مجله علوم و صنایع غذایی ایران

سایت مجله: www.fsct.modares.ac.ir

مقاله علمی_پژوهشی

ویژگی ضداکسایشی و ممانعت کنندگی آلفا آمیلازی و آلفاگلوکوزیدازی پلی ساکارید با روش آنزیمی و اسیدی از پوست انار

حسن احمدی گاولیقی[1*]، مهدی طبرسا [2]، مریم قادری قهفرخی [3]

۱- دانشیار، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.

۲- دانشیار، گروه فرآوری محصولات شیلاتی، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور، ایران.

۳- استادیار، گروه بهداشت مواد غذائی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.

اطلاعات مقاله

تاریخ های مقاله :

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۲/۱۴

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۴/۰۶

کلمات کلیدی:

پلی ساکارید پکتینی،

پوست انار،

ضد اکسایشی،

ضد دیابتی.

DOI: 10.52547/fsct.18.117.145

* مسئول مکاتبات:

Ahmadi_ha@modares.ac.ir

چکیده

پوست انار اصلی ترین محصول جانبی در طی فرآوری انار است که منبع ارزشمندی از ترکیبات زیست فعال با اثرات مفید برای سلامتی است. این مطالعه به طور مقایسه ای تاثیر دو روش استخراج (آنزیمی و اسیدی) بر روی پوست انار را با اندازه گیری میزان فعالیت زیستی آنها از نظر محتوای فنل کل، فعالیت ضداکسایشی با استفاده از مهار رادیکال های آزاد 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) و مهار رادیکال کاتیون 2,2′-azino-bis-3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid (ABTS) و ویژگی ضد دیابتی با اندازه گیری فعالیت مهار کنندگی آنزیم آلفا آمیلاز و آلفا گلوکوزیداز مورد بررسی قرار داده شده است. میزان فنل کل برای هر دو پکتین استخراجی با روش آنزیمی و اسیدی به ترتیب برابر با ۲۴۳ و ۱۱۶ میلی گرم گالیک اسید در گرم ماده خشک (GAE mg/g dw) بود. میزان غلظت مهار ۵۰ درصد فعالیت مهار کنندگی رادیکال DPPH (IC_{50}) نمونه پکتین استخراجی با روش آنزیمی (۱۳۶/۸ میکرو گرم/ میلی لیتر) بطور معنی داری کمتر از نمونه پکتین استخراجی با روش اسیدی (۶۵۲/۴ میکرو گرم/ میلی لیتر) بود ($p < ۰/۰۵$). IC_{50} رادیکال کاتیونی ABTS نمونه پکتین استخراجی با روش آنزیمی و نمونه پکتین استخراجی با روش اسیدی به ترتیب برابر با ۳۶۱ و ۹۴۵ میکرو گرم/ میلی لیتر بود. فعالیت مهار کنندگی آنزیم های آلفا آمیلازی و آلفا گلوکوزیدازی پکتین استخراجی با روش آنزیمی قوی تر از نمونه پکتین اسیدی بود. میزان فعالیت مهار کنندگی آنزیم آلفا آمیلازی تمام نمونه ها قوی تر از فعالیت مهار آنزیم آلفا گلوکوزیدازی بود. نتایج نشان داد که پکتین استخراجی با روش آنزیمی دارای توان بالقوه ضد اکسایشی و ضد دیابتی بوده و می تواند به عنوان ماده فراسودمند مورد قبول در فرمولاسیون مواد غذایی مورد استفاده قرار گیرد.

۱- مقدمه

براساس گزارش سازمان بهداشت جهانی میزان آمار افراد دیابت نوع ۲ در حال افزایش است و به‌طورکلی تخمین زده می‌شود که تا سال ۲۰۴۵، ٦۲۹ میلیون نفر به دیابت مبتلا شوند. در صورت عدم کنترل دیابت، این بیماری باعث ایجاد عوارض در بافت های مختلف چشم، مغز و قلب میشود [۱]. افزایش قندخون ناشی از هیدرولیز کربوهیدراتهای مصرفی توسط آنزیم های آلفا آمیلاز موجود در دهان و پانکراس و در مرحله بعد توسط آنزیم آلفاگلوکوزیداز موجود در روده کوچک می باشد. بنابراین ممانعت از فعالیت این دو آنزیم به عنوان یک راهکار در کنترل دیابت نوع ۲ می باشد. داروهایی که برای درمان استفاده می شوند خود دارای عوارضی هستند؛ به همین جهت، در راستای کاهش این عوارض و نیز همزمان بهره مندی از ویژگی تغذیه ای و دارویی، تعدادی از گیاهان و ترکیبات استخراج شده از آن ها برای به دست آوردن محصولات طبیعی، در سراسر جهان مورد توجه قرار گرفته است.

