مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی - مولکولی
دوره پنجم، شماره نوزدهم - تابستان ۱۳۹۴

Research Article
مقاله تحقیقی

ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی و سایتوتوکسیک اکتینومایست‌های بومی ایران

آزاده علایی[۱]، جواد حامدی*[۲،۳]، فاطمه محمدی پناه[۳،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، دانشکدهٔ زیست شناسی، پردیس علوم، دانشگاه تهران، تهران، ایران.
۳- کلکسیون ترکیبات زیستی. مرکز پژوهشی فناوری و فراورده‌های میکروبی دانشگاه تهران، تهران، ایران.
۴- استادیار، بخش زیست فناوری میکروبی، دانشکدهٔ زیست شناسی، پردیس علوم، دانشگاه تهران، تهران، ایران.
۵- استادیار، گروه فارماکوگنوزی، 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، حشره‌کش، 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 اکتینومایست‌های کشور منتشر نشده است. هدف این پژوهش بررسی توان تولید آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی از منابع میکروبی با منشاء بومی است.

مواد و روش: ۵۰ سویه اکتینومایست بومی ایران، ذخیره شده در مرکز کلکسیون میکروارگانیسم‌های 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 آرتمیا مورد بررسی قرار گرفت. سویه‌های منتخب دارای فعالیت به روش مولکولی شناسایی شدند.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که در میان ۵۰ عصاره اکتینومایست، ۱۰٪ عصاره‌ها فاقد فعالیت آنتی‌اکسیدانی، ۲۰٪ دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالا (IC۵۰<۲۰۰)، ۳۲٪ دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی متوسط (۲۰۰>IC۵۰>۴۰۰)، ۸٪ از عصاره‌ها دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی پایین (۴۰۰>IC۵۰>۶۰۰) و۳۰٪ عصاره‌ها دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی بسیار پایین(IC۵۰>۶۰۰) بوده‌اند. در تست سمیت سنجی بر آرتمیا مشخص شد که ۵۰٪ عصاره‌های اکتینومایست 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 ۱۶-SrRNAمتعلق 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 UTMC۱۰۵۴ و UTMC۱۱۶۶ 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 اکتینومایست‌های بومی ایران وجود دارد. این ترکیبات به طور قابل توجهی می توانند قابل رقابت با آنتی‌اکسیدان‌های مصنوعی نظیر BHA در صنایع غذایی و دارویی باشند.

کلمات کلیدی اکتینومایست، آنتی‌اکسیدان، DPPH ، تست آرتمیا

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 میکروارگانیسم‌ها رادیکال‌های آزاد سوپراکسید و H_2O_2 تولید می‌کنند. استرس‌اکسیداتیو به

* نویسنده مسئول:
بخش زیست فناوری میکروبی، دانشکدهٔ زیست شناسی، پردیس علوم
دانشگاه تهران، تهران، ایران.
پست الکترونیکی : jhamedi@at.ac.ir
تاریخ دریافت :۱۳۹۳/۰۴/۲۰
تاریخ دریافت :۱۳۹۳/۰۵/۲۵

وجود آمده، ناشی ازگونه‌های واکنش دهنده اکسیژن(Reactive oxygen species)، نقش بسیار مهمی را درگسترش 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 هانتیگتون و بیماری‌های تخریب کننده اعصاب نظیر بیماری پارکینسون استفاده می‌شوند. به علاوه تجویز خوراکی برخی از آنتی‌اکسیدان‌ها مکمل افزایش انرژی وتقویت سیستم ایمنی می باشد(۲۳،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 نظیرBHT(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 باکتری های 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٪ است. در میان اکتینومایست‌ها، استرپتومایسس‌ها غالب هستند. و اکتینومایست‌های غیر استرپتومایسسی(non-streptomycetes)، اکتینومایست‌های کمیاب نامیده می‌شوند که نزدیک ۱۰۰ جنس را شامل می‌شوند (۲۶،۲۸).

