شیلات، مجله منابع طبیعی ایران
دوره ۷۲، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۸
صفحات ۲۲۰-۲۱۱

سنجش اثر ضدباکتریایی ترکیب بتا آمبرین استخراج شده از گناد خیار دریایی گونه *Holothuria leucospilota* از جزیره هنگام، خلیج فارس

ملیکا ناظمی[۱*]، یزدان مرادی[۲]، هادی غفاری[۳]، کیوان جلالی خانقاه[۱]، فرحناز لکزایی[۴]

۱. استادیار، پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، بندرعباس، ایران.
۲. دانشیار، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران.
۳. استادیار، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران.
۴. دانشجوی دکتری، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران.

تاریخ ارسال: ۱۳۹۷/۱۰/۲۶ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۹/۰۸

چکیده

با توجه به اثرات ضـــدمیکروبی خیارهای دریایی و فراوانی گونه *Holothuria leucospilota* در آب‌های خلیج فارس، در این تحقیق علمی به بررسی خواص ضد باکتریایی ترکیب بتا آمیرین استخراج شده از خیار دریایی پرداخته شده است. عصاره استونی از پودر خشک خیار دریایی تهیه شد، سپس جدا سازی ترکیب بتا آمبرین با ا ستفاده از ستون کروماتوگرافی سیلیکاژل و شنا سایی آن با ا ستفاده از کروماتوگرافی لایه نازک و کروماتوگرافی گازی انجام شد. اثرات ضدباکتریایی با آزمون رقت لوله ای، روی سویه‌های باکتریایی؛ ا شر شیاکلی، سودوموناس آئروژینوزا، کلبسیلا نمونیا، پروتئوس ولگاریس، سالمونلا تیفی، ا ستافیلوکوکوس آرئوس، با سیلوس سوبتیلیس، با سیلوس سرئوس، نوکاردیا برازیلینسیس مورد سنجش قرار گرفت. ترکیب بتاآمبرین با فرمول شیمیایی C30H48O به مقدار ۹۸ درصد در فرکشن شماره ۱۱ شنا سایی شد. این ترکیب در غلظت برابر ۱۰۰۰ ماکروگرم در میلی لیتر منجر به مرگ باکتری‌های باســیلوس ســوبتیلیس و باســیلوس ســرئوس و در غلظت ۲۰۰۰ ماکرو گرم در میلی لیتر منجر به مرگ باکتری‌های اســتافیلوکوکوس آرئوس و ســالمونلا تیفی شــده اســت. بنابراین ترکیب بتا آمبرین اســتخراج شــده از خیار دریایی *H. leucospilota* می‌توانند به عنوان انتخاب مناسب برای تولید داروهای ضدباکتریایی مورد استفاده قرار گیرد.

واژگان کلیدی: خیار دریایی، ترکیبات طبیعی، ترپنوئید، ضدباکتریایی، خلیج فارس.

* نویسنده مسئول: ملیکا ناظمی
Email: melikanazemi@yahoo.com

Journal of Fisheries
Vol. 72, No. 2, Summer 2019
pp. 211-220

The Antibacterial activity of ß amberine extracted from the gonad of sea cucumber *Holothuria leucospilota* inhabiting Hengam island, Persian Gulf

M. Nazemi[1*], Y. Moradi[2], H. Ghaffari[3], K. Ejlali Khanghah[1], F. Lakzaei[4]

1- Assistant Professor, Persian Gulf and Oman Sea Ecological Cener, Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Bandar Abbas, Iran.
2- Associate Professor, Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran.
3- Assistant Professor, Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran.
4- Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran.

Received: 16-Janu-2019 **Accepted: 29-Nove-2019**

Abstract
Owing to the antibacterial activities of sea cucumber and the abundance of *Holoturia locuspila* in the Persian Gulf, the antibacterial activity of ß amberine extreacted from the gonad of this sea cucumber species was studied. In this investigation, acetone extract was prepared from the dried powder of sea cucumber. Isolation of ß amberine was carried out by column chromatography on silica gel and identification was carried out by TLC and GC/MS. In vitro antibacterial screening was determined by broth dilution against bacteria; *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumonia*, *Salmonella typhi*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* and *Nocardia brasiliensis*. The ß amberine formula $C_{30}H_{48}O$ was detected by GC/MS from no. 11 fraction with 98% purity. This component showed considerable activity against *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* (MBC = 1000 µg/mL) and *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus* (MBC = 2000 µg/mL). According to our results, ß amberine extracted from sea cucumber can be considered as a source of novel antibacterial drug.

Keywords: sea cucumber, natural products, terpenoid, antibacterial activity, Persian Gulf.

