

## ارزیابی تأثیر شرایط استخراج و نگهداری بر خواص آنتی میکروبی و میزان مهارکنندگی آنزیم‌های آلفا آمیلاز و آلفاگلوکوزیداز توسط عصاره آبی ترشک شبدری

فعالیت ضد میکروبی و مهار فعالیت آنزیم ترشک شبدری

مونا شریفی سلطانی<sup>۱</sup>، حسین میرسعیدقاضی<sup>۲\*</sup>، مصطفی سلطانی<sup>۳</sup>، گیتی کریم<sup>۴</sup>

۱- دانشجوی دکتری تخصصی، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده داروسازی، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲- مرکز تحقیقات علوم تغذیه و صنایع غذایی، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۳- دانشیار، گروه فناوری صنایع غذایی، دانشکده فناوری کشاورزی، دانشکده‌گان کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، پاکدشت، ایران

۴- استادیار، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده داروسازی، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۵- استاد، گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

\*نویسنده مسئول مکاتبات: [mirsaeed@ut.ac.ir](mailto:mirsaeed@ut.ac.ir)

(دریافت مقاله: // پذیرش نهایی: //)

### چکیده

افزایش روزافزون بیماری‌های مزمن از جمله دیابت و همچنین افزایش مقاومت باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها، الزام بررسی و یافتن منابع جدید حاوی ترکیبات ضد میکروبی و ضد دیابتی را ایجاد می‌کند. در این مطالعه، عصاره آبی گیاه ترشک شبدری به دو روش اولتراسوند و ماسراسیون تهیه گردید و تحت شرایط یخچالی و انجمادی، به دو شکل پوره و عصاره نگهداری شد. بررسی خواص مهارکنندگی از فعالیت آنزیم‌های آلفا آمیلاز و آلفاگلوکوزیداز نمونه‌های مختلف، و همچنین اثرات ضد میکروبی عصاره آبی با دو روش میکرو دیالوژن براث و انتشار در چاهک بر روی *استافیلوکوکوس اورئوس* و *شریشیاکلی*، انجام گرفت. بیشترین خاصیت ممانعت کنندگی عصاره آبی ترشک شبدری در عصاره‌ی به دست آمده به روش اولتراسوند در روز صفر مشاهده گردید. تأثیر زمان نگهداری بر روی half-maximal inhibitory concentration (IC50) نمونه‌ها معنی دار شد و رابطه معکوس بین زمان نگهداری و مهارکنندگی آنزیم مشاهده گردید. نتایج این مطالعه نشان داد که قدرت مهارکنندگی از فعالیت آنزیم توسط عصاره ترشک شبدری رابطه مستقیم با حضور ترکیبات آنتی‌اکسیدانی در این گیاه دارد. همچنین عصاره آبی گیاه ترشک شبدری بر روی مهار رشد باکتری‌های گرم مثبت و منفی مورد استفاده در این مطالعه تأثیر مثبت داشت. بیشترین قطر هاله عدم رشد در *استافیلوکوکوس اورئوس* (۲۰ میلی متر) مشاهده گردید. نتایج این مطالعه پتانسیل عصاره تازه استخراج شده گیاه ترشک شبدری به روش اولتراسوند را در ممانعت از رشد باکتری و مهار فعالیت آنزیم‌های آلفا آمیلاز و آلفاگلوکوزیداز نشان داد.

واژه‌های کلیدی: آلفا آمیلاز، آلفاگلوکوزیداز، حداقل غلظت مهارکنندگی، حداقل غلظت باکتری‌کشی، ترشک شبدری

## مقدمه

دیابت یک اختلال مزمن در متابولیسم پروتئین‌ها، چربی‌ها و کربوهیدرات‌ها است که باعث بالا رفتن بیش از حد سطح قند خون افراد می‌شود (Durazzo et al., 2021). در سال‌های اخیر، شیوع دیابت تقریباً در همه‌ی مناطق دنیا افزایش یافته‌است، به گونه‌ای که در حال حاضر در سراسر جهان میلیون‌ها نفر با دیابت زندگی می‌کنند. روزبه‌روز نگرانی‌ها در رابطه با این بیماری در حال افزایش است، چرا که علاوه بر اثرات عمیق بر کیفیت زندگی، باعث افزایش تقاضا برای خدمات بهداشتی و تحمیل هزینه‌های اقتصادی نیز می‌شود. از طرف دیگر، دیابت با مجموعه‌ای از بیماری‌ها از قبیل بیماری‌های قلبی-عروقی (عروق کرونر قلب)، سکته‌ی مغزی، بیماری کلیوی، رتینوپاتی و نوروپاتی، با احتمال قطع عضو اندام تحتانی همراه هست، بنابراین کاهش سطح قند خون به یکی از مباحث قابل توجه در سراسر جهان تبدیل گشته است (Kooti et al., 2016; Durazzo et al., 2021).

در سال‌های اخیر، مطالعات متعددی بر روی گیاهان مختلف با قابلیت کاهش سطح قند خون انجام شده است. آلفاآمیلاز و آلفاگلوکوزیداز دو آنزیم مهم در مجاری گوارشی انسان هستند که با هیدرولیز پلی‌ساکاریدهای موجود در غذا آن‌ها را تبدیل به قندهای ساده قابل جذب توسط بدن می‌کنند (Falah Hosseini et al., 2013). بنابراین مهار این آنزیم‌ها می‌تواند تأثیر بسزایی در کاهش جذب قند در مجاری گوارشی داشته باشند. مهارکننده‌های آلفاآمیلاز به‌دست‌آمده از گیاهان قادر هستند میزان افزایش قند خون بعد از غذا (Hyperglycemia) را کاهش دهند. با این وجود تخمین زده می‌شود که از ۲۵۰۰۰۰ گیاه، تنها ۲۵۰۰ مورد برای اثربخشی دارویی در برابر دیابت مورد مطالعه قرار گرفته‌اند (Abu-Odeh and Talib, 2021).

گیاه ترشک شبدری یک گیاه یک‌ساله از خانواده‌ی *اکسالیداسه (Oxalidaceae)* است، که گیاهی علفی و کوچک با ساقه‌ی خزنده و پوشیده از کرک خاکستری است. این گیاه بیشتر در مناطق مرطوب مانند شمال ایران می‌روید (Hosseini et al., 2009). برگ‌های ترشک شبدری حاوی آب، پروتئین، چربی، کربوهیدرات، ویتامین C، نیاسین، بتاکاروتن، کلسیم، فیتواسترول، فلاونوئید، موسیلاژ و ترکیبات فنولیک است (Handali et al., 2009; Hosseini et al., 2009; Salehi Sardoei, 2021; al., 2011). همچنین این گیاه به علت دارا بودن اسیدهای فنولیک، فلاونوئیدها، گلوکوتایون و ویتامین‌های E و C دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی است (Sirkanth et al., 2012). کلیه‌ی قسمت‌های این گیاه استفاده‌ی غذایی و دارویی دارد، به گونه‌ای که تاکنون مطالعات مختلف در داخل و خارج از کشور، اثربخشی این گیاه را در رفع اسهال، کم‌خونی و درمان التهاب دستگاه گوارش در دامپزشکی اثبات کرده‌اند. همچنین اثرات ضد فشارخون، ضد روان‌پریشی، تنظیم‌کننده سرعت ضربان قلب توسط گیاه ترشک شبدری طی مطالعات مختلف به اثبات رسیده است (Salehi Sardoei, 2021). نکته‌ی قابل توجه در مورد این گیاه اثربخشی آن بر کاهش سطح قند خون است. در حال حاضر داروهایی مانند آکاربوز، گلیبوز و میگلیتول جهت کاهش سطح قندخون استفاده می‌شوند، که مکانیسم عمل این داروها مهار آنزیم‌های آلفاآمیلاز و آلفاگلوکوزیداز است. این دو آنزیم از طریق هیدرولیز پلی‌ساکاریدهای مواد غذایی در مجاری گوارشی و تبدیل آن‌ها به قندهای ساده قابل جذب باعث افزایش سطح قندخون بعد از وعده‌های غذایی می‌شوند. بنابراین مهار فعالیت این دو آنزیم مخصوصاً در بیماران

دیابتی می‌تواند راه مناسبی برای پیشگیری از افزایش سطح گلوکز خون از طریق کنترل جذب گلوکز از دستگاه گوارش باشد (Falah Hosseini et al., 2013). این مطالعه با هدف تعیین اثر روش استخراج، شکل، طریقه و زمان نگهداری عصاره‌های مختلف ترشک شبدری بر میزان اثربخشی آن روی مهار فعالیت آنزیم‌های آلفاآمیلاز و آلفاگلوکزیداز و همچنین تعیین اثر ضدباکتریایی این عصاره انجام گرفت.

## مواد و روش‌ها

### مواد شیمیایی

آکاربوز، آنزیم آلفاآمیلاز، آلفاگلوکزیداز پانکراس خوکی، نشاسته ذرت و ۴-نیتروفنیل آلفا-D-گلوکوپیرانوزید از شرکت سیگما (Sigma-Aldrich, USA) تهیه شدند. سدیم کربنات، فسفات سدیم، محیط کشت مولر هیتون آگار و اسید ۳ و ۵ دی نیتروسالیسیلیک از شرکت مرک (Merck, Germany) خریداری شدند.

### باکتری‌ها

باکتری‌های مورد استفاده در این مطالعه از سازمان پژوهش علمی تهیه گردید. /شریشیاکلی دارای شناسه PTCC 1330 و /استافیلوکوکوس/ورئوس دارای شناسه PTCC 1764 بود.

