مقاله علمی پژوهشی/ نشریه پژوهش‌های صنایع غذایی/ جلد ۳۲ شماره ۳/ سال ۱۴۰۱/ صفحات ۱ تا ۱۶
DOI: 10.22034/FR.2022.41555.1760

بهینه‌سازی میزان استخراج ترکیبات فنلی و خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصاره قارچ *گانودرما لوسیدوم* (*Ganoderma Lucidum*) با روش غرقابی

رقیه‌السادات موسوی[۱]، لیلا ناطقی[۲]، مصطفی سلطانی*[۳و۴] و ژینوس عسگرپناه[۵]

تاریخ دریافت: ۹۹/۶/۱۲ تاریخ پذیرش: ۹۹/۱۱/۲۶

[۱] دانشجوی دکتری تخصصی، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده داروسازی، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
[۲] دانشیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، واحد ورامین-پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین، ایران
[۳] استادیار، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده داروسازی، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
[۴] مرکز تحقیقات علوم تغذیه و صنایع غذایی، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
[۵] دانشیار، گروه فارماکوگنوزی، دانشکده داروسازی و علوم دارویی، علوم‌پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
*مسئول مکاتبه: Email: m.soltani@iaups.ac.ir

چکیده

زمینه مطالعاتی: گیاهان منبع فوق‌العاده‌ای از ترکیبات فنلی هستند که جزو مهمترین ترکیبات آنتی‌اکسیدانی به شمار می‌روند. با توجه به خاصیت آنتی‌اکسیدانی *گانودرما لوسیدوم*، بهینه‌سازی استخراج ترکبات فنلی و خاصیت آنتی‌اکسیدانی آن ضروری به نظر میرسد. **هدف:** این تحقیق به منظور بررسی بهینه سازی شرایط استخراج عصاره از قارچ *گانودرما لوسیدوم* (*Ganoderma Lucidum*) بر میزان ترکیبات فنولیک و آنتی‌اکسیدانی آن به روش غرقابی انجام شد. **روش کار:** بدین منظور بررسی تاثیر سه متغیر نوع حلال (آب، متانول و ترکیب ۵۰/۵۰ درصد دوحلال)، زمان (۱۲، ۳۰ و۴۸ ساعت) و دما (۲۰، ۳۰ و ۴۰ درجه سانتی‌گراد) بر میزان استخراج ترکیبات فنلی و آنتی‌اکسیدانی (ارزیابی فعالیت مهار رادیکال آزاد (DPPH) از قارچ *گانودرما لوسیدوم* به روش غرقابی انجام شد. از روش سطح پاسخ به منظور طراحی تیمارها و بهینه‌سازی شرایط استخراج استفاده گردید. **نتایج:** بالاترین میزان فنل کل $21/08\ mg\ g^{-1}$ و حداکثر ترکیبات آنتی‌اکسیدانی (پایین‌ترین میزان IC50) $2/409\ mg\ ml^{-1}$ در عصاره استخراج شده از *گانودرما لوسیدوم* به روش غرقابی در شرایط زمانی ۴۸ ساعت، دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد و استفاده از حلال متانول مشاهده گردید. نتایج بهینه سازی تکی و همزمان با هدف دستیابی به حداکثر میزان فنل کل ($20/9944\ mg\ g^{-1}$) و پایین‌ترین میزان IC50 ($2/1128\ mg\ ml^{-1}$) از عصاره استخراج شده از *گانودرما لوسیدوم* متعلق به زمان استخراج ۴۸ ساعت، دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد و استفاده از حلال متانول بود. **نتیجه‌گیری نهایی:** شرایط بهینه برای دستیابی به حداکثر میزان ترکیبات فنلی و آنتی اکسیدانی استخراج شده از عصاره *گانودرما لوسیدوم* در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد و زمان ۴۸ ساعت و استفاده از حلال متانول می باشد.

واژگان کلیدی: استخراج، ترکیبات فنلی، روش غرقابی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، *گانودرما لوسیدوم*

مقدمه

از هزاران سال پیش گیاهان دارویی نقش بسیار مهمی در حفظ سلامتی و بهبود کیفیت زندگی انسان‌ها ایفا نموده‌اند که می‌توان به خاصیت ضدباکتریایی، ضد انگلی، ضد قارچی و آنتی‌اکسیدانی آن‌ها اشاره نمود(فاضلی نسب و همکاران ۲۰۱۷). گیاهان دارویی غنی از متابولیت‌های ثانویه و دارای مواد موثره اساسی بسیاری از داروها هستند (داوری و همکاران ۲۰۱۸). که طی سالیان گذشته متابولیت‌های ثانویه موجود در گیاهان، بدلیل دسترسی و کاربرد آسان و اثرات جانبی کمتر در مقایسه با فراورده‌های شیمیایی برای درمان اکثر بیماری‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند (فاضلی نسب و همکاران ۲۰۱۷). قارچ‌ها یکی از انواع گیاهان دارویی هستند که در طی سالیان اخیر علاقه محققین را به خود جلب نموده‌اند. قارچ‌ها به خاطر عطر و طعم منحصر به فرد خود به عنوان غذایی لذیذ در نظر گرفته می‌شدند و دارای تاریخچه‌ای طولانی در طب شرقی هستند.

قارچ *گانودرما لوسیدوم* قارچی یکساله از شاخه Basidiomycetes متعلق به کلاس Agaricomycetes ، راسته Ployporaceae و خانواده Ganodermataceae است (چن و همکاران ۲۰۱۷). این قارچ دارویی موثر از حدود ۲۰۰۰ سال پیش در کشورهای شرق آسیا شناخته شده است بطوریکه در کشور ژاپن موسوم به Reishi یا Mannetake (قارچ ده‌هزار ساله) و در کشورهای چین و کره به نام‌های Ling Chih، Ling Chu و Ling Zhi (قارچ فناناپذیر) شهرت دارد (روبرتس ۲۰۰٤).

خواص داروئی *گانودرما لوسیدوم* به دلیل وجود ترکیبات فعال زیستی و حائز اهمیتی مانند پلی ساکاریدها، استرول‌ها، اسیدهای آمینه، تری ترپنوئیدها، آلکالوئیدها، پروتئین‌ها و پپتیدها است (پتر سون ۲۰۰٦) به طوریکه تری‌ترپن‌ها و پلی‌ساکاریدها از مهمترین ترکیبات شیمیایی موجود در *گانودرما* هستند که بیشترین تحقیقات علمی بر روی آنها صورت گرفته است (استمتس ۲۰۰۰). گلوکان موجود در *گانودرما لوسیدوم* موجب تقویت سیستم ایمنی بدن می‌شود (ونگ و همکاران ۲۰۰۲). همچنین پلی‌ساکاریدهای موجود در *گانودرما لوسیدوم* دارای خواص آنتی‌اکسیدانی، ضدباکتریایی، ضدویروسی و محافظت‌کنندگی در برابر اشعه را دارا می‌باشند و پروتئین موجود در آن دارای فعالیت ضدتومور و ضد دیابت می باشد(گائو و همکاران ۲۰۰٤). *گانودرما لوسیدوم* حاوی انواع مختلفی از ترکیبات شامل کتون‌ها، استرها، لاکتون‌ها، الکل‌ها، اترها و هیدروکسی بنزن می‌باشد تسکین و همکاران ۲۰۱۳).

اسپور موجود در *گانودرما لوسیدوم* به تنهایی دارای کولین بتانین، اسیداستئاریک، اسیدپالمتیک، اسیدبهنیک تراکوزان، ارگوسترول و بتاسیتوسترول می‌باشد (چن و همکاران ۲۰۱٦). فعالیت آنتی‌اکسیدانی *گانودرما لوسیدوم* به دلیل وجود ترکیبات فنولی با خواص بیولوژیک بالا است (دیوتی و همکاران ۲۰۰۰ و کیم و همکاران ۲۰۰۸ و سالترلی و همکاران ۲۰۱۵).

