

بررسی ویژگی آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده گرده گل زنبور عسل

عاطفه مقصودلو^۱، علیرضا صادقی ماهونک^{۲*}، حسین محب‌الدینی^۳

۱- دانشجوی دکتری رشته شیمی مواد غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

۲- دانشیار گروه شیمی مواد غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

۳- استادیار گروه علوم دامی دانشگاه محقق اردبیلی

(تاریخ دریافت: ۹۵/۰۲/۲۱ تاریخ پذیرش: ۹۵/۰۳/۲۶)

چکیده

گرده گل، با شهد گل‌ها و بزاق زنبور عسل مخلوط می‌شود و پس از ذخیره در کیسه گرده واقع در بند سوم پای زنبور عسل، در تله‌ی گرده که توسط زنبوردار در آنجا تعبیه شده جمع‌آوری می‌گردد. یکی از ویژگی‌های عملکردی گرده، ویژگی آنتی‌اکسیدانی آنها می‌باشد که مربوط به پروتئین‌ها و ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی آنها است. در این پژوهش تاثیر هیدرولیز آنزیمی پروتئین‌های گرده گل بر خواص آنتی‌اکسیدانی آن و بهینه‌سازی شرایط هیدرولیز آنزیمی بررسی شد. بدین منظور ابتدا ترکیبات فنولی، فعالیت مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH، قدرت احیاکنندگی یون آهن سه ظرفیتی و شلات‌کنندگی یون آهن دو ظرفیتی گرده گل اندازه‌گیری شد که مقادیر این عوامل در غلظت ۱۰۰۰ پی‌پی‌ام به ترتیب ۴/۱ میکروگرم بر ۱۰۰ گرم گرده، ۳۱/۸۶ درصد، جذب ۱/۸۹ در طول موج ۷۰۰ نانومتر و ۴/۹ درصد بود. هیدرولیز گرده گل توسط آنزیم آلکالاز در محدوده زمانی ۲ تا ۵ ساعت و غلظت آنزیم ۱ تا ۲ درصد، با تیمارهایی که توسط نرم افزار RSM تعیین گردید، انجام شد و عواملی آنتی‌اکسیدانی تیمارهای هیدرولیز شده اندازه‌گیری شد. بیشترین قدرت احیاکنندگی با اعمال زمان ۲ ساعت و غلظت آنزیم ۲ درصد به دست آمد. بیشترین قدرت شلات‌کنندگی در مدت زمان ۱/۳۸ ساعت با میزان ۳۱/۷۱۶ درصد بوده، اثر غلظت آنزیم بر میزان قدرت شلات‌کنندگی گرده معنی‌دار نبوده است. بیشترین فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH در مدت زمان ۲ تا ۳/۵ ساعت و غلظت‌های ۱ تا ۱/۵ درصد آنزیم بدست آمد. بطور کلی قدرت شلات‌کنندگی و فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH گرده گل بعد از انجام فرایند هیدرولیز در شرایط بهینه با آنزیم آلکالاز، به ترتیب حدود ۲۶ درصد و ۲۳/۶۵ درصد افزایش یافت.

کلید واژگان: گرده گل، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، هیدرولیز، پپتیدهای زیست‌فعال، بهینه‌سازی

* مسئول مکاتبات: sadeghiaz@gau.ac.ir

۱- مقدمه

گرده گل که توسط زنبور عسل جمع‌آوری می‌شود، از آگلوتینه شدن گرده گل‌ها با شهد و بزاق زنبورعسل به دست می‌آید و پس از ذخیره در کیسه گرده واقع در بند سوم پای زنبورعسل، در هنگام ورود زنبورعسل به درون کندو در تله‌ی گرده که توسط زنبوردار در آنجا تعبیه شده جمع‌آوری می‌گردد [۱]. گرده گل حاوی ۱۰ تا ۴۰ درصد پروتئین، ۱ تا ۱۳ درصد لیپید، ۱۳ تا ۵۵ درصد کربوهیدرات و ۲ تا ۶ درصد خاکستر می‌باشد. از جمله ترکیبات مهم و فعال زیستی گرده گل عبارتند از: اسید آمینه‌های مختلف به ویژه پرولین و لیزین، کلاژن [۲ و ۳]، اسیدهای آلی آزاد با ساختار غیر معمول و کم‌یاب در طبیعت مانند مونو و هیدروکسی اسیدها و دی‌هیدروکسی کربوکسیلیک‌اسیدها با ۸ و ۱۰ اتم کربن، ویتامین‌ها و مواد معدنی و ترکیبات فرعی دیگر مانند پلی‌فنل‌ها [۴]، نوکلئوتیدها، استیل‌کولین و ترکیبات هورمونی [۵، ۶]، گلیکوپروتئین‌ها و پپتیدهای مختلف [۷]. مشخص شده است که ویژگی آنتی‌اکسیدانی گرده گل مربوط به پروتئین‌های اصلی و ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی آنها بوده [۸] و دی و تری پپتیدهای حاصل از هیدرولیز پروتئینی فعالیت آنتی‌اکسیدانی قوی‌تری از خود نشان می‌دهند [۹ و ۱۰]. دلایل مربوط به عملکرد آنتی‌اکسیدانی این پپتیدها شامل موارد زیر می‌باشد: قابلیت احیاء و فعالیت پاک‌کنندگی رادیکال‌های آزاد، خاصیت خنثی‌کنندگی برخی از ترکیبات سمی همانند رادیکال‌های هیدروکسیل و خاصیت شلات‌کنندگی کاتیون‌های فلزی پراکسیدان [۱۱]. پاسکوال و همکاران و مورایز و همکاران اعلام کردند که ترکیبات فنلی کل و فلاونوئیدهای هشت نوع گرده‌ی زنبورعسل تجاری بدست آمده از گل‌ها و نواحی جغرافیایی مختلف شاخص اسید تیوباریتوریک^۱ و فعالیت مهارکنندگی رادیکال‌های DPPH^۲ قابل توجهی را از خود نشان دادند [۱ و ۲]. ساریک و همکاران اثر آنتی‌اکسیدانی هفت نوع ترکیب فنلی گرده‌های گل ایسلندی جمع‌آوری شده توسط زنبورعسل را بررسی کردند. نتایج نشان داد که قرص‌های حاوی گرده‌های گل باعث کاهش شاخص اسیدتیوباریتوریک و فعالیت آنزیم‌های

