ORIGINAL ARTICLE

Cytotoxic and Antibacterial Activities of Fermented and Non-fermented Extracts of Garlic

Reyhaneh Ravanbakhshian[1],
Mandana Behbahani[2]

[1] MSc in Microbial Biotechnology, Faculty of Advanced Sciences and Technologies, University of Isfahan, Isfahan, Iran
[2] Associate Professor, Department of Biotechnology, Faculty of Advanced Sciences and Technologies, University of Isfahan, Isfahan, Iran

(Received February 1, 2017 Accepted August 14, 2017)

Abstract

Background and purpose: *Allium sativum* belongs to the *Liliaceae* family and is widely used in folk medicine. Antibacterial, anticancer and antioxidant activity of this genus have been previously reported. Current study, aimed at investigating the cytotoxic and antibacterial activity of fermented and non-fermented extracts of *A. sativum* on breath cancer cells (MCF7), lymphocyte cells, and some pathogenic bacteria.

Materials and methods: MCF-7 and lymphocyte cells were maintained in DMEM and RPMI medium supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (FBS), respectively. Cytotoxic effect of the methanol extracts of fermented and non-fermented garlics was measured on MCF7 at different concentrations (6.25, 12.5, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 300, 350, 400, 450, 500 µg/ml) using MTT assay. The antibacterial properties of these extracts were also investigated against *Staphylococcus saprophyticus*, *Proteus mirabilis*, and *Escherichia coli* by disk diffusion.

Results: The garlic fermented by *Lactobacillus plantarum*, strain1745, showed the highest cytotoxic activity (CC_{50} 400µg/ml) compared to strain 1058 (CC_{50} 450µg/ml) and natural flora (CC_{50} >500µg/ml). We observed a significant relationship between the flavonoid contents of garlic and cytotoxic activity (P value < 0.05). Among these extracts, fermented garlic had the highest levels of flavonoid, cytotoxic, and antibacterial activity.

Conclusion: This study showed that lacto fermented garlic extract might be a good candidate against breast cancer cells and pathogenic bacteria.

Keywords: garlic, cytotoxic, antibacterial, fermentation

J Mazandaran Univ Med Sci 2018; 27 (156): 38 - 49 (Persian).

پژوهشی

مجلـــه دانـشـــگاه عـلـــوم پـــزشـکـــی مـــازنـــدران
دوره بیست و هفتم شماره ۱۵۶ دی سال ۱۳۹۶ (۴۹-۳۸)

بررسی سمیت سلولی و ضدباکتریایی عصاره متانولی سیر تخمیری و غیر تخمیری

ریحانه روان بخشیان[1]
ماندانا بهبهانی[2]

چکیده

سابقه و هدف: Allium *Allium sativum* از خانواده *Alliaceae*، در طب سنتی دارای کاربردهای زیادی است. اثرات ضدباکتریایی، ضد سرطانی و آنتی‌اکسیدانی این جنس، قبلاً گزارش شده است. در مطالعه حاضر فعالیت سمیت سلولی و ضدباکتریایی عصاره تخمیری و غیر تخمیری سیر بر رده سلول سرطان سینه انسانی MCF7، سلول‌های لنفوسیت و برخی باکتری‌های پاتوژن بررسی شد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، رده سلول سرطان سینه MCF7 و سلول‌های لنفوسیت به ترتیب در محیط کشت DMEM و RPMI حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی کشت داده شدند. اثر سمیت سلولی عصاره متانولی سیر تخمیر شده و تخمیر نشده بر روی این سلول‌ها در غلظت‌های مختلف ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۷۵، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ۳۵۰، ۴۰۰، ۴۵۰ و ۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر به روش MTT اندازه‌گیری شد. هم‌چنین قابلیت ضد باکتریایی عصاره‌ها علیه پروتئوس میرابلیس، اشرشیاکلی و استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس با استفاده از روش دیسک‌گذاری مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: عصاره تخمیری سیر به وسیله لاکتوباسیلوس پلانتروم سویه ۱۷۴۵ (CC_{50}۴۰۰ µg/ml) نسبت به سویه ۱۰۵۸ (CC_{50}۴۵۰ µg/ml) و فلور طبیعی(CC_{50}>۵۰۰ µg/ml) دارای بیش‌ترین اثر سمیت سلولی است. در مطالعه حاضر، ارتباط معنی‌داری بین محتوای فلاونوئیدی سیر و سمیت سلولی آن نشان داده شد (P value <۰/۰۵). در میان عصاره‌ها، سیر تخمیری بالاترین سطح فلاونوئید و سمیت سلولی یا میکروبی را نشان داد.

استنتاج: نتایج نشان داد که عصاره تخمیری سیر، کاندید مناسبی علیه سلول‌های سرطانی سینه و باکتری‌های پاتوژن می‌باشد.

واژه های کلیدی: سیر، سمیت سلولی، ضدباکتریایی، تخمیر

مقدمه

سرطان سینه یکی از شایع‌ترین نوع سرطان در زنان محسوب می‌شود(۱). مقاومت سلول‌های سرطانی نسبت به دارو از بزرگ‌ترین محدودیت‌های درمان سرطان سینه می‌باشد(۲). افزایش عفونت‌های میکروبی و مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی از مشکلات دیگر جوامع بشری به خصوص کشورهای در حال توسعه می‌باشد(۳). ترکیبات گیاهی به علت منشا طبیعی، اثرات جانبی کم‌تر نسبت به داروهای شیمیایی و ارزان و در دسترس بودن، جایگاه ویژه‌ای در حفظ سلامت جوامع مختلف دارد(۴). سیر با نام علمی *Allium sativum* از خانواده *Alliaceae*، به طور گسترده به عنوان یک ادویه ارزشمند و درمان محبوب برای بیماری‌های مختلف به

مولف مسئول: ماندانا بهبهانی– اصفهان، خیابان هزارجریب، دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم و فناوری های نوین Email: ma_behbahani@yahoo.com
۱. کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی میکروبی، دانشکده علوم و فن آوری های نوین، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران
۲. دانشیار، گروه بیوتکنولوژی میکروبی، دانشکده علوم و فن آوری های نوین، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران
تاریخ دریافت : ۱۳۹۵/۱۱/۱۳ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۳۹۶/۳/۵ تاریخ تصویب : ۱۳۹۶/۵/۲۳

