فصلنامهٔ علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران
جلد ۲۸، شمارهٔ ۳، صفحهٔ ۴۳۳-۴۲۳ (۱۳۹۱)

بهینه‌سازی ترکیب‌های بستر کشت غوطه‌ور قارچ دارویی *Ganoderma lucidum* به منظور افزایش تولید بیومس میسلیومی و پلی‌ساکارید برون سلولی

مریم توانا[1*]، مجید عزیزی[2]، محمد فارسی[3] و فاطمه بانشی[4]

۱*- نویسنده مسئول، دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه باغبانی، دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد
پست الکترونیک: Tavana_maryam@yahoo.com
۲- دانشیار، گروه باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
۳- استاد، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
٤- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه باغبانی، دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد

تاریخ دریافت: مهر ۱۳۸۹ تاریخ اصلاح نهایی: اردیبهشت ۱۳۹۰ تاریخ پذیرش: اردیبهشت ۱۳۹۰

چکیده

این تحقیق به منظور معرفی محیط کشت غوطه‌ور مطلوب، جهت تولید بهینه بیومس میسلیومی و پلی‌ساکارید برون سلولی قارچ دارویی *Ganoderma lucidum* انجام گردید. اثر منابع مختلف کربن (قند گلوکز، قند لاکتوز و قند مالتوز)، غلظت منابع کربن (٤۰، ۵۰ و ٦۰ گرم بر لیتر) و pH (۳/۵، ٤/۵ و ۵/۵) بر تولید میسلیوم و پلی‌ساکارید برون سلولی مورد بررسی قرار گرفت. آزمایشها به صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی به اجرا در آمد. نتایج بدست آمده نشان داد که بیشترین تولید بیومس میسلیومی برابر با ۸/۵۸۸ گرم وزن خشک میسلیوم بر لیتر (۸/۵۸۸ g DW/l)، توسط قند مالتوز و کمترین بیومس میسلیومی توسط قند گلوکز برابر با ٤/۹۵۳ g DW/l بدست آمد. همچنین در بین منابع کربن، قند مالتوز با تولید ۱/۵۵۱ g/l بیشترین تولید پلی‌ساکارید را داشته است و کمترین تولید پلی‌ساکارید توسط قند لاکتوز با ۱/٤۱ g/l بدست آمد. بین غلظت‌های مختلف کربن بکار برده شده و همچنین pH محیط کشت از لحاظ تولید بیومس میسلیوم و پلی‌ساکارید اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. در پایان، با مقایسه ترکیب‌های مختلف بستر کشت غوطه‌ور قارچ گانودرما مشخص شد که بهترین ترکیب برای تولید بیومس میسلیومی، قند مالتوز با غلظت ۵۰ گرم در لیتر و pH=٤/۵ و بهترین ترکیب برای تولید پلی‌ساکارید برون سلولی، قند مالتوز با غلظت ٤۰ گرم در لیتر و pH=۳/۵ می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: پلی‌ساکارید، منبع کربن، قارچ *Ganoderma lucidum*، مالتوز.

مقدمه

مدتهای مدیدی است که گفته می‌شود استفاده از عصاره آب داغ بسیاری از قارچها در طب سنتی چینی در درمان امراض مختلفی شامل انواع بسیاری از سرطان‌ها مؤثر واقع شده است. استفاده از عصاره قارچهای دارویی نظیر *Ganoderma lucidum* در درمان سرطان در چین، ژاپن، کره، روسیه و هم اکنون به‌طور فزاینده‌ای در آمریکا به خوبی شناخته شده‌است (Mizuno *et al.*, 1995). در

Archive of SID

www.SID.ir

هرحال تنها در سه دهۀ اخیر است که تکنولوژی شیمیایی قادر به جداسازی ترکیب‌های مربوطه و استفاده از آنها در آزمایشهای کنترل‌شده، گردیده است. این ترکیب‌ها به‌طور وسیعی برای خواص دارویی، به خصوص کاربردهای ضد سرطانی بکار برده شده‌اند (Mizuno, 1999). مشخص شده است که برخی از قارچهای شاخه بازیدیومایکوتا (*Basidiomycota*) قادر به تولید تعداد زیادی از ترکیب‌های فعال بیولوژیکی می‌باشند (Haak-Frendscho *et al.*, 1993؛ Hatvani, 2001). کلاهک این قارچها، میسلیوم یا محیط کشت مایع حاوی میسلیوم را می‌توان به‌عنوان منابع تولید مواد مؤثره نام برد. اخیراً مشخص شده است که اسپورها نیز حاوی برخی از مواد مؤثره می‌باشند (Min *et al.*, 2000). قارچ دارویی *G. lucidum*، رویشگاه‌های بسیار وسیعی داشته و در سرتاسر جهان از آمازون تا مناطق جنوبی آمریکای شمالی و قسمت‌های وسیعی از آسیا یافت می‌شود (Stamets, 2000). این قارچ روی تعداد زیادی از درختان مرده و در حال فساد خصوصاً خزان‌دارهایی مثل بلوط، افرا، نارون، ماگنولیا، بید، شاه بلوط، سپیدار و غیره قادر به رشد بوده و در کشورهای شرقی (آسیا) به‌طور وسیعی روی درختان جنس *Prunus* رشد پیدا می‌کند. این قارچ متعلق به خانواده Polyporacea بوده و دارای منافذ کوچکی است که روی سطح زیرین کلاهک ایجاد شده و حاوی اسپورهای زایا می‌باشد. حالت چرمی و چوبی و همچنین وجود منافذ اسپورزا خاص قارچهای این خانواده است. قارچ *G. lucidum* به دلیل داشتن میوه خشن و عدم دارا بودن خصوصیات یک بافت تازه مشابه قارچهای خوراکی سفید و همچنین طعم نامطلوب در گروه قارچهای خوراکی قرار نمی‌گیرد.

