Journal of Microbial World
Volume 13, No. 2, July 2020

Original Article

Extraction, purification and evaluation of antimicrobial and antioxidant properties of phycoerythrin from terrestrial cyanobacterium *Nostoc* sp. FA1

Bahareh Nowruzi[1], Seyed Amir Ali Anvar[2], Hamed Ahari[3]

[1]Assistant Professor, Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran. [2]Assistant Professor, Department of food Hygiene, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran. [3]Associate Professor, Department of food Science and technology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

Abstract

Background & Objectives: Phycoerythrin (PE) found in cyanobacteria are natural dyes which have shown potential therapeutic properties. Nowadays, substitution of artificial oxidants with harmless natural antioxidants is crucial. Hence, the present study was focused on purification process of PE from a soil strain of *Nostoc* sp. FA1 and evaluating its antioxidant and antimicrobial activity. *Materials and Methods:* Extraction and purification of PE was performed in four stages of preparation of crude extract, 65% ammonium sulfate precipitation, dialysis and anion exchange chromatography. Subsequently, antioxidant and antimicrobial activity was determined by nitric oxide scavenging and paper disk diffusion method respectively. *Results:* It was found that concentration and purity of PE were increased after each purification step by almost four times (from 1.5 to 6.22). PE had the strongest inhibitory activity against *Bacillus subtilis* (10.5 ± 0.28) and *Candida albilancs* (10.98 ± 0.006). In addition, the results of antioxidant surveys showed that PE is a potent free radical scavenger and this activity increased significantly with the increasing pigment concentration.
Conclusion: The results of this study can be the basis for the introduction of natural edible pigments of soil cyanobacteria with antioxidant and antimicrobial properties that can be used in food and pharmaceutical industries.
Keywords: Phycoerythrin, bioactive properties, *Nostoc* sp.

Correspondence to: Bahareh Nowruzi

Tel: +98 9113710956

E-mail: bahareh.nowruzi@srbiau.ac.ir

Journal of Microbial World 2020, 13(2): 138-153.

DOI:

Copyright © 2019, This article is published in Journal of Microbial World as an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License. Non-commercial, unrestricted use, distribution, and reproduction of this article is permitted in any medium, provided the original work is properly cited.

مجله دنیای میکروب‌ها
سال سیزهم شماره دوم (پیاپی ۴۳) تابستان ۱۳۹۹
صفحات ۱۵۳-۱۰۴

Original Article

استخراج، خالص سازی و ارزیابی خواص ضد میکروبی و آنتی اکسیدانی رنگدانه فیکواریترین سیانوباکتری خاکزی *Nostoc* sp. FA1

بهاره نوروزی[1*]، سید امیر علی انوار[2]، حامد اهری[3]

[1]استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران، [2]استادیار، گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران، [3]دانشیار، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران.

چکیده

سابقه و هدف: رنگ های طبیعی فیکواریترین سیانوباکتری ها، دارای ویژگی های درمانی بالقوه ای هستند. امروزه جایگزینی آنتی اکسیدان های مصنوعی با آنتی اکسیدان های طبیعی بی ضرر مورد توجه می باشد. هدف ازاین تحقیق، جداسازی و خالص سازی رنگدانه ارغوانی خوراکی فیکواریترین و ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی سیانوباکتری خاکزی *Nostoc* sp. FA1 می باشد.

مواد و روش ها: استخراج و خالص سازی رنگدانه فیکواریترین در چهار مرحله آماده سازی عصاره خام، رسوب گیری با آمونیوم سولفات ۶۵ درصد، دیالیز و کروماتوگرافی تبادل آنیونی انجام گردید. سپس فعالیت آنتی اکسیدانی با روش نیتریک اکساید و فعالیت ضد میکروبی با روش انتشار در دیسک مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها: غلظت و خلوص رنگدانه فیکواریترین پس از هر مرحله خالص سازی تا ۴ برابر (از ۱/۵ تا ۶/۲۲) افزایش یافت. بیشترین فعالیت ممانعت کنندگی رنگدانه فیکواریترین در مقابل *باسیلوس سوبتلیس* (۱۰/۵±۰/۲۸) و *کاندیدا آلبیکنس* (۱۰/۹۸±۰/۰۰۶) یافت گردید. علاوه بر آن، نتایج حاصل از بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی، افزایش معناداری را با افزایش میزان غلظت رنگدانه نشان داد.

نتیجه گیری: نتایج این تحقیق می تواند زمینه ساز معرفی رنگدانه های طبیعی خوراکی سیانوباکتری های خاکزی دارای ویژگی های آنتی اکسیدانی و آنتی میکروبی با قابلیت استفاده در صنایع غذایی و دارویی باشد.

واژگان کلیدی: فیکواریترین،ویژگی زیست فعالی، *نوستوک*.

دریافت مقاله: بهمن ماه ۹۸ پذیرش برای چاپ: اردیبهشت ماه ۹۹

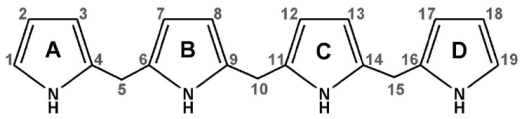
مقدمه

سیانوباکتری ها، جلبک های سبز آبی، باکتری های سبز آبی، سیانو پروکاریوت ها و یا سیانوفیتا، پروکاریوت های فتوسنتزی اکسیژنی دارای ویژگی های مشابه با باکتری ها (پروکاریوت ها) و جلبک ها (یوکاریوت ها) هستند. از نظر ساختمان سلولی با سلول های پروکاریوتی شباهت دارند، چرا که فاقد هسته و اندامک های مشخص مانند میتوکندری، دستگاه گلژی، شبکه آندوپلاسمی و واکوئل هستند. غشای خارجی و لیپوپلی ساکاریدهای دیواره سیانوباکتری ها مشابه با

*) آدرس برای مکاتبه: استان تهران، حصارک، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات.
تلفن: ۰۹۱۱۳۷۱۰۹۵۶ پست الکترونیک: bahareh.nowruzi@srbiau.ac.ir

حقوق نویسندگان محفوظ است. این مقاله با دسترسی آزاد و تحت مجوز مالکیت خلاقانه (http://creativecommons.org/licenses/bync/4.0/) در فصلنامه دنیای میکروب‌ها منتشر شده است. هرگونه استفاده غیرتجاری فقط با استناد و ارجاع به اثر اصلی مجاز است.

باکتری های گرم منفی است و با داشتن لایه ضخیم پپتیدو گلیکانی، مشابه با باکتری های گرم مثبت هستند. از طرف دیگر نوع تغذیه، تولید اکسیژن و شیوه فتوسنتز آن ها مشابه دیگر جلبک ها و گیاهان عالی است (۱). استفاده از سیانوباکتری ها، در صنایع داروسازی و بهداشتی در اواخر ۱۹۷۰ میلادی شروع شد که منجر به کشف ترکیبات جدید با ویژگی های ضد ویروسی، ضد سرطانی، ضدایدز (HIV)، ضد باکتریایی، ضد قارچی و سیتوتوکسیک در کاربردهای بالینی شد. در واقع این ارگانیسم ها منابع غنی از متابولیت های ثانویه هستند که کاربردهای جالب از لحاظ بیوتکنولوژی دارند. استفاده از سیانوباکتری ها در تولید غذا، سوخت، حاصلخیز سازی خاک و تولید متابولیت های ثانویه متنوع، نظیر سموم، ویتامین ها، آنزیم ها و داروها از جمله کاربردهای سیانوباکتری ها در بیوتکنولوژی محسوب می گردد (۲). بخش مهم پیگمان ها یا رنگیزه های فتوسنتزی سیانوباکتری ها را فیکوبیلی پروتین ها تشکیل می دهند که در داخل ساختمانی به نام فیکوبیلی سوم قرار دارند. چهار نوع فیکوبیلیسوم در سیانوفیت ها یافت می شود. فیکوسیانین C که نور را با طول موج ۶۲۰ نانومتر جذب می کند. آلوفیکوسیانین (۶۵۰ نانومتر)، فیکواریترین (۵۶۵ نانومتر) و فیکواریتروسیانین نور را با طول موج ۵۶۸ نانومتر جذب می کند (۳). پیکره اساسی فیکوبیلی پروتین ها یک تریمر پایدار $(\alpha\beta)3$ تشکیل دهنده یک قسمت حلقه مانند است. این ساختمان، حدود ۱۱ نانومتر قطر دارد، ضخامت ۳ تا ۳/۵ نانومتری و یک حفره مرکزی که حدود ۳ نانومتر قطر دارد. رنگ های فیکوبیلی پروتین ها، عمدتا به واسطه گروه های پروستتیک پیوند شده به طور کووالانسی است که همان کروموفورهای تتراپیرولی شامل حلقه های A، B، C و D به نام فیکوبیلین ها هستند. آنها فیکوسیانوبیلین های رنگی (PCB)، فیکواریتروبیلین قرمز (PEB)، فیکویوروبیلین زرد (PUB)، یا فیکوویوبیلین ارغوانی (PVB) و یا کریپتوویلین هستند (۳) (شکل ۱). فیکوبیلی پروتین ها، توده های پروتینی بزرگی هستند که در جمع آوری نور نقش مهمی دارند و ممکن است شامل حدود ۴۰ تا ۶۰ درصد کل پروتئین های محلول در این سلول ها را شامل شود. این ها می توانند به طور وسیع به سه رده بر اساس ویژگی های طیفی خود به گروه های، فیکواریترین ها، فیکوسیانین ها و آلوفیکوسیانین ها تقسیم بندی می شوند. این ها از دو نوع متفاوت از پلی پپتیدهای سبک (آلفا با وزن مولکولی ۱۲ تا ۱۹ کیلو دالتون) و سنگین (بتا ۱۴ تا ۲۱ کیلودالتون) تشکیل شده اند. فیکوبیلی پروتین ها، به طور عمده فیکواریترین ها، به طور وسیع به عنوان اجزای مواد غذایی، رنگ های طبیعی، مارکرهای فلورسنت و دارویی از قبیل آنتی اکسیدان ها و ترکیبات ضد میکروبی کاربرد دارند. فیکواریترین ها، به عنوان مواد رنگی در غذا و مواد آرایشی مانند رژ لب و خط لب در ژاپن، تایلند و چین کاربرد دارند. ارزش درمانی (فعالیت ضد سرطانی) فیکواریترین ها، سال ها است که پذیرفته شده است. فیکواریترین ها، مهمترین رنگدانه ارغوانی استفاده شده در صنایع غذایی و بیوتکنولوژی است و دارای ویژگی های زیادی در زمینه اثرات ضد میکروبی و آنتی اکسیدان هستند (۳). آنتی اکسیدان ها موادی هستند که از اکسیداسیون سلولی مواد قابل اکسید، جلوگیری می کنند یا به تاخیر می اندازند یا کیفیت غذاها را از زوال اکسیداتیو لیپیدها حفظ می کنند. اثرات این ترکیبات، توسط از بین بردن گونه های فعال اکسیژن (Reactive oxygen species =ROS) اعمال می گردد و فعال کننده پروتین های سمیت زدا هستند یا از تولید ROS جلوگیری می کنند. گونه های فعال اکسیژن (ROS)، شامل رادیکال آنیون سوپر اکساید، رادیکال هیدروکسیل، رادیکال نیتریک اکسید و پراکسید هیدروژن، متابولیت های فیزیولوژیکی هستند. میزان های کوچکی از ROS موجب تغییرات زیان آوری بر عملکرد سلول مانند، پراکسیداسیون لیپیدها، غیر فعال سازی آنزیم ها و تخریب اکسیداتیو DNA اشاره کرد. تخریب اکسیداتیو موجب شده توسط رادیکال های آزاد، ممکن است مرتبط با افزایش سن و



