Original Article

Iranian Journal of Medical Microbiology

Iran J Med Microbiol: Volume 11, Number 1 (March - April)

Journal homepage: www.ijmm.ir

Farname Inc.

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

Fahimeh Nojoki[1], Ashrafalsadat Hatamian-Zarmi[1], Bahman Ebrahimi Hosseinzadeh[1], Mohammad Mir-derikvand[1], Zahra Beygom mokhtari-Hosseini[2], Said Kalantari-Dehaghi[1]

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

Article Information

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

Article Subject:
Microbial Biotechnology

IJMM 2017; 11(1): 58-66

Corresponding author at:

Dr. Ashrafalsadat Hatamian-Zarmi

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

Tel: 0982161118503

Email:
hatamian_a@ut.ac.ir

Abstract

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

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

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

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

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

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

How to cite this article:

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

مقاله پژوهشی

مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران

سال ۱۱ – شماره ۱ – فروردین و اردیبهشت ۱۳۹۶

Journal homepage: www.ijmm.ir

Farname Inc.

بررسی و بهینه‌سازی اثر امواج فراصوت بر تولید گنودریک اسید، متابولیت ضد سرطان قارچ *Ganoderma lucidum*

فهیمه نوجوکی[۱]، اشرف‌السادات حاتمیان زارمی[۱]، بهمن ابراهیمی حسین زاده[۱]، محمد میردریکوند[۱]، زهرا بیگم مختاری حسینی[۲]، سعید کلانتری دهقی[۱]

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

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

اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله

دریافت: ۱۳۹۵/۰۳/۱۴

پذیرش:۱۳۹۵/۰۷/۰۹

انتشار آنلاین:۱۳۹۵/۰۷/۲۶

موضوع:

بیوتکنولوژی میکروبی

IJMM 1396; 11(1): 58-66

نویسنده مسئول:

دکتر اشرف‌السادات حاتمیان زارمی

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

تلفن: ۰۹۸۲۱۶۱۱۱۸۵۰۳

پست الکترونیک:

hatamian_a@ut.ac.ir

چکیده

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

مواد و روش کار: ابتدا جهت اطمینان از اثر تحریک‌کنندگی امواج فراصوت بر تولید گنودریک اسید، کشت مایع قارچ تحت تیمارهای یک‌بار (روز پنجم) و دو بار صوت دهی (روز پنجم و ششم) در زمان‌های ۲۰ و ۲۰۰ ثانیه قرار گرفت. پس از استخراج گنودریک اسید و اطمینان از اثر مثبت شوک، جهت بهینه‌سازی متغییرها از روش پاسخ سطح استفاده گردید. در این روش ۱۷ آزمایش با سه متغیر اولین زمان صوت دهی (روزهای ٤، ٥، ٦)، دومین زمان صوت دهی (روزهای ۷،۸،۹) و مدت‌زمان صوت دهی (٦٠، ١٨٠، ٣٠٠ ثانیه) توسط نرم‌افزار Design Expert طراحی و انجام شد.

یافته‌ها: بررسی نتایج نشان داد اثر امواج فراصوت با دو بار تیمار ۲۷٤ ثانیه‌ای در روزهای ٤ و ۷ می‌تواند بالاترین میزان تولید گنودریک اسید را ایجاد نماید. آزمایش مربوط به این نقطه انجام و نتایج به‌دست‌آمده تأیید شد. با مقایسه نمونه‌های صوت دهی شده با شاهد (فاقد صوت دهی) افزایش گنودریک اسید خارج سلولی به نسبت گنودریک اسید داخل سلولی مشخص گردید. در شرایط بهینه فرآیند، صوت دهی، میزان گنودریک اسید را نسبت به نمونه شاهد ٣٤٪ افزایش داد.

