نشریه علوم دامی
(پژوهش و سازندگی)

شماره ۱۱۸، بهار ۱۳۹۷
ص‌ص: ۱۴۹~۱۶۰

بهینه سازی شرایط تولید پپتیدهای زیست فعال حاصل از هیدرولیز آنزیمی پروتئین گرده زنبور عسل توسط آنزیم گوارشی تریپسین، و مقایسه آن با ژله رویال

- **عاطفه مقصودلو**
دانشجوی دکتری رشته شیمی مواد غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
- **علیرضا صادقی ماهونک** (نویسنده مسئول)
دانشیار گروه شیمی مواد غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان.
- **محمد قربانی**
دانشیار گروه شیمی مواد غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان.
- **فیدل تولدرا**
استاد گروه بیوشیمی، دانشگاه والنسیا، اسپانیا

تاریخ دریافت : آبان ۱۳۹۵ تاریخ پذیرش : شهریور ۱۳۹۶

شماره تماس نویسنده مسئول: ۰۹۱۱۳۷۷۹۳۰۷
Email: Sadeghiaz@gmail.com

چکیده

ویژگی‌آنتی‌اکسیدانی گرده و ژله رویال مربوط به پروتئین‌ها و ترکیبات فنولی آنها می‌باشد. در این پژوهش تاثیر هیدرولیز آنزیمی پروتئین‌های گرده گل توسط آنزیم گوارشی تریپسین بر خواص آنتی اکسیدانی آن و بهینه سازی شرایط هیدرولیز آنزیمی بررسی شد و نتایج آن با ویژگی آنتی‌اکسیدانی ژله رویال مقایسه گردید. بدین منظور ابتدا ترکیبات فنولی، فعالیت مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد، DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)، قدرت احیاکنندگی یون فریک گرده گل و ژله رویال اندازه گیری شد. مقادیر این فاکتورها برای غلظت ۱۰۰۰ میلی گرم بر لیتر گرده گل و ژله رویال، به ترتیب ۱۷٤ و ۱۰۳۱/۷۱ میلی‌گرم اسیدگالیک بر گرم نمونه، ٦۷/۳۳ و ۹۵/۲۷ درصد و جذب ۰/۸ و ۰/۷۷ در طول موج ۷۰۰ نانومتر بود. بیشترین قدرت احیاکنندگی تیمارهای هیدرولیز شده با آنزیم تریپسین ۱/۵ درصد و مدت زمان هیدرولیز ۲/۵ ساعت، ۰/٦٦۸ بود. بیشترین قدرت مهار رادیکال DPPH تیمارهای هیدرولیز شده با آنزیم تریپسین ۱/۵درصد و مدت زمان هیدرولیز ٤ ساعت، ۷۹/۸ درصد بود. نتایج نشان داد با انجام عمل هیدرولیز، ویژگی آنتی‌اکسیدانی گرده گل، نسبت به حالتی که عملیات هیدرولیز انجام نشده، افزایش پیدا کرد. این افزایش، در قدرت مهار رادیکال DPPH واضح‌تر بود. بطوری که از ٦۷/۳۳ درصد در گرده هیدرولیز نشده، به ۷۹/۸ درصد در گرده هیدرولیز شده با تریپسین ارتقا پیدا کرد. بعد از انجام عمل هیدرولیز، قدرت مهار رادیکال گرده گل، به قدرت مهار رادیکال ژله رویال (۹۵/۲۷ درصد) نزدیک‌تر شد. این مسئله نشان می‌دهد با هیدرولیز پروتئین‌های گرده گل، تا حدی می‌توان آنها را به پپتیدهای موجود در ژله رویال نزدیک کرد.

واژه‌های کلیدی: گرده گل، ژله رویال، فعالیت آنتی اکسیدانی، تریپسین، پپتیدهای زیست فعال

Animal Science Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 118 pp: 149-160

Optimization of production of bioactive peptides derived from the enzymatic hydrolysis of bee pollen protein, by trypsin and comparison with the royal jelly

By: Atefe Maqsoudlou [1], Alireza Sadeghi Mahoonak *[2], Mohamad Ghorbani[2], Fidel Toldra[3]
1: PhD student, food chemistry ,Gorgan university of agricultural sciences and natural resources, Department of Food Science & Technology, Iran.
2: Associate, food chemistry,Gorgan university of agricultural sciences and natural resources, Department of Food Science & Technology ,Iran. (Sadeghiaz@yahoo.com)
3: Professor -Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (CSIC), Avenue Agustín Escardino 7, 46980 Paterna, Valencia, Spain.

Received: October 2016 **Accepted: August 2017**

In this study, effect of hydrolysis enzymatic from pollen protein by Trypsin on its antioxidant properties and optimization of enzymatic hydrolysis condition was investigated and the results were compared with Royal Jelly antioxidant properties. For this purpose, phenolic compounds, DPPH free radical scavenging activity and ferric ion reducing power of pollen and royal jelly was measured. The values of these factors for pollen and royal jelly in concentration of 1000 ppm, were respectively, 174 and 1031.71 mg Gallic acid per gram sample, 67.33% and 95.27% and absorbance of 0.77 and 0.8 in a wavelength of 700 nm. The highest reducing power, in samples hydrolyzed by trypsin 1.5% for 2.5 hours, was 0.668. The highest scavenging power of DPPH radicals, in samples hydrolyzed by trypsin 1.5% for 4 hours, was 79.8%. Results showed that antioxidant properties of pollen were increased by hydrolysis. The increase was clearer in DPPH radical scavenging power than reducing power. So that, radical scavenging power increased from 67.33% to 97.8%. After hydrolysis, radical scavenging power of pollen, partly became close to radical scavenging power of Royal Jelly (95.27%). It is possible to be close the peptides of pollen to the peptides contained in Royal Jelly by hydrolysis of pollen proteins.

Key words: Bee pollen, Royal jelly, Antioxidant activity, Trypsin, Bioactive peptides.

مقدمه

گرده زنبور با ۱۰ تا ۴۰ درصد پروتئین که توسط زنبور عسل جمع آوری می‌شود، از ترکیب گرده گل‌ها با شهد آنها و بزاق زنبور عسل بدست می‌آید و پس از ذخیره در کیسه گرده واقع در بند سوم پای عقب زنبور عسل، در هنگام ورود زنبور عسل به درون کندو در تله‌ی گرده که توسط زنبوردار در آنجا تعبیه شده جمع آوری می‌گردد (Pascoal و همکاران، ۲۰۱۳). ژله رویال حاوی ۲۷ تا ۴۱ درصد پروتئین می‌باشد که به عنوان غنی‌ترین ماده مغذی بیولوژیک شناخته شده است. این ماده توسط آنزیم‌های پروتئازی و دیگر آنزیم‌های طبیعی زنبور عسل، از هضم مستقیم گرده به وجود می‌آید و از دو جفت غدد هیپوفارنژیال[1] موجود در طرفین سر زنبور عسل[2] کارگر جوان ترشح می‌شود، (Bogdanov, 2014؛ Morais و همکاران، ۲۰۱۱). مشخص شده است که ویژگی آنتی اکسیدانی ژله رویال و گرده زنبور عسل مربوط به پروتئین‌های اصلی و ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی آنها می‌باشد (Nagai and Inoue, 2004). دی و تری پپتیدهای حاصل از هیدرولیز پروتئینی فعالیت آنتی اکسیدانی قوی‌تری نسبت به پروتئین‌های هیدرولیز نشده از خود نشان می‌دهند (Kawashima و همکاران، ۱۹۷۹؛ Guo و همکاران،۲۰۰۹). دلایل مربوط به عملکردآنتی‌اکسیدانی این پپتیدها شامل موارد زیر می‌باشد: قابلیت احیاء و فعالیت پاک کنندگی رادیکال‌های آزاد،

