Assessment of nutrient elements, chemical composition, and antioxidant activity of *Ganoderma lucidum*

Introduction

Ganoderma lucidum is a high medicinal value mushroom have been widely used in the Far East countries especially in traditional Chinese medicine as promoting human health and treatment of many diseases. Nowadays, many published studies have established it contains a high source of nutraceutical and pharmaceutical substances with potent and unique properties as immune suppressors, hypercholesterolemic agents, or coadjutant treatments in diseases such as cancer, hypertension, insomnia, anorexia, dizziness, and chronic hepatitis, among others. This species is rich in several bioactive compounds (over 400 compounds) mainly, including polysaccharides, triterpenoids, steroids, fatty acids, amino acids, nucleotides, proteins, and alkaloids. Herein, the fruiting bodies of *G. lucidum* were studied in terms of nutritional value and chemical composition analysis. and further assessment of antioxidant activity of extracts from the fruiting body.

Materials and methods

In order to detection of nutrient elements, the samples were homogenized by microwave digestion (Milestone Ethos, Germany) with 1000 W maximum power and further characterized using Inductively coupled plasma optical emission spectroscopy (ICP-OES). Biochemical molecule contents were characterized using Acquity Ultra-Performance Liquid Chromatograph (UPLC, Waters) coupled to a photodiode array detector (PDA, Waters) and an electrospray ionization quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometer (ESI–QTOF/MS; Waters). In order to assess antioxidant activity, two kinds of extract including methanol 80 % (ME) and hot water (HWE) as solvent were prepared by ultrasonic method. Six different in vitro assays are used for the determination of antioxidant capacity including ABTS, DPPH, superoxide (SO), nitric oxide (NO) free radicals scavenging, iron-reducing power (FRAP), and iron chelating activity (ICA). The data were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) and the means were separated by the Newman-Keuls Multiple Comparison test (GraphPad Prism 8, San Diego, CA, USA)). All data were expressed as mean ± standard deviation. $P \leq 0.05$ values or less were considered to indicate a statistically significant difference. Furthermore, Half-maximum inhibitory concentration (IC50) values for each assay were calculated from linear or logarithmic regression using Excel software.

Results and Discussion

G.lucidum was characterized in terms of nutritional value and chemical composition. Generally, to study the nutraceutical value of *G.lucidum*, 14 elements were analyzed by ICP-OES. Amongst the macronutrient group, phosphorus and potassium (2910.8 and 1510.8 mg/kg dry matter) and in the micronutrient iron and zinc (8.5 and 7.74 mg/kg dry matter) have the highest amounts, respectively. In terms of biochemical compounds, totally 37 compounds were identified in which Ganoderic acid was observed as most abundant (15890.1 ± 232.1 µg per g dry matter) followed by Sinapic acid and Succinic acid (2011.4 ± 28.11 and 1505.33 ± 31.5 µg per g dry matter) were the predominant compounds. The results of antioxidant assays clearly revealed that, the methanolic extract proved to have higher

antioxidant potential than one corresponding hot water extract for all assays. In ABTS radical scavenging activity assay, ME with the best antioxidant activity (IC50,48.46±2.42 µg/ml) had a higher activity which was significantly different ($P \leq 0.05$) from HWE (163.51±4.51 µg/ml). For DPPH assay, radical scavenging capacity was dose-dependent and IC50 values of ME (111.93±1.39 µg/ml) and HWE (213.48±5.42µg/ml) was a significant difference ($P \leq 0.05$). In FRAP assay, The highest level of iron-reduction was observed in the highest level of ME(IC50, 308.13±4.13 µg/ml). This extract had higher iron-chelating activity (IC50, 671.75±5.66 µg/ml) as well. These values in both assays were significantly more potent than HWE ($P \leq 0.01$). In SO assay, ME extract (IC50, 488.8±7.38 µg/ml) and HWE (IC50, 645.92±5.48 µg/ml) showed no difference significantly. In addition, in the NO assay, both extracts released slight weak activity for neutralization of nitric oxide radicals, however, the highest activity level was related to ME (IC50, 1189.5±8.5 µg/ml) in comparison to HWE (IC50, 1343.2±10.6 µg/ml) that was significant ($P \leq 0.01$). The results clearly indicate that different solvents used in this study significantly affected antioxidant capacities and total biochemical contents.

Conclusion

G. lucidum, as a high medicinal value mushroom, proved is a very important source of nutrients and antioxidant compounds such as terpenoids, especially triterpenoids, and polysaccharides. The free radical scavenging properties, reducing power and iron-chelating inhibition of G. lucidum seemed to be correlated with phenolic compounds and triterpenoids mostly. Therefore, based on the nutritional and biochemical profile of *G. lucidum*, and also its antioxidant power, this mushroom possesses a high nutrient potential that reflects positively on its health benefits.

Keywords: Ganoderma lucidum, Antioxidant, Nutrient elements, Phenolic compounds, Ganoderic acid

ارزیابی محتوای عناصر غذایی، ترکیبات بیو شیمیایی و فعالیت آنتی اکسیدانی قارچ دارویی گانودرما لوسیدوم(*Ganoderma lucidum*)

ژاله زندوی فرد- مجید عزیزی*- مجید درودی-آذر حسینی

azizi@um.ac.ir-*

چکیده: قارچ دارویی گانودرما لوسیدوم یکی از مهمترین قارچ های دارویی در سرتاسر جهان است که حاوی طیف وسیعی از ترکیبات دارویی ارزشمند است. این مطالعه به منظور بررسی میزان عناصر غذایی، محتوای ترکیبات بیوشیمیایی و فعالیت آنتی اکسیدانی این قارچ طراحی شده است. محتوای عناصر غذایی اندام بارده این قارچ با دستگاه اسپکترومتری نشری پلاسمای جفت شده القائی(ICP-OES) و محتوای ترکیبات بیوشیمیایی آن با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی با کارایی فوق العاده بالا مجهز به طیف سنج جرمی (UPLC-MS) آنالیز شد. به منظور بررسی قدرت آنتی اکسیدانی عصاره گیری به روش التراسونیک با استفاده از دو حلال متانول و آب داغ صورت گرفت و فعالیت آنتی اکسیدانی با شش روش شامل اندازه گیری فعالیت مهار رادیکال آزاد ۱،۱-دی فنیل-۲-پیکریل هیدرازیل(DPPH)، رادیکال ۲،۲-آزینوبیس(۳-اتیل بنزو تیازولین-۶-سلفونیک اسید) (ABTS)، رادیکال سوپراکساید(SO)، رادیکال نیتریک اکساید(NO) و قدرت احیای آهن(FRAP) و قدرت شلاته کنندگی آهن(ICA) مورد ارزیابی قرار گرفتند. آنالیز واریانس یک سویه و متعاقب آن نیومن کولز توسط نرم افزار گراف پد پریزم ۸ به منظور مقایسه میانگین ها به کار رفت. نتایج حاکی از آن بود که عناصر فسفر و پتاسیم(۲۹۱۰/۸ و ۱۵۱۰/۸ میلی گرم در کیلوگرم ماده خشک) به ترتیب بیشترین مقدار از درشت مغذی ها و عناصر آهن و روی (۸/۵ و ۷/۷۴ میلی گرم در کیلوگرم ماده خشک) سهم قابل توجه ای از ریز مغذی ها را به خود اختصاص دادند. محتوای کلی ترکیبات بیوشیمیایی شامل ۳۷ ترکیب شناخته شده قابل توجه بود که در آن گنودریک اسید با بیشترین مقدار(۲۳۲/۱ ± ۱۵۸۹۰/۱ میکرو گرم در گرم ماده خشک) و به دنبال آن سیناپیک اسید و سوکونیک اسید (۲۸/۱۱ ± ۲۰۱۱/۴ و ۳۱/۵ ± ۱۵۰۵/۳۳ میکرو گرم در گرم ماده خشک) به عنوان ترکیبات غالب قرار گرفتند. به طور کلی هر دو عصاره آبی و متانولی، ظرفیت آنتی اکسیدانی قابل توجهی را در مهار رادیکال های آزاد DPPH، ABTS، SO، NO و همچنین قدرت احیا کنندگی و شلاته کنندگی آهن نشان دادند که این پتانسیل در یک رفتار وابسته به غلظت بیشتر نمایان شد. اگرچه عصاره متانولی در همه تست ها قدرت آنتی اکسیدانی بالاتری نسبت به عصاره آب داغ نشان داد(مقدارIC50 پایین تر). با این وجود هر دو عصاره حاوی طیفی از ترکیبات زیست فعال قارچ هستند که قدرت آنتی اکسیدانی آنها را تضمین می کند. با توجه به نتایج حاصل، قارچ گانودرما لوسیدوم پتانسیل قابل توجهی از نظر محتوای عناصر غذایی، ترکیبات زیست فعال و قدرت آنتی اکسیدانی به منظور کاربرد در صنایع غذایی و دارویی دارد.