اکسیدکننده در کبد و مغز موش شد [۱۲]. زیلیک و همکاران نشان دادند که گونه‌های مختلف گرده ذرت همگی دارای مقادیر قابل توجهی ترکیبات فلاونوئیدی و فنلی هستند و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بالایی از خود نشان دادند [۱۳]. کرویر و هگدوس نشان دادند با افزایش ترکیبات فنلی گرده گل، ویژگی آنتی‌اکسیدانی و مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد افزایش می‌یابد [۱۴]. مطالعات مختلف نشان داده است که پروتئین‌های هیدرولیز شده توسط آنزیم، اثرات بیولوژیکی قوی‌تری از خود نشان می‌دهند [۱۵]. گزارش شده است که پپتیدهای بدست آمده از هیدرولیز پروتئین‌های غذایی توسط پپسین، تریپسین و آلکالاز فعالیت آنتی‌اکسیدانی نشان می‌دهند [۱۶ و ۱۷]. زو و همکاران، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد پروتئین‌های هیدرولیز شده جوانه گندم توسط آنزیم آلکالاز را مورد بررسی قرار دادند؛ نتایج نشان داد اکسایش خود به خودی لینولئیک اسید به طور موثری با افزودن پروتئین‌های هیدرولیز شده گندم کاهش یافت. فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین‌های هیدرولیز شده به آلفا توکوفرول نزدیک، اما میزان آن از BHT پایین‌تر بود. این نتایج نشان دهنده حضور پپتیدها و آمینواسیدهای آنتی‌اکسیدان در این ترکیب هیدرولیز شده بود. همچنین نتایج نشان داد با افزایش غلظت نمونه هیدرولیز شده فعالیت مهارکنندگی رادیکال هیدروکسیل و DPPH و قدرت احیاءکنندگی آن افزایش می‌یابد. قابلیت شلات‌کنندگی یون آهن نیز تا حدودی وابسته به غلظت نمونه هیدرولیز شده بود [۱۸]. گیو و همکاران، پپتیدهای حاصل از هضم پروتئین‌های گرده‌ی زنبورعسل را که توسط آنزیم تریپسین به دست آمده بود را با استفاده از کروماتوگرافی مایع فاز معکوس- اسپکتروسکوپی جرمی جداسازی و توالی آمینواسیدهای آنها را شناسایی و ویژگی‌های بیولوژیکی‌شان را بررسی کردند [۱۹]. مارینوا و تچوربانو، با استفاده از پروتئیناز و آمینو پپتیدازهای با منشأ گیاهی از جمله بروملاین آناناس، آمینوپپتیداز و پرولین ایمینوپپتیداز برگ کلم و آمینوپپتیداز نخود، به هیدرولیز پروتئین‌های گرده گل پرداختند و ویژگی‌های مهارکنندگی رادیکال DPPH پپتیدهای به دست آمده را مورد بررسی قرار دادند [۲۰]. زیانوبو و همکاران، با استفاده از آنزیم آلکالاز پروتئین‌های گرده گل را هیدرولیز و قابلیت مهار رادیکال OH توسط

1. Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS)
2. 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

ترکیبات فنلی بر حسب میلی گرم اسید گالیک در هر میلی لیتر عصاره از روی معادله خط منحنی استاندارد تعیین گردید [۲۲].

۲-۱-۲-۲- سنجش فعالیت مهار کنندگی رادیکالهای آزاد

DPPH

سنجش فعالیت مهار کنندگی رادیکالهای آزاد DPPH با استفاده از روش میدت و همکاران انجام شد. به این منظور ۱ میلی لیتر از عصاره حل شده در متانول با یک میلی لیتر از محلول DPPH متانولی 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 مهار کنندگی بر اساس درصد، طبق فرمول زیر محاسبه شد [۲۳].

$$100 \cdot \frac{(A_0 - A_1)}{A_0} = \text{فعالیت مهار کنندگی رادیکال DPPH}$$

جذب کنترل: A_0 جذب نمونه: A_1

۲-۱-۲-۳- سنجش قدرت احیاء کنندگی

اندازه گیری قدرت احیاء کنندگی گرده گل در احیای آهن III با استفاده از روش بوگاتف و همکاران انجام شد. به این منظور ۱ میلی لیتر از محلول عصاره با ۲/۵ میلی لیتر بافر فسفات pH=۶/۶ و ۲/۵ میلی لیتر پتاسیم فری سیانید ۱ درصد مخلوط گردید و به مدت نیم ساعت در حمام آب ۵۰ درجه سانتی گراد قرار گرفت؛ سپس ۲/۵ میلی لیتر تری کلرواستیک اسید ۱۰ درصد وزنی/حجمی به آن اضافه شد. پس از ۱۰ دقیقه سانتریفوژ با دور ۱۶۵۰ g، ۲/۵ میلی لیتر از سوپرناتانت برداشته شد و به آن ۲/۵ میلی لیتر آب مقطر و ۰/۵ میلی لیتر محلول کلرید آهن ۰/۱ درصد اضافه شد. پس از ۱۰ دقیقه جذب آن در طول موج ۷۰۰ نانومتر خوانده شد [۲۴].

۲-۱-۲-۴- سنجش قدرت شلات کنندگی یون آهن (فرو)

۴/۷ میلی لیتر محلول عصاره به ۰/۱ میلی لیتر کلرید آهن II و ۰/۲ میلی لیتر محلول فروزین اضافه شد و ۲۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه گردید؛ سپس جذب محلول توسط اسپکترو فوتومتر در ۵۶۲ نانومتر خوانده شد [۲۳].

$$100 \cdot \frac{(A_0 - A_1)}{A_0} = \text{فعالیت مهار کنندگی } Fe^{2+}$$

جذب کنترل: A_0 جذب نمونه: A_1

۲-۲-۲- آماده سازی پروتئینهای هیدرولیز شده گرده

یک قسمت گرده با ۵ قسمت آب مقطر به صورت سوسپانسیون در آمد و هموژن شد. pH سوسپانسیون با افزودن بافر تریس-

پپتیدهای حاصل از آن را مورد بررسی قرار دادند [۲۱]. مارینوا و چوربانف اثر آنتی اکسیدانی گرده گل جمع آوری شده توسط زنبور عسل را که پروتئینهای آن توسط آنزیمهای گیاهی هیدرولیز شده بودند را مورد بررسی قرار دادند. مقدار ترکیبات فنلی و درجه هیدرولیز و اثر مهار کنندگی رادیکال آزاد DPPH مورد بررسی قرار گرفت، نتایج نشان داد که درجه هیدرولیز حدود ۲۰ تا ۲۸ درصد و ترکیبات فنلی گرده گل در حد قابل توجهی (۱۵ تا ۲۷ میکروگرم بر میلی گرم) بود. پروتئینهای هیدرولیز شده فعالیت مهار کنندگی زیادی نسبت به رادیکالهای آزاد DPPH داشتند [۲۰].

۲- مواد و روشها

۲-۱- مواد

این پژوهش در آزمایشگاه علوم و صنایع غذایی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان انجام شد. گرده گل از مرکز پرورش زنبور عسل و خدمات گرده افشانی واقع در گنبد، آنزیم آلکالاز از شرکت سیگما و سایر مواد آزمایشگاهی شامل اسید سولفوریک، هیدروکسید سدیم، اسید بوریک، اسید کلریدریک، تریس، مونوسدیم فسفات، دی سدیم فسفات، تری کلرواستیک اسید، اتانول، پتاسیم فری سیانید، کلرید فریک، کلرید فرو، فروزین، آنتی اکسیدان BHT، ADTA و رادیکال آزاد DPPH از شرکت های مرک و تتراکم با درجه خلوص آزمایشگاهی تهیه شدند.

