

مطالعه سینتیک رشد و تولید کمپلکس کیتین - گلوکان در کشت غوطه‌ور قارچ دارویی گنودرما لوسیدوم

اکرم مرادی تنها^۱، اشرف السادات حاتمیان زارمی^{۱*}، بهمن ابراهیمی حسین زاده^۱، زهرا بیگم مختاری

حسینی^۲، سهیل کیانی راد^۲

^۱تهران، دانشگاه تهران، دانشکده علوم و فنون نوین، گروه مهندسی علوم زیستی
^۲سبزوار، دانشگاه حکیم سبزواری، دانشکده مهندسی نفت و پتروشیمی، گروه مهندسی شیمی

فصلنامه علمی - پژوهشی بین‌رشته‌ای

سال دوم، شماره ۱، نسخه ۱،

بهار ۱۳۹۷، صفحه ۴۳-۳۱

چکیده

گنودرما لوسیدوم یکی از شناخته‌شده‌ترین قارچ‌های دارویی جهان است. این قارچ حاوی مقادیر قابل توجهی از دگرگشته‌های ثانویه و پلی‌ساکاریدهای خارج و داخل سلولی است که هریک از آن‌ها مصرف دارویی و پزشکی بخصوصی دارند. کمپلکس کیتین-گلوکان (CGC) از پلی‌ساکاریدهای مهم این قارچ محسوب می‌شود. از بین ده محیط کشت متفاوت که مورد آزمایش قرار گرفت، محیط کشت دارای مقدار ۲۴ گرم در لیتر ((Potato Dextrose Broth) PDB و ۱ گرم در لیتر پپتون با میزان وزن خشک سلولی برابر ۱۱/۶ گرم در لیتر، مقدار CGC تولیدی برابر ۳/۲ گرم در لیتر و ۲۷/۶ درصد CGC در وزن خشک سلولی به‌عنوان محیط کشت مناسب انتخاب شد. برای مشخصه‌یابی CGC تولید شده آزمون FTIR و بررسی خاصیت ضدباکتریایی انجام شد. پروفیل زمانی رشد و تولید CGC به مدت ۲۰ روز به دست آمد و با استفاده از مدل رشد منطقی و لودکینگ-پایرت، ضریب ویژه رشد قارچ گنودرما لوسیدوم (μ_m) و نرخ بهره‌وری حجمی تولید محصول به ترتیب 0.5274 day^{-1} و $2/85 \text{ g CGC L}^{-1} \text{ day}^{-1}$ محاسبه شد. نتایج نشان داد که انطباق خوبی بین داده‌های تجربی رشد سلولی با مدل منطقی ($R^2=0.9679$) و داده‌های تجربی تولید CGC با مدل لودکینگ-پایرت ($R^2=0.9901$) وجود دارد. مدل سینتیکی ارائه شده می‌تواند راهنمایی موثر برای کنترل فرایند تخمیر در تولید صنعتی پلیمر ارزشمند CGC باشد.

واژه‌های کلیدی

گنودرما لوسیدوم
پلی‌ساکارید کیتین-گلوکان
کشت غوطه‌ور
مدل سینتیکی
قارچ دارویی

*مسئول مکاتبات:

hatamian_a@ut.ac.ir

مقدمه

در بین قارچ‌های دارویی مهم کشف شده توسط بشر، گنودرما لوسیدوم یکی از با ارزش ترین قارچ‌ها در طب سنتی است که در چین به نام Lingzhi، در ژاپن به نام Reishi و در کره با عنوان Youngzhi شناخته می‌شود [۱]. به تازگی طب نوین نیز به دلیل دارا بودن اثرات درمانی از جمله تنظیم سامانه ایمنی، ضد آترواسکلروز، ضد التهاب، ضد درد، ضد تومور، ضد باکتری، ضد دیابت، ضد رگ‌زایی، آنتی اکسیدانی و مهار رادیکال‌های آزاد و ضد پیری شروع به پذیرش محصولات طبیعی از طب سنتی چین (Traditional Chinese Medicine) از جمله این قارچ کرده است. امروزه بیشتر توجه محققین برجدا سازی ترکیبات دارویی فعال و درک سازوکار عمل آن‌ها از این قارچ دارویی است. این ترکیبات دارویی جدا سازی شده از اندام بارده و میسلیم شامل پلی ساکاریدها، تریترپن‌ها و استروئیدها، آلکالوئیدها، نوکلئوتیدها، لاکتون‌ها و اسیدهای چرب هستند [۲].

پلی ساکاریدهای قارچ گنودرما از مونوساکاریدهای گلوکز، مانوز، گالاکتوز، آرابینوز، زایلوز، فوکوز، رامنوز، گلوکورونیک اسید و گالاکورونیک اسید تشکیل شده است. مهم ترین پلی ساکارید فعال زیستی این قارچ، گونه β -۱-۳ و β -۱-۶ دی گلوکان است که از یک β -۱-۳ دی گلوکوپیرونان با ۱-۱۵ واحد از زنجیره جانبی β -۱-۶ مونوگلوکوزیل تشکیل شده‌اند [۳]. این ترکیبات وزن مولکولی بالایی دارند که منجر به افزایش حلالیتشان در آب و موثرتر بودن فعالیت ضد اکسیدانی آن‌ها می‌شود. بعضی از پلی ساکاریدهای نامحلول در آب هم خاصیت ضد توموری از خود نشان می‌دهند [۴]. گزارش شده است که در کل میزان پلی ساکاریدهای محلول در آب بیشتر از پلی ساکاریدهای نامحلول در آب است [۳]. از ترکیبات ضد توموری دیگر این قارچ می‌توان به گلیکوپروتئین‌ها (پلی ساکارید + پروتئین)، هتروپلی ساکاریدها و گانودران‌های A و B و C اشاره کرد [۵]. در اوایل دهه ۱۹۸۰ گلوکان‌های مختلفی از عصاره قارچ گنودرما به وسیله آب و قلیا استخراج شدند که

ترکیبات فعال زیستی بودند [۳]. پلی ساکاریدهای فعال زیستی از بازیدیوکراپ، بیومس میسلیم کشت شده در محیط مایع و به مقدار کمتر از محیط کشت جامد جدا شده‌اند [۹-۶].

