



Investigation of antioxidant properties and the effect of ethanolic extract of cyanobacterial seaweed on the structure and activity of catalase enzyme

Somaye Shahraki^{1*} , Tahereh Shahraki², Abolghasem Moradgholi²,
Maliheh Khosravi³

¹ Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Zabol, Zabol, Iran, Email: somaye_shahraki@yahoo.com

² Horticulture Crops Research Department, Sistan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Zabol, Iran

³ Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Shahid Khiabani Agricultural and Natural Resources Education Center, Zahedan, Iran

Article type:

Research article

Abstract

Seaweeds contain various compounds that act as antioxidants and help protect cells against oxidative damage. In this study, the antioxidant properties and the effect of *Cyanothece* sp. microalgae extract on the structure and activity of bovine liver catalase (CAT) enzyme were evaluated using UV-Vis, fluorescence, and circular dichroism (CD) spectroscopy methods. Seaweed was collected in Shahrivar 1403 in its natural habitat on the coast of the Oman Sea and its extract was extracted using the maceration method in ethanol solvent. The antioxidant activity of the ethanol extract was determined using the DPPH method and showed that the antioxidant capacity of the ethanol extract (at a concentration of 250 µg/L) was 51.21 and 53.37% at incubation times of 30 and 60 minutes, respectively. Compared to the standard antioxidant vitamin C (inhibition percentage after 30 and 60 minutes of incubation time: 69.1 and 72.5%), the antioxidant capacity of the ethanol extract was significant. The ethanol extract was able to inhibit the catalytic activity of the catalase enzyme, so that in the presence of a concentration of 80 µg/L of the extract, the enzyme activity reached 14.56% of its initial activity. The results of fluorescence spectroscopy confirmed the presence of hydrophobic interactions between the catalase enzyme and the compounds present in the ethanol extract and showed that these compounds can quench the fluorescence emission of the enzyme with the help of a dynamic quenching mechanism. During the interaction process between the extract and the compounds present in the ethanol extract, the secondary structure of catalase changed and the amounts of alpha helices and beta sheets decreased;

Article history

Received: 2025.05.22

Revised: 2025.06.21

Accepted: 2025.06.24

Keywords

Extraction

Microalgae

Cyanothece sp.

Catalase enzyme

Antioxidant

Cite this article as: Shahraki, S., Shahraki, T., Moradgholi, A.Gh., Khosravi, M. (2025). Investigation of antioxidant properties and the effect of ethanolic extract of cyanobacterial seaweed on the structure and activity of catalase enzyme. *Eco-phytochemical Journal of Medicinal Plants*, 13(2): 57-73.



©The author(s)

Publisher: Islamic Azad University, Gorgan branch



<https://doi.org/10.71847/ejmp.2025.1209985>

بررسی خواص آنتی اکسیدانی و تاثیر عصاره اتانولی ریز جلبک *Cyanotheca* sp. بر ساختار و فعالیت آنزیم کاتالاز

سمیه شهرکی^{۱*}، طاهره شهرکی^۲، ابوالقاسم مرادقلی^۳، ملیحه خسروی^۳

^۱ گروه شیمی، دانشکده علوم، دانشگاه زابل، زابل، ایران، رایانامه: somaye_shahraki@yahoo.com

^۲ بخش تحقیقات زراعی و باغی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی سیستان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، زابل، ایران

^۳ سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مرکز آموزش کشاورزی و منابع طبیعی شهید خيابانیان، زاهدان، ایران

نوع مقاله:	چکیده
مقاله پژوهشی	ترکیبات متنوع موجود در جلبک‌های دریایی، دارای خاصیت آنتی اکسیدانی بوده و نقش مؤثری در حفاظت از سلول‌ها در برابر صدمات ناشی از فرآیندهای اکسیداتیو ایفا می‌کنند. در این مطالعه، ویژگی‌های آنتی اکسیدانی و اثر عصاره‌ی اتانولی [ریز] جلبک <i>Cyanotheca</i> sp. بر ساختار و فعالیت آنزیم کاتالاز کبد گاوی (CAT) با بهره‌گیری از روش‌های طیف‌سنجی فرابنفش-مرئی (UV-Vis)، فلورسانس و دورنگ‌نمایی دورانی (CD) مورد بررسی قرار گرفت. ریز جلبک <i>Cyanotheca</i> sp. در شهریور ۱۴۰۳ در رویشگاه طبیعی سواحل دریای عمان جمع‌آوری و عصاره آن با استفاده از روش ماسراسیون در حلال اتانول استخراج گردید. فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره اتانولی از طریق آزمون مهار رادیکال آزاد DPPH مورد ارزیابی قرار گرفت و نشان داد که ظرفیت آنتی اکسیدانی عصاره اتانولی (در غلظت ۲۵۰ میکرو گرم بر لیتر) در زمان انکوباسیون ۳۰ و ۶۰ دقیقه به ترتیب ۵۱/۲۱ و ۵۳/۳۷٪ است. در مقایسه با آنتی اکسیدان استاندارد ویتامین C (درصد مهار پس از ۳۰ و ۶۰ دقیقه زمان انکوباسیون: ۶۹/۱ و ۷۲/۵٪) ظرفیت آنتی اکسیدانی عصاره اتانولی قابل توجه بود. عصاره اتانولی توانست فعالیت کاتالاستی آنزیم کاتالاز را مهار کند بطوریکه در حضور غلظت ۸۰ میکرو گرم بر لیتر عصاره، فعالیت آنزیم به ۵۶/۱۴٪ از فعالیت اولیه خود رسید. نتایج طیف‌سنجی فلورسانس وجود برهم‌کنش‌های هیدروفوب بین آنزیم کاتالاز و ترکیبات موجود در عصاره اتانولی را تایید کرد و نشان داد که این ترکیبات می‌توانند نشر فلورسانس آنزیم را به کمک مکانیسم خاموش‌سازی از نوع پویا خاموش نمایند. طی فرایند برهم‌کنش میان عصاره و ترکیبات موجود در عصاره اتانولی، ساختار دوم کاتالاز تغییر کرد و مقادیر مارپیچ آلفا و صفحات بتا کاهش یافت.
تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۳/۰۱	
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۴/۰۴/۰۱	
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۴/۰۴	
واژه‌های کلیدی:	
عصاره گیری	
ریز جلبک <i>Cyanotheca</i> sp.	
آنزیم کاتالاز	
آنتی اکسیدان	

استناد: شهرکی، سمیه؛ شهرکی، طاهره؛ مرادقلی، ابوالقاسم؛ خسروی، ملیحه. (۱۴۰۴). بررسی خواص آنتی اکسیدانی و تاثیر عصاره اتانولی ریز جلبک *Cyanotheca* sp. بر ساختار و فعالیت آنزیم کاتالاز. فصلنامه اکوفیتوشیمی گیاهان دارویی،

۵۷-۷۳، (۲) ۱۳

مقدمه

جلبک ها موجوداتی با قابلیت فتوسنتز می باشند که دارای اشکال متنوع تک سلولی تا چند سلولی بوده و در دو گروه میکروجلبکها و ماکروجلبکها تقسیم بندی می شوند. اغلب میکروجلبکها مانند فیتوپلانکتون به طور معلق در آب زنده می مانند، درحالی که ماکروجلبکها که معمولاً به آن ها جلبک دریایی نیز گفته می شود (Mendili & Khadhri, 2025)، ارگانیسم هایی گیاه مانند هستند که ابعاد آنها از چند سانتیمتر تا چندین متر می رسد. جلبک ها به عنوان یکی از منابع طبیعی مهم، قادر به تولید ترکیبات جدیدی با خاصیت آنتی اکسیدانی قابل توجه هستند. برخی از جلبکها در زیستگاه های پیچیده ای زندگی می کنند که تحت شرایط شدید محیطی از قبیل شوری، دما، مواد مغذی، تابش اشعه ماورابنفش و غیره، قرار دارند. برای زنده ماندن در این شرایط نامطلوب، آنها باید با تولید متابولیت های ثانویه متنوع، که در موجودات دیگر یافت نمی شوند، به سرعت سازگار شوند. در بین ترکیبات گوناگون موجود در جلبک ها، به نظر می رسد آنتی اکسیدان ها از جمله مهم ترین موادی باشند که بیشترین توجه را از سوی صنایع مختلف، به ویژه صنایع آرایشی-بهداشتی و داروسازی، به خود جلب کرده اند. (Anburaj et al., 2024).

