

(OPEN ACCESS)

**Optimization of the production of bioactive compounds
from *Ganoderma lucidum* using cold plasma:
An exploratory factor analysis approach**

Leila Moradipour^{*1}, Vahide Payamnoor², Jamileh Nazari³, Farshad Sohbatzadeh⁴

1. Corresponding Author, Ph.D. Student of Silviculture and Forest Ecology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. E-mail: leila.moadipour_s98@gau.ac.ir
2. Associate Prof., Dept. of Silviculture and Forest Ecology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. E-mail: payamnoor@gau.ac.ir
3. Ph.D. Graduate of Silviculture and Forest Ecology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. E-mail: jamile.nazari85@gmail.com
4. Professor, Nuclear Physics Group, University of Mazandaran, Babolsar, Iran. E-mail: f.sohbat@umz.ac.ir

Article Info	ABSTRACT
Article type: Full Length Research Paper	Background and Objectives: <i>Ganoderma lucidum</i> is a medicinal mushroom renowned for its diverse bioactive compounds with significant cosmeceutical potential, including kojic acid, phenols, and polysaccharides, which exhibit skin-whitening, antioxidant, anti-inflammatory, and UV-protective properties. This study aimed to enhance the production of these valuable metabolites in <i>G. lucidum</i> mycelium using cold plasma technology as an elicitor.
Article history: Received: 06.01.2025 Revised: 08.19.2025 Accepted: 08.19.2025	
Keywords: Cold plasma, Factor analysis, <i>Ganoderma lucidum</i> , Kojic acid, Plant secondary compounds	Materials and Methods: <i>G. lucidum</i> samples were collected from the forests of Shasht Kalateh, Golestan, sterilized, and purified on potato dextrose agar (PDA). The mycelia were treated with 24 distinct regimens across three cold plasma types: Jet, Surface Dielectric Barrier Discharge (SDBD), and Volume Dielectric Barrier Discharge (VDBD). Bioactive compound production (kojic acid, total phenols, and antioxidant activity via DPPH assay) was quantified. The top 15 performing treatments were selected for further analysis of 16 extracellular and intracellular secondary metabolites. Relationships between treatments and compound production were evaluated using exploratory factor analysis.
	Results: Analysis of variance (ANOVA) revealed significant differences ($P < 0.05$) in the production of kojic acid, total phenols, and intracellular antioxidants among the treatments. Based on these metrics, nine lower-yielding treatments were eliminated. Factor analysis identified two key treatments: S-L (SDBD in liquid media) for the intracellular phase and V-S (VDBD in solid media) for the extracellular phase. The S-L treatment demonstrated strong positive correlations with the synthesis of astaxanthin ($r = 0.95$), ascorbic acid ($r = 0.95$), and polysaccharides ($r = 0.88$). The V-S treatment was strongly correlated with the production of betulinic acid ($r = 0.93$) and ganoderic acid ($r = 0.88$).

Conclusion: Cold plasma treatment is an effective strategy for eliciting enhanced production of high-value cosmeceutical compounds in *G. lucidum* cultures. Specific plasma treatments selectively increased the yield of target metabolites. These findings suggest that optimized *in vitro* culture systems supplemented with cold plasma elicitation could serve as a viable alternative to wild-harvested mushrooms. Further genetic and molecular studies are warranted to elucidate the mechanisms underlying this enhancement.

Cite this article: Moradipour, Leila, Payamnoor, Vahide, Nazari, Jamileh, Sohbatzadeh, Farshad. 2025. Optimization of the production of bioactive compounds from *Ganoderma lucidum* using cold plasma: An exploratory factor analysis approach. *Journal of Wood and Forest Science and Technology*, 32 (2), 25-50.



© The Author(s).

DOI: 10.22069/jwfst.2025.23721.2115

Publisher: Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

بهینه‌سازی تولید ترکیبات مؤثره گانودرما لوسیدوم (*Ganoderma lucidum*) با پلاسمای سرد: رویکرد تحلیل عاملی اکتشافی (Exploratory factor analysis)

لیلا مرادی پور^{۱*}، وحیده پیام‌نور^۲، جمیله نظری^۳، فرشاد صحبت‌زاده^۴

۱. نویسنده مسئول، دانشجوی دکتری جنگل‌شناسی و اکولوژی جنگل، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.
رایانامه: leila.moadipour_s98@gu.ac.ir
۲. دانشیار گروه جنگل‌شناسی و اکولوژی جنگل، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.
رایانامه: payamnoor@gu.ac.ir
۳. دانش‌آموخته دکتری جنگل‌شناسی و اکولوژی جنگل، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.
رایانامه: jamile.nazari85@gmail.com
۴. استاد گروه فیزیک هسته‌ای، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران. رایانامه: f.sohbat@umz.ac.ir

اطلاعات مقاله	چکیده
نوع مقاله: مقاله کامل علمی- پژوهشی	سابقه و هدف: گانودرما لوسیدوم نوعی قارچ ساپروفیت است که حیات آن وابسته به درختان پوسیده جنگلی بوده و معمولاً در مناطق معتدل و نیمه‌گرمسیری، روی تنه و کنده درختان برگ‌ریز رشد می‌کند. خواص ترکیباتی چون اسید کوجیک و اسید آسکوربیک (خاصیت سفیدکنندگی و ضد لک)، فنول‌ها (لایه‌برداری و سفت‌کنندگی پوست)، پلی‌ساکاریدها و کاروتنوئیدها (نرم‌کنندگی و حفاظت در برابر اشعه‌های ماوراءبنفش و همچنین بتاکاروتن، لیکوپن، آستاگزانتین، اسید آسکوربیک، فلاونوئیدها و فنول‌ها (خواص ضد التهابی و آنتی‌اکسیدانی) باعث شده‌اند که این قارچ در صنعت آرایشی و بهداشتی در جایگاه خوبی قرار گیرد.
واژه‌های کلیدی: اسید کوجیک، پلاسمای سرد، تحلیل عاملی، ترکیبات ثانویه گیاهی، گانودرما لوسیدوم	مواد و روش‌ها: نمونه‌های قارچ از جنگل‌های شصت‌کلاته گرگان (طرح جنگلداری دکتر بهرام‌نیا) تهیه، استریل و در محیط کشت جامد (PDA) خالص‌سازی شد. سه نوع پلاسمای سرد (SDBD = S، Jet plasma = J و VDBD = V) با ۲۴ تیمار بر روی میسیلیوم‌های موجود در محیط کشت جامد و مایع اعمال شد. سه ترکیب اسید کوجیک، فنول کل و آنتی‌اکسیدان به روش DPPH با سه تکرار اندازه‌گیری شد. تیمارهای با نتایج کم‌تر حذف و ۱۵ تیمار با بیش‌ترین مقدار ترکیبات در این مرحله جهت اندازه‌گیری سایر ترکیبات انتخاب شدند. ۱۶ ترکیب ثانویه برای ۱۵ تیمار پلاسمای سرد منتخب در فاز برون‌سلولی و درون‌سلولی اندازه‌گیری شد. سپس به بررسی روابط بین متغیرها با تحلیل عاملی اکتشافی پرداخته و تیمارهای شاخص شناسایی شدند.

یافته‌ها: با توجه به نتایج به دست آمده، آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) بین داده‌های اسید کوجیک، فنول کل و آنتی اکسیدان درون سلولی (میسلیوم) دارای اختلاف معنی دار در سطح ۹۵ درصد می باشد. همچنین بین داده‌های فنول کل و خواص آنتی اکسیدان درون سلولی اختلاف معنی دار مشاهده شد. با توجه به مقادیر این سه شاخص مهم با کاربردهای آرایشی-بهداشتی از تعداد ۲۴ تیمار پلاسمایی از سه منبع مختلف شامل پلاسمای جت (Jet plasma)، پلاسمای حجمی (Volume DBD) و پلاسمای سطحی (Surface DBD) و مقایسه آن‌ها با نمونه‌های طبیعی (NM) و شاهد (Con)، منجر به حذف ۹ تیمار با مقادیر کم تر معنی داری گردید. تیمارهای پلاسمای انتخاب شده برای محیط کشت جامد شامل Surface DBD (۴، ۲، ۰/۵ دقیقه)، Jet plasma در محیط جامد (۳، ۴، ۵ دقیقه) Volume DBD (۰/۵ و ۰/۷۵ و ۱/۵ دقیقه) و برای محیط کشت مایع شامل Jet plasma (۱، ۷ و ۹ دقیقه) و Surface DBD در محیط مایع (۱، ۱۲ و ۸ دقیقه) بود. همچنین، در فاز درون سلولی تیمار S-L (SDBD) اعمال شده در محیط کشت مایع با مقادیر ویژه بالاتر ۷/۱۹ توانست ۳۴/۸۶ درصد داده‌ها توجیه کند این تیمار با تحریک تولید ترکیبات ارزشمندی مانند آستاگزانتین (همبستگی ۰/۹۵)، اسید آسکوربیک (همبستگی ۰/۹۵) و پلی ساکاریدها (همبستگی ۰/۸۸)، همبستگی درونی این ترکیبات را به خوبی نشان داد. همین طور در فاز برون سلولی تیمار V-S (VDBD) اعمال شده در محیط کشت جامد با دارا بودن بالاترین سهم مؤلفه اول (۴۴/۹۹ درصد) و مقادیر ویژه ۷/۵۲ همبستگی قوی با ترکیبات ارزشمندی مانند اسید بتولینیک (۰/۹۳) و اسید گانودریک (۰/۸۸) داشت.

نتیجه گیری: قارچ دارویی گانودرما لوسیدوم با بیش از ۶۰۰ ترکیب فعال در این مطالعه تحت تیمار نوظهور پلاسمای سرد قرار گرفت. نتایج نشان از افزایش ترکیبات اسید کوجیک، فنول کل و خواص آنتی اکسیدان دارد. تحلیل عاملی نیز تیمار V-S در فاز برون سلولی و تیمار S-L در فاز درون سلولی را به عنوان تیمارهای تبیین کننده داده‌ها معرفی کرد. کشت‌های درون شیشه‌ای که تحت تیمار پلاسمای سرد قرار گرفته‌اند، پتانسیل زیادی برای جایگزینی قارچ‌های طبیعی دارند. انجام مطالعات ژنتیکی و مولکولی برای بررسی ژن‌های دخیل در افزایش ترکیبات و شناسایی مکانیسم تولید ضروری به نظر می‌رسد.

استناد: مرادی پور، لیلا، پیام نور، وحیده، نظری، جمیله، صحبت زاده، فرشاد (۱۴۰۴). بهینه سازی تولید ترکیبات مؤثره گانودرما لوسیدوم (*Ganoderma lucidum*) با پلاسمای سرد: رویکرد تحلیل عاملی اکتشافی (Exploratory factor analysis). نشریه پژوهش های علوم و فناوری چوب و جنگل، ۳۲ (۲)، ۵۰-۲۵.

DOI: 10.22069/jwfst.2025.23721.2115



© نویسندگان.

ناشر: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

مقدمه

Ganoderma lucidum به عنوان یک بازیدیومیست از خانواده Ganodermataceae شناخته می شود، حیات آن وابسته به خشکساده ها و بخش های پوسیده درختان جنگلی است. به عبارتی این گونه نوعی قارچ پارازیت و ساپروفیت است (۱). این قارچ در مناطق معتدل و نیمه گرمسیری، به ویژه در جنگل های آسیا، آمریکا، اروپا و آمریکای جنوبی، روی تنه و کنده درختان برگ ریز مانند بلوط، شاه بلوط، راش، ممرز، افرا، توس، توسکا، نمدار، زبان گنجشک، گلابی وحشی، ماگنولیا، فندق و صنوبر رشد می کند (۲). این قارچ در آمریکای شمالی بیش تر در سواحل شرقی و مناطق جنوب غربی یافت می شود. حضور این گونه در جنگل های هیرکانی شمال ایران گزارش شده است (۳، ۴). قارچ گانودرما لوسیدوم، معروف به "ملکه قارچ ها" منبع غنی از ترکیبات زیست فعال است که در داروسازی و تولید محصولات طبیعی کاربرد دارد. در کشورهای آسیایی، نماد سلامتی و جاودانگی معروف است (۵). این قارچ، با بیش از ۶۰۰ ترکیب فعال شامل پلی ساکاریدها، اسید کوجیک، تری ترپنوئیدها، فنول ها و مشتقات آن ها، سیستم ایمنی بدن را تقویت و در پیشگیری و درمان بیماری ها نقش دارد (۶).

