Biological Journal of Microorganism, 9th Year, No. 35, Autumn 2020

Investigating Antibacterial and Antioxidant Activity of *Inocutis levis* Extracts and Evaluating its Phenolic Compounds

Samaneh Chaharmiri Dokhaharani
Department of Biotechnology, Iranian Research Organization for Science and Technology (IROST), Tehran, Iran, 4miri@irost.ir
Masoomeh Ghobad-Nejhad
Department of Biotechnology, Iranian Research Organization for Science and Technology (IROST), Tehran, Iran, ghobadnejhad@irost.ir
Hamid Moghimi
Department of Microbial Biotechnology, School of Biology, College of Science, University of Tehran, Tehran, Iran, hmoghimi@ut.ac.ir
Abbas Farazmand*
Department of Biotechnology, Iranian Research Organization for Science and Technology (IROST), Tehran, Iran, farazmand@irost.ir
Hossein Rahmani
Department of Chemical Technologies, Iranian Research Organization for Science and Technology (IROST), Tehran, Iran, rahmani@irost.ir

Abstract

Introduction: *Inocutis levis* is a polypore basidiomycete from the Hymenochaetaceae family. Members of this family have well-known medicinal properties. Recently, anti-diabetic and anti-hypercholesterolemic effects of *I. levis* have been reported. This study aimed to evaluate antibacterial activities and antioxidant properties of the extracts of *I. levis*.

Materials and methods: After the sampling and fungus identification, the methanolic, ethanolic, and aqueous extracts of the dried fruiting bodies of *I. levis* were prepared. The antioxidant activities were determined by DPPH method, and antibacterial activities by microdilution method against some gram-positive and gram-negative bacteria. Furthermore, the identification and quantification of phenolic and flavonoid compounds of the extracts were investigated by spectrophotometers and HPLC.

Results: The results showed that the methanolic extract had the highest DPPH scavenging activity, with an IC50 value of 555 µg/ml. The ethanolic and methanolic extracts showed the same antibacterial effects, and *Streptococcus mutans*ATCC35665 was more sensitive than other bacteria, with the MIC and MBC values of 12.5 and 25 mg/ml, respectively. Total phenolic (34.15mg gallic acid) and total flavonoid contents (5.4mg quercetin) per 1 gram dry methanolic extract were higher than other extracts. Furthermore, in the HPLC analysis, ascorbic acid, resorcinol, caffeic acid, catechin and, vanillic acid were determined.

Discussion and conclusion: This is the first study presenting the antibacterial and antioxidant properties of *I. levis*. The results can be considered for future studies in the design of new antibiotics and antioxidant compounds from natural resources applying native fungi.

Key words: *Inocutis levis*, Antibacterial, Antioxidant, Polypore Fungus

* Corresponding author
Received: November 23, 2019/ **Accepted:** February 15, 2020

فصلنامه علمی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها (نوع مقاله: پژوهشی)
سال نهم، شماره ۳۵، پاییز ۱۳۹۹، صفحه ۱-۱۶
تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۹/۰۲ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۱/۲۶
doi: 10.22108/BJM.2020.120139.1240

بررسی اثر ضدباکتریایی و آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های قارچ پلی‌پور *اینوکوتیس لویس* و ارزیابی ترکیبات فنلی آن

سمانه چهارمیری دوخواهرانی: دانشجوی دکتری، پژوهشکدهٔ زیست‌فناوری، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، تهران، ایران، 4miri@irost.ir
معصومه قبادنژاد: دانشیار، پژوهشکدهٔ زیست‌فناوری، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، تهران، ایران، ghobadnejhad@irost.ir
حمید مقیمی: استادیار میکروبیولوژی، بخش زیست‌فناوری میکروبی، دانشکدهٔ زیست‌شناسی، پردیس علوم، دانشگاه تهران، ایران، hmoghimi@ut.ac.ir
عباس فرازمند*: استادیار، پژوهشکدهٔ زیست‌فناوری، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، تهران، ایران، farazmand@irost.ir
حسین رحمانی: دانشیار، گروه صنایع شیمیایی آلی و دارویی، پژوهشکدهٔ فناوری‌های شیمیایی، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، تهران، ایران، rahmani@irost.ir

چکیده

مقدمه: *اینوکوتیس لویس*، قارچی پلی‌پور از خانوادهٔ هایمنوکتاسه است. اعضای این خانواده ویژگی‌های دارویی شناخته‌شده‌ای دارند و به‌تازگی، آثار ضددیابتی و ضدکلسترولی گونهٔ *اینوکوتیس لویس* نیز گزارش شده‌اند. هدف مطالعهٔ حاضر، بررسی ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی و ضدباکتریایی عصاره‌های اندام بارده قارچ یادشده است.

مواد و روش‌ها: پس‌از نمونه‌برداری و شناسایی قارچ، عصاره‌گیری از اندام بارده با کمک حلال‌های متانول، اتانول و آب انجام شد. بررسی اثر آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها به روش DPPH و بررسی اثر ضدباکتریایی آنها روی تعدادی باکتری گرم مثبت و گرم منفی به روش رقیق‌سازی در چاهک انجام شد. تجزیه‌وتحلیل ترکیبات فنلی و فلاوونوئیدی عصاره‌ها به روش‌های اسپکتروفوتومتری و HPLC انجام شد.

نتایج: نتایج نشان دادند عصارهٔ متانولی *اینوکوتیس لویس* دارای بیشترین اثر آنتی‌اکسیدان با IC_{50} برابر با ۵۵۵ میکروگرم‌برمیلی‌لیتر است؛ همچنین عصاره‌های اتانولی و متانولی این قارچ اثر ضدباکتریایی مشابه و قوی‌تری نسبت به عصارهٔ آبی داشتند. باکتری *استرپتوکوکوس موتانس* نسبت به سایر باکتری‌ها حساسیت بیشتری به این دو عصاره با مقادیر MIC و MBC به‌ترتیب برابر با ۱۲/۵ و ۲۵ میلی‌گرم‌برمیلی‌لیتر داشت. میزان فنل کل و فلاونوئید کل عصارهٔ متانولی بیشتر از سایر عصاره‌ها و به‌ترتیب برابر با ۳۴/۱۵ میلی‌گرم گالیک‌اسید و ۵/۴ میلی‌گرم کوئرستین در هر گرم پودر خشک عصاره بود. ترکیبات آسکوربیک‌اسید، کاتچین، رزورسینول، کافئیک‌اسید و وانیلیک‌اسید در نتایج آزمون HPLC تشخیص داده شدند.

بحث و نتیجه‌گیری: بررسی حاضر برای نخستین‌بار وجود ویژگی‌های ضدباکتریایی و آنتی‌اکسیدانی را در قارچ *اینوکوتیس لویس* نشان داد و نتایج آن می‌توانند در مطالعه‌های آتی در زمینهٔ طراحی منابع جدید آنتی‌بیوتیکی و آنتی‌اکسیدانی با استفاده از قارچ‌های بومی مدنظر قرار گیرند.

واژه‌های کلیدی: *اینوکوتیس لویس*، ضدباکتریایی، آنتی‌اکسیدانی، قارچ پلی‌پور

* نویسندهٔ مسئول مکاتبات

Copyright©2020, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0/), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

مقدمه

قارچ‌های ماکرومیست پیشینه‌ای طولانی در مصارف دارویی به‌ویژه در کشورهای آسیایی و اروپایی دارند (۱) و دارای ترکیبات زیست‌فعال متنوعی نظیر ترکیبات فنلی، پلی‌ساکاریدها، پروتئین‌ها، لیپیدها، پلی‌کتیدها، ترپنوئیدها، آلکالوئیدها و مواد دیگرند (۲). تاکنون گزارش‌های متعددی دربارهٔ قارچ‌های ماکرومیست منتشر شده‌اند که در آنها به فعالیت‌های این قارچ‌ها ازجمله پلی‌پورها نظیر فعالیت‌های ضدمیکروبی، ضدسرطانی، ضدالتهابی، آنتی‌اکسیدانی، بهبوددهندگی مشکلات قلب و عروق، دیابت، آلزایمر و تقویت سیستم ایمنی اشاره شده است (۲ و ۳).

بیماری‌های عفونی یکی از تهدیدهای اصلی برای سلامت انسان به شمار می‌آیند و تلاش‌های بسیاری برای شناخت عوامل ایجادکننده، درمان و کنترل آنها انجام شده‌اند. امروزه، مقاومت دارویی چندگانهٔ میکروب‌ها مشکل بزرگی برای سلامت عمومی به شمار می‌آید (۴)؛ زیرا بسیاری از گونه‌های باکتریایی در برابر رده‌های مختلف آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم شده‌اند (۵). پژوهش در زمینهٔ کشف ترکیبات ضدباکتریایی جدید و کارآمد از منابع مختلف زیستی همواره مدنظر بوده است. قارچ‌ها از مهم‌ترین و متنوع‌ترین منابع طبیعی آنتی‌بیوتیک‌ها (۶) و منبع طبیعی آنتی‌اکسیدان‌های قوی ازجمله توکوفرول‌ها، کاروتنوئیدها، آسکوربیک‌اسید، بنزوئیک‌اسید، گالیک‌اسید، کاتچین و کافئیک‌اسید هستند (۷).

