فصلنامه (علمی – پژوهشی)
زیست شناسی تکوینی
سال دوازدهم، شماره ۱، زمستان ۱۳۹۸ ص. ۴۲-۲۷

مقاله پژوهشی

تأثیر روش تولید، استخراج و خالص‌سازی، بر خاصیت ضد سرطانی پلی‌ساکاریدهای قارچی

هاله الوندی[۱]، اشرف السادات حاتمیان زارمی[۱*]، بهمن ابراهیمی حسین زاده[۱]، زهرا بیگم مختاری حسینی[۲]، حامد آقاجانی[۳]

[۱] گروه مهندسی علوم زیستی، دانشکده علوم و فنون نوین، دانشگاه تهران، تهران، ایران
[۲] گروه مهندسی شیمی، دانشکده مهندسی نفت و پتروشیمی، دانشگاه حکیم سبزواری، سبزوار، ایران
[۳] گروه جنگلداری، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران

[*] Email: hatamian_a@ut.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۸/۰۳/۲۰ تاریخ پذیرش: ۹۸/۰۶/۱۶

چکیده

سرطان از جمله عوامل اصلی مرگ و میر در سراسر جهان است. با توجه به ارزش غذایی و دارویی قارچ‌ها در طب سنتی و پیشینه استفاده از آن‌ها در درمان انواع سرطان، روش‌های مدرن درمان سرطان با استفاده از محصولات قارچی به ویژه پلی‌ساکاریدها، مورد مطالعه قرار گرفته است. فعالیت ضدتوموری پلی‌ساکاریدهای قارچی به طور مستقیم با تحریک سیستم ایمنی بدن در ارتباط است. این پلی‌ساکاریدها با تغییر عملکرد ماکروفاژ، تحریک تولید آنتی‌بادی علیه سلول سرطانی، افزایش تولید نیتریک اکسید و سایتوکین‌ها، القای آپوپتوز و نکروز با اختلال در چرخه سلولی و فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی خود باعث تخریب رادیکال‌های آزاد و مهار رشد سلول‌های سرطانی می‌شوند. علی‌رغم تحقیقات گسترده روی اثرات درمانی پلی‌ساکاریدهای قارچی، شناخت ساختار شیمیایی آن‌ها به ویژه در زمینه خالص‌سازی به مطالعات بیشتر نیاز دارد. پلی‌ساکاریدهایی که از قارچ‌ها استخراج شده‌اند، در ویژگی‌هایی چون نوع پیوند، درجه انشعاب، وزن مولکولی و حلالیت متفاوت هستند. شرایط رشد گونه قارچی، ترکیبات محیط کشت، دما، pH و نوع بیوراکتور، بازده تولید پلی‌ساکارید و ترکیب مونوساکاریدهای آن را تحت تأثیر قرار می‌دهد. روش‌های استخراج پلی‌ساکارید، خشک کردن، خالص‌سازی و اصلاحات شیمیایی می‌تواند موجب تغییر در ویژگی‌های ساختاری پلی‌ساکارید از جمله نوع پیوند، درجه انشعاب، محتوای اورونیک اسید، محتوای پروتئین و حلالیت شود. تفاوت‌های ساختاری در پلی‌ساکاریدهای قارچی سبب تفاوت در فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی، ضد تکثیری و تحریک سیستم ایمنی می‌شوند. از این رو می‌توان با بررسی ساختار شیمیایی پلی‌ساکاریدهای قارچی، به تولید هدفمند این پلی‌ساکاریدها جهت درمان سرطان پرداخت.

کلیدواژه‌ها: قارچ، پلی‌ساکارید، بتاگلوکان، ضد سرطان، آنتی‌اکسیدان.

مقدمه

بیش از ۲۰۰۰ سال است در کشورهای شرقی مانند چین، کره و ژاپن قارچ‌ها به دلیل ارزش غذایی و خواص دارویی‌شان، برای پیشگیری و درمان بسیاری از بیماری‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند و به عنوان مکمل‌های غذایی توسط بیماران سرطانی مصرف می‌شوند. قارچ‌ها به عنوان منبع خوبی از فیبر، ویتامین‌ها، مواد معدنی، تری‌ترپن[1]ها، استروئیدها و اسیدآمینه‌های ضروری (لیزین، هیستیدین) شناخته می‌شوند. امروزه اثرات سودمند قارچ‌ها به رسمیت شناخته شده و استفاده از آن‌ها در مواد غذایی و دارویی توجهات زیادی را به خود جلب کرده است. داروسازی مدرن به دنبال دارویی از پلی‌ساکاریدهای قارچی است. مطالعات نشان می‌دهند قارچ‌ها خواصی از جمله ضد توموری، تقویت سیستم ایمنی، آنتی‌اکسیدانی، تخریب رادیکال‌ها، تقویت قلب و عروق، ضد ویروسی، ضد باکتریایی، سم زدایی و اثرات ضددردی دارند [۱۶، ۳۶، ۴۹].

بررسی انواع پلی‌ساکاریدهای قارچی

تاکنون پلی‌ساکارید گونه‌های قارچی بسیاری شناسایی شده‌اند. بتاگلوکان[2]، یکی از اجزای دیواره سلولی قارچی، از نظر درمانی مهم‌ترین پلی‌ساکارید در قارچ‌ها است. این گلوکان متشکل از واحدهای گلوکز است که با پیوندهای گلیکوزیدی (۳←۱)-β به شاخه‌ای با پیوند (۶←۱)-β ارتباط دارند. انواع بتاگلوکان در قارچ‌ها از قبیل پلوران[3] در *Pleurotus*، لنتینان[4] در *Lentinus*، شیزوفیلان[5] در *Schizophyllum*، گریفولان[6] در *Grifola* هستند. برخی بتاگلوکان‌ها مانند PSK[7] از قارچ *Trametes versicolor* به پروتئین متصل هستند. یافته‌ها نشان می‌دهد تحریک ایمنی ذاتی انسان با اتصال گلوکان‌ها به گیرنده‌های شناختی غشایی، دیکتین-۱ توسط تیروزین کیناز فسفریله شده و آبشار سیگنالینگ درون سلولی شکل می‌گیرد. شناسایی گلوکان توسط ماکروفاژها موجب تحریک تولید TNF-α و اینترلوکین‌ها می‌شود. طیف کاربرد پلی‌ساکاریدها از آنتی‌اکسیدانی، ضد التهابی، ضد سرطانی، تقویت سیستم ایمنی، ضددردی و ضد میکروبی تا استفاده به عنوان پری‌بیوتیک‌ها است [۱۶].

قارچ‌ها منابع غنی D-گلوکان هستند و می‌توانند α-D-glucans، β-D-glucans و α/β-D-glucans را در اندام بارده[8] خود ذخیره کنند. اغلب هوموپلی‌ساکاریدها توسط آنزیم‌های گوارش انسان هضم نمی‌شوند و به عنوان فیبر مورد استفاده قرار می‌گیرند و سبب تحرک روده، کاهش جذب مواد سمی و سرطان‌زا و درنهایت کاهش میزان ابتلا به سرطان می‌شوند. علی‌رغم اثرات درمانی D-گلوکان‌ها، به منظور شناخت ساختار شیمیایی آن به مطالعات بیشتر نیاز است. اختلاف بین ساختارهای D-گلوکان از قبیل نوع پیوند، درجه انشعاب، وزن مولکولی و حلالیت بر خواص زیستی آن تاثیرگذار است. بنابراین ساختار شیمیایی آن‌ها باید با دقت مطالعه گردد و مناسب‌ترین ساختار شیمیایی برای درمان مورد نظر مشخص گردد. به منظور شناسایی ساختار D-گلوکان از روش‌هایی چون شناسایی ترکیب مونوساکاریدها، تعیین وزن مولکولی، طیف سنجی مادون قرمز[9] استفاده می‌شود. رایج‌ترین ساختار D-گلوکان در بازیدیومیست‌ها β-D-glucan، با خواص ضدتوموری، در لنتینان، شیزوفیلان و گریفولان دیده می‌شود. تفاوت بین β-D-glucan های مختلف در درجه شاخه‌ای و ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی است که با توجه به منبع آن متفاوت خواهد بود [۳۶]. لنتینان β-D-glucan(۶←۱)،(۳←۱) جداشده از شیتاکه (*L. edodes*) است و با داشتن ساختار مارپیچ[10] سه تایی از رشد تومورهای (Sarcoma-180) جلوگیری می‌کند. این اثر مهاری زمانی‌که تومورها تحت تاثیر پلی‌ساکارید مارپیچ تکی قرار می‌گیرند، مشاهده نمی‌شود. درحالی‌که پلی‌ساکارید مارپیچ تکی شیزوفیلان نسبت به مارپیچ سه تایی سبب تولید بیشتر TNF-α در موش می‌شود. به نظر می‌رسد حضور پیوند (۳←۱) در زنجیره اصلی و پیوند (۶←۱) در شاخه‌ها

[1] Terpene
[2] β-glucan
[3] Pleuran
[4] Lentinan
[5] Schizophyllan
[6] Grifolan
[7] Polysaccharopeptide Krestin
[8] Fruiting body
[9] FT-IR
[10] Helix

برای فعالیت ضد توموری مورد نیاز است. درجه شاخه‌ای (DB) بین ۰/۲۰ تا ۰/۳۳، قوی‌ترین هموپلی‌ساکارید ضد توموری است، در حالی‌که D-گلوکان‌های با DB بالاتر (۰/۶۷ و ۰/۷۵) موثر نیستند [۳۶، ۳۲].

