

Evaluation of Chitin-Glucan Complex Production in Submerged Culture of Medicinal Mushroom of *Schizophyllum commune*: Optimization and Growth Kinetic

Mohaddeseh Zeynali¹, Ashrafalsadat Hatamian-Zarmi^{2*}, Mohaddeseh Larypoor¹

1. Department of Biology, Faculty of Bio Sciences, Tehran North Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2. Department of Life Sciences Engineering, Faculty of New Sciences and Technologies, University of Tehran, Tehran, Iran

doi [10.30699/ijmm.13.5.405](https://doi.org/10.30699/ijmm.13.5.405)



ABSTRACT

Background: *Schizophyllum commune*, is one of the important medicinal-fungi foods in the world. Due to its important constituents such as extracellular and intracellular polysaccharides, it is widely used in industry and medicine. One of the important polysaccharides of this fungus is chitin-glucan complex (CGC). The aim of this study was to investigate the growth of native fungus *Schizophyllum commune* isolated from northern forests of Iran and to optimize its CGC production in submerged cultivation.

Materials & Methods: Growth kinetics studies of native *Schizophyllum commune* fungi of Iran and CGC production were performed and growth curves were plotted. In order to increase CGC production, optimization of culture medium was done by investigating independent variables of pH, inoculum percentage and aeration percentage by response surface methodology.

Results: The results showed that the specific growth coefficient of Iranian native *Schizophyllum commune* (μ_{max}) was 0.991-day. Tenth day was also selected as the best time for growth and production in the submerged medium. In optimum conditions, initial pH of 8.92, percentage of inoculum 9.99 and aeration percentage of 150 was obtained. After 10 days, the amount of dry cell weight was 13.05 g/L and the amount of chitin-glucan complex produced was 2.9 g/L.

Conclusion: Investigation of kinetic parameters of growth and production showed that the experimental data are in accordance with the logistic growth model with $R^2=0.9665$ and the Luedeking and Piret model for production with $R^2 = 0.9439$. The results also show that the initial pH has a significant effect on the growth of this fungus.

Keywords: *Schizophyllum commune*, Chitin glucan complex, Optimization, Submerged Cultivation

Received: 2019/11/29; Accepted: 2019/12/20; Published Online: 2020/01/10

Corresponding Information:

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



Copyright © 2019, 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 Mobile to scan and read the article online



Zeynali M, Hatamian-Zarmi A, Larypoor M. Evaluation of Chitin-Glucan Complex Production in Submerged Culture of Medicinal Mushroom of *Schizophyllum commune*: Optimization and Growth Kinetic. Iran J Med Microbiol. 2019; 13 (5) :406-424

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

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

Introduction

In recent years, various metabolites such as, chitin, chitosan and CGC have been prepared from *Schizophyllum commune* due to their antibody properties and antiviral activity and have been used in pharmaceutical, cosmetic and hygienic fields (8-9). *S. commune* is a fungal and edible fungus belonging to the basidiomycetes family (14). CGC is a major component of

the cell wall in yeast and fungi that stabilizes and strengthens cells and is a copolymer of diglucosamine, N-acetylglucosamine, and glucose (2, 1). In 2010, Hao *et al.* investigated the optimization of variables affecting the growth and production of *S. commune* polysaccharide (17). Chagas *et al.* (2014) investigated the effect of pH and temperature on the production of CGC from the

yeast *Pichia pastoris* (2). The purpose of this study was to investigate the variables affecting the growth of native *S. commune* fungi in Iran and increasing the production of CGC using response surface methodology and growth kinetic model And CGC production using Logical and Luedeking and Piret model.

Materials and Methods

A) Cultivation *Schizophyllum commune* and CGC Extraction

The fungus was cultured in culture medium PDB for 10 days. Then 2 g of dried mycelium was mixed with 60 mL of 4.2 mol NaOH. This mixture was incubated at 90°C for 3 h. The mixture was centrifuged. The precipitate was then dissolved in 300 mL of sterilized distilled water and centrifuged again. The process was continued until pH=7. The precipitate was then mixed with 60 mL of 0.25 mol HCl and placed in a 50°C oven for 2 h. The precipitate was then mixed with 60 mL of 0.25 mol HCl and placed in the incubator at 50°C for 2 h. The precipitate was dissolved in 300 mL of distilled water and continued until pH=7. CGC was dehydrated with isopropanol and placed at 60°C for 24 h (18).

B) Experiment Design

Response surface methodology was used to estimate the effect of independent variables on cell mass growth and CGC production of *S. commune*. The parameters affecting the production of CGC (pH, aeration percentage, percentage of primary inoculum) of *S. commune* were designed based on the BBD method (Box Behnken Design) of Design Expert 11 software.

C) Investigation of Growth Kinetics and Production of CGC for *Schizophyllum commune*

To obtain the growth curve of *S. commune*, this fungus was cultured in PDB medium for a period of 20 days and biopsy was performed every two days and biomass and CGC were recorded (22).

$$dC/dt = \mu_m (1 - C/C_m) C \quad \text{Equation 1}$$

In Equation 2, cell viability (gr/L), μ_m is the maximum specific growth rate (in terms of day⁻¹) and C_m of the maximum cell mass concentration obtainable (gr/L). This equation is widely used to predict metabolites.

$$(dP)/dt = \alpha (dC)/dt + \beta C \quad \text{Equation 2}$$

Here P is the concentration of CGC (gr/L), C the cell mass (gr/L), α in β , ($g \times g^{-1}$) in ($g \times (g \times h)^{-1}$) values are constant. This model is experimental in which dC / dt indicates CGC production rate relative to growth rate and C represents CGC production regardless of growth.

Results

A) Optimization of Parameters Affecting CGC Production

Table 1 shows the results of cell dry weight and CGC values produced in each of the 17 experiments by combining different levels of parameters.

Analysis of variance of the results of the experiments in terms of cell mass and CGC level using Design Expert software is shown in Tables 2 and 3, respectively. R² values for cell dry weight and CGC were 9653% and 0.9584% respectively indicating a good correlation coefficient. According to software analysis based on dry weight of biomass produced, aeration percentage and pH with P-values of 0.0097 and <0.0001, respectively and based on CGC weighted values of 0.0149 and <0.00011, respectively it had a significant effect on biomass growth and CGC. According to this analysis, there is no interaction between the variables studied. Also, the second power of pH variable with P- value of 0.009 and 0.0023 had significant effect on growth rate of biomass and CGC production, respectively.

Table 1. Experimental Design (BBD) and Results Based on Cellular Dry Weight and CGC Amount

Response		Parameters			Number the experiment
CGC rate (g/L)	The amount of mycelium (g/L)	Percentage of inoculum (C)	(B) pH	Percentage of aeration	
2.5	11.33	5.5	7	100	1
2.9	12.94	10	7	150	2
2.6	12.04	1	7	150	3
2.88	12.9	5.5	9	150	4
2.55	11.46	5.5	7	100	5
2.73	12.24	1	9	100	6
1.6	7.14	1	5	100	7
2	8.96	5.5	5	50	8

Response		Parameters			Number the experiment
2.6	11.68	5.5	9	50	9
2.2	10.1	1	7	50	10
2.5	11.38	5.5	7	100	11
1.84	8.2	10	5	100	12
1.97	8.82	5.5	5	150	13
2.53	11.28	10	7	50	14
2.6	11.96	10	9	100	15
2.51	11.44	5.5	7	100	16
2.48	11.39	5.5	7	100	17

Table 2. Analysis of Variance and Regression Coefficients Estimated Cell Dry Weight Production

Expression	Sum of squares	Mean square	Degrees of freedom	F-Value	P-Value
Model	43.01	4.78	9	21.63	0.0003
A	2.74	2.74	1	12.40	0.0097
B	30.65	30.65	1	138.79	<0.0001
C	1.02	1.02	1	4.63	0.0685
AB	0.46	0.46	1	2.09	0.1912
AC	0.02	0.02	1	0.089	0.7744
BC	0.45	0.45	1	2.03	0.1970
A ²	0.84	0.84	1	3.82	0.0916
B ²	6.66	6.66	1	30.14	0.0009
C ²	0.28	0.28	1	1.26	0.2980
residua	1.55	0.22	7		

Table 3. Analysis of variance and regression coefficients estimated CGC weight production

Expression	Sum of squares	Mean square	Degrees of freedom	F-Value	P-Value
Model	2.04	0.33	9	17.92	0.0005
A	0.13	0.13	1	10.31	0.0149
B	1.45	1.45	1	114.51	<0.0001
C	0.068	0.068	1	5.42	0.0527
AB	0.024	0.024	1	1.90	0.2101
AC	2.250	2.250	1	0.018	0.8975
BC	0.034	0.034	1	2.71	0.1436
A ²	0.051	0.051	1	4.02	0.0850
B ²	0.27	0.27	1	21.74	0.0023
C ²	0.015	0.015	1	1.21	0.3075
residual	0.088	0.22	7		

The software proposed a nonlinear regression model for biomass production and a nonlinear regression model for CGC production based on code variables as follows:

$$\text{Biomass} = 11.40 + 0.59 A + 1.96 B + 0.34 AB - 0.070 AC - 0.33 BC + 0.45 A^2 - 1.26 B^2 - 0.26 C \quad \text{Equation 3}$$

$$\text{CGC} = 2.51 + 0.13 A + 0.42 B + 0.092 C + 0.077 AB - 7.500E-003 AC - 0.092 BC + 0.11 A^2 - 0.26 B^2 - 0.060 C^2 \quad \text{Equation 4}$$

In Figure 1-A, two-dimensional diagrams (A) the effect of acidity on aeration percentage; (B) the effect of aeration percentage on acidity; (C) Effect of acidity inoculum on cell dry weight and 1-B (3D) Effect of acidity to aeration percentage; (B) Effect of aeration percentage to acidity; (C) Effect of acidity percentage to acidity on cellular dry weight. In Figure 2-A, the two-dimensional diagram (A) the effect of acidity on aeration percentage; (B) the effect of aeration percentage on acidity; (C) Effect of inoculum

percentage on acidity and 4-B three-dimensional diagrams (A) Effect of acidity on percentage aeration; (B) Effect of percentage of inoculum on acidity; (C) The effect of the percentage of inoculum acidity on CGC weight is given.

The data obtained in this study showed that there is a linear relationship between cell mass production and CGC.

