



Research Article

**Optimal method for production of mycelia biomass of
Ganoderma lucidum in sugarcane molasses**

**SAEIDEH AHMADIFAR, SYED MOHSEN HOSSEINI,
EBRAHIM MOHAMMADI GOLTAPPEH✉, AKBAR JAHEDI**

Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

Received: 09.11.2019

Accepted: 01.02.2020

Ahmadifar S , Hosseini SM, MohammadiGoltapeh E, Jahedi A (2020) Optimal method for production of mycelia biomass of *Ganoderma lucidum* in sugarcane molasses. Plant Pathology Science 9(1):1-14. DOI: 10.2982/PPS.9.1.1.

Abstract

Introduction: *Ganoderma lucidum*, medicinal mushroom, is one of the most effective traditional medicine in East Asia. The mycelium, the spore and the basidiocarp contain about 400 different bioactive compounds with polysaccharides, peptidoglycans and triterpenes as active ingredient groups of medical value. Underwater cultivation is one of the most reliable technologies to produce the industrial biomass of this mushroom, which contains anti-tumor and anti-cancer polysaccharides. Regarding the growth of fungal mycelium, it is related to various environmental factors such as pH, temperature and available nutrients. The aim of this study was to determine the influence of pH, temperature and different concentrations of the carbon and nitrogen sources on the growth rate of fungal biomass in sugar cane molasses. **Materials and Methods:** The first part of the study dealt with the morphological and molecular identification of an Iranian isolate from *G. lucidum*. Then the effects of carbon sources of arabinose, maltose, cellulose and xylose at concentrations of 0.1, 0.2 and 0.3%, and nitrogen sources of yeast extract, MgSO₄.7H₂O, peptone and K₂HPO₄ at concentrations of 0.2, 0.3 and 0.4%, pH 4, 4.5, 5 and 5.5, and a temperature of 25° C, 28° C, 32 ° C and the number of 2, 3, and 4 inoculum particles of 5 mm² for the production of mycelium biomass of *G. lucidum*, in sugarcane molasses was studied, in completely randomized design experiments with four replicates for each treatment in vitro. **Results:** A comparison of the mean dry weight mycelium of *G. lucidum* produced with different treatments showed the significant differences between the treatments with a probability of 5%. The highest yield of *G. lucidum* was obtained in peptone with concentration of 0.3%, maltose with concentration of 0.2%, pH=5, 3 inoculum particles with 5mm² diameter, at 28°C. **Conclusion:** Sugar cane molasses can be used as a cheap and inexpensive medium for the biomass production of *G. lucidum*. For the first time this study showed that by adding peptone with concentration of 0.3%, maltose with concentration of 0.2%, to sugarcane molasses, with 3 particles of inoculum with 5mm² diameter, in pH=5, and 28°C, the highest biomass of this medicinal mushroom could be produced.

Keywords: Peptone, Immersed cultivation, Maltose, Sugarcane molasses, *Ganoderma*

✉ emgoltapeh@gmail.com

مقاله پژوهشی

روش بهینه تولید زیست توده میسلیومی *Ganoderma lucidum* در ملاس نیشکر

سعیده احمدی فر، سید محسن حسینی، ابراهیم محمدی گل تپه[✉]، اکبر جاهدی

دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

پذیرش: ۱۳۹۸/۱۱/۱۲

دریافت: ۱۳۹۸/۰۸/۱۸

احمدی فر س، حسینی س م، محمدی گل تپه ا، جاهدی ا (۱۳۹۸) روش بهینه تولید زیست توده میسلیومی *Ganoderma lucidum* در ملاس نیشکر. دانش بیماری‌شناسی گیاهی ۹(۱): ۱۴-۱. DOI:10.2982/PPS.9.1.1.

چکیده

مقدمه: قارچ دارویی *Ganoderma lucidum* به‌عنوان یکی از موثرترین محصول‌های طب سنتی در شرق آسیا شناخته شده است. بدنه بازیدیوکارپ، میسلیوم و اسپور این قارچ حاوی حدود ۴۰۰ ترکیب مختلف زیست فعال به‌همراه پلی‌ساکاریدها، پپتیدوگلیکان‌ها و تری‌ترپن‌ها، به‌عنوان گروه‌های موثر با ارزش دارویی می‌باشند. برای تولید مقیاس بزرگی از زیست‌توده این قارچ حاوی پلی‌ساکاریدهای ضد تومور و سرطان، کشت غوطه‌ور آن یکی از موثقت‌ترین فن‌آوری‌ها است. با توجه به اینکه رشد میسلیوم قارچ با عوامل محیطی مختلف مانند pH، دما و مواد مغذی در دسترس آن ارتباط دارد، هدف از این پژوهش تعیین تاثیر pH، دما، غلظت‌های مختلف منبع کربن و نیتروژن بر رشد زیست توده قارچ در محیط ملاس نیشکر بود.

مواد و روش‌ها: بخش اول پژوهش به شناسایی ریختی و مولکولی جدایه ایرانی *G. lucidum* اختصاص داده شد. سپس تاثیر منبع‌های کربن آرابینوز، مالتوز، سلولاز و زایلوز با غلظت‌های ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۳ درصد، منبع-های نیتروژن عصاره مخمر، $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ، پیتون و K_2HPO_4 با غلظت‌های ۰/۲، ۰/۳ و ۰/۴ درصد، اثر pH ۴، ۴/۵، ۵، ۵/۵، دماهای ۲۵، ۲۸ و ۳۲ درجه سلسیوس و تعداد ۲، ۳ یا ۴ قرص به قطر 5 mm^2 زادمایه، بر تولید زیست توده میسلیومی *G. lucidum* در ملاس نیشکر، در آزمایش‌های در قالب طرح آماری کاملاً تصادفی با چهار تکرار برای هر تیمار در شرایط آزمایشگاهی مطالعه شدند. **یافته‌ها:** مقایسه میانگین وزن خشک میسلیوم تولیدی در تیمارهای مختلف این آزمایش نشان داد که بین تیمارهای مختلف در سطح احتمال ۵ درصد اختلاف معنی‌داری وجود دارد. بیشترین توده میسلیومی قارچ با منبع نیتروژن پیتون با غلظت ۰/۳ درصد، منبع کربن مالتوز با غلظت ۰/۲ درصد، pH=5، دمای ۲۸ درجه سلسیوس و افزودن ۳ قرص به قطر 5 mm^2 زادمایه قارچ در محیط مایع ملاس نیشکر بدست آمد. **نتیجه‌گیری:** ملاس نیشکر می‌تواند به‌عنوان یک محیط ارزان و مقرون‌به‌صرفه برای تولید زیست‌توده *G. lucidum* مورد استفاده قرار گیرد. این پژوهش برای نخستین بار نشان داد، که می‌توان با افزودن پیتون با غلظت ۰/۳ درصد، مالتوز با غلظت ۰/۲ درصد، به ملاس نیشکر، با ۳ قرص به قطر 5 mm^2 زادمایه، در pH=5 و دمای ۲۸ درجه سلسیوس بیشترین زیست توده این قارچ دارویی را تولید کرد.