آنالیز کمّی و کیفی این قارچ نشان داده است که حاوی مواد مؤثره و همچنین مواد غذایی مفید نظیر کربوهیدرات، ویتامین، مواد معدنی و اسید آمینه‌ها می‌باشد (Hughes *et al.*, 1958؛ Kadiri, 1990؛ Ogbe, 2008). بیش از ۳۰۰ گزارش در مورد ترکیب‌های قارچ *G. lucidum* وجود دارد. میوه، میسلیوم و اسپور، حاوی ٤۰۰ ترکیب مختلف مواد مؤثره هستند که به‌طور عمده شامل تری‌ترپن‌ها، پلی‌ساکاریدها، نوکلئوتیدها، استرول‌ها، استروئیدها، اسیدهای چرب، پروتئین‌ها و همچنین عناصر به میزان کم هستند (Kim & Kim, 1999؛ Wasser & Weis, 1999؛ Chen *et al.*, 2000). پلی‌ساکاریدها مهمترین منبع مواد مؤثره این قارچ بوده و بیش از ده نوع پلی‌ساکارید از میوه، اسپور و میسلیوم جدا شده است. پلی‌ساکاریدهای قارچ *G. lucidum* شامل بتا–دی‌گلوکان، هترو پلی‌ساکاریدها و گلیکوپروتئین‌ها می‌باشند که قادر به پیشگیری و درمان سرطان بوده و سیستم ایمنی بدن را تقویت می‌نمایند (Zhou & Gao, 2002). این ترکیب‌ها علاوه بر درمان سرطان، ویژگی‌های ضد ویروسی، التهاب، دیابت، فشار خون بالا و جلوگیری از لخته شدن خون را نیز دارند (Gao *et al.*, 2004؛ Smith *et al.*, 2002؛ Wasser, 2002).

تولید میسلیوم قارچهای ماکرو (قارچهای کلاهک‌دار) در کشت غوطه‌ور (Submerged culture) برای اولین بار در سال ۱۹۵۰ صورت گرفت. کشت مایع، پتانسیل پیشرفت بیشتری برای تولید متابولیت‌های ثانویه نسبت به تولید میوه دارد. تولید میوه زمان‌بر بوده و فضای بیشتری نیاز دارد (Bae *et al.*, 2000)، همچنین کنترل شرایط محیطی بسیار مشکل‌تر از روش کشت مایع یا غوطه‌ور می‌باشد. احتمال ضعیف شدن میسلیوم در کشت مایع کمتر بوده و عوامل بستر کشت به راحتی قابل کنترل

Archive of SID

www.SID.ir

هستند. تحقیقاتی به منظور افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه نیز انجام شده‌است (Lee *et al.*, 1999؛ Kim *et al.*, 2003).

فاکتورهای مختلفی کیفیت و کمّیت تولید میسلیوم را تحت تأثیر قرار می‌دهد. دو فاکتور اساسی که باید مورد بحث قرار گیرند، ترکیب‌های بستر کشت (منابع نیتروژن، کربن، اسیدهای چرب و نمک‌های معدنی) و شرایط محیطی (pH، دما، هوادهی، چرخش، نور و دانسیته تلقیح) هستند که روی رشد میسلیوم قارچ اثر مستقیم دارند (Yang & Liao, 1998 ؛ Knudsen & Stack, 1991؛ Kim *et al.*, 2006). نوع مواد مصرفی توسط میسلیوم، کمّیت، کیفیت آن و مورفولوژی میسلیوم، معیارهای مهمی برای تعیین شرایط بهینه رشد قارچ بشمار می‌روند (Yang & Liao, 1998). گرچه بسیاری از محققان تلاش می‌کنند که این قارچ را در بستر غوطه‌ور وادار به رشد نمایند، اما با این حال تحقیقات اندکی در زمینه تأثیر فاکتورهای محیطی و اثر بستر کشت بر تولید میسلیوم و استخراج مواد مؤثره صورت گرفته‌است. اثر منابع کربن و نیتروژن روی تولید میسلیوم و گنودریک اسید (Peng *et al.*, 2008)، اثر میزان گلوکز اولیه روی رشد سلولی، عملکرد و تولید پلی‌ساکارید (Fang & zhong, 2002a) و تأثیر روغن‌های گیاهی روی رشد میسلیوم و تولید پلی‌ساکارید (Yang *et al.*, 2000) بررسی شده‌است.

ارزش مکمل‌های غذایی بدست آمده از قارچها در دنیا در سال ۱۹۹۱ حدود ۱/٦، سال ۱۹۹٤ حدود ۳/٦ (Chen, 1996) و در سال ۱۹۹۹ شش میلیارد دلار آمریکا بوده است (Wasser *et al.*, 2002). ارزش محصولات گانودرما به تنهایی در سال ۱۹۹۵ حدود ۱/٦ میلیارد دلار بوده است (Chang & Buswell, 1999). تولید جهانی قارچ گانودرما در سال ۲۰۰۲ حدود ٤۹۰۰-۵۰۰۰ تن اعلام شده‌است و حداقل ۱۰۰ نوع از محصولات آن در بازار موجود بوده و به فروش می‌رسد. اما تاکنون هیچ‌گونه فعالیتی در زمینه تولید قارچ گانودرما در ایران گزارش نشده است.