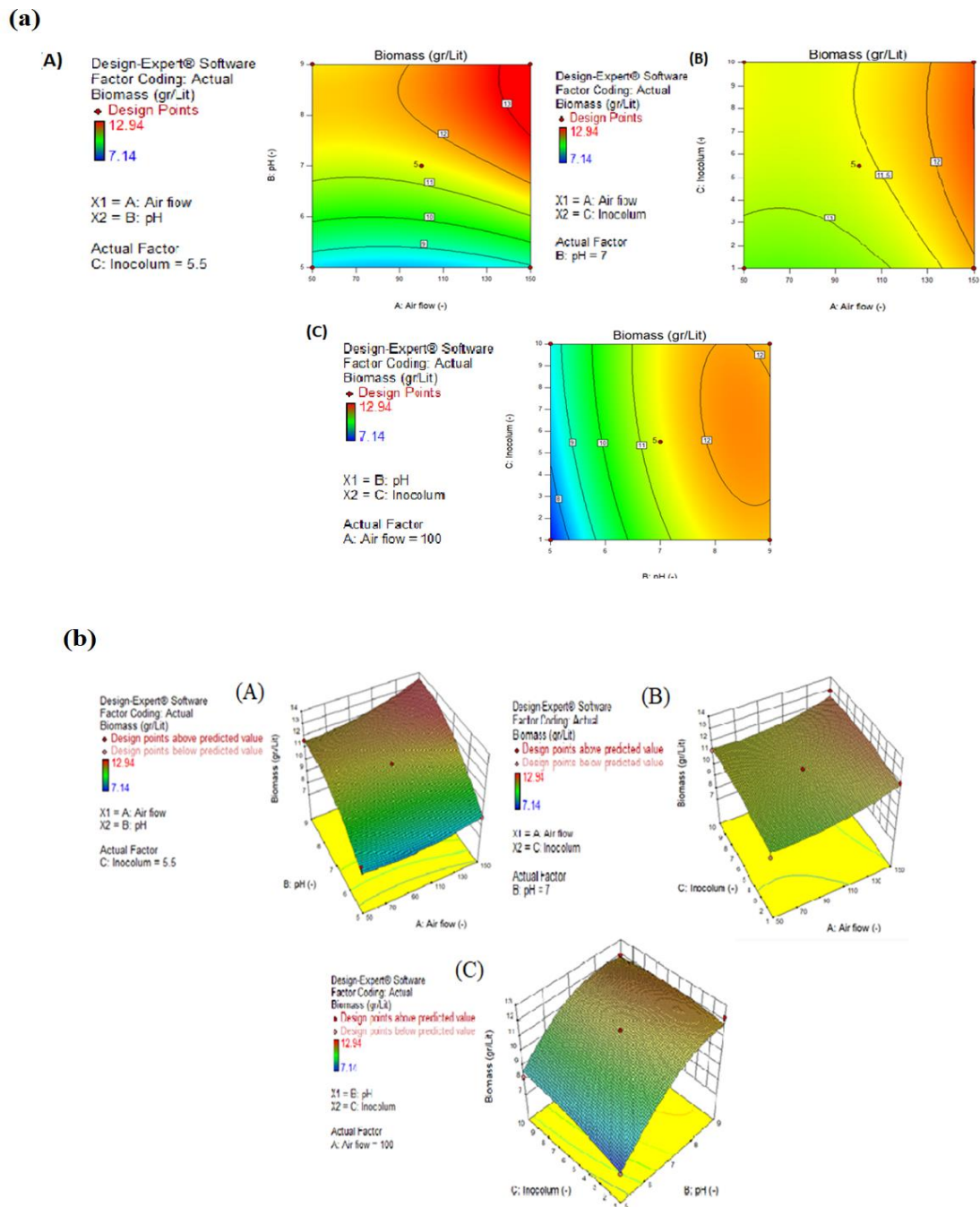


Figure 1. (a) Two-dimensional graph (A) Effect of acidity on aeration percentage; (B) Effect of aeration percentage on acidity; (C) Effect of acidity on aeration percentage; and (b) Three-dimensional graph (A) Effect of acidity on aeration percentage; (B) Effect of aeration percentage on aeration; (C) Effect of acidity percentage on acidity on cell dry weight.

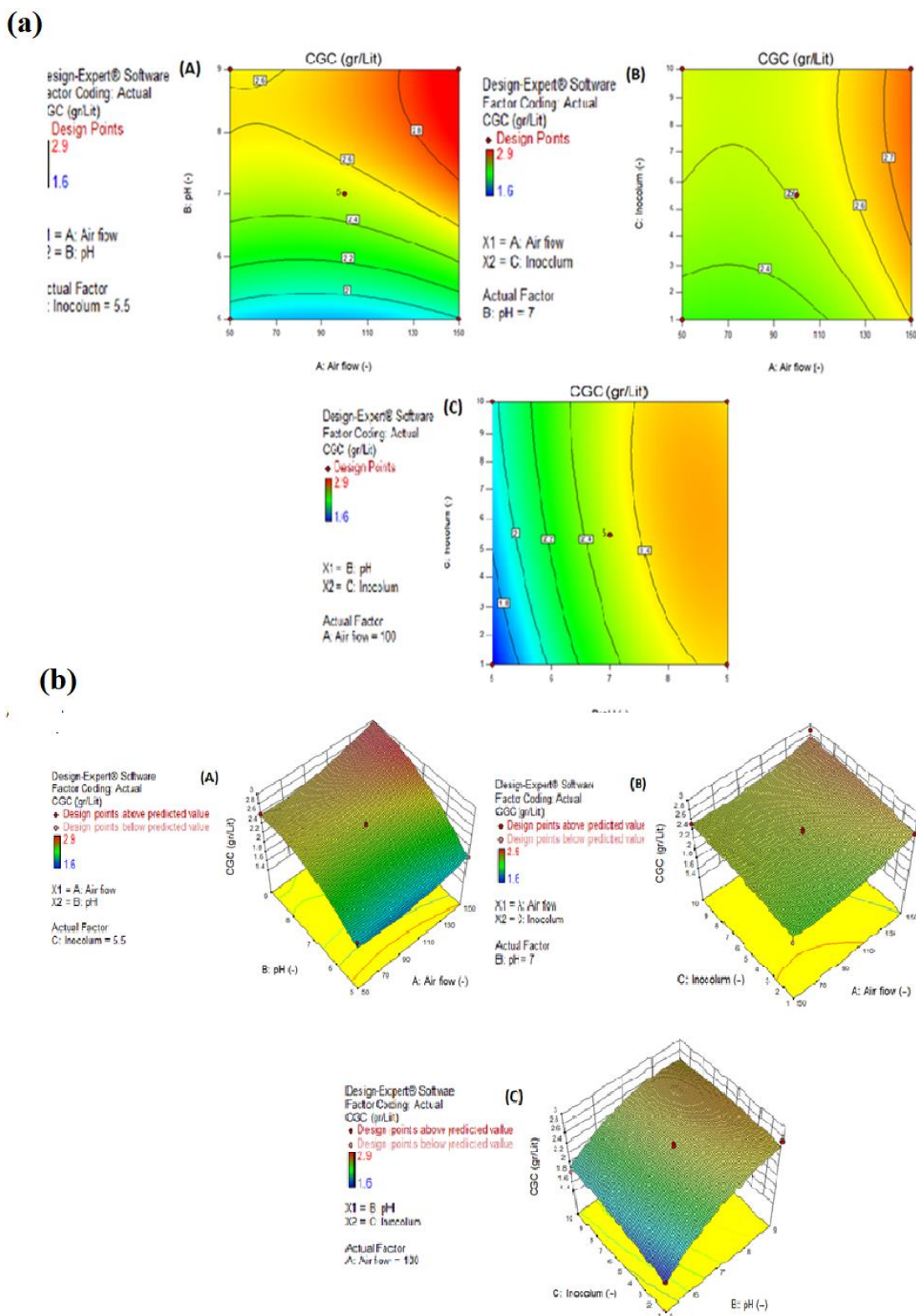


Figure 2. (a) Two-dimensional diagram (A) Effect of acidity on aeration percentage; (B) Effect of aeration percentage on aeration; (C) Effect of inoculum percentage on acidity and (b). Three-dimensional graph (A) of the effect of acidity on aeration percentage; (B) Effect of aeration percentage on aeration; (C) Effect of acidity percentage on acidity on CGC weight.

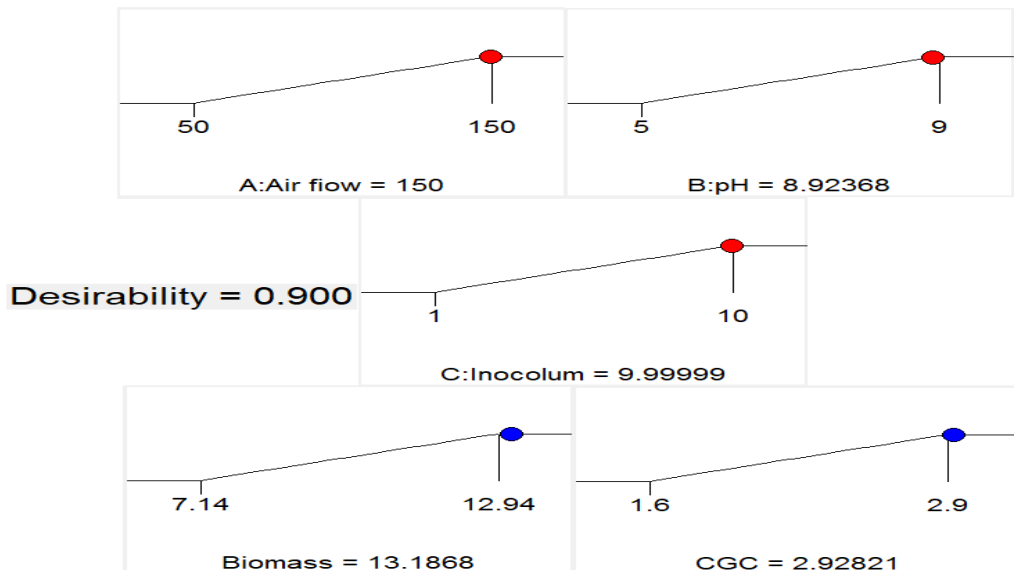


Figure 3. Optimum point to enhance fungal growth and CGC production

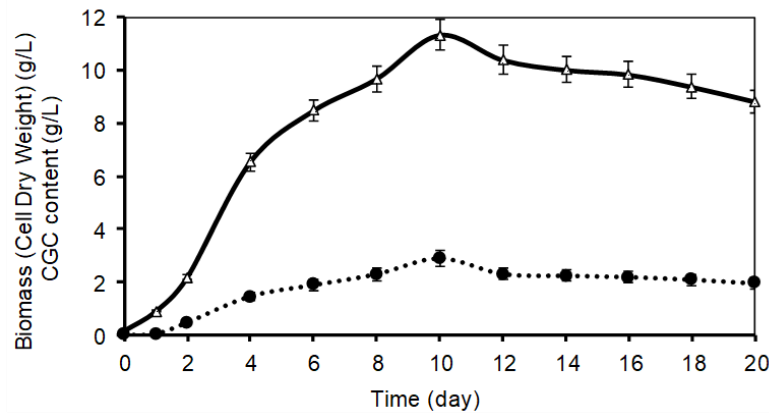


Figure 4. Temporal changes of cellular dry weight growth, production of CGC in PDB medium; *Schizophyllum commune*, CGC production curve (●), mycelium growth curve (Δ)

