فصلنامه علمی - پژوهشی زیست شناسی کاربردی دانشگاه الزهرا(س)
دوره ۳۳ ، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۹

بررسی مورفولوژیکی، فیتوشیمیایی و خواص بیولوژیکی قارچ طاقچه‌ای *Cerrena unicolor* جمع‌آوری شده از جنگل‌های ارسباران

سعید ملائی[۱] ، مصطفی عبادی*[۲]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۲/۱۴
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۲/۳

چکیده

قارچ‌های طاقچه‌ای یکی از مهمترین قارچ‌های ماکروسکوپی هستند که نقش بسزایی را در اکوسیستم ایفا می‌کنند. در این تحقیق، ابتدا ویژگی‌های مورفولوژیکی قارچ Cerrena unicolor مطالعه شد و سپس، تاثیر حلال‌های مختلف (n-هگزان، دی‌کلرومتان، اتیل‌استات و متانول) در استخراج ترکیبات فنولی، خاصیت آنتی‌اکسیدانی و سمیت‌سلولی مورد بررسی قرار گرفت. میزان فنول و فلاونوئید کل، آنالیز فنولیک‌اسیدها، خاصیت آنتی‌اسیدانی و فعالیت سمیت‌سلولی بر علیه رده سلولی سرطانی سینه (MCF-7) به ترتیب با روش‌های اسپتروفتومتری، کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC)، مهار رادیکال آزاد (DPPH)، و آزمون رنگ سنجی MTT مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج نشان داد که بازیدیوکارپ شکل نیم‌دایره و موج‌دار داشته و سطح بالایی آن پوشیده از کرک‌های سفید تا قهوه‌ای روشن بود. بازیدیوم‌ها به طول ۲۵ میکرومتر، چماغی شکل و حامل چهار استریگما با بازیدیوسپورهای بیضوی بودند. همچنین، نتایج نشان داد که در مقایسه با دیگر عصاره‌ها، عصاره متانولی بیشترین میزان فنول و فلاونوئید کل را داشت. بعلاوه، بنزوئیک‌اسید، پروتوکاتکوئیک اسید، پاراکوماریک‌اسید، گالیک‌اسید و سینامیک‌اسید عمده‌ترین فنولیک‌اسیدهای موجود در عصاره متانولی و اتیل‌استاتی بودند. علاوه بر این، عصاره متانولی بیشترین خاصیت آنتی-اکسیدانی در مهار رادیکال‌های آزاد DPPH و عصاره‌های متانولی و اتیل‌استاتی بیشترین خاصیت سمیت‌سلولی بر علیه رده‌سلولی MCF-7 را داشتند. بنابراین، عصاره متانولی بدلیل داشتن ترکیبات فنولی، می‌تواند بعنوان منبع جدید آنتی‌اکسیدان طبیعی با خاصیت سمیت‌سلولی مطرح باشد.

واژه‌های کلیدی: ***آنتی‌اکسیدان، بازیدیوکارپ، بازیدیومیست، ترکیبات فنولی، سمیت‌سلولی، عصاره متانولی.***

۱- تبریز، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، دانشکده علوم پایه، گروه شیمی
۲-تبریز، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی
*(نویسنده مسئول: m.ebadi@azaruniv.ac.ir)

مقدمه

در طب‌شرقی، قارچ‌های دارویی کاربردهای بسیار گسترده‌ای داشته و برای درمان انواع اختلالات از جمله بدخیمی‌ها استفاده می‌شده‌اند (Patel & Goyal, 2012). مطالعات گسترده‌ای در بسیاری از کشورهای مختلف دنیا در جهت استفاده از قارچ‌ها و کشف متابولیت‌های آنها برای درمان انواعی از بیماری‌ها انجام گرفته است. در همین راستا، ترکیبات دارویی مهمی نظیر پنی‌سیلین، گریفولین، سیکلوسپورین، آلکالوئیدهای ارگوت، کریستن، لنتینان و ... از قارچ‌ها استخراج شده‌اند (Das, 2010; Anjum *et al*., 2012; Mizuno & Nishitani, 2013). علاوه بر این، ترکیبات آنتی‌اکسیدانی زیادی همچون Interfungins A از قارچ‌های داروئی بدست آمده‌اند (Lee & Yun, 2007). بنابراین، با توجه به تاثیر بالا، هزینه پایین و سهولت تهیه، قارچ‌ها می‌توانند منبع مناسبی برای تهیه داروها برای مصارف پزشکی باشند.

قارچ‌های طاقچه‌ای بطور عمده از شاخه بازیدیومیست‌ها بوده و از چوب به عنوان منبع تغذیه و یا بستر رشد استفاده می‌کنند. این قارچ‌ها نقش حیاتی در اکوسیستم بویژه در چرخه مواد آلی ایفا می‌کنند و با دارا بودن سیستم آنزیمی منحصر به فرد قادر به تجزیه چوب به اجزای سازنده آن هستند. در عین حال، بسیاری از این قارچ‌ها دارای منابع عظیم درمانی و عناصر مفید و فعال به لحاظ بیولوژیک بوده و از دیرباز کاربردهای وسیعی در طب سنتی داشته‌اند (Christopher, 1988; Wasser & Weis, 1999). در تحقیقات انجام گرفته خواص دارویی برخی قارچ‌های طاقچه‌ای نظیر *Ganoderma*، *Phellinus*، *Fomes* و *Trametes* بررسی شده است. عصاره این قارچ‌ها، شامل ترکیبات فعالی همچون پروتئین‌ها، پلی‌ساکارید، گلیکوزید، چربی‌ها، اسانس، آلکالوئید، فنول، توکوفرول، کارتنوئید، فلاونوئید و اسیدهای آلی بوده و برای درمان بسیاری از بیماری‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند (Unyayar *et al*., 2006; Rashid *et al*., 2011; Patel & Goyal, 2012).

قارچ *Cerrena unicolor* (bull.) murril نوعی قارچ طاقچه‌ای غیر خوراکی است و پراکندگی وسیعی در دنیا بویژه در مناطق جنگلی آسیا، اروپا، آفریقا و آمریکای جنوبی دارد (Roody, 2003) . *C. unicolor* بعنوان یک قارچ تجزیه کننده چوب مطرح است و باعث ایجاد پوسیدگی سفید بر روی چوب می‌شود. این قارچ هم بصورت پارازیت در بافت زنده و هم بصورت ساپروفیت بر روی بخش آسیب دیده درختانی نظیر افرا، زبان گنجشک، راش، غان، و بلوط یافت می‌شوند. از جدایه‌های مختلف این قارچ جهت تولید آنزیم‌های صنعتی مختلف نظیر لاکاز، منگنز پراکسیداز، سلوبیزدهیدروژناز، گزیلیناز و سلولاز استفاده می‌کنند (Sulej *et al*., 2015; Zhang *et al*., 2017). همچنین، تحقیقات نشان داده‌اند که این قارچ منبع مناسبی از ترکیبات فعال زیستی با اهمیت دارویی و پزشکی است. در تحقیقی که بر روی مولکول‌های سبک وزن جداشده از قارچ *C. unicolor* انجام شده است فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی، ضدسرطانی و آنتی‌باکتریایی آنها مورد بررسی قرار گرفته و معلوم شده است که این ترکیبات خواص ضدسرطانی و آنتی‌اکسیدانی قابل قبولی دارند (Mizerska-Dudka *et al*., 2015).

