مجله بوم شناسی آبزیان

Journal homepage: http://jae.hormozgan.ac.ir

تأثیر بازدارندگی متابولیت‌های ثانویه باکتری *Streptomyces* sp. Strain SC 190 بر فعالیت آنزیم پلی فنول اکسیداز در راستای پیشگیری از عارضه لکه سیاه در میگو سفید غربی (*Litopenaeus vannamei*)

محسن گذری[۱*]، محمود حافظیه[۲]، سعید تمدنی جهرمی[۱]، سجاد پورمظفر[۳]، یزدان مرادی[۲]

[۱] *پژوهشکده اکولوژی خلیج‌فارس و دریای عمان، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، بندرعباس، ایران*

[۲] *موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران*

[۳] *ایستگاه تحقیقات نرم‌تنان خلیج فارس، پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، بندرلنگه، ایران*

نوع مقاله:
پژوهشی

تاریخچه مقاله:
دریافت: ۹۷/۰۴/۲۳
اصلاح: ۹۹/۰۸/۲۳
پذیرش: ۹۹/۰۹/۱۵

کلمات کلیدی:
آنتی اکسیدان
پلی فنول اکسیداز
متابولیت
ملانوزیس
میگوی سفید غربی

چکیده

عارضه لکه سیاه مشکلی اساسی در توسعه صنعت فرآوری سخت‌پوستان به ویژه میگو است و موجب زیان اقتصادی می‌گردد. عامل ایجاد این عارضه عملکرد آنزیم پلی فنول اکسیداز (PPO) و ایجاد رنگ‌دانه‌های سیاه در بدن میگو می‌باشد. هدف این مطالعه ارزیابی تأثیر بازدارندگی متابولیت‌های استخراج شده از باکتری *Streptomyces* sp. Strain SC 190 بر فعالیت آنزیم PPO در راستای یافتن جایگزینی برای بازدارنده‌های شیمیایی مورد استفاده بود. به این منظور آنزیم PPO از سفالوتوراکس نمونه‌های میگو استخراج و به طور نسبی خالص‌سازی گردید. نتایج نشان داد متابولیت‌های باکتری SC 190 جداشده از خیار دریایی *Holothuria scabra*، دارای فعالیت مهارکنندگی روی آنزیم PPO (۶۰/۶۹±۳/۷۶ µg/mL IC_{50}) بودند. همچنین این متابولیت‌ها قادر به مهار رادیکال‌های آزاد دی‌فنیل پیکریل هیدرازیل (DPPH) با IC_{50} معادل ۴۵/۱۰±۲/۱۴ µg/mL بودند. نتایج آزمون سمیت این ترکیبات بیانگر عدم سمیت آن‌ها در مقابل رده سلولی اندوتلیال بند ناف انسان (HUVEC) بود. حضور ترکیبات فنولی در عصاره متابولیت‌های باکتریایی با استفاده از غربالگری شیمیایی تأیید گردید. شناسایی پلی فازی جدایه SC 190 نشان داد ژن 16s rRNA این باکتری با سویه *Streptomyces cellulosae* به میزان ۹۹ درصد تشابه داشت. بر اساس این نتایج متابولیت‌های استخراج شده از باکتری *Streptomyces* sp. Strain SC 190 می‌توانند به عنوان نگهدارنده زیستی در فرایند فرآوری میگوی سفید غربی مورد مطالعه بیشتر قرار گیرند.

مقدمــه

عارضه لکه سیاه یا ملانوزیس یکی از مشکلات جدی در فرایند جابجایی پس از برداشت و نگهداری سخت‌پوستان به ویژه میگو می‌باشد. اگرچه این پدیده برای مصرف‌کننده آسیب مستقیمی ایجاد نمی‌کند اما ویژگی‌های حسی فراورده را تخریب نموده و

* نویسنده مسئول، پست الکترونیک: m_gozari@yahoo.com

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-01-29]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1399.10.3.3.3]

موجب کاهش کیفیت و ماندگاری می‌گردد. در نتیجه به شدت از ارزش اقتصادی و میزان بازارپسندی محصول کاسته شده و منجر به ضرر مالی قابل ملاحظه‌ای می‌شود (FAO, 2008). ملانوزیس در نتیجه ایجاد واکنش‌های بیوشیمیایی اکسید شدن فنول به کوئینون ها به‌وسیله آنزیم پلی فنول اکسیداز (PPO) ایجاد می‌گردد (Nirmal and Benjakul, 2012). آنزیم پلی فنول اکسیداز همچنین به عنوان فنول اکسیداز، تیروزیناز و کاتچین اکسیداز نیز شناخته می‌شود. این آنزیم در رنگ‌دانه زایی در بی‌مهرگان، قهوه‌ای شدن سبزیجات و میوه‌ها نقش دارد (Nurhayati *et al.*, 2015). PPO یک آنزیم دارای عملکرد دوگانه و حاوی فلز مس می‌باشد. دو واکنش پایه در حضور اکسیژن مولکولی به‌وسیله این آنزیم کاتالیز می‌شود. این واکنش‌ها شامل هیدروکسیلاسیون مونوفنول به دی فنول ها (مونو فنول اکسیداز، EC 1.14.18.1) و اکسیداسیون بعدی دی فنول ها به کوئینون (دی فنول اکسیداز EC 1.10.3.1) می‌باشند (Garcia-Molina *et al.*, 2005). این آنزیم در سه نوع مختلف ایزومر با نام اکسی PPO ، متیل PPO و داکسی PPO وجود دارد (Jukanti, 2017). شدت تشکیل ملانوزیس در سخت‌پوستان بسته به نوع گونه متفاوت است و این تفاوت به دلیل اختلاف در پیش ماده و غلظت آنزیم است (Benjakul *et al.*, 2005). مطالعات مختلفی در زمینه مهار یا پیشگیری از فعالیت آنزیم PPO با حذف اجزای ضروری واکنش مانند آنزیم‌ها، اکسیژن و مس انجام شده است. برای کنترل ملانوزیس در سخت‌پوستان، مشتقات سولفیت و ۴-هگزیل رزورسینول بسیار استفاده شده است (Gómez-Guillén *et al.*, 2005; Heuer *et al.*, 1997). با توجه به قوانین سخت‌گیرانه در زمینه استفاده از مشتقات سولفیتی و قیمت بالای بازدارنده‌های تجاری PPO توجه به سمت افزودنی‌های طبیعی برای به تأخیر انداختن ملانوزیس در میگو افزایش یافته است (Gonçalves and de Oliveira, 2016). اخیراً استفاده از ترکیبات فنولی گیاهی عصاره دانه انگور، ارگوتیونئین[1] عصاره قارچ خوراکی و عصاره چای سبز به عنوان افزودنی‌های مؤثر برای تأخیر در ایجاد ملانوزیس در میگو مطالعه شده است (Encarnacion *et al.*, 2011). میگوی سفید غربی (*Litopenaeus vannamei*) حدود ۹۰ درصد تولید میگوی پرورشی را در سطح جهان تشکیل داده است. این گونه در ایران نیز گونه غالب پرورشی بوده که به‌طور عمده در استان‌های هرمزگان، بوشهر، خوزستان و گلستان پرورش داده می‌شود. در حال حاضر روش معمول برای پیشگیری یا تأخیر این پدیده در کشور استفاده از متابی سولفیت سدیم است. اما به دلیل تأثیر نامطلوب این ترکیب شیمیایی انجام مطالعه در زمینه استفاده از ترکیبات طبیعی جایگزین ضروری می‌باشد. مطالعات اخیر نشان داد باکتری‌های جداسازی شده از گونه‌های خیار دریایی موجود در خلیج فارس دارای توانمندی بالایی در تولید ترکیبات زیست فعال به ویژه آنتی اکسیدان می‌باشند (Gozari *et al.*, 2018). بنابراین برای اولین بار ایده استفاده از متابولیت‌های ثانویه باکتری‌های دریایی به عنوان نگهدارنده زیستی[2] برای کنترل ملانوزیس در این مطالعه مطرح گردید. هدف اصلی از این تحقیق ارزیابی متابولیت‌های ثانویه استخراج شده از باکتری *Streptomyces* sp. Strain SC 190 به منظور یافتن جایگزین طبیعی برای بازدارنده‌های شیمیایی مورد استفاده در فرایند پیشگیری از عارضه ملانوزیس در میگوی سفید غربی بود. اهداف فرعی شامل: ۱- سنجش فعالیت بازدارندگی متابولیت‌های ثانویه استخراج شده از سویه SC 190 در مقابل آنزیم PPO استخراج شده از میگوی سفید غربی؛ ۲- بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی متابولیت ثانویه استخراج شده از باکتری؛ ۳- بررسی سمیت متابولیت ثانویه استخراج شده در مقابل رده سلولی طبیعی انسان و ۴- غربالگری شیمیایی متابولیت ثانویه استخراج شده، بود.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری و آماده‌سازی نمونه‌های میگو