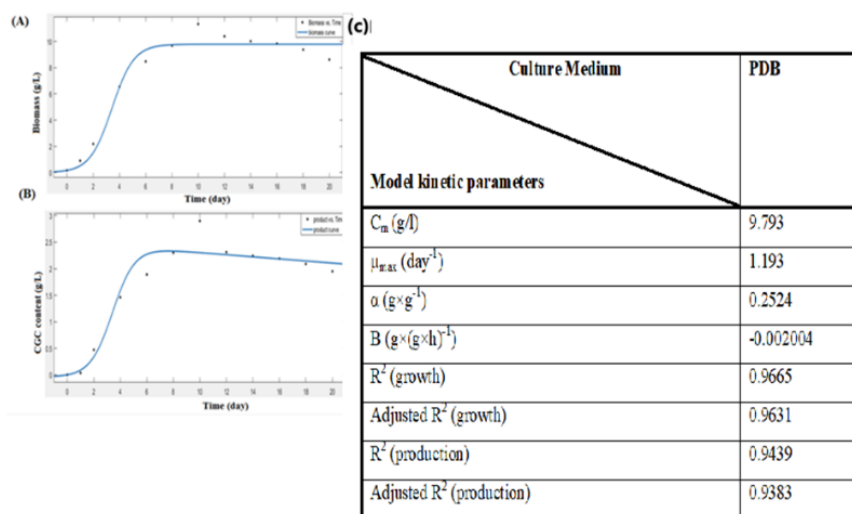


Figure 5. Laboratory data and regression curves of (A) biomass and (B) Figure 5. Laboratory data and regression curve (A) biomass and (B) CGC production in mycelial form of *Schizophyllum commune* in a fungus fermentation in PDB medium (.) laboratory data and (-) regression curve and (C) Coefficients of mycelial growth and CGC production obtained from the model.

Discussion

Based on the Figures 1-5, it can be said that as the aeration progresses and the alkaline pH increases, the CGC level increases. In 2001, Amorim *et al.* investigated the preparation of CGC at identical conditions and initial pH ranging from 5 - 6.5 and found that at pH = 6.5 the highest amount of CGC was produced (24). According to a 2006 study by Feofilova *et al.* about changing CGC content and composition during the development of ascites in submerged cultures, they found out that the composition and content of CGC clearly depend on the fungal development stage and the maximum amount of CGC production. Mycelium was observed in acidic medium in liquid culture (7).

It can be said that the present study is consistent with the studies of Amorim and Feofilova in 2001 and 2006, and as the alkaline pH progresses, CGC production increases (7,24). The important influence of the initial pH of the environment can be justified by the fact that the pH of the environment can affect membrane function, cell morphology, nutrient uptake and production of extracellular and intracellular products (25).

Specific growth coefficient of *Schizophyllum commune* native kumina ($\max\mu$) is 0.991-day. In 2018, Moraditanha *et al.* studied the kinetics of growth and production of CGC from *gonoderma leucidum* in the immersed medium. After investigating the changes; the specific growth coefficient ($\max\mu$) was found to be 0.5274 day⁻¹ (22). According to the specific growth

coefficient obtained, *Schizophyllum commune* has a faster growth and production of CGC than *Gonoderma leucidum*.

Also, the kinetic model of growth and production of CGC from *S. commune* in this study is in line with the model of Tang *et al.* (2004) on *G. leucidum* and Feng *et al.* (2010) study on structural model of polysaccharide production from fungi *Shitaka* (28).

Conclusion

Based on the optimization of the optimum conditions, aeration percentage of 150, pH of 8.92 and inoculation percentage of 9.99 were obtained. The kinetic parameters of growth and production have been investigated and matching of experimental data with logistic growth model with $R^2=0.9665$ and Luedeking and Piret's model for production with $R^2=0.9439$ showed good agreement. According to the curve plotted on day 10, it was selected for having the highest cellular dry weight and CGC.

Acknowledgment

This research is the result of Master's thesis with the code 15830560962037.

Conflict of Interest

Authors declared no conflict of interests.



بررسی تولید کمپلکس کیتین-گلوکان در کشت غوطه ور قارچ دارویی شیزوفیلوم کومینه: بهینه سازی و سینتیک رشد

محدثه زینعلی^۱، اشرف السادات حاتمیان زارمی^{۲*}، محدثه لاری پور^۱

۱. گروه علوم زیستی، دانشکده علوم، واحد شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

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

اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله

دریافت: ۱۳۹۸/۰۹/۰۸

پذیرش: ۱۳۹۸/۰۹/۲۹

انتشار آنلاین: ۱۳۹۸/۱۰/۲۰

موضوع:

بیوتکنولوژی میکروبی

نویسنده مسئول:

اشرف السادات حاتمیان زارمی، گروه

مهندسی علوم زیستی دانشکده علوم و فنون

نوین، دانشگاه تهران، تهران، ایران

ایمیل: hatamian_a@ut.ac.ir

چکیده

زمینه و اهداف: قارچ شیزوفیلوم کومینه از جمله قارچ‌های دارویی - غذایی مهم در دنیاست که به دلیل دارا بودن ترکیبات مهمی نظیر پلی ساکارید های خارج سلولی و داخل سلولی مصرف زیادی در صنعت و پزشکی دارد. از جمله پلی ساکارید های مهم این قارچ کمپلکس کیتین-گلوکان (CGC) است. هدف از این پژوهش بررسی رشد قارچ شیزوفیلوم کومینه بومی جداسازی شده از جنگل های شمال ایران و بهینه سازی تولید CGC آن در کشت غوطه ور است.

مواد و روش کار: مطالعات سینتیک رشد قارچ شیزوفیلوم کومینه بومی ایران و تولید CGC انجام و منحنی رشد رسم شد. به منظور افزایش میزان تولید CGC بهینه سازی محیط کشت با بررسی متغیر های مستقل pH، درصد مایه تلقیح و درصد هوادهی با روش سطح پاسخ انجام شد.

یافته‌ها: بررسی نتایج نشان داد، ضریب ویژه رشد قارچ شیزوفیلوم کومینه بومی ایران (μ_{max}) برابر با 0.991 day^{-1} می باشد. همچنین روز دهم به عنوان بهترین زمان رشد و تولید در محیط کشت غوطه ور انتخاب شد. در شرایط بهینه، pH اولیه ۸/۹۲، درصد مایه تلقیح ۹/۹۹ و درصد هوادهی ۱۵۰ بود. پس از ۱۰ روز مقدار وزن خشک سلولی ۱۳/۰۵ g/L و مقدار کمپلکس کیتین-گلوکان تولیدی به ۲/۹ g/L رسید.

نتیجه گیری: بررسی پارامترهای سینتیکی رشد و تولید نشان داد، تطابق داده های تجربی با مدل رشد لجستیک با $R^2=0.9665$ و مدل لودکینگ-پایرت برای تولید با $R^2=0.9439$ همخوانی خوبی دارد. همچنین نتایج نشان می دهد pH اولیه اثر معنی داری بر رشد این قارچ دارد.

کلید واژه‌ها: شیزوفیلوم کومینه، کمپلکس کیتین-گلوکان، بهینه سازی، کشت غوطه ور

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

مقدمه

ماده جاذب رطوبت بوده و در محیط‌های آبی و روغنی متورم می شود (۴) و می توان آن را با روش‌های مختلف فیزیکی، شیمیایی و آنزیمی استخراج کرد (۵،۶).

حضور فراوان قارچ‌ها در طبیعت، رشد سریع میسلیوم قارچی، ترکیب نشدن CGC قارچی با پروتئین و کم بودن ترکیبات کربنات موجود در میسلیوم‌های قارچی باعث کاهش هزینه های استخراج CGC از قارچ و استفاده تجاری آن در مطالعات زیست فناوری می شود (۷). قارچ‌های دارویی نظیر قارچ شیزوفیلوم کومینه، گنودرما لوسیدایوم و ترمیتیس ورسیکالر از قارچ‌های دارویی شناخته شده در جهان می باشد که از متابولیت‌های ثانویه آنها کیتین، گلوکان، کیتوسان،

از ابتدای دهه ۱۹۵۰ میلادی متابولیت های ثانویه میکروبی به عنوان ترکیبات فعال زیستی شناخته شدند. از جمله متابولیت‌های ثانویه می توان به کیتین، کیتوسان، شیزوفیلان و کمپلکس کیتین-گلوکان (CGC) اشاره کرد. کمپلکس کیتین-گلوکان جزء اصلی دیواره سلولی در مخمرها و قارچ‌ها است که باعث ایجاد ثبات و استحکام سلول‌ها می شود و کوپلیمری از دی گلوکز آمین، ان استیل دی گلوکز آمین و گلوکز است (۱،۲). در کمپلکس کیتین-گلوکان نسبت بین کیتین و بتاگلوکان باتوجه به منبع، شرایط محیط کشت و نوع قارچ متغیر است (۳). کمپلکس کیتین-گلوکان دارای ویژگی‌های هر دو پلی ساکارید بتا گلوکان و کیتین می باشد که در آب نامحلول است ولی یک

۲۰۱۸، تولید کمپلکس کیتین-گلوکان را از قارچ دارویی گنودرما لوسیدیوم در محیط کشت های مختلف بهینه سازی کردند (۲۲).

هدف از این پژوهش بررسی متغیرهای اثر گذار در رشد قارچ شیزوفیلوم کومینه بومی ایران و تولید CGC بیشتر از قارچ دارویی شیزوفیلوم کومینه بومی با استفاده از روش سطح پاسخ و بررسی مدل سینتیکی رشد و تولید CGC با استفاده از مدل منطقی و لودکینگ-پایرت است.

