شیلات، مجله منابع طبیعی ایران
دوره ۷۲، شماره ۱، بهار ۱۳۹۸
صفحات ۸۳-۶۹

بررسی برون‌تنی ویژگی‌های ضد باکتریایی و ضد اکسیدانی سلوموسیت مشتق شده از توتیای دریایی نقب‌زن (*Echinometra matheai*) و عصاره‌های آن

سجاد کاویانی[۱]، سید فخرالدین حسینی[۲*]، مسعود رضایی[۳]

۱. دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه فرآوری محصولات شیلاتی، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور، مازندران، ایران.

۲. دانشیار گروه فراوری محصولات شیلاتی، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور، مازندران، ایران.

۳. استاد گروه فراوری محصولات شیلاتی، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور، مازندران، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۱/۱۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۹/۱۴

چکیده

در این مطالعه فعالیت ضدباکتریایی و ضداکسیدانی سلوموسیت مشتق شده از توتیای دریایی و عصاره‌های آبی و آلی حاصل از آن، مورد ارزیابی قرار گرفت. برای این منظور نمونه‌های زنده توتیای دریایی از سواحل خلیج فارس (بندر بوشهر) جمع‌آوری گردید و سلوموسیت‌ها از مایع سلومیک آن جدا سازی و سپس عصاره‌گیری شدند. اثر ضد باکتریایی سلومو سیت و عصاره‌ها بر گونه‌های باکتریایی *Staphlococcus aureus*، *Bacillus cereus*، *Escherichia coli* و *Pseudomonas aeruginosa* ارزیابی شد و نتایج نشان داد این ترکیات اثر ضد باکتریایی قوی بر باکتری‌های مورد مطالعه داشتند. همچنین، اثرات ضد اکسیدانیِ سلوموسیت و هر یک از عصاره‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت به طوری که فاز آبی بیشترین اثر را بر کاهش رادیکال آزاد DPPH و فاز آلی بیشترین اثر را بر حذف رادیکال آزاد ABTS نشان دادند. به طورکلی نتایج این تحقیق نشان داد سلوموسیت و عصاره‌های حاصل از آن واجد اثرات ضداکسیدانی و ضدباکتریایی قوی‌ای هستند، بیشترین اثر حذف‌کنندگی سلوموسیت، فاز آبی و فاز آلی بر رادیکال‌های آزاد DPPH، ABTS و همچنین کاهندگی آهن به ترتیب در غلظت‌های ۱/۲۵، ۵ و ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر مشاهده شد؛ همچنین نتایج ارزیابی ضدباکتریایی سلوموسیت، فاز آبی و فاز آلی نشان داد مقادیر مربوط به MIC و MBC برای هر یک از ترکیبات با هم برابر است، به طوری‌که (MIC و یا MBC) این ترکیبات بر باکتری‌های *Staphlococcus aureus*، *Bacillus cereus*، *Escherichia coli* و *Pseudomonas aeruginosa* *به ترتیب، برای* سلوموسیت در غلظت‌های بیشتر از ۵ ،۲/۵، ۲/۵و ۵ میکروگرم در میلی‌لیتر، برای فاز آبی در غلظت‌های ۲/۵ ، ۰/۰۱۹، ۰/۰۱۹ و ۰/۰۱۹ میکروگرم در میلی‌لیتر و برای فاز آلی در غلظت‌های بیشتر از ۵، ۰/۶۲۵، ۰/۶۲۵و ۲/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر به‌دست آمد. با توجه به فعالیت ضدمیکروبی و ضداکسیدانی ترکیبات مورد مطالعه از توتیای دریایی می‌توانند به عنوان عامل ضدباکتریایی، ضد اکسیدانی در بسته‌بندی مورد استفاده قرار گیرند.

* نویسنده مسئول: سید فخرالدین حسینی
Email: hosseinisf@modares.ac.ir

واژ گان کلیدی: توتیای دریایی، سلوموسیت، فعالیت ضد باکتریایی، فعالیت ضد اکسیدانی.

۱. مقدمه

محیط زیست دریا یک منبع از مولکول‌های زیست فعال نوین است که از نظر پزشکی، فیزیولوژی، داروشناسی و بیوشیمی بسیار حائز اهمیت اند (Li *et al.*, 2008). این محیط در برگیرنده بیش از ۸۰ در صد از گونه‌های گیاهی و جانوری جهان از قبیل جلبک‌های بزرگ، ریز جلبک‌ها، سیانوباکترها، ماهی‌ها، بی‌مهرگان و گونه‌های دیگر است که منابع بالقوه‌ای برای پروتئین و پپتیدهای منحصر به فرد ه ستند (Kim and Wijesekara., 2010). با توجه به اینکه ترکیبات در یایی تحت فعالیت های داروسازی ه ستند، انتظار می‌رود که محیط‌زیست دریایی یک منبع با ارزش از این ترکیبات جدید در آینده با شد (Kim and Wijesekara., 2010). ترکیبات شیمیایی زیست‌فعال می‌توانند به‌عنوان متابولیت‌های اولیه و ثانویه طبقه‌بندی شوند (Uma and Parvathavarthini., 2010). از آنجایی که بی‌مهر گان در یایی به طور مداوم در معرض غلظت بالایی از باکتری ها، قارچ ها و ویروس ها قرار دار ند که ممکن است بیماری‌زا باشند ، بقای این موجودات بستگی به مکانیسم ضدمیکروبی کارآمد برای محافظت‌شان در برابر عفونت‌های میکروبی دارد (Abubakar *et al.*, 2012). خارپوستان[۱] مانند بسیاری دیگر از بی‌مهرگان در یایی به عنوان منبعی از ترکیبات فعال زیستی با کاربردهای پزشکی بررسی شده‌اند (Kelly, 2005). اگرچه تعداد ز یادی از م تابول یت های ثانو یه فعال دارویی از خارپوستان جدا شده‌اند، اما هنوز به نظر می‌رسد خارپوستان به عنوان یک منبع دست نخورده برای شناسایی و استخراج ترکیبات زیست فعال جدید محسوب شوند (Kelly, 2005). در سال‌های اخیر ترکیبات طبیعی زیادی از خارپوستان جدا شده که فعالیت‌زیستی وسیعی داشته و جهت استفاده دارویی و کاربردهای درمانی معرفی شده‌اند (Mayer, *et al.*, 2013).

توتیای‌دریایی[۲] متعلق به شاخه خارپو ستان و خانواده اکینوئیده[۳] و از بی‌مهرگان دریایی است؛ گونه‌های متنوعی از توتیای دریایی به طور وسیعی در اقیانوس‌های جهان از مناطق جزر و مدی تا اعماق زیاد اقیانوس‌ها گسترده شده‌اند (Arizza *et al.*, 2013; Amarowicz *et al.*, 2014).

انواع عوامل ضدمیکروبی ازجمله استروئیدگلیکوزیدها[۴]، استرول‌پلی‌هیدروکسیلات[۵]، رنگدانه‌نفتوکینون[۶] و پپتیدهای ضدمیکروبی[۷] از توتیاهای دریایی جدا شده‌اند (Soleimani *et al.*, 1394). توتیا های در یایی برای ز نده ماندن به سیستم دفاعی ذاتی بدن خود متکی هستند به طوری که یک مجموعه ژن ایمنی پیچیده دارند، که تنوع بالا و قابل توجه‌ای از مولکول‌های ایمنی دفاعی را نشان

[۱] Echinoderms
[۲] Sea urchin
[۳] Echinoidea
[۴] Steroidal glycosides
[۵] Polyhydroxylated sterols
[۶] Naphthoquinone pigment
[۷] Antimicrobial peptides

می‌دهند. در این رابطه فعالیت‌های ضدباکتریایی عصاره توتیای‌دریایی سبز *Strongylocentrotus droebachiensis* مشخص گردیده است (Li *et al.*, 2010).

