JRIFST
مقالۀ کامل پژوهشی
https://journals.rifst.ac.ir
ISSN: 2252-0937(print), 2538-2357(online)
پژوهش و نوآوری در علوم و صنایع غذایی
سال ۱۴۰۲، جلد ۱۲، شماره ۲، صفحات ۲۴۴-۲۳۱
https://doi.org/10.22101/JRIFST.2023.371107.1410

بررسی تولید بتا-گلوکان از میسلیوم قارچ صدفی به روش کشت غوطه‌وری و ارزیابی تکنیک‌های استخراج آن

ابوالفضل پهلوانلو[۱*]، محبوبه سرابی‌جماب[۱*]، منا کاوه[۲]،سیدمهدی زیارت‌نیا[۱]

۱- گروه زیست‌فناوری مواد غذایی، مؤسسه پژوهشی علوم و صنایع غذایی، مشهد، ایران
* نویسندۀ مسئول (a.pahlevanloo@rifst.ac.ir)
* نویسندۀ مسئول (m.sarabi@rifst.ac.ir)
۲- گروه فرآوری مواد غذایی، مؤسسه پژوهشی علوم و صنایع غذایی، مشهد، ایران

چکیده

بتا-گلوکان‌ها از ترکیبات بسیار ارزشمند پلی‌ساکاریدی در ساختار دیوارۀ سلولی برخی گیاهان عالی، قارچ‌ها و باکتری‌ها هستند که از میان آنها قارچ‌ها با داشتن انواع ویژه‌ای از بتا-گلوکان‌های زیست‌فعال حائز اهمیت می‌باشند. در تحقیق حاضر، قارچ صدفی به‌عنوان منبع تولید بتا-گلوکان درنظرگرفته شد که ضمن ارزیابی تأثیر روش هم‌زدن طی رشد قارچ، اثر نوع ترکیبات محیط‌کشت شامل ۴ قند زایلوز، گلوکز، مالتوز و لاکتوز (در سه سطح) و ۴ منبع متفاوت نیتروژن شامل؛ عصارۀ مالت، عصارۀ مخمر، پپتون و عصارۀ سبوس برنج (در یک سطح) بر میزان تولید میسلیوم قارچی بررسی شد. راندمان فرایند با اندازه‌گیری میزان میسلیوم خشک تولیدی در واحد حجم محاسبه شد. نتایج نشان داد هم‌زدن مداوم با سرعت ۲۲۰ دور در دقیقه سبب افزایش تولید میسلیوم گردید و بیشترین مقادیر بیومس تولیدی در حضور مالتوز به‌عنوان منبع کربوهیدرات و به‌ترتیب عصارۀ مالت و عصارۀ سبوس برنج به‌عنوان منابع نیتروژنی حاصل شد جهت مقایسۀ نتایج از طرح پایۀ کاملاً تصادفی در قالب فاکتوریل استفاده شد. علاوه‌برآن استخراج بتا-گلوکان از میسلیوم قارچی به دو روش اسیدی و اسید-قلیا موردارزیابی قرار گرفت، به‌منظور بررسی نتایج به‌دست‌آمده از روش آنالیز واریانس یک‌طرفه استفاده گردید، به‌طوری‌که استخراج به روش اسید-قلیا با مقدار خلوص حدود ۹۴ درصد به لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری در مقایسه با روش اسیدی نشان داد (P<۰/۰۵). یافته‌های تحقیق حاضر اهمیت هوادهی، نوع منابع قندی و نیتروژنی مورد استفاده و روش استخراج را در دستیابی به مقادیر اقتصادی از بتا-گلوکان نشان داد. استفاده از حلال‌ها در دو pH اسیدی و بازی می‌تواند بتا-گلوکانی با خلوص بالا در جهت استفاده در فراورده‌های دارویی را حاصل نماید.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۸/۳۰
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۱/۱۲/۱۴
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۲/۲۲
تاریخ انتشار برخط: ۱۴۰۲/۰۱/۱۲

واژه‌های کلیدی
بتا-گلوکان
عصارۀ سبوس برنج
قارچ صدفی
مالتوز

OPEN ACCESS
CC BY

مقدمه

بتا-گلوکان‌ها[1] از ترکیبات پلی‌ساکاریدهای غیرنشاسته‌ای بسیار ارزشمند در ساختار دیوارۀ سلولی برخی گیاهان عالی مانند غلات، جلبک‌ها، باکتری‌ها، مخمرها و به‌ویژه قارچ‌ها هستند (El Khoury *et al.*, 2012; Papaspyridi *et al.*, 2011; Papaspyridi *et al.*, 2010; Tanriverdi *et al.*, 2005; Vetvicka & Vetvickova, 2014). امروزه بتا-گلوکان‌ها به‌خاطر دارابودن خواص دارویی متعدد و منحصربه‌فرد (ضدالتهابی، ضدمیکروبی، ضدسرطانی، ضدویروسی، بهبوددهندۀ عملکرد سیستم ایمنی، کاهندۀ

[1] β-Glucans

کلسترول و غیره) به‌عنوان منبع جدیدی از فیبرهای غذایی به‌طور گسترده موردتوجه محققین قرار گرفته‌اند (Arabamerian *et al.*, 2013; Du *et al.*, 2015; Freimund *et al.*, 2003; Kogan, 2000; Papaspyridi *et al.*, 2011; Stone & Clark, 1992; Synytsya *et al.*, 2008; Villares *et al.*, 2012). در واقع بتا-گلوکان‌ها به گروهی از ترکیبات طبیعی فعال به نام اصلاح‌کنندگان پاسخ‌های زیستی[1] تعلق دارند (de Vries & Visser, 2001; Kaveh *et al.*, 2017; Nitschke *et al.*, 2011; Vetvicka & Vetvickova, 2010). در بسیاری از تحقیق‌های انجام‌شده، فعالیت‌های زیستی بتا-گلوکان‌ها به ویژگی‌های ساختاری (حضور پیوندهای بتا-گلیکوزیدی و ساختار منشعب) و همچنین خواص فیزیکوشیمیایی آنها همچون؛ اندازه، ساختار و وزن مولکولی، میزان انشعابات، حلالیت در آب، درجۀ پلیمریزاسیون، خلوص و ویسکوزیته نسبت داده شده است (Brown & Gordon, 2003; Chen & Seviour, 2007; Havrlentova *et al.*, 2011; Synytsya *et al.*, 2009; Vetvicka & Vetvickova, 2010; Villares *et al.*, 2012; Zeković *et al.*, 2005). بتا-گلوکان‌های استخراج‌شده از منابع مختلف و با اوزان مولکولی متفاوت دارای فعالیت‌های زیستی متفاوتی نیز هستند. به‌عنوان مثال؛ بتا-گلوکان‌های استخراج‌شده از مخمر نان و سایر قارچ‌ها در ساختار خود دارای پیوندهای بتا (۳→۱) و بتا (۶→۱) هستند درحالی‌که بتا-گلوکان‌های غلات دارای پیوندهای بتا (۳→۱) و (۴→۱) می‌باشند (Ahmad *et al.*, 2012; Brown & Gordon, 2003; Chen & Seviour, 2007; Clayton, 2013; Du *et al.*, 2015; El Khoury *et al.*, 2012; Hertzog, 2013; Kim *et al.*, 2000; Papaspyridi *et al.*, 2011; Robbins & Seeley, 1977; Vetvicka & Vetvickova, 2014; Villares *et al.*, 2012; Zeković *et al.*, 2005; Zhu *et al.*, 2016). میزان حجم تودۀ سلولی رابطۀ مستقیمی با میزان محتوای بتا-گلوکانی سلولی دارد بنابراین عوامل متعددی نظیر نوع منبع کربن و نیتروژن، ترکیبات معدنی، pH، درجه‌حرارت، سرعت هوادهی و سایر شرایط کشت می‌توانند بر ساختار و ترکیبات دیوارۀ سلولی طی فرایند تولید تودۀ سلولی تأثیرگذار باشند. در این میان، منابع کربن و نیتروژن، اساسی‌ترین نیاز سلول جهت افزایش توده و متابولیت‌های درون‌سلولی است که به‌طور مستقیم بر حجم میسلیوم و متابولیت‌های آن تأثیر می‌گذارند (Fang & Zhong, 2002; Hsu *et al.*, 2002). در سال‌های اخیر؛ بهره‌برداری از عصاره‌های بتا-گلوکان حاصل از اندام باردهی قارچ خوراکی صدفی با نام علمی *پلوروتوس اوستراتوس*[2] از گروه *بازیدیومیست‌ها*[3] و متعلق به خانوادۀ *پلوروتاسه*[4] که به‌علت طعم بی‌نظیر، محتوای پروتئینی، کربوهیدراتی، ویتامینی و مواد معدنی بالا و میزان بسیار کم چربی و حضور پلی‌ساکاریدهای غیرنشاسته‌ای، جایگاه ویژه‌ای در بین قارچ‌های دارویی و خوراکی به خود اختصاص داده است (Atli *et al.*, 2013)، در جهت تولید این ترکیبات زیست‌فعال در صنایع گوناگون با بازده اقتصادی بالا گسترش یافته است (Carbonero *et al.*, 2012). علی‌رغم مزیت‌های فراوان بتا-گلوکان‌ها، تولید و بهره‌مندی از آنها به‌ویژه انواع موجود در اندام باردهی قارچ‌ها در بستر جامد، فرایندی زمان‌بر و نیازمند انجام کار فشرده می‌باشد (Gregori *et al.*, 2007; Papaspyridi *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2001). به‌همین‌منظور در سال‌های اخیر، توسعۀ کشت توده‌های میسلیومی در محیط‌کشت مایع توانسته است جایگزین امیدوارکننده‌ای برای تولید کارآمد تودۀ قارچی حاوی ترکیبات زیست‌فعال نظیر بتا-گلوکان‌ها جهت مصارف خوراکی و دارویی باشد. درهمین‌راستا استفاده از محیط‌کشت مایع به روش غوطه‌وری با برخورداری از مزیت‌های؛ مستقل‌بودن از شرایط فصلی و تغییرات دمایی، جداسازی و تخلیص سریع، جایگاه خاصی در دستیابی به مقادیر زیادی از تودۀ میسلیومی در مدت‌زمان کوتاه دارد (Tang *et al.*, 2007; Vamanu, 2012). روش کشت‌غوطه‌وری علاوه‌بر مزایای تولید زیست‌تودۀ میسلیومی و متابولیت‌ها در دورۀ زمانی کوتاه‌تر، از مزیت‌های کاهش فضا و احتمال آلودگی کمتر نیز برخوردار است (Tang *et al.*, 2007).

