



مقاله علمی-پژوهشی

بررسی اثر بازدارندگی عصاره پوست انار بر تشکیل محصولات نهایی گلیکاسیون پیشرفته در سامانه‌های مدل

اقدس تسلیمی^۱، محسن برزگر^{۲*}، محمدعلی سحری^۳، خدیجه خوش طینت^۴، محمد حسین عزیزی^۵، شهرام شعبی^۶، سهیل

اسکندری^{۶،۵}

۱- دانشجوی دکتری علوم و مهندسی صنایع غذایی، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران،

ایران

۲- استاد گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، ص پ ۱۴۱۱۵-۳۳۶،

تهران، ایران

۳- استادیار گروه تحقیقات صنایع غذایی، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، انستیتو تحقیقات تغذیه‌ای و صنایع غذایی کشور- دانشگاه علوم

پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی، ص پ ۴۷۴۱-۱۹۳۹۵، تهران، ایران

۴- استاد مرکز تحقیقات آزمایشگاهی غذا و دارو، سازمان غذا و دارو، وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی

۵- دانشیار، مرکز تحقیقات آزمایشگاهی غذا و دارو، اداره کل آزمایشگاه‌های مرجع کنترل غذا، دارو و تجهیزات پزشکی، سازمان غذا و دارو، وزارت

بهداشت درمان و آموزش پزشکی، تهران، ایران

۶- دانشیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده علوم تغذیه و رژیم‌شناسی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران، تهران، ایران.

چکیده

اطلاعات مقاله

محصولات نهایی گلیکاسیون پیشرفته (AGEs)، گروهی از ترکیبات مضر هستند که در حین واکنش میلارد توسط یک سری واکنش‌های پیچیده تولید می‌شوند. در مطالعه حاضر از روش آماری سطح پاسخ برای بررسی اثر دو نوع پروتئین ((پروتئین آب پنیر (۲/۰، ۳/۵ و ۵/۰ درصد وزنی/حجمی) و کازئین (۱/۰، ۲/۰ و ۳/۰ درصد وزنی/حجمی))، سه نوع قند گلوکز و فروکتوز (۲/۰، ۰/۶ و ۱/۰ مولار) و لاکتوز (۰/۱، ۰/۳ و ۰/۵ مولار) و عصاره آبی پوست انار (۲۵۰/۰، ۵۰۰/۰ و ۷۵۰/۰ قسمت در میلیون) و بر بازداری از تشکیل محصولات نهایی گلیکاسیون پیشرفته با خاصیت فلونورسانس استفاده شد. بر اساس نتایج این مطالعه نوع پروتئین، نوع قند و غلظت عصاره فنولی پوست انار بر ممانعت از تشکیل AGEs موثر بود و عصاره پوست انار (به ویژه در غلظت ۷۵۰ قسمت در میلیون) توانست به خوبی از واکنش گلیکاسیون جلوگیری نماید. نتایج نشان داد که نوع پروتئین و غلظت آن بر تشکیل این محصولات موثر است. قدرت بازداری عصاره در سامانه مدل حاوی کازئین کمتر از سامانه حاوی پروتئین آب پنیر بود و در کل با افزایش غلظت پروتئین قدرت بازدارندگی کاهش یافت. با تغییر نوع قند موجود در سامانه مدل، رفتار بازداری عصاره پوست انار پیچیده بود و در برخی موارد اثر افزایشی، کاهش یا بی اثر نشان داد. با بررسی‌های کامل تر می‌توان پیشنهاد داد تا از این عصاره در فرمولاسیون مواد غذایی به ویژه در فرمولاسیون غذاهای کودک استفاده کرد.

تاریخ های مقاله :

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۱/۱۴

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۲/۱۹

کلمات کلیدی:

پروتئین آب پنیر،

عصاره پوست انار،

کازئین،

محصولات نهایی گلیکاسیون پیشرفته

DOI:10.22034/FSCT.21.151.174.

* مسئول مکاتبات:

mbb@modares.ac.ir

۱- مقدمه

فرآوری غذا و بسیاری از بیماری‌های مزمن انسان به تدریج مشخص شده است. مطالعات اخیر نشان داده که تجمع محصولات نهایی گلیکاسیون پیشرفته در بدن سبب انجام یکسری واکنش‌های اکسایشی و آسیب به سلول‌های عصبی می‌شود که می‌تواند منجر به بیماری‌هایی نظیر بیماری‌های اختلالات عصبی، واکنش‌های التهابی، بیماری‌های کلیوی، واکنش‌های حساسیتی، بیماری‌های قلبی - عروقی، سرطان و دیابت شود [۴، ۵]. با توجه به طیف گسترده‌ای از این ترکیبات و همچنین ترکیب پیچیده مواد غذایی و واکنش‌های پیچیده شیمیایی، تشخیص و تعیین AGEs در غذاها بسیار دشوار است. بدین ترتیب، تحقیقات زیادی در راستای تشخیص و اندازه‌گیری محصولات نهایی گلیکاسیون پیشرفته، اثرات فرآیندهای مختلف بر آن‌ها و توسعه روش‌هایی برای مهار تشکیل‌شان در صنایع غذایی در حال انجام است [۶]. همچنین مطالعات متعددی به رابطه دریافت AGEs با سرطان و بیماری‌های سوخت و ساز مزمن پرداخته‌اند [۷].

واکنش میلارد و گلیکاسیون از اهمیت ویژه‌ای در صنایع غذایی برخوردار هستند. این واکنش‌ها روی ویژگی‌های حسی، بهبود رنگ، عملکرد پروتئین و ارزش بیولوژی آن و خصوصیات دیگر غذایی محصول تأثیر دارند. از آن جایی که واکنش‌های گلیکاسیون همچنین عامل ایجاد طعم و رنگ مطلوب هستند، کاهش گلیکاسیون در محصولات غذایی موضوع چالش برانگیزی است. حرارت دهی غذاها منجر به سهولت هضم، احساس دهانی مناسب و سبب ایمنی میکروبی غذا می‌شود. اما درجه حرارت بالا و پخت طولانی مدت به‌طور قابل‌توجهی می‌تواند محتوای AGEs مواد غذایی را افزایش دهد [۸]. به‌طور مثال، در فرآیندهایی همچون کباب کردن و پختن گوشت، تولید ترکیبات فلئورسانس به‌صورت نمایی افزایش می‌یابد [۹]. بنابراین، پیدا کردن روشی برای به حداقل رساندن میزان AGEs در

