



Scan online to view this article

The effect of oak wood crude extract on the antioxidant nature of *Lentinula edodes* fungi

Marzieh Azizi¹, Fatemeh Yazdian^{2*}, Mojgan Pourshirazi², Bibi Fatemeh Haghirosadat²

1-Institute of Biochemistry and Biophysics (IBB), University of Tehran, Iran

2-Bioscience Group of New Science and Technology Department, University of Tehran, Iran

Abstract

Aim and Background: *Lentinula edodes* (Shiitake) mushroom have a significant pharmacological importance due to the presence of secondary metabolites with a miraculous effect on cancer treatment. The aim of this study was optimizing the production of antioxidant compounds by selecting the appropriate growth medium and investigating the affecting factors on the production of secondary metabolites.

Material and methods: The bank of fungal cells was prepared in a solid medium and then the samples were transferred to the liquid medium. Alcoholic extract of the samples was prepared. For antioxidant activity, two methods were used: 1- DPPH assay to investigate the capability of removing free radicals and 2- FRAP assay to investigate the ability of ferric ion reduction. Polysaccharide and phenol levels were measured using phenol-sulfuric acid and Folin-Ciocalteu methods, respectively. The cytotoxicity of the extract was measured by MTT assay.

Results: Optimization of antioxidant properties of Shiitake was done by introducing oak extract-enriched medium and the scavenging activity of DPPH radical and reduction potential for ferric ion increased by 5.24 and 1.9 times, respectively. Also, it has showed an appropriate cytotoxicity (IC₅₀ value of 8 µg/ml) on the MCF-7 cell line.

Conclusion: The results represented that oak wood crude extract could be used in Shiitake growth medium as an appropriate elicitation of increasing antioxidant activity.

Keywords: Secondary Metabolite, Antioxidant, *Lentinula edodes*

Corresponding author:

Bioscience Group of New Science and Technology Department, University of Tehran, Iran

Email: yazdian@ut.ac.ir



برای مشاهده این مقاله به صورت آنلاین اسکن کنید

تأثیر عصاره خام چوب بلوط در افزایش خاصیت آنتی اکسیدانی قارچ لندینولا ادودز

مرضیه عزیزی^۱، فاطمه یزدیان^{۲*}، مژگان پورشیرازی^۲، فاطمه حقیر السادات^۲

۱. مرکز تحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک، دانشگاه تهران

۲. گروه مهندسی علوم زیستی، دانشکده علوم و فنون نوین، دانشگاه تهران

چکیده

سابقه و هدف: قارچ/لنتینولا/ادودز (شی تاکه)، به دلیل وجود متابولیت‌های ثانویه معجزه‌آسای مؤثر در درمان سرطان اهمیت دارویی به‌سزایی دارد. در این مقاله تلاش می‌شود تا با انتخاب محیط مناسب جهت رشد بهینه و شناسایی و بررسی عوامل تأثیرگذار بر تولید متابولیت‌های ثانویه، تولید ترکیب‌های آنتی‌اکسیدان بهینه‌سازی گردد.

مواد و روش‌ها: ابتدا بانک سلول‌های قارچی در محیط جامد تهیه شد و سپس نمونه‌ها به محیط مایع انتقال داده شد. عصاره الکلی از نمونه‌ها تهیه شد. جهت بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی از دو روش ۲و۲ دی‌فنیل ۱- پیکریل‌هیدرازیل (DPPH) به‌منظور بررسی قابلیت حذف رادیکال‌های آزاد و قدرت احیاء‌کنندگی فریک (FRAP) به‌منظور بررسی قابلیت احیای یون فریک استفاده شد. جهت اندازه‌گیری میزان پلی‌ساکارید و فنل نیز به ترتیب از روش‌های فنول-سولفوریک اسید و Folin-Ciocalteu استفاده شد. میزان سمیت سلولی عصاره نیز با تست MTT سنجیده شد.

یافته‌ها: بهینه‌سازی خاصیت آنتی‌اکسیدانی قارچ شی تاکه با ارائه محیط غنی‌شده حاوی عصاره چوب بلوط انجام شد و میزان بازدارندگی رادیکال DPPH آن ۵/۲۴ برابر و میزان قدرت احیای یون فریک آن ۱/۹ برابر افزایش یافت. هم‌چنین سمیت سلولی بسیار مناسب (IC₅₀ برابر ۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر) را بر روی رده سلولی MCF-7 نشان داد.

نتیجه‌گیری: این مطالعه نشان داد که عصاره چوب بلوط دارای خاصیت تحریک‌کنندگی بر تولید مواد آنتی‌اکسیدان در قارچ شی تاکه است. پس می‌تواند به‌عنوان محرک مناسبی برای افزایش میزان آنتی‌اکسیدان‌ها در سلول‌های قارچ شی تاکه در محیط‌های کشت به‌کار رود.

واژه‌های کلیدی: متابولیت ثانویه، آنتی‌اکسیدان، لنتینولا ادودز

مقدمه

محققین اثرهای مطلوب آن‌ها را شناسایی، معرفی و نتایج آن را منتشر می‌سازند. از آنجایی که مواد دارویی مصنوعی بیش‌تر دارای تأثیرهای جانبی بر بدن انسان هستند و با توجه به گرایش روز افزون بشر به درمان توسط مواد طبیعی، قارچ‌ها می‌توانند منبعی مناسب برای تأمین این خواسته باشند. مؤثر بودن، ارزان بودن و سهولت استفاده (تهیه و مصرف) قارچ‌ها از مزایای آن‌ها در درمان به شمار می‌رود (۹،۱۴).

در سال‌های اخیر آشنایی علمی و بنیادی خواص و آثار مفید مواد دارویی طبیعی، زمینه استفاده روز افزون از آن‌ها را فراهم آورده است. به‌همین دلیل در اکثر کشورهای پیشرفته

نویسنده مسئول:

گروه مهندسی علوم زیستی، دانشکده علوم و فنون نوین، دانشگاه تهران

پست الکترونیکی: Yazdian@ut.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۵/۲۱

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۰/۲۷

در سال‌های اخیر جمع‌آوری اطلاعات و تحقیق در زمینه قارچ‌های دارویی در ایران پیشرفت چشم‌گیری داشته است. از

ویتامین D2) و قطعه‌های RNA ضدویروسی اشاره نمود. همچنین کیتوزان تولید شده توسط قارچ شی‌تاکه بر رادیکال هیدروکسیل اثر مهاری دارد و کلاته کننده یون آهن است (۲۲). عصاره آب داغ میسلیموم کشت شده شی‌تاکه محتوی پلی‌ساکارید KS-2 است که یک آلفا مانان پپتید شامل آمینواسیدهای سرین، ترئونین، آلانین و پرولین است. پلی‌ساکاریدهای موجود در قارچ شی‌تاکه مسئول اصلی فعالیت ضدسرطانی آن هستند (۱۱، ۴).