### روش کار

#### فرآیند عصاره‌گیری

ابتدا گیاه ترشک شبدری به‌منظور حذف خاک و هرگونه آلودگی احتمالی، با آب شسته شد. سپس توسط چرخ‌گوشت خانگی، خرد شده (پوره) (Moulinex, France) و به دو گروه تقسیم گردید. گروه اول به مدت شش ماه در فریزر نگهداری شد، اما گروه دوم بلافاصله عصاره‌گیری شد. عصاره‌گیری به دو روش اولتراسوند و ماسراسیون به کمک آب به عنوان حلال انجام گرفت. عصاره‌های به‌دست آمده از گروه دوم نیز خود به دو گروه تقسیم‌بندی شدند، یک گروه در یخچال و گروه دیگر در فریزر (۱۸-) نگهداری شدند. پوره‌ی نگهداری شده در فریزر نیز در ماه سه و ماه شش از فریزر خارج و عصاره‌گیری (به دو روش اولتراسوند و ماسراسیون) انجام گرفت. برای این منظور، گیاه ترشک شبدری با آب به‌عنوان حلال به نسبت ۱:۱ مخلوط شد و درون دستگاه حمام اولتراسوند (Ultrasonic Cleaner, PARSONIC 7500 S, 28 kHz, 100 W) به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق (۲۵ درجه سلسیوس) قرار گرفت. در روش ماسراسیون نیز مخلوط آب (حلال) و گیاه به مدت ۱۵ دقیقه در دمای محیط قرار گرفت. در مرحله بعد عصاره‌های استخراج شده توسط کاغذ صافی واتمن شماره ۵ صاف شدند و به کمک خشک‌کن انجمادی (EHRSA, Germany) خشک گردید.

#### اندازه‌گیری میزان مهارکنندگی آنزیم آلفاآمیلاز

میزان مهارکنندگی فعالیت آنزیم آلفاآمیلاز و آلفاگلوکزیداز در روز صفر، ماه سه و ماه شش سنجیده شد. به‌منظور اندازه‌گیری میزان مهارکنندگی آنزیم آلفاآمیلاز مخلوط واکنش حاوی ۲۰۰ میکرولیتر بافر فسفات سدیم ۰/۰۲ مولار، ۲۰ میکرولیتر آنزیم آلفاآمیلاز پانکراس خوکی (Pig Pancreas Alpha amylase) و غلظت‌های مختلفی از نمونه

(۱۰، ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰ میکروگرم بر میلی گرم) به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق (۲۵ درجه سلسیوس) گرما گذاری شد و سپس ۲۰۰ میکرولیتر نشاسته ۱ درصد به لوله‌های آزمایش اضافه گردید. واکنش بوسیله افزودن ۴۰۰ میکرولیتر معرف رنگی اسید ۳ و ۵ دی نیتروسالیسیلیک (Dinitrosalicylic acid-3,5) و قراردعی بر روی حمام آب جوش به مدت ۵ دقیقه، خاتمه یافت. پس از سرد شدن مخلوط تا دمای اتاق، با ۱۵ میلی لیتر آب مقطر رقیق شد و جذب آن در طول موج ۵۴۰ نانومتر به وسیله اسپکتروفوتومتر (Shimadzu, UV-2450, Japan) اندازه گیری شد.

#### -نمونه شاهد مثبت

آکاربوز به عنوان شاهد در گستره غلظتی بین ۱۰ تا ۱۰۰ میکروگرم مورد استفاده قرار گرفت. آکاربوز یک داروی ضد دیابتی مورد استفاده برای درمان دیابت نوع ۲ است. این ترکیب یک ممانعت کننده فعالیت آنزیم آلفا گلوکوزیداز (یک آنزیم روده ای عامل آزاد شدن گلوکز از کربوهیدرات های بزرگ تر) است (Jyothi et al., 2011).

#### -اندازه گیری میزان مهارکنندگی آنزیم آلفا-گلوکوزیداز توسط عصاره

غلظت ۰/۵ میلی مولار از محلول ۴-نیترو فنیل آلفا-D-گلوکوپیرانوزید (pNPG) در بافر فسفات ۰/۱ مولار (۶/۹ = pH) آماده شد. همچنین غلظت های ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر از عصاره ها و نمونه استاندارد (آکاربوز) در بافر فسفات (pH = ۶/۹) آماده گردید. ۰/۱ (واحد در میلی لیتر) از محلول آلفا-گلوکوزیداز در ۰/۱ مولار بافر فسفات (pH = ۶/۰) آماده شد. در مرحله ی بعد ۵ میلی لیتر بافر فسفات (۰/۱ مولار)، ۲/۵ میلی لیتر pNPG، ۱ میلی لیتر نمونه تحت آزمون و ۲/۵ میلی لیتر محلول آلفا گلوکوزیداز با هم مخلوط شدند. مخلوط واکنش برای ۲۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرما گذاری شد. واکنش به وسیله افزودن ۱۰ میلی لیتر محلول سدیم کربنات (۰/۱ مولار) خاتمه یافت. مقادیر جذب در طول موج ۴۰۵ نانومتر اندازه گیری شد. نمونه شاهد به صورت نمونه ای که در آن عصاره به وسیله متانول جایگزین شده است در نظر گرفته شد.

#### -نمونه شاهد مثبت

آکاربوز به عنوان شاهد در گستره غلظتی بین ۵۰ تا ۲۰۰ میکروگرم مورد استفاده قرار گرفت. (Das and Himaja, 2015).

#### - حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC)

حداقل غلظت مهارکنندگی رشد و حداقل غلظت کشندگی عصاره های استحصالی، به روش میکرو دایلوشن بر اثر ارائه شده توسط مطالعات پیشین (Shahabi et al., 2016) با اندکی تغییرات انجام گرفت. باکتری (شرشیاکلی: PTCC 1330 و استافیلوکوکوس اورئوس: PTCC 1764) ۲۴ ساعت قبل از انجام تست در محیط کشت مولر هیتون آگار کشت داده شد و در ۳۷ درجه ی سلسیوس گرما گذاری شد. عصاره ی ترشک شبدری در غلظت ۴۷۰ میلی گرم در لیتر تهیه گردید. در ابتدای کار، در هر چاهک (میکرو پلیت ۹۶ خانه ای پلی استایرن استریل) ۱۰۰ میکرو لیتر از مولر هیتون آگار (Merck, Germany) اضافه شد. سپس ۱۰۰ میکرو لیتر از عصاره به چاهک اول اضافه و مخلوط گردید. در مرحله ی بعد ۱۰۰ میکرو لیتر از چاهک اول برداشته شد و به چاهک دوم اضافه گردید، و در نهایت از چاهک دهم ۱۰۰ میکرو لیتر برداشته و دور ریخته شد. به این ترتیب ساخت رقت های دو برابر رقیق شده در

چاهک‌های دیگر ادامه یافت، در نتیجه از چاهک دوم غلظت‌ها نصف چاهک قبلی بود. در مرحله‌ی بعد، ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری ( $10^8 \times 1/5$  cfu/ml، نیم مک فارلند) به چاهک‌ها افزوده گردید. در نهایت سطح پلیت‌ها پوشیده شد و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه‌ی سلسیوس گرمخانه‌گذاری شد. برای تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی رشد و حداقل غلظت کشندگی از روش چشمی، رنگ آمیزی با رزازورین ۰/۱ درصد و کشت و شمارش استفاده شد (Shahabi et al., 2016).

بعد از قرائت نتیجه MIC به منظور تعیین مقدار MBC از گوده‌ای که تغییر رنگ بینابینی داشت (گوده‌ی مابین گوده‌ی قرمز و گوده‌ای که تغییر رنگ نداده بود) به کمک آنس نمونه برداشته و در سطح محیط کشت BHI آگار به صورت نقطه‌ای کشت داده شد. بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون، رشد باکتری بررسی گردید و رقتی که رشد باکتری منفی بود به عنوان MBC اعلام گردید.

#### –روش انتشار در آگار با استفاده از چاهک

در این روش بعد از تهیه‌ی محیط کشت (مولر هیتتون آگار)، ۱۰۰ میکرولیتر از کشت باکتریایی ( $10^8 \times 1/5$  cfu/ml، نیم مک فارلند، اشرشیاکلی : PTCC 1330 و استافیلوکوکوس اورئوس : PTCC 1764) به کمک پخش کننده، در تمام نقاط محیط کشت پخش گردید. سپس در سطح محیط کشت به کمک انتهای پیت استریل ۷ چاهک به قطر ۶ میلی‌متر ایجاد شد. به کمک سمپلر در هر یک از چاهک‌ها ۲۵ میکرولیتر از غلظت‌های مختلف عصاره ریخته شد و پلیت‌ها برای مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سلسیوس گرماگذاری شدند. در نهایت قطر هاله‌های عدم رشد توسط کولیس اندازه‌گیری شد و نتایج میانگین‌ها به صورت میلی‌متر گزارش شد (Farahmandfar and Kordjazi, 2018).

#### –تجزیه و تحلیل آماری

کلیدی آزمون‌های انجام گرفته در این مطالعه در سه تکرار انجام شد. داده‌های به دست آمده با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) و تفاوت معنی‌دار بین میانگین‌ها در سطح احتمال ۹۵ درصد توسط آزمون چند دامنه‌ای دانکن مشخص گردید. نتایج به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار SPSS19 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

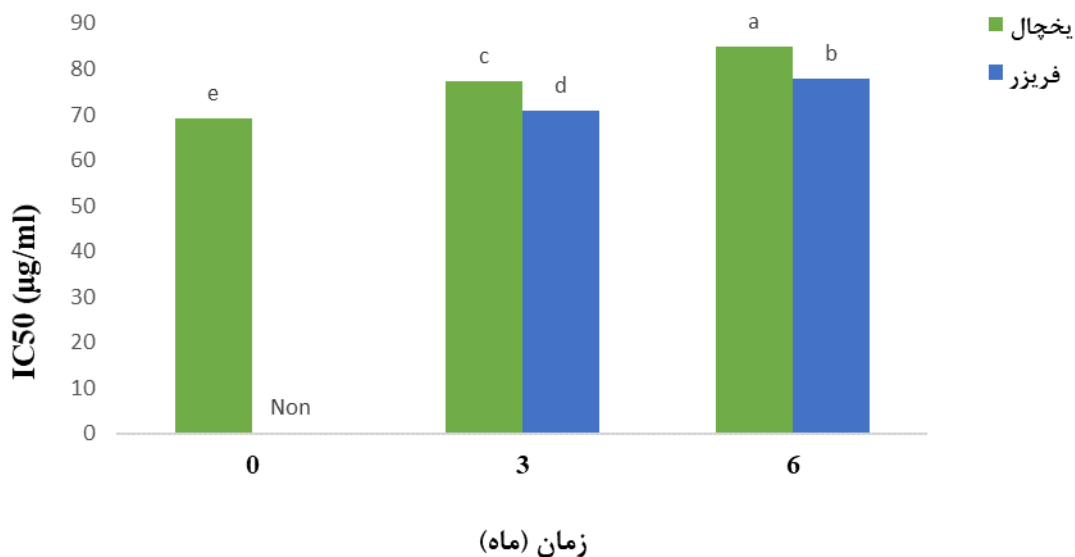
#### یافته‌ها

##### –مهارکنندگی آنزیم آلفاآمیلاز

IC<sub>50</sub> آکاربوز و نمونه‌های عصاره‌ی ترشک شبدری، با رسم نمودار درصد بازدارندگی در برابر غلظت عصاره به دست آمد. مقدار IC<sub>50</sub> آکاربوز برای آنزیم آلفاآمیلاز برابر  $0/41 \pm 60/21$  میکروگرم در میلی‌لیتر بود. این مقدار بیانگر مقدار غلظتی است که آکاربوز موجب مهار ۵۰ درصد از فعالیت آنزیم آلفاآمیلاز می‌شود.

