

## بهینه‌سازی شرایط هیدرولیز آنزیمی پروتئین گرده زنبورعسل توسط آنزیم گوارشی پپسین براساس ویژگی‌های ضداکسایشی و بازدارندگی ACE و مقایسه آن با ژله رویال

عاطفه مقصودلو<sup>۱</sup>، علیرضا صادقی ماهونک<sup>۲\*</sup>، محمد قربانی<sup>۲</sup>، فیدل تولدرا<sup>۳</sup>

۱- دانشجوی دکتری، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران  
۲- دانشیار، گروه شیمی مواد غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران  
\* نویسنده مسئول (sadedeghiaz@gau.ac.ir)  
۳- استاد، انستیتو آگروشیمی و تکنولوژی مواد غذایی (IATA)، والنسیا، اسپانیا

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۹/۰۱

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۴/۱۴

### چکیده

واژه‌های کلیدی  
ژله رویال  
فعالیت آنتی‌اکسیدانی  
گرده گل  
هیدرولیز آنزیمی  
ACE

در این پژوهش تأثیر هیدرولیز آنزیمی پروتئین گرده گل توسط آنزیم پپسین بر خواص آنتی‌اکسیدانی و بازدارندگی ACE بررسی و با ویژگی آنتی‌اکسیدانی ژله رویال مقایسه گردید. ترکیبات فنلی، فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH، قدرت احیاکنندگی گرده گل و ژله رویال اندازه‌گیری شد که مقادیر آنها برای غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر گرده گل و ژله رویال، به ترتیب ۱۷۴ و ۱۰۳۱/۷۱ میلی‌گرم اسیدگالیک بر گرم نمونه، ۶۷/۳۳ درصد و ۹۵/۲۷ درصد و جذب ۰/۸ و ۰/۷۷ در طول موج ۷۰۰ نانومتر بود. بیشترین قدرت احیاکنندگی تیمارهای هیدرولیزشده با آنزیم پپسین ۲ درصد و مدت هیدرولیز ۴ ساعت، ۰/۸۱ (براساس میزان جذب) بود. بیشترین قدرت مهار رادیکال DPPH تیمارهای هیدرولیزشده با آنزیم پپسین ۲ درصد و مدت هیدرولیز ۲/۵ ساعت، ۱۰۰ درصد بود. بیشترین قدرت مهار ACE تیمارهای هیدرولیزشده با پپسین ۲ درصد و مدت هیدرولیز ۴ ساعت ۹۱/۴۹ درصد بود. نتایج نشان داد با انجام هیدرولیز، قدرت مهار رادیکال DPPH از ۶۷/۳۳ درصد در گرده هیدرولیزنشده، به ۱۰۰ درصد و قدرت مهار ACE گرده گل، از ۱۵/۵۴ درصد در گرده هیدرولیزنشده، به ۹۱/۴۹ درصد در گرده هیدرولیزشده ارتقاء پیدا کرد. بنابراین بعد از انجام عمل هیدرولیز، قدرت مهار رادیکال DPPH و ACE گرده گل با ژله رویال قابل مقایسه شد. باتوجه به اینکه گرده گل تنها منبع اصلی پروتئینی زنبور است؛ با هیدرولیز پروتئین گرده گل، می‌توان آنها را به پپتیدهای موجود در ژله رویال نزدیک کرد.

### مقدمه

است. این ماده توسط آنزیم‌های پروتئاز و دیگر آنزیم‌های طبیعی زنبورعسل، از هضم مستقیم گرده به وجود آمده و از ۲ جفت غده هیپوفارنژیال<sup>۲</sup> موجود در طرفین سر زنبورعسل<sup>۳</sup> کارگر جوان ترشح می‌شود (Bogdanov, 2014; Morais et al., 2011). ویژگی

گرده جمع‌آوری‌شده توسط زنبورعسل با ۱۰ تا ۴۰ درصد پروتئین از تجمع و مخلوط شدن گرده گل‌ها با شهد آنها و بزاق زنبورعسل به دست می‌آید (Pascoal et al., 2013). ژله رویال<sup>۱</sup> با ۲۷ تا ۴۱ درصد پروتئین، به عنوان غنی‌ترین ماده مغذی بیولوژیک شناخته شده

<sup>۲</sup> Hypopharyngeal

<sup>۳</sup> *Apis mellifera*

<sup>۱</sup> Royal Jelly

به دست آمده را مورد بررسی قرار دادند. Salampessy و همکاران (۲۰۱۵) اثر پپتیدهای حاصل از هیدرولیز پروتئین‌های ماهی با آنزیم بروملاین<sup>۵</sup> را بر بازدارندگی از آنزیم مبدل آنژیوتنسن (ACE) مورد بررسی قرار دادند. پپتیدها با بیشترین فعالیت بازدارندگی، شناسایی و وزن مولکولی آنها مشخص شد و به عنوان غذای عملگرا مورد استفاده قرار گرفت.

مصرف ژله رویال، با وجود اثرات مفید و سلامت‌بخش آن، به دلیل اثرات احتمالی از جمله آلرژی‌زایی و طعم اسیدی خاص آن و همچنین کمبود مقدار تولید آن، مرسوم نیست. بسیاری از ویژگی‌های قابل توجه ژله رویال مربوط به پپتیدهایی است که به طور طبیعی در آن وجود دارد. بنابراین هدف از انجام پژوهش حاضر این است که با هیدرولیز آنزیمی گرده که دسترس‌پذیری بیشتری دارد و ارزان‌تر از ژله رویال است، می‌توان ماده‌ای تولید کرد که از نظر برخی از خواص مفید ژله رویال از جمله ویژگی مهار رادیکال DPPH، قدرت احیاکنندگی و بازدارندگی ACE به آن نزدیک باشد.

#### مواد و روش‌ها

این پژوهش در آزمایشگاه علوم و صنایع غذایی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان انجام شد. گرده مخلوط چند گل و ژله رویال از مرکز پرورش زنبورعسل و خدمات گرده‌افشانی واقع در گنبدکاووس، آنزیم‌های پپسین و ACE و سوبسترای آن از شرکت سیگما و سایر مواد آزمایشگاهی شامل اسیدسولفوریک، هیدروکسید سدیم، اسیدبوریک، اسیدکلریدریک، تریس، مونوسدیم فسفات، دی‌سدیم فسفات، تری‌کلرواستیک اسید، اتانول، پتاسیم فری‌سیانید، کلرید فریک، کلرید فرو، رادیکال آزاد DPPH و اتیل استات از شرکت‌های مرک و تتراکم با درجه خلوص آزمایشگاهی تهیه شدند.

#### سنجش خواص آنتی‌اکسیدانی گرده

##### اندازه‌گیری ترکیبات فنلی

اندازه‌گیری ترکیبات فنلی، با استفاده از روش فولین

آنتی‌اکسیدانی ژله رویال و گرده زنبورعسل مربوط به پروتئین‌های اصلی و ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی آنها بوده (Nagai & Inoue, 2004) و دی و تری‌پپتیدهای<sup>۱</sup> حاصل از هیدرولیز پروتئینی فعالیت آنتی‌اکسیدانی قوی‌تری نسبت به پروتئین‌های هیدرولیز نشده از خود نشان می‌دهند (Kawashima *et al.*, 1979; Guo *et al.*, 2009). دلایل مربوط به عملکرد آنتی‌اکسیدانی این پپتیدها شامل قابلیت احیاء و فعالیت مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد، خاصیت خنثی‌کنندگی برخی از ترکیبات سمی همانند رادیکال‌های هیدروکسیل و خاصیت چلاته‌کنندگی کاتیون‌های فلزی پراکسیدان می‌باشد (Benjakul & Kishimura, 2011). نتایج پژوهش‌های انجام شده در زمینه هیدرولیز آنزیمی پروتئین نشان داده است که پپتیدهای به دست آمده از هیدرولیز پروتئین‌های غذایی توسط پپسین، تریپسین و آلکالاز دارای ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی می‌باشند (Wiriaphan *et al.*, 2012; Khantaphant & Benjakul, 2008) فعالیت آنتی‌اکسیدانی ژله رویال در مورد نمونه‌های گیاهی و مخمرها و همچنین 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 *et al.*, 2008; Nagai *et al.*, 2005). Guo و همکاران (۲۰۰۹) اعلام کردند پپتیدهای ژله رویال که از فعالیت پروتئین‌های مختلف به دست می‌آیند، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و کاهندگی فشارخون بالایی را از خود نشان می‌دهند. Almeida و همکاران (۲۰۱۶) نشان دادند ترکیبات فنلی موجود در عصاره گرده گل با ویژگی آنتی‌اکسیدانی مناسب، به طور چشمگیری باعث کاهش واکنش‌های اکسایشی در سوسیس می‌گردد. Marinova و Tchobanov (۲۰۱۰) با استفاده از پروتئیناز و آمینوپپتیدازها<sup>۲</sup> با منشأ گیاهی از جمله بروملاین<sup>۳</sup> آناناس، آمینوپپتیداز و پرولین ایمینوپپتیداز برگ کلم و آمینوپپتیداز نخود، به هیدرولیز پروتئین‌های گرده گل پرداختند و ویژگی‌های مهارکنندگی رادیکال DPPH<sup>۴</sup> پپتیدهای

<sup>1</sup> Dipeptide and Tripeptide

<sup>2</sup> Aminopeptidases

<sup>3</sup> Bromelain

<sup>4</sup> 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

<sup>5</sup> Bromelain

<sup>6</sup> Angiotensin-converting enzyme

کلرید آهن ۰/۱ درصد اضافه شد. پس از ۱۰ دقیقه جذب آن در طول موج ۷۰۰ نانومتر خوانده شد.

