





دانشکده کشاورزی

پایان نامه کارشناسی ارشد گروه علوم و صنایع غذایی

بررسی اثرات آنتی باکتریال گانودریک اسید مستخرجه از عصاره الکلی قارچ گانودرما لوسیدوم

نگارنده: محمدرضا نجمدی

استاد راهنما

دکتر حمیدرضا صمدلویی

اساتید مشاور

دکتر امیر سالک فرخی

دکتر هادی امراللهی

بهمن ۱۴۰۰

در این صفحه صورت جلسه دفاع را قرار دهید. لازم است پس از صحافی این صفحه مجدداً توسط دانشکده مهر گردد و استاد راهنما با امضای خود اصلاحات پایان نامه را تایید کند.

تقدیم به

همه کسانی که تاکنون مرا در فراگیری تمام فنون زندگی تنها نگذاشتند، از اولین آموزگارانم، پدر و مادر عزیزم که با گوهر جان و مال خویش مرا پرورش دادند و از آموزگاران و اساتیدم به خصوص استاد راهنما جناب آقای دکتر صمدلویی، اساتید مشاور و اساتید محترمی که در بازخوانی این تحقیق، این حقیر را لایق دانستند و مساعدت فرمودند. تقدیم به همسر عزیزم که همیشه مرا لایق محبت های بی دریغش دانست.

شکر و قدردانی

خداوند را سپاس می گویم، سپاسی که که یاری کند هرکسی که آنرا برشمرد و قوت دهد هر آن کسی را که مبالغه نماید و نیکوتر از عهده آن برآید و حمد می نمایم، حمدی که موجب تقرب و نزدیکی درگاهش شود. حمدی که افزونی نعمت را واجب نماید، حمدی بی انتها که کسی را توان شمارش آن نباشد.

پس از حمد و سپاس خداوند متعال برخورد واجب می دانم از همه افرادی که به نحوی مرا در انجام این تحقیق یاری نمودند، قدردانی بنمایم. ابتدا مراتب تقدیر و تشکر خود را از استاد راهنمای خود جناب آقای دکتر حمیدرضا صمدلویی ابراز می نمایم که با تمام وجود و بدون هیچ چشم داشتی مرا صمیمانه مساعدت و راهنمایی نمود و در تک تک مراحل و در تهیه مواد لازم مرا یاری نمودند. از آقای دکتر جهان بین و همچنین از آقای دکتر رجایی که از نظرات ارزشمندشان بهره مند شدم، سپاسگزارم. از اساتید مشاورم آقایان دکتر هادی امراللهی و دکتر امیر سالک فرخی که مرا در انجام صحیح آزمون ها و مشکلات پیش آمده، صمیمانه یاری نمودند. در انتها از آقای دکتر خدابی مدیر محترم آزمایشگاه بهپرور سلامت که مرا در تهیه لوازم آزمایشگاهی از جمله استانداردهای مورد نیاز و... صمیمانه یاری نمودند، سپاسگزارم.

تهدنامه

اینجانب **محمدرضا نجمدی** دانشجوی دوره کارشناسی ارشد رشته علوم و صنایع غذایی - فناوری مواد غذایی دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی شاهرود نویسنده پایان نامه بررسی اثرات آنتی باکتریال گانودریک اسید مستخرجه از عصاره الکلی قارچ گانودرما لوسیدوم تحت راهنمایی آقای دکتر حمید رضا صمدلویی 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

از آن جا که بیماری های عفونی عامل مرگ های زودرس هستند، از آنتی بیوتیک های تجاری متفاوتی در سرتاسر جهان برای کنترل عفونتها و بیماریهای عفونی انسان استفاده می شود. از طرفی استفاده طولانی مدت از این آنتی بیوتیکها باعث ظهور باکتریهای مقاوم به چند دارو شده، مشکلات بالینی مهمی را در درمان بیماریهای عفونی ایجاد کرده و باعث تقاضای روز افزون جامعه برای دریافت دارو و مواد آنتی باکتریال طبیعی شده است. این مطالعه با هدف بررسی اثر آنتی باکتریال اسید گانودریک مستخرجه از عصاره الکلی دو واریته قارچ گانودرما لوسیدوم با دو رنگ متفاوت قرمز کمرنگ و زرد ، روی ۵ باکتری مختلف گرم مثبت و گرم منفی شامل: *Pseudomonas aeruginosa*(ATCC27853), *Escherichia coli* (ATCC25922) , *Staphylococcus aureus* (ATCC25923), *Bacillus subtilis* (PTCC1715), *Micrococcus luteus* (ATCC9341), انجام شد. نتایج نشان داد میزان اسید گانودریک بر حسب وزن خشک قارچ، در قارچ های با مزه تلخی کمتر و رنگ قرمز 2.140 mg/g و در قارچ های با مزه تلخی بیشتر و رنگ زرد 3.264 mg/g بود. با توجه به میزان گانودریک استخراجی هر دو قارچ، محلول هایی با غلظت های مختلف گانودریک اسید از هر دو نوع قارچ قرمز و زرد تهیه و به روش استاندارد میکرودايلوشن، بازه ی تاثیر گذاری بر اساس حداقل غلظت ممانعت کنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) اندازه گیری شد که این بازه و یا میزان MIC/MBC را بر حسب $\mu\text{g/ml}$ برای باکتری های *Escherichia coli* و *Staphylococcus aureus* مورد استفاده در این تحقیق از $22.5/26 \mu\text{g/ml}$ برای قارچ قرمز و برای قارچ زرد رنگ میزان $23/29 \mu\text{g/ml}$ حاصل شد و برای باکتری های *Pseudomonas aeruginosa* , *Micrococcus luteus* , *Bacillus subtilis* میزان $34/45 \mu\text{g/ml}$ برای قارچ قرمز رنگ و برای قارچ با رنگ زرد $34/46 \mu\text{g/ml}$ بود که نشان داد که خاصیت آنتی باکتریالی به میزان گانودریک اسید وابسته است و افزایش میزان گانودریک اسید قارچ گانودرما لوسیدوم باعث افزایش خاصیت آنتی باکتریالی آن خواهد شد.

کلمات کلیدی: گانودرما، گانودریک اسید، آنتی باکتریال، عصاره الکلی

فهرست مطالب

۱	فصل ۱: کلیات پژوهش
۱-۱-۱	مقدمه
۱-۱-۲	قارچ گانودرما لوسیدوم
۱-۱-۳	انواع گانودرما
۱-۱-۴	اندام شناسی و پراکندگی جغرافیایی در جهان و ایران
۱-۱-۵	زیستگاه رشد
۱-۱-۶	نیازهای قارچ گانودرما لوسیدوم برای رشد
۱-۶-۱	عوامل تغذیه ای
۱-۶-۲	عوامل محیطی
۱-۱-۷	ترکیبات شیمیایی قارچ گانودرما
۱-۷-۱	پلی ساکاریدها
۱-۷-۲	پروتئین ها
۱-۷-۳	چربی ها
۱-۷-۴	مواد معدنی
۱-۷-۵	ترپنوئیدها
۱-۷-۶	گانودریک اسید و لوسیدینیک اسید به عنوان جزیی از ترپنوئیدها
۱-۷-۷	استرول ها
۱-۷-۸	ترکیبات فنولی
۱-۷-۹	نوکلوتیدها و نوکلئوزیدها

۲۳.....	۱۰-۷-۱- آمینواسیدها
۲۳.....	۱۱-۷-۱- آلکالوئیدها
۲۵.....	۸-۱- کاربردهای متنوع قارچ گانودرما
۲۵.....	۹-۱- کشت مصنوعی قارچ گانودرما
۲۶.....	۱-۹-۱- کشت برای تولید میوه
۲۶.....	۱-۹-۱-۱- کشت روی تنه درخت
۲۶.....	۱-۹-۱-۲- کشت جایگزینی
۲۷.....	۳-۱-۹-۱- کشت میسلیم در بیوراکتور (Bioreactor)
۲۷.....	۳-۱-۹-۱- کشت جامد
۲۷.....	۲-۱-۹-۱- کشت مایع
۲۹.....	۱۰-۱- استخراج، بازیابی، تجزیه و تحلیل ترکیبات فعال زیستی
۲۹.....	۲-۱۰-۱- خشک کردن
۳۰.....	۳-۱۰-۱- کاهش اندازه قارچ برای افزایش راندمان استخراج
۳۰.....	۴-۱۰-۱- پیش تصفیه با استفاده از محلول اتانولی آبی
۳۱.....	۵-۱۰-۱- استخراج پلی ساکاریدها
۳۱.....	۶-۱۰-۱- استخراج تری ترین ها
۳۱.....	۷-۱۰-۱- اثرات درمانی ترکیبات فعال زیستی گانودرما لوسیدوم
۳۲.....	۸-۱- مشکلات موجود
۳۲.....	۹-۱- هدف تحقیق

فصل ۲: مروری بر مطالعات پیشین ۳۴

۳۵.....	۱-۲- ساختار گانودریک اسید و اثرات آن
---------	--------------------------------------

۲-۱-۱- عصاره و اسید گانودریک استخراج شده از قارچ گانودرما لوسیدوم اثرات کشندگی آن بر گونه <i>Staphylococcus aureus</i>	۳۶
۲-۱-۲- عصاره و اسید گانودریک استخراج شده از قارچ گانودرما لوسیدوم اثرات کشندگی آن بر <i>Escherichia coli</i>	۳۷
۲-۱-۳- عصاره و اسید گانودریک استخراج شده از قارچ گانودرما لوسیدوم اثرات کشندگی آن بر باکتری <i>Bacillus</i>	۳۹
۲-۱-۴- عصاره و اسید گانودریک استخراج شده از قارچ گانودرما لوسیدوم اثرات کشندگی آن بر <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	۴۰
۲-۱-۵- عصاره و اسید گانودریک استخراج شده از قارچ گانودرما لوسیدوم اثرات کشندگی آن بر <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	۴۲
۲-۱-۶- مطالعات ضد سرطان.....	۴۳
۲-۱-۷- مطالعات اثرات آنتی اکسیدانی.....	۴۳
۲-۱-۸- مطالعات اثرات ضد حساسیت.....	۴۴
۲-۱-۹- مطالعات اثرات ضد دیابتی.....	۴۴
۲-۱-۱۰- مطالعات اثرات ضد باکتری و ضد ویروسی.....	۴۴
۲-۱-۱۱- سمیت گانودرما لوسیدوم	۴۴
۲-۲- جمع بندی نتایج پژوهش های صورت گرفته.....	۴۵

فصل ۳: مواد و روش ها ۴۷

۳-۱- مواد اولیه مورد استفاده	۴۷
۳-۲- تجهیزات مورد استفاده	۴۸
۳-۳- روش ها	۴۹
۳-۳-۲- تهیه و نگهداری کشت مادر.....	۴۹
۳-۳-۲- تهیه محیط کشت توسعه تلقیح.....	۴۹
۳-۳-۳- کشت جامد	۴۹
۳-۳-۴- استخراج گانودریک اسید از میوه قارچ گانودرما لوسیدوم	۵۰

۵-۳-۳- ارزیابی آنتی باکتریال به روش میکرودايلوشن..... ۵۰

فصل ۴: نتایج و بحث ۵۳

۴-۱- بخش اول..... ۵۴

۴-۲- بخش دوم..... ۵۵

۴-۲-۱- تاثیر استفاده از گانودریک اسید در دوزهای مختلف بر علیه باکتری *Bacillus subtilis* (PTCC1715) و میزان MIC و MBC گانودریک اسید برای باکتری فوق..... ۵۶

۴-۲-۲- تاثیر استفاده از گانودریک اسید در دوزهای مختلف بر علیه باکتری *Esherichia coli* (ATCC25922) و میزان MIC و MBC گانودریک اسید برای باکتری فوق..... ۶۱

۴-۲-۳- تاثیر استفاده از گانودریک اسید در دوزهای مختلف بر علیه باکتری *Staphylococcus aureus* (ATCC25923)..... ۶۶

۴-۲-۴- تاثیر استفاده از گانودریک اسید در دوزهای مختلف بر علیه باکتری *Micrococcus luteus* (ATCC9341)..... ۷۱

۴-۲-۵- تاثیر استفاده از گانودریک اسید در دوزهای مختلف بر علیه باکتری *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC27853) و میزان MIC و MBC..... ۷۷

۴-۳- نتایج کلی MIC/MBC میکرودايلوشن هر دو گونه تلخ و شیرین..... ۸۳

۴-۵- نتیجه گیری کلی و پیشنهادات..... ۸۳

پیوست ۸۵

مراجع ۹۲

فهرست اشکال

- شکل ۱-۱: تصاویری از قارچ گانودرما لوسیدوم..... ۵
- شکل ۲-۱: تصاویر گونه های گانودرما..... ۸
- شکل ۳-۱ بدنه یک قارچ..... ۹
- شکل ۴-۱ تصویر قارچ گانودرما رشد کرده روی درخت..... ۱۱
- شکل ۵-۱: ساختمان تعدادی از پلی ساکاریدهای جدا شده از قارچ گانودرما..... ۱۶
- شکل ۶-۱: ساختمان تعدادی از تری ترپن های جدا شده از قارچ گانودرما..... ۱۸
- شکل ۷-۱: ساختمان شیمیایی گانودریک اسید جدا شده از قارچ گانودرما..... ۲۰
- شکل ۸-۱: ساختمان شیمیایی لوسیدینیک اسید جدا شده از قارچ گانودرما..... ۲۱
- شکل ۹-۱: تصویر ساختمان شیمیایی استرول های گانودرما..... ۲۲
- شکل ۱۰-۱: تصویر ساختمان شیمیایی آلکالوئیدهای گانودرما..... ۲۴
- شکل ۱۱-۱: روشهای مختلف کشت مصنوعی قارچ گانودرما لوسیدوم..... ۲۶
- شکل ۱۲-۱: روشهای مختلف کشت مصنوعی قارچ گانودرما در کشور چین..... ۲۸
- شکل ۵-۱: تصویر کشت انجام شده و رنگ های مشاهده شده با استفاده از گانودرمای تلخ تر..... ۸۶
- شکل ۵-۲: تصویر کشت انجام شده و رنگ های مشاهده شده با استفاده از گانودرمای تلخ تر..... ۸۷
- شکل ۵-۳: تصویر کشت انجام شده و رنگ های مشاهده شده با استفاده از گانودرمای با تلخی کمتر..... ۸۸
- شکل ۵-۴: تصویر کشت انجام شده و رنگ های مشاهده شده با استفاده از گانودرمای با تلخی کمتر..... ۸۹
- شکل ۵-۵: تصویر عصاره های حاصله در اولین مرحله که رنگ عصاره گانودرما..... ۹۰
- شکل ۵-۶: تصویر ترازو و گواهی کالیبراسیون مورد استفاده در آزمایشات این مطالعه..... ۹۱

فصل ۱ : کلیات پژوهش

۱-۱- مقدمه

از آن جا که بیماری های عفونی عامل مرگ های زودرس بوده و روزانه باعث مرگ هزاران نفر در سرتاسر جهان می شوند از آنتی بیوتیک های تجاری متفاوتی در سرتاسر جهان برای کنترل عفونتها و بیماریهای عفونی انسان استفاده می شود. از طرفی استفاده طولانی مدت از این آنتی بیوتیکها باعث ظهور باکتریهای مقاوم به چند دارو شده و مشکلات بالینی مهمی را در درمان بیماریهای عفونی ایجاد کرده بنابراین باعث تقاضای روز افزون جامعه برای دریافت دارو و مواد آنتی باکتریال طبیعی شده است.

با توجه به گرایش روز افزون بشر به درمان توسط مواد طبیعی، قارچ ها می توانند منبعی مناسب برای تأمین این نیاز باشند. مؤثر و ارزان بودن و سهولت استفاده (تهیه و مصرف) قارچها از مزایای آنها در تولید دارو می باشد. همچنین از زمان های دیرین برای حفظ سلامت بشر، داروهای سنتی به طرق مختلف از گیاهان و قارچ ها تهیه می شد و از طرفی این داروهای سنتی نقش برجسته ای در درمان انسان ها داشت.

قارچ ها از زمان های قدیم به لحاظ خواص دارویی، به خصوص در کشورهای آسیای شرقی مورد توجه بوده اند. فرآورده های قارچی به طور قابل ملاحظه ای از لحاظ ساختاری پیچیده بوده و از لحاظ شیمیایی خالص نمی باشند. ترکیبات ضد سرطانی بدست آمده از قارچ ها در سطوح متفاوتی از لحاظ میزان خلوص مورد استفاده بوده و در صورتیکه این مواد به طور کامل مصرف شوند، می توانند همانند مواد غذایی مصرفی در کنار ترکیبات درمانی شیمیایی در درمان به کار گرفته شوند و یا در عمل از آنها همانند عصاره تغلیظ شده و به صورت مکمل های غذایی رژیمی استفاده شوند [۷؛ ۸؛ ۹؛ ۱۰].

خاصیت درمانی قارچهای ماکروسکوپی تا سالهای اخیر در پرده ای از ابهام باقی مانده بود، تا اینکه بررسیهای علمی، خواص دارویی آنها را نشان داد. از جمله آنها می توان به خواص ضد باکتریایی، ضد ویروسی، ضد قارچی، ضد حساسیت، تقویت سیستم ایمنی، ضد توموری، کاهش قند و فشار خون و ... اشاره کرد [۱۶].

تاریخچه قارچ های دارویی کمیاب نشان داد که استفاده از آن ها دقیقاً به صورت کامل نبوده بلکه به عنوان عصاره آب داغ، کنسانتره، انواع نوشیدنی یا پودر بوده و در انواع مواد نیروزا، چای و سوپ بکار گرفته می شدند. امروزه، تقریباً تمامی قارچهای مهم دارویی در ابعاد وسیع کشت شده و بنابراین دیگر نادر و کمیاب نمی باشند. هنگامی که اثر درمانی قارچهای دارویی مد نظر باشد، عموماً به صورت عصاره های غلیظ شده حاصل از آب داغ و به عنوان یک نوشیدنی مصرف شده، یا آنکه از طریق انجماد و پودر خشک گرانوله بدست می آیند که به سادگی قابل حمل و نقل و مصرف می باشند [۱۱]. این عصاره های مایع یا خشک شده یا پودری داخل کپسول، می توانند به عنوان مکمل های رژیمی یا غذایی و یا دارویی با فواید بالقوه در سلامتی در نظر گرفته شوند [۱۲]. اعتقاد بر این است که جذب منظم این عصاره ها، واکنش ایمنی بدن انسان را بهبود بخشیده و لذا مقاومت به بیماری را افزایش داده و در برخی مواقع موجب برطرف شدن

بیماری نیز می‌شوند [۱۳]. در طب چینی غذاها نقش مهمی را در حفظ و بهبود سلامتی و همچنین جلوگیری از ابتلا به بیماری دارند [۱۴]. حتی با پیشرفت های پزشکی غرب در زمینه درمان بیماران سرطانی با روش های مدرن مانند جراحی، اشعه درمانی و شیمی درمانی، می توان بوسیله استفاده از رژیم غذایی مناسب، انواع بدخیم سرطان را بهبود بخشید. استفاده از رژیم های غذایی خاص در آمریکا به طور قابل ملاحظه ای طی ده سال گذشته افزایش یافته و بکارگیری این مکمل ها و درمان به روش گیاهی برای درمان سرطان توسعه یافته است [۱۵]. برای مثال در ژاپن به طور سنتی از شیتاکه به عنوان اکسیر زندگی، تقویت کننده روح و جسم استفاده می‌شد. همچنین در چین از قارچ گانودرما به عنوان اکسیری سنتی در درمان انواع بیماری ها استفاده می شد و یا مشاهده شد که در بین عده ای از پرورش دهندگان قارچ های موثر دارویی در ژاپن که خود نیز از مصرف کنندگان محصولاتشان بودند، نرخ شیوع سرطان به صورت قابل توجهی کمتر از نرخ جهانی ابتلا به سرطان بود. اطلاعات موجود حاکی از آن است که بسیاری از قارچ ها نظیر گانودرما، به عنوان مکمل غذایی می توانند برای بهبود سلامتی و سیستم ایمنی مفید واقع شوند [۴؛ ۵؛ ۶].

Ganoderma lucidum یکی از قارچ هایی است که به لحاظ دارا بودن خواص درمانی متعدد به عنوان بهترین و موثرترین قارچ های دارویی محسوب می شود. ژاپنی ها معتقدند که سوش قرمز رنگ این قارچ دارای خواص درمانی است، اما چینی ها معتقدند که سوش سیاه رنگ این قارچ دارای خواص درمانی به مراتب بیشتر از سوش قرمز رنگ است [۱۷]. این قارچ جزء یکی از مهم ترین رستنی ها در طب سنتی چین محسوب می شود، به طوری که همراه با رستنی های دیگر و یا به تنهایی برای مصارف دارویی به کار گرفته می شود. منابع و کتب قدیم، این قارچ را برای درمان تنگی نفس، تقویت حافظه، افزایش قدرت بدنی، افزایش طول عمر، درمان بیماری های کلیه و کبد، آرتریت (ورم مفاصل)، آسم، زخم معده، دیابت و بی اشتها می مفید دانسته اند. در چین و طی سالیان متمادی به عنوان اکسیری سنتی و مؤثر در درمان انواع بیماری ها شناخته شده بود. کلیه متون طب سنتی چین از این قارچ نام برده اند و آن را برای درمان انواع بیماری ها (بدون عوارض جانبی) مؤثر می دانند. امروزه از این قارچ که به صورت کشت شده در دسترس می باشد برای مصارف درمانی چون سردرد و ضعف اعصاب، بی خوابی، سرگیجه، هپاتیت، کاهش کلسترول و فشار خون، مشکلات قلبی و عروقی، مسمومیت ناشی از مصرف قارچ های سمی، سرطان استفاده می شود [۱۸]. با توجه به یکی از ویژگی های کلیدی این قارچ که عدم وجود عوارض جانبی می باشد، باعث شده است به عنوان یک مکمل عالی برای سلامتی شهرت یافته و از محبوبیت و جایگاه ویژه ای در "فارماکوپه آمریکایی و درمانی" برخوردار شود [۱۲].

۲-۱- قارچ گانودرما لوسیدوم

قارچ *Ganoderma lucidum* متعلق به شاخه Basidiomycota رده agaricomycetes راسته Polyporacea و یا (Ganodermaceae) از گیاه Aphyllophorales بوده و متعلق به خانواده گانودرما که یکی از ۴ خانواده متعلق به راسته مذکور شامل: گانودرما، هادوویا، آمورودرما و هامفریا می باشد، البته و همگی اینها بیشتر در ۸۶ گونه طبقه بندی می شوند [۳۴؛ ۳۳؛ ۳۲].

قارچ های شاخه بازیدیومیکوتا منبع تولید تعداد زیادی از ترکیبات فعال بیولوژیکی به شمار می روند [۱۹؛ ۲۰؛ ۲۱]. کلاهک این قارچ ها، میسلیم یا محیط کشت مایع که میسلیم در آن کشت داده شده است را می توان به عنوان منابع تولید مواد موثره در قارچ ها نام برد [۲۲]. بازیدیومیکوتا ها را می توان از طریق وجود اندام میوه ده (تولید کلاهک) تشخیص داد. به طور کلی به این قارچ ها، قارچ های ماکرو اطلاق شده که به اندازه ی کافی بزرگ بوده و با چشم غیر مسلح دیده شده و با دست قابل چیدن می باشند [۲۳]. مشخص شده است که تقریباً یک و نیم میلیون گونه قارچ در جهان وجود دارد که ۷۰۰۰۰ گونه از آن ها بررسی شده اند [۲۴].

در راسته پلی پوراسه منافذی زیر سطح اسپروفور وجود دارد. اسپروفور سخت و بیشتر به حالت چرمی و یا حتی چوبی است. اسپروفور این قارچ ها اکثراً روی سطح خارجی تنه درختان زنده و یا مرده و شاخه ها رشد نموده و حالت تاقچه ای به خود می گیرد. اسپروفور این قارچ ها نسبت به قارچ های چتری بزرگتر بوده و می تواند به صورت فعال تا چندین ماه باقی بماند. اگرچه بیشتر قارچ های این راسته فقط تا یک فصل می توانند فعال بمانند، اما یک حالت استثنایی در مورد جنس گانودرما (شکل ۱) وجود دارد و اندام تولید مثلی این قارچ ها همیشگی می باشد [۳۰].

قارچ گانودرما معمولاً ضخیم و به صورت تاقچه های چوبی مانند روی تنه درختان افتاده یا مرده نظیر راش، بلوط، سپیدار و بسیاری از دیگر درختان رشد می کند. گاهی اوقات عرض این قارچ به ۰/۵ متر هم می رسد که بسیار سخت و چسبیده روی تنه قرار دارد [۳۰].

گانودرما لوسیدوم دارای سابقه طولانی در استفاده برای تضمین سلامت و طول عمر در چین، ژاپن و دیگر کشورهای آسیایی است. این قارچ دارای اندازه بزرگ و یک بافت چوبی است. کلمه لاتین *lucidum* (درخشان) اشاره به ظاهر قارچ دارد.

در چین، این قارچ به لیگزی معروف است که نشان دهنده ترکیبی از قدرت معنوی و جوهر جاودانگی و به عنوان "گیاه با قدرت معنوی" نماد موفقیت، رفاه، قدرت الهی و طول عمر محسوب می شود. در بازارهای جهانی گانودرما در اشکال مختلف مانند پودر، مکمل های غذایی و چای موجود است که از نقاط مختلف

قارچ، از جمله میسیلیوم، اسپور و اندام بارده تولید شده است. متأسفانه به دلیل خصوصیات مورفولوژیکی متفاوت ناشی از تفاوت شرایط رشد در مکان های جغرافیایی مختلف و همچنین وقوع جهش و نوترکیبی، استفاده از ویژگی های ماکروسکوپی برای طبقه بندی گانودرما منجر به اشتباه در طبقه بندی می شود [۳۱]. ویژگی های مورفولوژیکی که بیشتر قابل اعتماد هستند شامل شکل اسپور و اندازه آن، رنگ زمینه و استحکام و میکروآناتومی پوسته است. تولید کلامیدوسپور و شکل آن و نیز مطالعات آنزیمی برای طبقه بندی گونه های مشابه استفاده می شود [۳۴؛ ۳۳؛ ۳۲]. روش های جدید برای شناسایی شامل روش های بیوشیمیایی، ژنتیکی و مولکولی می باشد. لازم به ذکر است پیترا آدولف کارستن در سال ۱۸۸۱ این جنس را گانودرما که یک نام لاتین می باشد، نامگذاری نمود و لوسیدوم نیز که از نظر گیاه شناسی از سطح براق آن مشتق شده است، به کار برده شد [۱۲۸؛ ۱۲۹].



شکل ۱-۱: تصاویری از قارچ گانودرما لوسیدوم [۱۹۹؛ ۱۳۲]

۳-۱- انواع گانودرما

گانودرما به دلیل مزایای زیاد بهداشتی محبوبیت زیادی به عنوان یک غذای سالم در ژاپن و چین پیدا کرده است. با توجه به شرایط مختلف رشد این گونه دارای اشکال مختلف، درخشش، رنگ و کیفیت متفاوت بوده که نمی‌توان نتایج تحقیقات مختلف را به همه گونه‌ها در شرایط مختلف پرورش داده شده تعمیم داد [۲۷]. در بازارهای جهانی گانودرما در اشکال مختلف مانند پودر، مکمل‌های غذایی و چای موجود است که از نقاط مختلف قارچ، از جمله میسلیوم، اسپور و اندام بارده تولید شده است.

اگرچه بیش از ۲۰۰۰ نوع گانودرما تاکنون شناخته شده ولی تا سال ۲۰۰۰ در حدود ۶ نوع جهت کشف مزایای دارویی مورد مطالعه قرار گرفته‌اند که شامل ریشی قرمز، سیاه، آبی، سفید، زرد و بنفش می‌باشد [۲۸]. از این شش نوع، گانودرمای سیاه، سفید و قرمز مهمترین اثرات تقویت کننده و دارویی را از خود نشان داده‌اند و اکنون به طور گسترده در بازارهای جهانی به عنوان مکمل‌های سلامتی استفاده می‌شوند. با این حال گانودرمای قرمز موثرترین گونه در بهبود سلامت با تاثیر بر سیستم ایمنی بدن و بسیاری از اعضای حیاتی است. گانودرمای سیاه نسبتاً رایج است و آن را می‌توان در بسیاری از فروشگاه‌های گیاهی چین یافت. این گونه از گانودرما دارای شکل ناهموار است و می‌تواند تا ۱۰ سانتیمتر قطر داشته باشد، اگر چه نمونه‌های بالغ حدود ۱۵ سانتیمتر قطر دارند. این گونه گانودرما به دلیل کمبود پلی ساکاریدها نسبت به گانودرمای قرمز دارای ارزش پایین تری است. ریشی سیاه و سفید نیز به گانودرمای چای معروف هستند و در بسیاری از فروشگاه‌های گیاهان دارویی چین یافت می‌شوند.

گانودرمای بنفش به صورت وحشی در کوه‌های چانگ بای در استان جیلین چین رشد می‌کند. این گونه بسیار نادر بوده و در ظاهر شباهت زیادی به گانودرمای قرمز دارد. اما دارای رنگ بنفش قابل توجه در کلاه قارچ می‌باشد. به دلیل کمبود نمونه، تحقیقات و آزمایش‌های محدودی روی این نوع گانودرما صورت گرفته است.

گانودرمای قرمز دارای مقدار زیادی از پلی ساکاریدها (قندهای پیچیده) می‌باشد. با این حال به علت شرایط سخت زیست محیطی، بی‌ثباتی گانودرمای قرمز وحشی در طبیعت و آسیب‌پذیری آن به واسطه آلودگی به بیماری‌ها و آلودگی حشرات، تعداد نمونه‌های ریشی قرمز وحشی با کیفیت بالا که می‌تواند در طبیعت به بلوغ کامل برسد، نادر است. در نتیجه از حدود ۳۰ سال پیش، دانشمندان و کشاورزان روش‌های مختلف کشت برای تولید انبوه گانودرما را مورد آزمایش قرار داده‌اند [۲۹].

البته گونه‌های *G. tsugae*، *Ganoderma. sinse*، *G. applanatum* و *G. capense* گونه‌های دارویی این جنس هستند که کشت آنها شبیه *Ganoderma lucidum* است [۲۱]. گانودرما یا ریشی نام‌های دیگری

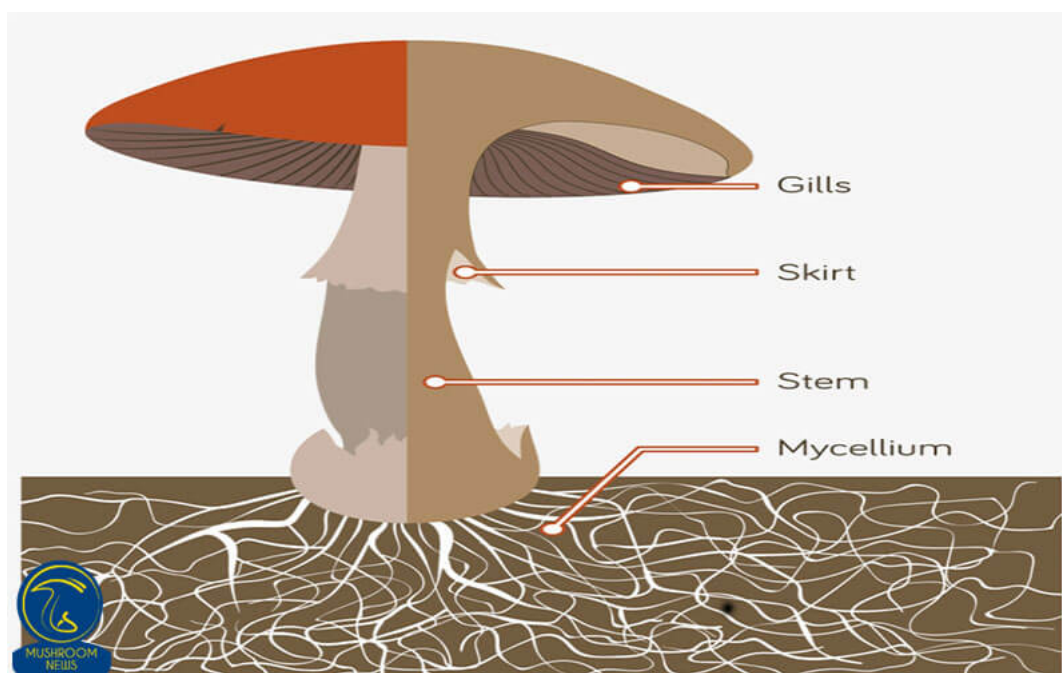
مانند *Gyokurai, Kisshotake, Kamishiba, Saegusa, Sakikusa, Saiwaitake, Mannentake* نیز دارد. *Zuishi Sankei, Fushiso*



شکل ۱-۲: تصاویر گونه های گانودرما ۱. *G. orbiforme*، ۲. *G. sinense*، ۳. *G. calidophilum*.

۴. *G. lucidum*، ۵. *G. flexipes*، ۶. *G. multiplicatum*، ۷. *G. resinaceum* [۲۰۰]

۴-۱- اندام شناسی و پراکندگی جغرافیایی در جهان و ایران



شکل ۱-۳ بدنه یک قارچ نشان داده شده است که متشکل از بخش های زیر است [۱۳۳].

۱-۴-۱-۱- میسلیوم

میسلیوم یک شبکه گیاهی رویشی است که می تواند مانند یک تشک و یا یک زیر گلدانی روی محیط کشت مورد نظر گسترش پیدا کند. به نظر می رسد که میسلیوم گانودرما حاوی مقادیر زیادی از ترکیبات زیست فعال همانند میوه بارده باشند [۱۳۰]. پلی ساکاریدهای استخراج شده از میسلیوم نیز تاثیری شبیه همانند میوه بارده دارند. اسپوره های گانودرما از بدنه میوه بارده به صورت ذرات ریزی جدا شده و روی تکه های چوبی که در حال پوسیدن می باشد فرود آمده و تحت شرایط مناسب جوانه می زنند [۱۳۱؛ ۱۳۲].

۲-۴-۱-۱- بدن میوه دهنده

بدن میوه دهنده بازیدیوکارپ یا اجسام میوه ای قارچ از ۲ تا ۱۰ سانتیمتر قطر دارند. آنها به شکل کلیه هستند و دارای سطح بیرونی براق با نوارهای سفید زرد رنگ حاشیه ای که در مراحل اولیه رشد آنها را زیبا تر می کند از خود را نشان می دهند و در طی زمان و با بلوغ آنها به رنگ قهوه ای مایل به قرمز می شوند [۱۳۳].

۳-۱-۴-۱- ساقه

استیپ (ساقه) معمولاً وجود دارد، اما گاهی اوقات ممکن است کوتاه و یا کشیده باشد و طول قطر ساقه بر اساس شرایطی که در آن رشد می کند می تواند دارای اندازه های متفاوتی باشد [۱۳۳].

۴-۱-۴-۱- اسپور

اسپورهای *Ganoderma lucidum* در محدوده اندازه ۱ تا ۱۰ میکرون و کمی زرد رنگ هستند. دیواره اسپور از کیتین تشکیل شده است. گزارش شده است که اسپورها دارای مقادیر بیشتری ترکیبات فعال زیستی نسبت به بدن بارده می باشند اما به سختی می توان اسپورها را شکست و این به دلیل وجود کیتین به صورت یک دیواره ضخیم که از ویژگی های اصلی اسپور می باشد و از قارچ در برابر شرایط نامناسب محافظت می کند و در برابر اسیدها مقاوم بوده و باعث ماندگاری آن در طبیعت می شود اسپور تقریباً از ۱۹٪ سیلیس و ۱۷٪ کلسیم و ۵۲٪ تا ۵۷٪ کیتین تشکیل شده است [۱۳۴].

۵-۱- زیستگاه رشد

این قارچ یک ساله می تواند روی درختان مختلفی مانند بلوط، افرا، نارون، بید، صمغ شیرین، ماگنولیای در حال پوسیدگی و یا روی درختان مخروطی مانند *Larix*، *ptea* و *pinus* در مناطق نیمه گرمسیری از جمله مناطقی از اروپا، آسیا و آمریکای شمالی و جنوبی و در کشورهای شرقی و در مناطق معتدل و نیمه گرمسیری که در آن ها درختان آلو رشد می کند و در نزدیکی سطح خاک و گاهی اوقات در خاکهای ناشی از ریشه های مدفون به تنهایی و یا به صورت گروهی رشد کرده و باعث بیماری پوسیدگی سفید در پایه درختان شود [۱۲۸؛ ۱۳۵].

