



## مقایسه استخراج، بهینه‌سازی و خالص‌سازی لنتینان در فروتینگ

### بادی و میسلیوم *Lentinula edodes*

حانیه عطااللهی<sup>1</sup>، محدثه لاری پور<sup>2\*</sup>، مینو صدوری<sup>3</sup>

1. کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی میکروبی، دانشکده علوم زیستی، گروه علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، تهران، ایران.

2. استادیار، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، تهران، ایران.

3. دانشیار، گروه علوم زیستی، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، مجتمع شیمی و مهندسی شیمی، تهران، ایران.

\* نویسنده مسئول: m.larypoor@iau-tnb.ac.ir

شماره ارجید: 0000-0002-2003-8343

#### چکیده

*Lentinula edodes* (شیتاکه) به دلیل محتوای بالای پروتئینی، پلی ساکاریدی و عطر منحصر به فرد خود یکی از گونه‌های محبوب قارچ خوراکی/دارویی است که از نظر کشت و مصرف دومین رتبه جهانی را دارد. امروزه ترکیبات مؤثر و کاربردی آن به عنوان درمان کمکی در کنار درمان‌های شیمیایی استفاده می‌شود. در این مطالعه محیط کشت، اسیدیته و دمای بهینه رشد میسلیوم (*Lentinula edodes* (TMU340) تعیین شد. میسلیوم، جسم بارده و کل قارچ لیوفیلیزه شد و نسبت وزن تر به خشک به دست آمد. لنتینان با استفاده از روش آب گرم در  $60^{\circ}\text{C}$  پروتئین‌زدایی با روش *Sevage* و رسوب‌گیری با اتانول خالص در  $4^{\circ}\text{C}$  استخراج و به وسیله کروماتوگرافی تعویض یونی تخلیص شد. غلظت لنتینان با استفاده از تست فنول- سولفوریک اسید به دست آمد. در نتیجه، شرایط بهینه شامل محیط‌های کشت PDA و PDB، دمای  $25^{\circ}\text{C}$ ، pH 5/5، تعیین شد. نسبت وزن تر به خشک در همه نمونه‌ها 10 به 1 بود. غلظت لنتینان بعد از استخراج و خالص‌سازی به ترتیب 0/243، 0/103 و 0/148 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به دست آمد. نتیجه آنکه، این قارچ می‌تواند در تولید انواع متابولیت‌ها و ترکیبات طبیعی بدون عوارض نظیر پلی ساکارید لنتینان به عنوان عاملی در ارتقاء سیستم ایمنی مفید باشد.

کلید واژگان: شیتاکه، فنول-سولفوریک اسید، پلی ساکارید، قارچ کلاه‌دار، کروماتوگرافی تعویض یونی

*Lentinula edodes* (Berk) Pegler . دومین قارچ خوراکی

محبوب در بازار جهانی است. این قارچ یکی از قارچ‌های خوراکی مشهور در جهان به ویژه در تغذیه کشورهای شرقی محسوب می‌شود و اخیراً در غذاهای غربی به دلیل

#### مقدمه

اکثر قارچ‌ها در بسیاری از اکوسیستم‌های طبیعی به صورت هتروتروفی زندگی می‌کنند که این حالت منحصر به فرد تغذیه‌ای، قارچ‌ها را مناسب امور تکنولوژیکی می‌کند<sup>(1)</sup>

داشتن طعم و عطر مطبوع جایگاهی ویژه پیدا کرده است. به عبارت دیگر جنس *Lentinula* در کل جهان مورد توجه است و حدود 22% از قارچ‌های کشت‌شده را در دنیا به خود اختصاص می‌دهد. این قارچ با اسامی دیگری نظیر *xiang gu* در چین<sup>(2)</sup>، *Shiitake* در ژاپن، قارچ جنگلی ژاپنی، قارچ سیاه جنگلی و قارچ بلوط سیاه در انگلیس نیز شناخته می‌شود<sup>(3)</sup>. *L.edodes* یکی از انواع ارزشمند قارچ خوراکی با محتوای بالای ریزمغذی‌های غذایی نظیر پروتئین‌ها، پلی‌ساکاریدها و همچنین عطری منحصر به فرد است که در بسیاری از کشورهای آسیایی به‌ویژه در چین، ژاپن و کره در سطحی گسترده کشت می‌شود. این قارچ به شاخه *Basidiomycota*، رده *Agaricomycetes* و راسته *Agaricales*<sup>(4)</sup> تعلق دارد. از اثرات درمانی آن می‌توان به اثرات ضد توموری، ضد باکتریایی، ضد ویروسی، ضد میکروبی، ضد قارچی، ضد دیابت، تعدیل‌کننده ایمنی، آنتی‌اکسیدانی، کاهنده چربی خون، ضد بیماری‌های قلبی و عروقی و محافظت از کبد اشاره کرد که این اثرات مربوط به ترکیبات زیست فعال آن است<sup>(5)</sup>. پلی‌ساکاریدهای این قارچ فعالیت‌های زیست محیطی متنوعی نظیر فعالیت‌های ضد توموری و تعدیل سیستم ایمنی دارند. براساس شواهد حاصل از مطالعات آزمایشگاهی، قسمت‌های پلی‌ساکاریدی قارچ *Shiitake* می‌تواند تکثیر طیفی وسیع از سلول‌های سرطان‌زا را مهار و همچنین آپوپتوز در سلول‌های توموری القا کند. شش پلی‌ساکارید از قارچ *L.edodes* استخراج می‌شود که فقط یکی از آنها به نام *Lentinane* فعالیت ضد توموری قوی دارد<sup>(6)</sup>. پلی‌ساکاریدها یکی از ترکیبات خام مورد استفاده در صنایع مختلف شیمیایی، مواد دارویی و غذایی و برخی از صنایع دیگر نیز هستند که آنها را مناسب بهره‌برداری‌هایی نظیر چسب‌های زیستی، پروبیوتیک‌ها، غلیظ‌کننده‌ها، جاذب‌های زیستی و تثبیت‌کننده‌ها می‌کند. همچنین، فعالیت‌های مختلف بیولوژیکی دارند<sup>(7)</sup>.

پلی‌ساکارید لنتینان یک  $\beta$ -گلوکان محلول در آب جداشده از قارچ خوراکی معمول *L.edodes* است. در واقع، ماکرومولکول بیولوژیکی فعالی با کاربردهای بالقوه پزشکی در قبال عملکردهای سیستم ایمنی است<sup>(8)</sup>.  $\beta$ -گلوکان در اصطلاح به گروهی از اصلاح‌کننده‌های واکنش‌های بیولوژیک نسبت داده می‌شود که به اثرات ضد توموری به واسطه پاسخ ایمنی، در سلول منجر می‌شوند<sup>(9)</sup>.  $\beta$ -گلوکان‌ها پلیمرهایی از گلوکز با اتصالات گلیکوزیدی هستند که در دیواره سلولی قارچ، مخمر، جو دوسر و جو به وفور وجود دارند. این ترکیبات به سطوح لنفوسیت‌ها یا پروتئین‌های اختصاصی سرم متصل می‌شوند تا بتوانند ماکروفاژها یا سلول‌های T کمکی، کشته طبیعی و سلول‌های مؤثر دیگر را فعال کنند که در نهایت به افزایش تولید و رهاشدن آنتی‌بادی‌ها، اینترلوکین‌ها و اینترفرون منجر می‌شوند<sup>(10)</sup>. لنتینان علیه باکتریایی همانند *Mycobacterium tuberculosis* (عامل سل)، *Salmonella enteritis*، *Listeria monocytogenes* و *Staphylococcus aureus* فعال است و همچنین تعداد باکتری‌های زنده و شمارش کلنی‌های *Escherichia coli* را در روده خوک‌ها کاهش می‌دهد. به علاوه پلی‌ساکارید اثر ضد ویروسی علیه ویروس‌های *Influenza* و *Polio* دارد. همچنین، به‌عنوان یکی از داروهای ضد HIV نیز شناخته شده است که سبب تحریک مقاومت میزبان در مقابل این ویروس می‌شود و سمی بودن داروهای متداول این بیماری را محدود می‌کند؛ این فرایند سبب افزایش آزادسازی اینترفرون گاما و تکثیر سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی می‌شود. همچنین، لنتینان عامل مهمی در کاهش کلسترول افراد نیز محسوب می‌شود، زیرا سطح لیپوپروتئین LDL را کاهش و HDL را در خون افزایش می‌دهد. در مطالعات بالینی انسانی و غیر انسانی نیز اثرات کاهنده قند خون این گلوکان قارچی به اثبات رسیده است<sup>(11)</sup>. پلی‌ساکارید لنتینان به دلیل فعالیت ضد توموری قوی