نتایج تجزیه‌ی واریانس آنزیم آلفاآمیلاز نشان داد که اثرات ساده زمان، دما و روش عصاره‌گیری در سطح یک درصد معنی‌دار شد ( $p < 0/01$ )، همچنین اثر متقابل دوگانه زمان در دما نیز در سطح ۵ درصد معنی‌دار شد ( $p < 0/05$ ). درحالی‌که سایر اثرات متقابل دوگانه و همچنین اثر متقابل سه گانه تیمارهای مورد بررسی از نظر آماری معنی‌دار نبود ( $p > 0/05$ ). مقایسه میانگین اثر متقابل زمان در دما نشان داد که بیشترین مقدار IC<sub>50</sub> در تیمار متقابل شرایط نگهداری

یخچال در زمان ۶ ماه با مقدار ۸۹/۴ میکروگرم در میلی لیتر مشاهده شد و کمترین مقدار نیز مربوط به تیمار ماه صفر با مقدار ۶۹/۱ میکروگرم در میلی لیتر بود (شکل ۱). مقایسه میانگین اثر روش عصاره‌گیری نیز نشان داد که کمترین مقدار  $IC_{50}$  در روش عصاره‌گیری اولتراسوند مشاهده شد (شکل ۲).

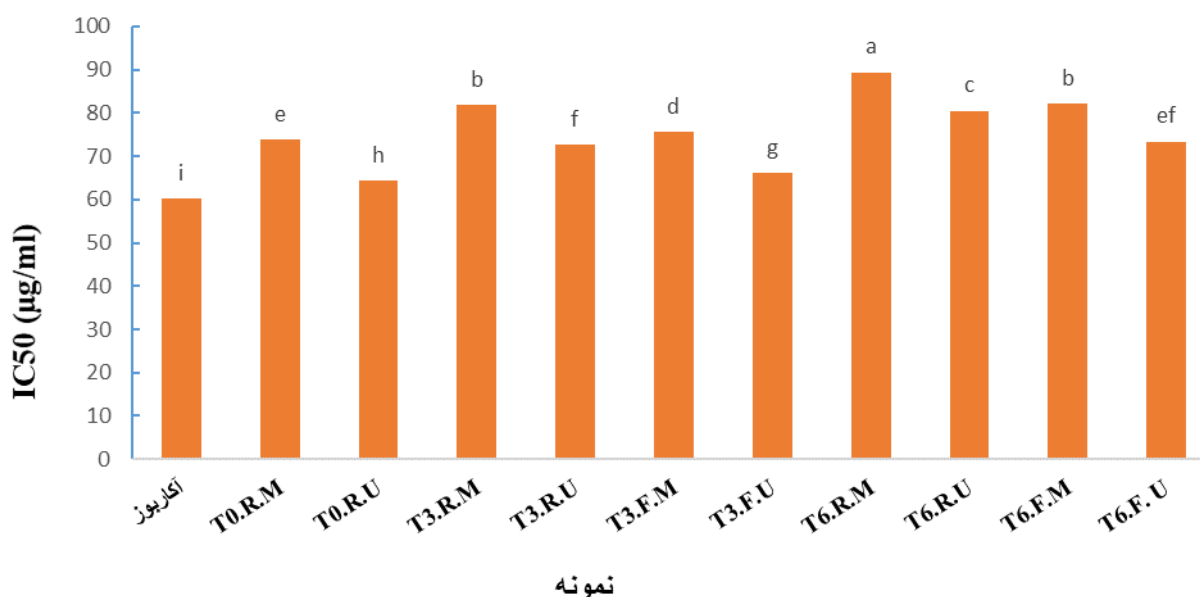


شکل (۱) - اثر زمان و دمای نگهداری بر مقدار  $IC_{50}$  آلفاآمپلاز در نمونه های اولتراسوند  
\*میانگین‌های دارای حروف متفاوت دارای تفاوت معنی‌دار در سطح یک درصد بر اساس آزمون دانکن هستند



شکل (۲) - مقایسه میانگین اثر روش عصاره گیری بر مهار عملکرد آلفاآمیلاز  
\*میانگین‌های دارای حروف متفاوت دارای تفاوت معنی‌دار در سطح یک درصد بر اساس آزمون دانکن هستند

نتایج تجزیه واریانس مقایسه‌ی کلیه‌ی نمونه‌ها با آکاربوز نشان داد که بین تیمارهای مختلف مورد بررسی از نظر آماری اختلاف معنی‌دار وجود دارد به‌طوری‌که این اختلاف در سطح یک درصد معنی‌دار شد ( $p < 0.01$ ). مقدار  $IC_{50}$  کلیه نمونه‌ها نسبت به آکاربوز بیشتر بود. بیشترین و کمترین مقدار  $IC_{50}$  به‌ترتیب از تیمارهای ۶ ماه در یخچال به روش ماسراسیون با میانگین ۸۹/۴ میکروگرم در میلی‌لیتر و آکاربوز با میانگین ۶۰/۲ میکروگرم در میلی‌لیتر به‌دست آمد (شکل ۳).



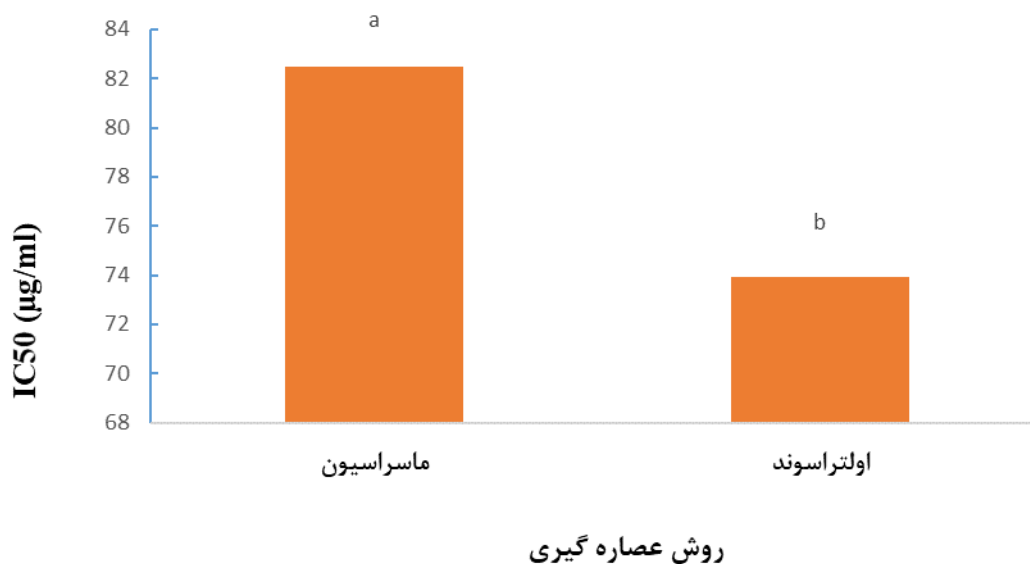
شکل (۳) - مقایسه میانگین اثر تیمارهای مختلف بر مقدار  $IC_{50}$  آنزیم آلفاآمیلاز  
\*میانگین‌های دارای حروف متفاوت دارای تفاوت معنی‌دار در سطح یک درصد بر اساس آزمون دانکن هستند.  
(T: زمان (ماه)، R: نگهداری یخچالی، F: نگهداری در فریزر، M: عصاره‌گیری به روش ماسراسیون، U: عصاره‌گیری به روش اولتراسوند)

نتایج جدول تجزیه‌ی واریانس نمونه‌های پوره شده‌ی ترشک شبدری نشان داد که اثرات ساده زمان و روش عصاره‌گیری در سطح یک درصد معنی‌دار شد ( $p < 0.01$ )، درحالی‌که اثر متقابل دوگانه زمان در روش عصاره‌گیری معنی‌دار نشد ( $p > 0.05$ ). مقایسه میانگین اثر ساده زمان نشان داد که بیشترین مقدار  $IC_{50}$  برای آنزیم آلفاآمیلاز در زمان ۶ ماه با میانگین ۸۲/۱ میکروگرم در میلی‌لیتر و کمترین آن در زمان ۳ ماه با میانگین ۷۴/۳ میکروگرم در میلی‌لیتر مشاهده شد (شکل ۴)، که حاکی از افزایش  $IC_{50}$  با گذشت زمان نگهداری پوره در فریزر است. مقایسه میانگین اثر ساده روش عصاره‌گیری نیز نشان داد که بیشترین مقدار  $IC_{50}$  با میانگین ۸۲/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر از

روش ماسراسیون و کمترین مقدار با میانگین ۷۳/۹ میکروگرم در میلی‌لیتر از روش اولتراسوند به دست آمد (شکل ۵).



