NCMBJ
Research article

New Cell Mol Biotech
j.9/35 , 2019

Scan online to view this article

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

Marzieh Azizi[1], Fatemeh Yazdian[2*], Mojgan Pourshirazi[2], Bibi Fatemeh Haghirosadat[2]

1-Institute of Biochemistry and Biophysics (IBB), University of Tehran, Iran
2-Bioscience Group of New Science and Technology Department, University of Tehran, Iran

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 0:16 +0430 on Monday August 2nd 2021

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 appropriatecytotoxicity (IC_{50} 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

مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی مولکولی
دوره ۹ - شماره ۳۵ - تابستان ۱۳۹۸
مقاله تحقیقی

برای مشاهده این مقاله به صورت آنلاین اسکن کنید

تأثیر عصاره خام چوب بلوط در افزایش خاصیت آنتی‌اکسیدانی 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

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 0:16 +0430 on Monday August 2nd 2021

چکیده

سابقه و هدف: قارچ *لنتینولا ادودز* (شی‌تاکه)، به‌دلیل 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 شی‌تاکه 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 (IC_{50} 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 شی‌تاکه است. پس می‌تواند به‌عنوان محرک مناسبی برای افزایش میزان آنتی‌اکسیدان‌ها درسلول‌های قارچ شی تاکه در محیط‌های کشت به‌کار رود.

واژه‌های کلیدی: متابولیت ثانویه، آنتی‌اکسیدان، لنتینولا ادودز

مقدمه

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 محققین اثرهای مطلوب آن‌ها را شناسایی، معرفی و نتایج آن را منتشر می‌سازند. از آن‌جایی‌که مواد دارویی مصنوعی بیش‌تر دارای تأثیرهای جانبی بر بدن انسان هستند و با توجه‌به گرایش روز افزون بشر به درمان توسط مواد طبیعی، قارچ‌ها می‌توانند منبعی مناسب برای تـأمین 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 جمع‌آوری اطلاعات و تحقیق در زمینه قارچ‌های دارویی در ایران پیشرفت چشم‌گیری داشته است. از

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

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 0:16 +0430 on Monday August 2nd 2021

جمله این تحقیق‌ها می‌توان به گزارش و معرفی بزرگترین قارچ خوراکی با خاصیت دارویی در مراتع ییلاقی استان مازندران با نام لندینولا ادودز[1] و نام علمی گانودرما لوسیدوم (Basidiomycota) *Ganoderma lucidum* (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 میسلیومی 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[2] به شی‌تاکه معروف است. قارچ شی‌تاکه طی هزاران سال در ژاپن و چین هم به عنوان 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[3]) و کمپلکس هتروگلوکان-پروتئین (LEM[4]) با اثرهای ضدتوموری و تقویت کننده سامانه ایمنی، اریتادنین (کاهش دهنده کلسترول)، ارگوسترول (پیش‌ساز 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 میسلیوم 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 توجه‌به 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 به‌صرفه 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). میسلیوم‌های این قارچ به‌راحتی می‌توانند بر روی محیط‌های ساده مانند سیب‌زمینی دکستروز آگار رشد یابند (۱۷). Shen و همکاران در سال ۲۰۰۹ نشان دادند که میسلیوم قارچ شی‌تاکه قابلیت رشد بر روی تفاله نیشکر و سبوس برنج بدون چربی نیز دارد (۲۰). Razeghi YL و همکاران در سال ۱۳۸۸، محیط دست سازی 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

[1] Lentinula edodes
[2] Shia tree
[3] Lentinan
[4] *Lentinula edodes mycelium (LEM)*

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 0:16 +0430 on Monday August 2nd 2021

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. به‌منظور تهیه بانک، هر ۲۰ روز یک پرگنه از محیط حاوی میسلیوم قارچ به محیطی تازه منتقل شد.