انواع پلی ساکاریدهای دیواره‌های سلولی قارچی نظیر گلوکان، شیزوفیلان، کیتین و کیتوسان و غیره علاوه بر خاصیت ضدسرطانی، خواص درمانی، بهداشتی دیگری نیز دارند که آن‌ها را نامزد مناسبی برای کاربردهای پزشکی نموده است [۱۵، ۳۴]. این موضوع باعث شده است که در سال‌های اخیر توجه محققان به تولید این ترکیبات بیشتر شود. از جمله تحقیقات انجام شده در زمینه تولید کیتین و کیتوسان می توان به پژوهش مختاری حسینی و همکاران که در مورد بهینه سازی فرایند تولید کیتین و کیتوسان از *Ganoderma lucidum* است و Ospina و همکاران که در مورد جداسازی کیتوسان از این قارچ است، اشاره نمود [۲۶، ۲۵]. کمپلکس این پلیمرها هم، به خاطر هم افزایی خواص مفید آن‌ها، مورد توجه حوزه پزشکی و سلامت است و لذا تعدادی از گزارش‌های علمی منتشر شده در زمینه تولید کمپلکس این پلیمرها مطالعه کرده‌اند؛ مانند تحقیق مرادی تنها و همکاران که در زمینه بهینه سازی فرایند تولید کمپلکس کیتین-گلوکان از قارچ دارویی *Ganoderma lucidum* است [۲۷]. این کمپلکس فعالیت‌هایی مانند ترمیم زخم، آنتی اکسیدانی و ضد سرطانی دارد [۲۷، ۲۹]. هم‌چنین مطالعه Smirnou و همکاران در زمینه تولید کمپلکس کیتین-گلوکان از قارچ *Schizophyllum commune* در کشت غوطه‌ور است [۳۹]. چندین محقق هم بر مطالعه در مورد کاربردهای پزشکی این پلیمرها تمرکز نموده اند نظیر مطالعه صفایی و همکاران که با توجه به خواص ضدالتهابی و ضد میکروبی شیزوفیلان، در زمینه تولید یک پوشش زخم مناسب و بهینه سازی فرایند تولید آن می باشد [۳۷].

بررسی خواص ضدسرطانی پلی‌ساکاریدها

سرطان از جمله عوامل اصلی مرگ و میر در سراسر جهان است. به دلیل وجود اثرات جانبی داروهای شیمیایی، دانشمندان به دنبال استفاده از منابع طبیعی برای درمان سرطان هستند. در این راستا، توانایی ضدتوموی پلی‌ساکاریدهای قارچی مورد ارزیابی قرار گرفتند و نتایج امیدوارکننده‌ای به دست آمده است. روش‌های مدرن درمان سرطان با استفاده از محصولات قارچی، مورد مطالعه قرار گرفته‌اند [۱۶]. فعالیت ضدتوموری پلی‌ساکاریدها به طور مستقیم با تحریک سیستم ایمنی مرتبط بوده و تحت تأثیر خواص فیزیکی و شیمیایی قرار می‌گیرد . بین کونفورماسیون و وزن مولکولی هم‌بستگی وجود دارد، زیرا تنها مولکولی با وزن حداقل ۹۰ kDa ممکن است یک ساختار مارپیچ سه‌گانه داشته باشد. Lee و همکاران نشان دادند اثر EPS قارچ *G. applanatum* بر TNF-α به اندازه مولکولی آن وابسته است. پلی‌ساکاریدها عمدتا با تحریک ماکروفاژها و سلول‌های دندریتیک سبب تولید انواع سیتوکین‌ها، از جمله TNF-α و IL-1β و تحریک سلول‌های NK، T و B می‌شوند؛ این سلول‌ها با مهار رشد سلول‌های سرطانی در ارتباط هستند. تغییر عملکرد ماکروفاژ توسط پلی‌ساکاریدها تا حدی از طریق فعال سازی NF-κB صورت می‌گیرد. هم‌چنین پلی‌ساکاریدها تولید آنتی‌بادی IgM علیه سلول سرطانی را تحریک می‌کنند [۱۶، ۱۷، ۴۳، ۲۱، ۲، ۵۰، ۴۱].

آنتی‌اکسیدان‌ها با تخریب رادیکال‌ها به عنوان گونه‌های واکنش‌پذیر اکسیژن[1] و نیتروژن[2] از ابتلا به بیماری‌ها جلوگیری می‌کنند. وجود مقدار زیاد ROS و RNS سبب استرس اکسیداتیو، آسیب به ساختار سلول و عملکرد مولکول‌های زیستی می‌گردد و در بروز بسیاری از بیماری‌ها مانند آسم، بیماری‌های ریوی، التهاب، دیابت و بیماری‌های قلبی نقش دارد. سیستم ایمنی انسان تکامل یافته تا از آسیب به مولکول‌های زیستی جلوگیری و آسیب‌های ناشی از آن را ترمیم کند، اما در مواردی این سیستم کارآمد نیست. بنابراین لزوم توسعه و بهره‌مندی از آنتی‌اکسیدان‌ها به منظور استفاده در صنایع دارویی، غذایی و آرایشی-بهداشتی برای تخریب رادیکال‌های آزاد احساس می‌شود [۱۶، ۱۷]. گزارش‌های بسیاری در زمینه تولید آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی نظیر گنودریک اسید منتشر شده است. به عنوان مثال در مطالعه‌ای

[1] ROS

[2] RNS

به بررسی تأثیر الیسیتورها و شوک مکانیکی بر تولید گنودریک اسید توسط قارچ *Ganoderma lucidum* پرداختند. گنودریک اسید به عنوان یکی از متابولیت‌های مهم این قارچ با القای آپوپتوز سبب مهار رشد سلول‌های سرطانی شده و با اثر بر عملکرد سوپراکسید دسموتاز فعالیت آنتی‌اکسیدانی دارد. مشاهدات نشان می‌دهد، استفاده از امواج فراصوت با دو بار تیمار ۲۷۴ ثانیه‌ای در روزهای ۴ و ۷، سبب افزایش تولید گنودریک اسید برون سلولی نسبت به گنودریک اسید درون سلولی می‌شود. به نظر می‌رسد شوک مکانیکی حاصل از امواج فراصوت روی دریچه‌های سلولی قارچ اثر گذاشته و سبب خروج بیشتر این متابولیت از قارچ می‌شود. هم‌چنین بررسی اثر ریفتامفین بر تولید گنودریک اسید نشان می‌دهد، اضافه کردن ۱۰۰μM ریفتامفین در روز ۹ کشت، سبب افزایش تولید گنودریک اسید تا ۱۸/۶ mg g^{-1} می‌شود [۳۰، ۳۱، ۱۴]. حیدریان و همکاران به بررسی اثر متیل جاسمونات و آسپرین بر تولید گنودریک اسید توسط قارچ *Ganoderma lucidum* پرداختند. بیشترین تولید گنودریک اسید $mgml^{-}$ [1] ۰/۰۸۵ در غلظت ۴/۴ میلی مولار آسپرین و ۲۵۰ میلی مولار متیل جاسمونات به‌دست می‌آید. متیل جاسمونات به عنوان عامل افزایش دهنده وزن خشک سلولی نیز مطرح است [۱۱]. در مطالعه‌ای دیگر Fang و همکاران به بررسی اثر مقدار اولیه گلوکز و منبع نیتروژن بر تولید گنودریک اسید پرداختند [۹]. فعالیت آنتی‌اکسیدانی پلی‌ساکاریدها به صورت تخریب رادیکال آزاد، کلاته کردن یون آهن، مهار پراکسیداسیون لیپید و افزایش سوپراکسیددسموتاز[1]، کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز[2] است. برای مثال پلی‌ساکارید برون سلولی (EPS)[3] قارچ *Tremella fuciformis* توانایی کلاته کردن یون آهن را دارد. پلی‌ساکاریدها خواص آنتی‌اکسیدانی بیشتری نسبت به مونوساکاریدها نشان می‌دهند، زیرا مهم‌ترین عامل تاثیرگذار بر توانایی از بین بردن رادیکال‌های آزاد، اندازه مولکول کربوهیدرات است. انتخاب روش مناسب برای استخراج پلی‌ساکارید به ویژه نوع حلال‌ها، بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی تاثیر می‌گذارد. در ادامه به بررسی اثر عوامل مختلف بر خواص ضد سرطانی پلی‌ساکاریدها می‌پردازیم [۲۳، ۳۳، ۳۸].

