

الحمد لله الذي
خلقنا من
الحمم



دانشکده کشاورزی گروه علوم باغبانی و صنایع غذایی

رشته مهندسی کشاورزی - علوم و مهندسی صنایع غذایی - گرایش فناوری مواد غذایی

پایان نامه کارشناسی ارشد

بررسی عوامل شیمیایی موثر بر کشت قارچ گانودرما لوسیدم

نگارنده: امیر قاسمی

استاد راهنما

دکتر حمیدرضا صمدلوئی

بهمن ۱۳۹۹

سپاس بی‌کران پروردگار یکتا را که، هستی‌مان، بخشد و به طریق علم و دانش، رهنمونان شد و به، همیشگی رهروان

علم و دانش مفتخران نمود و خوشه چینی از علم و معرفت را روزی‌مان ساخت.

این پایان نامه را ضمن تشکر و سپاس بیکران و در کمال افتخار و امتنان تقدیم می‌نمایم به:

محضر ارزشمند پدر و مادر عزیزم به خاطر همه‌ی تلاشهای محبت آمیزی که در دوران مختلف زندگی ام انجام داده اند و

با مهربانی چگونه زیستن را به من آموخته اند.

بائشکر و قدردانی از:

استاد فریخته و فرزانه جناب آقای دکتر حمید رضا صد لونی که با نکته های دلاویز و گفته های بلند، صحیفه های سخن را علم
پرور نمود و همواره راهبنا و راهگشای من در اتمام و تکمیل این پایان نامه بوده است.

تعمدنامه

اینجانب **امیر قاسمی** دانشجوی دوره کارشناسی ارشد رشته **مهندسی علوم صنایع غذایی** دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی شاهرود نویسنده پایان نامه **بررسی عوامل شیمیایی موثر بر کشت قارچ گانودرما لوسیدم تحت راهنمایی دکتر حمیدرضا صمدلوئی** متعهد می شوم.

- تحقیقات در این پایان نامه توسط اینجانب انجام شده است و از صحت و اصالت برخوردار است .
- در استفاده از نتایج پژوهشهای محققان دیگر به مرجع مورد استفاده استناد شده است .
- مطالب مندرج در پایان نامه تاکنون توسط خود یا فرد دیگری برای دریافت هیچ نوع مدرک یا امتیازی در هیچ جا ارائه نشده است .
- کلیه حقوق معنوی این اثر متعلق به دانشگاه صنعتی شاهرود می باشد و مقالات مستخرج با نام « دانشگاه صنعتی شاهرود » و یا « Shahrood University of Technology » به چاپ خواهد رسید .
- حقوق معنوی تمام افرادی که در به دست آمدن نتایج اصلی پایان نامه تأثیرگذار بوده اند در مقالات مستخرج از پایان نامه رعایت می گردد.
- در کلیه مراحل انجام این پایان نامه ، در مواردی که از موجود زنده (یا بافتهای آنها) استفاده شده است ضوابط و اصول اخلاقی رعایت شده است .
- در کلیه مراحل انجام این پایان نامه، در مواردی که به حوزه اطلاعات شخصی افراد دسترسی یافته یا استفاده شده است اصل رازداری ، ضوابط و اصول اخلاق انسانی رعایت شده است .

تاریخ

امضای دانشجو

مالکیت نتایج و حق نشر

کلیه حقوق معنوی این اثر و محصولات آن (مقالات مستخرج ، کتاب ، برنامه های رایانه ای ، نرم افزارها و تجهیزات ساخته شده است) متعلق به دانشگاه صنعتی شاهرود می باشد . این مطلب باید به نحو مقتضی در تولیدات علمی مربوطه ذکر شود . استفاده از اطلاعات و نتایج موجود در پایان نامه بدون ذکر مرجع مجاز نمی باشد.

چکیده

قارچ گانودرما لوسیدم به دلیل داشتن ارزش دارویی بالا، در سرتاسر جهان مورد استفاده قرار می‌گیرد. این قارچ حاوی دو ماده موثره مهم گانودریک اسید و پلی‌ساکارید می‌باشد. در این تحقیق تاثیر عوامل شیمیایی محیط کشت مایع بر میزان رشد و تشکیل متابولیت‌های ثانویه (پلی‌ساکارید و گانودریک اسید) توده زیستی قارچ گانودرما لوسیدم بررسی شدند؛ تا سوبسترای کلیدی که بیشترین تاثیر را در تولید محصول دارد مشخص شود. آزمایشات این تحقیق در دو بخش صورت گرفت. در بخش اول با استفاده از روش یک عامل در زمان، تاثیر پنج نوع منبع کربنی (شربت فروکتوز، شربت گلوکز، پودر گلوکز، نشاسته گندم و نشاسته ذرت)، پنج نوع منبع نیتروژنی (پودر آب پنیر، پپتون گوشت، عصاره مخمر، پودر سویا و شربت گلوتن مایع)، هفت pH اولیه (۵، ۵/۵، ۶، ۶/۵، ۷، ۷/۵ و ۸)، سه غلظت مختلف ($\frac{g}{L}$) ۰/۱، ۰/۱ و ۰/۰۵) نانو ذره اکسید منیزیم و دی‌اکسید تیتانیوم و در نهایت چهار غلظت مختلف ($\frac{\mu L}{L}$) ۱۰، ۲۰، ۱۰۰ و ۳۰۰) ویتامین پیریدوکسین (B_6) بر میزان رشد و تشکیل متابولیت‌های ثانویه توده زیستی این قارچ در محیط کشت مایع مورد بررسی قرار گرفتند. در بخش دوم با استفاده از روش آماری سطح پاسخ، تولید گانودریک اسید و پلی‌ساکارید توده زیستی این قارچ با استفاده از مقادیر متفاوت سوبسترای کلیدی بهینه سازی شد. نتایج روش یک عامل در زمان نشان داد، که منبع کربنی شربت گلوکز، منبع نیتروژنی پودر آب پنیر، pH اولیه ۵، غلظت $\frac{g}{L}$ ۰/۱ نانوذره دی‌اکسید تیتانیوم، غلظت $\frac{g}{L}$ ۰/۰۵ نانوذره اکسید منیزیم و غلظت $\frac{\mu L}{L}$ ۱۰۰ ویتامین پیریدوکسین در ۱۰۰ ml محیط کشت مایع بیشترین تاثیر را بر میزان رشد توده زیستی این قارچ داشتند. نتایج روش یک عامل در زمان نشان داد، که منبع کربنی نشاسته گندم، منبع نیتروژنی پودر آب پنیر، pH اولیه ۶/۵، غلظت $\frac{g}{L}$ ۰/۰۱ اکسید منیزیم، غلظت $\frac{\mu L}{L}$ ۲۰ ویتامین پیریدوکسین بیشترین تاثیر را در تولید پلی‌ساکارید داشتند. نتایج روش بهینه سازی سطح پاسخ مشخص کرد که سطوح ($\frac{g}{L}$) ۳۷/۵ نشاسته گندم و ($\frac{g}{L}$) ۲۰ پودر آب پنیر بیشترین تاثیر را بر میزان تولید پلی‌ساکارید توده زیستی این قارچ در محیط کشت مایع دارند. در حالیکه نتایج روش یک عامل در زمان نشان داد، که منبع کربنی شربت گلوکز، منبع نیتروژنی عصاره مخمر، pH اولیه ۶/۵، غلظت $\frac{g}{L}$ ۰/۰۵ نانوذره دی‌اکسید تیتانیوم، غلظت $\frac{g}{L}$ ۰/۰۵ نانوذره اکسید منیزیم، غلظت $\frac{\mu L}{L}$ ۱۰۰ ویتامین پیریدوکسین بیشترین تاثیر را در تولید گانودریک اسید داشتند. نتایج روش بهینه سازی سطح پاسخ مشخص کرد که ($\frac{g}{L}$) ۵۰ شربت گلوکز و ($\frac{g}{L}$) ۳۰ شربت گلوتن مایع بیشترین تاثیر را بر میزان تشکیل گانودریک اسید توده زیستی این قارچ در محیط کشت مایع دارند.

کلید واژه‌ها: قارچ گانودرما لوسیدم، محیط کشت مایع، بهینه سازی، یک عامل در زمان، روش سطح پاسخ، رشد توده زیستی، تشکیل پلی ساکارید، تشکیل گانودریک اسید

فهرست مطالب

فصل اول	۱
کلیات	۱
۱-۱ مقدمه	۲
۲-۱ معرفی قارچ‌های دارویی	۳
۳-۱ معرفی قارچ گانودرما لوسیدوم	۵
۱-۳-۱ تاریخچه	۵
۲-۳-۱ رده بندی علمی	۷
۳-۳-۱ اندام شناسی و خصوصیات میکروسکوپی	۸
۴-۳-۱ پراکنش جغرافیایی و عادت رشد در طبیعت	۹
۴-۱ شرایط مورد نیاز برای رشد قارچ گانودرما لوسیدم	۱۰
۱-۴-۱ عوامل تغذیه‌ای	۱۰
۱-۴-۱-۱ منبع کربن	۱۱
۲-۴-۱-۱ منبع نیتروژنی	۱۱
۳-۴-۱-۱ عناصر معدنی و ویتامین ها	۱۲
۴-۴-۱-۱ نانوذرات	۱۲
۲-۴-۱ عوامل محیطی	۱۳
۱-۲-۴-۱ عامل دما	۱۳
۲-۲-۴-۱ عامل رطوبت	۱۳
۳-۲-۴-۱ سطح اکسیژن و دی اکسید کربن	۱۳
۴-۲-۴-۱ عامل نور	۱۴
۵-۲-۴-۱ pH	۱۴
۵-۱ کشت مصنوعی قارچ گانودرما لوسیدوم	۱۴
۱-۵-۱ کشت برای تولید میوه	۱۵
۱-۱-۵-۱ کشت بر روی تنه درخت	۱۵
۲-۱-۵-۱ کشت جایگزینی	۱۶
۲-۵-۱ کشت میسلیم در بیوراکتور	۱۶
۱-۲-۵-۱ کشت جامد	۱۶
۲-۲-۵-۱ کشت مایع	۱۶

۱۷	۶-۱ اجزای شیمیایی تشکیل دهنده قارچ گانودرما لوسیدم
۱۸	۷-۱ مواد موثره قارچ گانودرما لوسیدم
۱۸	۱-۷-۱ پلی ساکاریدها
۱۹	۲-۷-۱ ترپنوئیدها
۲۱	۳-۷-۱ استرول ها
۲۲	۴-۷-۱ پروتئین ها
۲۳	۸-۱ محصولات و ارزش اقتصادی قارچ گانودرما لوسیدم
۲۵	۱-۸-۱ معایب محصولات
۲۵	۹-۱ هدف تحقیق
۲۷	فصل دوم
۲۷	مروری بر مطالعات پیشین
۲۸	۱-۲ تحقیقات انجام گرفته بر قارچ گانودرما لوسیدم
۲۸	۱-۱-۲ پژوهش های مربوط به منابع کربنی
۳۱	۲-۱-۲ پژوهش های مربوط به منابع نیتروژنی
۳۴	۳-۱-۲ پژوهش های مربوط به pH
۳۵	۴-۱-۲ پژوهش های مربوط به نانوذرات و یون های فلزی
۳۷	۵-۱-۲ پژوهش های مربوط به نسبت کربن به نیتروژن
۳۹	۶-۱-۲ سایر پژوهش های انجام شده
۴۱	فصل سوم
۴۱	مواد و روش ها
۴۲	۱-۳ مواد اولیه مورد استفاده
۴۲	۲-۳ تجهیزات مورد استفاده
۴۳	۳-۳ روش ها
۴۳	۱-۳-۳ تهیه و نگهداری محیط کشت مادر
۴۳	۲-۳-۳ تهیه محیط کشت توسعه تلقیح
۴۳	۳-۳-۳ تیمارها
۴۴	۱-۳-۳-۳ بخش اول
۴۴	۱-۱-۳-۳-۳ منبع کربنی
۴۴	۲-۱-۳-۳-۳ منبع نیتروژنی
۴۵	۳-۱-۳-۳-۳ pH
۴۵	۴-۱-۳-۳-۳ ویتامین پیریدوکسین
۴۵	۵-۱-۳-۳-۳ نانوذرات اکسید منیزیم و دی اکسید تیتانیوم

۴۶	 ۲-۳-۳-۳ بخش دوم
۴۶	 ۱-۲-۳-۳-۳ بهینه سازی نسبت کربن به نیتروژن برای تولید حداکثر پلی ساکارید
۴۶	 ۲-۲-۳-۳-۳ بهینه سازی نسبت کربن به نیتروژن برای تولید حداکثر گانودریک اسید
۴۶	 ۴-۳-۳ گرمخانه گذاری
۴۷	 ۵-۳-۳ استخراج و خشک کردن توده زیستی قارچ
۴۷	 ۶-۳-۳ استخراج پلی ساکارید توده زیستی قارچ
۴۸	 ۷-۳-۳ استخراج گانودریک اسید توده زیستی قارچ
۴۹	 فصل چهارم
۴۹	 نتایج و بحث
۵۰	 ۱-۴ بخش اول
۵۰	 ۱-۱-۴ اثر منابع کربنی
۵۰	 ۱-۱-۱-۴ اثر منابع کربنی بر میزان رشد توده زیستی
۵۱	 ۲-۱-۱-۴ اثر منابع کربنی بر میزان تشکیل پلی ساکارید
۵۱	 ۳-۱-۱-۴ اثر منابع کربنی بر میزان تشکیل گانودریک اسید
۵۳	 ۲-۱-۴ اثر منابع نیتروژنی
۵۴	 ۱-۲-۱-۴ اثر منابع نیتروژنی بر میزان رشد توده زیستی
۵۵	 ۲-۲-۱-۴ اثر منابع نیتروژنی بر میزان تشکیل پلی ساکارید
۵۶	 ۳-۲-۱-۴ اثر منابع نیتروژنی بر میزان تشکیل گانودریک اسید
۵۷	 ۳-۱-۴ اثر pH اولیه
۵۸	 ۱-۳-۱-۴ اثر pH اولیه بر میزان رشد توده زیستی
۵۹	 ۲-۳-۱-۴ اثر pH اولیه بر میزان تشکیل پلی ساکارید
۶۰	 ۳-۳-۱-۴ اثر pH اولیه بر میزان تشکیل گانودریک اسید
۶۱	 ۴-۱-۴ اثر نانوذرات دی اکسید تیتانیوم و اکسید منیزیم
۶۲	 ۱-۴-۱-۴ نانوذره دی اکسید تیتانیوم
۶۲	 ۱-۱-۴-۱-۴ تاثیر نانوذره دی اکسید تیتانیوم بر میزان رشد توده زیستی
۶۳	 ۲-۱-۴-۱-۴ تاثیر نانوذره دی اکسید تیتانیوم بر میزان تشکیل پلی ساکارید
۶۴	 ۳-۱-۴-۱-۴ تاثیر نانوذره دی اکسید تیتانیوم بر میزان تشکیل گانودریک اسید
۶۵	 ۲-۴-۱-۴ نانوذره اکسید منیزیم
۶۵	 ۱-۲-۴-۱-۴ تاثیر نانوذره اکسید منیزیم بر میزان رشد توده زیستی
۶۶	 ۲-۲-۴-۱-۴ تاثیر نانوذره اکسید منیزیم بر میزان تشکیل پلی ساکارید
۶۷	 ۳-۲-۴-۱-۴ تاثیر نانوذره اکسید منیزیم بر میزان تشکیل گانودریک اسید
۶۸	 ۵-۱-۴ اثر ویتامین پیریدوکسین B6

۶۹	 ۱-۵-۱-۴ تاثیر ویتامین پیریدوکسین بر میزان رشد توده زیستی
۷۰	 ۲-۵-۱-۴ تاثیر ویتامین پیریدوکسین بر میزان تشکیل پلی ساکارید
۷۱	 ۳-۵-۱-۴ تاثیر ویتامین پیریدوکسین بر میزان تشکیل گانودریک اسید
۷۲	 ۲-۴ بخش دوم
۷۲	 ۱-۲-۴ آزمایش اول
۷۵	 ۱-۱-۲-۴ نتایج میزان تشکیل پلی ساکارید
۷۶	 ۲-۱-۲-۴ مقادیر بهینه پیش بینی شده توسط مدل درجه دوم و اعتبار سنجی
۷۷	 ۲-۲-۴ آزمایش دوم
۷۹	 ۱-۲-۲-۴ نتایج میزان تولید گانودریک اسید
۸۰	 ۲-۲-۲-۴ مقادیر بهینه پیش بینی شده توسط مدل درجه دوم و اعتبار سنجی
۸۱	 نتیجه گیری کلی
۸۱	 پیشنهادات
۸۲	 منابع

فهرست جداول

- جدول ۱-۱: ساختار شیمیایی برخی ترپنهای جدا شده از گانودرما لوسیدوم ۲۱
- جدول ۲-۱: اسیدهای آمیه استخراج شده از گانودرما لوسیدوم ۲۳
- جدول ۳-۱: محصولات تولید شده در کشورهای مختلف ۲۵
- جدول ۴-۱: متغیرهای کربن و نیتروژن در بهینه سازی و سطوح مختلف آنها ۷۳
- جدول ۴-۲: طراحی آزمایشات و نتایج دو متغیر اعمال شده بر روی پاسخ در روش RSM ۷۴
- جدول ۴-۳: پارامترهای ANOVA برای تولید پلی ساکارید ۷۵
- جدول ۴-۴: متغیرهای کربن و نیتروژن در بهینه سازی و سطوح مختلف آنها ۷۷
- جدول ۴-۵: طراحی آزمایشات و نتایج دو متغیر اعمال شده بر روی پاسخ در روش RSM ۷۸
- جدول ۴-۶: پارامترهای ANOVA برای تولید گانودریک اسید ۷۹

فهرست اشکال

- شکل ۱-۱: تصاویر قارچهای یال شیر، ریشی، شیتاکه، مایتاکه و ترکی تیل ۵
- شکل ۱-۲: تصاویر گونه‌های مختلف قارچ گانودرما ۸
- شکل ۱-۳: تصاویری از سطوح میوه، میسلیم و اسپور قارچ ۹
- شکل ۱-۴: منابع کربنی که توسط توده زیستی گانودرما لوسیدوم استفاده میشود ۱۱
- شکل ۱-۵: روشهای مختلف کشت مصنوعی قارچ گانودرما لوسیدوم ۱۵
- شکل ۱-۶: ساختار مولکولی پلی‌ساکارید گانودرما لوسیدوم ۱۹
- شکل ۱-۷: ساختار شیمیایی آرگوسترول پرواکسید ۲۲
- شکل ۴-۱: تاثیر منابع کربنی بر میزان رشد توده زیستی ۵۱
- شکل ۴-۲: تاثیر منابع کربنی بر میزان تشکیل پلی‌ساکارید توده زیستی ۵۲
- شکل ۴-۳: تاثیر منابع کربنی بر میزان تشکیل گانودریک اسید توده زیستی ۵۳
- شکل ۴-۴: تاثیر منابع نیتروژنی بر میزان رشد توده زیستی ۵۵
- شکل ۴-۵: تاثیر منابع نیتروژنی بر میزان تشکیل پلی‌ساکارید توده زیستی ۵۶
- شکل ۴-۶: تاثیر منابع نیتروژنی بر میزان تشکیل گانودریک اسید توده زیستی ۵۷
- شکل ۴-۷: تاثیر pH اولیه بر میزان رشد توده زیستی ۵۹
- شکل ۴-۸: تاثیر pH اولیه بر میزان تشکیل پلی‌ساکارید توده زیستی ۶۰
- شکل ۴-۹: تاثیر pH اولیه بر میزان تشکیل گانودریک اسید توده زیستی ۶۱
- شکل ۴-۱۰: تاثیر غلظت نانوذره دی‌اکسید تیتانیوم بر میزان رشد توده زیستی ۶۳
- شکل ۴-۱۱: تاثیر غلظت نانوذره دی‌اکسید تیتانیوم بر میزان تشکیل پلی‌ساکارید ۶۴
- شکل ۴-۱۲: تاثیر غلظت نانوذره دی‌اکسید تیتانیوم بر میزان تشکیل گانودریک اسید ۶۵
- شکل ۴-۱۳: تاثیر غلظت نانوذره اکسید منیزیم بر میزان رشد توده زیستی ۶۶
- شکل ۴-۱۴: تاثیر غلظت نانوذره اکسید منیزیم بر میزان تشکیل پلی‌ساکارید ۶۷
- شکل ۴-۱۵: تاثیر غلظت نانوذره اکسید منیزیم بر میزان تشکیل گانودریک اسید ۶۸
- شکل ۴-۱۶: تاثیر غلظت ویتامین پیریدوکسین بر میزان رشد توده زیستی ۷۰
- شکل ۴-۱۷: تاثیر غلظت ویتامین پیریدوکسین بر میزان تشکیل پلی‌ساکارید ۷۱
- شکل ۴-۱۸: تاثیر غلظت ویتامین پیریدوکسین بر میزان تشکیل گانودریک اسید ۷۲
- شکل ۴-۱۹: منحنی RSM برای تولید پلی‌ساکارید توده زیستی قارچ گانودرما لوسیدوم ۷۶
- شکل ۴-۲۰: منحنی RSM برای تولید گانودریک اسید توده زیستی قارچ گانودرما لوسیدوم ۸۰

فصل ۱

کلیات

۱-۱ مقدمه

از زمان های قدیم تا به امروز جوامع بشری برای برطرف کردن نیازهای خوراکی و درمانی خود، گیاهان، جانوران و قارچ ها را مصرف می کنند. به مرور زمان انسان های اولیه فهمیدند که چه در سلامتی و چه در بیماری به طبیعت وابسته هستند، و هرچه به طبیعت نزدیک تر باشند سالم تر و عمر بیشتری می کنند. اساس درمان در آن زمان بر پایه غریزه، تجربه و همچنین مشاهده (چگونه حیوانات به هنگام بیماری از گیاهان استفاده می کنند) بود. به عنوان مثال هنگامی که دیدند یک گوزن برای کاهش درد جراحات خود بدنش را به یک علف خاصی میمالد به خواص ضد درد آن پی بردند (ضیایی، ۱۳۸۱). شواهد نشان می دهد که قدمت استفاده از گیاهان دارویی به ۶۰۰۰ سال پیش بر می گردد. تاریخ شناسان در سال ۱۹۶۰ در یکی از آرامگاه های کشور عراق جسدی پیدا کردن که همراه آن جسد مقدار زیادی گیاه دارویی وجود داشت (Solecki, 1975). بشر همیشه کوشیده است، تا با شناسایی گیاهان مفید و مصرف کردن آنها در صنایع مختلف همچون صنایع غذایی، کشاورزی و دارویی سالم تر زندگی کند.

امروزه محققین زیست شناس، جانداران را به پنج سلسله تقسیم می کنند:

۱. سلسله پروکاریوت ها
۲. سلسله آغازیان
۳. سلسله گیاهان
۴. سلسله جانوران
۵. سلسله قارچ ها

قارچ ها تا مدت ها جزء سلسله گیاهان طبقه بندی می شدند، اما به دلیل اینکه قارچ ها فاقد کلروفیل می باشند و نمیتوانند مواد آلی مورد نیاز خود را از CO₂ و آب بدست آورند، و فاقد اندام هایی چون ساقه، ریشه و سیستم آوندی می باشند، در سلسله جداگانه ای قرار گرفتند. سلسله قارچ ها حدود ۵۰۰۰۰ گونه داشته که شامل انواع مختلف کپک ها، مخمرها، سفیدک ها، زنگ ها، سیاهک ها و... می باشد. همچنین قارچ های بزرگ همچون قارچ های سمی، طاقچه ای، منفذدار، پفکی و قارچ های بد بویی که به طور معمول فصل پاییز در جنگل ها مشاهده می شوند در این سلسله قرار می گیرند. قارچ شناسان سلسله قارچ ها را به چهار شاخه تقسیم می کنند، که شامل:

۱. زیگوماست ها^۱
۲. دوترومایست ها^۲
۳. آسکوماست ها^۳

^۱ Zygomycetes

^۲ Deutromycetes

^۳ Ascomycetes

۴. بازیدیوماست‌ها^۱ (رزقی جهرمی، ۱۳۹۶)

بازیدیوماست‌ها با ۳۱۰۰۰ گونه یکی از فراوانترین و مشخصترین قارچ‌ها هستند، که میتوان در طبیعت آنها را یافت. بازیدیوماست‌ها جز گروه قارچ‌های ماکروسکوپی^۲ می‌باشند؛ یعنی دارای اندام بارده^۳ مشخص بوده و اندازه آن به قدری است که با چشم غیر مسلح قابل مشاهده می‌باشند. واژه قارچ در عموم به اندام بارده یا بازیدیوکارپ^۴ آن اطلاق داده می‌شود. لذا بازیدیوکارپ را به میوه یک درخت می‌توان تشبیه کرد که تولید بذر می‌کند (Taylor et al., 2015). یکی از قارچ‌های متعلق به رده بازیدیوماست‌ها گانودرما لوسیدوم نام دارد.

۲-۱ معرفی قارچ‌های دارویی

قارچ‌ها حدود ۳۰۰ میلیون سال است، که در این کره خاکی زندگی می‌کنند (سرگزی، ۱۳۸۶). سابقه استفاده از قارچ‌های مختلف برای درمان بسیاری از بیماری‌ها به هزاران سال قبل بر می‌گردد. هرچند براساس اسناد موجود در طب سنتی چین، این زمان تقریباً بین ۴۰۰۰ تا ۴۵۰۰ سال پیش می‌باشد، اما کشف جسد موسوم به «مرد اُتری» متعلق به ۵۳۰۰ سال قبل نشان داد، استفاده از قارچ‌ها به عنوان دارو برای درمان بیماری‌ها به ۵۳۰۰ سال پیش بر می‌گردد. قدیمی‌ترین نوشته موجود در مورد قارچ‌های دارویی مربوط به یک رساله پزشکی هندی بوده، که از سه هزار سال قبل از میلاد مسیح باقی مانده است (آصف شایان، ۱۳۹۴).

قارچ‌ها از قدیم مورد توجه انسان‌ها بودند؛ این توجه به بخاطر خواص زیاد، پراکندگی گسترده در طبیعت و ظاهر آنها می‌باشد. به طور کلی قارچ‌ها را می‌توان به ۴ دسته طبقه بندی کرد:

۱. قارچ‌های خوراکی

۲. قارچ‌های دارویی

۳. قارچ‌های سمی

۴. قارچ‌های هالسینوزنیک^۵ یا توهم‌زا

قارچ‌های دارویی مجموعه‌ای از قارچ‌های آسکوماست‌ها، بازیدیوماست‌ها و سایر گروه‌های قارچی بوده که تنها شباهت آنها داشتن اثر دارویی می‌باشد. تاکنون بیش از ۱۰۰۰ جنس قارچ خوراکی و دارویی شناسایی شده‌اند، که از این تعداد توانسته‌اند ۹۲ جنس را به صورت مصنوعی کشت کنند. ۵۰ جنس آن امروزه به صورت تجاری و انبوه توسط پرورش‌دهندگان کشت داده می‌شوند. امروزه کشت قارچ‌های دارویی از نظر اقتصادی اهمیت بالایی دارند. بخشی از صادرات کشورهای هم‌چون آمریکا، استرالیا، هلند،

^۱ Basidiomycetes

^۲ Macrofungi

^۳ Fruiting body

^۴ Basidiocarp

^۵ Hallucinogenic

فرانسه، انگلیس و... را تشکیل می‌دهد (سرگزی، ۱۳۸۶).

چین و ژاپن احتمالاً اولین کشورهای دارویی را پرورش دادند. در چین بیش از ۳۰۰ گونه قارچ دارویی وجود دارد. احتمالاً چینی‌ها اولین انسان‌هایی می‌باشند که برای درمان بیماری‌های خود قارچ‌های دارویی را مورد استفاده قرار دادند. در چین کتاب‌هایی وجود دارد متعلق به هزار سال قبل که در آنها از اهمیت قارچ‌های دارویی بیان شده است، ولی در کشورهای دیگر پرورش این قارچ‌ها به تازگی شروع شده است. در سال ۱۹۳۰ تنها ۱۰ کشور در دنیا تولیدکننده قارچ‌های دارویی بودند، اما امروزه بیش از ۱۰۰ کشور در حال تولید این قارچ‌های دارویی می‌باشند (سرگزی، ۱۳۸۶).

قارچ‌های دارویی نه تنها به دلیل خواص درمانی بلکه به دلیل دارا بودن پروتئین و مواد معدنی زیاد و پایین بودن میزان کالری جزء اصلی غذای مردم جهان می‌باشند. قارچ‌های دارویی در ایران از قدیم مورد استفاده قرار می‌گرفتند، به عنوان مثال در کتاب‌های قانون ابوعلی سینا، صیدیه ابوریحان بیرونی و الحاوی زکریای رازی قارچ دارویی غاریقون^۱ را جهت درمان تب، نیش حشرات، ورم مفاصل، درد مفاصل، یرقان و بسیاری از بیماری‌های دیگر مفید میدانستند؛ و قارچ دیگر با اهمیت آن زمان قارچ دارویی سماروغ^۲ بود که برای درمان خونریزی‌های معده، خونریزی‌های داخلی، دفع انگل‌های معده و اسهالی استفاده می‌کردند (کی پور سنگسری، ۱۳۸۷).

در بین سلسله‌های قارچی، بازیدیومیست‌ها به دلیل زیاد داشتن ترکیبات زیست فعال اثر درمانی بالایی دارند. Lucase و همکارانش در سال ۱۹۵۷ اولین کسانی بودند، که خاصیت ضد سرطانی قارچ‌های بازیدیومیست را بررسی کردند. داروهای با منشأ قارچی فراوانی تولید شده، که برای پیشگیری و درمان بسیاری از بیماری‌ها همچون سرطان، آسیب‌های مغزی، بیماری‌های قلبی و... مورد استفاده قرار می‌گیرند. از جمله داروهای با منشأ قارچی میتوان به *Cyclosporine*، *Ergotamine*، *Griseofulvin* و *Penicillin* اشاره کرد (دهقانی حصار جلال، ۱۳۹۵).

در دو دهه اخیر بیشتر تحقیقات بر روی خواص تقویت سیستم ایمنی بدن و ضد سرطانی قارچ‌ها بوده، در حالی که آنها اثرات موثر دیگری نیز بر سلامتی بدن ما دارند. از جمله خواص: آنتی اکسیدانی، ضد فشار خون، کاهش کلسترول، محافظ کبد، ضد التهاب، ضد دیابت، ضد ویروس و ضد میکروب را دارا می‌باشند (دهقانی حصار جلال، ۱۳۹۵). این فواید باعث شده است که بسیاری از شرکت‌های دارویی به قارچ‌های دارویی توجه خاصی داشته باشند. در علم پزشکی جدید قارچ‌های دارویی دارای اهمیت بالایی می‌باشند، در حال حاضر ۲۷۰ گونه قارچ شناخته شده‌اند که در پزشکی مورد استفاده قرار می‌گیرند (Wasser, 2011).

پنج قارچ دارویی مشهور دنیا که تصاویر آنها در شکل ۱-۱ آمده عبارتند از:

^۱Larecifomes

^۲Pleurotus

۱. شیتاکه^۱

۲. مایتاکه^۲

۳. ترکی تیل^۳ (دم بوقلمون)

۴. یال شیر^۴

۵. ریشی^۵ (Marek et al., 2015)

از میان قارچ‌های خوراکی، قارچ *Agaricus* در دنیا بیشتر از سایر جنس‌های قارچ خوراکی تولید می‌شود، و از میان قارچ‌های دارویی، قارچ *Ganoderma* در دنیا بیشتر از سایر جنس‌های قارچ دارویی تولید می‌شود (توانا، ۱۳۸۹). در بخش بعدی با این قارچ دارویی شگفت انگیز آشنا خواهید شد.



شکل ۱-۱: تصاویر قارچ‌های ۱ یال شیر، ۲ ریشی، ۳ شیتاکه، ۴ مایتاکه، ۵ ترکی تیل (دهقانی حصارر جلال، ۱۳۹۵)

۳-۱ معرفی قارچ گانودرما لوسیدوم

۱-۳-۱ تاریخچه

مصرف قارچ دارویی گانودرما لوسیدوم و سایر جنس‌های گانودرما برای درمان بیماری‌ها، در خاور دور بخصوص کشورهای چین، ژاپن و کره در تاریخ یک سابقه طولانی دارد، که قدمت آن حداقل به ۴۰۰۰

^۱ *Lentinula edodes* (Shiitake)

^۲ *Grifola tridosa* (Maitake)

^۳ *Coriolus versicolor* (Turkey Tail)

^۴ *Hericium erinaceus* (Lion's Mane)

^۵ *Ganoderma lucidum* (Reishi)

هزار سال قبل بر می‌گردد. در لاتین کلمه لوسیدوم معنای پر نور، درخشان و براق را می‌رساند، که به طور جالبی ظاهر میوه این قارچ دارویی را که جلا داده و براق هست، بیان میکند. این قارچ در ژاپن به نام ریشی یا مانتاکه^۱ (قارچ ده هزار ساله) معروف می‌باشد و در چین و کره به نام های لینگ چو^۲، لینگ چی^۳ و لینگ ژی^۴ (فنا ناپذیر) شهرت پیدا کرده است (Wasser, 2005).

با شروع سلسه یوان^۵ (۱۲۷۱-۱۳۶۸ بعد از میلاد مسیح) در چین گانودرما لوسیدوم از طریق هنرهای همچون نقاشی و منبت کاری روی شاخ آهو، مبلمان، جواهرات، شیشه عطر و طراحی فرش نمایان شد. اولین توجه به لینگ ژی در امپراتوری اول چین می‌باشد، که به وفور در هنر و ادبیات آن زمان دیده می‌شود (Wasser, 2005). در دوره جیاجینگ^۶ (۱۵۶۶-۱۵۲۱ بعد از میلاد مسیح) تصویر گانودرما بر روی جعبه‌ها و جلد کتاب کشیده می‌شد، که امروزه این آثار در موزه قصر چین نگهداری می‌شود (Wan, 2007). به عنوان مثال موتیف^۷ قارچ گانودرما لوسیدوم بر روی یکی از درب‌های شهر مدفون شده بیجینگ در چین دیده شده (عظیمی، ۱۳۹۳). امپراتوری جیاجینگ بر این باور بود که گانودرما جاودانگی اعطا می‌کند. گانودرما در گذشته در کشورهای خاور دور دارای خصوصیات روحانی بود، مثلاً به عنوان یک طلسم برای حفاظت اشخاص یا پناهگاهی برای دوری از شیطان استفاده می‌شد (Marek et al., 2015).

یک متن فارماکوپیا^۸ که قدمتش به سلسله قین^۹ (۲۲۱-۲۰۶ قبل از میلاد مسیح) بر میگردد بسیار مورد توجه می‌باشد. در این متن شش ویژگی لینگ ژی توصیف شده است. به طور کلی بیان می‌کند این قارچ از پیری جلوگیری کرده، زندگی را طولانی می‌کند، شما را جاودانه می‌کند، آرامش میبخشد، ظرفیت حافظه را افزایش می‌دهد و انسان را چابک می‌کند (Bishop et al., 2015).

اولین کتابی که ارزش دارویی قارچ گانودرما لوسیدوم را بیان کرد، در سلسله هان^{۱۰} (۲۰۶ سال قبل از میلاد تا ۲۲۰ سال بعد از میلاد مسیح) توسط Nong Beng Cao Jing نوشته شده است. اولین کتاب گیاهان دارویی چین در سال ۱۵۹۰ بعد از میلاد مسیح نوشته شده است. در این کتاب لینگ ژی به عنوان یک قارچ دارویی با خواص زیاد ثبت شده است. در یکی از کتاب‌های قدیمی چین جنس گانودرما با توجه به رنگ میوه در شش گونه قرمز، زرد، زرد کمرنگ، سفید، سیاه و آبی طبقه بندی شده است. در مجموعه

^۱ Mannetake

^۲ Ling Chu

^۳ Ling Chih

^۴ Ling zhi

^۵ Yuan

^۶ Jiajing

^۷ یکی از اصطلاحات رایج در هنر و ادب و همچنین در علم و فن است (en.wikipedia.org).

^۸ Farmacopia

^۹ Qin

^{۱۰} Han

از گذشته تا به امروز گانودرما لوسیدوم به عنوان یک اکسیر سنتی و موثر برای درمان بیماری‌ها شناخته شده است (Hapuarachchi et al., 2018).

۲-۳-۱ رده بندی علمی

گونه گانودرما لوسیدوم متعلق به سلسله *Fungi*، شاخه *Basidiomycota*، رده *Agaricomycetes*، راسته *Polyporales*، تیره *Ganodermataceae*، جنس *Ganoderma* و گونه *lucidum* می‌باشد، نقل قول صحیح گونه به صورت *Ganoderma lucidum* (Curt.: Fr.) P. Karst می‌باشد (Sudheer et al., 2018).

جنس گانودرما را میتوان از لحاظ مورفولوژی ظاهری به دو گروه تقسیم کرد:

۱. گروهی که بازیدیوکارپ براق با رنگ‌های قهوه‌ای، قرمز، زرد و قهوه‌ای تیره داشته، و منافذی بر

روی سطح زیرین کلاهک دارند. گانودرما لوسیدوم در این گروه قرار می‌گیرد.

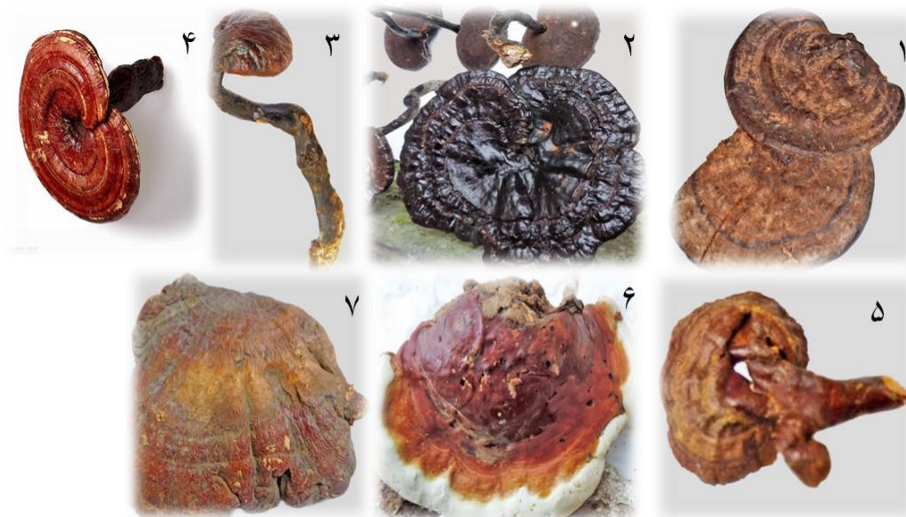
۲. گروهی که بازیدیوکارپ مات با رنگ‌های قهوه‌ای مایل به خاکستری تا مشکی دارند، و فاقد منافذ

بر روی سطح زیرین کلاهک می‌باشند مانند *Ganoderma applanatum*.

شناسایی سنتی گونه‌های گانودرما بر پایه ویژگی‌های شکل شناسی، فیزیولوژیکی و ترکیبات شیمیایی مانند متابولیت‌های ثانویه می‌باشد، ولی امروزه این روش در جهان پذیرفته نیست؛ چون این صفات به طور گسترده تحت تاثیر شرایط محیطی، عرض جغرافیایی و ارتفاع از سطح دریا قرار می‌گیرند (توانا، ۱۳۸۹). امروزه سیستم رده بندی قدیمی منسوخ شده و روش‌های جدید شناسایی همچون ^۱RFLP، بیوشیمیایی، ژنتیکی، مولکولی و الکتروفورز ایزوزیم مورد استفاده قرار می‌گیرد (Miller et al., 1999; Smith and Sivasithamparam, 2000).

اگرچه گونه‌های زیادی در این جنس وجود دارد، ولی فقط هفت گونه از این بین با جزئیات بیشتر مورد بررسی قرار گرفته‌اند. وجه اشتراک این هفت گونه رنگ سیاه یا قرمز اندام بارده و خواص دارویی بالای آنها می‌باشد. نام علمی این هفت گونه *Ganoderma calidophilum*، *Ganoderma sinense*، *Ganoderma orbiforme*، *Ganoderma flexipes*، *Ganoderma resinaceum*، *Ganoderma lucidum* و *multiplicatum* می‌باشند. تصویر آنها در شکل ۱-۲ آمده است. (Hapuarachchi et al., 2018; Dinesh-Babu and Subhasree, 2008). در میان این هفت گونه، قارچ گانودرما لوسیدوم از اهمیت بیشتری برخوردار است (Marek et al., 2015). وجود تنها هفت گونه با نام‌های علمی *G. austral*، *G. manoutchehrii*، *G. resinaceum*، *G. clossum*، *G. tsugae*، *G. lucidum* و *applanatum* در نواحی معتدل و مرطوب ایران گزارش شده است (Moradali et al., 2007).

^۱ Restriction Fragment Length Polymorphism



شکل ۱-۲: تصاویر گونه‌های ۱ *G. orbiforme*، ۲ *G. sinense*، ۳ *G. calidophilum*، ۴ *G. lucidum*، ۵ *G. flexipes*، ۶ *G. multiplicatum* و ۷ *G. resinaceum* (Hapuarachchi et al., 2018)

۱-۳-۳ اندام شناسی و خصوصیات میکروسکوپی

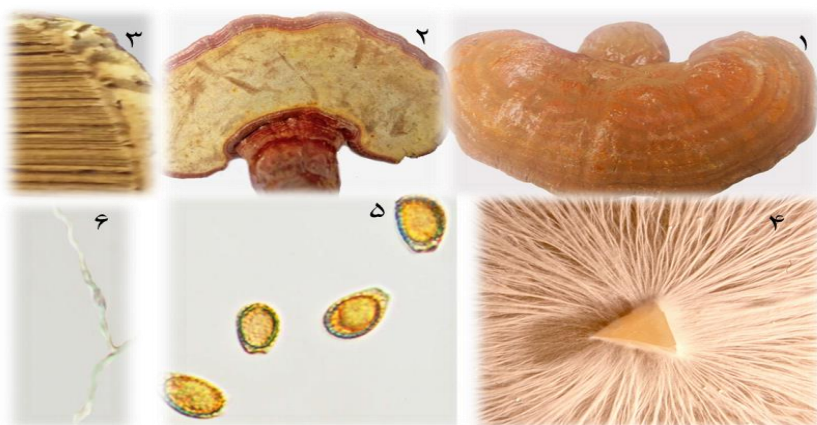
بازیدیوکارپ قارچ گانودرما لوسیدوم دارای یک کلاهک و یک پایه می‌باشد. همانطوری که در شکل ۱-۳ مشاهده می‌کنید، کلاهک لوبیایی شکل، دارای دایره‌های متحدالمرکز و به رنگ های قرمز، نارنجی، قهوه‌ای، سیاه - قهوه‌ای و با لبه‌هایی که به رنگ‌های سفید، زرد مایل به قرمز و قهوه‌ای می‌باشد. کلاهک در مراحل ابتدایی رشد به رنگ زرد تا قهوه‌ای روشن می‌باشد و با گذشت زمان، به قرمز لاک‌ی تا قهوه‌ای تیره تبدیل می‌گردد. ضخامت کلاهک حدود ۱/۵ cm و طول سطح آن حدود ۲۰ cm و عرض سطح آن حدود ۱۴ cm می‌باشد. کلاهک به طور معمول به یک پایه متصل است، البته ممکن بازیدیوکارپ پایه نداشته باشد (Marek et al., 2015).