پلی ساکاریدها به عنوان درشت مولکولهای آلی موجود در حیوانات، گیاهان و ریززنده ها دارای ویژگی دارویی ثابت شده می باشند. در این میان، پلی ساکاریدهای استخراجی از منابع گیاهی مانند پکتین، بتاگلوکان و آرابینوگالاکتان دارای ویژگی فراسودمند و کاربردی در صنایع غذایی بوده و اخیرا مورد توجه مصرف کنندگان به دلیل منشا طبیعی آن قرار گرفته اند. محققین مطالعات زیادی در زمینه کاربرد این ترکیبات به عنوان ترکیبات قندی جدید با ویژگی بیولوژیکی و عملکردی در صنایع مختلف مطرح کرده اند. مطالعات مختلف نشان داده است که پلی ساکاریدهای با منشا گیاهی دارای ویژگی ضداکسایشی، ضدمیکروبی، ضدسرطانی، ضد فشارخونی و ضد دیابتی می باشند[۲]. کاربردهای متنوع پلی ساکاریدها در صنایع غذایی و دارویی منجر به بررسی روش های مختلف در استخراج این ترکیبات با بیشترین ویژگی کاربردی می باشند. در مقیاس صنعتی، پکتین با استفاده از روش تجزیه اسیدی استخراج می شود[۳]. اما این روش در دمای بالا انجام شده و باعث مصرف انرژی زیاد و تولید ضایعات مضر برای محیط زیست می گردد. در مقابل، استفاده از روش آنزیمی جهت استخراج در دمای معتدل، انرژی کمتر و دوست دار محیط زیست می باشد[٤]. لذا استفاده از آنزیمهای مختلف در استخراج پکتین مانند سلولاز در ضایعات کنگر فرنگی [۵]، پکتیناز در پوست پشن فروت[٦] و ویسکوزایم L ازپالپ Yuza [۷] گزارش شده است.

انار با نام علمی(*Punica granatum*) درکشورهای آسیای میانه ،آسیای شرقی و مرکزی، ماوراء قفقاز و اسپانیا مورد کشت قرار گرفته و در حال حاضر بزرگترین تولید کنندگان انار به ترتیب ایران، قزاقستان، اسپانیا و امریکا می باشند. در سالهای اخیر استفاده از میوه انار برای تولید آبمیوه، مربا و ژله مورد توجه قرار گرفته است. در صنعت تولید آب انار به ازای هر تن میوه تازه، ٦٦۸ کیلوگرم محصول جانبی تولید میشود که ۷۸ درصد آن پوست و ۲۸ درصد آن دانه می باشد[۸]. مطالعات مختلفی ویژگی ضد اکسایشی، ضدمیکروبی ترکیبات فنلی حاصل از پوست انار را گزارش کرده اند[۹]. اقبال و همکاران (۲۰۰۸) از عصاره فنلی پوست انار بعنوان ضد اکساینده جهت افزایش پایداری روغن آفتابگردان استفاده کردند. علاوه بر این، در مطالعه دیگری گزارش شد که عصاره فنلی پوست انار دارای خاصیت ضد باکتریایی قوی بر علیه *استافیلوکوکوس اورئوس* و *باسیلوس سرئوس* بوده و باعث افزایش ماندگاری فراورده گوشتی شد. مطالعه انجام شده توسط احمدی و همکاران [۱۰] نشان داد که پلی ساکارید استخراجی از پوست انار با روش آنزیمی قوی تر از روش کلاسیک دارای ویژگی تقویت کنندگی سیستم ایمنی بود.

علیرغم تولید تفاله فراوان در کارخانجات تولید آب انار، متاسفانه در ایران تمامی این ضایعات دور ریخته می شود که علاوه بر خسارات جبران ناپذیر زیست محیطی سبب از بین رفتن منبعی غنی از ترکیبات زیست فعال به خصوص پکتین ها می شود. لذا در این تحقیق پکتین حاصل از ضایعات پوست انار به روش آنزیمی و کلاسیک استخراج شده و ویژگی ضداکسایشی و ممانعت کنندگی آلفا آمیلازی و آلفا گلوکوزیدازی مورد بررسی قرار خواهد گرفت.

۲- مواد و روشها

۲-۱- مواد

انار از فروشگاه محلی در تهران تهیه و پوست آن به شکل کامل با دست جدا و برای حذف مواد قندی با آب دمای ۲۵ درجه سانتی گراد با نسبت یک به ۱۰ و دو مرتبه شستشو شده و پوست حاصل در خشک کن انجمادی خشک به مدت ۲٤ ساعت خشک گردید. پوست خشک شده توسط آسیاب کن سانیو ساخت کشور ژاپن آسیاب شده و با الک مش ٤۰ عبور داده شد و در نهایت نمونه در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد تا زمان استخراج نگهداری شد. معرف فولین-سیوکالتو، سدیم کربنات، گالیک اسید، دی سدیم فسفات، نشاسته محلول ، سدیم هیدروکسید و هیدروکلریدریک اسید از شرکت Merck آلمان، متانول از شرکت LOBA Chemie هند، اتانول از شرکت هامون طب مرکزی، PAHBAH (4-Hydroxybenzhydrazide)، PNPG (4-Nitrophenyl α-D-glucopyranoside)، DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl)، آنزیم آلفا-آمیلاز خوکی ، پودر روده موش و 2,2′-azino-bis-3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid (ABTS) از شرکت سیگما تهیه شد. آنزیم Cellic CTec2 از شرکت نووزایم دانمارک خریداری شد. تمام مواد شیمیایی بالا با خلوص بالا و بدون هیچ گونه خالص سازی مجدد مورد استفاده قرار گرفت.