#### هیدرولیز آنزیمی گرده گل

هیدرولیز گرده گل توسط آنزیم پپسین در دما و pH بهینه این آنزیم انجام شد. آنزیم‌ها در محدوده غلظت ۱ تا ۲ درصد وزنی/وزنی به محلول پروتئینی افزوده شده و هیدرولیز در مدت زمان‌های ۲ تا ۵ ساعت و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و pH معادل ۳ در انکوباتورهای شیکردار و در دما و pH ثابت انجام شد.

در انتها در دمای ۸۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه واکنش آنزیمی متوقف شد. برای حذف ترکیبات اضافی، سانتریفیوژ در ۴۰۰۰×g به مدت ۳۰ دقیقه انجام شد و سوپرناتانت پس از جمع‌آوری با خشک‌کن انجمادی خشک شد (Villanueva et al., 1999; Matsuoka et al., 2012; Guo et al., 2005)

#### بررسی ویژگی آنتی‌اکسیدانی گرده زنبورعسل هیدرولیزشده

سنجش فعالیت مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH سنجش فعالیت مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH با استفاده از روش Hmidet و همکاران (۲۰۱۱) انجام شد.

#### سنجش قدرت احیاکنندگی

سنجش قدرت احیاکنندگی با استفاده از روش Bougategf و همکاران (۲۰۰۹) انجام شد.

اثر بازدارندگی ACE (افزایش‌دهنده فشارخون) این آزمون بر طبق روش Nasri و همکاران (۲۰۱۳) انجام شد. براساس این روش ۸۰ میکرولیتر از گرده هیدرولیزشده با ۲۰۰ میکرولیتر HHL مخلوط گردید و به مدت ۳ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه‌گذاری شد. واکنش با افزودن ۲۰ میکرولیتر ACE با غلظت ۰/۱ واحد در میلی‌لیتر آغاز شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد ادامه یافت؛ سپس با افزودن ۲۵۰ میکرولیتر اسید کلریدریک ۰/۰۵ مولار متوقف گردید. در مرحله بعد ۱/۷

سیوکالتو<sup>۱</sup> انجام شد. به این منظور ۵۰۰ میکرولیتر از هر غلظت عصاره با ۵۰۰ میکرولیتر معرف فولین سیوکالتو و ۵۰۰ میکرولیتر محلول کربنات سدیم ۱۰ درصد وزنی/حجمی مخلوط گردید و به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق و مکان تاریک گرم‌خانه‌گذاری شد؛ در نهایت جذب آن در طول موج ۷۰۰ نانومتر خوانده شد. مقدار ترکیبات فنلی برحسب میلی‌گرم اسیدگالیک در هر میلی‌لیتر عصاره از طریق معادله خط حاصل از منحنی استاندارد تعیین گردید (Deshpande et al., 1987).

#### سنجش فعالیت مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH

سنجش فعالیت مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH با استفاده از روش Hmidet و همکاران (۲۰۱۱) انجام شد. برای این منظور ۱ میلی‌لیتر از عصاره حل‌شده در اتانول با ۱ میلی‌لیتر از محلول DPPH اتانولی با غلظت ۰/۱ میلی‌مولار مخلوط شد، سپس به مدت ۵۰ دقیقه در تاریکی قرار گرفت. جذب مخلوط در طول موج ۵۱۷ نانومتر خوانده شد. در نهایت فعالیت مهارکنندگی براساس درصد، طبق رابطه (۱) محاسبه شد.

رابطه (۱)

$$DPPH = 100 \times \frac{(A_0 - A_1)}{A_0}$$

در رابطه (۱)،  $A_0$ : جذب کنترل و  $A_1$ : جذب نمونه می‌باشد.

#### سنجش قدرت احیاکنندگی

اندازه‌گیری قدرت احیاکنندگی گرده گل در احیای آهن III با استفاده از روش Bougategf و همکاران (۲۰۰۹) انجام شد. به این منظور ۱ میلی‌لیتر از محلول عصاره با ۲/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات pH معادل ۶/۶ و ۲/۵ میلی‌لیتر پتاسیم فری‌سیانید ۱ درصد مخلوط گردید و به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب با دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت؛ سپس ۲/۵ میلی‌لیتر تری‌کلرواستیک اسید ۱۰ درصد وزنی/حجمی به آن اضافه شد. پس از ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ با دور ۱۶۵۰×g، به ۲/۵ میلی‌لیتر از سوپرناتانت به دست آمده، ۲/۵ میلی‌لیتر آب مقطر و ۰/۵ میلی‌لیتر محلول

<sup>2</sup> N-Hippuryl-His-Leuhydrate

<sup>1</sup> Folin-Ciocalteu

## رابطه (۳)

$$Y = 0.0011X + 0.196 \quad R^2 = 0.98$$

در رابطه (۳)،  $X$  و  $Y$ : به ترتیب معادل جذب نمونه در طول موج ۷۰۰ نانومتر و مقدار کل ترکیبات فنلی براساس میلی گرم معادل اسیدگالیک در هر گرم گرده گل می باشد. شکل (۱) مقایسه میانگین میزان ترکیبات فنلی در غلظت های مختلف عصاره آبی گرده گل و ژله رویال را نشان می دهد. میزان ترکیبات فنلی گرده گل بین ۱۵/۴۸ تا ۱۷۴ میلی گرم اسیدگالیک بر گرم گرده و میزان ترکیبات فنلی ژله رویال بین ۲۴/۹ و ۲۶۱/۸۷ میلی گرم اسیدگالیک بر هر گرم ژله رویال متغیر بود. روند تغییرات میزان ترکیبات فنلی هر دو نمونه با افزایش غلظت عصاره، افزایشی بود و این تغییرات در غلظت های ۲۰۰ تا ۱۰۰۰ میلی گرم بر لیتر معنی دار بود ( $P < 0.05$ ). میزان ترکیبات فنلی اندازه گیری شده در این پژوهش، قابل مقایسه با میزان ترکیبات فنلی اندازه گیری شده توسط سایر پژوهشگران می باشد. به عنوان مثال Almeida و همکاران (۲۰۱۶)، میزان ترکیبات فنلی عصاره اتانولی گرده گل را ۱۹/۶۹ میلی گرم اسیدگالیک بر گرم گرده گل گزارش کردند. Daoud و همکاران (۲۰۱۵)، ترکیبات فنلی عصاره آبی گرده گل دو واریته خرما را ۵/۴ تا ۲۳۷/۷۴ و ۱۳/۴۲ تا ۱۹۷/۶۲ میلی گرم اسیدگالیک بر گرم گرده گل گزارش کردند. Pascoal و همکاران (۲۰۱۳)، میزان ترکیبات فنلی عصاره متانولی ۸ نوع گرده تجاری اسپانیا و پرتغال را در محدوده ۱۸/۵ تا ۳۲/۱۵ میلی گرم اسیدگالیک بر گرم گرده گل گزارش کردند. Liu و همکاران (۲۰۰۸)، میزان ترکیبات فنلی ژله رویال را در حدود ۲۲۰ میکروگرم اسیدگالیک بر گرم ژله رویال گزارش کردند که در مقایسه با ترکیبات فنلی ژله رویال مورد آزمون در پژوهش حاضر بسیار کمتر است. Leblanc و همکاران (۲۰۰۹) اعلام کردند در نوع حلال مورد استفاده برای استخراج ترکیبات فنلی، درجه پلیمریزاسیون ترکیبات فنلی گرده گل و ژله رویال، همچنین واکنش های آنها با یکدیگر، فاکتورهای ژنتیکی و مناطق جغرافیایی، تک گل یا چندگل بودن گرده در میزان و نوع ترکیبات فنلی

میلی لیتر اتیل استات به مخلوط اضافه شد و به مدت ۱۵ دقیقه با دور  $800 \times g$  سانتریفیوژ شد. جهت تبخیر اتیل استات، سوپرناتانت به دست آمده به مدت ۱۰ دقیقه در آون با دمای ۹۵ درجه سانتی گراد قرار گرفت. رسوب باقی مانده در ۱ میلی لیتر آب مقطر حل شد و جذب آن با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر دو پرتویی ماوراء بنفش-مرئی (شرکت PG instrument Ltd T80+، ساخت انگلستان) با طول موج ۲۲۸ نانومتر خوانده شد. در نهایت درصد بازدارندگی از ACE توسط رابطه (۲) محاسبه گردید (Nasri et al., 2013).