با توجه به خواص درمانی متعدد موجود در قارچ شی‌تاکه، افزایش خاصیت آنتی‌اکسیدانی این قارچ‌ها می‌تواند نقش درمانی آن‌ها را بیش از پیش پررنگ سازد. انتخاب روشی مناسب برای بهینه‌سازی که نیازمند وقت و تکرار زیاد نباشد و از نظر اقتصادی و مصرف مواد اولیه به صرفه باشد هدف اصلی این مقاله بود. بر این اساس انتخاب و ارزیابی عصاره چوب بلوط بومی ایران به‌عنوان ترکیب محیط کشت قارچ شی‌تاکه برای اولین بار در این پژوهش صورت گرفت. این قارچ بومی ژاپن، چین و کشورهای آسیایی با آب و هوای معتدل است و به‌طور وحشی روی درختان خزان‌دار قطع شده، به‌خصوص شاه‌بلوط، راش، بلوط، درخت شیا و غیره یافت می‌شود. با این وجود چندین قرن به‌طور مصنوعی روی کنده‌های بریده شده نیز تولید شده و می‌توان در تمام فصول سال میوه آن‌را مشاهده نمود (۱۳). به‌تازگی کشت انبوه آن به‌طور غالب با استفاده از تکنولوژی کشت در خاک اره صورت گرفته است و یک چهارم تولید قارچ جهان را شامل می‌شود (۱۳). میسلیموم‌های این قارچ به‌راحتی می‌توانند بر روی محیط‌های ساده مانند سبب‌زمینی دکستروز آگار رشد یابند (۱۷). Shen و همکاران در سال ۲۰۰۹ نشان دادند که میسلیموم قارچ شی‌تاکه قابلیت رشد بر روی تفاله نیشکر و سبوس برنج بدون چربی نیز دارد (۲۰). Razeghi YL و همکاران در سال ۱۳۸۸، محیط دست‌سازی را ارائه دادند که در آن از سبوس برنج استفاده شده بود (۱۸). بر این اساس در این پژوهش شناسایی و انتخاب محیط مناسب جهت رشد بیشینه و هم-چنین شناسایی و بررسی عوامل تأثیرگذار بر تولید متابولیت ثانویه این قارچ صورت گرفت. میزان ترکیب‌های مؤثره با استفاده از بررسی‌های فیتوشیمیایی تعیین و سمیت سلولی بر روی رده سلولی بررسی شد.

روش کار

جمله این تحقیق‌ها می‌توان به گزارش و معرفی بزرگترین قارچ خوراکی با خاصیت دارویی در مراتع بیلاقی استان مازندران با نام لندینولا ادودز^۱ و نام علمی گانودرما لوسیدوم (*Ganoderma lucidum* (Basidiomycota) (۶، ۱۳) و بررسی خواص ضدباکتریایی آن (۱)، مقایسه ترکیب‌های سویه قارچ گانودرما لوسیدوم بومی ایران و چین (۱۲)، طراحی محیطی با بازده بالای رشد جسم میوه‌ای و میسلیمومی قارچ گانودرما لوسیدوم با استفاده از انواع مختلف خاک اره (۵)، تولید قارچ شی‌تاکه برای اولین بار در ایران از ضایعات کشاورزی به‌ویژه تراشه چوب (۴) و معرفی بهینه دما و pH و ارائه محیطی دست‌ساز برای حداکثر رشد قارچ شی‌تاکه (۱۷) اشاره کرد.

در این مقاله انگیزه انتخاب قارچ‌های شی‌تاکه، اهمیت دارویی این قارچ و وجود ترکیب‌های معجزه‌آسای مؤثر در درمان سرطان و نیز کمبود تحقیقات و اطلاعات در مورد فعالیت‌های بیولوژیکی آنتی‌اکسیدانی آن در ایران بوده است که زمینه بررسی این خواص و بهینه‌سازی تولید ترکیب‌های آنتی‌اکسیدان را فراهم می‌آورد.

قارچ شی‌تاکه یکی از شناخته‌شده‌ترین قارچ‌ها در دنیا است و یک چهارم تولید قارچ جهان را شامل می‌شود (۱۷). در چین به‌نام Xiang gu (قارچ خوشبو یا معطر) شناخته شده است و در ژاپن به‌خاطر همبستگی تاریخی‌اش با درخت شیا^۲ به شی‌تاکه معروف است. قارچ شی‌تاکه طی هزاران سال در ژاپن و چین هم به‌عنوان غذا و هم دارو مصرف شده است و به‌دلیل طعم لذیذ و کم‌نظیر آن بخش مهمی از غذای مردم شرق را تشکیل می‌دهد و به‌طور زیادی مورد قبول مردم غرب نیز قرار گرفته است (۱۸). در طب شرق این قارچ برای درمان طیف وسیعی از عوارض استفاده شده و این خصوصیت‌های درمانی به‌خوبی به‌عنوان درمان‌های محلی و بومی مورد تأیید قرار گرفته است (۱۴). قارچ شی‌تاکه به‌خصوص در درمان فشار خون بالا و به‌منظور کاهش کلسترول خون استفاده می‌شود (۱۱).

از ترکیب‌های کلیدی متابولیت‌های ثانویه در این قارچ می‌توان به بتادی‌گلوکان (لنتینان^۳) و کمپلکس هتروگلوکان-پروتئین (LEM^۴) با اثرهای ضدتوموری و تقویت کننده سامانه ایمنی، اریتاندین (کاهش دهنده کلسترول)، ارگوسترول (پیش‌ساز

¹ *Lentinula edodes*

² *Shia tree*

³ *Lentinan*

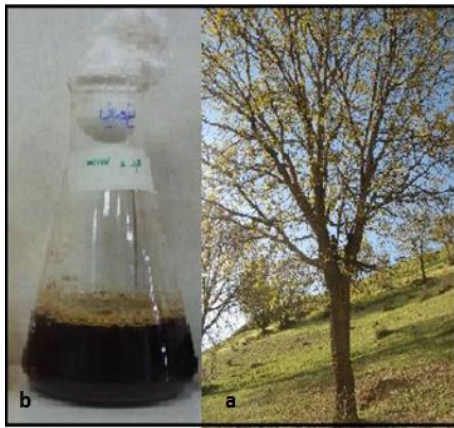
⁴ *Lentinula edodes mycelium (LEM)*

تهیه بانک در محیط جامد

نمونه قارچ لندینولا ادودز، سویه CS-2 از دانشگاه فردوسی مشهد دریافت شد و بر روی محیط کشت جامد سیبزمینی دکستروز آگار (PDA) در دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد کشت داده شد. به منظور تهیه بانک، هر ۲۰ روز یک پرگنه از محیط حاوی میسلیم قارچ به محیطی تازه منتقل شد.

انتقال به محیط مایع

محیط‌های مایع پیشنهادی از مقالات استخراج شد (جدول ۱) و به منظور تعیین محیط کشت بهینه با بیش‌ترین میزان رشد میسلیم؛ یک پرگنه به قطر ۵ میلی‌متر از محیط جامد در شرایط سترون به ارلن ۱۰۰ حاوی ۳۰ میلی لیتر محیط کشت (جدول ۱) منتقل شد و مدت ۳۰ روز در شیکر انکوباتور (Orbital incubator model SI50, Stuart Scientific, UK) با دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد و دور ۱۳۰ rpm در شرایط به‌طور کامل یکسان انکوبه شدند (۱۶،۱۹).



شکل ۱- (a) درخت بلوط (b) عصاره چوب درخت بلوط

برای تهیه عصاره‌ها مقدار ۲۵۰ گرم از هر ماده با ۱۰۰۰ میلی لیتر آب مقطر به مدت ۱۵ دقیقه اتوکلاو شد تا عصاره آن خارج شود. سپس با پارچه لمل صاف شد و مجدد با آب مقطر به حجم ۱۰۰۰ میلی لیتر رسانده شد.

انتخاب محیط‌هایی با بیش‌ترین میزان رشد

به منظور انتخاب محیط کشت با بیش‌ترین میزان رشد و مقایسه آن‌ها با محیط‌های پیشنهادی مقاله‌ها، ترکیب‌های محیط کشت بر اساس جدول ۲ در نظر گرفته شد.

در شرایط کامل سترون یک پرگنه به قطر ۵ میلی لیتر از محیط جامد به ۳۰ میلی لیتر محیط مایع اضافه شد و مدت ۲۰ روز در شیکر انکوباتور با دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد دور ۱۳۰ rpm قرار گرفتند (کلیه کشت‌ها در دو تکرار انجام شد).