صنعتی به کار برد. در این مطالعه تلاش شد که با تعیین شرایط محیطی مناسب و بهینه کردن شرایط رشد میسلیم قارچ دارویی *L.edodes* در مراحل مختلف کشت، اثر انواع محیط کشت جامد و مایع، دما و pH بررسی شود؛ چراکه برای کشت بهتر این قارچ فراسودمند، به دست آوردن شرایط استاندارد رشد بسیار ارزشمند خواهد بود. در مرحله بعد برای به دست آوردن نسبت وزن تر به خشک از تکنیک لیوفیلیزاسیون کمک گرفته شد. پلی ساکارید دارویی لتینان با اثرات بسیار سودمند از میسلیم‌ها، اندام بارده و قارچ کامل با استفاده از روشی مقرون به صرفه جداسازی، تخلیص و در نهایت غلظت آن تعیین و مقایسه شد تا شرایط بهره‌وری برای کاربردهای دارویی این قارچ فراهم شود.

#### مواد و روش‌ها

##### تهیه سوش و کشت میسلیم قارچ *L.edodes*

میسلیم قارچ *L.edodes* با شماره شناسایی TMU340 به صورت پلیت کشت فعال، جسم بارده تازه و قارچ کامل از شرکت قارچ ایران زمین تهیه شد (شکل 1). برای تعیین مناسب‌ترین شرایط محیطی، اثر بعضی از عوامل مؤثر در رشد نظیر انواع محیط کشت جامد، مایع، تغییرات دمایی و تغییرات pH (به صورت مجزا در 4 تکرار) بررسی شد. ابتدا اثرات سه محیط کشت جامد و دو محیط مایع بررسی شد.

خود با فعال کردن سیستم ایمنی به عنوان یک پلی ساکارید زیست‌فعال شناخته شده است؛ چراکه در ترکیب با شیمی‌درمانی در درمان تومور کاربرد گسترده‌ای دارد و تأیید شده است. این مولکول یک  $\beta$ -گلوکان (پلی گلوکز) با واحدهای تکرارشونده است که از دوشاخه  $(1 \rightarrow 6)\beta$ -گلوکوپیرانوزید به ازای هر پنج اتصال خطی  $(1 \rightarrow 6)\beta$  گلوکوپیرانوزید در زنجیره اصلی تشکیل شده است. همچنین، به دلیل حضور پیوندهای هیدروژنی داخل و خارج مولکولی، لتینان می‌تواند ساختارهای مارپیچی به ویژه مارپیچ سه‌گانه را در محلول آبی تشکیل دهد<sup>(12)</sup>. جهت ساختار مارپیچ سه‌گانه این پلی ساکارید راست‌گرد و با چرخش  $+29^\circ$  درجه در آب است<sup>(13)</sup>. همچنین، مشخص شده است که وزن مولکولی، میزان انشعاب، ترکیب و اتصالات درون مولکولی در زنجیره پلی ساکاریدی برای پاسخ‌های بیولوژیکی آن حیاتی است و میزان حلالیت لتینان،  $(1 \rightarrow 3)\beta$ -D-گلوکان، در واقع به وزن مولکولی آن وابسته است. فرمول مولکولی این ترکیب با میانگین وزن مولکولی 500 کیلو دالتون برابر است با  $(C_6H_{10}O_5)_n$ <sup>(14)</sup>. همچنین در محلول آبی اندازه ذرات لتینان تقریباً 100 تا 200 میکرومتر است<sup>(15)</sup>.

کشت این قارچ ارزشمند خوراکی/دارویی و اجزای فعال آن مانند میسلیم با هدف یافتن شرایط بهینه رشد و بهره‌وری از خواص دارویی بالای این قارچ انجام گرفت. با کشت و پرورش بهینه این قارچ، می‌توان مواد مؤثر آن را در تولید مکمل‌های دارویی و خوراکی به صورت



شکل 1. اشکال مختلف *L. edodes*. میسلیموم (الف)؛ اندام بارده (ب) و قارچ کامل (ج).

### محیط‌های کشت جامد

برای کشت میسلیموم این سویه قارچی از سه محیط کشت جامد Potato Dextrose Agar، Malt Extract Agar و Sabouraud Dextrose Agar استفاده شد. ترکیبات محیط کشت PDA حاوی مقدار 200 گرم سیب‌زمینی تازه (معادل 4 گرم عصاره سیب‌زمینی)، 20 گرم دکستروز و مقدار 15 گرم آگار<sup>(16)</sup>، محیط کشت MEA نیز حاوی ترکیبات 20 گرم عصاره مالت، 5 گرم پپتون و 15 گرم آگار<sup>(17)</sup> و محیط کشت SDA دارای 40 گرم دکستروز، 10 گرم پپتون و 15 گرم آگار بودند (تمامی محیط‌های کشت از شرکت Merk، آلمان خریداری شدند). بعد از آماده‌کردن محیط‌های کشت، استریلیزاسیون و تنظیم pH، در زیر هود لامینار (CHC biolus، کره)، هریک از محیط‌های کشت به وسیله دیسک‌های میسلیموم فعال قارچ، تلقیح و در دمای 25°C به مدت 14 روز انکوبه شد. در نهایت، رشد میسلیمومی هریک از محیط‌ها، با هم مقایسه و محیط کشت PDA به‌عنوان محیط بهینه برای مقاصد بعدی پژوهش انتخاب شد.

### بررسی تغییرات دمایی

برای تعیین دمای بهینه رشد، دماهای مختلف بر محیط PDA اعمال شد؛ چراکه برای بررسی شرایط محیطی، محیط‌های کشت جامد مناسب‌تر هستند. بدین‌صورت که میزان رشد میسلیموم قارچ بعد از تلقیح و

گرم‌گذاری در انکوباتور (Memmert، آلمان) در بازه‌های دمایی 27°C، 25°C و 23°C پس از مدت زمان کامل شدن رشد میسلیموم بررسی شد<sup>(18)</sup>.

### محیط‌های کشت مایع

در کشت مایع میسلیموم قارچ *L. edodes* از دو محیط کشت مایع Potato Dextrose Broth و محیط ترکیبی استفاده شد که اجزای موجود در محیط ترکیبی شامل 30 گرم در لیتر گلوکز، 2 گرم در لیتر پپتون، 3 گرم در لیتر عصاره مخمر، 0/5 گرم در لیتر  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ، 1/5 گرم در لیتر  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ، 1 گرم در لیتر  $\text{MgSO}_4$  و به مقدار 0/002 گرم در لیتر ویتامین B<sub>1</sub> بود<sup>(19)</sup>. بعد از تنظیم pH هریک از محیط‌های کشت، تلقیح سویه قارچی به‌وسیله قطعات 5×5 میلی‌متر مربع از قارچ رشد کرده در پلیت PDA در محیط کشت PDB صورت گرفت<sup>(20)</sup> و به مدت 14 روز در دمای 25°C در شیکر انکوباتور (Iran Khodsaz، ایران) با سرعت 110 دور در دقیقه<sup>(21)</sup> انکوبه شد. سپس بیومس و تراکم میسلیموم قارچ ارزیابی شد (تمامی مواد شیمیایی و ترکیبات محیط از شرکت Merk، آلمان خریداری شدند).

### بررسی تغییرات pH

برای تعیین مناسب‌ترین pH با هدف دستیابی به بالاترین تراکم میسلیموم از بازه‌های pH ~1/5، pH ~2/5، pH ~3/5، pH ~4/5، pH ~5/5 و pH ~6/5 و

لام‌ها و لامل‌ها جداسازی، به کمک رنگ لاکتوفنل-کاتن بلو رنگ‌آمیزی و با میکروسکوپ نوری (Nikon، ژاپن) بررسی شد (22).