گونه *Echinometra mathae*i با وزن و طول متوسط ۸۵ گرم و ۶ سانتی متر حاوی ۱۰ الی ۱۵ میلی‌لیتر مایع سلومیک است. این گونه در مناطق جزرومدی درون چال آب‌ها، زیر سنگ‌ها و به ندرت به حالت غیر پنهان پراکنش دارد، همچنین بیشترین فراوانی را در میان گونه‌های دیگر خانواده اکینوئیده دارا ست (Khaghli and Oufi., 1389). این گونه در تمام ماه‌های سال در مناطق مختلف خلیج فارس و دریای عمان یافت می‌شود. واکنش ایمنی توتیای دریایی در برابر میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا به صورت بروز سلول‌های ایمنی و عوامل هومورال در مایع سلومیک است. همچنین رنگدانه‌های هیدروکسیلات نفتوکینون در توتیای نقب‌زن دارای فعالیت ضدباکتریایی، ضدجلبکی و ضداکسیدانی است (Soleimani *et al.*, 1394). در تحقیقاتی که تاکنون روی عصاره ها و ترکیبات بدست آمده از بی‌مهرگان دریایی صورت گرفته، خواص سیتوتوکسیسیتی، ضد اکسیدانی، ضد باکتریای، ضد التهاب، ضد ویروسی و ضد سرطانی آن‌ها به اثبات رسیده است. به طوری که تاکنون مطالعات زیادی بر خواص ضد میکروبی و ضد اکسیدانی اندام‌های مختلف خارپوستان در جهان صورت گرفته است (Chen, 2013; Farouk *et al.*, 2007).

در مطالعه راهی و همکاران، ۱۳۹۳، روی عصاره آلی و آبی اجزای مختلف بدن توتیای دریایی (گناد، پوته، خار و بخش دهانی)، نتایج نشان داد عصاره‌ها در دو غلظت ۶۰۰ و ۱۵۰۰ µg/ml میکروگرم در لیتر دارای اثر ضد قارچی هستند. همچنین فعالیت‌های ضدباکتریایی عصاره توتیای‌دریایی سبز (*Strongylocentrotus droebachiensis*) مورد مطالعه قرار گرفته است و اثر ضد باکتریایی و ضد قارچی آن به اثبات رسیده است (Haug *et al.*, 2002). از سوی دیگر اولین پپتیدهای ضدمیکروب از عصاره سلوموسیت توتیای سبز جداسازی و تخلیص شده‌اند (استرونگلین ۱و۲، سنتروسین۱ و ۲)؛ که نتایج فعالیت ضد منیکروبی آن نشان داد پپتیدها دارای اثر ضد باکتریایی قوی بر باکتری های گرم مثبت و گرم منفی بودند (Li *et al.*, 2008, 2010). بیان شده است که مایع سلومیک و عصاره های آلی پوسته و گناد توتیای دریایی خاصیت ضد اکسیدانی دارد (Soleimani *et al.*, 2014). هم چنین Qin و همکاران (۲۰۱۱)، به طور جداگانه گناد توتیای دریایی بنفش *Strongylocentrotus nudus* را با پروتئاز های مختلف تحت هیدرولیز آنزیمی قرار دادند. نتایج نشان داد که تمام فرکشن‌های پپتید دارای ظرفیت مهار رادیکال DPPH و کاهش قدرت کاهندگی آهن بودند. لذا، نیاز است اثرات ضد باکتریایی محصولات حاصل از عصاره به روش‌های مختلف مورد بررسی بیشتری قرار گیرد تا در صنعت آبزی پروری بکار گرفته شود. درمطالعه حاضر خواص ضد اکسیدانی و ضد باکتریایی سلوموسیت مشتق شده از گونهٔ توتیای دریایی (*Echinometra mathaei*) و فازهای آبی و آلی حاصل از آن بررسی شد.

۲. مواد و روش‌ها

۲.۱. جمع‌آوری توتیای دریایی نقب‌زن

نمونه‌های زنده توتیای دریایی نقب‌زن در پاییز سال ۱۳۹۵ در ۶ نوبت از منطقه بالا جزر و مدی با ساحل سنگی _ صخره‌ای در خلیج فارس (بوشهر، بندر بوشهر، ساحل شغاب، طول و عرض جغرافیایی "۲۸°۵۴'۲۴,۴۵ شمالی و "۵۰°۴۹'۲۳,۷۷ شرقی) جمع‌آوری گردیدند. توتیاهای صید شده در ظرف‌های پلاستیکی حاوی آب دریا قرار گرفتند و به پژوهشکده خلیج فارس (واقع در استان بوشهر، بندر بوشهر) انتقال یافتند. نمونه‌های زنده به منظور سازگاری با محیط و کاهش استرس تا پایان زمان نمونه برداری در ونیروهای (ظرف های) حاوی آب دریا (همان آب دریا منطقه صید) و در معرض هوادهی قرار گرفتند. به منظور جداسازی سلوموسیت‌ها از پلاسما (سلول‌های آزاد مایع سلومیک)، مایع سلومیک از طریق

شکستن دیواره کلسیمی جمع‌آوری گردید و به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ (۸۰۰g×، دمای ۴ درجه سانتی‌گراد) شد. پس از آن سلوموسیت‌ها مخلوط و لیوفلیزه شدند و تا زمان استخراج در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردیدند (Schiallaci *et al.*, 2014).

۲.۲. جداسازی فاز آبی و آلی سلوموسیت‌های توتیای دریایی

با برش بخش دهانی توتیا مایع سلومویک حاوی سلوموسیت ها جمع آوری و سپس خشک انجمادی شد ، پس از آن سلوموسیت های خشک انجمادی شده به منظور شویش طی دو مرحله با مقدار ۶۰ درصد (حجمی/حجمی) استونیتریل به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه در قیف جمع کننده نگهداری شدند، پس از آن مایعات روماند در دمای منفی۲۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ تا ۲ ساعت انکوبه گریدند، تا اجازه داده شود که فازهای آلی و آبی تفکیک شوند. فاز آبی و آلی جمع‌آوری شدند و در سانتریفیوژ خلاء (یا در خشک کن انجمادی) خشک گردیدند (Schiallaci *et al.*, 2014).

۲.۳. تعیین حداقل غلظت بازدارندگی[۱] و حداقل غلظت کشندگی[۲]

سلوموسیت و هر کدام از فازها (فاز آبی و آلی) در رقت‌های ۰/۱۵۶- ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر تهیه شدند. برای ساختن غلظت‌های ذکر شده ابتدا ۰/۰۱ گرم از وزن خشک هر کدام از فازها را در ۱ میلی‌لیتر بافر اولیه (آب مقطر) حل گردید تا محلول استوک با غلظ ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بدست آید (برای رسیدن به غلظت‌های کمتر به نسبت ۱ به ۲ رقیق شدند). برای هر عصاره به وسیله محیط کشت مولر هینتون براث (MHB) ۸ رقت ۱۰ ، ۵ ، ۲/۵ ، ۱/۲۵ ، ۰/۶۲۵، ۰/۳۱۲، ۰/۱۵۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر به روش، رقیق سازی مرحله به مرحله[۳] تهیه گردید (Schiallaci *et al.*, 2014).

۲.۴. سویه‌های باکتریایی و شرایط رشد آن‌ها

از باکتری‌های گرم منفی *Pseudomonas aeruginosa*، *Escherichia coli*، و از باکتری‌های گرم مثبت *Staphlococcus aureus*، *Bacillus cereus* به عنوان میکروارگانیزم‌های آزمون استفاده شد. همه این سویه‌ها در دمای اتاق و در محیط کشت Mueller Hinton broth رشد یافتند. سویه‌های باکتری‌های مورد بررسی در این تحقیق، سویه های وحشی بودند. سویه ها در موسسه رازی اراک و از منابع آلوده مختلف جدا گردیدند، باکتری اشریشیا کولای و استافیلوکوکوس از عفونت انسانی جدا شدند و باکتری سدوموناس آئروژینوس از اسهال و در آخر باکتری باسیلوس سرئوس از غذا انسانی جدا گردید. سپس هر کدام از سویه‌ها کشت خطی داده شدند و به مدّت ۲۴ ساعت در دمای۳۷ °C درجه سانتیگراد در انکوباتور قرار گرفتند تا از کلونی‌های تک آنها به منظور انجام آزمایش استفاده شود.