در استخراج متابولیت‌های ثانویه، عوامل مختلفی همچون نوع و قطبیت حلال‌ها می‌توانند نقش مهمی در بازده و خواص بیولوژیکی آنها داشته باشند (Ngo *et al*., 2017; Thouri *et al*., 2017). بطور مثال، حلالیت ترکیبات قندی در حلال آبی بیشتر است و این حلال قابلیت استخراج ترکیبات قندی با بازده بالا را دارد. درحالیکه، برای استخراج متابولیت‌های غیرقطبی نیاز به حلال غیرقطبی همچون هگزان می‌باشد. افزایش تعداد مراحل استخراج نیز عامل دیگری است که می‌تواند نقش اساسی را در افزایش بازده ایفا کند. بعلاوه، از لحاظ تجاری، در بررسی روش یا حلال استخراج، بازده استخراج و پارامترهای اقتصادی همچون قیمت حلال حائز اهمیت هستند. بنابراین، استخراج متابولیت‌های ثانویه با استفاده از حلال‌هایی با قطبیت‌های مختلف و بررسی خواص بیولوژیکی حاصل از آنها می‌تواند بسیار حائز اهمیت باشد. مطالعات قبلی نشان داده‌اند که قارچ *C. unicolor* بعنوان منبعی از ترکیبات فعال زیستی با اهمیت دارویی و پزشکی است. اما، بر اساس مطالعات کتابخانه‌ای، تاکنون تحقیقی بر روی ترکیبات فیتوشیمیایی و خواص آنتی‌اکسیدانی و سمیت‌سلولی عصاره‌های مختلف قارچ *C. unicolor* صورت نگرفته است. بنابراین، هدف از این مطالعه، بررسی مورفولوژیکی قارچ *C. unicolor* جمع‌آوری شده از زیستگاه طبیعی آن در جنگل‌های ارسباران و تحقیق بر روی ترکیبات فیتوشیمیایی، خاصیت آنتی‌اکسیدانی و فعالیت سمیت‌سلولی عصاره‌های n-هگزانی، کلروفرمی، اتیل استاتی و متانولی آن می‌باشد.

مواد و روش‌ها

جمع آوری قارچ

جمع‌آوری اندام بارده قارچ *C. unicolor* در پاییز سال ۱۳۹۶ از باقیمانده تنه درختان در جنگل‌های ارسباران (واقع در استان آذربایجان‌شرقی، شهرستان کلیبر با عرض جغرافیایی ″۲۴ □۵۰ °۳۸، طول جغرافیای ″۴۹ □۵۹ °۴۶ و ارتفاع ۱۷۰۸ متر از سطح دریا) انجام گرفت. نمونه‌های جمع‌آوری شده در داخل کیسه‌های پلی‌اتیلینی تمیز قرار داده شدند و برای بررسی بیشتر به آزمایشگاه منتقل شدند. شناسایی قارچ با توجه به خصوصیات ماکروسکوپی بازیدیوکارپ و همچنین خصوصیات میکروسکوپی نظیر بازیدیوم و شکل بازیدیوسپور با استفاده از کلیدهای معتبر صورت گرفت (Zhishu *et al*., 1993; Ginns, 2017). جهت مشاهده بازیدیوم و بازیدیوسپور، برش‌های بسیار نازک از قسمت زیرین بازیدیوکارپ تهیه شد و بعد از رنگ آمیزی با محلول لاکتوفنل – کاتن بلو، با میکروسکوپ نوری (مدل Olympus BH2) و بزرگ‌نمایی ۴۰۰ و ۱۰۰۰ مورد بررسی قرار گرفت.

عصاره‌گیری به روش التراسونیک

برای انجام عمل استخراج، به ۲ گرم از قارچ پودر شده، ۲۰ میلی لیتر از حلال‌های مختلف (n-هگزان، دی‌کلرومتان، اتیل‌استات و متانول) به طور جداگانه اضافه شد و در دستگاه التراسونیک با قدرت ۱۰۰وات و فرکانس ۴۰ کیلوهرتز به مدت ۳۰

دقیقه عصاره‌گیری گردید. با استفاده از کاغذ صافی عصاره‌های بدست آمده صاف شدند و سپس با استفاده از دستگاه تبخیرکننده مدور خشک گردیده و برای آنالیزهای بعدی در داخل یخچال نگهداری شدند.

اندازه‌گیری میزان کل ترکیبات فنولی

برای اندازه‌گیری میزان کل ترکیبات فنولی عصاره‌ها، مقدار ۱۰ میلی‌گرم از عصاره‌های مختلف قارچ *C. unicolor* با ۱۰۰۰ میکرولیتر اتانول حل گردید و در بالن ۱۰ میلی‌لیتری با آب مقطر به حجم رسانده شد. به ۱۰۰ میکرولیتر از هرکدام از محلول‌های بدست‌آمده، ۵۰۰ میکرولیتر از محلول فولین‌سیوکالتو (۱۰ ٪ حجمی/حجمی) ریخته و پس از گذشت ۵ دقیقه، ۵۰۰ میکرولیتر از محلول سدیم‌کربنات ۷ درصد نیز به آن‌ها اضافه شد. محلول شاهد نیز به همین ترتیب تهیه شد، با این تفاوت که به جای محلول عصاره‌ها از محلول اتانول-آب استفاده گردید. نمونه‌ها در فضای تاریک به مدت ۲ ساعت باقی ماندند. سپس جذب نمونه‌ها در دستگاه اسپکتروفوتومتر در ناحیه ۷۶۵ نانومتر خوانده شد و بر اساس نمودار کالیبراسیون بدست‌آمده از گالیک‌اسید، میزان کل ترکیبات فنولی عصاره‌ها محاسبه گردید (Hazrati *et al*., 2019).

اندازه‌گیری میزان کل ترکیبات فلاونوئیدی

برای اندازه‌گیری فلاونوئید کل عصاره‌ها، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره‌ها (با غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر متانول) با ۵۰ میکرولیتر آلومینیوم‌کلرید ۲ درصد و ۱۰۰ میکرولیتر آمونیوم‌استات ۱مولار مخلوط گردید. نمونه‌ی شاهد نیز به همین ترتیب تهیه شده منتهی با این تفاوت که به جای عصاره از حلال متانول استفاده شد. پس از گذشت ۱۰ دقیقه، جذب محلول‌ها در دستگاه اسپکتروفوتومتر در ناحیه‌ی ۴۲۶ نانومتر اندازه‌گیری شد و بر اساس نمودار کالیبراسیون بدست آمده از ماده استاندارد کوئرستین، میزان کل ترکیبات فلاونوئیدی عصاره‌ها محاسبه گردید (Hazrati *et al*., 2019).