شکل ۱: ساختمان تتراپیرول ها با حلقه های شماره گذاری شده (۴).

بیماری و بیماری هایی مانند تصلب شرایین، دیابت، سرطان و بیماری های کبدی باشد. مکانیسم های دفاع آنتی اکسیدانی مختلف، نقش مهمی در حذف ROS و پراکسیداسیون لیپیدها دارند و بنابر این سلول ها را در مقابل اثرات سمی ترکیبات ROS و پراکسیداسیون لیپیدها محافظت می کنند. به این منظور، تاکنون آنتی اکسیدان های مصنوعی و سنتتیک زیادی وارد بازار شده است. یکی از مهمترین مشکلات صنایع غذایی،استفاده از نگهدارنده های مصنوعی می باشد (۵). منابع مختلف، خطرات سرطان زایی نگهدارنده های مصنوعی را به وفور بیان کرده اند، استفاده از آنتی اکسیدان های مصنوعی، به واسطه ویژگی سرطان زایی، کاهش زیادی یافته است، این کاهش همچنین در استفاده از افزودنی های مصنوعی غذایی نیز مشهود است. بنابراین امروزه در سراسر جهان کوشش می شود تا آنتی اکسیدان های جدید و ایمن را از منابع طبیعی جداسازی کنند تا از تخریب اکسیداتیو مواد غذایی جلوگیری شودو همچنین تخریب اکسیداتیو سلول های زنده را کاهش دهد (۶). به همین دلیل در حال حاضر کلیه تحقیقات آزمایشگاهی در کشورهای توسعه یافته در زمینه نگهدارنده های طبیعی است که نتایج این تحقیقات به پایلوت های صنعتی و صنعت منتقل می گردد. رنگدانه ارغوانی فیکواریترین، اهمیت قابل توجهی در بخش تجاری دارند. پتانسیل اولیه این مولکول ها به عنوان رنگ های طبیعی است، اما تحقیقات بیشتر، ویژگی های آنتی اکسیدانی و آنتی میکروبی آنها را در صنایع داروسازی نشان داده است (۷). با وجود تولید گستره وسیعی از رنگیزه های طبیعی توسط سیانوباکتری ها و قابلیت رشد پذیری بالای آنها، تاکنون منابع طبیعی و بیوتکنولوژی آنها در ایران کمتر مورد بهره برداری قرار گرفته است. هدف از این پژوهش، استخراج و خالص سازی رنگدانه طبیعی خوراکی فیکواریترین در چهار مرحله و ارزیابی پتانسیل آنتی اکسیدانی و آنتی میکروبی آن به منظور کاربرد در صنایع است.

مواد و روش ها

الف) جداسازی، استخراج و خالص سازی رنگدانه فیکواریترین:

سیانوباکتری خاکزی *نوستوک* سویه FA1 (*Nostoc* sp. FA1) از مجموعه کشت سیانوباکتری های دانشگاه آزاد واحد علوم و تحقیقات Cyanobacteria culture collection (CCC)، واقع در هرباریوم البرز، در محیط کشت مایع $BG11_0$ کشت گردید. بررسی ویژگی های مورفولوژیکی سویه *نوستوک* خالص شده توسط میکروسکوپ نوری مجهز به دوربین انجام گردید (۸). جداسازی، استخراج و خالص سازی رنگیزه فیکواریترین در چهار مرحله انجام گردید.

مرحله اول: برای جداسازی رنگدانه فیکواریترین، ۵۰۰ میلی لیتر از محیط کشت ۱۴ روزه در ۴۰۰۰ rpm سانتریفیوژ و رسوب حاصل در ۲۰۰ میلی لیتر بافر استات ۲۰ میلی مولار شامل سدیم کلراید ۵۰ میلی مولار و سدیم ازید ۰/۰۰۲ مولار با pH ۱/۵ معلق گردید. فیکوبیلی پروتئین ها با تکرار روش فریز کردن در دمای ۲۰- سلسیوس و دوباره ذوب کردن در دمای اتاق استخراج گردیدند. مرحله دوم: برای خالص سازی از سولفات آمونیوم ۶۵ درصد استفاده گردید. ترکیب حاصل را به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری شد.

مرحله سوم: در این مرحله رسوب حاصله از مرحله قبل دیالیز گردید. به این ترتیب که در ابتدا کیسه دیالیز با منافذ ۱۲ تا ۱۴ کیلودالتونی به مدت ۱۰ الی ۲۰ دقیقه، در بشر حاوی آب ولرم قرار داده شد تا نرم و به راحتی از هم جدا شود. سپس رسوب حاصله از مرحله قبل در ۱۰ میلی لیتر بافر استات حل شده و با سمپلر به آرامی وارد کیسه دیالیز شد و سر آن با حلقه بسته شد. کیسه دیالیز در بشر حاوی ۱۰۰۰ میلی لیتر بافر استات با pH ۱/۵ به صورت معلق آویزان شد و به مدت ۲۴ ساعت به صورت معلق در دمای اتاق و سپس ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری شد.

مرحله چهارم: در این مرحله برای خلوص بیشتر از کروماتوگرافی تبادل آنیونی، ستون ۳۰ در ۲۰ سانتی متر و پر شده با رزین DEAD-Celloluse استفاده گردید. رنگدانه با بافر استات و گستره pH (۱/۵، ۴/۹، ۴/۷، ۴/۵، ۴/۳، ۴/۲، ۳/۹، ۳/۷۶)، آماده و وارد ستون گردید. مراحل شستشو با هر pH از

بافر استات حدودا ۳ روز زمان برد. در طی این جداسازی رنگ های مختلف در گستره های مختلف pH جداسازی گردید (۹).

ب) طیف سنجی: در انتهای هر مرحله میزان فیکواریترین، فیکوسیانین و آلوفیکوسیانین در طول موج های ۲۸۰، ۵۶۲، ۶۱۵، ۶۵۲، ۸۵۲ بر طبق Roma´n و همکاران (۱۰) خوانده و ثبت شد. میزان خلوص فیکواریترین با اندازه گیری نرخ خلوص و با استفاده از فرمول یک تا سه (A555/A280) سنجش شد. به این ترتیب که ابتدا میزان غلظت فیکوسیانین (PC) با استفاده از فرمول ۱ در طول موج های ۶۲۰ و ۶۵۰ نانومتر سنجیده شد. سپس غلظت آلوفیکوسیانین با استفاده از فرمول ۲ در طول موج های ۶۵۰ و ۶۲۰ نانومتر سنجیده شد و در نهایت غلظت فیکواریترین با استفاده از فرمول ۳ سنجیده شد.

$$PC\ (\mu g\ ml^{-1}) = \frac{(OD\ 620nm - 0.7OD\ 650nm)}{7.38} \quad \text{(فرمول ۱)}$$

$$APC\ (\mu g\ ml^{-1}) = \frac{(OD\ 650nm - 0.19OD620nm)}{5.65} \quad \text{(فرمول ۲)}$$

$$PE\ (\mu g\ ml^{-1}) = \frac{(OD\ 565nm - 2.8[PC] - 1.34[APC])}{12.7} \quad \text{(فرمول ۳)}$$

ج) SDS-PAGE: ماکزیمم محلول خالص شده از مرحله قبل به منظور تزریق بر روی ژل استفاده گردید. پس از آماده سازی محلول ذخیره اکریل آمید ۳۰٪، بافر تریس ژل پایین با غلظت ۱/۵ مولار و بافر تریس ژل بالا با غلظت ۰/۵ مولار، تهیه گردید. برای تهیه بافر تانک، ۳ گرم تریس، ۴/۱۴ گرم گلایسین و ۱۰ میلی لیتر ۱۰٪ SDS در حجم نهایی ۱ لیتر آب مقطر حل گردید. pH بافر حدود ۸/۳ تنظیم گردید. سپس ۵۰۰ میکرولیتر از نمونه به همراه ۵۰۰ میکرولیتر سمپل بافر در یک میکروتیوب ریخته شد و در یک بشر آب جوش، به مدت ۵ الی ۶ دقیقه جوشید. سپس ۵ میکرولیتر رنگدانه و ۳ میکرولیتر مارکر پروتین در چاهک ها ریخته شد. سپس با برقراری جریان ولتاژ ۱۰۰ ولت، حرکت پروتئین ها براساس وزن مولکولی ایجاد شد. در این حالت رنگ نشانگر (برومونفل بلو) طی مدت ۱/۵ تا ۲ ساعت به انتهای ژل رسید و در نهایت جریان ولتاژ قطع گردید. سپس رنگ آمیزی با استفاده از کماسی بلو انجام گردید (۱۰).