کیفیت قارچ گانودرما نیز به شدت به مواد مغذی موجود در زیستگاه آن بستگی دارد. کمیت و کیفیت این مواد مغذی تعیین کننده کیفیت و اندازه کلاهک قارچ است. گانودرما (ریشی قرمز) نزدیک به بلوغ، اسپور تولید می کند که در نهایت به هوا منتشر شده و چرخه زندگی قارچ ادامه می یابد. از آنجا که پوسته بیرونی این اسپور سخت است، جوانه زنی آن نیز مشکل است و این یکی از دلایل کم بودن پراکنش طبیعی گانودرما در طبیعت می باشد.

قارچ دارویی گانودرما لوئسیدوم رویشگاههای بسیار وسیعی داشته و در سرتاسر جهان از آمازون تا مناطق جنوبی آمریکای شمالی و قسمت های وسیعی از آسیا یافت می شود [۱۸]. از مناطق مختلف دنیا نیز مانند فرانسه، انگلیس، کانادا، آمریکای شمالی، تایوان، چین، کره و ژاپن گزارش شده است [۱۹].

تاکنون گونه‌های مختلفی از این جنس نیز از ایران گزارش شده‌اند [۱۹]. این قارچ روی تعداد زیادی از درختان مرده و در حال فساد به خصوص خزان دارهایی مانند بلوط، افرا، نارون، ماگنولیا، بید، شاه بلوط، سپیدار و غیره قادر به رشد بوده و در کشورهای شرق آسیا به طور وسیعی روی درختان جنس پرونوس رشد پیدا می‌کند. با توجه به شرایط اقلیمی کشور ایران و وجود اقلیم‌های مختلف (معتدل مرطوب تا گرم و خشک) پراکندگی گونه‌های قارچ گانودرما متفاوت است. بیشترین میزان گونه‌های گانودرما گزارش شده در نواحی معتدل و مرطوب حاشیه دریای خزر مانند گرگان، تنکابن، گیلان، جنگل‌های مازندران و رامسر روی درختانی مانند خرمالو، بلوط، شمشاد جنگلی، ممرز و نارون گزارش شده است [۲۰].



شکل ۱-۴ تصویر قارچ گانودرما رشد کرده روی درخت [۲۰۰]

۶-۱- نیازهای قارچ گانودرما لوسیدوم برای رشد

قارچ گانودرما لوسیدوم که به عنوان داروی عامیانه یا تغذیه‌ای مورد استفاده قرار می‌گیرد، یک ساپروفیت است. آنها به دلیل عدم وجود کلروفیل نمی‌توانند فتوسنتز کنند. میسلیم می‌تواند قندهای ساده، اسیدهای

آلی و سایر کربوهیدرات های موجود را به طور مستقیم جذب کند ولی در بستر رشد، میسلیم قارچ نمی تواند از کربن معدنی استفاده کند. این رشد میسلیم نیاز به حضور نیتروژن دارد [۱۳۶]. باتوجه به مراحل مختلف رشد این قارچ از قبیل رشد میسلیم، جوانه زدن میوه، رشد میوه و.... که در هریک از مراحل دارای نیازهای متفاوت تغذیه ای می باشد. در صورتیکه این نیازها به درستی و با توجه به هر مرحله رشد فراهم نشوند می توانند در میزان رشد اختلال ایجاد کرده و یا باعث از بین رفتن قارچ شوند. این نیازها را عوامل تغذیه ای و شرایط محیطی دانست [۸۱].

جدول ۱-۱: شرایط مورد نیاز برای کشت گانودرما در شرایط مختلف رشد [۲]

مرحله ی رشد میسلیم		
نور	رطوبت نسبی	دما
بدون نور	۹۰-۹۵ درصد	۳۰ درجه سانتیگراد
مرحله ی تشکیل پریمور دیا		
نور	رطوبت نسبی	دما
۲۰۰-۵۰۰ لوکس	۸۵-۹۵ درصد	۲۰-۲۵ درجه سانتیگراد
مرحله ی تشکیل میوه		
نور	رطوبت نسبی	دما
۵۰۰-۱۰۰۰ لوکس	۸۰-۸۵ درصد	۲۰-۲۲ درجه سانتیگراد

۱-۶-۱- عوامل تغذیه ای

باتوجه به رشد گانودرما لوسیدوم روی درختان پیر و فرسوده به عنوان یک قارچ گندروی در نظر گرفته می شود. برای رشد به کربن، نیتروژن، املاح معدنی و ویتامین ها نیاز داشته و هریک اثر مهمی روی رشد قارچ دارد [۸۲].

۱-۶-۱-۱- منابع کربنی

منبع کربنی انرژی مورد نیاز برای رشد و نمو را تهیه نموده و نوع و میزان آن عامل موثری در رشد و متابولیت های ثانویه می باشد. منابع کربنی مورد نیاز در محیط کشت مایع و جامد متفاوت بوده به صورتی که در محیط کشت مایع بهترین منابع کربنی ساکارز و گلوکز بوده و در محیط کشت جامد از خاک اره، پوست پنبه دانه، کاه و کلش (برنج و گندم) و سایر ضایعات کشاورزی به عنوان منابع کربنی استفاده می شوند [۸۱].

۱-۶-۱-۲- منبع نیتروژنی

یکی از اجزای اصلی پروتئین نیتروژن می باشد که در تمام فرآیندهای بیولوژیک نقش داشته و بدون آن امکان سنتز پروتئین وجود ندارد. معمولا منابع نیتروژن برای کشت مایع شامل از پودر عصاره مخمر و پپتون گوشت و در محیط کشت میوه این قارچ از ترکیبات مختلفی مانند سبوس برنج، سبوس گندم، پودر ذرت، سولفات آمونیوم، اوره و سایر ترکیبات حاوی نیتروژن می توان استفاده کرد [۸۱].

۱-۶-۱-۳- منابع عناصر معدنی و ویتامین ها

عناصر مورد نیاز برای قارچ گانودرما لوسیدوم شامل: پتاسیم، سدیم، کلسیم، منیزیم، فسفر، سولفور و روی می باشد. مهمترین این عناصر برای رشد این قارچ فسفر، پتاسیم و منیزیم بوده که از نمک های معدنی آن ها استفاده می شود. ویتامین های مورد نیاز این قارچ، ویتامین های گروه B و به میزان بسیار کم می باشد و عمدتا در سایر اجزای تشکیل دهنده وجود داشته و نیازی به افزودن آن ها نمی باشد [۸۱].

۲-۶-۱- عوامل محیطی

۱-۲-۶-۱- عامل دما

دما یکی از عوامل موثر در رشد این قارچ بوده و اپتیمم دمای مناسب این قارچ بین 20°C - 35°C می باشد. در دماهای دیگر رشد این قارچ کم شده و در دمای زیر صفر متوقف می شود ولی قارچ از بین نمی رود [۸۱].

۲-۲-۶-۱- عامل رطوبت

رطوبت مورد نیاز برای رشد میسلیم $65-70\%$ و رطوبت کمتر از 45% باعث توقف رشد میسلیم روی می شده و باعث مرگ میوه جوان قارچ می شود و برای رشد میوه این قارچ $85-90\%$ بوده و رطوبت نسبی هوای کمتر از 60% رشد میوه قارچ متوقف می شود. وقتی که رطوبت نسبی هوا بیش از 95% شود به دلیل کاهش میزان اکسیژن هوا باعث مرگ میوه قارچ می شود [۸۱؛ ۸۳].

۳-۲-۶-۱- عامل اکسیژن

باتوجه به این که قارچ ها هوازی هستند به اکسیژن نیاز دارند که این موضوع در کشت مایع مهم تر بوده و اکسیژن رسانی بوسیله حرکت محیط کشت به صورت چرخشی و دورانی می باشد [۸۴].

۴-۲-۶-۱- عامل نور

با توجه به مراحل مختلف رشد قارچ گانودرما حساسیت های متفاوتی به نور از خود نشان می دهد، به صورتی که رشد میسلیم در تاریکی بوده و حتی تاباندن نور فرابنفش در طول موج $260-265\text{ nm}$ به مدت ۳۰ دقیقه می تواند آن را نابود کند و برای تحریک به تولید میوه نیاز به نور ضعیف آبی با طول موج $500-\text{nm}$ 400 می باشد [۸۵].

۵-۲-۶-۱- تاثیر pH

میسلیم های گانودرما در دامنه pH ۳-۹ رشد می کنند. البته رشد در pH محیط کشت مایع به ۸ برسد رشد شروع به کاهش می کند و وقتی pH به ۹ برسد رشد متوقف خواهد شد و باید گفت: گانودرما در محیط

اسیدی بهتر رشد می کند [۸۵].

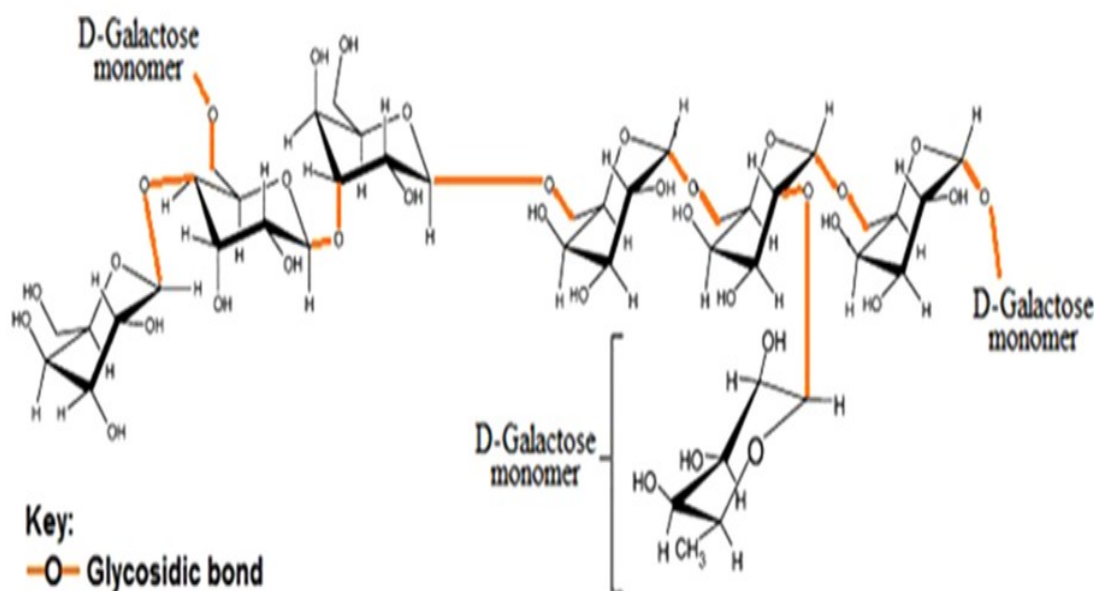
۷-۱- ترکیبات شیمیایی قارچ گانودرما

انسان از هزاران سال قبل از قارچ های وحشی به عنوان منبع غذایی استفاده کرده است [۳۷]. قارچ ها از نظر تغذیه ای مواد غذایی جذابی می باشند [۳۸]. در گذشته از قارچ ها عمدتاً به دلیل خوش طعم و منحصر به فرد بودن به عنوان یک ماده غذایی استفاده می شد [۳۹؛ ۴۰]. امروزه استفاده از قارچ کاملاً متفاوت از استفاده های سنتی شده است، زیرا بسیاری از تحقیقات در مورد ترکیبات قارچ ها انجام شده به صورتی که قارچ ها را از لحاظ تغذیه ای بین سبزیجات و گوشت قرار داده است [۴۱؛ ۴۲؛ ۴۳؛ ۴۴؛ ۴۵؛ ۴۶؛ ۴۷؛ ۴۸]. به طور کلی قارچ ها عموماً حاوی حدود ۹۰٪ آب و ۱۰٪ ماده خشک است. محتوای پروتئین در ماده خشک ۲۷٪ تا ۴۸٪ درصد متغیر بوده و کربوهیدرات آن ها کمتر از ۶۰٪ و لیپیدها بین ۲٪ تا ۸٪ می باشد [۴۹]. البته ترکیبات غذایی قارچ گانودرما کمی متفاوت تر است که شامل ۱۶/۹٪ آب، ۲۶/۴٪ پروتئین، ۴۳/۱٪ کربوهیدرات، ۱۰/۲٪ عناصر، ۴/۵٪ چربی و ۱٪ فیبر تشکیل شده است [۵۰؛ ۵۱]. البته گانودرما حاوی حدود ۴۰۰ ترکیب مختلف زیست فعال از قبیل تری ترپنویدها، پلی ساکاریدها، گلیکوپروتئین ها، نوکلئوتیدها، استرول ها، استروئیدها، اسیدهای چرب، پروتئین ها، پپتیدها، ژرمانیوم آلی، آنزیم های درون سلولی و بیرون سلولی و عناصر کمیاب می باشد [۷۱؛ ۱۲۸؛ ۱۳۷].

۷-۱-۱- پلی ساکاریدها

در حدود ۵۰٪ تا ۶۵٪ از ماده خشک میوه قارچ ها از کربوهیدرات تشکیل شده است [۵۲]. پلی ساکارید یک زنجیره طولانی از مونوساکاریدها است که توسط پیوندهای گلیکوزیدی به هم متصل می شوند. بیشتر آنها متعلق به گروهی از β -گلوکان هستند که از ستون فقرات خطی β -تشکیل شده اند. آنها به عنوان عوامل فعال در مبارزه با سرطان در نظر گرفته می شوند. وزن مولکولی آن ها 10^5 تا 10^6 در ساختار اولیه متغیر است [۱۲۸]. β گلوکانهای با جرم مولکولی بالاتر موثرتر از گلوکانهای با جرم مولکولی پائین تر هستند [۷۲؛ ۱۳۸]. تاکنون بیش از ۲۰۰ نوع پلی ساکارید متفاوت از اسپور، اندام بارده، میسلیوم و محیط کشت مایع این قارچ جدا شده است [۷۲]. از این پلی ساکاریدها می توان به β -D-glucan، هتروپلی ساکاریدها و گلیکوپروتئین ها اشاره کرد [۱]. تحقیقات نشان داده است که پروتئین های متصل به پلی ساکاریدهایی که از *Ganoderma lucidum* استخراج شده است، دارای فعالیت ضد تومور و ضد دیابت هستند [۳؛ ۱۷۹]. تا کنون نقش های متفاوت دارویی مختلفی از پلی ساکاریدهای موجود در قارچ گانودرما گزارش شده است که

می توان به به فعالیت های ضد التهابی، ضد تومورزایی، کاهش قند خون، افزایش قدرت سیستم ایمنی بدن، ویژگی های ضد ویروسی و جلوگیری از لخته شدن خون را نام برد و این خواص به شدت وابسته به ساختار و وزن مولکولی آن ها بستگی دارد [۷۳؛ ۷۴؛ ۷۵؛ ۷۶؛ ۷۷].



شکل ۱-۵: ساختار مولکولی پلی ساکارید گانودرما لوسیدوم که از واحدهای D-گالاکتوز با پیوندهای گلیکوزیدی تشکیل شده [۲۰۶]

۲-۷-۱- پروتئین ها

پروتئین ها یکی از اجزای مهم ماده خشک قارچ ها می باشد [۵۴؛ ۵۵؛ ۵۶؛ ۵۷؛ ۵۸]. مطابق گزارش لینستل پروتئین موجود در قارچ ها بین ۷۲٪ تا ۸۳٪ قابلیت هضم دارند و در گوشت تقریباً ۹۹٪ می باشد [۵۹؛ ۶۰]. از طرفی پروتئین قارچ کمتر از گوشت و بیشتر از اغلب غذاها از جمله شیرمی باشد [۶۱]. میزان پروتئین قارچ ها اغلب بین ۱۹/۱٪ تا ۳۹/۱٪ در ماده خشک گزارش شده است [۶۲؛ ۶۳]. ورما و سایر همکاران گزارش دادند که قارچ برای گیاه خواران بسیار مفید می باشند زیرا دارای اغلب اسید آمینه های موجود در پروتئین حیوانات را دارا می باشند [۶۴]. البته با میزان پروتئین قارچ ها با نگهداری کاهش می یابد [۶۵]. قارچ ها دارای اغلب اسید آمینه های ضروری برای یک انسان بزرگ سال می باشند [۶۶]. از گانودرما چندین پروتئین فعال جدا شده است و این در حال است که برخی پروتئین ها نیز در ترکیب با پلی ساکاریدها و پپتیدها وجود دارد و در سال ۱۹۸۹ یک پروتئین جدید به نام ling zhi-8 (LZ-8) که از آن خواص ایمنی کشف شده است،

جداسازی شد. البته دیگر پروتیین ها که دارای اثرات میتوزنیک و تعدیل کننده سیستم ایمنی موش ها
و ضد قارچ نیز جداسازی شده است [۸۰].

۳-۷-۱- چربی ها

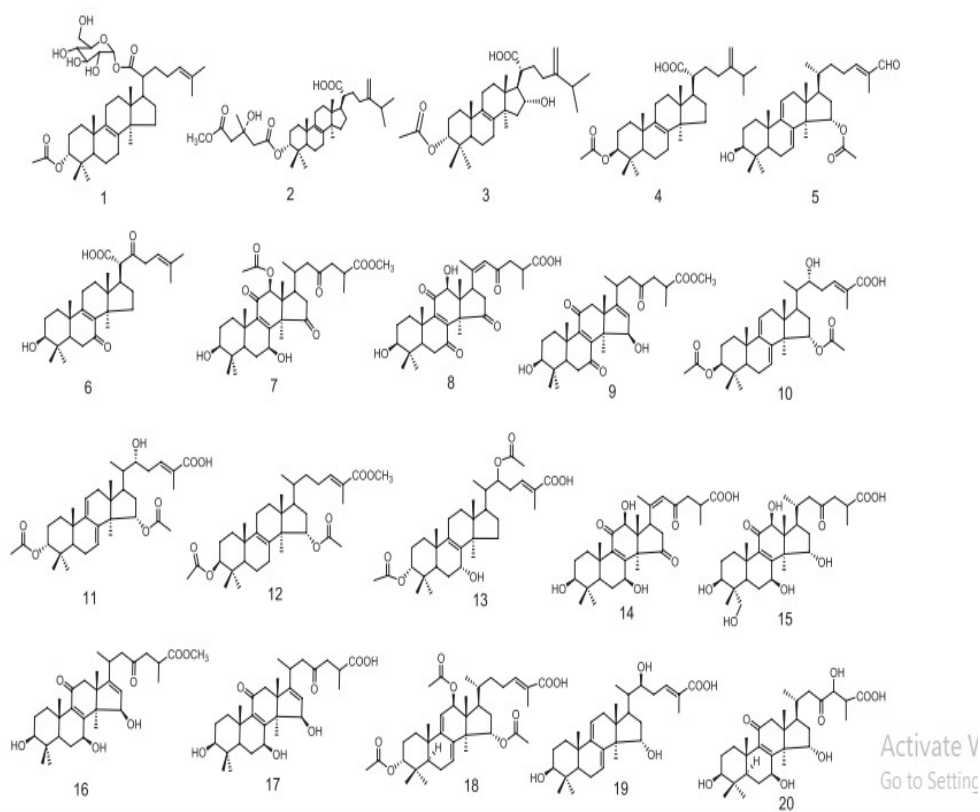
محتوای چربی در قارچ ها در مقایسه با کربوهیدرات و پروتیین ها بسیار کم است. چربی های موجود در بدن
بارده قارچ از درصد بالایی از چربی های غیر اشباع تشکیل شده است [۶۷]. مشاهده شد که قارچ ها سرشار از
اسید لینولنیک است که یک اسید چرب ضروری است [۶۸].

۴-۷-۱- مواد معدنی

عمده مواد معدنی موجود در قارچ شامل K، P، Na، Ca و Mg است، البته عناصری مانند Cu، Zn، Fe، Mo
و Cd نیز به صورت جزئی در قارچ ها وجود دارد [۶۸؛ ۶۹؛ ۷۰].

۵-۷-۱- ترپنوئیدها

گروه های ترپنوئیدی گانودرما به دلیل اثرات دارویی مختلف مورد توجه زیادی قرار گرفتند و تاکنون بیش از
۳۰۰ تری ترپن اکسیژن دار مختلف جداسازی شده است [۷۸؛ ۸۹؛ ۱۷۸]. این ترپنوئیدها را می توان بر اساس
تعداد کربن ۲۴، ۲۷ و ۳۰ عددی و همچنین براساس ساختار و گروه های عملکردی می توان تقسیم بندی
کرد، که بر همین اساس دارای وزن مولکولی متفاوتی بین ۴۵۰ تا ۶۵۰ کیلو دالتون می باشد و به دلیل وجود
حالت اکسید شده از ساختار پیچیده ای برخوردار می باشند [۷۸؛ ۸۹]. برای اولین بار محققین در سال ۱۹۸۲
گانودرمیک اسید A و B که ترپنوئید می باشند را از قارچ گانودرما لوسیدوم استخراج و شناسایی کردند [۸۷].
با توجه به تری ترپن بودن، آنها از نوع غیر فرار می باشند و در حلال های قطبی مانند اتانول و متانول حل می
شوند [۸۸]. می توان از گانودریک اسید، لوسیدینیک اسید، گانودرمیک اسید، گانودرنیک اسید، لوسیدون،
گانودرال و گانودرول را به عنوان تری ترپنوئید نام برد [۹۰؛ ۹۱]. تری ترپنوئیدها دارای ارزش زیادی از نظر
دارویی هستند. می توان از خواص ضد تومور بودن، محافظت از کبد، ضد فشار خون، ضد سنتز و جذب
کلسترول، جلوگیری از تجمع پلاکت ها در خون، ضد آلرژی و ... به عنوان خاصیت های دارویی تری
ترپنوئیدها نام برد [۸۹].



شکل ۱-۶: ساختمان تعدادی از تری ترین های جدا شده از قارچ گانودرما [۱۷۸]

۶-۷-۱- گانودریک اسید و لوسیدینیک اسید به عنوان جزیی از ترپنوئیدها

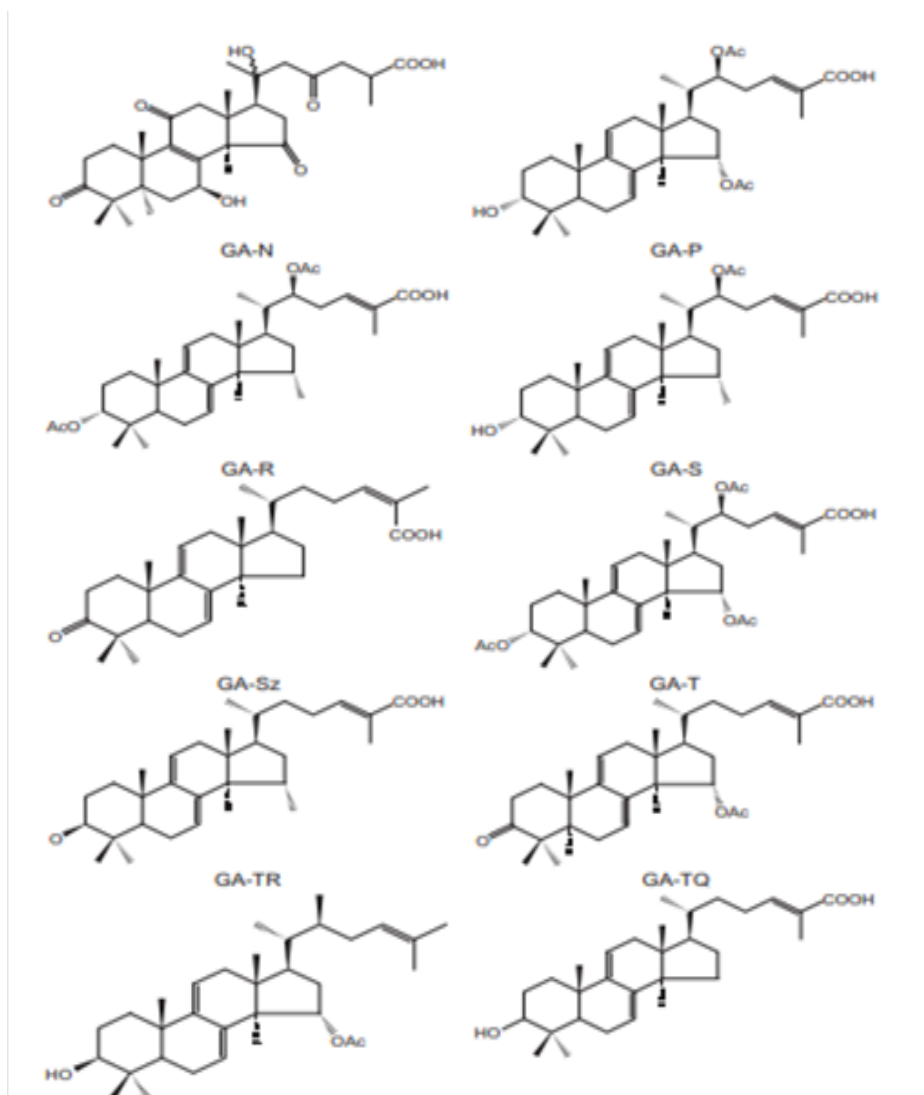
بسیاری از ترپترپنوئیدها (از جمله اسیدهای لوسیدینیک و اسیدهای گانودریک) از قسمتهای مختلف (از جمله قارچ و بدن بارور) گانودرما جدا شده اند و از لحاظ ساختمانی تا کنون تعداد قابل ملاحظه ای شناسایی شده است [۱۸۲].

Weng و همکاران در سال ۲۰۰۸ [۲۰۶]، Hsu و همکاران در سال ۲۰۰۸ [۲۰۸] و Liu و همکاران در سال ۲۰۰۶ [۲۰۷] نشان دادند از قارچ گانودرما لوسیدوم اسیدهای لوسیدینیک (A, C, D, E2 و F) و اسیدهای گانودریک (A, D, F, E و T-Q) بوسیله اتانول استخراج شد.

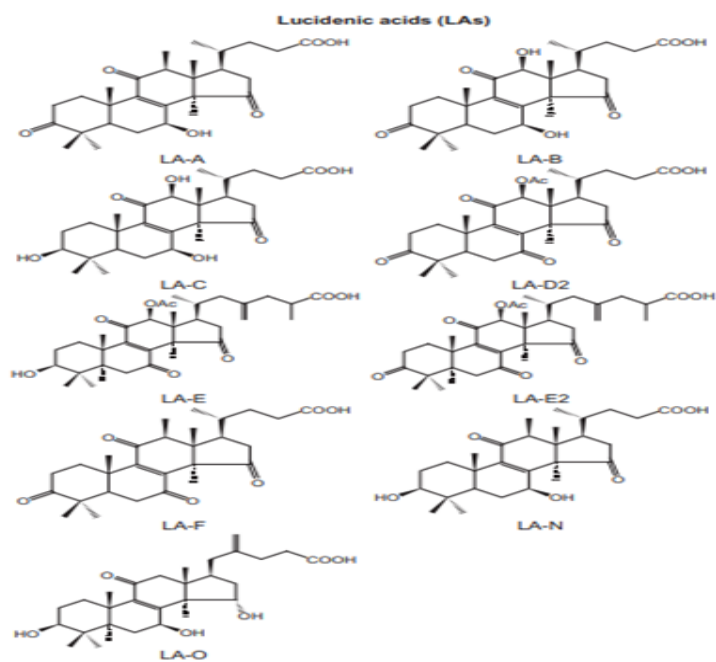
Xu و همکاران در سال ۲۰۱۹ و در جلد ۱۱۸۱ از سری کتاب های منتشر شده در مجله اسپرینگر و با استفاده از تحقیقات مختلف صورت گرفته به فرمولاسیون گانودریک اسیدهای مختلف پرداخته که به برخی از آن ها در جدول ۱-۱ اشاره شده است [۲۰۸].

جدول ۱-۲: فرمول و نام لاتین برخی گانودریک اسیدهای شناسایی شده [۲۰۸]

No	Chemical name	Formula	No	Chemical name	Formula
1	Ganoderic acid A	C30H44O7	24	Ganoderic acid GS-2	C30H44O6
2	Ganoderic acid C	C30H42O7	25	Ganoderic acid Ma	C34H52O7
3	Ganoderic acid C6	C30H42O8	26	Ganoderic acid Mc	C36H54O9
4	Ganoderic acid DM	C30H44O4	27	Ganoderic acid Me	C34H50O6
5	Ganoderic acid K	C32H46O9	28	Ganoderic acid Mg	C35H54O8
6	Ganoderic acid Mi	C33H52O6	29	Ganoderic acid P	C34H50O7
7	Ganoderic acid R	C34H50O6	30	Ganoderic acid S2	C33H48O5
8	Ganoderic acid U	C30H48O4	31	Ganoderic acid W	C34H52O7
9	Ganoderic acid XL1	C30H46O7	32	Ganoderic acid Z	C30H48O3
10	Ganoderic acid XL3	C30H46O5	33	Ganoderic acid β	C32H46O6
11	Ganoderic acid XL5	C31H48O8	34	Ganoderic acid δ	C30H44O7
12	Ganoderic acid ζ	C30H42O7	35	Ganoderic acid θ	C30H42O8
13	Ganoderic acid C2	C30H46O7	36	Ganoderic acid AM1	C30H42O7
14	Ganoderic acid Df	C30H44O7	37	Ganoderic acid B	C30H44O7
15	Ganoderic acid GS-1	C30H42O6	38	Ganoderic acid GS-3	C32H46O8
16	Ganoderic acid GS-3	C32H46O8	39	Ganoderic acid LM2	C30H42O7
17	Ganoderic acid Mb	C36H54O9	40	Ganoderic acid Md	C35H54O7
18	Ganoderic acid Mh	C34H52O8	41	Ganoderic acid Mf	C32H48O5
19	Ganoderic acid Mj	C33H52O6	42	Ganoderic acid S1	C30H44O3
20	Ganoderic acid Q	C34H50O7	43	Ganoderic acid X	C33H50O5
21	Ganoderic acid T	C36H52O8	44	Ganoderic acid XL2	C30H46O7
22	Ganoderic acid V	C32H48O6	45	Ganoderic acid Y	C31H46O3
23	Ganoderic acid α	C32H46O9	46	Ganoderic acid ϵ	C30H44O7



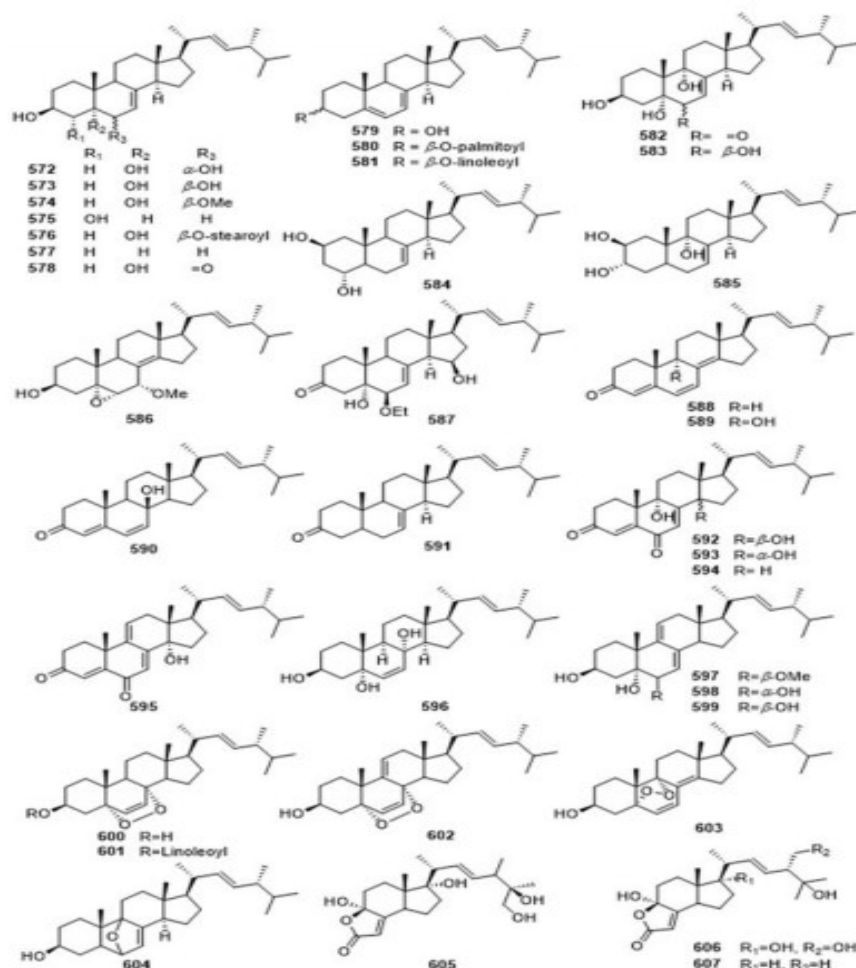
شکل ۱-۷: ساختمان شیمیایی گانودریک اسید جدا شده از قارچ گانودرما [۱۸۳]



شکل ۸-۱: ساختمان شیمیایی لوسیدنیک اسید جدا شده از قارچ گانودرما [۱۸۳]

۷-۷-۱- استرول ها

استرول ها (Sterols) که به طور طبیعی در گیاهان و حیوانات و قارچ ها مشاهده می شوند، استروئیدهای الکلی زیر گروه مولکول های ارگانیک می باشند. استرول ها ارتباط نزدیکی با ترپنوئیدها دارند، که در گانودرما لوسیدوم یافت می شوند [۹۲]. ارگوسترول یک استرول موجود در غشای سلولی قارچ می باشد که همانند کلسترول در سلول های حیوانی می باشد و همان نقش را ایفا می کند [۹۳]. از آزمایش وجود ارگوسترول در صنعت غلات به عنوان نتیجه آلودگی قارچی مورد استفاده قرار می گیرد. ارگوسترول در صورت قرار گرفتن در معرض اشعه ماوراء بنفش تبدیل به ویتامین D شده و به عنوان پیش ساز ویتامین D می باشد. استرول های موجود در قارچ گانودرما باعث جلوگیری از بیماری های قلبی و عروقی می شود [۸۹].



شکل ۹-۱ تصویر ساختمان شیمیایی استرول های گانودرما

۸-۷-۱- ترکیبات فنولی

ترکیبات فنولی یکی از مهمترین و رایج ترین ترکیبات زیست فعال حاصل از استخراج گانودرما لوسیدوم هستند. آنها را می‌توان به عنوان فنل های ساده و اسیدهای فنولیک مانند گالیک اسید، بنزوئیک اسید، اسید سرنگ، کلروژنیک و پلی فنول ها که در گروه های متمایز زیادی مانند فلاونوئیدها، تانن ها و استیلبن ها طبقه‌بندی می‌شوند، فلاونوئیدها گروهی از ترکیبات پلی فنلی هستند که خواص مفیدی برای سلامتی از قبیل: مهار رادیکال‌های آزاد، مهار آنزیم‌های هیدرولیتیک و اکسیداتیو و فعالیت ضد التهابی را دارا می‌باشند [۱۳۹]. مطالعات پژوهشی نشان می‌دهد که فعالیت بیولوژیکی این ترکیبات به فعالیت آنتی اکسیدانی آنها مربوط می‌شود. ترکیبات فنولی دارای ویژگی‌های بیولوژیکی و دارویی قابل توجهی هستند و برخی از آنها توانایی چشمگیری در تغییر ترکیب سولفات نشان داده‌اند. فعالیت زیستی فنولیک ها ممکن است مربوط به توانایی آنها در شلات کردن فلزات و مهار لیپوکسیژناز و حذف رادیکال های آزاد باشد [۱۴۰]. گزارش شده است که عصاره متانولی *Ganoderma lucidum* دارای فعالیت آنتی اکسیدانی بالاتری است [۱۴۱؛ ۱۴۲].

۹-۷-۱- نوکلئوزیدها و نوکلئوتیدها

نوکلئوتیدها و نوکلئوزیدها ترکیبات نیتروژنی هستند که نقش مهمی در متابولیسم دارند و باعث تحریک خونریزی می‌شود. نوکلئوزیدها شامل آدنوزین و ۵-دئوکسی ۵۰ متیل سولفینیل آدنوزین می‌باشد. آدنوزین موجود در گانودرما لوسیدوم تجمع پلاکت‌ها را سرکوب و از حملات قلبی و ترومبوز جلوگیری می‌کند [۱۴۳].