سطح پایه صاف و براق بوده، و با رنگ‌های سفید، زرد، قهوه‌ای یا سیاه به صورت غیر عادی و بطور جانبی به کلاهک متصل شده است. پایه حالت مارپیچ داشته و قطر آن بین ۵-۰/۵ cm و طول آن بین ۱۰ - ۲۵ cm می‌باشد (توانا، ۱۳۸۹).

بر روی سطح زیرین کلاهک منافذی وجود دارد که اسپورها به صورت پودر قهوه‌ای رنگ در آنها قرار دارند. پراکندگی منافذ به این صورت است که در هر میلی متر از سطح زیرین کلاهک، ۴-۵ منفذ وجود دارد. اسپورها دارای دیواره سلولی دو لایه بوده که لایه خارجی شفاف و لایه داخلی به رنگ قهوه‌ای می‌باشد، و ظاهری تخم مرغی شکل تا بیضوی شکل با انتهای صاف دارند. ابعاد اسپور آنها ۵/۵-۸ × ۱۲-۹ میکرومتر میباشد (عظیمی، ۱۳۹۳؛ توانا، ۱۳۸۹). قارچ گانودرما لوسیدوم در نزدیکی بلوغ تولید اسپور میکند، که با منتشر شدن آن در هوا چرخه زندگی قارچ ادامه پیدا میکند. یکی از دلایل کمیاب بودن این قارچ در طبیعت، سخت بودن پوسته بیرونی اسپور آن می‌باشد، که جوانه زنی را مشکل کرده

است (رزقی جهرمی، ۱۳۹۶).

بافت قارچ گانودرما در مراحل ابتدایی نرم می‌باشد، به مرور با نزدیک شدن به مرحله بلوغ بافت سفت و سفت‌تر می‌شود تا در نهایت یک حالت چوبی یا چرمی به بافت قارچ می‌دهد، به همین دلیل نمیشود آن را به راحتی مصرف قارچ‌های خوراکی مانند دکمه‌ای و مورال استفاده کرد (توانا، ۱۳۸۹). کیفیت و کمیت قارچ گانودرما لوسیدوم تا حد زیادی به مواد مغذی موجود در زیستگاه آن بستگی دارد، به طوری که هرچه مواد مغذی موجود در زیستگاه بیشتر و با کیفیت‌تر باشد، اندازه کلاهک بزرگتر و خواص درمانی بیشتر دارد (Hapuarachchi et al., 2018; Dinesh-Babue and Subhasree, 2008).



شکل ۱-۳: تصاویری از سطح رویی قارچ ۱، سطح زیرین قارچ ۲، برشی عمودی از بافت میوه قارچ ۳، میسلیموم قارچ ۴، اسپور قارچ ۵ و هایف قارچ ۶ (Hapuarachchi et al., 2018).

۴-۳-۱ پراکنش جغرافیایی و عادت رشد در طبیعت

قارچ گانودرما لوسیدوم رویشگاه بسیار وسیعی در سرتاسر جهان دارد از آمازون تا مناطق جنوبی آمریکای شمالی و در بسیاری از قسمت‌های آسیا و اروپا یافت می‌شود (Hapuarachchi et al., 2018). وجود این قارچ در مناطق مختلف دنیا همچون فرانسه، انگلیس، آمریکای شمالی، تایوان، چین، کانادا، ژاپن و کره گزارش شده است (Hong and Jung, 2004). اولین گزارش در مورد وجود یکی از گونه‌های قارچ گانودرما در ایران مربوط به سال‌های ۱۳۴۸ تا ۱۳۵۰ می‌باشد. امروزه وجود هفت گونه از این جنس که قبلاً به آنها اشاره شد، در ایران گزارش شده است (مرادعلی، ۱۳۸۲).

قارچ گانودرما لوسیدوم در طبیعت به ندرت یافت می‌شود، به طوری که از بین ۱۰۰۰۰ درخت خشک شده موجود در جنگل، فقط شاید بر روی ۲ یا ۳ تا از آنها رشد کند (Dinesh-Babu and Subhasree, 2008). این قارچ در جنگل‌هایی با رطوبت بالا و روشنائی کم، معمولاً بر روی درختان مرده یا پیر به صورت یک انگل یا ساپروفیت رشد می‌کند. در طبیعت، بیشتر در مناطقی که آب و هوای گرمسیری، نیمه گرمسیری و در مناطق معتدل رشد می‌کند (Marek et al., 2015). البته در این مناطق گونه‌های

دیگر گانودرما هم یافت می‌شود. در ایران این قارچ بیشتر در نواحی معتدل و مرطوب حاشیه دریای خزر، معمولاً در فصل تابستان و پاییز یافت می‌شود (ارشاد، ۱۳۷۴).

گانودرما بر روی تنه درختان و نزدیک به سطح خاک و گاهی اوقات بر روی ریشه درختان رشد می‌کنند (pirone, 1957). آنها بر روی بیش از ۴۴ گونه گیاهی قادر به رشد می‌باشند (Hapuarachchi et al., 2018). معمولاً بر روی درختان مرده یا پیر خزان‌کننده (پهن برگ) مانند بلوط، صنوبر، افرا، نارون، ماگنولیا، بید، شاه بلوط، سپیدار و... همینطور به ندرت بر روی درختان مخروطی (سوزنی برگ) مانند *Pinus* و *Picea Larix* رشد می‌کنند (Chen, 1999). در شرق آسیا بیشتر بر روی چوب درختان مرده آلو^۱ و در اروپا بیشتر بر روی چوب درختان پیر بلوط و صنوبر رشد میکنند (Sokol, 2000). این قارچ در کشور ما ایران بیشتر در شهرهای گرگان، تنکابن، جنگل‌های مازندران، گیلان و رامسر بر روی درختان خرمالو، بلوط، شمشاد جنگلی، ممرز و نارون یافت می‌شود (ارشاد، ۱۳۷۴؛ صابر، ۱۳۵۱؛ صابر، ۱۳۷۹).

گونه‌های گانودرما دارای آنزیم لیگوسلولاز هستند که با آن چوب را تجزیه، و از آن کسب انرژی کرده و پوسیدگی سفیدی در چوب ایجاد می‌کنند. گونه‌های مختلف گانودرما می‌تواند باعث بیماری‌های شدیدی مانند پوسیدگی سفید ساقه و ریشه در درختان مهم اقتصادی همچون نخل پالم، نخل نارگیل، بوته چای و محصولات زراعی چند ساله به ویژه در کشورهای گرمسیری شوند. یکی از این گونه‌ها که در پوسیدگی تنه نخل پالم دارای اهمیت است *G. boninense* می‌باشد (Hapuarachchi et al., 2018).

۱-۴ شرایط موردنیاز برای رشد قارچ گانودرما لوسیدوم

رشد این قارچ شامل چند مرحله متفاوت می‌باشد، از قبیل رشد میسلیم، جوانه زدن میوه، رشد میوه و... که هر مرحله برای رشد نیاز به شرایط تغذیه‌ای و محیطی متفاوتی دارد. اگر این شرایط به درستی در طی پرورش فراهم نشود، قارچ رشد نمی‌کند و یا قارچ رشد کرده از بین میرود. عوامل مورد نیاز برای رشد این قارچ شامل تغذیه، pH، دما، رطوبت، نور، سطح اکسیژن و دی‌اکسید کربن می‌باشند (Zhou, 2017).

۱-۴-۱ عوامل تغذیه‌ای

قارچ گانودرما لوسیدم به علت اینکه بر روی درختان پیر و پوسیده رشد می‌کند، به عنوان یک قارچ گندروی^۲ چوب طبقه‌بندی می‌شود. مواد غذایی مورد نیاز رشد این قارچ شامل: کربن، نیتروژن، املاح معدنی و ویتامین می‌باشد، که این ترکیبات بر روی کمیت و کیفیت میسلیم و میوه این قارچ اثر مهمی

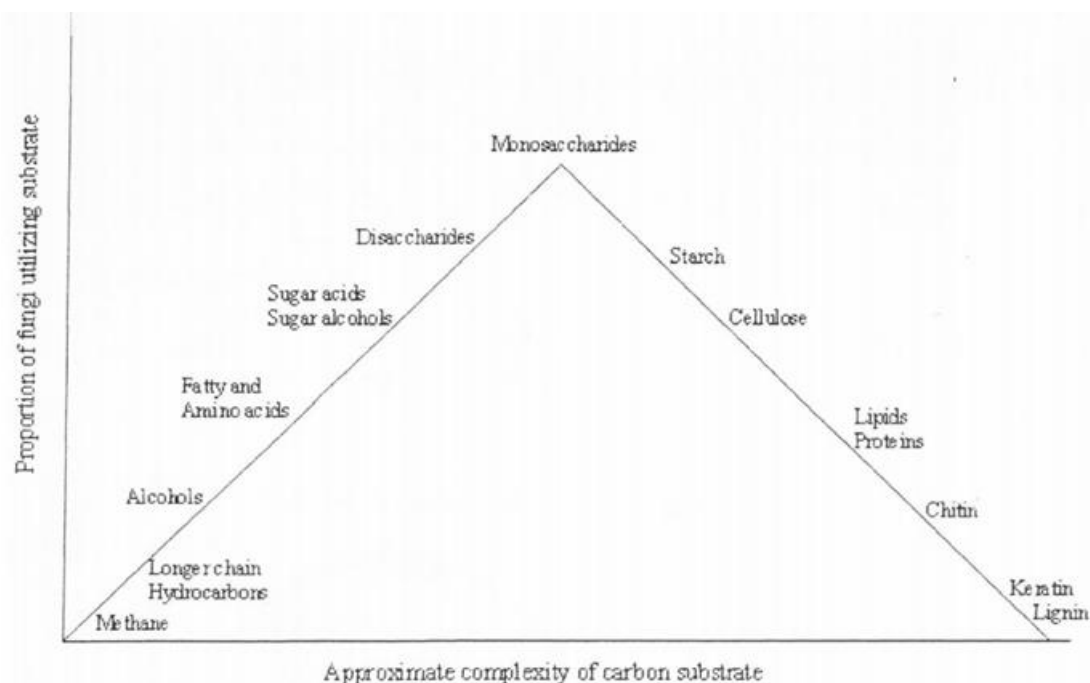
^۱ *Prunus salicina*

^۲ به آن دسته از موجودات گفته می‌شود که مواد غذایی موردنیاز خود را از مواد آلی غیر زنده، معمولاً از گیاهان مرده و پوسیده بدست می‌آورند (en.wikipedia.org).

میگذارد (Mayzumi et al., 1997).

۱-۱-۴-۱ منبع کربن

منبع کربنی انرژی مورد نیاز رشد و نمو توده زیستی قارچ را تامین می‌کند. نوع و غلظت منبع کربنی تاثیر مهمی بر روی میزان رشد و تشکیل متابولیت‌های ثانویه توده زیستی قارچ میگذارد. منابع کربنی به خصوص منابع کربنی خوب مانند گلوکز و فروکتوز به شدت pH محیط کشت را تحت تاثیر قرار داده، و باعث کاهش pH می‌شوند (Canteri and Ghoul, 2015). همان طوری که در شکل ۱-۴-۱ آمده، قارچ گانودرما لوسیدوم از ترکیبات زیستی مونوساکاریدی (گلوکز، فروکتوز و مانوز)، دی‌ساکاریدی (ساکاروز، مالتوز و لاکتوز) و پلی‌ساکاریدی (نشاسته، سلولز، همی‌سلولز و لیگنین) به عنوان منبع کربنی استفاده می‌کند. توده زیستی این قارچ میتواند در نبود منبع کربنی مناسب، الکل‌ها و برخی از اسیدهای آلی را به عنوان منبع کربنی در محیط کشت تجزیه و مصرف کند. گلوکز و ساکارز به عنوان مناسب‌ترین منابع کربنی، در محیط کشت مایع رشد توده زیستی قارچ استفاده می‌شوند. در محیط کشت رشد میوه این قارچ از خاک‌اره چوب، پوست پنبه دانه، کاه و کلش (برنج و گندم)، ساقه ذرت و سایر ضایعات کشاورزی و کارخانجات صنایع غذایی به عنوان منبع کربنی استفاده می‌شوند (Zhou, 2017).



شکل ۱-۴-۱: منابع کربنی که توسط توده زیستی گانودرما لوسیدوم استفاده می‌شود (Inglet, 2004)

۱-۴-۱-۲ منبع نیتروژنی

نیتروژن یکی از اجزای اصلی پروتئین می‌باشد، و پروتئین تقریباً در تمام فرایندهای بیولوژیک قارچ نقش

دارد. بدون منبع نیتروژنی توده زیستی قارچ نمی‌تواند پروتئین سنتز کند، پس در نتیجه رشد نخواهد کرد. میسلیوم قارچ گانودرما لوسیدم میتواند مستقیماً ترکیبات نیتروژن دار همچون اسیدهای آمینه، اوره، نمک‌های آمینیوم و دیگر ریز مولکول‌های حاوی نیتروژن را جذب کنند. معمولاً در محیط کشت مایع رشد توده زیستی، از پودر عصاره مخمر و پپتون گوشت به عنوان منبع نیتروژنی استفاده می‌شود. به طور معمول در محیط کشت رشد میوه این قارچ از ترکیباتی همچون سبوس گندم، سبوس برنج، پودر ذرت، سولفات آمینیوم، اوره و سایر ترکیبات حاوی نیتروژن به عنوان منبع نیتروژنی استفاده می‌شود (Zhou, 2017).

۳-۱-۴-۱ عناصر معدنی و ویتامین‌ها

عناصر معدنی مناسب برای رشد و نمو توده زیستی قارچ گانودرما لوسیدم شامل: پتاسیم، سدیم، کلسیم، منیزیم، فسفر، سولفور و روی می‌باشند. از بین این عناصر مهمترین آنها فسفر، پتاسیم و منیزیم بوده. به طور معمول بین $100-150 \frac{mg}{L}$ از آنها در محیط کشت این قارچ استفاده می‌شود. در محیط‌های کشت معمولاً از نمک‌های معدنی آنها مانند: کلسیم سولفات، منیزیم سولفات و پتاسیم فسفات بسته به شرایط مختلف مصرف می‌شوند، برای مثال از کلسیم سولفات به عنوان تنظیم pH، تثبیت نیتروژن و افزایش عناصر کلسیم و سولفور محیط کشت استفاده می‌شود. ویتامین‌های مورد نیاز رشد این قارچ عمدتاً ویتامین‌های گروه B از جمله B₁, B₂, B₆ و B₇ می‌باشند. به دلیل اینکه به مقدار بسیار کم (حدود $\frac{mg}{L}$) از این ویتامین‌ها برای رشد و نمو این قارچ نیاز است؛ معمولاً به مقدار اندک به همراه اجزای تشکیل دهنده محیط کشت موجود می‌باشند، و نیازی به اضافه کردن آنها به محیط کشت نیست (Zhou, 2017).

۴-۱-۴-۱ نانوذرات

امروزه نانوتکنولوژی به عنوان یک شاهراه مهم در علوم تحقیقاتی، محل پیوست حوزه‌های مختلفی از علوم در مسیر پیشرفت به سوی کشف مرزهای جدید دانش می‌باشد. از همین تعریف ساده بر می‌آید که نانوتکنولوژی یک رشته جدید نیست، بلکه رویکردی جدید در تمام رشته‌ها است. نانوذرات، مجموعه‌ای از اتم‌ها در مقیاس ۱ تا ۱۰۰ نانومتر هستند، و در حقیقت حداقل در یک بعد اندازه نانومتری دارند. اندازه نانومتری آنها باعث شده که خواص متفاوتی از خود نشان دهند (Fatemi et al., 2019; Barati et al., 2017).

با وجود اینکه نانوذرات فلزی دارای خواص زیادی می‌باشند، ولی تحقیقات اندکی در مورد تاثیر آنها بر میزان رشد و تشکیل متابولیت‌های ثانویه توده زیستی قارچ گانودرما لوسیدوم در محیط گشت مایع صورت گرفته است.

نانوذرات اکسید منیزیم و دی اکسید تیتانیوم برای سلول‌های پستانداران و محیط زیست بی‌خطر

هستند. استفاده آنها به تنهایی یا با یک دیگر در محیط‌های کشت، خاصیت ضد باکتری بالایی ایجاد می‌کنند. نانوذرات اکسید منیزم و دی اکسید تیتانیوم اگر در غلظت مناسب استفاده شوند، میتوانند موجب افزایش توانایی قارچ‌ها در جذب آب و مواد غذایی از محیط‌های کشت شوند (Jin and He, 2011 هاشمی و همکاران ۱۳۹۵).

۱-۴-۲ عوامل محیطی

۱-۴-۲-۱ عامل دما

یکی از عوامل محیطی که برای رشد میسلیم و میوه قارچ گانودرما لوسیدوم اهمیت دارد دما می‌باشد. میسلیم این قارچ میتواند در دامنه دمای بین 20°C - 35°C رشد کند، و در درجه حرارت‌های بیشتر و کمتر از این دامنه، رشد میسلیم قارچ بسیار کند میشود. دمای زیر صفر درجه سانتیگراد رشد میسلیم را متوقف می‌کند ولی آن را از بین نمیبرد، با بالا آمدن دما دوباره میسلیم به رشد خود ادامه می‌دهد. دمای بهینه رشد میسلیم بین 25°C - 30°C می‌باشد (Zhou, 2017).

دمای بهینه رشد میوه قارچ بین 24°C - 28°C می‌باشد. زمانی که دما کمتر از 20°C شود، میوه بافتی متراکم و سفت با رنگ زرد پیدا می‌کند، و در دماهای بالاتر از 35°C قارچ به آرامی میمیرد. در طی رشد و نمو میوه قارچ اگر تغییر دمای شدید داشته باشیم، باعث رشد غیر طبیعی ساقه و کلاهک می‌شود (Zhou, 2017).

۱-۴-۲-۲ عامل رطوبت

آب یکی از اجزای مهم سلول می‌باشد، برای همین رشد و نمو میسلیم و میوه قارچ گانودرما لوسیدوم کاملاً به میزان رطوبت محیط و بستر کشت بستگی دارند. رطوبت نسبی هوا مورد نیاز برای رشد میسلیم 65% - 70% می‌باشد. رطوبت نسبی هوا مورد نیاز برای رشد و نمو میوه این قارچ 85% - 90% می‌باشد. اگر رطوبت نسبی هوا کمتر از 45% شود رشد میسلیم رویشی متوقف شده، در نتیجه باعث مرگ میوه جوان قارچ می‌شود. اگر رطوبت نسبی هوا کمتر از 60% شود رشد میوه قارچ متوقف می‌شود. وقتی که رطوبت نسبی هوا بیش از 95% شود به دلیل کاهش میزان اکسیژن هوا، میسلیم رویشی نمیتواند به خوبی تنفس کند، در نتیجه باعث مرگ میوه قارچ می‌شود (Zhou, 2017; Du et al., 2019).

۱-۴-۲-۳ سطح اکسیژن و دی اکسید کربن

به طور کلی قارچ‌ها هوازی می‌باشند، با استفاده از اکسیژن (O_2) ترکیبات آلی را اکسید و کاتابولیز کرده و انرژی آن را مصرف می‌کنند. در نتیجه یکی از عناصر مورد نیاز رشد و نمو قارچ گانودرما لوسیدم اکسیژن

می‌باشد (Zhou, 2017).

در محیط‌های کشت مایع با رشد توده زیستی، ویسکوزیته محیط کشت مایع افزایش پیدا میکند. این افزایش ویسکوزیته سرعت انتقال اکسیژن به درون محیط کشت مایع را کاهش میدهد. برای رفع این اشکال یکی از متداولترین روش‌ها تکان دادن محیط کشت مایع با سرعت چرخشی مناسب می‌باشد، که به این صورت سرعت انتقال اکسیژن به درون محیط کشت مایع افزایش میابد (Elisashvili, 2012).

۱-۴-۲-۴ عامل نور

قارچ گانودرما لوسیدوم در مراحل مختلف رشد، به نور حساسیت متفاوتی از خود نشان می‌دهد. میسلیم در شرایط تاریک رشد می‌کند. نور آبی و بنفش در طیف مرئی از رشد میسلیم جلوگیری می‌کند. تاباندن اشعه فرابنفش در طول موج ۲۶۰-۲۶۵ nm به مدت حدود ۳۰ دقیقه به میسلیم می‌تواند آن را کاملاً نابود کند. نور مستقیم خورشید برای میسلیم مضر بوده، و هرچه نور قوی‌تر ضرر آن بیشتر می‌باشد. نور قرمز در طول موج ۵۷۰-۹۲۰ nm برای رشد میسلیم بی‌ضرر می‌باشد. در غیاب نور (تاریکی) نمی‌توانند میسلیم‌ها از حالت رویشی به حالت زایشی تغییر کنند. با القای نور ضعیفی، میسلیم‌ها تحریک به تولید میوه می‌شوند. معمولاً از نور آبی با طول موج حدود ۴۰۰-۵۰۰ nm برای این تحریک استفاده می‌شود. تاباندن نور آبی و بنفش بر محیط کشت طی رشد میوه مضر می‌باشد (Du et al., 2019).

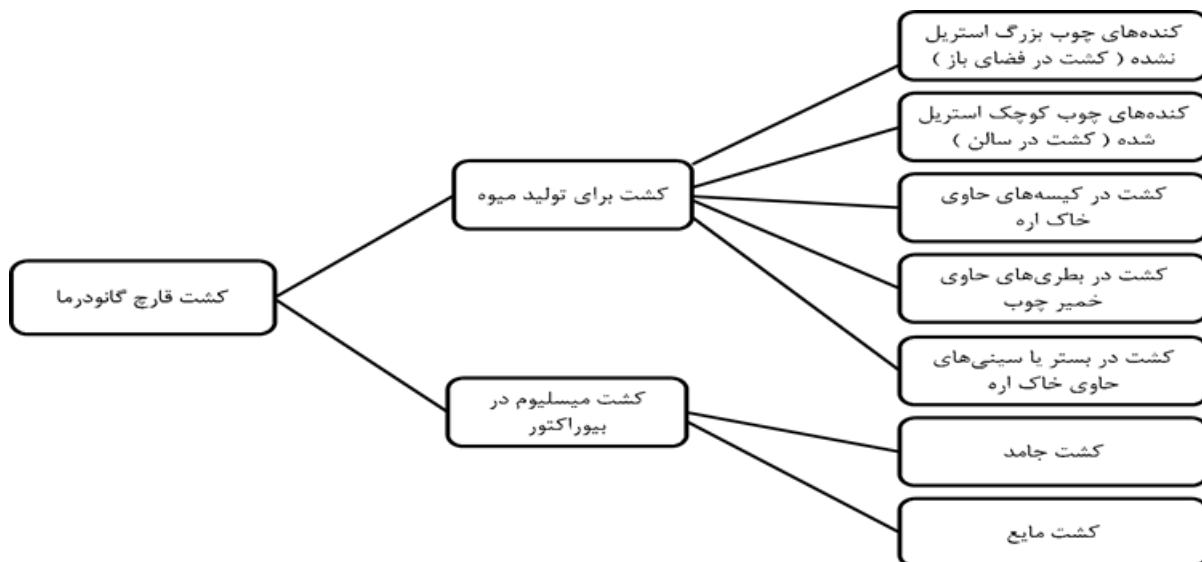
۵-۲-۴-۱ pH

گونه‌های گانودرما در شرایط اسیدی بهتر رشد می‌کنند. میسلیم‌ها می‌تواند در دامنه pH ۳-۹ رشد کنند. زمانی که pH محیط کشت مایع به ۸ می‌رسد رشد میسلیم کاهش پیدا می‌کند و زمانی که به بیشتر از ۹ می‌رسد رشد میسلیم متوقف می‌شود. تحت شرایط قلیایی، حلالیت یون‌های معدنی همچون کلسیم و منیزیم در محیط کشت مایع افزایش پیدا کرده، که این افزایش از فعالیت برخی آنزیم‌ها جلوگیری، و فعالیت متابولیکی سلول را با مشکل مواجه می‌کند (Du et al., 2019). برای اینکه pH محیط کشت مایع، در طی رشد میسلیم تغییری چندانی نکند، و در دامنه مناسب خود باقی بماند، از بافرهایی همچون دی پتاسیم هیدروژن فسفات (K_2HPO_4) یا پتاسیم دی هیدروژن فسفات (KH_2PO_4) در تهیه محیط کشت استفاده می‌کنند (Du et al., 2019).

۵-۱ کشت مصنوعی قارچ گانودرما لوسیدوم

قارچ گانودرما لوسیدوم در طبیعت به ندرت رشد می‌کند، و پیدا کردن آن بسیار مشکل است. به همین دلیل در قدیم اگر کسی از مردم معمولی جامعه آن را پیدا میکرد برای گرفتن پول زیاد آن را به افراد ثروتمند جامعه می‌فروخت، پس در هر صورت فقط افراد ثروتمند می‌توانستند از آن استفاده کنند. امروزه

به دلیل کشت مصنوعی، قارچ گانودرما به مقدار زیادی تولید می‌شود، که عموم مردم میتوانند از خواص دارویی فراوان آن استفاده کنند (Wasser, 2011). گونه‌های مختلف گانودرما برای رشد به شرایط متفاوتی نیاز دارند. گونه‌های *G. sinense*, *G. tsugae*, *G. applanatum* و *G. capense* کشت شبیه به کشت گونه *Ganoderma lucidum* را دارند (Chen, 2004). در شکل ۱-۵ روش‌های مختلف کشت مصنوعی میسلیم و میوه قارچ گانودرما لوسیدوم آورده شده است.



شکل ۱-۵: روش‌های مختلف کشت مصنوعی قارچ گانودرما لوسیدوم (Boh et al., 2007)

۱-۵-۱ کشت برای تولید میوه

۱-۵-۱-۱ کشت بر روی تنه درخت

اولین کشت مصنوعی موفقیت آمیز میوه گانودرما لوسیدوم در سال ۱۹۶۹ در چین انجام شد. برای اولین بار اسپور از میوه قارچ جداسازی شد و بر روی تنه چوب بزرگ استریل نشده (کشت در فضای باز) کشت داده شد. به دلیل زمان‌بر بودن کاشت تا برداشت (حدود ۲ سال) و تقاضای بالای بازار، این روش پاسخگوی نیاز بازار نبود، و تقریباً امروزه منسوخ شده است. در اواخر دهه ۱۹۸۰ از تنه چوب کوچک استریل شده (کشت در سالن) برای تولید میوه این قارچ استفاده شد، که در این روش نسبت به روش قبل مدت زمان کاشت تا برداشت کاهش پیدا کرد (Boh et al., 2007; Hapuarachchi et al., 2019). در مجموع کشت بر روی تنه درخت با کیفیت‌ترین میوه قارچ گانودرما لوسیدوم را به ما می‌دهد؛ که در بازارهای جنوب شرق آسیا بالاترین قیمت را دارد، ولی یک روش پیچیده با راندمان تولید پایین و مدت زمان کاشت تا برداشت (حدود ۸ ماه تا ۱ سال) طولانی می‌باشد (Chen and Chao, 1997). در این

روش به دلیل اینکه چوب‌ها از جنگل آورده می‌شود به محیط زیست آسیب وارد می‌شود (Chen and Chen, 2004).

۲-۱-۵-۱ کشت جایگزینی

در کشت جایگزینی بجای کشت قارچ گانودرما لوسیدوم بر روی تنه درخت، کشت بر روی ترکیبی مشخص از خاک اره چوب درختان پهن برگ همچون بلوط، صنوبر، نارگیل که با سبوس غلات (مانند سبوس گندم و برنج)، ضایعات کارخانجات صنایع غذایی (مانند کنجاله سویا) و سایر مکمل‌ها همچون سولفات کلسیم و کربنات کلسیم مغذی شده، انجام می‌شود. سه روش کشت در بطری، بستر و کیسه در این قسمت قرار دارند (Boh et al., 2007; Zhou, 2017). کشت در کیسه نسبت به سایر روش‌ها توسط پرورش‌دهندگان بیشتر مورد استفاده قرار می‌گیرد، زیرا در این روش در زمان کوتاهی میوه‌ای بزرگ و با کیفیت بالا تولید می‌شود (Du et al., 2019).

۲-۱-۵-۲ کشت میسلیم در بیوراکتور^۱ (Bioreactor)

به طور کلی الگوی کشت میسلیم یا توده زیستی قارچ گانودرما لوسیدوم بر اساس حالت فیزیکی محیط کشت، به دو نوع کشت جامد^۲ و کشت مایع یا غوطه‌ور^۳ تقسیم می‌شود (Zhou, 2017).

۱-۵-۲-۱ کشت جامد

در محیط کشت جامد بیشتر دانه غلات و تراشه چوب به عنوان مواد اولیه استفاده می‌شود. محیط کشت جامد برای تولید میوه، اسپور و میسلیم استفاده می‌شود. از آنجا که محیط کشت میسلیم در حالت جامد، شبیه به محیط کشت رشد میوه قارچ می‌باشد، فاز تاخیر را در چرخه رشد قارچ کاهش می‌دهد. بنابراین بهتر است که میسلیم کشت داده شده در محیط کشت جامد به محیط کشت تولید میوه منتقل شود، تا فاز تاخیر کاهش یافته و تولید میوه سریعتر صورت گیرد (Zhou, 2017).

۲-۱-۵-۲ کشت مایع

تولید میسلیم قارچ ماکرو در محیط کشت غوطه‌ور، برای اولین بار در ده ۱۹۵۰ انجام شد. کشت مایع، محیطی است متشکل از منابع کربنی، نیتروژنی و سایر ترکیبات که باعث رشد بهینه میسلیم قارچ‌ها

^۱ یک بیوراکتور می‌تواند به هر سیستم یا دستگاه مصنوعی ساخته یا مهندسی شده که از یک محیط زیستی فعال حمایت می‌کند، اطلاق شود (en.wikipedia.org).

^۲Solid-state cultivation

^۳Submerged cultivation in liquid media

می‌شود. استفاده از کشت در بستر مایع برای رشد قارچ‌های ناقص که تولید اندام بارده نمی‌کنند، در دستگاه فرمنتور^۱ بسیار موفقیت آمیز بوده است (Yang and Liau, 1998).

یکی از ویژگی‌های مهم استفاده از محیط کشت مایع، جداسازی آسان توده زیستی از محیط کشت می‌باشد. میسلیم‌ها در کشت مایع کمتر ضعیف می‌شوند، و پارامترهای بستر کشت به راحتی قابل دستکاری می‌باشند. کشت مایع پتانسیل بالایی برای تولید متابولیت‌های ثانویه مانند گانودریک اسید و پلی‌ساکارید دارد. خواص دارویی میسلیم یا توده زیستی گانودرما لوسیدوم تقریباً مانند میوه آن می‌باشد؛ با این تفاوت که میتوان توده زیستی یکنواختی، با نیاز به نیروی کار دستی کمتر در مدت زمان کوتاه‌تر و هزینه پایین‌تر در فضای کوچک‌تر با کنترل شرایط بهتر به شکل کاملاً مکانیزه بدست آورد. به خاطر مزایای زیاد محیط کشت مایع، این روش به سرعت در حال گسترش می‌باشد (Elisashvili, 2012; Block, 1960).

با وجود اینکه کشت در محیط مایع دارای مزایای زیادی می‌باشد، ولی معایبی هم دارد. معایب هنگامی رخ میدهد که محیط کشت مایع در مقیاس بالا استفاده میشود. در مقیاس‌های بالا با رشد توده زیستی ویسکوزیته مایع افزایش یافته، که همین افزایش ویسکوزیته انتقال اکسیژن به توده زیستی را با مشکل مواجه می‌کند، که منجر به کاهش رشد توده زیستی می‌شود؛ و همچنین جداسازی توده زیستی را از محیط کشت سخت می‌کند. پودر میسلیم که از کشت مایع قارچ گانودرما لوسیدوم بدست می‌آید، در بازار به عنوان مکمل‌های غذایی به صورت کپسول و قرص بفروش می‌رسد (Boh et al., 2007; Zhou, 2017).

۶-۱ اجزای شیمیایی تشکیل دهنده قارچ گانودرما لوسیدوم

ترکیبات شیمیایی قارچ گانودرما لوسیدوم که به صورت مصنوعی کشت شده، مشابه ترکیبات شیمیایی قارچ رشد یافته در طبیعت می‌باشد. به طور کلی این قارچ حاوی پروتئین، کربوهیدرات، چربی و فیبر است (Solomon, 2005). قارچ گانودرما لوسیدوم دارای ماده خشک بالایی می‌باشد، از هر ۱ kg میوه قارچ تازه حدود ۴۵۰ gr آن را وزن خشک تشکیل میدهد، که از این مقدار وزن خشک حدود ۴۵-۴۰٪ آن را سلولز، ۳۵-۲۵٪ همی سلولز، ۳۰-۱۵٪ لیگنین و حدود ۱۰٪ سایر ترکیبات می‌باشد (Dorrestijn et al., 2000). به عبارت دیگر میوه قارچ گانودرما لوسیدوم بر پایه وزن خشک حاوی حدود ۱۵٪ پروتئین، ۸۲٪ کربوهیدرات‌ها (که ۵۴٪ از آن را فیبر تشکیل میدهد)، ۱-۰/۵٪ چربی و ۲٪ املاح معدنی می‌باشد (Sharif et al., 2016). توده زیستی این قارچ به دلیل نداشتن فیبر، دارای کربوهیدرات و پروتئین بیشتری می‌باشد (Mizuno et al., 1995). کمیت و کیفیت اجزای شیمیایی توده زیستی قارچ گانودرما لوسیدوم بستگی به نژاد گونه، منشاء، روش استخراج و شرایط کشت دارد (Solomon, 2005).

^۱Fermentor

مونوساکاریدهایی همچون دی-گلوکز، دی-مانوز، ال-فوکوز، دی-گالاکتوز و دی-گزیلوز به مقدار زیادی در عصاره توده زیستی این قارچ وجود دارند (Bishop et al., 2015). ویتامین‌هایی که بیشتر در عصاره توده زیستی این قارچ یافت می‌شوند شامل اینوزیتول، کولین، نیاسین، B₁، B₂ و B₆ می‌باشند (Ahmad, 2018). کلسیم، منیزیم و پتاسیم از مهمترین فلزاتی هستند که در عصاره توده زیستی گانودرما لوسیدم وجود دارند (Solomon, 2005). اسیدهای آمینه آسپارتیک، گلوتامیک، گلیسین و آلانین به مقدار زیادی در این عصاره یافت شدند (Wang et al., 2002).

۷-۱ مواد موثره^۱ قارچ گانودرما لوسیدوم

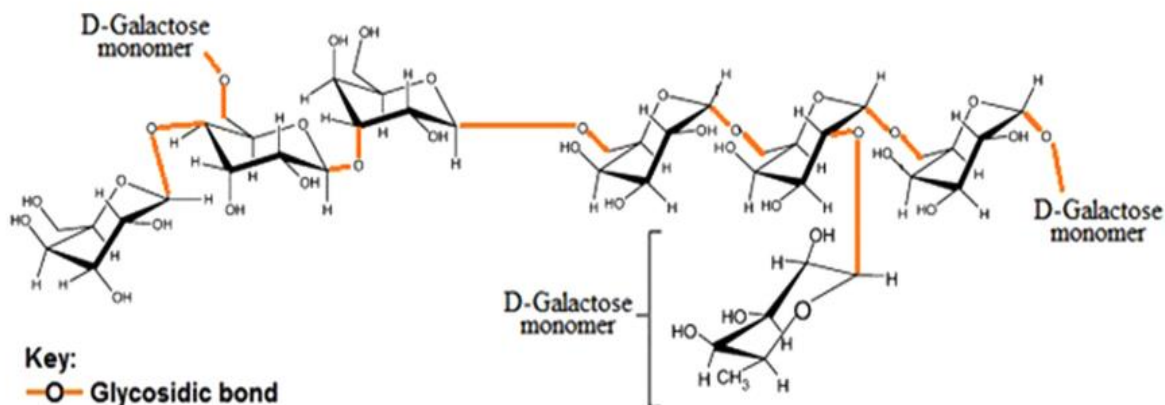
از ۲۰ سال گذشته تا به امروز تحقیقات علمی جدی بر روی این قارچ انجام شده است. بیشتر از ۳۰۰ گزارش در مورد ترکیبات شیمیایی گونه‌های گانودرما از جمله لوسیدوم منتشر شده است. میوه، توده زیستی و اسپور این قارچ حاوی تقریباً ۴۰۰ ماده موثره متفاوت می‌باشند. این مواد موثره عمدتاً شامل پلی‌ساکاریدها، ترپنوئیدها، استرول‌ها، پروتئین‌ها، استروئیدها، اسیدهای چرب و نوکلئوتیدها می‌باشند؛ که از این بین پلی‌ساکاریدها و ترپنوئیدها اهمیت درمانی بیشتری دارند (Solomon, 2005). تحقیقات گسترده‌ای برای افزایش تولید این ترکیبات مفید صورت گرفته است. با وجود اینکه توده زیستی پرورش یافته قارچ در محیط کشت غوطه‌وری همانند میوه آن دارای متابولیت‌های ثانویه مفید زیادی می‌باشد، ولی محققین توجه زیادی به میوه آن به عنوان منبعی برای استخراج مواد موثره دارند (Lorenzen and Anke, 1998).

۷-۱-۱ پلی‌ساکاریدها

یکی از مهمترین مواد موثره قارچ گانودرما لوسیدم، پلی‌ساکاریدها می‌باشند. تاکنون بیش از ۲۰۰ نوع پلی‌ساکارید متفاوت از میوه، اسپور و میسلایوم این قارچ جداسازی شده است (Supramani et al., 2019). حدود ۵۰-۱۰٪ وزن خشک میوه این قارچ را پلی‌ساکاریدها تشکیل می‌دهند. محققین با تجزیه و تحلیل ساختار پلی‌ساکاریدهای گانودرما لوسیدوم متوجه شدند، عمدتاً هتروپلیمرهایی با وزن مولکولی بالا می‌باشند. بیشتر آنها در ساختار ابتدایی خود وزن مولکولی در حد بین ۴۰۰-۱۰۰۰ کیلو دالتون دارند. پلی‌ساکاریدهای گانودرما لوسیدوم شامل بتا-دی‌گلوکان‌ها، آلفا-دی‌گلوکان‌ها، آلفا-دی‌مانان‌ها، هتروپلی‌ساکاریدها و گلیکوپروتئین‌ها می‌باشند (Solomon, 2005; Marek et al 2015). پلی‌ساکاریدی نامحلول به نام کیتین هم در این قارچ وجود دارد، که دلیل سختی قارچ بوده و غیرقابل هضم می‌باشد (Bishop et al., 2015). مونوساکاریدهایی که در میوه قارچ وجود دارند، عمدتاً گلوکز و گالاکتوز بوده و

^۱ Bioactive constituents

مونوساکاریدهایی که در توده زیستی و اسپور آن وجود دارند، عمدتاً گلوکز می‌باشند. سایر مونوساکاریدهایی که در این قارچ یافت می‌شود گزیلوز، مانوز، و فوکوز می‌باشد (Yang et al., 2019).
 باتوجه به شکل ۱-۶ در ساختار پلی‌ساکاریدهای این قارچ سه نوع پیوند گلیکوزیدی وجود دارد که پیوند $\beta(1 \rightarrow 3)$ بین مولکول‌های قند در زنجیر اصلی می‌باشد، و از طریق پیوندهای $\beta(1 \rightarrow 6)$ و $\beta(1 \rightarrow 4)$ زنجیرهای جانبی به زنجیره اصلی متصل می‌شوند. خاصیت اثر بخشی پلی‌ساکاریدها به میزان حلالیت آنها در آب، اندازه مولکول و تعداد شاخه جانبی آنها بستگی دارد، برای مثال بتا-دی گلوکانی که وزن مولکولی کمتری دارد فعالیت زیستی بیشتری داشته. میتوان با حداقل تغییر دادن ساختار پلی‌ساکاریدها خاصیت درمانی آنها را زیاد کنیم (Benkeblia, 2015; Zhou, 2017).
 محققین اثر درمانی پلی‌ساکاریدها را مورد بررسی قرار دادند، و متوجه شدن آنها سیستم ایمنی بدن را تقویت کرده و خاصیت ضد تومور دارند. پلی‌ساکاریدهای این قارچ علاوه بر درمان سرطان، دارای ویژگی ضد ویروس (در مقابل هپاتیت B)، کاهش دهنده فشار خون (تری‌گلیسیرید و کلسترول خون را کاهش می‌دهد)، ضد دیابت (قند خون را کاهش می‌دهد)، ضد پیری (دلیل آن داشتن خاصیت آنتی اکسیدانی می‌باشد)، افزایش مقاومت بدن در برابر اشعه (اشعه γ) و از لخته شدن خون جلوگیری می‌کنند (Marek et al., 2015; Yang et al., 2019). محققین پی بردند که هر گونه از جنس گانودرما ساختار پلی‌ساکارید مخصوص به خود را دارد، که مانند اثر انگشت آن گونه می‌ماند. پس میتوان از روی این ساختار گونه‌های گانودرما را طبقه‌بندی کرد (Sun et al., 2014).



شکل ۱-۶: ساختار مولکولی پلی‌ساکارید گانودرما لوسیدوم که از واحدهای D-گالاکتوز با پیوندهای گلیکوزیدی تشکیل شده (Bishop et al., 2015)

۲-۷-۱ ترپنوئیدها

برای اولین بار محققین در سال ۱۹۸۲ دو ترپنوئید (گانودرمیک اسید^۱ A و B) از قارچ گانودرما لوسیدوم استخراج و شناسایی کردند (Kubta et al., 1982). ترپنوئیدهای کشف شده از گانودرما لوسیدوم از نوع غیر فرار (تری ترپن) می باشند، و بیشتر در حلال های قطبی همچون اتانول و متانول حل میشوند (Sudheer et al., 2018). تری ترپنوئیدهای^۲ موجود در این قارچ که دارای عامل کربوکسیل می باشند، عموماً گانودریک اسید^۳ نامیده می شوند. از نظر ساختار شیمیایی، ترکیبات شدیداً اکسید شده^۴ lanostane می باشند. تری ترپنوئیدها لیپوفیل بوده و وزن مولکولی بین ۴۵۰-۶۵۰ کیلو دالتون دارند. تری ترپنوئیدها ۳۰، ۲۷ یا ۲۴ اتم کربن در مولکول خود دارا می باشند (Marek et al., 2015). تری ترپنوئیدها مسئول طعم تلخ گانودرما لوسیدوم می باشند، و از این تلخی میتوان به عنوان یک روش سریع برای تعیین کیفیت گانودرما لوسیدوم استفاده کرد (Kim and Kim, 1999).

تا به امروز بیش از ۱۵۰ تری ترپنوئید از گانودرما لوسیدوم و سایر گونه های گانودرما جدا و شناسایی شده است. مطالعات اولیه نشان داد که اسپور، مقدار تری ترپنوئید بیشتری نسبت به سایر قسمت های قارچ دارد. کمیت و کیفیت تری ترپن های موجود در این قارچ به منطقه ای که در آن رشد کرده بستگی دارد (Solomon, 2005). نام بعضی از تری ترپنوئیدها عبارتند از: اسید گانودریک (Ganoderic acid)، اسید لوسیدینیک (Lucidinic acid)، اسید گانودرمیک (Ganodemric acid)، اسید گانودرنیک (Ganodernic acid)، لوسیدون (Lucidone)، گانودرال (Ganoderal) و گانودرول (Ganoderol). ساختار شیمیایی بعضی از تری ترپنوئیدها در جدول ۱-۱ آمده است (Keypour et al., 2010; Boh et al., 2007).