## رابطه (۲)

$$ACE \text{ درصد بازدارندگی} = \frac{(B-A)}{B} \times 100$$

در رابطه (۲)،  $A$ : جذب مخلوط ACE، HHL و پروتئین هیدرولیز شده و  $B$ : جذب مخلوط ACE و HHL می باشد.

## تجزیه و تحلیل آماری

آزمون های آنتی اکسیدانی قبل از انجام هیدرولیز براساس طرح کاملاً تصادفی در سطح معنی داری ۰/۰۵ درصد و با استفاده از نرم افزار IBM SPSS Statistics v25 انجام شد. تیمار بندی و بهینه سازی فعالیت آنتی اکسیدانی گرده گل هیدرولیز شده با استفاده از نرم افزار Design Expert با روش سطح پاسخ ( $RSM^1$ ) در نقاط مشخص شده با طرح مرکب مرکزی انجام شد. مقایسه دوتایی مقادیر پیش بینی شده با مقادیر واقعی با استفاده از آزمون T-test در نرم افزار SPSS انجام شد.

## نتایج و بحث

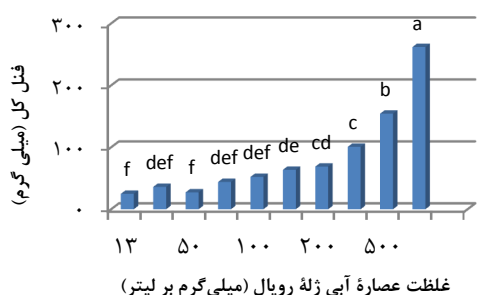
## آزمون های آنتی اکسیدانی

## اندازه گیری ترکیبات فنلی

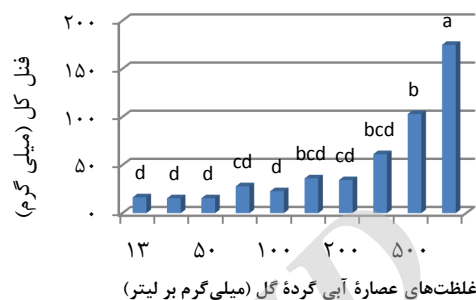
معادله خط همبستگی که رابطه غلظت محلول اسیدگالیک را با میزان جذب نمونه ها در طول موج ۷۰۰ نانومتر نشان می دهد، به صورت رابطه (۳) می باشد. در این رابطه ضریب همبستگی ۰/۹۸ بود ( $R^2 = 0.98$ ).

<sup>1</sup> Response Surface Methodology

که در گرده گل و ژله رویال با افزایش غلظت عصاره، میزان ترکیبات فنلی افزایش می‌یابد، این روند افزایشی در ژله رویال، از غلظت ۳۰۰ میلی‌گرم بر لیتر عصاره به بعد با شدت بیشتری نسبت به گرده گل قابل مشاهده بود.



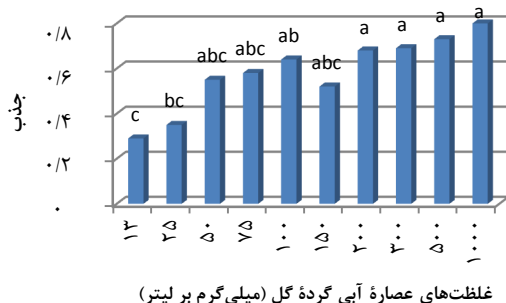
گرده‌ها و ژله رویال مناطق مختلف تأثیرگذار می‌باشد. باتوجه‌به اینکه ژله رویال از هضم مستقیم گرده گل توسط زنبورعسل حاصل می‌شود، از نظر میزان ترکیبات فنلی با یکدیگر قابل مقایسه هستند (Bogdanov, 2014). در این پژوهش نیز مشخص شد



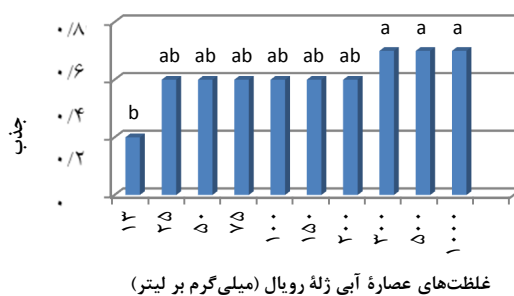
شکل ۱- میزان ترکیبات فنلی غلظت‌های مختلف عصاره آبی گرده گل و ژله رویال

احیاکنندگی در غلظت‌های پایین (۱۲/۵ و ۲۵) با غلظت‌های بالاتر از ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر اختلاف معنی‌دار بود ( $P < 0.05$ ). این یافته با نتایج Morais و همکاران (۲۰۱۱) مطابقت داشت. اما قدرت احیاکنندگی ژله رویال و گرده گل اختلاف معنی‌دار و مشخصی نداشتند که می‌توان دلیل آن را یکسان بودن نسبی میزان ترکیبات احیاکننده یون آهن در گرده گل و ژله رویال دانست (Bogdanov, 2014).

Morais و همکاران (۲۰۱۱) مشاهده کردند کمترین و بیشترین غلظت عصاره فنلی گرده به ترتیب کمترین و بیشترین قدرت احیاکنندگی یون آهن را داشته درحالی‌که بین قدرت احیاکنندگی غلظت‌های میانی تفاوت معنی‌داری وجود نداشت. کم‌شدن قدرت احیاکنندگی یون آهن با کاهش غلظت ترکیبات فنلی عصاره را Leblance و همکاران (۲۰۰۹) و Marghitas و همکاران (۲۰۰۹) نیز گزارش کرده‌اند.



قدرت احیاکنندگی یون آهن سه‌ظرفیتی در مطالعه قدرت احیاکنندگی یون آهن سه‌ظرفیتی، احیاء این یون به‌عنوان معیاری برای قابلیت الکترون‌دهی ترکیبات فنلی به‌کار می‌رود. این موضوع سازوکار مهمی را در فرایند اکسایش ترکیبات فنلی تشکیل می‌دهد. ظرفیت‌دهندگی الکترون (قدرت احیاکنندگی) مرتبط با فعالیت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات زیستی می‌باشد (Arabshahi et al., 2001). در شکل (۲) مقایسه میانگین قدرت احیاکنندگی غلظت‌های مختلف عصاره آبی گرده گل و ژله رویال مشخص شده است، این نتایج حاکی از آن بود که قدرت احیاکنندگی 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 نمونه با افزایش غلظت عصاره افزایشی بود، به‌طوری‌که بین قدرت

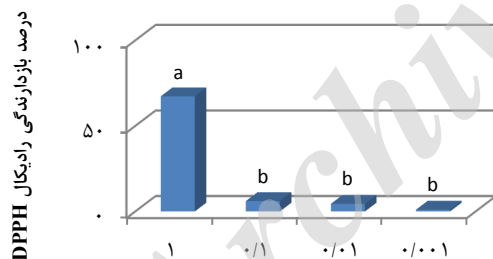


شکل ۲- قدرت احیاکنندگی غلظت‌های مختلف عصاره آبی گرده گل و ژله رویال

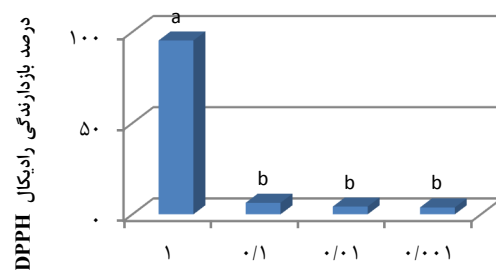
حاضر، ۹۵/۲۷ درصد بود که در مقایسه با گزارش Liu و همکاران (۲۰۰۸) بسیار بالاتر است. این مسأله را می‌توان به تفاوت در میزان ترکیبات فنلی ژله رویال، منطقه جغرافیایی و پروتئین‌ها و پپتیدهای آنتی‌اکسیدان موجود در ژله رویال نسبت داد. بین قدرت مهار رادیکال گرده گل و ژله رویال، اختلاف قابل توجهی مشاهده شد. این 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 به‌دام‌انداختن رادیکال‌های آزاد را دارا هستند. Nagai و همکاران (۲۰۰۵) نشان دادند که پروتئین‌های ژله رویال دارای ویژگی آنتی‌اکسیدانی قوی هستند. Guo و همکاران (۲۰۰۵) پپتیدهای آنتی‌اکسیدان را از پروتئین‌های محلول در آب ژله رویال جداسازی و شناسایی کردند.

### فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH

شکل (۳) نتایج مقایسه میانگین درصد مهارکنندگی رادیکال DPPH در غلظت‌های مختلف عصاره آبی گرده گل و ژله رویال را نشان می‌دهد. در شکل (۳) 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 نمونه، با افزایش غلظت عصاره، افزایشی بود؛ به طوری که اختلاف در بیشترین غلظت با سایر غلظت‌ها به‌طور قابل توجهی معنی‌دار بود ( $P < 0.05$ ). Sun و همکاران (۲۰۰۷)، Kroyer و Hegedus (۲۰۰۱) و Morais و همکاران (۲۰۱۱) نیز گزارش نمودند که فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH عصاره‌های فنلی وابسته به غلظت بوده و با افزایش غلظت اثر مهارکنندگی شدت می‌یابد. 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



شکل ۳-۱: اثر بازدارندگی رادیکال DPPH در غلظت‌های مختلف عصاره آبی گرده گل (میلی‌گرم بر لیتر)



شکل ۳-۲: اثر بازدارندگی رادیکال DPPH در غلظت‌های مختلف عصاره آبی ژله رویال (میلی‌گرم بر لیتر)

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

آورده شده است. در مرحله بعد داده‌های به‌دست‌آمده تجزیه و تحلیل شدند. ضرایب همبستگی و جدول تجزیه واریانس برای هر یک از پاسخ‌ها برای آزمون‌های آنتی‌اکسیدانی احیاکنندگی، مهار رادیکال آزاد DPPH و مهار ACE به ترتیب مطابق با جداول (۲)، (۳) و (۴) می‌باشد.

### بهینه‌سازی هیدرولیز گرده گل و آزمون‌های آنتی‌اکسیدانی

باتوجه به نقاط تعریف‌شده در روش سطح پاسخ RSM، آزمون‌های مربوطه انجام شد. نتایج آزمون‌های فعالیت آنتی‌اکسیدانی گرده گل هیدرولیزشده در نقاط مشخص‌شده با طرح مرکب مرکزی در جدول (۱)

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

تیمار	غلظت آنزیم (درصد)	زمان (ساعت)	فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH	قدرت احیاکنندگی (میزان جذب در ۷۰۰ نانومتر)	فعالیت مهارکنندگی ACE
۱	۲	۱	۳۴/۰۹	۰/۶۸	۳۴/۰۹
۲	۱/۵	۱	۹۶/۵۱	۰/۶۵	۳۵/۵۸
۳	۱	۱	۸۸/۵۸	۰/۷۵	۶۷/۷۴
۴	۲	۲/۵	۱۰۰	۰/۶۸	۴۴/۳
۵	۱/۵	۲/۵	۹۱/۷۱	۰/۶۱	۲۷/۹۳
۶	۱/۵	۲/۵	۹۳/۶۴	۰/۵۷	۲۸/۹۳
۷	۱/۵	۲/۵	۹۲/۷۱	۰/۶۱	۲۷/۹۳
۸	۱/۵	۲/۵	۹۴/۶۴	۰/۵۷	۲۷/۹۳
۹	۱/۵	۲/۵	۹۵/۷۱	۰/۶۱	۲۷/۹۳
۱۰	۱	۲/۵	۹۱/۰۲	۰/۵۷	۴۴/۲۲
۱۱	۲	۴	۷۱/۸۸	۰/۸۱	۹۱/۴۹
۱۲	۱/۵	۴	۶۶/۶۹	۰/۷۴	۵۸/۲۴
۱۳	۱	۴	۶۷/۲۴	۰/۷۳	۵۷/۶۷

آزمایش از آزمون ضعف برازش مدل (Lack of fit) استفاده شد که با توجه به نتایج جدول (۲)، این فرض برای هر ۳ آنزیم معنی‌دار نشد ( $P > 0.05$ ). این مسأله بیانگر آن است که مدل به خوبی با داده‌های مربوط به قدرت احیاکنندگی گرده هیدرولیز شده تطبیق دارد.

جدول ۲ - جدول تجزیه واریانس برای فعالیت احیاکنندگی یون آهن

سطح معنی‌داری (P)	ضریب همبستگی	درجه آزادی	مدل
۰/۰۰۰۲	۰/۷۰۳۴۶	۵	مدل
۰/۰۰۰۲	-۰/۱۳۵۶۲	۱	$X_1$ (زمان)
۰/۰۰۱۱	-۰/۰۸۴۷۴	۱	$X_2$ (غلظت آنزیم)
۰/۴۹۰۸	۰/۰۳۸۹	۱	$X_1^2$
۰/۰۰۰۴	۰/۰۷۰۴۱	۱	$X_2^2$
۰/۲۳۸۴	-۰/۰۱۱	۱	$X_1X_2$
۰/۴۲۵		۳	Lack of fit
	۰/۹۱		$R^2$ -Pred
	۰/۷۴		$R^2$ -Adj

نمودار سه‌بعدی اثر زمان و غلظت آنزیم بر قدرت احیاکنندگی گرده هیدرولیز شده توسط آنزیم پپسین در شکل (۴) نشان داده شده است. همان‌طور که مشخص است، بیشترین قدرت احیاکنندگی تیمارهای هیدرولیز شده با آنزیم پپسین، ۰/۸۱ براساس میزان جذب بود که مربوط به تیمار هیدرولیز شده با غلظت

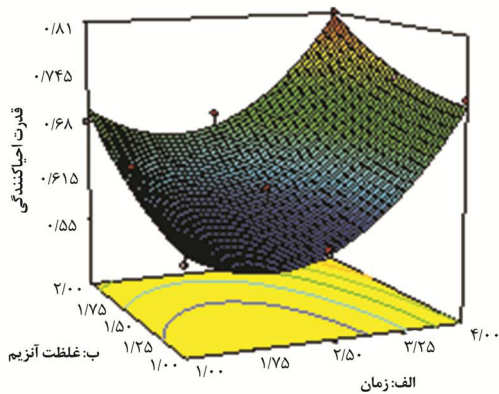
قدرت احیاکنندگی یون آهن سه‌ظرفیتی نتایج مربوط به تجزیه واریانس و ضرایب همبستگی برای پاسخ‌های قدرت احیاکنندگی گرده هیدرولیز شده در جدول (۲) ذکر شده است. آنالیز سطح پاسخ نشان می‌دهد که در مورد قدرت احیاکنندگی گرده‌های هیدرولیز شده با آنزیم پپسین پارامترهای واکنش از نوع درجه دوم و با ضریب همبستگی ( $R^2 = 0.95$ ) می‌باشد که در رابطه (۴) نشان داده شده است.

رابطه (۴)

$$Y = 0.70346 - 0.13562X_1 - 0.08474X_2 + 0.389X_1^2 + 0.07041X_2^2 - 0.011X_1X_2$$

در رابطه (۴)،  $X_1$  و  $X_2$ : به ترتیب متغیرهای زمان هیدرولیز و غلظت آنزیم و  $Y$ : قدرت احیاکنندگی می‌باشند.

نتایج جدول (۲) نشان می‌دهد که مدل آماری ارائه شده برای پیش‌بینی اثر متغیرهای آزمایش بر قدرت احیاکنندگی گرده گل هیدرولیز شده توسط آنزیم پپسین مناسب می‌باشد ( $P < 0.05$ ). اثر متغیر زمان روی قدرت احیاکنندگی ( $P < 0.0002$ )، بیشتر و معنی‌دارتر از متغیر غلظت آنزیم ( $P < 0.0011$ ) می‌باشد. اثر درجه ۲ زمان و اثر متقابل زمان و غلظت آنزیم بر قدرت احیاکنندگی معنی‌دار نبود ( $P > 0.05$ ). جهت بررسی مناسب بودن مدل برای داده‌های این



شکل ۴ - نمودار سه‌بُعدی اثر غلظت آنزیم (درصد) و مدت زمان هیدرولیز (ساعت) بر قدرت احیاکنندگی گرده گل هیدرولیز شده

#### فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH

نتایج مربوط به تجزیه واریانس و ضرایب همبستگی برای پاسخ‌های فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH گرده هیدرولیز شده در جدول (۳) ذکر شده است. آنالیز سطح پاسخ نشان می‌دهد در فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH گرده هیدرولیز شده معادله واکنش از نوع درجه دوم بوده و ضریب همبستگی آن ( $R^2=0.98$ ) می‌باشد (رابطه ۵).