اکتینومایست‌ها باکتری های 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 آنتی بیوتیک‌هایی 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 فراورده‌های میکروبی دانشگاه تهران

نگهداری می‌شوند به صورت تصادفی انتخاب شدند.
,۱۰۱۱UTMC ,۱۰۳UTMC ,۱۰۲UTMC ,۱۰۱UTMC
,۱۰۴۲UTMC ,۱۰۳۷UTMC ,۱۰۳۴UTMC ,۱۰۲۹UTMC
۱,۱۰۵۲UTMC,۱۰۵۱UTMC,۱۰۴۶UTMC,۱۰۴۵UTMC
,۱۰۶۲UTMC ,۱۰۵۷UTMC ,۱۰۵۵UTMC,۰۵۳UTMC
۱,۱۰۶۹UTMC,۱۰۶۷UTMC,۱۰۶۶UTMC,۱۰۶۳UTMC
۱,۱۱۱۰UTMC,۱۱۰۷UTMC,۱۱۰۶UTMC,۱۰۲UTMC
۱,۱۱۳۰UTMC,۱۱۲۴UTMC,۱۱۱۶UTMC,۱۱۵UTMC
۱-,۱۱۳۷UTMC,۱۱۳۵UTMC,۱۱۳۳UTMC,۱۳۰UTMC
۱,۱۰۰۹UTMC,۱۱۴۲UTMC,۱۱۳۹UTMC,۱۳۸UTMC
,۱۱۵۵UTMC,۱۰۵۴UTMC,۱۱۵۴UTMC ,۱۵۱UTMC
,۱۱۶۲UTMC,۱۱۵۹UTMC,۱۱۵۸UTMC,۱۱۵۶UTMC
,۱۱۷۵UTMC ,۱۱۷۳UTMC,۱۱۶۶UTMC,۱۱۶۴UTMC
.۱۱۲۰UTMC ,UTMC ۱۱۷۷

این جدایه‌ها به منظور فعال سازی و تهیه اسپور، بر روی محیط Agar ISP۲ کشت داده شدند و به مدت ۱۰-۷ روز در دمای ۲۸°C گرماگذاری شدند.

تهیه پیش کشت

برای پیش کشت ازمحیط Broth ISP۲ به میزان ۵۰ml در فلاسک‌های ۲۵۰ ml استفاده شد. سپس فلاسک‌ها به مدت ۴۸ ساعت در شیکر انکوباتور در دمای ۲۸°C با دور ۲۰۰rpm گرماگذاری شد (۲۵،۲۳).

تهیه محیط تخمیر

محیط Broth ISP۲ برای تخمیر مورد استفاده قرار گرفت. درشرایط آسپتیک ۱۲/۵ m محیط پیش کشت، به ۲۵۰ ml محیط کشت تخمیر در فلاسک‌های ۱ لیتری تلقیح شد (به میزان ۵٪ =v/v). سپس فلاسک‌ها به مدت ۷ روز در دمای ۲۸°C روی شیکر انکوباتور با دور ۲۰۰ rpm گرماگذاری شد. سپس محیط کشت تخمیر به مدت ۱۰ دقیقه با دور rpm ۴۰۰۰ سانتریفیوژ شد و به میزان دو برابر حجم مایع تخمیر، حلال آلی اتیل استات افزوده شد و به مدت ۲ ساعت برروی همزن قرار گرفت. در ادامه فاز رویی ایجاد شده، توسط دکانتور از فاز زیرین جدا شد(۱۵،۳۱). عصاره‌ها توسط دستگاه تبخیر کننده دوار (Rotary) در فشار کم و در دمای ۴۰°C تغلیظ شد و در فریزر ۷۰°C-، در مرکز کلکسیون ترکیبات زیستی دانشگاه تهران (UTBC) ثبت و نگهداری شد(۴).

ارزیابی قدرت مهار کنندگی رادیکال آزاد عصاره کشت اکتینومایست‌ها

برای این منظور با استفاده از روش(۱،۱-Diphenyl-۲-Picrylhydrazyl) DPPH ، میزان مهار رادیکال‌های آزاد DPPH، توسط عصاره‌ها با استفاده از روش Yamamoto مورد ارزیابی قرار گرفت (۳۵). برای این منظور، محلول‌هایی با رقت‌های متوالی ۵،۱۰،۲۵،۵۰ µg/ml از عصاره‌ها و آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی BHA و اسیدآسکوربیک 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. محلول‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در محلی تاریک و در دمای اتاق قرار داده شدند و بعد از این مدت جذب آنها در طول موج ۵۱۷ nm قرائت شد. نمونه کنترل شامل متانول و محلول DPPH بود. این تست برای هر عصاره سه بار تکرار صورت گرفت.