واژگان کلیدی: پیتون، کشت غوطه‌ور، مالتوز، ملاس نیشکر، *Ganoderma*

✉ emgoltapeh@gmail.com

مقدمه

Introduction

بعضی گونه‌های *Ganoderma* به عنوان تولیدکننده طیف وسیعی از محصولات دارویی طبیعی در آسیا و آمریکای شمالی شناخته شده‌اند. بسیاری از پژوهش‌ها به داروهای تولیدی از *Ganoderma lucidum* (Curtis) P.Kars مربوط می‌شود که در طب سنتی در چین و ژاپن مورد استفاده قرار می‌گرفتند (Jong et al. 1992, Boh et al. 2007, Cor et al. 2018, et al. 2019). بسیاری از گونه‌های این جنس در مناطق نیمه‌گرمسیری و گرمسیری یافت می‌شوند و در شرایط گرم و مرطوب رشد می‌کنند (Pilotti et al. 2004). این قارچ روی بسیاری از درختان مرده و در حال فساد خصوصاً خزان‌دارهایی مانند بلوط، افرا، نارون، ماگنولیا، بید، شاه‌بلوط، سپیدار و غیره قادر به رشد است و در کشورهای شرق آسیا روی درختان جنس *Prunus* رشد می‌کند. *G. lucidum* دارای تنوعی در شش رنگ می‌باشد، اما واریته قرمز به طور گسترده‌ای مورد استفاده قرار گرفته و به صورت تجارتي در آمریکای شمالی، چین، تایوان، ژاپن و کره جنوبی کشت می‌شود (Lai et al. 2004). پژوهش‌ها نشان داده که مهم‌ترین اجزای فعال *G. lucidum*، پلی‌ساکارید و اسید گانودریک می‌باشد (Xu et al. 2008). بازیدیوکارپ، میسلیوم و اسپور این قارچ حاوی حدود ۴۰۰ ترکیب مختلف زیست فعال به همراه پلی‌ساکاریدها، پپتیدوگلیکان‌ها و تری‌ترین‌ها می‌باشد (Wachtel-Galor et al. 2011). این قارچ برای درمان و پیشگیری از فشار خون بالا، قندخون، هپاتیت، برونشیت مزمن، آسم، بیماری‌های قلبی، سرطان، HIV و کاهش روند پیرشدن سلول‌ها مفید است (Zarate-Chaves et al. 2013). بعضی پلی‌ساکاریدهای این قارچ دارای خاصیت ضدالتهابی، ضدباکتری، ضدقارچی و ضدویروسی می‌باشند، که می‌توانند از طریق تخمیر بستر جامد (SSF) و یا تخمیر بستر مایع (SLF) به دست آیند (Wan et al. 2016, Bao et al. 2001, Barbieri et al. 2017). با این حال، بسیاری از محیط‌های تخمیر مصنوعی یا نیمه‌مصنوعی هنوز از لحاظ اقتصادی با هزینه کم در دسترس نیستند. سازوکار رشد قارچ در طبیعت به شدت با چسبیدن نوک قارچ به بستر جامد ارتباط دارد. بدین منظور، مقادیر زیادی از پلی-ساکارید چسبنده قارچ تولید می‌شوند و در نوک سلول‌های ریشه (HypHa) جوان انباشته می‌شوند. برای تولید مقیاس بزرگی از زیست توده (Biomass) این قارچ دارویی و به دست آوردن ترکیبهای دارویی فعال آن، یکی از بهترین فن‌آوری‌ها کشت غوطه‌ور آن است. بسیاری از قارچ‌های دارویی و خوراکی قادر به رشد به شکل زیست توده میسلیوم در کشت غوطه‌ور هستند (Wasser et al. 2000). تولید میسلیوم قارچ‌های ماکرو در کشت غوطه‌ور برای نخستین بار در سال ۱۹۵۰ صورت گرفت. چندین مزیت جهت کشت غوطه‌ور نسبت به کشت جامد برای تولید اسید گانودریک وجود دارد که شامل بهره‌وری بالا، هزینه‌های پایین و آسان بودن تنظیم شرایط مناسب می‌باشد (Hughes et al. 1958). کشت مایع، توان پیشرفت بیشتری برای تولید ترکیبهای ثانویه نسبت به تولید بازیدیوکارپ دارد. تولید بازیدیوکارپ زمان‌بر بوده و نیاز به فضای بیشتری دارد و نیز کنترل شرایط محیطی بسیار مشکل‌تر از روش کشت مایع (غوطه‌ور) می‌باشد. کشت غوطه‌ور توسط تخمیر یک روش جایگزین برای تولید کارآمد ترکیبهای دارویی قارچ است (Fang and Zhong 2002). سوپرمانی و همکاران (Supramani et al. 2019)، به مطالعه بهینه‌سازی تولید زیست توده، اگزوپلی‌ساکارید و پلی‌ساکارید درون‌سلولی با استفاده از پارامترهای pH، غلظت گلوکز و سرعت حرکت در کشت غوطه‌ور *G. lucidum* پرداختند و میزان ۵/۱۲ گرم بر لیتر زیست توده (در شرایط pH=۴/۰۱ و ۳۲/۰۹ گرم بر لیتر گلوکز در ۱۲۰ دور بر دقیقه)، ۲/۴۹ گرم بر لیتر اگزوپلی‌ساکارید (در شرایط pH=۴، غلظت گلوکز ۲۴/۲۵