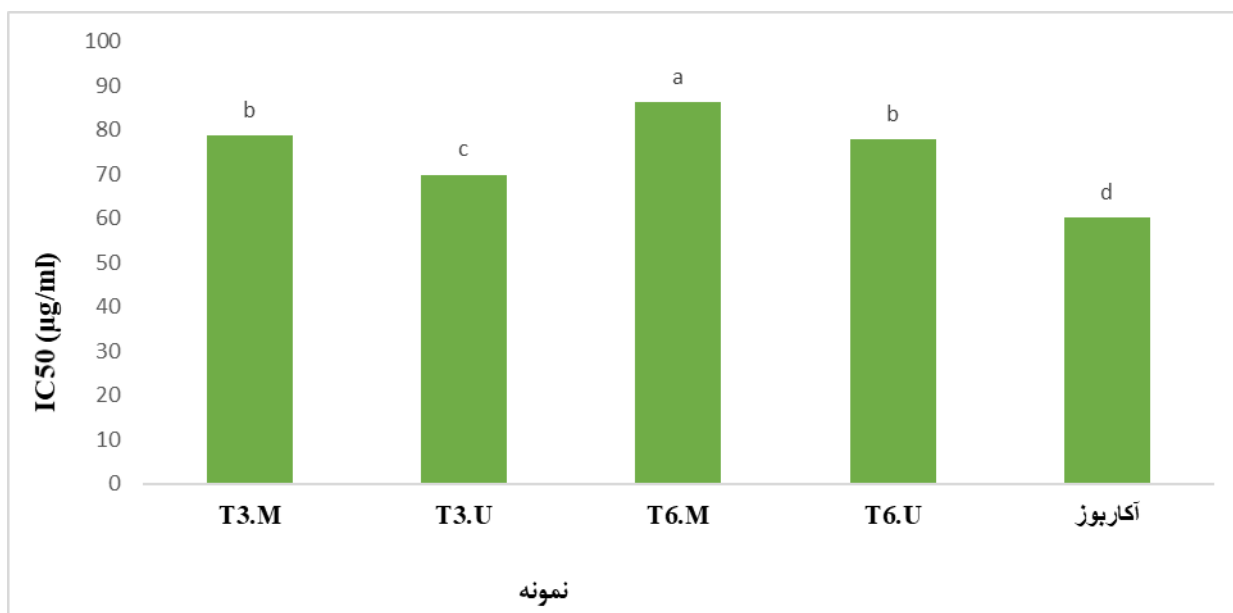
شکل (۴) - مقایسه میانگین اثر ساده زمان بر مقدار IC<sub>50</sub> آنزیم آلفا آمیلاز در نمونه‌های پوره  
\*میانگین‌های دارای حروف متفاوت دارای تفاوت معنی‌دار در سطح یک درصد بر اساس آزمون دانکن هستند



شکل (۵) - مقایسه میانگین اثر ساده روش عصاره‌گیری بر مقدار IC<sub>50</sub> آنزیم آلفا آمیلاز در نمونه‌های پوره  
\*میانگین‌های دارای حروف متفاوت دارای تفاوت معنی‌دار در سطح یک درصد بر اساس آزمون دانکن هستند



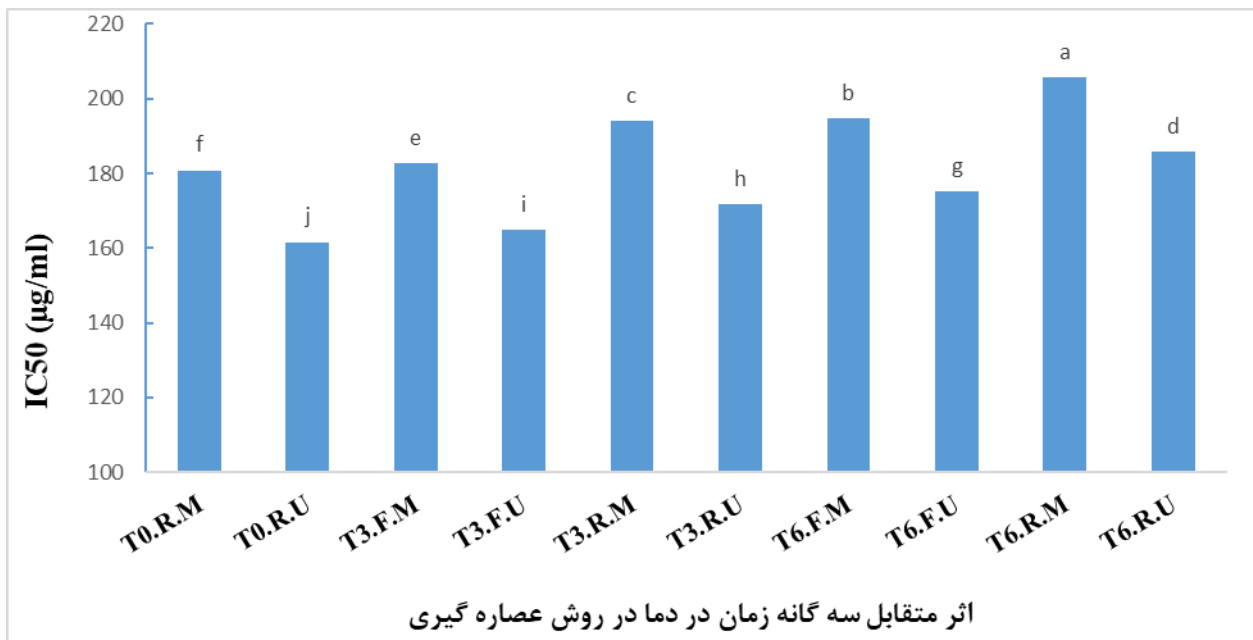
نتایج تجزیه واریانس  $IC_{50}$  آلفاآمیلاز نمونه‌های پوره با آکاربوز نشان داد که بین تیمارهای مختلف مورد بررسی از نظر آماری اختلاف معنی‌دار وجود دارد به‌طوری‌که این اختلاف در سطح یک درصد معنی‌دار شد ( $p < 0/01$ ). کلیه نمونه‌های پوره مقدار  $IC_{50}$  بیشتری نسبت به آکاربوز نشان دادند (شکل ۶).



شکل (۶) - مقایسه میانگین اثر نمونه‌های پوره و آکاربوز بر مقدار  $IC_{50}$  آنزیم آلفاآمیلاز  
 \*میانگین‌های دارای حروف متفاوت دارای تفاوت معنی‌دار در سطح یک درصد بر اساس آزمون دانکن هستند  
 (T: زمان (ماه)، R: نگهداری یخچالی، F: نگهداری در فریزر، M: عصاره‌گیری به روش ماسراسیون، U: عصاره‌گیری به روش اولتراسوند)

#### مهارکنندگی آنزیم آلفاگلوکوزیداز

مقدار  $IC_{50}$  آکاربوز برای آنزیم آلفاگلوکوزیداز برابر با  $0/51 \pm 144/40$  میکروگرم در میلی‌لیتر بود. این مقدار بیانگر مقدار غلظتی است که آکاربوز موجب مهار ۵۰ درصد از فعالیت آنزیم آلفاگلوکوزیداز می‌شود. در بررسی سطح  $IC_{50}$  آنزیم آلفاگلوکوزیداز نمونه‌ها، نتایج مشابه آنزیم آلفاآمیلاز مشاهده گردید. نتایج جدول تجزیه‌ی واریانس آنزیم آلفاگلوکوزیداز نشان داد که اثرات ساده زمان، دما و روش عصاره‌گیری در سطح یک درصد معنی‌دار شد ( $p < 0/01$ )، همچنین تمامی اثرات متقابل دوگانه و همچنین اثر متقابل سه‌گانه در سطح یک درصد معنی‌دار شد ( $p < 0/01$ ). مقایسه میانگین اثر متقابل سه‌گانه زمان در دما در روش عصاره‌گیری نشان داد که تیمار متقابل ۶ ماه زمان در یخچال به روش عصاره‌گیری ماسراسیون با میانگین  $205/6$  میکروگرم در میلی‌لیتر بیشترین مقدار  $IC_{50}$  را داشت. و تیمار متقابل زمان صفر در یخچال به روش اولتراسوند با میانگین  $161/6$  میکروگرم در میلی‌لیتر کمترین مقدار  $IC_{50}$  را داشت (شکل ۷).

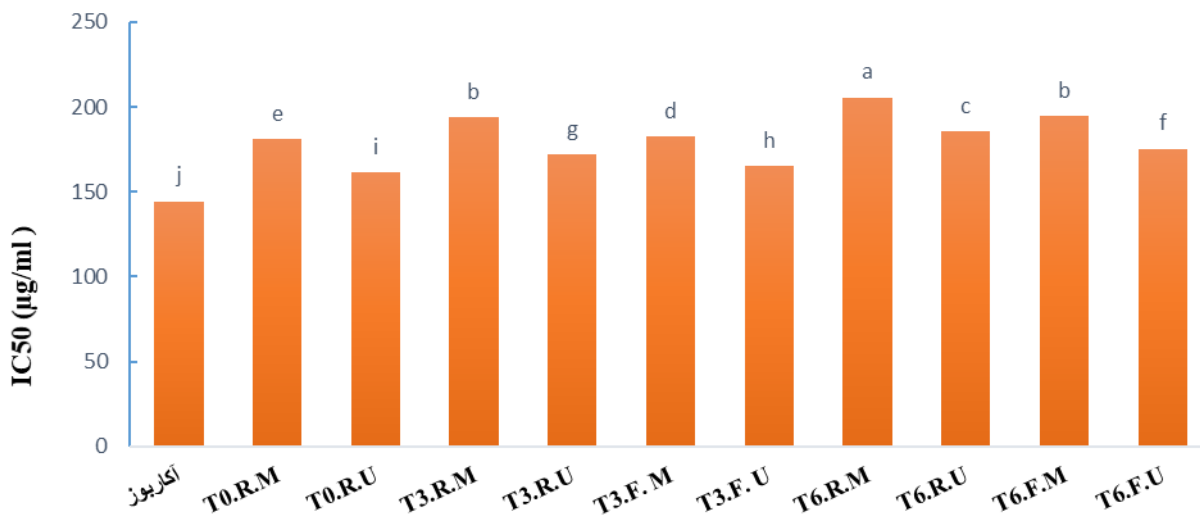


شکل (۷) - مقایسه میانگین اثر متقابل زمان، دما و روش عصاره گیری بر مقدار IC<sub>50</sub> آنزیم آلفاگلوکوزیداز

\* میانگین‌های دارای حروف متفاوت دارای تفاوت معنی‌دار در سطح یک درصد بر اساس آزمون دانکن هستند

(T: زمان (ماه)، R: نگهداری یخچالی، F: نگهداری در فریزر، M: عصاره‌گیری به روش ماسراسیون، U: عصاره‌گیری به روش اولتراسوند)

مقدار IC<sub>50</sub> برای آنزیم آلفاگلوکوزیداز در کلیه‌ی نمونه‌های عصاره‌ی ترشک شبدری به‌دست آمده، از آکاربوز بیشتر بود. نتایج تجزیه واریانس آنزیم آلفاگلوکوزیداز نشان داد که بین تیمارهای مختلف مورد بررسی و آکاربوز از نظر آماری اختلاف معنی‌دار وجود دارد به‌طوری‌که این اختلاف در سطح یک درصد معنی‌دار شد ( $p < 0.01$ ). بیشترین و کمترین مقدار IC<sub>50</sub> به ترتیب از تیمارهای ۶ ماه در یخچال به روش ماسراسیون با میانگین ۲۰۵/۶ میکروگرم در میلی‌لیتر و آکاربوز با میانگین ۱۴۴/۴ میکروگرم در میلی‌لیتر به‌دست آمد (شکل ۸).