ارزیابی سمیت عصاره‌ها توسط روش آرتمیا

روش تکثیر و پرورش کیست آرتمیا ((Artemia franciscana در آب نمک دریایی مصنوعی بر طبق دستور العمل Goldman انجام شد(۱۰). ابتدا مقادیر ۲۳ /۳۷۵ g/l NaCl ، ۴/۹۲۵ g/l ، $MgSO_4,7H_2O$ ۱/۱۱g/l، $CaCl_2,2H_2O$ ،۰/۲۰۲۵g/l KBr ، ۰/۷۴۵ g/l KCl ، ۴/۰۶۲۵ g/l $MgCl_2,6H_2O$ در ۱ لیتر آب مقطر حل و استریل گردید. به بیوراکتور حاوی۵۰۰ ml آب نمک دریایی مصنوعی، مقدار ۰/۱ گرم کیست‌های آرتمیا (Artemia franciscana) اضافه و دمای این بیوراکتور در ۲۸°C تنظیم شد (۲۰).

برای انجام این تست از هر عصاره مقدار رقت‌های متوالی µg/ ml ۱۰،۲۰،۴۰، ۵ با استفاده ازDMSO تهیه شد، در هر چاهک ۲۰ لارو آرتمیا 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 چاهک‌ها در زیر میکروسکوپ شمارش شد. هم چنین تعداد لاروهای کشته شده بعد از گذشت ۱۸ ساعت نیز شمارش شدند.

شناسایی جدایه‌های 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، (g/l) ۵ کلرید سدیم ، ۷/۳= pH) به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۸°C و دورrpm ۲۲۰ رشد داده شدند. پس از اطمینان از عدم آلودگی و کامل بودن رشد میسلیومی باکتری ها، محیط داخل ارلن را داخل ویال‌های اپندورف ۱/۵ریخته و به مدت ۸ دقیقه با ۸۰۰۰rpm دور سانتریفوژ 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

۱/۵ استریل، به منظور تخریب سلول‌ها، SET buffer ۹۵۰ µl (Tris-HCl ۲۰mM ، EDTA ۲۵mM NaCl ۷۵mM) pH=۸/۲ ، بر روی ویال ریخته، ورتکس شد و ۵۰ µl لیزوزیم، به آن اضافه شد. ویال ۱ ساعت در ۳۷ºC قرار داده شد. سپس ۱۵۰ µl SDS ۱۰٪، اضافه و ویال ۱ ساعت در بن ماری ۶۰ºC، 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 رویی 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 رویی 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 رویی 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 ۲۰ºC- 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 ۴۰µl بافرTE، به درون ویال اضافه شد و در یخچال قرار داده شد(۱۴).

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

انجام واکنش زنجیره ای پلیمراز(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 DNA۲µl استخراج شده ، ۱ µl از هرکدام از پرایمرها، ۱۲/۵ µl آنزیم Taq master mix و در نهایت ۱/۲۵ µl DMSO اضافه شد. لازم به ذکر است استفاده از DMSOبه دلیل بالا بودن در صد C+G اکتینومایست ها لازم است که این ماده سبب بهتر باز شدن باندها می‌شود(۱۷). دناتوره شدن اولیه در دمای ۹۵ºC و به مدت ۵ دقیقه بود. ۳۵ چرخه ی تکثیر شامل ۱۰ ثانیه در ۹۸ºC ، ۱ دقیقه در ºC ۵۵ ، ۵ دقیقه در ۷۲ºC انجام شد. پس از این مراحل ۵ دقیقه در ۷۲ºC به منظور تکمیل نهایی سنتز DNA نگه داشته شد. بررسی محصولات PCR، با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز ۰/۸٪ صورت گرفت. ژن‌های تکثیر شده و مشاهده شده بر روی ژل آگارز در صورت مناسب بودن باندها برای توالی‌یابی، به شرکت Macrogen کره جنوبی ارسال شدند.