انتقال به محیط مایع

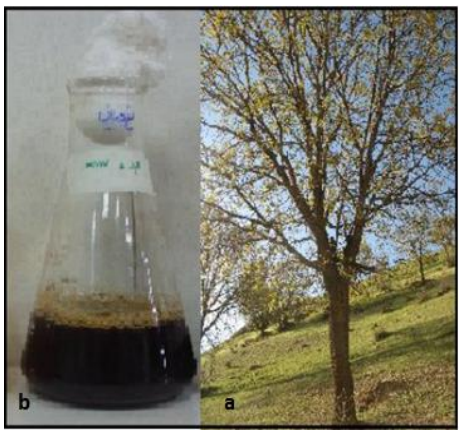
محیط‌های مایع پیشنهادی از مقالات استخراج شد (جدول ۱) و به‌منظور تعیین محیط کشت بهینه با بیش‌ترین میزان رشد میسلیوم؛ یک پرگنه به قطر ۵ میلی‌متر از محیط جامد در شرایط سترون به ارلن ۱۰۰ حاوی ۳۰ میلی لیتر محیط کشت (جدول ۱) منتقل شد و مدت ۳۰ روز در شیکر انکوباتور (Orbital incubator model SI50, Stuart Scientific,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

جدول۱- ترکیب محیط کشت‌های مختلف برای رشد قارچ شی‌تاکه

محیط کشت	ترکیب‌ها(g/L)
MMN (Melin-Norkrans Culture Medium)	۰/۰۲۵ NaCl، ۵ Malt extract، ۱ Casein، ۰/۲۵ $(NH_4)_2HPO_4$، ۰/۵ KH_2PO_4، ۰/۰۰۵ FeCl3، ۰/۰۵ CaCl2، ۰/۱۵ MgSO4.7H2O، ۰/۱ Thiamin و ۱۰ Glucose
PGC	۲۵۰ Potato، ۱ Casein و ۱۵ Glucose
PGC+ویتامین B_1	۲۵۰ Potato، ۱ Casein، ۰/۱ Thiamin و ۱۵ Glucose
BM (Basal Medium)	۱۰ Yeast extract، ۱۰ Casein، ۱ KH2PO4 و ۵۰ Glucose
BM+ویتامین B_1	۱۰ Yeast extract، ۱۰ Casein، KH2PO4 ۱، ۰/۱ Thiamin و ۵۰ Glucose
BM+$CaCl_2$	۱۰ Yeast extract، ۱۰ Casein، ۱ KH2PO4، ۵۰ Glucose و ۰/۰۵ CaCl2
PDC	۲۴ PDC، ۱ Casein
PDC+ویتامین B_1	۲۴ PDC، ۱ Casein و ۰/۱ Thiamin

انتخاب عوامل محیطی به‌منظور افزایش سرعت رشد

با توجه‌به این که قارچ شی‌تاکه به‌طور وحشی روی درخت بلوط رشد می‌کند، چوب بلوط از دامنه کوه‌های زاگرس در استان کهکیلویه و بویراحمد جمع‌آوری شد و عصاره آن به‌عنوان عامل مؤثر در رشد در نظر گرفته شد (شکل۱). هم‌چنین 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.



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

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

انتخاب محیط‌هایی با بیش‌ترین میزان رشد

به‌منظور 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 میلی‌لیتر از محیط جامد به ۳۰ میلی‌لیتر 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

به‌منظور 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 نمونه ها

به‌منظور استخراج ترکیب‌های مؤثره موجود در میسلیوم، بر روی ۰/۵ گرم از میسلیوم لیوفیلیز شده ۲۰ میلی‌لیتر متانول ۹۶٪ ریخته شد و به‌مدت ۲ ساعت با دور ۱۵۰ rpm هم‌زده شد. سپس رسوب آن با کاغذ واتمن شماره ۱ جدا شد.