کمپلکس کتین-گلوکان (CGC) از پلی ساکاریدهای خارج سلولی قارچ گنودرما لوسیدوم محسوب می‌شود. این کمپلکس، کوپلیمری است که در آن کتین که پلیمری از واحدهای ان-استیل گلوکز آمین (N-acetylglucosamine) است (دومین زیست پلیمر فراوان بعد از سلولز روی کره زمین، که در بی مهرگان دریایی، حشرات و دیواره سلولی برخی قارچ‌ها وجود دارد) با دو پیوند کووالانسی به بتاگلوکان (پلی ساکاریدی متشکل از واحدهای دی-گلوکز موجود در دیواره سلولی مخمرها و قارچ‌هاست) متصل شده است [۱۰]. با آب کافت CGC به راحتی می‌توان موادی از قبیل کتین، کیتوزان (حالت استیل زدوده شده کتین) و بتا گلوکان را به دست آورد [۱۱]. در کمپلکس کتین-گلوکان نسبت بین کتین به گلوکان متغیر است و این موضوع نه تنها به منبع آن بلکه به شرایط محیط کشت و گونه‌های قارچی نیز مربوط می‌شود. نمی‌توان از CGC به عنوان مخلوطی از دو پلی ساکارید یاد کرد که به وسیله پیوندهای ناپایدار هیدروژنی یا یونی به هم متصل شده‌اند؛ بلکه شواهد بسیاری برای پیوند کووالانسی بین کتین و گلوکان وجود دارد. خواص فیزیکی-شیمیایی بتاگلوکان با توجه به مشخصات ساختار اولیه مانند نوع پیوند، درجه شاخه‌زایی، وزن مولکولی و شکل فضایی مولکول متفاوت است. بسته به منبع طبیعی بتاگلوکان، آن‌ها ساختارهای شاخه‌جدايي را تشکیل می‌دهند. بتاگلوکان ترکیب زیست‌سازگار، زیست تخریب پذیر و جاذب زیستی است و فعالیت‌هایی مانند ترمیم زخم، ضد فساد، ضد پیری، ضد چروک، اثرات ضد جوش و محافظت در برابر اشعه ماورای بنفش دارد. کتین نیز پلی ساکاریدی است که در بافت‌های زیستی وجود دارد و به طور عمده در پوست ماهی، حشره و اسکلت خارجی قارچ‌ها یافت می‌شود [۱۲]. کمپلکس کتین-گلوکان دارای ویژگی‌های

هر دو ترکیب است. این ترکیب در آب نامحلول است اما یک ماده جاذب رطوبت بوده، در محیط‌های آبی و روغنی به صورت واضحی متورم می‌شود. اگر پودر ریز CGC در فاز آبی قرار داده شود با همگن‌سازی ساده در دمای اتاق به حالت تعلیقی درآمده و دارای pH خنثی است. CGC ماده پایدار زیستی بوده و هیچ‌گونه ماده افزودنی و نگه‌دارنده‌ای ندارد و به راحتی قابلیت ترکیب شدن با بسیاری از مواد را دارد و ترکیبات مفیدتری را ایجاد می‌کند [۱۲]. وزن مولکولی CGC خالص برابر با $(4/9 \times 10^5)$ دالتون، ضریب بلوری شدن ۵۰٪ و دمای نقطه تجزیه ۳۱۵ درجه سانتی‌گراد است [۱۳].

میشیک و همکاران در سال ۲۰۱۱ موفق به استخراج CGC از دیواره سلولی قارچ هم‌زیست در گل سنگ پلنتی‌گرا آفت و زاشدند [۱۴]. اردونز و همکاران در سال ۲۰۱۳ توانستند از قارچ آسپرژیلوس نایجر با استفاده از آب بحرانی، کتین و CGC استخراج کنند. باربارا چاگاس و همکاران در سال ۲۰۱۴ ضمن استخراج CGC از مخمر پیچیا پاستوریس، با تغییراتی در محیط کشت این مخمر مانند pH و دما، اثرات این تغییرات را روی تولید CGC بررسی کردند [۱۵]. محققان دیگری نیز توانسته‌اند تاکنون از منابع میکروبی مختلفی مانند آسپرژیلوس آلیاسئوس (*Aspergillus Aliasceus*)، لنتینوس ادودنس، شیزوفیلوم کمون (*Schizophyllum Commune*)، قارچ میکوتالوس (*Mycothallus*)، کمپلکس کتین-گلوکان را استخراج کنند [۱۶-۱۸]. در سال ۲۰۱۴ آردیانیتاز منبع پیچیا پاستوریس، ماده زیستی CGC را استخراج کرده و زخم‌پوشی با ساختار ژل و فیلم تهیه کرد.

حضور فراوان قارچ‌ها در طبیعت، رشد سریع میسیلیوم قارچی، ترکیب نشدن CGC قارچی با پروتئین و کم بودن مقدار کربنات موجود در میسیلیوم‌های قارچی باعث کاهش هزینه‌های استخراج CGC از قارچ می‌شود. دلایل مذکور و همچنین کمتر بودن ساختار بلوری در CGC قارچی و تولید آسان‌تر مشتقات شیمیایی آن، باعث شده‌است که پژوهشگران از قارچ‌ها به‌عنوان منبع CGC تجاری برای مطالعات زیست‌فناوری استفاده

کنند [۱۹]. اعتقاد بر این است که این کمپلکس نقشی کلیدی در رشد و نمو دارد. فتوفیلووا و همکاران در مطالعه‌ای که برای اولین بار در سال ۲۰۰۶ انجام دادند، توانستند اطلاعاتی درباره تغییر محتوا و ترکیب CGC در طی نمو آسکومیست‌ها در کشت سطحی و غوطه‌ور به دست آورند. این مطالعه نشان داد که ترکیب و محتوای کتین و گلوکان به طور واضح به مرحله نمو قارچ بستگی دارد و بیش‌ترین مقدار تولید CGC در کشت مایع میسیلیوم در محیط اسیددوست مشاهده شده است. در CGC حاصل، میزان گلوکان بیشتر از کتین است که نشان می‌دهد مقدار و ترکیب CGC به فشار عملکردی محیط کشت بستگی دارد [۲۰]. طراحی فرایندهای تولید محصولات زیستی با استفاده از سویه‌های مختلف قارچ، مستلزم آگاهی از سینتیک رشد و تولید این ریزجانداران است. کنترل فرایند و حل مشکلات در فرایند تخمیر با استفاده از مدل ریاضی و مدل‌های سینتیکی تولید محصول، بسیار مورد علاقه صنعت زیستی است. معادلات مکعب ریشه و منطقی برای مدل سینتیکی برای رشد قارچ استفاده شده است [۲۱]. معادله لودکینگ-پای‌رت به‌طور گسترده‌ای برای نشان دادن رابطه رشد سلولی و محصول سنتز شده مانند پیش‌بینی تولید اسیدگلوکونیک توسط آسپرژیلوس نایجر [۲۲]، کنترل تولید لیپاز توسط ریزوپوس اریزوس [۲۳]، تولید پروماتیلیناز قارچ پلوروتوس موتیلیس و پلی‌ساکارید خارج سلولی از قارچ دارویی شیتاکه [۲۴] استفاده شده است. فنگ و همکاران [۲۵] مدل‌سازی فرایند کشت مایع غوطه‌ور شده قارچ گنودرما لوسیدوم را با هدف پیش‌بینی سینتیک غلظت‌های سلولی، گلوکز و تری‌ترین‌ها در اثر حضور نیتروژن انجام دادند. نتایج نشان می‌دهد که رشد سلولی و تشکیل تریترین‌ها را می‌توان به صورت معادلات ریاضی با استفاده از مدل‌های سینتیک غیرساختاری توصیف کرد. در این مدل‌ها، متغیرهای مدل با استفاده از داده‌های تجربی به دست می‌آید. مدل‌سازی ریاضی فرایند برای تجاری‌سازی فرایند بسیار مفید است.