Corresponding author: Melika Nazemi Email: melikanazemi@yahoo.com

۱. مقدمه

سالیان طولانی ا ست که از ترکیبات طبیعی به عنوان غذا، رنگدانه، حشره کش، لوازم آرایشی بهداشتی، دارو و... استفاده می‌گردد (Joseph and Sujatha, 2011). در این میان نقش ترکیبات طبیعی با منشاء دریایی در سال‌های اخیر بسیار حائز اهمیت ا ست (Mancini *et al*., 2007). تقریبا ۸۰ درصد موجوات جهان در دریاها زندگی می‌کنند (McCarthy and Pomponi, 2004). تنوع گونه‌های عظیمی در این اکوسیستم وجود دارد؛ در مناطق حاره ای نزدیک به ۱۰۰۰ گونه مختلف در هر متر مربع یافت می‌شود. رقابت بر سر فضا، غذا و دفاع از خود منجر به تولید متابولیت های ثانویه می‌شود. این جانداران از متابولیت های ثانویه به منظور برقراری ارتباط با هم و محیط استفاده می‌کنند، این مولکول‌ها رابطه همزیستی را نیز فراهم می‌نمایند(Datta *et al*., 2015).

ترکیبات طبیعی در سه دسته؛ متابولیت‌های اولیه، متابولیت‌های ثانویه و پلیمرها با وزن مولکولی بالا تقسیم می شوند. متابولیت‌های اولیه شامل؛ اسیدهای نوکلئیک، اسیدهای آمینه و قندها هستند که در تمام سلول‌ها وجود داشته و در تولید مثل و متابولیسم نقش دارند، پلیمرها با وزن مولکولی بالا مانند؛ سلولز، لیگنین و پروتئین‌ها در ساختار سلول نقش دارند. متابولیت‌های ثانویه ترکیباتی متشکل از مولکول‌های کوچک اند که در رشد و تکامل جاندار از عوامل اساسی و ضروری محسوب نمی شوند، اما فعالیت‌های زیستی روی سایر موجودات دارند، در واقع منظور از ترکیبات طبیعی همان متابولیت‌های ثانویه است (Hanson, 2003). با وجود آنکه کمتر از چهار دهه از تلاش دانشمندان در رابطه با خواص زیستی ترکیبات شیمیایی جاندارن دریایی می‌گذرد اما تعداد این ترکیبات نسبت به سایر منابع بسیار بیشتر است (Munro, 1998).

خیارهای دریایی متعلق به شاخه خارپوستانند (Campbell and Dawes, 2005)، و طبق گزارش سازمان خواربار و کشاورزی ملل متحد، خیار دریایی به واسطه افزایش تولید و تجارت جهانی، ارزش تجاری بالایی دارد. خیارهای دریایی تازه یا خشک شده قرن‌هاست که یک غذای آسیایی لذیذ بمحسوب می‌شود و همچنین در فرمولاسیون داروهای سنتی در شرق آسیا استفاده می‌شود(Toral-Granda, 2008). مطالعات انجام شده نشان می‌دهد خیارهای دریایی منبع غنی از ترکیبات طبیعی با خواص بیولوژیک مانند؛ ضد رگزایی، ضدسرطان، ضدانعقاد، ضد فشار خون بالا، ضدالتهاب، ضدمیکروبی، آنتی اکسیدان، ضد لخته شدن، ضدتومور و بهبود دهنده زخم می‌باشد ، بیشتر این خواص به ترکیبات ترپنوئیدی، سولفات کندرویتین، گلیکوزآمینوگلیکان، پلی ساکارید سولفاته، استرول ، فنول، پپتیدولکتین نسبت داده شده است(Bordbar *et al*., 2011).

عصاره ترکیبات زیستی استخراج شده از خیار دریایی در مطالعات مختلف به عنوان عوامل ضد میکروبی بالقوه ثابت شده است (Rahman, 2014)، با توجه به خواص ضدمیکروبی ترکیبات ترپنوئید استخراج شده از خیارهای دریایی، در این پژوهش علمی به بررسی اثر ضدباکتریایی ترکیب بتا آمیرین جداسازی شده از خیار دریایی گونه *Holothuria leucospilota* از جزیره هنگام، خلیج فارس پرداخته شد.

ترکیب بتا آمبرین یک تری ترپنوئید پنج حلقه ای با اسکلت اولانی است و جزء ترکیبات طبیعی محسوب می‌شود (Kushiro *et al*., 1998). تری ترپن گلوکوزید با دارا بودن بیشترین فعالیت زیستی؛ ضدقارچ، سیتوتوکسیک، همولیتیک و تقویت کننده سیستم ایمنی است و مهمترین متابولیت ثانویه شناخته شده در خیارهای دریایی محسوب می‌شود (Chludil *et al*., 2002).