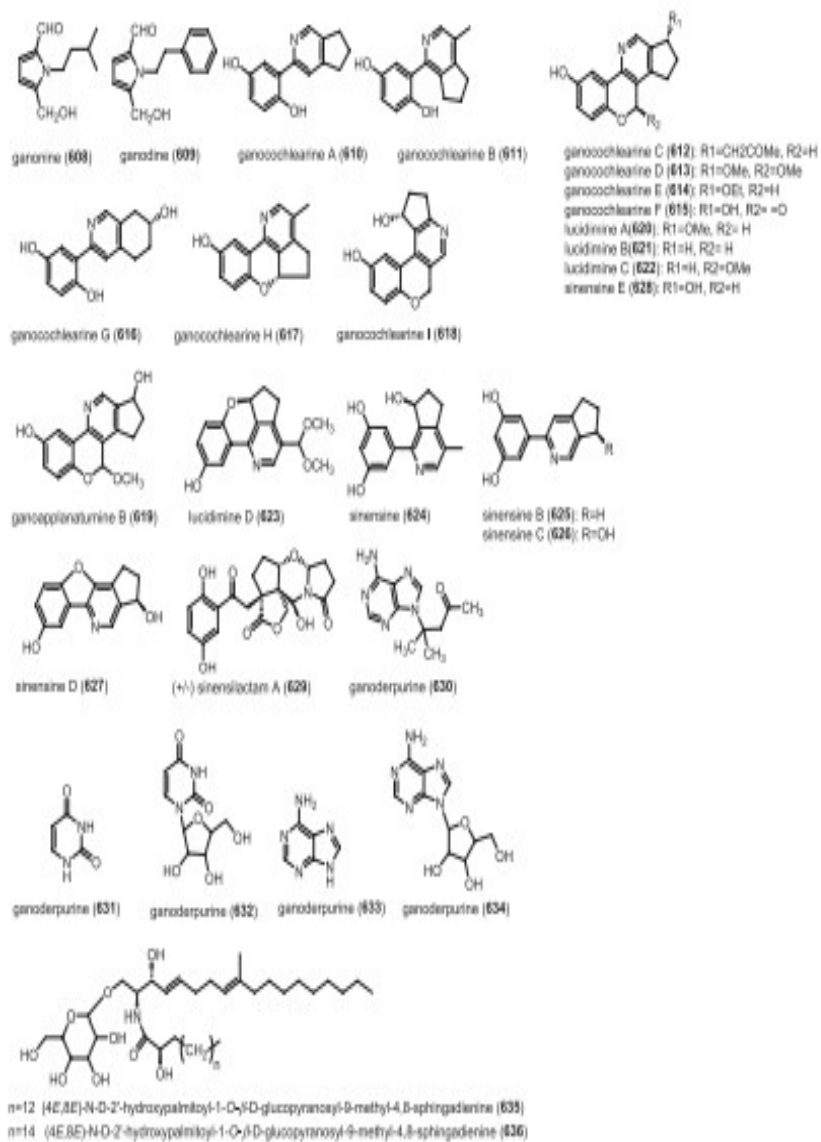
۱۰-۷-۱- آمینواسیدها

تجزیه و تحلیل تغذیه ای گانودرما لوسیدوم حضور ۱۶ اسید آمینه مختلف را نشان می‌دهد، که در آن گلوتامیک اسید، آسپارتیک اسید، گلیسین و آلانین بیشترین میزان فراوانی را نشان می‌دهند. این در حالی است که متیونین کمترین مقدار فراوانی را را نشان می‌دهد [۱۴۴].

۱۱-۷-۱- آلکالوئیدها

به طور کلی، محتوای آلکالوئیدها در گانودرما لوسیدوم نسبتاً کمتر است. آلکالوئیدها مانند کولین و بتائین از

اسپورهای گانودرما لوسیدوم جدا شد [۷۲].



شکل ۱۰-۱ تصویر ساختمان شیمیایی آلکالوئیدهای گانودرما

۸-۱- کاربردهای متنوع قارچ گانودرما

با توجه به افزایش آگاهی مردم از خواص قارچ گانودرما لوسیدوم، از استقبال رو به رشدی برخوردار می باشد. با توجه به مواد موجود در بخش های مختلف میوه، توده زیستی و اسپور قارچ گانودرما لوسیدوم محصولات مختلف به صورت مکمل های نوشیدنی، خوردنی و فرآورده های آرایشی و بهداشتی و محصولات دارویی تولید و به بازار عرضه می شود [۹۴؛ ۹۵]. می توان برای مثال از یک محصول آرایشی و بهداشتی تحت عنوان ماسک روشن کننده پوست که از گانودرما لوسیدوم در کشورهای چین، آمریکا، ژاپن و کره جنوبی تولید می شود، نام برد که این محصول بر اساس مهار کردن آنزیم تیروزیناز که یک آنزیم کلیدی در تیرگی پوست می باشد [۹۶]. امروزه در بازار حدود بیش از ۷۵۰ فرآورده متفاوت با حداقل ۱۰۰ برند مختلف از گانودرما لوسیدوم در بازارها یافت می شود [۹۷؛ ۹۸].

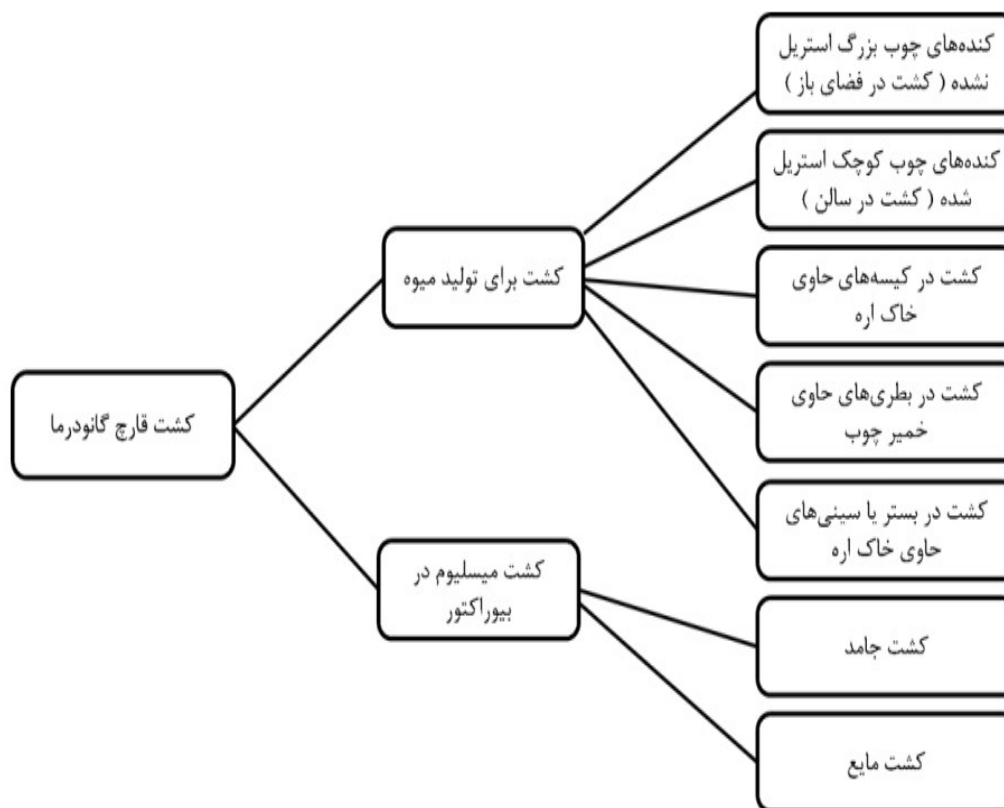
۱-۸-۱ ارزش اقتصادی قارچ گانودرما لوسیدوم

فرآورده های متفاوت از جمله انواع نوشیدنی بر پایه قهوه و چای، صابون، شامپو، خمیر دندان، انواع قرص و کپسول حاوی اسپور، عصاره، پلی ساکاریدهای گانودرما و یا اسانس گانودرما و یا محصولات مراقبتی پوست و یا روغن های درمانی و ... در کشورهای مختلف مورد توجه قرار گرفته اند [۹۹]. بازار جهانی گانودرما لوسیدوم در سال ۲۰۱۹ بالغ بر ۳ میلیارد دلار بوده و تخمین زده می شود تا سال ۲۰۲۷ با ثبت نرخ رشد سالانه ۸ درصد به رقم ۵ میلیارد دلار نیز برسد [۲۰۱].

۹-۱- کشت مصنوعی قارچ گانودرما

از آن جا که گانودرما لوسیدوم در طبیعت به ندرت رشد می کند و پیدا کردن آن بسیار مشکل است و به همین علت وقتی کسی گانودرما پیدا می کرد آن را در ازای پول زیاد به افراد ثروتمند می فروخت و به این ترتیب این قارچ فقط در اختیار افراد ثروتمند قرار می گرفت [۸۶]. اولین تلاش برای کشت گانودرما به روش مصنوعی توسط T. Henmi و همکاران در سال ۱۹۳۷ بود و آغاز تولید انبوه آن برای اولین بار توسط Y. Naoi در سال ۱۹۷۱ با کشت با استفاده از گلدان های حاوی خاک اره حاصل شد. از آن زمان تاکنون استفاده از چوب بستر یا خاک اره تبدیل به روشی عادی تبدیل شده است. معمولاً برای پرورش *Reishi* با کیفیت بالا، چه در فضای باز و چه در فضای داخلی، از چوب بسترهای سفید بلوط (*Quercus monogolica*)، بلوط (*Quercu acutissima*)، شاه بلوط ژاپنی (*Castanea*)، زردآلو ژاپنی (*Prunus mume*) و غیره استفاده می

شود. تولید ریشی در سال ۱۹۸۸ در ژاپن حدود ۲۵۰ تن تخمین زده شده است [۲۷]. در شکل ۴-۱ روش‌های مختلف کشت مصنوعی میسلیم و میوه‌قارچ گانودرما لوسیدوم آورده شده است.



شکل ۱-۱۱: روشهای مختلف کشت مصنوعی قارچ گانودرما لوسیدوم

۱-۹-۱- کشت برای تولید میوه

۱-۹-۱-۱- کشت روی تنه درخت

اولین کشت موفقیت آمیز گانودرما در سال ۱۹۶۹ در چین انجام شد. برای اولین بار اسپور از میوه قارچ جداسازی شد و روی تنه درختی بزرگ که استریل نشده بود و در فضای باز کشت صورت گرفت. با توجه به طولانی بودن زمان کاشت تا برداشت که در حدود ۲ سال طول می‌کشید و زمان زیادی بود که با توجه به تقاضای بازار، این روش پاسخگوی نیاز بازار نبود و تقریباً این روش در حال حاضر منسوخ شده است. در اواخر دهه هشتاد میلادی از تنه کوچک چوب استریل شده و در سالن کشت صورت گرفت و مدت زمان

کاشت تا برداشت کاهش پیدا کرد [۱۰۸؛ ۱۰۷]. می توان گفت بهترین میوه حاصل کشت روی تنه درخت بوده و بالاترین قیمت را در بازارهای جنوب شرق آسیا دارد. از طرفی این روش، یک روش پیچیده، دارای راندمان پائین و مدت زمان کاشت تا برداشت طولانی (حدود ۸ ماه تا یکسال) می باشد [۱۰۹].

۲-۱-۹-۱- کشت جایگزینی

در این کشت، عملیات کشت روی ترکیبی از خاک اره چوب درختان پهن برگ همچون بلوط، صنوبر، نارگیل که با سبوس غلات (مانند سبوس گندم و جو)، ضایعات کارخانه های صنایع غذایی (مانند کنجاله سویا) و سایر مکمل ها از قبیل سولفات کلسیم و کربنات کلسیم غنی شده، صورت می گیرد. سه روش کشت در بطری، بستر و کیسه در این قسمت قرار دارند [۱۱۰؛ ۱۱۱]. با توجه به این موضوع که حاصل روش کشت در کیسه از کیفیت بالاتر و زمان کوتاه تری برای محصول نهایی و میوه ای بزرگ، برخوردار می باشد، لذا این روش در مقایسه با سایر روش ها از اولویت بالاتری نزد تولید کنندگان برخوردار می باشد [۱۱۲].

۳-۱-۹-۱- کشت میسلیم در بیوراکتور (Bioreactor)

به طور کلی کشت میسلیم با توده زیستی قارچ گانودرما لوسیدوم براساس حالت فیزیکی محیط کشت به دو نوع کشت جامد و کشت مایع یا غوطه ور تقسیم می شود [۱۱۳].

۴-۱-۹-۱- کشت جامد

در محیط کشت جامد بیشتر دانه غلات و تراشه چوب به عنوان مواد اولیه استفاده می شود. محیط کشت جامد برای تولید میوه، اسپور و میسلیم استفاده می شود. از آن جا که محیط کشت میسلیم در حالت جامد شبیه به محیط کشت رشد میوه قارچ می باشد، فاز تاخیر را در چرخه رشد قارچ کاهش می دهد. بنابراین بهتر است که میسلیم کشت داده شده در محیط کشت جامد به محیط کشت تولید میوه انتقال یافته، تا فاز تاخیر کاهش یافته و تولید میوه سریعتر صورت گیرد [۱۱۳].

۴-۱-۹-۱- کشت مایع

کشت مایع، محیطی است متشکل از منابع کربنی، نیتروژنی و سایر ترکیبات که باعث رشد بهینه میسلیم قارچ ها می شود. استفاده از کشت در بستر مایع برای رشد قارچ های ناقص که تولید اندام بارده نمی کنند، در دستگاه فرمنتور بسیار موفقیت آمیز بوده است [۱۱۴].

باتوجه به مزایای استفاده از کشت مایع، جداسازی آسان توده زیستی از محیط کشت، تغییر راحت پارامترهای محیط کشت، پتانسیل بالا برای تولید متابولیت‌های ثانویه از جمله گانودریک اسید، استفاده کمتر از نیروی دستی در مدت زمان کوتاه تر، توده زیستی یکنواخت، فضای کوچکتر مورد نیاز، شرایط کاملاً مکانیزه و ... این روش به سرعت در حال گسترش می باشد [۱۱۵؛ ۱۱۶].

البته استفاده از کشت به محیط مایع دارای معایبی نیز می باشد، معایب آن در هنگام کشت در مقیاس بالا رخ می دهد و در این حالت با رشد توده زیستی، ویسکوزیته مایع افزایش یافته و انتقال اکسیژن به توده زیستی با مشکل مواجه شده و از طرفی جداسازی توده زیستی را از محیط کشت سخت می کند [۹۱؛ ۱۱۴].



شکل ۱-۱۲: روشهای مختلف کشت مصنوعی قارچ گانودرما در کشور چین [۲۰۰]

۱۰-۱- استخراج، بازیابی، تجزیه و تحلیل ترکیبات فعال زیستی

گانودرما لوسیدوم غنی شده با ترکیبات فعال مانند پلی ساکاریدها، تری ترپنوئیدها، نوکلئوتیدها، ژرمانیوم آلی، اسیدهای چرب، پروتئین ها، اسیدهای آمینه و استرول ها است. بنابراین برای بازیابی و تجزیه و تحلیل آسان ترکیبات نیاز به یک روش ساده و آسان ضروری است. از آن جاکه برای اغلب این ترکیبات کاربردهای دارویی گزارش شده است. جداسازی این ترکیبات به صورت مستقل و تفکیک شده دشوار، وقت گیر و گران است. بنابراین صنایع به دنبال جداسازی تصادفی ترکیبات به شکل عصاره قارچ خام هستند و این مسئله به صورت یک چالش خودنمایی می کند. به عنوان مثال پلی ساکاریدها در آب محلول هستند و این در حالیست که به نظر می رسد ترپنوئیدها آب گریز بوده و در اتانول و یا کلروفرم محلول می باشند.

۱-۱۰-۱- آماده سازی گانودرما لوسیدوم برای استخراج ترکیبات

گانودرما لوسیدوم ابتدا باید پس از جمع آوری پردازش شود. این فرایند شامل تمیز کردن مواد از خاک بوسیله شستشو و جدا کردن تنه ها بوسیله دست و یا با یک دستگاه برش می باشد. سپس می بایست به منظور جلوگیری از فساد و تسهیل ذخیره سازی، سهولت حمل و نقل و افزایش کارایی فرآیند استخراج می بایست رطوبت آن ها را کاهش داد و یا خشک کرد [۱۴۵].

۲-۱۰-۱- خشک کردن

به طور کلی روشهای زیادی برای خشک کردن نمونه قارچ استفاده می شود. این روش ها به دو گروه تقسیم می شوند: گرمایش (پخت، کوره، اجاق گاز و مادون قرمز) و خشک کردن بوسیله هوا (محفظه های خشک کن با گردش هوا) صورت می پذیرد [۱۴۶]. روش خشک کردن گانودرما لوسیدوم در هوای آزاد تحت سایه یا مستقیم در معرض آفتاب رایج ترین روشی است که به دلیل آماده سازی کم هزینه و ساده مورد استفاده قرار می گیرد. با این حال انتخاب روش خشک کردن مناسب را با توجه به نوع اجزای زیستی مورد نظر و ترکیبات آنها انتخاب می کنند. به عنوان مثال برای اجزای ناپایدار در برابر حرارت مانند پلی فنول ها توصیه می شود که آن را به منظور جلوگیری از تخریب، در دمای زیر ۴۰ درجه سانتی گراد خشک کرد [۱۴۷؛ ۱۴۸].

برای برخی ترکیبات از جمله پلی فنول‌ها که به نور حساس هستند و مهم است که مواد اولیه را در طول خشک شدن از نور خورشید دور نگه دارند [۱۴۸]. برای تولید صنعتی در مقیاس بزرگ می‌توان از روش خشک کردن در هوا که از نظر اقتصادی مقرون به صرفه است، استفاده کرد اما به دلیل احتمال آسیب اکسیداسیون که ممکن است هنگام قرار گرفتن در معرض هوا ایجاد شود، روش مناسبی نباشد [۱۴۹]. به طور کلی برای حفظ اکثر اجزای زیست فعال استفاده از محدوده دمایی ۵۰-۶۰ درجه سانتیگراد بیشترین کاربرد را برای خشک کردن گیاه دارد [۱۴۹؛ ۱۵۰]. البته برای حفظ ترکیبات فعال قارچ دارویی شگفت انگیز گانودرما لوسیدوم خشک کردن در دمای زیر ۶۰ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت مناسب می باشد [۱۴۹].

۳-۱۰-۱- کاهش اندازه قارچ برای افزایش راندمان استخراج

کاهش اندازه دومین مرحله مهم آمادگی برای هرگونه فرآیند استخراج است. مشخص شده است که کاهش اندازه قطعات قارچ به قطعات کوچک باعث کاهش اندازه ذرات و افزایش سرعت انتقال جرم بوسیله افزایش سطح بین حلال و توده استخراج شده و یک عملکرد ضروری است [۱۵۱].

۴-۱۰-۱- پیش تصفیه با استفاده از محلول اتانولی آبی

بسیاری از مطالعات نشان داد که پیش تصفیه مواد گیاهی با استفاده از حلال‌های آلی قطبی (اتانول و متانول) یا مخلوط الکلی آبی به حذف مواد بزرگ کمک می‌کند. برخی ترکیبات مانند (مونوساکاریدها، اسیدهای چرب، اسیدهای آمینه، فنول‌ها و آنزیم‌های درون زا) البته به غیر از مولکول‌های ماکرومولکول مانند پلی ساکاریدها، نوکلئیک اسیدها و پروتئین‌هایی که می‌توانند در مرحله بعد توسط حلال قطبی استخراج شوند [۱۵۲]. برای استخراج پلی ساکاریدها از گانودرما لوسیدوم ابتدا مواد با اتانول ۸۰٪ و تحت تکان دادن دادن و در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت به منظور حذف قندهای آزاد (مونوساکاریدها)، پلی فنولیک‌ها و اجزای چربی دوست به صورت اولیه تصفیه می شوند [۱۵۳؛ ۱۵۴؛ ۱۵۵]. البته یک روش دیگر به منظور بهبود کیفیت حذف و حذف آنزیم‌های درون زا و کاهش زمان استخراج از اتانول ۹۵٪ و در دمای ۷۰ درجه سانتیگراد است که توسط S. Sudheer و همکاران گزارش شده است [۱۵۷؛ ۱۵۶].

۵-۱۰-۱- استخراج پلی ساکاریدها

پلی ساکاریدها طیف گسترده ای از عوامل فعال زیستی در گانودرما لوسیدوم هستند. اصلی ترین دسته های از لحاظ خواص فیزیکی شیمیایی، پلی ساکاریدها 3،β-1 و 6-D،β-1 می باشند که گلوکان آنها به دو شکل محلول در آب و نامحلول در آب وجود دارند. پلی ساکاریدها در دو نوع خارج سلولی (EPS) و درون سلولی (IPS) که پلی ساکاریدهای خارجی یا پلی ساکاریدهای خارج سلولی توسط میکروارگانیسم ها به محیط اطراف ترشح می شوند و استخراج آن ها با ۳ یا ۴ بار استخراج با الکل ۹۵ درصد صورت می گیرد و برای استخراج IPS نیز با محلول ۱M سود و در دمای ۶۰ درجه سانتیگراد و به مدت ۱ ساعت انجام می شود البته برای استخراج IPS از حلال های دیگری مانند آمونیم اگزالات ۱ درصد و سود ۵ درصد نیز استفاده می شود [۱۵۸].

۶-۱۰-۱- استخراج تری ترین ها

تا کنون بیش از ۱۳۰ تری ترین اکسیژن دار از گانودرما لوسیدوم جدا شده است [۱۵۹]. اکثر آنها تری ترین های نوع لانوستان هستند. دو نوع استخراج وجود دارد. یک روش با استفاده از حلال های آلی و آب می باشد که برای جداسازی کل تری ترین ها استفاده می شود [۱۶۰؛ ۱۶۱]. می توان تری ترین ها را از اسپورهای گانودرما لوسیدوم با رفلاکس با متانول استخراج کرد. استخراج تریترین ها معمولاً با استفاده از متانول، اتانول، استون، کلروفرم، اتر یا مخلوطی از این حلالها استفاده می شود. روش دوم جداسازی انتخابی کسری از تری ترین های اسیدی از کل تری ترین های موجود در میوه گانودرما لوسیدوم با استفاده از اتانول آبی ۹۵ درصد تحت رفلاکس گزارش شده است [۱۶۲].

۷-۱۰-۱- اثرات درمانی ترکیبات فعال زیستی گانودرما لوسیدوم

گانودرما لوسیدوم به عنوان یک داروی گیاهی مورد پرستش قرار گرفته است، کارهای زیادی روی کاربردهای درمانی این قارچ خاص انجام شده است [۱۶۳]. استفاده دارویی از گانودرما لوسیدوم در نسخه های خطی چین باستان ثبت شده است. عصاره های این قارچ در درمان بی خوابی، سرگیجه، هیپاتیت مزمن، بیماریهای کرونری قلب، فشار خون بالا، سرطان و سرفه برونش مورد استفاده قرار گرفته است. یکی از خواص امیدوار کننده ای که توسط این داروی شگفت انگیز نشان داده شده است، افزایش نشاط و طول عمر طولانی است. از گانودرما لوسیدوم در زمینه های ضد پیری، اختلال عملکرد جنسی مردانه، کلسترول بالا، سمیت ناشی از

شیمی درمانی، ضد سرطان، سرکوب سیستم ایمنی ناشی از مواد مخدر، فعالیت ضد توموری، خواب آور، ضد ویروس، ضد زخم، مهار رادیکال های آزاد و تحریک سیستم ایمنی استفاده شده است [۱۲۸]. اسلیوا نشان داد که در پزشکی غربی یکی از موانع عمده در پذیرش محصولات طبیعی مبتنی بر قارچ پیچیدگی آنهاست. از سوی دیگر این پیچیدگی همچنین می تواند مزایای قابل توجهی را به همراه داشته باشد. برخی از اجزای موجود در محصولات طبیعی می توانند سمیت سلولی سلولها و تعامل بین آنها را کاهش دهند. تری ترین های گانودرما لوسیدوم به طور مستقیم رشد و رفتار تهاجمی سلول های سرطانی را تحت فشار قرار می دهند، در حالی که پلی ساکاریدهای گانودرما لوسیدوم سیستم ایمنی بدن را تحریک کرده و منجر به تولید سایتوکین ها و فعال سازی فعالیت های سلول های ایمنی ضد سرطانی شود. داده های بدست آمده از مطالعات تحقیقاتی اثر گانودرما را فقط بر سطح مولکولی نشان می دهد، بنابراین مطالعات پیش بالینی و بالینی برای تأیید این امر ضروری است [۱۶۴].

۸-۱ مشکلات موجود

با توجه به برخی تحقیقات اخیر مشخص شد که بیشتر فرآورده های بر پایه گانودرما لوسیدوم موجود در بازار فاقد تری ترپنوئیدها بوده و پلی ساکاریدهای فرآورده های مذکور با پلی ساکارید قارچ گانودرما لوسیدوم متفاوت بوده است [۱۰۱]. از طرفی قیمت بالا و کیفیت پایین محصولات موجود از عمده مشکلات سر راه تولید فرآورده های جانبی گانودرما لوسیدوم بوده و می بایست کنترل کیفیت فرآورده های مذکور به منظور کنترل اجزای زیستی محصولات مد نظر قرار گرفته تا از ورود محصولات بی کیفیت از لحاظ اجزای زیستی و یا محصولات حاوی آفت کش ها و فلزات سنگین بیشتر از حد مجاز جلوگیری تا بازار فروش این فرآورده ها از بین نرود [۹۸؛ ۱۰۱؛ ۱۰۲؛ ۱۰۳].

۹-۱ هدف تحقیق

با توجه به موارد ذکر شده در بالا و اثر عصاره های مختلف گانودرما لوسیدوم و نتایج مختلفی که با توجه به روش کاشت و گونه های مختلف بیان شد و در این تحقیق با هدف استفاده از روش کشتی که در آن میزان گانودریک اسید بیشتری حاصل شده و نتایج آن روی چند باکتری بررسی شده و بتوان با این تحقیق به نتایج بهتری به منظور استفاده از این قارچ دارویی به صورت عملی رسید.

فصل ۲ : مروری بر مطالعات پیشین

۱-۲- ساختار گانودریک اسید و اثرات آن

گانودریک اسید یکی از ترکیبات موجود در قارچ گانودرما لوسیدوم است که اولین بار در سال ۱۹۸۲ توسط کوباتا و آساکا از گانودرما لوسیدوم جداسازی شد [۱۸۵]. گانودریک اسید یک ترپنوئید حاوی عامل کربوکسیل (^۱lanostane) می‌باشند و موقعیت آن روی کربن ۲۶ می‌باشد. تا کنون در حدود ۲۰ نوع lanostane از بدنه گانودرما لوسیدوم جدا شده است که ۹ عدد از آن‌ها گانودریک اسید می‌باشند [۱۸۶]. گانودریک اسید دارای خواص قابل توجهی از جمله آنتی باکتریال، ضد تومور، ضد التهاب، ضد سرطان، ضد HIV، آنتی اکسیدان می‌باشد [۷۸؛ ۸۹؛ ۱۷۸]. عصاره‌ها و تری‌ترین‌های حاصل از گانودرما لوسیدوم اثرات مهار کنندگی روی آنزیم آلفا گلوکوزیداز داشته و با جلوگیری از هضم کربوهیدرات‌ها به عنوان عاملی برای درمان دیابت نوع ۲ شناخته می‌شود [۱۸۷]. Toth و همکاران در سال ۱۹۸۳ و در شرایط آزمایشگاهی نشان دادند که گانودریک اسید نوع U, V, W, X و Y اثر سمیت سلولی بر علیه هیپاتوما که یک نوع سرطان سلولی کبد می‌باشد را دارا می‌باشند [۱۸۸]. Li CH و همکاران در سال ۲۰۰۵ نشان دادند که گانودریک اسید نوع X مانع فعالیت توپوایزومرازها ناشی از هیپاتوما سلولی و در نهایت آپوپیتوز در سلول‌های HuH-7 می‌شود [۱۸۹]. Yue QX و همکاران در سال ۲۰۰۸ نشان دادند که گانودریک اسید نوع D دارای اثر سمیت سلولی بر HeLa که یک رده سلولی سرطان رحم می‌باشد [۱۹۰]. در سال ۱۹۹۸ طی پژوهش گروه El-Mekkaway مشخص شد برخی از گانودریک اسیدها از جمله گانودریک اسید نوع GA-C1، α و H- با مهار فعالیت پروتئاز در یک غلظت معین به عنوان ضد HIV-1 فعال هستند [۱۹۱]. البته Min و همکاران نیز در سال ۱۹۹۸ به همین نتایج دست یافتند [۱۹۲]. در سال ۱۹۸۶ Morigiwa و همکاران دریافت که گانودریک اسید‌های نوع S, -K, -B, -H, -F, GA-Y و D- با مهار آنزیم angiotensin-converting از ترشح آلدسترون که باعث احتباس آب و سدیم و در نهایت باعث افزایش فشارخون می‌شود را جلوگیری می‌نماید [۱۹۳]. با در نظر گرفتن تحقیقات انجام شده اثرات ضد باکتری‌های این ترکیب مورد توجه قرار گرفته که در ذیل به چند نمونه از آن اشاره می‌شود.

^۱ ترکیبی هیدروکربنی و پلی‌سیکلیک می‌باشد (en.wikipedia.org).

۱-۱-۲ عصاره و اسید گانودریک استخراج شده از قارچ گانودرما لوسیدوم

اثرات کشندگی آن بر *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus یک باکتری گرم مثبت و بی هوازی اختیاری می باشد و با توجه به وجود پیگمان های طلایی که به عنوان یک آنتی اکسیدان عمل کرده و موجب در امان ماندن باکتری از رادیکال های آزاد شده توسط گلبول های سفید می شود و گستره وسیعی از عفونت های ساده از قبیل گل مژه، جوشدانه و... تا بیماری های تهدید کننده زندگی مانند پنومونی، مننژیت، اندوکاردیت و... را در بر می گیرد.

پس از کشف پنی سیلین، در ابتدا از این دارو برای درمان عفونت های استافیلوکوکی استفاده می شد اما روز به روز به مقاومت آنتی بیوتیکی علیه پنی سیلین افزوده شد بطوریکه در سال ۱۹۵۰، ۴۰٪ درصد سویه های بیمارستانی به پنی سیلین مقاوم شدند و این میزان در سال ۱۹۶۰ به ۸۰٪ رسید. علت این پدیده تولید پنی سیلیناز توسط باکتری بود که پنی سیلین را تجزیه می کند، بنابراین از آنتی بیوتیک های جدیدتر یعنی پنی سیلین های مقاوم به پنی سیلیناز (مانند اکساسیلین و متی سیلین) استفاده شد [۱۹۶]. متأسفانه این باکتری به مرور به این آنتی بیوتیک ها نیز مقاوم شده است. از این آنتی بیوتیک ها به همراه جنتامایسین برای درمان عفونت های جدی مانند اندوکاردیت استفاده می شود.

این سویه ها در اصطلاح استافیلوکوک های مقاوم به متیسیلین را (MRSA) می گویند. برای درمان MRSA، از آنتی بیوتیک دیگری به نام وانکومایسین استفاده می شود. همچنین از آنتی بیوتیک جدیدی به نام لینزولید نیز برای درمان MRSA استفاده شده است.

آنتی بیوتیک های آمینوگلوکوزیدی مانند جنتامایسین، استرپتومایسین و کانامایسین زمانی به خوبی علیه استافیلوکوک ها جواب می دادند اما استافیلوکوک به مرور زمان به این آنتی بیوتیک ها نیز مقاوم شد [۱۹۷].

در سال ۲۰۰۸ Keypour, S و همکارانش با استفاده از عصاره کلروفرمی حاصل از قارچ گانودرما لوسیدوم جمع آوری شده از مازندران به روش ماکرو دایلوژن و دیسک دیفیوژن، حداقل غلظت ممانعت کنندگی (MIC=8mg/ml) و حداقل غلظت کشندگی (MBC=8mg/ml) را برای باکتری *Staphylococcus aureus* به دست آوردند [۱۲۴].

در پژوهش انجام شده توسط Quereshi, S و همکاران در سال ۲۰۱۰ با استفاده از عصاره استنی حاصل از یک گونه قارچ گانودرما لوسیدوم در هند و با استفاده از روش میکرو دایلوژن به غلظت MIC برابر 20.80mg/ml برای باکتری *Staphylococcus aureus* را به دست آوردند [۱۸۰].

در پژوهش انجام شده توسط Mehta, S و همکاران در سال ۲۰۱۲ با استفاده از عصاره استنی حاصل از یک گونه قارچ گانودرما لوسیدوم کشت داده شده در هند و با استفاده از روش میکرو دایلوژن به غلظت MIC برابر 10 mg/ml برای باکتری *Staphylococcus aureus* به دست آوردند [۱۲۷].

در پژوهش انجام شده توسط Sandrina A. Heleno و همکاران در سال ۲۰۱۳ با استفاده از عصاره متانولی حاصل از یک گونه قارچ گانودرما لوسیدوم جمع آوری شده از شمال پرتقال و با استفاده از روش میکرودايلوشن به غلظت MIC برابر 0.025 mg/ml و MBC 0.035 mg/ml برای باکتری *Staphylococcus aureus* به دست آوردند [۱۸۴].

در پژوهش انجام شده توسط Čilerdžić J و همکاران در سال ۲۰۱۴ با استفاده از عصاره اتانولی حاصل از سه گونه مختلف گانودرما لوسیدوم، حداقل غلظت ممانعت کنندگی یا همان MIC را برای باکتری *Pseudomonas aeruginosa* بوسیله روش میکرودايلوشن 1.3–2mg/ml و MBC و یا حداقل غلظت کشندگی را برای این باکتری 2–3.3mg/ml به دست آوردند [۱۱۹].

در پژوهش انجام شده توسط Upadhyay, M. در سال ۲۰۱۴ با استفاده از گانودریک اسید حاصله از قارچ گانودرما لوسیدوم جمع آوری شده در هند و به روش میکرو دایلوژن روی باکتری *Staphylococcus aureus*، غلظت موثره بازدارندگی 0.25 mg/ml را نشان داد که بیانگر این موضوع است که وقتی ما از گانودرما لوسیدوم، گانودریک اسید را مشتق می کنیم خاصیت بازدارندگی بیشتر شده و می بایست به این موضوع بپردازیم [۱۸۱].

در پژوهش انجام شده توسط Celal, B و همکاران در سال ۲۰۱۹ با استفاده از عصاره های دی کلرومتان و متانول حاصل از یک گونه قارچ گانودرما لوسیدوم جمع آوری شده در ترکیه با استفاده از روش میکرودايلوشن به غلظت MIC برابر 200 µg/ml برای باکتری *Staphylococcus aureus* را به دست آوردند [۱۲۵].

در پژوهش انجام شده توسط Serrano-Márquez, L و همکاران در سال ۲۰۲۱ با استفاده از عصاره مخلوط کلروفرم و متانول حاصل از یک گونه قارچ گانودرما کارتیزی در مکزیك و با استفاده از روش میکرودايلوشن به غلظت MIC برابر 500 µg/ml برای باکتری *Staphylococcus aureus* را به دست آوردند. این آزمایشات روی گونه مشابه گانودرما لوسیدوم به نام گانودرما کارتیزی انجام شد که این گونه شباهت زیادی به گانودرما لوسیدوم داشته و در آمریکای شمالی وجود دارد و زیستگاه هر دو گونه یکسان است ولی مطالعات اخیر نشان داده است که گونه ای متمایز از گانودرما لوسیدوم است. [۱۲۳].

۲-۱-۲- عصاره و اسید گانودریک استخراج شده از قارچ گانودرما لوسیدوم

اثرات کشندگی آن بر *Escherichia coli*

Escherichia coli یک باکتری گرم منفی از خانواده انتروباکتریاسه می باشد و برخی سروتیپ های آن

موجب مسمومیت غذایی و اسهال می شوند [۱۹۵].

