



## Investigation and Optimization Effects of ultrasound waves to produce Ganoderic acid, anti-cancer mushrooms metabolite

Fahimeh Nojoki<sup>1</sup>, Ashrafalsadat Hatamian-Zarmi<sup>1</sup>, Bahman Ebrahimi Hosseinzadeh<sup>1</sup>, Mohammad Mir-derikvand<sup>1</sup>, Zahra Beygom mokhtari-Hosseini<sup>2</sup>, Said Kalantari-Dehaghi<sup>1</sup>

1. Department of Life Science Engineering, Faculty of New Sciences and Technologies, University of Tehran, Tehran, Iran
2. Department of Chemical Engineering, Faculty of Petroleum and Petrochemical Engineering, Hakim Sabzevari University, Sabzevar, Iran

### Article Information

#### Article history:

Received: 2016/06/03  
Accepted: 2016/09/30  
Available online: 2016/10/17

#### Article Subject:

Microbial Biotechnology

IJMM 2017; 11(1): 58-66

#### Corresponding author at:

Dr. Ashrafalsadat Hatamian-Zarmi

Department of Life Science Engineering, Faculty of New Sciences and Technologies, University of Tehran, Tehran, Iran

Tel: 0982161118503

#### Email:

hatamian\_a@ut.ac.ir

### Abstract

**Background and Aim:** *Ganoderma lucidum* is a main source of ganoderic acid. This metabolite has pharmaceutical effects such as cancer treatment. However, due to low yields and high prices, clinical application is difficult. Stimulants such as elicitor and mechanical shocks can be used to increase the produce of ganoderic acid effectively. This study aimed to investigate the effect of ultrasound on the production of this medicine.

**Materials and Methods:** In this study, a liquid culture of the fungus treated with the once and twice at 20 and 200 seconds of sound with a frequency of 50 kHz and constant output power in ultrasonic bath was investigated. After extraction of ganoderic acid and ensure of positive impact of shock, to optimize variables, response surface methodology was used. In this method, 17 experiments with three variables, the first time ultrasound (4, 5, 6 days), the second ultrasound (7, 8, 9 days) and time of ultrasound (60, 180, 300 seconds) by Design Expert software were designed and done.

**Results:** The results showed that the effects of ultrasound stimulation with twice 274 seconds treatment on days 4 and 7 were established highest ganoderic acid production. By comparing samples with control (without sound) Increase in extracellular ganoderic acid to intracellular ratio was determined. In optimum conditions, 34% increase in GA production relative to the control sample was observed.

**Conclusions:** Ultrasound can be used as a non-chemical and cheap stimulus, increase ganoderic acid production.

**KeyWords:** Ultrasound, *Ganoderma lucidum*, Ganoderic acid, Anticancer metabolite

Copyright © 2017 Iranian Journal of Medical Microbiology. All rights reserved.

### How to cite this article:

Nojoki F, Hatamian-Zarmi A, Ebrahimi Hosseinzadeh B, Mir-derikvand M, Beygom mokhtari-Hosseini Z, Kalantari-Dehaghi S. Investigation and Optimization Effects of ultrasound waves to produce Ganoderic acid, anti-cancer mushrooms metabolite. Iran J Med Microbiol. 2017; 11 (1): 58-66

## بررسی و بهینه‌سازی اثر امواج فراصوت بر تولید گنودریک اسید، متابولیت

### ضد سرطان قارچ *Ganoderma lucidum*

فهیمه نوجوکی<sup>۱</sup>، اشرف‌السادات حاتمیان زارمی<sup>۱</sup>، بهمن ابراهیمی حسین زاده<sup>۱</sup>، محمد میردردریکوند<sup>۱</sup>،  
زهرا بیگم مختاری حسینی<sup>۲</sup>، سعید کلانتری دهقی<sup>۱</sup>

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

۲. گروه مهندسی شیمی، دانشکده مهندسی نفت و پتروشیمی، دانشگاه حکیم سبزواری، سبزوار، ایران

#### چکیده

#### اطلاعات مقاله

**زمینه و اهداف:** قارچ *Ganoderma lucidum* منبع اصلی تولید گنودریک اسید می‌باشد. این متابولیت اثرات دارویی فراوانی همچون درمان سرطان دارد. به علت بازده پایین تولید و قیمت بالا، کاربرد بالینی آن با مشکل مواجه است. محرک‌هایی نظیر الیستورها و شوک‌های مکانیکی می‌توانند تولید گنودریک اسید را افزایش دهند. تحقیق حاضر به مطالعه اثر امواج فراصوت بر تولید این دارو می‌پردازد.

**مواد و روش کار:** ابتدا جهت اطمینان از اثر تحریک‌کنندگی امواج فراصوت بر تولید گنودریک اسید، کشت مایع قارچ تحت تیمارهای یکبار (روز پنجم) و دو بار صوت دهی (روز پنجم و ششم) در زمان‌های ۲۰ و ۲۰۰ ثانیه قرار گرفت. پس از استخراج گنودریک اسید و اطمینان از اثر مثبت شوک، جهت بهینه‌سازی متغیرها از روش پاسخ سطح استفاده گردید. در این روش ۱۷ آزمایش با سه متغیر اولین زمان صوت دهی (روزهای ۴، ۵، ۶)، دومین زمان صوت دهی (روزهای ۷، ۸، ۹) و مدت زمان صوت دهی (۶۰، ۱۸۰، ۳۰۰ ثانیه) توسط نرم‌افزار Design Expert طراحی و انجام شد.

**یافته‌ها:** بررسی نتایج نشان داد اثر امواج فراصوت با دو بار تیمار ۲۷۴ ثانیه‌ای در روزهای ۴ و ۷ می‌تواند بالاترین میزان تولید گنودریک اسید را ایجاد نماید. آزمایش مربوط به این نقطه انجام و نتایج به‌دست‌آمده تأیید شد. با مقایسه نمونه‌های صوت دهی شده با شاهد (فاقد صوت دهی) افزایش گنودریک اسید خارج سلولی به نسبت گنودریک اسید داخل سلولی مشخص گردید. در شرایط بهینه فرآیند، صوت دهی، میزان گنودریک اسید را نسبت به نمونه شاهد ۳۴٪ افزایش داد.

