مقایسه فعالیت آنتی اکسیدانی و محتوی پلی فنلی در اکتینومیست‌های دریایی رسوبات ساحل دیلم

معصومه ناطق زاده[۱]، سهیلا مطرودی*[۱]، کمال الدین حق بین[۲]

۱. گروه زیست شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم وفنون دریایی خرمشهر
۲. پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۸/۱۴ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۶/۲۰
شناسه دیجیتال (DOI) : 10.22113/jmst.2018.104541.2073

چکیده

با توجه به اهمیت آنتی‌اکسیدان‌ها در درمان بیماری‌های مزمن و جایگزینی آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی با آنتی‌اکسیدان های مصنوعی و به منظور دستیابی به ترکیبات آنتی‌اکسیدانی طبیعی با منشا میکروبی، از اکتینومیست‌های دریایی که منبع غنی از ترکیبات زیستی هستند، استفاده شد. در این تحقیق، ۱۵ ایزوله باکتری اکتینومیست دریایی که از رسوبات ناحیه بین جزرومدی ساحل دیلم جداشده شده‌اند، برای آنالیز مولکولی و بررسی روابط فیلوژنی ایزوله های مورد مطالعه، درخت فیلوژنی بر اساس توالی‌های 16S rDNA، رسم گردید. علاوه بر این، در مطالعه حاضر، محتوی فنلی تام (TPC) توسط معرف فولین سیوکالتو و با استفاده از اسیدگالیک به عنوان یک مرجع استاندارد تعیین شد و نتایج بر حسب میلی‌مولارگالیک اسید بیان شد. سپس پتانسیل آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها با روش قدرت کاهندگی آهن Fe^{+3} (FRAP) اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که قدرت کاهندگی با محتوای فنلی تام مرتبط بود. دربین ایزوله‌های مورد بررسی، ایزوله AHA1 بیشترین محتوی فنلی تام (۱۴۱۹میکرومولار) و کمترین مقدار AMJ1 (۶۰۸/۸) و همچنین دو ایزوله AHA3 و AMJ5 به ترتیب بیشترین (۲۳۰/۶۶ میکرومولار) و کمترین (۷۵/۵۷ میکرومولار) فعالیت آنتی اکسیدانی با روش قدرت کاهندگی آهن را نشان دادند. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که سویه-های مورد مطالعه فعالیت آنتی‌اکسیدانی خوبی ازخود نشان دادند، که می‌توان از انها برای جداسازی و شناسایی ترکیبات مهم آنتی اکسیدانی جهت مطالعات بیشتر استفاده کرد.

واژگان کلیدی: اکتینومیست‌های دریایی، ساحل دیلم، ferric reducing antioxidant power ، محتوای فنلی تام

* نویسنده مسئول، پست الکترونیک: s.matroodi@kmsu.ac.ir

۱. مقدمه

به دنبال کشف اولین متابولیت های زیست فعال میکروبی درسال ۱۹۴۰، میکروبیولوژیست‌ها بر جداسازی، خالص‌سازی و شناسایی مولکول های فارماکولوژیکی تولید شده توسط میکروارگانیسم ها تمرکز کردند. در سال ۱۹۴۶، استرپتومایسین، اولین آنتی بیوتیک تولید شده در برابر بیماری سل از باکتری *Streptomyces griseus*، گزارش شد. اکتینومیست‌ها بعنوان باکتری‌های گرم مثبت تولید کننده آنتی بیوتیک شناخته شده‌اند. گروهی از اکتینومیست‌ها، آنهایی که در دریاها زندگی می‌کنند (Ramesh, 2009; Bull *et al*., 2007; Singh *et al*.,2008). متابولیت‌ها طبیعی بعنوان منبعی از ترکیبات ارزشمند با کاربردهای متنوع می‌باشند که در محیط‌های آبی کمتر شناخته شده (Bull *et al*., 2007 ; Heidari *et al*., 2015) و گزارش‌های کمی از اکتینومیست‌های دریایی ایران وجود دارد. محیط دریایی در ایران غنی از میکروب‌های متنوع است. تاکنون میکروفلور دریایی به خوبی در ایران شناخته شده نیست.