بررسی اثرات فیزیکوشیمیایی کشت بر خواص ضدسرطانی پلی‌ساکاریدها

شرایط رشد قارچ، از جمله نوع محیط کشت، دما، pH، منبع کربن و نیتروژن، مواد معدنی مناسب و زمان کشت، تولید EPS در آسکومیست‌ها و بازیدیومیست‌ها را تحت تأثیر قرار می‌دهد. بیشترین تولید EPS در انتهای فاز رشد لگاریتمی یا اوایل فاز سکون رخ می‌دهد. زمان مطلوب برای تولید EPS عمدتا به نوع کشت و نوع قارچ بستگی داشته و معمولا ۳ تا ۴۰ روز است؛ زمان کشت بسیار طولانی منجر به کاهش تولید EPS و تشکیل پلی‌ساکاریدهایی با وزن مولکولی کم می‌شود. دمای مناسب ۲۰ تا ۳۰ درجه سانتیگراد و pH مناسب برای تولید EPS در محدوده ۴-۷ است. نوع منبع کربنی و غلظت آن عاملی مهم در تولید EPSاست. از دیگر عوامل مهم در تولید EPS، وجود منابع آلی و غیر آلی نیتروژن در محیط کشت است [۳۳، ۳۸].

قارچ *Cordyceps sinensis* در طب سنتی چین به‌منظور درمان بیماری‌های کبدی، کلیوی، تنفسی و قلبی استفاده می‌شود. با توجه به ارتباط رادیکال‌های آزاد با پیشرفت تومور، آنتی‌اکسیدان‌ها می‌توانند راهی برای مهار رشد تومور باشند. پلی‌ساکارید قارچ *Cordyceps* با تخریب رادیکال‌ها و مهار پراکسیداسیون لیپید، از آسیب اکسیداتیو به سلول‌ها جلوگیری می‌کند. تیمار موش‌های سرطانی(H22 cells) با ۱۰۰ mg/kg پلی‌ساکارید این قارچ سبب کاهش وزن تومور تا ۶۱/۷۰% می‌شود.

پلی‌ساکارید قارچ *C. sinensis* می‌تواند سبب بهبود عملکرد سوپراکسید دسموتاز و گلوتاتیون پراکسیداز در سلول‌های سرطانی شود. هم‌چنین مقدار مالوندیالدهید[4] (MDA) که در مراحل پایانی پراکسیداسیون لیپید تولید می‌شود، در بافت سرطانی بیش از بافت سالم است. این

[1] SOD
[2] GSH-Px
[3] Exopolysaccharide
[4] Malondialdehyde

پلی‌ساکارید می‌تواند تجمع MDA در بافت سرطانی را کاهش داده و با تعدیل فعالیت آنتی‌اکسیدانی میزبان رشد تومور را مهار کند [۴، ۲۰].

در مطالعه‌ای Leung و همکاران پس از جدا کردن Cs-HK1 از اندام بارده قارچ طبیعی *Cordyceps* به بررسی تولید EPS و خواص آنتی‌اکسیدانی آن پرداختند. تولید EPS بین روزهای ۲ تا ۴ کشت به سرعت افزایش می‌یابد. محتوای قندی EPS بین روزهای ۴ تا ۶ افزایش و محتوای پروتئین از روز ۴ (۲۹/۳%) تا روز ۵ (۲۷/۹%) کاهش می‌یابد. در تست‌های TEAC[1] و FRAP[2] تفاوت کمی بین فعالیت آنتی‌اکسیدانی EPS در روزهای ۸-۵ مشاهده شد [۲۰].

Arora و همکاران به بررسی اثر شرایط فیزیکوشیمیایی بر خواص آنتی‌اکسیدانی دو قارچ *Aspergillus* PR78 و *Aspergillus* PR66 پرداختند. در تست‌های اولیه مشخص شد، فعالیت آنتی‌اکسیدانی *Aspergillus* PR78 به‌طور معنی‌داری بیشتر از *Aspergillus* PR66 است. بررسی‌ها نشان داد، همزدگی اثر منفی بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی داشته و با افزایش دور همزن این فعالیت در هر دو قارچ کاهش می‌یابد. در کشت ساکن قدرت آنتی‌اکسیدانی و محتوای فنولی در هر دو قارچ بیشتر است [۱].

استفاده از سوکروز به عنوان منبع کربن و نیترات به عنوان منبع نیتروژن سبب افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی می‌شود. به‌طورکلی دی‌ساکاریدها برای تولید EPS مناسب‌تر هستند زیرا سبب سهولت در پلی‌مریزاسیون می‌شوند. بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی در دمای ۲۵C° است و با افزایش دما در ۴۰C° فعالیت آنتی‌اکسیدانی بین ۲۷-۳% و در ۱۰۰C° بیش از ۵۰% در هر دو قارچ کاهش می‌یابد. pH مناسب برای تولید پلی‌ساکارید نیز بین ۵-۷ است. تولید متابولیت‌های زیست‌فعال در pHهای اکستریم کاهش می‌یابد؛ زیرا pH با نفوذپذیری دیواره و غشا در ارتباط است و سبب اختلال در جذب یون‌ها و دفع مواد زاید می‌گردد [۱، ۸].

سلنیوم[3] از جمله عناصر ضروری برای سلامت انسان، کوفاکتور بسیاری از آنزیم‌ها از جمله گلوتاتیون پراکسیداز است. کمبود سلنیوم سبب ابتلا به بسیاری از بیماری‌ها از جمله سرطان شود. قابلیت دسترسی سلنیوم به شکل شیمیایی آن بستگی دارد. تصور می‌شود ترکیب پلی‌ساکاریدهای تولید شده توسط قارچ‌ها با سلنیوم، می‌تواند به افزایش خواص پلی‌ساکاریدها منجر شود. Malinowska و همکاران به مطالعه اثر Selol (ترکیبی متشکل از سلنیت تری‌گلیسیرید) بر رشد میسلیوم، تولید پلی‌ساکارید و فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن توسط قارچ *Hericium erinaceum* در کشت غوطه‌ور پرداختند. پلی‌ساکاریدهای این قارچ سبب افزایش تولید TNF-α و نیتریک اکسید توسط ماکروفاژها می‌شوند و با تقویت سیستم ایمنی خاصیت ضد سرطانی نشان می‌دهند. در غلظت ۵-۲/۱۰ g/L از Selol رشد میسلیوم افزایش می‌یابد. پیوستگی اسید چرب و Se در Selol سبب جذب آرام‌تر سلنیوم شده و اثرات سمی آن خنثی می‌گردد، هم‌چنین حضور اسیدهای چرب رشد میسلیوم را افزایش می‌دهند [۲۴].

تولید EPS با افزودن Selol به دلیل اصلاح ساختار غشای سلولی و افزایش نفوذپذیری آن به‌طور معنی‌داری افزایش می‌یابد و بازده تولید به ۲ برابر حالت کنترل می‌رسد. هم‌چنین فعالیت آنتی‌اکسیدانی پلی‌ساکارید حاوی سلنیوم نسبت به حالت کنترل افزایش می‌یابد. سلنیت تری‌گلیسیرید، محرک مؤثری در رشد میسلیوم و پلی‌ساکارید برون سلولی است و پلی‌ساکاریدهای حاوی سلنیوم می‌توانند به عنوان یک مکمل غذایی از Se و آنتی‌اکسیدان جهت بهبود مواد غذایی استفاده شوند [۲۴، ۱۹].

تولید EPS قارچ *Pycnoporus sanguineus* در دو بیوراکتور همزن‌دار[4] و هواگرد[5]، مورد مطالعه قرار گرفت. بررسی ترکیب EPS در دو بیوراکتور در جدول ۲ آمده است. وزن مولکولی EPS حاصل از STR و AR به ترتیب ۴۰۳ و ۵۵ کیلو دالتون است. فعالیت آنتی اکسیدانی EPS قارچ از

[1] Trolox equivalent antioxidant capacity
[2] Ferric reducing antioxidant power
[3] Selenium (Se)
[4] STR
[5] AR

جدول ۱. اثر پلی‌ساکارید قارچ Cordyceps بر رشد تومور در موش ($\bar{x}$±S.D.) [۴].

گروه‌ها	غلظت (mg/kg)	وزن تومور	نسبت مهار (%)
نرمال	-	-	-
کنترل	۰	۰/۰±۶۷۱/۳۴۸	-
غلظت پایین	۱۰۰	۰/۰±۲۵۷/۲۱۸[a]	۶۱/۷۰
غلظت بالا	۲۰۰	۰/۰±۴۸۵/۱۵۵	۲۷/۷۲
سیکلوفسفامید(CTX)	۲۰	۰/۰±۳۶۲/۲۱۹	۴۶/۰۵

[a] $p < 0.05$ (در مقایسه با گروه کنترل)

جدول ۲. ترکیب پلی‌ساکارید قارچ در دو بیوراکتور STR و AR [۳].

ترکیب کربوهیدرات	بیوراکتور هواگرد	بیوراکتور همزن‌دار
ریبوز	جدا نشد	۵/۰۷
زایلوز	۰/۶۱	۱۰/۴۰
گالاکتوز	۲/۱۶	۱۲/۳۰
گلوکز	۹۲/۹۱	۲۹/۶۱
مانوز	۳/۸۷	۴۲/۰۱
ترهالوز	جدا نشد	۰/۴۶
رامنوز	۰/۴۵	۰/۱۵

P. sanguineus درکشت غوطه‌ور STR و AR با استفاده تست DPPH بررسی شد؛ EPS تولید شده در STR به دلیل وزن مولکولی بالا، ترکیب مونوساکاریدها و باندهای گلیکوزیدی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی بیشتری دارد [۳].