تری ترپنوئیدها از لحاظ دارویی ارزش بالایی دارند. برخی از خواص درمانی تری ترپنوئیدها عبارتند از: محافظت از کبد، ضد تومور، ضد فشار خون، جلوگیری از سنتز و جذب کلسترول، جلوگیری از تجمع پلاکت ها در خون، ضد آلرژی، ضد ویروس HIV، همراه با β -گلوکان ها تقویت کننده سیستم ایمنی و... می باشند (Marek et al., 2015).

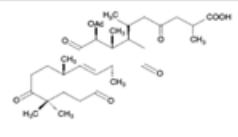
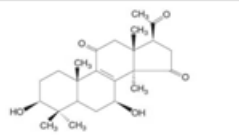
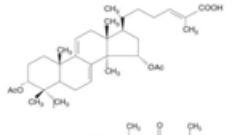
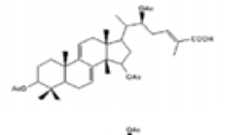
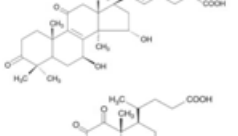
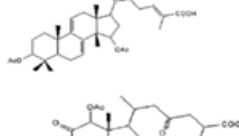
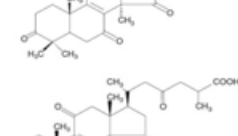
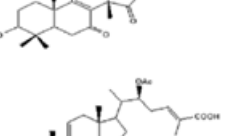
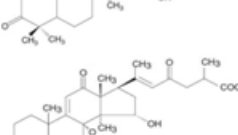
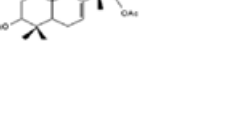
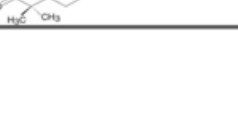
^۱ Ganodermic acid

^۲ Triterpenoids

^۳ Ganoderic acid

^۴ ترکیبی هیدروکربنی و پلی سیکلیک می باشد (en.wikipedia.org).

جدول ۱-۱: ساختار شیمیایی برخی ترپن‌های جدا شده از گانودرما لوسیدوم (Keypour et al., 2010; Boh et al., 2007)

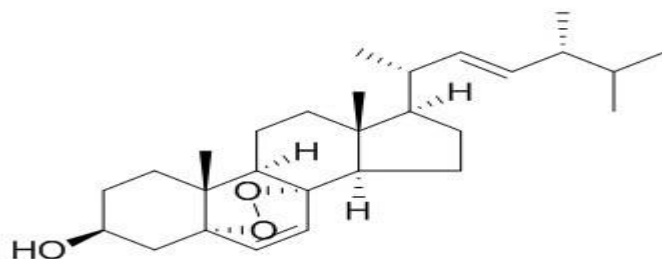
ردیف	نام ترپن	ساختار شیمیایی ترپن	ردیف	نام ترپن	ساختار شیمیایی ترپن
۱	Ganodermic acid F		۷	Lucidone	
۲	Ganodermic acid R		۸	Ganoderic acid T	
۳	Ganoderenic acid A		۹	Ganoderic acid C ₂	
۴	Lucidenic acid D1		۱۰	Ganoderic acid H	
۵	Ganolucidic acid A		۱۱	Ganoderic acid Me	
۶	Applanoxidic acid A				

۳-۷-۱ استرول‌ها

استرول‌ها^۱ ارتباط نزدیکی با ترپنوئیدها دارند، که در گانودرما لوسیدوم یافت می‌شود (Yokokawa and Mitsuhashi, 1981). آرگوسترول^۲ یک استرول حاضر در غشای سلولی قارچ می‌باشد، که نقشی مشابه کلسترول را در سلول‌های حیوانی ایفا می‌کند (Chilton, 2016). آرگوسترول پرواکسید، استرولی است که فقط از گانودرما لوسیدوم جداسازی شده (شکل ۷-۱). آرگوسترول پرواکسید باعث افزایش فعالیت بازدارندگی اسید لینولئیک بر روی DNA پلیمراز می‌شود (Mizushina et al., 1998). سال‌های زیادی می‌باشد، که در صنعت غلات برای مطلع شدن از آلودگی قارچی، آزمایش حضور یا عدم حضور آرگوسترول را انجام می‌دهند. آرگوسترول‌ها پیش‌ساز ویتامین D می‌باشند. زمانی که آرگوسترول‌ها در معرض اشعه ماوراءبنفش قرار می‌گیرند به ویتامین D₂ تبدیل می‌شوند. قارچ گانودرما لوسیدوم منبع خوبی برای ویتامین D می‌باشد. استرول‌های موجود در قارچ گانودرما لوسیدوم سبب کاهش کلسترول و جلوگیری از بیماری‌های قلبی و عروقی می‌شود (Chilton, 2016).

^۱ استرول‌ها (Sterols): این استروئیدهای الکلی زیرگروه مولکول‌های ارگانیک می‌باشند. آن‌ها به‌طور طبیعی در گیاهان و حیوانات و قارچ‌ها مشاهده می‌شوند (en.wikipedia.org).

^۲Ergosterol



شکل ۱-۷: ساختار شیمیایی آرگوسترول پرواکسید (Chilton, 2016)

۴-۷-۱ پروتئین‌ها

قدیمی‌ترین پروتئینی که از میسلایوم قارچ گانودرما لوسیدوم جداسازی شده، Ling Zhi-8 (LZ-8) نامیده می‌شود (Solomon, 2005). LZ-8 یک ترکیب پلی‌پپتیدی با وزن مولکولی حدود ۱۲ کیلو دالتون می‌باشد، که از ۱۱۰ آمینواسید تشکیل شده است. LZ-8 سیستم ایمنی بدن را تقویت می‌کند. گانودرمین^۱ یک پلی‌پپتیدی با وزن مولکولی ۱۵ کیلو دالتون می‌باشد، که از میوه قارچ جداسازی می‌شود. گانودرمین دارای خاصیت ضد قارچ می‌باشد. گانودران^۲ یک ترکیب پپتیدگلیکان می‌باشد، که از β -گلوکان و ۴٪ پروتئین تشکیل شده است. مشخص شده که گانودران خاصیت ضد سرطان دارد (Marek et al., 2015). اسیدهای آمینه استخراج شده از گانودرما لوسیدوم در جدول ۱-۲ آمده است.

^۱ Ganodermin

^۲ Ganoderan

جدول ۱-۲: اسیدهای آمینه استخراج شده از گانودرما لوسیدوم (Sanodiya et al., 2009)

Amino Acid	Relative Abundance
Aspartic acid	117
Threonine	66
Serine	54
Glutamic acid	120
Proline	60
Glycine	108
Alanine	100
Valine	61
Methionine	6
Isoleucine	36
Leucine	55
Tyrosine	16
Phenylalanine	28
Histidine	12
Lysine	21
Arginine	22

۸-۱ محصولات و ارزش اقتصادی قارچ گانودرما لوسیدوم

در حال حاضر با آگاهی مردم از خواص قارچ گانودرما لوسیدوم، استقبال آنها از محصولات گانودرما لوسیدوم رو به افزایش می‌باشد. بسته به نیاز از میوه، توده زیستی و اسپور این قارچ محصولاتی تولید می‌شود. این محصولات به صورت مکمل‌های غذایی، نوشیدنی‌ها، محصولات آرایشی بهداشتی و محصولات دارویی در بازار یافت می‌شوند (Lai et al., 2004; Badalyan et al., 2007). به عنوان مثال یکی از محصولات آرایشی مبتنی بر گانودرما لوسیدوم که به طور عمده در ژاپن، چین، کره جنوبی و آمریکا تولید می‌شود، ماسک روشن‌کننده پوست می‌باشد. آنزیم تیروزیناز^۱ یک آنزیم کلیدی در تشکیل ملانین و تیرگی پوست است. قارچ گانودرما لوسیدوم این آنزیم را مهار کرده، و باعث سفید شدن پوست می‌شود (Chein et al., 2008). فقط در چین نزدیک به ۲۰۰ دارو و بیشتر از ۱۰۰۰ محصول آرایشی بهداشتی حاوی ترکیبات گانودرما لوسیدوم وجود دارد (Chen et al., 2016).

محصولات بر پایه این قارچ که در جدول شماره ۱-۳ آمده است، طی دهه گذشته در اروپا، مالزی، آمریکای شمالی و سنگاپور مورد توجه بسیاری قرار گرفته‌اند. چین، ژاپن و کره جنوبی اصلی‌ترین کشورهای تولیدکننده محصولات بر پایه گانودرما لوسیدوم هستند (Miles and Chang, 2004). کل

^۱ Tyrosinase

تولید این قارچ در ژاپن طی سال ۱۹۹۵ حدود ۵۰۰ تن تخمین زده شده. در سال ۱۹۹۷ تولید گانودرما لوسیدوم در سراسر جهان ۴۳۰۰ تن بود، که ۳۰۰۰ تن آن در چین، و ۱۳۰۰ تن باقی‌مانده عمدتاً در کشورهای کره جنوبی، ژاپن، تایوان، مالزی، آمریکا، ویتنام، اندونزی و سریلانکا تولید شد (Gao and Zhou, 2002). گروه DXN^۱ در مالزی ۷۰ تن از این قارچ را تولید کرد و حدود ۱٪ از تولید کل جهان را در سال ۲۰۰۱ به خود اختصاص داد (Hapuarachchi et al., 2018).

گردش مالی بازار محصولات غذایی و آرایشی بهداشتی حاوی گانودرما لوسیدوم در سال ۱۹۹۵ حدود ۱۶۲۸ میلیون دلار آمریکا بود (Chang and Buswell, 1999). در سال ۲۰۰۴ تولید جهانی گانودرما لوسیدوم حدود ۵۰۰۰ - ۶۰۰۰ تن بود، که بیش از نیمی از آن در چین تولید شد. انجمن قارچ چین، تولید گانودرما لوسیدوم را به ترتیب در سال‌های ۲۰۰۲ و ۲۰۰۳ حدود ۳۶۷۰۰ و ۴۹۲۰۰ تن ثبت کردند. در حال حاضر چین با تولید بیش از ۱۱۰۰۰۰ تن بزرگترین تولیدکننده و صادرکننده این قارچ در جهان می‌باشد. اگرچه چین ۷۰٪ از تولید جهان را به خود اختصاص داده، ولی کمتر از ۵٪ کل تولید خود را صادر می‌کند. بزرگترین بازار خرید و فروش قارچ گانودرما لوسیدوم و محصولات آن در آمریکا می‌باشد (Hapuarachchi et al., 2018).

در اوایل دهه ۱۹۸۰ اولین محصولات دارویی مبتنی بر گانودرما لوسیدوم مانند جوشانده‌ها، شربت‌ها، قرص‌ها و مایع‌های تزریقی در بازارهای بین‌المللی به وجود آمد (Hapuarachchi et al., 2018). امروزه تخمین زده می‌شود که حداقل ۱۰۰ مارک و بیش از ۷۵۰ محصول از گانودرما لوسیدوم در بازارهای جهانی خرید و فروش می‌شود (Lai et al., 2004; Li et al., 2016).

^۱ یک شرکت بازاریابی در مالزی می‌باشد، که در سال ۱۹۹۳ توسط Dr. Lim Siow Jin تأسیس شد. کار این شرکت تولید قارچ گانودرما لوسیدوم و محصولات حاوی این قارچ می‌باشد (en.wikipedia.org).

جدول ۱-۳: محصولات تولید شده در کشورهای مختلف (کی پور و همکاران، ۱۳۹۲)

نام کشور	محصولات تولید شده
فیلیپین	انوع قهوه و چای، مکمل های غذایی، محصولات دارویی، محصولات آرایشی - بهداشتی مانند: صابون، شامپو، خمیر دندان
سنگاپور	گانودرم، انواع کپسول های درمانی
ژاپن	گانودرم، انواع قرص های حاوی عصاره گانودرم
هند	پودر میسلیم و میوه گانودرم، انواع کپسول های درمانی
مالزی	گانودرم، پلی ساکارید گانودرم، انواع قهوه و چای، انواع کپسول های درمانی
کره جنوبی	انواع چای، کپسول عصاره گانودرم، محصولات مراقبت از پوست
هنگ کنگ	پودر میسلیم و میوه گانودرم، کپسول اسانس گانودرم، کپسول پلی ساکارید های گانودرم، روغن های درمانی، چای و قهوه، کپسول های حاوی اسپور گانودرم
آمریکا	گانودرم، پلی ساکارید گانودرم، انواع قهوه و چای، میسلیم گانودرم

۱-۸-۱ معایب محصولات

عدم وجود محصولات با ارزش افزوده بالا، کیفیت پایین و قیمت بالای این محصولات نیز عمده مشکلاتی هستند که در سر راه تولید این محصولات قرار دارند (Li et al., 2016). اخیرا گروهی از محققان نشان دادند که بیشتر محصولات گانودرم لوسیدوم موجود در آمریکا فاقد تری ترپنوئید هستند و پلی ساکارید گرفته شده از این محصولات با پلی ساکارید این قارچ تفاوت داشت (Wu et al., 2017).

کیفیت قارچ گانودرم لوسیدوم و مدیریت محصولات حاصل از آن باید بهبود یابد، تا بازار فروش این محصول با ارزش از بین نرود. مدیریت محصول یعنی شناسایی و کنترل اجزای فعال زیستی قارچ در محصولات، که از حد استاندارد کاهش پیدا نکنند، و همچنین قارچ هایی که به هر دلیلی حاوی مواد خطرناک و مضر مانند فلزات سنگین و سموم دفع آفات هستند، شناسایی و از آنها در تولید محصول استفاده نشوند (Zhou et al., 2012; Hapuarachchi et al., 2018).

۱-۹ هدف تحقیق

امروزه قارچ گانودرم لوسیدوم به دلیل اینکه حاوی مقادیر زیادی مواد موثره می باشد، و نقش مثبتی در سلامتی انسان ها ایفا می کند به عنوان یک منبع دارویی بسیار امیدوارکننده در نظر گرفته می شود. اخیرا

پرورش این قارچ و تولید مکمل‌های غذایی حاوی آن در کشور ایران مورد توجه قرار گرفته است. با توجه به اینکه این قارچ به طور خودرو در ایران رشد می‌کند؛ و ثابت شده نژادهای رشد یافته در ایران نسبت به نژادهایی که در چینی رشد می‌کنند، پلی‌ساکارید بیشتری دارند، اما تاکنون در ایران تحقیقات علمی اندکی بر روی این قارچ ارزشمند صورت گرفته است (Sangesari-Keypour et al., 2009).

عمدتاً در ایران میوه این قارچ توسط پرورش‌دهندگان بر روی محیط کشت جامد تولید و در بازار به فروش میرسد، در صورتی که توده زیستی این قارچ همان خواص دارویی را داشته با این تفاوت که در فضای کم، هزینه پایین و در مدت زمان کوتاهی در محیط کشت مایع تولید می‌شود. برخی از تحقیقات نشان می‌دهد مقدار پلی‌ساکارید توده زیستی این قارچ از میوه آن بیشتر است (Carolin, 2013). با این وجود تحقیقات بسیار اندکی برای بهینه‌سازی محیط کشت مایع توده زیستی قارچ گانودرما لوسیدم در ایران انجام شده است.

ریخت‌شناسی توده زیستی قارچ یک عامل مهم می‌باشد، که بر میزان رشد و تشکیل متابولیت‌های ثانویه توده زیستی قارچ در محیط کشت مایع اثر گذار است. ریخت‌شناسی توده زیستی قارچ به شدت وابسته شرایط محیط کشت همچون منابع کربنی، منابع نیتروژنی، نسبت کربن به نیتروژن، pH اولیه و... می‌باشد (Vieira et al., 2008). به همین دلیل در این تحقیق با هدف انتخاب بهترین عوامل شیمیایی محیط کشت مایع که بیشترین تاثیر را بر میزان رشد و تشکیل متابولیت‌های ثانویه (گانودریک اسید و پلی‌ساکارید) توده زیستی قارچ گانودرما لوسیدم دارند؛ عوامل شیمیایی محیط کشت مایع مورد بررسی قرار گرفتند.

فصل ۲

مروری بر مطالعات پیشین

۲-۱ تحقیقات انجام گرفته بر روی قارچ گانودرما لوسیدم

مقالات زیادی با موضوع قارچ گانودرما لوسیدوم در دنیا به چاپ رسیده است. در این فصل از آن دسته مقالاتی استفاده شد، که اثر اجزای شیمیایی محیط کشت مایع را بر میزان رشد و تشکیل متابولیت‌های ثانویه توده زیستی قارچ گانودرما لوسیدوم مورد بررسی قرار دادند.

۱-۱-۲ پژوهش‌های مربوط به منابع کربنی

طی پژوهشی Tang و Zhong در سال ۲۰۰۲ به بررسی تاثیر چهار منبع کربنی ساکارز، مالتوز، لاکتوز و گلوکز بر میزان رشد و تشکیل متابولیت‌های ثانویه توده زیستی قارچ گانودرما لوسیدم در محیط کشت مایع پرداختند. آنها گزارش کردند، محیط کشت حاوی منبع کربنی لاکتوز بیشترین میزان رشد، تشکیل پلی‌ساکارید و گانودریک اسید توده زیستی را نشان داد (Tang and Zhong, 2002).

Malarvizhi و همکاران در سال ۲۰۰۳ تاثیر شش منبع کربنی گلوکز، سلولز، آربینوز، گالاکتوز، گزیلوز و گزیلان را بر میزان رشد توده زیستی قارچ گانودرما لوسیدم در محیط کشت مایع بررسی کردند. بعد از ۱۵ روز تخمیر به ترتیب منبع کربنی گزیلوز، گزیلان و سلولز بیشترین تاثیر را بر میزان رشد توده زیستی داشتند (Malarvizhi et al., 2003).

Babitskaya و همکاران در سال ۲۰۰۵ به بررسی تاثیر سه منبع کربنی مونوساکارید بر میزان تشکیل پلی‌ساکارید توده زیستی قارچ گانودرما لوسیدم در محیط‌های کشت مایع پرداختند. در این پژوهش سه منبع کربنی مانوز، گالاکتوز و گلوکز در محیط‌های کشت مایع استفاده شدند. آنها گزارش کردند، محیط کشت حاوی منبع کربنی گلوکز بیشترین میزان تشکیل پلی‌ساکارید توده زیستی را از خود نشان داد (Babitskaya et al., 2005).

Hsieh و همکاران در سال ۲۰۰۵ تاثیر سه محیط کشت مایع حاوی منابع کربنی متفاوت را بر میزان رشد و تشکیل پلی‌ساکارید توده زیستی قارچ گانودرما لوسیدم در محیط کشت مایع بررسی کردند. در این پژوهش محیط کشت اول حاوی منبع کربنی استیلاژ نازک^۱ (thin stillage)، محیط کشت دوم حاوی منبع کربنی استیلاژ نازک غنی سازی شده با ملاس و محیط کشت سوم حاوی منبع کربنی استیلاژ نازک غنی سازی شده با گلوکز بود. محیط کشت حاوی استیلاژ نازک غنی سازی شده با ملاس بیشترین میزان رشد توده زیستی قارچ را داشت. محیط کشت حاوی استیلاژ نازک غنی سازی شده با گلوکز بیشترین میزان تشکیل پلی‌ساکارید را از خود نشان داد (Hsieh et al., 2005).

Hsieh و همکاران در سال ۲۰۰۵ پژوهشی با هدف اینکه کدام قندها می‌توانند میزان رشد میسلیوم قارچ گانودرما لوسیدوم را در محیط کشت PDA افزایش دهند، انجام دادند. پنج قند گلوکز، فروکتوز، مالتوز، ساکارز و ملاس به مقدار $\frac{w}{v}$ ۱٪ به پلیت‌های PDA اضافه کردند، سپس میسلیوم قارچ گانودرما

^۱ به پساب کارخانجات تولید شراب برنج در تایوان گفته می‌شود (en.wikipedia.org).

لوسیدم را بر روی آن کشت دادند. محیط کشت حاوی قند ملاس بیشترین میزان رشد میسلیم را داشت. آنها بیان کردند ملاس به دلیل اینکه به جزء قند حاوی مواد مغذی بسیاری می‌باشد، رشد میسلیم را بیشتر تحریک می‌کند، و نسبت به سایر قندها برتری دارد (Hsieh et al., 2005).

Li و همکاران در سال ۲۰۰۶ با هدف یافتن یک منبع کربنی مناسب، برای افزایش میزان تشکیل گانودریک اسید توده زیستی قارچ گانودرما لوسیدم در محیط کشت مایع پژوهشی انجام دادند. آنها در این پژوهش شش منبع کربنی گلوکز، ساکارز، مالتوز، مانوز، لاکتوز و نشاسته محلول را با یکدیگر مقایسه کردند. آنها گزارش کردند، محیط کشت مایع حاوی منبع کربنی ساکارز بیشترین میزان تشکیل گانودریک اسید را داشت، و محیط کشت مایع حاوی منبع کربنی نشاسته محلول کمترین میزان تشکیل گانودریک اسید را از خود نشان داد. در مجموع آنها اذعان کردن انتخاب منبع کربنی مناسب بیشترین نقش را در افزایش میزان تشکیل گانودریک اسید توده زیستی دارد (Li et al., 2006).

Chang و همکاران در سال ۲۰۰۶ به بررسی اثر شش منبع کربنی بر میزان رشد و تشکیل پلی‌ساکارید خارجی توده زیستی قارچ گانودرما لوسیدم پرداختند. در این پژوهش شش منبع کربنی شکر قهوه‌ای، فرکتوز، گلوکز، لاکتوز، عصاره مالت و ساکارز در محیط‌های کشت استفاده شدند. ابتدا شکر قهوه‌ای و بعد از آن لاکتوز بیشترین میزان رشد توده زیستی را داشتند. اول عصاره مالت و بعد از آن شکر قهوه‌ای بیشترین میزان تشکیل پلی‌ساکارید توده زیستی را از خود نشان دادند. آنها نتیجه گرفتند اگرچه ساکارز ترکیب اصلی شکر قهوه‌ای می‌باشد، ولی به دلیل داشتن ریز مغذی‌ها نسبت به منبع کربنی ساکارز تاثیر بیشتری بر میزان رشد و تشکیل پلی‌ساکارید توده زیستی قارچ دارد (Chang et al., 2006).

Xu و همکاران در سال ۲۰۰۸ به بررسی تاثیر هفت منبع کربنی (گلوکز، مالتوز، لاکتوز، ساکارز، گزیلوز، نشاسته محلول و نشاسته ذرت) بر میزان رشد و تشکیل گانودریک اسید توده زیستی قارچ گانودرما لوسیدوم در محیط کشت مایع پرداختند. در این پژوهش محیط کشت حاوی منبع کربنی گلوکز بیشترین میزان رشد توده زیستی را داشت، و محیط کشت حاوی منبع کربنی نشاسته ذرت بیشترین میزان تشکیل گانودریک اسید را از خود نشان داد (Xu et al., 2008).

Elisashvili و همکاران در سال ۲۰۰۸ طی پژوهشی تاثیر شش منبع کربنی را بر میزان رشد و تشکیل پلی‌ساکارید توده زیستی قارچ گانودرما لوسیدم در محیط‌های کشت مایع بررسی کردند. در این تحقیق شش منبع کربنی گزیلوز، گلوکز، مالتوز، ساکارز، مانیتول و سدیم گلوکونات استفاده شدند. به ترتیب محیط‌های کشت مایع حاوی منبع کربنی گلوکز، مانیتول و مالتوز بیشترین تاثیر را بر میزان رشد توده زیستی داشتند. اول گلوکز و بعد از آن ساکارز بیشترین تاثیر را بر میزان تشکیل پلی‌ساکارید داشتند (Elisashvili et al., 2008).

George و همکاران در سال ۲۰۰۸ تاثیر هفت منبع کربنی را بر میزان رشد توده زیستی قارچ گانودرما لوسیدم در محیط کشت مایع بررسی کردند. در این تحقیق هفت منبع کربنی کربوکسیل متیل سلولز، گزیلان، گزیلوز، گلوکز، سلوبیوز، مانیتول و گلیسرول بررسی شدند. به ترتیب محیط‌های کشت مایع

حاوی گلوکز، سلوبیوز و گلیسرول بیشترین میزان رشد توده زیستی را داشتند. محیط‌های کشت حاوی منابع کربنی کربوکی متیل سلولز و گزیلوز کمترین میزان رشد توده زیستی را داشتند (George et al., 2008).

Jo و همکاران در سال ۲۰۰۹ تاثیر ده منبع کربنی را بر میزان رشد میسلیم قارچ گانودرما لوسیدم در محیط کشت آگاردار مورد بررسی قرار دادند. آنها گزارش کردند، به ترتیب دکستروز، مانیتول، لاکتوز و ساکارز بیشترین تاثیر را بر میزان رشد میسلیم داشتند (Jo et al., 2009).

توانا و همکاران در سال ۱۳۹۱ در پژوهش خود به بررسی تاثیر سه منبع کربنی مالتوز، لاکتوز و گلوکز بر میزان رشد و تشکیل پلی ساکارید توده زیستی قارچ گانودرما لوسیدم در محیط کشت مایع پرداختند. محیط کشت حاوی منبع کربنی مالتوز بیشترین میزان رشد و تشکیل پلی ساکارید توده زیستی را داشت (توانا و همکاران، ۱۳۹۱).

Yuan و همکاران در سال ۲۰۱۴ طی پژوهشی به بررسی تاثیر منبع کربنی گلوکز در غلظت‌های مختلف بر میزان رشد و تشکیل پلی ساکارید قارچ گانودرما لوسیدم در محیط کشت مایع پرداختند. آنها گزارش کردند، میزان رشد و تشکیل پلی ساکارید توده زیستی ابتدا با افزایش غلظت گلوکز تا $60 \frac{g}{L}$ افزایش یافتند، و بعد از آن با افزایش غلظت گلوکز کاهش پیدا کردند. محققین اذعان کردند، در نژاد *lucidum CAU5501* یک ارتباط مستقیم بین رشد و میزان تشکیل پلی ساکارید توده زیستی وجود دارد. Wei و همکاران در سال ۲۰۱۴ طی پژوهشی که انجام دادند گزارش کردند بهترین منبع کربنی برای رشد و تولید متابولیت‌های ثانویه توده زیستی قارچ گانودرما لوسیدم در محیط کشت مایع، شربت گلوکز می‌باشد (Wei et al 2014).

Subera و همکاران در سال ۲۰۱۴ به بررسی اثر چهار منبع کربنی (شربت مالتوز، شربت گلوکز، پودر لاکتوز و نشاسته محلول) بر میزان رشد توده زیستی قارچ گانودرما لوسیدم در محیط کشت مایع پرداختند. ابتدا شربت مالتوز و بعد از آن به ترتیب شربت گلوکز و پودر لاکتوز بیشترین میزان رشد توده زیستی را از خود نشان دادند. نشاسته محلول تاثیری بر روی میزان رشد توده زیستی نداشت. پژوهشگرها دلیل بهتر بودن مالتوز را الیگوساکارید بودن مالتوز و داشتن کربن بیشتر نسبت به منوساکاریدها بیان کردند (Subera et al., 2014).

Zhou و همکاران در سال ۲۰۱۵ اثر چند منبع کربنی را بر میزان رشد توده زیستی قارچ گانودرما لوسیدم در چهار محیط کشت مایع مورد بررسی قرار دادند. در این پژوهش محیط کشت اول حاوی عصاره سیب زمینی و پودر گلوکز، محیط کشت دوم حاوی نشاسته ذرت و پودر ساکارز و محیط کشت سوم حاوی نشاسته ذرت و پودر گلوکز بودند. محیط کشت اول بیشترین میزان رشد توده زیستی را از خود نشان داد. پژوهشگرها دلیل آن را وجود مقدار متعادلی از نشاسته، پروتئین و فیبر در عصاره سیب زمینی بیان کردند (Zhou et al., 2015).

Cui و همکاران در سال ۲۰۱۵ تاثیر پنج نوع منبع کربنی را بر میزان رشد و تشکیل گانودریک اسید

توده زیستی قارچ گانودرما لوسیدم در محیط کشت مایع مورد پژوهش قرار دادند. در این تحقیق پنج منبع کربنی پودر گلوکز، نشاسته ذرت، عصاره مخمر، ساکارز و نشاسته محلول بررسی شدند. پژوهشگرها بیان کردند که برای اولین بار از عصاره مخمر به عنوان منبع کربنی در این پژوهش استفاده شده است. محیط کشت حاوی پودر گلوکز بالاترین میزان رشد توده زیستی را داشت. محیط کشت حاوی عصاره مخمر بیشترین میزان تشکیل گانودریک اسید توده زیستی را از خود نشان داد (Cui et al., 2015).

Shah and Modi در سال ۲۰۱۸ به بررسی اثر شش منبع کربنی گلوکز، مالتوز، فروکتوز، گزیلوز، ساکارز و لاکتوز بر میزان رشد توده زیستی قارچ گانودرما لوسیدم در محیط کشت مایع پرداختند. در این پژوهش ابتدا منبع کربنی گلوکز و بعد از آن منبع کربنی مالتوز بیشترین میزان رشد توده زیستی را از خود نشان دادند. آنها نتیجه گرفتند منبع کربنی گلوکز به دلیل سهولت مصرف و تولید انرژی بهترین منبع کربنی می باشد (Shah and Modi, 2018).

در طی پژوهشی Ahmadifar و همکاران در سال ۲۰۲۰ ملاس نیشکر را با چهار منبع کربنی آربینوز، مالتوز، گزیلوز و سلولز غنی سازی کردند. آنها گزارش کردند، محیط کشت حاوی ملاس نیشکر غنی سازی شده با مالتوز بیشترین میزان رشد توده زیستی را از خود نشان داد (Ahmadifar et al., 2020).

۲-۱-۲ پژوهش های مربوط به منابع نیتروژنی

Lee و همکاران در سال ۱۹۹۹ به بررسی تاثیر منبع نیتروژن آمونیوم فسفات بر میزان رشد و تشکیل پلی ساکارید توده زیستی قارچ گانودرما لوسیدم در محیط کشت مایع پرداختند. آنها به این نتیجه رسیدند، اگر هدف طرح تولید توده زیستی است از آمونیوم فسفات استفاده شود، و اگر هدف طرح تولید پلی ساکارید توده زیستی است از آمونیوم فسفات استفاده نشود (Lee et al., 1999).

Malarvizhi و همکاران در سال ۲۰۰۳ تاثیر چهار منبع نیتروژنی عصاره مخمر، پپتون گوشت، آمونیوم تارتارات و سدیم نترات را بر میزان رشد توده زیستی قارچ گانودرما لوسیدم در محیط کشت مایع بررسی کردند. منبع نیتروژنی پپتون گوشت بیشترین تاثیر را بر میزان رشد توده زیستی قارچ گانودرما لوسیدم داشت (Malarvizhi et al., 2003).

Hsieh و همکاران در سال ۲۰۰۶ مطالعه ای در مورد تاثیر منبع نیتروژنی CSP^۱ در سه غلظت ($\frac{g}{L}$) ۱، ۲ و ۵ بر میزان رشد و تشکیل پلی ساکارید توده زیستی قارچ گانودرما لوسیدم در محیط کشت مایع انجام دادند. بیشترین رشد توده زیستی زمانی رخ داد که منبع نیتروژنی CSP در غلظت $\frac{g}{L}$ ۵ استفاده شد. حداکثر تولید پلی ساکارید وقتی بدست آمد که منبع نیتروژنی CSP در غلظت $\frac{g}{L}$ ۱ مصرف شد. آنها به این نتیجه رسیدن که در محدودیت منبع نیتروژنی میزان پلی ساکارید افزایش پیدا می کند (Hsieh et al., 2006).

^۱ Corn steep powder

Li و همکاران در سال ۲۰۰۶ با هدف یافتن یک منبع نیتروژنی مناسب برای افزایش میزان تشکیل گانودریک اسید توده زیستی گانودرما لوسیدم پژوهشی انجام دادند. آنها از سه منبع نیتروژنی پودر سویا، پپتون گوشت و عصاره مخمر استفاده کردند. ابتدا محیط کشت حاوی منبع نیتروژنی پودر سویا و بعد از آن محیط کشت حاوی منبع نیتروژنی پپتون گوشت بیشترین میزان تشکیل گانودریک اسید را از خود نشان دادند (Li et al., 2006).

Chang و همکاران در سال ۲۰۰۶ در پژوهشی به بررسی تاثیر پنج منبع نیتروژنی عصاره گوشت گاو، عصاره مخمر، مونوسدیم گلوتمات، شیر بدون چربی و پپتون گوشت بر میزان رشد و تشکیل پلی ساکارید توده زیستی قارچ گانودرما لوسیدم در محیط کشت مایع پرداختند. ابتدا عصاره مخمر و بعد از آن شیر بدون چربی بیشترین میزان رشد و تشکیل پلی ساکارید را داشتند (Chang et al., 2006).

Xu و همکاران در سال ۲۰۰۸ به بررسی تاثیر هفت منبع نیتروژنی پپتون گوشت، عصاره مخمر، نیترات آمونیوم، سولفات آمونیوم، پودر سویا، اوره و سبوس گندم بر میزان رشد و تشکیل گانودریک اسید توده زیستی قارچ گانودرما لوسیدم در محیط کشت مایع پرداختند. محیط های کشت مایع حاوی پپتون گوشت و عصاره مخمر بیشترین میزان رشد توده زیستی را داشتند. محیط کشت حاوی پودر سویا بیشترین میزان تشکیل گانودریک اسید را از خود نشان داد. پژوهشگرها نتیجه گرفتند منابع نیتروژنی آلی نسبت به منابع نیتروژنی غیر آلی تاثیر بیشتری بر میزان رشد و تشکیل گانودریک اسید توده زیستی میگذارند (Xu et al., 2008).

Jo و همکاران در سال ۲۰۰۹ تاثیر ۱۳ منبع نیتروژنی را بر میزان رشد میسلیم قارچ گانودرما لوسیدم در محیط کشت آگاردار مورد بررسی قرار دادند. آنها گزارش کردند، به ترتیب نیترات کلسیم، عصاره مالت، کلرید آمونیوم، عصاره مخمر و پپتون گوشت بیشترین تاثیر را بر میزان رشد میسلیم داشتند (Jo et al., 2009).

Erkel در سال ۲۰۰۹ طی پژوهشی از پودر گلوتن ذرت به عنوان منبع نیتروژنی در سه مقدار $(\frac{W}{W})$ ۱٪، ۲ و ۳ در محیط کشت جامد قارچ گانودرما لوسیدم استفاده کرد. ایشان گزارش کرد، محیط کشت حاوی ۱٪ پودر گلوتن ذرت بیشترین میزان رشد میسلیم را نسبت به دو مقدار دیگر و نمونه شاهد نشان داد (Erkel, 2009).

Zhou و همکاران در سال ۲۰۱۱ در پژوهش خود به بررسی تاثیر چهار مکمل منبع نیتروژنی بر میزان رشد و تشکیل گانودریک اسید توده زیستی قارچ گانودرما لوسیدم در محیط کشت مایع پرداختند. در این آزمایش چهار مکمل منبع نیتروژنی آمونیوم سولفات، گلیسین، آسپاراژین و گلوتامین در دو غلظت ۳ mM و ۶۰ mM در یک دوره هفت روز استفاده شدند. بیشترین رشد توده زیستی در محیط کشت حاوی ۶۰ mM گلوتامین صورت گرفت. بیشترین میزان تشکیل گانودریک اسید توده زیستی در محیط کشت حاوی ۳ mM آسپاراژین بدست آمد (Zhou et al., 2011).

Zarate-Chaves و همکاران در سال ۲۰۱۳ با استفاده از روش Plackett-Burman design آزمایشی

طراحی کردند. آنها گزارش کردند از بین سه منبع نیتروژنی (عصاره مخمر، پپتون گوشت و کلرید آمونیوم) مورد استفاده، محیط کشت حاوی منبع نیتروژنی عصاره مخمر بیشترین میزان رشد توده زیستی را نشان داده است. آنها اذعان کردند منبع نیتروژنی عصاره مخمر به همراه روغن زیتون بهترین تاثیر را بر میزان رشد توده زیستی دارد (Zarate-Chaves et al., 2013).

Suberu و همکاران در سال ۲۰۱۳ به بررسی تاثیر سه منبع نیتروژنی اسید آسپارتیک، نیتروژن نیترات و پپتون گوشت پرداختند. محیط کشت حاوی اسید آسپارتیک بیشترین میزان رشد توده زیستی را نشان داد. محققین گزارش کردند اسید آسپارتیک یک اسید آمینه ضروری برای رشد توده زیستی می باشد، و غالب شدن آن در محیط کشت تاثیر زیادی بر میزان رشد توده زیستی دارد (Suberu et al., 2013).

Wei و همکاران در سال ۲۰۱۴ طی پژوهشی که انجام دادند گزارش کردن بهترین منبع نیتروژنی برای رشد و تولید متابولیت های ثانویه توده زیستی قارچ گانودرما لوسیدم در محیط کشت مایع، عصاره مخمر می باشد (Wei et al., 2014).

Salmon و همکاران در سال ۲۰۱۶ تاثیر شش منبع نیتروژنی (عصاره مخمر، اوره، عصاره مالت، پپتون گوشت، سیترات آمونیوم و تریپتون) را بر میزان آنزیم فیتاز توده زیستی قارچ گانودرما لوسیدم در محیط کشت مایع بررسی کردند. آنها گزارش کردند، در محیط کشت حاوی منبع نیتروژنی عصاره مخمر بیشترین آنزیم فیتاز تولید شد (Salmon et al., 2016).

Shah و Modi در سال ۲۰۱۸ اثر شش منبع نیتروژنی پپتون گوشت، عصاره مخمر، آمینیوم سولفات، آمونیوم کلراید، سدیم نیترات و پتاسیم نیترات را بر میزان رشد توده زیستی قارچ گانودرما لوسیدم در محیط کشت مایع بررسی کردند. ابتدا منبع نیتروژنی عصاره مخمر و بعد از آن منبع نیتروژنی پپتون گوشت بیشترین میزان رشد توده زیستی را از خود نشان دادند. آنها یکی از دلایل بهتر بودن منبع نیتروژنی عصاره مخمر نسبت به سایر منابع نیتروژنی را وجود ویتامین های گروه B به جز ویتامین B₁₂ در آن بیان کردند. منابع نیتروژنی غیر آلی تاثیر چندانی بر میزان رشد توده زیستی نداشتند. این موضوع نشان دهنده این حقیقت است که منابع نیتروژنی آلی اثر بهتری نسبت به منابع نیتروژنی غیر آلی بر میزان رشد توده زیستی دارند. علت آن را عدم ساخت بعضی از اسیدهای آمینه ضروری توده زیستی از منابع نیتروژنی غیر آلی بیان کردند (Shah and Modi, 2018).

طی پژوهشی Ma و همکاران در سال ۲۰۱۹ به بررسی تاثیر منبع نیتروژنی فنیل آلانین بر میزان رشد و تشکیل پلی ساکارید توده زیستی قارچ گانودرما لوسیدم پرداختند. محیط کشت حاوی منبع نیتروژنی فنیل آلانین نسبت به نمونه شاهد، ۶۲/۵٪ میزان تشکیل پلی ساکارید بیشتری داشت. میزان رشد توده زیستی در محیط کشت مایع حاوی منبع نیتروژنی فنیل آلانین نسبت به نمونه شاهد کمتر بود. آنها پیشنهاد کردند برای افزایش پلی ساکارید توده زیستی قارچ گانودرما لوسیدم، بهتر است از این اسید آمینه ارزان قیمت در محیط کشت مایع استفاده شود (Ma et al., 2019).

Ahmadifar و همکاران در سال ۲۰۲۰ به بررسی روش بهینه تولید توده زیستی میسلیوم قارچ گانودرما لوسیدم در ملاس نیشکر پرداختند. در این پژوهش با دو منبع نیتروژنی پیتون گوشت و عصاره مخمر ملاس نیشکر را غنی سازی کردند. محیط کشت حاوی ملاس نیشکر غنی سازی شده با پیتون گوشت، بیشترین میزان رشد توده زیستی را از خود نشان داد (Ahmadifar et al., 2020).

۳-۱-۲ پژوهش‌های مربوط به pH

Yang و Liao در سال ۱۹۹۸ به بررسی تاثیر هشت pH اولیه ۳، ۳/۵، ۴، ۴/۵، ۵، ۵/۵، ۶ و ۶/۵ بر میزان رشد توده زیستی قارچ گانودرما لوسیدم پرداختند. این تحقیق در دو دوره زمانی ۷ و ۱۴ روز صورت گرفت. بیشترین میزان رشد توده زیستی در هر دو دوره زمانی در pH اولیه ۴ و ۴/۵ صورت گرفت، و کمترین میزان رشد توده زیستی در هر دو دوره زمانی مربوط به pH اولیه ۵/۵ و ۶ بود (Liao and Yang, 1998).

Fang و Zhong در سال ۲۰۰۲ تاثیر پنج سطح pH اولیه ۳/۵، ۴/۵، ۵/۵، ۶/۵ و ۷ را بر میزان رشد و تشکیل گانودریک اسید و پلی ساکارید توده زیستی قارچ گانودرما لوسیدم در محیط کشت مایع بررسی کردند (Fang and Zhong, 2002).

بیشترین میزان رشد توده زیستی در pH اولیه ۶/۵ صورت گرفت. بیشترین میزان تشکیل پلی ساکارید ابتدا در pH اولیه ۵/۵ و بعد از آن در pH اولیه ۶/۵ صورت گرفت. بیشترین میزان تشکیل گانودریک اسید ابتدا در pH اولیه ۵/۵ و بعد از آن در pH اولیه ۶/۵ شکل گرفت. محققین نتیجه گرفتند دامنه pH اولیه بین ۵/۵ تا ۷ بیشترین تاثیر را بر میزان رشد و تشکیل متابولیت‌های ثانویه توده زیستی میگذارد (Fang and Zhang, 2002).

Kim و همکاران در سال ۲۰۰۵ با هدف یافتن سطح pH مناسب برای افزایش میزان رشد و تشکیل پلی ساکارید توده زیستی قارچ گانودرما لوسیدم در محیط کشت مایع پژوهشی انجام دادند. در این تحقیق از پنج سطح pH اولیه ۳، ۴، ۵، ۶ و ۷ استفاده شد. بیشترین رشد توده زیستی در pH اولیه ۴ بود، در حالی که بیشترین میزان تشکیل پلی ساکارید در pH اولیه ۵ صورت گرفت (Kim et al., 2005).

Hsieh و همکاران در سال ۲۰۰۵ به بررسی تاثیر استیلاژ نازک در چهار pH اولیه ۴، ۵، ۶ و ۷ بر میزان رشد توده زیستی قارچ گانودرما لوسیدم در محیط کشت مایع پرداختند. بیشترین میزان رشد توده زیستی در pH اولیه ۵ و ۶ بدست آمد (Hsieh et al., 2005).

Li و همکاران در سال ۲۰۰۶ تاثیر سه سطح pH اولیه ۴، ۵ و ۶ را بر میزان تشکیل گانودریک اسید توده زیستی قارچ گانودرما لوسیدم در محیط‌های کشت مایع بررسی کردند. ابتدا pH ۴ و بعد از آن pH ۵ بیشترین تاثیر را بر میزان تشکیل گانودریک اسید داشتند (Li et al., 2006).