با بهبود کیفیت زندگی، تقاضا برای غذاهای با کیفیت در حال افزایش است و مصرف کنندگان نه تنها به رنگ، طعم و مزه غذاها، بلکه به ترکیبات مغذی، کیفیت و ایمنی آن‌ها نیز توجه زیادی دارند. در فرآوری مواد غذایی، اغلب واکنش میلارد برای ایجاد طعم منحصر به فرد و ایجاد رنگ جذاب در آن‌ها اتفاق می‌افتد [۱]. با این حال، این فرآیندها اغلب با خطرات ایجاد ترکیبات شیمیایی ناخواسته همراه هستند. محصولات نهایی گلیکاسیون پیشرفته^۱ (AGEs)، خانواده‌ای از ترکیبات مضر هستند که طی واکنش‌های پیچیده غیرآنزیمی بین قندهای احیا کننده و پروتئین‌ها، لیپیدها یا نوکلئیک اسیدها (واکنش میلارد) تولید می‌شوند. عوامل مختلفی بر میزان تشکیل این ترکیبات اثر گذار است که می‌توان به اجزای مختلف غذا (مانند قند، پروتئین، چربی، آب و غیره)، عوامل موثر طی نگهداری (مانند درجه حرارت، زمان، رطوبت، pH و غیره) و روش‌های فرآوری (مانند بخارپز، جوشاندن، سرخ کردن، پختن، کباب کردن و غیره) اشاره نمود [۲]. تجمع این ترکیبات در بدن می‌تواند منجر به ایجاد بیماری‌های مزمن مانند دیابت نوع ۲، آترواسکلروز و آلزایمر شود [۳].

با توجه به پایداری حرارتی، عمدتاً محصولات نهایی گلیکاسیون به سه دسته زیر تقسیم می‌شوند: (۱) محصولات نهایی گلیکاسیون پیشرفته با پیوند عرضی و خاصیت فلئورسانس مانند: پنتوسیدین، (۲) محصولات نهایی گلیکاسیون پیشرفته با پیوند عرضی و بدون خاصیت فلئورسانس مانند: ایمیدازولیوم دی‌لیزین، (۳) محصولات نهایی گلیکاسیون پیشرفته بدون پیوند عرضی و بدون خاصیت فلئورسانس مانند: N-کربوکسی اتیل‌لیزین (CEL^۲)، N-کربوکسی متیل‌لیزین (CML^۳). در این میان CML و پنتوسیدین از اهمیت ویژه‌ای در بدن برخوردار هستند و به‌عنوان نشانگرهای تجمع محصولات نهایی گلیکاسیون پیشرفته مورد استفاده قرار می‌گیرند. علاوه بر این، ارتباط تنگاتنگ بین خطرات شیمیایی احتمالی در

3-N- carboxymethyllysine

1 Advanced glycation end products

2 -N- carboxyethyllysine

گاوی-گلوکز) پرداختند؛ نتایج نشان داد که این عصاره حاوی لوتئین^۵ و آپی جنین^۶ بوده و خواص مهارکنندگی قابل توجهی دارد [۱۵].

در مطالعه‌ای اثر ۱۴ نوع چاشنی مورد استفاده در مواد غذایی بر واکنش گلیکاسیون ۱- سرم آلبومین گاوی-گلوکز و ۲- سرم آلبومین گاوی-متیل گلی اکسال مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این بررسی نشان داد که در سامانه مدل دوم بیشترین اثر مهارکنندگی مربوط به رازیانه (۸۸ درصد) بوده و بعد از آن به ترتیب دارچین (۸۵ درصد)، فلفل دلمه‌ای (۸۱ درصد) و میخک (۷۹ درصد) قرار داشتند. همچنین در سامانه مدل اول اثر مهارکنندگی پونه کوهی بیشترین بود [۱۶].

در تحقیق دیگری در سال ۲۰۱۹ نشان داده شد که رنگدانه‌های اصلی گوجه فرنگی (لیکوپن، لوتئین و بتا کاروتن) بر واکنش گلیکاسیون تاثیرگذار هستند. با بررسی میزان گلی اکسال، کربوکسی متیل لایزین و پنتوسیدین از طریق طیف سنجی فلورسانس مشخص شد که هر سه رنگدانه اثر مهارکنندگی خوبی بر واکنش گلیکاسیون دارند. در بخش دیگری از این پژوهش اثر مهارکنندگی رنگدانه گوجه فرنگی بر میزان AGEsها و کربوکسی متیل لایزین، در کوکی فرموله شده مورد بررسی قرار گرفت و نتایج نشان داد رنگدانه گوجه فرنگی در سطح ۲/۷ درصد توانسته به ترتیب ۴۶ و ۲۶ درصد از میزان این ترکیبات (AGEs و کربوکسی متیل لایزین) کاهش دهد [۱۷].

در پژوهشی دیگر در سال ۲۰۲۰ اثر ضدگلیکاسیونی ترکیبات فنولی عصاره مریم گلی بررسی شد. نتایج حاصل از این بررسی نشان داد که این عصاره اثراتی مشابه با آمینوگوانیدین داشته و سبب کاهش شدت نشر فلورسانس شده است به طوری که مشخص شد آسیب به آلبومین در حضور این دو ترکیب رزمارینیک اسید و رسوراتول به ترتیب ۵۳ و ۵۰ درصد کاهش یافته است و در مقابل محافظت از گروه‌های تیول پروتئینی به ترتیب ۵۰ و ۴۴ درصد افزایش و تجمع کربونیل پروتئین به ترتیب ۶۷ و ۷۱ درصد کاهش داشته است. بنابراین، عصاره مریم گلی منبع غنی از ترکیبات

غذاها، ضمن حفظ خواص حسی و ایمنی میکروبی قابل قبول، ضروری است. عوامل مؤثر بر گلیکاسیون مانند گونه‌های واکنش دهنده، مقدار آب در دسترس، pH و حضور اکسیژن می‌توانند بر پیشرفت این واکنش تأثیر گذار باشند. بنابراین، با تغییر و کنترل این عوامل، گلیکاسیون کاهش می‌یابد. از طرفی برای مهار تشکیل محصولات نهایی گلیکاسیون پیشرفته مواد سنتزی و طبیعی زیادی پیشنهاد شده است. اگرچه ترکیبات سنتزی توانایی مهارکنندگی قوی تری نسبت به انواع طبیعی دارند اما ممکن است دارای عوارض جانبی باشند. در مقایسه با مهارکننده‌های سنتزی، ترکیبات طبیعی ممکن است انتخاب مناسبی برای استفاده در مواد غذایی برای کاهش محتوی این ترکیبات مضر باشند [۱۰، ۱۱]. پلی‌فنول‌ها بیشترین ترکیبات طبیعی هستند که در سامانه‌های غذایی به‌عنوان عوامل ضدگلیکاسیون مورد استفاده قرار می‌گیرند. اثر ضدگلیکاسیونی آن‌ها بیشتر به فعالیت‌های ضداکسایشی و به دام انداختن دی‌کربونیل‌ها (عامل اصلی حدواسط و مهم پیشرفت واکنش) مربوط است. در حقیقت ضداکسایندها از طریق کی لیت کردن^۴ یون‌های فلزی، جذب گونه‌های رادیکال آزاد، کاهش تنش اکسایشی و همچنین با به دام انداختن ترکیبات کربونیل دار (در مرحله میانی گلیکاسیون) مانع از ادامه واکنش و تشکیل AGEs می‌شوند [۱۲، ۱۳].