اسید کوجیک^۱ با فرمول شیمیایی $C_6H_6O_4$ یکی از ترکیبات ثانویه گانودرما لوسیدوم به حساب می آید، این ترکیب یک اسید ضعیف است که در گروه اسیدهای آلی طبقه بندی می شود (۵). اسید کوجیک دارای خواص متعددی از جمله سفیدکنندگی پوست، محافظت در برابر اشعه ماوراءبنفش، اثرات ضد میکروبی و ضد قارچی، خاصیت ضد التهابی، کاهش علائم پیری و پاک سازی رادیکال های آزاد است. به دلیل این ویژگی های برجسته، اسید کوجیک به عنوان جایگزین

1- Kojic acid

ایمن و مؤثر هیدروکینون در محصولات آرایشی-بهداشتی شناخته می شود. امروزه استفاده از این ترکیب در فرمولاسیون هایی مانند کرم ها، لوسیون ها و صابون ها با غلظت ۱ تا ۴ درصد رایج است (۷). ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی این قارچ با خاصیت لایه برداری و پتانسیل آنتی اکسیدانی قوی در کاهش روند پیری، کاهش التهاب و کاهش خطر استرس اکسیداتیو مرتبط با بیماری های مزمن نقش به سزایی ایفا می کنند (۸). وجود ترکیبات دیگری چون اسید آسکوربیک (ضد لک)، پلی ساکاریدها و کاروتنوئیدها (نرم کنندگی و حفاظت در برابر اشعه ماوراءبنفش)، بتاکاروتن، لیکوپن، آستاگزانتین (خاصیت ضد التهابی و آنتی اکسیدانی) از این گونه گزارش شده است که باعث شده به عنوان یک منبع غنی از ترکیبات آرایشی توسط تولیدکنندگان و پژوهشگران در نظر گرفته شود (۹، ۱۰، ۱۱، ۱۲، ۱۳). تجمع بیش از حد طبیعی گونه های اکسیژن واکنش پذیر (ROS) مانند آنیون سوپر اکسید (O_2^-)، رادیکال هیدروکسیل (OH) و پراکسید هیدروژن (H_2O_2) می تواند منجر به آسیب اکسیداتیو به DNA، پروتئین ها و سایر ماکرومولکول ها شده و در نهایت به بروز بیماری های مختلف منجر گردد (۱۴). همبستگی مثبت بین توانایی آنتی اکسیدانی و میزان تری ترپنوئیدها و پلی فنول ها در عصاره قارچ *G. lucidum* وجود دارد. در واقع، عملکرد دارویی این گونه به ترکیبات ثانویه آن وابسته است (۱۵، ۱۶، ۱۷). آگاهی نسبی جنگل نشینان و گردشگران با پتانسیل بالای این قارچ در حوزه دارویی و درمان باعث برداشت بی رویه آن از سطح جنگل شده است. در چنین مواقعی کشت های آزمایشگاهی به عنوان جایگزینی برای تولید ترکیبات ثانویه مطرح می باشند. در این نوع کشت ها معمولاً از الیستورها (محرك های شیمیایی و فیزیکی) با هدف افزایش تولید بهره

(Exploratory factor analysis) ارتباط بین ترکیبات ثانویه در هر تیمار پلاسمایی تفسیر و تیمارهای شاخص شناسایی شد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری و استریل کردن نمونه‌ها: نمونه‌برداری قارچ *G. lucidum* با جنگل گردشی تصادفی از جنگل‌های شرق هیرکانی - گلستان - ایران انجام شد. ضدعفونی نمونه‌ها با استفاده از اتانول ۷۰٪ (۱/۵ دقیقه) و سپس هیپوکلریت سدیم ۱/۵٪ (۱۰ دقیقه) انجام و سه بار با آب مقطر استریل شستشو شده و در محیط PDA (سیب‌زمینی، دکستروز، آگار) کشت و در انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و در تاریکی تا پر شدن پتری‌ها نگهداری شدند. سپس، میسلیم‌ها بازکشت و خالص‌سازی شدند.

اعمال تیمار پلاسمای سرد: اعمال تیمارها در دو حالت اعمال انرژی بر پتری‌های حاوی محیط جامد (میسلیم خالص‌شده) و بر روی محیط مایع با قرار گرفتن میسلیم خالص به مدت ۲۱ روز در محیط کشت مایع PDB (سیب‌زمینی، دکستروز) انجام شد. لازم به ذکر است تیمارهایی که بر روی محیط‌های جامد انجام شدند مجدد در شرایط تاریکی و بر روی شیکر به فاز سوسپانسیون منتقل گردیده و بعد از ۲۱ روز فیلتر شدند. مواد جامد حاصل از فیلتراسیون به‌عنوان عصاره درون‌سلولی و مایع محیط کشت عصاره برون‌سلولی می‌باشد. شرایط تیمارهای القاء شده در جدول ۱ نشان داده شده است.

گرفته می‌شود. محرک‌ها می‌توانند با اتصال به گیرنده‌های خاص در سطح سلول‌های گیاه، یک سری واکنش‌های بیوشیمیایی را آغاز کنند که منجر به تنظیم بیان ژن‌ها و افزایش تولید ترکیبات دفاعی می‌شود (۲۰، ۱۹).

هم‌چنین، پلاسمای سرد محتوای تری‌تریپنویید کل را نیز افزایش داد. ما و همکاران (۲۰۱۸) در مطالعه خود گزارش کردند که تیمار با پلاسمای سرد موجب ایجاد یک‌سویه جهش‌یافته شده است که ۲۶ درصد افزایش در تولید پلی‌ساکاریدهای کل نسبت به سویه وحشی نشان می‌دهد (۲۶).

تحلیل عاملی (Factor analysis) یا تجزیه عاملی یکی از روش‌های آماری برای تجزیه اطلاعات موجود در داده‌ها است که با خلاصه و ترکیب متغیرها، تفسیر همبستگی درونی بین تعدادی صفت، به شناسایی تأثیرگذارترین متغیر و صفات می‌پردازد. با کاهش حجم داده‌ها علاوه بر کاهش هزینه‌ها متغیرهای مؤثر در شکل‌گیری پدیده‌ها شناسایی شده و به‌این‌ترتیب متغیرهای مؤثرتر در پژوهش‌های آینده با تکرار و تمرکز بیشتری بررسی می‌شوند (۲۷، ۲۸).

در پژوهش حاضر از ۲۴ تیمار پلاسمای سرد با هدف افزایش ترکیبات مؤثر برای پوست شامل اسید کوجیک، فنول کل و درصد خواص آنتی‌اکسیدانی عصاره درون‌سلولی و برون‌سلولی گانودرما لوسیدوم استفاده شد. ۱۵ تیمار بهتر انتخاب و تغییرات ۱۶ گروه ترکیب زیست‌فعال در اثر تیمار پلاسمای بررسی گردید. با آزمون تحلیل عاملی اکتشافی

جدول ۱- مشخصات تیمارهای پلاسمای اعمال شده.

Table 1. Specifications of the applied plasma treatments.

نوع پلاسما Plasma type	گاز ورودی Process Gas	زمان تیمار (min) Duration of treatment	نمونه تحت تیمار Treated Sample	مقدار ولتاژ (KV) Peak-to-Peak voltage	فرکانس (KHz) Frequency
پلاسمای جت Jet plasma	آرگون	1, 3, 4, 5	محیط کشت جامد (PDA)	15	6
پلاسمای جت Jet plasma	آرگون	1, 3, 5, 7, 9	محیط کشت مایع (PDB)	15	6
پلاسمای سطحی SDBD	هوای اتمسفر	0.5, 1, 2, 4, 6	محیط کشت جامد (PDA)	16	9
پلاسمای سطحی SDBD	هوای اتمسفر	1, 4, 8, 12	محیط کشت مایع (PDB)	16	9
VDBD	هوای اتمسفر	0.16, 0.5, 0.75, 1, 1.5, 3	محیط کشت جامد (PDA)	16	37

پایین) برداشته و در آون خشک گردید. به رسوب باقی مانده ۱ میلی لیتر اتانول مطلق زده و با فیلتر سرنگی ۰/۲ میکرونی فیلتر شد. در نهایت با استفاده از طیف سنج (اسپکترومتر UV-Vis) در طول موج ۲۴۵ نانومتر جذب آن خوانده و با استاندارد تیمول مقایسه گردید. (۲۹). برای اندازه گیری اسید گانودریک برون سلولی نیز همین مراحل انجام شد فقط در ابتدا از ۴ میلی لیتر محیط استفاده گردید.

اندازه گیری کاروتنوئیدها (آستاگزانتین، بتاکاروتن و لیکوپن)

آستاگزانتین: مقدار ۰/۱ گرم نمونه خشک (میسلیوم یا قارچ) یا ۱ میلی لیتر محیط کشت به همراه ۴ میلی لیتر هگزان مخلوط شده و به مدت یک دقیقه مخلوط شد. سپس جذب این محلول در طول موج ۴۷۰ نانومتر قرائت گردید مقدار آستاگزانتین با استفاده از رابطه ۱ محاسبه شد (۳۰).

در ادامه ترکیبات اسید کوجیک، فنول کل و آنتی اکسیدان به روش DPPH با سه تکرار اندازه گیری شد. تیمارهای با نتایج کم تر حذف شدند و ۱۵ تیمار با بیش ترین مقدار ترکیبات در این مرحله جهت اندازه گیری سایر ترکیبات انتخاب شدند. ۱۶ ترکیب برای ۱۵ تیمار پلاسمای سرد در فاز برون سلولی و درون سلولی اندازه گیری شد.

اسید گانودریک: ۰/۱ گرم قارچ یا میسلیوم با ۵ میلی لیتر اتانول ۵۰٪ به مدت یک هفته دو بار استخراج شد. دو عصاره مخلوط و در آون گذاشته شد تا خشک شوند. به رسوب باقی مانده ۵ میلی لیتر آب مقطر و ۵ میلی لیتر کلروفرم اضافه و به مدت ۲۴ ساعت روی شیکر قرار داده شد. با کمک قیف دکانتور، فاز پایین که کلروفرم آلی است برداشته شد. به نسبت برابر آن بی کربنات سدیم ۵٪ اضافه شده و ۱۲ ساعت شیکر شد. فاز بالا بی کربنات سدیم برداشته و با هیدروکلرید ۲ نرمال اسیدی شد. به مقدار بی کربنات سدیم موجود، کلروفرم اضافه و ۲۴ ساعت شیک شد. با استفاده از قیف دکانتور کلروفرم (فاز

$$A_{staxanthin} (mg) = A * V * P / \epsilon \quad (1)$$

درصد به مدت ۱ دقیقه به شدت تکان داده شد. پس از آن، با دور ۵۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتیفریوژ شد. سپس، جذب مایع رویی به دست آمده در طول موج‌های ۴۵۳ نانومتر، ۵۰۵ نانومتر و ۶۶۳ نانومتر اندازه‌گیری گردید (۳۱). غلظت بتاکاروتن و لیکوپن با استفاده از رابطه‌های ۲ و ۳ محاسبه شد:

$$b - \text{carotene} (mg / 100ml) = 0.216A_{663} - 0.304A_{505} + 0.452A_{453} \quad (2)$$

$$lycopene (mg / 100ml) = -0.0458A_{663} + 0.372A_{505} - 0.0806A_{453} \quad (3)$$

معرف مخلوط شده تا حجم نهایی به ۲ میلی‌لیتر برسد. سپس مخلوط به مدت ۱۰ دقیقه در تاریکی قرار گرفت و میزان جذب در طول موج ۷۶۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (۳۰).

ارگسترول: ۰/۱ گرم نمونه پودری قارچ و میسلیم برای کشت مایع، ۱ میلی‌لیتر محیط کشت در ۳ میلی‌لیتر KOH الکلی ۲۵٪ (۲۵ گرم KOH و ۳۵ میلی‌لیتر آب مقطر استریل مخلوط و با اتانول ۹۶٪ به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده می‌شود) مخلوط و ۱ دقیقه ورتکس شد و سپس یک ساعت در بن‌ماری با دمای ۸۰ درجه تغلیظ شد. بعد از سرد شدن، ۳ میلی‌لیتر n-heptan و ۱ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه و مخلوط ۳ دقیقه سانتیفریوژ شد. ۲۰ میکرولیتر از عصاره استرولی در ۱/۵ میلی‌لیتر اتانول ۱۰۰٪ رقیق شد. میزان جذب لایه شفاف رویی با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول موج ۲۸۱/۵ و ۲۳۰ نانومتر خوانده و با استفاده از رابطه ۴ میزان ارگسترول به دست آمد (۳۲).

که در آن، A مقدار جذب، V حجم رقیق شده برحسب میلی‌متر، P وزن مولکولی کاروتنوئید، ε ضریب جذب مولی.