گرم بر لیتر در ۱۱۰ دور بر دقیقه) و ۱/۲۵ پلی ساکارید درون سلولی (در شرایط pH=۴، غلظت گلوکز ۴۵/۴۳ گرم بر لیتر در ۱۰۳ دور بر دقیقه) را بدست آوردند. نسرين و همکاران (Nasreen et al. 2005) محیط سیب‌زمینی دکستروز با pH=۵ و دمای ۲۵ °C و به دنبال آن محیط عصاره مالت به همراه شیر قند و گلوکز را جهت بهینه‌سازی رشد زیست توده میسلیم قارچ مورد مطالعه قرار دادند و بالاترین عملکرد زیست توده میسلیم را بعد از ۱۵ روز در محیط سیب‌زمینی دکستروز با میزان ۱/۵۹ گرم بر لیتر ۱۰۰ میلی‌لیتر گزارش کردند. پودر زیست توده میسلیم می‌تواند به عنوان فرمول انواع مختلف قرص‌ها و کپسول‌های سلامتی استفاده شود (Chen and Jie 2001). میسلیم قارچ در ضایعات فراوری شده مرکبات، ملاس و ضایعات سولفات و صنایع کاغذ رشد می‌کند (Takashaki 1996). محیط کشتی که میسلیم در آن رشد می‌کند، ممکن است از مواد شیمیایی خالص و بسترهای زیست‌محیطی تصفیه شده ساخته شده باشد. ژو و همکاران (Xu et al. 2008) تاثیر منبع‌های مختلف کربن و نیتروژن را روی رشد میسلیم و تولید اسید گانودریک با استفاده از قارچ *G. lucidum* مورد مطالعه قرار دادند و یافته‌ها آنها حاکی از این بود که گلوکز و پپتون دارای صرفه اقتصادی جهت تولید زیست توده میسلیم هستند و آرد ذرت (۲۰/۹۳ گرم بر لیتر) و پودر سویا (۶/۴۴ گرم بر لیتر) جهت تولید اسید گانودریک نیز مناسب می‌باشند. کشت قارچ با هدف تولید بازیدیوکارپ یک فرایند طولانی‌مدت است، که ظهور بازیدیوکارپ‌ها برای اولین بار بسته به نوع گونه و بستر، یک تا چند ماه طول می‌کشد. درمقابل، رشد قارچ خالص در شرایط غوطه‌ور در محیط کشت مایع، باعث افزایش سرعت رشد و عملکرد زیست توده طی چند روز می‌شود (Wasser et al. 2000). با توجه به دلایل ذکر شده، همواره مطالعه مولفه‌های محیط‌های مختلف و عوامل محیطی برای رشد میسلیم *G. lucidum* ضروری می‌باشد. ضایعات کشاورزی همچون ملاس نیشکر می‌تواند به عنوان یک محیط ارزان و مقرون به صرفه برای تولید زیست توده مورد استفاده قرار گیرد. از آنجا که رشد میسلیم با عوامل محیطی مختلف مانند pH و دما و مواد مغذی در دسترس آن ارتباط دارد، این پژوهش برای بررسی تاثیر pH، دما، غلظت‌های مختلف منبع کربن و منبع نیتروژن مقدار زادمايه بر رشد زیست توده میسلیم جدایه ایرانی این قارچ انجام شد. کشت غوطه‌ور دارای پتانسیل بالایی جهت تولید میسلیم بالا در یک فضای فشرده و در زمان کوتاه با احتمال آلودگی کم می‌باشد، از این رو در این آزمایش از محیط کشت غوطه‌ور حاصل از عصاره ملاس نیشکر استفاده شد.

Materials and Methods

مواد و روش‌ها

جدایه قارچ و آماده‌سازی محیط کشت

تعداد ۱۵ جدایه قارچ *Ganoderma lucidum* از پارک جنگلی نور واقع در استان مازندران جمع‌آوری شد و بعد از شناسایی مولکولی جهت بهینه‌سازی عملکرد زیست توده میسلیم مورد استفاده قرار گرفت. با استفاده از تیغ اسکالپر زیر هود لامینار قطعه کوچکی از بافت قارچ بریده شد و جهت رشد میسلیم روی محیط کشت تجارتي سیب زمینی دکستروز آگار (PDA) در دمای ۲۶ درجه سلسیوس به مدت پنج روز داخل انکوباتور قرار گرفت. در ادامه جهت مایه‌زنی برای محیط کشت غوطه‌ور، محیط دارای میسلیم به مدت دو هفته در دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری شد. محیط کشت مورد استفاده شامل عصاره ملاس نیشکر بود که حاوی ۳۵ درصد ساکارز، ۱۰ درصد قندهای تبدیل شده (گلوکز و فروکتوز)، ۲/۵ درصد سایر کربوهیدرات‌ها، ۴/۳

درصد پروتئین خام، ۰/۰۶ درصد چربی خام، ۹/۶ درصد خاکستر، ۴/۶ درصد نمک، ۲۵ درصد آب و ۸/۹ درصد یون‌های فلزی مانند کلسیم، پتاسیم، سدیم، آهن، منیزیم و مس بود. محیط، در فشار ۱/۴ اتمسفر و دمای ۱۲۱ درجه به مدت ۲۰ دقیقه سترون شد (Kotzamanidis et al. 2002, Roukas 1998).

شناسایی ریختی و مولکولی *Ganoderma lucidum*

در چارچوب مطالعه حاضر، برای ارزیابی اولیه جهت تایید هویت مولکولی قارچ، شناسایی مشخصات ریختی یک روش کلی مفید در نظر گرفته شد. تمام مشخصات ریختی با استفاده از میکروسکوپ نوری تعیین شدند. بخش نازکی از بازیدیوکارب هر نمونه جدا شد و پس از خیساندن در آب، هر اسپور زیر میکروسکوپ نوری الیمپوس مدل BX51 (Olympus BX51, Dic Nomarski, Japan) مطالعه و با استفاده از کلیدهای شناسایی معتبر، گونه آن شناسایی شد (Moradali et al. 2007, Steyaert 1972). مشخصات ریخت‌شناسی میکرو و ماکرو کلاهک و میسلیوم از جمله شکل، رنگ، تراکم، بافت، بدنه میوه، سرعت رشد، مورد مطالعه قرار گرفت. به‌طور کلی، وجود DNA خالص گونه‌های مختلف قارچ به‌منظور انجام مراحل استخراج و کار با PCR ضروری است. استخراج DNA با استفاده از روش CTAB توصیف شده توسط روگر و بندیچ (Roger and Bendich 1985) با اندکی تغییر انجام شد. تکثیر قطعه‌های از DNA، با آغازگرهای اختصاصی GSR: TATCGTACAGGTTCTCGTG و GSF: CCCTAAACCTCTCAAAGTCA و برنامه حرارتی: ۹۴ درجه سلسیوس برای مدت زمان ۵ دقیقه، ۹۴ درجه سلسیوس برای ۳۰ ثانیه، ۵۶ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، ۷۲ درجه سلسیوس برای ۱ دقیقه، ۷۲ درجه سلسیوس برای مدت زمان ۵ دقیقه در ۳۰ چرخه انجام شد. سپس برای مشاهده محصولات واکنش PCR، الکتروفورز با استفاده از ژل آگارز یک درصد انجام شد.