### لیوفیلزاسیون میسلیوم، جسم بارده و قارچ کامل L.edodes

برای انجام مراحل بعدی مطالعه خشک کردن میسلیوم، جسم بارده و قارچ کامل لازم بود. به همین دلیل از تکنیک لیوفیلزاسیون استفاده شد؛ چراکه تکنیک خشک‌کن انجمادی پروسه‌ای بسیار خاص در حذف آب و هرگونه رطوبت است و هدفش این است که عمر مفید مواد ضروری و خوراکی را با از بین بردن آب و رطوبت طولانی‌تر گرداند. در این مرحله از دستگاه فریز درایر آزمایشگاهی (Telstar Lyo Quest، اسپانیا) و در لیوفیلزاسیون از میسلیوم، اندام بارده و قارچ کامل تازه L.edodes استفاده شد. به این منظور ابتدا میسلیوم کشت داده شده سه بار با آب مقطر با هدف خارج شدن محیط کشت شست‌وشو داده شد. قبل از خشک شدن، وزن خیس هریک ثبت شد. سپس، میسلیوم بعد از فریز کردن در دمای  $20^{\circ}\text{C}$  آماده انجام فرایند شد. فرایند کلی لیوفیلزاسیون به مدت 24 ساعت در فشار 65 بار در دمای  $60^{\circ}\text{C}$  و  $30^{\circ}\text{C}$  انجام گرفت (23). همچنین، برای خشک کردن اندام بارده و قارچ کامل هریک برای حذف ضایعات شست‌وشو، با اتانول 70% در سطح استریل، به ابعاد  $1 \times 1$  سانتی‌متر مربع تقسیم و با این شرایط خشک شدند. در نهایت نسبت وزن خیس به خشک محاسبه شد.

برای یافتن مناسب‌ترین شرایط لیوفیلزاسیون، پارامترهای دستگاهی شامل فشار، دما و مدت زمان مربوط به هر مرحله، در بازه‌های مختلف بررسی و تکرار شد. با بررسی‌های گوناگون، مناسب‌ترین پارامترهای دستگاهی لازم تعیین شد که در جدول 1 آمده است.

pH  $7/5 \sim$  استفاده شد. به این صورت که محیط کشت مایع PDB بعد از آماده کردن و استریل‌زاسیون، خنک شد. سپس، در شرایط استریل، زیر هود لامینار، محیط‌های کشت مایع در ارلن‌های استریل هم‌حجم تقسیم شدند و در هریک از ارلن‌ها pH تنظیم، سپس تلقیح و انکوباسیون انجام شد (دمای محیط‌های کشت تا دمای  $25^{\circ}\text{C}$  خنک و بعد pH تنظیم شد تا کمترین خطا وجود داشته باشد). برای تنظیم pH از کلریدریک اسید (1 مولار) استفاده و pH نیز با کمک دستگاه pH متر (Mettler Toledo، سوئیس) تعیین شد. در محیط کشت جامد PDA نیز تنظیم pH انجام شد؛ به این صورت که قبل از افزودن آگار برای ممانعت از تشکیل توده تنظیم pH انجام و سپس آگار به آن اضافه شد. در شرایط آسپتیک توسط دیسک‌های حاوی میسلیوم فعال قارچ L.edodes تلقیح و انکوباسیون انجام گرفت (18).

### اسلاید کالچر یا کشت قارچ‌ها روی لام

این آزمون برای بررسی ساختمان و شناسایی قارچ روی لام و لامل و از طریق رنگ‌آمیزی انجام گرفت. در این تکنیک ابتدا به وسیله اسکالپل از محیط کشت استریل PDA به ابعاد  $1 \times 1$  سانتی‌متر مربع در شرایط کاملاً استریل برش زده و محیط کشت در مرکز لام استریل موجود روی لوله U شکل داخل پلیت قرار داده شد. سپس به کمک یک آنس استریل مقداری از قارچ، در مرکز هریک از اضلاع محیط کشت تلقیح شد و لامل با کمک یک پنس استریل روی محیط کشت تلقیح شده قرار گرفت. برای پیشگیری از خشک شدن قطعات محیط کشت در زمان انکوباسیون مقدار 10 میلی‌لیتر آب مقطر استریل با کمک پی پیت به داخل لوله U شکل و پلیت انتقال یافت. به منظور بررسی‌های میکروسکوپی بعد از مدت زمان لازم که رشد میسلیوم‌ها روی لام و لامل انجام گرفت، هریک از

جدول 1. بهینه پارامترهای دما، فشار و زمان هر مرحله در فرایند لیوفیلیزاسیون

بخش کردن و خارج کردن	مراحل	زمان(دقیقه)	فشار(میلی بار)	دما(درجه سانتی گراد)
	1	30	0/85	- 60
	2	30	0/75	- 40
	3	30	0/65	- 20
	4	30	0/65	0
گرم کردن	مراحل	زمان(ساعت)	فشار(میلی بار)	دما(درجه سانتی گراد)
	1	6	0/65	10
	2	5	0/65	15
	3	6	0/65	20
	4	4	0/65	25
	5	3	0/65	30
خشک کردن	مراحل	زمان(دقیقه)	فشار(میلی بار)	دما(درجه سانتی گراد)
	1	3	0	30

کلروفرم 1- بوتانول با نسبت، 5 به 1) به منظور حذف پروتئین‌ها تیمار و بعد از هم‌زدن شدید، با سانتریفیوژ (2500 دور در دقیقه) به مدت 5 دقیقه سانتریفیوژ شد تا سه لایه تشکیل شود. لایه میانی سفیدرنگ حاوی پروتئین و لایه زیرین حاوی پلی‌ساکارید استخراج شده لتینان بود. با برداشت دو لایه خارجی، مایع باقی‌مانده پروتئین‌زدایی، با سه حجم از اتانول خالص دیالیز و به‌شدت هم‌زده و به مدت 12 ساعت در دمای  $4^{\circ}\text{C}$  نگهداری شد. لتینان خام نیز به‌وسیله سانتریفیوژ با تعداد دور 2500 دور در دقیقه در مدت زمان 15 دقیقه به دست آمد و برای خلوص بیشتر لیوفیلیزه و به‌منظور انجام مراحل بعدی داخل آب مقطر مجدداً حل شد<sup>(19)</sup>.

#### خالص‌سازی پلی‌ساکارید استخراج شده

برای افزایش خلوص پلی‌ساکارید لتینان استخراج شده، از ستون کروماتوگرافی تعویض یونی دی اتیل آمینو اتیل سفادکس A-25 (Sigma-Aldrich، آلمان) با ابعاد  $1/5 \times$

#### استخراج پلی‌ساکارید لتینان از قارچ *L.edodes*

بعد از کشت سویه قارچی *L.edodes* در محیط کشت مایع و به‌دست آوردن تراکم بالایی از میسلیم، لیوفیلیزاسیون میسلیم‌ها، اندام بارده و قارچ کامل انجام شد. پلی‌ساکارید لتینان، با استفاده از روش استخراج آب گرم و رسوب‌گیری به‌وسیله اتانول خالص از میسلیم‌ها، اندام بارده و قارچ کامل لیوفیلزه شده استخراج شد. برای استخراج پلی‌ساکارید لتینان مقدار 10 گرم از هر نمونه توزین و به‌صورت مجزا با 1 لیتر آب مقطر دیونیزه به مدت 170 دقیقه با دمای  $60^{\circ}\text{C}$  در بن ماری (ممرت، آلمان) استخراج شد (این مرحله با سه تکرار انجام گرفت). در ادامه نیز به‌وسیله سانتریفیوژ (Hettich، آلمان) 2500 دور در دقیقه در مدت زمان 10 دقیقه) سوپرناتانت جداسازی و با دستگاه تبخیرکننده دوار (Strike202، ایتالیا) به 30% حجم اولیه در دمای  $60^{\circ}\text{C}$  غلیظ شد. مایع غلیظ‌شده با یک حجم از معرف Sevag

ریدر (BioTek، آمریکا) استفاده شد. مقدار 50 میکرولیتر از هر نمونه در چاهک‌ها ریخته، بلافاصله 150 میکرولیتر اسید سولفوریک غلیظ به هریک از چاهک‌ها اضافه و به مدت 30 دقیقه شیک شد. سپس، به مخلوط موجود در هریک از چاهک‌ها 30 میکرولیتر از فنول 5% در آب اضافه و 5 دقیقه در حمام آب گرم با دمای 90°C حرارت‌دهی شد. بعد از اندکی خنک‌شدن مجدداً در حمام آب با دمای محیط به مدت 5 دقیقه قرار گرفت. در نهایت OD محتویات میکروپلیت درون الایزا ریدر در طول موج 490 نانومتر خوانده و نسبت به استاندارد گلوکز تعیین غلظت شد (27).