انتخاب محیط بهینه بر اساس خاصیت آنتی‌اکسیدانی

به منظور انتخاب محیطی با بالاترین خاصیت آنتی‌اکسیدانی، محیط کشت‌هایی از بین مواردی که بیش‌ترین میزان رشد را نشان دادند، انتخاب گردید و قارچ شی‌تاکه در شرایط یکسان در این محیط‌ها دوباره کشت داده شد.

عصاره‌گیری از نمونه‌ها

به منظور استخراج ترکیب‌های مؤثره موجود در میسلیم، بر روی ۰/۵ گرم از میسلیم لیوفیلیز شده ۲۰ میلی لیتر متانول ۹۶٪ ریخته شد و به مدت ۲ ساعت با دور ۱۵۰ rpm هم‌زده شد. سپس رسوب آن با کاغذ واتمن شماره ۱ جدا شد.

جدول ۱- ترکیب محیط کشت‌های مختلف برای رشد قارچ شی‌تاکه

محیط کشت	ترکیب‌ها (g/L)
MMN (Melin-Norkrans Culture Medium)	Casein ۰/۱، Malt extract ۰/۰۲۵، NaCl ۰/۰۲۵، FeCl ₃ ۰/۰۱۵، KH ₂ PO ₄ ۰/۰۲۵، (NH ₄) ₂ HPO ₄ ۰/۰۱۵، MgSO ₄ .7H ₂ O ۰/۰۱۵، CaCl ₂ ۰/۰۰۵، ۱۰ Glucose و ۰/۱ Thiamin
PGC	۱۵ Glucose و ۰/۱ Casein، ۲۵۰ Potato
PGC+ویتامین B ₁	۱۵ Glucose، ۰/۱ Thiamin، ۱ Casein، ۲۵۰ Potato
BM (Basal Medium)	۱۰ Casein، ۱۰ Yeast extract، ۱ KH ₂ PO ₄ و ۵۰ Glucose
BM+ویتامین B ₁	۱۰ Casein، ۱۰ Yeast extract، ۱۰ KH ₂ PO ₄ ، ۱۰ Glucose و ۰/۱ Thiamin
BM+CaCl ₂	۱۰ Casein، ۱۰ Yeast extract، ۱ KH ₂ PO ₄ ، ۰/۰۵ CaCl ₂ و ۵۰ Glucose
PDC	۱ Casein، ۲۴ PDC
PDC+ویتامین B ₁	۱ Casein، ۲۴ PDC و ۰/۱ Thiamin

انتخاب عوامل محیطی به منظور افزایش سرعت رشد

با توجه به این که قارچ شی‌تاکه به‌طور وحشی روی درخت بلوط رشد می‌کند، چوب بلوط از دامنه کوه‌های زاگرس در استان کهگیلویه و بویراحمد جمع‌آوری شد و عصاره آن به عنوان عامل مؤثر در رشد در نظر گرفته شد (شکل ۱). هم چنین با توجه به این که کشت انبوه شی‌تاکه بر روی خاک اره صورت می‌گیرد، عصاره خاک اره نیز انتخاب شد. Razeghi و همکاران در سال ۱۳۸۸، محیط دست سازی را ارائه دادند که در آن از سبوس برنج استفاده شده بود (۱۸). بنابراین عصاره سبوس برنج نیز به‌عنوان یک فاکتور محیطی انتخاب شد.

جدول ۲ ترکیب‌های محیط‌های مایع حاوی عصاره های گیاهی

ترکیب‌ها (g/L)	محیط کشت
Malt extract ۰/۰۲۵، NaCl ۰/۰۲۵، Casein ۰/۰۱، (NH ₄) ₂ HPO ₄ ۰/۰۲۵، CaCl ₂ ۰/۰۰۵، FeCl ₃ ۰/۰۱۵، KH ₂ PO ₄ ۰/۰۱۵، MgSO ₄ .7H ₂ O ۰/۰۱۵، ۱۰ Glucose و ۰/۱ Thiamin	MMN (Melin-Norkrans Culture Medium)

فنیل-۱-پیکریل هیدرازیل (DPPH) مورد ارزیابی قرار گرفت. DPPH، ترکیبی است بنفش رنگ که به دلیل حضور گروه‌های فنیل در ساختار به راحتی به صورت رادیکال در آمده و در واقع منبع رادیکال آزاد است. این ترکیب با گرفتن یک الکترون از ترکیب آنتی‌اکسیدان، از رنگ بنفش به سمت زرد تا بیرنگ تغییر رنگ می‌دهد. رادیکال‌های آزاد موجود در DPPH، در ۵۱۷ نانومتر جذب دارند که از قانون بیر-لامبرت پیروی می‌کنند و کاهش جذب آن با میزان ماده آنتی‌اکسیدان رابطه خطی دارد. هر چه بر مقدار ماده آنتی‌اکسیدان افزوده شود، DPPH بیش تری مصرف شده و رنگ بنفش بیش تر به سمت زرد میل می‌کند (۶). بلانک، غلظت‌های مختلف نمونه و کنترل (محلول ۲ mg/ml از BHT^v در متانول)، درون چاهک‌های یک میکروپلیت ۹۶ خانه اضافه شدند. استفاده از بلانک برای بی‌اثر کردن رنگ عصاره‌ها در سنجش نهایی جذب است. سپس پلیت به مدت ۳۰ دقیقه در دمای محیط و در تاریکی قرار داده شد و جذب هر چاهک توسط دستگاه اسپکتوفوتومتر (Bio-Tek آلمان) در ۵۱۷ نانومتر خوانده شد. با قرار دادن مقدارهای به دست آمده در فرمول زیر درصد بازدارندگی رادیکال DPPH به دست آمد. سپس با رسم منحنی درصد بازدارندگی نسبت به غلظت، می‌توان غلظتی از نمونه که در آن ۵۰ درصد بازدارندگی (IC₅₀) مشاهده می‌شود را به دست آورد. بنابراین هرچه میزان کم تر باشد، نمونه خاصیت آنتی‌اکسیدانی بالاتری دارد.

$$(A_c - A_s) \times 100 / A_c = A_f$$

که در آن A_c جذب کنترل، A_s جذب نمونه و A_f جذب نهایی است.

ب- بررسی قابلیت احیای یون فریک به روش FRAP^۸
این روش بر اساس توانایی ترکیب مورد نظر در احیاء یون‌های فریک (آهن سه ظرفیتی) به فرو (آهن دو ظرفیتی) در حضور محلول TPTZ^۹ استوار است. کمپلکس TPTZ-Fe²⁺، کمپلکس آبی رنگی است که ماکزیمم جذب آن در طول موج ۵۹۳ نانومتر است. میزان قدرت احیاکنندگی ترکیب از طریق افزایش غلظت کمپلکس فوق (که همراه با کاهش جذب محلول است) توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر اندازه‌گیری می‌شود. با مخلوط کردن ۲۵ میلی‌لیتر بافر استات، ۲/۵ میلی‌لیتر کلرید آهن و ۲/۵ میلی‌لیتر محلول TPTZ (نسبت