هدف از این پژوهش بررسی انواع محیط کشت با ترکیبات مختلف برای تولید میسلیوم و استخراج CGC بیشتر از قارچ بازیدیومیست دارویی گنودرما لوسیدوماست. پس از بررسی مشخصات ترکیب تولید شده مدل سینتیک رشد و تولید زیست پلیمر ارزشمند کیتین-گلوکان با استفاده از مدل منطقی و لودکینگ-پای رت به دست آمد.

مواد و روش ها

کشت قارچ گنودرما لوسیدوم

قارچ *Ganoderma lucidum* CCGMC 5.616 از بانک میکروبی دانشگاه فردوسی مشهد تهیه شد و در محیط ((Potato Dextrose Agar) PDA)) خریداری شده از شرکت Merck آلمان کشت داده و در دمای 30°C به مدت یک هفته در انکوباتور (۴۰۰۰ IKA-KS ساخت آلمان) قرار داده شد.

بررسی انواع محیط کشت برای افزایش تولید مقدار توده زیستی و CGC

پرنه ای به قطر ۵ mm از محیط کشت جامد در شرایط

سترون به ارلن های حاوی ۳۰ ml محیط کشت منتقل شد و مدت ۵ روز در لرزاننده با دمای 28°C و دور ۱۸۰ rpm و در شرایط تاریکی، گرمخانه گذاری شد. سپس یک میلی لیتر از محیط کشت حاوی اسپور برداشته و در ارلن حاوی ۳۰ ml محیط کشت تازه ریخته و به مدت ۳ روز در شیکر انکوباتور با دمای 28°C و دور ۱۸۰ rpm گرمخانه گذاری شد. از مایه تلقیح به دست آمده برای مراحل بعدی کار استفاده شد. برای به دست آوردن ترکیب محیط کشت بهینه به منظور تولید بیشترین مقدار توده زیستی و CGC، با مطالعه مقالات مختلف در زمینه تولید پلی ساکاریدها ده محیط کشت انتخاب شد (جدول ۱). پس از استریل کردن محیط های کشت مختلف ۶% مایه تلقیح اضافه شد و در دمای 28°C ، دور ۱۸۰ rpm و به مدت ۱۴ روز، گرمخانه گذاری شد. آزمایش با ۳ بار تکرار انجام شد. توده زیستی قارچی با سانتریفیوژ کردن هر یک از محیط ها و خشک کردن آنها در خشک کن انجمادی به دست آمد.

استخراج CGC از قارچ گنودرما لوسیدوم

برای استخراج CGC از قارچ گنودرما لوسیدوم پس از

جدول ۱ ترکیب ده محیط کشت استفاده شده برای رشد گنودرما لوسیدوم و تولید CGC

شماره محیط کشت	ترکیب محیط کشت
۱	Glucose 70 g/l, KH_2PO_4 2.5 g/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.75 g/l
۲	Glucose 35 g/l, peptone 5 g/l, yeast extract 2.5 g/l, $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1g/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g/l, vitamin B1 0.05 g/l
۳	Glucose 20 g/l, soybean powder 5 g/l, KH_2PO_4 3 g/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2 g/l
۴	Glucose 40 g/l, Peptone 4 g/l, yeast extract 2 g/l, KH_2PO_4 1.5 g/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.75 g/l, vitamin B1 0.01 g/l
۵	Glucose 10 g/l, Malt extract 5 g/l, potato dextrose(synthetic) 24 g/l, casein 1 g/l
۶	NaCl 0.025 g/l, Malt extract 5 g/l, Casein 1 g/l, $[\text{NH}_4]_2\text{HPO}_4$ 0.25 g/l, KH_2PO_4 0.5 g/l, FeCl_3 0.005 g/l, CaCl_2 0.05 g/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.15 g/l, Thiamin 0.1 g/l, Glucose 10g/l
۷	Potato 250 g/l, Glucose 15 g/l, Casein 1g/l
۸	Glucose 5 g/l, Casein 1 g/l, Yeast Extract 1 g/l, KH_2PO_4 0.1g/l
۹	Yeast Extract 10 g/l, Pepton 5 g/l, Glucose 10g/l
۱۰	PDB 24g/l, Pepton 1g/l

FTIR بر روی آن‌ها انجام شد. طیف‌سنجی مادون قرمز، ابزاری قدرتمند برای مطالعات زیستی است. امکان استفاده از FTIR برای انواع نمونه‌ها در حالت‌های مختلف فیزیکی وجود دارد. در این روش با بررسی جذب و پراکندگی‌های حاصل از جهش‌های ارتعاشی مولکول‌ها و یون‌های چند اتمی ترکیبات شیمیایی، ساختار و گروه‌های عاملی آن‌ها مشخص می‌شود.

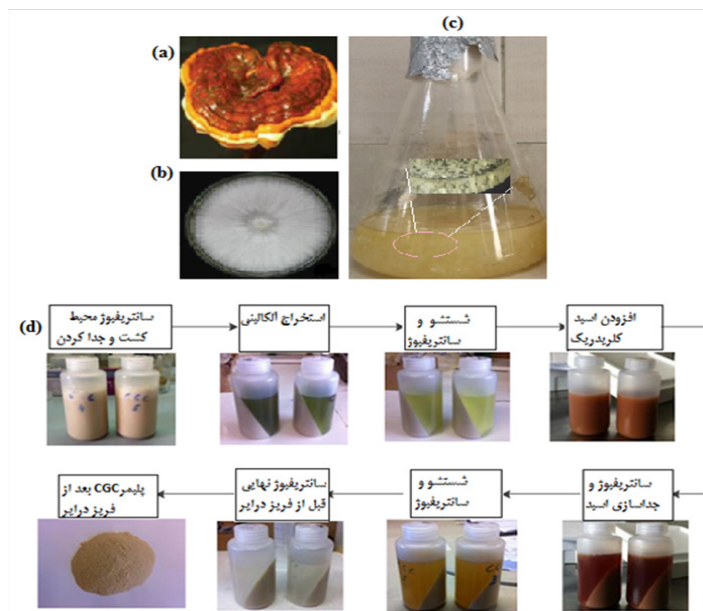
آزمون بررسی خاصیت ضدباکتریایی انتشار دیسکی

