بسم الله الرحمن الرحيم

دانشکده کشاورزی

پایان نامه کارشناسی ارشد صنایع غذایی

بررسی و تعیین ترکیبات تغذیه ای گونه قارچی خوراکی *Morchella* جداسازی شده از مناطق شمال ایران

نگارنده:

زهرا رهگوی

استاد راهنما:

دکتر حمیدرضا صمدلوئی

اساتید مشاور:

دکتر شیده موجرلو

دکتر کامبیز جهان بین

بهمن ۱۳۹۶

شماره: ۳۹۰
تاریخ: ۱۳۹۶/۱۱/۱۷

باسمه‌تعالی

مدیریت تحصیلات تکمیلی

فرم شماره (۳) صورتجلسه نهایی دفاع از پایان نامه دوره کارشناسی ارشد

با نام و یاد خداوند متعال، ارزیابی جلسه دفاع از پایان نامه کارشناسی ارشد خانم / آقای زهرا رهگوی با شماره دانشجویی ۹۴۰۸۵۶۴ رشته علوم و مهندسی صنایع غذایی گرایش علوم موادغذایی تحت عنوان بررسی و تعیین ترکیبات تغذیه ای گونه قارچی خوراکی Morchella جداسازی شده از مناطق شمال ایران که در تاریخ ۹۶/۱۱/۹ با حضور هیأت محترم داوران در دانشگاه صنعتی شاهرود برگزار گردید به شرح ذیل اعلام می گردد:

قبول (با درجه: خیلی خوب) ☑ مردود ☐

نوع تحقیق: نظری ☐ عملی ☑

عضو هیأت داوران	نام ونام خانوادگی	مرتبهٔ علمی	امضاء
۱ـ استادراهنمای اول	دکتر حمیدرضا صمدلوئی	استادیار	
۲- استادراهنمای دوم			
۳- استاد مشاور	دکتر شیده موجرلو دکتر کامبیز جهان بین	استادیار	
۴- نماینده تحصیلات تکمیلی	دکتر حسین میرزایی مقدم	استادیار	
۵- استاد ممتحن اول	دکتر احمد رجائی	استادیار	
۶ـ استاد ممتحن دوم	دکتر زیبا قسیمی حق	استادیار	

نام و نام خانوادگی رئیس دانشکده: دکتر محمدرضا عامریان

تاریخ و امضاء و مهر دانشکده:

تبصره: در صورتی که کسی مردود شود حداکثر یکبار دیگر (در همان مجاز تحصیل) می تواند از پایان نامه خود دفاع نماید (دفاع مجدد نباید زودتر از ۴ ماه برگزار شود).

این پایان نامه را ضمن تشکر و سپاس بیکران و در کمال افتخار و امتنان تقدیم می نمایم به:

پدر بزرگوارم اسوه باشکوه تلاش و بزرگواری، پاسخی به زحمات بی دریغش و بوسه هایی بر دستان پرتوانش، آن کوه بردباری که دانشم مدیون، هستی اوست.

مادر مهربانم که وجودم همه برای اوست، الگوی صبر و ایثار که در تمام مراحل زندگی یار و مددکارم بوده است، آن نادر وجود که هر چه دارم مدیون گذشت و بزرگواری اوست.

استاد فرهیخته جناب آقای دکتر حمیدرضا صمدلوئی که زحمت راهنمایی این پایان نامه را بر عهده گرفتند و همواره راهنما و راه گشای نگارنده در اتمام و اکمال پایان نامه بودند. سرکار خانم دکتر شیده موجرلو و جناب آقای دکتر کامبیز جهان بین که زحمت مشاوره این پایان نامه را در حالی متقبل شدند که بدون مساعدت ایشان، این پروژه به نتیجه مطلوب نمی رسید.

تعهدنامه

اینجانب **زهرا رهگوی** دانشجوی دوره کارشناسی ارشد رشته **علوم و مهندسی صنایع غذایی** دانشکده **کشاورزی** دانشگاه **صنعتی شاهرود** نویسنده پایان نامه **بررسی و تعیین ترکیبات تغذیه ای گونه قارچی خوراکی *Morchella* جداسازی شده از مناطق شمال ایران** تحت راهنمائی **دکتر حمیدرضا صمدلوئی** متعهد می شوم.

تحقیقات در این پایان نامه توسط اینجانب انجام شده است و از صحت و اصالت برخوردار است .

- در استفاده از نتایج پژوهشهای محققان دیگر به مرجع مورد استفاده استناد شده است .
- مطالب مندرج در پایان نامه تاکنون توســط خود یا فرد دیگری برای دریافت هیچ نوع مدرک یا امتیازی در هیچ جا ارائه نشده است .
- کلیه حقوق معنوی این اثر متعلق به دانشگاه صنعتی شاهرود می باشد و مقالات مستخرج با نام « دانشگاه صنعتی شاهرود » و یا « Shahrood University of Technology » به چاپ خواهد رسید .
- حقوق معنوی تمام افرادی که در به د ست آمدن نتایج ا صلی پایان نامه تأثیرگذار بوده اند در مقالات م ستخرج از پایان نامه رعایت می گردد.
- در کلیه مراحل انجام این پایان نامه ، در مواردی که از موجود زنده (یا بافتهای آنها) ا ستفاده شده ا ست ضوابط و ا صول اخلاقی رعایت شده است .

در کلیه مراحل انجام این پایان نامه، در مواردی که به حوزه اطلاعات شخصی افراد دسترسی یافته یا استفاده شده است اصل رازداری ، ضوابط و اصول اخلاق انسانی رعایت شده است

تاریخ ۹۶/۷/۲۹

امضای دانشجو

مالکیت نتایج و حق نشر

- کلیه حقوق معنوی این اثر و محصولات آن (مقالات مستخرج ، کتاب ، برنامه های رایانه ای ، نرم افزار ها و تجهیزات ساخته شده است) متعلق به دانشگاه صنعتی شاهرود می باشد . این مطلب باید به نحو مقتضی در تولیدات علمی مربوطه ذکر شود .
- استفاده از اطلاعات و نتایج موجود در پایان نامه بدون ذکر مرجع مجاز نمی باشد.

* متن این صفحه نیز باید در ابتدای نسخه های تکثیر شده پایان نامه وجود داشته باشد.

چکیده

قارچ های خوراکی یکی از منابع مهم پروتئینی می باشد و مطالعات بسیاری تا به امروز در زمینه ی کشت و تولید توده زیستی قارچ ها صورت گرفته است. گونه های قارچ خوراکی مورچلا به علت طعم منحصر به فرد و همچنین دارا بودن میزان بالای پروتئین، پلی ساکارید و فیبر خام مورد توجه دانشمندان قرار گرفته است. در این تحقیق پس از جداسازی گونه قارچی با بهره گیری از روش های مولکولی گونه شناسایی شده و ترکیبات کلیدی پروتئین و کربوهیدرات، نوع اسیدهای چرب تشکیل دهنده آن بررسی شد. درخت فیلوژنتیک بدست آمده از توالی ژنتیکی منطقه ریبوزومی مشخص کرد که گونه جدا شده شباهت قابل توجه به *Morchella fluvialis* دارد. با توجه به نتایج بدست آمده از بررسی پروفایل اسید چرب در می یابیم که بالاترین اسید چرب مربوط به اسید چرب لینولئیک است و اسید چرب پالمیتیک دومین اسید چرب پر مقدار این قارچ است. بر اساس روش "one-factor-at-a-time" منابع مختلف نیتروژنی و کربنی بر میزان توده زیستی و پروتئین آن در محیط کشت مایع بررسی شد. نتایج نشان داد که منبع پروتئینی سویا محرک رشد سلولی بود در حالیکه منبع نیترات آمونیوم و اوره تاثیر اندکی در رشد توده زیستی داشت، همچنین بررسی منابع کربنی مختلف نشان داد که نشاسته بهترین منبع کربنی برای تولید توده زیستی قارچ است در حالیکه گلوکز محرک تولید پروتئین قارچ است. روش سطح پاسخ برای بررسی سطوح مختلف از گلوکز و پودر سویا بر میزان توده زیستی بررسی شد. نتایج نشان داد که بیشترین مقدار توده زیستی در غلظت گلوکز (۶۰-۷۰ گرم بر لیتر) و پودر سویا (۴۰ گرم بر لیتر) بدست آمد. همچنین مشاهده شد افزایش غلظت گلوکز (۸۰ گرم بر لیتر) موجب افزایش درصد پروتئین در توده زیستی می شود.

کلمات کلیدی: قارچ خوراکی، مورچلا، پروتئین، بهینه سازی، توده زیستی

فهرست مطالب

فصل اول: کلیات

مقدمه..... ۲

کلیات تحقیق..... ۳

۱-۱ تاریخچه..... ۳

۱-۲ مشخصات عمومی قارچ ها..... ۴

۱-۳ ساختمان شیمیایی سلولی در قارچ ها..... ۵

۱-۴ طبقه بندی قارچ ها..... ۶

۱-۴-۱ تقسیم بندی قارچ ها از نظر نوع دریافت مواد غذایی..... ۶

۱-۴-۱-۱ساپروفیت..... ۷

۱-۴-۱-۲ قارچ های انگلی..... ۷

۱-۴-۱-۳ قارچ های همزی یا سمبیوتیک..... ۷

۱-۴-۲ قارچ های سمی و خوراکی..... ۸

۱-۴-۳ دسته بندی قارچ های خوراکی..... ۹

۱-۵ نحوه زندگی قارچ ها..... ۹

۱-۵-۱ چرخه زندگی قارچ (*Morchella*)..... ۱۰

۱-۵-۲ ساختار قارچ..... ۱۱

۱-۵-۳ تولید مثل قارچ..... ۱۱

۱-۶ جنبه های مفید قارچ ها..... ۱۱

۱-۶-۱ اهمیت قارچ در رژیم غذایی..... ۱۳

۱-۶-۲ مضرات قارچ ها..... ۱۴

۱-۷ مزایای کشت قارچ خوراکی نسبت به دیگر محصولات کشاورزی..... ۱۴

۱-۸ شناخت قارچ های خوراکی و دارویی..... ۱۶

۱-۸-۱ قارچ های خوراکی..... ۱۶

۱-۸-۲ ارزش غذایی و دارویی قارچ خوراکی..... ۱۶

۱-۸-۳ قارچ غذایی سرشار از پروتئین..... ۱۷

۱-۸-۴ اسیدهای آمینه در پروتئین..... ۱۸

۱-۸-۵ پروتئین های میکروبی..... ۱۸

۱-۸-۶ رتبه بندی محصولات مشتق شده SCP از جلبک ها، قارچ ها و باکتری ها..... ۱۹

۱-۸-۷ قارچ به عنوان غذای کم کالری..... ۲۰

۱-۸-۸ کربوهیدرات های قارچ..... ۲۰

۱-۸-۹ چربی قارچ..... ۲۱

۱-۸-۱۰ پروفایل اسیدهای چرب قارچ ها..... ۲۱

۱-۸-۱۱ ویتامین های قارچ..... ۲۳

۱-۸-۱۲ مواد معدنی موجود درقارچ..... ۲۳

۱-۹ ارزش دارویی قارچ..... ۲۴

۱-۹-۱ ارزش خون سازی..... ۲۴

۱-۹-۲ ارزش ضد ویروسی..... ۲۵

۱-۱۰ توالی ژنوم در قارچ ها..... ۲۵

۱-۱۱ قارچ مورچلا (*Morchella*)..... ۲۶

۱-۱۱-۱ ترکیبات فعال قارچ مورچلا..... ۲۷

۱-۱۱-۲ چشم انداز دارویی قارچ مورچلا..... ۲۷

۱-۱۱-۳ خواص ضد میکروبی..... ۲۸

۱-۱۱-۴ خواص ضد التهابی..... ۲۸

۱-۱۱-۵ ظرفیت آنتی اکسیدانی..... ۲۸

۱-۱۱-۶ خواص ایمنی..... ۲۹

۱-۱۱-۷ خواص ضد تومور..... ۲۹

فصل دوم: بررسی منابع

۲ بررسی منابع..... ۳۲

۲-۱ ساختار شیمیایی، مواد مغذی قارچ ها..... ۳۲

فصل سوم: مواد و روش ها

۳ مواد و روش ها..... ۴۶

۳-۱ مواد شیمیایی و تجهیزات..... ۴۶

۳-۱-۱ مواد شیمیایی..... ۴۶

۳-۱-۲ تجهیزات و لوازم ازمایشگاهی..... ۴۶

۳-۲ روش ها..... ۴۷

۳-۲-۱ روش نگهداری میکروارگانیسم ها..... ۴۷

۳-۲-۲ مایه تلقیح وکشت های اصلی..... ۴۸

۳-۲-۳ تهیه محیط کشت توسعه تلقیح..... ۴۹

۳-۲-۴ تهیه محیط کشت تولید محصول..... ۴۹

۳-۲-۵ استخراج DNA ژنومی قارچ..... ۵۰

۳-۲-۶ محلول بافر TBE..... ۵۱

۳-۲-۷ ژل آگارز ۱٪..... ۵۱

۳-۲-۸ واکنش زنجیره پلیمراز (PCR)..... ۵۲

۳-۲-۹ الکتروفورز محصول..... ۵۳

۳-۲-۱۰ استخراج توده زیستی..... ۵۴

۳-۲-۱۱ اندازه گیری وزن خشک سلولی..... ۵۴

۳-۲-۱۲ مشتق سازی اسیدهای چرب..... ۵۴

۳-۲-۱۳ تعیین و اندازه گیری اسیدهای چرب..... ۵۵

۳-۲-۱۴ اندازه گیری درصد پروتئین به روش کجلدال..... ۵۶

۳-۲-۱۵ طرح آزمایشی..... ۵۸

فصل چهارم: نتایج و بحث

نتایج و بحث..... ۶۰

۴-۱ کشت جدایه قارچی..... ۶۰

۴-۲ تشخیص گونه قارچی..... ۶۰

۴-۳ محتوی اسید چرب بافت میوه ای قارچ *Morchella fluvialis*.....۶۳

۴-۴ بررسی اثرات ترکیبات محیط کشت بر میزان توده زیستی و پروتئین به روش آماری *"one-factor-at-a-time"*.....۶۴

۴-۴-۱ منبع نیتروژنی.....۶۴

۴-۴-۲ منبع کربن.....۶۶

۴-۴-۳ بهینه سازی به روش آماری سطح پاسخ.....۶۸

۴-۴-۴ نتایج میزان توده زیستی.....۷۲

۴-۴-۵ نتایج میزان پروتئین.....۷۳

۴-۴-۶ مقادیر بهینه پیش بینی شده توسط مدل درجه دوم برای متغیرها.....۷۴

۴-۴-۷ ارزیابی مدل رگرسیون تولید توده زیستی و پروتئین.....۷۴

نتیجه گیری.....۷۴

پیشنهادات.....۷۶

فهرست اشکال

شکل ۳-۱: نمونه قارچ مورچلا جمع آوری شده از مناطق کوه های شمال ایران (اصلی).....۴۸

شکل ۳-۲: نمونه قبل از تیتر شدن (سمت راست)، نمونه بعد از تیتر شدن (سمت چپ).....۵۸

شکل ۴-۱: نمونه تکثیر شده در محیط PDA (الف)، ریسه جوانه زده در محیط PDA (ب).....۶۰

شکل ۴-۲: بررسی کیفیت DNA ژنومی استخراج شده از جدایه *مورچلا* بر روی ژل آگارز ۱٪. M خط کش ژنومی ۱kb.....۶۱

شکل۴-۳: تکثیر جدایه *مورچلا* بررسی شده در این تحقیق با استفاده از آغازگر های ناحیه ITS (الف) و ژن EF1-α (ب) بر روی ژل آگارز ۱/۲٪. M خط کش ژنومی ۱kb.....۶۱

شکل ۴-۴: درخت فیلوژنیکی گونه *مورچلا* بررسی شده در این تحقیق با گونه های نزدیک به آن بر اساس ژن EF1-α (Bootstrap = ۱۰۰۰).....۶۲

شکل ۴-۵: درخت فیلوژنیکی گونه *مورچلا* بررسی شده در این تحقیق با گونه های نزدیک به آن بر اساس ناحیه ITS (Bootstrap = ۱۰۰۰).....۶۲

شکل ۴-۶: محتوی اسید چرب سازنده روغن گونه قارچی *Morchella fluvialis*.....۶۳

شکل ۴-۷: تاثیر منابع نیتروژنی و مواد معدنی متفاوت بر تولید توده زیستی (oil).....۶۵

شکل ۴-۸: تاثیر منابع نیتروژنی و مواد معدنی متفاوت بر میزان پروتئین.....۶۶

شکل ۴-۹: تاثیر منبع کربنی در تولید توده زیستی.....۶۷

شکل ۴-۱۰: تاثیر منبع کربنی بر میزان پروتئین.....۶۸

شکل ۴-۱۱: منحنی RSM برای تولید توده زیستی (٪) بوسیله قارچ *Morchella esculenta* با متغیرهای پودر سویا (N) و گلوکز (C).....۷۲

شکل ۴-۱۲: منحنی RSM برای تولید پروتئین بوسیله قارچ *Morchella esculenta* با متغیرهای پودر سویا (B) و گلوکز (A).....۷۳

فهرست جداول

جدول ۳-۱: سیکل حرارتی واکنش PCR جهت تکثیر ناحیه ITS..... ۵۲

جدول ۳-۲: سیکل حرارتی واکنش PCR جهت تکثیر ناحیه $EF1-\alpha$..... ۵۳

جدول ۴-۱: میزان واقعی و کد شده متغیرهای غیر وابسته در روش آماری RSM..... ۶۹

جدول ۴-۲: طراحی آزمایش ها و نتایج از دو متغیر اعمال شده بر روی سطح پاسخ در روش RSM..... ۷۰

جدول ۴-۳: پارامترهای ANOVA برای مدل توده زیستی و پروتئین (A گلوکز و B پودر سویا)..... ۷۱

فصل اول

کلیات

مقدمه

امروزه پرورش قارچ خوراکی از اهمیت بالایی برخوردار بوده و پیشرفت قابل توجهی در این زمینه حاصل شده است. نظر بسیاری از دانشمندان و محققین به این محصول شگفت انگیز که فقط از بقایای گیاهی کم ارزش از نظر اقتصادی مثل کاه گندم، کاه جو، کاه برنج و امثال آن ها پرورش می یابد، جلب شده است. قارچ اگرچه از مواد زائد گیاهی تغذیه می کند اما کیفیت غذایی قابل توجهی دارد، سرشار از پروتئین و در عین حال بسیار خوش طعم است. همچنین دوره کشت آن بسیار کوتاه است و در سال چندین بار می توان به کشت آن مبادرت نمود. قارچ های خوراکی یکی از منابع مهم پروتئینی است که مطالعات بسیاری تا به امروز در زمینه ی کشت و تولید توده زیستی قارچ ها به منظور تامین منبع پروتئینی و انرژی صورت گرفته است، یکی از منابع غذایی مهم قارچ خوراکی قارچ *مورچلا* می باشد که در مناطق جنگلی و در اوایل فصل بهار می روید بعضی از گونه های قارچی *مورچلا* به علت دارا بودن میزان بالای پروتئین، پلی ساکارید و فیبر خام مورد توجه دانشمندان قرار گرفته است. در گزارشی مشابه، از این گونه قارچی ۳۶/۵٪ پلی ساکارید و در عین حال ۲۸٪ فیبر خام بدست آمده است که نشان دهنده ارزش غذایی بالای این گونه قارچی می باشد. از این رو در این تحقیق بعد از جداسازی این قارچ از منطقه شمال کشور، تشخیص گونه آن با استفاده از روش PCR[1] با استفاده از آغازگرهای تکثیر کننده ناحیه ITS[2] قارچ ها و تعیین توالی ناحیه تکثیر شده، انجام شد. سپس به دو روش کشت جامد و مایع گونه قارچی رشد داده شده و میزان ترکیبات کلیدی تشکیل‌دهنده این گونه قارچی مهم تجاری مورد بررسی قرار گرفت. همچنین با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی گازی نوع اسیدهای چرب تشکیل دهنده آن مشخص شد.

[1] Polymerase chain reaction
[2] Internal transcribed spacer

۱ کلیات تحقیق

۱-۱ تاریخچه

قارچ تا به امروز مراحل مختلفی را در دوران تکاملش طی کرده است و هنوز به طور کامل نزد جهانیان شناسایی نشده است. مردم بد بینی خاصی نسبت به قارچ ها دارند چون شنیده اند که بعضی از انسان ها بر اثر خوردن قارچ مسموم شده اند و جان خود را از دست داده اند. قارچ های سمی در کنار انواع خوراکی و کیفیت غذایی این محصول انسان را بر آن داشت که قارچ خوراکی را پرورش دهند (محمدی گل تپه، ۱۳۸۹).

هزاران سال پیش چینی ها و ژاپنی ها نحوه پرورش چندین نوع قارچ را می دانستند که از میان آن ها شیتاکه[1] معروف است. دو قرن قبل از تولد مسیح، یک پزشک یونانی به نام «نیکاندر[2]» قارچ را در بستری از کود حیوانی و خاکستر که شاخ و برگ انجیر روی آن را پوشانده بود پرورش داد. سیصد سال بعد «دیو سکورید[3]» یک پزشک دیگر یونانی روش ساده و عملی برای پرورش قارچ ابداع کرد و سرانجام در قرن شانزدهم یک ایتالیایی به نام سالپینگو[4] و یک گیاه شناس فرانسوی به نام کلوسیوس[5] آثاری در مورد پرورش قارچ نوشتند (محمدی گل تپه، ۱۳۸۹).

کمی دیرتر در حدود دهه ۱۶۵۰ کشاورزان فرانسه کاملاً به طور تصادفی به نحوه پرورش قارچ پی بردند. آن ها متوجه شدند که در گوشه جالیزشان جایی که کود های اسب وجود داشت، قارچ ظاهر شده اما علت آن را نمی دانستند ولی در اندیشه تکثیر قارچ افتادند. یکی از کشاورزان متوجه شد قارچی که در جالیزشان است با قارچ های وحشی مراتع تفاوت هایی دارد، به طوری که علاوه بر تفاوت ظاهری، قابلیت تطبیق بیشتری با شرایط پرورش در باغچه را دارند (محمدی گل تپه، ۱۳۸۹).

[1] Shiitake
[2] Nikandre
[3] Dioscorid
[4] Salpingo
[5] Clausius

کین تینی[1] در وروسای به پرورش قارچ برای پادشاه خورشید دست می زند. چند سال بعد، تورن فورت به آکادمی سلطنتی علوم نامه ای درباره پرورش قارچ می نویسد. پرورش قارچی که همه این نوآوران می شناختند یک عیب جدی داشت: پرورش قارچ در زمستان به علت سرما و در تابستان به علت گرما و وجود انگل ها غیر ممکن بود در اواخر قرن هیجدهم عده ای به فکر افتادند که قارچ را در گلخانه پرورش دهند تا فصل تولید را طولانی تر سازند و این قدم جدیدی بود (محمدی گل تپه، ۱۳۸۹).

دو فرانسوی به نام های کنستانتین[2] و ماتروشو[3] از انستیتو پاستور هستند که در این زمینه قدم مهمی بر داشتند به طوری که پیشرفت تکنولوژی پرورش قارچ را تا حد زیادی مرهون آن ها هستیم. این دو نفر با بهره گیری از روش های پاستوریزاسیون اسپور قارچ را وادار به جوانه زدن کردند و میسلیوم بدست آورند. کار این دو محقق باعث شد که انواع قارچ ها مورد توجه قرار بگیرند و تلاش برای اهلی کردن قارچ های وحشی آغاز شود (محمدی گل تپه، ۱۳۸۹).

۱-۲ مشخصات عمومی قارچ ها

۱- یوکاریوتیک هستند.

۲- فاقد کلروفیل و آوند هستند.

۳- دارای دیواره سلولی اند.

۴- تکثیر از طریق جنسی و غیرجنسی صورت می‌گیرد.

۵- پیکره قارچ تک سلولی یا پر سلولی می باشد.

[1] Kintini
[2] Constantine
[3] Matroshu

۶- قارچ ها از طریق پدیده جذب، مواد غذایی خود را بدست می آورند در حالیکه گیاهان از طریق فتوسنتز و جانوران از طریق بلع این مواد را تهیه می کنند.

۷- قارچ ها فاقد تحرک هستند که این تفاوت آن ها را با جانوران و تشابه آن ها را با گیاهان نشان می دهد. از حرکات جزئی قارچ ها می توان به حرکت قارچ های آمیبی شکل اشاره کرد که با ایجاد پاهای کاذب روی ماده غذایی جابجا می شوند. اسپورهای قارچ ها (جز قارچ های حقیقی) دارای تاژک می باشند که موجب جابجایی آن ها می شود. همچنین حرکت سیتوپلاسمی درون سلولی نیز نوعی حرکت محسوب می‌گردد (Blackwell *et al*., 2006).

۱-۳ ساختمان شیمیایی سلولی در قارچ ها

درصد بیشتری از وزن سلول های قارچی را آب تشکیل می دهد مخصوصاً در سلول های جوان ۹۰٪ وزن تازه میسلیوم را آب تشکیل می دهد. اسپورها نیز دارای درصد بالایی از آب می باشند. کربن ۴۰ تا ۴۴٪، ترکیبات معدنی ۲ تا ۵٪ که فسفر، پتاسیم، سیلیس و آلومینیوم در ردیف مهم ترین ترکیبات معدنی قارچ اند. ترکیبات ازته ۲ تا ۷٪ که پروتئین ها، اسیدهای نوکلئیک و اوره را شامل می شوند. قسمت اعظم کربنی که قارچ ها می گیرند صرف ساخت دیواره سلولی می شود.

دیواره سلولی در قارچ ها حاوی درصد زیادی کیتین می باشد. در بررسی های انجام گرفته روی ۲۵ نوع قارچ، میزان کیتین متغیر و بین ۲/۶ تا ۲/۲۶٪ وزن خشک قارچ گزارش شده است. قارچ های تک سلولی نظیر مخمرها مقدار کمی کیتین تولید می کنند. ماده اصلی دیواره قارچ ها گلوکان و مانان می باشد. همچنین سلولز، لیگنین، هالوز و کیتوزان نیز از دیگر مواد تشکیل دهنده دیواره سلولی قارچ ها می باشد. انواعی از هتروپلی ساکاریدها، پروتئین ها، چربی ها و مواد معدنی نیز ممکن است وجود داشته باشند. همچنین منیزیم و کلسیم از مواد معدنی رایج در ساختمان دیواره سلولی قارچ هستند (Preininger *et al*., 2013).