آزمایش اثر متقابل غلظت و نوع منبع‌های نیتروژن بر تولید زیست توده میسلیوم قارچ در ملاس نیشکر

برای مطالعه بهینه‌سازی عملکرد رشد میسلیوم از منبع‌های نیتروژن عصاره مخمر، $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ، پپتون و K_2HPO_4 با غلظت‌های ۰/۲ درصد، ۰/۳ و ۰/۴ درصد استفاده شد و در ادامه هر یک از منبع‌های نیتروژن با غلظت مشخص به ارلن‌های (حجم ۲۵۰ میلی‌لیتر) حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر از محیط کشت عصاره ملاس نیشکر با ۴ تکرار اضافه شدند و با ۳ قرص 5 mm^2 از میسلیوم قارچ تلقیح شدند و در دمای ۲۵ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ روز در ۱۳۰ دوربردقیقه در دستگاه لرزا انکوباتور (Shaker incubator) قرار گرفتند.

آزمایش اثر متقابل غلظت‌ها و نوع منبع‌های کربن بر تولید زیست توده میسلیوم قارچ در ملاس نیشکر

منبع‌های کربن شامل آرابینوز، مالتوز، سلولاز و زایلوز با غلظت‌های ۰/۱ درصد، ۰/۲ و ۰/۳ درصد جهت رشد میسلیوم قارچ مورد استفاده قرار گرفتند. هر یک از منبع‌های کربن با غلظت مشخص به ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت عصاره ملاس نیشکر با ۴ تکرار اضافه شدند و با ۳ قرص 5 mm^2 از میسلیوم قارچ تلقیح شدند و در دمای ۲۵ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ روز در ۱۳۰ دوربردقیقه در دستگاه لرزا انکوباتور قرار گرفتند.

آزمایش اثر pH بر تولید زیست توده میسلیوم قارچ در ملاس نیشکر

pHهای هر ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط عصاره ملاس نیشکر با استفاده از اسید کلریدریک نیم مولار و سود یک مولار در ۴، ۴/۵، ۵، ۵/۵ با چهار تکرار برای هر تیمار تنظیم گردیدند. محیط، با فشار ۱/۴ اتمسفر و دمای ۱۲۰ درجه سلسیوس سترون شدند. بعد از خنک شدن محیط در دمای اتاق ۳ قرص 5 mm^2 از میسلیوم به محیط‌ها تلقیح شد و در دمای ۲۵ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ روز با ۱۳۰ دوربردقیقه در دستگاه لرزا انکوباتور قرار گرفتند.

آزمایش اثر دما بر تولید زیست توده میسلیوم قارچ در ملاس نیشکر

ارلن‌های ۱۰۰ میلی‌لیتری محیط سترون شده عصاره ملاس نیشکر آماده شدند و ۳ قرص 5 mm^2 زادمایه قارچ به هر چهار تکرار آنها اضافه شدند. ارن‌ها در دماهای ۲۵، ۲۸ و ۳۲ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ روز با ۱۳۰ دوربردقیقه در دستگاه لرزا انکوباتور قرار گرفتند.

تأثیر میزان زادمایه اولیه قارچ بر تولید زیست توده میسلیوم قارچ در ملاس نیشکر

ارلن‌های ۱۰۰ میلی‌لیتری محیط سترون شده عصاره ملاس نیشکر ۲، ۳ یا ۴ قرص 5 mm^2 زادمایه قارچ با چهار تکرار برای هر تیمار، اضافه شدند. ارن‌ها در دمای ۲۵ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ روز با ۱۳۰ دوربردقیقه در دستگاه لرزا انکوباتور قرار گرفتند.

برداشت زیست توده میسلیوم قارچ در ملاس نیشکر در هر آزمایش

بعد از ۱۰ روز، محیط کشت حاوی میسلیوم هر محیط به صورت جداگانه توسط کاغذ واتمن فیلتر شد تا یک کاغذ شفاف بدست آید. میسلیوم دو مرتبه با آب مقطر شسته شد و درون آون در دمای ۵۰ درجه سلسیوس در طول شب قرار گرفت تا زمانی که یک وزن خشک ثابت بدست آمد (Feng et al. 2010). وزن خشک میسلیوم با استفاده از ترازوی دیجیتالی و بر حسب میلی‌گرم بر ۱۰۰ میلی‌لیتر ($\text{mg}/100\text{ml}$) اندازه‌گیری و ثبت شد.

داده‌های هر آزمایش با استفاده از نرم‌افزار SPSS 24 در قالب طرح آماری کاملاً تصادفی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون کولموگروف-اسمیرنوف (آزمون K-S یا آزمون KS) مطالعه شدند و همگن بودن واریانس در سطح ۵ درصد با استفاده از آزمون ANOVA یک‌طرفه و با آزمون چند دامنه‌ای دانکن مقایسه شدند.