در تحقیقی فعالیت ضد گلیکاسیونی عصاره برگ زیتون در بیسکوئیت مورد بررسی قرار گرفت. در این پژوهش از کوئرتستین و گالیک اسید به عنوان استاندارد با فعالیت ضد گلیکاسیونی استفاده شد. بدین ترتیب هر سه ترکیب در محدوده ۰/۲۵-۰/۷۵ درصد (وزنی/وزنی) به نمونه‌های بیسکوئیت اضافه شدند و سپس در دمای ۱۸۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ دقیقه پخته شدند. نتایج نشان داد که نمونه‌های فرموله شده با عصاره برگ زیتون ظرفیت ضدگلیکاسیونی مثبتی در عدم تشکیل پنتوسیدین و CEL دارند [۱۴]. در بررسی دیگری به ارزیابی اثر عصاره برگ توت بر واکنش گلیکاسیون در سامانه مدل (سرم آلبومین

(مانند پنتوسیدین) از طیف سنجی فلورسانس کمک گرفته می‌شود. در این طیف سنجی، طول موج تحریک محصولات نهایی گلیکاسیون پیشرفته بین ۳۰۰ تا ۴۲۰ نانومتر و طول موج نشر آن‌ها بین ۳۵۰ تا ۶۰۰ نانومتر انتخاب می‌شود [۲۳]. از آن جایی که تجمع این ترکیبات در بدن می‌تواند منجر به ایجاد بیماری‌های مزمن مانند دیابت نوع ۲، آترواسکلروز و آلزایمر شود و عصاره پوست انار (PPE⁹) غنی از ترکیبات ضد اکساینده مانند تانن‌ها و ترکیبات فنولی است، می‌تواند توانایی قابل توجهی به عنوان مهار کننده طبیعی AGEs داشته باشد، لذا هدف از مطالعه حاضر، بررسی اثر بازدارندگی عصاره آبی پوست انار بر میزان پیشرفت واکنش گلیکاسیون در شرایط مختلف است. در این تحقیق اثر این عصاره در سامانه‌های مدل حاوی دو نوع پروتئین (کازئین و پروتئین آب پنیر) و سه نوع قند (گلوکز، لاکتوز و فروکتوز) بررسی گردید. برای این منظور میزان نشر فلورسانس نمونه‌ها به عنوان شاخص ارزیابی میزان بازدارندگی عصاره بر تشکیل محصولات نهایی گلیکاسیون پیشرفته (مانند پنتوسیدین) اندازه گیری شد.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد شیمیایی مورد استفاده

قندهای گلوکز، فروکتوز و لاکتوز از شرکت مرک آلمان خریداری شدند. پروتئین کازئین از شرکت سیگما آمریکا و پروتئین آب پنیر از شرکت کارن یزد خریداری شدند. تمام مواد شیمیایی مورد استفاده در این تحقیق دارای بالاترین خلوص بوده و به همان صورت مورد استفاده قرار گرفتند.

۲-۲- استخراج عصاره پوست انار

انارهای سوخته و خراب جدا و انارهای سالم با دست پوست گیری شدند. پوست انارها در سایه و در دمای اتاق خشک شدند و سپس توسط دستگاه آسیاب خرد سپس از الک با مش ۴۰ عبور داده شده و تا زمان استخراج در دمای ۲۰-

پلی فنولی بوده که قادر است از تشکیل AGEs و بیماری‌های مرتبط با آن جلوگیری نماید [۱۸].

انار (*Punica granatum L.*) یک میوه تجاری مهم است که به‌طور گسترده در مناطقی از آسیا، شمال آفریقا، مدیترانه و خاورمیانه کشت می‌شود و ایران یکی از مهم‌ترین تولیدکنندگان و صادرکنندگان انار در جهان است. بخش زیادی از میوه انار را پوست آن تشکیل می‌دهد که معمولاً به مصرف خوراک دام یا رنگرزی می‌رسد و استفاده مفیدتری از آن نمی‌شود. پوست انار منبع سرشاری از ترکیبات فنولی است که دارای خاصیت ضد اکسایشی قوی است و مطالعات زیادی در این زمینه و کاربرد عصاره پوست آن انجام شده است [۱۹، ۲۰]. همچنین عصاره پوست انار حاوی مقادیر زیادی از ترکیبات فنولی، از جمله آنتوسیانین‌ها، الیجیک اسید، پونیکالین، پونیکالاجین، پدونکولاجین و فلاوانول‌ها می‌باشد. همچنین مشخص شده است، عصاره پوست انار نسبت به پالپ و دانه آن ضد اکساینده قوی‌تری به حساب می‌آید و تقریباً ده برابر خاصیت ضد اکسایشی بالاتری دارد [۲۱].

اگرچه در سال‌های اخیر، بسیاری از فناوری‌های جدید مانند طیف سنجی فراطیفی و رامان (مطالعه نوعی از برهم کنش بین نور و ماده) برای تشخیص ویژگی‌های کیفی و ایمنی مواد غذایی توسعه یافته است، اما روش‌های تشخیصی موجود برای AGEs عمدتاً به روش‌های تجزیه دستگاهی و آزمون‌های ایمنی تقسیم می‌شوند. تا به امروز کروماتوگرافی گازی-طیف سنجی جرمی (GC-MS⁷)، کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (همراه با آشکارسازهای مختلف از جمله آشکارساز آرایه دیودها و آشکارساز فلورسانس)، تعیین اثر انگشت با طیف سنجی فلورسانس، طیف سنجی جرمی (MS) و طیف سنجی جرمی-جرمی (MS/MS) از جمله روش‌های تجزیه دستگاهی، و روش الایزا (ELISA⁸) جز آزمون‌های ایمنی بوده که در تعیین میزان AGEs مورد استفاده قرار گرفته‌اند [۲۲]. برای اندازه گیری محصولات نهایی گلیکاسیون پیشرفته فلورسانس

9 -Pomegranate peel extract

7 -Gas chromatography- Mass spectrometry

8 -Enzyme-linked immunosorbent assay

از روش سطح پاسخ (RSM¹⁰) طرح (CCF¹¹) طراحی شدند. به طور کلی برای طراحی سامانه‌های مدل از سه متغیر وابسته و در سه سطح عبارت بودند از: غلظت قندهای فروکتوز و گلوکز (۰/۲، ۰/۶ و ۱/۰ مولار) و لاکتوز (۰/۱، ۰/۳ و ۰/۵ مولار)، پروتئین آب پنیر با غلظت (۲/۰، ۳/۵ و ۵/۰ درصد وزنی/حجمی) و کازئین با غلظت (۱/۰، ۲/۰ و ۳/۰ درصد وزنی/حجمی) و غلظت عصاره پوست انار ۲۵۰، ۵۰۰ و ۷۵۰ قسمت در میلیون (جدول ۱).

