

ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی و سایتوتوکسیک اکتینوماست‌های بومی ایران

آزاده علایی^۱، جواد حامدی^{۲،۳*}، فاطمه محمدی پناه^۴، سعید محمدی معتمد^۵، سید مهدی رضایت^۶

- ۱- کارشناسی ارشد، گروه میکروبیولوژی، واحد علوم دارویی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.
- ۲- دانشیار، بخش زیست فناوری میکروبی، دانشکده زیست شناسی، پردیس علوم، دانشگاه تهران، تهران، ایران.
- ۳- کلکسیون ترکیبات زیستی. مرکز پژوهشی فناوری و فرآورده‌های میکروبی دانشگاه تهران، تهران، ایران.
- ۴- استادیار، بخش زیست فناوری میکروبی، دانشکده زیست شناسی، پردیس علوم، دانشگاه تهران، تهران، ایران.
- ۵- استادیار، گروه فارماکولوژی، واحد علوم دارویی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.
- ۶- استاد، گروه فارماکولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

چکیده

سابقه و هدف: از بین بیش از ۲۳۰۰۰ متابولیت ثانویه میکروبی شناخته شده، ۴۲٪ آنها از اکتینوباکترها جدا شده است. این متابولیت‌های ثانویه فعالیت زیستی وسیعی نظیر فعالیت‌های ضد باکتریایی، ضد قارچی، ضد انگلی، ضد ویروسی، ضد تومور، سرکوب کننده ایمنی، حشره کش، ضد التهاب، آنتی‌اکسیدان و دیگر فعالیت‌ها را دارند. در سال‌های گذشته پژوهش‌های متعددی در مورد این فعالیت‌های زیستی در کشور انجام شده است، با این وجود گزارشی در مورد فعالیت آنتی اکسیدانی اکتینوماست‌های کشور منتشر نشده است. هدف این پژوهش بررسی توان تولید آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی از منابع میکروبی با منشاء بومی است.

مواد و روش: ۵۰ سویه اکتینوماست بومی ایران، ذخیره شده در مرکز کلکسیون میکروارگانسیم‌های دانشگاه تهران انتخاب شدند و پس از انجام مراحل اسپورزایی، پیش تخمیر و تخمیر، عصاره مایع تخمیر با اتیل استات استخراج شد. فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های مایع تخمیر بدون حلال، به روش DPPH با استفاده از مقایسه آنتی‌اکسیدان‌های اسیدآسکوربیک و BHA مورد ارزیابی قرار گرفت. هم چنین سمیت عصاره‌ها با استفاده از تست آرمیا مورد بررسی قرار گرفت. سویه‌های منتخب دارای فعالیت به روش مولکولی شناسایی شدند.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که در میان ۵۰ عصاره اکتینوماست، ۱۰٪ عصاره‌ها فاقد فعالیت آنتی‌اکسیدانی، ۲۰٪ دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالا ($IC_{50} > 200$)، ۳۲٪ دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی متوسط ($400 > IC_{50} > 200$)، ۸٪ از عصاره‌ها دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی پایین ($IC_{50} > 600$) و ۳۰٪ عصاره‌ها دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی بسیار پایین ($IC_{50} > 600$) بوده‌اند. در تست سمیت سنجی بر آرمیا مشخص شد که ۵۰٪ عصاره‌های اکتینوماست فاقد سمیت، ۳۰٪ از عصاره‌ها سمیت پایین، ۱۶٪ از عصاره‌ها سمیت بالا و ۴٪ از عصاره‌ها سمیت بسیار بالا داشتند. سه سویه منتخب دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی بر اساس نتایج آنالیز ژن $SrRNA$ متعلق به جنس *Streptomyces* بوده‌اند.

نتیجه گیری: در بررسی حاضر، از میان ۵۰ عصاره‌ی بررسی شده از نظر خاصیت آنتی‌اکسیدانی به روش DPPH و فعالیت سمی، ۲ سویه $UTMC 1054$ و $UTMC 1166$ دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی مشابهی نسبت به BHA و سمیتی کمتر از آن را نشان دادند. هم چنین این عصاره‌ها فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالاتری نسبت به اسید آسکوربیک داشتند، بدین ترتیب امید دستیابی به ترکیبات آنتی‌اکسیدان موثر و فاقد اثرات سمی در میان اکتینوماست‌های بومی ایران وجود دارد. این ترکیبات به طور قابل توجهی می‌توانند قابل رقابت با آنتی‌اکسیدان‌های مصنوعی نظیر BHA در صنایع غذایی و دارویی باشند.

کلمات کلیدی: اکتینوماست، آنتی‌اکسیدان، DPPH، تست آرمیا

مقدمه

آنتی‌اکسیدان‌ها ترکیباتی هستند که با جلوگیری از تولید

رادیکال‌های آزاد و یا تبدیل آنها به اشکالی با فعالیت کمتر، تهدید رادیکال‌های آزاد را برای حیات سلول‌ها از بین می‌برند (۲۵). در فرایندهای التهابی در بدن، میزان زیادی رادیکال آنیون سوپراکسید توسط فاگوسیت‌ها تولید می‌شود. ماکروفاژها و نوتروفیل‌ها برای دفاع در برابر میکروارگانسیم‌ها رادیکال‌های آزاد سوپراکسید و H_2O_2 تولید می‌کنند. استرس اکسیداتیو به

* نویسنده مسئول:

بخش زیست فناوری میکروبی، دانشکده زیست شناسی، پردیس علوم دانشگاه تهران، تهران، ایران.

پست الکترونیکی: jhamedi@at.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۴/۲۰

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۵/۲۵

است. در میان اکتینومایست‌ها، استرپتومایسیس‌ها غالب هستند. و اکتینومایست‌های غیر استرپتومایسیسی (non-streptomycetes)، اکتینومایست‌های کمیاب نامیده می‌شوند که نزدیک ۱۰۰ جنس را شامل می‌شوند (۲۶،۲۸).

اکتینومایست‌ها باکتری‌های گرانبهایی در بیوتکنولوژی هستند که از آنها برای تولید متابولیت‌های ثانویه با ارزش اقتصادی بالا بهره برداری می‌شود. اکتینومایست‌ها بخاطر توانایی‌شان در تولید آنتی‌بیوتیک‌ها به خوبی شناخته شده‌اند و اخیراً به عنوان یک منبع مهم برای محصولات طبیعی با تنوع شیمیایی نادر مطرح شده‌اند (۲۷).

این باکتری‌ها به لحاظ مورفولوژی، رشد، تکثیر و فیزیولوژی متمایز از سایر باکتری‌ها هستند. بیش از ۸۵٪ از آنتی‌بیوتیک‌هایی که به طور طبیعی تولید می‌شوند و تا به حال کشف شده‌اند توسط اکتینومایست‌ها فراهم می‌شود و هنوز هم به علت تنوع در میان جمعیت‌های باکتریایی و توانایی تولید ترکیبات شیمیایی جدید، به عنوان یک منبع غنی از متابولیت‌های دارای فعالیت زیستی جدید مطرح هستند. اکتینومایست‌ها به دلیل توانمندی‌های خارق‌العاده‌ای که در تولید مواد فعال زیستی نظیر آنتی‌بیوتیک‌ها و آنزیم‌ها دارند، از لحاظ زیست فناوری بسیار حائز اهمیت می‌باشند (۳۴).

باتوجه به اینکه تولید از طریق میکروارگانیسم‌ها به واسطه داشتن پتانسیل زیاد هم در مرحله بازده تولید و هم در مرحله تنوع گونه‌های مولکولی، مقرون به صرفه‌تر از سایر منابع زیستی است، امروزه غربالگری متابولیت‌های میکروبی دارای فعالیت‌های زیستی، توجه محققین زیادی را به خود جلب کرده است. هم چنین تحقیق در زمینه کشف آنتی‌اکسیدان با کاربرد دارویی نیز حائز اهمیت است (۸).