۲-۲- روشها

۲-۱-۲-۲- سنجش خواص آنتی اکسیدانی گرده

۲-۱-۲-۲- اندازه گیری ترکیبات فنلی

اندازه گیری ترکیبات فنلی، با استفاده از روش فولین سیوالتی انجام شد. به این منظور ۵۰۰ میکرو لیتر از هر غلظت عصاره ی گرده با ۵۰۰ میکرو لیتر معرف فولین سیوالتی و ۵۰۰ میکرو لیتر محلول کربنات سدیم ۱۰ درصد وزنی/حجمی مخلوط گردید و به مدت یک ساعت در دمای اتاق و در مکان تاریک اینکوبه شد؛ در نهایت جذب آن در طول موج ۷۰۰ نانومتر خوانده شد. مقدار

۳-۱-۱- 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:

$$Y = 0.0676X + 0.0069 \quad R^2 = 0.9973 \quad \text{معادله (۱-۳)}$$

در این رابطه، Y و X به ترتیب معادل جذب نمونه در طول موج ۷۰۰ نانومتر و مقدار کل ترکیبات فنلی بر اساس گرم معادل اسید گالیک در هر ۱۰۰ گرم ماده گل می‌باشد. شکل ۱ مقایسه میانگین میزان ترکیبات فنلی در غلظت‌های مختلف عصاره آبی ماده گل را نشان می‌دهد. میزان ترکیبات فنلی بین ۳/۳۷ تا ۴/۱۶ میکروگرم اسید گالیک بر ۱۰۰ گرم ماده گل می‌باشد. شکل ۱ مقایسه معنی داری در میزان ترکیبات فنلی و ارتباط آن با غلظت عصاره، وجود ندارد، به جز غلظت‌های ۱۲/۵، ۲۵ و ۵۰ میکروگرم بر میلی گرم و غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی گرم که به ترتیب کمترین و بیشترین میزان ترکیبات فنلی را با اختلاف معنی دار داشتند. ساریک و همکاران به بررسی ترکیبات فنولی نوعی ماده گل که با حلال متانول استخراج شده بود، پرداختند که میزان آنها در مجموع حدود ۴ میکروگرم بر گرم بر گرم ماده گل بود [۱۲]. زیلیک و همکاران، میزان ترکیبات فنولی چند نوع ماده را بررسی و مقایسه کردند که این میزان در محدوده ۷ تا ۹ گرم بر کیلو گرم ماده گزارش شد. در این پژوهش از مخلوط آب استون برای استخراج ترکیبات فنولی استفاده شد [۱۳]. همانطور که مشخص است، میزان ترکیبات فنولی اندازه‌گیری شده در این پژوهش، در مقایسه با میزان ترکیبات فنولی اندازه‌گیری شده توسط ساریک و همکاران و زیلیک و همکاران، کمتر می‌باشد. توجیه این مسئله را می‌توان در ضرورت به کارگیری آب به عنوان حلال به منظور استخراج ترکیبات فنلی در این پژوهش نسبت داد [۲۶]. علاوه بر کارایی پایین حلال آب، استخراج برخی ترکیبات غیر فنلی مثل اسیدهای آلی و قندها و فعال ماندن آنزیم پلی فنل اکسیداز ممکن است باعث ایجاد مشکلاتی در شناسایی و تعیین مقدار ترکیبات فنلی به ویژه در منابع گیاهی گردد [۲۷].

اسیدکلریدریک (با نسبت ۱ به ۲) بر روی pH اپتیمم آنزیم آکالاز (pH=8) تنظیم شد [۲۰]. آنزیم آکالاز، در محدوده غلظت یک تا دو درصد وزنی پروتئین به محلول‌های پروتئینی افزوده شد و هیدرولیز در محدوده زمانی ۲ تا ۵ ساعت و دمای ۵۰ درجه سانتیگراد در انکوباتورهای لرزان در دما و pH ثابت انجام گرفت [۲۵]. در انتها در دمای ۸۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه واکنش آنزیمی متوقف شد [۳۸]. برای حذف ترکیبات اضافی، سانتریفوژ کردن در $4000 \times g$ به مدت ۳۰ دقیقه انجام شد و سوپرناتانت پس از جمع‌آوری با خشک کن انجمادی خشک شد [۲۵].

۲-۲-۳- سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین‌های هیدرولیز شده ماده

۲-۲-۳-۱- سنجش فعالیت مهارکنندگی رادیکالهای آزاد DPPH
سنجش فعالیت مهارکنندگی رادیکالهای آزاد DPPH ماده هیدرولیز شده طبق بند ۲-۲-۱-۲ انجام شد.

۲-۲-۳-۲- سنجش قدرت احیاءکنندگی
سنجش قدرت احیاءکنندگی ماده هیدرولیز شده طبق بند ۲-۲-۱-۳ انجام شد.

۲-۲-۳-۳- سنجش قدرت شلات کنندگی یون آهن (فرو)
سنجش قدرت شلات کنندگی یون آهن (فرو) ماده هیدرولیز شده طبق بند ۲-۲-۱-۴ انجام شد.

۲-۲-۴- آنالیز آماری
برای بهینه سازی شرایط آزمایش از روش آماری RSM^2 استفاده شد. تجزیه تحلیل داده‌ها در قالب طرح فاکتوریل و با استفاده از نرم افزار SPSS ver. 19 انجام شد و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح ۹۵٪ صورت گرفت. رسم نمودارها با نرم افزار اکسل و Design expert ver. 8 انجام شد.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- آزمون‌های آنتی‌اکسیدانی اولیه بر روی ماده گل

الکترون می‌باشند، بنابراین ممکن است درصد بیشتری از یون‌های سه ظرفیتی آهن با جذب الکترون احیا شده و بنابراین شدت جذب محلول را تحت تاثیر قرار دهد [۳۰].

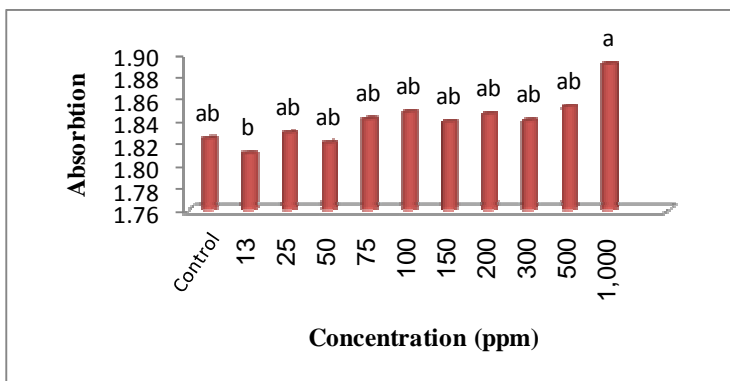


Fig 2 Reducing power of different concentration of aqueous extract of pollen

۳-۳- شلات کنندگی یون آهن دو ظرفیتی

مقایسه میانگین درصد شلات کنندگی یون آهن دو ظرفیتی در غلظت‌های مختلف عصاره آبی گرده گل در شکل ۳ مشخص شده و اختلاف معنی دار آنها قابل مشاهده است ($P < 0.05$). به طوری که غلظت ۱۰۰۰ پی پی ام با ۴/۹۶ درصد بیشترین میزان و غلظت ۲۵ پی پی ام با ۱/۳ درصد، کمترین فعالیت شلات کنندگی را داشتند. روند افزایشی درصد شلات کنندگی با افزایش غلظت عصاره به وضوح قابل مشاهده می‌باشد. علت افزایش درصد شلات کنندگی با افزایش غلظت عصاره، به دلیل افزایش میزان ترکیبات فنلی بوده که قابلیت به دام انداختن یون آهن دو ظرفیتی را دارا هستند [۲۹].