اکتینومیست های دریایی با ارزشمند ترین پروکاریوت ها به لحاظ اقتصادی و بیوتکنولوژی هستند. تاکنون حدود ۳۲۵۰۰ متابولیت ثانویه ی فعال زیستی از میکروارگانیسم ها کشف شده‌است که برآورد می‌شود ۱۰۰۰۰ مورد از آنها ازباکتری های دریایی جدا شده است (Thenmozhi *et al*., 2010 ; Thenmozhi *et al*., 2012) . اکتینومیست های دریایی بهترین منبع برای تولید متابولیت های ثانویه هستند که اکثریت این ترکیبات از جنس استرپتومایسس مشتق شده‌اند(Berdy, 2005) . آنتی اکسیدان به ماده ای اطلاق می‌شود که فرایند اکسیداسیونی را به تاخیر می‌اندازد و یا مانع تخریب و آسیب از طریق فرایند اکسیداسیون می‌شود (Arabsorkhi *et al*., 2015; Dekkers *et al*. 1996). رادیکال‌های آزاد و اکسیدکننده‌ها نقش دوگانه بعنوان مواد سمی و مفیدهردو را دارند. علت آن اینست که هم به بدن آسیب می‌رسانند و هم مفید هستند و برای درمان بسیاری از بیماری‌ها در انسان استفاده می شوند. رادیکال‌های آزاد یا از متابولیسم سلول‌های نرمال یا از منابع خارجی (مانند آلودگی، کشیدن سیگار، تشعشعات و مواد دارویی) حاصل می‌شوند (Lakhtakia *et al*., 2011). زمانیکه تراکم رادیکالهای آزاد زیاد می‌شود به تدریج تجزیه نمی‌شوند و براثر تجمع آنها پدیده استرس اکسیداتیو ایجاد می‌شود. این پروسه در توسعه بیماریهای تحلیل برنده حاد نقش مهمی ایفا می‌کند (Pham-Huy *et al*., 2008). ترکیبات آنتی اکسیدانی اکسیداسیون لیپیدها را از طریق مهار آغاز تکثیر واکنش‌های زنجیره ای اکسیداسیون مهار می‌کنند و در حذف رادیکالهای آزاد نقش دارند. اخیرا روشهای کلینیکی آنتی اکسیدان‌ها برای مدیریت و کاربرد دارو نواقص تحلیل سیستم عصبی، پیری، و بیماریهای تحلیل برنده حاد، افزایش یافته‌است.

در این مطالعه پتانسیل آنتی اکسیدانی و محتوی فنلی اکتینومیست‌های جدا شده از ساحل دیلم، ارزیابی گردید (Irshad *et al*., 2012). تحقیقات مختلفی به بررسی فعالیت‌های دارویی و آنتی اکسیدانی متابولیت ثانویه اکتینوباکتریهای جدا شده از رسوبات مختلف در جهان، صورت گرفته است (Kekuda *et al*., 2013; Sanjivkumar *et al*., 2016) . ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی دوترکیب herbimycin A و dihydroherbimycin A ، تولید شده توسط استرپتومایسس (Sanjivkumar *et al*., 2016)، همچنین مطالعه فعالیت آنتی اکسیدانی و فعالیت زیستی مانند فعالیت ضدمیکروبی ترکیبات تولید شده بوسیله ایزوله اکتینومیست A2 توسط Kekuda و همکاران (۲۰۱۳) از جمله این تحقیقات می‌باشند. هدف از این مطالعه بررسی محتوی پلی فنلی و فعالیت آنتی اکسیدانی اکتینومیست‌های

ساحل دیلم با استفاده از روش های فولین سیوکالتو و قدرت احیاکنندگی آهن می‌باشد.

۲. مواد و روش‌ها

در این بررسی ۱۵ ایزوله باکتری اکتینومیست که از قبل بر اساس توالیی16S rRNA شناسایی شده‌بودند (Jabari *et al*., 2016; Alijani *et al*., 2017)و توالی نوکلئوتیدی آن‌ها در سایت NCBI ثبت شده بود، انتخاب شدند.

آنالیز داده‌های توالی‌یابی و ترسیم درخت‌های فیلوژنی: برای رسم درخت‌های فیلوژنی از نرم افزار MEGA6استفاده شد (Tamura *et al*., 2004). درخت‌های فیلوژنی به روش پیوند هم‌جواری [۱](NJ) ترسیم گردید و آنالیز بوت استرپ نیز با ۱۰۰۰ بار تکرار صورت‌گرفت.

استخراج متابولیت‌های پلی فنلی اکتینومیست‌ها: ابتدا ایزوله‌ها درمحیط کشتLB کشت داده‌شدند و پس از گذشت یک هفته به محیط کشت القایی منتقل شدند. محیط کشت القایی شامل۱۰ گرم مالتوز، ۵ گرم عصاره مخمر، ۲/۹گرم سدیم فسفات، ۳/۲ گرم پتاسیم فسفات، ۱گرم آمونیوم کلرید، ۰/۵ گرم منیزیم سولفات، ۰/۵ گرم کلسیم کربنات، ۲۰ میکرولیتر سولفات آهن، ۱۰۰ میلی‌گرم سولفات روی، ۳۰۰ میلی‌گرم اسیدبوریک، ۲۰۰ میلی‌گرم کلریدکبالت، ۳۰ میلی گرم کلرید منگنز، ۳۰ میلی گرم سدیم مولیبدن، ۲۰ میلی‌گرم نیترات نیکل، ۱۰میلی‌گرم نیترات مس، در ۱۰۰۰میلی‌لیتر آب می-باشد (Nonomura, 1974).برای این منظور، هر یک ازسویه‌های اکتینومیست در ارلن‌های ۲۵۰ میلی-لیتری حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت القایی تلقیح شدند. ارلن‌ها در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰روز در انکوباتور شیکردار با دور ۱۰۰ دور در دقیقه قرار داده شدند. برای جداسازی میسلیوم‌ها از فاز مایع، محیط کشت فیلتر و در دور ۱۲۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانترفیوژ شد. رسوب دور ریخته شد و از سوپرناتانت برای بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات پلی‌فنلی استفاده‌شد.