پژوهش‌های زیادی در زمینه فعالیت آنتی‌اکسیدان‌ها با منشا گیاهی انجام شده است اما تحقیقات اندکی در زمینه آنتی‌اکسیدان‌های میکروبی انجام شده است. مطالعه حاضر اولین گزارش در خصوص فعالیت آنتی‌اکسیدانی اکتینومایست‌های بومی ایران می‌باشد. هدف از این مطالعه ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی و مضرات فیزیولوژیکی عصاره‌های اکتینومایست بومی ایران با آنتی‌اکسیدان‌های تجاری در دسترس (BHA، اسیدآسکوربیک و آلفاتوکوفرول) است.

مواد و روش‌ها

تهیه عصاره

دراین پژوهش ۵۰ جدایه اکتینومایست که با نشان‌های زیر به صورت منجمد در نیتروژن مایع در کلکسیون میکروارگانیسم‌ها، مرکز پژوهشی فناوری‌ها و فرآورده‌های میکروبی دانشگاه تهران

وجود آمده، ناشی ازگونه‌های واکنش دهنده اکسیژن(Reactive oxygen species)، نقش بسیار مهمی را در گسترش بیماری‌های مختلف نظیر بیماری‌های آلزایمر، پارکینسون و شیزوفرنی ایفا می‌کنند، درچنین شرایطی حضور آنتی‌اکسیدان‌ها برای تعدیل واکنش‌هایی که در آن رادیکال‌های آزاد تولید شده‌اند و برای جلوگیری از اثرات مضرگونه‌های واکنش دهنده اکسیژن و جلوگیری از آسیب به سلول‌های ایمنی، ضروری می‌باشد (۲۹). آنتی‌اکسیدان‌ها به عنوان داروی ضد پیری، ضد سرطانی، درمان بیماری‌های قلبی-عروقی، بیماری‌های میتوکندریایی، بیماری هانتینگتون و بیماری‌های تخریب کننده اعصاب نظیر بیماری پارکینسون استفاده می‌شوند. به علاوه تجویز خوراکی برخی از آنتی‌اکسیدان‌ها مکمل افزایش انرژی و تقویت سیستم ایمنی می‌باشد (۳۳،۷).

مرکز کنترل و نظارت بر محصولات غذایی، آنتی‌اکسیدان‌ها را تحت عنوان افزودنی‌های غذایی طبقه‌بندی کرده است، و آنها را مواد محافظت کننده غذا، عنوان می‌کند. بیشتر مطالعات بر روی آنتی‌اکسیدان‌ها در غذاها، بر تاخیر اکسیداسیون لیپیدی تاکید می‌کند، که از طریق به تاخیر انداختن تجزیه و فساد مواد غذایی که وظیفه آنتی‌اکسیدان‌ها می‌باشد، عمل می‌نمایند (۳۳،۹). در مجموع آنتی‌اکسیدان‌ها کاربردهای فراوان دارویی و غذایی دارند (۳).

منابع اولیه آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی، حبوبات، میوه‌ها و سبزیجات می‌باشد، که تحت عنوان آنتی‌اکسیدان‌های غذایی شناسایی شده‌اند و به طور بالقوه‌ای بیماری‌ها را کاهش می‌دهند. با توجه به اینکه آنتی‌اکسیدان‌های مصنوعی مورد استفاده نظیر BHT (Butylated hydroxytoluene) و BHA (Butylated hydroxyanisole) می‌توانند کارسینوژن و هم چنین هپاتوتوکسیک باشند، در طول دو دهه اخیر تمایل برای استفاده از منابع طبیعی برای تولید آنتی‌اکسیدان‌ها از سوی مصرف‌کنندگان افزایش یافته و توجه بسیار زیادی را به خود معطوف داشته است (۷).

در بیش از ۷۵ سال گذشته، ترکیبات مشتق شده از محصولات طبیعی منجر به کشف داروهای زیادی برای درمان بسیاری از بیماری‌های انسانی شده است. از سویی دیگر امروزه تولید طبیعی ترکیبات شیمیایی از طریق ارگانیسم‌های زنده مانند گیاهان، حیوانات و میکروارگانیسم‌ها امکان پذیرگشته است (۲۷).

اکتینومایست‌ها باکتری‌های گرم مثبت و هتروتروف، میله‌ای شکل، هوازی و غیر متحرک هستند. محتوای بازهای نیتروژن‌دار سیتوزین و گوانین در DNA اغلب اکتینومایست‌ها، بیشتر از سایر باکتری‌ها و اغلب در محدوده ۷۸٪-۶۳٪

توسط عصاره ها با استفاده از روش Yamamoto مورد ارزیابی قرار گرفت (۳۵). برای این منظور، محلول هایی با رقت های متوالی $5, 10, 25, 50 \mu\text{g/ml}$ از عصاره ها و آنتی اکسیدان های سنتزی BHA و اسید آسکوربیک در متانول تهیه شد. سپس ۳ ml از محلول متانولی DPPH (با غلظت ۱ میلی مولار) به ۱ ml از عصاره افزوده و مخلوط حاصله به شدت مخلوط شد. محلول ها به مدت ۳۰ دقیقه در محلی تاریک و در دمای اتاق قرار داده شدند و بعد از این مدت جذب آنها در طول موج 517 nm قرائت شد. نمونه کنترل شامل متانول و محلول DPPH بود. این تست برای هر عصاره سه بار تکرار صورت گرفت.

ارزیابی سمیت عصاره ها توسط روش آرتیمیا

روش تکثیر و پرورش کیست آرتیمیا (*Artemia franciscana*) در آب نمک دریایی مصنوعی بر طبق دستور العمل Goldman انجام شد (۱۰). ابتدا مقادیر $23/375 \text{ g/l NaCl}$ ، $4/925 \text{ g/l KBr}$ ، $0/2025 \text{ g/l CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ، $1/11 \text{ g/l MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ، $0/745 \text{ g/l KCl}$ ، $4/0625 \text{ g/l MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ در ۱ لیتر آب مقطر حل و استریل گردید. به بیوراکتور حاوی ۵۰۰ ml آب نمک دریایی مصنوعی، مقدار ۰/۱ گرم کیست های آرتیمیا (*Artemia franciscana*) اضافه و دمای این بیوراکتور در 28°C تنظیم شد (۲۰).

برای انجام این تست از هر عصاره مقدار رقت های متوالی $5, 10, 20, 40, 80 \mu\text{g}$ با استفاده از DMSO تهیه شد، در هر چاهک ۲۰ لارو آرتیمیا اضافه شد. این تست برای هر عصاره دو بار تکرار صورت گرفت. در این تست از آلفا توکوفرول به عنوان شاهد مثبت و از BHA به عنوان شاهد منفی استفاده شد. در ابتدا، تعداد لاروهای مرده بلافاصله پس از انتقال به چاهک ها در زیر میکروسکوپ شمارش شد. هم چنین تعداد لاروهای کشته شده بعد از گذشت ۱۸ ساعت نیز شمارش شدند.

شناسایی جدایه های اکتینومیست منتخب

برای شناسایی مولکولی سویه های مورد نظر و به منظور استخراج DNA، این سویه ها در محیط LB عصاره مخمر ۵ (g/l)، تریپتون (g/l) ۱۰، ۵ کلرید سدیم (pH = ۷/۳) به مدت ۴۸ ساعت در دمای 28°C و دور 220 rpm رشد داده شدند. پس از اطمینان از عدم آلودگی و کامل بودن رشد میسلیومی باکتری ها، محیط داخل ارلن را داخل ویال های اپندورف ۱/۵ ریخته و به مدت ۸ دقیقه با 8000 rpm دور سانتریفیوژ شد. مایع رویی دور ریخته شد و رسوب نهایی به دست آمده ۲ بار با آب مقطر استریل شسته شد (۲).