۲-۲- استخراج پلی ساکاریدهای پوست انار

پودر خشک شده پوست انار با محلول ۰/۱ مولار اسید هیدروکلریدریک (نسبت ۱ به ۵) درpH برابر ۱/۵ در دمای ۹۰ درجه سانتیگراد به مدت ۹۰ دقیقه تحت استخراج قرار گرفت. پس از پایان واکنش، محلول استخراج به سرعت خنک شد و تحت سانتریفیوژ در دور ٦۰۰۰ g به مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفت. مایع روماند به مدت ۳۰ دقیقه با نسبت ۱ به ۲ ایزوپروپانول مخلوط گردید. پلی ساکاریدهای رسوب داده شده به وسیله اتانول مطلق دو مرتبه شستشو شد و سپس در آب مقطر حل و در خشک کن انجمادی قرار گرفت. پارامتر های استخراج با توجه به نتایج به دست آمده از آزمایشات مقدماتی مرتبط با بهینه سازی بوده است. استخراج آنزیمی نیز بوسیله آنزیم Cellic CTec2 در سطح ۵ درصد در دمای ۵۰ درجه سانتیگراد درpH برابر ۵ به مدت ۹۰ دقیقه انجام گرفت. پس از پایان واکنش، آنزیم در دمای د۱۰۰ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه غیر فعال شد. محلول سانتریفیوژ شد و پس از رسوب دهی، پلی ساکاریدها با اتانول ۹٦ درصد، آبگیری و خشک شدند. استخراج با بافر استات سدیم در همان شرایط اشاره شده برای استخراج آنزیمی به عنوان کنترل این روش درنظر گرفته شد.

۲-۳- تعیین میزان فنل کل

میزان ترکیبات فنولی کل، با روش فولین-سیوکالتو اندازه گیری شد. در این روش میزان۲۰ میکرولیتر از محلول عصاره با۱/۱٦ میلی لیترآب دیونیزه و ۱۰۰ میکرولیترمعرف فولین-سیوکالتو مخلوط شد و پس از طی زمان ۱ تا ۸ دقیقه، ۳۰۰ میکرولیتر از محلول سدیم کربنات ۲۰ درصد (w/v) به آن افزوده شد. سپس مخلوط در لوله های آزمایش درب دار به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب گرم ٦۰ سانتیگراد قرار داده شد و در نهایت جذب آن در برابر محلول شاهد در طول موج ۷٦۰ نانومتر اندازه گیری گردید (در محلول شاهد، آب مقطر، جایگزین عصاره شد). میزان ترکیبات فنولی بر حسب میلی گرم گالیک اسید در گرم ماده خشک (dw GAE mg/g) گزارش گردید[۱۱].

۲-٤- آزمون‌های ضد اکسایشی

۲-٤-۱- قابلیت مهارکنندگی رادیکال DPPH

جهت ارزیابی قابلیت پلی ساکارید در مهار رادیکال آزاد DPPH از روش Brand-Williams و همکاران [۱۲] با کمی تغییر استفاده شد. به طور خلاصه، ۱۰۰ میکرو لیتر از غلظت های مختلف نمونه های پلی ساکارید (۰/۲۵، ۰/۵ و ۱/۰ میلی گرم/ میلی لیتر) به ۹۰۰ میکرو لیتر محلول DPPH اضافه شد. سپس ترکیب حاصل در ۲۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد. جذب محلول در ۵۱۷ نانومتر توسط طیف سنجی UV-Vis با استفاده دستگاه خوانشگر میکروپلیت (Epock، آمریکا) خوانده شد. درصد مهار کنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH مطابق فرمول زیر محاسبه گردید:

فعالیت مهار کنندگی رادیکال آزاد DPPH(٪) =

۱۰۰ × جذب کنترل/(جذب کنترل- جذب نمونه)

۲-٤-۲- قدرت مهارکنندگی رادیکال های آزاد کاتیون ABTS

به منظور بررسی قدرت مهارکنندگی رادیکال های آزاد کاتیونی ABTS پلی ساکارید انار، از روش Re و همکاران [۱۳] استفاده شد. برای تهیه رادیکال پایدار ABTS، ابتدا یک محلول ۷ مولار ABTS در آب مقطر تهیه شد و جهت تشکیل کاتیون رادیکال سبز-آبی، محلول حاضر با پتاسیم پرسولفات ۲/٤٥ میلی‌مولار اکسید شد و محلول در مکان تاریکی به مدت ١٦ ساعت، قرار گرفت. سپس محلول نهایی با اتانول تا حدی که جذب آن به ۰/۷ در ۷۳٤ نانومتر برسد، رقیق شد. در ادامه ۰/٥ میلی لیتر از غلظت های مختلف نمونه ۰/٥، ۱ و ۲ میلی گرم/ میلی لیتر به ۱/٥ میلی لیتر از محلول تازه تهیه شده ی ABTS افزوده شد. در این آزمایش از مخلوط ABTS و اتانول به عنوان کنترل واکنش استفاده گردید.