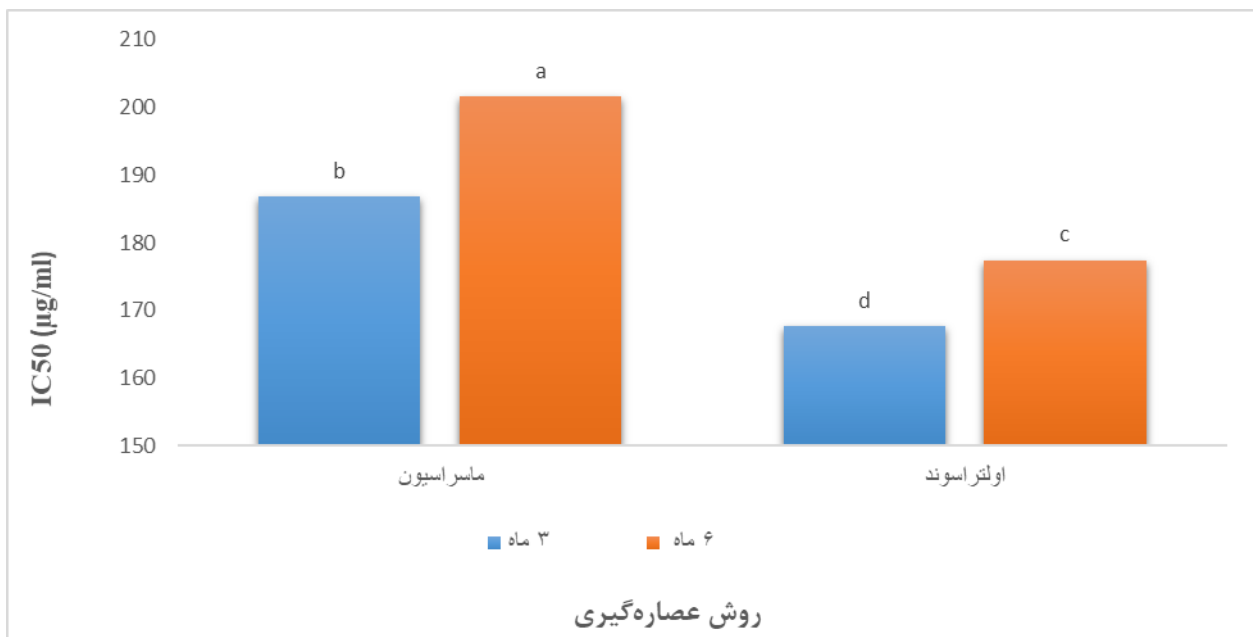
#### نمونه

شکل (۸) - مقایسه میانگین تیمارهای مختلف بر مقدار IC<sub>50</sub> آنزیم آلفاگلوکوزیداز

\* میانگین‌های دارای حروف متفاوت دارای تفاوت معنی‌دار در سطح یک درصد بر اساس آزمون دانکن هستند

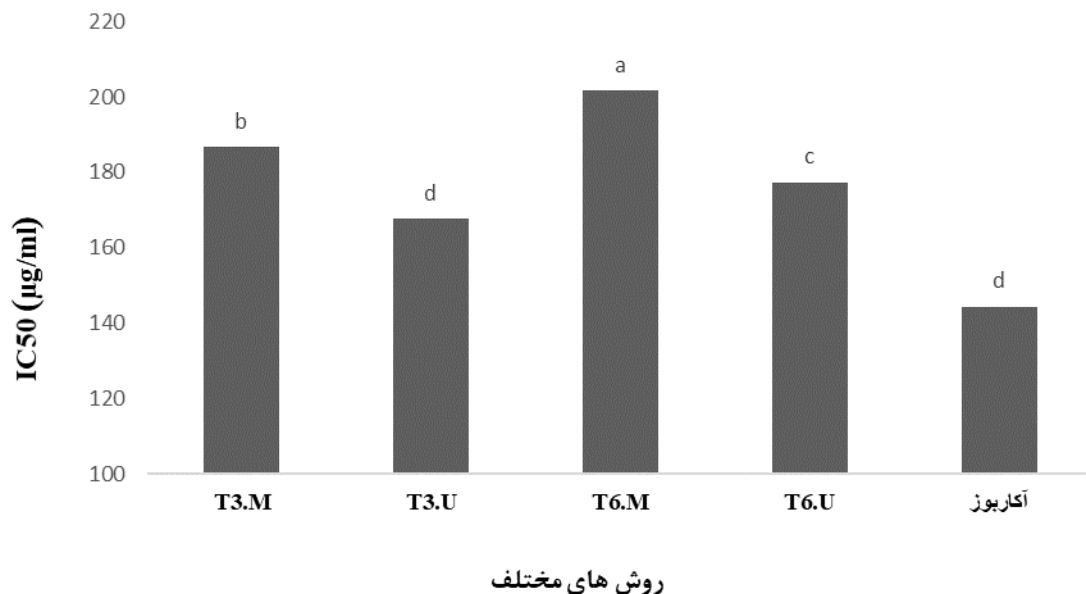
(T: زمان (ماه)، R: نگهداری یخچالی، F: نگهداری در فریزر، M: عصاره‌گیری به روش ماسراسیون، U: عصاره‌گیری به روش اولتراسوند)

نتایج جدول تجزیه‌ی واریانس میزان بازدارندگی از فعالیت آنزیم آلفاگلوکوزیداز نمونه‌های پوره شده نشان داد که علاوه بر اثرات ساده زمان و روش عصاره‌گیری، همچنین اثر متقابل دوگانه زمان در روش عصاره‌گیری نیز در سطح یک درصد معنی‌دار شد ( $p < 0.01$ ). مقایسه میانگین اثر متقابل زمان در روش عصاره‌گیری نشان داد که بیشترین مقدار IC<sub>50</sub> در تیمار متقابل روش ماسراسیون عصاره‌گیری در زمان ۶ ماه با میانگین ۲۰۱/۶ میکروگرم در میلی‌لیتر مشاهده شد و کمترین مقدار نیز مربوط به تیمار متقابل روش اولتراسوند در زمان ۳ ماه با میانگین ۱۶۷/۷ میکروگرم در میلی‌لیتر بود (شکل ۹).



شکل (۹) - مقایسه میانگین اثر متقابل زمان و روش عصاره‌گیری بر مقدار  $IC_{50}$  آنزیم آلفاگلوکوزیداز در نمونه‌های پوره \*میانگین‌های دارای حروف متفاوت دارای تفاوت معنی‌دار در سطح یک درصد بر اساس آزمون دانکن هستند

همچنین، نتایج تجزیه واریانس نشان داد که بین مقدار  $IC_{50}$  نمونه‌های پوره در مقایسه‌ی با آکاربوز از نظر آماری اختلاف معنی‌دار وجود دارد به‌طوری‌که این اختلاف در سطح یک درصد معنی‌دار شد. کلیه‌ی نمونه‌ها سطح  $IC_{50}$  بالاتری در مقایسه با آکاربوز نشان دادند (شکل ۱۰).



شکل (۱۰) - مقایسه میانگین اثر تیمارهای مختلف بر مقدار  $IC_{50}$  آنزیم آلفاگلوکوزیداز در نمونه‌های پوره \*میانگین‌های دارای حروف متفاوت دارای تفاوت معنی‌دار در سطح یک درصد بر اساس آزمون دانکن هستند  
 (T: زمان (ماه)، R: نگهداری یخچالی، F: نگهداری در فریزر، M: عصاره‌گیری به روش ماسراسیون، U: عصاره‌گیری به روش اولتراسوند)

### بررسی فعالیت ضد میکروبی عصاره به روش انتشار در آگار (چاهک)

با استفاده از روش انتشار در آگار، اثر ضدباکتریایی عصاره‌ی ترشک شبدری به روش چاهک پلیت بر باکتری‌های اشریشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس انجام شد و نتایج حاصل در جدول ۱ گزارش شده است. براساس نتایج مقایسه‌ی میانگین‌ها در روش چاهک، بیشترین میزان قطر هاله عدم رشد ( $20 \pm 0/00$  میلی‌متر) مربوط به باکتری استافیلوکوکوس اورئوس بود. اثر ضد میکروبی عصاره‌ی ترشک شبدری به روش چاهک نشان داد که افزایش غلظت عصاره نسبت مستقیم با افزایش قطر هاله‌ی عدم رشد در باکتری‌های مورد مطالعه دارد. در مورد هر دو باکتری مورد آزمایش، در غلظت‌های ۱۱ و ۲۳ درصدی عصاره‌ی آبی ترشک شبدری بر روی استافیلوکوکوس اورئوس و اشریشیاکلی هاله‌ی عدم رشد مشاهده گردید. همچنین طبق نتایج به دست آمده مقاومت باکتری اشریشیاکلی نسبت به استافیلوکوکوس اورئوس در برابر عصاره‌ی آبی ترشک شبدری بیشتر بود. نتایج بیانگر اثر بازدارندگی عصاره‌ی ترشک شبدری بر رشد باکتری‌های مورد مطالعه بود که به صورت هاله‌ی عدم رشد نمایان شد. کمترین غلظت عصاره، قطر هاله‌ای برابر با  $11 \pm 0/00$  میلی‌متر برای هر دو باکتری ایجاد نمود، اما بالاترین غلظت (۴۷ درصد) قطر هاله‌ای برابر  $16 \pm 0/02$  و  $20 \pm 0/01$  میلی‌متر به ترتیب برای اشریشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس ایجاد نمود.

