قارچ‌های دارویی: معرفی، تکنولوژی تولید، استفاده بهینه از ضایعات کشاورزی و اشتغال‌زایی

مجید عزیزی
دانشیار گروه علوم باغبانی دانشگاه فردوسی مشهد.

چکیده
در حال حاضر قارچ ها یکی از امیدبخش ترین موجودات زنده ای هستند که در تحقیقات زیست فناوری (صنعت، پزشکی و کشاورزی) مورد استفاده قرار میگیرند. در این بین، قارچ های دارویی کلاهکدار که غالباً هم مصرف خوراکی و هم مصرف دارویی دارند به یکی از ارزشمندترین منابع زیستی در صنایع داروسازی تبدیل شده اند و کاربردهای فراوانی در این زمینه یافته اند. تاکنون 270 گونه قارچ دارویی شناخته شده اند که در فارماکوپه چین بیش از 100 گونه از این قارچ ها معرفی شده است. قارچ‌های دارویی اغلب مستقیماً از ضایعات بخش کشاورزی (مانند کاه و کلش غلات، ضایعات حاصل از هرس درختان، خاک اره، دانه قهوه، پوست پنبه دانه و غیره) استفاده می‌نمایند و بنابراین یکی از باصرفه ترین و اقتصادی‌ترین محصولات هستند. در حال حاضر، برخی از عصاره ها و ترکیباتی که اخیراً از قارچ های دارویی به دست آمده اند، امید زیادی را به لحاظ داشتن خواص تعدیل کننده سیستم ایمنی، ضد سرطان، درمان بیماریهای قلبی عروقی، ضد ویروس، ضد باکتری، ضد انگل و محافظت کننده در برابر هپاتیت و بیماری قند به وجود آورده اند. این قارچها دارای متابولیتهای ارزشمندی چون پلی ساکارید مانند آلفا دی گلوکان, ترپنوئید, رنگیزه و ترکیبات فلاونوییدی میباشند که به ندرت در گیاهان آلی یافت میشوند. مطالعات علمی در مورد قارچ های دارویی، در طی دو دهه گذشته به طور فزاینده ای گسترش پیدا کرده است و مسلما در آینده نزدیک صنایع دارویی توجه ویژه ای به این منابع داشته و خواهد داشت. در این مقاله نتایج حاصل از 5 سال تحقیق بر روی قارچهای دارویی شیتاکه (*Lentinula edodes*), گانودرما(*Ganoderma Lucidium*) و موناسکوس(*Monascus purpureus*) ارائه شده است.

کلمات کلیدی: ضایعات کشاورزی, قارچهای دارویی, متابولیتهای ثانویه

1-آزمایش اول: قارچ شی‌تاکه

قارچ شی‌تاکه (*Lentinula edodes*(Berk) Singer/Pegler) یکی از مهمترین قارچهای دارویی دنیا است که از لحاظ تولید مرتبه دوم دنیا را به خود اختصاص داده است. این قارچ به خاطر طعم و مزهٔ بی‌نظیر و همچنین خواص دارویی متعدد مدتهای مدیدی است که مورد توجه ویژه قرار گرفته است. با توجه به اهمیت این قارچ در دنیا و همچنین با توجه به حجم ضایعات بخش کشاورزی تحقیق بر روی این قارچ در گروه باغبانی دانشگاه فردوسی مشهد و با همکاری پژوهشکده اقبال وابسته به جهاد دانشگاهی مشهد صورت گرفت.

1-1- بهینه سازی رشد میسلیوم

در این آزمایش تاثیر ترکیب محیط کشت، pH و دما بر سرعت رشد و وزن میسلیوم قارچ "شی‌تاکه" در دو شرایط جامد و مایع بررسی گردید. بدین منظور محیط کشت هایPDA, MEA و CEA مورد استفاده قرار گرفت. نتایج بدست آمده نشان داد که در بین این محیط کشت ها ،محیط کشت MEA از نظر سرعت رشد(6.8 میلیمتر بر روز) وتراکم رشد نسبت به محیطهای کشت دیگر برتری دارد. در ادامه این آزمایش تیمارها مختلف شامل ترکیبات محیط کشت های مختلف (بر اساس وزن خشک) که عصاره هایی ازمواد زیر بود مورد آزمایش قرار گرفت:

(1)خاک اره 100گرم، ملاس چغندر قند 40گرم، سبوس گندم20گرم، سبوس برنج20گرم، کربنات کلسیم4 گرم
(2)خاک اره 100 گرم ،سبوس گندم 20گرم ،سبوس برنج20 گرم ،کربنات کلسیم 4 گرم
(3)خاک اره 100 گرم.