برای انجام آزمون حساسیت میکروبی از محیط کشت مولر هیتون آگار استفاده شد. این محیط از نظر شرایط محیطی مانند pH، غلظت کاتیون‌ها و مقدار تایمیدین توسط کارخانه سازنده استاندارد شده است. باکتری گرم منفی *E. coli* در محیط کشت به روش چمنی کشت داده شد به طوری که در همه جای پلیت، باکتری به صورت یکنواخت پخش شد. حداکثر تا پانزده دقیقه پس از تلقیح قطعات CGC فشرده شده و دیسک کنترل در شرایط استریل و با استفاده از پنس به صورت کاملاً

تخمیر در محیط مایع، نمونه‌ها با دور rpm ۱۰۰۰۰ به مدت ۱۰ min سانتریفیوژ شد. سپس مایع سوپ‌رویی را بیرون ریخته و توده زیستی قارچ جدا شد. در مرحله اول به مقدار سوپ‌رویی دور ریخته شده از محلول NaOH ۵ مولار برای شکستن و تغییر ساختار پروتئین‌های سلولی، بر روی توده زیستی قارچی ریخته شد و به مدت دو ساعت در حمام آب گرم گذاشته شد. پس از خنک شدن محلول، آن را سانتریفیوژ کرده و رسوب حاصل با آب بدون یون دو بار شستشو داده شد. در مرحله بعدی به رسوب حاصل، محلول ۱ مولار HCl اضافه شد و مجدد سانتریفیوژ شد. رسوب را به همان روش قبلی دو بار با آب بدون یون شستشو داده و سرانجام رسوب به دست آمده به وسیله دستگاه خشک‌کن انجمادی در دمای (۵۰°C- به مدت ۴ روز خشک شد (شکل ۱).

بررسی ساختار شیمیایی توسط طیف‌سنجی مادون قرمز FTIR بر روی CGC قارچ گنودرما لوسیدوم

پس از تولید CGC از قارچ گنودرما لوسیدوم، آزمون



شکل ۱ تصویر (a) جسم میوه‌ای گنودرما لوسیدوم؛ (b) کشت جامد روی محیط PDA؛ (c) محیط کشت مایع و (d) مراحل استخراج کمپلکس کیتین-گلوکان از قارچ گنودرما لوسیدوم.

تخت بر روی سطح آگار قرار داده شد. به مدت ۱۸ تا ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد داخل انکوباتور قرار گرفت.

بررسی متغیرهای سینتیکی رشد و تولید CGC برای قارچ گنودرما لوسیدوم

برای به دست آوردن منحنی رشد گنودرما و همچنین ارتباط بین مصرف میزان کربن کل محیط کشت با مقدار توده زیستی و CGC به دست آمده از محیط کشت منتخب (محیط شماره ۱۰) استفاده شد. بدین منظور گنودرما لوسیدوم در شرایط ۲۸°C و ۱۸۰ rpm رشد داده شد و از روز صفر تا روز بیستم هر دو روز، یک بار نمونه گیری انجام شد. پس از ساتریفیوژ کردن نمونه ها، رسپ رویی برای سنجش کربن کل نگه داری شد. رسوب حاصل ابتدا با روش انجمادی خشک شد تا میزان توده زیستی به دست آید، سپس مراحل استخراج CGC روی آنها انجام شد و دوباره با خشک کن انجمادی خشک و میزان CGC خشک ثبت شد.

معادله منطقی برای انطباق با منحنی توده زیستی سلولی مورد استفاده قرار گرفت. این معادله، مدلی مستقل از سوبسترا است و به عنوان مدل بدون ساختار به طور گسترده برای توضیح رشد سلولی استفاده می شود:

$$dC/dt = \mu_m (1 - C/C_m) C \quad \text{معادله ۱:}$$

در معادله C توده زیستی سلولی (برحسب گرم بر لیتر)، μ_m حداکثر سرعت رشد ویژه (برحسب day^{-1}) و C_m حداکثر میزان غلظت توده زیستی سلولی به دست آوردنی (برحسب گرم بر لیتر) است. مدل لودکینگ-پایرت برای منحنی تولید CGC استفاده شد. این معادله به طور گسترده برای پیش بینی متابولیت ها استفاده می شود.

$$(dP)/dt = \alpha (dC)/dt + \beta C \quad \text{معادله ۲:}$$

در اینجا P غلظت کمپلکس کتین گلوکان (برحسب

گرم بر لیتر)، C میزان توده سلولی (برحسب گرم بر لیتر)، α برحسب β ، $(g \times g^{-1})$ (برحسب $(g \times h)^{-1}$) مقدارهای ثابت هستند. این مدل، تجربی (آزمایشی) بوده که در آن dC/dt ، میزان تولید کمپلکس کتین گلوکان را نسبت به سرعت رشد نشان می دهد و C نشان دهنده تولید کمپلکس کتین گلوکان بدون توجه به رشد است. بهره وری حجمی CGC یا r_p بر حسب $\text{day}^{-1}g$ از طریق معادله زیر محاسبه می شود.

$$r_p = \Delta P / \Delta t \quad \text{معادله ۳:}$$

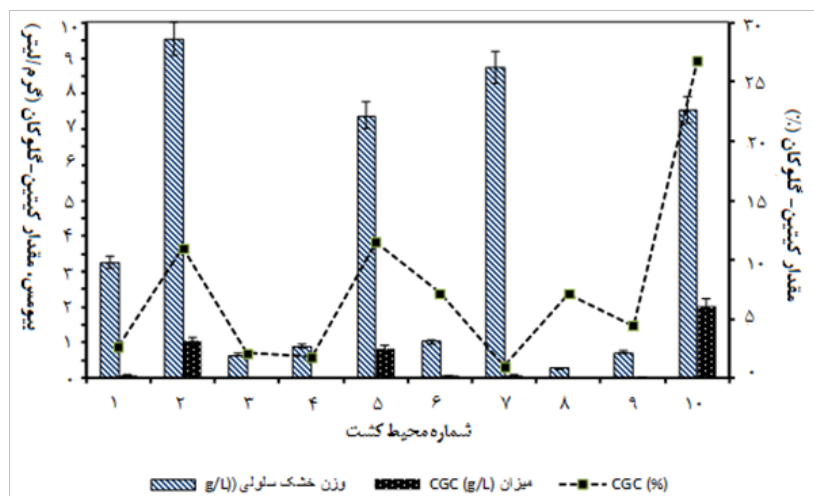
ΔP با تولید CGC بر حسب g/l در مدت زمان Δt بر حسب روز و CGC% با مقدار CGC بر حسب g در مقدار توده زیستی بر حسب g (wt %) برابر است.

