

بررسی برون تنی ویژگی‌های ضد باکتریایی و ضد اکسیدانی سلوموسیت مشتق شده از توتیای دریایی نقبزن (*Echinometra matheai*) و عصاره‌های آن

سجاد کاویانی^۱، سید فخرالدین حسینی^{۲*}، مسعود رضایی^۳

۱. دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه فراوری محصولات شیلاتی، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور، مازندران، ایران.

۲. دانشیار گروه فراوری محصولات شیلاتی، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور، مازندران، ایران.

۳. استاد گروه فراوری محصولات شیلاتی، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور، مازندران، ایران.

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۹/۱۴

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۱/۱۱

چکیده

در این مطالعه فعالیت ضدباکتریایی و ضداکسیدانی سلوموسیت مشتق شده از توتیای دریایی و عصاره‌های آبی و آلی حاصل از آن، مورد ارزیابی قرار گرفت. برای این منظور نمونه‌های زنده توتیای دریایی از سواحل خلیج فارس (بندر بوشهر) جمع‌آوری گردید و سلوموسیت‌ها از مایع سلومیک آن جدا سازی و سپس عصاره‌گیری شدند. اثر ضد باکتریایی سلوموسیت و عصاره‌ها بر گونه‌های باکتریایی *Staphylococcus aureus*، *Bacillus cereus*، *Escherichia coli* و *Pseudomonas aeruginosa* ارزیابی شد و نتایج نشان داد این ترکیبات اثر ضد باکتریایی قوی بر باکتری‌های مورد مطالعه داشتند. همچنین، اثرات ضد اکسیدانی سلوموسیت و هر یک از عصاره‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت به طوری که فاز آبی بیشترین اثر را بر کاهش رادیکال آزاد DPPH و فاز آلی بیشترین اثر را بر حذف رادیکال آزاد ABTS نشان دادند. به طور کلی نتایج این تحقیق نشان داد سلوموسیت و عصاره‌های حاصل از آن واجد اثرات ضد اکسیدانی و ضدباکتریایی قوی‌ای هستند، بیشترین اثر حذف‌کنندگی سلوموسیت، فاز آبی و فاز آلی بر رادیکال‌های آزاد DPPH، ABTS و همچنین کاهندگی آهن به ترتیب در غلظت‌های ۱/۲۵، ۵ و ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر مشاهده شد؛ همچنین نتایج ارزیابی ضدباکتریایی سلوموسیت، فاز آبی و فاز آلی نشان داد مقادیر مربوط به MIC و MBC برای هر یک از ترکیبات با هم برابر است، به طوری که (MIC و یا MBC) این ترکیبات بر باکتری‌های *Staphylococcus aureus*، *Bacillus cereus*، *Escherichia coli* و *Pseudomonas aeruginosa* به ترتیب، برای سلوموسیت در غلظت‌های بیشتر از ۵، ۲/۵، ۲/۵ و ۵ میکروگرم در میلی‌لیتر، برای فاز آبی در غلظت‌های ۲/۵، ۰/۱۹، ۰/۱۹ و ۰/۱۹ میکروگرم در میلی‌لیتر و برای فاز آلی در غلظت‌های بیشتر از ۵، ۰/۶۲۵، ۰/۶۲۵ و ۲/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر به دست آمد. با توجه به فعالیت ضد میکروبی و ضد اکسیدانی ترکیبات مورد مطالعه از توتیای دریایی می‌تواند به عنوان عامل ضدباکتریایی، ضد اکسیدانی در بسته‌بندی مورد استفاده قرار گیرند.

واژگان کلیدی: توتیای دریایی، سلوموسیت، فعالیت ضد باکتریایی، فعالیت ضد اکسیدانی.

۱. مقدمه

محیط زیست دریا یک منبع از مولکول‌های زیست فعال نوین است که از نظر پزشکی، فیزیولوژی، داروشناسی و بیوشیمی بسیار حائز اهمیت اند (Li *et al.*, 2008). این محیط در برگیرنده بیش از ۸۰ درصد از گونه‌های گیاهی و جانوری جهان از قبیل جلبک‌های بزرگ، ریز جلبک‌ها، سیانوباکترها، ماهی‌ها، بی‌مهرگان و گونه‌های دیگر است که منابع بالقوه‌ای برای پروتئین و پپتیدهای منحصر به فرد هستند (Kim and Wijesekara., 2010). با توجه به اینکه ترکیبات دریایی تحت فعالیت‌های داروسازی هستند، انتظار می‌رود که محیط‌زیست دریایی یک منبع با ارزش از این ترکیبات جدید در آینده باشد (Kim and Wijesekara., 2010). ترکیبات شیمیایی زیست‌فعال می‌توانند به‌عنوان متابولیت‌های اولیه و ثانویه طبقه‌بندی شوند (Uma and Parvathavarthini., 2010). از آنجایی که بی‌مهرگان دریایی به طور مداوم در معرض غلظت بالایی از باکتری‌ها، قارچ‌ها و ویروس‌ها قرار دارند که ممکن است بیماری‌زا باشند، بقای این موجودات بستگی به مکانیسم ضد میکروبی کارآمد برای محافظت‌شان در برابر عفونت‌های میکروبی دارد (Abubakar *et al.*, 2012). خارپوستان^۱ مانند بسیاری دیگر از بی‌مهرگان دریایی به عنوان منبعی از ترکیبات فعال زیستی با

کاربردهای پزشکی بررسی شده‌اند (Kelly, 2005). اگرچه تعداد زیادی از متابولیت‌های ثانویه فعال دارویی از خارپوستان جدا شده‌اند، اما هنوز به نظر می‌رسد خارپوستان به عنوان یک منبع دست‌نخورده برای شناسایی و استخراج ترکیبات زیست‌فعال جدید محسوب شوند (Kelly, 2005). در سال‌های اخیر ترکیبات طبیعی زیادی از خارپوستان جدا شده که فعالیت‌زیستی و وسیعی داشته و جهت استفاده دارویی و کاربردهای درمانی معرفی شده‌اند (Mayer, *et al.*, 2013).

توتیای دریایی^۲ متعلق به شاخه خارپوستان و خانواده اکتینوئیده^۳ و از بی‌مهرگان دریایی است؛ گونه‌های متنوعی از توتیای دریایی به طور وسیعی در اقیانوس‌های جهان از مناطق جزر و مدی تا اعماق زیاد اقیانوس‌ها گسترده شده‌اند (Arizza *et al.*, 2013; Amarowicz *et al.*, 2014).

انواع عوامل ضد میکروبی از جمله استروئید گلیکوزیدها^۴، استرول پلی‌هیدروکسیلات^۵، رنگدانه نفتوکینون^۶ و پپتیدهای ضد میکروبی^۷ از توتیاهای دریایی جدا شده‌اند (Soleimani *et al.*, 1394). توتیاهای دریایی برای زنده ماندن به سیستم دفاعی ذاتی بدن خود متکی هستند به طوری که یک مجموعه ژن ایمنی پیچیده دارند، که تنوع بالا و قابل توجه‌ای از مولکول‌های ایمنی دفاعی را نشان

^۱ Echinoderms

^۲ Sea urchin

^۳ Echinoidea

^۴ Steroidal glycosides

^۵ Polyhydroxylated sterols

^۶ Naphthoquinone pigment

^۷ Antimicrobial peptides

ضد میکروبی آن نشان داد پپتیدها دارای اثر ضد باکتریایی قوی بر باکتری های گرم مثبت و گرم منفی بودند (Li et al., 2008, 2010). بیان شده است که مایع سلومیک و عصاره های آلی پوسته و گناد توتیای دریایی خاصیت ضد اکسیدانی دارد (Soleimani et al., 2014). هم چنین Qin و همکاران (۲۰۱۱)، به طور جداگانه گناد توتیای دریایی بنفش *Strongylocentrotus nudus* را با پروتئازهای مختلف تحت هیدرولیز آنزیمی قرار دادند. نتایج نشان داد که تمام فرکشن های پپتید دارای ظرفیت مهار رادیکال DPPH و کاهش قدرت کاهندگی آهن بودند. لذا، نیاز است اثرات ضد باکتریایی محصولات حاصل از عصاره به روش های مختلف مورد بررسی بیشتری قرار گیرد تا در صنعت آبی پروری بکار گرفته شود. در مطالعه حاضر خواص ضد اکسیدانی و ضد باکتریایی سلوموسیت مشتق شده از گونه توتیای دریایی *Echinometra mathaei* و فازهای آبی و آلی حاصل از آن بررسی شد.