رسمیت شناخته شده است(۵). سیر اثر مفیدی را در کاهش کلسترول پلاسما، فشار خون و لخته شدن پلاکت از خود نشان داده است. منشا آن آسیای مرکزی می‌باشد و کشت و مصرف آن در ایران به ۱۰۰۰ سال قبل تخمین زده می‌شود(۶). سیر با اثرات درمانی از قبیل کاهش ناراحتی قلبی عروقی، پیشگیری از سرطان، اثرات ضددیابت و فعالیت ضدمیکروبی مورد توجه می‌باشد(۷). سیر دارای ترکیبات مختلفی از جمله ترکیبات آلی گوگردی مانند آلیسین، آلین و ترکیبات فلاونوئیدی می‌باشد. قسمت عمده‌ای از اثر درمانی سیر به ترکیبات آنتی‌اکسیدانی آن در مطالعات مختلف و احتمال ارتباط آن با ترکیبات فلاونوئیدی می‌باشد(۸). از ویژگی‌های مهم فلاونوئیدهای موجود در غذا، فعالیت ضدمیکروبی و ضدسرطانی می‌باشد. فعالیت ضد سرطانی فلاونوئیدها در مدل‌های حیوانی و رده‌های مختلف سلول‌های سرطانی انسان از جمله سرطان پروستات تایید شده است(۹،۱۰).

گزارشات نشان داده است که در طی تخمیر سبزیجات، سطح فلاونوئیدها افزایش پیدا می‌کند(۱۱). تخمیر برای هزاران سال در بسیاری از فرهنگ‌ها شناخته شده بود. از این روش برای نگهداری، افزایش طول عمر غذا و افزایش کیفیت غذا استفاده می‌کردند(۱۲). غذاهای تخمیری در بسیاری از کشورها به خصوص کشورهای آسیایی، متداول می‌باشد. به دلیل ارزان بودن فرآیند تخمیر، قابل قبول بودن آن و ارزش غذایی بالا، در رژیم غذایی مردم قرار گرفته است(۱۳). تخمیر بر اساس فعالیت زیستی میکروارگانیسم‌ها که تولید متابولیت می‌کنند، انجام می‌شود(۱۴). مخمرها و باکتری‌هایی چون باکتری‌های اسیدلاکتیک و اسید استیک نقش مهمی در فرآیند تخمیر ایفا می‌کنند. میکروارگانیسم‌های غالب برای انجام تخمیر سبزیجات، باکتری‌های لاکتوباسیلوس (LAB) می‌باشند. باکتری‌های اسید لاکتیک توانایی تخمیر مواد غذایی و تولید اسیدهای ارگانیک و آروماتیک را دارند. در ضمن تخمیر، باعث حذف نیترات یا نیتریت از مواد غذایی می‌گردند(۱۷-۱۵). میکروارگانیسم‌های مسئول تخمیر سبزیجات، *Lactobacillus plantarum*، *L.bararircus* ، *L.brevis* ، *L.bifidus* و*L.xylosus* می‌باشند(۱۸). لاکتوباسیلوس پلانتروم، مشابه همه پروبیوتیک‌ها، جزئی از باکتری‌های سودمند برای بهبود سلامتی انسان به شمار می‌رود. این باکتری قادر به تخمیر طیف وسیعی از منابع کربن است. هم‌چنین این باکتری، پپتیدهای ضدمیکروبی و اگزوپلی‌ساکارید تولید می‌کند. این باکتری از جنس لاکتوباسیلوس و در گروه باکتری‌های اسیدلاکتیک قرار می‌گیرد و به اسید و نمک‌های صفراوی مقاوم می‌باشد(۱۹).

در این تحقیق، اثر سمیت سلولی و ضد باکتریایی سیردر حالت‌های تخمیری به وسیله دو سویه لاکتوباسلوس پلانتروم ۱۰۵۸، ۱۷۴۵ و به وسیله میکروارگانیسم‌های طبیعی مربوط به سیر و در حالت غیر تخمیری در شرایط in vitroبررسی شد. سیر به صورت خام و ترشی در ایران مصرف می‌شود، ولی مصرف آن به صورت تخمیر شده بسیار کم می‌باشد، لذا اهمیت بررسی بر روی سیر تخمیری مشخص می‌باشد.

مواد و روش ها

آماده‌سازی نمونه گیاهی

نمونه گیاهی سیر از مزارع همدان در اواخر شهریور ۱۳۹۴ جمع‌آوری شد.

جهت تهیه نمونه خشک، نمونه‌ها پوست گرفته شده با آب مقطر شسته شد، قطعه قطعه شد و در دمای اتاق خشک، سپس توسط آسیاب پودر شدند.

جهت آماده کردن عصاره متانولی سیر قبل از تخمیر، ۵۰ گرم از پودر سیر حاصل در ۱۵۰ میلی لیتر متانول ۹۶ درصد غوطه ور شدند و به مدت ۷۲ ساعت بر روی شیکر با دور (rpm) ۱۶۰ قرار داده شدند. پس از مدت مذکور، عصاره حاصل به وسیله کاغذ صافی، صاف شده و جهت تغلیظ به روتاری با دمای ۴۵ درجه

سانتی‌گراد منتقل شد. سپس به وسیله فریز درایر خشک گردیدند. در آخر عصاره خشک شده به ظروف فالکون استریل منتقل و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. به منظور تهیه غلظت‌های مختلف از عصاره‌های حاصل، میزان ۰/۰۱ گرم از عصاره‌ها در ۱۰۰۰ میکرولیتر (۵۰ درصد) DMSO حل و پس از سترون سازی با عبور از فیلترهای ۰/۲ میکرونی به وسیله بافر فسفات استریل (PBS) به غلظت‌های ۲۵/ ۶، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۷۵، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ۳۵۰، ۴۰۰، ۴۵۰ و ۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر رقیق شدند. عصاره‌های رقیق شده را جهت نگهداری و استفاده، در میکروتیوب‌های استریل ریخته و تا زمان استفاده در یخچال قرار داده شد.