سیانوباکتری ها (Cyanobacteria)، که با نام سیانوفیت ها نیز شناخته می شوند، به عنوان شاخه ای از باکتری های گرم منفی طبقه بندی می شوند. آن ها اغلب اتوتروف بوده و حاوی رنگدانه های فتوسنتزی مختلفی مانند کاروتنوئیدها، فیکوبیلین و انواع مختلف کلروفیل هستند و با کمک این رنگدانه ها نور را جذب کرده و در نهایت، فتوسنتز می کنند. آنها در طیف وسیعی از زیستگاه های طبیعی یافت میشوند و برخی توانایی تثبیت نیتروژن را دارند. این امر یکی از ویژگی های مهم در بعضی از اکوسیستمها مانند مزارع

برنج و اقیانوسها است (Carr & Whitton, 1982). این میکروارگانیسم ها معمولاً به صورت تک سلولی و در برخی موارد چندسلولی ساده مشاهده می شوند. سرعت بالای رشد، توانایی سازگاری با شرایط نامساعد محیطی نظیر آب های شور و مناطق خشک، قابلیت استفاده از فاضلاب های مختلف به عنوان منبع تغذیه، جذب دی اکسیدکربن از گازهای خروجی نیروگاه های سوخت فسیلی، و نیز تولید ترکیبات جانبی با ارزش از جمله ویژگی ها و مزایای برجسته ی بهره گیری از سیانوباکتری ها محسوب می شود (Hu et al., 2008). سیانوباکتری ها برای رشد به منابعی چون نور، دی اکسیدکربن، نیتروژن، فسفر و پتاسیم نیازمند بوده و قادرند در مدت زمان کوتاه، مقادیر قابل توجهی از لیپیدها، کربوهیدرات ها و پروتئین ها را به عنوان فرآورده های متابولیکی تولید کنند (Mata et al., 2010). تولید هیدروژن مولکولی، ترکیبات زیستی و ترکیبات دارویی ضدسرطان مانند دولاستین و میکروسیستین ۲ از ویژگیهای مهم و کاربردی آنها در زیست فناوری میکروبی است. همچنین مواد پروتئینی به عنوان غذا از این میکروارگانیسمها خصوصاً اسپیرولینا ۳ بدست آمده است (Carr & Whitton, 1982). سیانوباکتری ها در مقایسه با سایر میکروارگانیسم ها از مزایای قابل توجهی برخوردارند؛ از جمله داشتن حجم لعاب بیشتر، تمایل اتصال قوی تر، سطح مقطع بزرگ تر و نیاز به مواد غذایی ساده تر، که این ویژگی ها امکان کشت آسان و در مقیاس بالا را در شرایط آزمایشگاهی فراهم می سازد.

از جمله عوامل اصلی ایجاد بیماری در بدن، اکسیدان ها یا همان رادیکال های آزاد محسوب می شوند (Small et al., 2012). این ترکیبات به علت وجود یک الکترون منفرد، از واکنش پذیری بسیار بالایی برخوردار بوده و می توانند در بدن به بروز بیماری هایی چون سرطان منجر شوند. آنتی اکسیدان ها

از جمله عوامل محافظتی سلولی محسوب می‌شوند که با مهار اکسیدان‌ها از تخریب سلول‌ها و بروز آسیب‌های مزمن نظیر سرطان، بیماری‌های قلبی و دیابت جلوگیری می‌کنند (Jelic et al., 2021). از جمله آنتی اکسیدان‌های شاخص می‌توان به ویتامین‌های C و E و همچنین بتاکاروتن اشاره نمود (Soleimani, 2022). مصرف متعادل آنتی اکسیدان‌ها، از جمله ویتامین C، بر اساس شواهد علمی فزاینده، می‌تواند اثربخشی داروهای شیمی‌درمانی را افزایش دهد (Zhang et al., 2001). با توجه به نقش اساسی آنتی اکسیدان‌ها در بهبود وضعیت سلامت، تقویت عملکرد سیستم ایمنی و پیشگیری از بروز بیماری‌ها، تحقیقات گسترده‌ای به منظور شناسایی ترکیباتی با توانایی آنتی اکسیدانی بالا انجام گرفته است؛ به گونه‌ای که تاکنون انواع متعددی از جلبک‌های دریایی برای ارزیابی ظرفیت مهار رادیکال‌های آزاد مورد مطالعه قرار گرفته‌اند، از جمله می‌توان به *Chondrus crispus*، *Mastocarpus stellatus*، *Taonia atomaria*، *Laminaria japonica*، *Cystoseira* sp جلبک قرمز و غیره اشاره کرد (Soleimani, 2022). با این حال، جست‌وجو برای شناسایی موادی با طیف وسیع‌تری از ویژگی‌ها همچنان در حال انجام است.

ترکیبات شیمیایی مورد نظر به عنوان کاندیدهای درمانی باید قابلیت جابه‌جایی در سیستم گردش خون و دستیابی به اندام هدف را داشته باشند. برای تحقق این فرایند معمولاً از حامل‌های دارویی استفاده می‌شود. از مهم‌ترین حامل‌هایی که به طور طبیعی و به مقدار قابل توجهی در بدن وجود دارند، می‌توان به پروتئین‌ها و آنزیم‌ها اشاره کرد. یکی از مهمترین آنزیم‌های بدن، کاتالاز است که اغلب از کبد ترشح می‌شود (K. Shahraki et al., 2024). این آنزیم از چهار گروه پورفیرین حاوی آهن تشکیل شده است که توانایی واکنش با پراکسید هیدروژن را داشته و آن

را به آب و اکسیژن تجزیه می‌کند. حالت ایده‌آل pH کاتالاز انسان هفت است (Shahraki et al., 2024). هر زیر واحد کاتالاز دارای ۵۲۷ باقی مانده و یک Fe^{+3} است. داروها و مواد مختلف می‌توانند با کاتالاز برهمکنش دهند که در نتیجه‌ی آن ساختار و یا فعالیت آنزیم دچار تغییراتی می‌شود (Shahraki et al., 2025). در نتیجه، درک جامع‌تر از چگونگی تعامل مولکول‌ها با این آنزیم می‌تواند زمینه‌ساز دستیابی به دیدگاهی گسترده‌تر و هدفمندتر در به‌کارگیری ترکیبات دارویی نوین باشد.

با توجه به مطالب ارائه شده در بالا، در این تحقیق ریزجلبک *Cyanothece* sp. که در مناطق جنوبی استان سیستان و بلوچستان و سواحل دریای عمان رشد میکند انتخاب شده و عصاره اتانولی آن استخراج و خواص آنتی اکسیدانی آن مورد بررسی قرار گرفت. در ادامه برهم کنش عصاره اتانولی این ریزجلبک با آنزیم کاتالاز کبد گاو (CAT) به کمک طیف‌سنجی UV-Vis و فلورسانس انجام و تغییرات در فعالیت آنزیمی و ساختار این آنزیم آنتی اکسیدان مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

جمع آوری نمونه‌ها: جلبک دریایی مورد استفاده در این پژوهش در شهریورماه سال ۱۴۰۳ از ریشگاه‌های طبیعی سواحل دریای عمان جمع‌آوری شد. شناسایی گونه مورد نظر، با مقایسه ویژگی‌های مورفولوژیک آن با منابع و کتب مرجع، توسط کارشناس بخش گیاه‌پزشکی مرکز تحقیقات، آموزش کشاورزی و منابع طبیعی زاهدان مورد تأیید قرار گرفت. برای آماده‌سازی پودر جلبک، نمونه‌های برگ جمع‌آوری شده در شرایط طبیعی محیط و با استفاده از جریان هوا به مدت یک هفته در سایه خشک و سپس آسیاب شدند.

عصاره‌گیری به روش ماسراسیون در حلال اتانول:
برای این هدف، مقدار ۱۲,۵ گرم از پودر جلبک دریایی توزین شد و سپس ۵۰ میلی‌لیتر از حلال منتخب (اتانول) به آن افزوده گردید. نمونه‌ی حاصل به مدت ۷۲ ساعت در دمای اتاق تحت هم‌زدن مداوم توسط همزن مغناطیسی قرار گرفت.

تهیه عصاره گیاه با غلظت 1 ppm: محلول اتانولی تهیه‌شده در بخش پیشین در دمای ۶۰ درجه سلسیوس در آن کاملاً خشک گردید. پس از آن، مقدار ۰/۰۰۵ گرم از پودر خشک جلبک دریایی در یک میلی‌لیتر حلال اتانول حل شد و به‌عنوان محلول مادر مورد استفاده قرار گرفت. برای آماده‌سازی محلول کاری، مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از محلول مادر با اتانول به حجم نهایی یک میلی‌لیتر رسانده شد تا محلولی با غلظت ۱ قسمت در میلیون (1 ppm) حاصل گردد.

