

Optimization of Production Conditions for Bioactive Polysaccharides from *Fomes fomentarius* and Investigation of Antibacterial and Antitumor Activities

Hale Alvandi¹, Ashrafalsadat Hatamian-Zarmi^{1*},
Bahman Ebrahimi Hosseinzadeh¹, Zahra Beagom Mokhtari-Hosseini²,

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

 [10.30699/ijmm.14.5.596](https://doi.org/10.30699/ijmm.14.5.596)



ABSTRACT

Background: One of the medicinal fungi that has been used in traditional medicine for a long time is the Basidiomycete fungus *Fomes fomentarius*, which is widely distributed in Iran. Polysaccharides as one of the metabolites of this fungus have anti-inflammatory, anti-diabetic, antibacterial, antioxidant, and anti-cancer properties.

Materials & Methods: Optimization of independent variables of $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ concentration, initial pH, yeast extract, and inoculum percentage to increase biomass and polysaccharide production of *F. fomentarius* was investigated using the Taguchi method. Then, the biological properties of the produced polysaccharide including antibacterial activity was investigated by bacterial colony counting method, antioxidant activity using DPPH free radical, and antiproliferative effect on 5 cancer cell lines MKN-45, AGS, A549, KYSE-30 and 5637 using MTS test.

Results: The concentration of $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ and initial pH had a significant effect ($P < 0.05$) on the production of *F. fomentarius* polysaccharide and in optimal conditions polysaccharide production reaches 5.410 g/L. The polysaccharide of this fungus inhibits the growth of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* bacteria by 50% and 25%, respectively. The antioxidant activity of this polysaccharide in the DPPH test is 16.11%. The antiproliferative effect of this polysaccharide on cancer cells is different ($KYSE-30 > A549 \geq 5637 > AGS > MKN-45$). This effect increases with increasing concentration. In KYSE-30 cell line treatment with 200 g/mL polysaccharide, cell viability reaches 40% after 72 hours.

Conclusion: Optimizing the culture medium of the medicinal fungus *Fomes fomentarius* increases the production of polysaccharides up to 5.410 g/L. Optimization increases the biological activity of polysaccharides. Antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* is 50% and 25%, respectively. The antioxidant activity of polysaccharides is 16.11% and the viability of KYSE-30 cancer cells reaches 40% after 72 hours.

Keywords: *Fomes fomentarius*, Optimization, Taguchi, Antibacterial, Antioxidant, Anticancer

Received: 2020/08/27;

Accepted: 2020/10/05;

Published Online: 2020/10/20

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 © 2020, 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



Alvandi H, Hatamian-Zarmi A, Ebrahimi Hosseinzadeh B, Mokhtari-Hosseini Z. Optimization of Production Conditions for Bioactive Polysaccharides from *Fomes fomentarius* and Investigation of Antibacterial and Antitumor Activities. Iran J Med Microbiol. 2020; 14 (6) :596-611

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

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

Introduction

The history of using medicinal fungi in East Asian countries dates back to thousands of years ago. Many of these fungi are still used to treat diseases (1). The medicinal fungi

properties include stimulating the proliferation of lymphocytes, reducing the proliferation of cancer cells, and anti-inflammation. The increasing importance of medicinal

fungi and their metabolites in the treatment of various diseases, the appropriate biodiversity of medicinal fungi in Iran, and the economic value of metabolites derived from these fungi indicate the need to pay attention to this branch of biological sciences (2). Among the medicinal fungi, Basidiomycete *Fomes fomentarius* has long been used in the treatment of gastrointestinal diseases, liver cirrhosis, and various cancers. The distribution of this fungus is widespread in Iran and its presence has been reported in Mazandaran, Golestan, Gilan, Isfahan, Tehran, Kurdistan, Kermanshah, Khorasan and Azerbaijan provinces (2, 3). This fungus has important properties in various aspects. This species is considered as one of the important causes of white heart rot on forest trees. Its extract has antioxidant and anti-cancer properties. *F. fomentarius* is also considered for the production of the laccase enzyme and use in processes such as decolorization and biodegradation (3-5). One of the bioactive compounds of this fungus is polysaccharides that have anti-cancer, anti-inflammatory, anti-diabetic, and immune-enhancing activities. *F. fomentarius* β -glucan polysaccharide prevents tumor angiogenesis and metastasis (6, 7). The anti-proliferative effect of this polysaccharide has been observed on SGC-7901, A549, MCF7, and MKN-45 cancer cell lines (4, 5, 8). Studies show that the polysaccharides of *F. fomentarius* also have antibacterial and antiviral activity (9, 10). Chen *et al.* (2008), examined the biomass and polysaccharide production of *F. fomentarius* in submerging culture conditions. A temperature of 25°C and an initial pH in the range of 5-6 are suitable for the growth of this fungus. Also, using glucose as carbon source, yeast extract as a nitrogen source, CaCl₂ and MgSO₄.7H₂O improves mycelial growth and increases polysaccharide production (11). Cultures of *F. fomentarius* in stirred bioreactor and solid bed bioreactor have also been studied (4, 12). Many studies have been done on optimizing the culture medium for the growth of other fungi and their metabolite production. One of these statistical methods is the Taguchi array design, which allows the study and optimization of several variables simultaneously (13). Therefore, in this study, the production of biomass and polysaccharide of the Iranian medicinal fungus *F. fomentarius*, which has been isolated from the forests of Mazandaran, was investigated. Also, the composition of the culture medium of this fungus was optimized to increase the production of biomass and polysaccharide by the Taguchi method. Then the biological activities of polysaccharides including antibacterial, anti-oxidant, and cytotoxicity were investigated.

Materials and Methods

Collection of Mushroom Samples

The *F. fomentarius* was isolated from Mazandaran forests in 2017 with the cooperation of Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University. In each case, the fungal specimen was harvested in a healthy, complete

and appropriate manner based on the color, shape, size and surface decoration of the cap, base, blades and many other characteristics. After morphological confirmation by mycologists, it is kept at 4°C.

Cultivation of *F. fomentarius* and Polysaccharides Extraction

The *F. fomentarius* mycelium was cultured in potato dextrose agar (PDA) (manufactured by Merck, Germany) in a petri dish and incubated for 5 days at 28°C (BINDER, USA). For seed culture, 10 mm² pieces of fungus grown in PDA medium were transferred to 100 mL of Potato dextrose broth (PDB) medium (manufactured by Merck, Germany) for 7 days at 28°C and 150 rpm in shaker incubator (JAL TAJHIZ, Iran). Suitable culture medium of this fungus includes glucose (5%), peptone (0.2%), malt extract (1%), yeast extract (0.2%), MgSO₄.7H₂O (0.25%) and KH₂PO₄ (0.5%). The initial pH of this medium was adjusted to 6 by adding NaOH (1M) and HCl (1M). After autoclaving, 5% v/v inoculum was added and incubated at 28°C and 150 rpm for 4 days (11). To extract the *F. fomentarius* polysaccharide, after separating the biomass using Whatman paper, absolute ethanol with a ratio of 4:1 v/v was added to the supernatant. After overnight refrigeration, the polysaccharide precipitates were centrifuged for 10 min and 10,000 rpm (AWEL/MF20-R/France). The biomass and polysaccharide were lyophilized (OPERON) and the final product was stored at room temperature.

Optimization of Culture Medium Compositions by Taguchi Method

Taguchi method was used to investigate the effect of independent variables of MgSO₄.7H₂O, pH, yeast extract, and inoculum percentage on biomass and polysaccharide production. The Taguchi L9 array was used to examine four variables at three levels (Table 1), the experiments were performed according to this array, and the results were analyzed using Design Expert 11 software (State-Ease, USA).

Biological Assessments

Antibacterial Activity

The colony-forming unit (CFU) method was used to evaluate the antibacterial activity of polysaccharides. *Staphylococcus aureus* (UTMC 1429) and *Escherichia coli* (PTCC 1269) were obtained from the the Research Center for Technology and Microbial Products of the University of Tehran and Persian Type Culture Collection. Bacteria were cultured in Müller-Hinton Broth (manufactured by Merck, Germany) and after 24 hours of incubation (BINDER, USA), 0.5 McFarland solution was prepared from them. A 5% solution of each polysaccharide with 0.5 McFarland solution was prepared from each bacterium in a volume of 500 μ L and kept for 24 hours in a shaker incubator (JAL TAJHIZ,

Iran) at 37°C and 140 rpm. The mixture was diluted with phosphate buffer saline (1:10) and 10 µL of it cultured in nutrient agar medium (manufactured by Merck, Germany). In the control state, 10 µL of McFarland 0.5 solution of each bacteria was cultured. Then, all culture media were incubated and after 24 hours, bacterial colony count was performed with a gel dock (Quantum, France) (14).

Antioxidant Activity

DPPH (2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl-hydrate) test was used to evaluate the antioxidant activity of polysaccharides. After preparing 2 mg/mL polysaccharide solution in water, the polysaccharide solution and DPPH solution were mixed in a ratio of 1:4 v/v and placed in a shaker incubator for 30 minutes (10). Then the absorbance of the samples was measured at 517 nm with ELISA reader (Carry 100 Bio, Australia) and antioxidant activity was calculated according to the following formula:

:(eq.1)

$$\text{DPPH} \bullet \text{ scavenging effect (\%)} = [(A_0 - \text{sample A})/A_0] \times 100$$

A₀: Adsorption of DPPH solution at 517 nm

sample A: Absorption of the test sample at 517 nm

Cytotoxicity Assay

MKN45, AGS, A549, KYSE-30, and 5637 cancer cell lines were purchased from the Iranian Genetic Resources Center. Cancer cells were cultured in RPMI 1640 medium with 2 mM L-glutamine and 15% FBS and stored in a CO₂ incubator at 37°C. To evaluate the effect of polysaccharide, its solution was prepared in sterile water (1 mg/mL) and used at specific concentrations (50, 100, 200 µg/mL) to treat cells for 24 and 72 hours. In this experiment, positive control included culture medium and negative control included untreated cell culture. MTS test was used to evaluate cell viability. A

total of 2000 cancer cells were cultured in each well of 96 well plates (24 hours). After treatment with specified concentrations of polysaccharide for 24 and 72 hours, 10 µM MTS solution (1:10 diluted in RPMI 1640) was added to each well and incubated for 3 hours (15). Then, adsorption of each sample was read at 495 nm using ELISA reader (Carry 100 Bio, Australia) and the cell viability percentage was calculated using the following formula:

:(eq.2)

$$\text{Cell viability} = \text{Sample absorbance} / \text{Control absorbance} \times 100$$

Statistical Analysis

Data were analyzed statistically by ANOVA method using Design Expert, version 11 (State Ease, USA). P-values below 0.05 ($P < 0.05$) were considered to be statistically significant.