۲.۵. سنجش پروتئین به روش BCA[۴]

در بررسی حاضر میزان پروتئین سلوموسیت، فاز آبی و آلی لیوفلیزه شده، با استفاده از روش BCA سنجیده شد (Smith *et al.*, 1985). به طوری که با توجه به منحنی استاندارد (شکل ۱)، به دست آمده میزان پروتئین محاسبه گردید.

۲.۶. آزمون‌های ضد اکسیدانی سلوموسیت و فازهای آبی و آلی جداسازی شده از آن

[۱] Minimum Inhibitory Concentration

[۲] Minimum Bactericidal Concentration

[۳] Serial dilution

[۴] Bicinchoninic Acid Method

۲.۶.۱. قدرت حذف‌کنندگی رادیکال آزاد DPPH[۱]

قدرت حذف کنندگی رادیکال DPPH بر طبق روش You و همکاران (۲۰۱۰) انجام شد. ۵۰۰ مایکرولیتر از نمونه با ۵۰۰ مایکرولیتر محلول DPPH ۰/۱۶ میلی‌مولار که در اتانول ۹۵ درصد حل شده مخلوط گردید. محلول به دست آمده به مدت ۱ دقیقه تکان داده شد و سپس در دمای اتاق به مدت ۳۰ دقیقه در شرایط تاریکی نگهداری شد. در نهایت جذب همه نمونه‌ها در طول موج ۵۱۷ نانومتر با دستگاه میکروپلیت ریدر الایزا خوانده شد. قدرت مهارکنندگی با استفاده از رابطه زیر محاسبه گردیدند.

رابطه (۱):

Free radical scavenging (%) =
(A blank – A sample) × 100/ Ablank

A sample نمونه با DPPH:

A blank اتانول با DPPH:

مواد لازم: ۱- محلول DPPH ۰/۱۶ میلی مولار معادل ۰/۰۶۳۰۹۱۲ گرم در ۱ لیتر آب. ۲- محلول DPPH ۰/۱ میلی مولار معادل ۰/۰۳۹۴۳۲ گرم در ۱ لیتر آب. ۳- DPPH molar mass: 394.32 g/mol ۴-رقیق سازی نمونه از ۴۰ mg/ml تا 0.078125 mg/ml یعنی از S_1 تا S_{10} انجام شد. یک سی سی نمونه (باید ۰,۲ سی سی نمونه که با آب مقطر به حجم ۲ سی سی برسد برای این کار ۲۰۰ سی سی از هر غلظت + ۱۸۰۰ سی سی آب مقطرشد) + ۲ سی سی DPPH ۱۶٪ مولارشد.

⬇

۱دقیقه تکان داده می شود

⬇

خواندن جذب در ۵۱۷ نانومتر با اسپکتروفوتومتر

۲.۶.۲. قدرت حذف رادیکال ABTS[۲]

قدرت حذف‌کنندگی رادیکال ABTS با روش Wang و همکاران (۲۰۱۲) اندازه‌گیری شد. ابتدا محلول ABTS (۷ میلی‌مولار) با پتاسیم پرسولفات (۲/۴۵ میلی‌مولار) مخلوط گردید و به مدت ۱۶ ساعت در دمای اتاق در شرایط تاریکی نگهداری شد. محلول رادیکال ABTS در بافر فسفات پتاسیم نمکی (pH= ۷/۴) رقیق سازی شد تا محلول مورد نظر برای انجام آزمایش به میزان جذب ۰/۷ ۰±/۰۲ در ۷۳۴ نانومتر رسید. در ادامه، ۹۸۰ میکرولیتر از محلول ABTS با ۲۰ میکرولیتر از غلظت‌های مختلف نمونه مخلوط شد و پس از ۱۰ دقیقه جذب نمونه‌ها در ۷۳۴ نانومتر خوانده شد. قدرت حذف‌کنندگی رادیکال ABTS با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد:

رابطه (۲):

Free radical scavenging (%) =
(A blank – Asample)/ Ablank ×100

A blank آب با محلول ABTS:

A sample نمونه با ABTS:

۲.۶.۳. آزمون قدرت کاهندگی آهن

به منظور آزمون قدرت کاهندگی آهن، ۲۰۰ مایکرولیتر نمونه با ۵۰۰ مایکرولیتر بافر فسفات پتاسیم ۰/۲ مولار (pH= ۶/۶) و ۵۰۰ مایکرولیتر فری‌سیانید پتاسیم ۱ در صد ترکیب گردید. ترکیب حاصله به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت، سپس ۵۰۰ مایکرولیتر TCA ۱۰ درصد (حجمی/ حجمی) به آن اضافه شد. در ادامه محلول حاصل با دور ۴۰۰۰×g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. در نهایت

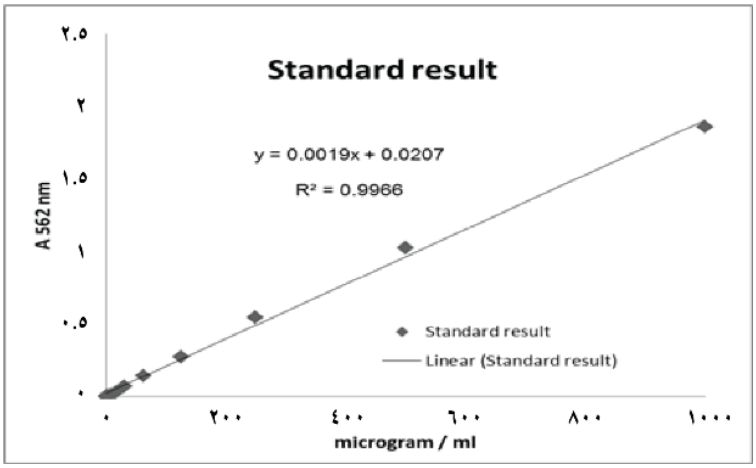
[۱] 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical

[۲] 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)

به ۵۰۰ مایکرولیتر از فاز بالائی، ۵۰۰ مایکرولیتر آب مقطر و ۱۰۰ مایکرولیتر کلرید آهن III ۰/۱ درصد اضافه شد و سپس محلول در دمای ثابت به مدت ۳۰ دقیقه نگهداری گردید تا به رنگ سبز تغییر یابد. میزان جذب محلول نهائی در طول موج ۷۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (Bougatef, *et al.*, 2009).

۲.۷. تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS انجام شد. پس از بررسی نرمال بودن داده ها به کمک آزمون کولموگروف-اسمیرنف، داده‌ها با آزمون واریانس یک طرفه (One way ANOVA) آنالیز شدند. جهت تعیین وجود تفاوت معنی‌دار بین مقادیر میانگین تیمارهای مختلف از آزمون حداقل تفاوت معنی‌دار (LSD) در سطح ($p \leq ۰/۰۵$) استفاده گردید.



شکل۱- منحنی استاندارد مربوط به ارزیابی پروتئین به روش BCA.