$$\Delta P = CDW \times CGC\% \quad \text{معادله ۴:}$$

بررسی انواع محیط کشت برای تولید CGC

با مقایسه مقدار وزن خشک توده زیستی و CGC حاصل درده محیط کشت مختلف، بهترین محیط کشت انتخاب شد. همان طور که در شکل ۲ نیز مشخص شده است، از میان ده محیط کشت، محیط کشت های شماره ۲، ۵، ۷ و ۱۰ بیشترین وزن خشک سلولی را داشتند که محیط کشت شماره ۲ و ۱۰ به ترتیب بیشترین مقدار را به خود اختصاص داده و مقدار تولید CGC نیز در آنها از سایر محیط های کشت، بیشتر است. این دو محیط کشت برای کشت مجدد و تکرار آزمایش انتخاب شدند و دوباره کشت قارچ گنودرما در آنها انجام شد. میزان تولید توده قارچی در محیط ۱۰ برابر $7/54 \text{ g/l}$ ، میزان CGC برابر $2/02 \text{ g/l}$ و درصد وزنی CGC در توده قارچی خشک برابر با $26/8\%$ و برای محیط ۲ این مقادیر به ترتیب برابر با $9/54 \text{ g/l}$ ، $1/05 \text{ g/l}$ و 11% به دست آمد.

محیط ۱۰ با ترکیب 24 g/l از پودر PDB و 1 g/l از پودر پیتون، بهترین محیط کشت برای به دست آوردن بیشترین مقدار CGC از قارچ گنودرما لوسیدوم است.



شکل ۲ مقایسه بین وزن خشک سلولی g/l، میزان CGC g/l، درصد CGC در ده محیط کشت مختلف.

به حضور پیوند بتا است. علاوه بر این، پیوندهای ۱۰۳۹، ۱۰۷۶، ۱۱۵۹ و 1120 cm^{-1} به حضور پیوندهای بتا (۱،۶) گلوکان اشاره می‌کند [۲۷،۲۶].

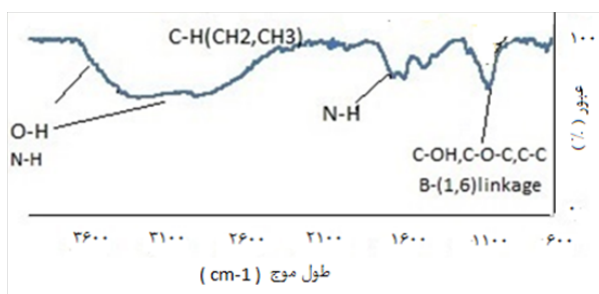
آزمون خاصیت ضدباکتریایی انتشار دیسکی

خاصیت ضدباکتریایی پودر CGC به صورت فشرده نیز بررسی شد. شکل ۴ نتیجه آزمون ضد باکتریایی روش انتشار دیسکی را نشان می‌دهد. همانطور که در شکل ۴ مشاهده می‌شود هاله ایجاد شده در حاشیه پودر CGC نشان‌دهنده فعالیت ضدباکتریایی آن است. حضور گلوکان در کمپلکس کتین-گلوکان فعالیت ضدباکتریایی

همان‌طور که نمودار فوق نشان می‌دهد در محیط‌های شماره ۲ و ۵ برخلاف اختلاف محسوس بین داده‌های وزن خشک سلولی، درصد تولید CGC در هر دو تقریباً مساوی است. از طرفی در محیط شماره ۷ علی‌رغم میزان وزن خشک سلولی بالا، درصد تولید CGC بسیار ناچیز است و گمان می‌رود که بالا بودن وزن خشک سلولی مربوط به سایر متابولیت‌های قارچی باشد. در سایر محیط‌ها هم میزان توده قارچی و هم تولید CGC هر دو کم هستند. محیط شماره ۱۰ با وجود سادگی توانسته است عوامل لازم برای تولید CGC را تأمین کرده و درصد بالاتری از CGC را تولید کند.

تحلیل داده‌های FTIR

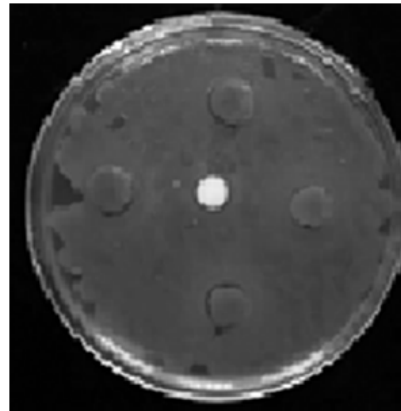
پس از ترسیم منحنی برخی از گروه‌های عاملی مهم، قله‌ها در شکل ۳ مشخص شده‌اند. پیوندهای جذبی در محدوده 1650 ، 1552 و 1376 cm^{-1} به علت حضور گروه‌های آمیدی، نشان‌دهنده کتین هستند. حضور گلوکان و ترکیبات کیتوزان با حضور پیوندهای جذبی در محدوده 2800 تا 3400 ، 1020 و 1160 cm^{-1} مشخص می‌شود. پیوندهای ذکر شده به علت حضور گروه‌های C-H ، C-O ، N-H ، O-H است که هم در کتین و هم در گلوکان وجود دارد. پیوندهای محدوده 854 cm^{-1} مربوط



شکل ۳ طیف FTIR مربوط به کمپلکس کتین-گلوکان از قارچ گنودرما لوسیدم

در بازه زمانی ذکر شده به صورت نمودار سه عاملی ترسیم شد.

شکل ۵ نشان می‌دهد که بیشترین مقدار تولید وزن خشک سلولی و CGC در محدوده زمانی ۱۲ تا ۱۴ روز است و مقدار CGC، ارتباط مستقیم با میزان توده زیستی دارد. بر اساس منحنی‌های به دست آمده مشخص شد که از روز صفر تا روز ۱۱ فاز لگاریتمی رشد، از روز ۱۳ تا ۱۷ فاز سکون و از روز ۱۸ به بعد فاز مرگ آغاز می‌شود. نکته جالب توجه این‌که در روز ۱۸ که پایان فاز سکون است بیشترین مقدار CGC به دست آمد و این بدان معناست که اگرچه رشد سلولی متوقف شده‌است ولی تولید CGC هنوز ادامه دارد. بنابراین برای تولید بیشتر CGC نیاز است که زمان رشد قارچ را به ۱۷-۱۸ روز افزایش داد.



