

Growth Kinetics and Ganoderic Acid Production from *Ganoderma lucidum* GIRAN17: A Real-Time Monitoring Platform

Motaharehsadat Heydarian^{1,2}, Ashrafalsadat Hatamian-Zarmi^{1*}, Ghassem Amoabediny^{2,3}
Bahman Ebrahimi Hoseinzadeh¹, Hale Alvandi¹, Ali Doryab^{1,2}, Amir Salehi⁴

1. Department of Life Science Engineering, Faculty of New Sciences and Technologies, University of Tehran, Tehran, Iran
2. Research Center for New Technologies in Life Science Engineering, University of Tehran, Tehran, Iran
3. Department of Chemical Engineering, Faculty of Engineering, University of Tehran, Tehran, Iran
4. Department of Microbiology, School of Biology, College of Science, University of Tehran, Tehran, Iran

doi [10.30699/ijmm.15.1.67](https://doi.org/10.30699/ijmm.15.1.67)



ABSTRACT

Background: *Ganoderma lucidum* is a traditional medicinal mushroom that has many therapeutic applications. However, the application of this beneficial fungus has been limited due to its secondary metabolite's low production. Many investigations have been carried out to improve the production of *G. lucidum* as well as Ganoderic Acid (GA); however, prior studies suffer from the lack of sufficient monitoring platform. A real-time monitoring study could be useful to find more information through cultivation and evaluating secondary metabolite production.

Materials and Methods: In the current study, aerated shaken flasks (AF) with different culture mediums were used for online measurement of the respiration activity of *G. lucidum* in small scale bioreactors. Then, to find more information through *G. lucidum* growth, four factors, including biomass formation, GA, residual sugar, and gene expression were evaluated on different days.

Results: Online monitoring of cell proliferation demonstrated that GA starts to synthesize in the second growth phase as a partially growth-associated metabolite. High maximum biomass and GA production were obtained at an initial glucose concentration of 35 g/L with vitamin and KH_2PO_4 . During fermentation, the $Y_{\text{O}_2/\text{GA}}$ and $Y_{\text{O}_2/\text{X}}$ the rate of oxygen consumption rate per GA production and biomass formation, respectively, were introduced as beneficial parameters to scale-up the process.

Conclusions: A novel monitoring strategy was suggested which can be beneficial for future investigations.

Keywords: *Ganoderma lucidum*, Monitoring, Growth kinetics, Oxygen transfer rate, Miniaturized bioreactor

Received: 2020/02/29; Accepted: 2020/12/06; Published Online: 2021/01/10

Corresponding Information: Ashrafalsadat Hatamian-Zarmi, Department of Life Science Engineering, Faculty of New Sciences and Technologies, University of Tehran, Tehran, Iran. Email: hatamian_a@ut.ac.ir



Copyright © 2021. This is an original open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-noncommercial 4.0 International License which permits copy and redistribution of the material just in noncommercial usages with proper citation.

Use your device to scan and read the article online



Heydarian M, Hatamian-Zarmi A, Amoabediny G, Ebrahimi-Hosseinzadeh B, Alvandi H, Doryab A et al . Growth Kinetics and Ganoderic Acid Production from *Ganoderma lucidum* GIRAN17: A Real-Time Monitoring Platform. Iran J Med Microbiol. 2021; 15 (1) :67-84

Download citation: [BibTeX](#) | [RIS](#) | [EndNote](#) | [Medlars](#) | [ProCite](#) | [Reference Manager](#) | [RefWorks](#)

Send citation to:  [Mendeley](#)  [Zotero](#)  [RefWorks](#)

Introduction

Ganoderma lucidum is widely used in Asia to treat health problems and increase vitality and longevity. These mushrooms offer various health benefits,

including immunomodulatory, antitumor, antibacterial, antiviral, anti-diabetic, and anti-oxidant properties [1, 2]. Ganoderic Acid (GA) is a type of

triterpenoids produced by *G. lucidum* and is considered a secondary metabolite [3]. Some GAs can inhibit cholesterol synthesis and tumor growth, which can effectively cure cancer [4, 5]. However, due to the low efficacy of GA production from *G. lucidum*, these useful metabolite applications have been limited.

Therefore, investigations are growing to enhance the GA biosynthesis' efficiency by evaluating diverse conditions, in desired parameters such as pH, oxygen pressure and shear stress [6-8]. Furthermore, several studies have been performed to find suitable culture media for optimizing the production of mycelial biomass and secondary metabolite. Although available studies suggests that the more complex media are superior in cell growth and production of secondary metabolites compared to other media, such as semi-synthetic [9], further research is needed to improve the efficacy of production. It has also been reported that the biomass and secondary metabolite yields are increased by improving the oxygen supply [10, 11]. On the other hand, before scale-up studies, the traditional cultivation process has required the screening of large numbers of samples, and consequently, a vast number of development cultivations should be performed. So far, many investigations have been done to enhance *G. lucidum* production; however, in all of these studies, the lack of an efficient monitoring system is apparent. In fact, we can find useful information through the cultivation and obtain the necessary data for process development by monitoring the procedure. Several small-scale platforms have been developed for high throughput screening and process development.

Nevertheless, one of the most efficient and useful platforms is miniaturized bioreactors. They are widely used as tools for drug screening and discovery, optimization of media, strain, and production [12]. Miniaturized shaken bioreactor systems are also applied to measure the Oxygen Transfer Rate (OTR) during fermentation. OTR is an essential factor in obtaining more data by culturing the strains [13].

In the present work, for the first time, online and offline monitoring using miniaturized bioreactors was used for *G. lucidum* production concurrently as well as GA biosynthesis. Many different media were used in earlier studies; however, we tried to evaluate their different components in this study.

Moreover we examined the effects of these media on the growth of *G. lucidum*, level of oxygen consumption, and GA production. In practice, *G. lucidum* and secondary metabolite production's growth behavior using a miniaturized shaken bioreactor system suggested the best culture medium for maximal production of GA. These data are so

beneficial to find a better idea to increase *G. lucidum* yields, and it would suggest solutions for challenges.

Materials and Methods

Strains and Cultural Conditions

G. lucidum (Sp. GIRAN17) was obtained from bioscience faculty, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran. It has been screened from *Carpinus betulus* L. (Corylaceae) from Mazandaran, Iran [14, 15]. The strain of *G. lucidum* was cultured on potato dextrose agar (PDA) plates according to prior study [16]. The optimum conditions for this fungus growth were temperature (25°C), aeration (130 rpm), and initial pH (6.5). Due to the effect of media pH on the stability of GA production and cell growth, the pH of media was kept constant during cultivation.

Studies show that high concentrations of primary glucose lead to increased biomass production and GA biosynthesis [17]. Adding vitamin B1 to the culture medium also increases productivity [18]. The aerated shaken flasks (online) and ventilation flasks (offline) included 20 mL broth culture [15, 17]. Four broth culture media were chosen to evaluate the growth kinetics of *G. lucidum* (Table 1), and inoculum size was 10% v/v for each broth flasks. In addition to online monitoring of the OTR during cultivation, we performed offline monitoring to measure biomass formation, residual sugar, and GA production using parallel flasks in given intervals during the fermentation time course. All the conditions of the online and offline flasks for each broth culture were kept constant.

The Miniaturized Shaken Bioreactor System

For online measurement of the respiration activity of *G. lucidum* in small scales bioreactors, aerated shaken flasks (AF) were used (Figure 1A). In this modified 250 ml Erlenmeyer flasks, all of the conditions except the culture medium were the same [19]. Each AF contained a different culture medium: AF₁ contained PDB (basal medium), AF₂ contained PDB and vitamin B₁, AF₃ contained YPG, and AF₄ contained complex media (Table 1). Briefly, on-line monitoring based on OTR was performed and the partial pressures were monitored using an oxygen sensor. The OTR was calculated by the following equation:

$$OTR = \frac{\Delta pO_2}{\Delta t} \frac{V_G}{RTV_L} \quad \text{Equation 1}$$

Where ΔpO_2 is a difference of oxygen partial pressure (Pa), V_G is the gas volume (L), V_L is the liquid volume (L), R is gas constant (L.Pa/K.mol), T is the temperature (K), and Δt is the time of the measuring phase (h).

Table 1. Operating conditions of aerated shaken flasks

Flask Number (AF and VF)	Culture medium	Working volume (mL)	Gas volume (mL)	Flask volume (mL)	Flow rate (L/h)
1	Potato dextrose broth (PDB)	20	240	260	1.2
2	PDB+ 0.05 g/L vitamin B ₁	20	240	260	1.2
3	Yeast extract 2.5 g/L, peptone 5 g/L and glucose 35 g/L (YPG).	20	240	260	1.2
4	Complex media (glucose 35 g/L, peptone 5 g/L, yeast extract 2.5 g/L, KH ₂ PO ₄ ·H ₂ O 1 g/L, MgSO ₄ ·7H ₂ O 0.5 g/L, and vitamin B1 0.05 g/L)	20	240	260	1.2
VF ₁ , VF ₂ , VF ₃ and VF ₄ : offline monitoring		AF ₁ , AF ₂ , AF ₃ and AF ₄ : online monitoring			

250 mL Erlenmeyer shake flasks, called ventilation flasks (VF), were also cultivated simultaneously under the same condition as used in the aerated shaken flasks system [20]. There are several VFs that have different gas transfer resistance of the sterile closure as described and modeled [21]. Since the aeration value of online monitoring flasks or AF is 1.2 vvm, VF type (diameter, D=2.80 cm; height, H= 2.12 cm) was used for offline monitoring which has the same aeration value as AFs (Figure 1). Equations 2 and 3 relate the Oxygen Transfer Rate of the plug (OTR_{plug}) and the gas transfer coefficient (k_{plug}) in VF where V_L is the filling volume, P_{abs} is the absolute pressure, P_{O_2} is oxygen partial pressure in headspace of the flask, $P_{O_2,out}$ is oxygen partial pressure in the surrounding

environment and a, b and c are fitting parameters (dimensionless) of Eq.3.

$$OTR_{plug} = k_{plug} \cdot (1/V_L \cdot p_{abs}) \cdot (p_{O_2,out} - p_{O_2})$$

Equation 2

$$k_{plug} = \frac{a \cdot OTR_{plug}}{b + OTR_{plug} + \frac{OTR_{plug}^2}{c}} \quad \text{Equation 3}$$

for VF type 1; a : 22.4×10^6 , b: 6.95×10^3 , c: 19.97 [21]

Therefore, to find more information through *G. lucidum* growth, four factors, including biomass formation, GA, residual sugar, and gene expression were evaluated on days 0, 2, 4, 6, 8, 9, 11, 13, and 14 by 35 pcs of VFs. Each run was performed at 130 rpm and the temperature was set at 25°C for fourteen days.