سویه‌های لاکتوباسیلوس پلانتروم مورد مطالعه

در این بررسی، لاکتوباسیلوس پلانتروم سویه ۱۰۵۸ PTCCو سویه ۱۷۴۵ PTCC از مرکز پژوهش علم و صنعت ایران در تهران در مهرماه ۹۴ تهیه گردید.

این سویه‌ها در محیط MRS مایع در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت در شرایط استریل قرار داده شد که به عنوان کشت استارتر در تخمیر از آن استفاده شود.

تهیه سیر تخمیر شده

سیر پوست گرفته شده، شسته، به قطعات ۰/۵ × ۰/۵ سانتی متر برش داده و سپس در ظرف‌های شیشه‌ای قرار داده شدند. تمامی ظروف با ۱۰ سی سی محلول NaCl ۰/۵ درصد پر شدند و به هر کدام، به طور جداگانه ۱ سی سی از سویه‌های ۱۷۴۵ و ۱۰۵۸(10^8 CFU/ml) اضافه شدند(۲۰). سپس ظروف در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۳ روز قرار داده شدند. پس از سه روز، سیر تخمیر شده از ظروف خارج شده و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد خشک شدند. با استفاده از متانول ۹۶ درصد، عصاره‌گیری و غلظت‌های مورد نظر از این عصاره‌ها تهیه گردید. سپس عصاره‌های رقیق شده را جهت نگهداری و استفاده در میکروتیوب‌های استریل ریخته و تا زمان استفاده در یخچال نگهداری گردید. برای تهیه سیر تخمیر شده با فلور طبیعی، از NaCl ۰/۵ درصد بدون کشت استارتر استفاده شد.

کشت و نگهداری رده سلول سرطانی MCF7 و نرمال لنفوسیت

رده سلول سرطانی MCF7 و سلول نرمال لنفوسیت از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه و به ترتیب در محیط کشت DMEM و RPMI حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی(FCS) ، محلول پنی سیلین (۱۰۰U/ml)، استرپتومایسین (۱۰۰ g/ml) و ۲ mM L – گلوتامین کشت داده شدند. سپس در انکوباتور ۵٪ CO_2 نگهداری و هر ۳ روز یکبار محیط کشت تعویض شدند.

بررسی سمیت سلولی با استفاده از روش MTT

به منظور بررسی اثر سیتوتوکسیتی عصاره‌ها با روش رنگ سنجی، از تست MTT استفاده گردید. اساس این روش، فعالیت آنزیم سوکسینات دهیدروژناز میتوکندریایی سلول‌های زنده می‌باشد که محلول زرد رنگ MTT را به کریستال‌های بنفش رنگ فورمازان تبدیل می‌کند و پس از حل کردن در DMSO می‌توان آن‌ها را در دستگاه الایزا ریدر مورد بررسی قرار داد.

مقدار ۱۸۰ میکرولیتر سوسپانسیون سلولی در هر چاهک از پلیت ۹۶ چاهکی، به گونه‌ای که هر میلی‌لیتر از محیط کشت دارای 3×10^4 سلول باشد، ریخته شد. سپس مقدار ۲۰ µl از غلظت‌های مختلف عصاره‌ها به چاهک‌های مورد نظر از پلیت اضافه گشت، به گونه‌ای که حجم نهایی هر چاهک به ۲۰۰ µl رسید. محیط کشت حاوی ۰/۵ درصد DMSO بدون هیچ گونه عصاره‌ای به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شدند. پلیت به مدت ۴۸ ساعت درون انکوباتور ۵٪ CO_2 و

دمای ۳۷°C انکوبه گردید. سپس ۲۰ میکرولیتر محلول MTT (۵ mg/ml) به هر چاهک از پلیت افزوده شد و به مدت ۲ ساعت درون انکوباتور نگهداری شد. مقدار DMSO۱۰۰ µl به منظور حل کردن کریستال‌های فورمازان جایگزین محلول قبلی گشت و جذب در طول موج ۵۶۰ nm توسط دستگاه الایزاریدر خوانده شد. برای هر غلظت عصاره، ۳ تکرار انجام شد. درصد بقا سلولی در گروه کنترل منفی، ۱۰۰ در نظر گرفته شد و از فرمول زیر محاسبه شد. غلظتی از ترکیبات مورد آزمایش که درصد حیات سلولی را به نصف کاهش می‌دهد، به عنوان CC_{50} در نظر گرفته شد.

۱۰۰ × جذب کنترل منفی/ جذب حاصل از هر نمونه = درصد بقا

تحلیل آماری با استفاده از نرم افزار SPSS انجام شد و نتایج با تحلیل واریانس یک طرفه ANOVA مورد بررسی قرار گرفت. سطح معنی‌دار بودن اختلافات P value < ۰/۰۵ لحاظ گردید.

تعیین خاصیت ضدباکتریایی با روش انتشار دیسک

سویه‌های باکتری مورد بررسی در این پژوهش عبارت بودند از پروتئوس میرابیلیس (ATCC، ۵۹۳۳)، اشرشیاکلی (ATCC، ۲۵۹۲۲) و استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس (ATCC، ۱۵۳۰۵).آمپول لیوفیلیزه باکتری‌های مذکور پس از باز شدن در شرایط استریل زیر لامینار فلو به محیط مایع مولر هینتون منتقل و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. به منظور بررسی خواص ضدباکتریایی از روش انتشار دیسک استفاده گردید. از هر کدام از باکتری‌های مورد نظر چند کلنی به محیط مولر هینتون مایع منتقل و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. بعد از زمان مذکور با استفاده از روش رقیق‌سازی و تعیین کدورت از هر کدام از باکتری‌ها، سوسپانسیونی معادل نیم مک فارلند ۱/۵ × ۱۰^۸ CFU/ml تهیه و به وسیله سواپ استریل بر محیط مولر هینتون آگار پخش شدند. سپس به دیسک‌های کاغذی استریل، میزان ۲ میکرولیتر از عصاره‌های حاصل در غلظت‌های ذکر شده اضافه گشت و هر کدام از دیسک‌های مورد نظر بر سطح محیط کشت داده شده با باکتری‌های مورد مطالعه قرار گرفته و در نهایت به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. در این پژوهش از دیسک‌های استاندارد جنتامایسین به عنوان کنترل مثبت و از DMSO به عنوان کنترل منفی استفاده گردید. پس از طی مدت گرماگذاری ذکر شده، هاله عدم رشد ناشی از عصاره‌های تخمیری و غیرتخمیری سیر به وسیله‌ی کولیس اندازه‌گیری شد.