Glucose و ۰/۱ Casein ، ۲۵۰ Potato ۱۵	PGC
Casein ، ۱۰ Yeast extract ، ۱۰ CaCl ₂ و ۵۰ Glucose ، ۱ KH ₂ PO ₄ ۰/۰۵	BM+CaCl ₂
Casein ، ۲۴ PDC ۱	PDC
NaCl ، ۰/۰۲۵ Malt extract ، ۵ Casein ، ۱ (NH ₄) ₂ HPO ₄ ، ۰/۲۵ KH ₂ PO ₄ ، ۰/۰۵ FeCl ₃ ، ۰/۰۰۵ CaCl ₂ ، ۰/۰۵ MgSO ₄ ·7H ₂ O ، ۰/۱۵ Thiamin ، ۰/۱ و ۱۰ میلی‌لیتر عصاره Glucose و بلوط	PGC+MMN+ بلوط
Potato ، ۲۵۰ Casein و ۰/۱ Glucose ۱۵ و ۳۰ میلی‌لیتر عصاره بلوط	PGC+بلوط
گلوکز ۱۵ و ۳۰ میلی‌لیتر عصاره بلوط	G+بلوط
NaCl ، ۰/۰۲۵ Malt extract ، ۵ Casein ، ۱ (NH ₄) ₂ HPO ₄ ، ۰/۲۵ KH ₂ PO ₄ ، ۰/۰۵ FeCl ₃ ، ۰/۰۰۵ CaCl ₂ ، ۰/۰۵ MgSO ₄ ·7H ₂ O ، ۰/۱۵ Thiamin و ۰/۱ Glucose ۳۰ و ۱۰ میلی‌لیتر خاک اره	MMN+خاک اره
Casein ، ۲۵۰ Potato ۱۵ Glucose و ۳۰ میلی‌لیتر خاک اره	PGC+خاک اره
گلوکز ۱۵ و ۳۰ میلی‌لیتر خاک اره	G+خاک اره
NaCl ، ۰/۰۲۵ Malt extract ، ۵ Casein ، ۱ (NH ₄) ₂ HPO ₄ ، ۰/۲۵ KH ₂ PO ₄ ، ۰/۰۵ FeCl ₃ ، ۰/۰۰۵ CaCl ₂ ، ۰/۰۵ MgSO ₄ ·7H ₂ O ، ۰/۱۵ Thiamin و ۰/۱ Glucose ۳۰ و ۱۰ میلی‌لیتر سبوس برنج	MMN+سبوس برنج
Glucose و ۰/۱ Casein ، ۲۵۰ Potato ۱۵ و ۳۰ میلی‌لیتر سبوس برنج	PGC+سبوس برنج
گلوکز ۱۵ و ۳۰ میلی‌لیتر سبوس برنج	G+سبوس برنج
گلوکز ۱۵، کازئین ۱ و ۱۰ میلی‌لیتر از هر عصاره	GC+بلوط+خاک اره+سبوس برنج

استخراج بر روی رسوب یک بار دیگر با ۱۰ میلی‌لیتر متانول تکرار شد (انتخاب حلال بر اساس منبع شماره ۸ انجام گردید). مایع بعد از صافی به وسیله دستگاه تبخیر کننده دوار (heidolph rotary evaporator laborota 4000، آلمان) در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد تغلیظ شد تا عصاره متانولی به دست آید. جهت نگهداری عصاره به دست آمده از دمای ۴ درجه سانتی‌گراد استفاده گردید (۱۸).

بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی

الف- بررسی قابلیت حذف رادیکال‌های آزاد توسط روش DPPH^۵

اثر آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها با استفاده از روش اندازه‌گیری کاهش ظرفیت رادیکالی^۶ (RSC) به کمک رادیکال ۲،۲-دی

⁷ Butylated Hydroxy Toluene

⁸ Ferric Reducing Antioxidant Power

⁹ 2,4,6-tripirydyl-s-triazine

⁶ Radical Scavenging Capacity

۱:۱:۱۰)، معرف FRAP تهیه شد. این محلول باید به صورت تازه تهیه شود چرا که پس از مدت ۳۰ دقیقه کدر شده و دیگر قابل استفاده نیست. معرف FRAP به مدت ۱۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد، سپس به ترتیب زیر عمل شد: در سری اول، ۲۰ میکرولیتر سولفات آهن در رقت‌های مختلف + ۲۰۰ میکرولیتر معرف FRAP و در سری دوم، ۲۰ میکرولیتر نمونه حل شده در آب (یا DMSO) + ۲۰۰ میکرولیتر معرف FRAP استفاده شد. پس از ریختن محلول‌ها، میکروپلیت ۹۶ خانه به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شد. محلول‌های استاندارد با توجه به غلظت تغییر رنگ می‌دهند و شدت رنگ با بالا رفتن غلظت افزایش می‌یابد. اگر در محلول نمونه تغییر رنگ حاصل نشده باشد، نشان می‌دهد که آن نمونه توانایی احیای یون فریک به یون فرو را ندارد، از این رو در مجاور معرف FRAP، کمپلکس TPTZ-فرو تشکیل نمی‌شود و در نتیجه رنگ آبی ایجاد نمی‌شود. در یک نمونه آنتی‌اکسیدان، به علت توانایی در احیای یون فریک به یون فرو در مجاور معرف FRAP، رنگ آبی لاجوردی تشکیل می‌شود که ناشی از کمپلکس TPTZ-فرو است. شدت رنگ حاصل توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۵۹۳ نانومتر در مقابل بلانک (معرف FRAP) خوانده شد. بر اساس غلظت‌های مختلف استاندارد و میزان جذب خوانده شده، منحنی استاندارد رسم گردید و مقدار غلظت نمونه از روی منحنی به دست آمد. آسکوربیک اسید نیز به عنوان یک احیا کننده قوی یون آهن برای مقایسه و به عنوان کنترل مثبت استفاده شد (۲۰).

در ادامه تحقیق با توجه به این که محیط بلوط+MMN را به عنوان محیط بهینه انتخاب گردید؛ میزان تولید متابولیت‌های ثانویه (میزان کل پلی‌ساکارید و محتوای کل فنولی) در میسلیم کشت شده در محیط بلوط+MMN اندازه‌گیری شد. همچنین میزان سمیت آن علیه سلول‌های سرطانی مورد ارزیابی قرار گرفت.

شناسایی و اندازه‌گیری متابولیت‌های ثانویه

خواص دارویی قارچ‌ها ناشی از متابولیت‌های ثانویه به خصوص پلی‌ساکاریدهای ویژه آن‌ها و محتوای اورونیک‌اسید و آسکوربیک‌اسید این پلی‌ساکاریدها است که مشخص شده یا فاقد عوارض جانبی هستند یا عوارض جانبی حداقلی دارند (۹). در این تحقیق، از بین متابولیت‌های ثانویه قارچ، میزان کل پلی‌ساکارید و فنل مورد بررسی قرار گرفت.

الف- اندازه‌گیری میزان پلی‌ساکارید کل

تحقیقات بر روی عصاره‌های آبی میسلیم کشت شده شی‌تاکه نشان داده است این عصاره‌ها محتوی پلی‌ساکارید KS-2 هستند که یک آلفا مانان پپتید شامل آمینواسیدهای سرین، ترئونین، آلانین و پرولین است. در واقع پلی‌ساکاریدهای موجود در قارچ شی‌تاکه مسئول اصلی فعالیت ضدسرطانی آن هستند (۲۳). پلی‌ساکاریدهای موجود در قارچ شی‌تاکه عبارت از لنتینان و LAP^{۱۰} و LEM^{۱۱} هستند. LAP و LEM هر دو فعالیت ضدسرطانی قوی را به روش تزریق عضلانی و تجویز خوراکی در انسان‌ها و حیوانات نشان داده‌اند (۱).

در ژاین لنتینان به عنوان یک دارو طبقه‌بندی می‌شود، در حالی که LEM و LAP بیش‌تر به عنوان مکمل‌های غذایی به حساب می‌آیند. این اعتقاد وجود دارد که این ترکیب‌ها به جای حمله مستقیم به سلول‌های سرطانی بیش‌تر به صورت تقویت سامانه ایمنی عمل می‌کنند. همچنین سمیت بالینی لنتینان به ندرت مشاهده شده است (۱). بنابراین در این تحقیق، میزان کل پلی‌ساکارید مورد اندازه‌گیری قرار گرفت.