استخراج DNA، طبق روش Salting out پیشنهاد شده توسط Kieser انجام گرفت (۱۳). بر روی بیومس داخل ویال اپندورف

نگهداری می شوند به صورت تصادفی انتخاب شدند.

101UTMC, 102UTMC, 103UTMC, 104UTMC, 105UTMC, 106UTMC, 107UTMC, 108UTMC, 109UTMC, 110UTMC, 111UTMC, 112UTMC, 113UTMC, 114UTMC, 115UTMC, 116UTMC, 117UTMC, 118UTMC, 119UTMC, 120UTMC, 121UTMC, 122UTMC, 123UTMC, 124UTMC, 125UTMC, 126UTMC, 127UTMC, 128UTMC, 129UTMC, 130UTMC, 131UTMC, 132UTMC, 133UTMC, 134UTMC, 135UTMC, 136UTMC, 137UTMC, 138UTMC, 139UTMC, 140UTMC, 141UTMC, 142UTMC, 143UTMC, 144UTMC, 145UTMC, 146UTMC, 147UTMC, 148UTMC, 149UTMC, 150UTMC, 151UTMC, 152UTMC, 153UTMC, 154UTMC, 155UTMC, 156UTMC, 157UTMC, 158UTMC, 159UTMC, 160UTMC, 161UTMC, 162UTMC, 163UTMC, 164UTMC, 165UTMC, 166UTMC, 167UTMC, 168UTMC, 169UTMC, 170UTMC, 171UTMC, 172UTMC, 173UTMC, 174UTMC, 175UTMC, 176UTMC, 177UTMC, 178UTMC, 179UTMC, 180UTMC, 181UTMC, 182UTMC, 183UTMC, 184UTMC, 185UTMC, 186UTMC, 187UTMC, 188UTMC, 189UTMC, 190UTMC, 191UTMC, 192UTMC, 193UTMC, 194UTMC, 195UTMC, 196UTMC, 197UTMC, 198UTMC, 199UTMC, 200UTMC.

این جدایه ها به منظور فعال سازی و تهیه اسپور، بر روی محیط Agar ISP۲ کشت داده شدند و به مدت ۷-۱۰ روز در دمای 28°C گرماگذاری شدند.

تهیه پیش کشت

برای پیش کشت از محیط Broth ISP۲ به میزان ۵۰ ml در فلاسک های ۲۵۰ ml استفاده شد. سپس فلاسک ها به مدت ۴۸ ساعت در شیکر انکوباتور در دمای 28°C با دور 200 rpm گرماگذاری شد (۲۳، ۲۵).

تهیه محیط تخمیر

محیط Broth ISP۲ برای تخمیر مورد استفاده قرار گرفت. در شرایط آسپتیک ۱۲/۵ m محیط پیش کشت، به ۲۵۰ ml محیط کشت تخمیر در فلاسک های ۱ لیتری تلقیح شد (به میزان $v/v = 5\%$). سپس فلاسک ها به مدت ۷ روز در دمای 28°C روی شیکر انکوباتور با دور 200 rpm گرماگذاری شد. سپس محیط کشت تخمیر به مدت ۱۰ دقیقه با دور 4000 rpm سانتریفیوژ شد و به میزان دو برابر حجم مایع تخمیر، حلال آلی اتیل استات افزوده شد و به مدت ۲ ساعت بر روی همزن قرار گرفت. در ادامه فاز رویی ایجاد شده، توسط دکانتور از فاز زیرین جدا شد (۳۱، ۱۵). عصاره ها توسط دستگاه تبخیر کننده دوار (Rotary) در فشار کم و در دمای 40°C تغلیظ شد و در فریزر -70°C ، در مرکز کلکسیون ترکیبات زیستی دانشگاه تهران (UTBC) ثبت و نگهداری شد (۴).

ارزیابی قدرت مهار کنندگی رادیکال آزاد عصاره کشت

اکتینومیست ها

برای این منظور با استفاده از روش (۱، ۱)-Diphenyl-2- DPPH (Picrylhydrazyl)، میزان مهار رادیکال های آزاد DPPH

تازه های بیو تکنولوژی سلولی - مولکولی دوره پنجم . شماره نوزدهم تابستان ۱۳۹۴ ارزیابی فعالیت ...

DNA نگه داشته شد. بررسی محصولات PCR، با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز ۰/۸٪ صورت گرفت. ژن های تکثیر شده و مشاهده شده بر روی ژل آگارز در صورت مناسب بودن باندها برای توالی یابی، به شرکت Macrogen کره جنوبی ارسال شدند. تکرارپذیری و آنالیز آماری داده ها

هر یک از داده های ارائه شده حاصل ۳ بار تکرار است و برای آنالیز آماری از نرم افزار spss استفاده شد. برای تعیین درصد مهار رادیکال DPPH توسط عصاره از فرمول زیر استفاده گردید.

$$DPPH \text{ (رادیکال رادیکال مهار درصد)} = \frac{ODc - (ODs - ODc)}{ODc} \times 100$$

در این رابطه ODc و ODs به ترتیب جذب کنترل و میزان جذب نمونه می باشند. میزان IC₅₀ هر یک از عصاره ها و اسید آسکوربیک و BHA با استفاده از نرم افزار spss (linear Regression) سنجیده شد. IC₅₀ غلظتی از عصاره است که توانایی مهار ۵۰٪ از رادیکال های آزاد موجود در محیط را دارد بنابراین هر چه میزان IC₅₀ کمتر باشد عصاره دارای ترکیب آنتی اکسیدان موثرتری می باشد (۱۸).

برای ارزیابی میزان سمیت عصاره ها بر آرتمیا، فرمول زیر مورد استفاده قرار گرفت.

$$M = A - B - N / G - N \times 100$$

در این رابطه M، A، B، N و G به ترتیب درصد لاروهای مرده بعد از ۱۸ ساعت، تعداد لاروهای مرده بعد از ۱۸ ساعت، میانگین تعداد لارو مرده در شاهد منفی بعد از ۱۸ ساعت، تعداد لارو مرده قبل از شروع تست و تعداد کل لاروهای آرتمیا می باشند. تحلیل نتایج تست طبق روش Manilal و Krishnaraju انجام شد: ۱۹٪-۰ لارو مرده، عصاره فاقد فعالیت سمی، ۳۹٪-۲۰٪ عصاره دارای سمیت پایین، ۵۹٪-۴۰٪ عصاره دارای فعالیت سمی و بیشتر از ۶۰٪ لارو مرده عصاره فعالیت سمی بسیار بالایی داشته است (۱۵، ۱۹).

آنالیز فیلوژنتیک توالی ژن ۱۶-SrDNA سویه های اکتینومایست منتخب

برای بررسی نتیجه توالی های ژن ۱۶-SrDNA، با استفاده از نرم افزار BioEdit ویرایش شد و سپس توسط نرم افزار Chromas pro مورد بررسی قرار گرفت. برای شناسایی مولکولی، توالی سویه های برتر با توالی های ثبت شده در پایگاه داده اطلاعات ژنومی NCBI و EZTaxon مقایسه شده و میزان شباهت آن با سویه های مختلف ثبت شده، تعیین شد و برای بررسی های بعدی ذخیره گردید (۵).