جدول ۲ ترکیب‌های محیط‌های مایع حاوی عصاره های گیاهی

محیط کشت	ترکیبات (g/L)
MMN (Melin-Norkrans Culture Medium)	۰/۰۲۵ NaCl، ۵ Malt extract، ۱ Casein، ۰/۲۵ $(NH_4)_2HPO_4$، ۰/۵ KH_2PO_4، ۰/۰۰۵ FeCl3، ۰/۰۵ CaCl2، ۰/۱۵ MgSO4.7H2O، ۰/۱ Thiamin و ۱۰ Glucose

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 0:16 +0430 on Monday August 2nd 2021

PGC	Glucose و ۰/۱ Casein ،۲۵۰ Potato ۱۵
BM+$CaCl_2$	،۱۰ Casein ،۱۰ Yeast extract ۵۰ Glucose ، ۱ KH2PO4 و CaCl2 ۰/۰۵
PDC	۱ Casein ،۲۴ PDC
بلوط +MMN+	NaCl،۰/۰۲۵ Malt extract ،۵Casein ،۱(NH4)2HPO4 ،۰/۲۵ KH_2PO_4 ،۰/۰۵ CaCl2 ،۰/۰۰۵ ،۰/۵FeCl3 ۰/۱ Thiamin ،۰/۱۵ MgSO4.7H2O ۱۰ و ۳۰ میلی‌لیتر عصاره Glucose و بلوط
بلوطPGC+	Glucose و ۰/۱ Casein ،۲۵۰ Potato ۱۵ و ۳۰ میلی‌لیتر عصاره بلوط
بلوطG+	گلوکز ۱۵ و ۳۰ میلی‌لیتر عصاره بلوط
خاک اره+MMN	NaCl G ،۰/۰۲۵ Malt extract ،۵ Casein ،۱ (NH4)2HPO4 ،۰/۲۵ KH_2PO_4 ،۰/۵ FeCl3 ،۰/۰۰۵ CaCl2 ،۰/۰۵MgSO4.7H2O ،۰/۱۵ ۱۰ و ۳۰ Glucose ۰/۱ و Thiamin میلی‌لیتر خاک اره
خاک اره+PGC	Casein ،۲۵۰ Potato و ۰/۱ ۱۵ Glucose و ۳۰ میلی لیتر خاک اره
خاک اره +G	گلوکز ۱۵ و ۳۰ میلی لیتر خاک اره
سبوس برنج+MMN	NaCl ،۰/۰۲۵ Malt extract ،۵ Casein ،۱ (NH4)2HPO4 ،۰/۲۵ KH_2PO_4 ،۰/۵ FeCl3 ،۰/۰۰۵ CaCl2 ،۰/۰۵MgSO4.7H2O ،۰/۱۵ ۱۰ و ۳۰ Glucose ۰/۱ و Thiamin میلی‌لیتر سبوس برنج
سبوس برنجPGC+	Glucose و ۰/۱ Casein ،۲۵۰ Potato ۱۵ و ۳۰ میلی‌لیتر سبوس برنج
سبوس برنجG+	گلوکز ۱۵ و ۳۰ میلی‌لیتر سبوس برنج
بلوط+خاک اره+سبوس برنجGC+	گلوکز ۱۵، کازئین ۱ و ۱۰ میلی‌لیتر از هر عصاره

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 به‌وسیله دستگاه تبخیر کننده دوار (heidolph rotary evaporator laborota 4000، آلمان) در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد تغلیظ شد تا عصاره متانولی به‌دست آید. جهت نگهداری عصاره به‌دست آمده از دمای ۴ درجه سانتی‌گراد استفاده گردید (۱۸).

بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی

الف- بررسی قابلیت حذف رادیکال‌های آزاد توسط روش DPPH[5]

اثر آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها با استفاده از روش اندازه‌گیری کاهش ظرفیت رادیکالی[6] (RSC) به‌کمک رادیکال ۲،۲-دی فنیل-۱-پیکریل هیدرازیل (DPPH) مورد ارزیابی قرار گرفت. DPPH، ترکیبی‌است بنفش رنگ که به‌دلیل حضور گروه‌های فنیل در ساختار به‌راحتی به‌صورت رادیکال در آمده و در واقع منبع رادیکال آزاد است. این ترکیب با گرفتن یک الکترون از ترکیب آنتی‌اکسیدان، از رنگ بنفش به‌سمت 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 بیش‌تری مصرف شده و رنگ بنفش بیش‌تر به‌سمت زرد میل می‌کند (۶). بلانک، غلظت‌های مختلف نمونه و کنترل (محلول mg/ml ۲ از BHT[7] 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 به‌مدت 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 به‌دست آمده در فرمول زیر درصد بازدارندگی رادیکال DPPH به‌دست آمد. سپس با رسم منحنی درصد بازدارندگی نسبت‌به غلظت، می‌توان غلظتی از نمونه که در آن ۵۰ درصد بازدارندگی (IC_{50}) مشاهده می‌شود را به‌دست آورد. بنابراین هرچه میزان کم‌تر 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[8]

این روش بر اساس توانایی ترکیب مورد نظر در احیاء یون‌های فریک (آهن سه ظرفیتی) به فرو (آهن دو ظرفیتی) در حضور محلول TPTZ[9] استوار است. کمپلکس $TPTZ\text{-}Fe^{2+}$، 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

[6] Radical Scavenging Capacity

[7] Butylated Hydroxy Toluene

[8] Ferric Reducing Antioxidant Power

[9] 2,4,6-tripyridyl-s-triazine

۱:۱:۱۰)، معرف FRAP تهیه شد. این محلول باید به‌صورت تازه تهیه شود چرا که پس از مدت ۳۰ دقیقه کدر شده و دیگر قابل استفاده نیست. معرف FRAP به‌مدت ۱۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد، سپس به‌ترتیب 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 به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد 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، به‌علت 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 به‌دست آمد. آسکوربیک اسید نیز به‌عنوان یک احیا کننده قوی یون آهن برای مقایسه و به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد (۲۰).

در ادامه تحقیق با توجه به این‌که محیط بلوط+MMN را به عنوان محیط بهینه انتخاب گردید؛ میزان تولید متابولیت‌های ثانویه (میزان کل پلی‌ساکارید و محتوای کل فنولی) در میسلیوم 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 به‌خصوص پلی‌ساکاریدهای ویژه آن‌ها و محتوای اورونیک‌اسید و اسکوربیک‌اسید 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 میسلیوم کشت شده شی‌تاکه نشان داده است این عصاره‌ها محتوی پلی‌ساکارید KS-2 هستندکه 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[10] و LEM[11] هستند. LEM و LAP هردو فعالیت ضدسرطانی قوی را به‌روش تزریق عضلانی و تجویز خوراکی در انسان‌ها و حیوانات نشان داده‌اند (۱).

در ژاپن لنتینان به‌عنوان یک دارو طبقه‌بندی می‌شود، در حالی‌که LEM و LAP بیش‌تر به‌عنوان مکمل‌های غذایی به‌حساب می‌آیند. این اعتقاد وجود دارد که این ترکیب‌ها به‌جای حمله مستقیم به سلول‌های سرطانی بیش‌تر به‌صورت تقویت سامانه ایمنی عمل می‌کنند. هم‌چنین سمیت بالینی لنتینان به‌ندرت 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 دوبوس 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؛ به‌طوری‌که مقدار قند حتی در حد میکروگرم شناسایی می‌شود (۱۵). برای انجام آزمایش از قند گلوکز به‌عنوان استاندارد و میکروپلیت‌های ۹۶ خانه‌ای ته‌گرد (SPL ، کره) استفاده شد. ۵۰ میکرو لیتر از نمونه و هم‌چنین گلوکز استاندارد در مقادیری به چاهک‌ها اضافه شدند که غلظت هر چاهک ۳۶۰ppm 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 به‌مدت ۵ دقیقه در حمام آب ۹۰ درجه سانتی‌گراد و بعد از آن به‌مدت ۵ دقیقه در حمام آب

