

UNIVERSITATEA DE ȘTIINȚE AGRICOLE ȘI MEDICINĂ VETERINARĂ CLUJ-NAPOCA
ȘCOALA DOCTORALĂ DE ȘTIINȚE AGRICOLE INGINEREȘTI



CLUJ-NAPOCA, 2018

TEZA DE DOCTORAT

Caracterizarea biochimică a proteinelor majoritare purificate din lăptișorul de matcă (*Apis mellifera*)

Doctorand **Carmen Ioana Mureșan**

Conducător de doctorat **Prof. univ. dr. Liviu Al. Mărghitaș**



PhD THESIS

Biochemical characterization of the most abundant proteins purified from royal jelly (*Apis mellifera*)

PhD student **Carmen Ioana Mureşan**

Scientific coordinator **Prof. univ. dr. Liviu Al. Mărghităş**



LISTA DE PUBLICAȚII

Articole publicate *in extenso* ca rezultat al cercetării doctorale

1. MUREȘAN CARMEN IOANA, L. A. MĂRGHITAŞ, D. S. DEZMIREAN, OTILIA BOBİŞ, VICTORIȚA BONTA, IULIA ZACHARIAS, RODICA MĂRGĂOAN, CLAUDIA PAȘCA, 2016, Quality Parameters for Commercial Royal Jelly, *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca, Animal Science and Biotechnologies*, vol. 73(1), 37-44. **B+**
2. PAȘCA CLAUDIA, L. A. MĂRGHITAŞ, OTILIA BOBİŞ, D. S. DEZMIREAN, RODICA MĂRGĂOAN, CARMEN IOANA MUREȘAN, 2016, Total Content of Polyphenols and Antioxidant Activity of Different Melliferous Plants, *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca, Animal Science and Biotechnologies*, vol. 73(1), 59-65. **B+**
3. MĂRGĂOAN RODICA, L. A. MĂRGHITAŞ, D. S. DEZMIREAN, OTILIA BOBİŞ, VICTORIȚA BONTA, CORINA CĂTANĂ, ADRIANA URCAN, CARMEN IOANA MUREȘAN, MIRELA GABRIELA MARGIN, 2017, Comparative Study on Quality Parameters of Royal Jelly, Apilarnil and Queen Bee Larvae Triturate, *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca, Animal Science and Biotechnologies*, vol. 74(1), 51-58. **B+**
4. URCAN ADRIANA L. A. MĂRGHITAŞ, D. S. DEZMIREAN, OTILIA BOBİŞ, VICTORIȚA BONTA, CARMEN IOANA MUREȘAN, RODICA MĂRGĂOAN, 2017, Chemical Composition and Biological Activities of Beebread – Review, *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca, Animal Science and Biotechnologies*, vol. 74(1), 6-14. **B+**
5. BUTTSTEDT ANJA, CARMEN IOANA MUREȘAN, H. LILIE, G. HAUSE, C. H. IHLING, S. H. SCHULZE, M. PIETZSCH, R.F.A. MORITZ, 2018, How Honeybees Defy Gravity with Royal Jelly to Raise Queens, *Current Biology*, vol. 28(7), 1095–1100. **ISI (FI 9.251)**
6. MUREȘAN CARMEN IOANA, ANGELIKA SCHIERHORN, ANJA BUTTSTEDT, 2018, The Fate of Major Royal Jelly Proteins during Proteolytic Digestion in the Human Gastrointestinal Tract, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 66(16), 4164–4170. **ISI (FI 3.412)**

Articole submise spre publicare

1. MUREȘAN CARMEN IOANA, ANJA BUTTSTEDT, 201x, Some like it acidic-pH-dependent stability of honey bee (*Apis mellifera*) major royal jelly proteins, *Scientific Reports*. **ISI (FI 4.609)**

CUPRINS

INTRODUCERE	15
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII.....	17
1. Lăptișorul de matcă	19
1.1. Sursa lăptișorului de matcă	19
1.2. Proprietățile fizico-chimice ale lăptișorului de matcă.....	21
2. Proteinele din lăptișorul de matcă	24
2.1. Proteinele-generalități.....	24
2.2. Proteinele specifice lăptișorului de matcă	26
2.2.1. Familia de proteine Major royal jelly proteins	27
2.3. Proprietăți biologice ale proteinelor MRJPs din lăptișorul de matcă.....	29
2.4. Purificarea proteinelor – generalități	30
2.5. Stabilitatea proteinelor – generalități	32
2.6. Digestibilitatea proteinelor – generalități	34
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	37
3. Obiectivele urmărite	39
3.1. Obținerea proteinelor majoritare individuale și pure din lăptișorul de matcă.....	39
3.2. Stabilitatea proteinelor majoritare din lăptișorul de matcă în timpul simulării <i>in vitro</i> a digestiei umane.....	39
3.3. Influența pH-ului asupra stabilității proteinelor purificate din lăptișorul de matcă.....	40
4. Purificarea proteinelor majoritare din lăptișorul de matcă folosind metode cromatografice	41
4.1. Materialul biologic	41
4.2. Obținerea extractului proteic din lăptișorul de matcă	41
4.3. Purificarea proteinelor cu ajutorul cromatografiei	41
4.3.1. Cromatografia cu schimbători de ioni	43
4.3.2. Cromatografia de interacțiuni hidrofobe	43
4.3.3. Analiza fracțiunilor proteice cu spectroscopia UV	44
4.3.4. Identificarea fracțiunilor proteice pure cu ajutorul electroforezei în gel de dodecilsulfat de sodiu-poliacrilamidă (SDS-PAGE).....	45
4.3.5. Electroforeza proteinelor în condiții nedenaturante cu ajutorul Native PAGE.....	46
4.3.6. Analiza proteinelor cu ajutorul spectrometriei de masă.....	46
4.3.7. Analiza statistică	47
4.4. Rezultate și discuții.....	47
5. Stabilitatea proteinelor majoritare din lăptișorul de matcă pe parcursul simulării <i>in vitro</i> a digestiei umane la nivel gastro-intestinal	52
5.1. Materialul biologic	52
5.2. Obținerea proteinelor majoritare pure din lăptișorul de matcă	52
5.3. Determinarea concentrației de proteine cu ajutorul spectroscopiei UV	53
5.4. Protocolul <i>in vitro</i> de simulare a digestiei umane la nivel gastro-intestinal	53
5.4.1 Simularea <i>in vitro</i> a digestiei gastrice	54
5.4.2 Simularea <i>in vitro</i> a digestiei intestinale	54
5.5. Electroforeza în gel de dodecilsulfat de sodiu-poliacrilamidă (SDS-PAGE) a produșilor de digestie	55
5.6. Analiza gelurilor de SDS-poliacrilamidă cu ajutorul densitometriei.....	56
5.7. Analiza cu ajutorul spectrometriei de masă a produșilor de digestie	56
5.8. Analiza statistică	56
5.9. Rezultate și discuții.....	56
5.9.1. Etapa gastrică.....	59
5.9.2. Etapa intestinală.....	66

6.Influența pH-ului asupra stabilității proteinelor purificate din lăptișorul de matcă.....	68
6.1. Materialul biologic.....	68
6.2. Obținerea proteinelor majoritare pure din lăptișorul de matcă	68
6.3. Determinarea concentrației de proteine cu ajutorul spectroscopiei UV	68
6.4. Monitorizarea stabilității proteinelor majoritare din lăptișorul de matcă cu ajutorul spectroscopiei de fluorescență	68
6.5. Analiza statistică	69
6.6. Rezultate și discuții	70
7. Concluzii și recomandări.....	81
7.1. Concluzii privind obținerea proteinelor majoritare individuale și pure din lăptișorul de matcă	81
7.2. Concluzii privind stabilitatea proteinelor majoritare din lăptișorul de matcă în timpul simulării <i>in vitro</i> a digestiei umane	82
7.3. Concluzii privind influența pH-ului asupra stabilității proteinelor purificate din lăptișorul de matcă	83
7.4. Recomandări	85
8. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei.....	87
BIBLIOGRAFIA	89
ANEXE.....	99

CONTENTS

INTRODUCTION.....	15
LITERATURE REVIEW.....	17
1. Royal jelly.....	19
1.1. The source of royal jelly	19
1.2. Physico-chemical properties of royal jelly	21
2. Royal jelly proteins.....	24
2.1. Proteins-overview.....	24
2.2. Specific royal jelly proteins.....	26
2.2.1. Major royal jelly proteins family	27
2.3. Biological properties of MRJPs from royal jelly	29
2.4. Protein purification -overview.....	30
2.5. Protein stability -overview	32
2.6. Protein digestibility -overview	34
PERSONAL CONTRIBUTION.....	37
3. Objectives of the thesis.....	39
3.1. Obtaining individual and pure proteins from royal jelly.....	39
3.2. Stability during <i>in vitro</i> human digestion of the most abundant proteins from royal jelly	39
3.3. The influence of pH on the stability of the most abundant proteins purified from royal jelly	40
4. Purification of the most abundant proteins from royal jelly using chromatographic methods	41
4.1. Biological material	41
4.2. Obtaining the protein extract from royal jelly	41
4.3. Protein purification using chromatography	41
4.3.1. Ion exchange chromatography.....	43
4.3.2. Hydrophobic interaction chromatography	43
4.3.3. Protein fractions analysis using UV spectroscopy	44
4.3.4. Protein fractions identification using SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)	45
4.3.5. Protein electrophoresis in non-denaturing conditions using Native PAGE	46
4.3.6. Protein analysis using mass spectrometry.....	46
4.3.7. Statistical analysis	47
4.4. Results and discussion	47
5. Stability of the most abundant proteins from royal jelly during <i>in vitro</i> human gastro-intestinal digestion.....	52
5.1. Biological material	52
5.2. Purification of the most abundant proteins from royal jelly	52
5.3. Protein concentration determination using UV spectroscopy	53
5.4. <i>In vitro</i> human gastro-intestinal digestion simulation.....	53
5.4.1. <i>In vitro</i> gastric digestion simulation	54
5.4.2. <i>In vitro</i> intestinal digestion simulation	54
5.5. Electrophoresis using SDS-polyacrylamide (SDS-PAGE) of the digestion products	55
5.6. SDS-polyacrylamide gels analysis using densitometry	56
5.7. Digestion products analysis using mass spectrometry	56
5.8. Statistical analysis.....	56
5.9. Results and discussion	56
5.9.1. Gastric step.....	59

5.9.2. Intestinal step.....	66
6. Influence of pH on the stability of proteins purified from royal jelly	68
6.1. Biological material	68
6.2. Purification of the most abundant proteins from royal jelly	68
6.3. Protein concentration determination using UV spectroscopy	68
6.4. Monitoring the stability of the most abundant proteins from royal jelly using fluorescence spectroscopy.....	68
6.5. Statistical analysis	69
6.6. Results and discussion	70
7. Conclusions and recommendations	81
7.1. Conclusions regarding the purification of the most abundant proteins from royal jelly	81
7.2. Conclusions regarding the stability of the most abundant proteins from royal jelly during <i>in vitro</i> human digestion simulation	82
7.3. Conclusions regarding the influence of pH on the stability of purified proteins from royal jelly	83
7.4. Recommendations.....	85
8. Originality and innovative contributions of the thesis.....	87
REFERENCES.....	89
SUPPLEMENTARY	99

ACRONIME ȘI ABREVIERI UTILIZATE ÎN TEXT

10-HDA	acid 10-hidroxi-2-decanoic
10-HDAA	acid 10-hidroxi-decanoic
BAEE	N _α -Benzoyl-L-arginină etil ester
BSA	albumină serică bovină
BTEE	N-Benzoyl-L-tirozină etil ester
ESI-QTOF	electrospray ionization - quadrupole time of flight
HCl	acid clorhidric
kDa	kilodalton
MALDI-TOF	matrix-assisted laser desorption ionization – time of flight
monoMRJP1	monomerul MRJP1
MRJPs	Major royal jelly proteins
MS	spectrometrie de masă
NaCl	clorură de sodiu
Native PAGE	gel electroforeză în condiții nedenaturante (nativă)
oligoMRJP1	oligomerul MRJP1
RFU	unități relative de fluorescență
SD	deviația standard
SDS	dodecil sulfat de sodiu
SDS-PA	dodecil sulfat de sodiu-poliacrilamidă
SE	eroarea standard
SP	sulphopropyl
Tm	Temperatura de denaturare termică a proteinei

INTRODUCERE

INTRODUCTION

Lăptișorul de matcă este o secreție a glandelor hipofaringeale și mandibulare ale albinelor lucrătoare, fiind un produs nutritiv de bază în dieta mătcelor de albine și a larvelor de albine în primele trei zile după ecloziunea din ouăle depuse de matcă. Acest produs de secreție complex are în compoziție proteine, glucide, lipide (majoritari fiind acizii grași), vitamine, minerale, ATP și cataboliții săi (SABATINI, 2009). Pe lângă rolul nutritiv, lăptișorul de matcă este de asemenea implicat în subiectul controversat al diferențierii pe caste a albinelor, subiect care a atras atenția oamenilor încă din Antichitate (ARISTOTEL, circa 350 î.Hr.). Abia în anul 1760, după efectuarea unor experimente, Adam Gottlob Schirach a reușit să înțeleagă sistemul complex de reproducere al albinelor ajungând la următoarea concluzie: larvele albinelor devin albine lucrătoare sau mătci în funcție de hrana administrată (MAZZOLINI, 1985).

De asemenea, lăptișorului de matcă i s-au atribuit diverse efecte benefice asupra sănătății omului precum efect antioxidant, stimularea creșterii celulare, acțiune antibacteriană, acțiune imunomodulatoare, efect antiinflamator, efect hipコレsterolemiant, efect antialergic etc (LIU, 2008; KAMAKURA, 2006; WATANABE, 1998; FUJIWARA, 1990; FONTANA, 2004; ROMANELLI, 2011; OKAMOTO, 2003; KOHNO, 2004; KASHIMA, 2014). Datorită proprietăților nutriționale și funcționale, lăptișorul de matcă este considerat un produs valoros al stupului, fiind folosit în medicina tradițională, în produse funcționale și cosmetice. Datorită efectelor terapeutice, în marea majoritate a cazurilor acest produs este consumat direct în stare pură și crudă ca supliment alimentar. Cererea din partea consumatorilor pentru acest produs este în continuă creștere, lăptișorul de matcă atrăgând atât interesul consumatorilor cât și al cercetătorilor (până acum fiind publicate peste 1000 de articole despre sau în legătură cu lăptișorul de matcă conform Web of Science). Prin urmare, studiile științifice care cercetează și evaluatează efectele benefice ale consumului de lăptișor de matcă sunt de asemenea în continuă creștere. Așadar acest produs apicol prezintă un important potențial pentru industrie, în special pentru industria alimentară, cosmetică și cea farmaceutică. În principal proteinele, compușii fenolici și acizii grași sunt implicați în proprietățile funcționale atribuite lăptișorului de matcă. Cele mai abundente proteine din lăptișorul de matcă aparțin familiei Major royal jelly proteins (MRJPs) care reprezintă 82-90 % din proteinele totale (SCHMITZOVA, 1998). Aceste proteine sunt sintetizate de familia de gene *mrjps* și au secvențe ale aminoacizilor înrudite. Expresia genelor *mrjps* nu este exclusivă glandelor hipofaringeale (sursa lăptișorului de matcă), existând tipare caracteristice ale expresiei genelor la nivel de țesuturi, etape de dezvoltare a organismului albinei sau la nivel de caste. Importanța studierii proteinelor din lăptișorul de matcă contribuie atât la înțelegerea diferențierii pe caste în cadrul sistemului de reproducere al albinelor, cât și pentru a contura și înțelege funcțiile pe care moleculele proteice le dețin, atât cu implicații în fiziologia albinelor cât și a omului care este consumator în scop terapeutic al lăptișorului de matcă.

STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

LITERATURE REVIEW

1. Lăptișorul de matcă

1. Royal jelly

1.1. Sursa lăptișorului de matcă

1.1. The source of royal jelly

Albinele (*Apis mellifera* L.) sunt insecte sociale a căror colonie este alcătuită din mii de albine lucrătoare, trântori și matcă (Fig.1). Fiecare dintre aceste trei caste joacă un rol diferit. Caracteristica principală a familiei de albine este eusocialitatea, cooperarea altruistă între indivizi din stup. Diviziunea muncii este fundamentală supraviețuirii coloniei care formează astfel un supraorganism format din indivizi specializați care pot îndeplini diverse funcții în același timp. Diviziunea muncii este specifică albinele lucrătoare care trăiesc în medie 30-40 de zile pe perioada verii (OHASHI, 1999) și îndeplinesc pe parcursul vieții lor o serie de funcții în colonie. În coloană de albine sexul este determinat genetic. Astfel, albinele lucrătoare și matca, regina stupului, sunt femelele familiei de albine, indivizi identici genetic, care rezultă din ouăle fecundate, diploide, în timp ce trântorii sunt de sex masculin și rezultă din ouă nefecundate, haploide (WINSTON, 1987).

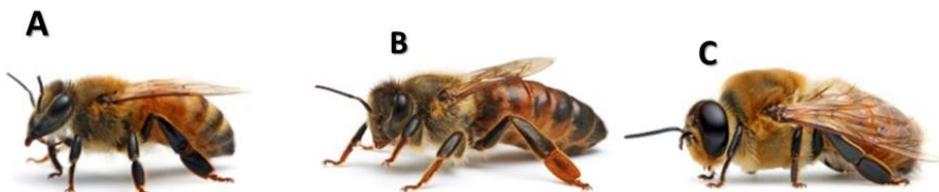


Fig. 1. Colonia de albine este formată din albine lucrătoare (A), o matcă (B) și câțiva trântori (C)(sursa: www.alexanderwild.com).

Fig. 1. The colony of honey bees is formed of worker bees (A), one queen bee (B) and some drones (C) (source: www.alexanderwild.com)

În schimb, diferențierea femelelor pe caste în albine lucrătoare sau mătci nu este determinată genetic precum sexul, ci este determinată de nutrienții asimilați. Lăptișorul de matcă este implicat în polifenismul specific albinelor. Polifenismul este prezent în situația în care deosebirile dintre indivizi unei populații sunt fenotipice, adică indivizi identici genetic vor avea fenotipuri diferite în funcție de factorii de mediu. Albinele lucrătoare și matca au același genotip, iar diferențele care există între acestea sunt datorate factorilor de mediu, mai exact dietei diferite, hrănirea cu lăptișorul de matcă fiind un factor care cauzează diferite modificări epigenetice implicate în diferențierea pe caste a albinelor, iar înțelegerea acestui mecanism de diferențiere depinde de cercetarea compușilor prezenti în lăptișorul de matcă.

Lăptișorul de matcă este un produs de secreție al glandelor hipofaringeale și mandibulare ale albinelor lucrătoare doici care au grija de larvele de albine în primele trei zile după ecloziunea din ouăle depuse de matcă în celulele de fagure (VON PLANTA, 1888; HAYDAK, 1970)(Fig.2).



Fig. 2. Lăptișor de matcă în botci cu larve de matcă (sursa: Wikipedia).

Fig. 2. Royal jelly in queen bee cells (source: Wikipedia)

Larvele care sunt destinate să devină albine lucrătoare sau trântori vor fi hrănite cu lăptișor de matcă amestecat cu polen și miere după cele trei zile de la ecloziune (SNODGRASS, 1984). Larvele menite să devină mătci eclozionatează în celule speciale numite botci și vor fi hrănite numai cu lăptișor de matcă. Matca va fi hrănita pe tot parcursul vieții cu această secreție care îi conferă fertilitate și longevitate. Așadar, cantitatea cât și calitatea hranei sunt factori determinanți cu efect epigenetic în diferențierea unor indivizi identici genetic, dar care au caracteristici fenotipice și fiziologice divergente: albine sterile care vor avea grija de stup, respectiv mătci care vor fi fertile și vor avea o durată de viață mai lungă.

Lăptișorul de matcă este deci o combinație a secrețiilor rezultate din glande specializate localizate la nivelul capului albinei: glandele hipofaringeale și glandele mandibulare (Fig.3).

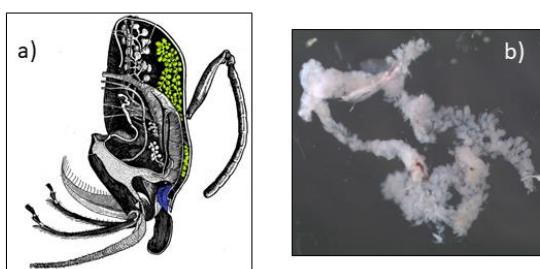


Fig. 3. a) Glandele hipofaringeale (galben) și mandibulare (albastru) ale albinei lucrătoare (sursa: Snodgrass, 1984), b) Imagine a glandelor hipofaringeale obținută la microscopul optic (sursa: Anja Buttstedt)

Fig. 3. a) Hypopharyngeal (yellow) and mandibular (blue) glands of worker bee (source: Snodgrass, 1984), b) Hypopharyngeal glands light microscope image (source: Anja Buttstedt)

Glandele hipofaringeale ale albinelor sunt specifice ordinului Hymenoptera, fiind glande exocrine aşezate bilateral în partea frontală a capului insectei alcătuite din

numeroși acini care conțin celule secretoare și ducte de colectare care se deschid în hipofarinx (SNODGRASS, 1984; HALBERSTADT, 1970). Structura și funcția glandelor hipofaringeale se schimbă în funcție de rolul pe care albinele îl îndeplinește în stup, astfel glandele albinelor doici care îngrijesc puietul își vor mări volumul, deci și capacitatea, și vor sintetiza proteine specifice lăptișorului de matcă când albinele au vîrstă de 6-12 zile, iar după acest moment, glandele se vor micșora (DESEYN, 2005; FENG, 2009). Proteinele din lăptișorul de matcă sunt produse de glandele hipofaringeale (PATEL, 1960), în timp ce glandele mandibulare ale albinelor doici produc în principal acizii grași ω-hidroxilați, dintre care acidul 10-hidroxi-2-decanoic (10-HDA) și precursorul acestuia acidul 10-hidroxidecanoic însumează 60-80 % din totalul acizilor grași regasiti în lăptișor (BARKER, 1959; ISIDOROV, 2012). Secreția glandelor mandibulare are un pH acid de 3.9 ± 0.1 datorat conținutului ridicat de acizi grași (HOFFMANN, 1960). În momentul în care secrețiile celor două glande vin în contact produsul rezultat (lăptișorul de matcă) are o culoare albuiu, opacă (HAYDAK, 1957). Glandele hipofaringeale ale albinelor doici produc în mare parte proteine din familia MRJPs (KLAUDINY, 1994; KUBO, 1996; OHASHI, 1997), dar și enzime implicate în metabolismul carbohidraților, în lăptișorul de matcă fiind identificate enzime precum α -glucozidaza și glucozoxidaza (OHASHI, 1996; FENG, 2009). Sinteza proteinelor la nivelul acestor glande are loc în reticulul endoplasmatic rugos bine dezvoltat și în numeroasele vezicule secretoare ale celulelor (KNECHT, 1990; DESEYN, 2005). Aceste proteine sunt sintetizate din polenul ingerat în cantități mari de către albinele doici, dezvoltarea glandelor fiind pozitiv corelată cu consumul de polen (CRAILSHEIM, 1992). Când albinele doici încetează hrănirea larvelor și încep să îndeplinească alte roluri în stup precum colectarea de nectar și polen, glandele lor hipofaringeale se micșorează, dar vor fi încă active, iar sinteza de proteine va include enzime, în principal cele necesare transformării nectarului în miere, precum α -glucozidaza, amilaza, glucozoxidaza, galactozidaza, esteraza, lipaza (KUBO, 1996; OHASHI, 1996; OHASHI, 1997; OHASHI, 1999; DESEYN, 2005). Albinele care au iernat își pot activa din nou glandele hipofaringeale atrofiate pentru a produce lăptișor de matcă la apariția puietului în primăvară care emite un semnal ce declanșează sinteza de proteine caracteristice lăptișorului (BROUWERS, 1982; HUANG, 1989). Glandele hipofaringeale sunt înconjurate de hemolimfa ("sângele" albinei) al cărei titru de hormon juvenil și ecdison a fost demonstrat că este implicat în reglarea și expresia genelor la nivelul celulelor secretoare (ROBINSON, 1987; UENO, 2015).

1.2. Proprietățile fizico-chimice ale lăptișorului de matcă

1.2. Physico-chemical properties of royal jelly

Compoziția lăptișorului de matcă a fost studiată încă din secolul al XIX-lea (VON PLANTA, 1888). Lăptișorul de matcă este un produs de consistență vâscoasă, de culoare alb-gălbuiu, cu gust caracteristic, astringent. Valoarea pH-ului se încadrează

între 3.5 și 4.5, aciditatea titrabilă este de 3.0-6.0, iar densitatea este de 1.1 g/ml (LERCKER, 1992; SABATINI, 2009).

Compoziția lăptișorului de matcă poate varia în funcție de hrana albinelor, de sezon, de momentul recoltării și de vârstă larvei (LIU, 2008), variabilitatea fiind înregistrată în special în cazul diferitelor tipuri de glucide și lipide, însă factorii de mediu nu vor influența semnificativ nivelul compoziției majoritare (RAMADAN, 2012). Sursa proteinelor și lipidelor din lăptișorul de matcă sunt glandele hipofaringeale, respectiv mandibulare, în timp ce sursa glucidelor este mierea (JUNG-HOFFMANN, 1966). Acest produs apicol se recoltează din celulele speciale ale fagurelui, numite botci, în care se dezvoltă larvele de matcă atunci când acestea au trei zile de la ecloziunea din ouă. Lăptișorul are un conținut ridicat de apă de 60-70 % (SABATINI, 2009), iar substanța uscată reprezintă 1/3 (KARAALI, 1988; SIMUTH, 2001). Lăptișorul de matcă are o compozиție complexă care a fost studiată intensiv, însă standardele de calitate lăptișorului la nivel european sau internațional lipsesc, existând doar standarde la nivel național în câteva țări (KANELIS, 2015). Există doar o propunere preliminară de standardizare din partea Comisiei Internaționale pentru Miere (IHC) (SABATINI, 2009), iar în 2016 Organizația internațională de standardizare (ISO) a înregistrat un proiect de standard internațional (ISO/DIS 12824). Compoziția lăptișorului crud conform ISO și IHC este prezentată în Tabelul 1.