۲. مواد و روش ها

۲.۱. جمع آوری توتیای دریایی نقبزن

نمونه های زنده توتیای دریایی نقبزن در پاییز سال ۱۳۹۵ در ۶ نوبت از منطقه بالا جزر و مدی با ساحل سنگی _ صخره ای در خلیج فارس (بو شهر، بندر بو شهر، ساحل شغاب، طول و عرض جغرافیایی "۲۸°۵۴'۲۴،۴۵" شمالی و "۵۰°۴۹'۲۳،۷۷" شرقی) جمع آوری گردیدند. توتیاهای صید شده در ظرف های پلاستیکی حاوی آب دریا قرار گرفتند و به پژوهشکده خلیج فارس (واقع در استان بو شهر، بندر بو شهر) انتقال یافتند. نمونه های زنده به منظور سازگاری با محیط و کاهش استرس تا پایان زمان نمونه برداری در ونیروهای (ظرف های) حاوی آب دریا (همان آب دریا منطقه صید) و در معرض هوادهی قرار گرفتند. به منظور جداسازی سلوموسیت ها از پلاسما (سلول های آزاد مایع سلومیک)، مایع سلومیک از طریق

می دهند. در این رابطه فعالیت های ضدباکتریایی عصاره توتیای دریایی سبز *Strongylocentrotus droebachiensis* مشخص گردیده است (Li et al., 2010).

گونه *Echinometra mathaei* با وزن و طول متوسط ۸۵ گرم و ۶ سانتی متر حاوی ۱۰ الی ۱۵ میلی لیتر مایع سلومیک است. این گونه در مناطق جزرومدی درون چال آب ها، زیر سنگ ها و به ندرت به حالت غیر پنهان پراکنش دارد، همچنین بیشترین فراوانی را در میان گونه های دیگر خانواده اکینوئیده دارا ست (Khaghli and Oufi., 1389). این گونه در تمام ماه های سال در مناطق مختلف خلیج فارس و دریای عمان یافت می شود. واکنش ایمنی توتیای دریایی در برابر میکروارگانیسم های بیماری زا به صورت بروز سلول های ایمنی و عوامل همورال در مایع سلومیک است. همچنین رنگدانه های هیدروکسیلات نفتوکینون در توتیای نقبزن دارای فعالیت ضدباکتریایی، ضد جلبکی و ضد اکسیدانی است (Soleimani et al., 1394). در تحقیقاتی که تاکنون روی عصاره ها و ترکیبات بدست آمده از بی مهرگان دریایی صورت گرفته، خواص سیتوتوکسیسیتی، ضد اکسیدانی، ضد باکتریایی، ضد التهاب، ضد ویروسی و ضد سرطانی آن ها به اثبات رسیده است. به طوری که تاکنون مطالعات زیادی بر خواص ضد میکروبی و ضد اکسیدانی اندام های مختلف خارپوستان در جهان صورت گرفته است (Chen, 2013; Farouk et al., 2007).

در مطالعه راهی و همکاران، ۱۳۹۳، روی عصاره آلی و آبی اجزای مختلف بدن توتیای دریایی (گناد، پو ته، خار و بخش دهانی)، نتایج نشان داد عصاره ها در دو غلظت ۶۰۰ و ۱۵۰۰ $\mu\text{g/ml}$ میکروگرم در لیتر دارای اثر ضد قارچی هستند. همچنین فعالیت های ضدباکتریایی عصاره توتیای دریایی سبز (*Strongylocentrotus droebachiensis*) مورد مطالعه قرار گرفته است و اثر ضد باکتریایی و ضد قارچی آن به اثبات رسیده است (Haug et al., 2002). از سوی دیگر اولین پپتیدهای ضد میکروب از عصاره سلوموسیت توتیای سبز جداسازی و تخلیص شده اند (استرون گلین ۱ و ۲، سنتروسین ۱ و ۲)؛ که نتایج فعالیت

۲/۵، ۱/۲۵، ۰/۶۲۵، ۰/۳۱۲، ۰/۱۵۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر به روش، رقیق سازی مرحله به مرحله^۳ تهیه گردید (Schiallaci et al., 2014).

۲.۴. سویه‌های باکتریایی و شرایط رشد آن‌ها

از باکتری‌های گرم منفی *Pseudomonas aeruginosa*، *Escherichia coli*، و از باکتری‌های گرم مثبت *Bacillus cereus*، *Staphylococcus aureus* به عنوان میکروارگانیزم‌های آزمون استفاده شد. همه این سویه‌ها در دمای اتاق و در محیط کشت Mueller Hinton broth رشد یافتند. سویه‌های باکتری‌های مورد بررسی در این تحقیق، سویه‌های وحشی بودند. سویه‌ها در مو سسه رازی اراک و از منابع آلوده مختلف جدا گردیدند، باکتری‌ها شریشیا کولای و استافیلوکوکوس از عفونت انسانی جدا شدند و باکتری سدوموناس آئروژینوس از اسهال و در آخر باکتری باسیلوس سرئوس از غذا انسانی جدا گردید. سپس هر کدام از سویه‌ها کشت خطی داده شدند و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ °C درجه سانتیگراد در انکوباتور قرار گرفتند تا از کلونی‌های تک آنها به منظور انجام آزمایش استفاده شود.

۲.۵. سنجش پروتئین به روش BCA^۴

در بررسی حاضر میزان پروتئین سلوموسیت، فاز آبی و آلی لیوفلیزه شده، با استفاده از روش BCA سنجیده شد (Smith et al., 1985). به طوری که با توجه به منحنی استاندارد (شکل ۱)، به دست آمده میزان پروتئین محاسبه گردید.

۲.۶. آزمون‌های ضد اکسیدانی سلوموسیت و

فازهای آبی و آلی جداسازی شده از آن

شکستن دیواره کلسیمی جمع‌آوری گردید و به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ (۸۰۰gX)، دمای ۴ درجه سانتی‌گراد) شد. پس از آن سلوموسیت‌ها مخلوط و لیوفلیزه شدند و تا زمان استخراج در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردیدند (Schiallaci et al., 2014).

۲.۲. جداسازی فاز آبی و آلی سلوموسیت‌های

توتیای دریایی

با برش بخش دهانی توتیا مایع سلومویک حاوی سلوموسیت‌ها جمع‌آوری و سپس خشک انجمادی شد، پس از آن سلوموسیت‌های خشک انجمادی شده به منظور شویش طی دو مرحله با مقدار ۶۰ درصد (حجمی/حجمی) استونیتریل به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه در قیف جمع‌کننده نگهداری شدند، پس از آن مایعات روماند در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ تا ۲ ساعت انکوبه گردیدند، تا اجازه داده شود که فازهای آلی و آبی تفکیک شوند. فاز آبی و آلی جمع‌آوری شدند و در سانتریفیوژ خلاء (یا در خشک کن انجمادی) خشک گردیدند (Schiallaci et al., 2014).