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

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

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

مقدمه

قارچ *Ganoderma lucidum* از معروف‌ترین قارچ‌های دارویی جهان می‌باشد. این قارچ دارای ویژگی‌هایی مانند تقویت سیستم ایمنی، فعالیت ضدویروسی و اثرات ضد توموری است (۱). در طب سنتی چینی از این قارچ برای مبارزه با بیماری‌هایی مانند هپاتیت، برونشیت، میگرن، فشارخون، التهاب مفاصل، بواسیر، آسم، بی‌اشتهایی، کلسترول بالا، التهاب کلیه و یبوست استفاده می‌شود (۲). قارچ *G.lucidum* حاوی انواع پروتئین‌ها، پلی ساکاریدها و متابولیت‌های ثانویه می‌باشد که هرکدام نقش خاصی در درمان انواع بیماری‌ها دارند (۱). تحقیقات دانشمندان نشان داده است که برخی از این متابولیت‌ها دارای اثرات چشم‌گیری بر القای آپوپتوزیس، مهار متاستاز و به‌طور کل کنترل رشد سلول‌های سرطانی می‌باشند (۳). به‌عنوان‌مثال گنودریک اسید D، DM، گنودرول B و گنودرمانونتریول مهم‌ترین

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

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

مواد و روش‌ها

کشت قارچ *G.lucidum*

قارچ *G.lucidum* CCGMC 5.616 از بانک میکروبی دانشگاه فردوسی مشهد تهیه شد و در محیط PDA خریداری شده از شرکت Merck آلمان کشت داده و در انکوباتور (IKA-KS 4000 ساخت آلمان) در دمای ۳۰ ˚C به مدت یک هفته نگهداری شد. محیط YPG به منظور کشت مایع ایستا از شرکت Merck آلمان خریداری شد.

تهیه مایع تلقیح و کشت مایع ایستا

کشت اولیه در محیط YPG به مدت ۵ روز در دمای ۳۰˚C و دور ۱۵۰rpm انجام شد. سپس ۱ میلی‌لیتر از کشت اولیه در ۳۰ میلی‌لیتر محیط کشت تازه تلقیح گردید. نمونه‌ها در شیکر انکوباتور (Heidolph-titramax 1000 ساخت آلمان) با دمای ۳۰˚C و دور ۱۵۰rpm و در شرایط تاریکی به مدت ۴ روز قرار داده شدند. پس از این مدت کشت‌های مایع به حالت ایستا به مدت ۱۰ روز در انکوباتور قرار داده شد.

القای تنش مکانیکی

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

استخراج گنودریک اسید داخل سلولی

پس از دوره ۹ روزه کشت، میسلیوم ها جمع‌آوری و طبق روش Fang و همکاران (۲۰۰۲) گنودریک اسید آن استخراج گردید (۱۱). ۱۰۰ میلی‌گرم از میسلیوم خشک‌شده توسط اتانول ۵۰٪ (v/v) به مدت یک هفته استخراج شد (دو بار). محلول حاصل تحت خلأ و ۵۰˚C خشک شد. رسوب باقی‌مانده در آب حل شد و توسط کلروفرم استخراج گردید. گنودریک اسید موجود در کلروفرم توسط ۵٪ $NaHCO_3$ (w/v)، جدا شد. با استفاده از HCl، pH محلول به کمتر از ۳ رسانده شد. گنودریک

Final Proof

اسید موجود در لایه $NaHCO_3$ توسط کلروفرم استخراج‌شده و کلروفرم باقی‌مانده توسط تبخیر در ۴۰°C جداسازی شد. رسوب گنودریک اسید به‌جامانده در اتانول به‌طور کامل حل شد. میزان جذب آن در ۲۴۵nm توسط دستگاه اسپکتوفتومتری خوانده شد. با استفاده از نمودار استاندارد تیمول مقدار گنودریک اسید در هر نمونه تعیین گردید (۱۱).

استخراج گنودریک اسید خارج سلولی

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

طراحی آزمایش و تجزیه‌وتحلیل آماری

به‌منظور تخمین اثر متغیرهای مستقل زمان صوت دهی اول و دوم و مدت‌زمان صوت دهی بر میزان تولید گنودریک اسید از روش سطح پاسخ و طرح باکس بنکن استفاده شد. آزمایش RSM طبق جدول شماره ۱ با سه متغیر در سه سطح به روش BBC (Box Behnken Desing) به‌وسیله نرم‌افزار Design expert 7.0.0 ساخت شرکت Ease-Stat آمریکا طراحی شد. این نرم‌افزار روزهای ۴، ۵ و ۶ را برای اولین روز صوت دهی، روزهای ۷، ۸ و ۹ را برای دومین روز صوت دهی و ۶۰، ۱۸۰ و ۳۰۰ ثانیه را برای مدت‌زمان صوت دهی ارائه داد. ۱۷ آزمون با سه بار تکرار مستقل انجام شد. معنادار بودن آماری عبارت‌ها در معادله رگرسیونی در سطح اطمینان ۹۵ درصدی ($p<۰/۰۵$) موردبررسی قرار گرفت. برای تحلیل داده‌ها و ترسیم نمودار از نرم‌افزار Design Expert استفاده شد. مقدار بهینه متغیرها برای حداکثر تولید گنودریک اسید، به کمک نرم‌افزار تعیین شد.