در این تحقیق اثر نوع منبع کربن و غلظت آن و همچنین pH محیط کشت بر تولید بیومس میسلیومی (وزن خشک میسلیوم) و میزان پلی‌ساکارید برون سلولی توسط قارچ *G. lucidum* در کشت غوطه‌ور مطالعه گردید. هدف اصلی، رسیدن به ترکیب بهینه‌ای از سه فاکتور یاد شده به منظور دستیابی به تولید حداکثر میسلیوم و پلی‌ساکارید در کشت غوطه‌ور این قارچ ارزشمند بود. با توجه به اینکه در ایران روی تولید این قارچ دارویی مهم، کار تحقیقاتی انجام نشده است، امید است در آینده با بررسی جوانب تولید این قارچ شاهد خودکفایی در تولید آن، درمان بیماریهای صعب‌العلاج و ایجاد اشتغال‌زایی در کشور باشیم و با عرضه بهینه آن، بتوان گام مهمی در صنعت داروسازی و تأمین نیاز دارویی کشور برداشت.

مواد و روشها

میکرو ارگانیزم

میسلیوم قارچ *G. lucidum* از آزمایشگاه گروه زیست‌فناوری قارچهای صنعتی جهاد دانشگاهی مشهد تهیه گردید و روی محیط کشت تجاری PDA (Potato dextrose agar) نگهداری شدند. محیط کشت PDA بعد از مایه‌زنی توسط میسلیوم قارچ در دمای ۲۵ °C درجه و به مدت ۷ روز به منظور رشد میسلیوم قرار گرفته و بعد به مدت ۲ هفته (به منظور استفاده برای مایه‌زنی محیط کشت غوطه‌ور) در دمای ٤°C نگهداری شد.

Archive of SID

www.SID.ir

تهیه محیط کشت

محیط کشت مورد استفاده شامل: ۵ گرم عصاره مخمر، ۱ گرم K_2HPO_4، ۰/۵ گرم $MgSO_47H_2O$، ۵ گرم پپتون و ۰/۰۵ گرم در لیتر ویتامین B_1 بود. به منظور بررسی اثر نوع کربن، از سه منبع مختلف گلوکز، مالتوز و لاکتوز در سه غلظت ٤٠، ۵۰ و ٦٠ گرم در لیتر استفاده شد. هر کدام از تیمارهای غلظت نیز به سه قسمت مساوی، به میزان ۳۲ میلی‌لیتر تقسیم شده و در ویال‌هایی با حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر به منظور تنظیم pH ۳/۵، ٤/۵ و ۵/۵ توزیع گردید. از اسید کلریدریک نیم نرمال و سود یک نرمال برای تنظیم pHهای مورد نظر استفاده شد. بعد از آماده شدن محیط‌ها، سترون کردن در دمای ۱۲۱°C و فشار ۱/۵ اتمسفر به مدت ۲۰ دقیقه توسط اتوکلاو انجام شد و در پایان پس از خنک شدن محیط کشت، ویتامین B_1، با استفاده از فیلتر سَر سرنگی با منافذ ۰/۲ میکرون (به منظور استریل شدن) به آن اضافه گردید.

مایه‌زنی

مایه‌زنی به کمک پرگنه‌هایی با قطر مساوی ۷ میلی‌متر (به کمک چوب‌پنبه سوراخ‌کن)، از بستر کشت تازه PDA حاوی میسلیوم قارچ *G. lucidum* و تحت شرایط استریل، زیر هود لامینار انجام شد. در این بخش سعی گردید که پرگنه‌ها با حداقل آگار به ویال‌ها منتقل شوند. ویال‌ها بعد از مایه‌زنی، به مدت ۸ روز به دمای ۲۹±۱ °C و شرایط تاریک منتقل گردیدند.

روش آنالیز

مقدار بیومس میسلیوم بر پایه وزن خشک میسلیوم تعیین شد. بعد از گذشت ۸ روز از زمان مایه‌زنی، میسلیوم به همراه محیط مایع، با استفاده از پمپ خلأ فیلتر شد و بعد از شستشو توسط آب مقطر در دمای ٦٠°C خشک گردیده و سپس وزن خشک آن توسط ترازوی دیجیتال با دقت اندازه‌گیری گردید. میزان پلی‌ساکارید توسط روش فنول- سولفوریک اسید تعیین گردید (Dubois *et al.*, 1956). تیمارها توسط آزمایش فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی و با ۳ تکرار اجرا شد. از نرم‌افزارهای JMP و Excel جهت آنالیز داده‌ها استفاده گردید.

نتایج

اثر نوع کربن بر وزن خشک میسلیوم و میزان تولید پلی‌ساکارید برون سلولی

نتایج آنالیز واریانس تأثیر نوع کربن بر وزن خشک میسلیوم و تولید پلی‌ساکارید قارچ گانودرما نشان می‌دهد که نوع کربن استفاده شده تأثیر معنی‌داری بر وزن خشک میسلیوم و تولید پلی‌ساکارید در سطح احتمال ۵٪ دارد (جدول ۱). همان‌طور که در شکل ۲ مشخص است، قند مالتوز با تولید ۸/۵۸۸ گرم وزن خشک میسلیوم در لیتر (۸/۵۸۸ g DW/l)، بیشترین و قند گلوکز با تولید ٤/۹۵۳ g DW/l، کمترین عملکرد را بعد از گذشت ۸ روز داشته‌اند. بین قندهای لاکتوز و گلوکز اختلاف معنی‌داری از این نظر وجود نداشت. در بین منابع کربن، قند مالتوز با تولید ۱/۵۵۱ گرم بر لیتر (۱/۵۵۱ g/l) بیشترین تولید پلی‌ساکارید را داشته است. کمترین تولید پلی‌ساکارید توسط قند لاکتوز با ۱/٤۱ g/l بدست آمد. بین قندهای لاکتوز و گلوکز اختلاف معنی‌داری از این نظر وجود نداشت (شکل ۳).