جدول (۱) - خصوصیات ضدباکتریایی عصاره‌ی ترشک شبدری

باکتری	فعالیت ضدباکتریایی		حداقل غلظت مهارکنندگی (میلی‌گرم در لیتر)	حداقل غلظت کشندگی (میلی‌گرم در لیتر)
	قطر عدم هاله رشد (میلی‌متر)	حداقل غلظت کشندگی (میلی‌گرم در لیتر)		
اشریشیاکلی	$11 \pm 0/00$ aA	$16 \pm 0/02$ bB	۲۹/۵	۵۹
استافیلوکوکوس اورئوس	$11 \pm 0/00$ aA	$20 \pm 0/01$ bC	۱۴/۷	۲۹/۵

\*حروف غیرمتشابه کوچک در هر ردیف و حروف غیرمتشابه بزرگ در هر ستون نشان‌دهنده‌ی اختلاف معنی‌دار ( $p < 0/05$ ) هستند

### بررسی میزان MIC و MBC عصاره

در این مطالعه حداقل غلظت ممانعت از رشد عصاره‌ی ترشک شبدری در برابر اشریشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس مورد بررسی قرار گرفت. به‌طورکلی، MIC یا حداقل میزان بازدارندگی بیانگر کمترین مقدار از عصاره است که می‌تواند بیشترین مهارکنندگی از رشد یک میکروارگانیسم را پس از گذشت یک دوره انکوباسیون مشخص ایجاد نماید (Kowalska-Krochmal and Dudek-Wicher., 2021). از آنجا که نمونه‌ی اولتراسوند روز صفر بیشترین میزان بازدارندگی از فعالیت آنزیم‌های آلفا‌آمیلاز و آلفا‌گلوکوزیداز را نشان داد، در نتیجه حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی این نمونه در برابر باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس و اشریشیاکلی سنجیده شد. عصاره‌ی آبی ترشک شبدری دارای اثر مهارکنندگی و کشندگی بر هر دو باکتری استافیلوکوکوس اورئوس و

اشریشیاکلی است. طبق نتایج ارائه شده در جدول ۱ مقدار MIC و MBC برای استافیلوکوکوس اورئوس به ترتیب ۱۴/۷ و ۲۹/۵ قسمت در میلیون و برای اشریشیاکلی به ترتیب معادل ۲۹/۵ و ۵۹ قسمت در میلیون بود.

## بحث و نتیجه گیری

در این پژوهش میزان قدرت مهارکنندگی آنزیم‌های آلفاآمیلاز و آلفاگلوکوزیداز توسط گیاه ترشک شبدری تحت پارامترهای متفاوت از جمله روش عصاره‌گیری (اولتراسوند و ماسراسیون)، مدت زمان نگهداری (صفر، ۳ و ۶ ماه)، شکل نگهداری (عصاره و پوره) و دمای نگهداری (یخچال و فریزر) بررسی شد. نتایج کلی به‌دست آمده حاکی از آن است که بهترین IC<sub>50</sub> مربوط به تاثیر نمونه‌ی اولتراسوند روز صفر بر فعالیت آنزیم آلفاآمیلاز است. اگرچه تاثیر این نمونه نسبت به مابقی نمونه‌ها بهتر بود، اما اثر آن در مقایسه با آکاربوز ضعیف‌تر بود. نتایج مشابهی در رابطه با تاثیر عصاره‌های مورد استفاده در این مطالعه بر روی آنزیم آلفاگلوکوزیداز نیز به‌دست آمد. همانگونه که اشاره شد، زمان نگهداری اثر معنی‌داری بر مقدار IC<sub>50</sub> نمونه‌ها داشت. با گذشت زمان نگهداری، میزان قابلیت بازدارندگی از فعالیت آنزیم‌های آلفاآمیلاز و آلفاگلوکوزیداز نمونه‌ها کاهش یافت. از طرف دیگر، نگهداری در فریزر باعث حفظ بیشتر قابلیت بازدارندگی از فعالیت آنزیم توسط نمونه‌های ترشک شبدری گردید. به طور کلی با توجه به نتایج به‌دست آمده می‌توان اظهار داشت که فرآیند اولتراسوند تاثیر قابل توجهی بر روی میزان اثر بازدارندگی نمونه‌ها داشت، به‌گونه‌ای که نمونه‌های اولتراسوند شده نسبت به عصاره‌های به‌دست آمده به روش ماسراسیون میزان IC<sub>50</sub> پایین تری را نشان دادند. نتایج این پژوهش نشان داد که عصاره‌ی آبی اولتراسوند شده‌ی گیاه ترشک شبدری اثر مهارکنندگی قابل توجهی بر روی آنزیم‌های آلفاآمیلاز و آلفاگلوکوزیداز داشت. مطالعات پیشین اثر عصاره‌ی ترشک شبدری بر مهار آنزیم آلفاآمیلاز را اثبات کرده‌اند (Jyothi et al., 2014). محققان با تایید خاصیت ضددیابتی عصاره‌ی ترشک شبدری، اعلام کردند که عصاره‌ی آبی گیاه ترشک شبدری با مهار آنزیم آلفاآمیلاز قادر به ممانعت از افزایش قندخون تا دو ساعت پس از صرف غذا است (Angila and Kavitha, 2012). یافته‌های مطالعه‌ای دیگر نیز فعالیت ضد میکروبی عصاره‌ی آبی ترشک شبدری را به اثبات رسانده است (Sharangouda and Patil, 2007). مکانیسم عمل عصاره‌ی ترشک شبدری در مهار آنزیم‌های آلفاآمیلاز و آلفاگلوکوزیداز هنوز مشخص نیست. اما فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ی ترشک شبدری توسط مطالعات پیشین به اثبات رسیده است (Sreejith, 2014). یافته‌های مطالعه‌ای دیگر نیز مشخص نمود که ترکیبات دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی، قادر به مهار فعالیت آنزیم آلفاگلوکوزیداز از طریق مهار رادیکال‌های آزاد اکسیژن هستند (Zhang et al., 2015). پتانسیل ضددیابتی ترکیبات فنولیک مخصوصاً تانین‌ها و فلاونوئیدها نیز توسط مطالعات پیشین به اثبات رسیده است (Ali Asgar et al., 2010; Zhang et al., 2013). نتایج یک مطالعه نشان داد که گیاه ترشک شبدری دارای مقادیر قابل توجهی ویتامین C، فلاونوئیدها و ترکیبات فنولیک است (Sardoei., 2021). از طرفی، مطالعات متعددی خاصیت آنتی‌اکسیدانی و ضد دیابتی فلاونوئیدها و اسید فنولیک‌ها را به اثبات رسانیده‌اند (Hoang et al., 2020; Proenca et al., 2022). گروه‌های مختلفی از فلاونوئیدها قادر به مهار آنزیم‌های آلفاآمیلاز هستند زیرا این ترکیبات می‌توانند به صورت

غیرکروالانس به جایگاه‌های فعال باقیمانده آنزیم متصل شوند (Williams *et al.*, 2012). همچنین در متابولیسم کربوهیدرات‌ها، اسیدهای فنولیک بیشتر به دلیل توانایی‌شان در مهار فعالیت بیولوژیکی آنزیم‌های آلفا‌آمیلاز و آلفا‌گلوکوزیداز شناخته شده‌اند (Kashtoh and Baek., 2023).

در مطالعه‌ای که بر روی اثر مهارکنندگی عصاره بر روی فعالیت آنزیم انجام گرفت، مشخص گردید که متابولیت‌های ثانویه از جمله لیگنین‌ها، فلاوونوئیدها، تری‌ترپنوئیدها، تانین‌ها، استروئیدها، گلیکوزیدها، فنول‌ها، و ساپونین‌ها فنولیک‌اسیدها، و کومارین‌ها دارای پتانسیل مهارکنندگی از فعالیت آلفا‌آمیلاز و آلفا‌گلوکوزیداز هستند (Kifle *et al.*, 2021). نتایج یک بررسی نشان داد که حضور گروه‌های هیدروکسیلی در موقعیت‌های ارتو و پارای ترکیبات فنلی، آن‌ها را به گزینه‌ی مناسبی برای پاکسازی رادیکال‌های آزاد تبدیل می‌کند. در مطالعه‌ی مذکور با اشاره بر ریشه‌ی بروز ناهنجاری‌هایی مانند دیابت (ناشی از ایجاد استرس اکسیداتیو) به علت حمله مشتقات فعال اکسیژن به ماکرومولکول‌های حیاتی بدن (لیپیدها، کربوهیدرات‌ها، پروتئین‌ها، و DNA)، گزارش شده است که بین استرس اکسیداتیو و دیابت رابطه‌ی مستقیمی وجود دارد. در نتیجه با توجه به این اثر متقابل می‌توان اعلام نمود که عصاره‌های دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضددیابتی امکان دارد که دارای اثرات ضددیابتی و آنتی‌اکسیدانی، به ترتیب، نیز باشند (Pirian *et al.*, 2016).

یکی از راهبردها و روش‌های اتخاذ شده برای درمان دیابت، مهار آنزیم‌های هضم‌کننده کربوهیدرات‌ها مانند آلفا‌آمیلاز و آلفا‌گلوکوزیداز در جذب گلوکز گوارشی است که در نتیجه سطح گلوکز پس از غذا را کاهش می‌دهد. به‌طور کلی می‌توان گفت که عملکرد اصلی مهارکننده‌های آنزیم، ایجاد تاخیر در تجزیه کربوهیدرات‌ها در روده‌ی کوچک است. در نتیجه میزان گلوکز خون پس از صرف غذا را در فردی که از دیابت رنج می‌برد کاهش می‌دهد. عصاره‌های گیاهی دارای پتانسیل مهارکنندگی فعالیت آنزیم، دارای ترکیبات فعالی هستند که با سوبسترا برای اتصال به محل فعال آنزیم رقابت می‌کنند و در نتیجه از تجزیه لیگوساکاریدها به دی‌ساکاریدها جلوگیری می‌کنند (Kazeem *et al.*, 2013).