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

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

یافته‌ها

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

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

آزمایش		وزن خشک میسلیوم ($g\ l^{-1}$)	گنودریک اسید خارج سلولی ($mg\ g^{-1}$)	گنودریک اسید داخل سلولی ($mg\ g^{-1}$)	گنودریک اسید کل ($mg\ g^{-1}$)
یک‌بار صوت دهی	۲۰ ثانیه	۱۱/۳	۸	۱۱	۱۹
دو بار صوت دهی	۲۰ ثانیه	۸/۳	۷/۴	۱۸/۴	۲۵/۸
یک‌بار صوت دهی	۲۰۰ ثانیه	۰/۳۳۲	۱۰/۱	۲۱	۳۱/۱
دو بار صوت دهی	۲۰۰ ثانیه	۱۱/۰۶	۱۴/۳	۲۴	۳۸/۳
شاهد		۱۱	۵/۲	۱۲/۶	**۲۶/۸**

تحلیل داده‌های حاصل از بهینه‌سازی شرایط صوت دهی به روش RSM

با توجه به نتایج مرحله قبل، دو بار صوت دهی جهت افزایش تولید گنودریک اسیدها برای بهینه‌سازی شرایط انتخاب شد. یک طراحی آزمایش مطابق روش باکس بنکن برای سه عامل مهم شامل زمان اولین صوت دهی، زمان دومین صوت دهی و مدت‌زمان لازم برای صوت دهی به هر نمونه در قالب ۱۷ آزمایش با پنج نقطه مرکزی طراحی و آزمایش‌ها مطابق آن انجام شد.

Final Proof

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

جدول ۳: چیدمان طراحی آزمایش باکس بنکن و نتایج به‌دست‌آمده

آزمایش	متغیرها			پاسخ‌ها			
	A روز اول صوت دهی	B روز دوم صوت دهی	C مدت‌زمان صوت دهی	وزن خشک ($g\ l^{-1}$)	گنودریک خارج سلولی ($mg\ g^{-1}$)	گنودریک اسید داخل سلولی ($mg\ g^{-1}$)	گنودریک اسید کل ($mg\ g^{-1}$)
۱	۴	۷	۱۸۰	۸/۳	۱۵/۴	۲۰/۱	۳۵/۵
۲	۶	۷	۱۸۰	۹/۹	۱۰/۸	۱۸/۱	۲۸/۹
۳	۴	۹	۱۸۰	۱۰/۰۳	۶/۵	۱۵/۶	۲۲/۱
۴	۶	۹	۱۸۰	۱۰/۳۳	۶/۲	۱۵/۴	۲۱/۶
۵	۴	۸	۶۰	۹/۲۶	۲/۸	۱۳/۹	۲۰/۷
۶	۶	۸	۶۰	۹/۳۶	۶/۵	۱۴/۳	۲۰/۸
۷	۴	۸	۳۰۰	۸/۸۳	۱۰/۷	۱۷/۵	۲۸/۲
۸	۶	۸	۳۰۰	۱۰/۰۳	۹/۵	۱۶/۵	۲۶/۰
۹	۵	۷	۶۰	۱۰/۲۳	۶/۵	۱۶/۳	۲۲/۸
۱۰	۵	۹	۶۰	۱۰/۴۷	۷/۱	۱۴/۵	۲۱/۶
۱۱	۵	۷	۳۰۰	۸/۹۷	۱۴/۱	۲۰/۱	۳۴/۲
۱۲	۵	۹	۳۰۰	۹/۲۶	۷/۴	۱۹/۱	۲۶/۵
۱۳	۵	۸	۱۸۰	۱۰/۰۶	۱۰/۵	۱۹/۶	۳۰/۱
۱۴	۵	۸	۱۸۰	۱۰	۱۰/۱	۲۰/۲	۳۰/۳
۱۵	۵	۸	۱۸۰	۱۰/۱۳	۱۰/۹	۱۹/۸	۳۰/۷
۱۶	۵	۸	۱۸۰	۱۰/۲	۹/۹	۱۹/۹	۲۹/۵
۱۷	۵	۸	۱۸۰	۱۰/۱۳	۱۰/۵	۲۰/۳	۳۰/۸