در این پژوهش، هر کدام از غلظت‌ها برای تمامی باکتری‌های مورد مطالعه در ۳ تکرار انجام و میانگین و انحراف معیار نیز محاسبه شد.

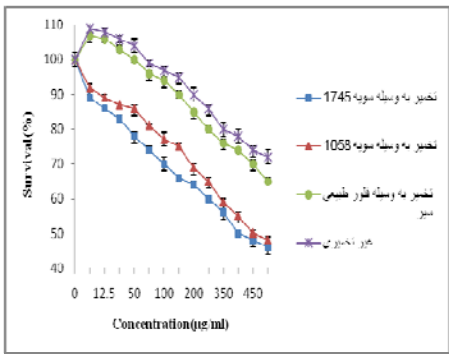
تعیین میزان کل فلاونوئید در عصاره تخمیری و غیرتخمیری سیر

محتویات فلاونوئیدی در عصارهای مورد آزمایش به وسیله روش اسپکتروفتومتری تعیین شد. نمونه شامل ۱ میلی‌لیتر از محلول آبی عصاره و ۱ میلی لیتر از کلرید آلومینیوم ۲ درصد می‌باشد. میزان جذب نوری نمونه‌ها به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتریک در طول موج ۴۳۰ نانومتر تعیین شد. منحنی استاندارد توسط غلظت‌های مختلف ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰ میکروگرم از کوئرستین تهیه و منحنی با نرم افزار Excel رسم گردید(۲۱).

یافته ها

تاثیر سمیت سلولی عصاره‌های تخمیری و غیرتخمیری سیر بر رده سلولی MCF7

نتایج مربوط به سمیت سلولی عصاره‌های حاصل از سیر تخمیر شده با لاکتوباسیلوس‌ها و فلور طبیعی سیر و عصاره غیرتخمیری آن در نمودار شماره ۱ نشان داده شده است. نتایج نشان داد که عصاره‌های مورد بررسی در تمامی غلظت‌ها موجب کاهش بقا سلولی می‌شوند. همه این عصاره‌ها، سمیت سلولی وابسته به دوز بر روی سلول‌های MCF7 داشتند، به طوری که با افزایش غلظت عصاره‌ها، این فعالیت بیش‌تر می‌شود. عصاره‌های تخمیری، سمیت سلولی بیش‌تری نسبت به عصاره‌های غیرتخمیری داشتند. عصاره‌ی تخمیری سیر تخمیر شده با سویه ۱۷۴۵، بیش‌ترین فعالیت سمیت سلولی نسبت به سویه ۱۰۵۸ و فلور طبیعی از خود نشان داد. CC_{50} سیر تخمیر شده به وسیله سویه ۱۷۴۵، ۱۰۵۸، فلور طبیعی و عصاره غیر تخمیری به ترتیب ۴۰۰، ۴۵۰ و بالاتر از ۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر علیه MCF7 نشان داده شد. جدول شماره ۱، CC_{50} مربوط به عصاره‌های تخمیر شده و تخمیر نشده را نشان می‌دهد.



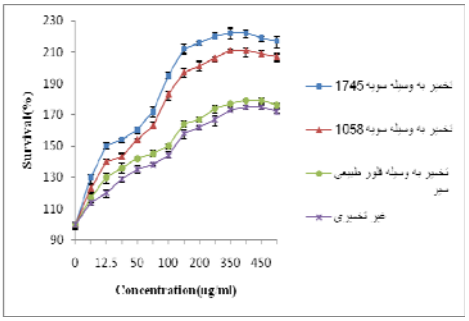
نمودار شماره ۱: نمودار تاثیر عصاره‌های تخمیری و غیرتخمیری سیر بر روی سلول‌های MCF7

جدول شماره ۱: CC_{50} (میکروگرم بر میلی لیتر) مربوط به عصاره‌های تخمیری غیر تخمیری سیر

نوع تخمیر	CC_{50} µg/ml
تخمیر با سویه ۱۷۴۵	۴۰۰
تخمیر با سویه ۱۰۵۸	۴۵۰
تخمیر با فلور طبیعی سیر	>۵۰۰
غیر تخمیری	>۵۰۰

تاثیر سمیت سلولی عصاره‌های تخمیری و غیرتخمیری سیر بر سلول‌های لنفوسیت

نتایج مربوط به سمیت سلولی عصاره‌های حاصل از سیر تخمیر شده با لاکتوباسیلوس‌ها و فلور طبیعی و عصاره غیرتخمیری سیر در نمودار شماره ۲ نشان داده شده است. نتایج نشان داده که عصاره‌های موجود بررسی در غلظت‌های ۵۰۰، ۴۵۰، ۴۰۰، ۳۵۰، ۳۰۰، ۲۰۰، ۱۵۰، ۱۰۰، ۷۵، ۵۰، ۲۵، ۱۲/۵ و ۶/۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر موجب افزایش رشد و تکثیر سلول‌های لنفوسیت می‌شوند. همه این عصاره‌ها فعالیت وابسته به دوز داشتند، به طوری‌که با افزایش غلظت عصاره‌ها، رشد و تکثیر سلول‌های لنفوسیت بیش‌تر می‌شوند. بیش ترین میزان رشد و تکثیر در حضور غلظت ۳۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از این عصاره‌ها مشاهده شد. عصاره‌های تخمیری سیر تخمیر شده با سویه ۱۷۴۵، بیش‌ترین فعالیت اثربخشی روی رشد و تکثیر لنفوسیت نسبت به سویه ۱۰۵۸ و فلور طبیعی از خود نشان داد. بررسی مقایسه‌ای میزان تاثیر عصاره‌های مختلف سیر تخمیر شده و نشده نشان داد که سیر تخمیر شده با سویه ۱۷۴۵ و عصاره تخمیر نشده سیر با ۲/۲۲ و ۱/۷۵ برابر نمودن میزان تکثیر لنفوسیت‌ها، بیش‌ترین و کم‌ترین میزان تاثیر را بر رشد و تکثیر لنفوسیت‌ها دارند.