Lavi و همکاران به بررسی خواص ضد توموری پلی‌ساکارید استخراج شده از کشت مایع میسلیوم (ME)[1] و اندام بارده (FBE)[2] قارچ *Pleurotus pulmonarius* پرداختند. بررسی ترکیب مونوساکارید این دو پلی‌ساکارید با استفاده از کروماتوگرافی گازی نشان داد، مقدار گلوکز در ME کمتر است و قندهایی مانند فوکوز و زایلوز در آن یافت می‌شود. پلی‌ساکارید FBE از پیوندهای آلفا و بتا تشکیل شده درحالی‌که پلی‌ساکارید ME فقط پیوندهای آلفا دارد.

این دو پلی‌ساکارید می‌توانند به طور معنی‌داری رشد سلول سرطانی کلورکتال HT29، HCT-116، LS174T، HM-7 و RSB را مهار کنند. چسبیدن سلول‌های سرطانی به سلول‌های اندوتلیال و ماتریکس خارج سلولی مرحله‌ای مهم در پیشرفت بیماری و متاستاز تومور است؛ قابلیت چسبیدن به فیبرونکتین، ترکیبی در ماتریکس خارج سلولی، با نشان‌دار کردن سلول‌های سرطانی روده بررسی شد. تیمار سلول‌های سرطانی روده با ME و FBE، توانایی چسبیدن به فیبرونکتین را به صورت وابسته به غلظت و زمان کاهش می‌دهد [۱۸].

بررسی اثرات روش استخراج بر خواص ضدسرطانی پلی‌ساکاریدها

به‌منظور استخراج EPS از کشت قارچ‌های آسکومیست و بازیدیومیست، معمولا از الکل‌ها مانند اتانول (مطلق یا ۹۵%) یا متانول استفاده می‌شود. EPS آسکومیست‌ها و بازیدیومیست‌ها عمدتا هتروپلی‌ساکارید است. بسیاری از خواص زیستی EPS مانند آنتی‌اکسیدانی، ضد میکروبی،

[1] Mycelium extract

[2] Fruiting body extract

ایمن سازی، ضد توموری و ... می‌توانند تحت تأثیر روش استخراج باشند. پلی‌ساکارید استخراج شده با آب از قارچ *P. tuber-regium* برای دفع سوپراکسید بهتر است، درحالی‌که پلی‌ساکارید استخراج شده با قلیا برای مهار هیدروکسیل، پراکسیداسیون لیپید کبدی و همولیز گلبول قرمز قوی‌تر است [۱۶، ۱۷، ۱۲].

Huang و همکاران به‌منظور جداسازی پلی‌ساکارید قارچ *Cordyceps sinensis* از حجم‌های متفاوت اتانول استفاده کردند. زمانی‌که نسبت اتانول به سوپرناتانت $\frac{1}{5}$ و $\frac{2}{5}$ است، EPS شامل ۸۳% قند و ۱% پروتئین است. در حجم برابر، محتوای قند در EPS کاهش یافته (۳۱/۲%) و محتوای پروتئین به ۲۸/۵% می‌رسد و باندهای پروتئینی در SDS-PAGE مشاهده می‌شود. در بالاترین نسبت اتانول به سوپرناتانت (۵)، محتوای قند ۶/۳% و محتوای پروتئین ۶۴/۴% می‌گردد [۱۲].

به‌منظور سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانی از تست‌های TEAC و FRAP استفاده شد و هر دو نتایج مشابهی داشت. پلی‌ساکاریدهایی که با استفاده از حجم‌های $\frac{1}{5}$ ، $\frac{2}{5}$ و ۱ اتانول استخراج شده بودند، فعالیت آنتی‌اکسیدانی نشان ندادند یا این فعالیت بسیار کم بود. درحالی‌که پلی‌ساکارید جدا شده با ۵ برابر اتانول، بالاترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی را در هر دو تست نشان داد. این پلی‌ساکارید می‌تواند بیش از ۷۰% از سلول‌های PC12 القا شده با H_2O_2، حفاظت کند. محتوای پروتئین پلی‌ساکارید و وجود گروه‌های هیدروکسیل می‌تواند روی فعالیت آنتی‌اکسیدانی تأثیرگذار باشد [۱۲].

Jia و همکاران به بررسی اثر روش استخراج بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی پلی‌ساکارید قارچ *Agaricus blazei* Murrill (ABM)، شامل استخراج با آب داغ، استخراج آنزیمی با سه آنزیم پکتیناز، سلولاز و پاپائین و استخراج آنزیم‌های ترکیبی (پکتیناز: سلولاز: پاپایین) پرداختند. عصاره ترکیب آنزیمی بالاترین بازده تولید پلی‌ساکارید (۴۴%/۱۷) و عصاره آب داغ کم‌ترین بازده تولید پلی‌ساکارید (۹۵%/۱۱) را داشت. به طورکلی محتوای قند و پروتئین در پلی‌ساکاریدهای استخراج شده با آنزیم بیشتر بود. بررسی‌های طیف‌سنجی مادون قرمز نشان داد، گروه‌های شیمیایی پلی‌ساکاریدها به هم شباهت دارند و آنزیمولیز ساختار پلی‌ساکارید را نابود نمی‌کند. تمام پلی‌ساکاریدها در تست DPPH فعالیت‌های آنتی اکسیدانی وابسته به غلظت نشان دادند. عصاره آنزیم‌های ترکیب شده دارای بالاترین عملکرد است؛ اما بین فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های تک آنزیمی تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد [۱۳].

در مطالعه‌ای Wang و همکاران از آب داغ، آمونیوم اگزالات ۱% و $NaBH_4$ 0.05% NaOH برای استخراج پلی‌ساکارید قارچ *Phellinus linteus* استفاده کردند و به بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی آن پرداختند. پلی‌ساکاریدهای استخراج شده با آب PL-W، PL-A ($(NH4)_2C_2O_4$) و PL-N (1.25 M NaOH/0.05% $NaBH_4$) نامیده شدند. محتوای پروتئینی پلی‌ساکارید PL-W بیشتر است. محتوای اسید اورونیک پلی‌ساکارید که ارتباط مستقیمی با

جدول ۳. بازده و ترکیب پلی‌ساکارید قارچ *C. sinensis* در حجم‌های مختلف اتانول [۱۲].

پلی‌ساکارید	بازده (mg)	قند (wt%)	پروتئین (wt%)	باندهای پروتئینی در PAGE(kDa)
P$\frac{1}{5}$	۲۸۵۴	۸۳/۶	۰/۹	دیده نشد
P$\frac{2}{5}$	۳۳۶۵	۸۳/۲	۱/۱	دیده نشد
P 1	۳۷۵	۳۱/۲	۲۸/۵	۱۱۰، ۹۵، ۵۵، ۱۵
P 2	۱۸۲۲	۲۱/۰	۵۰/۸	۵۵، ۴۰، ۲۲، ۱۹، ۱۵
P 5	۱۸۱۵	۶/۳	۶۴/۴	۱۵

قدرت تخریب و فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن دارد، در PL-A وPL-N بیشتر است. سنجش ترکیب مونوساکاریدهای PL-W، PL-A و PL-N با استفاده از کروماتوگرافی گازی نشان داد، در PL-W و PL-A، D-گلوکز مونوساکارید غالب است. D-زایلوز و D-آرابینوز در PL-N بیشتر و مونوساکارید D-گالاکتوز فقط در PL-N دیده شد.

فعالیت آنتی‌اکسیدانی پلی‌ساکاریدها با تست‌های DPPH، TEAC و FRAP سنجیده شد؛ PL-N که در محیط قلیایی استخراج شده با داشتن اورونیک اسید بیشتر، قدرت آنتی‌اکسیدانی بیشتری دارد. حضور اورونیک اسید در پلی‌ساکارید می‌تواند اتم هیدروژن کربن آنومریک را فعال کند و خاصیت آنتی‌اکسیدانی با توجه به دهندگی هیدروژن افزایش می‌یابد. هم‌چنین تست MTT روی سلول‌های SH-SY5Y القا شده با آب اکسیژنه نشان داد، در غلظت ۸۰g/mL از پلی‌ساکاریدها، زنده‌مانی سلول‌های تیمار شده با پلی‌ساکارید، بیش از ۸۴% است [۴۴].