طبق تحلیل انجام‌شده توسط نرم‌افزار بر اساس میزان کل گنودریک اسید تولیدی، دومین زمان صوت دهی و مدت‌زمان صوت دهی به هر نمونه تأثیر معنی‌داری بر میزان تولید گنودریک اسید داشته است (جدول ۳). طبق این تحلیل برهمکنشی بین متغیرهای موردمطالعه وجود ندارد. این تحلیل همچنین نشان می‌دهد که توان دوم اولین زمان صوت دهی و مدت‌زمان صوت دهی از عوامل تأثیرگذار بر مدل پیشنهادی می‌باشند.

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

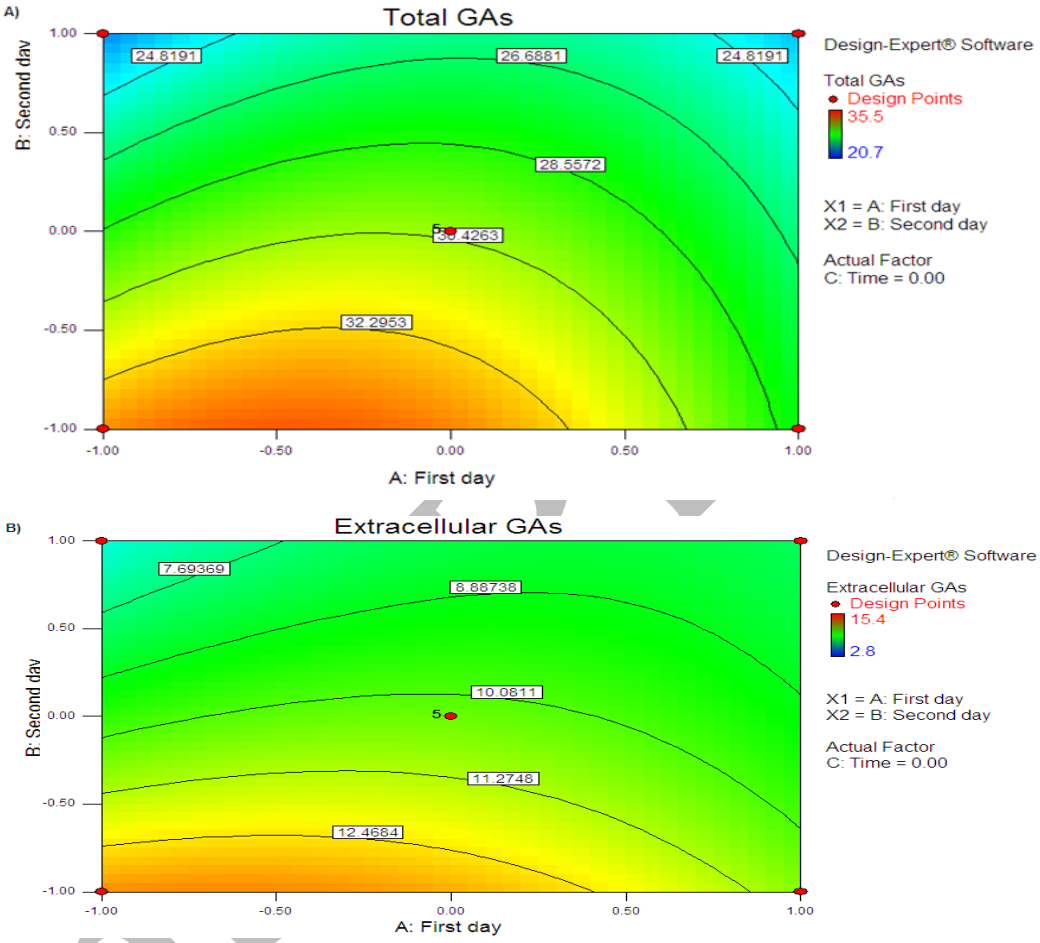
عبارت	مجموع مربعات	مربع میانگین	درجه آزادی	F-Value	p-Value
مدل	۳۴۰/۰۳	۳۷/۷۸	۹	۱۱/۳۸	۰/۰۰۲
روز اول صوت دهی(A)	۱۰/۵۸	۱۰/۵۸	۱	۳/۱۹	۰/۱۱۷
(B)روز دوم صوت دهی	۱۰۹/۵۲	۱۰۹/۵۲	۱	۳۲/۹۹	۰/۰۰۰۷
(C)مدت‌زمان صوت دهی	۱۰۵/۱۲	۱۰۵/۱۲	۱	۳۱/۶۷	۰/۰۰۰۸
(AB)	۹/۳۰	۹/۳۰	۱	۲/۸۰	۰/۱۳
(AC)	۱/۳۲	۱/۳۲	۱	۲/۴۰	۰/۵
(BC)	۱۰/۵۶	۱۰/۵۶	۱	۳/۱۸	۰/۱۱
(A^2)	۳۳/۰۷	۳۳/۰۷	۱	۹/۹۶	۰/۰۱
(B^2)	۰/۸۶	۰/۸۶	۱	۰/۲۶	۰/۶۲
(C^2)	۵۳/۱۴	۵۳/۱۴	۱	۱۶/۰۱	۰/۰۰۴
عدم برازش مدل	۲۲/۱۵	۷/۳۸	۳		
باقیمانده	۲۳/۲۳	۳/۱۹	۷		
خطای خالص	۱/۰۸	۰/۲۷	۴		