اندازه‌گیری مقدار ترکیبات فنولی کل: در این روش، میزان ۵۰۰ میکرولیتر از محلول سوپرناتانت هر یک از باکتری‌ها در لوله های آزمایش مجزا با ۲/۵ میلیلیتر معرف فولین سیوکالتو ۳۳ ٪ مخلوط گردید.پس از گذشت ۵ دقیقه انکوباسیون در دمای محیط به آنها حدود ۲ میلی‌لیتر محلول سدیم کربنات ۷۵٪ اضافه شد.در نهایت پس از ۲ ساعت جذب محلول ها در۷۶۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر اندازه‌گیری شـد(Singleton *et al*., 1999). از آسکوربیک اسید به منظور رسم منحنی استاندارد استفاده‌شد و نتایج بر حسب میلی‌گرم در هر گرم عصاره بیان شد. بدین صورت که محلول پایهای از این ماده با غلظت یکمیلی‌مولار تهیه گردید.سپس از این محلول پایه غلظت‌های مختلف (۱۰۰،۲۰۰،۴۰۰،۶۰۰،۸۰۰،۱۰۰۰ میکرومولار) آماده شد و پس از انجام مراحل مختلف مطابق روش ذکر شده مقدار جذب نمونه‌ها خوانده شد. پس از رسم منحنی کالیبراسیون آسکوریک اسید، با قرار دادن مقدار جذب عصاره در معادله خطی مربوط به منحنی استاندارد، مقدارترکیبات فنولی تام موجود در عصاره محاسبه شد. محتوای فنولیک تام با میانگین دو بار تکرار آزمایش گزارش گردیده است.

بررسی قدرت احیاکنندگی آهن(FRAP[۲]): در این روش ویژگی الکترون‌دهندگی آنتی‌اکسیدان‌ها در pH پایین موجب احیاء کاتیون Fe^{3+} به Fe^{2+} می‌شود. بنابراین قادرند کمپلکس بی‌رنگ فریک-تری‌پیریدیل-تریازین[۳] را به کمپلکس آبی رنگ فروس-تری-پیریدیل-تریازین[۴] تبدیل نمایند که در طول موج