[10] Lentinula edodes aqueous precipitate extract extracted from the mycelium (LAP)
[11] Lentinus edodes mycelia (LEM)

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 0:16 +0430 on Monday August 2nd 2021

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 0:16 +0430 on Monday August 2nd 2021

سرد قرار گرفت. در نهایت میکروپلیت درون دستگاه اسپکتوفوتومتر قرار گرفته و پس از۲۰ 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 به‌مدت 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 به‌دست می‌آید که با قراردادن مقادیر جذب به‌دست آمده از عصاره‌ها در این معادله می‌توان غلظت معادل گالیک اسید از عصاره‌ها را به‌دست آورد. غلظت به‌دست آمده بر حسب میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم خشک عصاره گزارش می‌شود.

بررسی سمیت سلولی

میزان سمیت سلولی عصاره به‌دست آمده از محیط کشت بهینه قارچ شی‌تاکه برضد 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 به‌وسیله 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 به‌حالت پایدار خود درآیند. 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 محلول MTT اضافه می‌شود و به‌مدت ۲ تا ۴ ساعت در انکوباتور CO_2 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 به‌راحتی 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 به‌دست 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 به‌دست آوردن درصد حیات، میانگین جذب ۵۷۰ خوانده شده مربوط به نمونه‌های تیمار شده، از میانگین جذب ۵۷۰ خوانده شده مربوط به نمونه تیمار نشده (به‌عنوان کنترل منفی) کسر گردید و تقسیم‌بر 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.

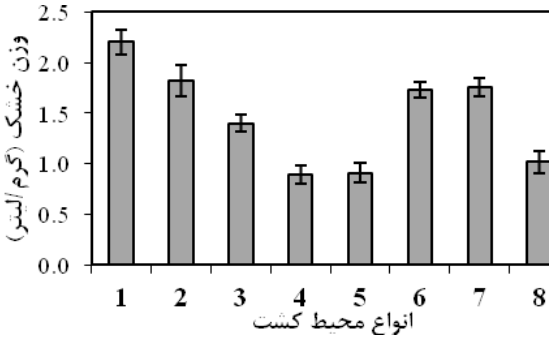
نتایج

مقایسه میزان رشد در محیط‌های مایع معرفی شده

به‌منظور مقایسه میزان رشد میسلیوم 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 میسلیوم (g/L) در شکل ۲ آمده است. نتایج به‌دست آمده نشان می‌دهد محیط‌های MMN، PGC، PDC و $BM+CaCl_2$ به‌ترتیب با ۲/۲ g/L، ۱/۸۲ g/L، ۱/۵۵و ۱/۵۳ g/L بیش‌ترین وزن خشک را سبب می‌شوند. بنابراین این محیط‌ها برای مرحله بعد انتخاب شدند. هم‌چنین با وجود این‌که حضور ویتامین B_1 در بسیاری از قارچ‌ها میزان رشد را افزایش می‌دهد، وجود این ویتامین تأثیر قابل توجهی

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 0:16 +0430 on Monday August 2nd 2021

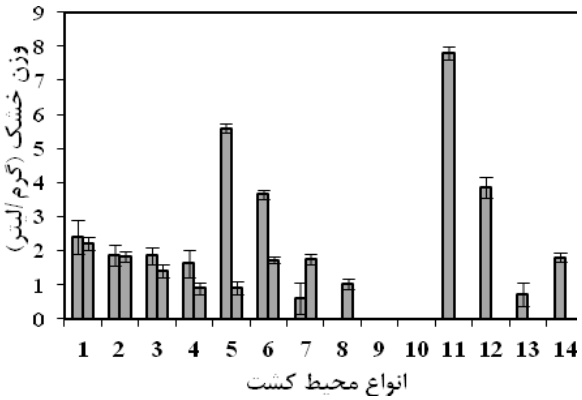
بر روی رشد قارچ شی‌تاکه نداشته است. با توجه به این‌که قارچ شی‌تاکه در محیط‌های MMN و PGC رشد به‌نسبت خوبی را نشان می‌دهد، این محیط‌ها برای بهینه‌سازی خاصیت آنتی‌اکسیدانی انتخاب شدند.