Final Proof

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

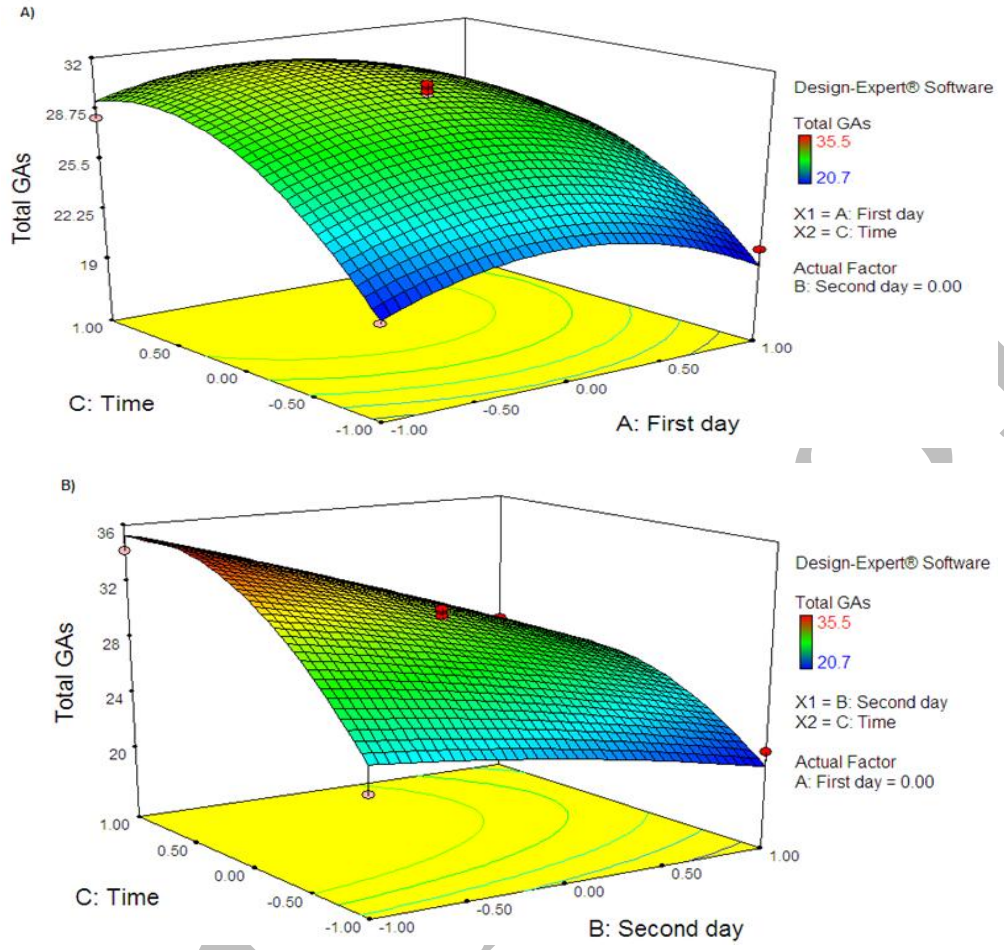
$$\text{Total GAs} = 30.28 - 1.150\,A - 3.7\,B + 3.6\,C + 1.53\,AB - 0.5750\,AC - 1.63\,BC - 2.80A^2 - 0.45\,B^2 - 3.55\,C^2$$