Results

The results of initial experiments on the biomass and polysaccharide production of the *F. fomentarius* showed that four days after the cultivation of the fungus in the desired culture medium, biomass production reaches 15 g/L and polysaccharide production reaches 4.06 g/L. Therefore, the culture medium that includes glucose, peptone, malt extract, yeast extract, MgSO₄·7H₂O, and KH₂PO₄ is a suitable culture medium for the growth and production of polysaccharides of this fungus.

Optimization of Biomass and Polysaccharide Production

According to the preliminary results, the optimization of the culture medium was designed and performed using the Taguchi method with four factors at three levels (Table 1).

Table 1. Taguchi L9 array test design layout and results obtained for the production of biomass and polysaccharide of *F. fomentarius*

Parameters					Response	
Runs	A:MgSO ₄ ·7H ₂ O (g/L)	B:pH	C:Yeast extract (g/L)	D:Inoculum (% v/v)	Biomass (g/L)	Polysaccharide (g/L)
1	2.5	8	2	5	9.890	4.498
2	2.5	4	4	10	10.560	2.337
3	1	4	2	3	11.840	1.274
4	1	6	4	5	14.522	2.785
5	4	4	6	5	11.626	4.201
6	1	8	6	10	9.920	2.878
7	2.5	6	6	3	14.690	3.573
8	4	8	4	3	12.150	5.410
9	4	6	2	10	7.600	3.110

Figure 1 (A) shows a comparison chart of the amount of biomass produced in each experiment and the amount predicted by the software. As can be seen, these results are very close to the data predicted by the software. R² for biomass production is 90.54%. Analysis of the results with ANOVA using Design Expert showed that inoculum have a significant effect (P<0.05) on the biomass production of *F. fomentarius*. The linear model for biomass production based on each of the variables is as follows:

$$:(\text{eq.3})$$

$$\text{Biomass: } 10.44 - 1.44A - 0.4200B + 1.55C - 3.18D$$

In this equation (A) is the concentration of MgSO₄.7H₂O, (B) pH, (C) yeast extract, and (D) the percentage of inoculum. The two-dimensional and three-dimensional diagrams of the effect of variables on biomass production are shown in Figure 1.

Table 1. Analysis of variance and regression coefficients for biomass production of *F. fomentarius*.

Source	Sum of squares	df	Mean square	F-value	P-value
Model	41.69	4	10.42	9.57	0.0251
MgSO₄.7H₂O (A)	5.55	1	5.55	5.55	0.0868
pH (B)	1.06	1	1.06	0.9722	0.3800
Yeast extract (C)	6.41	1	6.41	5.88	0.0723
Inoculum (D)	28.67	1	28.67	26.34	0.0068
Residual	4.35	4	1.09		
Cor Total	46.05	8			

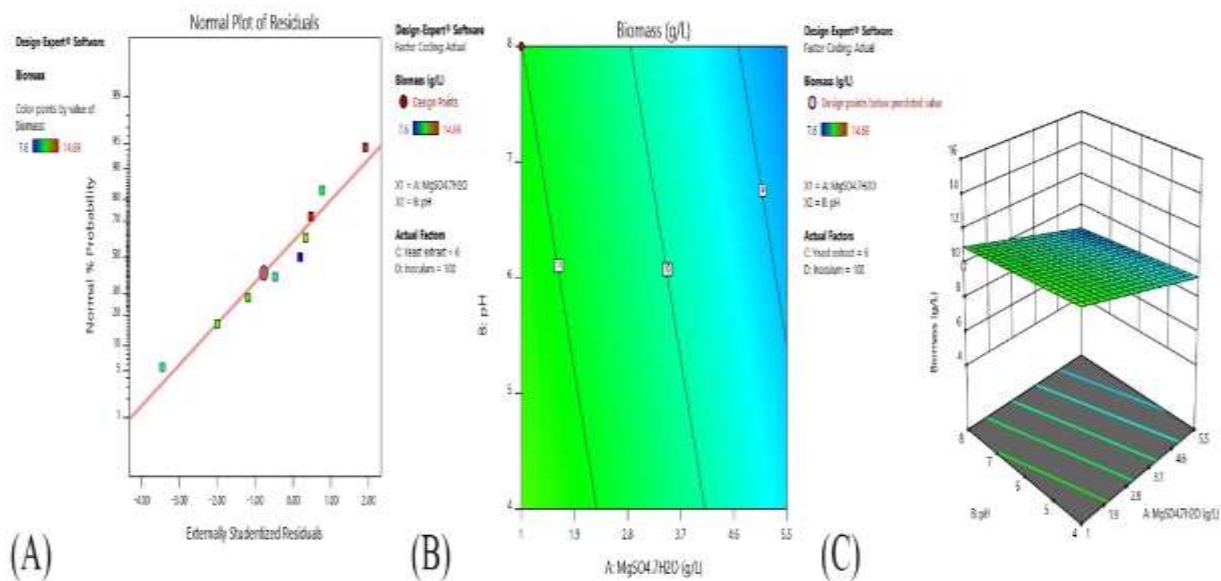


Figure 1. Comparison diagram of produced and predicted biomass (A), two-dimensional diagram (B) and three-dimensional (C) effect of MgSO₄.7H₂O and initial pH on *F. fomentarius* biomass production.

A comparison of the amount of polysaccharide produced in each experiment and the amount predicted by the software showed that these results are very close. R² for biomass production is 91.68%. Analysis of the results with ANOVA using Design Expert showed that concentrations of MgSO₄.7H₂O and initial pH have a significant effect (P<0.05) on the production of polysaccharides of *F. fomentarius*. The

linear model for polysaccharide production based on each of the variables is as follows:

$$:(\text{eq.4})$$

$$\text{Polysaccharide} = 3.71 + 1.45A + 0.8292B + 0.4427C - 0.6025D$$

In this equation (A) is the concentration of MgSO₄.7H₂O, (B) pH, (C) yeast extract and (D) the

percentage of inoculum. The two-dimensional and three-dimensional diagrams of the effect of variables on polysaccharide production are shown in Figure 2.

Table 2 . Analysis of variance and regression coefficients for polysaccharide production of *F. fomentarius*.

Source	Sum of squares	df	Mean square	F-value	P-value
Model	11.25	4	2.81	11.02	0.0196
MgSO₄.7H₂O (A)	5.58	1	5.58	21.84	0.0095
pH (B)	4.13	1	4.13	16.16	0.0159
Yeast extract (C)	0.5227	1	0.5227	2.05	0.2257
Inoculum (D)	1.03	1	1.03	4.02	0.1153
Residual	1.02	4	0.2553		
Cor Total	12.27	8			

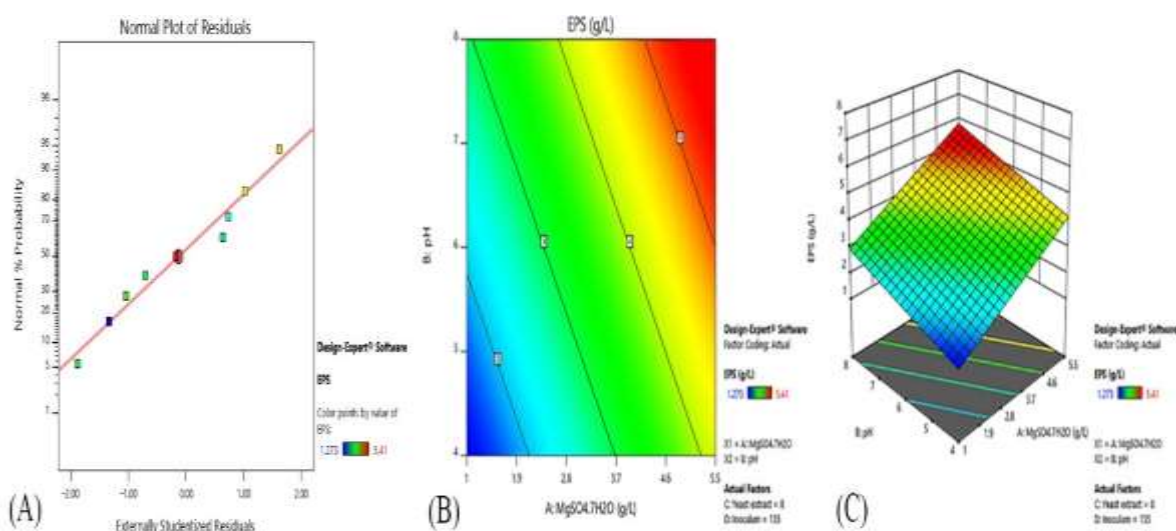


Figure 2. Comparison diagram of produced and predicted polysaccharide (A), two-dimensional diagram (B) and three-dimensional (C) effect of MgSO₄.7H₂O and initial pH on *F. fomentarius* polysaccharide production.

Biological Assessments

Antibacterial Activity

The antibacterial activity of polysaccharide produced by *F. fomentarius* in Taguchi experiments was tested against Gram-positive bacteria *S. aureus* and Gram-negative bacteria *E. coli*. Bacterial colony count using a gel dock device showed that in the control sample of both strains, bacterial growth is 100%. Colony counts showed that the polysaccharide of this fungus has an inhibitory effect on bacterial growth. This effect is greater on the gram-positive bacteria *S. aureus*. Sample 7 with 50% inhibition of *S. aureus* had the highest inhibitory effect ($P < 0.05$). It can also inhibit the growth of *E. coli* by up to 24%. The highest inhibitory effect on *E. coli* was observed in sample 3 (25%). There was no significant difference between the antibacterial activities of polysaccharides on *E. coli*. The Figure 3 (A) shows the antibacterial activity of the polysaccharide of the fungus *F. fomentarius*.