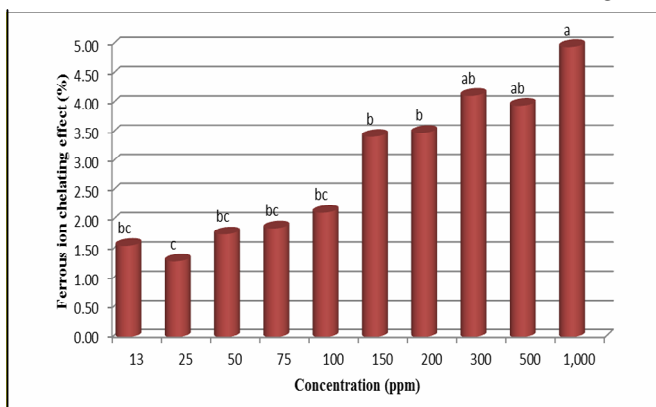


Fig 3 Ferrous ion chelating effect of different concentrations of aqueous extract of pollen

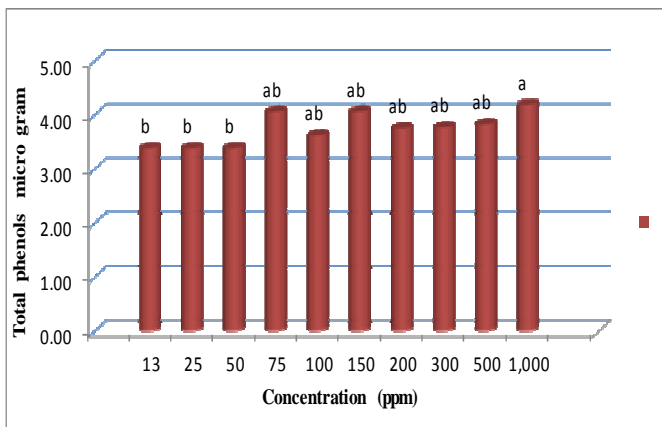


Fig 1 Total phenols of different concentration of pollen extract

۲-۳- قدرت احیاء کنندگی یون آهن سه ظرفیتی

در این روش، احیا یون آهن سه ظرفیتی (آهن III) به عنوان معیاری برای قابلیت الکترون دهی ترکیبات فنلی به کار می‌رود. این مسئله ساز و کار مهمی را در فرایند اکسایش ترکیبات فنلی تشکیل می‌دهد. ظرفیت دهندگی الکترون (نیروی احیاء کنندگی) مرتبط با فعالیت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات زیستی می‌باشد [۲۸]. در شکل ۲ مقایسه میانگین قدرت احیاء کنندگی غلظت‌های مختلف عصاره مشخص شده است، این نتایج حاکی از آن بود که قدرت احیاء کنندگی غلظت‌های مختلف عصاره، به جز کمترین و بیشترین غلظت، به ترتیب ۱۲/۵ پی پی ام که ۱/۸۱۱ و ۱۰۰۰ پی پی ام که جذب ۱/۸۹ را نشان دادند و دارای اختلاف معنی داری بودند ($P < 0.05$), سایر غلظت‌ها اختلاف معنی دار نداشتند که با نتایج موریرا و همکاران مطابقت داشت [۴۰]. مورایز و همکاران گزارش کردند که کمترین و بیشترین غلظت عصاره فنولی گرده به ترتیب کمترین و بیشترین قدرت احیاء کنندگی یون آهن را داشتند و قدرت احیاء کنندگی غلظت‌های میانی تفاوت معنی داری نداشتند [۴۰]. این مسئله را می‌توان با عدم وجود روند مشخص در میزان ترکیبات فنلی غلظت‌های مختلف عصاره مرتبط دانست. زیرا میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره های گیاهی به نوع و میزان ترکیبات فنلی موجود در آنها بستگی دارد [۲۹]. از طرفی در حین فرایند استخراج، ترکیبات محلول در آب دیگری نیز همراه ترکیبات فنلی وارد عصاره می‌شوند. از آنجایی که برخی از این ترکیبات مانند اسیدهای آمینه و قندها، خود اهداکننده

۳-۴- فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH

شکل ۴ که نتایج مقایسه میانگین درصد مهارکنندگی رادیکال DPPH در غلظت‌های مختلف عصاره آبی گرده گل را نشان می‌دهد. در این شکل مشخص است که غلظت‌های پایین عصاره (۱۲/۵ تا ۱۵۰ پی پی ام) فاقد فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH بودند، اما با افزایش غلظت از ۲۰۰ تا ۱۰۰۰ پی پی ام، به طور قابل توجه و معنی داری ($P < 0.05$) میزان فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH از ۱/۲۳ درصد به ۳۱/۸۶ درصد افزایش یافت. نتایج به دست آمده با نتایج سان و همکاران و کرویر و هگدوس مطابقت داشت [۳۱ و ۱۴]. لجا و همکاران نیز درصد مهارکنندگی رادیکال مربوط به گرده گونه‌های مختلف گل را بین ۱۵ تا ۹۱ درصد گزارش کردند که این میزان را در ارتباط مستقیم با نوع ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی دانستند [۳۹]. این پژوهشگران گزارش نمودند که فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH عصاره‌های گیاهی وابسته به غلظت بوده و با افزایش غلظت اثر مهارکنندگی شدت می‌یابد.

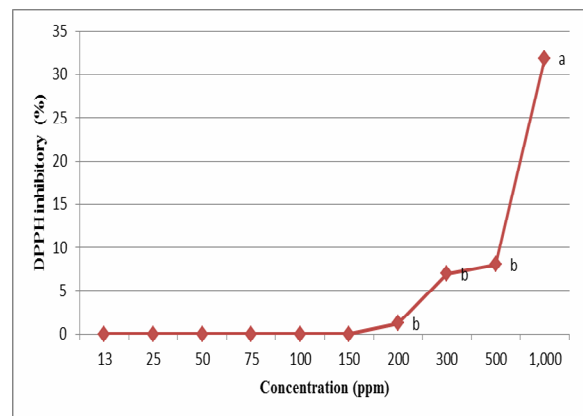


Fig 4 DPPH inhibiting effect of different concentration of aqueous extract of pollen

۳-۵- بهینه سازی هیدرولیز گرده گل و آزمون-

های آنتی‌اکسیدانی

۳-۵-۱- بررسی داده‌ها در نقاط تعریف شده برای

فعالیت آنتی‌اکسیدانی 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، شلات‌کنندگی و مهار رادیکال آزاد DPPH مطابق با جدول ۲، ۳ و ۴ می‌باشد.

۳-۵-۱- قدرت احیاءکنندگی یون آهن سه ظرفیتی

نتایج مربوط به تجزیه واریانس و ضرایب رگرسیونی برای پاسخ‌های قدرت احیاءکنندگی گرده هیدرولیز شده در جدول ۲ ذکر شده است. آنالیز سطح پاسخ نشان می‌دهد که رابطه قدرت احیاءکنندگی گرده هیدرولیز شده با پارامترهای واکنش از نوع درجه دوم با ضریب رگرسیون ($R^2 = 0.908$) می‌باشد.

معادله ۳-۱

$$Y = 1/0.5509 + 0.27222 X_1 + 0.4497 X_2 - 0.03426 X_1^2 - 0.08935 X_2^2 - 0.04267 X_1 X_2$$

نتایج جدول ۲ نشان می‌دهد که مدل آماری ارائه شده برای پیش بینی اثر متغیرهای آزمایش بر قدرت احیاءکنندگی گرده گل هیدرولیز شده مناسب می‌باشد ($P < 0.0003$). اثر متغیر زمان ($P < 0.0007$) بر روی قدرت احیاءکنندگی بیشتر و معنی دار تر از متغیر غلظت آنزیم ($P < 0.0087$) می‌باشد.