فعالیت آنتی‌اکسیدانی

برای بررسی خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها از روش DPPH و ماده استاندارد اسید آسکوربیک استفاده شد (Mollaei *et al*., 2019). ابتدا ۲ میلی‌گرم از عصاره‌ها را در ۱ میلی‌لیتر متانول حل کرده و سپس غلظت‌های مختلف (۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) تهیه شدند. مقدار ۵۰ میکرولیتر از محلول‌های تهیه شده به ۵۵۰ میکرولیتر محلول DPPH اضافه گردید و در تاریکی به مدت ۳۰ دقیقه قرار داد شد. سپس، جذب تمام محلول‌ها و نمونه‌های شاهد با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول‌موج ۵۱۷ نانومتر خوانده شد و درصد مهارکنندگی از معادله‌ی زیر محاسبه گردید:

$$RSC\ (\%) = [(A\ control - A\ sample)/A\ control] \times 100$$

آزمون سمیت سلولی

برای اندازه‌گیری اثر سمیت‌سلولی عصاره‌های مختلف قارچ *C. unicolor* بر ضد رده سلولی سرطانی سینه (MCF-7) از آزمون رنگ سنجی MTT استفاده شد (Asnaashari *et al*., 2019). سلول‌های MCF-7 از انستیتوپاستور ایران خریداری شدند و در محیط کشت RPMI 1640 و سرم جنین گاوی (FBS) ۱۰٪ به همراه آنتی بیوتیک‌های استرپتومایسین و پنیسیلین کشت و پاساژ داده شدند تا از لحاظ تعداد و مورفولوژی به حد مطلوب برسند (پس از ۴-۳ پاساژ). سلول‌های چسبنده از سطح فلاسک توسط تریپسین-EDTA (Gibco BRL, Scotland) جدا شدند و بعد از شمارش سلولی، ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون (دارای $۱×۱۰^۴$ سلول) به چاهک‌های پلیت ۹۶ تایی انتقال داده و در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد، ۵٪ CO_2 و رطوبت ۱۰۰٪ به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شدند. سلول‌ها با غلظت‌های مختلف عصاره‌ها (۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) تیمار شدند و بعد از گذشت مدت زمان ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، به هر یک از چاهک‌ها ۲۰ میکرولیتر از محلول MTT (غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) اضافه گردید و به مدت ۴ ساعت انکوبه شدند. در ادامه، در چاهک‌های ۹۶ تایی، جذب نمونه‌ها در طیف جذب ۵۷۰ نانومتر خوانده شدند و بر حسب فرمول مربوطه میزان زنده‌مانی محاسبه شد. **آنالیز فنولیک‌اسیدها**

از دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) (شرکت waters، ایالات متحده آمریکا) برای جداسازی و شناسایی فنولیک‌اسیدها استفاده گردید. ستون کروماتوگرافی بکار برده شده از نوع تجزیه‌ای با فاز معکوس Eurospher 100-5 C18 و ابعاد ۲۵ سانتی‌متر طول و ۴/۶ میلی‌متر قطر داخلی و ۵ میکرومتر اندازه ذرات بود. سرعت فاز متحرک ۱ میلی‌لیتر بر دقیقه بود و جداسازی در دمای اتاق و با روش شویش گرادیانی با استفاده از حلال‌های متانول (حلال نوع A) و آب گرید HPLC (حلال B) انجام گرفت. حجم تزریق نمونه ۲۰ میکرولیتر بود و پیک‌ها در طول موج ۲۸۲ نانومتر مشاهده شدند.

آنالیز آماری

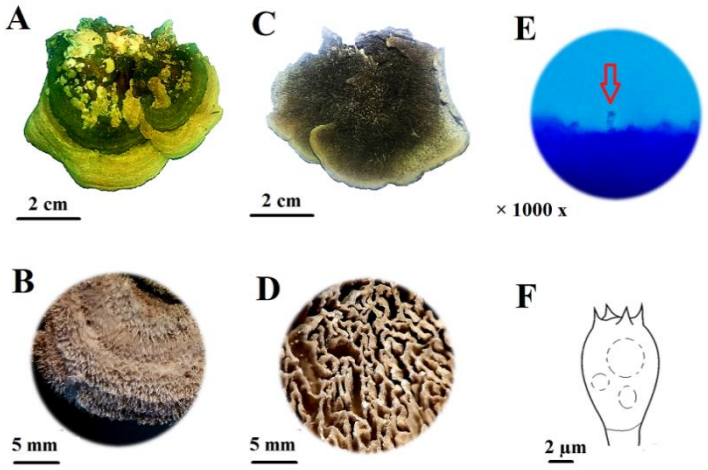
جهت تجزیه و تحلیل آماری اعداد و مقایسه میانگین‌ها از نرم افزار SPSS (ver. 17) و روش تحلیل واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) و آزمون پس تجربی Tukey استفاده شد.

نتایج

بررسی مورفولوژیکی

با توجه به کلیدهای معتبر، تشخیص قارچ *C. unicolor* مورد تائید قرار گرفت. این قارچ مربوط به شاخه Basidiomycota، راسته Polyporales و تیره Polyporaceae است. شکل بازیدوکارپ نیم دایره و موجدار بوده و اندازه آن بین

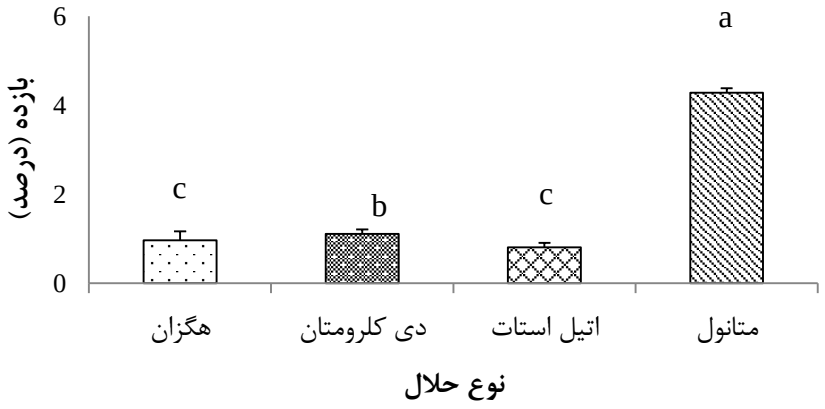
۳ تا ۱۰ سانتی متر متغیر است. بازیدیوکارپ بافتی سخت، چوبی و کرکدار داشته و رنگ قسمت زبرین آن سفید تا قهوه‌ای است ولی به علت رشد جلبک، سطح رویی سبز رنگ دیده می‌شود (شکل ۱A و ۱B). قسمت زیرین قارچ خاکستری رنگ با منافذ لوله‌ای متعدد است (شکل ۱C و ۱D). بازیدوم به ابعاد ۶-۴ × ۲۵-۲۰ میکرومتر، چماقی شکل و حامل چهار استریگما بود که بر روی آن بازیدسپورهای بیضوی شکل با سطح صاف تشکیل می‌گردد (شکل ۱E و ۱F).



شکل ۱: خصوصیات ماکروسکوپی و میکروسکوپی قارچ *C. unicolor*. A و B سطح رویی بازیدیوکارپ، C و D سطح زیرین بازیدیوکارپ، E: بازیدیوم با بزرگنمایی ۱۰۰۰x× ، F: شکل شماتیک بازیدیم با چهار استریگما