۱-۴ طبقه بندی قارچ ها

در عالم موجودات هستی، دو سلسله مهم گیاهان و جانوران قرار دارند که گیاهان به علت داشتن کلروفیل (سبزینه)، توانایی تولید مواد غذایی مانند گلوکز و فروکتوز و ترکیباتی مانند سلولز و همی سلولز و لیگنین را دارا می باشند و نقش تولید کننده را در طبیعت ایفا می کنند. در مقابل، جانوران به خاطر نداشتن کلروفیل وابستگی کامل به موجودات دیگر داشته و برای تأمین غذا از گیاهان یا سایر جانوران استفاده می کنند و در طبیعت مصرف کننده هستند.

قارچ ها در طبیعت به عنوان تجزیه کننده فعالیت می کنند و به علت نداشتن کلروفیل قادر به تولید مواد غذایی مورد نیاز خود نمی باشند و برای رفع نیازهای غذایی خود ناچار به ترشح آنزیم و تجزیه مواد آلی به مواد ساده تر می باشند. به عنوان مثال برای تجزیه سلولز به مواد قندی ساده تر از آنزیم سلولاز استفاده می کنند. قارچ ها پس از تجزیه مواد آلی پیچیده به ترکیبات ساده تر مانند گلوکز و فروکتوز، مواد غذایی مورد نیاز خود را تولید می کنند و در طی این فرآیند مانند سایر جانوران تنفس می کنند یعنی اکسیژن (O_2) مصرف می کنند و دی‌اکسیدکربن (CO_2) پس می دهند (برخلاف گیاهان که دی‌اکسیدکربن مصرف و اکسیژن تولید می کنند) (Brandt and Warnock 2011).

به طورکلی قارچ ها برای زندگی و حیات نیاز به مواد آلی دارند که این مواد را از بقایای گیاهی یا جانوری تأمین می کنند. به همین علت جنگل ها یکی از مکان های مناسب برای رویش قارچ های خودرو می باشند.

۱-۴-۱ تقسیم بندی قارچ ها از نظر نوع دریافت مواد غذایی

زندگی قارچ به سه طریق است:

۱- ساپروفیت (تجزیه‌گر)[1]

۲- انگلی (مضر یا پارازیت)[2]

۳- همزی (سمبیوتیک)[3] یعنی با گیاهان آلی (سبزینه دار) مشترکاً زندگی می کنند.

۱-۴-۱-۱ ساپروفیت

بستر یا کمپوست مکانی است که از قبل برای پرورش قارچ آماده شده است. قارچ ها چون کلروفیل یا سبزینه ندارند قادر به تأمین نیازهای خود نمی باشند. رنگیزه سبزی که گیاهان آلی به کمک آن کربن موجود در گاز کربنیک هوا را با مواد دیگر ترکیب می کنند و ماده غذایی آلی می سازند. همین سبزینه یا کلروفیل است که رنگ سبز را به بیشتر گیاهان می دهد بنابراین باید از قبل مکان و مواد مورد نیاز قارچ را آماده کرد و این کار به منزله پشـــتیبانی از قارچ می باشـــد و واژه ســـاپروفیت هم به همین معناست (ارشاد ۱۳۷۴ و بهل ۱۳۸۴).

۱-۴-۱-۲ قارچ های انگلی

بعضـــی دیگر از قارچ ها روی موجودات زنده بســـر می برند و ســـهم غذای خود را از آن ها می گیرند. چنین قارچ هایی که معمولاً روی درختان زخمی شده، مریض یا ضعیف زندگی می کنند و سرانجام باعث خشکیدن آن ها می شوند را قارچ های انگلی یا پارازیت می‌گویند (ارشاد ۱۳۷۴ و بهل ۱۳۸۴).

۱-۴-۱-۳ قارچ های همزی یا سمبیوتیک

گروه دیگری از قارچ ها با دیگر گیاهان همزیســـتی دارند. یعنی قارچ و گیاه میزبان متقابلاً از وجود یکدیگر بهره می برند. این قارچ ها ر شته هایی را به درون ریشک های درختان یا گیاهان میزبان دیگر

[1] Saprophytic fungi
[2] Parasitic fungi
[3] Symbiotic fungi

وارد می کنند و با تر شح موادی رقیق کننده و ضعیف ریـ شه گیاه میزبان را تغییر می دهند و ریـ شه های کوتاه و متورمی تولید می شود. پوششی روی این ریشک ها وجود دارد که ریشه قارچ وارد آن می شـــود و اندام های ویژه ای که میکوریز[1] نام دارند، را تشـــکیل می دهند، این اندامک ها دارای اهمیت زیادی هستند چون تبادل غذایی بین گیاه میزبان و قارچ توسط آن ها انجام می شود. قارچ سهم خود را از شـــیره گیاهی جذب می کند و مواد معدنی را که خود به ســـهولت از محیط می گیرد به گیاه میزبان می دهد (ارشاد ۱۳۷۴ و بهل ۱۳۸۴).

۱-۴-۲ قارچ های سمی و خوراکی

چگونگی تشخیص قارچ خوراکی (Mushroom) از انواع سمی (Tood stool) بسیار مشکل است. راه های قدیمی مانند سیاه شدن قاشق های نقره ای توسط قارچ های سمی یا داشتن بوی بد و ترکیبات و ترشحات ناخوشایند توسط آن ها نمی توانند ملاک تشخیص باشند. قارچ *آمانیتا موسکاریا*[2] با کلاهک قرمز و لکه های سفید و خوش رنگ حتی تا ساعت ها پس از تغذیه تولید ناراحتی نکرده، ولی بعد از چند ساعت باعث ناراحتی های شدید روده ای و در نهایت مرگ می شود. این قارچ ها به نام فرشته مرگ یا فرشته های فاسد کننده لقب یافته اند و اثر این قارچ مشابه اثر مار زنگی اعلام شده و تا به حال قربانیان زیادی نیز داده است. لذا بهترین راه این است که گونه های مختلف قارچ خوراکی را به دقت شناسایی کرده و از مصرف قارچ های ناشناخته خودداری شود و حتی شناسایی خانواده و جنس نیز کفایت نمی‌کند، زیرا در بسیاری از خانواده ها و جنس ها ممکن است گونه های خوراکی و غیر خوراکی وجود داشته باشد. بهترین روش شناخت قارچ های خوراکی از سمی با مراجعه به متخصصین قارچ شناس، استفاده از کتب راهنما و مرجع، مراجعه به افراد خبره و بومی منطقه و در نهایت بررسی قسمت

[1] Mycorise
[2] Amanita muscaria

زیر کلاهک و تیغه ها می باشد که در صورت وجود حشرات احتمال خوراکی بودن قارچ بیشتر و در صورت عدم وجود حشره در زیر کلاهک احتمال سمی بودن قارچ زیاد است (Brandt *et al*., 2011).

۱-۴-۳ دسته بندی قارچ های خوراکی

قارچ ها انواع خوراکی نیز دارند. قارچ هایی که در مناطق صحرایی می رویند، اغلب خوردنی اند. سلسله ی قارچ ها به دو شاخه ی قارچ های کاذب و قارچ های حقیقی تقسیم بندی می شوند. قارچ های حقیقی خود به پنج شاخه تقسیم می شوند که عبارتند از: ماستیگو مایکوتا[۱]، زیگو مایکوتا[۲]، آسکو مایکوتا[۳]، بازیدیو مایکوتا[۴] و دئوترومایکوتا[۵]. قارچ های خوراکی اغلب جزء شاخه بازیدیو مایکوتا هستند. بعضی از قارچ ها با تثبیت نیتروژن به گیاهان کمک می کنند و بعضی دیگر به خاطر داشتن این ویژگی با گیاهان به طور همزیست زندگی می کنند. قارچ های خوراکی از لحاظ نوع تغذیه شان به دو دسته ی تجزیه کننده اولیه و تجزیه کننده های ثانویه تقسیم می شوند.

تجزیه کننده های اولیه به دسته ای از قارچ ها اطلاق می گردد که توانایی تجزیه ی سلولز و بقایای مرده ی گیاهی را دارند اما تجزیه کننده های ثانویه برای رشد و تغذیه به محیطی احتیاج دارند که قبلاً توسط میکروارگانیسم ها تجزیه شده باشند (Brandt *et al*., 2011).

۱-۵ نحوه زندگی قارچ ها

قارچ ها به حالت ساپروفیت روی مواد در حال پوسیدن و یا در فرم انگل یا پارازیت روی سایر موجودات زنده زندگی می کنند. موجودی که مورد حمله قارچ قرار می گیرد میزبان نامیده می شود. قارچ ها از نظر تأمین مواد غذایی با گیاهان تفاوت دارند و به تنهایی قادر به ساختن مواد غذایی مورد نیاز خود نمی باشند. اگر مواد قندی از قبیل گلوکز، ساکارز و مالتوز در اختیار قارچ ها قرار گیرد با استفاده از

[1] Mastigomycota
[2] Zygomycota
[3] Ascomycota
[4] Basidiomycota
[5] Deuteromycota

ترکیبات آلی می توانند پروتئین های مورد نیاز خویش را بسازند. تیامین و بیوتین از ویتامین های مورد نیاز قارچ ها می باشند. قارچ ها در درجه حرارت C ° ۰ تا ۳۰ می توانند زندگی کنند. درجه حرارت مناسب برای قارچ ها °C ۲۰ تا ۳۰ می باشد. pH مناسب برای رشد قارچ ها ۶ =pH است ولی در دامنه pH ۲ تا ۱۲ قادر به رشد هستند (محمدی گل تپه، ۱۳۸۹).

۱-۵-۱ چرخه زندگی قارچ (*Morchella*)

در دو طرف تیغه های موجود در بخش زیرین کلاهک قارچ تعداد بسیار زیادی اسپور تولید می شود. اسپورها بسیار ریز بوده و با چشم غیر مسلح دیده نمی شود. اسپور در آب مقطر هم قدرت جوانه زنی دارد ولی برای ادامه رشد و تولید میسلیوم نیاز به مواد غذایی (بستر کشت مناسب) دارد. بهترین جوانه زنی اسپورها در دمای °C ۲۲ تا ۲۴ انجام می شود و بهترین pH برای جوانه زنی حدود ۷-۶ است. pH بیشتر از ۹ یا کمتر از ۳، مانع جوانه زدن اسپورها می شود. همچنین غلظت CO2 بیشتر از ۲٪ مانع جوانه زدن اسپور می شود.

زمانی که یک اسپور جوانه می زند یک رشته باریکی که هیف نامیده می شود تولید می کند. این رشته به سرعت رشد کرده و دارای دیواره عرضی می شود و یک شبکه هیفی به نام میسلیوم (ریسه) تولید می کند. ریسه ها نقش مهمی در رشد قارچ ها ایفا کرده و ترشح آنزیم ها و تجزیه مواد آلی پیچیده به مواد قندی ساده تر توسط آن ها صورت می گیرد. این قسمت، اندام رویشی قارچ را تشکیل می دهد که در نهایت اندام باردهی (Mushroom) ایجاد می شود.

آغاز تشکیل اندام باردهی را مرحله اولیه یا مرحله ته سنجاقی (pin head) می گویند. تولید اندام باردهی بر اثر شوک انجام می شود. با توسعه این مرحله دکمه تشکیل و سپس اندام باردهی بالغ یا کامل (چتر قارچ) می شود. در قسمت زیرین کلاهک تعداد زیادی تیغه وجود دارد که اسپورها در این محل تشکیل می شوند (Andrews, 2017).

۱-۵-۲ ساختار قارچ

ساختار اغلب قارچ ها از رشته ها یا ریسه های نخی شکل به نام هیف تشکیل شده است. در قارچ های پست، ریسه ها یا هیف ها فاقد دیواره عرضی هستند. انشعابات هیف ها یا ریسه ها شبکه ای به نام میسلیوم را به وجود می آورند. شبکه میسلیوم را می توان به صورت کپک بر روی مواد آلی مختلف مشاهده کرد. آنزیم هایی که توسط قارچ های مختلف به وجود می آیند می توانند انواع مواد آلی را تجزیه کرده و به مواد ساده تری مبدل کنند. قارچ ها از لحاظ ساختار یاخته ای جزء یوکاریوت ها هستند و در اطراف هسته و دیگر اجزای یاخته غشای دو لایه ای وجود دارد. در اطراف سلول، دیواره سلولی حاوی کیتین قرار می گیرند (Preininger *et al*., 2013).

۱-۵-۳ تولید مثل قارچ

قارچ ها به طریق غیر جنسی و جنسی تکثیر می یابند. تولید مثل غیرجنسی در قارچ ها رایج تر بوده در صورتی که تولید مثل جنسی ممکن است فقط یک بار در سال اتفاق بیفتد. در تولید مثل غیر جنسی تلفیق هسته ها صورت نگرفته و نو ترکیبی به وجود نمی آید و فرزندان خیلی شبیه به سلول مادری هستند. در صورتی که در تولید مثل جنسی تلفیق گامت ها الزامی بوده، ترکیب گامت ها صورت می‌گیرد و با تلفیق هسته ها نو ترکیبی ژنتیکی صورت می گیرد. بنابراین قارچ های حاصل شده از نظر ژنتیکی با والدین خود متفاوت هستند (Taylor *et al*., 1999).

۱-۶ جنبه های مفید قارچ ها

۱- قارچ ها همراه با باکتری ها، قندها، آمینو اسیدها و پروتئین ها را تجزیه می کنند. قارچ ها مخصوصاً در تجزیه لیگنین چوب نقش دارند.

۲- از قارچ ها در ساختن آنتی بیوتیک ها استفاده می شود. پنی سیلین[۱] و کریزوفولوین[۲] از آنتی بیوتیک های مستخرج از قارچ ها هستند. از قارچ *پنی سیلیوم کریزوژنوم*[۳] آنتی بیوتیکی به نام پنی سیلین استخراج می کنند که از رشد استافیلوکوک ها جلوگیری می کند. کشف خاصیت آنتی بیوتیکی پنی سیلین اولین بار در سال ۱۹۲۵ توسط الکساندر فلیمینگ[۴] که در بیمارستان سنت ماری در لندن روی قارچ *پنی سیلیوم نوتاتوم*[۵] تحقیق می کرد، صورت گرفت.

۳- قارچ ها در فرآیند های صنعتی و غذایی نظیر تهیه نان و تهیه پنیر نقش دارند. قارچ هایی که مواد قندی را تخمیر کنند، قارچ قندی یا ساکارومیست هستند. از قدرت تخمیری قارچ های قندی در ایجاد الکل، گاز کربنیک و تخمیر مواد در صنایع متعدد استفاده می کنند. در سال های اخیر با روش های اصلاح نژاد و انتخاب نژاد بهتر توانسته اند انواعی از مخمرها را بدست آورند که امتیازات بیولوژیکی زیادی نسبت به نژادهای وحشی داشته و می توانند طعم و مزه فرآورده ها را مطبوع تر سازند.

۴- ارزش غذایی مخمرها به علت داشتن مقدار قابل توجه اسیدهای آمینه، ازت، فسفر، ویتامین های C و D است. در کشور چین به منظور جبران مواد پروتئینی، به جیره غذایی افراد از این قارچ ها اضافه می کنند. امروزه از قارچ های جنس *آسپرژیلوس* در تخمیر مواد غذایی زیاد استفاده می شود.

۵- فرآورده های مختلفی از قارچ ها بدست می آید که از این فرآورده ها به اسیدهای آلی نظیر اسید سیتریک، اسید گلوکونیک و اسید ایتاکونیک، می توان اشاره کرد. همچنین از قارچ ها در تهیه هورمون ها و ویتامین هایی از قبیل ریبوفلاوین، بتاکاروتن و در تهیه آنزیم هایی نظیر پروتئاز ها، آمیلاز ها و پکتیناز ها استفاده می شود. ماده دارویی افدرین[۶] نیز از قارچ ها تهیه می شود.

---

[1] Penicillin
[2] Griseofulvin
[3] Penicillium chrysogenum
[4] Alexander Fleming
[5] Penicillium notatum
[6] Ephedrine

۶- بعضی از قارچ ها با انجام فعالیت های شیمیایی و تجزیه مواد در خاک اقدام به سم زدایی[1] می کنند.

۷- قارچ ها در تشکیل گلسنگ ها به حالت همزیستی شرکت داشته و به صورت میکوریز در ریشه برخی از گیاهان دیده می شوند.

۸- مصرف خوراکی قارچ: قارچ هایی که برای تغذیه جمع آوری می شوند، شامل ماش روم ها، تروفول ها، مورل ها و پاف بول ها هستند. دنبلان ها که به گروه تروفل ها تعلق دارند، مهم ترین گروه از قارچ های خوراکی بوده و به دلیل بوی تند آن ها از خوک یا سگ تربیت شده برای جمع آوری آن ها استفاده می شود. از قارچ های گروه ماش روم ها می توان به جنس های قارچ *آگاریکوس* اشاره کرد. *لیکوپرودون* ها[2] دارای مصرف غذایی هستند، *اوری کولاریا*[3] هم خوراکی هستند.

۹- استفاده از قارچ ها در کارهای تحقیقاتی: از قارچ ها به طور گسترده ای در این موارد استفاده می شود. قارچ ها را تحت عنوان کارخانه مهندسی ژنتیک هم می شناسند. از قارچ هایی که روی آن ها تحقیقات وسیع در ژنتیک صورت گرفته، می توان به قارچ *نوروسپورا*[4] اشاره کرد (Wani *et al.*, 2010).

۱-۶-۱ اهمیت قارچ در رژیم غذایی

پس از جنگ جهانی دوم میزان کل تولید قارچ خوراکی در جهان افزایش یافته است. در سال ۱۹۸۶میزان کل تولید جهانی ۲۱۸۲۰۰۰ تن گزارش شده است. کشورهای اصلی تولید کننده در جهان عبارتند از: چین، فرانسه، هلند، ایتالیا، ژاپن، انگلستان، آمریکا. کشور آلمان بالاترین مصرف سالانه‌ی جهان را دارا می باشد.

۱-۶-۲ مضرات قارچ ها

[1] Detoxification
[2] Lycoperdon
[3] Auricularia
[4] Neurospora

۱- عده‌ای از قارچ ها نظیر ارگوت غلات به شدت سمی هستند و مسمومیت هایی به نام ارگوتیسم ایجاد می کنند، علت مسمومیت قارچ ارگوت وجود آلکالوئیدهایی مانند ارگوتوکسین[1] در آن است.

۲- قارچ ها در انسان، دام، طیور و گیاهان ایجاد بیماری می کنند.

۳- رشد قارچ ها بر روی مواد مختلف نظیر ساختمان های چوبی یا الوار، باعث پوسیدگی می شود.

۴- برخی از قارچ های کلاهک دار خوراکی و عده‌ای نیز مانند بعضی از آمانیت ها نظیر *آمانیتا فالوئیدیس*[2] به علت داشتن مواد آمانیتا توکسین[3] و آمانیتا همولیزین[4]، بسیار سمی و مهلک هستند.

۵- قارچ *آمانیتا موسکاریا* در ردیف قارچ های مخدر، جای دارد. ماده ای به نام موسکارین تولید می کند. در صورتی که به مقدار کم مصرف شود، دارای اثری جنون آمیز است و در صورتی که مقدار مصرف زیاد باشد، کشنده و مهلک خواهد بود (حسینی و همکاران، ۱۳۸۸).

۱-۷ مزایای کشت قارچ خوراکی نسبت به دیگر محصولات کشاورزی

۱- اطمینان از سالم بودن قارچ: قارچی که بذر آن توسط واحدهای تولید کننده مجاز بذر قارچ خوراکی تهیه و توسط تولید کنندگان قارچ برای پرورش مورد استفاده قرار گیرد، پس از رشد و نمو در سالن های تولید و با رعایت اصول فنی و بهداشتی زیر نظر کارشناسان مجرب به بازار عرضه می شود، مصرف‌کننده می تواند با اطمینان خاطر از کیفیت و سلامت، آن را مصرف نماید.

۲- جلوگیری از آلودگی محیط‌زیست: سالانه مقدار زیادی از ضایعات کشاورزی در روی زمین باقیمانده و استفاده صحیح از آن ها نمی شود و با ماندن در محیط و روی زمین سبب بروز مشکلاتی در انجام شخم کشت بعد می گردد. طبق آمار سالانه حدود ۲۰ میلیون تن ضایعات کشاورزی از بین می روند که می توان با استفاده از این ضایعات در پرورش قارچ خوراکی علاوه بر تولید قارچ، از کمپوست باقیمانده

[1] Ergotoxin
[2] Amanita phalloides
[3] Amanita toxin
[4] Amanita hemolysin

به عنوان کود آلی و در برخی موارد به عنوان غذای دام و طیور استفاده کرد که با تولید قارچ خوراکی چرخه تجزیه شدن بقایای کشاورزی سریع تر شده و جلوی آلودگی محیط زیست نیز گرفته می شود.

۳- کنترل عوامل محیطی: در طبیعت ظهور قارچ های خودرو در دو فصل بهار و پاییز صورت می گیرد که پس از رعد و برق می باشد. در زمان رعد و برق میزان رطوبت هوا به علت بارندگی زیاد شده و دمای هوا کاهش می یابد. نور و صدای حاصل از رعد و برق به همراه عوامل فوق سبب ایجاد شوک و تحریک اندام های رویشی موجود در محیط و ایجاد اندام باردهی (زایشی) می شود.

با توجه به محدودیت زمانی و مکانی برای مهیا شدن شرایط محیطی مناسب در طبیعت، می توان با ایجاد سالن های پرورش و کنترل عوامل محیطی مورد نیاز در تمام طول سال اقدام به پرورش قارچ های خوراکی نمود.

۴- ایجاد اشتغال زایی بالا: برای تولید قارچ، چندین شغل مرتبط ایجاد می شود که عبارتند از تولید کننده بذر قارچ، عرضه کننده مواد تولید بستر و بسته بندی، پرورش دهنده قارچ، بسته بندی کننده ی قارچ، پخش کننده قارچ، عرضه کننده قارچ، صنایع تبدیلی قارچ، صادرکننده قارچ و غیره.

۵- استفاده مفید از واحد سطح: با استفاده از قفسه در سالن های پرورش قارچ می توان میزان تولید را در واحد سطح افزایش داده و از ارتفاع استفاده بهینه کرد.

۶- کوتاه بودن دوره رشد و نمو قارچ ها: قارچ ها نسبت به بسیاری از محصولات کشاورزی دوره رشد کوتاهی دارند و به همین منظور می توان چندین بار در سال قارچ کاشت و برداشت شود.

۷- قارچ خوراکی امروزه به عنوان یک غذای لذیذ و کامل و مفید در دنیا به حساب می آید و به آن غذای تندرستی می گویند.

۸- قارچ خوراکی بیشترین میزان محصول را در واحد سطح نسبت به سبزیجات و گیاهان گلخانه ای دارد (سازمان پژوهش و برنامه ریزی آموزشی ۱۳۹۵).

۱-۸ شناخت قارچ های خوراکی و دارویی

۱-۸-۱ قارچ های خوراکی

در اکثر کشورهای جهان خوردن قارچ متداول است زیرا از نظر پروتئین با گوشت قرمز تفاوت چندانی ندارد و دارای چربی کمی است و مصرف آن نیز با صرفه و اقتصادی است. از مهم ترین قارچ های خوراکی می توان به قارچ دکمه ای و انواع صدفی آن اشاره کرد. این قارچ ها را می توان در مکان های کوچک هم تولید کرد (حسینی و همکاران، ۱۳۸۸).

۱-۸-۲ ارزش غذایی و دارویی قارچ خوراکی

کلسترول و استرول ها که برای بیماران قلبی مضرند در قارچ ها وجود ندارند و متقابل ارگوسترول[1] در قارچ موجود است که توسط بدن به ویتامین D تبدیل می شود. اکثر سبزیجات فاقد اسید فولیک و ویتامین B_{12} هستند در حالیکه این مواد در قارچ به میزان فراوانی یافت می شوند. علاوه بر ویتامین های فوق الذکر قارچ مقدار قابل ملاحظه‌ای ویتامین C دارد.

قارچ سرشار از آهن و ویتامین های خاص است. در واقع حاوی مقدار بیشتری ویتامین B_{12} و نیاسین در مقایسه با سایر سبزیجات است. قارچ ها برای اشخاص گیاه خوار به عنوان طعم دهنده غذا بسیار مطلوب و قابل فریز شدن و نگهداری برای مدت طولانی هستند و کیفیت خود را نیز از دست نمی دهند. همچنین حاوی مقدار چشمگیری فسفر، سدیم، پتاسیم، کلسیم و حاوی مقدار ناچیزی سلنیم و سرب است (Mohammad Hamdi *et al*., 2016).

قارچ یک غذای ثابت در سبد غذایی مردم کشورهای مختلف با فرهنگ های مختلف و به عنوان یک منبع غذایی با ارزش مورد علاقه مردم است و همچنین به عنوان چاشنی و ادویه مورد استفاده قرار می

[1] Ergosterol

گیرد. قارچ به عنوان غذایی کم کالری، دارای ارزش تغذیه ای بالا، مفید برای بیماری های قلب و عروق، غذایی مناسب برای نوجوانان، بزرگسالان و اشخاص دارای بیماری قند است (Guo *et al*., 2003).

۱-۸-۳ قارچ غذایی سرشار از پروتئین

قارچ توسط سازمان غذا و کشاورزی به عنوان غذایی با پروتئین بالا شناخته شده است. در کشورهای پر جمعیت با رژیم گیاه خواری مثل هند مردم بیشتر به غلات و سایر سبزیجات دارای درصد پروتئین و سایر عناصر غذایی ضعیف وابسته اند که وجود قارچ در هرم غذایی به دلیل درصد پروتئین بالا اهمیت ویژه ای دارد. قارچ خشک ۲۰ تا ۳۰٪ (بسته به نوع آن) و قارچ تازه حدود ۳ تا ۴/۵٪ پروتئین دارد. کیفیت پروتئین قارچ نسبت به سبزیجات بسیار بهتر است. کلمه پروتئین واژه یونانی است که معنی اولین و بالاترین را می دهد و نام مناسبی برای ماده انسانی تشکیل دهنده زندگی و ادامه حیات همه موجودات زنده است. پروتئین مهم ترین قسمت ساختمان بدن موجودات زنده و وزن خشک آن ها را تشکیل می دهد. پروتئین یک ماده سازمان یافته است که با هضم شدن در بدن عناصر اصلی بدن را به وجود می آورد. به عبارت دیگر اسیدهای آمینه مولکول های پیچیده پروتئین را تشکیل می دهند. اسیدهای آمینه ای که توسط بدن قابل ساختن نیستند و ضرورت آن ها در تغذیه روزانه کاملاً احساس می شود. قارچ ها سرشار از این اسیدهای آمینه ضروری هستند (Cheung, 2008; Wani *et al*., 2010).