Tabelul 1. Compoziția lăptișorului de matcă crud conform ISO/DIS 12824 și IHC (SABATINI, 2009)

Table 1. Royal jelly composition according to ISO/DIS 12824 and IHC (SABATINI, 2009)

	Umiditate Humidity %	10-HDA % %	Proteine Proteins %	Glucide % Carbohydrates %	Fructoză Fructose %	Glucoză Glucose %
ISO/DIS 12824	62.5-68.5	Min. 1.4	11-18	7-18	2-9	2-9
IHC (SABATINI, 2009)	60-70	Min. 1.4	9-18	7-18	3-13	4-8

Glucidele din lăptișorul de matcă reprezintă în medie 30 % din substanța uscată (SABATINI, 2009). Glucidele prezente sunt fructoza, glucoza, sucroza, riboza, manzoza, trehaloza, manitolul, primele două fiind majoritare (PALMA, 1992). Conținutul în sucroză este foarte variabil și depinde de hrana albinelor (SESTA, 2006). Nivelul de glucide crește în sezon mai ploios (WONGCHAI, 2002). Oligozaharidele ajută la autentificarea acestui produs apicol (SABATINI, 2009).

Se estimează un conținut de 9-18 % **proteine** în lăptișorul de matcă dintre care majoritatea sunt hidrosolubile (SABATINI, 2009). Proteinele pot reprezenta până la 50 % din substanța uscată (SIMUTH, 2001). Proteinele majoritare din lăptișorul de matcă fac parte din familia Major Royal Jelly Proteins (MRJPs) care pot reprezenta până la 90 % din totalul de proteine hidrosolubile (SCHMITZOVA, 1998; BUTTSTEDT, 2014).

Valoarea nutrițională a proteinelor unui produs este datorată aminoacicilor compoziți. Toți aminoacicii esențiali pentru organismul uman sunt prezentați în proteinele din lăptișorul de matcă.

În lăptișorul de matcă se găsesc și **aminoacizi liberi**. BOSELLI (2003) a determinat în lăptișorul de matcă aminoacicii liberi și a obținut o valoare medie de 7.3 mg/g, principaliii aminoacicizi liberi determinați fiind prolina, lizina, glutamatul, beta-alanina, fenilalanina, acidul aspartic, serina. LIMING (2009) a determinat aminoacicizi totali și liberi din lăptișorul de matcă prin metoda UPLC, iar valorile medii obținute au fost de 9.21 mg/g pentru aminoacicizi liberi, respectiv de 111.27 mg/g pentru aminoacicizi totali. Un studiu mai recent (BALKANSKA, 2015), a determinat un nivel pentru aminoacicizi liberi de 5.5-6.2 mg/g. Pe parcursul păstrării au loc reacții enzimatiche care determină oscilații ale concentrației aminoacicilor prezentați (SABATINI et al, 2009).

Lipidele din lăptișorul de matcă crud au un nivel de 3-8 % (SABATINI, 2009). Acizii grași ω-hidroxilați 10-HDA (acid 10-hidroxi-2-decanoic) și 10-HDAA (acid 10-hidroxidecanoic) reprezintă 60-80 % din totalul lipidelor (LERCKER, 1981). Profilul lipidic al lăptișorului de matcă este deci dominat de acizi organici care determină caracterul acid al acestui produs. Lăptișorul de matcă conține și steroli, cei mai abundenți fiind 24-metilencolesterolul, beta-sitosterolul și delta5-avenasterolul (LERCKER, 1982). Mai conține și acetilcolină ($912 \pm 58 \mu\text{g/g}$) determinată de WEI (2009). Principalul acid gras, acidul 10-HDA, este un acid gras de catenă scurtă care se regăsește doar în lăptișorul de matcă (CAPARICA-SANTOS, 2007; FERIOLI, 2014). 10-HDA trebuie să fie prezent într-o concentrație de peste 1.4 % fiind un bun indicator al autenticității acestui produs apicol deoarece este stabil pe parcursul păstrării (GARCIA-AMOEDO, 2007; SABATINI, 2009). Nivelul de lipide este mai ridicat în sezon mai cald (WONGCHAI, 2002).

Lăptișorul de matcă este bogat în **vitamine** hidrosolubile, în special în acid pantotenic (B5)(CIULUI, 2013). Vitaminele tiamina (B1), riboflavina (B2), piridoxina (B6), biotina (B7), niacina (PP)(PRESOTO, 2004; HAYAKAWA, 2008; MORESCHI, 2009) sunt de asemenea prezente însă în concentrații scăzute de ordinul ng/g. Vitaminele liposolubile A, D, E și K lipsesc (MELAMPY, 1939). Sursa vitaminelor din lăptișorul de matcă este polenul cu care se hrănesc albinele doici motiv pentru care vitaminele din lăptișorul de matcă variază în funcție de sursele florale și de sezon (SABATINI, 2009).

Conținutul în cenușă al lăptișorului de matcă proaspăt este de 0.8-3 % (GARCIA-AMOEDO, 2007), fiind un produs bogat în **minerale**. Lăptișorul de matcă are un conținut ridicat de K, Mg, Ca, Fe, P și S, iar cele mai abundente oligoelemente au fost Zn, Fe, Cu, Al și Mn (STOCKER, 2005).

De asemenea, din studiile pe lăptișorul de matcă a reieșit prezența unor substanțe din diferite clase chimice precum **hormoni** (estradiol, testosteron, progesteron), **biopterine și neopterine**, **nucleozide și nucleotide libere** (adenozină, guanozină, AMP, ADP, ATP) (REMBOLD, 1965; VITTEK, 1984; MISHIMA, 2005; SABATINI, 2009; BOGDANOV, 2011; WU, 2015).

2. Proteinele din lăptișorul de matcă

2. Royal jelly proteins

2.1. Proteinele - generalități

2.1. Proteins - overview

Proteinele sunt implicate în tot ceea ce înseamnă viață: în structura celulelor, în sistemul de semnalizare celulară, în reacțiile de cataliză la nivelul celulelor, în replicarea și expresia ADN-ului, respectiv în formarea structurii altor proteine. Proteinele sunt macromolecule organice fiind polimeri liniari ai aminoacicilor. Între gruparea aminică și cea carboxilică a aminoacicilor învecinați se formează legături peptidice de natură covalentă prin reacții de condensare care dau naștere lanțului polipeptidic, adică proteinei. Alte tipuri de legături implicate sunt legăturile non-covalente precum legături de hidrogen, legături electrostatice, legături hidrofobe și legături Van der Waals. Secvența aminoacicilor este unică pentru fiecare proteină, iar aceasta secvență a aminoacicilor este codificată de către secvența nucleotidelor din gena specifică proteinei regăsită în genom. Aminoacicii sunt cei care dictează structura tridimensională a proteinei datorită tuturor legăturilor chimice pe care le pot forma. Această structură tridimensională este conformația nativă a proteinei adică forma în care proteina s-ar găsi în mod natural în organismul viu. Sistemele biologice folosesc un număr de 20 de aminoacizi pentru a sintetiza proteine numiți aminoacizi proteinogeni (Fig. 4).

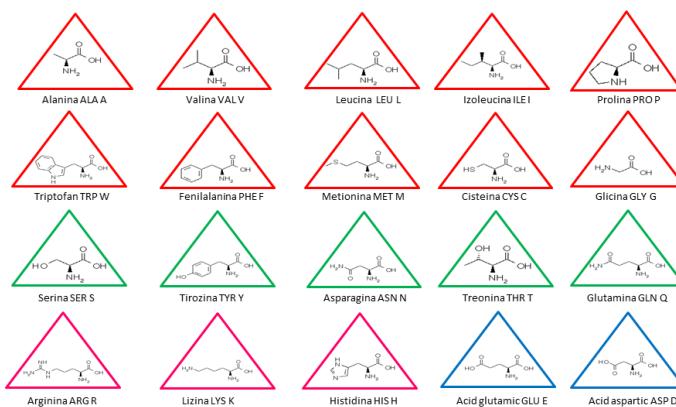


Fig. 4. Cei 20 de aminoacizi proteinogeni. Denumirea aminoacidului este urmată de codurile IUPAC cu 3 litere, respectiv cu o literă. Roșu: aminoacizi apolari, Verde: aminoacizi polari cu grupări hidroxil și amidă, Albastru: aminoacizi polari acizi, Magenta: aminoacizi polari bazici (POMMIE, 2004).

Fig. 4. The 20 proteinogenic amino acids. The name of the amino acid is followed by the IUPAC codes of 3, respectively 1 letters. Red: apolar amino acids, Green: polar aminoacids having hydroxy and amide groups, Blue: polar acidic amino acids, Magenta: polar basic amino acids (POMMIE, 2004).

Procesul de biosinteză a proteinelor numește translație și are loc în ribozom cu ajutorul ARN-ului mesager care conține informația genetică de pe ADN. Ribozomul recunoaște și folosește exclusiv aminoacizi din seria L sau aminoacizi achirali pentru procesul de construcție al lanțului polipeptidic al proteinelor (ENGLANDER, 2015). Proteinile au patru grade de organizare a macromoleculei: structura primară, structura secundară, structura terțiară și structura cuaternară (Fig.5).

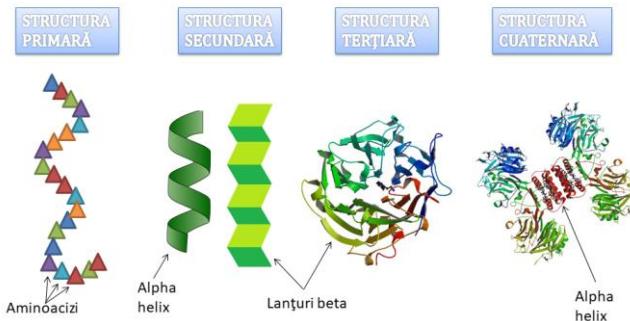


Fig. 5. Cele patru grade de organizare ale macromoleculei proteice. Acestea sunt: structura primară formată din lanțul de aminoacizi, structura secundară având ca principale configurații alpha helixul și lanțul beta, structura terțiară și structura cuaternară. Pentru structura terțiară a fost folosit ca exemplu modelul structurii teoretice al proteinei MRJP1 în forma monomerică (DOI: 10.2210/pdb3Q6K/pdb), iar pentru structura cuaternară a fost folosit modelul complexului oligomeric dintre MRJP1/apisimină/24-metilenocolesterol (TIAN, 2018; DOI: 10.2210/pdb5YYL/pdb) din baza de date RC SB PDB (www.rcsb.org).

Fig. 5. The four levels of protein structure organization. These are: the primary structure, formed by the amino acids chain, the secondary structure having as principal configurations the alpha helix and the beta sheet, tertiary structure and the quaternary structure. The tertiary structure shows the theoretical model for the structure of MRJP1 in monomeric form (DOI: 10.2210/pdb3Q6K/pdb). For the quaternary structure the oligomeric complex of MRJP1/apisimin/24-methylencholesterol was used (TIAN, 2018; DOI: 10.2210/pdb5YYL/pdb) from the database RC SB PDB (www.rcsb.org).

Structura primară este cea a lanțului de aminoacizi între care s-au stabilit legăturile peptidice. Structura secundară este datorată în principal legăturilor de hidrogen între structuri locale ale moleculei care influențează forma lanțului polipeptidic. Principalele configurații ale structurii secundare sunt alpha helixul, lanțurile beta și structurile de foi pliate beta. Aminoacizii aromatici precum triptofanul, tirozina, fenilalanina vor adopta configurația beta, în timp ce aminoacizii din seria MALEK (metionina, alanina, leucina, acidul glutamic, lizina) vor adopta configurația de tip alpha. Structura terțiară este structura generală, tridimensională a proteinei formată din interacțiunile dintre structurile secundare. Exemple de astfel de interacțiuni care vor da conformația tridimensională a macromoleculei proteice sunt legăturile disulfidice formate post-translațional, legăturile de hidrogen locale, punțile de sare sau interacțiunile datorate hidrofobicității. Asocierea de proteine (numite subunități proteice) dau naștere structurii cuaternare. Complexii moleculari rezultați în urma asocierii se numesc complecsi oligomerici (termenul oligomer își are originea din cuvintele grecești *oligos*

care înseamnă câteva și *meros* care înseamnă părți), iar în funcție de numărul de proteine asociate se vor forma dimeri (oligomer format din două proteine asociate), trimeri (trei proteine asociate), tetramerii, pentameri, hexameri etc. În urma sintezei proteinei în general molecula proteică suferă aşa numite modificări post-translaționale (precum fosforilarea, amidarea, glicozilarea, ubiquitinarea, acetilarea, hidroxilarea etc) care vor influența la rândul lor proprietățile fizico-chimice ale proteinei, implicit structura, stabilitatea și funcțiile proteinei. Proteinele pot interacționa cu o serie de molecule (precum lipide, glucide, ioni de metale, ADN, ARN etc) care de asemenea vor influența aceste proprietăți. Proteinele nu sunt rigide, fiind molecule dinamice a căror flexibilitate le permite rearanjarea interacțiunilor moleculare în funcție de modificările din mediul care le înconjoară. Diferitele rearanjări ale structurii poartă numele de conformații, iar modificările sunt denumite modificări ale conformatiei.

2.2. Proteinele specifice lăptișorului de matcă

2.2. Specific royal jelly proteins

Dintre toți compușii chimici caracteristici lăptișorului de matcă, proteinele prezintă interes în ceea ce privește rolul nutritiv și funcțional al acestora. Proteinele se găsesc într-un procent ridicat de 9-18 % în lăptișorul de matcă (SABATINI, 2009), reprezentând aproape 50 % din substanța uscată (SIMUTH, 2001). În ultimii ani proteomul lăptișorului de matcă a fost investigat intens, iar rezultatele au arătat că majoritatea sunt proteine hidrosolubile care fac parte din familia Major royal jelly proteins, denumită și MRJPs, și care reprezintă 82-90 % din proteinele regăsite în lăptișorul de matcă (SCHMITZOVÁ, 1998; SIMUTH, 2001; BUTTSTEDT, 2014). Alte proteine prezente sunt apismina, royalisina, jelleinele etc. Apismina este o proteină mică de numai 54 de aminoacizi cu caracter puternic hidrofob care formează complexe oligomerici cu MRJP1 (BILIKOVA, 2002; TAMURA, 2009; MANDACARU, 2017). Jelleinele sunt peptide cu caracter foarte hidrofob care au acțiune antimicrobiană împotriva bacteriilor Gram pozitive și Gram negative (FONTANA, 2004; ROMANELLI, 2011). Royalisina este o proteină mică de masă moleculară 5.5 kDa bogată în cistină cu acțiune antimicrobiană împotriva bacteriilor Gram pozitive și aparține familiei defensinelor implicate în imunitate (FUJIWARA, 1990). Au fost identificate și enzime implicate în metabolismul carbohidraților precum glucozoxidaza (85 kDa), precursorul α -glucozidazei și glucoz-dehidrogenaza și o proteină implicată în transportul lipidelor, apolipoforin-III-like (SANO, 2004; HAN, 2011).

2.2.1. Familia de proteine Major royal jelly proteins

2.2.1. Major royal jelly proteins family

Studiul proteinelor din lăptișorul de matcă început acum câteva decenii (PATEL, 1960), iar proteinele descoperite au fost denumite în funcție de masa lor moleculară sau după ordinea descoperirii rezultând o multitudine de denumiri pentru aceleași proteine (BUTTSTEDT, 2014). Majoritatea proteinelor din lăptișorul de matcă aparțin familiei de proteine MRJPs fiind codificate de genele *mrjps* care au origine evoluționară comună cu genele *yellow* aparținând *Drosophila melanogaster* (ALBERT, 1999a). Genele *yellow* au fost găsite numai în insecte și în unele specii de bacterii (DRAPEAU, 2006). În *Apis mellifera* genomul cuprinde 9 gene *mrjps* active (*mrjp1-9*) care codifică 9 membri omologi (MRJP1-9) și o pseudogenă (HELBING, 2017). În *Apis florea*, cea mai veche dintre speciile *Apis*, sunt prezente 10 gene *mrjps* (HELBING, 2017). Omologia acestor proteine rezultă din faptul că au în comun 111 aminoacizi, iar identitatea secvențelor de aminoacizi variază între 47 și 74 % (BUTTSTEDT, 2014). Inițial s-a considerat că genele *mrjps* sunt active doar în glandele hipofaringeale ale albinelor lucrătoare doici, însă pe parcurs s-a demonstrat că genele *mrjps* sunt prezente și în trântori, matcă sau albine culegătoare și că aceste gene nu sunt exclusive glandelor hipofaringeale, ele fiind identificate și în alte părți ale corpului albinei, în abdomen, hemolimfă și creier ceea ce implică o multifuncționalitate a proteinelor MRJPs și nu doar un rol nutrițional (BUTTSTEDT, 2013). Proteinele care fac parte din familia MRJPs sunt alcătuite din 400 până la 578 de aminoacizi, majoritatea având în componență aminoacizi esențiali precum arginina, lizina, valina, histidina, leucina, izoleucina, metionina, fenilalanina, treonina și triptofanul (DE GROOT, 1952). MRJPs sunt modificate post-translațional prin atașare de resturi de oligozaharide (proces de glicozilare) la atomul N al asparaginei (Anexe: Figura 1), fiind aşadar glicoproteine (ALBERT, 1999a). Alte modificări post-translaționale sunt fosforilarea proteinelor MRJPs, precum și metilarea și deamidarea (FURUSAWA, 2008; ZHANG, 2012). Modificările post-translaționale sunt determinate genetic, fiind deci variabile între indivizii care formează colonia de albine. Aceste modificări au roluri importante în procesele biologice precum diviziunea celulară, transducția semnalelor la nivel intracelular etc. Din cauza modificărilor post-translaționale proteinele au mase moleculare (MW) și puncte izoelectricre (pI) diferite de cele teoretice calculate (Tabel 2).

Tabelul 2. Masele moleculare și punctele izoelectricice teoretice ale celor mai abundente MRJPs din lăptișorul de matcă. Acestea au fost calculate cu ajutorul ExPasy ProtParam (ARTIMO, 2012)

folosind secvențele aminoacicilor din baza de date UniProtKB. Nu s-au luat în calcul modificările post-translaționale și nici peptida semnal de la capătul N-terminal, ci doar forma definitivă, matură a proteinei după translație

Table 2. Molecular weight and isoelectrical points of the most abundant MRJPs from royal jelly. They were obtained with the help of ExPasy ProtParam (ARTIMO, 2012) using the amino acid sequence from the UniProtKB database. The post-translational modifications and the N-terminal signal peptide were not considered, just the mature form of the protein after translation

Proteina	Cod UniProt	MW teoretic (kDa)	pI
MRJP1	O18330	46.86	5.03
MRJP2	O77061	49.19	6.65
MRJP3	Q17060	59.48	6.50
MRJP5	O97432	68.43	5.95

Proteinele MRJP1, MRJP2, MRJP3 și MRJP5 sunt cele mai abundente proteine în lăptișorul de matcă (SCHMITZOVA, 1998). Aceste proteine au fost regăsite și în miere, iar MRJP1 și MRJP2 au fost identificate și în păstură (SCARSELLI, 2005). Au fost publicate rezultate diferite referitor la conținutului proteinelor din lăptișorul de matcă. SCHMITZOVA (1998) a determinat un conținut relativ de 31 % MRJP1, 16 % MRJP2, 26 % MRJP3, 9 % MRJP5, iar FURUSAWA (2008) a determinat 46 % MRJP1, 11 % MRJP2, 13 % MRJP3, 5 % MRJP5. Aceste diferențe se pot datora solubilității diferite a proteinelor în soluțiile folosite în timpul experimentelor sau sensibilității metodei utilizate pentru cuantificarea proteinelor.

Prima și cea mai abundentă proteină identificată în lăptișorul de matcă a fost MRJP1 (HANES, 1992). MRJP1 este o glicoproteină a cărei monomer are masa moleculară teoretică de 46.86 kDa și punctul izoelectric (pI) de 5.03. MRJP1 formează complexe oligomerică de diferite dimensiuni prin legături non-covalente cu o altă proteină numită apisină (BILIKOVA, 2002; TAMURA, 2009; MANDACARU, 2017). În lăptișorul de matcă crud forma oligomerică a fost cuantificată la o concentrație de 41.96-55.01 mg per gram (LIN, 2018). Oligomerul MRJP1 de masă moleculară 350 kDa este numit apisin (KIMURA, 2003). Ionii de calciu ar putea fi implicați în funcționalitatea proteinei MRJP1 deoarece structura oligomerică este distrusă în prezența calciului (CRUZ, 2011). Structura tridimensională a oligomerului a fost elucidată recent fiind formată din dimeri de dimeri: patru monomeri MRJP1 se asociază cu patru apisină și 8 molecule de 24-metileno-sterol (TIAN, 2018). La pH-ul lăptișorului de matcă (pH 4.0) MRJP1 formează un complex oligomeric fibrilar care dă vâscozitate acestui produs apicol (BUTTSTEDT, 2018). Structura oligomerică conferă stabilitate față de denaturarea termică (CRUZ, 2011), MRJP1 fiind încă detectabilă chiar și după păstrare la temperatură camerei timp de un an (LI, 2008). Prin scindarea de către proteaze a capătului C-terminal al proteinei MRJP1 se formează peptidele cu acțiune antimicrobiană numite jelleine (jeleina I-IV) (FONTANA, 2004).

Expresia genei *mrjp1* a fost identificată de asemenea în *corpora pedunculata* din creierul albinei, fiind corelată cu procesul de învățare și memorie (HOJO, 2010).

MRJP2 are masa moleculară teroretică de 49.15 kDa și punctul izoelectric (pI) de 6.65. MRJP 8 și MRJP 9 sunt specifice veninului de albine, acestea fiind rar regăsite în lăptișorul de matcă (BLANK, 2012). MRJP3 și MRJP5 au regiuni repetitive cu grade diferite de polimorfism în secvența de aminoacizi. MRJP3 are regiuni repetitive a către cinci aminoacizi [NKR]-Q-N-[AGD]-[DNG] între aminoacizii 424 și 535 la capătul C-terminal al lanțului polipeptidic, iar MRJP5 are regiuni repetitive între aminoacizii 367 și 540 (ALBERT, 1999b). Polimorfismul conferă mase moleculare diferite acestor proteine datorită numărului variabil de repetiție a regiunii, iar proteinele rezultate se numesc izoforme. Datorită acestor secvențe repetitive, una din funcțiile proteinelor MRJP3 și MRJP5 este aceea de a fi o sursă importantă de azot biologic accesibil pentru albine. MRJP2 are de asemenea regiuni repetitive ale secvenței de aminoacizi NQ(N/K)XN, însă fără polimorfism în *Apis mellifera*, polimorfismul existând în *Apis cerana* (SU, 2005).

2.3. Proprietăți biologice ale proteinelor MRJPs din lăptișorul de matcă

2.3. Biological properties of MRJPs from royal jelly

Lăptișorului de matcă i-au fost atribuite diverse proprietăți benefice, unele dintre acestea fiind datorate proteinelor din familia MRJPs.

Fiind cea mai abundentă proteină din lăptișorul de matcă, MRJP1 a fost studiată intensiv pentru a se determina proprietățile biologice. Experimentele *in vivo* și *in vitro* au demonstrat proprietatea proteinei MRJP1 de a stimula creșterea celulară. Oligomerul de masă moleculară 350 kDa izolat din lăptișorul de matcă a stimulat proliferarea liniilor celulare de monocite umane (KIMURA, 1995), în timp ce monomerul de 57 kDa a avut activitate de stimulare a proliferării culturilor de hepatocite și de intensificare a sintezei de ADN (KAMAKURA, 2001a). În continuare, cercetările ulterioare au dovedit că atât forma monomerică cât și cea oligomerică a MRJP1 manifestă activitate de stimulare a proliferării hepatocitelor și monocitelor (KAMAKURA, 2006; KIMURA, 2003). În plus, oligomerul induce proliferarea celulelor umane limfoide Jurkat (TAMURA, 2009; WATANABE, 1996; MORIYAMA, 2015), respectiv a celulelor umane mieloide (WATANABE, 1998). Proteina MRJP1 recombinantă din *Apis cerana* a avut efect de creștere celulară asupra liniilor celulare aparținând Lepidoptera (SHEN, 2010).

Pe lângă proprietatea de stimulare a creșterii celulare, MRJP1 monomeric și MRJP2 exercită efect imunostimulator și proinflamator prin stimularea eliberării de citokine, precum factorul de necroză tumorală TNF- α (SIMUTH, 2004; MAJTAN, 2006). Spre deosebire de MRJP1, MRJP3 inhibă producerea de TNF- α (KOHNO, 2004), având deci efect antiinflamator.

Efectul antibiotic al MRJP1 a fost de asemenea evidențiat (BRUDZYNSKI, 2015b; VEZETEU, 2017), iar fragmentele de proteoliză a MRJP1, numite jelleine, au de asemenea efect antibacterian (FONTANA, 2004; BRUDZYNSKI, 2015a). MRJP2 are activitate antibacteriană împotriva *Paenibacillus larvae* (BILIKOVA, 2009; FENG, 2015). MRJP1, MRJP2 și MRJP3 au efect antihipertensiv, MRJP1 având cea mai pronunțată activitate de reducere a nivelului de colesterol asimilat (KASHIMA, 2014). Proliferarea și migrarea crescută a celulelor de țesut muscular neted caracteristice peretelui arterial sunt indicatori ai bolilor cardiovasculare (precum ateroscleroza), iar MRJP1 a avut efect de inhibare a proliferării și migrării *in vitro* a acestor tipuri de celule (FENG, 2015). Din dorința de a înțelege mecanismul din care rezultă efectul antihipertensiv, FAN (2016) a indus expresia proteinei MRJP1 în celule de țesut muscular neted caracteristice peretelui arterial și a observat o reducere a contractiei musculare, acest efect al MRJP1 putând fi deci asociat cu reglarea presiunii arteriale.

MRJP1 și MRJP2 cauzează reacții alergice prin interacțiunea cu imunoglobulinele E (ROSMILAH, 2008). MRJP3 inhibă răspunsul alergic prin inhibarea imunoglobulinelor E (KASHIMA, 2014), având deci efect antialergic. MRJP3 are potențial imunoregulator prin reprimarea producerii de citokine proinflamatorii IL-2, IL-4 și IFN- γ în celulele T (OKAMOTO, 2003).

2.4. Purificarea proteinelor – generalități

2.4. Protein purification -overview

Izolarea și purificarea proteinelor se bazează pe un design experimental optim obținut în urma încercărilor care va ține cont de sensibilitatea, acuratețea, precizia și costul metodelor folosite.

Purificarea proteinelor se realizează prin metode cromatografice (BURGESS, 2009). Cromatografia reprezintă o metodă de separare a compușilor de interes dintr-un amestec folosind interacțiunea acestora cu două faze distincte: faza mobilă și faza staționară. Tehnicile chromatografice separă moleculele dintr-un amestec în funcție de proprietățile lor (dimensiunea, sarcina electrică, caracterul hidrofob și afinitatea față de liganzi).