واژه های کلیدی: گانودرما لوسیدوم، آنتی اکسیدان، ترکیبات فنولی، عناصر غذایی، گنودریک اسید

مقدمه:

با توجه به گرایش روز افزون بشر به استفاده از ترکیبات طبیعی، قارچ‌ها نیز به عنوان یکی از منابع زیستی مهم با ارزش غذایی بالا و متابولیت‌های ثانویه منحصر به فرد، به منظور تولید فرمول های دارویی جدید بیش از پیش مورد توجه جوامع علمی قرار گرفته اند(۲۱).

در این میان قارچ گانودرما لوسیدوم با کاربردهای تاریخی چندهزار ساله به منظور اهداف درمانی، شهرت زیادی در سراسر جهان دارد. این قارچ با نام علمی *Ganoderma lucidum (Fr.) Karst* یک بازیدیومایست[1] متعلق به راسته پلی پورالس[2] و خانواده گنودرماتاسه[3] می‌باشد(۸) این قارچ، به رنگ‌های قرمز، قرمز مایل به قهوه ای و زرد روشن در سراسر جهان از آمازون تا مناطق جنوبی آمریکای شمالی و قسمت‌های وسیعی از آسیا یافت می‌شود(۳۶).

استفاده از این قارچ در کشورهای خاور دور خصوصاً ژاپن، چین وکره به منظور پیشگیری و درمان بیماری های مختلف و اقزایش طول عمر به بیش از ۲۰۰۰ سال پیش برمی گردد(۴۴). مطالعات فارماکولوژیک اخیر نشان می دهد که گانودرما لوسیدوم دارای خواص ضد التهابی، آنتی اکسیدانی، تعدیل کننده سیستم ایمنی، ضد دیابت، کاهنده کلسترول و فشار خون، ضد سرطان و ضد ویروس است(۸) گزارش های متعددی در مورد ترکیبات اصلی این قارچ که مسئول خواص درمانی آن هستند تاکنون به چاپ رسیده است. اندام بارده، میسلیوم و اسپور آن، به عنوان منابع تولید مواد مؤثره حاوی بیش ۴۰۰ ترکیب بیولوژیکی فعال هستند که به طور عمده شامل تری‌ترپن‌ها(به ویژه گنودریک اسید)، پلی‌ساکاریدها، پروتئین‌ها، فنول ها، نوکلئوتیدها، استروئیدها، اسیدهای چرب، و همچنین عناصر به میزان کم هستند(۵). همچنین مشخص شده است که گانودرما لوسیدوم دارای ارزش غذایی بالایی است، به عنوان مثال پلی ساکاریدها(۲۸-۳۰٪)، پروتئین ها (۱۸-۲۰٪)، کربوهیدرات ها (۱۰-۱۲٪)، چربی ها (۲-۴٪)، به علاوه مقادیر بالای فیبر و مواد معدنی دارد(۲۶).

اگرچه تری‌ترپن‌ها(به ویژه گنودریک اسید) و پلی ساکاریدها به عنوان مهم ترین ترکیبات این قارچ با خواص ضد سرطان شناخته شده اند و در کشت‌های درون شیشه ای علیه تومورهای سرطانی (۲۳) و برخی بیماری‌های دیگر نظیر ایدز(۱۳) نتایج بسیار رضایت بخشی نشان داده اند، اما مطالعات اخیر نشان می دهد که بخشی از اثرات مفید گانودرما

[1] Basidiomycete
[2] Polyporales
[3] Ganodermataceae

بر سلامتی انسان را می توان به نقش ترکیبات آنتی اکسیدان آن در پیشگیری و کنترل بیماری هایی نظیر بیماری قلبی و سرطان نسبت داد، که آسیب تخریبی ناشی از فعالیت رادیکال های آزاد را کاهش می دهد(۸).

در بسیاری از موجودات زنده اکسیداسیون یک امر ضروری به منظور فراهم کردن انرژی مورد نیاز برای فرایندهای فیزیولوژیکی هست. با این وجود گاهاً عوامل خارجی از جمله فاکتورهای زیست محیطی منجر به تولید رادیکال های آزاد و سایر گونه های فعال اکسیژن در میتوکندری می شوند است که تأثیر آن برهم زدن تعادل بین آنتی اکسیدان ها و رادیکال های آزاد است. بدن انسان به طور مداوم تحت تأثیر استرس اکسیداتیو است که منجر به ایجاد بیماری های قلبی- عروقی ، اختلالات عصبی، اختلالات کلیوی، اختلالات کبدی، فشار خون، ، سندرم دیسترس تنفسی بزرگسالان، بیماری خود ایمنی، دیابت، اوتیسم، آلزایمر، پارکینسون، هانتینگتون، زخم معده، هموکروماتوز و پره اکلامپسی میگردد(۳۴).

رادیکال های آزاد در واقع اتم، مولکول یا یونی با الکترون جفت نشده است. در نتیجه بسیار ناپایدار و فعال برای واکنش های شیمیایی با مولکول های دیگر هستند. اکسیژن، نیتروژن و سولفور سه عنصر تشکیل دهنده رادیکال های آزاد هستند که به ترتیب ذرات فعال اکسیژن (ROS)،گونه های فعال نیتروژن (RSS)و ذرات فعال سولفور (RNS)را تولید می کنند(۲۴). آنتی اکسیدان ها ترکیباتی هستند که می توانند از تولید رادیکال ها آزاد و پرواکسیدانت ها با دو سیستم آنزیمی و غیرآنزیمی مهار یا جلوگیری می کنند(۶). آنتی اکسیدان های آنزیمی مانند آنزیم سوپراکساید دیسموتاز، کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز به طورغیرمستقیم رادیکال های آزاد را خنثی می کند. آنتی اکسیدان های غیرآنزیمی شامل ویتامین های A و E و ترکیباتی چون سلنیم و روی، کوفاکتورهای آنزیمی و پپتیدها مانند گلوتاتیون هستند(۹ و۱۱). فنول ها گروهی از ترکیبات آنتی اکسیدان موجود در گیاهان هستند خاصیت آنتی اکسیدانی این ترکیبات مربوط به گروه های هیدروکسیل فنولیک واقع در ساختار حلقوی است و به عنوان اهداءکننده هیدروژن، سرکوب کننده اکسیژن یگانه، مهارکننده رادیکال های آزاد سوپراکساید و شلاته کننده فلزات عمل می کنند .فنول ها همچنین آنزیم های آنتی اکسیدان را فعال می کنند و سبب کاهش توکوفرول، بازداری اکسیدازها و α- رادیکال های آزاد افزایش سطح اسید اوریک می شوند(۴۰). گزارش های موجود حاکی از آن است که مهار رادیکال های آزاد، کاهش قدرت و مهار پراکسیداسیون لیپیدی توسط گانودرما لوسیدوم با ترکیبات فنولی این قارچ در ارتباط بوده است(۳۷) ترکیبات فنولی گانودرما لوسیدوم به طور گسترده مورد مطالعه قرار گرفته اند و اسیدهای فنولیک شامل اسیدهای کلروژنیک، سینامیک، گالیک، پروتوکاتچوئیک، پی-هیدروکسی بنزوئیک و پی-کوماریک برجسته ترین آنها هستند که مسئول خواص آنتی اکسیدانی، ضد میکروبی و ضد التهابی این قارچ هستند (۲۷ و ۳۹). گزارش های متعددی بر خواص آنتی اکسیدانی گانودرما با عصاره متانولی (۱۴، ۱۶ و ۱۸) عصاره اتانولی (۶ و ۳۲) و همچنین عصاره آبی (۱۴ و ۱۹) تمرکز کرده اند که نشان می دهد خاصیت مهارکنندگی رادیکالهای آزاد مربوط به وجود پلی ساکاریدها و ترکیب های فنولی این قارچ است. اگرچه گانودرما لوسیدوم منبع قوی از ترکیبات فنلی نیست برخی تحقیقات گزارش کردند که این ترکیبات بیشترین نقش را در فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره دارد.

از آنجا که نوع حلال تاثیر قابل توجهی بر دینامیک فرایند استخراج و ترکیب شیمیایی عصاره دارد. بنابراین می توان پارامترهای استخراج را به منظور دستیابی به عصاره با ترکیبات دلخواه بهینه سازی کرد. مطالعات قبلی نشان می دهد که عصاره متانولی قارچ گانودرما پتانسیل آنتی اکسیدان بالاتری در مقایسه با عصاره آبی دارد (۳۰) با این وجود متانول بسیار سمی است و حلال مناسبی برا عصاره به منظور کاربرد در صنایع غذایی محسوب نمی شود. اگرچه دانش در

مورد ترکیب شیمیایی قارچ بسیار مهم است، اطلاعات در مورد شرایط استخراج بهینه و ترکیباتی که عمدتا در پتانسیل آنتی اکسیدانی عصاره نقش دارند محدود است(۶ و۳۱) .