۱-۸-۴ اسیدهای آمینه در پروتئین

قارچ حاوی انواع اسیدهای آمینه از جمله اسیدهای آمینه غیر ضروری است. اسیدهای آمینه ضروری عبارتند از متیونین (Methionine)، ایزولوسین (Lsoleucine)، لوسین (Leusine)، لیزین (Lysine)، تریپتوفان (Trypthophan)، والین (Valine)، هیستیدین (Histidine) و آرژنین (Arginine)،

اسیدهای آمینه غیرضروری عبارتند از سیستین (Cystine)، پرولین (Prolin)، گلیسین (Glysine)، سرین (Serine)، آلانین (Alanine)، اسید آسپارتیک، گلوتامین.

قارچ حاوی انواع اسیدهای آمینه است. اسیدهای آمینه غیر ضروری توسط بدن ساخته می شوند. از کل اسیدهای آمینه حدود ۲۵ تا ۴۰٪ آن ها را اسیدهای آمینه ضروری تشکیل می دهند. حدود ۲۵ تا ۳۵٪ از کل اسیدهای آمینه آزادند و بقیه در ترکیب پروتئین ها قرار دارند (Cheung, 2008; Wani *et al*., 2010).

۱-۸-۵ پروتئین های میکروبی

مایکو پروتئین لفظی است که توسط کمیته استاندارد غذای انگلستان جهت نام عمومی غذای تولید شده حاصل از تخمیر مداوم و رشد قارچی به نام *Fusarium venenatu* (در اصل *F.graminerarum*) بر روی مواد نشاسته ای ابداع گردید. این ماده پروتئین تک یاخته یا همان SCP[1] یک بیومس میکروبی است که برای مصرف انسان و حیوان توسط شرکت انگلیسی RHM با همکاری شرکت ICI در اواسط دهه ۸۰ میلادی تولید شد. این محصول قرار بود به صورت پودر خشک به عنوان آرد SCP با پروتئین بالا فروخته شود اما کیفیت ارگانولپتیکی توده هیفی و ساختار رشته ای آن که بسیار شبیه به فیبرهای ماهیچه بود باعث شناخته شدن آن شد. در نتیجه محصولی شبیه به گوشت با درصد ترکیبات عمومی ۴۴٪ پروتئین، ۱۸٪ فیبر رژیمی و تنها ۱۳٪ چربی تولید و تحت نام تجاری کورن محصول به بازار عرضه گردید. شرایط رشد این قارچ، دمای ۳۰ $^{\circ}C$ و pH= ۶ است. این محصول به خاطر استفاده از قارچ (که به طور طبیعی حاوی اسید نوکلئیک کمتری نسبت به باکتری ها می باشد) و اضافه کردن یک عملیات برای کاهش اسید ریبو نوکلئیک در فرآیند تولید صنعتی، دارای محتوی ژنتیکی خیلی پایین می باشد و لذا استفاده از آن در خوراک انسان در انگلستان مجاز تشخیص داده شد. این ماده غذایی امروزه در

[1] Single Cell Protein

محصولات بسیاری به صورت کورن برگرها، سوسیس ها و وعده های غذایی آماده، می باشد و با منابع پروتئینی گوشت و سویا رقابت می کند (قمری و قمری ۱۳۸۸).

۱-۸-۶ رتبه بندی محصولات مشتق شده SCP از جلبک ها ، قارچ ها و باکتری ها

۱- پروتئین تک یاخته حاصل از جلبک: این نوع پروتئین تک یاخته حاوی پروتئین (۴۰ تا ۶۰٪)، چربی، ویتامین های E، A، D، C، B و نمک های معدنی (۷٪)، کلروفیل و فیبر هستند. همچنین دارای کمترین مقدار اسید های نوکلئیک می باشند.

۲- پروتئین تک یاخته حاصل از قارچ: این نوع پروتئین تک یاخته حاوی ویتامین های گروه B کمپلکس، ریبوفلاوین، تیامین، بیوتین، نیاسین، اسید پنتوتنیک، پیریدوکسین، کولین، گلوتاتیون و اسید فولیک می باشند. همچنین از نظر اسیدهای آمینه گوگرد دار غنی می باشند و پروتئین آن ها حدود ۳۰ تا ۷۰٪ است.

۳- پروتئین تک یاخته حاصل از باکتری: این نوع پروتئین تک یاخته پروتئین بالایی دارند (۸۰٪) و حاوی اسید آمینه های ضروری معینی هستند. پروتئین تک یاخته باکتریایی همچنین از نظر متیونین غنی است و میزان متیونین آن از متیونین جلبک و قارچ بیشتر است و دارای بیشترین مقدار اسیدهای نوکلئیک می باشند.

۱-۸-۷ قارچ به عنوان غذای کم کالری

قارچ مثل سبزیجات دارای حدود ۹۰٪ آب است و اصولاً کالری ایجاد شده توسط آن پایین است. از محتوی کلی کربوهیدرات های آن ۵-۴٪ کیتین بوده و بقیه را همی سلولز و گلیکوژن تشکیل می دهند.

قارچ فاقد نشاسته و حاوی مقدار ناچیز (حدود ۳٪) قند آزاد است. این ویتامین برای استخوان ها و دندان ارزش اساسی دارد. فیبر قارچ در مقایسه با سایر محصولات گیاهی بالا است که باعث دفع آسان مدفوع از بدن و مانع یبوست می شود. ویتامین B کمپلکس و ویتامین C به مقدار قابل ملاحظه ای در قارچ یافت می شود که عمدتاً شامل تیامین، ریبوفلاوین، نیاسین، بیوتین و نیز اسید فولیک هستند. اکثر سبزیجات فاقد اسید فولیک و ویتامین B_{12} هستند. در حالیکه این مواد در قارچ به میزان قابل ملاحظه‌ای یافت می شوند (Cheung, 2008; Wani *et al*., 2010).

۱-۸-۸ کربوهیدرات های قارچ

کربوهیدرات ها با فرمول شیمیایی ($C_6H_{12}O_6$) مرکب از کربن، هیدروژن و اکسیژن هستند. عمده ترین واحد تشکیل دهنده کربوهیدرات ها، مونوساکاریدها هستند. مونوساکاریدها حاوی سری های اتم کربن در زنجیره مولکولی همراه با اتم های اکسیژن و هیدروژن هستند. کربوهیدرات های تشکیل دهنده گلوکز به میزان زیاد در طبیعت باقی نمی مانند در حالیکه کربوهیدرات های با مولکول های پلیمریک پیچیده با از دست دادن آب خود در طبیعت به وفور یافت می شوند. کربوهیدرات ها به صورت نشاسته در گیاهان و گلیکوژن در حیوانات وجود دارند. نشاسته و گلیکوژن در مجاورت آب در مواقع مورد نیاز به آسانی به گلوکز تبدیل می شوند. در صورت کاهش میزان قند خون به حداقل لازم، گلیکوژن ذخیره شده در حیوانات (مخصوصا در کبد و عضلات) به گلوکز تبدیل و وارد خون می شود. قارچ تازه به میزان کافی حاوی کربوهیدرات و فیبر گیاهی است. قارچ دکمه ای، حاوی قند پنتوز، هگزوز، دی ساکاریدها و اسیدهای آمینه می باشد. بین کربوهیدرات های پلیمریک، گلیکوژن و کیتین به عنوان پلیمرهای استیل گلیکوزآمین – ان[1] به عنوان ترکیب ساختمانی دیواره های سلولی قارچ هستند. در نمونه های جوان به

[1] Acetylglyecosamine-N

مقدار فراوان تره هالوز (قند قارچ) وجود دارد که به محض رسیدن قارچ به گلوکز هیدرولیز می شود (Cheung. 2008; Wani *et al*., 2010).

۱-۸-۹ چربی قارچ

چربی ها به عنوان ذخیره کننده انرژی در ساختار قارچ وجود دارند. چربی ها در بافت های چربی حیوانات[1] یافت می شوند. یک مولکول چربی که به مصرف جانوران در می آید، ابتدا به صورت امولسیون در می آیند، سپس هضم و جذب بدن می شوند. همراه با مقدار کافی کربوهیدرات، چربی در بافت های چربی بدن ذخیره می شود. مصرف کربوهیدرات بیش از نیاز بدن، منجر به تبدیل آن به چربی و ذخیره در بافت های چرب بدن می شود. چربی ترکیبی از اسیدهای چرب و نوعی الکل به نام گلیسرول است، مثل کربوهیدرات ها حاوی کربن، هیدروژن و اکسیژن کمتر است. انواع قارچ ها حاوی مقدار کمی چربی هستند بنابراین اشخاص بدون نگرانی از اضافه وزن می توانند از آن مصرف کنند (Cheund, 2008; Wani *et al*., 2010).

۱-۸-۱۰ پروفایل اسیدهای چرب قارچ ها

با توجه به این که اسیدهای چرب در منابع گیاهی در مقادیر کم وجود دارد، محققین نسبت به یافتن منابع جدید آن ها مطالعات گسترده‌ای انجام داده اند، یکی از این منابع، میکروارگانیسم های روغنی یا در بردارنده روغن می باشند. به میکروارگانیسم هایی که بیش از ۲۰٪ بیومس خشک آن ها را روغن تشکیل دهد میکروارگانیسم روغنی می گویند. بیوشیمی فرآیند تولید لیپید به صورت گسترده ای مطالعه شده است. انواع گوناگونی از میکروارگانیسم ها شامل باکتری ها، قارچ ها و مخمرها که قادر به تجمع چربی در ساختارشان هستند در منابع کربنی متفاوت رشد می کنند و مقادیر خاصی از لیپید را در خود ذخیره سازی می کنند (Ratledge, 1992). لیپیدهای میکروبی تولید شده توسط

[1] Adipose

میکروارگانیسم ها کاربردهای متفاوتی دارند. لیپیدهای مخمری در تولید بیو دیزل بسیار کارا هستند و لیپیدهای باکتری ها و قارچ ها از نظر اسیدهای چرب غیر اشباعی که تولید می کنند بیشتر مورد توجه قرار گرفته اند.

اولین تلاش جدی در زمینه استفاده از میکروارگانیسم ها برای تولیدات صنعتی روغن در جنگ جهانی اول، زمانی که کشورهای دشمن عرضه روغن را قطع کردند آغاز گردید اما پس از پایان جنگ به دلیل قیمت پایین منابع قدیمی تحقیق و تولید روغن صنعتی متوقف گردید (Woodbine, 1959).

بیشتر قارچ ها از جمله زیگو مایست ها شامل *مورتیرلا*[1]، *موکور*[2] و *ریزوپوس*[3] قادر به تجمع لیپید هستند (Papanikolaou, 2007). این سویه ها وقتی در منابع کربنی مختلف کشت داده می شوند قادر به ذخیره لیپید با ارزش در ساختار خود می باشند و استفاده تجاری آن ها مقرون به صرفه است.

روغن هایی که با کشت قارچ ها تولید می شوند، اساساً دارای مقادیر زیادی اسید پالمیتیک، اسید اولئیک، اسید لینولئیک و اسید لینولنیک می باشند (Gwendoline *et al*., 2012).

مونا[4] و همکاران (۲۰۰۸) سویه ای از باکتری گوردونیا[5] را شناسایی نمودند که دارای ۸۰٪ بازده تولید لیپید بود در حالیکه تولید ۱/۸۸ گرم وزن خشک می‌کرد. در بین ۶۰۰ سویه مخمری تنها ۳۰ مورد قادر به ذخیره بیش از ۲۰٪ لیپید در بیومس خود می باشند.

[1] Mortrilla
[2] Mucor
[3] Rhizopous
[4] Mona
[5] Gordonia

۱-۸-۱۱ ویتامین های قارچ

قارچ سرشار از پتاسیم، آهن و ویتامین های خاص است. در واقع قارچ حاوی مقدار زیادتری ویتامین B_{12} و نیاسین در مقایسه با سایر سبزیجات می باشد. مقدار سدیم قارچ کم است لذا غذای مناسبی برای بیماران قلبی است. قارچ ها برای اشخاص گیاه خوار به عنوان طعم دهنده غذا مطلوب و قابل فریز شدن و نگهداری برای مدت طولانی هستند و کیفیت خود را نیز از دست نمی دهند. مقدار قابل ملاحظه‌ای از ویتامین B_{12} هنگام جوشاندن آب میوه از بین می رود. ولی ویتامین B_{12} قارچ در سوپ باقی می ماند. حدود صد نوع قارچ خوراکی در طبیعت وجود دارد که منبع تغذیه ای ارزشمند هستند و در تمام فصول سال در دسترس قرار دارند. ویتامین ها تنظیم کننده های حیاتی بدن می باشند و در مقادیر کم برای رشد و سلامت ضروری هستند. اغلب ویتامین ها توسط بدن ساخته می شوند و بعضی از آن ها باید از طریق تغذیه تأمین گردند مقدار اندکی از نیازهای ویتامینی توسط بدن تامین می شود (Cheung, 2008; Wani *et al*., 2010).

۱-۸-۱۲ مواد معدنی موجود در قارچ

قارچ غنی از مواد معدنی است که معمولاً به شکل انواع نمک ها در قارچ وجود دارند. این مواد عبارتند از کلسیم، فسفر، پتاسیم، سدیم، ید، آهن، مس، مولیبدن، گوگرد، کلر، منیزیم، منگنز و غیره. مواد معدنی در تنظیم متابولیسم بدن نقش دارند، مایعات درون بدن را تنظیم می کنند و نقش های مختلف دیگری در بدن دارند. همانند ویتامین ها، به مقدار کم مورد نیاز بدن هستند و نقش اساسی در حیات انسان دارند. این مواد که به طور روزانه از بدن از طریق کلیه، روده و پوست دفع می شوند، به همین خاطر لازم است روزانه وارد بدن شوند. این مواد ممکن است به صورت ترکیبات آلی و غیر آلی در بدن وجود داشته باشند. ترکیبات آلی عبارتند از فسفو پروتئین ها، فسفو لیپیدها، هموگلوبین، تیروکسین و

ترکیبات غیر آلی شامل کلرورسدیم، فسفات کلسیم و یون های خاص آزاد. این مواد معدنی مهم در انواع قارچ های خوراکی وجود دارند. مواد معدنی موجود در قارچ به سه گروه مهم زیر تقسیم می شوند:

۱- مواد معدنی ماژور یا مواد معدنی ماکرو[1]: ماکرو مینرال ها عبارتند از کلسیم، فسفر، سدیم و کلر. این مواد به میزان زیاد (حداقل ۱۰۰ میلی‌گرم) در روز مورد نیاز بدن هستند.

۲- مواد معدنی مینور[2]: این مواد به میزان کم (در حدود چند میلی‌گرم) مورد نیاز بدن هستند و عبارتند از آهن، گوگرد و منیزیم که در عین کم بودن از نظر مقدار، نقش مهمی در بدن انسان دارند.

۳- مواد با مصرف ناچیز[3] : این مواد به مقدار کم مورد نیاز بدن هستند و عبارتند از ید، مولیبدن و روی (Cheung, 2008; Wani *et al*., 2010).

۱-۹ ارزش دارویی قارچ

قارچ دارای ارزش دارویی است که بعضی گونه های آن برای درمان بیماری ها مورد استفاده قرار می گیرند. سالیان پیش، مردم به ارزش دارویی قارچ بیشتر از ارزش غذایی آن اهمیت می دادند. ارزش دارویی قارچ به شرح زیر خلاصه می‌شود.

۱-۹-۱ ارزش خون سازی

لکتین‌ها[4]، پروتئین های گیاهی هستند که در انواع قارچ وجود دارند این نوع پروتئین مصارف مختلفی دارند. لکتین بدست آمده از قارچ *آگاریکوس کارتاسیوس*[5] یک تترامر با جرم مولکولی ۶۴۰۰۰ است. لکتین بدست آمده از قارچ *فلامولینا ولوتیپ*[6] دارای جرم مولکولی ۲۰۰۰۰ است (Guo *et al*., 2003).

[1] Macro elements
[2] Micro elements
[3] Trace elements
[4] Lectin
[5] Agaricus chartaceus
[6] Flammulina velutipes

۱-۹-۲ ارزش ضد ویروسی

گزارش هایی حاکی از وجود ماده ضد ویروس در قارچ خوراکی وجود دارند. با بررسی قارچ *لنتینوس ادود*[1] و هاگ های آن، آثار ضد ویروسی آن در مقابل ویروس آنفولانزا در موش مشخص شده است. بخش فنولی عصاره قارچ قادر به انجام فعالیت های ضد ویروسی است. بررسی ها نشان داده است که ذراتی شبیه ویروس از بین رفته در ورقه قارچ ها دیده شده است (Cheung, 2008).

۱-۱۰ توالی ژنوم در قارچ ها

تکنیک جداسازی ژن جهت بررسی ویژگی های آن و ساخت سازه های اختصاصی برای اهداف مختلف سال هاست توسط محققان صورت می پذیرد. جداسازی ژن های PARSI و PARSII و همسان سازی آن ها و متعاقبا مطالعه نرم افزاری خصوصیات فیزیکو شیمیایی، ساختار مولکولی و قرابت ژنتیکی نشان داد که دو آنزیم PARSI و PARSII به خانواده نوکلئازی S1/P1 تعلق داشته و شباهت زیادی به نوکلئازهای اختصاصی DNA هترودوپلکس دارند (Mirzaie *et al*., 2015). توالی ژن mnp-1 در گونه *P.chrysosporum* حدود ۲۵۳۹ جفت باز بوده و مقایسه cDNA و توالی های ژنومی نشان می دهد که در موقعیت ۵۷ تا ۷۲ اینترون متفاوت دارند. تجزیه و تحلیل نوردن بلات نشان داده که ژن mnp-1 توسط HSPs (عناصر شوک حرارتی[2]) تنظیم می شود. همچنین ژنوم قارچ مدل *Schizophyllum commune* نیز که به احتمال زیاد منبع خوبی از آنزیم های تجزیه کننده ترکیبات لیگنو سلولزی است، توالی یابی شده است (Robin *et al*., 2010). در مطالعه دیگری، بیان سه ژن منگنز پراکسیداز، لیگنین پراکسیداز و گلی اکسال اکسیداز با استفاده از تکنیک RT-PCR در قارچ *P. chrysosporium* بررسی شده و نتایج حاکی از بیان متفاوت این ژن ها است. الگو های رونویسی به طور چشمگیری با همدیگر

[1] Lentinus edodes
[2] Heat Shock Proteins

متفاوت هستند که این امر احتمالا ناشی از فعالیت متفاوت آنزیم ها در خاک مناطق مختلف است (Janse *et al*., 1998).

۱-۱۱ قارچ مورچلا (*Morchella*)

جنس قارچی *مورچلا* که در مناطق جنگلی شمال کشور در اوایل بهار یافت می شود مصرف محلی داشته و از گونه های قارچی خوراکی شناخته شده به شمار می رود و در مناطق شمال کشور بسیار مورد توجه است. گونه های این جنس معروف به کلاه دار اسفنجی (مورل) می باشند و از خانواده Morchellaceae، راسته Pezizales، رده Pezizomycete، زیرشاخه Pezizomycotina و شاخه Ascomycota می باشند (Krombholz *et al*., 2011).کلاهک این قارچ شباهت قابل توجهی به کندوی زنبور دارد. به علت طعم و مزه قابل توجه، این گونه قارچی دارای قیمت بسیار بالایی است و زیستگاه این گونه قارچ در مناطق شمالی آمریکا، ترکیه، چین، هند و پاکستان است که تجارت مهمی از این گونه قارچ در این مناطق صورت می گیرد (Xi-Hui *et al*., 2012). کشت صنعتی این گونه قارچ با مشکلات زیادی همراه است، از این رو تولید صنعتی آن همواره مورد توجه دانشمندان بوده است. مطالعه فیلوژنتیکی و ژنتیکی نشان داده است که قارچ *مورچلا* در سه گروه مورل های زرد (*Morchella anatolica and rufobrunnea*)، مورل های سفید (*Morchella elata* و گونه های دیگر) و مورل های سیاه (*Morchella esculenta* و گونه های دیگر) تقسیم بندی می شوند (Yoon *et al*., 1990). بسیاری از این گونه های قارچی همزیست با درختان هستند. در شمال غربی آمریکا این گونه قارچی در جوار درختان مخروطیان رشد کرده و عموماً در نیمکره شمالی این گونه قارچ در جوار درختان برگ ریز رشد مناسبی دارد (Xi-Hui *et al*., 2012; Wurtz *et al*., 2005).

این گونه قارچ به علت رشد بهاره به ندرت در مجاور قارچ های سمی رشد می کند. این گونه قارچ تمایل گرما دوستی (حرارت دوستی) داشته و در مناطقی که جنگل های آن تحت تأثیر آتش سوخته اند، رشد

زیادی می کنند که می تواند به علت تجزیه شدن و خروج ترکیبات آلی از درختان جنگلی باشد (O'Donnell *et al*., 2011).

مورچلا دارای مقادیر اندکی سم هیدرازین است که در حین حرارت دهی از بین می رود، از این رو تازه خوری این قارچ سفارش نشده است (Mihail *et al*., 2007; Xi-Hui *et al*., 2012). تخمیر در بستر مایع این گونه قارچی نشان داده که این گونه قارچی منبع غنی از پروتئین بوده و جزء گونه های قارچی پروتئینی به شمار می رود. میزان پروتئین با توجه به شرایط کشت بین ۲۱ تا ۵۰٪ وزن خشک قارچ متغیر است. میزان روغن ذخیره ای این گونه قارچی بین ۲ تا ۷٪ گزارش شده است (Thakur *et al*., 2011).

۱-۱۱-۱ ترکیبات فعال قارچ *مورچلا*

مورچلا دارای طیف گسترده ای از اجزای فعال است که شامل توکوفرول، کاروتنوئید، اسیدهای آلی و ترکیبات فنلی می باشد. توکوفرول ها شامل انواع آلفا، گاما و سیگما توکوفرول هستند. کاروتنوئیدها حاوی بتا کاروتن و لیکوپن هستند. اسیدهای آلی شامل اسید اگزالیک، اسید مالیک، اسید سیتریک و اسید فوماریک هستند. اسید پروتوکاتچوئیک[1]، بتا اسید p- هیدروکسی بنزوئیک و اسید p- کوماریک ترکیبات فنولی هستند (Ajmal *et al*., 2015).

۱-۱۱-۲ چشم انداز دارویی قارچ *مورچلا*

از سال ۲۰۰۰ گونه *مورچلا* در طب سنتی چین و همچنین در ژاپن و مالزی برای درمان بیماری های مختلف مورد استفاده قرار گرفته است. *مورچلا* معمولا برای سوء هاضمه، خلط مفرط و درمان آسم استفاده می شود. برای درمان معده درد و همچنین به عنوان مسهل و نرم کننده نیز کاربرد دارد (Ajmal *et al*., 2015).

[1] Protocatechuic acid

۱-۱۱-۳ خواص ضد میکروبی

میسلیوم *مورچلا اسکولنتا*[1] دارای خواص ضد میکروبی است. مطالعات پیشین نشان داده است که عصاره متانولی، کلروفرم و اتانولی *مورچلا اسکولنتا* دارای خواص ضد باکتریایی است. این قارچ فعالیت ضد باکتریایی در برابر *استافیلوکوکوس اورئوس، سالمونلا تیفی موریوم، لیستریا مونوسیتوجنس، اشریشیا کلای* و *انترو باکتر* را نشان داده است (Ajmal *et al*., 2015).

۱-۱۱-۴ خواص ضد التهابی

التهاب به دلایل متعددی از جمله نیش حشرات، دارو های سمی یا به علت بیماری مزمن رخ می دهد. *مورچلا اسکولنتا* دارای ترکیبات متعددی است که نشان دهنده فعالیت ضد التهابی قوی آن است. عصاره متانولی کل اندام های این قارچ همانند یک ضد التهاب قوی عمل می کند و درد را کاهش می دهد. نیتها[2] و همکاران (۲۰۰۸) فعالیت ضد التهابی قوی عصاره اتانولی از میسلیوم کشت شده این قارچ را گزارش کردند. این قارچ هر دو التهاب حاد و مزمن را مهار می کند.

۱-۱۱-۵ ظرفیت آنتی اکسیدانی

اکسیداسیون برای موجودات زنده لازم است اما رادیکال های آزاد با اکسیژن برانگیخته شده باعث آسیب اکسیداتیو می شود که می تواند منجر به مرگ سلولی، آسیب بافتی، همچنین باعث بیماری های متعددی از جمله تصلب شریان (آترواسکلروز)، دیابت و سرطان می شود. همه موجودات دارای سیستم دفاعی هستند که برای محافظت در برابر آسیب های اکسیداتیو کافی نیست. آسیب اکسیداتیو می تواند با استفاده از مواد غذایی حاوی مواد آنتی اکسیدانی کاهش یابد. غذای دارای آنتی اکسیدان می تواند بدن را از این آسیب محافظت کند. مطالعات قبلی فعالیت آنتی اکسیدانی قارچ به ویژه *مورچلا اسکولنتا*

[1] *Morchella esculenta*
[2] Nitha

را گزارش کرده اند. *مورچلا* دارای طیف گسترده ای از ترکیبات فعال است که نشان دهنده فعالیت آنتی اکسیدانی قوی است. میسلیوم *مورچلا اسکولنتا* حاوی بتا کاروتن و اسید لینولئیک است که فعالیت آنتی اکسیدانی از خود نشان می دهند. پلی ساکاریدها و استروئیدها دارای خواص آنتی اکسیدانی هستند. اسیدهای چرب و ترکیبات فنولیک در *مورچلا* به طور گسترده ای حضور دارند که مسئول فعالیت آنتی اکسیدانی قوی و توانایی آزاد شدن رادیکال آزاد را دارند. نیتها و همکاران (۲۰۰۸) ظرفیت مهار رادیکال عصاره اتانولی *مورچلا* را گزارش کردند.

۱-۱۱-۶ خواص ایمنی

گالاکتومانان و پلی ساکاریدهای استخراج شده از قارچ *مورچلا اسکولنتا* دارای وزن مولکولی بالا و خواص ایمنی قوی هستند (Christine *et al*., 2002).

۱-۱۱-۷ خواص ضد تومور

سرطان عامل اصلی مرگ انسان است. شیمی درمانی و پرتو درمانی روش های مدرن درمان سرطان هستند اما به علت اثرات نا مطلوب بر سلول های طبیعی میزبان ایمنی کمتری دارند. در طب سنتی چینی، قارچ هایی با خواص دارویی معمولا برای درمان سرطان استفاده می شود. کشورهای مختلف مانند ژاپن، کره، روسیه و ایالات متحده از عصاره قارچ های دارویی برای درمان سرطان استفاده می کنند. ترکیبات مختلف استخراج شده از اندام های قارچ دارای خواص ضد سرطان و ضد تومور هستند (Ajmal *et al*., 2015).