#### نتایج

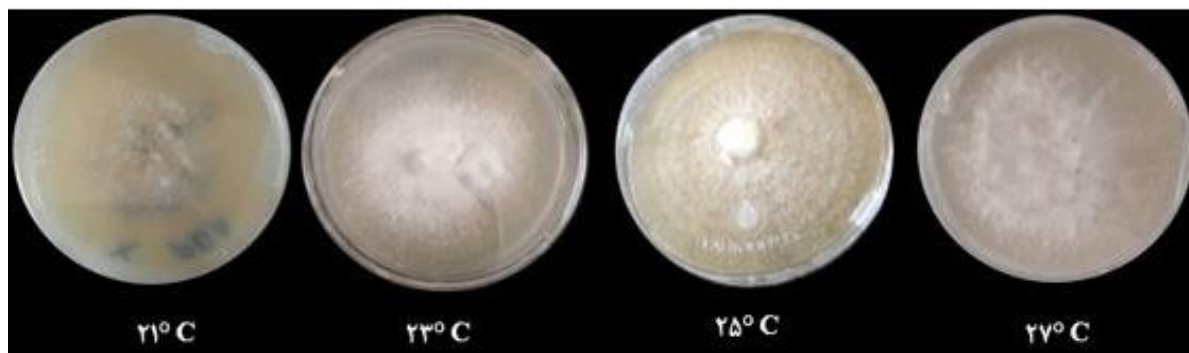
##### محیط‌های بهینه کشت جامد

از بین سه محیط کشت PDA، MEA و SDA استفاده‌شده در این مطالعه، بیشترین قطر کلنی در محیط PDA مشاهده شد. نتیجه آنکه مشخص شد این محیط کشت از نظر مواد مغذی و میزان رشد، مناسب‌ترین محیط کشت جامد در دمای 25°C و دوره رشد کامل 14 روزه است. طبق نتایج آنالیز واریانس نوع محیط کشت تأثیر معناداری در سطح  $P < 0/01$  بر میزان رشد میسلیم را نشان داد. نتایج حاصل در نمودار 1 گزارش شده است.

10 سانتی‌متر استفاده شد (24). برای پک‌کردن این ستون، ابتدا 5 گرم از پودر خشک دی اتیل آمینو اتیل سفادکس A-25 توزین و به مدت یک شبانه‌روز در بافر اتصال‌دهنده خیسانده شد. پس از گذشت این مدت زمان و افزایش حجم، ژل بیدها به آرامی و بادقت به نحوی که حباب ایجاد نشود، به داخل ستون ثابت‌شده روی پایه نگه‌دارنده هدایت شدند (شایان ذکر است که این فرایند در چندین مرحله انجام گرفت و برای خروج هوای اضافی به دیواره ستون ضرباتی وارد شد). پس از حصول اطمینان از پکینگ صحیح، ستون با 3 الی 4 برابر حجم خود با لودینگ بافر (لودینگ بافر همان بافر فسفات سالین با pH ~ 4/5 است) شست‌وشو شد. سپس، لنتینان استخراج‌شده از نمونه‌های مختلف، برای خالص‌سازی در ستون اعمال شدند. در انتها ستون با محلول NaCl با شیب خطی 0 تا 0/2 مولار و جریانی با سرعت 0/44 میلی‌لیتر در دقیقه شسته شد. فراکشن‌های خروجی در میکروتیوپ‌های 2 میلی‌لیتری جمع‌آوری و غلظت هریک تعیین شد (25، 26).

##### اندازه‌گیری غلظت کل پلی‌ساکارید استخراج‌شده

برای تعیین غلظت پلی‌ساکارید استخراجی از میان روش‌های دیگر رنگ‌سنجی، از روش فنول-سولفوریک اسید استفاده شد. برای اجرای این تکنیک نیز از میکروپلیت 96 خانه ته‌گرد و دستگاه الایزا

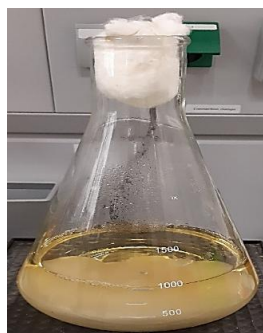


نمودار 1. اندازه قطر کلنی قارچ *L.edodes* در محیط‌های کشت جامد مختلف در دمای  $25^{\circ}\text{C}$  و 14 روز (معنادار در سطح  $P < 0/01$ )

مشاهده و ثبت و به‌عنوان دمای بهینه رشد در نظر گرفته شد (شکل 2). براساس نتایج آنالیز واریانس تأثیر دما بر میزان رشد میسلیوم در سطح معنادار  $P < 0/01$  تعیین شد. در نمودار 2 میزان رشد میسلیوم قارچ *L.edodes* در محیط کشت PDA در دماهای مختلف و بهینه دمای  $25^{\circ}\text{C}$  نشان داده شده است.

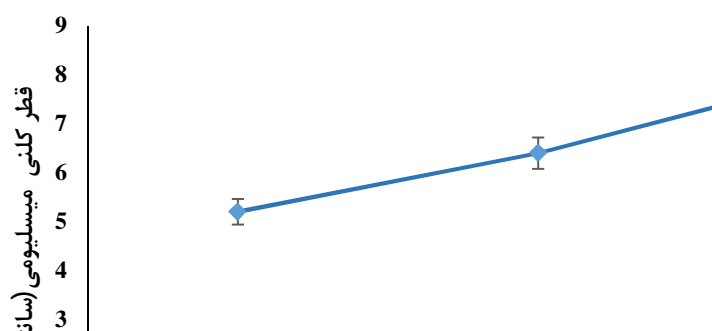
#### دمای بهینه

بعد از تعیین محیط PDA به‌عنوان مناسب‌ترین محیط کشت جامد دماهای مختلف برای یافتن دمای بهینه بر این محیط بررسی شد. قطر کلنی قارچ *L.edodes* در دماهای 21، 23، 25، 27 و  $25^{\circ}\text{C}$  بعد از 14 روز تعیین شد. طبق نتایج به‌دست‌آمده بیشترین میزان رشد میسلیوم در دمای  $25^{\circ}\text{C}$



شکل 2. میزان رشد میسلیوم قارچ *L.edodes* بر محیط کشت PDA در دماهای مختلف بعد از 14 روز، بهینه دمای رشد با بیشترین میزان رشد میسلیوم در دمای  $25^{\circ}\text{C}$



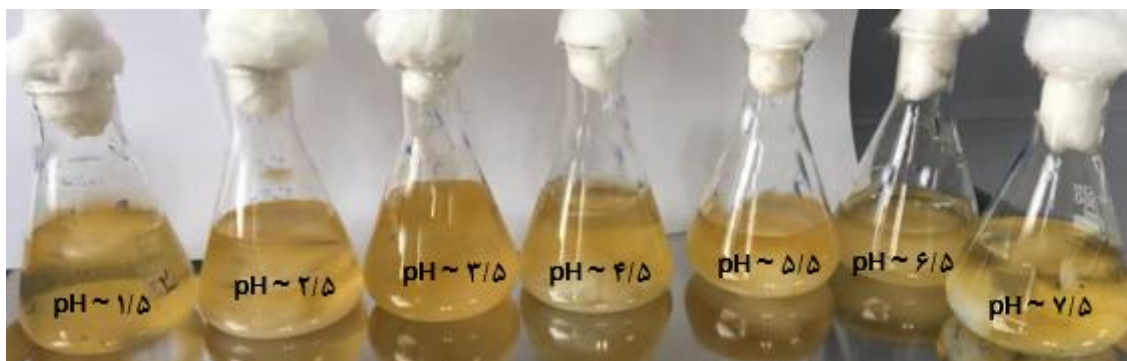


نمودار 2. اندازه قطر کلنی *L.edodes* بر محیط کشت PDA در دماهای مختلف بعد از 14 روز (معنادار در سطح  $P < 0/01$ )