Antioxidant Activity

The antioxidant activity of polysaccharides produced by *F. fomentarius* in Taguchi experiments was investigated using DPPH free radicals. When the antioxidant substance donates protons to this free radical, its absorption in 517 nm decreases; this decrease indicates the level of antioxidant activity. The antioxidant activity of polysaccharides produced by this fungus varies in different environments (Figure 3, B). Analysis of DPPH results showed that the antioxidant activity in polysaccharide produced in environment 7 shows the highest antioxidant activity (16.11%). The lowest antioxidant activity is related to sample 2.

Cytotoxicity Assay

Biological assessments in previous stages showed that sample 7 has the most biological activity; therefore, this sample was used to evaluate cytotoxicity. In this study, the antiproliferative effect of polysaccharide of this

fungus in different concentrations on 5 cancer cell lines MKN-45, AGS, A549, KYSE-30 and 5637 was investigated using MTS test (Figure 4). In general, *F. fomentarius* polysaccharide inhibits the growth of all studied cancer cells significantly ($P<0.05$). After 24 hours, the antiproliferative effect of polysaccharide at a concentration of 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ on AGS was significantly ($P<0.05$) greater than that KYSE-30 and 5637, but no difference was observed between the antiproliferative effect of polysaccharide in other cancer cell lines. At a concentration of 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ polysaccharide had the highest antiproliferative effect on the AGS cell line and it was significantly higher than other cell lines ($P<0.05$). At

a concentration of 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, the polysaccharide has a significant antiproliferative effect on A549 cancer cells compared to other cell lines, and it inhibits the growth of this cell by more than 50%. After 72 hours, there was no significant difference between the antiproliferative effects of polysaccharide on the cancer cell lines. At a concentration of 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ polysaccharide of *F. fomentarius* had the most antiproliferative effect on 5637 cells and it was significantly different from other cell lines ($P<0.05$). At a concentration of 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, polysaccharide inhibits the growth of A549, KYSE-30 and 5637 cells by up to 40% and has a significant difference compared to this effect on MKN-45 and AGS cells ($P<0.05$).

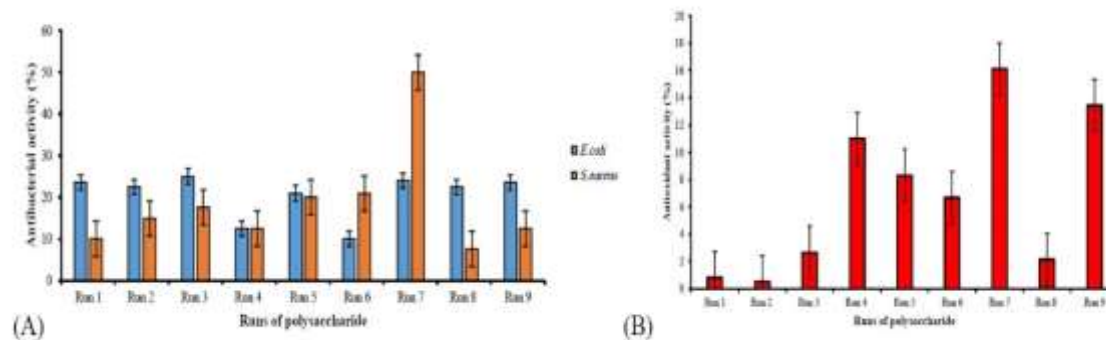


Figure 3. Antibacterial (A) and antioxidant (B) activity of polysaccharide obtained from the Taguchi L9 array.

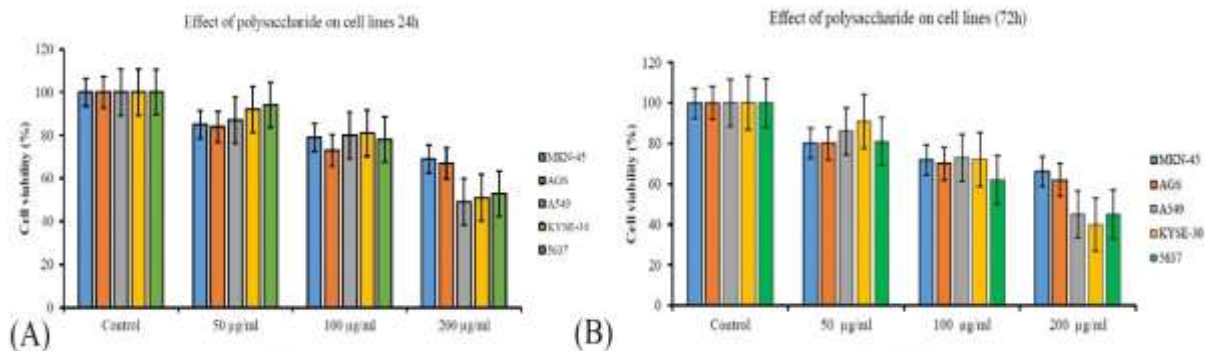


Figure 4. Cell viability diagram of 5 cancer cell lines treated with *F. fomentarius* polysaccharide after 24 (A) and 72 hours (B)

Discussion

In this study, the optimization of biomass and polysaccharide production of the medicinal fungus *F. fomentarius* and its polysaccharide biological properties were investigated. As observed in previous studies (4) and this study, the suitable culture medium for this fungus includes glucose, peptone, malt extract, yeast extract, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, and KH_2PO_4 . Studies show that peptone in this environment plays an important role in increasing the growth and production of fungal enzymes (16). Optimization of culture medium using the Taguchi method showed that $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ concentration and initial pH have a

significant effect ($P<0.05$) on polysaccharide production of this fungus. With the increase of $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ and the initial pH, the production of polysaccharide of *F. fomentarius* increases. pH is involved in permeability, cell membrane function, and production of secondary metabolites (11). Magnesium is an important element in the metabolism of fungi and the stability of cell membranes. It is also involved in DNA replication, cell division, and many enzymatic reactions (11, 17, 18). Chen *et al.* (2008), increased the polysaccharide production of this fungus (3.64 g/L) by optimizing the culture medium. In this study, under optimal conditions (4 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, initial pH=8),

the production of polysaccharide of the *F. fomentarius* reached 5.410 g/L. This amount is 1.5 times the production of polysaccharides in common fungal culture medium (PDB) (11).

Studies show that physicochemical conditions of the culture medium such as carbon source, nitrogen source, mineral sources, pH and culture temperature play an important role in the biological activity of fungal metabolites (19, 20). *F. fomentarius* polysaccharide inhibits the growth of *S. aureus* and *E. coli* by 50% and 25%, respectively. Polysaccharide of this fungus contains terpenoids and polyphenols with antibacterial activity and with their increase this activity increases (21). Studies show that the type and volume of solvent used to extract polysaccharides play a role in the content of polyphenols. The use of polar solvents such as ethanol increases polyphenols (10, 22). Kalyoncu *et al.* (2010), found that the antioxidant activity of the polysaccharide of the *F. fomentarius* was 5.97%. By optimizing the culture conditions in this study, the antioxidant activity of polysaccharide increased to 16.11%. Most biological properties such as antioxidant, antibacterial, and antiproliferative activity are observed when the initial pH of the fungal culture medium is in the range of 5-7 (23). The difference between the initial pH and the composition of the culture medium causes a difference in the phenolic content of the polysaccharide. These compounds are associated with antioxidant activity and reduction of OH[•], O₂[•], and NO[•] radicals (24). Investigations in this study and previous studies (4, 5, 11) show that this polysaccharide has an antiproliferative effect on cancer cells, but this effect varies in cell lines and increases with increasing of the concentration. The antiproliferative effect of *F. fomentarius* polysaccharide was observed (KYSE-30> A549 ≥563749> AGS> MKN-45) after 72 hours. In the treatment of KYSE-30 cells with 200 µg/mL polysaccharide, cell viability reaches 40% after 72 hours. Also, after 72 hours, the life expectancy of A549 and 5637 cancer cells was 45% and that of MKN-45 and AGS cancer cells was 66% and 62%, respectively. Today, the polysaccharides of the fungi like *Ganoderma lucidum* and *Tinea versicolor* are used as supplements in the treatment of various cancers. The anti-cancer activity of these polysaccharides includes inhibiting the growth of cancer cells and stimulating the immune system (25). The antiproliferative activity of fungal polysaccharides is related to the chemical structure and composition of their monosaccharides. The polysaccharide of *F. fomentarius* is rich in beta-

glucan, which has anti-cancer properties. This compound destroys transcription proteins in cancer cells and arrests the cell cycle in the G1 phase. It also induces apoptosis in cells by damaging organelles, the cell nucleus, and fragmenting DNA (10, 26, 27, 28). The results of this study showed that the polysaccharide of the medicinal *F. fomentarius*, due to its antibacterial, antioxidant and antiproliferative properties, can be a suitable option for the treatment of many diseases and can be used as a dietary supplement.

Conclusion

In this study, the production of biomass and polysaccharide of the Iranian medicinal *F. fomentarius* was optimized using the Taguchi method. Inoculum percentage had significant effects on biomass production and MgSO₄.7H₂O concentration and initial pH had significant effects ($P<0.05$) on polysaccharide production of this fungus and under optimal conditions (4 g/L MgSO₄.7H₂O, initial pH=8) polysaccharide production increases 1.5 times and reaches 5.410 g/L. Biological assessments showed that this polysaccharide inhibits the growth of *S. aureus* and *E. coli* 50% and 25%, respectively ($P<0.05$). Also, its antioxidant activity increases 2 times and reaches 16.11%. The antiproliferative effect of *F. fomentarius* polysaccharide is different on different cancer cells and increases with increasing concentration. The cell viability of KYSE-30 treatment with 200 µg/mL polysaccharide, reaches 40% after 72 hours. Also, the cell viability of A549 and 5637 cancer cells is 45% and the cell viability of MKN-45 and AGS cancer cells is 66% and 62%, respectively.