Krupodorowa در سال ۲۰۰۷ پژوهشی در مورد pH اولیه محیط کشت مایع قارچ گانودرما لوسیدم انجام داد. ایشان گزارش کرد، بیشترین میزان رشد توده زیستی ($\frac{g}{V}$) در محیط کشت مایع دارای pH

اولیه ۵/۵ بدست آمد (Krupodorowa, 2007).

Kapoor و Sharma در سال ۲۰۱۴ به بررسی تاثیر یازده سطح pH اولیه ۲، ۳، ۴، ۵، ۶، ۷، ۸، ۹، ۱۰، ۱۱ و ۱۲ بر میزان رشد توده زیستی قارچ گانودرما لوسیدم در محیط کشت مایع پرداختند. بیشترین میزان رشد توده زیستی به ترتیب در سطوح pH اولیه ۵، ۶ و ۷ صورت گرفت. پژوهشگرها به این نتیجه رسیدند که توده زیستی قارچ گانودرما لوسیدم در دامنه pH ۳ تا ۱۱ قادر به رشد می باشد (Kapoor and Sharma, 2014).

Zhou و همکاران در سال ۲۰۱۵ به بررسی چهار سطح pH اولیه ۵/۵، ۶، ۶/۵ و ۷ محیط های کشت مایع بر میزان رشد توده زیستی قارچ گانودرما لوسیدم پرداختند. در این بین اول pH ۵/۵ و بعد از آن pH ۶ بیشترین تاثیر را بر میزان رشد توده زیستی از خود نشان دادند. کمترین میزان رشد توده زیستی ابتدا در pH ۷ و بعد از آن در pH ۶/۵ صورت گرفت (Zhou et al., 2015).

Shah و Modi در سال ۲۰۱۸ تاثیر شش سطح pH اولیه ۴/۵، ۵، ۵/۵، ۶، ۶/۵ و ۷ را بر میزان رشد توده زیستی قارچ گانودرما لوسیدم در محیط کشت مایع بررسی کردند. نتایج نشان داد زمانی که pH اولیه محیط های کشت مایع در دامنه ۴/۵ تا ۵/۵ باشد، بیشترین میزان رشد توده زیستی صورت میگیرد (Shah and Modi, 2018).

۴-۱-۲ پژوهش های مربوط به نانوذرات و یون های فلزی

Li و همکاران در سال ۲۰۰۶ تاثیر چهار یون فلزی فروس سولفات، زینک سولفات، کلسیم کلرید و سدیم کلرید را بر میزان تشکیل گانودریک اسید توده زیستی قارچ گانودرما لوسیدم در محیط کشت مایع بررسی کردند. ابتدا محیط کشت حاوی فروس سولفات و بعد از آن محیط کشت حاوی زینک سولفات بیشترین تاثیر را بر میزان تشکیل گانودریک اسید توده زیستی قارچ داشتند (Li et al., 2006).

در طی پژوهشی Simonic و همکاران در سال ۲۰۰۸ تاثیر شش عنصر فلزی K، Na، Mg، Ca، Fe و Mn در غلظت های مختلف را بر میزان رشد و تشکیل متابولیت های ثانویه توده زیستی قارچ گانودرما لوسیدم در محیط کشت مایع بررسی کردند. محیط های کشت حاوی K، Na و Mg به ترتیب در سه غلظت ۶، ۳ و ۲ بیشترین میزان رشد توده زیستی از خود نشان دادند. بیشترین میزان تشکیل پلی ساکارید توده زیستی در محیط های کشت حاوی K و Na مشاهده شد، که با افزایش غلظت آنها در محیط کشت مایع میزان تشکیل پلی ساکارید توده زیستی افزایش پیدا کرد (Simonic et al., 2008).

Tang و Zhu در سال ۲۰۱۰ تاثیر یون های فلزی سنگین Ag^+ ، Cu^+ ، Cd^{2+} ، Cd^{3+} ، Mn^{2+} و Hg^{2+} را بر میزان رشد و تشکیل متابولیت های ثانویه توده زیستی قارچ گانودرما لوسیدم در محیط کشت مایع بررسی کردند. محیط کشت حاوی Cu^{2+} بیشترین رشد توده زیستی را از خود نشان داد. یون های فلزی Ag^+ و Hg^{2+} به شدت از رشد توده زیستی جلوگیری کردند. بیشترین میزان تشکیل گانودریک اسید توده زیستی در محیط کشت حاوی Cu^{2+} بدست آمد. بیشترین میزان تشکیل پلی ساکارید در محیط کشت

حاوی Mn^{2+} مشاهده شد (Tang and Zhu, 2010).

Cui و Zhag در سال ۲۰۱۱ در مورد تاثیر یون‌های فلزی بر میزان رشد و تشکیل پلی‌ساکارید توده زیستی قارچ گانودرما لوسیدم پژوهشی انجام دادند. در این پژوهش از پنج یون فلزی Se^{2+} ، Cr^{2+} ، Mg^{2+} ، Fe^{2+} و Zn^{2+} در غلظت‌های (ppm) ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ استفاده کردند (Cui and Zhang, 2011).

بیشترین میزان رشد توده زیستی مربوط به یون فلزی Se^{2+} در غلظت ۵۰ ppm بود، و بعد از آن یون‌های فلزی Fe^{2+} و Zn^{2+} به ترتیب در غلظت‌های ۱۰۰ و ۵۰ ppm بیشترین میزان رشد توده زیستی را نشان دادند. یون فلزی Mg^{2+} در این غلظت‌ها اثر قابل توجه‌ای بر میزان رشد توده زیستی نداشت. یون فلزی Cr^{2+} در این غلظت‌ها اثر سمی بر روی رشد توده زیستی داشت، و از رشد آن در محیط کشت مایع جلوگیری کرد (Cui and Zhang, 2011).

محیط کشت حاوی ۲۵ ppm یون فلزی Se^{2+} بیشترین میزان تشکیل پلی‌ساکارید را داشت. غلظت‌های بیشتر این یون فلزی در محیط‌های کشت اثر عکس از خود نشان دادند. یون فلزی Mg^{2+} تاثیری بر میزان تشکیل پلی‌ساکارید توسط توده زیستی نداشت. بدترین یون فلزی در میزان تشکیل پلی‌ساکارید توده زیستی یون فلزی Cr^{2+} بود (Cui and Zhang, 2011).

Xu و همکاران در سال ۲۰۱۳ در پژوهش خود به بررسی تاثیر یون فلزی Na^+ بر میزان رشد و تشکیل گانودریک اسید توده زیستی قارچ گانودرما لوسیدم در محیط کشت مایع پرداختند. در این آزمایش یون فلزی Na^+ در چهار غلظت (1 mM ، 10 mM ، 100 mM و 200 mM) استفاده شد. یون فلزی Na^+ در تمام غلظت‌ها تاثیر قابل توجه‌ای بر میزان رشد توده زیستی نداشت. یون فلزی Na^+ در غلظت 100 mM تاثیر زیادی بر میزان تشکیل گانودریک اسید توده زیستی داشت. پژوهشگرها بیان کردند اضافه کردن یون فلزی Na^+ به محیط کشت مایع یک استراژی ساده و متفاوت برای افزایش تشکیل گانودریک اسید می‌باشد (Xu et al., 2013).

Xu و همکاران در سال ۲۰۱۴ به بررسی تاثیر یون فلزی Mn^{2+} بر میزان تشکیل گانودریک اسید توده زیستی قارچ گانودرما لوسیدم در محیط کشت مایع پرداختند. در این پژوهش مشخص شد با افزودن 10 mM Mn^{2+} به محیط کشت مایع، میزان تشکیل گانودریک اسید $2/2$ برابر افزایش پیدا می‌کند. بنابراین آنها بیان کردند اضافه کردن Mn^{2+} به محیط کشت مایع یک استراتژی موثر در افزایش میزان تشکیل گانودریک اسید توده زیستی می‌باشد (Xu et al., 2014).

Wei و همکاران در سال ۲۰۱۴ طی پژوهشی که انجام دادند گزارش کردند بهترین یون فلزی موثر بر میزان رشد و تولید متابولیت‌های ثانویه توده زیستی قارچ گانودرما لوسیدم در محیط کشت مایع، سولفات فریک می‌باشد (Wei et al., 2014).

Yuan و همکاران در سال ۲۰۱۴ تاثیر دو یون فلزی منیزیم و فسفات را در غلظت‌های مختلف بر

^۱ millimolar

میزان رشد و تشکیل پلی ساکارید توده زیستی قارچ گانودرما لوسیدم در محیط کشت مایع مورد بررسی قرار دادند. آنها گزارش کردند، محیط کشت حاوی $2 \frac{g}{L}$ یون فلزی فسفات نسبت به نمونه شاهد، $23/91\%$ پلی ساکارید بیشتری تولید کرد. یون فلزی فسفات در تمام غلظت‌ها تاثیر قابل توجهی بر میزان رشد توده زیستی نداشت. در آزمایشی دیگر گزارش کردند، میزان رشد توده زیستی در محیط کشت حاوی $\frac{g}{L}$ ۳ یون فلزی منیزیم $2/5$ برابر نمونه شاهد بود. سپس اذعان کردند، یون فلزی منیزیم تاثیر قابل توجهی بر میزان تشکیل پلی ساکارید توده زیستی ندارد (Yuan et al., 2014).

رزقی جهرمی در سال ۱۳۹۶ طی پژوهشی به بررسی تاثیر غلظت‌های مختلف نانوذره کلسیم بر میزان رشد و تشکیل گانودریک اسید سه نژاد قارچ گانودرما لوسیدم در محیط کشت مایع پرداخت. ایشان گزارش کرد، قارچ گانودرما لوسیدم نژاد G.L در محیط کشت حاوی غلظت 6 mM نانوذره کلسیم بیشترین میزان رشد توده زیستی را داشت. قارچ گانودرما لوسیدم نژاد G.20 در محیط کشت فاقد نانوذره کلسیم بیشترین میزان تشکیل گانودریک اسید را نشان داد. ایشان اذعان کرد علاوه بر نانوذره، ژنتیک نژاد قارچ تاثیر معنی داری بر میزان رشد و تشکیل گانودریک اسید قارچ می‌گذارد (رزقی جهرمی، ۱۳۹۶).

Rostami-Darzian و همکاران در سال ۲۰۲۰ دو نانوذره اکسید گرافن و اکسید گرافن کاهیده را در غلظت‌های مختلف بر میزان رشد و تشکیل گانودریک اسید توده زیستی قارچ گانودرما لوسیدم بررسی کردند. آنها گزارش کردند نانوذره اکسید گرافن تاثیر منفی بر میزان رشد و تشکیل گانودریک اسید توده زیستی داشت. سپس گزارش کردند نانوذره اکسید گرافن کاهیده در تمامی غلظت‌ها تاثیر منفی بر میزان رشد توده زیستی داشت، ولی در غلظت $50 \frac{mg}{L}$ اثر مثبت بر میزان تشکیل گانودریک اسید توده زیستی نشان داد (Darzian-Rostami et al., 2020).

Singh و همکاران در سال ۲۰۲۰ تاثیر سه نانوذره نقره، سیلیکا و دی‌اکسید تیتانیوم را بر میزان رشد میسلیم، تولید اسپور و تشکیل آنزیم لاکاز قارچ گانودرما لوسیدم مورد بررسی قرار دادند (Singh et al., 2020).

۵-۱-۲ پژوهش‌های مربوط به نسبت کربن به نیتروژن

Hsieh و Bioresource در سال ۲۰۰۴ به بررسی تاثیر هشت نسبت کربن به نیتروژن بر میزان رشد میسلیم قارچ گانودرما لوسیدم در محیط کشت جامد پرداختند. آنها گزارش کردند با افزایش نسبت کربن به نیتروژن در محیط کشت، میزان رشد میسلیم افزایش یافت (Hsieh and Bioresource, 2004).

Jo و همکاران در سال ۲۰۰۹ به بررسی تاثیر هشت نسبت کربن به نیتروژن بر میزان رشد میسلیم قارچ گانودرما لوسیدم در محیط کشت PDA پرداختند. آنها گزارش کردند، به ترتیب در نسبت‌های کربن به نیتروژن (C:N) ۱:۱ و ۲:۱ بیشترین میزان رشد میسلیم مشاهده شد (Jo et al., 2009).

Yuan و همکاران در سال ۲۰۱۲ تاثیر نسبت‌های مختلف کربن به نیتروژن را بر میزان رشد و تشکیل پلی‌ساکارید توده زیستی قارچ گانودرما لوسیدم در محیط کشت مایع بررسی کردند. آنها گزارش کردند، بیشترین میزان رشد توده زیستی در نسبت کربن به نیتروژن (C:N) ۳۰:۱ و بیشترین میزان تشکیل پلی‌ساکارید در نسبت کربن به نیتروژن ۱۰:۱ بدست آمده است (Yuan et al., 2012).

Suberu و همکاران در سال ۲۰۱۳ برای تعیین بهترین نسبت کربن به نیتروژن، از مالتوز به عنوان منبع کربنی و از اسید آسپارتیک به عنوان منبع نیتروژنی در محیط کشت مایع استفاده کردند. در آزمایش آنها از نسبت‌های (C:N) ۱:۱، ۱:۲، ۲:۱ و ۲:۲ استفاده شد. ابتدا نسبت ۲:۲ و بعد از آن نسبت ۱:۱ بیشترین تاثیر را بر میزان رشد توده زیستی داشتند. آنها گزارش کردند کنترل در تعادل نسبت کربن به نیتروژن در رشد توده زیستی بسیار موثر است، سپس اذعان کردند باتوجه به این تحقیق و تحقیقاتی که قبلاً شده، بسته به شرایط محیط کشت تعادل نسبت کربن به نیتروژن متفاوت می‌باشد (Suberu et al., 2013).

Fraga و همکاران در سال ۲۰۱۴ به بررسی پانزده نسبت کربن به نیتروژن بر میزان رشد و تشکیل پلی‌ساکارید توده زیستی قارچ گانودرما لوسیدوم در محیط کشت مایع پرداختند. آنها گزارش کردند، میانگین میزان رشد و تشکیل پلی‌ساکارید توده زیستی در نسبت‌های بالای کربن به نیتروژن بیشتر است (Fraga et al., 2014).

در پژوهشی دیگر Wei و همکاران در سال ۲۰۱۴ با استفاده از روش Steepest ascertain design یک آزمایش طراحی کردند، که در آن تاثیر چهار نسبت کربن به نیتروژن را بر میزان رشد و تشکیل متابولیت‌های ثانویه (گانودریک اسید و پلی‌ساکارید) توده زیستی قارچ گانودرما لوسیدم مورد بررسی قرار دادند. آنها گزارش کردند در محیط کشت حاوی نسبت کربن به نیتروژن (C:N) ۴۵:۱۴ بیشترین میزان رشد و تشکیل متابولیت‌های ثانویه توده زیستی بدست آمده است (Wei et al., 2014).

Zhang و همکاران در ۲۰۱۴ به بررسی تاثیر پنج نسبت کربن به نیتروژن بر میزان رشد و تشکیل گانودریک اسید توده زیستی قارچ گانودرما لوسیدم در محیط کشت مایع پرداختند. آنها گزارش کردند در نسبت کربن به نیتروژن ۲۰:۱۰ بیشترین میزان رشد و تشکیل گانودریک اسید مشاهده شد. آنها اذعان کردند توده زیستی در نسبت‌های پایین کربن به نیتروژن، بیشتر تمایل به ساخت گانودریک اسید دارد (Zhang et al., 2014).

Chen و Zeng در سال ۲۰۱۶ به بررسی تاثیر نسبت کربن به نیتروژن بر میزان تشکیل پلی‌ساکارید توده زیستی قارچ گانودرما لوسیدم در محیط کشت مایع پرداختند. آنها گزارش کردند، هنگامی که از منبع کربنی نشاسته ذرت و منبع نیتروژنی پودر سویا به نسبت (C:N) ۱۰:۵ در محیط کشت استفاده شد؛ بیشترین میزان تشکیل پلی‌ساکارید مشاهده شد (Zeng and Chen, 2016).

Hu و همکاران در سال ۲۰۱۸ نسبت‌های مختلف کربن به نیتروژن را بر میزان تشکیل گانودریک اسید توده زیستی قارچ گانودرما لوسیدم در محیط کشت مایع بررسی کردند. آنها گزارش کردند، توده زیستی

در نسبت کربن به نیتروژن بالا که سطح محدودی از نیتروژن در محیط کشت وجود دارد؛ بیشترین میزان تشکیل گانودریک اسید رخ میدهد (Hu et al., 2018).

۶-۱-۲ سایر پژوهش‌های انجام شده

Yang و همکاران در سال ۲۰۰۰ در پژوهش خود چند اسید چرب و روغن گیاهی را به محیط‌های کشت مایع اضافه کردند، و تاثیر آن را بر میزان رشد و تشکیل پلی‌ساکارید توده زیستی مورد بررسی قرار دادند (Yang et al., 2000).

اولین آزمایشی که صورت گرفت افزودن $(\frac{W}{V})$ ۱٪ روغن از دانه‌های روغنی سویا، بادام زمینی، گلرنگ، ذرت، آفتاب گردان و زیتون به محیط‌های کشت مایع بود. بیشترین میزان رشد توده زیستی را ابتدا روغن زیتون و سپس روغن ذرت داشت. بیشترین میزان تشکیل پلی‌ساکارید را ابتدا روغن گلرنگ و بعد از آن روغن بادام زمینی داشت (Yang et al., 2000).

آزمایش دیگری که در این پژوهش انجام شد، بررسی تاثیر اسیدهای چرب استئاریک اسید، اولئیک اسید، پالمیتیک اسید و لینولئیک اسید بود. اول اسید چرب اولئیک و دوم اسید چرب پالمیتیک بیشترین تاثیر را بر میزان رشد توده زیستی داشتند. ابتدا اسید چرب پالمیتیک و سپس اسید چرب اولئیک بیشترین تاثیر را بر میزان تشکیل پلی‌ساکارید توده زیستی داشتند. اسید لینولئیک کمترین تاثیر را بر میزان رشد و تشکیل پلی‌ساکارید توده زیستی داشت (Yang et al., 2000).

Yang و همکاران در سال ۲۰۰۴ اثر چند نوع الکل را بر میزان رشد و تشکیل پلی‌ساکارید توده زیستی قارچ گانودرما لوسیدم در محیط کشت مایع، مورد ارزیابی قرار دادند. آنها چند الکل با نام های اتانول، متانول، ۱-پروپانول، ۲-پروپانول، ۱-بوتانول و ۱-پنتانول را در مقدار $(\frac{V}{V})$ ۱/۵ به محیط‌های کشت مایع اضافه کردند. محیط کشت حاوی الکل اتانول بیشترین میزان رشد و تشکیل پلی‌ساکارید توده زیستی را داشت. این پژوهش نشان داد با وجود اینکه الکل اتانول در محیط کشت مایع به عنوان منبع کربنی عمل نمی‌کند و به مقدار کمی توسط توده زیستی در طول تخمیر مصرف میشود، ولی تاثیر زیادی بر روی میزان رشد توده زیستی و بخصوص تشکیل پلی‌ساکارید میگذارد. در نتیجه استفاده از این ماده ارزان قیمت در محیط‌های کشت مناسب می‌باشد (Yang et al., 2004).

Zhang و همکاران در سال ۲۰۱۴ به بررسی اثر الیسیستور^۱ بر میزان تشکیل گانودریک اسید توده زیستی قارچ گانودرم لوسیدم در محیط کشت مایع پرداختند. در این آزمایش پژوهشگرها شش الیسیستور (Malto-oligosaccharid, Cellulas, Olive oil, ZnCl₂, CaCl₂ and Lycium chinense) را به محیط‌های کشت اضافه کردند. ابتدا محیط کشت حاوی الیسیستور سلولز و بعد از آن محیط کشت حاوی

^۱ الیسیستور ها ترکیبات آلی یا معدنی هستند، که باعث تحریک و اختلالات فیزیولوژیکی در گیاهان میشوند. الیسیستورها میتوانند برای افزایش متابولیت‌های ثانویه مورد استفاده قرار گیرند. آنها میتوانند نقش مهمی در مسیر بیوسنتز برای افزایش تولید محصولات با ارزش تجاری داشته باشند (en.wikipedia.org).

الیستور CaCl_2 بیشترین میزان تشکیل گانودریک اسید را از خود نشان دادند (Zhang et al., 2014). Ren و همکاران در سال ۲۰۱۴ به بررسی تاثیر اسید استیک بر میزان رشد و تشکیل گانودریک اسید توده زیستی قارچ گانودرما لوسیدم در محیط کشت مایع پرداختند. اسید استیک تاثیر منفی بر رشد توده زیستی داشت، ولی به شدت باعث افزایش تشکیل گانودریک اسید توده زیستی شد. پژوهشگرها بیان کردن اضافه کردن اسید استیک یک رویکرد اقتصادی و ایمن برای افزایش تولید گانودریک اسید توده زیستی می باشد (Ren et al., 2014).

Fenge و همکاران در سال ۲۰۱۶ به بررسی تاثیر چهار دمای 23°C ، 26°C ، 29°C و 32°C بر میزان رشد و تشکیل گانودریک اسید توده زیستی قارچ گانودرما لوسیدم در محیط کشت مایع پرداختند. بیشترین رشد و تشکیل گانودریک اسید توده زیستی در دمای 29°C بدست آمد (Fenge et al., 2016). Hassan و همکاران در سال ۲۰۱۹ برای بهینه سازی محیط کشت مایع توده زیستی قارچ گانودرما لوسیدم پژوهشی انجام دادند. در این پژوهش تاثیر سه عامل دما، pH و غلظت گلوکز را بر میزان رشد و تشکیل پلی ساکارید توده زیستی قارچ بررسی کردند. محیط کشت دارای غلظت گلوکز $50 \frac{\text{g}}{\text{L}}$ ، pH اولیه $5/26$ و دمای 30°C بیشترین تاثیر را بر میزان رشد و تشکیل پلی ساکارید داشت و به عنوان محیط کشت مایع بهینه توده زیستی قارچ انتخاب شد (Hassan et al., 2019).

فصل ۳

مواد و روش ها

۳-۱ مواد اولیه مورد استفاده

پودر گلوکز تک آبه^۱، ساخت شرکت مرک آلمان، شربت گلوکز و شربت فروکتوز ساخت شرکت زر فرکتوز ایران، نشاسته گندم و نشاسته ذرت ساخت شرکت پارس بسپار ایران به عنوان منابع کربنی مورد استفاده قرار گرفتند. پپتون گوشت و عصاره مخمر ساخت شرکت مرک آلمان، گلوتن مایع^۲ ساخت شرکت فراوری فرکتوز ناب ایران، پودر آب پنیر ساخت شرکت پگاه ایران و سویا ساخت شرکت سبحان ایران به عنوان منابع نیتروژنی مورد استفاده قرار گرفتند. سولفات منیزیم ۷ آبه ($\frac{g}{L}$ ۰/۵)، دی پتاسیم هیدروژن سولفات سه آبه ($\frac{g}{L}$ ۴)، محیط کشت PDA، کلروفرم، بی کربنات سدیم و پودر هیدروکسید سدیم از شرکت مرک آلمان تهیه شدند. پودر سفید رنگ نانوذرات اکسید منیزیم (MgO) و دی اکسید تیتانیوم (TiO₂) به اندازه ۲۰ nm با ۹۹/۹۹٪ خلوص و انحلال پذیر در آب و اسیدهای آلی از شرکت US-Nano آمریکا خریداری شدند. اسید کلریدریک ۳۷٪ از شرکت آرمان سینا و الکل اتانول ۹۶٪ از شرکت سپاهان ایران تهیه شدند. ویال ویتامین پیریدوکسین B₆ ($\frac{mg}{2ml}$ ۱۰۰) ساخت شرکت کاسپین ایران از داروخانه محلی شهرستان شاهرود تهیه شد.

۳-۲ تجهیزات مورد استفاده

۱. اتوکلاو مدل RT-21 (۷۵ لیتری) ساخت شرکت ریحان طب ایران
۲. آون ساخت شرکت Memmert آلمان
۳. انکوباتور مجهز به سامانه همزن ساخت شرکت Pars Azma Co(1597) ایران
۴. دستگاه pH متر Mettler ساخت کشور سوئیس
۵. دستگاه سانتریفیوژ Eppendorf 5810 ساخت کشور آلمان
۶. دستگاه سانتریفیوژ (سیگما ۳-۱۶ Kl) ساخت کشور آلمان
۷. دستگاه Vortex Mixer ساخت شرکت نسل امید پژوهش ایران
۸. ترازو مدل Sartorius TE124S ساخت کشور آلمان
۹. هاون آزمایشگاهی ساخت شرکت بهار تجهیز ایران
۱۰. دستگاه اسپکتروفتومتر نور مرئی UV 2150 (UNICO، آمریکا)
۱۱. سمپلر در اندازه‌های مختلف ۱۰۰ و ۱۰۰۰ میکرولیتر (Alton، چین)
۱۲. هات پلیت و مگنت مدل Safety Control ساخت IKA آلمان

^۱ Glucose monohydrate

^۲ Corn Steep Liquor(CSL)

۳-۳ روش‌ها

۳-۳-۱ تهیه و نگهداری محیط کشت مادر

میسلیوم قارچ گانودرما لوسیدوم نژاد CAU5501 از کلکسیون قارچ دانشکده کشاورزی گرگان تهیه شد. میسلیوم دریافت شده، زیر هود لامینار بر روی محیط کشت PDA در ظرف بشقابک کشت داده شد، و سپس در دمای 30°C به مدت ۷ روز گرمخانه گذاری شد. بعد از گرم خانه گذاری، محیط کشت PDA حاوی میسلیوم به عنوان کشت مادر در دمای 4°C یخچال نگهداری شد. به منظور زنده ماندن میکروارگانیسم مادر هر ۶ ماه یکبار بر روی محیط کشت دیگر کشت داده شد (Huang et al., 2009).

۳-۳-۲ تهیه محیط کشت توسعه تلقیح^۱

مطابق با روش Agudelo-Escobar و همکاران در سال ۲۰۱۷ محیط کشت توسعه تلقیح به شکل سوسپانسیون میسلیومی، در محیط‌های کشت تولید محصول استفاده شدند. برای تهیه سوسپانسیون میسلیومی، در یک ظرف ارلن مایر ۲۵۰ ml حدود ۱۰۰ ml محیط کشت حاوی $(\frac{g}{L})$ ۳۵ گلوکز، ۷/۵ پپتون گوشت، ۲/۵ عصاره مخمر، KH_2PO_4 ۱ و $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ۰/۵ به شکل $\frac{w}{v}$ تهیه شد (با آب مقطر به حجم رسانیده شد). pH اولیه محیط کشت با استفاده از HCl یک نرمال یا NaOH یک نرمال در pH ۵/۵ به شکل $\frac{v}{v}$ تنظیم شد. ارلن حاوی محیط کشت در اتوکلاو با دمای 121°C ، فشار ۰/۱ MPa و در مدت زمان ۲۰ min استریل شد. مطابق با روش Esmaeilzadeh و همکاران در سال ۲۰۱۹ بعد از خنک شدن ارلن حاوی محیط کشت مایع، در زیر هود لامینار با استفاده از آنس استریل بلاکی^۲ به اندازه ۱ cm × ۱ cm از محیط کشت PDA که در یخچال نگهداری شده بود، به آن منتقل شد. در این بخش سعی شد، جوانترین پرگنه‌های میسلیوم با حداقل آگار به ارلن حاوی محیط کشت مایع منتقل شود. در نهایت ارلن حاوی محیط کشت و میسلیوم در انکوباتور شیکردار در دمای 27°C با چرخش لرزشی^۳ $150 \frac{\text{rpm}}{\text{min}}$ به مدت ۸ روز گرمخانه گذاری شد (Agudelo-Escobar et al., 2017; Esmaeilzadeh et al., 2019).

^۱ Seed Culture

^۲ block

^۳ rotary shaker

۳-۳-۳ تیمارها

کلیه آزمایشات این طرح در قالب ۲ بخش مجزا اجرا گردید. بخش اول به روش یک عامل در زمان^۱ شامل پنج آزمایش بود، که در هر آزمایش یک عامل شیمیایی موثر بر میزان رشد و تشکیل متابولیت‌های ثانویه (گانودریک اسید و پلی‌ساکارید) توده زیستی قارچ گانودرما لوسیدوم در محیط کشت مایع مورد بررسی قرار گرفت؛ تا بهترین عوامل شیمیایی که بیشترین تاثیر را بر این میزان دارند، مشخص شوند.

بخش دوم شامل دو آزمایش بود، که این دو آزمایش با استفاده از روش سطح پاسخ^۲ توسط نرم افزار (ورژن ۸) Design Expert طراحی شدند. طرح‌هایی که برای این منظور مناسب هستند، شامل طرح مرکب مرکزی^۳ و طرح باکس-بنکن^۴ می‌باشند. در این پژوهش از طرح مرکب مرکزی که اصلی‌ترین و پرکاربردترین طرح مورد استفاده برای مدل سازی سطح پاسخ مرتبه دوم است؛ با ۱۰ آزمایش و دو تکرار که شامل دو آزمایش در نقطه مرکزی بود، استفاده شد. در آزمایش اول با هدف تولید بهینه پلی‌ساکارید توده زیستی و در آزمایش دوم با هدف تولید بهینه گانودریک اسید توده زیستی، اثر ترکیبی سطوح مختلف کربن و نیتروژن محیط کشت مایع مورد بررسی قرار گرفت.

۳-۳-۳-۱ بخش اول

۱-۳-۳-۳ منبع کربنی

در این آزمایش به بررسی اثر پنج منبع کربنی پودر گلوکز، شربت گلوکز، شربت فروکتوز، نشاسته گندم و نشاسته ذرت بر میزان رشد و متابولیت‌های ثانویه (پلی‌ساکارید و گانودریک اسید) توده زیستی قارچ گانودرما لوسیدوم در محیط کشت مایع پرداخته شد، تا در بین آنها بهترین منبع کربنی انتخاب شود. روش کار به این صورت بود که در پنج ظرف ارلن مایر ۲۵۰ ml حدود ۱۰۰ ml محیط کشت مایع تهیه شد ($\frac{W}{V}$). اجزای تشکیل دهنده هر پنج محیط کشت شامل ($\frac{g}{L}$) پودر سویا ۱۰، KH_2PO_4 ۱، $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ۵/، بودند؛ به علاوه $\frac{g}{L}$ ۳۰ منبع کربنی، که برای هر کدام از محیط‌های کشت یک نوع منبع کربنی متفاوت استفاده شد (Yang et al., 2009).

^۱ One Factor at Time

^۲ در روش سطح پاسخ (Response Surface Methodology (RSM)) با معیار قرار دادن تعداد متغیرها و حدود بیشینه و کمینه تعیین شده برای هر متغیر، ماتریس آزمایش را طراحی می‌کند. بدین ترتیب تعداد آزمون‌ها و سطوح هر متغیر در هر آزمون مشخص می‌شود. طرح آزمایش به نحوی است که حتی بدون تکرار آزمون، نتایج آماری قابل اعتمادی به دست می‌آید. بنابراین این روش باعث تسهیل روند تحقیق، کاهش زمان و هزینه‌ها خواهد شد (عبدالملکی، ۱۳۹۲).

^۳ (Central Composite Design (CCD))

^۴ (Box-Behnken Design (BBD))

۲-۱-۳-۳ منبع نیتروژنی

در این آزمایش به بررسی اثر پنج منبع نیتروژنی شامل پودر سویا، پودر آب پنیر، شربت CSL، عصاره مخمر و پپتون گوشت بر میزان رشد و متابولیت‌های ثانویه (پلی ساکارید و گانودریک اسید) توده زیستی قارچ گانودرما لوسیدوم در محیط کشت مایع پرداخته شد، تا در بین آنها بهترین منبع نیتروژنی انتخاب شود.

روش کار به این صورت بود که در پنج ظرف ارلن مایر ۲۵۰ ml حدود ۱۰۰ ml محیط کشت مایع تهیه شد ($\frac{w}{v}$). اجزای تشکیل دهنده هر پنج محیط کشت شامل ($\frac{g}{L}$) پودر نشاسته گندم ۳۰، KH_2PO_4 ۱، $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ۰/۵ بودند؛ به علاوه $10 \frac{g}{L}$ منبع نیتروژنی، که برای هر کدام از محیط‌های کشت یک نوع منبع نیتروژنی متفاوت استفاده شد. (Yang et al., 2009).

۳-۱-۳-۳ pH

در این آزمایش به بررسی اثر هفت pH اولیه ۵، ۵/۵، ۶، ۶/۵، ۷، ۷/۵ و ۸ بر میزان رشد و تشکیل متابولیت‌های ثانویه (پلی ساکارید و گانودریک اسید) توده زیستی قارچ گانودرما لوسیدوم در محیط کشت مایع پرداخته شد، تا pH اولیه که بهترین تاثیر را دارد انتخاب شود.

روش کار به این صورت بود که در شش ظرف ارلن مایر ۲۵۰ ml حدود ۱۰۰ ml محیط کشت مایع تهیه شد ($\frac{w}{v}$). اجزای تشکیل دهنده هر پنج محیط کشت شامل ($\frac{g}{L}$) پودر نشاسته گندم ۳۰، پودر سویا ۱۰، KH_2PO_4 ۱، $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ۰/۵ بودند، و در هر محیط کشت از یک pH اولیه متفاوت استفاده شد. pH اولیه محیط‌های کشت با HCl یک نرمال یا NaOH یک نرمال به صورت $\frac{v}{v}$ تنظیم شدند (Kim et al., 2005).

۴-۱-۳-۳ ویتامین پیریدوکسین B_6

در چهار ظرف ارلن مایر ۲۵۰ ml حدود ۱۰۰ ml محیط کشت مایع تهیه شد. محیط‌های کشت شامل ($\frac{g}{L}$) پودر نشاسته گندم ۳۰، پودر سویا ۱۰، KH_2PO_4 ۱، $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ۰/۵ بودند (Tang and Zhong, 2002). ویتامین B_6 در غلظت‌های ($\frac{\mu l}{L}$) ۱۰، ۲۰، ۱۰۰ و ۳۰۰ به صورت $\frac{v}{v}$ به هر کدام از محیط‌های کشت بعد از استریل شدن آنها اضافه شد (از دستگاه سمپلر برای افزودن این غلظت‌ها استفاده شد). ویتامین‌های گروه B به دلیل اینکه توسط حرارت بالا از بین می‌روند، بعد از استریل شدن محیط‌های کشت افزوده می‌شوند (Zhou, 2017; Jackson and David, 1995).

۵-۱-۳-۳ نانو ذرات اکسید منیزیم و دی اکسید تیتانیوم

در شش ظرف ارلن مایر ۲۵۰ ml حدود ۱۰۰ ml محیط کشت مایع به شکل $\frac{w}{v}$ تهیه شد، که در سه محیط کشت نانوذره اکسید منیزیم و در سه محیط کشت دیگر نانوذره دی اکسید تیتانیوم در مقادیر ($\frac{g}{L}$)

۰/۱، ۰/۰۱، ۰/۰۵ استفاده شدند. سایر اجزای تشکیل دهنده هر شش محیط کشت شامل ($\frac{g}{L}$) پودر نشاسته گندم ۳۰، پودر سویا ۱۰، KH_2PO_4 ۱ و $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ۰/۵ بودند (Tang and Zhong, 2003).

۲-۳-۳-۲ بخش دوم

در این بخش از منابع کربنی و نیتروژنی استفاده شد، که در بخش اول بیشترین تاثیر را بر میزان تشکیل پلی ساکارید و گانودریک اسید توده زیستی داشتند. همینطور ویتامین پیریدوکسین B_6 ، نانوذرات (اکسید منیزیم و دی اکسید تیتانیوم) و pH اولیه در مقادیری استفاده شدند، که در بخش اول بیشترین تاثیر را بر میزان تشکیل پلی ساکارید و گانودریک اسید توده زیستی قارچ گانودرما لوسیدم داشتند. با استفاده از روش RSM دو آزمایش کلی طراحی شد. در آزمایش اول اثر ترکیبی سطوح مختلف کربن و نیتروژن محیط کشت مایع، برای تولید بهینه پلی ساکارید توده زیستی مورد بررسی قرار گرفت، و در آزمایش دوم اثر ترکیبی سطوح مختلف کربن و نیتروژن محیط کشت مایع برای تولید بهینه گانودریک اسید توده زیستی این قارچ مورد ارزیابی قرار گرفت.

۱-۲-۳-۳-۳ بررسی اثر ترکیبی کربن و نیتروژن محیط کشت برای تولید بهینه پلی ساکارید
در آزمایش اول از ۱۰ ظرف ارلن مایر ۲۵۰ ml استفاده شد، که در هر کدام ۱۰۰ ml محیط کشت مایع تهیه شد ($\frac{W}{V}$). محیط های کشت حاوی منبع کربنی نشاسته گندم و منبع نیتروژنی آب پنیر به علاوه ($\frac{g}{L}$) KH_2PO_4 ۱، $MgSO_4$ ۰/۵ و نانوذره MgO ۰/۵ بودند. ویتامین B_6 در غلظت $20 \frac{\mu l}{L}$ بعد از استریل شدن محیط های کشت، به هر کدام افزوده شد. pH اولیه محیط های کشت توسط HCl یک نرمال یا NaOH یک نرمال در pH ۶/۵ تنظیم شد ($\frac{V}{V}$).

۲-۲-۳-۳-۳ بررسی اثر ترکیبی کربن و نیتروژن محیط کشت برای تولید بهینه گانودریک اسید
در آزمایش دوم از ۱۰ ظرف ارلن مایر ۲۵۰ ml استفاده شد، که در هر کدام از آنها ۱۰۰ ml محیط کشت مایع تهیه شد ($\frac{W}{V}$). محیط های کشت حاوی منبع کربنی شربت گلوکز و منبع نیتروژنی شربت CSL به علاوه ($\frac{g}{L}$) KH_2PO_4 ۱، $MgSO_4$ ۰/۵، نانوذره MgO ۰/۵ و نانوذره TiO_2 ۰/۵ بودند. ویتامین B_6 در مقدار $100 \frac{\mu l}{L}$ بعد از استریل شدن محیط های کشت، به هر کدام افزوده شد. pH اولیه محیط های کشت توسط HCl یک نرمال یا NaOH یک نرمال در pH ۶/۵ تنظیم شد ($\frac{V}{V}$).

۴-۳-۳ گذار

ظروف ارلن مایر حاوی محیط کشت در اتوکلاو با دمای $121^\circ C$ و فشار ۰/۱ MPa به مدت ۳۰ min

استریل شدند. بعد از اینکه خنک شدند زیر هود لامینار با حدود $(\frac{v}{v})$ ۱۰٪ سوسپانسیون میسلومی توسعه تلقیح، مایع زنی شدند. در نهایت این محیط‌های کشت در اتوکلاو شیکردار در دمای 27°C با چرخش لرزشی $150 \frac{\text{rpm}}{\text{min}}$ به مدت ۸ روز گرمخانه گذاری شدند (Cui and Zhang, 2011).

۳-۳-۵ استخراج و خشک کردن توده زیستی قارچ

برای جدا کردن توده زیستی از محیط کشت مایع از کاغذ صافی واتمن^۱ شماره ۴۱ به عنوان صافی استفاده شد. محیط‌های کشت حاوی توده زیستی بر روی صافی ریخته شدند، سپس با آب مقطر چند بار شسته شدند تا به خوبی سایر ترکیبات محیط کشت از توده زیستی جدا شود. توده‌های زیستی جداسازی شده بر روی بشقابک‌ها ریخته، و به مدت یک شب در دمای 70°C آون قرار داده شدند، بعد از آن که به خوبی خشک شدند، در دمای 20°C - در فریزر نگهداری شدند (Yang et al., 2009; Zhou et al., 2018).

۳-۳-۶ استخراج پلی‌ساکارید توده زیستی قارچ

در مرحله اول با هدف جداسازی بخشی از پروتئین‌ها و رنگدانه‌های توده زیستی قارچ گانودرما لوسیدم، مطابق با روش Choong و همکاران در سال ۲۰۱۸ و همچنین Agudelo-Escobar و همکاران در سال ۲۰۱۷؛ توده زیستی خشک به خوبی در هاون چینی پودر شد و بعد 0.5 g از آن در فالكون (10 ml) ریخته شد سپس با نسبت یک به ده به آن الکل ۹۶٪ اضافه و با دستگاه ورتکس حدود 15 min هم زده شد. فالكون در بشر حاوی آب قرار گرفت و بعد بشر بر روی هات پلیت گذاشته شد، تا فالكون حاوی توده زیستی و الکل به مدت 2 h در دمای 90°C قرار گیرد. سپس الکل حاوی رنگدانه و پروتئین با استفاده از یک کاغذ صافی از توده زیستی جدا شد. برای اینکه مقدار بیشتری رنگدانه و پروتئین از توده زیستی جدا شود، این بخش دو مرتبه تکرار شد. توده زیستی جداسازی شده، به مدت 2 h در دمای 60°C آون خشک و توسط ترازو دیجیتالی وزن شد (Choong et al., 2018; Agudelo-Escobar et al., 2017).

در مرحله دوم با هدف جداسازی پلی‌ساکارید توده زیستی مطابق با روش Choong و همکاران در سال ۲۰۱۸ و همچنین Yuan و همکاران در سال ۲۰۱۲؛ 0.5 g توده زیستی فاقد رنگدانه داخل فالكون ریخته، سپس آب مقطر در نسب یک به ده به آن اضافه شد. توده زیستی و آب مقطر موجود در فالكون به مدت 15 min توسط دستگاه ورتکس با سرعت $1500 \frac{\text{rpm}}{\text{min}}$ هم زده شد. فالكون در داخل یک بشر حاوی آب گذاشته، و بشر بر روی یک هات پلیت به مدت 2 h در دمای 90°C قرار گرفت، تا پلی‌ساکاریدها از توده زیستی خارج و به آب مقطر منتقل شوند. توده زیستی و آب مقطر غلیظ حاوی پلی‌ساکارید موجود در فالكون توسط سانتریفیوژ با سرعت 4000 rpm در 15 min از یکدیگر جدا شدند

^۱ Whatman

(Choong et al., 2018; Yuan et al., 2012).

در مرحله آخر مطابق با روش Vukojevic و همکاران در سال ۲۰۰۶ و همچنین Yang و همکاران در سال ۲۰۰۰؛ سه برابر حجم آب مقطر حاوی پلی ساکارید، الکل ۹۶٪ ($\frac{v}{v}$) به آن اضافه شد. برای اینکه به خوبی پلی ساکاریدها رسوب کنند به مدت یک شب (حدود ۱۸ h) در دمای ۴ °C یخچال قرار گرفت. فالكون حاوی رسوب پلی ساکارید و مایع (الکل و آب مقطر) توسط سانتریفیوژ با سرعت ۱۰۰۰۰ rpm به مدت ۱۵ min از یکدیگر جدا شدند. بعد از جداسازی، پلی ساکارید مرطوب در دستگاه آون با دمای ۶۰ °C خشک و با ترازوی دیجیتالی وزن شد (Vukojevic et al., 2006; Yang et al., 2000).