مواد و روش ها

الف) کشت قارچ شیزوفیلوم کومینه

قارچ مورد استفاده در این پژوهش قارچی است که، بعد از جداسازی از جنگل های مازندران و ثبت در NCBI با شماره ثبت MG761830 مورد استفاده قرار گرفت. سپس در محیط کشت مایع پوتیتو دکستروز برات (PDB) کشت داده شد. مدت ۱۰ روز در شیکر انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سلسیوس و دور ۱۸۰ دور در دقیقه گرمخانه گذاری شد.

ب) استخراج کمپلکس کیتین-گلوکان

۲ گرم میسلیم خشک شده با ۶۰ میلی لیتر از سدیم هیدروکسید ۴/۲ مولار مخلوط گردید. این مخلوط تا دمای ۹۰ درجه سانتی گراد برای ۳ ساعت گرمخانه گذاری شد. مخلوط سانتریفیوژ شد و سوپرناتانت جدا و دور ریخته شد. سپس رسوب در ۳۰۰ میلی لیتر آب مقطر استریل شده حل شد و دوباره سانتریفیوژ شد. فرایند تا زمانی که pH برابر ۷ شود، ادامه داده شد. سپس رسوب با ۶۰ میلی لیتر از HCl ۰/۲۵ مولار مخلوط شد، سپس ۲ ساعت در گرمخانه با ۵۰ درجه سانتی گراد قرار داده شد. در نتیجه CGC سانتریفیوژ شد. رسوب در ۳۰۰ میلی لیتر آب مقطر حل شد و این فرایند تا زمانی که pH سوپرناتانت برابر ۷ شود، ادامه داده شد. کمپلکس کیتین-گلوکان با ایزوپروپانول دهیدراته شد و به مدت ۲۴ ساعت در ۶۰ درجه قرار داده شد و در نهایت وزن گردید (۱۸).

پ) طراحی آزمایش و تجزیه و تحلیل آماری

به منظور تخمین اثر متغیرهای مستقل بر میزان رشد توده سلولی و تولید پلی ساکارید داخل سلولی قارچ شیزوفیلوم کومینه از روش سطح پاسخ استفاده شد. پارامترهای مؤثر بر تولید CGC (pH، درصد هوادهی، درصد مایه تلقیح اولیه) از قارچ شیزوفیلوم کومینه براساس روش BBD (Box Behnken Design) از نرم افزار Design Expert 11 طراحی شد.

شیزوفیلان و کمپلکس کیتین-گلوکان هستند که در موارد گوناگون از آنها استفاده شده است (۵). منشأ صنعتی کمپلکس کیتین-گلوکان اسیدسیتریک، از میسلیوم زائد قارچ اسپرژیلوس نایجراست (۸). تا کنون CGC از منابع مختلف قارچی مانند اسپرژیلوس نایجر (۹)، شیزوفیلوم کومینه (۱۰)، کلانیدا آلیکنس (۱۱)، پیچیا پاستوریس (۱۲)، گنگرونلا باتلری (۱۳) و غیره تهیه شده است.

در سال های اخیر متابولیت های مختلفی مانند شیزوفیلان، کیتین، کیتوسان، کمپلکس کیتین-گلوکان از قارچ شیزوفیلوم کومینه به علت وجود خواص آنتی بادی، ضد انعقاد و فعالیت های ضد ویروسی تهیه شده و در زمینه های دارویی، آرایشی و بهداشتی مورد استفاده قرار گرفته است (۸، ۹). شیزوفیلوم کومینه قارچی رشته ای و خوراکی متعلق به خانواده بازیدیومیست ها، راسته آگاریکال و خانواده شیزوفیلان است که در سرتاسر جهان به جز قاره قطب جنوب، در طیف گسترده ای از جنگل های حاوی درختان کهن سال قادر به رشد است (۱۴). این قارچ به عنوان غذای محبوب و مفید، در بسیاری از کشورهای آسیایی و همچنین در شرق و جنوب غربی نیجریه مورد استفاده قرار می گیرد (۱۵).

براساس مطالعات Bowman و همکاران در زمینه ساختار و سنتز دیواره سلولی قارچی، دیواره سلولی به طور عمده از کیتین، گلوکان، مانان و گلیکوپروتئین ها تشکیل شده است که با یکدیگر متصل می شوند (۱۶). Gautier و همکاران در سال ۲۰۰۸ بیان کردند که کیتین-گلوکان، به عنوان داربست سلولی طبیعی برای مرطوب سازی و جوان سازی پوست مؤثر است و مطالعات بالینی نشان داد، ترکیبات کیتین-گلوکان بی خطر هستند (۴). در سال ۲۰۱۰ Hao و همکاران بهینه سازی متغیرهای مؤثر بر رشد و تولید پلی ساکارید شیزوفیلوم کومینه را بررسی کردند (۱۷). Smirnou و همکاران در سال ۲۰۱۱ بیان کردند، کشت غوطه ور شیزوفیلوم کومینه یک جایگزین قوی برای تولید کمپلکس کیتین-گلوکان در مقیاس صنعتی است (۱۸). Meichik و همکاران در سال ۲۰۱۲ موفق به استخراج CGC از دیواره سلولی قارچ هم زیست در گل سنگ پلتهی گرای آفت زا شدند (۱۹). Ordóñez و همکاران در سال ۲۰۱۳ توانستند از قارچ اسپرژیلوس نایجر با استفاده از آب بحرانی (subcritical water) کیتین و CGC استخراج کنند (۲۰). در سال ۲۰۱۴، Veverka و همکاران کمپلکس بتاگلوکان را از منابع مختلفی مانند گیاه جو دوسر، جو، جلبک یا خزّه دریایی و بسیاری باکتری ها، مخمر و قارچ ها تهیه کردند (۲۱). Chagas و همکاران در سال ۲۰۱۴ به بررسی اثر pH و دما بر تولید CGC از مخمر پیچیا پاستوریس پرداختند (۲). Moraditanha و همکاران در سال

$(g \times g^{-1})$ (بر حسب $(g \times h)^{-1}$ مقدارهای ثابت هستند. این مدل، تجربی بوده که در آن dC/dt ، میزان تولید کمپلکس کیتین-گلوکان را نسبت به سرعت رشد نشان می‌دهد و C نشان‌دهنده تولید کمپلکس کیتین-گلوکان بدون توجه به رشد است.

یافته‌ها

الف) بهینه‌سازی پارامترهای موثر بر تولید CGC از قارچ

شیزوفیلوم کومینه بومی ایران

برای تعیین شرایط بهینه طراحی آزمایش برای سه متغیر درصد هوادهی، میزان pH و درصد مایه تلقیح با استفاده از نرم‌افزار Design Expert انجام شد و در نهایت وزن خشک سلولی و میزان CGC به‌عنوان پاسخ اندازه‌گیری شد. در این روش اهمیت هر متغیر با P-value مشخص می‌گردد. جدول ۱ نتایج مربوط به مقادیر وزن خشک سلولی و CGC تولیدی در هر ۱۷ آزمایش با ترکیب سطوح مختلف پارامترها را نشان می‌دهد.

ب) بهینه‌سازی رشد قارچ شیزوفیلوم کومینه و پاسخ

وزن خشک سلولی

آنالیز واریانس نتایج حاصل از آزمایش‌ها بر حسب میزان توده سلولی با استفاده از نرم‌افزار Design Expert انجام و در جدول ۲ نشان داده شده است. به طور معمول R^2 بالای ۷۰٪ بیانگر ضریب تبیین نسبتاً خوبی بوده و هرچه این مقدار به ۱۰۰٪ نزدیک‌تر باشد انطباق داده‌های تجربی و مدل حاصل از رگرسیون بیشتر بوده و مدل از دقت بالاتری برخوردار است. مقدار R^2 برای وزن خشک سلولی ۹۶۵۳٪ بدست آمد که بیانگر ضریب همبستگی مناسبی می‌باشد. طبق تحلیل انجام شده توسط نرم‌افزار بر اساس میزان وزن خشک توده زیستی تولیدی، درصد هوادهی و pH با P-value های به ترتیب ۰/۰۰۹۷ و ۰/۰۰۰۱ < تاثیر معناداری بر میزان رشد توده زیستی داشته است. طبق این تحلیل برهمکنشی بین متغیرهای مورد مطالعه وجود ندارد. همچنین توان دوم متغیر pH با P-value ۰/۰۰۰۹ تاثیر معناداری بر میزان رشد توده زیستی داشته است.

معنادار بودن آماری عبارت‌ها در معادله رگرسیونی در سطح اطمینان ۹۵ درصدی ($P < 0/05$) مورد بررسی قرار گرفت.

در هر آزمایش محیط‌های کشت با حجم و pH تعیین شده توسط نرم‌افزار تهیه شد و پس از کشت در گرمخانه با شرایط دمای ۲۸ درجه سلسیوس، دور ۱۸۰rpm و به مدت ۱۰ روز، قرار داده شد. وزن خشک سلولی با سانتریفیوژ کردن هر یک از محیط‌ها و خشک کردن آن‌ها در فریز درایر به‌دست آمد. سپس مراحل استخراج CGC انجام شد و با تحلیل نتایج حاصله توسط نرم‌افزار شرایط بهینه تعیین شد.

ت) بررسی متغیرهای سینتیکی رشد و تولید CGC برای

قارچ شیزوفیلوم کومینه

برای به دست آوردن منحنی رشد قارچ شیزوفیلوم کومینه، این قارچ در محیط PDB در یک دوره ۲۰ روزه در شرایط ۲۸ درجه سلسیوس و ۱۸۰rpm کشت داده شد و هر دو روز، یک بار نمونه‌گیری انجام شد و میزان توده زیستی و CGC ثبت شد (۲۲).