Acknowledgment

This article is taken from the master's thesis (19/06/28690), which would like to thank all the professors who helped us in the Faculty of New Sciences and Technologies, University of Tehran.

Funding

Funding for this study was provided by the authors in collaboration with the University of Tehran.

Conflict of Interest

Authors declared no conflict of interests.



بهینه سازی شرایط تولید پلی ساکارید زیست فعال از فومس فومنتاریوس و بررسی فعالیت ضدباکتریایی و ضدسرطانی

هاله الوندی^۱، اشرف السادات حاتمیان زارمی^{۲*}، بهمن ابراهیمی حسین زاده^۲، زهرا بیگم مختاری حسینی^۲

۱. کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی صنعت و محیط زیست، گروه مهندسی علوم زیستی، دانشکده علوم و فنون نوین، دانشگاه تهران، تهران، ایران
۲. استادیار، گروه مهندسی علوم زیستی، دانشکده علوم و فنون نوین، دانشگاه تهران، تهران، ایران
۳. دانشیار، گروه مهندسی شیمی، دانشکده مهندسی نفت و پتروشیمی، دانشگاه حکیم سبزواری، سبزوار، ایران

چکیده

اطلاعات مقاله

زمینه و اهداف: یکی از قارچ‌های دارویی که از دیرباز در طب سنتی استفاده شده است، قارچ بازیدیومیست فومس فومنتاریوس است که پراکندگی گسترده‌ای در ایران دارد. پلی‌ساکاریدها به‌عنوان یکی از متابولیت‌های این قارچ خواص ضد التهابی، ضد دیابتی، ضد باکتریایی، آنتی‌اکسیدانی و ضدسرطانی دارند. لذا در این مطالعه به بهینه سازی شرایط تولید پلی ساکارید زیست فعال از فومس فومنتاریوس و بررسی فعالیت ضدباکتریایی و ضدسرطانی پرداخته شد.

مواد و روش کار: بهینه‌سازی متغیرهای مستقل غلظت $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ، مقدار pH، عصاره مخمر و درصد مایه تلقیح به‌منظور افزایش تولید زیست‌توده و پلی‌ساکارید قارچ فومس فومنتاریوس با استفاده از روش تاگوچی مورد بررسی قرار گرفت. سپس خواص زیستی پلی‌ساکارید این قارچ شامل فعالیت ضدباکتریایی با روش شمارش کلنی باکتری، فعالیت آنتی‌اکسیدانی با استفاده از رادیکال آزاد DPPH و اثر ضدتکثیری روی ۵ رده سلول‌های سرطانی KYSE-30، A549، AGS، MKN-45 و 5637 با استفاده از تست MTS بررسی شد.

یافته‌ها: غلظت $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ و pH اولیه تاثیر معنی‌داری ($P < 0.05$) بر تولید پلی‌ساکارید قارچ فومس فومنتاریوس دارد و در شرایط بهینه تولید پلی‌ساکارید این قارچ به $5/410 \text{ g/L}$ می‌رسد. پلی‌ساکارید این قارچ رشد باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیا کلی* را به ترتیب ۵۰٪ و ۲۵٪ مهار می‌کند. فعالیت آنتی‌اکسیدانی این پلی‌ساکارید در تست DPPH، $1/16/11$ است. بررسی اثر ضدتکثیری این پلی‌ساکارید روی سلول‌های سرطانی متفاوت است ($AGS < 5637 \leq A549 < KYSE-30$). این اثر با افزایش غلظت افزایش می‌یابد. در تیمار رده سلولی KYSE-30 با $200 \mu\text{g/mL}$ پلی‌ساکارید، زنده‌مانی سلول‌ها پس از ۷۲ ساعت به ۴۰٪ می‌رسد.

نتیجه‌گیری: بهینه‌سازی محیط کشت قارچ دارویی فومس فومنتاریوس سبب افزایش تولید پلی‌ساکارید تا $5/410 \text{ g/L}$ می‌شود. بهینه‌سازی سبب افزایش فعالیت زیستی پلی‌ساکارید می‌شود. فعالیت ضدباکتریایی علیه *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیا کلی* به ۵۰٪ و ۲۵٪ می‌رسد. فعالیت آنتی‌اکسیدانی پلی‌ساکارید $1/16/11$ است و زنده‌مانی سلول‌های سرطانی KYSE-30 پس از ۷۲ ساعت به ۴۰٪ می‌رسد.

کلید واژه‌ها: فومس فومنتاریوس، بهینه‌سازی، تاگوچی، ضدباکتریایی، آنتی‌اکسیدانی، ضدسرطانی

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

تاریخچه مقاله
دریافت: ۱۳۹۹/۰۶/۰۶
پذیرش: ۱۳۹۹/۰۷/۱۴
انتشار آنلاین: ۱۳۹۹/۰۷/۲۹
موضوع: بیوتکنولوژی میکروبی

نویسنده مسئول:

اشرف السادات حاتمیان زارمی،

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

تهران، ایران

ایمیل:

hatamian_a@ut.ac.ir

مقدمه

متعدد، تنوع زیستی مناسب قارچ‌های دارویی در ایران و ارزش اقتصادی متابولیت‌های این قارچ‌ها لزوم توجه به این شاخه از علوم زیستی را نشان می‌دهد (۲). از میان قارچ‌های دارویی، قارچ بازیدیومیست فومس فومنتاریوس از دیرباز در درمان بیماری‌های گوارشی، سیروز کبدی، و انواع سرطان‌ها استفاده می‌شده است. پراکندگی این قارچ در ایران گسترده است و تاکنون وجود آن در

سابقه استفاده از قارچ‌های دارویی در کشورهای شرق آسیا به هزاران سال قبل برمی‌گردد. بسیاری از این قارچ‌ها امروزه نیز در درمان بیماری‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند (۱). از خواص قارچ‌های دارویی می‌توان به تحریک تکثیر لنفوسیت‌ها، کاهش تکثیر سلول‌های سرطانی، و تأثیرات ضد التهابی اشاره کرد. اهمیت روزافزون قارچ‌های دارویی و متابولیت‌های استخراج شده از آن‌ها در درمان بیماری‌های

جداسازی شد. در هر مورد نمونه قارچی به شکل سالم، کامل و مناسب برای شناسایی براساس رنگ، شکل، اندازه و تزیینات سطحی کلاهک، پایه، تیغه‌ها و بسیاری از مشخصات دیگر برداشت شد. نمونه‌های آسیب دیده از مطالعه حذف شدند. نمونه‌ها پس از تایید ریخت‌شناسی توسط قارچ‌شناسان در دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری شده است.

شناسایی و کشت قارچ فومس فومنتاریوس و استخراج پلی ساکارید

میسلیوم قارچ فومس فومنتاریوس در محیط PDA (تولید شده در شرکت مرک کشور آلمان) در یک ظرف پتری کشت شد و به مدت ۵ روز در ۲۸°C در انکوباتور قرار گرفت (BINDER، ایالات متحده آمریکا). برای تهیه مایه تلقیح، قطعه‌ای ۱۰ mm² از قارچ رشد کرده در محیط PDA به ۱۵۰ میلی لیتر محیط کشت PDB (تولید شده در شرکت مرک کشور آلمان) منتقل شد و به مدت ۷ روز در دمای ۲۸°C و ۱۵۰ rpm در شیکر انکوباتور (JAL TAJHIZ، ایران) قرار گرفت. محیط کشت مناسب این قارچ شامل گلوکز (۰/۵٪)، پپتون (۰/۲٪)، عصاره مالت (۱٪)، عصاره مخمر (۰/۲٪)، $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (۰/۲۵٪) و KH_2PO_4 (۰/۰۵٪) است. pH اولیه این محیط با اضافه کردن (۱ M) NaOH و (۱ M) HCl روی ۶ تنظیم شد. پس از اتوکلاو، ۵٪ v/v مایه تلقیح به آن اضافه شد و به مدت ۴ روز در دمای ۲۸°C و ۱۵۰ rpm در شیکر انکوباتور قرار گرفت (۱۱). به منظور استخراج پلی ساکارید قارچ فومس فومنتاریوس، پس از جدا کردن زیست توده با استفاده از کاغذ صافی، به سوپرناتانت اتانول مطلق با نسبت ۴:۱ v/v اضافه شد. پس از یک شب نگهداری در یخچال، رسوب پلی ساکارید به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۰۰۰۰ rpm سانتریفیوژ (AWEL/MF20-R / فرانسه) شد. زیست توده و پلی ساکارید لیوفیلیزه شدند (OPERON) و محصول نهایی در دمای اتاق نگهداری شد.

بهینه سازی ترکیبات محیط کشت با روش تاگوچی

به منظور بررسی اثر متغیرهای مستقل غلظت $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ، pH، عصاره مخمر و درصد مایه تلقیح بر تولید زیست توده و پلی ساکارید از روش تاگوچی استفاده شد. برای بررسی چهار متغیر در سه سطح از آرایه L9 تاگوچی استفاده شد (جدول ۱)، آزمایش‌ها مطابق این آرایه انجام شد و نتایج حاصل با استفاده از نرم افزار Stat-Design Expert 11 (Ease، ایالات متحده آمریکا) مورد بررسی قرار گرفتند.