۷-۳-۳ استخراج گانودریک اسید توده زیستی قارچ

مطابق با روش Wei و همکاران در سال ۲۰۱۶ و همچنین Fang and Zhong در سال ۲۰۰۲؛ برای بررسی مقدار گانودریک اسید در یک فالكون ابتدا ۰/۱ g پودر توده زیستی خشک و سپس ۱/۵ ml الکل اتانول ۹۶٪ ریخته شد. فالكون توسط دستگاه ورتکس با سرعت $1500 \frac{rpm}{min}$ به مدت ۳۰ min هم زده، تا به حالت تعلیق درآورده شد. برای جداسازی مایع از میسلایوم، از دستگاه سانتریفیوژ با سرعت چرخشی $3500 \frac{rpm}{min}$ به مدت ۱۵ min استفاده شد. مایع بدست آمده به مدت ۳ h در دمای ۵۰ °C خشک شد، و آن چیزی که باقی ماند در کلروفرم حل شد. گانودریک اسید از کلروفرم با افزودن NaHCO_3 ($\frac{w}{v}$) ۵٪ جدا شد. پس از حذف کلروفرم از طریق تبخیر در دمای ۴۰ °C، گانودریک اسید در ۵ ml اتانول ۹۶٪ حل شد، و جذب آن در طول موج ۲۴۵ nm توسط دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت گردید (Wei et al., 2016; Fang and Zhong, 2002).

فصل ۴

نتایج و بحث

۴-۱ بخش اول

در این بخش به بررسی تاثیر عواملی شیمیایی محیط کشت مایع همچون منبع کربنی، منبع نیتروژنی، pH اولیه، نانوذره (دی اکسید پتاسیم و اکسید منیزیم) و ویتامین پیریدوکسین (B_6) بر میزان رشد و تشکیل متابولیت‌های ثانویه (گانودریک اسید و پلی ساکارید) توده زیستی قارچ گانودرما لوسیدم پرداخته شد.

۴-۱-۱ اثر منابع کربنی

کربن یک عنصر ضروری برای رشد و تولید متابولیت‌های ثانویه در قارچ‌ها می‌باشد. کربن نقش مهمی در ساختار پروتئین‌ها، اسید نوکلئیک‌ها و قندها دارد. قارچ‌ها معمولا کربن مورد نیاز خود را از ترکیباتی همچون اسیدهای ارگانیک، الکل‌ها، سلولز، همی سلولز، نشاسته و چوب دریافت می‌کنند (Zhou, 2017). در این مرحله تحقیق تاثیر پنج منبع کربنی پودر گلوکز، شربت گلوکز، شربت فروکتوز، نشاسته گندم و نشاسته ذرت بر میزان رشد و تشکیل متابولیت‌های ثانویه (پلی ساکارید و گانودریک اسید) توده زیستی بررسی شد.

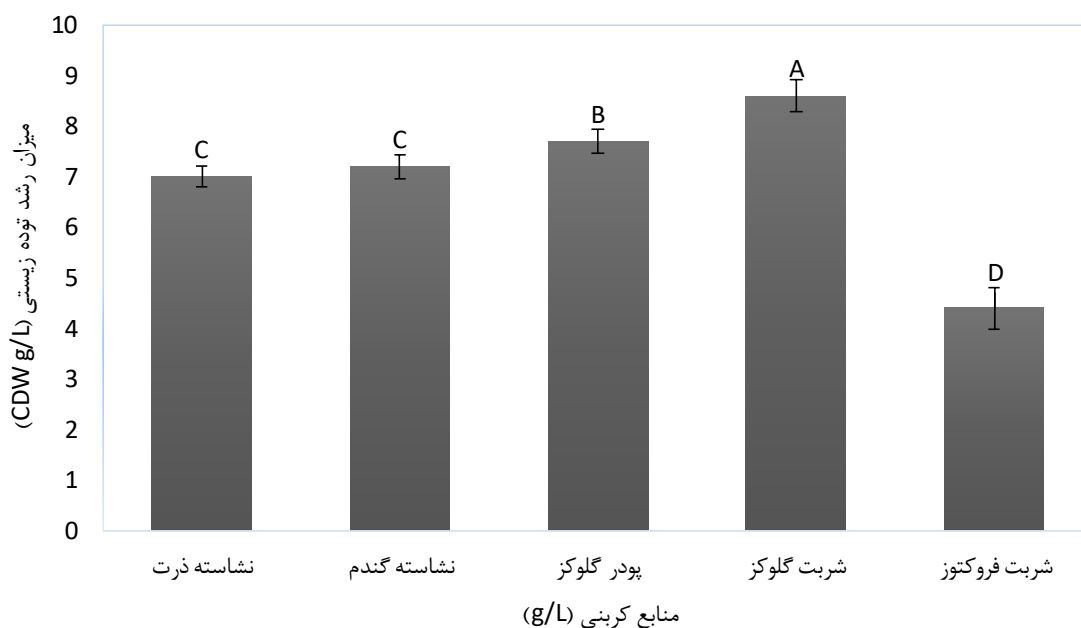
۴-۱-۱-۱ اثر منابع کربنی بر میزان رشد توده زیستی

همانطور که در شکل شماره ۴-۱ نشان داده شده، بیشترین میزان رشد یا وزن خشک توده زیستی^۱ در محیط کشت حاوی منبع کربنی شربت گلوکز ($8/6 \text{ CDW } \frac{g}{L}$)، و کمترین میزان رشد توده زیستی در محیط کشت حاوی شربت فروکتوز ($4/4 \text{ CDW } \frac{g}{L}$) بدست آمد. بین دو منبع کربنی نشاسته ذرت و نشاسته گندم اختلاف معنی داری مشاهده نشد. احتمال می‌رود توده زیستی این قارچ از لحاظ متابولیکی نمی‌تواند مونوساکارید فروکتوز را مصرف کند. معمولا مونوساکاریدها نسبت به پلی ساکاریدها راحت‌تر در محیط کشت جذب سلول قارچ می‌شوند. شاید به همین خاطر، در این پژوهش شربت گلوکز نسبت به نشاسته گندم و ذرت اثر بیشتری بر میزان رشد توده زیستی داشته است. نتایج حاصل از پژوهش Xu و همکاران در سال ۲۰۰۸ نشان داد که بیشترین میزان رشد توده زیستی در محیط کشت حاوی منبع کربنی گلوکز بدست آمده است. Shah و Modi در سال ۲۰۱۸ و همین طور George و همکاران در سال ۲۰۰۸ پژوهشی مشابه انجام دادند، که نتایج آنها با نتایج این پژوهش مطابقت داشت.

Subera و همکاران در سال ۲۰۱۳ گزارش کردند منبع کربنی مونوساکاریدی (شربت گلوکز) نسبت به منبع کربنی پلی ساکاریدی (نشاسته محلول) در میزان رشد توده زیستی برتری دارد، که با نتایج این پژوهش سازگار بود. Chang و همکاران در سال ۲۰۰۶ گزارش کردند منبع کربنی شربت گلوکز و فروکتوز به یک اندازه بر میزان رشد توده زیستی اثر دارند، که با نتایج این پژوهش مغایرت داشت. طی

^۱ Cell Dry Weigh (CDW)

پژوهشی Shah و Modi در سال ۲۰۱۸ گزارش کردند، منبع کربنی شربت گلوکز نسبت به فروکتوز اثر بهتری بر میزان رشد توده زیستی دارد، که با نتایج این پژوهش مطابقت داشت.

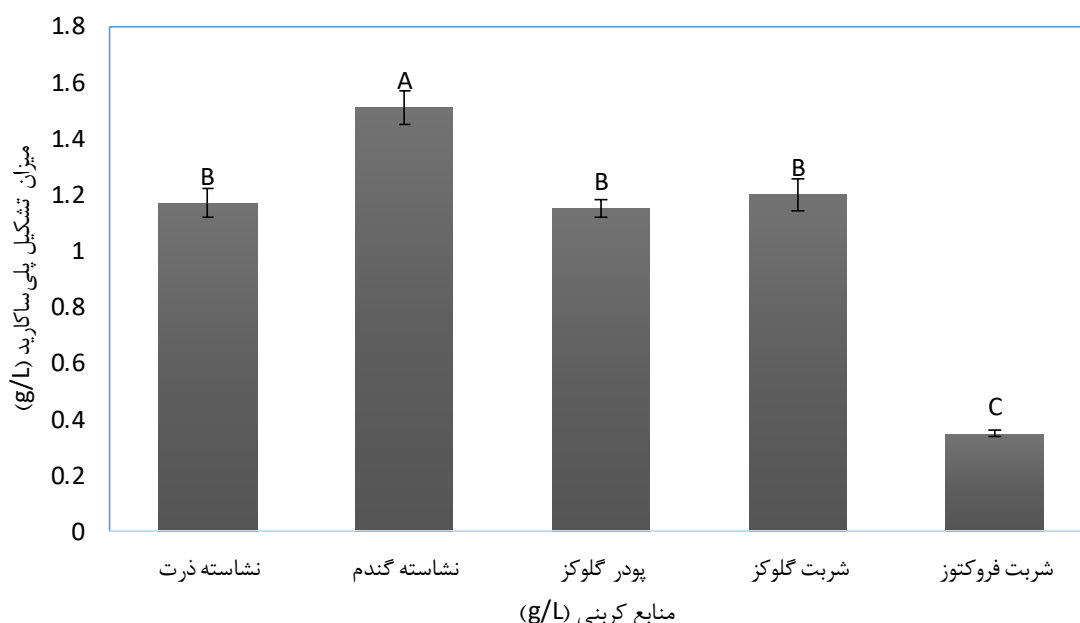


شکل ۴-۱: تاثیر منابع کربنی بر میزان رشد توده زیستی

۴-۱-۱-۲ اثر منابع کربنی بر میزان تشکیل پلی ساکارید

همانطور که در شکل ۴-۲ مشخص شده، محیط کشت حاوی منبع کربنی نشاسته گندم بیشترین ($\frac{g}{L}$) و محیط کشت حاوی شربت فروکتوز کمترین ($\frac{0.35}{L}$) میزان تشکیل پلی ساکارید را داشتند. بین سه منبع کربنی نشاسته ذرت، پودر گلوکز و شربت گلوکز اختلاف معنی داری مشاهده نشد. با توجه به مطالعات صورت گرفته احتمال می‌رود، به دلیل اینکه نشاسته گندم پلی ساکارید می‌باشد در محیط کشت مایع آهسته‌تر به مصرف توده زیستی می‌رسد؛ که این آهستگی در مصرف منبع کربنی علاوه بر رشد اجازه تولید پلی ساکارید به توده زیستی می‌دهد. بنابراین در آزمایش بررسی اثر ترکیبی سطوح مختلف کربن و نیتروژن محیط کشت برای تولید بهینه پلی ساکارید توده زیستی، از منبع کربنی نشاسته گندم استفاده شد.

نتایج حاصل از پژوهش Gupta و Behera در سال ۲۰۱۵ با نتایج این پژوهش سازگار بود. آنها گزارش کردند، منبع کربنی نشاسته گندم بهترین تاثیر را بر میزان تشکیل پلی ساکارید توده زیستی دو قارچ *Russula lepida* و *Calocybe indica* در محیط کشت مایع دارد. Hsieh و همکاران در سال ۲۰۰۵ در پژوهش خود نشان دادند، میزان تشکیل پلی ساکارید وابسته به میزان رشد توده زیستی نیست. هنگامی که نسبت کربن به نیتروژن در محیط کشت مایع افزایش پیدا می‌کند، میزان تشکیل پلی ساکارید افزایش می‌یابد.

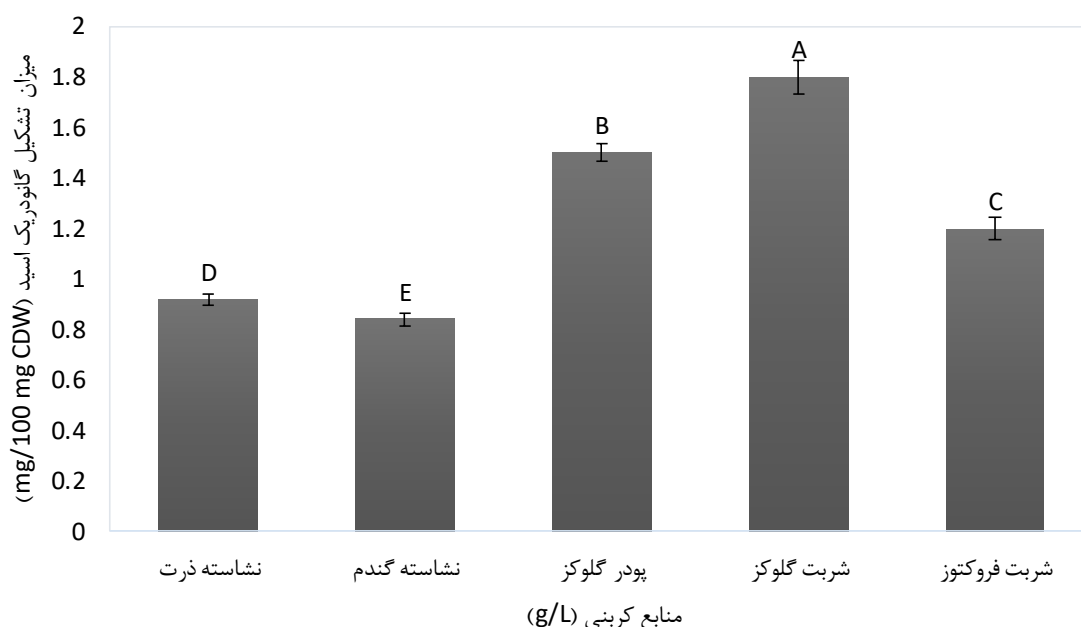


شکل ۴-۲: تاثیر منابع کربنی بر میزان تشکیل پلی ساکارید توده زیستی

۳-۱-۱-۴ اثر منبع کربنی بر میزان تشکیل گانودریک اسید

همان طور که در شکل ۴-۳ آورده شده است، محیط کشت حاوی منبع کربنی شربت گلوکز بیشترین ($\frac{1}{8} \frac{mg}{100 mg CDW}$) و محیط کشت حاوی منبع کربنی نشاسته گندم کمترین ($\frac{0}{84} \frac{mg}{100 mg CDW}$) میزان تشکیل گانودریک اسید توده زیستی قارچ را داشتند. بعد از شربت گلوکز، پودر گلوکز بیشترین ($\frac{1}{5} \frac{mg}{100 mg CDW}$) میزان تشکیل گانودریک اسید توده زیستی را از خود نشان داد. بنابراین در آزمایش بررسی اثر ترکیبی سطوح مختلف کربن و نیتروژن محیط کشت برای تولید بهینه گانودریک اسید توده زیستی، از منبع کربنی گلوکز استفاده شد.

نتایج این پژوهش با نتایج حاصل از پژوهش Tang و Zhong در سال ۲۰۰۲ تقریباً سازگار بود. آنها گزارش کردند، منبع کربنی شربت گلوکز در غلظت‌های پایین اثر خوبی بر میزان تشکیل گانودریک اسید توده زیستی در محیط کشت مایع دارد. Li و همکاران در ۲۰۰۶ گزارش کردند، در بین منابع کربنی استفاده شده، مونوساکاریدها و دی ساکاریدها نسبت به پلی ساکاریدها در میزان تشکیل گانودریک اسید برتری داشتند، که با نتایج این تحقیق مطابقت داشت. Xu و همکاران در سال ۲۰۰۸ گزارش کردند، در محیط کشت مایع حاوی منبع کربنی نشاسته ذرت بیشترین میزان تشکیل گانودریک اسید توده زیستی بدست آمد، که با نتایج این پژوهش مغایرت داشت. آنها اذعان کردند، منابع کربنی که به آهستگی تخمیر می‌شوند، اثر بیشتری بر میزان تشکیل متابولیت‌های ثانویه دارند. آنها دلیل آن را جلوگیری از اثر منفی ناشی از سرکوب کاتابولیت در غلظت‌های بالای گلوکز که به راحتی متابولیزه می‌شوند، بیان کردند.



شکل ۴-۳: تاثیر منابع کربنی بر میزان تشکیل گانودریک اسید توده زیستی

۴-۱-۲ اثر منابع نیتروژنی

نیتروژن برای رشد و تولید متابولیت‌های ثانویه قارچ‌ها بسیار حیاتی است، زیرا یکی از عناصر اصلی پروتوپلاسم و واحدهای ساختاری سلول می‌باشد. نیتروژن یکی از مولفه‌های ترکیبات انتقال انرژی ATP (آدنوزین تری فسفات) می‌باشد. بنابراین حضور نیتروژن در محیط کشت مایع ضروری است، و در فقدان آن رشد توده زیستی کند می‌شود. اکثر بازیدیوماست‌ها از جمله قارچ گانودرما لوسیدم منابع نیتروژنی آلی پیچیده همچون پپتون گوشت، عصاره مخمر، پودر سویا و... را به منابع نیتروژنی معدنی همچون آمونیوم سولفات، آمونیوم کلرید، اوره و... ترجیح می‌دهند، زیرا قادر به ساختن برخی از اسیدهای آمینه ضروری خود از منابع نیتروژنی معدنی نیستند. بنابراین وجود یک منبع نیتروژنی مناسب در محیط کشت مایع از رشد میسلیم حمایت کرده، و باعث تحریک تولید متابولیت‌های ثانویه در قارچ می‌شود (Shih et al., 2006).

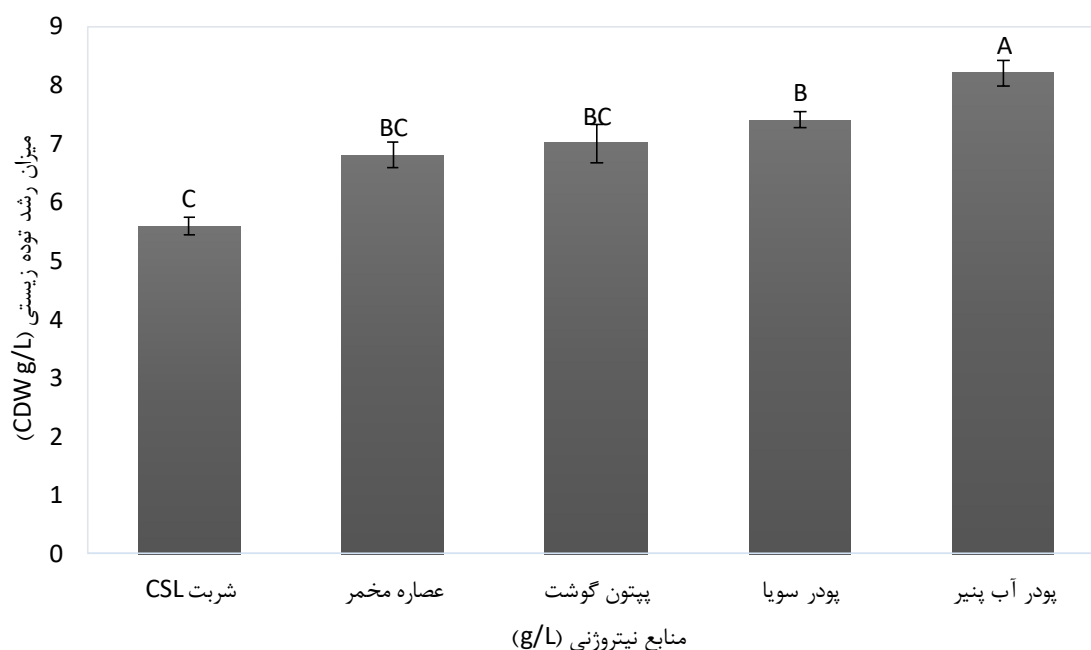
در این آزمایش تاثیر پنج منبع نیتروژنی پودر سویا، پودر آب پنیر، پپتون گوشت، عصاره مخمر و شربت CSL بر میزان رشد و تشکیل متابولیت‌های ثانویه (گانودریک اسید و پلی ساکارید) توده زیستی قارچ گانودرما لوسیدم در محیط کشت مایع مورد بررسی قرار گرفت.

۴-۱-۲-۱ اثر منابع نیتروژنی بر میزان رشد توده زیستی

همانطور که در شکل ۴-۴ مشخص شده است، محیط کشت حاوی منبع نیتروژنی آب پنیر بیشترین ($\frac{g}{L}$) و محیط کشت حاوی منبع نیتروژنی شربت CSL کمترین ($\frac{g}{L}$ ۵/۶ CDW) میزان رشد توده

زیستی قارچ را داشتند. بعد از آب پنیر محیط کشت حاوی منبع نیتروژنی پودر سویا بیشترین ($\frac{g}{L}$ CDW ۷/۴) میزان رشد توده زیستی را از خود نشان داد. بین دو منبع نیتروژنی پپتون گوشت و عصاره مخمر اختلاف معنی داری مشاهده نشد. بر اساس تحقیقات انجام شده آب پنیر علاوه بر داشتن پروتئین، چربی و ریز مغذی‌ها دارای قند لاکتوز بوده که به عنوان مکمل منبع کربنی محیط کشت عمل کرده، و نقش مهمی در تحریک رشد توده زیستی قارچ ایفا می‌کند (Lee et al., 2003; Chang et al., 2006). به همین دلیل در این آزمایش تاثیر منبع نیتروژنی آب پنیر نسبت به سایر منابع نیتروژنی بر میزان رشد توده زیستی قارچ بیشتر بود. با توجه به مطالعات صورت گرفته، تاکنون تحقیقی در مورد اثر منبع نیتروژنی پودر آب پنیر بر میزان رشد توده زیستی قارچ گانودرما لوسیدوم در محیط کشت مایع انجام نشده است.

Chang و همکاران در سال ۲۰۰۶ تاثیر پنج منبع نیتروژنی را بر میزان رشد توده زیستی قارچ گانودرما لوسیدوم بررسی کردند. آنها گزارش کردند محیط کشت حاوی عصاره مخمر نسبت به پپتون گوشت اثر بیشتری بر میزان رشد توده زیستی دارد. که با نتایج این تحقیق مغایرت داشت. Liu و Huang در سال ۲۰۰۸ طی پژوهشی مشابه، تاثیر ۹ منبع نیتروژنی را بر میزان رشد توده زیستی قارچ *Grifola umbellata* در محیط کشت مایع بررسی کردند. آنها گزارش کردند، بین منبع نیتروژنی عصاره مخمر و منبع نیتروژنی پودر سویا، عصاره مخمر اثر بیشتری بر میزان رشد توده زیستی داشت، که با نتایج این پژوهش مغایرت داشت. Modi و Shah در سال ۲۰۱۸ تاثیر شش منبع نیتروژنی را بر میزان رشد توده زیستی قارچ گانودرما لوسیدوم بایکدیگر مقایسه کردند. آنها گزارش کردند، محیط کشت حاوی عصاره مخمر بیشترین تاثیر را بر میزان رشد توده زیستی دارد، که با نتایج این پژوهش مغایرت داشت. در آزمایش آنها عصاره مخمر و پپتون گوشت با یکدیگر اختلاف معنی داری نداشتند، که با نتایج این پژوهش سازگار بود. Xu و همکاران در سال ۲۰۰۸ گزارش کردند، در بین محیط کشت حاوی منبع نیتروژنی پپتون گوشت و عصاره مخمر در میزان رشد توده زیستی اختلاف معنی داری مشاهده نشد، که با نتایج این پژوهش مطابقت داشت. Suberu و همکاران در سال ۲۰۱۳ گزارش کردند، محیط کشت حاوی اسید آسپارتیک بیشترین میزان رشد توده زیستی را از خود نشان داده است. پژوهشگرها بیان کردند، اسید آسپارتیک یک اسید آمینه ضروری برای رشد توده زیستی می‌باشد، و غالب شدن آن در محیط کشت مایع تاثیر زیادی بر رشد توده زیستی دارد.



شکل ۴-۴: تاثیر منابع نیتروژنی بر میزان رشد توده زیستی

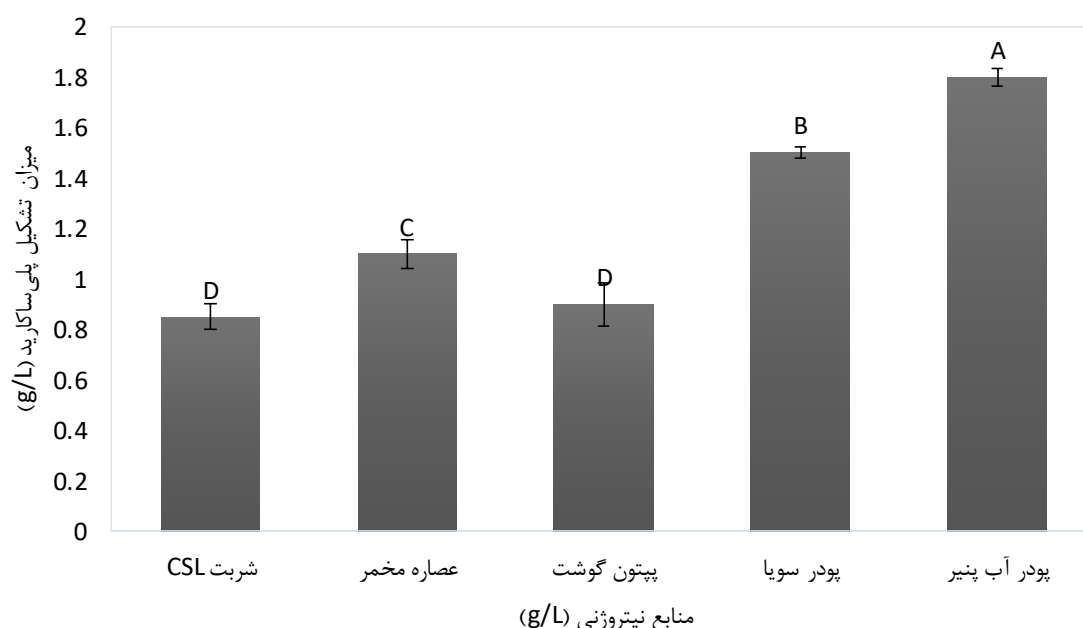
۴-۱-۲-۲ اثر منابع نیتروژنی بر میزان تشکیل پلی ساکارید

همان طور که در شکل ۴-۵ مشاهده می کنید، محیط کشت حاوی منبع نیتروژنی آب پنیر بیشترین ($\frac{g}{L}$) و محیط کشت حاوی منبع نیتروژنی شربت CSL کمترین ($\frac{g}{L}$) میزان تشکیل پلی ساکارید توده زیستی را داشتند. بعد از آب پنیر محیط کشت حاوی منبع نیتروژنی پودر سویا بیشترین ($\frac{g}{L}$) میزان تشکیل پلی ساکارید توده زیستی را از خود نشان داد. منبع نیتروژنی آب پنیر به دلیل داشتن قند لاکتوز، نسبت کربن به نیتروژن را در محیط کشت مایع افزایش می دهد. با افزایش نسبت کربن به نیتروژنی در محیط کشت مایع، میزان تشکیل پلی ساکارید بیشتر می شود، این موضوع توسط یافته های Simonic و همکاران در سال ۲۰۰۸ و همین طور Fang و Zhong در سال ۲۰۰۲ تایید شد. بنابراین در آزمایش بررسی اثر ترکیبی سطوح مختلف کربن و نیتروژن محیط کشت برای تولید بهینه پلی ساکارید توده زیستی، از منبع نیتروژنی پودر آب پنیر استفاده شد.

با توجه به مطالعات انجام شده، پژوهشی در مورد تاثیر منبع نیتروژنی آب پنیر بر میزان تشکیل پلی ساکارید توده زیستی قارچ گانودرما لوسیدم در محیط کشت مایع صورت نگرفته است. با این وجود طی پژوهشی Huang و Liu در سال ۲۰۰۸ به بررسی تاثیر ۹ منبع نیتروژنی بر میزان تشکیل پلی ساکارید قارچ *Grifola umbellata* در محیط کشت مایع پرداختند، سپس گزارش کردند در محیط کشت حاوی منبع نیتروژنی شیر بدون چربی بیشترین میزان تشکیل پلی ساکارید توده زیستی بدست آمده است. در پژوهشی دیگر Wu و Hansen در سال ۲۰۰۶ گزارش کردند، پودر آب پنیر بهترین منبع نیتروژنی برای افزایش میزان تشکیل پلی ساکارید توده زیستی قارچ *Lentinus edodes* در محیط کشت

مایع می‌باشد، که با نتایج این پژوهش سازگار بود.

Simonc و همکاران در سال ۲۰۰۸ تاثیر منبع نیتروژنی پیتون گوشت را در سه غلظت ($\frac{w}{v}$ ۰/۲، ۰/۵ و ۱) و دو منبع نیتروژنی نیترات آمونیوم و سولفات آمونیوم را در سه غلظت (mM) ۱۵، ۲۵ و ۴۰ بر میزان تشکیل پلی‌ساکارید توده زیستی بررسی کردند. آنها گزارش کردند محیط کشت حاوی سولفات آمونیوم در غلظت ۱۵ mM بیشترین میزان تشکیل پلی‌ساکارید را داشته، و با افزایش غلظت سولفات آمونیوم میزان تشکیل پلی‌ساکارید کاهش یافته است. آنها اذعان کردند هنگامی که در محیط کشت مایع غلظت نیتروژن پایین است، توده زیستی بیشتر تمایل به ساخت پلی‌ساکارید دارد. در طی پژوهشی Fang و Zhong در سال ۲۰۰۲ اثر دو منبع نیتروژنی عصاره مخمر و پیتون گوشت را در سه غلظت ($\frac{g}{L}$) ۲/۵، ۵ و ۱۰ بر میزان تشکیل پلی‌ساکارید توده زیستی قارچ بررسی کردند. آنها گزارش کردند محیط کشت حاوی عصاره مخمر بیشترین میزان تشکیل پلی‌ساکارید را نشان داده است. Jeong و همکاران در سال ۲۰۰۵ گزارش کردند، پودر گلوتن^۱ بهترین منبع نیتروژنی برای تشکیل پلی‌ساکارید توده زیستی قارچ گانودرما اپلانتوم^۲ در محیط کشت مایع می‌باشد.



شکل ۴-۵: تاثیر منابع نیتروژنی بر میزان تشکیل پلی‌ساکارید توده زیستی

۳-۲-۱-۴ اثر منابع نیتروژنی بر میزان تشکیل گانودریک اسید

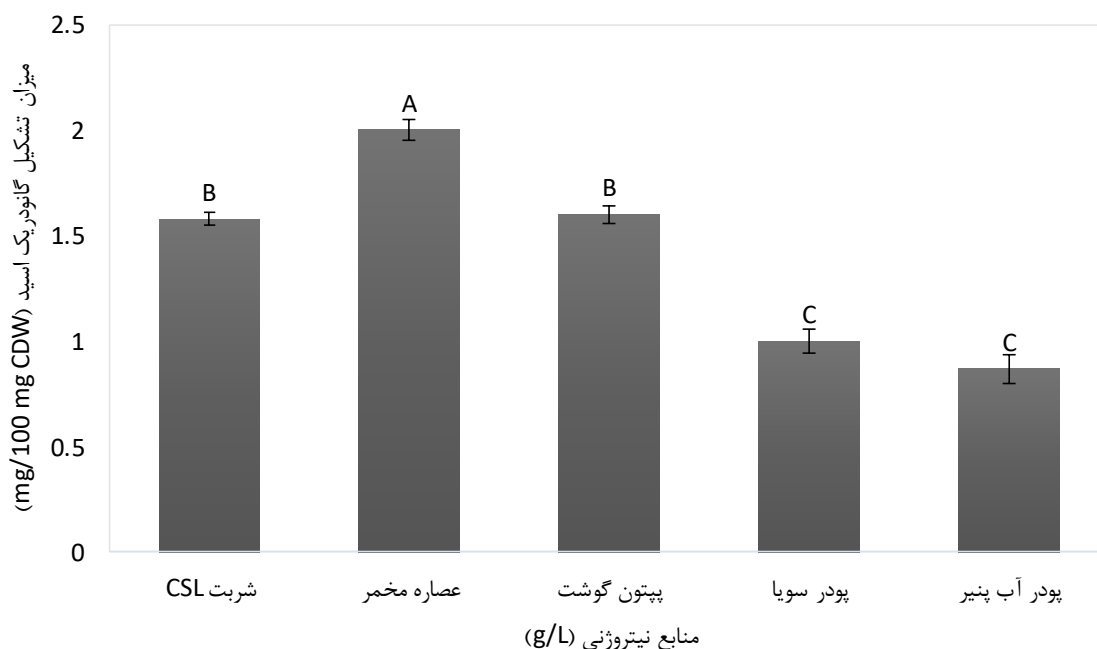
همانطور که در شکل ۴-۶ آمده است، محیط کشت حاوی عصاره مخمر بیشترین ($\frac{mg}{100 mg CDW}$) و (۲) و

^۱ Corn Steep Power (CSP)

^۲ *Ganoderma applanatum*

محیط کشت حاوی آب پنیر کمترین ($0.87 \frac{mg}{100 mg CDW}$) میزان تشکیل گانودریک اسید توده زیستی را از خود نشان دادند. اختلاف معنی داری بین دو منبع نیتروژنی پپتون گوشت و شربت CSL مشاهده نشد. با توجه به نتایج بدست آمده، منبع نیتروژنی شربت CSL به دلیل داشتن قیمت ارزان و تولید گانودریک اسید تقریباً به اندازه پپتون گوشت به عنوان منبع نیتروژنی منتخب، در آزمایش بررسی اثر ترکیبی سطوح مختلف منبع کربنی و نیتروژنی محیط کشت برای تولید بهینه گانودریک اسید، استفاده شد.

در طی پژوهشی Xu و همکاران در سال ۲۰۰۷ به این نتیجه رسیدند، که پودر سویا بیشترین تاثیر را بر میزان تشکیل گانودریک اسید توده زیستی دارد، که با نتایج این پژوهش مغایرت داشت. اثر پنج منبع نیتروژنی توسط Cui و همکاران در سال ۲۰۱۵ مورد مطالعه قرار گرفت. آنها گزارش کردند محیط کشت حاوی عصاره مخمر بیشترین میزان تشکیل گانودریک اسید توده زیستی را دارد، که با نتایج این پژوهش سازگار بود. Fang و Zhong در سال ۲۰۰۲ در طی پژوهشی اثر دو منبع نیتروژنی عصاره مخمر و پپتون گوشت را در سه غلظت ($\frac{g}{L}$) ۲/۵، ۵ و ۱۰ بررسی کردند. آنها گزارش کردند عصاره مخمر در هر سه غلظت نسبت به پپتون گوشت در تشکیل گانودریک اسید برتری دارد، که با نتایج این پژوهش مطابقت داشت.



شکل ۴-۶: تاثیر منابع نیتروژنی بر میزان تشکیل گانودریک اسید توده زیستی

۳-۱-۴ اثر pH اولیه

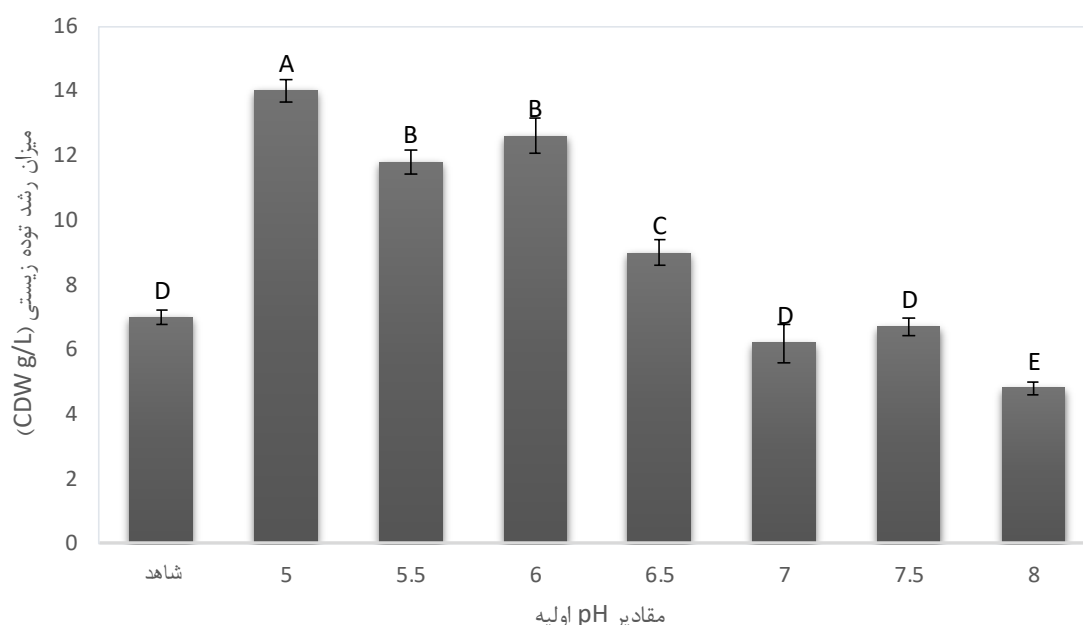
هر گونه واکنش متابولیک که در توده زیستی قارچ رخ می‌دهد تحت تاثیر آنزیم‌ها می‌باشد. آنزیم‌ها کاتالیزور بیولوژیک هستند، که فعالیت آنها تحت تاثیر pH می‌باشد. بنابراین انتخاب pH اولیه مناسب برای محیط کشت مایع توده زیستی قارچ گانودرما لوسیدم اهمیت بالایی دارد (Fang and Zhong,).

2002). در این آزمایش تاثیر هفت pH اولیه ۵، ۵/۵، ۶، ۶/۵، ۷، ۷/۵ و ۸ بر میزان رشد و تشکیل متابولیت‌های ثانویه (گانودریک اسید و پلی‌ساکارید) توده زیستی قارچ گانودرما لوسیدم در محیط کشت مایع مورد بررسی قرار گرفتند، و از یک نمونه شاهد که هیچ تغییری در pH اولیه آن صورت نگرفته بود استفاده شد.

۱-۳-۴ اثر pH اولیه بر میزان رشد توده زیستی

همان طور که در شکل ۴-۷ مشاهده می‌شود، محیط کشت دارای pH اولیه ۵ بیشترین ($14 \text{ CDW } \frac{g}{L}$) و محیط کشت دارای pH اولیه ۸ کمترین ($4/8 \text{ CDW } \frac{g}{L}$) میزان رشد توده زیستی را داشتند. با توجه به شکل ۴-۷ با افزایش pH اولیه میانگین میزان رشد توده زیستی کاهش یافت، که این نشان می‌دهد توده زیستی قارچ گانودرما لوسیدوم تمایل به رشد در محیط کشت کمی اسیدی دارد، که با نتایج حاصل از پژوهش Shah و Modi در سال ۲۰۱۸ مطابقت داشت. آنها گزارش کردند بهترین pH اولیه محیط کشت برای رشد توده زیستی، pH اولیه ۵ می‌باشد، و با افزایش pH محیط کشت میزان رشد توده زیستی کاهش پیدا می‌کند. در طی پژوهشی Shih و همکاران در سال ۲۰۰۷ گزارش کردند محیط کشت کمی اسیدی برای رشد توده زیستی آسکوماپیست‌ها و بازیدیوماپیست‌ها مناسب است، که با نتایج حاصل از این تحقیق تطابق داشت.

طی پژوهشی Zhou و همکاران در سال ۲۰۱۵ چهار سطح pH اولیه را بررسی کردند، آنها گزارش کردند با افزایش pH اولیه میزان رشد توده زیستی کاهش پیدا می‌کند که با نتایج این تحقیق سازگار بود. Fang و Zhong در سال ۲۰۰۲ بعد از بررسی پنج pH اولیه گزارش کردند، pH اولیه ۶/۵ برای رشد توده زیستی مناسب می‌باشد، که با نتایج این پژوهش مغایرت داشت. آنها اذعان کردند pH اولیه مناسب رشد توده زیستی، وابسته نوع منبع نیتروژنی محیط کشت مایع می‌باشد. Ahmadifar و همکاران در سال ۲۰۲۰ گزارش کردند، بیشترین میزان رشد توده زیستی در pH اولیه ۵ بدست آمده است، که با نتایج این تحقیق مطابقت داشت. Babitskaya و همکاران در سال ۲۰۰۵ گزارش کردند، محیط کشت دارای pH اولیه ۶/۵ بیشترین میزان رشد توده زیستی را از خود نشان داده است. آنها اذعان کردند، نوع منبع کربنی و نیتروژنی محیط کشت در میزان pH بهینه رشد قارچ اثر گزار می‌باشد.



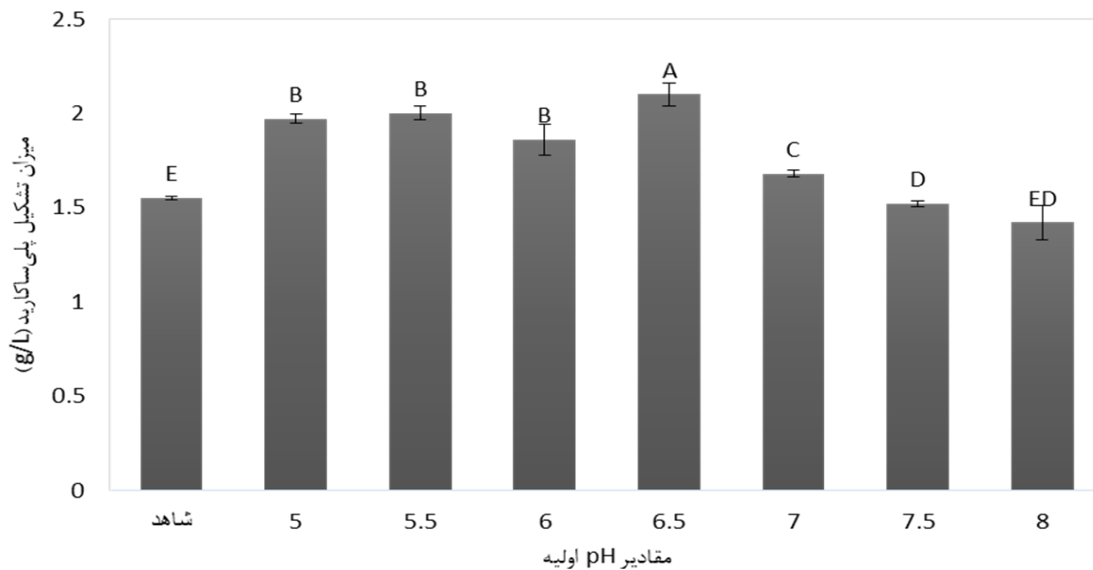
شکل ۴-۷: تاثیر pH اولیه بر میزان رشد توده زیستی

۳-۱-۴ اثر pH اولیه بر میزان تشکیل پلی ساکارید

همان طور که در شکل ۴-۸ آورده شده است، محیط کشت دارای pH اولیه ۶/۵ بیشترین ($2/1 \frac{g}{L}$) و محیط کشت دارای pH اولیه ۸ کمترین ($1/42 \frac{g}{L}$) میزان تشکیل پلی ساکارید را داشتند. با توجه به شکل ۴-۸ در دامنه pH اولیه ۵ تا ۶/۵ میزان تشکیل پلی ساکارید توده زیستی تقریباً نزدیک به هم بود، پس در نتیجه این دامنه pH اولیه برای تشکیل پلی ساکارید مناسب می باشد. ولی در دامنه pH اولیه ۷ تا ۸ با افزایش pH اولیه میزان تشکیل پلی ساکارید توده زیستی کاهش یافت. بنابراین در آزمایش بررسی اثر ترکیبی کربن و نیتروژن محیط کشت، برای تولید بهینه پلی ساکارید، از pH اولیه ۶/۵ استفاده شد.

