoIw og AAoS_w) og alfa- amylasebehandlete rå-ekstrakter (AAoIwAB og AAoS_wAB).

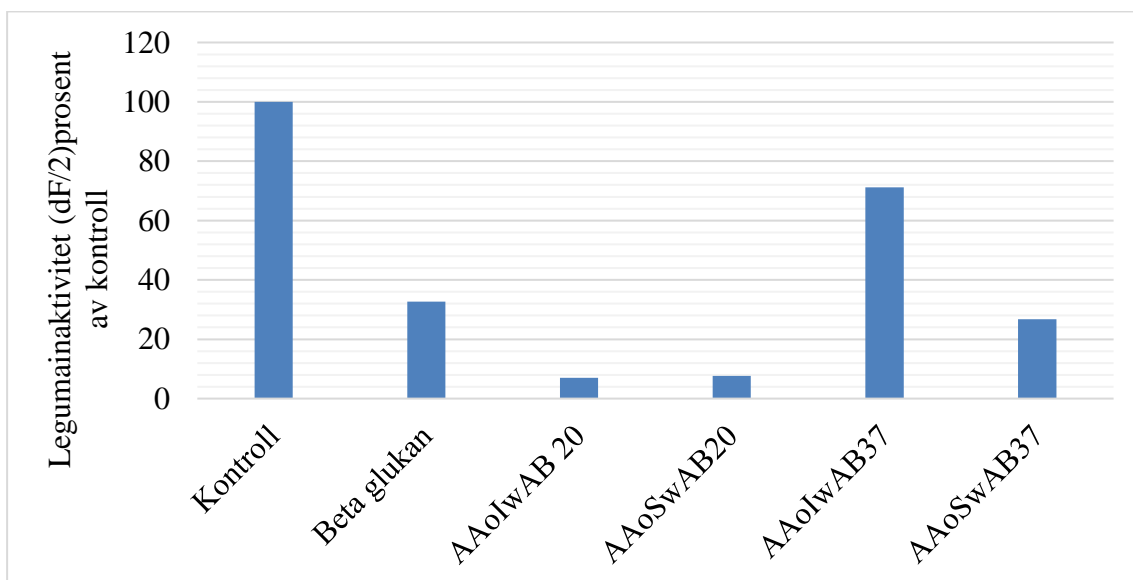
For å kontrollere at RAW 264.7 uttrykker legumain slik det skal, ble det brukt en negativ kontroll som kun bestod av serumfritt medium og positiv kontroll av betaglukan fra gjærsopp (1 mg/mL) om er vist å hemme legumainaktivitet (Berven *et al.*, 2015).



Figur 54. Legumainaktivitet målt i cellelysater etter stimulering med W AoF₁, AAoIw og AAoS_w, alfa-amylasedegraderte prøver AAoIwAB og AAoS_wAB. Forsøket ble utført 3 ganger, og figuren viser resultater fra ett representativt forsøk.

Figur 54 viser at vannløselige vann (W_{AoF₁})- og alkali (AAoSw)- ekstrakter gav nesten ingen hemming av legumainaktiviteten sammenlignet med kontroll (henholdsvis 3,2 % og 0 %). Vannuløselig alkali ekstrakt AAoIw gav henholdsvis 22,5 % sammenlignet med kontroll. Den største hemming av legumainaktivitet var observert hos alfa-amylasebehandlede alkaliekstrakter AAoSwAB (49,6 %) og AAoIwAB (43,1 %) sammenlignet med kontroll.

Det var rapportert at aktiviteten og stabiliteten av alfa-amylase er temperaturavhengig (aktiviteten øker med temperatur mens stabiliteten senkes)(MacGregor, 1978). Behandling med alfa-amylase ble gjennomført for å isolere mest mulig rene beta-glukaner og separere dem fra alfa-glukaner. Det var derfor interessant å undersøke i hvilken grad forskjellige tilstander av enzymatisk degradering av alkaliekstrakter (20⁰C i 20 timer og 37⁰C i 2 timer) (metode 4.4.5) kan påvirke legumainaktivitet i RAW 264.7-makrofager som ble stimulert med AAoIwAB og AAoSwAB behandlet med alfa-amylase ved de to ulike betingelsene.



Figur 55. Legumainaktivitet målt i cellelysater etter enzymatisk degradering av AAoIw og AAoSw ved 20⁰C 20 timer og 37⁰C 2 timer.

Det ble observert 92,9 % hemming av legumainaktivitet etter stimulering av RAW 264.7 med AAoIwAB 20⁰C i 20 timer og 28,8 % hemming av legumainaktivitet etter stimulering av RAW 264.7 med AAoIwAB 37⁰C i 2 timer sammenlignet med kontroll. Hemming av legumainaktivitet etter stimulering av RAW 264.7 med AAoSwAB 20⁰C i 20 timer ble 92,3 % og 73,2 % legumainaktivitet etter stimulering av RAW 264.7 med AAoSwA 37⁰C i 2 timer sammenlignet med kontroll.

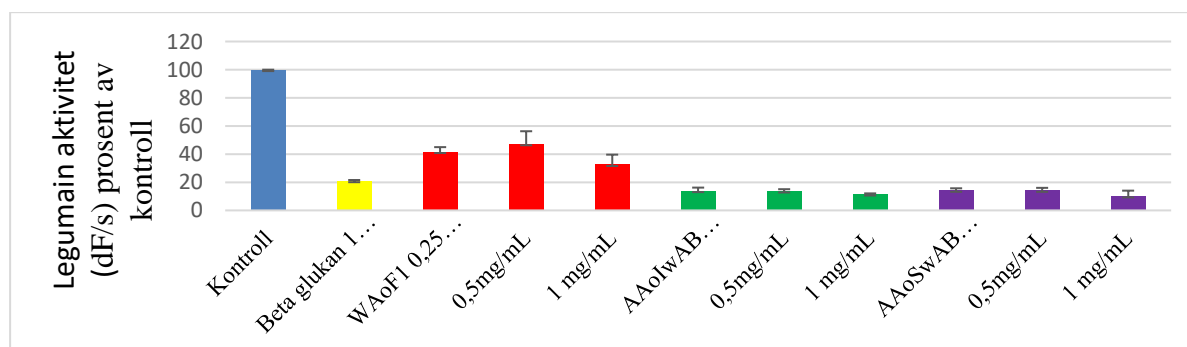
Resultatene viste at enzymatisk degradering av alkali ekstrakter av *A.ovinus* med alfa-amylase gav best og nesten lik hemming av legumainaktivitet i de langvarige eksponerte (20⁰C i 20 timer) prøvene. I tillegg viste den vannløselige AAoSw som ble behandlet med alfa-amylase 37⁰C i 2 timer bedre hemming av ligumainaktivitet enn den vannuløselig AAoIw etter behandling med de samme betingelsene.

Det var rapportert at fukogalaktaner kan aktivere makrofager (Samanta *et al.*, 2015), men mekanismen er ikke kartlagt (Ruthes *et al.*, 2012; Moradali *et al.*, 2007; Mizuno *et al.*, 2000). Siden strukturoppklaring av WAoF₁ tyder på tilstedeværelse av fukogalaktan i den analyserte prøven ble det det bestemt å teste videre WAoF₁, selv om den gav nesten ingen hemming av legumainaktivitet (3,2 %).

På bakgrunn av disse resultatene ble polysakkaridfraksjonene WAoF₁, AAoIwAB 20⁰C i 20 timer og AAoSwAB 20⁰C i 20 timer videre testet i synkende konsentrasjoner (0,25 mg/mL, 0,5 mg/mL og 1mg/mL) for å undersøke om disse gav dose-respons.

Dose-responsforsøk ble utført for å studere sammenheng mellom legumainaktivitet og konsentrasjon av prøver. Det var også studert hvilke konsentrasjon av analyserte prøver som fører til størst hemming av legumainaktivitet.

De polysakkaridfraksjonene som viste reduksjon av legumainaktivitet ved konsentrasjon 1 mg/mL ble videre testet ved lavere konsentrasjoner (1mg/mL; 0,5 mg/mL og 0,25 mg/mL) (figur 56).



Figur 56. Legumainaktivitet målt i cellelysater etter stimulering med WAoF1 og enzymdegraderte prøver AAoIwAB og AAoSwAB. Forsøket ble utført 4 ganger, og figuren viser resultater fra et representativt forsøk.

Figur 56 viser at det ikke var noen klar dose-respons i de analyserte prøvene.

WAO_{F1} gav nesten lik hemming av legumainaktivitet, som var ca. 60 % sammenlignet med kontroll. I tillegg gav den laveste dosen av WAO_{F1} (0,25 mg/mL) større hemming (58,2 %) enn den høyre dosen (0,5 mg/mL), som gav 52,7 % sammenlignet med kontroll. Forskjellen i hemming av legumainaktivitet var ikke signifikant, men viste at hemming var uavhengig av konsentrasjon.

Begge alkaliekstraktene (vannløselig alfa-amylasebehandlet AAoSwAB og delvis vannløselig alfa-amylasebehandlet AAoIwAB) av *A. ovinus* gav uvanlig høy hemming (87 % hemming for begge ekstraktene) av legumainaktivitet sammenlignet med kontroll. Det var ikke observert noen signifikant forskjell i hemming av legumainaktivitet i alle konsentrasjonene og standardavvik var ubetydelig.

WAO_{F1} ble isolert av vannekstrakt av *A. ovinus* og hadde derfor gode muligheter til å inneholdt LPS. AAoSw og AAoIw var to alkaliekstrakter av *A. ovinus* som ble isolert etter behandling med basiske løsninger og skulle i utgangspunktet ikke inneholdt LPS ettersom LPS blir brutt ned under isoleringsprosessen. AAoIwAB og AAoSwAB var fraksjoner som ble behandlet med alfa- amylase og ble eksponerte i 20 timer med T=20°C, noe som kunne føre til lipopolysakkarid (LPS) kontaminasjon.

LPS er hovedbestanddelen av den ytre membranen av gramnegative bakterier. Strukturen av LPS består av tre regioner; lipid A, core oligosaccharide og O-antigen polysakkarid (O-PS). Det er lipid A-delen som øker den biologiske aktivitet i immunceller, spesielt makrofager (Raetz, 1990; Raetz & Whitfield, 2002). Toll-like reseptor-4 på makrofager er ansvarlige binding av LPS (Janeway, 2001; Rang, 2003; Shimada et al., 2012).

LPS kunne kontaminere prøvene under prøveopparbeidelsen ettersom det finnes overalt, ikke minst på sopp og planter. Tilstedeværelse av LPS kunne føre til falske resultater. For å unngå kontaminering av de analyserte prøvene med LPS, ble følgende tiltak brukt: utstyr og arbeidsplassen var alltid rene, alle arbeidene ble utført med hansker. Alle arbeidene med cellelinje ble utført i LAF-benken for å hindre kontaminering. Cellene ble dyrket i sterile cellekulturflasker med steril vekstmedie. Men amylasen som ble brukt var neppe steril, kanskje heller ikke det utstyret som ble brukt for øvrig i denne prosessen.

Det er derfor viktig å sikre at alle reagenser og kulturmedier blir frie av endotoksiner. Gram negativ bakterielt endotoksin eller lipopolysakkarid (LPS) kan også aktivere makrofager, og det er viktig å sikre at alle reagenser og kulturmedier blir fri av endotoksinet. Generelt kan slik sikring gjøres ved hjelp av Limulus Amebocyte Lysate (LAL) test. Men fordi beta -

glukaner også kan utløse koagulering i standard LAL test, kan det brukes, for eksempel, en LPS-spesifikk Glucospeccy test (Hunter *et al.*, 2002) eller modifisert LAL test som inneholder beta- glukan blokker (Lonza, 2014). Blokker kan blokkere glukan sensitive G-pathway (Morita *et al.*, 1981; Pearson *et al.*, 1984) og gjøre testen mer spesifikk til endotoksiner. Det var rapportert at tilsetning av polymyxin B (PMB)(et antibiotikum av bakterie *Bacillus polymyxa*) kan blokkere aktiviteten av LPS gjennom binding til lipid A delen av LPS (Morrison & Jacobs, 1976). Men det også var påvist at små mengder av LPS stimulerer sekresjon av IL 8 mye raskere enn beta -glukaner fra korn og beta-(1 → 3)- glukan/protein komplekser zymosan på grunn av den manglende evne av PMB til å hemme den stimulerende effekten av LPS (Rieder *et al.*, 2013).

6. DISKUSJON

6.1. WAoF₁

Vannekstrakt av *A. ovinus* WAo inneholdt hovedsakelig glukose (41,1 %), galaktose (40,7 %), fukose (13,6 %), mannose (3,2 %) og spor av xylose (tabell 6).