آنتی‌اکسیدان‌های مصنوعی و طبیعی به کاهش آسیب اکسیداتیو ناشی از گونه‌های اکسیژن فعال[1] (ROS) در بدن انسان کمک می‌کنند (۸). غلظت‌های زیاد ROS سبب آسیب گسترده به بافت و سلول‌ها طی عفونت‌ها، بیماری‌های قلبی و عروقی، پیری، آلزایمر، دیابت، جهش و سرطان می‌شوند (۹). آنتی‌اکسیدان‌های مصنوعی مانند بوتیلات هیدروکسیل آنیزول[2] ممکن است سبب بروز آثار سمی یا سرطان شوند (۱۰)؛ بنابراین، یافتن آنتی‌اکسیدان‌های جدید و مؤثرتر با منشأ طبیعی نظیر متابولیت‌های قارچی اهمیت ویژه‌ای دارد (۱۱). هدف مطالعهٔ حاضر، بررسی اثر ضدباکتریایی و آنتی‌اکسیدانی قارچ *اینوکوتیس لویس*[3] و ارزیابی ترکیبات فنلی در عصاره‌های مختلف آن است.

اینوکوتیس لویس، قارچ پلی‌پور بازیدیومیست از راستهٔ هایمنوکتالز[4] و خانوادهٔ هایمنوکتاسه[5] است که اندام بارده آن به رنگ قهوه‌ای مایل به زرد روی تنهٔ درختان زنده رشد می‌کند (۱۲). در پژوهش‌های اخیر نشان داده شده است این قارچ دارای ویژگی‌های ضدهیپرتری‌گلیسیریدمی (۱۳) و آثار هیپوگلیسمیک و تنظیم انسولین در دیابت نوع دو است (۱۴). در مطالعهٔ حاضر، ویژگی‌های ضدباکتریایی و آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های اتانولی، متانولی و آبی قارچ *اینوکوتیس لویس* و ترکیبات فنلی آن برای نخستین‌بار بررسی شد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌های قارچی طی سال ۱۳۹۶ از تهران جمع‌آوری و با معرف‌های شیمیایی آبی‌کتان و پتاس و به کمک میکروسکوپ نوری و با مراجعه به منابع معتبر قارچ‌شناسی (۱۲) با عنوان *اینوکوتیس لویس* شناسایی شدند. قطعه‌هایی از نمونه‌های استفاده‌شده در عصاره‌گیری با شماره‌های دسترسی ICH494F و ICH495F در هرباریوم سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران با نمایهٔ بین‌المللی ICH نگهداری می‌شوند.

عصاره‌گیری: به‌منظور عصاره‌گیری، ابتدا سطوح بیرونی بازیدیوکارپ قارچ با هیپوکلریت‌سدیم ۵ درصد

شستشو شد و پس‌از شستشوی سطح آن با آب مقطر استریل، قارچ کاملاً خشک شد. عمل پودرکردن با دستگاه آسیاب برقی انجام شد. عصاره‌گیری با حلال‌های اتانول، متانول و آب مقطر استریل به روش خیساندن همراه با حمام فراصوتی (اولتراسونیک PARSONIC 15s) انجام شد؛ به‌این‌ترتیب که مخلوط ۳۰ گرم پودر قارچ در ۳۰۰ میلی‌لیتر حلال تهیه و ابتدا به‌مدت یک ساعت در دستگاه حمام امواج فراصوتی با فرکانس ۲۸ کیلوهرتز و در دمای محیط گذاشته شد و سپس عصاره‌گیری به‌مدت ۷۲ ساعت در دمای اتاق و به کمک شیکر (GFL3005) با سرعت ۲۰۰ دوردردقیقه انجام شد. عصارهٔ حاصل با کاغذ صافی واتمن شمارهٔ ۴ صاف و دوباره این روش به‌مدت ۲۴ ساعت روی پودر قارچ باقیمانده از عصاره‌گیری پیش انجام شد. عصارهٔ نهایی صاف‌شده در دمای ۴۰ درجهٔ سانتی‌گراد با دستگاه روتاری (LabTech EV311) خشک و حلال آن کاملاً تبخیر شد. بازده تولید عصاره‌ها از رابطهٔ زیر به دست آمد:

$$\text{درصد بازده} = \frac{\text{مقدار عصارهٔ نهایی بر حسب گرم}}{\text{مقدار پودر قارچ استفاده شده بر حسب گرم}} \times 100$$

بررسی محتوای فنل کل عصاره‌ها: محتوای فنل کل عصاره‌های هیدروالکلی و آبی قارچ به روش رنگ‌سنجی فولین سیوکالتیو بر حسب گالیک‌اسید اندازه‌گیری شد (۱۵)؛ ابتدا محلول استاندارد با غلظت‌های مختلف بر حسب میکروگرم‌برمیلی‌لیتر از گالیک‌اسید در محلول متانول تهیه شد، سپس ۱۰۰ میکرولیتر از هریک به لولهٔ آزمایش منتقل و به آنها ۲/۵ میلی‌لیتر از محلول (۱:۱۰) واکنشگر فولین سیوکالتیو اضافه شد و پس‌از ۳ تا ۸ دقیقه، ۲ میلی‌لیتر از محلول کربنات‌سدیم ۷/۵ درصد به آنها اضافه شد. لوله‌ها به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه نگهداری شدند و سپس میزان جذب آنها با دستگاه اسپکتروفتومتر (T80+UV/VIS Spectrometer-PG Instruments Ltd) در طول موج ۷۶۵ نانومتر اندازه‌گیری و منحنی استاندارد آنها تهیه شد. به‌منظور تعیین فنل کل عصاره‌های آبی، اتانولی و متانولی، غلظت ۲۰۰۰ میکروگرم‌برمیلی‌لیتر از هرکدام از آنها تهیه و در ادامه، میزان آن بر اساس روش فولین سیوکالتو اندازه‌گیری شد. حلال متانول خالص برای شاهد استفاده شد (۱۶). بر اساس میزان جذب خوانده‌شده، مقدار فنل کل با استفاده از رابطهٔ خط منحنی کالیبراسیون گالیک‌اسید بر حسب میلی‌گرم گالیک‌اسید در وزن پودر خشک (گرم) عصاره و پودر خشک قارچ به دست آمد.

بررسی محتوای فلاونوئید کل عصاره‌ها: محتوای فلاونوئید عصارهٔ قارچ به روش رنگ‌سنجی آلومینیوم‌کلرید اندازه‌گیری شد؛ به‌این‌ترتیب که ۱۰۰۰ میکرولیتر نمونه از هر سه عصارهٔ محلول در متانول با غلظت ۲۰۰۰ میکروگرم‌برمیلی‌لیتر و ۱۰۰۰ میکرولیتر از محلول ۲ درصد $AlCl_3.6H_2O$ در لولهٔ آزمایش ریخته شد. نمونه‌ها به‌مدت یک ساعت در دمای محیط نگهداری شدند و سپس جذب آنها در طول موج ۴۳۵ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر (T80+UV/VIS Spectrometer-PG Instruments Ltd) اندازه‌گیری شد. کوئرستین برای استاندارد ترکیب فلاونوئید در غلظت‌های مختلف بر حسب میکروگرم‌برمیلی‌لیتر استفاده و منحنی استاندارد از آنها تهیه شد؛ سپس محتوای فلاونوئید کل عصاره‌ها با استفاده از رابطهٔ خط منحنی استاندارد بر حسب میلی‌گرم کوئرستین در گرم وزن پودر خشک عصاره و قارچ به دست آمد (۱۷-۱۹).

بررسی اثر آنتی‌اکسیدان: توانایی عصاره‌های متانولی، اتانولی و آبی قارچ *اینوکوتیس لویس* در مهار رادیکال آزاد ۲ و ۲- دی‌فنیل ۱-۱۱پیکریل هیدرازیل[۶] بررسی شد؛ به این منظور، محلول‌هایی با غلظت‌های مختلف ۳۱۲، ۶۲۵، ۱۲۵۰، ۲۵۰۰ و ۵۰۰۰ میکروگرم‌برمیلی‌لیتر از عصاره‌های متانولی، اتانولی و آبی در حلال متانول آماده شدند. ۱۰۰ میکرولیتر از محلول متانولی ۲ و ۲- دی فنیل ۱- پیکریل هیدرازیل (DPPH) به ۱۰۰ میکرولیتر عصارهٔ درون پلیت ۹۶ خانه‌ای افزوده و مخلوط حاصل کاملاً همگن شد. پلیت آزمایش به‌مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی قرار گرفت و سپس میزان جذب در طول موج ۵۱۷ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر (BioTek-Epoch) سنجیده شد. مقدار ۲۰۰ میکرولیتر DPPH بدون عصاره برای شاهد منفی و آسکوربیک‌اسید برای شاهد مثبت استفاده شد (۲۰). فاکتور IC_{50} برای مقایسهٔ فعالیت ضدرادیکالی عصاره‌ها به کار رفت.