تعیین فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره جلبک دریایی:
برای انجام آزمایش، رادیکال آزاد DPPH در حلال اتانول مورد استفاده قرار گرفت. در گام نخست، مقدار ۰/۰۰۱ گرم از رادیکال آزاد DPPH در حلال مذکور حل شد و حجم نهایی محلول به ۲۵ میلی‌لیتر رسانده شد. سپس به ۳/۹ میلی‌لیتر از این محلول، ۰/۱ میلی‌لیتر از محلول حاوی عصاره جلبک دریایی افزوده گردید و مخلوط حاصل جهت تکمیل واکنش در تاریکی نگهداری شد. در پایان، میزان تغییرات جذب آن در ناحیه‌ی UV-Vis پس از گذشت دو بازه زمانی ۳۰ و ۶۰ دقیقه، در طول موج ۵۷۲ نانومتر اندازه‌گیری و ثبت گردید. برای محاسبه میزان مهار رادیکال آزاد، از رابطه‌ی زیر استفاده شد (Shahraki & Shahraki, 2018):

$$\%I = \left(A_{blank} - \frac{A_{sample}}{A_{blank}} \right) \times 100$$

در این رابطه A_{sample} و A_{blank} به‌ترتیب نشان‌دهنده جذب نوری محلول شاهد (شامل تمامی مواد

واکنش‌دهنده به‌جز عصاره) و جذب محلول محتوی عصاره در حلال اتانول هستند. داده‌های حاصل از این آزمایش با آنتی‌اکسیدان استاندارد، یعنی اسید آسکوربیک (ویتامین C)، مورد مقایسه قرار گرفتند.

برهم‌کنش با کاتالاز: برای کنترل و ثبات pH در محدوده‌ی ۷/۴ در مطالعات مربوط به برهم‌کنش عصاره‌ی اتانولی با آنزیم کاتالاز، از بافر تریس (تریس هیدروکسی‌متیل آمینومتان) استفاده شد (Shahraki et al., 2016). برای تهیه محلول بافر مادر، مقدار ۳/۲ گرم از بافر تریس در ۲۵۰ میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر حل شد. از این محلول به‌عنوان بافر مادر استفاده گردید. به‌منظور تهیه بافر کار، ۱۰۰ میلی‌لیتر از بافر مادر با ۳۰۰ میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر مخلوط شد و محلول حاصل با افزودن تدریجی HCl یک مولار تا رسیدن pH به حدود ۷/۴ تنظیم گردید. سپس حجم نهایی محلول با افزودن آب دو بار تقطیر به ۵۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد و جهت نگهداری در یخچال قرار گرفت. برای تهیه محلول کاتالاز، ۲۵ میلی‌گرم از آنزیم در ۵ میلی‌لیتر از محلول بافر کار حل گردید. مخلوط به‌منظور یکنواخت‌سازی در یخچال و به‌مدت ۲۴ ساعت نگهداری شد.

طیف‌سنجی UV-Vis: در سال‌های اخیر، استفاده از طیف‌سنجی مرئی فرابنفش به‌منظور بررسی برهم‌کنش پروتئین‌ها با ترکیبات گوناگون مورد توجه و مطالعه گسترده قرار گرفته است. برای بررسی این نوع برهم‌کنش‌ها، طیف‌های جذبی محلول پروتئین-عصاره با استفاده از طیف‌سنج UV-Visible در محدوده طول موج ۲۰۰ تا ۵۰۰ نانومتر ثبت شدند. این بررسی غلظت کاتالاز ۳/۰ میکرومولار و غلظت عصاره اتانولی در محدوده ۱۶۵ ppm الی ۰/۱ بود.

طیف‌سنجی فلورسانس: اندازه‌گیری فلورسانس در گستره‌ی طول موجی ۳۰۰ تا ۵۰۰ نانومتر انجام گرفت و طیف‌های حاصل در سه دمای مختلف ۳۰۳، ۳۱۰ و

۳۱۷ کلون ثبت گردید. طیف‌های فلورسانس پروتئین تنها با غلظت ثابت (۳/۰ میکرومولار) و در غلظت‌های مختلفی از عصاره (۱۶۵ ppm الی ۰/۱) در طول موج تهییجی ۲۸۵ نانومتر و بیشینه طول موج نشر ۳۴۸ nm ثبت شدند.

خاموش‌سازی فلورسانس از طریق دو مکانیسم متمایز قابل وقوع است؛ این دو مکانیسم شامل خاموش‌سازی ایستا (Static quenching) و خاموش‌سازی پویا (Dynamic quenching) هستند. خاموش‌سازی ایستا به دلیل تشکیل کمپلکس حالت پایه بین فلوروفور و خاموش‌کننده است و خاموش‌سازی پویا نتیجه برخورد بین فلوروفور و خاموش‌کننده می‌باشد (Wu et al., 2019). برای بررسی خاموش‌سازی ایجاد شده توسط عصاره از معادله استرن-ولمر (۱) استفاده شد (Eftink & Ghiron, 1981):

$$\frac{F}{F_0} = 1 + K_{SV}[Q] = 1 + K_q\tau_0[Q] \quad (۱)$$

در این معادله، F و F_0 به ترتیب شدت‌های فلورسانس در غیاب و حضور عصاره اتانولی ریزجلبک *Cyanotheca* sp. و k_q ثابت سرعت خاموش‌سازی عصاره-پروتئین، K_{SV} ثابت سرعت خاموش‌سازی استرن-ولمر، τ_0 مدت زمان عمر پروتئین بدون عصاره و $[Q]$ غلظت خاموش‌کننده (عصاره) است و میزان در دسترس بودن فلوروفورها در برابر خاموش‌کننده به اندازه و بار الکتریکی آن بستگی دارد. از آنجا که در فرآیند خاموش‌سازی تنها بخشی از برخورد‌های بین مولکولی مؤثرند، ثابت سرعت خاموشی باید از طریق داده‌های تجربی تعیین گردد.

با توجه به رابطه $K_{SV} = k_q\tau_0$ زمان عمر فلورسانس تریپتوفان در کاتالاز حدود 10^{-8} ثانیه است. ثابت سرعت خاموش‌سازی میان عصاره و پروتئین بر

اساس معادله فوق قابل برآورد است. افزون بر این، از تحلیل خاموش‌سازی فلورسانس می‌توان برای تعیین سایر پارامترها از جمله ثابت‌های پیوند (K) و تعداد جایگاه‌های اتصال ترکیبات فعال عصاره به آنزیم کاتالاز (n) بهره گرفت (معادله ۲):

$$\log \frac{(F_0-F)}{F} = \log K + n \log [Q] \quad (۲)$$

تعیین پارامترهای ترمودینامیکی: پارامترهای ترمودینامیکی شامل انرژی آزاد گیبس (ΔG°)، تغییر آنتالپی (ΔH°) و تغییر آنتروپی (ΔS°) هستند که نوع برهم‌کنش را می‌توان بر اساس علامت و مقدار آن‌ها تفسیر نمود. این پارامترها با استفاده از معادلات (۳) و (۴) و از طریق ترسیم منحنی $\ln K$ در برابر $1/T$ بر اساس معادله وانت‌هوف محاسبه گردیدند.

$$\ln K = -\frac{\Delta H^\circ}{RT} + \frac{\Delta S^\circ}{R} \quad (۳)$$

$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ \quad (۴)$$

طیف‌سنجی فلورسانس همزمان: برهم‌کنش میان پروتئین و مولکول‌های حاضر در محیط اطراف آن، از جمله ترکیبات فعال موجود در عصاره اتانولی ریزجلبک *Cyanotheca* sp. می‌تواند موجب تغییرات جزئی در قطبیت فلوروفورهای پروتئینی نظیر تریپتوفان و تیروزین گردد. برای انجام این اندازه‌گیری، اختلاف طول‌موج بین تحریک و نشر به ترتیب برای تیروزین ۱۵ نانومتر و برای تریپتوفان ۶۰ نانومتر در نظر گرفته شد. همچنین شکاف باندهای تحریک و نشر در مقدار ثابتی برابر با ۵ نانومتر تنظیم شدند.

دورنگ‌نمایی دروانی (CD): با این آزمایش تغییرساختارهای دوم آنزیم کاتالاز در غیاب و در حضور عصاره اتانولی جلبک دریایی در دمای محیط بررسی شد. غلظت آنزیم مورد نیاز برای این مطالعه ۳ میکرومولار بود و تغییر در ساختار پروتئین در اثر

برهم‌کنش با عصاره پس از سه دقیقه انکوباسیون بررسی شد.

مطالعه تغییرات خواص کاتالستی آنزیم کاتالاز:
فعالیت آنزیم کاتالاز در شرایط دارای و فاقد عصاره اتانولی ریزجلبک *Cyanotheca* sp. با استفاده از طیف‌سنجی UV-Vis مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه، سرعت تجزیه‌ی مولکول H_2O_2 به‌وسیله‌ی آنزیم کاتالاز در حضور و عدم حضور عصاره مذکور برآورد شد. کاهش جذب در طول موج ۲۴۰ نانومتر که هم‌زمان با تبدیل H_2O_2 به آب و اکسیژن رخ می‌دهد، به‌عنوان شاخصی برای سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز در فرایند کاتالیز واکنش مورد استفاده قرار گرفت.