د) تعیین فعالیت آنتی اکسیدانی (اسکونجرینگ اکسید نیتریک): این فعالیت با کمک فیکواریترین خالص شده در حجم های ۵۰-۱۰۰-۱۵۰-۲۵۰ میکرولیتر انجام گردید. از ویتامین C به عنوان محلول استاندارد با غلظت ۱ میلی گرم بر میلی لیتر استفاده گردید. برای ایجاد رادیکال های آزاد از محلول نیتروپروکساید ۱۰ میلی مولار استفاده گردید. لوله های تلقیح شده به مدت ۱۵۰ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگه داشته شدند و پس از گرمخانه گذاری، ۱/۵ میلی لیتر از مخلوط واکنش به لوله های جدید منتقل گردید و ۱/۵ میلی لیتر از معرف Griess به همه لوله ها اضافه شد. سپس جذب در طول موج ۵۴۵ نانومتر خوانده شد. ویتامین C به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. کاهش در جذب به معنای میزان بالای فعالیت اسکونجرینگ است (۱۱).

ه) بررسی تاثیر ضد میکروبی عصاره به روش انتشار در ژل: در این روش از رنگدانه فیکواریترین با غلظت ۷۱۰ میکروگرم بر میلی لیتر به عنوان بازدارنده رشد باکتری ها و قارچ ها استفاده شد و نتیجه به صورت یک هاله حاوی میکروارگانیسم های رشد نیافته ظاهر شد. اندازه هاله نشان دهنده غلظت و قدرت بازدارندگی عصاره نمونه مورد آزمون می باشد. در واقع یک ارتباط خطی بین اندازه هاله و غلظت ماده مورد بررسی وجود دارد و با اندازه گیری فاصله ای که ماده مورد آزمایش در آن منتشر می گردد و به صورت رشد یا عدم رشد میکروب مورد آزمون مشخص می گردد. در انتشار به صورت افقی ماده مورد بررسی از مرکز به اطراف منتشر می شود و هاله های رشد یا عدم رشد ایجاد می کند و در این روش قطر هاله اندازه گیری می شود (۱۲).

و) بررسی خواص ضد میکروبی: سه باکتری گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* (*Staphylococcus aureus* PTCC 1112)، *باسیلوس سوبتیلیس* (*Bacillus subtilis* PTCC 1023)، *باسیلوس سرئوس* (*Bacillus cereus* PTCC 1015) و سه باکتری گرم منفی *اشریشیاکلی* (*Escherichia coli* PTCC 1047)، *سودوموناس آئروژینوسا* (*Pseudomonas aeroginosa* PTCC 1310)،

سالمونلا تایفی (*Salmonella typhi* PTCC 1609)، یک مخمر *کاندیدا آلبیکنس* (*Candida albilancs* ATCC 10231) و یک قارچ پاتوژنیک *آسپرجیلوس نایجر* (*Aspergillus niger* ATCC 16404) برای این منظور مورد ارزیابی قرار گرفت.

ز) تهیه محیط کشت باکتریایی: برای کشت باکتری ها از محیط کشت مولر–هینتون آگار استفاده گردید. به این ترتیب که ۳۴ گرم پودر مولر هینتون آگار و ۰/۵ میکروگرم متیلن بلو در یک لیتر آب مقطر به همراه هم زن مغناطیسی روی هیتر حل گردید. متیلن بلو کمک می کند تا بعد از جامد شدن محیط و قرار دادن دیسک های کاغذی قطر منطقه بازدارندگی (IZ) با وضوح بیشتری مشاهده و اندازه گیری گردد. برای تهیه محیط آبگوشت غذایی برای باکتری ها و سنجش حداقل غلظت بازدارندگی، ۱۳ گرم پودر نوترینت براث به یک لیتر آب مقطر اضافه گردید و به همراه هم زن مغناطیسی روی هیتر قرار داده شد. بعد از شفاف شدن محیط، سترون سازی انجام گردید.

ح) تهیه محیط کشت قارچی: برای بررسی اثر ضد قارچی از محیط سابرو دکستروز آگار استفاده شد، برای این منظور، ۲۵ گرم در لیتر محیط کشت به همراه ۰/۵ میکروگرم متیلن بلو بر اساس دستوری که برای کشت مولر گفته شد تهیه گردید و پس از سترون شدن درون ظرف های پتری سترون شده از قبل در کنار شعله پخش شد. برای تهیه سوسپانسیون قارچی برای سنجش حداقل غلظت بازدارندگی از محیط کشت مایع سابرو دکستروز براث ۳۰ گرم در لیتر استفاده گردید. سترون سازی محیط کشت ها در اتوکلاو با دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس و فشار ۱/۵ اتمسفر به مدت ۲۰–۱۵ دقیقه انجام گردید.

ط) آماده سازی باکتری ها و قارچ ها قبل از آزمون: برای این منظور *کاندیدا آلبیکنس* در محیط سابرودکستروز آگار به مدت ۲۴ ساعت در ۲۸ درجه سلسیوس کشت داده شد، *آسپرجیلوس نایجر* در محیط سابرودکستروز آگار به مدت هفت روز در ۲۸ درجه سلسیوس کشت داده شد. باکتری ها در محیط مولر هینتون آگار به مدت ۲۴ ساعت در ۳۵ درجه سلسیوس رشد داده شدند. کلنی های رشد یافته *کاندیدا آلبیکنس* و باکتری ها به ۲ میلی لیتر محلول نمکی (NaCl ۰/۱۴۵ مولار) منتقل شدند تا سوسپانسیون تشکیل گردد، سپس کدورت هر سوسپانسیون با استاندارد نیم مک فارلند تنظیم گردید. برای تهیه استاندارد نیم مک فارلند، ۱/۱۷۵ درصد کلرید باریوم به ۹/۹۵ میلی لیتر اسید سولفوریک یک درصد اضافه گردید. کدورت ایجاد شده تقریبا معادل $1/5\times10^{8}$ cfu ml^{-1} باکتری است. کلنی های رشد یافته *آسپرجیلوس نایجر* به محلول نمکی با همان غلظت منتقل شد، کدورت سوسپانسیون مربوطه با دستگاه اسپکتروفتومتر میکروپلیت (Infinite M200, Tecan) در طول موج ۵۳۰ نانومتر بین ۰/۰۹ و ۰/۱۱ تنظیم گردید.

ی) تلقیح سوسپانسیون آماده شده: برای این منظور در کنار شعله سواپ در شرایط کاملا استریل در زیر لامینار فلو درون لوله محتوی سوسپانسیون باکتریایی یا قارچی با کدورت تنظیم شده وارد گردید و مایع اضافی با فشار محکم سواپ به داخل لوله در بالای سطح محیط کشت خارج شد، سپس سواپ به صورت یکنواخت در تمام سطح محیط کشت آگار در سه جهت با چرخش ۶۰ درجه روی سطح محیط کشیده شد.

ک) آماده سازی دیسک های کاغذی با رنگدانه فیکواریترین: پس از آماده سازی محیط کشت باکتری ها و قارچ ها و تلقیح کردن هر ظرف پتری با سوسپانسیون باکتریایی و قارچی با کدورت تنظیم شده، برای کنترل مثبت هر دیسک با ۱۰۰ میکرولیتر رنگدانه فیکوارترین تلقیح گردید. ظرف های پتری با پارافیلم بسته شدند و در گرم خانه در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت برای باکتری ها و به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در ۲۷ درجه سلسیوس برای قارچ ها قرار گرفتند. قطر مناطق بازدارنده رشد شامل قطر دیسک کاغذی با خط کش اندازه گیری و با میلی متر بیان شد. دیسک های آنتی بیوتیکی استاندارد ۳۰ میکرو گرمی تتراسایکلین و جنتامایسین، ۱۰ میکروگرمی اریترومایسین و ۱۰ گرمی نیستاتین از شرکت پادتن طب خریداری گردید. نتایج حاصل از اندازه گیری قطر هاله عدم رشد در اطراف هر دیسک با استاندارد مقایسه گردید.