در طی پژوهشی Valentina و همکاران در سال ۲۰۰۷ گزارش کردند، بهترین دامنه pH اولیه برای تشکیل پلی ساکارید بین ۵ تا ۶/۵ می باشد، که با نتایج این تحقیق سازگار بود. در پژوهشی دیگر Kim و همکاران در سال ۲۰۰۵ گزارش کردند بیشترین میزان تشکیل پلی ساکارید در محیط کشت مایع دارای pH اولیه ۴/۵ بدست آمده است. Simonic و همکاران در سال ۲۰۰۸ گزارش کردند، سه pH اولیه ۵، ۵/۵ و ۶ اختلاف معنی داری بر میزان تشکیل پلی ساکارید نداشتند، که با نتایج این پژوهش سازگار بود. Zhong و Fang در سال ۲۰۰۲ گزارش کردند، محیط کشت دارای pH اولیه ۵/۵ بیشترین تاثیر را بر میزان تشکیل پلی ساکارید توده زیستی قارچ دارد. آنها اذعان کردن در دامنه pH اولیه ۳/۵ تا ۷ بین افزایش pH اولیه و میزان تشکیل پلی ساکارید توده زیستی رابطه مستقیم وجود دارد. آنها گزارش کردند، هنگامی که pH اولیه محیط کشت بالا می باشد، زمان بیشتری طی می شود، تا pH محیط کشت در اثر

فعالیت توده زیستی به کمتر از ۳ برسد (گزارش شده در pH کمتر از ۳ رشد و تولید متابولیت‌های ثانویه توده زیستی متوقف می‌شود)؛ به همین دلیل توده زیستی مدت زمان بیشتری برای تولید پلی‌ساکارید دارد.

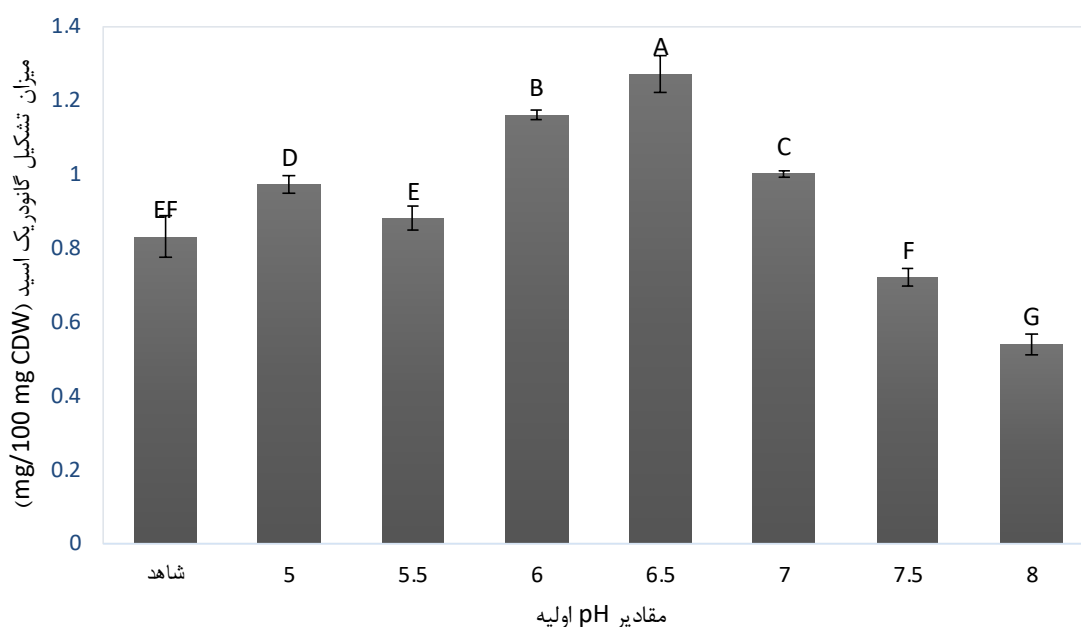


شکل ۴-۸: تاثیر pH اولیه بر میزان تشکیل پلی‌ساکارید توده زیستی

۳-۳-۱-۴ اثر pH اولیه بر میزان تشکیل گانودریک اسید

همانطور که در شکل ۴-۹ آمده است، محیط کشت دارای pH اولیه ۶/۵ بیشترین ($\frac{mg}{100\ mg\ CDW}$ ۱/۲۷) و محیط کشت دارای pH اولیه ۸ کمترین ($\frac{mg}{100\ mg\ CDW}$ ۰/۵۴) میزان تشکیل گانودریک اسید توده زیستی را نشان دادند. بنابراین در آزمایش بررسی اثر ترکیبی کربن و نیتروژن محیط کشت برای تولید بهینه گانودریک اسید از pH اولیه ۶/۵ استفاده شد.

باتوجه به شکل ۴-۹ با افزایش pH اولیه تا ۶/۵ میانگین میزان تشکیل گانودریک اسید افزایش پیدا کرد، و سپس کاهش یافت؛ که با نتایج Li و همکاران در سال ۲۰۰۶ تقریباً سازگار بود. آنها گزارش کردند با افزایش pH اولیه تا ۶ میزان تشکیل گانودریک اسید بیشتر شده و بعد از آن کاهش یافته است. در طی پژوهشی Fang و Zhong در سال ۲۰۰۲ گزارش کردند، بهترین دامنه pH اولیه برای تشکیل گانودریک اسید ۵/۵ تا ۶/۵ می‌باشد، که با نتایج این پژوهش مطابقت داشت. Cui و همکاران در سال ۲۰۱۵ گزارش کردند در دامنه pH اولیه ۳/۵ تا ۷/۵ ابتدا میزان تشکیل گانودریک اسید توده زیستی افزایش یافته، و در pH اولیه ۵/۵ به حداکثر خود رسیده و سپس کاهش یافته است.



شکل ۴-۹: تاثیر pH اولیه بر میزان تشکیل گانودریک اسید توده زیستی

۴-۱-۴ اثر نانوذرات دی اکسید تیتانیوم و اکسید منیزیم

به ذراتی که حداقل یکی از ابعاد آنها قطری معادل ۱۰۰ نانومتر یا کمتر داشته باشد، نانوذره گفته می شود. تبدیل ذرات به مقیاس نانو ویژگی های فیزیکی، شیمیایی، زیستی و فعالیت های کاتالیزوری آنها را تغییر می دهد، و برتری قابل توجهی نسبت به ذرات در مقیاس بزرگتر پیدا میکنند. به عنوان مثال سطح مخصوص ذرات افزایش یافته، که به آنها قابلیت حلالیت و عملکرد سطحی بهتر می دهد (Biswas and Wu, 2005). در سال های اخیر پژوهشگرها تحقیقات زیادی با موضوع نحوه تاثیر عناصر معدنی مورد نیاز گیاهان در مقیاس نانو، بر میزان رشد و نمو گیاهان انجام داده اند؛ و نتایج مثبتی در این رابطه گزارش شده است (Naderi and Abedi, 2012). با این وجود تحقیقات اندکی در مورد تاثیر عناصر معدنی در مقیاس نانو بر میزان رشد و تشکیل متابولیت های ثانویه توده زیستی قارچ گانودرما لوسیدم صورت گرفته است.

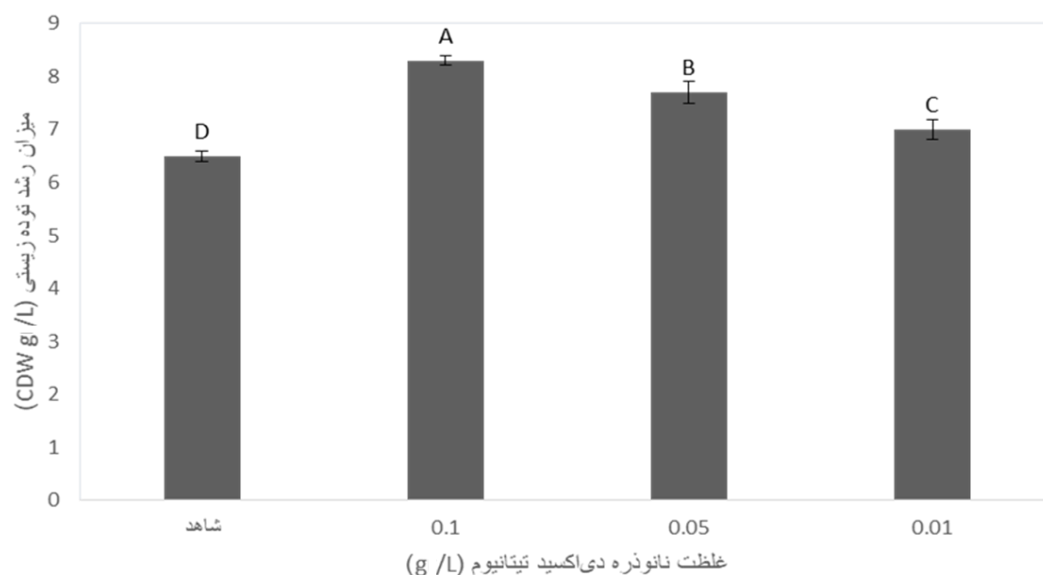
با توجه به مطالعات صورت گرفته، تاکنون پژوهشی با موضوع تاثیر نانوذره دی اکسید تیتانیوم یا اکسید منیزیم بر میزان رشد و تشکیل متابولیت های ثانویه توده زیستی قارچ گانودرما لوسیدم در محیط کشت مایع مشاهده نشد. با این وجود در این تحقیق تاثیر دو نانوذره دی اکسید تیتانیوم و اکسید منیزیم در سه غلظت ($\frac{g}{L}$) ۰/۱، ۰/۰۵ و ۰/۰۱ بر میزان رشد و تشکیل متابولیت های ثانویه (گانودریک اسید و پلی ساکارید) توده زیستی قارچ گانودرما لوسیدم در محیط کشت مایع مورد بررسی قرار گرفت. در این آزمایش از نمونه شاهد که فاقد نانوذرات بود استفاده شد.

۴-۱-۴-۱ نانوذره دی اکسید تیتانیوم

۴-۱-۴-۱-۱ تاثیر نانوذره دی اکسید تیتانیوم بر میزان رشد توده زیستی

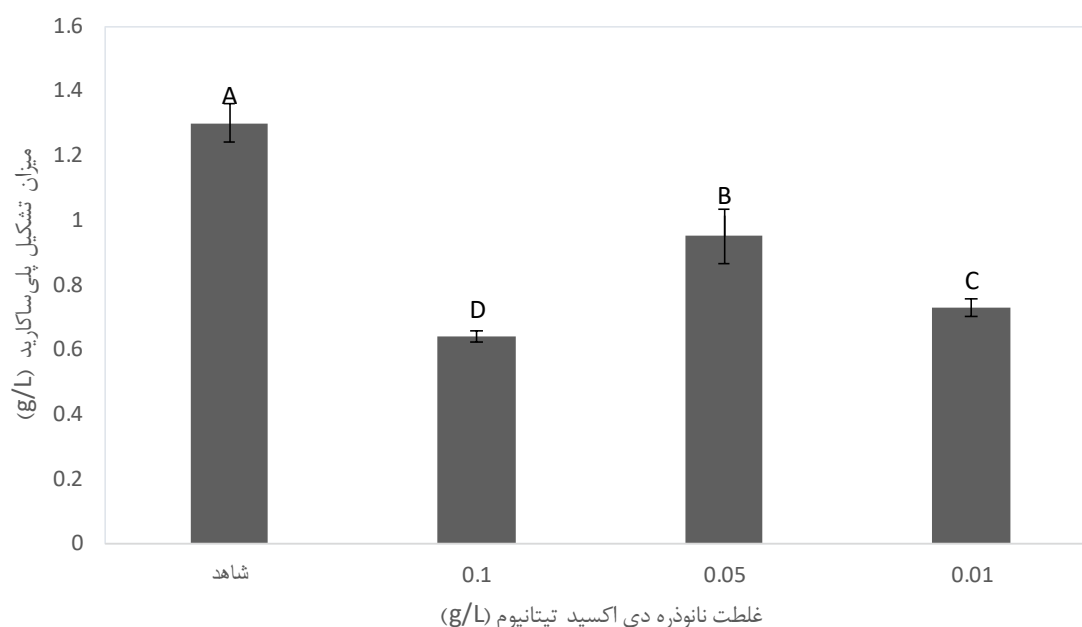
همان طور که در شکل ۴-۱۰ مشخص شده، محیط کشت حاوی $\frac{0.1}{L}$ نانوذره دی اکسید تیتانیوم ($\frac{g}{L}$) (۸/۳ CDW) بیشترین میزان رشد توده زیستی را از خود نشان داد. کاهش غلظت نانوذره دی اکسید تیتانیوم در محیط کشت، تاثیر منفی بر میزان رشد توده زیستی داشت. نمونه شاهد که فاقد نانوذره دی اکسید تیتانیوم بود، ($\frac{6}{5}$ CDW $\frac{g}{L}$) کمترین میزان رشد توده زیستی را از خود نشان داد. Paise در سال ۱۹۸۳ گزارش کرد تیتانیوم به عنوان یک عنصر سودمند، باعث افزایش و تحریک رشد گیاهان و قارچ‌ها می‌شود. این عنصر می‌تواند جذب برخی از عناصر نظیر نیتروژن، فسفر، کلسیم، منیزیم، آهن، منگنز و روی را افزایش دهد. Singh و همکاران در سال ۲۰۲۰ گزارش کردند عناصر در اندازه نانو نسبت به اندازه واقعی آسانتر جذب سلول می‌شوند. به دنبال گزارشات قبل و با بدست آمدن این نتایج، اثر بخشی استفاده از نانوذره دی اکسید تیتانیوم بر میزان رشد توده زیستی قارچ گانودرما لوسیدم تایید شد. با این وجود در طی پژوهشی Singh و همکاران در سال ۲۰۲۰ دو آزمایش انجام دادند. در آزمایش اول به بررسی تاثیر دی اکسید تیتانیوم در اندازه واقعی و نانو بر میزان رشد میسلیم قارچ گانودرما لوسیدم در محیط کشت PDA پرداختند. آنها گزارش کردن میزان رشد میسلیم در محیط کشت حاوی نانوذره دی اکسید تیتانیوم نسبت به محیط کشت حاوی عنصر دی اکسید تیتانیوم بیشتر بود. محققین اذعان کردند نانوذره دی اکسید تیتانیوم به دلیل سبکتر و کوچکتر بودن نسبت به اندازه واقعی آن، حلالیت بیشتری داشته پس در نتیجه آسانتر جذب سلول می‌شود. در آزمایش دوم آنها غلظت‌های ($\frac{mg}{L}$) ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ نانوذره دی اکسید تیتانیوم را بر میزان رشد میسلیم چهار نژاد مختلف قارچ گانودرما لوسیدم در محیط کشت PDA بررسی کردند. آنها گزارش کردند غلظت مورد نیاز برای حداکثر رشد میسلیم وابسته به نژاد می‌باشد. برای همین فقط در یکی از نژادها با افزایش غلظت نانوذره دی اکسید تیتانیوم، میزان رشد میسلیم افزایش پیدا کرد که با نتایج این پژوهش مطابقت داشت.

در طی پژوهشی رزقی جهرمی در سال ۱۳۹۶ به بررسی تاثیر غلظت نانوذره کلسیم بر میزان رشد توده زیستی سه نژاد گانودرما لوسیدم در محیط کشت مایع پرداختند. آنها گزارش کردند، بیشترین میزان رشد توده زیستی توسط نژاد G.19 در محیط کشت مایع حاوی ۶ mM نانوذره کلسیم مشاهده شد. آنها اذعان کردند غلظت نانوذره و نژاد قارچ دو عامل اصلی تاثیرگذار بر میزان رشد توده زیستی می‌باشد. در مطالعه‌ای Darzian-Rostami و همکاران در سال ۲۰۲۰ تاثیر نانو اکسید گرافن را در غلظت‌های مختلف بر میزان رشد توده زیستی قارچ گانودرما لوسیدم در محیط کشت مایع بررسی کردند. آنها گزارش کردن اکسید گرافن در تمامی غلظت‌ها تاثیر منفی بر رشد توده زیستی داشته است.



شکل ۴-۱۰: تاثیر غلظت نانوذره دی اکسید تیتانیوم بر میزان رشد توده زیستی

۲-۱-۴-۱-۴ تاثیر نانوذره دی اکسید تیتانیوم بر میزان تشکیل پلی ساکارید همان طور که در شکل ۴-۱۱ نشان داده شده است، نمونه شاهد ($\frac{1}{3} \frac{g}{L}$) بیشترین میزان تشکیل پلی ساکارید را از خود نشان داد. نانوذره دی اکسید تیتانیوم در هر سه غلظت تاثیر منفی بر میزان تشکیل پلی ساکارید داشت. Carvajal و Alcaraz در سال ۱۹۹۸ پژوهشی در مورد گیاهان انجام دادند، که با نتایج این پژوهش سازگار بود. آنها گزارش کردند، دانستن اینکه عنصر تیتانیوم در سنتز یا تخریب پلی ساکارید گیاهان تاثیر میگذارد بسیار دشوار است. آنها پس از تیمار کردن گیاه با عنصر تیتانیوم مشاهده کردند، رشد گیاه افزایش و میزان تشکیل پلی ساکارید کاهش یافته است.

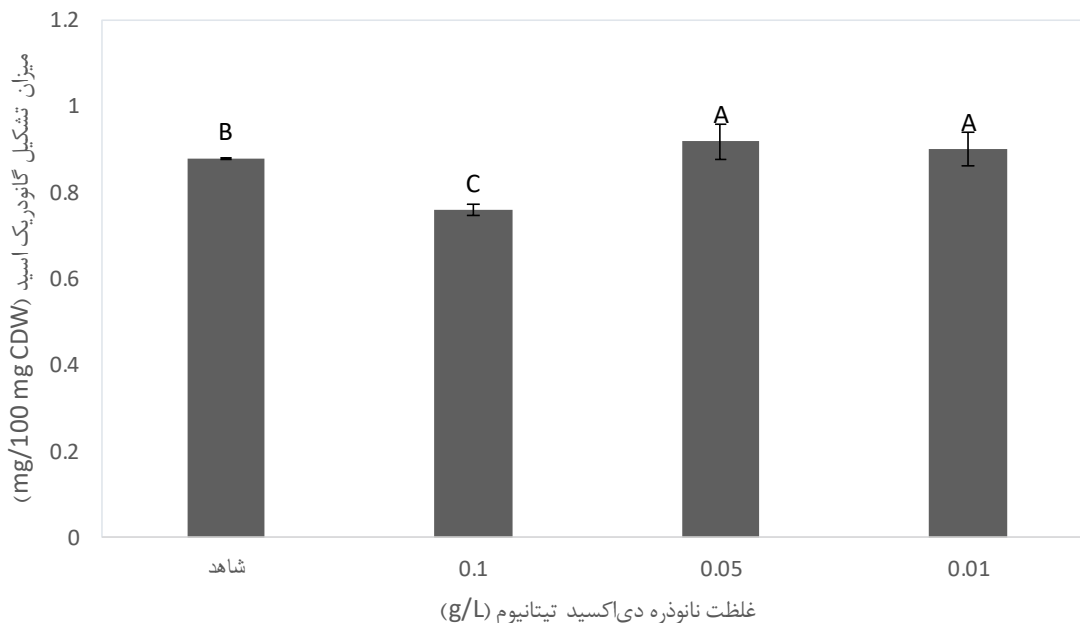


شکل ۴-۱۱: تاثیر غلظت نانوذره دی اکسید تیتانیوم بر میزان تشکیل پلی ساکارید توده زیستی

۳-۱-۴-۱ تاثیر نانوذره دی اکسید تیتانیوم بر میزان تشکیل گانودریک / اسید همان طور که در شکل ۴-۱۲ مشخص شده، ابتدا محیط کشت حاوی $\frac{0.5}{L}$ دی اکسید تیتانیوم $(\frac{mg}{100 mg CDW})$ و سپس محیط کشت حاوی $\frac{0.1}{L}$ نانوذره دی اکسید تیتانیوم $(\frac{mg}{100 mg CDW})$ ، بیشترین میزان تشکیل گانودریک اسید را نشان دادند. میزان تشکیل گانودریک اسید در محیط کشت حاوی $\frac{0.1}{L}$ نانوذره دی اکسید تیتانیوم نسبت به نمونه شاهد کمتر بود. بنابراین در آزمایش بررسی اثر ترکیبی سطوح مختلف کربن و نیتروژن برای تولید بهینه گانودریک اسید، از $\frac{0.5}{L}$ دی اکسید تیتانیوم استفاده شد.

در طی پژوهشی رزقی جهرمی در سال ۱۳۹۶ به بررسی تاثیر سه غلظت (۴، ۶ و ۸) نانوذره کلسیم بر میزان تشکیل گانودریک اسید سه نژاد (G.L، G.20، G.19) گانودرما لوسیدم در محیط کشت مایع پرداخت. در نژاد G.20 بیشترین میزان تشکیل گانودریک اسید در نمونه شاهد صورت گرفت. در دو نژاد G.L و G.19 به ترتیب در غلظت‌های ۴ و ۶ بیشترین میزان تشکیل گانودریک اسید بدست آمد. ایشان گزارش کرد، نژادهای مختلف قارچ گانودرما لوسیدم پاسخ‌های متفاوتی به نانوذره کلسیم می‌دهند. پس در نتیجه علاوه بر غلظت نانوذره کلسیم، ژنتیک نژاد قارچ گانودرما لوسیدم تاثیر معنی‌داری بر میزان تشکیل گانودریک اسید دارد. Rostami-Darzian و همکاران در سال ۲۰۲۰ به بررسی تاثیر غلظت‌های مختلف نانوذره اکسید گرافن بر میزان تشکیل گانودریک اسید توده زیستی پرداختند. آنها گزارش کردند، نمونه شاهد که فاقد نانوذره اکسید گرافن بود، بیشترین میزان تشکیل گانودریک اسید توده زیستی را از خود نشان داد. پس در نتیجه نانوذره اکسید گرافن تاثیر منفی بر میزان تشکیل

گانودریک اسید دارد.



شکل ۴-۱۲: تاثیر غلظت نانوذره دی اکسید تیتانیوم بر میزان تشکیل گانودریک اسید توده زیستی

۴-۱-۴-۲ نانوذره اکسید منیزیم

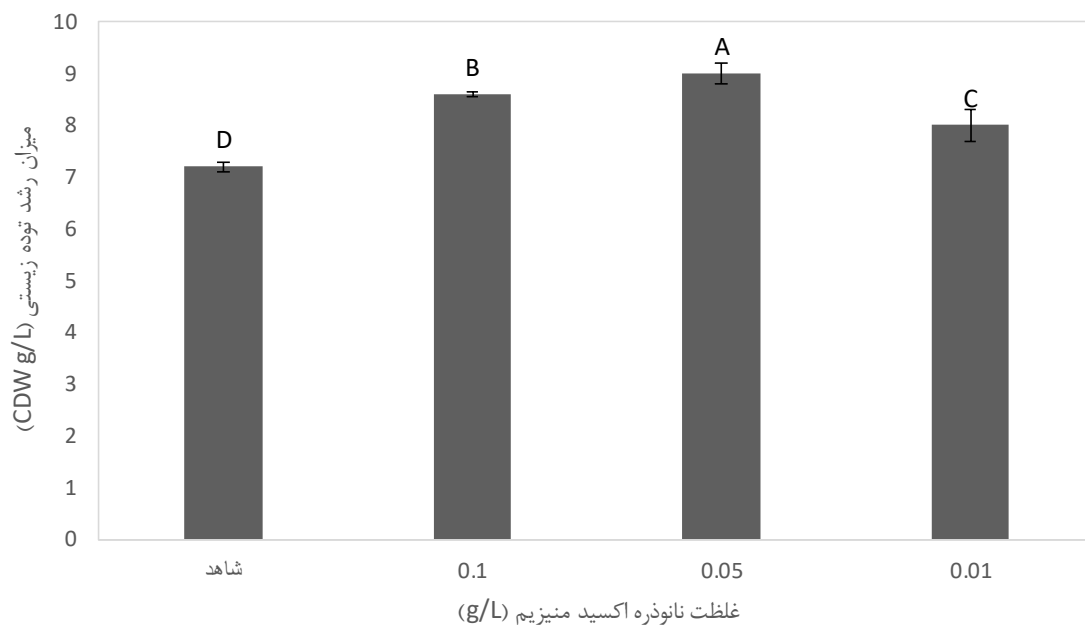
۴-۱-۴-۲-۱ تاثیر نانوذره اکسید منیزیم بر میزان رشد توده زیستی

همان طور که در شکل ۴-۱۳ نشان داده شده، میزان رشد توده زیستی در محیط های کشت حاوی هر سه غلظت نانوذره اکسید منیزیم نسبت به نمونه شاهد بیشتر بود. با این وجود در محیط کشت حاوی $\frac{9}{L}$ نانوذره اکسید منیزیم بیشترین ($\frac{9}{L}$ CDW) میزان رشد توده زیستی مشاهده شد.

Simonici و همکاران در سال ۲۰۰۸ طی پژوهش عنصر منیزیم را در سه غلظت ۱، ۲ و ۴ بررسی کردند، که با نتایج این پژوهش سازگار بود. آنها گزارش کردند محیط کشت حاوی ۲ mM عنصر منیزیم بیشترین رشد توده زیستی را داشته است. آنها اذعان کردند به دلیل نقش موثر عنصر منیزیم در سنتز پروتئین ها، فعال سازی آنزیم ها، جذب آنزیم ها و توزیع هیدروکربن های سلول گیاهان و قارچ ها، استفاده از غلظت مناسب آن در محیط کشت گیاهان و قارچ ها باعث افزایش رشد توده زیستی می شود. نتایج حاصل از پژوهش Yuan و همکاران در سال ۲۰۱۲ با نتایج این پژوهش سازگار بود. آنها گزارش کردند، با افزایش غلظت یون فلزی منیزیم تا $\frac{3}{L}$ میزان رشد توده زیستی افزایش پیدا کرد، و با افزایش بیشتر آن میزان رشد توده زیستی کاهش یافت.

Darzian-Rostami و همکاران در سال ۲۰۲۰ گزارش کردند نانوذره اکسید گرافن در تمامی غلظت ها تاثیر منفی بر میزان رشد توده زیستی داشته است. Poyedinok و همکاران در سال ۲۰۲۰ به بررسی

تاثیر سه نانوذره فلزی بر میزان رشد توده زیستی قارچ *Inonotus obliquus* پرداختند. آنها گزارش کردند، بیشترین میزان رشد توده زیستی در محیط کشت حاوی نانوذره اکسید منیزیم بدست آمده است. آنها اذعان کردند علاوه بر نوع و غلظت نانوذره، اندازه و روش تولید نانوذره بر میزان رشد توده زیستی قارچ تاثیر گذار است. نتایج حاصل از پژوهش Zhang و Cui در سال ۲۰۱۱ با نتایج این پژوهش مغایرت داشت. آنها گزارش کردند یون فلزی منیزیم تاثیر قابل توجه‌ای بر میزان رشد توده زیستی قارچ گانودرما لوسیدم نداشت. رزقی جهرمی در سال ۱۳۹۶ در پژوهش خود گزارش کرد، در دو نژاد G.20 و G.19 با افزایش غلظت نانوذره اکسید روی تا ۶ mM میزان رشد توده زیستی افزایش یافت و سپس در غلظت بالاتر کاهش پیدا کرد.

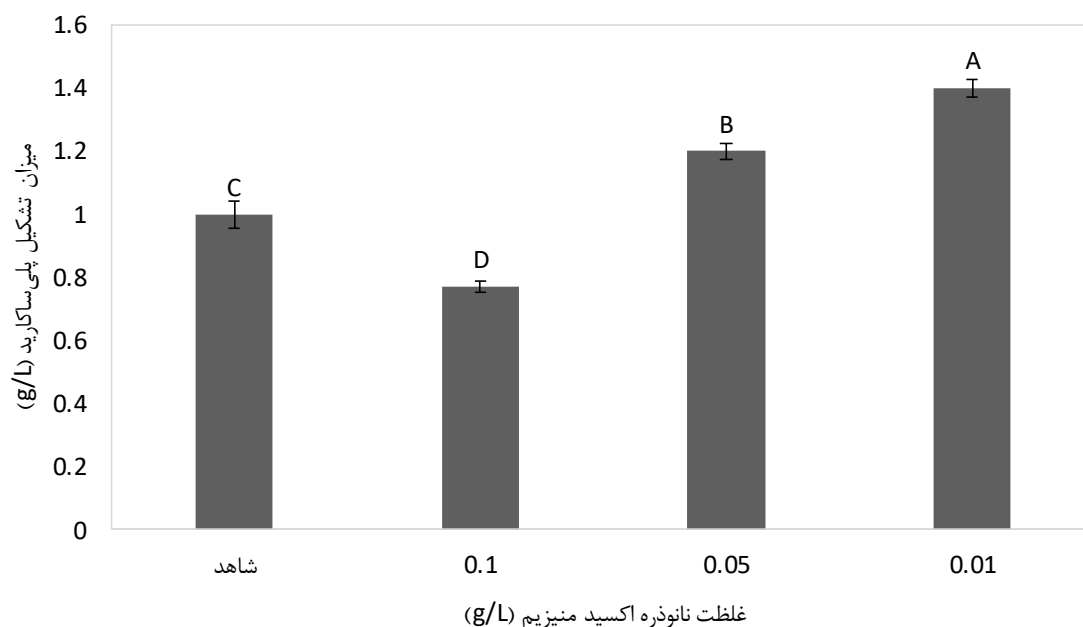


شکل ۴-۱۳: تاثیر غلظت نانوذره اکسید منیزیم بر میزان رشد توده زیستی

۲-۲-۴-۱-۴ تاثیر نانوذره اکسید منیزیم بر میزان تشکیل پلی ساکارید

همانطور که در شکل ۴-۱۴ مشخص است، ابتدا محیط کشت حاوی $\frac{0.1}{L}$ نانوذره اکسید منیزیم ($\frac{g}{L}$) و سپس محیط کشت حاوی $\frac{0.05}{L}$ نانوذره اکسید منیزیم ($\frac{g}{L}$) (بیشترین میزان تشکیل پلی ساکارید را داشتند). میزان تشکیل پلی ساکارید در نمونه شاهد نسبت به محیط کشت حاوی $\frac{0.1}{L}$ نانوذره اکسید منیزیم بیشتر بود. در مجموع با افزایش غلظت نانوذره اکسید منیزیم میزان تشکیل پلی ساکارید توده زیستی کاهش یافت. بنابراین در آزمایش بررسی اثر ترکیبی سطوح مختلف منبع کربن و نیتروژن محیط کشت، برای تولید بهینه پلی ساکارید توده زیستی، از غلظت $\frac{0.1}{L}$ نانوذره اکسید منیزیم استفاده شد.

Simonic در سال ۲۰۰۸ گزارش کرد، با افزایش غلظت یون فلزی منیزیم میزان تشکیل پلی ساکارید کاهش پیدا می کند که با نتایج این پژوهش سازگار بود. Poyedinok و همکاران در سال ۲۰۲۰ گزارش کردند میزان تشکیل پلی ساکارید توده زیستی قارچ *Inonotus obliquus* در محیط کشت حاوی نانوذره اکسید منیزیم نسبت به نمونه شاهد ۴۶٪ افزایش داشت، که مشابه نتایج این پژوهش بود. در پژوهشی دیگر Yuan و همکاران در سال ۲۰۱۲ گزارش کردند، حداکثر میزان تشکیل پلی ساکارید در محیط کشت حاوی حداقل میزان یون فلزی منیزیم بدست آمده است. آنها اذعان کردند، با افزایش غلظت یون فلزی منیزیم، تمایل توده زیستی بیشتر به رشد می باشد و کمتر انرژی صرف تولید پلی ساکارید می کند.

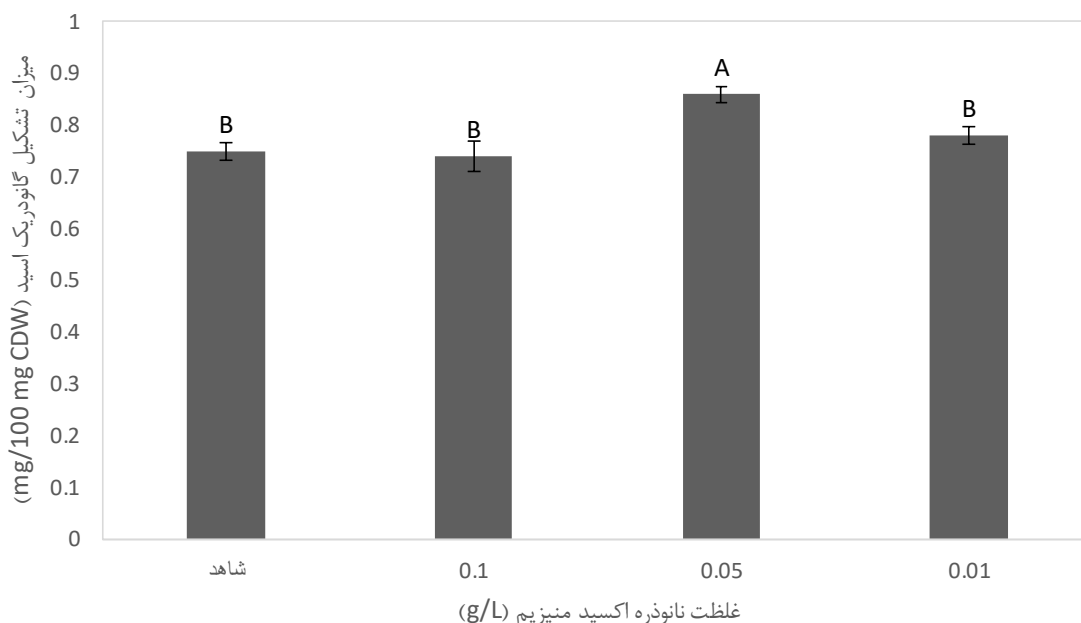


شکل ۴-۱۴: تاثیر غلظت نانوذره اکسید منیزیم بر میزان تشکیل پلی ساکارید توده زیستی

۳-۲-۴-۱- تاثیر نانوذره اکسید منیزیم بر میزان تشکیل گانودریک اسید همانطور که در شکل ۴-۱۵ آمده است، ابتدا محیط های کشت حاوی $\frac{g}{L}$ ۰/۰۵ نانوذره اکسید منیزیم ($\frac{mg}{100 mg CDW}$ ۰/۷۸) و سپس محیط کشت حاوی $\frac{g}{L}$ ۰/۰۱ نانوذره اکسید منیزیم ($\frac{mg}{100 mg CDW}$ ۰/۸۶) بیشترین میزان تشکیل گانودریک اسید توده زیستی را از خود نشان دادند. اختلاف معنی داری بین محیط های کشت حاوی $\frac{g}{L}$ ۰/۱ و ۰/۰۱ نانوذره اکسید منیزیم و نمونه شاهد مشاهده نشد. بنابراین در آزمایش بررسی اثر ترکیبی سطوح مختلف منبع کربن و نیتروژن محیط کشت، برای تولید بهینه گانودریک اسید توده زیستی، از غلظت $\frac{g}{L}$ ۰/۰۵ نانوذره اکسید منیزیم استفاده شد.

رزقی جهرمی در سال ۱۳۹۶ به بررسی تاثیر غلظت های ۴، ۶ و ۸ نانوذره اکسید روی بر میزان تشکیل گانودریک اسید توده زیستی سه نژاد G.19، G.20 و G.L قارچ گانودرما لوسیدم پرداخت. ایشان

گزارش کرد، توده زیستی نژاد G.L بهترین نژاد در پاسخ به نانوذره اکسید روی بود، که بیشترین گانودریک اسید را تولید کرد. سپس گزارش کرد غلظت ۴ mM بهترین غلظت نانوذره اکسید منیزیم برای هر سه نژاد بود. Darzian-Rostami و همکاران در سال ۲۰۲۰ گزارش کردند، توده زیستی در محیط کشت حاوی $50 \frac{mg}{L}$ نانوذره اکسید گرافن کاهیده نسبت به نمونه شاهد گانودریک اسید بیشتری تولید می‌کند.



شکل ۴-۱۵: تاثیر غلظت نانوذره اکسید منیزیم بر میزان تشکیل گانودریک اسید توده زیستی

۵-۱-۴ اثر ویتامین پیریدوکسین (B_6)

ویتامین‌ها ترکیبات آلی هستند که به مقدار خیلی جزئی برای سوخت و ساز مواد غذایی و اعمال حیاتی سلول ضرورت دارند، یا به عبارت دیگر ویتامین‌ها انرژی تولید نمی‌کنند ولی برای انجام واکنش‌های انرژی‌زا لازم می‌باشند. ویتامین‌ها به دو دسته: ویتامین‌های محلول در چربی همچون ویتامین E و ویتامین‌های محلول در آب همچون ویتامین‌های گروه B تقسیم می‌شوند (Depeint et al., 2006). به طور کلی تمامی ویتامین‌های گروه B در متابولیسم سلول‌ها یا نقش کوآنزیم‌ها را دارا هستند، و یا در ساختار کوآنزیم‌ها مشارکت دارند؛ که باعث افزایش رشد و تقسیم سلول‌های قارچی می‌شوند. طی پژوهشی Adenipekun و Gbolagade در سال ۲۰۰۶ گزارش کردند، استفاده از غلظت‌های پایین ویتامین‌های گروه B در محیط کشت قارچ‌ها باعث افزایش رشد میسلیم قارچ‌ها می‌شود (Adenipekun and Gbolagade, 2006). با این وجود با توجه به مطالعات صورت گرفته، پژوهشی با موضوع تاثیر ویتامین پیریدوکسین (B_6) بر میزان رشد و تشکیل متابولیت‌های ثانویه (پلی‌ساکارید و گانودریک اسید)

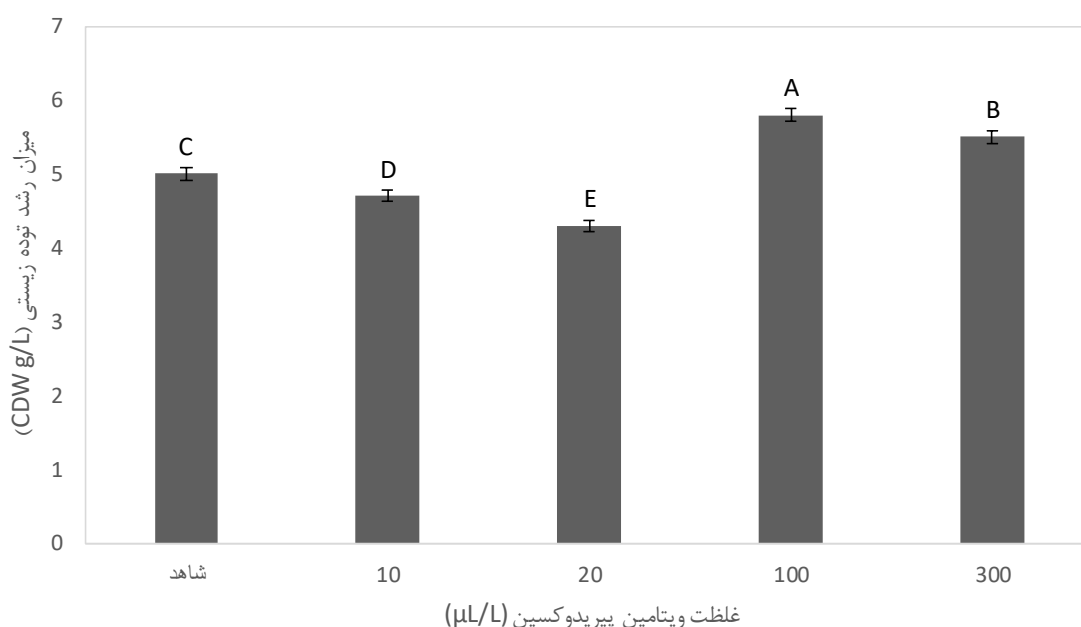
توده زیستی قارچ گانودرما لوسیدم در محیط کشت مایع مشاهده نشد.

در این تحقیق تاثیر ویتامین پیریدوکسین (B₆) در چهار غلظت ($\frac{\mu L}{L}$) ۱۰، ۲۰، ۱۰۰ و ۳۰۰ بر میزان رشد و تشکیل متابولیت‌های ثانویه (گانودریک اسید پلی ساکارید) توده زیستی قارچ گانودرما لوسیدم در محیط کشت مایع مورد بررسی قرار گرفتند. در این آزمایش از نمونه شاهد که فاقد ویتامین پیریدوکسین بود استفاده شد.

۴-۱-۵-۱ تاثیر ویتامین پیریدوکسین بر میزان رشد توده زیستی

همان طور که در شکل ۴-۱۶ آمده است، محیط کشت حاوی $\frac{100 \mu L}{L}$ پیریدوکسین بیشترین ($\frac{g}{L}$ CDW) میزان رشد توده زیستی را نشان داد. بعد از آن محیط کشت حاوی $\frac{300 \mu L}{L}$ پیریدوکسین بیشترین ($\frac{g}{L}$ CDW ۵/۵) میزان رشد توده زیستی را داشت. نمونه شاهد میزان رشد توده زیستی بیشتری را نسبت به دو غلظت دیگر ویتامین پیریدوکسین نشان داد. در مجموع با توجه به نتایج این آزمایش غلظت‌های بالای این ویتامین نسبت به غلظت‌های پایین آن تاثیر بهتری بر میزان رشد توده زیستی داشتند، که با یافته‌های پژوهش Arti و همکاران در سال ۲۰۱۳ سازگار بود. آنها تاثیر پنج نوع ویتامین را در پنج غلظت مخالف بر میزان رشد توده زیستی قارچ *Lentinus squarrosulus* مورد بررسی قرار دادند. آنها گزارش کردند، غلظت‌های بالای تمام ویتامین‌ها نسبت به غلظت‌های پایین آنها تاثیر بهتری بر میزان رشد توده زیستی قارچ دارند. در پژوهشی دیگر Chen و همکاران در سال ۲۰۱۱ گزارش کردند، میزان رشد توده زیستی قارچ *Fomes fomentarius* در نمونه شاهد نسبت به محیط کشت حاوی پیریدوکسین بیشتر می‌باشد. آنها اذعان کردند ترکیبی که مجموعه‌ای از ویتامین‌های گروه B را داشته باشد، مانند عصاره مخمر بیشترین تاثیر را بر میزان رشد توده زیستی می‌گذارد.

یافته‌های حاصل از پژوهش Jonathan و Fasidi در سال ۲۰۰۱ اهمیت ویتامین پیریدوکسین را تایید کرد. آنها بعد از بررسی ۹ ویتامین گزارش کردند، بیشترین میزان رشد توده زیستی قارچ *Schizophyllum commune* در محیط کشت حاوی ویتامین پیریدوکسین بدست آمده است. آنها اذعان کردند در بعضی از قارچ‌ها ویتامین پیریدوکسین به فسفات فعال تبدیل می‌شود، که نقش مهمی در سنتز اسید آمینه تریپتوفان (یک اسید آمینه مورد نیاز برای رشد) دارد. به همین علت ویتامین پیریدوکسین در محیط کشت بعضی از قارچ‌ها نسبت به سایر ویتامین‌ها برتری دارد. Jo و همکاران در سال ۲۰۰۹ به بررسی تاثیر پنج نوع ویتامین بر میزان رشد توده زیستی قارچ گانودرما لوسیدم در محیط کشت آگاردار پرداختند. آنها گزارش کردند، به ترتیب محیط‌های کشت حاوی تیامین، بیوتین و پیریدوکسین بیشترین تاثیر را بر میزان رشد توده زیستی از خود نشان دادند.