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



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

نرم‌افزار Design Expert با استفاده از نتایج ۱۷ آزمایش انجام‌شده و بررسی اثر مدت‌زمان صوت دهی بر تولید گنودریک اسید نشان داد دوره‌های صوت دهی ۲۷۰ ثانیه می‌توانند بیشترین تأثیر را برافزایش تولید گنودریک اسید داشته باشند (شکل۲). شرایط بهینه معرفی‌شده توسط نرم‌افزار شامل اولین صوت دهی بعد از ۴ روز و ۱۱ ساعت، زمان دومین صوت دهی پس از ۷ روز و مدت‌زمان صوت دهی ۲۷۴ ثانیه است. این نرم‌افزار میزان تولید گنودریک اسید در این شرایط را ۳۶/۳ میلی‌گرم در هر گرم توده زیستی اعلام کرد. آزمایش مربوط به نقطه بهینه مجدداً تکرار، و نتایج به‌دست‌آمده تأیید شد.



شکل۲: نمایش سه‌بعدی تأثیر مدت‌زمان صوت دهی و A) روز اول صوت دهی و B) روز دوم صوت دهی، بر گنودریک اسید کل

بحث

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

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

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

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

Final

نخستین بار Zhu و همکاران (۲۰۰۸) اثرات تحریکی الیسیتورهای زیستی بر تولید گنودریک‌اسید را نشان دادند. آن‌ها از عصاره قارچ‌های مختلف برای افزایش تولید گنودریک اسید استفاده کردند و توانستند تا ۱۹٪ میزان گنودریک اسید کل را تحت القای الیسیتور افزایش دهند (۱۶). در تحقیق Liu و همکاران (۲۰۱۱) با بررسی اثر القای عصاره تعدادی از حشرات بر قارچ *G.lucidum* افزایش ۱۲ درصدی تولید گنودریک اسید کل مشاهده شد (۱۷). ترکیبات شیمیایی نیز از پرطرفدارترین الیسیتورها در کارهای تحقیقاتی هستند. با بررسی اثر فنوباربیتال به‌عنوان یک القاکننده قوی سیتوکروم P_{450} بر رشد و تولید متابولیت های ثانویه قارچ، توانستند تا ۶۴٪ تولید گنودریک اسید را افزایش دهند. فنوباربیتال با اثر بر مسیرهای هیدروکسیلاسیون، اکسیداسیون و دمتیلاسیون تولید بسیاری از متابولیت های قارچ *G.lucidum* را تحت تأثیر قرار می‌دهد (۱۸). پس از آن Nojoki و همکاران (۲۰۱۶) توانستند با القای ۱۰۰ µM ریفامپین به‌عنوان یک القاکننده سیتوکروم P450، در روز نهم تا ۷۷٪ تولید گنودریک اسید را افزایش دهند (۱۹). اثر مهارکنندگی متیل جاسمونات بر رشد و بسیاری از فعالیت‌های متابولیکی قارچ توسط Ren و همکاران (۲۰۱۰) بررسی شد. متیل جاسمونات با توقف در رشد سلولی و تقسیم میتوز قارچ را در مرحله G1 متوقف می‌سازد. این در حالی است که باوجود توقف رشد میزان تولید