از بین روش‌های رنگ سنجی موجود، جهت اندازه‌گیری محتوی قندی، روش فنول-سولفوریک اسید جزء آسان‌ترین و مطمئن‌ترین روش‌ها است. این روش برای اولین بار توسط دوپوس و همکاران در سال ۱۹۵۶ برای تعیین غلظت کل قندها و مشتقات آن‌ها ابداع شد. در این روش، قندهای ساده (مونوساکاریدها)، الیگو ساکاریدها و مشتق‌های آن‌ها مانند متیل‌اترها با گروه احیا کننده آزاد، با فنول و اسید سولفوریک غلیظ رنگ نارنجی، زرد و قهوه‌ای ثابت تولید می‌کنند. این واکنش دارای دقت زیادی است؛ به طوری که مقدار قند حتی در حد میکروگرم شناسایی می‌شود (۱۵). برای انجام آزمایش از قند گلوکز به عنوان استاندارد و میکروپلیت‌های ۹۶ خانه‌ای ته‌گرد (SPL، کره) استفاده شد. ۵۰ میکرو لیتر از نمونه هم‌چنین گلوکز استاندارد در مقادیری به چاهک‌ها اضافه شدند که غلظت هر چاهک ۳۶۰ ppm باشد. سپس زیر هود شیمیایی ۱۵۰ میکرولیتر اسید سولفوریک غلیظ به آن افزوده شد. بلافاصله ۳۰ میکرولیتر محلول آبی فنول ۵٪ به هر چاهک اضافه گردید. سپس به مدت ۵ دقیقه در حمام آب ۹۰ درجه سانتی‌گراد و بعد از آن به مدت ۵ دقیقه در حمام آب

¹⁰ Lentinula edodes aqueous precipitate extract extracted from the mycelium (LAP)

¹¹ Lentinus edodes mycelia (LEM)

محلول MTT اضافه می‌شود و به مدت ۲ تا ۴ ساعت در انکوباتور CO₂ در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه می‌شود. در طی زمان انکوباسیون MTT توسط سیستم سوکسینات دهیدروژناز که یکی از آنزیم‌های چرخه تنفسی میتوکندری‌ها است احیا می‌شود. احیا و شکسته شدن این حلقه موجب تولید کریستال‌های آبی رنگ فورمازان می‌شود که در زیر میکروسکوپ به راحتی قابل تشخیص هستند. میزان رنگ تولید شده با تعداد سلول‌هایی که از نظر متابولیک فعال هستند رابطه مستقیم دارد. کریستال‌های فورمازان در آب غیرمحلول بوده و بایستی قبل از رنگ سنجی توسط ماده حلالی نظیر DMSO به حالت محلول در آیند. در نهایت جذب نوری محلول به دست آمده را می‌توان در طول موج ۵۷۰ نانومتر مورد ارزیابی قرار داد. برای هر رده سلولی ارتباط خطی بین تعداد سلول‌ها و جذب نوری محلول نهائی وجود دارد. تعداد تکرارها در این آزمایش‌ها بین ۳ تا ۵ تکرار برای هر نمونه بود. جهت به دست آوردن درصد حیات، میانگین جذب ۵۷۰ خوانده شده مربوط به نمونه‌های تیمار شده، از میانگین جذب ۵۷۰ خوانده شده مربوط به نمونه تیمار نشده (به عنوان کنترل منفی) کسر گردید و تقسیم بر میانگین جذب ۵۷۰ خوانده شده مربوط به نمونه تیمار نشده شد. انحراف معیار از تابع زیر محاسبه گردید.

$$s = \sqrt{\frac{\sum(x - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

که S، مقدار انحراف معیار، x درصد حیات هر نمونه، X بار میانگین درصد حیات و n نیز برابر با تعداد تکرارها است.

نتایج

مقایسه میزان رشد در محیط‌های مایع معرفی شده
به منظور مقایسه میزان رشد میسلیم قارچ شی‌تاکه در محیط‌های مایع ارائه شده در مقاله‌ها و شناسایی محیط‌هایی با بیش‌ترین میزان رشد، آزمایشی صورت گرفت که نتایج آن بر حسب وزن خشک میسلیموم (g/L) در شکل ۲ آمده است. نتایج به دست آمده نشان می‌دهد محیط‌های PGC، MMN، PDC و BM+CaCl₂ به ترتیب با ۱/۵۳ g/L، ۲/۲ g/L، ۱/۸۲ g/L، ۱/۵۵ g/L و بیش‌ترین وزن خشک را سبب می‌شوند. بنابراین این محیط‌ها برای مرحله بعد انتخاب شدند. هم‌چنین با وجود این‌که حضور ویتامین B₁ در بسیاری از قارچ‌ها میزان رشد را افزایش می‌دهد، وجود این ویتامین تأثیر قابل توجهی

سرد قرار گرفت. در نهایت میکروپلیت درون دستگاه اسپکتوفوتومتر قرار گرفته و پس از ۲۰ ثانیه تکان دادن، جذب UV در طول موج ۴۹۰ نانومتر خوانده شد.

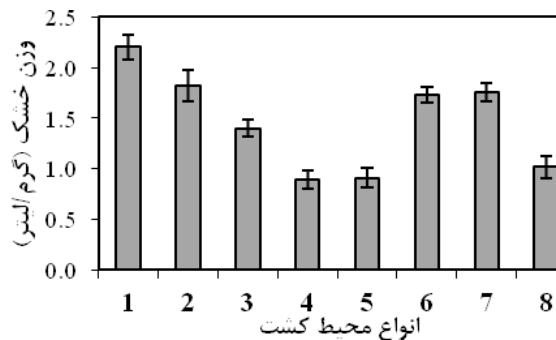
ب- اندازه‌گیری محتوای کل ترکیب‌های فنولی

برای اندازه‌گیری مقدار کل ترکیب‌های فنولی از روش Folin-Ciocalteu استفاده شد (۶). در چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه ۲۵ میکرولیتر از عصاره ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، ۱۲۵ میکرولیتر معرف Folin-Ciocalteu و ۱۰۰ میکرولیتر سدیم کربنات (۷/۵٪) اضافه شد و محلول‌ها به مدت یک ساعت و نیم در دمای اتاق و در تاریکی تکان داده شدند. سپس جذب در ۷۶۰ نانومتر توسط اسپکتوفوتومتر خوانده شد. مقدار کل ترکیب‌های فنولی عصاره‌ها با استفاده از منحنی استاندارد گالیک اسید محاسبه می‌شود. پس از رسم منحنی کالیبراسیون گالیک اسید، معادله خطی منحنی به دست می‌آید که با قراردادن مقادیر جذب به دست آمده از عصاره‌ها در این معادله می‌توان غلظت معادل گالیک اسید از عصاره‌ها را به دست آورد. غلظت به دست آمده بر حسب میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم خشک عصاره گزارش می‌شود.