بررسی اثر ضدباکتریایی: به‌منظور آزمون ضدباکتریایی از ۶ گونهٔ مرجع باکتری شامل باکتری‌های گرم مثبت (*استافیلوکوکوس اورئوس*[۷] ATCC25923، *باسیلوس سوبتیلیس*[۸] ATCC6633 و *استرپتوکوکوس موتانس*[۹] ATCC35665) و باکتری‌های گرم منفی (*سودوموناس آئروژینوزا*[۱۰] ATCC 9027، *اسینتوباکتر بومانی*[۱۱] BAA-747 و *اشریشیا کلی*[۱۲] ATCC8739) استفاده شد. باکتری‌ها از بانک میکروبی انستیتو پاستور ایران و آزمایشگاه زیست‌فناوری محیطی دانشگاه تهران تهیه شدند. روش رقیق‌سازی در چاهک (میکرودایلوشن) برای تعیین میزان MIC (حداقل غلظت مهارکنندگی) و MBC (حداقل غلظت کشندگی) عصاره‌های اتانولی، متانولی و آبی قارچ استفاده شد (۱)؛ به‌این‌ترتیب که ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر محیط‌کشت مولرهینتون‌براث در تمام چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای ریخته شد، سپس ۱۰۰ میکرولیتر عصاره به نخستین چاهک یک ردیف تلقیح شد و سری رقت از غلظت‌های ۰/۱۹ تا ۱۰۰ میلی‌گرم‌درمیلی‌لیتر در چاهک‌ها تهیه شد؛ سپس ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت‌های ۰/۰۰۱ تا ۵ میلی‌گرم‌درمیلی‌لیتر آنتی‌بیوتیک کانامایسین (ترکیب ضدباکتری استاندارد) به یک ردیف از چاهک‌ها اضافه و از دی‌متیل‌سولفوکسید (DMSO) ۵ درصد برای شاهد حلال پودر عصاره‌ها استفاده شد؛ درنهایت، ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری رقیق‌شده معادل نیم مک فارلند به چاهک‌ها تلقیح شد. یک ردیف محیط‌کشت مولرهینتون‌براث همراه با ۱۰ میکرولیتر باکتری برای شاهد مثبت رشد باکتری و محیط‌کشت مولرهینتون بدون باکتری برای شاهد منفی رشد باکتری استفاده شد. پس‌از ۲۴ ساعت انکوباسیون، میزان MIC (حداقل غلظت مهارکنندگی) در چاهک‌هایی تعیین شد که بدون کدورت رشد باکتریایی بودند؛ همچنین کمترین غلظت کشندهٔ باکتری (MBC) از کشت دوبارهٔ ۲۰ میکرولیتر سوسپانسیون موجود در چاهک‌ها (یا همان رقت‌های عصارهٔ بدون کدورت رشد باکتری) روی مولرهینتون‌آگار به‌مدت ۲۴ ساعت در ۳۵ درجهٔ سانتی‌گراد تعیین شد؛ سپس کمترین غلظتی که باکتری هیچ رشدی در آن نداشت، میزان MBC گزارش شد.

بررسی کروماتوگرافی مایع با کارایی زیاد (HPLC): روش کروماتوگرافی مایع با کارایی زیاد (HPLC) برای جداسازی آسکوربیک‌اسید و ترکیبات فنلی موجود در قارچ *اینوکوتیس لویس* استفاده شد. نُه

ترکیب استاندارد شامل آسکوربیک‌اسید، سالیسیلیک‌اسید، وانیلیک‌اسید، کوئرستین، پاراکوماریک‌اسید، رزورسینول، کاتچین، کافئیک‌اسید و سیرینجیک‌اسید استفاده و استانداردها در غلظت ۱ میلی‌گرم‌درمیلی‌لیتر متانول حل شدند؛ همچنین از ۰/۱ گرم پودر خشک عصارهٔ متانولی قارچ در ۱۰ میلی‌لیتر متانول استفاده شد. آزمایش HPLC با استفاده از دستگاه KNAUER مدل well chrom مجهز به دتکتور (ردیاب) UV visible k2600 و برنامهٔ EZchrom در سه طول موج ۳۷۰، ۲۸۰، ۲۵۴ نانومتر به روش شویشی ایزوکراتیک انجام شد. این روش در شرایط شدت جریان ۰/۸ میلی‌لیتربردقیقه با استفاده از ستون Perfectsil Target ODS-3 (5µm) مجهز به گارد[۱۳] و حجم تزریق ۱۰ میکرولیتر انجام شد (۲۱) تزریق برای هرکدام از ترکیبات استاندارد به‌طور مجزا در طول موج ۲۸۰ نانومتر انجام شد. فاز متحرک شامل حلال A (آب حاوی ۰/۵ درصد استیک‌اسید) و حلال B (استونیتریل) بود؛ برنامهٔ حلال‌ها در جدول ۱ آورده شده است.

جدول ۱- برنامهٔ درصدهای فاز متحرک و زمان روش ایزوکراتیک برای HPLC

درصدحلال**B	درصدحلال*A	زمان(دقیقه)
۲۰	۸۰	۰/۰۰
۲۰	۸۰	۱۰
۷۰	۳۰	۳۰
۸۵	۱۵	۳۲
۸۵	۱۵	۵۸
۲۰	۸۰	۵۹
۲۰	۸۰	۶۰

*حلال A (آب حاوی ۰/۵ درصد استیک‌اسید)، **حلال B (استونیتریل)

تمام آزمایش‌ها در سه تکرار انجام شدند. داده‌ها به روش آنالیز واریانس یک‌طرفه تجزیه‌وتحلیل آماری شدند و مقدار P کمتر از ۰/۰۵ معنادار در نظر گرفته شد. تمام داده‌ها به شکل mean±SD گزارش شدند.

نتایج

میزان استخراج پودر خشک عصاره‌های به‌دست‌آمده از حلال‌های متانول، اتانول و آب به‌ترتیب برابر با ۱/۳، ۱/۰۷، ۱/۰۱ گرم و بازده استخراج عصاره‌های متانولی برابر ۴/۳ درصد، اتانولی برابر ۳/۵ درصد و آبی برابر ۳/۴ درصد بود.

میزان فنل کل موجود در عصاره‌ها: مقدار فنل موجود در هر عصاره بر اساس رابطهٔ خط منحنی استاندارد گالیک‌اسید به‌شکل ($y = 0.002x + 0.014$, $R^2 = 0.998$) محاسبه شد (جدول ۲). محتوای فنل کل در ۱ گرم عصاره‌های متانولی، اتانولی و آبی به‌ترتیب برابر با ۳۴/۱۵، ۱۷/۵ و ۱۴/۵ میلی‌گرم گالیک‌اسید در ۱ گرم پودر خشک عصاره بود. نتایج نشان دادند مقدار فنل استخراج‌شده با متانول بیشتر از دو حلال دیگر است ($P<۰/۰۵$).

میزان فلاونوئید کل در عصاره‌ها: محتوای فلاونوئید کل موجود در عصاره‌ها با رابطهٔ خط استاندارد کوئرستین ($y= 0.0526x+0.028$, $R2=0.9993$) محاسبه شد (جدول ۳). محتوای فلاونوئید کل عصاره‌های متانولی، اتانولی و آبی قارچ به‌ترتیب برابر با ۵/۴، ۴/۸۵ و ۳/۵ میلی‌گرم کوئرستین در ۱ گرم پودر خشک عصاره بود. محتوای فلاونوئید عصاره‌ها تفاوت معناداری ($P<۰/۰۵$) با یکدیگر داشتند؛ به‌طوری‌که بیشترین میزان به عصارهٔ متانولی و کمترین میزان به عصارهٔ آبی مربوط بود.