یافته ها

میزان مهار رادیکال آزاد

نتایج ارائه شده در مورد ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی ۵۰

۱/۵ استریل، به منظور تخریب سلول ها،

Tris-HCl ۲۰mM، EDTA ۲۵mM) SET buffer ۹۵۰ μl pH=۸/۲ (NaCl ۷۵mM، بر روی ویال ریخته، ورتکس شد و ۵۰ μl لیزوزیم، به آن اضافه شد. ویال ۱ ساعت در ۳۷°C قرار داده شد. سپس ۱۵۰ μl SDS ۱۰٪، اضافه و ویال ۱ ساعت در ۶۰°C، قرار داده شد سپس ویال بادور ۱۳۵۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شد. سوپرناتانت حاوی DNA را از رسوب زیرین جدا کرده و فاز روئی به یک ویال تمیز منتقل شد. سپس هم حجم آن کلروفرم و فنل با نسبت یک به یک اضافه و ویال با دور ۱۳۵۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شد. فاز روئی به میکروتیوپ جدید منتقل شده و هم حجم آن کلروفرم اضافه شد و ویال به مدت ۵ دقیقه با دور ۱۳۵۰۰ rpm سانتریفوژ شد. مایع درون ویال به یک ویال تمیز منتقل شد و یک دهم حجم ویال سدیم استات اضافه شد و سه برابر حجم مایع درون ویال، الکل مطلق سرد اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۲۰°C- قرار داده شد. سپس ویال با دور rpm ۱۳۵۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شد. الکل به آرامی خارج شد و DNA به صورت رسوب در ته ویال تشکیل شد. در پایان DNA با الکل ۷۰٪ شستشو شد و ویال با دور rpm ۱۳۵۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شد. سپس الکل خالی شد و در نهایت ۴۰ μl بافر TE، به درون ویال اضافه شد و در یخچال قرار داده شد (۱۴).

به منظور بررسی موفق بودن عمل استخراج DNA، الکتروفورز با ژل آگارز ۰/۸٪ به مدت ۳۰ دقیقه انجام شد. در نهایت ژل با محلول اتیدیوم برمایند رنگ آمیزی شده و در دستگاه ژل داک، باندها مشاهده شد.

انجام واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR)

در این پژوهش از دو پرایمر عمومی با نام های F۹ و R۱۵۴۱ برای تکثیر ژن ۱۶-SrDNA استفاده شد. این پرایمر های عمومی به منظور تکثیر ژن ۱۶-SrDNA با طول ۱۵۰۰ نوکلئوتید مورد استفاده قرار گرفتند (۱۷).

حجم نهایی برای انجام PCR ۲۵ μl است. حاوی DNA ۲ μl استخراج شده، ۱ μl از هر کدام از پرایمرها، ۱۲/۵ μl آنزیم Taq master mix و در نهایت ۱/۲۵ μl DMSO اضافه شد. لازم به ذکر است استفاده از DMSO به دلیل بالا بودن در صد C+G اکتینومایست ها لازم است که این ماده سبب بهتر باز شدن باندها می شود (۱۷). دناتوره شدن اولیه در دمای ۹۵°C و به مدت ۵ دقیقه بود. ۳۵ چرخه ی تکثیر شامل ۱۰ ثانیه در ۹۸°C، ۱ دقیقه در ۵۵°C، ۵ دقیقه در ۷۲°C انجام شد. پس از این مراحل ۵ دقیقه در ۷۲°C به منظور تکمیل نهایی سنتز

تازه های بیو تکنولوژی سلولی - مولکولی دوره پنجم . شماره نوزدهم . آزاده علایی و همکاران

۱۱۴۲	۲۸۶	۱۵۰/۳	۰	۱	۱۰/۵۵	۱۴/۶۶
۱۰۵۳	۲۸۷	۴۷۷/۹۸	۵/۸۸	۶/۶۹	۷/۷۷	۱۰/۲۲
۱۱۵۸	۲۹۷	۴۱۹/۷۳	۲/۴۱	۲/۸۹	۴/۴	۷/۵۷
۱۱۱۶	۲۹۸	۴۹/۹۷	۰	۸	۳۴/۴۸	۴۵/۸۴
۱۱۵۶	۲۹۹	۷۵۴/۸۹	۱/۳۹	۲/۲۳	۳/۲۴	۴/۶۷
۱۱۰۶	۳۰۰	۳۰۴/۵۵	۰	۱/۱۳	۲/۸	۷/۷۴
۱۱۰۷	۳۰۱	۶۵۰/۱۷	۰	۰	۰/۸	۳/۴۴
۱۱۱۵	۳۰۲	۳۰۹/۸۱	۰	۰	۲/۰۱	۷/۲۱
۱۱۳۵	۳۰۳	۷۹۸	۰	۰	۱/۸۸	۲/۶۷
۱۱۵۵	۳۰۴	۵۹۱/۲۷	۰	۱/۱	۱/۴	۴/۲
۱۱۳۸	۳۰۵	۲۹۹/۰۶	۰	۱/۶۴	۳/۴۵	۷/۹۷
۱۱۳۱	۳۰۶	۵۲۶/۳۵	۰	۱/۱۱	۲/۹۸	۴/۴۹
۱۱۰۲	۳۰۷	۲۷۲/۹	۴/۹۸	۴/۸۱	۷/۷۴	۱۲/۲۵
۱۱۳۰	۳۰۸	۲۱۲/۹۵	۰	۰/۷۱	۲/۴۳	۱۰/۹۷
۱۱۲۰	۳۰۹	۵۱/۶۷	۱/۳۵	۴/۲۸	۵/۳۹	۱۰/۰۱
۱۰۰۹	۳۱۰	۳۶۰/۷	۲/۶۷	۲/۹۴	۴/۵۷	۸/۶۳
۱۰۴۲	۳۱۱	۲۳۲/۲۹	۲/۷۱	۵/۷۲	۵/۷۶	۱۳/۰۱
۱۰۳۷	۳۱۲	۰	۰	۰	۰	۰
۱۰۲۹	۳۱۳	۱۹۹/۲۲	۴/۳۳	۶/۴۹	۷/۶	۱۵/۵۱
۱۰۱۱	۳۱۴	۱۱۵/۸۴	۰	۰	۴/۴	۲۰/۵
۱۱۳۳	۳۱۵	۱۸۹/۰۹	۱/۹۲	۵/۸۳	۱۰/۱۶	۱۴/۱۸
۱۰۳۴	۳۱۶	۳۹۰/۰۲	۰	۱/۰۵	۳/۴۲	۵/۹۴

جدول ۱- بررسی اثر آنتی اکسیدانی غلظت های مختلف عصاره های کشت

اکتینومیست ها به روش DPPH.

در این سنجش BHA و اسید آسکوربیک به عنوان شاهد مثبت مورد

استفاده قرار گرفتند.

نتایج ارزیابی سمیت عصاره های کشت اکتینومیست

در این مطالعه به منظور اندازه گیری سمیت حاد عصاره های اکتینومیست، میزان مرگ و میر آرمیا در تماس با غلظت های مختلف اندازه گیری شد. نتایج به صورت درصد کشندگی ذکر شده است. نتایج در جدول های ۵، ۴، ۳، ۲ آورده شده است و به ترتیب شامل عصاره های غیرسمی، عصاره های دارای سمیت پایین، عصاره های سمی و عصاره های بسیار سمی می باشد. در این تست آنتی اکسیدان های تجاری آلفاتوکوفرول و BHA نیز مورد ارزیابی قرار گرفتند. همان طور که مشاهده می شود، ۵۰٪ عصاره های اکتینومیست فاقد سمیت، ۳۰٪ از عصاره ها سمیت پایین، ۱۶٪ از عصاره ها سمیت بالا و ۴٪ از عصاره ها سمیت بسیار بالایی داشتند.