مواد فوق در یک لیتر آب به مدت 20 دقیقه جوشانده و سپس عصاره حاصل توسط پارچه ی ململ صاف گردید و سپس به هرکدام از عصاره های (1)و(2) 10 گرم دکستروز و 20 گرم آگاراضافه شد. عصاره (3)به محیط کشت تجاری MEA اضافه گردید و محیط کشت MEA تجاری (4) نیز برای مقایسه مورد استفاده قرار گرفت. سپس pH هر کدام از محیط کشت ها در سه pH متفاوت 4.5 ، 5.5 و 6.5 تنظیم گردید. بعد ازجامد شدن محیطهای کشت، در زیر هود لامینار تمام پتری دیشها با استفاده از پرگنه‌هایی با قطر مساوی 5 میلیمتر کشت شدند و سپس ظروف به دو گروه تقسیم شدند، یک گروه در دمای 25 درجه سانتیگراد و گروه دوم در دمای 30 درجه سانتیگراد در دو اتاقک رشد متفاوت قرارداده شدند و بطور روزانه رشد شعاعی میسلیومها در دو جهت عمود بر هم اندازه گیری گردید.

محیط کشت مایع

در بررسی دوم برای ارزیابی بیومس و تراکم میسلیوم قارچ مورد نظر از محیط کشت مایع استفاده شد، بدین منظور مراحل قبل (بدون آگار) دقیقا تکرار شد. سپس ml 20 از هر محیط کشت در ویالهایی با حجم ml 100 توزیع گردید، پس از آن در زیر هود استریل پرگنه هایی با قطر مساوی 5 میلیمتر و با حداقل آگار به داخل ویال ها مایه کوبی و به مدت 18 روز در دمای 25 درجه سانتیگراد در اتاقک رشد آنکوبه گردید. پس ازگذشت 18 روز محتویات ویال خارج شده و به دقت میسلیومها از محیط کشت جدا گردید. سپس با قرار دادن میسلیومها بر روی کاغذ صافی نسبت به حذف رطوبت باقیمانده اقدام گردید. در نهایت وزن میسلیوم تولید شده با ترازوی دیجیتال با دقت 0/0001 تعیین گردید.

این آزمایش بصورت فاکتوریل و در قالب بلوک های کاملا تصادفی با 4 تکرار اجرا شد، نتایج حاصله پس از ارزیابی و مقایسه آماری با نرم افزار MSTAT-C مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

نتایج حاصله نشان داد که در محیط جامد اثر نوع محیط کشت، pH و دما برسرعت رشد میسلیوم در سطح 1 درصد معنی دار است. عکس العمل متقابل بین محیط کشت × pH ، دما × محیط کشت و بین pH × دما نیز در سطح 1 درصد معنی دار شد. مقایسه سرعت رشد میسلیوم در محیطهای کشت جامد نشان داد که بیشترین سرعت رشد(8.5 میلیمتر در روز) در محیطهای دست ساز بدست آمد و کمترین سرعت رشد(6.2 میلیمتر در روز) در محیط کشت تجاری MEA مشاهده شد. افزایش دما از 25 به 27 درجه منجر به کاهش معنی داری در سرعت رشد گردید. افزایش pH از 4.5 به 6.5 نیز منجر به کاهش رشد گردید و بیشترین سرعت رشد در pH =4.5 مشاهده شد. در محیط کشت مایع نیز تاثیر نوع محیط کشت و pH در سطح 5 درصد معنی دار بود. بیشترین وزن میسلیوم در محیط مایع متعلق به محیط های دست ساز بود و برعکس آزمایش اول، بهترین عملکرد میسلیوم در pH=5.5 بدست آمد.