شکل ۴ آزمون ضدباکتریایی پودر فشرده CGC در برابر باکتری گرم منفی *E.coli*

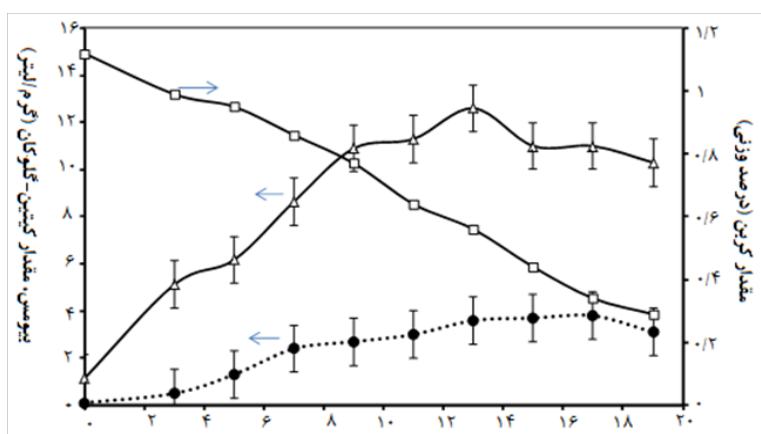
قوی ایجاد می‌کند.

منحنی رشد قارچ گنودرما لوسیدوم و تولید CGC

پس از کشت قارچ گنودرما لوسیدوم در بازه زمانی بیست روزه درون محیط کشت بهینه به دست آمده و سنجش میزان کربن کل محیط پس از جداسازی سلول‌های قارچی از آن، مقدار مصرف کربن در طول مدت رشد معین شد و ارتباط بین میزان وزن خشک سلولی، CGC استخراج شده و مقدار کل کربن محیط

بررسی متغیرهای سینتیکی رشد و تولید CGC برای قارچ گنودرما لوسیدوم

در شکل ۵ تغییرات وزن خشک سلولی (CDW) با نماد C و میزان کمپلکس کتین-گلوکان به عنوان محصول تولیدی با نماد p برای قارچ گنودرما لوسیدوم نسبت به زمان در بازه زمانی ۱۹ روز نشان داده شده است. نرخ بهره‌وری حجمی تولید محصول (r_p) از معادله



شکل ۵ تغییرات زمانی رشد میسلیوم، تولید کمپلکس کتین-گلوکان و میزان مصرف کربن آلی در محیط کشت قارچ گنودرما لوسیدوم، منحنی تولید CGC (●)، منحنی مصرف کربن (□)، منحنی رشد میسلیوم (Δ).

خود رسیدند. از معادله منطقی مستقل از سوبسترا برای شبیه سازی تغییرات در توده سلولی و از معادله لودکینگ-پایرت برای شبیه سازی غلظت های CGC تولید شده استفاده شد که فرمول (۱) به صورت زیر نوشته شده است:

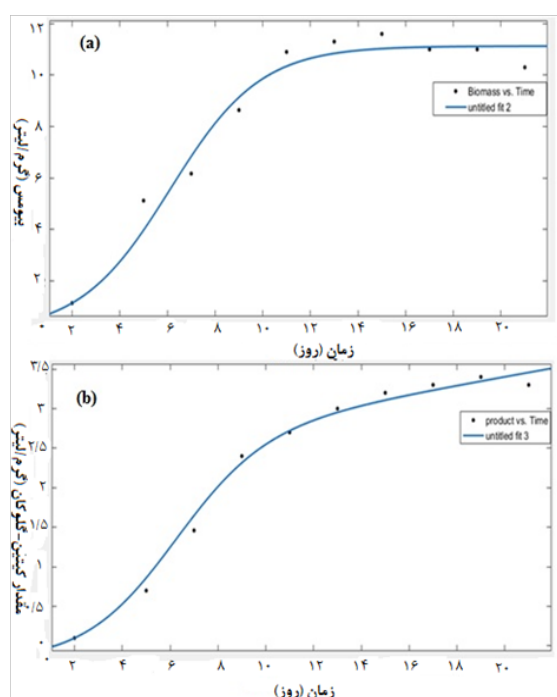
$$C(t) = C_m / (1 + ((C_m / C_0) - 1) e^{-\mu t}) \quad \text{معادله ۵}$$

معادله (۵) درون معادله (۲) به صورت زیر جایگزین شد:

معادله ۶:

$$P(t) = P_0 + \alpha [C(t) - C_0] + \beta C_m \{ \ln [C_0 / C(t)] + \mu_m t \} / \mu_m$$

با تطابق داده های تجربی با مدل های منطقی و لودکینگ-پایرت (معادله ۵ و ۶) مقادیر ثابت این معادلات به دست آمد که در جدول شماره ۲ آمده است. با تطبیق داده های تجربی، رشد قارچ گنودرما با مدل منطقی



شکل ۶ داده های آزمایشگاهی و منحنی رگرسیون (a) توده زیستی و (b) تولید CGC در شکل میسلیومی تخمیر قارچ گنودرما لوسیدوم (۰) داده های آزمایشگاهی و (-) منحنی رگرسیون.

۳ برابر با $2/85 \text{ g CGC L}^{-1} \text{ day}^{-1}$ محاسبه شد. چاگاس و همکاران در سال ۲۰۱۴ نرخ بهره وری محصول CGC از مخمر پیچیا پاستوریس (*Komagataella Pastoris*) را با بهینه سازی تولید CGC در محدوده $2/53 - 4/031 \text{ g CGC L}^{-1} \text{ day}^{-1}$ گزارش کردند. نتایج نشان داد که بهینه سازی دو متغیر دما و pH بر روی شرایط رشد و تولید محصول، موجب افزایش ضریب ویژه رشد (μ_m) تا h^{-1} ۰/۱۸ می شود [۱۵].

قارچ ها شکل های مختلفی را در محیط کشت غوطه ور از خود نشان می دهند. آن ها عمدتاً به شکل رشته های میسلیومی پراکنده (فیلامنتوس) و توده های درهم بافته حجیم (پلت ها) هستند. این شکل ها بر رشد و تولید متابولیت ها تأثیر می گذارند. در سال ۲۰۰۲ پارک و همکاران دریافتند که پلت ها، شکل مناسب میسلیومی برای تولید پلیمرهای زیستی خارج سلولی توسط *Cordyceps Militaris* هستند [۲۸]، درحالی که لی و همکاران در تخمیر *Grifola Frondosa* رشته های میسلیومی راباعث افزایش عملکرد توده سلولی و پلیمرهای زیستی خارج سلولی دانستند [۲۹]. شکل پلت، معمولاً گرانروی کمتری نسبت به شکل رشته ای دارد که به ویژگی های مایع نیوتنی نزدیک است. شکل پلت به عنوان توده میسلیومی کروی غیرقابل رشد محسوب می شود که توسط پوسته بیرونی رشته های فعال احاطه شده است. قسمت های مرکزی شکل پلت احتمالاً به علت کمبود تغذیه ای اتولیز می شوند. در شکل رشته ای (فیلامنتوس)، تمام هیف ها در معرض محیط کشت قرار داشته و از این رو تمام آن ها توانایی کمک به رشد میسلیومی را داشته و نیازمند رشد سریع است. این باعث می شود که گرانروی محیط کشت بیشتر شده، به ویژگی های مایع شبه پلاستیکی نزدیک شود.