جدایه اکتینومیست (جدول ۱) نشان می دهد که ۱۰٪ عصاره ها فاقد فعالیت آنتی اکسیدانی، ۲۰٪ از عصاره ها دارای فعالیت آنتی اکسیدانی بالا ($IC_{50} > 200$)، ۳۲٪ عصاره ها دارای فعالیت آنتی اکسیدانی متوسط ($IC_{50} > 400 > 200$)، ۸٪ از عصاره ها دارای فعالیت آنتی اکسیدانی پایین ($IC_{50} > 600 > 400$) و ۳۰٪ عصاره ها دارای فعالیت آنتی اکسیدانی بسیار پایین ($IC_{50} > 600$) می باشند.

UTMC number	UTBC number	IC ₅₀ (µg/ml)	%DPPH radical scavenging (dose in µg/ml)			
			۵	۱۰	۲۵	۵۰
	BHA	۴۶/۵۵	۸/۰۶	۱۵/۴۲	۳۸/۲۵	۴۹/۷۲
	Acid ascorbic	۱۰۶/۷۹	۰/۴۵	۲/۰۲	۹/۷۸	۲۲/۱۹
۱۱۶۶	۵۱	۵۰/۱۵	۳/۸	۵/۸۵	۲۹/۵۷	۴۷/۸۹
۱۱۵۹	۵۲	۲۴۰	۴/۵	۱۲/۸	۲۴/۲	۳۵/۵
۱۰۱	۵۳	۰	۰	۰	۰	۰
۱۱۵۴	۵۴	۵۲۷۸	۲/۵	۲/۶۱	۲/۷۸	۲/۹۵
۱۰۲	۵۵	۳۱۴/۷۶	۰	۱/۱۹	۳/۸۷	۵/۵۹
۱۰۳	۵۶	۳۰۲/۴۱	۱	۲/۶۴	۴/۵۸	۸/۸۹
۱۰۵۷	۸۵	۳۰۴/۷۵	۰	۱/۸۱	۲/۸۲	۷/۹۷
۱۰۵۴	۸۶	۶۳/۲۷	۸/۸۲	۹/۳۲	۱۹/۷۹	۴۱/۱۴
۱۰۵۱	۸۸	۰	۰	۰	۰	۰
۱۰۴۶	۸۹	۲۸/۱۷	۱/۰۲	۳۲/۷۸	۳۸/۷۹	۸۸/۴۹
۱۱۷۵	۹۰	۳۴۶/۶۹	۱/۸	۳/۸۳	۵/۵۵	۸/۵۸
۱۱۷۳	۹۱	۰	۰	۰	۰	۰
۱۱۷۷	۹۲	۲۲۲/۸۸	۰	۳/۶۵	۴/۷۶	۱۱/۲۵
۱۱۶۲	۹۴	۵۸۲	۰	۱	۱/۸۲	۲/۴
۱۱۲۴	۹۵	۷۵۲/۸۳	۰	۰	۱/۴۳	۲/۸۷
۱۱۶۴	۹۶	۴۷۴/۰۳	۳/۰۸	۳/۳۹	۵/۴۶	۷/۴۶
۱۰۶۳	۲۷۱	۲۴۲/۱۴	۰	۰/۵	۳/۸۵	۹/۳۲
۱۰۶۶	۲۷۲	۱۵۸/۰۵	۰	۰	۷/۰۵	۱۴/۱
۱۰۶۷	۲۷۳	۵۳۹/۸۱	۰/۵	۰/۹	۱/۴۵	۴/۷۷
۱۰۶۲	۲۷۴	۲۳۰/۲	۰	۱/۸۹	۴/۱۹	۱۰/۳۴
۱۰۶۹	۲۷۸	۵۰۰/۳۵	۰	۱/۵۷	۲/۳۵	۴/۹۷
۱۱۳۹	۲۷۹	۳۶۱/۹۵	۰	۰	۲/۵۲	۶/۰۸
۱۱۲۷	۲۸۰	۳۵۵/۰۸	۱/۵۵	۲/۸۶	۵/۴۷	۷/۹۲
۱۱۱۰	۲۸۱	۶۲۶/۶۸	۲/۲۶	۲/۴۵	۳/۵۸	۵/۶۹
۱۱۵۱	۲۸۲	۰	۰	۰	۰	۰
۱۰۵۲	۲۸۳	۳۸۹/۳۷	۳/۷۲	۳/۷۲	۴/۴۶	۹/۱۱
۱۰۵۵	۲۸۴	۹۷۶/۳۸	۱/۱۱	۱/۸۸	۲/۷	۳/۵۵
۱۰۴۵	۲۸۵	۶۳۳/۴۶	۰	۱/۰۳	۲/۱۵	۳/۸۳

تازه های بیو تکنولوژی سلولی - مولکولی دوره پنجم . شماره نوزدهم تابستان ۱۳۹۴ ارزیابی فعالیت ...

UTMC number	UTBC number	Percentage of lethality (dose in µg/ml)			
		۴۰	۲۰	۱۰	۵
	BHA	۲/۲۵±۵۹/۲۵	۱/۳±۶۹/۱۵	۰/۱۲±۷۱/۳۵	۰/۴۶±۷۸/۴
	Acid ascorbic	۰/۲۵±۵۹/۲۵	۰	۰	۰
۱۰۳	۵۶	۰/۱۲±۵۱/۶۷	۰/۴۵±۳۹/۴۷	۰±۳۷/۲۷	۰/۲۶±۴/۲
۱۰۵۱	۸۸	۰/۳۶±۵۹/۲۵	۰/۶۲±۶۹/۱۵	۰/۱۵±۷۱/۳۵	۰/۴۷±۷۸/۴
۱۰۴۶	۸۹	۰/۲۵±۵۰	۰/۱۳±۵۹	۰/۱۵±۶۳	۰/۳±۷۱
۱۱۷۵	۹۰	۰/۲۴±۵۵/۶	۰/۷۶±۵۵/۰۵	۰/۱۲±۴۷/۲۲	۰/۶۲±۴۰/۶۵
۱۱۷۳	۹۱	۰/۸۵±۴۲/۳۵	۱/۲±۳۱/۲	۰	۰
۱۰۶۶	۲۷۲	۰/۷۵±۵۰/۷۵	۰/۲۶±۴۵/۱	۰±۲۴	۰±۵
۱۱۰۲	۳۰۷	۰/۶۴±۵۱/۷۵	۰/۴۸±۴۹/۱۷	۰/۱±۲۵/۷۵	۰/۱۴±۶/۵
۱۱۲۰	۳۰۹	۰/۲۴±۵۹/۲۵	۰/۵۸±۶۹/۱۵	۰/۱۴±۷۱/۳۵	۰/۴۵±۷۸/۴
۱۰۳۷	۳۱۲	۰/۳۱±۵۹/۲۵	۰/۱۲±۶۹/۱۵	۰/۶۵±۷۰/۱۲	۰/۴۷±۷۲/۶

جدول ۴- نتایج ارزیابی تست سمیت سنجی غلظت های مختلف عصاره های

اکتینومیست بر آرتیمیا.

عصاره های دارای فعالیت سمی (۶۰٪-۴۰٪) BHA به عنوان شاهد منفی

مورد استفاده قرار گرفته است.