Results

یافته‌ها

خصوصیات ریختی و مولکولی جدایه قارچ *Ganoderma lucidum*

میسلیوم قارچ سفید رنگ، با رشد خطی متراکم و بافت سفت در حین رشد بود. کلاهک بازیدیوکارب به شکل کلیه‌ای، بی‌پایه یا چسبیده به پایه به شکل مرکزی، بادبزی شکل با اندازه‌های مختلف $15 \times 12/2 \times 3/2$ سانتی‌متر بود. حاشیه کلاهک به رنگ زرد یا سفید بود و در نمونه‌های بالغ قرمز یا قهوه‌ای با سطح کلاهک

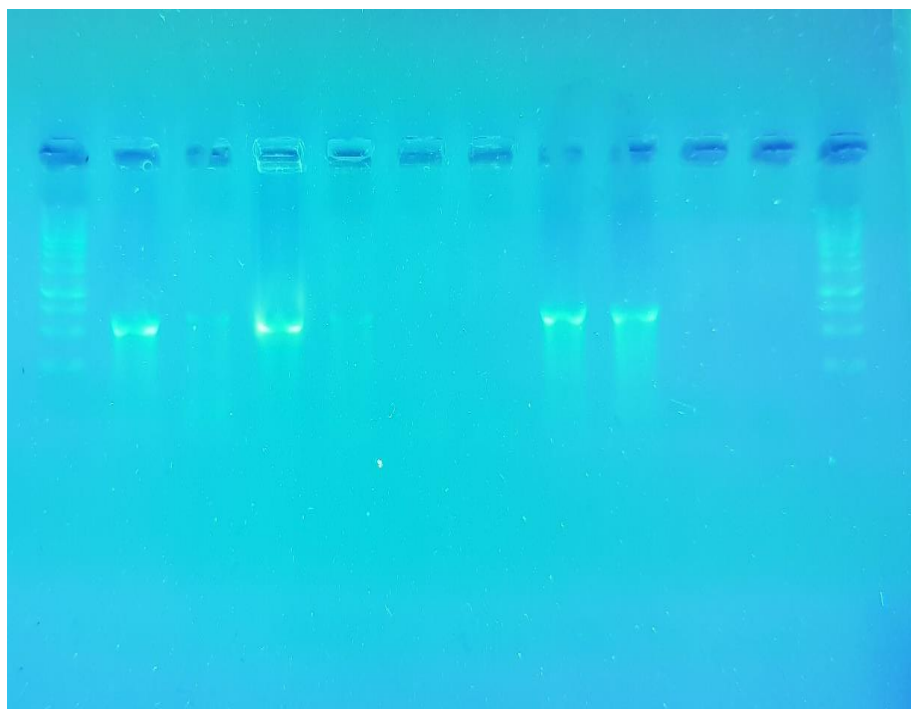


شکل ۱. مشخصات ریختی قارچ *Ganoderma lucidum*: A. بازیدیوکارب، B. بازیدیوسپورها.

Figure 1. Morphological characteristics of *Ganoderma lucidum*: A. Basidiocarp, B. Basidiospores.

براق بود. علاوه بر این بازیدیوسپورها تخم مرغی شکل، دوجداره، بیضی شکل و قهوه‌ای با اندازه ۷-۱۴ × ۵-۱۰ میکرومتر بودند (شکل ۱).

مشخصات این گونه با ویژگی‌های ذکر شده در منابع Güler et al. 2011, Badalyan et al. 2015, Liu et al. 2017, et al. 2014, Keypour et al. 2014 مطابقت داشت. در ادامه بر اساس کارهای مولکولی گونه *Ganoderma lucidum* باند ۵۶۰ bp را تکثیر کرده و شناسایی ریخت شناسی را تایید کرد (شکل ۲).



شکل ۲. شناسایی گونه *Ganoderma lucidum* با استفاده از آغازگرهای اختصاصی GSF و GSR.

Figure 2. Identification of *Ganoderma lucidum* species using GSF and GSR specific primers.

اثر متقابل منبع‌های نیتروژن و غلظت آنها بر وزن خشک میسلیوم تولیدی قارچ در ملاس نیشکر مقایسه میانگین وزن خشک میسلیوم تولیدی در تیمارهای مختلف این آزمایش نشان داد که بین تیمارهای مختلف در سطح احتمال ۵ درصد بین آنها اختلاف معنی‌داری وجود دارد. همانطور که در جدول ۱ مشاهده می‌شود بالاترین وزن خشک میسلیوم در منبع نیتروژن پپتون با غلظت ۰/۳ درصد، ۲۶۵/۵۸ mg/100ml بدست‌آمد در حالی که پایین‌ترین وزن خشک میسلیوم در منبع نیتروژن $Mgso_4.7H_2O$ با غلظت ۰/۲ درصد، ۲۲۱ mg/100ml مشاهده شد.

اثر متقابل منبع‌های کربن و غلظت آنها بر وزن خشک میسلیوم تولیدی قارچ در ملاس نیشکر برای انتخاب بهترین منبع کربن برای رشد میسلیوم منبع‌های مختلف شامل: آرابینوز، مالتوز، سلولاز و زایلوز با غلظت‌های موردنظر به محیط عصاره ملاس نیشکر اضافه شد. همانطور که در جدول ۲ مشاهده می‌شود، اثر متقابل نوع کربن و غلظت بر وزن خشک میسلیوم در سطح احتمال ۵ درصد اختلاف معنی‌داری دارند. بیشترین وزن خشک میسلیوم برابر با ۳۰۸/۵۰ mg/100ml در تیمار حاوی قند مالتوز با غلظت ۲ درصد و کمترین وزن خشک میسلیوم در تیمار قند زایلوز با غلظت ۱ درصد مشاهده شد.

اثر pH و دما بر وزن خشک میسلیوم تولیدی قارچ در ملاس نیشکر حداکثر وزن خشک زیست توده میسلیوم (۳۰۳/۷۵ mg/100ml) در pH=۵ و به دنبال آن pH=۴/۵ دارای وزن خشک زیست توده ۳۰۰/۵ mg/100m می‌باشد. علاوه بر این حداکثر وزن خشک زیست توده میسلیوم با میزان ۲۸۵/۲۵ mg/100ml در دمای ۲۸ درجه سلسیوس در حالی که حداقل وزن خشک زیست توده میسلیوم با میزان ۲۵۸ mg/100ml در دمای ۳۲ سلسیوس مشاهده شد.

جدول ۱. اثر متقابل منبع‌های نیتروژن و غلظت‌های مختلف آنها بر وزن خشک میسلیوم تولیدی *Ganoderma lucidum*.

Table 1. Interaction of nitrogen sources and their different concentrations on dry weight of mycelium produced by *Ganoderma lucidum*.