دراین‌بین، روش‌های مختلفی جهت استخراج بتا-گلوکان از منابع مختلف میکروبی و گیاهی پیشنهاد شده است، که بازده استخراج و کیفیت بتا-گلوکان‌ها را تحت‌تأثیر قرار می‌دهند ((Zhu *et al.*, 2016). در واقع؛ بهینه‌یابی روش استخراج، علاوه‌بر افزایش راندمان و خلوص می‌تواند تأثیر بسزایی در ویژگی‌های بتا-گلوکان ازجمله؛ ویسکوزیته، کفزایی، امولسیفایری و غیره ایفا نماید. لذا؛ انتخاب و به‌کارگیری نوع روش استخراج، در

[1] Biological response modifiers

[2] *Pleurotus ostreatus*
[3] *Basidiomycetes*
[4] *Pleurotaceae*

ساختمان ترکیب بتا-گلوکان حاصله مؤثر بوده که باید مدنظر قرار گیرد (Irakli *et al.*, 2004). علی‌رغم روش‌های استانداردشدهٔ موجود در استخراج بتا-گلوکان‌ها از منابع معمول نظیر؛ مخمرها، باکتری‌ها، غلات و غیره، تاکنون مطالعه‌های کمتری جهت استخراج بتا-گلوکان‌های قارچی با رویکرد دارابودن خواص فراسودمندی و تغذیه‌ای ارائه گردیده است.

تحقیق حاضر تلاشی در جهت ارائهٔ روشی به‌منظور افزایش راندمان تولید زیست‌تودهٔ حاوی بتا-گلوکان از قارچ صدفی *پلوروتوس اوستراتوس* در محیط‌کشت مایع به روش غوطه‌وری و همچنین؛ ارائهٔ روشی مناسب جهت استخراج بتا-گلوکان با خلوص و بازده بالا از تودهٔ زیستی است.

مواد و روش‌ها

تولید کشت مادر

جهت حصول اطمینان از کشت خالص و همچنین جهت بررسی مراحل رشد و توسعهٔ هیفها، سویهٔ ATHUM 4438 از مرکز کلکسیون میکروارگانیسم‌های صنعتی، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شد و مشاهده‌های میکروسکوپی در زمان‌های متفاوت تا مرحلهٔ ایجاد کُنیدی‌فور و کنیدی از میسلیوم‌های هوایی نمونه صورت گرفت. سپس؛ از سویهٔ خالص کشت‌هایی در محیط‌کشت حاوی پتیتو دکستروز آگار (PDA[1])، (Merck، Darmstadt، ساخت آلمان) تهیه شد و در دمای ۲۸ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۵ روز گرم‌خانه‌گذاری (Labtech، ساخت کره جنوبی) شد. کشت‌ها پس از رشد کامل، در دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد و فاقد رطوبت نگهداری شدند (Alsohaili & Bani-Hasan, 2018).

آماده‌سازی محیط پیش‌کشت و تهیهٔ کشت آغازگر

از پتیتو دکستروز براث (PDB[2]) به‌عنوان محیط پیش‌کشت در تمامی مراحل استفاده گردید. پس از تلقیح، سویهٔ جداشده از حاشیهٔ کُلنی، به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۸ درجهٔ سانتی‌گراد و ۹۰ دور در دقیقه در انکوباتور شیکردار (Daihan- WISI10، ساخت کره جنوبی) قرار داده شد و سپس برای ۲۴ ساعت دیگر با دور ۱۲۰ دور در دقیقه تا تشکیل پلت[3] گرم‌خانه‌گذاری ادامه یافت (Huang *et al.*, 2007). بخشی از پلت حاصل؛ برای تهیهٔ کشت آغازگر به محیط‌کشت PDB اضافه گردید و به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۵۰۰ دور در دقیقه تا حصول محلولی همگن هم‌زده شد و مستقیماً به محیط‌کشت‌های نهایی اضافه شد.

اندازه‌گیری و بررسی رشد

رشد قارچ *پلوروتوس اوستراتوس* با روش اندازه‌گیری وزن خشک تودهٔ سلولی در مدت ۱۲ روز موردبررسی قرار گرفت. تودهٔ سلولی قارچی رشدیافته به‌صورت فواصل ۲ روزه، از محیط‌کشت به‌وسیلهٔ کاغذ صافی واتمن شمارهٔ ۴ جداسازی شد و در آون (فن‌آوران سهند آذر، ساخت ایران) با دمای ۶۰ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد و پس از سردشدن توزین (Mettler، ساخت انگلستان) گردید. منحنی رشد بر مبنای میزان وزن خشک تودهٔ میسلیومی برحسب گرم در دورهٔ ۱۲ روزه رسم گردید (Noora *et al.*, 2018).

بررسی اثر تنش حرکتی/سکون (یک‌مرحله‌ای/دو مرحله‌ای) بر راندمان تولید

بر مبنای بررسی منحنی رشد قارچی و تشخیص طول مدت فاز لگاریتمی رشد، اثر تنش حرکت و سکون بر راندمان تولید تودهٔ سلولی پس از سپری‌شدن ۸ روز از زمان کشت در قالب ۵ تیمار: ۸ روز سکون؛ ۲ روز حرکت و ۶ روز سکون؛ ۴ روز حرکت و ۴ روز سکون؛ ۶ روز حرکت و ۲ روز سکون؛ و ۸ روز حرکت بدون سکون، با دور همزن ۱۲۰ و ۲۲۰ دور در دقیقه (در شرایط حرکتی) در محیط PDB، با محاسبهٔ میانگین وزن خشک تودهٔ زیستی اندازه‌گیری شد.

بهینه‌یابی نسبت کربن به نیتروژن

جهت انتخاب بهترین منبع کربن برای رشد میسلیومی گونهٔ *پلوروتوس اوستراتوس*؛ از ۴ منبع کربن متفاوت (گلوکز، لاکتوز و مالتوز و زایلوز) در سه سطح (۱، ۳ و ۶ درصد) بهره‌گرفته شد. در این مرحله محیط‌کشت سنتزی، جایگزین PDB گردید که مشتمل بر پپتون (۱ گرم در لیتر)، عصارهٔ مخمر (۲ گرم در لیتر)، سولفات آمونیوم (۵

---

[1] Potato dextrose agar
[2] Potato dextrose broth
[3] Pellet

گرم در لیتر)، فسفات پتاسیم و سولفات منیزیم ۷ آبه (هر کدام ۰/۲ گرم در لیتر) بود (Papaspyridi *et al.*, 2010). جهت ارزیابی اثر منابع نیتروژن بر رشد تودهٔ میسلیومی نیز، ۴ ترکیب پیچیده و آلی متفاوت (عصارهٔ سبوس برنج، پپتون، عصارهٔ مخمر و عصارهٔ مالت) موردآزمون قرار گرفت. تمام منابع نیتروژن به میزان ثابت ۱۰ گرم بر لیتر (۱ درصد) به محیط‌کشت افزوده گردید (Milessi *et al.*, 2013; Papaspyridi *et al.*, 2011; Papaspyridi *et al.*, 2010). تمام مواد شیمیایی به‌کاررفته از شرکت مرک (ساخت آمریکا) تهیه گردید و سبوس برنج از ضایعات کارخانه‌ها خریداری شد. به‌منظور جلوگیری از واکنش میلارد در اتوکلاو، منابع نیتروژن به‌صورت جداگانه استریل گردید و در انتها به محیط‌کشت استریل اضافه شد (Lee *et al.*, 2007).

استخراج و خالص‌سازی بتا-گلوکان از دیوارهٔ سلولی میسلیوم‌ها

استخراج با اسید

تودهٔ میسلیومی در آون خشک و سپس با هاون پودر شد و از الک شمارهٔ ۱۵۰ عبور داده شد و با آب‌مقطر (۱۰ تا ۳۰ برابر حجم نمونه) شست‌وشو داده شد. سپس در دمای ۹۵ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۱۰ ساعت در pH=۵ (توسط اسید استیک) در ۱۲۰ دور بر دقیقه هم‌زده شد. سپس مخلوط حاصل در ۷۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ (Sigma، ساخت آلمان) شد و توسط اتانول مطلق رسوب‌دهی گردید (Bae *et al.*, 2012). رسوب حاصل جهت انجام آزمایش میزان خلوص بتا-گلوکان و همچنین میزان درصد پروتئین کل توسط خشک‌کن انجمادی (Operon، ساخت کره جنوبی) خشک گردید.