پلی‌ساکاریدهای قارچ *Tremella mesenterica* می‌توانند تولید سیتوکین‌ها، TNF-α و نیتریک اکسید را در سلول‌های ماکروفاژ RAW 264.7 تحت تأثیر قرار دهد. استفاده از آب داغ به دلیل دمای بالا، زمان طولانی برای استخراج پلی‌ساکاریدهای این قارچ مناسب نیست. استفاده از فراصوت[1] برای استخراج، با توجه به تولید بالا در زمان کمتر، سهولت انجام و صرف انرژی کمتر پیشنهاد می‌گردد. استفاده از ۲۰-۱۰۰ kHz در استخراج پلی‌ساکارید، از تغییر ساختار و تخریب آن جلوگیری می‌کند و UAE می‌تواند روشی مؤثر برای استخراج پلی‌ساکاریدها باشد. به نظر می‌رسد فراصوت سبب افزایش محتوای پروتئینی پلی‌ساکارید می‌گردد. فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین‌ها با آمینواسیدهایی اهداکننده الکترون مانند تیروزین، متیونین، هیستیدین، لایزین و تریپتوفان در ارتباط است. Yan و همکاران از این روش برای استخراج پلی‌ساکارید از قارچ *Tremella mesenterica* استفاده کردند. در شرایط بهینه تولید نسبت آب به مواد خام ۳۴ mL/g، زمان استخراج ۳۰ دقیقه در دمای ۵۰°C تعریف شد. در این شرایط، بازده تولید پلی‌ساکارید ۸/۲۶% بود.

پلی‌ساکارید این قارچ (TMP) توسط کروماتوگرافی DEAE-Sephadex A-50 و Sephrose 6B gel filtration خالص‌سازی شد و ۲ پلی‌ساکارید بزرگ TMPA و TMPB با نسبت مونوساکاریدی متفاوت حاصل گردید. اثر TMP، TMPA و TMPB (۰/۵-۲ mg/mL) بر اریتروسیت رت القا شده با H_2O_2 مورد بررسی قرار گرفت. TMP، TMPA و TMPB غشاء اریتروسیت را از همولیز محافظت می‌کنند. IC50 برای TMP پس از یک ساعت انکوباسیون ۱/۰۱ mg/mL، برای TMPA مقدار ۱/۱۷ mg/mL و برای TMPB مقدار ۰/۵۲ mg/mL می‌باشد. این نتایج نشان می‌دهد پلی‌ساکاریدهای این قارچ به عنوان دهنده الکترون یا هیدروژن در تخریب $^{\bullet}OH$ نقش دارد [۴۰، ۲۸، ۶، ۴۶].

بررسی اثرات روش خشک کردن بر خواص ضدسرطانی پلی‌ساکاریدها

خصوصیات فیزیکوشیمیایی پلی‌ساکاریدها مانند وزن مولکولی به طور قابل توجهی تحت تأثیر فرآیند خشک کردن قرار می‌گیرد. روش خشک کردن می‌تواند سبب تغییر بازده تولید، محتوای پروتئینی، محتوای اورونیک اسید و در نتیجه فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی پلی‌ساکارید شود [۴۵]. Ma و همکاران در مطالعه‌ای به بررسی اثر روش‌های خشک کردن بر خواص فیزیکوشیمیایی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی پلی‌ساکارید (IOPS) قارچ *Inonotus obliquus* پرداختند. آن‌ها از فریزدرای، خلا و هوای گرم برای خشک کردن پلی‌ساکارید استفاده کردند. بازده پلی‌ساکارید به دست آمده از فریزدرای (IOPS-F) به‌طور معنی‌داری بیش از روش‌های دیگر بود. IOPS-F شامل ۲۶/۵۱% قند، ۲۲%۲۰/ اورونیک اسید و ۱۰/۸۵%پروتئین بود. همان‌طور که پیش‌تر ذکر شد، بین محتوای اورونیک اسید و تخریب رادیکال ارتباط مستقیمی وجود دارد.

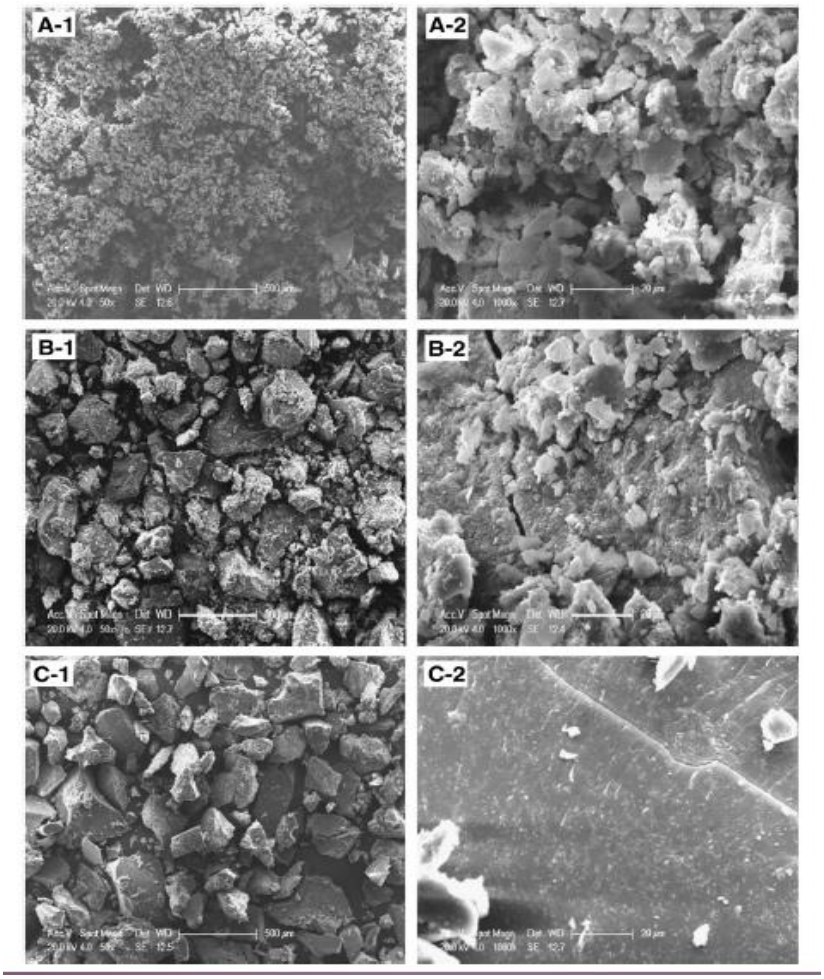
[1] Ultrasonic-assisted extraction technique (UAE)

بر اساس تجزیه و تحلیل کروماتوگرافی گازی، پلی‌ساکاریدها از نسبت‌های متفاوت مونوساکاریدی تشکیل شده‌اند. مشاهدات انجام شده با SEM نشان داد، سطوح سه نمونه IOPS تغییرات قابل توجهی در اندازه و شکل دارند. IOPS-Fعمدتا از پودر کرکی با ذرات کوچکتر و خاکستری رنگ تشکیل شده، در حالی‌که IOPS-H و IOPS-V شامل ذرات سیاه و سفید هستند.

فعالیت پلی‌ساکارید IOPS-F در تست‌های DPPH، کاهندگی یون آهن و مهار پراکسیداسیون لیپید از دیگر پلی‌ساکاریدها بیشتر بود. روش خشک کردن روی شکل پلی‌ساکارید، وزن مولکولی، درجه شاخه‌ای و ساختار هلیکس سه‌گانه آن و در نتیجه عملکرد پلی‌ساکارید تاثیرگذار است [۴۵، ۲۲].

بررسی اثر اصلاحات شیمیایی بر خواص ضدسرطانی پلی‌ساکاریدها

با توجه به اهمیت دسترسی به گروه‌های هیدروکسیل در واکنش پذیری، مطالعات زیادی به بررسی روش‌های اصلاحات شیمیایی اختصاص داده شده است. از کربوکسی متیلاسیون و سولفاته کردن برای اصلاح ساختار پلی‌ساکاریدها به منظور دست‌یابی به عملکردهای فیزیولوژیک متنوع از جمله خواص ضد توموری، ضد تکثیری و فعالیت آنتی‌اکسیدانی استفاده می‌شود [۴۲].



شکل ۱. تصویر میکروسکوپ الکترونی از پلی‌ساکارید. (A) خشک شده با فریزدرای، (B) خشک شده با هوا، (C) خشک شده با خلا [۲۲].

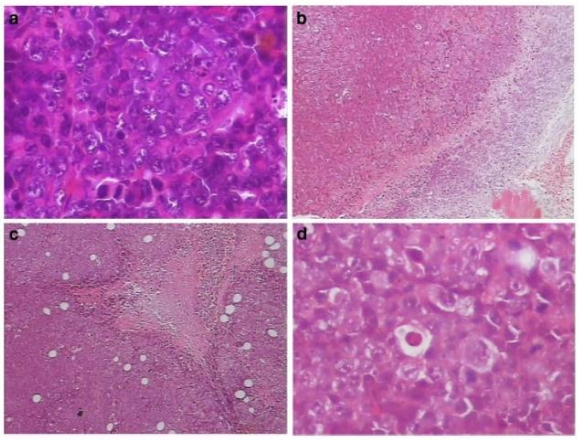
ترکیب اصلی قارچ *Poria cocos* فعالیت زیستی کمی دارد؛ گفته می‌شود این فعالیت کم با شکل و شاخه‌های زنجیره اصلی در ارتباط است. Chen و همکاران به بررسی اثر اصلاحات شیمیایی پلی‌ساکارید بر خواص ایمن‌سازی و ضد توموری آن پرداختند. آن‌ها ابتدا پلی‌ساکارید قارچ *Poria cocos* (PCS3-II) را استخراج کردند و سپس مشتق کربوکسی متیله (C-PC3-II) و مشتق کربوکسی متیل سولفاته (CS-PCS3-II) این پلی‌ساکارید را ساختند. همان‌طور که در جدول ۴ آمده است، مشتق کربوکسی متیل سولفاته پلی‌ساکارید بیش از داروی 5-Fluorouracil می‌تواند وزن تومور را کاهش دهد [۵].