**نتیجه‌گیری:** امواج فراصوت می‌توانند به‌عنوان یک محرک غیر شیمیایی و ارزان‌قیمت، تولید گنودریک اسید را افزایش دهند.

**کلمات کلیدی:** فراصوت، گنودریک اسید، متابولیت ضد سرطان، قارچ دارویی *Ganoderma lucidum*

کپی‌رایت ©: حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله میکروبی شناسی پزشکی ایران محفوظ است.

تاریخچه مقاله  
دریافت: ۱۳۹۵/۰۳/۱۴  
پذیرش: ۱۳۹۵/۰۷/۰۹  
انتشار آنلاین: ۱۳۹۵/۰۷/۲۶  
موضوع:  
بیوتکنولوژی میکروبی

IJMM 1396; 11(1): 58-66

نویسنده مسئول:

دکتر اشرف‌السادات حاتمیان  
زارمی

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

تلفن: ۰۹۸۲۱۶۱۱۸۵۰۳

پست الکترونیک:

hatamian\_a@ut.ac.ir

مقدمه

پلی ساکاریدها و متابولیت‌های ثانویه می‌باشد که هرکدام نقش خاصی در درمان انواع بیماری‌ها دارند (۱). تحقیقات دانشمندان نشان داده است که برخی از این متابولیت‌ها دارای اثرات چشم‌گیری بر القای آپوپتوزیس، مهار متاستاز و به‌طور کل کنترل رشد سلول‌های سرطانی می‌باشند (۳). به‌عنوان مثال گنودریک اسید D، DM، گنودرول B و گنودرمانوتتریول مهم‌ترین

قارچ *Ganoderma lucidum* از معروف‌ترین قارچ‌های دارویی جهان می‌باشد. این قارچ دارای ویژگی‌هایی مانند تقویت سیستم ایمنی، فعالیت ضدویروسی و اثرات ضد توموری است (۱). در طب سنتی چینی از این قارچ برای مبارزه با بیماری‌هایی مانند هیپاتیت، برونشیت، میگرن، فشارخون، التهاب مفاصل، بواسیر، آسم، بی‌اشتهایی، کلسترول بالا، التهاب کلیه و یبوست استفاده می‌شود (۲). قارچ *G. lucidum* حاوی انواع پروتئین‌ها،

### تهیه مایع تلقیح و کشت مایع ایستا

کشت اولیه در محیط YPG به مدت ۵ روز در دمای  $30^{\circ}\text{C}$  و دور  $150\text{rpm}$  انجام شد. سپس ۱ میلی لیتر از کشت اولیه در ۳۰ میلی لیتر محیط کشت تازه تلقیح گردید. نمونه‌ها در شیکر انکوباتور (Heidolph-titramax 1000 ساخت آلمان) با دمای  $30^{\circ}\text{C}$  و دور  $150\text{rpm}$  و در شرایط تاریکی به مدت ۴ روز قرار داده شدند. پس از این مدت کشت‌های مایع به حالت ایستا به مدت ۱۰ روز در انکوباتور قرار داده شد.

### القای تنش مکانیکی

به منظور تعیین اثر تحریک‌کنندگی امواج فراصوت بر تولید گنودریک اسید در روز ۵، صوت دهی نمونه‌ها توسط حمام فراصوت مدل WiseClean (WUC-A06H) ساخت کره جنوبی انجام گرفت. صوت دهی به صورت یک‌بار تکرار و دو بار تکرار با زمان‌های ۲۰ و ۲۰۰ ثانیه انجام شد. به منظور اعمال تیمار دو بار صوت دهی، همان مدت‌زمان در روز ششم تکرار گردید. بیش از دو بار صوت دهی به سلول‌های زنده آسیب وارد کرده و از رشد آن‌ها جلوگیری می‌کند به همین دلیل مقدار میسلیم تولیدی بسیار کمتر خواهد بود که در بازدهی اثر منفی خواهد داشت. از سوی دیگر مهم‌ترین مزیت استفاده از الیسیتورها علاوه بر افزایش تولید دارو، امکان‌پذیری و قیمت تمام‌شده است. تعداد زیاد صوت دهی علاوه بر اینکه در فرمانتور مشکل ایجاد می‌کند، روش مناسبی به نسبت سایر الیسیتورها نمی‌باشد. در تمام موارد مشابهی که از امواج فراصوت به‌عنوان الیسیتور استفاده شده حداکثر دو بار صوت دهی در نظر گرفته شده است (۱۰). توان خروجی دستگاه ثابت و فرکانس امواج ۵۰ کیلوهرتز بود. در مرحله بهینه‌سازی، القای شوک طبق طراحی آزمایش انجام شده در فرکانس ۵۰ کیلوهرتز و با توان ثابت انجام شد.

### استخراج گنودریک اسید داخل سلولی

پس از دوره ۹ روزه کشت، میسلیم‌ها جمع‌آوری و طبق روش Fang و همکاران (۲۰۰۲) گنودریک اسید آن استخراج گردید (۱۱). ۱۰۰ میلی گرم از میسلیم خشک‌شده توسط اتانول ۵۰٪ (v/v) به مدت یک هفته استخراج شد (دو بار). محلول حاصل تحت خلأ و  $50^{\circ}\text{C}$  خشک شد. رسوب باقی‌مانده در آب حل شد و توسط کلروفرم استخراج گردید. گنودریک اسید موجود در کلروفرم توسط ۵٪  $\text{NaHCO}_3$  (w/v) جدا شد. با استفاده از HCl، pH محلول به کمتر از ۳ رسانده شد. گنودریک

متابولیت‌های استخراج‌شده از *G.lucidum* می‌باشند که اثرات ضد سرطان سینه دارند (۴).