Tehnici chromatografice utilizate pentru purificarea proteinelor sunt: cromatografia pe schimbători de ioni (de adsorbție), cromatografia de interacțiuni hidrofobe, cromatografia de afinitate, cromatografia prin excludere moleculară (gel filtrarea) etc. Cromatografia pe schimbători de ioni realizează separarea compușilor de interes dintr-un amestec pe principiul formării de legături electrostatice între sarcinile electrice ale moleculelor de interes și sarcinile electrice de semn contrar ale schimbătorului de ioni de pe coloana chromatografică. Eluarea proteinei de interes de pe schimbătorul de ioni se realizează prin modificarea valorii pH-ului sau a tăriei ionice. Cromatografia de interacțiuni hidrofobe se bazează pe caracterul hidrofob al proteinelor care depinde de secvența aminoacicilor ce fomează molecula proteică, iar tăria ionică a soluției în care

se găsește proteina influențează numărul de interacțiuni hidrofobe. Proteinele de interes sunt aplicate pe coloana cromatografică de interacțiuni hidrofobe într-o soluție tampon cu o concentrație ridicată de săruri minerale care vor intensifica interacțiunile proteinelor cu grupările hidrofobe ale coloanei cromatografice. Pentru a elua proteinelor de pe coloana de interacțiuni hidrofobe se poate varia tăria ionică a soluției tampon, pH-ul, concentrația detergenților din soluție etc.

Proprietățile proteinelor (masa moleculară, punctul izoelectric, caracterul hidrofob, regiunile implicate în glicozilare sau fosforilare etc.) pot fi estimate pe baza secvenței aminoacicilor cu ajutorul bazelor de date precum ProtParam (GASTEIGER, 2005), NetGlycServer sau NetPhos (BLOM, 1999), iar secvența de aminoacizi specifică fiecărei proteine poate fi obținută folosind UniProt. Toate aceste informații pot ajuta în alegerea condițiilor de purificare ale proteinelor de interes.

Purificarea proteinelor va depinde de stabilitatea acestora la variații de temperatură sau de pH, de masa moleculară a proteinelor ce urmează să fie supuse purificării, de punctul lor izoelectric, respectiv de stabilitatea proteinelor în prezența ionilor de metale. Pentru a controla variația de pH în timpul purificării se folosesc soluții tampon pentru a asigura o concentrație stabilă de protoni. În general sunt folosite soluții tampon fosfat, HEPES, Tris, citrat, acetat sau acid 3-(N-morfolino)propansulfonic.

Pentru verificarea purificării se folosește în general gel electroforeza. Gel electroforeza în SDS-poliacrilamidă se bazează pe migrarea proteinelor într-un gel de poliacrilamidă a cărui porozitate poate fi aleasă în funcție de proprietățile proteinelor supuse electroforezei. Proteinile sunt amestecate cu un solvent care conține un detergent anionic (SDS) care are proprietatea de a se leagă de regiunile hidrofobe ale proteinelor, iar ca urmare proteinele sunt denaturate și lanțul polipeptidic va avea sarcină electrică negativă. Migrarea proteinelor în gelul de poliacrilamidă depinde de câmpul electric aplicat și de dimensiunea moleculelor proteice, astfel moleculele mai mari migrează mai greu, iar cele mai mici vor migra mai rapid în gel. Electroforeza în SDS-poliacrilamidă folosește condiții denaturante pentru proteine, iar în cazul în care se dorește migrarea proteinelor în condiții nedenaturante se poate folosi electroforeza Native-PAGE, caz în care SDS nu este adăugat, iar proteinile vor migra în starea lor nativă. Spectrometria de masă este o metodă mai sensibilă care este folosită pentru a identifica proteinile purificate cât și pentru a determina puritatea fracțiunilor proteice obținute în urma purificării.

Până acum, purificarea (izolarea) proteinelor individuale din lăptișorul de matcă s-a realizat prin folosirea cromatografiei prin excludere moleculară sau a cromatografiei pe schimbători de ioni. De obicei protocolul de purificare a presupus izolarea proteinelor la pH în jurul valorii de 7.0 (HANES, 1992; SCHMITZOVA, 1998; WATANABE, 1998; BILIKOVA, 2002; TAMURA, 2009; HU, 2017), valoare nefavorabilă proteinelor din lăptișorul de matcă care are pH-ul în jur de 4.0. Proteinile din lăptișorul de matcă din familia MRJPs au valorile punctelor izoelectrice între 5.0 și 6.5, ceea ce înseamnă că au sarcini electrice pozitive la pH-ul de 4.0 caracteristic sursei lor,

în timp ce la pH de 7.0 vor avea sarcini electrice negative. Aceste sarcini electrice negative pot avea un impact asupra conformației moleculelor proteice și implicit asupra funcțiilor specifice proteinelor care sunt prezente doar la pH-ul de 4.0, pH la care proteinele se găsesc în mod natural.

2.5. Stabilitatea proteinelor – generalități

2.5. Protein stability -overview

Proteinile sunt molecule de importanță deosebită pentru funcționarea celulelor, implicit a organismului din care fac parte. Proteinile pot cataliza reacții chimice, pot transporta sau depozita diferite molecule necesare funcționării celulei, pot da suport mecanic celulelor, pot modula răspunsul imunitar sau pot fi implicate în creșterea celulară etc. Toate aceste proprietăți ale proteinelor depind de structura lor tridimensională. Există un consens la nivel academic referitor la faptul că este esențială cunoașterea structurii proteinelor pentru înțelegerea stabilității proteinelor, respectiv a mecanismelor care stau la baza denaturării, deci a pierderii functionalității proteinelor. În plus, structura poate anticipa comportamentul proteinei față de proteaze, deci biodisponibilitatea proteinei. Procesul de tranziție de la o structură nativă, funcțională la una denaturată, nefuncțională a fost reprodus *in vitro* prin expunerea la condiții denaturante. Monitorizarea stabilității proteinelor a dobândit o importanță crescândă în domeniul proteomicii.

De-a lungul timpului studiile asupra lăptișorului de matcă au indicat pierderea proprietăților funcționale ale acestui produs pe parcursul păstrării. Proteinile și glucidele sunt cele mai sensibile la păstrare la temperatura camerei, dar nu la -20°C (CHEN, 1995). În ceea ce privește proteinele, stabilitatea acestora este dependentă de factori interni și externi, cei mai importanți dintre cei externi fiind temperatura și pH-ul.

Păstrarea la diferite valori de temperatură a lăptișorului de matcă a fost cea mai studiată din dorința de a găsi condițiile optime menținerii calității lăptișorului de matcă. Proteinile se denaturează sub acțiunea temperaturii datorită destabilizării legăturilor non-covalente (legături de hidrogen sau electrostatice) care dau structura secundară și terțiară. Mai departe, destabilizarea acestor structuri conduce la expunerea centrului hidrofobic al proteinelor, urmată de interacțiunea proteinelor și precipitarea lor. LI (2008) a monitorizat degradarea proteinelor din lăptișorul de matcă pe parcursul păstrării și a descoperit că MRJP5 este absentă la un an de păstrare la temperatura camerei, în timp ce MRJP1-3 pot fi încă detectate. Forma monomerică se degradează mai repede decât forma oligomerică a proteinei MRJP1, oligomerul MRJP1 își păstrează structura chiar și după încălzire la temperatura de 56°C, în timp ce monomerul se degradează deja la temperatura de 40°C (TAMURA, 2009; KAMAKURA, 2001b). LAZAREVSKA (2015) a analizat degradarea proteinelor din lăptișorul de matcă crud, respectiv din cel liofilizat și a arătat că degradarea proteinelor începe în

jurul temperaturii de 30°C, fiind accelerată la 65-70°C. Aceste rezultate sunt în concordanță cu cele obținute de SHEN (2015) care a analizat degradarea proteinei MRJP1 pe timpul păstrării la 40°C observând o scădere a concentrației proteinei de 37.3 % încă după primele 7 zile. Investigarea stabilității termice a demonstrat că oligomerul MRJP1 își păstrează proprietatea de stimulare a creșterii celulare chiar și după încălzire la 56°C (TAMURA, 2009), proprietatea fiind mai scăzută după încălzirea la 96°C (MORYIAMA, 2015). Temperatura este însă importantă și în privința stabilității proteinelor în stup, temperatura putând varia de la 20°C în timpul iernării coloniei de albine până la 35°C în timpul creșterii de puieți (GATES, 1914).

După cum a fost descris anterior, proprietățile proteinelor MRJPs sunt diverse, de la asigurarea de aminoacizi esențiali și azot biologic disponibil, la proliferarea celulelor, la acțiune antibacteriană. La acestea se adaugă formarea de structuri fibrilare între MRJP1 și apisinină care duce la o vâscozitate crescută a lăptișorului de matcă, caracteristică importantă pentru creșterea larvelor de matcă care conferă aderență lăptișorului de matcă cu care sunt hrănite larvele astfel încât le este împiedicată căderea din celulele speciale orientate cu deschiderea în jos în care se dezvoltă (BUTTSTEDT, 2018). Formarea de structuri fibrilare a MRJP1 (deci și vâscozitatea) este dependență de pH, având loc doar la pH apropiat de cel al lăptișorului de matcă, adică la pH 4.0. Proteinele MRJPs au un grad ridicat de omologie a căror identitate a secvențelor de aminoacizi variază între 47 și 74 % (SCHMITZOVA, 1998) fiind deci posibil ca pH-ul să joace un rol important și în cazul celorlalte MRJPs. Într-adevăr, MRJPs se găsesc la diferite valori de pH pe parcurs: de la locul de sinteză în celulele secretorii ale glandelor hipofaringeale cu pH de 7.0 (PATEL, 1960; HANES, 1992; DEMAUREX, 2002), la stagnarea în veziculele secretorii de pH 5.5-5.1 (KNECHT, 1990; DEMAUREX, 2002), la amestecarea cu secreția glandelor mandibulare de pH 3.9 formată din acizi grași, ajungând în final la pH de 4.0 în lăptișorul de matcă (HOFFMANN, 1960). În plus, aceste proteine nu sunt exclusive lăptișorului de matcă, fiind regăsite de asemenea de exemplu în hemolimfa albinelor (BISHOP, 1923; RANDOLT, 2008; ARARSO, 2018), în creierul albinezii (KUCHARSKI, 1998; GARCIA, 2009), în miere (BILIKOVA, 2015), venin (PEIREN, 2005; MATYSIAK, 2016) sau în polen (SIMUTH, 2004), toate fiind medii de pH diferit. Valoarea pH-ului afectează solubilitatea proteinelor care au solubilitate minimă la valoarea de pH corespunzătoare punctului izoelectric (pI) din cauza forțelor electrostatice care sunt minime și permit interacțiunile între proteine conducând la o posibilă precipitare a lor (pierderea solubilității). Proteinele sunt amfotere deoarece pot avea atât sarcină electrică netă pozitivă (la pH sub punctul izoelectric), cât și negativă (la pH peste punctul izoelectric).

Aceste rezultate conduc la concluzia că investigarea stabilității specifice acestor proteine la diferite valori de pH și de temperatură este necesară, luând în considerare faptul că stabilitatea afectează proprietățile biochimice și fiziologice ale proteinelor. Informațiile referitoare la stabilitate sunt esențiale pentru experimente care implică

purificarea, depozitarea, expresia proteinelor, respectiv studierea structurii sau a activităților biologice ale lor.

2.6. Digestibilitatea proteinelor – generalități

2.6. Protein digestibility -overview

Digestia proteinelor se referă la procesul complex care începe cu scindarea proteinelor de către pepsina secretată de stomac în condiții acide, continuă cu scindarea de către enzimele secrete de pancreas în intestin, având ca etapă finală continuarea hidrolizei proteinelor prin scindarea de către enzimele din celulele mucoasei intestinale. Acest proces duce la obținerea de produși de digestie diversi care fie vor fi absorbiți în sistemul circulator prin mecanisme active sau pasive, fie vor interacționa cu sistemul imunitar prin legarea de imunoglobuline IgE etc.

Pentru a avea un impact relevant la nivel fiziologic, proteinele ingerate trebuie să dețină o anumită stabilitate la condițiile digestiei la nivel gastro-intestinal astfel încât să ajungă în raza de acțiune a celulelor mucoasei intestinale în forma lor intactă sau sub formă de produși de digestie.

Proteinele intacte sau produși de digestie care ajung la nivelul intestinului subțire împlinesc condiția de bioaccesibilitate. Pe lângă această condiție mai trebuie îndeplinite încă două condiții și anume potențialul de a fi transportate la nivel intestinal, respectiv potențialul de a fi metabolizate (asimilate și absorbite de către organism). Când toate aceste trei condiții sunt îndeplinite, proteinele au proprietatea de a fi biodisponibile și ar putea fi mai departe implicate în mecanisme cu efecte benefice sănătății.

Studiile asupra digestibilității proteinelor pot oferi informații referitoare la proprietățile proteinelor în ceea ce privește stabilitatea lor (proteazele vor scinda proteinele la punctele lor cele mai accesibile), mobilitatea lanțului polipeptidic la locurile de scindare de către proteaze, potențialul de a fi asimilate de către organism (permeabilitate intestinală), procesarea intracelulară a produșilor de digestie, contextul în care acești produși de digestie pot interacționa cu sistemul imunitar, potențialul lor de a influența semnalizarea celulară etc.

Proteazele scindează proteinele în fragmente de dimensiuni mai mici numite peptide care pot fi asimilate pe cale paracelulară sau transcelulară ajungând în sistemul circulator unde pot exercita efecte biologice (CHABANCE, 1998).

O parte importantă a sistemului imunitar este localizată la nivelul tractului gastrointestinal unde se găsesc aproximativ 70 % din celulele implicate în imunitate care formează țesutul limfoid asociat mucoasei digestive (GUERRA, 2012). De exemplu, s-a descoperit că proteina β -lactoglobulină poate fi înglobată de către enterocitele intestinale prin procesul de endocitoză (WICKHAM, 2009), deci proteinele în forma lor intactă, nedigerată pot declansa răspunsul imunitar.

Cercetătorii s-au axat în ultimii ani pe descoperirea de anticorpi din surse naturale care să poată fi administrați oral și care să dețină proprietăți imunomodulatoare. Însă pentru a declanșa răspunsul imunitar, proteinele trebuie să supraviețuiască digestiei de către pepsină la nivelul stomacului, apoi să reziste digestiei de către proteaze pancreaticе eliberate în intestinul subțire, respectiv să poată trece de peretele mucoasei intestinale astfel încât să ajungă la locul unde se găsește țesutul limfoid asociat mucosei digestive implicat în imunitate.

Lăptișorul de matcă este un produs cu diverse efecte terapeutice fiind consumat cu preponderență pe cale orală. O parte importantă din compoziția lăptișorului o ocupă proteinele din familia MRJPs. Acestea proteine în forma lor intactă le-au fost deja atribuite diverse efecte biologice (Subcapitolul 2.3: Proprietăți biologice ale proteinelor MRJPs din lăptișorul de matcă), însă și fragmentele de digestie ale acestor proteine pot fi benefice. De exemplu, peptidele rezultate din hidroliza proteinei MRJP1 au avut activitate antihipertensivă în experimentele pe şobolani (MATSUI, 2002).

Deci, studierea digestibilității proteinelor din lăptișorul de matcă este obligatorie pentru a înțelege în ce măsură proteinele din lăptișorul de matcă pot ajunge în intestinul subțire, în ce formă ajung la nivelul intestinului, ce permeabilitate intestinală au, respectiv ce activități biologice pot exercita în organismul consumatorului.

CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

PERSONAL CONTRIBUTION

3. Obiectivele urmărite

3. Objectives of the thesis

Deși rolul nutrițional al proteinelor din familia MRJPs este recunoscut, aceste proteine sunt considerate a deține o gamă variată de funcții fiziologice, iar pentru a înțelege aceste funcții, studierea proteinelor este imperativă.

Scopul a fost utilizarea proteomicii pentru obținerea și caracterizarea biochimică a proteinelor majoritare din lăptișorul de matcă. Pentru a împlini acest scop, au fost vizate diferite obiective, primul fiind acela al necesității obținerii proteinelor individuale pure care au fost fracționate prin metode cromatografice.

Odată obținute, aceste fracțiuni proteice au fost incluse în experimente al căror obiective au fost acele de a testa stabilitatea proteinelor la diferite valori de pH precum și în prezența proteazelor care se găsesc la nivelul tractului gastro-intestinal uman.

3.1. Obținerea proteinelor majoritare individuale și pure din lăptișorul de matcă

3.1. Obtaining individual and pure proteins from royal jelly

Un prim pas în procesul de caracterizare a proteinelor este izolarea acestora din materialul biologic.

Obiectivul a fost acela de a purifica proteinele majoritare din lăptișorul de matcă folosind metode cromatografice care separă proteinele de interes pe baza proprietăților lor fizico-chimice la valori de pH apropriate de cele ale sursei acestor proteine, adică la pH-ul lăptișorului de matcă (pH 4.0).

3.2. Stabilitatea proteinelor majoritare din lăptișorul de matcă în timpul simulației *in vitro* a digestiei umane

3.2. Stability during *in vitro* human digestion of the most abundant proteins from royal jelly

Lăptișorul de matcă este un produs apicol complex care nu este important numai pentru dezvoltarea puietului de albine și pentru nutriția reginei familiei de albine, ci poate avea și efecte benefice asupra sănătății omului.

Proteinele din familia MRJPs sunt cele mai abundente proteine din lăptișorul de matcă cărora li s-au atribuit diverse funcții biologice în urma studiilor pe culturi de celule sau pe animale.

Însă o condiție pentru a avea efecte asupra sănătății omului este aceea de a supraviețui digestiei pe parcursul tractului gastro-intestinal.

Obiectivul acestui experiment a fost acela de a testa stabilitatea celor mai abundente trei proteine din lăptișorul de matcă, MRJP1, MRJP2 și MRJP3, pe parcursul

simulării *in vitro* a digestiei umane.

3.3. Influența pH-ului asupra stabilității proteinelor purificate din lăptișorul de matcă

3.3. The influence of pH on the stability of the most abundant proteins purified from royal jelly

Influența variațiilor de pH asupra proteinelor este bine cunoscută. Chiar și diferențe insignificante de pH pot determina modificări ale funcțiilor biologice ale proteinelor.

Obiectivul a fost acela de a testa stabilitatea proteinelor MRJP1, MRJP2 și MRJP3 în regiunea de pH 2.5-11.0 cu ajutorul unei metode bazată pe fluorescentă.

4. Purificarea proteinelor majoritare din lăptișorul de matcă folosind metode chromatografice

4. Purification of the most abundant proteins from royal jelly using chromatographic methods

4.1. Materialul biologic

4.1. Biological material

Lăptișorul de matcă (*Apis mellifera*) proaspăt recoltat a fost obținut de la apicultori în anul 2015.

Probele au fost codificate astfel: LM1 a fost recoltat în luna iulie în județul Cluj (Cluj-Napoca), LM2 a fost recoltat în luna august în județul Mureș (Bratca), iar LM3 a fost recoltat în luna iunie în județul Cluj (Cluj-Napoca).

Toate probele au fost păstrate la -20°C până la utilizare.

4.2. Obținerea extractului proteic din lăptișorul de matcă

4.2. Obtaining the protein extract from royal jelly

Sursa de extracție a proteinelor au fost 5 g de lăptișor cântărite într-un tub de 50 ml. Pentru extracție proba a fost dizolvată 1:10 cu soluție tampon 20 mM citrat de sodiu/acid citric, pH 4.0. După omogenizarea conținutului, tubul a fost centrifugat la 8500 g timp de 10 minute la temperatură de 4°C.

În urma centrifugării, supernatantul a fost dializat cu ajutorul membranelor de dializă (Spectra/Por 6 Dialysis Membrane MWCO: 25 kDa, Spectrum Laboratories, Rancho Dominguez, CA, USA) timp de o oră într-un volum de 1 litru de soluție tampon 20 mM citrat de sodiu/acid citric, pH 4.0. Procesul de dializă s-a efectuat de două ori. Dializa este cunoscută și sub numele de cernere moleculară fiind utilizată în scopul separării proteinelor de interes de moleculele non-proteice de dimensiuni mici (mai mici decât 25 kDa în acest caz).

Dializatul a fost apoi supus clarificării de materii insolubile prin centrifugare la 20 000 g pentru 10 minute la temperatură de 4°C, iar supernatantul obținut a fost extractul proteic care s-a păstrat în aliquoturi de 10 ml la -20°C până la utilizare.

4.3. Purificarea proteinelor cu ajutorul chromatografiei

4.3. Protein purification using chromatography

Pentru obținerea proteinelor individuale s-au folosit metode chromatografice care separă moleculele dintr-un amestec în funcție de proprietățile lor specifice.

Purificarea este de fapt un proces de fracionare a moleculelor proteice dintr-

un extract în care au fost izolate doar proteinele din materialul biologic. Schema de izolare, respectiv de fracționare și obținere a fracțiunilor proteice purificate din lăptișorul de matcă a ținut cont de proprietățile proteinelor de interes (punctul izoelectric, sarcina electrică netă, gradul de hidrofobie). Extracția proteinelor s-a urmărit a se realiza în condiții optime într-un mediu apropiat celui din lăptișor.

Proprietățile proteinelor majoritare din lăptișorul de matcă care fac parte din familia MRJPs au fost estimate pe baza secvenței aminoacizilor cu ajutorul bazei de date ProtParam, iar secvența de aminoacizi specifică fiecărei proteine a fost obținută folosind UniProt. Toate aceste informații au ajutat în alegerea condițiilor de purificare.

Valoarea pH-ului lăptișorului de matcă în stare naturală este în jur de 4.0 și conferă o sarcină electrică netă pozitivă proteinelor majoritare (MRJP1, MRJP2, MRJP3 și MRJP5), acestea având punctele lor izoelectrice (pI) cuprinse între 5.03 (MRJP1) și 6.65 (MRJP2) (conform ExPASy ProtParam).

Astfel, soluția în care s-a dizolvat lăptișorul de matcă pentru a obține extractul proteic a avut pH de 4.0 și deoarece la acest pH proteinele ar fi avut sarcini electrice pozitive, pentru purificare s-a folosit cromatografia schimbătoare de cationi care folosește o fază imobilă cu grupări reactive de sarcină negativă. Sarcinile negative atrag sarcinile de semn opus, adică proteinele de interes încărcate pozitiv care vor fi deci imobilizate pe fază imobilă.

Cromatografia cu schimbători de ioni are ca principiu separarea compușilor de interes dintr-un amestec prin formarea unor legături electrostatice între sarcinile electrice ale moleculelor de interes și sarcinile electrice de semn contrar ale schimbătorului de ioni. Proteinele imobilizate vor putea fi separate prin modificarea caracteristicilor fazei mobile, deci a stării de echilibru dinamic, care vor determina fluctuații de afinitate a moleculelor proteice față de faza imobilă.

Deoarece proprietățile teoretice ale proteinelor nu sunt întotdeauna în concordanță cu cele din realitate, prin această metodă cromatografică de schimbători de ioni s-a reușit purificarea a două din cele patru proteine majoritare din lăptișor și anume MRJP1, respectiv MRJP2.

Mai departe, pentru separarea proteinei MRJP3 de proteina MRJP5 s-a folosit cromatografia de interacțiuni hidrofobe. Această metodă de purificare este ideală pentru a fi folosită în urma purificării cu ajutorul schimbătorilor de ioni. Probele sunt aplicate pe coloana de purificare de interacțiuni hidrofobe în soluții cu o concentrație crescută de sare care să favorizeze interacțiunea între părțile hidrofobe ale proteinelor și coloana de purificare.

Protocolul pentru purificare prin metoda gravitației a fost adaptat după instrucțiunile producătorului de suport cromatografic.

Fiecare purificare a constat în următoarele etape: pregătirea coloanei cromatografice, echilibrarea coloanei cromatografice cu soluția tampon în care se găsesc proteinele de interes, aplicarea extractului proteic pe coloană, purificarea propriu-zisă, regenerarea coloanei cromatografice, determinarea concentrației de

proteine și verificarea puritatei fracțiunilor obținute.

Fracțiuni având un volum de 1 ml au fost colectate în tuburi Eppendorf în timpul purificării și depozitat pe gheăță până la analizele subsecvente.

4.3.1. Cromatografia cu schimbători de ioni

4.3.1. Ion exchange chromatography

Suportul cromatografic de Sulphopropyl (SP) Sepharose Fast Flow (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) se găsește sub formă de suspensie (în soluție de 0.2 M acetat de sodiu, 20 % etanol). SP Sepharose este un schimbător de cationi puternic având ca grup schimbător de ioni $-O-CH_2-CHOH-CH_2-OCH_2-CH_2-CH_2SO_3-$.

Suspensia ca atare a fost pipetată pe o coloană de plastic pentru a obține un volum de 1.5 ml de suport. Coloana cromatografică a fost spălată cu 4 ml de apă distilată și a fost echilibrată cu 4 ml de 20 mM citrat de sodiu/acid citric, pH 4.0. Apoi s-a aplicat cei 10 ml de extract proteic pe coloana cu suport cromatografic de 1.5 ml.

Coloana cromatografică a fost echilibrată cu 10 ml de 20 mM citrat de sodiu/acid citric, pH 4.0, apoi cu 10 ml de 20 mM citrat de sodiu/acid citric, 200 mM NaCl, pH 4.0.

Eluarea unor proteine de pe coloană a început prin adăugarea a 10 ml de 20 mM citrat de sodiu/acid citric, 300 mM NaCl, pH 4.0.

Când în fracțiunile obținute nu au mai fost detectate proteine, coloana cromatografică a fost spălată cu 5 ml de 20 mM citrat de sodiu/acid citric, pH 4.0. Eluarea următoarelor proteine a fost realizată prin adăugarea a 10 ml de 50 mM Na_2HPO_4/NaH_2PO_4 , pH 7.0, apoi a 10 ml de 50 mM Na_2HPO_4/NaH_2PO_4 , 200 mM NaCl, pH 7.0.

Coloana a fost regenerată prin spălare cu 4 ml de apă distilată, urmăți de 4 ml de 0.1 M hidroxid de sodiu (etapa necesară pentru a reduce contaminarea cu bacterii) și încă 4 ml de apă distilată.

Coloana a fost păstrată în 0.2 M acetat de sodiu, 20 % etanol în frigider.

4.3.2. Cromatografia de interacțiuni hidrofobe

4.3.2. Hydrophobic interaction chromatography

Soluția în care se găseau fracțiunile proteice obținute în ultima etapă de eluare de pe coloana cromatografică schimbătoare de cationi a fost schimbată cu 50 mM Na_2HPO_4/NaH_2PO_4 , 1.5 M $(NH_4)_2SO_4$, pH 7.0 prin gel-filtrare cu ajutorul coloanelor de desalinizare PD-10 (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) conform instrucțiunilor producătorului coloanelor.