درصد مهارکنندگی رادیکال های آزاد ABTS پلی ساکاریدها، طبق فرمول زیر محاسبه گردید:

=٪ABTSفعالیت مهار کنندگی رادیکال آزاد

۱۰۰× جذب کنترل / (جذب کنترل- جذب نمونه)

۲-٥- آزمون‌های ضد دیابتی

۲-٥-۱- قابلیت بازدارندگی آنزیم آلفا-آمیلازخوکی

میزان بازدارندگی پلی ساکارید انار نسبت به آنزیم آلفا-آمیلاز بر اساس روش Apostolidis و همکاران [١٤] انجام شد. ابتدا غلظت‌های ۱ و ۳ میلی گرم بر میلی لیتر از پلی‌ساکاریدها در بافرفسفات (۰/۰۲ مول بر لیترکه حاوی ۰/۰۰۷ مول بر لیتر NaCl و ٦/۸ =pH) تهیه شد. در مرحله‌ی اول، ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه با ۱۰۰ میکرولیتر آنزیم (۰/٥ U/ml) مخلوط و به مدت ٥ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد (حمام آب گرم) گرمخانه گذاری شد؛ سپس ۱۰۰ میکرولیتر محلول نشاسته ۰/٥ درصد به آن اضافه‌شده و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد مجدد گرمخانه گذاری شد. پس از گذشت مدت‌زمان مذکور، جهت غیر فعال‌سازی آنزیم، نمونه‌ها به همراه کنترل منفی (بافر جایگزین نمونه) در دستگاه بلوک اختلاط (دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۱۰ دقیقه) قرار گرفتند. پس از خنک شدن، به منظور جداسازی نشاسته هضم نشده، نمونه‌ها سانتریفوژ شدند (۳ دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه) و روماند به‌عنوان نمونه برای مرحله دوم مورداستفاده قرار گرفت. در مرحله دوم، نمونه‌ها رقیق و سپس ۲۰ میکرولیتر از نمونه رقیق‌شده با ۱ میلی‌لیتر از محلول رنگی (PAHBAH) مخلوط و در دستگاه بلوک اختلاط (دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد، ۱۰ دقیقه) حرارت‌دهی شد. پس از خنک شدن جذب در طول موج ٤۱۰ نانومتر قرائت شد. درصد مهارکنندگی از فرمول زیر محاسبه شد:

=درصد بازدارندگی آلفا-آمیلاز

۱۰۰ × جذب کنترل / جذب کنترل- (جذب پیش زمینه-جذب نمونه)

۲-٥-۲- قابلیت بازدارندگی آنزیم آلفا-گلوکوزیداز موشی

میزان بازدارندگی پلی ساکارید انار نسبت به آنزیم آلفا-گلوکوزیداز براساس روش Apostolidis و همکاران [١٤] انجام شد. میزان ۲٥۰ میکرولیتر از غلظت های مختلف نمونه ها با میزان ۱٥۰ میکرولیتر از آنزیم آلفا-گلوکوزیداز موشی (mU ۳٦در هر میلی‌لیتر) به محلول اضافه و به مدت ٥ دقیقه در دمای ۲٥ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شد. سپس به میزان ۱۰۰ میکرولیتر p-نیترو فنل α-D-گلیکوپیرانوزید (۰/۰۱ مول بر لیتر) به مخلوط واکنش اضافه و جذب نمونه واکنش را پس از ۲۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در ٤۱۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. میزان فعالیت آنزیمی به صورت مقدار آنزیم مورد نیاز برای آزاد شدن یک ماکرو مول p- نیترو فنل تعریف شد. میزان بازدارندگی از رابطه زیر محاسبه شد.

شیب خط کنترل /شیب خط کنترل-شیب خط نمونه = درصد بازدارندگی آلفا-گلوکوزیداز

۲-٦-تجزیه و تحلیل آماری داده¬ها

تمامی آزمون ها بر اساس طرح کاملاً تصادفی و با سه تکرار انجام شدند. برای تجزیه و تحلیل داده ها از روش تجزیه واریانس یک طرفه (one way ANOVA) و نرم‌افزار۱۰ SAS, JMP استفاده شد. مقایسه میانگین داده ها با آزمون Tukeyدر سطح احتمال ٥ درصد انجام شد. نتایج به صورت میانگین±انحراف استاندارد بیان شدند.

۳- نتایج وبحث

۳-۱- فنل کل

میزان فنل کل در نمونه های استخراجی با سه روش آنزیمی، بافر و اسیدی به ترتیب برابر ۲۴۳، ۱۲۲ و ۱۱۶ GAE mg/g dw بود (شکل ۱). بیشترین میزان فنل کل مربوط به نمونه استخراجی با روش آنزیمی و کمترین فنل نمونه اسیدی بود. میزان فنل کل بالا در نمونه آنزیمی می تواند به دلیل شرایط ملایم استخراجی نسبت به روش اسیدی باشد. ضمنا آنزیم سلولاز، قادر به هیدرولیز دیواره سلولی بوده و می تواند باعث افزایش میزان استخراج فنل کل شود[۱۵].

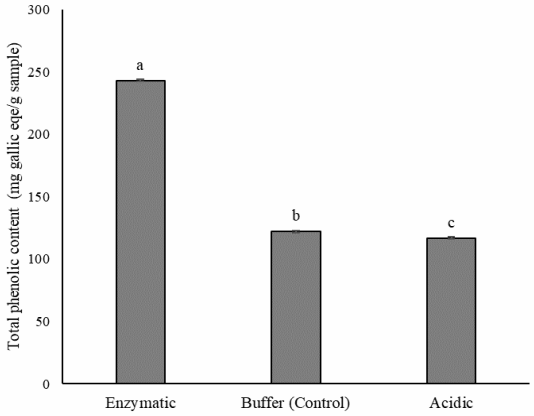

Fig 1 Total phenolic content of pectin extracted with enzyme, acid and buffer. Values with different letters within each parameter have mean values that are significantly different ($p < 0.05$).