گنودریک اسیدها از اهمیت ویژه‌ای برخوردار هستند. در اغلب موارد این متابولیت‌ها قیمت بالا و بازده تولید بسیار پایینی دارند. به همین دلیل تحقیقات فراوانی در خصوص تولید و افزایش بازده این متابولیت‌ها در تمام جهان انجام می‌شود، اما دانشمندان به دلیل کمبود اطلاعات در مورد مسیر بیوسنتز و پرهزینه بودن استخراج و جداسازی متابولیت‌های مختلف با محدودیت‌هایی مواجه هستند (۵). بازده تولید متابولیت‌های دارویی این قارچ تحت تأثیر تنوع عوامل محیطی از جمله محیط کشت، الیسیتورها و پارامترهای فرآیند تخمیر قرار دارد (۶). در سال‌های اخیر تحقیقات زیادی روی شناسایی مسیر بیوسنتز و به‌کارگیری شرایط و عوامل مختلف در افزایش بازده تولید متابولیت‌های دارویی این قارچ انجام شده است (۷). در پژوهش‌های مختلف محققین با بهینه‌سازی شرایط کشت و استفاده از انواع الیسیتورهای شیمیایی و زیستی به تلاش برای تولید هر چه بیشتر متابولیت‌های دارویی پرداخته‌اند. الیسیتورهای شیمیایی (فلزات سنگین، متیل جاسمونات، آسپرین، فنوباربتال، سلولاز و نمک‌ها) و زیستی (عصاره قارچ‌ها و حشرات) از طریق مسیرهای انتقال سیگنالی قارچ را در معرض استرس قرار داده و با به راه انداختن مکانیسم‌های دفاعی قارچ، تولید متابولیت‌های ثانویه را سرعت می‌دهند (۸،۹). علاوه بر این الیسیتورها، تنش‌های مکانیکی مانند امواج فراصوت به‌عنوان یک فن‌آوری نوین غیرحرارتی، محرکی فیزیکی، بی‌خطر و ارزان‌قیمت است که ضمن تحریک سنتز متابولیت‌های ثانویه تأثیرات نامطلوب الیسیتورهای شیمیایی را نیز ندارد (۱۰). بر این اساس هدف از این مطالعه بررسی اثر تنش‌زای امواج فراصوت بر رشد قارچ و تولید گنودریک اسید می‌باشد.

### مواد و روش‌ها

#### کشت قارچ *G.lucidum*

قارچ *G.lucidum* CCGMC 5.616 از بانک میکروبی دانشگاه فردوسی مشهد تهیه شد و در محیط PDA خریداری شده از شرکت Merck آلمان کشت داده و در انکوباتور (IKA-KS 4000 ساخت آلمان) در دمای  $30^{\circ}\text{C}$  به مدت یک هفته نگهداری شد. محیط YPG به منظور کشت مایع ایستا از شرکت Merck آلمان خریداری شد.

معادله رگرسیونی در سطح اطمینان ۹۵ درصدی ( $p < 0.05$ ) مورد بررسی قرار گرفت. برای تحلیل داده‌ها و ترسیم نمودار از نرم‌افزار Design Expert استفاده شد. مقدار بهینه متغیرها برای حداکثر تولید گنودریک اسید، به کمک نرم‌افزار تعیین شد.

جدول ۱: مقدار سطوح مدنظر در آزمایش RSM بر اساس روش BBD

متغیرها	سطح (-۱)	سطح (۰)	سطح (۱)
زمان اولین صوت دهی	۴	۵	۶
زمان دومین صوت دهی	۷	۸	۹
مدت زمان صوت دهی (ثانیه)	۶۰	۱۸۰	۳۰۰

#### یافته‌ها

نتایج آزمایش اولیه برای تعیین اثر تحریک‌کنندگی امواج فراصوت بر تولید گنودریک اسید نشان داد دو بار صوت دهی در روزهای پنجم و ششم و در هر بار ۲۰۰ ثانیه بیشترین تأثیر را در بین سایر شرایط روی تولید گنودریک اسید کل داشته است. این در حالی است که یک بار صوت دهی و همچنین صوت دهی در ۲۰ ثانیه علاوه بر این که در حجم توده زیستی تأثیر چندانی نداشته‌اند بلکه موجب کاهش مقدار گنودریک اسید کل شده‌اند. هرچند مقایسه مقدار گنودریک اسید داخل سلولی و خارج سلولی نشان می‌دهد صوت دهی بر میزان گنودریک اسید خارج سلولی افزوده که این امر نشان‌دهنده خروج گنودریک اسید موجود در سلول بر اثر شوک حاصل از صوت دهی است (جدول ۲).

اسید موجود در لایه  $\text{NaHCO}_3$  توسط کلروفورم استخراج شده و کلروفورم باقی‌مانده توسط تبخیر در  $40^\circ\text{C}$  جداسازی شد. رسوب گنودریک اسید به‌جامانده در اتانول به‌طور کامل حل شد. میزان جذب آن در  $245\text{nm}$  توسط دستگاه اسپکتوفتومتری خوانده شد. با استفاده از نمودار استاندارد تیمول مقدار گنودریک اسید در هر نمونه تعیین گردید (۱۱).

#### استخراج گنودریک اسید خارج سلولی

گنودریک اسید خارج سلولی نیز طبق روش Qiang و همکاران (۲۰۱۱) از محیط سوپرناتانت استخراج گردید؛ در این روش محیط کشت جداشده از میسلیم به نسبت ۱:۴ با اتانول ۹۶٪ مخلوط و سپس توسط کلروفورم استخراج شد. سایر مراحل مشابه استخراج گنودریک اسید درون سلولی می‌باشد (۱۲).