جدول ۲- میزان فنل کل استخراج‌شده از قارچ *اینوکوتیس لویس* درحلال‌های اتانول، متانول و آب و جذب آنها در۷۶۵ نانومتر (n:3) بر حسب میلی‌گرم گالیک‌اسید در گرم پودر خشک عصاره (P<۰/۰۵)

غلظت عصاره‌ها (میکروگرم برمیلی‌لیتر)	عصاره متانولی		عصاره اتانولی		عصاره آبی	
	میزان گالیک‌اسید به‌دست‌آمده از منحنی کالیبراسیون (میلی‌گرم‌برمیلی‌لیتر)	جذب	میزان گالیک‌اسید به‌دست‌آمده از منحنی کالیبراسیون (میلی‌گرم‌برمیلی‌لیتر)	جذب	میزان گالیک‌اسید به‌دست‌آمده از منحنی کالیبراسیون (میلی‌گرم‌برمیلی‌لیتر)	جذب
۲۰۰۰	۰/۰۶۸۳± ۰/۰۰۳	۰/۱۵۱±۰/۰۰۷	۰/۰۳۵±۰/۰۰۲	۰/۰۸۴±۰/۰۰۴	۰/۰۲۸۵± ۰/۰۰۱	۰/۰۷۱±۰/۰۰۲
میزان فنل کل در یک گرم عصارهٔ قارچ (میلی‌گرم برگرم)	۳۴/۱۵		۱۷/۵		۱۴/۲۵	

جدول ۳- محتوای فلاونوئید کل و میزان جذب در ۴۳۵ نانومتر در عصاره‌های متانولی، اتانولی و آبی قارچ *اینوکوتیس لویس* (n:3) بر حسب میلی‌گرم کوئرستین در گرم پودر خشک عصاره (P<۰/۰۵)

غلظت (میکروگرم برمیلی‌لیتر)	عصاره متانولی		عصاره اتانولی		عصاره آبی	
	میزان فلاونوئید به‌دست‌آمده از منحنی استاندارد (میلی‌گرم‌برمیلی‌لیتر)	جذب	میزان فلاونوئید به‌دست‌آمده از منحنی استاندارد (میلی‌گرم‌برمیلی‌لیتر)	جذب	میزان فلاونوئید به‌دست‌آمده از منحنی استاندارد (میلی‌گرم‌برمیلی‌لیتر)	جذب
۲۰۰۰	۰/۰۱۰۸± ۰/۰۰۱	۰/۵۵۸± ۰/۰۱۰	۰/۰۰۹۷ ± ۰/۰۰۰۱	۰/۵۳۴±۰/۰۰۷	۰/۰۰۷±۰/۰۰۰۳	۰/۴۲۶±۰/۰۰۲
میزان فلاونوئید کل در ۱ گرم عصارهٔ قارچ (میلی‌گرم برگرم)	۵/۴		۴/۸۵		۳/۵	

اثر آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها: ظرفیت آنتی‌اکسیدانی عصارهٔ قارچ به روش حذف رادیکال‌های آزاد DPPH ارزیابی شد. در این روش، درصد مهار DPPH در غلظت‌های مختلف آسکوربیک‌اسید (شاهد مثبت) و عصاره‌ها به دست آمد. IC_{50} آسکوربیک‌اسید برابر با ۴/۹۴ میکروگرم‌برمیلی‌لیتر بود. درصد مهار و IC_{50} عصاره‌ها در بازهٔ غلظت‌های ۳۱۲/۵ تا ۵۰۰۰ میکروگرم‌برمیلی‌لیتر در جدول ۴ دیده می‌شود.

اثر ضدباکتریایی عصاره‌ها: نتایج بررسی اثر ضدباکتریایی به روش رقیق‌سازی در چاهک (پلیت ۹۶ خانه‌ای) در جدول ۵ ارائه شده‌اند؛ میزان MIC و MBC عصاره‌های متانولی و اتانولی در این روش

تقریباً برابر بود. عصاره‌های متانولی و اتانولی با غلظت ۵۰ میلی‌گرم‌برمیلی‌لیتر خاصیت مهارکنندگی بر باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* داشتند؛ ولی در غلظت‌های بیشتر، اثر کشندگی روی این باکتری نداشتند. باکتری *اشریشیا کلی* با MIC برابر ۲۵ میلی‌گرم‌برمیلی‌لیتر و MBC برابر ۵۰ میلی‌گرم‌برمیلی‌لیتر بیشترین حساسیت را بین باکتری‌های گرم منفی نسبت به عصاره‌های متانولی و اتانولی داشت؛ هر سه باکتری گرم منفی به عصارهٔ آبی این قارچ مقاوم بودند. اثر عصاره‌های متانولی و اتانولی بر باکتری‌های گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* و *باسیلوس سوبتیلیس* مشابه یکدیگر و MIC آنها برابر ۲۵ میلی‌گرم‌برمیلی‌لیتر و MBC آنها برابر ۵۰ میلی‌گرم‌برمیلی‌لیتر بود. *استرپتوکوکوس موتانس* با MIC برابر ۱۲/۵ میلی‌گرم‌برمیلی‌لیتر و MBC برابر ۲۵ میلی‌گرم‌برمیلی‌لیتر حساس‌تر از سایر باکتری‌ها نسبت به عصاره‌های متانولی و اتانولی بود.

جدول ۴- میزان جذب در ۵۱۷ نانومتر، درصد مهار DPPH و IC_{50} (برحسب میکروگرم‌برمیلی‌لیتر) عصاره‌های *اینوکوتیس لویس*

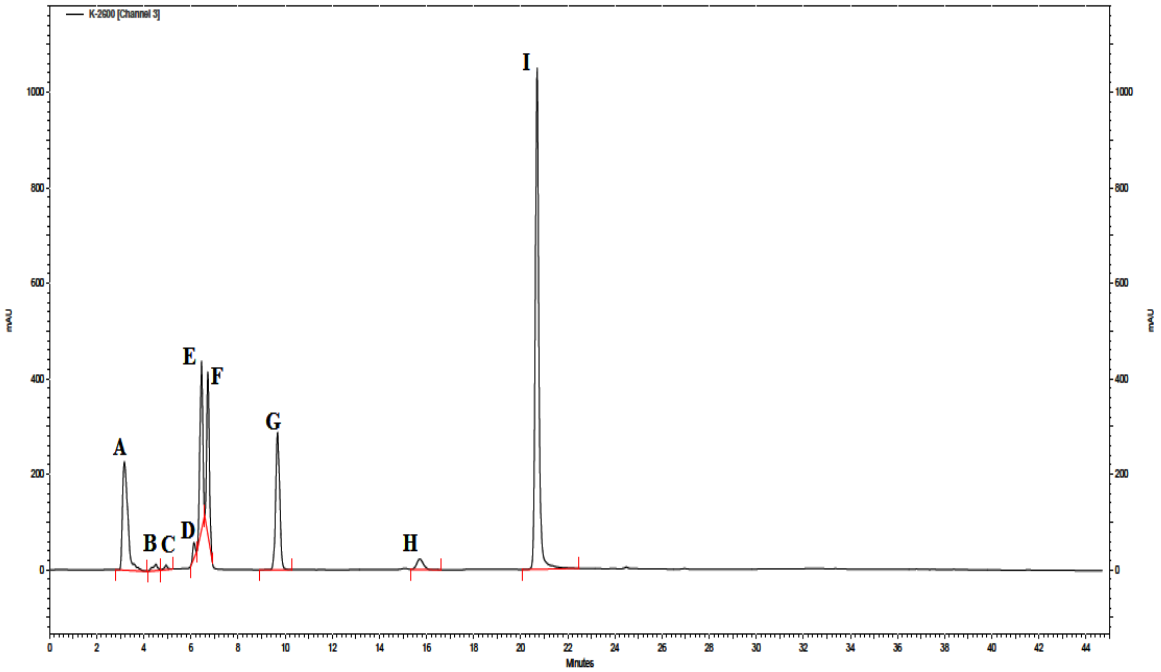
غلظت عصاره بر حسب میکروگرم‌برمیلی‌لیتر	عصارهٔ متانولی		عصارهٔ اتانولی		عصارهٔ آبی	
	جذب	درصدمهار DPPH	جذب	درصدمهار DPPH	جذب	درصدمهار DPPH
۵۰۰۰	۰/۰۸۰±۰/۰۱	۹۰/۹۱	۰/۱۳۶±۰/۰۰۹	۸۴/۵۶	۰/۳۲۷±۰/۰۱	۶۲/۸۴
۲۵۰۰	۰/۱۲۳±۰/۰۱	۸۶/۰۳	۰/۲۰۳±۰/۰۱	۷۹/۹۵	۰/۴۹۸±۰/۰۲	۴۳/۴۷
۱۲۵۰	۰/۲۲۹±۰/۰۴	۷۴/۰۰	۰/۳۹۹±۰/۰۱	۵۴/۷۱	۰/۵۶۳±۰/۰۲	۳۶/۰۹
۶۲۵	۰/۳۷۱±۰/۰۲	۵۷/۸۸	۰/۴۹۸±۰/۰۱	۴۵/۴	۰/۶۰۸±۰/۰۲	۳۰/۰۹
۳۱۲/۵	۰/۴۷۲±۰/۰۱	۴۶/۴۲	۰/۵۷۲±۰/۰۳	۳۵/۰۷	۰/۶۷۹±۰/۰۱	۲۲/۴۷
IC_{50}(µg/ml)	۵۵۵		۱۰۰۳		۳۳۱۱/۲۵	

جدول ۵- میزان MIC و MBC عصاره‌های قارچ *اینوکوتیس لویس* بر باکتری‌ها (بر حسب میلی‌گرم‌برمیلی‌لیتر)؛ علامت-: بدون اثر ضدباکتری