درجه نگهداری شدند. در ادامه حلال آب مقطر به نسبت ۱: ۴ با پودر پوست انار مخلوط و عمل استخراج به روش غرقابی به مدت ۸ ساعت و در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد انجام گردید. عصاره استخراجی توسط کاغذ واتمن شماره ۴۱ صاف شد تا مواد زاید و اضافی از آن جدا شود. عصاره توسط دستگاه تبخیر کننده چرخان (تحت خلأ و در دمای ۴۵ درجه سانتی گراد) تغلیظ گردید.

۳-۲- تهیه و آماده سازی نمونه‌ها

پایه و اساس کلی تمام واکنش‌های انجام شده در مدل‌های این تحقیق، قند و پروتئین بود که تیمارهای مختلف با استفاده

Table 1. Designed models for investigating the inhibitory effect of studied extract on glycation reaction*.

Run No.	Protein	Sugar	Extract
1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1
3	-1	1	-1
4	1	1	-1
5	-1	-1	1
6	1	-1	1
7	-1	1	1
8	1	1	1
9	-1	0	0
10	1	0	0
11	0	-1	0
12	0	1	0
13	0	0	-1
14	0	0	1
15	0	0	0
16	0	0	0
17	0	0	0

* -1, 0, and, 1 means lowest, central, and highest level of independent variables, respectively. Extract (PPE, 250, 500, and 750 ppm); Sugar Glucose (0.2, 0.6, and 1.0 M), Fructose (0.2, 0.6, and 1.0 M), and Lactose (0.1, 0.3, and 0.5 M); Protein (Whey, 2.0, 3.5, and 5.0 % w/v and Casein, 1.0, 2.0 and 3.0 % w/v).

به مدت ۷ روز در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد انجام شد. پس از طی این مدت، ۱۰۰ میکرولیتر از مخلوط واکنش در میکروپلیت ۳۸۴ خانه (Corning, USA) ریخته شدند و در دستگاه اندازه گیری فلوروسانس Cytation 3 ساخت شرکت بیوتک آمریکا قرار داده شدند. طول موج تحریک ۳۴۰ نانومتر و طول موج نشر در ۴۳۰ نانومتر تنظیم شدند.

۲-۲- شرایط واکنش گلیکاسیون

پانصد میکرولیتر از قند و پروتئین با غلظت مشخص شده در جدول ۱ با یکدیگر مخلوط شدند. سپس ۱۰۰ میکرولیتر عصاره در غلظت‌های از قبل تعیین شده آن‌ها اضافه شد. در نهایت ۲۰ میکرولیتر سدیم آزید به منظور جلوگیری از کپک زدن و فساد به مخلوط‌ها اضافه شد. سپس گرمخانه گذاری

۳-۱- اثر بازدارندگی عصاره پوست انار در سامانه مدل حاوی پروتئین آب پنیر

جدول ۲ پارامترهای طرح RSM را برای سامانه‌های مدل پروتئین آب پنیر + عصاره پوست انار + سه قند مورد مطالعه را نشان می‌دهد. نتایج نشان می‌دهند که مدل برازش شده برای تیمار پروتئین آب پنیر + فروکتوز دارای صحت ۹۵ درصد بوده و همچنین تکرار پذیری بالایی دارد که این عدد برای سامانه‌های حاوی قندهای گلوکز و لاکتوز به ترتیب ۹۴ و ۸۷ درصد بود. از طرفی اعتبار سنجی مدل قدرت پیش بینی آن را نشان می‌دهد که با بررسی اختلاف میزان بازدارندگی تیمار بهینه پیش بینی شده و واقعی نیز می‌توان به توانایی پیش‌بینی مدل پی‌برد.

پس از اندازه‌گیری میزان نشر و مقایسه آن با نمونه شاهد میزان بازدارندگی هریک تیمارها بر اساس رابطه زیر محاسبه شد:

$$\text{Inhibition (\%)} = [(F_c - F_s)/F_c] \times 100$$

که F_c و F_s به ترتیب مقدار نشر کنترل و نمونه هستند.

۳-۲- تجزیه و تحلیل آماری

در این تحقیق از روش صفحه پاسخ طرح CCF استفاده شد و در مجموع برای هر نوع پروتئین ۱۷ فرمول (جدول ۱) آماده و آزمایش شد. آزمایش‌ها با سه تکرار انجام شد و تجزیه و تحلیل داده‌ها با نرم افزار 7 MODDE® شرکت سارتریوز (ایتالیا) انجام گرفت.

۳-نتایج و بحث

Table 2. RSM model validation parameters of pomegranate peel extract + whey protein + sugar.

Model	R ²	R ² Adj.	Q ² 13	RSD ¹²	Repeatability
Whey + Glucose	0.94	0.92	0.90	2.76	0.93
Whey + Fructose	0.95	0.94	0.92	0.95	0.95
Whey + Lactose	0.87	0.84	0.78	5.29	0.86

نوع قند بر واکنش گلیکاسیون، حضور قند سبب کاهش انحلال اکسیژن در محیط آبی، مهار اکسیژن آزاد و تشکیل کی لیت یون‌های فلزی شده و در نتیجه از اکسایش ترکیبات فنولی جلوگیری می‌نماید [۲۴]. بنابراین، قند به دلیل واکنش پذیری، علاوه بر شرکت در واکنش قهوه‌ای شدن، از ترکیبات فنولی موجود در عصاره نیز محافظت کرده و سبب کاهش تشکیل محصولات گلیکاسیون پیشرفته می‌گردد. بیشترین اثر عصاره انار در سامانه مدل حاوی لاکتوز دیده شد اما به طور کلی در تمام فرمولاسیون‌های دارای پروتئین آب پنیر عصاره انار به طور قابل توجهی توانست از واکنش گلیکاسیون جلوگیری نماید و به طور میانگین ضریب اثر آن ۱۱/۵ - ۱۵/۰ بود.

جدول ۳ اثرات اصلی و متقابل پارامترهای موثر در واکنش گلیکاسیون و نیز تاثیر عصاره مورد مطالعه را نشان می‌دهد. نتایج نشان داد که غلظت پروتئین آب پنیر تاثیر منفی در بازدارندگی واکنش دارد یعنی با افزایش غلظت آن واکنش گلیکاسیون با شدت بیشتری انجام می‌شود. اثر متقابل پروتئین-قند فروکتوز نیز بیشترین تاثیر را داشت و درصد بازداری را کاهش می‌داد و قند لاکتوز کمترین تاثیر را در کاهش درصد بازداری عصاره داشت. برخلاف نمونه‌های شاهد، که با افزایش مقدار قند گلیکاسیون افزایش پیدا کرد، در حضور عصاره پوست انار با افزایش غلظت قند میزان پیشرفت واکنش گلیکاسیون کمتر شد. برای این موضوع سه دلیل اصلی ارائه شده است. در حقیقت علاوه بر تاثیر مهم

Table 3. Regression coefficients of predicted quadratic polynomial models for the response of antiglycation activity of pomegranate peel extract (PPE) in model system containing whey protein

Independent variable	Glucose		Fructose		Lactose	
	Coeff. SC	p-value	Coeff. SC	p-value	Coeff. SC	p-value

12 -Relative standard deviation (RSD)

13 -Q2 is the median value in the set.