فصل دوم

بررسی منابع

۲ بررسی منابع

۲-۱ ساختار شیمیایی، مواد مغذی قارچ ها

تیتل و ماسافی[1] (۲۰۱۷) با مروری بر ساختار شیمیایی و مواد مغذی، اثرات مفید و طعم قارچ *مورچلا* را گزارش کردند، *مورچلا* یک قارچ خوراکی است که به واسطه طعم خوشمزه آن شناخته می شود. *مورچلا* در طب سنتی به دلیل مزیت هایش برای قرن ها مورد استفاده قرار گرفته است. مطالعات پیشین حاکی از اثر آنتی اکسیدانی، ضد التهابی و ضد تومور این قارچ می باشد. با وجود افزایش تقاضا برای *مورچلا* و افزایش اهمیت اقتصادی آن کشت آن محدود شده است و به صورت وحشی برداشت می شود. همچنین به عنوان یک غذای عملگرا و به منظور طعم دهنده غذا مورد استفاده قرار می گیرد. مزیت های سلامتی بخش این قارچ به پلی ساکارید های آن مربوط می شود که به عنوان ترکیب فعال و ترکیبات فیتوشیمیایی مختلف، عمدتاً ترکیبات فنلی، توکوفرول، اسید آسکوربیک و ویتامین D مربوط می شود. ترکیبات *مورچلا* شامل قند، اسید آمینه، اسید چرب و اسید آلی و پروفایل مواد معدنی می باشد (Tietel and Masaphy, 2017).

راویکریشنان[2] و همکاران (۲۰۱۷) ساختار شیمیایی و ترکیبات مغذی دو قارچ وحشی هند *Amanita hemibapha* و *Trogia cantharelloides* را مورد بررسی قرار دادند. ترکیبات مغذی شامل اسیدهای آمینه، اسید چرب و مواد معدنی بررسی شد. پروفایل ترکیبات مغذی نشان داد این قارچ ها غنی از کربوهیدرات و پروتئین بودند و مقدار کمی چربی داشتند. بر اساس آنالیز تجزیه و تحلیل می توان محاسبه کرد که بخش خوراکی ۱۰۰ گرم از این قارچ ها به طور متوسط ۴۲۰/۰۸۳ کیلوکالری را فراهم می کند. در میان کل اسید های آمینه لیزین، لوسین، ترئونین و ایزولوسین به عنوان اسید آمینه اصلی در هر دو نمونه شناخته شدند (Ravikrishnan *et al*., 2017).

[1] Tietel and Masaphy
[2] Ravikrishnan

تولدو[1] و همکاران (۲۰۱۶) ساختار شیمیایی قارچ های خوراکی وحشی آرژانتین را مورد بررسی قرار دادند. ترکیبات درشت مغذی، قند، اسیدهای چرب، توکوفرول، اسیدهای آلی، ترکیبات فنلی تعیین شد. میزان پروتئین در سطح بالا و بین ۳/۳۵ گرم در ۱۰۰ گرم در *Cyttaria hariotii* و ۲۲/۲۹ گرم در ۱۰۰ گرم در *Lepista nuda* متفاوت بود. در همه نمونه ها مانیتول و تره هالوز قند اصلی بود. عمده ترین اسیدهای چرب اسید لینولئیک و به دنبال آن اسید اولئیک و اسید پالمیتیک بود (Toledo *et al.*, 2016).

لیو[2] و همکاران (۲۰۱۶) خصوصیات و فعالیت ضد تومور پلی ساکاریدهای استخراج شده از *Morchella esculenta* را توسط میدان پالس الکتریکی مورد بررسی قرار دادند. اندوپلی ساکارید جداسازی و توسط ستون کروماتوگرافی و کروماتوگرافی نفوذ ژل و آنالیز توسط کروماتوگرافی گازی خالص سازی شد. پلی ساکارید حاصل از *Morchella esculenta* با وزن مولکولی ۸۱/۸۳۵ حاوی گزیلوز، گلوکز، مانوز، رامنوز و گالاکتوز با نسبت ۵/۴، ۵، ۶/۵، ۳/۸، ۷۲/۷ بود. ساختار پلی ساکارید حاصل از *Morchella esculenta* برای آنالیز بیشتر با استفاده از طیف سنج مادون قرمز و اسپکتروسکوپی مغناطیسی هسته ای مایع C13مورد بررسی قرار گرفت. مطالعات نشان داد پلی ساکارید حاصل از *Morchella esculenta* می تواند رشد سلول HT-29 سرطان کولون انسانی را در مدت زمان ۴۸ ساعت با توجه به دوز مهار کند (Liu *et al.*, 2016).

ویرا[3] و همکاران (۲۰۱۶) ترکیبات مغذی و بیواکتیو دو قارچ *مورچلا* از دو منبع (صربستان و پرتغال) را مورد بررسی قرار دادند. قندهای آزاد، اسیدهای چرب، توکوفرول، اسیدهای آلی و فنولیک توسط تکنیک کروماتوگرافی گازی شناسایی شد. عصاره متانولی *مورچلا* برای فعالیت آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد ترکیبات مغذی بین دو نمونه متفاوت بود

[1] Toledo
[2] Liu
[3] Vieira

و نمونه صربستانی بیشترین میزان از پروتئین و کربوهیدرات را نشان داد. نمونه پرتغالی بیشترین میزان از خاکستر را نشان داد. فروکتوز در هر دو نمونه با غلظت یکسان دیده شد. مانیتول و تره هالوز نیز در هر دو نمونه شناسایی شدند. نمونه صربستانی بیشترین سهم انرژی، قند، اسیدهای چرب چند غیر اشباع را داشت در حالیکه نمونه پرتغالی غنی از اسیدهای چرب اشباع و تک غیر اشباع، توکوفرول و اسیدهای آلی بود. نمونه پرتغالی بیشترین فعالیت آنتی اکسیدانی را نشان داد در حالیکه نمونه صربستانی بیشترین اثر ضد میکروبی را نشان داد. هیچکدام از نمونه ها اثر سمی نسبت به سلول های کبدی نشان ندادند (Vieira *et al*., 2016).

اجمل[1] و همکاران (۲۰۱۵) قارچ *مورچلا* را به عنوان یک قارچ خوراکی و مفید مورد بررسی قرار دادند. نتایج حاصل نشان داد *مورچلا* به عنوان یک قارچ گران، مغذی و مهم در داروسازی است. این قارچ به دلیل جنبه های تغذیه ای در اروپا، مدیترانه و آمریکا شناخته شده است. *مورچلا* حاوی کربوهیدرات، پروتئین، فیبر، ویتامین ها، مواد معدنی و ترکیبات آروماتیک است. *مورچلا* دارای طیف گسترده ای از خواص دارویی از جمله آنتی اکسیدان، ضد تومور، ضد میکروبی و ضد التهاب می باشد. همچنین به عنوان ایمنی کننده به دلیل حضور مواد مختلف فعال می باشد. با توجه به قیمت بالای آن نقش مهمی در اقتصاد دارد قارچ *مورچلا* دارای ترکیبات فعالی از قبیل توکوفرول، کاروتنوئید، اسیدهای آلی و فنولی است. توکوفرول ها شامل آلفا و دلتا توکوفرول و کاروتنوئیدها شامل بتا کاروتن و لیکوپن و اسیدهای آلی شامل اسید اگزالیک، اسید مالیک، اسید سیتریک، اسید فوماریک و اسید کوئینیک است. اسید پروتوکاتچوئیک، اسید p- هیدروکسی بنزوئیک و p- کوماریک ترکیبات فنلی هستند (Ajmal *et al*., 2015).

تاسکین[2] (۲۰۱۳) ترکیبات طعم دهنده فرار دو نمونه *مورچلا* (*Morchella elata* و *Morchella esculenta*) را توسط کروماتوگرافی گازی مورد بررسی قرار دادند. نتایج حاصل نشان داد ۳۱ ترکیبات

[1] Ajmal
[2] Taskin

طعم دهنده در دو نمونه *مورچلا* ارزیابی شدند: ۷ الکل، ۷ استر، ۷ کتون، ۳ اسید، ۲ آلدئید، ۱ ترپن، فنل، ۱-پروپانامید، ژرانیل لینالول[1] و کینولین[2] بودند. ۱۷ ترکیبات معطر در *Morchella esculenta* و ۱۸ ترکیب در *Morchella elata* شناسایی شدند. فنل به عنوان ترکیب اصلی معطر در هر دو نمونه به میزان ۵۰/۸۸۸٪ (*Morchella esculenta*) و ۵۸/۲۹۳٪ (*Morchella elata*) شناخته شد. الکل ها خصوصاً ۱-اکتن-۳-ال به عنوان دومین ترکیب اصلی معطر در نمونه ها به میزان ۱۵/۵۰۰٪ (*Morchella esculenta*) و ۵/۶۶۰٪ (*Morchella elata*) شناسایی شد. اسید کاربامیک[3]، متیل استر تنها در نمونه *Morchella esculenta* به میزان ۱۱/۳۷۹٪ شناسایی شد. ترکیبات معطر در دو نمونه متفاوت بود (Taskin, 2013).

استوجکوویک[4] و همکاران (۲۰۱۳) عصاره های متانولی بدست آمده از *Morchella esculenta* در مناطق پرتغال و صربستانی را برای بررسی اثر ضد سرطانی و ضد انعقادی و مقایسه با اسید پروتوکاتچوئیک که قبلاً در هر دو گونه شناسایی شده بود را مورد بررسی قرار دادند. روش باز تولید *سالمونلا تیفی موریوم* TA100 برای خصوصیات ضد سرطانی انتخاب شد. عصاره متانولی توانایی ضد سرطانی در برابر *سالمونلا تیفی موریوم* نشان دادند که توسط شاخص ضد سرطانی تعیین شد. یک نمونه از صربستان دارای خواص ضد سرطانی کمی بیشتر با میزان مهار ۵۸/۷٪ نشان داد. یک نمونه از پرتغال میزان مهار ۵۱/۷٪ داشت. اسید پروتوکاتچوئیک میزان مهار ۷۲/۴٪ داشت. قابلیت زنده ماندن در حضور عصاره همچنین تعیین شد. نمونه ها از صربستان و پرتغال دارای پتانسیل جدید بیولوژیکی برای گونه های مورد مطالعه همانند ترکیبات فنلی- اسید پروتوکاتچوئیک شناسایی شده در هر دو نمونه بودند. اثر ژنوتوکسیک با توجه به شاخص میتوز و امتیاز انحراف کروموزومی، با استفاده از آزمون Allium

[1] Geranyl linalool
[2] Quinoline
[3] Carbamic acid
[4] Stojkovic

.cepa L مورد ارزیابی قرار گرفت. اسید پروتوکاتچوئیک بیشترین کاهش شاخص متیوتیک و همچنین کاهش میزان انحراف کروموزومی را نشان داد (Stojkovic *et al*., 2013).

یانگ[1] و همکاران (۲۰۱۳) جداسازی، خالص سازی و خصوصیات پلی ساکارید حاصل از *مورچلا* وحشی را مورد بررسی قرار دادند. یک پلی ساکارید جدید (MEP-1) از بدنه خوراکی *مورچلا* وحشی با روش استخراج آب گرم و خارج کردن پروتئین جداسازی شد. خصوصیات فیزیکوشیمیایی پلی ساکاریدها توسط روش شیمیایی، کروماتوگرافی نفوذ ژل با کارایی بالا، کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا، کروماتوگرافی کاغذی، طیف فرابنفش و طیف سنج مادون قرمز بررسی شد. پلی ساکاریدها عمدتاً از گلوکز، مانوز، گالاکتوز و آرابینوز بودند. متوسط وزن مولکولی ۴۳۶۲۵ دالتون بود (Yang *et al*., 2013).

هالنو[2] و همکاران (۲۰۱۳) ساختار شیمیایی و فعالیت آنتی اکسیدانی *Morchella esculenta* را مورد بررسی قرار دادند. نتایج حاصل نشان داد عصاره های متانولی، کلروفرم و اتانولی *Morchella esculenta* دارای فعالیت ضد باکتریایی در مقابل *استافیلوکوکوس اورئوس، سالمونلا تیفی موریوم، لیستریا مونوسیتوژنز، اشرشیاکلی و انتروباکتر* می باشد (Haleno *et al*., 2013).

راجاراتنام و تیاجاراجام[3] (۲۰۱۲) شناسایی مولکولی قارچ های وحشی را مورد بررسی قرار دادند. شناسایی قارچ های وحشی به صورت عینی و یا متابولیکی دشوار است. نشانگرهای مولکولی خصوصاً نشانگرهای DNA، نشانگرهای سریع و قابل اعتماد برای شناسایی قارچ های وحشی است و به طبقه بندی قارچ کمک می کند. DNA ژنومی قارچ استخراج شد، بخش rDNA-ITS ژنوم DNA با استفاده از پرایمرهای ITS1 و ITS4 تکثیر و مورد بررسی توالی نوکلئوتیدی قرار گرفت. توالی، ۸۸٪ تطابق با *Perenniporia* را نشان داد. بنابراین این قارچ های وحشی متعلق به آگاریکومیست ها هستند که در تنوع زیستی هند، جدید هستند (Rajaratnam and Thiagarajan, 2012).

[1] Yang
[2] Haleno
[3] Rajaratnam and Thiagarajan

دو[1] و همکاران (۲۰۱۲) فیلوژنتیک مولکولی مورل های واقعی در چین را مورد بررسی قرار دادند. تنوع فیلوژنتیک مورل واقعی در چین توسط آنالیز اولیه از توالی rDNA (ITS) ریبوزوم داخلی هسته از ۳۶۱ نمونه جمع آوری شده در ۲۱ استان در طی ۲۰۰۳-۲۰۱۱ انجام شد. بر اساس نتایج بدست آمده، ۴۰ *Esculenta Clade* (مورل زرد) و ۳۰ *Elata Clade* (مورل سیاه) برای نشان دادن طیف گسترده ای از تنوع فیلوژنتیک انتخاب شدند. برای بررسی محدودیت های گونه ها، توالی DNA از بخش های سه ژن پروتئین زدایی شده (RPB1، RPB2 و EF-1a) و دامنه D1 و D2 زیر مجموعه بزرگ هسته (LSU) rDNA برای ۷۰ نمونه تولید کردند. آنالیز فیلوژنتیکی با حداکثر احتمال از ۳۰ گونه در چین با ۲۲ گونه در آمریکا و ۱۹ گونه در شمال آمریکا مقایسه شد. ۱۱ گونه متمایز فیلوژنتیکی در چین شامل دو گونه با *Elata Clade* و *Esculenta Clade* کشف شد (Du *et al*., 2012).

کاوال[2] و همکاران (۲۰۱۱) خصوصیات مولکولی گونه های *مورچلا* را مورد بررسی قرار دادند. در این مطالعه تنوع مولکولی ۳۲ گونه مختلف *مورچلا* از منطقه هیمالیا غربی مورد بررسی قرار گرفت. در مورد بسیاری از گونه های *مورچلا* اختلاف قابل توجهی در طبقه بندی وجود دارد. اگرچه طبقه بندی در شناسایی بسیاری از آسکومیست ها مفید است، مورل ها تنوع مورفولوژی قابل توجهی نشان دادند و در شناسایی گونه های مورل اختلاف نظر وجود دارد. آنالیز فیلوژنتیک بر توالی DNA می تواند در طبقه بندی مورل که برای تعریف بهتر تنوع مورل ضروری است مفید باشد. در این مطالعه آنالیز توالی نشان داد که در منطقه همالیا غربی هند، هم مورل زرد (*Morchella crassipes* و *Morchella spongiola*) و هم مورل سیاه (*Morchella elata* و *Morchella angusticeps*) با دو گونه Verpa غالب بودند. آنالیز فیلوژنتیک با حداکثر احتمال و یک تشخیص واضح بین مورل زرد و سیاه را نشان داد (Kanwal *et al*., 2011).

[1] Du
[2] Kanwal

دمبیتسکی[1] و همکاران (۲۰۱۰) اسید های آمینه و اسید چرب قارچ های وحشی جنس *Boletus* را مورد بررسی قرار دادند. ترکیبات شیمیایی توسط کروماتوگرافی گازی-طیف سنجی جرمی تعیین شد. نتایج نشان داد که اسید آمینه اصلی در بخش خوراکی، آرژنین، آلانین، گلوتامین و اسید گلوتامیک بود. فراوان ترین اسید چرب اسید اولئیک، اسید لینولئیک و اسید پالمیتیک بود (Dembitsky *et al.*, 2010).

نیتها[2] و همکاران (۲۰۱۰) فعالیت مهارکنندگی رادیکال قارچ *مورچلا* به عنوان منبع قوی از آنتی اکسیدان های مفید مورد بررسی قرار دادند. عصاره آبی-اتانولی میسلا کشت داده شده قارچ *مورچلا* برای توانایی آن به عنوان مهار سوپر اکسید، هیدروکسیل، نیتریک اکسید، ۲، ۲-دی فنیل-۱-پیکریل هیدرازیل و ۲، ۲-آزینو-بیس (۳-اتیل بنز تیازولین-۶-سولفونیک اسید) برای مهار پراکسیداسیون لیپید ارزیابی شد. عصاره به طور موثری همه این رادیکال ها را مهار کرد و همچنین پراکسیداسیون لیپید را نیز مهار کرد. آزمون قدرت احیا کنندگی آهن، ظرفیت اهدا هیدروژن عصاره را نشان داد. مطالعات رادیولیز پالس با استفاده از ۲، ۲-آزینو-بیس (۳-اتیل بنز تیازولین-۶- اسید سولفونیک) نشان داد که عصاره به طور معنی داری این رادیکال ها را در یک رابطه وابسته به غلظت، کاهش داد. در نتیجه بررسی ها نشان داد که میسلیوم قارچ *مورچلا* یک منبع عالی از آنتی اکسیدان ها است که قادر به حفاظت در سطوح مختلف است. یافته های این تحقیق نشان داد که میسلا قارچ *مورچلا* به عنوان یک آنتی اکسیدان کارآمد است (Nitha *et al.*, 2010).

وانی[3] و همکاران (۲۰۱۰) با مروری بر ترکیبات مغذی قارچ ها گزارش نمودند پروتئین جزء مهمی از ماده خشک است. هضم پروتئین قارچی ۷۲ تا ۸۳٪ است. میزان پروتئین قارچ به ساختار زیر لایه، گونه

[1] Dembitsky
[2] Nitha
[3] Wani

قارچ و زمان برداشت بستگی دارد. میزان پروتئین در *Morchella esculenta* و *Morchella deliciosa* به ترتیب ۳۴/۷٪ و ۲۹/۱۶٪ تعیین شد (Wani *et al*., 2010).

جنسلیپ[1] و همکاران (۲۰۰۹) میزان ترکیبات معدنی قارچ های وحشی خوراکی را مورد بررسی قرار دادند. فسفر، آهن، کلسیم، روی، منیزیم، پتاسیم، سدیم و منگنز ۳۰ قارچ وحشی خوراکی جمع آوری شده از استان ارزروم ترکیه را مورد ارزیابی قرار دادند. ترکیبات معدنی *مورچلا* شامل ۱/۹۲ میلی گرم بر گرم منیزیم، ۰/۸۷ میلی گرم بر گرم کلسیم، ۲۰/۴ میلی گرم بر گرم پتاسیم، ۰/۰۸ میلی گرم بر گرم سدیم، ۲/۹۲ میلی گرم بر گرم فسفر، ۲۰۳ میلی گرم برگرم آهن، ۱۳۳ میلی گرم بر گرم روی، ۷۳/۴ میلی گرم بر گرم مس و ۱۶/۹ میلی گرم بر گرم منگنز در *Morchella vulgaris* و ۱/۸۲ میلی گرم بر گرم منگنز، ۰/۸۵ میلی گرم بر گرم کلسیم، ۲۳/۵ میلی گرم بر گرم پتاسیم، ۰/۱۸ میلی گرم بر گرم سدیم، ۳/۴۹ میلی گرم بر گرم فسفر، ۱۹۵ میلی گرم بر گرم آهن، ۹۸/۹ میلی گرم بر گرم روی، ۶۲/۶ میلی گرم بر گرم مس، ۵۴/۷ میلی گرم بر گرم منگنز در *Morchella esculenta* تعیین کردند (Genccelep *et al*., 2009).

الفتی[2] و همکاران (۲۰۰۹) ساختار شیمیایی قارچ های خوراکی وحشی رایج از شمال ایران را مورد بررسی قرار دادند. قارچ های *اسفنجی*، قارچ *صدفی*، *Macrolepiota procera* و *Russul paludosa* قارچ های وحشی خوراکی در شمال ایران هستند. در مورد پتانسیل تجاری این قارچ ها در منطقه اطلاعات کم است. در این تحقیق ۳ جنس از مورل شامل *Morchella esculenta*، *Morchella delisiosa* و *Morchella crassipes* شناسایی شد. ترکیبات مغذی این قارچ های خوراکی *Cantharellus cibarius*، *Pleurotus osteriatus*، *M. procera*، *A. caesarea* و *R. paludosa* تعیین شد. بیشترین مواد معدنی، ماده خشک و خاکستر ۸/۵، ۳۱/۷، ۱/۴، ۱/۴، ۱/۸ میلی گرم بر کیلوگرم (بر اساس ماده خشک) ۱۴ و ۲٪ برای فسفر، پتاسیم، سدیم، کلسیم، منیزیم، ماده خشک و خاکستر در

[1] Gençcelep
[2] Olfati

کلاهک جوانه *M. procera*، کلاهک بالغ *Amanita caesarea*، ساقه بالغ *A. caesarea* و ساقه بالغ *M. procera* به ترتیب دیده شد (Olfati *et al*., 2009).

گورسوی[1] و همکاران (۲۰۰۹) فعالیت آنتی اکسیدانی، ترکیبات فلاونوئیدی و فنلی ۶ جنس از *مورچلا* را مورد بررسی قرار دادند. عصاره متانولی *Morchella conica* بیشترین فعالیت آنتی اکسیدانی را نشان داد. قدرت کاهش دهندگی عصاره متانولی با غلظت افزایش یافت. ظرفیت شلاته کنندگی عصاره ها با غلظت افزایش یافت. به عبارت دیگر درغلظت ۴۰ میلی گرم در لیتر عصاره متانولی *Morchella conica* بیشترین فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد (۷۸/۶۶٪) را نشان داد. مقدار ۷ عنصر (مس، منگنز، کبالت، روی، آهن، کلسیم و منیزیم) و ۵ فلز سنگین (نیکل، سرب، کادمیوم، کروم و آلومینیوم) نیز تعیین شد. بیشترین عنصر تشکیل دهنده در قارچ ها کلسیم و منیزیم بود. کبالت کمترین میزان عنصر تشکیل دهنده بود. در مورد فلزات سنگین بیشترین مربوط به آلومینیوم بود مقدار این فلزات بین ۶۲ و ۵۲۲ میلی گرم بر کیلوگرم بود. در مقایسه با آلومینیوم، مقدار نیکل خیلی کمتر بود و بین ۲/۰۶ و ۱۹/۴۸ میلی گرم بر کیلوگرم بود. کمترین فلز سنگین سرب بود که در محدوده ۰/۲۶ و ۱/۱۴ میلی گرم بر کیلوگرم تعیین شد. *Morchella conica* بیشترین ترکیبات فنلی را داشت. میزان فلاونوئید *Rotunda Morchella* نیز بیشتر بود (۰/۵۹ میکروگرم) (Gursoy *et al*., 2009).

کانوک[2] و همکاران (۲۰۰۶) ساختار شیمیایی قارچ های مختلف را مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد *Suillus luteus* بیشترین میزان رطوبت (۹۵/۰۵٪) و *Morchella deliciosa* (۷۷/۱۳٪) کمترین میزان رطوبت (۷۷/۱۳٪) را داشتند. بیشترین میزان پروتئین در *Morchella deliciosa* ۳۸/۱۱٪ و کمترین میزان در *Pluteus salicinus* ۱۰/۷۲٪ مشاهده شد (Konuk *et al*., 2006).

[1] Gursoy
[2] Konuk

نگی[1] (۲۰۰۶) گزارش کرد *مورچلا* یک غذای سالم و مغذی است که حاوی ۴۲٪ پروتئین در وزن خشک، کالری کم و غنی از مواد معدنی است (Negi, 2006).

راتزول[2] و همکاران (۲۰۰۵) ترکیبات طعمی اصلی را در قارچ *مورچلا* (*Morchella deliciose*) مورد بررسی قرار دادند. اجزای حسی عصاره آبی آماده شده از قارچ *مورچلا* منجر به شناسایی اسید گاما-آمینوبوتیریک به عنوان ماده شیمیایی خشکی دهان و حساسیت دهانی ایجاد شده توسط *مورچلا* شد. علاوه بر این اسید ال-گلوتامیک، اسید ال-آسپارتیک، اسید سوکسینیک، اسید اس-مالیک -۱-او-بتا-دی گلوکوپیرانوزید، به عنوان مهم ترین ترکیبات طعم شناسایی شدند. برای تکمیل اتصال بین ساختار شیمیایی خالص و ادراک طعم و مزه انسان ۳۳ عنصر ترکیب طعم دهنده در عصاره آبی *مورچلا* اندازه گیری شد و سپس برای سهم آن ها بر اساس فاکتورهای بیشترین حد آستانه مورد ارزیابی قرار گرفتند. برای تایید این نتایج کمی، یک محلول آبی توسط ترکیب محلول آبی از ۱۶ اسید های آمینه، ۶ اسیدهای آلی، ۳ پورین، ۴ کربوهیدرات، ۳ مواد معدنی و S-morelid در غلظت های طبیعی آن ها آماده سازی شد. آزمون های مثلثی نشان داد که پروفایل طعم این کوکتل به طور معنی داری متفاوت از پروفایل طعم *مورچلا* اصلی نبود. برای محدود کردن نهایی تعداد ترکیبات طعم دهنده آزمایشات حذف طعم برای نشان دادن اینکه S-morelid با اسید ال-گلوتامیک، اسید ال-آسپارتیک، اسید مالیک، اسید سیتریک، اسید استیک و اسید گاما-آمینوبوتیریک ترکیبات ارگانولپتیکی اصلی در عصاره *مورچلا* هستند انجام شد. اگرچه ارزیابی حسی با محلول مدل نشان داد که S-morelid نه تنها عامل طعم ترش نیست بلکه می تواند فعالیت طعمی مونو سدیم گلوتامات را همانند محلول های کلرید سدیم تقویت کند (Rotzoll *et al*., 2005).