میگوی سفید غربی *Litopenaeus vannamei* با وزن حدود ۲۰ گرم از سایت پرورش میگوی تیاب در استان هرمزگان خریداری شد. نمونه‌ها به‌صورت تازه و بدون هیچ نوع افزودنی در مخلوط یخ با نسبت وزنی (۱:۲) نگهداری و طی مدت ۹۰ دقیقه به آزمایشگاه منتقل شدند. سپس با آب سرد شسته و در یخ نگهداری شدند. پس از جدا کردن سفالوتوراکس میگوها با کوبیدن در نیتروژن مایع، به پودر تبدیل شده و در ظروف پلی اتیلنی در دمای ^{o}C ۲۰- به مدت دو هفته نگهداری شدند.

[1] Ergothioneine
[2] Biopreservative

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-01-29]
[DOR: 20.1001.1.23222751.1399.10.3.3.3]

استخراج آنزیم PPO

استخراج آنزیم PPO بر اساس روش Monteroa و همکاران انجام شد (Montero *et al.*, 2001). ۱۰ گرم پودر به دست آمده از سفالوتوراکس با ۳۰ میلی‌لیتر از بافر فسفات سدیم ۰/۰۵ مولار (pH= ۷/۲) مخلوط شد. این بافر حاوی کلرید سدیم ۱ مولار، ۰/۲٪ از *BRIJ® 35* بود. این ترکیب به مدت ۳ ساعت در دمای ^{o}C ۴ مخلوط شد. سپس در سانتریفیوژ یخچال دار با دور ۸۰۰۰g در دمای ^{oC} ۴ به مدت ۳۰ دقیقه قرار گرفت. برای ته نشین شدن، سولفات آمونیوم ۴۰ درصد به مایع رویی جمع‌آوری شده اضافه گردید. رسوب به دست آمده پس از سانتریفیوژ در ۱۲۵۰۰g در دمای ^{o}C ۴ به مدت ۳۰ دقیقه جمع‌آوری و در ۲/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات سدیم (pH= ۶/۵) حل شد. در نهایت برای نمک‌زدایی از فیلتراسیون مولکولی (PD-10 column, Sephadex G-25 M) استفاده شد. حجم نهایی به دست آمده به میزان ۲/۵ میلی‌لیتر، در بافر فسفات سدیم ۰/۰۵ مولار حل و در دمای ^{o}C ۷۵- نگهداری شد.

سنجش فعالیت آنزیم PPO

فعالیت آنزیم PPO بر طبق روش Montero و همکاران و با استفاده از L-DOPA[3] به عنوان سوبسترا مورد سنجش قرار گرفت (Montero *et al.*, 2001). چاهک مورد آزمون حاوی µL ۴۰ ترکیب خالص شده آنزیم PPO با µL۲۸۰ محلول L-DOPA با غلظت ۲۰ میلی مولار در آب مقطر و µL۲۸۰ بافر فسفات ۰/۰۵ مولار بود. فعالیت PPO پس از قرار دادن این محلول به مدت ۵ دقیقه در دمای ^{o}C ۲۵ و ثبت میزان جذب نوری در ۴۷۵ نانومتر با استفاده از اسپکتروفوتومتر (Shimadzu UV-1601) مورد سنجش قرار گرفت و نتایج به‌صورت افزایش میزان جذب بر دقیقه بیان شد. فعالیت نسبی آنزیم به‌صورت درصد فعالیت آنزیمی با معادله $(A/A_{max}) \times 100$ محاسبه گردید. A بیانگر افزایش جذب نوری در دقیقه است. نمونه‌های بلانک برای آنزیم و سوبسترا به ترتیب با جایگزینی آب مقطر و حذف آن‌ها از ترکیب واکنش تهیه شد.