گانودرما لوسیدوم به طور طبیعی در زیستگاه های خود کمیاب است، از طرفی دیگر به دنبال فواید ارزشمند اثبات شده ای که برای سلامتی انسان دارد، صنایع غذایی و دارویی در سرتاسر جهان در حال عرضه فرمولاسیون های مختلف از این قارچ عمدتا به عنوان مکمل غذایی، شربت،چای و قهوه با ارزش سالانه بیش از ۲,۵ میلیارد دلار در بازار جهانی هستند. . از این رو کشت مصنوعی آن به طورگسترده در سراسر جهان به خصوص در کشورهای آسیایی رو به افزایش است(۲۲ ، ۲۶ و۴۲). برخی مطالعات انجام شده، تاثیر شرایط پرورش قارچ بر کمیت و کیفیت ترکیبات فعال موجود در آن را به عنوان یک عامل بسیار مهم گزارش کرده اند(۳۵). طبق پژوهشی که صورت گرفته است مقادیر پروتئین خام، کربوهیدرات، فیبر خام از نمونه رشد بافته تحت کشت مصنوعی نسبت به نمونه جمع آوری شده بیشتر است(۴۴).

از آنجا که سیستم های دفاعی برای جلوگیری از آسیب اکسیداتیو به طور کلی ناکافی هستند. تلاش برای یافتن مواد غذایی با پتانسیل آنتی اکسیدانی بالا، همیشه یکی از متداولترین و پویاترین زمینه پژوهشی است. در پژوهش حاضر قارچ گانودرما لوسیدوم پرورش یافته در شرایط مصنوعی از نظر ارزش عناصر غذایی، ترکیبات بیوشیمیایی و فعالیت آنتی اکسیدانی علیه انواع گونه های رادیکال آزاد از قبیل DPPH، ABTS ، سوپراکساید، نیتریک اکساید، قدرت شلاته کنندگی آهن و قدرت احیا کنندگی مورد بررسی قرار گرفت. از آنجاییکه کاربرد حلال های گوناگون طی استخراج، منجر به جداسازی طیف ترکیبات مختلف با غلظت های متفاوت می گرد، به منظور بررسی بهتر اثر ترکیبات فعال این قارچ در مهار رادیکال های آزاد مختلف از دو سیستم حلال آبی و متانولی استفاده گردید.

مواد و روش ها

مواد شیمیایی:کلیه مواد استاندارد، معرف ها و حلال های شیمیایی از شرک مرک آلمان و شرکت سیگما-آلدریچ آمریکا تهیه گردیدند.

آنالیز عناصر غذایی: برای همگن سازی نمونه ها از دستگاه هضم مایکروویو (Milestone Ethos) ساخت کشور آلمان با حداکثر توان ۱۰۰۰ W استفاده شد. برای تشخیص عناصر از دستگاه اسپکترومتری نشری پلاسمای جفت شده القائی(ICP-OES) مدل (Avio 560 Max)ساخت شرکت پرکین المر کشور آلمان با مشعل ۲,۵ میلی متری استفاده شد.

آنالیز کروماتوگرافی ترکیبات بیوشیمیایی: تشخیص ترکیبات بیوشیمیایی با دستگاه کروماتوگرافی مایع با عملکرد فوق العاده بالا (UPLC,Waters) مجهز به طیف سنج جرمی (ESI–QTOF/MS; Waters) انجام گرفت. جداسازی کروماتوگراف با استفاده از ستون (C18, 100 mm × 2.1 mm, 1.7 µm, Waters UPLC® BEH) صورت گرفت. از دو فاز متحرک شامل فاز متحرک A (آب فوق خالص با فرمیک اسید ۰/۱ درصد) و فاز متحرک B (استونیتریل با فرمیک اسید ۰/۱ درصد) استفاده شد. ۱۰ میکرولیتر نمونه تزریق شد و در محدوده ۲۱۰ تا ۴۰۰ نانومتر آنالیز گردید.

مشخصات دستگاه میکروپلیت ریدر: به منظور قرائت جذب نمونه ها در پلیت ۹۶ خانه از دستگاه میکروپلیت ریدر مدل (SpectraMax Plus 384) ساخت کشور آمریکا استفاده گردید.

آماده سازی عصاره: اندام بارده قارچ گانودرما لوسیدوم نژاد Akitama-shiki از سالن پرورش قارچ واقع در مرکز گلخانه های تحقیقاتی گروه علوم باغبانی دانشگاه فردوسی مشهد تهیه گردید. به منظور تهیه عصاره ابتدا نمونه را کاملاً تمیز نموده و به منظور خشک کردن در آون با دمای ۴۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت نگه داری شد. سپس توسط آسیاب کاملاً پودر شده و از الک ۶۰ مش عبور داده شد. جهت تهیه عصاره متانولی، به مقدار ۲۰ گرم پودر حاصل ، ۳۰۰ میلی لیتر متانول ۸۰ درصد طی دو مرحله اضافه گردید و پس از قرارگیری در دستگاه سونیکاتور به مدت دو ساعت، به مدت یک شبانه روز در روتاری شیکر با دور ۱۲۰ rpm قرار داده شد. پس از آن عصاره با استفاده از پمپ خلا از کاغذ واتمن شماره ۴۰ عبور داده شد. سپس برای حذف حلال از دستگاه روتاری اواپراتور و در نهایت به منظور حذف کامل حلال از دستگاه خشک کن انجمادی استفاده گردید. پودر عصاره حاصل عصاره تا زمان انجام آزمایش ها در یخچال ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شد. به منظور تهیه عصاره آب داغ نیز ۲۰ گرم از پودر نمونه به ۳۰۰ میلی لیتر آب دیونیزه اضافه شد و سپس به مدت دو ساعت در بن ماری با دمای ۸۰ درجه سانتی گراد قرار داده شد. همچنین پس از دو ساعت قرارگیری در حمام التراسونیک به مدت یک شبانه روز در دمای آزمایشگاه روی روتاری شیکر قرار گرفت. تمامی مراحل ذکر شده جهت جداسازی حلال به طور همزمان برای عصاره آب داغ نیز صورت گرفت.

ارزیابی قدرت مهارکنندگی رادیکال (ABTS) :

جهت بررسی فعالیت رادیکال ABTS از روش آگستین و همکاران (۲) با اندکی تغییر استفاده شد. به منظور تهیه محلول کاری کاتیون ABTS ، ابتدا محلول های استوک شامل ABTS (۷ میلی مولار) و پتاسیم پرسولفات (۲/۴۵ میلی مولار) تهیه شده و سپس به میزان مساوی با یکدیگر مخلوط شدند. جهت انکوباسیون محلول حاصل به مدت ۱۲ تا ۱۶ ساعت در دمای اتاق و تاریکی قرار گرفت. سپس ۰/۵ میلی لیتر از محلول کاری ABTS را با ۴۴ میلی لیتر بافر استات رقیق نموده تا جذبی حدود ۰/۷۴±۰/۰۳ در طول موج ۷۴۳ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتری حاصل گردد. پس از تهیه غلظت های مختلف از هر عصاره جهت محاسبه IC50 ، میزان ۱۲ میکرولیتر عصاره و ۱۸۸ میکرولیتر محلول ABTS در ۴ تکرار به چاهک های پلیت ۹۶ خانه اضافه شدند. در این آزمایش از ترولوکس به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید. در انتها پس از گذشت ۳۰ دقیقه از انکوباسیون، جذب نوری پلیت ۹۶ خانه در طول موج ۷۴۳ نانومتر قرائت گردید و درصد مهارکنندگی با استفاده از رابطه زیر بدست آمد:

معادله شماره(۱) :

$$\text{درصد مهارکنندگی رادیکال} = [(\text{جذب نمونه-جذب کنترل})/(\text{جذب کنترل})] \times 100$$

نسخه پیش انتشار

ارزیابی قدرت مهارکنندگی رادیکال های ۱،۱-دی فنیل-۲-پیکریل هیدرازیل (DPPH) :

برای ارزیابی پتانسیل آنتی اکسیدانی از طریق مهار رادیکال های ۱،۱-دی فنیل-۲-پیکریل هیدرازیل طبق روش هوگان و همکاران(۱۵) انجام شد. بدین ترتیب که ابتدا محلول ۰/۱ میلی مولار DPPH در اتانول ۹۶ درصد تهیه شد. سپس ۱۳۰ میکرولیتر از محلول مذکور به ۲۰ میکرو لیتر از غلظت های مختلف عصاره های قارچ در چاهک های پلیت ۹۶ خانه ای اضافه شدند. از محلول ترولوکس به عنوان کنترل مثبت در این آزمایش استفاده شد. پس از آماده شدن پلیت به مدت یک ساعد در شرایط تاریکی و دمای اتاق قرار داده شد و در نهایت جذب هر چاهک در طول موج ۵۱۵ نانومتر توسط دستگاه میکروپلیت ریدر به ثبت رسید. درصد به دام اندازی رادیکال DPPH طبق معادله شماره(۱) محاسبه گردید.