Escherichia coli عضوی از خانواده بزرگ انتروباکتریاسه است که جنس‌های متعدد باکتریایی، از جمله برخی از پاتوژن‌های معروف مثل سالمونلا، شیگلا و یرسینیا را در خود جای داده است. عبارت «انترو» از ریشه «انتریک» گرفته شده است و گویای این مطلب است که اعضای این خانواده با «روده» و «مدفوع» در ارتباط هستند. هر سویه *Escherichia coli* دربرگیرنده گروهی از اعضای این گونه است که به واسطه یک یا چند ویژگی مشترک، از اعضای دیگر این خانواده، تفکیک می‌شوند. اغلب، این ویژگی‌ها تنها در سطح مولکولی قابل ردیابی هستند. اما گاهی ممکن است موجب تغییراتی در ویژگی‌های فیزیولوژیکی یا چرخه زندگی باکتری شوند که پیامدهای گوناگونی را در پی دارد. یکی از مواردی که از این تغییرات، تاثیر می‌پذیرد، میزان بیماری‌زایی باکتری است.

سویه‌های مختلف ای کولی در بدن حیوانات مختلف، زندگی می‌کنند. از این ویژگی می‌توان برای شناسایی منشأ آب آلوده بهره گرفت.

همواره، سویه‌های جدیدی از *Escherichia coli* در اثر فرایند طبیعی جهش، به وجود می‌آیند. ممکن است این جهش منجر به ایجاد یا تقویت ویژگی‌هایی در باکتری شود که برای میزبان، مضر هستند. چنین سویه‌هایی، اغلب در افراد بالغ سالم، هیچ نوع نشانه بیماری‌شناختی ایجاد نمی‌کنند، یا حداکثر به یک اسهال ساده منجر می‌شوند. اما همین سویه‌ها می‌توانند در گروه‌های خاصی از افراد، منجر به بیماری‌های جدی و خطرناک یا حتی مرگ شوند [۱۹۵].

طی پژوهش Liu, D و همکاران در سال ۲۰۰۹ حداقل غلظت ممانعت‌کنندگی (MIC=2.05mg/ml) برای باکتری *Escherichia coli* با اسانس به دست آمده از *Ganoderma japonicum* که یک گونه ی قارچی است موجود در چین و متعلق به خانواده گانودرما P.Kars می باشد را به دست آوردند [۱۹۴].

در پژوهش انجام شده توسط Quereshi, S و همکاران در سال ۲۰۱۰ با استفاده از عصاره استنی حاصل از یک گونه قارچ گانودرما لوسیدوم در هند و با استفاده از روش میکروداپلوشن به غلظت MIC برابر 8.17 mg/ml برای باکتری *Escherichia coli* را به دست آوردند [۱۸۰].

در پژوهش انجام شده توسط Mehta, S و همکاران در سال ۲۰۱۲ با استفاده از عصاره استنی حاصل از یک گونه قارچ گانودرما لوسیدوم کشت داده شده در هند و با استفاده از روش میکروداپلوشن به غلظت MIC برابر 6 mg/ml برای باکتری *Escherichia coli* را به دست آوردند [۱۲۷].

در پژوهش انجام شده توسط Sandrina A. Heleno و همکاران در سال ۲۰۱۳ با استفاده از عصاره متانولی حاصل از یک گونه قارچ گانودرما لوسیدوم جمع‌آوری شده از شمال پرتقال و با استفاده از روش میکرودايلوشن به غلظت MIC برابر 0.35 mg/ml و 0.75 mg/ml MBC برای باکتری *Escherichia coli* به دست آوردند [۱۸۴].

در پژوهش انجام شده توسط Upadhyay, M. در سال ۲۰۱۴ با استفاده از گانودریک اسید حاصله از قارچ گانودرما لوسیدوم جمع‌آوری شده در هند و به روش میکرو دایلوژن روی باکتری *Escherichia coli* غلظت موثره بازدارندگی 1 mg/ml را نشان داد که بیانگر این موضوع است که وقتی ما از گانودرما لوسیدوم، گانودریک اسید را مشتق می‌کنیم خاصیت بازدارندگی بیشتر شده و می‌بایست به این موضوع بپردازیم [۱۸۱].

در پژوهش انجام شده توسط Celal, B و همکاران در سال ۲۰۱۹ با استفاده از عصاره متانول حاصل از یک گونه قارچ گانودرما لوسیدوم جمع‌آوری شده در ترکیه با استفاده از روش میکرودايلوشن که غلظت MIC برابر 100 µg/ml برای باکتری *Escherichia coli* را به دست آوردند [۱۲۵].

در پژوهش انجام شده توسط Serrano-Márquez, L و همکاران در سال ۲۰۲۱ با استفاده از عصاره مخلوط کلروفرم و متانول حاصل از یک گونه قارچ گانودرما کارتیسی در مکزیک و با استفاده از روش میکرودايلوشن به حداقل غلظت MIC بالاتر از 1000 µg/ml برای باکتری *Escherichia coli* را به دست آوردند [۱۲۲].

۳-۱-۲- عصاره و اسید گانودریک استخراج شده از قارچ گانودرما لوسیدوم

اثرات کشندگی آن بر گونه *Bacillus*

Bacillus یک باکتری گرم مثبت، میله‌ای شکل و اغلب هوازی اجباری یا بی‌هوازی اختیاری هستند. باسیلوس در همه جا یافت شده و به علت تشکیل اسپور می‌توانند سال‌ها در محیط باقی بمانند [۱۹۵].

باسیلوس (*Bacillus*) نام یک دسته از رده باسیل و از خانواده باسیلاسه است. باسیل‌ها یک رده از باکتری‌های گرم مثبت، میله‌ای شکل و اغلب هوازی اجباری یا بی‌هوازی اختیاری می‌باشند. جنس باسیلوس شامل باکتری‌های بزرگ، هوازی، گرم مثبت و میله‌ای که به صورت پشت سر هم قرار می‌گیرند. از این جنس ۵۰ گونه شناسایی شده است. این باکتری‌ها هوازی تا بی‌هوازی اختیاری، گرم مثبت و کاتالاز مثبت بوده که بعضی غیر متحرک و بعضی دارای فلاژل‌های پریتیش می‌باشند که به صورت میله‌ای شکل و اکثراً به صورت زنجیر به دنبال هم قرار می‌گیرند. بعضی از گونه‌ها در مرکز و یا انتهای سلول اسپور تولید کرده و از تخمیر قند، اسید و به ندرت گاز تولید می‌کنند. ولی باکتری‌های "باسیلوس ماسرانس (*B. macerans*)" "باسیلوس پلی میکسا" (*B. polymexa*) که باعث فساد سبزی و میوه می‌شوند گاز زیادی

تولید می کنند و اکثراً مزوفیلند اما بعضی از آنها سرما دوست و بعضی گرما دوست می باشند. انواع گرما دوست آن در صنعت کنسرو سازی، به خاطر مقاومت حرارتی بسیار بالای اسپوره های آنها، اهمیت زیادی دارند. این جنس دارای گونه ی بیماریزای انسانی و حیوانی به نام "باسیلوس آنتراسیس" (*B. anthracis*) که مولد سیاه زخم (شاربن) بوده و یک گونه مولد مسمومیت غذایی به نام "باسیلوس سرئوس" (*B. cereus*) می باشد. باسیلوس ها در درجه حرارت های بالا تر از درجه حرارت یخچال باعث فساد بسیاری از مواد غذایی می شوند. از انواع مهم باسیلوس ها می توان گونه های زیر را نام برد: باسیلوس استئاروترموفیلوس (*B. stearo thermophilus*)، باسیلوس سوبتیلیس (*B. subtilis*)، باسیلوس کو آگولانس (*B. coagulans*)، باسیلوس لیچنیفورمیس (*B. leicheniformis*)، باسیلوس سیرکولانس (*B. circulans*)، باسیلوس پومیلوس (*B. pumilus*)، باسیلوس آنتراسیس و باسیلوس سرئوس [۱۹۵].

در پژوهش انجام شده توسط Yoon, S.Y و همکاران در سال ۱۹۹۴ با استفاده از عصاره آبی حاصل از یک گونه قارچ گانودرما لوسیدوم و با استفاده از روش براث دایلوژن به غلظت MIC برابر 3.5 mg/ml برای باکتری *Bacillus subtilis* دست یافتند [۲۰۲].

در پژوهش انجام شده توسط Skalicka-Wozniak, K. و همکاران در سال ۲۰۱۲ با استفاده از پلی ساکاریدهای استخراجی حاصل از ۴ گونه قارچ گانودرما لوسیدوم متفاوت و با استفاده از روش میکرو دایلوژن و در بهینه ترین حالت به غلظت MIC برابر 2.5 mg/ml و غلظت MBC برابر 5 mg/ml برای باکتری *Bacillus subtilis* دست یافتند [۲۰۳].

در پژوهش انجام شده توسط Mehta, S و همکاران در سال ۲۰۱۲ با استفاده از عصاره استنی حاصل از یک گونه قارچ گانودرما لوسیدوم کشت داده شده در هند و با استفاده از روش میکرو دایلوژن به غلظت MIC برابر 6 mg/ml برای باکتری *Bacillus subtilis* را به دست آوردند [۱۲۷].

در پژوهش انجام شده توسط Sandrina A. Heleno و همکاران در سال ۲۰۱۳ با استفاده از عصاره متانولی حاصل از یک گونه قارچ گانودرما لوسیدوم جمع آوری شده از شمال پرتقال و با استفاده از روش میکرو دایلوژن به غلظت MIC برابر 0.0125 mg/ml و MBC 0.035 mg/ml برای باکتری *Bacillus cereus* به دست آوردند [۱۸۴].

۴-۱-۲- عصاره و اسید گانودریک استخراج شده از قارچ گانودرما لوسیدوم

اثرات کشندگی آن بر *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa یک باکتری باسیل گرم منفی فرصت طلب می باشد. این باکتری با بیماران سرطانی، سوختگی و بیماران دچار نقص ایمنی ارتباط داشته و در این بیماران عفونت های مختلفی مانند عفونت مجاری ادراری، التهاب و آماس پوست، عفونت های معده و روده ای را ایجاد نماید. این باکتری در برابر

آنتی بیوتیک های معمولی مقاومت می کند. تحرک توسط یک تاژک تک قطبی است. گونه ها با آزمایش های بیوشیمیایی و هیبریداسیون DNA متمایز می شوند. نوتروپنی (یک نارسایی ایمنی ناشی از نقص نوتروفیل است). در بیماران سرطانی و سایر افرادی که داروهای سرکوب کننده سیستم ایمنی دریافت می کنند به عفونت کمک می کند. اکثر سویه های جدا شده سم A، اگزوتوکسین شبه دیفتری تولید می کنند. همه سویه ها دارای اندوتوکسین هستند که یک عامل خطرناک است. گونه های سودوموناس به طور معمول در خاک، آب و پوشش گیاهی زندگی می کنند و می توانند از پوست، گلو و مدفوع افراد سالم جدا شوند. آنها غالباً غذای بیمارستان، سینک ظرفشویی و تجهیزات تنفسی را محل تجمع خود قرار می دهند [۱۹۵].

در پژوهش انجام شده توسط Mehta, S و همکاران در سال ۲۰۱۲ با استفاده از عصاره استنی حاصل از یک گونه قارچ گانودرما لوسیدوم کشت داده شده در هند و با استفاده از روش میکرودايلوشن به غلظت MIC برابر 4 mg/ml برای باکتری *Pseudomonas aeruginosa* 15mg/ml را به دست آوردند [۱۲۷].

در پژوهش انجام شده توسط Sandrina A. Heleno و همکاران در سال ۲۰۱۳ با استفاده از عصاره متانولی حاصل از یک گونه قارچ گانودرما لوسیدوم جمع آوری شده از شمال پرتقال و با استفاده از روش میکرودايلوشن به غلظت MIC برابر 0.35 mg/ml و 0.75 mg/ml MBC برای باکتری *Pseudomonas aeruginosa* به دست آوردند [۱۸۴].

در پژوهش انجام شده توسط Ćilerdžić J و همکاران در سال ۲۰۱۴ با استفاده از عصاره اتانولی حاصل از سه گونه مختلف گانودرما لوسیدوم، حداقل غلظت ممانعت کنندگی یا همان MIC را برای باکتری *Pseudomonas aeruginosa* بوسیله روش میکرودايلوشن 1.3-2mg/ml و MBC و یا حداقل غلظت کشندگی را برای این باکتری 2-3.3mg/ml به دست آوردند [۱۱۹].

در پژوهش انجام شده توسط Upadhyay, M. در سال ۲۰۱۴ با استفاده از گانودریک اسید حاصله از قارچ گانودرما لوسیدوم جمع آوری شده در هند و به روش میکرو دايلوشن روی باکتری *Pseudomonas aeruginosa* که گونه مقاومی بود، غلظت موثره بازدارندگی 1 mg/ml را نشان داد که بیانگر این موضوع است که وقتی ما از گانودرما لوسیدوم، گانودریک اسید را مشتق می کنیم خاصیت بازدارندگی بیشتر شده و می بایست به این موضوع بپردازیم [۱۸۱].

در پژوهش انجام شده توسط Celal, B و همکاران در سال ۲۰۱۹ با استفاده از عصاره دی کلرومتان حاصل از یک گونه قارچ گانودرما لوسیدوم جمع آوری شده در ترکیه با استفاده از روش میکرودايلوشن که غلظت MIC برابر 200 µg/ml برای باکتری *Pseudomonas aeruginosa* را به دست آوردند [۱۲۵].

در پژوهش انجام شده توسط Serrano-Márquez, L و همکاران در سال ۲۰۲۱ با استفاده از عصاره مخلوط کلروفرم و متانول حاصل از یک گونه قارچ گانودرما کارتیسی در مکزیک و با استفاده از روش میکرودايلوشن به حداقل غلظت MIC بالاتر از 1000 µg/ml برای باکتری *Pseudomonas aeruginosa* را به دست

۵-۱-۲- عصاره و اسید گانودریک استخراج شده از قارچ گانودرما لوسیدوم

اثرات کشندگی آن بر باکتری *Micrococcus*

Micrococcus luteus یک باکتری گرم مثبت، غیر متحرک، کوکوس، ساپروتروف و متعلق به خانواده *Micrococcaceae* است. کوکسی های گرم مثبت هستند که قطر آن ها ۵~۳/۵ میکرون است. آرایش آن ها در زیر میکروسکوپ به اشکال دوتایی، چهارتایی، هشت تایی و یا خوشه ای دیده می شوند. کلنی های آن ها روی محیط کشت هایی از قبیل نوترینت آگار به اندازه ۴ الی ۶ میلی متر، گرد با سطح یکنواخت کناره ی صاف سطح کمی محدب، قوام کره ای کدر با پیگمان های رنگی سفید، زرد لیمویی، نارنجی و بدون بو می باشد. همگی آن ها دارای آنزیم کاتالاز بوده ولی بعضی از آن ها دارای آنزیم اکسیداز می باشند. هوازی مطلق و بعضی هوازی اختیاری هستند. یکی از میکروکوکوس ها، میکروکوکوس لوتئوس می باشد. کوکسی گرم مثبت، که قطر آن ها بین ۱ الی ۲ میکرون است. اگر روی نوترینت آگار کشت داده شوند قادر به ترشح پیگمان زرد یا طلایی یا نارنجی و یا زرد مایل به سبز می باشند. می توانند تا درجه حرارت ۴۵ درجه سانتی گراد را نیز تحمل کنند. بنابراین این فاکتور آن را از سایر باکتری های این خانواده می تواند جدا سازد. در مجاورت نمک ۷/۵ درصد قادر به رشد نیستند ولی در محیط حاوی نمک ۵ درصد رشد می کنند. احیا نیترات در آن ها منفی است. برخی از آن ها دارای آنزیم اوره آز هستند (اوره را به آمونیاک تبدیل می کنند). آنزیم اکسیداز و ژلاتیناز در آنها مثبت است. تخمیر قند گلوکز در آن ها منفی است. نمی توانند سیتрат را به عنوان منبع کربن تجزیه کنند [۱۹۸].

در پژوهش انجام شده توسط Yoon, S.Y و همکاران در سال ۱۹۹۴ با استفاده از عصاره آبی حاصل از یک گونه قارچ گانودرما لوسیدوم و با استفاده از روش براث دایلوژن به غلظت MIC برابر 0.75 mg/ml برای باکتری *Micrococcus luteus* دست یافتند [۲۰۲].

در پژوهش انجام شده توسط Skalicka-Wozniak, K. و همکاران در سال ۲۰۱۲ با استفاده از پلی ساکاریدهای استخراجی حاصل از ۴ گونه قارچ گانودرما لوسیدوم متفاوت و با استفاده از روش میکرودایلوژن و در بهینه ترین حالت به غلظت MIC برابر 0.5 mg/ml و غلظت MBC برابر 2.5 mg/ml برای باکتری *Micrococcus luteus* دست یافتند [۲۰۳].

در پژوهش انجام شده توسط Sandrina A. Heleno و همکاران در سال ۲۰۱۳ با استفاده از عصاره متانولی حاصل از یک گونه قارچ گانودرما لوسیدوم جمع آوری شده از شمال پرتقال و با استفاده از روش

میکروداپلوشن به غلظت MIC برابر 0.5 mg/ml و MBC 0.75 mg/ml برای باکتری *Micrococcus flavus* به دست آوردند [۱۸۴].

در پژوهش انجام شده توسط Čilerdžić J و همکاران در سال ۲۰۱۴ با استفاده از عصاره اتانولی حاصل از سه گونه مختلف گانودرما لوسیدوم، حداقل غلظت ممانعت کنندگی یا همان MIC را برای باکتری *Micrococcus flavus* بوسیله روش میکروداپلوشن 1.3-2mg/ml و MBC و یا حداقل غلظت کشندگی را برای این باکتری 1.3-3.3mg/ml به دست آوردند [۱۱۹].

۶-۱-۲- مطالعات ضد سرطان

سرطان یکی از نگران کننده ترین شرایط پزشکی در بین جمعیت بشر است و همیشه درمانهای موثری مورد استفاده قرار می گیرند که دارای حداقل و یا بدون عوارض جانبی باشند. گانودرما لوسیدوم یک مکمل محبوب است که توسط افراد سالم مصرف می شود برای تقویت سیستم ایمنی بدن خود و یا توسط بیماران سرطانی برای کاهش عوارض جانبی که بر اثر شیمی درمانی ایجاد می شود. گانودرما لوسیدوم به عنوان یک کارخانه تولید ترکیبات فعال زیستی در نظر گرفته می شود، ترکیباتی که می توانند اثرات کشنده سرطان را کاهش دهند. پلی ساکاریدها و تری ترپن ها دو دسته اصلی اجزای این قارچ هستند که اثرات شیمی درمانی و یا تومورزایی که توسط آزمایشات متعدد نشان داده شده است [۱۶۵]. توماسی و همکاران در مدل های حیوانی کاشته شده با تومور اثرات مهار کنندگی گانودرما لوسیدوم روی رگ زایی و متاستاز (بافت تومور با بوسیله ایجاد سیستم مویرگی و یا رگ زایی رشد کرده و به بافت های دیگر بدن حمله کرده که این حالت متاستاز گفته می شود) را نشان داده است هر چند که مدل های انسانی با طراحی مناسب هنوز بسیار کمیاب است [۱۶۶]. توماسی و همکاران ۵۸ قارچ مختلف بازیدیومایست را آزمایش کرد که از این تعداد، گانودرما لوسیدوم موثرترین آن ها در کشتن سلول های سرطانی بود. گانودرما لوسیدوم باعث توقف چرخه سلولی و آپوپتوز (مرگ برنامه ریزی شده سلولی) در تومورهای مختلف انسان و جوندگان شد [۱۶۶]. لوزو گزارش داده است که یکی از پپتیدهای پلی ساکارید موجود در گانودرما لوسیدوم پارامترهای سیستم ایمنی را که تحت درمان با مورفین فراتر از سطح طبیعی کاهش می کنند را بازیابی می کند [۱۶۷].

۷-۱-۲- مطالعات اثرات آنتی اکسیدانی

آنتی اکسیدان ها مواد طبیعی یا مصنوعی هستند که می توانند از فعالیت سایر مواد شیمیایی معروف به رادیکال های آزاد که باعث آسیب به سلول ها می شوند جلوگیری کنند. گانودرما لوسیدوم یکی از این قارچ ها است که به دلیل فعالیت آنتی اکسیدانی مورد استفاده قرار می گیرد. مصرف آنتی اکسیدان ها ممکن است به

جلوگیری از سرطان و سایر بیماری‌های مزمن کمک کند [۱۶۸]. آنتی اکسیدان‌ها از اجزای سلولی در برابر آسیب اکسیداتیو محافظت می‌کنند و از خطر جهش و سرطان زایی جلوگیری و از سلول‌های ایمنی محافظت کنند. ترکیبات فعال زیستی مانند پلی ساکاریدها و تری ترپنوئیدهای موجود در گانودرما لوسیدوم در شرایط آزمایشگاهی فعالیت آنتی اکسیدانی نشان می‌دهند [۱۷۱؛ ۱۷۰؛ ۱۶۹].

۸-۱-۲- مطالعات اثرات ضد حساسیت

کاربرد مهم دیگر بدنهای بارور گانودرما لوسیدوم کاربرد آنها به عنوان عوامل ضد التهابی برای درمان آسم یا آلرژی است. گانودرما لوسیدوم دارای آرایه منحصر به فردی از ترکیبات به نام immunonutraceuticals است که نقش اصلی را در درمان واکنش‌های آلرژیک ناشی از هیستامین را به عهده دارد [۱۷۲].

۹-۱-۲- مطالعات اثرات ضد دیابتی

مطالعات حیوانی روی اثرات پلی ساکارید نشان داد که آنها دارای فعالیت‌های احتمالی کاهش قند خون و کاهش چربی خون هستند. عصاره آبی (۱۰۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم) گانودرما لوسیدوم سطح قند گلوکز خون را در آلوکسان ناشی از دیابت در موش‌های صحرایی ویستار را عادی کرد [۱۷۳]. یک مطالعه بالینی با هدف ارزیابی اثر و ایمنی ضد دیابت بخش‌های پلی ساکاریدی استخراج شده گانودرما لوسیدوم به وسیله یک روش ثبت شده در ۷۱ بیمار تایید شده دیابت نوع II توسط Gao و همکاران مبنی بر اثرات قابل توجهی در میانگین HbA1c را از ۸/۴٪ به ۷/۶٪ داشت [۱۷۴].

۱۰-۱-۲- مطالعات اثرات ضد باکتریایی و ضد ویروسی

گانودرما لوسیدوم به طور گسترده‌ای به عنوان یک عامل ضد باکتری خوب گزارش شده است. عصاره‌های آبی و متانولی گانودرما لوسیدوم چندین نوع از باکتریهای گرم مثبت و گرم منفی را مهار می‌کند. مطالعات S. Sudheer و همکاران نشان داد که ترکیبی از عصاره گانودرما لوسیدوم با آنتی بیوتیک‌های مختلف منجر به اثر افزایشی در اکثر موارد شده است [۱۷۵].

۱۱-۱-۲- سمیت گانودرما لوسیدوم

با توجه به آزمایشات حیوانی روی عصاره حاصل از گانودرما لوسیدوم سمیت بسیار پائینی داشته و اثرات سوء بلند مدت بسیار کمی از مشتقات گانودرما براساس داده های کمی به اثبات رسیده است. عصاره آبی حاصل از گانودرما لوسیدوم به موش ها به مدت ۳۰ روز و در دوز ۵ گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن موش ها تزریق شد و هیچ گونه تغییری در بدن آن ها و در وزن اندام و یا پارامترهای خون شناسی ایجاد نکرد و استفاده از کسر پلی ساکارید در همان دوز نیز هیچ گونه اثرات کشنده و جدی ایجاد نکرد. همچنین مصرف قارچ گانودرما لوسیدوم در دوز ۱۰ گرم به ازای هر کیلوگرم از وزن موش ها هیچ تغییری در چرخه فحلی و یا چرخه زمانی پذیرش باروری موش ها ی ماده ایجاد نشد و همین دوز نیز برای موش های نر هیچ گونه عوارضی از جمله عضلات کف لگنی موثر در اجابت مزاج و فعالیت جنسی جنس نر و یا تاثیری در اندازه بیضه های موش های نر نداشت. استفاده از عصاره الکلی به مدت ۳۰ روز و به ازای دوز روزانه ۱/۲ گرم و ۱۲ گرم به ازای وزن بدن موش صحرایی جوان هیچ گونه عوارض عملکرد کبدی، اندام ها و رشد آن ها نداشت. استفاده از عصاره الکلی و در دوز ۱۲ گرم به ازای هر کیلوگرم وزن سگ ها به مدت ۱۵ روز نیز هیچ گونه واکنش سمی دیده نشد، البته استفاده از دوز ۲۴ گرم به ازای وزن بدن سگ ها در مدت ۱۳ روز باعث ایجاد بی حالی در سگ ها شد. همچنین برای آزمایش سمیت از میوه گانودرما لوسیدوم که از طبیعت منطقه روستایی هنگ کنک برداشت شده بود را به روش فریز درایر و با عملکرد ۱ گرم به ازای ۲۰ گرم خشک نمودند و با ۵۰ ml عصاره حاصل از ۱۰۰ گرم پودر فوق الذکر اقدام به بررسی سمیت آن روی موش های نر با دوز مصرفی ۰/۹ گرم به ازای هر کیلوگرم از وزن بدن موش نمودند که هیچ گونه سمیت حادی و یا تغییری در اندام ها و یا ناهنجاری در کبد، کلیه ها، قلب، ریه و طحال مشاهده نگردید [۱۷۶].

۲-۲- جمع بندی نتایج پژوهش های صورت گرفته

با در نظر گرفتن تحقیقات انجام شده و اثرات آنتی باکتریال گانودریک اسید روی گونه های مختلف باکتری ما در این مطالعه با طراحی یک روش کشت جامد تولید گانودریک اسید را تحریک کرده و پس از خالص سازی عصاره اتانولی گانودریک اسید و اثرات آنتی باکتریال آن را بررسی کردیم

فصل ۳ : مواد و روش ها

۱-۳- مواد اولیه مورد استفاده

پودر گلوکز، نشاسته ذرت و نشاسته گندم ساخت شرکت مرک آلمان، شربت گلوکز و شربت فروکتوز ساخت شرکت زر فروکتوز ایران به عنوان منابع کربنی مورد استفاده قرار گرفتند. پپتون گوشت و عصاره مخمر ساخت شرکت مرک آلمان، شربت Corn Steep Liquor (CSL) 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 (۵/۰٪)، کلرور باریم، اسید سولفوریک، سولفات باریم، دی پتاسیم هیدروژن سولفات سه آبه (۴٪)، محیط کشت های مولر هینتون براث، مولر هینتون آگار، PDA، کلروفرم، بی کربنات سدیم، معرف رنگی تری فنیل تترازولیوم و پودر هیدروکسید سدیم از شرکت مرک آلمان تهیه شدند. اسید کلریدریک ۳۷٪ از شرکت آرمان سینا و الکل اتانول ۹۶٪ از شرکت سپاهان ایران تهیه شدند. ویتال ویتامین پیریدوکسین B6 ساخت شرکت کاسپین ایران از داروخانه محلی شهرستان سمنان تهیه شد. آنتی بیوتیک های جنتامایسین و اریترومایسین از شرکت کیو لب کانادا تهیه شدند.

۲-۳- تجهیزات مورد استفاده

۱. اتوکلاو مدل RT-21 (۷۵ لیتری) ساخت شرکت ریحان طب ایران
۲. آون ساخت شرکت Memmert آلمان
۳. انکوباتور ساخت شرکت (1597) pars Azmaco ساخت ایران
۴. دستگاه سانتریفوز ساخت شرکت Microfuge ایران
۵. ترازو مدل PW254 ساخت شرکت Ae ADAM انگلیس
۶. دستگاه اسپکتروفتومتر نور مرئی uv 2150 (UNICO، آمریکا)
۷. سمپلر در اندازه های مختلف ۱۰۰ و ۱۰۰۰ میکرولیتر (Alton، چین)
۸. هات پلیت و مگنت در مدل Saftely control ساخت IKA آلمان
۹. دستگاه pH متر Mettler ساخت سوئیس
۱۰. دستگاه Vortex Mixer ساخت شرکت نسل امید پژوهش ایران

۳-۳-۳- روش ها

۳-۳-۱- تهیه و نگهداری کشت مادر

میسلیوم قارچ گانودرما لوسیدوم نژاد CAU5501 از کلکسیون تهیه شد. میسلیوم دریافت شده زیر هود لامینار روی محیط کشت PDA در ظرف بشقابک کشت داده شد و سپس در دمای 30°C به مدت ۷ روز گرم خانه 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 روی محیط کشت دیگر کشت داده شد [۱۰۴].

۳-۳-۲- تهیه محیط کشت توسعه تلقیح

مطابق با روش Aguledo - Escobar و همکاران در سال ۲۰۱۷ محیط کشت توسعه تلقیح به شکل سوسپانسیون میسلیومی، در محیط های کشت محصول استفاده شدند. برای تهیه سوسپانسیون میسلیومی، در یک ظرف ارلن مایر ۲۵۰ ml حدود ۱۰۰ ml محیط کشت حاوی 35 g/L گلوکز، $7/5\text{ g}$ پپتون گوشت، $2/5$ عصاره مخمر، 1 g KH_2PO_4 و $0/5\text{ g}$ $\text{MgSO}_4.7\text{H}_2\text{O}$ به شکل W/V تهیه شد و به حجم ۲۵۰ ml رسانیده شد. pH اولیه محیط کشت با استفاده از HCl و یا NaOH یک نرمال به $6/5$ به صورت v/v تنظیم شد. محیط کشت مذکور در اتوکلاو با دمای 121°C ، فشار $0/1\text{ MPa}$ و در مدت زمان ۲۰ دقیقه استریل شد. مطابق با روش Esmailzadeh و همکاران در سال ۲۰۱۹ بعد از خنک شدن ارلن مایر حاوی محیط کشت مایع، در زیر هود لامینار با استفاده از آنس استریل به اندازه ۱ cm در ۱ cm از محیط کشت PDA که در یخچال نگهداری شده بود، به آن منتقل شد. در نهایت ارلن حاوی محیط کشت و میسلیوم در انکوباتور شیکردار در دمای 27°C با پرخش لرزشی 150 rpm/min به مدت ۸ روز گرم خانه گذاری شد [۱۰۵؛ ۱۰۶].

۳-۳-۳- کشت جامد

در این تحقیق نمونه قارچ گانودرما از مرکز تحقیقاتی نگهداری میکروبی تهران (Irost) تهیه شد پس از کشت در محیط بذر حاوی گندم نمونه قارچ تکثیر شدند. محیط کشت جامد به منظور تولید میوه قارچ گانودرما ۲۰ درصد نشاسته ذرت و ۱۰ درصد پروتئین سویا و ۵ درصد کربنات کلسیم به بستر چوب راش اضافه شد سپس به مدت ۲/۵ ساعت در دمای 120°C درجه سانتی گراد استریل شدند.

۴-۳-۳- استخراج گانودریک اسید از میوه قارچ گانودرما لوسیدوم

با تلفیقی از روش Wie و همکاران در سال ۲۰۱۶ و همچنین Fang and Zhong در سال ۲۰۰۲، برای بررسی مقدار گانودریک اسید و به منظور استفاده از حداقل دما برای فرآیند مذکور ابتدا از میوه قارچ گانودرما لوسیدوم که در فریزر نگهداری می شد، ابتدا قارچ های تهیه شده که به دو رنگ متفاوت زرد و قرمز که نوع زرد با مزه تلخ تر و نوع قرمز که از تلخی کمتری برخوردار بود، از هر یک به میزان ۱۰ گرم برداشته و آن را به قطعات خیلی ریز و در اندازه دانه برنج بوسیله تیغ جراحی خورد کرده و سپس تا رسیدن به وزن ثابت و در آن با دمای 50°C خشک گردید. سپس هر یک از قارچ های خشک شده را با نسبت ۱ به ۵ الکل اتانول ۹۶٪ مخلوط کرده و در دمای اتاق 24°C و با رطوبت ۳۰٪ به مدت ۵ روز نگه داری شدند، سپس سوسپانسیون حاصل شده به مدت ۲۴ ساعت در شیکر مکانیکی تکان داده شد، برای جداسازی تکه های میوه از سانتریفوژ با ۷۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه استفاده شد و مایع رویی را به صورت کامل جدا و مجدداً به منظور جداسازی کامل ذرات، مایع جداسازی شده را در سانتریفوژ مذکور و با همان ۷۰۰۰ دور در دقیقه و به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شد و مایع رویی جدا گردید، سپس مایع جدا شده بوسیله روتاری تحت خلا با فشار ۱۵۰ mbar و در دمای 50°C خشک گردید و ماده حاصله در کلروفرم حل کرده و پس از ۲۴ ساعت بوسیله روتاری تحت خلا با فشار ۱۵۰ mbar و در دمای 50°C خشک گردید و ماده حاصله در محلول ۵٪ NaHCO_3 حل کرده و پس از ۱۲ ساعت pH آن با اسید کلریدریک به ۳ رسانیده شد و دوباره آنرا بوسیله حل کردن در کلروفرم و طی مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق استخراج شده و باقی مانده در ۵ ml اتانول ۹۶٪ حل گردید و جذب آن در طول موج ۲۴۵ nm توسط دستگاه اسپکترو فوتومتر قرائت شد [۱۱۸؛ ۱۱۷].

۵-۳-۳- ارزیابی آنتی باکتریال به روش میکرودايلوشن

در این مطالعه از روش میکرودايلوشن، که یک روش استاندارد بوده و در اکثر آزمایشگاههای مرجع در ایالات متحده و خارج از آن استفاده می شود، استفاده گردید. در این روش معمولاً می توان رقت های متعدد و یا عوامل متعدد ضد میکروبی را در سینی های پلاستیکی یکبار مصرف که دارای ۹۶ چاهک می باشد را به صورت همزمان آزمایش کرد. محیط کشت معمولاً مولر هینتون مایع است، ابتدا سوسپانسیون ارگانیسم مورد آزمایش در آب نمک یا محیط مولر هینتون با کدورت استاندارد ۰/۵ مک فارلند (10^8 CFU/ml) تهیه

می شود. سپس با رقت سازی می توان به کدورت های مختلف رسید و غالبا از کدورت به تعداد تقریبی 10^5 CFU/ ml * Δ استفاده می شود. از همین روش، کدورت مذکور را تهیه و برای آزمون های آنتی باکتریال استفاده شد و برای آزمون نیز از ۵ باکتری مختلف گرم مثبت و گرم منفی شامل: *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC27853), *Escherichia coli* (ATCC25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC9341), *Micrococcus luteus* (ATCC25923), *Bacillus subtilis* (PTCC1715) () استفاده گردید و پس از آن اقدام به انکوبه کردن به مدت ۱۸ تا ۲۴ ساعت و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد با گونه های مختلف و غلظت های مختلف از عوامل ضد میکروبی می شود و برای شاهد آنتی بیوتیک نیز بر اساس نوع باکتری از آنتی بیوتیک های مختلف از قبیل: کلرامفنیکل، تتراسایکلین، کلیندامایسین، اریترومایسین و ... استفاده می شود. البته برای تفسیر راحت تر از یک معرف رنگی جهت تعیین رشد میکروارگانیسم مربوطه استفاده می گردد. در این آزمایش ها از محلول ۵٪ تری فنیل تترازولیوم و پس از انکوبه کردن به مدت نیم ساعت و در همان دمای ۳۷ درجه سانتی گراد استفاده می شود که در صورت رشد باکتری و وجود آن رنگ چاهک به قرمزی منتهی می شود و به همین ترتیب برای چاهک هایی که رنگ آن ها قرمز نشده به منظور صحت و تعیین MIC و MBC اقدام به کشت در محیط کشت مولر هینتون آگار از همان چاهک می شود [۱۷۶].