۲. مواد و روش‌ها

۲.۱. نمونه برداری خیار دریایی

نمونه های خیار دریایی گونه *H. leucospilota*، به تعداد ۱۵ عدد در مرداد ماه سال ۱۳۹۴ توسط غواصی و از عمق ۱۵ تا ۲۰ متر از شمال جزیره هنگام، واقع در

خلیج فارس تهیه شدند.

۲.۲. عصاره گیری از خیار دریایی

نمونه‌های خیار دریایی در ابتدا به صورت طولی برش داده شدند و اندام‌های داخی و گنادها از داخل بدن خیار دریایی خارج شد، سپس گناد، در دستگاه فریز درایر (شرکت درسا تک، مدل alph1-4 LSCplus) در دمای ۶۰- درجه سانتی گراد خشک، سپس توسط آسیاب پودر شد. به پودر تهیه شده که به مقدار ۵۰ گرم بود، ۲۵۰ سی سی استون افزوده شد، سپس نمونه‌ها به مدت ۷۲ ساعت در دمای اتاق و در تاریکی به منظور جداسازی ترکیبات طبیعی قرار گرفتند (Çitoğlu and Acıkara, 2012). پس از مدت زمان طی شده محلول به دست آمده از صافی عبور داده شد و متابولیت‌های ثانویه محلول در استون به دستگاه روتاری (هیدولف آلمان) در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد و دور ۱۴۵ در دقیقه تا تبخیر کامل حلال قرار داده شد.

۲.۳. جداسازی ترکیب بتا آمبرین[1]

عصاره استونی به وزن ۶/۲۰ گرم از گناد خیار دریایی برای جداسازی با استفاده از ستون کروماتوگرافی شیشه ای با ارتفاع ۷۰ سانتی متر و با قطر داخلی ۲ سانتی متر حاوی سیلیکاژل مرک به اندازه ۰/۲ تا ۰/۶ میلی متر، منتقل شد. شست و شوی عصاره استونی توسط حلال‌های ان هگزان- اتیل استات به عنوان فاز متحرک با نسبت‌های؛ ۱۰۰:۰- ۹۰:۱۰- ۸۰:۲۰- ۷۰:۳۰- ۶۰:۴۰- ۵۰:۵۰- ۴۰:۶۰- ۳۰:۷۰- ۲۰:۸۰- ۱۰:۹۰- ۰:۱۰۰، انجام شد و فرکشن‌ها در هر ۱۰ سی سی جداسازی شدند (۱۱۲ فرشکن) (Çitoğlu and Acıkara, 2012).

۲.۴. شناسایی ترکیب بتا آمبرین

فراکسیون‌های به دست آمده از ستون کروماتوگرافی شیشه ای توسط کروماتوگرافی لایه نازک مرک با کد ۱۰۵۵۵۳ با فاز متحرک شامل حلال های متانول- کلروفرم- ان بوتانول با نسبت‌های ۱۰:۲۰:۷۰ انجام شد. به منظور شناسایی ترکیب بتا آمیرین (متعلق به تری ترپنوئیدها) ازمعرف وانیلین- اسید سولفوریک، به صورت محلول ۱ درصد وانیلین در اتانول و محلول ۵ درصد اسید سولفوریک اسید در اتانول به صورت اسپری روی صفحه کروماتوگرافی لایه نازک استفاده شد. پس از اسپری صفحات کروماتوگرافی لایه نازک در آون و در دمای ۱۱۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفتند، تغیرات در نور مرئی بررسی شد؛ نمونه‌های ترپنوئید به رنگ بنفش کمرنگ – پررنگ تغییر رنگ دادند (Attaway *et al.*, 1965). پس از ظهور لکه‌ها R_f هر یک از آنها از رابطهٔ زیرمحاسبه شد:

R_f =فاصله حلال از مبدأ / فاصله لکه از مبدأ

لکه‌هایی که به رنگ بنفش در آمدند و R_f آن‌ها در حدود ۰/۶ بود. برای شناسایی ترکیب بتا آمیرین به دستگاه جی سی مس (ساخت کشور آمریکا مدل Agilent7000 Series Triple Quad GC/MS MainFrame) تزریق شدند.

۲.۵. بررسی خواص ضدباکتریایی

بررسی خواص ضدباکتریایی با استفاده از روش رقت لوله ای[2] انجام گرفت (Rosenblatt, 1991). سویه‌های باکتری اشر شیاکلی[3]، سودوموناس آئروژینوزا[4]، کلبسیلا نمونیا[5]، پروتئوس ولگاریس[6]، سالمونلا تیفی[7]،

[1] ß amberine
[2] Bacterial Broth Dilution Methods
[3] *Escherichia coli* ATCC 2785
[4] *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 2785
[5] *Klebsiella pneumonia* ATCC 1053
[6] *Proteus vulgaris* PTCC 1079
[7] *Salmonella typhi* PTCC 1609

استافیلوکوکوس آرئوس[1]، باسیلوس سوبتیلیس[2]، باسیلوس سرئوس[3]، نوکاردیا برازیلینسیس[4] از مرکز کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های صنعتی ایران به صورت لیوفیلیزه تهیه شد، سپس هر کدام از سویه‌ها کشت اولیه داده شدند و به مدّت ۲۴ تا ۷۲ ساعت بر اساس میزان سرعت رشد باکتری‌ها در دمای ۳۷ در جه سانتیگراد در انکوباتور قرار داده شدند تا از کلونی های تک به منظور انجام آزمایش استفاده شود.