بتاکاروتن، لیکوپن: برای این منظور، نمونه (۰/۱ گرم نمونه خشک (میسلیم یا قارچ) یا ۱ میلی‌لیتر محیط کشت) در یک مخلوط ۱۰ میلی‌لیتری از استون و هگزان با نسبت ۴:۶، به ترتیب با خلوص ۹۹/۵ و ۹۹

پلی‌ساکارید (قند کل): مقدار مشخص شده نمونه (۰/۱ گرم نمونه خشک (میسلیم یا قارچ) یا ۱ میلی‌لیتر محیط کشت) با نسبت ۴:۱ با اتانول ۸۰ درصد مخلوط شد. برای تغلیظ شدن به مدت ۱۰ دقیقه در بن‌ماری با دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. عصاره الکلی شفاف رویی پس از ۱۰ دقیقه در سانتیفریوژ ۱۰۰۰ دور در دقیقه حاصل شد. پس از آن، ۲۰۰ میکرولیتر از عصاره الکلی با ۳ میلی‌لیتر معرف آنترون (که شامل ۰/۱۵ میلی‌گرم پودر آنترون در ۱۰۰ میلی‌لیتر اسیدسولفوریک ۷۲ درصد است) مخلوط گردید و به مدت ۲۰ دقیقه در بن‌ماری در دمای ۱۰۰ درجه قرار داده شد. پس از سرد شدن، جذب در طول موج ۶۲۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. غلظت واقعی با استفاده از استاندارد گلوکز محاسبه شد (۳۱).

اسید آسکوربیک: ۰/۵ میلی‌لیتر عصاره متانولی میسلیم، قارچ و محیط کشت با ۰/۲ میلی‌لیتر معرف فولین سوکالچو مخلوط شد. سپس آب مقطر به مقدار لازم اضافه کرد تا حجم به ۲ میلی‌لیتر برسد. برای محیط کشت نیز، ۱/۸ میلی‌لیتر از آن با ۰/۲ میلی‌لیتر از

$$Ergostrol (mg / gDW) = (OD_{281.5} / 290 - OD_{230} / 518) * F \quad (4)$$

بتولین و اسید بتولینیک: ۰/۱ گرم نمونه با ۵ میلی لیتر متانول گرید HPLC مخلوط و ۲۴ ساعت شیکر شد. بعد از آن با کاغذ واتمن شماره ۴ فیلتر و با دستگاه کروماتوگرافی مایع (مدل کروماتوگرافی HPLC سیستم Hitachi L-7400، ستون C18، ابعاد ۴/۶ * ۱۵۰ mm، فاز متحرک متشکل از استونیتریل و آب به نسبت ۹۱:۹) ارزیابی حضور این دو ماده مؤثره انجام شد. برای عصاره گیری از محیط کشت نسبت ۱۰:۱ کلروفرم/متانول برابر حجم محیط مخلوط و در قیف دکانتور ریخته و فاز آلی (پایین) برداشته در دمای ۶۰ درجه در آن خشک شد و به رسوب باقیمانده ۱ میلی متر متانول HPLC زده و تا زمان آزمایش در تاریکی و در یخچال نگهداری شد (۳۲).

فنول کل: این روش شامل مخلوط کردن ۰/۵ میلی لیتر از معرف فولین سوکالچو با ۰/۵ میلی لیتر عصاره متانولی نمونه و ۱/۵ میلی لیتر کربنات سدیم ۲۰ درصد است. پس از ۳۰ دقیقه، رنگ آبی تیره نشان دهنده محتوای فنل کل است که با جذب در ۷۶۵ نانومتر اندازه گیری شد. نتایج معادل اسید گالیک گزارش گردید (۳۴).

فلانونوئید کل: عصاره متانولی نمونه با استفاده از کلرید آلومینیوم ۱۰ درصد (۱۰ گرم در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر)، ۰/۱ میلی لیتر استات پتاسیم یک مولار (۲/۴۱ گرم در ۱۰ میلی لیتر آب مقطر) و ۲/۸ میلی لیتر آب مقطر تهیه شد. برای کنترل نیز به جای عصاره متانولی، از متانول خالص استفاده گردید. پس از ۳۰ دقیقه در تاریکی، جذب در طول موج ۴۱۵ نانومتر اندازه گیری شد. محتوای کل فلانونوئید به صورت معادل کوئرستین در هر گرم وزن خشک نمونه بیان شد (۳۱).

اسید کوجیک: با استفاده از واکنش محلول ۰/۵ میلی لیتر عصاره متانولی با معرف کلرید آهن ۱٪ در هیدروکلرید ۰/۱ مولار انجام شد. این واکنش منجر به تشکیل رنگ های قرمز و نارنجی می شود. جذب

محلول در طول موج ۵۰۰ نانومتر اندازه گیری شد. سپس غلظت اسید کوجیک با استفاده از منحنی استاندارد اسید کوجیک خالص تعیین گردید (۳۵).

ترپنوئید کل: عصاره نمونه خشک (۸۰۰ میلی گرم) و ۱ میلی لیتر محیط کشت با ۱۰ میلی لیتر متانول به مدت ۱ ساعت استخراج و سپس فیلتر شد. پس از آن، با ۰/۴ میلی لیتر کلروفرم و ۰/۶ میلی لیتر اسیدسولفوریک مخلوط شد. جذب مایع رویی در طول موج ۵۳۸ نانومتر در برابر بلانک (همان محلول بدون نمونه خشک) اندازه گیری و با استاندارد لینالول مقایسه گردید. نتایج نیز برحسب میلی گرم معادل لینالول در هر گرم از وزن خشک بیان شد (۳۶).

تری ترین کل: سپس ۱۰۰ میکرو لیتر از عصاره متانولی با وانیلین اسید استیک یخچالی (۱۵۰ میلی لیتر، ۵٪ وزنی) و محلول اسید پرکلریک (۵۰۰ میلی لیتر، ۷۰٪) مخلوط شد. سپس محلول های نمونه در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ دقیقه حرارت داده و در حمام آب یخ خنک شد پس از آن، جذب در ۵۴۸ نانومتر در برابر بلانک (متانول با دیگر معرف ها) اندازه گیری شد. نتایج به عنوان میلی گرم معادل اسید اورسولیک در هر گرم از وزن خشک بیان شد (۳۶).

آنتی اکسیدان به روش DPPH: این روش توانایی نمونه در مهار رادیکال پایدار DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) را ارزیابی می کند. ۰/۰۰۴ گرم DPPH در متانول مطلق حل شد، به مدت ۳ دقیقه به آرامی تکان داده شد و به دلیل حساسیت به نور در یک مکان تاریک قرار گرفت. سپس ۰/۵ میلی لیتر از عصاره متانولی با ۰/۵ میلی لیتر از این محلول مخلوط شد. نمونه شاهد آزمایش نیز با استفاده از ۰/۵ میلی لیتر از محلول فوق و ۰/۵ میلی لیتر متانول ۸۰ درصد تهیه گردید. جذب نمونه ها پس از ۳۰ دقیقه در تاریکی در طول موج طول ۵۱۷ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر اندازه گیری شد و درصد آنتی اکسیدان با استفاده از رابطه ۵ محاسبه گردید (۳۱).

$$DPPH\% = A - B / A * 100$$

(۵)

و تفسیر همبستگی درونی آن‌ها تحلیل عاملی اکتشافی در بسته نرم‌افزاری SPSS انجام شد.

نتایج و بحث

در این مطالعه ابتدا با توجه به مقادیر معنی‌داری ترکیبات اسید کوجیک، فنول کل و خواص آنتی‌اکسیدانی ۱۵ تیمار برتر پلاسماهای سرد شناسایی شد. سایر ترکیبات ثانویه برای تیمارهای برتر در فاز برون سلولی و درون سلولی اندازه‌گیری شدند. سپس با تحلیل عاملی اکتشافی ارتباط بین ترکیبات ثانویه در هر تیمار پلاسمایی تفسیر و تیمارهای شاخص شناسایی گردید. فاز درون سلولی: نتایج نشان می‌دهد اختلاف معنی‌دار در سطح ۹۵٪ بین میزان کمی اسید کوجیک، فنول کل و آنتی‌اکسیدان درون سلولی (میسلیوم) تحت تأثیر ۲۴ تیمار پلاسمایی القاشده مشاهده شد که در جدول ۲ نشان داده شده است

نتیجه آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) بین داده‌های اسید کوجیک، فنول کل و آنتی‌اکسیدان درون سلولی (میسلیوم) دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشد.

که در آن، A جذب کنترل، B جذب نمونه. آنتی‌اکسیدان روش: FRAP با استفاده TPTZ (Tri(2-pyridyl)-s-triazine-۲،۴،۶) معرف شیمیایی برای اندازه‌گیری آهن دوظرفیتی، انجام گرفت. معرف آزمایش با استفاده از سه محلول آماده می‌شود که شامل بافر استات سدیم ۳۰۰ میلی‌مولار (pH=۶/۳)، محلول ۱۰ میلی‌مولار TPTZ در HCl (۴۰ میلی‌مولار) و محلول ۲۰ میلی‌مولار کلرید آهن (III)، با نسبت‌های ۱۰-۱-۱ است. محلول FRAP باید به‌صورت تازه تهیه شود. در این روش ۱۰۰ میکرولیتر عصاره متانولی با ۱/۴ میلی‌لیتر محلول FRAP مخلوط شده و بعد از ۲۰ دقیقه جذب در طول موج ۵۹۳ نانومتر قرائت شد نتایج به‌صورت میلی‌مول سولفات آهن در میلی‌لیتر عصاره درون سلولی و برون سلولی گزارش می‌شود (۳۷).

برای بررسی اختلاف معنی‌دار داده‌های ترکیبات اسید کوجیک، فنول کل و خواص آنتی‌اکسیدان (DPPH) آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) و آزمون مقایسه میانگین دانکن استفاده شد. برای شناسایی تأثیرگذارترین متغیرها در هر تیمار پلاسمایی

جدول ۲- نتایج حاصل از تجزیه واریانس اعمال تیمارهای پلاسما بر ترکیبات ثانویه در فاز درون سلولی - پیش‌تست.

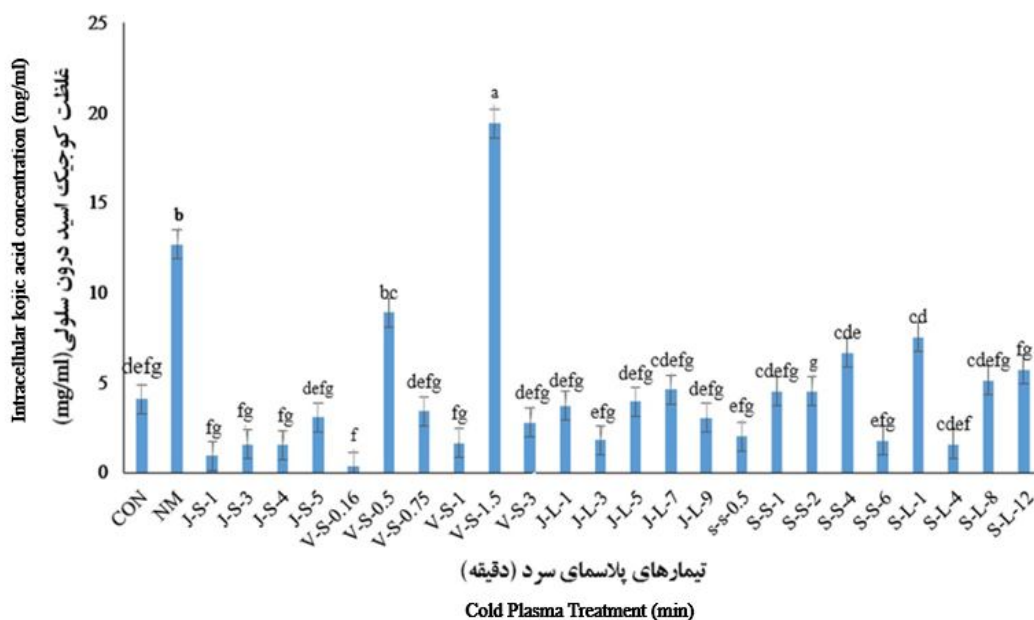
Table 2. Results of variance analysis of plasma treatments on secondary metabolites in the intracellular phase - Pre-test.

P-value	F	میانگین مربعات Mean squares	df	جمع مربعات Sum of squares	ترکیبات ثانویه Secondary compounds
0.000	3.238	3879.929	25	96998.226	بین گروه‌ها
		1198.296	52	62311.414	درون گروه‌ها
			77	159309.64	کل Total phenol
0.000	8.243	52.322	25	1308.047	بین گروه‌ها
		6.348	52	330.085	درون گروه‌ها
			77	1638.132	کل Kojic acid
0.000	4.791	263.97	25	6599.242	بین گروه‌ها
		55.095	52	2864.924	درون گروه‌ها
			77	9464.166	کل Antioxidant

V-S-1.5 دارای حداکثر غلظت (۱۹/۴۲ mg/ml) است، به گونه‌ای که مقدار آن ۱/۵۳ برابر قارچ طبیعی و ۴/۷۸ برابر نمونه شاهد اسید کوچیک می‌باشد (شکل ۱).