استخراج به روش اسید-قلیا

تودهٔ میسلیومی پودرشده بعد از عبور از الک شمارهٔ ۱۵۰ و شست‌وشو با آب‌مقطر، سانتریفیوژ شد و پس از جمع‌آوری، با سود (pH=۱۰) در دمای ۵۰ درجهٔ سانتی‌گراد شست‌وشوداده‌شده و مجدد سانتریفیوژ گردید. باقی‌مانده با آب‌مقطر در pH اسیدی شست‌وشو داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۶۰ درجهٔ سانتی‌گراد (pH=۵) عملیات هیدرولیز صورت پذیرفت. پس از آن جهت تخریب دیوارهٔ سلولی در ۲۳۰ وات و دمای ۷۰ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۶۲ دقیقه تحت عملیات فراصوت (Elma P300H، ساخت آلمان) قرار گرفت و در شرایط قلیایی با کمک هیدروکسید سدیم و دمای ۹۰ درجهٔ سانتی‌گراد، به مدت ۲ ساعت عصاره‌گیری‌شده و درنهایت استخراج اسیدی (pH=۵) توسط اسید استیک به مدت ۵ ساعت در دمای ۸۰ درجهٔ سانتی‌گراد انجام گرفت و رسوب حاصل توسط خشک‌کن انجمادی خشک گردید (Thammakiti *et al.*, 2004).

تعیین میزان و خلوص بتا-گلوکان

میزان و خلوص بتا-گلوکان توسط روش آنزیمی ارائه‌شده توسط کیت مگازیم (شرکت مگانزایم، ساخت ایرلند) طبق دستورالعمل شمارهٔ K/YBGL10-2005 تعیین گردید. در این روش، میزان بتا-گلوکان برحسب تفاوت بین آلفا و بتا-گلوکان با استفاده از رابطهٔ (۱)، (۲) و (۳) و همچنین نرم‌افزار K-BGLU software Mega-Calc™ نسخهٔ ۱۶.۰۹ ارزیابی گردید.

رابطهٔ (۱)

$$\text{(درصد) کل گلوکان} = \frac{162\times100\times0.001\times F\times\Delta E}{180\times W}$$

رابطهٔ (۲)

$$\text{(درصد) کل آلفا-گلوکان} = \frac{162\times100\times0.001\times103\times F\times\Delta E}{180\times W}$$

رابطهٔ (۳)

کل آلفا-گلوکان-کل گلوکان=کل بتا-گلوکان

در رابطه‌های فوق؛ ΔE: جذب واکنش-بلانک، F: فاکتور مبدل جذب به میکروگرم از دی-گلوکز، W: وزن نمونه، ۱۰۳= ضریب تصحیح برای دی-گلوکز و ۱۶۲/۱۸۰= ضریب تبدیل دی-گلوکز آزاد می‌باشد.

لازم به ذکر است، به‌دلیل محتوی پروتئینی بالا در قارچ صدفی و امکان همراه‌شدن این مواد در فیبر بتا-گلوکان استخراج‌شده از روش کلدال جهت اندازه‌گیری میزان ناخالصی پروتئینی در نمونهٔ استخراجی استفاده شد (Bradstreet, 1954).

آنالیز آماری

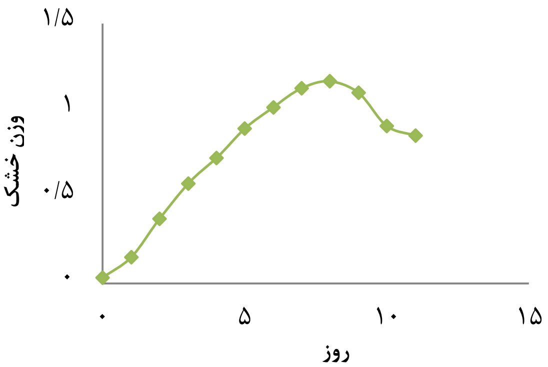
جهت تجزیه‌وتحلیل آماری در فازهای مختلف تحقیق از نرم‌افزار مینی‌تب نسخهٔ ۱۶ استفاده گردید. در مراحل تعیین نمونهٔ منتخب تولید آزمایشگاهی میسلیوم قارچی در شیکرفلاسک، از طرح پایهٔ کاملاً تصادفی در قالب فاکتوریل استفاده شد. به‌طوری‌که در بخش بررسی اثر

روش تولید (تنش حرکتی/سکون) بر راندمان تولید بیومس، متغیرهای یک یا دو مرحله‌ای‌بودن فرایند (در ۵ سطح) و دور همزن (در دو سطح) و در بخش تعیین اثر نسبت منبع کربن به نیتروژن بر راندمان تولید، متغیرهای منبع کربن (۴ نوع) و هر کدام در سه سطح) و منبع نیتروژن (۴ نوع) موردارزیابی قرار گرفت و آزمون‌ها در سه تکرار انجام شد. به‌منظور تحلیل نتایج بررسی روش استخراج بر راندمان تولید، باتوجه‌به انتخاب دو روش استخراج اسیدی و اسید-قلیا و مقایسهٔ آن با میزان بتا-گلوکان در میسلیوم خام (بدون تیمار) از روش آنالیز واریانس یک‌طرفه به‌منظور بررسی نتایج به‌دست‌آمده استفاده گردید. در این مراحل نیز آزمون‌ها در سه تکرار انجام شد. لازم به ذکر است مقایسهٔ میانگین‌ها براساس روش دانکن انجام شد. سنجش میزان ازت کل درخصوص دو روش استخراج نیز با آزمون T-test انجام شد. رسم نمودارها با نرم‌افزار Microsoft Excel نسخهٔ ۲۰۰۷ انجام گرفت.

نتایج و بحث

بررسی منحنی رشد قارچ صدفی

رسم منحنی رشد، اطلاعات کاملی از شرایط رشد قارچ، طول مدت فاز لگاریتمی، زمان ورود به فاز سکون و مرگ را در اختیار قرار می‌دهد. همان‌طورکه در منحنی رشد شکل (۱) مشاهده می‌شود، قارچ *پلوروتوس اوستراتوس* بلافاصله بعد از روز اول وارد فاز لگاریتمی گردیده است. در واقع، بتا-گلوکان یک ترکیب پلی‌ساکاریدی در داخل دیوارهٔ سلولی است و رابطهٔ مستقیمی با بیومس تولیدی دارد که به‌عنوان متابولیتی اولیه در ابتدای فاز لگاریتمی تولید و تا قبل از ورود به فاز ایستایی در شرایط ماکزیمم تولید است. فعالیت بالا، جوان‌بودن میسلیوم تلقیحی و توانایی قارچ صدفی در متابولیزه‌نمودن مشتقات کربنی و نیتروژنی در سرعت خروج از فاز تأخیری بسیار حائز اهمیت می‌باشد. به هر میزان زمان خروج از فاز تأخیر افزایش یابد بازده فرایند افزایش‌یافته و هزینهٔ تولید کاهش می‌یابد. همان‌گونه‌که گزارش گردید فاز لگاریتمی تا روز ۸ ادامه‌یافت و سپس فاز سکون آغاز گردید. فعالیت شدید قارچ *پلوروتوس اوستراتوس* در روز اول تا ۸، محیط را با کاهش منابع غذایی و ریزمغذی‌ها روبرو می‌نماید. همچنین؛ در روز ۸ با ترشح و فعال‌شدن آنزیم‌های هیدرولیزکننده، تخریب سلولی توده‌های میسلیومی شروع می‌شود. هرچند؛ دما و سایر شرایط محیطی نظیر pH نیز می‌تواند بر آغاز فاز سکون تأثیر گذاشته و منجربه‌تخریب تودهٔ میسلیومی شود. در فاز لگاریتمی در روزهای نخست، تشکیل هسته‌های اولیهٔ میسلیومی به‌صورت گویچه و کاهش سرعت تنفس، کاهش سطح مواد مغذی و تغییرات pH و قطورشدن هیفها باعث وزن‌گیری گویچه‌های میسیلیومی می‌گردد. لذا؛ بعد از روز ۹ با تشدید عوامل آنزیمی عملا افزایش توده مقدور نمی‌باشد. درنتیجه، باتوجه‌به روند رشد می‌توان نتیجه گرفت در سیستم‌های ناپیوسته در قارچ صدفی بهترین زمان جهت رسیدن به قلهٔ تولید و جمع‌آوری نهایی میسلیوم‌ها در محیط‌کشت مایع از روز ۶ و قبل از روز ۹ می‌باشد. کوتاه‌شدن زمان و افزایش حداکثری رشد از فاکتورهای بسیار مهم در بازده تولید در محیط‌های کشت مایع بوده، به‌طوری‌که تعداد فازهای تولید در واحد زمان را افزایش داده و بهره‌وری تخمیر را در واحد حجم افزایش می‌دهد (Bernardi *et al.*, 2013; Guadarrama-Mendoza *et al.*, 2014; Tay *et al.*, 2011). در مطالعه‌های پیشین نتایج مشابه و نمودار سیگمویدی رشد منطبق بر نتایج به‌دست‌آمده گزارش شده است (Tay *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2004). در پژوهشی دیگر، زمان موردنیاز جهت ورود رشد به فاز لگاریتمی را ۳ روز گزارش کردند و اشاره داشتند که کاهش زمان پیش‌لگاریتمی می‌تواند از عوامل افزایش بازده و کوتاه‌ترشدن سیکل تولید باشد (Guadarrama-Mendoza *et al.*, 2014). عواملی نظیر نوع گونه، نسبت کربن/نیتروژن، نوسانات دمایی، pH و غیره می‌تواند طول دورهٔ لگاریتمی را در قارچ *پلوروتوس اوستراتوس* متأثر سازد (Bernardi *et al.*, 2013).