۳-۲- فعالیت ضد اکسایشی

۳-۲-۱ – فعالیت مهار رادیکال DPPH

نتایج مهار رادیکال DPPH توسط پکتین های استخراج شده با سه روش آنزیمی، بافر و اسیدی در شکل ۲ نشان داده شده است. همانطور که نشان داده شده است محتوای ضد اکسایشی پکتین های استخراجی با سه روش وابسته به غلظت بوده و با افزایش غلظت پکتین افزایش یافت. بالاترین فعالیت ضد اکسایشی مربوط به پکتین استخراجی با روش آنزیمی و پایین ترین مربوط به روش اسیدی بود. میزان IC_{50} کمتر باشد، میزان فعالیت ضد اکسایشی بیشتر خواهد بود. میزان IC_{50} برای تمام پکتین های استخراجی محاسبه وبرای پکتین استحصالی با روش آنزیمی ، بافری و اسیدی به ترتیب برابر ۱۳۶/۸ ، ۳۷۰ و ۶۵۲/۴ میکرو گرم/ میلی لیتر بود. به این ترتیب، روش آنزیمی کمترین میزانIC_{50}و بالاترین قدرت بازدارندگی رادیکال را داشت.

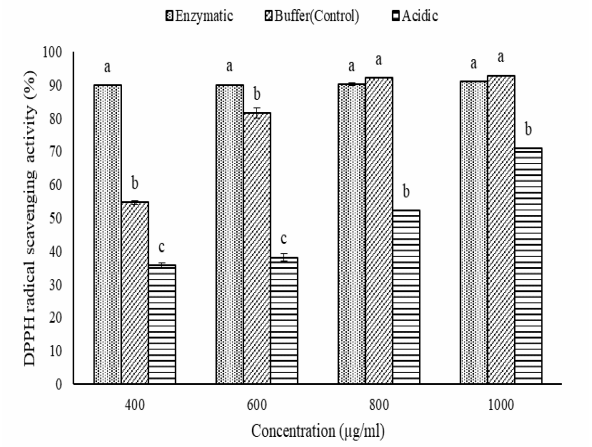

Fig 2 DPPH radical scavenging activity of pectin extracted with enzyme, acid and buffer. Values with different letters within each parameter have mean values that are significantly different ($p < 0.05$).

۳-۲-۲ – فعالیت مهار رادیکال ABTS

کارایی مهار رادیکال کاتیون ABTS توسط پکتین های استخراجی با روش آنزیمی ، بافر و اسیدی در شکل ۳ نشان داده شده است. ظرفیت ضد اکسایشی پکتین های تولیدی با سه روش وابسته به غلظت بوده و با افزایش غلظت پکتین افزایش یافت. بالاترین فعالیت ضد اکسایشی مربوط به پکتین استخراجی با روش آنزیمی و پایین ترین مربوط به روش اسیدی بود. میزان IC_{50} برای تمام پکتین ها محاسبه وبرای پکتین استحصالی با روش آنزیمی ، بافری و اسیدی به ترتیب برابر۳۶۱/۴ ، ۵۱۶/۱ و ۹۴۵/۲ میکرو گرم/ میلی لیتر بود. بنابراین، پکتین استخراجی با روش آنزیمی دارای بالاترین فعالیت مهارکنندگی رادیکال کاتیون ABTS بود.

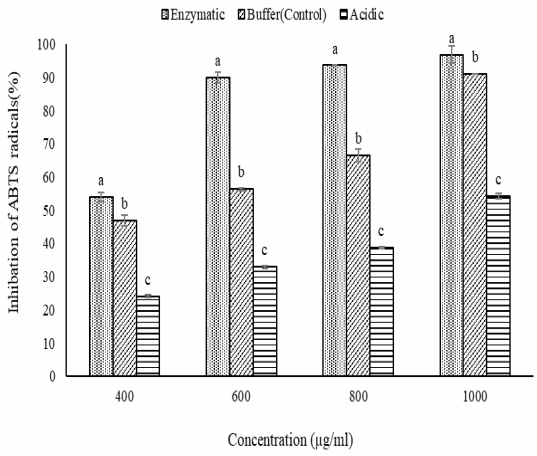

Fig 3 ABTS radical scavenging activity of pectin extracted with enzyme, acid and buffer. Values with different letters within each parameter have mean values that are significantly different ($p < 0.05$).

ویژگی آنتی اکسیدانی فیبرها یکی از ویژگیهای کاربردی آنها محسوب شده چراکه می توانند به عنوان حامل آنتی اکسیدان های خوراکی در سیستم گوارش بکار روند. بطور مشخص، ثابت شده است که حضور پکتین و آرابینوزایلان در ساختار فیبرها امکان اتصال به فنلها را برقرار می کنند[١٦]. نتایج به دست آمده در این تحقیق (شکل١) ، نشان داد که ترکیبات فنلی در پکتین استخراجی با روش آنزیمی بیشترین بود. از طرف دیگر، ویژگی ضد اکسایشی پلی ساکاریدها می تواند به دلیل تفاوت در وزن مولکولی، ترکیبات قندی تشکیل دهنده و ساختار مولکولی باشد[١٧]. نتایج مطالعه پیشین این محققین نشان داده بود که پکتین استخراجی با روش آنزیمی میزان ترکیبات قندی متفاوت و وزن مولکولی پایین تری نسبت به روش معمول داشته است [١٠]. همچنین پلی ساکاریدها با اهدا اتم هیدروژن ، میتوانند در خنثی سازی رادیکالهای تشکیل شده نقش داشته باشند [١٨].