تولید و استخراج متابولیت‌های ثانویه از باکتری *Streptomyces* sp. Strain SC 190

باکتری سویه SC 190 جداشده از خیار دریایی *Holothuria scabra* از کلکسیون باکتری‌های مولد ترکیبات زیست فعال خلیج فارس و دریای عمان متعلق به پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان دریافت شد. این باکتری به محیط کشت Marine broth شرکت Himedia تلقیح گردید و به مدت ۵ روز در انکوباتور شیکردار با سرعت چرخش ۲۲۰ rpm در دمای ^{o}C ۲۸ قرار گرفت. پس از اتمام فرایند گرماگذاری، مایع تخمیری فیلتر و با استفاده از روش مایع- مایع به‌وسیله حلال اتیل استات (۱:۱ v/v) استخراج شد. پس از تبخیر حلال آلی عصاره باقیمانده به منظور انجام آزمون‌های سنجش زیستی در دمای ^{o}C۷۰- نگهداری شد (Gozari *et al.*, 2016b).

ارزیابی تأثیر متابولیت‌های ثانویه استخراج شده از باکتری بر فعالیت آنزیم PPO

به منظور سنجش تأثیر بازدارندگی متابولیت‌های استخراج شده از باکتری بر فعالیت آنزیم PPO، مقدار µL ۴۰ از آنزیم خالص شده با µL ۱۴۰ بافر فسفات ۰/۱۰ مولار (pH= ۸) و µL۱۴۰ از متابولیت استخراج شده با غلظت‌های نهایی ($\mu g\ mL^{-1}$ ۵۰۰ ، ۲۵۰، ۱۲۵، ۶۲/۵، ۳۱/۲۵، ۱۵/۶۲، ۷/۸۱) مخلوط و سپس به مدت ۵ دقیقه در دمای ^{o}C ۲۵ گرماگذاری شد و فعالیت آنزیمی در همان شرایط با افزودن µL ۲۸۰ محلول L-DOPA در آب اندازه‌گیری گردید. جذب هر واکنش در طول موج nm ۴۷۵ مورد سنجش قرار گرفت و درصد ممانعت از فعالیت آنزیمی با معادله $[(A1-A2) / A] \times 100$ محاسبه شد. A1 نشان‌دهنده میزان جذب نوری در غیاب بازدارنده و A2 میزان جذب نوری در حضور بازدارنده است (Montero *et al.*, 2001).

سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانی متابولیت‌های استخراج شده

[3] L-3,4-dihydroxyphenylalanine

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-01-29]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1399.10.3.3.3]

فعالیت آنتی‌اکسیدانی متابولیت‌های ثانویه SC 190 با استفاده از روش سنجش مهار رادیکال‌های آزاد DPPH به صورت مایکرودایلوشن[4] مورد غربالگری قرار گرفت. به منظور تعیین IC_{50} غلظت‌های نهایی (µg/ml ۶۲۵ ,۳۱۲، ۱۵۶، ۷۸، ۳۹، ۱۹ ، ۹/۷۵) مورد سنجش قرار گرفتند. در این آزمایش، آسکوربیک اسید به عنوان استاندارد، متانول به عنوان کنترل منفی و عصاره اتیل استاتی محیط کشت Marine broth به عنوان شاهد استفاده گردید (Gozari *et al.*, 2019a). مقدار µl ۵ از غلظت متابولیت یا نمونه‌های کنترل به µl ۱۹۵ محلول DPPH (µM ۱۰۰) به هر چاهک افزوده شد. پس از ۳۰ دقیقه قرارگرفتن در دمای اتاق و تاریکی، مقدار جذب نوری نمونه‌ها در nm ۵۱۷ با دستگاه Microplate reader (BioTech instrument) اندازه‌گیری شد. درصد فعالیت مهار رادیکال‌های آزاد DPPH با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد (Leong and Shui, 2002).

درصد فعالیت مهار رادیکال‌های آزاد DPPH = $(I_0) - (I_s) / I_0 \times ۱۰۰$

I_0: جذب در چاهک حاوی DPPH µl ۱۹۵ + µl ۵ متانول

I_s: جذب در چاهک نمونه یا کنترل

سنجش فعالیت سیتوتوکسیک متابولیت‌های استخراج شده در مقابل سلول‌های انسانی

رده سلولی اندوتلیال بند ناف انسان HUVEC[5] با کد C554 به عنوان سلول نرمال از انستیتو پاستور ایران تهیه شد و فعالیت سیتوتوکسیک متابولیت‌های ثانویه SC 190 با استفاده از روش رنگ سنجی با معرف تترازولیوم MTT شرکت Sigma-Aldrich مورد سنجش قرار گرفت (Peng and Zhao, 2009). به هر چاهک µL ۱۰۰ از محیط کشت حاوی سلول با تعداد نهایی ۱×۱۰^{۴} سلول در میلی‌لیتر اضافه شد. به دنبال آن میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای در دمای °C ۳۷ در حضور ۵ درصد دی اکسید کربن به مدت ۲۴ ساعت گرماگذاری شد (Gozari *et al.*, 2019b). با استفاده از رقیق سازی دو برابری[6] غلظت‌های ($۱۰۰۰\mu g\ mL^{-1}$ ،۵۰۰، ۲۵۰، ۱۲۵، ۶۲/۵، ۳۱/۲۵، ۱۵/۶۲، ۷/۸۱) از عصاره در محیط کشت DMEM شرکت Gibco تهیه گردید. پس از تهیه رقت‌های مورد نظر از هر رقت µl ۱۰۰ به هر چاهک افزوده شده و میکروپلیت به مدت ۳۶ ساعت دیگر با شرایط قبلی گرماگذاری گردید (Gozari *et al.*, 2019c). پس از اتمام این مرحله µl ۵۰ محلول MTT (۵mg/ml) افزوده شد و به مدت ۳ ساعت با شرایط قبلی گرماگذاری گردید. به دنبال آن µl ۱۰۰ معرف حلال حاوی دی متیل سولفوکساید و متانول با نسبت ۴ به ۱ به هر چاهک افزوده شد. مقدار جذب نوری هر چاهک به‌وسیله میکروپلیت ریدر در طول موج nm ۵۵۰ ثبت گردید. این آزمون با سه تکرار انجام شد و فعالیت سیتوتوکسیک هر نمونه با معادله زیر محاسبه شد.

درصد فعالیت سیتوتوکسیک = $[(A_{test}) - (A_{Blank})/ (A_{control}) - (A_{Blank})] \times 100$

A_{test}: مقدار جذب نوری چاهک حاوی سلول تیمار شده

A_{Blank}: مقدار جذب نوری چاهک حاوی محیط کشت

$A_{control}$: مقدار جذب نوری چاهک حاوی سلول تیمار نشده

شناسایی اولیه متابولیت‌های استخراج شده از باکتری

به منظور غربالگری اولیه متابولیت‌های استخراج شده از باکتری از کروماتوگرافی لایه نازک و آشکارسازی با معرف Foline-Ciocalteu استفاده شد. عصاره متابولیت‌ها روی صفحه سیلیکاژل فلورسنت لکه‌گذاری گردید و با سیستم حلال کلروفرم: متانول ۱۰:۹۰ اجرا گردید. پس از اتمام کروماتوگرافی و خشک شدن صفحه، فرایند آشکارسازی به وسیله اسپری

[4] Microdilution
[5] Human Umbilical Vein Endothelial Cells
[6] Two fold dilution

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-01-29]
[DOR: 20.1001.1.23222751.1399.10.3.3.3]

نمودن معرف روی صفحه کروماتوگرافی انجام شد. با بررسی رنگ لکه‌های ایجاد شده و R_f[7] آن‌ها، حضور گروه‌های عاملی فنولی بررسی شد (Ashworth and Stahl, 2013).