شکل ۱- منحنی رشد قارچ صدفی برحسب گرم وزن خشک تولیدی طی زمان

جدول ۱- اثر فاکتور حرکتی و سکون طی دورهٔ رشد قارچ بر میزان تولید بیومس

نوع تیمار	بیومس تولیدی (گرم بر لیتر)	
	سرعت همزدن ۱۲۰ دور در دقیقه	سرعت همزدن ۲۲۰ دور در دقیقه
۸ روز سکون بدون حرکت	۰/۰۱۰±۰/۰۰۵[h]	۰/۰۱۰±۰/۰۰۴[h]
۲ روز حرکت و ۶ روز سکون	۰/۰۲۰±۰/۰۰۳[g]	۰/۰۵۰±۰/۰۰۲[e]
۴ روز حرکت و ۴ روز سکون	۰/۰۳۰±۰/۰۰۶[f]	۰/۱۳۰±۰/۰۰۳[c]
۶ روز حرکت و ۲ روز سکون	۰/۰۵۰±۰/۰۰۲[e]	۰/۲۲۰±۰/۰۰۵[b]
۸ روز حرکت بدون سکون	۰/۰۶۰±۰/۰۰۲[d]	۰/۴۰۰±۰/۰۰۲[a]

* اعداد به‌صورت میانگین±انحراف معیار نمایش داده شده است. حروف غیرمشترک بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد می‌باشد (P<۰/۰۵).

بررسی تولید دومرحله‌ای (حرکتی و سکون)

باتوجه‌به نتایج حاصل از رسم منحنی رشد قارچ، جهت بررسی اثر تنش برشی حرکتی/سکون، تیمارهای ۸ روزه انتخاب و نتایج موردآنالیز قرار گرفت. همان‌طورکه نتایج ارائه‌شده در جدول (۱) نشان می‌دهد، در تیماری که طی ۸ روز عمل همزدن با سرعت ۲۲۰ دور در دقیقه انجام گرفت، بیشترین بازده تودهٔ میسلیومی نسبت به سایر تیمارها به‌دست‌آمد و کمترین میزان بیومس تولیدی مربوط به نمونه‌ای بود که عمل همزدن طی ۸ روز نگهداری صورت نگرفت. همچنین نتایج حاکی از آن است که افزایش دور شیکر، از ۱۲۰ به ۲۲۰ دور در دقیقه، بر افزایش بازده تولید بیومس میسلیومی اثر قابل‌توجهی داشته است که آن را می‌توان به اکسیژن‌رسانی بیشتر به گویچه‌های درحال‌رشد و کوچک‌شدن ابعاد آنها و متعاقب آن افزایش تعداد پلت‌های میسلیومی نسبت داد؛ بنابراین باتوجه‌به موارد فوق می‌توان نتیجه گرفت که حجم زیست‌توده و تولید گویچه‌های با ابعاد کوچک‌تر، با سرعت همزن و اکسیژن محلول رابطهٔ مستقیم داشته و سکون باعث افزایش قطر گویچه در مرحلهٔ نخست شده و با کاهش سطح تنفس سلولی در مرکز گویچه، توقف رشد میسلیومی و تخریب میسلیوم‌های تولیدی اولیه صورت می‌پذیرد. باتوجه‌به بررسی منابع صورت‌گرفته، اثر سرعت همزدن علاوه‌بر اکسیژن‌رسانی باعث همگن‌شدن محتوای تغذیه‌ای در محیط‌کشت و یکنواختی دمای کل محیط می‌گردد ازیکسو و ایجاد شکست‌های میسلیومی که باعث ایجاد هسته‌گذاری و تولید گویچه‌های جدید می‌شود، اشاره دارند نتایج در پیوستگی کامل هستند (Tang *et al.*, 2007). البته افزایش زیاد و بیش‌ازحد سرعت همزن که منجربه‌افزیش نیروی برشی وارده می‌شود، می‌تواند سبب آسیب‌رساندن به هیف‌های قارچی گردد و درنتیجه منجربه‌تغییر در سرعت رشد و خروج از فاز لگاریتمی شود (Kim *et al.*, 2006). نتایج به‌دست‌آمده با گزارش Park و همکاران (۲۰۰۲) دریک‌راستا قرار دارد، بدین‌صورت‌که؛ بالاترین میزان اگزوپلی‌ساکارید تولیدشده از *کوردیسپس میلیتاریس*[1] با سرعت همزدن تقریباً ملایم، در حدود ۱۵۰ دور در دقیقه حاصل شد. براساس نتایج حاصل از این مرحله، هرچند استفاده از همزن با سرعت بالا، به‌طور معنی‌داری در سطح اطمینان ۹۵ درصد، سبب افزایش میزان تولید زیست‌توده گردید؛ همچنان راندمان تولید بسیار پایین بوده که این مطلب، ضرورت مطالعهٔ بیشتر درخصوص سایر عوامل مؤثر در رشد میسلیوم قارچی نظیر؛ بررسی نوع منابع کربنی و نیتروژنی، در محیط‌کشت را نمایان می‌سازد.

بررسی اثر منابع کربن و نیتروژن در بازده تولید

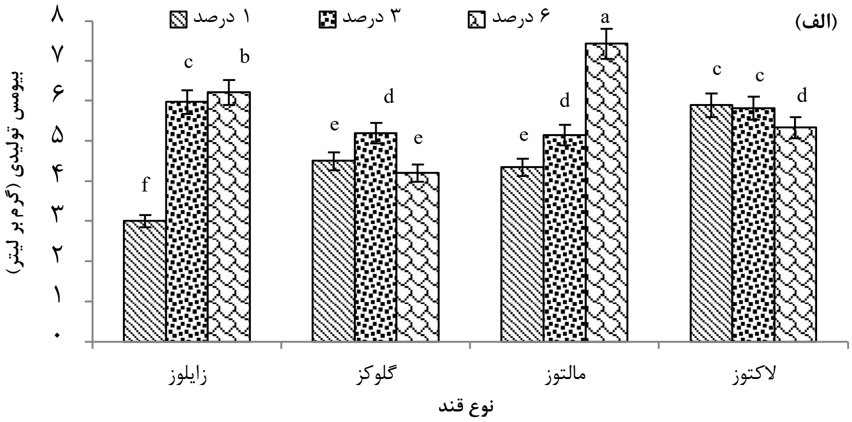
کربوهیدرات‌ها به‌عنوان منابع باارزش انرژی جهت رشد سلولی موردتوجه هستند. استفاده از منابع کربنی متنوع جهت رشد سلولی قارچ *پلوروتوس اوستراتوس* به تنهایی و به‌طور گسترده موردبررسی قرار گرفته است. باتوجه‌به اینکه بتا-گلوکان ترکیبی درون ساختار دیوارهٔ سلولی می‌باشد و افزایش میزان توده در واحد حجم باعث افزایش ضریب تولید بتا-گلوکان می‌گردد به‌طور تقریبی و بر پایهٔ مطالعه‌های انجام‌شده حدود ۱۵ تا ۲۰ درصد وزن دیوارهٔ سلولی قارچ‌ها را بتا-گلوکان تشکیل می‌دهد (Papaspyridi *et al.*, 2011). جهت شناسایی بهترین منبع کربن به‌منظور افزایش تودهٔ سلولی در قارچ صدفی در شرایط تخمیر غوطه‌وری و شرایط بهینه‌شدهٔ مرحلهٔ فوق، ۴ قند زایلوز، گلوکز، مالتوز و لاکتوز با سطوح ۱، ۳ و ۶ درصد مورد استفاده قرار گرفت. علاوه‌بر منبع کربوهیدراتی، از ۴ منبع متفاوت نیتروژن نیز در سطح ثابت ۱ درصد، به‌عنوان منبع

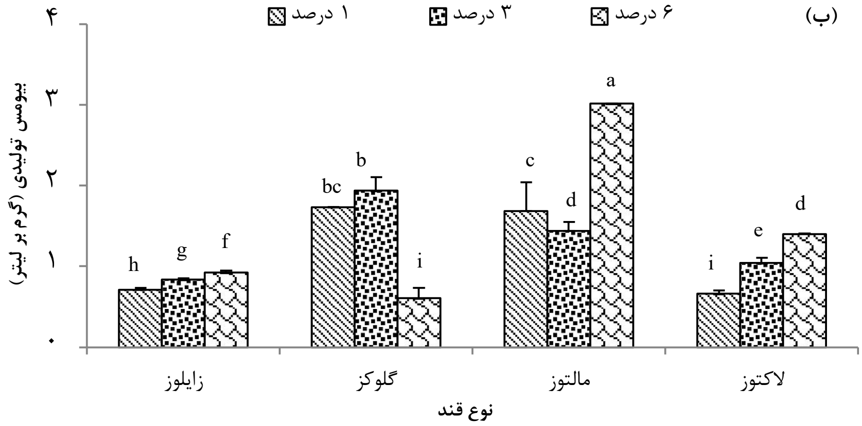
[1] *Cordyceps militaris*

تأثیرگذار در بازده تولید استفاده گردید (شکل ۲) و میزان بازده فرایند با اندازه‌گیری میزان میسلیوم خشک تولیدی در واحد حجم محاسبه شد.