فصل ۴ : نتایج و بحث

۱-۴-بخش اول

در این بخش به اندازه گیری میزان گانودریک اسید در قارچ قرمز و قارچ زرد پرداخته شد. البته برای افزایش راندمان تولید گانودریک اسید از قارچ گانودرما لوسیدوم استراتژی های مختلفی وجود دارد و عوامل مختلفی مانند گونه، محیط کشت، دما، اکسیژن و ... به طور اجتناب ناپذیری روی میزان گانودریک اسید قارچ گانودرما لوسیدوم اثر می گذارد [۲۰۴]. به عنوان مثال در پژوهش Li N - 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 با انتخاب شش منبع کربنی گلوکز، ساکارز، مالتوز، مانوز، لاکتوز و نشاسته محلول و مقایسه آنها، مشخص شد که محیط کشت مایع حاوی منبع کربنی ساکارز بیشترین میزان تشکیل گانودریک اسید (24.3 mg/ gr) را در محیط کشت داشت و محیط کشت مایع حاوی منبع کربنی نشاسته محلول کمترین میزان تشکیل گانودریک اسید (9.7 mg/ gr) را از خود نشان داد [۲۰۵]. البته در این تحقیق مقایسه راندمان میزان گانودریک اسید قارچ گانودرما لوسیدوم به عنوان هدف تعیین نشد و فقط میزان گانودریک اسید در دونوع قارچ گانودرما لوسیدوم تهیه شده مورد نظر بود. لذا در این تحقیق با استفاده از تلفیقی از روش Wie و همکاران در سال ۲۰۱۶ و همچنین Fang and Zhong در سال ۲۰۰۲، نسبت به بررسی مقدار گانودریک اسید اقدام و به منظور اطمینان بیشتر این آزمون در ۳ مرحله تکرار و میانگین آن به عنوان نتیجه برای هریک از قارچ های گانودرما لوسیدوم زرد و قرمز در نظر گرفته شد که در هر مرحله و به منظور استفاده از حداقل دما برای فرآیند مذکور ابتدا از میوه قارچ گانودرما لوسیدوم که در فریزر نگهداری می شد، ابتدا از هر دو رنگ زرد و قرمز ۱۰ برداشته و آن را به قطعات خیلی ریز و در اندازه دانه برنج بوسیله تیغ جراحی خورد کرده و سپس تا رسیدن به وزن ثابت و در آون با دمای 50°C خشک گردید. سپس هر یک از قارچ های خشک شده را با نسبت ۱ به ۵ الکل اتانول ۹۶٪ مخلوط کرده و در دمای اتاق 24°C و با رطوبت ۳۰٪ به مدت ۵ روز نگه داری و پس از آن سوسپانسیون حاصل شده به مدت ۲۴ ساعت در شیکر مکانیکی تکان داده شد، برای جداسازی تکه های میوه از سانتریفوژ با ۷۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه استفاده شد و مایع رویی را به صورت کامل جدا و مجدداً به منظور جداسازی کامل ذرات، مایع جداسازی شده را در سانتریفوژ مذکور و با همان ۷۰۰۰ دور در دقیقه و به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شد و مایع رویی جدا گردید، سپس مایع جدا شده بوسیله روتاری تحت خلا با فشار ۱۵۰ mbar و در دمای 50°C خشک گردید و ماده حاصله در کلروفرم حل کرده و پس از ۲۴ ساعت بوسیله روتاری تحت خلا با فشار ۱۵۰ mbar و در دمای 50°C خشک گردید و ماده حاصله در محلول ۵٪ NaHCO_3 حل کرده و پس از ۱۲

ساعت pH آن با اسید کلریدریک به ۳ رسانیده شد و دوباره آنرا بوسیله حل کردن در کلروفرم و طی مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق استخراج شده و باقی مانده در ۵ ml اتانول ۹۶٪ حل گردید و جذب آن در طول موج ۲۴۵ nm توسط دستگاه اسپکترو فوتومتر قرائت شد، به منظور اطمینان بیشتر به نتایج حاصله این آزمون ۳ بار تکرار و در پایان میانگین به دست آمده هر ۳ آزمون به عنوان میزان گانودریک اسید هریک از قارچ ها در نظر گرفته شد که در این تحقیق برای قارچ زرد 3.264 mg/ gr بوده و میزان گانودریک اسید برای قارچ گانودرما قرمز 2.140 mg/gr بود.

۲-۴- بخش دوم

در این بخش ابتدا از سویه گانودرمای تلخ تر که به ازای هر گرم قارچ گانودرما لوسیدوم حاوی 3.264 mg/g گانودریک اسید بود، سه غلظت ابتدایی $t_1 = 152 \mu\text{g/ml}$ و $t_2 = 120 \mu\text{g/ml}$ و $t_3 = 92 \mu\text{g/ml}$ تهیه و سپس ۵ رقت بعدی از هریک از غلظت های اولیه نیز تهیه که با t نام گذاری شد، سپس هریک از استوانه ها را با حجم ۱۰۰ میکرولیتر به روش نیم مک فارلند، با کدورت تقریبی $CFU/ml \approx 10^5$ تهیه و با ۵ گونه مختلف گرم مثبت و گرم منفی شامل: *Pseudomonas aeruginosa*(ATCC27853), *Esherichia coli* (ATCC25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC25923), *Bacillus subtilis* (PTCC1715), *Micrococcus luteus* (ATCC9341) کشت داده و پس از ۲۴ ساعت انکوبه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و با اضافه کردن $20 \mu\text{g}$ از تری فنیل تترازولیوم به هریک از چاهک ها و پس از انکوبه مجدد به مدت نیم ساعت و در دمای ۳۷ درجه رنگ هر یک از چاهک ها را مشاهده و یادداشت شد. همچنین از نمونه آنتی بیوتیک مورد نظر و شاهد محیط کشت و نمونه خالص حاوی گانودریک اسید نیز به همین ترتیب آزمون گردید. مجددا فقط نمونه هایی که رنگ چاهک، قرمز نشده بود را در محیط کشت مولر هینتون کشت داده و نتایج نهایی ثبت شد. لازم به ذکر است این آزمایش در دو نوبت و در شرایط یکسان تکرار شد. سپس از همین سویه گانودرما مجددا سه غلظت ابتدایی $t_1 = 90 \mu\text{g/ml}$ و $t_2 = 64 \mu\text{g/ml}$ و $t_3 = 52 \mu\text{g/ml}$ را نیز تهیه و تا انتها و با دو بار تکرار انجام که نتایج حاصل در جداول زیر به ترتیب ثبت شده است.

سپس از سویه گانودرمای با تلخی کم تر که به ازای هر گرم قارچ گانودرما حاوی 2.140 mg/g گانودریک اسید بود، سه غلظت ابتدایی $s_1 = 116 \mu\text{g/ml}$ و $s_2 = 92 \mu\text{g/ml}$ و $s_3 = 70 \mu\text{g/ml}$ را تهیه و ۵ رقت بعدی هریک از غلظت های اولیه بالا نیز تهیه شد و با s نام گذاری گردید، سپس هریک از استوانه ها را با حجم ۱۰۰ میکرولیتر به روش نیم مک فارلند، کدورت تقریبی $CFU/ml \approx 10^5$ تهیه و با ۵ گونه مختلف گرم مثبت و گرم منفی شامل: *Pseudomonas aeruginosa*(ATCC27853), *Esherichia coli* (ATCC25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC25923), *Bacillus subtilis* (PTCC1715)

(*Micrococcus luteus* (ATCC9341), کشت داده و پس از ۲۴ ساعت انکوبه در دمای ۳۷ درجه با اضافه کردن ۲۰ µg از تری فنیل تترازولیوم به هریک از چاهک ها و پس از انکوبه مجدد به مدت نیم ساعت و در دمای ۳۷ درجه رنگ هر یک از چاهک ها مشاهده و نتیجه یادداشت گردید و از نمونه آنتی بیوتیک مورد نظر و شاهد محیط کشت و نمونه خالص حاوی گانودریک اسید نیز به همین ترتیب آزمون انجام گردید و مجددا فقط نمونه هایی که رنگ چاهک قرمز نشده بود را در محیط کشت مولر هینتون کشت داده و نتایج نهایی ثبت گردید. لازم به ذکر است این آزمایش در دو نوبت و در شرایط یکسان تکرار شد. سپس از همین سویه گانودرما مجددا سه غلظت ابتدایی $t_1 = 64 \mu\text{g} / \text{ml}$ و $t_2 = 50 \mu\text{g} / \text{ml}$ و $t_3 = 40 \mu\text{g} / \text{ml}$ تهیه و تا انتها و با دو بار تکرار آزمون انجام شد که نتایج حاصل در جداول زیر به ترتیب ثبت شده است.

۱-۲-۴- تاثیر استفاده از گانودریک اسید در دوزهای مختلف بر علیه

باکتری (*Bacillus subtilis* (PTCC1715) و میزان MIC و MBC گانودریک اسید

برای باکتری فوق

یکی از باکتری هایی را که به عنوان شاخص برای بررسی اثرات آنتی باکتریال گانودریک اسید استخراجی از قارچ گانودرما لوسیدوم روی آن انتخاب شد، باکتری (*Bacillus subtilis* (PTCC1715) می باشد که در جداول ۴-۱، ۴-۲، ۴-۳ و ۴-۴ به بررسی اثرات گانودریک اسید به دست آمده از هر دو گونه زرد و قرمز در غلظت های مختلف به منظور کشف حداقل غلظت ممانعت کنندگی از رشد و حداقل غلظت مورد نیاز برای حذف جمعیت هدف برابر روش استاندارد نیم مک فارلند از باکتری (*Bacillus subtilis* (PTCC1715) پرداخته شده است.

جدول ۴-۱: اثرات آنتی باکتریال گانودریک اسید حاصله از میوه های زرد تلخ تر روی باکتری *Bacillus subtilis* (PTCC1715) بر اساس میزان گانودریک به ازای هر میلی لیتر بر حسب $\mu\text{g/ml}$ با روش میکرودايلوشن با سه غلظت ابتدایی $152 \mu\text{g/ml}$ ، $120 \mu\text{g/ml}$ و $92 \mu\text{g/ml}$ و ۹۲ و ۵ رقت بعدی هریک از غلظت های اولیه بروش 0.5 مک فارلند روی باکتری هدف صورت پذیرفت.

نمونه باکتری باجمعیت	محیط کشت	آنتی بیوتیک و غلظت آن به $\mu\text{g/ml}$	غلظت های گانودریک اسید استفاده شده به $\mu\text{g/ml}$	باکتری
نمونه شاهد t1	شاهد محیط کشت	اریترومایسین 32	۴/۷ ۹/۵ ۱۹ ۳۸ ۷۶ ۱۵۲	<i>Bacillus subtilis</i>
قرمز	زرد شفاف	سفید و شفاف	قرمز قرمز قرمز	زرد زرد زرد
			مثبت	منفی
نتیجه کشت مجدد				
نمونه شاهد t2	شاهد محیط کشت	اریترومایسین 32	۳/۷ ۷/۵ ۱۵ ۳۰ ۶۰ ۱۲۰	<i>Bacillus subtilis</i>
قرمز	زرد شفاف	سفید و شفاف	قرمز قرمز قرمز	زرد زرد زرد
			مثبت	منفی
نتیجه کشت مجدد				
نمونه شاهد t3	شاهد محیط کشت	اریترومایسین 32	۲/۸ ۵/۷ ۱۱/۵ ۲۳ ۴۶ ۹۲	<i>Bacillus subtilis</i>
قرمز	زرد شفاف	سفید و شفاف	قرمز قرمز قرمز	زرد زرد زرد
			مثبت	منفی
نتیجه کشت مجدد				

با توجه به نتایج جدول ۴-۱ استفاده از گانودریک اسید با غلظت $46 \mu\text{g/ml}$ توانست کل جمعیت هدف باکتری *Bacillus subtilis* را نابود کرده و حتی پس از ۴۸ ساعت نیز هیچ کلونی مشاهده نشد و در غلظت $38 \mu\text{g/ml}$ فقط دو کلونی مشاهده شد که می توان از آن غلظت تحت عنوان غلظت ممانعت کننده استفاده کرد.

جدول ۴-۲: اثرات آنتی باکتریال گانودریک اسید حاصله از میوه های زرد تلخ تر روی باکتری (*Bacillus subtilis* (PTCC1715) بر اساس میزان گانودریک به ازای هر میلی لیتر بر حسب $\mu\text{g/ml}$ با روش میکرودايلوشن با سه غلظت ابتدایی $90 \mu\text{g/ml}$ ، $45 \mu\text{g/ml}$ و $22.5 \mu\text{g/ml}$ و ۵ و $52 \mu\text{g/ml}$ رقت بعدی هریک از غلظت های اولیه بروش 0.5 مک فارلند روی باکتری هدف صورت پذیرفت.

نمونه باکتری باجمعیت هدف فاقد آنتی باکتریال	محیط کشت بدون باکتری	آنٹی بیوتیک و غلظت آن به $\mu\text{g/ml}$	غلظت های گانودریک اسید استفاده شده به $\mu\text{g/ml}$						باکتری
نمونه شاهد t1	شاهد محیط کشت	اریترومایسین 32	۳	۶/۱	۱۱/۲	۲۲/۵	۴۵	۹۰	<i>Bacillus subtilis</i>
قرمز	زرد شفاف	سفید و شفاف	قرمز	قرمز	قرمز	قرمز	زرد شفاف	زرد شفاف	رنگ مشاهده شده
			مثبت	منفی	منفی	منفی	منفی	منفی	نتیجه کشت مجدد
نمونه شاهد t2	شاهد محیط کشت	اریترومایسین 32	۲/۱	۴/۲	۸/۵	۱۷	۳۴	۶۸	<i>Bacillus subtilis</i>
قرمز	زرد شفاف	سفید و شفاف	قرمز	قرمز	قرمز	قرمز	زرد شفاف	زرد شفاف	رنگ مشاهده شده
			مثبت	منفی	منفی	منفی	منفی	منفی	نتیجه کشت مجدد
نمونه شاهد t3	شاهد محیط کشت	اریترومایسین 32	۱/۶	۳/۲	۶/۵	۱۳	۲۶	۵۲	<i>Bacillus subtilis</i>
قرمز	زرد شفاف	سفید و شفاف	قرمز	قرمز	قرمز	قرمز	صورتی	زرد شفاف	رنگ مشاهده شده
			مثبت	منفی	منفی	منفی	منفی	منفی	نتیجه کشت مجدد

با توجه به نتایج جدول ۴-۲ استفاده از گانودریک اسید با غلظت $45 \mu\text{g/ml}$ توانست کل جمعیت هدف باکتری (*Bacillus subtilis* (PTCC1715) را نابود کرده و حتی پس از ۴۸ ساعت نیز هیچ کلونی مشاهده نشد و در غلظت $34 \mu\text{g/ml}$ فقط چند کلونی محدود مشاهده شد که می توان از آن غلظت تحت عنوان غلظت ممانعت کننده استفاده کرد.

جدول ۳-۴: اثرات آنتی باکتریال گانودریک اسید حاصله از میوه های قرمز با تلخی کم تر روی باکتری *Bacillus subtilis* (PTCC1715) بر اساس میزان گانودریک به ازای هر میلی لیتر برحسب $\mu\text{g/ml}$ با روش میکرودایلوشن با سه غلظت ابتدایی $\mu\text{g/ml}$ ۱۱۶، ۹۲ و $\mu\text{g/ml}$ ۷۰ و ۵ رقت بعدی هریک از غلظت های اولیه بروش ۰/۵ مک فارلند روی باکتری هدف صورت پذیرفت.

نمونه باکتری	محیط کشت	آنتی بیوتیک و غلظت آن به $\mu\text{g/ml}$	غلظت های گانودریک اسید استفاده شده به $\mu\text{g/ml}$						باکتری
نمونه شاهد t1	شاهد محیط کشت	اریترومایسین 32	۳/۶	۷/۲	۱۴/۵	۲۹	۵۸	۱۱۶	<i>Bacillus subtilis</i>
قرمز	زرد شفاف	سفید و شفاف	قرمز	قرمز	قرمز	قرمز	زرد شفاف	زرد شفاف	رنگ مشاهده شده
			مثبت	منفی	منفی	منفی	نتیجه کشت مجدد		
نمونه شاهد t2	شاهد محیط کشت	اریترومایسین 32	۲/۸	۵/۷	۱۱/۵	۲۳	۴۶	۹۲	<i>Bacillus subtilis</i>
قرمز	زرد شفاف	سفید و شفاف	قرمز	قرمز	قرمز	قرمز	زرد شفاف	زرد شفاف	رنگ مشاهده شده
			مثبت	منفی	منفی	منفی	نتیجه کشت مجدد		
نمونه شاهد t3	شاهد محیط کشت	اریترومایسین 32	۲/۱	۴/۳	۸/۷	۱۷/۵	۳۵	۷۰	<i>Bacillus subtilis</i>
قرمز	زرد شفاف	سفید و شفاف	قرمز	قرمز	قرمز	قرمز	زرد شفاف	زرد شفاف	رنگ مشاهده شده
			مثبت	مثبت	منفی	منفی	نتیجه کشت مجدد		

با توجه به نتایج جدول ۳-۴ استفاده از گانودریک اسید با غلظت $46 \mu\text{g/ml}$ توانست کل جمعیت هدف باکتری (*Bacillus subtilis* (PTCC1715) را نابود کرده و حتی پس از ۴۸ ساعت نیز هیچ کلونی مشاهده نشد و در غلظت $35 \mu\text{g/ml}$ فقط چند کلونی محدود مشاهده شد که می توان از آن غلظت تحت عنوان غلظت ممانعت کننده استفاده کرد.

جدول ۴-۴: اثرات آنتی باکتریال گانودریک اسید حاصله از میوه های قرمز با تلخی کم تر روی باکتری *Bacillus subtilis* (PTCC1715) بر اساس میزان گانودریک به ازای هر میلی لیتر برحسب $\mu\text{g/ml}$ با روش میکرودایلوشن با سه غلظت ابتدایی $\mu\text{g/ml}$ ۶۴، ۵۰ و $\mu\text{g/ml}$ ۴۰ و ۵ رقت بعدی هریک از غلظت های اولیه بروش ۰/۵ مک فارلند روی باکتری هدف صورت پذیرفت.

نمونه باکتری باجمعیت هدف فاقد آنتی باکتریال	محیط کشت بدون باکتری	آنٹی بیوتیک و غلظت آن به $\mu\text{g/ml}$	غلظت های گانودریک اسید استفاده شده به $\mu\text{g/ml}$						باکتری
نمونه شاهد t1	شاهد محیط کشت	اریترومایسین 32	۲	۴	۸	۱۶	۳۲	۶۴	<i>Bacillus subtilis</i>
قرمز	زرد شفاف	سفید و شفاف	قرمز	قرمز	قرمز	قرمز	زرد	زرد شفاف	رنگ مشاهده شده
							مثبت	منفی	نتیجه کشت مجدد
نمونه شاهد t2	شاهد محیط کشت	اریترومایسین 32	۱/۵	۳/۱	۶/۲	۱۲/۵	۲۵	۵۰	<i>Bacillus subtilis</i>
قرمز	زرد شفاف	سفید و شفاف	قرمز	قرمز	قرمز	قرمز	قرمز	زرد شفاف	رنگ مشاهده شده
							مثبت	منفی	نتیجه کشت مجدد
نمونه شاهد t3	شاهد محیط کشت	اریترومایسین 32	۱/۲	۲/۵	۵	۱۰	۲۰	۴۰	<i>Bacillus subtilis</i>
قرمز	زرد شفاف	سفید و شفاف	قرمز	قرمز	قرمز	قرمز	قرمز	مثبت	رنگ مشاهده شده
							مثبت	مثبت	نتیجه کشت مجدد

با توجه به نتایج جدول ۴-۴ استفاده از گانودریک اسید با غلظت $50 \mu\text{g/ml}$ توانست کل جمعیت هدف باکتری *Bacillus subtilis* (PTCC1715) را نابود کرده و حتی پس از ۴۸ ساعت نیز هیچ کلونی مشاهده نشد و در غلظت $40 \mu\text{g/ml}$ فقط یک کلونی محدود مشاهده شد که می توان از آن غلظت تحت عنوان غلظت ممانعت کننده استفاده کرد.

باتوجه به نتایج به دست آمده از ۴ جدول ۴-۱، ۴-۲، ۴-۳ و ۴-۴ که گانودریک اسیدهای حاصل از هر دو گونه را به عنوان آنٹی باکتریال استفاده کردیم که بر همین اساس می توان بیان کرد که MIC برای باکتری *Bacillus subtilis* (PTCC1715) میزان $34 \mu\text{g/ml}$ و MBC باکتری مذکور، میزان $45 \mu\text{g/ml}$ بر

اساس گانودریک اسید استخراجی از گانودرما لوسیدوم می باشد. باتوجه به پژوهش های مقایسه شده در این تحقیق روی باکتری *Bacillus subtilis* کمترین میزان مربوط به پژوهش Skalicka-Wozniak, K. و همکاران در سال ۲۰۱۲ با پلی ساکاریدهای استخراجی که به حداقل غلظت ممانعت کنندگی (MIC=2.5mg/ml) و حداقل غلظت کشندگی (MBC=5mg/ml) برای این باکتری رسیدند و این در حالیست که برای گانودریک اسید در این تحقیق (MIC=0.034mg/ml) و (MBC=0.045mg/ml) که نشان می دهد استخراج گانودریک اسید از گانودرما لوسیدوم و استفاده از آن در هدف ضد باکتریایی از کارایی بسیار بالاتری برخوردار بوده و از طرفی با توجه به میانگین راندمان استخراج گانودریک اسید از گانودرما لوسیدوم مورد استفاده در این مطالعه که 2.702 mg/gr از هر دو گونه بوده است که بیانگر مصرف میانگین 0.0126 gr قارچ گانودرما لوسیدوم برای هدف ممانعت کنندگی و 0.0167 gr قارچ گانودرما لوسیدوم برای هدف کشندگی می باشد و در مقایسه با پژوهش Skalicka-Wozniak, K. و همکاران در سال ۲۰۱۲ که میانگین پلی ساکارید استخراجی 47.23 mg/gr که از 0.052 gr قارچ گانودرما لوسیدوم برای هدف ممانعت کنندگی و 0.105 gr قارچ گانودرما لوسیدوم برای هدف کشندگی استفاده شده و بیانگر دوز مصرفی کمتر قارچ گانودرما لوسیدوم در این مطالعه به منظور رسیدن به هدف ضد باکتریایی می باشد.

۲-۲-۴- تاثیر استفاده از گانودریک اسید در دوزهای مختلف بر علیه

باکتری (*Esherichia coli* (ATCC25922) و میزان MIC و MBC گانودریک اسید

برای باکتری فوق

یکی از باکتری هایی را که به عنوان شاخص برای بررسی اثرات آنتی باکتریال گانودریک اسید استخراجی از قارچ گانودرما لوسیدوم انتخاب شد، باکتری (*Esherichia coli* (ATCC25922) می باشد و این یک سویه بیمارستانی است که در جداول ۴-۵، ۴-۶، ۴-۷ و ۴-۸ به بررسی اثرات گانودریک اسید به دست آمده از هر دو گونه زرد و قرمز در غلظت های مختلف به منظور کشف حداقل غلظت ممانعت کنندگی از رشد و حداقل غلظت مورد نیاز برای حذف جمعیت هدف برابر روش استاندارد نیم مک فارلند پرداخته شده است.

جدول ۴-۵: اثرات آنتی باکتریال گانودریک اسیدحاصله از میوه های زرد تلخ تر روی باکتری (*Esherichia coli* (ATCC25922) بر اساس میزان گانودریک به ازای هر میلی لیتر بر حسب $\mu\text{g/ml}$ با روش میکرودايلوشن با سه غلظت ابتدایی $152 \mu\text{g/ml}$ ، $76 \mu\text{g/ml}$ و $38 \mu\text{g/ml}$ و ۵ و ۹۲ $\mu\text{g/ml}$ رقت بعدی هریک از غلظت های اولیه بروش ۵/۰ مک فارلند روی باکتری هدف صورت پذیرفت.

نمونه باکتری باجمعیت هدف فاقد آنتی باکتریال	محیط کشت بدون باکتری	آنتی بیوتیک و غلظت آن به $\mu\text{g/ml}$	غلظت های گانودریک اسید استفاده شده به $\mu\text{g/ml}$						باکتری
نمونه شاهد t1	شاهد محیط کشت	جنتامایسین 32	۴/۷	۹/۵	۱۹	۳۸	۷۶	۱۵۲	<i>Esherichia coli</i>
قرمز	زرد شفاف	سفید و شفاف	قرمز	قرمز	زرد	زرد	زرد	زرد	رنگ مشاهده شده
					کدر	شفاف	شفاف	شفاف	نتیجه کشت مجدد
					مثبت	منفی	منفی	منفی	
نمونه شاهد t2	شاهد محیط کشت	جنتامایسین 32	۳/۷	۷/۵	۱۵	۳۰	۶۰	۱۲۰	<i>Esherichia coli</i>
قرمز	زرد شفاف	سفید و شفاف	قرمز	قرمز	قرمز	زرد	زرد	زرد	رنگ مشاهده شده
						شفاف	شفاف	شفاف	نتیجه کشت مجدد
					مثبت	منفی	منفی	منفی	
نمونه شاهد t3	شاهد محیط کشت	جنتامایسین 32	۲/۸	۵/۷	۱۱/۵	۲۳	۴۶	۹۲	<i>Esherichia coli</i>
قرمز	زرد شفاف	سفید و شفاف	قرمز	قرمز	قرمز	زرد	زرد	زرد	رنگ مشاهده شده
						شفاف	شفاف	شفاف	نتیجه کشت مجدد
					مثبت	مثبت	مثبت	منفی	

با توجه به نتایج جدول ۴-۵ استفاده از گانودریک اسید با غلظت $30 \mu\text{g/ml}$ توانست کل جمعیت هدف باکتری (*Esherichia coli* (ATCC25922) را نابود کرده و حتی پس از ۴۸ ساعت نیز هیچ کلونی مشاهده نشد و در غلظت $23 \mu\text{g/ml}$ فقط سه کلونی مشاهده شد که می توان از آن غلظت تحت عنوان غلظت ممانعت کننده استفاده کرد.

جدول ۴-۶: اثرات آنتی باکتریال گانودریک اسیدحاصله از میوه های زرد تلخ تر روی باکتری *Esherichia coli* (ATCC25922) بر اساس میزان گانودریک به ازای هر میلی لیتر برحسب $\mu\text{g/ml}$ با روش میکرودايلوشن با سه غلظت ابتدایی $90 \mu\text{g/ml}$ ، $45 \mu\text{g/ml}$ و $22.5 \mu\text{g/ml}$ و ۵ و ۵۲ $\mu\text{g/ml}$ رقت بعدی هریک از غلظت های اولیه بروش ۰/۵ مک فارلند روی باکتری هدف صورت پذیرفت.

نمونه باکتری	محیط کشت	آنتی بیوتیک و غلظت آن به $\mu\text{g/ml}$	غلظت های گانودریک اسید استفاده شده به $\mu\text{g/ml}$						باکتری
باجمعیته هدف فاقد آنتی باکتریال	بدون باکتری								
نمونه شاهد t1	شاهد محیط کشت	جنتامایسین 32	۳	۶/۱	۱۱/۲	۲۲/۵	۴۵	۹۰	<i>Esherichia coli</i>
قرمز	زرد شفاف	سفید و شفاف	قرمز	قرمز	قرمز	زرد	زرد شفاف	زرد شفاف	رنگ مشاهده شده
						مثبت	منفی	منفی	نتیجه کشت مجدد
نمونه شاهد t2	شاهد محیط کشت	جنتامایسین 32	۲/۱	۴/۲	۸/۵	۱۷	۳۴	۶۸	<i>Esherichia coli</i>
قرمز	زرد شفاف	سفید و شفاف	قرمز	قرمز	قرمز	قرمز	زرد شفاف	زرد شفاف	رنگ مشاهده شده
						مثبت	منفی	منفی	نتیجه کشت مجدد
نمونه شاهد t3	شاهد محیط کشت	جنتامایسین 32	۳/۱	۳/۲	۶/۵	۱۳	۲۶	۵۲	<i>Esherichia coli</i>
قرمز	زرد شفاف	سفید و شفاف	قرمز	قرمز	قرمز	قرمز	زرد شفاف	زرد شفاف	رنگ مشاهده شده
						مثبت	منفی	منفی	نتیجه کشت مجدد

با توجه به نتایج جدول ۴-۶ استفاده از گانودریک اسید با غلظت $26 \mu\text{g/ml}$ توانست کل جمعیت هدف باکتری *Esherichia coli* (ATCC25922) را نابود کرده و حتی پس از ۴۸ ساعت نیز هیچ کلونی مشاهده نشد و در غلظت $22.5 \mu\text{g/ml}$ فقط سه کلونی مشاهده شد که می توان از آن غلظت تحت عنوان غلظت ممانعت کننده استفاده کرد.

جدول ۴-۷: اثرات آنتی باکتریال گانودریک اسیدحاصل از میوه های قرمز با تلخی کم تر روی باکتری *Esherichia coli* (ATCC25922) بر اساس میزان گانودریک به ازای هر میلی لیتر برحسب $\mu\text{g/ml}$ با روش میکرودايلوشن با سه غلظت ابتدایی $\mu\text{g/ml}$ ۱۱۶، ۹۲ و $\mu\text{g/ml}$ ۵۰ و ۵ رقت بعدی هریک از غلظت های اولیه بروش ۰/۵ مک فارلند روی باکتری هدف صورت پذیرفت.

نمونه باکتری	محیط کشت	آنتی بیوتیک و غلظت آن به $\mu\text{g/ml}$	غلظت های گانودریک اسید استفاده شده به $\mu\text{g/ml}$						باکتری
باجمعیت هدف فاقد آنتی باکتریال	بدون باکتری								
نمونه شاهد t1	شاهد محیط کشت	جنتامایسین 32	۳/۶	۷/۲	۱۴/۵	۲۹	۵۸	۱۱۶	<i>Esherichia coli</i>
قرمز	زرد شفاف	سفید و شفاف	زرد	زرد	زرد	زرد	زرد	زرد	رنگ مشاهده شده
			کدر	کدر	کدر	کدر	کدر	شفاف	شفاف شده
					مثبت	مثبت	مثبت	مثبت	نتیجه کشت مجدد
نمونه شاهد t2	شاهد محیط کشت	جنتامایسین 32	۲/۸	۵/۷	۱۱/۵	۲۳	۴۶	۹۲	<i>Esherichia coli</i>
قرمز	زرد شفاف	سفید و شفاف	زرد	زرد	قرمز	زرد	زرد	زرد	رنگ مشاهده شده
			کدر	کدر				شفاف	شفاف شده
					مثبت	مثبت	مثبت	مثبت	نتیجه کشت مجدد
نمونه شاهد t3	شاهد محیط کشت	جنتامایسین 32	۲	۴/۱	۸/۲	۱۷/۵	۳۵	۷۰	<i>Esherichia coli</i>
قرمز	زرد شفاف	سفید و شفاف	زرد	زرد	زرد	قرمز	زرد	زرد	رنگ مشاهده شده
			کدر	کدر	کدر			شفاف	شفاف شده
						مثبت	مثبت	مثبت	نتیجه کشت مجدد

با توجه به نتایج جدول ۴-۷ استفاده از گانودریک اسید با غلظت $29\mu\text{g/ml}$ توانست کل جمعیت هدف باکتری (*Esherichia coli* (ATCC25922) را نابود کرده و حتی پس از ۴۸ ساعت نیز هیچ کلونی مشاهده نشد و در غلظت $23\mu\text{g/ml}$ فقط دو کلونی مشاهده شد که می توان از آن غلظت تحت عنوان غلظت ممانعت کننده استفاده کرد.

جدول ۴-۸: اثرات آنتی باکتریال گانودریک اسید حاصله از میوه های قرمز با تلخی کم تر روی باکتری *Esherichia coli* (ATCC25922) بر اساس میزان گانودریک به ازای هر میلی لیتر بر حسب $\mu\text{g/ml}$ با روش میکرودایلوشن با سه غلظت ابتدایی $\mu\text{g/ml}$ ۶۴، ۵۰ و $\mu\text{g/ml}$ ۴۰ و ۵ رقت بعدی هریک از غلظت های اولیه بروش ۰/۵ مک فارلند روی باکتری هدف صورت پذیرفت.

نمونه باکتری	محیط کشت	آنتی بیوتیک و غلظت آن به $\mu\text{g/ml}$	غلظت های گانودریک اسید استفاده شده به $\mu\text{g/ml}$	باکتری
نمونه شاهد t1	شاهد محیط کشت	جنتامایسین 32	۲، ۴، ۸، ۱۶، ۳۲، ۶۴	<i>Esherichia coli</i>
قرمز	زرد شفاف	سفید و شفاف	زرد کدر	رنگ مشاهده شده
			مثبت	نتیجه کشت مجدد
نمونه شاهد t2	شاهد محیط کشت	جنتامایسین 32	۱/۵، ۳/۱، ۶/۲، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰	<i>Esherichia coli</i>
قرمز	زرد شفاف	سفید و شفاف	زرد کدر	رنگ مشاهده شده
			مثبت	نتیجه کشت مجدد
نمونه شاهد t3	شاهد محیط کشت	جنتامایسین 32	۱/۲، ۲/۵، ۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰	<i>Esherichia coli</i>
قرمز	زرد شفاف	سفید و شفاف	زرد کدر	رنگ مشاهده شده
			مثبت	نتیجه کشت مجدد

با توجه به نتایج جدول ۴-۸ استفاده از گانودریک اسید با غلظت $32\mu\text{g/ml}$ توانست کل جمعیت هدف باکتری (*Esherichia coli* (ATCC25922) را نابود کرده و حتی پس از ۴۸ ساعت نیز هیچ کلونی مشاهده نشد و در غلظت $25\mu\text{g/ml}$ فقط دو کلونی مشاهده شد که می توان از آن غلظت تحت عنوان غلظت ممانعت کننده استفاده کرد.

باتوجه به نتایج به دست آمده از ۴ جدول ۴-۵، ۴-۶، ۴-۷ و ۴-۸ که گانودریک اسیدهای حاصل از هر دو گونه را به عنوان آنتی باکتریال استفاده کردیم که بر همین اساس می توان بیان کرد که MIC برای باکتری (*Esherichia coli* (ATCC25922) میزان $22/5\mu\text{g/ml}$ و MBC باکتری مذکور، میزان $26\mu\text{g/ml}$ بر اساس گانودریک اسید استخراجی از گانودرما لوسیدوم می باشد. با توجه به پژوهش های صورت گرفته قبلی مورد

اشاره در این پژوهش بر اساس تحقیق Sandrina A. Heleno و همکاران در سال ۲۰۱۳ با استفاده از عصاره متانولی حاصل از یک گونه قارچ گانودرما لوسیدوم جمع آوری شده از شمال پرتقال و با استفاده از روش میکرودايلوشن به غلظت MIC برابر 0.35 mg/ml و MBC 0.75 mg/ml برای باکتری *Escherichia coli* دست یافتند [۱۸۴] و این در حالیست که برای گانودریک اسید در این تحقیق (MIC=0.0225mg/ml) و (MBC=0.026 mg/ml) حاصل شده و این نتایج نشان می دهد استخراج گانودریک اسید از گانودرما لوسیدوم و استفاده از آن در هدف ضد باکتریایی از کارایی بسیار بالاتری برخوردار بوده و از طرفی با توجه به میانگین راندمان استخراج گانودریک اسید از گانودرما لوسیدوم مورد استفاده در این مطالعه که 2.702 mg/gr از هردو گونه بوده است که بیانگر مصرف میانگین 0.0083 gr قارچ گانودرما لوسیدوم برای هدف ممانعت کنندگی و 0.0097 gr قارچ گانودرما لوسیدوم برای هدف کشندگی می باشد و در مقایسه با پژوهش Sandrina A. Heleno و همکاران در سال ۲۰۱۳ که از 0.00035 gr قارچ گانودرما لوسیدوم برای هدف ممانعت کنندگی و 0.00075 gr قارچ گانودرما لوسیدوم برای هدف کشندگی استفاده شده و بیانگر دوز مصرفی قارچ گانودرما لوسیدوم با تفاوت بسیار پائین در این مطالعه و پژوهش مورد اشاره به منظور رسیدن به هدف ضد باکتریایی می باشد.