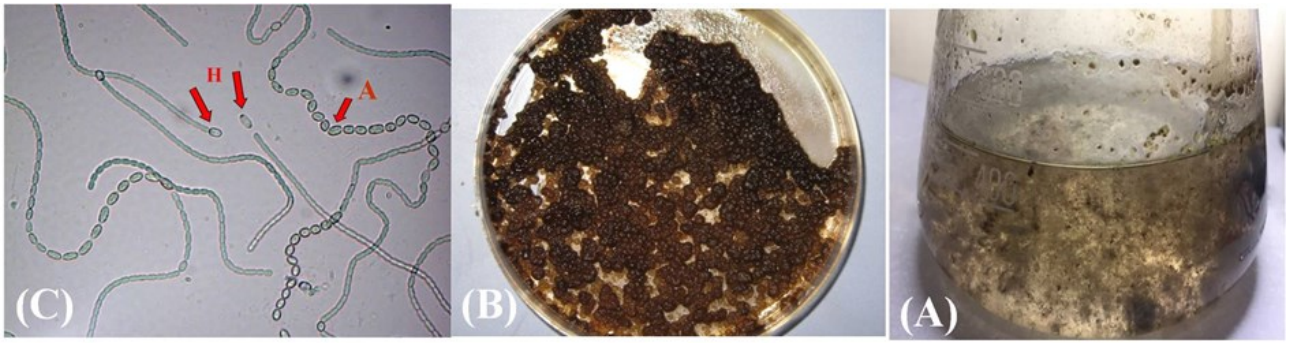
ل) آزمون آماری: آنالیزهای آماری داده های حاصل از هر آزمون با استفاده از نسخه ۲۲ نرم افزار *SPSS* انجام شد. تمام

داده ها حاصل نتایج سه تکرار است. تفاوت معنی دار بین عوامل اندازه گیری شده با آنالیز واریانس یک طرفه با حدود اطمینان ۹۵ درصد انجام گردید. به منظور مقایسه میانگین ها پس از انجام چندین بار آنالیز از آزمون توکی استفاده گردید.

یافته ها

الف) بررسی ویژگی های مورفولوژیکی سویه سیانوباکتری نوستوک: ریسه های قهوه ای روشن تا تیره به همراه سلول های هتروسیست و آکینت از ویژگی های شاخص نوستوک می باشد. *نوستوک* می توانند به آسانی کلنی تشکیل دهند و محدوده وسیعی از کلنی های ماکروسکوپیک با رنگ ها، شکل ها، اندازه ها و بافت های مختلف روی سطح ظرف پتری حاوی آگار شکل دهند. اندازه کلنی های کروی محدوده ای از ۰/۵ تا ۵ میلی متر اندازه گیری شد. با گذشت زمان و پیشرفت رشد روی ظرف پتری ها، تغییر رنگی از قهوه ای روشن تا قهوه ای تیره دیده شد. مشاهده میکروسکوپی کلنی های توپ مانند نشان داد که کلنی های جوان دارای فیلامنت های طویل هستند هر کدام با بیشتر از ۲۰ سلول رویشی و ۲ تا ۵ هتروسیست هستند (شکل ۲).

ب) ارزیابی خلوص رنگدانه فیکواریترین و آنالیز SDS-PAGE: نتایج حاصل از خوانش میزان جذب در هر مرحله خالص سازی (از تهیه عصاره خام تا کروماتوگرافی تبادل آنیونی)، افزایش معنی داری را در میزان جذب و خلوص رنگدانه فیکواریترین سیانوباکتری *نوستوک* سویه FA1 نشان داد. به طوری که میزان خلوص رنگدانه فیکواریترین تقریبا ۶ برابر (از ۱/۵ تا ۶/۲۲) گردید (جدول ۱). نتایج استفاده از بافر استات در pH ۵/۱، استخراج رنگدانه صورتی ارغوانی فیکواریترین را با خلوص ۵/۱ نشان داد. همچنین نتایج طیف سنجی (۳۰۰ تا ۷۰۰ نانومتر)، بیشترین پیک را در طول موج ۵۶۵ نانومتر، مرتبط با پیک جذب فیکوارترین نشان داد (شکل ۳). نتایج خالص از رسوب گیری با آمونیوم سولفات در مرحله دوم، موجب افزایش میزان خلوص و جذب رنگدانه فیکواریترین گردید (شکل ۴). انجام دیالیز رسوب حاصل از مرحله قبل موجب افزایش معناداری در رنگدانه خالص شده نسبت به مرحله قبل نگردید (شکل ۵). استفاده از کروماتوگرافی تبادل آنیونی موجب افزایش معناداری در میزان



شکل ۲: (A) محیط کشت مایع به همراه کلنی های قهوه ای رنگ *نوستوک* سویه FA1 سرشار از رنگدانه فیکواریترین (B) میکروفتوگراف های کلنی های کروی *نوستوک* سویه FA1 روی ظرف های پتری جامد، (C) فوتومیکروگراف *نوستوک* سویه FA1، نشان دهنده تمایز سلولی سلول های رویشی به هتروسیست های انتهایی (H) و آکینت هایی که به صورت خطی قرار گرفتند (A) است (X400).

جدول ۱: میزان غلظت و خلوص رنگدانه فیکواریترین در چهار مرحله خالص سازی.

مراحل	حجم (ml)	فیکواریترین (µg/ml)	خلوص فیکواریترین (OD555/OD280)
عصاره خام	۱۰۰	۶۵/۰۴	۱/۵
رسوب گیری با سولفات آمونیوم	۱۰	۵۳۲	۴/۸۲
دیالیز	۱۰	۵۵۰	۴/۹۷
کروماتوگرافی تبادل آنیونی	۵	۷۱۰	۶/۲۲

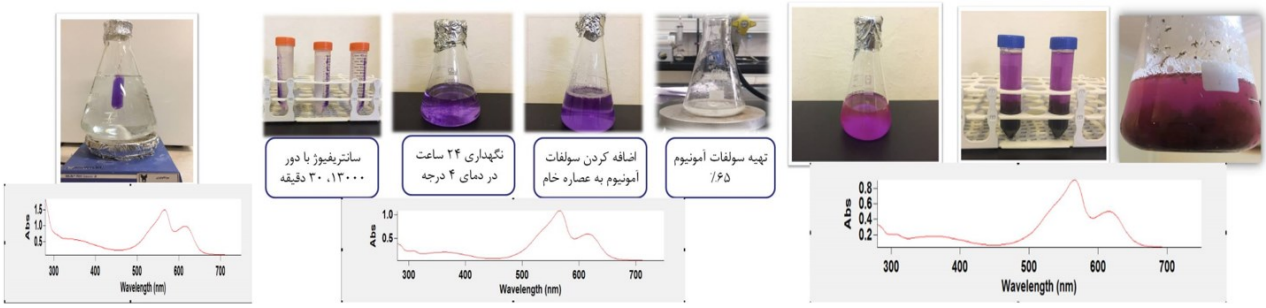
خلوص رنگدانه تا ۶ برابر نسبت به مرحله اول استخراج گردید و بیشترین میزان خلوص در pH ۳/۹ با غلظت ۷۱۰ (µg/ml) یافت گردید. نتایج آنالیز SDS-PAGE رنگدانه فیکوواریترین استخراج شده در pH ۳/۹، دو باند ۱۵ و ۱۸ کیلودالتونی مرتبط با زیرواحد های آلفا و بتاپروتین فیکوواریترین خالص شده را نشان داد (شکل ۶). شکل حاصل نشان داد که کیفیت باندهای حاصله در مرحله کروماتوگرافی همراه با افزایش خلوص و غلظت بیشتر گردید.

ج) ارزیابی فعالیت ضد میکروبی رنگدانه فیکوواریترین خالص شده: *رنگدانه* فیکوواریترین خالص شده، فعالیت قابل توجهی را در برابر باکتری های گرم مثبت و گرم منفی نشان داد (شکل های ۷ و ۸). رنگدانه فیکوواریترین بیشترین فعالیت ممانعت کنندگی را در مقابل *باسیلوس سوبتیلیس* (۰/۲۸±۱۰/۵) و *کاندیدا آلبیکنس* (۰/۰۰۶±۱۰/۹۸) نشان داد (جداول ۲ و ۳).

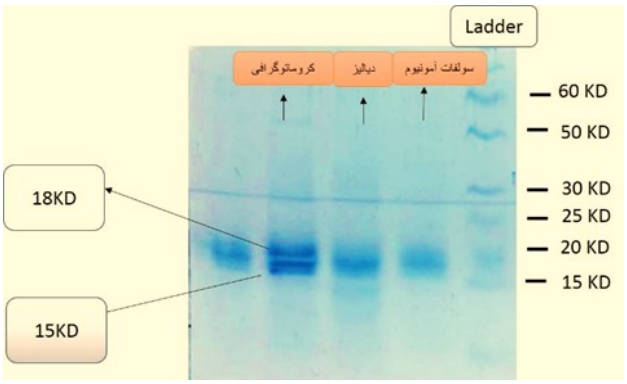
د) ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی: بررسی فعالیت اسکونجینگ رادیکال های آزاد نیتریک اکساید نشان داد که رنگدانه فیکوواریترین وابسته به غلظت است، به این معنی که با افزایش میزان غلظت (۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۵۰) میزان فعالیت افزایش معناداری پیدا می کند (۷۹٪، ۸۴٪، ۹۱٪ و ۹۸٪) (شکل ۹).