بخش پلی فنلی *گانودرما لوسیدوم* عمدتا از فلاوونوئیدهایی مانند کوئرستین، روتین، میرسیتین، مورین، هیسپریدین و نارنجین تشکیل شده است (سالترلی و همکاران ۲۰۱۵ و ویلیجویک و همکاران ۲۰۱۷).

تسکین و همکاران (۲۰۱۳) میزان ترکیبات فنلی قارچ *گانودرما لوسیدوم* استخراج شده با دستگاه کروماتوگرافی گازی GC/MS[1] را ٤/۳٤ درصد از کل ترکیبات موجود در قارچ گزارش نمودند. به دلیل دارا بودن اثرات دارویی متعدد و موثر و همچنین ترکیبات بی‌نظیر موجود، قارچ *گانودرما لوسیدوم* مورد توجه

[1]. Gas Chromatography Mass Spectrometry

محققین قرار گرفته است (نقیبی و همکاران ۲۰۰۵). وننا سپو و همکاران (۲۰۱۱) به بررسی کاربرد *گانودرما لوسیدوم* در تولید سوسیس ماهی دودی پرداختند و بیان کردند که استفاده از گانودرما مرحله اکسیداسیون لیپید را به تاخیر می‌اندازد. لی و همکاران (۲۰۱۱) به بررسی ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی ماست حاوی *گانودرما لوسیدوم* پرداختند و بیان کردند که نمونه‌های حاوی *گانودرما* دارای پلی‌ساکارید و باکتری‌های اسیدلاکتیک با محتوای ویسکوزیته و استالدئید بالاتری نسبت به نمونه شاهد می‌باشد. سا و همکاران (۲۰۱۵)، در بررسی عصاره پروتئینی *گانودرما لوسیدوم* دریافتند که *گانودرما لوسیدوم* دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی و ضدباکتریایی است. قبادی و همکاران (۲۰۱۸) در بررسی اثر جایگزینی ۰/۵ درصد وزنی – وزنی پودر *گانودرما لوسیدوم* بجای نیتریت در نمونه های سوسیس، دریافتند که *گانودرما لوسیدوم* به عنوان یک گیاه دارویی در افزایش خاصیت آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی نمونه‌های سوسیس بسیار موثر عمل نمود.

از روش‌های مختلفی برای استخراج عصاره‌های گیاهی مانند فراصوت، مایکروویو، سیال فوق بحرانی و غرقابی استفاده می شود که هر کدام از روشهای فوق‌الذکر، در استخراج ترکیبات گیاهی دارای توانایی متفاوتی هستند که به نمونه، نوع حلال مصرفی و شرایط استخراج وابسته است. در روش غرقابی در مدت زمانی‌که محلول با نمونه در تماس است، انتقال جرم ترکیب موردنظر از نمونه به حلال مصرفی صورت می‌گیرد. همچنین استخراج وابسته به اندازه ذرات و خصوصیات بافت گیاهی می‌باشد. راندمان استخراج در روش غرقابی نسبت به روش‌های جدید استخراجی، عموما بالاتر و احتمال آسیب حرارتی نیز در این روش پائین‌تر است (ونگ و همکاران ۲۰۰۲).

با توجه به مطالب فوق، هدف کلی از این پژوهش، بهینه‌سازی شرایط استخراج عصاره از قارچ *گانودرما لوسیدوم*(*Ganoderma Lucidum*) بر میزان ترکیبات فنولیک و آنتی‌اکسیدانی آن به روش غرقابی بود.

مواد و روش‌ها

مواد

قارچ *گانودرما لوسیدوم*(*Ganoderma Lucidum*) از بخش گیاهان داروئی دانشگاه تهران تهیه شد. حلال متانول ۱۰۰ درصد از شرکت پارس شیمی، ایران خریداری شد. معرف فولین سیو کالتو[۱] از شرکت Merk،(آلمان) و گالیک اسید، معرف دی فنیل پیکریل هیدرازین و کربنات سدیم از شرکت Sigma ،(آمریکا) تهیه گردید.

تهیه عصاره *گانودرما لوسیدوم* به روش استخراج غرقابی

استخراج عصاره از *گانودرما لوسیدوم* با استفاده از روش شون و همکاران (۲۰۰۷) با اندکی اصلاح و به شرح زیر انجام شد. ۲۰ گرم نمونه پودرخشک شده *گانودرما* با نسبت ۱ به ۵ با حلال های مورد نظر (متانول، آب، ترکیب ۵۰/۵۰ درصد حلال متانول و آب) مطابق با جدول تیمارها(جدول شماره یک) به حجم رسانده شدند. سپس مخلوطهای بدست آمده روی همزن مغناطیسی (RKI مدل RHB) قرار گرفتند و دماها (۲۰، ۳۰ و ٤٠ درجه سانتی‌گراد) و زمان‌های (۱۲، ۳۰ و ٤٨ ساعت) استخراج مطابق با جدول تیمارها برای آنها فراهم گردید. پس از طی زمان استخراج، عصاره‌ها با کاغذ صافی واتمن شماره یک صاف شدند و عصاره‌های حاصل از حلال های آلی ابتدا توسط تبخیرکننده چرخشی (مدل EKA overy 10) تحت دمای ٤٠ درجه سانتی‌گراد و سپس با خشک‌کن انجمادی (FDB 5503 operun) تحت دمای ۵۰- درجه سانتی‌گراد خشک شدند.

---

۱. Folin cio calto

اندازه گیری مقدار کل ترکیبات فنلی عصاره

مقدار کل ترکیبات فنلی عصاره *گانودرما لوسیدوم* به روش فولین‌سیوکالتو اندازه‌گیری شد. در این روش معرف فولین در حضور ترکیبات فنولی در محلول قلیایی احیا شده و رنگ آبی در محلول تولید می‌کند. شدت رنگ را میتوان در طول موج ۷٦٥ نانومتر توسط دستگاه طیف‌سنج‌نوری تعیین نمود. پس از تهیه عصاره‌ها، یک گرم از عصاره‌های به دست آمده ، به حجم ۱۰ میلی لیتر رسانده شد و سپس ٥ میکرولیتر از عصاره‌های رقیق شده در لوله های آزمایش مجزا ریخته شد. به محتوای هر لوله آزمایش یک میلی لیتر از معرف فولین سیو کالتو و ۰/۸میلی لیتر محلول کربنات سدیم ۷/٥٪ افزوده و به خوبی مخلوط گردید. پس ازگذشت یک ساعت در دمای اتاق، جذب آن درطول موج ۷٦٥ نانومتر خوانده شد. از روی معادله منحنی درجه‌بندی برای اسید گالیک به عنوان استاندارد، مقدار کل ترکیبات فنولیک بر مبنای اسید گالیک بر حسب میلی‌گرم و ترکیبات فنولی بر حسب گرم وزن خشک تعیین گردید (فرنگ و همکاران ۱۹۸۹).

ارزیابی فعالیت مهار رادیکال آزاد با دی فنیل پیکریل هیدرازین (DPPH)

توانایی دادن اتم هیدروژن یا الکترون توسط *گانودرما* از طریق بی رنگ شدن محلول اتانولی DPPH اندازه‌گیری شد. ۲و۲دی‌فنیل-۱- پیکریل هیدرازیل یک ترکیب رادیکالی پایدار با رنگ بنفش بوده که با احیا شدن توسط عناصر دهنده الکترون یا هیدروژن (ترکیبات آنتی‌اکسیدانی) به دی فنیل پیکریل هیدرازین زرد رنگ تبدیل می‌شود. بدین منظور ۵۰ میکرولیتر از عصاره آماده شده با ۱۰۰۰ میکرولیتر محلول متانولی ۰/۱۳٥ میلی مولار DPPH مخلوط شدند. نمونه‌های شاهد تمام مراحل استخراج را بدون افزودن نمونه طی نمودند. سپس نمونه‌ها به مدت یک دقیقه تکان داده شدند و به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی قرار داده شدند و جذب نمونه‌ها توسط دستگاه اسپکتروفتومتر مدل L 800 آکوالیتیک، آلمان در طول موج ٥۱۷ نانومتر قرائت شد و درصد مهار شدن رادیکال‌های آزاد با استفاده از فرمول یک محاسبه گردید (یائو و همکاران ۲۰۱۳).