ارزیابی قدرت احیاءکنندگی فریک (FRAP):

برای اندازه گیری پتانسیل آنتی اکسیدانی از طریق FRAP از روش کین و همکاران (۲۹) استفاده شد. بدین منظور ابتدا محلول کار FRAP به روش زیر تهیه گردید. میزان ۱۰ میلی لیتر بافر استات(۳۰۰ میل مول بر لیتر، پی اچ ۳/۶) را با را یک میلی لیتر محلول TPTZ محلول در اسیدکلریدریک(۴۰ میلی مولار بر لیتر) مخلوط شد. سپس به مخلوط حاصل، یک میلی لیتر محلول کلرید فریک (۲۰ میلی مولار بر لیتر) اضافه گردید و محلول فوق در حمام آبی به دمای ۳۷ درجه سانتی گراد رسانده شد. در نهایت، میزان ۷۵ میکرولیتر از محلول کاری به ۱۰ میکرولیتر از عصاره در چاهک های پلیت ۹۶ خانه اضافه گردید. پس از گذشت ۱۵ دقیقه انکوباسیون در تاریکی، جذب نمونه ها در طول موج ۵۹۳ نانومتر با استفاده از دستگاه میکروپلیت ریدر ارزیابی شد و داده ها به صورت معادل میلی مولار آهن دو ظرفیتی در گرم نمونه با استفاده از منحنی کالیبراسیون محلول سولفات آهن ($FeSO_4.7H_2O$) در محدود ۲۰۰ تا۲۰۰۰ میکرو مولار محاسبه شدند.

ارزیابی قدرت کلاته کنندگی آهن(ICA):

اندازه گیری قدرت کلاته کنندگی آهن با روش مقصود و بنجاکول(۲۵) انجام شد. به ۵۰ میکرو لیتر از غلظت های مختلف هر عصاره، ۵۰ میکرو لیتر محلول ۱ میلی مولار کلرید آهن دو ظرفیتی اضافه شد و پس از ۵ دقیقه محلول ۰/۶ میلی مولار فروزن اضافه شد. پس از ۱۵ دقیقه انکوبه شدن در دمای محیط، جذب مخلوط در طول موج ۵۶۲ نانومتر اندازه گیر شد. در این آزمایش EDTA به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد. درصد مهار تشکیل کمپلکس آهن-فروزین با کمک معادله شماره(۱) محاسبه شد.

ارزیابی قدرت مهارکنندگی رادیکال نیتریک اکساید(NO):

مهار رادیکال نیتریک اکساید با استفاده از روش بلاکریشنان و همکاران (۳) محاسبه گردید. بدین منظور ۵۰ میکرولیتر سدیم نیتروپروساید(۱۰ میلی مولار در بافر فسفات سالین با پی اچ ۷) به ۵۰ میکرولیتر از نمونه با غلظت های مختلف اضافه شد. پس از دو ساعت انکوباسیون در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد تحت روشنایی، ۲۵ میکرولیتر محلول گریس

به چاهک ها اضافه گردید(معرف گریس از مخلوط مقادیر مساوی از سولفونیل آمید یک درصد و نفتیل اتیلن دی آمین دی هیدروکلراید ۰/۱ درصد در فسفریک اسید ۲/۵ درصد بدست می آید). پس از گذشت ۳۰ دقیقه انکوباسیون در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد، جذب محلول در ۵۴۶ نانومتر اندازه گیری شد. درصد مهار طبق معادله شماره(۱) محاسبه گردید.

ارزیابی قدرت مهارکنندگی رادیکال سوپراکسید (SO):

فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز بر اساس روش بیر و فریدرویچ (۴) اندازه‌گیری شد. اساس اندازه‌گیری قدرت مهارکنندگی این رادیکال با احیای نوری نیتروبلوتترازولیوم (NBT) است. مقدار ۵۰ میکرولیتر از نمونه(در غلظت های مختلف) و ۱ میلی‌لیتر محلول واکنش در لوله‌های آزمایش ریخته شد و به‌منظور تهیه نمونه شاهد ۲۰ میکرولیتر آب مقطر و ۱ میلی‌لیتر محلول واکنش در لوله‌های مربوطه ریخته و لوله‌های آزمایش حاوی نمونه‌های تیماری و کنترل به‌مدت ۱۰ دقیقه در روشنائی حاصل از نور مصنوعی در یک اتاقک قرار گرفته شدند. سپس در طول موج ۵۶۲ نانومتر جذب نمونه‌ها قرائت و با استفاده از معادله شماره(۱) میزان درصد فعالیت مهارکنندگی برای هر نمونه محاسبه شد.

محاسبات آماری

تمام آزمونها سه بار تکرار گردیدند و نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار گزارش شدند. نتایج با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه و متعاقب آن نیومن کولز تحت نرم افزار PRISM نسخه ۸ مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. نتایج در سطح احتمال $P \leq ۰,۰۵$ از نظر آماری معنی دار فرض شدند. غلظت های مربوط به مقادیر IC50 از روی رگرسیون خطی یا لگاریتمی با استفاده از نرم افزار Excel محاسبه شد.

نتایج و بحث

ارزیابی محتوای عناصر غذایی و ترکیبات بیوشیمیایی: از دیدگاه غذایی، قارچ گانودرما لوسیدوم شامل مقادیر زیادی پروتئین ، فیبر ، عناصر غذایی، ویتامین ها شامل ویتامین های گروه B ، D ، E و C می باشد. نتایج آنالیز عناصر غذایی میوه قارچ گاتودرما با استفاده از دستگاه طیف سنج نشری پلاسمای جفت شده القایی (ICP-OES) در جدول شماره یک ارائه شده است. به طور کلی ۱۴ عنصر شامل درشت مغذی ها و ریز مغذی ها مورد بررسی قرار گرفتند. عنصر فسفر و پتاسیم(۲۹۱۰/۸ و ۱۵۱۰/۸ میلی گرم در کیلوگرم ماده خشک) به ترتیب بیشترین مقدار از درشت مغذی ها را به خود اختصاص داده اند. به دنبال آن عناصر کلسیم، منیزیم و سدیم در مقادیر(۴۷۹/۸، ۳۵۶/۵ و ۶۵/۵۸ میلی گرم در کیلوگرم ماده خشک)مشاهده شدند. عنصر آهن و روی (۸/۵ و ۷/۷۴ میلی گرم در کیلوگرم ماده خشک سهم قابل توجه ای از ریز مغذی ها را به خود اختصاص می دهند. ال شیخا(۹) به طور میانگین مقادیر درشت مغذی ها شامل پتاسیم، فسفر، گوگرد، منیزیم ، سدیم و کلسیم به ترتیب (۴۳۲، ۲۲۵ ، ۱۲۹ ، ۷/۹۵ ، ۲/۸۲ ، ۱/۸۸ میلی گرم

در ۱۰۰ گرم ماده خشک) و برای ریزمغذی ها شامل مس، منگنز، آهن و روی به ترتیب (۲۶، ۲۲، ۲/۲۲، ۰/۷ میلی گرم در ۱۰۰ گرم ماده خشک) گزارش کرده است.

جدول۱- آنالیز عناصر اندام بارده قارچ گانودرما توسط دستگاه اسپکترومتری

Table 1- Analytical view of the nutritional profile of *G.lucidium* Fruitbody by ICP-OES

عناصر Elements	غلظت بر حسب(میلی گرم/کیلوگرم) Concentration(mg/kg)
P	2910.8
K	1510.8
Ca	479.8
Mg	356.5
Na	65.58
S	15.13
Fe	8.5
Zn	7.74
Cu	2.87
Mn	2.15
B	1.11
Se	0.63
Si	0.165
Ba	0.065

تجزیه و تحلیل ترکیبات بیوشیمیایی اندام بارده گانودرما لوسیدوم در جدول شماره دو ارائه شده است. به طور کلی ۳۷ ترکیب شامل تری ترپنوئیدها و ترکیبات فنولی شناخته شده که در آن گنودریک اسید با بیشترین مقدار(۲۳۲/۱ ± ۱۵۸۹۰/۱ میکرو گرم در گرم ماده خشک) و به دنبال آن سیناپیک اسید و سوکونیک اسید (۲۸/۱۱ ± ۲۰۱۱/۴ و ۳۱/۵ ± ۱۵۰۵/۳۳ میکرو گرم در گرم ماده خشک) به عنوان ترکیبات غالب قرار گرفتند.

طبق مطالعه انجام شده توسط توفیق(۳۹) مقدار تری ترپنوئید کل در قارچ گاتودرما لوسیدوم را ۴۵۵ میلی گرم بر گرم گزارش کردند که شامل انواع گنودریک اسید (AM,H, F, G, B, A, D, C2,C6, E, J) بودند.