۲.۳. تعیین حداقل غلظت بازدارندگی^۱ و حداقل

غلظت کشندگی^۲

سلوموسیت و هر کدام از فازها (فاز آبی و آلی) در رقت‌های ۰/۱۵۶ - ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر تهیه شدند. برای ساختن غلظت‌های ذکر شده ابتدا ۰/۰۱ گرم از وزن خشک هر کدام از فازها را در ۱ میلی‌لیتر بافر اولیه (آب مقطر) حل گردید تا محلول استوک با غلظ ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بدست آید (برای رسیدن به غلظت‌های کمتر به نسبت ۱ به ۲ رقیق شدند). برای هر عصاره به وسیله محیط کشت مولر هینتون براث (MHB) ۸ رقت ۱۰، ۵،

^۱ Minimum Inhibitory Concentration

^۲ Minimum Bactericidal Concentration

^۳ Serial dilution

^۴ Bicinchoninic Acid Method

خواندن جذب در ۵۱۷ نانومتر با اسپکتروفوتومتر

۲.۶.۲. قدرت حذف رادیکال ABTS^۲

قدرت حذف کنندگی رادیکال ABTS با روش Wang و همکاران (۲۰۱۲) اندازه گیری شد. ابتدا محلول ABTS (۷ میلی مولار) با پتاسیم پرسولفات (۲/۴۵ میلی مولار) مخلوط گردید و به مدت ۱۶ ساعت در دمای اتاق در شرایط تاریکی نگهداری شد. محلول رادیکال ABTS در بافر فسفات پتاسیم نمکی (pH= ۷/۴) رقیق سازی شد تا محلول مورد نظر برای انجام آزمایش به میزان جذب 0.2 ± 0.07 در ۷۳۴ نانومتر رسد. در ادامه، ۹۸۰ میکرولیتر از محلول ABTS با ۲۰ میکرولیتر از غلظت‌های مختلف نمونه مخلوط شد و پس از ۱۰ دقیقه جذب نمونه‌ها در ۷۳۴ نانومتر خوانده شد. قدرت حذف کنندگی رادیکال ABTS با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد:

رابطه (۲):

$$\text{Free radical scavenging (\%)} = \frac{(A \text{ blank} - A \text{ sample})}{A \text{ blank}} \times 100$$

ABTS: آب با محلول A blank
ABTS: نمونه با A sample

۲.۶.۳. آزمون قدرت کاهندگی آهن

به منظور آزمون قدرت کاهندگی آهن، ۲۰۰ میکرولیتر نمونه با ۵۰۰ میکرولیتر بافر فسفات پتاسیم ۰/۲ مولار (pH= ۶/۶) و ۵۰۰ میکرولیتر فری-سیانید پتاسیم ۱ درصد ترکیب گردید. ترکیب حاصله به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت، سپس ۵۰۰ میکرولیتر TCA ۱۰ درصد (حجمی/حجمی) به آن اضافه شد. در ادامه محلول حاصل با دور $4000 \times g$ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. در نهایت

۲.۶.۱. قدرت حذف کنندگی رادیکال آزاد

DPPH^۱

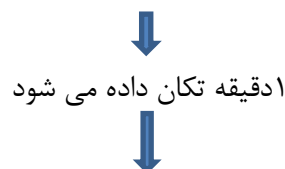
قدرت حذف کنندگی رادیکال DPPH بر طبق روش You و همکاران (۲۰۱۰) انجام شد. ۵۰۰ میکرولیتر از نمونه با ۵۰۰ میکرولیتر محلول DPPH ۰/۱۶ میلی مولار که در اتانول ۹۵ درصد حل شده مخلوط گردید. محلول به دست آمده به مدت ۱ دقیقه تکان داده شد و سپس در دمای اتاق به مدت ۳۰ دقیقه در شرایط تاریکی نگهداری شد. در نهایت جذب همه نمونه‌ها در طول موج ۵۱۷ نانومتر با دستگاه میکروپلیت ریدر الیزا خوانده شد. قدرت مهار کنندگی با استفاده از رابطه زیر محاسبه گردیدند.

رابطه (۱):

$$\text{Free radical scavenging (\%)} = \frac{(A \text{ blank} - A \text{ sample})}{A \text{ blank}} \times 100$$

DPPH: نمونه با A sample
DPPH: اتانول با A blank

مواد لازم: ۱- محلول DPPH ۰/۱۶ میلی مولار معادل ۰/۶۳۰۹۱۲ گرم در ۱ لیتر آب. ۲- محلول DPPH ۰/۱ میلی مولار معادل ۰/۳۹۴۳۲ گرم در ۱ لیتر آب. ۳- DPPH molar mass: 394.32 g/mol -۴ رقیق سازی نمونه از ۴۰ mg/ml تا 0.078125 mg/ml یعنی از S₁ تا S₁₀ انجام شد. یک سی سی نمونه (باید ۰،۲ سی سی نمونه که با آب مقطر به حجم ۲ سی سی برسد برای این کار ۲۰۰ سی سی از هر غلظت + ۱۸۰۰ سی سی آب مقطر شد) + ۲ سی سی DPPH ۱۶٪ مولاژ شد.



^۲ 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)

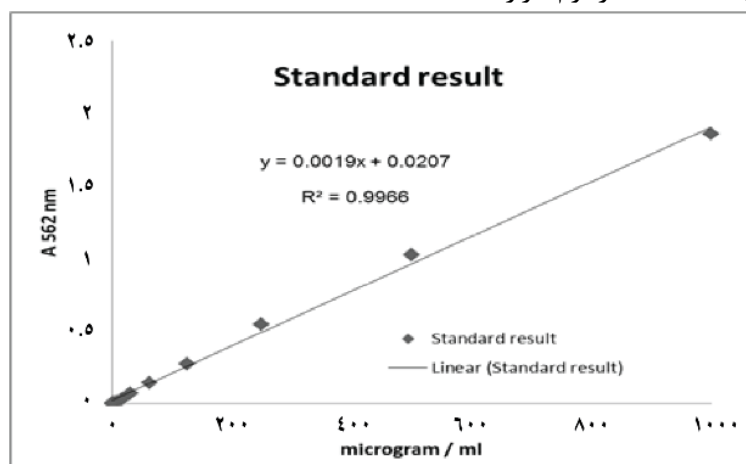
^۱ 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical

انجام شد. پس از بررسی نرمال بودن داده ها به کمک آزمون کولموگروف-اسمیرنف، داده ها با آزمون واریانس یک طرفه (One way ANOVA) آنالیز شدند. جهت تعیین وجود تفاوت معنی دار بین مقادیر میانگین تیمارهای مختلف از آزمون حداقل تفاوت معنی دار (LSD) در سطح $(p \leq 0/05)$ استفاده گردید.

به ۵۰۰ میکرولیتر از فاز بالائی، ۵۰۰ میکرولیتر آب مقطر و ۱۰۰ میکرولیتر کلرید آهن III ۰/۱ درصد اضافه شد و سپس محلول در دمای ثابت به مدت ۳۰ دقیقه نگهداری گردید تا به رنگ سبز تغییر یابد. میزان جذب محلول نهائی در طول موج ۷۰۰ نانومتر اندازه گیری شد (Bougatef, et al., 2009).

۲.۷. تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل داده ها با استفاده از نرم افزار SPSS



شکل ۱- منحنی استاندارد مربوط به ارزیابی پروتئین به روش BCA.

در میلی لیتر تا ۵ میکرو گرم در میلی لیتر ثابت ماند $(P \geq 0/05)$. حداقل غلظت بازدارندگی (۵۰ درصد > MIC) و احتمالاً غلظت های بیشتر از ۵ میکرو گرم در میلی لیتر بود. فاز استونیتریل (فاز آلی) نیز مشابه سلوموسیت ها با افزودن آن به چاهک، بر باکتری ها تاثیر ضد میکروبی نشان داد. ولی با افزایش غلظت تغییر محسوسی مشاهده نشد و هیچ کدام از رقت ها تاثیر بارزی بر میزان باکتری نداشت $(P > 0/05)$. فاز آبی در مقایسه با دو ماده قبلی با افزایش غلظت، روند کاهشی رشد باکتری را نشان داد. بطوریکه میزان باکتری ها در غلظت ۵ میکرو گرم بر میلی لیتر فاز آبی کاهش چشمگیری نشان دادند. حداقل غلظت بازدارندگی ($MIC > 50\%$) با حداقل غلظت کشندگی (MIC) فاز آبی با هم یکسان و برابر با غلظت ۲/۵ میکروگرم بر میلی لیتر بود (شکل ۲).