1-2- تولید میوه قارچ شی‌تاکه

مطالعه تاثیر ترکیبات مختلف سوبسترا بر فرایند میوه دهی قارچ شی تاکه:

در این بخش از تحقیق در یک طرح بلوک کاملا تصادفی چهار فرمول بستر کاشت شامل:1)خاک اره، سبوس گندم، ارزن 2)خاک اره، سبوس برنج، ملاس،گچ و سوپر فسفات کلسیم 3)خاک اره، سبوس گندم و تفاله چای 4)خاک اره، ساکارز، اسید سیتریک،گچ و کربنات کلسیم بر فرآیند میوه دهی، عملکرد، عملکرد بیولوژیکی، میانگین تعداد و وزن هر قارچ با 6 تکرار بررسی شد. نتایج این بررسی‌ها نشان داد که آغاز میوه‌دهی در فرمول سوبسترای 1 بسیار زودتر (58 روز از تلقیح تا تولید میوه) از بقیه فرمول ها رخ داد. همچنین این فرمول سبب بیشترین عملکرد(112/3گرم در هر کنده) و عملکرد بیولوژیکی(35 درصد) در بین سایر فرمول های سوبسترای مورد بررسی داشت. تعداد قارچ نیز در فرمول سوبسترای 1 بیشترین مقدار (16.6 در هر کنده) بود. لازم به ذکر است که بین فرمول های سوبسترای 1 و 2 از لحاظ خصوصیات اندازه گیری شده، اختلاف معنی داری وجود نداشت. بیشترین میانگین وزن قارچ متعلق به فرمول سوبسترای 4 با 14.3 گرم قارچ بود.

2-آزمایش دوم : قارچ گانودرما

قارچ *Ganoderma lucidum* و گونه‌های مربوط به آن کاربردهای تاریخی طولانی در زمینه اهداف دارویی دارند که قدمت آن حداقل به 4 هزار سال قبل (عصرطلایی) بر می‌گردد. میوه این قارچ در ژاپن به ریشی یا مانتاکه (قارچ 10000 ساله) و در چین و کره به نام‌های لینگ چی، لینگ چو و لینگ زی (قارچ‌های جاودانه و مرگ ناپذیر) معروف است. این قارچ به عنوان محافظ در برابر سرطان بوده و سمبل شادی، خوش شانسی، سلامتی، طول عمر و جاودانگی می باشد. بالغ بر 300 گزارش در مورد ترکیبات موجود در این قارچ و گونه‌های مربوط به آن وجود دارد. میوه، میسلیوم و اسپور حاوی 400 ترکیب مختلف مواد مؤثره هستند که به طور عمده شامل تری ترپن‌ها' پلی ساکاریدها، نوکلئوتیدها، استرول‌ها، استروئیدها، اسیدهای چرب، پروتئین‌ها و همچنین عناصر به میزان کم هستند. متابولیت‌های ثانویه زیادی در میسلیوم پرورش یافته در کشت‌های غوطه ور وجود دارد، گرچه محققین توجه عمده‌ای به میوه به عنوان منبعی برای استخراج مواد مؤثره دارند. مشخص شده است که متابولیت‌های میوه اغلب شبیه متابولیت‌های میسلیوم پرورش یافته در کشت غوطه ور نبوده، بلکه ممکن است تحت تأثیر مراحل مختلف توسعه (رشدی) باشند. بنابراین بررسی تمام مراحل رشدی گانودرما برای ترکیبات مواد مؤثره مفید و ضروری میباشد. بیش از ده نوع پلی ساکارید از میوه، اسپور و میسلیوم جدا شده‌است. پلی ساکاریدهای گانودرما شامل بتا-دی گلوکان' هترو پلی ساکاریدها و گلیکو پروتئین‌ها هستند که اثرات درمانی آن‌ها بررسی شده‌است. اکثر پلی ساکاریدهای جدا شده از این قارچ شامل گلوکان‌ها، بتا-1-3 و بتا-1-6 گلوکان می‌باشند. مشخص شده‌است که این پلی‌ساکاریدها می توانند سرطان را درمان کنند و باعث تقویت سیستم ایمنی بدن گردند. این ترکیبات علاوه بر درمان سرطان، ویژگی‌های ضد ویروسی، التهاب، دیابت، فشار خون بالا و جلوگیری از لخته شدن خون را نیز دارند. حداقل 140 نوع تری ترپن مختلف در گانودرما لوسیدوم گزارش شده‌است.