ارزیابی های زیستی

فعالیت ضدباکتریایی

برای بررسی فعالیت ضدباکتریایی پلی ساکاریدها از روش شمارش کلنی باکتری استفاده شد (CFU). باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* (UTMC 1429) و *اشریشیا کلی* (PTCC 1269) از مرکز پژوهشی فناوری و فرآورده‌های میکروبی دانشگاه تهران

استان‌های مازندران، گلستان، گیلان، اصفهان، تهران، کردستان، کرمانشاه، خراسان و آذربایجان گزارش شده است (۲،۳). این قارچ از جنبه‌های مختلف دارای ویژگی‌های مهمی می‌باشد. این گونه به عنوان یکی از عوامل مهم پوسیدگی سفید قلبی روی درختان جنگلی مطرح است. عصاره آن خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدسرطانی دارد (۳). همچنین این قارچ برای تولید آنزیم لاکاز و استفاده در فرآیندهایی مانند رنگ‌زدایی و پاک‌سازی زیستی نیز مورد توجه است (۳-۵). یکی از ترکیبات زیست فعال این قارچ پلی ساکاریدها هستند که فعالیت ضد سرطانی، ضد التهابی، ضد دیابتی و تقویت سیستم ایمنی دارد (۴). پلی ساکارید بتاگلوکان فومس فومنتاریوس از رگ‌زایی تومور و متاستاز جلوگیری می‌کند (۶، ۷). اثر ضد تکثیری این پلی ساکارید روی رده سلول‌های سرطانی MKN-7، A549، SGC-7901 و MCF7 و مطالعات نشان می‌دهند 45 مشاهده شده است (۴، ۵، ۸). فعالیت ضدباکتریایی و ضدویروسی نیز دارند (۹، ۱۰). در سال ۲۰۰۸، Chen و همکاران تولید زیست توده و پلی ساکارید فومس فومنتاریوس در کشت غوطه‌ور را مورد بررسی قرار دادند. دمای ۲۵°C و pH اولیه در محدوده ۵-۶ برای رشد این قارچ مناسب است. همچنین استفاده از منبع کربنی گلوکز، منبع نیتروژنی عصاره مخمر، $CaCl_2$ و $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ سبب بهبود رشد زیست توده و افزایش تولید پلی ساکارید می‌شود (۱۱). کشت این قارچ در بیوراکتور همزن‌دار و بیوراکتور بستر جامد نیز مورد مطالعه قرار گرفته است (۴، ۱۲). مطالعات زیادی در مورد بهینه‌سازی محیط کشت مناسب سایر قارچ‌ها و تولید متابولیت آن‌ها با کمک روش‌های آماری صورت گرفته است. یکی از این روش‌های آماری، طراحی آرایه تاگوچی است که امکان بررسی و بهینه‌سازی هم‌زمان چند متغیر را فراهم می‌سازد (۱۳). از این‌رو در این پژوهش، تولید زیست توده و پلی ساکارید خارج سلولی قارچ دارویی فومس فومنتاریوس بومی که از جنگل‌های مازندران، ایران جداسازی شده است مورد بررسی قرار گرفت. همچنین ترکیبات محیط کشت این قارچ به منظور افزایش تولید زیست توده و پلی ساکارید با روش تاگوچی بهینه‌سازی شد. سپس فعالیت‌های زیستی پلی ساکارید شامل فعالیت ضدباکتریایی، آنتی‌اکسیدانی و سمیت سلولی بررسی گردید.

روش پژوهش

جمع آوری نمونه‌های قارچ و سویه استاندارد

در این مطالعه مقطعی-توصیفی، قارچ فومس فومنتاریوس از رانشستان‌های جنگل مازندران با همکاری دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری با روش نمونه‌گیری تصادفی در سال ۱۳۹۶

سرطانی در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه کشت داده شد (۲۴ ساعت). پس از تیمار با غلظت‌های مشخص پلی‌ساکارید به مدت ۲۴ و ۷۲ ساعت، μM ۱۰ محلول MTS (۱:۱۰ رقیق شده در محیط RPMI 1640) به هر چاهک اضافه گردید (هر نمونه ۴ تکرار) و به مدت ۳ ساعت در انکوباتور قرار گرفت (۱۵). سپس هر نمونه جذب با استفاده از دستگاه خوانشگر الیزا (Carry 100 Bio، استرالیا) در ۴۹۵ نانومتر خوانده شد و درصد زنده‌مانی سلول‌ها با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید:

معادله (۲):

$100 \times \text{جذب کنترل} / \text{جذب نمونه}$: درصد زنده‌مانی سلولی

تجزیه و تحلیل آماری

داده‌ها با استفاده از Stat-Ease Design Expert 11، ایالات متحده آمریکا) و روش آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. مقادیر ($P < 0.05$) از نظر آماری معنی‌دار تلقی شدند.

یافته‌ها

نتایج آزمایش‌های اولیه روی تولید زیست‌توده و پلی‌ساکارید قارچ دارویی فومنتاریوس نشان داد، چهار روز پس از کشت قارچ در محیط مطلوب تولید زیست‌توده به 15 g/L و تولید پلی‌ساکارید به 4.06 g/L می‌رسد. بنابراین محیط کشت شامل گلوکز، پپتون، عصاره مالت، عصاره مخمر، $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ و KH_2PO_4 محیطی مناسب برای رشد و تولید پلی‌ساکارید این قارچ می‌باشد.

بهینه‌سازی تولید زیست‌توده و پلی‌ساکارید

با توجه به نتایج اولیه، بهینه‌سازی محیط کشت با استفاده از روش تاگوچی با چهار فاکتور در سه سطح طراحی و اجرا شد (جدول ۱).

در شکل ۱ (A) نمودار مقایسه میزان زیست‌توده تولید شده در هر آزمایش و مقدار پیش‌بینی شده توسط نرم‌افزار آورده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود این نتایج به داده‌های پیش‌بینی شده توسط نرم‌افزار بسیار نزدیک است. R^2 برای تولید زیست‌توده ۹۰٪/۵۴ می‌باشد. تحلیل نتایج ANOVA با استفاده از نرم‌افزار Design Expert 11 نشان می‌دهد، درصد مایه تلقیح اثر معنی‌داری ($P < 0.05$) بر تولید زیست‌توده قارچ فومنتاریوس دارد (جدول ۲). مدل خطی برای تولید زیست‌توده بر اساس هریک از متغیرها به صورت زیر است:

معادله (۳):

$$\text{Biomass: } 10.44 - 1.44A - 0.4200B + 1.55C - 3.18D$$

و مرکز کلکسیون میکروارگانیسم‌های صنعتی ایران تهیه شدند. این باکتری‌ها در محیط مولر هینتون براث (شرکت مرک کشور آلمان) کشت داده شدند. و پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون (BINDER، ایالات متحده آمریکا)، محلول ۰/۵ مک فارلند از آن‌ها تهیه گردید. محلول ۵٪ هر پلی‌ساکارید با محلول ۰/۵ مک فارلند از هر باکتری به حجم ۵۰۰ میکرولیتر تهیه و به مدت ۲۴ ساعت در شیکر انکوباتور (JAL، TAJHIZ، ایران) با دمای 37°C و 140 rpm نگهداری شد. مخلوط فوق با بافر سالین فسفات (PBS) رقیق شد (۱:۱۰) و ۱۰ میکرولیتر آن در محیط نوترینت آگار (تولید شده در شرکت مرک کشور آلمان) کشت داده شد. در حالت کنترل ۱۰ میکرولیتر از محلول ۰/۵ مک فارلند هر باکتری کشت داده شد (هر نمونه سه بار تکرار). سپس همه محیط‌های کشت در انکوباتور قرار گرفتند و پس از ۲۴ ساعت شمارش کلنی باکتری با دستگاه ژل داگ (Quantum، فرانسه) انجام شد (۱۴).

فعالیت آنتی‌اکسیدانی

به‌منظور بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی پلی‌ساکاریدها از تست DPPH استفاده شد. پس از تهیه محلول 2 mg/mL پلی‌ساکارید در آب مقطر، محلول پلی‌ساکارید و محلول DPPH با نسبت ۴:۱ v/v مخلوط گردید و به مدت ۳۰ دقیقه در شیکر انکوباتور گذاشته شد (۱۰). سپس جذب نمونه‌ها در ۵۱۷ نانومتر با دستگاه خوانشگر الیزا (Carry 100 Bio، استرالیا) سنجیده شد و فعالیت آنتی‌اکسیدانی با توجه به فرمول زیر محاسبه گردید:

معادله (۱):

$$\text{DPPH} \cdot \text{scavenging effect (\%)} = [(A_0 - A_{\text{sample}}) / A_0] \times 100$$

A_0 : جذب محلول DPPH در ۵۱۷ نانومتر

A_{sample} : جذب نمونه مورد آزمایش در ۵۱۷ نانومتر

بررسی سمیت سلولی

رده سلول‌های سرطانی KYSE-30، A549، AGS، MKN-45 و 5637 از مرکز ذخایر ژنتیک ایران خریداری شدند. سلول‌های سرطانی در محیط RPMI 1640 به همراه 2 mM L-گلوتامین و ۱۵٪ FBS کشت داده شد و در انکوباتور CO_2 در دمای 37°C نگهداری شد. به‌منظور بررسی اثر پلی‌ساکارید، محلول آن در آب استریل آماده گردید (1 mg/mL) و با غلظت‌های مشخص (50 ، 100 ، $200 \mu\text{g/mL}$) برای تیمار سلول‌ها به مدت ۲۴ و ۷۲ ساعت مورد استفاده قرار گرفت. در این آزمایش کنترل مثبت شامل محیط کشت و کنترل منفی کشت سلولی فاقد تیمار بود. به‌منظور بررسی زنده‌مانی سلولی از تست MTS استفاده شد. ۲۰۰۰ سلول

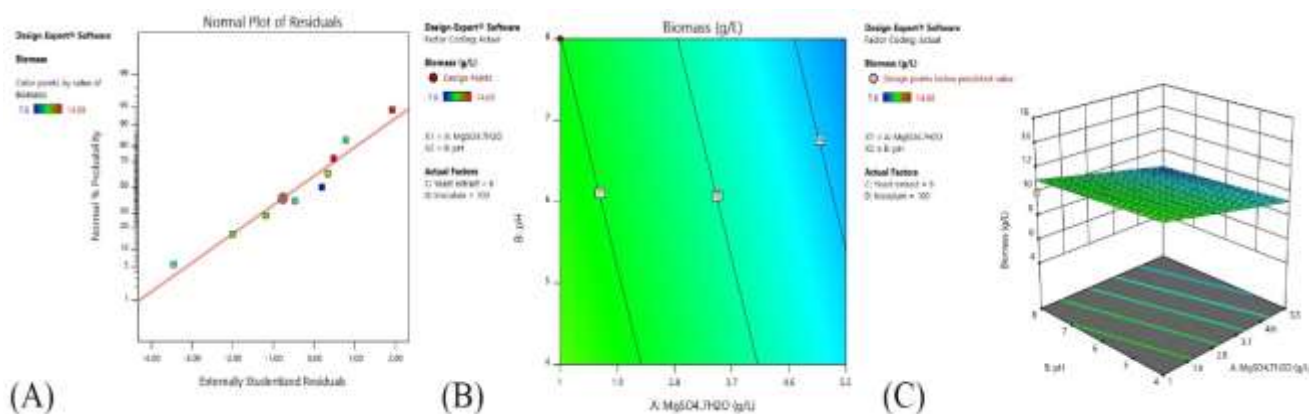
جدول ۱. چیدمان طراحی آزمایش آرایه L9 تاگوچی و نتایج بدست آمده برای تولید زیست توده و پلی ساکارید قارچ فومس فومنتاریوس.