For å fjerne mannose ble WAo separert på kolonnen Con A Sepharose 4B. Det var funnet at (1→4)-bundne glukoseenhetene bandt seg til kolonnen. Siden Con A har sterk affinitet for alfa-D-glukose var det forutsatt at glukose i fraksjon 2 kunne hadde alfa-konfigurasjon. Dette var et uventet funn, men som kan tas videre som en mulig opprenningsmetode der det er ønskelig å isolere eller fjerne alfa-1-4 glukaner fra en vandig løsning.

Eksklusjonskromatografi viste at WAo bestod av to fraksjoner (figurer 31 og 35). For å isolere disse fraksjonene ble det benyttet SEC kromatografi på en Sephacryl S-300 kolonne. Det ble isolert fraksjon WAoF₁ (Mw 251 kDa) og fraksjon WAoF₂ (237,2 kDa).

Fraksjonen WAoF₁ inneholdt hovedsakelig galaktose (59,8 %), glukose (19,1 %), fukose (15,1 %) med mindre mengder av mannose (3,2 %) og spor av xylose (tabell 5).

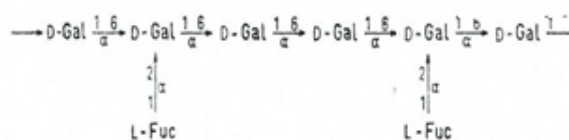
De fleste heterogalaktaner som er beskrevet i litteraturen har en hovedkjede bestående av alfa-(1 → 6) -bundne-D-Galaktopyranoseenheter med hovedsakelig fukose eller mannose i forgreninger (Carbonero *et al.*, 2008; Rosado *et al.*, 2003; Smiderle, Olsen, Carbonero, Marcon, *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2006; Wasser, 2002).

Dersom galaktoseenhetene utgjorde et galaktan alene ville vi finne en høyere andel (1→) bundet galaktose, helst tilsvarende mengde vi har funnet forgreiningspunkter (1→ 2,6)-bundet galaktose. Men det ble funnet bare 2,2 % (1→) -galaktose og det kan derfor tenkes at det i stedet kan være en annen substituent som sitter i O-2 på galaktose. Det ble funnet 15 % (1→)-bundet fukose, og det er mulig at disse enhetene kan være en del av galaktanet. HMBC-spekteret av WAoF₁ (figur 52) viste kobling mellom H1 i fukose og C2 i (1→2,6)-bundet galaktose. Dette bekrefter også at fukose er bundet til posisjon 2 på galaktose.

Det ble funnet 59,8 % galaktoseenheter totalt. 17,8 % tilsvarte (1 → 2,6)-bundet galaktoseenheter. Det ser ut at hver tredje galaktoseenhet har forgreninger i posisjon 2. Antall forgreiningspunkter stemmer bra med andel fukose bundet i ikke-reduserende ende (17,8 og 14,6 %).

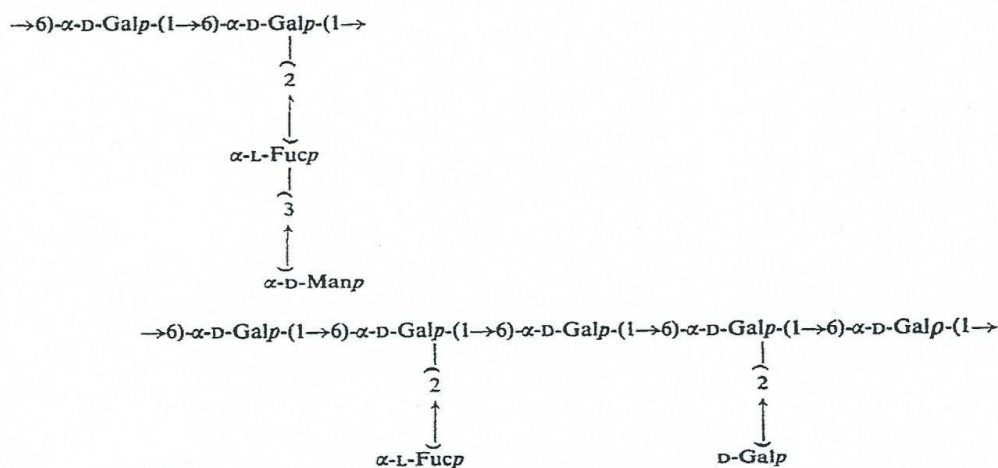
Det er også tidligere funnet slik struktur i vannekstrakt fra *A. ovinus* (Axelsson & Björndal, 1969). Lignende struktur ble også funnet i vannekstrakt av *Polyporus borealis* (Björndal &

Wågström, 1969). Derfor, på basis av de utførte analysene foreslås det at celleveggen på fåresopp inneholder alfa-(1 → 6)-bundet - D-galaktan med alfa-L- fukose substituert i posisjon 2 på hver 3. galaktoseenhet.



Figur 57. Mulig struktur for fukogalaktan fra *Allbatrellus ovinus*

Siden det var funnet små mengder (1→3) bundet -alfa-L-fukose og (1→) bundet -D-mannose kunne man også foreslå en struktur der mannose inngår som en del av et fukomannogalaktan der sidekjedene kunne inneholde 3-O- D mannopyranosyl- L-fukopyranosyl, -L fukopyranosyl og- D galaktopyranosyl. Fukomannogalaktan med lignende struktur ble beskrevet i studien fra 1969 (Brörndal & Lindberg, 1969). Derfor var det muligens at WAOF₁ inneholdt det samme.



Figur 58. Mulig struktur av fukomannogalaktan fra *Allbatrellus ovinus* ut fra metylerings analyse. Fukomannogalaktan med lignende struktur ble funnet i *Polyporus fomentarius* og *Polyporus igniarius* (Brörndal & Lindberg, 1969).

Samtidig finnes det ikke NMR-data som støtter teorien om at mannose inngår som en del av fukogalaktanet. Mannose mengden var såpass liten i forhold til forgreiningspunkter på galaktanet at denne sannsynligvis ikke er bundet til fukogalaktan. Det samme gjelder xylose. Derfor er strukturen som er presentert i figur 57 mest sannsynlig.

WAO_{F1} inneholdt en betydelig mengde av glukose (19,1 %) i motsetning til spor av glukose som ble rapportert av Axelsson K (Axelsson & Björndal, 1969). De ulike polymerene kan være assosiert med hverandre i celleveggen og ko-ekstrakteter kan være ikke-fullstendig separert. Det holder at noe glukose var vannløselig og har blitt ekstrahert sammen med fukogalaktanet. Dette kan også sees på kromatogram fra SEC-HPLC analyse av WAO, WAO_{F1} og WAO_{F2} (figur 31 og 35).

Tidligere studier beskriver fukomannogalaktaner isolert fra *Flammulina velutipes*, *Ganoderma applanatum*, *Laetiporus sulphureus*, *Coprinus comatus*, *Grifola Frondosa* og *Lentinula edodes* (Alquini *et al.*, 2004; Mukumoto & Yamaguchi, 1977; Ramawat *et al.*, 2015; Carbonero *et al.*, 2008). De fleste av disse heterogalaktanene hadde hovedkjeden alfa-(1 → 6)-bundet-D-galaktopyranose med forgreninger i O-2 med L-fukopuranose, 3-O-D-Mannopyranose-L-Fukopyranose eller D-Mannopyranose grupper. Men det var også rapportert om fukogalaktan som ble isolert fra *Agaricus bisporus* (Mw 370 kDa) (Ruthes *et al.*, 2013) og fukogalaktan med lignende struktur som ble isolert fra *Polyporus borealis* (Björndal & Wågström, 1969).

Det er tidligere rapportert om heterogalaktaner, spesielt de som inneholdt fukose, som har vist biologisk aktivitet (Cho *et al.*, 1998; Lu *et al.*, 2010; Mukumoto & Yamaguchi, 1977). Det finnes bare få studier som viser deres detaljerte struktur og biologisk aktivitet (spesielt antitumor aktivitet) (Moradali *et al.*, 2007). De nyeste studiene gjelder stort sett anti-inflammatorisk og antinociceptive effekten av fucogalaktaner, fucomannogalaktaner og mannogalaktaner som ble isolert fra *Agaricus brasiliensis* og *Agaricus bisporus*. *Hortensis* (Komura *et al.*, 2010), *Lentinus edodes* (Carbonero *et al.*, 2008) og *Pleurotus pulmonarius* (Smiderle, Olsen, Carbonero, Marcon, *et al.*, 2008).

Det finnes noen få studier som viser at fukogalaktan fra *Agaricus bisporus*, *Lactarius rufus* og *Sarcodon aspratus* (effektiv dose 50 µg/mL) øker TNF-alfa, NO og IL-1β (Ruthes *et al.*, 2012; Moradali *et al.*, 2007; Mizuno *et al.*, 2000). I tillegg viste vannløselig fucogalaktan (Mw 120 kDa) av vannekstrakt av *Macrolepiota dolichaula* in vitro makrofagaktivering (produksjon NO) i RAW 264,7 cellelinje (effektiv dose 100 µg/mL) (Samanta *et al.*, 2015). Derfor var det interessant å undersøke i hvilken grad fukogalaktan fra *A. ovinus* kan påvirke legumainaktivitet i RAW 264.7-makrofager som produserer legumain og uttrykker overflatereseptor Dectin-1 som spiller en viktig rolle i cellulær respons for karbohydrater (Brown & Gordon, 2005).

Det var påvist at vannløselig fukogalaktan fra *A. ovinus* gav nesten ingen hemming av legumainaktivitet sammenlignet med kontroll (figur 54) men 41,5 % hemming av legumainaktivitet i dose-responsforsøk uten dose-respons (figur 56). De få tidligere studier som beskriver hemming av legumainaktivitet i RAW 264.7-makrofager gjelder stort sett bare beta- glukaner og ikke fukogalaktaner. Det var rapportert at løselig og partikulære beta-glukaner bruker forskjellige reseptorer for å utløse deres biologiske aktivitet. Dectin-1 var avgjørende for partikulære beta-glukan-medierte immunmodulerende virkning på dendritiske celler-aktivering, makrofag fagocytose, cytotoxisk T-lymfocyt differensiering og antitumor-immunrespons in vivo. Løselig beta-glukan alene hadde ingen direkte stimulerende effekt på adaptive T-celler respons, men økte antitumor-monoklonalt antistoff-mediert terapeutisk effekt (figur 5). Det var påvist at denne effekten var uavhengig av Dectin-1 reseptoren, men at den var avhengig av binding av beta-glukaner til CR-3 reseptor på granulocytter som effektorceller (Qi *et al.*, 2011). Det var også rapportert at både løselige og partikulære beta-glukaner kan interreagere med Dectin-1 på makrofager, men bare partikulære beta-glukaner (ikke løselig) bandt seg til Dectin-1 og ble internalisert av makrofager gjennom Dectin-1 aktivering (Goodridge *et al.*, 2011; Berven *et al.*, 2015), noe som førte til økt produksjon av TNF-alfa og redusert legumain aktivitet (Berven *et al.*, 2015). I en tidligere masterstudie som studerte effekt av beta-glukaner fra gjær på legumainaktivitet var det konkludert at bare partikulære og delvis løselig beta-glukaner gir hemming av legumainaktivitet i RAW-264.7 cellelinje (Zubaidi, 2013).

Derfor kan det tenkes at vannløselig fukogalaktanet ikke var istand til å binde seg til og aktivere Dectin-1 slik ble observert. Hemming av legumainaktiviteten i dose-responsforsøket (41,5 %) kunne tyde i liten grad på tilstedeværelse av uløselig partikulære beta-glukaner (det var funnet 6,9 % av (1 → 3)- og 2,6 % av (1 → 3,6)-bundne glukoseenheter i WAoF₁ (tabell 7)), men det er nesten usannsynlig siden det ikke var observert noen synlige partikler i løsninger av WAoF₁.

Det var mer sannsynlig at hemming av legumainaktivitet skjedde på grunn av tilstedeværelse av LPS. Siden LPS er veldig potente stimulatorer av makrofager var det ikke observert noen doserespons i dose-responsforsøk. På bakgrunn av disse resultatene kan vi ikke si med sikkerhet at det var fukogalaktan som førte til hemming av legumainaktivitet i de utførte forsøkene.

6.2. WAoF₂

Fraksjonen WAoF₂ inneholdt hovedsakelig glukose (69,0 %), galaktose (22,3 %), fukose (6,0 %) med mindre mengder av mannose (1,5 %) og spor av xylose (tabell 6).