خاصیت ایمن‌سازی پلی‌ساکارید را می‌توان با بررسی شاخص‌های تیموس، طحال، فاگوسیتوز ماکروفاژ و تولید آنتی‌بادی هومورال تعیین کرد. استفاده از CS-PCS3-II سبب افزایش وزن تیموس و طحال موش می‌شود، در نتیجه واکنش سیستم ایمنی به آنتی‌ژن افزایش می‌یابد.هم‌چنین CS-PCS3-II سبب افزایش معنی‌دار فاگوسیتوز و تولید آنتی‌بادی هومورال می‌شود.

آزمایش های درون تن[1] مشتقات پلی‌ساکارید قارچ روی سلول‌های توموری Sarcoma 180 موش و مقایسه با داروی 5-Fluorouracil نشان داد، فعالیت ضدتوموری CS-PCS3-II بیش از پلی‌ساکاریدهای دیگر است. با توجه به شکل ۲، CS-PCS3-II نکروز بزرگی در تومور پدید می‌آورد و با آسیب به کروماتین سبب القای آپوپتوز در سلول سرطانی می‌شود. نتایج نشان می‌دهد حضور کربوکسی متیل و سولفات به دلیل افزایش حلالیت، افزایش انعطاف‌پذیری زنجیر پلی‌ساکارید با تعاملات الکترواستاتیک و پیوند هیدروژنی سبب تسهیل عبور پلی‌ساکارید از غشا و اتصال با گیرنده‌های ماکروفاژ شده و نقش مهمی در ایمن‌سازی و خاصیت ضد توموری بازی می‌کنند [۵، ۳۵].

جدول ۴. وزن مولکولی پلی‌ساکارید و وزن تومور بعد تیمار با پلی‌ساکارید قارچ [۵].

نمونه	دز (روز+mg/kg)	وزن تومور (g)	نرخ مهار (%)	نرخ افزایش وزن بدن (%)
سالین	–	۱/۰۵۱	–	۲۵/۹
5-Fu	۲۰×۸	۰/۳۷۳	۶۴/۵	۱۸/۹
PCS3-II	۲۰×۸	۱/۰۲۵	۲/۵	۳۰/۳
C-PCS3-II	۲۰×۸	۰/۶۱۲	۴۱/۸	۲۹/۲
CS-PCS3-II	۲۰×۸	۰/۲۶۵	۷۴/۸	۳۶/۱



شکل ۲. تصویر میکروسکوپی تومور موش. (a) کنترل منفی، (b) کنترل مثبت، (c) نکروز تومور با CS-PCS3-II، (d) کروماتین تومور با CS-PCS3-II [۵].

[1] In vivo

در مطالعه‌ای Yang و همکاران به بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی پلی‌ساکارید قارچ *Phoma herbarum* و دو ترکیب سولفاتی مشتق شده از آن پرداختند. دو مشتق سولفاتی این پلی‌ساکارید YCP-S1 و YCP-S2 با استفاده از پیریدین و کلروسولفونیک اسید تهیه شدند. ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از YCP-S2 و YCP-S1 می‌تواند به ترتیب ۵۵/%۳ و ۴۸/۳% رادیکال سوپراکسید را که سبب آسیب سلولی و تولید انواع رادیکال‌های آزاد و اکسیدکننده می‌شود، مهار کنند. هم‌چنین ۱۰۰ میکروگرم این ترکیبات می‌تواند به ترتیب ۶۹/۶% و ۵۹/۱% هیدروکسیل را مهار کند، درحالی‌که همین مقدار گلوتاتیون تنها می‌تواند ۳۴/۶% هیدروکسیل را خنثی کند. نکته قابل ذکر این است که پلی‌ساکارید این قارچ به تنهایی توانایی تخریب رادیکال‌های سوپراکسید و هیدروکسیل را ندارد. ۸۰۰ میکروگرم از YCP-S2 و YCP-S1 به ترتیب ۶۸% و ۵۷% پراکسیداسیون لیپید را مهار کند [۴۷].

بررسی اثر خالص‌سازی بر خواص ضدسرطانی پلی‌ساکاریدها

پلی‌ساکاریدهای قارچ *Tricholoma matsutake* فعالیت‌های زیستی متعددی مانند تنظیم سیستم ایمنی، ضد توموری، آنتی‌اکسیدانی و ضد جهش‌زایی دارند. Tao در سال ۲۰۰۶ بیان کرد حلالیت خوب در آب و وزن مولکولی نسبتا بالا برای افزایش فعالیت ضد توموری پلی‌ساکاریدها بسیار مهم است. در مطالعه‌ای You و همکاران پلی‌ساکاریدهای *T. matsutake* را استخراج کردند و با استفاده از کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون (HP-GPC) خالص‌سازی انجام دادند. سه پیک TM-P1، TM-P2 و TM-P3 بدست آمد. بررسی FT-IR پلی‌ساکاریدها نشان داد، ترکیبات مونوساکاریدی TM-P1 و TM-P3 مشابه و متفاوت از TM-P2 هستند.

فعالیت ضد تکثیری پلی‌ساکاریدها روی سلول‌های HepG2و A549 با استفاده از تست MTT مورد بررسی قرار گرفت. تمام پلی‌ساکاریدها سبب مهار وابسته به غلظت رشد سلول‌های سرطانی می‌شوند. TM-P2با توجه به تفاوت در ترکیب شیمیایی و ساختار با مهار ۶۷/۹۸% و ۵۹/۰۴% سلول‌های HepG2 و A549 بیشترین فعالیت ضد تکثیری داشت [۴۸].

DU و همکاران به بررسی اثر خالص‌سازی بر تقویت سیستم ایمنی توسط پلی‌ساکارید قارچ *Tremella aurantialba* پرداختند. پس از استخراج با آب داغ، ۳ پلی‌ساکارید TAP50w، TAP10-50w و TAP1-10w با استفاده از اولترافیلتراسیون به دست آمدند. پلی‌ساکارید TAP50w با توجه به بازده بیشتر، با استفاده از کروماتوگرافی تعویض یونی خالص‌سازی شد و ۵ ترکیب TAPA تا TAPE به دست آمدند. پلی‌ساکارید TAPA با بازده بالاتر، توسط ژل کروماتوگرافی S-500 خالص سازی شد و ۲ پیک TAPA1 و TAPA2 به دست آمدند. TAPA1 با استفاده از کروماتوگرافی HPLC خالص‌سازی شد. مشتق سولفاتی پلی‌ساکارید TAPA1 نیز ساخته شد. اثر پلی‌ساکاریدهای به دست آمده بر تکثیر لنفوسیت طحال موش مورد بررسی قرار گرفت. پلی‌ساکاریدهای TAP50w، TAP10-50w و TAP1-10w به طور معنی‌داری سبب تحریک وابسته به غلظت تکثیر لنفوسیت طحال موش می‌شوند. همان‌طور که انتظار می‌رفت پلی‌ساکارید TAPA1 حاصل از کروماتوگرافی HPLC سبب تحریک بیشتر تکثیر لنفوسیت طحال موش نسبت به TAPA می‌شود. مشتق سولفاته TAPA1 به دلیل ساختار، وزن مولکولی، ترکیب مونوساکاریدی و محل قرارگیری سولفات بیشترین اثر را روی تکثیر لنفوسیت طحال موش دارد [۷].

در مطالعه‌ای Gan و همکاران به بررسی خاصیت ضد توموری پلی‌ساکارید قارچ Bi *Pholiota dinghuensis* پرداختند. پلی‌ساکارید (PDP) با استفاده از کروماتوگرافی تعویض یونی خالص‌سازی شد؛ ۳ پیک PDP-1، PDP-2 و PDP-3 به دست آمد. بررسی ترکیبات پلی‌ساکاریدها نشان داد، PDP-3 بیشترین محتوای پروتئین، اورونیک اسید و سولفات را دارد. مونوساکاریدهای زایلوز و رامنوز تنها در این پلی‌ساکارید یافت می‌شود و مقدار فوکوز، مانوز و گالاکتوز نیز در PDP-3 نسبت به PDP-1 و PDP-2 بیشتر است. بررسی‌های FTIR نشان داد، در پلی‌ساکارید

جدول ۵. اثر پلی‌ساکارید با خلوص متفاوت بر تکثیر لنفوسیت طحال موش [۷].