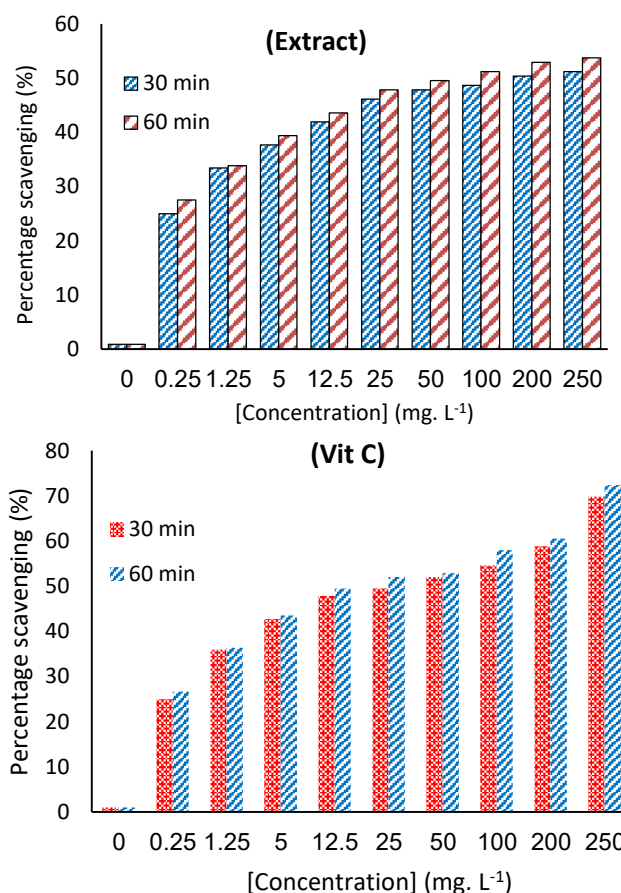
نتایج

بررسی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی عصاره اتانولی: در میان سازوکارهای مختلف، مهم‌ترین مکانیسم آنتی‌اکسیدان‌ها، خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد است، که این فرایند با عنوان فعالیت آنتی‌اکسیدانی مورد ارزیابی قرار می‌گیرد. برای سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانی، روش‌های متعددی به کار گرفته می‌شود که یکی از روش‌های پرکاربرد، آزمون مبتنی بر رادیکال آزاد 2,2-دی‌فنیل-۱-پیکریل‌هیدرازیل (DPPH) است. ترکیب DPPH دارای یک رادیکال آزاد نیتروژن بوده و به‌طور گسترده برای ارزیابی ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی ترکیبات مختلف استفاده می‌شود. در پژوهش حاضر، خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصاره اتانولی ریزجلبک *Cyanotheca* sp. با به‌کارگیری این روش اندازه‌گیری شد (شکل ۱). همچنین، فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره با آنتی‌اکسیدان استاندارد (ویتامین C) مقایسه گردید. مکانیسم عملکرد این واکنش اساساً به توانایی ترکیب در واگذاری الکترون یا اتم هیدروژن به رادیکال

DPPH وابسته است، که در نتیجه‌ی آن، رهاسازی هیدروژن سبب تغییر رنگ محلول از بنفش به زرد می‌گردد (Kabeer et al., 2020). نتایج نشان داد که عصاره اتانولی ریزجلبک *Cyanotheca* sp. ظرفیت آنتی‌اکسیدانی قابل توجهی دارد. ظرفیت آنتی‌اکسیدانی عصاره اتانولی (در غلظت ۲۵۰ میلی گرم بر لیتر) در زمان انکوباسیون ۳۰ و ۶۰ دقیقه به ترتیب ۵۱/۲۱ و ۵۳/۳۷٪ بدست آمد. در مقایسه با آنتی‌اکسیدان استاندارد ویتامین C (درصد مهار: ۶۹/۱ و ۷۲/۵٪ پس از ۳۰ و ۶۰ دقیقه زمان انکوباسیون) ظرفیت آنتی-اکسیدانی عصاره اتانولی قابل توجه است. همان‌طور که در تحقیقات گذشته گزارش شده است (Nouri et al., 2021) وجود گروه‌های عاملی مانند گروه‌های هیدروکسیل و حلقه‌های آروماتیک می‌تواند به مهار تک الکترون رادیکال‌ها کمک کند. در عصاره‌ی اغلب جلبک‌های دریایی رنگدانه‌هایی مانند فیکوسیانین حضور دارد. با توجه به حضور گروه‌های فنولیک در ساختار شیمیایی فیکوسیانین، این ترکیب از توان آنتی‌اکسیدانی قابل توجهی برخوردار است. علاوه بر این، بر اساس نمودار فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره اتانولی، می‌توان دریافت که میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره وابستگی مستقیم به غلظت و زمان دارد، به‌گونه‌ای که با افزایش زمان، درصد مهار رادیکال‌های آزاد توسط عصاره اتانولی افزایش می‌یابد. خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصاره اتانولی ریزجلبک *Cyanotheca* sp. در مقایسه با بسیاری از گیاهان دارویی و ترکیبات مشتق شده از گیاهان، قابل مقایسه است. به عنوان مثال برای داروی گیاهی نوروسیل (در غلظت ۱۰۰۰ میلی گرم بر لیتر)، بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی در حدود ۹۱٪ مهار گزارش شده است. خاصیت آنتی‌اکسیدانی گیاه دارویی گلپر (رویش در شمال غرب ایران، ژنوتیپ مشکین شهر) ۶۷/۰۹ میکرومول آهن بر گرم وزن

خشک بدست آمده است (مریم و محمد، ۲۰۱۸). ظرفیت آنتی اکسیدانی برگ گل راعی در رویشگاه بروجرد و همدان به ترتیب ۶۷ و ۶۶ میکروگرم بر لیتر مشاهده شده است (شقاقی و همکاران، ۲۰۲۱).

موحد و همکارانش مقدار IC_{50} را برای گیاه نعناع (رویشگاه مشهد) برابر با ۲۱۹ میکروگرم بر میلی لیتر بدست آوردند (غلامعلی و معصومه، ۲۰۰۹).



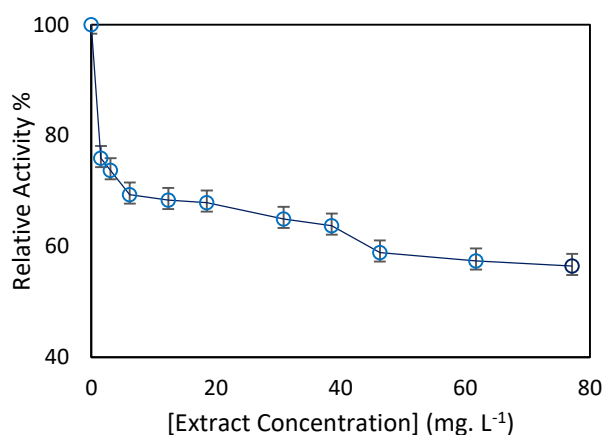
شکل ۱: میزان درصد فعالیت آنتی اکسیدانی مقادیر مختلف عصاره اتانولی ریزجلبک *Cyanothece* sp. و ویتامین C در مقابل رادیکال آزاد DPPH در زمان انکوباسیون ۳۰ و ۶۰ دقیقه

اتانولی تحت شرایط کنترل شده آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس گزارش های پیشین، در صورتی که غلظت H_2O_2 از مقدار $10^{-3} \times 55/5$ مولار فراتر رود، پدیده ی غیرفعال شدن خودبه خودی آنزیم رخ می دهد. از این رو، مقدار $10^{-3} \times 55/5$ مولار به عنوان غلظت بهینه ی سوستر در این تحقیق در نظر گرفته شد. همان گونه که در شکل ۲ نشان داده شده است، افزایش غلظت عصاره اتانولی منجر به کاهش

بررسی فعالیت کاتالستی کاتالاز در حضور عصاره اتانولی: کاتالاز از جمله پروتئین های کلیدی است که فعالیت و ساختار آن می تواند در اثر مواجهه با ترکیبات گوناگون دچار تغییر شود. ارزیابی تغییرات فعالیت آنزیم کاتالاز معمولاً با سنجش غلظت سوسترای آن، یعنی پراکسید هیدروژن، صورت می گیرد. در این پژوهش، تغییرات فعالیت کاتالیزوری آنزیم CAT در حضور سطوح متفاوتی از عصاره