[1] - *Hypopharyngeal glands*
[2]- *Apis mellifera L.*

خاصیت خنثی کنندگی برخی از ترکیبات سمی همانند رادیکال-های هیدروکسیل و خاصیت شلاته کنندگی کاتیون‌های فلزی پراکسیدان (Kishimura and Benjakul, 2011). گزارش شده است که پپتیدهای بدست آمده از هیدرولیز پروتئین‌های غذایی توسط پپسین، تریپسین و آلکالاز دارای ویژگی‌های آنتی-اکسیدانی می‌باشند (Wiriyaphan و همکاران، ۲۰۱۲؛ Khantaphant و همکاران، ۲۰۰۸). فعالیت آنتی‌اکسیدانی ژله رویال در مدل‌های آزمایشگاهی بر روی گیاهان و مخمرها و همچنن اثر محافظتی آن در مقابل تنش‌های اکسیداتیو در حیوانات آزمایشگاهی به اثبات رسیده است؛ این ترکیب در شرایط آزمایشگاهی از پراکسیداسیون لیپید جلوگیری کرده است (Liu و همکاران، ۲۰۰۸؛ Nagai و همکاران، ۲۰۰۵). پپتیدهای ژله رویال که از فعالیت پروتئازهای مختلف به دست می‌آیند، فعالیت آنتی اکسیدانی و کاهندگی فشار خون بالایی را از خود نشان می‌دهند (Guo و همکاران،۲۰۰۹). Almeida و همکاران (۲۰۱۶) نشان دادند ترکیبات فنولی موجود در عصاره گرده گل با ویژگی آنتی اکسیدانی مناسب، بطور چشمگیری باعث کاهش واکنش‌های اکسایشی در سوسیس گردید. مارینوا و چوربانو با استفاده از پروتئیناز و آمینو پپتیدازهای با منشاء گیاهی از جمله بروملائین آناناس، آمینوپپتیداز و پرولین ایمینوپپتیداز برگ کلم و آمینوپپتیداز نخود، به هیدرولیز پروتئین‌های گرده گل پرداختند و ویژگی‌های مهار کنندگی رادیکال DPPH پپتیدهای به دست آمده را مورد بررسی قرار دادند (Marinova and Tchorbano; 2010). در کشور ما ایران توجه اندکی به آنها می‌شود و این محصولات با ارزش جایگاه خود را در صنایع غذایی و دارویی بطور کامل بدست نیاورده اند. بنابراین لازم است با بررسی ویژگی های کاربردی آنها و قابلیت کاربردشان در مواد غذایی به عنوان یک افزودنی طبیعی و سلامتی بخش و جلوگیری کننده از بسیاری از بیماری‌ها، توجه بسیاری از متخصصان در صنعت غذا، زنبورداری و داروسازی به این محصولات معطوف گردد.

مواد و روش‌ها

این پژوهش در آزمایشگاه علوم و صنایع غذایی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان انجام شد. گرده گل و ژله رویال از مرکز پرورش زنبورعسل و خدمات گرده افشانی واقع درگنبد، آنزیم تریپسین از شرکت سیگما و سایر مواد آزمایشگاهی شامل اسید سولفوریک، هیدروکسید سدیم، اسید بوریک، اسید کلریدریک، تریس، مونوسدیم فسفات، دی سدیم فسات، تری کلرواستیک اسید، اتانول، پتاسیم فری سیانید، کلرید فریک، کلرید فرو، و رادیکال آزاد DPPH و اتیل استات از شرکت‌های Merck و Titrachem با درجه خلوص آزمایشگاهی تهیه شدند.

سنجش خواص آنتی‌اکسیدانی گرده

اندازه گیری ترکیبات فنلی، با استفاده از روش فولین سیوکالته[3] انجام شد. مقدار ترکیبات فنلی بر حسب میلی‌گرم اسید گالیک در هر میلی‌لیتر عصاره از روی معادله خط منحنی استاندارد تعیین گردید (Deshpande و همکاران، ۱۹۸۷).

سنجش فعالیت مهار کنندگی رادیکالهای آزاد DPPH با استفاده از روش Hmidet و همکاران (۲۰۱۱) انجام شد. به این منظور یک میلی‌لیتر از عصاره حل شده در اتانول با یک میلی‌لیتر از محلول DPPH اتانولی با غلظت ۰/۱ میلی مولار مخلوط و شیک شد، سپس به مدت ۵۰ دقیقه در تاریکی انکوبه گردید. جذب مخلوط در طول موج ۵۱۷ نانومتر خوانده شد. در نهایت فعالیت مهارکنندگی بر اساس درصد، طبق فرمول زیر محاسبه شد.

$$\text{درصد فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH} = ((A_0 - A_1)/A_0) \times 100$$

جذب کنترل:A_0 جذب نمونه:A_1

اندازه‌گیری قدرت احیاکنندگی گرده گل در احیای آهن (III) با استفاده از از روش Bougatef و همکاران (۲۰۰۹) انجام شد. به این منظور ۱ میلی‌لیتر از محلول عصاره با ۲/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات۶/۶= pH و ۲/۵ میلی‌لیتر پتاسیم فری سیانید ۱ درصد مخلوط گردید و به مدت نیم ساعت در حمام آب ۵۰ درجه

[3] - Folin–Ciocalteu

سانتی‌گراد قرار گرفت؛ سپس ۲/۵ میلی‌لیتر تری‌کلرواستیک اسید ۱۰ درصد وزن/حجم به آن اضافه شد. پس از ۱۰ دقیقه سانتریفوژ با دور g۱۶۵۰ ، ۲/۵ میلی‌لیتر از سوپرناتانت برداشته شد و به آن ۲/۵ میلی‌لیتر آب مقطر و ۰/۵ میلی‌لیتر محلول کلریدآهن ۰/۱ درصد اضافه شد. پس از ۱۰ دقیقه جذب آن در طول موج ۷۰۰ نانومتر خوانده شد.