بررسی سمیت سلولی

میزان سمیت سلولی عصاره به دست آمده از محیط کشت بهینه قارچ شی‌تاکه بر ضد رده سلولی سرطان بافت سینه MCF-7 و رده سلولی سرطان رحم HeLa مورد بررسی قرار گرفت. مطالعه سمیت سلولی با استفاده از روش MTT انجام شد (۳،۲۱). آزمایش MTT یک روش رنگ‌سنجی است و بر اساس احیا شدن و شکسته شدن کریستال‌های زرد رنگ تترازولیوم به وسیله آنزیم سوکسینات دهیدروژناز و تشکیل کریستال‌های آبی رنگ نامحلول انجام می‌شود. در این روش برخلاف سایر روش‌ها مراحل شستشو و جمع‌آوری سلول‌ها، که اغلب باعث از دست رفتن تعدادی از سلول‌ها می‌شوند، حذف شده‌اند و تمام مراحل آزمایش در یک میکروپلیت انجام می‌شوند. لذا تکرار پذیری، دقت و حساسیت آزمایش بالا است. ابتدا بایستی تعداد مناسبی سلول (بلکه ۵۰۰۰ سلول در هر چاهک) کشت داده و اجازه داد تا سلول‌ها به کف پلیت بچسبند و به حالت پایدار خود در آیند. سپس چاهک‌های کنترل و آزمایش انتخاب شده و مقدار مناسبی از نمونه مورد نظر به چاهک‌ها اضافه می‌شود و پلیت تا زمان مورد نیاز جهت تأثیر ماده مورد نظر، انکوبه می‌شود. پس از اتمام زمان انکوباسیون محیط کشت روئی دور ریخته شده و به هر چاهک ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت حاوی نیم میلی‌گرم در میلی‌لیتر

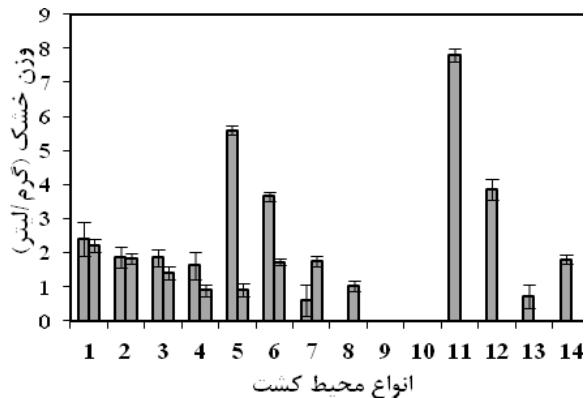
بر روی رشد قارچ شی تا که نداشته است. با توجه به این که قارچ شی تا که در محیط های MMN و PGC رشد به نسبت خوبی را نشان می دهد، این محیط ها برای بهینه سازی خاصیت آنتی اکسیدانی انتخاب شدند.



شکل ۲: مقایسه میزان رشد میسلیم قارچ شی تا که در محیط مایع (g/L): MMN -۱، PGC-۲، PGC+ویتامین B1، -۳، PGC+ویتامین B1، -۴، BM، -۵، BM+CaCl₂، -۶، PDC، -۷، PDC، -۸، +ویتامین B1. تعداد تکرارها در این آزمایش ها بین ۳ تا ۵ تکرار برای هر نمونه بود. بر روی هیستوگرام بیانگر SD است.

تأثیر عوامل محیطی بر روی رشد میسلیم

جهت بررسی اثر عصاره بلوط، سبوس برنج و خاک اره به عنوان جزئی از محیط کشت بر روی رشد و مقایسه آن با محیط های معرفی شده، وزن خشک میسلیم رشد یافته در محیط های مختلف مورد مقایسه قرار گرفت. نتایج مطابق شکل ۳ به دست آمد.



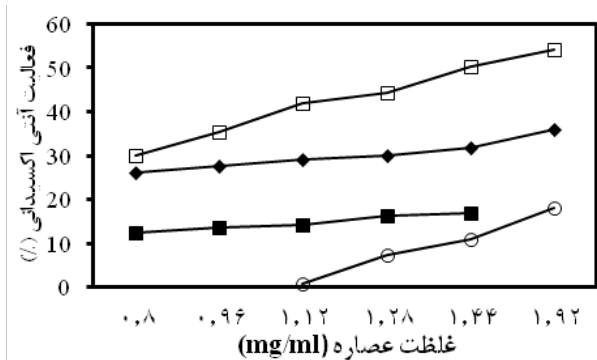
شکل ۳: مقایسه تاثیر عصاره های بلوط، سبوس برنج و خاک اره بر وزن خشک میسلیم (g/L) -۱ MMN، -۲ PGC، -۳ BM+CaCl₂، -۴ PDC، -۵ بلوط + PGC، -۶ بلوط + PGC، -۷ بلوط + G، -۸ خاک اره + MMN، -۹ خاک اره + PGC، -۱۰ خاک اره + G، -۱۱ سبوس برنج + MMN، -۱۲ سبوس برنج + PGC، -۱۳ سبوس برنج + G، -۱۴ بلوط + خاک اره + سبوس برنج + G، تعداد تکرارها در این آزمایش ها بین ۳ تا ۵ تکرار برای هر نمونه بود. بر روی هیستوگرام بیانگر SD است.

ناخالص بودن خاک اره استفاده شده و حضور ترپنوئیدهای ممانعت کننده رشد باشد. همچنین از مقایسه وزن خشک به دست آمده مشخص شد محیط های MMN+ بلوط، MMN+ سبوس، PGC+ بلوط و PGC+ سبوس سبب تولید بیشترین میسلیم شده اند، بنابراین برای ادامه تحقیق، میسلیم کشت شده بر روی این ۴ محیط کشت عصاره گیری گردید.

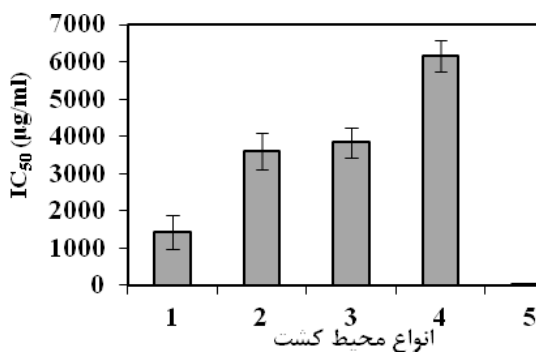
بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی

الف- قابلیت حذف رادیکال های آزاد

میزان فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره متانولی ۴ محیط (محیط های ۱- MMN+ بلوط، ۲- MMN+ سبوس، ۳- PGC+ بلوط و ۴- PGC+ سبوس که باعث بیشترین تولید میسلیم شده بودند) با استفاده از معرف DPPH بررسی شد. تا محیط بهینه از لحاظ خاصیت آنتی اکسیدانی مشخص شود. نتایج به دست آمده از میانگین ۴ بار تکرار فعالیت آنتی اکسیدانی غلظت های مؤثر مختلف از عصاره ها (mg/ml) ۰/۸، ۰/۹۶، ۱/۱۲، ۱/۲۸، ۱/۴۴، ۱/۹۲ در شکل ۴ و مقادیر IC₅₀ (µg/ml) در شکل ۵ آورده شده است.



شکل ۴- مقایسه فعالیت آنتی اکسیدانی محیط های MMN+ بلوط (●)، MMN+ سبوس (○)، PGC+ بلوط (■) و PGC+ سبوس (□)



شکل ۵- مقادیر IC₅₀ -۱ محیط های MMN+ بلوط، -۲ PGC+ بلوط، -۳ MMN+ سبوس، -۴ PGC+ سبوس و -۵ BHT. تعداد تکرارها در این آزمایش ها بین ۳ تا ۵ تکرار برای هر نمونه بود. بر روی هیستوگرام بیانگر SD است.

بررسی مقادیر پلی ساکارید کل

اندازه گیری غلظت پلی ساکارید کل محیط بهینه بلوط+MMN نشان داد میزان قند موجود در یک میلی گرم عصاره خشک ۸۳۵ میکروگرم است.

بررسی مقادیر محتوای کل فنولی

محتوای کل فنولی محیط بلوط+MMN با جای گذاری جذب نمونه در معادله نمودار استاندارد گالیک اسید، مقدار ۵/۶۲ میکروگرم گالیک اسید/میلی گرم عصاره خشک به دست آمد.

بررسی سمیت سلولی

نتایج حاصل از بررسی سمیت سلولی عصاره متانولی محیط بهینه بلوط+MMN نشان داد، عصاره به دست آمده بر ضد رده سلولی HeLa به خوبی قادر به احیای کریستال های تترازولیمو بلو نیست و تغییر رنگ مناسبی دیده نشد. IC_{50}^{13} به دست آمده برای آن بیش تر از ۱۰۰ گزارش شد. اما نتایج مشاهده شده بر روی رده سلولی MCF-7 بسیار مناسب ارزیابی شد و میزان IC_{50} برابر ۸ میکروگرم بر میلی لیتر از عصاره گزارش شد. نتایج به دست آمده در جدول ۵ آورده شده است.