Nitrogen source	Concentration (%)	Mycelium dry weight (mg/100ml)
Peptone	0.2	244.50 dc
Yeast extract	0.3	264.50 b
$Mgso_4.7H_2O$	0.4	258 b
K_2Hpo_4	0.2	243 dc
Peptone	0.3	292.25 a
Yeast extract	0.4	264.50 b
$Mgso_4.7H_2O$	0.2	221 e
K_2Hpo_4	0.3	262 b
Peptone	0.4	264.50 b
Yeast extract	0.2	239.25 d
$Mgso_4.7H_2O$	0.3	253 c
K_2Hpo_4	0.4	259.75 b

جدول ۲. اثر متقابل منبع‌های کربن و غلظت‌های آنها بر وزن خشک میسلیوم تولیدی *Ganoderma lucidum*.

Table 2. Interaction of carbon sources and their concentrations on dry weight of mycelium produced by *Ganoderma lucidum*.

Carbon source	Concentration (%)	Mycelium dry weight (mg/100ml)
Arabinose	1	248.50 fe
Maltose	2	308.50 a
Cellulase	3	275 c
Xylose	1	246.25 f
Arabinose	2	284.25 b
Maltose	3	287.75 b
Cellulase	1	259.25 d
Xylose	2	260.50 d
Arabinose	3	275.50 c
Maltose	1	258 d
Cellulase	2	273 c
Xylose	3	256 ed

اثر مقدار زاد مایه بر وزن خشک میسلیوم تولیدی قارچ در ملاس نیشکر اندازه بهینه زادمایه قارچ جهت تولید حداکثر وزن خشک میسلیوم به میزان $259/5 \text{ mg}/100\text{ml}$ در ارلن دارای 5 mm^2 قرص ۳ بدست آمد در حالی که کمترین وزن خشک میسلیوم در ارلن دارای ۲ قرص 5 mm^2 به میزان $245 \text{ mg}/100\text{ml}$ مشاهده شد (شکل ۳).



شکل ۳. توده میسلیومی قارچ *Ganoderma leucidum* در محیط ملاس نیشکر به ترتیب از چپ به راست شامل: ۲ قرص، ۳ قرص و ۴ قرص 5mm^2 .

Figure 3. Mycelium mass of *Ganoderma leucidum* in sugar cane molasses medium from left to right, respectively: 2 pieces, 3 pieces and 4 pieces of 5mm^2 .

بحث

Discussion

ملاس نیشکر حاوی عناصر کمیاب و ویتامین‌هایی مانند تیامین، ریبوفلاوین، پیریدوکسین و نیاسینامید می‌باشد که می‌تواند به عنوان منبع فاکتورهای رشد برای تولید زیست توده میسلیومی قارچها استفاده شود (Crueger and Crueger 1984 White 1954). به طور کلی مکمل بستر با افزودنی‌های غنی از نیتروژن باعث افزایش وزن زیست توده میسلیوم می‌شود. اکثر بازیدیومیست‌ها منبعها نیتروژن آلی پیچیده را ترجیح می‌دهند زیرا امکان عدم تولید بعضی از آمینواسیدهای ضروری در منبعها نیتروژن معدنی در محیط کشت غوطه‌ور قارچ‌های ماکرو وجود دارد (Shih et al. 2006). در این آزمایش برای توسعه مناسب کشت غوطه‌ور گانودرما لوسیدم از ۴ منبع نیتروژن استفاده شد. پپتون از مواد پروتئینی تشکیل شده است. اساسا پپتون‌ها حاوی مشتقات پروتئین از جمله پلی‌پپتید، دی‌پپتید و اسیدهای آمینه می‌باشد (Priatni et al. 2017). در پژوهش حاضر بیشترین عملکرد زادمایه از منبع نیتروژن پپتون حاصل شد. علت این نتیجه را می‌توان به این موضوع نسبت داد که پروتئین یک منبع نیتروژن است که از رشد میسلیوم حمایت کرده و باعث تحریک رشد قارچ در دو حالت کشت غوطه‌ور و جامد می‌شود (Feng et al. 2017, Postemsky et al. 2014). ژو و همکاران (Xu et al. 2008) نیز بالاترین وزن زیست توده را در منبع نیتروژن پپتون ($19/21 \pm 0/36 \text{ g/l}$) کسب کردند.

اضافه کردن منابع کربن از جمله گلیسرول و گلوکز در تقویت زادمایه بسیار موثر می‌باشد (Yee 2015). سهم منابع مختلف کربن جهت رشد نه تنها به نوع گونه بستگی دارد بلکه به قابلیت انتقال مناسب مونوساکارید به غشای درون سلول نیز وابسته است (Ozmihci and Kargi 2007). علاوه بر این، در کنار قندها، ملاس چغندر حاوی مقداری ویتامین و مواد معدنی مانند پتاسیم، سدیم و کلسیم است که به افزایش تولید زادمایه کمک می‌کند (Zhang et al. 2015). شه و همکاران (Shah et al. 2018) بالاترین وزن زیست توده میسلیوم قارچ ($307 \pm 3.97 \text{ mg/100 mL}$) را در قند گلوکز با غلظت ۱/۵ درصد بدست آوردند. برای افزایش زیست توده میسلیوم، استفاده کردن از محیط کربن و نیتروژن به جای فرمول‌های مرکب از مواد مصنوعی مناسب‌تر است (Xu et al. 2008). یافته‌های این پژوهش با مطالعه سوپرو و همکاران (Suberu et al. 2013) که بهترین عملکرد زیست توده میسلیوم *G. lucidum* را با قند مالتوز کسب کردند سازگار است. pH محیط روی سطح جذب میسلیوم تاثیر می‌گذارد، زیرا قابلیت استفاده از مواد به شکل محلول را برای جذب تعیین می‌کند (Galli et al. 2003). اساسا مقدار pH بهینه به عوامل مختلفی از جمله نوع جدایه مورد استفاده بستگی دارد (Xu and Yun, 2003). pH ابتدایی تخمیر مایع، یک پارامتر مهم برای رشد میسلیوم است، زیرا ممکن است بر عملکرد غشای سلولی قارچ، مورفولوژی و ساختار سلولی و استفاده از نیازهای تغذیه‌ای مختلف تأثیر بگذارد. گزارش شده است که pH اسیدی برای رشد و تولید زیست توده میسلیوم گونه‌های مختلف آسکومیست‌ها و بازیدیومیست‌ها مناسب‌تر است (Shih et al. 2006). نتیجه آزمایش اثر pH بر وزن خشک میسلیوم تولیدی *Ganoderma lucidum* در مطابقت با گزارش شه و همکاران (۲۰۱۸) می‌باشد که حداکثر وزن خشک زیست توده میسلیوم را به میزان $3/18 \pm 291$ در $\text{pH}=5$ بدست آوردند.