Archive of SID

www.SID.ir

تأثیر غلظت کربن بر وزن خشک میسلیوم و میزان تولید پلی‌ساکارید برون سلولی

بین غلظت‌های مختلف بکار برده شده (۴۰، ۵۰ و ۶۰ گرم در لیتر) از لحاظ وزن خشک میسلیوم اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (جدول ۱). بیشترین وزن خشک میسلیوم (۷/۲۸۰ g DW/l) در غلظت ۵۰ و کمترین وزن خشک میسلیوم (۵/۶۹۴ g DW/l) در غلظت ۶۰ گرم در لیتر بدست آمد.

مشابه وزن میسلیوم، مقایسه میانگین تولید پلی‌ساکارید نیز معنی‌دار نشد و غلظت ۵۰ گرم در لیتر بیشترین (۱/۴۸۱ g/l) و ۶۰ گرم در لیتر کمترین (۱/۴۴۶ g/l) تولید پلی‌ساکارید را داشتند.

تأثیر pH محیط کشت بر وزن خشک میسلیوم و میزان تولید پلی‌ساکارید برون سلولی

به‌طوری که در جدول ۱ مشاهده می‌شود، pH محیط کشت تأثیر معنی‌داری بر وزن خشک میسلیوم تولید شده ندارد. زمانی که از pH= ۴/۵ و pH= ۳/۵ استفاده گردید، به‌ترتیب بالاترین عملکرد (۷/۶۱۵ g DW/l) و کمترین عملکرد میسلیوم (۵/۰۳۵) تولید شد.

اسیدیته محیط کشت بر تولید پلی‌ساکارید نیز تأثیر معنی‌داری نداشت. حداکثر تولید پلی‌ساکارید برابر با ۱/۴۷۸ g/l، توسط pH= ۵/۵ بدست آمد و pH=۴/۵ حداقل پلی‌ساکارید (۱/۴۴۹ g/l) را تولید کرد.

اثر متقابل نوع کربن و غلظت بر وزن خشک میسلیوم و میزان تولید پلی‌ساکارید برون سلولی

همان‌طور که در جدول ۱ مشاهده می‌شود، اثر متقابل نوع کربن و غلظت بر وزن خشک میسلیوم و پلی‌ساکارید در سطح احتمال ۵٪ معنی‌دار نشده است. بیشترین وزن خشک برابر با ۱۱/۸۷۵ g DW/l در تیمار حاوی قند مالتوز با غلظت ۵۰ گرم در لیتر و کمترین وزن خشک برابر با ۴/۲۰۲ g DW/l در تیمار قند گلوکز با غلظت ۴۰ گرم در لیتر مشاهده شد. با افزایش غلظت قند مالتوز از ۴۰ به ۵۰ گرم، وزن خشک میسلیوم نیز افزایش یافت (از ۶/۳۰۲ به ۸/۱۹۴ g DW/l) و با بیشتر شدن غلظت و رسیدن به ۶۰ گرم، وزن خشک کاهش پیدا کرد (از ۸/۱۹۴ به ۵/۴۸۶ g DW/l). همچنین غلظت مناسب برای افزایش تولید میسلیوم برای قندهای مختلف، متفاوت است.

تیمار حاوی قند مالتوز با غلظت ۴۰ گرم در لیتر با ۱/۵۶۹ g/l بیشترین و تیمار قند لاکتوز با غلظت ۴۰ گرم در لیتر با ۱/۳۵۶ g/l کمترین تولید پلی‌ساکارید را داشتند.

اثر متقابل نوع کربن و pH بر وزن خشک میسلیوم و میزان تولید پلی‌ساکارید برون سلولی

مقایسه میانگین وزن خشک میسلیوم در این بخش نشان داد که بین تیمارهای مختلف در سطح احتمال ۵٪ اختلاف معنی‌دار وجود ندارد (جدول ۱). بیشترین وزن خشک برابر با ۱۱/۰۰۶ g DW/lدر تیمار حاوی قند مالتوز و pH= ۴/۵ مشاهده شد. بعد ازاین تیمار، تیمار مالتوز با pH= ۵/۵ بالاترین وزن خشک میسلیوم را تولیدکرد (۸/۶۴۶ g DW/l). تیمار حاوی قند گلوکز با pH= ۳/۵ با تولید ۴/۳۷۵ g DW/l، کمترین عملکرد را داشت.

اثر متقابل نوع کربن و pH نیز بر تولید پلی‌ساکارید در سطح احتمال ۵٪ معنی‌دار نشد. حداکثر تولید پلی‌ساکارید (۱/۵۶۸ g/l) در تیمار قند مالتوز با pH= ۵/۵ و حداقل تولید (۱/۳۷۵ g/l) در تیمار قند لاکتوز با pH= ۳/۵ مشاهده گردید.

Archive of SID

www.SID.ir

اثر متقابل غلظت و pH بر وزن خشک میسلیوم و میزان تولید پلی‌ساکارید برون سلولی

اختلاف معنی‌داری بین تیمارها برای دو صفت مورد بررسی در سطح احتمال ۵٪ مشاهده نشد (جدول ۱). بالاترین و پایین‌ترین عملکرد میسلیوم به‌ترتیب برابر با ۸/۹۹۳ g DW/l مربوط به غلظت ۴۰ گرم در لیتر با ۴/۵ =pH و ۳/۶۸۱ g DW/l مربوط به غلظت ۴۰ گرم در لیتر و ۳/۵ =pH بود. بعد از غلظت ۴۰ و ۴/۵ =pH، غلظت ۵۰ و ۴/۵ =pH با عملکرد ۷/۷۷۸ g DW/l در رتبه دوم جای داشت.

حداکثر و حداکثر تولید پلی‌ساکارید به‌ترتیب برابر با ۱/۵۲۲ g/l و ۱/۴۱۷ g/l در غلظت ۵۰ گرم در لیتر و ۳/۵ =pH و غلظت ۵۰ گرم در لیتر با ۵/۵ =pH حاصل شد.