جدول ۱- متغیرهای مستقل و سطوح آنها به منظور استخراج عصاره از *گانودرما لوسیدوم*

Table 1-Independent variables and their levels to extract from the *Ganoderma Lucidum*

Independent variables	Units	Symbol	Coded levels		
			-1	0	+1
Solvent type [a]	.....	A	1	2	3
Temperature	°C	B	20	30	40
Time	h	C	12	30	48

[a] Solvent type:1) Water: 100%, 2) Methanol:100%, 3) Water/Methanol: 50/50.

فرمول [۱]

$$\text{Percentage inhibition of DPPH} = \frac{(\text{Percentage of blank absorption} - \text{Percentage of sample absorption})}{\text{Percentage of blank absorption}} \times 100$$

جهت بررسی بهتر فعالیت آنتی‌رادیکالی از فاکتور IC_{50} که بیان‌کننده میزان نمونه مورد نیاز برای بازدارندگی ۵۰ درصدی رادیکال‌های آزاد است، استفاده شد. IC_{50} کمتر نشان‌دهنده پتانسیل آنتی‌اکسیدانی بیشتر (غلظت کمی از نمونه قادر به جلوگیری میزان زیادی از رادیکال‌های آزاد است) می‌باشد (خلیلی و ابراهیم‌زاده ۲۰۱٥).

تجزیه تحلیل داده ها

طراحی تیمارها مطابق با روش سطح پاسخ مدل باکس بنکن برای سه متغیر مستقل نوع حلال، زمان و دمای

استخراج انجام گرفت. بنابراین ۱۵ تیمار مطابق با جدول شماره یک طراحی شد و ترکیبات فنلی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی آنها مورد ارزیابی قرار گرفت. به منظور تجزیه و تحلیل داده ها و دستیابی به شرایط بهینه استخراج عصاره از *گانودرما لوسیدوم* با هدف دستیابی به حداکثر ترکیبات فنلی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی از روش آماری سطح پاسخ باکس بنکن در نرم افزار مینی‌تب ۱۶ مورد استفاده قرار گرفت.

نتایج و بحث

میزان ترکیبات فنلی و IC 50 عصاره استخراج شده از *گانودرما لوسیدوم* در شرایط مختلف

میزان فنل کل و IC 50 عصاره استخراج شده از *گانودرما لوسیدوم* و مقادیر پیش‌بینی شده در شرایط مختلف در جدول ۲ گزارش شده است. با توجه به نتایج جدول۲، مشاهده شد که شرایط متفاوت استخراج (دما، زمان و نوع حلال) تاثیر معناداری بر میزان کل ترکیبات فنلی و آنتی‌اکسیدانی عصاره استخراج شده از *گانودرما لوسیدوم* داشت. بطوری‌که میزان کل ترکیبات فنلی عصاره استخراج شده از *گانودرما لوسیدوم* در محدوده ۷/۲۴۴ تا ۲۱/۰۸۹ $mg\ g^{-1}$ و IC 50 در محدوده $mg\ ml^{-1}$ ۲/۴۰۹ تا ۸/۳۶۹ متغیر بود. نتایج نشان داد با افزایش دما (۲۰ به ۴۰ درجه سانتی‌گراد)، زمان استخراج (۱۲به ۴۸ ساعت) و استفاده از حلال متانول نسبت به استفاده از حلال آب و مخلوط ۵۰/۵۰ آب و متانول، اثر معنی‌داری ($P\leq$۰/۰۵) بر افزایش میزان استخراج کل ترکیبات فنلی و کاهش میزان IC50 از *گانودرما لوسیدوم* داشت.

بالاترین میزان کل ترکیبات فنلی عصاره استخراج شده از *گانودرما لوسیدوم* $mg\ g^{-1}$ ۲۱/۰۸۹ در دمای ۴۰درجه سانتی‌گراد، زمان استخراج ۴۸ ساعت توسط حلال متانول و کمترین میزان ترکیبات فنلی استخراج شده $mg\ g^{-1}$ ۷/۲۴۴ در دمای ۳۰درجه سانتی‌گراد، زمان استخراج ۱۲ساعت توسط حلال آب مشاهده گردید.

بالاترین درصد IC50 در عصاره استخراج شده از *گانودرما لوسیدوم* $mg\ ml^{-1}$ ۸/۳۶۹ در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد، زمان استخراج ۳۰ ساعت توسط حلال آب و پایین‌ترین میزان IC 50 در عصاره استخراج شده از *گانودرما لوسیدوم* $mg\ ml^{-1}$ ۲/۴۰۹ در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد و زمان استخراج ۴۸ ساعت توسط حلال متانول به دست آمد.

در گیاهان ترکیباتی وجود دارد که دارای ساختار گوناگونی هستند. استخراج ترکیبات موجود در گیاهان به عوامل متعددی وابسته است که مهمترین آن، نوع حلال و روش استخراج است (خلیلی و ابراهیم‌زاده ۲۰۱۵).

فنول‌ها ترکیباتی هستند که دارای یک یا بیشتر از یک گروه هیدروکسیل دارند که به یک حلقه آروماتیک (غیرقطبی) متصل شده‌اند که این ساختمان فضایی، فنول‌ها را مطابق با قطبیت‌شان متمایز می‌کند. بنابراین حلالیت فنول‌ها در حلال، می‌تواند به وسیله ساختمان فضایی (قطبی و غیرقطبی) و نیروی بین‌ملکولی (پیوند هیدروژنی) که بین آنها با حلال ایجاد می‌شود توضیح داده شود (گالانکیس و همکاران ۲۰۱۳).

آب با وجود قطبیت بالا نسبت به حلالهای متانول، آب-متانول، ترکیبات فنلی کمتری استخراج نمود. علت این تفاوت می تواند به دلیل حل شدن پروتئین‌ها، پلی‌ساکاریدها و دیگر ترکیبات قطبی طی فرایند استخراج در آب باشد که موجب کاهش درجه خلوص عصاره استخراج شده و در نتیجه ترکیبات فنولی آن باشد (گیلانی و همکاران ۲۰۱۷).

در تایید نتایج حاصل از این تحقیق بهرامیان و همکاران (۲۰۱۲) میزان استخراج ترکیبات فنلی در عصاره آلوی(بخارا، طرقبه، شمس و تبریزی) تحت تاثیر حلال‌های(متانول، اتانول، استون و آب) را بررسی نمودند و نتایج نشان داد در بین حلال‌های مورداستفاده، بیشترین میزان استخراج در تمام نمونه‌ها مربوط به متانول و کم‌ترین میزان مربوط به آب بود.

ولی‌خواه و همکاران(۲۰۰۸) اعلام کردند در تعیین ویژگیهای آنتی‌اکسیدانی عصاره، یکی از فاکتورهای مهم، روند استخراج ترکیبات فنولی است بطوریکه زمان عصاره‌گیری، نوع حلال، دما و روش استخراج تاثیر بسیاری در محتویات عصاره خواهد گذاشت.

ترکیبات فنولی که توزیع گسترده‌ای در بسیاری از گیاهان دارند، دارای خواص آنتی‌اکسیدانی می‌باشند. ویژگیهای آنتی‌اکسیدانی این ترکیبات عمدتا ناشی از قدرت احیاکنندگی و ساختار شیمیایی است که آنها را قادر به خنثی کردن رادیکال‌های آزاد تشکیل کمپلکس با یون‌های فلزی و خاموش‌کردن مولکول‌های اکسیژن یگانه و سه‌گانه می‌سازد. ترکیبات فنلی از طریق اهداء الکترون به رادیکال‌های آزاد واکنش‌های اکسایش چربی را مهار می‌کنند (احمدی و همکاران ۲۰۰۷). نتایج نشان داد قدرت ترکیبات آنتی‌اکسیدانی *گانودرما لوسیدوم* با افزایش زمان و دمای استخراج، افزایش یافت. با افزایش میزان قدرت ترکیبات آنتی‌اکسیدانی و همراه با افزایش غلظت، میزان ترکیبات فنولی کل افزایش یافته که این توانایی بستگی به تعداد حلقه‌های آروماتیکی و ماهیت گروههای هیدروکسیل دارد. بطوری‌که در غلظت‌های بیشترترکیبات فنولی به علت افزایش تعداد گروههای هیدروکسیل، میزان مهارکنندگی عصاره افزایش می‌یابد (بابا و ملیک ۲۰۱٤).