شناسایی باکتری SC 190

جدایه باکتری بر اساس ویژگی‌های فنوتیپی شامل صفات مورفولوژیک، بیوشیمیایی، فیزیولوژیک و بر اساس ویژگی‌های ژنتیکی شامل تعیین توالی ژن 16s rRNA مورد شناسایی قرار گرفت. صفات مورفولوژیک ماکروسکوپی شامل شکل و رنگ میسلیوم ها، میزان رشد و تولید اسپور در محیط‌های استاندارد ISP[8] بررسی شد (Shirling and Gottlieb, 1966). ویژگی‌های بیوشیمیایی شامل مصرف منابع نیتروژن و کربن توسط باکتری مورد سنجش قرار گرفت و خصوصیات فیزیولوژیک شامل تولید پیگمان و رشد در دماهای مختلف ثبت گردید (Williams, 1989). برای شناسایی ژنتیکی ابتدا DNA ژنومی باکتری بر اساس روش CTAB[9] استخراج شد (Kieser, 2000). به منظور تکثیر توالی 16s rRNA از پرایمرهای عمومی 27F و 1492R استفاده شد (Desai *et al.*, 2016). چرخه‌های واکنش به صورت: دمای ۹۴ °C به مدت ۴ دقیقه، دمای ۹۴ °C به مدت ۱ دقیقه، دمای ۶۰ °C به مدت ۱ دقیقه و دمای ۷۲ °C به مدت ۲ دقیقه با اجرای ۳۵ چرخه و به دنبال آن دمای ۷۲ °C به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد (Gozari *et al.*, 2016a). ژن تکثیر شده پس از خالص‌سازی به شرکت ماکروژن کره جنوبی (Seoul, South Korea) ارسال و توالی دریافت شده با استفاده از برنامه Megablast در مقایسه با سویه‌های ثبت شده در پایگاه داده‌های NCBI[10] مورد آنالیز قرار گرفت (Zhang *et al.*, 2000). پس از انجام آنالیز توالی ژن 16s rRNA در بانک ژن NCBI با شماره دستیابی MH633705 ثبت شد.

آنالیز آماری

تمام آزمون‌ها با سه تکرار انجام شد. نتایج سنجش‌های زیستی به صورت میانگین ± خطای استاندارد (SE) ارائه شد. IC_{50} با سطح اطمینان ۹۵٪، با رگرسیون غیرخطی و با استفاده از نرم‌افزار Graphpad prism 6 (GraphPad Software, Inc.) محاسبه گردید.

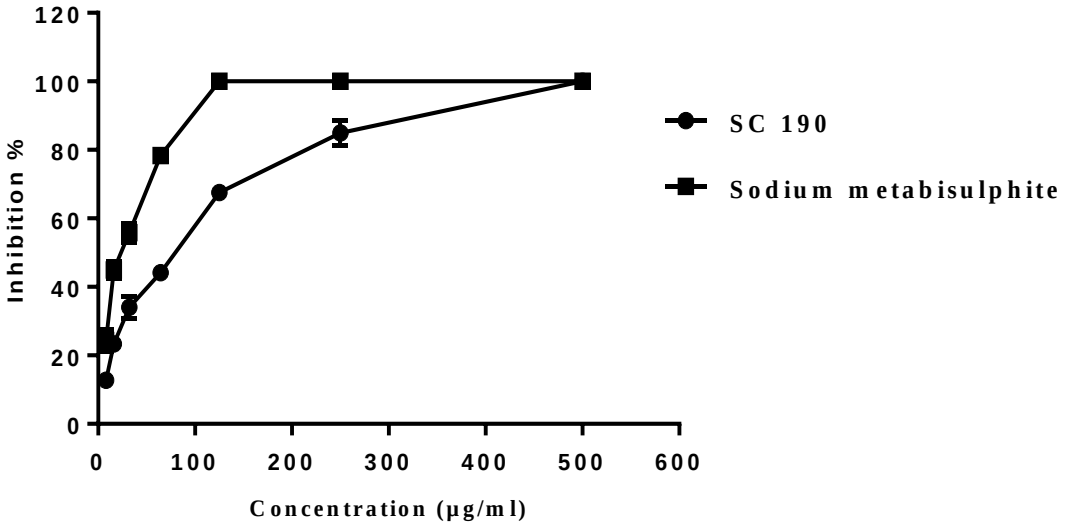
نتایــج

آزمون سنجش فعالیت آنزیم PPO استخراج شده از سفالوتوراکس میگوی سفید غربی نشان داد فعالیت کل آنزیم معادل ۳۴۱ Δ (OD/min/ml) و فعالیت ویژه آن معادل ۷۵/۳ (فعالیت کل/میلی‌گرم پروتئین) بود. بررسی تأثیر بازدارندگی متابولیت‌های ثانویه استخراج شده از باکتری *Streptomyces* sp. Strain SC 190 بر فعالیت آنزیم PPO نشان داد روند بازدارندگی آنزیم به صورت وابسته به دوز بود و با افزایش غلظت عصاره SC 190، درصد بازدارندگی افزایش نشان داد (شکل ۱). عصاره باکتریایی در غلظت ۵۰۰ µg/mL قادر به ایجاد بازدارندگی کامل فعالیت آنزیم بود درحالی‌که با کاهش غلظت عصاره، فعالیت بازدارندگی نیز کاهش یافت. محاسبات آماری نشان داد عصاره متابولیت‌های SC 190 توانست در غلظت ۶۰/۶۹±۳/۷۶ µg/mL به میزان ۵۰ درصد فعالیت آنزیمی را مهار نماید. مقایسه فعالیت بازدارندگی عصاره SC 190 با متابی سولفیت سدیم، بیانگر فعالیت کمتر متابولیت باکتری بود. به‌طوری که متابی سولفیت سدیم با IC_{50} به میزان ۲۱/۱۲±۱/۲۸ µg/mL فعالیت آنزیمی را مهار نموده و ترکیب متابی سولفیت سدیم در غلظت‌های ۵۰۰ µg/mL، ۲۵۰، ۱۲۵ فعالیت آنزیمی را به‌طور کامل متوقف کرد. سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانی نشان داد عصاره SC 190 قادر است با IC_{50} به مقدار ۴۵/۱۰ ± ۲/۱۴ µg/mL رادیکال‌های آزاد DPPH را مهار نماید. روند فعالیت آنتی‌اکسیدانی نیز از روند وابسته به دوز پیروی می‌کرد (شکل ۲). مقایسه فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره متابولیت‌های SC 190 با آسکوربیک اسید بیانگر فعالیت بیشتر آسکوربیک اسید بود. ارزیابی فعالیت