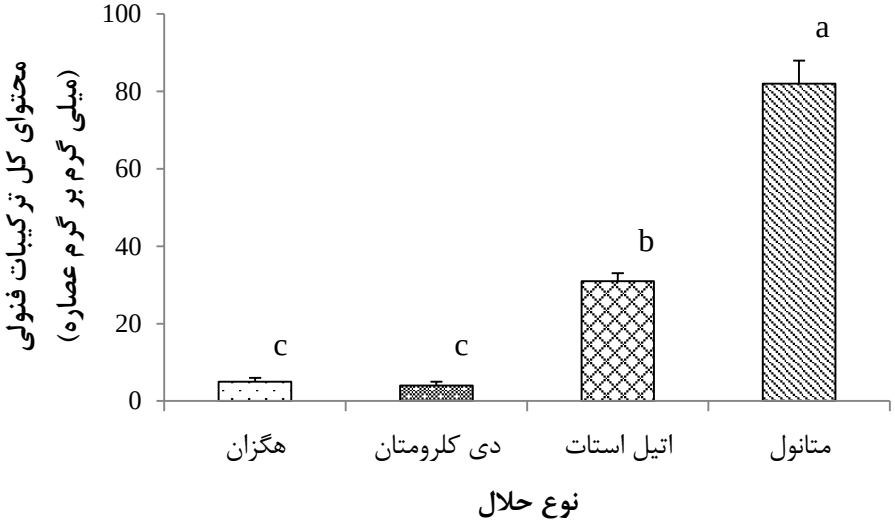
مطالعات فیتوشیمیایی

نتایج میانگین بازده استخراج عصاره‌های n-هگزانی، دی‌کلرومتانی، اتیل‌استاتی و متانولی قارچ مورد بررسی در شکل ۲ نشان داده شده است. همانطور که ملاحظه می‌شود بیشترین بازده استخراج مربوط به عصاره متانولی (۴/۲۸درصد) بود و تفاوت معنی‌داری بین بازده عصاره‌های هگزانی و اتیل‌استاتی وجود نداشت.



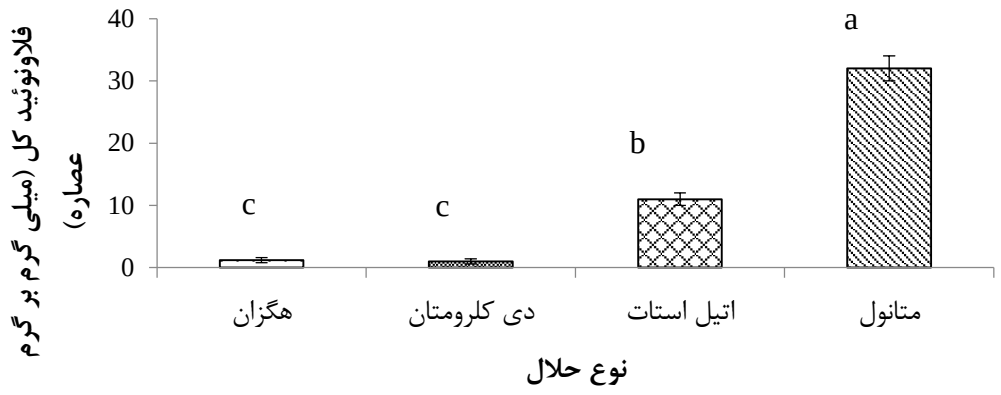
شکل ۲: بازده عصاره بدست آمده از قارچ *C. unicolor* با کمک حلال‌های مختلف. ستون‌های دارای حروف مشابه فاقد اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۵٪ هستند.

میزان کل ترکیبات فنولی موجود در عصاره‌ها با استفاده از منحنی استاندارد گالیک‌اسید و معادله بدست آمده از آن، $Y=0.0029X + 0.38; R^2=0.99$، محاسبه گردید. شکل ۳ میزان کل ترکیبات فنولی موجود در یک گرم از عصاره‌ها را نشان می‌دهد. نتایج نشان داد که بیشترین میزان ترکیبات فنولی مربوط به عصاره متانولی با مقدار ۸۲ میلی‌گرم گالیک‌اسید بر گرم عصاره بود و عصاره‌های هگزانی و دی‌کلرومتانی نیز کمترین میزان ترکیبات فنولی را داشتند. عصاره اتیل‌استاتی نیز دارای میزان متوسطی از ترکیبات فنولی با مقادیر ۳۱ میلی‌گرم گالیک‌اسید بر گرم عصاره بود.



شکل ۳: میزان کل ترکیبات فنولی عصاره بدست آمده از قارچ *C. unicolor* با کمک حلال‌های مختلف. ستون‌های دارای حروف مشابه فاقد اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ هستند.

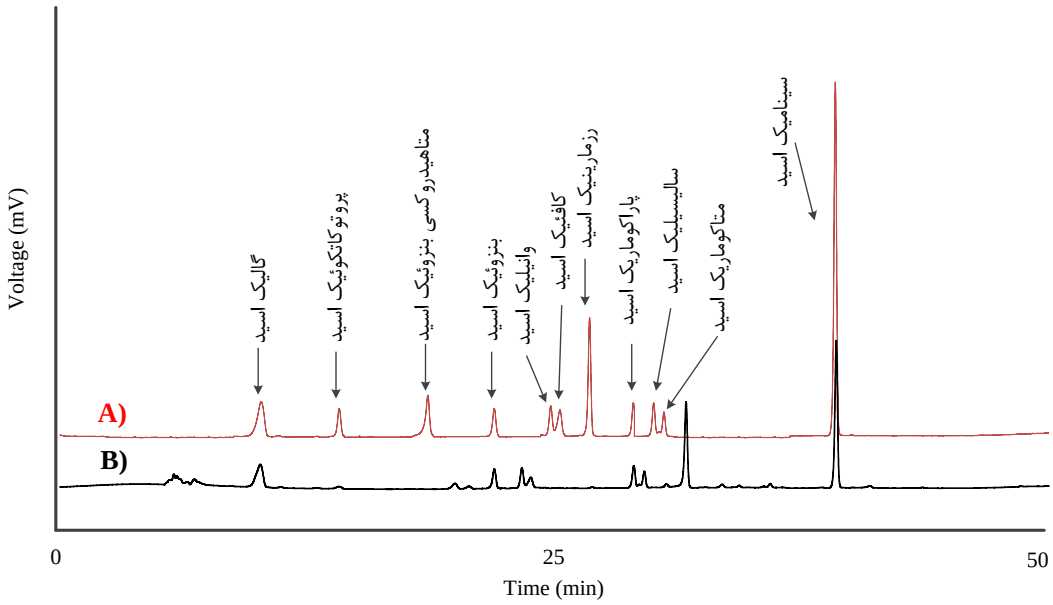
شکل ۴ نتایج حاصل از میزان کل فلاونوئید موجود در یک گرم از عصاره‌های n-هگزانی، دی‌کلرومتانی؛ اتیل‌استاتی و متانولی را نشان می‌دهد. برای محاسبه میزان کل فلاونوئید از منحنی استاندار کوئرستین و معادله بدست‌آمده از آن یعنی$Y=0.0037X - 0.03; R^2=0.99$ استفاده گردید. نتایج نشان داد که عصاره متانولی بیشترین میزان فلاونوئید (۳۲ میلی گرم کوئرستین بر گرم عصاره) و عصاره‌های هگزانی و دی‌کلرومتانی دارای کمترین میزان فلاونوئید بودند.



شکل ۴: میزان فلاونوئید کل عصاره بدست آمده از قارچ *C. unicolor* با کمک حلال‌های مختلف. ستون‌های دارای حروف مشابه فاقد اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ هستند.

بررسی فنولیک‌اسیدهای موجود در عصاره‌ها

فنولیک‌اسیدهای موجود در عصاره‌های مختلف قارچ *C. unicolor* با روش HPLC و با کمک استاندارد، جداسازی و شناسایی شدند (شکل ۵) و در ادامه مقدار کمی آنها اندازه‌گیری گردید. از مجموع ۱۱ فنولیک‌اسید مورد آنالیز، ۵ فنولیک‌اسید در عصاره‌های متانولی و اتیل‌استاتی شناسایی شدند (جدول ۱). بر اساس نتایج بدست‌آمده، بیشترین میزان فنولیک‌اسیدها مربوط به گالیک‌اسید و سینامیک‌اسید بود و عصاره متانولی نیز مقدار قابل‌توجهی از بنزوئیک‌اسید داشت. همچنین، عصاره‌های هگزانی و اتیل‌استاتی فاقد فنولیک‌اسیدهای مورد آنالیز بودند.