پاسخ		متغیرها				
پلی ساکارید (g/L)	زیست توده (g/L)	D: مایه تلقیح (v/v)	C: عصاره مخمر (g/L)	B: pH	A: MgSO ₄ .7H ₂ O (g/L)	آزمایش
۴/۴۹۸	۹/۸۹۰	۵	۲	۸	۲/۵	۱
۲/۳۳۷	۱۰/۵۶۰	۱۰	۴	۴	۲/۵	۲
۱/۲۷۴	۱۱/۸۴۰	۳	۲	۴	۱	۳
۲/۷۸۵	۱۴/۵۲۲	۵	۴	۶	۱	۴
۴/۲۰۱	۱۱/۶۲۶	۵	۶	۴	۴	۵
۲/۸۷۸	۹/۹۲۰	۱۰	۶	۸	۱	۶
۳/۵۷۳	۱۴/۶۹۰	۳	۶	۶	۲/۵	۷
۵/۴۱۰	۱۲/۱۵۰	۳	۴	۸	۴	۸
۳/۱۱۰	۷/۶۰۰	۱۰	۲	۶	۴	۹

جدول ۲. آنالیز واریانس و ضرایب رگرسیون برای تولید زیست توده قارچ فومس فومنتاریوس.

P-value	F-value	مربع میانگین	درجه آزادی	مجموع مربعات	مدل
۰/۰۲۵۱	۹/۵۷	۱۰/۴۲	۴	۴۱/۶۹	مدل
۰/۰۸۶۸	۵/۵۵	۵/۵۵	۱	۵/۵۵	A: MgSO ₄ .7H ₂ O (g/L)
۰/۳۸۰۰	۰/۹۷۲۲	۱/۰۶	۱	۱/۰۶	B: pH
۰/۰۷۲۳	۵/۸۸	۶/۴۱	۱	۶/۴۱	C: عصاره مخمر (g/L)
۰/۰۰۶۸	۲۶/۳۴	۲۸/۶۷	۱	۲۸/۶۷	D: مایه تلقیح (v/v)
		۱/۰۹	۴	۴/۲۵	باقی مانده
			۸	۴۶/۰۵	مجموع

در این معادله (A) غلظت MgSO₄.7H₂O، (B) pH، (C) عصاره مخمر و (D) درصد مایه تلقیح است. نمودار دو بعدی و سه بعدی و سهمی اثر متغیرها بر تولید زیست توده در شکل ۱ نمایش داده شده است



شکل ۱. نمودار مقایسه میزان زیست توده تولیدشده و پیش بینی شده (A)، نمودار دو بعدی (B) و سه بعدی (C) اثر متغیرهای MgSO₄.7H₂O و pH اولیه بر تولید زیست توده قارچ فومس فومنتاریوس.

بر اساس هریک از متغیرها به صورت زیر است:

معادله (۴):

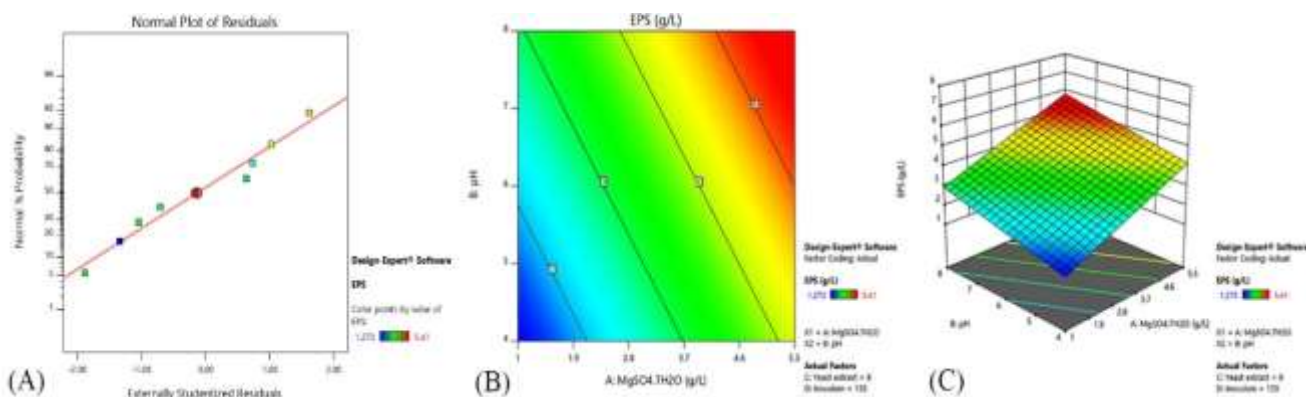
$$\text{Polysaccharide: } 3.71 + 1.45A + 0.8292B + 0.4427C - 0.6025D$$

در این معادله (A) غلظت $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ، pH (B)، عصاره مخمر و (D) درصد مایه تلقیح است. نمودار دو بعدی و سه بعدی اثر متغیرها بر تولید پلی ساکارید در شکل ۲ نمایش داده شده است.

مقایسه میزان پلی ساکارید تولید شده در هر آزمایش و مقدار پیش بینی شده توسط نرم افزار نشان می دهد این نتایج به بسیار نزدیک است (شکل ۲، A). R^2 برای تولید پلی ساکارید ۹۱/۶۸٪ می باشد. تحلیل نتایج ANOVA با استفاده از نرم افزار Design Expert 11 نشان می دهد، غلظت $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ و pH اولیه اثر معنی داری ($P < 0.05$) بر تولید پلی ساکارید قارچ فومس فومنتاریوس دارند (جدول ۳). مدل خطی برای تولید پلی ساکارید

جدول ۳. آنالیز واریانس و ضرایب رگرسیون برای تولید پلی ساکارید قارچ فومس فومنتاریوس.

P-value	F-value	مربع میانگین	درجه آزادی	مجموع مربعات	مدل
۰/۰۱۹۶	۱۱/۰۲	۲/۸۱	۴	۱۱/۲۵	A: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (g/L)
۰/۰۰۹۵	۲۱/۸۴	۵/۵۸	۱	۵/۵۸	B: pH
۰/۰۱۵۹	۱۶/۱۶	۴/۱۳	۱	۴/۱۳	C: عصاره مخمر (g/L)
۰/۲۲۵۷	۲/۰۵	۰/۵۲۲۷	۱	۰/۵۲۲۷	D: مایه تلقیح (v/v)
۰/۱۱۵۳	۴/۰۲	۱/۰۳	۱	۱/۰۳	باقی مانده
		۰/۲۵۵۳	۴	۱/۰۲	مجموع
			۸	۱۲/۲۷	



شکل ۲. نمودار مقایسه میزان پلی ساکارید تولید شده و پیش بینی شده (A)، نمودار دو بعدی (B) و سه بعدی (C) اثر متغیرهای $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ و pH اولیه بر تولید زیست توده قارچ فومس فومنتاریوس.

بیشترین اثر مهاری را داشت ($P < 0.05$). همچنین این نمونه بهینه سازی شده، می تواند رشد باکتری /شیرشیا کلی را تا ۲۴٪ مهار کند. بیشترین اثر مهاری روی /شیرشیا کلی در نمونه ۳ مشاهده شد (۲۵٪). بین فعالیت ضدباکتریایی پلی ساکاریدها روی باکتری /شیرشیا کلی تفاوت معنی داری مشاهده نشد. در شکل ۳ (A) نمودار میزان فعالیت ضدباکتریایی پلی ساکارید قارچ فومس فومنتاریوس نشان داده شده است.

فعالیت آنتی اکسیدانی

فعالیت آنتی اکسیدانی پلی ساکاریدهای تولید شده توسط قارچ فومس فومنتاریوس در آزمایش های تاگوچی با استفاده از رادیکال آزاد DPPH بررسی شد. زمانیکه ماده آنتی اکسیدانی

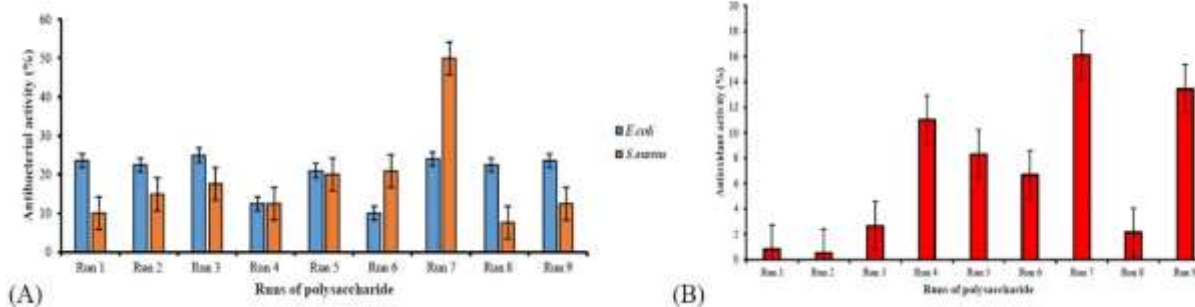
ارزیابی های زیستی

فعالیت ضدباکتریایی

فعالیت ضدباکتریایی پلی ساکارید تولید شده توسط قارچ فومس فومنتاریوس در آزمایش های تاگوچی در برابر باکتری گرم مثبت /استافیلوکوکوس اورئوس و باکتری گرم منفی /شیرشیا کلی مورد بررسی قرار گرفت. شمارش کلنی باکتری با استفاده از دستگاه ژل داک نشان داد در نمونه کنترل هر دو سویه، رشد باکتری ها ۱۰۰٪ است. شمارش کلنی ها نشان می دهد پلی ساکارید این قارچ اثر مهاری بر رشد باکتری ها دارد. این اثر روی باکتری گرم مثبت /استافیلوکوکوس اورئوس بیشتر است. نمونه ۷ بهینه سازی شده با ۵۰٪ مهار /استافیلوکوکوس اورئوس

(شکل ۳، B). تجزیه و تحلیل نتایج DPPH نشان داد پلی ساکارید تولید شده در محیط ۷ بالاترین فعالیت آنتی اکسیدانی (۱۶/۱۱٪) را نشان می دهد. کمترین فعالیت آنتی اکسیدانی مربوط به نمونه ۲ است.