Resultater av strukturell analyse viste at WAoF₂ (Mw 12,0 kDa) inneholdt rester av fukogalaktan (beskrevet ovenfor) som ikke ble fullt separert fra WAoF₁. Tilstedeværelse av flere ulike glykosidbindinger ((1 → 4)-, (1 → 3)-, (1 → 3,6)- og (1 → 4,6)-) indikerer heterogenitet av glukaner i denne fraksjonen. Dette kan muligens henge sammen med at fraksjonen inneholder en blanding av flere polysakkarider.

Funn av (1 → 3) og (1 → 3,6)-bundne glukoseenheter (henholdsvis 6,0 og 2,5 %) indikerte innhold av et glukane med en 1 → 3-bundet hovedkjede og forgreining i posisjon 6. (1 → 6) bundet glukose kan også være en del av dette, f.eks. som sidekjede. NMR analyse viste tilstedeværelse av beta-(1 → 3) bundne-glukoseenheter.

Funn av (1 → 4) og (1 → 4,6)-bundne glukoseenheter (henholdsvis 24,9 og 11,8 %) indikerte innhold av et glukane med en (1 → 4)-bundet hovedkjede og forgreining i posisjon 6.

Terminal glukose (17,6 %) kunne fordele seg slik: 11,8 % på (1 → 4) glukane og 5,1 % på (1 → 3) glukane i posisjon 6.

NMR analyse viste at det var alfa-(1 → 4) bundet-D-glukane (figuren er ikke vist). Separasjon på Con A Sepharose 4 B viste tilstedeværelse av glukose i alfa-konfigurasjon i WAo (tabell 15). Jod-jod-kalium-test gav negativ resultat (figur 39), men det var også rapportert at alfa-(1 → 4) bundet-glukane (glykogen) i *Agaricus bisporus* gav negativ resultat med jod-jod-kalium testen (Kojima *et al.*, 2010). Samtidig førte behandling med alfa -amylase til reduksjon av Mw fra 12,1 til 10,3 kDa (tabell 20 og 28). Dette kan bekrefte at WAoF₂ inneholdt alfa-(1 → 4)-D-glykosidbindinger som ble brutt ned i mindre glukoseenheter.

Det finnes informasjon i litteraturen om glykogenliknende polysakkarider fra sopp med tilsvarende struktur (Kojima *et al.*, 2010).

WAoF₂ bestod av lavmolekylær fraksjon (Mw 12,0kDa) og det så ut som at det var rester etter isolering av fukogalaktan (WAoF₁) fra vannekstrakt av *A.ovinus*. Minimal Mw for en stabil trippelheliks konformasjon er 25-40 kDa og under denne verdien eksisterer bare enkeltråder i vanlig løsninger (Synytsya & Novák, 2013). Det var påvist at trippelheliks konformasjon er nødvendig for antitumor aktivitet (Zhang *et al.*, 2007). I tillegg var det påvist

at WAoF₂ innehold en blanding av polysakkarider og derfor var det ikke interessant å undersøke i hvilken grad WAoF₂ kan påvirke legumainaktivitet i RAW 264.7-makrofager.

6.3. AAoS_w

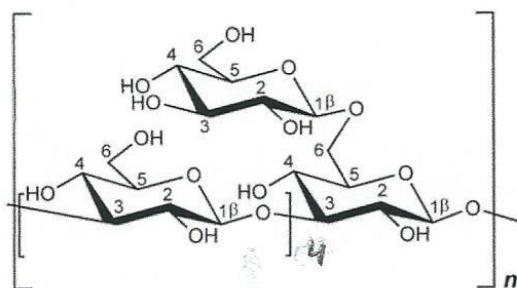
Vannløselig alkaiekstrakt fra *A.ovinus* (AAoS_w) inneholdt hovedsakelig glukose (78,8 %) og mannose (11,7 %) med mindre mengder av xylose (4,1 %), fukose (2,5 %) og galaktose (2,4 %)(tabell 6). Eksklusjonskromatografi viste at AAoS_w bestod av en høymolekylær fraksjon med Mw 324,5 kDa og en lavmolekylær fraksjon med Mw 16,7 kDa (tabell 8 og figur 11).

Funn av (1→3) og (1→3,6)-bundne glukoseenheter (henholdsvis 35,6 og 9,6 %) indikerte dominerende innhold av et glukane med en (1→3)-bundet hovedkjede og forgreininger i posisjon 6. (1→6) bundet glukose kan også være del av dette, for eksempel som sidekjede.

Disse forgreiningene kunne inneholdt D-mannopuranosyl eller D-glukopyranosyl. NMR analyse viste tilstedeværelse av (1→3) bundne -beta- glukoseenheter (figuren ikke vist).

Mengdeforholdet mellom (1→3) og (1→3,6) bindinger var 45:9. Det så ut at hver 5. glukoseenhet hadde forgreininger i posisjon 6.

Forgrenet (1→3) (1→6) -beta- glukaner er en av de viktigste vanlige bestanddelene i soppcellevegg. Derfor på basis av de utførte analysene var det foreslått at celleveggen på fåresopp inneholder også beta-(1→3) (1→6) bundet-D-glukan med enkle glukoseenheter (eller sidekjeder) i posisjon 6 på hver 5. glukoseenhet i hovedkjede.



Figur 59. Struktur til vannløselig beta-(1→3) bundet-D-glukan med enkle glukoseenheter i posisjon 6 på hver 5. glukoseenhet i hovedkjede (Synytsya & Novák, 2013). Sidekjeder i posisjon 6 ikke vist.

Funn av mindre mengder (1→4) og (1→4,6)-bundne glukoseenheter (henholdsvis 14,7 og 0,8 %) indikerte innhold av et glukane med en (1→4)-bundet hovedkjede og små antall forgreininger i posisjon 6. NMR analyse viste at det var alfa-(1→4) bundet-D-glukan (figuren ikke vist). Jod-jod-kalium-test viste et svakt positivt resultat (figur 39) og behandling med alfa-amylase førte til reduksjon i andel av (1→4) bundne glukoseenheter (tabell 17).

Dette stemte med Mw som ble nesten det samme etter alfa-amylase behandlingen (tabell 21 og 29). Dette var noe som kan indikere at mengden av alfa-(1→4) bundet-D-glukan var ubetydelig. I tillegg kunne den glykogenliknende polysakkariden være løselig i vann (Arvindekar & Patil, 2002) uten å danne kovalente bindinger med hovedfraksjonen som bestod av beta- (1→3) (1→6)-bundet- glukan.

Resultater av strukturell analyse viste at AAoS_w inneholdt rester av fukogalaktan (beskrevet ovenfor) som ikke ble fullt separert.

Det var rapportert at biologisk aktive beta-glukaner har struktur som ligner på den som ble observert i AAoS_w (Chen & Seviour, 2007; Novak & Vetvicka, 2008). Derfor var det interessant å undersøke i hvilken grad beta-glukan (AAoS_w) fra *A. ovinus* kan påvirke legumainaktivitet i RAW 264.7-makrofager.

Vannløselig beta- glukan fra *A. ovinus* gav nesten ingen hemming av legumainaktivitet sammenlignet med kontroll (figur 54) og ble derfor ikke testet videre i dose-responsforsøk.

Det er vist at vannløselig beta-glukan ikke kunne aktivere RAW-264.7 makrofager gjennom binding til Dectin-1.

Samtidig var det undersøkt i hvilken grad opprenset beta-glukan (alfa-amylase behandlet AAoS_wAB_{20⁰C i 20 timer}) kan påvirke legumainaktiviteten. Dose-respons ble også studert. Det var påvist at AAoS_wAB betydelig hemmet legumainaktivitet (49,6 %) sammenlignet med kontroll (figur 56). Hemming av legumainaktiviteten i dose-responsforsøket var også betydelig (ca.87 %) uten noen dose-respons. Alle disse resultatene motsier de molekylære mekanismene som foregår under aktivering av 264.7 makrofager og som ble beskrevet ovenfor.

Vi kan spekulere at hemming av legumainaktiviteten kunne skje på grunn av tilstedeværelse av uløselig partikulær beta-glukaner men det var lite sannsynlig siden det ikke var observert noen synlig partikler i løsninger av AAoS_w og AAoS_wAB_{20⁰C i 20 timer}. I tillegg viser figur 55 at prøvene som ble behandlet med alfa-amylase i 20 timer ved T=20°C gav 92 % hemming av legumainaktivitet sammenlignet med kontroll (mot 73,2 % i prøver som ble behandlet 37⁰C i 2 timer). Reduksjon av molekylvekt under langvarig alfa-amylase behandlingen og høy hemming av legumainaktivitet kan tyde på at polysakkarider i prøven kan ha hatt bakterievekst under enzymbehandlingen og dermed forurenset med LPS.

Tilstedeværelse av potente LPS gav ingen doserespons i dose-responsforsøk.

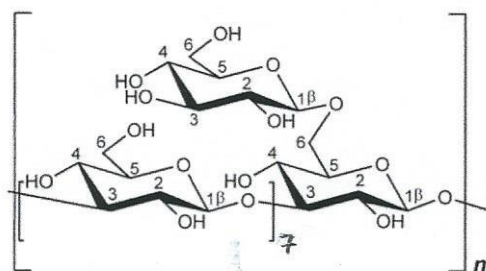
6.4. AAoIw

Vannuløselig alkaiekstrakt fra *A. ovinus* AAoIw inneholdt hovedsakelig glukose (77,9 %) og mannose (12,7 %) med mindre mengder av xylose (6,4 %), fukose (2,2 %) og spor av galaktose (tabell 6). Eksklusjonskromatografi viste at AAoIw bestod av en høymolekylær fraksjon med Mw 285,5 kDa og en lavmolekylær fraksjon med Mw 15,9 kDa (tabell 9, 12 og figur 33, 37).

Funn av (1→3) og (1→3,6)-bundne glukoseenheter (henholdsvis 37,6 og 5,2 %) indikerte innhold av et glukane med en (1→3)-bundet hovedkjede og forgreininger i posisjon 6. NMR analyse viste tilstedeværelse av (1→3)- og (1→6)- bundne beta- glukoseenheter (figur 53).

Funn av 42,8 % glukoseenheter totalt som hører til (1→3) (1→6)- glukane og 5,2 % (1→3,6)-bundet glukoseenheter tydet på at hver 8. glukoseenhet hadde forgreininger i posisjon 6.

På basis av disse resultatene kan det tenkes at AAoIw kunne inneholdt beta-glukan med lignende struktur:



Figur 60. Struktur til vannuløselig beta-(1→3) bundet-D-glukan med enkle glukoseenheter i posisjon 6 på hver 8. glukoseenhet i hovedkjede (Synytsya & Novák, 2013). Sidekjedene i posisjon 6 ikke vist.

Det var mulig at uløseligheten av AAoIw kunne bestemmes av mengden av (1→6) forgreininger i beta-(1→3) (1→6) bundet-D-glukan. Det er kjent at beta-(1→3)-glukaner med en høy grad av polymerisering (DP > 100) er helt uløselig i vann. På grunn av polymerkjedekonformasjon blir det sterkere interaksjoner mellom kjedene enn mellom kjedene og vannmolekyler. Løseligheten øker når grad av polymerisering av beta-(1→3)-glukaner avtar. I tillegg avhenger løseligheten av forgreininger som forstyrrer interaksjoner mellom beta-(1→3)-bundet-glukan kjedene. Det er kjent at polysakkarider med høy molekylvekt og lavt antall (1→6) forgreininger er uløselig i vann (Fleet & Manners, 1976).

Analyse av bindingsforhold ved GC-MS viste at det finnes en strukturell forskjell mellom vannløselig (AAoS_w) og vannuløselig(AAoI_w) beta-glukaner. Beta -glukan i AAoS_w som var vannløselig inneholdt en mer forgrenet struktur (35,6 % av (1 → 3) -, 9,6 % av (1 → 3, 6)-bundne glukoseenheter) men mindre vannløselig beta-glukan i AAoI_w inneholdt 37,6 % av (1 → 3) og 5,2 % av (1 → 3,6)- bundne glukoseenheter.

Funn av store mengder (1→ 4) og (1→ 4,6)-bundne glukoseenheter (henholdsvis 22,0 og 0,3 %) indikerte innhold av et glukan med en (1→ 4)-bundet hovedkjede og et lite antall forgreininger i posisjon 6. Topp 3 (figur 34 og 43) med Mw 2,3 kDa forsvant etter amylase-behandlingen og mulig innehold rester av alfa-(1→ 4)-bundne glukoseenheter.