بحث

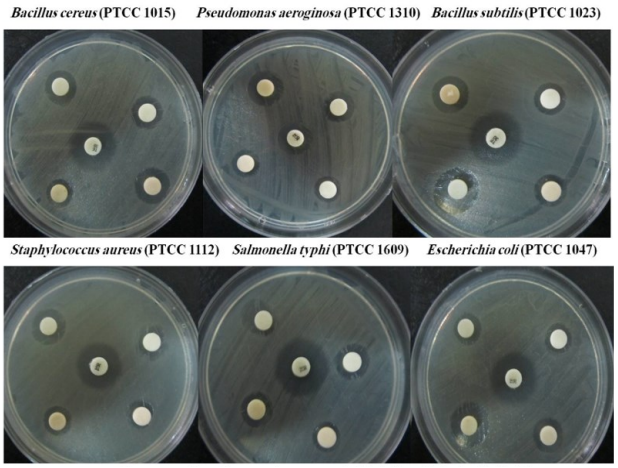
از نیم قرن پیش، آنتی بیوتیک ها، به عنوان داروهای معجزه کننده، همراه مورد توجه بوده اند، اما به تدریج با استفاده افراطی آنتی بیوتیک ها، از محبوبیت شان کاسته شد. از دهه گذشته، محققان به این نتیجه رسیدند که تاثیر داروهای ضد



شکل ۳: استخراج رنگدانه ارغوانی فیکوواریترین با استفاده از بافر استات در مرحله اول (الف)، رسوب گیری با آمونیوم سولفات در مرحله دوم (ب)، انجام دیالیز در مرحله سوم (ج) و نتایج حاصل از طیف سنجی.

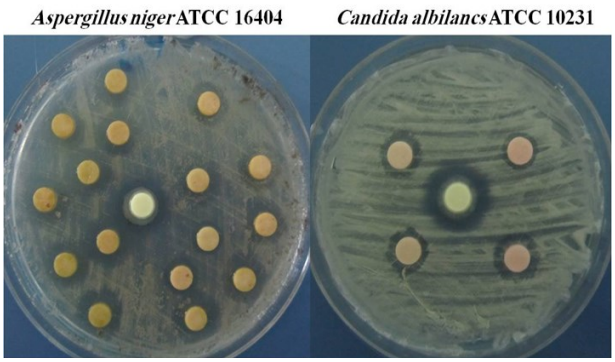


شکل ۶: آنالیز SDS-PAGE رنگدانه فیکوواریترین استخراج شده در مرحل استخراج به آمونیوم سولفات، دیالیز و کروماتوگرافی. حضور دو باند ۱۵ و ۱۸ کیلودالتونی مرتبط با زیرواحد های آلفا و بتا پروتئین فیکوواریترین خالص شده در شکل مشخص است.



شکل ۷: تاثیر بازدارندگی رنگدانه فیکوواریترین در برابر شش باکتری گرم مثبت و گرم منفی.

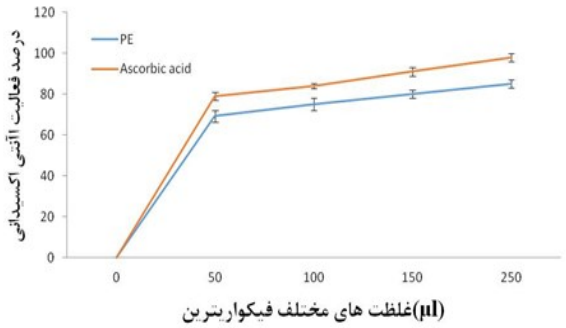
میکروبی، به مرور زمان در حال کاهش است، این امر عمدتا به واسطه افزایش مقاومت به پاتوژن ها است. مقاومت آنتی بیوتیکی در جمعیت های باکتریایی با استفاده از داروهای ضد میکروبی امروزی در حال افزایش است. بنابر این اهمیت نیاز مداوم به جستجو و تحقیق برای جستجوی ترکیبات طبیعی با خاصیت ضد میکروبی با طیف وسیع موثر و جدیدتر بدون آثار جانبی، پیش از پیش تاکید می گردد. جستجوی سیانوباکتری ها، به عنوان منابعی جدید از آنتی بیوتیک ها، افق تازه ای را برای کشف داروهای جدید گشود. در دو دهه گذشته، سیانوباکتری های جنس *نوستوک* با تولید محدوده وسیعی از ترکیب های فعال زیستی جدید با اهمیت دارو شناختی فراوان، شناخته شدند. ترکیب های فعال زیستی در این جنس، گستره وسیعی از فعالیت های زیستی مانند فعالیت های ضد باکتریایی، ضد قارچی، ضد ویروسی و سیتوتوکسیک و گاهی فعالیت های بازدارندگی پروتئاز را دارد. همچنین بررسی های مختلف در زمینه آثار ضد میکروبی عصاره های *نوستوک* بر ارگانیسم های مختلف پاتوژنیک انجام شده است. بیشتر این متابولیت های ثانویه با خاصیت ضد میکروبی، در بیومس سیانوباکتری ها تجمع می یابند، اما مطالعات نشان می دهد که سیانوباکتری ها قادرند این ترکیبات را به درون محیط شان نیز تراوش کنند. بنابراین بررسی هر چه بیشتر روی سیانوباکتری ها فرصت خوبی برای کشف ترکیب های جدید فعال زیستی است. در سال های اخیر تحقیق های فراوانی در زمینه جداسازی ترکیب های فعال زیستی نیز از سیانوباکتری ها انجام شده است (۱۳، ۱۴). نتایج این مطالعات منجر به استخراج موادی با ویژگی های ضد باکتریایی، سیتوتوکسیک، ضد سرطان، ضد قارچ و غیره شد. به عنوان نمونه ترکیبات جداشده از Nostocyclamide سویه *نوستوک* دارای خواص ضد قارچی، Nostocine A *نوستوک اسپانجی فورمی* (*Nostoc spongiaeforme*) دارای خواص ضد جلبکی، Cyanobacterin LU-1 *نوستوک لینکیا* (*Nostoc linckia*) دارای خواص ضد جلبکی، Nostodione *نوستوک کامونی* (*Nostoc commune*) دارای خواص ضد قارچی،

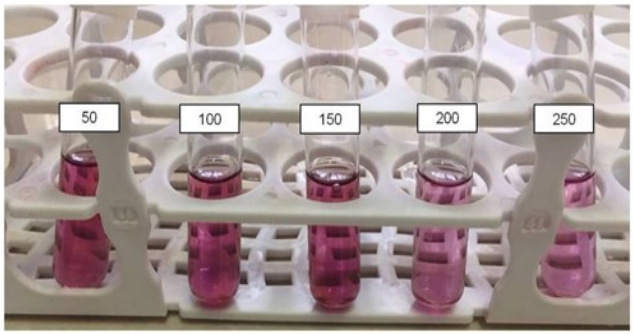


شکل ۸: تاثیر بازدارندگی رنگدانه فیکواریترین در برابر مخمر و قارچ پاتوژنیک.

جدول ۲: فعالیت ضد باکتریایی و ضد قارچی رنگدانه فیکواریترین، قطر منطقه بازدارندگی بر حسب میلی متر و به صورت Means ± SE نشان داده شده است.

رنگدانه فیکواریترین	
۰/۲۸ ±۱۰/۵	*باسیلوس سوبتیلیس*
۰/۵۲ ±۱۱/۰۶	*باسیلوس سرئوس*
۰/۰۹ ±۸/۱۴	*اشرشیاکلی*
۰/۱۶ ±۹/۱۶	*استافیلوکوکوس اورئوس*
۰/۷۲ ±۱۰/۱۶	*سودوموناس آئروژینوسا*
۰/۲۸ ±۵/۹	*سالمونلا تایفی*
۰/۲۸± ۹/۵	*آسپرجیلوس نایجر*
۰/۰۰۶±۱۰/۹۸	*کاندیدا آلبیکنس*





شکل ۹: فعالیت اسکونجینگ رادیکال های آزاد نیتریک اکساید. میزان فعالیت با افزایش میزان غلظت به طور معناداری افزایش داشت.