اختصارات تیمارها در نمودارها به شرح زیر است: S-L: SDBD در محیط مایع، S-S: SDBD در محیط جامد، J-L: Jet plasma در محیط مایع، J-S: Jet plasma در محیط جامد، V-S: VDBD در محیط جامد، NM: قارچ طبیعی، CON: نمونه شاهد.

نتایج مقایسات میانگین داده‌های اسید کوچیک درون سلولی نشان می‌دهد که بالاترین غلظت‌ها برحسب میلی گرم در میلی لیتر در تیمار SDBD در محیط مایع به مدت ۱، ۱۲ و ۸ دقیقه، تیمار SDBD در محیط جامد تیمارهای ۴، ۲، ۱ دقیقه و Jet plasma در محیط مایع در زمان‌های ۵، ۷ و ۹ دقیقه، Jet plasma در محیط جامد ۵ دقیقه و VDBD اعمال شده بر میسلایوم در محیط جامد به مدت ۱/۵، ۰/۵ و ۰/۷۵ دقیقه مشاهده شد. از میان تیمارهای اعمال شده، تیمار

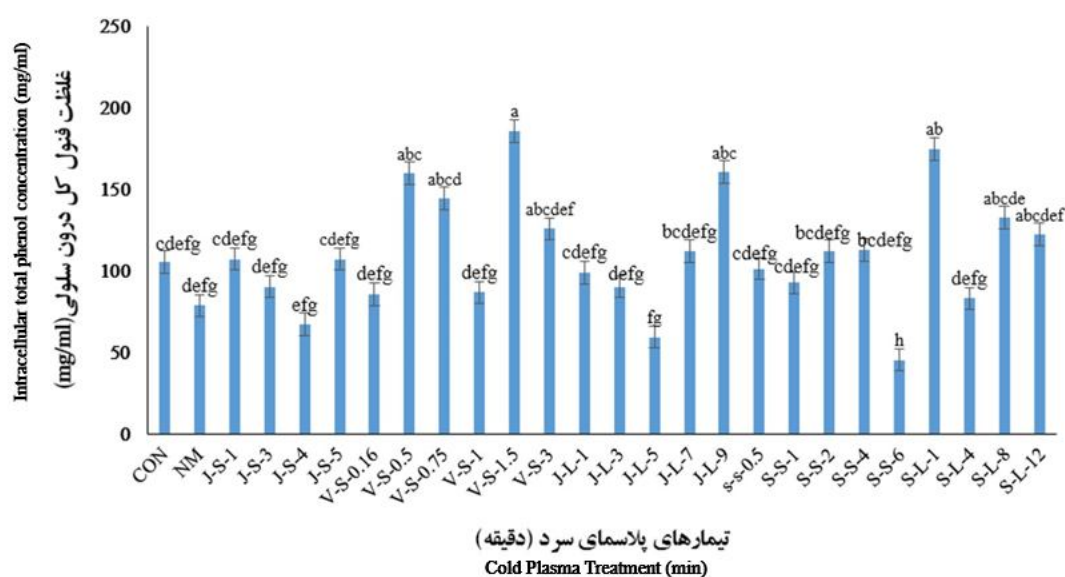


شکل ۱- اثر پلاسمای سرد بر غلظت اسید کوچیک عصاره درون سلولی گانودرما لوسیدوم.

Figure 1. The effect of cold plasma on the concentration of kojic acid in the intracellular extract of *Ganoderma lucidum*.

محیط جامد در زمان‌های ۴، ۲، ۰/۵ دقیقه، بهترین‌های تیمار Jet plasma در محیط مایع در زمان ۱، ۷ و ۹ دقیقه، در محیط جامد ۵ و ۱ دقیقه و همچنین، منتخب شش تیمار VDBD اعمال شده بر میسلایوم در محیط جامد تیمارهای ۰/۵ و ۰/۷۵ و ۱/۵ دقیقه بود. کم‌ترین تیمارها نسبت به شاهد تیمار J-S-4، V-S-0.16، V-S-1، J-L-5 و S-S-6 بودند (شکل ۲).

نتایج مقایسات میانگین داده‌های فنول کل درون سلولی نشان داد V-S-1.5 (VDBD اعمال شده بر میسلایوم در محیط کشت جامد به مدت ۱/۵ دقیقه) با غلظت ۱۸۵/۹۹ mg/ml برترین تیمار بود که این مقدار ۲/۳ برابر بیشتر از قارچ طبیعی و ۱/۷۵ برابر شاهد است. سایر تیمارها به شرح زیر است: تیمارهای برتر SDBD در محیط مایع به مدت ۱، ۱۲ و ۸ دقیقه، در

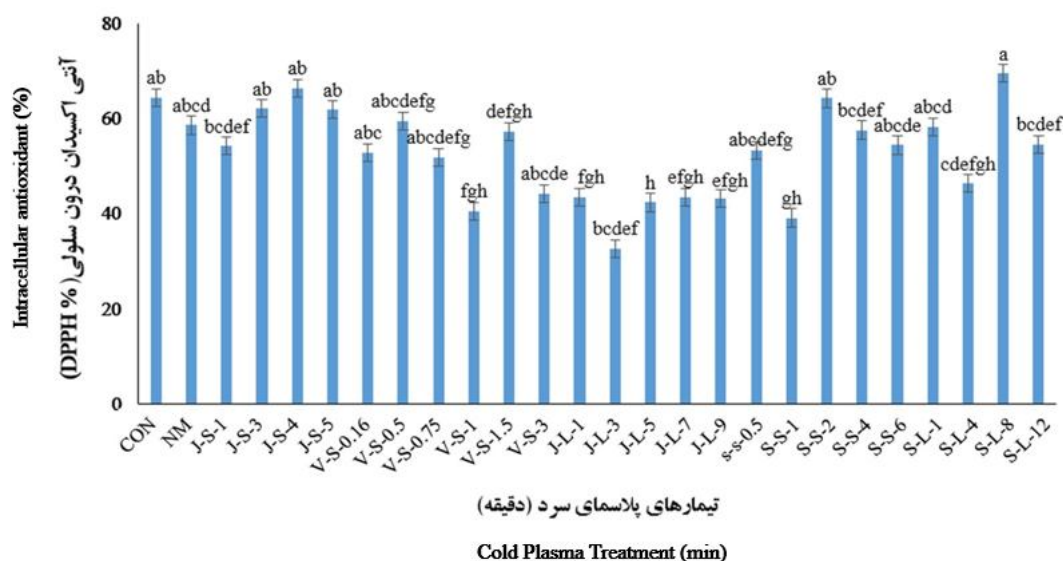


شکل ۲- اثر پلاسمای سرد بر غلظت فنول کل عصاره درون سلولی گانودرما لوسیدوم.

Figure 2. Effect of cold plasma on the total phenol concentration in the intracellular extract of *Ganoderma lucidum*.

همچنین VDBD اعمال شده بر میسلیموم در محیط جامد ۰/۵ و ۰/۷۵ و ۱/۵ دقیقه بود. به طور کلی، تیمار S-L-8 با ۶۹/۵۱٪ آنتی اکسیدان در بالاترین جایگاه قرار دارد. آنتی اکسیدان نمونه شاهد (CON) و طبیعی (NM) به ترتیب ۶۴/۴۱ و ۵۸/۶۳٪ بود (شکل ۳).

نتایج مقایسات میانگین داده‌های آنتی اکسیدان درون سلولی نشان می‌دهد که تیمارهای برتر شامل SDBD در محیط مایع در مدت زمان تابش ۱، ۱۲ و ۸ دقیقه، SDBD در محیط جامد در زمان‌های ۴، ۲، ۰/۵ دقیقه، Jet plasma در محیط مایع ۱، ۷ و ۹ دقیقه، Jet plasma در محیط جامد ۵، ۴، ۳ دقیقه و



شکل ۳- اثر پلاسمای سرد بر درصد آنتی اکسیدان عصاره درون سلولی گانودرما لوسیدوم.

Figure 3. The effect of cold plasma on the intracellular antioxidant percentage of *Ganoderma lucidum* extract.

فاز برون سلولی: نتایج آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) اسید کوجیک، فنول کل و آنتی‌اکسیدان برون‌سلولی در جدول ۲ نشان‌داده شده است. بین داده‌های غلظت اسید کوجیک تحت تأثیر تیمارهای پلاسما اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. مقادیر دو ترکیب دیگر در سطح ۹۵٪ تحت تأثیر پلاسما قرار گرفتند.

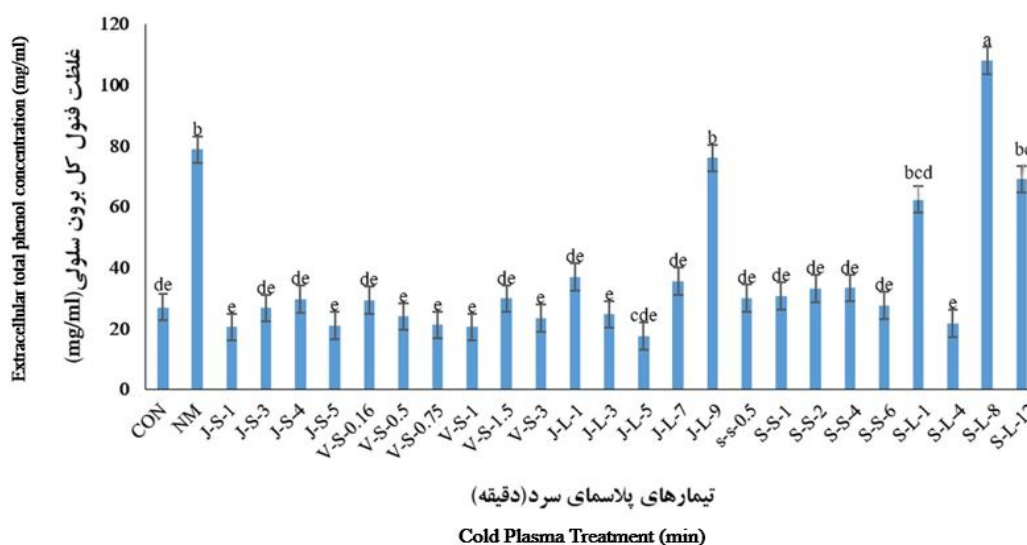
جدول ۲- نتایج حاصل از تجزیه واریانس اعمال تیمارهای پلاسما بر ترکیبات ثانویه در فاز برون‌سلولی - پیش‌تست.

Table 2. Results of variance analysis of plasma treatments on secondary compounds in the extracellular phase - Pre-test.

P-value	F	میانگین مربعات Mean squares	df	جمع مربعات Sum of squares	ترکیبات ثانویه Secondary compounds
0.000	3.706	1354.226	24	23501.430	بین گروه‌ها
		365.423	50	18271.147	درون گروه‌ها
			74	50772.577	کل
0.468	1.014	13.252	24	318.051	بین گروه‌ها
		13.073	50	653.663	درون گروه‌ها
			74	971.714	کل
0.000	10.495	907.536	24	21780.861	بین گروه‌ها
		86.471	50	4323.548	درون گروه‌ها
			74	26104.410	کل

تیمارهای ۴، ۲، ۵/۰ دقیقه برتری محسوسی در غلظت فنول کل نسبت به سایر تیمارها داشتند. برترین‌های Jet plasma در محیط مایع ۱، ۷ و ۹ دقیقه، در محیط جامد تیمارهای ۳ و ۴ دقیقه بود. هم‌چنین تیمارهای ۵/۰ و ۷/۵ و ۱/۵ دقیقه VDBD حداکثر فنول کل را دارد (شکل ۴).