Fullstendig metylering vil gi terminal/forgreningsratio 1:1. Et lite antal av (1→ 4,6)-bundne glukoseenheter kunne skje på grunn av undermetylering. NMR analyse viste også at det var alfa-(1→ 4)- bundne-D-glukoseenheter. Jod-jod-kalium-test gav positiv resultat (figur 39). Behandling med alfa-amylase førte til reduksjon av Mw fra 286,5 kDa (tabell 12) til 198,2 kDa (tabell 30) og en stor nedgang av (1→4)- bundne glukoseenheter (fra 22 til 8,1 %) (tabell 17), noe som kan også vise tilstedeværelse av alfa-(1 → 4)-glykosidbindinger.

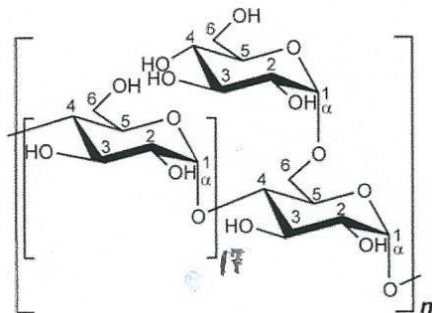
Mengdeforholdet mellom (1→4) og (1→4,6) bindinger var 23:1,3. Det så ut at hver 18. glukoseenhet hadde forgreininger i posisjon 6.

I tillegg var det funnet 5,2 % av (1→ 3,6)- og bare 0,3 % av (1→ 4,6)-bundne glukoseenheter. Da funn av alfa- og beta-glukoseenheter med reduserende ende etter alfa-amylase behandlingen (NMR) kan tyde på mulig tilstedeværelse av blandet alfa-, beta-D glukan med beta -bundet sidekjede. Pramanik, Chakraborty, Mondal og Islam (Pramanik *et al.*, 2007) beskrev vannløselig blandet alfa-, beta-glukan fra fruklegemer fra *Pleurotus sajor-caju*. Det finnes få studier som rapporterer om blandede alfa-, beta-glukaner.

Samtidig tilstedeværelse av alfa-og beta-glukoseenheter med reduserende ende etter alfa-amylase behandlingen kan med større sikkerhet forklares som polysakkriddegradering av bakterier under lang (20 timer) eksponering av den analyserte prøven ved T=20°C i tilfelle de ble kontaminert.

Det var også rapportert om høymolekylær alfa-glukan fra *Acaricus bisporus* som dannet komplekser med en lavmolekylær galaktan (Smiderle *et al.*, 2010). Alfa-(1→4)-bundet-D-glukan med forgreininger i posisjon 6 ble funnet i *Flammulina velutipes* (1:7)(Pang *et al.*, 2007), *Acaricus bisporus* (ratio 1:8), *Cordyceps sinensis* (1:10)(Pang *et al.*, 2007).

Derfor på basis av de utførte analysene var det foreslått AAoIw inneholdt også alfa-(1→4) (1→6) bundet-D-glukan med enkle glukoseenheter (eller sidekjeder) i posisjon 6 på hver 18. glukoseenhet i hovedkjede



Figur 61. Struktur til alfa-(1→4) bundet-D-glukan med enkle glukoseenheter i posisjon 6 på hver 18. glukoseenhet i hovedkjede (Synytsya & Novák, 2013). Siderkjeder ikke vist.

De største forandringene i molekylvekten skjedde i den høymolekylære fraksjonen. Alle disse resultatene kan bekrefte tilstedeværelse av alfa-(1→4) bundet-D-glukan i AAoIw.

Siden det var rapportert at spesielt partikulære beta-glukaner kan binde seg til Dectin-1 og ble internalisert av makrofager gjennom Dectin-1 aktivering (Goodridge *et al.*, 2011; Berven *et al.*, 2015), var det interessant å undersøke i hvilken grad vannløselig (ikke på partikkel form) beta-glukan (AAoIw) fra *A. ovinus* kan påvirke legumainaktivitet i RAW 264.7-makrofager.

Det var påvist at vannløselig AAoIw (tenkes at det var vannløselig beta-glukan) fra *A. ovinus* gav 22,5 % hemming av legumainaktivitet sammenlignet med kontroll (figur 54), største hemming av legumainaktivitet mellom de ubehandlede fraksjonene. Dette kan forklares med molekylær mekanismen av makrofagaktivering gjennom Dectin-1 som ble beskrevet før. I tillegg var det rapportert at beta-glukaner med partikkelstørrelse 1-2 μm diameter er optimale til fagocyttering av makrofager, mens store uløselige aggregater ikke er egnet til å interreagere med makrofager og fremme fagocytose (Tabata & Ikada, 1988). AAoIw var ikke løselig i vann, men allikevel ikke på partikkelform, og derfor antagelig ikke egnet helt for fagocytose på grunn av det.

Samtidig alfa-amylase behandlet AAoIwAB_{20°C i 20 timer} (som ble delvis løselig i vann) gav enda større hemming av legumainaktivitet sammenlignet med kontroll (43,1 %). Derfor ble AAoIwAB_{20°C i 20 timer} videre testet ved lavere konsentrasjoner (1mg/mL; 0,5 mg/mL og 0,25 mg/mL). Hemming av legumainaktiviteten i dose-responsforkøket var også betydelig (ca.86,7 %) uten noen dose-respons. Figuren 55 viser at AAoIw som ble behandlet med alfa-amylase(AAoIwAB) i 20 timer ved T=20°C gav 93 % hemming av legumainaktivitet

sammenlignet med kontroll mot 28,8 % i prøver som ble behandlet 37⁰C i 2 timer. Dette (som det også ble beskrevet for AAoSwAB) kan skyldes kontaminering med LPS tilført under enzymbehandling.

7. KONKLUSJON

Målet med denne oppgaven var å karakterisere polysakkaridfraksjoner (WAo (WAoF₁ og WAoF₂), AAoS_w og AAoI_w) isolert fra fåresopp (*Albatrellus ovinus*) med hensyn på molekylvekt, monosakkaridsammensetning og bindingsforhold, og å studere deres effekt på legumainaktivitet i RAW 264.7 makrofager.

Det ble funnet at fåresopp inneholder fire ulike typer polysakkarider: fukogalaktanet, to ulike typer beta-glukan med ulik løselighet og alfa-glukan.

Analyser av vannekstraktet WAo viste at dette inneholdt et fukogalaktan (WAoF₁) med Mw 251 kDa. Fukogalaktanet bestod av alfa-(1 → 6)-bundet - D-galaktan med alfa-L- fukose substituert i posisjon 2 på hver 3. galaktoseenhet. Det ble påvist at fukogalaktanet ikke hadde noen effekt på legumainaktivitet. Betydelig reduksjon av legumainaktivitet i dose respons-forsøk uten dose-respons tydet på at polysakkarider i prøven ble forurenset av bakterier som førte til LPS kontaminasjon.

Det ble også funnet at vannløselig alkaliekstrakt AAoS_w (Mw 324,5 og 16, 7 kDa) inneholdt vannløselig beta-(1→3) bundet-D-glukan med forgreninger i posisjon 6 på hver 5. glukoseenhet i hovedkjede. I tillegg inneholdt AAoS_w rester av fukogalaktan og alfa-(1→4) bundet-D-glukan med små antall forgreninger i posisjon 6. AAoS_w hadde ikke noen effekt på legumainaktivitet.

Beta-glukanet i det vannløselige alkaliekstraktet AAoI_w bestod av (1→3) bundet-D-glukan med enkle glukoseenheter (eller sidekjeder) i posisjon 6 på hver 8. glukoseenhet i hovedkjede.

Alfa - glukanet bestod av (1→4) bundet-D-glukan med forgreninger (enkle glukoseenheter eller sidekjeder) i posisjon 6 på hver 18. glukoseenhet i hovedkjede. AAoI_w gav 22,5 % hemming av legumainaktivitet sammenlignet med kontroll.

Alfa-amylase behandlet AAoS_w og AAoI_w viste betydelig reduksjon av legumainaktivitet i dose respons-forsøk uten dose-respons. Det ble konkludert med at prøvene muligens var kontaminert med LPS.

Vannekstrakt WAoF₂ (Mw 12,0 kDa) bestod av rester av fukogalaktan, beta- og alfa-glukan og ble ikke testet for biologisk aktivitet.

I tillegg var det funnet ut at affinitetskromatografi med ConA Sepharose 4B kan egne seg til å fjerne alfa-glukan fra vannløselig soppekstrakter.

8. MULIGHET TIL VIDERE STUDIER

AAoS_w og AAoI_w består henholdsvis av alfa-(1 → 4)(1 → 6)-bundet-D-glukan og beta-(1 → 3)(1 → 6)-bundet-D-glukan. For å få bedre resultater med strukturoppklaring og aktivitetforsøk kan det være nyttig å separere disse glukane (for eksempel på Con A Shepharose 4 B) fra hverandre og gjenta undersøkelsene med mest mulig rene stoffer.

Det kan også være interessant å bruke de andre metodene, for eksempel komplementfikseringstest eller måling av NO, TNF-alfa sekresjon fra makrofager til løselige fraksjoner, for å påvise biologisk aktivitet av analyserte polysakkaridfraksjoner som blir isolert fra *A.ovinus*.

Aktivitet av makrofager henger nøye sammen med polysakkariders løselighet og fysikalske form. Partikulære beta -glukaner induserer proinflatatorisk cytokin sekresjon gjennom aktivering av Dectin-1, mens løselige beta-glukaner binder seg til CR3 reseptoren (Hong *et al.*, 2003). Fordi beta-glukanene må passe til reseptorene på effektorceller, er deres størrelse viktig. Forskning tyder på at partikler med 1-2 µm diameter er optimale til fagocyttering av makrofager, mens store uløselige aggregater ikke er egnet til å inter reagere med makrofager og fremme fagocytose (Tabata & Ikada, 1988). Tillaging av homogene, ikke-aggregerte og dermed immunologisk aktive mikropartikler av beta-glukan kan løse problemet. Det finnes teknologier som fører til homogen fremstilling av 1-2 µm beta-glukan partikler ved bruk av spray-tørking av sonikerte alkali – og syre løselig celleveggmateriale. I tillegg kan den metoden unngå problemet med aggregering av beta-glukan-mikropartikler i vandige medier (det som fant sted i denne studien med alle fraksjonene når lavmolekylære polysakkarider aggregerte til høymolekylære klasterne). (Hunter *et al.*, 2002).

9. REAGENSELISTE

Reagenser	Produsent
Ammoniakk (NH ₃)	VWR
A- Amylase (from Barley malt)	Sigma
Beta-glukan	M-Gard [®] , Biotec betaglacans
Bio-Rad Protein Assay Dye reagent Consentratum	BIO-RAD
Bovin serum albumin (BSA)	Thermo Scientific
D-Mannitol	Sigma- Aldrish
Di-Natiumhydrogensulfat (Na ₂ SO ₄)	Merck
Diklormetan	Merck
Ditiotretiol (DDT)	Thermo Fisher Scientific
DMSO	Sigma- Aldrish
Deuteriom oxide	Sigma- Aldrish
Dulbecco's Modified Eagle medium (DMEM)	Gibco [®] by Life technologies
Dinatrium fosfat (Na ₂ HPO ₄)	Sigma- Aldrish
Eddiksyre 100 %	Merck
Eddiksyreanhydrid	Merck
3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]- 1-propanesulfonate hydrate (CHAPS)	Sigma- Aldrish
Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dihydrate (Na ₂ EDTA)	Sigma
(1,3)(1,4)-β-Glukan	Megazyme, Irland
Fetal bovine serum	Gibco [®] by Life technologies
Etanol	Sigma- Aldrish
Heksan	Sigma
Kalsiumklorid (CaCl ₂)	Merck
Metanol vannfri	Merck
Metanolisk HCl 3M	Supelco analytical, USA
Metiljodid	Fluka
Methyl- α-D-mannopyranoside	Sigma
1-Methylimidazole	Fluka
Mangan(II)klorid (MnCl ₂)	Merck
Magnesium klorid (MgCl ₂)	Sigma- Aldrish
Natriumacetat (NaC ₂ H ₃ O ₂)	Merck
Natriumhydroksyd	Merck
Natriumthiosulfat	Merck
Natrium-bordeuterid	Sigma- Aldrish
Natrium klorid	VWE Chemicals
Natriumazid (NaN ₃)	Sigma- Aldrish
Natrium bilarbonat (7,5 %)	Gibco [®] by Life technologies
Natrium citrar	Sigma- Aldrish
Natrium fosfat buffer (PBS)	Gibco [®] by Life technologies