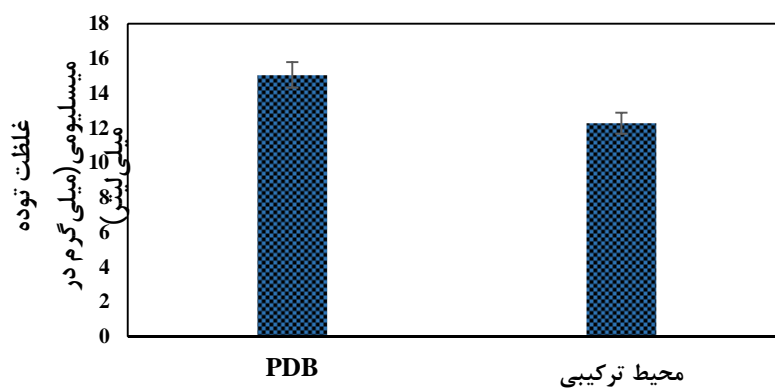
### بهینه‌سازی محیط‌های کشت مایع

براساس نتایج آنالیز واریانس اثر نوع محیط کشت بر غلظت توده میسلیمیوم در سطح  $P < 0/05$ ، معنی‌دار است. از بین دو محیط کشت مایع PDB و محیط ترکیبی، محیط کشت PDB برای کشت میسلیموم و حصول بیومس بیشتر از قارچ *L.edodes* بعد از مدت زمان 14 روز در دمای  $25^{\circ}\text{C}$  به‌عنوان محیط بهینه کشت مایع تعیین شد؛

چراکه در مدت زمان یکسان از محیط کشت PDB مقدار بیشتری میسلیموم به‌دست آمد. درحالی‌که از محیط کشت ترکیبی در همین مدت و شرایط، مقدار کمتری میسلیموم حاصل شد. نمونه‌ای از میسلیموم‌های رشد کرده در محیط کشت PDB در شکل 3 نشان داده شده است. همچنین، در نمودار 3 میزان رشد میسلیموم قارچ *L.edodes* در دو محیط کشت به‌صورت مجزا به نمایش گذاشته شده است.



شکل 3. میسلیموم قارچ *L.edodes* در محیط کشت PDB



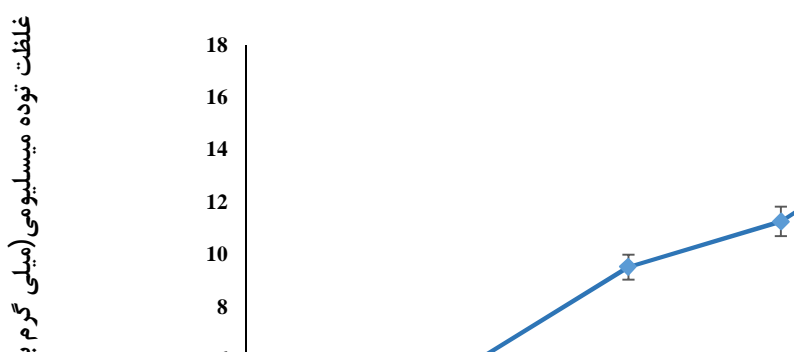
نمودار 3. غلظت توده میسلیمیوم *L.edodes* در دو محیط کشت PDB و ترکیبی (معنادار بودن در سطح  $P < 0/05$ )

### pH مناسب

براساس محاسبات و نتایج آنالیز واریانس اثر pH بر غلظت توده میسلیمیوم در سطح  $P < 0/05$  معنادار و بیشترین میزان رشد میسلیوم قارچ *L.edodes* در pH ~ 5/5 و متعاقب آن pH ~ 4/5 تعیین شد. در شکل 4

غلظت توده میسلیمیوم در مقادیر مختلف pH نشان داده شده است و کمترین میزان رشد در pH ~ 1/5 مشاهده شد؛ چراکه شرایط بسیار اسیدی مناسب رشد این قارچ نیست. نمودار 4 نیز غلظت توده میسلیمیوم را بر حسب میلی گرم بر میلی لیتر در مقادیر مختلف pH نشان می دهد.

شکل 4. میسلیوم رشد کرده قارچ *L.edodes* در مقادیر مختلف pH

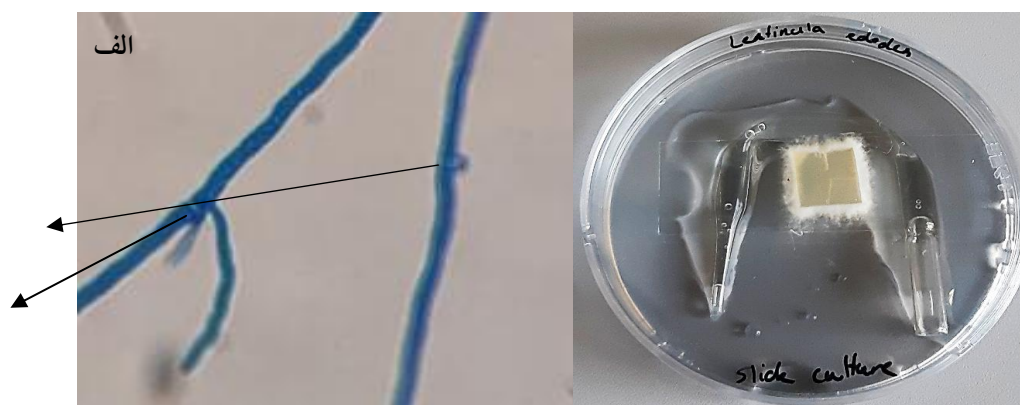


نمودار 4. غلظت توده میسلیمیوم بر حسب میلی گرم بر میلی لیتر در مقادیر مختلف pH (معنادار در سطح  $P < 0/05$ )

### مشاهدات حاصل از اسلاید کالچر

بعد از گذر مدت زمان لازم برای رشد میسلیوم های قارچ و رنگ آمیزی، میسلیوم های سالم و کامل موجود بر لامها با میکروسکوپ بررسی و مشخص شد، هایف های

قارچ *L.edodes* واجد دیواره عرضی هستند. همچنین، اتصالات گیره در هایف های این قارچ دیده می شود. در شکل 5 دیواره عرضی و Clamp Connections به وضوح در هایف قارچ به نمایش گذاشته شده است.

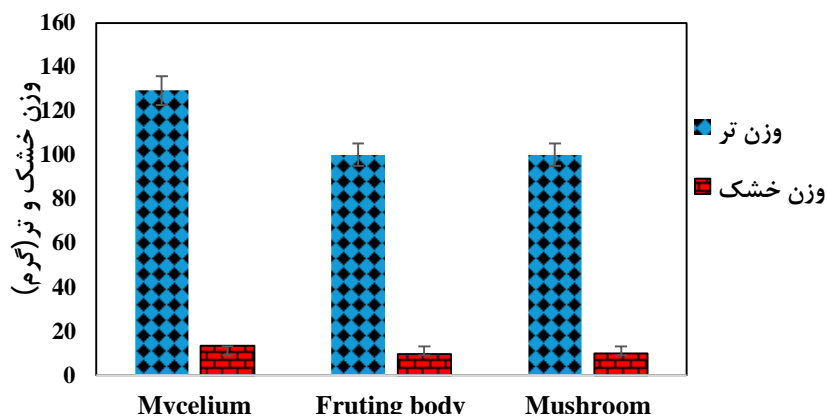


Clamp connection  
septum

شکل 5. پلیت اسلاید کالچر (الف)، دیواره عرضی و Clamp connection در میسلیوم قارچ *L.edodes* (ب)

بین وزن خیس به خشک 10 به 1 تعیین شد. وزن تر و خشک حاصل از لیوفیلزاسیون هریک از اشکال قارچ *L.edodes* در نمودار 5 نشان داده شده است.

تعیین اختلاف وزن خیس و خشک میسلیم، اندام بارده و قارچ کامل  
طبق بررسی‌های انجام‌شده و نتایج به‌دست‌آمده در سه شکل قارچ یعنی میسلیم، اندام بارده و قارچ کامل *L.edodes* نسبت



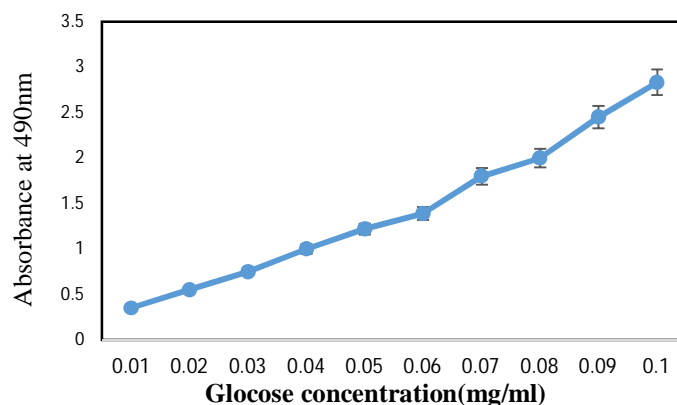
نمودار 5. وزن تر و خشک (لیوفیلزاسیون) هریک از اشکال قارچ *L.edodes*

در هریک از استخراج‌های قارچ *L.edodes* و استاندارد گلوکز در جدول 2 نشان داده شده است. نمودار استاندارد گلوکز نیز در نمودار 6 به نمایش گذاشته شده است.