هیدرولیز گرده گل توسط آنزیم تریپسین در دما و pH اپتیمم این آنزیم انجام شد. آنزیم‌ها در محدوده غلظتی یک تا ۲ درصد وزنی/ وزنی به محلول پروتئینی افزوده شده و هیدرولیز در مدت زمان‌های ۲ تا ۵ ساعت و دمای۳۷ درجه سانتیگراد و pH=۷/۶ در انکوباتورهای شیکردار و در دما و pH ثابت ، انجام شد. تیمار بندی دقیق‌تر توسط روش RSM[۴] مشخص شد. در انتها در دمای ۸۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه واکنش آنزیمی متوقف شد (ویگو و همکاران، ۲۰۰۰). برای حذف ترکیبات اضافی، سانتریفوژ یخچال‌دار در g۴۰۰۰ به مدت ۳۰ دقیقه انجام شد و سوپرناتانت پس از جمع آوری با خشک کن انجمادی خشک شد (Villanueva و همکاران، ۱۹۹۹؛ Guo و همکاران، ۲۰۰۵؛ Matsuoka و همکاران،۲۰۱۲).

بررسی ویژگی آنتی اکسیدانی پپتیدهای حاصل

سنجش فعالیت مهار کنندگی رادیکالهای آزاد DPPH پروتئینهای هیدرولیز شده و سنجش قدرت احیاکنندگی پروتئینهای هیدرولیز شده مطابق روش گفته شده در بالا انجام شد.

نتایج و بحث

آزمون‌های آنتی‌اکسیدانی اولیه بر روی گرده گل و ژله رویال

اندازه گیری ترکیبات فنلی

معادله خط رگرسیونی که رابطه غلظت محلول اسید گالیک را با میزان جذب نمونه‌ها در طول موج ۷۰۰ نانومتر نشان می‌دهد، به صورت زیر می‌باشد:

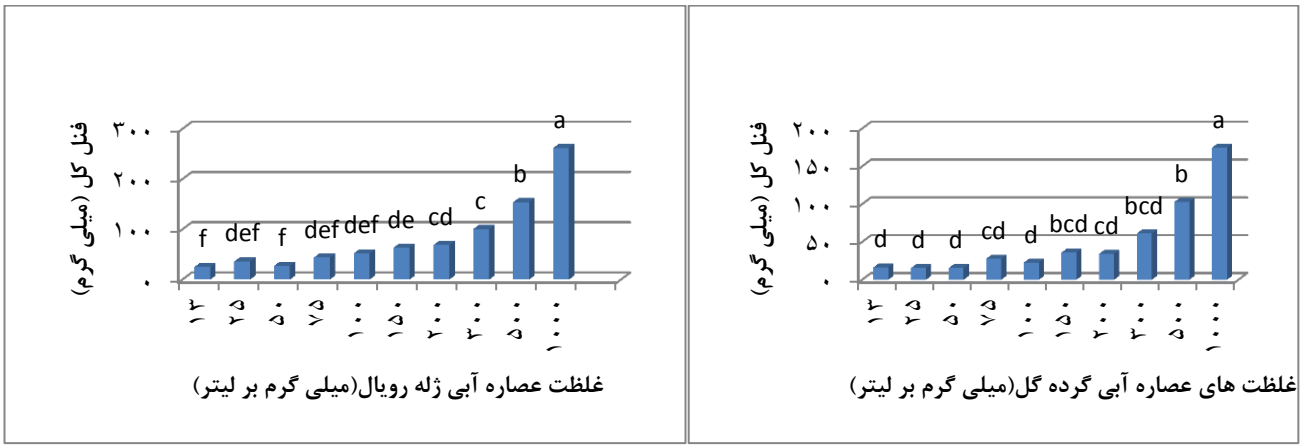
$$Y= ۰/۰۰۱۱X + ۰/۰۱۹۶$$

$$R^2= ۰/۹۸$$

در این رابطه ، Y و X به ترتیب معادل جذب نمونه در طول موج ۷۰۰ نانومتر و مقدار کل ترکیبات فنلی بر اساس میلی‌گرم معادل اسید گالیک در هر گرم گرده گل می‌باشد. شکل (۱) مقایسه میانگین میزان ترکیبات فنلی در غلظت‌های مختلف عصاره آبی گرده گل و ژله رویال را نشان می‌دهد. میزان ترکیبات فنلی گرده گل بین ۱۵/۴۸ تا ۱۷۴ میلی‌گرم اسید گالیک برگرم گرده و میزان ترکیبات فنلی ژله رویال بین ۲۴/۹ و ۲۶۱/۸۷ میلی‌گرم اسید گالیک بر هر گرم ژوله رویال متغیر بود. روند تغییرات میزان ترکیبات فنلی هر دو، با افزایش غلظت عصاره، افزایشی بود و این تغییرات در غلظت‌های ۲۰۰ تا ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر معنی‌دار بود. میزان ترکیبات فنولی اندازه‌گیری شده در این پژوهش، قابل مقایسه با میزان ترکیبات فنولی اندازه گیری شده توسط سایر پژوهشگران می‌باشد. به عنوان مثال Almeida و همکاران (۲۰۱۶) ، میزان ترکیبات فنولی عصاره اتانولی گرده گل را ۱۹/۶۹ میلی گرم گالیک اسید بر گرم گرده گل گزارش کردند. Daoud و همکاران (۲۰۱۵)، ترکیبات فنولی عصاره آبی گرده گل دو واریته خرما را در محدوده‌ی ۵/۴ تا ۲۳۷/۷۴ و ۱۳/۴۲ تا ۱۹۷/۶۲ میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم گرده گل گزارش کردند. Pascoal و همکاران (۲۰۱۳)، میزان ترکیبات فنولی عصاره متانولی هشت نوع گرده تجاری از اسپانیا و پرتغال را در محدوده‌ی ۱۸/۵ تا ۳۲/۱۵ میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم گرده گل گزارش کردند. Liu و همکاران (۲۰۰۸)، میزان ترکیبات فنولی ژله رویال را در حدود ۲۲۰ میکرو گرم گالیک اسید بر گرم ژله رویال گزارش کردند که در مقایسه با ترکیبات فنولی ژله رویال مورد آزمون در پژوهش حاضر بسیار کمتر است. اختلاف میزان ترکیبات فنلی در این پژوهش در مقایسه با برخی کارهای پژوهشی دیگر را می‌توان درضرورت به کار گیری آب به عنوان حلال به منظور استخراج ترکیبات فنلی در این پژوهش نسبت داد. چرا که احتمالا قابلیت استخراج ترکیبات فنولی غیر قطبی در این پژوهش، با حلال قطبی آب، پایین بوده است. Leblanc و همکاران (۲۰۰۹) اعلام کردند که در نوع حلال مورد استفاده برای استخراج ترکیبات فنولی، درجه پلیمریزاسیون ترکیبات فنولی گرده گل و

[4] -Response surface methodology

ژله رویال و واکنش‌های آنها با هم، فاکتورهای ژنتیکی و مناطق جغرافیایی، تک گل یا چند گل بودن گرده در میزان و نوع ترکیبات فنولی گرده ها و ژله رویال مناطق مختلف تاثیرگذار می-باشد. با توجه به اینکه ژله رویال از هضم مستقیم گرده گل توسط زنبور عسل حاصل می‌شود، از نظر میزان ترکیبات فنلی با یکدیگر قابل مقایسه هستند (Bogdanov, 2014). در این پژوهش نیز مشخص شد که هم در گرده گل و هم در ژله رویال با افزایش غلظت عصاره، میزان ترکیبات فنلی افزایش یافت، این روند افزایشی در ژله رویال، از غلظت ۳۰۰ میلی گرم بر لیتر عصاره به بعد با شدت بیشتری نسبت به گرده گل قابل مشاهده بود.