گنودریک اسید تا ۲۸٪ افزایش می‌یابد (۲۰). در چند سال اخیر نیز اثرات مواد شیمیایی فراوانی بر تولید گنودریک اسید بررسی‌شده است. القای آسپیرین توانست تا ۷۲٪ سنتز گنودریک اسید کل را افزایش دهد (۲۱). همچنین Zhang و همکاران (۲۰۱۴) ۷۱٪ افزایش تولید گنودریک اسید را در صورت القای مقادیر مشخصی سلولاز به قارچ گزارش دادند (۸). Heydarian و همکاران (۲۰۱۵) نیز با بررسی اثر هم‌افزایی دو الیسیتور آسپرین و متیل جاسمونات به افزایش تولید گنودریک اسید دست یافتند (۹). مقایسه پژوهش‌های انجام‌شده با این مطالعه نشان می‌دهد امواج فراصوت در شرایط زمانی مشخص می‌توانند به‌عنوان یک الیسیتور مناسب برای افزایش گنودریک اسیدها استفاده شوند. از سوی دیگر استفاده از روش‌های مکانیکی به‌جای روش‌های زیستی و شیمیایی جهت تولید متابولیت‌های ثانویه، به کاهش هزینه‌ها در فاز صنعتی تولید نیز کمک می‌کند. هرچند امواج فراصوت در بهترین شرایط ۳۴٪ تولید گنودریک اسید کل را افزایش می‌دهند و این میزان به نسبت برخی الیسیتورهای شیمیایی مانند ریفامپین بسیار کمتر است (۱۹)، اما نتایج مطالعات نشان داده است که هر الیسیتور قادر است مقادیر متفاوتی تولید انواع گنودریک اسیدها را افزایش دهد (۲۲). تاکنون بیش از ۵۰ نوع گنودریک اسید شناخته‌شده است که هرکدام خواص و کاربردهای متفاوتی دارند (۲۳). الیسیتورهای مختلف هرکدام از مسیرهای جداگانه‌ای تولید برخی گنودریک اسیدها را افزایش می‌دهند. درعین‌حال ممکن است بر تولید برخی گنودریک اسیدها تأثیر منفی داشته باشند. به‌عنوان‌مثال فنوباربیتال به‌عنوان یک القاکننده سیتوکروم P450 تنها موجب افزایش گنودریک اسیدهای Mk، Me و S می‌گردد و بر الیسیتورهای ضد سرطان A و T اثر چندانی ندارد (۱۸). آسپرین نیز با اثر بر مسیرهای پیام‌رسانی قارچ و القای آپوپتوزیس، میزان گنودریک اسید ۲۴ را افزایش می‌دهد و شواهدی مبنی برافزایش سایر اعضای خانواده گنودریک اسیدها تحت تأثیر این الیسیتور وجود ندارد (۲۱). به همین علت هر الیسیتوری که افزایش‌دهنده گنودریک اسید باشد، ارزش خاص خود را دارد و با الیسیتورهای دیگر متفاوت است (۱۸،۲۳). به‌منظور تعیین انواع گنودریک اسیدهای تولید شده در این روش به آزمایش‌های بیشتری احتیاج است که در مطالعات بعدی به آن خواهیم پرداخت.

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

تقدیر و تشکر

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

تعارض منافع

بین نویسندگان و مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران هیچ‌گونه تعارض منافعی وجود ندارد.