Norharmane *نوستوک اینسولاری* (*N. insulare*) دارای خواص ضد باکتریایی، Indolocarbazoles *نوستوک اسفاریکوم* (*N. sphaericum*) دارای خواص ضد ویروسی است و Nostofungicidine *نوستوک کامونه* دارای خواص ضد قارچی می باشند (۱۵، ۱۶، ۱۷، ۱۸ و ۱۹). Asthana و همکاران (۲۰) نشان دادند که عصاره متانولی حاصل از سویه *فیشرلا* (*Fischerella* sp.) دارای خاصیت ضد باکتریایی در برابر *سودوموناس آئروجینوسا*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *انتروباکتر آئروجنس* (*Enterobacter aerogenes*)، *مایکوباکتریوم توبرکیلوسیس* (*Mycobacterium tuberculosis*)، *سالمونلا تایفی*، *اشریشیاکلی* و هم چنین سه سویه از *اشریشیاکلی* مقاوم در برابر چند دارو در شرایط آزمایشگاهی (in vitro) است. همچنین گزارش شده است که سیانوفیت خاکزی *فیشرلا*، به دلیل دارا بودن ترکیبی به نام Hapalindole T، دارای فعالیت ضد باکتریایی و ضد قارچی می باشد. ترکیب های فعال زیستی تاکنون شناسایی شده دارای ساختمان های متنوعی چون اسیدهای چرب، فنولیک ها، برومونفل ها، ترپنوئیدها، N-گلیکوزیدها، دپسی پپتیدهای حلقوی، لیپوپپتیدها، پپتیدهای حلقوی و آلکالوئیدهای ایندولی هستند. بسیاری از ترکیب های زیستی متعلق به رده های شیمیایی پپتیدهای سیکلیک و آلکالوئیدها هستند که در گونه های *Nostoc* شناسایی شدند. ساختمان های لیپوپپتیدی گاهی به بزرگی ۳۰۰ تا ۲۰۰۰ دالتون نیز می رسد. تعداد فراوانی از پپتیدها، شامل باقی مانده های غیر پروتینی، مانند D آمینو اسیدها، β آمینو اسیدها، اسیدهای آمینه هیدروکسیله شده و N متیله شده و همچنین اسیدهای آمینه پروتینوژنیک هستند که منجر به افزایش تنوع ساختمانی آن ها می شود (۷). مسیر بیوسنتزی چندین پپتید سیانوباکتریایی، تاکنون بررسی شدند. پپتیدهای حلقوی از لحاظ فیلوژنتیکی بسیار قدیمی هستند. سنتز پپتیدهای حلقوی، غیر ریبوزومی است و به وسیله آنزیم های رمزگذاری شده توسط مجموعه ژنی کنترل می شود. این مجموعه ژنی، در معرض نوترکیبی های طبیعی هستند (تکرارهای ناقص، از دست دادن ژن و انتقال افقی ژن) که می تواند دلیلی برای تنوع وسیع آن ها باشد. فرضیه ها، نشان می دهد که با مهندسی ژنتیک مجموعه های ژنی رمزگذاری کننده پپتید سنتازهای غیر ریبوزومی، پپتیدهایی با تنوع دلخواه مانند آنتی بیوتیک های مختلف و سودمند تولید می شود (۸). ایجاد مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک های موجود در بازار، توجه همگان را برای کشف ترکیبات ضد باکتریایی جدید به خود جلب کرده است. همواره، ریز جلبک های دریایی، ترکیبات مفیدی را از این نوع تولید می کنند، به همین دلیل، تحقیقات برای آنتی بیوتیک های جدید در حال انجام است. چندین باکتری بیماری زا مانند سویه های مقاوم به چندین دارو مانند *استافیلوکوکوس اورئوس* که با کمک حتی آنتی بیوتیک های سنتی موجود در بازار هم از بین نمی روند، بسیار مورد توجه سازمان بهداشت جهانی قرار دارند. بنابر این، کشف ترکیبات ضد باکتریایی جدید با مکانیسم های بیوشیمیایی مجزا، عامل مهمی برای غلبه بر مشکلات ایجاد شده در نتیجه مقاومت است. اگر چه تعداد کمی از ریز جلبک های دریایی برای تولید محصولات این نوع شناخته شدند، اما هنوز جستجو برای کشف آنتی بیوتیک های جدید، هنوز در حال انجام است. به عنوان نمونه فعالیت عصاره های سلولی *فیوداکتیوم تریکورنوتوم* (*Phaeodactylum tricornutum*) در مقابل هم باکتری های گرم مثبت و هم گرم منفی، در سطوح میکرومول، به دلیل حضور اسید ایکوزاپنتانوئیک (Eicosapentaenoic acid =EPA) است، ترکیبی که به صورت بدون الگو (de novo) در دیاتومه ها سنتز می شود. این اسیدهای چرب غیر اشباع (Polyunsaturated fatty acids= PUFAs) به طور عمده در ترکیبات ساختمانی سلول (به عنوان نمونه در غشا) وجود دارد. این ترکیب در دفاع ریز جلبک ها به واسطه سمیت شان نقش مهمی دارد. با این حال، هنوز مکانیسم عملکردشان ناشناخته است. EPA، مکان های هدف چندگانه ای دارند. غشاهای سلول بیشترین احتمال تخریب را دارد، زیرا تخریب غشا ممکن است منجر به نشت سلولی شود و جذب مواد غذایی را کاهش دهد، همچنین تنفس سلولی را کاهش می دهد (۱۹-۱۷). عصاره آلی تولید شده از ترکیبات سنتز شده توسط *سندسمس*

کوستاتوم (*Scenedesmus costatum*)، فعالیت ضد باکتریایی دارند. این فعالیت، به دلیل حضور اسیدهای چرب طویل تر از ده اتم کربن در طول زنجیره است، که ظاهرا موجب لیز شدن پروتوپلاست های باکتریایی می شود. توانایی اسیدهای چرب، برای مداخله با رشد باکتریایی و زنده ماندن، چندین دهه است که ثابت شده است. اما مطالعات روابط اخیر، ساختمان عمل آن را واضح تر می سازد که این چنین فعالیت آنتی میکروبی به طول زنجیره و میزان غیر اشباع بودن آن وابسته است. توانایی ضد جلبکی، می تواند ناشی از دخالت در سنتز پروتین و کلروفیل باشد، که با تغییرات در نفوذ پذیری غشا و گسستگی تجمعات فیکوبیلین ها در غشاهای تیلاکوئید، کوپل می شود و در نهایت منجر به نشت از طریق دیواره سلولی می شود (۷، ۱۰ و ۱۱). فعالیت های ضد باکتری توسط ترکیبات متفاوتی با سیانوتوکسین ها تولید می شوند. در یک مطالعه، ۲۷ کشت کلنی شامل ۱۴ جنس سیانوباکتری ها (۱۸ سمی و ۹ سویه غیر سمی) در شرایط کنترل شده آزمایشگاه، کشت شدند. نتایج نشان داد که هم سیانوباکتری های سمی و هم غیر سمی، تولید کنندگان متابولیت های ثانویه با ویژگی های ضدباکتریایی هستند (۱۷ و ۱۸). مخلوطی از اسیدهای چرب مختلف شامل اسید لینولئیک و لینولنیک نشان داده شد که مسئول این خواص هستند. حداقل غلظت بازدارنده (MICs) اسید لینولنیک از ۷۵ میکروگرم بر میلی لیتر در برابر *استافیلوکوکوس اورئوس* تا ۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر در برابر *میکروکوکوس فلاووس* (*Micrococcus flavus*) به دست آمد. با این حال آمپی سیلین با MIC ۰/۰۵ میکروگرم بر میلی لیتر و ۰/۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر به ترتیب، قدرت ممانعت کنندگی بیشتری داشت. ترکیبات دارای خواص ضد باکتریایی دیگری نیز از سیانوباکتری ها از ستون فاز معکوس کروماتوگرافی جدا شده است که مخلوطی از اسیدهای چرب غیر اشباع شده و هیدروکسیله هستند (۶، ۱۷ و ۱۸). بررسی های بسیاری در زمینه آثار ضد باکتریایی عصاره های سویه های *فیشرلا*، *اسپیرولینا پلتنسیس* (*Spirulina platensis*)، *آنابنا وریبلیس* (*Anabaena variabilis*)، *نوستوک*، *اسیلاتوریا* (*Oscillatoria*)، *آنابنا* (*Anabaena*)، *سینکوسیستیس* (*Synechocystis*)، *سینکوکوس* (*Synechococcus*) و دیگر گونه های متعلق به راسته های *Chroococales*، *Pleurocapsales*، *Oscilatoriales*، *Nostocales* و *Stigonematales* انجام گردیده است. به عنوان نمونه از جمله ترکیب های ضد باکتریایی جدا شده در منابع می توان به ایزونیتریل های آمبیگوئین، آئوسکومین، کومنوستین A-E، نورهارمان، لینگبیازوترین ها و کربامیدوسیکلوفان ها اشاره کرد (۱۹ و ۲۰). بسیاری از پپتیدهای حلقوی سیانوباکتری ها، دارای فعالیت ضد میکروبی ویژه ای هستند. برای نمونه کاواگوچی پپتین A و B، دو پپتید حلقوی با فعالیت ضد باکتریایی هستند که از *میکروسیتیس آئروجینوسا* (*Microcystis aeruginosa*) جداسازی شدند و مانع از رشد باکتری گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* در غلظت یک میکروگرم بر لیتر می شوند (۲۰). با این حال و بر طبق مقالات موجود و در دسترس، تاکنون مطالعات کمی در زمینه استخراج و خالص سازی رنگدانه فیکواریترین و همچنین بررسی فعالیت بیواکتیو سویه نوستوک انجام شده است. اما بیشتر مطالعات بر جداسازی رنگدانه فیکواریترین از سویه های دیگر سیانوباکتریایی و جلبک های قرمز متمرکز هستند (۴، ۹، ۱۰و ۲۶-۲۱) رنگدانه فیکواریترین کاربرد بسیار زیادی در صنایع غذایی و دارویی دارد (۴، ۲۷ و ۲۸). به همین دلیل تاکنون از روش های مختلفی برای خالص سازی رنگدانه فیکواریترین استفاده شده است، در این مطالعه رسوب گیری با سولفات آمونیوم ۶۵٪، منجر به خلوص ۴/۸۲ گردید. اما رانجیتا (Ranjitha) و کوشیک (Kaushik) (۲۹)، با استفاده از سولفات آمونیوم ۵۵٪، خلوص ۲/۸۹ را از *نوستوک موسکوروم* (*Nostoc muscorum*) گزارش کرده اند. همچنین پارمار (Parmar) و همکاران (۲۴)، خلوص ۱/۵٪ را در سویه *فورمیدیوم* (*Phormidium* sp. A27DM)، *لینگ بیا* (*Lyngbya* sp. A09DM) و *هالومیکرونما* (*Halomicronema* sp. A32DM) پس از تیمار عصاره خام با سولفات آمونیوم ۷۰٪ به دست آوردند. محققان دیگر سعی