همچنین نتایج، اثر درجه دوم هریک از متغیرها را بر روی پاسخ آزمایش نزولی و معنی دار نشان می‌دهد. همچنین 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 معنی دار نشد ($P > 0.05$). این مسئله بیانگر آن است که مدل به خوبی با داده‌های مربوط به قدرت احیاءکنندگی گرده هیدرولیز شده تطبیق دارد.

Table 1 Results of antioxidant activity tests of hydrolyzed pollen at certain points of the central composite design

Reducing Power (Absorbance in 700 nm)	Ferrous ion chelating effect (%)	DPPH inhibiting activity (%)	Time (Hour)	Enzyme concentration (%)	Treatment
1.77	28.106	53.43	2	1	1
1.83	28.73	56.9	3.5	1.5	2
1.66	21.05	47.68	5	2	3
1.831	23.75	54.7	3.5	1.5	4
1.75	26.53	53.78	3.5	0.79	5
1.72	31.716	47.75	1.38	1.5	6
1.708	21.573	47.77	5	1	7
1.83	25.12	53.82	3.5	1.5	8
1.838	26.71	54	3.5	1.5	9
1.86	28.4	52.7	3.5	1.5	10
1.819	25.353	48.5	3.5	2.31	11
1.63	21.19	43.83	5.64	1.5	12
1.85	27.343	44.1	2	2	13

دهد که بیشترین قدرت احیاءکنندگی با اعمال زمان ۲ ساعت و غلظت آنزیم ۲ درصد به دست آمد، و برای رسیدن به بیشترین قدرت احیاءکنندگی، می‌بایست در مدت زمان‌های پایین‌تر و از غلظت‌های نسبتاً بالاتر آنزیم استفاده کرد. در مدت زمان ۲ تا ۳/۵ ساعت هیدرولیز، با افزایش درجه هیدرولیز، میزان پپتیدهای دهنده‌ی الکترون و رهایش آنها از زنجیره پروتئینی افزایش یافت و توانایی احیای یون آهن سه ظرفیتی موجود در محیط افزایش پیدا کرد. در این شرایط، استفاده از غلظت‌های بالاتر آنزیم (۲ درصد) تا حدودی بر شدت این روند افزایشی افزود که با نتایج جی و همکاران و خاناتاف و همکاران مطابقت داشت [۳۲] و [۳۳]. جی و همکاران اعلام کردند که میزان فعالیت احیاءکنندگی پروتئین هیدرولیز شده ضایعات ماهی حاصل از آنزیم آلکالاز با افزایش غلظت آنزیم مورد استفاده، افزایش یافت [۳۲]. خاناتاف و همکاران نشان دادند که با افزایش مدت زمان هیدرولیز پروتئین ماهی، میزان فعالیت احیاءکنندگی آن افزایش یافت. با افزایش مدت زمان هیدرولیز بیشتر از ۳/۵ ساعت و احتمالاً هیدرولیز بیش از اندازه و تجزیه پپتیدها، از میزان پپتیدهای دهنده الکترون

Table 2 Analysis of variance for reducing power of hydrolyzed pollen

P value	Regression coefficient	DF	Model
0.0003	1.05509	5	Model
0.0007	0.27222	1	(Time) X ₁
0.0087	0.4497	1	Enzyme) X ₂ (concentration
0.0001	-0.03426	1	X ₁ ²
0.0038	-0.08935	1	X ₂ ²
0.0027	-0/04267	1	X ₁ X ₂
0.55		3	Lack of fitness
	0.764		R ² - Pred
	0.908		R ² - Adj

شکل ۵ نمودار صفحه‌ای و کانتور اثر زمان و غلظت آنزیم را بر روی قدرت احیاءکنندگی گرده هیدرولیز شده را نشان می‌دهد. در این شکل، نمودار سطح پاسخ نشان می‌دهد که بیشترین قدرت احیاءکنندگی در مدت زمان ۲ تا ۳/۵ ساعت بوده و اثر تغییر غلظت آنزیم بر میزان قدرت احیاءکنندگی گرده هیدرولیز شده کمتر از اثر زمان بوده است. همانطور که نمودار ۴-۵ نشان می‌-

کاسته شد و قدرت احیاءکنندگی گرده هیدرولیز شده کاهش یافت [۳۳].

نتایج جدول ۳ نشان می‌دهد که مدل آماری ارائه شده برای پیش بینی اثر متغیرهای آزمایش بر قدرت شلات کنندگی گرده گل هیدرولیز شده مناسب می‌باشد ($P < 0/0006$). اثر متغیر زمان بر روی قدرت شلات کنندگی کاملاً معنی دار ($P < 0/0002$) و اثر غلظت آنزیم غیر معنی دار بود. همچنین جهت مناسب بودن 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 ($P > 0/05$). این مسئله بیانگر آن است که مدل به خوبی با داده‌های مربوط به قدرت شلات کنندگی گرده هیدرولیز شده تطبیق دارد.

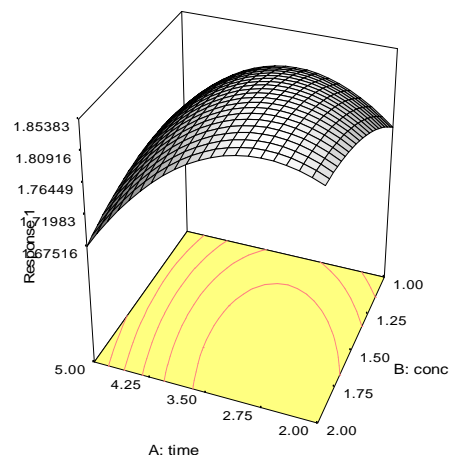
Table 3 Analysis of variance for chelating activity of hydrolyzed pollen

P value	Regression coefficient	DF	
< 0.0006	35.00912	2	Model
< 0.0002	-2.30767	1	(Time) X_1
0.5489	-0.74455	1	Enzyme) X_2 (concentration
0.851		6	Lack of fitness
	0.674		R^2 - Pred
	0.725		R^2 - Adj

شکل ۶ نمودار صفحه ای و کانتور اثر زمان و غلظت آنزیم را بر روی شلات کنندگی گرده هیدرولیز شده را نشان می‌دهد. در این شکل، نمودار سطح پاسخ نشان می‌دهد که بیشترین قدرت شلات کنندگی در مدت زمان ۱/۳۸ ساعت با میزان ۳۱/۷۱۶ درصد بوده و با افزایش مدت زمان هیدرولیز تا ۵/۶۲ ساعت، میزان قدرت شلات کنندگی تا میزان ۲۱/۱۹ درصد کاهش پیدا کرد. اثر غلظت آنزیم بر میزان قدرت شلات کنندگی گرده معنی دار نبود. رسیدن به بیشترین قدرت شلات کنندگی، می‌توان از غلظت ثابت آنزیم استفاده کرد و مدت زمان هیدرولیز را کوتاه کرد. همانطور که ذکر شد پیشرفت هیدرولیز با افزایش زمان هیدرولیز باعث کاهش قدرت شلات کنندگی یون آهن دو ظرفیتی توسط پروتئین هیدرولیز شده گردید. این مسئله احتمالاً به دلیل تولید پپتیدهای زنجیر کوتاه و عدم توانایی آنها برای تشکیل کمپلکس با یون آهن دو ظرفیتی و به دام انداختن آنها باشد. در واقع ایجاد شرایط برای هیدرولیز محدود نسبت به واکنش هیدرولیز گسترده، بهتر