تدریجی فعالیت CAT گردید، به طوری که در غلظت ۸۰ میلی گرم بر لیتر، فعالیت این آنزیم به حدود ۵۶/۱۴ درصد از مقدار اولیه خود کاهش یافت. اما آیا کاهش فعالیت کاتالاز، در مطالعات دارویی یک رفتار ناخوشایند است؟ این رفتار را به خصوص در مورد بیماری سرطان می توان توجیه کرد. مهار آنزیم کاتالاز (که H_2O_2 را تجزیه می کند) می تواند منجر به افزایش سطح گونه های فعال اکسیژن (ROS) در سلول سرطانی و افزایش فعالیت ضد سرطانی دارو و در نتیجه به طور بالقوه منجر به مرگ سلول سرطانی شود. این استراتژی به عنوان راهی برای حساس کردن سلول های سرطانی به استرس اکسیداتیو و

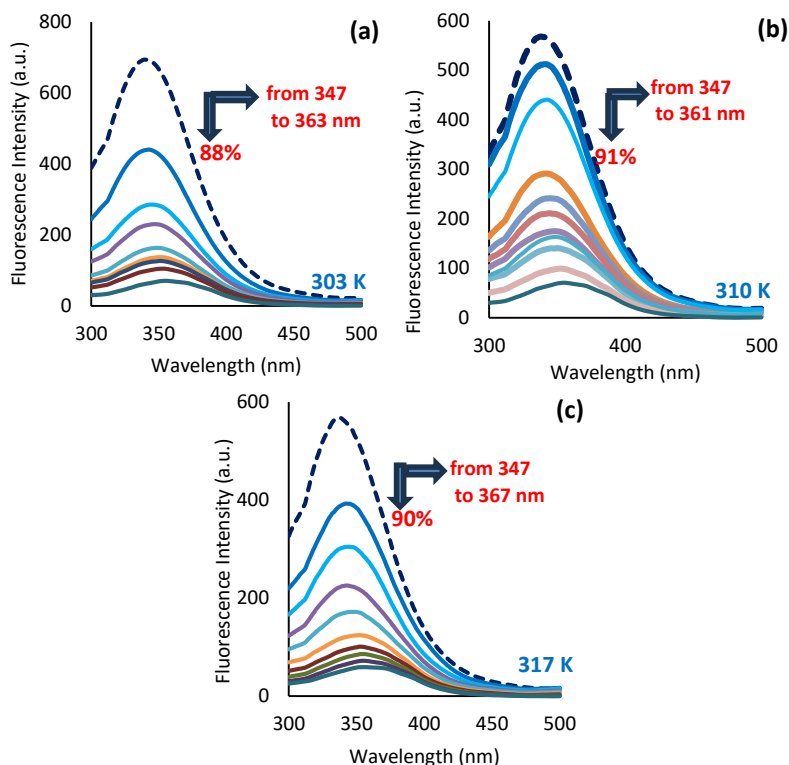
آسیب پذیرتر کردن آنها در حال بررسی است (Smith et al., 2007). فعالیت آنزیم ها به طور قابل توجهی با ساختار سه بعدی آنها در ارتباط است، چنان که یافته های پیشین نیز این رابطه تنگاتنگ را تأیید کرده اند. از این رو، هرگونه برهم کنش یک مولکول یا ترکیب دارویی با آنزیم که منجر به تغییر در ساختار آن شود، می تواند عملکرد آنزیمی را تحت تأثیر قرار دهد (Yekta et al., 2017). بر این اساس، در ادامه مکانیسم برهم کنش CAT با عصاره ریز جلبک *Cyanothece* sp. و نیز تغییرات ساختاری BLC با بهره گیری از روش های طیفسنجی مورد بررسی قرار خواهد گرفت.



شکل ۲: بررسی تغییرات فعالیت کاتالاستی آنزیم کاتالاز (۳ میکرومولار) در حضور غلظت های مختلف عصاره اتانولی.

مطالعات برهم کنش عصاره اتانولی ریز جلبک *Cyanothece* sp. با کاتالاز: خاموش سازی فلورسانس: پروتئین ها به واسطه ی حضور سه اسید آمینه ی آروماتیک شامل تریپتوفان (Trp)، تیروزین (Tyr) و فنیل آلانین (Phe)، دارای خاصیت نشر فلورسانس هستند. شدت این نشر به تغییرات محیطی پیرامون اسیدهای آمینه، به ویژه تریپتوفان و تیروزین، بسیار حساس است (Divsalar et al., 2009). در آنزیم کاتالاز، سیگنال فلورسانس عمدتاً از اسید آمینه ی تریپتوفان (Trp) ناشی می شود. در

مطالعات فلورسانس، طول موج برانگیختگی ۲۸۵ نانومتر انتخاب گردید که متناظر با طول موج برانگیختگی ویژه ی تریپتوفان و تیروزین است (Yekta et al., 2017). از این رو، بررسی تغییرات شدت نشر فلورسانس می تواند ابزاری مؤثر برای مطالعه ی برهم کنش مولکول های کوچک با پروتئین ها به شمار آید (He et al., 2022). تغییرات شدت فلورسانس کاتالاز در حضور غلظت های مختلف عصاره اتانولی در شکل ۳ نشان داده شده است.



شکل ۳: طیف فلورسانس کاتالاز (۳ میکرومولار) در دماهای ۳۰۳، ۳۱۰ و ۳۱۷ کلوین در حضور غلظت‌های مختلف از عصاره اتانولی ریز جلبک *Cyanothece* sp.

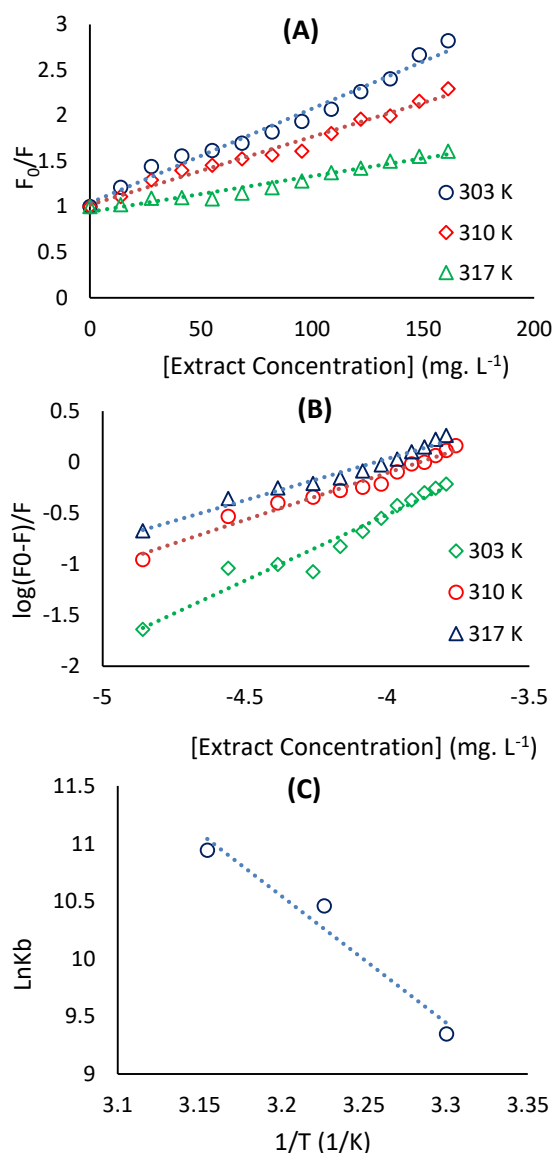
به‌طور کلی از دو مکانیسم اصلی پیروی می‌کند: خاموش‌سازی پویا که در آن برخورد میان حالت برانگیخته و فلوروفور رخ می‌دهد و خاموش‌سازی ایستا که با تشکیل یک کمپلکس در حالت پایه میان فلوروفور و خاموش‌کننده همراه است. گاهی نیز ترکیبی از این دو مکانیسم در فرآیند خاموش‌سازی مشاهده می‌شود. تمایز میان این مکانیسم‌ها از طریق بررسی وابستگی آن‌ها به تغییرات دمایی قابل انجام است. در مکانیسم‌های دینامیکی و استاتیکی، با افزایش دما، به‌ترتیب ثابت‌های خاموش‌کنندگی افزایش و کاهش می‌یابند. برای تعیین دقیق‌تر نوع برهم‌کنش عصاره اتانولی و بررسی مکانیسم خاموش‌سازی فلورسانس آنزیم کاتالاز در حضور این عصاره، از معادله استرن-ولمر (معادله ۱) بهره گرفته شد. منحنی‌های استرن-ولمر حاصل از ترسیم F_0/F در برابر غلظت خاموش‌کننده $[Q]$ در سه

با افزایش تدریجی غلظت عصاره اتانولی در محلول حاوی آنزیم کاتالاز، کاهش قابل‌ملاحظه‌ای در شدت فلورسانس این آنزیم مشاهده شد که بیانگر وقوع برهم‌کنش میان ترکیبات زیست‌فعال موجود در عصاره ریزجلبک *Cyanothece* sp. و مولکول کاتالاز است. به‌طور کلی، مجاورت مولکول‌های پروتئینی با ترکیبات قطبی و فرارگیری در محیط‌های آبی می‌تواند بازده کوانتومی فلوروفورهای تریپتوفان (Trp) و تیروزین (Tyr) را تحت‌تأثیر قرار دهد. افزون بر این، طیف فلورسانس کاتالاز با افزایش مقدار عصاره به سمت طول‌موج‌های بلندتر (جابجایی قرمز) انتقال یافت که حاکی از تغییر در قطبیت محیط مولکولی پیرامون دو فلوروفور مذکور است (Zhang et al., 2017).