N-oktyl- β -D-glukopyranosid	Sigma
Penicillin Streptomycin (P/S)	Thermo Fisher Scientific
Pullulaner	Polymer Laboratories LTD
Pen Strep	Gibco [®] by Life technologies
Saltsyre 37 %	VWR Prolabo
Sitron syre	Sigma
Toluene	Sigma- Aldrich
Tromethane hydrochloride (Tris-HCl)	Merck
Trifluoreddiksyre (TFA)	Merck
Trimetylsilyl propanylsyre (TSP)	Sigma- Aldrich
Tryptanblått 0,4 %	Life technologies
Vannfri metanol	Sigma
Z-Ala-Ala-Asn-NHMec	Thermo Fisher Scientific

10. LITTERATURLISTE

- 3.2.1.1, EC. 1961. "IUBMB Enzyme Nomenclature", Hentet 28.11.2016.
<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC3/2/1/1.html>.
- Adachi, Y., M. Okazaki, N. Ohno, og T. Yadomae. 1994. "Enhancement of Cytokine Production by Macrophages Stimulated with (1→3)-β-D-Glucan, Grifolan (GRN), Isolated from *Grifola frondosa*", *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 17: 1554-60.
- Akramiene, D., A. Kondrotas, J. Didziapetriene, og E. Kevelaitis. 2007. "Effects of beta-glucans on the immune system", *Medicina (Kaunas)*, 43: 597-606.
- Alquini, Giovana, Elaine R. Carbonero, Fábio R. Rosado, Cesare Cosentino, og Marcello Iacomini. 2004. "Polysaccharides from the fruit bodies of the basidiomycete *Laetiporus sulphureus* (Bull.: Fr.) Murr", *FEMS Microbiology Letters*, 230: 47-52.
- Amersham pharmacia biotech. 2016. "Affinity chromatography".
- Arvindekar, Akalpita U., og Narayan B. Patil. 2002. "Glycogen - A covalently linked component of the cell wall in *Saccharomyces cerevisiae*", *Yeast*, 19: 131-39.
- Axelsson, K., og H. Björndal. 1969. "Polysaccharides elaborated by *Polyporus ovinus* (Schaeff). 1. Structure of a fucogalactan from the water extracts of the fruit bodies", *Acta chemica Scandinavica*, 23: 1815.
- Bao, Xingfeng, Jinyou Duan, Xuya Fang, og Jinian Fang. 2001. "Chemical modifications of the (1→3)-α- d-glucan from spores of *Ganoderma lucidum* and investigation of their physicochemical properties and immunological activity", *Carbohydrate Research*, 336: 127-40.
- Berven, Lise, Frode Miltzow Skjeldal, Kristian Prydz, et al. 2015. "Particulate yeast β-glucan is internalized by RAW 264.7 macrophages and reduces the activity of the tumor-associated protease legumain", *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, 6: 15-23.
- Berven, Lise, institutt Universitetet i Oslo Farmasøytisk, og fakultet Universitetet i Oslo Det matematisk-naturvitenskapelige. 2016. "Regulation of the tumor-associated protease legumain by dietary fiber and endogenous carbohydrate polymers", Department of Pharmaceutical Biosciences, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, University of Oslo.
- Biermann, Christopher J., og Gary D. McGinnis. 1989. *Analysis of carbohydrates by GLC and MS* (CRC Press: Boca Raton, Fla).
- Birk, R. W., A. Gratchev, N. Hakiy, et al. 2001. "Alternatively activated antigen presenting cells. Basic concepts and clinical relevance." In *Hautarzt*, 193-210.

- Björndal, H., og B. Wågström. 1969. "Polysaccharides elaborated by *Polyporus borealis* (Wahlenb.). 1. Water-soluble neutral polysaccharides from the fruit bodies", *Acta chemica Scandinavica*, 23: 1560.
- Bock, Klaus, Didier Gagnaire, Michel Vignon, og Marc Vincendon. 1983. "High resolution nuclear magnetic resonance studies of nigeran", *Carbohydrate Polymers*, 3: 13-22.
- Boehm, U., T. Klamp, M. Groot, og J. C. Howard. 1997. "Cellular responses to interferon- γ ." In *Annu. Rev. Immunol.*, 749-95.
- Boertmann, David, Lise Hansen, og Henning Knudsen. 1992. *Nordic macromycetes : 2 : Polyporales, boletales, agaricales, russulales* (Nordsvamp: Copenhagen).
- Borchers, A. T., J. S. Stern, R. M. Hackman, C. L. Keen, og M. E. Gershwin. 1999. "Mushrooms, tumors, and immunity", *Proc Soc Exp Biol Med*, 221: 281-93.
- Bose, Nandita, Lindsay R. Wurst, Anissa S. H. Chan, et al. 2014. "Differential regulation of oxidative burst by distinct β -glucan-binding receptors and signaling pathways in human peripheral blood mononuclear cells", *Glycobiology*, 24: 379-91.
- Bowman, Shaun M., og Stephen J. Free. 2006. "The structure and synthesis of the fungal cell wall." In, 799-808. Hoboken.
- Brown, Gordon D, og Siamon Gordon. 2005. "Immune recognition of fungal β -glucans." In, 471-79. Oxford, UK.
- Brown, Gordon D., og Siamon Gordon. 2003. "Fungal β -Glucans and Mammalian Immunity", *Immunity*, 19: 311-15.
- Bräunlich, Paula Marie. 2010. "Struktur- og aktivitetsstudier av polysakkarider isolert fra en sørafrikansk medisinsplante : *Artemissa afra*." In. Universitetet i Oslo Farmasøytisk institutt.
- Brörndal, Høkan, og Bengt Lindberg. 1969. "Polysaccharides elaborated by *Polyporus fomentarius* (Fr.) and *Polyporus igniarius* (Fr.): Part I. Water-soluble neutral polysaccharides from the fruit bodies", *Carbohydrate Research*, 10: 79-85.
- Böhm, Nicolai, og Werner-Michael Kulicke. 1999. "Rheological studies of barley (1 \rightarrow 3)(1 \rightarrow 4)- β -glucan in concentrated solution: mechanistic and kinetic investigation of the gel formation", *Carbohydrate Research*, 315: 302-11.
- Carbonero, E. R., A. H. P. Gracher, D. L. Komura, et al. 2008. "*Lentinus edodes* heterogalactan: Antinociceptive and anti-inflammatory effects", *Food Chemistry*, 111: 531-37.

- Celerin, M., J. M. Ray, N. J. Schisler, et al. 1996. "Fungal fimbriae are composed of collagen", *The EMBO journal*, 15: 4445.
- Chakraborty, Indranil, Soumitra Mondal, Malay Pramanik, Dilip Rout, og Syed S. Islam. 2004. "Structural investigation of a water-soluble glucan from an edible mushroom, *Astraeus hygrometricus*", *Carbohydrate Research*, 339: 2249-54.
- Chambers, R. E., og J. R. Clamp. 1971. "An assessment of methanolysis and other factors used in the analysis of carbohydrate-containing materials", *Biochemical Journal*, 125: 1009-18.
- Chan, Godfrey Chi-Fung, Wing Keung Chan, og Daniel Man-Yuen Sze. 2009. "The effects of β -glucan on human immune and cancer cells", *Journal of Hematology & Oncology*, 2: 25.
- Chang, S. T., og P. G. Miles. 1992. "Mushroom biology — A new discipline", *Mycologist*, 6: 64-65.
- Chanput, Wasaporn, Marit Reitsma, Lennart Kleinjans, et al. 2012. " β -Glucans are involved in immune-modulation of THP-1 macrophages", *Molecular Nutrition & Food Research*.
- Chauveau, Christophe, Philippe Talaga, Jean-Michel Wieruszeski, Gérard Strecker, og Louis Chavant. 1996. "A water-soluble β - d-glucan from *Boletus erythropus*", *Phytochemistry*, 43: 413-15.
- Chen, J. M., P. M. Dando, N. D. Rawlings, et al. 1997. "Cloning, isolation, and characterization of mammalian legumain, an asparaginyl endopeptidase", *The Journal of biological chemistry*, 272: 8090.
- Chen, Jiezhong, og Robert Seviour. 2007. "Medicinal importance of fungal β -(1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 6)-glucans", *Mycological Research*, 111: 635-52.
- Chen, Jinghua, Lina Zhang, Yo Nakamura, og Takashi Norisuye. 1998. "Viscosity behavior and chain conformation of a (1 \rightarrow 3)- α -glucan from *Ganoderma lucidum*", *Polymer Bulletin*, 41: 471-78.
- Chen, Yue-Yawn, og Hung-Min Chang. 2004. "Antiproliferative and differentiating effects of polysaccharide fraction from fu-ling (*Poria cocos*) on human leukemic U937 and HL-60 cells", *Food and Chemical Toxicology*, 42: 759-69.
- Cho, Soo-Muk, Hiroyuki Koshino, Seung-Hun Yu, og Ick-Dong Yoo. 1998. "A mannofucogalactan, fomitellan A, with mitogenic effect from fruit bodies of *Fomitella fraxinea* (Imaz.)", *Carbohydrate Polymers*, 37: 13-18.

- Ciucanu, Ionel, og Francisc Kerek. 1984. "A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates", *Carbohydrate Research*, 131: 209-17.
- Cooi, Vincent, og Fang Liu. 2000. "Immunomodulation and Anti-Cancer Activity of Polysaccharide-Protein Complexes", *Current Medicinal Chemistry*, 7: 715-29.
- Cui, Steve W. 2005. *Food carbohydrates: chemistry, physical properties, and applications*.
- Dall, E., og H. Brandstetter. 2016. "Structure and function of legumain in health and disease", *Biochimie*, 122: 126-50.
- Dalonso, Nicole, Gustavo Goldman, og Regina Gern. 2015. " β -(1 \rightarrow 3),(1 \rightarrow 6)-Glucans: medicinal activities, characterization, biosynthesis and new horizons", *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99: 7893-906.
- Dalton, J. P., L. Holajamriska, og Pj Brindley. 1995. "Asparaginyl endopeptidase activity in adult *Schistosoma mansoni*", *Parasitology*, 111: 575-80.
- Dekermendjian, K., R. Shan, M. Nielsen, et al. 1997. "The affinity to the brain dopamine D1 receptor in vitro of triprenyl phenols isolated from the fruit bodies of *Albatrellus ovinus*", *European Journal of Medicinal Chemistry*, 32: 351-56.
- Dey, Jonathan P., C. J. Alexopoulos, C. W. Mims, og M. Blackwell. 1996. "Introductory Mycology", *The Bryologist*, 99: 484.
- Dong, Q., L. M. Jia, og J. N. Fang. 2006. "A beta-D-glucan isolated from the fruiting bodies of *Herichium erinaceus* and its aqueous conformation", *Carbohydr Res*, 341: 791-5.
- Dong, Qun, Jian Yao, Xiao-Tong Yang, og Ji-Nian Fang. 2002. "Structural characterization of a water-soluble β - d-glucan from fruiting bodies of *Agaricus blazei* Murr", *Carbohydrate Research*, 337: 1417-21.
- Dyntaxa. 2016. "*Albatrellus ovinus*", Hentet 29.08.2016.
<https://www.dyntaxa.se/taxon/info/2959#>.
- Egeland, Inger Lagset, Anneli Skaar, Gro Gulden, og Steinar Myhr. 2011. *Norske sopper* (Gyldendal: Oslo).
- El Enshasy, Hesham A., og Rajni Hatti-Kaul. 2013. "Mushroom immunomodulators: unique molecules with unlimited applications", *Trends in Biotechnology*, 31: 668-77.
- Elsayed, Elsayed A., Hesham El Enshasy, Mohammad A. M. Wadaan, og Ramlan Aziz. 2014. "Mushrooms: a potential natural source of anti-inflammatory compounds for medical applications.(Report)", *Mediators of Inflammation*.