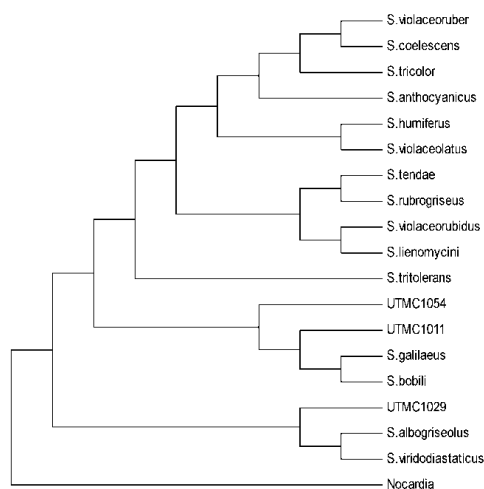
UTMC number	UTBC number	Percentage of lethality (dose in µg/ml)			
		۴۰	۲۰	۱۰	۵
۱۱۶۲	۹۴	۰/۲۵±۶۰/۲	۴۸/۴±۱/۳	۰/۴۵±۳۷/۶	۰±۱۵
۱۱۶۴	۹۶	۰/۵±۶۴/۱۵	۵۹/۲۵±۲/۴	۰/۲۱±۴۶/۳۵	۰/۲۱±۴۰/۹۵

جدول ۵- نتایج ارزیابی تست سمیت سنجی غلظت های مختلف عصاره های

کشت شده اکتینومیست بر آرتیمیا.

عصاره های دارای سمیت بسیار بالا (<۶۰٪)

بررسی فیلوژنتیکی اکتینومیست های منتخب



پس از توالی خوانی ژن SrfDNA-۱۶ مربوط به اکتینومیست های منتخب و بررسی توالی ها در EZtaxon ، نتایج حاصل نشان داد که هر ۳ سویه متعلق به جنس *Streptomyces* می باشند.

بحث

آنتی اکسیدان های طبیعی مولکول هایی هستند که سلول را در

UTMC number	UTBC number	Percentage of lethality (dose in µg/ml)			
		۴۰	۲۰	۱۰	۵
	α -tocopherol	۰	۰	۰	۰
۱۱۵۹	۵۲	۰	۰	۰	۰
۱۰۳	۵۳	۰	۰	۰	۰
۱۰۵۷	۸۵	۰	۰	۰	۰
۱۰۵۴	۸۶	۰/۴±۴/۲۵	۰	۰	۰
۱۱۲۴	۹۵	۰	۰	۰	۰
۱۰۶۳	۲۷۱	۰	۰	۰	۰
۱۰۶۷	۲۷۳	۰	۰	۰	۰
۱۰۶۹	۲۷۸	۰	۰	۰	۰
۱۱۳۹	۲۷۹	۰	۰	۰	۰
۱۱۳۷	۲۸۰	۰	۰	۰	۰
۱۱۱۰	۲۸۱	۰	۰	۰	۰
۱۱۵۱	۲۸۲	۰	۰	۰	۰
۱۰۵۲	۲۸۳	۰	۰	۰	۰
۱۰۴۵	۲۸۵	۰/۰۴±۱۱/۹۷	۰/۱±۷	۰	۰
۱۰۳۴	۳۱۶	۰	۰	۰	۰
۱۱۵۸	۲۹۷	۰	۰	۰	۰
۱۱۵۶	۲۹۹	۰	۰	۰	۰
۱۱۰۶	۳۰۰	۰	۰	۰	۰
۱۱۰۷	۳۰۱	۰	۰	۰	۰
۱۱۳۱	۳۰۶	۰	۰	۰	۰
۱۰۰۹	۳۱۰	۰	۰	۰	۰
۱۰۴۲	۳۱۱	۰	۰	۰	۰
۱۰۲۹	۳۱۳	۰/۶±۱۵	۰	۰	۰
۱۰۱۱	۳۱۴	۰/۱۲±۱۹/۱۵	۰	۰	۰

جدول ۲- نتایج ارزیابی تست سمیت سنجی غلظت های مختلف عصاره های

اکتینومیست بر آرتیمیا.

عصاره های فاقد سمیت بر آرتیمیا (۲۰٪-۰٪) آلفا-توکوفرول به عنوان شاهد

مثبت مورد استفاده قرار گرفت.

UTMC number	UTBC number	(Percentage of lethality (dose in µg/ml)			
		۴۰	۲۰	۱۰	۵
۱۱۶۶	۵۱	۰/۵۱±۲۲	۰/۱۵±۵/۵	۰/۴۳±۵۸/۵	۰/۲۵±۶۱/۴۵
۱۱۵۴	۵۴	۰/۱۲±۳۰/۴	۰/۲۶±۲۵/۴۲	۰/۱۲±۴/۸۷	۰
۱۰۲	۵۵	۰/۲±۳۵/۹	۰/۱۲±۳۳/۲۲	۰/۱±۲۶/۲۵	۰/۵۱±۱۵/۶
۱۱۷۷	۹۲	۰/۱۳±۳۳/۶	۰/۲۵±۲۰/۳	۰	۰
۱۱۱۵	۳۰۲	۰/۲۵±۳۷/۵۲	۰/۸۴±۲۶/۰۵	۰±۱۴/۲۵	۰
۱۰۶۲	۲۷۴	۰/۳±۲۳/۶	۰	۰	۰
۱۰۵۵	۲۸۴	۰/۱۴±۲۱/۱	۰	۰	۰
۱۱۴۲	۲۸۶	۰/۲۵±۳۷/۶	۰/۴۵±۲۴/۱	۰/۷۵±۱۰	۰
۱۱۱۶	۲۹۸	۰/۱۵±۳۰/۲	۰	۰	۰
۱۱۳۵	۳۰۳	۰/۲۱±۳۲/۶	۱/۶۵±۲۸/۸	۰	۰
۱۱۵۵	۳۰۴	۰/۴۳±۲۰/۴	۰/۴۲±۱۴/۱۷	۰/۶۱±۱۰/۲	۱/۳±۴/۴۲
۱۱۳۸	۳۰۵	۰/۲۶±۲۲/۳۲	۰	۰	۰
۱۱۳۰	۳۰۸	۰/۶۲±۲۶/۵۲	۱/۲±۱۹/۱۷	۰	۰
۱۱۳۳	۳۱۵	۰/۴۶±۲۴/۴	۰	۰	۰
۱۰۵۳	۲۸۷	۰/۱۴±۲۸۷	۰/۱۷±۶/۳۷	۰	۰

جدول ۳- نتایج ارزیابی تست سمیت سنجی غلظت های مختلف عصاره های

اکتینومیست بر آرتیمیا.

عصاره های دارای سمیت پایین بر آرتیمیا (۴۰٪-۲۰٪)

برابر *Streptomyces VITSVK5* بدست آمد و دارای IC_{50} برابر $8 \mu\text{g/ml}$ بود. که خاصیت کشندگی بر روی سلول های سرطانی داشت (۲۷).

نتیجه گیری

با توجه به نتایج بدست آمده در این پژوهش، ۳ جدایه منتخب $UTMC1011-UTMC1054-UTMC1029$ می باشد که عصاره این جدایه ها فاقد فعالیت سمی و در عین حال دارای فعالیت بالای آنتی اکسیدانی ($IC_{50} \leq 200$) هستند. جدایه $UTMC1011$ دارای IC_{50} برابر $63/27 \mu\text{g/ml}$ و $UTMC1054$ دارای IC_{50} برابر $115/84$ و $UTMC1029$ دارای IC_{50} برابر $199/22 \mu\text{g/ml}$ در تست قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH بودند. BHA نیز دارای IC_{50} برابر $46/55 \mu\text{g/ml}$ بود. بنابراین جدایه $UTMC1054$ از نظر فعالیت آنتی اکسیدانی قابل رقابت با آنتی اکسیدان های مصنوعی رایج در صنایع غذایی مانند BHA است که در ضمن فاقد اثرات سمی این نوع آنتی اکسیدان هم می باشد. در ضمن عصاره های $UTMC1166, UTMC1116$ ، $UTMC1133, UTMC1142$ که به ترتیب دارای IC_{50} برابر $150/3 \mu\text{g/ml}, 50/15 \mu\text{g/ml}, 49/97 \mu\text{g/ml}$ و $189/09$ بودند. این عصاره ها فعالیت کشندگی پایینی در مقایسه با BHA داشتند، در نتیجه عصاره های $UTMC1166, UTMC1116$ قابلیت جایگزینی با BHA را دارا می باشند. عصاره های $UTMC1066, UTMC1120, UTMC1046$ دارای IC_{50} برابر $51/67 \mu\text{g/ml}, 28/17 \mu\text{g/ml}$ و $151/05$ بودند که در مقایسه با BHA سمیت بالاتری داشته و غیر قابل استفاده بودند.