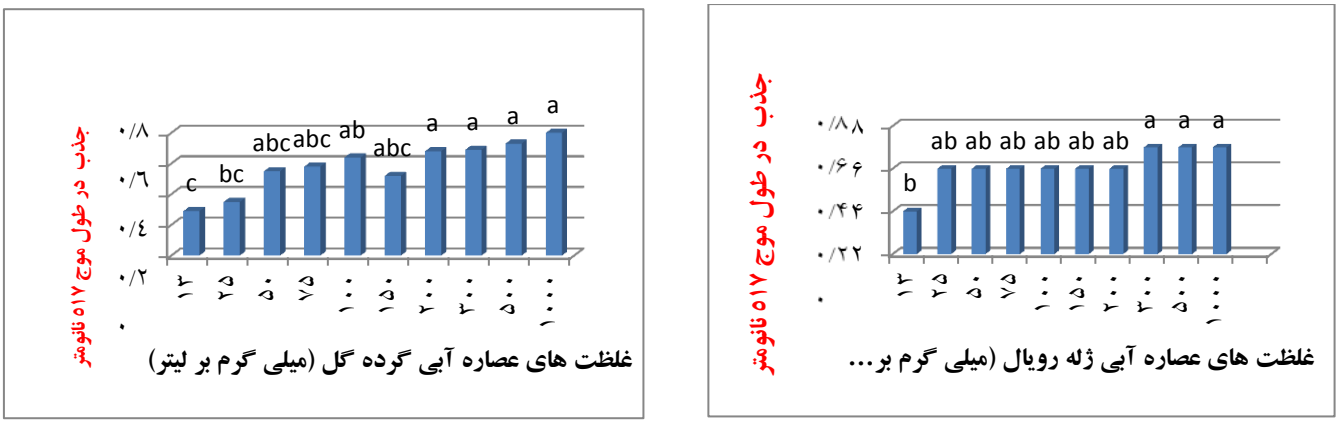
شکل ۱- میزان ترکیبات فنولی غلظتهای مختلف عصاره آبی گرده گل و ژله رویال

قدرت احیاءکنندگی یون آهن سه ظرفیتی

در این روش، احیا یون آهن سه ظرفیتی به عنوان معیاری برای قابلیت الکترون دهی ترکیبات فنلی به کار می رود. این مسئله ساز و کار مهمی را در فرایند اکسایش ترکیبات فنلی تشکیل می‌دهد. ظرفیت دهندگی الکترون (نیروی احیاءکنندگی) مرتبط با فعالیت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات زیستی می‌باشد (Arabshahi, 2001). در شکل ۲ مقایسه میانگین قدرت احیاءکنندگی غلظت‌های مختلف عصاره آبی گرده گل و ژله رویال مشخص شده است، این نتایج حاکی از آن بود که قدرت احیاءکنندگی غلظت‌های مختلف عصاره گرده گل بین ۰/۲۹ تا ۰/۸ و میزان قدرت احیاکنندگی ژله رویال بین ۰/۷۴ و ۰/۷۷ متغیر بود. روند تغییرات میزان قدرت احیاکنندگی هر دو، با افزایش غلظت عصاره، افزایشی بود، بطوریکه اختلاف‌ها، در غلظت‌های ۱۲/۵ و ۲۵ با غلظت‌های بالاتر از ۲۰۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم بر لیتر معنی دار بود که با نتایج Morais و همکاران (۲۰۱۱) مطابقت داشت. اما قدرت احیاکنندگی ژله رویال و گرده گل اختلاف معنی دار و مشخصی نداشتند که می‌توان دلیل آن را یکسان بودن نسبی میزان ترکیبات احیا کننده یون آهن، در گرده گل و ژله رویال دانست (Bogdanov, 2014). Morais و همکاران (۲۰۱۱)، گزارش کردند که کمترین و بیشترین غلظت عصاره فنولی گرده به ترتیب کمترین و بیشترین قدرت احیا کنندگی یون آهن را داشتند و قدرت احیاکنندگی غظتهای میانی تفاوت معنی داری نداشتند. کم شدن قدرت احیا کنندگی یون آهن با کاهش غلظت ترکیبات فنولی عصاره را Leblanc و همکاران (۲۰۰۹) و Marghitas و همکاران (۲۰۰۹) نیز تایید کردند. آنها اعلام کردند با افزایش غظت ترکیبات فنولی عصاره‌های گرده گل، میزان قدرت احیای یون آهن افزایش می‌یابد.

فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH

شکل ۳ نتایج مقایسه میانگین درصد مهار کنندگی رادیکال DPPH در غلظت‌های مختلف عصاره آبی گرده گل و ژله رویال را نشان می‌دهد. در این شکل‌ها مشخص است که کمترین و بیشترین میزان درصد مهارکنندگی رادیکال DPPH در گرده گل ۱/۰۵ و ۶۷/۳۳ درصد و در ژله رویال ۳/۷۵ و ۹۵/۲۷ درصد بود. روند تغییرات درصد مهارکنندگی رادیکال DPPH در هر دو، با افزایش غلظت عصاره، افزایشی بود؛ بطوری که اختلاف در بیشترین غلظت با سایر غلظت‌ها به طور قابل توجهی معنی دار بود. سان و همکاران، کروبر و همکاران و موراییز و همکاران نیز گزارش نمودند که فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH عصاره‌های فنولی وابسته به غلظت بوده و با افزایش غلظت اثر مهارکنندگی شدت می‌یابد (Sun و همکاران، ۲۰۰۷؛ Kroyer and Hegedus، 2001 و Morais و همکاران، ۲۰۱۱).



شکل۲- قدرت احیاکنندگی غلظت‌های مختلف عصاره‌ی آبی گرده‌ی گل و ژله رویال

Liu و همکاران (۲۰۰۸)، میزان قدرت مهار رادیکال DPPH ژله رویال را ۶۵ درصد گزارش کردند. قدرت مهار رادیکال بالاترین غلظت ژله رویال مورد آزمون در پژوهش حاضر، ۹۵/۲۷ درصد بود که در مقایسه با گزارش Liu و همکاران (۲۰۰۸)بسیار بالاتر است. این مسئله را می‌توان به تفاوت در میزان ترکیبات فنولی ژله رویال، منطقه جغرافیایی و پروفایل پروتئینی و پپتیدهای آنتی اکسیدان موجود در ژله رویال نسبت داد. بین قدرت مهار رادیکال گرده گل و ژله رویال، اختلاف قابل توجهی مشاهده شد. این اختلاف در بالاترین غلظت عصاره‌های گرده گل و ژله رویال به بیشترین مقدار خود، یعنی ۲۸ درصد، رسید. دلیل بیشتر بودن قدرت مهار رادیکال ژله رویال نسبت به گرده گل را می‌توان به حضور بیشتر پروتئینها و پپتیدهایی در ژله رویال نسبت داد که زنجیره جانبی آنها قابلیت به دام انداختن رادیکال‌های آزاد را دارا هستند. پروتئینهای ژله رویال دارای ویژگی آنتی اکسیدانی قوی هستند(Nagai and Inoue , 2004). Guo و همکاران (۲۰۰۵) پپتیدهای آنتی اکسیدان را از پروتئین‌های محلول در آب ژله رویال جداسازی و شناسایی کردند.