٣-٣- فعالیت ضد دیابتی

٣-٣-١- مهارکنندگی فعالیت آلفا آمیلازی

طبق شکل ٤، با افزایش غلظت پکتینهای استخراجی فعالیت مهارکنندگی آلفاآمیلازی نیز افزایش یافته و وابسته به غلظت بود و همه نمونه ها دارای فعالیت مهارکنندگی آلفاآمیلازی بودند. بالاترین فعالیت مهارکنندگی آنزیم با میزان بازدارندگی ٧٩/٧٣ درصد مربوط به نمونه پکتین استخراجی (غلظت ٣ میلی گرم/ میلی لیتر) با بافر بود. پایین ترین فعالیت مهارکنندگی آنزیم با میزان بازدارندگی ٣٥/٢٧ مربوط به نمونه پکتین استخراجی (غلظت ٠/٧٥ میلی گرم/ میلی لیتر) با اسید بود. IC_{50} پکتین های مورد مطالعه به ترتیب برای پکتین استخراجی با بافر، آنزیم و اسید ٢٨٤/٤٧، ١١٧١/٨٧ و ١٩٥٥/١٧ میکرو گرم/ میلی لیتر بود. حضور ترکیبات فنلی بالا در روش استخراج آنزیمی، میتواند دلیلی بر کارایی بالای فعالیت ممانعت کنندگی آلفا آمیلازی باشد.

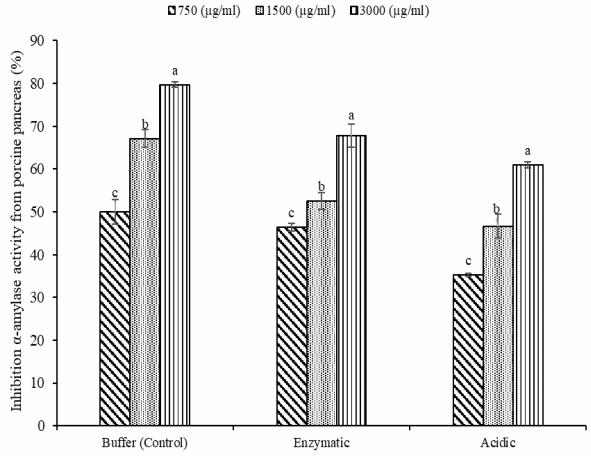

Fig 4 Percentage of inhibition (%) of α-amylase activity of porcine pancreatic by pectin extracted with enzyme, acid and buffer. Different letters denote significant differences between varied concentrations of PPE ($p < 0.05$).

٣-٣-٢- فعالیت مهار فعالیت آلفا گلوکوزیدازی

آنزیم α-گلوکوزیداز آنزیمی کلیدی در مرحله پایانی هضم نشاسته می باشد. بر همین اساس بازدارندگی آنزیم α-گلوکوزیداز به عنوان یک راهکار مناسب به منظور تاخیر در آزاد سازی مونومرگلوکز شناخته می شود که به دنبال آن سرعت جذب گلوکز کاهش خواهد یافت.

در شکل ٥ میزان بازدارندگی آنزیم آلفا-گلوکوزیدازی پکتین های بهدستآمده با روشهای مختلف استخراج نمایش داده شده است. بالاترین میزان بازدارندگی مربوط به پکتین تولیدی با روش آنزیمی با مقدار ٨٢/٨١ درصد در غظت ٥ میلی گرم/ میلی لیتر بود. پس از آن پکتین تولیدی با روش بافری با مقدار ٦٤/٢٩ درصد (٥ میلی گرم/ میلی لیتر) قرار داشت. بازدارندگی پکتین

تولیدی با روش اسیدی کمترین و برابر با ۱۲/۲٤ درصد در غلظت ۲/۵ میلی گرم/ میلی لیتر بود. با افزایش غلظت پکتین های استخراجی فعالیت مهارکنندگی آلفاگلوکوزیدازی نیز افزایش یافته و وابسته به غلظت بود. IC_{50} پکتین های مورد مطالعه به ترتیب برای پکتین استخراجی با آنزیم، بافر و اسید ۱/۲۳، ٤/۰۲ و ۱۰/۲۲ میلی گرم/ میلی لیتر بود.