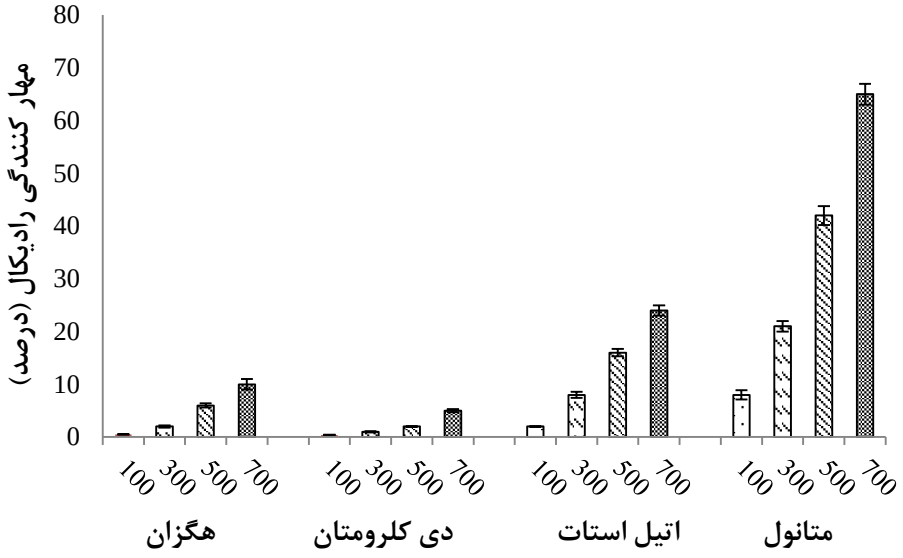
شکل ۵: کروماتوگرام HPLC مربوط به A) استاندارد فنولیک‌اسیدها B) عصاره متانولی قارچ *C. unicolor*

جدول ۱: میزان فنولیک‌اسیدهای (mg/10g extract) موجود در عصاره‌های مختلف قارچ *C. unicolor*

	بنزوئیک‌اسید	پروتوکاتکوئیک‌اسید	پاراکوماریک‌اسید	گالیک‌اسید	سینامیک‌اسید
n-هگزان	-	-	-	-	-
دی‌کلرومتان	-	-	-	-	-
اتیل‌استات	۱/۱۲±۰/۲۱	۰/۶۱±۰/۰۶	۲/۰۸±۰/۳۸	۵/۵۲±۰/۵۴	۹/۴۹±۱/۷۴
متانول	۴/۵۱±۰/۷۸	۱/۴۳±۰/۱۲	۲/۴۲±۰/۲۶	۹/۱۹±۰/۶۸	۲۲/۶۱±۱/۹۲

بررسی خاصیت آنتی اکسیدانی

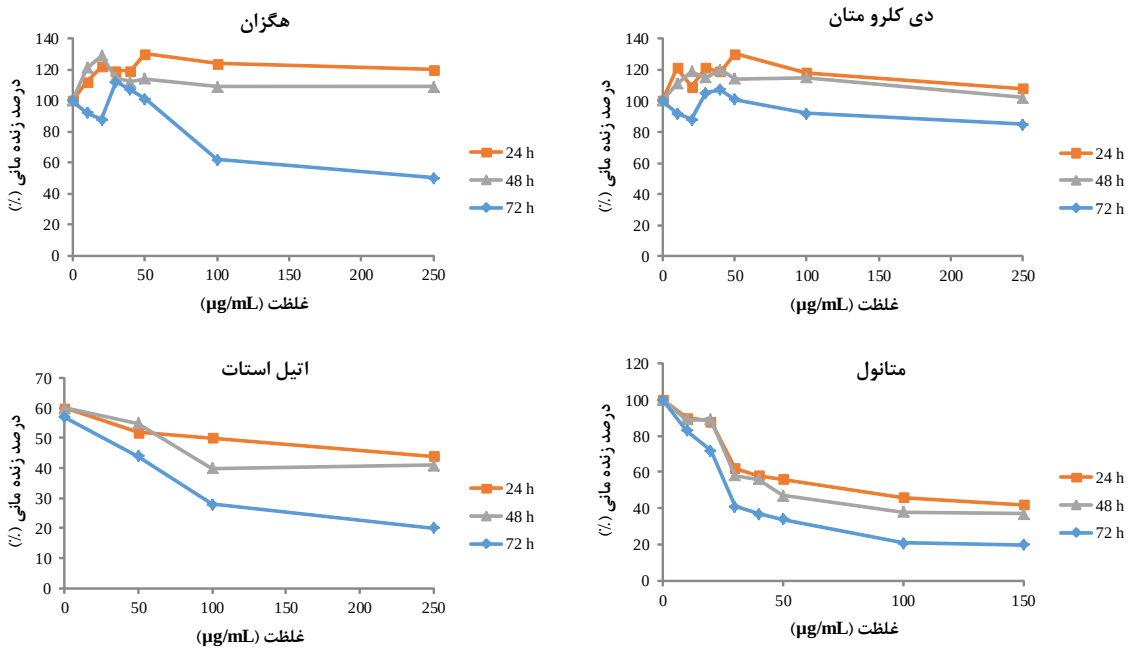
نتایج آنالیز واریانس خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های مختلف قارچ نشان داد که فعالیت مهارکنندگی عصاره‌ها وابسته به غلظت بوده و با افزایش غلظت، درصد مهارکنندگی افزایش می‌یابد (شکل ۶). در محدوده غلظتی، آنتی‌اکسیدان سنتزی فعالیت ضدرادیکالی بالایی نسبت به تمام عصاره‌ها از خود نشان داد و از این نظر هیچ یک از عصاره‌ها قابل رقابت با آنتی‌اکسیدان سنتزی نبودند. مقدار IC_{50} عصاره‌های n-هگزانی، دی‌کلرومتانی، اتیل‌استاتی و متانولی به ترتیب ۳۱۸۲، ۷۲۶۵، ۱۴۱۳ و ۵۶۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر بدست آمد. بر اساس نتایج، عصاره متانولی دارای کمترین مقدار IC_{50} است و بیشترین خاصیت آنتی-اکسیدانی را نسبت به بقیه عصاره‌ها دارد.