پس از رشد باکتری‌ها کلونی‌های تک ایجاد شده به لوله‌های آزمایش حاوی محیط کشت براث به مقدار ۱ میلی لیتر وارد شد، اشاره به این نکته لازم است که تعداد باکتری های مورد آز مایش برابر[6] ۱۰*۵/ بود. سپس از ترکیب بتا آمبرین با غلظت‌های ۱، ۲، ۴، ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۲۰۰۰ ماکروگرم در میلی لیتر که در محیط براث حل شده بود به مقدار ۱ میلی لیتر به لوله‌های فوق افزوده شد و آزمایش با سه بار تکرار انجام شد. برای در نظر گرفتن شاهد مثبت از آنتی‌بیوتیک های تتراسایکلین و آمپی سیلین، با غلظت‌های فوق ا ستفاده شد. پس از ۲۴ ساعت لوله‌های آزمایش از انکوباتور خارج شد و کدورت آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت. لوله‌هایی را که کدورت داشتند از ادامه کار خارج شدند و لوله‌هایی که در آن کدورت ایجاد نشده بود به منظور ادامه کار جدا شدند. لازم به ذکر است غلظت مواد مصرفی در لوله‌های بدون کدورت میزان باکتریواستاتیک را نشان داد. در ادامه آزمایش به منظور تعیین توانایی ترکیب‌های مورد نظر در از بین بردن باکتری‌ها از لوله‌هایی که در آن‌ها کدورت م شاهده ن شده بود به مقدار ۰/۱ میلی لیتر به پلیت‌های استریل تزریق شد و محیط نوترینت آگار به آن اضافه شد. پس از ۲۴ ساعت تعداد کلونی‌های ت شکیل شده مورد برر سی قرار گرفت. در پلیت‌هایی که هیچ گونه کلونی مشاهده نشد حداقل غلظت کشندگی تشخیص داده شد (Rosenblatt, 1991).

۳. نتایج

۳.۱. جداسازی ترکیب لانوسترول توسط کروماتوگرافی لایه نازک

در جدول شماره ۱، میزان R_f فرکشن‌های مختلف توسط کرو ماتوگرافی لا یه نازک که با معرف وانیلین واکنش نشان داده اند، مشاهده می‌گردد. همان طور که از این جدول برداشت می‌شود فرکشن شماره ۱۱(۳) که حاصل شست و شوی ستون سیلیکاژل اتیل استات – ان هگزان ۳۰: ۷۰ خالص است دارای R_f برابر ۰/۶۹ است که نزدیک‌ترین میزان به ترکیب بتا آمبرین است.

۳.۲. شناسایی ترکیب بتا آمیرین توسط کروماتوگرافی گازی

همان طور که در شکل‌های شماره ۱ و ۲ مشاهده می‌گردد، ترکیب بتا آمبرین (4, 4, 6a, 6b, 8a, 11, 12, 14b-octamethyl-1, 2, 3, 4, 4a, 5, 6, 6a, 6b, 7, 8, 8a, 9, 10, 11, 12, 12a, 14, 14a, 14 b-icosahydropicen-3-one =IUPAC) با فرمول شیمیایی $C_{30}H_{48}O$، وزن مولکولی $424/70\ g\cdot mol^{-1}$ که به گروه تری ترپنوئیدها تعلق دارد، به مقدار ۹۸ درصد در فرکشن شماره ۱۱ (۳) (اتیل استات – ان هگزان ۳۰: ۷۰) در دقیقه ۴۱ تا ۴۲ شناسایی شد.