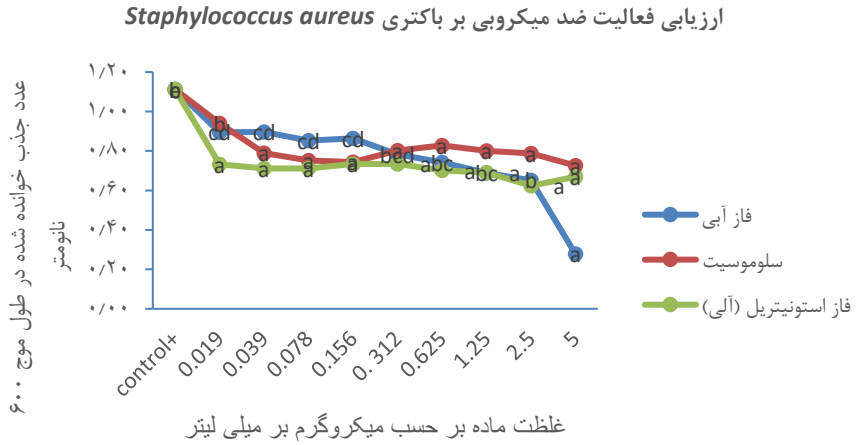
۳. نتایج

۳.۱. اثر ضد باکتریایی سلوموسیت، فاز آبی و فاز آلی بر باکتری *Staphylococcus aureus*

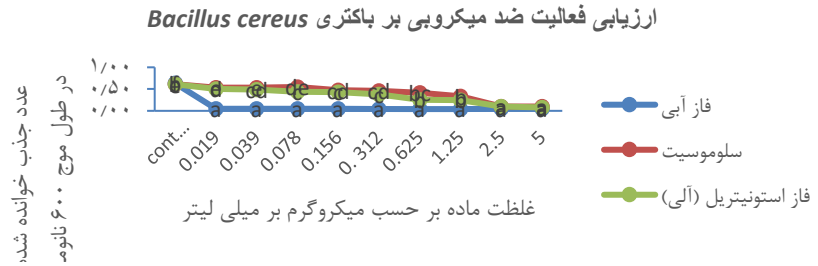
نتایج ارزیابی رقت‌های مختلف محلول سلوموسیت و فاز آبی و فاز آلی روی باکتری *Staphylococcus aureus* پس از ۱۸ ساعت انکوباسیون نشان داد که سلوموسیت، فاز آبی و فاز آلی واجد خاصیت ضد میکروبی است (شکل ۲). به‌طوریکه چاهک‌های حاوی این ترکیبات در مقایسه با چاهک فاقد این ترکیبات (کنترل مثبت) از مقدار عددی کمتری برخورداربودند. علی‌رغم تاثیر ضد میکروبی سلومو سیت با افزایش غلظت بر فعالیت ضد میکروبی آن تاثیر بارزی نداشت. در واقع از غلظت ۰/۰۳۹ میکروگرم در میلی‌لیتر تا ۵ میکرو گرم در میلی‌لیتر ثابت ماند ($P \geq ۰/۰۵$). حداقل غلظت بازدارندگی (۵۰ درصد < MIC) و MBC احتمالاً غلظت‌های بیشتر از ۵ میکرو گرم در میلی‌لیتر بود. فاز استونیتریل (فاز آلی) نیز مشابه سلوموسیت‌ها با افزودن آن به چاهک، بر باکتری‌ها تاثیر ضدمیکروبی نشان داد. ولی با افزایش غلظت تغییر محسوسی مشاهده نشد و هیچ‌کدام از رقت‌ها تاثیر بارزی بر میزان باکتری نداشت ($P > ۰/۰۵$). فاز آبی در مقایسه با دو ماده قبلی با افزایش غلظت، روندکاهشی رشد باکتری را نشان داد. بطوریکه میزان باکتری‌ها در غلظت ۵ میکرو گرم بر میلی‌لیتر فاز آبی کاهش چشمگیری نشان دادند. حداقل غلظت بازدارندگی (٪ ۵۰ < MIC) با حد اقل غلظت کشندگی (MIC) فاز آبی با هم یکسان و برابر با غلظت ۲/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود (شکل۲).

۳.۲. اثر ضد باکتریایی سلوموسیت، فاز آبی و فاز آلی بر باکتری *Bacillus cereus*

نتایج ارزیابی فعالیت ضد میکروبی رقت‌های مختلف محلول سلوموسیت و فاز آبی و فاز آلی بر باکتری *Bacillus cereus* پس از ۱۸ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد بیانگر آن بود که با افزودن هر کدام از عصاره ها به محیط باکتری، بر آن‌ها تاثیر منفی دارد ولی با افزایش غلظت، علی رغم کاهش رشد باکتریایی، عکس العمل های متفاوتی مشاهده شد. فاز آلی و سلوموسیت از روند نسبتا مشابه‌ای برخوردار بود و حداقل غلظت بازدارندگی برای فاز آلی در غلظت ۰/۶۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر و حد اقل غلظت باز دارندگی برای سلوموسیت در غلظت ۲/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر به دست آمد ($P < ۰/۰۵$). نتایج فاز آبی بیانگر تاثیر مخرب و قوی آن با تلقیح به باکتری‌ها است. بطوریکه در کمترین غلظت، به شدت بر رشد باکتری‌ها اثر گذاشته و نشانگر کنترل کامل جمعیت باکتریایی بود. حداقل غلظت بازدارندگی (MIC > ۵۰٪) برابر با غلظت ۲/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر به دست آمد. در حالیکه غلظت ۰/۶۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر، حداقل غلظت بازدارندگی (MIC > ۵۰٪) فاز آلی را نشان داد. اما فاز آبی با بازدارندگی بیش از ۹۰ درصد در تمام غلظت‌ها، بیانگر اثر گذاری بسیار قوی بر کاهش جمعیت باکتری بود. در واقع در فاز آبی از کمترین غلظت، باعث حذف کامل جمعیت باکتریایی شد و اعداد خوانده شده با میانگین عدد کنترل منفی (۰/۰۴)، بودند که بیانگر حداقل غلظت کشندگی (MBC) در پایین ترین غلظت است (شکل ۳).



شکل۲- نتایج ارزیابی رقت‌های مختلف محلول سلوموسیت و فاز آبی و فاز آلی بر باکتری *Staphylococcus* aureus پس از ۱۸ ساعت انکوباسیون.

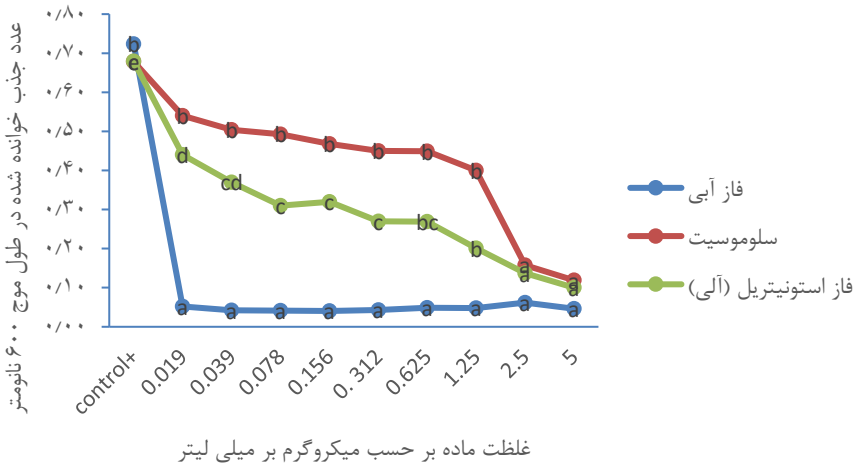


شکل۳- نتایج ارزیابی رقت‌های مختلف محلول سلوموسیت و فاز آبی و فاز آلی بر باکتری *Bacillus cereus* پس از ۱۸ ساعت انکوباسیون.

۳.۳. اثر ضد باکتریایی سلوموسیت، فاز آبی و فاز آلی بر باکتری *Escherichia coli*

در شکل۴، تاثیر رقت‌های مختلف سلوموسیت، فاز آبی و فاز آلی بر باکتری *Escherichia coli* نشان داده شده است. فاز آلی در مقایسه با سلوموسیت از تاثیر گذاری بیشتری برخوردار بود ولی فاز آبی در مقایسه با آن دو به شدت تاثیر گذار بود. به‌طوری که باکتری‌ها در کمترین غلظت کاهش شدیدی را نشان دادند. حداقل غلظت بازدار ندگی و کشندگی ((MIC > ۵۰ ٪) و (MBC سلوموسیت مقدار ۲/۵ میکروگرم بر میلی لیتر تعیین شد و حداقل غلظت بازدارندگی و کشندگی ((MIC > ۵۰ ٪) و (MBC فاز آلی در مقایسه با سلوموسیت در غلظت کمتر و معادل مقدار ۰/۰۷۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر به دست آمد. فاز آبی بر این باکتری نیز تاثیر بارزی داشت و با افزودن آن به محیط کشت، باکتری‌ها را از بین برد. در واقع حداقل کشندگی (MBC) فاز آبی از کمترین غلظت آزمایش شده یعنی ۰/۰۱۹ میکروگرم بر میلی‌لیتر به دست آمد.