عصاره / باکتری	عصارهٔ اتانولی		عصارهٔ متانولی		عصارهٔ آبی		کانامایسین		DMSO(5%)DW
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	-
Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027	۵۰	-	۵۰	-	-	-	۰/۶۲۵	۱/۲۵	-
Acinetobacter baumanniBAA747	۵۰	۱۰۰	۵۰	۱۰۰	-	-	۰/۰۱	۰/۰۳	-
Escherichia coli ATCC8739	۲۵	۵۰	۲۵	۵۰	-	-	۰/۰۰۴	۰/۰۰۹	-
Staphylococcus aureus ATCC25923	۲۵	۵۰	۲۵	۵۰	۱۰۰	-	۰/۰۷	۰/۱۵۶	-
Bacillus subtilis ATCC6633	۲۵	۵۰	۲۵	۵۰	۱۰۰	-	۰/۰۰۱	۰/۰۰۲	-
Streptococcus mutansATCC35665	۱۲/۵	۲۵	۱۲/۵	۲۵	۱۰۰	-	۰/۰۳	۰/۰۷	-

نتایج بررسی کروماتوگرافی HPLC: باتوجه‌به اینکه مقادیر پلی‌فنل و فلاونوئید در عصارهٔ متانولی بیشتر بود، عصارهٔ متانولی برای تجزیه‌وتحلیل در آزمون HPLC استفاده شد.آزمون HPLC به روش ایزوکراتیک در سه

طول موج به‌طور هم‌زمان انجام شد. طول موج‌های استفاده‌شده و زمان بازداری[۱۴] آسکوربیک‌اسید، سالیسیلیک‌اسید، وانیلیک‌اسید، کوئرستین، پاراکوماریک‌اسید، رزورسینول، کاتچین، کافئیک‌اسید و سیرینجیک‌اسید که استاندارد در پژوهش حاضر بودند، در شکل ۱ و جدول ۶ گزارش شده‌اند.

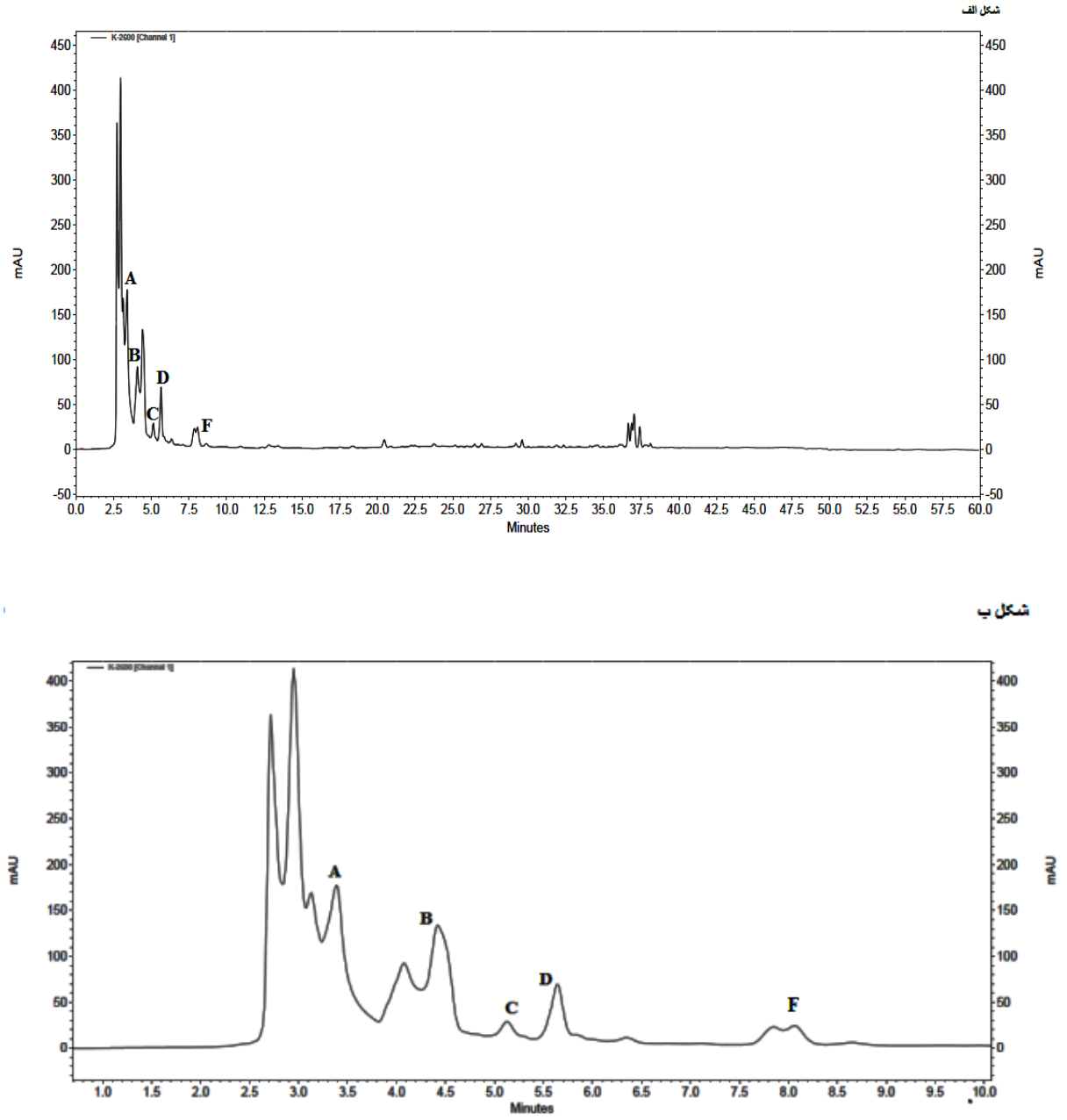


شکل ۱- نمودار HPLC ترکیبات استاندارد بر اساس ترتیب آنهادر سه طول موج ۲۸۰، ۲۵۴، ۳۷۰ به روش ایزوکراتیک (زمان بازداری دقیق آنها در جدول ۶ گزارش شده است). A: آسکوربیک اسید، B: کاتچین، C: کافئیک‌اسید، D: رزورسینول، E: سیرینیجیک‌اسید، F: وانیلیک‌اسید، G: پاراکوماریک‌اسید، H: سالیسیلیک‌اسید، I : کوئرستین

جدول ۶- استانداردهای استفاده‌شده در HPLC در پژوهش حاضر

ترکیب استاندارد	زمان بازداری (دقیقه)	طول موج(نانومتر)
Ascorbic acid	۳/۲۷	۲۸۰
Catechin	۴/۵۵	۲۸۰
Caffeic acid	۵/۱۸	۲۸۰
Resorcinol	۵/۸۳	۲۸۰
Syringic acid	۶/۱۶	۲۸۰
Vanillic acid	۸/۰۵	۲۸۰
P-coumaric acid	۱۰/۳۸	۲۸۰
Salicylic acid	۱۶/۳۳	۲۸۰
Quercetin	۲۱/۵۶	۲۸۰

ترکیباتی که در طول موج و زمان بازداری مشابه با ترکیبات استاندارد در نمودار عصارهٔ قارچ به دست آمدند، در شکل ۲، الف و ب و جدول ۷ مشخص شده‌اند. نتایج نشان دادند از میان نُه استاندارد بررسی‌شده، پنج ترکیب آسکوربیک‌اسید، کاتچین، رزورسینول، کافئیک‌اسید و وانیلیک‌اسید در عصارهٔ متانولی این قارچ وجود داشتند.



شکل ۲- الف. نمودار HPLC قارچ *اینوکوتیس لویس* بر اساس زمان بازداری. A: آسکوربیک‌اسید، B: کاتچین، C: کافئیک‌اسید، D: رزورسینول، F: وانیلیک‌اسید (سه طول موج ۲۵۴، ۲۸۰ و ۳۷۰ نانومتر، روش ایزوکراتیک). ب. بزرگ‌نمایی پیک‌های نمودار HPLC شکل الف به‌طور تفکیک‌شده

جدول ۷- ترکیبات شناسایی‌شده در عصارهٔ متانولی *اینوکوتیس لویس*

طول موج(نانومتر)	زمان بازداری(دقیقه)	ترکیبات شناسایی شده
۲۸۰	۳/۳۸	Ascorbic acid
۲۸۰	۴/۴۱	Catechin
۲۸۰	۵/۱۳	Caffeic acid
۲۸۰	۵/۶۳	Resorcinol
۲۸۰	۸/۰۶	Vanillic acid