نمودار شماره ۲: نمودار تاثیر عصاره‌های تخمیری و غیر تخمیری سیر بر روی سلول‌های لنفوسیت

خواص ضدباکتریایی سیر تخمیر شده و تخمیر نشده

نتـایج مربـوط بـه خـواص ضـدباکتریایی سـیرهای تخمیر شده با لاکتوباسیلوس‌هـای سـویه ۱۷۴۵، ۱۰۵۸ و فلور طبیعی سیر و سیر تخمیر نشده به ترتیـب در جـدول شماره ۲ ذکر شده است. نتایج نشان داد که عصـاره‌هـای مورد بررسی قابلیت ضدباکتریایی در غلظت‌های ۲۰۰۰، ۱۰۰۰، ۵۰۰ و ۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتـر دارنـد. میـزان خاصیت ضدباکتریایی با غلظت عصاره رابطـه مسـتقیمی داشت، به طـوری کـه بـیش‌تـرین قابلیـت ضـدباکتریایی بـرای سـیر در غلظـت ۲۰۰۰ میکروگـرم بـر میلـی لیتـر مشاهده شد.

جدول شماره ۲: نتایج مربوط به خواص ضدباکتریایی عصاره‌های تخمیری و غیرتخمیری سیر

ردیف	باکتری	غلظت µg/ml	میانگین قطر هاله عدم رشد (میلی متر) عصاره تخمیری با سویه ۱۷۴۵	عصاره تخمیری با سویه ۱۰۵۸	عصاره تخمیری با فلور طبیعی	قبل تخمیر	جنتامایسین
		۲۵۰	۸±۰/۳	۷±۰/۲	۴±۰/۱	۴±۰/۱	
۱	پروتئوس میرابلیس	۵۰۰	۹±۰/۲	۷±۰/۲	۴±۰/۲	۴±۰/۲	۱۸±۰/۴
		۱۰۰۰	۱۱±۰/۳	۱۰±۰/۴	۵±۰/۳	۵±۰/۳	
		۲۰۰۰	۱۲±۰/۱	۱۱±۰/۲	۶±۰/۲	۶±۰/۲	
		۲۵۰	۷±۰/۲	۶±۰/۱	۰	۰	
۲	اشرشیاکلی	۵۰۰	۸±۰/۱	۷±۰/۱	۴±۰/۱	۴±۰/۱	۱۶±۰/۳
		۱۰۰۰	۱۰±۰/۳	۹±۰/۲	۴±۰/۲	۴±۰/۲	
		۲۰۰۰	۱۱±۰/۴	۱۱±۰/۱	۵±۰/۲	۵±۰/۲	
		۲۵۰	۶±۰/۱	۶±۰/۱	۴±۰/۱	۰	
۳	استافیلوکوکوس	۵۰۰	۷±۰/۴	۷±۰/۳	۴±۰/۲	۰	۱۷±۰/۱
	ساپروفیتیکوس	۱۰۰۰	۱۰±۰/۳	۸±۰/۳	۵±۰/۳	۴±۰/۳	
		۲۰۰۰	۱۱±۰/۲	۹±۰/۲	۵±۰/۱	۵±۰/۱	

در بررسـی دیسـک آگـار، سـیر تخمیـر شـده بـا لاکتوباسیلوس‌ها، به طور بالقوه مانع از رشد باکتری‌هـای گرم منفی و تا حدودی مانع از رشد باکتری گـرم مثبـت شـده اسـت. قـوی‌تـرین فعالیـت ضـدباکتریایی از تمـام سیرهای تخمیر شده علیه باکتری پروتئوس میـرابلیس بـا محدوده‌ای از هاله عدم رشد بین ۴ تا ۱۲ میلی‌متـر اتفـاق افتاد.

نتایج میزان فلاونوئیدهای کل سیرهای تخمیر شـده و نشده

میزان فلاونوئیدهای کل در سیر تخمیر شده توسـط لاکتوباسیلوس‌ها، فلور طبیعی سیر و در حالت غیرتخمیر شده که توسط روش اسپکتروفتومتریک تعیین شـده، در جـدول شـماره ۳ نشـان داده شـد. بـا اسـتفاده از منحنـی اسـتاندارد کوئرسـتین(R2 = ۰/۹۷۵ و y = ۰/۰۱۴۸x)، میـزان فلاونوئیـدهای کـل، طیفـی از ۱۴/۱۱-۵/۴ میکروگـرم کوئرسـتین بـر گـرم وزن خشـک نشـان داد. میزان فلاونوئیـدهای سـیر تخمیـر شـده بـا سـویه ۱۷۴۵، بیش‌تر از سیر تخمیر شده به وسـیله سـویه ۱۰۵۸ و فلـور طبیعی بود. بیش‌ترین میزان فلاونوئیدهای کل در عصاره تخمیـری سـیر بـه وسـیله سـویه ۱۷۴۵، بـه میـزان ۱۴/۱۱ میکروگرم کوئرستین بر گرم وزن خشک به دست آمد.

جـدول شـماره ۳: میـزان فلاونوئیـدهای کـل (میکروگـرم کوئرسـتین بـر گـرم وزن خشـک) موجـود در سـیرتخمیری و غیرتخمیری

نوع تخمیر	میزان فلاونوئید کل
تخمیر با سویه ۱۷۴۵	۱۴/۱۱ ± ۱/۱
تخمیر با سویه ۱۰۵۸	۱۲/۶ ± ۰/۸
تخمیر با فلور طبیعی	۷/۲ ± ۰/۲
قبل تخمیر	۵/۴ ± ۰/۳