کردند با افزودن نگهدارنده های مختلف به رنگدانه فیکوارترین، زمان ماندگاری و پایداری آن را افزایش دهند. به عنوان نمونه، آفرین (Afreen) و همکاران (۵)، تحقیقی در زمینه جداسازی رنگدانه فیکواریترین و افزایش خلوص آن انجام دادند. این افراد ترکیبات متفاوتی را مانند استات، کربنات، سیترات، فسفات سدیم و تریس به عنوان بافر اضافه کردند و در نهایت به این نتیجه رسیدند که افزودن استات با pH ۶ بیشترین میزان فیکواریترین را حاصل می کند. میشرا (Mishra) و همکاران (۳)، تحقیقی در زمینه افزایش زمان ماندگاری رنگدانه فیکواریترین جدا شده از سویه *سودوموناس* انجام دادند. نتایج نشان داد که اسید سیتریک، از بهترین نگهدارنده های افزایش دهنده زمان ماندگاری رنگدانه در محلول است. مطالعات نشان می دهد که وزن مولکولی زیر واحد های فیکواریترین خالص شده از ارگانیسمی به ارگانیسم دیگر متفاوت است (۳۰). به عنوان نمونه، باندهای ۱۹/۴ و ۱۶/۹ کیلودالتونی از *نوستوک موسکوروم* (۲۹)، باندهای ۱۸، ۲۰ و ۳۲ کیلودالتونی از *لینگ بیا آربوریکولا* (*Lyngbya arboricola*) (۳۱)، باندهای ۱۷/۹ و ۱۹ کیلودالتونی در *سینکوکوس* (*Synechococcus*) (۳۲)، باند های ۱۸، ۱۸/۵ و ۲۰ کیلودالتونی در *هالومیکرونما* (*Halomicronema*) (۲۴) و باندهای ۴۲/۱ kDa و ۵۳/۷ kDa از *پلی سیفونیا ارسیولاتا* (*Polysiphonia urceolata*) (۳۳) گزارش شده است. این در حالی است که زیرواحدهای یافت شده از رنگدانه استخراج شده در این مطالعه مشابه با پژوهش انجام شده توسط آفرین (Afreen) و فاطما (Fatma) (۵) بود. به این ترتیب که آنها نیز دو زیر واحد ۱۵/۸ و ۱۷/۷ کیلودالتون را که نشان دهنده زیرواحدهای آلفا و بتا بود در *میکروچات* (*Michrochaete*) یافتند. نتایج حاصل از چندین مطالعه، فعالیت آنتی میکروبی مشابه با کار حاضر را نشان داد، در این مطالعات فعالیت متوسط ضد میکروبی فیکواریترین استخرج شده از سویه های دیگر سیانوباکتری در مقابل *کاندیدا آلبیکس*، *اسپرجیلوس نایجر*، *سودوموناس ائروجینوسا*، *کاندیدا آلبیکنس*، *اشریشیا کلی* و *استافیلوکوکوس* نشان داده شده است (۵ و ۳۴).

استفاده از فیکواریترین به عنوان یک رنگ طبیعی در صنایع غذایی نه تنها بی خطر است، بلکه دارای فعالیت آنتی اکسیدانی بالقوه ای نیز هست (۳۵). به عنوان نمونه سونانی (Sonani) و همکاران (۳۵)، فعالیت آنتی اکسیدانی و ضد پیری و ضد آلزایمری فیکواریترین استخراج شده از سویه *لینگ بیا* (*Lyngbya* sp. A09DM) را نشان دادند. نیتریک اکساید، ترکیب شیمیایی مهمی است که در سلول های اندوتلیال، ماکروفاژها، نورون ها و غیره تولید می شود. این ترکیب تنظیم کننده فعالیت های فیزیولوژیکی متنوع است. غلظت بالای نیتریک اکساید موجب بیماری های مختلف مانند تصلب شرایین، کم خونی، آلزایمر، پارکینسون، سرطان و دیابت می شود (۳۶). اکسیژن با نیتریک اکساید اضافی واکنش می دهد و آنیون های نیتریت و پراکسی نیتریت را تولید می کند که به عنوان رادیکال های آزاد عمل می کنند. در این مطالعه رنگدانه فیکواریترین خالص شده با اکسیژن و نیتریک اکساید واکنش می دهد و بنابر این مانع از تولید آنیون ها می شود. به طور مشابه کمبل (Kamble) و همکاران (۱۱) نشان دادند که درصد ممانعت نیتریک اکساید تولید شده توسط فیکوسیانین در غلظت های ۱۰، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ µg/ml به طور مشخص موجب ممانعت ۶۴/۶، ۸۶/۶۵، ۹۰/۱۷ و ۹۲/۴ درصدی از رادیکال های نیتریک اکساید می شوند. محققان آنتی اکسیدانی رنگدانه فیکوسیانین را از *آفانیزومنان فلوس-آکوآ* (*Aphanizomenon flos-aquae*) جدا کردند. نتایج، کارامدی عصاره طبیعی رنگدانه را در محافظت از اریتروسیت های انسان و نمونه های خونی در مقابل تخریب اکسیداتیو القا شده با AAPH (2,2'-Azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride) نشان داد. در سلول های گلبول قرمز تیمار شده با ۵۰ میلی مولار AAPH، رادیکال های آزاد به ترکیبات غشایی اریتروسیت ها مانند پروتین ها و لیپیدها که منجر به تغییراتی در ساختمان و عملکرد غشاها می شوند، حمله می کنند و نتیجه، هومولیز گلبولهای قرمز در طول انکوباسیون سلول ها با AAPH مشاهده گردید (۲۱، ۲۵ و ۲۶). عصاره های رنگدانه های

سیانوباکتری ها، دارای ویژگی های دارویی بسیار بالایی هستند. محققان ویژگی های آنتی اکسیدانی رنگدانه ها را در جلوگیری از تکثیر سلول ها مطالعه کردند. مطالعات نشان داد که فیکوسیانین از سویه *آنابنا* (*Anabaena* PCC 7120) می تواند تکثیر سلول ها را ممانعت کند و مرگ سلولی را با دپلیمریزاسیون اسکلت سلولی و فعال سازی فعالیت های آبشاری القا کند. همچنین نتایج نشان داد که رشد همه سلول های سرطانی به مقدار زیادی توسط تیمار با رنگدانه ها ممانعت می شود. این رنگدانه، بیشترین ممانعت را به میزان ۶۰ درصد دارد و از طرف دیگر، رنگدانه ها اثرات ممانعت کنندگی کمی (تا ۳۰ درصد) بر رشد سلول های غیر سرطانی را نشان می دهد. این رنگدانه همچنین از تکثیر سلولها جلوگیری می کند و دارای ژن های مقاومت به چندین دارو (Multi-drug Resistance gene-1 =MDR1) است. این ژن پروتین MDR1 را رمز گذاری می کند که مانع اولیه در شیمی درمانی سرطان است. در *اسپیرولینا پلتنسیس* (*Spirulina platensis*)، این رنگدانه ROS را از بین می برد و بیان داروهای متنوع دیگر را به طور اولیه با بیان بیش از حد MDRI متوقف می سازند (۳۶). در مقایسه ای بین آنتی اکسیدان های غیر آنزیمی دیگر به نام های فرو سولفات، اسید آسکوربیک، اسید اوریک، آلفا توکوفرول و فیکوسیانین، رنگدانه های سیانوباکتری ها دارای فعالیت آنتی اکسیدانی یا مساوی و یا بیشتر از همه آنتی اکسیدان ها را داشت. ظرفیت آنتی اکسیدانی فیکوسیانین به فرو سولفات، اسید آسکوربیک، اسید اوریک، آلفا توکوفرول به ترتیب ۴/۲۵، ۱/۷۸، ۰/۹۴، ۳/۹۸ و ۲/۶۵ بود. گروه پروستتیک تتراپیرولی خطی که عموما بیلین ها نامیده می شوند، به این رنگدانه، توانایی اسکونجرینگ ROS را می دهند. از این رو می توانند به عنوان یک آنتی اکسیدان عمل کنند (۳۵).

نتیجه گیری

اگرچه تاکنون کتاب ها و مقالات تخصصی در زمینه کاربرد سیانوباکتری ها در زیست پزشکی و حتی آرایشی به چاپ رسیده است (۲ و ۳۷)، تا کنون تحقیقی در مورد استخراج، جداسازی و خالص سازی و همچنین ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی رنگدانه فیکوواریترین در ایران انجام نگرفته است. بنابراین نتایج این تحقیق می تواند زمینه ساز معرفی رنگدانه های طبیعی خوراکی از سیانوباکتری ها با قابلیت استفاده در صنایع غذایی با فعالیت آنتی اکسیدانی و آنتی میکروبی از ایران تلقی گردد. تمامی مراحل کشت و استخراج رنگدانه در ابعاد وسیع به غیر از هزینه مربوط به فضا، مقرون به صرفه بوده و به راحتی می توان با تولید رنگدانه و تهیه پودر خشک آن، در صنایع غذایی جایگزینی مناسب برای رنگ های مصنوعی سرطان زا باشد. با این حال، مطالعات سم شناسی برای تولیدات تجاری توصیه می گردد. علاوه بر آن، انجام مطالعات وسیع در زمینه پایداری مولکولی رنگدانه فیکوواریترین در معرض تنش های مختلف نیاز است تا استفاده از آن را بدون محدودیت در صنایع مختلف افزایش دهد.