اگرچه ترکیبات فنلی یکی از مهمترین ترکیبات با اثرات زیست فعالی قابل توجه در گانودرما هستند، مطالعات زیادی به منظور تعیین محتوای آنها تاکنون انجام شده است. برای ترکیبات فنولی شناخته شده در این قارچ از گالیک اسید، پیروگالول، ۵–سولفوسالیسیلیک اسید، پروتوکاتچوئیک اسید، کاتچین، بنزوئیک اسید، میریستین، کورستین،کامفرول، هسپرتین، فورمونونتین و بیوچانین نام برده شده است. کیم و همکاران (۱۸)محتوای ترکیبات فنولی در قارچ گانودرما کشت شده در کره جنوبی را مطالعه کردند و محتوای ترکیبات فنولی را ۱۶۲ گرم بر کیلوگرم ماده خشک ماده و به

طور جزئی مقادیرگالیک اسید، پریگالول، دهیدروکسی بنزوئیک اسید، نارنجین، میرستین، کوئرستین، کمپفرول(۸، ۱۸، ۱۴ ، ۹، ۲۱، ،۲۶ ، ۲۵ میروگرم بر گرم) گزارش کردند که با نتایج پژوهش حاضر قابل مقایسه است. تفاوت های بارز بین ترکیبات بیوشیمیایی و عناصر غذایی گانودرما لوسیدوم در مطالعات انجام شده به دلیل ژنوم و خواستگاه نمونه ها ، نوع و ترکیب بستر کشت در شرایط مصنوعی، تغییر در محتوای فنل آزاد شده در طول فرایند خشک کردن یا تشکیل ترکیبات آنتی اکسیدانی اضافی مانند ملانوئیدین می تواند باشد.

جدول ۲- آنالیز ترکیبات بیوشیمایی اندام بارده گانودرما لوسیدوم با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی مایع با عملکرد فوق العاده
Table 2 Identification and quantification of biochemical compounds in *G. lucidum* fruitbody by UPLC-MS

اجزای ترکیبات فنولی Phenolic Constituents	مقدار (میکروگرم/گرم) Found value(µg/g)	UPLC ESI-MS زمان بازداری(دقیقه) RT (min)	UPLC ESI-MS [M-H] (m/z)
Malic acid	311.0± 46.2	0.94	133.11
Quinic acid	65.2± 8.1	0.96	191.1
Succinic acid	1505.33± 31.5	1.21	117.018
Ganoderic acid	15890.1±232.1	1.22	191.111
Pyrogallol	4.03 ±0.80	1.24	125.11
Gallic acid	19.4 ± 1.8	1.33	168.5
Pyrocatechol	<LOD	1.95	109.028
3-4-Hydroxybenzoic acid	7.4 ± 1.0	2.01	153.11
Catechin	27.2± 3.4	2.21	289
Chlorogenic acid	71.3 ± 5.5	2.37	353.212
4-hydroxybenzoic acid	92.4 ± 6.0	2.8	137.15
3-Hydroxybenzoic acid	1243 ± 21.4	2.83	137.025
Esculetin	44.0 ± 2.3	3.03	177.018
Vanillic acid	201.33± 16.3	3.13	167.036
Syringic acid	<LOD	3.17	197.045
Caffeic acid	52.5± 8.12	3.19	179.035
Epicatechin	<LOD	3.84	289.064
4-Hydroxycinnamic acid	<LOD	4.54	163.042
3-Hydroxycinnamic acid	310.0± 18.4	4.56	163.042
Rutin	<LOD	4.71	609.1
Sinapic acid	2011.4±28.11	4.88	223.061
Ferulic acid	374.2 ± 20.0	5.05	193.05
2-Hydroxycinnamic acid	<LOQ	5.14	163.042
Tannic acid	693.11± 15.94	5.31	1700.08
Naringin	433.5 ± 11.0	5.84	579.173
Benzoic acid	3.4± 0.2	5.97	121.031
Quercitrin	<LOD	6.02	447.12
Hesperidin	73.12 ± 6.2	6.24	609.172
Rosmarinic acid	21.0 ± 5.1	6.94	359.054

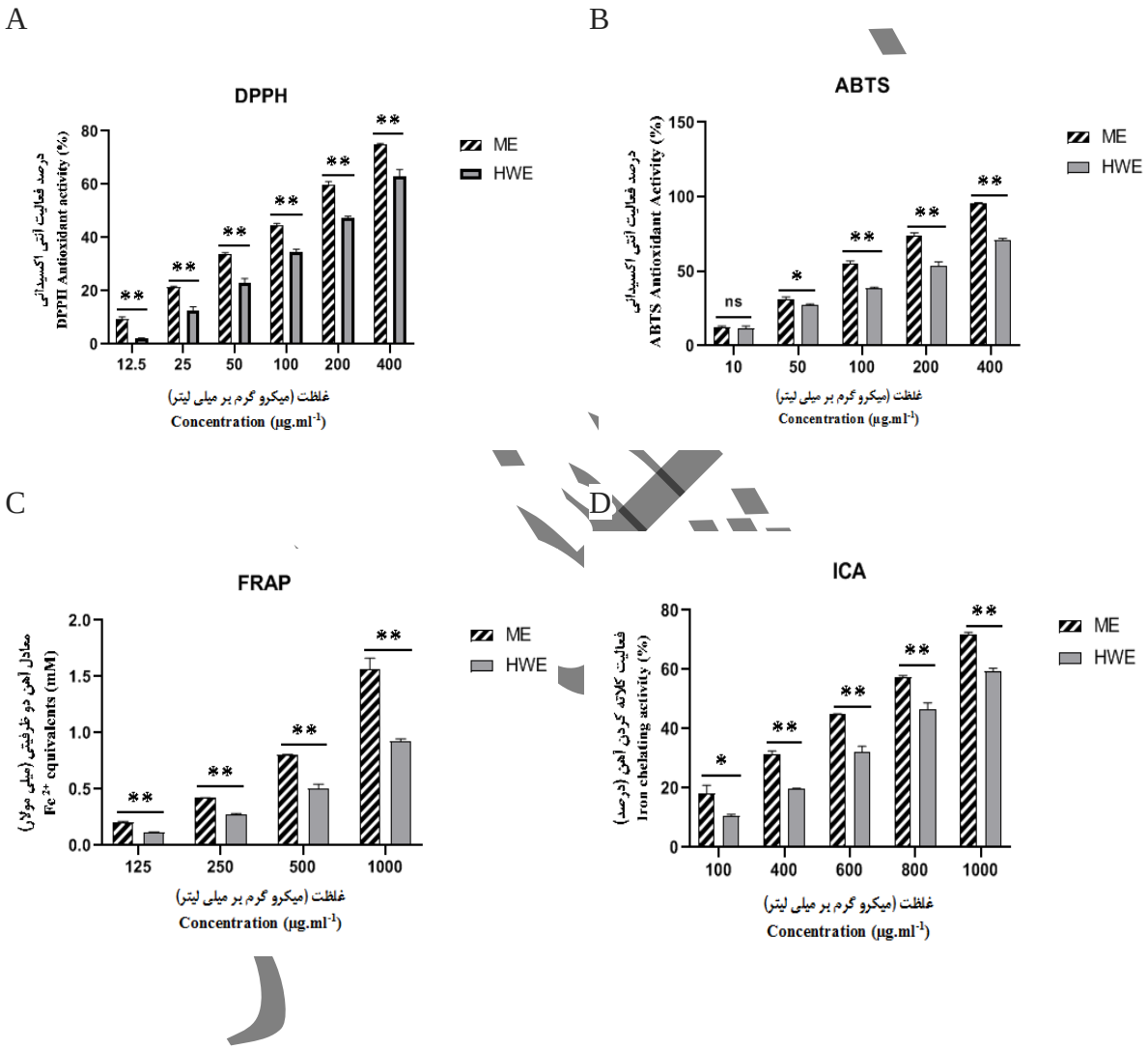
4-Hydroxycoumarin	913.0± 86.0	7.04	163.042
Salicylic acid	18.90 ± 4.1	7.38	137.025
Resveratrol acid	<LOD	8.24	227.072
Luteolin	<LOD	8.87	215.04
Quercitin	<LOD	9.11	301.112
Naringenin	3.70 ± 0.2	10.77	271.161
Hesperetin	2.94 ± 0.21	11.04	301.315
Kaempferol	<LOD	11.12	285.24

ترکیبات فنولی شامل فنول های ساده، با یک حلقه آروماتیک که حداقل دارای یک گروه هیدروکسی روی آن است و ترکیبات پلی فنولی می باشند. ترکیبات پلی فنولی که دارای دو بخش فنولی باشند، فلاونوئیدها را تشکیل می دهند. از مهم ترین خصوصیاتی که به این گروه نسبت داده می شود، خاصیت آنتی اکسیدانی بوده که به آن ها امکان از دست دادن هیدروژن و به دام انداختن رادیکال آزاد را می دهد. در نتیجه روند استخراج ترکیبات فنولی یک فاکتور مهم در تعیین خصوصیات آنتی اکسیدانی عصاره است . دما، حلال، زمان عصاره گیری، قدرت استخراج و روش استخراج تاثیر بارزی در محتویات عصاره خواهد گذاشت. این تفاوت ها وابسته به تمایل این ترکیبات به حلال مورد نظر برای عصاره گیری و مخصوصا قطبیت آن است.