سنجش غلظت لنتیان موجود در استخراج قارچ *L.edodes* فراکشن‌های جداشده از ستون کروماتوگرافی، مربوط به استخراج‌ها از میسلیم، اندام بارده و قارچ کامل با تست فنول سولفوریک اسید سنجش شد. غلظت لنتیان موجود

جدول 2- غلظت لنتیان با استفاده از تست فنول سولفوریک اسید نسبت به استاندارد گلوکز در هریک از استخراج‌های *L.edodes*

استخراج از	غلظت لنتیان (میلی گرم بر میلی لیتر)
میسلیم	0/243
اندام بارده	0/103
قارچ کامل	0/148
استاندارد گلوکز	0/1



نمودار 6- استاندارد گلوکز

## بحث

در این مطالعه، شرایط محیطی مختلف برای رشد میسلیم قارچ *L.edodes* بهینه شد. غلظت لتینان در استخراج‌های میسلیم، جسم بارده و قارچ کامل به دست آمد و براساس لیوفیلزاسیون نسبت وزن تر به خشک در هر سه حالت نیز معادل 10 به 1 تعیین شد. به علاوه از طریق اسلاید کالچر وجود نواحی گیره و دیواره عرضی در میسلیم این قارچ نیز تأیید شد. همچنین، شرایط محیطی بهینه (شامل pH معادل 5/5، دما 25°C و محیط کشت جامد و مایع به ترتیب PDA و PDB) تعیین و استخراج لتینان با روش آب گرم و رسوب‌گیری با اتانول از میسلیم، جسم بارده و قارچ کامل *L.edodes* انجام شد. سپس، با استفاده از ستون کروماتوگرافی تعویض یونی دی اتیل آمینو اتیل سفادکس A-25 خالص‌سازی انجام گرفت.

قارچ دارویی شیتاکه قارچی کلاهدار با کلاهک قهوه‌ای و پایه سفید رنگ و بومی کشور ژاپن است، اما قرن‌ها در ایران و برخی از مناطق دیگر خاورمیانه به ویژه نواحی شرقی آن کشت شده است. تولید سوبه‌های قارچی و اسپان در ایران از سال 1880 میلادی (1259 شمسی) انجام گرفته است. این قارچ تقریباً در هر نوعی از تنه درختان چوب سخت بومی ایران رشد می‌کند؛ البته رشد روی برخی از گونه‌های درختان بیشتر است. به ویژه در شمال ایران (گیلان و مازندران) زمین‌های جنگلی به وفور وجود دارند که انواع مختلفی از قارچ‌های خوراکی/دارویی روی چوب درختان یا در بستر این جنگل‌ها رشد می‌کنند (28). بنابراین، وجود این ذخایر عظیم از چوب‌های سخت، بستری مناسب را برای کشت و پرورش ارزان قارچ *L.edodes* در ابعاد وسیع فراهم می‌کند. از این رو، یافتن بهترین شرایط کشت میسلیم که مهم‌ترین مرحله در تولید انبوه این قارچ است، بسیار کاربردی است.

قارچ ماکروسکوپی خوراکی *L.edodes* ترکیبات دارویی مختلف با خواص درمانی دارد. داروها و محصولات دارویی دیگر به دست آمده از *L.edodes* در درمان انواع مختلف سرطان استفاده می‌شود که به دلیل خواص افزایش‌دهنده سیستم ایمنی، ضد آنترواسکلروزیز، ضد التهابی و اثرات آنتی‌اکسیدانی بالای آن است. از انواع مختلفی از پلی‌ساکاریدهای موجود در جسم بارده این قارچ برای از بین بردن عوارض جانبی شیمی درمانی و رادیوتراپی استفاده می‌شود. این قارچ علاوه بر خواص ضد سرطانی، خواص ضد ویروسی و ضد باکتریایی نیز دارد. در جسم بارده این قارچ مواد دیگری با خواص مهم آنتی‌بیوتیکی چون *Lentin*، *Lenthiaonine*، *Lentinysin* و *Lentinamycin A, B* نیز شناسایی شده است. از ترکیبات مؤثر دارویی آن نیز می‌توان به KS-2 و *Lentinacin* نیز اشاره کرد (29,30).

از اثرات دارویی و زیست فعالی دیگر این قارچ می‌توان به محافظت از کبد، تعدیل سیستم ایمنی، خاصیت ضد انگلی و ضد دیابتی، هیپوکلسترولمیک (31) و ضد فشار خون اشاره کرد. همچنین *L.edodes* ترکیبات زیستی مختلف و ویتامین B<sub>12</sub> دارد که در سیستم ایمنی اهمیت دارد. به علاوه مقادیر زیادی از ارگسترول و استرول‌های قارچی را شامل می‌شود. این ترکیبات زیست فعال، استرول موجود در *L.edodes* را به ویتامین D تبدیل می‌کند. ویتامین D نیز موجب می‌شود مقاومت بدن در برابر امراض مختلف نظیر سرماخوردگی افزایش یابد. این قارچ دارای مونوساکایدهایی نظیر آرابینوز، گالاکتوز، گلوکز، مانوز و گزیلوز است. محتوای پروتئینی این قارچ نیز بسیار ارزشمند است؛ چراکه آمینو اسیدهای ضروری را در خود جای داده است. از مواد فیتوکمیکال در این قارچ می‌توان به پلی‌فنول‌ها، فلاونوئیدها، β-کاروتن‌ها و لیکوپن اشاره کرد. همچنین، عصاره اتانولی در این قارچ سبب می‌شود درماتیک آتوپیک مهار شود (32).

مقدار pH بهینه به دست آمده 5/5 است و با مطالعه Chicatto و همکاران مطابقت دارد. می‌توان از شرایط محیطی بهینه به دست آمده در این مطالعه، برای بهینه‌کردن شرایط تولید آنزیم‌های مختلف نظیر گزیلاناز و سلولاز که در تولید بسیاری از سوخت‌های زیستی کاربرد دارند، استفاده کرد. همچنین، قارچ‌های رشته‌ای به دلیل تولید آنزیم‌های خارج سلولی، از پتانسیل تکنولوژیکی بالایی برخوردار هستند، از این رو به آنها بسیار توجه می‌شوند. قارچ *L.edodes* نیز به دلیل محتوای آنزیمی خود می‌تواند در صنایع مختلف و تولید سوخت‌های زیستی جایگاه ویژه‌ای داشته باشد.

امروزه یکی از مشکلات اساسی در جهان، پاندمی کرونا ویروس و سندرم حاد تنفسی (SARS-CoV-2) است. جدیدترین تحقیق Murphy و همکاران نشان می‌دهد  $\beta$ -گلوکان حاصل از *L.edodes* (شامل دو نوع عصاره لتینان) باعث شده است فعال شدن NF- $\kappa$ B ناشی از سیتوکین در سلول‌های A549 اپیتلیال آلوئولار انسانی کاهش یابد. همچنین، یکی از انواع لتینان (IHI) در دوز پایین‌تر مؤثرتر است. در مقابل در ماکروفاژهای فعال و مشتق از THP-1، عصاره لتینان تجاری (CL) تولید سیتوکین‌های پیش‌التهابی (IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ ) و همچنین TGF- $\beta$  و IL-10 را به طور مؤثرتری تضعیف کرد. یافته‌های آنها نشان می‌دهد که تفاوت‌های فیزیکی و شیمیایی بسیاری بین عصاره‌های لتینان وجود داشت که به ایجاد اثرات مختلف تعدیل‌کننده سیستم ایمنی و اثرات محافظت‌کنندگی از سلول‌های ریوی در شرایط آزمایشگاهی منجر شد. هر دو فرآورده لتینان باعث کاهش التهاب در مدل اپیتلیال ریه شدند (36). براساس این مطالعه جدید درباره خاصیت تعدیل‌کنندگی ایمنی لتینان می‌توان گفت، این پلی‌ساکارید دارویی اهمیت زیادی دارد و استفاده از روش استخراج پلی‌ساکارید لتینان با کمترین هزینه، امکانات و

در پژوهش Aminuddin و همکاران درباره عوامل مختلف محیطی نظیر pH و ترکیبات محیط کشت دخیل در میزان بازده بیومس تولیدی و رشد قارچ *L.edodes* بهترین pH و محیط کشت  $\sim$ 6 pH و محیط کشت جامد و مایع Potato dextrose شناخته شد. نتایج حاصل از بررسی‌های انجام گرفته در این مطالعه، شباهت زیادی با این مطالعه دارد؛ چراکه میزان pH بهینه 5/5 و انواع محیط کشت جامد و مایع نیز Potato dextrose تعیین شد (33).