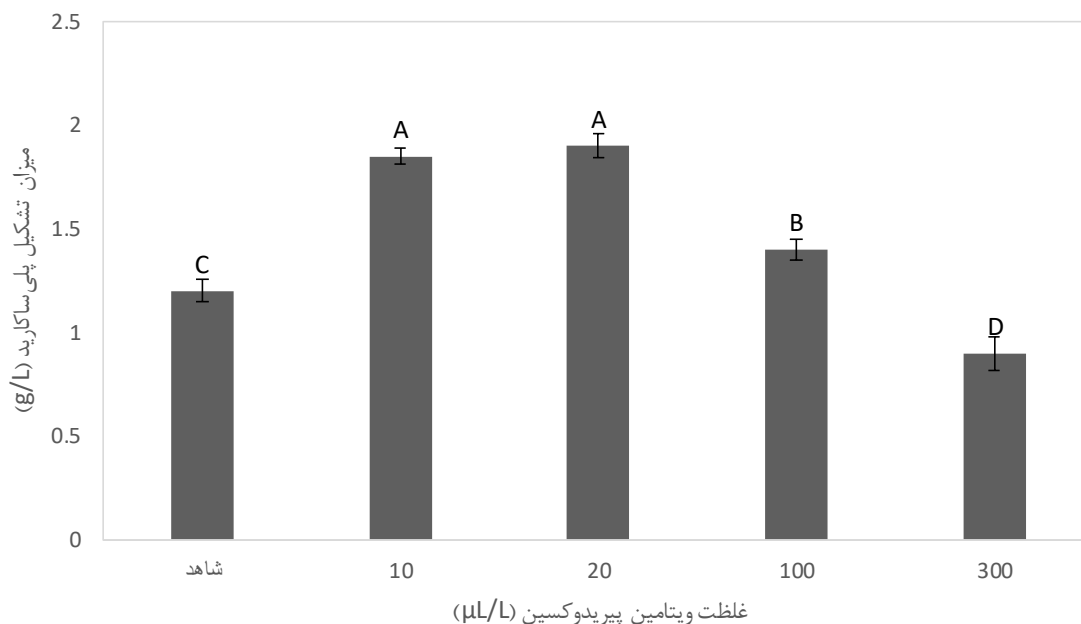
شکل ۴-۱۶: تاثیر غلظت ویتامین پیریدوکسین بر میزان رشد توده زیستی

۴-۱-۵-۲ تاثیر ویتامین پیریدوکسین بر میزان تشکیل پلی ساکارید

همانطور که در شکل ۴-۱۷ نشان داده شده، محیط کشت حاوی $20 \frac{\mu L}{L}$ ویتامین پیریدوکسین بیشترین ($1/9 \frac{g}{L}$) میزان تشکیل پلی ساکارید را داشت. بعد از آن محیط کشت حاوی $10 \frac{\mu L}{L}$ ویتامین پیریدوکسین بیشترین ($1/85 \frac{g}{L}$) میزان تشکیل پلی ساکارید را از خود نشان داد. محیط کشت حاوی $300 \frac{\mu L}{L}$ ویتامین پیریدوکسین کمترین ($0/9 \frac{g}{L}$) میزان تشکیل پلی ساکارید را داشت. در مجموع میانگین این نتایج نشان داد، غلظت‌های پایین ویتامین پیریدوکسین نسبت به غلظت‌های بالا آن تاثیر بهتری بر میزان تشکیل پلی ساکارید توده زیستی می‌گذارد. احتمال می‌رود غلظت‌های بالای ویتامین پیریدوکسین، توده زیستی را از لحاظ متابولیکی بیشتر تحریک به رشد می‌کند، و انرژی بیشتر صرف رشد توده زیستی می‌شود. به همین دلیل پلی ساکارید کمتری تولید می‌شود. بنابراین در آزمایش بررسی اثر ترکیبی سطوح مختلف منبع کربن و نیتروژن محیط کشت، برای تولید بهینه پلی ساکارید توده زیستی، از $20 \frac{\mu L}{L}$ ویتامین پیریدوکسین استفاده شد.

Malinowska و همکاران در سال ۲۰۰۹ با بررسی چهار نوع ویتامین، اهمیت ویتامین پیریدوکسین را تایید کردند. آنها گزارش کردند، در محیط کشت حاوی ویتامین پیریدوکسین بیشترین میزان تشکیل پلی ساکارید توده زیستی قارچ *Hericium erinaceum* مشاهده شد. سپس اذعان کردند، ویتامین‌ها در غلظت پایین تاثیر بهتری بر میزان تشکیل پلی ساکارید توده زیستی دارند، که با نتایج این پژوهش مطابقت داشت. در پژوهشی دیگر Lin و Chen در سال ۲۰۰۷ گزارش کردن، با افزایش غلظت ویتامین

تیامین در محیط کشت میزان تشکیل پلی ساکارید توده زیستی قارچ *Antrodia cinnamomea* افزایش یافت.



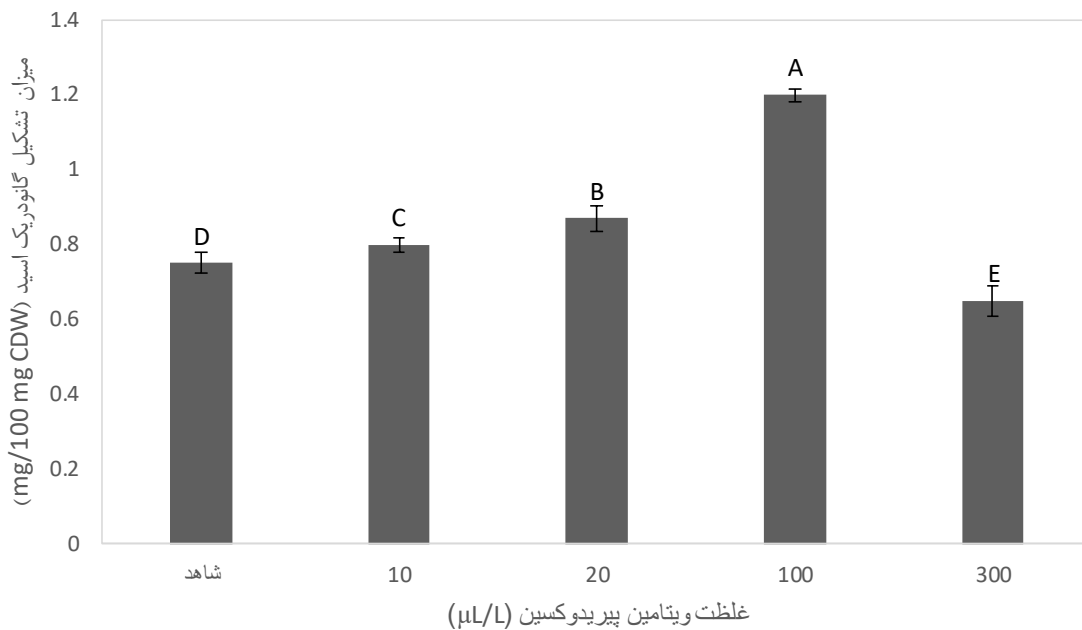
شکل ۴-۱۷: تاثیر غلظت ویتامین پیریدوکسین بر میزان تشکیل پلی ساکارید توده زیستی

۳-۵-۱-۴ تاثیر ویتامین پیریدوکسین بر میزان تشکیل گانودریک اسید

همان طور که در شکل ۴-۱۸ مشخص است، محیط کشت حاوی $100 \frac{\mu L}{L}$ ویتامین پیریدوکسین بیشترین ($\frac{1}{2} \frac{mg}{100 mg CDW}$) میزان تشکیل گانودریک اسید توده زیستی را نشان داد. محیط کشت حاوی $300 \frac{\mu L}{L}$ ویتامین پیریدوکسین کمترین ($\frac{0.65}{100 mg CDW}$) میزان تشکیل گانودریک اسید توده زیستی را داشت. در مجموع با توجه به نتایج بدست آمده، با افزایش غلظت ویتامین پیریدوکسین تا $100 \frac{\mu L}{L}$ میزان تشکیل گانودریک اسید افزایش پیدا کرد، ولی در غلظت بالاتر یعنی $300 \frac{\mu L}{L}$ به شدت کاهش یافت. بنابراین در آزمایش بررسی اثر ترکیبی سطوح مختلف منبع کربن و نیتروژن محیط کشت، برای تولید بهینه گانودریک اسید، از ویتامین پیریدوکسین در غلظت $100 \frac{\mu L}{L}$ استفاده شد.

این تحقیق نشان داد ویتامین پیریدوکسین در صورتی بر میزان تشکیل گانودریک اسید توده زیستی اثر گذار است، که از غلظت مناسب آن استفاده شود. باتوجه به مطالعات انجام شده، تاکنون پژوهشی با موضوع تاثیر غلظت های مختلف ویتامین پیریدوکسین بر میزان تشکیل گانودریک اسید توده زیستی قارچ صورت نگرفته است. با این وجود در اکثر پژوهش های که با هدف افزایش تشکیل گانودریک اسید توده زیستی قارچ گانودرما لوسیدم انجام شده، همچون پژوهش Wei و همکاران در سال ۲۰۱۶ یا پژوهش

Zhong و Fang در سال ۲۰۰۲ از ویتامین‌های B₁ یا B₆ در محیط‌های کشت مایع پایه آنها استفاده شده است.



شکل ۴-۱۸: تاثیر غلظت ویتامین پیریدوکسین بر میزان تشکیل گانودریک اسید توده زیستی

۲-۴ بخش دوم

کربن و نیتروژن مهمترین اجزای تشکیل‌دهنده محیط کشت قارچ‌ها می‌باشند. توازن غلظت این دو عنصر در محیط کشت، به شدت بر میزان رشد و تشکیل متابولیت‌های ثانویه توده زیستی قارچ‌ها تاثیر گذار است (Tuli et al., 2014). در این بخش برای بهینه سازی تولید پلی ساکارید و گانودریک اسید توده زیستی قارچ گانودرما لوسیدم در محیط کشت مایع، با استفاده از روش آماری سطح پاسخ اثر ترکیبی منبع کربنی و منبع نیتروژنی محیط کشت مایع در دو آزمایش مورد بررسی قرار گرفت. روش سطح پاسخ یک رویکرد آماری برای طراحی آزمایشات، بررسی تاثیر عوامل مختلف و یافتن شرایط بهینه برای بازدهی مطلوب می‌باشد. این روش به طور وسیعی برای بهینه سازی محیط کشت میکروارگانیسم‌ها استفاده می‌شود. به طور کلی در آزمایشات بهینه سازی، یک مدل ریاضی برای پیش بینی فرایند ایجاد می‌شود. طرح‌های بهینه سازی از عوامل کمتری نسبت به طرح‌های سنتی برخوردار بوده، ولی این عوامل شدیداً تاثیر گذار می‌باشند. (در این بخش پلی ساکارید بر حسب درصد وزن خشک توده زیستی بیان شد، و گانودریک اسید بر حسب میلی گرم در ۱۰۰ گرم وزن خشک توده زیستی بیان شد).

۱-۲-۴ آزمایش اول

هدف از این آزمایش افزایش میزان تشکیل پلی ساکارید از توده زیستی قارچ گانودرما لوسیدم در محیط کشت مایع بود. بازه‌ای از دو ترکیب کلیدی نشاسته گندم به عنوان منبع کربنی، و پودر آب پنیر به عنوان منبع نیتروژنی انتخاب گردید (جدول ۴-۱). سپس میزان این دو ترکیب با روش آماری RSM بهینه سازی شد.

جدول ۴-۱: متغیرهای کربن و نیتروژن در بهینه سازی و سطوح مختلف آنها

عامل	سطح				
	۱/۴۱۴۲	-۱	۰	۱	۱/۴۱۴۲
نشاسته گندم ($\frac{g}{L}$)	۱۹/۸۲۲۳۳	۲۵	۳۷/۵	۵۰	۵۵/۱۷۷۶۷
پودر آب پنیر ($\frac{g}{L}$)	۵/۸۵۷۸۶۴	۱۰	۲۰	۳۰	۳۴/۱۴۲۱۴

طرح مرکب مرکزی روش سطح پاسخ به همراه میزان واقعی داده‌ها در جدول ۴-۲ گزارش شده است. همان طور که در جدول ۴-۲ مشخص است، با ثابت نگه داشتن منبع نیتروژنی پودر آب پنیر در غلظت $\frac{g}{L}$ ۱۰ و افزایش غلظت منبع کربنی نشاسته گندم از $\frac{g}{L}$ ۲۵ به ۵۰ میزان تشکیل پلی ساکارید از ۱۵٪ به ۱۹٪ افزایش یافت (نمونه ۴ و ۹). در حالی که با ثابت نگه داشتن منبع نیتروژنی پودر آب پنیر در غلظت $\frac{g}{L}$ ۳۰ و افزایش غلظت منبع کربنی نشاسته گندم از $\frac{g}{L}$ ۲۵ به ۵۰ میزان تشکیل پلی ساکارید از ۱۷/۷٪ به ۲۰٪ افزایش یافت (نمونه ۶ و ۷). این نتایج نشان می‌دهد در غلظت ثابت بالای پودر آب پنیر، افزایش غلظت منبع کربنی نشاسته گندم اثر کمتری بر میزان تشکیل پلی ساکارید دارد. همان گونه که در جدول ۴-۲ آمده است با ثابت نگه داشتن منبع نیتروژنی پودر آب پنیر در غلظت $\frac{g}{L}$ ۲۰ و افزایش غلظت منبع کربنی نشاسته گندم از $\frac{g}{L}$ ۱۹/۸۲ به ۳۷/۵ در محیط کشت مایع، میزان تشکیل پلی ساکارید (۲۱/۵٪) به خوبی افزایش یافت. ولی افزایش غلظت منبع کربنی از ۳۷/۵ به ۵۵/۱۷ تاثیر منفی بر میزان تشکیل پلی ساکارید (۱۹٪) داشت. احتمال می‌رود این کاهش تولید پلی ساکارید به خاطر افزایش ترکیبات اسیدی محیط کشت مایع در غلظت بالای منبع کربنی باشد، که بر رشد و تولید متابولیت‌های ثانویه توده زیستی قارچ در محیط کشت مایع اثر منفی می‌گذارد (Cantri and Ghoul, 2015). همان طور که در شکل ۴-۲ نشان داده شده، نتایج حاصل از ثابت نگه داشتن غلظت منبع کربنی نشاسته گندم و ایجاد تغییر در غلظت منبع نیتروژنی پودر آب پنیر، با نتایج حاصل از ثابت نگه داشتن غلظت منبع نیتروژنی پودر آب پنیر و ایجاد تغییر در منبع کربنی نشاسته گندم شباهت داشت. چنین تحلیل می‌شود که هر دو منبع کربنی و نیتروژنی تقریباً به یک اندازه در تشکیل پلی ساکارید توده زیستی اهمیت دارند.

طی پژوهشی Fraga و همکاران در سال ۲۰۱۴ به بررسی پانزده سطح مختلف کربن و نیتروژن محیط کشت پرداختند. سپس گزارش کردند، در یک غلظت منبع نیتروژنی ثابت، افزایش یا کاهش زیاد غلظت منبع کربنی تاثیر منفی بر میزان تشکیل پلی ساکارید توده زیستی قارچ گانودرما لوسیدم در محیط کشت

مایع دارد، که با نتایج این تحقیق تقریباً سازگار بود. در پژوهشی دیگر Zeng و Chen در سال ۲۰۱۶ با بررسی چهار سطح مختلف کربن و نیتروژن (نشاسته ذرت و پودر سویا) محیط کشت گزارش کردند، هنگامی که در محیط کشت مایع، غلظت منبع کربنی دو برابر غلظت منبع نیتروژنی بود؛ بیشترین میزان تشکیل پلی ساکارید مشاهده شد. که با نتایج این تحقیق تقریباً مطابقت داشت. در پژوهشی دیگر Wei و همکاران در سال ۲۰۱۴ با استفاده از روش Steepest ascertain design چهار سطح مختلف کربن و نیتروژن محیط کشت را بر میزان تشکیل پلی ساکارید توده زیستی قارچ گانودرما لوسیدم بررسی کردند. آنها گزارش کردند زمانی که از $15 \frac{g}{L}$ منبع کربنی و $2 \frac{g}{L}$ منبع نیتروژنی در محیط کشت مایع استفاده شد، بیشترین میزان تشکیل پلی ساکارید توده زیستی مشاهده شد.

جدول ۴-۲: طراحی آزمایشات و نتایج دو متغیر اعمال شده

بر روی پاسخ در روش RSM			
منبع کربن		منبع نیتروژن	پلی ساکارید %
نمونه	نشاسته گندم	پودر آب پنیر	پاسخ مشاهده شده
۱	۳۷/۵	۵/۸۵۷۸۶۴	۱۵/۶
۲	۳۷/۵	۲۰	۲۱/۵
۳	۳۷/۵	۲۰	۲۰/۸
۴	۲۵	۱۰	۱۵
۵	۳۷/۵	۳۴/۱۴۲۱۴	۱۸/۳
۶	۵۰	۳۰	۲۰
۷	۲۵	۳۰	۱۷/۷
۸	۱۹/۸۲۲۳۳	۲۰	۱۶/۵
۹	۵۰	۱۰	۱۹
۱۰	۵۵/۱۷۷۶۷	۲۰	۱۹

جدول ۴-۳ ضرایب رگرسیون و مقادیر p را برای مدل‌های رگرسیون نشان می‌دهد. اثرات خطی پودر آب پنیر (A) و نشاسته گندم (B) بر میزان تشکیل پلی ساکارید در محیط کشت مایع معنی‌دار می‌باشد ($P < 0.05$). در مورد اثر درجه دوم بر میزان تشکیل پلی ساکارید هر دو عامل معنی‌دار است ($P < 0.05$). همچنین مدل نهایی معنی‌دار است، که نشان دهنده بر ارزش خوب مدل می‌باشد ($P < 0.05$). همان‌طور که در جدول ۴-۳ مشخص است، میزان F نشاسته گندم از پودر آب پنیر بیشتر است. این موضوع نشان می‌دهد، نشاسته گندم تاثیر بیشتری بر میزان تشکیل پلی ساکارید دارد.

جدول ۴-۳: پارامترهای ANOVA برای تولید پلی ساکارید

منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربع	P	F
پلی ساکارید	پلی ساکارید	پلی ساکارید	پلی ساکارید	پلی ساکارید
مدل	۵	۸/۰۵۲۱۴۳	۰/۰۰۸۱۸۵	۱۷/۲۸۵۹
A-پودر آب پنیر	۱	۷/۰۶۵۷۸	۰/۰۱۷۶۲۱	۱۵/۱۶۸۳۶
B-نشاسته گندم	۱	۱۲/۰۹۲۲۲	۰/۰۰۷۰۰۷	۲۵/۹۵۸۹۱
A ²	۱	۱۷/۴۹۴۴۶	۰/۰۰۳۵۹۲	۳۷/۷۶۷۹۲
B ²	۱	۱۱/۰۷۱۶۱	۰/۰۰۸۱۸۹	۲۳/۷۶۷۹۲
باقی مانده	۴	۰/۴۶۵۸۲۱		
عدم تطابق	۳	۰/۵۳۹۴۲۹	۰/۴۵۱۳۶۶	۲/۲۰۱۷۴۹
خطای خالص	۱	۰/۲۴۵		

معادله (۱) مدل رگرسیون را برای تولید پلی ساکارید در محیط کشت مایع پس از تجزیه تحلیل نتایج توسط نرم افزار Design expert نشان می دهد. ضرایب مدل چند جمله ای درجه دوم پس از تجزیه و تحلیل توسط نرم افزار و حذف عبارات غیر معنی دار توسط روش Forward در نرم افزار بدست آمد، که نتیجه حاصل معادله (۱) است. در معادله (۱) P.S مقدار پلی ساکارید می باشد. A و B به ترتیب مربوط به مقادیر پودر آب پنیر و نشاسته گندم ($\frac{g}{L}$) می باشد. مقدار عددی ضریب تبیین (R^2) برای فرمول تولید پلی ساکارید ۰/۹۵۵۸ می باشد؛ که نشان دهنده میزان انطباق داده ها در مدل رگرسیون می باشد. می توان از مقدار عددی ضریب تبیین چنین نتیجه گرفت، که مدل های رگرسیون به خوبی توانسته اند رابطه بین شرایط کشت (نشاسته گندم و پودر آب پنیر) و میزان تشکیل پلی ساکارید توده زیستی قارچ در محیط کشت مایع را نشان داده و پیش بینی کنند.

معادله (۱):

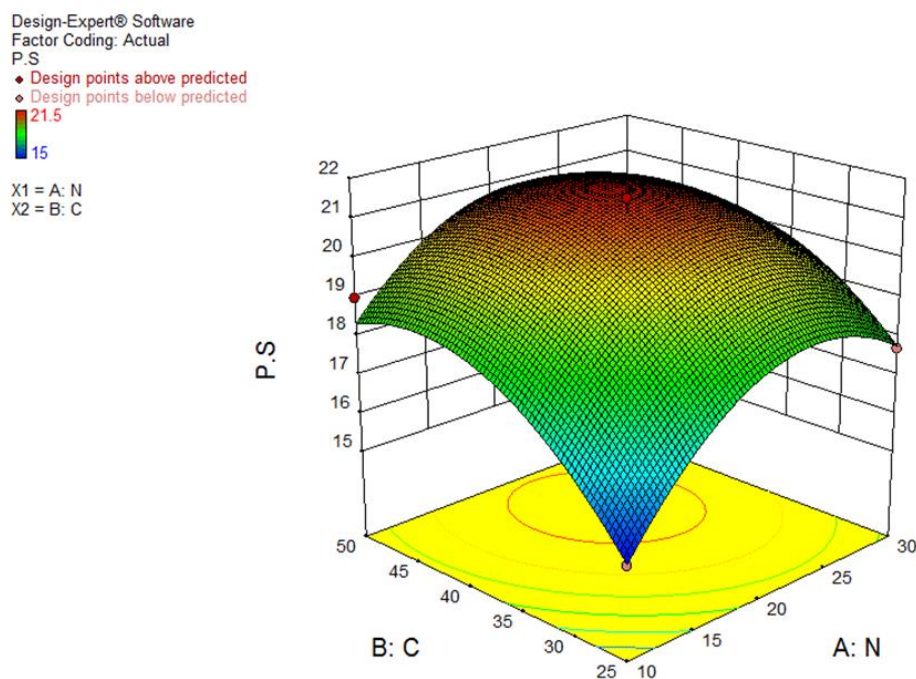
$$P.S = -8.79917 + 1.00398 \times A + 0.91336 \times B - 3.40000E - 0.019562 \times A^2 - 9.96000E - 0.03 \times B^2$$

۱-۲-۴ نتایج میزان تشکیل پلی ساکارید

شکل ۴-۱۹ اثر ترکیبی سطوح مختلف منبع کربنی نشاسته گندم و منبع نیتروژنی پودر آب پنیر را بر میزان تشکیل پلی ساکارید توده زیستی قارچ در محیط کشت مایع نشان می دهد. همان طور که در منحنی سطح پاسخ مشخص است، بیشترین میزان تشکیل پلی ساکارید تقریباً در سطوح حد واسط به

بالای نشاسته گندم و پودر آب پنیر می‌باشد. بیشترین میزان تشکیل پلی‌ساکارید با مقدار ۲۱/۵٪ در محیط کشت مایع حاوی غلظت $\frac{g}{L}$ ۳۷/۵ نشاسته گندم و $\frac{g}{L}$ ۲۰ پودر آب پنیر مشاهده شد. کمترین میزان تشکیل پلی‌ساکارید با مقدار ۱۵٪ در محیط کشت مایع حاوی غلظت ۱۰ نشاسته گندم و ۲۵ پودر آب پنیر ($\frac{g}{L}$) بدست آمد.

طی پژوهشی که Diamantopoulou و همکاران در سال ۲۰۱۶ بر روی توده زیستی قارچ *Volvariella volvacea* در محیط کشت مایع انجام دادند، گزارش کردند زمان تخمیر بر میزان تشکیل پلی‌ساکارید توده زیستی اثر گذار است. آنها اذعان کردند در زمان تخمیر کمتر از ۱۴ روز، بیشترین میزان تشکیل پلی‌ساکارید در محیط کشت مایع حاوی مقادیر بالای منبع کربنی و نیتروژنی مشاهده شد، که با نتایج این پژوهش سازگار بود. ولی در زمان تخمیر بیشتر از ۱۴ روز، بیشترین میزان تشکیل پلی‌ساکارید در محیط کشت مایع حاوی مقادیر منبع کربنی بالا و منبع نیتروژنی پایین مشاهده شد.



شکل ۴-۱۹: منحنی RSM برای تولید پلی‌ساکارید توده زیستی قارچ گانودرما لوسیدم با متغیرهای پودر آب پنیر (A) و نشاسته گندم (B)

۲-۱-۲-۴ مقادیر بهینه پیش‌بینی شده توسط مدل درجه دوم و اعتبار سنجی مدل
مقادیر بهینه پیش‌بینی شده با استفاده از نرم افزار Design Expert با هدف تولید حداکثر پلی‌ساکارید

توده زیستی در محیط کشت مایع، برای متغیرهای پودر آب پنیر (A) و نشاسته گندم (B) به ترتیب ($\frac{g}{L}$) ۲۲/۰۰۳ و ۴۲/۱۰۲ می‌باشد؛ و میزان محصول ۲۱/۴۷٪ پیش‌بینی شد. همین میزان از پودر آب پنیر و نشاسته گندم استفاده شد، پس از فرایند تخمیر میزان پلی ساکارید بدست آمده ۲۳٪ بود که با نتیجه بدست آمده از فرمول نزدیکی قابل توجه ای داشت.

۲-۲-۴ آزمایش دوم

هدف از این آزمایش، افزایش میزان تشکیل گانودریک اسید توده زیستی قارچ گانودرما لوسیدم در محیط کشت مایع بود. بازه‌ای از دو ترکیب کلیدی شربت گلوکز به عنوان منبع کربنی، و شربت CSL به عنوان منبع نیتروژنی انتخاب گردید (جدول ۴-۴). سپس میزان این دو ترکیب با روش آماری RSM بهینه سازی شد.

جدول ۴-۴: متغیرهای کربن و نیتروژن در بهینه سازی و سطوح مختلف آنها ($\frac{g}{L}$)

عامل	سطح				
	۱/۴۱۴۲	-۱	۰	۱	۱/۴۱۴۲
شربت گلوکز ($\frac{g}{L}$)	۱۹/۸۲۲۳۳	۲۵	۳۷/۵	۵۰	۵۵/۱۷۷۶۷
شربت CSL ($\frac{g}{L}$)	۵/۸۵۷۸۶۴	۱۰	۲۰	۳۰	۳۴/۱۴۲۱۴

طرح مرکب مرکزی روش سطح پاسخ به همراه میزان واقعی داده‌ها در جدول ۴-۵ گزارش شده است. همان گونه که در جدول ۴-۵ مشخص است، با ثابت نگه‌داشتن غلظت منبع نیتروژنی شربت CSL و ایجاد افزایش در غلظت منبع کربنی شربت گلوکز در محیط کشت مایع، میزان تشکیل گانودریک اسید توده زیستی افزایش یافته است (نمونه ۱، ۴، ۶ و ۸). همچنین با ثابت نگه‌داشتن غلظت منبع کربنی شربت گلوکز و ایجاد افزایش در غلظت منبع نیتروژنی شربت CSL در محیط کشت مایع، میزان تشکیل گانودریک اسید توده زیستی افزایش پیدا کرده است (نمونه ۳، ۴، ۶ و ۹). مقادیر بالای ($\frac{mg}{100 g CDW}$) ۹۰ گانودریک اسید، در محیط‌های کشت مایع حاوی غلظت‌های بالای شربت گلوکز و شربت CSL مشاهده شد (نمونه ۲، ۳ و ۸). از این جدول چنین تحلیل می‌شود، که غلظت‌های بالای شربت گلوکز و شربت CSL بیشترین تاثیر را بر میزان تشکیل گانودریک اسید توده زیستی این قارچ در محیط کشت مایع دارند.

Zhang و همکاران در سال ۲۰۱۴ طی پژوهشی مقادیر مختلف کربن و نیتروژن را بر روی میزان تشکیل گانودریک اسید توده زیستی قارچ گانودرما لوسیدم در محیط کشت مایع بررسی کردند. آنها گزارش کردند، در محیط کشت مایع حاوی ($\frac{g}{L}$) ۲۰ منبع کربنی و ۱۰ منبع نیتروژنی بیشترین میزان تشکیل گانودریک اسید توده زیستی مشاهده شد. آنها اذعان کردند با افزایش غلظت نیتروژن در محیط

کشت مایع، تمایل توده زیستی به ساخت گانودریک اسید افزایش پیدا می‌کند؛ که با نتایج این پژوهش سازگار بود. در پژوهشی دیگر Hu و همکاران در سال ۲۰۱۸ گزارش کردند، بیشترین میزان تشکیل گانودریک اسید توده زیستی قارچ گانودرما لوسیدم، در محیط کشت مایع حاوی حداکثر غلظت منبع کربنی و حداقل غلظت منبع نیتروژنی بدست آمد، که با نتایج این پژوهش مطابقت نداشت. Xu و همکاران در سال ۲۰۰۸ با استفاده از روش سطح پاسخ، به بررسی اثر ترکیبی منبع کربن و منبع نیتروژن محیط کشت مایع بر میزان تشکیل گانودریک اسید توده زیستی قارچ گانودرما لوسیدم پرداختند. آنها گزارش کردند، هنگامی که به یک اندازه از غلظت منبع کربنی گلوکز و منبع نیتروژنی پپتون گوشت در محیط کشت مایع استفاده شد، بیشترین میزان تشکیل گانودریک صورت گرفت؛ که با نتایج این پژوهش تقریباً سازگار بود.

جدول ۴-۵: طراحی آزمایشات و نتایج دو متغیر اعمال شده

بر روی پاسخ در روش RSM

نمونه	منبع کربن	منبع نیتروژن	گانودریک اسید
	شربت گلوکز	شربت CSL	گانودریک اسید
۱	۱۹/۸۲۲۳۳	۲۰	۷۰
۲	۵۰	۳۰	۱۰۰
۳	۳۷/۵	۳۴/۱۴۲۱۴	۹۶/۶
۴	۳۷/۵	۲۰	۸۰
۵	۲۵	۳۰	۷۴
۶	۳۷/۵	۲۰	۷۹
۷	۵۰	۱۰	۸۹
۸	۵۵/۱۷۷۶۷	۲۰	۹۲/۲
۹	۳۷/۵	۵/۸۵۷۸۶۴	۶۱/۶
۱۰	۲۵	۱۰	۶۲/۲

جدول ۴-۶ ضرایب رگرسیون و مقادیر P را برای مدل‌های رگرسیون نشان می‌دهد. اثرات خطی منبع نیتروژنی شربت CSL (A) و منبع کربنی شربت گلوکز (B) بر میزان تشکیل گانودریک اسید توده زیستی در محیط کشت مایع معنی‌دار بود ($P < 0.05$). همچنین مدل نهایی معنی‌دار است، که نشان دهنده بر ارزش خوب مدل است ($P < 0.05$). میزان ارزش F شربت گلوکز از شربت CSL بیشتر است؛ این موضوع نشان می‌دهد، شربت گلوکز تاثیر بیشتری بر میزان تشکیل گانودریک اسید دارد.

جدول ۴-۶: پارمترهای ANOVA برای تولید گانودریک اسید

منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربع	P	F
گانودریک	گانودریک	گانودریک	گانودریک	گانودریک
اسید	اسید	اسید	اسید	اسید
مدل	۲	۷۶۹/۷۳۸۴	۰/۰۰۰۲۳۷	۳۴/۴۹۳۷۲
A-شربت CSL	۱	۶۵۳/۳۶۵۶	۰/۰۰۰۹۹۷	۲۹/۲۷۸۷۹
B-شربت گلوکز	۱	۸۸۶/۱۱۱۱	۰/۰۰۰۴۰۴	۳۹/۷۰۸۶۴
باقی مانده	۷	۲۲/۳۱۵۳۲		
عدم تطابق	۶	۲۵/۹۵۱۲۱	۰/۱۰۵۸۵۴	۰/۱۰۵۸۵۴
خطای خالص	۱	۰/۵		

معادله (۲) مدل رگرسیون را برای تولید گانودریک اسید در محیط کشت مایع پس از تجزیه تحلیل نتایج توسط نرم افزار Design expert نشان می‌دهد. ضرایب مدل چند جمله‌ای درجه دوم پس از تجزیه و تحلیل توسط نرم افزار و حذف عبارات غیر معنی‌دار توسط روش Forward در نرم افزار بدست آمد، که نتیجه حاصل معادله (۲) است. در معادله (۲) G.A مقدار گانودریک اسید توده زیستی می‌باشد. به ترتیب A و B مربوط به مقادیر شربت CSL و شربت گلوکز ($\frac{g}{L}$) می‌باشد. مقدار عددی ضریب تبیین (R^2) برای فرمول تولید گانودریک اسید ۰/۹۱ می‌باشد؛ که نشان دهنده میزان انطباق داده‌ها در مدل رگرسیون می‌باشد. میتوان از مقدار عددی ضریب تبیین چنین نتیجه گرفت، که مدل‌های رگرسیون به خوبی توانسته‌اند رابطه بین شرایط کشت (شربت CSL و شربت گلوکز) و میزان تشکیل گانودریک اسید توده زیستی قارچ در محیط کشت مایع را نشان داده و پیش‌بینی کنند.

معادله (۲):

$$G.A = 30.812 + 0.903718 \times A + 0.841955 \times B$$

۴-۲-۲-۱ نتایج میزان تولید گانودریک اسید

شکل ۴-۲۰ تاثیر سطوح مختلف منبع کربنی شربت گلوکز (B) و منبع نیتروژنی شربت CSL (A) را بر میزان تشکیل گانودریک اسید نشان می‌دهد. همان گونه که منحنی سطح پاسخ نشان می‌دهد، با افزایش غلظت هر دو منبع در محیط کشت مایع میزان تشکیل گانودریک اسید افزایش پیدا می‌کند. بیشترین میزان تشکیل گانودریک اسید توده زیستی با مقدار $100 \frac{mg}{g CDW}$ در محیط کشت مایع حاوی $50 \frac{g}{L}$ شربت گلوکز و ۳۰ شربت CSL بدست آمد. کمترین میزان تشکیل گانودریک اسید با مقدار $100 \frac{mg}{g CDW}$ در محیط کشت مایع حاوی $37/5 \frac{g}{L}$ شربت گلوکز و ۵/۸۶ شربت CSL مشاهده شد.

Design-Expert® Software

Factor Coding: Actual

G.A

◆ Design points above predicted

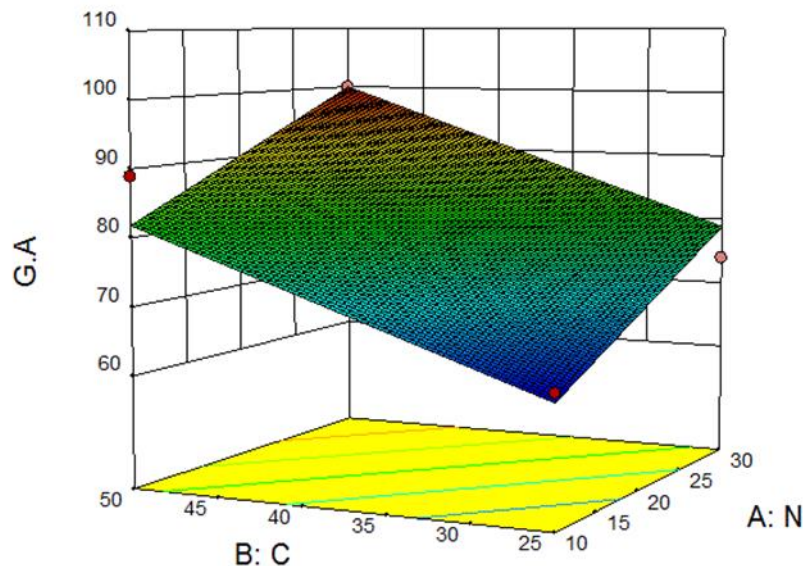
◇ Design points below predicted

100

61.6

X1 = A: N

X2 = B: C



شکل ۴-۲۰: منحنی RSM برای تولید گانودریک اسید ($\frac{mg}{100 g CDW}$) توسط توده زیستی قارچ گانودرما لوسیدم با متغیرهای منبع کربنی شربت گلوکز (B) و منبع نیتروژنی شربت CSL (A).

۲-۲-۲-۴ مقادیر بهینه پیش‌بینی شده توسط مدل درجه دوم و اعتبار سنجی مدل

مقادیر بهینه پیش‌بینی شده با استفاده از نرم افزار Design Expert برای متغیرهای شربت CSL (A) و شربت گلوکز (A) با هدف تولید حداکثری گانودریک اسید، به ترتیب $(\frac{g}{L})$ ۳۰ و ۵۰ بود؛ و میزان محصول $\frac{mg}{100 g CDW}$ ۱۰۰/۰۲۱۶ پیش‌بینی شد. همین میزان از شربت گلوکز و CSL استفاده شد پس از فرایند تخمیر میزان گانودریک اسید بدست آمده $\frac{mg}{100 g CDW}$ ۹۸,۲ بود که با نتیجه بدست آمده از فرمول نزدیکی قابل توجهی داشت.

نتیجه گیری کلی:

در این پژوهش در بخش اول از میان عوامل شیمیایی که در محیط کشت مایع استفاده شدند؛ منبع کربنی شربت گلوکز، منبع نیتروژنی پودر آب پنیر، pH اولیه ۵، $\frac{g}{L}$ ۰/۱ نانوذره دی اکسید تیتانیوم، $\frac{g}{L}$ ۰/۰۵ نانوذره اکسید منیزیم و $\frac{\mu L}{L}$ ۱۰۰ ویتامین پیریدوکسین بیشترین تاثیر را بر میزان رشد توده زیستی داشتند؛ در ادامه منبع کربنی نشاسته گندم، منبع نیتروژنی پودر آب پنیر، pH اولیه ۶/۵، $\frac{g}{L}$ ۰/۰۵ نانوذره اکسید منیزیم و $\frac{\mu L}{L}$ ۲۰ ویتامین پیریدوکسین بیشترین تاثیر را بر میزان تشکیل پلی ساکارید توده زیستی داشتند؛ و در نهایت منبع کربنی شربت گلوکز، منبع نیتروژنی عصاره مخمر، pH اولیه ۶/۵، $\frac{g}{L}$ ۰/۰۵ نانوذره دی اکسید تیتانیوم، $\frac{g}{L}$ ۰/۰۵ نانوذره اکسید منیزیم و $\frac{\mu L}{L}$ ۱۰۰ ویتامین پیریدوکسین بیشترین تاثیر را بر میزان تشکیل گانودریک اسید داشتند. در بخش دوم، اثر ترکیبی سطوح مختلف منبع کربنی و نیتروژنی محیط کشت مایع، برای تولید بهینه گانودریک اسید و پلی ساکارید توده زیستی مورد بررسی قرار گرفت. محیط کشت مایع حاوی ۳۷/۵ نشاسته گندم و ۲۰ پودر آب پنیر ($\frac{g}{L}$) حداکثر تولید پلی ساکارید توده زیستی این قارچ را داشت؛ و محیط کشت مایع حاوی ۵۰ شربت گلوکز و ۳۰ شربت CSL ($\frac{g}{L}$) حداکثر تولید گانودریک اسید توده زیستی این قارچ را داشت. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد، هر عامل اندازه گیری شده (رشد، تشکیل گانودریک اسید و تشکیل پلی ساکارید) از توده زیستی این قارچ، به یک محیط کشت مایع با عواملی شیمیایی متفاوتی نیاز دارد. به عنوان مثال در این تحقیق نشان داده شد، منبع نیتروژنی آب پنیر که بهترین تاثیر را بر میزان رشد و تشکیل پلی ساکارید توده زیستی داشت، کمترین تاثیر را بر میزان تشکیل گانودریک اسید توده زیستی قارچ از خود نشان داد. نانوذره دی اکسید تیتانیوم نقش مثبتی در رشد توده زیستی از خود نشان داد، در حالی که این نانوذره بر میزان تشکیل پلی ساکارید توده زیستی قارچ اثر منفی داشت. در ادامه منبع نیتروژنی شربت CSL اثر خوبی بر میزان تشکیل گانودریک اسید ایجاد کرد، ولی کمترین تاثیر را بر میزان تشکیل پلی ساکارید توده زیستی در محیط کشت مایع داشت. پس در نتیجه باید بر اساس هدف تولید، عوامل شیمیایی محیط کشت مایع انتخاب شوند.

پیشنهادهات:

پیشنهادهات برای تحقیقات بعدی شامل موارد زیر می باشد:

۱. اندازه گیری سایر مواد موثره موجود در توده زیستی قارچ گانودرما لوسیدم
۲. استفاده از ضایعات مختلف کارخانجات صنایع غذایی و کشاورزی در محیط کشت مایع رشد توده زیستی قارچ گانودرما لوسیدم
۳. مقایسه مواد موثره موجود در توده زیستی نژادهای مختلف این قارچ که بومی ایران هستند
۴. بررسی اثرات ضد میکروبی متابولیت های ثانویه توده زیستی نژادهای مختلف این قارچ
۵. بررسی تاثیر استفاده از سایر نانوذرات و ویتامین ها بر میزان رشد و تشکیل متابولیت های ثانویه توده زیستی این قارچ در محیط کشت مایع

منابع

- ارشاد ج. (۱۳۷۴). "قارچ‌های ایرانی" چاپ دوم، انتشارات سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، ص ۱۷۹.
- آصف شایان م. ر. (۱۳۹۴). "قارچ‌های دارویی ایران" چاپ اول، انتشارات ایرانشناسی، تهران، ص ۷.
- توانا م. (۱۳۸۹). پایان نامه ارشد: "مطالعه تاثیر نوع و اجزاء محیط کشت، pH و دما بر تولید قارچ دارویی *Ganoderma lucidum* در شرایط آزمایشگاهی" دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد.
- توانا م.، عزیزی م.، فارسی م و بانسی ف. (۱۳۹۱). "بهینه‌سازی ترکیبهای بستر کشت غوطه‌ور قارچ دارویی *Ganoderma lucidum* به منظور افزایش تولید بیومس میسلیمی و پلی‌ساکارید برون سلولی" تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران، دوره ۲۸، شماره ۳، ص ۴۲۳-۴۳۳.
- دهقانی حصار جلال ش. (۱۳۹۵). پایان نامه ارشد: "بررسی اثر سایتوتوکسیک جدای‌های گونه ایرانی قارچ گانودرمالوسیدوم (*Ganoderma lucidum*) بر روی رده‌های سلولی (MCF-7, HepG2, MDBk)" دانشکده علوم زیستی، دانشگاه شهید بهشتی.
- رزقی جهرمی م. ه. (۱۳۹۶). پایان نامه ارشد: "اثر نانوالیسیستورهای مختلف بر تولید گانودریک اسید در کشت مایع گانودرما لوسیدوم" دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی.
- سرگزی ف. (۱۳۸۶). پایان نامه ارشد: "کشت برخی از قارچ‌های دارویی (شیتاکه، گانودرما لوسیدوم، هریسیوم و پلوروتوس ارینگی) و بررسی خواص بیولوژیک و برخی خواص شیمیایی گانودرما لوسیدوم" دانشکده علوم زیستی، دانشگاه شهید بهشتی.
- صابر م. (۱۳۵۱). "شناسایی قارچ‌های *Homobasidiomyseta* جمع‌آوری شده در ایران" مجله بیماری‌های گیاهی، دوره ۸، ص ۲۰-۴۵.
- صابر م. (۱۳۷۹). "معرفی دو گونه جدید گانودرما برای ایران" خلاصه مقالات چهاردهمین کنگره گیاه پزشکی ایران، ص ۳۷۹.
- ضیایی ع. (۱۳۸۱). "تاریخچه طب گیاهی" فصلنامه علمی پژوهشی گیاهان دارویی، شماره ۲، دوره ۲، ص ۴۳-۵۲.
- عبدالملکی ح. (۱۳۹۲). پایان نامه ارشد: "طراحی و ساخت دستگاه آزمون گر چرخ محرک وسایل نقلیه بر روی خاک زراعی" دانشکده مهندسی مکانیک ماشین‌های کشاورزی، دانشگاه تهران.
- عظیمی م. (۱۳۹۳). پایان نامه ارشد: "بررسی تاثیر محیط کشت‌های تکمیل شده با ضایعات مختلف کشاورزی در تولید قارچ دارویی گانودرما (*Ganoderma lucidum*)" دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد.