۳.۳. بررسی خواص ضدباکتری فرکشن حاوی ترکیب بتا آمبرین

مطابق جدول ۲ ؛ حداقل غلظت ممانعت کنندگی از رشد باکتری (باکتریواستاتیک) ترکیب بتا آمبرین برای

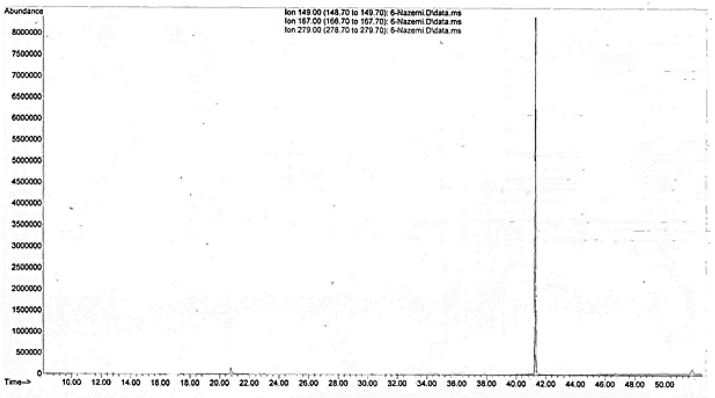
[1] *Staphylococcus aureus aureus* ATCC 1764
[2] PTCC *subtilis spizizenii Bacillus* 1715
[3] ATCC *cereus Bacillus* 11778
[4] *Nocardia brasiliensis* PTCC 1422

باکتری‌های باسیلوس سوبتیلیس و باسیلوس سرئوس برابر ۵۰۰ ماکرو گرم در میلی لیتر، اســتافیلوکوکوس آرئوس و اشرشیاکلی برابر ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی لیتر و باکتری سالمونلا تیفی برابر ۲۰۰۰ میکروگرم در میلی لیتر است.

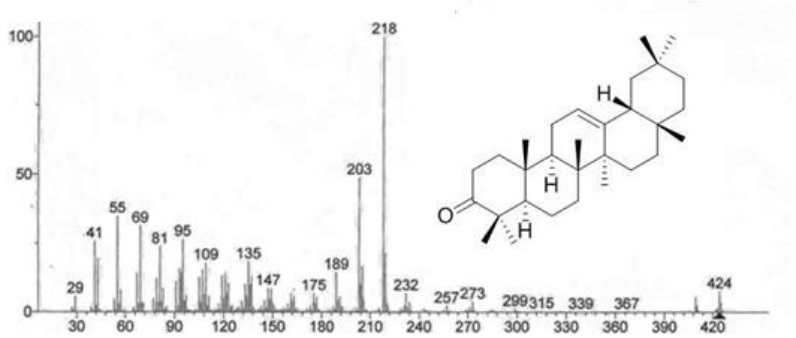
جدول ۱- مشخصات لکه‌های ترپنوئید فرکشن‌های عصاره متانولی گناد خیار دریایی.

شماره فرکشن	فاز متحرک ستون (درصد حلال)	رنگ لکه (با معرف وانیلین)	R_f	شماره فرکشن	فاز متحرک ستون (درصد حلال)	رنگ لکه (با معرف وانیلین)	R_f
۱۰(۱)	N* ۸۰ : E* ۲۰	بنفش کمرنگ	۰/۰۵	۱۹	N* ۵۰ : E* ۵۰	صورتی کم رنگ	۰/۷۸
۱۰(۲)	N* ۸۰ : E* ۲۰	بنفش کم رنگ	۰/۲۵	۲۰	N* ۴۰ : E* ۶۰	صورتی کم رنگ	۰/۷۸
۱۰(۳)	N* ۸۰ : E* ۲۰	صورتی کم رنگ	۰/۷	۲۱	N* ۴۰ : E* ۶۰	صورتی کم رنگ	۰/۷۷
۱۰(۴)	N* ۸۰ : E* ۲۰	بنفش	۰/۸۹	۲۲	N* ۴۰ : E* ۶۰	بنفش پررنگ	۰/۸۵
۱۱(۱)	N* ۷۰ : E* ۳۰	صورتی کمرنگ	۰/۰۳	۲۳	N* ۴۰ : E* ۶۰	بنفش پررنگ	۰/۸۵
۱۱(۲)	N* ۷۰ : E* ۳۰	بنفش کم رنگ	۰/۲۲	۲۴	N* ۴۰ : E* ۶۰	بنفش پررنگ	۰/۸۵
۱۱(۳)	N* ۷۰ : E* ۳۰	بنفش پررنگ	۰/۶۹	۲۵	N* ۳۰ : E* ۷۰	بنفش پررنگ	۰/۸۴
۱۱(۴)	N* ۷۰ : E* ۳۰	بنفش پررنگ	۰/۹۳	۲۶	N* ۳۰ : E*۷۰	بنفش پررنگ	۰/۸۴
۱۲	N* ۶۰ : E* ۴۰	بنفش کم رنگ	۰/۲۲	۲۷	N* ۳۰ : E* ۷۰	بنفش پررنگ	۰/۸۲

* (N: حلال ان هگزان، E: حلال اتیل استات، M: متانول)



شکل ۱ - کروماتوگرام حاصل از کروماتوگرافی گازی فرکشن شماره ۱۱ (اتیل استات- ان هگزان:۳۰- ۷۰)، حاوی ترکیب بتا آمیرین از گناد خیار دریایی.