#### طراحی آزمایش و تجزیه و تحلیل آماری

به‌منظور تخمین اثر متغیرهای مستقل زمان صوت دهی اول و دوم و مدت زمان صوت دهی بر میزان تولید گنودریک اسید از روش سطح پاسخ و طرح باکس بنکن استفاده شد. آزمایش RSM طبق جدول شماره ۱ با سه متغیر در سه سطح به روش RSM (Box Behnken Design) به‌وسیله نرم‌افزار Design expert 7.0.0 ساخت شرکت Ease-Stat آمریکا طراحی شد. این نرم‌افزار روزهای ۴، ۵ و ۶ را برای اولین روز صوت دهی، روزهای ۷، ۸ و ۹ را برای دومین روز صوت دهی و ۶۰، ۱۸۰ و ۳۰۰ ثانیه را برای مدت زمان صوت دهی ارائه داد. ۱۷ آزمون با سه بار تکرار مستقل انجام شد. معنادار بودن آماری عبارت‌ها در

جدول ۲: نتایج بررسی اثر صوت دهی بر تولید گنودریک اسید

آزمایش	وزن خشک میسلیم ( $\text{g l}^{-1}$ )	گنودریک اسید خارج سلولی ( $\text{mg g}^{-1}$ )	گنودریک اسید داخل سلولی ( $\text{mg g}^{-1}$ )	گنودریک اسید کل ( $\text{mg g}^{-1}$ )
یک بار صوت دهی	۱۱/۳	۸	۱۱	۱۹
دو بار صوت دهی	۸/۳	۷/۴	۱۸/۴	۲۵/۸
یک بار صوت دهی	۰/۳۳۲	۱۰/۱	۲۱	۳۱/۱
دو بار صوت دهی	۱۱/۰۶	۱۴/۳	۲۴	۳۸/۳
شاهد	۱۱	۵/۲	۱۲/۶	۲۶/۸

شد. یک طراحی آزمایش مطابق روش باکس بنکن برای سه عامل مهم شامل زمان اولین صوت دهی، زمان دومین صوت دهی و مدت زمان لازم برای صوت دهی به هر نمونه در قالب ۱۷ آزمایش با پنج نقطه مرکزی طراحی و آزمایش‌ها مطابق آن انجام شد.

#### تحلیل داده‌های حاصل از بهینه‌سازی شرایط صوت

##### دهی به روش RSM

با توجه به نتایج مرحله قبل، دو بار صوت دهی جهت افزایش تولید گنودریک اسیدها برای بهینه‌سازی شرایط انتخاب

طراحی انجام شده و پاسخ‌های حاصل شامل وزن خشک سلولی، گنودریک اسید کل در جدول ۳ نشان داده شده است. نتیجه‌ها به میزان گنودریک اسید خارج سلولی و داخل سلولی و مقدار کمک نرم‌افزار Design Expert 7.0 آنالیز شد.

جدول ۳: چیدمان طراحی آزمایش باکس بنکن و نتایج به دست آمده

آزمایش	متغیرها		پاسخ‌ها		
	روز اول صوت دهی	روز دوم صوت دهی	C مدت زمان صوت دهی	وزن خشک (g l <sup>-1</sup> )	گنودریک اسید خارج سلولی (mg g <sup>-1</sup> )
۱	۴	۷	۱۸۰	۸/۳	۱۵/۴
۲	۶	۷	۱۸۰	۹/۹	۱۰/۸
۳	۴	۹	۱۸۰	۱۰/۰۳	۶/۵
۴	۶	۹	۱۸۰	۱۰/۳۳	۶/۲
۵	۴	۸	۶۰	۹/۲۶	۲/۸
۶	۶	۸	۶۰	۹/۳۶	۶/۵
۷	۴	۸	۳۰۰	۸/۸۳	۱۰/۷
۸	۶	۸	۳۰۰	۱۰/۰۳	۹/۵
۹	۵	۷	۶۰	۱۰/۲۳	۶/۵
۱۰	۵	۹	۶۰	۱۰/۴۷	۷/۱
۱۱	۵	۷	۳۰۰	۸/۹۷	۱۴/۱
۱۲	۵	۹	۳۰۰	۹/۲۶	۷/۴
۱۳	۵	۸	۱۸۰	۱۰/۰۶	۱۰/۵
۱۴	۵	۸	۱۸۰	۱۰	۱۰/۱
۱۵	۵	۸	۱۸۰	۱۰/۱۳	۱۰/۹
۱۶	۵	۸	۱۸۰	۱۰/۲	۹/۹
۱۷	۵	۸	۱۸۰	۱۰/۱۳	۱۰/۵

متغیرهای مورد مطالعه وجود ندارد. این تحلیل همچنین نشان می‌دهد که توان دوم اولین زمان صوت دهی و مدت زمان صوت دهی از عوامل تأثیرگذار بر مدل پیشنهادی می‌باشند.

طبق تحلیل انجام شده توسط نرم‌افزار بر اساس میزان کل گنودریک اسید تولیدی، دومین زمان صوت دهی و مدت زمان صوت دهی به هر نمونه تأثیر معنی‌داری بر میزان تولید گنودریک اسید داشته است (جدول ۳). طبق این تحلیل برهمکنشی بین