تکرارپذیری و آنالیز آماری داده‌ها

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

(DPPHآزادرادیکال مهار درصد)^ =(ODc-(ODs-ODc)/ODc)*۱۰۰

در این رابطه ODc وODs به ترتیب جذب کنترل و میزان جذب نمونه می‌باشند. میزان IC۵۰ هر یک از عصاره‌ها و اسید آسکوربیک و BHA با استفاده از نرم افزار spss(linear Regression) سنجیده شد. IC۵۰ غلظتی از عصاره است که توانایی مهار ۵۰٪ از رادیکال‌های آزاد موجود در محیط را دارد بنابراین هر چه میزان IC۵۰ کمتر باشد عصاره دارای ترکیب آنتی‌اکسیدان موثرتری می‌باشد(۱۸).

برای ارزیابی میزان سمیت عصاره‌ها بر آرتمیا، فرمول زیرمورد استفاده قرار گرفت.

M=A-B-N/G-N*۱۰۰

در این رابطه M، A,B,Nو 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 می‌باشند. 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(۱۹،۱۵).

آنالیز فیلوژنتیک توالی ژن۱۶-SrDNA سویه‌های اکتینومایست منتخب

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

یافته‌ها

میزان مهار رادیکال آزاد

نتایج ارائه شده در مورد ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی ۵۰

جدایه اکتینومایست (جدول ۱) نشان می‌دهد که ۱۰٪ عصاره‌ها فاقد فعالیت آنتی‌اکسیدانی، ۲۰٪ از عصاره‌ها دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالا (IC۵۰>۲۰۰)، ۳۲٪ عصاره‌ها دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی متوسط (۲۰۰>IC۵۰>۴۰۰)، ۸٪ ازعصاره‌ها دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی پایین(۴۰۰>IC۵۰>۶۰۰) و ۳۰٪ عصاره‌ها دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی بسیار پایین(IC۵۰>۶۰۰) می‌باشند.