آزمایشات این بخش در قالب 4 قسمت تقسیم بندی شد. قسمت اول، تعیین بهترین محیط کشت جامد به منظور تولید میسلیوم با کیفیت بالا جهت استفاده در مرحله تولید اسپاون قارچ گانودرما بود. در بخش دوم به بررسی بسترهای مختلف و همچنین تعیین دمای بهینه در تولید اسپاون پرداخته شد. در بخش سوم این تحقیق به بررسی تولید پلی ساکارید های برون سلولی پرداخته شده و در بخش آخر تولید میوه قارچ گانودرما مورد بررسی قرار گرفت.

2-1- رشد میسلیوم

در این بخش از تحقیق، اثر محیط کشت‌های مختلف شامل محیط‌های تجاری PDA و MEA (20 گرم عصاره مالت، 15 گرم آگار) و MYA (23 گرم عصاره مالت، 4گرم عصاره مخمر، 16 گرم آگار) و همچنین محیط‌های تغییر یافته PDA-Y (39گرم PDA، 5 گرم عصاره مخمر) ، MYA-G (2 گرم عصاره مالت، 2گرم عصاره مخمر، 20 گرم آگار، 10 گرم گلوکز)، MYA-GP (3 گرم عصاره مالت، 3گرم عصاره مخمر، 20 گرم آگار، 10 گرم گلوکز، 5 گرم پپتون) بر بیومس میسلیوم قارچ گانودرما بررسی شد. به منظور تهیه محیط کشت‌های حاوی عصاره‌های خاک اره و کاه و کلش، خاک اره‌ها و کاه و کلش مذکور هر کدام به طور جداگانه در یک لیتر آب مقطر جوشانده شده و سپس صاف کرده و به حجم یک لیتر رسانده شد. نهایتاً 39 گرم محیط کشت PDA به هر کدام از عصاره‌ها اضافه گردید.

نتایج این آزمایشات نشان داد که اختلاف معنی داری در سرعت رشد و وزن خشک میسلیوم در بین بسترهای مختلف وجود دارد. با مقایسه بسترهای مختلف مشاهده شد که بستر MYA با تولید 6.77 گرم وزن خشک میسلیوم در یک لیتر محیط کشت (g DW/l)، بالاترین وزن خشک میسلیوم را تولید کرده و بستر PDA-Y (4.42 g DW/l) در مرحله بعدی حایز اهمیت می باشد

(نمودار1). بین محیط‌های PDA ، MEA وMYA-G از لحاظ وزن میسلیوم تفاوت معنی‌داری وجود نداشت. در بین بسترهای مختلف، حداکثر سرعت رشد با 4.89 میلی‌متر در روز در بستر MYA مشاهده گردید و بعد از آن محیط MEA با سرعت رشدی (3.89 mm/day) در رتبه دوم قرار گرفت.