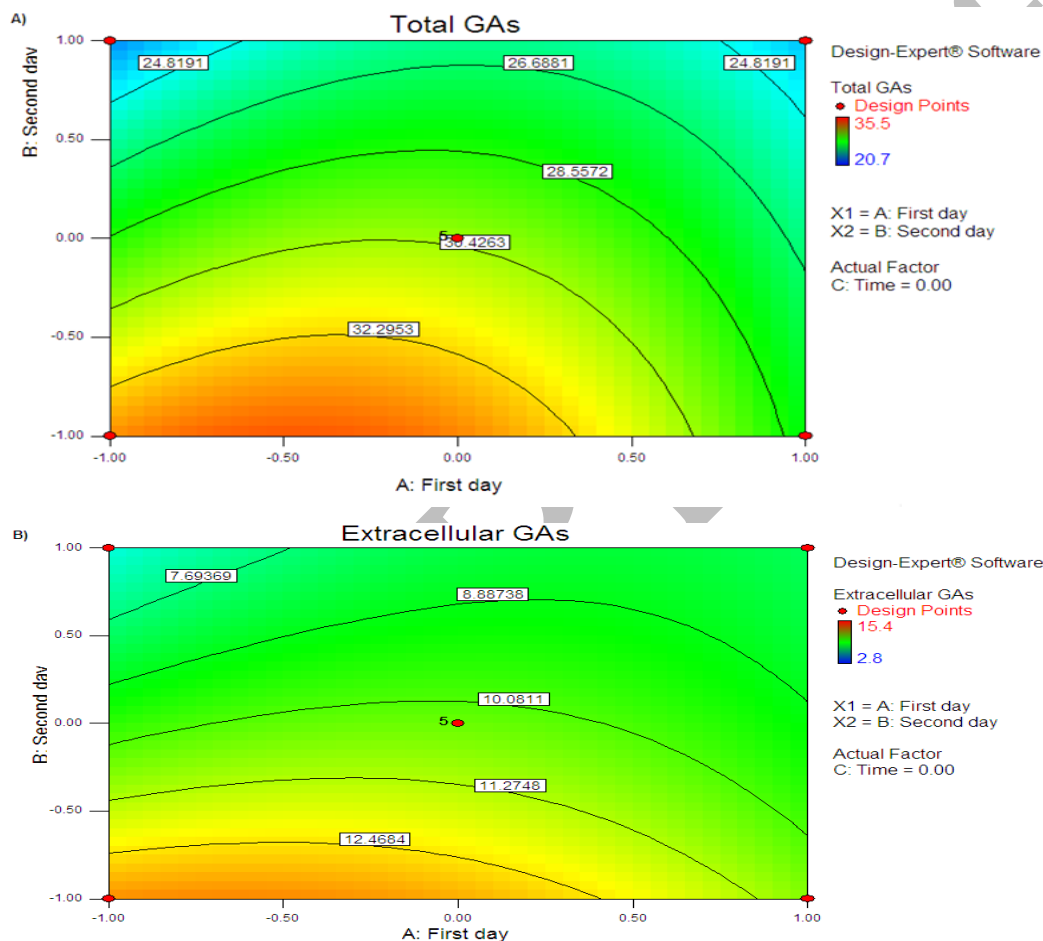
جدول ۴: آنالیز واریانس و ضرایب رگرسیون تخمین زده شده تولید گنودریک اسید کل

عبارت	مجموع مربعات	مربع میانگین	درجه آزادی	F-Value	p-Value
مدل	۳۴۰/۰۳	۳۷/۷۸	۹	۱۱/۳۸	۰/۰۰۲
روز اول صوت دهی (A)	۱۰/۵۸	۱۰/۵۸	۱	۳/۱۹	۰/۱۱۲
(B) روز دوم صوت دهی	۱۰۹/۵۲	۱۰۹/۵۲	۱	۳۲/۹۹	۰/۰۰۰۷
(C) مدت زمان صوت دهی	۱۰۵/۱۲	۱۰۵/۱۲	۱	۳۱/۶۷	۰/۰۰۰۸
(AB)	۹/۳۰	۹/۳۰	۱	۲/۸۰	۰/۱۳
(AC)	۱/۳۲	۱/۳۲	۱	۲/۴۰	۰/۵
(BC)	۱۰/۵۶	۱۰/۵۶	۱	۳/۱۸	۰/۱۱
(A <sup>2</sup> )	۳۳/۰۷	۳۳/۰۷	۱	۹/۹۶	۰/۰۱
(B <sup>2</sup> )	۰/۸۶	۰/۸۶	۱	۰/۲۶	۰/۶۲
(C <sup>2</sup> )	۵۳/۱۴	۵۳/۱۴	۱	۱۶/۰۱	۰/۰۰۴
عدم برازش مدل	۲۲/۱۵	۷/۳۸	۳		
باقیمانده	۲۳/۲۳	۳/۱۹	۷		
خطای خالص	۱/۰۸	۰/۲۷	۴		

تصاویر دو بعدی به دست آمده از مقایسه تأثیر عوامل مختلف نشان می‌دهد که اثر تحریک‌کنندگی امواج فراصوت در تیمارهای دو بار صوت دهی شده در روزهای ابتدایی به مراتب بیشتر از روزهای انتهایی است (شکل ۱).

نرم‌افزار یک مدل رگرسیون غیرخطی برای تولید گنودریک اسید کل بر اساس متغیرهای کد به صورت معادله زیر پیشنهاد نمود:

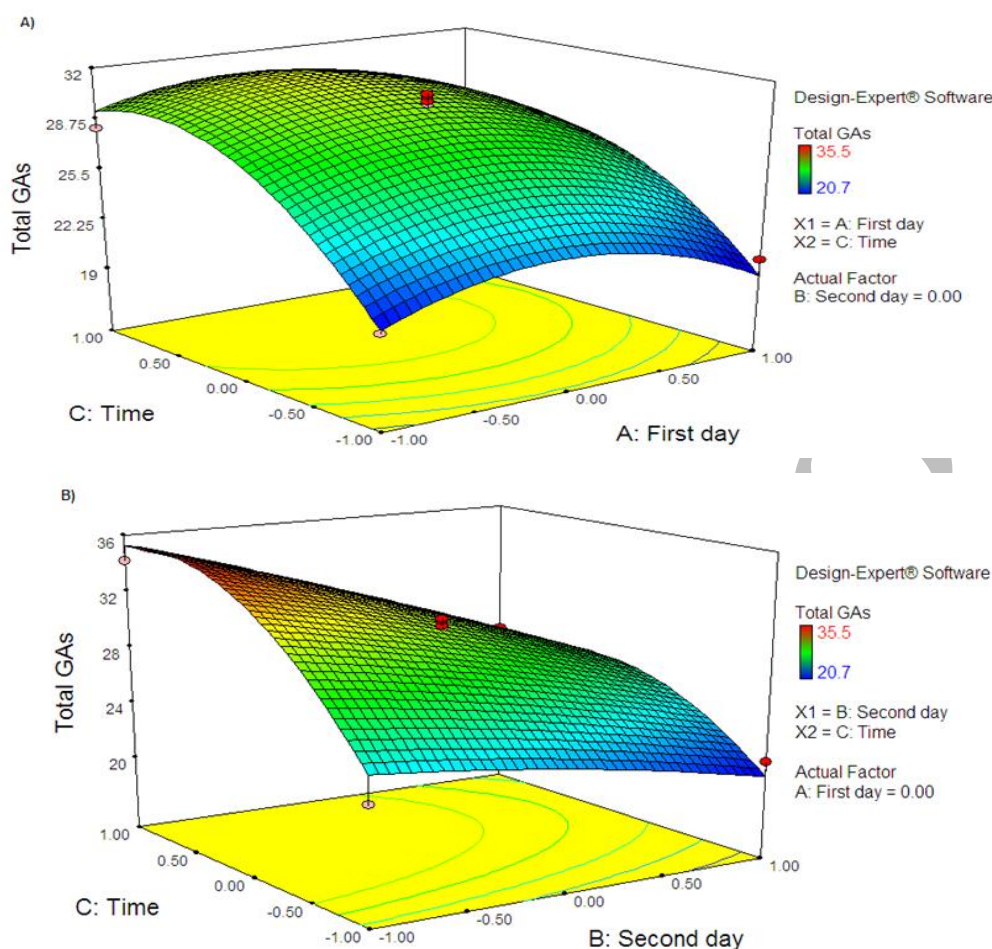
$$\text{Total GAs} = 30.28 - 1.150 A - 3.7 B + 3.6C + 1.53 AB - 0.5750 AC - 1.63 BC - 2.80A^2 - 0.45 B^2 - 3.55 C^2$$



شکل ۱: نمایش دوبعدی تأثیر روز اول صوت دهی و روز دوم بر (A) گنودریک اسید کل و (B) گنودریک اسید خارج سلولی

صوت دهی بعد از ۴ روز و ۱۱ ساعت، زمان دومین صوت دهی پس از ۷ روز و مدت زمان صوت دهی ۲۷۴ ثانیه است. این نرم‌افزار میزان تولید گنودریک اسید در این شرایط را ۳۶/۳ میلی‌گرم در هر گرم توده زیستی اعلام کرد. آزمایش مربوط به نقطه بهینه مجدداً تکرار، و نتایج به دست آمده تأیید شد.

نرم‌افزار Design Expert با استفاده از نتایج ۱۷ آزمایش انجام شده و بررسی اثر مدت زمان صوت دهی بر تولید گنودریک اسید نشان داد دوره‌های صوت دهی ۲۷۰ ثانیه می‌توانند بیشترین تأثیر را برافزایش تولید گنودریک اسید داشته باشند (شکل ۲). شرایط بهینه معرفی شده توسط نرم‌افزار شامل اولین



شکل ۲: نمایش سه بعدی تأثیر مدت زمان صوت دهی و (A) روز اول صوت دهی و (B) روز دوم صوت دهی، بر گنودریک اسید کل

بنابراین به نظر می‌رسد اولاً تولید گنودریک اسید یک پاسخ زیستی به این محرک باشد. از سوی دیگر افزایش گنودریک اسید خارج سلولی نسبت به گنودریک اسید درون سلولی نشان می‌دهد احتمالاً شوک مکانیکی حاصل از امواج فراصوت روی دریچه‌های سلولی قارچ تأثیر گذاشته و موجب خروج بیشتر این متابولیت از سلول‌های قارچ شده است. این موضوع در آزمایش‌های با شوک ۱۸۰ و ۳۰۰ ثانیه به‌وضوح مشخص است (جدول ۳). از سوی دیگر نمونه‌هایی که در متغیرهای A و B روزهای اولیه (-۱) دچار تنش شده‌اند به مراتب گنودریک اسید بیشتری را به درون محیط کشت رها کرده‌اند (شکل ۲).

در این تحقیق نشان داده شد که تولید گنودریک اسید در کشت شاهد ۲۶/۸ میلی‌گرم در هر گرم توده زیستی در کشت‌های تیمار شده با امواج فراصوت تا ۳۶/۳ میلی‌گرم در هر گرم توده زیستی گنودریک اسید می‌باشد. این به معنای ۳۴٪ افزایش در تولید گنودریک اسید کل می‌باشد.

## بحث

بسیاری از متابولیت‌های ثانویه فرآورده نهایی متابولیسم نیتروژن و کربن نیستند و تولید آن‌ها مستلزم رشد و تمایز سلولی نمی‌باشد. به عبارت بهتر متابولیت‌های ثانویه صرفاً در شرایط خاص و برای اهداف خاصی تولید می‌شوند (۱۳). اخیراً استفاده از الیسیتورهای زیستی، غیر زیستی و شیمیایی به‌عنوان محرک‌های فیزیکی و شیمیایی برای تحریک کشت‌های میکروبی و گیاهی به تولید این ترکیبات به‌عنوان یک ابزار قدرتمند در بیوتکنولوژی مطرح گردیده است (۱۴).

در مورد قارچ *G.lucidum* نیز با توجه به ارزش بالا و تولید پایین متابولیت‌های ثانویه این قارچ به‌ویژه خانواده تری تریپنوئیدها، استفاده از الیسیتورهای مختلف رایج است (۱۵). با این‌وجود تاکنون اثر تنش دهنده‌های مکانیکی بر تولید گنودریک اسید بررسی نشده است. در مطالعه حاضر نشان داده شد که امواج فراصوت می‌توانند به‌عنوان محرک در کشت مایع ایستا قارچ *G.lucidum* عمل کنند و تولید گنودریک اسید را تغییر دهند.