DESIGN-EXPERT Plot

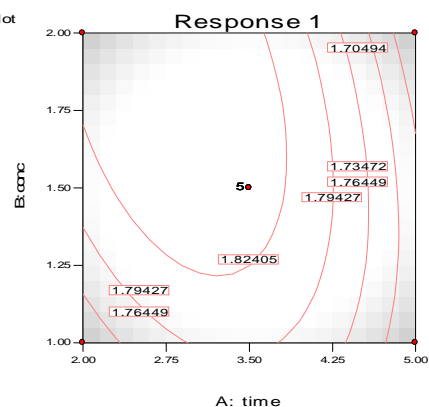
Response 1
X = A: time
Y = B: conc



a

DESIGN-EXPERT Plot

Response 1
● Design Points
X = A: time
Y = B: conc



b

Fig 5 Surface plot (a) Contour plot (b) for Reducing power against time (hours) and enzyme concentration (percent)

۳-۵-۲- شلات کنندگی یون آهن دو ظرفیتی

نتایج مربوط به تجزیه واریانس و ضرایب رگرسیونی برای پاسخ-های قدرت شلات کنندگی گرده هیدرولیز شده در جدول ۳ آمده است. آنالیز سطح پاسخ نشان می‌دهد که رابطه قدرت شلات کنندگی گرده هیدرولیز شده با پارامترهای واکنش از نوع درجه اول با ضریب رگرسیون ($R^2 = 0/725$) می‌باشد.

معادله ۲-۳

$$Y = 35/00912 - 2/30767 X_1 - 0/74455 X_2$$

۳-۵-۳- فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH

نتایج مربوط به تجزیه واریانس و ضرایب رگرسیونی برای پاسخ-های فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH گرده هیدرولیز شده در جدول ۴ ذکر شده است. آنالیز سطح پاسخ نشان می‌دهد که رابطه فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH گرده هیدرولیز شده با پارامترهای واکنش از نوع درجه دوم با ضریب رگرسیون $(R^2=0.9075)$ می‌باشد.

معادله ۳-۴

$$Y = 40.08939 + 8.33869 X_1 + 5.3589 X_2 - 1.94367 X_1^2 - 6.793 X_2^2 + 3.08667 X_1 X_2$$

نتایج جدول ۴ نشان می‌دهد که مدل آماری ارائه شده برای پیش‌بینی اثر متغیرهای آزمایش بر فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH گرده گل هیدرولیز شده مناسب می‌باشد ($P < 0.0003$). اثر غلظت آنزیم ($P < 0.0025$) بر روی فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH بیشتر و معنی‌دار تر از متغیر زمان ($P < 0.0075$) می‌باشد. همچنین نتایج، اثر درجه دوم هر یک از متغیرها را بر روی پاسخ آزمایش نزولی و اثر درجه دوم مربوط به زمان معنی‌دار نشان می‌دهد. همچنین 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 معنی‌دار نشد ($P > 0.05$). این مسئله بیانگر آن است که مدل به خوبی با داده‌های مربوط به فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH گرده هیدرولیز شده تطبیق دارد.

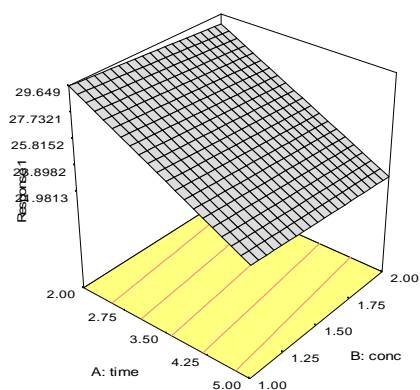
Table 4 Analysis of variance for DPPH inhibiting effect of hydrolyzed pollen

P Value	Regression coefficient	DF	
0.0003	40.08939	5	Model
0.075	8.33869	1	(Time) X_1
0.0025	5.3589	1	Enzyme) X_2 (concentration
0.0001	-1.94367	1	X_1^2
0.0106	-6.793	1	X_2^2
0.0091	3.08667	1	$X_1 X_2$
0.8373		3	Lack of fitness
	0.8635		R^2 - Pred
	0.9075		R^2 - Adj

می‌تواند منجر به تولید پپتیدهایی با قدرت شلات‌کنندگی مناسب شود که این مسئله توسط خانتاناف و همکاران، نیز تایید شده است [۱۷]. آنها اعلام کردند که با افزایش مدت زمان و درجه هیدرولیز میزان فعالیت شلات‌کنندگی پروتئین‌های هیدرولیز شده‌ی ماهی کاهش یافت [۱۷]. با توجه به اینکه قدرت شلات‌کنندگی گرده گل قبل از هیدرولیز حدود ۵ درصد بوده و با انجام عمل هیدرولیز به میزان ۳۱/۷۱۶ درصد افزایش یافته است، می‌توان دریافت که آنزیم آلکالاز به عنوان یک اندوپپتیداز، به خوبی توانسته است پپتیدهایی با زنجیره‌های جانبی مختلف و با قابلیت به دام‌اندازی یون‌های فلزی تولید کند که با شکسته شدن نقاط مختلف مولکول پروتئین صورت گرفته است که با نتایج خانتاناف و همکاران و بایرام و همکاران مطابقت داشت [۳۳].

DESIGN-EXPERT Plot

Response 1
X = A: time
Y = B: conc



DESIGN-EXPERT Plot

Response 1
● Design Points
X = A: time
Y = B: conc

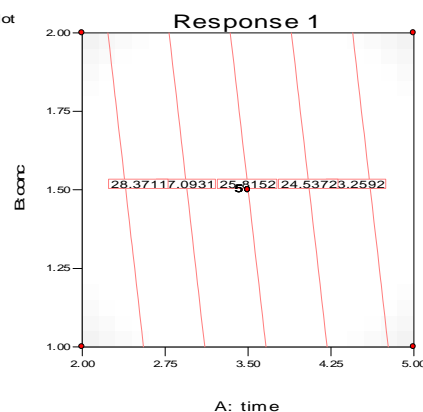


Fig 6 Surface plot (a) Contour plot (b) for chelating activity against time (hours) and enzyme concentration (percent)

ماهی داشتند، گزارش کردند که میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی با مدت زمان و درجه هیدرولیز ارتباط مستقیمی ندارد و در واقع این عوامل به عنوان یک معیار اصلی در تولید پپتیدهای آنتی‌اکسیدان مطرح نمی‌باشد [۳۶].

۳-۵-۴- 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 شامل مدت زمان ۲/۶۹ ساعت و غلظت آنزیم ۱/۳۲ درصد بود.