Total constant	70.12	0.00	78.62	0.00	73.27	0.00
Protein	-4.03	0.00	-4.44	0.00	-2.83	0.00
Sugar	2.11	0.00	3.04	0.00	2.23	0.02
Extract	11.43	0.00	13.98	0.00	14.99	0.00
Protein × Protein	0.30	0.75*	-0.37	0.72*	4.78	0.01
Sugar × Sugar	-2.92	0.00	-3.75	0.00	-5.63	0.00
Extract × Extract	-3.38	0.00	-4.50	0.00	-6.26	0.00
Protein × Sugar	0.14	0.79*	-1.67	0.00	-1.77	0.10*
Extract × Protein	1.17	0.04	3.92	0.00	1.56	0.15*
Sugar × Extract	-2.53	0.00	-1.32	0.03	-0.45	0.67*

* No significant difference observed ($p < 0.05$).

در شکل ۱ نیز می‌توان مشاهده و پیش بینی نمود که اثر بازدارندگی عصاره پوست انار (در غلظت ۷۵۰ ppm) در غلظت‌های مختلف پروتئین و قند بیشترین بازدارندگی را در مدل‌های حاوی پروتئین آب پنیر داشت.

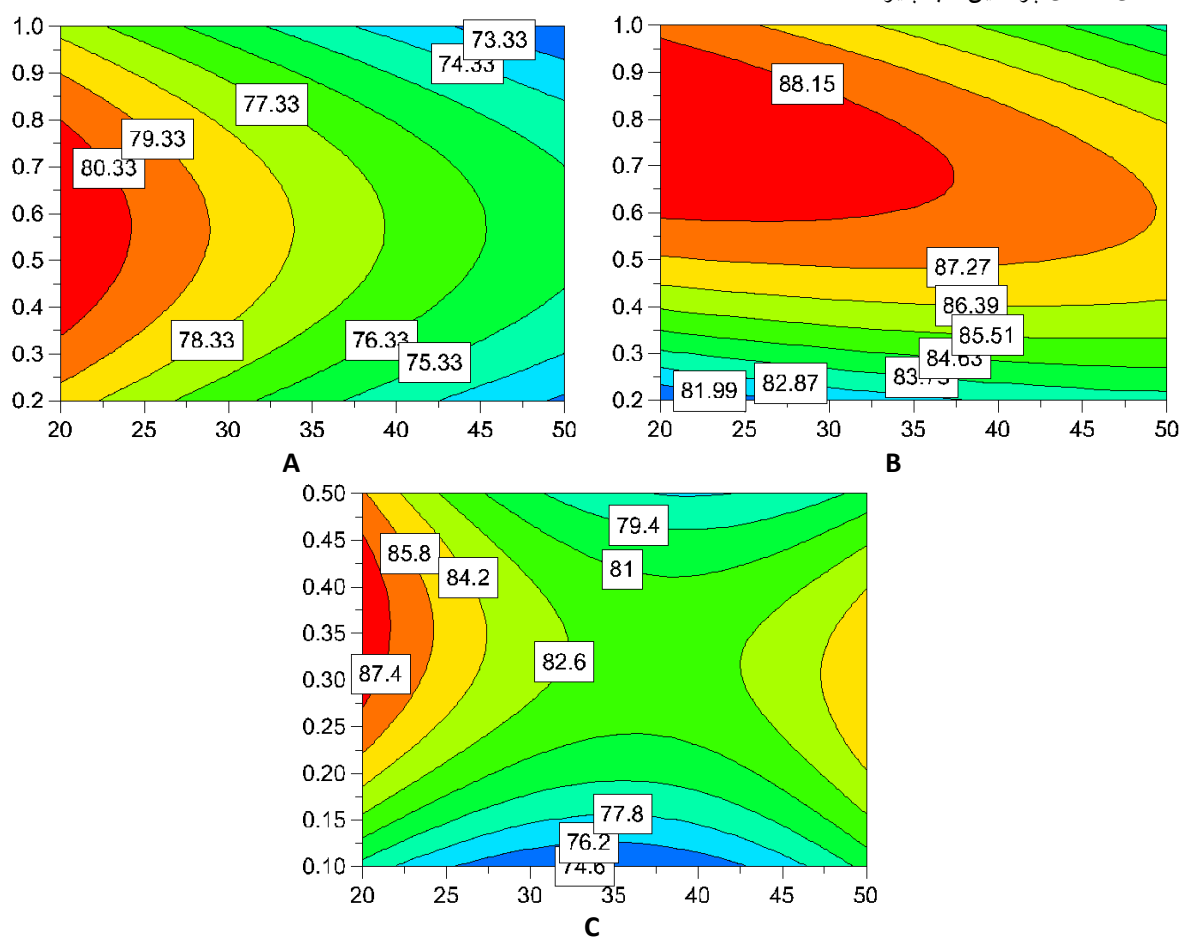


Figure 1. The color map of antiglycation activity in the model system containing whey protein and pomegranate peel extract (750 ppm). A: containing glucose; B: containing fructose; C: containing lactose. The horizontal axis shows protein concentration (% w/v × 100) and the vertical axis shows sugar concentration (M).

همچنین این مدل‌ها دارای تکرار پذیری و اعتبار قابل قبولی هستند (جدول ۴).

۲-۳ اثر بازدارندگی عصاره پوست انار در سامانه مدل پروتئین کازئین

صحت این مدل برای فرمول‌های حاوی قند گلوکز، فروکتوز و لاکتوز به ترتیب ۹۱، ۸۹ و ۹۰ درصد است.

Table 4. RSM model validation parameters of pomegranate peel extract + casein + sugar.

Model	R ²	R ² Adj.	Q ²	RSD	Repeatability
Casein + Glucose	0.91	0.89	0.86	5.35	0.90
Casein + Fructose	0.89	0.87	0.85	4.84	0.89
Casein + Lactose	0.90	0.88	0.84	4.33	0.87

میانی گلیکاسیون، مانع از تشکیل محصولات نهایی گلیکاسیون پیشرفته شدند [۲۵].