نتایج مقایسات میانگین نشان داد که محتوای فنل کل در تیمار S-L-8 (۱۰۸ mg/ml) تقریباً ۴ برابر بیش‌تر از نمونه شاهد (۲۷ mg/ml) و ۱/۳ برابر بیش‌تر از قارچ طبیعی (۷۸/۷۴ mg/ml) است. از میان ۴ تیمار SDBD مربوط به محیط مایع تیمارهای ۱، ۱۲ و ۸ دقیقه، هم‌چنین از بین ۵ تیمار محیط جامد

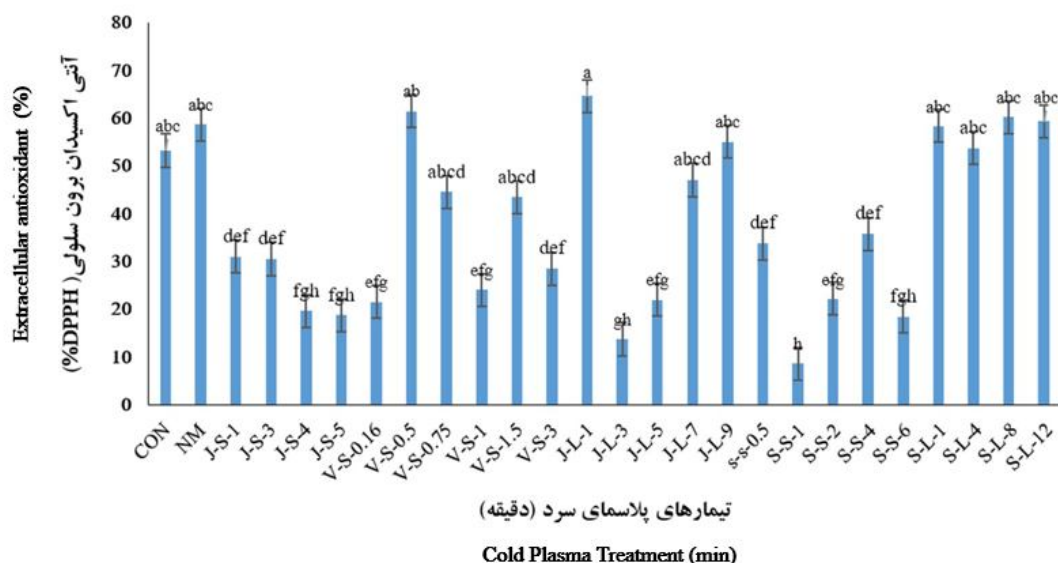


شکل ۴- اثر پلاسمای سرد بر غلظت فنول کل عصاره برون سلولی گانودرما لوسیدوم.

Figure 4. Effect of cold plasma on the total phenol concentration of *Ganoderma lucidum* extracellular extract.

برخی نیز نتایج بهتری را نشان می‌دهند. تیمار J-L-1 باعث بالاترین درصد آنتی‌اکسیدان (۶۴/۵۶٪) نسبت به شاهد (۵۳/۲۱٪) و قارچ طبیعی جنگلی (۵۸/۶۳٪) شده است.

شکل ۵، اثر تیمارهای پلاسمای سرد را بر خواص آنتی‌اکسیدان عصاره برون‌سلولی نشان می‌دهد. برخی تیمارها اثر معکوس داشته و باعث کاهش درصد آنتی‌اکسیدان نسبت به تیمار شاهد شده‌اند (S-S-1، اما J-S، V-S-3، V-S-1، J-L-5، J-L-3، S-S-6



شکل ۵- اثر پلاسمای سرد بر درصد آنتی‌اکسیدان عصاره برون‌سلولی گانودرما لوسیدوم.

Figure 5. The effect of cold plasma on the antioxidant percentage of extracellular extract of *Ganoderma lucidum*.

نتایج تحلیل عاملی ترکیبات عصاره درون‌سلولی: با توجه به نمودار تحلیل عاملی که از ماتریس دوران یافته^۱ و مؤلفه اول آنالیز مؤلفه‌های اصلی^۲ (PCA)، عاملی استخراج می‌شود که بیش‌ترین واریانس داده‌ها را تبیین کند. با توجه به ماتریس به‌دست‌آمده ترکیباتی که در بخش مثبت نمودار قرار دارند و همبستگی معنی‌دار ۰/۷ بالاتر با مؤلفه اول مشخص هستند.

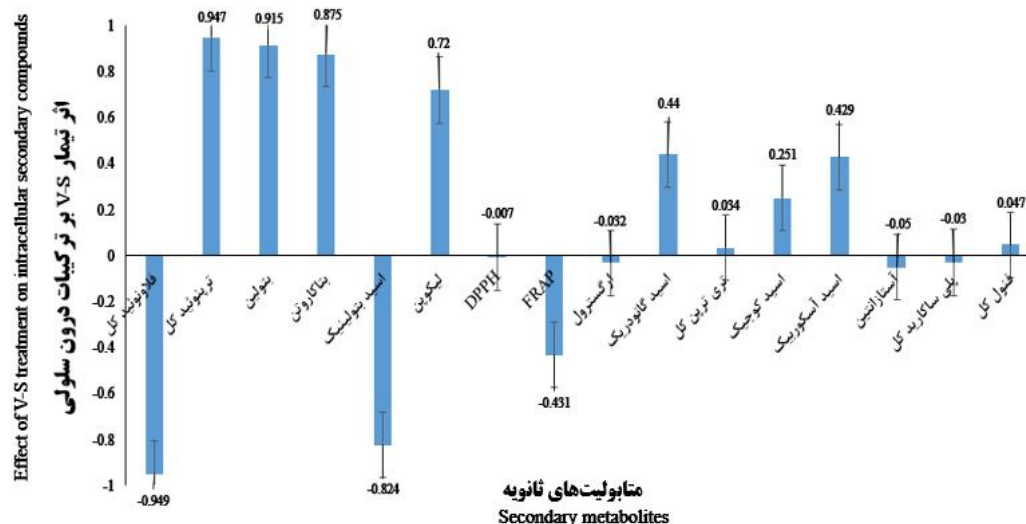
تیمار V-S: کل واریانس تبیین شده ۹۳/۷۶٪ و سهم ۵ مؤلفه اثرگذار به ترتیب ۳۲/۶۹٪، ۲۲/۳۵٪، ۱۶/۳۹٪، ۱۳/۰۳٪، ۹/۲۸٪ می‌باشد. مؤلفه اول به‌تنهایی حدود یک‌سوم (۳۲/۶۹٪) از تغییرپذیری داده‌ها را توضیح می‌دهد. ترکیبات ترپن کل و بتولین و بتاکاروتن

پس از آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) داده‌های اسید کوجیک، فنول کل و آنتی‌اکسیدان (DPPH) تعداد ۹ تیمار از ۲۴ تیمار پلاسمایی با مقادیر کمتر حذف شدند. سایر ترکیبات شامل اسید گانودریک، آستازانتین، بتاکاروتن، لیکوپن، اسید آسکوربیک، ارگسترول، بتولین، اسید بتولینیک، پلی‌ساکارید کل، فنول کل، فلاونوئید کل، اسید کوجیک، ترپن کل، تری‌ترپن کل، ترپن کل و خواص آنتی‌اکسیدانی با دو روش DPPH و FRAP، برای ۱۵ تیمار در فاز درون‌سلولی و برون‌سلولی اندازه‌گیری و با تحلیل عاملی، متغیرها خلاصه شدند و همبستگی درونی ترکیبات زیست‌فعال آن‌ها مشخص شد. به‌این‌ترتیب تأثیرگذارترین متغیرها در هر تیمار پلاسمایی مشخص شدند.

1- Rotated Component Matrix
2- Principal Component Analysis

است نشان‌دهنده رفتار متضاد این ترکیبات در پاسخ به تیمار باشد (شکل ۶).

بیش‌ترین تأثیر را در این مؤلفه دارند. الگوی همبستگی منفی اسید بتولینیک و فلاونوئیدها ممکن

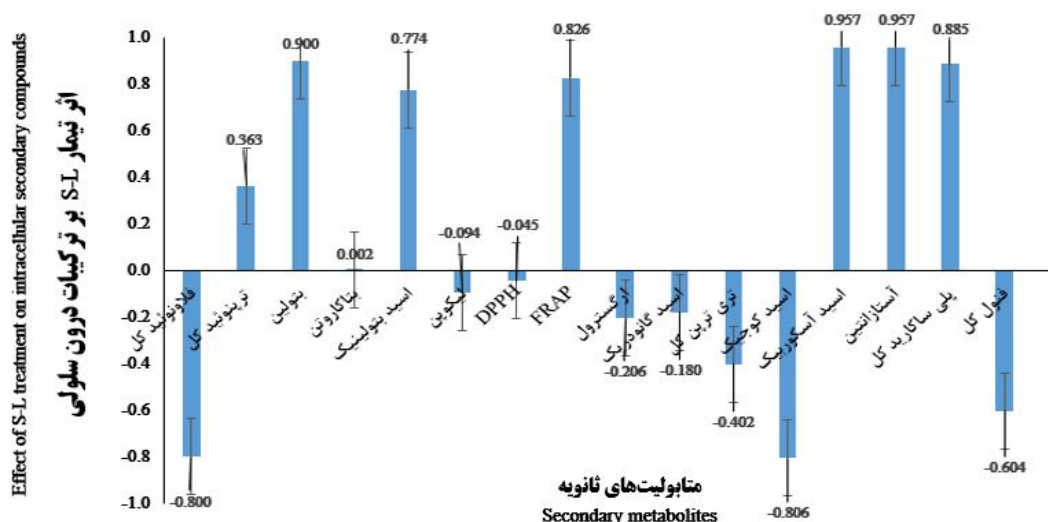


شکل ۶- نتایج تحلیل عاملی اثر تیمار V-S بر ترکیبات ثانویه درون‌سلولی.

Figure 6. Results of the factor analysis on the effect of V-S treatment on intracellular secondary metabolites.

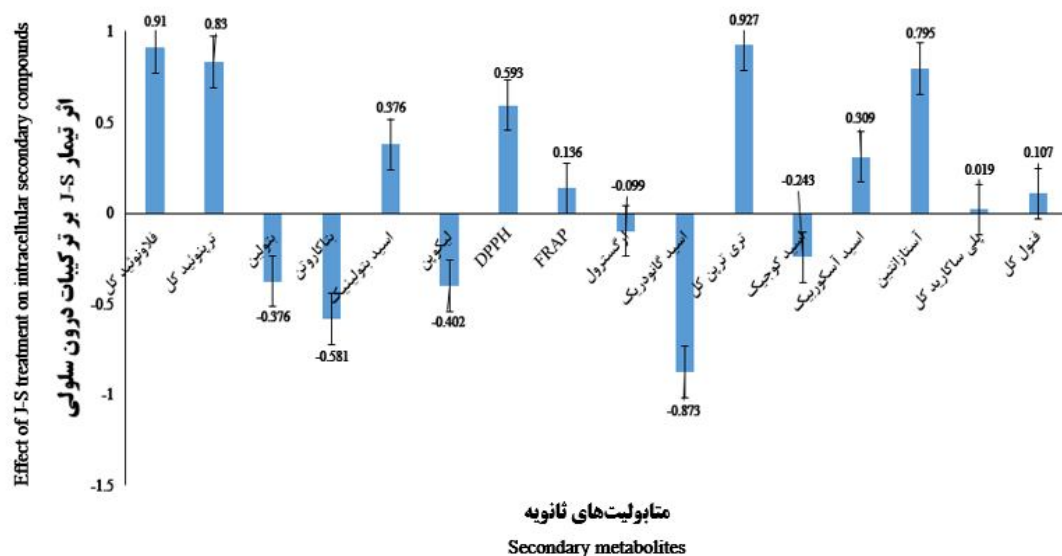
مقابل، فنول‌ها، اسید کوچیک و فلاونوئیدها رابطه معکوس نشان دادند. مؤلفه‌های دوم و سوم به ترتیب ۱۲/۴۲٪ و ۱۱/۲۲٪ از تغییرات را توضیح دادند. این نتایج نشان می‌دهد ترکیبات آنتی‌اکسیدانی نقش کلیدی در پاسخ به تیمار داشته‌اند (شکل ۷).

تیمار S-L: تحلیل داده‌ها نشان داد مؤلفه اول با ۳۴/۸۶٪ بیش‌ترین تأثیر را در تغییرات دارد. چهار ترکیب اصلی شامل اسید آسکوربیک، آستازانتین، بتولین و پلی‌ساکاریدها (با همبستگی ۰/۹۵، ۰/۹ و ۰/۸۸ بیش‌ترین نقش را در این مؤلفه داشتند. در



شکل ۷- نتایج تحلیل عاملی اثر تیمار S-L بر ترکیبات ثانویه درون‌سلولی.

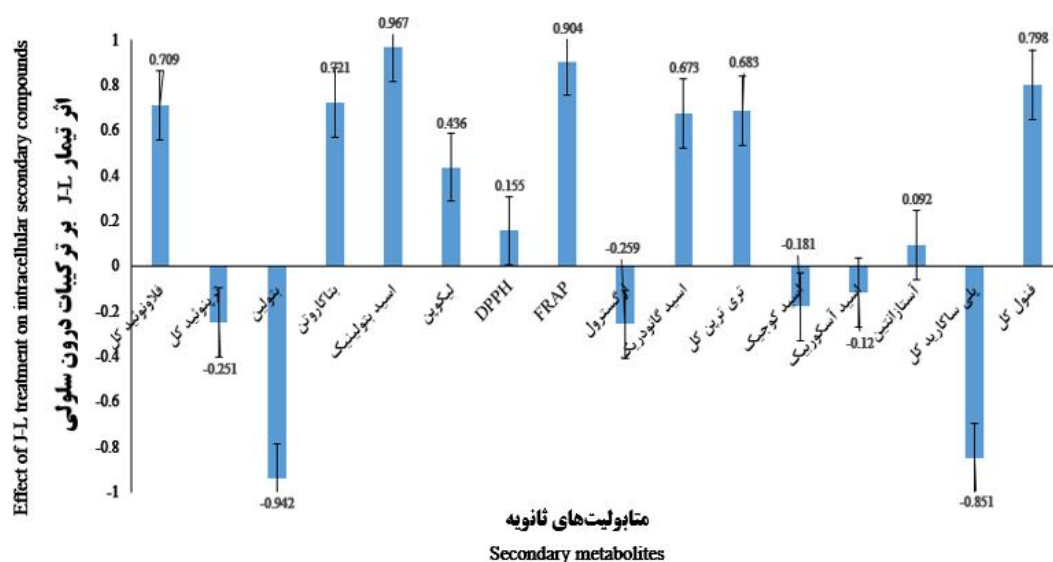
Figure 7. Results of the factor analysis on the effect of S-L treatment on intracellular secondary metabolites.