بحث

طبق گزارش‌های سازمان بهداشت جهانی (WHO)، مقاومت باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها ممکن است به‌زودی به بحران بهداشت عمومی تبدیل شود. امروزه، اثربخشی آنتی‌بیوتیک‌های موجود در بازار به‌طور چشمگیری کاهش یافته و توسعهٔ داروهای جدید برای درمان باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها به‌سرعت درحال پیشرفت است (۲۲). در سال‌های اخیر، منابع دارویی طبیعی بسیاری استفاده شده‌اند و در این میان، قارچ‌ها با تنوع زیستی و تنوع متابولیتی زیادی که دارند می‌توانند به‌شکل منابع جدید ضدباکتریایی جایگزین شوند (۲ و ۲۳). در پژوهش حاضر برای نخستین‌بار، آثار ضدباکتریایی قارچ بازیدیومیستی *اینوکوتیس لویس* از خانوادهٔ قارچ‌های ماکرومیستی هایمنوکتاسه بررسی شد؛ اعضای این خانواده آثار دارویی شناخته‌شده‌ای دارند (۳) و آثار ضدباکتری و آنتی‌اکسیدانی از اعضای گونه‌های متعدد این خانواده به‌ویژه *فلینوس* و *اینونوتوس* گزارش شده است. نتایج پژوهش حاضر نشان دادند از میان باکتری‌های بررسی‌شده، باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* ATCC 9027 بیشترین مقاومت را نسبت به عصاره‌های قارچ *اینوکوتیس لویس* دارد و هیچ‌کدام از عصاره‌ها خاصیت MBC نسبت به این باکتری از خود نشان نمی‌دهند و صرفاً عصاره‌های متانولی و اتانولی در غلظت ۵۰ میلی‌گرم‌برمیلی‌لیتر MIC نسبت به این باکتری از خود نشان می‌دهند. در مطالعهٔ حاضر، باکتری‌های گرم مثبت در برابر عصاره‌ها حساسیت بیشتری نسبت به باکتری‌های گرم منفی نشان دادند. در مطالعهٔ سوای[15] و همکاران نیز فعالیت ضدباکتریایی قارچ‌های بازیدیومیست مختلف نشان داد باکتری‌های گرم مثبت نسبت به عصاره‌های قارچ‌ها حساس‌تر از باکتری‌های گرم منفی‌اند (۲۴) که با نتایج مطالعهٔ حاضر مطابقت دارد. باکتری‌های گرم منفی دارای غشای خارجی حاوی لیپوپلی‌ساکاریدند که آنها را نسبت به برخی از ترکیبات ضدباکتریایی مقاوم می‌کند؛ این مطلب حساسیت بیشتر باکتری‌های گرم مثبت در مقایسه با انواع گرم منفی را نسبت به عصارهٔ قارچ توجیه می‌کند (۲۵–۲۷)؛ همچنین در پژوهش حاضر، عصارهٔ آبی *اینوکوتیس لویس* تنها باعث مهار رشد (MIC) باکتری‌های گرم مثبت شد، ولی خاصیت کشندگی (MBC) روی آنها نداشت.

در پژوهش گلاموکلیجا[16] و همکاران، خاصیت ضدباکتری عصاره‌های اتانولی و آبی *اینونوتوس اوبلیگوس*[17] روی چهار باکتری گرم مثبت و چهار باکتری گرم منفی بررسی شد و MIC و MBC آنها در عصارهٔ اتانولی بین ۱/۵ تا ۶ میلی‌گرم‌برمیلی‌لیتر و در عصارهٔ آبی ۰/۷۵ تا ۳ میلی‌گرم‌برمیلی‌لیتر بود که درمقایسه با مطالعهٔ حاضر نشان می‌دهد اثر ضدباکتریایی عصاره‌های مشابه *اینونوتوس اوبلیگوس* قوی‌تر از *اینوکوتیس لویس* است (۲۸). خاصیت ضدباکتری عصارهٔ متانولی *فلینوس ریموسوس*[18] روی سویه‌های باکتری‌های بیماری‌زا ازجمله *سودوموناس آئروژینوزا*، *اشریشیا کلی*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *باسیلوس*

سوبتیلیس در پژوهش شینا[۱۹] و همکاران گزارش شده است (۲۹). هور[۲۰] و همکاران اثر ضدباکتری عصارهٔ متانولی *فلینوس لینتئوس*[۲۱] را با MIC برابر ۵۰۰ میکروگرم‌برمیلی‌لیتر روی *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متیسیلین گزارش کرده‌اند (۳۰). در مطالعه‌ای دیگر، بلسار[۲۲] و همکاران خاصیت ضدباکتری قارچ‌های پلی‌پور *فلینوس سویتینیا*[۲۳] و *فلینوس مریلیی*[۲۴] را با میزان MIC برابر ۰/۷۱ تا ۱/۴۲ میلی‌گرم‌برمیلی‌لیتر روی باکتری *اسینتوباکتربومانی* گزارش کرده‌اند (۳۱). در پژوهش ندلکوسکا[۲۵] و همکاران، اثر ضدباکتری عصارهٔ متانولی *فلینوس ایگنیاریوس*[۲۶] بر باکتری‌های *سودوموناس آئروژینوزا*، *اشریشیا کلی*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *باسیلوس سوبتیلیس* با MICهای به‌ترتیب ۱۰، ۵، ۵، ۲/۵ میلی‌گرم‌برمیلی‌لیتر گزارش شده است؛ در مطالعهٔ آنها مانند پژوهش حاضر، اثر ضدباکتری عصارهٔ متانولی بر باکتری‌های گرم مثبت بیشتر از باکتری‌های گرم منفی بود (۳۲)، ولی میزان MIC و MBC عصاره‌های قارچ‌های یادشده با نمونهٔ آزمایش‌شده در پژوهش حاضر تفاوت داشت که از تفاوت در نوع و مقدار متابولیت‌های موجود در هر گونه ناشی می‌شود.

آنتی‌اکسیدان‌ها توانایی حذف یا کاهش رادیکال‌های آزاد را دارند و مانع بیماری‌های دژنراتیو می‌شوند. روش رنگ‌سنجی (DPPH)، روش ساده‌ای برای تعیین فعالیت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات مختلف است (۳۳). در بررسی حاضر، خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های مختلف قارچ *اینوکوتیس لویس* بررسی شد. نتایج نشان دادند عصاره‌های متانولی و اتانولی خاصیت آنتی‌اکسیدانی قوی‌تری نسبت به عصارهٔ آبی دارند و آزمون آماری نیز این نتایج را تأیید کرد؛ همچنین IC_{50} عصاره‌های متانولی، اتانولی و آبی به‌ترتیب برابر با ۵۵۵، ۱۰۰۳و ۳۳۱۱/۲۵ میکروگرم‌برمیلی‌لیتر بود. در پژوهش دبناث[۲۷] و همکاران خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های مختلف *اینونوتوس اوبلیگوس* گزارش شد و خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها رابطهٔ مستقیمی با غلظت آنها داشت (۳۴). در مطالعه‌ای دیگر، جانگ[۲۸] و لی[۲۹] خاصیت آنتی‌اکسیدانی پلی‌فنل‌هایی نظیر هیسپیدین، هیفولومین بی[۳۰]، کافئیک‌اسید و دیگر ترکیبات فنلی موجود در قارچ‌های *اینونوتوس زرانتیکوس*[۳۱] و *فلینوس لینتئوس* را گزارش کرده‌اند (۳۵–۳۷) که در آزمون HPLC مطالعهٔ حاضر، ترکیب کافئیک‌اسید در عصارهٔ متانولی تشخیص داده شد؛ در پژوهش دیگری نیز خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصارهٔ متانولی و پلی‌فنل‌های اینونوبلین[۳۲] و فلیگریدین[۳۳]جداشده از قارچ *اینونوتوس اوبلیگوس* گزارش شده است (۳۸). دای[۳۴] و همکاران در سال ۲۰۱۰، خاصیت آنتی‌اکسیدانی هیسپیدین موجود در گونه‌های *فلینوس* را گزارش کرده‌اند (۳۹). اگرچه نتایج پژوهش‌های یادشده با نتایج پژوهش حاضر مطابقت دارند، تفاوت‌هایی در مقدار IC_{50} آنها وجود دارند که به نظر می‌رسد از تفاوت در نوع متابولیت‌های هر قارچ و روش عصاره‌گیری ناشی می‌شوند.