شکل ۶: درصد مهارکنندگی رادیکالی عصاره‌ها در غلظت‌های مختلف (میکروگرم بر میلی‌لیتر)

بررسی سمیت سلولی

جهت بررسی فعالیت سمیت‌سلولی عصاره‌های مختلف در *In vitro* از آزمون MTT استفاده شد. نتایج حاصل از تیمار سلول‌های MCF-7 با غلظت‌های مختلف از عصاره‌ها در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در شکل ۷ نشان داده شده است. بر اساس نتایج بدست آمده، درصد زنده‌مانی سلول‌های سرطانی وابسته به غلظت عصاره‌های اتیل‌استاتی و متانولی است. درصورتیکه درصد سلول‌های زنده رده سلولی MCF-7 در مجاورت عصاره‌های هگزانی و کلروفرمی در مقایسه با کنترل (نمونه حاوی سلول‌های MCF-7 و فاقد عصاره) اختلاف معنی‌داری نداشت. این یافته‌ها بیانگر این است که درصد سلول‌های MCF-7 زنده، با افزایش غلظت عصاره‌های اتیل‌استات و متانولی قارچ *C. unicolor* کاهش داشته و از قابلیت پرولیفراسیون سلول‌ها جلوگیری شده است. همچنین، با گذشت زمان، میزان سلول‌های زنده به طور معنی‌داری کاهش یافته است که نشان‌دهنده وابستگی درصد زنده‌مانی سلول‌های سرطانی به زمان تیماردهی با عصاره‌های اتیل‌استات و متانول است. IC_{50} عصاره‌ها بر روی رده‌سلولی MCF-7 محاسبه گردید و بر اساس نتایج، سمیت‌سلولی در بین عصاره‌های مورد مطالعه با توالی متانولی> اتیل‌استاتی> هگزانی+کلروفرمی کاهش نشان می‌دهد.



شکل ۷: درصد زنده‌مانی سلول‌های سرطانی سینه (MCF-7) در اثر تیمار با عصاره‌های مختلف قارچ *C. unicolor*

مباحث

قارچ *C. unicolor* بصورت ساپروفیت موجب پوسیدگی در تنه باقیمانده درختان می‌شود. بروز هر گونه آسیب در اندام درختان خصوصا آسیب فیزیکی نظیر قطع درختان سبب ظهور این قارچ می‌گردد. دامنه انتشار این قارچ در ایران جنگل‌های

هیرکانی، ارسباران و زاگرس است. در این مطالعه، میزبان قارچ *C. unicolor* درخت بلوط و افرا تشخیص داده شد که مطابق با این نتیجه در سایر مطالعات نیز این گونه از روی میزبان بلوط، افرا، راش و آزاد گزارش شده است (صابر، ۱۳۷۹; قبادنژاد، ۲۰۱۴).

از لحاظ قطبیت، متانول مابین حلال‌های قطبی و غیرقطبی قرار دارد و قابلیت استخراج طیف وسیعی از ترکیبات را دارد. در این پژوهش، تاثیر چهار حلال با قطبیت مختلف (n-هگزانی، دی‌کلرومتانی، اتیل‌استاتی و متانولی) بر بازده استخراج مورد بررسی قرار گرفت و معلوم شد که بیشترین بازده استخراج مربوط به متانول است. بنابراین، انتخاب مناسب حلال می‌تواند بر بازده استخراج و غلظت آنتی‌اکسیدانت‌های موجود در عصاره‌ها تاثیر بگذارد.

رادیکال‌های آزاد موجود در بافت‌های بیولوژیکی از طریق واکنش با اسیدهای آمینه، پروتئین‌ها، کربوهیدرات‌ها، لیپیدها و DNA، باعث تخریب سلول‌ها شده و بیماری‌های قلبی-عروقی ایجاد می‌کنند. بنابراین، پیشگیری از چنین واکنش‌های تخریبی، در سلامت انسان‌ها اهمیت بسیاری دارد (Nimse & Pal, 2015). نتایج آزمون DPPH نشان داد که مهار رادیکال‌های آزاد وابسته به غلظت عصاره‌های متانول و اتیل‌استاتی==بوده و با افزایش غلظت آنها، فعالیت به دام‌اندازی رادیکال‌ها افزایش می‌یابد؛ به عبارت دیگر، در غلظت‌های بالاتر، به دلیل افزایش تعداد گروه‌های هیدروکسیل موجود در عصاره‌ها، احتمال اهداء هیدروژن به رادیکال‌های آزاد کاهش یافته و به دنبال آن قدرت مهارکنندگی عصاره‌ها افزایش می‌یابد. در نتیجه، شاید بتوان حدس زد که خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصاره متانولی قارچ *C. unicolor* مربوط به ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی موجود در آن است و میزان فنول و فلاونوئید کل در این تحقیق می‌تواند فعالیت آنتی‌اکسیدانی موجود در عصاره متانولی قارچ را توجیه نماید.

در مطالعه کشت‌سلولی، اثر سمیت عصاره‌های مختلف قارچ بر رده‌سلولی سرطان سینه بررسی گردید. با مشاهده نتایج به دست آمده می‌توان گفت که بیشترین میزان IC_{50}، مربوط به عصاره‌های هگزانی و کلروفرمی و کمترین میزان آن مربوط به عصاره متانولی است و این نتایج، اثر نسبی مهارکنندگی رشد و سمیت‌سلولی عصاره متانولی حاوی متابولیت‌های قارچ *C. unicolor* بر روی روده‌سلولی MCF-7 را نشان می‌دهد. از طرفی، نتایج آزمایش سمیت‌سلولی نشان داد که کاهش معنی‌داری در تعداد سلول‌های MCF-7 تیمار شده با عصاره‌های اتیل‌استاتی و متانولی مشاهده می‌شود و با افزایش غلظت و زمان عصاره، تعداد سلول‌ها به تدریج کاهش بیشتری می‌یابد. بر طبق نتایج بدست آمده، می‌توان پیشنهاد کرد که این عصاره‌ها می‌توانند اثر سمیت‌سلولی بر سلول‌های سرطانی MCF-7 داشته و به صورت وابسته به غلظت و زمان بر روند تکثیر سلول‌ها تاثیر می‌گذارند.

جهت ارزیابی میزان کل ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی موجود در عصاره‌های مختلف قارچ، از روش فولین سیوکالتو و روش رنگ‌سنجی استفاده شد. نتایج بدست آمده از اندازه‌گیری ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی نشان داد که بیشترین مقدار این ترکیبات به ترتیب مربوط به عصاره‌های متانولی و اتیل‌استاتی است. مطالعات مختلف نشان داده‌اند که ارتباط معنی‌داری بین خاصیت آنتی‌اکسیدانی و ضدسرطانی با مقدار فنول و فلاونوئید موجود در عصاره‌ها وجود دارد (Tamuly *et al*., 2013; Li *et al*., 2018). ترکیبات فنولی موجود در عصاره متانولی قارچ *C. unicolor* ممکن است به عنوان عامل‌کاهنده عمل کرده و با دادن

الکترون، با ترکیبات رادیکالی واکنش داده و آنها را به ترکیبات پایدار تبدیل کنند که در نهایت باعث خنثی‌شدن زنجیره رادیکال آزاد می‌شود (Leopoldini *et al*., 2004). بنابراین، می‌توان انتظار داشت که خاصیت آنتی‌اکسیدانی و سمیت‌سلولی عصاره متانولی بیشتر از عصاره اتیل‌استاتی باشد. همچنین، همانطور که در شکل ۳ و ۴ مشاهده می‌شود پس از عصاره متانولی، عصاره اتیل‌استاتی دارای بیشترین میزان ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی بود که می‌تواند دلیل افزایش خاصیت آنتی‌اکسیدانی و سمیت‌سلولی عصاره اتیل‌استاتی نسبت به دی‌کلرومتانی باشد.