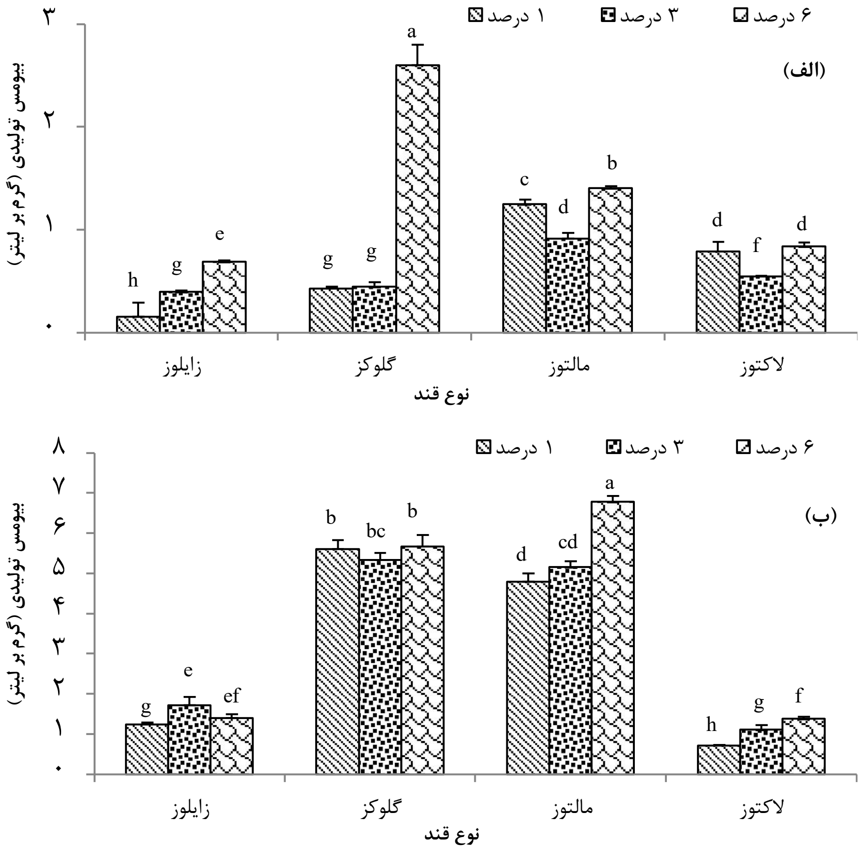
شکل ۲- مراحل مختلف کشت جهت به‌دست‌آوردن شرایط بهینهٔ تولید تودهٔ میسلیومی

به‌منظور تجزیه‌وتحلیل بهتر داده‌ها اثر هریک از منابع نیتروژنی به‌همراه سطوح مختلف قندهای مورد استفاده، در شکل‌های مجزا نشان داده شده است. شکل (۳-الف) اثر سطوح مختلف قندها و منبع نیتروژنی عصارهٔ مالت را بر بازده تولید میسلیوم قارچ نشان می‌دهد. همان‌طورکه در شکل (۳) مشاهده می‌گردد با افزایش درصد قندهای مالتوز و زایلوز در حضور عصارهٔ مالت به‌عنوان منبع نیتروژنی، میزان بیومس تولیدی افزایش یافت؛ درحالی‌که با افزایش درصد قند لاکتوز میزان تولید کاهش یافت. درخصوص قند گلوکز، با افزایش آن از میزان ۱ به ۳ درصد، میزان میسلیوم خشک تولیدی روندی افزایشی داشته اما پس از آن روندی کاهشی را در پیش گرفته است. نتایج حاکی از آن است که در حضور قند مالتوز با سطح ۶ درصد در حضور منبع نیتروژن مالت بعد از ۸ روز گرم‌خانه‌گذاری بیشترین مقدار بیومس تولیدی (۷/۳۸ گرم بر لیتر) به‌دست‌آمد. در حضور زایلوز به میزان ۶ درصد نیز مقدار تولید در حد قابل‌قبولی (۶/۱۱ گرم بر لیتر) محاسبه گردید. این در حالی است که کمترین میزان بیومس تولیدی در حضور میزان ۱ درصد قند زایلوز و منبع نیتروژنی مالت (در حدود ۳ گرم بر لیتر) به‌دست‌آمد.





شکل ۳- اثر نسبت‌های مختلف منابع کربن بر میزان تولید مادهٔ خشک میسلیومی در حضور منبع نیتروژنی الف) عصارهٔ مالت و ب) عصارهٔ مخمر. داده‌ها به‌صورت میانگین و انحراف معیار در سه تکرار بیان شده است. حروف متفاوت روی تیرک‌ها نشان‌دهندهٔ اختلاف معنی‌داری آماری می‌باشد ($P<0.05$).



شکل ۴- اثر نسبت‌های مختلف منابع کربن بر میزان تولید مادهٔ خشک میسلیومی در حضور الف) منبع نیتروژنی پپتون و ب) عصارهٔ سبوس برنج. داده‌ها به‌صورت میانگین و انحراف معیار در سه تکرار بیان شده است. حروف متفاوت روی تیرک‌ها نشان‌دهندهٔ اختلاف معنی‌داری آماری می‌باشد ($P<0/05$).

در شکل (۳-ب) نشان داده شده است که با تغییر منبع نیتروژن از عصارهٔ مالت به عصارهٔ مخمر کاهش چشمگیری در تولید تودهٔ میسلیومی مشاهده گردید که به لحاظ آماری در سطح اطمینان ۹۵ درصد با نتایج حاصل از اثر عصارهٔ مالت به‌عنوان منبع نیتروژنی، اختلاف معنی‌دار بود. ازسوی‌دیگر، مشابه نتایج عصارهٔ مالت بیشترین میزان تودهٔ سلولی در حضور ۶ درصد مالتوز و در حدود ۳ گرم بر لیتر گزارش گردید. همچنین باتوجه‌به نتایج به‌دست‌آمده با افزایش درصد زایلوز، لاکتوز و مالتوز، روند افزایشی در میزان بیومس تولیدی مشاهده گردید؛ درحالی‌که درخصوص قند گلوکز با افزایش میزان آن از ۳ به ۶ درصد مقدار تولید بسیار کاهش یافت. در حضور پپتون به‌عنوان منبع نیتروژن (شکل ۴-الف) میزان تولید تودهٔ سلولی در مقایسه با سه منبع نیتروژنی دیگر، بسیار کمتر بود؛ به‌طوری‌که در حضور درصدهای متفاوت اکثر قندهای موردآزمون، مقدار تولید بیومس کمتر از ۱ گرم بر لیتر بود و تنها در حضور ۶ درصد گلوکز بیشترین مقدار تولید، در حدود ۲/۵ گرم بر لیتر به‌دست‌آمد. این در حالی است که با استفاده از عصارهٔ سبوس برنج حاصل از ضایعات کشاورزی به‌عنوان منبع نیتروژن (شکل ۴-ب)، میزان تولید تودهٔ زیستی در حضور دو قند مالتوز و گلوکز افزایش قابل‌توجهی داشت؛ به‌طوری‌که به حدود ۷ گرم در لیتر در حضور ۶ درصد مالتوز رسید. متعاقب آن، گلوکز به‌عنوان یک منوساکارید بیشترین میزان تولید تودهٔ میسلیومی را در حضور منبع نیتروژنی سبوس برنج به خود اختصاص داد. براساس نتایج به‌دست‌آمده، بیشترین مقادیر بیومس تولیدی به‌ترتیب در حضور مالتوز به‌عنوان منبع قندی و عصارهٔ مالت و عصارهٔ سبوس برنج به‌عنوان منابع نیتروژنی به‌دست‌آمد. باتوجه‌به دردسترس‌بودن، ارزانی و فراوانی سبوس برنج به‌عنوان ضایعات بخش کشاورزی، استفاده از این ترکیب به‌عنوان منبع نیتروژن می‌تواند در بهره‌وری سیستم تولید مؤثر باشد. در پژوهشی گلوکز بهترین منبع کربنی در تولید *پلوتوروس فلوریدا*[1] در

[1] *Pleurotus florida*

مقایسه با منابعی همچون؛ ساکارُز، گالاکتوز، لاکتوز و زایلوز گزارش شد (Burus *et al.*, 1994).

نتایج مطالعهٔ Park و همکاران (۲۰۰۲) روی دو نوع منبع کربنی (ساکارُز و شربت فروکتوز ذرت) در تولید متابولیت سلولی قارچ *کوردیسپس میلیتاریس* نشان داد که ساکارُز منبع مناسب‌تری برای تولید اگزوپلی‌ساکاریدها می‌باشد. هرچند مورفولوژی گرانولی میسلیومی را در انتخاب مسیر تخمیر، مهم ارزیابی نمود. به‌طورکلی شرایط تولید، منبع نیتروژن و هدف از تخمیر بر نوع استفاده از نوع منبع کربنی تأثیرگذار است (Park *et al.*, 2002). در مطالعهٔ حاضر، قند مالتوز در غلظت‌های بالا، عملکرد بهتری را نسبت به زایلوز، لاکتوز و گلوکز از خود نشان داد که توانایی قارچ *پلوروتوس اوستراتوس* در تولید محصولات حدواسط در متابولیت‌های اولیه می‌تواند این افزایش راندمان تولید تودهٔ میسلیومی را توجیه نماید (Shah & Modi, 2018).