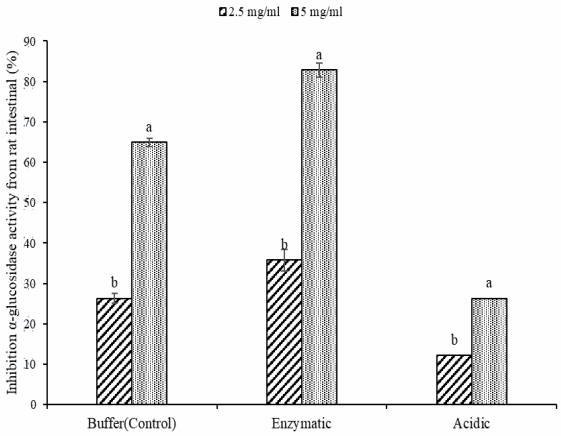

Fig 5 Percentage of inhibition (%) of α-Glucosidase activity of rat intestinal by pectin extracted with enzyme, acid and buffer. Different letters denote significant differences between varied concentrations of PPE ($p < 0.05$).

نتایج IC_{50} ممانعت کنندگی فعالیت آلفا گلوکوزیدازی ترکیبات طبیعی مانند چای اولونگ و سبز به ترتیب ۱/۳٤ و ۰/۷۳۵ میلی گرم/ میلی لیتر بود [۱۹]. همچنین نتایج تحقیق دیگری نشان داد که عصاره انگور قرمز دارای IC_{50} کمتر (۱۰/۵ میکروگرم/ میلی لیتر) بود [۲۰]. میراب و همکاران [۲۱] با بررسی تاثیر عصاره فنلی پوست انار بر میزان فعالیت آلفا آمیلازی و آلفا گلوکوزیدازی نشان دادند که عصاره فنلی حاصل از پوست انار دارای خاصیت ممانعت کنندگی آلفا آمیلازی و آلفا گلوکوزیدازی خوبی بود. همچنین نتایج تحقیق آنها نشان داد که عصاره دارای فعالیت ممانعت کنندگی آلفا آمیلازی بالاتری نسبت به آلفا گلوکوزیداز بود. دلیل این امر تفاوت در ساختار تشکیل دهنده هر دو آنزیم می باشد.

٤- نتیجه گیری کلی

نتایج این تحقیق نشان داد که استفاده از روش آنزیمی باعث آزادسازی پکتین با میزان پلی فنل کل بالاتری نسبت به روش معمول شد. در غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم/ میلی لیتر، پلی ساکاریدهای استخراج آنزیمی بیشترین میزان مهار رادیکال های آزاد DPPH و ABTS را نشان دادند. پلی ساکارید استخراج آنزیمی سبب ممانعت از فعالیت آنزیم آلفا-آمیلاز در غلظت ۳ میلی گرم/میلی لیتر به میزان ۷۹/۷۳ درصد و آنزیم آلفا-گلوکوزیداز در غلظت ۵ میلی گرم/میلی لیتر به میزان ۸۲/۸۱ درصد شد. بطورکلی استفاده از روش آنزیمی در صنعت فراوری ضایعات مواد غذایی میتواند به عنوان راهکاری جهت تولید ترکیبات زیست فعال با ویژگی ضد دیابتی مورد استفاده قرار گیرد.

۵- تقدیر و تشکر

مقاله حاضر بخشی از طرح " استخراج ترکیبات زیست فعال از گونه های گیاهی خشکی و دریایی واجد هتروگلیکان ها به منظور تولید فرآورده های غذایی سلامتی بخش" مصوب ستاد توسعه زیست فناوری به شماره ۳۱۵۹۰/۱۱ می باشد که نویسندگان از حمایتهای آنان تشکر می نمایند.

٦- منابع

[1] Saed, L., Deihim, Z., Naghshbandi, M. K., Rajabnia, M., and Naleini, S. N. 2019. Cardiovascular events in patients with over 10 years history of type 2 diabetes mellitus, Diabetes and Metabolic Syndrome: Clinical Research and Reviews, 13: 68-72.

[2] Liu, J., Willför, S., and Xu, C. 2015. A review of bioactive plant polysaccharides: Biological activities, functionalization, and biomedical applications, Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre, 5: 31-61.

[3] May, C. D. 1990. Industrial pectins: sources, production and applications, Carbohydrate Polymers, 12: 79-99.

[4] Zapata, A. D. Z., Montoya, C. A. G., Cavalitto, S. F., Hours, R. A., and Rojano, B. A. 2012. Enzymatic maceration of albedo layer from sour orange (*Citrus aurantium* L.) with protopectinase-se and measurement of antioxidant activity of the obtained products, LWT-Food Science and Technology, 45: 289-294.