۳-۲-۴- تاثیر استفاده از گانودریک اسید در دوزهای مختلف بر علیه

باکتری (*Staphylococcus aureus* (ATCC25923) و میزان MIC و MBC

گانودریک اسید برای باکتری فوق

یکی از باکتری هایی را که به عنوان شاخص برای بررسی اثرات آنتی باکتریال گانودریک اسید استخراجی از قارچ گانودرما لوسیدوم برای این تحقیق انتخاب شد باکتری (*Staphylococcus aureus* (ATCC25923) می باشد، این سویه یک سویه بیمارستانی است و نتایج حاصل در جداول ۴-۹، ۴-۱۰، ۴-۱۱ و ۴-۱۲ آمده و به بررسی اثرات گانودریک اسید به دست آمده از هر دو گونه زرد و قرمز در غلظت های مختلف به منظور کشف حداقل غلظت ممانعت کنندگی از رشد و حداقل غلظت مورد نیاز برای حذف جمعیت هدف برابر روش استاندارد نیم مک فارلند پرداخته شده است.

جدول ۴-۹: اثرات آنتی باکتریال گانودریک اسید حاصله از میوه های زرد تلخ تر روی باکتری (*Staphylococcus aureus* (ATCC25923) بر اساس میزان گانودریک به ازای هر میلی لیتر بر حسب $\mu\text{g/ml}$ با روش میکرودايلوشن با سه غلظت ابتدایی $152 \mu\text{g/ml}$ ، $120 \mu\text{g/ml}$ و $92 \mu\text{g/ml}$ و ۵ رقت بعدی هریک از غلظت های اولیه بروش $0.5 \times$ مک فارلند روی باکتری هدف صورت پذیرفت.

نمونه باکتری	محیط کشت	آنتی بیوتیک و غلظت آن به $\mu\text{g/ml}$	غلظت های گانودریک اسید استفاده شده به $\mu\text{g/ml}$						باکتری
باجمعییت هدف	بدون	غلظت آن به $\mu\text{g/ml}$							
فاقد آنتی باکتریال	باکتری								
نمونه شاهد t1	شاهد محیط کشت	جنتامایسین 32	۴/۷	۹/۵	۱۹	۳۸	۷۶	۱۵۲	<i>Staphylococcus aureus</i>
قرمز	زرد شفاف	سفید و شفاف	قرمز	قرمز	قرمز	زرد	زرد	زرد	رنگ مشاهده شده
			صورتی	صورتی	صورتی	شفاف	شفاف	شفاف	
					مثبت	منفی	منفی	منفی	نتیجه کشت مجدد
نمونه شاهد t2	شاهد محیط کشت	جنتامایسین 32	۳/۷	۷/۵	۱۵	۳۰	۶۰	۱۲۰	<i>Staphylococcus aureus</i>
قرمز	زرد شفاف	سفید و شفاف	قرمز	قرمز	قرمز	زرد	زرد	زرد	رنگ مشاهده شده
			صورتی	صورتی		شفاف	شفاف	شفاف	
					مثبت	منفی	منفی	منفی	نتیجه کشت مجدد
نمونه شاهد t3	شاهد محیط کشت	جنتامایسین 32	۲/۸	۵/۷	۱۱/۵	۲۳	۴۶	۹۲	<i>Staphylococcus aureus</i>
قرمز	زرد شفاف	سفید و شفاف	قرمز	قرمز	قرمز	زرد	زرد	زرد	رنگ مشاهده شده
			صورتی	صورتی	صورتی	شفاف	شفاف	شفاف	
					مثبت	مثبت	منفی	منفی	نتیجه کشت مجدد

با توجه به نتایج جدول ۴-۹ استفاده از گانودریک اسید با غلظت $30 \mu\text{g/ml}$ توانست کل جمعیت هدف باکتری (*Staphylococcus aureus* (ATCC25923) را نابود کرده و حتی پس از ۴۸ ساعت نیز هیچ کلونی مشاهده نشد و در غلظت $23 \mu\text{g/ml}$ فقط یک کلونی مشاهده شد که می توان از آن غلظت تحت عنوان غلظت ممانعت کننده استفاده کرد.

جدول ۴-۱۰: اثرات آنتی باکتریال گانودریک اسید حاصله از میوه های زرد تلخ تر روی باکتری (*Staphylococcus aureus* (ATCC25923) بر اساس میزان گانودریک به ازای هر میلی لیتر بر حسب $\mu\text{g/ml}$ با روش میکرودايلوشن با سه غلظت ابتدایی $90 \mu\text{g/ml}$ ، $68 \mu\text{g/ml}$ و $52 \mu\text{g/ml}$ و ۵ و ۵۲ رقت بعدی هریک از غلظت های اولیه بروش ۰/۵ مک فارلند روی باکتری هدف صورت پذیرفت.

نمونه باکتری	محیط کشت	آنتی بیوتیک و غلظت آن به $\mu\text{g/ml}$	غلظت های گانودریک اسید استفاده شده به $\mu\text{g/ml}$	باکتری
باجمعیت هدف فاقد آنتی باکتریال	بدون باکتری			
نمونه شاهد t1	شاهد محیط کشت	جنتامایسین 32	۲/۸ ۵/۶ ۱۱/۲ ۲۲/۵ ۴۵ ۹۰	<i>Staphylococcus aureus</i>
قرمز	زرد شفاف	سفید و شفاف	قرمز صورتی	قرمز صورتی
نتیجه کشت مجدد			مثبت	منفی
نمونه شاهد t2	شاهد محیط کشت	جنتامایسین 32	۲/۱ ۴/۲ ۸/۵ ۱۷ ۳۴ ۶۸	<i>Staphylococcus aureus</i>
قرمز	زرد شفاف	سفید و شفاف	قرمز صورتی	قرمز صورتی
نتیجه کشت مجدد			مثبت	منفی
نمونه شاهد t3	شاهد محیط کشت	جنتامایسین 32	۱/۶ ۳/۲ ۶/۵ ۱۳ ۲۶ ۵۲	<i>Staphylococcus aureus</i>
قرمز	زرد شفاف	سفید و شفاف	قرمز صورتی	قرمز صورتی
نتیجه کشت مجدد			مثبت	منفی

با توجه به نتایج جدول ۴-۱۰ استفاده از گانودریک اسید با غلظت $26 \mu\text{g/ml}$ توانست کل جمعیت هدف باکتری (*Staphylococcus aureus* (ATCC25923) را نابود کرده و حتی پس از ۴۸ ساعت نیز هیچ کلونی مشاهده نشد و در غلظت $22/5 \mu\text{g/ml}$ فقط یک کلونی مشاهده شد که می توان از آن غلظت تحت عنوان غلظت ممانعت کننده استفاده کرد.

باتوجه به نتایج به دست آمده از دو جدول ۴-۹ و ۴-۱۰ می توان بیان کرد که MIC برای باکتری *Staphylococcus aureus* (ATCC25923) میزان $22/5 \mu\text{g/ml}$ و MBC میزان $26 \mu\text{g/ml}$ بر اساس

گانودریک استخراجی از گانودریک تلخ تر به دست آمده است. البته نتایج هر دو جدول کاملاً منطبق با هم به دست آمده است.

جدول ۴-۱۱: اثرات آنتی باکتریال گانودریک اسید حاصله از میوه های قرمز با تلخی کم تر روی باکتری *Staphylococcus aureus* (ATCC25923) بر اساس میزان گانودریک به ازای هر میلی لیتر بر حسب $\mu\text{g/ml}$ با روش میکرودايلوشن با سه غلظت ابتدایی $\mu\text{g/ml}$ ۱۱۶، ۹۲ و $\mu\text{g/ml}$ ۷۰ و ۵ رقت بعدی هریک از غلظت های اولیه بروش ۰/۵ مک فارلند روی باکتری هدف صورت پذیرفت.

نمونه باکتری باجمعیت هدف فاقد آنتی باکتریال	محیط کشت بدون باکتری	آنتی بیوتیک و غلظت آن به $\mu\text{g/ml}$	غلظت های گانودریک اسید استفاده شده به $\mu\text{g/ml}$						باکتری
نمونه شاهد t1	شاهد محیط کشت	جنتامایسین 32	۳/۶	۷/۲	۱۴/۵	۲۹	۵۸	۱۱۶	<i>Staphylococcus aureus</i>
قرمز	زرد شفاف	سفید و شفاف	قرمز صورتی	قرمز صورتی	قرمز صورتی	زرد شفاف	زرد شفاف	زرد شفاف	رنگ مشاهده شده نتیجه کشت مجدد
نمونه شاهد t2	شاهد محیط کشت	جنتامایسین 32	۲/۸	۵/۷	۱۱/۵	۲۳	۴۶	۹۲	<i>Staphylococcus aureus</i>
قرمز	زرد شفاف	سفید و شفاف	قرمز صورتی	قرمز صورتی	قرمز صورتی	زرد شفاف	زرد شفاف	زرد شفاف	رنگ مشاهده شده نتیجه کشت مجدد
نمونه شاهد t3	شاهد محیط کشت	جنتامایسین 32	۲/۱	۴/۳	۸/۷	۱۷/۵	۳۵	۷۰	<i>Staphylococcus aureus</i>
قرمز	زرد شفاف	سفید و شفاف	قرمز صورتی	قرمز صورتی	قرمز صورتی	قرمز صورتی	زرد شفاف	زرد شفاف	رنگ مشاهده شده نتیجه کشت مجدد

با توجه به نتایج جدول ۴-۱۱ استفاده از گانودریک اسید با غلظت $29\mu\text{g/ml}$ توانست کل جمعیت هدف باکتری *Staphylococcus aureus* (ATCC25923) را نابود کرده و حتی پس از ۴۸ ساعت نیز هیچ کلونی مشاهده نشد و در غلظت $23\mu\text{g/ml}$ فقط یک کلونی مشاهده شد که می توان از آن غلظت تحت عنوان غلظت ممانعت کننده استفاده کرد.

جدول ۴-۱۲: اثرات آنتی باکتریال گانودریک اسید حاصله از میوه های قرمز با تلخی کم تر روی باکتری *Staphylococcus aureus* (ATCC25923) بر اساس میزان گانودریک به ازای هر میلی لیتر برحسب $\mu\text{g/ml}$ با روش میکرودايلوشن با سه غلظت ابتدایی $\mu\text{g/ml}$ ۶۴، ۵۰، ۴۰ و ۵ رقت بعدی هریک از غلظت های اولیه بروش ۰/۵ مک فارلند روی باکتری هدف صورت پذیرفت.

نمونه باکتری	محیط	آنتی بیوتیک و	غلظت های گانودریک اسید استفاده شده به $\mu\text{g/ml}$						باکتری
باجمعیت هدف	کشت بدون	غلظت آن به $\mu\text{g/ml}$							
فاقد آنتی باکتریال	باکتری								
نمونه شاهد t1	شاهد محیط کشت	جنتامایسین 32	۲	۴	۸	۱۶	۳۲	۶۴	Staphylococcus aureus
قرمز	زرد شفاف	سفید و شفاف	قرمز	قرمز	قرمز	قرمز	زرد شفاف	زرد شفاف	رنگ مشاهده شده
نتیجه کشت مجدد							منفی	منفی	
نمونه شاهد t2	شاهد محیط کشت	جنتامایسین 32	۱/۵	۳/۱	۶/۲	۱۲/۵	۲۵	۵۰	Staphylococcus aureus
قرمز	زرد شفاف	سفید و شفاف	قرمز	قرمز	قرمز	قرمز	زرد شفاف	زرد شفاف	رنگ مشاهده شده
نتیجه کشت مجدد							مثبت	منفی	
نمونه شاهد t3	شاهد محیط کشت	جنتامایسین 32	۱/۲	۲/۵	۵	۱۰	۲۰	۴۰	Staphylococcus aureus
قرمز	زرد شفاف	سفید و شفاف	قرمز	قرمز	قرمز	قرمز	قرمز	زرد	رنگ مشاهده شده
نتیجه کشت مجدد			صورتی	صورتی	صورتی	صورتی	صورتی	صورتی	
							مثبت	منفی	

با توجه به نتایج جدول ۴-۱۲ استفاده از گانودریک اسید با غلظت $32\mu\text{g/ml}$ توانست کل جمعیت هدف باکتری *Staphylococcus aureus* (ATCC25923) را نابود کرده و حتی پس از ۴۸ ساعت نیز هیچ کلونی مشاهده نشد و در غلظت $25\mu\text{g/ml}$ فقط یک کلونی مشاهده شد که می توان از آن غلظت تحت عنوان غلظت ممانعت کننده استفاده کرد.

باتوجه به نتایج به دست آمده از دو جدول ۴-۱۱ و ۴-۱۲ می توان بیان کرد که MIC برای باکتری *Staphylococcus aureus* (ATCC25923) میزان $29\mu\text{g/ml}$ و MBC میزان $23\mu\text{g/ml}$ بر اساس گانودریک استخراجی از گانودرما با تلخی کم تر به دست آمده است. البته نتایج هر دو جدول کاملاً منطبق با

هم به دست آمده است.

باتوجه به نتایج به دست آمده از ۴ جدول ۹-۴، ۱۰-۴، ۱۱-۴ و ۱۲-۴ که گانودریک اسیدهای حاصل از هر دو گونه را به عنوان آنتی باکتریال استفاده کردیم که بر همین اساس می توان بیان کرد که MIC برای باکتری *Staphylococcus aureus* (ATCC25923) میزان $22/5 \mu\text{g/ml}$ یا $26 \mu\text{g/ml}$ و MBC باکتری مذکور، میزان $26 \mu\text{g/ml}$ بر اساس گانودریک اسید استخراجی از گانودرما لوسیدوم می باشد. با توجه به تحقیقات قبلی صورت گرفته از جمله تحقیق Sandrina A. Heleno و همکاران در سال ۲۰۱۳ با استفاده از عصاره متانولی حاصل از یک گونه قارچ گانودرما لوسیدوم جمع آوری شده از شمال پرتقال و با استفاده از روش میکرودايلوشن به غلظت MIC برابر 0.025 mg/ml و غلظت MBC برابر 0.035 mg/ml برای باکتری *Staphylococcus aureus* به دست آمد [۱۸۴]. در تحقیق Sandrina A. Heleno و همکاران نتیجه حاصله قابل مقایسه با آنتی بیو تیک بوده و در مقایسه با تحقیق اخیر که گانودریک اسید مصرفی ($\text{MIC}=0.0225 \text{ mg/ml}$) و ($\text{MBC}=0.026 \text{ mg/ml}$) حاصل شد، بیانگر کارایی بالاتر گانودریک اسید در کشندگی این باکتری نسبت به استفاده از عصاره آن بوده و در مقایسه با سایر تحقیقات مورد بررسی در این تحقیق نیز از جمله پژوهش انجام شده توسط Upadhyay, M. در سال ۲۰۱۴ با استفاده از گانودریک اسید حاصله از قارچ گانودرمالوسیدوم جمع آوری شده در هند و به روش میکرو دایلووشن روی باکتری *Staphylococcus aureus* که غلظت موثره بازدارندگی 0.25 mg/ml را نشان داد [۱۸۱] و یا در پژوهش Liu, D و همکاران در سال ۲۰۰۹ که حداقل غلظت ممانعت کنندگی ($\text{MIC}=2.05 \text{ mg/ml}$) برای باکتری *Staphylococcus aureus* با اسانس گانودرما لوسیدوم نشان داد [۱۹۴] که در مقایسه با تحقیقات مذکور نیز، استفاده از گانودریک اسید از نتیجه بهینه تری برخوردار شده است.

۴-۲-۴- تاثیر استفاده از گانودریک اسید در دوزهای مختلف بر علیه

باکتری (*Micrococcus luteus* ATCC9341) و میزان MIC و MBC گانودریک

اسید برای باکتری فوق

یکی از باکتری هایی را که به عنوان شاخص برای بررسی اثرات آنتی باکتریال گانودریک اسید استخراجی از قارچ گانودرما لوسیدوم روی آن انتخاب شد، باکتری (*Micrococcus luteus* ATCC9341) می باشد که نتایج حاصل از این تحقیق در جداول ۱۳-۴، ۱۴-۴، ۱۵-۴ و ۱۶-۴ آمده و به بررسی این اثرات گانودریک اسید به دست آمده از هر دو گونه زرد و قرمز در غلظت های مختلف به منظور کشف حداقل غلظت ممانعت

کنندگی از رشد و حداقل غلظت مورد نیاز برای حذف جمعیت هدف برابر روش استاندارد نیم مک فارلند پرداخته شده است.

جدول ۴-۱۳: اثرات آنتی باکتریال گانودریک اسید حاصله از میوه های زرد تلخ تر روی باکتری *Micrococcus luteus* (ATCC9341) بر اساس میزان گانودریک به ازای هر میلی لیتر برحسب $\mu\text{g/ml}$ با روش میکرودا یلوشن با سه غلظت ابتدایی $152 \mu\text{g/ml}$ ، $120 \mu\text{g/ml}$ و $92 \mu\text{g/ml}$ و ۵ و ۹۲ رقت بعدی هریک از غلظت های اولیه بروش ۰/۵ مک فارلند روی باکتری هدف صورت پذیرفت.

نمونه باکتری باجمعیت هدف فاقد آنتی باکتریال	محیط کشت بدون باکتری	آنتی بیوتیک و غلظت آن به $\mu\text{g/ml}$	غلظت های گانودریک اسید استفاده شده به $\mu\text{g/ml}$						باکتری
نمونه شاهد t1	شاهد محیط کشت	اریترومایسین 32	۴/۷	۹/۵	۱۹	۳۸	۷۶	۱۵۲	<i>Micrococcus luteus</i>
قرمز	زرد شفاف	سفید و شفاف	قرمز	قرمز	قرمز	زرد	زرد	زرد	رنگ مشاهده شده
						شفاف	شفاف	شفاف	نتیجه کشت مجدد
نمونه شاهد t2	شاهد محیط کشت	اریترومایسین 32	۳/۷	۷/۵	۱۵	۳۰	۶۰	۱۲۰	<i>Micrococcus luteus</i>
قرمز	زرد شفاف	سفید و شفاف	قرمز	قرمز	قرمز	قرمز	زرد	زرد	رنگ مشاهده شده
						شفاف	شفاف	شفاف	نتیجه کشت مجدد
نمونه شاهد t3	شاهد محیط کشت	اریترومایسین 32	۳/۸	۵/۷	۱۱/۵	۲۳	۴۶	۹۲	<i>Micrococcus luteus</i>
قرمز	زرد شفاف	سفید و شفاف	قرمز	قرمز	قرمز	قرمز	زرد	زرد	رنگ مشاهده شده
						شفاف	شفاف	شفاف	نتیجه کشت مجدد

با توجه به نتایج جدول ۴-۱۳ استفاده از گانودریک اسید با غلظت $46 \mu\text{g/ml}$ توانست کل جمعیت هدف باکتری *Micrococcus luteus* (ATCC9341) را نابود کرده و حتی پس از ۴۸ ساعت نیز هیچ کلونی مشاهده نشد و در غلظت $38 \mu\text{g/ml}$ فقط دو کلونی مشاهده شد که می توان از آن غلظت تحت عنوان غلظت ممانعت کننده استفاده کرد.

جدول ۴-۱۴: اثرات آنتی باکتریال گانودریک اسید حاصله از میوه های زرد تلخ تر روی باکتری *Micrococcus luteus* (ATCC9341) بر اساس میزان گانودریک به ازای هر میلی لیتر بر حسب $\mu\text{g/ml}$ با روش میکرودايلوشن با سه غلظت ابتدایی $90 \mu\text{g/ml}$ ، $68 \mu\text{g/ml}$ و $52 \mu\text{g/ml}$ و ۵ رقت بعدی هریک از غلظت های اولیه بروش $0/5$ مک فارلند روی باکتری هدف صورت پذیرفت.

نمونه باکتری	محیط	آنتی بیوتیک	غلظت های گانودریک اسید استفاده شده به $\mu\text{g/ml}$					باکتری	
باجمعیت هدف	کشت	و غلظت آن							
فاقد آنتی	بدون	به							
باکتریال	باکتری	$\mu\text{g/ml}$							
نمونه شاهد t1	شاهد محیط کشت	اریترومایسین 32	۲/۸	۵/۶	۱۱/۲	۲۲/۵	۴۵	۹۰	<i>Micrococcus luteus</i>
قرمز	زرد شفاف	سفید و شفاف	قرمز	قرمز	صورتی	زرد کدر	زرد شفاف	زرد شفاف	رنگ مشاهده شده
						مثبت	منفی	منفی	نتیجه کشت مجدد
نمونه شاهد t2	شاهد محیط کشت	اریترومایسین 32	۳/۸	۴/۷	۸/۵	۱۷	۳۴	۶۸	<i>Micrococcus luteus</i>
قرمز	زرد شفاف	سفید و شفاف	قرمز	قرمز	قرمز	صورتی	زرد شفاف	زرد شفاف	رنگ مشاهده شده
						مثبت	مثبت	منفی	نتیجه کشت مجدد
نمونه شاهد t3	شاهد محیط کشت	اریترومایسین 32	۱/۶	۳/۲	۶/۵	۱۳	۲۶	۵۲	<i>Micrococcus luteus</i>
قرمز	زرد شفاف	سفید و شفاف	قرمز صورتی	قرمز صورتی	قرمز صورتی	صورتی	زرد کدر	زرد شفاف	رنگ مشاهده شده
						مثبت	مثبت	منفی	نتیجه کشت مجدد

با توجه به نتایج جدول ۴-۱۴ استفاده از گانودریک اسید با غلظت $45 \mu\text{g/ml}$ توانست کل جمعیت هدف باکتری *Micrococcus luteus* (ATCC9341) را نابود کرده و حتی پس از ۴۸ ساعت نیز هیچ کلونی مشاهده نشد و در غلظت $34 \mu\text{g/ml}$ فقط چند کلونی مشاهده شد که می توان از آن غلظت تحت عنوان غلظت ممانعت کننده استفاده

کرد.

باتوجه به نتایج به دست آمده از دو جدول ۴-۱۳ و ۴-۱۴ می توان بیان کرد که MIC برای باکتری *Micrococcus luteus* (ATCC9341) میزان $34 \mu\text{g/ml}$ و MBC میزان $45 \mu\text{g/ml}$ بر اساس گانودریک استخراجی از گانودریک تلخ تر به دست آمده است. البته نتایج هر دو جدول کاملاً منطبق با هم به دست آمده است.

جدول ۴-۱۵: اثرات آنتی باکتریال گانودریک اسید حاصله از میوه های قرمز با تلخی کم تر روی باکتری *Micrococcus luteus* (ATCC9341) بر اساس میزان گانودریک به ازای هر میلی لیتر بر حسب $\mu\text{g/ml}$ با روش میکرودايلوشن با سه غلظت ابتدایی $116 \mu\text{g}$ ، $92 \mu\text{g/ml}$ و $70 \mu\text{g/ml}$ و ۵ رقت بعدی هریک از غلظت های اولیه بروش ۰/۵ مک فارلند روی باکتری هدف صورت پذیرفت.

نمونه باکتری	محیط	آنتی بیوتیک و غلظت آن به $\mu\text{g/ml}$	غلظت های گانودریک اسید استفاده شده به $\mu\text{g/ml}$						باکتری
ت1 نمونه شاهد	شاهد محیط کشت	اریترومایسین 32	۳/۶	۷/۲	۱۴/۵	۲۹	۵۸	۱۱۶	<i>Micrococcus luteus</i>
قرمز	زرد شفاف	سفید و شفاف	قرمز	قرمز	قرمز	قرمز	زرد شفاف	زرد شفاف	رنگ مشاهده شده
						مثبت	منفی	منفی	نتیجه کشت مجدد
ت2 نمونه شاهد	شاهد محیط کشت	اریترومایسین 32	۲/۸	۵/۷	۱۱/۵	۲۳	۴۶	۹۲	<i>Micrococcus luteus</i>
قرمز	زرد شفاف	سفید و شفاف	قرمز	قرمز	قرمز	قرمز	زرد شفاف	زرد شفاف	رنگ مشاهده شده
						مثبت	منفی	منفی	نتیجه کشت مجدد
ت3 نمونه شاهد	شاهد محیط کشت	اریترومایسین 32	۲/۱	۴/۳	۸/۷	۱۷/۵	۳۵	۷۰	<i>Micrococcus luteus</i>
قرمز	زرد شفاف	سفید و شفاف	قرمز	قرمز	قرمز	قرمز	زرد شفاف	زرد شفاف	رنگ مشاهده شده
						مثبت	مثبت	منفی	نتیجه کشت مجدد

با توجه به نتایج جدول ۴-۱۵ استفاده از گانودریک اسید با غلظت $46 \mu\text{g/ml}$ توانست کل جمعیت هدف باکتری (*Micrococcus luteus* (ATCC9341 را نابود کرده و حتی پس از ۴۸ ساعت نیز هیچ کلونی مشاهده نشد و در غلظت $35 \mu\text{g/ml}$ فقط چند کلونی مشاهده شد که می توان از آن غلظت تحت عنوان غلظت ممانعت کننده استفاده کرد.

جدول ۴-۱۶: اثرات آنتی باکتریال گانودریک اسید حاصله از میوه های قرمز با تلخی کم تر روی باکتری *Micrococcus luteus* (ATCC9341) بر اساس میزان گانودریک به ازای هر میلی لیتر بر حسب $\mu\text{g/ml}$ با روش میکرودايلوشن با سه غلظت ابتدایی $50 \mu\text{g/ml}$ ، $40 \mu\text{g/ml}$ و $5 \mu\text{g/ml}$ رقت بعدی هریک از غلظت های اولیه بر روش 0.5 مک فارلند روی باکتری هدف صورت پذیرفت.

نمونه باکتری	محیط کشت	آنتی بیوتیک و غلظت آن به $\mu\text{g/ml}$	غلظت های گانودریک اسید استفاده شده به $\mu\text{g/ml}$	باکتری
نمونه شاهد t1	شاهد محیط کشت	اریترومایسین 32	۲ ۴ ۸ ۱۶ ۳۲ ۶۴	<i>Micrococcus luteus</i>
قرمز	زرد شفاف	سفید و شفاف	قرمز قرمز قرمز قرمز قرمز	رنگ مشاهده شده شفاف
نتیجه کشت مجدد			مثبت مثبت مثبت	منفی
نمونه شاهد t2	شاهد محیط کشت	اریترومایسین 32	۱/۶ ۳/۲ ۶/۵ ۱۳ ۲۶ ۵۰	<i>Micrococcus luteus</i>
قرمز	زرد شفاف	سفید و شفاف	قرمز قرمز قرمز قرمز قرمز	رنگ مشاهده شده شفاف
نتیجه کشت مجدد			مثبت مثبت مثبت	منفی
نمونه شاهد t3	شاهد محیط کشت	اریترومایسین 32	۱/۶ ۲/۵ ۵ ۱۰ ۲۰ ۴۰	<i>Micrococcus luteus</i>
قرمز	زرد شفاف	سفید و شفاف	قرمز قرمز قرمز قرمز قرمز	رنگ مشاهده شده شفاف
نتیجه کشت مجدد			مثبت مثبت مثبت	مثبت

با توجه به نتایج جدول ۴-۱۶ استفاده از گانودریک اسید با غلظت $50 \mu\text{g/ml}$ توانست کل جمعیت هدف باکتری (*Micrococcus luteus* (ATCC9341 را نابود کرده و حتی پس از ۴۸ ساعت نیز هیچ کلونی مشاهده نشد و در غلظت $40 \mu\text{g/ml}$ فقط یک کلونی مشاهده شد که می توان از آن غلظت تحت عنوان غلظت ممانعت کننده استفاده کرد.

باتوجه به نتایج به دست آمده از ۴ جدول ۴-۱۳، ۴-۱۴، ۴-۱۵ و ۴-۱۶ گانودریک اسیدهای حاصل از هر دو گونه را به عنوان آنتی باکتریال استفاده کردیم که بر همین اساس می توان بیان کرد که MIC برای

باکتری *Micrococcus luteus* (ATCC9341) میزان $34\mu\text{g/ml}$ و MBC باکتری مذکور، میزان $45\mu\text{g/ml}$ بر اساس گانودریک اسید استخراجی از گانودرما لوسیدوم می باشد. باتوجه به پژوهش های مقایسه شده در این تحقیق روی باکتری *Micrococcus luteus* (ATCC9341) کمترین میزان مربوط به پژوهش Skalicka-Wozniak, K. و همکاران در سال ۲۰۱۲ با پلی ساکاریدهای استخراجی که به حداقل غلظت ممانعت کنندگی (MIC=0.5mg/ml) و حداقل غلظت کشندگی (MBC=2.5mg/ml) برای این باکتری رسیدند و این در حالیکه برای گانودریک اسید در این تحقیق (MIC=0.034mg/ml) و (MBC=0.045mg/ml) که نشان می دهد استخراج گانودریک اسید از گانودرما لوسیدوم و استفاده از آن در هدف ضد باکتریایی از کارایی بسیار بالاتری برخوردار بوده و از طرفی با توجه به میانگین راندمان استخراج گانودریک اسید از گانودرما لوسیدوم مورد استفاده در این مطالعه که 2.702 mg/gr از هر دو گونه بوده است که بیانگر مصرف میانگین 0.0126 gr قارچ گانودرما لوسیدوم برای هدف ممانعت کنندگی و 0.0167 gr قارچ گانودرما لوسیدوم برای هدف کشندگی می باشد و در مقایسه با پژوهش Skalicka-Wozniak, K. و همکاران در سال ۲۰۱۲ که میانگین پلی ساکارید استخراجی 47.23 mg/gr که از 0.010 gr قارچ گانودرما لوسیدوم برای هدف ممانعت کنندگی و 0.053 gr قارچ گانودرما لوسیدوم برای هدف کشندگی استفاده شده و بیانگر دوز مصرفی کمتر قارچ گانودرما لوسیدوم در این مطالعه به منظور رسیدن به هدف ضد باکتریایی می باشد.

۵-۲-۴- تاثیر استفاده از گانودریک اسید در دوزهای مختلف بر علیه

باکتری *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC27853) و میزان MIC و MBC

گانودریک اسید برای باکتری فوق

در این تحقیق ما از باکتری *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC27853) که یک سویه بیمارستانی است، استفاده کردیم و نتایج آن در جداول ۴-۱۷، ۴-۱۸، ۴-۱۹ و ۴-۲۰ آمده است.

جدول ۴-۱۷: اثرات آنتی باکتریال گانودریک اسید حاصله از میوه های زرد تلخ تر روی باکتری *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC27853) بر اساس میزان گانودریک به ازای هر میلی لیتر برحسب $\mu\text{g/ml}$ با روش میکرودايلوشن با سه غلظت ابتدایی $\mu\text{g/ml}$ ۱۵۲، ۱۲۰ و $\mu\text{g/ml}$ ۹۲ و ۵ رقت بعدی هریک از غلظت های اولیه بروش ۰/۵ مک فارلند روی باکتری هدف صورت پذیرفت.

نمونه باکتری	محیط	آنتی بیوتیک و غلظت آن به $\mu\text{g/ml}$	غلظت های گانودریک اسید استفاده شده به $\mu\text{g/ml}$						باکتری
باجمعیت هدف فاقد آنتی باکتریال	کشت بدون باکتری								
نمونه شاهد t1	شاهد محیط کشت	جنتامایسین 32	۴/۷	۹/۵	۱۹	۳۸	۷۶	۱۵۲	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
قرمز	زرد شفاف	سفید و شفاف	قرمز صورتی	قرمز صورتی	قرمز صورتی	زرد	زرد شفاف	زرد شفاف	رنگ مشاهده شده
			مثبت	مثبت	مثبت	مثبت	منفی	منفی	نتیجه کشت مجدد
نمونه شاهد t2	شاهد محیط کشت	جنتامایسین 32	۳/۷۵	۷/۵	۱۵	۳۰	۶۰	۱۲۰	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
قرمز	زرد شفاف	سفید و شفاف	قرمز صورتی	قرمز صورتی	قرمز صورتی	قرمز	زرد شفاف	زرد شفاف	رنگ مشاهده شده
			مثبت	مثبت	مثبت	مثبت	منفی	منفی	نتیجه کشت مجدد
نمونه شاهد t3	شاهد محیط کشت	جنتامایسین 32	۳/۸	۵/۷	۱۱/۵	۲۳	۴۶	۹۲	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
قرمز	زرد شفاف	سفید و شفاف	قرمز صورتی	قرمز صورتی	قرمز صورتی	قرمز	زرد شفاف	زرد شفاف	رنگ مشاهده شده
			مثبت	مثبت	مثبت	مثبت	منفی	منفی	نتیجه کشت مجدد

با توجه به نتایج جدول ۴-۱۷ استفاده از گانودریک اسید با غلظت $46 \mu\text{g/ml}$ توانست کل جمعیت هدف باکتری (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853) را نابود کرده و حتی پس از ۴۸ ساعت نیز هیچ کلونی مشاهده نشد و در غلظت $38 \mu\text{g/ml}$ فقط چند کلونی محدود مشاهده شد که می توان از آن غلظت تحت عنوان غلظت ممانعت کننده استفاده کرد.

جدول ۴-۱۸: اثرات آنتی باکتریال گانودریک اسید حاصله از میوه های زرد تلخ تر روی باکتری *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC27853) بر اساس میزان گانودریک به ازای هر میلی لیتر برحسب $\mu\text{g/ml}$ با روش میکرودیالوژن با سه غلظت ابتدایی $\mu\text{g/ml}$ ۹۰، ۶۸ و $\mu\text{g/ml}$ ۵۲ و ۵ رقت بعدی هریک از غلظت های اولیه بروش ۰/۵ مک فارلند روی باکتری هدف صورت پذیرفت.

نمونه باکتری	محیط	آنتی بیوتیک و	غلظت های گانودریک اسید استفاده شده به $\mu\text{g/ml}$						باکتری
باجمعیت هدف	کشت بدون	غلظت آن به							
فاقد آنتی	باکتری	$\mu\text{g/ml}$							
باکتریال									
نمونه شاهد t1	شاهد	جنتامایسین	۲/۸	۵/۷	۱۱/۲	۲۲/۵	۴۵	۹۰	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	محیط	32							
	کشت								
قرمز	زرد شفاف	سفید و شفاف	قرمز	صورتی	صورتی	صورتی	زرد	زرد	رنگ مشاهده شده
			صورتی	کم رنگ	کم رنگ	کم رنگ	شفاف	شفاف	
				مثبت	مثبت	مثبت	منفی	منفی	نتیجه کشت مجدد
نمونه شاهد t2	شاهد	جنتامایسین	۳/۸	۴/۷	۸/۵	۱۷	۳۴	۶۸	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	محیط	32							
	کشت								
قرمز	زرد شفاف	سفید و شفاف	صورتی	صورتی	صورتی	صورتی	زرد	زرد	رنگ مشاهده شده
			کم رنگ	کم رنگ	کم رنگ	کم رنگ	کدر	شفاف	
				مثبت	مثبت	مثبت	منفی	منفی	نتیجه کشت مجدد
نمونه شاهد t3	شاهد	جنتامایسین	۱/۶	۳/۲	۶/۵	۱۳	۲۶	۵۲	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	محیط	32							
	کشت								
قرمز	زرد شفاف	سفید و شفاف	صورتی	صورتی	صورتی	صورتی	زرد	زرد	رنگ مشاهده شده
			کم رنگ	کم رنگ	کم رنگ	کم رنگ	کدر	شفاف	
				مثبت	مثبت	مثبت	منفی	منفی	نتیجه کشت مجدد

با توجه به نتایج جدول ۴-۱۸ استفاده از گانودریک اسید با غلظت $45\mu\text{g/ml}$ توانست کل جمعیت هدف باکتری (*Pseudomonas aeruginosa*(ATCC27853) را نابود کرده و حتی پس از ۴۸ ساعت نیز هیچ کلونی مشاهده نشد و در غلظت $34\mu\text{g/ml}$ فقط چند کلونی محدود مشاهده شد که می توان از آن غلظت تحت عنوان غلظت ممانعت کننده استفاده کرد.

باتوجه به نتایج به دست آمده از دو جدول ۴-۱۷ و ۴-۱۸ می توان بیان کرد که MIC برای باکتری *Pseudomonas aeruginosa*(ATCC27853) میزان $34\mu\text{g/ml}$ و MBC میزان $45\mu\text{g/ml}$ بر اساس گانودریک استخراجی از گانودریک تلخ تر به دست آمده است. البته نتایج هر دو جدول کاملاً منطبق با هم به

دست آمده است.

جدول ۴-۱۹: اثرات آنتی باکتریال گانودریک اسید حاصله از میوه های قرمز با تلخی کم تر روی باکتری *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC27853) بر اساس میزان گانودریک به ازای هر میلی لیتر برحسب $\mu\text{g/ml}$ با روش میکرودايلوشن با سه غلظت ابتدایی $112 \mu\text{g/ml}$ ، $92 \mu\text{g/ml}$ و $50 \mu\text{g/ml}$ و ۵ رقت بعدی هریک از غلظت های اولیه بروش ۰/۵ مک فارلند روی باکتری هدف صورت پذیرفت.