پژوهش آبوگری[۳۵] در سال ۲۰۱۳ نشان داد روش استخراج، نوع حلال و نوع گونهٔ قارچ بر میزان استخراج متابولیت‌های ثانویه اثر می‌گذارد و مقدار فنل و فلاونوئید کل در عصاره‌ها باتوجه‌به حلال‌های مختلف و گونه‌های قارچ‌های مختلف تفاوت زیادی دارد؛ برای نمونه در برخی مطالعه‌ها، میزان فنل کل عصارهٔ متانولی یک قارچ بیشتر است و در قارچ دیگر، میزان فنل کل عصارهٔ اتانولی در مقایسه با دیگر عصاره‌ها بیشتر است و این تفاوت‌ها نشان می‌دهند استخراج متابولیت‌های قارچ‌ها دستورعمل‌های متفاوتی دارد که به نوع قارچ،

گروه و جنس آن نیز بستگی دارد و به پژوهش‌های بیشتر در این زمینه نیاز است (۴۰). در مطالعهٔ حاضر، مقدار فنل و فلاونوئید کل در عصارهٔ متانولی در غلظت‌های مختلف بیشتر از دو عصارهٔ دیگر بود و اختلاف میان آنها معنادار بود؛ همچنین ارتباط مستقیمی بین میزان فنل و فلاونوئید با میزان اثر آنتی‌اکسیدانی و ضدباکتریایی عصاره‌ها وجود داشت که این نسبت در مطالعه‌های دیگر نیز نشان داده شده است (۴۱)؛ باوجوداین، محتوای کل ترکیبات فنلی به‌تنهایی معیار دقیق و ثابتی برای اثبات قدرت آنتی‌اکسیدانی و ضدباکتریایی یک نمونه نیست، بلکه ماهیت، نوع و میزان ترکیبات منفرد فنلی نمونه شاخص قدرت آنتی‌اکسیدانی و ضدباکتریایی آن به شمار می‌آیند. در پژوهش حاضر، روش کروماتوگرافی HPLC استفاده و باتوجه‌به استانداردهای انتخابی، حضور تعدادی از ترکیبات فنلی و آسکوربیک‌اسید در عصارهٔ متانولی این قارچ بررسی شد.

ترکیباتی که در آزمون HPLC عصارهٔ متانولی قارچ *اینوکوتیس لویس* در پژوهش حاضر تشخیص داده شدند، عبارتند از: آسکوربیک‌اسید، کاتچین، رزورسینول، وانیلیک‌اسید و کافئیک‌اسید. ویژگی ضدباکتریایی و آنتی‌اکسیدانی کافئیک‌اسید، کاتچین، رزورسینول (۴۲–۴۵) و آسکوربیک‌اسید (۴۶ و ۴۷) در پژوهش‌های مختلف بررسی و گزارش شده است. در مطالعهٔ نوواکا[۳۶] در سال ۲۰۱۵ و آلوس[۳۷] در سال ۲۰۱۳، ویژگی‌های ضدباکتریایی فنل کل و چند ترکیب فنلی مانند وانیلیک‌اسید و مشتقات سینامیک‌اسید (فرولیک‌اسید، کومارین، و کافئیک‌اسید) شناسایی‌شده در چند قارچ ماکرومیست روی باکتری‌های گرم مثبت و منفی گزارش شده‌اند (۱ و ۴۸)؛ بنابراین، ویژگی ضدباکتریایی قارچ *اینوکوتیس لویس* را می‌توان تا حدی به ترکیبات فنلی آن نسبت داد، اما پژوهش‌های بیشتری در این زمینه لازم است.

پژوهش‌های چندانی در زمینهٔ ویژگی‌های ترکیبات زیست‌فعال قارچ‌های خانوادهٔ هایمنوکتاسه در ایران انجام نشده‌اند. احسانی‌فرد[۳۸] و همکاران پتانسیل کنترل هیپرتری‌گلیسیریدمی و نیز تنظیم انسولین را با استفاده از عصارهٔ آبی قارچ *اینوکوتیس لویس* گزارش کرده‌اند (۱۳ و ۱۴)؛ به‌طوری‌که تیمار موش‌ها با عصارهٔ آبی این قارچ سبب کاهش سطوح تری‌گلیسیرید در سرم خون و سطح آنزیم کبدی AST و کاهش نفوذ لکوسیت‌ها در بافت کبد می‌شود (۱۳)؛ ازاین‌رو، به نظر می‌رسد انجام پژوهش‌های بیشتر در زمینهٔ ویژگی‌های دارویی این قارچ ضروری است.

نتیجه‌گیری

نتایج مطالعهٔ حاضر نشان دادند قارچ *اینوکوتیس لویس* عملکرد آنتی‌اکسیدانی و ضدباکتریایی دارد و دارای ترکیبات فنلی و آسکوربیک‌اسید است. عصاره‌های متانولی و اتانولی اثر ضدباکتریایی و آنتی‌کسیدانی قوی‌تری نسبت به عصارهٔ آبی دارند و مقدار ترکیبات فنلی و فلاونوئید کل آنها نسبت به عصارهٔ آبی بیشتر است. ویژگی ضدباکتریایی *اینوکوتیس لویس* را تا حدی می‌توان به میزان ترکیبات فنلی آن نسبت داد. ترکیبات ضدباکتریایی موجود در قارچ‌ها پتانسیل ارزشمندی برای کاربرد به‌شکل آنتی‌بیوتیک‌های جدید در درمان عفونت‌ها دارند؛ همچنین می‌توان از آنها به‌شکل آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی استفاده کرد. بدیهی است به‌منظور طراحی آنتی‌بیوتیک‌ها و آنتی‌اکسیدان‌ها از گونه‌های مختلف

ازجمله *اینوکوتیس لویس* باید سایر متابولیت‌های قارچ استخراج و بررسی‌های فارماکولوژیک به‌ویژه آزمون‌های سمیت سلولی و سازوکارهای تعاملی انجام شوند.

سپاسگزاری

مطالعهٔ حاضر بخشی از پایان‌نامهٔ دورهٔ دکتری نویسندهٔ اول مصوب در سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران است. نویسندگان از همکاری مسئولان محترم آزمایشگاه‌ها و افرادی که ما را در انجام پژوهش حاضر یاری کردند، سپاسگزاری می‌کنند. پژوهش حاضر باکمک مالی شمارهٔ ۹۸/۸۲۴۳ ستادتوسعهٔ زیست‌فناوری معاونت علمی و فناوری ریاست جمهوری انجام شده است.

References

(1) Nowacka N., Nowak R., Drozd M., Olech M., Los R., Malm A. Antibacterial, antiradical potential and phenolic compounds of thirty-one polish mushrooms. *Plos One* 2015; 10(10): 1-13.

(2) De Silva DD., Rapior S., Sudarman E., Stadler M., Xu J., Alias SA., Hyde KD. Bioactive metabolites from macrofungi: ethnopharmacology, biological activities and chemistry. *Fungal Diversity* 2013; 62(1): 1-40.

(3) Zjawiony JK. Biologically active compounds from Aphyllophorales (Polypore) fungi. *Journal of Natural Products* 2004; 67(2): 300-310.

(4) Yamaç M., Bilgili F. Antimicrobial activities of fruit bodies and/or mycelial cultures of some mushroom isolates. *Pharmaceutical Biology* 2006; 44(9): 660-667.

(5) Svahn KS., Go U., El-seedi H., Bohlin L., Joakim DG., Chryssanthou E. Antimicrobial activity of filamentous fungi isolated from highly antibiotic-contaminated river sediment. *Infection Ecology and Epidemiology* 2012; 1: 6-11.

(6) Alves MJ., Ferreira ICFR., Dias J., Teixeira V., Martins A. A review on antifungal activity of mushroom extracts and isolated compounds. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 2012; 78: 1707-1718.

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

(8) Sánchez C. Reactive oxygen species and antioxidant properties from mushrooms. *Synthetic and Systems Biotechnology* 2017; 2(1): 13-22.

(9) Di Meo S., Reed TT., Venditti P., Victor VM. Role of ROS and RNS sources in physiological and pathological conditions. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2016; Special Issue: 1-44.

(10) Leslie SW., Gad SC., Acosta D. Cytotoxicity of butylated hydroxytoluene and butylated hydroxyanisole in cultured heart cells. *Toxicology* 1978; 10: 281-289.

(11) Ferreira IC., Barros L., Abreu R. Antioxidants in wild mushrooms. *Current Medicinal Chemistry* 2009; 16(12): 1543-1560.

(12) Ghobad-Nejhad M., Kotiranta H. The genus *Inonotus* sensu lato in Iran, with keys to *Inocutis* and *Mensularia* worldwide. *Annales Botanici Fennici* 2008; 45(6): 465-476.

(13) Ehsanifard Z., Mir Mohammadrezaei F., Ghobad-Nejhad M., Safarzadeh A. Effect of aqueous extract of *Inocutis levis* on liver histopathology and hypertriglyceridemia in high sucrose fed Wistar rats. *Journal of Medicinal Plants* 2019; 70: 181-187.

(14) Ehsanifard Z., Mir-Mohammadrezaei F., Safarzadeh A., Ghobad-Nejhad M. Aqueous extract of *Inocutis levis* improves insulin resistance and glucose tolerance in high sucrose-fed Wistar rats., *Journal of Herbmed Pharmacology* 2017; 6(4): 160-164.

(15) Singleton VL., Orthofer R., Lamuela-Raventós RM. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology* 1999; 299: 152-178.

(16) Mitrović T., Stamenković S., Cvetković V., Tošić S., Stanković M., Radojević I., Stefanović O., Čomić L., Đačić D., Ćurčić M., Marković S. Antioxidant, antimicrobial and antiproliferative activities of five lichen species. *International Journal of Molecular Sciences* 2011; 12(8): 5428-5448.