	%DPPH radical scavenging (dose in µg/ml)			IC_{50} (µg/ml)	UTBC number	UTMC number
	۵۰	۲۵	۱۰	۵			
BHA	۴۹/۷۲	۳۸/۲۵	۱۵/۴۲	۸/۰۶	۴۶/۵۵		
Acid ascorbic	۲۲/۱۹	۹/۷۸	۲/۰۲	۰/۴۵	۱۰۶/۷۹		
۵۱	۴۷/۸۹	۲۹/۵۷	۵/۸۵	۳/۸	۵۰/۱۵	۱۱۶۶
۵۲	۳۵/۵	۲۴/۲	۱۲/۸	۴/۵	۲۴۰	۱۱۵۹
۵۳	۰	۰	۰	۰	۰	۱۰۱
۵۴	۲/۹۵	۲/۷۸	۲/۶۱	۲/۵	۵۲۷۸	۱۱۵۴
۵۵	۵/۵۹	۳/۸۷	۱/۱۹	۰	۳۱۴/۷۶	۱۰۲
۵۶	۸/۸۹	۴/۵۸	۲/۶۴	۱	۳۰۲/۴۱	۱۰۳
۸۵	۷/۹۷	۲/۸۲	۱/۸۱	۰	۳۰۴/۷۵	۱۰۵۷
۸۶	۴۱/۱۴	۱۹/۷۹	۹/۳۲	۸/۸۲	۶۳/۲۷	۱۰۵۴
۸۸	۰	۰	۰	۰	۰	۱۰۵۱
۸۹	۸۸/۴۹	۳۸/۷۹	۳۲/۷۸	۱/۰۲	۲۸/۱۷	۱۰۴۶
۹۰	۸/۵۸	۵/۵۵	۳/۸۳	۱/۸	۳۴۶/۶۹	۱۱۷۵
۹۱	۰	۰	۰	۰	۰	۱۱۷۳
۹۲	۱۱/۲۵	۴/۷۶	۳/۶۵	۰	۲۲۲/۸۸	۱۱۷۷
۹۴	۲/۴	۱/۸۲	۱	۰	۵۸۲	۱۱۶۲
۹۵	۲/۸۷	۱/۴۳	۰	۰	۷۵۲/۸۳	۱۱۲۴
۹۶	۷/۴۶	۵/۴۶	۳/۳۹	۳/۰۸	۴۷۴/۰۳	۱۱۶۴
۲۷۱	۹/۳۲	۳/۸۵	۰/۵	۰	۲۴۲/۱۴	۱۰۶۳
۲۷۲	۱۴/۱	۷/۰۵	۰	۰	۱۵۸/۰۵	۱۰۶۶
۲۷۳	۴/۷۷	۱/۴۵	۰/۹	۰/۵	۵۳۹/۸۱	۱۰۶۷
۲۷۴	۱۰/۳۴	۴/۱۹	۱/۸۹	۰	۲۳۰/۲	۱۰۶۲
۲۷۸	۴/۹۷	۲/۳۵	۱/۵۷	۰	۵۰۰/۳۵	۱۰۶۹
۲۷۹	۶/۰۸	۲/۵۲	۰	۰	۳۶۱/۹۵	۱۱۳۹
۲۸۰	۷/۹۲	۵/۴۷	۲/۸۶	۱/۵۵	۳۵۵/۰۸	۱۱۳۷
۲۸۱	۵/۶۹	۳/۵۸	۲/۴۵	۲/۲۶	۶۲۶/۶۸	۱۱۱۰
۲۸۲	۰	۰	۰	۰	۰	۱۱۵۱
۲۸۳	۹/۱۱	۴/۴۶	۳/۷۲	۳/۷۲	۳۸۹/۳۷	۱۰۵۲
۲۸۴	۳/۵۵	۲/۷	۱/۸۸	۱/۱۱	۹۷۶/۳۸	۱۰۵۵
۲۸۵	۳/۸۳	۲/۱۵	۱/۰۳	۰	۶۳۳/۴۶	۱۰۴۵
۲۸۶	۱۴/۶۶	۱۰/۵۵	۱	۰	۱۵۰/۳	۱۱۴۲
۲۸۷	۱۰/۲۲	۷/۷۷	۶/۶۹	۵/۸۸	۴۷۷/۹۸	۱۰۵۳
۲۹۷	۷/۵۷	۴/۴	۲/۸۹	۲/۴۱	۴۱۹/۷۳	۱۱۵۸
۲۹۸	۴۵/۸۴	۳۴/۴۸	۸	۰	۴۹/۹۷	۱۱۱۶
۲۹۹	۴/۶۷	۳/۲۴	۲/۲۳	۱/۳۹	۷۵۴/۸۹	۱۱۵۶
۳۰۰	۷/۷۴	۲/۸	۱/۱۳	۰	۳۰۴/۵۵	۱۱۰۶
۳۰۱	۳/۴۴	۰/۸	۰	۰	۶۵۰/۱۷	۱۱۰۷
۳۰۲	۷/۲۱	۲/۰۱	۰	۰	۳۰۹/۸۱	۱۱۱۵
۳۰۳	۲/۶۷	۱/۸۸	۰	۰	۷۹۸	۱۱۳۵
۳۰۴	۴/۲	۱/۴	۱/۱	۰	۵۹۱/۲۷	۱۱۵۵
۳۰۵	۷/۹۷	۳/۴۵	۱/۶۴	۰	۲۹۹/۰۶	۱۱۳۸
۳۰۶	۴/۴۹	۲/۹۸	۱/۱۱	۰	۵۲۶/۳۵	۱۱۳۱
۳۰۷	۱۲/۲۵	۷/۷۴	۴/۸۱	۴/۹۸	۲۷۲/۹	۱۱۰۲
۳۰۸	۱۰/۹۷	۲/۴۳	۰/۷۱	۰	۲۱۲/۹۵	۱۱۳۰
۳۰۹	۱۰/۰۱	۵/۳۹	۴/۲۸	۱/۳۵	۵۱/۶۷	۱۱۲۰
۳۱۰	۸/۶۳	۴/۵۷	۲/۹۴	۲/۶۷	۳۶۰/۷	۱۰۰۹
۳۱۱	۱۳/۰۱	۵/۷۶	۵/۷۲	۲/۷۱	۲۳۲/۲۹	۱۰۴۲
۳۱۲	۰	۰	۰	۰	۰	۱۰۳۷
۳۱۳	۱۵/۵۱	۷/۶	۶/۴۹	۴/۳۳	۱۹۹/۲۲	۱۰۲۹
۳۱۴	۲۰/۵	۴/۴	۰	۰	۱۱۵/۸۴	۱۰۱۱
۳۱۵	۱۴/۱۸	۱۰/۱۶	۵/۸۳	۱/۹۲	۱۸۹/۰۹	۱۱۳۳
۳۱۶	۵/۹۴	۳/۴۲	۱/۰۵	۰	۳۹۰/۰۲	۱۰۳۴

جدول۱- بررسی اثر آنتی‌اکسیدانی غلظت‌های مختلف عصاره‌های کشت اکتینومایست‌ها به روشDPPH.