Suportul cromatografic de Butyl-Sepharose 4 Fast Flow (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) se găsește sub formă de suspensie în 20 % etanol și a fost pipetat pe o coloană de plastic pentru a obține un volum de 1 ml de suport. Butyl-Sepharose are un

caracter "pur" hidrofobic, iar purificarea se datorează interacțiunilor proteinei cu lanțurile alchil —O—(CH₂)₃—CH₃.

Coloana chromatografică a fost spălată cu 4 ml de apă distilată și a fost echilibrată cu 4 ml de 50 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, 1.5 M (NH₄)₂SO₄, pH 7.0. Apoi s-au aplicat fracțiunile proteice conținând MRJP3 și MRJP5 în 50 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, 1.5 M (NH₄)₂SO₄, pH 7.0 pe coloana chromatografică.

Concentrația proteinelor a fost determinată cu ajutorul spectrofotometrului NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), iar pe coloana chromatografică a fost aplicat un volum de proteine care a dat o absorbanță maximă de 4.3 la lungimea de undă de 280 nm.

Pentru a spăla de pe coloană proteinele care nu au fost immobilizate pe suportul chromatografic, s-au adăugat 4 ml de 50 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, 1.5 M (NH₄)₂SO₄, pH 7.0.

Mai departe, proteinele au fost eluate cu 6 ml de 50 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, 1.0 M (NH₄)₂SO₄, pH 7.0, apoi cu 3 ml de 50 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, pH 7.0.

La sfârșit, coloana a fost regenerată prin spălare cu 4 ml de apă distilată, urmăți de 4 ml de 0.1 M hidroxid de sodiu (etapă necesară pentru a reduce contaminarea cu bacterii) și încă 4 ml de apă distilată.

Coloana a fost păstrată în 20 % etanol în frigider.

4.3.3. Analiza fracțiunilor proteice cu spectroscopia UV

4.3.3. Protein fractions analysis using UV spectroscopy

În timpul purificării de pe coloana chromatografică au fost colectate fracțiuni al căror volum a fost de 1 ml. Fracțiunile obținute în urma purificării au fost analizate cu ajutorul spectrofotometrului NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Conținutul în proteine a fost determinat prin măsurarea absorbanței la lungimea de undă de 280 nm în domeniul UV.

Conținutul în proteine a fost estimat cu ajutorul legii Lambert-Beer care descrie relația dintre absorbanță și concentrația probei. Concentrația soluției proteice se determină conform ecuației:

$$C = (\text{Abs}280\text{nm} \times \text{MW}) / (\varepsilon \times d)$$

Unde:

- Abs280nm este absorbanță cîtită (în unități de absorbanță),
- MW este masa moleculară a proteinei (în Da),
- ε este coeficientul molar de extincție specific fiecărei proteine în parte (în M^{-1} cm^{-1}),
- C este concentrația probei (în mg/ml),
- d este grosimea de strat (grosimea cuvei) străbătută de fasciculul luminous (în

cm).

Coefficienții molari de extincție (ϵ) au fost cei teoretici calculați cu ExPasy ProtParam (ARTIMO, 2012) pentru fiecare proteină în parte: $56185\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ pentru MRJP1, $51590\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ pentru MRJP2, respectiv $47580\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ pentru MRJP3.

Masa moleculară (MW) a fost cea estimată pe baza secvenței de aminoacizi cu ajutorul ExPasy ProtParam: 46860.5 Da pentru MRJP1, 49191 Da pentru MRJP2, respectiv 59508 Da pentru MRJP3.

4.3.4. Identificarea fracțiunilor proteice pure cu ajutorul electroforezei în gel de dodecilsulfat de sodiu-poliacrilamidă (SDS-PAGE)

4.3.4. Protein fractions identification using SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

Puritatea fracțiunile a fost verificată cu ajutorul electroforezei în gel de dodecilsulfat de sodiu-poliacrilamidă (SDS-PAGE) în condiții denaturante (LAEMMLI, 1970).

SDS-PAGE s-a efectuat cu gel de concentrare de concentrație 6 % și gel de separare de concentrație 10 %, 12 % sau 16 % în buffer de electroforeză de 25 mM Tris, 187 mM glicină, 0.1 % (w/v) SDS.

Volumul probelor a fost calculat astfel încât să conțină 5 µg de proteine. Volumul calculat s-a amestecat cu 5 µL de soluție pentru probe 5X (100 mM Tris, 4.8 % SDS, 16 % glicerină, 0.1 % albastru de bromfenol, 100 mM β-mercaptoetanol), iar ca standard molecular a fost folosit Unstained Protein Standard, Broad Range (10-200 kDa) (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA).

Electroforeza a fost realizată timp de 60 de minute prin aplicarea unui current electric constant de 175 Volți.

Proteinele au fost vizualizate fie prin colorare :

- cu metoda Colloidal Coomasie (0.08 % Coomasie Brilliant Blue G250 în 1.56 % acid fosforic, 7.84 % sulfat de amoniu, 20 % metanol) după fixarea gelului timp de 60 de minute în soluție de 40 % metanol, 10 % acid acetic (NEUHOFF, 1988),
- fie cu Coomasie Brilliant Blue (25 % izopropanol, 10 % acid acetic, 0.05 % Coomasie R250),
- fie prin metoda Silver staining (CHEVALLET, 2006) care a constat în următoarele etape: fixarea gelului de două ori în soluție 30 % etanol, 10 % acid acetic timp de 30 de minute; incubarea gelului de două ori în soluție 20 % etanol timp de 10 minute; incubarea gelului de două ori în apă distilată timp de 10 minute; incubarea gelului în 0.8 mM tiosulfat de sodiu; spălarea gelului de două ori în apă distilată timp de 1 minut; colorare în 12 mM nitrat de argint timp de 20 de minute;

spălare timp de 10 secunde în apă distilată; developare în soluție formată din 3 % carbonat de sodiu, 25 µl formalină și 12.5 µl de 10 % tiosulfat de sodiu în 100 ml de apă distilată; oprirea developării culorii cu soluție de 4 % Tris, 2 % acid acetic.

Gelurile au fost decolorate în apă și apoi scanate.

4.3.5. Electroforeza proteinelor în condiții nedenaturante cu ajutorul Native PAGE

4.3.5. Protein electrophoresis in non-denaturing conditions using Native PAGE

Proteinele au fost aplicate pe gel de acrilamidă de concentrație 10 %, iar electroforeza Native PAGE s-a efectuat în soluție de 50 mM NaH₂PO₄ / NaOH, pH 7.0 după protocolul descris de GALLAGHER (1999) timp de 6 ore la o intensitate a curentului electric de 60 mA.

Proteinele au fost vizualizate prin colorare cu metoda Colloidal Coomasie.

Gelurile au fost decolorate în apă și apoi scanate.

4.3.6. Analiza proteinelor cu ajutorul spectrometriei de masă

4.3.6. Protein analysis using mass spectrometry

Proteinele au fost precipitate prin incubare la -20°C peste noapte în acetonă. Proteinele precipitate au fost centrifugate la 14 000 g timp de 15 minute. Peletul obținut a fost solubilizat în 0.4 M bicarbonat de sodiu, 8 M uree.

Legăturile disulfidice din structura proteinelor au fost reduse cu DTT, iar cisteinele au fost alchilate cu iodoacetamidă. Soluțiile de proteine au fost diluate până la 1 M uree.

Digestia enzimatică a fost efectuată prin adăugare de tripsină și incubare peste noapte la temperatura de 37°C.

Analiza peptidelor rezultate prin digestie s-a realizat cu LC/MS/MS. Probele au fost injectate cu o viteză volumetrică de 30µl minut⁻¹ și supuse etapei de spălare timp de 15 minute cu 0.1 % acid trifluoroacetic pe o coloană Acclaim PepMap C8, 300 mm x 5 mm, 5 mm, 100A° (Thermo Fisher Scientific).

Eluarea și separarea peptidelor s-a realizat pe coloană de separare Acclaim PepMap C18, 75 mm x 250 mm, 2 mm, 100A°. Eluarea s-a făcut cu o viteză volumetrică de 300 nL min⁻¹ timp de 90 de minute prin creșterea gradientului fazei mobile de la 1 % la 40 % a solventului B (solvent A: 0.1 % acid formic în apă, solvent B: 0.08 % acid formic în acetonitril).

Detectorul a înregistrat semnalele pentru raportul *m/z* (masă/sarcină) în regiunea 300-1500 la fiecare 5 secunde.

Analiza datelor s-a efectuat cu Proteome Discoverer 2.0 (Thermo Fisher

Scientific). Acuratețea masei a fost setată la 5 ppm pentru ionii precursorilor, respectiv 0.02 Da pentru ionii fragmentelor.

Ca posibile modificări au fost selectate oxidarea metioninei și acetilarea capătului N-terminal, iar ca modificare fixă au fost selectată carbamidometilarea a cisteinelor. Numai două puncte ratate de scindare ale tripsinei au fost permise.

4.3.7. Analiza statistică

4.3.7. Statistical analysis

Rezultatele au fost exprimate ca medie a valorilor obținute \pm deviație standard (SD). Analiza statistică a fost efectuată cu ajutorul STATISTICA 8.0 (StatSoft, Tulsa, OK, USA).

4.4. Rezultate și discuții

4.4. Results and discussion

Proteinele au sarcina electrică diferită în funcție de punctul lor izoelectric având sarcină electrică netă pozitivă la pH sub punctul lor izoelectric, respectiv sarcina electrică netă negativă la pH superior punctului izoelectric.

Luând în considerare acest lucru, protocolul de purificare la pH de 4.0 ar fi trebuit să confere în teorie tuturor MRJPs o sarcină electrică netă pozitivă (în conformitate cu valorile punctelor izoelectrice teoretice calculate cu ProtParam).

Totuși, după aplicarea extractului proteic din lăptișorul de matcă pe coloana cromatografică schimbătoare de cationi, unele molecule proteice nu au fost imobilizate pe coloană (Fig.8).

Odată cu creșterea gradientului de sare până la 300 mM NaCl, o altă proteină a eluat de pe coloană care a migrat pe gelul de SDS-PAGE la aceeași masă moleculară cu cea care nu a fost imobilizată pe coloana de purificare (Fig. 6 și Fig. 8).

Fracțiunile proteice au fost separate cu ajutorul electroforezei (Fig.6), iar benzile de proteine de pe gel au fost excizate și analizate cu ajutorul spectrometriei de masă (MS).

Rezultatele spectrometriei de masă au confirmat identitatea proteinelor obținute în urma purificării și au identificat ca fiind MRJP1 proteina care nu rămâne imobilizată pe coloana cromatografică la aplicarea extractului pe coloană.

Conform punctului izoelectric proteina MRJP1 trebuie să posedă teoretic o sarcină electrică netă pozitivă la pH 4.0, deci ar fi trebuit să fie imobilizată pe coloană.

Există două posibilități care să explice acest comportament: fie sarcinile electrice ale MRJP1 nu sunt disponibile pentru interacțiune, fie nu există sarcină electrică netă deoarece aminoacidii care ar conferi această sarcină sunt în interacțiune cu alte molecule și nu pot fi protonați.

Rezultatele MS au arătat că este vorba de aceeași proteină (MRJP1) la eluarea

de pe coloană cu o concentrație crescută de sare (300 mM NaCl) (Anexe: Tabelele 4 și 5).

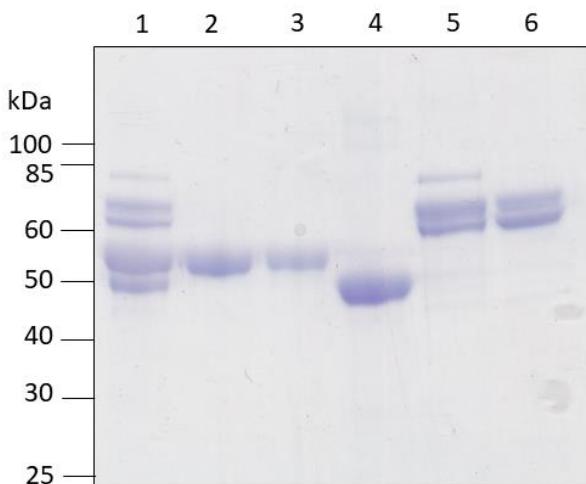


Fig.6. Electroforeza în gel de concentrație 12 % de SDS-poliacrilamidă a fracțiunilor proteice obținute în urma purificării folosind cromatografia de schimb cationic (2-5) și după cromatografia de interacțiuni hidrofobe (6). Standardul de proteine este reprezentat cu linii orizontale, iar masa lor moleculară este dată în kDa, 1-extract proteic din lăptișor de matcă, 2-MRJP1 în forma oligomerică, 3-MRJP1 în forma monomerică, 4-MRJP2, 5-MRJP3 împreună cu MRJP5, 6-MRJP3.

Fig.6. Electrophoresis in 12 % SDS-polyacrylamide gel of the protein fractions obtained after cation exchange chromatography (2-5) and after hydrophobic interaction chromatography (6), respectively. The protein standard is represented by horizontal lines, while the molecular weight is given in kDa, 1-protein extract from royal jelly, 2-MRJP1 in oligomeric form, 3-MRJP1 in monomeric form, 4-MRJP2, 5-MRJP3 together with MRJP5, 6-MRJP3.

Pentru a afla de ce anume aceeași proteină se comportă diferit și are fluctuații de afinitate în timpul purificării am separat fracțiunile proteice colectate din cele două etape ale purificării cu ajutorul electroforezei în condiții nedenaturante Native PAGE (Fig.7). Acest tip de electroforeză se efectuează în condiții care nu reduc legăturile ce dău structură proteinei, iar aceasta își va păstra conformatia nativă și va migra prin gelul de electroforeză în funcție de raportul sarcină electrică/dimensiune, nu doar în funcție de dimensiune ca în cazul electroforezei SDS-PAGE.

Native PAGE a evidențiat faptul că deși era vorba de aceeași proteină (MRJP1), aceasta se comportă diferit datorită dimensiunii moleculei (Fig.7).

Pentru a testa repetabilitatea acestui fenomen, am separat cu ajutorul electroforezei Native PAGE cele două fracțiuni din trei probe diferite de lăptișor de matcă (Fig.7 și Anexe: Fig.3).

Proteina MRJP1 a fost detectată de alți cercetători ca având diferite mase moleculare, deci diferite forme (SIMUTH, 2001). Formele proteice mai mari, numite oligomerice, sunt formate din molecule de MRJP1 în complex cu o proteină de masa

moleculară 5.5 kDa numită apisimină (BILIKOVA, 2002; TAMURA, 2009).

Pentru a detecta apisimina, o proteină de masă moleculară mică, am folosit electroforeza SDS-PAGE pe geluri de concentrație mai mare (16 %) care separă cu rezoluție bună proteinele mai mici de 10 kDa.

Gelurile obținute au fost colorate printr-o metodă mai sensibilă, anume metoda "Silver staining" care detectează proteinele la nivel de nanograme, pentru a fi siguri ca vom vizualiza apisimina (Fig.7).

Apisimina a fost identificată într-una din fracțiuni, fracțiune care a conținut deci oligomerul proteinei MRJP1.

Cealaltă fracțiune care nu a conținut apisimina a fost forma monomerică a proteinei MRJP1.

Banda corespunzătoare apisiminei a fost excizată de pe gel și analizată cu spectrometria de masă, iar rezultatele au confirmat identitatea acesteia (Anexe: Figura 2).

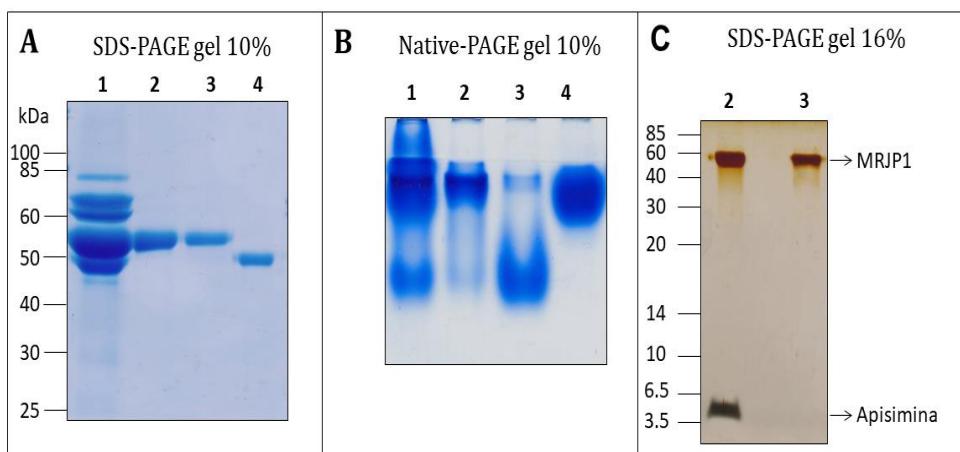


Fig.7. Purificarea și analiza proteinei MRJP1 în formă oligomerică și monomerică din lăptișorul de matcă. Purificarea este arătată pentru un lăptișor de matcă (LM3). A) Electroforeza în gel de concentrație 10 % de SDS-poliacrilamidă și colorare cu Colloidal Coomasie; B) Electroforeza în gel de concentrație 10 % în condiții nedenaturante (Native PAGE) și colorare cu Colloidal Coomasie; C) Electroforeza în gel de concentrație 16 % de SDS-poliacrilamidă și colorare cu metoda Silver staining; 1-extract proteic din lăptișor de matcă, 2-MRJP1 în formă oligomerică, 3-MRJP1 în formă monomerică, 4-MRJP2.

Fig. 7. Purification and analysis of MRJP1 in oligomeric and monomeric form obtained from royal jelly. Purification is shown for one royal jelly sample (LM3). A) Electrophoresis in 10 % SDS-polyacrylamide gel and Colloidal Coomasie staining; B) Non-denaturing electrophoresis in 10 % gel (Native PAGE) and Colloidal Coomasie staining; C) Electrophoresis in 16 % SDS-polyacrylamide gel and Silver staining; 1-protein extract from royal jelly, 2-MRJP1 in oligomeric form, 3-MRJP1 in monomeric form, 4-MRJP2.

Așadar, cu ajutorul cromatografiei schimbătoare de cationi a fost posibilă purificarea proteinei MRJP1 în formă oligomerică și în formă monomerică.

Forma oligomerică nu a fost immobilizată pe coloana de purificare la pH de 4.0

fiind obținută deja de la aplicarea extractului proteic pe coloană.

Forma monomerică a MRJP1 a fost imobilizată pe suportul cromatografic și a fost obținută prin eluare cu o concentrație crescută de sare (300 mM NaCl).

MRJP2 a eluat de pe coloană numai prin schimbarea pH-ului de la pH 4.0 la pH 7.0.

MRJP3 a co-eluat cu MRJP5 odată cu creșterea gradientului de sare (200 mM NaCl).

Am încercat eluarea proteinei MRJP3 din amestecul cu MRJP5 folosind diferite concentrații de NaCl sau sulfat de amoniu folosind tot cromatografia de schimb ionic, însă nu a fost posibil.

Așadar am ales un alt tip de cromatografie, cromatografia de interacțiuni hidrofobe. Am utilizat medii de hidrofobicitate diferită (Phenyl-sepharose 6 Fast Flow, Butyl-sepharose 4 Fast Flow sau Octyl-sepharose 4 Fast Flow), diferite soluții tampon (citrat de sodiu/acid citric, fosfat de sodiu), diferite valori de pH (4.0, 7.0) și diferite concentrații de sare (NaCl, sulfat de amoniu).

În urma încercărilor am reușit să dezvolt un protocol prin care MRJP3 a fost purificat din amestecul cu MRJP5 cu ajutorul cromatografiei de interacțiuni hidrofobe pe mediul cromatografic Butyl-sepharose.

Amestecul MRJP3/MRJP5 a fost aplicat pe coloana de purificare în soluție de 50 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, 1.5 M (NH₄)₂SO₄, pH 7.0.

Proteina MRJP3 a fost obținută încă din primele fracțiuni proteice, precum și în etapa de spălare sau de eluare cu concentrație mai scăzută de sulfat de amoniu: 50 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, 1 M (NH₄)₂SO₄, pH 7.0.

MRJP3 prezintă izoforme care apar pe gelul SDS-PA sub forma a multiple benzi cu mase moleculare între 60 și 70 kDa (Fig.6). Aceste izoforme se datorează existenței unor regiuni repetitive polimorfe în secvența de aminoacizi (ALBERT, 1999b).

Purificarea cu schimbători de cationi a fost realizată din trei probe diferite de lăptișor (LM1, LM2 și LM3).

Pentru fiecare din cele trei probe diferite a fost construită câte o cromatogramă din valorile medii a trei purificări independente dovedind repetabilitatea acestui protocol de purificare (Fig.8).

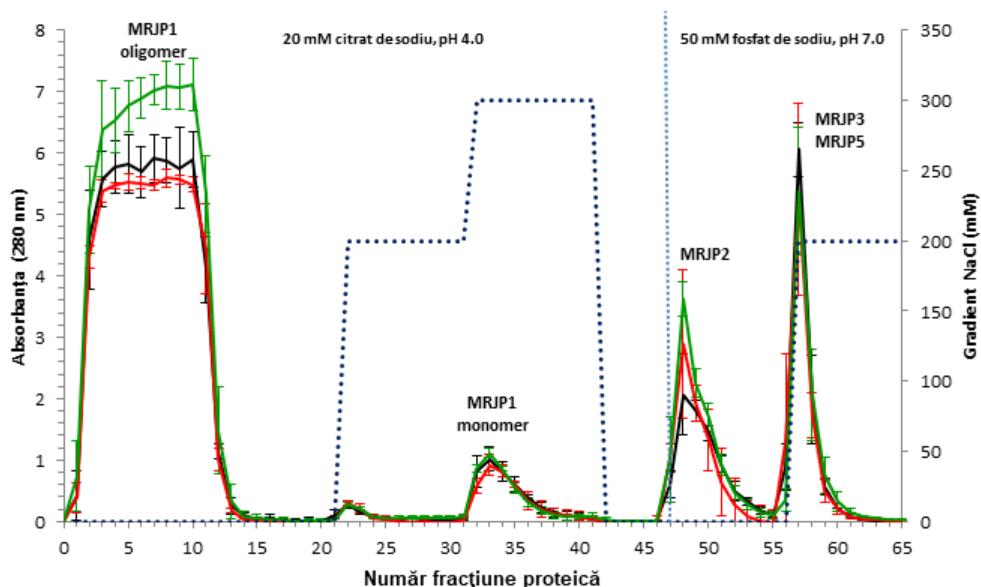


Fig. 8. Cromatogramele purificării proteinelor majoritare din trei probe de lăptișor de matcă diferite (LM1-negru, LM2-roșu și LM3-verde). Fiecare chromatogramă este obținută din media valorilor a trei purificări independente pentru fiecare lăptișor \pm SD. Gradientul de NaCl este reprezentat cu linie întreruptă de culoare albastru închis, iar trecerea de la pH de 4.0 la pH de 7.0 este delimitată cu linie întreruptă de culoare albastru deschis.

Fig. 8. Purification chromatograms of the most abundant proteins from three different samples of royal jelly (LM1-black, LM2-red, LM3-green). Each chromatogram was obtained from the average of three independent purifications for each of the royal jelly sample \pm SD. The NaCl gradient is represented by dark blue colour line, while the transition from pH 4.0 to pH 7.0 is represented by light blue colour line.

5. Stabilitatea proteinelor majoritare din lăptișorul de matcă pe parcursul simulării *in vitro* a digestiei umane la nivel gastro-intestinal

5. Stability of the most abundant proteins from royal jelly during *in vitro* human gastro-intestinal digestion

5.1. Materialul biologic

5.1. Biological material

Probele de lăptișor de matcă (*Apis mellifera*) proaspăt recoltat au fost obținute de la apicultori și păstrate la -20°C până la purificarea proteinelor.

Controlul pozitiv folosit a fost albumina serică bovină (BSA, 01400, Biomol, Hamburg, Germany).

Enzimele folosite pentru digestie au fost pepsina (≥ 0.5 Ph.Eur. units/mg, porcine, Cat.-No. 0230, Carl Roth, Karlsruhe, Germany), tripsina (1,000 – 2,000 BAEE units/mg, porcine, Cat.-No. T4799, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) și chimotripsina (Chymotrypsinogen A/ α -Chymotrypsin, ≥ 40 BTEE units/mg protein, bovine, Cat.-No. C4129, Sigma-Aldrich).

5.2. Obținerea proteinelor majoritare pure din lăptișorul de matcă

5.2. Purification of the most abundant proteins from royal jelly

Proteina MRJP1 este prezentă în lăptișorul de matcă atât în formă de oligomer cât și în formă de monomer, aşadar ambele forme au fost purificate în vederea testării stabilității pe parcursul digestiei *in vitro*.

Cele două forme ale MRJP1 au fost purificate cu ajutorul cromatografiei de schimb cationic folosind suportul cromatografic Sulphopropyl (SP) Sepharose Fast Flow (GE Healthcare, Little Chalfont, UK), faza mobilă fiind 20 mM citrat de sodiu/acid citric, pH 4.0.

Forma oligmerică a proteinei MRJP1 a fost obținută în primele fracțiuni proteice după aplicarea extractului proteic, iar forma monomerică a fost eluată de pe coloană cu faza mobilă conținând 300 mM NaCl. Coloana a fost spălată cu 4 ml de 20 mM citrat de sodiu/acid citric, pH 4.0, apoi proteina MRJP2 a fost eluată de pe coloană prin schimbarea pH-ului, faza mobilă folosită în această etapă fiind 50 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$, pH 7.0. Restul proteinelor au fost eluate cu aceeași fază mobilă care a conținut 200 mM NaCl, obținând un amestec de proteine MRJP3/MRJP5 împreună cu MRJP5.

Pentru acest studiu am folosit amestecul MRJP3/MRJP5 deoarece la acel

moment nu stabilisem încă protocolul pentru purificarea proteinei MRJP3.

Puritatea fracțiunilor proteice a fost verificată cu ajutorul electroforezei cu geluri de SDS-poliacrilamidă (LAEMMLI, 1970).

5.3. Determinarea concentrației de proteine cu ajutorul spectroscopiei UV

5.3. Protein concentration determination using UV spectroscopy

Concentrația de proteine a fost determinată cu ajutorul spectrofotometrului NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

Conținutul în proteine a fost determinat prin măsurarea absorbanței la lungimea de undă de 280 nm în domeniul UV.

Conținutul în proteine a fost estimat cu ajutorul legii Lambert-Beer care descrie relația dintre absorbanță și concentrația probei.