بهینه سازی هیدرولیز گرده گل و آزمون‌های آنتی‌اکسیدانی

بررسی داده‌ها در نقاط تعریف شده برای فعالیت آنتی اکسیدانی توسط RSM

با توجه به نقاط تعریف شده در RSM، آزمون‌های مربوطه انجام شد. نتایج آزمون‌های فعالیت آنتی‌اکسیدانی گرده گل هیدرولیز شده در نقاط مشخص شده با طرح مرکب مرکزی در جدول (۱) آورده شده است. در مرحله بعد داده‌های به دست آمده تجزیه و تحلیل شدند. ضرایب رگرسیونی و جدول تجزیه واریانس برای هر یک از پاسخ‌ها برای آزمونهای آنتی‌اکسیدانی احیاءکنندگی و

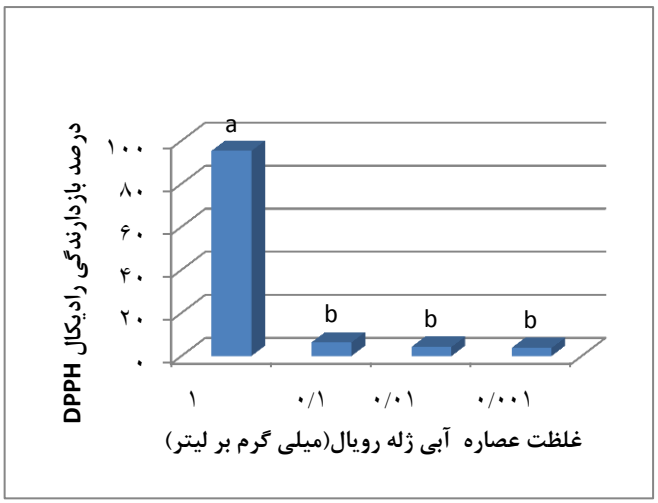
مهار رادیکال آزاد DPPH به ترتیب مطابق با جداول (۲ و ۳) می-باشد.

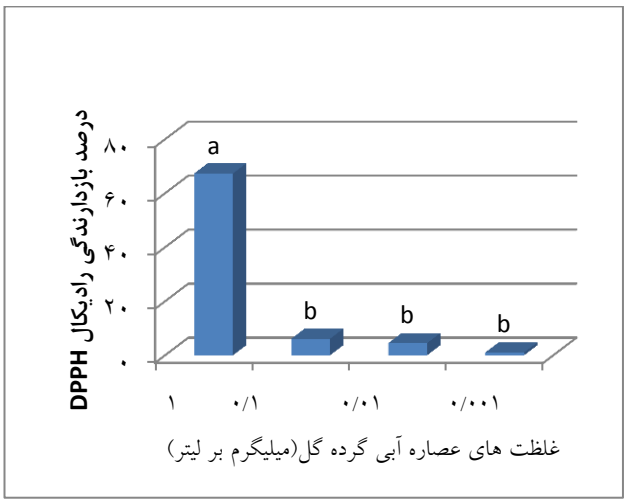
قدرت احیاءکنندگی یون آهن سه ظرفیتی

نتایج مربوط به تجزیه واریانس و ضرایب رگرسیونی برای پاسخ-های قدرت احیاءکنندگی گرده هیدرولیز شده در جدول (۲) ذکر شده است. آنالیز سطح پاسخ نشان می‌دهد که در رابطه قدرت احیاءکنندگی گرده‌های هیدرولیز شده با آنزیم تریپسین پارامترهای واکنش از نوع درجه دوم و به ترتیب با ضریب رگرسیون (R^2=۰/۹۹) می‌باشد. این رابطه در معادله۱ نشان داده شده است که در آنها X_1 و X_2 به ترتیب متغیرهای زمان هیدرولیز و غلظت آنزیم و Y قدرت احیاکنندگی می‌باشد.

معادله ۱

$$Y= ۰/۵۲۶۸ + ۰/۰۸۲۶۰۵X_1 + ۰/۰۳۶۷۳۶X_2 - ۰/۰۱۶۵۲X_1^2 - ۰/۰۱۲۶۹X_2^2 + ۲/۶۷ X_1X_2$$





شکل ۳- اثر بازدارندگی از رادیکال DPPH در غلظت‌های مختلف عصاره‌ی آبی گرده گل

نتایج جدول (۲) نشان می‌دهد که مدل آماری ارائه شده برای پیش بینی اثر متغیرهای آزمایش بر قدرت احیاءکنندگی گرده گل هیدرولیز شده توسط آنزیم تریپسین مناسب می‌باشد (P <۰/۰۵). اثر متغیر زمان بر روی قدرت احیاءکنندگی، بیشتر و معنی‌دار تر از متغیر غلظت آنزیم بود. اثر درجه ۲ غلظت و اثر متقابل زمان و غلظت آنزیم معنی‌دار نبود. جهت مناسب بودن مدل برای داده‌های این آزمایش از آزمون عدم برازش مدل (Lack of fitness) استفاده شد که با توجه به نتایج جدول، این فرض برای هر سه آنزیم معنی دار نشد (P>۰/۰۵). این مسئله بیانگر آن است که مدل به خوبی با داده‌های مربوط به قدرت احیاءکنندگی گرده هیدرولیز شده تطبیق دارد.

جدول ۱: نتایج آزمون‌های فعالیت آنتی‌اکسیدانی گرده گل هیدرولیز شده در نقاط مشخص شده با طرح کامپوزیت مرکزی