[7] Retardation Factor
[8] International Streptomyces Project
[9] Cetyl trimethylammonium bromide method
[10] National Centre for Biotechnology Information

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-01-29]
[DOR: 20.1001.1.23222751.1399.10.3.3.3]

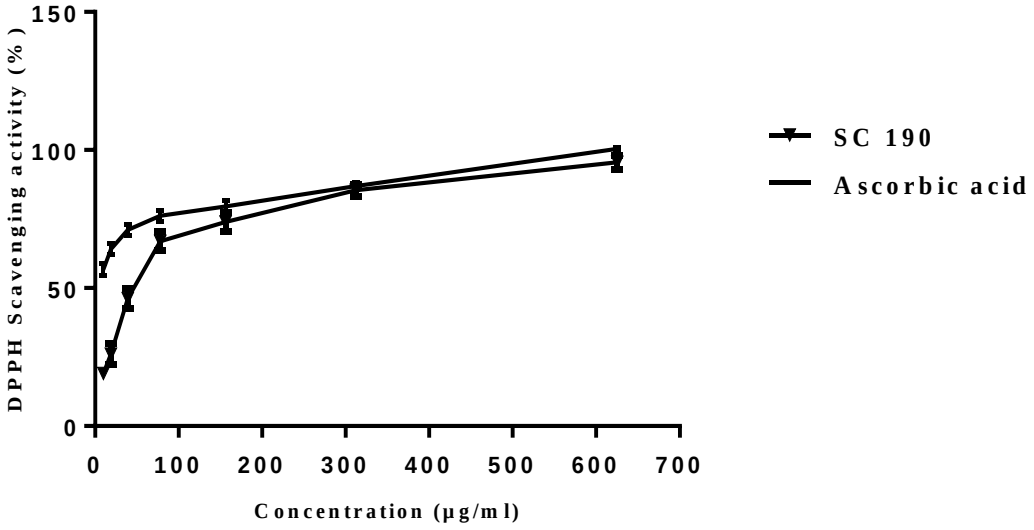
سیتوتوکسیک تأیید نمود عصاره متابولیت‌های SC 190 در مقابل رده سلولی انسانی HUVEC، در غلظت‌های کمتر از ۱ mg فعالیت سیتوتوکسیک نشان نداد. علاوه بر شمارش سلولی با روش رنگ سنجی، مشاهده میکروسکوپی نیز بیانگر عدم تغییر قابل ملاحظه در فراوانی و مورفولوژی سلول‌ها پس از انجام تیمار با عصاره متابولیت‌های SC 190 بود (شکل ۳). این نتایج بیانگر غیرسمی بودن عصاره متابولیت‌های باکتری SC 190 در برابر سلول‌های انسانی است. آزمون کروماتوگرافی لایه نازک نشان داد عصاره متابولیت‌های باکتری SC 190 از چهار جزء دارای جذب در طول موج پرتو فرابنفش تشکیل شده است. غربالگری شیمیایی این ترکیبات از نظر وجود ترکیبات فنولی در متابولیت‌های باکتریایی استخراج شده، تأیید نمود که ۳ جزء از ۴ جزء تفکیک شده حاوی ترکیباتی با گروه‌های عاملی فنولی بودند. فاکتور نگهداری (R_F) این ۳ جزء به ترتیب ۰/۳۳، ۰/۳۸ و ۰/۴۴ثبت گردید (شکل ۴). با توجه به فعالیت‌های بازدارندگی، آنتی‌اکسیدانی و عدم سمیت متابولیت‌های استخراج شده از باکتری SC 190 و به منظور تکمیل مطالعات، شناسایی باکتری با روش‌های پلی فازی صورت گرفت. نتایج آزمون‌های شناسایی مورفولوژیک نشان داد باکتری SC 190 دارای ویژگی‌های معین در محیط کشت شامل، رنگ میسلیوم و میزان رشد در محیط‌های کشت ISP مشابه جنس *Streptomyces* می‌باشد. مورفولوژی میکروسکوپی این جدایه بیانگر ایجاد آرایش اسپوری Rectiflexible توسط این باکتری بود. بررسی خصوصیات بیوشیمیایی نشان داد این جدایه قادر به تولید آنزیم‌های اکسیداز و کاتالاز است؛ در حالی که فاقد توانایی تولید آنزیم نیترات ردوکتاز و سولفید هیدروژن بود. بررسی مصرف منابع کربن دارای ارزش تشخیصی برای این جدایه نشان داد به جز قندهای لاکتوز و رافینوز، بقیه ترکیبات کربنی مورد آزمون توسط این باکتری متابولیزه گردید. ویژگی‌های فیزیولوژیک این باکتری نشان داد هیچ پیگمانی توسط این باکتری تولید نشده و در محدوده دمایی ۴۰ °C – ۱۰و محدوده pH از ۵ تا ۹ به عنوان دامنه مناسب برای رشد این باکتری تعیین گردید (جدول ۱). الکتروفورز توالی ژن 16s rRNA تکثیر شده، بیانگر تولید قطعه‌ای با طول حدود ۱۵۰۰ نوکلئوتید بود که ۱۴۸۱ نوکلئوتید را تعیین توالی نمود (شکل ۵). آنالیز Megablast بر اساس مقایسه توالی ژن 16s rRNA این باکتری با سویه‌های موجود در بانک ژن NCBI نشان داد جدایه SC 190 دارای همولوژی به میزان ۹۹٪ با سویه *Streptomyces cellulosae* می‌باشد.