شکل ۲: مقایسه میزان رشد میسلیوم قارچ شی‌تاکه در محیط مایع (g/L): ۱- MMN، ۲-PGC ، ۳- PGC+ویتامین B1، ۴- BM، ۵- BM +ویتامین B1، ۶- $BM+CaCl_2$، ۷- PDC، و ۸- PDC +ویتامین B1، تعداد تکرارها در این آزمایش‌ها بین ۳ تا ۵ تکرار برای هر نمونه بود.بار بر روی هیستوگرام بیانگر SD است.

تأثیر عوامل محیطی بر روی رشد میسلیوم

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



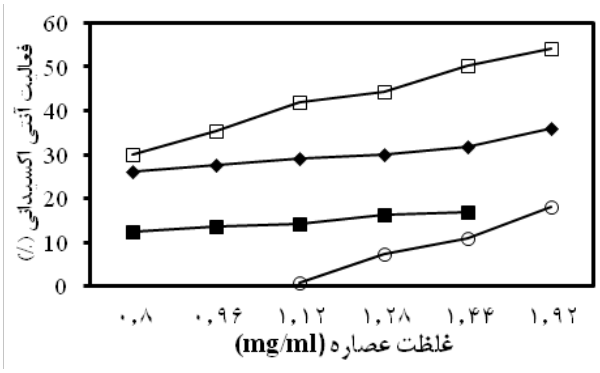
شکل ۳ مقایسه تاثیر عصاره‌های بلوط، سبوس برنج و خاک اره بر وزن خشک میسلیوم (g/L) ۱- MMN، ۲-PGC ، ۳- $BM+CaCl_2$، ۴- PDC، ۵- بلوط + PGC، ۶- بلوط + PGC، ۷- بلوط + G، ۸- خاک اره +MMN، ۹- خاک اره + PGC، ۱۰- خاک اره + G، ۱۱- سبوس برنج +MMN، ۱۲-سبوس برنج + PGC، ۱۳- سبوس برنج + G و ۱۴- بلوط+ خاک اره+ سبوس برنج+ GC، تعداد تکرارها در این آزمایش‌ها بین ۳ تا ۵ تکرار برای هر نمونه بود. بار بر روی هیستوگرام بیانگر SD است

نتایج به‌دست آمده مشخص کرد عصاره بلوط و سبوس برنج می‌تواند رشد را تا حد قابل توجهی افزایش دهد، اما عصاره خاک اره رشد را مهار می‌کند. علت آن به‌احتمال می‌تواند ناخالص بودن خاک اره استفاده شده و حضور ترپنوئیدهای ممانعت کننده رشد باشد. هم‌چنین از مقایسه وزن خشک به‌دست آمده مشخص شد محیط‌های MMN+ بلوط، MMN+ سبوس، PGC+ بلوط و PGC+ سبوس سبب تولید بیش‌ترین مسلیوم شده‌اند، بنابراین برای ادامه تحقیق، میسلیوم کشت شده بر روی این ۴ محیط کشت عصاره گیری گردید.