رودریگز و همکاران (۱۹۹٤) در تحقیقی استخراج ترکیبات فنلی را از پوست سیب‌زمینی با استفاده از حلال متانول و آب بررسی کردند و دریافتند که میزان استخراج ترکیبات فنلی با حلال متانولی در دمای ٤ درجه سلسیوس در مقایسه با استخراج آبی در دمای ۲۵درجه سلسیوس بیشتر بود. چی‌انگ و همکاران(۲۰۰۳) در استخراج ترکیبات فنلی از قارچ خوراکی با استفاده از ٤ نوع حلال (آب، متانول، اتیل استات و پترولیوم‌اتر) گزارش کردند که عصاره آبی بیشترین مقدار ترکیبات فنلی را استخراج کرد.

نتایج جدول ۲ نشان داد اختلاف معنی‌داری بین مقادیر تجربی و پیش‌بینی شده عصاره استخراج شده از *گانودرما لوسیدوم* مشاهده نگردیده است ($P>۰/۰۵$).

جدول ۲- مقایسه بین میزان فنل کل و IC 50 عصاره استخراج شده از *گانودرما لوسیدوم* آزمون شده با پیش‌بینی شده در شرایط مختلف

Table 2-Comparison between the yields of *Ganoderma Lucidum* extracted from the tested with predicted in different conditions

Run	Variable Levels[a]			TPC[b](mg g^{-1})		IC 50(mg ml^{-1})	
	A[c]	B	C	Observed	Predicted	Observed	Predicted
1	2	30	30	21.000	20.741	2.555	2.679
2	3	30	48	14.600	14.592	3.327	3.393
3	2	40	12	19.600	20.133	2.803	2.756
4	2	20	48	21.000	20.467	2.714	2.761
5	2	30	30	20.778	20.741	2.683	2.679
6	1	40	30	10.756	10.214	7.230	7.343
7	1	20	30	7.822	7.719	8.369	8.139
8	2	30	30	20.444	20.741	2.800	2.679
9	1	30	12	7.244	7.253	8.357	8.291
10	3	30	12	13.978	13.342	4.243	4.060
11	1	30	48	8.733	9.369	7.700	7.883
12	2	40	48	21.089	20.994	2.409	2.113
13	3	20	30	13.978	14.519	3.636	3.524
14	2	20	12	17.867	17.961	2.895	3.191
15	3	40	30	14.622	14.725	3.007	3.237

[a] A, Solvent type; B, Temperature (h); C, Time

[b] Total phenolic compound was expressed in mg GAE per 100 g

[c] Solvent type: 1) Water: 100%, 2) Methanol:100%, 3) Water/Methanol: 50/50.

معادله خط عصاره استخراج شده از *گانودرما لوسیدوم* در شرایط مختلف

تجزیه و تحلیل واریانس مدل سطح پاسخ بر روی این مدل چندجمله‌ای درجه دوم انجام شد که نتایج آن در جدول ۳ نشان داده شده است. همانطور که در این جدول مشاهده می‌گردد مقدار ضریب تبیین این مدل(R^2) برای استخراج ترکیبات فنلی از *گانودرما لوسیدوم* در شرایط مختلف، ۹۹/٤۱ درصد و ضریب تبیین اصلاح شده آن (R^2-Sq(adj)، ۹۸/۳٦ درصد و مقدار ضریب تبیین این مدل (R^2) برای IC 50 در شرایط مختلف ۹۹/٤٤ درصد و ضریب تبیین اصلاح شده آن (R^2-Sq(adj)، ۹۸/٤۳ درصد تعیین شد که نشان‌دهنده برازش خوب مدل به داده‌های آزمایشی است.

جدول۳- مدل رگرسیونی برای متغیرهای وابسته توسط مدل سطح پاسخ

Table 3- Regression model for dependent variables by response surface model

Source	Model	R^2	R^2- adj
TPC[a]	20.7407 +2.8278A + 0.6750B+ 0.8417C -8.8481A^2-0.0981B^2 -0.7537C^2 -0.5722AB-0.2167AC -0.4111BC	99.41	98.36
IC 50	2.67917-2.18025A -0.27079B-0.26848C +3.04145A^2-0.16007B^2 + 0.18614C^2 +0.12746AB-0.06474AC -0.05318BC	99.44	98.43

[a] TPC: Total phenolic compound

A, Solvent type; B, Temperature (h); C, Time

نتایج آنالیز واریانس عصاره استخراج شده از *گانودرما لوسیدوم* در شرایط مختلف

طبق جدول ٤، اثرات خطی هر سه متغیر دما، زمان و نوع حلال و اثر مربعی نوع حلال **(C^2)** بر میزان استخراج کل ترکیبات فنلی و IC 50 از *گانودرما لوسیدوم* معنی‌دار بود ($P\leq$۰/۰۵) ولی اثرات مربعی دما و زمان استخراج و اثرات متقابل دما، زمان استخراج و نوع حلال بر میزان استخراج کل ترکیبات فنلی و IC 50 از *گانودرما لوسیدوم* معنی‌دار نبود ($P>$ ۰/۰۵)

جدول ۴- نتایج آنالیز واریانس میزان فنل کل و IC 50 عصاره استخراج شده از *گانودرما لوسیدوم* در شرایط مختلف

Table 4-Results of analysis variance of TPC and IC 50 extract of *Ganoderma Lucidum* in different condition

Source	Total Phenolic Compounds		IC 50	
	F-value	P-value	F-value	P-value
Regression	94.07	0.000*	98.69	0.000*
Linear effect	56.53	0.000*	156.76	0.000*
A	148.05	0.000*	456.32	0.000*
B	8.44	0.034*	7.04	0.045*
C	13.12	0.015*	6.92	0.047*
Square effect	224.01	0.000*	138.93	0.000*
A^2	669.00	0.000*	409.85	0.000*
B^2	0.08	0.786	1.14	0.335
C^2	4.85	0.079	1.54	0.270
Interaction effect	1.68	0.286	0.37	0.777
A×B	3.03	0.142	0.78	0.418
A×C	0.43	0.539	0.20	0.673
B×C	1.56	0.266	0.14	0.728
Lack-of-Fit	8.54	0.107	8.58	0.106

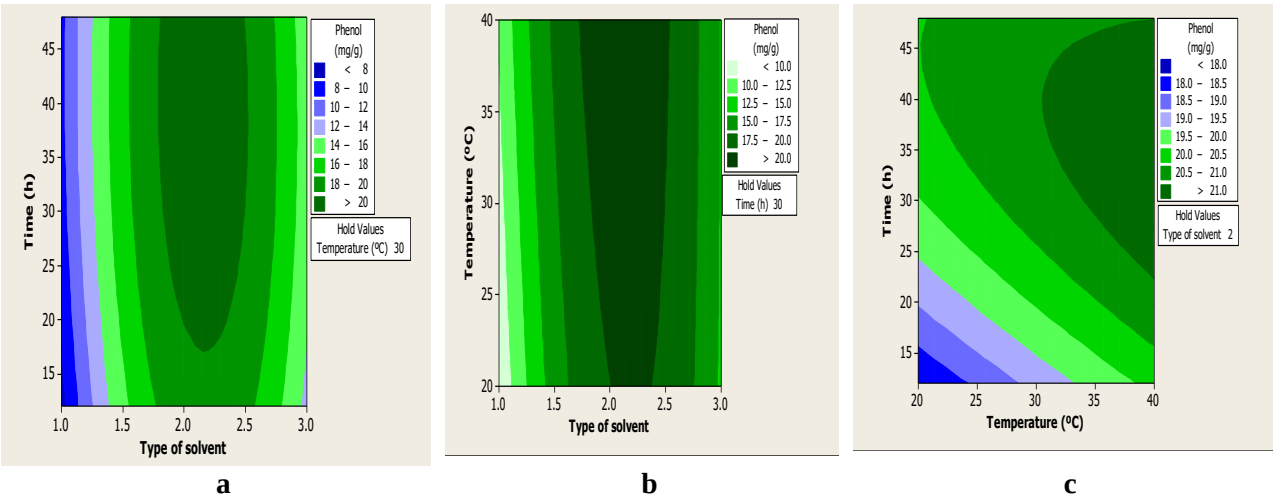
*significant difference ($P\leq$0.05)