نسبت برخی الیستوره‌های شیمیایی مانند ریفامپین بسیار کمتر است (۱۹)، اما نتایج مطالعات نشان داده است که هر الیستور قادر است مقادیر متفاوتی تولید انواع گنودریک اسیدها را افزایش دهد (۲۲). تاکنون بیش از ۵۰ نوع گنودریک اسید شناخته شده است که هرکدام خواص و کاربردهای متفاوتی دارند (۲۳). الیستوره‌های مختلف هرکدام از مسیرهای جداگانه‌ای تولید برخی گنودریک اسیدها را افزایش می‌دهند. درعین حال ممکن است بر تولید برخی گنودریک اسیدها تأثیر منفی داشته باشند. به‌عنوان مثال فنوباربتال به‌عنوان یک الفاکندنده سیتوکروم P450 تنها موجب افزایش گنودریک اسیدهای Me، Mk و S می‌گردد و بر الیستوره‌های ضد سرطان A و T اثر چندانی ندارد (۱۸). آسپرین نیز با اثر بر مسیرهای پیام‌رسانی قارچ و القای آپوپتوزیس، میزان گنودریک اسید ۲۴ را افزایش می‌دهد و شواهدی مبنی بر افزایش سایر اعضای خانواده گنودریک اسیدها تحت تأثیر این الیستور وجود ندارد (۲۱). به همین علت هر الیستوری که افزایش‌دهنده گنودریک اسید باشد، ارزش خاص خود را دارد و با الیستوره‌های دیگر متفاوت است (۱۸، ۲۳). به‌منظور تعیین انواع گنودریک اسیدهای تولید شده در این روش به آزمایش‌های بیشتری احتیاج است که در مطالعات بعدی به آن خواهیم پرداخت.

در این پژوهش اثر تحریک‌کنندگی امواج فراصوت، به‌عنوان یکی از مهم‌ترین الیستوره‌های مکانیکی شناخته شده، به‌منظور افزایش تولید گنودریک اسید مورد ارزیابی قرار گرفت و با کمک روش سطح پاسخ شرایط بهینه فرآیند صوت دهی مشخص شد. بر اساس نتایج به‌دست آمده، امواج فراصوت می‌توانند به‌عنوان یک محرک غیر شیمیایی و ارزان‌قیمت، تولید گنودریک اسید را افزایش دهند.

#### تقدیر و تشکر

این مقاله برگرفته از پایان‌نامه کارشناسی ارشد می‌باشد که بدین‌وسیله از تمام اساتید محترم و دانشجویانی که در آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشکده علوم و فنون نوین دانشگاه تهران ما را یاری نمودند تشکر و قدردانی می‌گردد.

#### تعارض منافع

بین نویسندگان و مجله میکروبی‌شناسی پزشکی ایران هیچ‌گونه تعارض منافی وجود ندارد.

نخستین بار Zhu و همکاران (۲۰۰۸) اثرات تحریکی الیستوره‌های زیستی بر تولید گنودریک اسید را نشان دادند. آن‌ها از عصاره قارچ‌های مختلف برای افزایش تولید گنودریک اسید استفاده کردند و توانستند تا ۱۹٪ میزان گنودریک اسید کل را تحت القای الیستور افزایش دهند (۱۶). در تحقیق Liu و همکاران (۲۰۱۱) با بررسی اثر القای عصاره تعدادی از حشرات بر قارچ *G.lucidum* افزایش ۱۲ درصدی تولید گنودریک اسید کل مشاهده شد (۱۷). ترکیبات شیمیایی نیز از پرترفدارترین الیستورها در کارهای تحقیقاتی هستند. با بررسی اثر فنوباربتال به‌عنوان یک الفاکندنده قوی سیتوکروم P450 بر رشد و تولید متابولیت‌های ثانویه قارچ، توانستند تا ۶۴٪ تولید گنودریک اسید را افزایش دهند. فنوباربتال با اثر بر مسیرهای هیدروکسیلاسیون، اکسیداسیون و دمتیلاسیون تولید بسیاری از متابولیت‌های قارچ *G.lucidum* را تحت تأثیر قرار می‌دهد (۱۸). پس از آن Nojoki و همکاران (۲۰۱۶) توانستند با القای  $100 \mu\text{M}$  ریفامپین به‌عنوان یک الفاکندنده سیتوکروم P450، در روز نهم تا ۷۷٪ تولید گنودریک اسید را افزایش دهند (۱۹). اثر مهارکنندگی متیل جاسمونات بر رشد و بسیاری از فعالیت‌های متابولیکی قارچ توسط Ren و همکاران (۲۰۱۰) بررسی شد. متیل جاسمونات با توقف در رشد سلولی و تقسیم میتوز قارچ را در مرحله G1 متوقف می‌سازد. این در حالی است که باوجود توقف رشد میزان تولید گنودریک اسید تا ۲۸٪ افزایش می‌یابد (۲۰). در چند سال اخیر نیز اثرات مواد شیمیایی فراوانی بر تولید گنودریک اسید بررسی شده است. القای آسپرین توانست تا ۷۲٪ سنتز گنودریک اسید کل را افزایش دهد (۲۱). همچنین Zhang و همکاران (۲۰۱۴) ۷۱٪ افزایش تولید گنودریک اسید را در صورت القای مقادیر مشخصی سلولاز به قارچ گزارش دادند (۸). Heydarian و همکاران (۲۰۱۵) نیز با بررسی اثر هم‌افزایی دو الیستور آسپرین و متیل جاسمونات به افزایش تولید گنودریک اسید دست یافتند (۹). مقایسه پژوهش‌های انجام شده با این مطالعه نشان می‌دهد امواج فراصوت در شرایط زمانی مشخص می‌توانند به‌عنوان یک الیستور مناسب برای افزایش گنودریک اسیدها استفاده شوند. از سوی دیگر استفاده از روش‌های مکانیکی به‌جای روش‌های زیستی و شیمیایی جهت تولید متابولیت‌های ثانویه، به کاهش هزینه‌ها در فاز صنعتی تولید نیز کمک می‌کند. هرچند امواج فراصوت در بهترین شرایط ۳۴٪ تولید گنودریک اسید کل را افزایش می‌دهند و این میزان به