مکانیسم خاموش‌سازی فلورسانس آنزیم کاتالاز: فرآیند خاموش‌سازی فلورسانس ذاتی پروتئین‌ها

کاتالاز از نوع پویا است. بنابراین، برخورد میان حالت‌های برانگیخته و فلوروفور به‌عنوان عامل غالب در خاموش‌سازی فلورسانس کاتالاز طی تعامل با ترکیبات فعال موجود در عصاره اتانولی ریزجلبک *Cyanothece* sp. محسوب می‌شود.

دمای متفاوت در شکل ۴ ارائه گردیده‌اند. مقادیر ثابت خاموش‌سازی K_{SV} از شیب این منحنی‌ها استخراج شد. داده‌های حاصل که در جدول ۱ فهرست شده‌اند، نشان می‌دهند با افزایش دما، مقادیر K_{SV} روند افزایشی دارند. این یافته‌ها، مؤید آن است که مکانیسم خاموش‌سازی در فرآیند برهم‌کنش عصاره با آنزیم



شکل ۴: (A) منحنی‌های استرن-ولمر براساس طیف فلورسانس آنزیم کاتالاز در حضور عصاره اتانولی ریزجلبک *Cyanothece* sp. در دماهای ۳۰۳، ۳۱۰ و ۳۱۷ کلون (B) منحنی‌های $\log(F_0-F)/F$ برحسب $\log$ [Extract] در دماهای مختلف (C) منحنی وانت‌هوف در دماهای مختلف برای فرآیند برهم‌کنش عصاره اتانولی و آنزیم کاتالاز

جدول ۱: مقادیر K_{sv} و K_b و پارامترهای ترمودینامیکی محاسبه شده در دماهای مختلف برای برهم کنش عصاره اتانولی با آنزیم کاتالاز

T(K)	n	K_{sv} ($\times 10^4 \text{ mg}^{-1} \cdot \text{L}$)	K_b ($\times 10^4 \text{ mg}^{-1} \cdot \text{L}$)	ΔG° ($\text{kJ} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{L}$)	ΔH° ($\text{kJ} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{L}$)	ΔS° ($\text{kJ} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{K}^{-1}$)
303	1.02	6.45	1.14	-23.66	91.48	0.38
310	1.11	8.55	3.47	-26.32		
317	1.15	9.43	5.64	-28.98		

اتانولی و آنزیم کاتالاز را فراهم می‌سازد. مقادیر منفی هر دو پارامتر ($\Delta S^\circ < 0$ و $\Delta H^\circ < 0$) بیانگر غالب بودن نیروهای واندروالس و پیوندهای هیدروژنی در فرآیند اتصال است. در مقابل، مقادیر مثبت ($\Delta S^\circ > 0$ و $\Delta H^\circ > 0$)، نشان‌دهنده نقش نیروهای آبریز در برهم کنش می‌باشد. همچنین، در صورتی که آنتالپی منفی و آنتروپی مثبت باشد ($\Delta S^\circ > 0$ و $\Delta H^\circ < 0$)، وجود برهم کنش‌های الکترواستاتیکی تأیید می‌گردد (De Haan & Rottier, 2005). مقادیر ΔH° ، ΔS° و ΔG° (انرژی آزاد گیبس) با معادلات ۳ و ۴ به ترتیب به دست می‌آیند. از رسم منحنی $\ln K$ در برابر $1/T$ (معادله وانت هوف) پارامترهای ترمودینامیکی فوق محاسبه می‌شوند (شکل ۴C). نتایج نشان داد که برهم کنش‌های آبریز، مهمترین نیرو در فرآیند اتصال عصاره با کاتالاز محسوب می‌شوند. مقادیر منفی تغییرات انرژی آزاد گیبس نیز خود به خودی بودن فرآیند را تایید می‌کند. مشابه این برهم کنش‌ها در پیوند بسیاری از داروها و همچنین ترکیب‌های فلزی با پروتئین‌های مختلف گزارش شده است (Gurusamy et al., 2022; He et al., 2021; K. Shahraki et al., 2024; Shahraki et al., 2025; S. Shahraki et al., 2024; Shahraki et al., 2019).

بررسی تغییرات ساختاری آنزیم کاتالاز در حضور عصاره اتانولی ریز جلبک *Cyanothecce sp.*: داده‌های طیف‌سنجی فلورسانس، وجود برهم کنش میان ترکیبات عصاره‌ی اتانولی و آنزیم کاتالاز را تأیید کردند. همچنین، ارزیابی تغییرات ساختاری آنزیم در

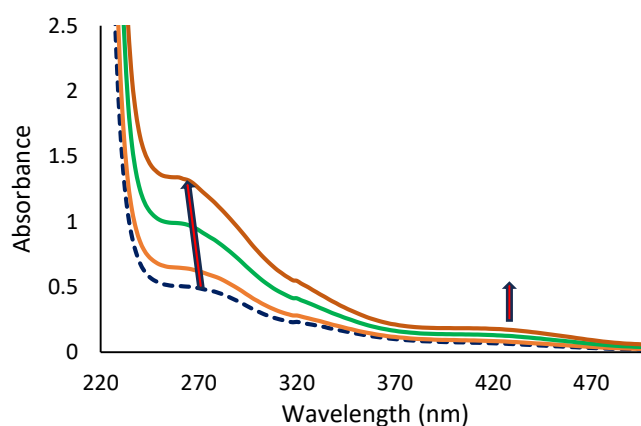
در این مطالعه، به منظور تعیین پارامترهای پیوندی شامل ثابت پیوند (K_b) و تعداد جایگاه‌های اتصال (n) در فرایند برهم کنش آنزیم کاتالاز با ترکیبات فعال موجود در عصاره اتانولی، داده‌های فلورسانس با استفاده از معادله‌ی اصلاح‌شده‌ی استرن-ولمر (معادله ۲) تحلیل گردید. بر اساس نمودارهای ترسیم‌شده از رابطه‌ی $\log(F_0-F)/F$ در برابر $\log[Q]$ (شکل ۴B)، مقادیر n و K_b استخراج و در جدول ۱ گزارش شده است. خطی بودن این نمودارها، نشان‌دهنده‌ی تطابق برهم کنش میان ترکیبات عصاره‌ی اتانولی جلبک دریایی و آنزیم کاتالاز با مدل نظری ارائه‌شده در معادله‌ی مذکور است (Zhang et al., 2017). مشاهدات نشان داد که مقدار n تقریباً برابر با یک است، که بیانگر وجود تنها یک جایگاه اتصال در آنزیم کاتالاز برای ترکیبات موجود در عصاره می‌باشد. همچنین، افزایش مقدار ثابت اتصال با بالا رفتن دما مشاهده گردید، که این موضوع تأییدکننده‌ی وقوع برهم کنش بین حالت برانگیخته و فلوروفور و نیز نشان‌دهنده‌ی ماهیت دینامیکی مکانیسم خاموشی است. بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت که فرآیند اتصال ترکیبات عصاره به کاتالاز از نوع گرماگیر است.

با استفاده از داده‌های فلورسانس، می‌توان مجموعه‌ای از پارامترهای ترمودینامیکی را تعیین نمود. این پارامترها، از جمله تغییر انرژی آزاد (ΔG)، تغییر آنتالپی (ΔH) و تغییر آنتروپی (ΔS)، به دما وابسته‌اند. بررسی علامت ΔH و ΔS امکان پیش‌بینی نوع نیروی غالب در فرآیند برهم کنش میان عصاره

حضور عصاره‌ی اتانولی با بهره‌گیری از روش‌های گوناگون از جمله طیف‌سنجی UV-Vis، فلورسانس همزمان و طیف‌سنجی دورنگ‌نمایی دورانی (CD) انجام شد.