کی پور س.، رباحی ح. و رفعتی ح. (۱۳۹۲). "مروری بر ترکیبات فعال بیولوژیکی و خواص درمانی گانودرما لوسیدوم *Ganoderma lucidum* گیاهان دارویی. دوره ۲، شماره ۴۶، ص ۱۳-۲۴.

کی پور سنگسری س. (۱۳۸۷). پایان نامه ارشد: "شناسایی قارچ *Ganoderma lucidum* (Basidiomycota) از ایران و بررسی خواص ضد باکتری آن" دانشکده علوم زیستی، دانشگاه شهید بهشتی.

مرادعلی م. ف.، (۱۳۸۲). پایان نامه ارشد: "شناسایی گونه‌های قارچ جنس *Ganoderma karst.* (Basidiomycota) در شمال ایران (مازندران) و استخراج مواد ضد باکتری از آنها" دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران.

هاشمی-دهکردی ا.، موسوی م.، معلمی ن.، غفاریان مقرب م. ه. (۱۳۹۵). "بررسی تاثیر نانوذرات تیتانیوم دی‌اکسید (آناتاز) بر روی خصوصیات فیزیولوژیکی توت فرنگی رقم کوئین الیزا *Fragaria ananassa c.v. Queen* (Elisa) در شرایط کشت هیدروپونیک" **مجله فرایند و کارکرد گیاهی**. دوره ۵، شماره ۱۶، ص ۸-۱.

Adenipekun C. O. and Gbolagade J. S. (2006). "Nutritional Requirements of *Pleurotus florida* (Mont.) Singer, A Nigerian Mushroom" **Pakistan Journal of Nutrition.**, 5, 6, pp 597-600.

Agudelo-Escobar L. M., Gutierrez-Lopez Y. and Urrego-Restrepo S. (2017). "Effects of aeration, agitation and pH on the production of mycelial biomass and exopolysaccharide from the filamentous fungus *Ganoderma lucidum*" **Dyna.**, 84, 200, pp 72-79.

Ahmad M. d. F. (2018). "Ganoderma lucidum: Persuasive biologically active constituents and their health endorsement" **Biomedicine & Pharmacotherapy.**, 107, pp 507-519.

Ahmadifar S., Mohammadi-Goltapeh E., Jahedi A. and others. (2020). "Optimal method for production of mycelia biomass of *Ganoderma lucidum* in sugarcane molasses" **University of Yasouj Journals System Plant Pathology Science.**, 9, 1, pp 1-14.

Atri N. S., Kumari B., Singh R, Upadhyay R. C. (2013). "Effect of vitamins and growth regulators on the vegetative growth of *Lentinus squarrosulus*" **Mycosphere.**, 4, 6, pp 1080-1090.

Babitskaya V. G. Shcherba V. V. Puchkova T. A. and Smirnov D. A. (2005). "Polysaccharides of *Ganoderma lucidum*: factors affecting their production" **Applied Biochemistry and Microbiology.**, 41, 2, pp 169-173.

Babitskaya V. G., Shcherba V. V., Puchkova T. A. and Smirnov D. A. (2005). "Polysaccharides of *Ganoderma lucidum*: factors affecting their production" **Applied Biochemistry and Microbiology.**, 41, 2, pp 169-173.

Badalyan S. M., Gharibyan N.G. and Kocharyan A. E. (2007). "Erspective in usage of bioactive substances of medicinal mushrooms in pharmaceutical and cosmetic industry"

International journal of medicinal mushrooms., 6, 3, pp 275.

Barati S., Najafzadehvarzi H. and Gharibi D. (2017). "Comparison of antibacterial effects of nanoparticles of magnesium oxide and silicon oxide on methicillin resistant bacteria" **Scientific Journal of Kurdistan University of Medical Sciences.**, 22, 4, pp 27-35.

Behera S. and Gupta N. (2011). "Exopolysaccharide Production by Some Mushroom Fungi in Wheat Flour Liquid Culture Medium" **Carbohydr Polym.**, 59, 3, pp 275-280.

Benkeblia N. (2015). "Ganoderma lucidum polysaccharides and Terpenoids: profile and health benefits" **J Food Nutr Diet.**, 1, 1, pp 1-6.

Bishop K. S., Kao C. H. J., Xu Y., Glucina M. P., Paterson R. R. M. and Ferguson L. R. (2015). "From 2000 years of Ganoderma lucidum to recent developments in nutraceuticals" **Phytochemistry.**, 114, pp 56-65.

Biswas P. and Wu C. Y. (2005). "Nanoparticles and the environment" **Journal of the air & waste management association.**, 55, 6, pp 708-746.

Block S. S. (1960). "Developments in the production of mushroom mycelium in submerged liquid culture" **Journal of Biochemical and Microbiological Technology and Engineering.**, 2, 3, pp 243-252.

Boh, B., Berovic M., Zhang J. and Zhi-Bin L. (2007). "Ganoderma lucidum and its pharmaceutically active compounds" **Biotechnology annual review.**, 13, pp 265-301.

Canteri H. and Ghoul M. (2015). "Submerged liquid culture for production of biomass and spores of Penicillium" **Food Reviews International.**, 31, 3, pp 262-278.

Caroline I. (2013). Thesis "A comparative study between the medicinal mushrooms Inonotus obliquus and Ganoderma lucidum-An analysis between polysaccharides, triterpenes and their functions", Bioprocess engineering, Department of Biotechnology and Chemical Technology.

Carvajal M. and Alcaraz C. F. (1998). "Why titanium is a beneficial element for plants" **Journal of Plant Nutrition.**, 21, 4, pp 655-664.

Chang M. Y., Tsai G. J. and Houn J. Y. (2006). "Optimization of the medium composition for the submerged culture of Ganoderma lucidum by Taguchi array design and steepest ascent method" **Enzyme and Microbial Technology.**, 38, 3-4, pp 407-414.

Chang S. T. and Buswell J. A. (1999). "Ganoderma lucidum (Curt.: Fr.) P. karst.(Aphyllphoromycetideae)- a mushrooming medicinal mushroom" **International Journal of Medicinal Mushrooms.**, 1, 2, pp 139-146.

Chen A. W. (1999). "Cultivation of the medicinal mushroom Ganoderma lucidum (Curt.: Fr.) P. karst.(Reishi) in North America" **International Journal of medicinal mushrooms.**, 1, 3, pp 263-282.

- Chen A. W. (2002). "Natural log cultivation of the medicinal mushroom, *Ganoderma lucidum* (Reishi)" **Mushroom Growers's Newsletter.**, 3, 9, pp 2-6.
- Chen A. W. (2004). "Growing *Ganoderma* Mushroom" **Mushroom growers handbook.**, 1, pp 224-234.
- Chen H. Z. and Chen J. W. (2004). "A preliminary report on solid-state fermentation of *Ganoderma lucidum* with *Radix astragali* containing medium" **Journal of Chinese Integrative Medicine.**, 2, 3, pp 216-218.
- Chen K. L. and Chao D. M. (1997). "Ling Zhi (*Ganoderma* species)" **Chinese medicinal mycology, United Press of Beijing Medical University and Chinese United Medical University, Beijing, China.**, pp 496-517.
- Chen R.Y., Kang J. and Du G. (2016). "Construction of the quality control system of *Ganoderma* products" **Edi and Med Mushr.**, 24, 6, pp 339-344.
- Chen W., Zhao Z. and Li Y. (2011). "Simultaneous increase of mycelial biomass and intracellular polysaccharide from *Fomes fomentarius* and its biological function of gastric cancer intervention" **Carbohydrate polymers.**, 85, 2, pp 369-375.
- Chien C. C., Tsai M. L., Chen C.C., Chang S. J. and Tseng C.H. (2008). "Effects on tyrosinase activity by the extracts of *Ganoderma lucidum* and related mushrooms" **Mycopathologia.**, 166, 2, pp 117-120.
- Chilton J. (2016). "Commercial Sample Identification and Characterization Challenges in Medicinal Mushroom Research" **International journal of medicinal mushrooms.**, 18, 3, pp 203-214.
- Choong Y. K., Ellan K., Chen X.D. and Mohamad S. A. (2019). Extraction and Fractionation of Polysaccharides from a Selected Mushroom Species, *Ganoderma lucidum*: A Critical Review, pp 39-60, In: "**Fractionation**", Chapter 3, Haj-Ibrahim H. A. IntechOpen, Rijeka.
- Cui M. l., Yang H. y. and He G. q. (2015). "Submerged fermentation production and characterization of intracellular triterpenoids from *Ganoderma lucidum* using HPLC-ESI-MS" **Journal of Zhejiang University-SCIENCE B.**, 16, 12, pp 998-1010.
- Cui, Y. H. and Zhang K. C. (2011). "Effect of metal ions on the growth and metabolites production of *Ganoderma lucidum* in submerged culture" **African Journal of Biotechnology.**, 10, 56, pp 11983-11989.
- Darzian-Rostami A., Yazdian F., Mirjani R. and Soleimani M. (2020). "Effects of different graphene-based nanomaterials as elicitors on growth and ganoderic acid production by *Ganoderma lucidum*" **Biotechnology Progress.**, 36, 5, pp e3027.
- Dehghani R., Charkhloo E., Mostafaii G. H., Asadi M. A., Mousavi G. A., Saffari M. and Pourbabaei M. (2012). "A study on the variations of temperature, moisture, pH and carbon to nitrogen ratio in producing compost by stack method." **Feyz Journal of Kashan**

University of Medical Sciences., 16, 1, pp 359-365.

Depeint F., Bruce W. R., Shangari N., Mehta R. and O'Brien P. J. (2006). "Mitochondrial function and toxicity: role of the B vitamin family on mitochondrial energy metabolism" **Chemico-biological interactions.**, 163, 1-2, pp 94-112.

Diamantopoulou P., Papanikolaou S., Aggelis G. and Philippoussis A. (2016). "Adaptation of *Volvvariella volvacea* metabolism in high carbon to nitrogen ratio media" **Food chemistry.**, 196, pp 272-280.

Dinesh-Babu P. and Subhasree R.S. (2008). "The sacred mushroom "Reishi"" **American-Eurasian Journal of Botany.**, 1, 3, pp 107-110.

Dorrestijn E., Laarhoven L. J. J., Arends I. W. C. E. and Mulder P. (2000). "The occurrence and reactivity of phenoxyl linkages in lignin and low rank coal" **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis.**, 54, 1-2, pp 153-192.

Du Z., Dong C. H., Wang K. and Yao Y. J. (2019). Classification, Biological Characteristics and Cultivations of *Ganoderma*, pp 15-58, In: "**Ganoderma and Health**", Vol 1181, Lin Z. and Yang B. Springer Singapore, Singapore.

Elisashvili V. I. (2012). "Submerged cultivation of medicinal mushrooms: bioprocesses and products" **International journal of medicinal mushrooms.**, 14, 3, pp 211-239.

Erkel E. I. (2009). "Yield performance of *Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst cultivation on substrates containing different protein and carbohydrate sources" **African journal of agricultural Research.**, 4, 11, pp 1331-1333.

Esmailzadeh M., Kianirad M., Sheykhinejad A., Khosravi A. and Sharifzadeh A. (2019). "Ganoderic Acid and Exopolysaccharide Production by *Ganoderma Lucidum* from Semi-Solid-State and Submerged Fermentation" **Biological Journal of Microorganism.**, 7, 28, pp 63-75.

Fang Q. H. and Zhong J. J. (2002). "Effect of initial pH on production of ganoderic acid and polysaccharide by submerged fermentation of *Ganoderma lucidum*" **Process Biochemistry.**, 37, 7, pp 769-774.

Fang Q. H. and Zhong J. J. (2002). "Two-stage culture process for improved production of ganoderic acid by liquid fermentation of higher fungus *Ganoderma lucidum*" **Biotechnology progress.**, 18, 1, pp 51-54.

Fatemi M., Mollania N., Momeni-Moghaddam M. and Sadeghifar F. (2019). "The anti-bacterial effects of magnetic iron oxide nanoparticles produced by biological method and the kinetic study of mortality of common strains in clinical infections" **Nova Biologica Reperta.**, 6, 1, pp 30-38.

Feng J., Feng N., Zhang J. S., Yang Y., Jia W. and Lin C. C. (2016). "A new temperature control shifting strategy for enhanced triterpene production by *Ganoderma lucidum* G0119

- based on submerged liquid fermentation” **Applied biochemistry and biotechnology.**, 180, 4, pp 740-752.
- Fraga I., Coutinho J., Bezerra R. M., Dias A. A., Marques G. and Nunes F. M. (2014). “Influence of culture medium growth variables on *Ganoderma lucidum* exopolysaccharides structural features” **Carbohydrate polymers.**, 111, pp 936-946.
- Gao L., Sun M. H., Liu X. Z. and Che Y. S. (2007). “Effects of carbon concentration and carbon to nitrogen ratio on the growth and sporulation of several biocontrol fungi” **Mycological research.**, 111, 1, pp 87-92.
- Gao Y. and Zhou S. (2002). “The Immunomodulating Effects of *Ganoderma lucidum* (Curt.: Fr.) P. Karst.(*Ling Zhi*, *Reishi* Mushroom)(*Aphyllphoromycetideae*)” **International Journal of Medicinal Mushrooms.**, 4, 1, pp 1-11.
- Hapuarachchi K. K., Elkhateeb W. A., Karunarathna S. C., Cheng C. R., Bandara A. R., Kakumyan P., Hyde K. D., Daba G. M. and Wen T. C. (2018). “Current status of global *Ganoderma* cultivation, products, industry and market” **Mycosphere.**, 9, 5, pp 1025-1052.
- Hassan N. A., Supramani S., Sohedein M. N. A., Usuldin S. R. A., Klaus A., Ilham Z., Chen W. H., Wan W. A. A. Q. I. and others. (2019). “Efficient biomass-exopolysaccharide production from an identified wild-Serbian *Ganoderma lucidum* strain BGF4A1 mycelium in a controlled submerged fermentation” **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology.**, 21, pp 1-24.
- Heydarian M., Hatamian Z. A., Amoabediny G., Yazdian F. and Doryab A. (2015). “Synergistic effect of elicitors in enhancement of ganoderic acid production: Optimization and gene expression studies” **APPLIED FOOD BIOTECHNOLOGY.**, 2. 3. pp 57-62.
- Hong S. G. and Jung H. S. (2004). “Phylogenetic analysis of *Ganoderma* based on nearly complete mitochondrial small-subunit ribosomal DNA sequences” **Mycologia.**, 96, 4, pp 742-755.
- Hsieh C., Hsu T. H. and Yang F. C. (2005). “Production of polysaccharides of *Ganoderma lucidum* (CCRC36021) by reusing thin stillage” **Process Biochemistry.**, 40, 2, pp 909-916.
- Hsieh C., Hsu T. H. and Yang F. C. (2005). “Production of polysaccharides of *Ganoderma lucidum* (CCRC36021) by reusing thin stillage” **Process Biochemistry.**, 40, 2, pp 909-916.
- Hsieh C., Tseng M. H. and Liu C. J. (2006). “Production of polysaccharides from *Ganoderma lucidum* (CCRC 36041) under limitations of nutrients” **Enzyme and Microbial Technology.**, 38, 1-2, pp 109-117.
- Hu G., Zhai M., Niu R., Xu X., Liu Q. and Jia J. (2018). “Optimization of culture condition for ganoderic acid production in *Ganoderma lucidum* liquid static culture and design of a suitable bioreactor” **Molecules.**, 23, 10, pp 5663.

- Huang H. C., Chen C. I., Hung C. N. and Liu Y.C. (2009). "Experimental analysis of the oil addition effect on mycelia and polysaccharide productions in *Ganoderma lucidum* submerged culture" **Bioprocess and biosystems engineering**., 32, 2, pp 217-224.
- Inglet B. S. (2004). "Cultivation of Mushroom Mycelia Using Whey Products as a Growth Substrate"
- Jackson M. A. and Schisler D. A. (1995). "Liquid culture production of microsclerotia of *Colletotrichum truncatum* for use as bioherbicidal propagules" **Mycological Research**., 99, 7, pp 879-884.
- Jin T. and He Y. (2011). "Antibacterial activities of magnesium oxide (MgO) nanoparticles against foodborne pathogens" **Journal of Nanoparticle Research**., 13, 12, pp 6877-6885.
- Jo W. S., Cho Y. J., Cho D. H., Park S. D., Yoo Y. B. and Seok, S. J. (2009). "Culture conditions for the mycelial growth of *Ganoderma applanatum*" **Mycobiology**., 37, 2, pp 94-102.
- Jonathan S. G. and Fasidi I. O. (2001). "Studies on phytohormones, vitamins and mineral element requirements of *Lentinus subnudus* (Berk) and *schizophyllum commune* (Fr. Ex. Fr) from Nigeria" **Food Chemistry**., 75, 3, pp 303-307.
- Kapoor P. and Sharma B. M. (2014). "Studies on different growth parameters of *Ganoderma lucidum*" **Int J Sci Environ Tech**., 3, pp 1515-1524.
- Keypour S., Rafati H., Riahi H., Mirzajani-Demneh F. and Moradali M. F. (2010). "Separation and identification of different ganoderic acids from *Ganoderma lucidum* of East and West of Asia by hyphenated RP-HPLC and mass spectrometry" **Food Chem**., 119, 4, pp 1704-1708.
- Keypour-Sangesari S., Riahi H., Rafati H. and Moradali M. F. (2009). "Investigation of antibacterial effect of *Ganoderma lucidum* water extract from Iran" **J. Med. Plant**., 32, pp 9-53.
- Khan S. M. and Mirza J. H. (1991). "Studies on shiitake mushroom (*Lentinula edodes* (Berk.) Pegler)" pp 232-237, In: "**Science and cultivation of edible fungi**", Maher M. J. Balkema, Rotterdam.
- Kim H. K., Seo G. S. and Kim H. G. (2001). "Comparison of characteristics of *Ganoderma lucidum* according to geographical origins: consideration of morphological characteristics" **Mycobiology**., 29, 2, pp 80-84.
- Kim H. M., Park M. K. and Yun J. W. (2005). "Culture pH affects exopolysaccharide production in submerged mycelial culture of *Ganoderma lucidum*" **Applied biochemistry and biotechnology**., 134, 3, pp 249-262.
- Kim H.W. and Kim, B. K. (1999). "Biomedicinal triterpenoids of *Ganoderma lucidum* (Curt.: Fr.) P. Karst.(Aphyllphoromycetideae" **International journal of medicinal**

mushrooms., 1, 2, pp 121-138.

Kim S. S., Lee J. S., Cho J. Y., Kim Y. E. and Hong E. K. (2010). "Effects of C/N ratio and trace elements on mycelial growth and exo-polysaccharide production of *Tricholoma matsutake*" **Biotechnology and Bioprocess Engineering.**, 15, 2, pp 293-298.

KRUPODOROVA T. A., BARSHTEYN V. Y., KIZITSKA T. O. and POKAS E. V. (2019). "Effect of cultivation conditions on mycelial growth and antibacterial activity of *Lentinula edodes* and *Fomitopsis betulina*." **Czech Mycology.**, 71, 2, pp 167-186.

Kubota T., Asaka Y., Miura I. and Mori H. (1982). "Structures of Ganoderic Acid A and B, Two New Lanostane Type Bitter Triterpenes from *Ganoderma lucidum* (FR.) KARST." **Helvetica Chimica Acta.**, 65, 2, pp 611-619.

Lai T., Gao Y. and Zhou S. (2004). "Global marketing of medicinal Ling Zhi mushroom *Ganoderma lucidum* (W. Curt.: Fr.) Lloyd (Aphyllophoromycetideae) products and safety concerns" **International journal of medicinal mushrooms.**, 6, 2, pp 189-194.

Lee H., Song M., Yu Y. and Hwang S. (2003). "Production of *Ganoderma lucidum* mycelium using cheese whey as an alternative substrate: response surface analysis and biokinetics" 15, 2, pp 93-99.

Lee K. M., Lee S. Y. and Lee H. Y. (1999). "Effect of ammonium phosphate on mycelial growth and exopolysaccharides production of *Ganoderma lucidum* in an air-lift fermenter" **Journal of microbiology and biotechnology.**, 9, 6, pp 726-731.

Li N., Liu X. H., Zhou J., Li Y. X. and Zhao M. W. (2006). "Analysis of Influence of Environmental Conditions on Ganoderic Acid Content: in *Ganoderma lucidum* Using Orthogonal Design" **Journal of microbiology and biotechnology.**, 16, 12, pp 1940-1946.

Li S., Dong C., Wen H. A. and Liu X. (2016). "Development of Ling-zhi industry in China--emanated from the artificial cultivation in the Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences (IMCAS)" **Mycology.**, 7, 2, pp 74-80.

Lin E. S. and Chen Y. H. (2007). "Factors affecting mycelial biomass and exopolysaccharide production in submerged cultivation of *Antrodia cinnamomea* using complex media" **Bioresource Technology.**, 98, 13, pp 2511-2517.

Liu G. and Zhang K. (2006). "Effects of water and ethanol extracts of insects on polysaccharide production by submerged fermentation of *Ganoderma lucidum*" **Mycosystema.**, 25, 2, pp 308-315.

Lorenzen K. and Anke T. (1998). "Basidiomycetes as a source for new bioactive natural products" **Curr org chem.**, 2, 4, pp 329-364.

Ma Z., Xu M., Wang Q., Wang F., Zheng H., Gu Z., Li Y., Shi G. and Ding Z. (2019). "Development of an efficient strategy to improve extracellular polysaccharides production of *Ganoderma lucidum* using L-phenylalanine as enhancer" **Frontiers in microbiology.**,

10, pp 2306.

- Malarvizhi K., Murugesan K. and Kalaichelvan P. T. (2003). "Xylanase production by *Ganoderma lucidum* on liquid and solid state fermentation" **Indian Journal of Experimental Biology.**, 14, pp 620-626.
- Malinowska E., Krzyczkowski W., Lapienis G. and Herold F. (2009). "Improved simultaneous production of mycelial biomass and polysaccharides by submerged culture of *Hericium erinaceum*: optimization using a central composite rotatable design (CCRD)" **Journal of industrial microbiology & biotechnology.**, 36, 12, pp 1513-1527.
- Marek S., Krzysztof S., Iwona G. S., Sławomir S. and Agnieszka S. (2015). "Ganoderma lucidum (Curt.: Fr.) Karst. – health-promoting properties" **Herba Polonica.**, 61, 3, pp 105-118.
- Mayzumi F., Okamoto H. and Mizuno T. (1997). "Cultivation of reishi (*Ganoderma lucidum*) Cultivation of reddish reishi (*Ganoderma lucidum*, Red)" **Food Reviews International.**, 13, 3, pp 365-370.
- Miles P. G. and Chang S. T. (2004). "**Mushrooms: cultivation, nutritional value, medicinal effect, and environmental impact**", Second edition, CRC press, New York, pp 357-372.
- Miller R. N. G., Holderness M., Bridge P. D., Chung G. F. and Zakaria M. H. (1999). "Genetic diversity of *Ganoderma* in oil palm plantings" **Plant Pathology.**, 48, 5, pp 595-603.
- Mizuno T., Wang G., Zhang J., Kawagishi H., Nishitoba T. and Li J. (1995). "Reishi, *Ganoderma lucidum* and *Ganoderma tsugae*: bioactive substances and medicinal effects" **Food Reviews International.**, 11, 1, pp 151-166.
- Mizushima Y., Watanabe I., Togashi H., Hanashima L., Takemura M., Ohta K., Sugawara F., Koshino H., Esumi Y., Uzawa J. and others. (1998). "An ergosterol peroxide, a natural product that selectively enhances the inhibitory effect of linoleic acid on DNA polymerase beta" **Biological and Pharmaceutical Bulletin.**, 21, 5, pp 444-448.
- Moradali M. F., Hedjaroude G. A., Mostafavi H., Abbasi M., Ghods S. and Sharifi-Tehrani A. (2007). "The genus *Ganoderma* (Basidiomycota) in Iran" **Mycotaxon.**, 99, pp 251-269.
- Naderi M. R. and Abedi A. (2012). "Application of nanotechnology in agriculture and refinement of environmental pollutants" **J Nanotechnol.**, 11, 1, pp 18-26.
- Pais I. (1983). "The biological importance of titanium" **Journal of Plant Nutrition.**, 6, 1, pp 3-131.
- Patel G. B. and Agnew B. J. (1988). "Growth and butyric acid production by *Clostridium populeti*" **Archives of microbiology.**, 150, 3, pp 267-271.
- Pirone P. P. (1957). "Ganoderma lucidum, a parasite of shade trees" **Bulletin of the Torrey Botanical Club.**, 84, 6, pp 424-428.

- Poyedinok N., Mykhaylova O., Sergiichuk N. Tugay T., Tugay A., Lopatko S. and Matvieieva N. (2020). "Effect of Colloidal Metal Nanoparticles on Biomass, Polysaccharides, Flavonoids, and Melanin Accumulation in Medicinal Mushroom *Inonotus obliquus* (Ach.: Pers.) Pil'at" **Applied Biochemistry and Biotechnology.**, 191, pp 1315-1395.
- Qiu L., Li Y., Liu Y., Gao Y., Qi Y. and Shen J. (2010) "Particle and naked RNA mycoviruses in industrially cultivated mushroom *Pleurotus ostreatus* in China" **Fungal biology.**, 114, 5-6, pp 507-513.
- Ren A., Li X. B., Miao Z. G., Shi L., Jaing A. L. and Zhao M. W. (2014). "Transcript and metabolite alterations increase ganoderic acid content in *Ganoderma lucidum* using acetic acid as an inducer" **Biotechnology letters.**, 36, 12, pp 2529-2536.
- Salmon D. N. X., Fendrich R. C., Cruz M. A. Montibeller V. W., Vandenberghe L. P. S., Soccol C. R. and Spier M. R. (2016). "Bioprocess for phytase production by *Ganoderma* sp. MR-56 in different types of bioreactors through submerged cultivation" **Biochemical Engineering Journal.**, 114, pp 2887-297.
- Sanodiya B. S., Thakur G. S., Baghel R. K., Prasad G. and Bisen P. S. (2009). "Ganoderma lucidum: a potent pharmacological macrofungus" **Current pharmaceutical biotechnology.**, 10, 8, pp 717-742.
- Shah P. and Modi H. A. (2018). "Optimization of culture conditions for biomass production of *ganoderma lucidum*" **Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.**, 7, 2, pp 1882-1889.
- Sharma S. K., Gautam N. and Atri N. S. (2015). "Optimization, composition, and antioxidant activities of exo-and intracellular polysaccharides in submerged culture of *cordyceps gracilis* (Grev.) durieu & Mont." **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.**, 15, pp 1-8.
- Shih L., Pan K. and Hsieh C. (2006). "Influence of nutritional components and oxygen supply on the mycelial growth and bioactive metabolites production in submerged culture of *Antrodia cinnamomea*" **Process Biochemistry.**, 41, 5, pp 1129-1135.
- Simonic J., Stajic M., Glamoclija J., Vukojevic J., Duletic-Lausevic S. and Brceski I. (2008). "Optimization of submerged cultivation conditions for extra-and intracellular polysaccharide production by medicinal Ling Zhi or Reishi mushroom *Ganoderma lucidum* (W. Curt.: Fr." **International Journal of Medicinal Mushrooms.**, 10, 4, pp 351-360.
- Singh S., Kuca K. and Kalia A. (2020). "Alterations in Growth and Morphology of *Ganoderma lucidum* and *Volvariella volvacea* in Response to Nanoparticle Supplementation" **Mycobiology.**, 48, 5, pp 383-391.
- Smith B. J. and Sivasithamparam K. (2000). "Internal transcribed spacer ribosomal DNA sequence of five species of *Ganoderma* from Australia" **Mycological Research.**, 104, 8, pp 943-951.
- Sokol S. (2000). "O współczesnej systematyce europejskich gatunków rodzaju *Ganoderma*"

Acta Biologica Silesiana., 35, 52, pp 200-207.

- Solecki R. S. (1975). "Shanidar IV, a Neanderthal flower burial in northern Iraq" **Sci.**, 190, 4217, pp 880-881.
- Stamets P. (1993). "**Growing gourmet and medicinal mushrooms**", Ten Speed Press, Berekely, pp 13-614.
- Stamets P. and Chilton J. S. (1983). "The mushroom cultivator" **First Washington**.
- Suberu H. A., Lateef A. A., Bello I. M. and Daudu O. A. Y. (2013). "Mycelia biomass yield of *Ganoderma lucidum* mushroom by submerged culture" **Nigerian Journal of Technological Research.**, 8, 2, pp 64-67.
- Sudheer S., Alzorqi I., Manickam S. and Ali A. (2018). "Bioactive compounds of the wonder medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*" **Springer International Publishing AG.**, 64, pp 1863-1893.
- Sun X., Wang H., Han X., Chen S., Zhu S. and Dai J. (2014). "Fingerprint analysis of polysaccharides from different *Ganoderma* by HPLC combined with chemometrics methods" **Carbohydrate Polymers.**, 114, pp 432-439.
- Supramani S., Rahayu A., Zul I., Annuar M. S., Klaus A. and Wan W. A. (2019). "Optimisation of biomass, exopolysaccharide and intracellular polysaccharide production from the mycelium of an identified *Ganoderma lucidum* strain QRS 5120 using response surface methodology" **AIMS microbiology.**, 5, 1, pp 19-38.
- Tang Y. J. and Zhong J. J. (2002). "Fed-batch fermentation of *Ganoderma lucidum* for hyperproduction of polysaccharide and ganoderic acid" **Enzyme and Microbial Technology.**, 31, 1-2, pp 20-28.
- Tang Y. J. and Zhong J. J. (2003). "Role of oxygen supply in submerged fermentation of *Ganoderma lucidum* for production of *Ganoderma* polysaccharide and ganoderic acid" **Enzyme and Microbial Technology.**, 32, 3-4, pp 478-484.
- Tang Y. J. and Zhu L. W. (2010). "Improvement of ganoderic acid and *Ganoderma* polysaccharide biosynthesis by *Ganoderma lucidum* fermentation under the inducement of Cu^{2+} " **Biotechnology progress.**, 26, 2, pp 417-423.
- Taylor T. N., Krings M. and Taylor E. L. (2015). Basidiomycota, pp 173-179, In: "**Fossil Fungi**", Chapter 9, Taylor T. N., Krings M. and Taylor E. L. Academic Press, San Diego.
- Tuli H. S. Sharma A. K. and Sandhu S. S. (2014). "Optimization of fermentation conditions for cordycepin production using *Cordyceps militaris* 3936" **J Biol Chem Sci.**, 1, pp 35-47.
- Vieira G. R. T., Liebl M., Tavares L. B. B. Paulert R. and Smania-Junior A. (2008). "Submerged culture conditions for the production of mycelial biomass and antimicrobial

- metabolites by *Polyporus tricholoma* Mont.” **Brazilian Journal of Microbiology.**, 39, 3, pp 561-568.
- Vukojevic J., Staji M., Duletic-Lauvsevic S. and Simonic J. (2006). “Effect of medium pH and cultivation period on mycelial biomass, polysaccharide, and ligninolytic enzyme production by *Ganoderma lucidum* from Montenegro” **Archives of Biological Sciences.**, 58, 3, pp 179-182.
- Wan M. C. K. (2007). “Jiajing emperor and his auspicious words” **Archives of Asian art.**, 57, 1, pp 95-120.
- Wang D. M. and Yao Y. J. (2005). “Intrastrain internal transcribed spacer heterogeneity in *Ganoderma* species” **Canadian journal of microbiology.**, 51, 2, pp 113-121.
- Wang Y. Y., Khoo K. H., Chen S. T., Lin C. C., Wong C. H. and Lin C. H. (2002). “Studies on the immuno-modulating and antitumor activities of *Ganoderma lucidum* (Reishi) polysaccharides: functional and proteomic analyses of a fucose-containing glycoprotein fraction responsible for the activities” **Bioorganic & medicinal chemistry.**, 10, 4, pp 1057-1062.
- Wasser S. P. (2005). “Reishi or ling zhi (*Ganoderma lucidum*)” **Encyclopedia of dietary supplements.**, 1, pp 603-622.
- Wasser S. P. (2011). “Current findings, future trends, and unsolved problems in studies of medicinal mushrooms” **Applied microbiology and biotechnology.**, 89, 5, pp 1323-1332.
- Wei Z. H., Duan Y. Y., Qian Y. Q., Guo X. F., Li Y. J., Jin S. H., Zhou Z. X., Shan S.Y., Wang C. R., Chen X. J. and others. (2014). “Screening of *Ganoderma* strains with high polysaccharides and ganoderic acid contents and optimization of the fermentation medium by statistical methods” **Bioprocess and biosystems engineering.**, 37, 9, pp 1789-1797.
- Wei, Z. H., Liu L., Guo X. F., Li Y. J., Hou B. C., Fan Q. L., Wang K. X., Luo Y. and Zhong J. J. (2016). “Sucrose fed-batch strategy enhanced biomass, polysaccharide, and ganoderic acids production in fermentation of *Ganoderma lucidum* 5.26” **Bioprocess and biosystems engineering.**, 39, 1, pp 37-44.
- Wu D.T., Deng Y., Chen L. X., Zhao J., Bzhelyansky A. and Li S. P. (2017). **Scientific reports.**, 7, 1, pp 1-10.
- Wu X. J. and Hansen C. (2006). “Effects of whey permeate-based medium on the proximate composition of *Lentinus edodes* in the submerged culture” **Journal of food science.**, 71, 6, pp M174-M179.
- Xu P., Ding Z. Y., Qian Z., Zhao C. X. and Zhang K. C. (2008). “Improved production of mycelial biomass and ganoderic acid by submerged culture of *Ganoderma lucidum* SB97 using complex media” **Enzyme and Microbial Technology.**, 42, 4, pp 325-331.
- Xu Y. N. Xia X. X. and Zhong J. J. (2013). “Induced effect of Na⁺ on ganoderic acid

- biosynthesis in static liquid culture of *Ganoderma lucidum* via calcineurin signal transduction” **Biotechnology and Bioengineering.**, 110, 7, pp 1913-1923.
- Xu Y. N., Xia X. X. and Zhong J. J. (2014). “Induction of ganoderic acid biosynthesis by Mn^{2+} in static liquid cultivation of *Ganoderma lucidum*” **Biotechnology and Bioengineering.**, 111, 11, pp 2358-2365.
- Yang F. C. and Liau C. B. (1998). “Effects of cultivating conditions on the mycelial growth of *Ganoderma lucidum* in submerged flask cultures” **Bioprocess Engineering.**, 19, 3, pp 233-236.
- Yang F. C., Ke Y. F. and Kuo S. S. (2000). “Effect of fatty acids on the mycelial growth and polysaccharide formation by *Ganoderma lucidum* in shake flask cultures” **Enzyme and microbial technology.**, 27, 3-5, pp 295-301.
- Yang F. C., Yang M. J. and Cheng S. H. (2009). “A novel method to enhance the mycelia production of *Ganoderma lucidum* in submerged cultures by polymer additives and agitation strategies” **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers.**, 40, 2, pp 148-154.
- Yang H. L., Wu T. X. and Zhang K. C. (2004). “Enhancement of mycelial growth and polysaccharide production in *Ganoderma lucidum* (the Chinese medicinal fungus, Lingzhi) by the addition of ethanol” **Biotechnology letters.**, 26, 10, pp 841-844.
- Yang Y., Zhang H., Zuo J., Gong X., Yi F., Zhu W. and Li L. (2019). “Advances in research on the active constituents and physiological effects of *Ganoderma lucidum*” **Biomedical Dermatology.**, 6, 3, pp 1-17.
- Yokokawa H. and Mitsuhashi T. (1981). “The sterol composition of mushrooms” **Phytochemistry.**, 20, 6, pp 1349-1351.
- You B. J., Lee M. H., Tien N., Lee M. S., Hsieh H. C., Tseng L. H., Chung Y. L. and Lee, H. Z. (2013). “A novel approach to enhancing ganoderic acid production by *Ganoderma lucidum* using apoptosis induction” **PLOS ONE.**, 8, 1, pp 1-7.
- Yuan B., Chi X. and Zhang R. (2012). “Optimization of exopolysaccharides production from a novel strain of *Ganoderma lucidum* CAU5501 in submerged culture” **Brazilian journal of microbiology.**, 43, 2, pp 490-497.
- Zarate-Chaves C. A., Romero-Rodriguez M. C., Nino-Arias F. C., Robles-Camargo J., Linares-Linares M., Rodriguez-Bocanegra M. X. and Gutierrez-Rojas I. (2013). “Optimizing a culture medium for biomass and phenolic compounds production using *Ganoderma lucidum*” **Brazilian Journal of Microbiology.**, 44, 1, pp 215-223.
- Zeng H. W. and Chen H. (2016). “THE DRIED MYCELIUM OF *GANODERMA LUCIDUM* EXHIBITING IMPROVING INTRACELLULAR POLYSACCHARIDE CONTENT BY SUBMERGED FERMENTATION OPTIMIZATION IN LARGE-SCALE FERMENTATION PROCESSES AND ITS FOOD SAFETY.” **Carpathian Journal of**

Food Science & Technology., 8, 2, pp 209-216.

Zhang J., Liu Y., Tang Q., Zhou S., Feng J. and Chen H. (2019). Polysaccharide of Ganoderma and Its Bioactivities, pp 107-134, In: “**Ganoderma and Health**” Vol 1181, Lin Z. and Yang B. Springer Singapore, Singapore.

Zhang J., Zhong J. J. and Geng A. (2014). “Improvement of ganoderic acid production by fermentation of Ganoderma lucidum with cellulase as an elicitor” **Process Biochemistry**., 49, 10, pp 1580-1586.

Zhang W. and Tang Y. J. (2008). “A novel three-stage light irradiation strategy in the submerged fermentation of medicinal Mushroom Ganoderma lucidum for the efficient production of ganoderic acid and Ganoderma polysaccharides” **Biotechnology progress**., 24, 6, pp 1249-1261.

Zhao W., Xu J. W and Zhong J. J. (2011). “Enhanced production of ganoderic acids in static liquid culture of Ganoderma lucidum under nitrogen-limiting conditions” **Bioresource technology**., 102, 17, pp 8185-8190.

Zhou X. and Lin J. (1999). “Resources of Wild Ganoderma spp. in China and their Development and Utilization” **Acta Edulis Fungi**., 6, 1, pp 60.

Zhou X. W. (2017). Cultivation of Ganoderma lucidum, pp 385-413, In: “**Edible and Medicinal Mushrooms: Technology and Applications**”, Chapter 18, Diego C. Z. and Pardo-Giménez A. Wiley Online Library, Shanghai.

Zhou X. W., Su K. Q. and Zhang Y. M. (2012). “Applied modern biotechnology for cultivation of Ganoderma and development of their products” **Applied Microbiology and Biotechnology**., 93, 3, pp 941-963.

Zhou X., Li Q., Zhao J., Tang K., Lin J. and Yin Y. (2007). “Comparison of rapid DNA extraction methods applied to PCR identification of medicinal mushroom Ganoderma spp” **Preparative Biochemistry and Biotechnology**., 37, 4, pp 369-380.

Zhoul Q., Yang W., Lin J. F. and Guo L. Q. (2015). “Optimization of Medium pH, Growth Media Compositions and Analysis of Nutritional Components of Ganoderma lucidum in Submerged Culture Fermentation” **European Journal of Medicinal Plants**., 6, 1, pp 17-25.

Abstract:

Ganoderma lucidum with high curative properties has been used worldwide. This fungi is of two vital components, ganoderic acid and polysaccharide. In the present research, the effect of chemical conditions of media were examined on *Ganoderma* growth and secondary metabolisms (polysaccharide and ganoderic acids) to determine the key substrates which had the most positive impact on the fungi productions. The experimentations were conducted in two sections. First, One Factor at Time was applied to examine five carbon sources (Glucose syrup, Glucose powder, Fructose syrup, Wheat starch and Corn starch), five nitrogen sources (Whey powder, Soy powder, Corn Steep Liquor syrup, Yeast extract and Meat Peptone), seven pH (5, 5.5, and 6, 6.5, 7, 7.5 and 8), three concentration (0.1, 0.05 and $0.01 \frac{g}{L}$) of TiO_2 MgO nanoparticles and four levels of vitamin Pyridoxine (B_6) (10, 20, 100 and $300 \frac{\mu L}{L}$). Then, the best substrates for secondary metabolisms and growth were determined. In the second section, response surface method was served to optimize the ganoderic acid and polysaccharide productions through the key substrates determined by One Factor at Time. The results indicated that TiO_2 nanoparticles, 0.05 Glucose syrup, Whey powder and initial pH 5, $0.1 \frac{g}{L}$ B_6 had the highest positive effect on $100 \frac{\mu L}{L}$ MgO nanoparticles and *Ganoderma* growth. One Factor at Time method indicated that the medium containing Wheat starch, Whey protein, initial pH 6.5, $0.01 \frac{g}{L}$ MgO

nanoparticels and $20 \frac{\mu L}{L}$ medium B₆ supported the highest content of polysaccharides. RSM revealed that medium containing $37.5 \frac{g}{L}$ Wheat starch and $20 \frac{g}{L}$ whey powder was by far the best substrates which stimulated the highest content of polysaccharide. One Factor at Time showed that Glucose syrup, Yeast extract and initial pH 6.5, $0.05 \frac{g}{L}$ TiO₂ and MgO, $100 \frac{\mu L}{L}$ B₆ exerted a high influence on ganoderic acid. RSM method showed that $50 \frac{g}{L}$ Glucose syrup and $30 \frac{g}{L}$ CSL induced the highest quantity of ganoderic acid.

Key words: *Ganoderma lucidum*, Submerged Culture, Biomass growth, Optimization, Response Surface Method, Polysaccharide formation, Ganodric acid formation, One Factor at Time



Shahrood University of Technology

Faculty of Agriculture

MSc Thesis in Food Science

Investigation of chemical factors affecting the cultivation of *Ganoderma lucidum*

By: Amir Ghasemi

Supervisor:

Dr. Hamidreza Samadlouie

February 2021