شکل ۲- طیف جی سی فرکشن شماره ۱۱ حاوی ترکیب بتا آمیرین.

جدول ۲- حداقل غلظت ممانعت کنندگی فرکشن حاوی ترکیب بتا آمبرین

باکتری	غلظت بتا آمیرین µg/ml	آمپی سیلین µg/ml
Bacillus subtilis	۵۰۰	۳۰۰
Staphylococcus aureus	۱۰۰۰	۳۰۰
Bacillus cereus	۵۰۰	۳۰۰
Salmonella typhi	۱۰۰۰	۵۰۰
Escherichia coli	۱۰۰۰	۵۰۰

مطابق جدول ۳ حداقل غلظت کشندگی باکتریایی ترکیب بتاآمبرین برای باکتری باسیلوس سوبتیلیس و با سیلوس سرئوس برابر ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی لیتر و برای باکتری‌های اشرشیاکلی برابر ۲۰۰۰ میکروگرم در میلی لیتر است. ترکیب بتا آمبرین اثر کشندگی روی باکتری سالمونلا تیفی از خود نشان نداده است.

جدول۳- حداقل غلظت کشندگی باکتریایی فرکشن حاوی ترکیب بتاآمیرین

باکتری	غلظت بتا آمیرین µg/ml	آمپی سیلین µg/ml
Bacillus subtilis	۱۰۰۰	۵۰۰
Staphylococcus aureus	۲۰۰۰	۵۰۰
Bacillus cereus	۱۰۰۰	۵۰۰
Escherichia coli	۲۰۰۰	۱۰۰۰
Salmonella typhi	-	۲۰۰۰

۴. بحث

بیش از ۱۸۰۰۰ ترکیب شیمیایی از جانداران دریایی استخراج شده است (MarinLit, 2003)، تا کنون بیش از ۲۰۰۰۰ تری ترپنوئید از منابع طبیعی استخراج و شناسایی شده است. تغییرات در ساختار تری ترپنوئیدها مانند قرار گرفتن؛ استرول‌ها، ساپونین‌های استروئیدی، گلیکوزیدها، کورتیکواستروئیدها و ... سبب شده تا این دسته از ترکیبات جزء مهمترین ترکیبات طبیعی با خواص زیستی قرار گیرند (Zhang, 2011).

در این تحقیق بر اساس شکل ۱ کروماتوگرافی گازی، ترکیب بتا آمبرین از خیار دریایی *H.leucospilota* در فرکشن شماره ۱۱، عصاره استونی استخراج شد. میزان R_f آن ۰/۶۹ سنجیده شد. ترکیب آمبرین بسیار قوی تر از آسپرین در جلوگیری از عملکرد کلاژن در انعقاد خون عمل می‌کند، همچنین این ترکیب به عنوان ترکیب ترمیم کنند پوست، ضدالتهاب و در کرم‌های ضدآفتاب نیز استفاده می‌شود (Kweifio-Okai *et al*., 1995).

از ۴۱۹۶ ترکیب طبیعی شناسایی شده از منابع دریایی، ۵۲۱ ترکیب (۱۳ درصد از کل ترکیبات شناسایی شده) دارای خواص ضدباکتری هستند (Hu *et al*., 2015). ترکیبات بسیاری مانند گلیکوزیدهای استروئیدی، ترپنوئیدها، پپتیدها و ... از خیار دریایی با خواص ضدمیکروبی شناسایی شده است. در بررسی‌های انجام شده مشخص شده که خارپوستان در مقایسه با دیگر موجودات دریایی از جمله بریوزوا، نرمتنان، مرجان‌ها و کرم‌های حلقوی آنلیدا و غیره دارای بیشترین آثار ضدباکتریایی هستند (Shakouri *et a*l., 2009)

ترکیب بتا آمبرین استخراج شده از خیار دریایی

H. leucospilota در این پروژه تحقیقاتی نشـــان داد که این ترکیب در غلظت برابر ۱۰۰۰ ماکروگرم در میلی لیتر منجر به مرگ باکتری‌های گرم مثبت باسیلوس سوبتیلیس و باســیلوس ســرئوس خواهد شــد. ترکیب بتا آمیرین روی باکتری‌های گرم منفی ا شر شیاکلی و سالمونلا تیفی منجر به ممانعت از رشــد شــده اســت. اما این ترکیب تنها روی باکتری اشــرشــیاکلی در غلظت ۲۰۰۰ ماکروگرم در میلی لیتر منجر به مرگ شــده اســت. آزمایش‌های انجام شــده نشـــان می‌دهد که باکتری‌های گرم مثبت از باکتری‌های گرم منفی نسـبت به ترکیبات طبیعی دریایی حسـاسـیت بیشـــتری از خود نشـــان می‌دهند، که این تفاوت به علت اختلاف دیواره باکتری‌ها اســت (Bordbar *et al*., 2011). در باکتری های گرم منفی دیواره باکتری از یک وا حد اضافی شامل فسفولیپید، پروتئین و پلی ساخارین تشکیل یافته اســت. در حالیکه دیواره باکتری گرم مثبت فاقد چربی اسـت و میزان پروتئین کمتری دارد و عموما از پلی ساخارین‌ها و پپتیدوگلیکان تشکیل یافته است. به همین علت باکتری‌های گرم مثبت نســبت به باکتری‌های گرم منفی ضعیف ترند (Bordbar *et al*., 2011).