طیف‌سنجی UV-Vis: یکی از روش‌های طیف‌سنجی متداول برای بررسی تغییرات ساختاری آنزیم‌ها در هنگام برهم‌کنش با مولکول‌های کوچک، طیف‌سنجی جذبی مرئی-فرابنفش (UV-Vis) است. طیف جذبی آنزیم کاتالاز (شکل ۵)، که از نوع هموپروتئین‌ها می‌باشد، دو نوار اصلی در طول‌موج‌های ۲۷۸ نانومتر (متناسب به انتقال‌های الکترونی اسیدهای آمینه آروماتیک) و ۴۰۵

نانومتر (مرتبط با گروه پروستتیک هم) نشان می‌دهد. در حضور عصاره‌ی اتانولی، شدت هر دو قله بدون جابه‌جایی در مکان طول‌موج بیشینه به‌طور محسوس افزایش یافته است، که این امر بیانگر وقوع برهم‌کنش میان ترکیبات موجود در عصاره‌ی اتانولی و آنزیم کاتالاز می‌باشد. با این حال، تغییرات مشاهده‌شده در طول‌موج ۴۰۵ نانومتر بسیار جزئی است و نشان می‌دهد که محل اتصال ترکیبات محلول در عصاره‌ی اتانولی در فاصله‌ای از گروه پروستتیک واقع شده و بنابراین، این بخش از آنزیم کمتر تحت تأثیر فرآیند برهم‌کنش قرار می‌گیرد (Singh et al., 2020).



شکل ۵: تغییرات طیف الکترونی UV-Vis کاتالاز در غلظت ثابت (۳/۰ میکرومولار)

در حضور غلظت‌های مختلف عصاره اتانولی در دمای ۳۰.۳ کلوین

طیف‌سنجی فلورسانس همزمان : طیف‌سنجی

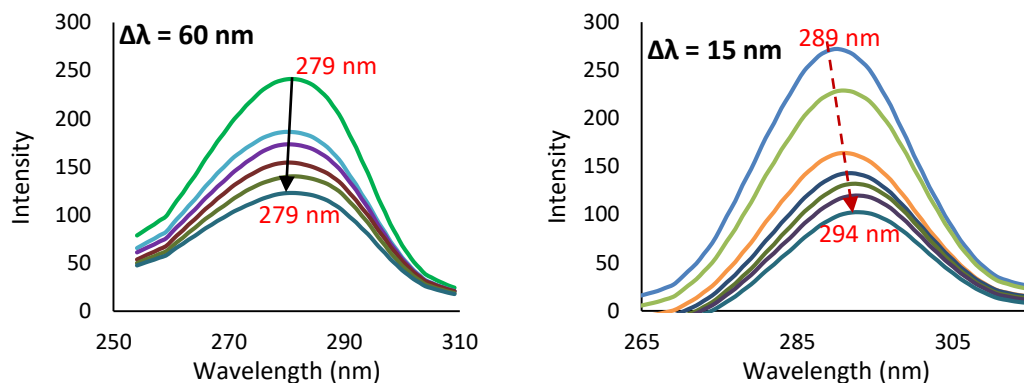
فلورسانس همزمان^۱ (SF) یکی از روش‌های ارزشمند در مطالعه رفتار فلوروفورها به شمار می‌آید. در این تکنیک، تغییر در قطبیت مولکول فلوروفور موجب جابه‌جایی در طول موج بیشینه انتشار (λ_{max}) در طیف SF می‌شود. این روش ابزاری کارآمد برای بررسی تغییرات ساختاری پروتئین‌ها است و معمولاً برای ارزیابی قطبیت باقیمانده‌های اسید آمینه‌ای تریپتوفان (Trp) و تیروزین (Tyr)، هنگامی که فاصله طول موج تحریک و نشر ($\Delta\lambda$) به ترتیب برابر با ۶۰ و

۱۵ نانومتر باشد، مورد استفاده قرار می‌گیرد. هرگونه تغییر در موقعیت λ_{max} بیانگر دگرگونی در قطبیت محیط مولکولی این اسیدهای آمینه است. طیف فلورسانس همزمان آنزیم کاتالاز در مقادیر $\Delta\lambda$ برابر با ۶۰ و ۱۵ نانومتر در شکل ۶ نمایش داده شده است. همان‌گونه که مشاهده می‌شود، با افزایش غلظت عصاره اتانولی در محلول آنزیم، شدت فلورسانس به تدریج کاهش می‌یابد. در عین حال، موقعیت λ_{max} در طیف مربوط به Trp بدون تغییر باقی می‌ماند، در حالی که در طیف Tyr جابه‌جایی λ_{max} به طول موج‌های بلندتر (تغییر قرمز از ۲۸۹ به ۲۹۴ نانومتر)

¹ synchronous fluorescence (SF)

اتانولی به ناحیه‌ای در نزدیکی باقیمانده Trp در آنزیم کاتالاز نزدیک‌تر از Tyr واقع شده است (Zhang et al., 2017).

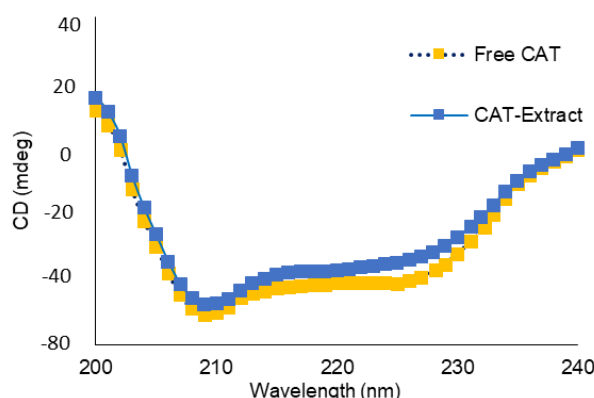
مشاهده می‌شود. بر این اساس، می‌توان نتیجه گرفت که محیط مولکولی Tyr در مقایسه با Trp به میزان بیشتری از فرایند برهم‌کنش متاثر می‌شود و به نظر می‌رسد که جایگاه اتصال ترکیبات موجود در عصاره



شکل ۶: طیف فلورسانس همزمان آنزیم کاتالاز در غلظت‌های مختلف از عصاره اتانولی در دمای ۳۰۳ کلین

اتانولی به محلول کاتالاز، شدت هر دو سیگنال کاهش یافته است. مقادیر ساختار ثانویه کاتالاز قبل و بعد از برهم‌کنش باترکیبات موجود در عصاره اتانولی در جدول ۲ ارائه شده‌است. کاهش محتوای مارپیچ α بیانگر افت پایداری آنزیم است که ناشی از تخریب بخش‌هایی از ساختار مارپیچ α یا صفحات β و در نتیجه، گسستن پیوندهای هیدروژنی میان اسیدهای آمینه سازنده آن‌ها می‌باشد (Liu et al., 2004).

طیف‌سنجی دورنگ‌نمایی دورانی: طیف‌سنجی دور رنگ‌نمایی دورانی (CD) ابزاری تحلیلی است که به‌طور گسترده برای ارزیابی پایداری ساختار ثانویه پروتئین‌ها در حین برهم‌کنش با مولکول‌های کوچک به کار می‌رود. در طیف CD مربوط به آنزیم کاتالاز آزاد (شکل ۷) دو سیگنال منفی در ۲۱۰ و ۲۲۳ نانومتر ظاهر شده است (به ترتیب مربوط به انتقال $\pi \rightarrow \pi^*$ و $n \rightarrow \pi^*$ در مارپیچ α). پس از افزایش عصاره



شکل ۷: طیف CD مربوط به آنزیم کاتالاز در حضور و بدون حضور عصاره اتانولی

جدول ۲: تجزیه و تحلیل ساختار ثانویه کاتالاز در حضور عصاره اتانولی

System	ساختار ثانویه کاتالاز (%)		
	α -Helix	β -Sheet	Unordered coil
CAT	24.0 $\pm$ 0.06	36.2 $\pm$ 0.06	32.1 $\pm$ 0.06
CAT- Extract	21.9 $\pm$ 0.05	33.1 $\pm$ 0.05	37.7 $\pm$ 0.09

نتیجه گیری

فلورسانس تأیید کرد که بین آنزیم کاتالاز و ترکیبات موجود در عصاره اتانولی، برهم کنش های هیدروفوب برقرار است و این ترکیبات قادرند نشر فلورسانس آنزیم را از طریق مکانیسم خاموش سازی از نوع دینامیک کاهش دهند. مطالعه تغییرات ساختاری در پروتئین نشان داد که میزان مارپیچ آلفا کاهش یافته است، هرچند این تغییر چندان قابل توجه نبود، اما همین مقدار کاهش نیز موجب مهار فعالیت کاتالستی آنزیم گردید. در مجموع اگرچه عصاره اتانولی جلبک دریایی سیانوباکتری دارای خواص آنتی اکسیدانی قابل توجهی است، اما در استفاده از آن در محیط های زیستی باید بررسی های بیشتری انجام داد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مراتب سپاس و قدردانی خود را از آزمایشگاه مرکزی دانشگاه زابل و همچنین مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی سیستان (زابل) به منظور همکاری و مساعدت در انجام آزمایش های این پژوهش ابراز می دارند.