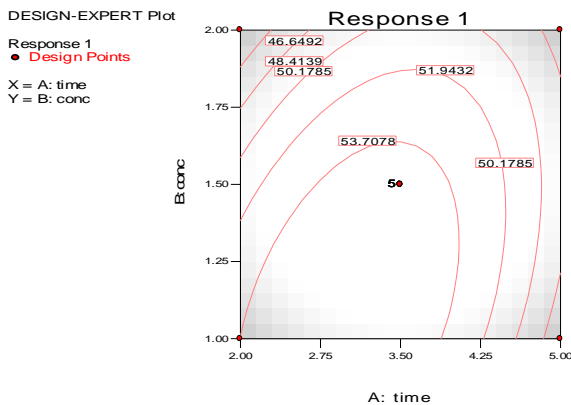
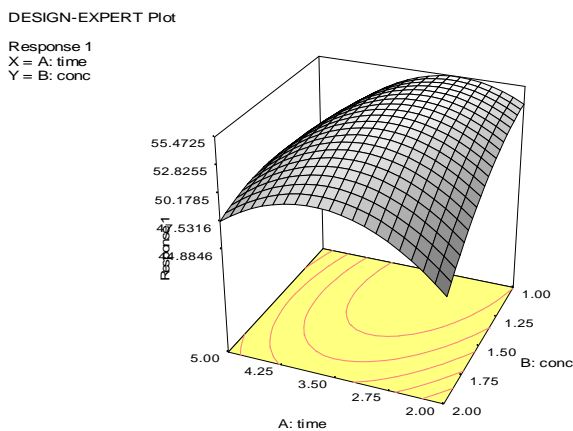


Fig 7 Surface plot (a) Contour plot (b) for DPPH inhibiting activity against time (hours) and enzyme concentration (percent)

پیش‌بینی شاخص‌های آنتی‌اکسیدانی شامل فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH، قدرت احیاءکنندگی و قدرت شلات‌کنندگی به ترتیب ۵۴/۶۵۵ درصد، میزان جذب ۱/۸۲ و ۲۷/۸۱۲ درصد بود. جهت ارزیابی اعتباری مدل آماری، یک آزمایش اضافه تحت

شکل ۷ نمودار صفحه ای و کانتور اثر زمان و غلظت آنزیم را بر روی فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH گرده هیدرولیز شده را نشان می‌دهد. در این شکل، نمودار سطح پاسخ نشان می‌دهد که بیشترین فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH در مدت زمان ۲ تا ۳/۵ ساعت بوده و غلظت‌های ۱ تا ۱/۵ درصد آنزیم بوده است. همانطور که نمودار ۷ نشان می‌دهد، کمترین فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH با اعمال زمان ۲ ساعت و غلظت آنزیم ۲ درصد به دست آمد، و برای رسیدن به بیشترین فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH، می‌بایست از غلظت‌های پایین آنزیم و مدت زمان نسبتاً کوتاه هیدرولیز استفاده کرد. ماریانو و همکاران، با استفاده از چهار ساعت هیدرولیز آنزیمی پروتئین‌های گرده گل، پپتیدهایی با قابلیت مهار رادیکال DPPH به میزان ۴۶ درصد دست پیدا کردند [۲۰]. در حالیکه در پژوهش حاضر، با دوساعت هیدرولیز قابلیت مهارکنندگی به ۵۴/۶۵ درصد رسید و پس از کاهش یافت. در ارتباط با این موضوع، طاهری و همکاران اعلام کردند که پیشرفت فرایند هیدرولیز منجر به رهاسازی پپتیدهای آنتی‌اکسیدان از زنجیره‌های پروتئینی می‌گردد ولی ادامه فرایند هیدرولیز ممکن است باعث کاهش این فعالیت شود [۳۷].

با توجه به اینکه فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH گرده گل، قبل از هیدرولیز ۳۱ درصد بوده و با انجام عمل هیدرولیز، به میزان حداکثر ۵۴/۶۵۵ درصد رسیده است، مشخص است که آنزیم آلکالاز به عنوان یک اندوپپتیداز، به خوبی توانسته است پپتیدهایی با زنجیره‌های جانبی مختلف و با قابلیت مهار رادیکال‌های آزاد تولید کند که با شکسته شدن نقاط مختلف مولکول پروتئین صورت گرفته است که با نتایج ناگای و همکاران مطابقت داشت [۳۴ و ۳۵]. ناگای و همکاران اعلام کردند که عملیات هیدرولیز گرده گل با استفاده از پروتئاز باعث افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی گرده گل از طریق تولید پپتیدهایی با قابلیت مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد و گونه‌های اکسیژن فعال می‌شوند [۳۵].

زیائوبو و همکاران اعلام کردند که هیدرولیز گرده گل توسط آنزیم آلکالاز باعث تولید پپتیدهایی با قابلیت مهار رادیکال‌های هیدروکسیل گردید [۲۱]. چابثود و همکاران در پژوهشی که در زمینه بهینه سازی فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده

- royal jelly glycoproteins. *Glycobiology*. 14 (11): 241.
- [8] Nagai, T., & Inoue, R. 2004. Preparation and the functional properties of water extract and alkaline extract from royal jelly. *Food Chemistry*. 84, 181–186.
- [9] Kawashima, K., Itoh, H., Miyoshi, M., & Chibata, I. (1979). Antioxidant properties of branched-chain amino acid derivatives. *Chemical Pharmacological Bulletin*. 27. 1912–1916.
- [10] 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.
- [11] 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*. 318-327.
- [12] Šaric, A., Balog, T., Soboc, A., Borcka, K., Višnja, Š. 2009. Antioxidant effects of flavonoid from Croatian *Cystus incanus* L. rich bee pollen. *Food and Chemical Toxicology*. 47: 547–554.
- [13] Žilic, S., Jelena, V., Marijana, J., Vuk, M. 2014. Chemical composition, bioactive compounds, antioxidant capacity and stability of floral maize (*Zea mays* L.) pollen. *Journal of functional foods*. 10:65–74.
- [14] Kroyer, G., Hegedus, N. 2001. Evaluation of bioactive properties of pollen extracts as functional dietary food supplement. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 2: 171-174.
- [15] Minervini, F., Algaron, F., Rizzello, C.G., Fox, P.F., Monnet, V., Gobbetti, M. 2003. Angiotensin converting-enzyme-inhibitory and antibacterial peptides from *Lactobacillus helveticus* PR4 proteinase hydrolyzed caseins of milk from six species. *Application of Environment and Microbiology*. 69: 5297–5305
- [16] Wiriyaphan, C., Chitsomboon, B., Yongsawadigul, J. 2012. Antioxidant activity of protein hydrolysates derived from threadfin bream surimi byproducts. *Food Chemistry*, 132, 104-111.
- [17] 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. شرایط مذکور انجام شد که در آن فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH، قدرت احیاءکنندگی و قدرت شلات کنندگی به ترتیب ۵۳/۷۶۱ درصد، میزان جذب ۱/۶۹ و ۲۶/۷۹۳ درصد 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 می‌تواند اثر دو متغیر زمان و غلظت آنزیم را بر فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH، قدرت احیاءکنندگی و قدرت شلات کنندگی کرده هیدرولیز شده نشان دهد.