جدول ۵- سمیت سلولی حاصل از محیط بهینه شی تا که

نمونه	IC_{50} رده سلولی HeLa	IC_{50} رده سلولی MCF-7
عصاره متانولی بلوط+MMN	< ۱۰۰ (μg/ml)	۸ (μg/ml)
Paclitaxel (استاندارد)	۴ (نانومولار)	۲۸/۴ (نانومولار)

شایان ذکر است که عصاره متانولی به دست آمده، عاری از هرگونه متانول است؛ چراکه حلال آلی آن بعد از استخراج مواد مؤثره میسلیم، توسط دستگاه تبخیر کننده دوار به صورت کامل تبخیر شده است. بنابراین سمیت حاصله مربوط به متابولیت های قارچی است و نه متانول.

بحث

در این تحقیق، بهینه سازی خاصیت آنتی اکسیدانی قارچ شی تا که در محیط های کشت انتخابی مختلف انجام شد و نشان داده شد که در محیط غنی شده توسط عصاره بلوط خاصیت آنتی اکسیدانی قارچ شی تا که افزایش می یابد. در این پژوهش نشان داده شد که قبل از بهینه سازی محیط کشت، فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره ۴/۸ میلی گرم معادل ۱۰۰ گرم آسکوربیک اسید است. این مقدار با گزارش های Choi و همکاران در سال ۲۰۰۶ (۸) تشابه بسیار نزدیکی داشت. بعد از

با توجه به شکل ۵ محیط MMN+ بلوط با نشان دادن پائین ترین میزان IC_{50} بیشترین خاصیت آنتی اکسیدانی را دارد.

ب- قابلیت احیای یون فریک

بررسی میزان فعالیت آنتی اکسیدانی با استفاده از روش FRAP نیز انجام شد. نتایج حاصل از بررسی توانایی احیای یون فریک به فرو در حضور معرف TPTZ در ۳ تکرار با غلظت ۸ میلی گرم بر میلی لیتر از عصاره ها، نشان داد محیط بلوط+MMN با ۱۱۳/۷ میکروگرم اکی والان Fe^{2+} بر میلی گرم عصاره خشک، بیشترین فعالیت احیاءکنندگی یون آهن را دارد (جدول ۳).

جدول ۳: نتایج فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره های قارچ شی تا که

عصاره	بازدارندگی رادیکال آزاد DPPH ($\mu\text{g/ml } IC_{50}$)	احیای یون های فریک ($\mu\text{g eq. } Fe^{2+}/\text{mg extract}$)
بلوط+MMN	۱۴۲۸/۱۲	۱۱۳/۷ ± ۳/۳۷
بلوط+PGC	۳۵۹۷/۲۹	۸۹/۶۷ ± ۱/۳۵
سبوس+MMN	۳۸۴۰/۷۳	۱۰۷/۰۳ ± ۲/۳۹
سبوس+PGC	۶۱۵۷/۸۶	۳۸/۸۹ ± ۱/۶۵
BHT	۲۹/۰۳	-
اسکوربیک اسید	۰/۳	۷۷۴۰/۲ ± ۱/۶۴

بنابراین می توان محیط بلوط+MMN را به عنوان محیط بهینه در نظر گرفت. در مرحله بعد برای تأیید بهینه سازی محیط بلوط+MMN و محیط پایه MMN در شرایط کامل یکسان از نظر خاصیت آنتی اکسیدانی مقایسه شدند (جدول ۴).

جدول ۴: مقایسه فعالیت آنتی اکسیدانی محیط پایه و محیط بهینه قارچ شی تا که

عصاره	بازدارندگی رادیکال آزاد DPPH ($\mu\text{g/ml } IC_{50}$)	احیای یون های فریک ($\mu\text{g eq. } Fe^{2+}/\text{mg extract}$)
MMN	۷۳۴۵/۷	۶۰/۷۴ ± ۴/۳۷
بلوط+MMN	۱۴۰۲/۱۳	۱۱۵/۷ ± ۱/۷۸
BHT	۳۴/۳	-
اسکوربیک اسید	۰/۳	۷۹۸۹/۴ ± ۳/۳

با تحلیل نتایج مشخص می شود میزان بازدارندگی رادیکال DPPH در محیط بهینه نسبت به محیط پایه ۵/۲۴ برابر افزایش یافته و میزان احیای یون های فریک نیز ۱/۹ برابر بهبود یافته است.

¹³ Concentration resulting in 50% Inhibition of cell growth

شود. گام بعدی در بهینه‌سازی، بررسی اثر هم‌افزایی متابولیت‌های ثانویه چندین گونه قارچی است که در نهایت می‌توان ترکیب‌های مؤثره آنتی‌اکسیدان قارچ‌شی‌تاکه را استخراج و خالص‌سازی و شناسایی نمود.

نتیجه‌گیری

عصاره چوب بلوط می‌تواند قارچ‌شی‌تاکه را تحریک به تولید ترکیب‌های آنتی‌اکسیدان کند و استفاده از آن به‌عنوان جزئی از محیط کشت مناسب بوده است به‌طوری‌که میزان بازدارندگی رادیکال DPPH در محیط بهینه نسبت به محیط پایه ۵/۲۴ برابر افزایش و میزان احیای یون‌های فریک نیز ۱/۹ برابر بهبود یافت. هم‌چنین سمیت سلولی بسیار مناسب (IC_{50} برابر ۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر) را بر روی رده سلولی MCF-7 نشان داد. نتایج به‌دست آمده نشان می‌دهد که می‌توان با افزودن عصاره چوب بلوط به محیط کشت قارچ، قارچ‌شی‌تاکه را به‌عنوان تولیدکننده ترکیب‌های آنتی‌اکسیدان با فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالا معرفی کرد.

سپاسگزاری

از معاونت تحقیقات و فن‌آوری دانشگاه تهران جهت حمایت‌های مادی و معنوی از این پروژه تشکر و قدردانی می‌شود.

بهینه‌سازی این مقدار به ۲۱ میلی‌گرم معادل ۱۰۰ گرم آسکوربیک‌اسید افزایش یافت. این مقدار معادل ۵/۲۴ برابر افزایش خاصیت آنتی‌اکسیدانی در اثر افزودن عصاره چوب بلوط به محیط کشت است. در حالی‌که بهینه‌سازی‌های محققان پیشین مقدار ۱۰/۷۸ میلی‌گرم معادل ۱۰۰ گرم آسکوربیک‌اسید را نشان می‌داد (۲). این امر بیانگر آن است که عصاره چوب بلوط نسبت به دیگر فاکتورهای بررسی شده توسط محققان، اثر چشم‌گیرتری دارد.

در پژوهشی که توسط Razeghi و همکاران در ۱۳۸۷ به منظور تعیین شرایط مناسب برای رشد قارچ‌شی‌تاکه به‌صورت فاکتوریل در قالب به‌طور کامل تصادفی انجام شد، مشخص شد حضور سبوس برنج در ترکیب محیط کشت سبب افزایش سرعت و میزان رشد می‌شود. در پژوهش حاضر نیز همان‌طور که از نتایج استنباط می‌شود محیط حاوی سبوس برنج بیش‌ترین وزن میسلیمیومی را دارد. اما در بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی چنین نتیجه‌ای مشاهده نشد و دلیل آن می‌تواند عدم وجود رابطه مستقیم بین رشد و تولید متابولیت ثانویه آنتی‌اکسیدان باشد (۱۸).