Concentrația soluției proteice se determină conform ecuației:

$$C = (\text{Abs}280\text{nm} \times \text{MW}) / (\varepsilon \times d),$$

Unde:

- Abs280nm este absorbanța citită (în unități de absorbanță),
- MW este masa moleculară a proteinei (în Da),
- ε este coeficientul molar de extincție specific fiecărei proteine în parte (în $M^{-1} cm^{-1}$),
- C este concentrația probei (în mg/ml),
- d este grosimea de strat (grosimea cuvei) străbătută de fascicul luminous (în cm).

Coefficienții molari de extincție (ε) și masele moleculare au fost estimate pe baza secvențelor de aminoacizi cu ExPasy ProtParam (ARTIMO, 2012) pentru fiecare proteină în parte: 46861 Da și $56185 M^{-1} cm^{-1}$ pentru MRJP1, 49191 și $51590 M^{-1} cm^{-1}$ pentru MRJP2, 59508 Da și $47580 M^{-1} cm^{-1}$ pentru MRJP3, 66432 Da și $42925 M^{-1} cm^{-1}$ pentru albumina serică bovină, 35000 Da și $50900 M^{-1} cm^{-1}$ pentru pepsină, 23800 Da și $45250 M^{-1} cm^{-1}$ pentru tripsină, respectiv 25000 Da și $51840 M^{-1} cm^{-1}$ pentru chimotripsină.

5.4. Protocolul *in vitro* de simulare a digestiei umane la nivel gastro-intestinal

5.4. *In vitro* human gastro-intestinal digestion simulation

Condițiile digestiei umane la nivel gastro-intestinal au fost simulate *in vitro* având ca substrat al digestiei proteinele MRJP1 în forma oligomerică, respectiv monomerică, MRJP2 și MRJP3 purificate din lăptișor de matcă.

Controlul pozitiv folosit a fost albumina serică bovină.

Controlul negativ a constat în simularea digestiei fără substrat, adică fără MRJPs.

Experimentul a fost realizat în triplicat pentru toate proteinele.

Protocolul a constat în două etape: digestia gastrică și digestia intestinală.

5.4.1 Simularea *in vitro* a digestiei gastrice

5.4.1. *In vitro* gastric digestion simulation

Soluția în care se găseau fracțiunile proteice obținute în urma purificării a fost schimbată cu 10 mM HCl, pH 2.0, 34 mM NaCl prin gel-filtrare cu ajutorul coloanelor de desalinizare PD-10 (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) conform instrucțiunilor producătorului coloanelor.

Imediat după gel-filtrare s-a efectuat simularea *in vitro* a digestiei.

Datorită susceptibilității crescute la digestia de către pepsină în cazul păstrării la frig a proteinelor, soluțiile proteice nu au fost nici congelate, nici păstrate pe gheăză.

Soluțiile proteice au fost aduse la o concentrație de 0.5 mg/ml într-un volum final de 500 µl și incubate timp de 10 minute la 37°C sub agitație continuă de 400 rpm într-un Thermomixer (Eppendorf, Hamburg, Germany).

După această perioadă, pepsina a fost adăugată în soluțiile proteice dintr-o soluție de pepsină solubilizată în 10 mM HCl, pH 2.0 până la concentrația finală de 0.3 mg/ml, care este concentrația medie de pepsină la nivelul stomacului uman (METHENY, 1997).

Imediat după adăugarea pepsinei soluțiile proteice au fost vortexate și incubate la 37°C sub agitație continuă de 400 rpm într-un Thermomixer (Eppendorf, Hamburg, Germany).

Au fost prelevate aliquoturi de câte 12 µl la diferite intervale de timp: 0, 15, 30, 45, 60 de minute, 3 ore, 6 ore și 24 de ore.

Reacția de digestie în probele prelevate a fost oprită prin adăugarea de 8 µl de soluție Laemmli 5x (100 mM Tris, 4.8 % SDS, 16 % glicerol, 0.1 % albastru de bromfenol, 100 mM mercaptoetanol) și incubare la temperatura de 95°C timp de 5 minute pentru a inactiva pepsina.

Probele au fost păstrate la -20°C.

5.4.2 Simularea *in vitro* a digestiei intestinale

5.4.2. *In vitro* intestinal digestion simulation

Durata fazei gastrice la om variază în limite largi fiind dependentă de cantitatea de mâncare ingerată, respectiv de consistența hranei.

O capsulă înghițită pe stomacul gol va trece din stomac în intestin în câteva secunde (WEITSCHIES, 2005), în timp ce un volum de 500 ml de mâncare va necesita

între 32 și 130 de minute în funcție de consistența alimentelor care compun acel volum de mâncare (GOETZE, 2007; MARCIANI, 2001).

Așadar, durata digestiei în stomac a lăptișorului și implicit a proteinelor conținute de acesta va depinde de asemenea în funcție de momentul ingestiei (dimineața pe stomacul gol), de cantitatea și de tipul hranei.

Pentru acest experiment, am asumat pentru etapa gastrică o durată de o oră.

După o oră de incubare a soluțiilor proteice cu pepsina am adus reacția la pH alcalin (pH 7.3) propice pentru activitatea enzimelor pancreatici prin adăugarea a 12 µl de 1 M carbonat de sodiu, pH 9.0. Astfel, s-au simulaat condițiile din intestinul subțire la nivelul căruia ionii de bicarbonat secretați de pancreas neutralizează chimul gastric inactivând totodată și pepsina care nu mai este activă în condiții alcaline (GUYTON, 2006).

Enzimele tripsină și chimitripsină solubilizate în apă distilată au fost adăugate până la o concentrație finală de 0.25 mg/ml (BORGSTRÖM, 1957).

Digestia a fost continuată prin incubare la 37°C sub agitație continuă la 400 rpm într-un Thermomixer (Eppendorf, Hamburg, Germany)..

Au fost prelevate aliquoturi de 13.2 µl la diferite intervale de timp: 10, 20, 30, 40, 60 de minute, 2 ore și 24 de ore.

Reacția de digestie a fost oprită prin adăugarea de 6.8 µl de soluție Laemmli 5x (100 mM Tris, 4.8 % SDS, 16 % glicerol, 0.1 % albastru de bromfenol, 100 mM mercaptoetanol) și incubare la temperatura de 95°C timp de 5 minute pentru a inactiva enzimele.

Probele au fost păstrate la -20°C.

5.5. Electroforeza în gel de dodecilsulfat de sodiu-poliacrilamidă (SDS-PAGE) a produșilor de digestie

5.5. Electrophoresis using SDS-polyacrylamide (SDS-PAGE) of the digestion products

Probele luate la diferite intervale de timp pe parcursul digestiei au fost analizate cu ajutorul gel electroforezei în SDS-poliacrilamidă.

Câte 10 µl din fiecare aliquot au fost supuși electroforezei pe geluri de concentrație 16 % și 6 %.

Ca standarde moleculare au fost folosite Roti®-Mark Petit (3.5-40 kDa) (Carl Roth) și Unstained Protein Standard, Broad Range (10-200 kDa) (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA).

Electroforeza a fost realizată timp de 60 de minute prin aplicarea unui current electric constant de 175 Volți.

Benzile de proteine în gel au fost vizualizate cu metoda Colloidal Coomasie (0.08 % Coomasie Brilliant Blue G250 în 1.56 % acid fosforic, 7.84 % sulfat de amoniu, 20 % metanol) după fixarea gelului timp de 60 de minute în soluție de 40 % metanol,

10 % acid acetic (NEUHOFF, 1988).

Gelurile astfel obținute au fost decolorate în apă și apoi scanate (CanoScan 5600F, Canon, Krefeld, Germany, 600 dpi, auto white balance, EXIF version 0221, 24 bit depth, sRGB JPEG).

5.6. Analiza gelurilor de SDS-poliacrilamidă cu ajutorul densitometriei

5.6. SDS-polyacrylamide gels analysis using densitometry

Imaginile scanate ale gelurilor au fost pregătite pentru analiza densitometrică cu ajutorul programului ImageJ 1.48v.

Analiza densitometrică a constat în determinarea intensității benzilor de proteine de pe imaginile scanate a gelurilor de SDS-poliacrilamidă cu ajutorul programului Gel analyzer 2010 (www.gelanalyzer.com, developed by Istvan Lazar).

Proteinele degradate în timpul digestiei au fost exprimate în procentaj (%) prin compararea față de valoarea intensității benzilor corespunzătoare proteinelor de pe gelul de poliacrilamidă la momentul zero al digestiei.

5.7. Analiza cu ajutorul spectrometriei de masă a produșilor de digestie

5.7. Digestion products analysis using mass spectrometry

Benzile de proteine excizate pe de gelul de poliacrilamidă au fost analizate cu ajutorul spectrometriei de masă (MALDI-TOF/TOF-MS și ESI-QTOF-MS/MS) conform protocolului dezvoltat de PAMMINGER (2016).

Deviația maxima permisă între masa teoretică și cea măsurată a fost de 0.5 Da în cazul MALDI-TOF/TOF-MS, respectiv de 2 ppm în cazul ESI-QTOF-MS/MS.

5.8. Analiza statistică

5.8. Statistical analysis

Fiecare gel a fost analizat în duplicat, iar rezultatele au fost exprimate ca medie \pm eroare standard (SE). Analiza statistică a fost efectuată cu ajutorul STATISTICA 8.0 (StatSoft, Tulsa, OK, USA).

5.9. Rezultate și discuții

5.9. Results and discussion

În urma purificării doar fracțiunile care au conținut proteine pure au fost folosite pentru experiment.

Verificarea puritatei proteinelor s-a făcut cu ajutorul electroforezei SDS-PAGE (Fig.9). Din cauza existenței unor regiuni repetitive polimorfe în secvența de aminoacizi (ALBERT, 1999b), MRJP3 există în lăptișorul de matcă ca izoforme care apar pe gelul de SDS-PA sub forma a multiple benzi cu mase moleculare între 60 și 70 kDa.

Fracțiunile conținând izoformele MRJP3 au avut o puritate de 94.7 % (determinată prin analiza densitometrică a gelului de electroforeză).

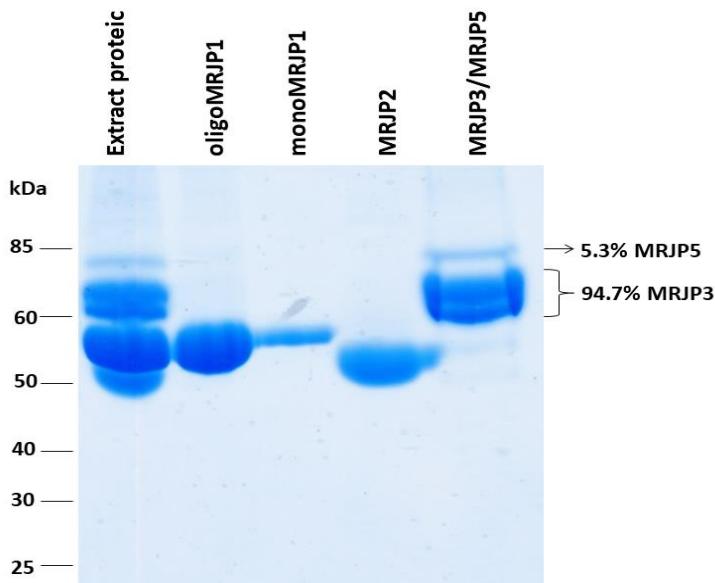


Fig. 9. Gel de concentrație 10 % de SDS-PA cu proteinele MRJPs purificate din lăptișorul de matcă. Isoformele proteinei MRJP3 au fost copurificate cu o cantitate mică de proteină MRJP5 (5.3 ± 0.2 % determinată cu Gelanalyzer2010a) care nu a putut fi purificată mai departe cu protocolul de atunci.

Fig. 9. 10 % SDS-PA gel showing MRJPs purified from royal jelly. MRJP3 isoforms were copurified along with a small quantity of MRJP5 (5.3 ± 0.2 % as determined using Gelanalyzer2010a) which was not possible to purify at that time.

Albumina serică bovină folosită cu rol de control pozitiv a fost degradată total de către pepsină în primele 15 minute ceea ce a dovedit eficacitatea protocolului de digestie (Fig.10, gelul din stânga).

Prin digestia controlului negativ cu enzime intestinale, adică a pepsinei fără proteinele MRJPs, au fost identificate fragmentele de digestie care nu aparțin digestiei proteinelor de interes.

Pe gelul care prezintă digestia controlului negativ pepsina migrează la 36 kDa, chimotripsinogenul A migrează la 25 kDa, tripsina migrează la 23.8 kDa, iar sub 15 kDa migrează produșii din urma autolizei în timp a chimotripsinogenului precum și produșii de digestie cu enzime intestinale ai pepsinei (Fig.10, gelul din dreapta).

Aşadar, în continuare enzimele și fragmentele lor au fost pseudocolorate cu gri pentru o mai bună identificare pe gel, respectiv distingere de proteinele de interes (Fig.12 și Fig.16).

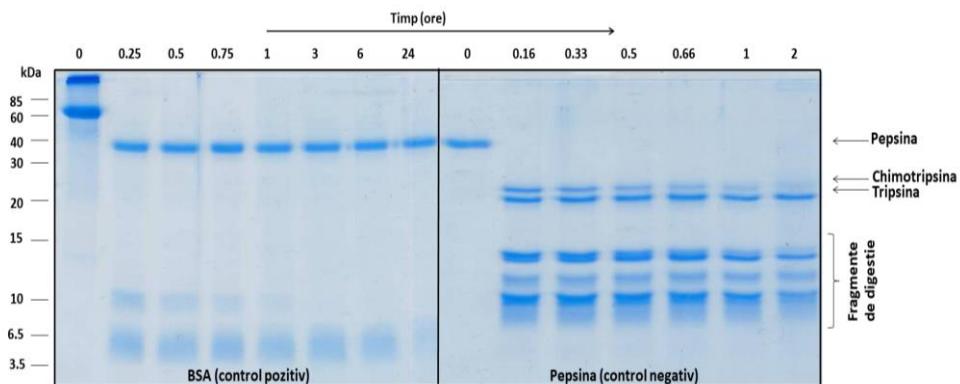


Fig. 10. Gel de SDS-PA de concentrație 16 % care arată digestia în etapa gastrică a controlului pozitiv (albumina serică bovină, BSA), respectiv digestia în etapa intestinală a controlului negativ (doar pepsina fără proteina de interes)

Fig. 10. 16 % SDS-PA gel showing the gastric phase digestion of the positive control (bovine serum albumin, BSA), respectively the intestinal phase digestion of the negative control (only pepsin without protein of interest)

Pe gelurile de SDS-poliacrilamidă care analizează digestia proteinei MRJP2 în stare nativă (50 kDa) au fost identificate încă două benzi de proteine de mase moleculare 26 kDa, respectiv 21 kDa.

Acste benzi au fost excizate de pe gel și analizate cu ajutorul spectrometriei de masă.

Rezultatele spectrometriei de masă (Fig.11 și Anexe: Tabelul 1) au identificat aceste benzi ca fiind capătul N-terminal (fragmentul de 26 kDa), respectiv capătul C-terminal (fragmentul de 21 kDa) al proteinei MRJP2.

Acste fragmente se formează ca urmare a incubării proteinei MRJP2 în soluție Laemmli care conține SDS la temperatura de 95°C timp de 5 minute (Fig.11, gelul din stânga, banda corespunzătoare +95°C), pas necesar pentru inactivarea enzimelor digestive, fragmentele fiind inexistente în cazul electroforezei proteinei MRJP2 în soluție Laemmli fără incubare la temperatura de 95°C (Fig.11, gelul din stânga, banda corespunzătoare -95°C).

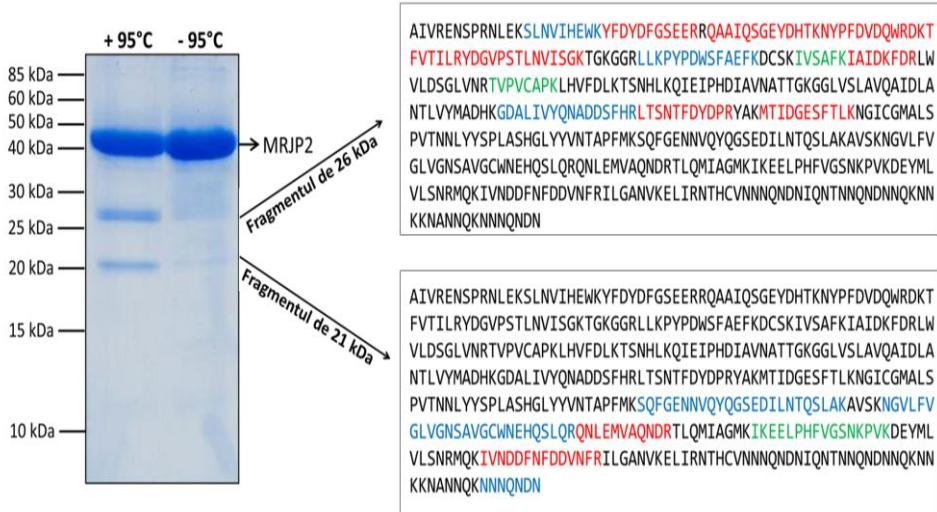


Fig. 11. Gel de SDS-PA de concentrație 16 % cu proteina MRJP2 și fragmentele ei la momentul zero al simulării digestiei *in vitro*. Fragmentele de 26 kDa, respectiv 21 kDa s-au format prin incubarea proteinei MRJP2 în soluție Laemmlii la temperatura de 95°C. Fragmentele formate au fost excizate de pe gel și analizate cu ajutorul spectrometriei de masă. În chenare se găsesc rezultatele spectrometriei de masă: aminoacizii de culoare albastră au fost identificați doar de MALDI-TOF/TOF-MS, cei de culoare verde doar de ESI-QTOF-MS/MS, iar cei de culoare roșie de ambele metode.

Fig. 11. 16 % SDS-PA gel showing MRJP2 and its fragments at moment zero of *in vitro* digestion simulation. The 26 kDa, respectively 21 kDa fragments formed after incubating MRJP2 in Laemmli sample buffer at a temperature of 95°C. The resulting fragments were excised from the gel and analyzed by mass spectrometry. The framing contains the mass spectrometry results: the blue amino acids were detected by MALDI-TOF/TOF-MS, the green amino acids were detected by ESI-QTOF-MS/MS, while the red amino acids were detected by both methods.

5.9.1. Etapa gastrică

5.9.1. Gastric step

Proteinele purificate și produși de digestie rezultați în urma simulării *in vitro* a digestiei la nivelul stomacului au fost vizualizați prin electroforeză pe geluri de SDS-poliacrilamidă.

Pepsina migrează la 36 kDa. Benzile corespunzătoare pepsinei sunt pseudocolorate, iar benzile albastre de pe gel reprezintă proteinele folosite ca substrat în timpul digestiei și produși lor de digestie (Fig.12).

În etapa gastrică proteinele din lăptișorul de matcă au fost mult mai stabile în comparație cu albumina serică bovină (controlul pozitiv).

În prezența pepsinei benzile proteinei MRJP1 au dispărut treptat fără produși de scindare, monomerul MRJP1 fiind detectat în starea nativă timp de 3 ore (Fig.12, gelul din dreapta, sus), iar oligomerul timp de 6 ore (Fig.12, gelul din stânga, sus).

Proteina MRJP2 în stare nativă a fost detectată în prezența pepsinei până la sfârșitul experimentului, adică pentru o perioadă de 24 de ore (Fig.12, gelul din dreapta, jos).

În etapa gastrică MRJP2 se scindează treptat într-un produs de digestie de masă moleculară 44 kDa care este de asemenea stabil până la sfârșitul etapei gastrice (Fig.12, gelul din dreapta, jos și Fig.14, B).

Din cauza existenței unor regiuni repetitive polimorfe în secvența de aminoacizi (ALBERT, 1999b), MRJP3 există în lăptișorul de matcă ca izoforme care apar pe gelul de SDS-PA sub forma a multiple benzi cu mase moleculare între 60 și 70 kDa (Fig.9). Aceste izoforme ale MRJP3 în stare nativă au fost detectate până la 3 ore în prezența pepsinei din stomac (Fig.12, gelul din dreapta, jos).

În figura 12 izoformele MRJP3 nu mai sunt la fel de ușor sesizate ca în figura 9 din cauza diferenței între concentrațiile gelurilor de electroforeză.

Toate izoformele proteinei MRJP3 au fost scindate de pepsină într-un singur produs de digestie de masă moleculară 44 kDa (Fig.12, gelul din dreapta, jos) care a apărut la 15 minute de digestie cu pepsină și a fost stabil în etapa gastrică pentru 60 de minute, după care a fost degradat treptat, fiind nedetectabil după 24 de ore (Fig.14, A).

În timpul digestiei cu pepsina atât pentru MRJP2 cât și pentru MRJP3 a rezultat un fragment de aproximativ 44 kDa. Benzile corespunzând fragmentului de 44 kDa după o oră de digestie cu pepsină au fost excizate de pe gelul de electroforeză și analizate cu ajutorul spectrometriei de masă (Fig.12 gelurile de jos).

Rezultatele spectrometriei de masă arată că pentru ambele proteine, deci atât în cazul proteinei MRJP2 cât și în cazul MRJP3, din lanțul polipeptidic lipsesc terminațiile N și C (Fig.13 și Anexe: Tabelele 2, respectiv 3).

Acest lucru indică o accesibilitate la solvent ridicată a terminațiilor acestor proteine la pH acid (pH 2.0). În cazul MRJP3 produsul de digestie de 44 kDa este rezultatul pierderii terminațiilor C a lanțurilor polipeptidice de către diferitele izoforme ale MRJP3.

Benzile de mase moleculare 19 kDa, respectiv de 24 kDa identificate pe geluri (Fig.12 și Fig.14, A) sunt terminațiile C de lungimi diferite (ALBERT, 1999b) ale izoformelor MRJP3 scindate de către pepsină în timpul digestiei.

De asemenea, masele moleculare ale fragmentelor identificate de spectrometria de masă au o valoare teoretică de 42.1 kDa pentru fragmentul de digestie al MRJP2, respectiv 44.0 kDa pentru fragmentul de digestie al MRJP3 (calculate cu ExPASy ProtParam fără a lua în considerare glicozilarea). Aceste valori sunt în concordanță cu masa moleculară de 44 kDa estimată de pe gelul de electroforeză.

Fragmentul de 44 kDa are o stabilitate ridicată în cazul MRJP2, respectiv temporară în cazul MRJP3, față de pepsină, fapt care denotă un centru al structurii proteice bine împachetat la pH acid în cazul MRJP2.

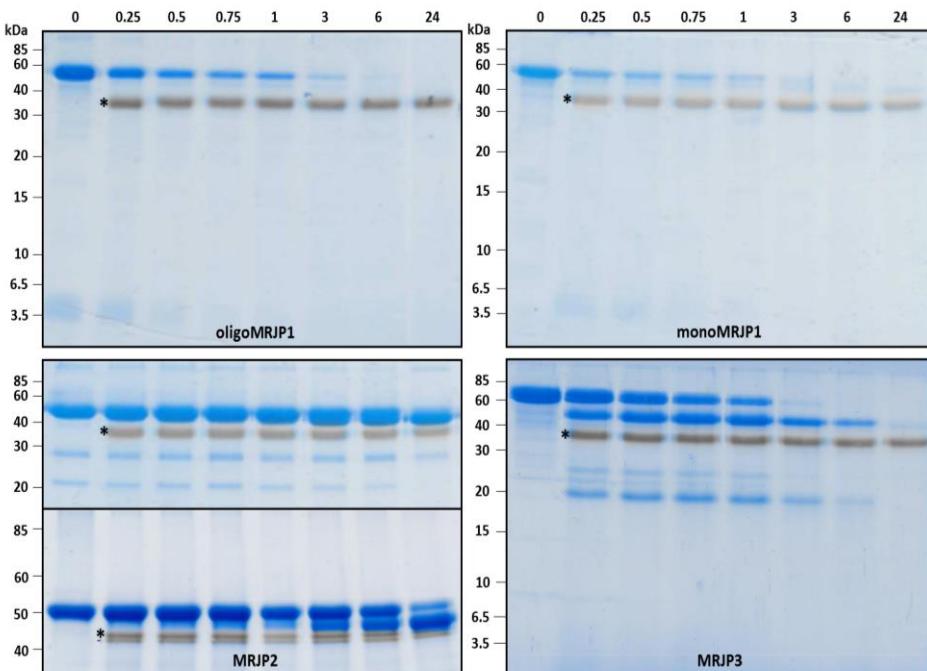


Fig. 12. Electroforeza proteinelor majoritare din lăptișorul de matcă pe parcursul simulării *in vitro* a digestiei la nivelul gastric. Au fost folosite geluri de SDS-PA de concentrație 16 %, respectiv 6 % (în cazul MRJP2, gelul de jos). Timpul este indicat în partea de sus și este exprimat în ore. Enzima pepsină migrează la 36 kDa fiind marcată cu asterisc și pseudocolorată cu gri. Digestia proteinei MRJP1 în forma oligomerică (oligoMRJP1) și monomerică (monoMRJP1) este vizualizată cu ajutorul gelurilor din partea de sus. Digestia proteinei MRJP2 este vizualizată cu gelurile din partea stângă, jos. Din cauza incubării proteinei MRJP2 în soluție Laemmli la temperatură de 95°C s-au format două benzi de mase moleculare 26 kDa, respectiv 21 kDa care reprezintă capătul N-terminal, respectiv capătul C-terminal al proteinei MRJP2 conform rezultatelor spectrometriei de masă (Anexe: Tabelul 1), aceste fragmente nu sunt deci produși de digestie. Digestia proteinei MRJP3 este vizualizată cu gelul din partea dreaptă, jos.

Fig.12. Electrophoresis showing the most abundant proteins from royal jelly during *in vitro* simulation of gastric digestion. 16 %, respectively 6 % (for MRJP2, lower gel) SDS-PA gels were used. The time is shown in the upper part of the image and is measured in hours. Pepsin migrates at 36 kDa, is indicated by asterisk and pseudocoloured with grey. The upper gels show the digestion of MRJP1 in oligomeric form (oligoMRJP1) and monomeric form (monoMRJP1). MRJP2 digestion is shown in the lower left gels. Because of incubating MRJP2 in Laemmli buffer at 95°C two 26 kDa, respectively 21 kDa fragments were formed representing the N-terminal, respectively the C-terminal of MRJP2 as determined by the mass spectrometry analysis (Supplementary: Table 1), thus these fragments are not digestion fragments. MRJP3 digestion is shown in the lower right gel.