ارزیابی فعالیت ضد میکروبی بر باکتری *Escherichia coli*



شکل۴ - نتایج ارزیابی رقت‌های مختلف محلول سلوموسیت و فاز آبی و فاز آلی روی باکتری *Escherichia coli* پس از ۱۸ ساعت انکوباسیون.

۳.۴. اثر ضد باکتریایی سلوموسیت، فاز آبی و فاز آلی بر باکتری *Pseudomonas aeruginosa*

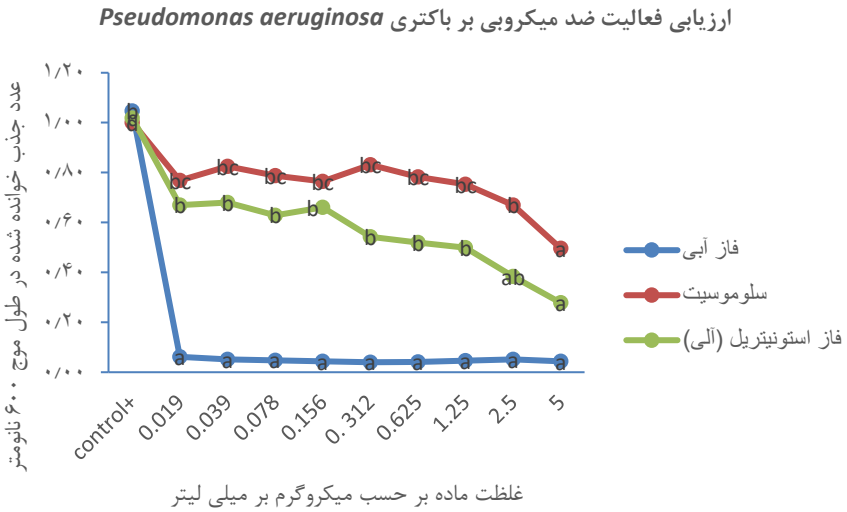
با افزودن مواد سلوموسیت، فاز آبی و فاز آلی به باکتری گرم‌منفی *Pseudomonas aeruginosa* کاهش رشد مشاهده شد ولی با افزایش غلظت بر آن تاثیر منفی داشت. فاز آبی در مقایسه با دو ماده دیگر مشابه سایر آزمون‌های ضد میکروبی انجام شده، بسیار موثرتر عمل نمود و رشد باکتری‌ها را بطور کامل مهار کرد.

حداقل غلظت بازدارندگی و کشندگی سلوموسیت ((MIC > ۵۰ ٪) و (MBC برای باکتری *Pseudomonas aeruginosa* مقدار ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر تعیین شد. فاز آلی نیز مشابه سلوموسیت با افزایش غلظت، تاثیر ضد باکتریایی قوی‌تری را نشان داد و حداقل غلظت بازدارندگی و کشندگی آن ((MIC > ۵۰ ٪) و (MBC برابر ۲/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. فاز آبی بر این گونه از باکتری نیز تاثیر

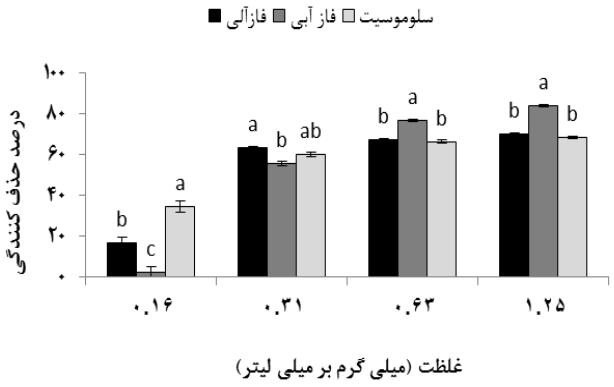
منفی بارزی داشت و با افزودن آن به محیط حاوی باکتری، کشندگی آن مشخص گردید. در واقع حداقل کشندگی فاز آبی درکمترین غلظت، یعنی ۰/۰۱۹ میکروگرم بر میلی‌لیتر حاصل شد (شکل ۵).

۳.۵. نتایج میزان حذف کنندگی رادیکال آزاد DPPH برای فاز آلی، فاز آبی و سلوموسیت

در شکل ۶ نتایج مقایسه درصد مهارکنندگی سلوموسیت و فازهای آبی و آلی جدا شده از آن آمده است. در غلظت‌های ۱/۲۵ و ۰/۶۳ میلی‌گرم در میلی‌لیتر تفاوت معنی‌داری بین فاز آلی و سلوموسیت وجود نداشت. در حالی که فاز آبی با دو ترکیب دیگر تفاوت معنی داشت ($P<0/05$). همچنین بیشترین اثر مهارکنندگی برای فاز آبی در غلظت‌های ۱/۲۵ و ۰/۶۳ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به دست آمد.

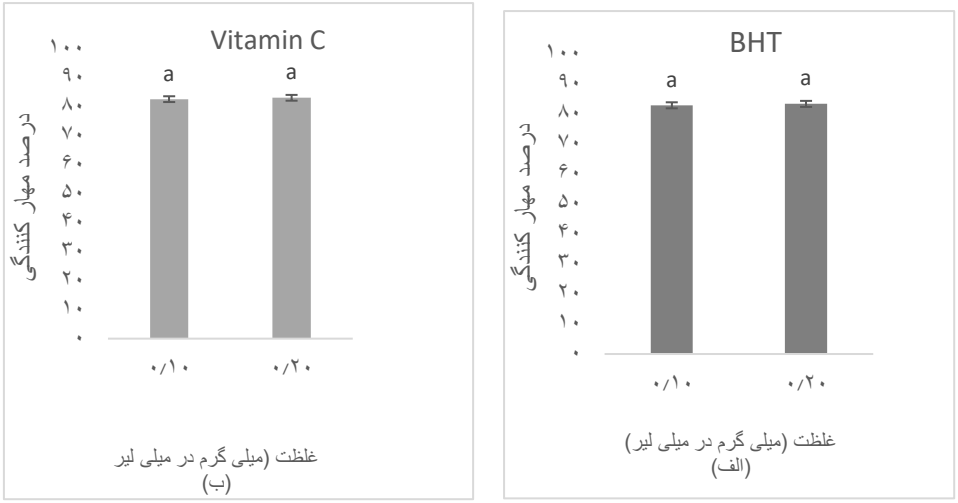


شکل۵- نتایج ارزیابی رقت‌های مختلف محلول سلوموسیت و فاز آبی و فاز آلی روی باکتری *Pseudomonas aeruginosa* پس از ۱۸ ساعت انکوباسیون.



شکل۶ - مقایسه درصد مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH سلوموسیت و فاز های آبی و آلی جدا شده از آن، هر غلظت به طور جداگانه مورد مقایسه قرار گرفته است.
حروف a-c بیانگر تفاوت معنی‌دار بین غلظت‌ها است ($P<0/05$). داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار ارائه شده‌اند.

بررسی نتایج به دست آمده نشان دادند که سلوموسیت و فاز آلی و آبی فعالیت حذف کنندگی رادیکال DPPH را به خوبی دارند، به طوری که با افزایش غلظت عصاره ها از ۰/۱۵۶ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به ۱/۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، فعالیت حذف کنندگی رادیکال آزاد افزایش یافت و در غلظت ۱/۲۵ میلی‌گرم در میلی لیر فعالیت حذف کنندگی رادیکال آزاد DPPH برای سلوموسیت و فاز آلی و آبی (۶۸/۴، ۶۹/۶ و ۸۳/۶ درصد) بود. همچنین فعالیت حذف کنندگی رادیکال آزاد DPPH در سلوموسیت و فاز آلی بطور معنی‌داری در تمامی غلظت‌ها کمتر از آسکوربیک اسید و BHT بود (P<۰/۰۵). اما در غلظت ۱/۲۵ میلی‌گرم در میلی لیر برای فاز آبی (۸۳/۶ درصد) تفاوت معنی‌داری با ضد اکسیدان‌های صنعتی و طبیعی در غلظت‌های ۰/۱ و ۰/۲ میلی‌گرم در میلی لیتر (برای BHT به ترتیب ۸۲/۶۷ و ۸۳/۱۴ درصد مهار کنندگی و همچنین برای آسکوربیک اسید به ترتیب ۸۳/۱۴ و ۸۷/۸۹ درصد مهار کنندگی) مشاهده نشد (شکل ۷).