براساس مطالعه Bak و همکاران، مقدار  $\beta$ -گلوکان در ساقه و کلاهک اندام بارده قارچ *L.edodes* در 10 سویه کشت شده با مقدار این ترکیب در میسلیم‌های هریک مقایسه شد. نتایج نشان می‌داد که با اندازه‌گیری آنزیمی، مقدار  $\beta$ -گلوکان در اندام بارده قارچ نسبت به میسلیم آن بیشتر است (10). در حالی که در این مطالعه نتایج حاصل از استخراج لتینان با آب گرم و رسوب‌گیری با اتانول خالص نشان می‌دهد، غلظت لتینان در میسلیم قارچ بیشتر از اندام بارده و قارچ کامل است که این اختلاف‌ها می‌تواند به تفاوت در بین سویه‌ها، شرایط کشت قارچ، میزان بلوغ جسم بارده، خشک یا تازه بودن قارچ‌ها و استفاده از قسمت‌های مختلف قارچ (کلاهک یا پایه) مربوط باشد. همچنین، ممکن است علت تفاوت این باشد که برخی از ترکیبات دیواره اندام بارده بازدیومیست‌هایی مانند *L.edodes* بعد از برداشت‌های مصنوعی و اسپوردهی دچار اتولیز (خودتخریبی) می‌شوند (34).

Chicatto و همکاران، در بررسی‌های خود نشان دادند pH متغییری تعیین‌کننده برای عملکرد فعالیت آنزیمی در قارچ *L.edodes* است. همچنین، فعالیت انواع آنزیم‌های سلولاز (اندوگلوکاناز، آگزوگلوکاناز، و  $\beta$ -گلوکوزیداز) و گزیلاناز را به دست آوردند و در فعالیت آنزیمی متغیر شیک‌کردن و pH را بسیار مهم دانسته‌اند. بالاترین بیان آنزیم را در مقادیر pH بین 5/5 تا 6 و سرعت همزدن 100 دور در دقیقه گزارش کردند (35) که در مطالعه فعلی

منابع

1. Suryanarayanan, T. S. (2018). *Fungal Biotechnology in India*. *Current Biotechnology*, 7(3), 149-150.
2. Royse, D. J., Baars, J., & Tan, Q. (2017). *Current overview of mushroom production in the world*. *Edible and medicinal mushrooms: technology and applications*, 5-13.
3. Sánchez, C. (2010). *Cultivation of Pleurotus ostreatus and other edible mushrooms*. *Applied microbiology and biotechnology*, 85(5), 1321-1337.
4. Chen, L., Gong, Y., Cai, Y., Liu, W., Zhou, Y., Xiao, Y., ... & Bian, Y. (2016). *Genome sequence of the edible cultivated mushroom Lentinula edodes (Shiitake) reveals insights into lignocellulose degradation*. *PLoS one*, 11(8), e0160336.
5. Bisen, P. S., Baghel, R. K., Sanodiya, B. S., Thakur, G. S., & Prasad, G. B. K. S. (2010). *Lentinus edodes: a macrofungus with pharmacological activities*. *Current medicinal chemistry*, 17(22), 2419-2430.
6. Pinya, S., Ferriol, P., Tejada, S., & Sureda, A. (2019). *Mushrooms reishi (Ganoderma lucidum), shiitake (Lentinula edodes), maitake (Grifola frondosa)*. In *Nonvitamin and Nonmineral Nutritional Supplements* (pp. 517-526). Academic Press.
7. Kalia, S., & Averous, L. (2011). *Biopolymers: biomedical and environmental applications*. John Wiley & Sons. PP 99-100
8. Tomassen, M. M., Hendrix, E. A. H. J., Sonnenberg, A. S. M., Wichers, H. J., & Mes, J. J. (2011). *Variation of bioactive lentinan-containing preparations in Lentinula edodes strains and stored products*. In *Proceedings of the 7th International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products* (Vol. 1, pp. 259-67).
9. Zhang, L., Li, X., Xu, X., & Zeng, F. (2005). *Correlation between antitumor activity, molecular weight, and conformation of lentinan*. *Carbohydrate Research*, 340(8), 1515-1521.
10. Bak, W. C., Park, J. H., Park, Y. A., & Ka, K. H. (2014). *Determination of glucan contents in the fruiting bodies and mycelia of Lentinula edodes cultivars*. *Mycobiology*, 42(3), 301-304.
11. Giavasis, I. (2014). *Bioactive fungal polysaccharides as potential functional ingredients*

فرایندهایی با کمترین آسیب به ساختار و عملکرد آن (مانند این مطالعه) بسیار مهم است؛ چراکه این قارچ در سلامت جایگاه مهمی دارد.

نتیجه گیری

شرایط بهینه رشد قارچ *L.edodes* به ترتیب محیط کشت‌های مایع و جامد PDA و PDB، دمای 25°C و pH برابر با 5/5 تعیین شد. غلظت لنتینان در استخراج‌های میسلیم، جسم بارده و قارچ کامل به ترتیب 0/243، 0/103 و 0/148 میلی گرم بر میلی لیتر به دست آمد. در مرحله لیوفیلزاسیون نیز نسبت وزن تر به خشک در سه شکل قارچ معادل 10 به 1 تعیین شد. نتایج این مطالعه می‌تواند در تولید انواع ترکیبات زیست فعال از میسلیم این قارچ نظیر لنتینان و انواع آنزیم‌ها و ترکیبات ضد میکروبی بسیار ارزشمند باشد. به همین دلیل، در کنار روش‌های درمانی کنونی، استفاده از ترکیبات طبیعی بدون عوارض نظیر پلی ساکارید لنتینان موجود در قارچ *L.edodes* به عنوان عاملی در ارتقای سیستم ایمنی بسیار مفید است. همچنین، جداسازی، استخراج و خالص سازی ترکیبات مؤثر این قارچ به راحتی امکان پذیر است.

سپاسگزاری

نویسندگان این مقاله مراتب قدرانی خود را از دریافت کمک تکنیکی از دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال اعلام می‌کند. هیچ گونه تعارض منافی وجود ندارد.

میزان همکاری

محدثه لاری پور ایده و پروتکل اصلی، آنالیز داده‌ها و مطالعه مفهوم و طراحی نوشتن و بازنگری انتقادی نسخه چاپ نشده را ارائه داد و حانبه عطااللهی و مینو صدری در انجام پروژه و ارائه داده‌ها و نگارش متن کمک کردند.

*Properties*. Iranian Journal of Medical Microbiology, 14(3), 186-200.

21. Moon, S., Lee, H. Y., Shim, D., Kim, M., Ka, K. H., Ryoo, R., ... & Ryu, H. (2017). *Development and molecular characterization of novel polymorphic genomic DNA SSR markers in Lentinula edodes*. Mycobiology, 45(2), 105-109.

22. Rosana, Y., Matsuzawa, T., Gonoi, T., & Karuniawati, A. (2014). *Modified slide culture method for faster and easier identification of dermatophytes*. Microbiology Indonesia, 8(3), 7-7.

23. Politowicz, J., Lech, K., Lipan, L., Figiel, A., & Carbonell - Barrachina, Á. A. (2018). *Volatile composition and sensory profile of shiitake mushrooms as affected by drying method*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 98(4), 1511-1521.

24. Li, K., Yu, M., Hu, Y., Ren, G., Zang, T., Xu, X., & Qu, J. (2016). *Three kinds of Ganoderma lucidum polysaccharides attenuate DDC-induced chronic pancreatitis in mice*. Chemico-Biological Interactions, 247, 30-38.