[1] Neibor-joining

[2] Ferric Reducing Antioxidant Power

[3] ferric-tripyridyltriazine

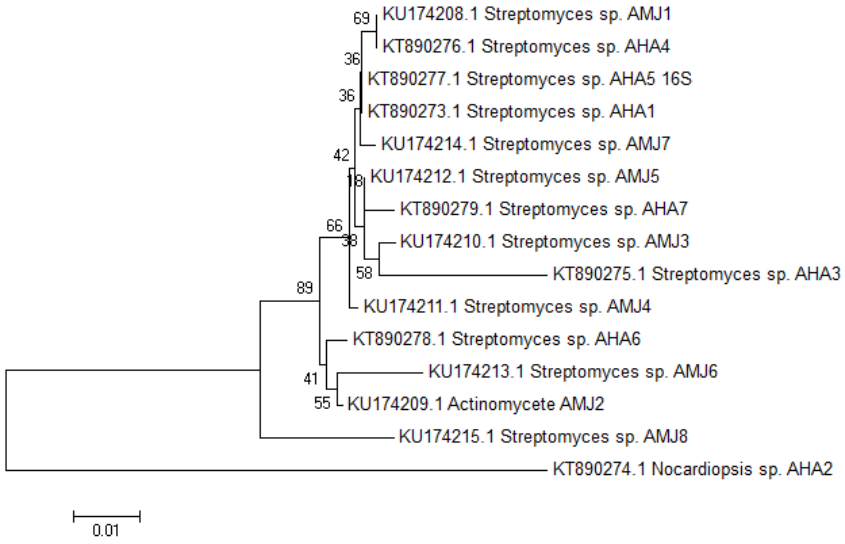
[4] ferrous-tripyridyltriazine

۵۹۳ نانومتر جذب دارد. به منظور سنجش این ویژگی، درلوله آزمایش مقدار ۱۵۰میکرولیتر از سوپرناتانت یا محلول استاندارد آسکوربیک اسید با ۲۸۵۰ میکرولیتر معرف FRAP مخلوط گردید. معرف FRAP شامل ۲۵ میلی لیتر بافر استات ۳۰۰ میلی‌مولار با pH= ۳/۶، ۲/۵ میلی لیترTPTZ(فریک- تری‌پریدیل- اس- تریازین) ۱۰ میلی‌مولار محلول در ۴۰HCl میلی مولار و FeCl3·6H2O ۲۰ میلی- مولارمی‌باشد. مخلوط حاصل قبل از استفاده ورتکس و در دمای ۳۷ °C گرم شد . بعد از ۳۰ دقیقه جذب نمونه ها در ۵۹۳ نانومتر نسبت به شاهد (شامل ۱۵۰میکرولیتر آب مقطر به همراه ۱۸۵۰ میکرولیتر معرفFRAP)، خوانده شد Benzie and Strain, (1996). از آسکوربیک اسید به عنوان مرجع استاندارد برای رسم منحنی استاندارد استفاده‌شد و نتایج بر حسب میکرومول بر لیتر عصاره بیان شد. بدین صورت که محلول پایه‌ای از این ماده با غلظت یک‌میلی‌مولار تهیه گردید. سپس از این محلول پایه غلظت‌های مختلف (۱۰۰،۸۰،۶۰،۴۰،۲۰،۱۰ میکرومولار) آماده شد و پس از انجام مراحل مختلف مطابق روش ذکر شده مقدار جذب عصاره‌ها خوانده شد. پس از رسم منحنی کالیبراسیون آسکوریک اسید، با قرار دادن مقدار جذب عصاره‌ها در معادله خطی مربوط به منحنی استاندارد، قدرت احیاکنندگی (ظرفیت آنتی اکسیدانی)هرعصاره محاسبه شد.

آنالیز آماری: برای بررسی رابطه همبستگی بین محتوای فنلی و فعالیت آنتی اکسیدانی به روش FRAP از نرم افزار SPSS 16.0 و از ضریب همبستگی پیرسن استفاده‌شد.

۳. نتایج

نتایج حاصل از بررسی درخت فیلوژنی نشان می- دهدکه ایزوله AHA2 از گونه *Nocardiopsis SP.* بیشترین فاصله ژنتیکی را با سایر ایزوله ها از گونه . *Streptomyces SP* دارد و از بین گونه‌های استرپتومایسس، ایزوله AMJ8بیشترین فاصله ژنتیکی را با سایر ایزوله‌ها دارد. همچنین ایزوله AMJ1 بیشترین نزدیکی را به ایزوله AHA4 از نظر توالی ژنتیکی دارد و در یک گروه خواهری قرار می‌گیرند. ایزوله AMJ2 بیشترین نزدیکی را به ایزوله AMJ6 از نظر توالی ژنتیکی دارد و در یک گروه خواهری قرار می‌گیرند. همچنین ایزولهAHA3 بیشترین نزدیکی را به ایزوله AMJ3 از نظر توالی ژنتیکی دارد و در یک گروه خواهری قرار می‌گیرند (**شکل۱**).



شکل۱. درختچه NJ گونه های مورد مطالعه براساس توالی 16S rDNA

نتایج بررسی محتوای تام فنلی: باتوجه به منحنی استاندارد رسم شده برای گالیک‌اسید ، نتایج مربوط به محتوای تام فنلی عصاره هر ایزوله بر حسب میکرومول اکی‌والان گالیک‌اسید بر لیتر، در جدول۱محاسبه شده است. مقادیر به دست آمده برای محتوای ترکیبات فنلی تام، طیف ۹/۶ ±۶۰۸/۸ تا ۱۴۱۹ ±۲۹۸/۶۸(µM GAE)را شامل می‌شود. که بیشترین محتوای فنلی کل مربوط به سویه AHA1 و کمترین محتوای فنلی مربوط به سویه‌ی AMJ1 می باشد.

نتایج بررسی قدرت احیاکنندگی آهن(FRAP): باتوجه به منحنی استاندارد رسم شده برای آسکوربیک‌اسید ، نتایج مربوط به قدرت احیاکنندگی عصاره هر ایزوله بر حسب میکرومول اکی‌والان آسکوربیک‌اسید بر لیتر، در جدول۱ محاسبه شده است. مقادیر به دست آمده برای قدرت احیاکنندگی طیف ۸/۹۷±۷۵/۵۷ تا ۱۵/۲۴±۲۳۰/۶۶ (µM ASC) را شامل شد. بیشترین قدرت احیاکنندگی مربوط به سویه AHA3 (۲۳۰/۶۶ میکرومولار) و کمترین قدرت احیاکنندگی مربوط به سویه‌ی AMJ5 (۷۵/۵۷ میکرومولار) بود.