معادله منطقی برای انطباق با منحنی توده زیستی سلولی مورد استفاده قرار گرفت. این معادله، مدلی مستقل از سوبسترا است و به‌عنوان مدل بدون ساختار به‌طور گسترده برای توضیح رشد سلولی استفاده می‌شود (۲۳):

$$dC/dt = \mu_m (1 - C/C_m) C$$

معادله ۱

در معادله C توده زیستی سلولی (برحسب گرم بر لیتر)، μ_m حداکثر سرعت رشد ویژه (برحسب day^{-1}) و C_m حداکثر میزان غلظت توده زیستی سلولی به دست آوردنی (بر حسب گرم بر لیتر) است. مدل لودکینگ-پایرت برای منحنی تولید CGC استفاده شد. این معادله به‌طور گسترده برای پیش بینی متابولیت‌ها استفاده می‌شود.

$$(dP)/dt = \alpha (dC)/dt + \beta C$$

معادله ۲

در اینجا p غلظت کمپلکس کیتین-گلوکان (بر حسب گرم بر لیتر)، C میزان توده سلولی (برحسب گرم بر لیتر)، α بر حسب β ،

جدول ۱. طراحی آزمایش باکس بنکن (BBD) و نتایج به دست آمده براساس وزن خشک سلولی و میزان CGC

شماره آزمایش	پارامترها	پاسخ‌ها
A: در صد هوادهی	pH (B)	(C) درصد مایه تلقیح
میزان میسیلیوم (g/L)	میزان (CGC) (g/L)	میزان (g/L)
۱۰۰	۷	۵/۵
۱۵۰	۷	۱۰
۱۵۰	۷	۱
۱۵۰	۹	۵/۵

شماره آزمایش	پارامترها	پاسخها
۵	۷	۱۱/۴۶
۶	۹	۱۲/۲۴
۷	۵	۷/۱۴
۸	۵	۸/۹۶
۹	۹	۱۱/۶۸
۱۰	۷	۱۰/۱
۱۱	۷	۱۱/۳۸
۱۲	۵	۸/۲
۱۳	۵	۸/۸۲
۱۴	۷	۱۱/۳۸
۱۵	۹	۱۱/۹۶
۱۶	۷	۱۱/۴۴
۱۷	۷	۱۱/۳۹

جدول ۲. آنالیز واریانس و ضرایب رگرسیون تخمین زده شده میزان تولید وزن خشک سلولی

عبارت	مجموع مربعات	مربع میانگین	درجه آزادی	F-Value	P-Value
مدل	۴۳/۰۱	۴/۷۸	۹	۲۱/۶۳	۰/۰۰۰۳
A	۲/۷۴	۲/۷۴	۱	۱۲/۴۰	۰/۰۰۹۷
B	۳۰/۶۵	۳۰/۶۵	۱	۱۳۸/۷۹	<۰/۰۰۰۱
C	۱/۰۲	۱/۰۲	۱	۴/۶۳	۰/۰۶۸۵
AB	۰/۴۶	۰/۴۶	۱	۲/۰۹	۰/۱۹۱۲
AC	۰/۰۲۰	۰/۰۲۰	۱	۰/۰۸۹	۰/۷۷۴۴
BC	۰/۴۵	۰/۴۵	۱	۲/۰۳	۰/۱۹۷۰
A ²	۰/۸۴	۰/۸۴	۱	۳/۸۲	۰/۰۹۱۶
B ²	۶/۶۶	۶/۶۶	۱	۳۰/۱۴	۰/۰۰۰۹
C ²	۰/۲۸	۰/۲۸	۱	۱/۲۶	۰/۲۹۸۰
باقیمانده	۱/۵۵	۰/۲۲	۷		

درصد مایه تلقیح به هوادهی؛ (C) اثر درصد مایه تلقیح به اسیدیته در میزان وزن خشک سلولی نشان داده شده است.

پ) بهینه سازی بر اساس پاسخ تولید CGC

مقدار R² برای تولید پلی ساکارید خارج سلولی ۰/۹۵۸۴٪ بدست آمد که بیانگر ضریب همبستگی مناسبی می باشد. طبق تحلیل انجام شده توسط نرم افزار بر اساس میزان وزن CGC تولیدی، درصد هوادهی و اسیدیته با P-Value های به ترتیب ۰/۰۱۴۹ و <۰/۰۰۰۱ تاثیر معناداری بر میزان CGC داشته است. طبق این تحلیل برهمکنش بین متغیرهای مورد مطالعه معنادار

نرم افزار یک مدل رگرسیون غیر خطی برای تولید زیست توده براساس متغیرهای کد به صورت معادله زیر پیشنهاد نمود:

$$=11.40 + 0.59 A + 1.96 B + 0.34 AB - 0.070 AC - CDW^* + 0.33 BC + 0.45 A^2 - 1.26 B^2 - 0.26 C^2$$

* = میزان وزن خشک سلولی

معادله ۳

در شکل ۱-الف نمودارهای دو بعدی (A) اثر اسیدیته به درصد هوادهی؛ (B) اثر درصد مایه تلقیح به هوادهی؛ (C) اثر درصد مایه تلقیح به اسیدیته در میزان وزن خشک سلولی و ۱-ب نمودارهای سه بعدی (A) اثر اسیدیته به درصد هوادهی؛ (B) اثر

در شکل ۲. الف نمودار دو بعدی (A) اثر اسیدیته به درصد هوادهی؛ (B) اثر درصد مایه تلقیح به هوادهی؛ (C) اثر درصد مایه تلقیح به اسیدیته و ۴-ب نمودارهای سه بعدی (A) اثر اسیدیته به درصد هوادهی؛ (B) اثر درصد مایه تلقیح به هوادهی؛ (C) اثر درصد مایه تلقیح به اسیدیته در میزان وزن CGC آورده شده است.

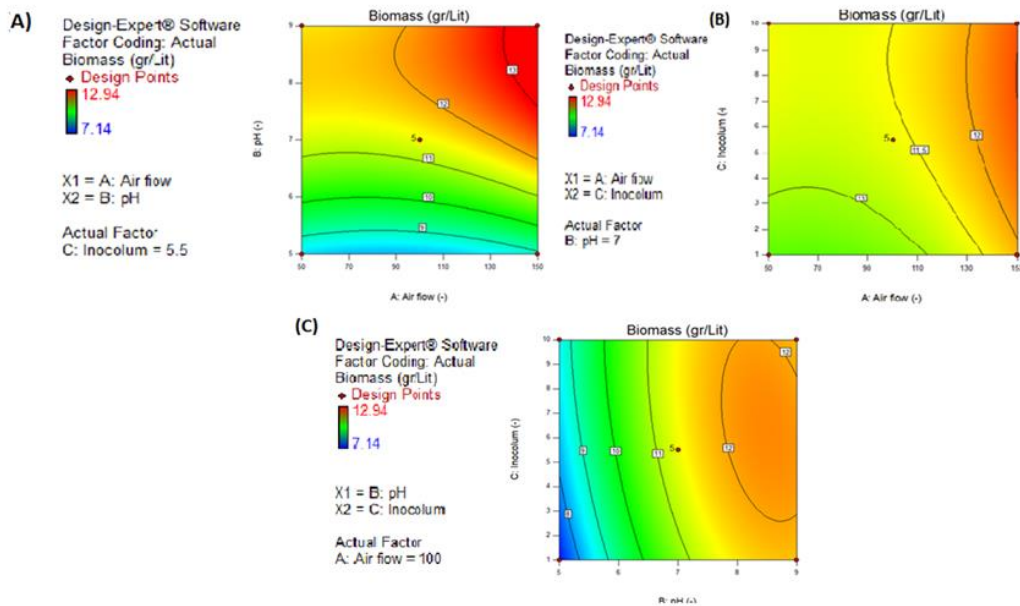
نیست. توان دوم متغیر pH با P-value، ۰/۰۰۲۳ تاثیر معناداری بر میزان تولید CGC را دارد.

نرم افزار یک مدل رگرسیون غیر خطی برای تولید زیست توده براساس متغیرهای کد به صورت معادله زیر پیشنهاد نمود:

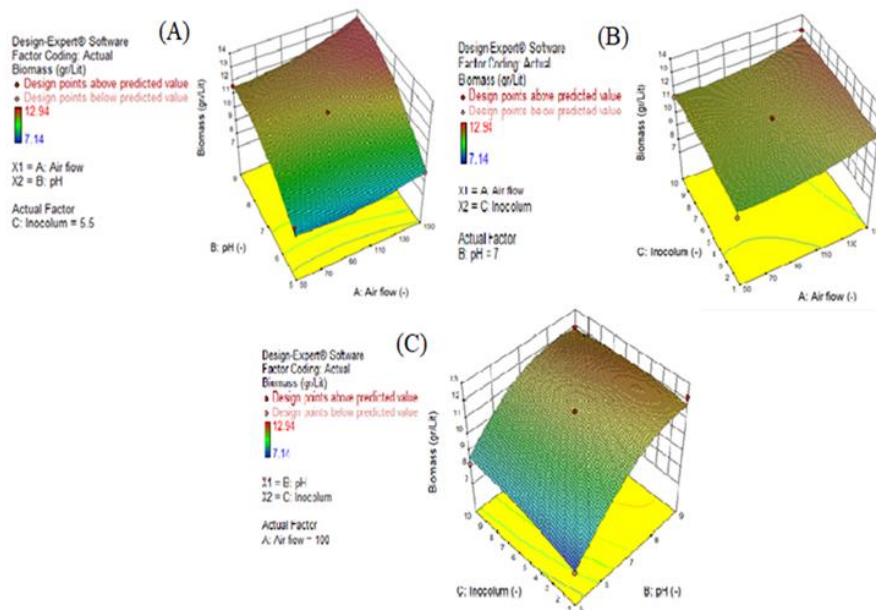
$$(CDW) CGC = 2.51 + 0.13 A + 0.42 B + 0.092 C + 0.077 AB - 7.500E-003 AC - 0.092 BC + 0.11 A^2 - 0.26 B^2 - 0.060 C^2$$

معادله ۴

(الف)