Conclusion

نتیجه گیری

کشت غوطه‌ور دارای پتانسیل بالایی برای افزایش تولید میسلیوم قارچ *G. lucidum* در مدت زمان کوتاه می‌باشد، از همین رو این پژوهش با هدف گزینش بهترین محیط جهت تولید زیست توده میسلیومی این قارچ در شرایط کشت غوطه‌ور در ملاس نیشکر انجام شد. برای کاربردهای اقتصادی و مقرون به صرفه در زمینه تولیدات دارویی، کشت با استفاده از مواد ارزان قیمت نقش به‌سزایی دارد. به علاوه، با توجه به اینکه رشد میسلیوم تحت تاثیر عوامل محیطی مختلف همچون دما و مواد مغذی می‌باشد، تلاش برای بررسی عوامل مختلف که بر رشد زیست توده میسلیوم قارچ اثر می‌گذارد حائز اهمیت است. ضایعات کشاورزی همچون ملاس نیشکر می‌تواند به عنوان یک محیط ارزان و مقرون به صرفه برای تولید زیست توده این قارچ مورد استفاده قرار گیرد. تا کنون گزارش مبنی بر استفاده از محیط ملاس نیشکر برای تولید زیست توده میسلیوم از ایران گزارش نشده است. یافته‌های این پژوهش حاکی از آن است که با بهینه‌سازی شرایط کشت در محیط ملاس نیشکر می‌توان میزان تولید زیست توده قارچ *G. lucidum* را افزایش داد. با توجه به یافته‌ها پژوهش حاضر، علاوه بر ویتامین و مواد معدنی موجود در ملاس نیشکر، اضافه کردن مکمل‌هایی همچون منبع‌های مختلف کربن و نیتروژن باعث افزایش عملکرد در زادمایه این قارچ دارویی می‌شود بدین صورت که بیشترین عملکرد زادمایه در منبع نیتروژن پپتون در غلظت ۰/۳ درصد به میزان ۵ mg/100ml، حداکثر عملکرد در منبع کربن مالتوز در غلظت ۰/۲ درصد به میزان ۵ mg/100ml، ۰/۵ pH، بهینه ۵ (۳۰۰/۵ mg/100ml)، دمای مناسب ۲۸ درجه سلسیوس (۲۸۵/۲ mg/100ml) و ۳ قرص 5mm² بیشترین میزان عملکرد (۲۵۹/۵ mg/100ml) زادمایه را به خود اختصاص دادند.

References

منابع

1. Tavana M, Azizi M, Farsi M, Banesh F (2012) Optimization of medium composition for efficient production of mycelial biomass and extracellular polysaccharides in the submerged culture of *Ganoderma lucidum*. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants 28(3): 423-433.
2. Bao X, Fang J, Li X (2001) Structural characterization and immunomodulating activity of a complex glucan from spores of *Ganoderma lucidum*. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry 65(11):2384-2391.
3. Barbieri A, Quagliariello V, Del Vecchio V, Falco M, Luciano A, Amruthraj N, Arra C (2017) Anticancer and anti-inflammatory properties of *Ganoderma lucidum* extract effects on melanoma and triple-negative breast cancer treatment. Nutrients 9(3):210. <https://doi.org/10.3390/nu9030210>
4. Boh B, Berovic M, Zhang J, Zhi-Bin L (2007) *Ganoderma lucidum* and its pharmaceutically active compounds. Biotechnology Annual Review 13: 265-301.
5. Chen T, Jie Z X (2001) Taurine in the spores and extract powder of log cultivated *Ganoderma lucidum*. Acta Edulis Fungi 8: 45-46.
6. Cör D, Knez Ž, Knez Hrnčič M (2018) Antitumour, antimicrobial, antioxidant and antiacetylcholinesterase effect of *Ganoderma Lucidum* terpenoids and polysaccharides: A review. Molecules 23(3):649.

7. Crueger W, Crueger A (1984) Biotechnology, A Text Book of Industrial Microbiology. Science Tech. Inc., Madison, Wisconsin 180(1):308.
8. Fang Q H, 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):769-774.
9. Feng Y L, Li W Q, Wu, X Q, Cheng J W, Ma S Y (2010) Statistical optimization of media for mycelial growth and exo-polysaccharide production by *Lentinus edodes* and a kinetic model study of two growth morphologies. Biochemical Engineering Journal 49(1):104-112.
10. Hughes D H, Lynch D L, Somers G F (1958) Mushroom analysis, chromatographic identification of the amino acids and carbohydrates in the cultivated mushroom *Agaricus Campestris* L. ex-Fries. Journal of Agricultural and Food Chemistry 6(11):850-853.
11. Jonathan S G, Fasidi I O (2001) Effect of carbon, nitrogen and mineral sources on growth of *Psathyrella atroumbonata* (Pegler), a Nigerian edible mushroom. Food Chemistry 72(4): 479-483.
12. Jong S C, Birmingham J M (1992) Medicinal benefits of the mushroom *Ganoderma lucidum*. Advances in Applied Microbiology. 37: 101-134.
13. Kotzamanidis C H, Roukas T, Skaracis G (2002) Optimization of lactic acid production from beet molasses by *Lactobacillus delbrueckii* NCIMB 8130. World Journal of Microbiology and Biotechnology 18(5): 441-448.
14. Lai T, Gao Y, Zhou S (2004) Global marketing of medicinal Ling Zhi mushroom *Ganoderma lucidum* (W. Curt.: Fr.) Lloyd (*Aphyllophoromycetidae*) products and safety concerns. International Journal of Medicinal Mushrooms 6(2):189-194.
15. Lee B C, Bae J T, Pyo H B, Choe T B, Kim S W, Hwang H J, Yun J W (2004) Submerged culture conditions for the production of mycelial biomass and exopolysaccharides by the edible Basidiomycete *Grifola frondosa*. Enzyme and Microbial Technology 35(5):369-376.
16. Nasreen Z, Kausar T, Nadeem M, Bajwa R (2005) Study of different growth parameters in *Ganoderma lucidum*. Micología Aplicada Internacional 17(1): 5-8.
17. Pilotti C A, Sanderson F R, Aitken E A, Armstrong W (2004) Morphological variation and host range of two *Ganoderma* species from Papua New Guinea. Mycopathologia 158(2): 251-265.
18. Roukas T (1998) Pretreatment of beet molasses to increase pullulan production. Process Biochemistry 33(8): 805-810.
19. Shah Pooja, Modi A (2018) Optimization of Culture Conditions for Biomass Production of *Ganoderma lucidum*. International Journal of Current Microbiology (7)2:1882-1889.
20. Shih L, Pan K, Hsieh C (2006) Influence of nutritional components and oxygen supply on the mycelial growth and bioactive metabolites production in submerged culture of *Antrodia cinnamomea*. Process Biochemistry 41(5):1129-1135.