A, Solvent type; B, Temperature (h); C, Time

اثرات متقابل بر میزان کل ترکیبات فنلی عصاره استخراج شده از *گانودرما لوسیدوم* در شرایط مختلف اثرات متقابل بر میزان کل ترکیبات فنلی در شکل ۱ نشان داده شده است. شکل a -1، اثرات متقابل زمان× نوع حلال بر میزان کل ترکیبات فنلی عصاره استخراج شده از *گانودرما لوسیدوم* در شرایطی که دمای استخراج در ۳۰ درجه سانتی‌گراد ثابت نگه‌داشته شد را نشان می‌دهد. مطابق شکل مذکور، با افزایش زمان استخراج، میزان کل ترکیبات فنلی افزایش پیدا کرد. به‌طوری که میزان کل ترکیبات فنلی $20\ mg\ g^{-1}$ و بالاتر از آن درزمان استخراج ۱۷ تا ٤٨ساعت در دمای ثابت ۳۰درجه سانتی‌گراد مشاهده گردید.

شکل b -1، اثرات متقابل نوع حلال× دمای استخراج بر میزان کل ترکیبات فنلی عصاره استخراج شده از *گانودرما لوسیدوم* در شرایطی که زمان استخراج در ۳۰ساعت ثابت نگه‌داشته شد را نشان می‌دهد. مطابق شکل مذکور، با افزایش دما و استفاده از حلال متانول میزان کل ترکیبات فنلی بیشتری از *گانودرما لوسیدوم* استخراج می‌گردد. به‌طوری که میزان کل ترکیبات فنلی $20\ mg\ g^{-1}$ و بالاتر از آن در دمای ۲۰ تا ٤٠ درجه سانتی‌گراد و استفاده از حلال متانول در زمان استخراج ثابت ۳۰ساعت مشاهده گردید.

شکل c -1، اثرات متقابل زمان× دما بر میزان کل ترکیبات فنلی عصاره استخراج شده از *گانودرما لوسیدوم* در شرایطی که نوع حلال متانول ثابت نگه‌داشته شد را نشان می‌دهد. مطابق شکل مذکور، با افزایش زمان و دمای استخراج میزان کل ترکیبات فنلی بیشتری از *گانودرما لوسیدوم* استخراج می‌گردد. به‌طوری که میزان کل ترکیبات فنلی $21\ mg\ g^{-1}$ و بالاتر از آن در دمای ۳۲ تا ۳٤ درجه سانتی‌گراد ، زمان استخراج ۲۵تا٤٨ ساعت و استفاده از حلال متانول به صورت ثابت مشاهده گردید. فاکتور زمان، مدت انتقال جرم را افزایش می‌دهد. بنابراین روند صعودی استخراج ترکیبات فنلی از قارچ *گانودرما لوسیدوم* با افزایش زمان باتوجه به نمودار سطح پاسخ کاملا منطقی به نظر می‌رسد.



a **b** **c**

شکل ۱- اثرات متقابل کل ترکیبات فنلی عصاره از *گانودرما لوسیدوم*: a) نوع حلال × زمان استخراج b)نوع حلال × دما c) زمان × دما

Fig 1- Contour plots of interaction on phenolic compound extract of *Ganoderma Lucidum* between (a) time and solvent type (b) solvent type and temperature (c) time and temperature

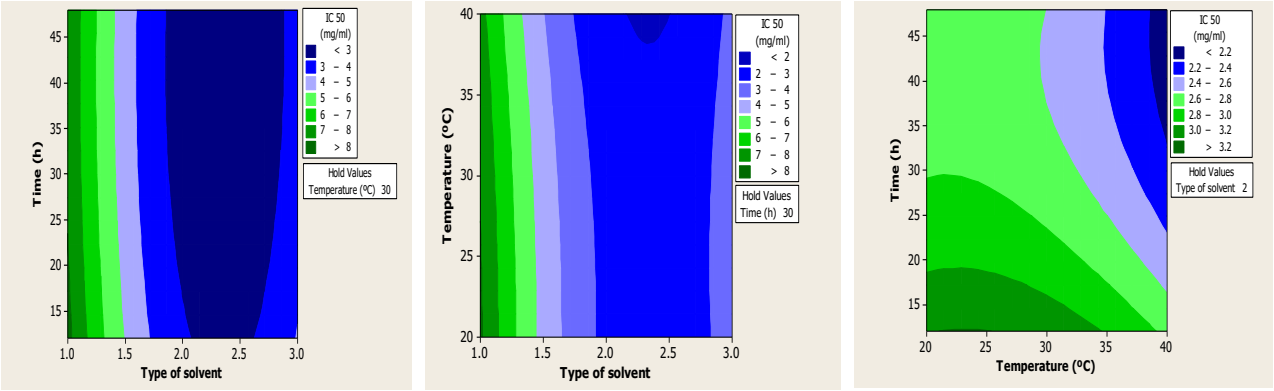
اثرات متقابل بر میزان IC 50 عصاره استخراج شده از *گانودرما لوسیدوم* در شرایط مختلف

در شکل ۲ اثرات متقابل بر میزان IC 50 نشان داده شده ا ست. شکل۲-a، اثرات متقابل زمان× نوع حلال بر

میزان ترکیبات آنتی‌اکسیدانی در صورت استفاده از حلال متانول را نشان می‌دهد. مطابق شکل مذکور ، ترکیبات آنتی‌اکسیدانی بیشتری از *گانودرما لوسیدوم* استخراج می‌گردد و میزان IC 50، $3\ mg\ ml^{-1}$ و کمتر از آن در زمان استخراج ۱۲ تا ٤٨ ساعت در دمای ثابت ۳۰درجه سانتی‌گراد مشاهده گردید.

شکل۲- b، اثرات متقابل نوع حلال× دمای استخراج بر میزان ترکیبات آنتی‌اکسیدانی استخراج شده از *گانودرما لوسیدوم* در شرایطی که زمان استخراج در ۳۰ ساعت ثابت نگه‌داشته شد را نشان می‌دهد. مطابق شکل مذکور، با افزایش قدرت آنتی‌اکسیدانی میزان IC 50 ، $mg\ ml^{-1}$ ۲ و پایین‌تر از آن دردمای استخراج ۳۸ تا ٤٠ درجه سانتی‌گراد مشاهده گردید.

شکل۲- c، اثرات متقابل زمان× دمای استخراج بر میزان ترکیبات آنتی‌اکسیدانی عصاره استخراج شده از *گانودرما لوسیدوم* در شرایطی که نوع حلال متانول ثابت نگه‌داشته شد را نشان می‌دهد. مطابق شکل مذکور، با افزایش قدرت فراصوت میزان ترکیبات آنتی‌اکسیدانی بیشتری از گانودرما *لوسیدوم* استخراج می‌گردد به‌طوری که مقادیر IC 50 کمتر از $2/2\ mg\ ml^{-1}$ در عصاره استخراج شده و در دمای ۳۸ تا ٤٠ درجه سانتی‌گراد و زمان استخراج ۳۳تا ٤٨ ساعت و استفاده از حلال متانول به صورت ثابت مشاهده گردید.