اثر متقابل نوع کربن، غلظت و pH بر وزن خشک میسلیوم و میزان تولید پلی‌ساکارید برون سلولی

بین تیمارهای آزمایشی به لحاظ وزن خشک میسلیوم اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵٪ مشاهده نشد (جدول ۱). بیشترین عملکرد میسلیوم (۱۴/۴۷۹ g DW/l) در تیمار قند مالتوز با غلظت ۵۰ گرم در لیتر و ۴/۵ =pH و کمترین عملکرد (۱/۹۷۹ g DW/l) در تیمار قند گلوکز با غلظت ۴۰ گرم در لیتر و ۳/۵ =pH مشاهده شد.

اثر متقابل نوع کربن، غلظت و pH بر تولید پلی‌ساکارید نیز در سطح احتمال ۵٪ معنی‌دار نشد. بالاترین سطح تولید پلی‌ساکارید (۱/۶۰۸ g/l) توسط تیمار قند مالتوز با غلظت ۴۰ گرم در لیتر و ۳/۵ =pH و پایین‌ترین سطح تولید (۱/۲۵۱ g/l) توسط تیمار قند لاکتوز با غلظت ۴۰ گرم در لیتر و ۳/۵ =pH بدست آمد. در منابع مختلف کربن، با غلظت ثابت، اسیدیته لازم برای تولید مناسب پلی‌ساکارید متفاوت است.

بحث

در این تحقیق اثر نوع کربن و غلظت آن و همچنین pH محیط کشت به منظور بهبود تولید بیومس میسلیومی (وزن خشک میسلیوم) و پلی‌ساکارید برون سلولی قارچ دارویی *G. lucidum* در کشت غوطه‌ور مطالعه گردید. نتایج بدست آمده نشان داد که اثر نوع کربن بر تولید بیومس میسلیوم در سطح ۵٪ معنی‌دار است. در بین منابع کربن بکار برده شده، بیشترین تولید میسلیوم و پلی‌ساکارید برون سلولی با استفاده از قند مالتوز بدست آمد. نتایج مشابهی نیز توسط Zhong و همکاران (۲۰۰۲) ارائه گردیده است. اولین تحقیق در زمینه اثر منابع مختلف کربن (ساکارز، لاکتوز، مالتوز و گلوکز) روی رشد میسلیوم و مواد مؤثره قارچ گانودرما توسط Tang و Zhong (۲۰۰۲) انجام شده است که این دو محقق دریافتند که قند لاکتوز به‌عنوان بهترین منبع برای تولید میسلیوم، پلی‌ساکارید و گنودریک اسید می‌باشد، گرچه بین قند لاکتوز و مالتوز اختلاف معنی‌دار مشاهده نکردند. Kim و همکاران (۲۰۰۶) نیز منابع مختلف کربن (گزیلوز، لاکتوز، ساکارز، مانیتول، فروکتوز، گلوکز، مالتوز، سورلوز و نشاسته) را روی رشد میسلیوم قارچ *Ganoderma resinaceum* مورد بررسی قرار دادند و مشاهده کردند که با مصرف قند گلوکز بالاترین حد بیومس میسلیوم و پلی‌ساکارید برون سلولی تولید می‌شود.

با مطالعه اثر غلظت منابع کربن مورد آزمایش مشخص شد که در صورت استفاده از غلظت ۵۰ گرم در لیتر از منابع کربن، تولید میسلیوم و پلی‌ساکارید به حداکثر خواهد رسید، گرچه اختلاف معنی‌داری در بین غلظت‌های مختلف مشاهده نشد. نتایج نشان داد که با افزایش غلظت تا ۵۰ گرم، تولید میسلیوم و پلی‌ساکارید

Archive of SID

www.SID.ir

افزایش یافته و با بیشتر شدن غلظت و رسیدن به ۶۰ گرم در لیتر، تولید کاهش می‌یابد. این نتایج با یافته‌های Fang و Zhong (2002a) مطابقت دارد. این محققان علت کاهش تولید میسلیوم در غلظت بالای ۵۰ گرم قند را، افزایش فشار اسمزی ناشی از غلظت بالای قند دانسته و اعلام کردند که فشار اسمزی بالا شرایط مطلوب برای جذب مواد غذایی توسط قارچ را کاهش داده و منجر به کاهش تولید میسلیوم می‌گردد. Kim و همکاران (۲۰۰۶) و همچنین Peng و همکاران (۲۰۰۸) اعلام کردند که با افزایش غلظت کربن تا g/l ۷۰، تولید پلی‌ساکارید برون سلولی نیز افزایش یافته و با افزایش بیشتر غلظت کربن، تولید کاهش می‌یابد.