[5] Sabater, C., Corzo, N., Olano, A., and Montilla, A. 2018. Enzymatic extraction of pectin from artichoke (*Cynara scolymus* L.) by-products using Celluclast® 1.5 L, Carbohydrate Polymers, 190: 43-49.
[6] Vasco-Correa, J., and Zapata, A. D. Z. 2017. Enzymatic extraction of pectin from passion fruit peel (*Passiflora edulis f. flavicarpa*) at laboratory and bench scale, LWT-Food Science and Technology, 80: 280-285.
[7] Lim, J., Yoo, J., Ko, S., and Lee, S. 2012. Extraction and characterization of pectin from Yuza (*Citrus junos*) pomace: A comparison of conventional-chemical and combined physical–enzymatic extractions, Food Hydrocolloids, 29: 160-165
[8] Abid, M., Cheikhrouhou, S., Renard, C. M., Bureau, S., Cuvelier, G., Attia, H., and Ayadi, M. 2017. Characterization of pectins extracted from pomegranate peel and their gelling properties, Food Chemistry, 215: 318-325.
[9] Akhtar, S., Ismail, T., Fraternale, D., and Sestili, P. 2015. Pomegranate peel and peel extracts: Chemistry and food features, Food Chemistry, 174: 417-425.
[10] Ahmadi Gavlighi, H., Tabarsa, M., You, S., Surayot, U., and Ghaderi-Ghahfarokhi, M. 2018. Extraction, characterization and immunomodulatory property of pectic polysaccharide from pomegranate peels: Enzymatic vs conventional approach, International Journal of Biological Macromolecules, 116: 698-706.
[11] Sadeghinejad, N., Sarteshnizi, R. A., Ahmadi Gavlighi, H., and Barzegar, M. 2019. Pistachio green hull extract as a natural antioxidant in beef patties: Effect on lipid and protein oxidation, color deterioration, and microbial stability during chilled storage, LWT-Food Science and Technology, 102: 393-402.
[12] Brand-Williams, W., Cuvelier, M.-E., and Berset, C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity, LWT-Food Science and Technology, 28: 25-30.
[13] Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., and Rice-Evans, C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay, Free Radical Biology and Medicine, 26: 1231-1237.
[14] Apostolidis, E., Kwon, Y.-I., and Shetty, K. 2007. Inhibitory potential of herb, fruit, and fungal-enriched cheese against key enzymes linked to type 2 diabetes and hypertension, Innovative Food Science and Emerging Technologies, 8: 46-54.
[15] Meini, M.-R., Cabezudo, I., Boschetti, C. E., and Romanini, D. 2019. Recovery of phenolic antioxidants from Syrah grape pomace through the optimization of an enzymatic extraction process, Food Chemistry, 283: 257-264.
[16] Harris, P. J., and Smith, B. G. 2006. Plant cell walls and cell□wall polysaccharides: structures, properties and uses in food products, International Journal of Food Science and Technology, 41:129-143.
[17 Chen, R., Liu, Z., Zhao, J., Chen, R., Meng, F., Zhang, M., and Ge, W. 2011. Antioxidant and immunobiological activity of water-soluble polysaccharide fractions purified from Acanthopanax senticosu, Food Chemistry, 127: 434-440.
[18] Li, X., and Wang, L. (2016) Effect of extraction method on structure and antioxidant activity of Hohenbuehelia serotina polysaccharides, International Journal of Biological Macromolecules, 83: 270-276.
[19] Oki, T., Matsui, T., and Osajima, Y. 1999. Inhibitory effect of α-glucosidase inhibitors varies according to its origin, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47: 550-553.
[20] Zhang, L., Hogan, S., Li, J., Sun, S., Canning, C., Zheng, S. J., and Zhou, K. 2011. Grape skin extract inhibits mammalian intestinal α-glucosidase activity and suppresses postprandial glycemic response in streptozocin-treated mice, Food Chemistry, 126: 466-471.
[21] Mirab, B., Gavlighi, H. A., Sarteshnizi, R. A., Azizi, M. H., and Udenigwe, C. C. 2020. Production of low glycemic potential sponge cake by pomegranate peel extract (PPE) as natural enriched polyphenol extract: Textural, color and consumer acceptability, LWT-Food Science and Technology, 134, 109973.

Iranian Journal of Food Science and Technology

Homepage:www.fsct.modares.ir

Scientific Research

Antioxidant, α-amylase and α-glucosidase inhibition properties of polysaccharide from pomegranate peel via enzymatic and acidic approach

Ahmadi Gavlighi, H. [1*], Tabarsa, M. [2], Ghaderi-Ghahfarokhi, M. [3]

1. Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.
2. Associate Professor, Department of Seafood Processing, Tarbiat Modares University, Nur, Iran.
3. Assistant Professor, Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.

ARTICLE INFO

Article History:

Received 2021/ 04/ 04
Accepted 2021/ 06/ 12

Keywords:

Pectic polysaccharides,
Pomegranate peel,
Antioxidant,
Antidiabetic.

DOI: 10.52547/fsct.18.117.145

*Corresponding Author E-Mail:
Ahmadi_ha@modares.ac.ir

ABSTRACT

Pomegranate peel is the main by-product during pomegranate processing that valuable source of bioactive compounds with health-beneficial effects. This study has comparatively assessed the effects of two extraction methods (enzymatic and acidic) on pomegranate peel by measuring their bioactivity in terms of total phenolic content (TPC), antioxidant activity, and antidiabetic properties using the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) free radical scavenging and 2,2′-azino-bis-3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid (ABTS) radical cation decolourization assays, and the α-amylase and α-glucosidase inhibition assays. The TPC mg gallic acid equivalents per g dry weight (GAE mg/g dw) of extracted pectin was ~ 243 and ~ 116 for enzymatic and acidic methods, respectively. The DPPH IC_{50} of enzymatic pectin was significantly lower than that of acidic pectin ($p < 0.05$). The ABTS IC_{50} of enzymatic pectin and acidic pectin was ~ 361 and ~ 945, respectively. The enzymatic pectin showed a significantly stronger α-amylase and α-glucosidase inhibition effect as compared to the acidic pectin. The α-amylase inhibition was stronger than α-glucosidase inhibition for all samples.
The results indicated that enzymatic extracted pectin showed antioxidant and antidiabetic potential, which could be considered as a promising candidate for functional foods in food formulation.