[1] Negi
[2] Rotzoll

کریستین[1] و همکاران (۲۰۰۵) جداسازی گالاکتومانان که باعث تقویت فعال سازی ماکروفاژ می شود را از قارچ های خوراکی *Morchella esculenta* مورد بررسی قرار دادند. جداسازی از عصاره قطبی *Morchella esculenta* از گالاکتومانان با وزن مولکولی بالا در حدود ۱ میلیون دالتون که فعالیت ایمنی فعال را نشان می دهد انجام شد. در ۳ میکروگرم بر میلی لیتر پلی ساکارید گالاکتومانان به طور مستقیم بیان لوسیفراز NF-kappa B را در سلول های مونوسیتوز THP-1 تا سطح ۵۰٪ از آن هایی که توسط بیشترین غلظت فعال کنندگی لیپوپلی ساکارید بدست آمدند افزایش داد. این گالاکتومانان شامل ۲٪ وزن ماده خشک قارچ است و اجزای گلیکوزیل شامل مانوز (۶۲/۹٪) و گالاکتوز (۲۰٪) بود (Christine *et al*., 2005).

یلدیز[2] و همکاران (۲۰۰۴) عناصر ارگانیک و پروتئین در برخی قارچ های جنوب شرقی آناتولی ترکیه را مورد بررسی قرار دادند. پروتئین خام *Morchella conica* و *Morchella esculenta* به ترتیب ۲۲/۶٪ و ۲۶/۸٪ بود (Yildiz *et al*., 2004).

هاتاناکا[3] (۱۹۶۹) یک اسید آمینه جدید را از *Morchella esculenta* و جنس های مرتبط جداسازی کرد. از نتایج تجزیه و تحلیل اولیه، دآمینه شدن، طیف سنجی رزونانس مغناطیسی هسته ای، ساختار آن به صورت سیس-۳-آمینو-ال-پرولین نشان داده شد. این اسید آمینه به صورت آزاد در *Morchella esculenta*، *Morchella conica* و *Morchella crassipes* و همچنین در میسلا کشت شده حضور دارد (Hatanaka, 1969).

لیتچفیلد[4] و همکاران (۱۹۶۳) ترکیبات مغذی میسلیوم قارچ مورل را مورد بررسی قرار دادند. میسلا سه گونه از قارچ مورل *Morchella crassipes*، *Morchella esculenta* و *Morchella hortensis* برای تعیین اسیدهای آمینه استفاده شد. پودر تجاری قارچ مورل نیز حاوی ۲۲/۸-۵۱٪ پروتئین و ۲/۱۸-

[1] Christine
[2] Yıldız
[3] Hatanaka
[4] Litchfield

۷/۵۵٪ چربی، بسته به نوع گونه بودند. میزان اسید آمینه مشابه میزان گزارش شده در مورد سایر قارچ ها بود (Litchfield *et al*., 1963).

ملکوت طبری[1] و همکاران (۱۳۹۲) ویژگی های آنتی اکسیدانی و فیتوشیمیایی *ترامتس جیبورا*[2] را مورد بررسی قرار دادند. پس از تهیه عصاره متانولی ویژگی های آنتی اکسیدانی آن توسط دو روش آنتی اکسیدانی از قبیل فعالیت مهار رادیکال DPPH و همچنین ظرفیت احیاء کنندگی سنجش شد. BHT و BHA به عنوان آنتی اکسیدان های مصنوعی در مقایسه با عصاره متانولی قارچ در غلظت های مشابه فراهم شدند. ۸ غلظت از عصاره متانولی تهیه شد. همچنین میزان فنل و فلاونوئید در حلال متانولی مورد سنجش قرار گرفت. نتایج نشان داد فعالیت آنتی اکسیدانی وابسته به غلظت عصاره بود. بالاترین میزان مهار کنندگی رادیکال آزاد را در غلظت ۷۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر و پایین ترین فعالیت در غلظت ۱۲/۵ میکروگرم بر میلی لیتر مشاهده شد. بالاترین ظرفیت قدرت احیاء در غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر و پایین ترین ظرفیت قدرت احیاء را در غلظت ۱۲/۵ میکروگرم بر میلی لیتر داشت. در غلظت های بالاتر فعالیت آنتی اکسیدانی بالاتر عصاره و در غلظت های پایین تر فعالیت آنتی اکسیدانی کمتر عصاره حاصل شد. در هر دو روش اتخاذ شده برای سنجش ظرفیت آنتی اکسیدانی نتایج نشان داد که فعالیت آنتی اکسیدانی شدیدا به غلظت عصاره وابسته بود. به طور کلی نتایج نشان داد که عصاره متانولی نمونه فعالیت آنتی اکسیدانی قابل ملاحضه ای نداشت (طبری و همکاران، ۱۳۹۲).

حسینی[3] و همکاران (۱۳۸۸) گونه های قارچ های ماکروسکوپی دارویی و سمی شهرستان خرم آباد را مورد بررسی قرار دادند. در بهار و پاییز سال ۱۳۸۷ و ۱۳۸۸ نمونه هایی از قارچ کلاهک دار در شهرستان خرم آباد جمع آوری و مشخصات مورفولوژیک ماکروسکوپی و میکروسکوپی آن ها در آزمایشگاه بررسی و با منابع علمی مطابقت داده شد. ۸ گونه قارچ دارویی و سمی شناسایی گردید که شامل گونه *Collybia*

[1] Malakoot Tabari
[2] Trametes gibbosa
[3] Hosseini

maculate، *Coprinus atramentarius*؛ سه گونه از جنس *Boletus* شامل *B. satana*، *B. felleus*، *B luridus*؛ دو گونه از جنس *Lactarius* شامل *L. piperatus* و *L. vellereus* و گونه *Hypholoma capnoides* است. با توجه به وجود چنین تنوعی در این منطقه می توان از اطلاعات بدست آمده بهره برداری های زیادی در کاربرد های پزشکی نمود (حسینی و همکاران، ۱۳۸۸).

برهانی[1] و همکاران (۱۳۸۸) قارچ های خوراکی و دارویی مناطق جنگلی و غیر جنگلی بهشهر را مورد بررسی قرار داد. طرح جمع آوری و شناسایی قارچ های خوراکی و دارویی منطقه بهشهر طی سال های ۸۶ و ۸۷ انجام شد برای این منظور از تمامی مناطقی که امکان و احتمال رویش قارچ وجود داشت نظیر جنگل ها، مراتع، باغات و اراضی ساحلی در طول سال و فواصل زمانی مختلف بازدید و نمونه برداری انجام شد. در این بررسی بیش از ۱۲۰ قارچ از آسکومیست و بازیدیومیست جمع آوری و شناسایی شدند. این قارچ ها به راسته های زیر تعلق داشتند در بین آن ها بیش از ۲۵ گونه قارچ خوراکی که خواص دارویی اغلب آن ها دارای خواص متعددی نیز می باشند. برای تمامی گونه ها نمونه های هرباریومی تهیه و برای تعدادی از آن ها کشت های خالص آن نیز تهیه شده است. علی رغم تنوع زیاد قارچ خوراکی و دارویی وحشی در این منطقه، تعداد قارچ های خوراکی که در این منطقه شناخته شده می باشد و کم و بیش توسط روستائیان برداشت، مصرف و یا به فروش می رسد بسیار محدود و تنها شامل گونه های *Morchella esculenta*،*Cantharellus*،Cibarius pleurotus می باشد (برهانی و همکاران، ۱۳۸۸).

[1] Borhani

فصل سوم

مواد و روش ها

۳ مواد و روش ها

۳-۱ مواد شیمیایی و تجهیزات

۳-۱-۱ مواد شیمیایی

گلوکز تک آبه، لاکتوز تک آبه، عصاره مخمر، پپتون، مالت آگار، نشاسته، اوره، فروکتوز، سوربیتول، نیترات آمونیوم، کلرید کلسیم ۲ آبه، دی پتاسیم هیدروژن فسفات ۳ آبه، سولفات منیزیم ۷ آبه، محیط کشت PDA، اسید بوریک، اسید سولفوریک، اسید کلریدریک ۰/۱ نرمال، ایزوپروپانول، اتانول، متانول، نمک اشباع، ان-هگزان، سود، تری فلور بورات[۱]، سولفات مس، سلنیم، متیل رد[۲]، بروموکروزول سبز[۳]، سولفات پتاسیم، تریس، کلرید سدیم، اتیلن دی آمین تترا اسید استیک[۴] (خریداری شده از شرکت مرک[۵] آلمان)، مستر میکس (خریداری شده از شرکت سیناکلون[۶])، سویا، نیتروژن مایع، آب مقطر دیونیزه مورد استفاده قرار گرفت.

۳-۱-۲ تجهیزات و لوازم آزمایشگاهی

برای انجام آزمایشات مربوطه، لوازم و تجهیزات زیر مورد استفاده قرار گرفت.

- دستگاه pH متر ساخت شرکت Mettler toledo کشور سوئیس
- ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۰۱ گرم، مدل FX-3000GD، ساخت شرکت A&D کشور ژاپن
- دستگاه شیکر انکوباتور مدل IKA KS 3000i، ساخت کشور آلمان
- دستگاه PCR ساخت شرکت Peq lab کشور آلمان
- اتوکلاو مدل F2000 (۷۵ لیتری)، ساخت شرکت ریحان طب کشور ایران

[1] Boron trifluoride (BF3)
[2] Methyl red (Dimethylamino-azo-benzene-2-carboxylic acid-4)
[3] Bromocresol green
[4] Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)
[5] Merck
[6] Sinacolon

- دستگاه کروماتوگرافی گازی مدل Unicam 4600، ساخت کشور انگلستان
- بن ماری (حمام آب گرم)، ساخت شرکت آرا تجهیز ایران
- دستگاه سانتریفیوژ مدل 5810R ساخت شرکت Eppendorf کشور آلمان
- دستگاه الکتروفورز ساخت شرکت مهندسی پزشکی پدیده نوژن پارس کشور ایران
- دستگاه هضم کجلدال ساخت شرکت Gerhardt کشور آلمان
- دستگاه ژل داک مدل Quantum ST4 ساخت شرکت Sobia کشور آلمان
- دستگاه آون ساخت شرکت Memmert کشور آلمان
- سمپلر ۱۰ و ۱۰۰ میکرو لیتر ساخت شرکت Alton کشور چین
- ورتکس ساخت کشور کره

۳-۲ روش ها

۳-۲-۱ روش نگهداری میکروارگانیسم ها

قارچ *مورچلا* در فصل بهار از منطقه شمال کشور (استان گلستان) بطور دستی جمع آوری شد و پس از بسته بندی در پاکت های کاغذی به آزمایشگاه منتقل شد و نمونه ها در محیط کشت اختصاصی کشت داده شد. برای کشت از قسمت وسط کلاهک قارچ که کمترین ارتباط با محیط اطراف داشت استفاده شد. میسلیوم روی محیط کشت مالت آگار در لوله آزمایش آگار شیب دار[1] و در بشقابک[2] در درجه حرارت ۲۲ °C و مدت زمان ۷ روز کشت داده شد و سپس در یخچال با درجه حرارت ۳ °C نگهداری شد. کشت مجدد میکروارگانیسم هردو ماه یک بار برای نگهداری آن انجام شد (شکل ۳-۱).

[1] Slant agar
[2] Petri dish

شکل ۳-۱: نمونه قارچ *مورچلا* جمع آوری شده از مناطق کوه های شمال ایران (اصلی)

۳-۲-۲ مایه تلقیح و کشت های اصلی

از سوسپانسیون میسلیومی برای تلقیح کشت های اصلی استفاده شد (Zhu *et al*., 2003). برای تهیه سوسپانسیون میسلیومی، ۱۰۰ میلی لیتر محیط کشت شامل گلوکز تک آبه (۳۰ گرم برلیتر) و عصاره مخمر (۱۰ گرم بر لیتر) در یک ارلن ۲۵۰ میلی لیتری تهیه شد و در درجه حرارت ۱۲۱°C به مدت ۱۵ دقیقه استریل گردید. سپس بوسیله آنس استریل آن را تلقیح کرده و در درجه حرارت ۲۵°C به

مدت ۷۲ ساعت و با سرعت ۱۷۰ دور در دقیقه[1] گرمخانه‌گذاری شد (Singh and Ward, 1997). پس از گرمخانه‌گذاری، محتویات ارلن که شامل تعدادی کلونی گویچه‌ای بود، در یک بشر ۵۰۰ میلی لیتری استریل تخلیه کرده و توسط تیغه استریل مخلوط‌کن، به مدت ۵ دقیقه مخلوط تا به راحتی توسط پیپت ۱۰ میلی لیتری قابل انتقال باشند. ۳-۱۰٪ (۳ تا ۱۰ میلی لیتر) از حجم کشت های توسعه تلقیح به عنوان مایه تلقیح به محیط کشت تولید محصول افزوده شد. از ارلن های ۲۵۰ میلی لیتری که شامل ۱۰۰ میلی لیتر محیط کشت اصلی می باشد، استفاده شد. پس از تهیه کشت های اصلی املاح معدنی کلرید کلسیم ۲ آبه (۰/۲ گرم بر لیتر) و دی پتاسیم هیدروژن فسفات ۳ آبه (۰/۲ گرم بر لیتر) به تمامی ارلن ها افزوده شد. قبل از استریل کردن در اتوکلاو، pH محیط کشت توسط اسید کلریدریک ۰/۱ نرمال به ۶/۵ رسانده شد (Zhu *et al*., 2002;2003).

۳-۲-۳ تهیه محیط کشت توسعه تلقیح

محیطی شامل ۲۰ گرم بر لیتر گلوکز، ۱۰ گرم بر لیتر عصاره مخمر، ۲ گرم بر لیتر کلرید کلسیم ۲ آبه، ۲ گرم برلیتر دی پتاسیم هیدروژن فسفات ۳ آبه، ۲ گرم بر لیتر پپتون در ارلن ۲۵۰میلی لیتری تهیه شد. پس از استریل شدن در اتوکلاو، توسعه تلقیح از محیط های حاوی قارچ صورت گرفت و در شیکر انکوباتور در دمای $24^{\circ}C$ و با سرعت ۱۹۰ دور در دقیقه به مدت ۴ روز قرار گرفت.

۳-۲-۴ تهیه محیط کشت تولید محصول

محیطی شامل ۴۰ گرم بر لیتر گلوکز، ۲۰ گرم بر لیتر عصاره مخمر،۲ گرم بر لیترکلریدکلسیم ۲ آبه، ۲ گرم بر لیتر دی پتاسیم هیدروژن فسفات ۳ آبه در ارلن ۲۵۰ میلی لیتری تهیه شد. پس از استریل شدن در اتوکلاو، ۳-۱۰٪ حجم محیط کشت به محیط تولید محصول اضافه شد سپس در شیکر

[1] Revolution per minute (rpm)

انکوباتور در دمای ۲۴°C و با سرعت ۱۹۰ دور در دقیقه به مدت ۴ روز قرار گرفت.

۳-۲-۵ استخراج DNA ژنومی قارچ

ابتدا حدود ۴۰ تا ۵۰ میلی گرم از توده زیستی فریز شده، درون هاون چینی قرار داده شد و پس از افزودن نیتروژن مایع ساییده شد. سپس مراحل زیر به ترتیب انجام شد: ۱- مقداری از توده زیستی پودر شده قارچ به یک میکروتیوب ۱/۵ میلی لیتری انتقال داده شد. سپس ۴۰۰ میکرولیتر بافر استخراج (۱۰۰ میلی مولار تریس، ۵ میلی مولار EDTA و ۱/۴ مولار کلرید کلسیم، pH= ۷/۵-۸) به هر میکروتیوب اضافه گردید. مقدار بافر اضافه شده به توده زیستی پودر شده باید به میزانی باشد که بافر کاملا توده زیستی را در بربگیرد و با تمام اجزای آن در تماس باشد. ۲- محتویات میکروتیوب توسط ورتکس به مدت چند ثانیه هم زده شد و کاملا مخلوط گردید. ۳- میکروتیوب ها سپس به مدت ۱۵ دقیقه در دستگاه بن ماری (حمام آب گرم) در دمای ۶۵ درجه سلسیوس قرار داده شدند. در طول این ۱۵ دقیقه دو تا سه بار میکروتیوب ها را به آرامی تکان دادیم تا فرآیند خروج DNA به بافر تسهیل شود. ۴- پس از انتقال میکروتیوب ها بر روی یخ (به مدت ۵ تا ۱۰ دقیقه)، به منظور سرد شدن و ته نشین شدن کامل پروتئین ها، محتویات میکروتیوب با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس و به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. بدین ترتیب رسوبی در ته میکروتیوب تشکیل شد و مایع شفافی در بخش بالای رسوب ایجاد گردید. ۵- محلول روشناور به کمک سمپلر به میکروتیوب تمیز و استریل دیگری منتقل شده و ۰/۷ حجم بافر استخراج، ایزوپروپانول سرد اضافه گردید. ۶- میکروتیوب به آرامی وارونه شد تا محتویات آن مخلوط گردد و حداقل به مدت ۱۰ تا ۲۰ دقیقه در فریزر ۲۰- درجه سلسیوس قرار گرفت. سپس میکروتیوب ها با سرعت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۵ درجه سلسیوس و به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. ۷- این بار فاز بالایی که همان ایزوپروپانول سرد بود، دور ریخته شد. در این مرحله محتویات DNA در ته میکروتیوب ته نشین گردید و توده ای شفاف را تشکیل داد. ۸- پس از حذف ایزوپروپانول سرد، رسوب حاصل در معرض هوای محیط قرار

گرفت تا باقیمانده الکل تبخیر و رسوب DNA در مجاورت هوا خشک گردد. سپس ۳۰ میکرولیتر آب دیونیزه استریل به رسوب DNA اضافه و یک شب در یخچال نگهداری شد تا DNA در آب حل گردد. کیفیت و کمیت DNA استخراج شده به ترتیب به کمک ژل آگارز ۱٪ و دستگاه اسپکتروفتومتر ارزیابی شد (صفایی و همکاران، ۱۳۸۴).

۳-۲-۶ محلول بافر TBE

بافر TBE (بافر الکتروفورز) با غلظت استوک ۱X تهیه شد. برای تهیه ی استوک ۱X، ۱۰/۸ گرم تریس، ۵/۵ گرم اسید بوریک، ۴ میلی‌لیتر EDTA ۰/۵ مولار با هم مخلوط و به حجم ۷۵۰ میلی‌لیتر رسانده شد. پس از تنظیم pH به میزان ۸، حجم محلول با آب مقطر به ۱۰۰۰ میلی لیتر رسید.

۳-۲-۷ ژل آگارز ۱٪

برای بررسی کیفیت DNA از ژل آگارز (w/v) ۱٪ استفاده شد. آگارز پلی ساکاریدی از واحدهای تکرار شونده گالاکتوز است که وقتی به حالت ژل در می‌آید، با تبدیل مولکول های حلقوی نامنظم به مولکول مارپیچ دوتایی، شبکه‌ای از منافذ به قطر ۱۰۰-۳۰۰ نانومتر ایجاد می کند. آگارز ۱٪ قادر به تفکیک قطعات ۵۰۰bp تا ۵۰۰۰bp است. در غلظت های بالاتر آگارز، قطر منافذ ریزتر است. برای تهیه آگارز ۱٪، ۱ گرم پودر آگارز در ۱۰۰ میلی لیتر بافر TBE (۱X) در اثر حرارت حل و یکنواخت شد. در آگارز مذاب بعد از سرد شدن، به میزان ۲/۵ میکرولیتر محلول اتیدیوم بروماید (برای رنگ آمیزی و بررسی کیفیت DNA روی ژل) اضافه نمودیم. سپس در سینی مخصوص ژل که جهت ایجاد چاهک، شانه[1] روی آن قرار داده شده بود ریخته شد تا ضخامت حدود ۵ میلی متر ایجاد شود. بعد از بستن ژل در دمای ۲۵ $^{\circ}C$ شانه به طور عمودی از سینی[2] خارج شد به گونه ای که چاهک های ژل آسیب ندید و ژل برای انجام الکتروفورز آماده است.

[1] Com
[2] Tray

۳-۲-۸ واکنش زنجیره پلیمراز (PCR)

پس از فراهم نمودن شرایط PCR جهت تکثیر ناحیه ITS (ITS1, 5.8s, ITS2) جدایه ها از آغازگرهای ITS1F (5’-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3) (Gardes and Bruns, 1993) و ITS4 (5’GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3’) (White *et al.*, 1990) و ناحیه $EF1-\alpha$ از آغازگرهای ۱۵۷۷F (5’- CARGAYGTBTACAAGATYGGTGG-3’) و (5’-ACHGTRCCRATACCACCRAT-3’) ۱۵۶۷RintB و (5’- CCRAACRGCRACRGTYYGTCTCAT-3’) ۲۲۱۲R استفاده شد (Rehner and Buckley, 2005; O’Donnell *et al.*, 2011). مخلوط واکنش ذیل در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر تهیه گردید که شامل: ۱۰ میکرولیتر مستر میکس ۲X، ۱ میکرولیتر آغازگر پیشرو (۱۰ pmol)، ۱ میکرولیتر آغازگر معکوس (۱۰pmol)، ۶ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه و ۲ میکرولیتر DNA (۵۰ng/µl) استخراج شده در دستگاه PCR که از قبل درجه حرارت و زمان مناسب آن برای تکثیر ژن ها تنظیم گردیده بود، انتقال داده شد و عمل PCR انجام گرفت (جدول ۳-۱ و جدول ۳-۲).

جدول ۳-۱: سیکل حرارتی واکنش PCR جهت تکثیر ناحیه ITS

مرحله	دما	زمان		تعداد چرخه
واسرشت شدن اولیه	۹۴ °C	۵′		۱
واسرشت شدن	۹۴ °C	۳۰″		۳۰
اتصال	۵۵ °C	۳۰″		
بسط	۷۲ °C	۱′		
بسط نهایی	۷۲ °C	۵′		۱

جدول ۳-۲: سیکل حرارتی واکنش PCR جهت تکثیر ناحیه $EF1-\alpha$

مرحله	دما	زمان		تعداد چرخه
واسرشت شدن اولیه	۹۴ °C	۵′		۱
واسرشت شدن	۹۴ °C	۳۰″	⎫	
اتصال	۶۲ °C	۳۰″	⎬	۳۰
بسط	۷۲ °C	۱′	⎭	
بسط نهایی	۷۲ °C	۵′		۱

۳-۲-۹ الکتروفورز محصول

بافر (۱X) TBE را به مقدار مورد نیاز در داخل تانک الکتروفورز ریخته و سینی حاوی ژل ۱٪ را درون تانک قرار می دهیم. به کمک سمپلر مقدار ۲ میکرولیتر از خط کش ژنی[1] را با احتیاط و به آرامی در داخل یکی از چاهک های ژل می ریزیم به نحوی که لدر کاملاً در داخل چاهک بنشیند. سپس مقدار ۲ میکرولیتر از محلول بافر بارگذاری را بوسیله سمپلر با ۵ میکرولیتر از محصول PCR خوب مخلوط کرده و آن را به آرامی و با احتیاط در داخل چاهک ژل می ریزیم. محصولات PCR باید کاملاً در داخل چاهک بنشیند و از آن خارج نشوند. در پایان، درب تانک را بسته و آن را به منبع تغذیه وصل می کنیم. منبع تغذیه الکتریکی را روشن کرده و آن را روی ولتاژ مناسب تنظیم می نماییم (در این تحقیق برای انجام الکتروفورز از ولتاژ ۶۵ استفاده شده است). پس از گذشت ۱ ساعت ژل را از تانک خارج کرده و داخل دستگاه ژل داک قرار داده و درب دستگاه را بسته، اشعه UV را روشن کرده تا باندها در مانیتور نمایان گردد. سپس نمونه ها برای تعیین توالی به شرکت پیشگام فرستاده شد. پس از تعیین توالی با استفاده از سایت NCBI توالی ها BLAST و با استفاده از نرم افزار Mega5 درخت فیلوژنیکی آن رسم گردید.

[1] Ladder

۳-۲-۱۰ استخراج توده زیستی

ارلن های حاوی توده زیستی پس از ۴ روز از شیکر انکوباتور خارج و توسط سانتریفیوژ توده زیستی از آب حاوی محیط کشت جداسازی و توزین شد.

۳-۲-۱۱ اندازه گیری وزن خشک سلولی

جهت اندازه گیری وزن خشک سلولی[1] توده زیستی را بر روی شیشه های ساعت قرار داده و به مدت ۲ ساعت در آون با درجه حرارت ۱۰۵°C خشک شد (Sakuradani *et al.*, 2004).

۳-۲-۱۲ مشتق سازی اسیدهای چرب

برای تعیین و اندازه گیری اسیدهای چرب، ابتدا باید چربی به اسیدهای چرب و گلیسرول تجزیه شود. سپس توسط عمل مشتق سازی، متیله شده و به دستگاه کروماتوگرافی گازی تزریق گردد. با توجه به عدم فراریت اسیدهای چرب بایستی مشتق های متیل استر آن ها را تهیه نمود. مشتق سازی اسیدهای چرب به روش متکالف[2] و همکاران (۱۹۹۶) انجام شد. بدین منظور، ۵ میلی لیتر محلول سود متانولی ۲٪ به همراه ۱ میلی لیتر استاندارد داخلی اسید پنتادکانوئیک (۲ میلی گرم بر لیتر) به لوله های آزمایش درب دار حاوی لیپید افزوده و پس از اختلاط به مدت ۱۰ دقیقه در آب جوش قرار داده شد. سپس لوله های آزمایش بو سیله آب سرد خنک شدند. در مرحله بعد، ۲/۱۷۵ میلی لیتر محلول تری فلور بورات به لوله های آزمایش افزوده و پس از مخلوط سازی به مدت ۳ دقیقه در آب در حال جوش قرار داده شدند. پس از خنک شدن لوله ها، ۱ میلی لیتر حلال ان-هگزان و ۱ میلی لیتر محلول نمک ا شباع به لوله های آزمایش ا ضافه و به شدت مخلوط گردید. پس از گذ شت چند ثانیه، محلول موجود در لوله های آزمایش به دو فاز تفکیک شد. فاز بالایی که شامل ا سیدهای چرب متیله شده و حلال

[1] Dry cell weight (DCW)
[2] Metcalf

بود، توسط سمپلر در یک میکروتیوب تخلیه گردید و مقداری از حلال آن به منظور تغلیظ توسط گاز نیتروژن تبخیر گردید. میکروتیوب ها تا زمان تزریق به دستگاه کروماتوگرافی گازی در یخچال (۴ $^{\circ}C$) نگهداری شدند.