نمونه	نرخ تکثیر(%)		
	۵۰ $\mu g/ml$	۲۰۰ $\mu g/ml$	۵۰۰ $\mu g/ml$
TAP50w	۲۹۹/۹۶	۴۵۳/۹۰	۴۷۴/۰۱
TAP10-50w	۲۷۸/۸۹	۳۶۵/۲۸	۴۴۳/۸۳
TAP1-10w	۲۵۰/۷۶	۳۲۹/۰۰	۳۲۴/۰۸
TAPA	۲۹۶/۴۶	۴۳۸/۲۷	۴۵۴/۱۵
TAPB	۴۲۶/۹۰	۴۶۰/۵۰	۴۲۳/۱۱
TAPC	۲۸۳/۰۴	۲۹۳/۴۴	۲۳۹/۶۱
TAPD	۲۱۳/۲۶	۲۴۸/۶۸	۲۰۲/۰۳
TAPE	۲۹۸/۴۶	۴۲۸/۲۷	۴۵۹/۹۷
TAPA1	۳۲۰/۵۱	۴۶۸/۲۵	۴۸۳/۱۵
TAPA1-s	۳۳۹/۶۷	۴۸۴/۱۰	۵۹۳/۹۸

PDP-3 پیوند نامتقارن و متقارن O-S وجود دارد. هم‌چنین پیوند N-H در این پلی‌ساکارید نشان دهنده مقدار زیاد پروتئین در آن می‌باشد.

اثر ضد تکثیری این ۳ پلی‌ساکارید روی سلول‌های سرطانی گوارش انسان BGC-823 بررسی شد. ۴۰۰mg/L از PDP-3 پس از ۲۴ ساعت ۴۶/۸۵% سلول‌ها و پس از ۷۲ ساعت ۸۵/۷۸% سلول‌های سرطانی را مهار می‌کند. تفاوت در خواص ضد توموری پلی‌ساکاریدهای قارچ *Pholiota dinghuensi* می‌تواند ناشی از تفاوت در ترکیب مونوساکاریدها، محتوای پروتئین و اورونیک اسید آن باشد [۱۰].

نتیجه‌گیری

همان‌طور که پیشتر ذکر شد باتوجه به خواص گسترده‌ی پلی‌ساکاریدهای قارچی می‌توان از آن‌ها به منظور پیشگیری و درمان بسیاری از بیماری‌ها استفاده کرد. جهت افزایش بازده و خواص پلی‌ساکاریدهای قارچی لازم است به شرایط فیزیکوشیمیایی محیط کشت، روش‌های استخراج و خشک کردن پلی‌ساکارید توجه شود. تغییر در هریک از مراحل ذکر شده می‌تواند موجب تغییر ساختار پلی‌ساکارید از جمله تغییر در نوع پیوند، درجه انشعاب، ترکیب مونوساکاریدها، وزن مولکولی، محتوای پروتئینی، حلالیت و ... شود که این تفاوت‌ها می‌تواند روی اثربخشی پلی‌ساکارید تأثیرگذار باشد. به همین دلیل لازم است ساختار شیمیایی پلی‌ساکاریدها باید با دقت مطالعه شود تا بهترین ساختار برای درمان مورد نظر مشخص گردد.

منابع

[1] Arora D.S, Chandra P. 2010, Assay of antioxidant potential of two *Aspergillus* isolates by different methods under various physio-chemical conditions. Brazilian Journal of Microbiology, 41(3):765-777.

[2] Bae I.Y., Shin J.Y., Lee H.G. 2011, Preparation of Black Hoof medicinal mushroom *Phellinus linteus* (Berk. et M.A. Curt.) Teng (Aphyllophoromycetideae) beta-glucan sulfate and in vitro tumor cell growth inhibitory activity. International Journal of Medicinal Mushrooms. 13(2): 115-120.

[3] Cao J., Zhang H.J., Xu C.P. 2014, Culture characterization of exopolysaccharides with antioxidant activity produced by *Pycnoporus sanguineus* in stirred-tank and airlift reactors. Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers, 45(5): 2075-2080.

[4] Chen J., Zhang W., Lu T., Li J., Zheng Y., Kong L. 2006, Morphological and genetic

characterization of a cultivated *Cordyceps sinensis* fungus and its polysaccharide component possessing antioxidant property in H22 tumor-bearing mice, Life Science, 78(23):2742-2748.

[5] Chen X., Zhang L., K-Cheung P.C. 2010, Immunopotentiation and anti-tumor activity of carboxymethylated-sulfated β-(1→3)-D-glucan from *Poria cocos*, International Immunopharmacol. 10(4):398-405.

[6] Cui J., Chisti Y. 2003, Polysaccharopeptides of *Coriolus versicolor*: physiological activity, uses, and production. Biotechnology Advances, 21(2):109-22.

[7] Du X.J., Zhang J.S., Yang Y., Tang Q.J., Jia W., Pan Y.J. 2010, Purification, chemical modification and immunostimulating activity of polysaccharides from *Tremella aurantialba* fruit bodies. Journal of Zhejiang University Science B, 11(6): 437-442.

[8] Fan L., Soccol A.T., Pandey A., Soccol C.R. 2007, Effect of nutritional and environmental conditions on the production of exo-polysaccharide of *Agaricus brasiliensis* by submerged fermentation and its antitumor activity. LWT-Food Science and Technology, 40(1):30-35.

[9] Fang Q., 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.

[10] Gan D., Ma L., Jiang C., Xu R., Zeng X. 2011, Production, preliminary characterization and antitumor activity in vitro of polysaccharides from the mycelium of *Pholiota dinghuensis* Bi. Carbohydrate Polymers, 84: 997-1003.

[11] Heydarian M.S., Hatamian-Zarmi A., Amoabediny G., Yazdian F., Doryab A. 2015, Synergistic Effect of Elicitors in Enhancement of Ganoderic Acid Production: Optimization and Gene Expression Studies. Applied food biotechnology, 2 (3): 57-62.

[12] Huang Q.L., Siua K.C., Wanga W.Q., Cheunga Y.C., Wu J.Y. 2013, Fractionation, characterization and antioxidant activity of exopolysaccharides from fermentation broth of a *Cordyceps sinensis* fungus. Process Biochemistry, 48(2):380-386.

[13] Jia S., Li F., Liu Y., Ren H., Gong G., Wang Y. 2013, Effects of extraction methods on the antioxidant activities of polysaccharides from *Agaricus blazei* Murrill. International Journal of Biological Macromolecules, 62:66-69.

[14] Jiang Z.M., Qiu H.B., Wang S.Q., Guo J., Yang Z.W., Zhou S.B. 2018, Ganoderic acid A potentiates the antioxidant effect and protection of mitochondrial membranes and reduces the apoptosis rate in primary hippocampal neurons in magnesium free medium. Pharmazie, 73(2): 87-91.

[15] Komatsu N., Okubo S., Kikumoto S., Kimura K., Saito G. 1969, Host-mediated antitumor action of schizophyllan, a glucan produced by *Schizophyllum commune*. GANN. 60(2):137-44.

[16] Kothari D., Patel S., Kim S.K. 2018, Anticancer and other therapeutic relevance of mushroom polysaccharides: A holistic appraisal. Biomedicine & Pharmacotherapy, 105:377-394.

[17] Kozarski M,, Klaus A., Jakovljevic D., Todorovic N., Vunduk J., Petrović P., Niksic M., Vrvic M.M., van Griensven L. 2015, Antioxidants of Edible Mushrooms. Molecules, 20(10):19489-19525

[18] Lavi I., Dana Levinson D., Peri I., Tekoah Y., Hadar Y., Schwartz B. 2010, Chemical characterization, antiproliferative and antiadhesive properties of polysaccharides extracted from *Pleurotus pulmonarius* mycelium and fruiting bodies. Applied Microbiology and Biotechnology, 85:1977-1990.

[19] Lee J.S., Cho J.Y., Hong E.K. 2009, Study on macrophage activation and structural characteristics of purified polysaccharides from the liquid culture broth of *Hericium erinaceus*. Carbohydrate Polymers, 78(1):162-168.

[20] Leung P.H., Zhao S., Ho K.P., Wu J.Y. 2009, Chemical properties and antioxidant activity of exopolysaccharides from mycelial culture of *Cordyceps sinensis* fungus Cs-HK1. Food Chemistry, 114(4): 1251-1256.

[21] Lio S.F., Liang C.H., Ho M.Y., Wong C.H. 2013, Immunization of fucose-containing polysaccharides from Reishi mushroom induces antibodies to tumor-associated Globo H-series epitopes. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 110 (34):13809-13814.

[22] Ma L., Chen H., Zhu W., Wang Z. 2013, Effect of different drying methods on physicochemical properties and antioxidant activities of polysaccharides extracted from mushroom *Inonotus obliquus*. Food Research International, 50(2):633.

[23] Ma X.K., Zhang H., Peterson E.C., Chena L. 2014, Enhancing exopolysaccharide antioxidant formation and yield from *Phellinus* species through medium optimization studies. Carbohydrate Polymers, 107(1):214-220.

[24] Malinowska E., Krzyczkowski W., Herold F., Łapienis G., S′ lusarczyk J., Suchocki P., Kuras M., Turło J. 2009, Biosynthesis of selenium-containing polysaccharides with antioxidant activity in liquid culture of *Hericium erinaceum*. Enzyme and Microbial Technology, 44(5):334-343.

[25] Mesa Ospina N., Ospina Alvarez S.P., Escobar Sierra D.M., Rojas Vahos D.F., Zapata Ocampo P.A., Ossa Orozco C.P. 2015, Isolation of chitosan from *Ganoderma lucidum* mushroom for biomedical applications. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 26(3):135.