## References

1. Wu GS, Lu J, Guo JJ, Li YB, Tan W. Ganoderic acid DM a natural triterpenoid induces DNA damage G1 cell cycle arrest and apoptosis in human breast cancer cells. *Fitoterapia* 2012; 83(2):408-14.
2. Eo SK, Kim Y, Lee CK, Han S. Antiherpetic activities of various protein bound polysaccharides isolated from *Ganoderma lucidum*. *J Ethnopharmacol* 1999; 68(3):175-81.
3. Johnson B, Doonan B, Radwan F, Haque A. Ganoderic acid DM an alternative agent for the treatment of advanced prostate cancer. *Open Prost Cancer J* 2010; 3(1): 78- 85.
4. Sliva D. *Ganoderma lucidum* in cancer research. *Leuk Res* 2006; 30(7):767-8.
5. Li Y, Liu R, Zhong J. a new ganoderic acid from *Ganoderma lucidum* mycelia and its stability. *Fitoterapia* 2013; 84(1):115-22.
6. Xu P, Ding Z, Qian Z, Zhao C, Zhang C. Improved production of mycelial biomass and ganoderic acid by submerged culture of *Ganoderma lucidum* SB97 using complex media. *Enzyme Microb Technol* 2008; 42(4):325–31.
7. Shi L, Ren A, Mu D, Zhao M. current progress in the study on biosynthesis and regulation of ganoderic acids. *Microbiol Biotechnol* 2010; 88(6):1243-51.
8. Zhang J, Zhong J, Geng A. Improvement of ganoderic acid production by fermentation of *Ganoderma lucidum* with cellulase as an elicitor. *Process Biochem* 2014; 49(10):1580- 6.
9. Heydarian MS, Hatamian AS, Amoabediny G, Yazdian F, Doryab A. Synergistic Effect of Elicitors in Enhancement of Ganoderic Acid Production: Optimization and Gene Expression Studies. *Appl Food Biotechnol* 2015; 2(3):57-62.
10. Lin L, Wu J, Ho K. Ultrasound-induced physiological effects and secondary metabolite (saponin) production in *Panax ginseng* cell cultures. *Ultrasound Med Bio* 2001; 27(8):1147-52.
11. Fang Q, Zhong J. Two-stage culture process for improved production of ganoderic acid by liquid fermentation of higher fungus *Ganoderma lucidum*. *Biotechnol Prog* 2002; 18(1):51-4.
12. Qiang G, Hua-Xi X, Xiao H, Wang X, Zhao Y, Zhang Y, Ren G. Stimulated Production of Triterpenoids of *Ganoderma lucidum* by an Ether Extract from the Medicinal Insect, *Catharsius molossus*, and Identification of the Key Stimulating Active Components. *Appl Biochem Biotechnol* 2011; 165(1):87-97.
13. Ziegenbein F, Hanssen H, Konig K. Secondary metabolites from *Ganoderma lucidum* and *Spongiporus leucomallellus*. *Phytochemistry* 2006; 67(2):202-11.
14. Zhao J, Lawrence C, Verpoorte R. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnol Adv* 2005; 23(4):283-333.
15. Xu Y, Xia X. Induction of ganoderic acid biosynthesis by Mn<sup>2+</sup> in static liquid cultivation of *Ganoderma lucidum*. *Biotechnol Bioeng* 2014; 111(11):2358-65.
16. Zhu L, Zhong J, Tang Y. Significance of fungal elicitors on the production of ganoderic acid and *Ganoderma* polysaccharides by the submerged culture of medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*. *Process Biochem* 2008; 43(1):1359-70.
17. Liu G, Xiao H, Wang X, Zhang G, Ren G. Stimulated Production of Triterpenoids of *Ganoderma lucidum* by an Ether Extract from the Medicinal Insect, *Catharsius molossus*, and Identification of the Key Stimulating Active Components. *Appl Biochem Biotechnol* 2011; 165(1):87-97.
18. Liang C, Li Y, Xu J, Wang J, Miao X, Tang Y. Enhanced biosynthetic gene expressions and production of ganoderic acids in static liquid culture of *Ganoderma lucidum* under phenobarbital induction. *Appl Microbiol Biotechnol* 2010; 86(5):1367-74.
19. Nojoki F, Hatamian AS, Mirderikvand M, Ebrahimi B, Mokhtari ZB, Kalantari S, Esmaeilifar M. Impact of Rifampin Induction on the Fermentation Production of Ganoderic Acids by Medicinal Mushroom *Ganoderma lucidum*. *Appl Food Biotechnol* 2016; 3(2):91-8.
20. Ren A, Qin L, Shi L, Dong X, Mu D, Li X. Methyl jasmonate induces ganoderic acid biosynthesis in the basidiomycetous fungus *Ganoderma lucidum*. *Bioresour Technol* 2010; 101(17): 6785-90.
21. You B, Lee M, Tien N, Lee M, Hsieh H. A Novel Approach to Enhancing Ganoderic Acid Production by *Ganoderma lucidum* Using Apoptosis Inducion. *PLoS One* 2013; 8(1):1-7.
22. Zhu W, Zhong J, Tang Y. Significance of fungal elicitors on the production of ganoderic acid and *Ganoderma* polysaccharides by the submerged culture of medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*. *Process Biochem* 2008; 43(1):1359-70.
23. Xu J, Zhao W, Zhong J. Biotechnological production and application of ganoderic acids. *Appl Microb Biotechnol* 2010; 87(2):457-66.