۳-۲-۱۳ تعیین و اندازه گیری اسیدهای چرب

به منظور تعیین پروفایل اسیدهای چرب از دستگاه کروماتوگرافی گازی گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس (مدل Unicam 4600 ساخت کشور انگلستان) استفاده شد. نوع اسید چرب براساس مقایسه زمان بازداری[1] آن با زمان بازداری استاندارد اسید پنتادکانوئیک مشخص و مقدار هر اسید چرب براساس روش استاندارد داخلی اندازه گیری شد (Metcalf, 1996).

گاز هلیم به عنوان گاز حامل استفاده شد و ستون دستگاه از نوع موئین[2] به طول ۳۰ متر، قطر خارجی ۰/۲۵ میلی متر، قطر داخلی ۰/۲۲ میکرومتر و جنس آن Fused Silica بوده است. همچنین از آشکارساز یونیزاسیون شعله ای[3] استفاده شد. حجم تزریق نمونه برابر با ۰/۲ میکرولیتر و نسبت تزریق ۱:۱۰۰ بود. برنامه دمایی اعمال شده به صورت زیر بوده است:

- دمای اولیه ستون ۱۴۰ $^{\circ}C$ به مدت ۵ دقیقه
- افزایش دمای ستون با سرعت ۲۰ $^{\circ}C$ در دقیقه تا رسیدن به دمای ۱۸۰ $^{\circ}C$ به مدت ۹ دقیقه
- افزایش دمای ستون با سرعت ۲۰ $^{\circ}C$ در دقیقه تا رسیدن به دمای ۲۰۰ $^{\circ}C$ به مدت ۲۵ دقیقه
- دمای آشکارساز ۳۰۰ $^{\circ}C$ و دمای محل تزریق ۲۵۰ $^{\circ}C$.

میزان اسیدهای چرب (mg/g) براساس رابطه زیر محاسبه گردید:

فرمول (۳-۱)

$$E = \frac{A \times \left(\frac{B}{C}\right)}{D}$$

[1] Retention time
[2] Capillary BPX70
[3] Flame ionization detector (FID)

A= مساحت پیک مجهول

B= غلظت استاندارد داخلی

C= مساحت پیک استاندارد داخلی

D= وزن نمونه (g)

E= مقدار اسید چرب

۳-۲-۱۴ اندازه گیری درصد پروتئین به روش کجلدال

مقدار نیتروژن موجود در نمونه های آون خشک شده با استفاده از دستگاه کجلدال ساخت شرکت Gerhardt کشور آلمان انجام شد. این دستگاه از دو بخش هضم و تقطیر تشکیل شده است. بخش هضم در این مدل شامل ۱۲ لوله است. برای انجام هضم نمونه ها، ۰/۵ گرم از نمونه خشک و پودر شده را با ۷ میلی لیتر اسید سولفوریک غلیظ (۹۶٪) و ۱/۱ گرم کاتالیزور (مخلوطی از ۱۰۰ گرم سولفات پتاسیم، ۱۰ گرم سولفات مس و ۱ گرم سلنیم) در لوله ها ریخته و در جایگاهشان در دستگاه هضم قرار داده شد. درجه دستگاه ابتدا روی ۱۸۰°C تنظیم گردید و سپس دما به ۳۰۰ °C و در نهایت به ۳۷۰ °C رسانده شد تا نمونه ها به رنگ سبز شفاف در آیند و عمل هضم نمونه ها کامل شود. این عمل حدود ۳ ساعت به طول انجامید. لازم به ذکر است که در سری اول که نمونه ها در دستگاه هضم قرار داده شد احتیاج به نمونه شاهد نیز بود که نمونه شاهد حاوی مخلوط بالا به جز نمونه خشک قارچ می باشد.

در مرحله بعد نمونه ها برای انجام عمل تقطیر، کاملا سرد گردیدند. بخش تقطیر، دارای دستگاهی با دو جایگاه می باشد، در یکی لوله مربوط به بخش هضم و در دیگری ارلنی حاوی ترکیبی از ۵۰ میلی لیتر اسید بوریک ۲٪ که برای هر نمونه ۲۴ میلی لیتر مورد استفاده قرار می گیرد، با شروع کار دستگاه تقطیر، در درون لوله حاوی نمونه هضم شده با اضافه شدن اسید، رنگ سبز لجنی ظاهر شده که این صحت انجام آزمایش را می رساند و بعد از اتمام کار دستگاه (حدود ۴ دقیقه)، رنگ محلول داخل ارلن

سبز می شود که هر چه این رنگ تیره تر باشد نشان دهنده غلظت نیتروژن بیشتر در نمونه مورد نظر است و برای عمل تیتراسیون، چند قطره معرف متیل رد (حاوی ۶۶ میلی گرم متیل رد و ۹۹ میلی گرم بروموکروزول سبز در ۱۰۰ میلی لیتر اتانول) و اسید سولفوریک ۰/۰۲ نرمال به صورت دستی انجام گرفت، اضافه کردن اسید سولفوریک تا زمانی که رنگ نمونه آلبالویی یا صورتی شود، ادامه داشت (شکل ۳-۲). سپس حجم اسید مصرفی را یادداشت نموده و از فرمول زیر مقدار کل نیتروژن موجود در نمونه محاسبه گردید. سپس از طریق ضریب تبدیل پروتئینی در قارچ که ۵/۹۹ می باشد، درصد پروتئین بدست آمد (Waling *et al.*, 1989).

مقدار نیتروژن که به صورت درصد کسر جرمی یا بر حسب گرم در ۱۰۰ میلی لیتر بیان می شود برابر است با:

m= مقدار جرم نمونه بر حسب گرم

C_t= غلظت اسید سولفوریک تیتر کننده برحسب نرمالیته در لیتر

V_0= حجم اسید سولفوریک مصرف شده برای تیتر نمونه شاهد برحسب میلی لیتر

V_1= حجم اسید سولفوریک مصرف شده برای تیتر نمونه برحسب میلی لیتر

V_i= حجم نمونه برحسب میلی لیتر

فرمول (۳-۲)

$$\%N = \frac{(V_1 - V_0) \times C_t \times 14 \times 100}{m \times 100}$$

فرمول (۳-۳)

$$\%N = \frac{(V_1 - V_0) \times C_t \times 14 \times 100}{V_i \times 100}$$

شکل ۳-۲: نمونه قبل از تیتر شدن (سمت راست)، نمونه بعد از تیتر شدن (سمت چپ)

۳-۲-۱۵ طرح آزمایشی

در این تحقیق پس از تشخیص DNA قارچ به روش مولکولی میزان تولید پروتئین و توده زیستی با استفاده از روش One factor at a time عوامل موثر در تولید پروتئین و توده زیستی بررسی شده و در مرحله بعد با استفاده از روش سطح پاسخ این عوامل کلیدی در تولید پروتئین و توده زیستی بهینه سازی شد. منبع کربنی گلوکز و منبع نیتروژنی پودر سویا به عنوان عوامل کلیدی در نظر گرفته شد و از طرح مرکب مرکزی با ۱۰ آزمایش استفاده شد.

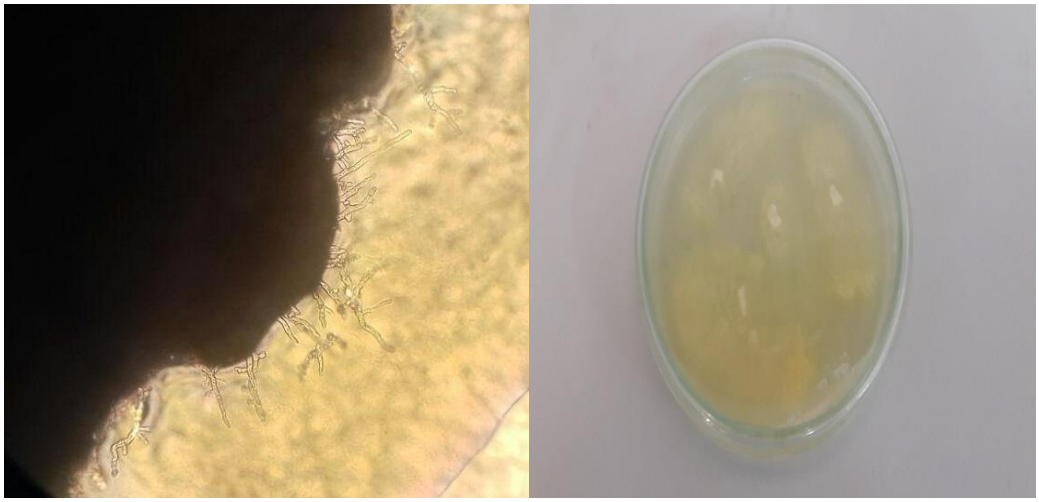
فصل چهارم

نتایج و بحث

۴ نتایج و بحث

۴-۱ کشت جدایه قارچی

پس از جداسازی و کشت قارچ بر روی محیط PDA مشاهده شد که رشد قارچ بسیار کند بود و پس از مدت ۱۰ روز رشد اندکی در محیط PDA داشته است (شکل ۴-۱الف). همانطور که در (شکل ۴-۱ب) دیده می شود ریسه های این گونه قارچی ضخیم بوده و ریسه های رشد کرده در زیر میکروسکوپ با بزرگنمایی ۱۰ جدا شد و به محیط کشت توسعه تلقیح منتقل شد.

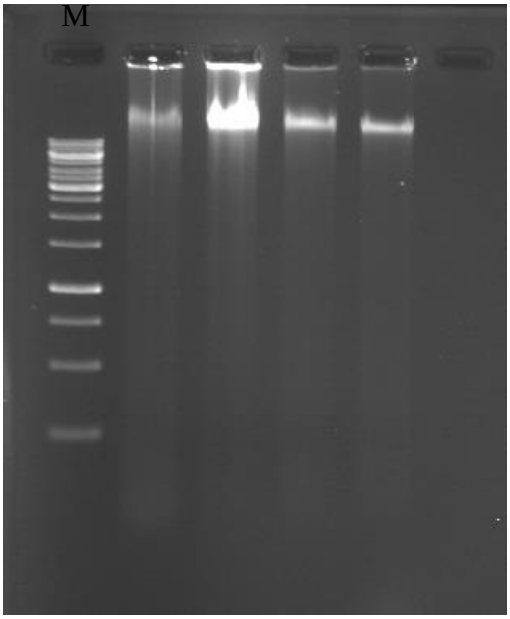


شکل ۴-۱: نمونه تکثیر شده در محیط PDA (الف)، ریسه جوانه زده در محیط PDA (ب)

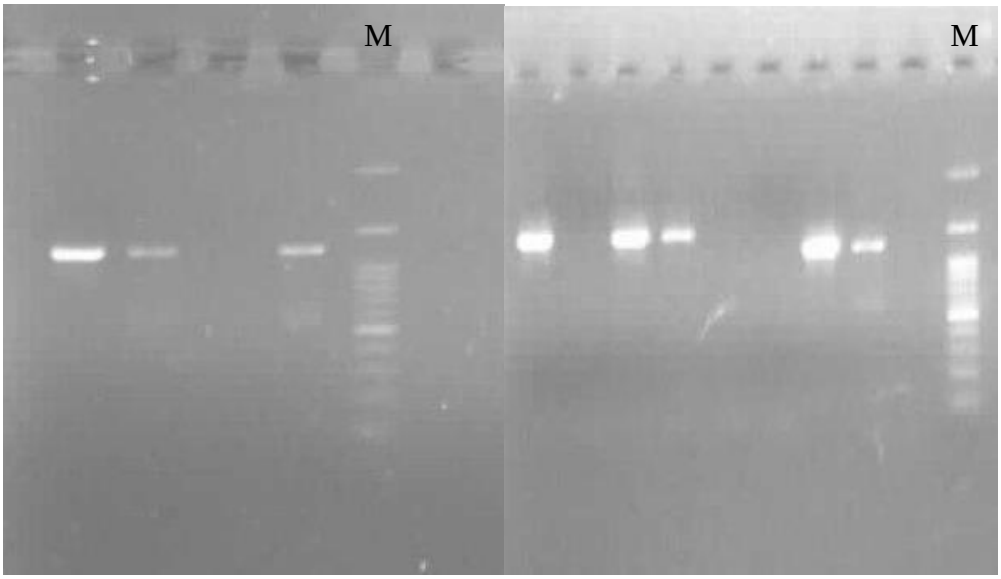
۴-۲ تشخیص گونه قارچی

در این مرحله از تحقیق پس از جداسازی DNA و بررسی کیفیت آن بر روی ژل آگارز ۱٪ (شکل ۴-۲) ناحیه ITS (ITS1, 5.8s, ITS2) و ژن طویل ساز (EF1-α) با استفاده از آغازگرهای اختصاصی تکثیر (شکل ۴-۳ الف و ب) و تعیین توالی شدند و شباهت توالی بدست آمده مربوط به جدایه قارچی جدا شده با توالی گونه های مشابه در سایت NCBI بررسی شد. بر اساس نتایج بدست آمده گونه جدایه بکار رفته در این تحقیق ۹۹٪ با گونه *Morchella fluvialis* شباهت داشت. درخت فیلوژنیکی رسم شده بر

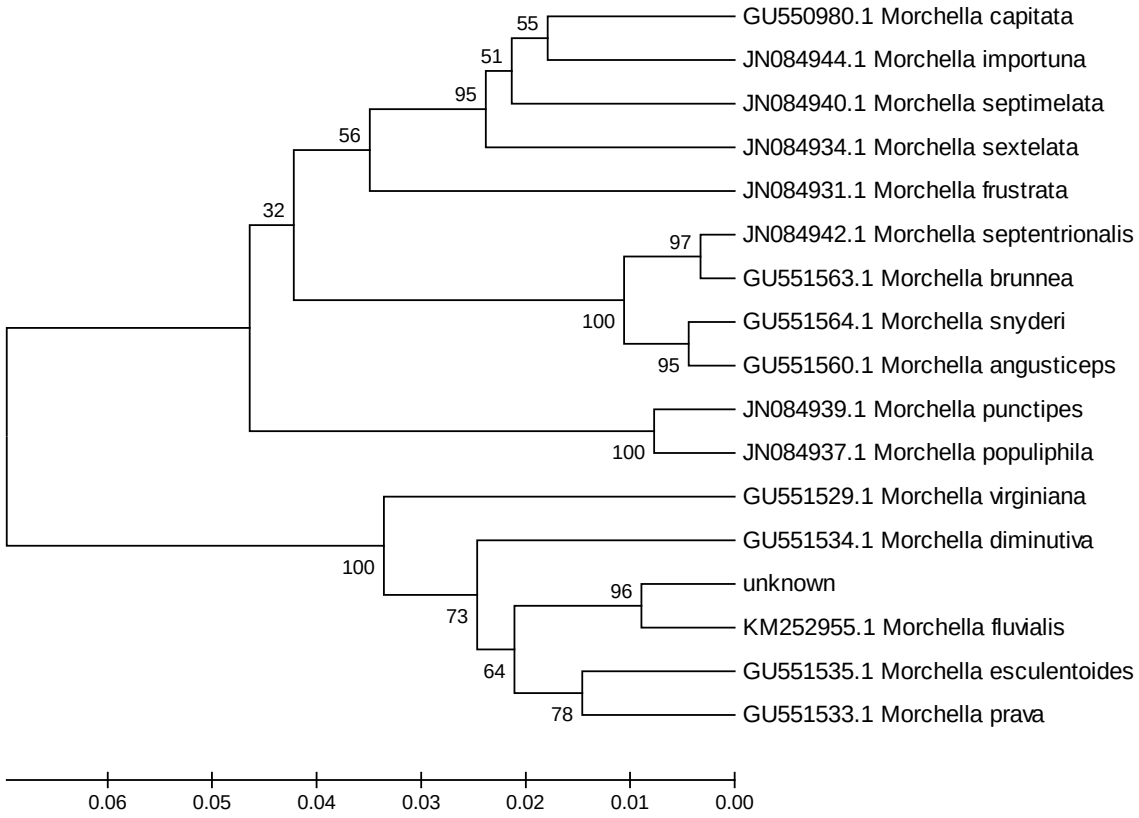
اساس دو ناحیه ژنی (ITS و EF1-α) تایید می کند که گونه حاضر گونه *Morchella fluvialis* می باشد (شکل ۴-۴ و ۴-۵).



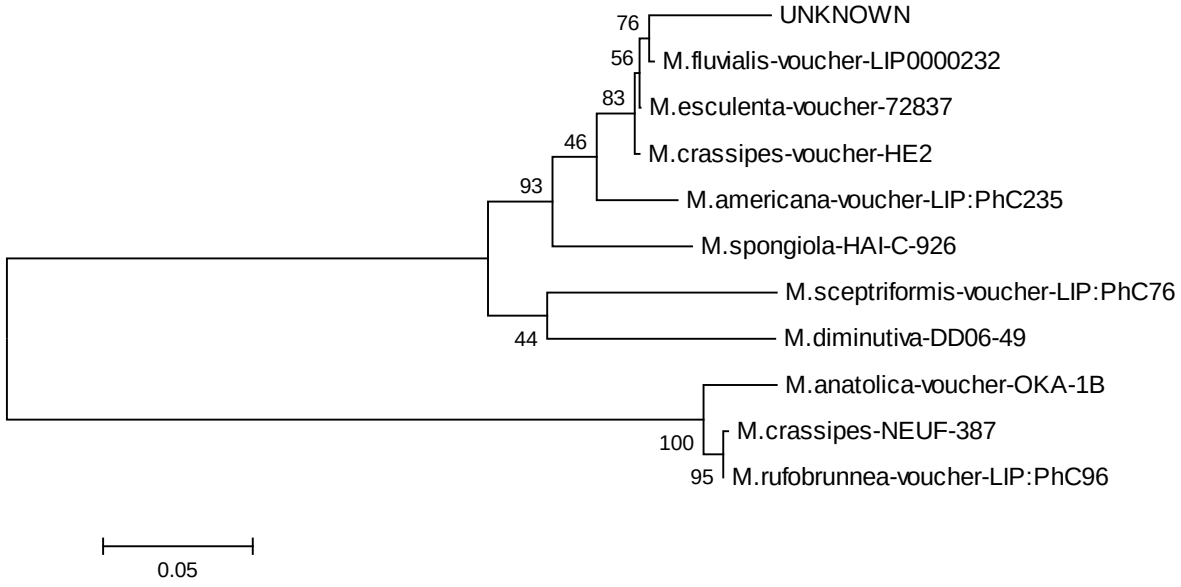
شکل ۴-۲: بررسی کیفیت DNA ژنومی استخراج شده از جدایه مورچلا بر روی ژل آگارز ۱٪. M خط کش ژنومی ۱kb



شکل ۴-۳: تکثیر جدایه مورچلا بررسی شده در این تحقیق با استفاده از آغازگر های ناحیه ITS (الف) و ژن EF1-α (ب) بر روی ژل آگارز ۱/۲٪. M خط کش ژنومی ۱kb



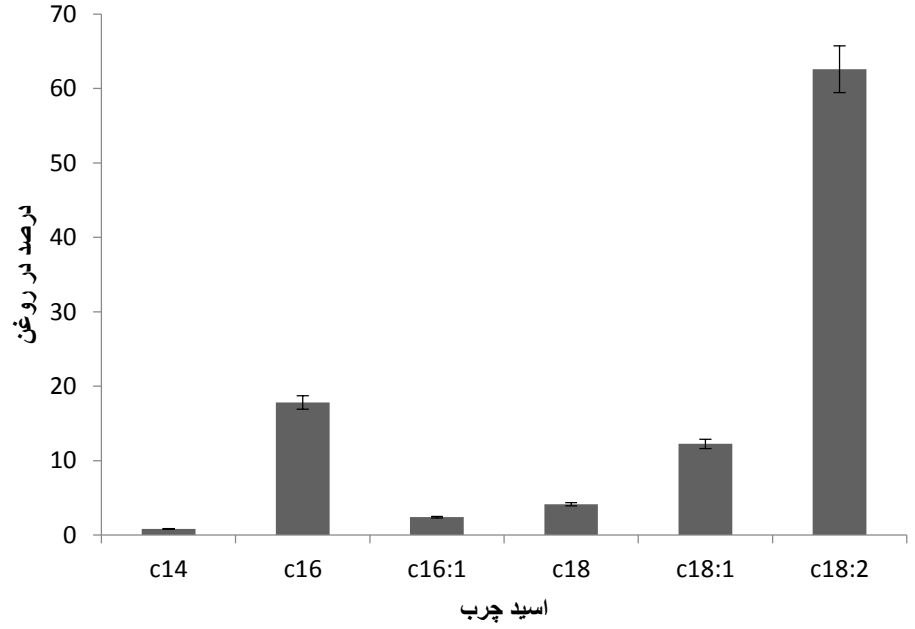
شکل۴-۴: درخت فیلوژنیکی گونه *مورچلا* بررسی شده در این تحقیق با گونه های نزدیک به آن بر اساس ژن EF1-α (Bootstrap = ۱۰۰۰).



شکل۴-۵: درخت فیلوژنیکی گونه *مورچلا* بررسی شده در این تحقیق با گونه های نزدیک به آن بر اساس ناحیه ITS (Bootstrap = ۱۰۰۰).

۴-۳ محتوی اسید چرب بافت میوه ای قارچ *Morchella fluvialis*

همانطور که در شکل ۴-۶ آمده است محتوی اسید چرب سازنده گونه قارچی *Morchella fluvialis* نشان داد که بالاترین اسید چرب مربوط به اسید چرب غیر اشباع لینولئیک (C18:2) می باشد محتوی این اسید چرب ۶۲٪ روغن تشکیل دهنده این گونه قارچی می باشد اسید چرب اشباع پالمیتیک دومین اسید چرب پر مقدار این گونه قارچی می باشد که در حدود ۱۷٪ روغن این گونه قارچی را تشکیل می دهد (Sandrina *et al*., 2013). نتایج سایان و همکاران در سال ۲۰۱۷ روی پروفایل اسیدهای چرب گونه قارچی *Pleurotus* نشان داد، میزان اسیدهای چرب غیر اشباع این گونه قارچی بین ۴۰/۹۲ تا ۶۳/۲۴٪ و اسیدهای چرب اشباع بین ۱۵ تا ۱۸٪ متغیر بود، همچنین اسیدهای چرب این گونه قارچی اسید لینولئیک و اسید پالمیتیک بود که با نتایج حاصل از این تحقیق مطابقت دارد.



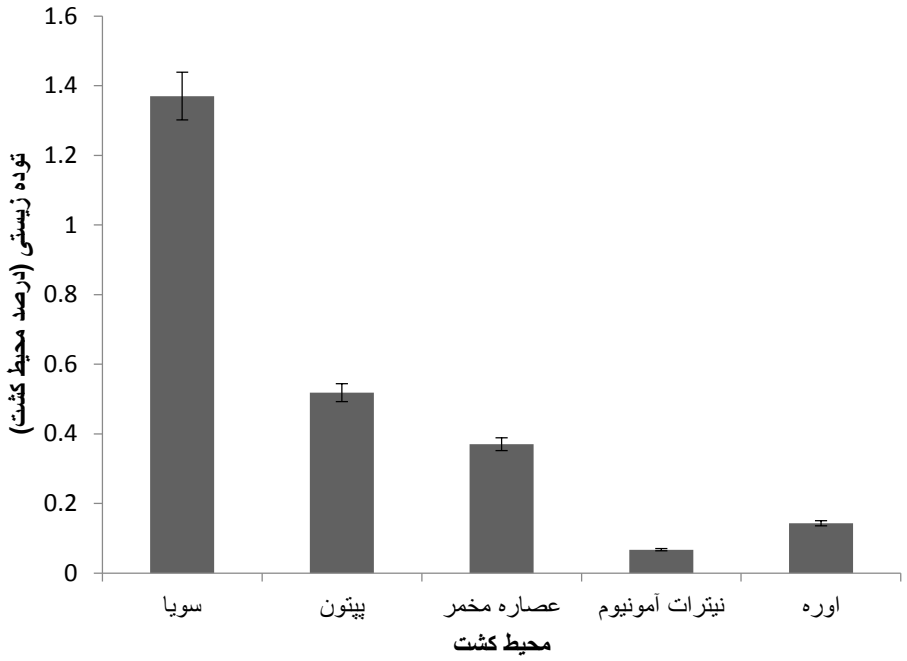
شکل ۴-۶: محتوی اسید چرب سازنده روغن گونه قارچی *Morchella fluvialis*

۴-۴ بررسی اثرات ترکیبات محیط کشت بر میزان توده زیستی و پروتئین به روش آماری *"one-factor-at-a-time"*

۴-۴-۱ منبع نیتروژنی

در این مرحله از آزمون، دما ۲۱ °C و (۴۰ گرم بر لیتر) گلوکز ، مواد معدنی (۰/۵ گرم بر لیتر) سولفات منیزیم ۷ آبه، (۰/۱ گرم بر لیتر) کلرید کلسیم ۲ آبه و (۴ گرم بر لیتر) دی پتاسیم هیدروژن سولفات ۳ آبه، pH= ۶ و مدت زمان تخمیر ۵ روز به عنوان ثابت های آزمون در نظر گرفته شد. منابع پروتئینی متفاوت مخلوط از متغیرهای آزمون بود. نتایج اثر نوع منبع نیتروژنی در شکل ۴-۷ آورده شده است. نتایج نشان داد که میزان توده زیستی در محیط کشت حاوی منبع پروتئینی سویا رشد حداکثری داشت در حالیکه میزان رشد توده زیستی در محیط کشت حاوی نیتروژن معدنی نیترات آمونیوم و اوره در پایین ترین مقدار بود (شکل ۴-۷). محققین گزارش کردند که منبع پروتئینی تاثیر قابل توجهی در رشد توده زیستی دارد و بالاترین مقدار توده زیستی را تولید می کند (Park *et al*., 1999; Jin *et al*., 2008).