21. Suberu H A, Lateef A A, Bello I M, Daudu O A Y (2013) Mycelia biomass yield of *Ganoderma lucidum* mushroom by submerged culture. Nigerian Journal of Technological Research 8(2):64-67.
22. Supramani S, Ahmad R, Ilham Z, Annuar M S M, Klaus A, Wan-Mohtar W A A Q (2019) Optimisation of biomass, exopolysaccharide and intracellular polysaccharide production from the mycelium of an identified *Ganoderma lucidum* strain QRS 5120 using response surface methodology. AIMS Microbiology 5(1):19-38.
23. Takashaki M (1996) Studies on bioactive substances and medical effect of Reishi (*Ganoderma lucidum*). Foods and Food Ingredients Journal of Japan 167:69-85.
24. Wachtel-Galor S, Yuen J, Buswell J A, Benzie I F (2011) *Ganoderma lucidum* (Lingzhi or Reishi). In Herbal Medicine Biomolecular and Clinical Aspects. 2nd edition. CRC Press/Taylor and Francis.
25. Wan W A A Q I, Latif N A, Harvey L M, McNeil B (2016) Production of exopolysaccharide by *Ganoderma lucidum* in a repeated-batch fermentation. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology 6:91-101.
26. Wasser S P, Sokolov D, Reshetnikov S V, Timor-Tismenetsky M (2000) Dietary supplements from medicinal mushrooms: diversity of types and variety of regulations. International Journal of Medicinal Mushrooms. 2(1):1-19.
27. White J (1954) Yeast Technology. Chapman and Hall, Ltd., London.
28. Xu P, Ding Z Y, Qian Z, Zhao C X, Zhang K C (2008) Improved production of mycelial biomass and ganoderic acid by submerged culture of *Ganoderma lucidum* SB97 using complex media. Enzyme and Microbial Technology 42(4):325-331.
29. Zárate-Chaves C A, Romero-Rodríguez M C, Niño-Arias F C, Robles-Camargo J, Linares-Linares M, Rodríguez-Bocanegra M X, Gutiérrez-Rojas I (2013) optimizing a culture medium for biomass and phenolic compounds production using *Ganoderma lucidum*. Brazilian Journal of Microbiology 44(1):215-223.
30. Moradali MF, Hedjaroude G-A, Mostafavi H, Abbasi M, Ghods S, Sharifi Tehrani A (2007) The genus *Ganoderma* (Basidiomycota) in Iran. Mycotaxon 99:251-69.
31. Steyaert RL (1972) Species of *Ganoderma* and related genera mainly of the Bogor and Lieden herbaria. Persoonia 7:55-118.
32. Rogers S O, Bendich A J (1985) Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues. Plant Molecular Biology 5(2):69-76.
33. Liu S R, Ke B R, Zhang W R, Liu X R, Wu X P (2017) Breeding of new *Ganoderma lucidum* strains simultaneously rich in polysaccharides and triterpenes by mating basidiospore-derived monokaryons of two commercial cultivars. Scientia Horticulturae 216:58-65.

34. Güler P, Kutluer F, Kunduz İ (2011) Screening to Mycelium Specifications of *Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst (Reishi). Hacettepe Journal of Biology and Chemistry 39(4): 397-401.
35. Badalyan S M, Shnyreva A V, Lotti M, Zambonelli A (2015) Genetic resources and mycelial characteristics of several medicinal polypore mushrooms (Polyporales, Basidiomycetes). International Journal of Medicinal Mushrooms 17(4):371-384.
36. Galli E F D M, Di Mario F, Rapana P, Lorenzoni P, Angelini R (2003) Copper biosorption by *Auricularia polytricha*. Letters in Applied Microbiology. 37(2):133-137.
37. Xu, C P, Yun J W (2003) Optimization of submerged- culture conditions for mycelial growth and exo- biopolymer production by *Auricularia polytricha* (wood ears fungus) using the methods of uniform design and regression analysis. Biotechnology and Applied Biochemistry 38(2):193-199.
38. Feng J, Zhang J S, Feng N, Yan M Q, Yang Y, Jia W, Lin C C (2017) A novel *Ganoderma lucidum* G0119 fermentation strategy for enhanced triterpenes production by statistical process optimization and addition of oleic acid. Engineering in Life Sciences 17(4): 430-439.
39. Postemsky P D, Delmastro S E, Curvetto N R (2014) Effect of edible oils and Cu (II) on the biodegradation of rice by-products by *Ganoderma lucidum* mushroom. International Biodeterioration and Biodegradation 93:25-32.
40. Priatni S, Kosasih W, Budiwati T A, Ratnaningrum D (2017) Production of peptone from boso fish (*Oxyeleotris marmorata*) for bacterial growth medium. In IOP Conference Series: Earth and Environmental Science 60(1):12009.
41. Yee W (2015) Feasibility of various carbon sources and plant materials in enhancing the growth and biomass productivity of the freshwater microalgae *Monoraphidium griffithii* NS16. Bioresource Technology 196:1-8.
42. Ozmihci S, Kargi F (2007) Kinetics of batch ethanol fermentation of cheese-whey powder (CWP) solution as function of substrate and yeast concentrations. Bioresource Technology 98(16): 2978-2984.
43. Zhang Y Y, Bu Y F, Liu J Z (2015) Production of L-ornithine from sucrose and molasses by recombinant *Corynebacterium glutamicum*. Folia Microbiologica 60(5): 393-398.