شکل ۶ میزان بازده توده سلولی و تولید CGC را در طول تخمیر نشان می دهد. بعد از فاز تأخیری (حدوداً ۱ روز)، میسلیوم وارد فاز نمایی شده و تولید CGC هم زمان با آن آغاز می شود. میزان توده سلولی در ۸-۱۰ روز و میزان تولید EPS نیز در همان زمان به بیشترین مقدار

جدول ۲ ضرایب سینتیکی رشد میسلیومی و تولید CGC

مقادیر	متغیرهای سینتیکی
۱/۱۴	C_0 (g/l)
۱۱/۱۳	C_m (g/l)
۰/۵۲۷۴	μ_m (day ⁻¹)
۰/۱	P_0 (g/l)
۰/۲۵۶۳	α (g×g ⁻¹)
۰/۰۰۴۸۸۱	β (g×(g×h) ⁻¹)

نتیجه گیری

قارچ گنودرما لوسیدوم یکی از قارچ‌های دارویی شناخته شده در جهان است. در حال حاضر متابولیت‌های مختلفی از قارچ گنودرما لوسیدوم استخراج شده و در زمینه‌های پزشکی، دارویی، آرایشی و بهداشتی مورد استفاده قرار می‌گیرد. کمپلکس کتین-گلوکان (CGC) از پلی‌ساکاریدهای مهم قارچ گنودرما لوسیدوم محسوب می‌شود. تاکنون استفاده‌های مختلفی از جمله به‌عنوان عامل بهبود زخم، فاکتور مقابله با چاقی و افزودنی غذایی به‌عنوان جاذب فلزات سنگین و رادیواکتیو از این ماده ارزشمند شده است. هدف از این مطالعه، انتخاب محیط کشت مناسب برای تولید CGC بیشتر است. از بین ده محیط کشت متفاوت که مورد آزمایش قرار گرفت محیط کشت با ترکیب ۲۴ گرم در لیتر PDB و ۱ گرم در لیتر پیتون با میزان وزن خشک سلولی برابر ۱۱/۶ گرم در لیتر، مقدار CGC تولیدی برابر ۳/۲ گرم در لیتر و ۲۷/۶ درصد CGC در وزن خشک سلولی، به‌عنوان محیط کشت بهینه انتخاب شد.

با رسم منحنی رشد قارچ و تولید CGC، ضریب ویژه رشد قارچ گنودرما لوسیدوم (μ_m) برابر با ۰/۵۲۷۴ day⁻¹ به‌دست آمد و نرخ بهره‌وری حجمی تولید محصول، برابر با ۲/۸۵ g CGC L⁻¹ day⁻¹ محاسبه شد. مقایسه داده‌های تجربی با مدل‌های سینتیکی رشد و تولید محصول نشان داد که رشد قارچ گنودرما لوسیدوم

(معادله ۵) مقدار R^2 برابر با ۰/۹۶۹۹ به‌دست آمد که توافق بالایی داده‌های تجربی با مدل پیشنهادی را نشان می‌دهد. بنابراین رشد این قارچ در محیط بهینه به‌دست آمده به خوبی با مدل منطقی قابل بیان است. مقدار R^2 به‌دست آمده (۰/۹۹۵۴) برای تطبیق داده‌های تجربی تولید CGC توسط گنودرما لوسیدوم با مدل لودکینگ-پایرت (معادله ۶) نیز توافق بالایی مدل لودکینگ-پایرت را با داده‌های تجربی نشان می‌دهد. مقدار محاسبه شده C_m کم‌تر از داده به‌دست آمده از آزمایش (۱۱/۶ گرم در لیتر) بوده است. مقدار ثابت آلفای وابسته به رشد بیشتر از مقدار ثابت بتای مستقل از رشد بوده که به این معنی است که رابطه خطی بین توده سلولی و CGC وجود دارد و در نتیجه تولید CGC وابسته به رشد است. نتایج نشان داد که شرایط تخمیر ایجاد شده باعث فراهم کردن اکسیژن با هوادهی موثر و نگه داشتن محیط کشت در حالت مخلوط است. میسلیوم‌ها به‌طور موثرتری پراکنده شده‌اند و در نتیجه، شکل رشته‌ای (فیلامنتوس) میزان تولید بیشتری در زمان چرخه سلولی کوتاهتری با سرعت رشد ویژه حداکثری تولید توده سلولی ($\mu_m = 0/5274$) داشته است. مدل سینتیکی می‌تواند برای کنترل سامانه تخمیر گنودرما لوسیدوم، از جمله تعیین مدت دوره تولید میسلیومی و پیش‌بینی فرایند استفاده شود. به هر حال، ضریب‌های سینتیکی بسته به شرایط فرایند در تخمیر خاص، متفاوت خواهد بود.

سینتیکی ارائه شده می تواند راهنمایی موثر برای کنترل پیشرفته در فرایند تخمیر برای تولید صنعتی متابولیت از قارچ دارویی گنودرما لوسیدوم باشد.

در محیط بهینه تعیین شده از مدل منطقی و سینتیک تولید CGC از مدل لودکینگ-پایرت پیروی می کند. داده های به دست آمده در این پژوهش نشان داد که بین تولید توده سلولی و CGC رابطه خطی وجود دارد. مدل