بحث

در این پژوهش، جنس آلیوم به دلیل پراکنش وسیع و خواص داروئی متعدد، جهت مطالعه تخمیر و بررسی سمیت آن مورد توجه قرار گرفت. بیش‌تر مطالعات و تحقیقات انجام شده در خصوص اثرات بیولوژیکی سیر قبل تخمیر یا تخمیر توسط فلور طبیعی مربوط به خود سیر بوده‌است. مطالعات متعدد نشان داده که عصاره سیر و ترکیبات آن بر روی سرکوب سلول‌های سرطانی سینه و پیشگیری از پیشرفت آن موثر بوده است(۲۳ ،۲۲). Arunkumar و همکاران تاثیر سیر و ترکیبات شیمیایی آن را بر توقف سیکل سلولی سرطان پروستات تایید کردند(۲۴). Ban و همکاران، اثر سیر و ترکیبات آن را در ممانعت از رشد سلول‌های سرطانی کولون و القای آپوپتوز در آن گزارش کردند(۲۵). در مطالعه حاضر، میزان سمیت سلولی و ضد باکتریایی عصاره متانولی سیر ایرانی تخمیر شده توسط لاکتوباسیلوس‌ها برای اولین بار مورد ارزیابی قرار گرفت. بر اساس نتایج به دست آمده از این پژوهش، سمیت سلولی سیر تخمیر شده با لاکتوباسیلوس‌ها به مراتب بیش‌تر از سیر تخمیر شده با فلور طبیعی، علیه MCF7 می‌باشد.

در مطالعه‌ای، سطح محتوای فلاونوئیدی سیر ۶/۹۹-۴/۱۶ میکروگرم کوئرستین بر گرم از عصاره وزن خشک نشان داده شده است(۲۱). گزارشات نشان داده که در طی تخمیر سبزیجات، سطح فلاونوئیدها افزایش پیدا می‌کند(۱۱). اطلاعات متعددی نشان داده که غذاهای تخمیری باعث کاهش یا حذف عوامل سرطانی و پیش سرطانی و جهش‌زایی غذا به وسیله تجزیه مواد جهش زا در طی تخمیر می‌شود(۲۶). در مطالعه‌ای در خصوص پیاز تخمیری با فلور طبیعی مربوط به خود پیاز، نشان داده شد که دارای اثر درمانی روی سلول‌های سرطانی HepG2 می‌باشد(۲۷). در مطالعه دیگری، اثر سویای تخمیری با زمان کوتاه بر روی سرطان سینه MCF7 نشان داد که سویای تخمیری، بهترین اثر را روی سرطان سینه دارد(۲۸). در پژوهشی Senawong و همکاران، نشان دادند که تخمیر گیاه داروئی *Houttuynia cordata* در تایلند در رده‌های سلولی Hela و HCT116 و HT29 باعث ایجاد آپوپتوز و مرگ سلولی می‌شود(۲۹). در پژوهشی دیگر، Park و همکارانش به بهبود اثرات ضدسرطانی *Chamomile* از خانواده کاسنی‌ها تخمیر شده با لاکتوباسیلوس پلانتروم اشاره کردند (۳۰). Kim و همکاران اثر کیمچی روی سلول‌های سرطان کولون HT-29 را بررسی کردند و نشان دادند که سبزی تخمیری دارای خاصیت ضدسرطانی می‌باشد(۳۱). در مطالعه‌ای نشان داده شد که مصرف سویای تخمیری در میان مردم ژاپن، باعث کاهش مرگ و میر ناشی از سرطان پروستات، کلون و سینه می‌شود(۳۲) Hubert و همکاران نشان دادند که تخمیر باکتریایی اسید لاکتیک سویا باعث تغییر ترکیب فیتوشیمیایی سویا می‌شود. این تغییرات ساختاری و غلظتی، ایزوفلاون‌ها را هم شامل می‌شود(۳۳).

در مطالعه حاضر، ارتباط معنی‌داری بین محتوای فلاونوئیدی سیرهای تخمیر شده با لاکتوباسیلوس‌ها و سمیت سلولی وجود داشت. فلاونوئیدها کاربردهای بالقوه در سرطان سینه و سرطان‌های دیگر دارند(۳۴). مطالعات گذشته نشان داده‌اند که تخمیر به وسیله میکروارگانیسم‌ها، باعث هیدرولیز شدن فلاونوئیدهای گلیکوزیدی به فلاونوئیدهای آگیکونی (غیر قندی) می‌شود. آنزیم β -glucosidas که به وسیله لاکتوباسیلوس‌ها تولید می‌شود، باعث لیز دیواره سلولی و انجام این واکنش‌ها می‌شود(۳۵). Biotransformation ، یک استراتژی برای افزایش تولید فلاونوئیدهای بیواکتیو می‌باشد. دگلیکوزیلاسیون باعث تبدیل فلاونوئیدهای گلیکوزیدی به آگلیکونی می‌شوند که باعث بهبود فعالیت آنتی اکسیدان فلاونوئید می‌شوند(۳۶). گزارشات نشان داد، آنزیم β-glucosidas می‌توانند باعث افزایش محتوای آگلیکون (غیر قندی) در شیر سویای تخمیر شده، شوند(۳۷).

روند رو به افزایش بیماری‌های عفونی و مقاومت آنتی بیوتیکی در طی سال‌های اخیر، موجب شده تا مطالعه‌های زیادی با تمرکز بر شناسایی، معرفی و خالص سازی ترکیبات ضد میکروبی جدید انجام گیرد(۳۸). Bakri و Douglas اثر ضد باکتریایی عصاره سیر را بر روی باکتری‌های دهان نشان دادند(۳۹). در مطالعه‌ای، اثر عصاره سیر بر روی باکتری هلیکوباکترپیلوری بررسی و حساسیت این باکتری در برابر عصاره سیر تایید شد(۴۰). گزارشات دیگر، اثر ضد باکتریایی عصاره سیر را بر برخی پاتوژن‌ها به خصوص کلبسیلا پنومونیه تایید کرده‌اند(۴۱).