MRJP3	AAVNHQRK SANNLAHSMKV IYEWKHIDFDGSDERRDAIAIKSGEFDHKNYPFDVDRWRD
MRJP2	--AIVRENSPRNLEK SLNV IHEWKYFDYDFGSEERRQAAIQSGEYDHKNYPFDVDRWRD
MRJP3	KTFVTIERNNGPSSLNVVTNKKGK GGPLL RYPDWSFAKYEDCSGIVSAFKIAVDKFDR
MRJP2	KTFVTILRYDGVPSTLNVISGK TGK GGRLLKPKYPDWSFAEFKDCSK IV SAFKIAIDKFDR
MRJP3	LWVLDSGLVNNNQPMCSPKLLT FDL KTSKLVKQVEIPHNIAVNATTGMGELVSLAVQAID
MRJP2	LWVLDSGLVNR TPV CAPKLHVFDLKTSHNLKQIEIPHDIAVNATTGK GGL VSLAVQAID
MRJP3	R---TNTM YI ADEK GEG LIMYQNSDDSFHRLTSNTFDYDPRYTK LTV AGE SFTV KNGIY
MRJP2	L---ANTLVYMA DHK G DAL IVYQNADDSF HRL TSNTFDYDPRYAK MT IDGESFTL KNG IC
MRJP3	GIALSPVTNNLYSPPLSHGLYYVDTEQFSNPQEENNQYEGSQDILNTQSFGKVSKN
MRJP2	GMALSPVTNNLYSPLAS H GLYYVNTAPFMK SQFGENN QYQGS E DILNTQS LAKAVSKN
MRJP3	GVLFLGLVGNSGIACVNEHQVL Q RESFDVVAQNEETLQMIVSMKIMENLPQS GRIND PEG
MRJP2	GVLFVGLVGNSAVGCWNEHQSL QR QNLEMVAQNDRTL Q MIAG M K I KEELPHFVG SN KPVK
MRJP3	NEY M ALS N R M Q K IINNDFNFNDVNFR I LG A NV D DL M R N TRC G RYHNQNAGNQNADNQNA
MRJP2	DEY M LV S N R M Q K IV N DDFN F DN F R I LG A N V K E L I R N THCVNNNNQ-DN I Q N TNN---
MRJP3	DNQNANNQNADNQNQANKQNGNRQNDNRQNDNK Q NGNRQNDNK Q NGNRQNDNK Q NGNRQNG
MRJP2	-----QNDNNQKNNKKNANN Q KNNNQNDN-----
MRJP3	NK Q NDNK Q NGNRQNDNK R NGNRQND Q NNQNDNNRND Q VHHSSKLH
MRJP2	-----

Fig. 13. Identificarea cu ajutorul spectrometriei de masă a fragmentelor de 44 kDa aparținând MRJP2 și MRJP3 după o oră de digestie în prezența pepsinei. Benzile acestor fragmente au fost excizate de pe gelurile de SDS-PA și trimise spectrometriei de masă. Aminoacizii de culoare albastră au fost identificați doar de MALDI-TOF/TOF-MS, cei de culoare verde doar de ESI-QTOF-MS/MS, iar cei de culoare roșie de ambele metode.

Fig.13. The 44 kDa fragments of MRJP2 and MRJP3 after one hour of pepsin digestion identified by mass spectrometry. The corresponding bands on the gels were excised and analyzed using mass spectrometry. The blue amino acids were determined by MALDI-TOF/TOF-MS, the green amino acids were determined by ESI-QTOF-MS/MS, while the red amino acids were determined by both methods.

Rezultatele analizei densitometrice ale simulației *in vitro* a digestiei umane asupra proteinelor majoritare MRJPs purificate din lăptișorul de matcă sunt prezentate în figura 14.

Aceste rezultate sunt bazate pe analiza densitometrică a gelurilor de SDS-poliacrilamidă cu ajutorul cărora au fost vizualizați produșii de digestie (Fig.12 și Fig.16).

După o oră de digestie în prezența pepsinei proteinele majoritare din lăptișorul de matcă sunt încă detectabile în starea lor nativă și vor ajunge în intestin $12.0 \pm 1.0\%$ în cazul monomerului MRJP1, $27.7 \pm 1.7\%$ în cazul oligomerului MRJP1, $84.5 \pm 2.8\%$ în cazul MRJP2 și $18.0 \pm 4.6\%$ în cazul MRJP3 din cantitatea ingerată (Fig. 14).

În consecință, se poate afirma că proteinele majoritare din lăptișorul de matcă pot ajunge la nivelul intestinului uman deoarece sunt încă detectabile până la 3 ore de digestie la nivel gastric în prezența pepsinei.

Forma oligomerică a proteinei MRJP1 a fost mai stabilă decât forma monomerică, însă ambele forme au fost mai puțin stabile în comparație cu proteinile MRJP2 și MRJP3. Aceste proteine fac parte din familia MRJPs, sunt înrudite între ele și au în comun un procentaj ridicat de aminoacizi (64-69 % conform Clustal Omega). Așadar, au un număr apropiat de locuri pe lanțul de aminoacizi unde pepsina poate scinda: 115 puncte de scindare pentru MRJP1, 105 pentru MRJP2, 106 pentru MRJP3 (conform Expasy Peptide Cutter, Fig.15).

În ciuda acestor asemănări, cele trei proteine au avut o stabilitate diferită față de scindarea de către pepsină.

Unele modificări ale proteinelor precum glicozilarea sau amidarea grupării carboxil la capătul C al lanțului polipeptidic pot stabiliza proteinele împotriva scindării de către pepsină (DIXON, 1964; ZHANG, 2014; NIU, 2016).

În ceea ce privește glicozilarea, toate proteinele sunt predispuse teoretic să fie N-glicozilate pe resturile de asparagină (KIMURA, 1995; BUTTSTEDT, 2014), MRJP1 având mai multe regiuni teoretice de N-glicozilare decât celelalte două proteine, MRJP2 și MRJP3, care au fost mai stabile față de acțiunea pepsinei (Fig.15). Deci acest tip de modificare nu poate fi implicat în stabilitatea față de digestie.

Amidarea la capătul C al proteinelor poate fi de asemenea exclusă deoarece proteinele cele mai stabile, MRJP2 și MRJP3, au fost scindate de pepsină tocmai de la capetele C și N terminale (Fig.13).

O explicație a rezistenței diferențiale față de pepsină a acestor proteine ar putea fi un centru hidrofobic bine împachetat în condiții acide care ascunde și protejează punctele susceptibile scindării de către pepsină (DALGALARRONDO, 1995).

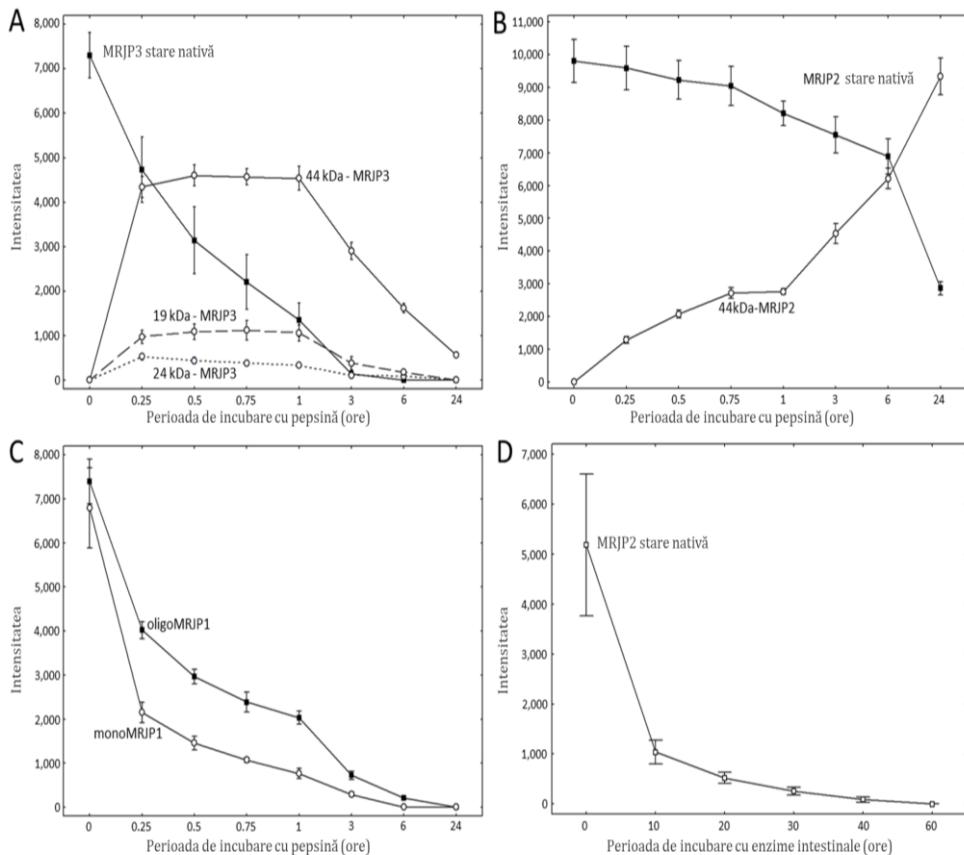


Fig. 14. Digestia proteinelor majoritare din lăptișorul de matcă analizată cu ajutorul densitometriei. Rezultatele sunt exprimate ca medie \pm eroarea standard. A) Digestia izoformelor proteinei MRJP3 de către pepsină, pătrate pline, proteina în stare nativă; cercuri și linie solidă, fragmentul de 44 kDa; cercuri și linie punctată, fragmentul de 24 kDa; cercuri și linie întreruptă, fragmentul de 19 kDa; B) Digestia proteinei MRJP2 de către pepsină, pătrate pline, proteina în stare nativă; cercuri, fragmentul de 44 kDa; C) Digestia proteinei MRJP1 în forma oligomerică (pătrate pline) și monomerică (cercuri) de către pepsină; D) Digestia proteinei MRJP2 în stare nativă de către enzimele intestinale.

Fig. 14. The digestion of the most abundant proteins from royal jelly was evaluated using densitometry. The results are shown as average \pm standard error. A) Digestion of MRJP3 isoforms by pepsin, squares, protein in native form; circle and solid line, digestion fragment of 44 kDa; circle and dotted line, digestion fragment of 24 kDa; circle and dashed line, digestion fragment of 19 kDa; B) Digestion of MRJP2 by pepsin, squares, protein in native form; circle, digestion fragment of 44 kDa; C) Digestion of MRJP1 by pepsin, squares, oligomeric form; circle, monomeric form; D) Digestion of native MRJP2 by intestinal enzymes.

Caracterizarea biochimică a proteinelor majoritare purificate din lăptișorul de matcă (*Apis mellifera*)

Fig. 15. Alinierea secvențelor de aminoacizi pentru cele mai abundente proteine din lăptișorul de matcă cu ajutorul Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). Secvențele de aminoacizi au fost obținute din baza de date UniProt. Fiecare aminoacid este asociat cu un simbol reprezentat de o singura literă. Aminoacizii de culoare roșie și marcați cu asterisc * reprezintă secvență de aminoacizi înalt conservată; aminoacizii cu proprietăți similare sunt grupați în coloane și au simbolul ':'; aminoacizii cu proprietăți slab similare sunt au simbolul ';'. punctele de scindare ale pepsinei au fost determinate cu ajutorul ExPASy Peptide Cutter și sunt identificate cu bold, underlined și italic; regiunile teoretice de N-glicozilare sunt în chenare.

Fig. 15. Amino acid sequence alignment of the most abundant proteins from royal jelly using Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). The amino acid sequence was obtained using the database UniProt. Each amino acid is represented by a one letter code. Red amino acids marked with asterisk represent the highly conserved sequence; the amino acids with similar properties are grouped in column and indicated by the symbol ‘:’; the weakly similar amino acids are indicated by the symbol ‘.’; the sites available for pepsin cleavage were determined using ExPASy Peptide Cutter and are indicated with bold, underline and italic features. The theoretical N-glycosylation sites are framed.

5.9.2. Etapa intestinală

5.9.2. Intestinal step

Tripsina și α -chimotripsina migrează pe gel la 23.8 kDa, respectiv 25 kDa.

Benzile corespunzătoare enzimelor și produșilor lor de digestie sunt pseudocolorate, iar benzile albastre de pe gel reprezintă proteinele de interes și fragmentele lor de digestie.

În etapa intestinală proteinele MRJPs sunt digerate rapid, proteina MRJP2 având din nou stabilitatea cea mai ridicată fiind detectabilă în stare nativă până la 40 de minute ($1.5 \pm 0.7\%$ din cantitatea inițială) în prezența tripsinei și chimotripsinei (Fig.16 și Fig.14, D).

Oligomerul și monomerul MRJP1 sunt degradate în primele 10 minute de către tripsină și chimotripsină (Fig.16).

MRJP3 în stare nativă și fragmentul său de digestie de 44 kDa sunt de asemenea degradate în 10 minute, în timp ce unele fragmente de digestie rezultate în această etapă (de aproximativ 30 kDa, respectiv 40 kDa) sunt degradate după 20 de minute (Fig.16).

Bioccesibilitatea este o condiție pentru ca un nutrient să aibă efecte în organismul uman și reprezintă cantitatea de nutrient care ajunge să fie disponibilă absorbției intestinale în urma digestiei.

Lăptișorul de matcă este consumat ca supliment alimentar, doza recomandată fiind de 1 gram pe zi.

Așadar cantitatea de proteine MRJPs consumată pe zi este de 120 mg (PAVEL, 2014) din care 37 mg MRJP1, 19 mg MRJP2 și 31 mg MRJP3 (SCHMITZOVA, 1998).

Din cele 37 mg de proteină MRJP1, forma oligomerică reprezintă 32 mg, iar forma monomerică 5 mg (BUTTSTEDT, 2016).

Dacă 1 g de lăptișor de matcă va fi consumat pe stomacul gol și considerând un volum de lichid în stomacul gol de 35 ml (MUDIE, 2014), vom avea în stomac o concentrație de 0.91 mg/ml MRJP1 oligomeric, 0.14 mg/ml MRJP1 monomeric, 0.54 mg/ml MRJP2 și 0.89 mg/ml MRJP3.

Conform rezultatelor experimentului de simulare *in vitro* a digestiei, după o oră în prezența pepsinei, vor ajunge în intestinul subțire 0.25 mg/ml MRJP1 oligomeric, 17 μ g/ml MRJP1 monomeric, 0.46 mg/ml MRJP2 și 0.16 mg/ml MRJP3.

Acstea concentrații sunt mai ridicate decât concentrațiile folosite în studiile pe animale sau la nivel de culturi de celule (de până la 100 μ g/ml)(OKAMOTO, 2003; SIMUTH, 2004; DETIENNE, 2014; VEZETEU, 2017).

Efectele biologice ale acestor proteine în starea lor nativă a fost demonstrată, însă la nivelul intestinului uman aceste proteine trebuie să fie transportate și să treacă în sistemul circulator pentru a avea efecte benefice asupra sănătății omului.

Deși în general proteinele sunt molecule prea mari pentru a trece bariera intestinală în stare intactă, există unele excepții de la această regulă, precum factorii de

creștere care sunt preluăți cu ajutorul receptorilor și înglobați în celulele intestinale prin endocitoză (GARDNER, 1988; SANDERSON, 1993).

Proteinile pot fi transportate și fără ajutorul receptorilor, cu ajutorul enterocitelor intestinale sau a celulelor epiteliale specializate regăsite la nivelul intestinului (CAILLARD, 1995).

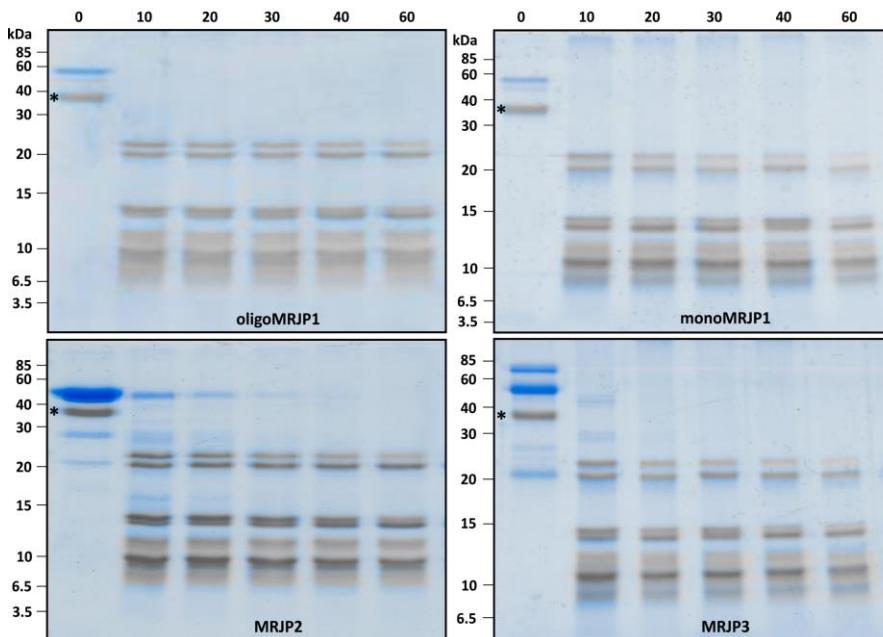


Fig. 16. Electroforeza proteinelor majoritare din lăptișorul de matcă pe parcursul simulării *in vitro* a digestiei la nivelul intestinal. Au fost folosite geluri de SDS-PA de concentrație 16 %. Timpul este indicat în partea de sus și este exprimat în minute. La momentul zero substratul este cel obținut în urma digestiei în prezența pepsinei timp de o oră. Enzima pepsină migrează la 36 kDa fiind marcată cu asterisc și pseudocolorată cu gri. Enzimele intestinale și produși de digestie intestinală ai controlului negativ (doar pepsina fără proteină de interes) sunt pseudocolorate cu gri pentru o mai bună distincție a proteinelor de interes și a produșilor lor de digestie care sunt de culoare albastră.

Fig. 16. Electrophoresis showing the most abundant proteins from royal jelly during *in vitro* simulation of intestinal digestion. 16 % SDS-PA gels were used. The time is shown in the upper part of the image and is measured in minutes. At time point zero the substrate is the one hour pepsin digested sample. Pepsin is migrating at 36 kDa, is indicated by asterisk and is pseudocoloured with grey. The intestinal enzymes and the digestion fragments of the negative control (only pepsin without protein of interest) are pseudocoloured for a better visualisation.

6.Influența pH-ului asupra stabilității proteinelor purificate din lăptișorul de matcă

6. Influence of pH on the stability of proteins purified from royal jelly

6.1. Materialul biologic

6.1. Biological material

Lăptișorul de matcă (*Apis mellifera*) proaspăt recoltat a fost obținut de la apicultori în anul 2015.

Probele au fost codificate astfel: LM1 a fost recoltat în luna iulie în județul Cluj (Cluj-Napoca), LM2 a fost recoltat în luna august în județul Mureș (Bratca), iar LM3 a fost recoltat în luna iunie în județul Cluj (Cluj-Napoca).

Toate probele au fost păstrate la -20°C până la utilizare.

6.2. Obținerea proteinelor majoritare pure din lăptișorul de matcă

6.2. Purification of the most abundant proteins from royal jelly

Obținerea extractului proteic din lăptișorul de matcă, precum și purificarea proteinelor majoritare din extract au fost realizate conform metodelor prezentate în subcapitolul 5.2.

6.3. Determinarea concentrației de proteine cu ajutorul

spectroscopiei UV

6.3. Protein concentration determination using UV spectroscopy

Concentrația de proteine a fost determinată conform metodei prezentate în subcapitolul 5.3.

6.4. Monitorizarea stabilității proteinelor majoritare din lăptișorul de matcă cu ajutorul spectroscopiei de fluorescență

6.4. Monitoring the stability of the most abundant proteins from royal jelly using fluorescence spectroscopy

Pentru a monitoriza stabilitatea în funcție de pH a proteinelor majoritare din lăptișorul de matcă a fost folosit un protocol dezvoltat de PANTOLIANO (2001).

Acest protocol trebuie adaptat fiecărei proteine în parte, aşadar am stabilit un

protocol pentru proteinele mele de interes prin testarea inițială a diferite concentrării de proteină, respectiv diferite diluții cu fluorofor până la combinația finală de 2 µM de proteine MRJPs și diluție de 1:1000 fluorofor care s-a dovedit eficientă pentru această metodă.

Probele au fost analizate cu ajutorul unui instrument PCR Real-Time CFF Connect™ în microplăci Hard-Shell® cu 96 de godeuri sigilate pentru etanșeitate cu folii Microseal® 'B' (toate de la firma Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

Volumul total de probă în fiecare godeu a fost de 20 µl care a conținut o concentrație de 2 µM de proteină MRJP1 oligomeric, MRJP1 monomeric, MRJP2 sau MRJP3 și fluorofor SYPRO® Orange (Cat.-no. S5692, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) la o diluție de 1:1000 în soluții tampon de diferite valori ale pH-ului: 50 mM Na₂HPO₄/acid citric, pH 2.5-8.0 sau 50 mM Na₂CO₃/NaHCO₃, pH 9.0-11.0.

Denaturarea termică a probelor a fost monitorizată prin setarea parametrilor experimentali în softul instrumentului PCR: încălzire de la 20°C la 95°C cu interval de creștere de câte un grad pe minut și măsurarea fluorescenței fluoroforului SYPRO® Orange (excitație la 450-490 nm și detecție la 560-580 nm) la fiecare un minut folosind modul FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) al instrumentului PCR Real-Time.

Intensitatea fluorescenței (FI) a fost utilizată pentru a calcula temperatura de denaturare a proteinei (T_m) care reprezintă temperatura la care concentrația de proteină denaturată este egală cu cea de proteină în stare nativă.

Pentru a calcula temperaturile de denaturare, intensitatea fluorescenței a fost reprezentată grafic în funcție de temperatură (T) și modelată cu ajutorul programului Origin 5.0 (Microcal Software Inc., Northampton, MA, USA) folosind ecuația Boltzmann care descrie cinetica unui sistem termodinamic (NIESEN, 2007):

$$FI = FI_{MIN} + \frac{(FI_{MAX} - FI_{MIN})}{1 + \exp\left(\frac{Tm - T}{dT}\right)}$$

Analiza s-a efectuat în cvadruplicat pentru fiecare din proteinele purificate din trei probe diferite de lăptișor de matcă (LM1-3).

6.5. Analiza statistică

6.5. Statistical analysis

Rezultatele sunt exprimate ca medie ± deviația standard (SD).

Analiza statistică s-a efectuat cu ajutorul STATISTICA 8.0 (StatSoft, Tulsa, OK, USA). Testul non-parametric Kruskal-Wallis ANOVA a fost utilizat.

6.6. Rezultate și discuții

6.6. Results and discussion

Lăptișorul de matcă este o secreție a glandelor mandibulare și hipofaringeale ale albinelor doici.

Proteinele reprezintă până la 18 % din compoziția lăptișorului crud (VON PLANTA, 1888), majoritare fiind proteinele din familia MRJPs care pot constitui până la 90 % din totalul proteinelor (SCHIMTZOVA, 1998).

MRJPs trebuie să fie stabile în medii de diferite valori ale pH-ului, de la locul de sinteză al acestora în reticulul endoplasmatic al celulelor secretoare ale glandelor hipofaringeale care are pH-ul în jur de 7.0 (DEMAUREX, 2002), la veziculele secretorii care au un pH de 5.1-5.5 (KNECHT, 1990; DEMAUREX, 2002) până la produsul final, lăptișorul de matcă cu pH în jur de 4.0 (HOFFMANN, 1960).

Mai mult decât atât, deși aceste proteine au fost descoperite inițial în lăptișorul de matcă, sursa lor nu se limitează la acesta, pe parcurs fiind descoperite și în alte părți ale albinei, precum veninul de pH 4.5-5.5 (PEIREN, 2005; MATYSIAK, 2016), hemolimfa de pH 6.8 (BISHOP, 1923; RANDOLT, 2008; ARARSO, 2018) și creierul de pH 7.2 (KUCHARSKI, 1998; GARCIA, 2009) sau în alte produse ale stupului, de exemplu miere de pH 3.2-4.5 (DA SILVA, 2016) și polen de albine de pH 4.4-5.4 (FUENMAYOR, 2014; SIMUTH, 2004; WON, 2009; DI GIROLAMO, 2012; BÍLIKOVÁ, 2015; CHUA, 2015).

Prin urmare, proteinele MRJPs trebuie să fie stabile într-un spectru larg de pH și la temperaturi diferite, de la 20°C în timpul iernării albinelor, până la 35°C în perioada creșterii de puiet (GATES, 1914).

În lăptișorul de matcă sunt regăsite în cantități mai mari proteinele MRJP1, MRJP2 și MRJP3 (SCHIMTZOVA, 1998), aşadar stabilitatea acestor proteine a fost estimată cu ajutorul metodei Differential Scanning Fluorimetry, numită și Thermofluor, prin care se monitorizează procesul de denaturare termică a proteinelor în prezența unui fluorofor (PANTOLIANO, 2001).

Aceasta este o metodă termodinamică bazată pe determinarea temperaturii de denaturare termică (T_m) a proteinelor care servește ca indicator al stabilității proteinelor pe considerentul că factorii care afectează stabilitatea proteinelor, afectează de asemenea punctul de "topire" al acestora (NIESEN, 2007).

Pentru acest experiment am folosit fluoroforul SYPRO® Orange (maxim al absorbției la 470 nm, maxim al emisiei la 569 nm) a cărui intensitate a fluorescenței crește odată cu creșterea hidrofobicității proteinelor supuse analizei datorită interacțiunii fluoroforului cu partea hidrofobă a proteinei care devine expusă la temperaturi ridicate prin denaturarea parțială sau totală a proteinei conducând la expunerea centrului hidrofobic (părțile hidrofobe ale proteinelor tind să se orienteze către centrul structurii proteice în condiții de stabilitate, de aceea prin denaturarea termică aceste părți hidrofobe ajung să fie expuse reacționând astfel cu fluoroforul

care va deveni fluorescent și poate fi detectat).

Așadar, în general o proteină bine împachetată într-o structură ordonată va avea o fluorescență de intensitate mică la începutul experimentului deoarece va avea regiunile hidrofobe ascunse în centrul moleculei proteice.

În timpul denaturării proteinelor fluorescența va crește și va putea fi reprezentată ca funcție a temperaturii (Fig. 17).