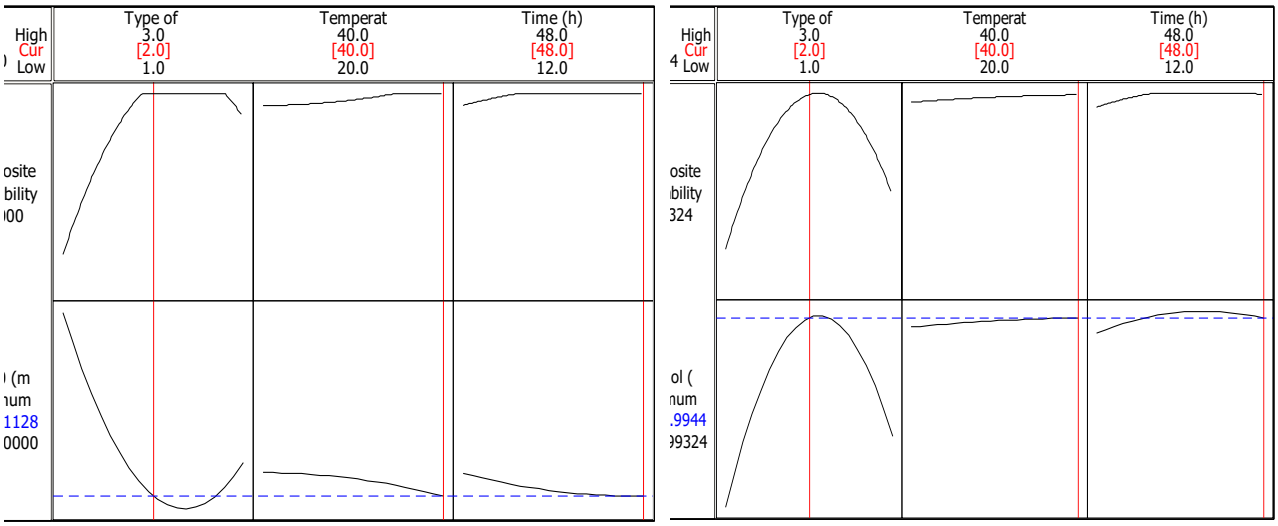
a **b** **c**

شکل ۲- اثرات متقابل بر میزان IC 50 عصاره از *گانودرما لوسیدوم*: a)نوع حلال × زمان استخراج b)نوع حلال × دما c) زمان × دما

Fig 2- Contour plots of interaction on IC 50 extract of *Ganoderma Lucidum* between (a) time and solvent type, (b) solvent type and temperature (c) time and temperature

شرایط بهینه بهینه‌سازی تکی کل ترکیبات فنلی و IC 50 از *گانودرما لوسیدوم*

مطابق با شکل۳-a، پیش‌بینی شد حداکثر میزان کل ترکیبات فنلی عصاره استخراج شده از *گانودرما لوسیدوم* $20/9944\ mg\ g^{-1}$ با ۹۹/۳۲ درصد مطلوبیت متعلق به زمان استخراج ٤٨ساعت، دمای ٤٠ درجه سانتی‌گراد و استفاده از حلال متانولی باشد. نتایج پیش‌بینی شده توسط آزمایشات تاییدی با دو بار تکرار انجام شد و اختلاف معنی‌داری بین مقادیر پیش‌بینی شده و واقعی مشاهده نگردید. مطابق با شکل ۳-b ، پیش‌بینی شد حداکثر میزان ترکیبات آنتی‌اکسیدانی عصاره استخراج شده از *گانودرما لوسیدوم* که قادر به مهار رادیکال‌های آزاد هستند $2/1128\ mg\ ml^{-1}$ با ۱۰۰درصد مطلوبیت متعلق به زمان استخراج ٤٨ ساعت، دمای ٤٠ درجه سانتی‌گراد و استفاده از حلال متانولی باشد. نتایج پیش‌بینی شده توسط آزمایشات تاییدی با دو بار تکرار انجام شد و اختلاف معنی‌داری بین مقادیر پیش‌بینی شده و واقعی مشاهده نگردید.

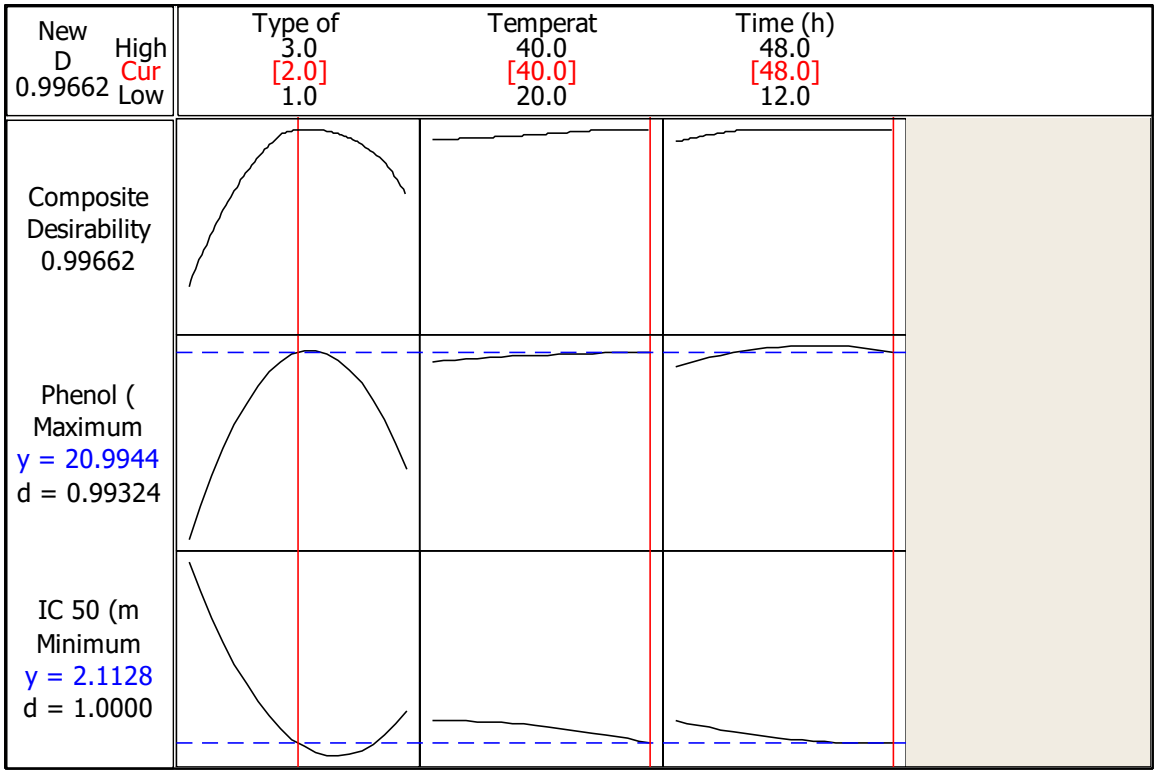


شکل ۳- بهینه‌سازی تکی ترکیبات فنلی و IC 50 از *گانودرما لوسیدوم*

Fig 3- Single optimum conditions for a (Total phenolic compound b) IC 50 from *Ganoderma Lucidum*

بهینه سازی همزمان فنل کل و IC 50 عصاره استخراج شده از *گانودرما لوسیدوم*

شکل ٤ نمودار بهینه یا اپتیمم فنل کل و IC 50 عصاره استخراج شده از *گانودرما لوسیدوم* را نشان می‌دهد. همانطور که مشاهده می‌شود، پیش‌بینی شد شرایط بهینه استخراج عصاره از *گانودرما لوسیدوم* به روش غرقابی برای دستیابی به حداکثر کل ترکیبات فنلی و حداقل میزان IC 50 به‌صورت همزمان با ۹۹/٦٦۲ درصد مطلوبیت در زمان استخراج ٤٨ ساعت، دمای استخراج ٤٠ درجه سانتی‌گراد و استفاده از حلال متانول باشد که میزان فنل کل ۲۰/۹۹٤٤ mg g^{-1} و میزانIC50، ۲/۱۱۲۸ mg ml^{-1} به‌دست آمده بود. نتایج پیش‌بینی شده توسط آزمایشات تاییدی با دو بار تکرار انجام شد و اختلاف معنی‌داری بین مقادیر پیش‌بینی شده و واقعی مشاهده نگردید.