بر اساس نتایج به دست آمده از این پژوهش، سیر تخمیر شده با لاکتوباسیلوس‌ها و فلور طبیعی، دارای خاصیت ضدباکتریایی هستند، ولی فعالیت آنتی‌باکتریال سیر تخمیر شده با لاکتوباسیلوس‌ها به مراتب بیش‌تر از سیر تخمیر شده با فلور طبیعی می‌باشد Machavarapu .و Vangalapati ، اثر پیاز تخمیر شده توسط فلور طبیعی مربوط به خود پیاز را بر روی باسیلوس سابتلیس، کلبسیلا پنومونیا، اشرشیاکلی، استافیلوکوک اورئوس و انتروباکتر آئروژینوزا بررسی کردند. نتایج نشان داد که پیاز تخمیر شده، فعالیت ضدباکتریایی چشمگیری به خصوص بر روی اشرشیاکلی و استافیلوکوک اورئوس داشته است(۴۲). در مطالعه‌ای دیگر، اثر سبزیجات تخمیری مشتق از لاکتوباسیلوس پلانتروم سویه ۱۰hk2 بر روی باکتری‌های بیماری زا بررسی شد. نتایج نشان داد که این سبزیجات تخمیری، خاصیت ضدباکتری علیه باکتری‌های سالمونلا و شیگلا داشته است(۴۳). در مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۲، اثر ضدباکتریی سه نوع عصاره آبی، متانولی و تخمیری پیاز بر روی باکتری‌های بیماری زا بررسی شد. نتایج نشان داد که عصاره تخمیری باعث توقف رشد باکتری‌های گرم منفی و کاهش رشد مختصری در باکتری‌های گرم مثبت شده بود. بیش‌تر فعالیت عصاره متانولی و آبی، روی باکتری‌های گرم مثبت بوده و تاثیر کمی روی گرم منفی‌ها داشته است(۲۷).

در مطالعه حاضر، ارتباط معنی داری بین محتوای فلاونوئیدی سیر تخمیر شده با لاکتوباسیلوس‌ها و فعالیت ضدباکتریایی وجود داشت. مطالعات مهمی در مورد افزایش میزان فلاونوئید در محصولات غذایی پس از تخمیر وجود دارد. در مطالعه‌ای نشان داده شد که تخمیر sorghum باعث افزایش سطح ارزش غذایی، افزایش سطح فلاونوئیدی و فعالیت ضدباکتریایی می‌شود(۴۴). در پژوهشی دیگر نشان داده شد که فلاونوئیدهای موجود در گونه گیاهانی مانند *Hypericum capsella* و *Chromolaena* دارای فعالیت آنتی‌باکتریایی می‌باشند(۴۵).

در پایان می‌توان نتیجه گرفت که عصاره تخمیری سیر به وسیله باکتری‌های اسید لاکتیک، کاندید مناسبی علیه سلول‌های سرطانی سینه و باکتری‌های پاتوژن می‌باشد. در مطالعه حاضر، تخمیر سیر به وسیله لاکتوباسیلوس پلانتروم و سمیت سلولی عصاره آن انجام شد. انجام تخمیر سبزیجات دیگر به وسیله انواع مختلف پروبیوتیک‌ها و بررسی سمیت آن توصیه می‌شود.

سپاسگزاری

بودجه پژوهشی این پژوهش توسط دانشکده علوم و فناوری‌های نوین دانشگاه اصفهان تامین شده است، لذا بدین وسیله از معاونت پژوهشی و کلیه مسئولین دانشکده تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

References

1. Behbahani M. Evaluation of in vitro anticancer activity of Ocimum basilicum, Alhagi maurorum, Calendula officinalis and their parasite Cuscuta campestris. PloS One. 2014; 9(12), e116049.
2. Katzung BG, Masters SB, Terevor AJ. Basic and clinical pharmacology. New York: Norwalk; 1997
3. Nabavi SM, Marchese A, Izadi M, Curti V, Daglia M, Nabavi SF. Plants belonging to the genus Thymus as antibacterial agents: From farm to pharmacy. Food Chem. 2015;173:339-347.
4. Asadi S, Zamiri A, Ezzati S, Parsaei P, Rafieian M, Shirzad H. Effect of alcoholic extract of green tea (Camellia sinensis) on the healing process in surgical and burn wounds in rats. J Birjand Univ Med Sci. 2011;18(1):1-9.(persian)
5. Singh VK, Singh DK. Pharmacological effects of garlic (Allium sativum L.). Annu Rev Biomed Sci. 2008;10:6-26.
6. Abdoli M, Habibi-Khaniani B, Baghalian K, Shahnazi S, Rassouli H, Naghdi Badi H. Classification of Iranian garlic (Allium sativum L.) ecotypes using RAPD marker. Journal of Medicinal Plants. 2009;1(29):45-51.(persian)
7. Gorinstein S, Leontowicz H, Leontowicz M, Drzewiecki J, Najman K, Katrich E, et al. Raw and boiled garlic enhances plasma antioxidant activity and improves plasma lipid metabolism in cholesterol-fed rats. Life Sci. 2006;78(6):655-663.
8. Lanzotti V. The analysis of onion and garlic. J Chromatogr A. 2006;1112(1):3-22.
9. Knowles LM, Zigrossi DA, Tauber RA, Hightower C, Milner JA. Flavonoids suppress androgen-independent human prostate tumor proliferation. Nutr Cancer. 2000;38(1):116-122.
10. Kumar S, Pandey AK. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. The Scientific World Journal. 2013;2013.
11. Yang E-J, Kim S-I, Park S-Y, Bang H-Y, Jeong JH, So J-H, et al. Fermentation enhances the in vitro antioxidative effect of onion (Allium cepa) via an increase in quercetin content. Food Chem Toxicol. 2012;50(6):2042-2048.
12. Halász A. Lactic acid bacteria. Food Quality and Standards. 2009;3:70-82.
13. Gadaga T, Mutukumira A, Narvhus J, Feresu S. A review of traditional fermented foods and beverages of Zimbabwe. Int J Food Microbiol.1999;53(1):1-11.
14. Ross RP, Morgan S, Hill C. Preservation and fermentation: past, present and future. Int J Food Microbiol. 2002;79(1):3-16.
15. Jakubowski H. On the health benefits of Allium sp. Nutrition. 2003;19(2):167-168.
16. Karovičová J, Drdák M, Greif G, Hybenová E. The choice of strains of Lactobacillus species for the lactic acid fermentation of vegetable juices. Eur Food Res Technol. 1999;210(1):53-56.
17. Adams MR, Nicolaides L. Review of the sensitivity of different foodborne

pathogens to fermentation. Food Control. 1997;8(5-6):227-239.