شکل ۹- نتایج تحلیل عاملی اثر تیمار J-S بر ترکیبات ثانویه درون‌سلولی.
Figure 9. Results of the factor analysis on the effect of J-S treatment on intracellular secondary metabolites.

(به ترتیب ۰/۹۶ و ۰/۹۰) دارد. عوامل دوم تا چهارم به ترتیب ۱۹/۳٪، ۱۸/۶٪ و ۱۲/۰۸٪ از تغییرات را تبیین می‌کنند. بتولین و پلی‌ساکاریدها رابطه معکوسی با عامل اول نشان دادند (شکل ۱۰).

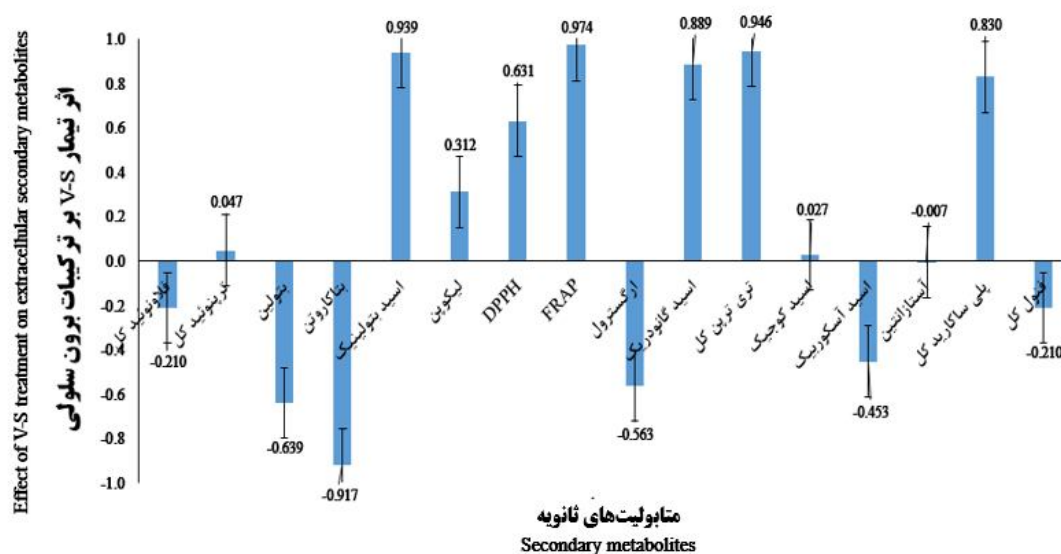
تیمار J-L: نتایج نشان داد که چهار عامل اصلی در مجموع ۸۸/۶۲٪ از تغییرات را توضیح می‌دهند. مهم‌ترین عامل (عامل اول) به تنهایی ۳۹/۶۳٪ از تغییرات را شامل می‌شود و بیش‌ترین ارتباط را با اسید بتولینیک و فعالیت آنتی‌اکسیدان (FRAP)



شکل ۱۰- نتایج تحلیل عاملی اثر تیمار J-L بر ترکیبات ثانویه درون‌سلولی.
Figure 10. Results of the factor analysis on the effect of J-L treatment on intracellular secondary compounds.

داده‌ها را توجیه کردند. آنتی‌اکسیدان (FRAP)، تری تریپن کل، اسید بتولینیک، اسید گانودریک و پلی‌ساکارید کل به ترتیب ۰/۹۷، ۰/۹۴، ۰/۹۳، ۰/۸۸ و ۰/۸۳ بیش‌ترین همبستگی با مؤلفه اول را دارند. بتاکاروتن کم‌ترین همبستگی منفی را دارد (شکل ۱۱).

نتایج تحلیل عاملی ترکیبات عصاره برون سلولی تیمار V-S: تحلیل داده‌ها نشان داد که سه عامل اصلی درمجموع ۹۲/۸۶٪ از تغییرات سیستم را توضیح می‌دهند. عامل اول با ۴۴/۹۹٪ بیش‌ترین سهم را دارد و به‌شدت با این ترکیبات مرتبط است. مؤلفه‌های دوم و سوم به‌ترتیب ۲۹/۱۱ و ۱۶/۸۲ درصد واریانس

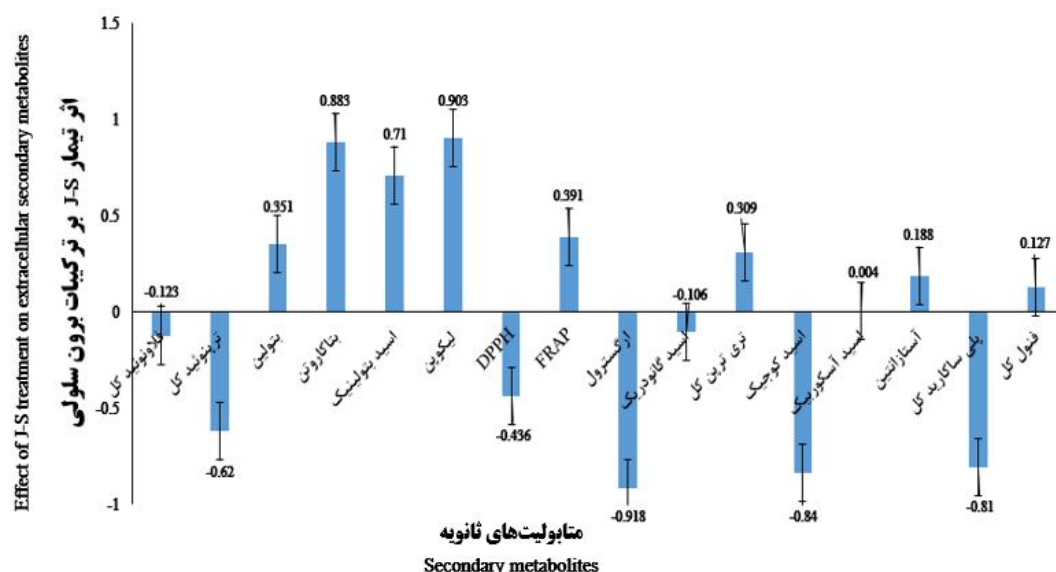


شکل ۱۱- نتایج تحلیل عاملی اثر تیمار V-S بر ترکیبات ثانویه برون سلولی.

Figure 11. Results of the factor analysis on the effect of V-S treatment on extracellular secondary metabolites.

چهارم به ترتیب ۲۳/۲۴ و ۲۱/۳۵ و ۱۱/۶۷ درصد از واریانس داده‌ها را توجیه کردند. نکته قابل‌توجه، همبستگی منفی قوی ارگسترول (۰/۹۱۸-) با مؤلفه اول بود که نشان‌دهنده رفتار متضاد این ترکیب در مقایسه با رنگدانه‌های گیاهی است (شکل ۱۲).

تیمار J-S: تحلیل داده‌های تیمار برون سلولی نشان داد چهار مؤلفه اصلی درمجموع ۸۹/۵۷٪ واریانس را تبیین می‌کنند. مؤلفه اول با سهم ۳۳/۳٪ بیش‌ترین تأثیر را داشته و همبستگی قوی با رنگدانه‌های لیکوپن (۰/۹) و بتاکاروتن (۰/۸۸) نشان داد. مؤلفه‌های دوم تا

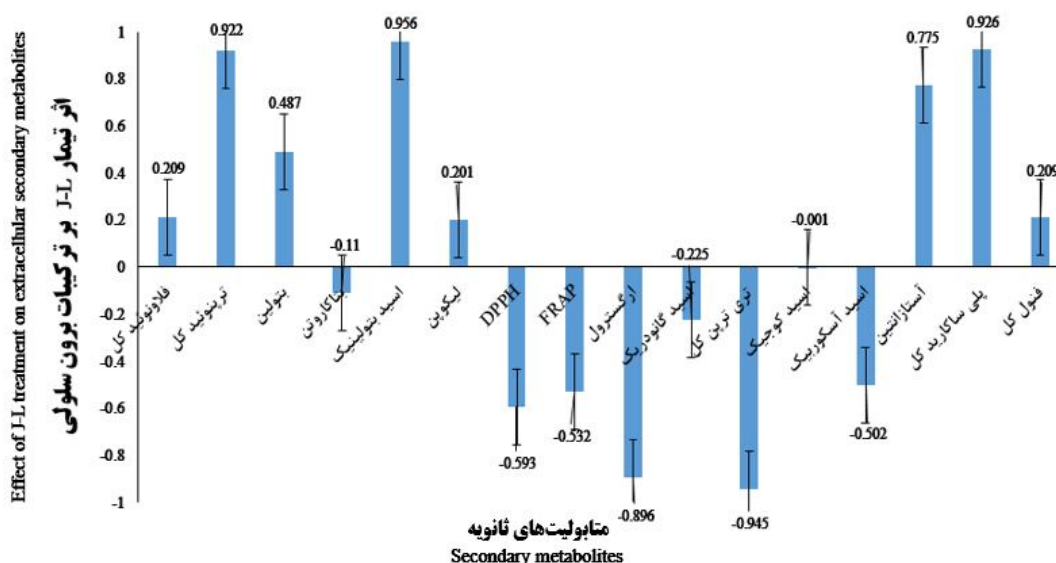


شکل ۱۲- نتایج تحلیل عاملی اثر تیمار J-S بر ترکیبات ثانویه برون سلولی.

Figure 12. Results of the factor analysis on the effect of J-S treatment on extracellular secondary metabolites.

۰/۹۵، ۰/۹۲ و ۰/۹۲) داشت. مؤلفه دوم و سوم به ترتیب ۳۴/۹۱ و ۱۱/۰۵ درصد از تغییرات را توضیح دادند. همبستگی منفی قوی با مؤلفه اول در ارگسترول (۰/۸۹۶-) و تری ترپن کل (۰/۹۴۵-) مشاهده شد (شکل ۱۳).

تیمار J-L: سه مؤلفه اصلی در مجموع ۸۴/۹۲ درصد از واریانس داده‌ها را تبیین کرد. مؤلفه اول با سهم ۳۸/۹۴ درصدی، به عنوان عامل غالب شناخته شد که بیشترین ارتباط را با ترکیبات مهمی مانند: اسید بتولینیک، ترپن کل و پلی ساکارید کل (به ترتیب

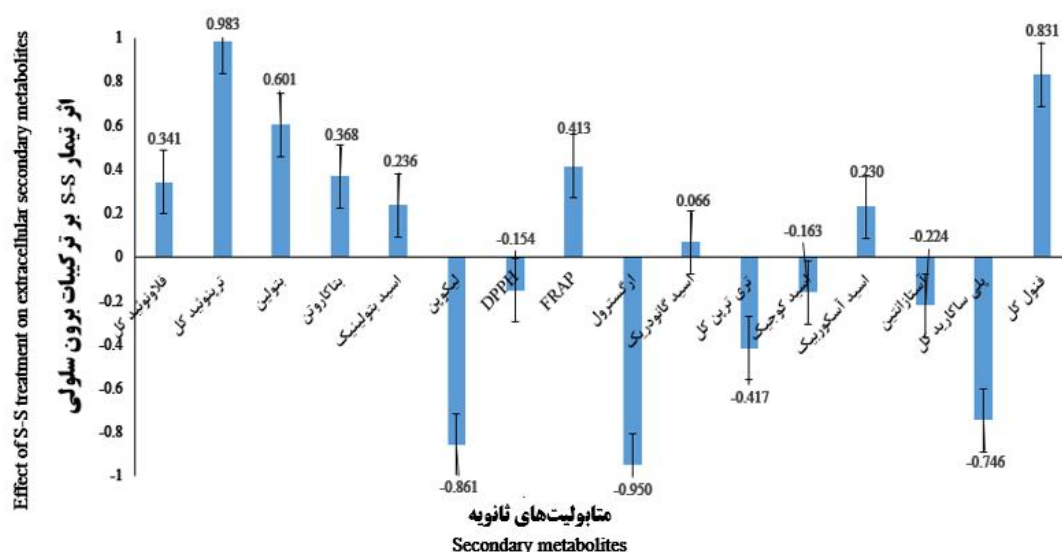


شکل ۱۳- نتایج تحلیل عاملی اثر تیمار J-L بر ترکیبات ثانویه برون سلولی.