ترکیبات فنولی گروه مهمی از متابولیت‌های ثانویه موجود در موجودات زنده همچون گیاهان و قارچ‌ها هستند که بدلیل داشتن خواص ضدسرطان توجه محققین را به خود جلب کرده‌اند. اثرات ضدسرطانی ترکیبات فنولی به طور عمده به دلیل توانایی در ایجاد توقف در چرخه‌سلولی، مدلوسیون سطوح ROS، مهار کانال‌های سیگنال انکوژنیک کنترل کننده تکثیرسلولی، آنژیوژنز و آپوپتوز، تقویت پروتئین‌های سرکوب‌کننده تومور و افزایش تمایز و تغییر شکل در سلول‌های طبیعی است (Fresco *et al*., 2010). همچنین، این ترکیبات بخاطر داشتن گروه‌های هیدروکسیل متصل به حلقه آروماتیک، بعنوان آنتی‌اکسیدان عمل کرده و نقش مهمی در پاک‌سازی رادیکال‌های آزاد و جلوگیری از تبدیل هیدروکسیدها به رادیکال آزاد که عامل اساسی برای ایجاد سرطان در انسان می‌باشد را دارند (Lin *et al*., 2016). علاوه بر این، مکانیسم عمل ترکیبات فنولی برای دارا بودن خاصیت آنتی‌اکسیدانی در اثر جمع‌آوری رادیکال‌های آزاد همچون پراکسیدهای چربی، آنیون‌ها، سوپراکسیدها و رادیکال‌های هیدروکسیل است (Nimse & Pal, 2015).

نتایج حاصل از آنالیز فنولیک‌اسیدهای موجود در عصاره‌های قارچ *C. unicolor* نشان داد که بنزوئیک‌اسید، پروتوکاتکوئیک‌اسید، پاراکوماریک‌اسید، گالیک‌اسید و سینامیک‌اسید، از اسیدهای فنولی موجود در عصاره متانولی و اتیل‌استاتی قارچ *C. unicolor* بوده و مقدار این ترکیبات در عصاره متانولی بیشتر از عصاره اتیل‌استاتی است. همچنین، عصاره‌های هگزانی و دی‌کلرومتانی فاقد فنولیک‌اسیدهای مذکور هستند. این ترکیبات شناخته شده معمولا در طبیعت به وفور یافت می‌شوند و به دلیل خواص بیولوژیکی فراوان، توجه زیادی را به خود جلب کرده‌اند (Saibabu *et al*., 2015). بر اساس مطالعات انجام گرفته، پروتوکاتکوئیک‌اسید با مکانیسم‌های مختلفی همچون ایجاد آپوپتوز، افزایش فعالیت آنزیم لاکتات‌دهیدروژناز، کاهش پتانسیل غشای میتوکندری و تخریب DNA باعث سمیت‌سلولی در سلول‌های سرطانی می‌گردد (Yin *et al*., 2009; Kassi *et al*., 2014). همچنین، بر اساس مطالعه انجام گرفته، پاراکوماریک‌اسید بقای سلول‌های HCT-15 و HT-29 را کاهش می‌دهد (Jaganathan *et al*., 2013). گالیک‌اسید با تولید گونه‌های اکسیژن واکنشی و توقف سلول‌ها در مرحله G2/M، مانع تکثیر سلول‌های سرطان می‌شود (Shahrzad *et al*., 2001). علاوه بر آن، هم سینامیک‌اسید و هم بنزوئیک‌اسید با القای ژن‌های سرکوب‌کننده تومور، چرخه سلولی را متوقف کرده و از این طریق مانع تکثیر سلول‌های سرطانی می‌گردد (Shin *et al*., 2013). بنابراین، احتمالا

خواص آنتی‌اکسیدانی و سمیت‌سلولی عصاره‌های متانولی و اتیل‌استاتی قارچ بدلیل وجود ترکیبات فنولیک‌اسید موجود در آنهاست.

به طور اجمالی، از آنجائی که رادیکال‌های آزاد، محصولات فرعی اجتناب ناپذیر واکنش های اکسیداسیون و احیاء هستند، لذا مصرف بیشتر آنتی‌اکسیدان‌ها و ترکیبات ضدسرطانی می‌تواند راهکاری برای حذف رادیکال‌های آزاد مضر از بدن باشد. از طرفی، مصرف آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی، سالم‌تر و ایمن‌تر است. لذا، با توجه به نتایج بدست آمده از این تحقیق و شناسایی خواص آنتی‌اکسیدانی و سمیت‌سلولی عصاره متانولی قارچ *C. unicolor*، استفاده از این منبع طبیعی به عنوان جایگزین مواد سنیتیک پیشنهاد می‌شود.

سپاسگزاری

بدین وسیله از دانشگاه شهید مدنی آذربایجان بدلیل حمایت مالی تشکر و قدردانی بعمل می‌آید.

منابع

صابر، م. (۱۳۷۹). معرفی دو گونه جدید از قارچ‌های پلی‌پور در ایران. چهاردهمین کنگره گیاهپزشکی ایران. ص ۳۷۴.

قبادنژاد، م. (۲۰۱۴). مروری بر قارچ‌های چوب‌زی بازیدیومیست بر روی بلوط در ایران. اولین همایش ملی جنگل‌های بلوط در ایران.۲۴۱-۲۳۴.

Anjum, T., Azam, A. and Irum, W. (2012). Production of Cyclosporine A by Submerged Fermentation from a Local Isolate of Penicillium fellutanum. Indian Journal of Pharmaceutical Sciences, 74(4): 372-374.

Asnaashari, S., Delazar, A., Safarzadeh, E., Tabibi, H., Mollaei, S., Rajabi, A. and Asgharian, P. (2019). Phytochemical analysis and various biological activities of the aerial parts of Scrophularia atropatana growing in Iran. Iranian Journal of Pharmaceutical Research, 18(3): 1543-1555.

Christopher, H. (1988). Medicinal mushrooms, An Exploration of Tradition Healing and Culture. Herbs and Health Series), 1: 27-33.

Das, K. (2010). Diversity and conservation of wild mushrooms in Sikkim with special reference to Barsey Rhododendron Sanctuary. NeBIO, 1(2): 1-13.

Fresco, P., Borges, F., Marques, M.P., and Diniz, C. (2010). The anticancer properties of dietary polyphenols and its relation with apoptosis. Current Pharmaceutical Design, 16(1): 114-34.

Ginns, J. (2017). Polypores of British Columbia. 1th edn. Province of British Columbia, 260 Pp. British.

Hazrati, S., Ebadi, M.T., Mollaei, S. and Khurizadeh, S. (2019). Evaluation of volatile and phenolic compounds, and antioxidant activity of different parts of Ferulago angulata (schlecht.) Boiss. Industrial Crops and Products, 140: 111589.

Jaganathan, S.K., Supriyanto, E. and Mandal, M. (2013). Events associated with apoptotic effect of p-Coumaric acid in HCT-15 colon cancer cells. World Journal of Gastroenterology, 19(43): 7726-34.

Kassi, E., Chinou, I., Spilioti, E., Tsiapara, A., Graikou, K., Karabournioti, S., Manoussakis, M. and Moutsatsou, P. (2014). A monoterpene, unique component of thyme honeys, induces apoptosis in prostate cancer cells via inhibition of NF-κB activity and IL-6 secretion. Phytomedicine, 21(11): 1483-9.

Lee, I.K. and Yun, B.S. (2007). Highly oxygenated and unsaturated metabolites providing a diversity of hispidin class antioxidants in the medicinal mushrooms Inonotus and Phellinus. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 15(10): 3309-3314.

Leopoldini, M., Marino, T., Russo, N. and Toscano, M. (2004). Antioxidant properties of phenolic compounds: H-atom versus electron transfer mechanism. Journal of Physical Chemistry A, 108(22): 4916-4922.