عصاره های مورد استفاده در این پژوهش نسبت به آنتی اکسیدان های به دست آمده از سایر اکتینومایست ها در پژوهش های مختلف، فعالیت آنتی اکسیدانی متوسطی داشتند اما این نکته حائز اهمیت است که عصاره های به کار گرفته شده، در مقایسه با دیگر آنتی اکسیدان ها، خالص سازی نشده بودند که در صورت خالص سازی میزان IC_{50} این ترکیبات نیز کاهش پیدا خواهد کرد و احتمال غیر سمی بودن این ترکیبات آنتی اکسیدانی بصورت خالص وجود دارد که این موضوع قابل توجه می باشد.

برابر اثرات مخرب رادیکال های آزاد محافظت می کنند و بدن را در شرایط بهینه نگهداری می کنند (۲۹). با به کار بردن تکنیک غربالگری، سرعت کشف ترکیبات طبیعی تا به حال متجاوز از یک میلیون می باشد. در میان ۲۲۵۰۰ ترکیب استخراج شده فعال زیستی ۴۵٪ توسط اکتینوباکترها، ۳۷٪ توسط قارچ ها، ۱۷٪ توسط سایر باکتری ها تولید شده است (۱).

با توجه به اهمیت آنتی اکسیدان ها در درمان بیماری ها و پیشگیری از ابتلا به بیماری های مزمن و جایگزینی آنتی اکسیدان های طبیعی با آنتی اکسیدان های مصنوعی دارای عوارض جانبی در صنایع غذایی و اینکه تاکنون تحقیقی در این زمینه بر روی اکتینومایست های بومی ایران صورت نگرفته است، پژوهشی به منظور دستیابی به ترکیبات آنتی اکسیدان طبیعی فاقد اثرات سمی با منشا میکروبی و بومی بر روی اکتینومایست ها که منبع غنی از ترکیبات زیستی هستند، طرح ریزی شد.

Kawahara و همکارانش ۲ ترکیب فنولی-JBIR-94 JBIR-25 از مایع فرماتاسیون ۵۶-۰۷-*Streptomyces R* جداسازی کردند که این ترکیبات دارای فعالیت آنتی اکسیدانی و اولین نمونه هایی از هیدروکسی سینامیک اسیدهای بودند که توسط اکتینومایست ها تولید می شدند. IC_{50} این ترکیبات آنتی اکسیدان برابر $9 \mu\text{M}$ بود (۳۱). Motoshashi و همکارانش، یک اکتینومایست از اسفنج موجود در خلیج بنگال جداسازی کردند، که توانایی تولید ۲ نوع پپتید تغییر یافته حاوی اندول و دارای فعالیت آنتی اکسیدانی را داشتند. این ترکیبات JBIR-34 و JBIR-35 نامگذاری شدند. این ۲ ترکیب فعالیت آنتی اکسیدانی ضعیفی داشتند و IC_{50} این ترکیبات برابر $50 \mu\text{M}$ بود. با وجود اینکه این ترکیبات خاصیت آنتی اکسیدانی ضعیفی داشتند، اما این مطالعه شیمی دانان را متقاعد کرد که گونه های جدید *Streptomyces* می توانند ترکیبات دارای ساختارهای اسکلتی نادری را تولید کنند (۲۲). در سال ۲۰۱۱، Zhong و همکارانش *Streptomyces* جدیدی از ریزوسفر را شناسایی و مورد بررسی قرار دادند که به عنوان *Streptomyces Eri* ۱۲ نامگذاری شد و این سویه توانایی تولید یک ترکیب آنتی اکسیدانی با IC_{50} برابر $43 \mu\text{g/ml}$ داشت (۳۶). Meyyappan و همکارانش از عصاره n-بوتانلی یک جنس جدید *Streptomyces* مولکول ۲-آلیل اکسی فنل را استخراج کردند که دارای خاصیت آنتی اکسیدانی بود و این ترکیب به عنوان یک نگهدارنده غذایی و یک ضد عفونی کننده دستگاه گوارش پیشنهاد شد. این ترکیب دارای IC_{50} برابر $22 \mu\text{g/ml}$ بود (۲۱). در پژوهش دیگری که توسط Saurav در سال ۲۰۱۱ انجام شد ترکیب دارای ساختار ۵-۲ و ۴-دی متیل بنزیل ۲-پیرولیدین جداسازی شد. متابولیت جداسازی شده از

تازه های بیو تکنولوژی سلولی - مولکولی دوره پنجم . شماره نوزدهم تابستان ۱۳۹۴ ارزیابی فعالیت ...

در این پژوهش در بررسی های مولکولی مشخص شد که ۳ سویه منتخب از جنس Streptomyces بودند که دارای بیشترین قرابت با سویه های Streptomyces galilaeus, Streptomyces tendae, Streptomyces albogriseolus می باشند. تا امروز هیچ ترکیب دارای فعالیت آنتی اکسیدانی از این سویه ها گزارش نشده است اما این سویه ها متابولیت های دارای فعالیت زیستی نظیر آنتی بیوتیک را تولید می نمایند.

Streptomyces tendae آنتی بیوتیک های نیکومایسین و جاگلومایسین را سنتز می نماید (۱۱). همچنین این سویه توانایی تولید ترکیباتی نظیر تندامیستات ، اکتوسرین، ژئوسمین، لیزولپین، نئوبلی اکسین را دارد (۱۲).

گزارش شده است که سویه MA۱۴۴-Streptomyces galilaeus M۱ توانایی تولید ۱۹ ترکیب آنتراسیکلیک را دارد که ۱۲ ترکیب آن فعالیت ضد باکتریایی داشتند. توانایی تولید ترکیباتی نظیر آکلاروبیسین ، بتارودومایسینون ، رودومایسینون ، پروپیونیک اسید، آکلاینون توسط این سویه گزارش شده است (۱۲).

همچنین Benedict تولید نئومایسین توسط Streptomyces albogriseolus را در سال ۱۹۵۴ گزارش کرد. این سویه توانایی تولید ۳۳ نوع آمومایسین و ۳ نوع آنزیم پروتئاز خارج سلولی را دارد (۲۹). Cui و همکارانش تولید ۲ نوع ترکیب سابتوتوکسی اکتوسپورین و ۷-دئوکسی اکتوسپورین را گزارش نمودند. این ترکیبات دارای فعالیت سابتوتوکسی بر روی سلول های سرطانی بودند (۶).

این پژوهش اولین گزارش از تولید ترکیبات آنتی اکسیدان توسط اکتینومایست های بومی ایران می باشد و همچنین برای اولین بار تولید ترکیبات آنتی اکسیدان توسط این سویه ها در جهان گزارش می شود.