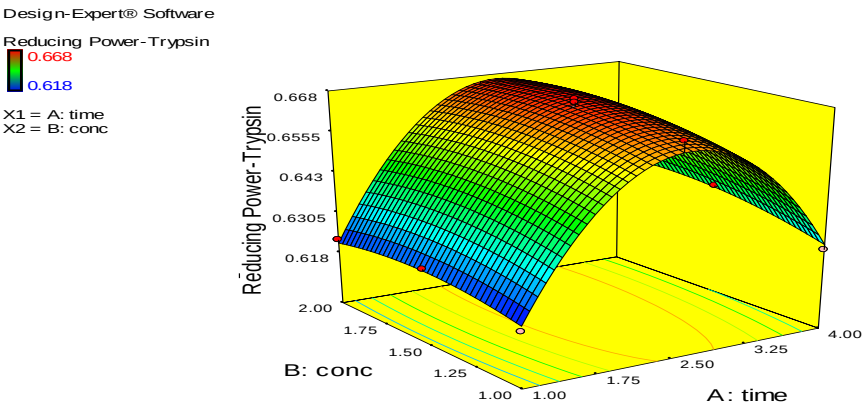
تیمار	غلظت آنزیم (٪)	زمان (ساعت)	فعالیت مهار کنندگی رادیکال **DPPH** (٪)	قدرت احیاکنندگی (جذب در ۷۰۰ نانومتر)
۱	۲	۱	۲۶/۲۱	۰/۶۲۲
۲	۱/۵	۱	۵۳/۸۷	۰/۶۲۴
۳	۱	۱	۴۲/۹۵	۰/۶۱۸
۴	۲	۲/۵	۵۲/۱۷۹	۰/۶۶۴
۵	۱/۵	۲/۵	۷۳/۱۲	۰/۶۶۷
۶	۱/۵	۲/۵	۷۲/۱۱	۰/۶۶۸
۷	۱/۵	۲/۵	۷۲/۲۱	۰/۶۶۵
۸	۱/۵	۲/۵	۷۱/۱۱	۰/۶۶۷
۹	۱/۵	۲/۵	۷۳/۲۲	۰/۶۶۵
۱۰	۱	۲/۵	۵۱/۴۸	۰/۶۶۴
۱۱	۲	۴	۶۹/۵۸	۰/۶۳۸
۱۲	۱/۵	۴	۷۹/۸	۰/۶۳۶
۱۳	۱	۴	۵۱/۴۶	۰/۶۲۶

جدول ۲- جدول تجزیه واریانس برای فعالیت احیاءکنندگی یون آهن

	درجه آزادی	ضریب رگرسیون	**P**عدد
مدل	۵	۰/۵۲۶۸	<۰/۰۰۰۱
X_1(زمان)	۱	۰/۰۸۲۶۰۵	۰/۰۰۰۲
X_2(غلظت آنزیم)	۱	۰/۰۳۶۷۳۶	۰/۰۱۶۴
X_1^2	۱	-۰/۰۱۶۵۲	<۰/۰۰۰۱
X_2^2	۱	-۰/۰۱۲۶۹	۰/۰۳۹
X_1X_2	۱	۲/۶۷	۰/۰۹۶
Lack of fitness	۳		۰/۰۹۷۱
R^2- Pred		۰/۹۸	
R^2- Adj		۰/۹۵	

نمودار صفحه‌ای اثر زمان و غظت آنزیم بر روی قدرت احیاءکنندگی گرده هیدرولیز شده توسط تریپسین به ترتیب در شکل (۴) نشان داده شده است. همانطور که در شکل(۴) مشخص است، بیشترین قدرت احیاکنندگی تیمارهای هیدرولیز شده با آنزیم تریپسین، ۰/۶۶۸ بود که مربوط به تیمار هیدرولیز شده با غلظت آنزیم ۱/۵ درصد و مدت زمان هیدرولیز ۲/۵ ساعت می‌باشد. به طور کلی در گرده هیدرولیز شده با آنزیم تریپسین، با افزایش زمان هیدرولیز تا چهار ساعت و غلظت آنزیم تا ۲ درصد، روند تغییرات قدرت احیاکنندگی ابتدا افزایشی و سپس کاهشی بود. با توجه به نتایج به دست آمده، می‌توان گفت برای دستیابی به

بیشترین میزان قدرت احیاکنندگی، می‌توان مدت زمان هیدرولیز بالا استفاده اکرد و با توجه به اینکه اثر غلظت آنزیم تریپسن معنی دار نبود، می‌توان از غلظت‌های پایین آنزیم استفاده کرد. با افزایش مدت زمان هیدرولیز و غلظت آنزیم، درجه هیدرولیز افزایش می-یابد و باعث تولید پپتیدهای کوچکتر با وزن مولکولی کمتر و زنجیر کوتاهتر می‌گردد. بسته به وزن مولکولی، بار و ساختار فضایی زنجیره انتهایی پپتیدهای تولید شده، قدرت به دام انداختن رادیکال آزاد و قدرت اهداکنندگی الکترون و احیای یون آهن در آنها تغییر می‌یابد. علاوه بر اختلاف در شرایط آزمایش و نوع آنزیم‌های مورد استفاده، نوع سوبسترا و توالی اسیدآمینه‌ی پپتیدهای تشکیل شده، درجه هیدرولیز و طول زنجیره پپتیدی در عملکرد آن در احیای یون آهن موثر است (Lassoued و همکاران، ۲۰۱۵). با افزایش زمان هیدرولیزاسیون، درجه هیدرولیز افزایش پیدا می‌کند و از شدت و سرعت هیدرولیز، به دلیل کاهش باندهای پپتیدی در دسترس آنزیم، کاهش فعالیت آنزیم و شکل گیری ممانعت کننده ها کاسته می‌شود(Guerar و همکاران، ۲۰۰۲).



شکل ٤- نمودار سطحی قدرت احیاکنندگی گرده گل هیدرولیز شده در مقابل زمان (ساعت) و غلظت آنزیم تریپسین (درصد)

فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH

نتایج مربوط به تجزیه واریانس و ضرایب رگرسیونی برای پاسخ-های فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH گرده هیدرولیز شده در جدول ۳ ذکر شده است. آنالیز سطح پاسخ نشان می‌دهد که رابطه فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH گرده هیدرولیز شده با آنزیم تریپسین با پارامترهای واکنش از نوع درجه دوم با ضریب رگرسیون (R^2=۰/۹۹) می‌باشد. این رابطه در معادله ۲ نشان داده شده است که در آنها X_1 و X_2 به ترتیب متغیرهای زمان هیدرولیز و غلظت آنزیم و Y قدرت مهارکنندگی رادیکال DPPH می-باشد.

معادله ۲

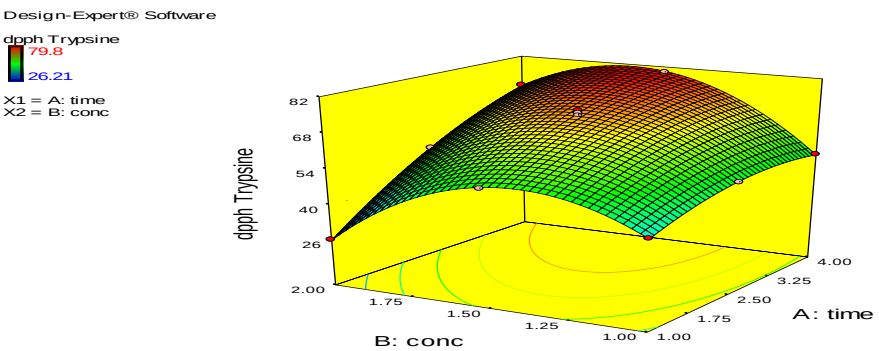
$$Y= -۹۹/۶۶۸۷ + ۰/۰۹۹۶۹ X_1 +۲۱۰/۴۸۳۳ X_2 -۲/۱۷۶۸۳X_1^2 - ۷۹/۶۱۳۵X_2^2 + ۱۱/۶۲X_1X_2$$

نتایج جدول (۳) نشان می‌دهد که مدل آماری ارائه شده برای پیش بینی اثر متغیرهای آزمایش بر فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH گرده گل هیدرولیز شده مناسب می‌باشد ($P < ۰/۰۰۰۱$). در تمامی تیمارها اثر زمان بر میزان مهار رادیکال DPPH معنی دار بود، اثر غلظت آنزیم معنی‌دار نبود. همچنین نتایج اثر درجه دوم هریک از متغیرها را بر روی پاسخ آزمایش معنی دار نشان می‌دهد. اثر متقابل متغیرها همگی معنی دار بودند همچنین جهت مناسب بودن مدل برای داده های این آزمایش از آزمون عدم برازش مدل (Lack of fitness) استفاده شد که با توجه به نتایج جدول، این فرض معنی دار نشد ($P>۰/۰۵$). این مسئله بیانگر آن است که مدل به خوبی با داده‌های مربوط به فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH گرده هیدرولیز شده تطبیق دارد.