اثر محیط کشت‌های مختلف جامد بر وزن خشک میسلیوم قارچ گانودرما

2-2-تولید اسپاون

کیفیت اسپاون در تولید موفقیت آمیز قارچ های دارویی نقش مهمی ایفا می کند. در این تحقیق ابتدا به منظور تعیین دمای بهینه برای رشد میسلیوم قارچ گانودرما، 4 بستر پایه به طور جداگانه شامل بذور گندم، جو، ارزن و تراشه چوب درخت روس در دو دمای c˚ 1±25 وc˚ 1±29 مورد بررسی قرار گرفتند. در مرحله دوم از تولید اسپاون، به منظور دستیابی به بستر مناسب برای رشد میسلیوم این قارچ، از بذور غلاتی مانند گندم، جو و ارزن با نسبت‌های مختلفی از سبوس گندم (10، 20 و 30%)، تراشه چوب روس (20، 30، 50 و 60%) و پوست ارزن (20، 40 و 60%) مخلوط شدند و هر کدام از مخلوط ها جداگانه مورد بررسی قرار گرفت. در آزمایش تعیین دمای بهینه، بالاترین سرعت رشد میسلیوم (8.92 mm/day) زمانی حاصل شد که از بستر گندم در دمای c˚ 1±29 استفاده شد. در مرحله دوم آزمایش، نتایج نشان داد که بالاترین سرعت رشد میسلیوم برای هر کدام از غله های گندم و جو، توسط تیمار10% سبوس گندم (به ترتیب 9.65mm/day و mm/day 9.26) و برای ارزن، توسط تیمار 20% تراشه چوب روس (8.96 mm/day) بدست آمد. در مجموع تیمار 10 درصد سبوس گندم به همراه غله گندم، بهترین ترکیب برای تولید اسپاون این قارچ معرفی شد.

2-3-بهینه سازی تولید پلی ساکارید های برون سلولی

این بخش از تحقیق به منظور معرفی محیط کشت غوطه ور جهت تولید بهینه بیومس میسلیومی و پلی ساکارید برون سلولی در قارچ گانودرما انجام گردید. اثر منابع مختلف کربن (گلوکز، لاکتوز و مالتوز) و غلظت آنها(40, 50 و 60 گرم بر لیتر) و اسیدیته (3.5, 4.5 و 5.5) بر این صفت بررسی شد. آزمایشها به صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک های کامل تصادفی به اجرا در آمد. نتایج بدست آمده نشان داد که بیشترین بیومس میسلیومی (8.58 گرم در لیتر) توسط قند مالتوز و کمترین آن (4.95 گرم در لیتر) با کاربرد گلوکز حاصل شد. همچنین در بین منابع کربن، مالتوز با تولید 1.55 گرم در لیتر بیشترین پلی ساکارید را تولید کرد و کمترین پلی ساکارید توسط قند لاکتوز بدست آمد. با مقایسه ترکیب های مختلف بستر کشت غوطه ور قارچ گانودرما مشخص شد که بهترین ترکیب برای تولید بیومس میسلیومی قند مالتوز (غلظت 50 گرم در لیتر) و اسیدیته برابر 4.5 است در حالیکه بهترین تیمار برای تولید پلی ساکارید برون سلولی قند مالتوز (40 گرم در لیتر) و اسیدیته برابر 3.5 بود.

2-4-تولید میوه

در این تحقیق اثر خاک اره، عصاره مالت، و سبوس گندم بر عملکرد، کارایی بیولوژیکی (BE)، و رشد قارچ گانودرما مورد بررسی قرار گرفت. سه نوع خاک اره (راش، صنوبر و ممرز) به عنوان محیط پایه با دو سطح از سبوس گندم (5٪ و 10٪ وزنی وزنی) و عصاره مالت (2.5٪ و 5٪ وزنی وزنی) به عنوان مکمل محیط کشت برای تولید میوه این قارچ مخلوط شد. این آزمایش بصورت فاکتوریل بر پایه طرح کاملا تصادفی با سه تکرار اجرا شد. نتایج نشان داد که انواع مختلف خاک اره بر باردهی, عملکرد بیولوژیکی و نرخ رشد میسلیوم بطور معنی داری موثر است. بیشترین میزان باردهی (102.58گرم در کیلوگرم) و بیشترین عملکرد بیولوژیکی(12.89درصد) با استفاده از ممرز با بدست آمد. خاک اره راش منجر به تحریک رشد میسلیوم بیش از انواع دیگر خاک اره گردید. مقایسه نهایی از فرمول های مختلف نشان می دهد که بهترین ترکیب برای عملکرد بالا (142.44 گرم / کیلوگرم) و (18.68٪) در ترکیبی از خاک اره صنوبر با 5درصد عصاره مالت و 10درصد سبوس گندم به دست آمد. بالاترین رشد میسلیوم (10.6 میلی متر / در روز) در ترکیبی از خاک اره راش با 2.5 درصد عصاره مالت و 10درصد سبوس گندم به دست آمد