نتایج به‌دست‌آمده از اثر منبع کربنی مالتوز و منبع نیتروژنی سبوس برنج در تطابق با نتایج Petre و همکاران (۲۰۱۰) می‌باشد. ازطرفی؛ نتایج مطالعه‌های گسترده دراین‌زمینه از توانایی بالای قارچ‌ها در استفاده از منابع کربنی متنوع حکایت دارد. Nunes و همکاران (۲۰۱۲) اثر غنی‌سازی با منابع نیتروژنی را در میزان تولید و نیز ترکیبات تغذیه‌ای قارچ *پلوروتوس اوستراتوس* موردبررسی قرار دادند. در این مطالعه که از اوره یا سبوس برنج به‌عنوان منابع نیتروژنی بهره‌برده‌شده بود، میزان تولید و ارزش تغذیه‌ای قارچ با افزودن منابع نیتروژنی افزایش یافت و مشخص گردید که استفاده از منابع نیتروژنی می‌تواند سبب افزایش میزان محتوای بتا-گلوکان در قارچ گردد (Nunes *et al.*, 2012). در بررسی دیگری که به مطالعهٔ تأثیر مخلوطی از چند منبع متفاوت نیتروژن آلی بر افزایش بازده تولید تودهٔ زیستی (در فاز لگاریتمی) در قارچ‌های بازیدیومیسیتی[1] در تخمیر غوطه‌وری پرداختند (Jung *et al.*, 1997)، حضور طیف فراوانی از انواع آمینواسیدهای ضروری توسط یک منبع نیتروژنی می‌تواند افزایش عملکرد را نسبت به استفاده از یک منبع واحد را توجیه نماید (Jennison *et al.*, 1996; Jung *et al.*, 1997). در قارچ صدفی به‌علت حضور طیف گسترده‌ای از آنزیم‌های هیدرولیزکننده، توانایی بالقوه‌ای در تجزیهٔ ترکیبات پیچیده‌تر وجود دارد.

[1] Basidiomycetes

تعیین میزان بتا-گلوکان استخراج‌شده به روش‌های اسیدی و اسید-قلیا

با استفاده از کیت تشخیصی مگازیم (K-YBGL 10/2005)، میزان بتا-گلوکان میسلیوم قارچی به هر دو روش استخراج توسط فرمول ارائه‌شدهٔ شرکت مگازیم و نرم‌افزار Microsoft Excel محاسبه گردید. براین‌اساس درصد بتا-گلوکان موجود در ۱۰۰ گرم میسلیوم خشک به روش‌های اسیدی و اسید-قلیا به‌ترتیب ۷۷/۷۲ و ۹۴/۱۵ به‌دست‌آمد، که در میسلیوم خشک بدون عملیات استخراج این میزان ۲۱/۳۵ درصد حاصل شد. استخراج به‌صورت چندمرحله‌ای میزان و کارآمدی بالاتری نسبت به روش استاندارد استخراج در کیت تجاری دارد (جدول ۲). همان‌طورکه در نتایج آمده است بازده استخراج در روش اسید-قلیا نسبت به روش اسیدی از عملکرد بهتری برخوردار بود. به نظر می‌رسد که اثر اسیدهای قوی بر میسلیوم‌های قارچی منجربه‌کاهش میزان استخراج به روش اسیدی می‌شود (Arabamerian *et al.*, 2013). بر مبنای پژوهشی میزان بتا-گلوکان در انواع وحشی قارچ‌های خوراکی خشک‌شده بیش از ۱۰ و کمتر از ۵۰ درصد گزارش شد (Bak *et al.*, 2014). در مطالعهٔ گستردهٔ دیگری که روی محتوای بتا-گلوکان طیف وسیعی از قارچ‌های صنعتی و وحشی انجام شد، ۵ گونه قارچ صدفی موردارزیابی قرار گرفت و میزان بتا-گلوکان موجود در میسلیوم خشک‌شدهٔ آنها بین ۱۵ تا ۲۲ گرم در ۱۰۰ گرم گزارش شد (Sari *et al.*, 2017)؛ قابل‌توجه اینکه این مقادیر به روش کیت مگازیم و بدون استخراج اولیه به‌دست‌آمد (Chang & Buswell, 2003). هرچند مطالعه‌های انجام‌شده بیشتر بر بتا-گلوکان موجود در میوهٔ ماکروسکوپی قارچ تمرکز داشتند؛ مطالعهٔ حاضر ازنظر بررسی میزان بتا-گلوکان در تودهٔ میسلیومی قارچ صدفی می‌تواند جالب توجه باشد. در مطالعه‌ای نشان داده شده است که حتی استخراج به روش مشابه روی قارچ‌های از یک گونه نیز می‌تواند تفاوت زیادی بین گزارش‌های بازده استخراج از خود نشان دهد (Chang & Buswell, 2003) تفاوت در نوع قارچ، محیط‌کشت بستر، چرخهٔ حیات قارچ (رویشی یا زایشی)، نحوهٔ استخراج و روش‌های آنالیز بتا-گلوکان می‌تواند به‌عنوان فاکتورهای اساسی، اختلاف بین موارد گزارش‌شده را توجیه نماید.

جدول ۲- درصد بتا-گلوکان استخراج‌شده در دو روش اسیدی و اسید-قلیا و میسلیوم بدون تیمار استخراج (در ۱۰۰ گرم مادهٔ خشک)

روش استخراج	درصد بتا-گلوکان
اسیدی	۷۷/۷۲±۰/۲۶[b]
اسید-قلیا	۹۴/۱۵±۰/۳۳[a]
بدون تیمار	۲۱/۳۵±۰/۱۱[c]

* اعداد به‌صورت میانگین±انحراف معیار نمایش داده شده است. حروف غیرمشترک بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد می‌باشد (P<۰/۰۵).

تعیین میزان آلودگی بتا-گلوکان استخراجی به پروتئین

مطابق نتایج جدول (۳) و باتوجه‌به درصد بالای پروتئین در قارچ صدفی و احتمال حضور این ناخالصی به‌همراه بتا-گلوکان چه در شکل آزاد و چه در ترکیب با پلی‌ساکارید، میزان ازت کل عصارهٔ استخراج‌شده در روش اسید-قلیا و روش اسیدی توسط روش کلدال موردارزیابی قرار گرفت. همان‌طورکه در نتایج به‌دست‌آمده مشاهده می‌شود، میزان ازت کل در بتا-گلوکان استخراجی به روش اسید-قلیا کمتر از روش اسیدی بود. علت این امر را می‌توان به توانایی بالای حذف ناخالصی پروتئینی توسط اسید نسبت داد.

جدول ۳- سنجش میزان ازت کل در بتا-گلوکان حاصل از دو روش استخراج

روش استخراج	درصد ازت کل در بتا-گلوکان استخراجی
روش اسید-قلیا	۲/۹۳±۰/۱۰[b]
روش اسیدی	۳/۱۷±۰/۰۸[a]

اعداد به‌صورت میانگین±انحراف معیار نمایش داده شده است. حروف غیرمشترک بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد می‌باشد (P<۰/۰۵).

نتیجه‌گیری

این تحقیق با هدف افزایش تولید میسلیوم قارچ *پلوروتوس اوستراتوس* و سپس استخراج بتا-گلوکان از آن انجام شد. بر مبنای نتایج حاصل از بررسی منحنی رشد، این قارچ صدفی تا روز ۸ در فاز لگاریتمی خود قرار دارد. به‌علاوه؛ درصورت هم‌زدن محیط‌کشت به‌طور مداوم طی ۸ روز رشد قارچ، میزان تولید نسبت به حالت سکون کامل و یا تلفیقی از حالت حرکتی/سکون در محیط‌کشت، بیشتر خواهد بود. همچنین؛ میزان میسلیوم خشک تولیدی در واحد حجم، در حضور ۶ درصد مالتوز به‌عنوان منبع قندی و عصارهٔ مالت و عصارهٔ سبوس برنج به‌عنوان منابع نیتروژنی بیشترین مقادیر را به خود اختصاص داد. در بررسی روش‌های استخراج بتا-گلوکان، نتایج حاکی از آن بود که در استخراج به روش اسیدی-قلیا میزان بتا-گلوکان استخراجی حدود ۹۴ گرم در ۱۰۰ و در روش اسیدی حدود ۷۷ گرم در ۱۰۰ به‌دست‌آمد که ارجحیت روش اسید-باز را بیشتر نشان می‌دهد. به‌طورکلی بر مبنای این بررسی، تولید تودهٔ میسلیومی قارچی به روش غوطه‌وری می‌تواند روشی کارآمد جهت بهره‌مندی از پتانسیل بالای این قارچ صدفی بخصوص در مصارف غذایی و دارویی باشد که در این میان بتا-گلوکان به‌عنوان یکی از ارزشمندترین ترکیبات زیست‌فعال افق‌های روشنی را فراروی محققین قرار می‌دهد که امید است با تمرکز بیشتر بر دیگر روش‌های استخراج و همچنین مطالعه‌های بیشتر درخصوص اندازه‌گیری و افزایش راندمان خلوص بتا-گلوکان استخراج‌شده گام‌های مؤثرتری در جهت تولید آن در کشور برداشته شود.

تشکر و قدردانی

این مقاله توسط صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور و مؤسسه پژوهشی علوم و صنایع غذایی حمایت مالی شده است که بدین‌وسیله از آنها قدردانی می‌شود.

مشارکت نویسندگان

ابوالفضل پهلوانلو: ارائهٔ ایدهٔ پژوهشی و طراحی مطالعه، جمع‌آوری داده، تجزیه‌وتحلیل و تفسیر داده‌ها، نوشتن پیش‌نویس مقاله، آنالیز داده‌ها، بازبینی و اصلاح مقاله، نظارت بر مطالعه، تأیید نسخه نهایی؛ **محبوبه سرابی جماب**: ارائهٔ ایدهٔ پژوهشی و طراحی مطالعه، جمع‌آوری داده، تجزیه‌وتحلیل و تفسیر داده‌ها، نوشتن پیش‌نویس مقاله، آنالیز داده‌ها، بازبینی و اصلاح مقاله، نظارت بر مطالعه، تأیید نسخه نهایی؛ **منا کاوه**: نوشتن پیش‌نویس مقاله، آنالیز داده‌ها، تجزیه‌وتحلیل و تفسیر داده‌ها؛ **سیدمهدی زیارت‌نیا**: تجزیه‌وتحلیل و تفسیر داده‌ها، نوشتن پیش‌نویس مقاله، آنالیز داده‌ها.