نمونه باکتری	محیط	آنتی بیوتیک و غلظت آن به $\mu\text{g/ml}$	غلظت های گانودریک اسید استفاده شده به $\mu\text{g/ml}$						باکتری
باجمعیت هدف	کشت بدون باکتری								
فاقد آنتی باکتریال									
نمونه شاهد t1	شاهد محیط کشت	جنتامایسین 32	۳/۶	۷/۲	۱۴/۵	۲۹	۵۸	۱۱۶	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
قرمز	زرد شفاف	سفید و شفاف	قرمز صورتی	قرمز صورتی	قرمز صورتی	قرمز صورتی	زرد شفاف	زرد شفاف	رنگ مشاهده شده
نتیجه کشت مجدد			مثبت	منفی	منفی	منفی			
نمونه شاهد t2	شاهد محیط کشت	جنتامایسین 32	۲/۸	۵/۷	۱۱/۵	۲۳	۴۶	۹۲	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
قرمز	زرد شفاف	سفید و شفاف	قرمز صورتی	قرمز صورتی	قرمز صورتی	قرمز صورتی	زرد شفاف	زرد شفاف	رنگ مشاهده شده
نتیجه کشت مجدد			مثبت	منفی	منفی	مثبت			
نمونه شاهد t3	شاهد محیط کشت	جنتامایسین 32	۲/۱	۴/۳	۸/۷	۱۷/۵	۳۵	۷۰	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
قرمز	زرد شفاف	سفید و شفاف	قرمز صورتی	قرمز صورتی	قرمز صورتی	قرمز صورتی	زرد شفاف	زرد شفاف	رنگ مشاهده شده
نتیجه کشت مجدد			مثبت	مثبت	کدر	منفی			

با توجه به نتایج جدول ۴-۱۹ استفاده از گانودریک اسید با غلظت $46 \mu\text{g/ml}$ توانست کل جمعیت هدف باکتری *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC27853) را نابود کرده و حتی پس از ۴۸ ساعت نیز هیچ کلونی مشاهده نشد و در غلظت $35 \mu\text{g/ml}$ فقط چند کلونی محدود مشاهده شد که می توان از آن غلظت تحت عنوان غلظت ممانعت کننده استفاده کرد.

جدول ۴-۲۰: اثرات آنتی باکتریال گانودریک اسید حاصله از میوه های قرمز با تلخی کم تر روی باکتری *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC27853) بر اساس میزان گانودریک به ازای هر میلی لیتر برحسب $\mu\text{g/ml}$ با روش میکروداپلوشن با سه غلظت ابتدایی $64 \mu\text{g/ml}$ ، $50 \mu\text{g/ml}$ و $40 \mu\text{g/ml}$ و ۵ رقت بعدی هریک از غلظت های اولیه بروش ۰/۵ مک فارلند روی باکتری هدف صورت پذیرفت.

نمونه باکتری	محیط	آنتی بیوتیک و غلظت آن به $\mu\text{g/ml}$	غلظت های گانودریک اسید استفاده شده به $\mu\text{g/ml}$	باکتری
باجمعیت هدف فاقد آنتی باکتریال	کشت بدون باکتری			
نمونه شاهد t1	شاهد محیط کشت	جنتامایسین 32	۲ ۴ ۸ ۱۶ ۳۲ ۶۴	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
قرمز	زرد شفاف	سفید و شفاف	قرمز صورتی	قرمز صورتی
رنگ مشاهده شده			قرمز صورتی	زرد شفاف
نتیجه کشت مجدد			مثبت	منفی
نمونه شاهد t2	شاهد محیط کشت	جنتامایسین 32	۱/۶ ۳/۲ ۶/۵ ۱۳ ۲۶ ۵۰	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
قرمز	زرد شفاف	سفید و شفاف	قرمز صورتی	قرمز صورتی
رنگ مشاهده شده			قرمز صورتی	زرد شفاف
نتیجه کشت مجدد			مثبت	منفی
نمونه شاهد t3	شاهد محیط کشت	جنتامایسین 32	۱/۲ ۲/۵ ۵ ۱۰ ۲۰ ۴۰	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
قرمز	زرد شفاف	سفید و شفاف	قرمز صورتی	قرمز صورتی
رنگ مشاهده شده			قرمز صورتی	زرد شفاف
نتیجه کشت مجدد			مثبت	مثبت

با توجه به نتایج جدول ۴-۲۰ فقط استفاده از گانودریک اسید با غلظت $50 \mu\text{g/ml}$ توانست کل جمعیت هدف باکتری *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC27853) را نابود کرده و حتی پس از ۴۸ ساعت نیز هیچ کلونی مشاهده نشد و در غلظت $40 \mu\text{g/ml}$ فقط دو کلونی مشاهده شد که می توان از آن غلظت تحت عنوان غلظت ممانعت کننده استفاده کرد.

باتوجه به نتایج به دست آمده از دو جدول ۴-۱۹ و ۴-۲۰ می توان بیان کرد که MIC برای باکتری *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC27853) میزان $34 \mu\text{g/ml}$ و MBC $45 \mu\text{g/ml}$ بر اساس گانودریک استخراجی از گانودرمای قرمز با تلخی کم تر به دست آمده است. البته نتایج هر دو جدول کاملا منطبق با هم به دست آمده است.

باتوجه به نتایج به دست آمده از ۴ جدول ۴-۱۷، ۴-۱۸، ۴-۱۹ و ۴-۲۰ که در آن از گانودریک اسیدهای حاصل از هر دو گونه به عنوان آنتی باکتریال استفاده شده است و بر همین اساس می توان بیان کرد که MIC برای باکتری *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC27853) میزان 0.034mg/ml (MIC) و 0.045mg/ml (MBC) می باشد. با توجه به تحقیقات قبلی از جمله تحقیق توسط Upadhyay, M. در سال ۲۰۱۴ با استفاده از گانودریک اسید حاصله از قارچ گانودرمالوسیدوم جمع آوری شده در هند و به روش میکرو دایلوژن روی باکتری *Pseudomonas aeruginosa* غلظت موثره بازدارندگی 1mg/ml را نشان داده است [۱۸۱] و در بهینه ترین پژوهش مورد بررسی قرار گرفته توسط Sandrina A. Heleno و همکاران در سال ۲۰۱۳ با استفاده از عصاره متانولی حاصل از یک گونه قارچ گانودرما لوسیدوم جمع آوری شده از شمال پرتقال و با استفاده از روش میکرو دایلوژن به غلظت MIC برابر 0.35mg/ml و 0.75mg/ml MBC برای باکتری *Pseudomonas aeruginosa* به دست آمده است [۱۸۴] و همگی بیانگر این موضوع است که استفاده از گانودریک اسید برای هدف کشندگی دارای قابلیت بیشتری بوده و در از بین بردن باکتری هدف گانودریک اسید بدست آمده از قارچ گانودرما لوسیدوم می تواند موفق تر از عصاره قارچ گانودرما لوسیدوم عمل کند.

۳-۴- نتایج کلی MIC/MBC میکرودايلوشن هر دو گونه تلخ و

شيرين

جدول ۴-۲۱: اثرات آنتی باکتریال گانودریک اسید حاصله از هردو گونه میوه های قرمز شیرین تر و زرد تلخ تر

بر اساس میزان گانودریک به ازای هر میلی لیتر بر حسب $\mu\text{g/ml}$ با روش میکرودايلوشن

Bacteria	MIC/MBC ($\mu\text{g/ml}$)	
	زرد	قرمز
<i>Bacillus subtilis</i>	34/45	35/46
<i>Escherichia coli</i>	22.5/26	23/29
<i>Staphylococcus aureus</i>	22.5/26	23/29
<i>Micrococcus luteus</i>	34/45	35/46
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	34/45	34/46

۵-۴- نتیجه گیری کلی و پیشنهادات

با توجه به تحقیقات قبلی که صورت گرفته و در این پژوهش فقط به تعداد محدودی پرداخته شد و غالب این پژوهش ها بر اساس عصاره استخراجی بوسیله اتانول، متانول، کلروفرم، آب و... که از بخش های مختلف و نژادهای متفاوت قارچ گانودرما صورت گرفته و محققین عملکردهای متفاوتی را مشاهده کردند که در اکثر موارد می توان گفت استفاده از گانودریک اسید در مقایسه با عصاره ها از موفقیت بالاتری در از بین بردن باکتری های مورد اشاره در این تحقیق بوده است و می توان گفت:

- ۱- در صورتیکه بتوان از سمیت قارچ گانودرما لوسیدوم با استفاده از تحقیقات بالینی اطمینان پیدا کرد، البته تحقیقات بالینی میزان سمیت روی خود قارچ گانودرما انجام شده و تا محدوده یک گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن موش هیچ گونه سمیتی مشاهده نشده ولی می بایست تحقیقات بالینی بیشتری در این خصوص صورت بگیرد.

۲- با توجه به نتایج این تحقیق که بالاترین غلظت کشندگی گانودریک اسید ($MBC=0.046mg/ml$)

حاصل شد و این غلظت برای هر ۵ باکتری: *Pseudomonas aeruginosa*(ATCC27853), *Staphylococcus aureus* (ATCC25923), *Bacillus subtilis* (PTCC1715), *Micrococcus luteus* (ATCC9341) موثر بوده و توانایی از بین بردن همه جمعیت هدف آن ها را برابر روش نیم مک فارلند داشته که نشان می دهد استخراج گانودریک اسید از گانودرما لوسیدوم و استفاده از آن در هدف ضد باکتریایی از کارایی خوبی برخوردار بوده و از طرفی با توجه به راندمان استخراج گانودریک اسید از گانودرما لوسیدوم مورد استفاده در این مطالعه که در کمترین حالت میزان 2.164 mg/gr بوده که بیانگر دوز مصرفی قارچ در بالاترین حالت میزان 0.0215 gr قارچ گانودرما لوسیدوم می باشد.

۳- با توجه به دوز حاصله در این تحقیق، می توان به فکر جایگزینی آن با آنتی بیوتیک ها بود، این موضوع می تواند آغاز راه تحقیقات جدیدی برای رقابت با آنتی بیوتیک ها و غلبه بر مشکلات مصرف آنتی بیوتیک ها باشد.

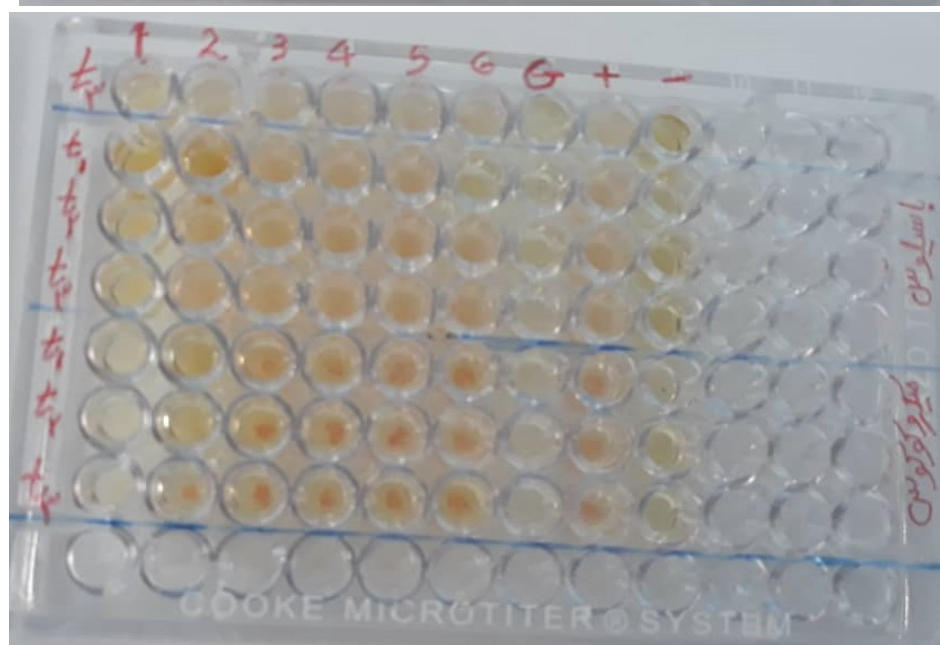
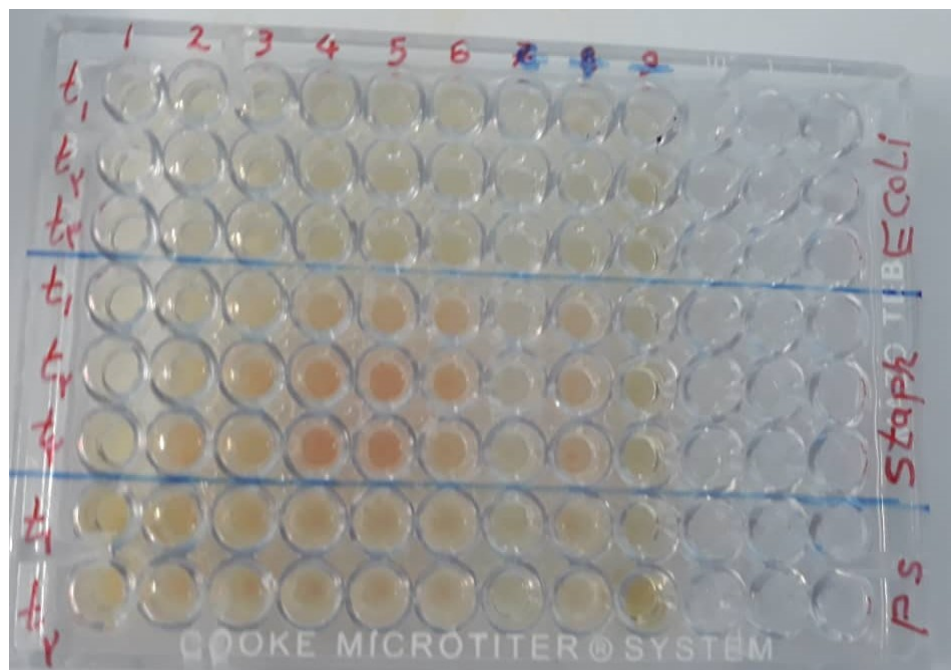
۴- با توجه به نتایج این تحقیق، یکی از عوامل تاثیر گذار در خاصیت آنتی باکتریالی قارچ گانودرما لوسیدوم میزان گانودریک اسید آن می باشد و با توجه به این موضوع هر چقدر که میزان گانودریک بیشتر باشد به همین ترتیب خاصیت آنتی باکتریالی بیشتری وجود خواهد داشت.

با توجه به نتایج حاصل از این تحقیق موارد زیر برای تحقیقات بعدی پیشنهاد می شود.

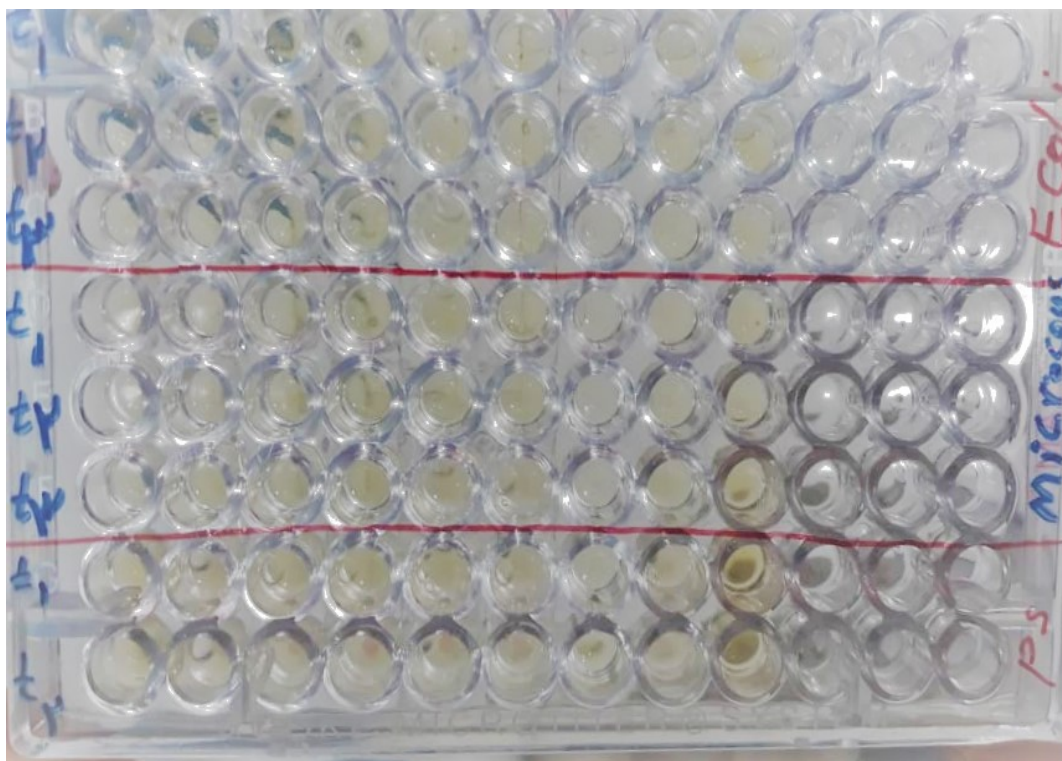
۱-انجام تحقیقات بالینی جهت کشف میزان سمیت عصاره گانودریک اسید برای تجویز مصارف انسانی به عنوان یک آنتی باکتریال موثر.

۲-انجام مطالعات دیگری به منظور کشف اثرات ترکیب گانودریک اسید و برخی از ترکیبات دیگر که تاکنون روی آن تحقیق صورت گرفته است.

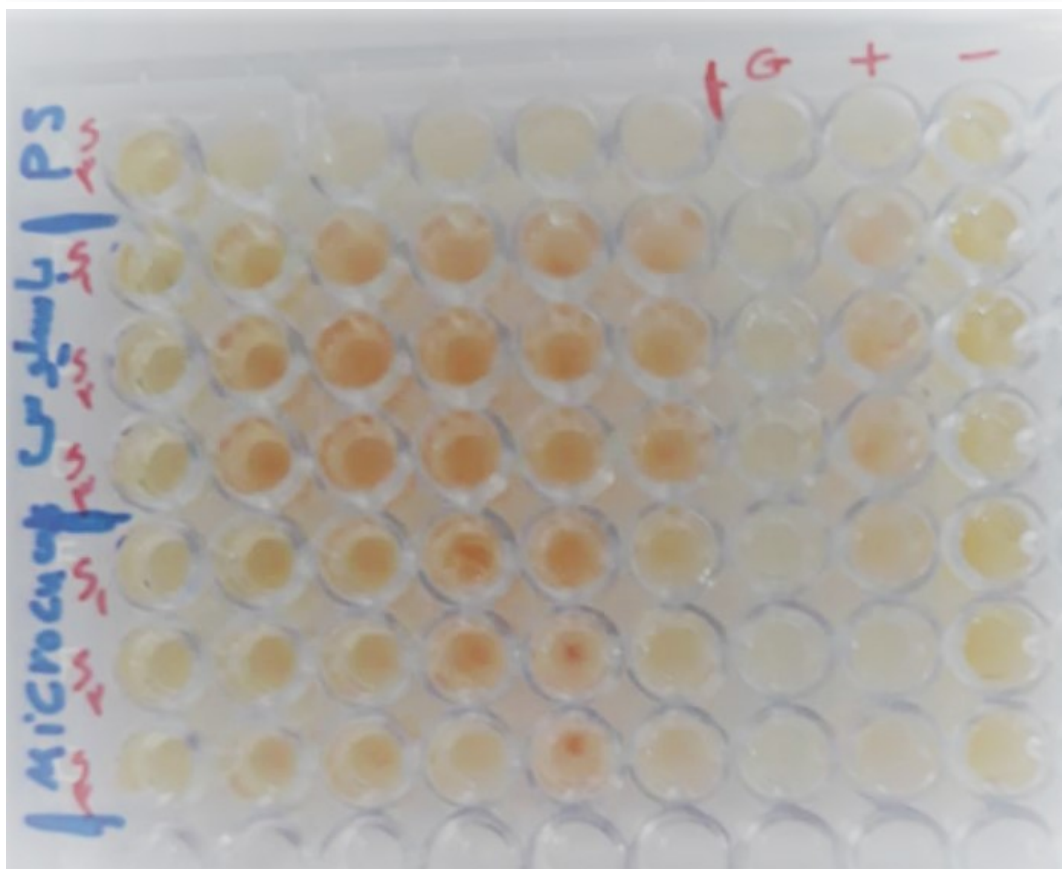
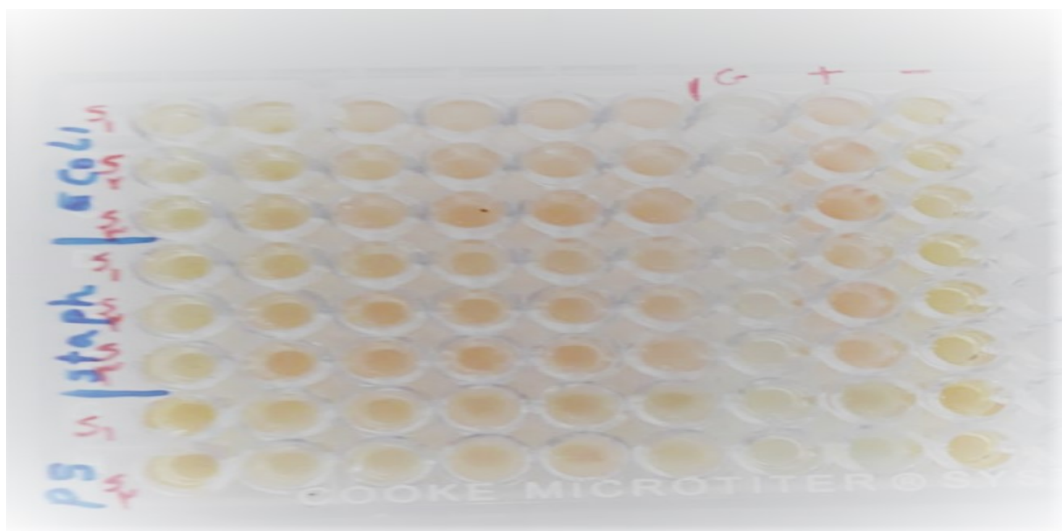
پوست



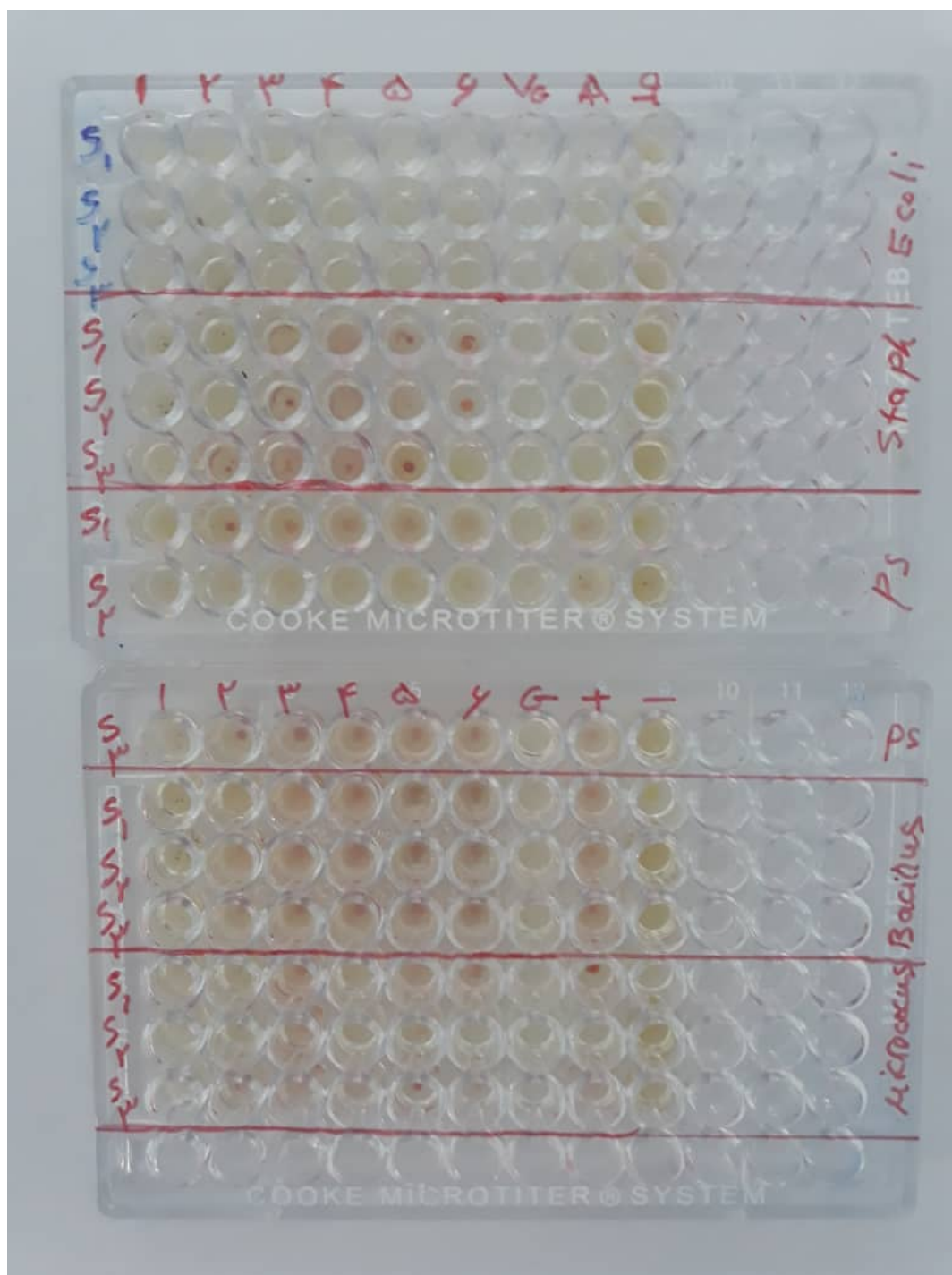
شکل ۵-۱: تصویر کشت انجام شده و رنگ های مشاهده شده با استفاده از گانودرمای تلخ تر با سه غلظت ابتدایی $t_1 = 90 \mu\text{g/ml}$ و $t_2 = 64 \mu\text{g/ml}$ و $t_3 = 52 \mu\text{g/ml}$ و ۵ رقت بعدی هریک از غلظت های اولیه بروی باکتری های هدف شامل: *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC27853), *Escherichia coli* (ATCC25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC25923), *Bacillus subtilis* (PTCC1715), *Micrococcus luteus* (ATCC9341)



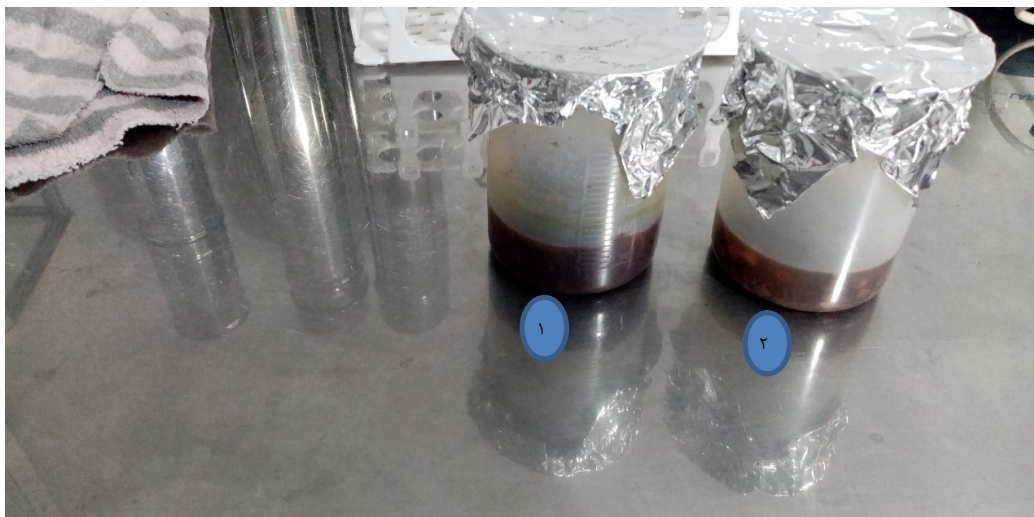
شکل ۵-۲: تصویر کشت انجام شده و رنگ های مشاهده شده با استفاده از گانودرمای تلخ تر با سه غلظت ابتدایی $t_1 = 152 \mu\text{g} / \text{ml}$ و $t_2 = 120 \mu\text{g} / \text{ml}$ و $t_3 = 92 \mu\text{g} / \text{ml}$ و ۵ رقت بعدی هریک از غلظت های اولیه بروی باکتری های هدف شامل: *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC27853), *Escherichia coli* (ATCC25922) , *Staphylococcus aureus* (ATCC25923), *Bacillus subtilis* (PTCC1715) , *Micrococcus luteus* (ATCC9341)



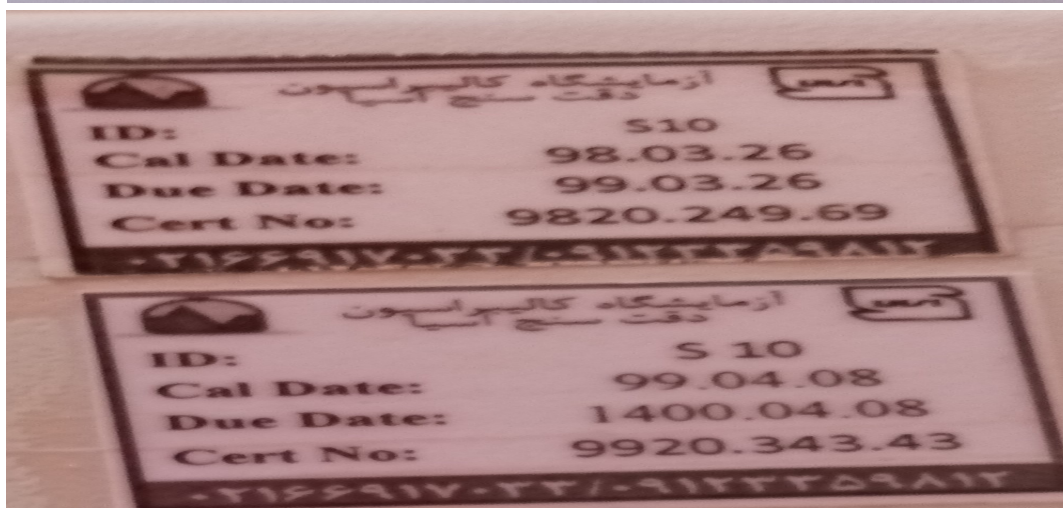
شکل ۵-۳: تصویر کشت انجام شده و رنگ های مشاهده شده با استفاده از گانودرمای با تلخی کمتر با سه غلظت ابتدایی $s1 = 64 \mu g / ml$ و $s2 = 50 \mu g / ml$ و $s3 = 40 \mu g / ml$ و ۵ رقت بعدی هریک از غلظت های اولیه بروی باکتری های هدف شامل: *Esherichia coli* (ATCC25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC27853), *Staphylococcus aureus* (ATCC25923), *Bacillus subtilis* (PTCC1715), *Micrococcus luteus* (ATCC9341)



شکل ۴-۵: تصویر کشت انجام شده و رنگ های مشاهده شده با استفاده از گانودرمای با تلخی کمتر با سه غلظت ابتدایی $s1 = 116 \mu\text{g/ml}$ و $s2 = 92 \mu\text{g/ml}$ و $s3 = 70 \mu\text{g/ml}$ و ۵ رقت بعدی هریک از غلظت های اولیه بروی باکتری های هدف شامل: *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC27853), *Escherichia coli* (ATCC25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC25923), *Bacillus subtilis* (PTCC1715), *Micrococcus luteus* (ATCC9341)



شکل ۵-۵: تصویر عصاره های حاصله در اولین مرحله که رنگ عصاره گانودرما ی تلخ (۱) تر در عصاره اولیه نیز زرد تر و پر رنگ تر از عصاره گانودرما با تلخی کمتر (۲) می باشد.



شکل ۵-۶: تصویر ترازو و گواهی کالیبراسیون مورد استفاده در آزمایشات این مطالعه

مراجع

- ۱- عظیمی، مسعود و عزیزی، مجید و زندوی فرد، ژاله، ۱۳۹۲، مروری بر خواص دارویی و تولید قارچ دارویی گانودرما (*Ganoderma lucidum*)، اولین همایش سراسری کشاورزی و منابع طبیعی پایدار، تهران، <https://civilica.com/doc/258100>
- ۲- کی پور، ریاحی & رفعتی. (۲۰۱۳). مروری بر ترکیبات فعال بیولوژیکی و خواص درمانی گانودرما *Ganoderma lucidum*. فصلنامه علمی پژوهشی گیاهان دارویی. 24-13, 2(46),
- 3-Wang YY, Khoo KH, Chen ST, Lin CC, Wong CH and Lin CH. Studies on the immunomodulating and antitumor activities of *Ganoderma lucidum* (Reishi) polysaccharides: functional and proteomic analyses of a fucose containing glycoprotein fraction responsible for the activities. *Bioorg. Med. Chem.* 2002; 10: 1057 - 62.
- 4-Adjumo, T. O. and Awonsnya, B. O. (2005) proximate and mineral composition of edible mushroom species from southwestern Nigeria. *Afri. J. Biotech.* 4(10):1084-1087.
- 5-Anon. (2006). Resins. Online at: <http://www.resins-> Oei, p., 2003. Mushroom cultivation, in: *Appropriate wikipedia, the free encyclopedia*, 01: 18.
- 6-Anon. (2007). Mushroom may be active against fowl parasite. *This day*, Vol. 11, Number 4280, january9:36.
- 7-Hobbs, C. (1995). *Medicinal Mushrooms: An Expioration of Tratition, Healing, and Culture*, 2nd Ed.; Botanica press, Inc.: Santa cruz, CA, USA
- 8-Monro, J.A.(2003). Treatment of cancer with mushroom products. *Archives Environmental Health*, 58:533-537
- 9-Wachtel-Galor, S., Tomlinson, B. and Benzie, I.F. (2004). *Ganoderma lucidum* (Lnighzhi), a Chinese medicinal mushroom: biomarker responses in a controlled human supplementation study. *Br. J. Nutr.*, 91: 263-269
- 10-Sliva, D., Rizzo, M. T. and English, D. (2002). Phosphatidylinositol 3-kinase and NF-k regulate motility of invasive MDA-MB-231 human breast cancer cells by secretion of urokinase-type plasminogen activator. *J. Biol. Chem.* 277(5): 3150-3157.
- 11- Mizuno, T., Wang, G. (1995a). Health foods and medicinal usages of mushroom. *Food Rev. Int.* 11, 69-81
- 12-Chang, S. T. and Buswell, J. A. (1999). *Ganoderma lucidum* (Curt.:Fr.) P. Karst. (aphyllophoromycetidae) –a mushrooming medicinal mushroom. *Int. J. Med. Mush.* 1, 139-146
- 13-Jong, S.C., Birmingham, J.M. and pai, S.H. (1991). Immunomodulatory substances of fungal origin. *J. Immunol. Immunopharmacol* 11, 115-122.
- 14-Yun, t. k. (1999). Update from Asia: Asian studies on cancer chemoprevention. *Ann N. Y. Acad Sci.* 889:157-192
- 15-Gao, Y., Zhou., Chen, G., Dal, X. and Ye, J. (2002) A phase 1/11 study of a *Ganoderma lucidum* (curt.: Fr.) P.Karst. Extract (ganopoly) in patients with advanced cancer. *Int. J. Med.*

Mushrooms, 4(3), 207-214

16-. Lindequist U, Niedermeyer TMJ and Jülich WD. The Pharmacological Potential of Mushrooms. Evidence-based compl. And Alt. Medicine. 2005; 2: 285 - 99.