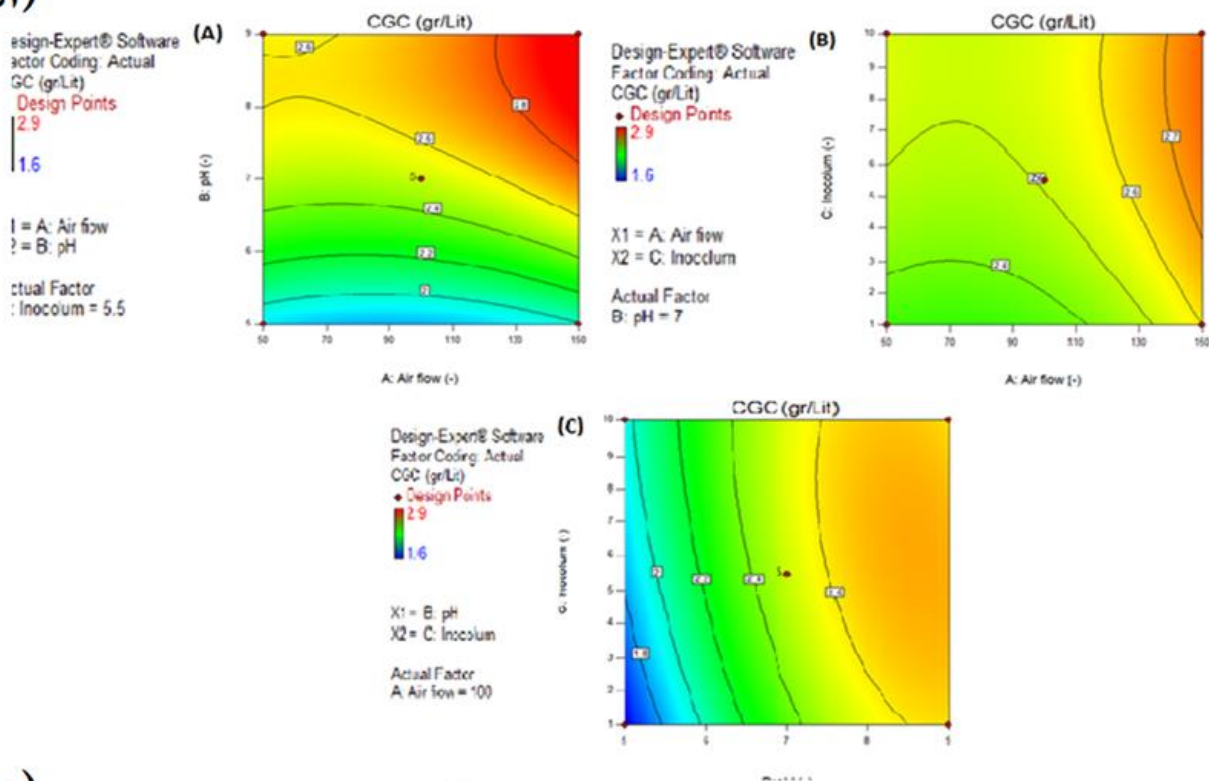


(ب)

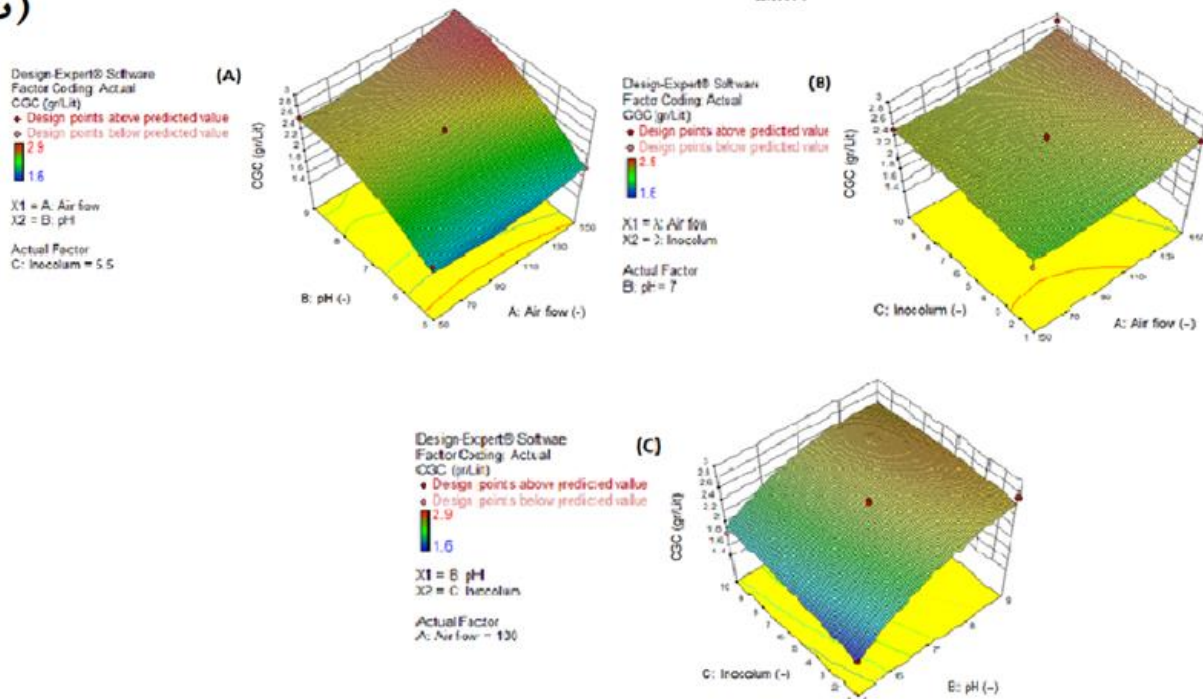


شکل ۱. الف) نمودار دو بعدی (A) اثر اسیدیته به درصد هوادهی؛ (B) اثر درصد مایه تلقیح به هوادهی؛ (C) اثر درصد مایه تلقیح به اسیدیته و (ب) نمودار سه بعدی (A) اثر اسیدیته به درصد هوادهی؛ (B) اثر درصد مایه تلقیح به هوادهی؛ (C) اثر درصد مایه تلقیح به اسیدیته در میزان وزن خشک سلولی.

(الف)



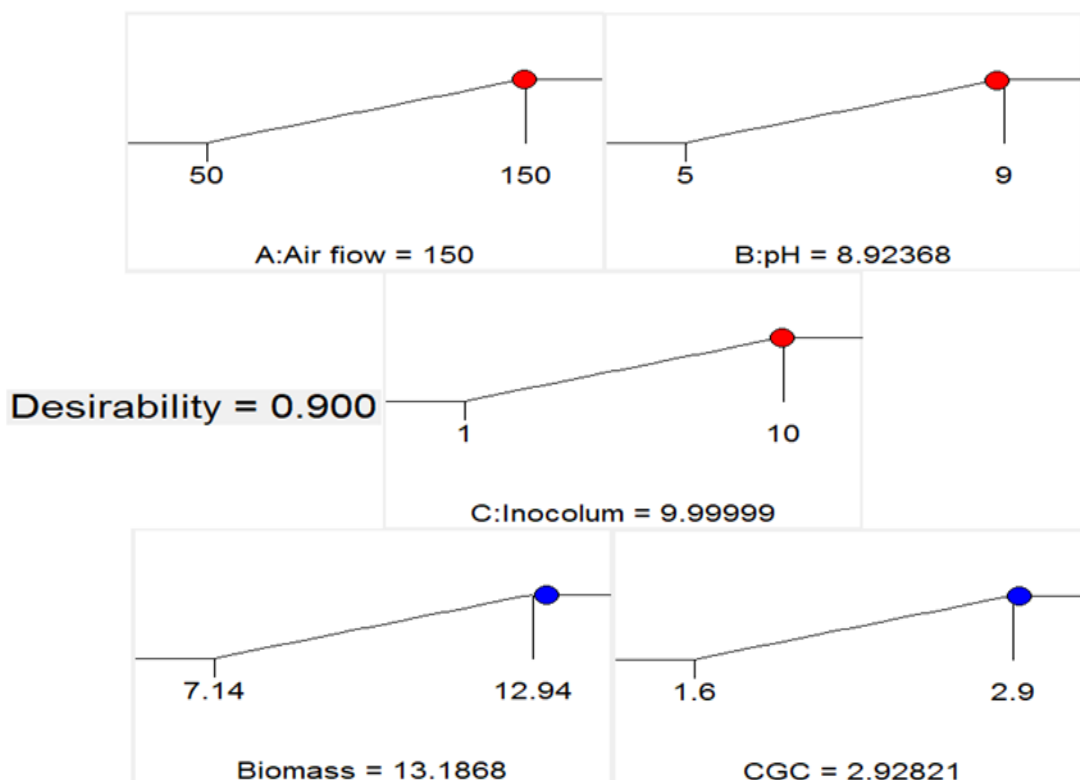
(ب)



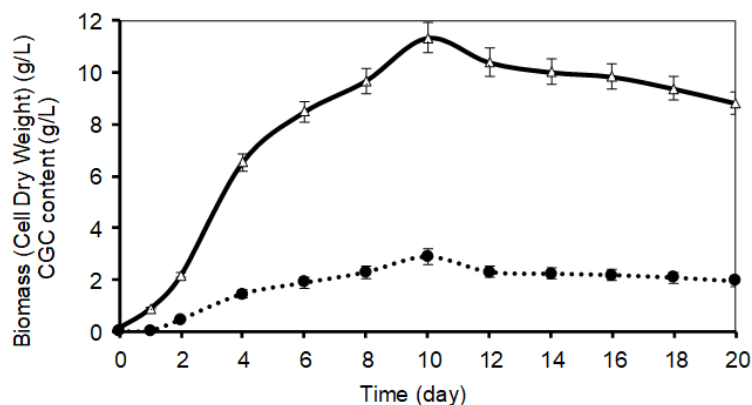
شکل ۲. (الف) نمودار دو بعدی (A) اثر اسیدیته به درصد هوادهی؛ (B) اثر درصد مایه تلقیح به هوادهی؛ (C) اثر درصد مایه تلقیح به اسیدیته و (ب). نمودار سه بعدی (A) اثر اسیدیته به درصد هوادهی؛ (B) اثر درصد مایه تلقیح به هوادهی؛ (C) اثر درصد مایه تلقیح به اسیدیته در میزان وزن CGC.