در مرحله اولیه گلیکاسیون، گروه کربونیل کربوهیدرات احیاکننده با گروه آمینو آزاد روی پروتئین یا آمینو اسیدها متراکم شده و محصولات آمادوری را تشکیل می‌دهد که این موضوع سبب افزایش جرم پروتئین‌ها نیز می‌شود. در بررسی انجام شده توسط لیو و همکاران روی اثر ترکیبات عصاره انار بر واکنش گلیکاسیون در سامانه مدل آلبومین سرم گاوی و فروکتوز، دریافتند که در مرحله اولیه گلیکاسیون ترکیب فنولی همچون گالیک اسید (در مقایسه با پونیکالاجین اسید و الاجیک اسید مقدار بسیار کمی از آن در عصاره انار وجود دارد) که معمولا در بسیاری از منابع گیاهی وجود دارد، اثر بازدارندگی قابل توجهی در تشکیل فرآورده‌های اولیه گلیکاسیون ندارد [۲۶]. در حالی که پونیکالاجین اسید و الاجیک اسید در مراحل اولیه گلیکاسیون نقش مهمی در مهارکنندگی داشتند. البته نویسندگان فوق اثر عصاره انار را در مرحله میانی گلیکاسیون نیز مطالعه نمودند. همانطور که معلوم است در مرحله میانی گلیکاسیون، محصولات آمادوری تولید می‌شود و در نهایت باعث تولید AGE‌های فلئورسانس (مانند پتوسیدین) می‌گردد. در مطالعه لیو و همکاران پس از انجام واکنش گلیکاسیون، شدت نشر فلئورسانس هر نمونه برای تشخیص AGE‌های فلئورسانس تشکیل شده در مرحله میانی اندازه‌گیری شد. نتایج این مطالعه نشان داد که قدرت مهارکنندگی پونیکالاجین اسید، الاجیک اسید و گالیک اسید به ترتیب ۹۰،

جدول ۵ اثرات اصلی و متقابل پارامترهای موثر در بازداری از واکنش گلیکاسیون را نشان می‌دهد. نظیر نتایج بخش ۳-۱، اثر پروتئین با ضریب منفی نشان داد که با افزایش غلظت کازئین اثر بازدارندگی عصاره کاهش می‌یابد و همچنین با مقایسه نتایج این دو پروتئین می‌توان دریافت که در سامانه حاوی کازئین میزان کاهش فعالیت بازدارندگی عصاره نسبت به سامانه حاوی پروتئین آب پنیر، احتمالاً به دلیل اختلاف در ساختار و ترکیب اسیدآمینه‌ای پروتئین، بیشتر است و سرعت واکنش گلیکاسیون و تشکیل AGEs در مدل حاوی کازئین بیشتر است. اثر قند با ضریب مثبت همانند نتایج بخش ۳-۱ مثبت بود و عصاره پوست انار سبب کاهش واکنش گلیکاسیون شد. همچنین در مجموع عصاره پوست انار توانست از واکنش گلیکاسیون به طور قابل توجهی جلوگیری نماید.

عصاره پوست انار حاوی مقادیر زیادی از ترکیبات فنولی، از جمله آنتوسیانین‌ها، الاجیک اسید، پونیکالین، پونیکالاجین، پدونکولاجین و فلاوانول‌ها است که خواص ضداکسایشی بالایی دارند [۲۰]. همان‌طور که قبلاً گزارش شده این ترکیبات از طریق فعالیت‌های ضداکسایشی و به دام انداختن دی‌کربونیل‌ها سبب مهار واکنش گلیکاسیون می‌شوند. علاوه بر این، در سامانه‌های مدل مورد مطالعه، این ضداکساینده‌ها با کی لیت کردن یون‌های فلزی، جذب گونه‌های رادیکال آزاد و کاهش تنش اکسایشی در مرحله

توت فرنگی، توت و هلو نسبت به عصاره سیب اثر بهتری داشتند. اما بیشترین اثر مهارکنندگی مربوط به نمونه‌های دارای عصاره انار بودند [۲۷].

۶۰ و ۷۰ درصد بود که نمایانگر قدرت بازدارندگی بیشتر پونیکالاجین در این واکنش دارد [۲۶]. در پژوهش دیگری اثر عصاره میوه‌های مختلف را در واکنش گلیکاسیون بررسی کردند. نتایج این تحقیق نشان داد که عصاره سیب نسبت به نمونه کنترل اثر معنی داری نداشته است. درحالی که عصاره

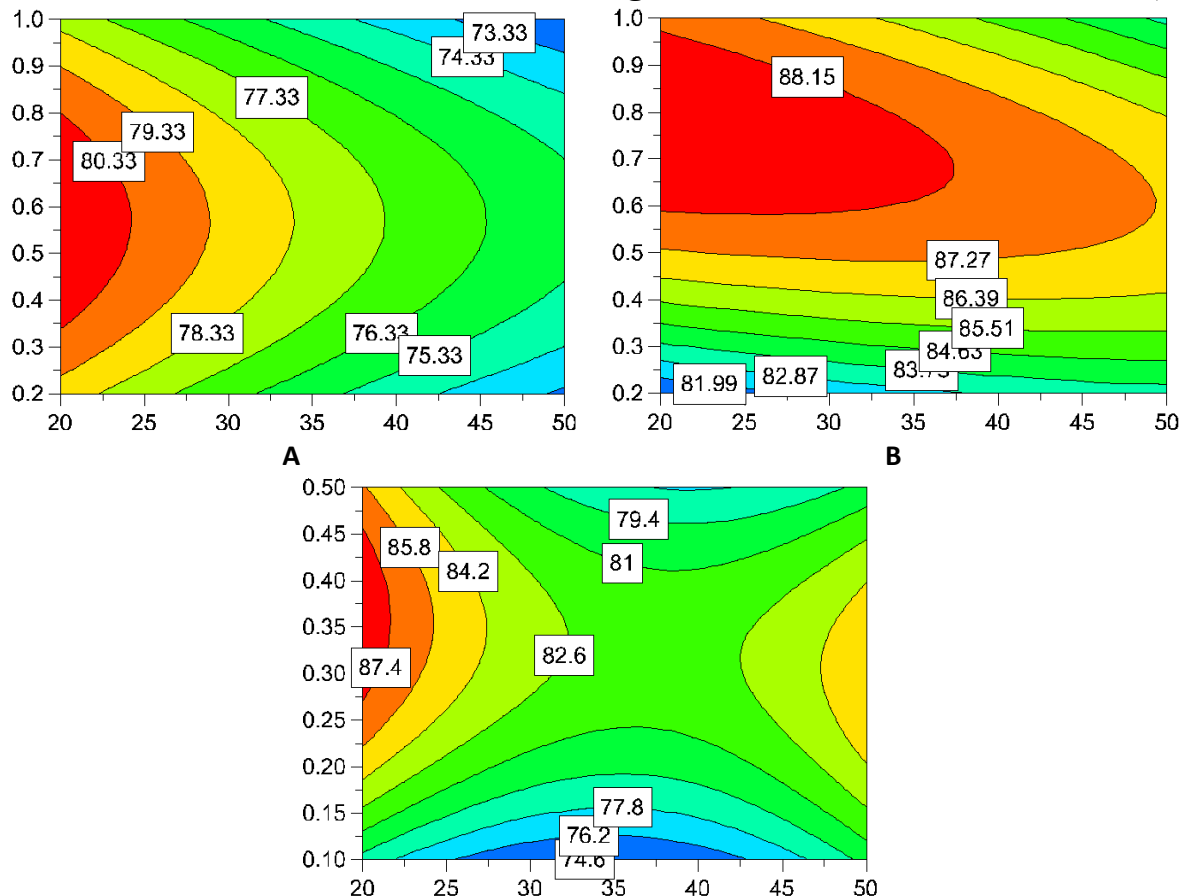
Table 5. Regression coefficients of predicted quadratic polynomial models for the response of antiglycation activity of pomegranate peel extract (PPE) in model systems containing casein.