- Enshasy, Hesham El. 2011. "Immunomodulators." in Martin Hofrichter (ed.), *Industrial Applications* (Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg).
- Fambrough, Douglas M. 1994. *Molecular evolution of physiological processes* (Rockefeller University Press: New York).
- Ferreira, Sónia S., Cláudia P. Passos, Pedro Madureira, Manuel Vilanova, og Manuel A. Coimbra. 2015. "Structure–function relationships of immunostimulatory polysaccharides: A review", *Carbohydrate Polymers*, 132: 378-96.
- Fleet, G. H., og D. J. Manners. 1976. "Isolation and composition of an alkali soluble glucan from the cell walls of *Saccharomyces cerevisiae*", *Journal of general microbiology*, 94: 180-92.
- Fontaine, T., C. Simenel, G. Dubreucq, et al. 2000. "Molecular organization of the alkali-insoluble fraction of *Aspergillus fumigatus* cell wall", *The Journal of biological chemistry*, 275: 27594.
- Frank M. Dunnivant , Jake Ginsbach 2008. *Gas Chromatography - Mass Spectrometry A Basic Introduction* (Whitman College).
- Fried, Joel R. 2003. *Polymer science and technology* (Prentice Hall PTR: Upper Saddle River, N.J).
- Gao, Qp, R. Seljelid, H. Q. Chen, og Rz Jiang. 1996. "Characterisation of acidic heteroglycans from *Tremella fuciformis* Berk with cytokine stimulating activity", *Carbohydr. Res.*, 288: 135-42.
- Gawenda, Jessica, Frank Traub, Hans Lück, Hans Kreipe, og Reinhard Wasielewski. 2007. "Legumain expression as a prognostic factor in breast cancer patients", *Breast Cancer Research and Treatment*, 102: 1-6.
- GE Healthcare. 2016. "Con-A Sepharose® 4B", Hentet 16.11.2016.
<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/ge17044001?lang=en®ion=NO>.
- Gómez-Miranda, Begoña, Alicia Prieto, Juan Leal, et al. 2003. "Differences among the cell wall galactomannans from *Aspergillus wentii* and *Chaetosartorya chrysella* and that of *Aspergillus fumigatus*", *Official Journal of the International Glycoconjugate Organization*, 20: 239-46.
- Goodridge, Helen S., Christopher N. Reyes, Courtney A. Becker, et al. 2011. "Activation of the innate immune receptor Dectin-1 upon formation of a 'phagocytic synapse'.(Report)", *Nature*, 472: 471.

- Gordon, D. Brown, og Gordon Siamon. 2001. "Immune recognition: A new receptor for β -glucans", *Nature*, 413: 36.
- Gow, N. A., F. L. van de Veerdonk, A. J. Brown, og M. G. Netea. 2011. "Candida albicans morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization", *Nat Rev Microbiol*, 10: 112-22.
- Grün, Christian, Frans Hochstenbach, Bruno Humbel, et al. 2005. "The structure of cell wall \pm -glucan from fission yeast", *Glycobiology*, 15: 245-57.
- Guillamón, Eva, Ana García-Lafuente, Miguel Lozano, et al. 2010. "Edible mushrooms: Role in the prevention of cardiovascular diseases", *Fitoterapia*, 81: 715-23.
- Han, Xiao-Qiang, Xiang-Mei Wu, Xing-Yun Chai, et al. 2011. "Isolation, characterization and immunological activity of a polysaccharide from the fruit bodies of an edible mushroom, *Sarcodon aspratus* (Berk.) S. Ito", *Food Research International*, 44: 489-93.
- Hardison, Sarah E., og Gordon D. Brown. 2012. "C-type lectin receptors orchestrate antifungal immunity", *Nat Immunol*, 13: 817-22.
- Hartland, R. P., C. A. Vermeulen, F. M. Klis, J. H. Sietsma, og J. G. Wessels. 1994. "The linkage of (1-3)-beta-glucan to chitin during cell wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*", *Yeast*, 10: 1591-9.
- Hawksworth, David L. 2001. "Mushrooms: The Extent of the Unexplored Potential", 3: 5.
- He, Jin-Zhe, Qiao-Mei Ru, Dan-Dan Dong, og Pei-Long Sun. 2012. "Chemical characteristics and antioxidant properties of crude water soluble polysaccharides from four common edible mushrooms", *Molecules*, 17: 4373-87.
- Hobbs, Christopher. 1995. *Medicinal mushrooms : an exploration of tradition, healing & culture* (Botanica Press: Santa Cruz, CA).
- Hoffmann, G. C., B. W. Simson, og T. E. Timell. 1971. "Structure and molecular size of pachyman", *Carbohydrate Research*, 20: 185-88.
- Honegger, R., og A. Haisch. 2001. "Immunocytochemical location of the (1 -> 3) (1 -> 4)-beta-glucan lichenin in the lichen-forming ascomycete *Cetraria islandica* (Icelandic moss)", *New Phytol.*, 150: 739-46.
- Hong, Feng, Richard D. Hansen, Jun Yan, et al. 2003. "Beta-glucan functions as an adjuvant for monoclonal antibody immunotherapy by recruiting tumoricidal granulocytes as killer cells", *Cancer Research*, 63: 9023.

- Horisberger, M., B. A. Lewis, og F. Smith. 1972. "Structure of a (1→3)- α - d-glucan (pseudonigeran) of *Aspergillus niger* NNRL 326 cell wall", *Carbohydrate Research*, 23: 183-88.
- Hunter, K. W., R. A. Gault, og M. D. Berner. 2002. "Preparation of microparticulate β -glucan from *Saccharomyces cerevisiae* for use in immune potentiation", *Letters in Applied Microbiology*, 35: 267-71.
- Hyde, K., A. Bahkali, og M. Moslem. 2010. "Fungi—an unusual source for cosmetics", *An International Journal of Mycology*, 43: 1-9.
- Janakat, S., S. Al-Fakhiri, og A. -K Sallal. 2004. "A promising peptide antibiotic from *Terfezia claveryi* aqueous extract against *Staphylococcus aureus* in vitro", *Phytotherapy Research*, 18: 810-13.
- Janeway, Charles. 2001. "Immunobiology 5 : the immune system in health and disease." In *Immunobiology 5*. Garland Pub.
- Janeway, Charles A., og Ruslan Medzhitov. 2002. "Innate immune recognition " In *Annu. Rev. Immunol.*, 197-216.
- Jin, Yong, Lina Zhang, Yongzhen Tao, et al. 2004. "Solution properties of a water-insoluble (1→3)- α - d-glucan isolated from *Poria cocos* mycelia", *Carbohydrate Polymers*, 57: 205-09.
- Johansen, H. T., C. G. Knight, og A. J. Barrett. 1999. "Colorimetric and fluorimetric microplate assays for legumain and a staining reaction for detection of the enzyme after electrophoresis", *Anal Biochem*, 273: 278-83.
- Kakutani, Ryo, Yoshiyuki Adachi, Hideki Kajiura, et al. 2007. "Relationship between structure and immunostimulating activity of enzymatically synthesized glycogen", *Carbohydrate Research*, 342: 2371-79.
- Kalač, Pavel. 2013. "A review of chemical composition and nutritional value of wild-growing and cultivated mushrooms." In, 209-18. Chichester, UK.
- Kao, Pai-Feng, Shwu-Huey Wang, Wei-Ting Hung, et al. 2012. "Structural Characterization and Antioxidative Activity of Low-Molecular-Weights Beta-1,3-Glucan from the Residue of Extracted Fruiting Bodies", *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2012.
- Karácsonyi, Š, og L Kuniak. 1994. "Polysaccharides of *Pleurotus ostreatus*: Isolation and structure of pleuran, an alkali-insoluble β - d-glucan", *Carbohydrate Polymers*, 24: 107-11.

- Kashimoto, Naoki, Minoru Hayama, Kenji Kamiya, og Hiromitsu Watanabe. 2006. "Inhibitory effect of a water-soluble extract from the culture medium of *Ganoderma lucidum* (Rei-shi) mycelia on the development of pulmonary adenocarcinoma induced by N-nitrosobis (2-hydroxypropyl) amine in Wistar rats", *Oncology reports*, 16: 1181.
- Kawagishi, H., T. Kanao, R. Inagaki, et al. 1990. "Formolysis of a potent antitumor (1-6) beta-D-glukan protein complex from *Agaricus Blazei* fruiting bodies and antitumor-activity of the resulting products ", *Carbohydr. Polym.*, 12: 393-403.
- Kembhavi, A. A., D. J. Buttle, C. G. Knight, og A. J. Barrett. 1993. "The Two Cysteine Endopeptidases of Legume Seeds: Purification and Characterization by Use of Specific Fluorometric Assays", *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 303: 208-13.
- Kim, Yea-Woon, Ki-Hoon Kim, Hyun-Ju Choi, og Dong-Seok Lee. 2005. "Anti-diabetic activity of β -glucans and their enzymatically hydrolyzed oligosaccharides from *Agaricus blazei*", *Biotechnology Letters*, 27: 483-87.
- Klimp, A. H., E. G. E. de Vries, G. L. Scherphof, og T. Daemen. 2002. "A potential role of macrophage activation in the treatment of cancer", *Critical Reviews in Oncology and Hematology*, 44: 143-61.
- Kodama, Noriko, Nachi Harada, og Hiroaki Nanba. 2002. "A polysaccharide, extract from *Grifola frondosa*, induces Th-1 dominant responses in carcinoma-bearing BALB/c mice", *Japanese journal of pharmacology*, 90: 357.
- Kogan, G., V. Pavliak, J. Šandula, og L. Masler. 1990. "Structure of the cell wall mannans of the pathogenic yeasts of *Candida* species—A complex insight", *Carbohydrate Polymers*, 14: 65-76.
- Kojima, Hiroaki, Junji Akaki, Satomi Nakajima, Kaeko Kamei, og Makoto Tamesada. 2010. "Structural analysis of glycogen-like polysaccharides having macrophage-activating activity in extracts of *Lentinula edodes* mycelia", *Journal of Natural Medicines*, 64: 16-23.
- Komatsu, N., S. Okubo, S. Kikumoto, K. Kimura, og G. Saito. 1969. "Host-mediated antitumor action of schizophyllan, a glucan produced by *Schizophyllum commune*", *Gann, The Japanese Journal of Cancer Research*, 60: 137-44.
- Komura, Dirce L., Elaine R. Carbonero, Ana Helena P. Gracher, et al. 2010. "Structure of *Agaricus* spp. fucogalactans and their anti-inflammatory and antinociceptive properties", *Bioresource Technology*, 101: 6192-99.
- Križková, Livia, Zdena Ďuračková, Jozef Šandula, Vlasta Sasinková, og Juraj Krajčovič. 2001. "Antioxidative and antimutagenic activity of yeast cell wall mannans in vitro", *Mut.Res.-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 497: 213-22.

- Lam, Ka-Lung, og Peter Chi-Keung Cheung. 2013. "Non-digestible long chain beta-glucans as novel prebiotics", *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, 2: 45-64.
- Lazaridou, A., og C. G. Biliaderis. 2004. "Cryogelation of cereal β -glucans: structure and molecular size effects", *Food Hydrocolloids*, 18: 933-47.
- Lee, Chi-Jen, Yu-Shuh Huo, Lucia H. Lee, Cheng-Hsiung Lu, og Kaio Koizumi. 2004. "Immunomodulating fungal and plant polysaccharides; Biochemistry, immunologic activity and clinical application", *Journal of Traditional Medicines*, 21: 67-80.
- Lee, D. H., og H. W. Kim. 2014. "Innate immunity induced by fungal beta-glucans via dectin-1 signaling pathway", *Int J Med Mushrooms*, 16: 1-16.
- Lemieszek, Marta, og Wojciech Rzeski. 2012. "Anticancer properties of polysaccharides isolated from fungi of the Basidiomycetes class", *Contemporary Oncology*, 16: 285-89.
- Leung, M. Y. K., C. Liu, J. C. M. Koon, og K. P. Fung. 2006. "Polysaccharide biological response modifiers", *Immunology Letters*, 105: 101-14.
- Li, Ge, Dong-Hee Kim, Tae-Dong Kim, et al. 2004. "Protein-bound polysaccharide from *Phellinus linteus* induces G 2/M phase arrest and apoptosis in SW480 human colon cancer cells", *Cancer Letters*, 216: 175-81.
- Lin, Xin, Yu-Jun Cai, Zhi-Xiao Li, et al. 2003. "Structure determination, apoptosis induction, and telomerase inhibition of CFP-2, a novel lichenin from *Cladonia furcata*", *BBA - General Subjects*, 1622: 99-108.
- Lindequist, Ulrike, Timo H. J. Niedermeyer, og Wolf-Dieter Jülich. 2005. "The Pharmacological Potential of Mushrooms", *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2: 285-99.
- Lingen, M. W. 2001. "Role of leukocytes and endothelial cells in the development of angiogenesis in inflammation and wound healing", *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*, 125: 67-71.
- Liu, Cheng, Haining Huang, Thomas Edgington, Chengzao Sun, og Kim Janda. 2003. "Overexpression of legumain in tumors is significant for invasion/metastasis and a candidate enzymatic target for prodrug therapy", *Cancer Research*, 63: 2957-64.
- Liu, Jicheng, Yongxu Sun, Haitao Yu, et al. 2012. "Purification and identification of one glucan from golden oyster mushroom (*Pleurotus citrinopileatus* (Fr.) Singer)", *Carbohydrate Polymers*, 87: 348-52.
- Liu, Liang-Yan, Zheng-Hui Li, Zhi-Hui Ding, et al. 2013. "Meroterpenoid pigments from the basidiomycete *Albatrellus ovinus*", *Journal of Natural Products*, 76: 79-84.