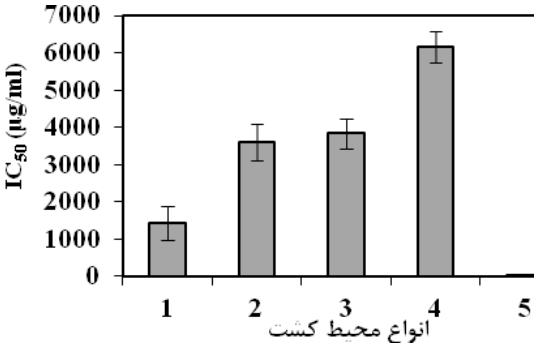
بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی

الف- قابلیت حذف رادیکال‌های آزاد

میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره متانولی ۴ محیط (محیط‌های ۱- MMN+ بلوط، ۲- MMN+ سبوس، ۳- PGC+ بلوط و ۴- PGC+ سبوس که باعث بیش‌ترین تولید میسلیوم شده بودند) با استفاده از معرف DPPH بررسی شد تا محیط بهینه از لحاظ خاصیت آنتی‌اکسیدانی مشخص شود. نتایج به‌دست آمده از میانگین ۴ بار تکرار فعالیت آنتی‌اکسیدانی غلظت‌های مؤثر مختلف از عصاره‌ها (mg/ml) ۰/۸، ۰/۹۶، ۱/۱۲، ۱/۲۸، ۱/۴۴ و ۱/۹۲ در شکل ۴ و مقادیر IC_{50} (µg/ml) در شکل ۵ آورده شده است.



شکل ۴- مقایسه فعالیت آنتی‌اکسیدانی محیط‌های MMN+ بلوط (●)، MMN+ سبوس (○)، PGC+ بلوط (■) و PGC+ سبوس (□)



شکل ۵- مقادیر IC_{50} ۱- محیط‌های MMN+ بلوط، ۲- PGC+ بلوط، ۳- MMN + سبوس، ۴- PGC+ سبوس و ۵- BHT، تعداد تکرارها در این آزمایش‌ها بین ۳ تا ۵ تکرار برای هر نمونه بود. بار بر روی هیستوگرام بیانگر SD است

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 0:16 +0430 on Monday August 2nd 2021

با توجه به شکل ۵ محیط MMN+ بلوط با نشان‌دادن پائین‌ترین میزان IC_{50} بیش‌ترین خاصیت آنتی‌اکسیدانی را دارد.

ب- قابلیت احیای یون فریک

بررسی میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی 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 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از عصاره‌ها، نشان داد محیط بلوط MMN+ با ۱۱۳/۷ میکروگرم اکی‌والان Fe^{2+} بر میلی‌گرم عصاره خشک، بیش‌ترین فعالیت احیاءکنندگی یون آهن را دارد (جدول ۳).

جدول ۳: نتایج فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های قارچ شی‌تاکه

عصاره	بازدارندگی رادیکال آزاد DPPH (µg/ml IC_{50})	احیای یون‌های فریک (µg eq.Fe^{2+}/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 می‌توان محیط بلوط MMN+ را به‌عنوان محیط بهینه در نظر گرفت. در مرحله بعد برای تأیید بهینه‌سازی محیط بلوط MMN+ و محیط پایه MMN در شرایط کامل یکسان از نظر خاصیت آنتی‌اکسیدانی مقایسه شدند (جدول ۴).

جدول ۴: مقایسه فعالیت آنتی‌اکسیدانی محیط پایه و محیط بهینه قارچ شی‌تاکه

عصاره	بازدارندگی رادیکال آزاد DPPH (µg/ml IC_{50})	احیای یون‌های فریک (µg eq.Fe^{2+}/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 می‌شود میزان بازدارندگی رادیکال DPPH در محیط بهینه نسبت‌به محیط پایه ۵/۲۴ برابر افزایش یافته و میزان احیای یون‌های فریک نیز ۱/۹ برابر بهبود یافته است.

بررسی مقادیر پلی‌ساکارید کل

اندازه‌گیری غلظت پلی‌ساکارید کل محیط بهینه بلوط MMN+ نشان داد میزان قند موجود در یک میلی‌گرم عصاره خشک ۸۳۵ میکروگرم است.

بررسی مقادیر محتوای کل فنولی

محتوای کل فنولی محیط بلوط MMN+ با جای‌گذاری جذب نمونه در معادله نمودار استاندارد گالیک اسید، مقدار ۵/۶۲ میکروگرم گالیک اسید/میلی‌گرم عصاره خشک به‌دست آمد.