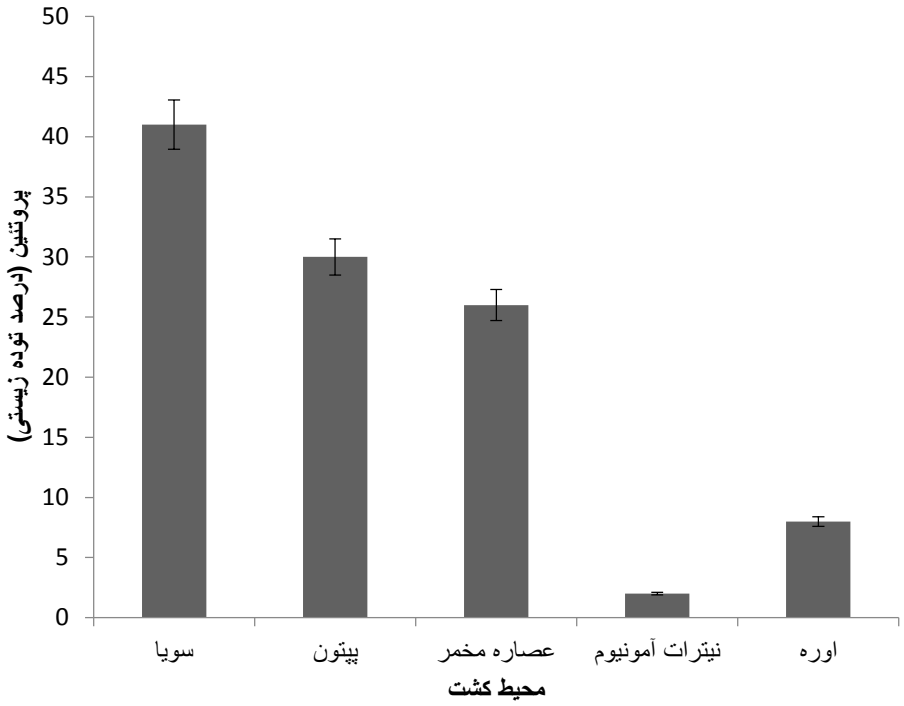
نتایج نشان داد که منبع پروتئینی سویا نسبت به عصاره مخمر اثر بیشتری در افزایش توده زیستی داشته است (شکل ۴-۷). نتایج بدست آمده مشابه نتایج پارک و همکاران در سال ۱۹۹۹ می باشد که گزارش کردند منبع پروتئینی سویا تاثیر قابل توجهی در رشد توده زیستی دارد. همچنین گزارش کردند پودر سویا یک منبع نیتروژنی است و به کندی توسط ریزسازواره استفاده شده که موجب افزایش میزان توده زیستی می شود.



شکل ۴-۷: تاثیر منابع نیتروژنی و مواد معدنی متفاوت بر تولید توده زیستی (oil). نمودارها دارای خطای معیار (SE[1]) در سه تکرار می باشند.

نتایج اثر منابع نیتروژنی بر میزان پروتئین در شکل ۴-۸ نشان داده شده است. میزان پروتئین داخل سلولی در تیمارهای آزمایش شده متفاوت بود. بیشترین و کمترین میزان پروتئین به ترتیب مربوط به تیمار حاوی تیمار پودر سویا و نیترات آمونیوم بود. نتایج این مرحله نشان داد که سوبسترای پروتئینی که باعث افزایش رشد توده زیستی می شود با افزایش پروتئین همراه است. در تحقیقی که توسط ساجبیدور در سال ۱۹۹۲ گزارش شده است پودر سویا بالاترین مقدار پروتئین را تولید می کند. البته پپتون هم بر تولید پروتئین تاثیر گذار است ولی بدلیل اینکه تاثیر پودر سویا نسبت به پپتون بر تولید پروتئین در محیط کشت به مراتب بیشتر است، پودر سویا برای مرحله بهینه سازی در نظر گرفته شد.

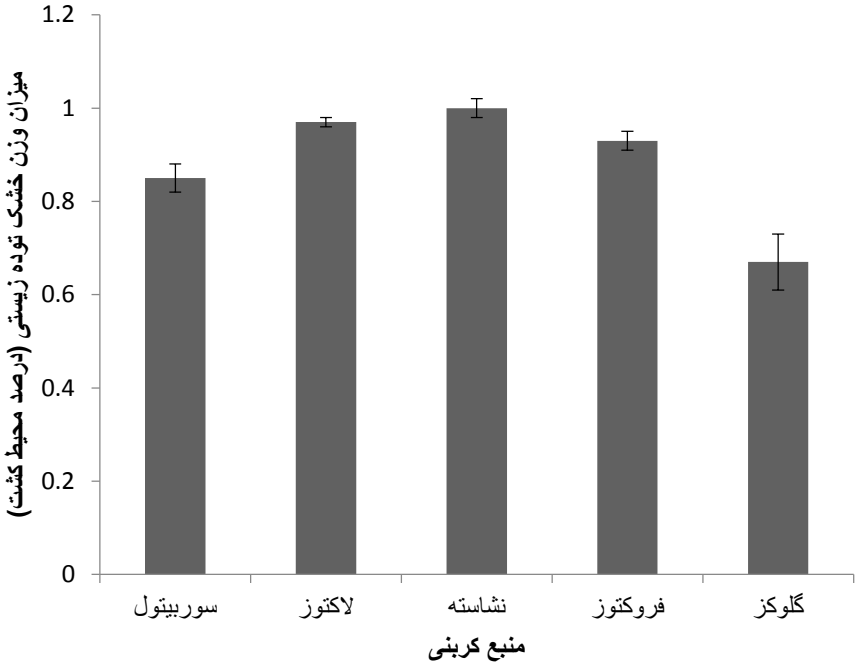
[1] Standard error



شکل ۴-۸: تاثیر منابع نیتروژنی و مواد معدنی متفاوت بر میزان پروتئین. نمودارها دارای خطای معیار (SE) در سه تکرار می باشند.

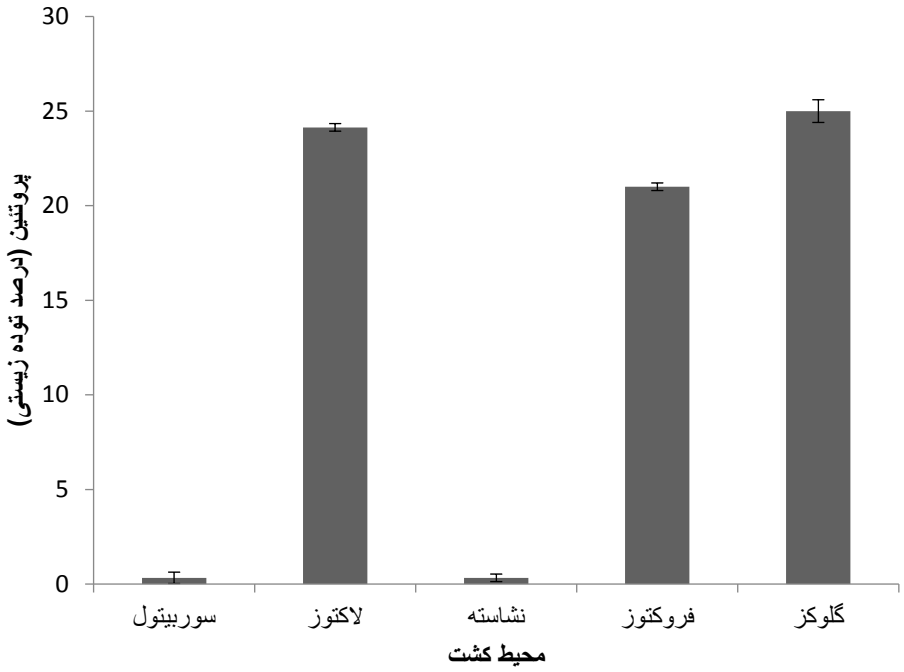
۴-۴-۲ منبع کربن

نتایج اثرات منابع کربنی در تولید توده زیستی و پروتئین در شکل ۴-۹ و ۴-۱۰ نشان داده شده است. با توجه به نتایج بدست آمده از آزمون گذشته، منبع پروتئینی سویا به میزان ۲۰ گرم بر لیتر، دمای ℃ ۲۸ و مدت زمان تخمیر ۵ روز به عنوان ثابت های آزمون در نظر گرفته شد. در این مرحله منبع کربنی به عنوان متغیر در نظر گرفته شد.



شکل ۴-۹: تاثیر منبع کربنی در تولید توده زیستی. نمودارها دارای خطای معیار (SE) در سه تکرار می باشند.

همانطور که در شکل ۴-۹ نشان داده می شود نشاسته بهترین منبع کربنی برای رشد حداکثری گونه قارچی است. چنین تحلیل می شود که فعالیت آنزیمی این گونه قارچی بالا بوده که در این محیط کشت پیچیده حداکثر رشد را داشته است. قابل توجه است حداقل رشد در محیط گلوکز است که با در نظر گرفتن سطوح ثابت از همه قندها چنین تحلیل می شود که قارچ در محیط گلوکز میزان قابل توجهی از انرژی حاصل از مصرف قند را در تولید محصول پروتئینی استفاده کرده است. با بررسی شکل ۴-۱۰ چنین نتیجه شده در این محیط کشت عامل محرک رشد تاثیر حداقلی در تجمع پروتئین داشته است. کمترین میزان پروتئین در بیشترین میزان تولید توده زیستی مشاهده شد که نشان دهنده این واقعیت می باشد که انرژی اندکی صرف تجمع پروتئین در سلول شده در حالیکه در نمونه با منبع کربنی گلوکز کمترین میزان توده زیستی تولید شده و بیشترین پروتئین در این نمونه مشاهده شد. در نمونه سوربیتول میزان اندکی پروتئین در توده زیستی قارچ *Morchella fluvialis* ذخیره شد.



شکل ۴-۱۰: تاثیر منبع کربنی بر میزان پروتئین. نمودارها دارای خطای معیار (SE) در سه تکرار می باشند.

نتایج طرح آماری One factor at a time نشان داد که منبع نیتروژنی سویا و منبع کربنی گلوکز بهترین شرایط شیمیایی محیط کشت برای تولید پروتئین می باشد. در مرحله بعد با استفاده از روش آماری سطح پاسخ میزان دو ترکیب کلیدی گلوکز و سویا در تولید توده زیستی و پروتئین بهینه شد.

۴-۴-۳ بهینه سازی به روش آماری سطح پاسخ

آزمایش های بهینه سازی، بدست آوردن یک مدل ریاضی برای پیش بینی رفتار فرآیند می باشد. طرح های بهینه سازی از عوامل کمتری نسبت به طرح های معمولی برخوردار بوده ولی این عوامل شدیدا تاثیر گذار است (Strobel *et al*., 1999). از آنجایی که هدف از این مرحله در تحقیق حاضر افزایش میزان توده زیستی و پروتئین می با شد، بازه ای از دو ترکیب کلیدی کربن (گلوکز) و نیتروژن (پودر سویا) با توجه به مطالعات و کارهای تحقیقاتی انجام شده انتخاب گردید (جدول ۴-۱) و میزان این دو ترکیب به منظور افزایش تولید توده زیستی و پروتئین به روش آماری RSM بهینه شد.

جدول ۴-۱: میزان واقعی و کد شده متغیرهای غیر وابسته در روش آماری RSM

عامل	سطح				
	-۱/۴۱۴۲	-۱	۰	۱	۱/۴۱۴۲
*پودر سویا (گرم بر لیتر)	۱۶	۲۰	۳۰	۴۰	۴۴/۱۴
*گلوکز (گرم بر لیتر)	۳۲	۴۰	۶۰	۸۰	۸۸/۲۸

طرح مرکب مرکزی روش سطح پاسخ به همراه میزان واقعی داده ها در جدول ۴-۲ گزارش شده است. همانطور که در جدول ۴-۲ دیده می شود با افزایش میزان سویا، پروتئین و توده زیستی افزایش یافته (نمونه های ۲ و ۸) در صورتی که با ثابت ماندن سطح سویا و با افزایش میزان گلوکز افزایش توده زیستی اندک و پروتئین قابل توجه بود (نمونه های ۲ و ۹). ضرایب مدل چند جمله ای درجه دوم پس از تجزیه و تحلیل توسط نرم افزار و حذف عبارت های غیرمعنی دار توسط روش Forward در نرم افزار بدست آمد و نتیجه حاصل معادله (۱) و (۲) می باشد.

$$Biomass = - 3.54109 + 0.063174 \times glucose + 0.159877 \times soybean + 9E - 05 \times glucose \times soybean - 0.00048 \times gloucose^2 - 0.00185 \times soybean^2$$

$$Protein = - 15.103 + 0.533219 \times glucose + 0.885904 \times soybean - 0.00834 \times glucose \times soybean$$

میزان Y_1 و Y_2 به ترتیب مربوط به درصد توده زیستی در وزن خشک سلولی و درصد پروتئین در توده زیستی می باشد. A و B به ترتیب مربوط به میزان گلوکز و پودرسویا بر حسب گرم بر لیتراست.

جدول ۴-۲: طراحی آزمایش ها و نتایج از دو متغیر اعمال شده بر روی سطح پاسخ در روش RSM

			پروتئین (٪)	میزان توده زیستی (٪)
نمونه	پودر سویا (B)	گلوکز (A)	پاسخ مشاهده شده	پاسخ مشاهده شده
۱	۳۰	۳۱/۷۱۵۷۳	۲۰	۱/۲۱
۲	۲۰	۴۰	۱۵	۰/۸
۳	۳۰	۶۰	۳۱/۵	۱/۸۳۶
۴	۱۵/۸۵۷۸۶	۶۰	۲۵	۰/۶
۵	۳۰	۸۸/۲۸۴۲۷	۳۸/۳۶	۱/۶۷۳
۶	۴۰	۸۰	۳۵	۲/۱۰۴
۷	۳۰	۶۰	۳۰/۸۶	۱/۸
۸	۴۰	۴۰	۲۸/۶۷	۱/۷۳۲
۹	۲۰	۸۰	۲۸	۱/۱
۱۰	۴۴/۱۴۲۱۴	۶۰	۳۲/۲	۲/۳۱۲

همانطور که از جدول ۴-۳ مشخص است اثرات خطی پودر سویا و گلوکز در میزان توده زیستی و پروتئین در محیط کشت، معنی‌دار می باشند ($P<0.01$). اثرات متقابل گلوکز-پودر سویا برای مقدار پروتئین و توده زیستی در توده زیستی معنی‌دار نمی باشند ($P>0.01$). در مورد اثر درجه دوم بر تولید توده زیستی هیچکدام از عامل ها معنی‌دار نمی باشد ($P>0.01$). ولی اثر درجه دوم منبع کربنی برای تولید پروتئین معنی‌دار می باشد ($P<0.05$). معادله های ۱ و ۲ مدل رگرسیون را برای توده زیستی و مقدار پروتئین در توده زیستی پس از تجزیه و تحلیل نتایج توسط نرم افزار Design Expert

نشـــان می دهد. مقدار عددی ضـــریب تعیین (R^2) برای دو فرمول پروتئین و توده زیســـتی به ترتیب ۰/۹۵ و ۰/۹۸ نشان دهنده میزان انطباق داده ها در مدل رگرسیون می باشد و می توان چنین نتیجه گرفت که مدل های رگرسیون به خوبی توانسته اند رابطه بین شرایط کشت (گلوکز و پودر سویا) و میزان پروتئین و توده زیستی در توده زیستی را نشان داده و پیش بینی کنند. همچنین مدل نهایی دارای عدم تطابق[1] غیر معنی‌دار است که نشان دهنده برازش خوب مدل می باشد. جدول ۴-۳ ضریب های رگرسیون و مقادیر p را برای مدل های رگرسیون نشان می دهد.

جدول ۴-۳: پارامترهای ANOVA برای مدل توده زیستی و پروتئین (A گلوکز و B پودر سویا)

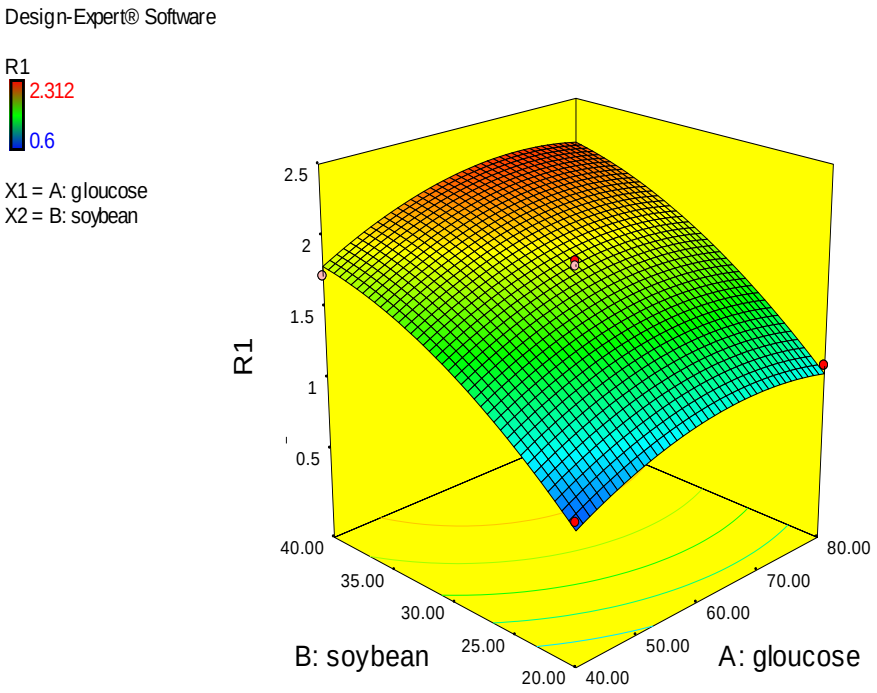
منبع تغییرات	درجه آزادی		میانگین مربع		F		P	
	توده زیستی	پروتئین	توده زیستی	پروتئین	توده زیستی	پروتئین	توده زیستی	پروتئین
مدل	۵	۳	۰/۵۶	۱۲۸/۸۵	۷۳/۹۱	۱۶/۰۴	۰/۰۰۰۵	۰/۰۰۲۹
A	۱	۱	۰/۲۲	۲۵۶/۴۵	۲۸/۸۲	۳۱/۹۳	۰/۰۰۵۳	۰/۰۰۱۳
B	۱	۱	۲/۳۷	۱۱۸/۹۸	۳۱۰/۸۲	۱۴/۸۱	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۸۵
AB	۱	۱	۰/۰۰۱	۱۱/۱۲	۰/۱۷	۱/۳۸	۰/۷۰۱۵	۰/۲۸
A^2	۱	-	۰/۱۷	-	۲۲/۰۵	-	۰/۰۰۹۳	-
B^2		-	۰/۱۵۵	-	۲۰/۴	-	۰/۰۱	-
باقیمانده	۴	۶	۰/۰۰۷	۸/۰۳		۹/۵۹		۰/۱۱
عدم تطابق	۳	۵	۰/۰۱	۹/۵۹	۱۵/۳۷	۰/۲	۰/۱۸	
خطای خالص	۱	۱	۰/۰۰۰۶	۰/۲				

میزان R^2 برای دو فرمول رگرسیون مربوط به پروتئین و توده زیستی به ترتیب ۰/۹۵ و ۰/۹۸ می باشد.

[1] Lack of fit

۴-۴-۴ نتایج میزان توده زیستی

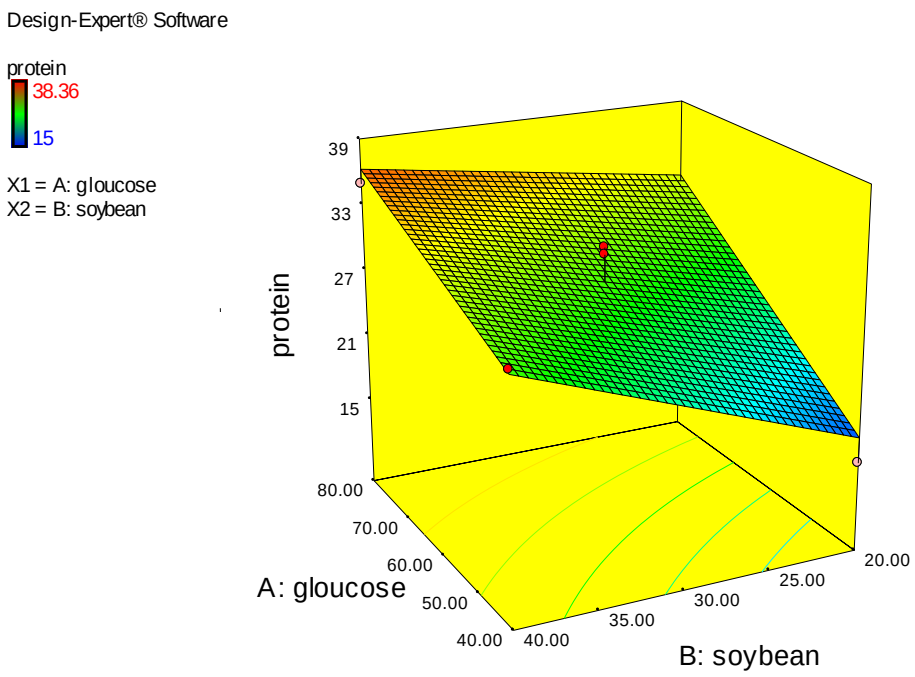
شکل ۴-۱۱ تاثیر سطوح مختلف گلوکز و پودر سویا را بر میزان توده زیستی نشان می دهد. سطح پاسخ نشان می دهد که هر چه میزان کربن و پودر سویا افزایش یابد میزان توده زیستی هم افزایش می یابد. بیشترین مقدار توده زیستی در غلظت گلوکز (۶۰ - ۷۰ گرم بر لیتر) و پودر سویا (۴۰ گرم بر لیتر) بدست آمد. چرا که با افزایش میزان نیتروژن میزان توده زیستی افزایش پیدا کرد. نتایج تحقیق بر روی این گونه قارچی نشان داد که همانند سایر گونه های قارچی، میزان توده زیستی تولید شده تحت تاثیر شرایط محیط کشت قرار می گیرد. میزان تولید توده زیستی در این گونه در سطوح حد واسط گلوکز بیشترین میزان بدست آمد که می توان آن را به تاثیر اثر بازدارندگی سطوح بالایی گلوکز در تولید توده زیستی نسبت داد (Jin *et al.*, 2009).



شکل ۴-۱۱: منحنی RSM برای تولید توده زیستی (٪) بوسیله قارچ *Morchella esculenta* با متغیرهای پودر سویا (N) و گلوکز (C).

۴-۴-۵ نتایج میزان پروتئین

شکل ۴-۱۲ تاثیر سطوح مختلف گلوکز و پودر سویا را روی درصد پروتئین نشان می دهد. منحنی کنتور پروتئین به صورت لبه بالارونده[1] است. همانطور که در کنتور مشاهده می شود افزایش میزان نیتروژن تاثیر قابل توجهی در تولید پروتئین دارد. به طوری که افزایش میزان پودر سویا (۴۰ گرم بر لیتر) و افزایش غلظت گلوکز (۸۰ گرم بر لیتر) موجب افزایش درصد پروتئین در توده زیستی می شود. چرا که افزایش میزان منبع نیتروژنی تاثیر قابل توجهی در تولید پروتئین در گونه قارچی با توانایی تولید پروتئین بالا داشت (Ravikrishnan *et al.*, 2017).



شکل ۴-۱۲: منحنی RSM برای تولید پروتئین بوسیله قارچ *Morchella esculenta* با متغیرهای پودر سویا (B) و گلوکز (A).

[1] Rising ridge

۴-۴-۶ مقادیر بهینه پیش بینی شده توسط مدل درجه دوم برای متغیرها

مقادیر بهینه پیش بینی شده با استفاده از نرم افزار Design Expert برای متغیرهای گلوکز (A) و پودر سویا (B) به منظور تولید حداکثری توده زیستی به ترتیب ۶۹/۵۸ و ۴۰ گرم بر لیتر می باشد میزان محصول ۲/۲۳٪ پیش بینی شد. در حالیکه مقادیر بهینه پیش بینی شده برای متغیرهای گلوکز و پودر سویا به منظور تولید حداکثری پروتئین (۳۶/۳۱٪) به ترتیب ۸۰ گرم بر لیتر و ۴۰ گرم بر لیتر می باشد.

۴-۴-۷ ارزیابی مدل رگرسیون تولید توده زیستی و پروتئین

به منظور ارزیابی مدل، در آزمون هایی با دو تکرار، شرایط پیش بینی شده مدل تولید توده زیستی و پروتئین اعمال گردید. محیط کشت مناسب تولید پروتئین حاوی ۸۰ گرم بر لیتر گلوکز و ۴۰ گرم بر لیتر پودر سویا بود. محیط کشت مناسب تولید توده زیستی به ترتیب حاوی ۶۹/۵۸ و۴۰ گرم بر لیتر گلوکز و پودر سویا بود. پس از ۵ روز تخمیر میزان پروتئین ۳۸٪ و میزان توده زیستی ۲/۲٪ بدست آمد که با نتیجه پیش بینی شده از فرمول، پروتئین ۳۶/۳۱٪ و توده زیستی ۲/۲۳٪ می باشد نزدیکی قابل توجهی دارد. میزان خطا به ترتیب ۴ و ۱٪ برای محیط بهینه پروتئین و توده زیستی بدست آمد. در تحقیقاتی که توسط راویندرا روی گونه قارچی پروتئینی صورت گرفته بود نشان داد که نسبت کربن به نیتروژن ۱/۳۸ نسبت مناسبی برای تولید حداکثر پروتئین می باشد که در این تحقیق این نسبت ۲ بدست آمد.