رابطه (۵)

$$Y = 69/3891 + 22/84933 X_1 + 1/22549 X_2 - 5/77572 X_1^2 + 3/64728 X_2^2 - 1/7373 X_1 X_2$$

در رابطه (۵)،  $X_1$  و  $X_2$ : به ترتیب متغیرهای زمان هیدرولیز و غلظت آنزیم و  $Y$ : قدرت مهارکنندگی رادیکال DPPH می‌باشد.

نتایج جدول (۳) نشان می‌دهد که مدل آماری ارائه شده برای پیش‌بینی اثر متغیرهای آزمایش بر فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH گرده گل هیدرولیز شده مناسب می‌باشد ( $P < 0.05$ ).

در تمامی تیمارها اثر زمان بر میزان مهار رادیکال DPPH معنی‌دار بود ( $P < 0.05$ )، و اثر زمان ( $P < 0.0001$ ) معنی‌دارتر از اثر غلظت آنزیم ( $P < 0.0014$ ) بود. همچنین نتایج اثر درجه دوم هر یک از متغیرها را بر پاسخ آزمایش معنی‌دار نشان می‌دهد ( $P < 0.05$ ). همچنین جهت مناسب بودن مدل برای داده‌های این آزمایش از آزمون ضعف برازش مدل (Lack of fit) استفاده شد که باتوجه به نتایج جدول

آنزیم ۲ درصد و مدت زمان هیدرولیز ۴ ساعت می‌باشد. به‌طور کلی در گرده هیدرولیز شده با آنزیم پپسین، با افزایش زمان هیدرولیز تا ۴ ساعت و غلظت آنزیم تا ۲ درصد، روند تغییرات قدرت احیاکنندگی، ابتدا نسبتاً ثابت و سپس افزایشی بوده و در تمام مراحل اثر زمان بیشتر از اثر غلظت آنزیم بود. بنابراین بهتر است برای دستیابی به بیشترین میزان قدرت احیاکنندگی، از محدوده غلظت آنزیم و مدت زمان هیدرولیز بالا استفاده کرد. آغاز روند افزایشی پس از گذشت ۲ ساعت را می‌توان باتوجه به گروه تیول در جایگاه فعال آنزیم پپسین توضیح داد. براین اساس آنزیم پپسین ترجیحاً اتصالات مجاور اسیدهای آمینه فنیل آلانین، تیروزین و تریپتوفان را می‌شکند. ابتدا با شکسته شدن این باندهای پپتیدی خاص و رها شدن از ساختار اصلی پروتئین‌ها، وزن مولکولی آنها کاهش یافته و سپس با افزایش زمان و پیشرفت فرایند هیدرولیز و شکسته شدن بیشتر زنجیره‌های پپتیدی، تولید پپتیدهای با قابلیت اهداء الکترون برای احیاء یون آهن سه‌ظرفیتی به دو ظرفیتی افزایش پیدا می‌کند. Lassoued و همکاران (۲۰۱۵)، اعلام کردند علاوه بر اختلاف در شرایط آزمایش و نوع آنزیم‌های مورد استفاده، نوع سوبسترا و توالی اسید آمینه در پپتیدهای تشکیل شده، درجه هیدرولیز و طول زنجیره پپتیدی در عملکرد آنها در احیاء یون آهن مؤثر است. Guerar و همکاران (۲۰۰۲)، اعلام کردند با افزایش غلظت آنزیم، میزان تولید پپتیدها با ویژگی آنتی‌اکسیدانی افزایش می‌یابد. Je و همکاران (۲۰۰۹) که پروتئین جگر ماهی‌تن را با استفاده از چند نوع پروتئاز هیدرولیز کردند، بیشترین میزان قدرت احیاء یون آهن را با جذب ۰/۴۵ در ۷۰۰ نانومتر گزارش نمودند.



پروتئین باشد که باعث شکستن برخی از زنجیره‌های پپتیدی اولیه با فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالا شده و کاهش فعالیت آنها را به دنبال دارد. Nagai و همکاران (۲۰۰۵) با استفاده از آنزیم‌های پپسین، تریپسین و پاپاین<sup>۱</sup> پروتئین‌های گرده گل را هیدرولیز کرده و اعلام داشتند که قدرت مهار رادیکال پروتئین‌های هیدرولیز شده با پپسین، تریپسین و پاپاین، با غلظت‌های ۱ درصد وزنی/حجمی به مدت ۴۸ ساعت هیدرولیز، به ترتیب ۹۷، ۹۵ و ۹۰ درصد بود. این مقادیر با بیشترین قدرت مهار رادیکال DPPH توسط گرده‌های هیدرولیز شده در پژوهش حاضر قابل مقایسه است.

Je و همکاران (۲۰۰۹) اعلام کردند که پپتیدها با وزن مولکولی بین ۱ تا ۳ کیلودالتون بیشترین قدرت مهار رادیکال DPPH را دارند. Marinova و Tchobanov (۲۰۱۰)، با استفاده از ۴ ساعت هیدرولیز آنزیمی پروتئین‌های گرده گل، پپتیدهایی با قابلیت مهار رادیکال DPPH به میزان ۴۶ درصد دست پیدا کردند؛ در حالی که در پژوهش حاضر، پس از ۲ ساعت و ۳۰ دقیقه هیدرولیز میزان مهار رادیکال DPPH به ۱۰۰ درصد رسید و پس از ۴ ساعت هیدرولیز، میزان قدرت مهار رادیکال کاهش یافت. Taheri و همکاران (۲۰۱۱) اعلام کردند پیشرفت فرایند هیدرولیز منجر به رهاسازی پپتیدها با ویژگی آنتی‌اکسیدانی از زنجیره‌های پروتئینی می‌گردد ولی ادامه فرایند هیدرولیز ممکن است باعث کاهش این فعالیت شود. در این زمینه Lassoued و همکاران (۲۰۱۵)، نشان دادند بیشترین قدرت مهار رادیکال DPPH در غلظت‌های ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر ماهیچه‌های هیدرولیز شده با پروتاز ۵۱ درصد بود، در حالی که این میزان در ماهیچه هیدرولیز شده ۲۵ درصد گزارش شد. این مقدار در مقایسه با مقدار به دست آمده در این پژوهش (۱۰۰ درصد) پایین‌تر است. Lassoued و همکاران (۲۰۱۵) بیان کردند پپتیدهایی که دارای کمترین درجه هیدرولیز بودند، بالاترین آب‌گریزی و بیشترین قدرت مهار رادیکال DPPH را از خود نشان دادند. هیدرولیز آنزیمی بیشتر، باعث کوتاه‌تر شدن زنجیره‌های پپتیدی و افزایش

(۳)، این فرض معنی‌دار نشد ( $P > 0.05$ ). این مسأله بیانگر آن است که مدل به خوبی با داده‌های مربوط به فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH گرده هیدرولیز شده تطبیق دارد.

### جدول ۳ - تجزیه واریانس فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH

درجه آزادی	ضریب همبستگی	سطح معنی‌داری (P)	مدل
۵	۶۹/۳۸۹۱	<۰/۰۰۰۱	مدل
۱	۲۲/۸۴۹۳	<۰/۰۰۰۱	X <sub>1</sub> (زمان)
۱	۱/۲۲۵۴	۰/۰۰۱۴	X <sub>2</sub> (غلظت آنزیم)
۱	-۵/۷۷۵۷	<۰/۰۰۰۱	X <sub>1</sub> <sup>2</sup>
۱	۳/۶۴۷۲	<۰/۰۰۰۱	X <sub>2</sub> <sup>2</sup>
۱	-۱/۷۳۷۳	۰/۲۰۹۳	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>
۳	۰/۲۵۲۵	۰/۲۵۲۵	Lack of fit
	۰/۹۷		R <sup>2</sup> - Pred
	۰/۹۰		R <sup>2</sup> - Adj