- Liu, Min, Fengling Luo, Chuanlin Ding, et al. 2015. "Dectin-1 Activation by a Natural Product β -Glucan Converts Immunosuppressive Macrophages into an M1-like Phenotype", *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950), 195: 5055.
- Lombard, Y., J. Giaimis, M. Makaya-Kumba, P. Fonteneau, og P. Poindron. 1994. "A new method for studying the binding and ingestion of zymosan particles by macrophages", *Journal of Immunological Methods*, 174: 155-65.
- Lonza, Pharma&Biotech. 2014. " β -G-Blocker", Hentet 17.04.2017.
http://bio.lonza.com/uploads/tx_mwaxmarketingmaterial/Lonza_ManualsProductInstructions_B-G-Blocker_Product_Insert.pdf.
- Lu, Mei-Kuang, Jing-Jy Cheng, Cha-Yui Lin, og Chia-Chuan Chang. 2010. "Purification, structural elucidation, and anti-inflammatory effect of a water-soluble 1,6-branched 1,3- α - d-galactan from cultured mycelia of *Poria cocos*", *Food Chemistry*, 118: 349-56.
- MacGregor, A. W. 1978. "Alpha-amylase I from malted barley: physical properties and action pattern on amylose", *Alpha-amylase I from malted barley: physical properties and action pattern on amylose.*, 55: 754-65.
- Manzi, Pamela, og Laura Pizzoferrato. 2000. "Beta-glucans in edible mushrooms", *Food Chemistry*, 68: 315-18.
- Martin-Christ. 2013. "Operating manual freeze-dryer. Alpha 1-4 LDplus. Alpha 2-4 LDplus Osterode am Harz", Hentet 22.10.2016.
http://www.sembio.com.tr/tr/article/download/p1afqgr0ku68a1n577431s3n1knj9.pdf?file=Christ_Laboratuvar-tipi_Alpha-2-4-LD-plus-manual.pdf.
- Megazyme. "(1,3)(1,4)-beta-Glucan; Molecular Weight Standards", Hentet 17.10.2016.
<https://secure.megazyme.com/Beta-Glucan-MW-Standard>.
- Meng, Xin, Hebin Liang, og Lixin Luo. 2016. "Antitumor polysaccharides from mushrooms: a review on the structural characteristics, antitumor mechanisms and immunomodulating activities", *Carbohydrate Research*, 424: 30-41.
- Misaki, Akira, Motoko Nasu, Yoshiaki Sone, Etsu Kishida, og Chigusa Kinoshita. 1986. "Comparison of Structure and Antitumor Activity of Polysaccharides Isolated from Fukurotake , the Fruiting Body of *Volvariella volvacea*", *Agricultural and Biological Chemistry*, 50: 2171-83.
- Mizuno, M., Y. Shiomi, K. Minato, et al. 2000. "Fucogalactan isolated from *Sarcodon aspratus* elicits release of tumor necrosis factor-alpha and nitric oxide from murine macrophages", *Immunopharmacology*, 46: 113-21.

- Mizuno, Takashi, Motoharu Ando, Reiko Sugie, et al. 1992. "Antitumor Activity of Some Polysaccharides Isolated from an Edible Mushroom, Ningyotake, the Fruiting Body and the Cultured Mycelium of *Polyporus confluens*", *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 56: 34-41.
- Mizuno, Takashi, Poohong Ykohlui, Tetsuya Kinoshita, et al. 1996. "Antitumor Activity and Chemical Modification of Polysaccharides from Niohshimeji Mushroom, *Tricholma giganteum*", *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 60: 30-33.
- Moradali, Mohammad-Fata, Hossein Mostafavi, Shirin Ghods, og Ghorban-Ali Hedjaroude. 2007. "Immunomodulating and anticancer agents in the realm of macromycetes fungi (macrofungi)", *Int Immunopharmacol*, 7: 701-24.
- Morita, Takashi, Shigenori Tanaka, Takanori Nakamura, og Sadaaki Iwanaga. 1981. "A new (1 → 3)- β -D-glucan-mediated coagulation pathway found in limulus ameobocytes", *FEBS Letters*, 129: 318-21.
- Morrison, David C., og Diane M. Jacobs. 1976. "Binding of polymyxin B to the lipid A portion of bacterial lipopolysaccharides", *Immunochemistry*, 13: 813-18.
- Mu, H., A. Zhang, W. Zhang, et al. 2012. "Antioxidative properties of crude polysaccharides from *Inonotus obliquus*", *Int J Mol Sci*, 13: 9194-206.
- Mukumoto, Takafumi, og Haruki Yamaguchi. 1977. "The chemical structure of a mannofucogalactan from the fruit bodies of *Flammulina velutipes* (Fr.) Sing", *Carbohydrate Research*, 59: 614-21.
- Murthy, Raghavendra Vasudeva, Gunnar Arbman, Jingfang Gao, G. David Roodman, og Xiao-Feng Sun. 2005. "Legumain expression in relation to clinicopathologic and biological variables in colorectal cancer", *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 11: 2293.
- Nieminen, Petteri, Markku Kirsi, og Anne-Mari Mustonen. 2006. "Suspected myotoxicity of edible wild mushrooms", *Experimental Biology and Medicine*, 231: 221-28.
- Novak, M., og V. Vetvicka. 2008. "-Glucans, History, and the Present: Immunomodulatory Aspects and Mechanisms of Action", *Journal of Immunotoxicology*, 2008, Vol.5(1), p.47-57, 5: 47-57.
- Nukata, Makiko, Toshihiro Hashimoto, Isao Yamamoto, et al. 2002. "Neogrifolin derivatives possessing anti-oxidative activity from the mushroom *Albatrellus ovinus*", *Phytochemistry*, 59: 731-37.
- Nyman, Anna Armika T., Finn L. Aachmann, Frode Rise, Simon Ballance, og Anne Berit C. Samuelsen. 2016. "Structural characterization of a branched (1 → 6)- α -mannan and β -

- glucans isolated from the fruiting bodies of *Cantharellus cibarius*", *Carbohydrate Polymers*, 146: 197-207.
- Olennikov, D., S. Agafonova, A. Rokhin, T. Penzina, og G. Borovskii. 2012. "Branched glucan from the fruiting bodies of *Piptoporus betulinus* (Bull.:Fr) Karst", *Applied Biochemistry and Microbiology*, 48: 65-70.
- Pang, Xiubing, Wenbing Yao, Xiaobing Yang, et al. 2007. "Purification, characterization and biological activity on hepatocytes of a polysaccharide from *Flammulina velutipes* mycelium", *Carbohydrate Polymers*, 70: 291-97.
- Paterson, R. Russell M. 2006. "Ganoderma – A therapeutic fungal biofactory", *Phytochemistry*, 67: 1985-2001.
- Paulík, Švrček J., Švrček J. Mojžišová, Švrček J. Ďurove, Švrček J. Beníšek, og Švrček J. Húska. 1996. "The immunomodulatory effect of the soluble fungal glucan (*Pleurotus ostreatus*) on delayed hypersensitivity and phagocytic ability of blood leucocytes in mice", *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, 43: 129-35.
- Pearson, F. C., J. Bohon, W. Lee, et al. 1984. "Characterization of *Limulus* amoebocyte lysate-reactive material from hollow-fiber dialyzers", *Applied and Environmental Microbiology*, 48: 1189.
- Pedersen-Bjergaard, Stig, og Knut E. Rasmussen. 2010. *Legemiddelanalyse (Fagbokforl.: Bergen)*.
- Peng, Yanfei, Lina Zhang, Yuying Zhang, Xiaojuan Xu, og John F. Kennedy. 2005. "Solution properties of water-insoluble polysaccharides from the mycelium of *Ganoderma tsugae*", *Carbohydrate Polymers*, 59: 351-56.
- Pereyra, M. T., A. Prieto, M. Bernabé, og J. A. Leal. 2003. "Studies of new polysaccharides from *Lasallia pustulata* (L.) Hoffm", *The Lichenologist*, 35: 177-85.
- Pettolino, Filomena A., Cherie Walsh, Geoffrey B. Fincher, og Antony Bacic. 2012. "Determining the polysaccharide composition of plant cell walls", *Nat. Protocols*, 7: 1590-607.
- Polymer Molecular Weight Measurement. 2013. (Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA).
- Poucheret, P., F. Fons, og S. Rapior. 2006. "Biological and pharmacological activity of higher fungi: 20-Year retrospective analysis", *Cryptogamie, Mycologie*, 27: 311-33.
- Pramanik, Malay, Indranil Chakraborty, Soumitra Mondal, og Syed S. Islam. 2007. "Structural analysis of a water-soluble glucan (Fr.I) of an edible mushroom, *Pleurotus sajor-caju*", *Carbohydrate Research*, 342: 2670-75.

- Putus Macromolecular Sci. & Tech. Ltd. 2009. "What do Mw, Mn, Mz, Mp and Pd stand for?", 21.01.2009, Hentet 10.10.2016.
<http://www.putus.org/news/2009/0121/13.shtml>.
- Qi, C. J., Yh Cai, L. Gunn, et al. 2011. "Differential pathways regulating innate and adaptive antitumor immune responses by particulate and soluble yeast-derived beta-glucans", *Blood*, 117: 6825-36.
- Raetz, Christian R. H. 1990. "Biochemistry of Endotoxins", *Annu. Rev. Biochem.*, 59: 129-70.
- Raetz, Christian R. H., og Chris Whitfield. 2002. "Lipopolysaccharide endotoxins", *Annual Review of Biochemistry*, 71: 635.
- Ramawat, Kishan Gopal, Jean-Michel Mérillon, og SpringerLink. 2015. "Polysaccharides Bioactivity and Biotechnology." In.: Springer International Publishing : Imprint: Springer.
- Rang, H. P. 2003. *Pharmacology* (Churchill Livingstone: Edinburgh).
- Rayner, A. D. M., David Moore, og C. M. Brasier. 1987. *Evolutionary biology of the fungi* (Cambridge University Press: Cambridge).
- Ren, L., C. Perera, og Y. Hemar. 2012. "Antitumor activity of mushroom polysaccharides: a review." In *Food Funct.*, 1118-30.
- Reshetnikov, Sergey V., og Kok- Kheng Tan. 2001. "Higher Basidiomycota as a Source of Antitumor and Immunostimulating Polysaccharides (Review)", 3: 34.
- Rieder, Anne, Stine Grimmer, Finn L. Aachmann, et al. 2013. "Generic tools to assess genuine carbohydrate specific effects on in vitro immune modulation exemplified by β -glucans", *Carbohydrate Polymers*, 92: 2075-83.
- Rogers, Robert. 2011. *The Fungal Pharmacy: The Complete Guide to Medicinal Mushrooms and Lichens of North America*
- Rondanelli, M., A. Opizzi, og F. Monteferrario. 2009. "[The biological activity of beta-glucans]", *Minerva Med*, 100: 237-45.
- Rop, Otakar, Jiri Mlcek, og Tunde Jurikova. 2009. "Beta-glucans in higher fungi and their health effects", *Nutrition Reviews*, 67: 624-31.
- Rosado, Fábio R., Elaine R. Carbonero, Rafaela F. Claudino, et al. 2003. "The presence of partially 3- O -methylated mannogalactan from the fruit bodies of edible basidiomycetes *Pleurotus ostreatus* 'florida' Berk. and *Pleurotus ostreatoroseus* Sing", *FEMS Microbiology Letters*, 221: 119-24.