جدول ۳. آنالیز واریانس و ضرایب رگرسیون تخمین زده شده میزان تولید وزن CGC

عبارت	مجموع مربعات	مربع میانگین	درجه آزادی	F-Value	P-Value
مدل	۲/۰۴	۰/۲۳	۹	۱۷/۹۲	۰/۰۰۰۵
A	۰/۱۳	۰/۱۳	۱	۱۰/۳۱	۰/۰۱۴۹
B	۱/۴۵	۱/۴۵	۱	۱۱۴/۵۱	<۰/۰۰۰۱
C	۰/۰۶۸	۰/۰۶۸	۱	۵/۴۲	۰/۰۵۲۷
AB	۰/۰۲۴	۰/۰۲۴	۱	۱/۹۰	۰/۲۱۰۱
AC	۲/۲۵۰	۲/۲۵۰	۱	۰/۰۱۸	۰/۸۹۷۵
BC	۰/۰۳۴	۰/۰۳۴	۱	۲/۷۱	۰/۱۴۳۶
A ²	۰/۰۵۱	۰/۰۵۱	۱	۴/۰۲	۰/۰۸۵۰
B ²	۰/۲۷	۰/۲۷	۱	۲۱/۷۴	۰/۰۰۲۳
C ²	۰/۰۱۵	۰/۰۱۵	۱	۱/۲۱	۰/۳۰۷۵
باقیمانده	۰/۰۸۸	۰/۲۲	۷		

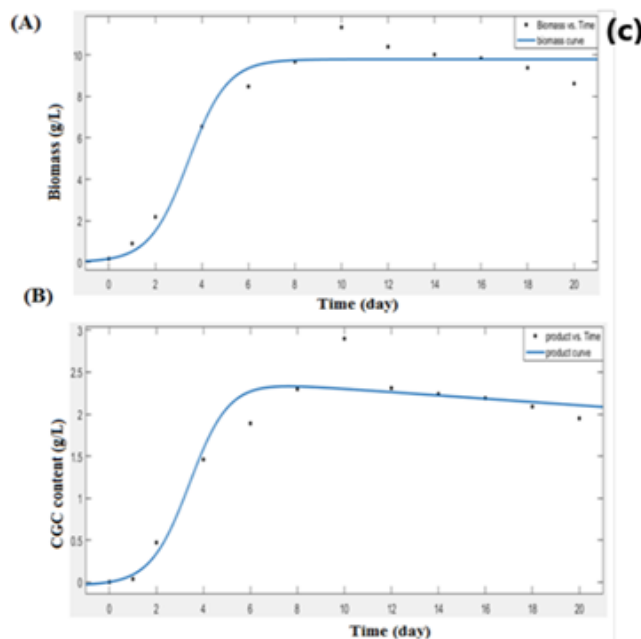


شکل ۳. تعیین نقطه بهینه به منظور افزایش رشد قارچ و تولید CGC



شکل ۴. تغییرات زمانی رشد وزن خشک سلولی، تولید کمپلکس کیتین-گلوکان در محیط کشت PDB قارچ شیزوفیلوم کومینه، منحنی تولید CGC (●)، منحنی رشد میسیلیوم (Δ)

محیط کشت پارامترهای سینتیکی مدل	PDB
C_m (g/L)	۹/۷۹۳
μ_m (day ⁻¹)	۱/۱۹۳
α (g×g ⁻¹)	۰/۲۵۲۴
β (g×(g×h) ⁻¹)	-۰/۰۰۲۰۰۴
R^2 (رشد)	۰/۹۶۶۵
Adjusted- R^2 (رشد)	۰/۹۶۳۱
R^2 (تولید)	۰/۹۴۳۹
Adjusted- R^2 (تولید)	۰/۹۳۸۳



شکل ۵. داده‌های آزمایشگاهی و منحنی رگرسیون (A) توده زیستی و (B) تولید کمپلکس کیتین-گلوکان در شکل میسیلیومی تخمیر قارچ شیزوفیلوم کومینه در محیط کشت PDB (۰) داده‌های آزمایشگاهی و (-) منحنی رگرسیون و (C) ضرائب سینتیکی رشد میسیلیومی و تولید CGC به دست آمده از مدل.

واقع براساس نرم‌افزار در اسیدیت ۸/۹۲، درصد مایه تلقیح ۹/۹۹ و درصد هوادهی ۱۵۰، مقدار توده خشک سلولی به ۱۳/۱۸ g/L و میزان CGC به ۲/۹۲ g/L با اطمینان ۹۰٪، پیش بینی شد. در نهایت به منظور تایید این نقطه، آزمایشی مجدد با شرایط بهینه با سه تکرار انجام شد و نتیجه نشان داد که به صورت عملی در نقطه بهینه میزان تولید توده زیستی ۱۳/۰۵ g/L و میزان CGC به ۲/۹ رسید.

با توجه به نمودارهای فوق می‌توان گفت که هرچه به سمت هوادهی بیشتر و pH قلیایی پیش می‌رود میزان تولید CGC افزایش می‌یابد.

ت تعیین نقطه بهینه و بررسی میزان وزن خشک سلولی و CGC

به منظور پیدا کردن نقطه بهینه از نرم‌افزار ۱۱ Design Expert استفاده شد. نتایج در شکل ۳ نشان داده شده است. در

بوده، که به این معنی است که رابطه خطی بین توده سلولی و CGC وجود دارد و در نتیجه تولید CGC وابسته به رشد می باشد. نتایج نشان داد که شرایط تخمیر ایجاد شده باعث فراهم کردن اکسیژن با هوادهی موثر و نگر داشتن محیط کشت است.

داده‌های به دست آمده در این پژوهش نشان داد که بین تولید توده سلولی و CGC رابطه خطی وجود دارد. مدل سینتیکی ارائه شده می تواند راهنمایی موثر برای کنترل پیشرفته در فرایند تخمیر برای تولید صنعتی متابولیت از قارچ دارویی *شیزوفیلوم کومینه* باشد.

بحث

با توجه به نمودارهای فوق می توان گفت که هرچه به سمت هوادهی بیشتر و pH قلیایی پیش می رود میزان CGC افزایش می یابد. Amorim و همکاران در سال ۲۰۰۱ بیان کردند که امکان دارد pH بر روی داستیلاسیون کیتین و فعالیت آنزیم های CGC تهیه شده اثر بگذارد. آن ها تهیه CGC در شرایط یکسان و pH اولیه متفاوت بین ۵ تا ۶/۵ مورد بررسی قرار دادند و دریافتند که در ۶/۵ = pH بیشترین مقدار CGC تولید شده است (۲۴). علت تاثیر مهم pH اولیه محیط را می توان به این صورت توجیه نمود که pH محیط می تواند روی عملکرد غشاء، مورفولوژی سلول، جذب مواد غذایی و تولید محصولات برون سلولی و درون سلولی تأثیرگذار باشد (۲۵).

طبق مطالعاتی که در سال ۲۰۰۶ Feofilova و همکاران در مورد تغییر محتوا و ترکیب CGC در طی نمو آسکومیت ها در کشت سطحی و غوطه ور انجام دادن و دریافتند ترکیب و محتوای کیتین-گلوکان به طور واضح به مرحله نمو قارچ بستگی دارد و بیشترین مقدار تولید CGC در کشت مایع میسلیوم در محیط اسید دوست مشاهده شده است. همچنین پس از بررسی مشخص شد میزان گلوکان بیشتر از کیتین است که نشان می دهد مقدار و ترکیب CGC به فشار عملکردی محیط کشت بستگی دارد (۷).

در سال ۲۰۱۵ Farinha و همکاران تولید کمپلکس کیتین-گلوکان از قارچ *پیچیا پاستوریس* و بهینه سازی و مشخصه یابی آن را بررسی کردند، در نتیجه بیان کردند که این ماده دارای خواص مشابه با دیگر پلیمر های زیستی می باشد و ممکن است جایگزین خوبی برای محصولات دارویی باشد (۶).

Abdel-Gawad و همکاران در سال ۲۰۱۶ تولید کیتوسان از قارچ دارویی *آسپرژیلوس نایجر* را با استفاده از RSM روش BBD بهینه سازی کردند. نتایج نشان داد که میسلیوم های قارچی

ث) بررسی منحنی رشد و متغیر های سینتیکی رشد و تولید CGC برای قارچ *شیزوفیلوم کومینه*

پس از کشت قارچ *شیزوفیلوم کومینه* در بازه زمانی بیست روزه درون محیط کشت PDB و سنجش میزان وزن خشک سلولی و CGC به دست آمده پس از استخراج از آن و ارتباط بین میزان وزن خشک سلولی و CGC استخراج شده به صورت یک نمودار دو عاملی ترسیم شد.

شکل ۴ نشان می دهد که بیشترین مقدار تولید وزن خشک سلولی و CGC در محدوده زمانی ۸ تا ۱۰ روز می باشد و مقدار CGC ارتباط مستقیم با میزان وزن خشک سلولی دارد. بر اساس منحنی های به دست آمده مشخص شد که از روز صفر تا روز ۱۰ فاز لگاریتمی رشد، از روز ۱۲ تا ۱۶ فاز سکون و از روز ۱۶ به بعد فاز مرگ آغاز می شود. نکته جالب توجه این که در روز ۱۰ که پایان فاز لگاریتم است و بیشترین مقدار وزن خشک سلولی و همچنین بیشترین مقدار CGC نیز به دست آمده و این بدان معناست که میزان وزن خشک سلولی با میزان CGC رابطه مستقیم دارد و از روز ۱۰ که میزان وزن خشک سلولی وارد فاز سکون شد میزان CGC نیز وارد فاز سکون شد. بنابراین برای تولید بیشترین میزان CGC زمان مورد نیاز برای کشت قارچ ۱۰ روز تعیین شد.

قارچ ها شکل های مختلفی مثل رشته های میسلیومی پراکنده (فیلامنتوس) و توده های درهم بافته حجیم (پلت ها) را در محیط کشت غوطه ور از خود نشان می دهند. شکل ۳ میزان زیست توده سلولی و تولید CGC را در طول تخمیر با استفاده از تطابق مدل رشد لجستیک و تولید لودکینگ-پایرت نشان می دهد. از معادله منطقی غیروابسته به سوبسترا برای شبیه سازی تغییرات در توده سلولی و از معادله لودکینگ-پایرت برای شبیه سازی غلظت های CGC تولید شده استفاده شد. فرمول بصورت زیر نوشته شده و با استفاده از نرم افزار Matlab شبیه سازی مدل انجام شد.

$$C(t) = C_m / (1 + ((C_m/C_0) - 1) e^{-\mu_m t})$$

معادله ۵

$$P(t) = P_0 + \alpha [C(t) - C_0] + \beta C_m \{ \ln C_0 / C(t) + \mu_m t \} / \mu_m$$

معادله ۶

مقدارهای رگرسیون در شکل شماره ۵ آمده است. مشخصات سینتیکی رشد سلولی و مدل سینتیکی CGC با استفاده از این مدل به خوبی توضیح داده شد. در محیط کشت مورد مطالعه مقدار ثابت آلفا وابسته به رشد بیشتر از مقدار ثابت بتا غیروابسته به رشد

یافته است. فاز سکون بعد از ۹ روز ظاهر شده، و بنابراین این مدل فقط یک دوره محدود (مرحله رشد تدریجی) را نشان می دهد. با توجه به برآورد مطلوب، براساس داده های آزمایش شده، نتیجه ای امیدوار کننده ای بدست آمد. احتمالاً کمبود انتقال اکسیژن و جذب مواد مغذی در داخل پلت ها تنها در دوره بعد با سرعت رشد کم اتفاق می افتد؛ بنابراین، رشد شکل پلت یک چرخه طولانی داشته است. مطابق شکل ۵ ضریب منفی β نشان داد که تولید وابسته به رشد، برخلاف تولید غیروابسته به رشد افزایش می یابد. مدل سینتیکی رشد و تولید کمپلکس کیتین گلوکان از قارچ شیزوفیلوم کومینه در این پژوهش با مدل بررسی شده در مطالعه Tang و همکاران در سال ۲۰۰۴ (۲۷) بر روی قارچ گنودرما لوسیدیوم و پژوهش Feng و همکاران در سال ۲۰۱۰ در بررسی مدل ساختاری تولید پلی ساکارید از قارچ شیتاکه (۲۸) مطابقت دارد.