۳. نتایج

۳.۱. اثر ضد باکتریایی سلوموسیت، فاز آبی و

فاز آلی بر باکتری *Staphylococcus aureus*

نتایج ارزیابی رقت های مختلف محلول سلوموسیت و فاز آبی و فاز آلی روی باکتری *Staphylococcus aureus* پس از ۱۸ ساعت انکوباسیون نشان داد که سلوموسیت، فاز آبی و فاز آلی واجد خاصیت ضد میکروبی است (شکل ۲). به طوریکه چاهک های حاوی این ترکیبات در مقایسه با چاهک فاقد این ترکیبات (کنترل مثبت) از مقدار عددی کمتری برخوردار بودند. علی رغم تاثیر ضد میکروبی سلوموسیت با افزایش غلظت بر فعالیت ضد میکروبی آن تاثیر بارزی نداشت. در واقع از غلظت ۰/۰۳۹ میکروگرم

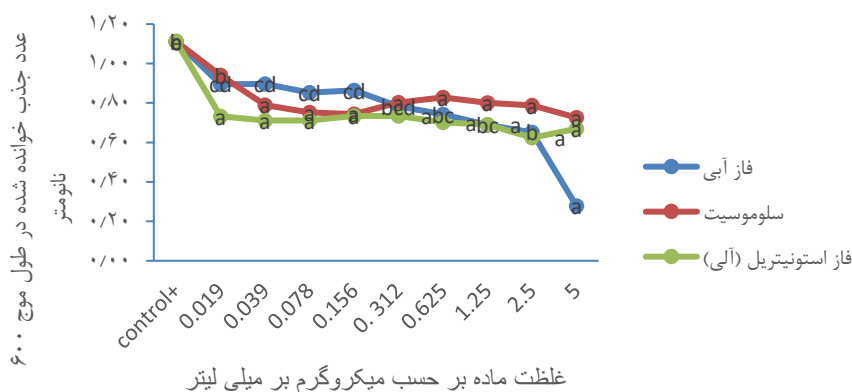
دست آمد ($P < 0/05$). نتایج فاز آبی بیانگر تاثیر مخرب و قوی آن با تلقیح به باکتری‌ها است. بطوریکه در کمترین غلظت، به شدت بر رشد باکتری‌ها اثر گذاشته و نشانگر کنترل کامل جمعیت باکتریایی بود. حداقل غلظت بازدارندگی ($MIC > 50\%$) برابر با غلظت ۲/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر به دست آمد. در حالیکه غلظت ۰/۶۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر، حداقل غلظت بازدارندگی ($MIC > 50\%$) فاز آلی را نشان داد. اما فاز آبی با بازدارندگی بیش از ۹۰ درصد در تمام غلظت‌ها، بیانگر اثر گذاری بسیار قوی بر کاهش جمعیت باکتری بود. در واقع در فاز آبی از کمترین غلظت، باعث حذف کامل جمعیت باکتریایی شد و اعداد خوانده شده با میانگین عدد کنترل منفی (۰/۰۴)، بودند که بیانگر حداقل غلظت کشندگی (MBC) در پایین‌ترین غلظت است (شکل ۳).

۳.۲. اثر ضد باکتریایی سلوموسیت، فاز آبی و

Bacillus cereus بر باکتری

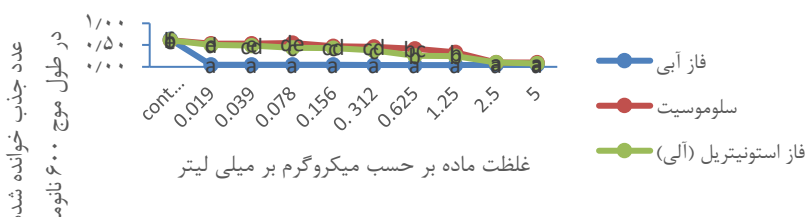
نتایج ارزیابی فعالیت ضد میکروبی رقت‌های مختلف محلول سلوموسیت و فاز آبی و فاز آلی بر باکتری *Bacillus cereus* پس از ۱۸ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد بیانگر آن بود که با افزودن هر کدام از عصاره‌ها به محیط باکتری، بر آن‌ها تاثیر منفی دارد ولی با افزایش غلظت، علی‌رغم کاهش رشد باکتریایی، عکس‌العمل‌های متفاوتی مشاهده شد. فاز آلی و سلوموسیت از روند نسبتاً مشابهی برخوردار بود و حداقل غلظت بازدارندگی برای فاز آلی در غلظت ۰/۶۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر و حد اقل غلظت بازدارندگی برای سلوموسیت در غلظت ۲/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر به

ارزیابی فعالیت ضد میکروبی بر باکتری *Staphylococcus aureus*



شکل ۲- نتایج ارزیابی رقت‌های مختلف محلول سلوموسیت و فاز آبی و فاز آلی بر باکتری *Staphylococcus aureus* پس از ۱۸ ساعت انکوباسیون.

ارزیابی فعالیت ضد میکروبی بر باکتری *Bacillus cereus*



شکل ۳- نتایج ارزیابی رقت‌های مختلف محلول سلوموسیت و فاز آبی و فاز آلی بر باکتری *Bacillus cereus* پس از ۱۸ ساعت انکوباسیون.

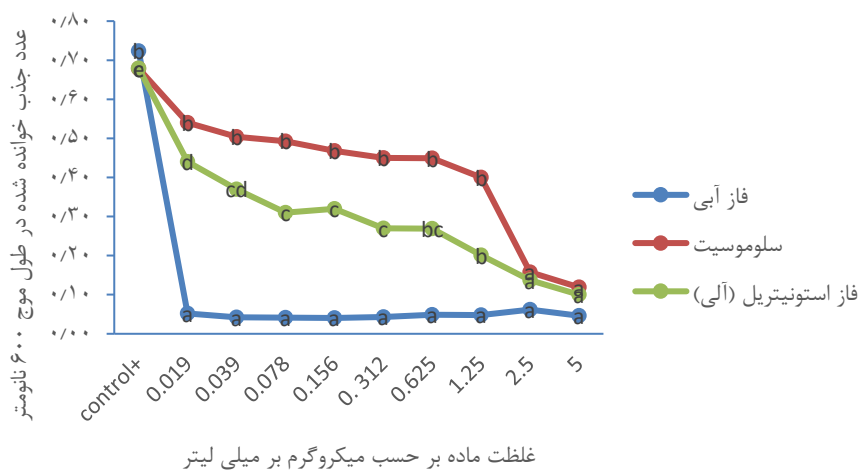
بازدارندگی و کشندگی ($MIC > 50\%$) و (MBC) سلوموسیت مقدار ۲/۵ میکروگرم بر میلی لیتر تعیین شد و حداقل غلظت بازدارندگی و کشندگی ($MIC > 50\%$) و (MBC) فاز آلی در مقایسه با سلوموسیت در غلظت کمتر و معادل مقدار ۰/۰۷۸ میکروگرم بر میلی لیتر به دست آمد. فاز آبی بر این باکتری نیز تاثیر بارزی داشت و با افزودن آن به محیط کشت، باکتری‌ها را از بین برد. در واقع حداقل کشندگی (MBC) فاز آبی از کمترین غلظت آزمایش شده یعنی ۰/۰۱۹ میکروگرم بر میلی لیتر به دست آمد.

۳.۳. اثر ضد باکتریایی سلوموسیت، فاز آبی و

فاز آلی بر باکتری *Escherichia coli*

در شکل ۴، تاثیر رقت‌های مختلف سلوموسیت، فاز آبی و فاز آلی بر باکتری *Escherichia coli* نشان داده شده است. فاز آلی در مقایسه با سلوموسیت از تاثیر گذاری بیشتری برخوردار بود ولی فاز آبی در مقایسه با آن دو به شدت تاثیر گذار بود. به طوری که باکتری‌ها در کمترین غلظت کاهش شدیدی را نشان دادند. حداقل غلظت

ارزیابی فعالیت ضد میکروبی بر باکتری *Escherichia coli*



شکل ۴ - نتایج ارزیابی رقت‌های مختلف محلول سلوموسیت و فاز آبی و فاز آلی روی باکتری *Escherichia coli* پس از ۱۸ ساعت انکوباسیون.