جدول۱. بررسی محتوای فنلی و ظرفیت احیاکندگی آهن در ایزوله‌های اکتینومیست دریایی مورد مطالعه

سویه	FOLIN(µMGAE)	FRAP(µMASC)
AHA1	۱۴۱۹±۲۹۸/۶۸	۱۱۴/۲۷±۱۳/۱۹
AHA2	۶۲۶/۲±۵۵/۱۵	۱۳۲/۱۷±۴/۶۲
AHA3	۸۷۹/۲±۶۴/۷۷	۲۳۰/۶۶±۱۵/۲۴
AHA4	۶۲۹±۶۴,۷۷	۱۰۳/۸۳±۷/۶۰
AHA5	۷۸۳/۹±۳/۳۶۳	۱۲۷/۵۵±۷/۴۵
AHA6	۸۹۲±۱۷/۸۱	۱۱۸/۶۲±۰/۴
AHA7	۹۳۵/۳±۱۰۶/۴	۱۱۲/۹۱±۱۷/۹۷
AMJ1	۶۰۸/۸±۹/۶۱	۱۹۷/۸۹±۳/۶۱
AMJ2	۸۴۵/۵±۵/۷۹۸	۱۳۵/۴۷±۲/۷۷
AMJ3	۹۸۸/۴±۳۶/۴	۹۱/۲۶±۳۰/۵۵
AMJ4	۹۴۹/۹±۴۶/۵۲	۱۹۷/۸۹±۳/۶۱
AMJ5	۷۹۴/۶±۱۷/۸۱	۷۵/۵۷±۸/۹۷
AMJ6	۸۱۱/۳±۱۱/۴	۱۱۴/۷۷±۱۲/۸۶
AMJ7	۱۱۲۲/۷±۹/۱۹۲	۹۳/۴۲±۸/۶۸
AMJ8	۷۶۶±۹۷/۲۹	۱۱۶/۸۷±۱/۰۲

نتایج حاصل از بررسی همبستگی بین فعالیت آنتی اکسیدانی به روش FRAP و محتوای فنلی نشان داد که همبستگی بین آنها و جود ندارد (ضریب همبستگی (R) < صفر).

۴. بحث و نتیجه گیری

درمطالعه حاضر از روش FRAP برای بررسی قدرت آنتی‌اکسیدانی اکتینومیست‌های دریایی جدا شده از رسوبات ساحل دیلم، استفاده‌شد. همچنین برای بررسی محتوای تام فنلی، از روش فولین سیوکالتو استفاده‌شد. پتانسیل آنتی‌اکسیدانی ترکیبات فنولی

موجود در عصاره، ناشی از نوع و غلظت این ترکیبات و نیز تعداد و موقعیت گروه‌های هیدروکسیل موجود در حلقه آروماتیک این ترکیبات است. در کل، افزایش غلظت ترکیبات فنولی به طور مستقیم میزان توانایی عصاره‌های مختلف را در مهار رایکال آزاد افزایش می‌دهد (Ross and Kasum 2002; Mladenka *et al*.,2010; Nemzer *et al*.,2011; Sandoval-Acuna *et al*.,2014; Naine *et al*., 2015).