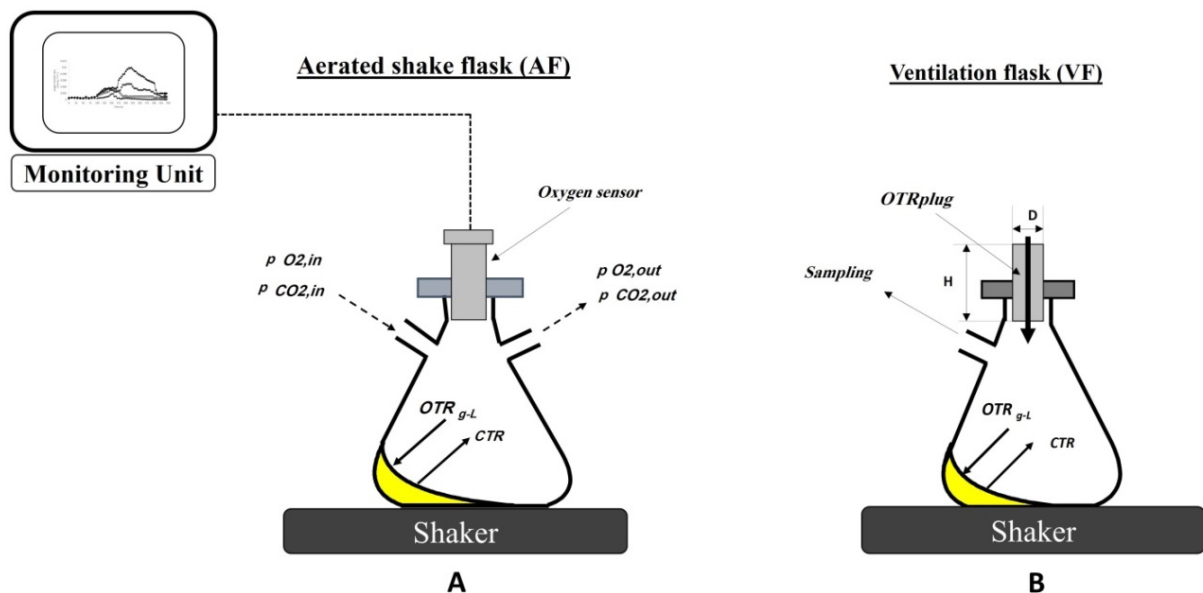


Figure 1. Miniaturized shaken bioreactor system. (A) Schematic drawing of gas transfer in an aerated flask (AF), (B) ventilation flask (VF) with sterile closures as offline technique which used in this research.

Determining dry biomass, residual sugar, specific growth rate, specific GA production rate, and oxygen uptake

As mentioned earlier, an offline monitoring flask or ventilation flask was used to measure four parameters namely dry biomass, GA, residual sugar, and gene expression. The selected ventilation flasks have the same aeration value (1.2 vvm) as the aerated flask used in online monitoring. Mycelium was isolated from liquid media by centrifugation and was dried by a freeze dryer (Alpha 1–2 LD Plus, Christ, Germany) to measure dry cell weight. Residual sugar concentration was also measured by the phenol–sulfuric acid method [18]. The average specific growth rate (μ) and the specific GA production rate (q_{GA}) were obtained from the following equations:

$$\mu = \frac{\ln\left(\frac{\text{Final biomass}}{\text{Initial biomass}}\right)}{\text{fermentation time}} \quad \text{Equation 4}$$

$$q_{GA} = \frac{1}{X} \frac{dP}{dt} \quad \text{Equation 5}$$

When X is cell concentration. Oxygen consumption during cultivation was also determined by the integration of the OTR profile as follows:

$$\text{Oxygen uptake} = \int_0^t \text{OTR} \cdot dt \quad \text{Equation 6}$$

Assay of Ganoderic Acid

According to literature [18], GA was extracted after obtaining dried mycelium. Briefly, to extract GA, 100 mg of dried biomass is added to ethanol 50% (v/v) twice for one week, and then biomass was isolated by centrifugation (25 min, 12,000g). Additionally, the supernatants were dried at 50°C under vacuum conditions, and the residue was dissolved in a few milliliters of water besides extracting the aqueous solution with 2 mL of chloroform. The GA extraction from chloroform is performed with 5% NaHCO₃ (w/v) and the pH of the solution is adjusted by the addition of hydrochloric acid (below 3). GA residues were then extracted by chloroform and in the next step, the remaining chloroform was evaporated at 40°C. The GA content was dissolved in absolute ethanol and measured at 245 nm in a spectrophotometer (T80, PG Instruments Limited, London) as standard [22].

RNA Isolation and Quantitative real-time PCR

A 0.1g Aliquot of mycelium was separated from the culture medium and frozen by liquid nitrogen. Total RNA was extracted by RNX plus (Sinacolon, Iran). cDNA synthesis was performed by a synthesizing kit (Amplicon, Denmark). The random primer was used for cDNA synthesis. Then, transcript levels of *hmgr* and *sqs* were determined by quantitative real-time PCR using SYBR Green (Applied biosystem, USA). The 2^{-ΔΔ}

CT method was employed to analyze relative gene expression [23]. 18srRNA primer was used as an internal control and to normalize the data for the gene expression. The sequences of the *hmgr* and *sqs* primers have been described in the literature. The primers sequences were as follows: *hmgr* forward: 5'-GTCATCCTCCTATGCCAAAC-3', *hmgr* reverse: 5'-GGGCGTAGTCGTCGTCCTTC-3', *sqs* forward: 5'-ACAGTTGTCAGCGAAGAGC-3', *sqs* reverse: 5'-CGTAGTGGCAGTAGAGGTTG-3', 18S rRNA forward: 5'-TATCGAGTTCTGACTGGGTTGT-3', 18S rRNA reverse: 5'-ATCCGTTGCTGAAAGTTGTAT-3' [24, 10].

The expression level 1 was selected for samples for the PDB culture and fold changes were done in comparison with it. An initial denaturation stage were at 95°C for 5 min, the amplification conditions were in a three-step procedure: 30s at 94°C (denaturation), 30 s at 56°C (annealing), and 30 s at 72°C (extension) followed by 40 cycles.

Statistical analysis

Experimental results were analyzed statistically using Student's t-test (S). All runs were carried out in triplicate. A probability (p) value of less than 0.05 (P<0.05) was taken as the level of significance.

Results

Online monitoring

Miniaturized shaken bioreactor system provides a rich source of data by studying the OTR profile in each fermentation period, such as physiological responses of aerobic microorganisms to specific culture conditions, inhibition of the product, diauxic growth, and other biological phenomena. The OTR evolutions of AF₁, AF₂, AF₃, and AF₄ during the cultivation of *G. lucidum* are shown in Figure 2. At first, in the first 100 hr of cultivation, no fundamental changes were detected. The OTR for AF₁ and AF₂ achieved their maximal values of 2 and 3.2 mmol/Lh at 150 hr and 160 hr, respectively. Although by culturing under AF₁ and AF₂ the growth behavior of *G. lucidum* was the same, the maximal OTR of AF₂ was more than that of AF₁, which can be attributed to vitamin B₁. By analyzing the AF₃ OTR profile, we found that two maximal values of 3.5 and 4.9 mmol/Lh occurred at 140 hr and 210 hr, respectively. Furthermore, with fermentation in complex media (AF₄), maximal values of 3.8 and 10 mmol/Lh occurred at 155 hr and 220 hr, respectively.

The OTR evaluation results also indicated that with culturing in AF₁ and AF₂, the OTR curve sloped downward after achieving their maximum value.

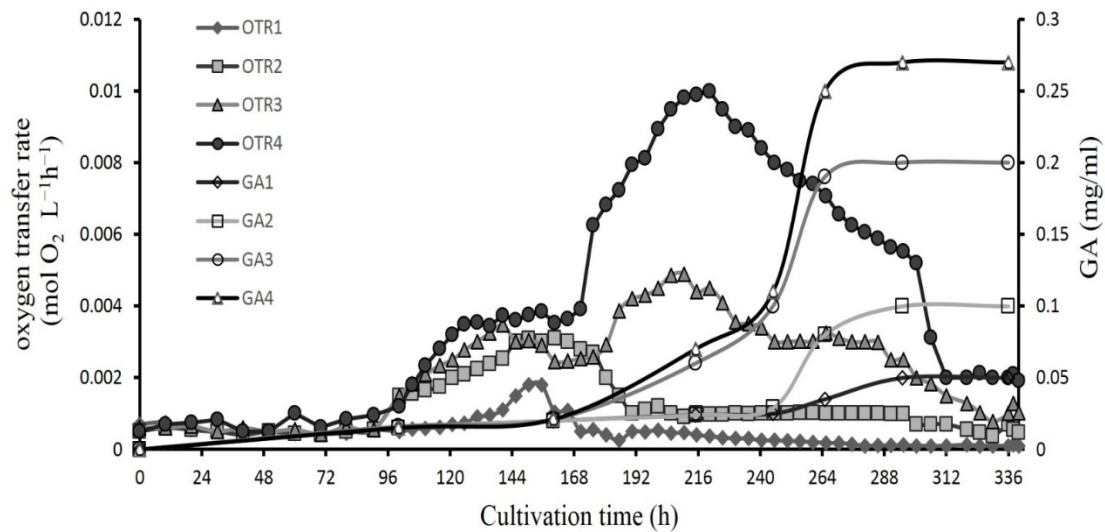


Figure 2. Evolution of oxygen transfer rate, expressed in mol/L/h using aerated shake flask (AF) and GA production expressed in mg/mL using ventilation flask (VF) during culturing of *G. lucidum* with different media culture; AF₁ and VF₁: PDB; AF₂ and VF₂: PDB + vitamin B₃; AF₃ and VF₃: YPG; AF₄ and VF₄: complex medium (n=3).

Offline Monitoring

Cultivation of *G. lucidum* using offline monitoring was also carried out to examine the biomass formation, GA biosynthesis, residual sugar, and gene expression during certain times. The combination of an offline and online monitoring can be beneficial for kinetic analysis of biomass formation and GA production.

Figure 3 shows the biomass production of *G. lucidum* during cultivation. After 48 hr, the biomass formation increased under VF₁-VF₄, and the maximum cell concentration was achieved after 192 hr. Then, the biomass almost remained constant until the end of the period despite the corresponding depletion of sugar concentration. During cultivation, a lag phase of two-day was considered for all the flasks. It is also observed that the culturing of *G. lucidum* under VF₄ yielded the maximum biomass (18.5 g DW/L) compared to other flasks. The maximum biomass accumulation under VF₃, VF₂, and VF₁ were 15.25, 12.25, and 11.25 g DW/L, respectively. Evaluation of the total cell concentration during fermentation demonstrated that biomass production in a more complex broth culture (VF₄) was 1.6-times higher than that in the basal medium (VF₁). The sugar consumption profiles in all flasks have the same permanent declining trend. Further analysis shows

that on the thirteenth day, residual sugar was almost depleted for all cases. Moreover, more complex media (flasks 3-4) that contain richer carbon sources experienced higher cell growth than less complex ones (flasks 1-2).

GA production analysis demonstrated that GA was produced after 144 h in all flasks and then by the rest of culturing this substance was accumulated continuously (Figure 2). Maximum GA production of VF₄ was obtained equal to 270 mg/L 4 times more than the VF₁.

Further analysis demonstrated that by culturing *G. lucidum* under different media (flasks 1-4), gene expression of *hmgr* and *sqs* had been experienced a sharp increase after 96 hr (Figure 4), which coincides with the starting of GA biosynthesis (Figure 2). For more complex media (flasks 3-4), another increase is observed after 192 hr. Also, gene expression of *hmgr* and *sqs* at the end of cultivation were 1.45- and 2-times higher than their initial value at beginning of culturing, respectively. The final gene expression analysis under different culture media demonstrated this parameter was increased 1.25 and 1.81 times in VF₃, and 1.2 and 1.6 times in VF₂ for *hmgr* and *sqs*, respectively. In all cases, the gene expression of *sqs* was higher than that of *hmgr*.