حداقل غلظت بازدارندگی و کشندگی سلوموسیت ($MIC > 50\%$) و (MBC) برای باکتری *Pseudomonas aeruginosa* مقدار ۵ میکروگرم بر میلی لیتر تعیین شد. فاز آلی نیز مشابه سلوموسیت با افزایش غلظت، تاثیر ضد باکتریایی قوی تری را نشان داد و حداقل غلظت بازدارندگی و کشندگی آن ($MIC > 50\%$) و (MBC) برابر ۲/۵ میکروگرم بر میلی لیتر بود. فاز آبی بر این گونه از باکتری نیز تاثیر

۳.۴. اثر ضد باکتریایی سلوموسیت، فاز آبی و

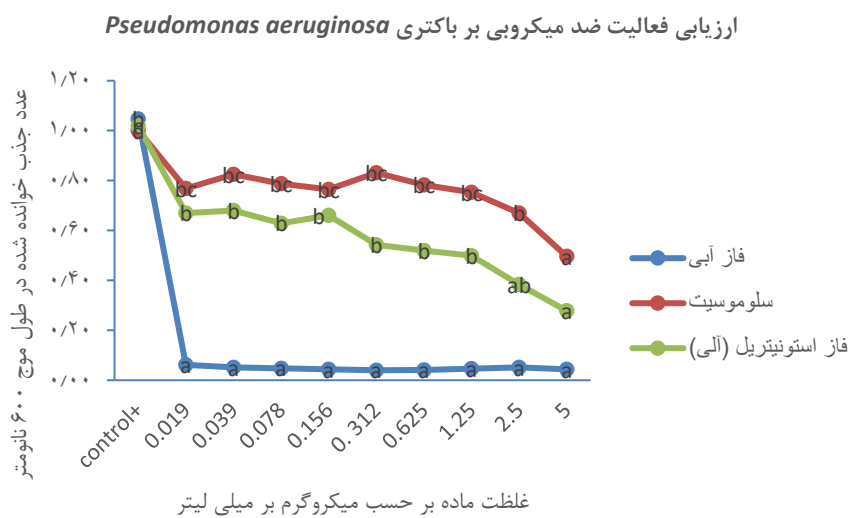
فاز آلی بر باکتری *Pseudomonas aeruginosa*

با افزودن مواد سلوموسیت، فاز آبی و فاز آلی به باکتری گرم منفی *Pseudomonas aeruginosa* کاهش رشد مشاهده شد ولی با افزایش غلظت بر آن تاثیر منفی داشت. فاز آبی در مقایسه با دو ماده دیگر مشابه سایر آزمون‌های ضد میکروبی انجام شده، بسیار موثرتر عمل نمود و رشد باکتری‌ها را بطور کامل مهار کرد.

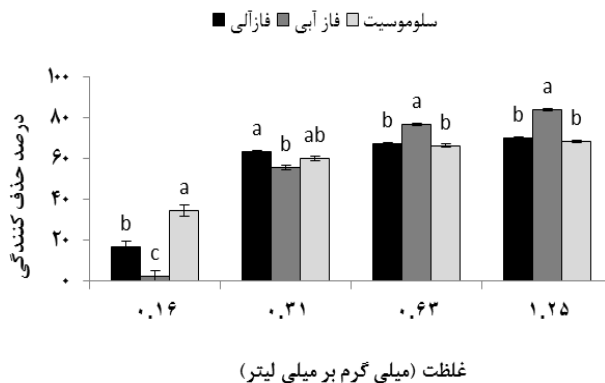
در شکل ۶ نتایج مقایسه درصد مهارکنندگی سلوموسیت و فازهای آبی و آلی جدا شده از آن آمده است. در غلظت‌های ۱/۲۵ و ۰/۶۳ میلی‌گرم در میلی‌لیتر تفاوت معنی‌داری بین فاز آلی و سلوموسیت وجود نداشت. در حالی که فاز آبی با دو ترکیب دیگر تفاوت معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵). همچنین بیشترین اثر مهارکنندگی برای فاز آبی در غلظت‌های ۱/۲۵ و ۰/۶۳ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به دست آمد.

منفی بارزی داشت و با افزودن آن به محیط حاوی باکتری، کشندگی آن مشخص گردید. در واقع حداقل کشندگی فاز آبی در کمترین غلظت، یعنی ۰/۰۱۹ میکروگرم بر میلی‌لیتر حاصل شد (شکل ۵).

۳.۵. نتایج میزان حذف کشندگی رادیکال آزاد DPPH برای فاز آلی، فاز آبی و سلوموسیت

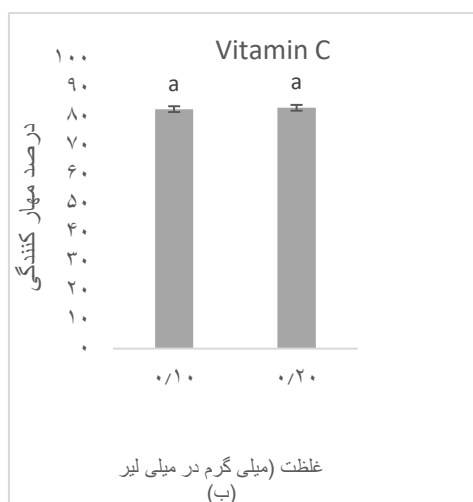


شکل ۵- نتایج ارزیابی رت‌های مختلف محلول سلوموسیت و فاز آبی و فاز آلی روی باکتری *Pseudomonas aeruginosa* پس از ۱۸ ساعت انکوباسیون.

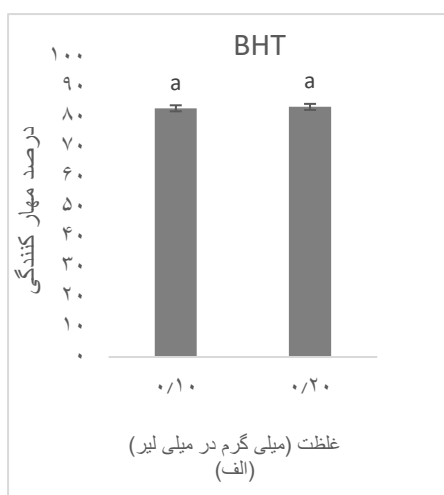


شکل ۶- مقایسه درصد مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH سلوموسیت و فازهای آبی و آلی جدا شده از آن، هر غلظت به طور جداگانه مورد مقایسه قرار گرفته است. حروف a-c بیانگر تفاوت معنی‌دار بین غلظت‌ها است (P<۰/۰۵). داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار ارائه شده‌اند.

آلی بطور معنی داری در تمامی غلظت‌ها کمتر از آسکوربیک اسید و BHT بود ($P < 0/05$). اما در غلظت ۱/۲۵ میلی‌گرم در میلی لیتر برای فاز آبی (۸۳/۶ درصد) تفاوت معنی داری با ضد اکسیدان‌های صنعتی و طبیعی در غلظت‌های ۰/۱ و ۰/۲ میلی‌گرم در میلی لیتر (برای BHT به ترتیب ۸۲/۶۷ و ۸۳/۱۴ درصد مهار کنندگی و همچنین برای آسکوربیک اسید به ترتیب ۸۳/۱۴ و ۸۷/۸۹ درصد مهار کنندگی) مشاهده نشد (شکل ۷).