Final Proof

References

1. Wu GS, Lu J, Guo JJ, Li YB, Tan W. Ganoderic acid DM a natural triterpenoid induces DNA damage G1 cell cycle arrest and apoptosis in human breast cancer cells. Fitoterapia 2012; 83(2):408-14.
2. Eo SK, Kim Y, Lee CK, Han S. Antiherpetic activities of various protein bound polysaccharides isolated from *Ganoderma lucidum*. J Ethnopharmacol 1999; 68(3):175-81.
3. Johnson B, Doonan B, Radwan F, Haque A. Ganoderic acid DM an alternative agent for the treatment of advanced prostate cancer. Open Prost Cancer J 2010; 3(1): 78- 85.
4. Sliva D. *Ganoderma lucidum* in cancer research. Leuk Res 2006; 30(7):767-8.
5. Li Y, Liu R, Zhong J. a new ganoderic acid from *Ganoderma lucidum* mycelia and its stability. Fitoterapia 2013; 84(1):115-22.
6. Xu P, Ding Z, Qian Z, Zhao C, Zhang C. Improved production of mycelial biomass and ganoderic acid by submerged culture of *Ganoderma lucidum* SB97 using complex media. Enzyme Microb Technol 2008; 42(4):325–31.
7. Shi L, Ren A, Mu D, Zhao M. current progress in the study on biosynthesis and regulation of ganoderic acids. Microbiol Biotechno 2010; 88(6):1243-51.
8. Zhang J, Zhong J, Geng A. Improvement of ganoderic acid production by fermentation of *Ganoderma lucidum* with cellulase as an elicitor. Process Biochem 2014; 49(10):1580- 6.
9. Heydarian MS, Hatamian AS, Amoabediny G, Yazdian F, Doryab A. Synergistic Effect of Elicitors in Enhancement of Ganoderic Acid Production: Optimization and Gene Expression Studies. Appl Food Biotechnol 2015; 2(3):57-62.
10. Lin L, Wu J, Ho K. Ultrasound-induced physiological effects and secondary metabolite (saponin) production in Panax ginseng cell cultures. Ultrasound Med Bio 2001; 27(8):1147-52.
11. Fang Q, Zhong J. Two-stage culture process for improved production of ganoderic acid by liquid fermentation of higher fungus *Ganoderma lucidum*. Biotechnol Prog 2002; 18(1):51-4.
12. Qiang G, Hua-Xi X, Xiao H, Wang X, Zhao Y, Zhang Y, Ren G. Stimulated Production of Triterpenoids of *Ganoderma lucidum* by an Ether Extract from the Medicinal Insect, Catharsius molossus, and Identification of the Key Stimulating Active Components. Appl Biochem Biotechnol 2011; 165(1):87-97.
13. Ziegenbein F, Hanssen H, Konig K. Secondary metabolites from *Ganoderma lucidum* and Spongiporus leucomallellus. Phytochemistry 2006; 67(2):202-11.
14. Zhao J, Lawrence C, Verpoorte R. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. Biotechnol Adv 2005; 23(4):283-333.
15. Xu Y, Xia X. Induction of ganoderic acid biosynthesis by Mn2+ in static liquid cultivation of *Ganoderma lucidum*. Biotechnol Bioeng 2014; 111(11):2358-65.
16. Zhu L, Zhong J, Tang Y. Significance of fungal elicitors on the production of ganoderic acid and Ganoderma polysaccharides by the submerged culture of medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*. Process Biochem 2008; 43(1):1359-70.
17. Liu G, Xiao H, Wang X, Zhang G, Ren G. Stimulated Production of Triterpenoids of *Ganoderma lucidum* by an Ether Extract from the Medicinal Insect, Catharsius molossus, and Identification of the Key Stimulating Active Components. Appl Biochem Biotechnol 2011; 165(1):87-97.
18. Liang C, Li Y, Xu J, Wang J, Miao X, Tang Y. Enhanced biosynthetic gene expressions and production of ganoderic acids in static liquid culture of *Ganoderma lucidum* under phenobarbital induction. Appl Microbiol Biotechnol 2010; 86(5):1367-74.
19. Nojoki F, Hatamian AS, Mirderikvand M, Ebrahimi B, Mokhtari ZB, Kalantari S, Esmaeilifar M. Impact of Rifampin Induction on the Fermentation Production of Ganoderic Acids by Medicinal Mushroom *Ganoderma lucidum*. Appl Food Biotechnol 2016; 3(2):91-8.
20. Ren A, Qin L, Shi L, Dong X, Mu D, Li X. Methyl jasmonate induces ganoderic acid biosynthesis in the basidiomycetous fungus *Ganoderma lucidum*. Bioresour Technol 2010; 101(17): 6785-90.
21. You B, Lee M, Tien N, Lee M, Hsieh H. A Novel Approach to Enhancing Ganoderic Acid Production by *Ganoderma lucidum* Using Apoptosis Inducion. PLoS One 2013; 8(1):1-7.
22. Zhu W, Zhong J, Tang Y. Significance of fungal elicitors on the production of ganoderic acid and Ganoderma polysaccharides by the submerged culture of medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*. Process Biochem 2008; 43(1):1359-70.
23. Xu J, Zhao W, Zhong J. Biotechnological production and application of ganoderic acids. Appl Microb Biotechnol 2010; 87(2):457-66.

Final Proof