شکل ۴- شرایط بهینه همزمان فنل کل و IC 50 پیش‌بینی شده عصاره استخراج شده از *گانودرما لوسیدوم*

Fig 4- Simultaneous optimization condition of total phenolic compound and IC 50 predicted of extract from *Ganoderma Lucidum*

نتیجه‌گیری

این پژوهش با هدف بررسی شرایط بهینه استخراج ترکیبات فنلی و آنتی اکسیدانی از عصاره *گانودرما لوسیدوم* صورت گرفت. نتایج نشان داد پارامترهای دما، زمان و نوع حلال اثر معنی‌داری بر استخراج میزان ترکیبات فنلی و آنتی اکسیدانی از عصاره *گانودرما لوسیدوم* داشت. مطابق با نتایج،با افزایش دما و زمان و استفاده از حلال متانولی، میزان استخراج ترکیبات فنلی افزایش یافت. نتایج نشان داد شرایط بهینه برای دستیابی به حداکثر میزان ترکیبات فنلی و آنتی اکسیدانی استخراج شده از عصاره *گانودرما لوسیدوم* در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد و زمان ۴۸ ساعت و استفاده از حلال متانول می باشد. نتایج این پژوهش اثبات کرد با بهینه سازی شرایط استخراج *گانودرما لوسیدوم* می‌توان به میزان بالاتری از ترکیبات موثره آن دست یافت. همچنین روش سطح پاسخ می‌تواند روشی موثر برای بهینه سازی شرایط استخراج ترکیبات موثره از *گانودرما لوسیدوم* باشد.

منابع مورداستفاده

Ahmadi F, Kadivar M and Shahedi M, 2007. Antioxidant activity of Kelussia odoratissima Mozaff, in model and food systems. Food Chemistry 105: 57-64.

Baba SA and Malik SA, 2015. Determination of total phenolic and flavonoid content antimicrobial and antioxidant activity of a root extract of Arisaema jacquemontii Blume. Journal of Taibah University for Science 9: 449-54.

Bahramiyan F, Ghiassi Tarzi B, Yaghmaei S and Bahonar A, 2012. Extraction of plum phenolic Compounds Using Different solvents, The Antimicrobial Effect of the Extracts on the growth of E. coli and S. aureus. Food Technology & Nutrition 1(9): 73-80.

Chen RY, Kang J and Du GH, 2016. Construction of the quality control system of Ganoderma Products. Edible and medicinal mushrooms 24(6):339–344.

Chen B, Ke B, Ye L, Jin S, Jie F, Zhao L and Wu X, 2017. Isolation and varietal characterization of Ganoderma resinaceum from areas of Ganoderma lucidum production in China. Scientia Horticulturae 224:109-114.

Cheung LM, Cheung P.C.K and Ooi V.E.C, 2003. Antioxidant activity and total phenolices of edible mushroom extracts. Food Chemistry 81(2): 249-255.

Davari A, Solouki M and Fazelinasab B, 2018. Effects of jasmonic acid and titanium dioxide nanoparticles on process of changes of phytochemical and antioxidant in genotypes of Satureja hortensis L. Eco Phytochem Journal of Medical Plants 5: 1-20.

Duthie GG, Duthie SJ and Kyle A, 2000. Plant polyphenols in cancer and heart disease: implications as nutritional antioxidants. Nutrition Research Reviews 13(1):79-106.

Farang RS, Badei AZMA, Hewedi, F.M and El-Baroty G.S.A, 1989. Antioxidant activity of some spice essential oils on linolenic acid oxidation in aqueous media. Journal of the American Oil Chemists Society 66(6):792-799.

Fazelinasab B, Rahnama M and Mazarei A, 2017.Correlation between Antioxidant Activity and Antibacterial Activity of Nine Medicinal Plant Extracts. Journal Mazandaran Uni Med Sci 27(149): 63-78.

- Galanakis CM, Goulas V, Tsakona S, Manganarisl GA and Gekas V, 2013. A knowledge base for the recovery of natural phenols with different solvents. International Journal of Food Properties 16(2):382-396.

Gao Y, Lan J, Dai X, YE J and Zhou S, 2004. A phase1/2 study of Ling Zhi mushroom Ganoderma Lucidum (W. curt:Fr) Lioyd (Aphyllophoromycetideae) extract in patients with type 2 diabetes mellitus. International Journal of Medicinal Mushrooms 6(1):33-39.

Gillani F, Z Raftani Amiri and Esmailzadeh kenari R, 2017. The effect of different solvents and ultrasound on antioxidant properties of extract of Cornus mas L. fruit. Iranian Food Science and Technology Research Journal 13(4): 517-527.

Ghobadi R, Mohammadi R, Chabavizade J and Sami M, 2018. Effect of Ganoderma lucidum Powder on Oxidative Stability, Microbial and Sensory Properties of Emulsion Type Sausage. Advanced Biomedical Research 7:24.

Khalili M and Ebrahimzadeh M.A, 2015. A review on antioxidants and some of their common evaluation methods. Journal of Mazandaran University of Medical Sciences 24(120):188-208.

Kim MY, Seguin P, Ahn JK, Kim JJ, Chun SC, Kim EH, Seo SH, Kang EY, Kim SL, Park YJ, Ro HM and Chung I.M, 2008. Phenolic compound concentration and antioxidant activities of edible and medicinal mushrooms from Korea. Journal of Agricultural and Food Chemistry 56(16):7265-7270.

Li J, Chen W, Li XY and Cheng F,2011. Ganoderma yogurt and changes in colonies, physical and chemical properties during storage. *China Dairy Industry* 5:18.

Naghibi F, Mossddegh M, MohammadiMotamed S and Ghorbani A, 2005. Labiatae family in folk medicine in Iran from Ethnobotany to pharmacology. Iranian Journal of Pharmacetical Research 2:63-79.

Paterson RRM, 2006. Ganoderma - A therapeutic fungal biofactory. Phytochemistry 67(18):1985–2001.

Roberts L, 2004. Australian ganoderma: Identification, Growth and Antibacterial Properties. Environment and Biotechnology Center School of Engineering and Science Swinburne University of Technology.

Saltarelli R, Ceccaroli P, Buffalini M, Vallorani L, Casadei L, Zambonelli A, Iotti M, Badalyan S and Stocchi V, 2015. Biochemical characterization and antioxidant and antiproliferative activities of different Ganoderma collections. Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology 25(1):16-25.

Shon MY, Lee J, Choi JH, Choi SY, Nam SH, Seo KI, Lee S.W, Sung NJ and Park SK, 2007, Antioxidant and free radical scavenging activity of methanol extract of chungkukjang. Journal of Food Composition and Analysis 20(2): 113-118.

Sotillo RD, Hadley M and Holm ET,1994. Phenolics in aqueous potato peel extract: Extraction, identification and degradation. Journal of Food Science 59(3): 649-651.

Stamets P,2000. Growing Gourmet and Medicinal Mushrooms.Third Edition. Ten Speed Press. Berkeley, Toronto.

Taşkın H, Kafkasl E, Özgün Çakıroğlu and Büyükalaca S, 2013. Afr J Tradit Complement Altern Med *10*,353.

Veljovic S, Veljovic M, Nikicevic N, Despotovic S, Radulovic S, Niksic M and Filipovic L, 2017. Chemical composition, antiproliferative and antioxidant activity of differently processed Ganoderma lucidum ethanol extracts. Journal Food Science Technol 54(5):1312-1320.

Vilkha K, Mawson R, Simons L and Bates D, 2008. Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry - A review. Innovative Food Science and Emerging Technologies 9(2):161-169.