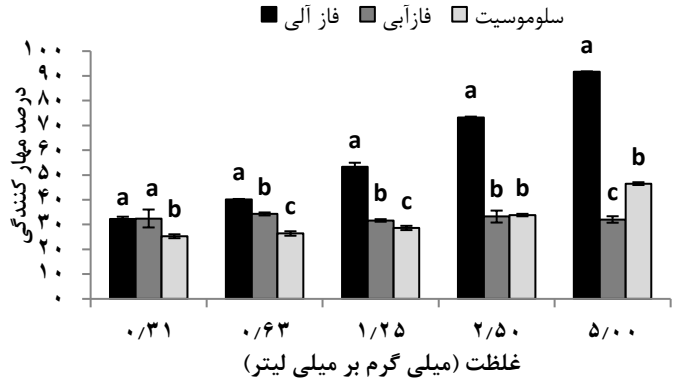


شکل۷ - میزان حذف کنندگی رادیکال آزاد DPPH برای ضد اکسیدان صنعتی BHT (الف) و ویتامین C (ب) در دو غلظت ۰/۲ و ۰/۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر. (درصد مهار کنندگی غلظت‌های ۰/۲ و ۰/۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر ضد اکسیدان های صنعتی و طبیعی (BHT و آسکوربیک اسید) مبنای مقایسه‌اند و درصد مهار کنندگی سایر ترکیبات با غلظت‌های متفاوت بر اساس مقدار عددی سنجیده شده است).

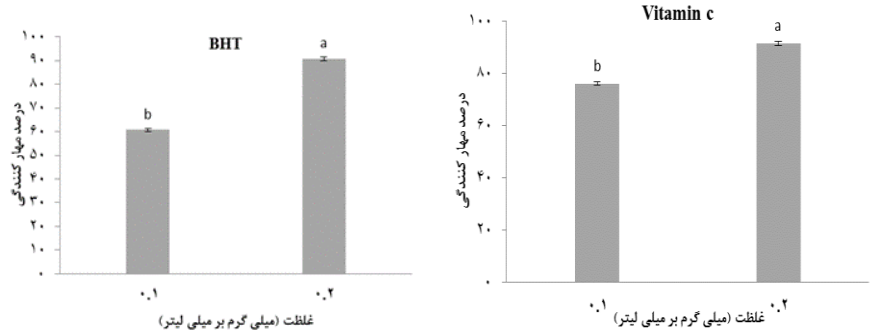
۳.۶. نتایج میزان حذف کنندگی رادیکال آزاد ABTS برای سلوموسیت، فاز آبی و فاز آلی

در شکل ۸، نتایج مقایسه درصد مهارکنندگی سلوموسیت ، فازهای آبی و آلی جدا شده از آن آمده است. طبق نتایج در تمامی غلظت‌ها بین سلوموسیت، فاز آبی و فاز آلی تفاوت معنی‌دار مشاهده شد (P<۰/۰۵). بررسی ها نشان داد در غلظت ۲/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر فاز آلی ۷۳/۱۶ درصد سلوموسیت ۳۳/۸۳ درصد و فاز آبی ۳۳/۲۳ در صد رادیکالهای آزاد ABTS حذف شدند، در غلظت ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر فاز آلی ۹۱/۷ درصد قدرت حذف کنندگی رادیکال آزاد ABT ثبت شد و سلوموسیت۴۶/۵۲ درصد رادیکال آزاد ABTS را حذف کرد و کمترین قدرت حذف کنندگی مربوط به فازآبی با درصد حذف کنندگی ۳۲/۰۵ درصد بود، همچنین فعالیت حذف کنندگی رادیکال آزاد ABTS در سلوموسیت و فاز آبی بطور

معنی‌داری کمتر از آسکوربیک اسید و BHT بود (P<۰/۰۵). اما در غلظت ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر برای فاز آلی (۹۱/۷ در صد) تفاوت معنی‌داری با ضد اکسیدان های صنعتی و طبیعی در غلظت ۰/۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر (برای BHT ۹۰/۷ درصد مهار کنندگی و برای آسکوربیک اسید ۶۰/۷ درصد مهار کنندگی) مشاهده نشد. اما درصد مهار کنندگی فاز آلی با غلظت ۰/۱ میکروگرم در میلی‌لیتر ضد اکسیدان های صنعتی و طبیعی تفاوت معنی‌داری داشت و درصد مهار کنندگی ضد اکسیدان های مذکور برای غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به ترتیب برای BHT ۶۰/۷ درصد و برای آسکوربیک اسید ۷۶/۰۵ درصد به دست آمد (شکل ۹).



شکل ۸ - مقایسه درصد مهارکنندگی رادیکال آزاد ABTS سلوموسیت و فازهای آبی و آلی جدا شده از آن، (حروف معنی‌داری اختلاف در هر غلظت را نشان می‌دهد و مقایسه بین تمام غلظت‌ها با توجه به درصد مهارکنندگی رادیکال آزاد توسط سلوموسیت، فاز آلی و فاز در غلظت‌های مختلف صورت گرفته است).



شکل۹ - میزان حذف کنندگی رادیکال آزاد ABTS برای ضد اکسیدان صنعتی BHT و ضد اکسیدان طبیعی (ویتامین C) در دو غلظت ۰/۲ و ۰/۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر (درصد مهار کنندگی غلظت‌های ۰/۲ و ۰/۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر ضد اکسیدان های صنعتی و طبیعی (BHT و آسکوربیک اسید) مبنای مقایسه‌اند و درصد مهار کنندگی سایر ترکیبات با غلظت‌های متفاوت بر اساس مقدار عددی سنجیده شده است).

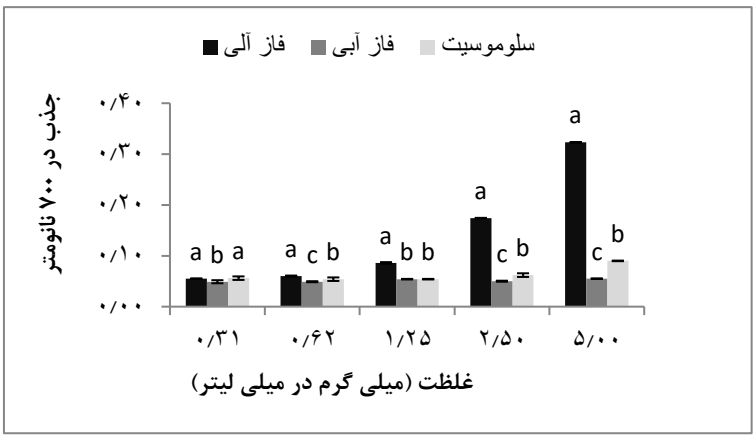
۳.۷. نتایج آزمون قدرت کاهندگی آهن برای سلوموسیت، فاز آلی و فاز آبی

بررسی نتایج نشان داد که قدرت کاهندگی آهن سلوموسیت و فازآلی و آبی در تمام غلظت‌ها دارای اختلاف معنی‌دار است (شکل ۱۰)، به طوری که با افزایش غلظت برای هر سه ماده افزایش میزان کاهندگی آهن مشاهده شد. در غلظت ۱/۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر

اختلاف معنی‌داری بین فاز آبی و سلوموسیت مشاهده نشد. بیشترین قدرت احیا کنندگی برای فاز آلی در غلظت‌های ۵ و ۲/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر با جذب ۰/۳۲۳ و ۰/۱۷۴ مشاهده شد و این میزان برای سلومو سیت ۰/۰۹ و ۰/۰۶ به د ست آمد. کمترین قدرت احیا کنندگی برای فاز آبی م شاهده شد، به طوری که در بیشترین غل ظت های آن یعنی ۵ و ۲/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر میزان جذب برابر ۰/۰۵ بود.