تاثیر اولتراسوند بر افزایش فعالیت آنزیم‌های آلفا‌آمیلاز و آلفا‌گلوکوزیداز را می‌توان در درجه اول به تاثیر اولتراسوند بر ترکیبات فعال نسبت داد. مطالعات پیشین به این اصل اشاره کرده‌اند که اولتراسوند در مقایسه با روش‌های حرارتی متداول، به حفظ بهتر ترکیبات زیست فعال مانند فلاوونوئیدها کمک می‌کند. در وهله بعد می‌توان به پدیده حفره‌زایی (کاویتاسیون) اشاره نمود. در اثر تابش اولتراسوند حباب‌هایی ناپایدار تشکیل می‌شوند که سبب ایجاد کاویتاسیون موقت می‌گردند. این حباب‌های ناپایدار فروپاشیده و اتم‌های هیدرون و رادیکال‌های هیدروکسیل را تولید می‌کنند، که می‌توانند فعالیت آنتی‌اکسیدانی را ایجاد کنند. این پدیده در دقایق ابتدایی فرآیند رخ می‌دهد. سپس، با گذشت زمان، اولتراسوند انتشار سریع‌تر ترکیبات موردنظر (فنول، فلاوونوئیدها و غیره) را تسهیل می‌کند و منجر به افزایش آن‌ها می‌شود. بنابراین، افزایش فلاوونوئیدها در نمونه‌های اولتراسوند شده را می‌توان عمدتاً به تخریب سلولی نسبت داد، زیرا غشاهای شکسته شده و آنزیم‌ها آزاد می‌شوند (Dzah *et al.*, 2022; Barani *et al.*, 2021).

از طرف دیگر، در اثر این پدیده هیدروژن مورد نیاز برای کاتالیز کردن هیدرولیز پیوند (۴-۱)  $\alpha$ -گلوکوزید توسط آنزیم آلفاگلوکوزیداز تامین می‌شود، ترکیبات فنولی با جدا کردن یون هیدروژن آزاد شده از جایگاه کاتالیزور آنزیم آلفاگلوکوزیداز باعث ممانعت از فعالیت آنزیم می‌شوند (Jalili Safaryan et al., 2022).

بنابراین تفاوت در مقدار پتانسیل مهارکنندگی آنزیم توسط نمونه‌های مختلف می‌تواند مربوط به تفاوت در مقدار ترکیبات فنولیک و فلاوونوئید آن‌ها باشد، که این تفاوت در ترکیبات فنلی نیز مربوط به تفاوت در روش استخراج و/یا نگهداری است (Nadeem et al., 2019). نتایج این مطالعه در راستای مطالعات پیشین بود. پژوهشگران پیشین در مطالعات ضددیابتی خود بر روی نمونه‌های مختلف عسل، فعالیت مهار آلفاگلوکوزیداز را ارزیابی کردند و دریافتند که همه‌ی نمونه‌ها دارای تاثیر متناسب با غلظت بودند. این رفتار به منشأ گیاهی عسل، به‌ویژه حضور فنول‌ها و فلاوونوئیدها نسبت داده شد (Ali et al., 2020). نتایج یک مطالعه‌ی دیگر نشان داد که ترکیبات فنلی می‌توانند اثرات بالقوه ضددیابتی داشته باشند، این مطالعه به‌طور خاص به تانن‌ها و فلاوونوئیدها اشاره کرد (Ali et al., 2013). برخی از اسیدهای فنلی، فلاوونوئیدها و رنگدانه‌های دیگر در تمشک توسط بررسی‌های انجام گرفته شناسایی، و اعلام شده که این ترکیبات فعالیت مهار قوی بر آنزیم‌ها دارند (Zhang et al., 2010). همچنین اولتراسوند به عنوان یک روش موثر برای تقویت ترکیبات زیست فعال مرتبط با مهار آنزیم آلفا گلوکوزیداز اثبات شده است. یک مطالعه تاثیر استخراج اولتراسونیک بر استخراج ترکیبات فعال از پوست میوه لانگان را ارزیابی کرد و اثرات مهار آلفا گلوکوزیداز را مورد بررسی قرار داد. نتایج این مطالعه مشخص نمود که میزان مهار آنزیم متناسب با مقدار عصاره است. آن‌ها همچنین ذکر کردند که این امر به دلیل آن است که فرآیند اولتراسوند به طور قابل توجهی استخراج را بهبود می‌بخشد؛ با افزایش این ترکیبات، قدرت مهارکنندگی نیز افزایش می‌یابد که به کاهش آزادسازی مونوساکاریدها پس از مصرف منجر می‌شود (Li et al., 2016).

برخی از مطالعات پیشین اثر مثبت فریز کردن بر خصوصیات عملکردی و کیفیت غذاهای گیاهی را اثبات کرده‌اند. از آنجا که فریز کردن باعث رهایش ترکیبات فعال زیستی مانند اسیدهای فنولیک و آنتوسیانین‌ها می‌شود، در نتیجه میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی افزایش می‌یابد (Neri et al., 2020). کاهش قدرت مهارکنندگی از فعالیت آنزیم در نمونه‌های ترشک شبدری پوره شده را می‌توان به اکسیداسیون نسبت داد. عمل پوره کردن باعث کاهش فعالیت آنتی‌اکسیدانی ناشی از افزایش سطح اکسیداسیون می‌شود. با توجه به رابطه‌ی مستقیم بین فعالیت آنتی‌اکسیدانی و میزان مهارکنندگی از فعالیت آنزیم، در نتیجه کاهش سطح  $IC_{50}$  در نمونه‌های پوره شده دور از انتظار نبود (Barmaverain et al., 2022).

نتایج بدست آمده حاصل از آزمون ضد میکروبی در این پژوهش، در راستای مطالعات پیشین بود. نتایج یک مطالعه نشان داد که عصاره‌ی متانولی ترشک در مقایسه با استرپتومایسین استاندارد فعالیت ضدباکتریایی نسبتاً قابل قبولی دارد، که به علت حضور ترکیبات فنولیک در این گیاه است (Raghavendra et al., 2006). نتایج مطالعه‌ای مشابه در این راستا، قطر هاله برابر ۲۱ و ۱۹/۳۳ میلی‌متر برای غلظت ۲۰ درصدی از عصاره‌ی ترشک شبدری را گزارش کردند (Hosseini et al., 2009). با توجه به نتایج به دست آمده از آزمون حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل



غلظت بازدارندگی، می‌توان اذعان داشت که حداقل غلظت بازدارندگی عصاره آبی ترشک شبدری در باکتری‌های گرم منفی بیشتر از باکتری‌های گرم مثبت است. دلیل این امر را می‌توان به وجود لایه لیپوپروتئین-لیپوپلی ساکاریدی موجود در پپتیدوگلیکان دیواره‌ی سلولی باکتری‌های گرم منفی نسبت داد، که باعث افزایش مقاومت باکتری‌های گرم منفی در برابر ترکیبات ضدباکتریایی موجود در عصاره‌های گیاهی می‌شود (Burt, 2004).

با یک دید کلی به نتایج حاصل از مطالعه‌ی پیش رو می‌توان گزارش نمود که روش اولتراسوند نسبت به روش ماسراسیون در استخراج ترکیبات عملکردی بسیار کاربردی‌تر و موثرتر است. عصاره‌های به‌دست آمده از گیاه ترشک شبدری تازه، قابلیت بالاتری در مهار فعالیت آنزیم‌های آلفاآمیلاز و آلفاگلوکوزیداز را دارد. به عبارتی می‌توان ذکر نمود که نگهداری در یخچال یا فریزر باعث کاهش قدرت مهارکنندگی از فعالیت آنزیم توسط عصاره می‌شود. نگهداری گیاه ترشک شبدری به صورت عصاره در قیاس با شکل پوره شده، باعث حفظ بیشتر ترکیبات موثر در مهار فعالیت آنزیم می‌گردد. عصاره‌ی آبی ترشک شبدری که دارای اثر ضد میکروبی قابل توجهی است اثر ضد میکروبی بالاتری بر باکتری‌های گرم مثبت نسبت به باکتری‌های گرم منفی نشان داد. پیشنهاد می‌شود که با مطالعات بیشتر بر روی ترکیبات اصلی و موثر این گیاه از ترکیبات ضد دیابتی و ضد میکروبی این گیاه در درمان دیابت و/یا عفونت با باکتری‌ها استفاده شود. از طرفی با توجه به تاثیر مثبت عصاره‌ی آبی ترشک شبدری بر روی مهار فعالیت آنزیم‌های موثر در افزایش قندخون، می‌توان از عصاره‌ی این گیاه در فرمولاسیون مواد غذایی مختلف جهت تولید محصولات فراسومند برای بیماران دیابتی بهره برد.

## تضاد منافع

نویسندگان هیچگونه تعارض منافی ندارند.