Wang YY, Khoo KH, Chen ST, Lin CC, Wong CH and Lin CH, 2002. Studies on the immune-modulating and antitumor activities of Ganoderma Lucidum (Reishi) polysaccharides: functional and proteomic analyses of a fucose-containing glycoprotein fraction responsible for the activities. Bioorganic & Medicinal Chemistry 10(4):1057-62.

Wannasupchue W, Siriamornpun S, Huaisan K, Huaisan J and Meeso N, 2011. Effect of adding Ling-zhi (*Ganoderma lucidum*) on oxidative stability, textural and sensory properties of smoked fish sausage. Thai Journal Agricultural science 44(5):505-12.

Yao X, Zhang D, Zu Y, Fu Y, Luo M, Gu C, Li CMF and Efferth T, 2013. Free radical scavenging capability, antioxidant activity and chemical constituents of Pyrola incarnata Fisch. Leaves. Industrial Crops and Products (49):247– 255.

Journal of Food Research, 2022,32(3):1-16
https://foodresearch.tabrizu.ac.ir

© 2009 Copyright by Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran
This is an open access article under the CC BY NC license (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/2.0/)

DOI: 10.22034/FR.2022.41555.1760

Optimization of the phenolic and antioxidants extraction from *Ganoderma Lucidum* using maceration method

R Sadat Mousavi[1], L Nateghi[2], M Soltani[*3,4] and J Asgarpanah[5]

Received: August 23, 2020 Accepted: February 14, 2021

[1]PhD Student, Department of Food Sciences and Technology, Faculty of Pharmacy, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran
[2]Associate Professor, Department of Food Sciences and Technology, Faculty of Agriculture, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin, Iran
[3]Assistant Professor, Department of Food Sciences and Technology, Faculty of Pharmacy, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran
[4]Nutrition and Food Sciences Research Center, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran
[5]Associate Professor, Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran
[*]Corresponding author Email**:** m.soltani@iaups.ac.ir

Introduction: Medicinal plants are rich in secondary metabolites and contain the active ingredients of many drugs (Davari et al., 2018). Over the years, the secondary metabolites in plants have been used to treat most diseases due to their ease of access and use and fewer side effects compared to chemical products (Fazelinasb et al., 2017). Fungi are one of the types of medicinal plants that have attracted the interest of researchers in recent years. *Ganoderma Lucidum* is an annual fungus of the genus Basidiomycetes belonging to the class *Agaricomyc*, order Ployporaceae and family Ganodermataceae (Chen et al., 2017). This effective medicinal fungus has been known in East Asian countries for about 2000 years, such as Reishi or Mannetake in Japan (ten thousand years old fungus) and Ling Chih, Ling Chu and Ling Zhi (immortal fungus) in China and Korea is famous (Robertos 2004). Medicinal properties of *Ganoderma Lucidum* are due to the presence of biologically active compounds such as polysaccharides, sterols, amino acids, triterpenoids, alkaloids, proteins and peptides (Peterson 2006). As triterpenes and polysaccharide are the most important chemical compounds in *Ganoderma* that most scientific research has been done on them (Stemets 2000**)**. One of the most important polysaccharides in *Ganoderma lucidum* is Glucan, which strengthens the immune system (Wang et al., 2002). The polysaccharides in *Ganoderma lucidum* also have antioxidant, antibacterial, antiviral, and radiation protection properties, and the protein in it has anti-tumor and anti-diabetic activity (Gao et al., 2004). *Ganoderma lucidum* contains a variety of compounds, including ketones, esters, lactones, alcohols, ethers, and hydroxybenzene (Taskin et al., 2013). The polyphenolic portion of *Ganoderma lucidum* consists mainly of flavonoids such as Quercetin, Routine, Myersitin, Morin, Hesperetin, and Naringenin (Saltarelli et al., 2015, Veljovic et al., 2017).

Different methods are used to extraction plant extracts such as ultrasound, microwave, supercritical fluid and maceration. Each of the above methods has a different ability in extracting plant compounds, depending on the sample, type of solvent used and extraction conditions.
In the maceration method, the mass of the desired compound is transferred from the sample to the solvent used while the solution is in contact with the sample. Extraction also depends on the particle size and properties of the plant tissue. Extraction efficiency in maceration method is generally higer than new extraction methods and the probability of heat damage in this method is lower (Wang et al 2002).
Material and method: *Ganoderma Lucidum* was obtained from the Department of Medicinal Plants of the University of Tehran. The materials used for the tests, including methanol solvent, was purchased from Pars Shimi Company, Iran. Folin ciocalteu reagent was purchased from Merk Company, Germany. Galic Acid, DPPH reagent, and sodium carbonate were purchased from Sigma Company, USA.*Ganoderma lucidum* was extracted by using the Shon method with modifications.
The total amount of phenolic compounds in the *Ganoderma lucidum* extraction was measured by the Folin-Ciocalteu method. In this method, Folin reagent is reduced in the presence of phenolic compounds in alkaline solution and blue color is produced in the solution. Color intensity can be determined at a wavelength of 765 nm by the optical spectrometer.
Evaluation of free radical inhibition activity with Diphenyl Picrylhydrazyl was measured. The IC50 factor, which represents the amount of required sample to inhibit 50 percent of free radicals, was used for better assessment of antiradical activity. The lower the IC50, the higher would be antioxidant potential (low concentrations of the sample can prevent large amounts of free radicals (Khalili and Ebrahimzadeh 2015). Minitab software version 16 was used to design the treatments from the response level method, the Box- Behnken model, and to assess the optimal conditions for extraction from *Ganoderma Lucidum* by the statistical method of the response level.
Results and discussion: different extraction conditions (temperature, time, and type of solvent) had significant effects on the total amount of phenolic compounds and IC 50 of *Ganoderma lucidum* extract, so that the total amount of phenolic compounds of produced extract from *Ganoderma lucidum* ranged from 7.244 to 21.089 mg g^{-1}, and IC 50 ranged from 2.409 to 8.369 mg ml^{-1}. The results show that increasing temperature (20 to 40 C°), extraction time (12 to 48 h), and application of methanol solvent, compared to the use of water solvent and a mixture of 50/50 water and methanol, significantly ($P \leq 0.05$) increases the total extraction of phenolic compounds and decreases the amount of IC 50 from *Ganoderma Lucidum.*
The linear effects of all three variables of temperature, time and type of solvent, and square effect of solvent type (C^2) on the total extraction of phenolic compounds and IC 50, were significant ($P \leq 0.05$). Meanwhile, the square effects of temperature, extraction time, interactional effects of temperature, extraction time, solvent type on the total extraction of phenolic compounds, and IC 50 from *Ganoderma lucidum* were not significant ($P > 0.05$).
According to Single optimization the maximum amount of phenolic composition of the produced extract from 20.9944 mg g^{-1} *Ganoderma lucidum* with 99.32 percent desirability was achieved in the following condition: 48 h of extraction time, 40 C° of temperature, and the use of methanol solvents and the maximum antioxidant composition of the produced extract from *Ganoderma lucidum* which can inhibit free radicals was predicted to be 2.1128 mg ml^{-1} with 100 percent utility belonging to 48 h extraction time, 40 C° temperature, and use of methanol solvent.
According to Multiple optimizations total phenol optimum and IC 50 of the produced extract from *Ganoderma lucidum*. It was predicted that the optimal conditions for the produced extract from *Ganoderma lucidum* by maceration method to achieve the maximum total phenolic composition and the minimum amount of IC 50 multiple with 99.662 percent of desirability on 48 h of extraction time, 40 C° of temperature and the using of methanol solvent that total phenol content and the IC50 were 20.9944 mg $g^{-1}$and 2.1128 mg ml^{-1}, respectively.

Conclusion: The results of this study proved that by optimizing the extraction conditions of *Ganoderma Lucidum*, a higher amount of its effective compounds can be achieved. Also, the response surface method can be an effective way to optimize the extraction conditions of effective compounds from *Ganoderma Lucidum*.

Key words: Antioxidant activity, Extraction, *Ganoderma lucidum*, Maceration method, pheolic compound