- Rundle, Joseph F., Joseph F. Foster, og Joseph F. Baldwin. 1944. "On the nature of the starch-iodine complex", *Journal of the American Chemical Society*, 66: 2116-20.
- Ruthes, Andrea C., Yanna D. Rattmann, Elaine R. Carbonero, Philip A. J. Gorin, og Marcello Iacomini. 2012. "Structural characterization and protective effect against murine sepsis of fucogalactans from *Agaricus bisporus* and *Lactarius rufus*", *Carbohydrate Polymers*, 87: 1620-27.
- Ruthes, Andrea C., Yanna D. Rattmann, Simone M. Malquevicz-Paiva, et al. 2013. "Agaricus bisporus fucogalactan: Structural characterization and pharmacological approaches", *Carbohydrate Polymers*, 92: 184-91.
- Samanta, Surajit, Ashis K. Nandi, Ipsita K. Sen, et al. 2015. "Studies on antioxidative and immunostimulating fucogalactan of the edible mushroom *Macrolepiota dolichaula*", *Carbohydrate Research*, 413: 22-29.
- Samorini, Giorgio. 2001. "New Data from the Ethnomycology of Psychoactive Mushrooms", 3: 22.
- Samuelsen, Anne Berit C. 2015. "Cholesterol-lowering activity of beta-glucan", *Kolesterolsenkende aktivitet av beta-glukan*, 123.
- Schepetkin, Igor A., og Mark T. Quinn. 2006. "Botanical polysaccharides: Macrophage immunomodulation and therapeutic potential", *Int Immunopharmacol*, 6: 317-33.
- Sepulveda, Fernando E., Sophia Maschalidi, Renaud Colisson, et al. 2009. "Critical Role for Asparagine Endopeptidase in Endocytic Toll-like Receptor Signaling in Dendritic Cells", *Immunity*, 31: 737-48.
- Shigeto Ohtsuka. "Polysaccharides having an anticarcinogenic effect and a method of producing them from species of basidiomycetes." In September 26, 1973 United Kingdom Kureha Chemical
- Shimada, M., T. Kadowaki, Y. Taniguchi, et al. 2012. "The involvement of O-antigen polysaccharide in lipopolysaccharide in macrophage activation", *Anticancer Res*, 32: 2337-41.
- Sica, Antonio, Marco Erreni, Paola Allavena, og Chiara Porta. 2015. "Macrophage polarization in pathology", *Cellular and Molecular Life Sciences*, 72: 4111-26.
- Sigma Aldrich Co. 2016. " α -Amylase from barley malt", Hentet 24.11.2016.
http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/a2771pis.pdf.
- Singdevsachan, Sameer Kumar, Pravamayee Auroshree, Jigni Mishra, et al. 2016. "Mushroom polysaccharides as potential prebiotics with their antitumor and

- immunomodulating properties: A review", *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, 7: 1-14.
- Sliva, Daniel, Jagadish Loganathan, Jiahua Jiang, et al. 2012. "Mushroom *Ganoderma lucidum* Prevents Colitis-Associated Carcinogenesis in Mice (Mushroom Prevents Colon Cancer)", 7: e47873.
- Smiderle, F. R., L. M. Olsen, E. R. Carbonero, et al. 2008. "A 3- O-methylated mannogalactan from *Pleurotus pulmonarius*: Structure and antinociceptive effect", *Phytochemistry*, 69: 2731-36.
- Smiderle, F., G. L. Sasaki, van J. Arkel, et al. 2010. "High molecular weight glucan of the culinary medicinal mushroom *Agaricus bisporus* is an α -glucan that forms complexes with low molecular weight galactan", *Molecules*, 15: 5818-3049.
- Smiderle, Fhernanda R., Lorena M. Olsen, Elaine R. Carbonero, et al. 2008. "Anti-inflammatory and analgesic properties in a rodent model of a (1 \rightarrow 3),(1 \rightarrow 6)-linked β -glucan isolated from *Pleurotus pulmonarius*", *European Journal of Pharmacology*, 597: 86-91.
- Smiderle, Fhernanda R., Guilherme L. Sasaki, Leo J. L. D. Van Griensven, og Marcello Iacomini. 2013. "Isolation and chemical characterization of a glucogalactomannan of the medicinal mushroom *Cordyceps militaris*", *Carbohydrate Polymers*, 97: 74-80.
- Smith, John, Neil Rowan, og Richard Sullivan. 2002. "Medicinal mushrooms: a rapidly developing area of biotechnology for cancer therapy and other bioactivities", *Biotechnology Letters*, 24: 1839-45.
- Sugiyama, K., H. Kawagishi, A. Tanaka, et al. 1992. "Isolation of plasma cholesterol-lowering components from Ningyotake (*Polyporus confluens*) mushroom", *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 38: 335-42.
- SUPELCO. 1996. "TSK-GEL® Gel Filtration Columns." In.
- Suzuki, T., T. Nishimaki-Mogami, H. Kawai, et al. 2006. "Screening of novel nuclear receptor agonists by a convenient reporter gene assay system using green fluorescent protein derivatives", *Phytomedicine*, 13: 401-11.
- Synytsya, Andriy, og Miroslav Novák. 2013. "Structural diversity of fungal glucans", *Carbohydrate Polymers*, 92: 792-809.
- Tabata, Yasuhiko, og Yoshito Ikada. 1988. "Effect of the size and surface charge of polymer microspheres on their phagocytosis by macrophage", *Biomaterials*, 9: 356-62.
- Tada, Rui, Asuka Tanioka, Haruyo Iwasawa, et al. 2008. "Structural characterisation and biological activities of a unique type β - d -glucan obtained from *Aureobasidium*

- pullulans", Official Journal of the International Glycoconjugate Organization, 25: 851-61.
- Tao, Y., L. Zhang, og P. C. Cheung. 2006. "Physicochemical properties and antitumor activities of water-soluble native and sulfated hyperbranched mushroom polysaccharides", Carbohydr Res, 341: 2261-9.
- Tosh, Susan M., Peter J. Wood, Qi Wang, og John Weisz. 2004. "Structural characteristics and rheological properties of partially hydrolyzed oat β -glucan: the effects of molecular weight and hydrolysis method", Carbohydrate Polymers, 55: 425-36.
- Tosoh Bioscience LLC. 2016. "Gel Filtration Chromatography", Hentet 20.09.2016.
<http://www.separations.us.tosohbioscience.com/Products/HPLCColumns/SizeExclusion/WaterSolublePolymers/PWxl/TSKgel+G5000PWxl.htm>.
- Trevelyan, W. E., og J. S. Harrison. 1952. "Studies on yeast metabolism. I. Fractionation and microdetermination of cell carbohydrates", The Biochemical journal, 50: 298-303.
- Tsukagoshi, S., Y. Hashimoto, G. Fujii, et al. 1984. "Krestin (PSK)", Cancer Treat Rev, 11: 131-55.
- Tzianabos, A. O. 2000. "Polysaccharide immunomodulators as therapeutic agents: Structural aspects and biologic function", Clinical Microbiology Reviews, 13: 523-33.
- Unursaikhan, Surenjav, Xiaojuan Xu, Fanbo Zeng, og Lina Zhang. 2006. "Antitumor Activities of O -Sulfonated Derivatives of (1 \rightarrow 3)- α - D -Glucan from Different *Lentinus edodes*", Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 70: 38-46.
- Usui, T., Y. Iwasaki, T. Mizuno, M. Tanaka, og K. Shinkai. 1983. "Isolation and characterization of antitumor active beta-D-glucans from the fruit bodies of *Ganoderma applanatum*", Isolation and characterization of antitumor active beta-D-glucans from the fruit bodies of *Ganoderma applanatum* [Fungi], 115: 273-80.
- Uthaisangsook, Suwannee, Noorbibi K. Day, Sami L. Bahna, Robert A. Good, og Soichi Haraguchi. 2002. "Innate immunity and its role against infections", Annals of Allergy, Asthma & Immunology, 88: 253-65.
- Vaikousi, H., C. G. Biliaderis, og M. S. Izydorczyk. 2004. "Solution flow behavior and gelling properties of water-soluble barley (1 \rightarrow 3,1 \rightarrow 4)- β -glucans varying in molecular size", Journal of Cereal Science, 39: 119-37.
- Van Rinsum, J., F. M. Klis, og H. van den Ende. 1991. "Cell wall glucomannoproteins of *Saccharomyces cerevisiae* mnn9", Yeast, 7: 717-26.

- Vinogradov, Evgeny, og Solomon P. Wasser. 2005. "The structure of a polysaccharide isolated from *Inonotus levis* P. Karst. mushroom (Heterobasidiomycetes)", *Carbohydrate Research*, 340: 2821-25.
- Vrkoč, Jan, Miloš Buděšinsky, og Ladislav Dolejš. 1977. "Phenolic meroterpenoids from the basidiomycete *Albatrellus ovinus*", *Phytochemistry*, 16: 1409-11.
- Wang, Sunan, og Massimo F. Marcone. 2011. "The biochemistry and biological properties of the world's most expensive underground edible mushroom: Truffles", *Food Research International*, 44: 2567-81.
- Wang, Tianqi, Li Deng, Shikun Li, og Tianwei Tan. 2007. "Structural characterization of a water-insoluble (1 → 3)- α - d-glucan isolated from the *Penicillium chrysogenum*", *Carbohydrate Polymers*, 67: 133-37.
- Wang, Yuan-Yuan, Kay-Hooi Khoo, Shui-Tein Chen, et al. 2002. "Studies on the immuno-Modulating and antitumor activities of *Ganoderma lucidum* (Reishi) polysaccharides: functional and proteomic analyses of a fucose-Containing glycoprotein fraction responsible for the activities", *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 10: 1057-62.
- Wasser. 2002. "Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides", *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60: 258-74.
- Wasser, Solomon. 2011. "Current findings, future trends, and unsolved problems in studies of medicinal mushrooms", *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89: 1323-32.
- Watts, C., Cx Moss, D. Mazzeo, et al. 2003. "Creation versus destruction of T cell epitopes in the class II MHC pathway", *Ann.NY Acad.Sci.*, 987: 9-14.
- Wiater, A., R. Paduch, M. Pleszczyńska, et al. 2011. " α -(1 → 3)- d -Glucans from fruiting bodies of selected macromycetes fungi and the biological activity of their carboxymethylated products", *Biotechnology Letters*, 33: 787-95.
- Wikipedia. 2016. "Albatrellus ovinus", Hentet 29.08.2016.
https://en.wikipedia.org/wiki/Albatrellus_ovinus.
- Xia, Youlin, Glen Legge, Kyu-yeon Jun, et al. 2005. "IP-COSY, a totally in-phase and sensitive COSY experiment", *Magnetic Resonance in Chemistry*, 43: 372-79.
- Yagisawa, Masako, Kumiko Saeki, Emiko Okuma, et al. 1999. "Signal transduction pathways in normal human monocytes stimulated by cytokines and mediators: Comparative study with normal human neutrophils or transformed cells and the putative roles in functionality and cell biology", *Experimental Hematology*, 27: 1063-76.

- Yamanaka, Daisuke, Rui Tada, Yoshiyuki Adachi, et al. 2012. "Agaricus brasiliensis-derived β -glucans exert immunoenhancing effects via a dectin-1-dependent pathway", *Int Immunopharmacol*, 14: 311-19.
- Zaidman, Ben-Zion, Majed Yassin, Jamal Mahajna, og Solomon Wasser. 2005. "Medicinal mushroom modulators of molecular targets as cancer therapeutics", *Applied Microbiology and Biotechnology*, 67: 453-68.
- Zakaria Boual, Abdellah Kemassi, Aminata Ould El Hadj Khelil, Philippe Michaud,, og and Mohammed DidiOuld El Hadj. 2012. "Partial characterization and hydrolysis procedure of water soluble polysaccharides extracted from onesaharian medicinal plant: *Malvaegyptiaca* L.", *International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics*, Vol. 2, No. 2,: 100-03.
- Zambonelli, Alessandra, og Gregory M. Bonito. 2013. *Soil Biology : Edible Ectomycorrhizal Mushrooms : Current Knowledge and Future Prospects (1)* (Berlin, Heidelberg, DE: Springer Berlin Heidelberg: Berlin).
- Zekovic, Db, S. Kwiatkowski, M. M. Vrvic, D. Jakovljevic, og Ca Moran. 2005. "Natural and modified (1 -> 3)-beta-D-glucans in health promotion and disease alleviation." In *Crit. Rev. Biotechnol.*, 205-30.
- Zhang, An-Qiang, Jing-Song Zhang, Qing-Jiu Tang, et al. 2006. "Structural elucidation of a novel fucogalactan that contains 3- O-methyl rhamnose isolated from the fruiting bodies of the fungus, *Herichium erinaceus*", *Carbohydrate Research*, 341: 645-49.
- Zhang, M., S. W. Cui, P. C. K. Cheung, og Q. Wang. 2007. "Antitumor polysaccharides from mushrooms: a review on their isolation process, structural characteristics and antitumor activity", *Trends in Food Science & Technology*, 18: 4-19.
- Zhang, Yangyang, Sheng Li, Xiaohua Wang, Lina Zhang, og Peter C. K. Cheung. 2011. "Advances in lentinan: Isolation, structure, chain conformation and bioactivities", *Food Hydrocolloids*, 25: 196-206.
- Zhuang, Cun, Takashi Mizuno, Atsushi Shimada, et al. 1993. "Antitumor Protein-containing Polysaccharides from a Chinese Mushroom Fengweigu or Houbitake, *Pleurotus sajor-caju* (Fr.) Sings", *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 57: 901-06.
- Zong, Aizhen, Hongzhi Cao, og Fengshan Wang. 2012. "Anticancer polysaccharides from natural resources: A review of recent research", *Carbohydrate Polymers*, 90: 1395-410.
- Zubaidi, Layla Mohammad Khader. 2013. "Effekt av δ -glukan fra gjær på legumainaktivitet." In. UNIVERSITETET I OSLO.