ملاحظات اخلاقی

نویسندگان تمامی نکات اخلاقی شامل عدم سرقت ادبی، انتشار دوگانه، تحریف داده ها و داده سازی را در این مقاله رعایت کرده اند.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از تمامی پرسنل محترم آزمایشگاه رازی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات کمال امتنان را دارند.

تعارض در منافع

وجود ندارد.

References

1. Nowruzi B, Haghighat S, Fahimi H, Mohammadi E. *Nostoc* cyanobacteria species: a new and rich source of novel bioactive compounds with pharmaceutical potential. Journal of Pharmaceutical Health Services Research. 2018 Mar;9(1):5-12.

2. Nowruzi B, Sarvari G, Blanco S. Applications of cyanobacteria in biomedicine. InHandb. Algal Sci. Microbiol. Technol. Med 2020. Elsevier Amsterdam. 441-454.

3. Mishra SK, Shrivastav A, Pancha I, Jain D, Mishra S. Effect of preservatives for food grade C-Phycoerythrin, isolated from marine cyanobacteria *Pseudanabaena* sp. International journal of biological macromolecules. 2010 Dec 1;47(5):597-602.

4. Stadnichuk IN. Phycobiliproteins: Determination of chromophore composition and content. Phytochemical Analysis. 1995 Nov;6(6):281-8.

5. Afreen S, Fatma T. Extraction, purification and characterization of phycoerythrin from *Michrochaete* and its biological activities. Biocatalysis and agricultural biotechnology. 2018 Jan 1;13:84-9.

6. Arun N, Gupta S, Singh DP. Antimicrobial and antioxidant property of commonly found microalgae *Spirulina platensis, Nostoc muscorum* and *Chlorella pyrenoidosa* against some pathogenic bacteria and fungi. International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research. 2012 Dec 1;3(12):4866.

7. Basheva D, Moten D, Stoyanov P, Belkinova D, Mladenov R, Teneva I. Content of phycoerythrin, phycocyanin, alophycocyanin and phycoerythrocyanin in some cyanobacterial strains: Applications. Engineering in Life Sciences. 2018 Nov;18(11):861-6.

8. Nowruzi B, Blanco S. In silico identification and evolutionary analysis of candidate genes involved in the biosynthesis methylproline genes in cyanobacteria strains of Iran. Phytochemistry Letters. 2019 Feb 1;29:199-211.

9. Chakdar H, Pabbi S. Extraction and purification of phycoerythrin from *Anabaena variabilis* (CCC421). Phykos. 2012;42(1):25-31.

10. Román RB, Alvarez-Pez JM, Fernández FA, Grima EM. Recovery of pure B-phycoerythrin from the microalga *Porphyridium cruentum*. Journal of Biotechnology. 2002 Jan 31;93(1): 73-85.

11. Kamble SP, Gaikar RB, Padalia RB, Shinde KD. Extraction and purification of C-phycocyanin from dry *Spirulina* powder and evaluating its antioxidant, anticoagulation and prevention of DNA damage activity. Journal of Applied Pharmaceutical Science. 2013 Aug 1;3(8):149.

12. Nowruzi B, Blanco S, Nejadsattari T. Chemical and molecular evidences for the poisoning of a duck by anatoxin-a, nodularin and cryptophycin at the coast of Lake Shoormast (Mazandaran province, Iran). Int J Algae. 2018;20(4).

13. Nowruzi B, Wahlsten M, Jokela J. A report on finding a new peptide aldehyde from cyanobacterium *Nostoc* sp. Bahar M by LC-MS and Marfey's analysis. Iranian journal of biotechnology. 2019 Apr;17(2).

14. Nowruzi B, Khavari-Nejad RA, Sivonen K, Kazemi B, Najafi F, Nejadsattari T. Identification and toxigenic potential of a *Nostoc* sp. Algae. 2012 Dec 1;27(4):303.

15. Hastie CJ, Borthwick EB, Morrison LF, Codd GA, Cohen PT. Inhibition of several protein phosphatases by a non-covalently interacting microcystin and a novel cyanobacterial peptide, nostocyclin. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects. 2005 Nov 15;1726(2): 187-93.

16. Becher PG, Jüttner F. Insecticidal compounds of the biofilm-forming cyanobacterium *Fischerella* sp.(ATCC 43239). Environmental Toxicology: An International Journal. 2005 Jun;20(3):363-72.

17. Dahms HU, Ying X, Pfeiffer C. Antifouling potential of cyanobacteria: a mini-review. Biofouling. 2006 Jan 1;22(5):317-27.

18. Jaiswal P, Singh PK, Prasanna R. Cyanobacterial bioactive molecules—an overview of their toxic properties. Canadian Journal of Microbiology. 2008 Sep;54(9):701-17.

19. Prasanna R, Nain L, Tripathi R, Gupta V, Chaudhary V, Middha S, Joshi M, Ancha R, Kaushik BD. Evaluation of fungicidal activity of extracellular filtrates of cyanobacteria–possible role of hydrolytic enzymes. Journal of basic microbiology. 2008 Jun;48 (3):186-94.

20. Asthana RK, Srivastava A, Singh AP, Singh SP, Nath G, Srivastava R, Srivastava BS. Identification of an antimicrobial entity from the cyanobacterium *Fischerella* sp. isolated from bark of *Azadirachta indica* (Neem) tree. Journal of applied phycology. 2006 Feb 1;18(1):33-9.

21. Kawsar SM, Fujii Y, Matsumoto R, Yasumitsu H, Ozeki Y. Protein R-phycoerythrin from marine red alga *Amphiroa anceps*: extraction, purification and characterization. Phytologia Balcanica. 2011;17(3):347-54.

22. Zhao M, Sun L, Sun S, Gong X, Fu X, Chen M. Phycoerythrins in phycobilisomes from the marine red alga *Polysiphonia urceolata*. International journal of biological macromolecules. 2015 Feb 1;73:58-64.

23. Wang L, Wang S, Fu X, Sun L. Characteristics of an R-Phycoerythrin with two γ subunits prepared from red macroalga *Polysiphonia urceolata*. PLoS One. 2015 Mar 17;10 (3):e0120333.

24. Parmar A, Singh NK, Kaushal A, Sonawala S, Madamwar D. Purification, characterization and comparison of phycoerythrins from three different marine cyanobacterial cultures. Bioresource technology. 2011 Jan 1;102(2):1795-802.

25. Wang L, Qu Y, Fu X, Zhao M, Wang S, Sun L. Isolation, purification and properties of an R-phycocyanin from the phycobilisomes of a marine red macroalga *Polysiphonia urceolata*. PloS one. 2014 Feb 4;9(2):e87833.

26. Fu X, Sun L, Yang G, Lu W, Zhao M, Gong X. The subunits analysis of R-phycoerythrin from marine red algae by isoelectric focusing. African Journal of Biotechnology. 2011;10(39): 7640-9.

27. Soni B, Visavadiya NP, Dalwadi N, Madamwar D, Winder C, Khalil C. Purified c-phycoerythrin: safety studies in rats and protective role against permanganate-mediated fibroblast-DNA damage. Journal of Applied Toxicology. 2010 Aug;30(6):542-50.

28. Tan H, Gao S, Zhuang Y, Dong Y, Guan W, Zhang K, Xu J, Cui J. R-Phycoerythrin induces SGC-7901 apoptosis by arresting cell cycle at S phase. Marine drugs. 2016 Sep;14(9):166.

29. Ranjitha K, Kaushik BD. Purification of phycobiliproteins from *Nostoc muscorum*.

30. Vásquez-Suárez A, Lobos-González F, Cronshaw A, Sepúlveda-Ugarte J, Figueroa M, Dagnino-Leone J, Bunster M, Martínez-Oyanedel J. The γ33 subunit of R-phycoerythrin from *Gracilaria chilensis* has a typical double linked phycourobilin similar to γ subunit. PloS one. 2018 Apr 10;13(4):e0195656.

31. Tripathi SN, Kapoor S, Shrivastava A. Extraction and purification of an unusual phycoerythrin in a terrestrial desiccation tolerant cyanobacterium *Lyngbya arboricola*. Journal of Applied Phycology. 2007 Oct 1;19(5):441-7.

32. Kim JJ, Jeon YM, Noh JH, Lee MY. Isolation and characterization of a new phycoerythrin from the cyanobacterium *Synechococcus* sp. ECS-18. Journal of Applied Phycology. 2011 Feb 1;23(1):137-42.

33. Zhao M, Sun L, Sun S, Gong X, Fu X, Chen M. The 42.1 and 53.7 kDa bands in SDS-PAGE of R-phycoerythrin from *Polysiphonia urceolata*. International journal of biological macromolecules. 2013 Sep 1;60:405-11.

34. Najdenski HM, Gigova LG, Iliev II, Pilarski PS, Lukavský J, Tsvetkova IV, Ninova MS, Kussovski VK. Antibacterial and antifungal activities of selected microalgae and cyanobacteria. International journal of food science & technology. 2013 Jul;48(7):1533-40.

35. Sonani RR, Rastogi RP, Madamwar D. Antioxidant potential of phycobiliproteins: Role in anti-aging research. Biochem Anal Biochem. 2015;4(172):2161-1009.

36. Wojcik M, Burzynska-Pedziwiatr I, Wozniak LA. A review of natural and synthetic antioxidants important for health and longevity. Current Medicinal Chemistry. 2010 Sep 1;17 (28):3262-88.

37. Nowruzi B, Sarvari G, Blanco S. The cosmetic application of cyanobacterial secondary metabolites. Algal Research. 2020 Aug 1;49:101959.