دراین سنجشBHA و اسید آسکوربیک به عنوان شاهد مثبت مورد استفاده قرارگرفتند.

نتایج ارزیابی سمیت عصاره‌های کشت اکتینومایست

در این مطالعه به منظور اندازه‌گیری سمیت حاد عصاره‌های اکتینومایست، میزان مرگ و میر آرتمیا در تماس با غلظت‌های مختلف اندازه‌گیری شد. نتایج به صورت درصد کشندگی ذکر شده است. نتایج در جدول‌های ۵،۴،۳،۲ آورده شده است و به ترتیب شامل عصاره‌های غیرسمی، عصاره‌های دارای سمیت پایین، عصاره‌های سمی و عصاره‌های بسیار سمی می‌باشد. در این تست آنتی‌اکسیدان‌های تجاری آلفاتوکوفرول و BHA نیز مورد ارزیابی قرار گرفتند. همان طور که مشاهده می‌شود، ۵۰٪ عصاره‌های اکتینومایست فاقد سمیت، ۳۰٪ از عصاره‌ها سمیت پایین، ۱۶٪ از عصاره‌ها سمیت بالاو ۴٪ از عصاره‌ها سمیت بسیار بالایی داشتند.

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

جدول۲-نتایج ارزیابی تست سمیت سنجی غلظت‌های مختلف عصاره‌های اکتینومایست برآرتمیا.

عصاره‌های فاقدسمیت برآرتمیا (۲۰٪-۰). آلفا-توکوفرول به عنوان شاهد مثبت مورد استفاده قرارگرفت.

UTMC number	UTBC number	Percentage of lethality (dose in µg/ml)			
		۴۰	۲۰	۱۰	۵
۱۱۶۶	۵۱	۰/۵۱±۲۲	۰/۱۵±۵۱/۵	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

جدول۳-نتایج ارزیابی تست سمیت سنجی غلظت‌های مختلف عصاره‌های اکتینومایست بر آرتمیا.

عصاره‌های دارای سمیت پایین بر آرتمیا (۴۰٪-۲۰٪)

UTMC number	UTBC number	Percentage of lethality (dose in µg/ml)			
		۴۰	۲۰	۱۰	۵
	BHA	۲/۲±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

جدول۴-نتایج ارزیابی تست سمیت سنجی غلظت‌های مختلف عصاره‌های اکتینومایست بر آرتمیا.

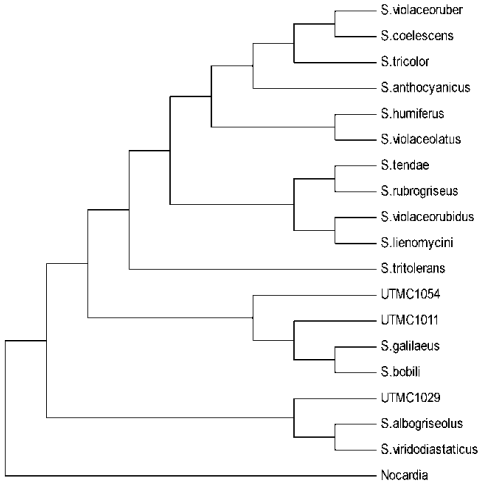
عصاره‌های دارای فعالیت سمی (۶۰٪-۴۰٪). BHA به عنوان شاهد منفی مورد استفاده قرار گرفته است.

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±۲۰/۹۵

جدول۵-نتایج ارزیابی تست سمیت سنجی غلظت‌های مختلف عصاره‌های کشت شده اکتینومایست بر آرتمیا.

عصاره‌های دارای سمیت بسیاربالا(۶۰٪>)

بررسی فیلوژنتیکی اکتینومیست‌های منتخب



پس از توالی خوانی ژن 16-SrDNA مربوط به اکتینومیست های منتخب و بررسی توالی‌ها در EZtaxon ، نتایج حاصل نشان داد که هر ۳ سویه متعلق به جنس ***Streptomyces*** می باشند.