[26] Mokhtari-Hosseini Z.B., Hatamian-Zarmi A., Mohammadnejad J., Ebrahimi-Hosseinzadeh B. 2018, Chitin and chitosan biopolymer production from the Iranian medicinal fungus *Ganoderma lucidum*: Optimization and characterization. Preparative Biochemistry and Biotechnology, 48(7):1-9.

[27] Moradi-Tanha A., Hatamian-Zarmi A., Ebrahimi-Hosseinzadeh B., Mokhtari-Hosseini Z.B., Kiani-Rad S. 2018, A Study of growth and chitin-Glucan complex production kinetics in submerged culture of medicinal fungus *Ganoderma lucidum*. Journal of Applied Research of Chemical -Polymer Engineering, 2(1): 31-43.

[28] Ng T.B. 1998, A Review of Research on the Protein-Bound Polysaccharide (Polysaccharopeptide, PSP) from the Mushroom *Coriolus versicolor* (Basidiomycetes: Polyporaceae). Pharmac. 30(1):1-4.

[29] Ngo D.H., Kim S.K. 2014, Antioxidant effects of chitin, chitosan, and their derivatives. Advances in Food and Nutrition Research, 73:15-31.

[30] Nojoki F., Hatamian-Zarmi A., Ebrahimi Hosseinzadeh B., Mir-derikvand M., Mokhtari-Hosseini Z.B., Kalantari-Dehaghi

S. 2017, Investigation and Optimization Effects of ultrasound waves to produce Ganoderic acid, anti-cancer mushrooms metabolite. Iranian J of Medical Microbiology, 11 (1): 58-66.

[31] Nojoki F., Hatamian-Zarmi A., Mir-drikvand M., Ebrahimi-Hosseinzadeh B., Mokhtari-Hosseini Z.B., Kalantari-Dehaghi S., Esmaeilifar M. 2016, Impact of Rifampin Induction on the Fermentation Production of Ganoderic Acids by Medicinal Mushroom *Ganoderma lucidum*, Applied food biotechnology, 3 (2): 91-98.

[32] Ohno N., N-Muira N., Chiba N., Adachi Y., Yadomae T. 1995, Comparison the immunopharmacological activities of triple and single-helical schizophyllan in mice. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 18(9):1242-1247.

[33] Osińska-Jaroszuk M., Jarosz-Wilkołazka A., Jaroszuk-Ściseł J., Szałapata K., Nowak A., Jaszek M., Ozimek E., Majewska M. 2015, Extracellular polysaccharides from Ascomycota and Basidiomycota: production conditions, biochemical characteristics, and biological properties. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 31(12): 1823-1844.

[34] Qin C., Du Y., Xiao L., Li Z., Gao X. 2002, Enzymic preparation of water-soluble chitosan and their antitumor activity. International Journal of Biological Macromolecules, 31(1-3):111-7.

[35] Ren L., Perera C., Hemar Y. 2012, Antitumor activity of mushroom polysaccharides: a review. Food and function, 3(11): 1118-1130.

[36] Ruthes A.C., Smiderle F.R., Iacomini M. 2015, d-Glucans from edible mushrooms: A review on the extraction, purification and chemical characterization approaches. Carbohydrate Polymers, 6(117): 753-761.

[37] Safaee-Ardakani M.R., Hatamian-Zarmi A., Sadat S.M., Mokhtari-Hosseini Z.B., Ebrahimi-Hosseinzadeh B., Rashidiani J., Kooshki H. 2019, Electrospun Schizophyllan /Polyvinyl alcohol blend nanofibrous scaffold as potential wound healing. International Journal of Biological Macromolecules, 127: 27-38

[38] Shu C.H., Lung M.Y. 2004, Effect of pH on the production and molecular weight distribution of exopolysaccharide by *Antrodia camphorata* in batch cultures. Process Biochemistry, 39(8):931-937.

[39] Smirnou D., Krcmar M., Prochazkova E. 2011, Chitin-glucan complex production by *Schizophyllum commune* submerged cultivation. Polish Journal of Microbiology, 60(3):223-8.

[40] Sun X., Sun Y., Zhang Q., Zhang H., Yang B., Wang Z., Zhu W., Li B., Wang Q., Kuang H. 2014, Screening and comparison of antioxidant activities of polysaccharides from *Coriolus versicolor*. International Journal of Biological Macromolecules, 69: 12-19

[41] Wang J., Hu S., Nie S., Yu Q., Xie M. 2016, Reviews on mechanisms of in vitro antioxidant activity of polysaccharides. Oxidative medicine and cellular longevity, (64):1-13.

[42] Wang X., Zhang Z., Zhao M. 2015, Carboxymethylation of polysaccharides from *Tremella fuciformis* forantioxidant and moisture-preserving activities. International Journal of Biological Macromolecules, 72:526-530.

[43] Wang Y., Fang J., Ni X., Li J., Liu Q., Dong Q., Duan J., Ding K. 2013, Inducement of cytokine release by GFPBW2, a novel polysaccharide from fruit bodies of *Grifola*

frondosa, through Dectin-1 in macrophages. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 61 (47):11400-11409.

[44] Wang Z.B., Pei J.J., Maa H.L., Cai P.F., Yan J.K. 2014,, Effect of extraction media on preliminary characterizations and antioxidant activities of *Phellinus linteus* polysaccharides. Carbohydrate Polymers, 109: 49-55.

[45] Wu S., Li F., Jia S., Ren H., Gong G., Wang Y., Lv Z., liu Y. 2014, Drying effects on the antioxidant properties of polysaccharides obtained from *Agaricus blazei* Murrill. Carbohydrate Polymers, 103:414-417.

[46] Yan Y.L., Yu C.H., Chen J., Li X.X., Wang W., Li S.Q. 2011, Ultrasonic-assisted extraction optimized by response surface methodology, chemical composition and antioxidant activity of polysaccharides from *Tremella mesenterica*. Carbohydrate Polymers, 83(1):217-224.

[47] Yang X.B., Gao X.D., Han F., Tan R.X. 2005, Sulfation of a polysaccharide produced by a marine filamentous fungus *Phoma herbarum* YS4108 alters its antioxidant properties in vitro. Biochimica et Biophysica Acta 1725(1):120-127.

[48] You L., Gao Q., Feng M., Yang B., Ren J., Gu L., C-Cui C., Zhao M. 2013, Structural characterisation of polysaccharides from *Tricholoma matsutake* and their antioxidant and antitumour activities. Food Chemistry, 138(4):2242-2249.

[49] Zhang Y., Dai L., Kong X., Chen L. 2012, Characterization and in vitro antioxidant activities of polysaccharides from *Pleurotus ostreatus*. International Journal of Biological Macromolecules, 51(3):259-265.

[50] Zhou C., Qiao Y., Tang Q., Jia W., Liu Y., Wu A. 2013, Purification and characterization of a novel small-molecule polysaccharide from the Maitake medicinal mushroom *Grifola frondosa* (higher Basidiomycetes). International Journal of Medicinal Mushrooms, 15(2):145-152.

Effect of Production, Extraction and Purification methods on Anti-cancer property of Fungal Polysaccharides

Hale Alvandi[1], Ashrafalsadat Hatamian-Zarmi[1]*, Bahman Ebrahimi Hosseinzadeh[1], Zahra-Beagom Mokhtari-Hosseini[2], Hamed Aghajani[3]

[1] Department of Life Science Engineering, Faculty of New Sciences and Technologies, University of Tehran, Tehran, Iran
[2] Department of Chemical Engineering, Faculty of Petroleum and Petrochemical Engineering, Hakim Sabzevari University, Sabzevar, Iran
[3] Department of Forestry and Forest Ecology, Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Iran

* Email: hatamian_a@ut.ac.ir

Received: 10 Jun 2019 Accepted: 7 September 2020

Abstract

Cancer is one of the death leading causes of worldwide. Considering the nutritional value of fungi in traditional medicine and the history of their use in the treatment of various cancers, modern methods of treating cancer were studied using fungal products, especially polysaccharides. The antitumor activity of fungal polysaccharides is directly related to the stimulation of the immune system. These polysaccharides damage the free radicals and inhibit the growth of cancer cells by altering the function of macrophages, stimulating the production of anti-cancer antibodies and increasing nitric oxide and cytokines production. Despite extensive research on the therapeutic effects of fungal polysaccharides, further research is needed to identify their chemical structure, especially in purification methods. Fungal polysaccharides are differed in featured such as linkage type, the degree of branching, molecular weight and solubility. The growth conditions of the fungal species, including the compositions of the culture medium, temperature, pH and type of bioreactor, affect the yield of polysaccharide and its monosaccharide composition. Polysaccharide extraction methods, drying, purification, and chemical modification can change the structural properties of polysaccharide, including linkage type, the degree of branching, uronic acid content, protein content, and solubility. Structural differences in fungal polysaccharides have been shown to lead to differences in antioxidant activity, anti-proliferation, and immune stimulation. Therefore, by investigating the chemical structure of fungal polysaccharides, it can be targeted to the production of polysaccharides for the treatment of cancer.

Keywords: Fungi, Polysaccharide, β-Glucan, Anti cancer, Antioxidant.