نتیجه گیری

گونه قارچی جدا شده در این تحقیق *Morchella fluvialis* از خانواده *Morchellaceae* می باشد که اولین بار در سال ۲۰۱۵ توسط اجمل و همکاران گزارش و جداسازی شد این گونه قارچی شباهت قابل توجهی به *Morchella esculenta* دارد. گزارشات زیادی از جداسازی این گونه قارچی در اسپانیا به ثبت رسیده است. تاکنون تحقیقی در زمینه تولید پروتئین از این گونه قارچی صورت نگرفته در حالیکه

تحقیقات نشان می دهد که گونه *Morchella esculenta* که شباهت قابل توجهی به گونه قارچی *Morchella fluvialis* جداسازی شده در این تحقیق دارد و توانایی قابل توجهی در تولید پروتئین دارد. بلک ول و همکاران در سال ۲۰۰۶ نشان دادند که *Morchella esculenta* گونه قارچی مناسبی برای تولید پروتئین می باشد. تاکور و همکاران در سال ۲۰۱۱ نشان دادند که میزان پروتئین در این گونه قارچی ۳۲/۷٪ وزن خشک توده زیستی است. با در نظر گرفتن این تحقیقات چنین به نظر می رسد که گونه قارچی جدا شده دارای توانایی مشابه است. پروتئین از اجزاء مهم قارچ های خوراکی است (Aletor, 1995; Alofe et al., 1995; Fasidi and Kadiri, 1990; Florczak and Lasota, 1995). لینتزل در سال ۱۹۴۱ گزارش کرد که میزان هضم پذیری پروتئین قارچی بین ۷۲ تا ۸۴٪ است. محتوی پروتئینی قارچ تحت تاثیر اجزاء سوبسترا، زمان ختم فرآیند، تخمیر و گونه قارچی است. کریسان در سال ۱۹۷۸ گزارش کرد که میزان پروتئین در گونه قارچی *Morchella esculenta* و *Morchella deliciosa* ۳۴/۷٪ و ۲۹/۱۶٪ وزن خشک توده زیستی است. پروتئین خام قارچ در مرتبه پایین تری نسبت به گوشت می باشد در حالیکه بالاتر از بسیاری از مواد غذایی از جمله شیر می باشد (Chang, 1980). محتوی پروتئینی قارچ به صورت معمول بین ۱۹ تا ۳۵٪ می باشد در مقایسه با برنج که ۷/۳٪، ۱۲/۷٪ در گندم، ۹/۴٪ در ذرت و ۳۸/۱٪ در سویا قابل توجه است (Crisan and Sands, 1978; Li and Chang, 1982). در این گونه قارچی میزان حداکثری پروتئین در شرایط بهینه ۳۹٪ شد که میزان قابل توجهی در بین گونه های قارچی می باشد. ورما و همکاران در سال ۱۹۸۷ گزارش کردند که قارچ ها نسبت به سبزیجات محتوی آمینو اسیدهای ضروری مناسب تری را دارا هستند که قابل رقابت با پروتئین گوشتی است. حایز و حداد درسال ۱۹۷۶ گزارش کردند که قارچ ها عموما آمینو اسیدهای ضروری بزرگسالان را دارا هستند. در قارچ های خوراکی عموما محتوی چربی از کربوهیدرات و پروتئین پایین تر است. تحقیقات نشان داده که اسیدهای چرب تشکیل دهنده قارچ های خوراکی غیراشباع و از نوع ساختاری می باشند (Smadlouie et al., 2014). از مهمترین اسیدهای چرب ساختاری لینولئیک می باشد. ییلماز و همکاران در سال ۲۰۰۶ و پدنیولت در سال ۲۰۰۶ گزارش کردند که اسید چرب غالب قارچ ها غیراشباع بوده و

قارچ های خوراکی عموما منبع مناسب چربی نمی باشند. ساندرینا و همکاران در سال ۲۰۱۳ نشان دادند که میزان اسیدهای چرب غیراشباع از اسیدهای چرب اشباع در گونه *Morchella esculenta* بالاتر بود. لینولئیک، اولئیک و پالمیتیک از اسیدهای چرب غالب روغن *Morchella esculenta* بود. با در نظر گرفتن تحقیقات انجام شده اسیدهای چرب گونه قارچی *Morchella fluvialis* تشابه قابل توجهی به *Morchella esculenta* داشته و اسید چرب غالب این گونه میکروبی لینولئیک می باشد.

پیشنهادات

۱- بررسی و شناسایی گونه های جدید مورچلا از سایر مناطق ایران

۲- بررسی تنوع ژنتیکی قارچ های مورچلا جدا سازی شده

۳- بررسی خواص آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی مورچلا

۴- غنی سازی فرآورده های غذایی با پروتئین مورچلا

منابع

۱. ارشاد ج، (۱۳۷۴) "**قارچ های ایران**" انتشارات سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی.

۲. برهانی ع و موســـی زاده ع، (۱۳۸۸)، "معرفی قارچ های خوراکی و دارویی مناطق جنگلی و غیرجنگلی بهشهر"، ششمین کنگره علوم باغبانی ایران، رشت، دانشگاه گیلان.

۳. بهل ن، (۱۳۸۴) " **اطلس پرورش قارچ های خوراکی**" تاتاری م، پیوســت ع، عســگری ن، چاپ دوم، انتشارات دانش پذیر.

۴. حسینی ز، اسماعیلی ا، بازگیر ع، درویش نیا م و محمودی غ، (۱۳۸۸) "شناسایی برخی گونه های قارچ های ماکروســکوپی دارویی و ســمی شــهرســتان خرم آباد"، **فصلنامه علمی- پژوهشی دانشگاه لرستان**، شماره ۱۱، دوره ۵: ص ۷۵-۸۳.

۵. سازمان پژوهش و برنامه ریزی آموز شی، (۱۳۹۵) " **تولید و عر ضه قارچ های صدفی و دکمه ای**" چاپ اول، شرکت چاپ و نشرکتاب های درسی ایران.

۶. صــفایی ن، علیزاده ع، ســعیدی ع، رحیمیان ح وگرهارد آدام، (۱۳۸۴) "تشــخیص مولکولی و بررســـی تنوع ژنتیکی جمعیت های ایرانی *Fusarium graminearum* عامل بلایت ســـنبله گندم"، **مجله بیماری های گیاهی**، جلد ۴۱، ص ۱۷۱-۱۹۰.

۷. قمری م و قمری ه، (۱۳۸۸)، "معرفی پروتئین میکروبی شبیه به گوشت تولید شده بوسیله قارچ" همایش منطقه ای غذا و بیوتکنولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرمانشاه.

۸. محمدی گل‌تپه ا و پورجم ا، (۱۳۸۹) "**اصــول پرورش قارچ های خوراکی**" انتشـــارات دانشگاه تربیت مدرس.

۹. ملکوت طبری ش، قربانلی م، صــفائیان ض و موســی زاده س، (۱۳۹۲) "مقایســه ویژگی های آنتی اکسیدانی و فیتوشیمیایی ترامتس جیبورا"، **مجله تازه های بیوتکنولوژی- مولکولی**، شماره ۳، دوره ۱۰: ص۷۳-۷۶.

10. Ajmal M., Akram A., Ara A., Akhund S. and Nayyar B. (2015) "Morchella Esculenta: An edible and health beneficial mushroom" **Pak J. of .Food Sci.**, 25, 2, pp 71- 78.
11. Andrews J. H. (2017), "**The Life Cycle. In Comparative Ecology of Microorganisms and Macroorganisms**", Springer, New York, NY, pp 197- 240.
12. Aletor V. A. (1995) "Compositional Studies on edible tropical species of mushrooms" **J. of .Food Chemistry**, 54, pp 265- 268.
13. Alofe F. V., Odeyemi O., Oke O. L. (1995). "Three edible mushrooms from Nigeria: Their proximate and mineral composition" **Plant Foods for Hum. Nutr.,** 49, pp 63-73.
14. Bano Z. and Rajarathanam S. (1982). Pleurotus mushrooms as a nutritious food, pp 363- 382, In: "**Tropical mushrooms – Biological Nature and cultivation methods"**, Chang S. T. and Quimio T. H., The Chinese University press, Hongkong.
15. Blackwell M., Hibbett D. S., Taylor J. W. and Spatafora J. W. (2006) "Research Coordination Networks: a phylogeny for kingdom Fungi (Deep Hypha)" **J. of .Mycologia.**, 98, 6, pp 829- 837.
16. Boudier E. (1897) "Revision analytique des morilles de France" **J. of .Bulletin trimestriel de la Societe mycologique de France**, 13, pp 130- 150.
17. Brandt M. and Warnock D. (2011), "**Taxonomy and Classification of Fungi**" Manual of Clinical Microbiology, 10th Edition, ASM Press, Washington.
18. Buswell J. A. and Chang S. T. (1993). Edible mushrooms attributes and applications, pp 297-394, In: **"Genetics and breeding of edible mushrooms",** Chang S.T.J., Buswell J. A. and Miles P. G. Gordon and breach, Philadelphia.
19. Cayan F., Cayan G. T., Ozler M. A., Duru M. E. (2017) "Comparative Study of Fatty Acids Profile of Wild Mushroom Species from Turkey" **J. of . Analytical Chemistry,** 12, 3, pp 257-263.
20. Chang R. (1996) "Functional properties of edible mushrooms" **J. of .Nutrition Reviews**, 54, 11, p 91.
21. Cheung P.C. (2008), "**Mushrooms as functional foods**", John Wiley & Sons.
22. Christine J. G., Pugh D. N., Pasco D. S. and Ros. S. A. (2002) "Isolation of a galactomannan that enhances macrophage activation from the edible fungus Morchella esculenta" **J. of .Agri. and Food Chemistry**, 50, 20, pp 5683- 5685.

23. Chang S. T. and Buswell J. A. (1996) “Mushroom Nutriceuticals” **World J. of .Microbiol Biotechnology,** 12, pp 473- 476.
24. Chang S. T. (1980) “Mushroom as human food” **J. of . Bio Science**, 30, pp 339-401.
25. Crisan E. W. (1978). A Nutritional value, pp 172- 189, In: “**The biology and cultivation of edible mushrooms**”, Chang S. T. and Hayes W. A. Academic press, New York.
26. Dembitsky V., Terent’ev A. and Levitsky D. (2010) “Amino and fatty acids of wild edible mushrooms of the genus Boletus” **J. of .Rec. Nat. Prod.**, 4, 4, pp 218-223.
27. Duncan C., Pugh N., Pasco D. and Ross S. (2002) “Isolation of a galactomannan yhat enhances macrophage activation from the edible fungus Morchella esculenta” **J. of .Agric. Food Chemistry**, 50, 20, pp 5683- 5685.
28. Du X., Zhao Q., O’Donnell K., Rooney A. and Yang Z. (2012) “Multigene molecular phylogenetics reveals true morels (Morchella) are especially species-rich in China” **J. of .Fungal Genet Biol**, 49, pp 455-469.
29. Fasidi I. O. and Kadiri M. (1990) “Changes in nutrient contents of two Nigerian mushrooms. Termitomyces robusts (Beeli) Heim and Lentinus subnudus (Berk), during sporophore development” **J. of .Die Nahrung**, 34, pp 141- 420.
30. Florezak J. and Lasota W. (1995) “Cadmium uptake and binding by artificially cultivated cultivated (Pleurotus ostreatus)” **J. of .Bromatol Chemistry Toksykol**, 28, pp 17- 23.
31. Gençcelep H., Uzun Y., Tunçtürk Y. and Demirel K. (2009) “Determination of mineral contents of wild-grown edible mushrooms” **J. of .Food Chemistry**, 113, pp 1033- 1036.
32. Gursoy N., Sarikurkcu C., Cengiz M. and Solak H. (2009) “Antioxidant activities, metal contents, total phenolics and flavonoids of seven Morchella species” **J. of .Food Chemistry Toxicol**, 47, pp 2381- 2388.
33. Guo F. C., Savelkoul H. F. J., Kwakkel R. P., Williams B. A. and Verstegen M. W. A. (2003) “Immunoactive, medicinal properties of mushroom and herb polysaccharides and their potential use in chicken diets” **World's Poultry Science J.**, 59, 4, pp 427- 440.

34. Gwendoline C., Vinod K., Regis N., Genevieve G., Pierre F. and Ashok P. (2012) "Recent developments in microbial oils production: a possible alternative to vegetable oils for biodiesel without competition with human food?" **J. of .Brazilian archives of biology and technology**, 55, pp 29- 46.
35. Hatanaka S. (1969) "A new amino acid isolated from Morchella esculenta and related species" **J. of . Phytochemistry**, 8, 7, pp 1305- 1308.
36. Heleno S. A., Stojkovic D., Barros L., Glamoclija J., Sokovic M., Martins A., Queiroz M. J. R. P. and Ferreira I. C. F. R. (2013) "A comparative study of chemical composition, antioxidant and antimicrobial properties of Morchella esculenta (L.) Pers. from Portugal and Serbia**" J. of .Food Res. Int,** 51, 1, pp 236- 243.
37. Hayes W. A. and Haddad N. (1976) "The food value of the cultivated mushrooms and its importance in industry" **Mushroom J**., 40, pp 104- 110.
38. Janse B. J. H., Gaskell J., Akhtar M. and Cullen D. (1998) "Expression of Phanerochaete chrysosporium genes encoding lignin peroxidase, manganese peroxidase and Glyoxal oxidase in wood" **J. of .Applied Environmental Microbiology**, pp 3536- 3538.
39. Jin M. J., Huang H., Xiao A. H., Gao Z., Liu X. and Peng C. (2009) "Enhancing arachidonic acid production by Mortierella alpina ME-1 using improved mycelium aging technology" **J. of .Bioprocess Biosystem Engineering**, 32, pp 117- 122.
40. Jin M. j., Huang H., Xiao A. H., Zhang K., Liu X., Li S. and Peng C. (2008) "A novel two-step fermentation process for improved arachidonic acid production by Mortierella alpine**" J. of .Biotechnology Letters**, 30, pp 1087- 1091.
41. Krombholz J. V. (2011) "Naturgetreue Abblidungen und Beschreibungen der essbaren, schadlichen und verdachtigen Schwamme" **Praha J.**, 36, pp 15- 22.
42. Kanwal H., Acharya K., Ramesh G. and Reddy M. (2011) "Molecular characterization of Morchella species from the Western Himalayan region of India" **Current Microbiology**, 62, 4, pp 1245-1252.
43. Konuk M., Afyon A. and Yagiz A. (2006) "Chemical composition of some naturally growing and rdible mushrooms" **Pak. J. of .Bot.**, 38, 3, pp 799- 804.

44. Litchfield J., Vely V. and Overbeck C. (1963) “Nutrient content of morel mushroom mycelium: amino acid compostion of the protein” **J. of .Food sci.**, pp 741- 743.

45. Liu C., Sun Y., Mao Q., Gue X., Li P., Liu Y. and Xu N. (2016) “Characteristics and antitumor activity of Morchella esculenta polysaccharide extracted by pulsed electric field” **Int. J. Mol. Sci.**, 17, 986, pp 1- 16.

46. Lintzel W. (1941) “The nutritional value of edible mushroom proteins” **J. of .Biochem. Acta.**, 308, pp 413- 419.

47. Li G. S. F. and Chang S. T. (1982). Nutritive value of Volvariella volvacea, pp 199- 219, In: “**Tropical mushrooms- Biological nature and cultivation methods**”, Chang S. T. and Quimio T. H. Chinese university press, Hong Kong.

48. Mihail J. D., Bruhn J. N. and Bonello P. (2007) "Spatial and temporal patterns of morel fruiting" **J. of .Mycological Research**, 111, 3, pp 339- 346.

49. Mirzaei M., Zolala J. and Shalouzad A. (2015) “Isolation, cloning and molecular characterization of genes encoding single strand specific endonucleases from parsley (Petroselinum Crispuml)” **Iranian J. of .Agricultural Biotechnology,** 7, pp 201- 215.

50. Mohammadi Goltapeh E. and Pourjam E. (2005), “**Principles of Mushroom Cultivation**”, Tarbiat Modarres University Press, p 626.

51. Mohammad Hamdi Z. A., Noorlidah A. and Nurhayati Z. A. (2016) “Therapeutic Properties of Pleurotus species (Oyster mushrooms) for Atherosclerosis: A Review” **International J. of .Food Properties**, 20, pp 1251- 1261.

52. Mona K. G., Sanaa H. O. and Linda M. A. (2008) “Single cell oil production by Gordonia sp. DG using agroindustrial wastes” **World J. of .Microbiol Biotechnol**, 24, pp 1703- 11.

53. Metcalf L. C., Schmitz A. A. and Pelka J. R. (1996) “Rapid preparation of methyl esters from lipid for gas chromatography analysis” **J. of .Analytical Chemistry,** 38, pp 514-518.

54. Nitha B. and Janardhanan K. K. (2008) “Aqueous-ethanolic extract of morel mushroom mycelium Morchella esculenta, protects cisplatin and gentamicin induced nephrotoxicity in mice” **J. of .Food and Chemical Toxicology**, 46, 9, pp 3193- 3199.

55. Negi C. S. (2006) “Morels (Morvhella spp) in kumanu Himalaya” **J. of .Nat. Pro. Rad.**, 5, 4, pp 306- 310.
56. Nitha B., De S., Adhikari S. K., Devasagayam T. P. A. and Janardhanan K. K. (2010) “Evaluation of free radical scavenging activity of morel mushroom, Morchella esculenta mycelia: A potential source of therapeutically useful antioxidants” **J. of .Pharm**. **Biol**., 48, 4, pp 453- 460.
57. Nitha, B. and Janardhanan, K. K. (2008) “Aqueous-ethanolic extract of morel mushroom mycelium Morchella esculenta, protects cisplatin and gentamicin induced nephrotoxicity in mice” Food and Chemical Toxicology, 46, 9, pp 3193-3199.
58. O'Donnell K., Rooney A. P., Mills G. L., Kuo M., Weber N. S. and Rehner S. A. (2011) "Phylogeny and historical biogeography of true morels (*Morchella*) reveals an early Cretaceous origin and high continental endemism and provincialism in the Holarctic" **J. of .Fungal Genetics and Biology**, 48, 3, pp 252- 265.
59. Olfati J., Peyvast G. and Mami Y. (2009) “Identification and chemical properties of popular wild edible mushrooms from northern Iran” **J. of .Hortic. For.**, 1, 3, pp 048- 051.
60. Papanikolaou S., Galiotou- Panayotou M., Fakas S. and Aggelis G. (2007) “Lipid production by oleaginous Mucorales cultivated on renewable carbon sources” **Eur. J. of .Lipid Sci. Technol.**, 109, pp 1060- 1070.
61. Preininger P. V. E., Kovac G. B., Kristof Z., Boka K. and Boddi B. (2013), “**Structure of plants and fungi**”, ELTE, Department of Plant Anatomy.
62. Pedneault K. P., Gosselia A. and Tweddell R. J. (2006) “Fatty acide composition of lipids from mushrooms belonging to the family Boletaceae” **J. of .Mycolog. Res.**, 110, pp 1179- 1183.
63. Park E. Y., Koike Y., Higashiyama K., Fujikawa S. and Okabe M. (1999) “Effect of nitrogen source on mycelia morphology and arachidonic acid production in cultures of Mortierella alpina” **J. of .Bioscience and Bioengineering**, 88, pp 61-67.
64. Ratledge C. (1992). Microbial lipids: Commercial realities or academic curiosities, pp 1- 15, In: “**Industrial Applications of Single Cell Oils**”, AOCS Press, IL, USA.

65. Rajaratnam R. and Thiagarajan T. (2012) "Molecular characterization of wild mushroom" **J. Exp. Biol**, 2, 2, pp 369-373.
66. Ravikrishnan V., Ganesh S. and Rajashekhar M. (2017) "Compositional and nutritional studies on two wild mushrooms from Western Ghat forests of Karnataka, India" **Int. Food Res J.**, 24, 2, pp 679- 684.
67. Rehner S. A. and Buckley E. (2005) "A *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1 $-\alpha$ sequences: evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps* teleomorphs" **J. of . The Mycological Society of America**, 97, 1, pp 84-98.
68. Rotzoll N., Dunkel A. and Hofmann T. (2005) "Quantitative Studies, Taste Reconstitution, and Omission Experiments on the Key Taste Compounds in Morel Mushrooms (Morchella deliciosa Fr.)" **J. of .Agric. Food Chemistry**, 54, 7, pp 2705- 2711.
69. Stojkovic D., Davidovic S., zivkovic J., Glamoclija J., Ciric A., Stevanovic M., Ferreira C. F. R. and Sokovic M. (2013) "Comparative evaluation of antimutagenic and antimitotic effects of Morchella esculenta extracts and protocatechuic acid" **J. of .Front Life Sci.**, 7, 2- 3, pp 218-223.
70. Sakuradani E., Hirano Y., Kamada N., Nojiri M., Ogawa J. and Shimizu S. (2004) "Improvement of arachidonic acid production by mutants with lower n-3 desaturation activity derived from Mortierella alpina 1S- 4" **J. of .Applied Microbiology and Biotechnology**, 66, 3, pp 243- 248.
71. Singh A. and Ward O. P. (1997) "Production of high yields of arachidonic acid in a fed-batch system by Mortierella alpina ATCC 32222" **J. of .Applied Microbiology and Biotechnology,** 37, pp 404-406.
72. Strobel R. J. and Sullivan G. R. (1999). Improvement of fermentation with experimental design, In: "**Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology. American Society for Microbiology**", Demain A. L. and Davies J. E. Washington D. C.
73. Sajbidor J., Kozelouhova D. and Certik M. (1992) "Influence of some metal ions on the biomass content and production by morchella" **J. of .Applied Microbiology and Biotechnology.**

74. Taylor J. W., Jacobson D. J. and Fisher M. C. (1999) “The evolution of asexual fungi: reproduction, speciation and classification” **J. of .Annual review of phytopathology**, 37, 1, pp 197- 246.
75. Thakur P. M., Tripathee H. P. and Devkota K. P. (2011) “Nutritional Analysis of Morchella conica and its Role onRural Livelihood” **Nepal J. of .Science and Technology**, 12, pp 119-126.
76. Taskin H. (2013) “Detection of Volatile Aroma Compounds of *Morchella* by Headspace Gas Chromatography Mass Spectrometry (HS-GC/MS)” **J. of .Not Bot Horti Agrobo**, 41, 1, pp 122- 125.
77. Tietel Z. and Masaphy S. (2017) “True morels (Morchella)—nutritional and phytochemical composition, health benefits and flavor: A review” **J. of .Crit. Rev. Food Sci. Nutr.,** pp 1- 14.
78. Toledo C., Barroetavena C., Fernandes A., Barros L. and Ferreira I. (2016) “Chemical and Antioxidant Properties ofWild Edible Mushrooms from Native Nothofagus spp. Forest, Argentina” **J. of .Molecules,** 21, pp 2- 15.
79. Vieira V., Fernandes A., Barros L., Glamoclija J., Ciric A., Stojkovic D., Martins A., Sokovic M. and Ferreira I. C. (2016) “Wild Morchella conica Pers. from different origins: a comparative study of nutritional and bioactive properties” **J. of .Sci. Food Agric.,** pp 1- 32.
80. Verma R. N., Singh G. B. and Bilgrami K. S. (1987) “Fleshy fungal flora of N. E. H. India- I. Manipur and Meghalaya” **J. of .Indian Mush. Sci.**, 2, pp 414- 421.
81. Wani B. A., Bodha R. H. and Wani A. H. (2010) “Nutritional and medicinal importance of mushrooms” **J. of .Medicinal Plants Research**, 4, 24, pp 2598-2604.
82. Woodbine M. (1959) “Microbial fat: microorganism as potential fat producer” **J. of .Progress Industrial Microbial**, 1, pp 179- 245.
83. Wurtz T. L., Wiita A. L., Weber N. S. and Pilz D. (2005). “Harvesting morels after wildfire in Alaska (Report)”. Research Note RN-PNW-546. Portland, Oregon: U.S. **Forest Service Pacific Northwest Research Station**.
84. White T. J., Bruns T. D., Lee S. B. and Taylor J.W. (1990) “Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis M. A., Gelfand D. H., Sninsky J. J. White T. J. (Eds.), PCR Protocols – a Guide to Methods and Applications” **Academic Press, San Diego**, CA, pp 315-322.

85. Waling I., Vark W. V., Houba V. J. G. and Van der Iee J. J. (1989). Soil and plant and Analysis, a series of syllabi. Plant 7. In: "**Plant Analysis Procedures**", Wageningen Agriculture University, the Netherland.
86. Xi-Hui Du, Qi Zhao, Zhu L. Yang, Karen Hansen, Hatira Taskin, Saadet Buyukalaca, Damon Dewsbury, Jean-Marc Moncalvo, Greg W. and Douhan Vincent A. R. G. (2012) "How well do ITS rDNA sequences differentiate species of true morels (*Morchella*)?" **J. of .Mycologia**, 104, pp 1351- 1368.
87. Yoon C. S., Gessner R. V. and Romano M. A. (1990) "Population genetics and systematics of the Morchella esculenta complex" **J. of .Mycologia,** 82, 2, pp 227-235.
88. Yang H., Yin T. and Zhang S. (2015) "Isolation, Purification, and Characterization of Polysaccharides from Wide Morchella esculenta (L.) Pers" **Int. J. Food Prop.**, 18, pp 1385-1390.
89. Yıldız A., Yeşil O. F., Yavuz O. and Karakaplan M. (2004) "Organic elements and protein in some macrofungi of South East Anatolia in Turkey" **J. of .Food Chemistry**, 89, pp 605- 609.
90. Yilmaz N. M., Solamaz I. E. I. and mastas M. (2006) "Fatty acid composition in some wil edible mushrooms growing in the Middle Black region of Turkey" **J. of .Food Chemistry**. 99, pp 168- 174.
91. Zhu M., Zhou P. P. and Yu L. J. (2002) "Extraction of lipid from *Mortierella alpina* and enrichment of arachidonic acid from the fungal" **J. of. Bioresource Technology,** 84, 1, pp93-95.
92. Zhu M., Yu L. J. and Wu Y. X. (2003) "An inexpensive medium for production of arachidonic acid by Mortierella alpine" **J. of .Industrial Microbiology and Biotechnology,** 30, 1, pp 75-79.

Abstract

Edible fungi are regarded as important sources of protein and many studies done to produce fungi biomass. The unique and stunning flavor of the *Morchella* fungus makes it as famous and delicious fungi among the fungi fruits. This fungus has been attracted more attention by scientists as some species of Murcia fungus were known to produce high levels of protein, polysaccharides and raw fiber. In this research, after having isolated the fungal species, the species were identified by using molecular method and subsequently the key components such as protein, carbohydrates and fatty acids profiles were investigated. The phylogenetic tree attained from the genetic sequencing of the ribosomal region revealed that the isolated species is similar to the *Morchella fluvialis*. Regarding to the results obtained from the analysis of fatty acid profiles, we found out that the linoleic fatty acid was predominated fatty acid in lipid, and the next one was palmitic fatty acid in the fungus lipid. Based on the "one-factor-at-a-time" method, different sources of nitrogen and carbon were tried out to examine the amount of protein production in dry weight biomass. The results showed that soybean protein source stimulated cell growth whereas the source of ammonium nitrate and urea had a small effect on the dry weight of the biomass. Also, starch as carbon resources was the best substrate for the production of dry weight biomass production, on the other hands glucose stimulated protein production. The response surface method was used to study the levels of glucose and soy powder on the amount of biomass and protein production. The results showed that the highest amount of biomass was obtained in glucose (60-70 g/l) and soy powder (40 g/l). It was also observed that an increase in glucose concentration up to 80 g/l coincided with protein content in the biomass.

Key words: Edible mushrooms, *Morchella*, Protein, Optimization, Bulk

Faculty of Agirculture

M.Sc. Thesis in Food Industry

Investigation and determination of nutrional component from isolated edible fungi, *Morchella* from north region of Iran

By: Zahra Rahgooy

Supervisor:

Dr. Hamidreza Smadlouie

Advisor:

Dr. Shideh Mojerlou

Dr. kambiz Jahanbin

January 2018