Figure 13. Results of the factor analysis on the effect of J-L treatment on extracellular secondary metabolites.

داده‌ها را توجیه کردند. ترین کل و فنول کل به ترتیب ۰/۹۸، ۰/۸۳ بیش‌ترین همبستگی با مؤلفه اول و ارگسترول، پلی‌ساکارید کل و لیکوپن کم‌ترین همبستگی منفی را با مؤلفه اول دارند (شکل ۱۴).

تیمار S-S: بر اساس نتیجه تحلیل عاملی چهار مؤلفه اصلی شناسایی شد درمجموع ۸۸/۴۴٪ از تغییرپذیری داده‌ها را تبیین می‌کنند. مؤلفه اول با سهم ۳۲/۷۶ درصد به‌عنوان عامل غالب و مؤلفه‌های دوم تا چهارم به ترتیب ۳۱/۷۹ و ۱۳/۳۱ و ۱۰/۵۷ درصد واریانس

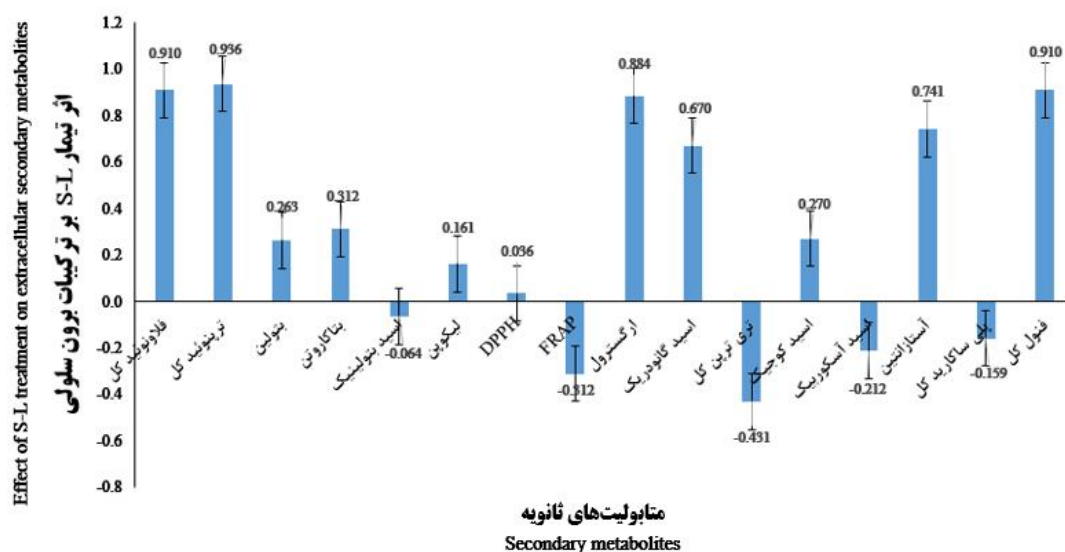


شکل ۱۴- نتایج تحلیل عاملی اثر تیمار S-S بر ترکیبات ثانویه برون‌سلولی.

Figure 14. Results of the factor analysis on the effect of S-S treatment on extracellular secondary metabolites.

۱۱/۵ درصد از واریانس داده‌ها را توجیه کردند. همچنین، ترکیب‌های فنول کل، فلاونوئید کل و ارگسترول به ترتیب با همبستگی‌های به ترتیب ۰/۹۳، ۰/۹۱، ۰/۹۱ و ۰/۸۸ بالاترین همبستگی را با مؤلفه اول نشان دادند (شکل ۱۵).

تیمار S-L: بر اساس تحلیل عاملی انجام‌شده، چهار مؤلفه اول توانستند ۸۸/۸۶ درصد از واریانس داده‌ها را توضیح دهند. مؤلفه اول با مقادیر ویژه ۷/۴۵، به‌تنهایی ۳۰/۸۳٪ از واریانس را تبیین کرد، درحالی‌که مؤلفه‌های دوم تا چهارم به ترتیب ۲۴/۲۱ و ۲۳/۳۱ و



شکل ۱۵- نتایج تحلیل عاملی تیمار S-L ترکیبات ثانویه بیرون سلولی.

Figure 15. Results of the factor analysis on the effect of S-L treatment on extracellular secondary metabolites.

و Surface DBD در محیط مایع (۱، ۱۲ و ۸ دقیقه) بود. در مرحله بعد، آزمایش‌های تکمیلی و اندازه‌گیری سایر ترکیبات مؤثره فقط برای ۱۵ تیمار منتخب انجام شد. این رویکرد دومرحله‌ای امکان شناسایی دقیق‌ترین تیمارهای مؤثر را با دقت بالایی فراهم آورد.

تجزیه عاملی: اکثر تیمارها بین ۹۲/۸۴ تا ۹۳/۷۶ درصد واریانس داده‌ها با مقادیر ویژه بالا را تبیین کردند. مؤلفه اول بیش‌ترین سهم را داشت. تعداد مؤلفه‌های مؤثر از ۳ تا ۵ متغیر بود. با توجه به ترکیبات مؤثر در صنعت آرایشی-بهداشتی و نتایج تحلیل عاملی، در فاز درون‌سلولی، مؤثرترین تیمار S-L اعمال‌شده در محیط کشت مایع) و همچنین تیمار J-L (Jet plasma اعمال‌شده در محیط کشت مایع) پیشنهاد می‌شود. تیمار S-L با تحریک تولید ترکیبات ارزشمندی مانند آستاگزانتین (همبستگی ۰/۹۵)، اسید آسکوربیک (همبستگی ۰/۹۵) و پلی‌ساکاریدها (همبستگی ۰/۸۸)، پروفایل متابولیکی مناسبی را برای فرمولاسیون محصولات

پیش‌تست: در این پژوهش، سه شاخص مهم با کاربردهای آرایشی-بهداشتی شامل اسید کوچیک، فنول کل و فعالیت آنتی‌اکسیدان مورد مطالعه قرار گرفتند. برای این منظور، تعداد ۲۴ تیمار پلاسمایی از سه منبع مختلف شامل پلاسمای جت (Jet plasma)، پلاسمای حجمی (Volume DBD) و پلاسمای سطحی (Surface DBD) به محیط کشت جامد و مایع حاوی میسلوم قارچ اعمال شد. پس از اندازه‌گیری این سه شاخص در تمام تیمارها و مقایسه آن‌ها با نمونه‌های طبیعی و شاهد، تجزیه واریانس انجام گرفت که منجر به حذف ۹ تیمار با مقادیر کم‌تر معنی‌دار V-S (۰/۱۶، ۱، ۳)، S-L (۴)، S-S (۱، ۶)، J-L (۳، ۵) و J-S (۱) گردید. انتخاب این سه شاخص به دلیل اثرگذاری آن‌ها در صنعت آرایشی و بهداشتی بود. تیمارهای پلاسما انتخاب‌شده برای محیط کشت جامد شامل Surface DBD (۴، ۲، ۵/۰ دقیقه)، Jet plasma در محیط جامد (۳، ۴، ۵ دقیقه) و Volume DBD (۵/۰ و ۷/۵ و ۱/۵ دقیقه) و برای محیط کشت مایع شامل plasma (۱، ۷ و ۹ دقیقه)

مراقبت از پوست ایجاد می‌کند. با توجه به اثرات سینرژستیک آستاگزانتین به‌عنوان یک کاروتنوئید قوی (مرطوب‌کننده محافظتی در برابر پرتوهای UV، ضدپیری)، اسید آسکوربیک (ویتامین C) به‌عنوان یک عامل روشن‌کننده طبیعی و محرک سنتز کلاژن، خاصیت آبرسانی پلی‌ساکاریدهای تولیدشده در این تیمار در بهبود سلامت پوست، کاهش علائم پیری و محافظت در برابر عوامل استرس‌زای محیطی نقش دارند (۶، ۱۲، ۱۳). به نظر می‌رسد تیمار S-L پتانسیل بالایی برای استفاده در صنایع آرایشی-بهداشتی داشته باشد. ضمن این‌که در این تیمار ترکیبات بتولین، اسید بتولینیک و آنتی‌اکسیدان (FRAP) نیز همبستگی معنی‌دار بالایی با مؤلفه اول داشتند. بتولین یک تری‌ترین طبیعی از نوع لوپان است. باوجوداین‌که منبع اصلی آن لایه بیرونی پوست درختان توس از خانواده Betulaceae است اما از بسیاری از گونه‌های گیاهی نیز قابل‌استخراج است. این ترکیبات نیز هم خواص ضد سرطانی دارند و هم پتانسیل خوبی برای درمان‌های پوستی دارند (۳۸). اثر مثبت اسید بتولینیک در کلاژن‌سازی در یک ثبت اختراع گزارش شده است (۳۹). به‌این‌ترتیب در فاز درون‌سلولی تیمار S-L با توجه به نتایج بسیار مثبت آن پیشنهاد می‌شود. نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که در فاز برون‌سلولی، دو تیمار V-S (VDBD اعمال‌شده در محیط کشت جامد) و J-L (Jet plasma) اعمال‌شده در محیط کشت مایع دارای پتانسیل قابل‌توجهی برای کاربردهای آرایشی-بهداشتی هستند، اما از جنبه‌های مختلفی با یکدیگر تفاوت دارند. تیمار V-S با دارا بودن بالاترین سهم مؤلفه اول (۴۴/۹۹) و همبستگی قوی با ترکیبات ارزشمندی مانند اسید بتولینیک (۰/۹۳) و اسید گانودریک (۰/۸۸)، گزینه‌ای ایده‌آل برای فرمولاسیون محصولات تخصصی مراقبت از پوست محسوب می‌شود. این ترکیبات با خواص ضدالتهابی،

ترمیم‌کنندگی و ضدپیری قوی می‌توانند در محصولات پیشرفته پوستی مانند سرم‌های درمانی و ضدچروک مورد استفاده قرار گیرند. از سوی دیگر، تیمار S-L برون‌سلولی با سهم ۳۰/۸۳٪ مؤلفه اول و تمرکز بر ترکیباتی مانند فنول کل (۰/۹۳) و فلاونوئید کل (۰/۹۱)، بیش‌تر برای محصولات مراقبت پایه پوست مناسب به نظر می‌رسد. اگرچه فعالیت آنتی‌اکسیدانی این تیمار در مقایسه با V-S (VDBD اعمال‌شده در محیط کشت جامد) ضعیف‌تر است، اما هم‌چنان می‌تواند در فرمولاسیون محصولات روزانه مراقبت از پوست مانند کرم‌های آبرسان و محافظتی مورد استفاده قرار گیرد. با در نظر گرفتن تمامی این عوامل، به نظر می‌رسد تیمار V-S به دلیل دارا بودن ترکیبات فعال تخصصی‌تر و خواص درمانی قوی‌تر، گزینه مناسب‌تری برای توسعه محصولات آرایشی-بهداشتی پیشرفته باشد. البته انتخاب نهایی تیمار به نوع محصول موردنظر و اهداف فرمولاسیونی بستگی خواهد داشت. پیشنهاد می‌شود در مطالعات آینده، تأثیر این تیمارها بر ویژگی‌های فیزیکی شیمیایی و پایداری محصولات نهایی نیز مورد بررسی قرار گیرد. پلاسمای سرد به‌طور قابل‌توجهی رشد باکتری‌های هوازی را مهار کرده و فعالیت آنتی‌اکسیدانی را افزایش داده است (۴۰).

توجه به پلاسمای سرد به‌عنوان یک الیستور در چند سال اخیر در تحقیقات کشاورزی و دارویی باهدف افزایش کیفیت و بهره‌وری کشت‌های سلولی درون‌شیشه‌ای موردتوجه قرار گرفته و تازگی دارد. بااین‌حال گزارش‌های مثبت خوبی در این خصوص وجود دارد. افزایش ۱۶٪ مقدار پلی‌ساکارید در میسلایوم قارچ صدفی (۲۲)، افزایش ۳/۸ برابری میزان اسید آسکوربیک سرخار گل نسبت به شاهد (۲۱)، بهبود رنگ و محتوای آنتوسیانین آب زرشک (۴۱)، از این موارد است. چندین عامل ممکن است به افزایش

نتیجه گیری کلی

به نظر می‌رسد که در تولید محصولات دارویی، آرایشی و بهداشتی، کشت‌های درون شیشه‌ای که تحت تیمار با پلاسما قرار گرفته‌اند، پتانسیل قابل توجهی در افزایش تولید ترکیبات مؤثره دارند. به همین سبب، استفاده از فناوری پلاسما سرد به عنوان محرک در کشت‌های آزمایشگاهی و فرآیندهای زیستی، یک استراتژی نویدبخش، اقتصادی و در دسترس است که می‌تواند تولید ترکیبات زیست‌فعال کاربردی در صنعت و تجارت را ارتقاء دهد.