18. Greifova ZK-JK-M. Analytical and organoleptic profiles of lactic acid-fermented cucumber juice with addition of onion juice. J Food Nutr Res. 2007;46(3):105-111.
19. Christensen JE, Dudley EG, Pederson JA, Steele JL. Peptidases and amino acid catabolism in lactic acid bacteria. Antonie van Leeuwenhoek. 1999;76(1-4):217-246.
20. de Castro A, Montaño A, Sánchez AH, Rejano L. Lactic acid fermentation and storage of blanched garlic. Int J Food Microbiol. 1998;39(3):205-211.
21. Bozin B, Mimica-Dukic N, Samojlik I, Goran A, Igic R. Phenolics as antioxidants in garlic (Allium sativum L., Alliaceae). Food Chem. 2008;111(4):925-929.
22. Malki A, El-Saadani M, Sultan AS. Garlic constituent diallyl trisulfide induced apoptosis in MCF7 human breast cancer cells. Cancer Biol Ther. 2009;8(22):2174-2184.
23. Tsubura A, Lai Y-C, Kuwata M, Uehara N, Yoshizawa K. Anticancer effects of garlic and garlic-derived compounds for breast cancer control. Anticancer Agents Med Chem. 2011;11(3):249-253.
24. Arunkumar A, Vijayababu MR, Srinivasan N, Aruldhas MM, Arunakaran J. Garlic compound, diallyl disulfide induces cell cycle arrest in prostate cancer cell line PC-3. Mol Cell Biochem. 2006;288(1):107-113.
25. Ban JO, Yuk DY, Woo KS, Kim TM, Lee US, Jeong HS, et al. Inhibition of cell growth and induction of apoptosis via inactivation of NF-κB by a sulfurcompound isolated from garlic in human colon cancer cells. J Pharmacol Sci..2007;104(4):374-383.
26. Reddy BS, Ekelund G, Bohe M, Engle A, Domellof L, Metabolie epidemiology of colon cancer: Dietary pattern and fecal sterol concentrations of three populations. Nutr Cancer. 1983;5(1):34-40.
27. Millet As, Lamy E, Jonas D, Stintzing F, Mersch-Sundermann V, Merfort I. Fermentation enhances the biological activity of Allium cepa bulb extracts J Agric Food Chem..2012;60(9):2148-2156.
28. Zhao X, Qian Y, Li G, Song JL, Wang Q, Sun P. Influences of fermentation period on anticancer effects of Shuidouchi in MCF-7 human breast adenocarcinoma cells (647.3). The FASEB Journal. 2014;28(suppl1):647-650.
29. Senawong T, Khaopha S, Misunaa S, Komaikula J, Senawonga G, Wongphakhama P, et al. Phenolic acid composition and anticancer activity against human cancer cell lines of the commercially available fermentation products of Houttuynia cordata. Science Asia. 2014;40:420-427.
30. Park EH, Bae WY, Eom SJ, Kim KT, Paik HD. Improved antioxidative and cytotoxic activities of chamomile (Matricaria chamomilla) florets fermented by Lactobacillus plantarum KCCM 11613P. J Zhejiang Univ Sci B. 2017; 18(2): 152–160.

31. Kim B, Song JL, Ju JH, Kang SA, Park KY. Anticancer effects of kimchi fermented for different times and with added ingredients in human HT-29 colon cancer cells. Food Science and Biotechnology. 2015;24(2):629-633.
32. Fukutake M, Takahashi M, Ishida K, Kawamura H, Sugimura T, Wakabayashi K. Quantification of genistein and genistin in soybeans and soybean products. Food Chem Toxicol. 1996;34(5):457-461.
33. Hubert J, Berger M, Nepveu F, Paul F, Daydé J. Effects of fermentation on the phytochemical composition and antioxidant properties of soy germ. Food Chem. 2008;109(4):709-721.
34. Martinez-Perez C, Ward C, Cook G, Mullen P, McPhail D, Harrison DJ, et al. Novel flavonoids as anti-cancer agents: mechanisms of action and promise for their potential application in breast cancer. Biochem Soc Trans. 2014;42(4):1017-1023.
35. Cao H, Chen X, Jassbi AR, Xiao J. Microbial biotransformation of bioactive flavonoids. Biotechnology Advances. 2015;33(1):214-223.
36. Plaza M, Pozzo T, Liu J, Gulshan Ara KZ, Turner C, Nordberg Karlsson E. Substituent effects on in vitro antioxidizing properties, stability, and solubility in flavonoids. J Agric Food Chem. 2014;62(15):3321-3333.
37. Huynh NT, Van Camp J, Smagghe G, Raes K. Improved release and metabolism of flavonoids by steered fermentation processes: a review. Int J Mol Sci.2014;15(11):19369-19388.
38. Fleming H, McFeeters R. Use of Microbial Cultures: Vegetable Products. Food Technology. 1981;35(1):84-87.
39. Bakri I, Douglas CW. Inhibitory effect of garlic extract on oral bacteria. Arch Oral Biol. 2005;50(7):645-651.
40. Sivam GP. Protection against Helicobacter pylori and other bacterial infections by garlic. J Nutr. 2001;131(3):1106S-1108S.
41. Saravanan P, Ramya V, Sridhar H, Balamurugan V, Umamaheswari S. Antibacterial activity of Allium sativum L. on pathogenic bacterial strains. Global Veterinaria. 2010;4(5):519-522.
42. Machavarapu M, Vangalapati M. Anti-bacterial activity of fermented methanolic extracts of skin of Allium cepa.World J Pharm Pharm Sci. 2015;4(11):1206-1212.
43. Chon H, Choi B. The effects of a vegetable-derived probiotic lactic acid bacterium on the immune response. Microbiol Immunol. 2010;54(4):228-236.
44. Svensson L, Sekwati-Monang B, Lutz DL, Schieber A, Gänzle MG. Phenolic acids and flavonoids in nonfermented and fermented red sorghum (Sorghum bicolor (L.) Moench). J Agric Food Chem. 2010;58(16):9214-9220.
45. Dall'Agnol R, Ferraz A, Bernardi A, Albring D, Nör C, Sarmento L, et al. Antimicrobial activity of some Hypericum species. Phytomedicine. 2003;10(6-7):511-516.