۳.۸. تعیین غلظت پروتئین

در بررسی حاضر میزان پروتئین سلوموسیت، فاز آبی و آلی لیوفلیزه شده آن با ا ستفاده از روش BCA سنجیده شد. به طوری که با توجه به منحنی استاندارد، میزان پروتئین به ترتیب برای سلومو سیت، فاز آبی و فاز آلی به ترتیب ۶۲/۴۱ ، ۲۳/۳۸ و ۶۹درصد محاسبه گردید.



شکل ۱۰- مقایسه آزمون قدرت کاهندگی سلوموسیت و فاز های آلی و آبی.

۴. بحث و نتیجه گیری

در سال های اخیر، توجه زیادی به بررسی فعالیتهای ترکیبات زیستی و استفاده دارویی بالقوه از آنها شده است. توسعه مقاومت دارویی در پاتوژن های انسانی در برابر پادزیست هایی مصرفی، جستجو برای مواد ضدمیکروبی از سایر منابع از جمله منابع طبیعی زیستی خشکی و دریایی زی را ضروری کرده ا ست. همچنین شکل‌گیری گونه‌های اکسیژن واکنش‌پذیر منجر به وقوع بیماری‌های زیادی از قبیل بیماری قلبی، سکته مغزی، ت صلب شرائین، دیابت و سرطان شده است. فرایند اکسیداسیون لیپیدها نه تنها در صنایع غذایی و تولید غذای سالم بلکه برای سلامتی انسان نیز مشکل ساز شده است (Shahidi، ۱۹۹۷و ۲۰۰۸). بنابراین، در صنایع غذایی و دارو سازی از ضداکسیدان‌های مصنوعی مانند: بوتیل هیدروکسی آنیزول[۱] (BHA)، پروپیل گالات[۲] (PG)، بوتیل هیدروکسی تولوئن[۳] (BHT) و تترا بوتیل هیدروکوینون[۴] TBHQ جهت به تاخیر انداختن اکسیداسیون لیپیدها استفاده می‌شود (Taher *et al.*, 2014; Di Bernardini *et al.*, 2011). در استفاده از این ضداکسیدان‌های مصنوعی توجه به مسائل

[۱] Butylhydroxyanisole

[۲] Propyl gallate

[۳] Butylated hydroxytoluene

[۴] Tert-Butylhydroquinone

بهداشتی دارای اهمیت زیادی است (Taher *et al.*, 2014; Hettiarachchy *et al.*, 1996). از این رو شناسایی منابع ایمن و طبیعی جایگزین بعنوان ضداکسیدان برای غذاها یک ضرورت است (Taher *et al.*, 2014; Di Bernardini *et al.*, 2011). بنابراین، علاقه روبه رشدی در جایگزینی ضداکسیدان‌های مصنوعی با ضداکسیدان‌های طبیعی از منابع غذایی برای مزایای سلامتی بالقوه و بدون عوارض جانبی وجود دارد (Taher *et al.*, 2014; Sarmadi, 2010; Ismail, 2010).

در مطالعه حاضر اثر ضدباکتری سلوموسیت و عصاره آبی و آلی حاصل از آن بر باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت (*Pseudomonas aeruginosa*، *Escherichia coli*، *Staphlococcus aureus*، *Bacillus cereus*) و همچنین اثر ضد اکسیانی این ترکیبات (حذف رادیکال‌های آزاد DPPH و ABTS همچنین قدرت کاهندگی آهن)، مورد بررسی قرار گرفت. به طوری که نتایج آمون‌های ضد باکتریایی نشان داد تمام این ترکیبات در تمام غلظت‌ها دارای اثر ضد باکتریایی قوی بر باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی دارند و می‌توانند به دلیل حضور ترکیباتی ازجمله استروئیدگلیکوزیدها، استرول‌پلی‌هیدروکسیلات، رنگدانه‌نفتوکینون، پپتیدهای ضد میکروب و لیزوزیم‌ها رشد باکتریها را مهار کنند. ولی فاز آبی اثر ضد باکتریایی بسیار قوی تری را نسبت به سلوموسیت و فاز آلی نشان داد که می‌تواند به دلیل حضور بیشتر پپتیدهای ضد میکروب (AMPs) در این فاز باشد (Li *et al.*, 2010; Schillaci *et al.*, 2014; Taher *et al.*, 2014). نتایج کارهای Li و همکاران، ۲۰۰۸ و ۲۰۱۰، بر توتیای دریایی سبز منجر به جدا سازی پپتیدهای ضد میکروبی غنی از سیستئین استرونگلین و سنتروسین از فاز آبی حاصل از سلوموسیت ها جداسازی و تخلیص آنها شد. نشان داده شد که AMPs دارای اثر ضد باکتریای قوی بر باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت (*Vibrio*) *anguillarum*، *Listonella*، *Escherichia coli* و (*Corynebacterium glutamicum*، *Staphylococcus aureus*) است.

همچنین در رابطه با خاصیت حذف کنندگی رادیکال های آزاد DPPH ، نتایج نشان داد که اثر حذف‌کنندگی DPPH در غلظت‌های ۰,۱۶ میلی‌گرم در میلی‌لیتر عصاره ها برای سلوموسیت و فاز آلی بیشتر از فاز آبی است. اما بیشترین اثر حذف کنندگی در غلظت‌های ۰/۶۳ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و ۱/۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر مربوط به فاز آبی به دست آمد ولی معنی‌داری نبود. همچنین در غلظت ۱,۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر مقدار عددی میزان مهار کنندگی DPPH برای فاز آبی (۸۳/۶ درصد) از ویتامین C (۷۸/۸۹) و BHT (۸۲/۶۷) بیشتر بوده است. در رابطه با خاصیت حذف‌کنندگی رادیکال‌های آزاد ABTS نتایج بیانگر این بود که تمامی غلظت‌ها در عصاره ها دارای اثر حذف کنندگی رادیکال آزاد ABTS هستند. اما اثر حذف کنندگی ABTS برای فاز آلی بیشتر از فاز آبی و سلوموسیت بود. به طوری که در غلظت‌های ۲/۵ و ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر ABTS دارای اثر حذف کنندگی بسیار بالایی بود و در غلظت ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر با درصد حذف کنندگی (۹۱/۷ درصد) عملکرد بهتری را نسبت به ضد اکسیدان های صنعتی و طبیعی نشان داد. در رابطه با قدرت کاهندگی آهن، بیشترین قدرت احیا کنندگی برای فاز آلی در غلظت‌های ۵ و ۲/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر با جذب ۰/۳۲۳ و ۰/۱۷۴ مشاهده شد و این میزان برای سلوموسیت ۰/۰۹ و ۰/۰۶ به دست آمد و کمترین قدرت احیا کنندگی برای فاز آبی مشاهده شد. در تحقیقی که سلیمانی و همکاران، ۲۰۱۴ انجام دادند، نتایج نشان داد که مایع سلومیک و رنگدانه پوست و رنگدانه خار دارای اثر حذف کنندگی خوبی در کنترل رادیکال آزاد DPPH دارند. به طوری که بیشترین میزان کنترل رادیکال آزاد DPPH مربوط به غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به دست آمد. همچنین در تحقیق Archana و همکاران، ۲۰۱۶ روی گناد توتیای دریایی *Stomopneustes variolaris* ، بررسیها نشان داد که

عصـــاره متانولی گناد می‌تواند با دارا بودن ترکیبات پلی فنول‌نفتوکینونی و نیز ترکیبات پروتئینی با خاصـت ضـد اکســیدانی، در غلظت های ۲۰ الی ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر، قدرت حذف‌کنندگی رادیکال آزاد DPPH را داشته باشد.