Choi و همکاران در سال ۲۰۰۶ تأثیر حرارت دادن را بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ترکیب‌های پلی‌فنولی قارچ‌شی‌تاکه بررسی کردند. در این تحقیق مشخص شد حرارت دادن شی‌تاکه خام در اتوکلاو به‌مدت ۳۰ دقیقه با حرارت ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد سبب افزایش بازدارندگی رادیکال DPPH و افزایش سطح پلی‌فنول‌های آزاد می‌شود. گرما دادن سبب آزاد شدن ترکیب‌های آنتی‌اکسیدانی می‌شود که با پیوند کووالان به پلی‌مرهای نامحلول در دیواره سلول متصل شده‌اند. در این تحقیق میزان بازدارندگی رادیکال DPPH ۲/۲ برابر نسبت به حالت پایه افزایش یافت (۲). هم‌چنین با بهبود محیط کشت قارچ‌شی‌تاکه میزان بازدارندگی رادیکال DPPH ۵/۲۴ برابر افزایش یافت.

در پژوهشی که توسط Turfo و همکاران در سال ۲۰۱۰ انجام شد، غنی‌سازی میسلیوم قارچ‌شی‌تاکه با سلنیوم به‌کمک واکنش اکسید-احیا، سبب افزایش ترکیب‌های پلی‌فنولی و به‌دنبال آن فعالیت آنتی‌اکسیدانی شده است (۲۲). با توجه به نتایج آنتی‌اکسیدانی بهینه به‌دست آمده از قارچ‌شی‌تاکه جهت گسترش مطالعه و تحقق کاربرد کلینیکی این قارچ پیشنهاد می‌گردد ابتدا با استفاده از برنامه آماری سطح پاسخ، خواص آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی قارچ‌شی‌تاکه و سپس شرایط تولید متابولیت‌های آنتی‌اکسیدان در بیوراکتور بهینه‌سازی

1. Ahmad, M. F. (2019). *Ganoderma lucidum*: A Macro Fungus with Phytochemicals and Their Pharmacological Properties. In *Plant and Human Health, Volume 2* (pp. 491-515). Springer, Cham.
2. Ajdari Z, Ebrahimpour A, Abdul Manan M, Hamid M, Mohamad R, Ariff AB. Nutritional requirements for the improvement of growth and sporulation of several strains of *Monascus purpureus* on solid state cultivation. *BioMed Research International*. 2011 Dec 29;2011.
3. Azizi, M., Ghourchian, H., Yazdian, F., & Alizadehzeinabad, H. (2018). Albumin coated cadmium nanoparticles as chemotherapeutic agent against MDA-MB 231 human breast cancer cell line. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*, 46(sup1), 787-797.
4. Azizi M, Razeghi Yadak L, Farsi M. Effect of spawn type and preparation methods on qualitative and quantitative characteristics of Shiitake mushroom. In *The 5th International Medicinal Mushroom Conference 2009 Sep 5*.
5. Azizi M, Tavana M, Farsi M, Oroojalian F. Yield performance of lingzhi or reishi medicinal mushroom, *Ganoderma lucidum* (W. Curt.: Fr.) P. Karst. (higher basidiomycetes), using different waste materials as substrates. *Int J Med Mushrooms*. 2012;14(5).
6. Azizi, M., Ghourchian, H., Yazdian, F., & Dashtestani, F. (2015). Anticancer and antioxidant properties of Ag NPs coated with BSA NPs.
7. Chen H, Ju Y, Li J, Yu M. Antioxidant activities of polysaccharides from *Lentinus edodes* and their significance for disease prevention. *Int J Biol Macromol*. 2012 Jan 1;50(1):214-8.
8. Choi Y, Lee SM, Chun J, Lee HB, Lee J. Influence of heat treatment on the antioxidant activities and polyphenolic compounds of Shiitake (*Lentinus edodes*) mushroom. *Food Chemistry*. 2006 Jan 1;99(2):381-7.
9. CLAc H. *Medicinal mushrooms: an exploration of tradition, healing and culture*. Santa Cruz.
10. Finimundy TC, Dillon AJ, Henriques JA, Ely MR. A review on general nutritional compounds and pharmacological properties of the *Lentinula edodes* mushroom. *Food Nutr Sci*. 2014 Jun 26;5(12):1095.
11. Hobbs C. *Medicinal mushrooms: an exploration of tradition, healing, and culture*. Book Publishing Company; 2002 Feb 1.
12. Keypour S, Rafati H, Riahi H, Mirzajani F, Moradali MF. Qualitative analysis of ganoderic acids in *Ganoderma lucidum* from Iran and China by RP-HPLC and electrospray ionisation-mass spectrometry (ESI-MS). *Food chemistry*. 2010 Apr 15;119(4):1704-8.
13. Keypour S, Riahi H, Moradali MF, Rafati H. Investigation of the antibacterial activity of a chloroform extract of Ling Zhi or Reishi medicinal mushroom, *Ganoderma lucidum* (W. Curt.: Fr.) P. Karst. (Aphyllphoromycetidae), from Iran. *Int J Med Mushrooms*. 2008;10(4).

14. Madhanraj, R., Ravikumar, K., Maya, M. R., Illuri, R., Venkatakrishna, K., Rameshkumar, K., & Paulraj, B. (2019). Evaluation of anti-microbial and anti-haemolytic activity of edible basidiomycetes mushroom fungi. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, 9(1), 132-135.
15. Masuko T, Minami A, Iwasaki N, Majima T, Nishimura SI, Lee YC. Carbohydrate analysis by a phenol-sulfuric acid method in microplate format. *Analytical biochemistry*. 2005 Apr 1;339(1):69-72.
16. Moğ AC, Silaghi-Dumitrescu R, Sârbu C. Rapid and effective evaluation of the antioxidant capacity of propolis extracts using DPPH bleaching kinetic profiles, FT-IR and UV-vis spectroscopic data. *J Food Compost Anal*. 2011 Jun 1;24(4-5):516-22.
17. Ngai PH, Ng TB. Lentin, a novel and potent antifungal protein from shitake mushroom with inhibitory effects on activity of human immunodeficiency virus-1 reverse transcriptase and proliferation of leukemia cells. *Life Sciences*. 2003 Nov 14;73(26):3363-74.
18. Razeghi YL, Azizi M, Farsi M, Shah Tahmasbi Sh, Evaluation effect of media formulation, PH and temperature on "shiitake" mycelium growth analysis on solid and liquid culture conditions, *J Horti Sci*. 2009, 23, 1;18-26.
19. Reis FS, Martins A, Barros L, Ferreira IC. Antioxidant properties and phenolic profile of the most widely appreciated cultivated mushrooms: a comparative study between in vivo and in vitro samples. *Food Chem Toxicol*. 2012 May 1;50(5):1201-7.
20. Shen J, Tanida M, Fujisaki Y, Horii Y, Hashimoto K, Nagai K. Effect of the culture extract of *Lentinus edodes* mycelia on splenic sympathetic activity and cancer cell proliferation. *Autonomic Neuroscience*. 2009 Jan 28;145(1-2):50-4.
21. Thaipong K, Boonprakob U, Crosby K, Cisneros-Zevallos L, Byrne DH. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *J Food Compost Anal*. 2006 Sep 1;19(6-7):669-75.
22. Turło J, Gutkowska B, Herold F. Effect of selenium enrichment on antioxidant activities and chemical composition of *Lentinula edodes* (Berk.) Pegl. mycelial extracts. *Food Chem Toxicol*. 2010 Apr 1;48(4):1085-91.
23. Yen MT, Tseng YH, Li RC, Mau JL. Antioxidant properties of fungal chitosan from shiitake stipes. *LWT-Food Sci Technol*. 2007 Mar 1;40(2):255-61.