17-Mayzumi F, Okamoto H & Mizuno T. Cultivation of Reishi (*Ganoderma lucidum*). Food Rev. Int. 1997; 13: 365 – 82

18-Chang ST. *Ganoderma* The leader in production and technology of mushroom nutraceuticals. In Proc 6th Int. Symp. Recent Adv. *Ganoderma lucidum* Res. (ed. B. K. Kim, I. H. Kim and Y. S. Kim), The Pharmaceutical society of Korea, Seoul, Korea. 1995, pp: 43-52

19-KH Gan, SH Kuo, CN Lin - Journal of natural products, 1998 - ACS Publications Steroidal Constituents of *Ganoderma applanatum* and *Ganoderma neo-japonicum*

20-M Haak-Frendscho, K Kino, T Sone, P Jardieu - Cellular immunology, 1993 -Ling Zhi-8: a novel T cell mitogen induces cytokine production and upregulation of ICAM-1 expression 150, 101-113 (1993)

21- Hatvani, N., 2001. Antibacterial effect of the culture fluid of *Lentinus edodes* mycelium grown in submerged liquid culture. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 17(1), pp.71-74.

22-Min, B. S., Nakamura, N. and Hattori, M. (2000). Triterpenes from the spores of *Ganoderma lucidum* and their cytotoxicity against meth- A and LLC tumor cells. Chem. Pharm. Bull (Tokyo). 46, 1607-1612

23-Chang, S. T. Miles, P. G.(1992). Mushroom biology – A new discipline. *Mycologist* 6,64-65.

24-Hawksworth, D. L. (1991). The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. *Mycological Res* 95, 641-655.

25- T. Mizuno, Chem. Times, 133, 50 (1989); 139, 6 (1991).

26- T. Mizuno, Kagaku to Seibutsu, 23, 797 (1985); 21, 473 (1983).

27-Takashi Mizuno, Guanying Wang, Jie Zhang, Hirokazu Kawagishi, Tsuyoshi Nishitoba & Jingxuan Li (1995) Reishi, *Ganoderma lucidum* and *Ganoderma tsugae*: Bioactive substances and medicinal effects, Food Reviews International, 11:1, 151-166

28-Woo, YA., Kim, HJ., Cho, JH. 1999. Chung H. Discrimination of herbal medicines according to geographical origin with near infrared reflectance spectroscopy and pattern recognition techniques. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 21: 407–413.

29-Ingold, CT., Hudson, HJ.1996. The biology of fungi. Sixth Edition. London: Chapman & Hall Publications. 228P.

30-Ryvarden, LPK., Hseu, RS., Moncalvo, JM. 1994. Can we trust morphology in *Ganoderma buchanan* *Ganoderma*: Systematics, phytopathology and pharmacology. Proceedings of Contributed Symposium, 1994:19–24.

31-Gottlieb, AM., Saidman, BO., Wright, JE. 1998. Isoenzymes of *Ganoderma* species from southern South America. *Mycological Research*, 102: 415–426.

32-Moncalvo, JM. 2005. Molecular Systematics of *Ganoderma*: What Is Reishi?. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 7: 353-354.

33-Saltarelli, R., Ceccaroli, P., Iotti, M. 2009. Biochemical characterisation and antioxidant activity of mycelium of *Ganoderma lucidum* from Central Italy. *Food chemistry*,

116:143–151.

34-Stamets, P. 2000. Growing Gourmet and Medicinal Mushrooms. Third Edition. California: Ten Speed Press Publications. 614P.

35-Hong, GS., Jung, SH. 2004. Phylogenetic analysis of *Ganoderma* based on nearly complete mitochondria small subunit ribosomal DNA sequences. *Mycologia*, 96: 742-755

36-Moradali, MF., Hedjaroude, GhA., Mostafavi, H., Abbasi, M., Ghods, Sh., Sharifi-Tehrani, A. 2007. The genus *Ganoderma* (Basidiomycota) in Iran. *Mycotaxon*, 99: 251 – 269.

37-Cooke RC (1977). *Fungi, Man, and his Environment*, Largman, London, New York, pp. 144

38-Mattila P, Konko K, Eurola M, Pihlawa JM, Astola J, Vahteristo Lietaniemi V, Kumpulainen J, Valtonen M, Piironen V (2001). Contents of vitamins, mineral elements, and some phenolic compounds in cultivated mushrooms. *J. Agric. Food Chem.*, 49: 2343-2348.

39-Rai RD (1994). Nutritional and medicinal values of mushrooms. In: *Advances in Horticulture*. (Chadha KL, Sharma SR eds.), Malhotra publishing house, New Delhi, pp. 537-551.

40-Rai RD (1997). Medicinal mushrooms. In: *Advances in Mushroom Biology and Production* (Rai RD, Dhar BL, Verma RN ed.) Mushroom society of India. NRCM, Solan, H.P., pp. 355-368.

41-Buller AHR (1915). The fungus lore of the Greeks and Romans.-*Trans. Br. Mycol. Soc.*, 5: 21-26.

42-Bano Z, Ahmed R, Srivastava HC (1964). Amino acids of edible mushrooms, *Lepiota* sp. and *Termitomyces* sp. *Indian j. Chem.*, 2: 380-381.

43-Bano Z, Rajarathanum S (1988). *Pleurotus* mushroom part II. Chemical composition nutritional value, post harvest physiology, preservation and role as human food crit. *Rev. Food Sci. Nutr.*, 27: 87-158.

44-Atkinson CF (1961). *Studies of American Fungi Mushrooms Edible, Poisonous*, Hafner publishing Co, New York, pp. 322

45-Jandaik CL , Kapoor JN (1975). Cultural studies on some edible fungi. *Indian J. Mushrooms*, 1: 22-26

46-Abou-Heilah AN, Kasionalsim MY, Khaliel AS (1987). Chemical composition of the fruiting bodies of *Agaricus bisporus*. *Int. J. Expt. Bot.*, 47: 64-68.

47-Houghton W (1995). Notices of fungi in the Greek and Latin author - *Ann. Mag. Nat. His.*, 15: 22-29

48-Singer R (1961). *Mushrooms and Truffles*, Leonard Hill Books Ltd., p. 272.

49- Crisan EW, Sands (1978). A Nutritional value. In: Chang ST and Hayes WA (eds.). *The biology and cultivation of edible mushrooms*. Academic press, New York, pp. 172-189

50- Orgundana SK, Fagade O (1981). The nutritive value of some Nigerian edible mushrooms. In: *Mushroom Science XI, Proceedings of the Eleventh International Scientific Congress on the Cultivation of Edible Fungi*, Australia, pp. 123-131.

51- Borchers, AT., Stern, JS., Hackman, RM., Keen, CL., Gershwin, ME. 1999. Mushrooms, tumors and immunity. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 221:281–293.

52- Florezak J, Karmnska A, Wedzisz A (2004). Comparision of the chemical contents of

- the selected wild growing mushrooms. *Bromatol. Chem. Toksykol.*, 37: 365-371
- 53-Aletor VA (1995). Compositional studies on edible tropical species of mushrooms. *Food Chem.*, 54: 265-268
- 54-Alofe FV, Odeyemi O, Oke OL (1995). Three edible mushrooms from Nigeria: Their proximate and mineral composition. *Plant Foods for Hum. Nutr.*, 49: 63-73.
- 55-Fasidi IO, Kadiri M (1990a). Changes in nutrient contents of two Nigerian mushrooms. *Termitomyces robustus* (Beeli) Heim and *Lentinus subnudus* (Berk), during sporophore development. *Die Nahrung*, 34: 141-420.
- 56-Florezak J, Lasota W (1995). Cadmium uptake and binding by artificially cultivated mushrooms (*Pleurotus ostreatus*). *Bromatol. Chem. Toksykol.*, 28: 17-23.
- 57-Chang ST, Buswell JA (1996). Mushroom Nutraceuticals. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 12: 473-476.
- 58-Zrodzowski Z (1995). The influence of washing and peeling of mushrooms *Agaricus bisporus* on the level of heavy metal contaminations. *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 4: 23-33.
- 59-Lintzel W (1941). The nutritional value of edible mushroom proteins. *Biochem. Acta.*, 308: 413-419
- 60-Bano Z, Rajarathanum S (1988). *Pleurotus* mushroom part II. Chemical composition nutritional value, post harvest physiology, preservation and role as human food crit. *Rev. Food Sci. Nutr.*, 27: 87-158.
- 61-Chang ST (1980). Mushroom as human food, *Bio Science* 30: 339-401.
- 62-Weaver KC, Kroger M, Kneebone LR (1977). Comparative protein studies on nine strains of *Agaricus bisporus* (Lange) *J. Food Sci.*, 42: 364-366.
- 63-Breene WM (1990). Nutritional and medicinal value of speciality mushrooms. *J. Food Protect.*, 53: 883-894.
- 64-Verma RN, Singh GB, Bilgrami KS (1987). Fleshy fungal flora of N. E. H. India- I. Manipur and Meghalaya. *Indian Mush. Sci.*, 2: 414- 421.
- 65-Rai RD, Saxena S (1989a). Biochemical changes during the post harvest storage of button mushroom (*Agaricus bisporus*). *Curr. Sci.*, 58: 508-10.
- 66-Hayes WA, Haddad N (1976). The food value of the cultivated mushrooms and its importance in industry. *Mushroom J.*, 40: 104- 110
- 67-Singer R (1961). *Mushrooms and Truffles*, Leonard Hill Books Ltd., p. 272.
- 68-Bano Z, Rajarathanam S (1982). *Pleurotus* mushrooms as a nutritious food. In: *Tropical mushrooms –Biological Nature and cultivation methods*, (Chang ST, Quimio, TH, eds.) The Chinese University press, Hongkong, pp. 363-382.
- 69-Bano Z, Bhagya S, Srinivasan KS (1981). Essential amino acid composition and proximate analysis of Mushroom, *Pleurotus florida*. *Mushrooms News Lett. Trop.*, 1: 6-10
- 70-Chang, S.T. (1982). Prospects for mushroom protein in developing countries. In: *Tropical Mushroom – Biological Nature and Cultivation Methods* (Chang ST, Quimio TH. eds.), Chinese University Press, Hong Kong, pp. 463-473.
- 71-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.

72-Huie, CW., Di, X. 2004. Chromatographic and electrophoretic methods for Lingzhi pharmacologically active components. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 812: 241–257.

73-Miyazaki, T., Nishijima, M. 1981. Studies on fungal polysaccharides. XXVII. Structural examination of a water-soluble, antitumor polysaccharide of *Ganoderma lucidum*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 29: 3611–3616.

74-Tomoda, M., Gonda, R., Kasahara, Y., Hikino, H. 1986. Glycan structures of ganoderans B and C, hypoglycemic glycans of *Ganoderma lucidum* fruit bodies. *Phytochemistry*, 25: 2817–2820.

75-Wachtel-Galor, S & Iris, FFB. 2011. *Herbal Medicine: Biomolecular and Clinical Aspects*, Second Edition. London: Taylor & Francis Group Publications. 465P.

76-Bao, X., Liu, C., Fang, J., Li, X. 2001. Structural and immunological studies of a major polysaccharide from spores of *Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst. *Carbohydrate Research*, 332:67–74.

77-Hikino, H., Konno, C., Mirin, Y., Hayashi, T. 1985. Isolation and hypoglycemic activity of ganoderans A and B, glycans of *Ganoderma lucidum* fruit bodies. *Planta Medica*, 4: 339–340

78-Huie, W., & Di, X. (2004). Chromatographic and electrophoretic methods for Lingzhi pharmacologically active components. *Journal of Chromatography B*, 812, 241–257.

79-Gao, L., Yu, L., Li, P., & Wang, T. (2005). Research advance on triterpenoids of *Ganoderma lucidum*. *Edible Fungi of China*, 24, 6–11.

80-Wang, H., & Ng, B. (2006). Ganodermin, an antifungal protein from fruiting bodies of the medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*. *Peptides*, 27, 27–30.

81-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.

82-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.

83-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.

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

85-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.

86-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.

87-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

- 88-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.
- 89-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.
- 90-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.
- 91-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.
- 92-Yokokawa H. and Mitsuhashi T. (1981). "The sterol composition of mushrooms" *Phytochemistry.*, 20, 6, pp 1349-1351.
- 93-Chilton J. (2016). "Commercial Sample Identification and Characterization Challenges in Medicinal Mushroom Research" *International journal of medicinal mushrooms.*, 18, 3, pp 203-214.
- 94-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" 84 *International journal of medicinal mushrooms.*, 6, 3, pp 275.
- 95-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.
- 96-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.
- 97-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.
- 98-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.
- 99-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
- 100-Chang S. T. and Buswell J. A. (1999). "Ganoderma lucidum (Curt.: Fr.) P. karst.(Aphyllophoromycetideae)- a mushrooming medicinal mushroom" *International Journal of Medicinal Mushrooms.*, 1, 2, pp 139-146.
- 101-Wu D.T., Deng Y., Chen L. X., Zhao J., Bzhelyansky A. and Li S. P. (2017). *Scientific reports.*, 7, 1, pp 1-10.
- 102-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.

- 103-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.
- 104-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
- 105-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.
- 106-Esmaeilzadeh M., Kianirad M., Sheykhinejad A., Khosravi A. and Sharifzadeh A. (2019). "Ganoderic Acid and Exopolysaccharide Production by *Ganoderma Lucidum* from SemiSolid-State and Submerged Fermentation" *Biological Journal of Microorganism.*, 7, 28, pp 63-75.
- 107-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.
- 108-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.
- 109-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.
- 110-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.
- 111-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.
- 112-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.
- 113-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.
- 114-Yang F. C. and Liao 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.
- 115-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.
- 116-Elisashvili V. I. (2012). "Submerged cultivation of medicinal mushrooms: bioprocesses and products" *International journal of medicinal mushrooms.*, 14, 3, pp 211-239.
- 117-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.

118-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.

119- Ćilerdžić J, Vukojević J, Stajić M, Stanojković T, Glamočlija J. 2014. Biological activity of *Ganoderma lucidum* basidiocarps cultivated on alternative and commercial substrate. *J Ethnopharmacol.* 155:312–319.

120- Islam, M.S., Rahi, M.S., Koli, H.K., Jerin, I., Sajib, S.A., Hoque, K.M.F. and Reza, M.A., 2018. Evaluation of phytochemical, antioxidant, cytotoxicity and in vitro antibacterial activity of aqueous extract of *Ganoderma lucidum* cultivated in Bangladeshi habitat. *Malaya Journal of Biosciences*, 5(1), pp.1-13.

121-Nadu, T., 2014. Evaluation of bioactive potential of basidiocarp extracts of *Ganoderma lucidum*. *International Journal*, 3(1), pp.36-46.

122-Serrano-Márquez, L., Trigos, Á., Couttolenc, A., Padrón, J.M., Shnyreva, A.V. and Mendoza, G., 2021. Antiproliferative and antibacterial activity of extracts of *Ganoderma* strains grown in vitro. *Food Science and Biotechnology*, 30(5), pp.711-721.

123- Radhika, R., 2021. Antibacterial Activity Of *Ganoderma Lucidum* Extracts Against Mdr Pathogens. *International Journal of Modern Agriculture*, 10(2), pp.3488-3493

124- Keypour, S., Riahi, H., Moradali, M.F. and Rafati, H., 2008. Investigation of the antibacterial activity of a chloroform extract of Ling Zhi or Reishi medicinal mushroom, *Ganoderma lucidum* (W. Curt.: Fr.) P. Karst.(Aphyllophoromycetideae), from Iran. *International journal of medicinal mushrooms*, 10(4).

125- Celal, B., 2019. Antioxidant and antimicrobial capacities of *Ganoderma lucidum*. *MedCrave*, 7(1), pp.5-7.

126- Cilerdzic, J., Stajic, M. and Vukojevic, J., 2016. Potential of submergedly cultivated mycelia of *Ganoderma* spp. as antioxidant and antimicrobial agents. *Current pharmaceutical biotechnology*, 17(3), pp.275-282.

127-Mehta, S. and Jandaik, S., 2012. In vitro comparative evaluation of antibacterial activity of fruiting body and mycelial extracts of *Ganoderma lucidum* against pathogenic bacteria. *J. Pure Appl. Microbiol*, 6, pp.1997-2001.

128-Wasser SP (2005) Reishi or Lingzhi (*G. lucidum*). In: Coates P, Blackman MR, Cragg G, Levine M, Moss J, White J (eds) *Encyclopaedia of dietary supplements*. Marcel Dekker, New York, pp 603–622

129-Leung SWS, Yeung KY, Ricky YLS, Man YK (2002) Lingzhi (*Ganoderma*) research the past, present and future perspectives. In: Lin ZB (ed) *Ganoderma: genetics, chemistry, pharmacology and therapeutics*. Beijing medical University Press, Beijing, pp 1–9

130-Wang JL, Li YB, Liu RM (2010) A new ganoderic acid from *G. lucidum* mycelia. *J Asian Nat Prod Res* 12(8):727–730

131-Hanaoka R, Ueno Y, Tanaka S (2011) The water-soluble extract from cultured medium of *G. lucidum* (Reishi) mycelia (Designated as MAK) ameliorates murine colitis induced by trinitrobenzene sulphonic acid. *Scand J Immunol* 74(5):454–462

132-Yang XJ, Liu J, Ye LB, Yang F, Ye L, Gao JR, Wu ZH (2006) In vitro and in vivo

protective effects of proteoglycan isolated from mycelia of *G. lucidum* on carbon tetrachloride induced liver injury. *World J Gastroenterol* 12(9):1379–1385

133-Arora D (1986) *Mushrooms demystified*, 2nd edn. Ten Speed Press, Berkeley, pp 169–164. ISBN 0-89815. Available at http://www.mushworld.com/sub_en.html

134-Jungjing MA, Zhenji FU, Peiyan MA, Yanli SU, Qingjie Z (2007) Breaking and characteristics of *G. lucidum* spores by high speed centrifugal shearing pulveriser. *J Wuhan Univ Technol Mat Sci Edit* 22:617–621

135-Chen AW (1999) Cultivation of the medicinal mushroom *G. lucidum* (Curtis: Fr.) P. Karst (Reishi) in North America. *Int J Med Mush* 1(3):263–282

136-Jayasinghe C, Imtiaj A, Hur H, Lee GW, Lee TS, Lee UY (2008) Favourable culture conditions for mycelial growth of Korean wild strains in *G. lucidum*. *Mycobiology* 36(1):28–33

137-Mckenna DJ, Jones K, Hughes K (2002) *Reishi, botanical medicines. The desk reference for major herbal supplements*, 2nd edn. The Haworth Herbal Press, New York/London/Oxford, pp 825–855

138-Chang YW, Lu T (2004) Molecular characterization of polysaccharides in hot water extracts of *G. lucidum* fruiting bodies. *J Food Drug Anal* 12:59–67

139- Frankel EN (1997) Nutritional benefits of flavonoids. In: Ohigashi H, Osawa T, Terao J, Watanabe S, Yoshikawa T (eds) *Food factors for cancer prevention*. Springer, Tokyo, pp 613–616

140-Decker EA (1997) Phenolics: prooxidants or antioxidants? *Nutr Rev* 55:396–407

141- Mau JL, Lin HC, Song SF (2002) Antioxidant properties of several specialty mushrooms. *Food Res Int* 35(6):519–526

142- Kumari K, Prakash V, Rana S, Sagar A (2016) In vitro antioxidant activity of methanolic extract of *G. lucidum* (Curt.) P. Karst. *IJASR* 1(5):51–54

143-Shimizu A, Yano T, Saito Y, Inada Y (1985) Isolation of an inhibitor of platelet aggregation from a fungus, *G. lucidum*. *Biol Pharm Bull* 33(7):3012–3015

144-Wang YY, Chen ST, Lin CC, Wong CH, Lin CH (2002) Studies on the immunomodulation and antitumor activities of *G. lucidum* (Reishi) polysaccharides: functional and proteomic analysis of fucose-containing glycoprotein fraction responsible for the activities. *Bioorg Med Chem* 10:1057–1062

145-Li P, Yi L, Liu HJ (2011) Chapter 2: Collection and identification of raw herbal materials. In: Liu JH (ed) *Traditional herbal medicine research methods: identification, analysis, bioassay, and pharmaceutical and clinical studies*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, pp 27–79

146-Li P, Yi L, Liu HJ (2011) Chapter 2: Collection and identification of raw herbal materials. In: Liu JH (ed) *Traditional herbal medicine research methods: identification, analysis, bioassay, and pharmaceutical and clinical studies*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, pp 27–79

147-Krishnaswamy N (2010) *Chemistry of natural products: the terpenes*. Taylor & Francis Group, New York, pp 1–10

148-. Kim DO, Lee CY (2003). Extraction and isolation of polyphenolics. In: *Current protocols in food analytical chemistry*, I:11:11.2 (Online)

- 149-Liu GQ, Zhao Y, Wang XL, Zhu CY (2011) Response surface methodology for optimization of polysaccharides extraction by mild alkaline hydrolysis from fruiting body of medicinal mushroom, *G. lucidum*. *J Med Plant Res* 5(10):2064–2070
- 150-Chin SK, Law CL, Supramaniam CV, Cheng PG (2009) Thin-layer drying characteristics and quality evaluation of air-dried *Ganoderma tsugae* Murrill. *Dry Technol* 27(9):975–984
- 151-Liu W, Xu J, Jing P, Yao W, Gao X, Yu L (2010) Preparation of a hydroxypropyl *G. lucidum* polysaccharide and its physicochemical properties. *Food Chem* 122(4):965–971
- 152-Azmi AF, Mustafa S, Hashim DM, Manap YA (2012) Prebiotic activity of polysaccharides extracted from *Gigantochloa levis* (Buluh beting) shoots. *Molecules* 17(2):1635–1651
- 153-. Fan L, Li J, Deng K, Ai L (2012) Effects of drying methods on the antioxidant activities of polysaccharides extracted from *G. lucidum*. *Carbohydr Polym* 87(2):1849–1854
- 154-Huang SQ, Li JW, Wang Z, Pan HX, Chen JX, Ning ZX (2010) Optimization of alkaline extraction of polysaccharides from *G. lucidum* and their effect on immune function in mice. *Molecules* 15(5):3694–3708
- 155-Li YQ, Fang L, Zhang KC (2007) Structure and bioactivities of a galactose rich extracellular polysaccharide from submergedly cultured *G. lucidum*. *Carbohydr Polym* 68(2):323–328
- 156-Huang SQ, Ning ZX (2010) Extraction of polysaccharide from *Ganoderma lucidum* and its immune enhancement activity. *Int J Biol Macromol* 47(3):336–341
- 157-Zhao Q, Kennedy JF, Wang X, Yuan X, Zhao B, Peng Y et al (2011) Optimization of ultrasonic circulating extraction of polysaccharides from *Asparagus officinalis* using response surface methodology. *Int J Biol Macromol* 49(2):181–187
- 158-Sanodiya BS, Takur GS, Baghel RK, Prasad GB, Bisen PS (2009) *G. lucidum*: a potent pharmacological macrofungus. *Curr Pharm Biotechnol* 10(8):717–742
40. Pandey A, Soccol CR, Mitchell D (2000) New developments in solid
- 159-Kim HW, Kim BK (1999) Biomedical triterpenoids of *G. lucidum* (Curt.: Fr.) P. Karst. (Aphyllorphoromycetideae). *Int J Med Mush* 1(2):121–138
- 160-Min BS, Gao JJ, Hattori M, Lee HK, Kim YH (2001) Anticomplement activity of terpenoids from the spores of *G. lucidum*. *Planta Med* 67(9):811–814
- 161-Min BS, Nakamura N, Miyashiro H et al (1998) Triterpenes from the spores of *G. lucidum* and their inhibitory activity against HIV-1 protease. *Chem Pharm Bull* 46(10):1607–1612
- 162-. Fang QH, Zhong JJ (2002b) Submerged fermentation of higher fungus *G. lucidum* for production of valuable bioactive metabolites – ganoderic acid and polysaccharide. *Biochem Eng J* 10:61–65
- 163-Wachtel-Galor S, Yuen J, Buswell JA, Benzie IFF (2011) Chapter 9: *G. lucidum* (Lingzhi or Reishi) a medicinal mushroom. In: *Herbal medicine: biomolecular and clinical aspects*, 2nd edn. CRC Press, Boca Raton
- 164-Sliva D (2004) Cellular and physiological effects of *G. lucidum* (Reishi). *Mini-Rev Med Chem* 4:873–879
- 165-Yuen JW, Gohel MD (2005) Anticancer effects of *G. lucidum*: a review of scientific

evidence. *Nutr Cancer* 53:11–17

166-Tomasi S, Lohezic-Le DF, Sauleau P, Bezivin C, Boustie J (2004) Cytotoxic activity of methanol extracts from Basidiomycete mushrooms on murine cancer cell lines. *Pharmazie* 59:290–293

167-Lu ZW (1995) Psycho-neuroimmunological effects of morphine and the immunoprotection of Ganoderma polysaccharides peptide in morphine dependent mice. *Chin J Phys* 26:45–49

168-Benzie IFF, Wachtel-Galor S (2009) Biomarkers of long-term vegetarian diets. *Adv Clin Chem* 47:169–220

169-Gao JJ, Nakamura N, Min BS, Hirakawa A, Zuo F, Hattori M (2004) Quantitative determination of bitter principles in specimens of *G. lucidum* using high-performance liquid chromatography and its application to the evaluation of Ganoderma products. *Chem Pharm Bull* 52(6):688–695

170-Yuen JW, Gohel MD (2008) The dual roles of Ganoderma antioxidants on urothelial cell DNA under carcinogenic attack. *J Ethnopharmacol* 118:324–330

171-Saltarelli R, Ceccaroli P, Lotti M, Zambonelli A, Buffalini M, Casadei L, Vallorani L, Stocchi V (2009) Biochemical characterisation and antioxidant activity of mycelium of *G. lucidum* from Central Italy. *Food Chem* 116:143–151

172-Calder PC (2003) Immunonutrition: may have beneficial effects in surgical patients. *BMJ* 327(7407):117–118

173-Mohammed A, Adelaiye AB, Abubakar MS, Abdurahman EM (2007) Effects of aqueous extract of *G. lucidum* on blood glucose levels of normoglycemic and alloxan induced diabetic wistar rats. *J Med Plant Res* 1:34–37

174-Gao JJ, Nakamura N, Min BS, Hirakawa A, Zuo F, Hattori M (2004) Quantitative determination of bitter principles in specimens of *G. lucidum* using high-performance liquid chromatography and its application to the evaluation of Ganoderma products. *Chem Pharm Bull* 52(6):688–695

175-Yoon SY, Eo SK, Kim YS, Lee CK, Han SS (1994) Antimicrobial activity of *G. lucidum* extract alone and in combination with some antibiotics. *Arch Pharm Res* 17:438–442

176- Patel, J. B., Weinstein, M., Eliopoulos, G., Jenkins, S., Lewis, J., & Limbago, B. (2017). M100 Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. United State: Clinical and Laboratory Standards Institute, 240.

177- Wasser, S.P., 2005. Reishi or ling zhi (*Ganoderma lucidum*). *Encyclopedia of dietary supplements*, 1, pp.603-622.

178- Xu, J. and Li, P., 2019. Researches and application of Ganoderma spores powder. *Ganoderma and Health*, pp.157-186.

179- Gao Y, Lan J, Dai X, Ye J and Zhou, Sh. A phase I/II study of Ling Zhi mushroom *Ganoderma lucidum* (W. curt.: Fr.) Lioid (Aphyllphoromycetidae) extract in patients with type II diabetes mellitus. *Int. J. Med. Mushr.* 2004; 6 (1): 33 - 9.

180-Quereshi, S., Pandey, A.K. and Sandhu, S.S., 2010. Evaluation of antibacterial activity of different *Ganoderma lucidum* extracts. *J Sci Res*, 3, pp.9-13.

181-Upadhyay, M., Shrivastava, B., Jain, A., Kidwai, M., Kumar, S., Gomes, J., Goswami,

- D.G., Panda, A.K. and Kuhad, R.C., 2014. Production of ganoderic acid by *Ganoderma lucidum* RCKB-2010 and its therapeutic potential. *Annals of microbiology*, 64(2), pp.839-846
- 182-Y. Mizushima, et al., Lucidenic acid O and lactone, new terpene inhibitors of eukaryotic DNA polymerases from a basidiomycete, *Ganoderma lucidum*, *Bioorg. Med. Chem.* 7 (9) (1999) 2047–2052.
- 183- Hsu, C.L. and Yen, G.C., 2014. Ganoderic acid and lucidenic acid (triterpenoid). In *The Enzymes* (Vol. 36, pp. 33-56). Academic Press.
- 184- Heleno, S.A., Ferreira, I.C., Esteves, A.P., Ćirić, A., Glamočlija, J., Martins, A., Soković, M. and Queiroz, M.J.R., 2013. Antimicrobial and demelanizing activity of *Ganoderma lucidum* extract, p-hydroxybenzoic and cinnamic acids and their synthetic acetylated glucuronide methyl esters. *Food and chemical toxicology*, 58, pp.95-100.
- 185-Kubota T, Asaka Y (1982) Structures of ganoderic acid A and B, two new lanostane type bitter triterpenes from *Ganoderma lucidum* (FR.) Karst. *Helv Chim Acta* 65:611–619
- 186- 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.
- 187- Zhao, X.R., Huo, X.K., Dong, P.P., Wang, C., Huang, S.S., Zhang, B.J., Zhang, H.L., Deng, S., Liu, K.X. and Ma, X.C., 2015. Inhibitory effects of highly oxygenated lanostane derivatives from the fungus *Ganoderma lucidum* on P-glycoprotein and α -glucosidase. *Journal of natural products*, 78(8), pp.1868-1876
- 188-Toth JO, Luu B, Beck JP, Ourisson G (1983) Cytotoxic triterpenes from *Ganoderma lucidum* (polyporaceae): structures of ganoderic acids U-Z. *Tetrahedron Lett* 24:1081–1084
- 189-Li CH, Chen PY, Chang UM, Kan LS, Fang WH, Tsai KS, Lin SB: Ganoderic acid X, a lanostanoid triterpene, inhibits topoisomerases and induces apoptosis of cancer cells. *Life Sci*, 2005, 77, 252–265.
- 190-Yue QX, Cao ZW, Guan SH, Liu XH, Tao L, Wu WY, Li YX et al.: Proteomics characterization of the cytotoxicity mechanism of ganoderic acid D and computer-automated estimation of the possible drug target network. *Mol Cell Proteomics*, 2008, 7, 949–961.
- 191-El-Mekkiway SR, Meselhy M, Nakamura N, Tezuka Y, Hattori M, Kakiuchi N, Shimotohno K, Kawahata T, Otake T (1998) Anti-HIV-1 and anti-HIV-protease substances from *Ganoderma lucidum*. *Phytochemistry* 49:1651–1657
- 192- Min BS, Nakamura N, Bae KW Miyashiro H, Hattori M (1998) Triterpenes from the spores of *Ganoderma lucidum* and their inhibitory activity against HIV-1 protease. *Chem Pharm Bull* 46:1607–1612
- 193-Morigiwa A, Kitabatake K, Fujimoto Y, Ikekawa N (1986) Angiotensin converting enzyme-inhibitory triterpenes from *Ganoderma lucidum*. *Chem Pharm Bull* 34:3025–3028
- 194- Liu, D., Hu, Z., Liu, Z., Yang, B., Tu, W. and Li, L., 2009. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil isolated from the cultured mycelia of *Ganoderma japonicum*. *Journal of Nanjing Medical University*, 23(3), pp.168-172.
- 195- Jawetz, Melnick, & Adelberg's Medical Microbiology, Twenty-Fifth Edition - LANGE Basic Science
- 196- Chambers, H.F., 2001. The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*?. *Emerging infectious diseases*, 7(2), p.178.

- 197- Carter, A.P., Clemons, W.M., Brodersen, D.E., Morgan-Warren, R.J., Wimberly, B.T. and Ramakrishnan, V., 2000. Functional insights from the structure of the 30S ribosomal subunit and its interactions with antibiotics. *Nature*, 407(6802), pp.340-348.
- 198- Ohama, T., Muto, A. and Osawa, S., 1989. Spectinomycin operon of *Micrococcus luteus*: evolutionary implications of organization and novel codon usage. *Journal of molecular evolution*, 29(5), pp.381-395.
- 199- Singh, C., Pathak, P., Chaudhary, N., Rathi, A. and Vyas, D., GANODERMA LUCIDUM: CULTIVATION AND PRODUCTION OF GANODERIC AND LUCIDENIC ACID.
- 200- 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.
- 201- Bhavana Thorat , Roshan Deshmukh, 2021, Reishi Mushroom Market by Form (Liquid and Powder), End Use (Pharmaceutical, Nutraceutical & Dietary Supplements, and Cosmetics & Personal Care), and Nature (Organic and Conventional): Global Opportunity Analysis and Industry Forecast, 2021–2027, Allied Market Research
- 202- Yoon, S.Y., Eo, S.K., Kim, Y.S., Lee, C.K. and Han, S.S., 1994. Antimicrobial activity of *Ganoderma lucidum* extract alone and in combination with some antibiotics. *Archives of pharmacal research*, 17(6), pp.438-442.
- 203- Skalicka-Wozniak, K., Szypowski, J., Los, R., Siwulski, M., Sobieralski, K., Glowinski, K. and Malm, A., 2012. Evaluation of polysaccharides content in fruit bodies and their antimicrobial activity of four *Ganoderma lucidum* (W Curt.: Fr.) P. Karst. strains cultivated on different wood type substrates. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 81(1).
- 204- Hu, Y., Ahmed, S., Li, J., Luo, B., Gao, Z., Zhang, Q., Li, X. and Hu, X., 2017. Improved ganoderic acids production in *Ganoderma lucidum* by wood decaying components. *Scientific reports*, 7(1), pp.1-10.
- 205- 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.
- 206- 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.
- 206- C.J. Weng, et al., Lucidenic acid inhibits PMA-induced invasion of human hepatoma cells through inactivating MAPK/ERK signal transduction pathway and reducing binding activities of NF-kappaB and AP-1, *Carcinogenesis* 29 (10) (2008) 147–156.
- 207- J. Liu, et al., 5alpha-reductase inhibitory effect of triterpenoids isolated from *Ganoderma lucidum*, *Biol. Pharm. Bull.* 29 (2) (2006) 392–395.
- 208- C.L. Hsu, Y.S. Yu, G.C. Yen, Lucidenic acid B induces apoptosis in human leukemia cells via a mitochondria-mediated pathway, *J. Agric. Food Chem.* 56 (11) (2008) 3973–3980.
- 209- Xu, J. and Li, P., 2019. Researches and application of *Ganoderma* spores powder. *Ganoderma and Health*, pp.157-186.

Abstract

The infectious diseases cause premature death. To control such human infectious diseases, various commercial antibiotics have been applied around the world. On the other hand, long-term use of these antibiotics have led to the emergence of multidrug-resistant bacteria and subsequently significant clinical problems. The aim of this study was to investigate the antibacterial effect of ganoderic acid extracted from two varieties of *Ganoderma lucidum*, red and yellow, on 5 different gram-positive and gram-negative bacteria, included: *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC27853), *Escherichia coli* (ATCC25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC25923), *Bacillus subtilis* (PTCC1715), *Micrococcus luteus* (ATCC9341) (1715 (PY79)). The results indicated that the amount of ganoderic acid in dry weight of the fungus in red variety with less bitter taste was 2.140 mg/g and in fungi with more bitter taste and yellow color was 3.264 mg/g. According to the extracted ganoderic amount of both fungi, solutions with different concentrations of ganoderic acid were prepared from both red and yellow fungi, following that the standard microdilution method was used to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) and the minimum lethal concentration (MBC). The range MIC/MBC in $\mu\text{g/ml}$ for *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* used in this study were 26.5/26 $\mu\text{g/ml}$ and 23/29 $\mu\text{g/ml}$ for red and yellow fungus respectively. to *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* this amount were 34/45 $\mu\text{g/ml}$ and 34/46 $\mu\text{g/ml}$ for red and yellow varieties respectively which showed that the antibacterial property was dependent on the amount of ganoderic acid and increasing the ganoderma acid of *Ganoderma lucidum* would increase its antibacterial properties.

Keywords: Ganoderma, Ganoderic acid, Antibacterial, Alcoholic extract



**Shahrood University of
Technology**

Faculty of Agriculture

M.A. Thesis in Food Science and Technology

**Evaluation of antibacterial Effects of Ganodreic
Acid Extracted from Alcoholic Extract of
*Ganoderma Lucidum***

By: Mohammad Reza Najmadi

Supervisor:
Dr. Hamid Reza Samadloui

Advisors:
Dr. Amir Salek Farokhi
Dr. Hadi Amrollahi

Feb,2022