نمودار سه‌بعدی اثر زمان و غلظت آنزیم را بر فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH گرده هیدرولیز شده با آنزیم پپسین در شکل (۵) نشان داده شده است. همان‌طور که مشخص است، بیشترین قدرت مهار رادیکال DPPH تیمارهای هیدرولیز شده با آنزیم پپسین، ۱۰۰ درصد بود که مربوط به تیمار هیدرولیز شده با غلظت آنزیم ۲ درصد و مدت زمان هیدرولیز ۲ ساعت و ۳۰ دقیقه می‌باشد. به‌طور کلی در گرده هیدرولیز شده با آنزیم پپسین، با افزایش زمان هیدرولیز، همچنین افزایش غلظت آنزیم تا ۲ درصد و روند تغییرات قدرت مهار رادیکال DPPH، ابتدا افزایشی و سپس کاهشی بود. این روند تغییرات با اثر زمان مشخص‌تر بود. بنابراین بهتر است برای دستیابی به بیشترین میزان قدرت مهار رادیکال DPPH، از مدت زمان هیدرولیز متوسط و ترجیحاً غلظت‌های بالای آنزیم استفاده کرد. Je و همکاران (۲۰۰۹) که پروتئین جگر ماهی‌تن را با استفاده از چند نوع پروتاز هیدرولیز کردند، بیشترین میزان قدرت مهار رادیکال DPPH را حدود ۱۰۰ درصد گزارش کردند. کاهش میزان فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH پروتئین هیدرولیز شده با طولانی‌شدن زمان هیدرولیز، می‌تواند ناشی از پیشرفت مقدار هیدرولیز و اثر بیشتر آنزیم بر

<sup>۱</sup> Papain

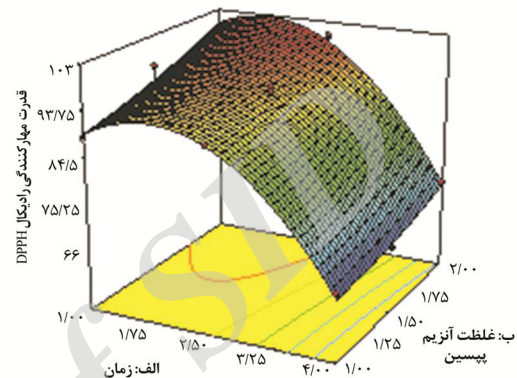
مهار ACE توسط تیمارهای هیدرولیز شده معنی دار بود ( $P < 0/0001$ ). درحالی که غلظت آنزیم پپسین بر مهار ACE اثری معنی دار نداشت. اثر درجه دوم و اثر متقابل هریک از متغیرها بر پاسخ آزمایش معنی دار بود ( $P < 0/0001$ ). باتوجه به نتایج جدول (۴)، آزمون ضعف برازش مدل (Lack of fit) معنی دار نشد ( $P > 0/05$ ).

جدول ۴ - جدول تجزیه واریانس واریانس برای فعالیت مهارکنندگی ACE

سطح معنی داری (P)	ضریب همبستگی	درجه آزادی	مدل
<0/0001	۲۲۸/۶۱۴۷	۵	مدل
<0/0001	-۶۷/۳۷۷۹	۱	$X_1$ (زمان)
0/۸۱۲	-۲۴۸/۰۰۷	۱	$X_2$ (غلظت آنزیم)
<0/0001	۸/۲۸۳۹	۱	$X_1^2$
<0/0001	۶۳/۹۵۵۱	۱	$X_2^2$
<0/0001	۲۲/۴۹	۱	$X_1X_2$
0/۶۱۸۶		۳	Lack of fit
	0/۹۹		$R^2$ - Pred
	0/۹۸		$R^2$ - Adj

نمودار سه بُعدی اثر زمان و غلظت آنزیم بر فعالیت بازدارندگی ACE گرده هیدرولیز شده در شکل (۶) نشان داده شده است. همان طور که مشخص است، بیشترین قدرت مهار ACE تیمارهای گرده هیدرولیز شده با آنزیم پپسین، ۹۱/۴۹ درصد بود که مربوط به تیمار هیدرولیز شده با غلظت آنزیم ۲ درصد و مدت زمان هیدرولیز ۴ ساعت می باشد. به طور کلی در گرده هیدرولیز شده با آنزیم پپسین با افزایش زمان هیدرولیز، روند تغییرات قدرت مهار ACE ابتدا کاهشی و سپس افزایشی بود. زمان هیدرولیز یا غلظت های آنزیمی واقع در نقاط گوشه ای یا غیرمرکزی نمودار برای دستیابی به بیشترین میزان قدرت مهار ACE مناسب بودند. Coscueta و همکاران (۲۰۱۶) نشان دادند با افزایش مدت زمان هیدرولیز پروتئین آرد سویا با آنزیم کروزا تا ۱۰ ساعت، پپتیدهایی با وزن مولکولی کمتر از ۳ کیلوالتون تولید شد و با افزایش مدت زمان هیدرولیز، قدرت بازدارندگی ACE افزایش یافت. Je و همکاران (۲۰۰۹)، بیشترین میزان قدرت بازدارندگی ACE در

آب دوستی آنها شد و کارایی آنها در مهار رادیکال DPPH کاهش یافت. Zhang و همکاران (۲۰۱۴) مشاهده نمودند که پپتیدهای با وزن مولکولی کمتر از ۱ کیلوالتون بیشترین قدرت آنتی اکسیدانی را دارا هستند. Marinova و Tchobanov (۲۰۱۰)، اعلام کردند میزان مهار رادیکال DPPH گرده گل از ۲۸ درصد قبل از هیدرولیز به حداکثر ۴۶ درصد بعد از هیدرولیز افزایش یافت.



شکل ۵ - نمودار سه بُعدی قدرت مهارکنندگی رادیکال DPPH توسط گرده گل هیدرولیز شده در مقابل زمان (ساعت) و غلظت آنزیم پپسین (درصد)

#### فعالیت بازدارندگی ACE

نتایج مربوط به تجزیه واریانس و ضرایب همبستگی برای پاسخ های فعالیت مهارکنندگی ACE گرده هیدرولیز شده در جدول (۴) ذکر شده است. آنالیز روش سطح پاسخ نشان می دهد که رابطه فعالیت بازدارندگی ACE گرده هیدرولیز شده با آنزیم پپسین با پارامترهای واکنش از نوع درجه دوم با ضریب همبستگی ( $R^2 = 0/99$ ) می باشد (رابطه ۶).

رابطه (۶)

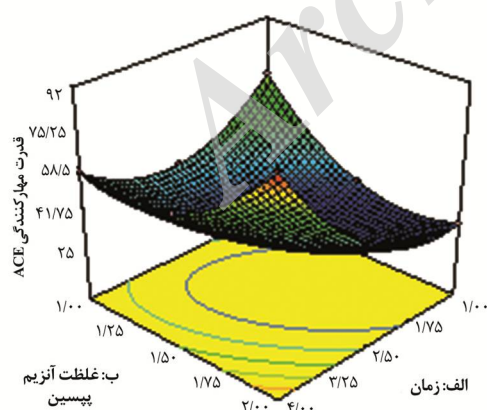
$$Y = 2288/6147 - 67/3779X_1 - 248/007X_2 + 8/2839X_1^2 + 63/9551X_2^2 + 22/49X_1X_2$$

در رابطه (۶)  $X_1$  و  $X_2$ : به ترتیب متغیرهای زمان هیدرولیز و غلظت آنزیم و  $Y$ : قدرت مهارکنندگی ACE می باشد.

نتایج جدول (۴) نشان می دهد که مدل آماری ارائه شده برای پیش بینی اثر متغیرهای آزمایش بر فعالیت مهارکنندگی ACE گرده گل هیدرولیز شده مناسب می باشد ( $P < 0/05$ ). اثر متغیر زمان بر میزان

قابل مقایسه است. همچنین آنها اعلام کردند که بالاترین میزان بازدارندگی ACE مربوط به پپتیدهایی بود که ویژگی آب‌گریزی بالایی داشتند، زیرا پپتیدهای آب‌گریز جاذبه بیشتری به قرارگیری در مکان فعال ACE از خود نشان دادند.

پپتیدهای بازدارنده ACE به ۲ طریق می‌توانند فعالیت کنند: پپتیدها یا به جایگاه فعال ACE متصل می‌شوند یا ممکن است بر مکان‌های بازدارنده‌ای که در ACE قرار دارند، متصل و منجر به تغییر ساختار فضایی پروتئین شده و از اتصال بعدی سوبسترا (آنزیم‌تسین) به مکان فعال آنزیم جلوگیری کند. Nasri و همکاران (۲۰۱۳) با استفاده از ۵ نوع پروتئاز گوآرشی، پروتئین‌های ماهی<sup>۵</sup> Goby را به مدت ۶ ساعت و با نسبت ۱ به ۳ آنزیم به پروتئین هیدرولیز کردند. نتایج نشان داد قدرت بازدارندگی ACE در ۵ تیمار در محدوده ۵۶ تا ۹۹ درصد بود که از نظر مقداری با داده‌های پژوهش حاضر قابل مقایسه است. بالاتر بودن قدرت مهار ACE در گرده‌های هیدرولیز شده در شرایط آزمایشگاه، نسبت به ژله رویال را می‌توان به تولید پپتیدهای زنجیره کوتاه‌تر با ویژگی آب‌گریزی-آب‌دوستی مناسب، وزن مولکولی کمتر و توالی اسیدآمینه‌های خاصی که در شرایط هیدرولیز آزمایشگاهی حاصل شده‌اند، نسبت داد (Paiva et al., 2016).