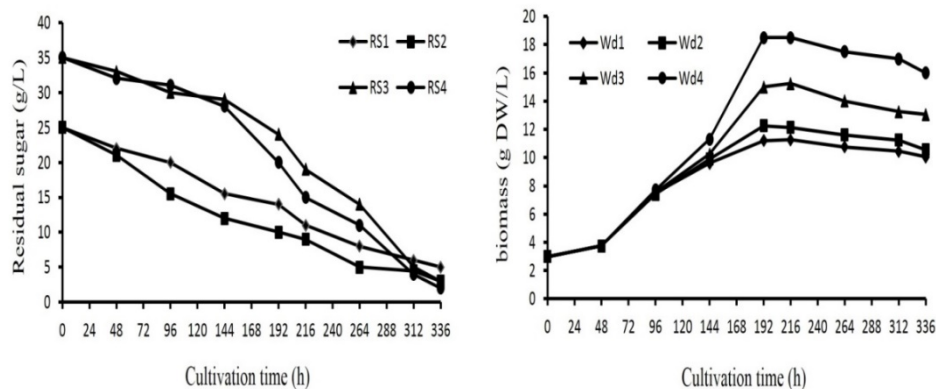


Figure 3. Monitoring of residual sugar and biomass formation expressed in g/L and g DW/L, respectively using ventilation flasks (VF) during culturing of *G. lucidum* with different media culture (n=3).

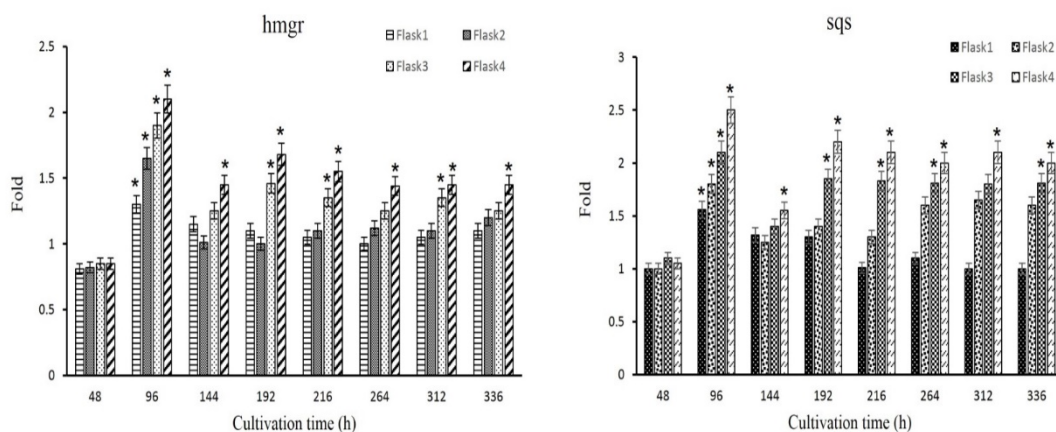


Figure 4. Comparison analysis of gene expression of *hmgr* and *sqs* in flasks 1-4 (*indicates $P < 0.05$ compared to PDB culture).

DISCUSSION

Kinetic Analysis of Biomass Formation and GA Production

The kinetic profiles of the mycelial growth and the GA accumulation of *G. lucidum* in the miniaturized shaken bioreactor systems in addition to residual sugar and gene expression were monitored and shown in four different media simultaneously.

According to the OTR profile of AFs through fermentation, the oxygen consumption for AF₄, AF₃, AF₂, and AF₁ were calculated to equal with 1.47, 0.76, 0.40, and 0.17 mol/L, respectively. It is concluded that the oxygen consumption of AF₄ including more complex media is 8.6-fold higher than that of AF₁ as a basal broth culture. Residual sugar analysis suggested that reducing in OTR values can be attributed to the depletion of carbon sources from media cultivation.

Measuring the average specific growth rate (μ) indicated that the μ for VF₄, VF₃, VF₂, and VF₁, was 0.237, 0.211, 0.190, and 0.175 d⁻¹, respectively.

Culturing under VF₄ was approximately 1.4-times higher in growth compared to VF₁.

With culturing by a more complex carbon medium (flask 4), the specific cell growth rate (μ) achieved two maximal values of 0.276 d⁻¹ and 0.247 d⁻¹ at 6 d and 8 d respectively. Moreover, culturing by using more than one carbon source (flask 3) the specific cell growth rate (μ) of VF₄ obtained two maximal values equal to 0.252 d⁻¹ and 0.190 d⁻¹ at the same time. However, with fermentation under VF₂ and VF₁ (basal medium), the specific cell growth rate (μ) achieved maximal value of 0.190 d⁻¹ and 0.175 d⁻¹ at 8 d. At maximum GA production, the growth curve can be divided into two phases: growth and production. Each phase has a specific growth rate (μ).

Also, by cultivation under VF₄, the maximal specific GA production rate (q_{GA}) was obtained 1.84×10^{-3} (g GA. g/DW.h), which was almost 2.8-times higher than VF₁ 0.65×10^{-3} (g GA. g/DW.h). Consequently, compared to VF₂ and VF₁, the growth rate of VF₄ and

VF₃ sharply increased, and the main GA was produced between 144-216 h.

Transcript levels of *hmgr* and *sqs* indicated that the maximum gene expression is accessible when GA starts to produce and after that, they have a steady trend, until the end of fermentation. Furthermore, more gene expression levels of flasks 3-4 can be attributed to enhancing in GA production.

Table 2 presents the growth behavior of *G. lucidum* in flask 4 during fermentation. The critical time courses are highlighted. It seems that the interval between hours 134 and 312 when the changes of biomass and GA production coincided with the OTR evolution, was the crucial time for *G. lucidum*. Therefore, this interval is suggested as the critical time for *G. lucidum* growth.

Table 2. Growth behavior of *G. lucidum* under AF₄ and VF₄

Time range (h) Monitoring		0-96	96-134	134-168	168-216	216-312	312-336
AF (online)	OTR (mmol/Lh)	0	increase up to 3.5	constant 3.5	increase up to 10 OTR _{max} : 10	decrease to 2	constant 2
		→	↑	→	↑	↓	→
VF (offline)	biomass (g DW/L)	increase up to 11.3 μ_1 : 0.276 (d ⁻¹)		increase up to μ_2 : 0.247 (d ⁻¹)		almost constant	
		↑		↑		→	
	GA (mg/L)	almost no production		increase up to 270		constant	
		---		↑		→	
	Residual sugar (g/L)	almost steady depletion		main sugar consumed		almost exhausted	
		→		↓		↓	

The Yield of Oxygen Consumption per GA Production, Biomass Formation, and Productivity

As shown in Figures 2 and 3, the ratio of biomass per GA production rose in 216 initial hours; however, it reached its lowest value afterward. Further, between hours 216 and 312 of fermentation, no cell growth is observed despite GA production. It can be argued that in this interval the GA production is partially growth-associated. To obtain more information about this interval, we measured the yield of oxygen consumption per GA biosynthesis ($Y_{O_2/GA}$), the yield of oxygen consumption per biomass production ($Y_{O_2/X}$), and the productivity ($Y_{X/GA}$) (Eq. 7, 8, and 9).

$$Y_{\frac{O_2}{GA}} \text{ (mol. g}^{-1}\text{)} = \frac{\text{Oxygen consumption (mol.L}^{-1}\text{)}}{\text{GA production (mg.mL}^{-1}\text{)}} \quad \text{Equation 7}$$

$$Y_{\frac{O_2}{X}} \text{ (mol. gDW}^{-1}\text{)} = \frac{\text{Oxygen consumption (mol.L}^{-1}\text{)}}{\text{biomass production (gDW.L}^{-1}\text{)}} \quad \text{Equation 8}$$

$$Y_{\frac{X}{GA}} \text{ (gDW. g}^{-1}\text{)} = \frac{\text{biomass production (gDW.L}^{-1}\text{)}}{\text{GA production (mg.mL}^{-1}\text{)}} \quad \text{Equation 9}$$

For this purpose, a more complex medium (i.e. flask number 4) was chosen due to its high cell growth and secondary metabolite production. Based on oxygen consumption, GA production, and biomass

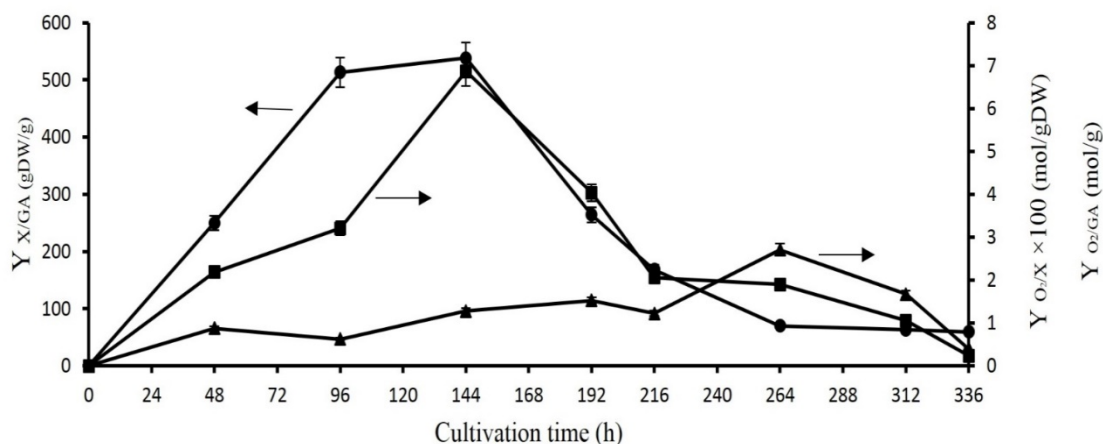
formation, desired parameters such as $Y_{O_2/GA}$, $Y_{O_2/X}$, and productivity during fermentation were measured at given times (Figure 5).

The maximum $Y_{O_2/X}$ was obtained in 264 h while no increase in cell growth is observed at this time (Figure 3). So, it can be concluded that a large portion of oxygen has been consumed to produce GA. Also, the highest amount of oxygen per GA biosynthesis is seen at 144h in which GA starts to produce (Figure 2). In fact, at the beginning of GA production, the majority of oxygen was consumed. At this time, culturing *G. lucidum* has the highest productivity. As a consequence, these results could approve OTR trends (Figure 2).

Since most GA was synthesized between hours 192 and 312, this interval was further analyzed to obtain more useful information. Between these ranges, oxygen consumption was not specified, and, this value should be subtracted from the amount of oxygen consumption by biomass formation to determine a better estimation of oxygen uptake by GA production. Therefore, two intervals were chosen; interval one (0-144 h) in which there was no GA biosynthesis, and interval two (192-312 h) with the main GA production. In the first interval, oxygen consumption was

calculated to be 0.225 mol/L. This value for the next interval, when GA began to produce, was 0.986 mol/L. Based on biomass analysis (Figure 3), the main mycelia was produced in the first interval (0-144 hr). On the other hand, the cell growth rate decreased in the second interval, suggesting that by secondary metabolites (GA) consumed most of the oxygen. Therefore, to measure GA's oxygen consumption

amount of oxygen consumed by mycelia in interval two. Finally, the actual oxygen consumption by GA production and $Y_{O_2/GA}$ was calculated to be equal with 0.761 mol/L and 3.81 mol/g, respectively. It can be concluded that after reaching maximal biomass accumulation, most of the oxygen has been consumed by secondary metabolite, and consequently GA production was partially growth-associated.



during the second interval, we should obtain the

Figure 5. Yield of oxygen consumption per GA production ($Y_{O_2/GA}$) (■), Yield of oxygen consumption per biomass production ($Y_{O_2/X}$) (▲), and productivity ($Y_{X/GA}$) (●) of culturing *G. lucidum* under more complex media (flask 4). The error bars show the standard deviation ($n=3$).