مراجع

- 1- Chen Y., Xie M.Y., Li W.J., Zhang H., Nie S.H., Wang Y., Li C.H., An Effective Method for Deproteinization of Bioactive Polysaccharides Extracted from Lingzhi (*Ganoderma atrum*), Food Sci. Biotechnol., 21, 191-198, 2012.
- 2- Shi L., Ren A., Mu D., Zhao M., Current Progress in the Study on Biosynthesis and Regulation of Ganoderic acid, Appl. Microbiol. Biotechnol., 88, 1243-1251, 2010.
- 3- Paterson R. R. M., *Ganoderma*—a Therapeutic Fungal Biofactory, Phytochemistry, 67, 1985–2001, 2006.
- 4- Wang G. Zhang J., Mizuno T., Zhuang C., Ito H., Mayuzumi H., Antitumor Active Polysaccharides from the Chinese Mushroom Songshan Lingzhi, the Fruiting Body of *Ganoderma Tsugae*, Biosci. Biotechnol. Biochem., 57, 894–900, 1993.
- 5- Lin S B., Li C H., Lee S S., Kan L S., Triterpene-enriched Extracts from *Ganoderma Lucidum* Inhibit Growth of Hepatoma Cells via Suppressing Protein Kinase C, Activating Mitogen-activated Protein Kinases and G2-phase Cell Cycle Arrest, Life Sci., 72, 2381–2390, 2003.
- 6- Kim S., Hwang H., Xu C., Sung J., Choi J., Yun J., Optimization of Submerged Culture Process for the Production of Mycelial Biomass and Exopolysaccharides by *Cordyceps Militaris* C738, J. Appl. Microbiol., 94, 120–126, 2003.
- 7- Bao X. F., Zhen Y., Ruan L., Fang J.N., Purification, Characterization, and Modification of T Lymphocyte-stimulating Polysaccharide from Spores of *Ganoderma Lucidum*, Chem. Pharm. Bull., 50, 623–629, 2002.
- 8- Zhang H.N. and Lin Z.B., Hypoglycemic Effect of *Ganoderma Lucidum* Polysaccharides, Acta Pharmacol. Sin., 25, 191–195, 2004.
- 9- Kim B K., Cho H Y., Kim J. S., Kim H. W., Choi E. C., Studies on Constituents of Higher Fungi of Korea (LXVIII). Antitumor Components of the Cultured Mycelia of *Ganoderma Lucidum*, Korean J. Pharmacol., 24, 203–212, 1993.
- 10- Nwe N., Stevens W.F., Tokura S., Tamura H., Characterization of Chitosan and Chitosan–glucan Complex Extracted from the Cell Wall of Fungus *Gongronella* Butleri USDB 0201 by Enzymatic Method. Enzyme Microb. Technol., 42, 242–251, 2008.
- 11- Roca C. Chagas B., Farinha I., Freitas F., Mafra L., Aguiar F., Oliveira R., Reisa M.A.M., Production of Yeast Chitin–glucan Complex from Biodiesel Industry Byproduct, Process. Biochem., 47, 1670–1675, 2012.
- 12- Gautier S., Pie G. E., Chitin–glucan, a Natural Cell Scaffold for Skin Moisturization and Rejuvenation, Int J Cosmet Sci., 30, 459–469, 2008.
- 13- Farinha I., Chitin–glucan Complex Production by *Komagataella Pastoris*: Downstream Optimization and Product Characterization, Carbohydr. Polym., 130, 455–464, 2015.
- 14- Meichik N. R., Vorob D. V., Chitin – Glucan Complex in Cell Walls of the *Peltigera Aphthosa* Lichen, Appl. Biochem. Microbiol., 48, pp. 307–311, 2012.
- 15- Chagas B., Farinha I., Galinha C. F., Freitas F., Reis M. A. M., Chitin-glucan Complex Production by *Komagataella (Pichia) pastoris*: Impact of Cultivation pH and Temperature on Polymer Content and Composition, N. Biotechnol., 31, 468–474, 2014.
- 16- Nwe N., Stevens W.F., Tokura S., Tamura H., Characterization of Chitosan and Chitosan–glucan Complex Extracted from the Cell wall of Fungus *Gongronella* Butleri USDB 0201 by Enzymatic Method. Enzyme Microb. Technol., 42, 242–251, 2008.
- 17- Smirnov D., Krcmar M., Prochazkova E V. A., Chitin-Glucan Complex Production by *Schizophyllum* Communes submerged Cultivation, 60, 223–228, 2011.
- 18- Gomez-Miranda B., Leal A.J., Extracellular and Cell Wall Polysaccharides of *Aspergillus Alliaceus*, Trans. Br. Mycol. Soc., 76, 249–253, 1981.
- 19- Vysotskaya M. R., Maslova G. V., Petrova V. A., Nud L.A., Electrochemical Recovery of Chitin – Glucan Complex from *Pleurotus Ostreatus* Basidial Fungus and Properties of the Product, Russ. J. Appl. Chem., 82, 1390–1395, 2009.
- 20- Feofilova E. P., Nemtsev D. V., Tereshina V. M., Memorskaya A. S., Developmental Change of the Composition and Content of the Chitin – Glucan Complex in the Fungus *Aspergillus Niger*, Appl. Biochem. Microbiol., 42, 624–628, 2006.
- 21- Znad H., Blazej M., Bales V., Markos J. A Kinetic Model for Gluconic Acid Production by *Aspergillus Niger*. Chem. Pap., 58, 23-8, 2004.
- 21- Rajendran A, Thangavelu V., Statistical Experimen-

- tal Design for Evaluation of Medium Components for Lipase Production by *Rhizopus Arrhizus* MTCC 2233, LWT-Food Sci. Technol., 42, 985-992, 2009.
- 22- Benkortbi O, Hanini S, Bentahar F., Batch Kinetics and Modelling of Pleuromutilin Production by *Pleurotus Mutilus*, Biochem. Eng. J., 36, 14-8.2007.
- 23- Feng YL, Li WQ, Wu, XQ, Cheng, JW, Ma SY. Statistical Optimization of Media for Mycelial Growth and Exo-polysaccharide Production by *Lentinus Edodes* and a Kinetic Model Study of Two Growth Morphologies, Biochem. Eng. J. 49, 104-122, 2010.
- 24- Jie F., Jing-Song Z., Wei J., Yan Y., Fang L., Chi-Chung L., An Unstructured Kinetic Model for the Improvement of Triterpenes Production by *Ganoderma Lucidum* G0119 Based on Nitrogen Source Effect, Biotechnol. Bioprocess Eng., 19, 727-732, 2014.
- 25- Abdel-mohsen A. M., Jancar J., Massoud D., Fohlerova Z., Elhadidy H., Novel Chitin/chitosan-glucon Wound Dressing: Isolation, Characterization, Antibacterial Activity and Wound Healing Properties, Int. J. Pharm., 510, 86-99, 2016.
- 26- Pestov A. V., Drachuk S. V., Koryakova O. V., Yatluk Y. U. G., Isolation and Characterization of Chitin-Glucon Complexes from the *Mycothallus* of Fungi Belonging to Russula Genus, Chem. Sustain. Develop. 17, 281-287, 2009.
- 27- Park J.P., Kim Y.M., Kim S.W., Effect of Aeration Rte on the Mycelial Morphology and Exo-biopolymer Production in *Cordyceps Militaris*, Process Biochem., 37, 1257-1262, 2002
- 28- Lee B.C., Bae J.T., Lee B.C., Bae J.T., Pyo H.B., Submerged Culture Conditions for the Production of Mycelial Biomass and Exopolysaccharides by the Edible Basidiomycete *Grifola Frondosa*, Enzyme Microb. Technol., 35, 369-376, 2004.