Independent variable	Glucose		Fructose		Lactose	
	Coeff. SC	p-value	Coeff. SC	p-value	Coeff. SC	p-value
Total constant	73.33	0.00	70.37	0.00	60.17	0.00
Protein	-11.66	0.00	-9.18	0.00	-8.83	0.00
Sugar	2.14	0.03	2.23	0.01	2.93	0.00
Extract	15.95	0.00	12.96	0.00	11.88	0.00
Protein × Protein	-1.87	0.32*	-3.34	0.06*	3.57	0.02
Sugar × Sugar	-5.07	0.01	-0.35	0.83*	-1.15	0.45*
Extract × Extract	-1.57	0.40*	0.46	0.78*	02.15	0.16*
Protein × Sugar	2.06	0.06*	-1.51	0.13*	-2.45	0.00
Extract × Protein	-0.52	0.63*	0.35	0.72	2.92	0.00
Sugar × Extract	-1.53	0.16*	-4.09	0.00	-3.25	0.00

* No significant difference observed ($p < 0.05$).

این نقشه کتابخانه‌ای از اطلاعات در رابطه با میزان بازدارندگی عصاره در واکنش گلیکاسیون است.

در شکل ۲ نیز می‌توان مشاهده و پیش بینی نمود که اثر بازدارندگی عصاره پوست انار (در غلظت ۷۵۰ ppm) در کدام یک از مدل‌های کازئین + قند بیشترین است. در واقع



C

Figure 2. The color map of antiglycation activity in the model system containing casein and pomegranate peel extract (750 ppm). A: containing glucose; B: containing fructose; C: containing lactose. The horizontal axis shows protein concentration (% w/v × 100) and the vertical axis shows sugar concentration (M).

پروتئین آب پنیر اثر منفی بیشتری بر درصد بازداری گلیکاسیون داشت و با این که کازئین به دلیل حلالیت کمتر نسبت به پروتئین آب پنیر از غلظت کمتری از آن استفاده شد، اما در نهایت منجر به تشکیل مقدار زیادی محصولات نهایی گلیکاسیون پیشرفته شد. نتایج این مطالعه نشان داد که نوع پروتئین و قند بر مقدار تشکیل محصولات نهایی گلیکاسیون پیشرفته موثر بوده و استفاده از ترکیبات فنولی پوست انار می‌تواند مانع از تشکیل این ترکیبات شود. به نظر می‌رسد با انجام بررسی‌های بیشتر و کامل تر می‌توان این عصاره را برای کنترل تشکیل محصولات نهایی گلیکاسیون پیشرفته (AGEs)، در مواد غذایی پیشنهاد داد.

۵- تشکر و قدردانی

از معاونت پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس و نیز معاونت پژوهشی مرکز تحقیقات آزمایشگاهی غذا و دارو، سازمان غذا و دارو، وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی بابت حمایت مالی از این تحقیق (موضوع قرارداد شماره ۶۸۷/۹۸۵۶۲/د مورخ ۱۳۹۹/۸/۱۰، کد Pr984601) تشکر می‌گردد.

۶- منابع

- [1] Poulsen, M. W., Hedegaard, R. V., Andersen, J. M., de Courten, B., Bügel, S., Nielsen, J., & Dragsted, L. O. (2013). Advanced glycation endproducts in food and their effects on health. *Food and Chemical Toxicology*, 60, 10- 37.
- [2] Zhang, G., Huang, G., Xiao, L., & Mitchell, A. E. (2011). Determination of advanced glycation end products by LC-MS/MS in raw and roasted almonds (*Prunus dulcis*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(22), 12037-12046.
- [3] Singh, V. P., Bali, A., Nirmal Singh, N., & Jaggi, A. S. (2014). Advanced glycation end products and diabetic complications. *Korean Journal of Physiological Pharmacology*, 18 (1), 1- 14.
- [4] Davis, K. E., Prasad, C., Vijayagopal, P., Juma, S., & Imrhan, V. (2016). Advanced glycation end

۴- نتیجه گیری

در این مطالعه اثر غلظت‌های مختلف عصاره پوست انار (حاوی ترکیبات فنولی) بر چند سامانه مدل حاوی دو نوع پروتئین (آب پنیر و کازئین)، سه نوع قند (گلوکز، فروکتوز و لاکتوز) بر بازداری از تشکیل محصولات گلیکاسیون پیشرفته فلئورسانس مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که با افزایش غلظت پروتئین میزان واکنش گلیکاسیون با سرعت بیشتری پیش می‌رود. همچنین تاثیر متقابل پروتئین و قند منفی بود که نشان دهنده افزایش شدت گلیکاسیون است. در حضور عصاره پوست انار با افزایش غلظت قند میزان پیشرفت واکنش گلیکاسیون کمتر شد. حضور قند سبب کاهش انحلال اکسیژن در محیط آبی، مهار اکسیژن آزاد و کی‌لیت کردن یون‌های فلزی شده و در نتیجه از اکسایش ترکیبات فنولی جلوگیری می‌نماید. بیشترین اثر عصاره پوست انار در سامانه مدل حاوی لاکتوز مشاهده شد اما در مجموع در تمام مدل‌های دارای پروتئین آب پنیر عصاره پوست انار به طور قابل توجهی توانست از واکنش گلیکاسیونی جلوگیری نماید. استفاده از کازئین نسبت به

- products, inflammation, and chronic metabolic diseases: Links in a chain?. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(6), 989-998.
- [5] Wang, Z., Jiang, Y., Liu, N., Ren, L., Zhu, Y., An, Y., & Chen, D. (2012). Advanced glycation end-product Ne-carboxymethyl-lysine accelerates progression of atherosclerotic calcification in diabetes. *Atherosclerosis*, 221(2), 387-396.
 - [6] Delgado-Andrade, C., & Fogliano, V. (2018). Dietary advanced glycosylation end-products (dAGEs) and melanoidins formed through the Maillard reaction: physiological consequences of their intake. *Annual Review of Food Science and Technology*, 9, 271- 291.