Conclusion

On-line and off-line *G. lucidum* cultivation monitoring provided insight into its growth kinetics during fermentation. Production of valuable metabolite, i.e., GA in various cultures media indicated that maximum oxygen consumption, cell concentration, and GA production occurred when this mushroom was cultured under a more complex medium (flask 4). High maximum biomass and GA production were obtained at an initial glucose concentration of 35 g/L with the presence of vitamin and KH_2PO_4 . Under these conditions, the growth curve was two-phase and oxygen limitation did not occur. A high cell respiratory activity, superior cell growth, and secondary metabolite production were observed under the cultivation of a more complex medium and as a result, this media can be suggested as an optimized media for *G. lucidum*. The start time of secondary metabolite production can also be estimated by using the OTR evaluation. It was indicated that GA production was partially growth-associated. Additionally, overexpression of *hmgr* and *sqs* genes, which are involved in the GA's biosynthesis

pathway, confirmed the results of monitoring. Earlier investigations have tried to examine different factors and conditions to enhance the production of *G. lucidum*. Despite prior research on *G. lucidum*, this study has introduced an online monitoring strategy that is more efficient, unsophisticated, and cost-effective than conventional methods. Finally, since finding cell growth behavior during cultivation is always considered a challenging issue, this method can be beneficial for studying the growth kinetics of other mushrooms.

Acknowledgment

The authors would like to thank the Faculty of New Science and Technologies, University of Tehran. The authors also are so grateful to Mr. Ebrahim Amoabediny for his kindly efforts.

Conflict of Interest

The authors declared no conflicts of interest



سینتیک رشد و تولید گنودریک اسید از گنودرما لوسیدوم GIRAN17

یک رویکرد پایش در زمان واقعی

مطهره سادات حیدریان^{۱،۲}، اشرف السادات حاتمیان زارمی^{۱*}، قاسم عموعابدینی^{۲،۳}

بهمن ابراهیمی حسین زاده^۱، هاله الوندی^۱، علی دریاب^{۱،۲}، امیر صالحی^۴

۱. گروه مهندسی علوم زیستی، دانشکده علوم و فنون نوین، دانشگاه تهران، تهران، ایران
۲. مرکز تحقیقات فناوری‌های نوین در مهندسی علوم زیستی، دانشگاه تهران، تهران، ایران
۳. گروه مهندسی شیمی، پردیس دانشکده‌های فنی، دانشگاه تهران، تهران، ایران
۴. گروه میکروبیولوژی، دانشکده زیست‌شناسی، پردیس علوم، دانشگاه تهران، تهران، ایران

اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله

دریافت: ۱۳۹۸/۱۲/۱۰

پذیرش: ۱۳۹۹/۰۹/۱۶

انتشار آنلاین: ۱۳۹۹/۱۰/۲۱

موضوع: بیوتکنولوژی میکروبی

چکیده

زمینه و اهداف: قارچ دارویی گنودرما لوسیدوم در طب سنتی کاربردهای فراوانی دارد. باین‌حال، استفاده از این قارچ ارزشمند به دلیل تولید پایین متابولیت‌های ثانویه آن محدود شده است. در مطالعات بسیاری به بهینه‌سازی تولید گنودرما لوسیدوم و گنودریک اسید (GA) پرداخته شده است. اما در این مطالعات بستر نظارتی مناسبی استفاده نشده است. مطالعه پایش در زمان واقعی می‌تواند برای یافتن اطلاعات بیشتر از طریق کشت و ارزیابی تولید متابولیت ثانویه مفید باشد.

مواد و روش کار: در این مطالعه، برای اندازه‌گیری آنلاین فعالیت تنفسی گنودرما لوسیدوم در راکتورهای کوچک مقیاس، از فلاسک‌های شیکر هوادهی (AF) با محیط‌کشت‌های مختلف استفاده شد. سپس، اثر چهار متغیر تشکیل زیست‌توده، GA، قند باقی‌مانده و بیان ژن در روزهای مختلف بر فرآیند رشد گنودرما لوسیدوم مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: بررسی آنلاین رشد سلولی نشان داد، GA در مرحله دوم رشد به عنوان متابولیتی تقریباً وابسته به رشد شروع به سنتز می‌کند. شرایط بهینه برای تولید زیست‌توده و GA، ۲۵ g/L گلوکز در حضور ویتامین و KH_2PO_4 است. در طول تخمیر $\text{Y}_{\text{O}_2/\text{GA}}$ و $\text{Y}_{\text{O}_2/\text{X}}$ به ترتیب میزان مصرف اکسیژن در تولید GA و تشکیل زیست‌توده بوده و متغیرهای بسیار مهمی برای افزایش مقیاس تولید هستند.

نتیجه‌گیری: این استراتژی نظارتی می‌تواند برای مطالعات آینده مورد استفاده قرار گیرد.

کلید واژه‌ها: گنودرما لوسیدوم، پایش، سینتیک رشد، نرخ انتقال اکسیژن، بیوراکتور مینیاتوری

کپی‌رایت © مجله میکروبیولوژی پزشکی ایران: دسترسی آزاد، کپی برداری، توزیع و نشر برای استفاده غیرتجاری با ذکر منبع آزاد است.

نویسنده مسئول:

دکتر اشرف السادات حاتمیان زارمی، گروه مهندسی علوم زیستی، دانشکده علوم و فنون نوین، دانشگاه تهران، تهران، ایران

ایمیل:

hatamian_a@ut.ac.ir

مقدمه

باین‌حال، به دلیل تولید پایین گنودریک اسید از گنودرما لوسیدوم، استفاده از این متابولیت ارزشمند محدود شده است.

از این رو، در مطالعات بسیاری اثر متغیرهای مختلف، از جمله pH، فشار اکسیژن و تنش برشی به منظور افزایش تولید گنودریک اسید مورد بررسی قرار گرفته است (۶-۸). علاوه بر این، مطالعات متعددی به منظور یافتن محیط‌کشت مناسب برای بهینه‌سازی تولید زیست‌توده میسلیموم و متابولیت ثانویه این قارچ انجام شده است. اگرچه تحقیقات نشان می‌دهد محیط غنی تر در

قارچ گنودرما لوسیدوم به‌طور گسترده‌ای در آسیا برای درمان بیماری‌ها و افزایش طول عمر مورد استفاده قرار می‌گیرد. از جمله خواص این قارچ می‌توان به فعالیت ضد توموری، ضد باکتریایی، ضد ویروسی، ضد دیابتی، آنتی‌اکسیدانی و تنظیم سیستم ایمنی اشاره کرد (۱، ۲). گنودریک اسید (GA) نوعی تری‌ترپنوئید است که به عنوان متابولیت ثانویه توسط گنودرما لوسیدوم تولید می‌شود (۳). برخی از گنودریک اسیدها می‌توانند از سنتز کلسترول و رشد تومور جلوگیری کرده و برای درمان سرطان مورد استفاده قرار گیرند (۴، ۵).

مقایسه با سایر محیط‌کشت‌ها مانند محیط نیمه سنتتیک در رشد سلول و تولید متابولیت‌های ثانویه برتر هستند (۹)، اما برای بهبود تولید، تحقیقات بیشتری لازم است.

هم‌چنین گزارش شده است با بهبود اکسیژن‌رسانی، بازده تولید زیست‌توده و متابولیت ثانویه افزایش می‌یابد (۱۰، ۱۱). از سوی دیگر، قبل از مطالعات افزایش مقیاس، کشت سنتی نیازمند غربالگری تعداد زیادی از نمونه‌ها است؛ در نتیجه، باید کشت‌های تکمیلی بسیاری گذاشته شود. تاکنون تحقیقات بسیاری برای افزایش تولید گنودرما لوسیدوم انجام شده است؛ در همه این مطالعات فقدان یک سیستم نظارتی کارآمد آشکار است. در حقیقت، با پایش بر فرآیند می‌توانیم اطلاعات مفیدی از کشت قارچ پیدا کرد و داده‌های لازم را برای توسعه فرآیند به دست آورد. چندین سامانه کوچک مقیاس برای غربالگری با توان بالا و توسعه فرآیند ایجاد شده است. اما، یکی از کارآمدترین و مفیدترین سامانه‌ها بیوراکتورهای کوچک مقیاس هستند. این بیوراکتورها به‌طور گسترده‌ای به‌عنوان ابزاری برای غربالگری و کشف مواد دارویی، بهینه‌سازی محیط‌کشت، سوپله و تولید استفاده می‌شوند (۱۲). بیوراکتورهای کوچک مقیاس برای اندازه‌گیری نرخ انتقال اکسیژن (OTR) در حین تخمیر نیز استفاده می‌شود. OTR عامل مهمی در به دست آوردن اطلاعات بیشتر از کشت سوپله‌ها است (۱۳).

در مطالعه حاضر، برای اولین بار، به‌طور هم‌زمان پایش آنالین و آفلاین با استفاده از بیوراکتورهای کوچک مقیاس برای تولید گنودرما لوسیدوم و بیوسنتز گنودریک اسید استفاده شد. در مطالعات قبلی از محیط‌کشت‌های مختلفی استفاده شده بود. با این حال، در این مطالعه، سعی شده است اثر متغیرهای مختلف ارزیابی شود.

در مطالعات پیشین ما اثرات محیط‌کشت بر رشد قارچ گنودرما لوسیدوم، میزان مصرف اکسیژن و تولید گنودریک اسید مورد بررسی قرار گرفت. به‌نظر می‌رسد رشد گنودرما لوسیدوم و تولید متابولیت ثانویه آن با استفاده از بیوراکتورهای شیکر کوچک مقیاس بهترین روش برای تولید حداکثر گنودریک اسید باشد. این داده‌ها به‌منظور یافتن راهی برای افزایش بازده گنودرما لوسیدوم بسیار سودمند است و می‌تواند راه‌حلی برای غلبه بر چالش‌ها باشد.

بیوراکتور شیکر کوچک مقیاس

برای اندازه‌گیری آنالین فعالیت هوازی گنودرما لوسیدوم در بیوراکتورهای کوچک مقیاس، از فلاسک‌های شیکر هوادهی (AF) استفاده شد (شکل ۱، A). همه شرایط کشت به جز محیط‌کشت در ارن مایرهای طراحی شده ۲۵۰ mL یکسان بود (۱۹). هر AF شامل یک محیط‌کشت متفاوت بود: AF₁ حاوی PDB (محیط پایه)، AF₂ حاوی PDB و ویتامین B₁، AF₃ حاوی YPG و AF₄ حاوی محیط‌کشت پیچیده بود (جدول ۱). به‌طور خلاصه، پایش آنالین بر اساس OTR انجام شد و فشارهای جزئی با استفاده از یک سنسور اکسیژن کنترل شد. OTR با معادله زیر محاسبه شد:

$$OTR = \frac{\Delta pO_2}{\Delta t} \frac{V_G}{RTV_L} \quad \text{Equation 1}$$

در این معادله ΔpO_2 اختلاف فشار جزئی اکسیژن (Pa)، V_G حجم گاز (L)، V_L حجم مایع (L)، R ثابت گاز (L.Pa/K.mol)، T دما (K) و Δt زمان فاز اندازه‌گیری (h) است.