۴- منابع

- [1] Pascoal, A., Rodrigues, S., Teixeira, A., Feás, X., L. M. Estevinho. 2013. Biological activities of commercial bee pollens: antimicrobial, antimutagenic, antioxidant and anti-inflammatory. *Food and Chemical Toxicology*.
- [2] 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, 1096-1101.
- [3] Boselli, E., Caboni, M., Sabatini, A. G., Marcazzan, G. L., Lercker, G. 2003. Determination and changes of free amino acids in royal jelly during storage. *Apidologie*. 34 (2): 129-137
- [4] Almaraz-Abarca, N., Campos, M.G., Avila-Reyes, J.A., Naranjo-Jimenez, N., HerreraCorral, J., Gonzalez-Valdez, L.S., 2004. Variability of antioxidant activity among honeybee-collected pollen of different botanical origin. *Interciencia* 29, 574-578.
- [5] Ramadan, M.F., Al-Ghamdi, A. 2012. Bioactive compounds and health-promoting properties of royal jelly: A review. *Journal of Functional Foods*. 4:39–52.
- [6] Crenguța, I., Pavel, Liviu, A. I., Mărghitaș, O., Daniel, S., Dezmirean, A., Șapcaliu, I. R., Mariana, N. 2011. Biological Activities of Royal Jelly – Review. *Animal Science and Biotechnologies*. 44 (2): 108-118.
- [7] Miyamoto, M., Tsumura, K., Kimura, M., Okihara, S., Sugimoto, H., Yamada, H. 2004. N-glycans bearing beta-1,3-galactosyl residue in

- [27] Zhang, Z., Pang, X., Ji., Z., Jiang, Y. 2001. Role of anthocyanin degradation in litchi pericarp browning. *Food Chemistry*. 75: 217-221.
- [28] 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: 559- 568.
- [29] Sun, L., Powers, J. R., and Tang, J. 2007. Evaluation of antioxidant activity of asparagus, broccoli and their juices. *Food Chemistry*. 105: 101- 106.
- [30] Sahreen, K., Fujikawa, k., Yahara, K., Nakamura, T. 2010. Evaluation of antioxidant activities of various solvent extracts of *Carissa opaca* fruits. *Food Chemistry*. 122: 1205-1211.
- [31] Sun, L., Zhang, J., Lu, X., Zang, L., Zang, Y. 2011. Evaluation to the antioxidant activity of total flavonoids extract from persimmon leaves. *Food and Chemical Toxicology*. 49: 2689-2696.
- [32] 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: 1266-1272.
- [33] Khantaphant, S., Benjakul, S., Ghomi, M. R. 2011. The effects of pretreatments on antioxidative activities of protein hydrolysate from the muscle of brownstripe red snapper. *LWT- Food Science and Technology*. 44: 1139-1148.
- [34] Bayram, T., Pekmez, M., Arda, N., Yalc, A. S. 2008. Antioxidant activity of whey protein fractions isolated by gel exclusion chromatography and protease treatment. *Talanta*. 75: 9-705.
- [35] 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.
- [36] Chabeaud, A., Dutournie, P., Guerard, F., Vandanjon, L., Bourseau, P. 2009. Application of RSM to optimize the antioxidant activity of Saithe hydrolysate. *Mar Biotechnology*. 11: 445-455.
- Comparative Biochemistry and Physiology, 151, 110-115.
- [18] Zhu, K., Zhou, H., Qian, H. 2006. Antioxidant and free radical-scavenging activities of wheat germ protein hydrolysates (WGPH) prepared with alcalase. *Process Biochemistry*. 41: 1296–1302.
- [19] Guo, J., Yan, J., Guo., M., Jin, Y. 2014. Application of reversed-phase liquid chromatography-tandem mass spectrometry in the identification of protein and bioactivity peptides from rape bee pollen. *US National Library of Medicine National Institutes of Health*. 32(3):284-9.
- [20] Marinova, M., Tchobanov, P. 2010. Preparation of Antioxidant Enzymatic Hydrolysates from Honeybee-Collected Pollen Using Plant Enzymes. *Enzyme Research*. 41: 5949-50.
- [21] Xiao, Bo, H., Zheng, R., Zhao, H. X., Mou, W. C. 2008. Preparation of peptides hydrolyzed from rape pollen glutelin. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering*. 24 (5): 240-244.
- [22] Deshpande, S., Chryan, M., Salunkhe, D. 1987. Tanin analysis of food products. *Critical review in food nutrition*. 24:41- 49.
- [23] 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, 2703-2711.
- [24] Bougatef.A ; Hajji.M ; Balti.R . 2009. Antioxidant and free radical – scavenging activities of smooth hound muscle protein hydrolysates obtained by gastro intestinal proteases. *Journal of food chemistry*;1198-1255.
- [25] 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, 1455-1460.
- [26] Chirinos, R., Rogez, H., Campos, D., Pedreschi, R. and Larondele, Y. 2007. Optimization of extraction conditions of antioxidant phenolic compounds from mashua tubers. *Separation and Purification Technology*. 55: 217-225.

- [39] Leja, M., Mareczek, A., Wy_ zgolik, G., Klepacz-Baniak, J., Czekon ´ska, K. 2007. Antioxidative properties of bee pollen in selected plant species. *Food Chemistry*. 100: 237–240.
- [40] Moreira, L., Dias, G., Pereira, J. A., Estevinho, L. 2008. Antioxidant properties, total phenols and pollen analysis of propolis samples from Portugal. *Food and Chemical Toxicology*. 46: 3482–3485.
- [37] Taheri, A., Abedian Kenari, A., Motamedzadegan, A, Habibi Rezaei, M. 2011. Optimization of goldstripe sardine protein hydrolysate using alcalase 2.4L by RSM. 1 *CyTA- Journal of Food Science*. 9:114-120.
- [38] Vioque, J., Sánchez-Vioque, R., Clemente, A., Pedroche, J., Millán, F. 2000. Partially Hydrolyzed Rapeseed Protein Isolates with Improved Functional Properties. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 77, 447-450.

Evaluation of the antioxidant properties Hydrolyzed protein of bee pollen

Maqsoodlou, A. ¹, Sadeghi Mahoonak, A. R. ^{2*}, Mohebodini, H. ³

1. PhD student, food chemistry ,Gorgan university of agricultural sciences and natural resources, Department of Food Science & Technology, Iran

2. Associate Professor, food chemistry,Gorgan university of agricultural sciences and natural resources, Department of Food Science & Technology ,Iran

3. Assistant Professor, Animal nutrition, University of Mohaghegh Ardabili, Faculty of agricultural science, Ardabil, Iran

(Received: 2016/05/02 Accepted: 2016/09/11)

Bee pollen, results from the agglutination of flower pollens with nectar and salivary substances of the honeybees. Honey bees save the pollen in the pollen bag at the third clause of their legs. At the entrance to the hive, pollen is trapped in pollen trap and beekeeper collects it. One of the functional properties of bee pollen is antioxidant activity due to its proteins and phenolic compounds. In this study, effect of enzymatic hydrolysis of bee pollen's proteins on its anti-oxidative activity and optimization of hydrolysis conditions was evaluated. In this regard, phenolic compounds, DPPH free radical scavenging activity, ferric ion reducing power and ferrous ion chelating properties of pollen were measured (respectively 4.1 µg/ 100 g, 31.86%, 1.89, 4.9). Bee pollens hydrolyzed by Alcalase at 2 to 5 hours and concentration of 1to 2%. Treatments determined by RSM. Anti-oxidative factors of hydrolyzed pollen were evaluated. Results showed that maximum amount of reducing power of hydrolyzed pollen received at 2 hours by enzyme concentration of 2%. Maximum amount chelating activity was 31.71% received at 1.38 hours of hydrolysis; effect of enzyme concentration on chelating activity was insignificant. Maximum amount of DPPH free radical scavenging activity received at 2-3.5 hours and enzyme concentration of 1-1.5%. Chelating and DPPH free radical scavenging activities of bee pollen increased to respectively 26% and 23.65% after hydrolyzing.

Keywords: Bee pollen, Anti-oxidative activity, Hydrolysis, bioactive peptides, Optimization.

* Corresponding Author E-Mail Address: Sadeghiaz@yahoo.com