تعارض منافع

بنابر اظهار نویسندگان، هیچ‌گونه تعارض منافعی وجود ندارد.

منابع

Ahmad, A., Anjum, F. M., Zahoor, T., Nawaz, H., & Dilshad, S. M. R. (2012). Beta glucan: a valuable functional ingredient in foods. *Critical reviews in food science and nutrition*, *52*(3), 201-212 .

Alsohaili, S. A., & Bani-Hasan, B. M. (2018). Morphological and molecular identification of fungi isolated from different environmental sources in the Northern Eastern desert of Jordan. *Jordan Journal of Biological Sciences*, *11(3)*

Arabamerian, F., Elhamirad, A. H., Qodsevali, A. R., & Armin, M. (2013). Evaluation of the effect of malting process on the physicochemical properties of two varieties of barley in Golestan province. *Journal of Innovation in Food Science and Technology*, *4*(13), 83-80 .

Atli, B., Yamac, M., & Yildiz, Z. (2013). Optimization of submerged fermentation conditions for lovastatin production by the culinary-medicinal oyster mushroom, Pleurotus ostreatus (Higher Basidiomycetes). *International Journal of Medicinal Mushrooms*, *15*(5), 487-495. https://doi.org/10.1615/intjmedmushr.v15.i5.60

Bae, S.-H., Kim, B.-R., Kang, B. J., Tsutsui, N., Okutsu, T., Shinji, J., . . . Wilder, M. N. (2012). Molecular cloning of prophenoloxidase and the effects of dietary β-glucan and rutin on immune response in hemocytes of the fleshy shrimp, Fenneropenaeus chinensis. *Fish & Shellfish Immunology*, *33*(3), 597-604. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2012.06.034

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. https://doi.org/10.5941%2FMYCO.2014.42.3.301

Bernardi, E., Minotto, E., & Nascimento, J. S. d. (2013). Evaluation of growth and production of Pleurotus sp. in sterilized substrates .*Arquivos do Instituto Biológico*, *80*, 318-324 .

Bradstreet, R. B. (1954). Kjeldahl method for organic nitrogen. *Analytical Chemistry*, *26*(1), 185-187. https://doi.org/10.1021/ac60085a028

Brown, G. D., & Gordon, S. (2003). Fungal β-glucans and mammalian immunity. *Immunity*, *19*(3), 311-315. https://doi.org/10.1016/s1074-7613(03)00233-4

Burus, M., Johnson, S. M., Williams, G., & Stackhouse, S. (1994). *Human factors evaluation of the Delco RDS radio receiver and the RDS architecture*. Retrieved from the University of Minnesota Digital Conservancy. https://hdl.handle.net/11299/156520

Carbonero, E. R., Ruthes, A. C., Freitas, C. S., Utrilla, P., Gálvez, J., da Silva, E. V., . . . Iacomini, M. (2012). Chemical and biological properties of a highly branched β-glucan from edible mushroom Pleurotus sajor-caju. *Carbohydrate polymers*, *90*(2), 814-819. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.06.005

Chang, S., & Buswell, J. (2003). Medicinal mushrooms-a prominent source of nutriceuticals for the 21st century. *Current Topics in Nutraceutical Research*, *1*, 257-280 .

Chen, J., & Seviour, R. (2007). Medicinal importance of fungal β-(1→ 3),(1→ 6)-glucans. *Mycological research*, *111*(6), 635-652. https://doi.org/10.1016/j.mycres.2007.02.011

Clayton, P. (2013). Beta Glucans–How scientific research brought this traditional nutrient to forefront of nutritional medicine–by. *The clinically tesred nutrient*, *4*, 22-41. https://doi.org/10.1016/j.mycres.2007.02.011

de Vries, R. P., & Visser, J. (2001). Aspergillus enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. *Microbiology and molecular biology reviews*, *65*(4), 497-522. https://doi.org/10.1128/mmbr.65.4.497-522.2001

Du, B., Lin, C., Bian, Z., & Xu, B. (2015). An insight into anti-inflammatory effects of fungal beta-glucans. *Trends in Food Science & Technology*, *41*(1), 49-59. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.09.002

El Khoury, D., Cuda, C., Luhovyy, B., & Anderson, G. (2012). Beta glucan: health benefits in obesity and metabolic syndrome. *Journal of nutrition and metabolism*, *2012*. https://doi.org/10.1155%2F2012%2F851362

Fang, Q.-H., & Zhong, J.-J. (2002). Submerged fermentation of higher fungus Ganoderma lucidum for production of valuable bioactive metabolites—ganoderic acid and polysaccharide. *Biochemical engineering journal*, *10*(1), 61-65. https://doi.org/10.1016/S1369-703X(01)00158-9

Freimund, S., Sauter, M., Käppeli, O., & Dutler, H. (2003). A new non-degrading isolation process for 1, 3-β-D-glucan of high purity from baker's yeast Saccharomyces cerevisiae. *Carbohydrate polymers*, *54*(2), 159-171. https://doi.org/10.1016/S0144-8617(03)00162-0

Gregori, A., Švagelj, M., & Pohleven, J. (2007). Cultivation techniques and medicinal properties of Pleurotus spp. *Food Technology and Biotechnology*, *45*(3), 238-249 .

Guadarrama-Mendoza, P., Valencia del Toro, G., Ramírez-Carrillo, R., Robles-Martinez, F., Yáñez-Fernández, J., Garín-Aguilar, M . . . ,.Bravo-Villa, G. (2014). Morphology and mycelial growth rate of Pleurotus spp. strains from the Mexican mixtec region. *Brazilian Journal of Microbiology*, *45*(3), 861-872. https://doi.org/10.1590%2Fs1517-83822014000300016

Havrlentova ,M., Petrulakova, Z., Burgarova, A., Gago, F., Hlinkova, A., & Šturdík, E. (2011). β-glucans and their significance for the preparation of functional foods-a review. *Czech Journal of Food Sciences*, *29*(1), 1-14. https://doi.org/10.17221/162/2009-CJFS

Hertzog, C. (2013). *Beta Glucan: a 21st Century Miracle?* Booksmango .

Hsu, M. J., Lee, S. S., & Lin, W. W. (2002). Polysaccharide purified from Ganoderma lucidum inhibits spontaneous and Fas-mediated apoptosis in human neutrophils through activation of the phosphatidylinositol 3 kinase/Akt signaling pathway. *Journal of leukocyte biology*, *72*(1), 207-216 .

Huang, K.-x., Badger, M., Haney, K., & Evans, S. L. (2007). Large scale production of Bacillus thuringiensis PS149B1 insecticidal proteins Cry34Ab1 and Cry35Ab1 from Pseudomonas fluorescens. *Protein expression and purification*, *53*(2), 325-330. https://doi.org/10.1016/j.pep.2007.01.010

Irakli, M., Biliaderis, C. G., Izydorczyk, M. S., & Papadoyannis, I. N. (2004). Isolation, structural features and rheological properties of water-extractable β-glucans from different Greek barley cultivars. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *84*(10), 1170-1178. https://doi.org/10.1002/jsfa.1787

Jennison, D., Schultz, P., & Sears, M. (1996). Ab initio calculations of adsorbate hydrogen-bond strength: ammonia on Pt (111). *Surface science*, *368*(1-3), 253-257. https://doi.org/10.1016/S0039-6028(96)01058-8

Jung, O. J., Lee, E. J., Kim, J. W., Chung, Y. R., & Lee, C.-W. (19 .(۹۷Identification of putative phosphoinositide-specific phospholipase C genes in filamentous fungi. *Molecules & Cells (Springer Science & Business Media BV)*, *7*(2) .

Kaveh, M., Pahlevanloo, A., & Sarabi-Jamab, M. (2017). Fungies, valuable sources of bioactive β-glucans. *Journal of Biosafety*, *10*(3), 45-65. http://dorl.net/dor/20.1001.1.27170632.1396.10.3.3.6 (in Persian)

Kim, H.-M., Kim, S.-W., Hwang, H.-J., Park, M.-K., Mahmoud, Y. A.-G., Choi, J.-W., & Yun, J.-W. (2006). Influence of agitation intensity and aeration rate on production of antioxidative exopolysaccharides from submerged mycelial culture of Ganoderma resinaceum. *Journal of microbiology and biotechnology*, *16*(8), 1240-1247 .