- [7] Dariya, B. & Nagaraju, G. P. (2020). Advanced glycation end products in diabetes, cancer and phytochemical therapy. *Drug Discovery Today*, 25 (9), 1614- 1623.
- [8] Uribarri, J., Woodruff, S., Goodman, S., Cai, W., Chen, X., Pyzik, R., & Vlassara, H. (2010). Advanced glycation end products in foods and a practical guide to their reduction in the diet. *Journal of the American Dietetic Association*, 110(6), 911-916.
- [9] Bombo Trevisan, A. J., de Almeida Lima, D., Sampaio, G. R., Manólio Soares, R. A., & Markowicz Bastos, D. H. (2016). Influence of home cooking conditions on Maillard reaction products in beef. *Food Chemistry*, 196, 161-169.
- [10] Wu, Q., Chen, H., Lv, Z., Li, S., Hu, B., Guan, Y., & Sun, Z. (2013). Oligomeric procyanidins of lotus seedpod inhibits the formation of advanced glycation end-products by scavenging reactive carbonyls. *Food Chemistry*, 138, 1493-1502.
- [11] Babu, P. V. A., Sabitha, K. E., & Shyamaladevi, C. S. (2008). Effect of green tea extract on advanced glycation and cross-linking of tail tendon collagen in streptozotocin induced diabetic rats. *Food and Chemical Toxicology*, 46(1), 280-285.
- [12] Peng, X., Ma, J., Chen, F., & Wang, M. (2011). Naturally occurring inhibitors against the formation of advanced glycation end-products. *Food & Function*, 2(6), 289- 301.
- [13] Reddy, V. P., & Beyaz, A. (2006). Inhibitors of the Maillard reaction and AGE breakers as therapeutics for multiple diseases. *Drug Discovery Today*, 11(13-14), 646- 654.
- [14] Navarro, M., Morales, F. J., & Ramos, S. (2017). Olive leaf extract concentrated in hydroxytyrosol attenuates protein carbonylation and the formation of advanced glycation end products in a hepatic cell line (HepG2). *Food & Function*, 8(3), 944-953.
- [15] Anandan, S., Mahadevamurthy, M., Ansari, M. A., Alzohairy, M. A., Alomary, M. N., Farha Siraj, S., & Urooj, A. (2019). Biosynthesized ZnO-NPs from *Morus indica* attenuates methylglyoxal-induced protein glycation and RBC damage: In-vitro, in-vivo and molecular docking study. *Biomolecules*, 9(12), 882.
- [16] Starowicz, M., & Zieliński, H. (2019). Inhibition of advanced glycation end-product formation by high antioxidant-leveled spices commonly used in European cuisine. *Antioxidants*, 8(4), 100.
- [17] Guo, W., Zhou, Q., Jia, Y., & Xu, J. (2019). Increased levels of glycated hemoglobin A1c and iron deficiency anemia: a review. *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, 25, 8371.
- [18] Khedher, M. R. B., Hafsa, J., Haddad, M., & Hammami, M. (2020). Inhibition of Protein Glycation by Combined Antioxidant and Antiglycation Constituents from a Phenolic Fraction of Sage (*Salvia officinalis* L.). *Plant Foods for Human Nutrition*, 75(4), 505-511.
- [19] Yasoubi, P., Barzegar, M., Sahari, M. A., & Azizi, M. H. (2007). Total phenolic contents and antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum* L.) peel extracts. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 9, 35-42.
- [20] Aliyari, P., Bakhshi Kazaj, F., Barzegar, M., Ahmadi Gavlighi, H. (2020). Production of functional sausage using pomegranate peel and pistachio green hull extracts as natural preservatives. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 9, 35- 42.
- [21] González-Molina, E., Moreno, D. A., & García-Viguera, C. (2009). A new drink rich in healthy bioactives combining lemon and pomegranate juices. *Food Chemistry*, 115(4), 1364- 1372.
- [22] Noda, Y., & Peterson, D. G. (2007). Structure– reactivity relationships of flavan-3-ols on product generation in aqueous glucose/glycine model systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(9), 3686- 3691.
- [23] Wei, Q., Liu, T., & Sun, D. W. (2018). Advanced glycation end-products (AGEs) in foods and their detecting techniques and methods: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 82, 32-45.
- [24] Li, J. X., Fang, H. J., Hu, H. X., & Li, L. X. (2011). Recent advances in research on dietary advanced glycation end products. *Food Science*, 32(21), 293- 297.
- [25] Shpigelman, A., Zisapel, A., Cohen, Y., & Livney, Y. D. (2013). Mechanisms of saccharide protection against epigallocatechin-3-gallate deterioration in aqueous solutions. *Food Chemistry*, 139(1-4), 1105- 1112.
- [26] Dorsey, P. G., & Greenspan, P. (2014). Inhibition of nonenzymatic protein glycation by pomegranate and other fruit juices. *Journal of Medicinal Food*, 17(4), 447-454.
- [27] Liu, W., Ma, H., Frost, L., Yuan, T., Dain, J. A., & Seeram, N. P. (2014). Pomegranate phenolics inhibit formation of advanced glycation endproducts by scavenging reactive carbonyl species. *Food & Function*, 5(11), 2996- 3004.



Scientific Research

Investigating the inhibitory effect of pomegranate peel extract on the formation of advanced glycation end products (AGEs) in the model systems

Aghdas Taslimi¹, Mohsen barzegar^{2*}, Mohammad Ali Shari², Khadijeh Khoshtinat³, Mohammad Hossein Azizi², Shahram Shoeibi⁴, Soheyl Eskandari^{5,6}

1-Ph.D. candidate of Food Science and Technology, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

2-Full Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, P.O. Box 14115-336, Tehran, Iran.

3-Assistant Professor, Department of Food Technology Research, Faculty of Nutrition Sciences and Food Technology, National Nutrition and Food Technology Research Institute, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, P.O. Box: 19395-4741, Tehran, Iran.

4-Full Professor, Food and Drug Laboratory Research Center, Food and Drug Organization, Ministry of Health and Medical Education.

5-Associate Professor, Food and Drug Laboratory Research Center (FDLRC), General Directorate of Food, Drug and Medical Equipment Control Laboratories, Food and Drug Administration (FDA), Tehran, Iran

6-Associate Professor, Food Sciences Department, School of Nutritional Sciences and Dietetics, Tehran University of Medical Sciences (TUMS), Tehran, Iran.

ARTICLE INFO

ABSTRACT

Article History:

Received:2024/2/3

Accepted:2024/3/9

Keywords:

Advanced glycation end products (AGEs), casein, pistachio green hull, pomegranate peel extract, whey protein.

DOI: 10.22034/FSCT.21.151.174.

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

Advanced glycation end products (AGEs) are a group of compounds formed during the Maillard reaction, which can have adverse effects. This study aims to investigate the formation of fluorescent AGEs using the response surface method (RSM). Factors such as protein type ((whey protein, 2.0, 3.5, and 5.0% w/v) and casein (1.0, 2.0, and 3.0% w/v)), sugar type ((glucose and fructose (0.2, 0.6, and 1.0 M) and lactose (0.1, 0.3, and 0.5 M)), and pomegranate peel extract (PPE, 250.0, 500.0, and 750.0 ppm) along with their interactions are analyzed. The results of this study showed that, the type of protein, type of sugar, and concentration of phenolic extract from pomegranate peel were effective in preventing the formation of AGEs, and the pomegranate peel extract was able to effectively prevent glycation reaction (specially at 750.0 ppm). According to the results, protein type and concentration significantly influence AGEs formation. The inhibitory activity of the extract in the model system containing casein was lower than system containing whey protein, and overall, the inhibitory power decreased with an increase in protein concentration. By changing the type of sugar present in the model system, the inhibitory behavior of the pomegranate peel extract became complex, showing increased, decreased, or no effect in some cases. Further investigations can suggest the use of this extract, especially in the formulation of food products, including infant formulas.