بررسی سمیت سلولی

نتایج حاصل از بررسی سمیت سلولی عصاره متانولی محیط بهینه بلوط MMN+ نشان داد، عصاره به‌دست آمده بر ضد رده سلولی HeLa به‌خوبی قادر به احیای کریستال‌های تترازولیوم بلو نیست و تغییر رنگ مناسبی دیده نشد.[13] IC_{50} به‌دست آمده برای آن بیش‌تر 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 میلی‌لیتر از عصاره گزارش شد. نتایج به‌دست آمده در جدول ۵ آورده شده است.

جدول ۵- سمیت سلولی حاصل از محیط بهینه شی‌تاکه

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 به‌دست آمده، عاری از هرگونه متانول است؛ چراکه حلال آلی آن بعد از استخراج مواد مؤثره میسلیوم، توسط دستگاه تبخیر کننده دوار به‌صورت کامل تبخیر شده است. بنابراین سمیت حاصله مربوط به متابولیت‌های قارچی است و نه متانول.

بحث

در این تحقیق، بهینه‌سازی خاصیت آنتی‌اکسیدانی قارچ شی‌تاکه در محیط های کشت انتخابی مختلف انجام شد و نشان داده شد که در محیط غنی‌شده توسط عصاره بلوط خاصیت آنتی‌اکسیدانی قارچ شی‌تاکه افزایش می‌یابد. در این پژوهش نشان داده شد که قبل از بهینه سازی محیط کشت، فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره ۴/۸ میلی‌گرم معادل ۱۰۰ گرم آسکوربیک‌اسید است. این مقدار با گزارش‌های Choi و همکاران در سال ۲۰۰۶ (۸) تشابه بسیار نزدیکی داشت. بعد از

[13] Concentration resulting in 50% Inhibition of *cell* growth

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 نسبت‌به 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 قارچ شی‌تاکه 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 میسلیومی 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 قارچ شی‌تاکه 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 نسبت‌به حالت پایه افزایش یافت (۲). هم‌چنین با بهبود محیط کشت قارچ شی‌تاکه میزان بازدارندگی رادیکال DPPH ۵/۲۴ برابر افزایش یافت.

در پژوهشی که توسط Turło و همکاران در سال ۲۰۱۰ انجام شد، غنی‌سازی میسلیوم قارچ شی‌تاکه با سلنیوم به‌کمک واکنش اکسید-احیا، سبب افزایش ترکیب‌های پلی‌فنولی و به‌دنبال آن فعالیت آنتی‌اکسیدانی شده است (۲۲). با توجه‌به نتایج آنتی‌اکسیدانی بهینه به‌دست آمده از قارچ شی‌تاکه جهت گسترش مطالعه و تحقق کاربرد کلینیکی این قارچ پیشنهاد می‌گردد ابتدا با استفاده از برنامه آماری سطح پاسخ، خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی قارچ شی‌تاکه و سپس شرایط تولید متابولیت‌های آنتی‌اکسیدان در بیوراکتور بهینه‌سازی شود. گام بعدی در بهینه‌سازی، بررسی اثر هم‌افزایی متابولیت‌های ثانویه چندین گونه قارچی است که در نهایت می‌توان ترکیب‌های مؤثره آنتی‌اکسیدان قارچ شی‌تاکه را استخراج و خالص‌سازی و شناسایی نمود.

نتیجه‌گیری

عصاره چوب بلوط می‌تواند قارچ شی‌تاکه 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 نسبت‌به 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، قارچ شی‌تاکه را به‌عنوان تولید کننده 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.

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 0:16 +0430 on Monday August 2nd 2021

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 0:16 +0430 on Monday August 2nd 2021

منابع

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. InThe 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.(Aphyllophoromycetideae), 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.Moţ 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 Hortic 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.

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 0:16 +0430 on Monday August 2nd 2021