ترکیبات ثانویه کمک می‌کنند، از جمله افزایش بیان ژن، تغییر در شبکه فیتوهورمونی (۴۲، ۴۳). مطالعات مولکولی نشان می‌دهند که پلاسما سرد فعالیت یک آنزیم خاص را افزایش می‌دهد که به بیان ژن مربوطه در نمونه تیمار شده منجر می‌شود (۴۴، ۴۵). شواهد موجود نشان می‌دهد که تماس با پلاسما سرد موجب افزایش جریان یونی در غشای پلاسمایی، تحولات ساختاری در دیواره سلولی و فعال‌سازی ژن‌های مرتبط با دفاع سلولی می‌شود که همگی منجر به تجمع و تولید متابولیت‌های ثانویه می‌گردد (۴۶، ۴۷).

منابع

1. Wu, J. G., Kan, Y. J., Wu, Y. B., Yi, J., Chen, T. Q., & Wu, J. Z. (2016). Hepatoprotective effect of ganoderma triterpenoids against oxidative damage induced by tert-butyl hydroperoxide in human hepatic HepG2 cells. *Pharmaceutical biology*. 54(5), 919-929.
2. Stamets, P. (2000) Growing gourmet and medicinal mushrooms. Ten Speed Press. Bekerly. Toronto. 267p.
3. Wasser, S. P. (2005). Reishi or ling zhi (*Ganoderma lucidum*). Encyclopedia of dietary supplements, 1, 603-622.
4. Moradali, M. F., Hedjaroude, G. A., Mostafavi, H., Abbasi, M., Ghods, S., & Sharifi-Tehrani, A. (2007). The genus *Ganoderma* (Basidiomycota) in Iran. *Mycotaxon*. 99, 251-270.
5. Kim, J. H., Chang, P. K., Chan, K. L., Faria, N. C., Mahoney, N., Kim, Y. K., & Campbell, B. C. (2012). Enhancement of commercial antifungal agents by kojic acid. *International Journal of Molecular Sciences*. 13(11), 13867-13880.
6. Paterson, R. R. M. (2006). *Ganoderma*—a therapeutic fungal biofactory. *Phytochemistry*. 67(18), 1985-2001.
7. Zilles, J. C., Dos Santos, F. L., Kulkamp-Guerreiro, I. C., & Contri, R. V. (2022). Biological activities and safety data of kojic acid and its derivatives: A review. *Experimental Dermatology*. 31(10), 1500-1521.
8. Sułkowska-Ziaja, K., Grabowska, K., Apola, A., Kryczyk-Poprawa, A., & Muszyńska, B. (2021). Mycelial culture extracts of selected wood-decay mushrooms as a source of skin-protecting factors. *Biotechnology Letters*. 43, 1051-1061.
9. Hacisevki, A. (2009). An overview of ascorbic acid biochemistry. *Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University*. 38(3), 233-255.
10. Hojjati, M., Razavi, S. H., Rezaei, K., & Gilani, K. (2014). Stabilization of canthaxanthin produced by *Dietzia natronolimnaea* HS-1 with spray drying microencapsulation. *Journal of Food Science and Technology*. 51, 2134-2140.
11. Song, Q., Wang, Y., Huang, L., Shen, M., Yu, Y., Yu, Q., & Xie, J. (2021). Review of the relationships among polysaccharides, gut microbiota, and human health. *Food Research International*. 140, 109858.
12. Bogacz-Radomska, L., Harasym, J., & Piwowar, A. (2020). Commercialization aspects of carotenoids. In *Carotenoids: Properties, processing and applications* (Pp: 327-357). Academic Press.
13. Ettefaghdoost, M., Alaf Noveirian, H., & Falahatkar, B. (2021). Influence of different dietary Astaxanthin levels on hemolymph biochemical parameters, total carotenoid content and intestinal

- microbial flora of the oriental river prawn, *Macrobrachium nipponense*. *ISFJ*, 30(4), 131-147.
14. Lee, M. J., Lee, H. J., Lee, Y., Yang, J. Y., Song, J. S., Woo, S. Y., & Park, S. I. (2023). Cold plasma treatment increases bioactive metabolites in oat (*Avena sativa* L.) sprouts and enhances in vitro osteogenic activity of their extracts. *Plant Foods for Human Nutrition*. 78(1), 146-153.
15. Mizuno, T., Wang, G., Zhang, J., Kawagishi, H., Nishitoba, T., & Li, J. (1995). Reishi, *Ganoderma lucidum* and *Ganoderma tsugae*: bioactive substances and medicinal effects. *Food Reviews International*. 11(1), 151-166.
16. Bhosle, S. R., Sandhya, G., Sonawane, H. B., & Vaidya, J. G. (2011). Ergosterol content of several wood decaying fungi using a modified method. *International Journal of Pharmacy & Life Sciences*. 2, 7.
17. Lin, M. S., Yu, Z. R., Wang, B. J., Wang, C. C., Weng, Y. M., & Koo, M. (2015). Bioactive constituent characterization and antioxidant activity of *Ganoderma lucidum* extract fractionated by supercritical carbon dioxide. *Sains Malays*. 44(12), 1685-91.
18. Li, C., Cui, Y., Lu, J., Meng, L., Ma, C., Liu, Z., & Kang, W. (2021). Spectrum-effect relationship of immunologic activity of *Ganoderma lucidum* by UPLC-MS/MS and component knock-out method. *Food Science and Human Wellness*. 10(3), 278-288.
19. Sachdev, S., Ansari, S. A., Ansari, M. I., Fujita, M., & Hasanuzzaman, M. (2021). Abiotic stress and reactive oxygen species: Generation, signaling, and defense mechanisms. *Antioxidants*. 10(2), 277.
20. Gholami, A. A. (2017). Production of secondary metabolites through genetic engineering and plant tissue culture. *Journal of Biosafety*. 10(3), 17-36.
21. Singh, S. P., & Thakur, R. (2024). Postharvest applications of cold plasma treatment for improving food safety and sustainability outcomes for fresh horticultural produce. *Postharvest Biology and Technology*. 209, 112694.
22. Mildažienė, V., Aleknavičiūtė, V., Žūkienė, R., Paužaitė, G., Naučienė, Z., Filatova, I., & Baniulis, D. (2019). Treatment of common sunflower (*Helianthus annuus* L.) seeds with radio-frequency electromagnetic field and cold plasma induces changes in seed phytohormone balance, seedling development and leaf protein expression. *Scientific reports*. 9(1), 6437.
23. Guo, Y., Wang, Y., Xu, X., Niu, D., Qing, Q., Wang, L., & Zhu, J. (2024). Effects of cold plasma pretreatment on the synthesis of polysaccharide from *Pleurotus ostreatus*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 196(4), 1977-1991.
24. Haddadian, K., Iranbakhsh, A., Khavari-Nejad, R. A., & Ghoranneviss, M. (2020). The effects of copper nanoparticles and cold atmospheric plasma on biochemical indices of *Dracocephalum moldavica*. *Nova Biologica Reperta*. 7(4), 411-418.
25. Haertel, B., Backer, C., Schulze, C., Funke, A., Wurster, M., von Woedtke, T., & Lindequist, U. (2014). Plasma-based stimulation of biotechnological processes in *Ganoderma lucidum* mycelia as example for a eukaryotic organism. *Plasma Medicine*. 4(1-4).
26. Ma, Y., Zhang, Q., Zhang, Q., He, H., Chen, Z., Zhao, Y., & Huang, Q. (2018). Improved production of polysaccharides in *Ganoderma lingzhi* mycelia by plasma mutagenesis and rapid screening of mutated strains through infrared spectroscopy. *PLoS One*. 13(9), e0204266.
27. Abu-Bader, S. H. (2021). Using statistical methods in social science research: With a complete SPSS guide. Oxford University Press.
28. Zarechahoki, M. A. (2010). Multivariate analysis methods in spss software. Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Tehran, Iran. Pp: 1-35.
29. Feng, N., Wei, Y., Feng, J., Tang, Q., Zhang, Z., Zhang, J., & Han, W.

- (2018). Preparative isolation of ganoderic acid S, ganoderic acid T and ganoderol B from *Ganoderma lucidum* mycelia by high-speed counter-current chromatography. *Biomedical Chromatography*, 32(10), e4283.
30. Gómez-Estaca, J., Calvo, M. M., Sánchez-Faure, A., Montero, P., & Gómez-Guillén, M. C. (2015). Development, properties, and stability of antioxidant shrimp muscle protein films incorporating carotenoid-containing extracts from food by-products. *LWT-Food Science and Technology*, 64(1), 189-196.
31. Mashayekhi, K., & Atashi, S. (2016). Guide to plant physiology experiments (pre-and post-harvest plant examinations). Sarva (Agricultural Education and Natural Resources Research (TAK)). 380p.
32. Bhosle, S. R., Sandhya, G., Sonawane, H. B., & Vaidya, J. G. (2011). Ergosterol content of several wood decaying fungi using a modified method. *International Journal of Pharmacy & Life Sciences*, 2(7).
33. Jafari Hajati, R., Payamnoor, V., Ghasemi Bezdi, K., & Ahmadian Chashmi, N. (2016). Optimization of callus induction and cell suspension culture of *Betula pendula* Roth for improved production of betulin, betulinic acid, and antioxidant activity. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 52, 400-407.
34. Molole, G. J., Gure, A., & Abdissa, N. (2022). Determination of total phenolic content and antioxidant activity of *Commiphora mollis* (Oliv.) Engl. resin. *BMC chemistry*, 16(1), 48.
35. Mahmoud, G. A. E., & Zohri, A. N. A. (2021). Amedment stable kojic acid produced by non-toxinogenic aspergillus oryzae using five levels central composite design of response surface methodology: Stable kojic acid production. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 10(6), e2683-e2683.
36. Taofiq, O., Heleno, S. A., Calhelha, R. C., Alves, M. J., Barros, L., González-Paramás, A. M., & Ferreira, I. C. (2017). The potential of *Ganoderma lucidum* extracts as bioactive ingredients in topical formulations, beyond its nutritional benefits. *Food and Chemical Toxicology*, 108, 139-147.
37. Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L., & Byrne, D. H. (2006). Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19(6-7), 669-675.
38. Pielok, M., & Grymel, M. (2023). Betulin-application in dermatology and cosmetology. *Aesth Cosmetol Med*, 12(3), 97.
39. Cho, S. H., Gottlieb, K., & Santhanam, U. (1996). U.S. Patent No. 5,529,769. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
40. Li, X., Li, M., Ji, N., Jin, P., Zhang, J., Zheng, Y., & Li, F. (2019). Cold plasma treatment induces phenolic accumulation and enhances antioxidant activity in fresh-cut pitaya (*Hylocereus undatus*) fruit. *Lwt*, 115, 108447.
41. Rahnama, T., & Abbaszade, R. (2018). Effects of cold plasma on color changes, anthocyanins content and microbial quality of barberry juice. *Journal of Food Science and Technology (Iran)*, 15(82), 373-385.
42. Verma, V., Ravindran, P., & Kumar, P. P. (2016). Plant hormone-mediated regulation of stress responses. *BMC plant biology*, 16, 1-10.
43. Ghodsi Maab, S. M., Makarian, H., Ghasimi Hagh, Z., & Gholipoor, M. (2022). Effects of cold plasma and salicylic acid on secondary metabolites and activity of enzymes involved in their biosynthesis in *Salvia leriifolia* Benth. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research*, 37(6), 954-970.

44. Darigh, F., Iranbakhsh, A., Oraghi Ardebili, Z., & Ebadi, M. (2023). Non-thermal plasma improved callogenesis performance and elicited the production of cannabinoids by modifying DNA methylome, expression of WRKY1 and ERF1B transcription factors, and expression of genes that contributed to the biosynthesis of cannabinoids. *Protoplasma*. 260(1), 159-170.
45. Tardast, Z., Iranbakhsh, A., Ebadi, M., & Oraghi Ardebili, Z. (2023). Corona discharge plasma stimulated production of atropine in callus of *Datura innoxia* by DNA hypomethylation and gene regulation: a novel technology for plant cell and tissue culture. *Protoplasma*. 260(6), 1515-1525.
46. Kumar, S., Korra, T., Thakur, R., Arutselvan, R., Kashyap, A. S., Nehela, Y., & Keswani, C. (2023). Role of plant secondary metabolites in defence and transcriptional regulation in response to biotic stress. *Plant Stress*. 8, 100154.
47. Aghasizadeh Shaarbaf, M., Payamnoor, V., Kavosi, M., & Asili, J. (2023). Optimization of ultrasound waves effects on production of ganoderic acid of *Ganoderma adspersum* by response surface method. *Journal of Wood and Forest Science and Technology*. 30(2), 15-37.