نتیجه گیری

بر اساس بهینه سازی انجام شده شرایط بهینه، درصد هوادهی ۱۵۰، pH ۸/۹۲ و درصد تلقیح ۹/۹۹ به دست آمده است. پارامترهای سینتیکی رشد و تولید بررسی شده است و تطابق داده های تجربی با مدل رشد لجستیک با $R^2 = ۰/۹۶۶۵$ و مدل لودکینگ-پایرت برای تولید با $R^2 = ۰/۹۴۳۹$ همخوانی خوبی نشان داده است. طبق منحنی ترسیم شده روز دهم به علت دارا بودن بیشترین مقدار وزن خشک سلولی و CGC انتخاب شده است.

تشکر و قدردانی

این تحقیق حاصل پایان نامه دانشجویی کارشناسی ارشد باکد ۱۵۷۳۰۵۶۰۹۶۲۰۳۷ است.

تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض منافع گزارش نشده است.

Referance

1. Singh A, Dutta PK, Kumar H, Kureel AK, Rai AK. Synthesis of chitin-glucan-aldehyde-quercetin conjugate and evaluation of anticancer and antioxidant activities. Carbohydr Polym. 2018;193:99-107. [DOI:10.1016/j.carbpol.2018.03.092] [PMID]
2. Chagas B, Farinha I, Galinha CF, Freitas F, Reis MAM. Chitin-glucan complex production by *Komagataella (Pichia) pastoris*: Impact of cultivation pH and temperature on polymer content and composition. N Biotechnol. 2014;31(5):468-74. [DOI:10.1016/j.nbt.2014.06.005] [PMID]

3. Vysotskaya MR, Maslova G V., Petrova VA, Nud'ga LA. Electrochemical recovery of chitin-glucan complex from *Pleurotus ostreatus* basidial fungus and properties of the product. *Russ J Appl Chem.* 2009;82(8):1390-5. [[DOI:10.1134/S1070427209080138](https://doi.org/10.1134/S1070427209080138)]
4. Gautier S, Khaufaire-Uhoda E, Gonry P, Piérard GE. Chitin-glucan, a natural cell scaffold for skin moisturization and rejuvenation. *Int J Cosmet Sci.* 2008;30(6):459-69. [[DOI:10.1111/j.1468-2494.2008.00470.x](https://doi.org/10.1111/j.1468-2494.2008.00470.x)] [PMID]
5. Kirtzel J, Scherwietes EL, Merten D, Krause K, Kothe E. Metal release and sequestration from black slate mediated by a laccase of *Schizophyllum commune*. *Environ Sci Pollut Res.* 2019;26(1):5-13. [[DOI:10.1007/s11356-018-2568-z](https://doi.org/10.1007/s11356-018-2568-z)] [PMID]
6. Farinha I, Duarte P, Pimentel A, Plotnikova E, Chagas B, Mafra L, et al. Chitin-glucan complex production by *Komagataella pastoris*: Downstream optimization and product characterization. *Carbohydr Polym.* 2015 Oct 5;130:455-64. [[DOI:10.1016/j.carbpol.2015.05.034](https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.05.034)] [PMID]
7. Feofilova EP, Nemtsev D V., Tereshina VM, Memorskaya AS. Developmental change of the composition and content of the chitin-glucan complex in the fungus *Aspergillus niger*. *Appl Biochem Microbiol.* 2006;42(6):545-9. [[DOI:10.1134/S0003683806060032](https://doi.org/10.1134/S0003683806060032)]
8. Du B, Zeng H, Yang Y, Bian Z, Xu B. Anti-inflammatory activity of polysaccharide from *Schizophyllum commune* as affected by ultrasonication. *Int J Biol Macromol.* 2016;91:100-5. [[DOI:10.1016/j.ijbiomac.2016.05.052](https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.05.052)] [PMID]
9. Sornlake W, Rattanaphanjak P, Champreda V, Eurwilaichitr L, Kittisenachai S, Roytrakul S, et al. Characterization of cellulolytic enzyme system of *Schizophyllum commune* mutant and evaluation of its efficiency on biomass hydrolysis. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2017;81(7):1289-99. [[DOI:10.1080/09168451.2017.1320937](https://doi.org/10.1080/09168451.2017.1320937)] [PMID]
10. Abdel-Mohsen AM, Jancar J, Massoud D, Fohlerova Z, Elhadidy H, Spatz Z, et al. Novel chitin/chitosan-glucan wound dressing: Isolation, characterization, antibacterial activity and wound healing properties. *Int J Pharm.* 2016 Aug 20;510(1):86-99. [[DOI:10.1016/j.ijpharm.2016.06.003](https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.06.003)] [PMID]
11. Estrada-Mata E, Navarro-Arias MJ, Pérez-García LA, Mellado-Mojica E, López MG, Csonka K, et al. Members of the *Candida parapsilosis* complex and *Candida albicans* are differentially recognized by human peripheral blood mononuclear cells. *Front Microbiol.* 2016;6(JAN):1-11. [[DOI:10.3389/fmicb.2015.01527](https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01527)] [PMID] [PMCID]
12. Farinha I, Duarte P, Pimentel A, Plotnikova E, Chagas B, Mafra L, et al. Chitin-glucan complex production by *Komagataella pastoris*: Downstream optimization and product characterization. *Carbohydr Polym.* 2015 Oct 5;130:455-64. [[DOI:10.1016/j.carbpol.2015.05.034](https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.05.034)] [PMID]
13. Nwe N, Stevens WF, Tokura S, Tamura H. Characterization of chitosan and chitosan-glucan complex extracted from the cell wall of fungus *Gongronella butleri* USDB 0201 by enzymatic method. *Enzyme Microb Technol.* 2008 Feb 4;42(3):242-51. [[DOI:10.1016/j.enzmictec.2007.10.001](https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2007.10.001)]
14. Li W, Zhou P, Yu L. Statistical optimization of the medium composition by response surface methodology to enhance schizophyllan production by *Schizophyllum commune*. *Zeitschrift fur Naturforsch - Sect C J Biosci.* 2011;66 C(3-4):173-81. [[DOI:10.1515/znc-2011-3-412](https://doi.org/10.1515/znc-2011-3-412)] [PMID]
15. Jonathan SG, Fasidi IO. Studies on phytohormones, vitamins and mineral element requirements of *Lentinus subnudus* (Berk) and *schizophyllum commune* (Fr. Ex. Fr) from Nigeria. *Food Chem.* 2001;75(3):303-7. [[DOI:10.1016/S0308-8146\(01\)00154-6](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(01)00154-6)]
16. Bowman SM, Free SJ. The structure and synthesis of the fungal cell wall. 2006;799-808. [[DOI:10.1002/bies.20441](https://doi.org/10.1002/bies.20441)] [PMID]
17. Hao LM, Xing XH, Li Z, Zhang JC, Sun JX, Jia SR, et al. Optimization of effect factors for mycelial growth and exopolysaccharide production by *schizophyllum commune*. In: *Applied Biochemistry and Biotechnology.* 2010. p. 621-31. [[DOI:10.1007/s12010-008-8507-6](https://doi.org/10.1007/s12010-008-8507-6)] [PMID]
18. Society P, Microbiologists OF. P O L S K I E T O W A R Z Y S T W O M I K R O B I O L O G Ó W Polish Journal of Microbiology. 2011;57(1):223-8.
19. Meichik NR, Vorob'ev D V. Chitin-glucan complex in cell walls of the *Peltigera aphthosa* lichen. *Appl Biochem Microbiol.* 2012;48(3):307-11. [[DOI:10.1134/S0003683812030088](https://doi.org/10.1134/S0003683812030088)]
20. Ordoñez L, García J, Bolanños G. Producing chitin and chitin-glucan complexes from *Aspergillus niger* biomass using subcritical water. In: *Proceedings of the Ibero-american Conference on Supercritical Fluids, Cartagena, Colombia 2013 Apr* (pp. 1-5).
21. Veverka M, Dubaj T, Gallovič J, Jorík V, Veverková E, Mičušík M, et al. Beta-glucan complexes with selected nutraceuticals: Synthesis, characterization, and stability. *J Funct Foods.* 2014;8(1):309-18. [[DOI:10.1016/j.jff.2014.03.032](https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.03.032)]
22. Moraditanha A, HatamianZarmi A, EbrshimiHoseinZade B, BeigomMokhtariHoseini Z, KianiRad S. Study of growth kinetics and production of chitin-glucans complex in drug-immersed cultivation of medicinal fungi *Ganoderma lucidum*. *Interdiscip J Sci Res.* 2018;2(1):31-43. [In Persian]
23. Tajdini F, Amini MA, Nafissi-Varcheh N, Faramarzi MA. Production, physiochemical and antimicrobial properties of fungal chitosan from *Rhizomucor miehei* and *Mucor*

- racemosus. *Int J Biol Macromol*. 2010 Aug 1;47(2):180-3. [DOI:10.1016/j.ijbiomac.2010.05.002] [PMID]
24. Amorim RV da S, Souza W de, Fukushima K, Campos-Takaki GM de. Faster Chitosan Production By Mucoralean Strains. *J Microbiol*. 2001;(1517-8382):20-3. [DOI:10.1590/S1517-83822001000100005]
25. 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 May 1;99(8):3187-94. [DOI:10.1016/j.biortech.2007.05.049] [PMID]
26. Abdel-Gawad KM, Hifney AF, Fawzy MA, Gomaa M. Technology optimization of chitosan production from *Aspergillus niger* biomass and its functional activities. *Food Hydrocoll*. 2017 Feb 1;63:593-601. [DOI:10.1016/j.foodhyd.2016.10.001]
27. Tang YJ, Zhong JJ. Modeling the kinetics of cell growth and ganoderic acid production in liquid static cultures of the medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*. *Biochem. Eng. J*. 2004; 21: 259-264. [DOI:10.1016/j.bej.2004.06.008]
28. Feng YL, Li WQ, Wu XQ, Cheng JW, Ma SY. Statistical optimization of media for mycelial growth and exopolysaccharide production by *Lentinus edodes* and a kinetic model study of two growth morphologies. *Biochem. Eng. J*. 2010; 49: 104-112. [DOI:10.1016/j.bej.2009.12.002]