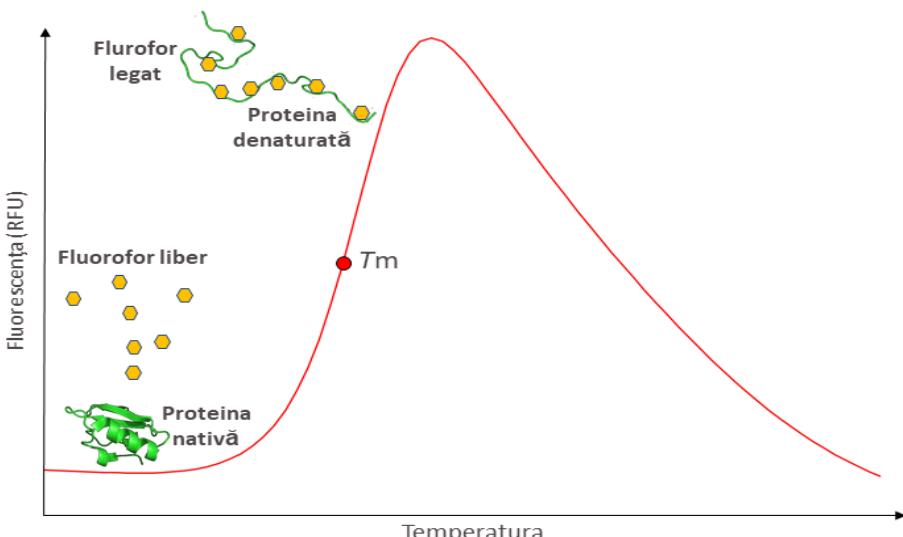


Fig. 17. Principiul metodei ThermoFluor (PANTOLIANO, 2001)

Fig. 17. The ThermoFluor method principle (PANTOLIANO, 2001)

Curbele de denaturare termică a proteinelor MRJPs arată că acestea sunt proteine de structuri bine împachetate în intervalul de pH natural (pH 4.0-7.0) deoarece încă de la începutul experimentului la temperatura de 20°C au fluorescență în jurul valorii de 3,000-3,500 RFU (Fig.19, Fig.20, Fig.21).

De asemenea, se poate observa că MRJP2 este o proteină stabilă la începutul experimentului de denaturare termică într-o gamă mai largă de pH. MRJP2 are o fluorescență mai ridicată în intervalul de pH natural (pH 4.0-7.0) în comparație cu celelalte proteine, indicând un centru al moleculei proteice bine împachetat (Fig.20).

Proteinile MRJP1 monomeric, MRJP2 și MRJP3 au fie o fluorescență foarte scăzută de circa 500 RFU, fie nu au nicio fluorescență la valori ale pH-ului de 2.0, respectiv de 3.0 (Fig. 19, Fig.20, Fig.21).

Acest fapt se poate datora unei structuri proteice foarte compacte care nu a permis accesul fluoroforului la partile hidrofobe ale proteinelor sau se poate datora creșterii polarității solventului la aceste valori de pH care au determinat fie o fluorescență mai scăzută, fie modificarea emisiei fluorescentei, situații întâlnite în cazul altor fluorofori (BARUAH, 2006).

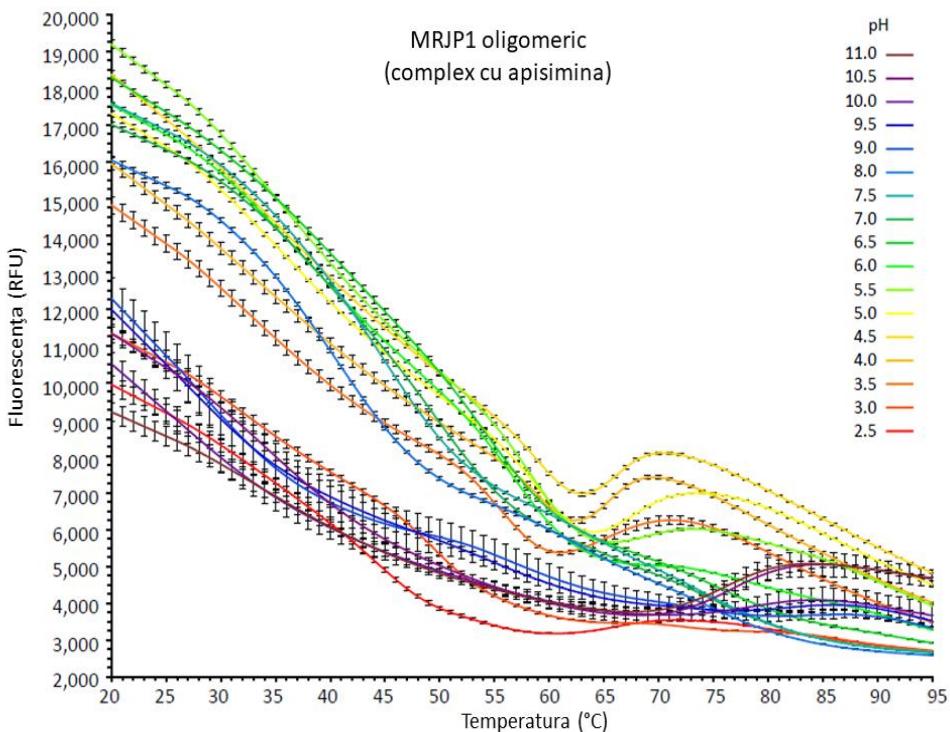


Fig. 18. Curbele de denaturare termică a MRJP1 oligomeric dintr-o probă de lăptișor de matcă obținute cu ajutorul metodei Differential Scanning Fluorimetry. Analiza s-a făcut în cvadruplicat la o concentrație a proteinelor de $2 \mu\text{M}$ și fluorofor SYPRO® Orange la o diluție de 1:1000 în soluții tampon de diferite valori ale pH-ului: $50 \text{ mM Na}_2\text{HPO}_4/\text{acid citric, pH } 2.5-8.0$ sau $50 \text{ mM Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3, \text{pH } 9.0-11.0$. Rezultatele sunt exprimate ca medie \pm deviația standard.

Fig. 18. Thermal denaturation curves of oligomeric MRJP1 from one sample of royal jelly determined using Differential Scanning Fluorimetry. The analysis was done using four replicates at a $2 \mu\text{M}$ protein concentration and 1:1000 dilution of SYPRO® Orange. The proteins were measured at different pH values: $50 \text{ mM Na}_2\text{HPO}_4/\text{acid citric, pH } 2.5-8.0$ sau $50 \text{ mM Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3, \text{pH } 9.0-11.0$. The results are shown as average \pm standard deviation.

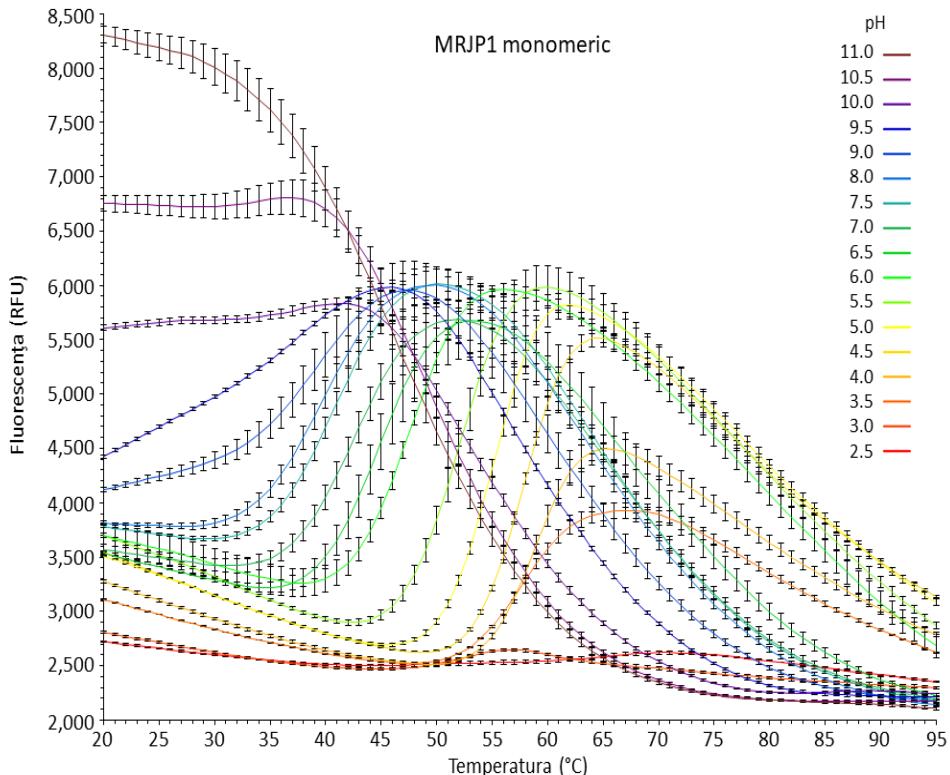


Fig. 19. Curbele de denaturare termică a MRJP1 monomeric dintr-o probă de lăptișor de matcă obținute cu ajutorul metodei Differential Scanning Fluorimetry. Analiza s-a făcut în cvadruplicat la o concentrație a proteinelor de $2 \mu\text{M}$ și fluorofor SYPERO® Orange la o diluție de 1:1000 în soluții tampon de diferite valori ale pH-ului: $50 \text{ mM Na}_2\text{HPO}_4/\text{acid citric, pH } 2.5-8.0$ sau $50 \text{ mM Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3, \text{pH } 9.0-11.0$. Rezultatele sunt exprimate ca medie \pm deviația standard.

Fig. 19. Thermal denaturation curves of monomeric MRJP1 from one sample of royal jelly determined using Differential Scanning Fluorimetry. The analysis was done using four replicates at a $2 \mu\text{M}$ protein concentration and 1:1000 dilution of SYPERO® Orange. The proteins were measured at different pH values: $50 \text{ mM Na}_2\text{HPO}_4/\text{acid citric, pH } 2.5-8.0$ sau $50 \text{ mM Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3, \text{pH } 9.0-11.0$. The results are shown as average \pm standard deviation.

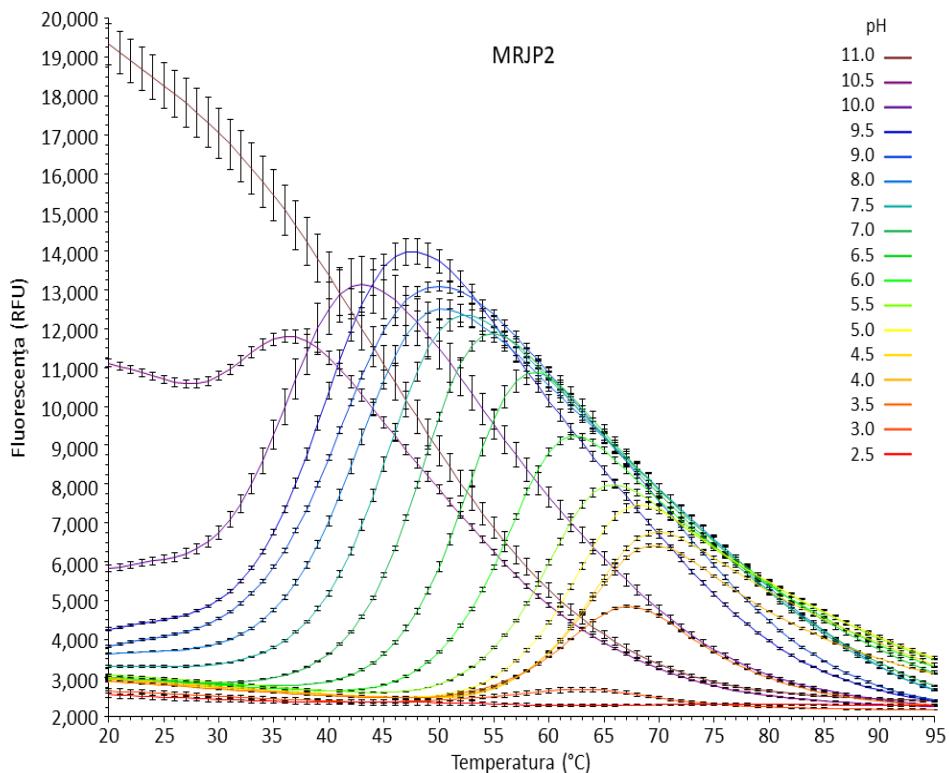


Fig. 20. Curbele de denaturare termică a MRJP2 dintr-o probă de lăptișor de matcă obținute cu ajutorul metodei Differential Scanning Fluorimetry. Analiza s-a făcut în cvadruplicat la o concentrație a proteinelor de $2 \mu\text{M}$ și fluorofor SYPRO® Orange la o diluție de 1:1000 în soluții tampon de diferite valori ale pH-ului: $50 \text{ mM Na}_2\text{HPO}_4/\text{acid citric, pH } 2.5-8.0$ sau $50 \text{ mM Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3, \text{pH } 9.0-11.0$. Rezultatele sunt exprimate ca medie \pm deviația standard.

Fig. 20. Thermal denaturation curves of MRJP2 from one sample of royal jelly determined using Differential Scanning Fluorimetry. The analysis was done using four replicates at a $2 \mu\text{M}$ protein concentration and 1:1000 dilution of SYPRO® Orange. The proteins were measured at different pH values: $50 \text{ mM Na}_2\text{HPO}_4/\text{acid citric, pH } 2.5-8.0$ sau $50 \text{ mM Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3, \text{pH } 9.0-11.0$. The results are shown as average \pm standard deviation.

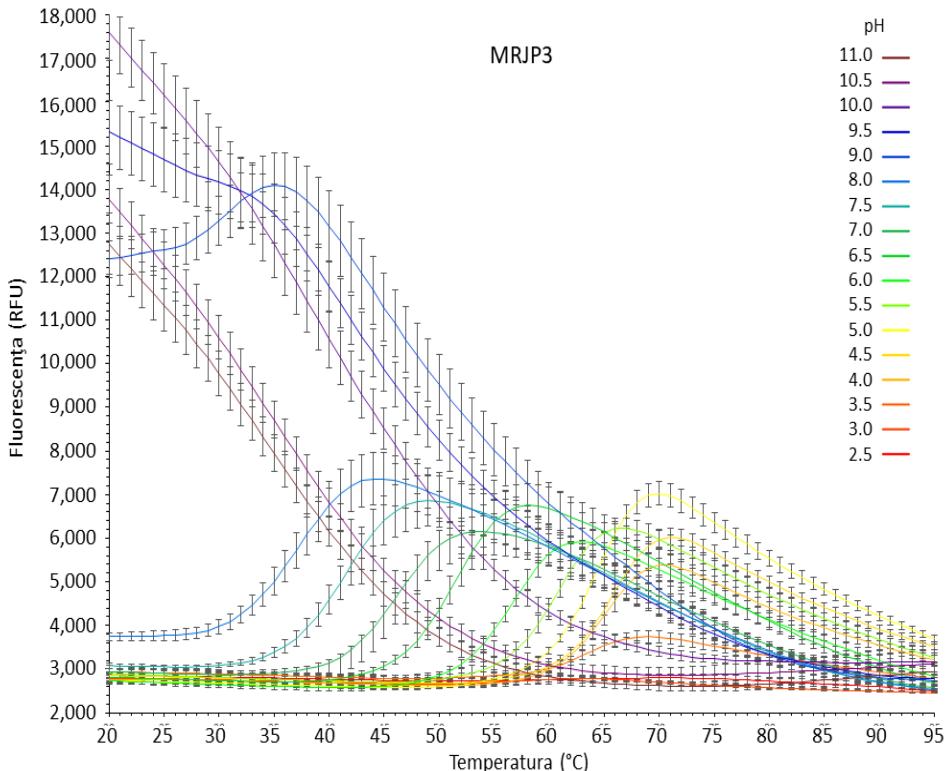


Fig. 21. Curbele de denaturare termică a MRJP3 dintr-o probă de lăptișor de matcă obținute cu ajutorul metodei Differential Scanning Fluorimetry. Analiza s-a făcut în cvadruplicat la o concentrație a proteinelor de 2 µM și fluorofoar SYPRO® Orange la o diluție de 1:1000 în soluții tampon de diferite valori ale pH-ului: 50 mM Na₂HPO₄/acid citric, pH 2.5-8.0 sau 50 mM Na₂CO₃/NaHCO₃, pH 9.0-11.0. Rezultatele sunt exprimate ca medie ± deviația standard.

Fig. 21. Thermal denaturation curves of MRJP3 from one sample of royal jelly determined using Differential Scanning Fluorimetry. The analysis was done using four replicates at a 2 µM protein concentration and 1:1000 dilution of SYPRO® Orange. The proteins were measured at different pH values: 50 mM Na₂HPO₄/acid citric, pH 2.5-8.0 sau 50 mM Na₂CO₃/NaHCO₃, pH 9.0-11.0. The results are shown as average ± standard deviation.

Din curbele de denaturare rezultă că la valori ale pH-ului de peste 9.0 proteinele MRJP1 monomeric, MRJP2 și MRJP3 au valori ale fluorescenței ridicate chiar și la temperaturi joase ceea ce indică faptul că părțile hidrofobe de pe molecula proteică sunt expuse (MRJP1 monomeric la pH ≥ 10.0, MRJP2 la pH ≥ 10.5, iar MRJP3 la pH ≥ 9.0), deci proteinele sunt deja denaturate (Fig. 19, Fig. 20, Fig. 21).

Nu toate proteinele vor avea puncte de tranziție pe curbele de denaturare termică, iar în acest caz nu se pot calcula temperaturile de denaturare (Tm).

MRJP1 monomeric, MRJP2 și MRJP3 au avut curbe de denaturare termică normale, însă MRJP1 în forma oligomerică a avut o fluorescență inițială foarte ridicată (15,000- 20,000 RFU) încă de la temperatura de 20°C la orice valoare a pH-ului

(Fig.18).

Acest fapt se datorează unor regiuni puternic hidrofobe pe structura acestei proteine de care se leagă fluoroforul. Deoarece MRJP1 în forma monomerică nu are astfel de anomalii pe curbele de denaturare termică, este posibil ca proprietatea hidrofobă să aparțină proteinei care determină formarea complexului oligomeric și anume apisimina care conține în jur de 40 % aminoacizi cu caracter hidrofob (BILIKOVA, 2002).

De asemenea hidrofobicitatea oligomerului poate fi explicată și de expunerea părților hidrofobe ale proteinei MRJP1 în urma asocierii cu apisimina.

Un alt motiv al hidrofobicității pot fi moleculele de 24-metilenoesterol care au fost recent descoperite ca fiind parte a complexului oligomeric (TIAN, 2018).

La pH 4.0-6.0 fluorescența oligomerului scade continuu până în jurul temperaturii de 60°C fiind urmată de o creștere la valori ale temperaturii între 67°C și 74°C, iar la pH 6.5-7.0 fluorescența oligomerului scade în mod constant fără inflexiuni (Fig.18).

Așadar, între pH 4.0 și pH 7.0 curbele de denaturare termică ale oligomerului au puncte de tranziție care apar în intervalul de pH în care complexul oligomeric suferă transformările majore, de la structuri mici oligomerice (pH 7.0), la structuri prefibrilare (pH 5.0), până la structura fibrilară la pH-ul natural al lăptișorului de matcă în jur de valoarea 4.0 (BUTTSTEDT, 2018).

Acstea tranziții observate pe curbele de denaturare pot fi explicate de disocierea treptată a complexului oligomeric, domeniile oligomerului denaturându-se independent.

Așadar, temperatura de denaturare (T_m) a putut fi calculată din curbele de denaturare termică doar pentru MRJP1 monomeric, MRJP2 și MRJP3 (Fig. 19, Fig. 20, Fig. 21).

Proteinele care au valoarea T_m ridicată au de asemenea stabilitate ridicată față de denaturarea termică, deci o structură a moleculei mai ordonată (ERICSSON, 2006).

Proteinele testate au stabilitate termică maximă fie la pH 4.0 (MRJP1 monomeric: $59.3 \pm 0.5^\circ\text{C}$), fie la pH 4.5 (MRJP2: $63.6 \pm 1.3^\circ\text{C}$; MRJP3: $64.8 \pm 0.4^\circ\text{C}$), valori ale pH-ului apropiate de pH-ul lăptișorului de matcă (Fig. 22, Fig. 23, Fig. 24).

Toate proteinele testate au fost mai stabile termic la pH 4.0 în comparație cu pH 7.0, diferența ΔT_m fiind între 14.3 și 18.6°C.

Deoarece rezultatele obținute nu au fost distribuite normal (Anexe: Fig.4) și pentru că a fost necesară compararea a mai mult de două grupuri independente de probe, analiza statistică s-a efectuat cu testul non-parametric Kruskal-Wallis ANOVA.

Unele valori ale T_m lipseau (Anexe: Tabelul 6), motiv pentru care aceste valori au fost excluse, iar analiza statistică a fost realizată în intervalul de pH 3.5-8.0.

Rezultatele testului au arătat că toate proteinele testate au stabilitate mai mare la pH 4.0 în comparație cu pH 7.0 (Kruskal-Wallis test, $n = 360$, $H = 351$, $P <$

0.001, MRJP1 monomer: $P = 0.016$, MRJP2: $P = 0.004$, MRJP3: $P < 0.001$), deci aceste proteine aparțin grupului restrâns de proteine care au stabilitate maximă la $\text{pH} \leq 4.5$ (TALLEY, 2010).

De asemenea, se poate constata că toate proteinele testate au în intervalul lor de pH natural (pH 4.0-7.0) valori ale temperaturii de denaturare termică T_m mai mari decât temperatura maximă de 35°C care poate fi înregistrată în stupul albinelor, prin urmare proteinele nu vor fi denaturate termic când în mediul înconjurător temperatura este mai ridicată (Fig. 22, Fig. 23, Fig. 24).

Acest studiu a permis evaluarea efectului pH-ului asupra cineticii de denaturare a proteinelor MRJPs.

Rezultatele experimentului au arătat că cele mai abundente proteine din lăptișorul de matcă au o stabilitate ridicată în mediu acid, cu stabilitate maximă la pH 4.0 (valoarea de pH a lăptișorului) în comparație cu pH de 7.0 ($\Delta T_m = 14.2 - 18.6^\circ\text{C}$), proteinile fiind susceptibile denaturării în mediu bazic.

Aceste rezultate corespund cu rezultatele simulării *in vitro* a digestiei umane asupra proteinelor MRJPs care au avut o stabilitate ridicată față de acțiunea pepsinei în mediul acid, proteinele MRJPs fiind labile în mediu bazic, implicit fiind mai ușor degradate de enzimele intestinale (Capitolul 5 al tezei).

De asemenea, LAZAREVSKA (2015) a demonstrat cu ajutorul metodei ATR-IR că denaturarea proteinelor MRJPs din lăptișorul de matcă crud începe la temperatura de 30°C , fiind accelerată la $65-70^\circ\text{C}$, aceste temperaturi fiind în acord cu cele observate pe curbele de denaturare termică obținute cu ajutorul metodei Thermofluor (Fig. 22, Fig. 23, Fig. 24).

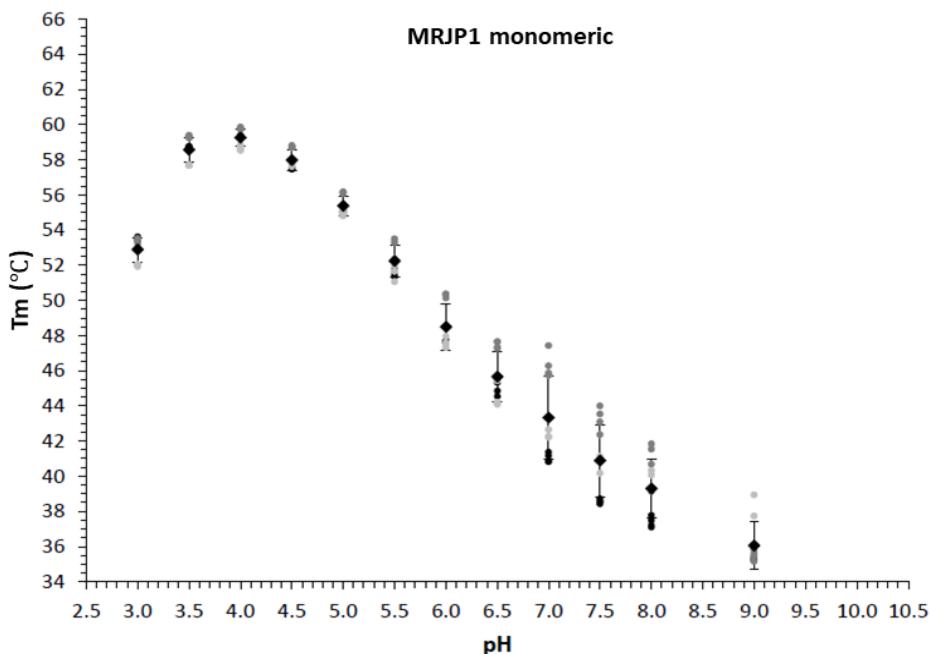


Fig. 22. Temperatura de denaturare termică (Tm) la diferite valori de pH a MRJP1 monomeric din lăptișorul de matcă obținute cu ajutorul metodei Differential Scanning Fluorimetry. Analiza s-a făcut la o concentrație a proteinelor de $2 \mu\text{M}$ și fluorofor SYPRO® Orange la o diluție de 1:1000 în soluții tampon de diferite valori ale pH-ului: 50 mM Na_2HPO_4 /acid citric, pH 2.5-8.0 sau 50 mM $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$, pH 9.0-11.0. Proteinele au fost purificate din trei probe diferite de lăptișor de matcă: cercuri negre, LM1; cercuri gri închis, LM2, cercuri gri deschis, LM3. Punctele în formă de diamant indică media valorilor obținute de la cele trei probe de lăptișor \pm deviația standard.

Fig. 22. Transition midpoints (Tm) of MRJP1 monomeric from royal jelly at different pH values as determined from the Differential Scanning Fluorimetry curves. The analysis was done at $2 \mu\text{M}$ protein concentration and 1:1000 dilution of SYPRO® Orange. The proteins were measured at different pH values: 50 mM Na_2HPO_4 /acid citric, pH 2.5-8.0 sau 50 mM $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$, pH 9.0-11.0. The proteins were purified from three different samples of royal jelly: black circle, LM1; dark grey circle, LM2; light grey circle, LM3. The diamonds represent the average \pm standard deviation of the values obtained from three different samples of royal jelly.