3- آزمایش سوم: قارچ موناسکوس

در این بخش تاثیر غلظتهای مختلف ساکارز، نیترات سدیم و سولفات روی بر میزان تولید رنگینه توسط موناسکوس پرپورئوس مورد بررسی قرار گرفت. در سال‌های اخیر توجه به پرورش قارچ موناسکوس پرپورئوس افزایش یافته است. در این پژوهش میزان تولید رنگینه و بیوماس توسط موناسکوس پرپورئوس (DSMZ 1603) با استفاده از سه سطح نیترات سدیم(1.5 ، 3 و 4.5 گرم در لیتر) 5 سطح ساکارز (، 150 ،125 ،100 75 و 175 گرم در لیتر) در قالب طرح فاکتوریل و پنج سطح سولفات روی(0، 5، 10، 15، 20میلی‌گرم در لیتر) در قالب طرح کاملاً تصادفی بررسی شد. تیمارهای کشت شده در محیط مایع درون انکوباتور شیکردار در دمای 25 درجه سانتی‌گراد و 120 دور در دقیقه قرار گرفتند. براساس نتایج، تولید رنگینه‌ها با افزایش سطح ساکارز به‌طور معنی‌داری افزایش یافت اما با افزایش سطح نیترات سدیم افزایش معنی‌داری نداشت. بیشترین تولید رنگینه درسطح 175گرم در لیتر ساکارز همراه با3 گرم در لیتر نیترات سدیم، مشاهده شد. علاوه بر این بیشترین مقدار بیوماس در غلظت 175گرم در لیتر ساکارز همراه با 4,5 گرم در لیتر نیترات سدیم مشاهده گردید. همچنین نتایج نشان داد، تولید رنگ با افزایش سطح سولفات روی به طور معنی‌داری کاهش می‌یابد به طوری که بیشترین مقدار تولید رنگینه‌ها در تیمار بدون سولفات روی به دست آمد.

کشت در بیوراکتور:

به منظور اقتصادی نمودن تولید مواد موثره این قارچ آزمایشاتی با کشت این قارچ در بیوراکتور ادامه یافت. در این بخش مشخص گردید که امکان رشد و تولید رنگیزه قارچ موناسکوس در بیوراکتور وجود دارد. به منظور بهینه سازی تولید رنگیزه از روش پاسخ سطح(RSM) استفاده گردید و نتایج این تحقیق بزودی منتشر خواهد شد.

تشکر و قدردانی:

این پژوهشها با همکاری تعدادی از دانشجویان کارشناسی ارشد دانشگاه فردوسی مشهد و نیز همکاران پژوهشکده اقبال جهاد دانشگاهی مشهد به شرح ذیل انجام گردیده است که بدینوسیله از آنها تشکر و قدردانی میگردد.

سرکار خانم مهندس لیلا رازقی, مریم توانا, فاطمه بانشی از دانشگاه فردوسی مشهد

مهندس صابر نجفی, مهندس خلیل ملک زاده و سرکار خانم مهندس شادی شاه طهماسبی همکاران جهاد دانشگاهی مشهد.

منابع

Majid Azizi, Maryam Tavana, Mohammad Farsi, & Fatemeh Oroojalian **(2012).** Yield Performance of Lingzhi or Reishi Medicinal Mushroom, Ganoderma lucidum (W.Curt.:Fr.) P. Karst. (Higher Basidiomycetes), Using Different Waste Materials as Substrates**.** ***International Journal of Medicinal Mushrooms,* 14(5): 521–527.**

لیلا رازقی یدک , **مجید عزیزی**, محمد فارسی(1389) مطالعه تاثیر ترکیبات مختلف سوبسترا بر فرایند میوه دهی قارچ شی تاکه ,(اولین گزارش تولید قارچ شی تا که در ایران). مجله پژوهشهای زراعی ایران، جلد 8 شماره 3 ص 501-507.

مجید عزیزی, سمیه توانا , فاطمه بانشی , محمد فارسی, (1390) بهینه سازی ترکیب بستر کشت غوطه ور قارچ دارویی گانودرما به منظور افزایش تولید بیومس میسلیومی و پلی ساکارید برون سلولی , تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران ، جلد 28 شماره 3 ص 1-8.