جدول۳: جدول تجزیه واریانس برای فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH

	درجه آزادی	ضریب رگرسیون	عدد P
مدل	۵	-۹۹/۶۶۸۷	<۰/۰۰۰۱
X_1(زمان)	۱	۲/۰۹۹۶۹	<۰/۰۰۰۱
X_2(غلظت آنزیم)	۱	۲۱۰/۴۸۳۳	۰/۲۸۶۳
X_1^2	۱	-۲/۱۷۶۸	<۰/۰۰۰۱
X_2^2	۱	-۷۹/۶۱۳۵	<۰/۰۰۰۱
X_1X_2	۱	۱۱/۶۲	<۰/۰۰۰۱
Lack of fitness	۳		۰/۷۱۹۷
R^2- Pred		۰/۹۹	
R^2- Adj		۰/۹۹	

نمودار صفحه ای اثر زمان و غظت آنزیم را بر روی فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH گرده هیدرولیز شده با آنزیم تریپسین در شکل ۵ نشان داده شده است. همانطور که مشخص است، بیشترین قدرت مهار رادیکال DPPH تیمارهای هیدرولیز شده با آنزیم تریپسین، ۷۹/۸ درصد بود که مربوط به تیمار هیدرولیز شده با غلظت آنزیم ۱/۵درصد و مدت زمان هیدرولیز ۴ ساعت می‌باشد. به طور کلی در گرده هیدرولیز شده با آنزیم تریپسین، با افزایش زمان هیدرولیز تا چهار ساعت، روند تغییرات قدرت مهار رادیکال DPPH افزایشی بود، اما غلظت آنزیم اثر معنی داری در این تغییرات نداشت. Nagai و همکاران (۲۰۰۵) اعلام داشتند که قدرت مهار رادیکال پروتئین‌های گرده گل هیدرولیز شده با پپسین، تریپسین و پاپایین، با غلظت‌های ۱درصد وزنی/ حجمی به مدت ۴۸ ساعت هیدرولیز، به ترتیب ۹۷، ۹۵ و ۹۰ درصد بود. که با ماکزیمم قدرت مهار رادیکال DPPH گرده های هیدرولیز شده در پژوهش حاضر قابل مقایسه است. با افزایش مدت زمان هیدرولیز و غلظت آنزیم، درجه هیدرولیز افزایش می-یابد و باعث تولید پپتیدهای کوچکتر با وزن مولکولی کمتر و زنجیر کوتاهتر می‌گردد. بسته به وزن مولکولی، بار و ساختار فضایی زنجیره انتهایی پپتیدهای تولید شده، قدرت به دام انداختن رادیکال ازاد در آنها افزایش می‌یابد. Zhang و همکاران (۲۰۱۴) اعلام کردند که پپتیدهای با وزن مولکولی کمتر از ۱ کیلو دالتون بیشترین قدرت آنتی اکسیدانی را دارا هستند. مارینوا و چوربانو اعلام کردند میزان مهار رادیکال DPPH توسط گرده از ۲۸ درصد قبل از هیدرولیز به ماکزمم ۴۶ درصد بعد از هیدرولیز با استفاده از پروتئیناز و آمینو پپتیدازهای با منشاء گیاهی افزایش یافت(Marinova and Tchorbanov , 2010).



شکل۵- نمودار سطحی برای قدرت مهارکنندگی رادیکال DPPH توسط گرده گل هیدرولیز شده در مقابل زمان (ساعت) و غلظت آنزیم تریپسین (درصد)

بهینه سازی فرایند هیدرولیز در رابطه با فعالیت آنتی‌اکسیدانی گرده هیدرولیز شده

شرایط بهینه برای فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده به وسیله نرم افزار پیش بینی شد. این شرایط برای آنزیم تریپسین مدت زمان ۳/۹۶ ساعت و غلظت آنزیم ۱/۷۴ درصد پیش بینی شد. پیش‌بینی شاخص‌های آنتی‌اکسیدانی شامل فعالیت مهار کنندگی رادیکال DPPH و قدرت احیاءکنندگی به ترتیب ۷۹/۸ درصد و میزان جذب ۰/۶ بود. جهت ارزیابی اعتباری مدل آماری، یک آزمایش اضافه تحت شرایط مذکور انجام شد که در آن فعالیت مهار کنندگی رادیکال DPPH و قدرت احیاءکنندگی به ترتیب ۷۸/۷۶۱ درصد، میزان جذب ۰/۶۹ به دست آمد. نتایج به دست آمده نشان می‌دهد که میزان پیش بینی شده‌ی عوامل توسط مدل با مقداری که به صورت آزمایشی به دست آمده است، تطابق دارد. این شرایط بیانگر آن است که مدل به صورت مناسبی می-تواند اثر دو متغیر زمان و غلظت آنزیم را بر فعالیت مهار کنندگی رادیکال DPPH و قدرت احیاءکنندگی گرده هیدرولیزشده نشان دهد.

نتیجه گیری

به طور کلی مشخص شد که با انجام عمل هیدرولیز، ویژگی آنتی اکسیدانی گرده گل، نسبت به حالتی که عملیات هیدرولیز انجام نشده، افزایش پیدا کرد. این افزایش، در قدرت مهار رادیکال DPPH شاخص تر بود. بطوری که از ۶۷/۳۳ درصد در گرده هیدرولیز نشده، به ۷۹/۸ درصد در گرده هیدرولیز شده با تریپسین ، ارتقا پیدا کرد . بنابراین بعد از انجام عمل هیدرولیز، قدرت مهار رادیکال گرده گل، به قدرت مهار رادیکال ژله رویال (۹۵/۲۷ درصد) نزدیک‌تر شد. این مسئله نشان می‌دهد که بخشی از ویژگی آنتی اکسیدانی ژله رویال، علاوه بر ترکیبات فنولی، مربوط به پروتئین‌ها و پپتیدهایی است که بطور طبیعی در ژله رویال وجود دارد. با توجه به اینکه تنها منبع اصلی پروتئینی زنبور برای تهیه ژله رویال، گرده گل است، می‌توان ادعا کرد که با هیدرولیز شدن پروتئین‌های گرده گل، تا حدی می‌توان آنها را به پپتیدهای موجود در ژله رویال نزدیک کرد.