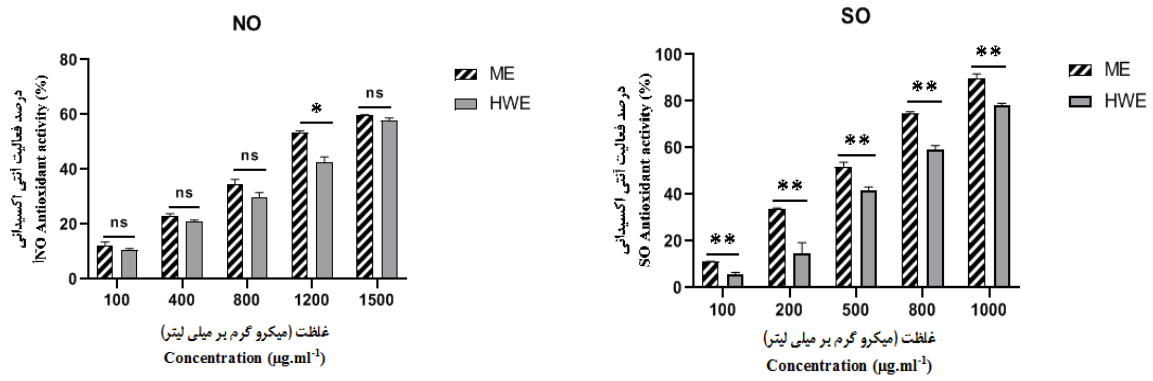
به طور گسترده مدل به دام اندازی رادیکال DPPH برای ارزیابی توانایی به دام اندازی رادیکال آزاد در نمونه های مختلف مورد استفاده قرار می گیرد . این ترکیب یک رادیکال آزاد پایدار است که دارای یک الکترون جفت نشده بر روی یکی از اتم های پل نیتروژنی میباشد که با احیاء شدن تولید مولکول پایداری می کند که از ارغوانی به زرد تغییر رنگ می دهد. نتایج حاصل از تاثیر قدرت عصاره بر به دام اندازی رادیکال DPPH در نمودار شماره یک(A) ارائه شده است. همانگونه که مشاهده میشود در این آزمون با افزایش غلظت هر دو عصاره متانولی و آب داغ، مهار رادیکال DPPH با قدرت بیشتری صورت گرفته و در همه ی غلظتها اختلاف معنی داری ($P \leq 0.01$) بین دو عصاره وجود دارد. همچنین مقدار IC50 برای عصاره متانولی (۵/۴۲ ± ۲۱۳/۴۸) و آب داغ (۱/۳۹ ± ۱۱۱/۹۳)میکرو گرم بر میلی لیتر بدست آمد که در سطح آماری ($P \leq 0.05$) اختلاف نشان دادند . نتایج آنتی اکسیدانی به دست آمده برای مهار و کاهش رادیکال DPPH بسیار مشابه آنچه که توسط هلنو و همکاران (۲۰۱۲) گزارش شده است که در آن نویسندگان از روش استخراج خیساندن در حلال متانول ۸۰ درصد استفاده کردند.فعالیت مهار DPPH عصاره علاوه بر محتویات پلی فنولی به مواد بیوشیمیایی مختلف وابسته است مهار رادیکال های آزاد با تبادل اتم هیدروژن یا الکترون درگیر است. ممکن است بخش های شیمیایی دیگری از ترکیبات فنولیکی نیز وجود داشته باشد که نقش مهمی در پاکسازی رادیکال DPPH دارند. هر چه تعداد گروه های هیدروکسیل حلقه فنیل آنتی اکسیدان بیشتر باشد، تعداد هیدروژن بیشتری برای واکنش DPPH وجود دارد.

کاتیون رادیکال نسبتا پایدار سبز آبی ABTS از اکسیداسیون ABTS توسط پتاسیم پرسولفات تولید می شود که معمولاً برای تعیین فعالیت آنتی اکسیدانی با شکستن زنجیره و هیدروژن دهی استفاده می شود و به یک محصول بی رنگ تبدیل میشود. شدت کاهش رنگ نشان دهنده مقدار رادیکال ABTS است که توسط آنتی اکسیدانها مهار شده است. غلظت های مختلف از دو عصاره متانولی و آبی و درصد مهارکنندگی رادیکالABTS در نمودار شماره یک(B) ارائه شده است. همانطور که مشاهده می شود قدرت مهارکنندگی رادیکال ABTS برای هر دو عصاره در یک رابطه

وابسته به دوز افزایش یافت. ظرفیت مهارکنندگی عصاره ها در کمترین غلظت (۱۰ میکروگرم بر لیتر) اختلاف معناداری نشان نداد و در بالاترین غلظت (۴۰۰ میکروگرم بر لیتر) این اختلاف درسطح احتمال ($P \leq 0.01$) معنادار شد. همچنین مقدار IC50 برای عصاره متانولی (۲/۴۲ ± ۴۸/۴۶) و آب داغ (۴/۵۱ ± ۱۶۳/۵۱) میکرو گرم بر میلی لیتر بدست آمد که در سطح آماری ($P \leq 0.05$) اختلاف نشان دادند. نتایج نشان می دهد که عصاره متانولی قدرت مهارکنندگی بیشتری برای رادیکال ABTS نسبت به DPPH دارد بنابراین ظرفیت عصاره متانولی مهار رادیکال ABTS با رادیکال DPPH متفاوت است.



E F



شکل ۱- ظرفیت مهار کنندگی رادیکالDPPH (A)،ABTS (B)، نیتریک اکساید (E)، سوپراکساید (F)، ظرفیت احیاکنندگی آهن(C)، ظرفیت شلاته کنندگی آهن(D) توسط عصاره متانولی (ME) و عصاره آبی (HWE) گانودرما لوسیدوم

Figure 6- DPPH(A), ABTS(B), Nitricoxide(NO) (E), Superoxide(SO) (F) Inhibitory activity, Iron reducing activity(FRAP) (E) and Iron chelating activity(ICA) (F) by MeoH(ME) and hot water(HWE) extracts of *G.lucidum*

سنجش احیا کنندگی با اهداء الکترون برای احیا آهن سه ظرفیتی و تبدیل آن به آهن دو ظرفیتی سنجیده می شود. در این واکنش افزودن معرف FRAP که یک محلوط زرد رنگ است به عصاره مورد نظر، منجر به احیای کمپلکس های فری سیانید و تشکیل کمپلس فروس آبی رنگ را میدهد که حداکثر جذب را در طول موج ۵۹۳ نانومتر دارد. افزایش جذب در این طول موج حاکی از افزایش ظرفیت احیاکنندگی می باشد. طبق نتایج ارائه شده در نمودار شماره یک(C) ، قدرت احیاکنندگی برای هر دو عصاره متانولی و آبی وابسته به دوز افزایش یافته است و این افزایش برای عصاره متانولی بیشتر نمایان است. در تمام غلظت ها قدر احیاکنندگی عصاره ها درسطح احتمال ($P \leq 0.01$) اختلاف تشان دادند. همانطور که در جدول شماره سه ذکر شده است مقدار IC50 برای عصاره متانولی (۴/۱۳± ۳۰۸/۱۳) و آب داغ (۲/۱۴ ±۵۲۲/۴۴) میکرو گرم بر میلی لیتر بدست آمد که در سطح آماری ($P \leq 0.01$) اختلاف نشان دادند. به لحاظ تئوری هر ترکیبی که بتواند آهن سه ظرفیتی را به آهن دو ظرفیتی احیا کند پتانسیل دخالت در سطح آنتی اکسیدانی نمونه را دارد. نکته قابل توجه در این روش این است که برخی ترکیبات پلی فنلی موجود در عصاره مانند کافئیک اسید، فرولیک اسید و تانیک اسید به آهستگی و در زمان بسیار طولانی با معرف FRAP واکنش میدهد(۲۸). بنابراین قدرت احیاکنندگی ارتباط تنگاتنگی با نوع ترکیبات زیست فعال موجود در عصاره دارد. با این وجود قدرت کاهندگی گانودرما تعیین شده توسط FRAP یک شاخص قابل توجه از پتانسیل فعالیت آنتی اکسیدانی این قارچ است.

نتایج حاصل از تاثیر عصاره ها بر میزان قدرت شلاته کنندگی آهن درنمودار شماره یک(D) آماده است. در این تست هم عصاره متانولی بالاترین فعالیت خود را نشان داد بطوریکه در تمام غلظت های مشابه در سطح آماری ($P \leq 0.01$) نسبت به عصاره آبی قدرت شلاته کنندگی بیشتری را از خود نشان داد. میزان IC50 در این تست برای عصاره متانولی (۵/۶۶ ± ۶۷۱/۷۵) و برای عصاره آبی(۱۰/۶ ± ۱۳۴۳/۲) میکرو گرم بر میلی لیتر محاسبه شد که در سطح آماری ($P \leq 0.01$) اختلاف داشتند.