بررسی نتایج به دست آمده نشان دادند که سلوموسیت و فاز آلی و آبی فعالیت حذف کنندگی رادیکال DPPH را به خوبی دارند، به طوری که با افزایش غلظت عصاره‌ها از ۰/۱۵۶ میلی‌گرم در میلی لیتر به ۱/۲۵ میلی‌گرم در میلی لیتر، فعالیت حذف کنندگی رادیکال آزاد افزایش یافت و در غلظت ۱/۲۵ میلی‌گرم در میلی لیتر فعالیت حذف کنندگی رادیکال آزاد DPPH برای سلوموسیت و فاز آلی و آبی (۶۸/۴، ۶۹/۶ و ۸۳/۶ درصد) بود. همچنین فعالیت حذف کنندگی رادیکال آزاد DPPH در سلوموسیت و فاز



شکل ۷ - میزان حذف کنندگی رادیکال آزاد DPPH برای ضد اکسیدان صنعتی BHT (الف) و ویتامین C (ب) در دو غلظت ۰/۱ و ۰/۲ میلی‌گرم در میلی لیتر. (درصد مهار کنندگی غلظت‌های ۰/۱ و ۰/۲ میلی‌گرم در میلی لیتر ضد اکسیدان‌های صنعتی و طبیعی (BHT و آسکوربیک اسید) مبنای مقایسه‌اند و درصد مهار کنندگی سایر ترکیبات با غلظت‌های متفاوت بر اساس مقدار عددی سنجیده شده است).

۷۳/۱۶ درصد سلوموسیت ۳۳/۸۳ درصد و فاز آبی ۳۳/۲۳ درصد رادیکال‌های آزاد ABTS حذف شدند، در غلظت ۵ میلی‌گرم در میلی لیتر فاز آلی ۹۱/۷ درصد قدرت حذف کنندگی رادیکال آزاد ABT ثبت شد و سلوموسیت ۴۶/۵۲ درصد رادیکال آزاد ABTS را حذف کرد و کمترین قدرت حذف کنندگی مربوط به فاز آبی با درصد حذف کنندگی ۳۲/۰۵ درصد بود، همچنین فعالیت حذف کنندگی رادیکال آزاد ABTS در سلوموسیت و فاز آبی بطور

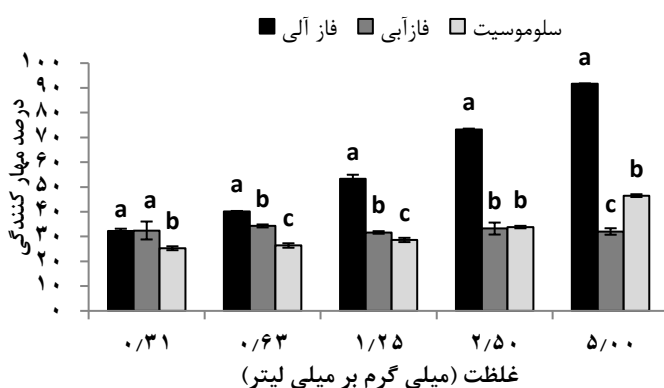
۳.۶. نتایج میزان حذف کنندگی رادیکال آزاد

ABTS برای سلوموسیت، فاز آبی و فاز آلی

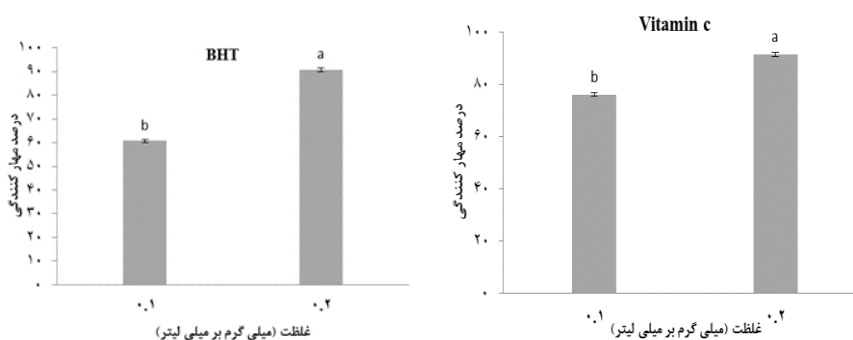
در شکل ۸، نتایج مقایسه درصد مهار کنندگی سلوموسیت، فازهای آبی و آلی جدا شده از آن آمده است. طبق نتایج در تمامی غلظت‌ها بین سلوموسیت، فاز آبی و فاز آلی تفاوت معنی دار مشاهده شد ($P < 0/05$). بررسی‌ها نشان داد در غلظت ۲/۵ میلی‌گرم در میلی لیتر فاز آلی

نشده. اما درصد مهار کنندگی فاز آلی با غلظت ۰/۱ میکروگرم در میلی لیتر ضد اکسیدان های صنعتی و طبیعی تفاوت معنی داری داشت و درصد مهار کنندگی ضد اکسیدان های مذکور برای غلظت ۰/۱ میلی گرم در میلی لیتر به ترتیب برای BHT ۶۰/۷ درصد و برای آسکوربیک اسید ۷۶/۰۵ درصد به دست آمد (شکل ۹).

معنی داری کمتر از آسکوربیک اسید و BHT بود اما در غلظت ۵ میلی گرم در میلی لیتر برای فاز آلی (۹۱/۷ درصد) تفاوت معنی داری با ضد اکسیدان های صنعتی و طبیعی در غلظت ۰/۲ میلی گرم در میلی لیتر (برای BHT ۹۰/۷ درصد مهار کنندگی و برای آسکوربیک اسید ۶۰/۷ درصد مهار کنندگی) مشاهده



شکل ۸ - مقایسه درصد مهار کنندگی رادیکال آزاد ABTS سلوموسیت و فازهای آبی و آلی جدا شده از آن، (حروف معنی داری اختلاف در هر غلظت را نشان می دهد و مقایسه بین تمام غلظت ها با توجه به درصد مهار کنندگی رادیکال آزاد توسط سلوموسیت، فاز آلی و فاز در غلظت های مختلف صورت گرفته است).



شکل ۹ - میزان حذف کنندگی رادیکال آزاد ABTS برای ضد اکسیدان صنعتی BHT و ضد اکسیدان طبیعی (ویتامین C) در دو غلظت ۰/۱ و ۰/۲ میلی گرم در میلی لیتر (درصد مهار کنندگی غلظت های ۰/۱ و ۰/۲ میلی گرم در میلی لیتر ضد اکسیدان های صنعتی و طبیعی (BHT و آسکوربیک اسید) مبنای مقایسه اند و درصد مهار کنندگی سایر ترکیبات با غلظت های متفاوت بر اساس مقدار عددی سنجیده شده است).

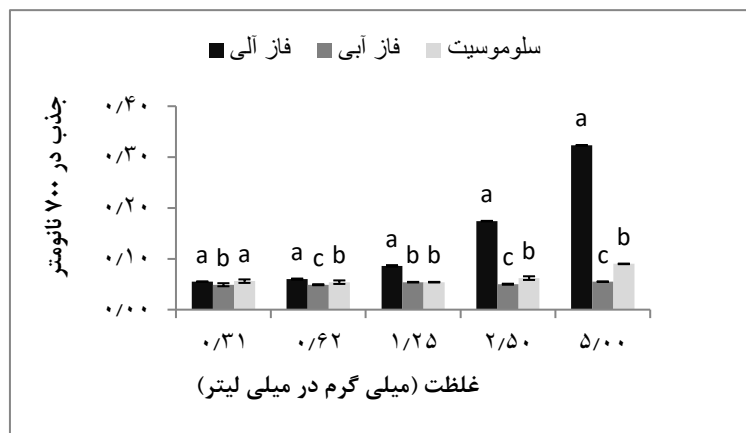
سلوموسیت و فاز آلی و آبی در تمام غلظت ها دارای اختلاف معنی دار است (شکل ۱۰)، به طوری که با افزایش غلظت برای هر سه ماده افزایش میزان کاهندگی آهن مشاهده شد. در غلظت ۱/۲۵ میلی گرم در میلی لیتر

۳.۷. نتایج آزمون قدرت کاهندگی آهن برای سلوموسیت، فاز آلی و فاز آبی
بررسی نتایج نشان داد که قدرت کاهندگی آهن

۳.۸. تعیین غلظت پروتئین

در بررسی حاضر میزان پروتئین سلوموسیت، فاز آبی و آلی لیوفلیزه شده آن با استفاده از روش BCA سنجیده شد. به طوری که با توجه به منحنی استاندارد، میزان پروتئین به ترتیب برای سلوموسیت، فاز آبی و فاز آلی به ترتیب ۶۲/۴۱، ۲۳/۳۸ و ۶۹ درصد محاسبه گردید.