خ یار های در یایی دارای م قادیر قا بل تو جه ای از؛ ویتامین‌ها، عناصر معدنی، سربروزیدها، پپتیدها و لکتین‌ها و همچنین دارای مولکول‌های منحصـــر به فرد مانند؛ پلی ســـاکـاریـدهـا، ۱۲ مـتیـل تـترادکـانوئیـداســـیـد (12-MTA)(Sottorff *et al*., 2013)، در مطالعه ای که در رابطه با خواص ضــدباکتری به روش دیســک ترکیب بتا آمبرین که از گیاه لائورنیکا میکروکلادیا[1] انجام شــد، این ترکیب در غلظت های ۱۰، ۵ و ۲/۵ میلی گرم بر میلی لیتر از رشـد هاله باکتری اسـتافیلوکوکوس آرئوس تا قطر ۲۶، ۲۰ و ۱۴ میلی متر و ۲۰، ۱۶ و ۱۱ میلی متر از رشد هاله باکتری سالمونلا تایفی ممانعت نموده ا ست(Abdel-Raouf *et al*., 2015). در مطالعه دیگری که روی میوه آمیکارا انجام شـــد، ترکیب بتا آمبرین در غلظت ۹۰ ماکروگرم در میلی لیتر از رشـد باکتری اسـتافیلوکوکوس آرئوس ممانعت نمود(Fernandes *et al*., 2012). ترکیب بتا آمبرین اسـتخراج شـده از کارپوبوتوز ادولیز[2] در غلظت کمتر از ۲۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر از رشـد باکتری‌های اســتافیلوکوکوس آرئوس و اشــرشــیاکلی ممانعت نموده است(Martins *et al*., 2011).

مطالعات انجام شـــده روی فرکشـــن‌های خیار دریایی *Athyonidium chilensis* نشـــان می‌دهد که ترکیبات خالص سازی شده اثر ضدباکتری نسبت به باکتری‌های گرم مثبت؛ اســتافیلوکوکوس آرئوس و بــاســیلوس ســوبتیلیس دارد، ا ما روی باکتری های گرم منفی اثر کشندگی از خود نشان نمی دهد(Sottorff *et al*., 2013). ترکیب بتا آمبرین اســتخراج شـــده از خیار دریایی *H. leucospilota* در این پروژه تحقیقاتی مانند ســایر مطالعات آزمایشــگاهی از رشــد باکتری‌های باســیلوس سوبتیلیس، با سیلوس سرئوس، ا شر شیاکلی و سالمونلا تیفی ممانعت کرد. همان طور که نتایج نشـــان می‌دهد ترکیب بتا آمبرین مورد بررســی در این پژوهش منجر به مرگ باکتری های گرم مثبت باســیلوس ســوبتیلیس، باسیلوس سرئوس، استافیلوکوکوس آرئوس و باکتری گرم منفی اشــرشــیاکلی می‌گردد، که نشـــان دهنده اثر ضـدباکتریایی قوی تری نسـبت به سـایر منابع اسـتخراج بتاآمبرین در خیار دریایی اسـت. آزمایش‌های انجام شـده نشـــان می‌دهد که باکتری‌های گرم مثبت از باکتری‌های گرم منفی نسـبت به ترکیبات طبیعی دریایی حسـاسـیت بی شتری از خود ن شان می‌دهند(Mancini *et al*., 2007) اما همان طور که نتایج آزمایش‌ها نشـــان می‌دهد ترکیب بتا آمبرین استخراج شده از خیار دریایی *H. leucospilota* دارای اثر ضـدباکتریایی نسـبتا قوی روی باکتری‌های گرم منفی اسـت، بنابراین با مطالعات بیشـتر می‌توان از آن به عنوان منبع مناســب برای تولید داروهای ضــدباکتریایی استفاده نمود.

[1] *Laurencia microcladia*
[2] *Carpobrotus edulis*

سپاسگزاری

این مقاله منتج از پروژه تحقیقاتی مصوب پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان با عنوان " جدا سازی و بررسی خواص زیستی ترپنوئید از خیار دریایی گونه *Holothuria leucospilota* موجود در خلیج فارس با شماره مصوب ۹۲۱۲۸-۱۲-۷۵-۲ است. بدینوسیله از همکاری عزیزانی که در انجام آن با ما همکاری داشته اند سپاسگزاری می گردد . ضمناً نتایج این مطالعه با منافع نویسندگان در تعارض ندارد.