نیتریک اکساید مولکول کوچکی با یک الکترون جفت نشده است و در سیستم بیولوژیک توسط در مسیر بیوسنتز آنزیم نیتریت اکساید سنتتاز آرژنین به سیترولین ساخته می شود. تولید بیش از حد این ذره ، توانایی مهار و کاهش فعالیت بسیاری از آنزیم های آنتی اکسیدانی مانند گلوتاتیون پراکسیداز، سوپر اکسید دیسموتاز و کاتالاز را دارند. قدرت به دام اندازی رادیکال نیتریک اکساید عصاره ها وابسته به دوز بود. همان طور که در نمودارشماره یک(E) نشان داده شده است، به علت ضعیف بودن توانایی عصاره ها در مهار نیتریک اکساید ، تست صرفا در یک غلظت بالا(میکرو گرم بر میلی لیتر) گزارش گردید. همزمان با افزایش غلظت عصاره ها، قدرت مهار کنندگی رادیکال نیتریک اکساید نیز افزایش می یابد. مطابق نتایج آماری در غلظت های یکسان قدرت مهار کنندگی عصاره متانولی با اختلافی ناچیز بیشتر از عصاره آبی بود به طوریکه این تفاوت تنها در غلظت (۱۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) در سطح آماری ($P \leq 0.01$) معنی دار شد. همانطور که در جدول شماره سه ذکر شده است مقدار IC50 برای عصاره متانولی (۸/۵ ± ۱۱۸۹/۵) و آب داغ (۱۰/۶ ± ۱۳۴۳/۲) میکرو گرم بر میلی لیتر بدست آمد که از نظر آماری اختلاف معنی داری نشان ندادند.

رادیکال سوپراکساید، یکی از خطرناک ترین رادیکال های آزاد موجود در طبیعت است. این رادیکال یک محصول فرعی و ثانویه متابولیسم اکسیژن است و اگر تحت کنترل نبا شد، موجب بروز انواع متفاوتی از آسیب‌های سلولی می‌گردد. به طور معمول این رادیکال توسط آنزیم سوپراکساید دیسموتاز تجزیه و خنثی می گردد. نتایج حاصل از تاثیر عصاره ها بر میزان قدرت مهارکنندگی رادیکال سوپراکساید در نمودار شماره یک(F) ارائه شده است. در این تست نیز در تمام غلظت های یکسان عصاره متانولی بالاترین فعالیت مهارکنندگی را نسبت به عصاره آبی در سطح آماری($P \leq 0.01$) از خود نشان داد. همچنان که در جدول شماره سه مشاهده می شود مقدار IC50 برای عصاره متانولی (۷/۳۸ ± ۴۸۸/۸) و آب داغ (۵/۴۸ ± ۶۴۵/۹۲) میکروگرم بر میلی لیتر بدست آمد که در سطح آماری ($P \leq 0.01$) اختلاف نشان دادند.

جدول ۳- غلظت مؤثر بازدارندگی عصاره های قارچ در شش روش بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی
Table 3- IC50 values of *G. lucidum* Extracts by six antioxidant activity assays

آزمون assay	غلظت مؤثر بازدارندگی(میکروگرم بر میلی لیتر) EC50 (µg.ml^{-1})		P-Value
	عصاره متانولی ME	عصاره آب داغ HWE	
ABTS	48.46±2.42	163.51±4.51	0.0155*
DPPH	111.93±1.39	213.48±5.42	0.0433*
FRAP	308.13±4.13	522.44±2.14	<0.01**
ICA	671.75±5.66	860.72±8.2	<0.01**
NO	1189.5±8.5	1343.2±10.6	0.0901ns
SO	488.8±7.38	645.92±5.48	<0.01**

عصاره های گیاهی مختلف ممکن است شامل انواع مختلف ترکیبات فنولی با فعالیت آنتی اکسیدانی متنوع باشند که به ساختارشان وابسته است(۱۷). با این وجود گولیسین و همکارانش گزارش کردند که بین میزان ترکیبات فنلی و اثر آنتی اکسیدانی عصاره گیاهی ارتباط مستقیمی وجود ندارد به طوریکه میزان فنل عصاره اتانولی بیشتر از عصاره آبی بوده ولی اثر آنتی اکسیدانتی عصاره اتانولی نسبت به آبی کمتر میباشد (۱۱). در مطالعه ای دیگر، که بر روی ۲۸ محصول گیاهی انجام شد مشخص گردید که در بسیاری از موارد بین میزان فنل و بالا بودن فعالیت آنتی اکسیدانتی همبستگی وجود ندارد در دلیل این امر بیان شده که احتمالاً فاکتورهای دیگری در فعالیت آنتی اکسیدانتی نقش دارند (۳۲ و ۴۱). تحقیقات متعددی رابطه نزدیک بین میزان ترکیبات فنولی، تری ترپنوئیدها و پلی ساکاریدهای موجود در اندام بارده گانودرما با ظرفیت آنتی اکسیدانی آن گزارش کردند(۱، ۲۰ و ۴۳). همچنین مجموع تری ترپن های جدا شده از گانودرما لوسیدیوم طی تحقیقی برای سنجش فعالیت آنتی اکسیدانی در محیط درون شیشه ای و برون شیشه ای مورد بررسی قرار گرفته است. نتایج حاصله نشان داده که تری ترپن ها به طور موفق رادیکال های سوپراکسید، DPPH و ABTS را مهار کرده و به طور قابل توجهی فعالیت کاهندگی یون فریک از خود نشان داده و به مقدار زیادی در کاهش پراکسیداسیون لیپیدها مؤثر بوده اند. این توانایی تری ترپن ها در مهار رادیکال های آزاد و تقویت سامانه دفاعی آنتی اکسیدانی نشان می دهد. میزان سمیت تری ترپن های این قارچ در موش Swiss albino مورد سنجش واقع شده است و نتایج بدست آمده نشان داد که این تری ترپن ها سمیتی از خود نشان نمی دهند. بنابراین یافته ها آشکار ساخت که استفاده غذایی- درمانی از تری ترپن های گانودرما امکان پذیر و بلامانع است.

نتیجه گیری

با توجه به کاربردهای درمانی گسترده این قارچ و پیشرفت های چشمگیر در درمان بیماری ها، محققین نه تنها در

کشور های آسیایی بلکه در سایر نقاط جهان، تحقیقات وسیعی را جهت جداسازی و شناسایی ترکیبات مؤثر و پی بردن به مکانیسم عمل مواد مؤثره ترکیبات آغاز نموده اند. آزمایشات درون شیشه ای و برون شیشه ای نشان داده است که گانودرما به دلیل داشتن محتوای بالای فنول، تری ترپنوئید و پلی ساکارید دارای فعالیت آنتی اکسیدان قابل توجهی است. علاوه بر ترکیبات زیست فعال، عناصر غذایی موجود در گانودرما، پتانسیل بالایی به منظور فرمولاسیون مکمل های غذایی از جمله قرص ها و کپسول ها نشان می دهد.

منابع:

1. Abdullah N., Ismail S.M., Aminudin N., Shuib A.S. and Lau B.F. 2012. Evaluation of selected culinary-medicinal mushrooms for antioxidant and ACE inhibitory activities. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.
2. Agustin-Salazar S., Medina-Juárez L.A., Soto-Valdez H., Manzanares-López F. and Gámez-Meza N. 2014. Influence of the solvent system on the composition of phenolic substances and antioxidant capacity of extracts of grape (*Vitis vinifera* L.) marc. Australian Journal of Grape and Wine Research 20(2): 208-213.
3. Balakrishnan N., Panda A.B., Raj N.R., Shrivastava A. and Prathani R. 2009. The evaluation of nitric oxide scavenging activity of *Acalypha indica* Linn root. Asian Journal of Research in Chemistry 2(2): 148-150.
4. Beyer-Jr W.F. and Fridovich I. 1987. Assaying for superoxide dismutase activity: some large consequences of minor changes in conditions. Analytical biochemistry 161(2): 559-566.
5. Bishop K.S., Kao C.H., Xu Y., Glucina M.P., Paterson R.R.M. and Ferguson L.R. 2015. From 2000 years of *Ganoderma lucidum* to recent developments in nutraceuticals. Phytochemistry 114: 56-65.
6. Ćilerdžić J., Vukojević J., Stajić M. Stanojković T. and Glamočlija J. 2014. Biological activity of *Ganoderma lucidum* basidiocarps cultivated on alternative and commercial substrate. Journal of ethnopharmacology 155(1): 312-319.
7. Collins A.R. 2005. Antioxidant intervention as a route to cancer prevention. European Journal of Cancer 41(13): 1923-1930.
8. Dong Q., He D., Ni X., Zhou H. and Yang H. 2019. Comparative study on phenolic compounds, triterpenoids, and antioxidant activity of *Ganoderma lucidum* affected by different drying methods. Journal of Food Measurement and Characterization 13(4): 3198-3205.
9. El Sheikha A.F. 2022. Nutritional Profile and Health Benefits of *Ganoderma lucidum* "Lingzhi, Reishi, or Mannentake" as Functional Foods: Current Scenario and Future Perspectives. Foods 11(7): 10-30.
10. Ferreira I.C., Baptista P., Vilas-Boas M. and Barros L. 2007. Free-radical scavenging capacity and reducing power of wild edible mushrooms from northeast Portugal: Individual cap and stipe activity. Food chemistry 100(4):1511-1516.