بحث

آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی مولکول‌هایی هستند که سلول را در

برابر اثرات مخرب رادیکال‌های آزاد محافظت می‌کنند و بدن را در شرایط بهینه نگهداری می‌کنند(۲۹). با به کاربردن تکنیک غربالگری، سرعت کشف ترکیبات طبیعی تا به حال متجاوز از یک میلیون می‌باشد. درمیان ۲۲۵۰۰ ترکیب استخراج شده فعال زیستی ۴۵٪ توسط اکتینوباکترها، ۳۷٪ توسط قارچ ها، ۱۷٪ توسط سایر باکتری‌ها تولیدشده است (۱).

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

Kawahara و همکارانش ۲ ترکیب فنولی-JBIR-۹۴JBIR ۱۲۵ازمایع فرمانتاسیون***StreptomycesR***-۵۶-۰۷جداسازی کردند که این ترکیبات دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی و اولین نمونه‌هایی از هیدروکسی سینامیک اسیدهایی بودند که توسط اکتینومایست‌ها تولید می‌شدند. $IC_{۵۰}$ این ترکیبات آنتی‌اکسیدان برابرμM ۹بود(۳۱). Motohashiو همکارانش، یک اکتینومایست از اسفنج موجود در خلیج بنگال جداسازی کردند، که توانایی تولید ۲ نوع پپتید تغییریافته حاوی اندول و دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی را داشتند. این ترکیبات۳۴-JBIR و ۳۵-JBIR نامگذاری شدند. این ۲ ترکیب فعالیت آنتی‌اکسیدانی ضعیفی داشتند و $IC_{۵۰}$ این ترکیبات برابر ۵۰ μMبود. با وجود اینکه این ترکیبات خاصیت آنتی‌اکسیدانی ضعیفی داشتند، اما این مطالعه شیمی‌دانان را متقاعد کرد که گونه‌های جدید ***Streptomyces*** می‌توانند ترکیبات دارای ساختارهای اسکلتی نادری را تولید کنند (۲۲). درسال۲۰۱۱، Zhong و همکارانش ***Streptomyces*** جدیدی از ریزوسفر را شناسایی و مورد بررسی قرار دادند که به عنوان۱۲***Strptomyces Eri*** نامگذاری شد و این سویه توانایی تولید یک ترکیب آنتی‌اکسیدانی با $IC_{۵۰}$ برابر ۴۳ ۱۷۲/μg/mlداشت(۳۶). Meyyappanو همکارانش از عصاره n-بوتانلی یک جنس جدید ***Streptomyces*** مولکول۲-آلیل اکسی فنل را استخراج کردند که دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی بود و این ترکیب به عنوان یک نگهدارنده غذایی و یک ضدعفونی کننده دستگاه گوارش پیشنهاد شد. این ترکیب دارای $IC_{۵۰}$برابر ۲۲μg/ml بود(۲۱). در پژوهش دیگری که توسط Saurav در سال۲۰۱۱ انجام شد ترکیب دارای ساختار ۵-۲ و۴دی متیل بنزیل۲-پیرولیدین جداسازی شد. متابولیت جداسازی شده از ۵***StreptomycesVITSVK*** بدست آمد و دارای $IC_{۵۰}$برابر ۸μg/ml بود. که خاصیت کشندگی برروی سلول‌های سرطانی داشت(۲۷).

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج بدست آمده در این پژوهش، ۳ جدایه منتخب UTMC۱۰۱۱-UTMC۱۰۵۴-UTMC۱۰۲۹ می‌باشد که عصاره این جدایه‌ها فاقد فعالیت سمی و در عین حال دارای فعالیت بالای آنتی‌اکسیدانی($IC_{۵۰}$≤۲۰۰) هستند. جدایه UTMC۱۰۱۱ دارای $IC_{۵۰}$ برابرμg/ml ۱۱۵/۸۴ ، UTMC۱۰۵۴ دارای $IC_{۵۰}$ برابر μg/ml ۶۳/۲۷ و UTMC۱۰۲۹ دارای $IC_{۵۰}$ برابر μg/ml۱۹۹/۲۲ در تست قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH بودند.