مواد و روش‌ها

سوپله و شرایط کشت

قارچ گنودرما لوسیدوم (GIRAN17) از دانشکده علوم زیستی دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران تهیه شد. این قارچ از درخت

جدول ۱. شرایط فلاسک‌های شیکر هوادهی

Flask Number (AF and VF)	Culture medium	Working volume (mL)	Gas volume (mL)	Flask volume (mL)	Flow rate (L/h)
1	Potato dextrose broth (PDB)	20	240	260	1.2
2	PDB+ 0.05 g/L vitamin B ₁	20	240	260	1.2
3	Yeast extract 2.5 g/L, peptone 5 g/L and glucose 35 g/L (YPG).	20	240	260	1.2
4	Complex media (glucose 35 g/L, peptone 5 g/L, yeast extract 2.5 g/L, KH ₂ PO ₄ ·H ₂ O 1 g/L, MgSO ₄ ·7H ₂ O 0.5 g/L, and vitamin B1 0.05 g/L)	20	240	260	1.2
VF ₁ , VF ₂ , VF ₃ and VF ₄ : offline monitoring		AF ₁ , AF ₂ , AF ₃ and AF ₄ : online monitoring			

اطراف و a، b و c پارامترهای مناسب (بدون بعد) در معادله ۳ هستند.

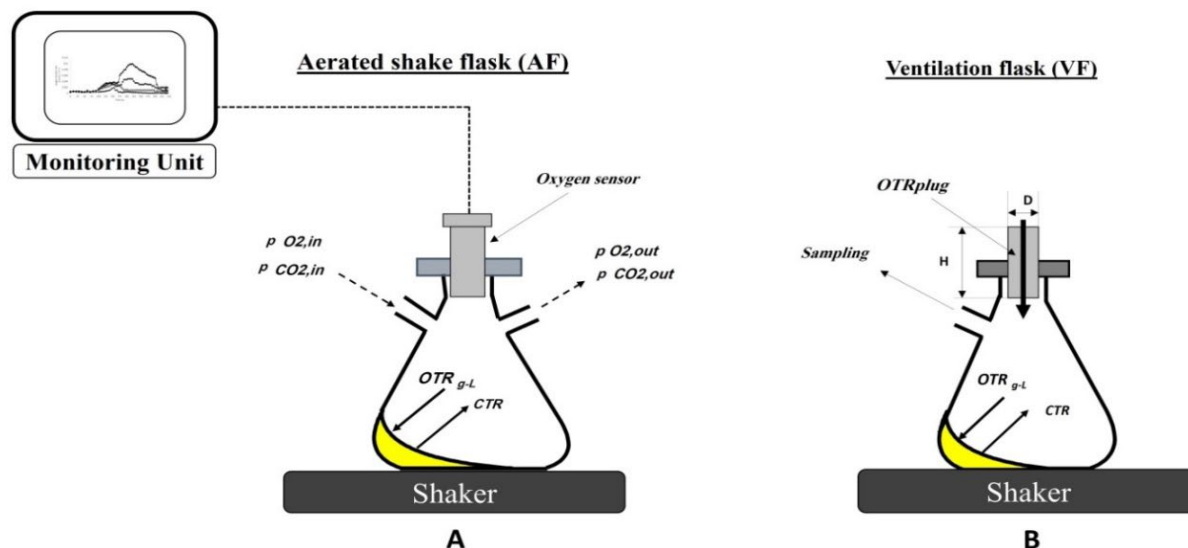
$$OTR_{plug} = k_{plug} \cdot (1/V_L \cdot P_{abs}) \cdot (pO_{2, out} - pO_2) \quad \text{Equation 2}$$

$$k_{plug} = \frac{a \cdot OTR_{plug}}{b + OTR_{plug} + \frac{OTR_{plug}^2}{c}} \quad \text{Equation 3}$$

for VF type 1; a : 22.4×10^6 , b: 6.95×10^3 , c: 19.97 (۲۱)

بنابراین، برای یافتن اطلاعات بیشتر از رشد گنودرما لوسیدوم، چهار متغیر شامل تشکیل زیست‌توده، GA، قند باقیمانده و بیان ژن در روزهای ۰، ۲، ۴، ۶، ۸، ۹، ۱۱، ۱۳ و ۱۴ توسط ۳۵ سیستم VF بررسی شدند. هر آزمایش در دمای ۲۵ درجه سلسیوس و ۱۳۰ rpm به مدت چهارده روز نگهداری شد.

فلاسک‌های ۲۵۰ mL ارلن مایر، که به آن‌ها فلاسک تهویه (VF) گفته می‌شود، نیز به‌طور هم‌زمان در شرایطی مشابه فلاسک‌های شیکر هوادهی، قرار گرفتند (۲۰). چندین نوع VF وجود دارد که مقاومت جابجایی گاز در محفظه استریل آن‌ها متفاوت است (۲۱). از آنجایی که مقدار هوادهی فلاسک‌های پایش آنلاین یا AF، vvm ۱/۲ است، از VF (قطر، $D = 2/80 \text{ cm}$ ، ارتفاع، $H = 2/12 \text{ cm}$) برای پایش آنلاین استفاده شد که همان مقدار هوادهی AF را دارد (شکل ۱). معادلات ۲ و ۳ مربوط به میزان انتقال اکسیژن ارتباط (OTR_{plug}) و ضریب انتقال گاز (k_{plug}) در VF است که V_L حجم پر، P_{abs} فشار مطلق، P_{O_2} فشار جزئی اکسیژن در فضای فلاسک، $P_{O_2, out}$ فشار جزئی اکسیژن در محیط



شکل ۱. سیستم بیوراکتور شیکر کوچک مقیاس. (A) رسم شماتیک انتقال گاز در یک فلاسک شیکر هوادهی (AF)، (B) فلاسک تهویه (VF) با بسته شدن محفظه استریل به عنوان روش آنلاین در این تحقیق استفاده شد.

(سیناکولون، ایران). سنتز cDNA توسط یک کیت سنتزی (Amplicon، دانمارک) انجام شد. از آغازگر تصادفی برای سنتز cDNA استفاده شد. سپس، سطح رونویسی *hmgR* و *sqs* توسط Real-time PCR با استفاده از سایبرگرین (Applied biosystem، ایالات متحده آمریکا) تعیین شد. برای تجزیه و تحلیل بیان نسبی ژن از روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ استفاده شده است. از آغازگر 18srRNA به عنوان کنترل داخلی و نرمال سازی داده‌ها برای بیان ژن استفاده شد. توالی آغازگرهای *hmgR* و *sqs* در مطالعات شرح داده شده است. توالی‌های آغازگرها به شرح زیر بود: *hmgR* forward: 5'-GTCATCCTCTATGCCAAAC-3' *hmgR* reverse: 5'-GGGCGTAGTCGTCAGTCCTTC-3' *sqs* forward: 5'-ACAGTTGTCAGCGAAGAGC-3' *sqs* reverse: 5'-CGTAGTGGCAGTAGAGGTTG-3' rRNA forward: 5'-TATCGAGTTCTGACTGGGTTGT-3' 18S rRNA reverse: 5'-ATCCGTTGCTGAAAGTTGTAT-3' (۲۴، ۱۰).

سطح بیان ۱ برای نمونه‌ها برای محیط کشت PDB انتخاب شد و تغییرات در مقایسه با آن بررسی شد. مرحله اول دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه بود، شرایط ازدیاد در سه مرحله بود: ۳۰ ثانیه در ۹۴ درجه سلسیوس (دناتوراسیون)، ۳۰ ثانیه در ۵۶ درجه سلسیوس (اتصال) و ۳۰ ثانیه در ۷۲ درجه سلسیوس (طویل شدن) در ۴۰ چرخه انجام شد.

تحلیل آماری

نتایج آزمایش‌ها با استفاده از آزمون Student's t-test (S) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. همه آزمایش‌ها با سه تکرار انجام شد. مقدار احتمال (P) کمتر از ۰/۰۵ ($P < 0/05$) به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

پایش آنالین

بیوراکتور شیکر کوچک مقیاس با مطالعه مشخصات OTR در هر دوره تخمیر، از جمله پاسخ‌های فیزیولوژیکی میکروارگانیسم‌های هوازی به شرایط کشت خاص، مهار محصول، رشد دوفازی و سایر پدیده‌های زیستی، منبع غنی از داده را فراهم می‌کند. تغییرات OTR، در AF_1 ، AF_2 ، AF_3 و AF_4 طی کشت گنودرما لوسیدوم در شکل ۲ نشان داده شده است. در ۱۰۰ ساعت ابتدایی کشت، هیچ تغییر اساسی مشاهده نشد. OTR برای AF_1 و AF_2 به ترتیب در ۱۵۰ ساعت و ۱۶۰ ساعت به حداکثر مقادیر ۲

تعیین زیست‌توده، قند باقیمانده، نرخ ویژه رشد، میزان

تولید GA و جذب اکسیژن

همانطور که بیان شد، یک فلاسک پایش آفلاین یا فلاسک تهویه برای اندازه‌گیری چهار متغیر زیست‌توده، GA، قند باقیمانده و بیان ژن استفاده شدند. فلاسک‌های تهویه انتخاب شده همان مقدار هوادهی (۱/۲ vvm) فلاسک هوادهی مورد استفاده در پایش آنالین را دارند. میسلیم قارچ با استفاده از سانتریفیوژ از محیط کشت جدا شد، توسط خشک‌کن انجمادی (Alpha 1-2 Christ، LD plus، آلمان) خشک شد و وزن خشک زیست‌توده اندازه‌گیری شد. غلظت قند باقیمانده نیز با روش فنل-سولفوریک اسید اندازه‌گیری شد (۱۸). میانگین نرخ ویژه رشد (μ) و میزان تولید GA ویژه (qGA) از معادلات زیر به دست آمده است:

$$\mu = \frac{\ln\left(\frac{\text{Final biomass}}{\text{Initial biomass}}\right)}{\text{fermentation time}} \quad \text{Equation 4}$$

$$q_{GA} = \frac{1}{X} \frac{dP}{dt} \quad \text{Equation 5}$$

در این معادله X غلظت سلول است. مصرف اکسیژن در دوره کشت نیز با ادغام مشخصات OTR به شرح زیر تعیین شد:

$$\text{Oxygen uptake} = \int_0^t OTR \cdot dt \quad \text{Equation 6}$$

سنجش گنودریک اسید

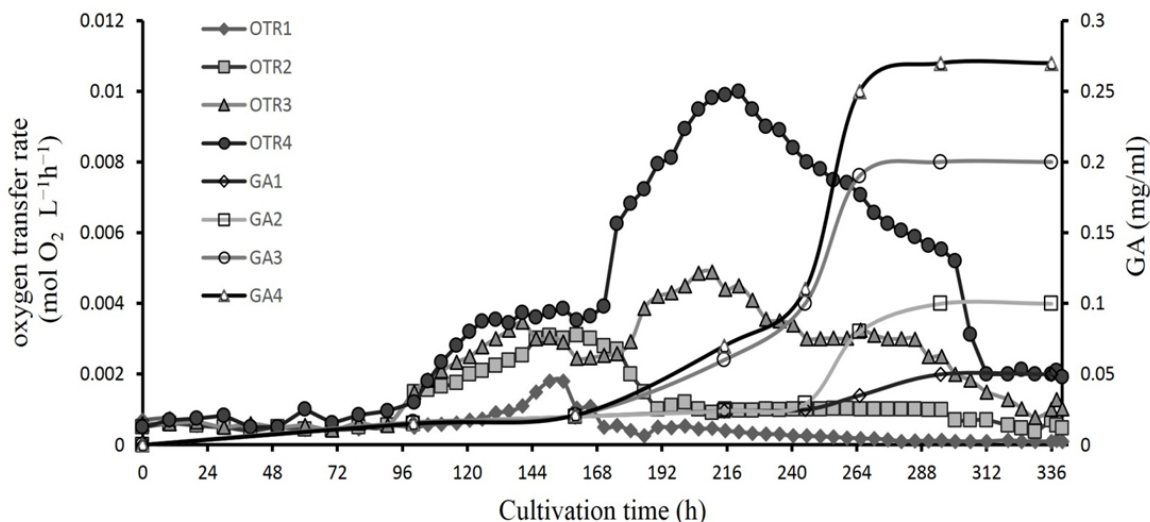
پس از به دست آوردن میسلیم خشک (۱۸)، GA استخراج شد. برای استخراج GA، ۱۰۰ mg زیست‌توده خشک دو بار در یک هفته به اتانول ۵۰٪ v/v اضافه شد. سپس، زیست‌توده توسط سانتریفیوژ (۲۵ دقیقه، ۱۲۰۰۰ g) جدا شد. علاوه بر این، سوپروبی در شرایط خلا در دمای ۵۰ درجه سلسیوس خشک شد، بقایای آن در چند میلی‌لیتر آب حل شد و سپس با ۲ mL کلروفورم استخراج انجام شد. استخراج GA از کلروفورم با NaHCO_3 (w/v) ۵٪ انجام شد و pH محلول با افزودن اسید کلریدریک تنظیم گردید (زیر ۳). پس از آن باقیمانده GA توسط کلروفورم استخراج شد. در مرحله بعدی، کلروفورم باقیمانده در دمای ۴۰ درجه سلسیوس تبخیر شد. محتوای GA به صورت استاندارد در اتانول مطلق حل شد و در ۲۴۵ nm توسط دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری انجام شد (T80, PG Instruments Limited, London) (۲۲).

جداسازی RNA و Real-time PCR

مقدار ۰/۱ g میسلیم از محیط کشت جدا و توسط نیتروژن مایع منجمد شد. RNA کل توسط RNX plus استخراج شد

علاوه بر این، با تخمیر در محیط‌های پیچیده (AF₄)، به ترتیب ترتیب حداکثر ۳/۸ و ۱۰ mmol/Lh در ۱۵۵ ساعت و ۲۲۰ ساعت اتفاق افتاد. ارزیابی نتایج OTR همچنین نشان داد که با کشت در AF₁ و AF₂، منحنی OTR پس از دستیابی به حداکثر مقدار خود به سمت پایین شیب می‌یابد.

و ۳/۲ mmol/Lh رسید. اگرچه با کشت در AF₁ و AF₂ رفتار رشد گنودرما لوسیدوم یکسان است، اما حداکثر OTR در AF₂ بیشتر از AF₁ بود که می‌تواند به ویتامین B1 نسبت داده شود. با تجزیه و تحلیل مشخصات OTR در AF₃، مشاهده شد دو مقدار حداکثر ۳/۵ و ۴/۹ mmol/Lh به ترتیب در ۱۴۰ ساعت و ۲۱۰ ساعت اتفاق افتاده است.



شکل ۲. بررسی سرعت انتقال اکسیژن، بیان شده در mol/Lh با استفاده از فلاسک هواده (AF) و تولید GA بیان شده در mg/mL با استفاده از فلاسک تهویه (VF) در طی کشت گنودرما لوسیدوم با محیط کشت‌های مختلف؛ AF₁ و VF₁: PDB؛ AF₂ و VF₂: PDB + ویتامین B1؛ AF₃ و VF₃: YPG؛ AF₄ و VF₄: محیط پیچیده (۳ تکرار).

پایش آفلاین

کشت گنودرما لوسیدوم با استفاده از پایش آفلاین نیز برای بررسی تشکیل زیست‌توده، بیوسنتز GA، قند باقیمانده و بیان ژن در زمان‌های مشخص انجام شد. ترکیبی از پایش آفلاین و آنالین می‌تواند برای تجزیه و تحلیل سینتیک تشکیل زیست‌توده و تولید GA مفید باشد.

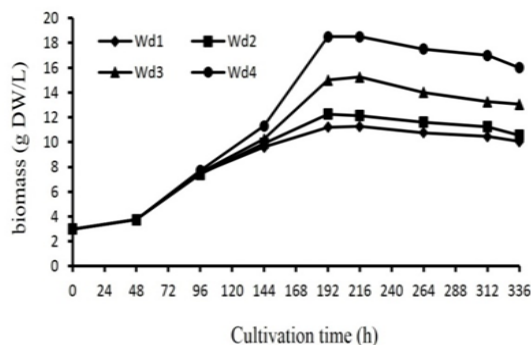
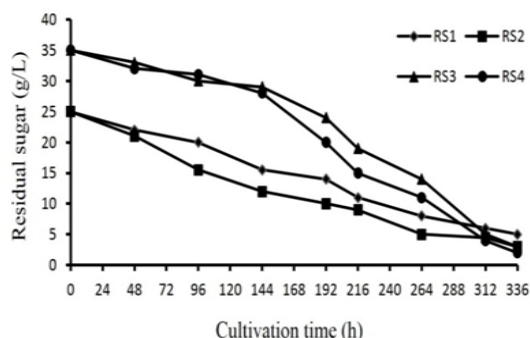
شکل ۳ تولید زیست‌توده گنودرما لوسیدوم در طول دوره کشت را نشان می‌دهد. بعد از ۴۸ ساعت، تشکیل زیست‌توده در VF₁-VF₄ افزایش یافته و پس از ۱۹۲ ساعت به حداکثر غلظت سلول می‌رسد. سپس، زیست‌توده تقریباً تا پایان دوره کشت با کاهش متناظر غلظت قند ثابت باقی ماند. در حین کشت، یک مرحله تاخیر دو روزه برای همه فلاسک‌ها در نظر گرفته شد. همچنین مشاهده شده است که کشت گنودرما لوسیدوم در VF₄ حداکثر زیست‌توده (۱۸/۵ g DW/L) را در مقایسه با سایر فلاسک‌ها به همراه دارد. حداکثر تجمع زیست‌توده در VF₂، VF₃ و

VF₁ به ترتیب ۱۵/۲۵، ۱۲/۲۵ و ۱۱/۲۵ g DW/L بود. ارزیابی غلظت کل سلول در طی تخمیر نشان داد تولید زیست‌توده در محیط کشت پیچیده (VF₄) ۱/۶ برابر بیشتر از آن در محیط پایه (VF₁) بود. پروفایل‌های مصرف شکر در همه فلاسک‌ها یک روند مشابه داشت و روند نزولی مداومی را نشان می‌دهند. تجزیه و تحلیل بیشتر نشان می‌دهد در روز سیزدهم، قند باقیمانده تقریباً برای تمام موارد مصرف شد. علاوه بر این، محیط‌های پیچیده (فلاسک‌های ۳-۴) که حاوی منابع کربن غنی‌تری هستند، در مقایسه با محیط‌های کمتر پیچیده رشد سلول بیشتری را دارند (فلاسک‌های ۱-۲).

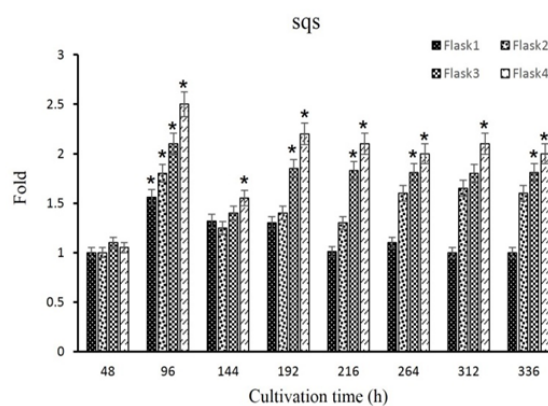
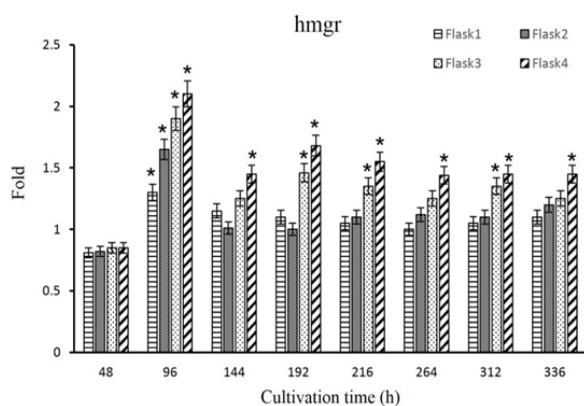
تجزیه و تحلیل تولید GA نشان داد GA پس از ۱۴۴ ساعت در همه فلاسک‌ها تولید می‌شود و تجمع GA توسط مابقی کشت ادامه می‌یابد (شکل ۲). حداکثر تولید GA، ۲۷۰ mg/L در VF₄ و ۴ برابر بیشتر از VF₁ به دست آمد.

شکل ۳ تولید زیست‌توده گنودرما لوسیدوم در طول دوره کشت را نشان می‌دهد. بعد از ۴۸ ساعت، تشکیل زیست‌توده در VF₁-VF₄ افزایش یافته و پس از ۱۹۲ ساعت به حداکثر غلظت سلول می‌رسد. سپس، زیست‌توده تقریباً تا پایان دوره کشت با کاهش متناظر غلظت قند ثابت باقی ماند. در حین کشت، یک مرحله تاخیر دو روزه برای همه فلاسک‌ها در نظر گرفته شد. همچنین مشاهده شده است که کشت گنودرما لوسیدوم در VF₄ حداکثر زیست‌توده (۱۸/۵ g DW/L) را در مقایسه با سایر فلاسک‌ها به همراه دارد. حداکثر تجمع زیست‌توده در VF₂، VF₃ و

۱/۴۵ و ۲ برابر بیشتر از آغاز کشت است. تجزیه و تحلیل نهایی بیان ژن در محیط‌های مختلف کشت نشان داد بیان ژن در VF₃ به ترتیب ۱/۲۵ برابر و ۱/۸۱ برابر، در VF₂ به ترتیب ۱/۲ برابر و ۱/۶ برابر برای *hmgr* و *sqs* افزایش یافته است. در همه موارد، بیان ژن *sqs* بالاتر از *hmgr* بود.



شکل ۳. پایش قند باقیمانده و تشکیل زیست‌توده بیان شده در g/L و g DW/L، به ترتیب با استفاده از فلاسک تهویه (VF) در طول کشت گنودرما لوسیدوم با محیط‌کشت‌های مختلف (n = ۳).