Kim, Y.-T., Kim, E.-H., Cheong, C., Williams, D. L., Kim, C.-W., & Lim, S.-T. (2000). Structural characterization of β-D-(1→ 3, 1→ 6)-linked glucans using NMR spectroscopy. *Carbohydrate research*, *328*(3), 331-341. https://doi.org/10.1016/S0008-6215(00)00105-1

Kogan, G. (2000). (1→ 3, 1→ 6)-β-d-Glucans of yeasts and fungi and their biological activity. *Studies in natural products chemistry*, *23*, 107-152. https://doi.org/10.1016/S1572-5995(00)80128-3

Lee, W. Y., Park, Y., Ahn, J. K., Ka, K. H., & Park, S. Y. (2007). Factors influencing the production of endopolysaccharide and exopolysaccharide from *Ganoderma applanatum*. *Enzyme and microbial technology*, *40*(2), 249-254. https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2006.04.009

Milessi, T. S., Antunes, F. A., Chandel, A. K., & Silva, S. S. (2013). Rice bran extract: an inexpensive nitrogen source for the production of 2G ethanol from sugarcane bagasse hydrolysate. *3 Biotech*, *3*(5), 373-379. https://doi.org/10.1007/s13205-012-0098-9

Nitschke, J., Modick, H., Busch, E., von Rekowski, R .W., Altenbach, H. J., & Mölleken, H. (2011). A new colorimetric method to quantify β-1, 3-1, 6-glucans in comparison with total β-1, 3-glucans and a method to quantify chitin in edible mushrooms. *Food Chemistry*, *127*(2), 791-796. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.12.149

Noora, H., Shahabi-vand, S., Karimi, F., Aghaee, A., & Darvishi, F. (2018). Optimization of growth and biomass production in the endophytic fungus *Piriformospora indica*. *Journal of Molecular and Cellular Research*, *30*(3), 441-451. https://dorl.net/dor/20.1001.1.23832738.1396.30.3.9.2 (in Persian)

Nunes, M. D., da Luz, J. M. R., Paes, S. A., Ribeiro, J. J. O., da Silva, M. d. C. S., & Kasuya, M. C. M. (2012). Nitrogen supplementation on the productivity and the chemical composition of oyster mushroom. *Journal of Food Research*, *1*(2), 113. https://doi.org/10.5539/jfr.v1n2p113

Papaspyridi, L.-M., Aligiannis, N., Christakopoulos, P., Skaltsounis, A.-L., & Fokialakis, N. (2011). Production of bioactive metabolites with pharmaceutical and nutraceutical interest by submerged fermentation of Pleurotus ostreatus in a batch stirred tank bioreactor. *Procedia Food Science*, *1*, 1746-1752. https://doi.org/10.1016/j.profoo.2011.09.257

Papaspyridi, L.-M., Katapodis, P., Gonou-Zagou, Z., Kapsanaki-Gotsi, E., & Christakopoulos, P. (2010). Optimization of biomass production with enhanced glucan and dietary fibres content by Pleurotus ostreatus ATHUM 4438 under submerged culture. *Biochemical engineering journal*, *50*(3), 131-138. https://doi.org/10.1016/j.bej.2010.04.008

Park, J., Kim, Y., Kim, S., Hwang, H., Cho, Y., Lee, Y., . . . Yun, J. (2002). Effect of agitation intensity on the exo-biopolymer production and mycelial morphology in Cordyceps militaris. *Letters in Applied Microbiology*, *34*(6), 433-438. https://doi.org/10.1046/j.1472-765x.2002.01126.x

Petre, M., Teodorescu, A., Tuluca, E., Bejan, C., & Andronescu, A. (2010). Biotechnology of mushroom pellets producing by controlled submerged fermentation. *Romanian Biotechnological Letters*, *15*(2), 50-55 .

Robbins, E., & Seeley, R. (1977). Cholesterol lowering effect of dietary yeast and yeast fractions. *Journal of Food Science*, *42*(3), 694-698. https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1977.tb12581.x

Sari, M., Prange, A., Lelley, J. I., & Hambitzer, R. (2017). Screening of beta-glucan contents in commercially cultivated and wild growing mushrooms. *Food Chemistry*, *216*, 45-51. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.08.010

Shah, P., & Modi, H. (2018). Optimization of culture conditions for biomass production of Ganoderma lucidum. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, *7*(2), 1882-1889. https://doi.org/10.20546/ijcmas.2018.702.227

Stone, B., & Clark, A. (1992). *Chemistry and Biology of (1→ 3)-β-Glucans*. La Trobe University Press .

Synytsya, A., Mickova, K., Jablonsky, I., SLUKOVÁ, M., & Copikova, J. (2008). Mushrooms of genus Pleurotus as a source of dietary fibres and glucans for food supplements. *Czech J. Food Sci*, *26*(6), 441-446. https://doi.org/10.17221/1361-CJFS

Synytsya, A., Míčková, K., Synytsya, A., Jablonský, I., Spěváček, J., Erban, V., . . . Čopíková, J. (2009). Glucans from fruit bodies of cultivated mushrooms Pleurotus ostreatus and Pleurotus eryngii: Structure and potential prebiotic activity. *Carbohydrate polymers*, *76*(4), 548-556. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2008.11.021

Tang, Y.-J., Zhu, L.-W., Li, H.-M., & Li, D.-S. (2007). Submerged culture of mushrooms in bioreactors–challenges, current state-of-the-art, and future prospects. *Food Technology and Biotechnology*, *45*(3), 221-229 .

Tanriverdi, P., Yuksel, B. C., Rasa, K., Guler, G., Iskit, A. B., Guc, M. O., & Korkmaz, A. (2005). The effects of selective nitric oxide synthase blocker on survival, mesenteric blood flow and multiple organ failure induced by zymosan1. *Journal of Surgical Research*, *124*(1), 67-73. https://doi.org/10.1016/j.jss.2004.09.004

Tay, C. C., Liew, H. H., Yin, C.-Y., Abdul-Talib, S., Surif, S., Suhaimi, A. A., & Yong, S. K. (2011). Biosorption of cadmium ions using Pleurotus ostreatus: Growth kinetics, isotherm study and biosorption mechanism. *Korean Journal of Chemical Engineering*, *28*(3), 825-830 https://doi.org/10.1007/s11814-010-0435-9

Thammakiti, S., Suphantharika, M., Phaesuwan, T., & Verduyn, C. (2004). Preparation of spent brewer's yeast β-glucans for potential applications in the food industry. *International journal of food science & technology*, *39*(1), 21-29. https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2004.00742.x

Vamanu, E. (2012). Biological activities of the polysaccharides produced in submerged culture of two edible Pleurotus ostreatus mushrooms. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, *2012*. https://doi.org/10.1155/2012/565974

Vetvicka, V., & Vetvickova, J. (2010). β1, 3-Glucan: Silver bullet or hot air? *Open Glycoscience*, *3*, 1-6 .

Vetvicka, V., & Vetvickova, J. (2014). Comparison of immunological effects of commercially available β-glucans. *Appl Sci Rep*, *1*(2), 1-7 .

Villares, A., Mateo-Vivaracho, L., & Guillamón, E. (2012). Structural features and healthy properties of polysaccharides occurring in mushrooms. *Agriculture*, *2*(4), 452-471 .https://doi.org/10.3390/agriculture2040452

Wang, J., Warris, A., Ellingsen, E., Jørgensen, P., Flo, T., Espevik, T., . . . Aasen, A. (2001). Involvement of CD14 and toll-like receptors in activation of human monocytes by Aspergillus fumigatus hyphae. *Infection and immunity*, *69*(4), 2402-2406. https://doi.org/10.1128%2FIAI.69.4.2402-2406.2001

Wu, T., Zivanovic, S., Draughon, F. A., & Sams, C. E. (2004). Chitin and chitosan value-added products from mushroom waste. *Journal of agricultural and food chemistry*, *52*(26), 7905-7910. https://doi.org/10.1021/jf0492565

Zeković, D. B., Kwiatkowski, S., Vrvić, M. M., Jakovljević, D., & Moran, C. A. (2005). Natural and modified (1→ 3)-β-D-glucans in health promotion and disease alleviation. *Critical reviews in biotechnology*, *25*(4), 205-230. https://doi.org/10.1080/07388550500376166

Zhu, F., Du, B., & Xu, B. (2016). A critical review on production and industrial applications of beta-glucans. *Food Hydrocolloids*, *52*, 275-288. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.07.003

Production of β-Glucans from Oyster Mushroom *Pleurotus ostreatus* by Submerged Culture Method and Evaluation of Its Extraction Techniques

Abolfazl Plahlevanloo[1*], Mahboobeh Sarabi-Jamab[1*], Mona Kaveh[2], Seyed Mahdi Ziaratnia[1]

1- Department of Food Biotechnology, Research Institute of Food Science and Technology, Mashhad, Iran
* Corresponding author (a.pahlevanloo@rifst.ac.ir)
* Corresponding author (m.sarabi@rifst.ac.ir)
2- Department of Food Processing, Research Institute of Food Science and Technology, Mashhad, Iran

Abstract

The β-Glucans are exceptionally important polysaccharide compounds in the cell wall of a higher plants, fungi and bacteria. Due to having functional types of bioactive β-glucans, fungi are one of the foremost important sources of β-glucans. In the present study, *Pleurotus ostreatus* was considered as a source of β-glucan production, which can also evaluate the effect of the stirring method during mass production. Also the effect of the types of 4 carbon sources namely; xylose, glucose, maltose and lactose (at 3 levels) and 4 different sources of nitrogen including; Malt extract, yeast extract, peptone and rice bran extract (at 1 level) were investigated. The efficiency of the process was calculated by measuring the amount of produced dry mycelium per unit volume. According to the results continuous stirring at a speed of 220 rpm per minute increased the mycelium production and the highest amounts of produced biomass were obtained in the presence of maltose as a carbon source and malt extract and rice bran extract as nitrogen sources. β-glucan extraction was also evaluated by acid and acid-alkaline methods extracted by acid-alkali method showed a statistically significant difference of about 94% compared to β-glucan extraction by acid method ($P<0.05$). At a glance the importance of aeration, the type of carbon and nitrogen sources used and the extraction method in achieving economic amounts of β-glucan were proved. Also, the use of right solvents in both acidic and basic pH can obtain β-glucans with high purity for use in pharmaceutical products.

Keywords: β-Glucan, Maltose, *Pleurotus ostreatus*, Rice bran extract

© 2023, Research Institute of Food Science and Technology. All rights reserved.
This is an open-access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution 4.0 International (CC-BY 4.0). To view a copy of this license, visit (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).