BHAنیز دارای $IC_{۵۰}$ برابر μg/ml ۴۶/۵۵ بود. بنابراین جدایه UTMC۱۰۵۴ از نظر فعالیت آنتی‌اکسیدانی قابل رقابت با آنتی‌اکسیدان‌های مصنوعی رایج در صنایع غذایی مانند BHA است که در ضمن فاقد اثرات سمی این نوع آنتی‌اکسیدان هم می‌باشد. در ضمن عصاره‌هایUTMC۱۱۶,UTMC۱۱۱۶,

UTMC۱۱۳۳,UTMC۱۱۴۲ که به ترتیب دارای $IC_{۵۰}$ برابر ۴۹/۹۷μg/ml، ۵۰/۱۵μg/ml, ۱۵۰/۳ μg/ml,۱۸۹/۰۹بودند, این عصاره‌ها فعالیت کشندگی پایینی در مقایسه با BHA داشتند، در نتیجه عصاره‌هایUTMC۱۱۶,UTMC۱۱۶۶ قابلیت جایگزینی با BHA را دارا می‌باشند. عصاره‌های UTMC۱۰۴۶,UTMC۱۱۲۰,UTMC۱۰۶۶ به ترتیب دارای $IC_{۵۰}$ برابر ۵۱/۶۷μg/ml,۲۸/۱۷μg/ml, ۱۵۱/۰۵ بودند که در مقایسه با BHA سمیت بالاتری داشته و غیر قابل استفاده بودند.

عصاره‌های مورد استفاده در این پژوهش نسبت به آنتی‌اکسیدان‌های به دست آمده از سایر اکتینومایست‌ها در پژوهش‌های مختلف، فعالیت آنتی‌اکسیدانی متوسطی داشتند اما این نکته حائز اهمیت است که عصاره‌های به کار گرفته شده، در مقایسه با دیگر آنتی‌اکسیدان‌ها، خالص‌سازی نشده بودند که در صورت خالص سازی میزان $IC_{۵۰}$ این ترکیبات نیز کاهش پیدا خواهد کرد و احتمال غیر سمی بودن این ترکیبات آنتی‌اکسیدانی بصورت خالص وجود دارد که این موضوع قابل توجه می‌باشد.

در این پژوهش در بررسی‌های مولکولی مشخص شد که ۳ سویه منتخب از جنس Streptomyces بودند که دارای بیشترین قرابت با سویه‌های, Streptomyces galilaeus, Streptomyces tendae Streptomyces albogriseolus می‌باشند. تا امروز هیچ ترکیب دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی از این سویه‌ها گزارش نشده است اما این سویه‌ها متابولیت‌های دارای فعالیت زیستی نظیر آنتی‌بیوتیک را تولید می‌نمایند.

Streptomyces tendae آنتی‌بیوتیک‌های نیکومایسین و جاگلومایسین را سنتز می‌نماید(۱۱). همچنین این سویه توانایی تولید ترکیباتی نظیر تندامیستات ، اکینوسرین، ژئوسمین، لیزولیپین، نئوپلی‌اکسین را دارد(۱۲).

گزارش شده است که سویه M۱-Streptomyces galilaeus MA۱۴۴ توانایی تولید ۱۹ ترکیب آنتراسیکلیک را دارد که ۱۲ ترکیب آن فعالیت ضد باکتریایی داشتند.توانایی تولید ترکیباتی نظیر آکلاروبیسین ، بتارودومایسینون ، رودومایسینون ، پروپیونیک اسید، آکلاوینون 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 آمفومایسین و ۳ نوع آنزیم پروتئاز خارج سلولی را دارد(۲۹). Cui و همکارانش تولید ۲ نوع ترکیب سایتوتوکسی اکینوسپورین و ۷-دئوکسی اکینوسپورین را گزارش نمودند. این ترکیبات دارای فعالیت سایتوتوکسی بر روی سلول‌های سرطانی بودند(۶).

این پژوهش اولین گزارش از تولید ترکیبات آنتی‌اکسیدان توسط اکتینومایست‌های بومی ایران می‌باشد و همچنین برای اولین بار تولید ترکیبات آنتی‌اکسیدان توسط این سویه‌ها در جهان گزارش می‌شود.

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. Nocardiopsis Kunsanensis Sp. Nov., A Moderately Halophilic ***Actinomycete*** 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. Echinosporins 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 ***StreptomycesVITSVK5 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.R***56-07. 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 Erli***2 Isolated From The Rhizosphere Of Rhizoma Curcumae Longae. curr Res Bacteriol, 2011; 4(2): 63-72.