11. Gülçın İ., Oktay M., Kıreççı E. and Küfrevıoğlu Ö.İ. 2003. Screening of antioxidant and antimicrobial activities of anise (*Pimpinella anisum* L.) seed extracts. Food chemistry 83(3): 371-382.
12. Halliwell B. 2007. Biochemistry of oxidative stress. Biochemical society transactions 35(5):1147-1150.
13. Hattori M. 2001. Recent studies on the bitter principles of *Ganoderma lucidum* isolation of novel triterpenes, their biological activity and pharmacokinetics. In Proceedings of the International Symposium Ganoderma Sciences. April 2001.
14. Heleno S.A., Barros L., Martins A., Queiroz M.J.R., Santos-Buelga C. and Ferreira I.C. 2012. Fruiting body, spores and in vitro produced mycelium of *Ganoderma lucidum* from Northeast Portugal: A comparative study of the antioxidant potential of phenolic and polysaccharidic extracts. Food Research International 46(1): 135-140.
15. Hogan S., Chung H., Zhang L., Li J., Lee Y., Dai Y. and Zhou K. 2010. Antiproliferative and antioxidant properties of anthocyanin-rich extract from açai. Food Chemistry 118(2): 208-214.
16. Karaman M., Jovin E., Malbaša R. Matavuly M. and Popović M. 2010. Medicinal and edible lignicolous fungi as natural sources of antioxidative and antibacterial agents. Phytotherapy research 24(10):1473-1481.
17. Kaur S. and Mondal P. 2014. Study of total phenolic and flavonoid content, antioxidant activity and antimicrobial properties of medicinal plants. Journal of microbiology & experimentation 1(1): 00005.
18. Kim M.Y., Seguin P., Ahn J.K., Kim J.J., Chun S.C., Kim E.H., Seo S.H., Kang E.Y., Kim S.L., Park Y.J. and Ro H.M. 2008. Phenolic compound concentration and antioxidant activities of edible and medicinal mushrooms from Korea. Journal of Agricultural and Food Chemistry 56(16): 7265-7270.
19. Kozarski M., Klaus A., Nikšić M., Vrvić M.M., Todorović N., Jakovljević D. and Van Griensven L.J. 2012. Antioxidative activities and chemical characterization of polysaccharide extracts from the widely used mushrooms *Ganoderma applanatum*, *Ganoderma lucidum*, *Lentinus edodes* and *Trametes versicolor*. Journal of food composition and analysis 26(1-2):144-153.
20. Kozarski M., Klaus A., Niksic M., Jakovljevic D., Helsper J.P. and Van Griensven L.J. 2011. Antioxidative and immunomodulating activities of polysaccharide extracts of the medicinal mushrooms *Agaricus bisporus, Agaricus brasiliensis, Ganoderma lucidum* and *Phellinus linteus*. Food chemistry 129(4):1667-1675.
21. Li J., Zhang J., Chen H., Chen X., Lan J. and Liu C. 2013. Complete mitochondrial genome of the medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*. Plos one 8(8): e72038.
22. Li Y.B., Liu R.M. and Zhong J.J. 2013. A new ganoderic acid from *Ganoderma lucidum* mycelia and its stability. Fitoterapia 84:115-122.
23. Lin S.B., Li C.H., Lee S.S. and Kan L.S. 2003. Triterpene-enriched extracts from *Ganoderma lucidum* inhibit growth of hepatoma cells via suppressing protein kinase C, activating mitogen-activated protein kinases and G2-phase cell cycle arrest. Life sciences 72(21): 2381-2390.

24. Lo K.M. and Cheung P.C. 2005. Antioxidant activity of extracts from the fruiting bodies of *Agrocybe aegerita var. alba*. Food chemistry 89(4): 533-539.
25. Maqsood S. and Benjakul S. 2010. Comparative studies of four different phenolic compounds on in vitro antioxidative activity and the preventive effect on lipid oxidation of fish oil emulsion and fish mince. Food Chemistry 119(1):123-132.
26. Mohsin M., Negi P.S. and Ahmed Z. 2011. Determination of the antioxidant activity and polyphenol contents of wild Lingzhi or Reishi medicinal mushroom, *Ganoderma lucidum* (W. Curt. Fr.) P. Karst.(higher Basidiomycetes) from central Himalayan hills of India. International journal of medicinal mushrooms, 13(6).
27. Oludemi T., Barros L., Prieto M.A., Heleno S.A., Barreiro M.F. and Ferreira I.C. 2018. Extraction of triterpenoids and phenolic compounds from *Ganoderma lucidum*: optimization study using the response surface methodology. Food & function 9(1): 209-226.
28. Pulido R., Bravo L. and Saura-Calixto F. 2000. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. Journal of agricultural and food chemistry 48(8):3396-3402.
29. Qin N.B., Jia C.C., Xu J., Li D.H., Xu F.X., Bai J., Li Z.L. and Hua H.M. 2017. New amides from seeds of *Silybum marianum* with potential antioxidant and antidiabetic activities. Fitoterapia 119:83-89.
30. Rawat A., Mohsin M. and Singh S. 2011. Evaluation of polyphenolic contents and antioxidant activity of wildly collected *Ganoderma lucidum* from central Himalayan hills of India. Asian Journal of Plant Science & Research.
31. Saltarelli R., Ceccaroli P., Buffalini M., Vallorani L., Casadei L., Zambonelli A., Iotti M., Badalyan S. and Stocchi V. 2015. Biochemical characterization and antioxidant and antiproliferative activities of different Ganoderma collections. Microbial Physiology 25(1):16-25.
32. Sengul M., Yildiz H., Gungor N., Cetin B., Eser Z. and Ercisli S. 2009. Total phenolic content, antioxidant and antimicrobial activities of some medicinal plants. Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences 22(1).
33. Sheikh I.A., Vyas D., Ganaie M.A., Dehariya K. and Singh V. 2014. HPLC determination of phenolics and free radical scavenging activity of ethanolic extracts of two polypore mushrooms. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences 6(2): 679-684.
34. Singh P.P., Chandra A., Mahdi F., Roy A. and Sharma P., 2010. Reconvene and reconnect the antioxidant hypothesis in human health and disease. Indian Journal of Clinical Biochemistry 25(3): 225-243.
35. Soković M., Glamočlija J., Ćirić A., Petrović J. and Stojković D. 2018. Mushrooms as sources of therapeutic foods. Therapeutic Foods:141-178.
36. Stamets P. 2011. Growing gourmet and medicinal mushrooms. Ten speed press.
37. Stojković D.S., Barros L., Calhelha R.C., Glamočlija J., Ćirić A., Van Griensven L.J., Soković M. and Ferreira I.C. 2014. A detailed comparative study between chemical and bioactive properties of *Ganoderma lucidum* from different origins. International Journal of Food Sciences and Nutrition 65(1):.42-47.

38. Taofiq O., Martins A., Barreiro M.F. and Ferreira I.C. 2016. Anti-inflammatory potential of mushroom extracts and isolated metabolites. Trends in Food Science & Technology 50: 193-210.
39. Taofiq O., Heleno S.A., Calhelha R.C., Alves M.J., Barros L., González-Paramás A.M., Barreiro M.F. and Ferreira I.C. 2017. The potential of *Ganoderma lucidum* extracts as bioactive ingredients in topical formulations, beyond its nutritional benefits. Food and chemical toxicology 108:139-147.
40. Terpinc P., Polak T., Šegatin N., Hanzlowsky A., Ulrih N.P. and Abramovič H. 2011. Antioxidant properties of 4-vinyl derivatives of hydroxycinnamic acids. Food chemistry 128(1): 62-69.
41. Velioglu Y., Mazza G., Gao L. and Oomah B.D.1998. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. Journal of agricultural and food chemistry 46(10): 4113-4117.
42. Wachtel-Galor S., Yuen J., Buswell J.A. and Benzie I.F. 2011. *Ganoderma lucidum* (Lingzhi or Reishi). Herbal Medicine: Biomolecular and Clinical Aspects. 2nd edition.
43. Zhang N., Chen H., Zhang Y., Xing L., Li, S., Wang X. and Sun Z. 2015. Chemical composition and antioxidant properties of five edible Hymenomycetes mushrooms. International Journal of Food Science & Technology 50(2):465-471.
44. Zhou X., Li Q., Zhao J., Tang K., Lin J. and Yin Y. 2007. Comparison of rapid DNA extraction methods applied to PCR identification of medicinal mushroom *Ganoderma* spp. Preparative Biochemistry and Biotechnology 37(4):369-380.