در غلظت‌های بالاتر ترکیبات فنلی، به دلیل افزایش تعداد گروه‌های هیدروکسیل موجود در محیط واکنش، احتمال اهداء هیدروژن به رادیکال‌های آزاد و به دنبال آن قدرت مهارکنندگی عصاره افزایش می‌یابد (Zhang *et al*., 2009). در مطالعات Kekuda، در سال ۲۰۱۳، بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی ۱۱ ایزوله اکتینومیست *Streptomyces SRDPH03*، جدا شده از ریزوسفر خاک‌های کارناتاکا در هند، نشان داد که با افزایش غلظت عصاره، قدرت مهارکنندگی افزایش می‌یابد. همچنین بیشترین اثر مهارکنندگی عصاره‌ها در غلظت ۱۰۰µg/ml ، با درصد مهار ۵۰٪ گزارش شد. در مطالعه حاضر بیشترین قدرت کاهندگی مربوط به سویه AMJ3 با مقدار ۱۰/۱۱mMبود. در مطالعات انجام شده توسط Sanjivkumarو همکاران در سال۲۰۱۶، فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره اتیل استاتی متابولیت ثانویه سویه *Streptomyces olivaceus* را بررسی کردند. نتایج آنها نشان داد که در غلظت ۱۰۰ µg/ml فعالیت مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH و قدرت کاهندگی آهن به ترتیب ۶۲/۰۶٪ و ۳۲/۵۱ ٪ بود. قدرت کاهندگی یک ترکیب به عنوان یک شاخص مهم در پتانسیل فعالیت آنتی‌اکسیدانی در نظر گرفته می‌شود. به طوری که عصاره هایی که در واکنش FRAP شرکت نمی‌کنند، قدرت آنتی‌اکسیدانی پایینی دارند. در مطالعه‌ای که توسط Kannabiran وThenmozhiدر سال ۲۰۱۲ صورت گرفته بود، فعالیت آنتی‌اکسیدانی اکتینومیست‌های دریایی گونه*Streptomyces sp. VITSTK7*،با دو روش DPPHو FRAP اندازه‌گیری شد، که در غلظت ۱۰میلی‌گرم در هر میلی‌لیتر، قدرت مهاری عصاره اتیل استاتی، ۴۳/۲ درصد و قدرت کاهش Fe^{+3} عصاره اتیل استاتی، ۰/۳۷ گزارش شد. فعالیت آنتی‌اکسیدانی غلظت‌های مختلفی از آسکوربیک‌اسید و عصاره اتیل-استاتی *Streptomyces parvulus VITJS11* اندازه-گیری کردند و مشاهده کردند که با افزایش غلظت، قدرت کاهندگی افزایش می‌یابد. همچنین حداکثرفعالیت آنتی‌اکسیدانیدرغلظت ۵µg/ml، با ۸۵٪قدرت کاهندگی گزارش شد. علاوه براین در مطالعات Kekuda و همکاران (۲۰۱۳) و Thenmozhiو همکاران در سال ۲۰۱۲ شبیه به این یافته‌ها مشاهده شده است. روش فولین سیوکالتو از متداول‌ترین روش‌های اندازه‌گیری ترکیبات فنولی می‌باشد. اساس کار در این روش، احیاء معرف فولین توسط ترکیبات فنولی درمحیط قلیایی و ایجاد کمپلکس آبی رنگ است که حداکثر جذب را در طول موج ۷۶۰ نانومتر نشان می‌دهند. بین محتوای فنلی موجود در عصاره و فعالیت آنتی اکسیدانی آن رابطه متقابلی وجود دارد (Katalinic *et al*., 2006). به طوری که محتوای فنلی به عنوان یک عامل کلیدی بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی متابولیت ثانویه اثر می-گذارد(Marković and Manojlović, 2010). در واقع ترکیبات فنلی به صورت موثری به عنوان دهنده هیدروژن عمل نموده، لذا به عنوان یک آنتی‌اکسیدان موثر عمل می‌کنند (Gulluce *et al*., 2007). همچنین نقش کلیدی ترکیبات فنلی به عنوان حذف کننده رادیکال‌های آزاد درچندین مقاله گزارش شده است (Katalinic *et al*., 2006; Theriault *et al*., 2006). در این بررسی، مقایسه بین دو شاخص قدرت آنتی‌اکسیدانی، روش FRAP و محتوای تام فنلی نشان داد رابطه مستقیمی بین این دو شاخص دیده می‌شود. به طوری که در برخی از سویه‌ها که محتوای فنلی بالایی داشتند، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بالایی مشاهده شد. به طور مثال سویه‌های AHA1

AMJ4 ،AMJ3 ،AMJ2 ،AHA7،AHA6،AHA3، AMJ7،AMJ5، که محتوای فنلی بالایی داشتند، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی خوبی هم از خود نشان دادند. از طرفی سویه AHA4که محتوای فنلی پایینی داشت، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی پایینی از خود نشان داد. البته در مورد برخی از سویه‌ها که محتوای فنلی پایینی داشتند، توانایی بالایی در ظرفیت آنتی اکسیدانی مشاهده شد. این موضوع نشان می‌دهد که برخی از ترکیبات آنتی‌اکسیدانی که محتوای فنلی پایینی دارند، قادرند در واکنش مربوط به FRAP شرکت کنند. بررسی همبستگی بین محتوای فنلی و فعالیت آنتی اکسیدانی نشان داد که رابطه مستقیمی بین آنها وجود ندارد. در مطالعه حاضر، از محیط کشت القایی در شرایط دمایی و زمانی یکسان، برای جداسازی عصاره‌ی تمامی ایزوله‌ها استفاده‌شد. سپس از عصاره خام به دست آمده، برای سنجش خاصیت آنتی‌اکسیدانی به روش FRAP استفاده‌شد. در مطالعات Nagaseshu در سال ۲۰۱۶، به منظور بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی ایزوله‌های اکتینومیست دریایی به روش DPPH و FRAP، از عصاره متانولی استفاده‌شد و عصاره‌ها فعالیت مهارکنندگی و قدرت کاهندگی خوبی از خود نشان دادند. نتایج با Benzie و همکاران مشابه است انها نیز رابطه بالایی بین محتوی فنلی و آزمایش FRAP یافتند. Rice-Evans و همکاران در سال ۱۹۹۷ (۳۰) گزارش کردند که ترکیبات حاوی ویژگی‌های ردوکس هستند که به آنها اجازه می‌دهد مانند عناصر کاهشی (دهنده هیدروژن) عمل کنند. پتانسیل ردوکس ترکیبات فنلی، نقش مهمی در تعیین پتانسیل انتی اکسیدان عمل می‌کند. در پایان می‌توان نتیجه گرفت که پتانسیل آنتی اکسیدان عصاره های اکتینومیست ساحل دیلم، قدرت آنتی اکسیدانی بالایی را نشان می‌دهند. همچنین فعالیت آنتی اکسیدانی این عصاره ها متناسب با محتوی فنلی است.