اختلاف معنی داری بین فاز آبی و سلوموسیت مشاهده نشد. بیشترین قدرت احیا کنندگی برای فاز آلی در غلظت‌های ۵ و ۲/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر با جذب ۰/۳۲۳ و ۰/۱۷۴ مشاهده شد و این میزان برای سلوموسیت ۰/۰۹ و ۰/۰۶ به دست آمد. کمترین قدرت احیا کنندگی برای فاز آبی مشاهده شد، به طوری که در بیشترین غلظت‌های آن یعنی ۵ و ۲/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر میزان جذب برابر ۰/۰۵ بود.



شکل ۱۰- مقایسه آزمون قدرت کاهندگی سلوموسیت و فاز های آلی و آبی.

سرطان شده است. فرایند اکسیداسیون لیپیدها نه تنها در صنایع غذایی و تولید غذای سالم بلکه برای سلامتی انسان نیز مشکل ساز شده است (Shahidi, ۱۹۹۷ و ۲۰۰۸). بنابراین، در صنایع غذایی و داروسازی از ضد اکسیدان‌های مصنوعی مانند: بوتیل هیدروکسی آنیزول^۱ (BHA)، پروپیل گالات^۲ (PG)، بوتیل هیدروکسی تولوئن^۳ (BHT) و تترا بوتیل هیدروکینون^۴ TBHQ جهت به تاخیر انداختن اکسیداسیون لیپیدها استفاده می‌شود (Taher et al., 2014; Di Bernardini et al., 2011). در استفاده از این ضد اکسیدان‌های مصنوعی توجه به مسائل

۴. بحث و نتیجه گیری

در سال‌های اخیر، توجه زیادی به بررسی فعالیت‌های ترکیبات زیستی و استفاده دارویی بالقوه از آنها شده است. توسعه مقاومت دارویی در پاتوژن‌های انسانی در برابر پادزیست‌هایی مصرفی، جستجو برای مواد ضد میکروبی از سایر منابع از جمله منابع طبیعی زیستی خشکی و دریایی زی را ضروری کرده است. همچنین شکل‌گیری گونه‌های اکسیژن واکنش‌پذیر منجر به وقوع بیماری‌های زیادی از قبیل بیماری قلبی، سکتة مغزی، تصلب شرایین، دیابت و

^۱ Butylhydroxyanisole

^۲ Propyl gallate

^۳ Butylated hydroxytoluene

^۴ Tert-Butylhydroquinone

است.

همچنین در رابطه با خاصیت حذف کنندگی رادیکال های آزاد DPPH، نتایج نشان داد که اثر حذف کنندگی DPPH در غلظت های ۰,۱۶ میلی گرم در میلی لیتر عصاره ها برای سلوموسیت و فاز آلی بیشتر از فاز آبی است. اما بیشترین اثر حذف کنندگی در غلظت های ۰/۶۳ میلی گرم در میلی لیتر و ۱/۲۵ میلی گرم در میلی لیتر مربوط به فاز آبی به دست آمد ولی معنی داری نبود. همچنین در غلظت ۱,۲۵ میلی گرم در میلی لیتر مقدار عددی میزان مهار کنندگی DPPH برای فاز آبی (۸۳/۶ درصد) از ویتامین C (۷۸/۸۹) و BHT (۸۲/۶۷) بیشتر بوده است. در رابطه با خاصیت حذف کنندگی رادیکال های آزاد ABTS نتایج بیانگر این بود که تمامی غلظت ها در عصاره ها دارای اثر حذف کنندگی رادیکال آزاد ABTS هستند. اما اثر حذف کنندگی ABTS برای فاز آلی بیشتر از فاز آبی و سلوموسیت بود. به طوری که در غلظت های ۲/۵ و ۵ میلی گرم در میلی لیتر ABTS دارای اثر حذف کنندگی بسیار بالایی بود و در غلظت ۵ میلی گرم در میلی لیتر با درصد حذف کنندگی (۹۱/۷ درصد) عملکرد بهتری را نسبت به ضد اکسیدان های صنعتی و طبیعی نشان داد. در رابطه با قدرت کاهندگی آهن، بیشترین قدرت احیا کنندگی برای فاز آلی در غلظت های ۵ و ۲/۵ میلی گرم در میلی لیتر با جذب ۰/۳۲۳ و ۰/۱۷۴ مشاهده شد و این میزان برای سلوموسیت ۰/۰۹ و ۰/۰۶ به دست آمد و کمترین قدرت احیا کنندگی برای فاز آبی مشاهده شد. در تحقیقی که سلیمانی و همکاران، ۲۰۱۴ انجام دادند، نتایج نشان داد که مایع سلومیک و رنگدانه پوست و رنگدانه خار دارای اثر حذف کنندگی خوبی در کنترل رادیکال آزاد DPPH دارند. به طوری که بیشترین میزان کنترل رادیکال آزاد DPPH مربوط به غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر به دست آمد. همچنین در تحقیق Archana و همکاران، ۲۰۱۶ روی گناد توتیای دریایی *Stomopneustes variolaris*، بررسیها نشان داد که

بهداشتی دارای اهمیت زیادی است (Taher et al., 2014; Hettiarachchy et al., 1996). از این رو شناسایی منابع ایمن و طبیعی جایگزین بعنوان ضد اکسیدان برای غذاها یک ضرورت است (Taher et al., 2014; Di Bernardini et al., 2011). بنابراین، علاقه روبه رشدی در جایگزینی ضد اکسیدان های مصنوعی با ضد اکسیدان های طبیعی از منابع غذایی برای مزایای سلامتی بالقوه و بدون عوارض جانبی وجود دارد (Taher et al., 2014; Sarmadi, 2010; Ismail, 2010).

در مطالعه حاضر اثر ضدباکتری سلوموسیت و عصاره آبی و آلی حاصل از آن بر باکتری های گرم منفی و گرم مثبت (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*) و همچنین *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* اثر ضد اکسیانی این ترکیبات (حذف رادیکال های آزاد DPPH و ABTS همچنین قدرت کاهندگی آهن)، مورد بررسی قرار گرفت. به طوری که نتایج آمون های ضد باکتریایی نشان داد تمام این ترکیبات در تمام غلظت ها دارای اثر ضد باکتریایی قوی بر باکتری های گرم مثبت و گرم منفی دارند و می توانند به دلیل حضور ترکیباتی از جمله استروئید گلیکوزیدها، استرول پلی هیدروکسیلات، رنگدانه نفتوکینون، پپتیدهای ضد میکروب و لیزوزیم ها رشد باکتریها را مهار کنند. ولی فاز آبی اثر ضد باکتریایی بسیار قوی تری را نسبت به سلوموسیت و فاز آلی نشان داد که می تواند به دلیل حضور بیشتر پپتیدهای ضد میکروب (AMPs) در این فاز باشد (Li et al., 2010; Schillaci et al., 2014; Taher et al., 2014). نتایج کارهای Li و همکاران، ۲۰۰۸ و ۲۰۱۰، بر توتیای دریایی سبز منجر به جدا سازی پپتیدهای ضد میکروبی غنی از سیستم استرون گلیکین و سنتروسین از فاز آبی حاصل از سلوموسیت ها جدا سازی و تخلیص آنها شد. نشان داده شد که AMPs دارای اثر ضد باکتریایی قوی بر باکتری های گرم منفی و گرم مثبت (*Escherichia coli*, *Listonella (Vibrio) anguillarum*) (*Corynebacterium glutamicum*, *Staphylococcus aureus*)

aeruginosa به ترتیب، برای سلوموسیت در غلظت‌های بیشتر از ۵، ۲/۵، ۲/۵، ۲/۵ و ۵ میکروگرم در میلی‌لیتر، برای فاز آبی در غلظت‌های ۲/۵، ۲/۵، ۲/۵، ۲/۵ و ۲/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر و برای فاز آلی در غلظت‌های بیشتر از ۵، ۲/۵، ۲/۵، ۲/۵ و ۲/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر به دست آمد و مهار رادیکال‌های آزاد ABTS و DPPH صورت گرفت.