References

Abdel-Raouf, N., Al-Enazi, N. M., Al-Homaidan, A. A., Ibraheem, I. B. M., Al-Othman, M. R., Hatamleh. A. A., 2015. Antibacterial β-amyrin isolated from Laurencia microcladia. *Arabian Journal of Chemistry* 8 (1), 32-37.

Attaway, J., Barabas, L., Wolford, R., 1965. Analysis of Terpene Hydrocarbons by Thin Layer Chromatography. *Analytical Chemistry* 37 (10), 1289-1290.

Bordbar, S., F, Anwar., N. Saari., 2011. High-value components and bioactives from sea cucumbers for functional foods—a review. *Marine Drugs* 9 (10),1761-1805.

Campbell, A. C., and J. Dawes., 2005. The Encyclopedia of underwater life: Oxford University Press.

Chludil, H. D., C. C. Muniain, A. M. Seldes., M. S. Maier., 2002. Cytotoxic and Antifungal Triterpene Glycosides from the Patagonian Sea Cucumber Hemoiedema s pectabilis. *Journal of natural products* 65 (6), 860-865.

Çitoğlu, G. S., Ö. B. Acıkara., 2012. Column Chromatography for Terpenoids and Flavonoids. In Chromatography and its applications: *INTECH Rijeka*, 13-49.

Fernandes, C. P., A. L. Corrêa, J. F. Lobo, O. P. Caramel, F. B. De Almeida, E. S. Castro, K. F. Souza, P. Burth, L. M. Amorim, and M. G. Santos., 2012. Triterpene esters and biological activities from edible fruits of Manilkara subsericea (Mart.) Dubard, Sapotaceae. *BioMed research international* 2013.

Hu, Y., J. Chen, G. Hu, J. Yu, X. Zhu, Y. Lin, S. Chen., J. Yuan., 2015. Statistical research on the bioactivity of new marine natural products discovered during the 28 years from 1985 to 2012. Marine Drugs 13 (1),202-221.

Joseph, B., and S. Sujatha., 2011. Pharmacologically important natural products from marine sponges. *Journa Natural Products* 4(1),5-12.

Kushiro, T., M. Shibuya, and Y. Ebizuka., 1998. β-Amyrin synthase. *European Journal of Biochemistry* 256 (1),238-244.

Kweifio-Okai, G., F. De Munk, T. A. Macrides, P. Smith., B. A. Rumble., 1995. Antiarthritic mechanisms of lupeol triterpenes. *Drug development research* 36 (1),20-24.

Mancini, I., A. Defant., G. Guella., 2007. Recent synthesis of marine natural products with antibacterial activities. Anti-Infective Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Infective Agents) 6 (1),17-48.

MarinLit, V. S., 2003. A marine literature database produced and maintained by the Department of Chemistry. University of Canterbury, New Zealand.

Martins, A., A. Vasas, M. Viveiros, J. Molnár, J. Hohmann., L. Amaral., 2011. Antibacterial properties of compounds isolated from Carpobrotus edulis. I*nternational journal of antimicrobial agents* 37 (5),438-444.

Munro, M. H., 1998. Marine bioprocess engineering: from ocean to industry Meeting.

Rahman, M. A., 2014. Global Sea Cucumber Fisheries: Their Culture Potentials, Bioactive Compounds and Sustainable Utilizations. *International Journal of Advances in Chemical Engineering and Biological Sciences* 1 (2),193-197.

Rosenlatt, J. E., 1991. Laboratory tests used to guide antimicrobial therapy. Paper read at Mayo Clinic Proceedings.

Shakouri, A., M. Nabavi, P. Kochanian, A. Savari, A. Safahieh., T. Aminrad., 2009. New observation of two species of sea cucumbers from Chabahar Bay (Southeast Coasts of Iran). *Asian Journal of Animal Sciences* 3 (4),130-134.

Sottorff, I., A. Aballay, V. Hernández, L. Roa, L. X. Muñoz, M. Silva, J. Becerra., A. Astuya., 2013. Characterization of bioactive molecules isolated from sea cucumber Athyonidium chilensis. *Rev. biol. mar. oceanogr* 48,23-35.

Toral-Granda, V., 2008. Population status, fisheries and trade of sea cucumbers in Latin America and the Caribbean. Sea cucumbers. A global review of fisheries and trade. *FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper* 516,213-229.

Zhang, J., 2011. Extraction, isolation, and structure elucidation of two new triterpene glycosides from sea cucumber Holothuria nobilis. *Chin Tradit Herb Drugs* 42 (8),1467-1472.