عصاره الکلی جلبک های دریایی به دلیل دارا بودن ترکیبات فنولی و سایر ترکیبات زیست فعال، توانایی مهار رادیکال های آزاد و جلوگیری از آسیب های اکسیداتیو سلولی را دارد، از این رو می توان آن را به عنوان منبعی غنی از آنتی اکسیدان ها معرفی کرد. در صورتی که از این ترکیبات به عنوان معرف های آنتی اکسیدان استفاده شود، تعامل آنها با پروتئین ها و آنزیم های مهم بدن حائز اهمیت است. یکی از مهم ترین آنزیم های آنتی اکسیدان بدن کاتالاز است که عمدتاً در کبد ترشح می شود. تحقیق انجام شده نیز بر همین اساس و با هدف تاثیر عصاره اتانولی ریزجلبک *Cyanothecae sp.* بر فعالیت آنزیمی و ساختار آنزیم کاتالاز است. آنالیز DPPH نشان داد که توانایی عصاره اتانولی در مهار رادیکال آزاد (در غلظت ۲۵۰ میلی گرم بر لیتر)، در زمان انکوباسیون ۳۰ و ۶۰ دقیقه به ترتیب ۵۱/۲۱ و ۵۳/۳۷٪ است. نتایج نشان داد که عصاره اتانولی قادر است فعالیت آنزیمی کاتالاز را مهار کند بطوری که در حضور غلظت ۸۰ میلی گرم بر لیتر عصاره اتانولی، فعالیت آنزیم کاتالاز به ۵۶/۱۴ درصد از فعالیت اولیه خود رسید. نتایج طیف سنجی

References

- Anburaj, R., Kathiresan, K., & Prasannakumar, C. (2024). Exploring the depths: A comprehensive review of marine algae. *RECENT TRENDS IN*, 176.
- Carr, N. G., & Whitton, B. A. (1982). *The biology of cyanobacteria* (Vol. 19). Univ of California Press.
- de Haan, C. A., & Rottier, P. J. (2005). Molecular interactions in the assembly of coronaviruses. *Advances in virus research*, 64, 165-230.
- Divsalar, A., Bagheri, M. J., Saboury, A. A., Mansoori-Torshizi, H., & Amani, M. (2009). Investigation on the interaction of newly designed anticancer Pd (II) complexes with

- different aliphatic tails and human serum albumin. *The journal of physical chemistry B*, 113(42), 14035-14042.
- Eftink, M. R., & Ghiron, C. A. (1981). Fluorescence quenching studies with proteins. *Analytical biochemistry*, 114(2), 199-227.
- Gurusamy, S., Krishnaveni, K., Sankarganesh, M., Asha, R. N., & Mathavan, A. (2022). Synthesis, characterization, DNA interaction, BSA/HSA binding activities of VO (IV), Cu (II) and Zn (II) Schiff base complexes and its molecular docking with biomolecules. *Journal of Molecular Liquids*, 345, 117045.
- Gholamali, G. M., & Masoumeh, M. S. A. (2009). Comparison of antioxidant and antiradical properties of methanolic extracts of edible leafy vegetables.
- He, C., Majd, M. H., Shiri, F., & Shahraki, S. (2021). Palladium and platinum complexes of folic acid as new drug delivery systems for treatment of breast cancer cells. *Journal of Molecular Structure*, 1229, 129806.
- He, F., Wan, J., Chu, S., Li, X., Zong, W., & Liu, R. (2022). Toxic mechanism on phenanthrene-triggered cell apoptosis, genotoxicity, immunotoxicity and activity changes of immunity protein in *Eisenia fetida*: Combined analysis at cellular and molecular levels. *Science of the Total Environment*, 819, 153167.
- Hu, Q., Sommerfeld, M., Jarvis, E., Ghirardi, M., Posewitz, M., Seibert, M., & Darzins, A. (2008). Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *The plant journal*, 54(4), 621-639.
- Jelic, M. D., Mandic, A. D., Maricic, S. M., & Srdjenovic, B. U. (2021). Oxidative stress and its role in cancer. *Journal of cancer research and therapeutics*, 17(1), 22-28.
- Kabeer, H., Hanif, S., Arsalan, A., Asmat, S., Younus, H., & Shakir, M. (2020). Structural-dependent N, O-donor imine-appended Cu (II)/Zn (II) complexes: Synthesis, spectral, and in vitro pharmacological assessment. *ACS omega*, 5(2), 1229-1245.
- Liu, J., Tian, J., He, W., Xie, J., Hu, Z., & Chen, X. (2004). Spectrofluorimetric study of the binding of daphnetin to bovine serum albumin. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 35(3), 671-677.
- Maryam, R., & Mohammad, F. (2018). Evaluation of diversity of some morphological characteristics and antioxidant activity of essential oil of populations of the medicinal plant, *Heracleum persicum* Desf. ex Fischer in northwest Iran.
- Mata, T. M., Martins, A. A., & Caetano, N. S. (2010). Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. *Renewable and sustainable energy reviews*, 14(1), 217-232.
- Mendili, M., & Khadhri, A. (2025). Chlorophylls: The Verdant World of Photosynthetic Pigments. *Microbial Colorants: Chemistry, Biosynthesis and Applications*, 223-239.
- Nouri, H., Mansouri-Torshizi, H., & Shahraki, S. (2021). Exploring the functional changes and binding mechanism of bovine liver catalase in the presence of Schiff base complexes. Comprehensive spectroscopic studies. *Journal of the Iranian Chemical Society*, 18(12), 3281-3294.
- Shahraki, K., Shahraki, S., Nezami, Z. S., & Delarami, H. S. (2024). New acetohydrazide-based Schiff base complexes with the ability to enhance catalase activity. *Inorganic Chemistry Communications*, 163, 112318.
- Shahraki, S., Dehghanian, E., & Shahraki, K. (2025). Evaluation of anticancer capacity, catalase interactions, molecular docking, and antioxidant studies of some diamagnetic (Pd, Pt, and Zn) Schiff base complexes. *Inorganica Chimica Acta*, 581, 122642.
- Shahraki, S., Delarami, H. S., Razmara, Z., & Heidari, A. (2024). Tracking the binding site of anticancer drug fluxoridin with Fe-related proteins to achieve intelligent drug delivery. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 306, 123569.
- Shahraki, S., Majd, M. H., & Heydari, A. (2019). Novel tetradentate Schiff base zinc (II) complex as a potential antioxidant and cancer chemotherapeutic agent: Insights from the photophysical and computational approach. *Journal of Molecular Structure*, 1177, 536-544.

- Shaghaghi, A., Ghalehmohammadi, A., & Jokar. (2021). Morphological, biochemical diversity and antioxidant activity of several populations of *Hypericum perforatum* L. in Iran. *Plant Products*, 44(3), 407-420.
- Shahraki, S., & Shahraki, T. (2018). Investigation of antioxidant, anti-bacterial properties and binding to humanserum albumin in the *Cressa cretica* L. grown in the Sistan region.
- Shahraki, S., Shiri, F., Mansouri-Torshizi, H., & Shahraki, J. (2016). Characterization of the interaction between a platinum (II) complex and human serum albumin: spectroscopic analysis and molecular docking. *Journal of the Iranian Chemical Society*, 13, 723-731.
- Singh, I., Luxami, V., & Paul, K. (2020). Spectroscopy and molecular docking approach for investigation on the binding of nocodazole to human serum albumin. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 235, 118289.
- Small, D. M., Coombes, J. S., Bennett, N., Johnson, D. W., & Gobe, G. C. (2012). Oxidative stress, anti-oxidant therapies and chronic kidney disease. *Nephrology*, 17(4), 311-321.
- Smith, P. S., Zhao, W., Spitz, D. R., & Robbins, M. E. (2007). Inhibiting catalase activity sensitizes 36B10 rat glioma cells to oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*, 42(6), 787-797.
- Soleimani, S. (2022). Antioxidant compounds with antioxidant properties in seaweed and their application in various industries. *Journal of Plant Process and Function*(1), 77-98.
- Wu, D., Wang, J., Liu, D., Zhang, Y., & Hu, X. (2019). Computational and spectroscopic analysis of interaction between food colorant citrus red 2 and human serum albumin. *Scientific reports*, 9(1), 1-8.
- Yekta, R., Dehghan, G., Rashtbari, S., Sheibani, N., & Moosavi-Movahedi, A. A. (2017). Activation of catalase by pioglitazone: Multiple spectroscopic methods combined with molecular docking studies. *Journal of Molecular Recognition*, 30(12), e2648.
- Zhang, R., Wu, Q., & Liu, R. (2017). Characterizing the binding interaction between ultrafine carbon black (UFCB) and catalase: electron microscopy and spectroscopic analysis. *RSC advances*, 7(67), 42549-42558.
- Zhang, W., Negoro, T., Satoh, K., Jiang, Y., Hashimoto, K., Kikuchi, H., Nishikawa, H., Miyata, T., Yamamoto, Y., & Nakano, K. (2001). Synergistic cytotoxic action of vitamin C and vitamin K3. *Anticancer research*, 21(5), 3439-3444.