با توجه به فعالیت ضد میکروبی مناسب عصاره‌ها در غلظت‌های کم، استفاده از این ترکیبات در سیستم‌های بسته‌بندی ضد میکروبی و داروهای ضد باکتریایی توصیه می‌شود. همچنین، با توجه به فعالیت ضد اکسیدانی مناسب سلوموسیت و فاز آبی و آلی حاصل از آن، استفاده از این ترکیبات در سیستم‌های بسته‌بندی ضد اکسیدانی توصیه می‌گردد.

عصاره متانولی گناد می‌تواند با دارا بودن ترکیبات پلی فنول نفتوکینونی و نیز ترکیبات پروتئینی با خاصیت ضد اکسیدانی، در غلظت‌های ۲۰ الی ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر، قدرت حذف‌کنندگی رادیکال آزاد DPPH را داشته باشد.

باتوجه به نتایج، مطالعه حاضر نشان داده شد که عصاره سلوموسیت و فاز‌های آبی و آلی حاصل از آن، اثر ضد باکتریایی قوی بر باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی دارند و حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کشندگی (MIC و MBC) برای ترکیبات زیست فعال مورد آزمون در این تحقیق با هم برابر است. حداقل غلظت کشندگی و بازدارندگی برای سلوموسیت، فاز آبی و فاز آلی بر باکتری‌های *Staphylococcus aureus*، *Bacillus cereus*، *Escherichia coli* و *Pseudomonas*

۵. منابع

- Abubakar L., Mwangi C., Uku J., and Ndirangu S., 2012. Antimicrobial activity of various extracts of the sea urchin *Tripneustes gratilla* (Echinoidea). *African Journal of Pharmacology and Therapeutics* 1(1), 19-23.
- Amarowicz R., Synowiecki J., Shahidi F., 2012. Chemical composition of shells from red (*Strongylocentrotus franciscanus*) and green (*Strongylocentrotus droebachiensis*) sea urchin. *Food Chemistry* 133(3), 822-826.
- Archana, A., and Babu, K.R., 2016. Nutrient composition and antioxidant activity of gonads of sea urchin *Stomopneustes variolaris*. *Food chemistry* 197, 597-602.
- Bougatef A., Hajji M., Balti R., Lassoued I., Triki-Ellouz Y., Nasri M., 2009. Antioxidant and free radical-scavenging activities of smooth hound (*Mustelus mustelus*) muscle protein hydrolysates obtained by gastrointestinal proteases, *Food Chemistry* 114(4), 1198-1205.
- Chen J., 2003. Overview of sea cucumber farming and sea ranching practices in China. *SPC Beche-de-Mer information bulletin* 18, 18-23.
- Di Bernardini, R., Harnedy, P., Bolton, D., Kerry, J., O'Neill E., Mullen, A. M., Hayes, M., 2011. Antioxidant and antimicrobial peptidic hydrolysates from muscle protein sources and by-products, *Food Chemistry* 124(4), 1296-1307.
- Farouk, A.E.A., Abd, F., Ghouse, H., Ridzwan, B.H., 2007. New Bacterial Species Isolated from Malaysian Sea Cucumbers with Optimized Secreted Antibacterial Activity. *Journal of Biochemistry and Biotechnology* 3(2), 60-5. (In Persian)
- Haug T., Kjuul A K., Styrvold, O. B., Sandsdalen E., Olsen, M., Stensvåg K., 2002. Antibacterial activity in *Strongylocentrotus droebachiensis* (Echinoidea), *Cucumaria frondosa* (Holothuroidea), and *Asterias rubens* (Asteroidea). *Journal of Invertebrate Pathology*. 81(2), 94-102.-Hettiarachchy N S., Glenn K C., Gnanasambandam, R., Johnson, M.G., 1996. Natural antioxidant extract from fenugreek (*Trigonella foenumgraecum*) for ground beef patties. *Journal of Food Science* 61(3), 516-519.

- Kelly M.S., 2005. Echinoderms: their culture and bioactive compounds. In *Echinodermata* 139-165. Springer Berlin Heidelberg.
- Khalegi, M., Oufi, F., 2009. Identification of marine species in the tidal zones of Chabahar bay, *Journal of Animal Environment Science* 4(3), 31-36 (in Persian).
- Kim, S. K., Wijesekara, I., 2010. Development and biological activities of marine-derived bioactive peptides: A review. *Journal of Functional Foods* 2(1), 1-9.
- Li, C., Haug, T., Moe, M. K., Styrvold, O. B., Stensvåg, K., 2010. Centrocins: isolation and characterization of novel dimeric antimicrobial peptides from the green sea urchin, *Strongylocentrotus droebachiensis*. *Developmental and Comparative Immunology* 34(9), 959-968.
- Li, C., Haug, T., Styrvold, O. B., Jorgensen, T., Stensvåg, K., 2008. Strongylocins, novel antimicrobial peptides from the green sea urchin, *Strongylocentrotus droebachiensis*. *Developmental and Comparative Immunology*, 32(12), 1430-1440.
- Mayer, A., Rodríguez, A. D., Taglialatela-Scafati, O., Fusetani, N., 2013. Marine pharmacology in 2009–2011: Marine compounds with antibacterial, antidiabetic, antifungal, anti-inflammatory, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the immune and nervous systems, and other miscellaneous mechanisms of action, *Marine drugs*. 11(7), 2510-2573.
- Qin, L., Zhu, B.W., Zhou, D. Y., Wu, H. T., Tan, H., Yang, J. F., Murata, Y., 2011. Preparation and antioxidant activity of enzymatic hydrolysates from purple sea urchin (*Strongylocentrotus nudus*) gonad. *LWT-Food Science and Technology* 44(4), 1113-1118.
- Rahi S., Heydari, B.A., Resa, M., 1393. Effects of extracts from Sea urchin (in Persian Gulf) on the pathogenicity of *Candida* fungi, *Journal of Aquatic Physiology and Biotechnology* 2(3), 45-31. (in Persian).
- Sarmadi, B. H., Ismail, A., 2010. Antioxidative peptides from food proteins: a review, *Peptides* 31(10), 1949-1956.
- Schillaci, D., Cusimano, M. G., Spinello, A., Barone, G., Russo, D., Vitale, M., Arizza, V., 2014. Paracentrin 1, a synthetic antimicrobial peptide from the sea-urchin *Paracentrotus lividus*, interferes with staphylococcal and *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. *AMB (Applied and Industrial Microbiology Biotechnology) Express*. 4(1), 78-83.
- Shahidi F., 1997. Natural antioxidants: Chemistry, health effects, and applications. Books.google.com. Chapter 1.
- Shahidi, F., Zhong, Y., 2008. Bioactive peptides. *Journal of AOAC International* 91(4), 914-931.
- Smith, L. C., Rast, J.P., Brockton, V., Terwilliger, D. P., Nair, S. V., Buckley, K. M., Majeske, A. J., 2006. The sea urchin immune system. *Invertebrate Survival Journal* 3, 25-39.
- Soleimani, S., Yousefzade, M., Moein, S., Amrallahi, B N., 2014. Antimicrobial and antioxidant effects of pigment and Coelomic liquid from *Echinometra matheai*, *Journal of Kerman University of Medical Sciences* 22(66), 628-614(in Persian).
- Uma, B., Parvathavarthini, R., 2014. Antibacterial activity of hydroalcohol extract of Sea Urchin *Temnopleurus alexandri*. *Journal of Applied Research* 1, 1677-1680.
- Wang, B., Li Z, R., Chi, C. F., Zhang, Q.H., Luo, H. Y., 2012. Preparation and evaluation of antioxidant peptides from ethanol-soluble proteins hydrolysate of *Sphyrna lewini* muscle, *Peptides* 36(2), 240-250.
- You, L., Zhao, M., Regenstein, J. M., Ren, J., 2010. Changes in the antioxidant activity of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) protein hydrolysates during a simulated gastrointestinal digestion, *Food Chemistry* 120(3), 810-816.