25. Yao, L., Zhao, Q., Xiao, J., Sun, J., Yuan, X., Zhao, B., ... & Niu, S. (2012). *Composition and antioxidant activity of the polysaccharides from cultivated Saussurea involucrata*. International Journal of Biological Macromolecules, 50(3), 849-853.

26. Ren, G., Li, K., Hu, Y., Yu, M., Qu, J., & Xu, X. (2015). *Optimization of selenizing conditions for Seleno-Lentinan and its characteristics*. International journal of biological macromolecules, 81, 249-258.

27. Masuko, T., Minami, A., Iwasaki, N., Majima, T., Nishimura, S. I., & Lee, Y. C. (2005). *Carbohydrate analysis by a phenol-sulfuric acid method in microplate format*. Analytical biochemistry, 339(1), 69-72.

28. Alinia-Ahandani, E., Fazilati, M., Alizadeh, Z., & Boghozian, A. (2018). *The introduction of some mushrooms as an effective source of medicines in Iran Northern*. Biology and Medicine, 10(5), 1-5.

29. Muszyńska, B., Pazdur, P., Lazur, J., & Sułkowska-Ziaja, K. (2017). *Lentinula edodes (Shiitake)-biological activity*. Medicina Internacia Revuo-International Medicine Review, 27(108), 189-195.

30. Song, H. Y., Kim, D. H., & Kim, J. M. (2018). *Comparative transcriptome analysis of dikaryotic mycelia and mature fruiting bodies in the edible*

*in food and nutraceuticals*. Current opinion in biotechnology, 26, 162-173.

12. Fan, L., Li, T., Hu, M., Ma, F., Yu, B., & Tian, J. (2019). *Rapid Quantification of Bioactive Lentinan with an Aniline Blue Fluorescent Method*. Pharmacology & Pharmacy, 10(6), 318-328.

13. Sasaki, T., & Takasuka, N. (1976). *Further study of the structure of lentinan, an anti-tumor polysaccharide from Lentinus edodes*. Carbohydrate Research, 47(1), 99-104.

14. Chihara, G., Hamuro, J., Maeda, Y. Y., Arai, Y., & Fukuoka, F. (1970). *Fractionation and purification of the polysaccharides with marked antitumor activity, especially lentinan, from Lentinus edodes (Berk.) Sing.(an edible mushroom)*. Cancer research, 30(11), 2776-2781.

15. Hazama, S., Watanabe, S., Ohashi, M., Yagi, M., Suzuki, M., Matsuda, K., ... & Oka, M. (2009). *Efficacy of orally administered superfine dispersed lentinan ( $\beta$ -1, 3-glucan) for the treatment of advanced colorectal cancer*. Anticancer Research, 29(7), 2611-2617.

16. Dai, C. C., Chen, Y., Tian, L. S., & Shi, Y. (2010). *Correlation between invasion by endophytic fungus Phomopsis sp. and enzyme production*. African Journal of Agricultural Research, 5(11), 1324-1340.

17. Cobos, J. D. V., Páramo, D., Aguilar, M. E. G., Hernández, A. S., Lara, H. L., & del Toro, G. V. (2017). *Production of hybrid strains among Pleutorus and Lentinula and evaluation of their mycelial growth kinetics on malt extract agar and wheat grain using the Gompertz and Hill models*. Emirates Journal of Food and Agriculture, 927-935.

18. Kumar, V., Mishra, S. K., & Kaur, M. (2019). *Effect of different media, temperature and pH on radial mycelial growth of Lentinula edodes strain Le-17-04*. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry, 8(1), 345-348.

19. Ren, G., Xu, L., Lu, T., & Yin, J. (2018). *Structural characterization and antiviral activity of lentinan from Lentinus edodes mycelia against infectious hematopoietic necrosis virus*. International journal of biological macromolecules, 115, 1202-1210.

20. Yasrebi, N., Zarmi, A. S. H., & Larypoor, M. (2020). *Optimization of Chitosan Production from Iranian Medicinal Fungus Trametes-Versicolor by Taguchi Method and Evaluation of Antibacterial*

*in the Lentinula edodes fruiting body during postharvest preservation is reduced by downregulation of the exo- $\beta$ -1, 3-glucanase EXG2.* Journal of agricultural and food chemistry, 62(32), 8153-8157.

35. Chicatto, J. A., Castamann, V. A., Helm, C. V., & Tavares, L. B. B. (2014). *Optimization of the production process of enzymatic activity of Lentinula edodes (Berk.) Pegler in holocelulases.* Embrapa Florestas-Artigo em periódico indexado (ALICE).

36. Murphy, E. J., Masterson, C., Rezoagli, E., O'Toole, D., Major, I., Stack, G. D., ... & Rowan, N. J. (2020).  *$\beta$ -Glucan extracts from the same edible shiitake mushroom Lentinus edodes produce differential in-vitro immunomodulatory and pulmonary cytoprotective effects—Implications for coronavirus disease (COVID-19) immunotherapies.* Science of the Total Environment, 139330.

*mushroom Lentinula edodes.* Scientific reports, 8(1), 1-15.

31. Xue, Z., Ma, Q., Chen, Y., Lu, Y., Wang, Y., Jia, Y., ... & Chen, H. (2020). *Structure characterization of soluble dietary fiber fractions from mushroom Lentinula edodes (Berk.) Pegler and the effects on fermentation and human gut microbiota in vitro.* Food Research International, 129, 108870.

32. Choi, E. J., Park, Z. Y., & Kim, E. K. (2016). *Chemical composition and inhibitory effect of Lentinula edodes ethanolic extract on experimentally induced atopic dermatitis in vitro and in vivo.* Molecules, 21(8), 993.

33. Aminuddin, H., Khan, A.M. and Madzlan, K., 2013. *Effects of pH on mycelial growth and amino acid composition of Lentinula edodes in submerged cultures.* Journal of tropical agriculture and food science, 41(1), pp.63-70.

34. Konno, N., Nakade, K., Nishitani, Y., Mizuno, M., & Sakamoto, Y. (2014). *Lentinan degradation*



# A comparison between extraction, optimization and purification of Lentinan in Fruiting body and Mycelium of *Lentinula edodes*

Hanieh ataollahi<sup>1</sup>, Mohaddeseh Larypoor<sup>2\*</sup>, Minoo Sadri<sup>3</sup>

1. M.Sc of Microbial Biotechnology, Department of Biological Sciences, Faculty of Biological Science, Islamic Azad University, Tehran North Branch, Tehran, Iran.
2. Assistant Professor of Mycology, Department of Biotechnology, Faculty of Biological Science, Islamic Azad University, Tehran North Branch, Tehran, Iran.
3. Associate Professor of Organic Chemistry, Department of Biological Sciences, Faculty of Chemistry and chemical Engineering, Malek Ashtar University, Tehran, Iran.

\*Corresponding author: [m.larypoor@iau-tnb.ac.ir](mailto:m.larypoor@iau-tnb.ac.ir)  
Orcid Number:0000-0002-2003-8343

## Abstract

Due to its high content of protein, polysaccharide and unique aroma, *Lentinula edodes* (Shitake) is one of the most popular species of edible/medicinal fungus, ranked second in the world in terms of cultivation and consumption. Today, its effective compounds are used as adjunctive therapy along with chemical treatments. In this study, the culture medium, acidity and optimum growth temperature of *Lentinula edodes* (TMU340) mycelium were determined. Mycelium, fruiting body and whole fungi were lyophilized and the wet to dry weight ratio was obtained; Lentinan was extracted using hot water at 60°C, degassing by Sevege method and precipitation with pure ethanol at 4°C and purified by Ion exchange chromatography. Lentinan concentration was obtained by phenol-sulfuric acid test. In result, optimum conditions including PDA and PDB media, 25°C and pH, 5.5 were determined. The wet-to-dry weight ratio was 10 to 1 in all samples. Lentinan concentrations after extraction and purification were 0.243, 0.103 and 0.148 mg/ml, respectively. As a result, this fungus can be useful in the production of a variety of metabolites and natural compounds without side effects such as Lentinan polysaccharide as a factor in boosting the immune system.

**Keywords:** *Shiitake*; Phenol-sulfuric acid; Polysaccharide; Mushroom; Ion Exchange Chromatography