نتایج بررسی اثر pH محیط کشت روی تولید میسلیوم و پلی‌ساکارید نشان داد که روند افزایش و کاهش تولید در میسلیوم و پلی‌ساکارید بر خلاف یکدیگر بوده، به‌طوری که با افزایش pH از ۳/۵ به ۴/۵ تولید میسلیوم به حداکثر رسیده اما تولید پلی‌ساکارید به کمترین حد خود می‌رسد و با افزایش بیشتر pH، تولید میسلیوم کاهش یافته و تولید پلی‌ساکارید افزایش می‌یابد. اطلاعات اندکی در مورد مطالعه اثر pH روی رشد میسلیوم و مواد مؤثره قارچ گانودرما وجود دارد. Fang و Zhong (۲۰۰۲b) دامنه pH=۳/۵-۷ را بررسی کردند و مشاهده نمودند که pH= ۶/۵ برای تولید میسلیوم و pH= ۳/۵-۴/۵ برای تولید پلی‌ساکارید برون‌سلولی مناسب است، چون در pHهای بالاتر، مصرف قند نسبت به pHهای پایین‌تر بیشتر بوده و در نتیجه رشد میسلیوم افزایش می‌یابد. در pHهای پایین، تولید پلی‌ساکارید مدت زمان بیشتری صورت گرفته و تولید را افزایش می‌دهد، که تا حدی به نتایج ما مشابهت دارد. این دو محقق کشت قارچ گانودرما را در دستگاه بیوراکتور (دستگاهی که در آن تمام فاکتورها نظیر pH، اکسیژن، دما، غلظت، سرعت چرخش و غیره تحت کنترل است) نیز انجام دادند و نتایجی بر خلاف یافته‌های قبلی بدست آوردند و اعلام کردند که تولید میسلیوم در اسیدیته پایین و تولید پلی‌ساکارید برون سلولی در اسیدیته بالا به حداکثر می‌رسد. Lee و همکاران (۱۹۹۹) پیشنهاد کردند زمانی تولید پلی‌ساکارید برون سلولی بهینه می‌شود که pH در ۶/۵ ثابت نگه داشته شود، زیرا رشد پلت‌های میسلیومی (توده‌های میسلیوم) حفظ می‌گردد. اما در صورت عدم کنترل اسیدیته، به مرور زمان و طی رشد، pH محیط کشت تا حد ۲/۶ کاهش یافته و باعث تغییر در مورفولوژی پلت‌ها و تبدیل آنها به شکل رشته‌ای شده که این حالت از رشد میسلیوم در تولید پلی‌ساکارید تغییر ایجاد می‌نماید. در آزمایشی دیگر که توسط Chang و Buswell (۱۹۹۹) انجام شد، اسیدیته مطلوب برای تولید میسلیوم و پلی‌ساکارید pH= ۶/۵ اعلام شد.

در پایان، با مقایسه ترکیب‌های مختلف بستر کشت غوطه‌ور قارچ گانودرما مشخص شد که بهترین ترکیب برای تولید میسلیوم، قند مالتوز با غلظت ۵۰ گرم در لیتر و pH=۴/۵ و بهترین ترکیب برای تولید پلی‌ساکارید برون سلولی، قند مالتوز با غلظت ۴۰ گرم در لیتر و pH= ۳/۵ می‌باشد، گرچه بین ترکیب‌های بکار برده شده اختلاف معنی‌دار به لحاظ دو صفت مورد بررسی مشاهده نگردید.

Archive of SID

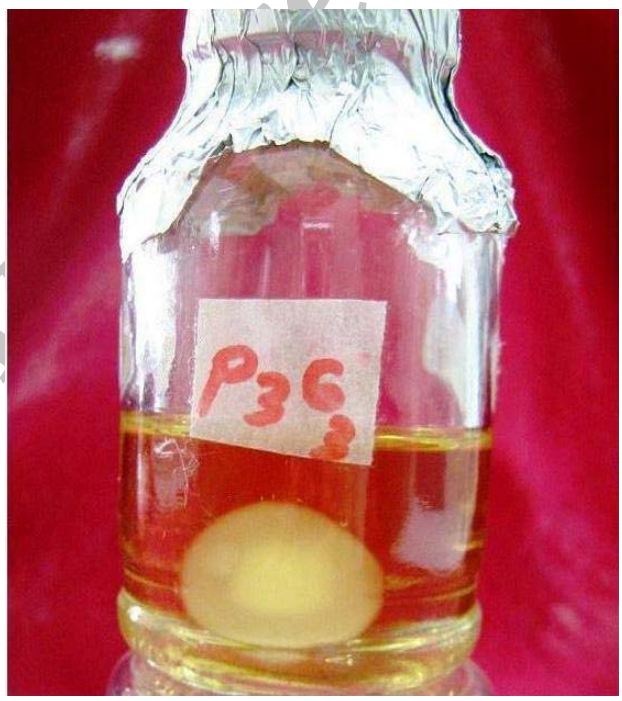
www.SID.ir

جدول ۱- تجزیه واریانس برای وزن خشک میسلیوم و پلی‌ساکارید برون سلولی قارچ گانودرما در محیط کشت مایع

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات	
		میسلیوم	پلی‌ساکارید
نوع کربن	۲	۱۰۰/۵۱*	۰/۱۶*
غلظت کربن	۲	۱۷/۶۴ ns	۰/۰۰۸ ns
pH	۲	۴۵/۳۷ ns	۰/۰۰۶ ns
کربن×غلظت	۴	۳۷/۵۴ ns	۰/۰۱۶ ns
کربن×pH	۴	۱۴/۳۸ ns	۰/۰۰۸ ns
غلظت×pH	۴	۱۷/۹۳ ns	۰/۰۱۸ ns
کربن×غلظت×pH	۸	۹/۹۸ ns	۰/۰۱۳ ns
خطا	۵۴	۱۹/۳۴	۰/۰۰۹