شکل ۶ - نمودار سه‌بعدی برای قدرت مهارکنندگی ACE توسط گرده گل هیدرولیز شده در مقابل زمان (ساعت) و غلظت آنزیم پپسین (درصد)

پروتئین جگر ماهی تن هیدرولیز شده با آنزیم‌های مختلف پروتئومیکس<sup>۱</sup>، آلکالاز، نوترئاز<sup>۲</sup>، فلاورزایم<sup>۳</sup> را ۳۶ درصد گزارش کردند که در مقایسه با بیشترین میزان بازدارندگی در پژوهش حاضر بسیار پایین‌تر است. Lassoued و همکاران (۲۰۱۵)، اثر بازدارندگی ACE ماهیچه‌های هیدرولیز شده با چند پروتئاز را مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد بیشترین اثر بازدارندگی ACE مربوط به غلظت‌های ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تیمارهای هیدرولیز شده با آنزیم نوترئاز با میزان ۸۷ درصد و بعد از آن مربوط به تیمار هیدرولیز شده با آلکالاز، ۸۴ درصد بود. این مقدار با نتایج به دست آمده در این پژوهش قابل مقایسه بود. در این زمینه Je و همکاران (۲۰۰۹) اعلام کردند که افزایش درجه هیدرولیز، به‌طور قطعی باعث افزایش قدرت بازدارندگی ACE نمی‌گردد، اما Nasri و همکاران (۲۰۱۳) نشان دادند که قدرت بالای بازدارندگی ACE ماهیچه هیدرولیز شده ارتباط زیادی با حضور پپتیدهای کوتاه‌زنجیر دارد. در پژوهش حاضر نیز بیشترین قدرت بازدارندگی ACE در بیشترین مدت زمان هیدرولیز به دست آمد؛ زیرا پس از سپری شدن مدت زمان طولانی‌تر، پپتیدها با زنجیره کوتاه‌تر تشکیل می‌گردند. اما به‌طور کلی تفاوت در میزان بازدارندگی ACE ممکن است به دلیل تفاوت در ماهیت آب‌گریزی-آب‌دوستی پپتیدها، وزن مولکولی و توالی اسیدآمینه در پپتیدهای ایجاد شده باشد. میزان بالای ویژگی آب‌دوستی پپتیدها باعث می‌شود قابلیت دسترسی آنها به جایگاه فعال ACE کاهش یابد؛ بنابراین وجود تعادل در ویژگی آب‌دوستی-آب‌گریزی پپتیدها بسیار حائز اهمیت است. Ktari و همکاران (۲۰۱۴) اثر بازدارندگی ACE در غلظت‌های مختلف پروتئین هیدرولیز شده ماهی را مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد که بیشترین میزان بازدارندگی ۸۰/۵ درصد و مربوط به بالاترین غلظت پروتئین مورد آزمون (۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) بود. این مقدار با توجه به غلظت پروتئین هیدرولیز شده مورد استفاده، با بیشترین مقادیر بازدارندگی ACE در پژوهش حاضر

<sup>1</sup> Protamex

<sup>2</sup> Neutrase

<sup>3</sup> Flavourzyme

<sup>4</sup> Angiotensin

<sup>5</sup> *Zosterisessor ophiocephalus*

بهینه‌سازی فعالیت آنتی‌اکسیدانی گرده هیدرولیز شده در فرایند هیدرولیز شرایط بهینه برای فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده گرده به روش سطح پاسخ (RSM) پیش‌بینی شد. این شرایط شامل مدت زمان ۴ ساعت و ۲ درصد غلظت آنزیم پپسین بود. جهت ارزیابی اعتبار مدل آماری و اطمینان از پاسخ‌ها در شرایط تعیین شده را نشان می‌دهد.

بهینه‌سازی فعالیت آنتی‌اکسیدانی گرده هیدرولیز شده در فرایند هیدرولیز شرایط بهینه برای فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده گرده به روش سطح پاسخ (RSM) پیش‌بینی شد. این شرایط شامل مدت زمان ۴ ساعت و ۲ درصد غلظت آنزیم پپسین بود. جهت ارزیابی اعتبار مدل آماری و اطمینان از پاسخ‌ها در شرایط

جدول ۵ - مقادیر پیش‌بینی شده و واقعی و نتایج مقایسه دوتایی

فاکتورهای اندازه‌گیری شده	مقادیر پیش‌بینی شده	مقادیر واقعی	سطح معنی‌داری ( $P$ ) در مقایسه دوتایی
قدرت مهار رادیکال DPPH (درصد)	۷۱/۵۱	۷۳/۷۱	۰/۱۷۸
قدرت احیاکنندگی (جذب)	۰/۸	۰/۷۱	۰/۳۶۲
قدرت مهار ACE (درصد)	۹۱/۳۱۶	۹۲/۷۹۳	۰/۱۸۸

همان‌طور که در جدول (۵) مشخص است سطوح معنی‌داری ( $P$ ) برای پاسخ‌ها نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین مقادیر پیش‌بینی شده و واقعی بود. این شرایط بیانگر آن است که روش سطح پاسخ و مدل پیشنهادی به صورت مناسب می‌تواند اثر دو متغیر زمان و غلظت آنزیم را بر فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH، قدرت احیاکنندگی و قدرت بازدارندگی ACE گرده هیدرولیز شده نشان دهد.

همان‌طور که در جدول (۵) مشخص است سطوح معنی‌داری ( $P$ ) برای پاسخ‌ها نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین مقادیر پیش‌بینی شده و واقعی بود. این شرایط بیانگر آن است که روش سطح پاسخ و مدل پیشنهادی به صورت مناسب می‌تواند اثر دو متغیر زمان و غلظت آنزیم را بر فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH، قدرت احیاکنندگی و قدرت بازدارندگی ACE گرده هیدرولیز شده نشان دهد.

نتیجه‌گیری  
به‌طور کلی مشخص شد که با انجام عمل هیدرولیز، ویژگی آنتی‌اکسیدانی و مهار ACE گرده گل افزایش پیدا کرد. به طوری که قدرت مهار رادیکال DPPH از ۶۷/۳۳ درصد در گرده هیدرولیز نشده به ۱۰۰ درصد و قدرت مهار ACE گرده گل از ۱۵/۵۴ درصد در گرده

هیدرولیز نشده به ۹۱/۴۹ درصد در گرده هیدرولیز شده ارتقاء پیدا کرد. بنابراین بعد از انجام عمل هیدرولیز، قدرت مهار رادیکال DPPH گرده گل به قدرت مهار رادیکال ژله رویال (۹۵/۲۷ درصد) نزدیک‌تر شد و قدرت مهار ACE گرده گل به مقدار قابل توجهی از قدرت مهار ACE ژله رویال بیشتر گردید. این مسأله نشان می‌دهد که بخشی از ویژگی آنتی‌اکسیدانی ژله رویال علاوه بر ترکیبات فنلی، مربوط به پروتئین‌ها و پپتیدهایی است که به‌طور طبیعی در ژله رویال وجود دارد. با توجه به اینکه تنها منبع اصلی پروتئینی زنبور عسل 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., & Carpes, S.T. 2016. Lyophilized bee pollen extract: A natural antioxidant source to prevent lipid oxidation in refrigerated sausages. LWT - Food Science and Technology, 76(B):299-305.
- Arabshahi, S., Ardestani, A., & Yazdanparast, R. 2001. Quantitative assessment of antioxidant properties of natural colorants and phytochemicals: carotenoids, flavonoids, phenols and indigoids. The role of B-carotene in antioxidants functions. Journal of Science of Food and Agriculture, 81(6):559-568.