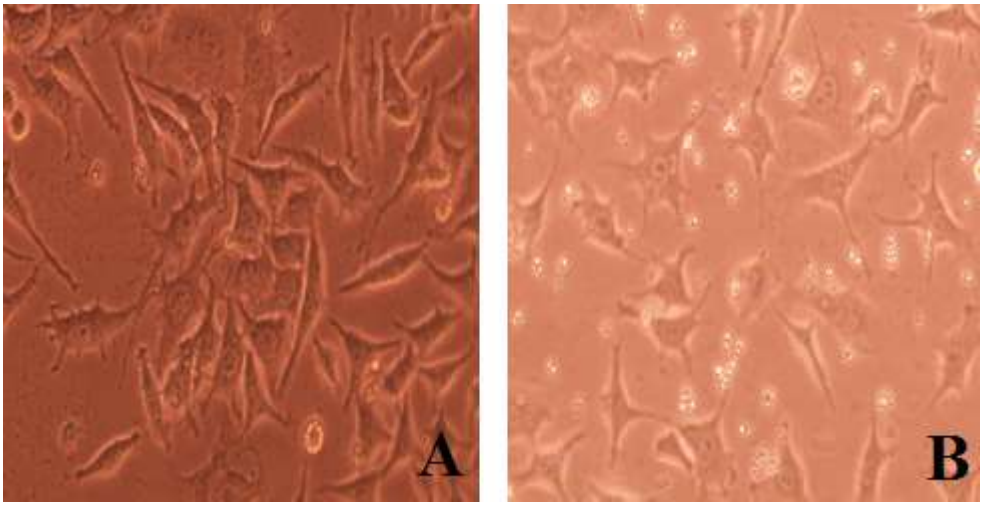
شکل ۱. تأثیر غلظت‌های متفاوت متابولیت SC 190 بر مهار آنزیم PPO استخراج شده از سفالوتوراکس میگو

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-01-29]

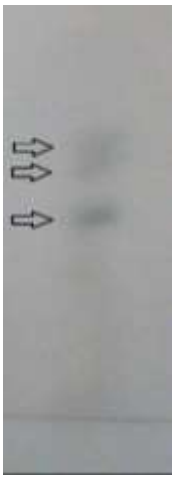
[DOR: 20.1001.1.23222751.1399.10.3.3.3]



شکل ۲. میزان مهار رادیکال آزاد DPPH توسط متابولیت‌های استخراج شده



شکل ۳. ارزیابی فعالیت سیتوتوکسیک متابولیت‌های باکتری بر رده سلولی HUVEC (A) سلول‌های موجود در چاهک کنترل سلول‌های تیمار شده (B) (با بزرگ‌نمایی 200X)



شکل ۴. غربالگری شیمیایی متابولیت‌های ثانویه تولید شده توسط جدایه SC 190, آشکارسازی شده با معرف Foline-Ciocalteu. لکه‌های حاوی ترکیبات فنولی با علامت پیکان نشان داده شده است.

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-01-29]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1399.10.3.3.3]

جدول ۱. ویژگی‌های مورفولوژیک، بیوشیمیایی و فیزیولوژیک جدایه SC 190

مشخصه		نتیجه	مشخصه	نتیجه
رنگ	میسلیوم رویشی	زرد	احیا نیترات	-
	میسلیوم هوایی	سفید	تولید اکسیداز	+
رشد و تولید اسپور روی محیط های کشت	ISP II	خوب	محدوده دمای رشد	۱۰- ۴۰ °C
	ISP III	خوب	محدوده pH رشد	۵-۸
	ISP IV	ضعیف	محدوده تحمل شوری	<۱۰%
	ISP V	خوب	مصرف منابع کربن: گلوکز	+
	ISP VI	خوب	فروکتوز	+
	ISP VII	خوب	زایلوز	+
	CDA	خوب	آرابینوز	+
	BA	خوب	رامنوز	+
	NA	خوب	سوکروز	+
مورفولوژی اسپور		Rectiflexible	رافینوز	-
پیگمان ملانوئیدی		-	گالاکتوز	+
پیگمان محلول		-	مانیتول	+
تولید سولفید هیدروژن		-	لاکتوز	-
تولید کاتالاز		+		

شکل ۵. ژن 16S rRNA تکثیر شده جدایه SC 190

بحث

با توجه به اهمیت عارضه ملانوزیس در افت کیفیت و تنزل بازارپسندی غذاهای دریایی به‌ویژه میگو، در سال‌های اخیر مطالعات مختلفی با هدف پیشگیری از این عارضه انجام شده است. نخستین گام این مطالعات استخراج آنزیم PPO از بافت میگو می‌باشد. از آنجا که این آنزیم در ارگانیسم‌های مختلف بر اساس ژن‌های بیوسنتز کننده دارای تنوع ساختاری می‌باشد استخراج آن از ارگانیسم هدف به منظور کارایی و کاربردی بودن مطالعه ضروری می‌باشد (Taranto *et al.*, 2017). علت

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-01-29]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1399.10.3.3.3]

انتخاب سفالوتوراکس به عنوان منبع استخراج آنزیم نتایج مطالعات مختلف در زمینه میزان بالای آنزیم PPO در این بافت بود (Dinçer *et al.*, 2015). به منظور استخراج و خالص‌سازی نسبی آنزیم از سولفات آمونیوم استفاده شد که موجب کاهش حلالیت پروتئین‌ها و رسوب‌گذاری آن‌ها گردیده و خلوص نسبی را ایجاد می‌نماید. البته به دلیل تداخل این ترکیب با آزمون سنجش آنزیم، باید آن را به‌وسیله دیالیز کردن یا نمک‌زدایی حذف نمود (Scopes, 2013). به سبب از بین رفتن بخش قابل ملاحظه‌ای از فعالیت آنزیم طی دیالیز (به دلیل طولانی بودن فرایند)، در مطالعه حاضر از ستون نمک‌زدایی استفاده شد. بررسی میزان بازدارندگی عصاره SC 190 نشان داد که این ترکیب با IC_{50} معادل ۶۰/۶۹ µg/mL توانمندی بالایی در ممانعت از فعالیت آنزیم PPO داشته است. اگرچه در مقایسه با متابی سولفیت سدیم (IC_{50} = ۲۱/۱۲ µg/mL) این ترکیب دارای قدرت مهارکنندگی کمتری بود اما نباید اثرات نامطلوب متابی سولفیت سدیم را از نظر دور داشت. متابی سولفیت سدیم و سایر ترکیبات دارای گروه سولفیت با مکانیسم‌های مختلفی مانند جلوگیری از پلیمریزه شدن رنگ‌دانه با اتصال بازگشت ناپذیر به کوئینون ها، تغییر ساختار پروتئین‌ها و احیاء کوئینون ها، فعالیت آنزیم PPO را مهار می‌نمایند. لیکن واکنش‌های آلرژیک ترکیبات سولفیتی بزرگ‌ترین ملاحظه در استفاده از آن‌ها می‌باشد (Yoo *et al.*, 2018). از این رو مطالعات به سمت استفاده از ترکیبات طبیعی غیرسمی متمرکز شده است. میزان تأثیر بازدارندگی متابولیت‌های استخراج شده با نتایج سایر مطالعات نیز قابل مقایسه می‌باشد. در یک مطالعه، Montero و همکارانش (۲۰۰۱) نشان دادند اسید کوژیک که دارای منشاء قارچی می‌باشد در غلظت ۱۵۰ µg/mL، به میزان ۸۰ درصد، از فعالیت آنزیم PPO استخراج شده از میگوی سفید غربی جلوگیری می‌کند. در مطالعه دیگری Nirmal و همکاران گزارش دادند که پودر عصاره دانه سوبابل (*Leucaena leucocephala*) حاوی ترکیب mimosine بوده که در غلظت ۳/۷ mM اثر بازدارندگی علیه PPO استخراج شده از میگوی سفید غربی دارد (Nirmal and Benjakul, 2011b).