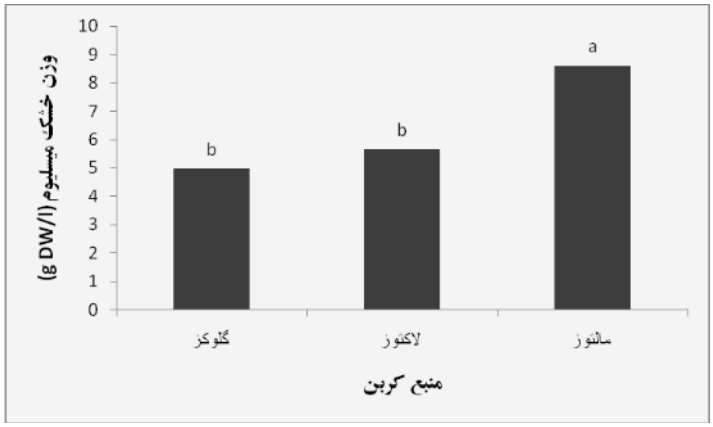
*: معنی‌دار در سطح احتمال ۵%

ns: عدم وجود تفاوت معنی‌دار

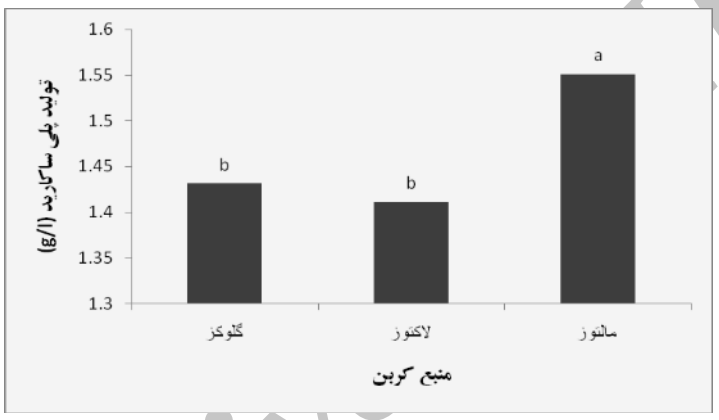


شکل ۱- رشد توده میسلیومی در کشت غوطه‌ور قارچ گانودرما

Archive of SID
www.SID.ir



شکل ۲- اثر نوع منبع کربن بر وزن خشک میسلیوم قارچ گانودرما



شکل ۳- اثر نوع منبع کربن بر تولید پلی‌ساکارید برون سلولی قارچ گانودرما

منابع مورد استفاده

- Bae, J.T., Sinha, J., Park, J.P., Song, C.H. and Yun, J.W., 2000. Optimization of submerged culture conditions for exo-biopolymer production by *Paecilomyces japonica*. Journal of Microbiology and Biotechnology, 10: 482-487.
- Chang, S.T. and Buswell, J.A., 1999. *Ganoderma lucidum* (Curt.: Fr.) P. Karst. (aphyllophoromycetideae) - a mushrooming medicinal mushroom. International Journal Medicinal Mushrooms, 1: 139-146.
- Chen, A.W., 1996. A practical guide for synthetic-log cultivation of medicinal mushroom *Grifola frondosa* (Dich. Fr) S.Fr.Gray (Maitake). International Journal Medicinal Mushrooms, 1: 153-168.
- Chen, J.H., Zhang, L.N., Yu, D.S. and Zhu, R.P., 2000. Chemical components and solution properties of a glycan-protein complex from *Ganoderma lucidum* mycelium. Chemical Journal of Chinese Universities, 21: 964-968.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. and Smith, F., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Analytical Chemistry, 28: 350-356.
- Fang, Q.H. and Zhong, J.J., 2002a. Submerged fermentation of higher fungus *Ganoderma lucidum* for production of valuable bioactive metabolites-ganoderic acid and polysaccharide. Biochemical Engineering Journal, 10: 61-65.
- Fang, Q.H. and Zhong, J.J., 2002b. Effect of initial pH on production of ganoderic acid and polysaccharide by submerged fermentation of *Ganoderma lucidum*. Process Biochemistery, 37: 769-774.
- Gao, Y., Lan, J., Dai, X., Ye, J. and Zhou, S.H., 2004. A phase I/II study of Ling Zhi mushroom *Ganoderma lucidum*. (W. Curt.: Fr.) Lloyd (Aphyllophoromycetideae) extract in patients with type II diabetes mellitus. International Journal of Medicinal Mushrooms, 6(1): 33-40.
- Haak-Frendscho, M., Kino, K., Sone, T. and Jardieu, P., 1993. Ling Zhi-8: a novel T cell mitogen induces