شکل ۴. تجزیه و تحلیل مقایسه بیان ژن *hmgr* و *sqs* در گلدان ۴-۱ (* نشان می‌دهد $p < 0.05$ نسبت به محیط کشت PDB)

۰/۷۶، ۰/۴۰ و ۰/۱۷ mol/L محاسبه شد. نتایج نشان می‌دهند مصرف اکسیژن در AF₄ که محیطی پیچیده‌تر بود ۸/۶ برابر بیشتر از AF₁ به عنوان یک محیط کشت پایه است. تجزیه و تحلیل قند باقیمانده نشان داد کاهش مقادیر OTR را می‌توان به کاهش منابع کربن در محیط کشت نسبت داد.

اندازه‌گیری میانگین نرخ ویژه رشد (μ) نشان داد μ برای VF₄، VF₃، VF₂ و VF₁ به ترتیب ۰/۲۳۷، ۰/۲۱۱، ۰/۱۹۰ و ۰/۱۷۵ d⁻¹ بود. رشد در کشت VF₄ در مقایسه با VF₁ تقریباً ۱/۴ برابر بود.

تجزیه و تحلیل بیشتر نشان داد با کشت گنودرما لوسیدوم در محیط‌های مختلف (فلاسک ۱-۴)، بیان ژن *hmgr* و *sqs* پس از ۹۶ ساعت افزایش شدیدی می‌یابند (شکل ۴). این افزایش همزمان با شروع بیوسنتز GA است (شکل ۲). در محیط‌های پیچیده (فلاسک‌های ۳-۴)، بعد از ۱۹۲ ساعت افزایش دیگری نیز مشاهده می‌شود. هم‌چنین، بیان ژن *hmgr* و *sqs* در پایان کشت به ترتیب

بحث

تجزیه و تحلیل سینتیک تشکیل زیست‌توده و تولید GA

پروفایل سینتیک رشد میسلیم گنودرما لوسیدوم و تجمع GA در بیوراکتور شیکر کوچک مقیاس به همراه قند باقیمانده و بیان ژن در چهار محیط کشت مختلف مورد بررسی قرار گرفت و به‌طور همزمان نشان داده شد.

با توجه به مشخصات OTR در AFها در طی تخمیر، مصرف اکسیژن برای AF₁، AF₂، AF₃، AF₄ به ترتیب برابر با ۱/۴۷،

نتیجه، در مقایسه با VF₂ و VF₁، سرعت رشد VF₃ و VF₄ به شدت افزایش یافت و GA بین ۱۴۴-۲۱۶ ساعت تولید شد.

سطح رونویسی *hmgr* و *sqs* نشان داد، حداکثر بیان ژن زمانی اتفاق می افتد که تولید GA شروع می شود و سپس، تولید آن روند پایداری تا پایان تخمیر دارند. علاوه بر این، می توان سطح بالاتر بیان ژن در فلاسک ۳-۴ را به افزایش تولید GA نسبت داد.

جدول ۲ رفتار رشد گنودرما لوسیدوم در فلاسک ۴ در هنگام تخمیر را نشان می دهد. دوره های زمانی حساس مشخص شدند. به نظر می رسد بازه زمانی ۱۳۴-۳۱۲ ساعت زمان بسیار مهمی برای گنودرما لوسیدوم است که همزمان با تغییرات مقدار زیست توده، تولید GA و OTR است. بنابراین، این بازه به عنوان زمان اصلی رشد گنودرما لوسیدوم پیشنهاد می شود.

با کشت در یک محیط کربنی پیچیده (فلاسک ۴)، نرخ ویژه رشد سلول (μ) به ترتیب به دو مقدار حداکثر ۰/۲۷۶ d⁻¹ و ۰/۲۴۷ d⁻¹ در ۶ و ۸ روز رسید. علاوه بر این، با کشت بیش از یک منبع کربن (فلاسک ۳) نرخ ویژه رشد (μ) دو مقدار حداکثر ۰/۲۵۲ d⁻¹ و ۰/۱۹۰ d⁻¹ را همزمان با VF₄ به دست آورد. با این حال، با تخمیر در VF₁ و VF₂ (محیط پایه)، نرخ ویژه رشد (μ) مقدار حداکثر ۰/۱۹۰ d⁻¹ و ۰/۱۷۵ d⁻¹ را در ۸ روز به دست آورد. در حداکثر تولید GA، منحنی رشد را می توان به دو مرحله تقسیم کرد که یکی به رشد و دیگری به تولید اشاره دارد. هر فاز یک نرخ ویژه رشد (μ) دارد.

همچنین، با کشت در VF₄، حداکثر میزان تولید GA ویژه (qGA) به میزان ۱/۸۴ × ۱۰^{-۳} g GA. g/DW.h رسید که تقریباً ۲/۸ برابر بیشتر از VF₁ (۰/۶۵ × ۱۰^{-۳} g GA. g/DW.h) بود. در

جدول ۲. رفتار رشد گنودرما لوسیدوم در VF₄ و AF₄

Time range (h) Monitoring		0-96	96-134	134-168	168-216	216-312	312-336
AF (online)	OTR (mmol/Lh)	0	increase up to 3.5	constant 3.5	increase up to 10 OTR _{max} : 10	decrease to 2	constant 2
		→	↑	→	↑	↓	→
VF (offline)	biomass (g DW/L)	increase up to 11.3 μ_1 : 0.276 (d ⁻¹)		increase up to μ_2 : 0.247 (d ⁻¹)		almost constant	
		↑		↑		→	
	GA (mg/L)	almost no production			increase up to 270		constant
		---			↑		→
	Residual sugar (g/L)	almost steady depletion			main sugar consumed		almost exhausted
		→			↓		↓

Equation 7

$$Y_{O_2/GA} \text{ (mol. g}^{-1}\text{)} = \frac{\text{Oxygen consumption (mol.L}^{-1}\text{)}}{\text{GA production (mg.mL}^{-1}\text{)}}$$

Equation 8

$$Y_{O_2/X} \text{ (mol. gDW}^{-1}\text{)} = \frac{\text{Oxygen consumption (mol.L}^{-1}\text{)}}{\text{biomass production (gDW.L}^{-1}\text{)}}$$

Equation 9

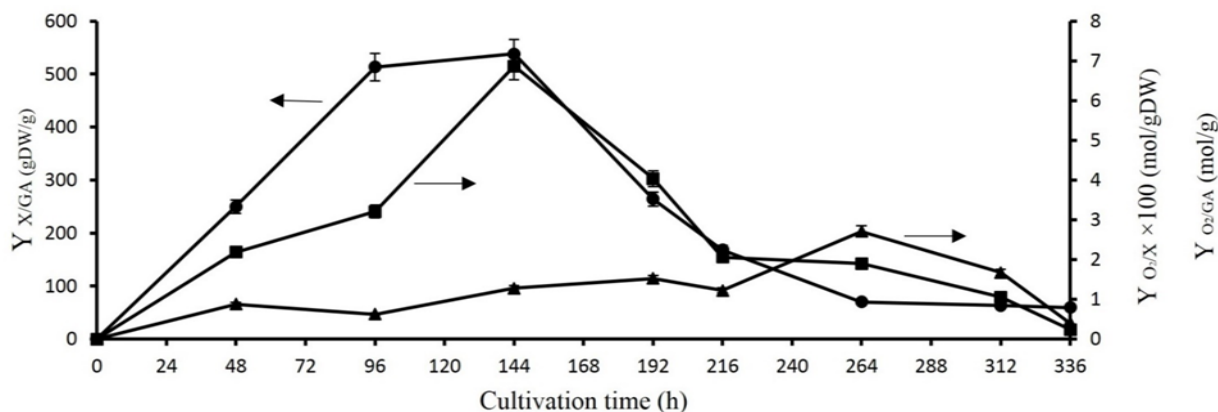
$$Y_{X/GA} \text{ (gDW. g}^{-1}\text{)} = \frac{\text{biomass production (gDW.L}^{-1}\text{)}}{\text{GA production (mg.mL}^{-1}\text{)}}$$

بدین منظور، یک محیط پیچیده تر (به عنوان مثال فلاسک شماره ۴) به دلیل رشد بالای سلول و تولید متابولیت ثانویه، انتخاب شد. بر اساس مصرف اکسیژن، تولید GA و تشکیل زیست توده، $Y_{O_2/X}$ ، $Y_{O_2/GA}$ و بهره وری در طی تخمیر در زمان های مشخص شده اندازه گیری شد (شکل ۵).

بازده اکسیژن مصرفی به ازای تولید GA، تشکیل

زیست توده و بهره وری

همانطور که در شکل ۲ و ۳ نشان داده شده است، نسبت زیست توده به تولید GA در ۲۱۶ ساعت ابتدایی افزایش یافته است. اما پس از آن به کمترین مقدار خود رسید. به علاوه، بین ۲۱۶-۳۱۲ ساعت تخمیر، با وجود تولید GA، رشد سلولی مشاهده نمی شود. می توان ادعا کرد در این فاصله تولید GA تا حدی به رشد مرتبط است. برای به دست آوردن اطلاعات بیشتر در مورد این بازه زمانی، بازده اکسیژن مصرفی در بیوسنتز GA ($Y_{O_2/GA}$)، بازده اکسیژن مصرفی در تولید زیست توده ($Y_{O_2/X}$) و بهره وری ($Y_{X/GA}$) اندازه گیری شد (معادله ۷، ۸ و ۹).



شکل ۵. بازده اکسیژن مصرفی در تولید GA (Y_{O₂/GA}) (■)، بازده اکسیژن مصرفی در تولید زیست توده (Y_{O₂/X}) (▲) و بهره‌وری (Y_{X/GA}) (●) گنودرما لوسیدوم در محیط کشت پیچیده (فلاسک ۴). میله‌های خطا انحراف استاندارد را نشان می‌دهند (n = ۳).

سرانجام، میزان اکسیژن مصرفی واقعی با تولید GA برابر با ۰/۷۶۱ mol/g محاسبه شد. در نتیجه، مقدار Y_{O₂/GA} مقدار ۳/۸۱ mol/g محاسبه شد. می‌توان نتیجه گرفت پس از رسیدن به حداکثر تجمع زیست توده، بیشتر اکسیژن توسط متابولیت ثانویه مصرف شده است، و در نتیجه تولید GA تا حدی مرتبط با رشد بود.