- Abu-Odeh, A.M. and Talib, W.H. (2021). Middle east medicinal plants in the treatment of diabetes: A review. *Molecules*, 26(3), 742-751.
- Ali Asgar, M.D. (2013). The anti-diabetic potential of phenolic compounds: A review. *International Journal of Food Properties*, 16 (1), 91-103.
- Ali, H., Abu Bakar, M.F., Majid, M., Muhammad, N. and Lim, S.Y. (2021). In vitro anti-diabetic activity of stingless bee honey from different botanical origins. *Food Research*, 4(11), 1421-1426.
- Aliasgar, M.D. (2013). The anti-diabetic potential of phenolic compounds: A review. *International Journal of Food Properties*, 16(1), 91-103.
- Angila, K.N. and Kavitha, N. (2012). Antidiabetic antihyperlipidemic and antioxidant activity of *Oxalis corniculata* in alloxan induced diabetic mice. *Journal of natural sciences research*, 2(7), 9-13
- Barani, Y.H., Zhang, M. and Wang, B. (2021). Effect of thermal and ultrasonic pretreatment on enzyme inactivation, color, phenolics, and flavonoids contents of infrared freeze-dried rose flower. *Journal of Food Measurement and Characterisation*, 15(6), 995-1004.
- Barmaverain, D., Hasler, S., Kalbermatten, C., Plath, M. and Kalbermatten, R. (2022). Oxidation during fresh plant processing: A race against time. *Processes*, 10(7), 1335-1342.
- Burt, S.S. (2004). Essential oil: their antibacterial properties and potential application in food-a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94(3), 223-253.
- Das, P. and Himaja, M. (2015). Antioxidant, anti-arthritic, and hypoglycemic activity of *oxalis corniculata* linn. Leaf extracts. *International Journal of PharmTech Research*, 8(7), 51-57.
- Durazzo, A., Lucarini, M. and Santini, A. (2021). Plants and Diabetes: Description, role, comprehension, and exploitation. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(8), 3938-3943.
- Dzah, C.S., Duan, Y., Zhang, H., Wen, C., Zhang, J., Chen, G. and Ma, H. (2020). The effect of ultrasound-assisted extraction on yield, antioxidant, anticancer and antimicrobial activity of polyphenol extracts: A review. *Food Bioscience*, 35 (12), 100547.
- Falah Hosseini, H., Asgari, B., Asgarpanah, ZH., Babaizarch, A. and Eghbalizarch, T. (2013). Investigating the effect of polar and non-polar extracts of *Aloe vera* L. on the activity of alpha-amylase and alpha-glucosidase enzymes in vitro. *Journal of Medicinal Plants*, 48 (12), 160-169. [In Persian]
- Farahmandfar, R. and Kordjazi, A. (2018). Antimicrobial effect of *Cardin* (*Biarum bovei*) extract against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*: Studies in vitro and hamburger. *Journal of Food Science and Technology*, 86 (16), 1-12. [In Persian]
- Handali, S., Hosseini, H., Ameri, A. and Moghimipour, E. (2011). Formulation and evaluation of an antibacterial cream from *Oxalis corniculata* aqueous extract. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 4(4), 255-260.
- Hoang, A.L., Xuan, T.D., Dieu Thuy, N.T., Van Quan, N. and Trang, L.T. (2020). Antioxidant and  $\alpha$ -amylase inhibitory activities and phytochemicals of *Clausena indica* fruits. *Medicines*, 7(10), 156-161.
- Hosseini, H., Hendali, S., Parishani, MR., Ghezelbash, GR. and Ameri, A. (2009). Investigating the antibacterial effects of the aqueous extract of *Oxalis conriculata* and comparing its effect with common antibiotics in the treatment of infections caused by *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Journal of Medicinal Plants*. 33 (9), 1-7. [In Persian]
- Jalili Safaryan, M., Ahmadi Gavlighi, H., Barzegar, M., Tabarsa, M. and Udenigwe, Ch. (2022). Evaluation of inhibitory effect of alpha-amylase and alpha-glucosidase by interaction phenolic compounds, soluble fiber, and protein extracted from green lentils. *Iranian Journal of Food Science and Technology*. 19(1), 35-45. [In Persian]

- Jyothi, K.S.N., Hemalatha, P. and Challa, S. (2011). Evaluation of  $\alpha$ -amylase inhibitory potential of three medicinally important traditional wild food plants of India. *International Journal of Green Pharmacy*, 5 (2), 95-99.
- Jyothi, K.S.N., Shailaja, M., Viveni, J. and Suresh, C. (2014). Identification of a proteinaceous  $\alpha$ -amylase inhibitor from a medicinal herb *Oxalis corniculata* L. (Oxalidaceae). *Journal of Homeopathy and Ayurvedic Medicine*, 3 (4), 165-171.
- Kashtoh, H. and Baek, K.H. (2023). New insights into the latest advancement in  $\alpha$ -amylase inhibitors of plant origin with anti-diabetic effects. *Plants*, 12(3), 2944-2967.
- Kazeem, M.I., Adamson, J.O. and Ogunwande, I.A. (2013). Modes of inhibition of  $\alpha$ -Amylase and  $\alpha$ -Glucosidase by aqueous extract of morinda lucida Benth leaf. *BioMed Research International*, 527570. 136(10), 137-143.
- Kifle, D.Z., Debeb, G.S. and Belayneh, M.Y. (2021). In Vitro  $\alpha$ -Amylase and  $\alpha$ -Glucosidase inhibitory and antioxidant activity of the crude extract and solvent fractions of Hagenia abyssinica leaves. *Biochemistry Research International*, 6652777. 11(1), 241-312.
- Kooti, W., Farokhipour, M., Asadzadeh, Z., Ashtary-Larky, D. and Asadi-Samani, M. (2016). The role of medicinal plants in the treatment of diabetes: a systematic review. *Electronic Physician*, 8(1), 1832-1842.
- Li, P.H., Lin, Y.W., Lu, W.C., Hu, J.M. and Haung, D.W. (2016). In vitro hypoglycemic activity of the phenolic compounds in longan fruit (*Dimocarpus Longan* var. Fen ke) shell against  $\alpha$ -glucosidase and  $\beta$ -glucosidase. *International Journal of Food Properties*, 19(5), 1786-1797.
- Nadeem, M., Mumtaz, M.W. and Danish, M. (2019). Ultrasonication-assisted extraction, antioxidant activity, and  $\alpha$ -amylase inhibition potential of *vitexnegundo* leaves. *Biology (Pakistan)*, 65 (2), 131-138.
- Neri, L., Faieta, M., Di- Mattia, C., Sacchetti, G., Mastrocola, D. and Pittia, P. (2020). Antioxidant activity in frozen plant foods: effect of cryoprotectants, freezing process, and frozen storage. *Foods*, 9(12), 1886-1872.
- Pelaez-Acero, A., Garrido-Islas, D.B., Campos-Montiel, F.G., Gonzalez-Montiel, L., Medina-Perez, G., Luna-Rodriguez, L., Gonzalez-Lemus, U. and Cenobio-Galindo, A.J. (2022). The application of ultrasound in honey: antioxidant activity, inhibitory effect on  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase, and in vitro digestibility assessment. *Molecules*, 27 (22), 5825.
- Pirian, K., Moin, S., Sohrabipour, J., Rabiee, R. and Piri, K. (2016). Evaluation of antioxidant and  $\alpha$ -amylase inhibitory activity of two species *Sargassum angostifolium* and *Palisada perforate*. *Journal of Cell and Molecular Research*, 31(2), 171-158 [In Persian].
- Proenca, C., Riberiro, D., Freitas, M. and Fernandes, E. (2022). Flavonoids as potential agents in the management of type 2 diabetes through the modulation of  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase activity: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 62(2), 3137-3207.
- Raghavendra, MP., Satish, S. and Raveesha, KA. (2006). Phytochemical analysis and antibacterial activity of *Oxalis corniculata*; a known medicinal plant. *Myscience*, 1 (1), 72-78.
- Salehi Sardoei, A. (2021). Introduction of *Oxalis conriculata*: Botany and Phytochemistry. *Journal of Plant and Biotechnology*, 15(4), 61-72. [In Persian]
- Shahabi, N., Tajik, H., Moradi, M. and Forough, M. (2016). Antibacterial properties of *Zataria multiflora* Boiss. Essential oil nanoemulsion formed by emulsion phase inversion. *Journal of Food Microbiology*, 3(3), 45-56. [In Persian]
- Sharangouda, K. and Patil, A.B. (2007). Anti-implantation and abortifacient activities of *oxalis corniculata* in albino rats. *Nigerian Journal of Natural Products and Medicine*, 11(2), 456-462.
- Sreejith, G. (2014). Hepatoprotective activity of *Oxalis corniculata* L. Phtanolic extract against paracetamol induced hepatotoxicity in Wistar rats and its in vitro antioxidant effects. *Journal of Natural Sciences Research*, 4 (3), 104-111.

- Srikanth, M., Swetha, T. and Veeresh, B. (2012). Phytochemical and pharmacology of *Oxalis corniculata* Linn: a review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 3(11), 4077-4083.
- William, L.K., Li, C., Withers, S.G. and Brayer, G.D. (2012). Order and disorder: differential structural impacts myricetin and ethyl caffeate on human amylase, an antidiabetic target. *Journal of Medicine and Chemistry*, 55(13), 10177-10186.
- Zhang, B., Deng, Z., Ramdath, D., Tang, Y., Chen, P. and Liu, P. (2015). Phenolic profiles of 20 Canadian lentil cultivar and their contribution to antioxidant activity and inhibitory effects on  $\alpha$ -glucosidase and pancreatic lipase. *Food Chemistry*, 172(1), 862-872.
- Zhang, L., Li, J., Hogan, S., Chung, H., Welbaum, G.E. and Zhou, k. (2010). Inhibitory effect of raspberries on starch digestive enzyme and their antioxidant properties and phenolic composition. *Food Chemistry*, 119(8), 592-599.
- Zhang, L., Li, J., Hogan, S., Chung, H., Welbaum, GE. and Zhou, K. (2010). Inhibitory effect of raspberries on starch digestive enzyme and their antioxidant properties and phenolic composition. *Food Chemistry*, 119(2), 592-599.

# Evaluation of the effect of extraction and storage conditions on the antimicrobial properties and inhibition of alpha-amylase and alpha-glucosidase enzymes by oxalis aqueous extract

## Antimicrobial activity and inhibition of enzyme activity by oxalis extract

Sharifi Soltani, M.<sup>1,2</sup>, Mirsaeedghazi, H.<sup>3\*</sup>, Soltani, M.<sup>2,4</sup>, Karim, G.<sup>5</sup>

1- PhD student, Department of Food Science and Technology, Faculty of Pharmacy, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran

2- Nutrition and Food Sciences Research Center, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran

3- Associated Professor, Department of Food Technology, College of Aburaihan, University of Tehran, Tehran, Iran

4- Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Pharmacy, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran

5- Professor, Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

## Abstract

The rise in chronic diseases like diabetes, along with increasing bacterial resistance to antibiotics, highlights the need to explore new sources of antimicrobial and antidiabetic compounds. This study prepared an aqueous extract of *Oxalis corniculata* using ultrasound and maceration methods. The extract was stored as both a puree and a liquid under refrigerated and frozen conditions. We evaluated the extract's ability to inhibit the enzymes alpha-amylase and alpha-glucosidase, as well as its antimicrobial effects on *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, using the microdilution broth and well diffusion methods. The ultrasound extract showed the highest enzyme inhibition on day 0. Storage time had a significant impact on the IC<sub>50</sub> values, with enzyme inhibition decreasing as storage time increased. The results suggest that the extract's enzyme inhibitory power is linked to the presence of antioxidants in the plant. The extract also showed antimicrobial activity against gram-positive and gram-negative bacteria, with the largest inhibition zone (20 mm) found against *Staphylococcus aureus*. Overall, this study demonstrates the potential of freshly extracted *Oxalis corniculata* using ultrasound to inhibit bacterial growth and suppress alpha-amylase and alpha-glucosidase activity.

**Conflict of interest:** None declared

**Keywords:** Alpha-amylase, Alpha-glucosidase, MBC, MIC, *Oxalis corniculata*