منابع

Almeida, J. F., Reis, A. S., Heldt, L. F. S., Pereira, D., Bianchin, M., Moura, C., Plata-Oviedo, M. V., Haminiuk, C .W.I., Ribeiro, I. S., Luz, C. F. P. and Carpes, S. T. (2016). Lyophilized bee pollen extract: A natural antioxidant source to prevent lipid oxidation in refrigerated sausages. *LWT - Food Science and Technology*. 1e7.

Arabshahi, S., Ardestani, A. and Yazdanparast, R. (2001). Quantitative assessment of antioxidant properties of natural colorants and phytochemicals: carotenoids, flavenois, phenols and indigoids. The role of B-carotene in antioxidants functions. *Journal of Science of Food and Agriculture*. 81:559- 568.

Bogdanov, S. (2014). Royal Jelly, Bee Brood: Composition, Health, Medicine: A Review. *Bee Product Science*. 28 (3):118-153.

Bougatef, A., Hajji, M. and Balti, R. (2009). Antioxidant and free radical – scavenging activities of smoth hound muscle protein hydrolysates obtained by gastro intestinal proteases.*Journal of food chemistry*.1198-1255.

Daoud, A., Malika, D., Bakari, S., Hfaiedh, N., Mnafgui, K. Kadri, A. and Gharsallah, N. (2015). Assessment of polyphenol composition, antioxidant and antimicrobial properties of various extracts of Date PalmPollen (DPP) from two Tunisian cultivars. *Arabian Journal of Chemistry*. 48:437-447.

Deshpande, S., Chryan, M. and Salunkhe, D. (1987). Tanin analysis of food products. *Critical review in food nutrition*. 24:41- 49.

Guerar, F., Guimas, l. and Binet, A. (2002). Production of tuna waste hydrolysates by a commercial neutral protease preparation. *Journal of Molecular catalysis B: Enzymatic*. 19:489-498.

Guo, H., Ekusa, A., Iwai, K., Yonekura, M., Takahara, Y. and Morimatsu, F. (2009). Royal jelly peptides inhibit lipid peroxidation in vitro and in vivo. *Journal of Nutural Science and Vitaminology*.54:191–195.

Guo, H., Kozuma, Y. and Yonekura, M. (2005). Isolation and properties of antioxidative peptides from water-soluble royal jelly protein hydrolysate. *Food Science Technology Research*. 11:222–230.

Hmidet, N., Balti, R., Nasri, R., Sila, A., Bougatef, A. and Nasri, M. (2011). Improvement of functional properties and antioxidant activities of cuttlefish (Sepia officinalis) muscle proteins hydrolyzed by Bacillus mojavensis A21 proteases. *Food Research International*. 44:2703-2711.

Kawashima, K., Itoh, H., Miyoshi, M. and Chibata, I. (1979). Antioxidant properties of branched-chain amino acid derivatives.*Chemical Pharmacological Bulletin*. 27:1912–1916.

Khantaphant, S. and Benjakul, S. (2008). Comparative study on the proteases from fish pyloric caeca and the use for production of gelatin hydrolysate with antioxidative activity. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 151:110-115.

Kishimura, H. and Benjakul, S. (2011). Antioxidative and ACE inhibitory activities of protein hydrolysates from the muscle of brownstripe red snapper prepared using pyloric caeca and commercial proteases. *Process Biochemistry*. 318-327.

Kroyer, G., and Hegedus, N. (2001). Evaluation of bioactive properties of pollen extracts as functional dietary food supplement. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 2: 171-174.

Lassoued, I., Mora, L., Nasri, R., Aydi, M., Toldrá, F., Aristoy, M., C., Barkia, A. and Nasri, M. (2015). Characterization, antioxidative and ACE inhibitory properties of hydrolysates obtained from thornback ray (Raja clavata) muscle. *Journal of Proteomics*. 111:120-125

Leblanc, B. W., Davis, O. K.,Boue, S., DeLucca, A. and Deeby, A. (2009). Antioxidant activity of Sonoran Desert bee pollen. *Food Chemistry*. 115: 1299–1305.

Liu, J. R., Yang, Y. C., Shi, L. S. and Peng, C. C. (2008). Antioxidant properties of royal jelly associated with larval age and time of harvest. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 56(23):11447-11452.

Marghitas, L. A., Stanciu, O. G., Dezmirean, D. S., Bobis, O., Popescu, O., Bogdanov, S. and Campos, M. S. (2009). In vitro antioxidant capacity of honeybee-collected pollen of selected floral origin harvested from Romania. *Food Chemistry*. 115:878–883.

Marinova, M. and Tchorbanov, P. (2010). Preparation of Antioxidant Enzymatic Hydrolysates from Honeybee-Collected Pollen Using Plant Enzymes. *Enzyme Research*. 41:5949-50.

Matsuoka, T., Kawashima, T., Nakamura, T., Kanamaru, Y. and Yabe, T. (2012). Isolation and characterization of proteases that hydrolyze royal jelly proteins from queen bee larvae of the honeybee, Apis mellifera. *Apidologie*. 43:685–697.

Morais, M., Moreira, L., Feás, X. and Estevinho, L. M. (2011). Honeybee-collected pollen from five portuguese natural parks: Palynological origin phenolic content antioxidant properties and antimicrobial activity. *Food and Chemical Toxicology*. 49:1096-1101.

Nagai, T., Inoue, R., Suzuki, N., Myoda, T. and Nagashima, T. (2005). Antioxidative ability in a linoleic acid oxidation system and scavenging abilities against active oxygen species of enzymatic hydrolysates from pollen Cistus ladaniferus. *International Journal of Molecular Medicine*. 15(2): 259-63.

Nagai, T. and Inoue, R. (2004). Preparation and the functional properties of water extract and alkaline extract from royal jelly. *Food Chemistry*. 84, 181–186.

Pascoal, A., Rodrigues, S., Teixeira, A., Feás, X and. Estevinho, L. M. (2013). Biological activities of commercial bee pollens: antimicrobial, antimutagenic, antioxidant and anti-inflammatory. *Food and Chemical Toxicology*. 11(4): 179-183.

Sun, L., Powers, J. R., and Tang, J. (2007). Evaluation of antioxidant activity of asparagus, broccoli and their juices. *Food Chemistry*. 105:101-106.

Villanueva, A., Vioque, J., Sánchez-Vioque, R., Clemente, A., Pedroche, J., Bautista, J. and Millán, F. (1999). Peptide Characteristics of Sunflower Protein Hydrolysates. *Journal of the American Oil Chemists Society*. 76:1455-1460.

Wiriyaphan, C., Chitsomboon, B. and Yongsawadigul, J. (2012). Antioxidant activity of protein hydrolysates derived from threadfin bream surimi byproducts. *Food Chemistry*. 132:104-111.

Zhang, M., Mu, T. H. and Sun, M. J. (2014). Purification and identification of antioxidant peptides from sweet potato protein hydrolysates by Alcalase. *Journal of Functional Foods*. 7:191–200.