منابع

1. Berdy J. Bioactive microbial metabolites. J Antibiot, 2005; 58:1-26.
2. Bertani G. Studies On Lysogenesis. J Bacteriol, 1961; 62 (3): 293-300.
3. Calabrese V, Randazzo S, Catalano C, Rizza V. Biochemical Studies On A Novel Antioxidant From Lemon Oil And Its Biotechnological Application In Cosmetic Dermatology. Drugs Exp Clin Res, 1999 ; 25 (5): 219-225
4. Chan J, Hueso rodriguez J. Compound Library Management. Methods Mol Biol, 2008; 190: 117-127.
5. Chun J, Sook Bae K, Young Moon E, Jung S O, Kum Lee H, Kim S J. Nocardiosis Kunsanensis Sp. Nov., A Moderately Halophilic *Actinomyces* Isolated From A Saltern . IJSEM , 2007; 50: 1909-1913.
6. Cui C B, Liu H B, Gu J Y, Gu Q Q, Cai B, Zhang D Y, Zhu T J. Echinospirins as new cell cycle inhibitors and apoptosis inducers from marine-derived *Streptomyces albogriseolus*. Fitoterapia, 2007; 78: 238-240.
7. Dekker M, HandBook Of Antioxidant, 2, The United States Of America, Eastern Hemisphere, 2002, 56-89.
8. Dharmaraj S, Ashokkumar B, Dhevendaran K. Fermentative Production Of Carotenoids From Marine *Actinomycetes*. Iran J Microbiol, 2009; 4(1): 36-41.
9. Diraviyam T, Radhakrishnan M, Balagurunathan R. Antioxidant Activity Of Melanin Pigment From *Streptomyces* Species D5 Isolated From Desert Soil. J.DIT, 2011; 3(3): 12-13.
10. Goldman J C, Carthy, M C. Steady State Growth And Ammonium Uptake Of A Fast Growing Marine Diatom. L&O, 1978; 23: 695-703.
11. Grammel H, Wolf H, Gilles E, Huth F, Laatsch H. Carbazole Antibiotics Synthesis In A *Streptomyces* Tendae Blad Mutana, Created By Acriflavine Treatment. Z Naturforsch, 1998; 53: 325-330
12. http://www.pharmaceutical-bioinformatics.de/streptomedb/search_organisms/.
13. Jao C L, Ko W C. 1,1-Diphenyl-2-Picrylhydrazyl (DPPH) Radical Scavenging By Protein Hydrolysates From Tuna Cooking Juice. Fish Science , 2002; 68:430-435.
14. Kieser, C R, Mahadik K R, Kadam S S, Chopade B A. Isolation, Characterization And Antimicrobial Activity Of Halophilic *Actinopolyspora* Species AH1 From The West Coast Of India. Curr. Sci, 2000; 86: 593-597.
15. Krishnaraju AV, Rao T V N, Sundararaju D, Vanisree M, Tsay H S, Subbaraju G V. Assessment Of Bioactivity Of Indian Medicinal Plants Using Brine Shrimp (*Artemia Salina*) Lethality Assay. Int J Applied Sci, 2005; 3: 125-134.
16. Kumar P, Dushenkov V, Motto H, Raskin I. Rhizofiltration The Use Of Plants To Remove Heavy Metals From Aqueous Streams. Environ Sci Technol, 1995; 29(5): 1239-1245.
17. Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3. Integrated Software For Molecular Evolutionary Genetics Analysis And Sequence Alignment. Brief Bioinform, 2004; 5(2):150-163.
18. Madhumitha G, Saral A. Free Radical Scavenging Assay Of Thevetia Neriifolia Leaf Extracts. Asian J Chem, 2009; 21:2468-2470.
19. Manilal A, Sujith S, Seghal Kiram G, Selvin J, Shaker C. Cytotoxic Potentials Of Red Alga, Laurencia Brandenii Collected From The Indian Coast. GJP, 2009; 3(2): 90-94.
20. Meyer B N, Ferrigni N, Putnam J, Jacobsen L, Nichols D, Mclaughlin L. Brine Shrimp:A Convenient

- General Bioassay For Active Plant Constituents. J Med Plants Res, 1982; 45: 31-34.
21. Meyyappan A, [et al]. Isolation Of An Unusual Metabolite 2-Allyloxyphenol From A Marine *Actinobacterium* , Its Biological Activities And Applications. Appl Microbiol Biotechnol , 2010; 86: 109-117 .
 22. Motohashi K, Takagi M, Shin-ya K. Tetrapeptides Possessing A Unique Skeleton , JBIR-34 And JBIR-35, Isolated From A Sponge-Derived Actinomycete, *Streptomyces* Sp. Sp080513GE-23. J Nat Prod, 2010; 73 (2): 226-228.
 23. Neelam S, [et al]. Production Of Coenzyme Q10 From Fungi And *Actinomycetes*, National Biotechnology Seminar, 2010.20-26 May.
 24. Neves A J, Nazaré M H. Properties Growth And Applications Of Diamond, Inst of Electrical Engineers, London, 2001, 114-123.
 25. Papas A M. Antioxidant Status, Diet, Nutrition, and Health. London, CRC Press, 1999, P. 1-20, 231-9.
 26. Pridham T G, Anderson P, Foley C, Lindenfelser L A, Hesseltine C W, Benedict R G. A Selection of Media for Maintenance and Taxonomic Study of *Streptomyces*. Antibiotics Annual, 1957: 947-53.
 27. Saurav K, Kannabiran K. Cytotoxicity And Antioxidant Activity Of 5-(2,4-Dimethylbenzyl) Pyrrolidin-2-One Extracted From Marine *Streptomyces VITSVK5 Spp.* sjbs , 2011; 19 (1): 81-86.
 28. SivaKumar K. 2001, *Actinomycetes* Of An Indian Mangrove (Pichavaram) Environment An Inventory Ph.D thesis, Annamalai University, India.
 29. Sokmen a , [et al]. The In Vitro Antimicrobial And Antioxidant Activities Of The Essential Oils And Methanol Extracts Of Endemic *Thymus Spathulifolius*. J Food Cont, 2004 ;15:627-634.
 30. Suzuki M, Taguchi S, Yamada S, Kojima S, Miura K I, Momose H. A Novel Member Of The Subtilisin-Like Protease Family From *Streptomyces Albogriseolus*. J. Bacteriol, 1997; 179 (2): 430-438.
 31. Teppei K, Miho I, Misa O, Hideki Y, Masayuki H, Motoki T, Shin-ya K. JBIR-94 And JBIR-125, Antioxidative Phenolic Compounds From *Streptomyces Sp.R56-07*. J Nat Prod, 2012; 75: 107-110.
 32. Usha Rakshanya J, Hemashenpagam N, Kanchana Devi D. Purification Of Secondary Metabolites From Soil *Actinomycetes*. IJMR, 2011; 3 (3): 148-156.
 33. Wanasundara P K J P D, Shahidi F, Science, Technology, And Applications, Bailey's Industrial Oil and Fat Products, Antioxidants, 6, John Wiley & Sons, 2005, 431-489.
 34. Williams S T, Goodfellow M, Alderson G, Wellington E M, Sneath P H, Sackin M J. Numerical Classification Of *Streptomyces* And Related Genera. J Gen Microbiol, 1984;129(6): 1743-1813.
 35. Yamamoto N, Kajimoto G. Antioxidation Effect Of Gly-Gly-His On Cu(II)-Catalyzed Autooxidation And Photosensitized Oxidation Of Lipids. Agric Biol Chem, 1980; 44: 2735-2736.
 36. Zhong K, Cao X, Zheng Jun X, Fan s. Antioxidant Activity Of A Novel *Streptomyces Strain Erli2* Isolated From The Rhizosphere Of Rhizoma Curcumae Longae. curr Res Bacteriol, 2011; 4(2): 63-72.