نتیجه گیری: بوضوح اکتینومیستها منبعی غنی از ترکیبات مهم اقتصادی و دارویی هستند بررسی ویژگیها و پتانسیل آنها برای اهداف آنتی اکسیدانی در این تحقیق نشان می‌دهد ایزوله های مورد مطالعه کاندیدهای خوبی برای استخراج و شناسایی دقیق ترکیبات آنتی اکسیدانی طبیعی هستند و می‌توان از آنها برای سلامت انسان استفاده کرد.

منابع

Alijani H, Matroodi S, sharafi A, zamani I. 2017. Diversity and Antimicrobial Activities of Streptomyces Isolated from intertidal Sediments of Deylam, Iran. Razi J Med Sci. 24 (162): 22-31.

Arabsorkhi F., Safaeian S., Salimi L. 2015. The Comparison of Antioxidant Property of Enriched Jelly Gum with *Chlorella vulgaris* and Normal Jelly Gum**.** J marine sci technol. 12(1).

Baltz RH. 2008. Renaissance in antibacterial discovery from actinomycetes. Curr Opin Pharmacol. 8:1-7.

Benzie FF., Szeto YT. 1999. Total antioxidant capacity of teas by the ferric reducing/antioxidant power assay. J Agri Food Chem. 47(2): 633–636.

Benzie IF., Strain JJ., 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. Analy biochem. 239(1):70-76.

Berdy J. 2005. Bioactive Microbial Metabolites. J Antibio. (Tokyo). 58:1-26.

Bull A.T., Stach JEM. 2007. Marine actinobacteria: new opportunities for natural product search and discovery. Trend Microbiol.15:491-9.

Dekkers J., van Doornen L., Kemper H. 1996. The role of antioxidant vitamins and enzymes in the prevention of exercise‐induced muscle damage. Sports Med. 21: 213‐238.

Gulluce M., Sahin F., Sokmen M., Ozer H., Daferera D., Sokmen A., Polissiou M., Adiguzel A. Ozkan H. 2007. Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oils and methanol extract from Mentha longifolia L. ssp. longifolia. Food chem. 103(4): 1449-1456.

Nemzer BV., Rodriguez LC., Hammond L., DiSilvestro R., Hunter JM., Pietrzkowski Z. 2011. Acute reduction of serum 8-iso-PGF2-alpha and advanced oxidation protein products in vivo by a polyphenol-rich beverage; a pilot clinical study with phytochemical and in vitro antioxidant characterization. Nutr J 10(1):1–11.

Nonomura H., Ohara Y. 1974. Distribution of actinomycetes in soil. XII. A new species of actinomycetes, *Thermononospora mesouviformis*, sp. nov. J Ferment Technol. 52: 10–13.

Pham-Huy LA., He H., Pham-Huyc C. 2008. Free radicals, antioxidants in disease and health. Int J Biomed Sci. 4:89-96.

Ramesh S. 2009. Marine actinomycetes diversity in Bay of Bengal, India: isolation and characterization of bioactive compounds from *Streptomyces fungicidicus* MML 1614. India. Dissertation, University of Madras, Chennai, India.

Refrenece

Rice-Evans CA., Miller NJ., Paganga G. 1997. Antioxidant properties of phenolic compounds. Trends Plant Sci. 4: 304–309.

Ross JA., Kasum CM. 2002. Dietary flavonoids: Bioavailability, metabolic effects, and safety. Annu Rev Nutr. 22*:*19–34.

Sandoval-Acuna C., Ferreira J., Speisky H. 2014. Polyphenols and mitochondria: an update on their increasingly emerging ROS-scavenging independent actions. Arch Biochem Biophys. 559*:*75–90.

Sanjivkumar M., Babu DR., Suganya AM., Silambarasan T., Balagurunathan R., Immanuel G., 2016. Investigation on pharmacological activities of secondary metabolite extracted from a mangrove associated actinobacterium *Streptomyces olivaceus* (MSU3). Biocata Agri Biotechnol. 6: 82-90.

Singh SB., Pelaez F. 2008. Biodiversity, chemical and drug discovery. Progr Drug Res. 65:143-74.

Singleton VL., Orthofer R., Lamuela-Raventós RM. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. Meth enzymol. 299: 152-178.

Tamura K., Dudley J., Nei M. Kumar, S. 2007. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. Molecul Boil Evol. 24(8): 1596-1599.

Heidari M., Zolgharnin H., Sakhaei N., Mirzaei A., Movahedinia A. 2015. Antioxidant capacity and phenolic and flavonoid content of macro algae in the northern coasts of the Persian Gulf in Bushehr province. J marine sci technol. 14(1).

Irshad M., Singh M., Zafaryab M., Rizvi MMA. 2012. Comparative analysis of the antioxidant activity of *Cassia fistula* extracts. Inter J Med Chem. doi:10.1155/2012/157125.