باتوجه به نتایج، مطالعه حاضـر نشـان داده شـد که عصاره سلوموسیت و فاز های آبی و آلی حاصل از آن، اثر ضد باکتریایی قوی بر باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی دارند و حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کشـندگی (MIC و MBC) برای ترکیبات زیسـت فعال مورد آزمون در این تحقیق با هم برابر اسـت. حداقل غلظت کشندگی و بازدارندگی برای سلوموسیت، فاز آبی و فـاز آلی بر بـاکتری‌هـای *Staphlococcus aureus*، *Bacillus cereus*، *Escherichia coli* و *Pseudomonas aeruginosa* به ترتیب، برای سـلوموسـیت در غلظت‌های بیشـتر از ۵، ۲/۵، ۲/۵ و ۵ میکروگرم در میلی‌لیتر، برای فاز آبی در غلظت های ۲/۵ ، ۰/۰۱۹، ۰/۰۱۹ و ۰/۰۱۹ میکروگرم در میلی‌لیتر و برای فاز آلی در غلظت های بیشتر از ۵، ۰/۶۲۵، ۰/۶۲۵ و ۲/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر به دسـت آمد و مهار رادیکال‌های آزاد ABTS و DPPH صورت گرفت.

با توجه به فعالیت ضدمیکروبی مناسب عصاره ها در غلظت‌های کم، اسـتفاده از این ترکیبات در سـیسـتم‌های بسته‌بندی ضدمیکروبی و داروهای ضد باکتریای توصیه می‌شـود. همچنین، با توجه به فعالیت ضـداکسـیدانی مناسب سلوموسیت و فاز آبی و آلی حاصل از آن ،استفاده از این ترکیبات در سیستم‌های بسته‌بندی ضد اکسیدانی توصیه می‌گردد.

۵. منابع

Abubakar L., Mwangi C., Uku J., and Ndirangu S., 2012. Antimicrobial activity of various extracts of the sea urchin *Tripneustes gratilla* (Echinoidea). *African Journal of Pharmacology and Therapeutics* 1(1), 19-23.

Amarowicz R., Synowiecki J., Shahidi F., 2012. Chemical composition of shells from red(*Strongylocentrotus franciscanus*) and green (*Strongylocentrotus* droebachiensis) sea urchin. *Food Chemistry 133*(3), 822-826.

Archana, A., and Babu, K.R., 2016. Nutrient composition and antioxidant activity of gonads of sea urchin *Stomopneustes variolaris*. *Food chemistry 197*, 597-602.

Bougatef A., Hajji M., Balti R., Lassoued I., Triki-Ellouz Y., Nasri M., 2009. Antioxidant and free radical-scavenging activities of smooth hound (*Mustelus mustelus*) muscle protein hydrolysates obtained by gastrointestinal proteases, *Food Chemistry* 114(4), 1198-1205.

Chen J., 2003. Overview of sea cucumber farming and sea ranching practices in China. SPC *Beche-de-Mer information bulletin*18, 18-23.

Di Bernardini, R., Harnedy, P., Bolton, D., Kerry, J., O'Neill E., Mullen, A. M., Hayes, M., 2011. Antioxidant and antimicrobial peptidic hydrolysates from muscle protein sources and by-products, *Food Chemistry* 124(4), 1296-1307.

Farouk, A.E.A., Abd, F., Ghouse, H., Ridzwan, B.H., 2007. New Bacterial Species Isolated from Malaysian Sea Cucumbers with Optimized Secreted Antibacterial Activity. *Journal of Biochemistry and Biotechnology* 3(2), 60-5. (In Persian)

Haug T., Kjuul A K., Styrvold, O. B., Sandsdalen E., Olsen, M., Stensvåg K., 2002. Antibacterial activity in *Strongylocentrotus droebachiensis* (Echinoidea), *Cucumaria frondosa* (Holothuroidea), and *Asterias rubens* (Asteroidea*). Journal of Invertebrate Pathology*. 81(2), 94-102.-Hettiarachchy N S., Glenn K C., Gnanasambandam, R., Johnson, M.G., 1996. Natural antioxidant extract from fenugreek (*Trigonella foenumgraecum*) for ground beef patties. *Journal of Food Science* 61(3), 516-519.

Kelly M.S., 2005. Echinoderms: their culture and bioactive compounds. *In Echinodermata* 139-165. *Springer Berlin Heidelberg.*

Khalegi, M., Oufi, F., 2009. Identification of marine species in the tidal zones of Chabahar bay, *Journal of Animal Environment Science* 4(3), 31-36 (in Persian).

Kim, S. K., Wijesekara, I., 2010. Development and biological activities of marine-derived bioactive peptides: A review. *Journal of Functional Foods* 2(1), 1-9.

Li, C., Haug, T., Moe, M. K., Styrvold, O. B., Stensvåg, K., 2010. Centrocins: isolation and characterization of novel dimeric antimicrobial peptides from the green sea urchin, *Strongylocentrotus droebachiensis*. *Developmental and Comparative Immunology* 34(9), 959-968.

Li, C., Haug, T., Styrvold, O. B., Jorgensen, T., Stensvåg, K., 2008. Strongylocins, novel antimicrobial peptides from the green sea urchin, *Strongylocentrotus droebachiensis*. *Developmental and Comparative Immunology*,32(12), 1430-1440.

Mayer, A., Rodríguez, A. D., Taglialatela-Scafati, O., Fusetani, N., 2013. Marine pharmacology in 2009–2011: Marine compounds with antibacterial, antidiabetic, antifungal, anti-inflammatory, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the immune and nervous systems, and other miscellaneous mechanisms of action, *Marine drugs.* 11(7), 2510-2573.

Qin, L., Zhu, B.W., Zhou, D. Y., Wu, H. T., Tan, H., Yang, J. F., Murata, Y., 2011. Preparation and antioxidant activity of enzymatic hydrolysates from purple sea urchin (*Strongylocentrotus nudus*) gonad. *LWT-Food Science and Technology* 44(4), 1113-1118.

Rahi S., Heydari, B.A., Resa, M., 1393. Effects of extracts from Sea urchin (in Persian Gulf) on the pathogenicity of Candida fungi, *Journal of Aquatic Physiology and Biotechnology* 2(3), 45-31. (in Persian).

Sarmadi, B. H., Ismail, A., 2010. Antioxidative peptides from food proteins: a review, *Peptides* 31(10), 1949-1956.

Schillaci, D., Cusimano, M. G., Spinello, A., Barone, G., Russo, D., Vitale, M., Arizza, V., 2014. Paracentrin 1, a synthetic antimicrobial peptide from the sea-urchin *Paracentrotus lividus*, interferes with staphylococcal and Pseudomonas aeruginosa biofilm formation. AMB (Applied and Industrial Microbiology Biotechnology) Express. 4(1), 78-83.

Shahidi F., 1997. Natural antioxidants: Chemistry, health effects, and applications. Books.google.com. Chapter 1.

Shahidi, F., Zhong, Y., 2008. Bioactive peptides. *Journal of AOAC International* 91(4), 914-931.

Smith, L. C., Rast, J.P., Brockton, V., Terwilliger, D. P., Nair, S. V., Buckley, K. M., Majeske, A. J., 2006. The sea urchin immune system. *Invertebrate Survival Journal* 3, 25-39.

Soleimani, S., Yousefzade, M., Moein, S., Amrallahi, B N., 2014. Antimicrobial and antioxidant effects of pigment and Coelomic liquid from *Echinometra matheai, Journal of Kerman University of Medical Sciences* 22(66), 628-614(in Persian).

Uma, B., Parvathavarthini, R., 2014. Antibacterial activity of hydroalcohil extract of Sea Urchin *Temnopleurus alexandri. Journal of Applied Research* 1, 1677-1680.

Wang, B., Li Z, R., Chi, C. F., Zhang, Q.H., Luo, H. Y., 2012. Preparation and evaluation of antioxidant peptides from ethanol-soluble proteins hydrolysate of *Sphyrna lewini* muscle, *Peptides* 36(2), 240-250.

You, L., Zhao, M., Regenstein, J. M., Ren, J., 2010. Changes in the antioxidant activity of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) protein hydrolysates during a simulated gastrointestinal digestion, *Food Chemistry* 120(3), 810-816.