- 3- Bogdanov, S. 2014. Royal jelly, bee brood: composition, health, medicine: a review. *Bee Product Science*, 28 (3):118-153.
- 4- Bougatef, A., Hajji, M., & Balti, R. 2009. Antioxidant and free radical-scavenging activities of smooth hound muscle protein hydrolysates obtained by gastro intestinal proteases. *Food Chemistry*, 114(4):1198-1255.
- 5- Coscueta, R.F., Amorim, M.M., Voss, G.B., Nerli, B.B., Picó, G.A., & Pintado, M.A. 2016. Bioactive properties of peptides obtained from argentinian defatted soy flour protein by corolase pp hydrolysis. *Food Chemistry*, 198:36-44.
- 6- Daoud, A., Malika, D., Bakari, S., Hfaiedh, N., Mnafigui, K., Kadri, A., & 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.
- 7- Deshpande, S., Chryan, M., & Salunkhe, D. 1987. Tanin analysis of food products. *Critical Review in Food Nutrition*, 24:41-49.
- 8- Guerar, F., Guimas, L., & Binet, A. 2002. Production of tuna waste hydrolysates by a commercial neutral protease preparation. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 19-20:489-498.
- 9- Guo, H., Ekusa, A., Iwai, K., Yonekura, M., Takahara, Y., & Morimatsu, F. 2009. Royal jelly peptides inhibit lipid peroxidation in vitro and in vivo. *Journal of Natural Science and Vitaminology*, 54:191-195.
- 10-Guo, H., Kozuma, Y., & Yonekura, M. 2005. Isolation and properties of antioxidative peptides from water-soluble royal jelly protein hydrolysate. *Food Science and Technology Research*, 11(2): 222-230.
- 11-Hmidet, N., Balti, R., Nasri, R., Sila, A., Bougatef, A., & 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(9): 2703-2711.
- 12-Je, J.Y., Lee, M.H., Lee, K.H., & Ahn, C.B. 2009. Antioxidant and hypertensive protein hydrolysates produced from tuna liver by enzymatic hydrolysis. *Food Research International*, 42(9): 1266-1272.
- 13-Kawashima, K., Itoh, H., Miyoshi, M., & Chibata, I. 1979. Antioxidant properties of branched-chain amino acid derivatives. *Chemical Pharmacological Bulletin*, 27(8):1912-1916.
- 14-Khantaphant, S., & 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(4):110-115.
- 15-Kishimura, H., & 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*, 46(1):318-327.
- 16-Kroyer, G., & Hegedus, N. 2001. Evaluation of bioactive properties of pollen extracts as functional dietary food supplement. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2(3):171-174.
- 17-Ktari, N., Nasri, R., Mnafigui, K., Hamden, K., Belguith, O., Boudaouara, T., Feki, A.E., & Nasri, M. 2014. Antioxidative and ACE inhibitory activities of protein hydrolysates from zebra blenny (*Salaria basilisca*) in alloxan-induced diabetic rats, *Process Biochemistry*, 49(5):890-897.

- 18-Lassoued, I., Mora, L., Nasri, R., Aydi, M., Toldrá, F., Aristoy, M., C., Barkia, A., & Nasri, M. 2015. Characterization, antioxidative and ACE inhibitory properties of hydrolysates obtained from thornback ray (*Raja clavata*) muscle. *Journal of Proteomics*, 128:458-468.
- 19-LeBlanc, B.W., Davis, O.K., Boue, S., DeLucca, A., & Deeby, A. 2009. Antioxidant activity of Sonoran Desert bee pollen. *Food Chemistry*, 115(4):1299-1305.
- 20-Liu, J.R., Yang, Y.C., Shi, L.S., & 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.
- 21-Marghitas, L.A., Stanciu, O.G., Dezmirean, D.S., Bobis, O., Popescu, O., Bogdanov, S., & Campos, M.S. 2009. In vitro antioxidant capacity of honeybee-collected pollen of selected floral origin harvested from Romania. *Food Chemistry*, 115(3):878-883.
- 22-Marinova, M., & Tchobanov, P. 2010. Preparation of antioxidant enzymatic hydrolysates from honeybee-collected pollen using plant enzymes. *Enzyme Research*, 41:5949-50.
- 23-Matsuoka, T., Kawashima, T., Nakamura, T., Kanamaru, Y., & Yabe, T. 2012. Isolation and characterization of proteases that hydrolyze royal jelly proteins from queen bee larvae of the honeybee, *Apis mellifera*. *Apidologie*, 43(6):685-697.
- 24-Morais, M., Moreira, L., Feás, X., & 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(4):1096-1101.
- 25-Nagai, T., Inoue, R., Suzuki, N., Myoda, T., & 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.
- 26-Nagai, T., & Inoue, R. 2004. Preparation and the functional properties of water extract and alkaline extract from royal jelly. *Food Chemistry*, 84(2):181-186.
- 27-Nasri, R., Younes, I., Jridi, M., Trigui, M., Bougatef, A., Arroume, N., Dhulster, P., Nasri, M., & Châabouni, M.K., 2013. ACE inhibitory and antioxidative activities of goby (*zosterisessor ophiocephalus*) fish protein hydrolysates: effect on meat lipid oxidation. *Food Research International*, 54(1):552-561.
- 28-Pascoal, A., Rodrigues, S., Teixeira, A., Feás, X., & Estevinho L.M.. 2013. Biological activities of commercial bee pollens: antimicrobial, antimutagenic, antioxidant and anti-inflammatory. *Food and Chemical Toxicology*, 63(1): 233-239.
- 29-Paiva, L., Lima, E., Neto, A.I., & Baptista, B. 2016. Isolation and characterization of angiotensin i-converting enzyme (ace) inhibitory peptides from *ulva rigida* c. Agardh protein hydrolysate. *Journal of Functional Foods*, 26:65-76.
- 30-Salampessy, J., Reddy, N., Kailasapathy, K., & Phillips, M. 2015. Functional and potential therapeutic ACE-inhibitory peptides derived from bromelain hydrolysis of trevally proteins. *Journal of Functional Foods*, 14:716-725.
- 31-Sun, L., Powers, J.R., & Tang, J. 2007. Evaluation of antioxidant activity of asparagus, broccoli and their juices. *Food Chemistry*, 105(1):101-106.
- 32-Taheri, A., AbedianKENari, A., Motamedzadegan, A., & Habibi Rezaei, M. 2011. Optimization of goldstripe sardine protein hydrolysate using alcalase 2.4L by RSM. *Journal of Food Science*, 9(2):114-120.

- 33-Villanueva, A., Vioque, J., Sánchez-Vioque, R., Clemente, A., Pedroche, J., Bautista, J., & Millán, F. 1999. Peptide characteristics of sunflower protein hydrolysates. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 76(12):1455-1460.
- 34-Wiriyaphan, C., Chitsomboon, B., & Yongsawadigul, J. 2012. Antioxidant activity of protein hydrolysates derived from threadfin bream surimi byproducts. *Food Chemistry*, 132(1):104-111.
- 35-Zhang, M., Mu, T.-H., & Sun, M.-J. 2014. Purification and identification of antioxidant peptides from sweet potato protein hydrolysates by alcalase. *Journal of Functional Foods*, 7:191-200.

Archive of SID

## Optimization of Enzymatic Hydrolysis of Bee Pollen Protein by Pepsin Based on Antioxidant and ACE Inhibitory Activity and Comparison with Those of Royal Jelly

Atefe Maqsoudlou<sup>1</sup>, Alireza Sadeghi Mahoonak<sup>2\*</sup>, Mohamad Ghorbani<sup>2</sup>, Fidel Toldra<sup>3</sup>

1- PhD Student, Department of Food Science & Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

2- Associate, Department of Food Science & Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

\* Corresponding author (sadedeghiaz@gau.ac.ir)

3- Professor -Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA), Valencia, Spain

### Abstract

In this study optimization of the enzymatic hydrolysis condition of bee pollen protein by pepsin and the effect of enzymatic hydrolysis on its antioxidant properties was investigated. Also, the results were compared with antioxidant properties of royal jelly. For this purpose, phenolic compounds, DPPH free radical scavenging activity and ferric ion reducing power of bee pollen and royal jelly were measured. The values of these factors for bee pollen and royal jelly (1000 ppm), were 174 and 1031.71 (mg Gallic acid/ g sample), 67.33% and 95.27% and absorbance of 0.77 and 0.8 at 700 nm, respectively. The highest reducing power of 0.81 was measured in samples which were hydrolyzed by 2% pepsin for 4 h. Also, the highest DPPH radicals scavenging power was 100% which was achieved in hydrolyzed samples by 2% pepsin for 2.5 h. The highest ACE inhibitory activity was 91.49% in hydrolyzed samples by 2% pepsine for 4 h. The results showed that the DPPH radical scavenging power of bee pollen increased from 67.33% to 100% and ACE inhibitory activity increased from 15.54% to 91.49% after enzymatic hydrolysis. The DPPH radical scavenging power and ACE inhibitory activity of bee pollen hydrolysats were comparable to those of royal jelly.

**Key words:** ACE, Antioxidant Activity, Bee Pollen, Enzymatic hydrolysis, Royal Jelly