(17) Stankovic MS. Total phenolic content, flavonoid concentration and antioxidant activity of *Marrubium peregrinum* L. extracts. *Kragujevac Journal of Science* 2011; 33: 63-72.

(18) Matejić JS., Džamić AM., Mihajlov-Krstev TM., Randelović VN., Krivošej ZD., Marin PD. Total phenolic and flavonoid content, antioxidant and antimicrobial activity of extracts from *Tordylium maximum*. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 2013; 3(1): 55-59.

(19) Wang X., Sankarapandian K., Cheng Y., Woo SO., Kwon HW., Perumalsamy H., Ahn YJ. Relationship between total phenolic contents and biological properties of propolis from 20 different regions in South Korea. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 2016: 2016; 16(65): 1-12.

(20) Shimada K., Fujikawa K., Yahara K., Nakamura T. Antioxidative properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1992; 40(6): 945-948.

(21) Mradu G., Saumyakanti S., Sohini M., Arup M. HPLC profiles of standard phenolic compounds present in medicinal plants. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research* 2012; 4(3): 162-167.

(22) Tacconelli E., Carrara E., Savoldi A., Harbarth S., Mendelson M., Monnet DL., Pulcini C., Kahlmeter G., Kluytmans J., Carmeli Y., Ouellette M. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *The Lancet Infectious Diseases* 2018; 18(3): 318-327.

(23) Wasser SP. Medicinal mushroom science: history, current status, future trends, and unsolved problems. *International Journal of Medicinal Mushrooms* 2010; 12(1): 1-16.

(24) Suay I., Arenal F., Asensio FJ., Basilio A., Cabello MA., Díez MT., García JB., Del Val AG., Gorrochategui J., Hernández P., Peláez F. Screening of basidiomycetes for antimicrobial activities. *Antonie van Leeuwenhoek* 2000; 78(2): 129-140.

(25) Nikaido H., Vaara M. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiological Reviews* 1985; 49(1): 1-32.

(26) Scherrer R., Gerhardt P. Molecular sieving by the *Bacillus megaterium* cell wall and protoplast. *Journal of Bacteriology* 1971; 107(3): 718-735.

(27) Negi PS., Jayaprakasha GK. Antioxidant and antibacterial activities of *Punicagranatum* peel extracts. *Journal of Food Science* 2003; 68(4): 1473-1477.

(28) Glamočlija J., Ćirić A., Nikolić M., Fernandes Â., Barros L., Calhelha RC., Ferreira IC., Soković M., Van Griensven LJ. Chemical characterization and biological activity of Chaga (*Inonotus obliquus*), a medicinal “mushroom”. *Journal of Ethnopharmacology* 2015; 162: 323-332.

(29) Sheena N., Ajith TA., Mathew A., Janardhanan KK. Antibacterial activity of

three macrofungi, *Ganodermalucidum*, Navesporusfloccosa and *Phellinus rimosus* occurring in South India. *Pharmaceutical Biology* 2003; 41(8): 564-567.

(30) Hur JM., Yang CH., Han SH., Lee SH., You YO., Park JC., Kim KJ. Antibacterial effect of *Phellinus linteus* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Fitoterapia* 2004; 75(6): 603-605.

(31) Belsare MH., Bapat GS., Ranadive KR., Vaidya JG., Deokule SS. No TiIn-vitro susceptibility testing of some *Phellinus* species against *Acinetobacter baumannii* from Maharashtra Indiatle. *Journal of Medicinal Plants Research* 2010; 4(13): 1335-1338.

(32) Walsh FM., Amyes SG. Microbiology and drug resistance mechanisms of fully resistant pathogens. *Current Opinion in Microbiology* 2004; 7(5): 439-444.

(33) Dulay RMR., Miranda LA., Malasaga JS., Kalaw SP., Reyes RG., Hou CT. Antioxidant and antibacterial activities of acetonitrile and hexane extracts of *Lentinus tigrinus* and *Pleurotus djamour*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 2017; 9: 141-144.

(34) Debnath T., Park S., Kim D., Jo J., Lim B. Anti-oxidant and anti-inflammatory activities of *inonotus obliquus* and germinated brown rice extracts. *Molecules.* 2013; 18(8): 9293-9304.

(35) Jung JY., Lee IK., Seok SJ., Lee HJ., Kim YH., Yun BS. Antioxidant polyphenols from the mycelial culture of the medicinal fungi *Inonotusxeranticus and Phellinus linteus*. *Journal of Applied Microbiology* 2008; 104(6): 1824-1832.

(36) Lee IK., Seok SJ., Kim WK., Yun BS. Hispidin derivatives from the mushroom *Inonotus xeranticus* and their antioxidant activity. *Journal of Natural Products* 2006; 69(2): 299-301.

(37) Park I-H., Chung S-K., Lee K-B., Yoo Y-C., Kim S-K., Kim G-S., et al. An antioxidant hispidin from the mycelial cultures of *Phellinus linteus.Archives of Pharmacal Research* 2004; 27(6): 615-618.

(38) Lee IK., Kim YS., Jang YW., Jung JY., Yun BS. New antioxidant polyphenols from the medicinal mushroom *Inonotus obliquus. Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 2007; 17(24): 6678-6681.

(39) Dai Y-C., Zhou L-W., Cui B-K., Chen Y-Q., Decock C. current advances in Phellinus sensu lato: medicinal species, functions, metabolites and mechanisms. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2010; 87(5): 1587-1593.

(40) Abugri DA., McElhenney WH. Extraction of total phenolic and flavonoids from edible wild and cultivated medicinal mushrooms as affected by different solvents. *Journal of Natural Product and Plant Resources* 2013; 3(3): 37-42.

(41) Chang HY., Ho YL., Sheu MJ., Lin YH., Tseng MC., Wu SH., Huang GJ., Chang YS. Antioxidant and free radical scavenging activities of *Phellinus merrillii* extracts. *Botanical Studies* 2007; 48(4): 407-417.

(42) Jiang RW., Lau KM., Hon PM., Mak TC., Woo KS., Fung KP. Chemistry and biological activities of caffeic acid derivatives from salvia miltiorrhiza. *Current Medicinal Chemistry* 2005; 12(2): 237-246.

(43) Magnani C., Isaac VL., Correa MA., Salgado HR. Caffeic acid: A review of its potential use in medications and cosmetics, analytical methods. *Royal Society of Chemistry* 2014; 6: 3203-3210.

(44) Alvarado IE., Navarro D., Record E., Asther M., Asther M., Lesage-Meessen L. Fungal biotransformation of p-coumaric acid into caffeic acid by Pycnoporus cinnabarinus: An alternative for producing a strong natural antioxidant. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 2003; 19(2): 157-160.

(45) Veluri R., Weir TL., Bais HP., Stermitz FR., Vivanco JM. Phytotoxic and antimicrobial activities of catechin derivatives. *Journal of Agricultural and*

Food Chemistry 2004; 52: 1077-1082.

(46) Cort, M. W. Antioxidant properties of ascorbic acid in foods. *Ascorbic Acid: Chemistry, Metabolism, and Uses* 1982; 31-45.

(47) Verghese RJ., Ramya SR., Kanungo R. *In vitro* antibacterial activity of vitamin C and in combination with ciprofloxacin against uropathogenic *Escherichia coli*. *Journal of Clinical and Diagnostic Research* 2017; 11(12): 1-5.

(48) Alves MJ., Ferreira ICFR., Froufe HJC., Abreu RMV., Martins A., Pintado M. Antimicrobial activity of phenolic compounds identified in wild mushrooms, SAR analysis and docking studies. *Journal of Applied Microbiology* 2013; 115(2): 346-357.

---

[1]- Reactive Oxygen Species (ROS)
[2]- BHA(Butylated Hydroxyl Anisole
[3]- *Inocutis levis* (P. Karst.) Y.C. Dai
[4]- Hymenochaetales
[5]- Hymenochaetaceae
[6]- 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl(DPPH)
[7]- *Staphylococcus aureus*
[8]- *Bacillus subtilis*
[9]- *Streptococcus mutans*
[10]- *Pseudomonas aeruginosa*
[11]- *Acinetobacter baumanni*
[12]- *Escherichia coli*
[13]- guard
[14]- Retention time
[15]- Suay
[16]- Glamoclija
[17]- *Inonotus obliquus*
[18]- *Phellinus rimosus*
[19]- Sheena
[20]- Hur
[21]- *Phellinus linteus*
[22]- Belsare
[23]- *Phellinus swieteniae*
[24]- *Phellinus merrillii*
[25]- Nedelkoska
[26]- *Phellinus igniarius*
[27]- Debnath
[28]- Jang
[29]- Lee
[30]- Hypholomine B
[31]- *Inonotus xeranticus*
[32]- Inonoblins
[33]- Phelligridins
[34]- Dai
[35]- Abugri
[36]- Nowacka
[37]- Alves
[38]- Ehsanifard