نتایج مطالعه حاضر نشان داد متابولیت استخراج شده از باکتری SC 190 در غلظت‌های مورد استفاده برای سلول‌های طبیعی انسانی، کاملاً ایمن و غیرسمی بود. بنابراین برای سلامت مصرف‌کننده از این نظر هیچ‌گونه خطری ایجاد نمی‌کند. در سایر مطالعات نیز سمیت ترکیبات مورد مطالعه سنجیده شده و عدم سمیت ترکیبات mimosine و اسید کوژیک مورد تأیید قرار گرفته است. در مورد مکانیسم عمل بازدارندگی ترکیبات استخراج شده از باکتری SC 190 احتمالاً عصاره SC 190 برای اتصال به جایگاه فعال آنزیم PPO ، با سوبسترا رقابت می‌نماید. مطالعات نشان داده است که ترکیبات فنولی دارای توانایی اتصال به یون مس در جایگاه فعال آنزیم PPO می‌باشند و از طریق این مکانیسم قادر به اعمال فعالیت مهارکنندگی خود هستند (Nirmal and Benjakul, 2011a). با توجه به تأیید حضور گروه‌های عامل فنولی در عصاره مورد بررسی با استفاده از تکنیک غربالگری شیمیایی، می‌توان مکانیسم احتمالی بازدارندگی را، اتصال ترکیبات فنولی به جایگاه فعال آنزیم PPO پیشنهاد نمود (شکل ۴). نتایج شناسایی ژنتیکی جدایه SC 190 نشان داد این باکتری تشابه ژنتیکی به میزان ۹۹ درصد با گونه *Streptomyces cellulosae* داشته است. وجود مسیرهای بیوسنتزی و تولید ترکیبات فنولی در برخی سویه‌های متعلق به این گونه اثبات گردیده است (Rani *et al.*, 2018). با توجه به فاکتور نگهداری اجزای تفکیک شده می‌توان ماهیت نسبتاً قطبی ترکیبات فنولی موجود در عصاره SC 190 را تأیید نمود (شکل ۴). نتایج مطالعه حاضر نشان داد متابولیت استخراج شده، دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی قوی است (شکل ۲). اخیراً مطالعات بسیاری در زمینه افزودن غذاهای دریایی با آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی در طی فرآوری آن‌ها انجام شده و ترکیبات زیادی از قبیل رزماری و چای سبز نیز برای این منظور پیشنهاد شده است. آنتی اکسیدان‌های طبیعی موجب کاهش روند اکسیداسیون اسیدهای چرب می‌شوند (Kulawik *et al.*, 2013). همچنین برخی از ترکیبات آنتی اکسیدان تأثیر مهارکنندگی بر کاهش رشد باکتری‌ها دارند (Ozogul *et al.*, 2011). به همین دلیل اهمیت متابولیت استخراج شده از باکتری SC 190 به سبب فعالیت بازدارندگی آنزیم و فعالیت آنتی‌اکسیدانی، مضاعف می‌گردد. اگرچه قابل ذکر است فعالیت بازدارنده‌های آنزیمی در مقیاس آزمایشگاهی و سیستم‌های مدل، نمی‌تواند به‌طور کامل به شرایط طبیعی تعمیم داده شود. اما درک مکانیسم‌ها و دستیابی به این ترکیبات زیستی، می‌تواند امکان مقایسه کارایی آن‌ها را، با افزودنی‌های مختلف برای گونه‌های هدف متفاوت، فراهم کند و در یافتن عوامل جدید و کارآمد برای به تأخیر انداختن یا ممانعت از ملانوزیس مفید باشد. در نهایت نتایج این مطالعه توانمندی باکتری *Streptomyces* sp. Strain

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-01-29]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1399.10.3.3.3]

SC 190 جداسازی شده از خیار دریایی را، در تولید متابولیت‌های ثانویه بازدارنده فعالیت آنزیم PPO عامل ایجاد لکه سیاه، تأیید نمود. همچنین نشان داد متابولیت‌های ثانویه استخراج شده فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالایی در مهار رادیکال‌های آزاد DPPH داشته و اثر سمی علیه سلول‌های انسانی نداشتند. بنابراین افزودن متابولیت‌های استخراج شده می‌تواند به عنوان یک نگهدارنده بالقوه در فراوری میگوی سفید غربی برای مطالعات بیشتر در نظر گرفته شود.

منابــع

Ashworth, M.R.F., Stahl, E. 2013. Thin-layer chromatography: a laboratory handbook. Springer Science & Business Media.

Benjakul, S., Visessanguan, W., Tanaka, M. 2005. Properties of phenoloxidase isolated from the cephalothorax of kuruma prawn (*Penaeus japonicus*). Journal of Food Biochemistry. 29(5): 470-485.

Desai, P.P., Prabhurajeshwar, C., Kelmani Chandrakant, R. 2016. Molecular genotyping and antimicrobial activities of secondary metabolites from *Streptomyces* sp: taxonomy, extraction and purification. Journal of Biologically Active Products from Nature. 6(4): 282-298.

Dincer, T., Cadun, A., Aydın, I., Metin, C., Cakli, S. 2015. Determination of the tissue distribution of PPO on Caramote Prawn (*Melicertus kerathurus*, Forskal, 1755) and Jinga Shrimp (Metapenaeus affinis, H. Milne Edwards, 1837) Caught from Izmir. Journal of Aquatic Food Product Technology. 24(4): 378-385.

Encarnacion, A.B., Fagutao, F., Shozen, K.-i., Hirono, I., Ohshima, T. 2011. Biochemical intervention of ergothioneine-rich edible mushroom (*Flammulina velutipes*) extract inhibits melanosis in crab (*Chionoecetes japonicus*). Food Chemistry. 127(4): 1594-1599.