Archive of SID

www.SID.ir

- Ogbe, A.O., 2008. The use of *Ganoderma lucidum* in improvement of antibody response to infectious bursal disease vaccination and treatment of caecal coccidiosis in chickens. PhD. Dissertation, Department of Veterinary Surgery and Medicine, Ahmadu Bello University, Zaria, Nigeria.
- Peng, X., Zhong,Y.D., Zhu, Q., Chang, X.Z. and Zhang, K.C., 2008. Improved production of mycelial biomass and ganoderic acid by submerged culture of *Ganoderma lucidum* SB97 using complex media. Enzyme and Microbial Technology, 42: 325-331.
- Smith, J., Rowan, N. and Sullivan, R., 2002. Medicinal mushroom: a rapid developing area of biotechnology for canser therapy and other bioactivities. Biotechnology Letters, 24: 1839-1845.
- Stamets, P., 2000. Growing Gourmet and Medicinal Mushrooms, 3rd Ed., 355-369, Ten Speed Press: CA, USA, 552p.
- Tang,Y.J. and Zhong, J.J., 2002. Fed-batch fermentation of *Ganoderma lucidum* for hyperproduction of polysaccharide and ganoderic acid. Enzyme and Microbial Technology, 31: 20-28.
- Wasser, S.P., 2002. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. Applied Microbiology and Biotechnology, 60: 258-274.
- Wasser, S.P. and Weis, A.L., 1999. Medicinal properties of substances occurring in higher *basidiomycetes* mushrooms: current perspectives (Review). International Journal of Medicinal Mushrooms, 1: 31-62.
- Wasser, S.P., Didukh, M.Y., Amazonas, M.A., Nevo, E., Stamets, P. and da Eira, A.F., 2002. Is a widely cultivated culinary-medicinal Royal Sun *Agaricus* (the Himematsutake mushroom) indeed *Agaricus blazei* Murrill. International Journal of Medicinal Mushrooms, 4: 267-290.
- Yang, F.C., Ke, Y.F. and Kuo, S.S., 2000. Effect of fatty acids on the mycelia growth and polysaccharide formation by *Ganoderma lucidum* in shake flask cultures. Enzyme and Microbial Technology, 27: 295-301.
- Yang, F.C. and Liao, C.B., 1998. Effects of cultivating conditions on the mycelial growth of *Ganoderma lucidum* in submerged flask cultures. Bioprocess and Biosystems Engineering, 19: 233-236.
- Zhong, J.J., Fang, Q.H. and Tang, Y.J., 2002. Enhanced production of valuable metabolites in submerged cultures of medicinal mushroom *Ganoderma lucidum* by manipulation of oxygen supply. Journal of Plant Biotechnology, 4: 109-115.
- Zhou, S. and Gao, Y., 2002. The immunomodulating effects of *Ganoderma lucidum* (Curt.:Fr.) P. Karst. (Ling Zhi, Reishi mushroom) (Aphyllophoromycetideae). International Journal of Medicinal Mushrooms, 4: 1-11.
cytokine production and upregulation of ICAM-1 expression. Cell Immunology, 150: 101-113.
- Hatvani, N., 2001. Antibacterial effect of the culture fluid of *Lentinus edodes* mycelium grown in submerged liquid culture. International Journal of Antimicrobial Agents, 17: 71-74.
- Hughes, D.H., Lynch, D.L. and Somers, G.F., 1958. Chromatographic identification of the amino acids and carbohydrates in cultivated Mushroom. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 6: 850-853.
- Kadiri, M., 1990. The Physiological studies of some Nigerian mushrooms, PhD. Thesis, University of Ibadan, Nigeria.
- Kim, H.W. and Kim, B.K., 1999. Biomedicinal triterpenoids of *Ganoderma lucidum* (Curt.:Fr.) P. Karst. (Aphyllophoromycetideae). International Journal of Medicinal Mushrooms, 1: 121-138.
- Kim, H.M., Paik, S.Y., Ra, K.S., Koo, K.B., Yun, J.W. and Jang Won Choi, W.W., 2006. Enhanced Production of Exopolysaccharides by Fed-batch Culture of *Ganoderma resinaceum* DG-6556. The Journal of Microbiology, 44: 233-242.
- Kim, S.W., Hwang, H.J., Park, J.P., Cho, Y.J., Song, C.H. and Yun, J.W., 2002. Mycelial growth and exo-biopolymer production by submerged culture of various edible mushrooms under different media. Letters in Applied Microbiology, 34: 56-61.
- Kim, S.W., Hwang, H.J., Xu, C.P., Sung, J.M., Choi, J.W. and Yun, J.W., 2003. Optimization of submerged culture process for the production of mycelial biomass and exo-polysaccharides by *Cordyceps militaris* C738. Journal Applied Microbiology, 94: 120-126.
- Knudsen, G.R. and Stack, J.P., 1991. Modeling growth and dispersal of fungi in natural environments. 625-645, In: Arora, D.K., Rai, B., Mukerji, K.G. and Knudsen, G.R., (Eds.), Handbook of Applied Mycology, vol. 1, Marcel, Dekker, New York, 733p.
- Lee, K.M., Lee, S.Y. and Lee, H.Y., 1999. Effect of ammonium phosphate on mycelial growth and exopolysaccharides production of *Ganoderma lucidum* in an air-lift fermenter. Journal of Microbiology and Biotechnology, 9: 726-731.
- Min, B.S., Gao, J.J., Nakamura, N. and Hattori, M., 2000. Triterpenes from the spores of *Ganoderma lucidum* and their cytotoxicity against meth-A and LLC tumor cells. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, Tokyo, 48: 1026-1033.
- Mizuno, T., 1999. The extraction and development of antitumoractive polysaccharides from medicinal mushrooms in Japan (review). International Journal of Medicinal Mushrooms, 1: 9–29.
- Mizuno, T., Sakai, T. and Chihara, G., 1995. Health foods and medicinal usages of mushrooms. Food Reviews International, 11: 69-81.

Archive of SID

www.SID.ir

Optimization of medium composition for efficient production of mycelial biomass and extracellular polysaccharides in the submerged culture of *Ganoderma lucidum*

M. Tavana[1*], M. Azizi[2], M. Farsi [3] and F. Baneshi[4]

1*- Corresponding author, MSc. Student, Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University Of Mashhad, Iran
E-mail: Tavana_maryam@yahoo.com
2- Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University Of Mashhad, Iran
3- Department of Biotechnology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University Of Mashhad, Iran
4- MSc. Student, Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University Of Mashhad, Iran

Received: October 2010 Revised: May 2011 Accepted: May 2011

Abstract

This study was aimed at optimizing the medium composition of *Ganoderma lucidum* in submerged culture for efficient production of mycelial biomass and extracellular polysaccharides (EPS). The effects of various carbon sources (glucose, lactose and maltose), carbon source concentration (40, 50 and 60 g/l) and medium pH (3.5, 4.5 and 5.5) were studied on the production of mycelial biomass and EPS at 29±1°C. The experimental was factorial on the basis of randomized complete blocks design with 3 replications. The results showed that the highest (8.588 g DW/l) and the lowest (4.953 g DW/l) mycelial biomass were obtained in medium containing maltose and glucose respectively. Also, among the carbon sources, the medium containing maltose produced the highest (1.551 g/l) polysaccharide but the lowest polysaccharide (1.41 g/l) was produced in medium contacting lactose. No significant differences were observed among the different concentrations of carbon sources and the pH of the medium in terms of mycelial biomass and polysaccharides production. Finally, comparing the different combination of submerged culture media of *Ganoderma lucidum* revealed that the best combination of carbon source and pH for mycelial biomass production was maltose with concentration of 50 g/l and pH=4.5, while maltose with concentration of 40 g/l and pH=5.5 was identified as the best combination for EPS production.

Key words: polysaccharide, carbon source, *Ganoderma lucidum*, maltose.

Archive of SID

www.SID.ir