پروتون در اختیار این رادیکال آزاد قرار می دهد، جذب آن در ۵۱۷ نانومتر کاهش می یابد؛ این کاهش نشان دهنده میزان فعالیت آنتی اکسیدانی است. فعالیت آنتی اکسیدانی پلی ساکارید تولید شده توسط این قارچ در محیط های مختلف، متفاوت است

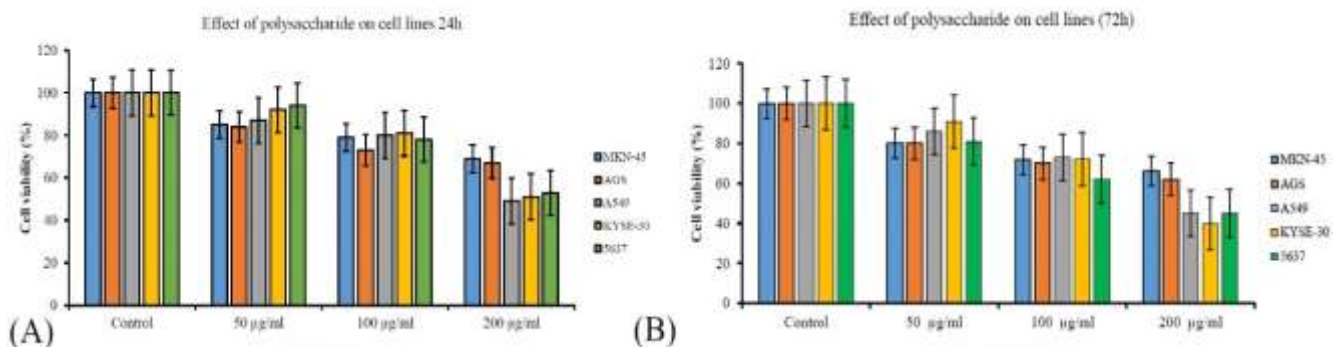


شکل ۳. فعالیت ضد باکتریایی (A) و آنتی اکسیدانی (B) پلی ساکارید به دست آمده از آرایه L9 تاگوچی.

سلول سرطانی مشاهده نشد. در غلظت ۱۰۰ µg/mL پلی ساکارید، بیشترین اثر ضد تکثیری روی رده سلولی AGS بوده و این اثر به طور معنی داری بیشتر از سایر رده های سلولی است ($P < 0.05$). در غلظت ۲۰۰ µg/mL پلی ساکارید، رشد اثر سلول سرطانی A549 را بیش از ۵۰٪ مهار می کند ($P < 0.05$). پس از ۷۲ ساعت، در غلظت ۵۰ µg/mL بین اثر ضد تکثیری پلی ساکارید روی رده سلول های سرطانی تفاوت معنی داری مشاهده نشد. در غلظت ۱۰۰ µg/mL پلی ساکارید قارچ فومس فومنتاریوس بیشترین اثر ضد تکثیری را روی رده سلولی 5637 نشان می دهد ($P < 0.05$) و زندمانی سلولی به ۶۲٪ می رسد. در غلظت ۲۰۰ µg/mL، پلی ساکارید رشد سلول های A549، KYSE-30، و 5637 را تا ۴۰٪ مهار می کند و تفاوت معنی داری در مقایسه با این اثر روی سلول های MKN-45 و AGS دارد ($P < 0.05$).

بررسی سمیت سلولی

ارزیابی های زیستی در مراحل قبل نشان داد، نمونه ۷ بیشترین فعالیت زیستی را دارد؛ بنابراین از این نمونه برای بررسی سمیت سلولی استفاده شد. در این مطالعه اثر ضد تکثیری پلی ساکارید این قارچ در غلظت های مختلف روی ۵ رده سلول های سرطانی MKN-45، AGS، A549، KYSE-30 و 5637 با استفاده از تست MTS مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۴). به طور کلی پلی ساکارید قارچ فومس فومنتاریوس رشد همه سلول های سرطانی مورد مطالعه را به طور معنی داری ($P < 0.05$) مهار می کند. پس از ۲۴ ساعت، اثر ضد تکثیری پلی ساکارید در غلظت ۵۰ µg/mL روی AGS به طور معنی داری ($P < 0.05$) بیشتر از این اثر روی KYSE-30 و 5637 است، اما تفاوتی بین اثر ضد تکثیری پلی ساکارید در سایر رده های



شکل ۴. نمودار زندمانی سلولی ۵ رده سلول سرطانی تیمار شده با پلی ساکارید قارچ فومس فومنتاریوس پس از ۲۴ (A) و ۷۲ ساعت (B).

بحث

در این مطالعه، بهینه‌سازی تولید زیست‌توده و پلی‌ساکارید قارچ دارویی فومس فومنتاریوس و خواص زیستی پلی‌ساکارید آن مورد بررسی قرار گرفت. همان‌طور که در مطالعات قبلی (۴) و این پژوهش مشاهده شد، محیط کشت مناسب این قارچ شامل گلوکز، پیتون، عصاره مالت، عصاره مخمر، $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ و KH_2PO_4 است. بررسی‌ها نشان می‌دهد پیتون در این محیط نقش مهمی در افزایش رشد و تولید آنزیم‌های قارچی دارد (۱۶). بهینه‌سازی محیط کشت با استفاده از روش تاگوچی نشان داد غلظت $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ و pH اولیه تاثیر معنی‌داری ($P < 0.05$) بر تولید پلی‌ساکارید این قارچ دارند. با افزایش $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ و pH اولیه تولید پلی‌ساکارید قارچ فومس فومنتاریوس افزایش می‌یابد. pH در نفوذپذیری، عملکرد غشا سلولی، و تولید متابولیت‌های ثانویه نقش دارد (۱۱). منیزیم عنصر مهمی در متابولیسم قارچ‌ها است. این عنصر کوفاکتور بسیاری از واکنش‌های آنزیمی است و بر متابولیسم سلولی تأثیر دارد. علاوه بر این منیزیم سبب پایداری غشای سلولی و کاهش استرس‌های سلولی می‌شود. هم‌چنین در همانندسازی DNA و تقسیم سلولی نقش مهمی دارد (۱۱، ۱۷، ۱۸). Chen و همکاران در سال ۲۰۰۸، مشاهده کردند رشد قارچ و تولید پلی‌ساکارید آن با افزودن $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ، افزایش معنی‌داری می‌یابد. با بهینه‌سازی محیط کشت، تولید پلی‌ساکارید این قارچ به $3/64 \text{ g/L}$ می‌رسد. در این مطالعه در شرایط بهینه (pH اولیه = ۸، $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ۴، تولید پلی‌ساکارید قارچ دارویی فومس فومنتاریوس به $5/410 \text{ g/L}$ رسید. این مقدار ۱/۵ برابر تولید پلی‌ساکارید در محیط متداول کشت قارچ‌ها (PDB) است (۱۱).

مطالعات نشان می‌دهند شرایط فیزیکی و شیمیایی محیط کشت مانند منبع کربنی، منبع نیتروژنی، منابع معدنی، pH و دمای کشت نقش مهمی در فعالیت زیستی متابولیت‌های قارچی دارند (۱۹، ۲۰). پلی‌ساکارید قارچ فومس فومنتاریوس رشد باکتری استافیلوکوکوس اورئوس و اشیریشیا کلی را به ترتیب ۵۰٪ و ۲۵٪ مهار می‌کند. پلی‌ساکارید این قارچ حاوی ترپنوئیدها و پلی‌فنول‌ها با فعالیت ضدباکتریایی است و با افزایش آن‌ها این فعالیت افزایش می‌یابد (۲۱). مطالعات نشان می‌دهد نوع و حجم حلال مورد استفاده برای استخراج پلی‌ساکاریدها در محتوای پلی‌فنول‌ها نقش دارد. استفاده از حلال‌های قطبی مانند اتانول سبب افزایش پلی‌فنول‌ها می‌شود (۲۲، ۱۰). Kalyoncu و همکاران در سال ۲۰۱۰ مشاهده کردند فعالیت آنتی‌اکسیدانی پلی‌ساکارید قارچ فومس فومنتاریوس ۹۷٪/۵ است. با بهینه‌سازی شرایط محیط کشت در این پژوهش، فعالیت

نتیجه‌گیری

در این پژوهش تولید زیست‌توده و پلی‌ساکارید قارچ دارویی فومس فومنتاریوس بومی ایران با استفاده از روش تاگوچی بهینه‌سازی شد. درصد مایه تلقیح اثر معنی‌داری بر تولید

سپاسگزاری

این مقاله برگرفته از پایان نامه کارشناسی ارشد با کد ۲۸۶۹۰/۰۶/۱۹ می باشد، بدینوسیله از تمام اساتید محترم دانشکده علوم و فنون نوین دانشگاه تهران، ایران که ما را یاری نمودند تشکر و قدردانی می گردد.

تعارض در منافع

این مقاله پژوهشی مستقل است که بدون حمایت مالی سازمانی انجام شده است. در انجام مطالعه حاضر، نویسندگان هیچ گونه تضاد منافی نداشته اند.