Katalinic V., Milos M., Kulisic T., Jukic M. 2006. Screening of 70 medicinalplant extracts for antioxidant capacity and total phenols. Food Chem. 94:550-7.

Jabari M, Matroodi S, Zolgharnein H, Sharafi A, Zamani I. 2016. Screening, isolation and study of antifungal activity of marine actinomycetes from Deylam nearshore sediments. Iran J Med Microbiol. 9 (4) :87-94.

Kekuda PTR, Rakesh KN., Junaid S. Kekuda PT. 2013. Antibacterial and antioxidant activities of Streptomyces species SRDP-H03 isolated from soil of Hosudi, Karnataka, India. J Drug Deliv Sci Technol. 3(4): 47-53.

Lakhtakia R., Ramji MT., Lavanya K., Rajesh K., Jayakumar K., Sneha C., Narayan A., Ramya B., Ramana G., Chari PVB., Chaitanya KV. 2011. The role of antioxidants in human health maintenance: Small molecules with infinite functions. IJPSR. 2:1395-402.

Markovic ZS., Manojlovic NT. 2010. Analytical characterizationof lichexanthone in lichen: HPLC, UVspectroscopic and DFT analysis of lichexanthone extracted from Laurera benguelenisis(Mull. Arg.). Zahlbr Monatshefte Chemie. 141:945-52.

Mladenka P., Zatloukalova L., Filipsky T., Hrdina R. 2010. Cardiovascular effects of flavonoids are not caused only by direct antioxidant activity. Free Radical Bio Med. 49(6)*:*963–75.

Nagaseshu P., Gayatridevi V., Anil Kumar B., Seema Kumari, Murali Mohan G., Rama Rao Malla. 2016. Antioxidant And Antiproliferative Potentials Of Marine Actinomycetes. Inter J Pharma Pharmaceut Sci. 8(8): 277-284.

Naine SJ., Devi CS., Mohanasrinivasan V. 2015. Antimicrobial, Antioxidant and Cytotoxic Activity of Marine *Streptomyces parvulus* VITJS11 Crude Extract. Brazilian Arch Biol Technol. 58(2): 198-207.

Th´eriault M., Gaillett S., Kermasha S., Lacroix M. 2006. Antioxidant, antiradical and antimutagenic activities of phenolic compounds present in maple products. Food Chem. 98: 490–501.

Thenmozhi M., Kannabiran K. 2012. Antimicrobial and antioxidant properties of marine actinomycete *Streptomyces* sp. VITSTK7. Oxidant. Antioxidant Med Sci. 1: 51-57.

Thenmozhi M., Sindhura S., Kannabiran K. 2010. Characterization of Antioxidant activity of *Streptomyces* species VITTK3 isolated from Puducherry Coast, India. J Adv Sci Res. 1:46-52.

Zhang Z., Liao L., Moore J., Wu T., Wang Z. 2009. Antioxidant phenolic compounds from walnut kernels (Juglans regia L.). Food Chem. 113(1): 160-1

Comparative Antioxidant Activities and Polyphenolic Content of Marine actinomycetes from Deylam nearshore sediments

Masoomeh Nateghzadeh [1] , Soheila Matroodi[1]*, Kamahldin Haghbeen[2]

1. Department of Marine biology, Faculty of Marine Science and oceanography, Khorramshahr University of marine science and technology, Iran.
2. National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology

(DOI): 10.22113/jmst.2018.104541.2073

Abstract

Antioxidant used for chronic disease as treatment and for repalcing artificial antioxidant with natural antioxidant; To investigate antioxidant activity, we used marine actinomycetes as an important resources of bioactive compounds.. In this study, for phylogenetic analysis of 15 marine actinomycetes isolated from Deylam intertidal sediments, 16S rDNA sequences were used. In addition, the total phenolic content (TPC) was determined with the Folin-Ciocalteu's reagent using gallic acid as a standard and the results were expressed as mM of gallic acid. Then, the antioxidant potential of the extracts was determined by analytical methods, ferric reducing antioxidants power (FRAP). The antioxidant potential of the crude extracts exhibited strong ferric reducing power activity at 517nm and the reducing power activity was strongly correlated with the total phenolics content of the isolates. Among the tested isolates, AHA1 (1419 µM) and AMJ1 (608.8) showed the hieghest and lowest total phenolic content, respectivly. Moreover AHA3 and AMJ5 (230.66 and 75.57µM) showed the highest and lowest reducing power, respectivly. These strains showed acceptable antioxidant activity and could be good candidates for more studies as nature resources of pharmaceutical antioxidant compound.

Keywords: Marine actinomycetes, Antioxidant activity, FRAP, Total phenolic Content (TPC)

List of tables & figures

Table 1. Total phenolic content and ferric reducing power activity in marine actinomycetes.
Figure 1. Neighbor- Joining tree of isolated strains based on 16S rDNA sequences.

*Corresponding author, E-mail: s.matroodi@kmsu.ac.ir