نتیجه‌گیری

پایش آنالین و آفلاین کشت گنودرما لوسیدوم بینشی از سینتیک رشد آن در طی تخمیر فراهم کرده است. تولید متابولیت ارزشمند GA در محیط کشت‌های مختلف کشت نشان داد حداکثر اکسیژن مصرفی، غلظت سلول و تولید GA زمانی به دست می‌آید که این قارچ در محیط پیچیده تری کشت شود (فلاسک ۴). حداکثر زیست توده و تولید GA در غلظت اولیه گلوکز ۳۵ g/L حضور ویتامین و KH₂PO₄ به دست آمد. در این شرایط، منحنی رشد دو فاز بود و محدودیت اکسیژن رخ نداد. فعالیت تنفسی بالا، رشد سلول بهتر و تولید متابولیت ثانویه در محیط کشت پیچیده تر مشاهده شد و در نتیجه، این محیط کشت را می‌توان به عنوان یک محیط کشت بهینه شده برای گنودرما لوسیدوم پیشنهاد کرد. زمان شروع تولید متابولیت ثانویه را نیز می‌توان با استفاده از ارزیابی OTR تخمین زد. مشخص شد تولید GA تا حدی به رشد وابسته است. علاوه بر این، بیان بیش از حد ژن‌های *hmgr* و *sqs* که در مسیر تولید GA نقش دارند، نتایج را تأیید کرد. در تحقیقات قبلی سعی شده بود عوامل و شرایط مختلف برای افزایش تولید گنودرما لوسیدوم بررسی شود. علی‌رغم تحقیقات قبلی در مورد گنودرما لوسیدوم، این مطالعه یک استراتژی پایش آنالین را ارائه داده است

حداکثر Y_{O₂/X} در ۲۶۴ ساعت به دست آمد در حالی که در این زمان هیچ افزایشی در رشد سلولی مشاهده نمی‌شود (شکل ۳). بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت اکسیژن اولیه برای تولید GA مصرف شده است. هم‌چنین، بیشترین میزان اکسیژن در بیوسنتز GA در ۱۴۴ ساعت دیده می‌شود که تولید GA شروع می‌شود (شکل ۲). در واقع، مقدار زیادی از اکسیژن در آغاز تولید GA مصرف شد. در این زمان، کشت گنودرما لوسیدوم بالاترین بهره‌وری را دارد. در نتیجه، این نتایج می‌توانند روند OTR را تایید کنند (شکل ۲).

از آنجایی که بیشتر GA بین ۱۹۲ تا ۳۱۲ ساعت تولید شده است، برای دستیابی به اطلاعات بیشتر، این بازه زمانی بیشتر مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. بین این بازه‌ها، مصرف اکسیژن مشخص نشده بود و این مقدار باید از مقدار اکسیژن مصرفی با تشکیل زیست توده کم باشد تا برآورد بهتری از جذب اکسیژن با تولید GA تعیین شود. بنابراین، دو بازه انتخاب شد. بازه اول (۰-۱۴۴ ساعت) که هیچ GA تولید نمی‌شود و بازه دوم (۱۹۲-۳۱۲ ساعت) که مقدار عمده GA تولید می‌شود. در اولین بازه، اکسیژن مصرفی ۰/۲۲۵ mol/L محاسبه شد. این مقدار برای بازه بعدی، زمانی که GA شروع به تولید کرد، ۰/۹۸۶ mol/L بود. بر اساس تجزیه و تحلیل زیست توده (شکل ۳)، میسلیم اصلی در بازه اول (۰-۱۴۴ ساعت) تولید شد. از طرف دیگر، سرعت رشد سلول در بازه دوم کاهش می‌یابد، که نشان می‌دهد توسط متابولیت‌های ثانویه (GA) بیشتر اکسیژن مصرف می‌شود. بنابراین، برای اندازه‌گیری میزان اکسیژن مصرفی GA در بازه دوم، باید مقدار اکسیژن مصرف شده توسط میسلیم را در بازه دوم به دست آوریم.

می‌گردد. هم‌چنین از زحمات جناب آقای ابراهیم عموعابدینی بسیار سپاسگزاری می‌گردد.

تعارض در منافع

این مقاله، پژوهشی مستقل است که بدون حمایت مالی سازمانی انجام شده است. در انجام مطالعه حاضر، نویسندگان هیچ‌گونه تضاد منافی نداشته‌اند.

که کارآمدتر، پیچیده‌تر و مقرون به صرفه‌تر از روش‌های معمول است. سرانجام، از آنجاکه یافتن رفتار رشد سلول در حین کشت همیشه مسئله‌ای چالش برانگیز است، این روش می‌تواند برای مطالعه روند رشد سایر قارچ‌ها نیز مفید باشد.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از تمام اساتید محترم دانشکده علوم و فنون نوین دانشگاه تهران، ایران که ما را یاری نمودند تشکر و قدردانی

Referance

- Kang Q, Chen S, Li S, Wang B, Liu X, Hao L, Lu J. Comparison on characterization and antioxidant activity of polysaccharides from *Ganoderma lucidum* by ultrasound and conventional extraction. *International Journal of Biological Macromolecules.*, 2019; 124: 1137-1144. [DOI:10.1016/j.ijbiomac.2018.11.215] [PMID]
- Sanodiya BS, Thakur GS, Baghel RK. *Ganoderma lucidum*: a potent pharmacological macrofungus, *Curr Pharm Biotechnol.*, 2009; 10: 717-742. [DOI:10.2174/138920109789978757] [PMID]
- Frisvad JC, Andersen B, Thrane U. The use of secondary metabolite profiling in chemotaxonomy of filamentous fungi, *Mycol Res.*, 2008; 112:231-240. [DOI:10.1016/j.mycres.2007.08.018] [PMID]
- Kalantari-Dehaghi S, Hatamian-Zarmi A, Ebrahimi-Hosseinzadeh B, Mokhtari-Hosseini ZB, Nojoki F, Hamedi J, Hosseinkhani S. Effects of microbial volatile organic compounds on *Ganoderma lucidum* growth and ganoderic acids production in Co-cultures (volatile co-cultures). *Prep Biochem Biotechnol.* 2019; 49(3):286-297. [DOI:10.1080/10826068.2018.1541809] [PMID]
- Gao JJ, Min BS, Ahn EM. New triterpene aldehydes, lucialdehydes AC, from *Ganoderma lucidum* and their cytotoxicity against murine and human tumor cells, *Chem Pharm Bull.*, 2002; 50:837-840. [DOI:10.1248/cpb.50.837] [PMID]
- Wu GS, Lu JJ, Guo JJ. Ganoderic acid DM, a natural triterpenoid, induces DNA damage, G1 cell cycle arrest and apoptosis in human breast cancer cells, *Fitoterapia.*, 2012; 83: 408-414. [DOI:10.1016/j.fitote.2011.12.004] [PMID]
- Fang, QH, Zhong JJ. Effect of initial pH on production of ganoderic acid and polysaccharide by submerged fermentation of *Ganoderma lucidum*, *Process Biochem.*, 2002; 37:769-774. [DOI:10.1016/S0032-9592(01)00278-3]
- Papinutti L. Effects of nutrients, pH and water potential on exopolysaccharides production by a fungal strain belonging to *Ganoderma lucidum* complex, *Bioresour Technol.*, 2010; 101:1941-1946. [DOI:10.1016/j.biortech.2009.09.076] [PMID]
- Zhao W, Xu J, Zhong J. Bioresource Technology Enhanced production of ganoderic acids in static liquid culture of *Ganoderma lucidum* under nitrogen-limiting conditions, *Bioresour Technol.*, 2011; 102:8185-8190. [DOI:10.1016/j.biortech.2011.06.043] [PMID]
- Xu P, Ding ZY, Qian Z. Improved production of mycelial biomass and ganoderic acid by submerged culture of *Ganoderma lucidum* SB97 using complex media, *Enzyme Microb Technol.*, 2008; 42:325-331. [DOI:10.1016/j.enzmictec.2007.10.016]
- Zhang WX, Zhong JJ. Effect of oxygen concentration in gas phase on sporulation and individual ganoderic acids accumulation in liquid static culture of *Ganoderma lucidum*, *J Biosci Bioeng.*, 2010; 109:37-40. [DOI:10.1016/j.jbiosc.2009.06.024] [PMID]
- Wei Z, Duan Y, Qian Y. Screening of *Ganoderma* strains with high polysaccharides and ganoderic acid contents and optimization of the fermentation medium by statistical methods, *Bioprocess Biosyst Eng.*, 2014; 37: 1789-1797. [DOI:10.1007/s00449-014-1152-2] [PMID]
- Kirk TV, Szita N. Oxygen transfer characteristics of miniaturized bioreactor systems, *Biotechnol Bioeng.*, 2013; 110:1005-1019. [DOI:10.1002/bit.24824] [PMID] [PMCID]
- Wagner R, Mitchell DA, Sasaki GL. Current Techniques for the Cultivation of *Ganoderma lucidum* for the Production of Biomass, Ganoderic Acid and Polysaccharides, *Food Technol. Biotechnol.*, 2003; 41:371-382.
- Keypour S, Rafat H, Riahi H. Qualitative analysis of ganoderic acids in *Ganoderma lucidum* from Iran and China by RP-HPLC and electrospray ionisation-mass

- spectrometry (ESI-MS, Food Chem., 2010; 119:1704-1708. [[DOI:10.1016/j.foodchem.2009.09.058](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.09.058)]
16. Heydarian MS, Hatamian-Zarmi A, Amoabediny G, Yazdian F, Doryab A. Synergistic Effect of Elicitors in Enhancement of Ganoderic Acid Production: Optimization and Gene Expression Studies. Applied food biotechnology. 2015; 2(3): 57-62.
 17. Anderlei T, Zang W, Papaspyrou M, Büchs J. Online respiration activity measurement (OTR, CTR, RQ) in shake flasks, Biochem Eng J., 2004; 17:187-194. [[DOI:10.1016/S1369-703X\(03\)00181-5](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(03)00181-5)]
 18. Fang, QH, Zhong JJ. Submerged fermentation of higher fungus Ganoderma lucidum for production of valuable bioactive metabolites - Ganoderic acid and polysaccharide, Biochem Eng J., 2002; 10:61-65. [[DOI:10.1016/S1369-703X\(01\)00158-9](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(01)00158-9)]
 19. Tang YJ, Zhong JJ. Fed-batch fermentation of Ganoderma lucidum for hyperproduction of polysaccharide and ganoderic acid, Enzyme Microb Technol., 2002; 31:20-28. [[DOI:10.1016/S0141-0229\(02\)00066-2](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(02)00066-2)]
 20. Amoabediny G, Rezvani M, Rashedi H. Application of a novel method for optimization of bioemulsan production in a miniaturized bioreactor, Bioresour Technol., 2010; 101:9758-9764. [[DOI:10.1016/j.biortech.2010.07.009](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.07.009)] [[PMID](#)]
 21. Amoabediny G, Ziaie-Shirkolae Y, Büchs J. Development of an unsteady-state model for a biological system in miniaturized bioreactors, Biotechnol Appl Biochem., 2009; 54:163-170. [[DOI:10.1042/BA20090141](https://doi.org/10.1042/BA20090141)] [[PMID](#)]
 22. Amoabediny G, Büchs J. Modelling and advanced understanding of unsteady-state gas transfer in shaking bioreactors, Biotechnol Appl Biochem., 2007; 46:57-67. [[DOI:10.1042/BA20060120](https://doi.org/10.1042/BA20060120)] [[PMID](#)]
 23. Xu JW, Xu YN, Zhong JJ. Production of individual ganoderic acids and expression of biosynthetic genes in liquid static and shaking cultures of Ganoderma lucidum, Appl Microbiol Biotechnol., 2010; 85:941-948. [[DOI:10.1007/s00253-009-2106-5](https://doi.org/10.1007/s00253-009-2106-5)] [[PMID](#)]
 24. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method, Methods., 2001; 25: 402-408. [[DOI:10.1006/meth.2001.1262](https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262)] [[PMID](#)]
 25. Ren A, Qin L, Shi L. Methyl jasmonate induces ganoderic acid biosynthesis in the basidiomycetous fungus Ganoderma lucidum, Bioresour Technol., 2010; 101:6785-6790. [[DOI:10.1016/j.biortech.2010.03.118](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.03.118)] [[PMID](#)]