FAO. 2008. Fish and Fishery Products. Food Balance Sheets and Fish Contribution to Protein Intake, Food and Agriculture Organisation Rome, Italy.

Garcia-Molina, F., Penalver, M., Rodriguez-Lopez, J., Garcia-Canovas, F., Tudela, J. 2005. Enzymatic method with polyphenol oxidase for the determination of cysteine and N-acetylcysteine. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 53(16):6183-6189.

Gómez-Guillén, M.C., Martínez-Alvarez, Ó., Llamas, A., Montero, P. 2005. Melanosis inhibition and SO2 residual levels in shrimps (*Parapenaeus longirostris*) after different sulfite-based treatments. Journal of the Science of Food and Agriculture. 85(7): 1143-1148.

Gonçalves, A.A., de Oliveira, A.R.M. 2016. Melanosis in crustaceans: A review. LWT-Food Science and Technology. 65: 791-799.

Gozari, M., Bahador, N., Jassbi, A.R., Mortazavi, M., Eftekhar, E. 2018. Antioxidant and cytotoxic activities of metabolites produced by a new marine Streptomyces sp. isolated from the sea cucumber Holothuria leucospilota. Iranian Journal of Fisheries Sciences. 17(2): 413-426.

Gozari, M., Bahador, N., Jassbi, A.R., Mortazavi, M.S., Hamzehei, S., Eftekhar, E. 2019a. Isolation, distribution and evaluation of cytotoxic and antioxidant activity of cultivable actinobacteria from the Oman Sea sediments. Acta Oceanologica Sinica. 38(12): 84-90.

Gozari, M., Bahador, N., Mortazavi, M.S., Eftekhar, E., Jassbi, A.R. 2019b. An “olivomycin A” derivative from a sponge-associated *Streptomyces* sp. strain SP 85. 3. Biotech. 9(12): 439-451.

Gozari, M., Mortazavi, M., Bahador, N., Rabbaniha, M. 2016a. Isolation and screening of antibacterial and enzyme producing marine actinobacteria to approach probiotics against some pathogenic vibrios in shrimp Litopenaeus vannamei. Iranian Journal of Fisheries Sciences. 15(2): 630-644.

Gozari, M., Mortazavi, M., Ebrahimi, M., Dehghani, R. 2016b. Isolation, identification and evaluation of antimicrobial activity of Actinomycetes from marine sediments of Persian Gulf (Hormozgan Province). Iranian Scientific Fisheries Journal. 25(1): 81-94.

Gozari, M., Zaheri, A., Jahromi, S.T., Gozari, M., Karimzadeh, R. 2019c. Screening and characterization of marine actinomycetes from the northern Oman Sea sediments for cytotoxic and antimicrobial activity. International Microbiology. 22(4): 521-530.

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-01-29]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1399.10.3.3.3]

Heuer, H., Krsek, M., Baker, P., Smalla, K., Wellington, E. 1997. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. Applied and Environmental Microbiology. 63(8): 3233-3241.

Jukanti, A. 2017. Polyphenol Oxidases (PPOs) in Plants. Springer. pp. 33-56.

Kieser, T. 2000. Practical streptomyces genetics. John Innes Foundation, Norwich, England.

Kulawik, P., Ozogul, F., Glew, R., Ozogul, Y. 2013. Significance of antioxidants for seafood safety and human health. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 61(3): 475-491.

Leong, L., Shui, G. 2002. An investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets. Food Chemistry. 76(1): 69-75.

Montero, P., Avalos, A., Perez-Mateos, M. 2001. Characterization of polyphenoloxidase of prawns (Penaeus japonicus). Alternatives to inhibition: additives and high-pressure treatment. Food Chemistry. 75(3): 317-324.

Nirmal, N.P., Benjakul, S. 2011a. Inhibition of melanosis formation in Pacific white shrimp by the extract of lead (*Leucaena leucocephala*) seed. Food Chemistry. 128(2): 427-432.

Nirmal, N.P ,.Benjakul, S. 2011b. Inhibitory effect of mimosine on polyphenoloxidase from cephalothoraxes of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei)*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 59(18): 10256-10260.

Nirmal, N.P., Benjakul, S. 2012. Biochemical properties of polyphenoloxidase from the cephalothorax of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). International Aquatic Research. 4(1): 1-13.

Nurhayati, T., Ambarsari, L., Suhandana, M. 2015. Partial purification of polyphenoloxidase of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) from Indonesian waters. International Food Research Journal. 22(6): 2267-2273.

Ozogul, Y., Durmuş, M., Balıkcı, E., Ozogul, F., Ayas, D., Yazgan, H. 2011. The effects of the combination of freezing and the use of natural antioxidant technology on the quality of frozen sardine fillets (Sardinella aurita). International Journal of Food Science & Technology. 46(2): 236-242.

Peng, S., Zhao, M. 2009. Pharmaceutical bioassays: methods and applications. John Wiley & Sons.

Rani, R., Arora, S., Kaur, J., Manhas, R.K. 2018. Phenolic compounds as antioxidants and chemopreventive drugs from Streptomyces cellulosae strain TES17 isolated from rhizosphere of *Camellia sinensis*. BMC Complementary and Alternative Medicine. 18(1): 1-15.

Scopes, R.K. 2013. Protein purification: principles and practice. Springer Science & Business Media.

Shirling, E.T., Gottlieb, D. 1966. Methods for characterization of Streptomyces species1. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 16(3): 313-340.

Taranto, F., Pasqualone, A., Mangini, G., Tripodi, P., Miazzi, M.M., Pavan, S., Montemurro, C. 2017. Polyphenol oxidases in crops: biochemical, physiological and genetic aspects. International journal of molecular sciences. 18(2): 1-16.

Williams, S. 1989. Genus Streptomyces waksman and henrici 1943. BERGEY's Manual of Syntematic Bacteriology. 4: 2452-2492.

Yoo, J., Lim, Y.-M., Kim, H., Kim, E.-J., Lee, D.-H., Lee, B., Kim, P., Yu, S.D., Kim, H.-M., Yoon, B.-I. 2018. Potentiation of Sodium Metabisulfite Toxicity by Propylene Glycol in Both in Vitro and in Vivo Systems. Frontiers in Pharmacology. 9(2): 1-13.

Zhang, Z., Schwartz, S., Wagner, L., Miller, W. 2000. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. Journal of Computational Biology. 7(1-2): 203-214.

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-01-29]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1399.10.3.3.3]