Li, Z., Lee, H.W., Liang, X., Liang, D., Wang, Q., Huang, D. and Ong, C.N. (2018). Profiling of phenolic compounds and antioxidant activity of 12 cruciferous vegetables. Molecules, 23(5): 1139.

Lin, D., Xiao, M., Zhao, J., Li, Z., Xing, B., Li, X., Kong, M., Li, L., Zhang, Q., Liu, Y., Chen, H., Qin, W., Wu, H. and Chen, S. (2016). An overview of plant phenolic compounds and their importance in human nutrition and management of type 2 diabetes. Molecules, 21(10): 1374.

Mizerska-Dudka, M., Jaszek, M., Błachowicz, A., Rejczak, T.P., Matuszewska, A., Osińska-Jaroszuk, M., Stefaniuk, D., Janusz, G., Sulej, J. and Kandefer-Szerszeń, M. (2015). Fungus Cerrena unicolor as an effective source of new antiviral, immunomodulatory, and anticancer compounds. International Journal of Biological Macromolecules, 79: 459-468.

Mizuno, M. and Nishitani, Y. (2013). Immunomodulating compounds in Basidiomycetes. Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition, 52(3): 202-207.

Mollaei, S., Sedighi, F., Habibi, B., Hazrati, S. and Asgharian, P. (2019). Extraction of essential oils of Ferulago angulata with microwave-assisted hydrodistillation. Industrial Crops and Products, 137: 43-51.

Ngo, T.V., Scarlett, C.J., Bowyer, M.C., Ngo, P.D. and Vuong, Q.V. (2017). Impact of different extraction solvents on bioactive compounds and antioxidant capacity from the root of Salacia chinensis L. Journal of Food Quality, 1: 1-8.

Nimse, S.B. and Pal, D. (2015). Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. RSC Advances, 5(35): 27986-28006.

Patel, S. and Goyal, A. (2012). Recent developments in mushrooms as anti-cancer therapeutics: A review. 3 Biotech, 2: 1-15.

Rashid, S., Unyayar, A., Mazmanci, M.A., McKeown, S.R., Banat, I.M. and Worthington, J. (2011). A study of anti-cancer effects of Funalia trogii in vitro and in vivo. Food and Chemical Toxicology, 49: 1477-1483.

Roody, W.C. (2003). Mushrooms of West Virginia and the Central Appalachians, 1th edn. University Press of Kentucky 536 Pp. Lexington.

Saibabu, V., Fatima, Z., Khan, L.A. and Hameed, S. (2015). Therapeutic potential of dietary phenolic acids. Advances in Pharmacological Sciences, 2015; 2015: 823539.

Shahrzad, S., Aoyagi, K., Winter, A., Koyama, A. and Bitsch, I. (2001). Pharmacokinetics of gallic acid and its relative bioavailability from tea in healthy humans. Journal of Nutrition, 131(4): 1207-10.

Shin, S.Y., Yoon, H., Ahn, S., Kim, D.W., Bae, D.H., Koh, D., Lee, Y.H. and Lim, Y. (2013). Structural properties of polyphenols causing cell cycle arrest at g1 phase in HCT116 human colorectal cancer cell lines. International Journal of Molecular Sciences, 14(8): 16970-85.

Sulej, J., Janusz, G., Osińska-Jaroszuk, M., Rachubik, P., Mazur, A., Komaniecka, I., Choma, A. and Rogalski, J. (2015). Characterization of cellobiose dehydrogenase from a biotechnologically important **Cerrena unicolor** strain. Applied Biochemistry and Biotechnology, 176: 1638–1658.

Tamuly, C., Saikia, B., Hazarika, M., Bora, J., Bordoloi, M.J. and Sahu, O.P. (2013). Correlation between phenolic, flavonoid, and mineral contents with antioxidant activity of underutilized vegetables. International Journal of Vegetable Science, 19(1): 34-44.

Thouri, A., Chahdoura, H., El Arem, A., Hichri, A.O., Hassin, R.B. and Achour, L. (2017). Effect of solvents extraction on phytochemical components and biological activities of Tunisian date seeds (var. Korkobbi and Arechti). BMC Complementary and Alternative Medicine, 17(1): 248.

Unyayar, A., Demirbilek, M., Turkoglu, M., Celik, A., Mazmanci, M.A., Erkurt, E.A., Unyayar, S., Cekic, O. and Atacag, H. (2006). Evaluation of cytotoxic and mutagenic effects of Coriolus versicolor and Funalia trogii extracts on mammalian cells. Drug and Chemical Toxicology, 29: 69-83.

Wasser, S.P. and Weis, A.L. (1999). Medicinal properties of substances occurring in higher Basidiomycetes. International Journal of Medicinal Mushrooms, 1: 31-62.

Yin, M.C., Lin, C.C., Wu, H.C., Tsao, S.M. and Hsu, C.K. (2009). Apoptotic effects of protocatechuic acid in human breast, lung, liver, cervix, and prostate cancer cells: potential mechanisms of action. Journal of Agriculture Food and Chemistry, 57(14): 6468-73.

Zhang, H., Zhang, J., Zhang, X. and Geng, A. (2017). Purification and characterization of a novel manganese peroxidase from white-rot fungus **Cerrena unicolor** BBP6 and its application in dye decolorization and denim bleaching. Process Biochemistry, 66: 222–229.

Zhishu, B., Guoyang, Z. and Li, T. (1993). The Macrofungus Flora of China's Guangdong Province. 1th edn. Chinese University Press, 734 Pp. Hong Kong.

Evaluation of morphological, phytochemical and biological activity of bracket fungi *Cerrena unicolor* collected from Arasbaran forests

S. Mollaei[1], M. Ebadi[2*]

Received: 2020.3.4
Accepted: 2020.4.22

Abstract

Bracket fungi are the most important macroscopic fungi that play a main role in the ecosystem. In this study, the morphological characters of *Cerrena unicolor* were evaluated and then, the effect of different solvents (n-Hexan, Dichloromethane, Ethyl acetate, and Methanol) on the extraction of phenolic compounds, antioxidant properties, and cytotoxic activities of the extracts were investigated. Total phenol and flavonoid content, phenolic acid analysis, antioxidant properties, and cytotoxic activities on MCF-7 cells were evaluated by spectrophotometry, HPLC, DPPH, and MTT methods, respectively. The obtained results showed the basidiocarp was semicircular and wavy, and the upper surface was covered with small white to grayish brown hairs. Basidia were 25 µm in length, calvate and including 4 sterigmata with ellipsoid basidiospores. The results also indicated that the Methanolic extract had the highest total phenol and flavonoid contents compared with other extracts. Moreover, Benzoic acid, Protocatechuic acid, Gallic acid, and Cinnamic acid were the main phenolic acids of the Methanolic and Ethyl acetate extracts. In addition, the Methanolic extract showed the highest antioxidant activity in inhibiting DPPH radicals, while the Methanolic and Ethyl acetate extracts indicated the highest cytotoxic activity on MCF-7 cells. Therefore the Methanolic extract due to phenolic compounds could be proposed as a new ***source*** of ***natural*** antioxidants with cytotoxic activity.

Keywords: Antioxidant, Basidiocarp, Basidiomycetes, Cytotoxic activity, Phenolic compounds, Methanolic extract.

1-Tabriz, Azarbaijan Shahid Madani University, Department of chemistry
2-Tabriz, Azarbaijan Shahid Madani University, Department of Biology
*(Corresponding author Email: m.ebadi@azaruniv.ac.ir)