زیست توده و غلظت $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ و pH اولیه اثر معنی داری ($P < 0.05$) بر تولید پلی ساکارید این قارچ دارد و در شرایط بهینه ($pH = 4$ ، $4 \text{ g/L } MgSO_4 \cdot 7H_2O$) تولید پلی ساکارید ۱/۵ برابر شده و به $5/410 \text{ g/L}$ می رسد. ارزیابی های زیستی نشان می دهد این پلی ساکارید رشد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیا کلی* را به ترتیب ۵۰٪ و ۲۵٪ مهار می کند ($P < 0.05$). هم چنین فعالیت آنتی اکسیدانی آن بیش از ۲ برابر افزایش می یابد و به ۱۶/۱۱٪ می رسد. اثر ضد تکثیر پلی ساکارید قارچ فومس *فومنتاریوس* روی سلول های سرطانی متفاوت بوده و با افزایش غلظت افزایش می یابد. زندمانی KYSE-30 در تیمار با $200 \mu\text{g/mL}$ پلی ساکارید، پس از ۷۲ ساعت به ۴۰٪ می رسد. هم چنین زندمانی سلول های سرطانی A549 و 5637، ۴۵٪ و زندمانی سلول های سرطانی MKN-45 و AGS به ترتیب به ۶۶٪ و ۶۲٪ می رسد.

Referance

- Cui J, Chisti Y. Polysaccharopeptides of *Coriolus versicolor*: physiological activity, uses, and production. *Biotechnol. Adv.* 2003; 21(2):109-122. [DOI:10.1016/S0734-9750(03)00002-8]
- Asefshayan MR. *Medicinal fungi of Iran*, 247, Tehran: Iranshenasi; 2016.
- Grienke U, Zöll M, Peintner U, M. Rollinger J. European medicinal polypores - A modern view on traditional uses. *J. Ethnopharmacol.* 2014; 154(3):564-583. [DOI:10.1016/j.jep.2014.04.030] [PMID]
- Chen W, Zhao Z, Li YQ. Simultaneous increase of mycelial biomass and intracellular polysaccharide from *Fomes fomentarius* and its biological function of gastric cancer intervention. *Carbohydr. Polym.* 2011; 85(2):369-375. [DOI:10.1016/j.carbpol.2011.02.035]
- Kim SH, Jakhar R, Kang SH. Apoptotic properties of polysaccharide isolated from fruiting bodies of medicinal mushroom *Fomes fomentarius* in human lung carcinoma cell line. *Saudi J Biol Sci.* 2015; 22(4):484-490. [DOI:10.1016/j.sjbs.2014.11.022] [PMID] [PMCID]
- R-Hernandez L, CG-Franco A, S-Parra JM, M-Dominguez F. Review of agricultural and medicinal applications of basidiomycete mushrooms. *Tecnociencia.* 2008; 1(2):95-107.
- Patel S, Goyal A. Recent developments in mushrooms as anti-cancer therapeutics: a review. *3 Biotech*, 2012; 2(1):1-15. [DOI:10.1007/s13205-011-0036-2] [PMID] [PMCID]
- Zang Y, Xiong J, Zhai WZ, Cao L, Zhang SP, Tang Y, Wang J, Su JJ, Yang GX, Zhao Y, Fan H, Xia G, Wang CG, Hua JF. Fomentarols A-D, sterols from the polypore macrofungus *Fomes fomentarius*. *Phytochemistry.* 2013; 92:137-145. [DOI:10.1016/j.phytochem.2013.05.003] [PMID]
- Krupodorova T, Rybalko S, Barshteyn V. Antiviral activity of Basidiomycete mycelia against influenza type A (serotype H1N1) and herpes simplex virus type 2 in cell culture. *Virologia Sin.* 2014; 29(5):284-290. [DOI:10.1007/s12250-014-3486-y] [PMID]
- Kolundzic M, Grozdanic ND, Dodevska M, Milenkovi'c M, Sisto F, Miani A, Farronato G, Kundakovi'ca T. Antibacterial and cytotoxic activities of wild mushroom *Fomes fomentarius* (L.) Fr.. *Polyporaceae. Ind Crops Prod.* 2016; 79:110-115. [DOI:10.1016/j.indcrop.2015.10.030]
- Chen W, Zhao Z, Chen SF, Li YQ. Optimization for the production of exopolysaccharide from *Fomes fomentarius* in submerged culture and its antitumor effect in vitro. *Bioresour. Technol.* 2008; 99(8):3187-3194. [DOI:10.1016/j.biortech.2007.05.049] [PMID]
- Neifar M, Jaouani A, Ayari A, Abid O, B-Salem H, Boudabous A, Najjar T, E-Ghorbel R. Improving the nutritive value of Olive Cake by solid state cultivation of the medicinal mushroom *Fomes fomentarius*. *Chemosphere.* 2013; 91(1):110-114. [DOI:10.1016/j.chemosphere.2012.12.015] [PMID]
- Houng JY, Hsu HF, Liu YH, Wu JY. Applying the Taguchi robust design to the optimization of the asymmetric reduction of ethyl 4-chloro acetoacetate by bakers' yeast. *J. Biotechnol.* 2003; 100, 239-250. [DOI:10.1016/S0168-1656(02)00179-7]
- Andreazza NL, De Lourenço CC, Stefanello MÉ, Atvars TD, Salvador MJ. Photodynamic antimicrobial effects of bis-indole alkaloid indigo from *Indigofera truxillensis* Kunth (Leguminosae). *Lasers Med Sci.* 2015;

- 30(4):1315-1324. [DOI:10.1007/s10103-015-1735-4] [PMID]
15. Arab-Bafrani Z, Shahbazi-Gahrouei D, Abbasian M, Fesharaki M. Multiple MTS Assay as the Alternative Method to Determine Survival Fraction of the Irradiated HT-29 Colon Cancer Cells. *J Med Signals Sens.* 2016; 6(2): 112-116. [DOI:10.4103/2228-7477.181040] [PMID] [PMCID]
 16. Qinghe C, Xiaoyu Y, Tianguai N, Cheng J, Qiugang M. The screening of culture condition and properties of xylanase by white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Process Biochem.* 2004; 39(11): 1561-1566. [DOI:10.1016/S0032-9592(03)00290-5]
 17. Okwudili U. Role of magnesium ions on yeast performance during very high gravity fermentation. *J. Brew. Distilling.* 2013; 4:19-45. [DOI:10.5897/JBD2013.0041]
 18. M.R.Rees E, G.Stewart G. The effects of increased magnesium and calcium concentrations on yeast fermentation performance in high gravity worts. *J. Inst. Brew.* 1997; 103: 287-291. [DOI:10.1002/j.2050-0416.1997.tb00958.x]
 19. Arora D S, Chandra P. Assay of antioxidant potential of two *Aspergillus* isolates by different methods under various physio-chemical conditions. *Braz J Microbiol.* 2010; 41(3), 765-777. [DOI:10.1590/S1517-83822010000300029] [PMID] [PMCID]
 20. Bhattacharyya PN, Jha DK. Optimization of cultural conditions affecting growth and improved bioactive metabolite production by a subsurface *Aspergillus* strain tsf 146. *Int J Appl Biol Pharm.* 2011. 2(4): 133-143.
 21. Prasad L, Kundu A, Bahukhandi D. Comparative analysis of volatile fractions of *Fomes fomentarius* and *F.rhabarbarinus*. *Indian Phytopathol.* 2018; 71: 25-31. [DOI:10.1007/s42360-018-0003-5]
 22. Huang QL, Siua KC, Wanga WQ, Cheunga YC, Wu JY. Fractionation, characterization and antioxidant activity of exopolysaccharides from fermentation broth of a *Cordyceps sinensis* fungus. *Process Biochem.* 2013; 48(2):380-386. [DOI:10.1016/j.procbio.2013.01.001]
 23. Kalyoncu F, Oskaya M, Kayalar H. Antioxidant activity of the mycelium of 21 wild mushroom species. *Mycology.* 2010; 1(3): 195-199. [DOI:10.1080/21501203.2010.511292]
 24. Miao L, F.N.Kwong T, Qian PY. Effect of culture conditions on mycelial growth, antibacterial activity, and metabolite profiles of the marine-derived fungus *Arthrinium c.f. saccharicola*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2006; 72: 1063-1073. [DOI:10.1007/s00253-006-0376-8] [PMID]
 25. R. Perron N, L. Brumaghim J. A review of the antioxidant mechanisms of polyphenol compounds related to iron binding. *Cell Biochem Biophys.* 2009; 53:75-100. [DOI:10.1007/s12013-009-9043-x] [PMID]
 26. M.Zhang, S.W.Cui, P.C.K.Cheung, Q.Wang. Antitumor polysaccharides from mushrooms: a review on their isolation process, structural characteristics and antitumor activity. *Trends Food Sci Tech.* 2007; 18(1), 4-19. [DOI:10.1016/j.tifs.2006.07.013]
 27. D-Petrova R, Z-Reznick A, P-Wasser S, M-Denchev C, Nevo E, Mahajna J. Fungal metabolites modulating NF- κ B activity: An approach to cancer therapy and chemoprevention (Review). *Oncology reports.* 2008; 19(2):299-308. [DOI:10.3892/or.19.2.299] [PMID]
 28. Queiroz EA, Fortes ZB, da Cunha MA, Barbosa AM, Khaper N, Dekker RF. Antiproliferative and pro-apoptotic effects of three fungal exocellular β -glucans in MCF-7 breast cancer cells is mediated by oxidative stress, AMP-activated protein kinase (AMPK) and the Forkhead transcription factor, FOXO3a. *Int J Biochem Cell Biol.* 2015; 67:14-24. [DOI:10.1016/j.biocel.2015.08.003] [PMID]
 29. Choe JH, Yi YJ, Lee MS, Seo DW, Yun BS, Lee SM. 2015. Methyl 9-Oxo-(10E,12E)-octadecadienoate isolated from *Fomes fomentarius* attenuates lipopolysaccharide-induced inflammatory response by blocking phosphorylation of STAT3 in murine macrophages. *Mycobiology.* 2015; 43(3): 319-26. [DOI:10.5941/MYCO.2015.43.3.319] [PMID] [PMCID]