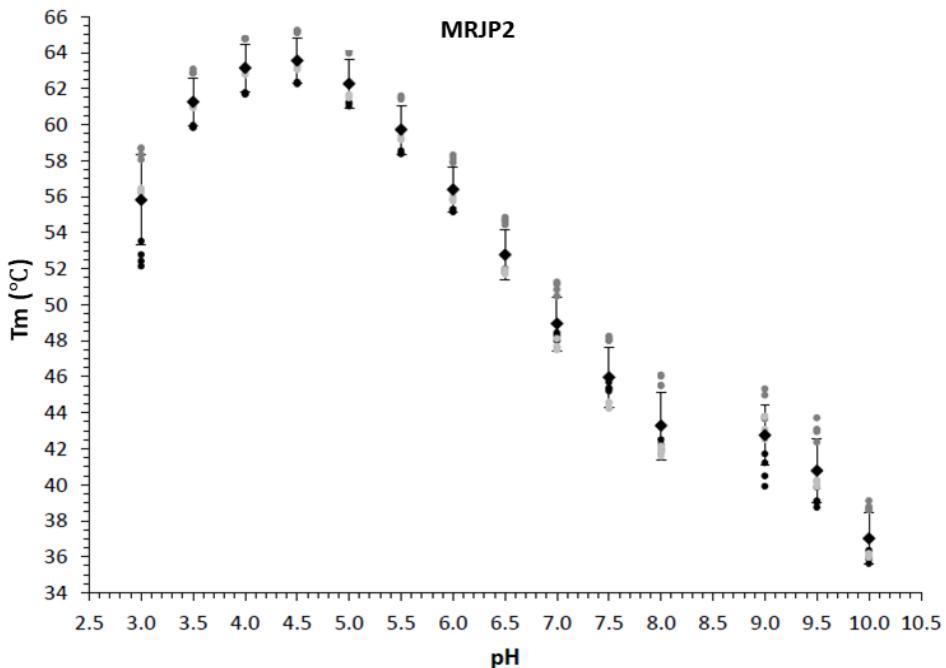


Fig. 23. Temperatura de denaturare termică (Tm) la diferite valori de pH a MRJP2 din lăptișorul de matcă obținute cu ajutorul metodei Differential Scanning Fluorimetry. Analiza s-a făcut la o concentrație a proteinelor de 2 μ M și fluorofor SYPRO® Orange la o diluție de 1:1000 în soluții tampon de diferite valori ale pH-ului: 50 mM Na₂HPO₄/acid citric, pH 2.5-8.0 sau 50 mM Na₂CO₃/NaHCO₃, pH 9.0-11.0. Proteinele au fost purificate din trei probe diferite de lăptișor de matcă: cercuri negre, LM1; cercuri gri închis, LM2, cercuri gri deschis, LM3. Punctele în formă de diamant indică media valorilor obținute de la cele trei probe de lăptișor \pm deviația standard.

Fig. 23. Transition midpoints (Tm) of MRJP2 from royal jelly at different pH values as determined from the Differential Scanning Fluorimetry curves. The analysis was done at 2 μ M protein concentration and 1:1000 dilution of SYPRO® Orange. The proteins were measured at different pH values: 50 mM Na₂HPO₄/acid citric, pH 2.5-8.0 sau 50 mM Na₂CO₃/NaHCO₃, pH 9.0-11.0. The proteins were purified from three different samples of royal jelly: black circle, LM1; dark grey circle, LM2; light grey circle, LM3. The diamonds represent the average \pm standard deviation of the values obtained from three different samples of royal jelly.

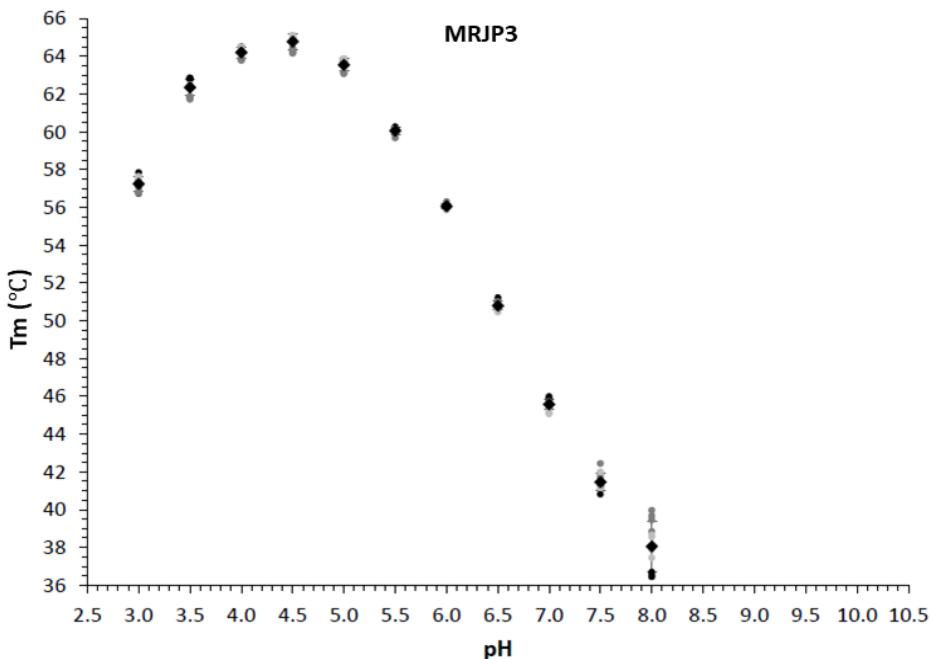


Fig. 24. Temperatura de denaturare termică (Tm) la diferite valori de pH a MRJP3 din lăptișorul de matcă obținute cu ajutorul metodei Differential Scanning Fluorimetry. Analiza s-a făcut la o concentrație a proteinelor de $2 \mu\text{M}$ și fluorofor SYPRO® Orange la o diluție de 1:1000 în soluții tampon de diferite valori ale pH-ului: $50 \text{ mM Na}_2\text{HPO}_4/\text{acid citric, pH } 2.5-8.0$ sau $50 \text{ mM Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3, \text{pH } 9.0-11.0$. Proteinele au fost purificate din trei probe diferite de lăptișor de matcă: cercuri negre, LM1; cercuri gri închis, LM2, cercuri gri deschis, LM3. Punctele în formă de diamant indică media valorilor obținute de la cele trei probe de lăptișor \pm deviația standard.

Fig. 24. Transition midpoints (Tm) of MRJP3 from royal jelly at different pH values as determined from the Differential Scanning Fluorimetry curves. The analysis was done at $2 \mu\text{M}$ protein concentration and 1:1000 dilution of SYPRO® Orange. The proteins were measured at different pH values: $50 \text{ mM Na}_2\text{HPO}_4/\text{acid citric, pH } 2.5-8.0$ sau $50 \text{ mM Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3, \text{pH } 9.0-11.0$. The proteins were purified from three different samples of royal jelly: black circle, LM1; dark grey circle, LM2; light grey circle, LM3. The diamonds represent the average \pm standard deviation of the values obtained from three different samples of royal jelly.

7. Concluzii și recomandări

7. Conclusions and recommendations

7.1. Concluzii privind obținerea proteinelor majoritare individuale și pure din lăptișorul de matcă

7.1. Conclusions regarding the purification of the most abundant proteins from royal jelly

Deși rolul nutrițional al proteinelor din lăptișorul de matcă este recunoscut, acestea fiind bogate în azot ușor asimilabil precum și în aminaocizi esențiali, faptul că aceste proteine se găsesc în diferite produse apicole și regiuni ale organismului albinei sugerează că aceste proteine au mai multe funcții pe lângă cea nutrițională.

Pentru a înțelege aceste funcții sunt necesare studii care să se focuseze pe caracterizarea biochimică a proteinelor.

Pentru a realiza acest deziderat este necesară purificarea proteinelor în condiții apropiate celor naturale.

Așadar, cele mai abundente proteine din lăptișorul de matcă, MRJP1, MRJP2 și MRJP3 au fost purificate cu ajutorul unui protocol simplu în numai două etape prin metode cromatografice cu schimbători de ioni și de interacțiuni hidrofobe.

Proteina MRJP1 a fost purificată atât în forma oligomerică cât și în forma monomerică, ambele forme fiind studiate mai departe.

Faptul că proteina a putut fi purificată ca și complex oligomeric înseamnă că pentru purificare s-au folosit condiții care au păstrat proprietățile necesare oligomerizării intace obținându-se o proteină în stare nativă.

Acest lucru este important deoarece pentru a determina activitatea unei proteine este necesar ca proteina să fie în conformația ei nativă.

Abilitatea de a forma oligomeri a MRJP1 poate fi esențială din punct de vedere biologic luând în considerare faptul că funcțiile anumitor proteine sunt dependente de forma monomerică sau oligomerică a acestora.

Purificarea proteinelor MRJPs din probe diferite de lăptișor de matcă este reproductibilă.

De asemenea, protocolul de purificare chromatografică este optim pentru separarea complexului proteic al proteinei MRJP1 din lăptișorul de matcă.

7.2. Concluzii privind stabilitatea proteinelor majoritare din lăptișorul de matcă în timpul simulării *in vitro* a digestiei umane

7.2. Conclusions regarding the stability of the most abundant proteins from royal jelly during *in vitro* human digestion simulation

Din acest experiment a reieșit că proteinele MRJP1, MRJP2 și MRJP3 sunt în general stabile în mediul acid și instabile în mediu alcalin.

La nivel gastric, aceste proteine au rezistență diferită față de scindarea sub acțiunea pepsinei din stomac, proteina MRJP2 având stabilitatea cea mai ridicată, urmată de MRJP3 și MRJP1 (Fig. 20).

La nivel intestinal toate proteinele MRJPs în stare nativă și produșii lor de digestie sunt degradați în mai puțin de o oră sub acțiunea proteazelor, MRJP2 având din nou stabilitatea cea mai ridicată (40 de minute).

În concluzie, aceste proteine pot ajunge în starea lor nativă în intestinul subțire uman, însă trebuie asimilate rapid pentru a avea un efect benefic sănătății omului.

Probabilitatea ca aceste proteine să ajungă în starea lor nativă în intestin este crescută în situația în care lăptișorul de matcă este consumat pe stomacul gol, trecerea din stomac în intestine fiind în acest caz de câteva secunde.

În plus, faptul că proteinele MRJP2 și MRJP3 sunt scindate de pepsină începând cu capetele lor N- și C- terminale dovedește accesibilitate la solvent a acestor capete ale lanțurilor polipeptidice la pH acid. Fragmentele de digestie care rezultă (de 44 kDa) au fost rezistente la scindarea de către pepsină, iar această stabilitate dezvăluie existența unui centru al moleculei proteinelor compact, bine împachetat în mediul acid (pH 2.0).

MRJP3 se prezintă sub formă de izoforme de diferite mase moleculare datorate unei regiuni repetitive în lanțul polipeptidic la capătul C - terminal. Faptul că aceste izoforme diferite au fost scindate de pepsină într-un același fragment de digestie de 44 kDa a dovedit încă o dată prezența acestor regiuni repetitive. Capetele C - terminale scindate au fost identificate ca fragmente de 19 kDa, respectiv 24 kDa.

Un rezultat remarcabil a fost stabilitatea proteinei MRJP2 în etapa gastrică. Proteina MRJP2 în stare nativă a fost detectată pe tot parcursul simulării digestiei la nivel gastric. De asemenea, fragmentul de digestie al MRJP2 (de 44 kDa) care s-a format pe parcurs în prezența pepsinei a fost de asemenea stabil până la sfârșitul experimentului (24 de ore).

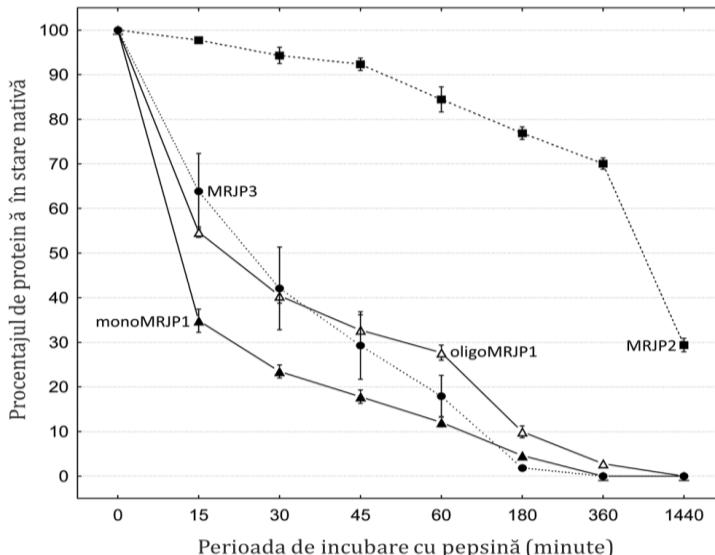


Fig. 20. Simularea *in vitro* a digestiei gastrice a proteinelor majoritare din lăptișorul de matcă. Rezultatele sunt exprimate ca procentaj de proteină în stare nativă la diferite momente ale digestiei (medie ± eroarea standard). Proteina MRJP1 în stare nativă, forma oligomerică (triunghiuri goale) și forma monomerică (triunghiuri pline); Proteina MRJP2 în stare nativă, pătrate pline; Proteina MRJP3 în stare nativă, cercuri pline.

Fig. 20. The most abundant protein from royal jelly during *in vitro* simulation of gastric digestion. The results are shown as percentage of native protein still detected at different time points of digestion (average ± standard error). MRJP1 in its native form is indicated by empty triangles for the oligomeric form and by full triangles for the monomeric form; MRJP2 in its native form is indicated by full squares; MRJP3 in its native form is indicated by full circles.

7.3. Concluzii privind influența pH-ului asupra stabilității proteinelor purificate din lăptișorul de matcă

7.3. Conclusions regarding the influence of pH on the stability of purified proteins from royal jelly

Stabilitatea moleculelor proteice este de interes pentru industria biotehnologilor, farmaceutică și alimentară, precum și pentru cercetători.

Temperatura de denaturare termică (T_m) este corelată cu stabilitatea conformației unei proteine, iar de conformație depinde funcția biologică.

Valorea pH-ului este un parametru care influențează stabilitatea proteinei, implicit funcția și activitatea acesteia, fiind crucială să înțelegi cât mai mult posibil referitor la acest subiect.

Stabilitatea conformatională poate fi studiată cu diferite metode precum dicroism circular, FTIR (Fourier-transform infrared spectroscopy) sau spectroscopie

Raman, însă aceste metode sunt complexe și necesită o cantitate importantă de probă.

Aceste impiedică pot fi surmontate prin folosirea metodei Thermofluor.

În cadrul acestui studiu a fost dezvoltat un protocol bazat pe această metodă simplă și sensibilă care a fost folosit pentru a caracteriza cele mai abundente proteine purificate din lăptișorul de matcă în ceea ce privește stabilitatea acestora la diferite valori ale pH-ului.

Rezultatele experimentului au arătat că proteinele MRJP1 în forma monomerică, MRJP2 și MRJP3 sunt mai stabile în mediul acid (pH 4.0) în comparație cu pH 7.0 (diferența ΔT_m fiind de 14.3-18.6°C).

Proteinele au avut pH optim la valoarea 4.0 (MRJP1 monomeric), respectiv 4.5 (MRJP2 și MRJP3), valori apropriate de pH-ul lăptișorului de matcă din care au fost purificate.

Toate proteinele testate au avut în intervalul de pH 4.0-7.0, adică în intervalul lor de pH natural, temperaturi de denaturare T_m de peste 43°C, ceea ce denotă că aceste proteine nu vor fi denaturate la valori extreme ale temperaturii mediului înconjurător (Tabelul 3).

Tabelul 3. Temperaturile de denaturare T_m (°C) ale proteinelor MRJP1 monomeric, MRJP2 și MRJP3 purificate din trei probe diferite de lăptișor de matcă. Valorile sunt exprimate ca medie \pm deviația standard. Stabilitatea maximă a fiecărei proteine este indicată de valoarea cea mai ridicată a T_m care este boldată.

Table 3. Denaturing temperatures T_m (°C) of proteins MRJP1 monomeric, MRJP2 and MRJP3 purified from three different samples of royal jelly. The values are represented as mean \pm standard deviation. The maximum stability is indicated by the highest value of T_m which is bolded.

pH	MRJP1 monomeric	MRJP2	MRJP3
3.5	58.6 \pm 0.7	61.3 \pm 1.3	62.4 \pm 0.4
4.0	59.3 \pm 0.5	63.2 \pm 1.3	64.2 \pm 0.3
4.5	58.0 \pm 0.6	63.6 \pm 1.3	64.8 \pm 0.4
5.0	55.4 \pm 0.6	62.3 \pm 1.3	63.5 \pm 0.3
5.5	52.2 \pm 0.9	59.7 \pm 1.4	60.1 \pm 0.2
6.0	48.5 \pm 1.3	56.4 \pm 1.3	56.1 \pm 0.1
6.5	45.7 \pm 1.4	52.8 \pm 1.4	50.8 \pm 0.2
7.0	43.3 \pm 2.4	48.9 \pm 1.5	45.6 \pm 0.3
7.5	40.9 \pm 2.1	46.0 \pm 1.6	41.5 \pm 0.4
8.0	39.3 \pm 1.7	43.3 \pm 1.9	38.1 \pm 1.3
9.0	36.1 \pm 1.3	42.8 \pm 1.7	denaturare
9.5	denaturare	40.8 \pm 1.8	denaturare
10.0	denaturare	37.0 \pm 1.4	denaturare
10.5	denaturare	denaturare	denaturare
11.0	denaturare	denaturare	denaturare

7.4. Recomandări

7.4. Recommendations

7.4.1. Stabilitatea proteinelor este un factor crucial în producția lor, păstrarea, precum și testarea *in vivo* sau *ex vivo*.

Metoda Thermofluor dezvoltată pentru testarea stabilității proteinelor MRJPs la diferite valori de pH deschide calea spre analiza diversilor factori care pot stabiliza sau destabiliza aceste proteine (diferite soluții tampon, aditivi, interacțiuni cu liganzi etc).

Totuși temperatura de denaturare Tm nu a putut fi calculată în cazul complexului oligomeric format din MRJP1 și apisimină care a avut hidrofobicitate ridicată în toate condițiile de testare.

Așadar stabilitatea acestui complex ar putea fi testată cu o altă metodă cum ar fi discroismul circular, FTIR sau spectroscopia Raman, cantitatea de proteină nefiind un factor limitant în cazul oligomerului care se găsește din abundență în lăptișorul de matcă.

7.4.2. Lăptișorul de matcă este un produs valoros care își pierde proprietățile terapeutice pe parcursul păstrării motiv pentru care familia de proteine MRJPs este considerată un potențial indicator de prospețime datorită corelației dintre degradarea acestor compuși de-a lungul păstrării și condițiile de păstrare (SHEN, 2015).

Proteinile MRJPs ar putea fi folosite ca parametri de calitate. Metode corespunzătoare pentru a determina prospețimea lăptișorului de matcă ar putea fi stabilite astfel încât să se împiedice intrarea produselor de calitate inferioară pe piață.

7.4.3. Biodisponibilitatea unui nutrient necesită îndeplinirea a trei condiții: bioaccesibilitate, transport la nivel intestinal și metabolizare.

Cu ajutorul simulării *in vitro* a digestiei umane am demonstrat condiția bioaccesibilității celor mai abundente proteine din lăptișorul de matcă.

Dacă proteinele majoritare din lăptișorul de matcă pot fi transportate în sistemul circulator unde să aibă efecte benefice asupra sănătății omului necesită studii cu ajutorul unor sisteme model pentru testarea absorptiei la nivel intestinal precum celulele epiteliale Caco-2 (ARTURSSON, 1991).

Aceste viitoare studii ar putea demonstra celelalte două condiții ale biodisponibilității proteinelor MRJPs în stare nativă.

7.4.4. Produsii de digestie ai proteinelor MRJPs pot avea semnificație nutrițională și fiziologică cu potențiale aplicații pentru utilizarea lor în produse funcționale de promovare a sănătății consumatorului.

Eventualele peptide bioactive rezultate în urma proteolizei MRJPs pot avea efecte benefice asupra sănătății consumatorului precum acțiune antioxidantă, antihipertensivă, antibacteriană, și a.

8. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei

8. Originality and innovative contributions of the thesis

Cercetarea lăptișorului de matcă trebuie să ofere o evaluare cantitativă și calitativă a compușilor care fac acest produs atât de valoros.

Dintre toți acești compuși, proteinele reprezintă aproape 50 % din substanța uscată a lăptișorului de matcă, deci proteinele reprezintă o fracțiune majoritară în acest produs (SIMUTH, 2001).

Așadar, analiza proteinelor din lăptișorul de matcă este importantă pentru a contura proprietățile biologice ale lăptișorului de matcă.

Proteinele din familia MRJPs reprezintă până la 90 % din proteinele totale, dintre care cele mai abundente sunt proteinele MRJP1, MRJP2 și MRJP3 (SCHMITZOVA, 1998).

Deși studiul MRJPs a început acum mai bine de 40 de ani, informațiile referitoare la funcțiile biologice ale acestora sunt limitate. În cadrul acestui studiu, MRJP1, MRJP2 și MRJP3 au fost purificate pentru ca mai apoi să fie studiate folosind diferite metode biochimice.

Pentru a studia proteinele este necesar a le obține în stare nativă. Am reușit să dezvolt un protocol de purificare în stare nativă a celor mai abundente MRJPs din lăptișorul de matcă folosind cromatografia de schimb cationic la pH 4.0 (nivelul natural al pH-ului lăptișorului de matcă) și cromatografia de interacțiuni hidrofobe la pH 7.0.

În continuare, cu ajutorul unui experiment *in vitro* care a reprodus condițiile procesului digestiv uman la nivel gastro-intestinal a fost analizată stabilitatea proteinelor purificate față de acțiunea proteazelor.

Cu ajutorul acestei simulări *in vitro* am demonstrat bioaccesibilitatea proteinelor majoritare din lăptișorul de matcă, ceea ce înseamnă că aceste proteine au potențialul de a ajunge la nivelul intestinelor în corpul uman unde pot eventual exercita efecte biologice.

Structura moleculei proteice este rezultatul legăturilor chimice dintre aminoacizii care intră în componența proteinei, iar energiile acestor legături chimice sunt influențate de diversi factori, printre care și pH-ul.

Așadar, structura proteinei poate fi destabilizată prin modificarea pH-ului, iar destabilizarea structurii poate însemna pierderea funcțiilor biologice ale proteinei.

Cu ajutorul unei metode de fluorescentă a fost testată stabilitatea la diferite valori de pH ale celor mai abundente proteine din lăptișorul de matcă.

Complexul oligomeric dintre MRJP1 și apisimină a demonstrat o hidrofobicitate crescută în toate condițiile de testare, motiv pentru care temperatura de denaturare Tm nu a putut fi estimată pentru acest complex proteic.

Proteinele MRJP1 în forma monomerică, MRJP2 și MRJP3 au fost mult mai stabile la pH 4.0 față de pH 7.0 ($\Delta T_m = 14.3\text{-}18.6^\circ\text{C}$), având temperaturi de denaturare T_m la pH 4.0 cuprinse între 59.3°C și 64.2°C.

În condiții alcaline la valori de $\text{pH} \geq 9.0$ proteinele testate au tendință de destabilizare încă de la temperatura de numai 20°C.

BIBLIOGRAFIA REFERENCES

1. ALBERT, S., BHATTACHARYA, D., KLAUDINY, J., SCHMITZOVÁ, J., SIMÚTH, J., 1999a, The family of major royal jelly proteins and its evolution, *Journal of Molecular Evolution*, 2, 49, 290–297.
2. ALBERT, S., KLAUDINY, J., ŠIMÚTH, J., 1999b, Molecular characterization of MRJP3, highly polymorphic protein of honeybee (*Apis mellifera*) royal jelly, *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 5, 29, 427–434.
3. ARARSO, Z., MA, C., QI, Y., FENG, M., HAN, B., HU, H., MENG, L., LI, J., 2018, Proteome Comparisons between Hemolymph of Two Honeybee Strains (*Apis mellifera ligustica*) Reveal Divergent Molecular Basis in Driving Hemolymph Function and High Royal Jelly Secretion, *Journal of Proteome Research*, 1, 17, 402–419.
4. Aristotle's History of Animals: In Ten Books translated by Richard Cresswell, Johann Gottlob Schneider, publication date 1897, book V, chapter XIX, p. 128.
5. ARTIMO, P., JONNALAGEDDA, M., ARNOLD, K., BARATIN, D., CSARDI, G., DE CASTRO, E., DUVAUD, S., FLEGEL, V., FORTIER, A., GASTEIGER, E., HERNANDEZ, C., IOANNIDIS, V., KUZNETSOV, D., LIECHTI, R., MORETTI, S., MOSTAGUIR, K., REDASCHI, N., ROSSIER, G., XENARIOS, I., STOCKINGER, H., 2012, ExPASy: SIB bioinformatics resource portal, *Nucleic Acids Research*, 40, W597–603.
6. ARTURSSON, P.; KARLSSON, J., 1991, Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 175, 3, 880 - 885.
7. BARKER SA, FOSTER AB, LAMB DC, JACKMAN LM, 1959, Biological origin and configuration of 10-hydroxy-delta-2-decenoic acid, *Nature*, 184, 634–634.
8. BARUAH, M., QIN, W., FLORS, C., HOFKENS, J., VALLE, R. A. L., BELJONNE, D., AUWERAER, M. Van Der, BORGGRAEVE, W. M. De, 2006, Solvent and pH Dependent Fluorescent Properties of a Dimethylaminostyryl Borondipyrromethene Dye in Solution, *The Journal of Physical Chemistry A*, 110, 18, 5998–6009.
9. BIILIKOVA, K., HANES, J., NORDHOFF, E., SAENGER, W., KLAUDINY, J., ŠIMÚTH, J., 2002, Apisimin, a new serine-valine-rich peptide from honeybee (*Apis mellifera* L.) royal jelly: purification and molecular characterization, *FEBS Letters*, 528, 1-3, 125–129.
10. BIILIKOVA, K., KRISTOF KRAKOVA, T., YAMAGUCHI, K., YAMAGUCHI, Y., 2015, Major royal jelly proteins as markers of authenticity and quality of honey, *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, 4, 66, 259–267.
11. BIILIKOVA, K., MIRGORODSKAYA, E., BUKOVSKA, G., GOBOM, J., LEHRACH, H., SIMUTH, J., 2009, Towards functional proteomics of minority component of honeybee royal jelly: The effect of post-translational modifications on the antimicrobial activity of apalbumin2, *Proteomics*, 9, 2131–2138.
12. BISHOP, G. H., 1923, Body fluid of the honey bee larva, *Journal of Biological Chemistry*, 58, 543–565.
13. BLANK, S., BANTLEON, F. I., MCINTYRE, M., OLLERT, M., SPILLNER, E., 2012, The major royal jelly proteins 8 and 9 (Api m 11) are glycosylated components of *Apis mellifera* venom with allergenic potential beyond carbohydrate-based reactivity, *Clinical & Experimental Allergy*, 42, 976–985.

- 14.BLOM, N., GAMMELTOFT, S., BRUNAK, S., 1999, Sequence- and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites, *Journal of Molecular Biology*, 294, 5, 1351-1362.
- 15.BOGDANOV, S., 2011, Royal Jelly, Bee Brood: Composition, Health, Medicine: A Review. www.bee-hexagon.net
- 16.BORGSTRÖM, B.; DAHLQVIST, A.; LUNDH, G.; SJÖVALL, J., 1957, Studies of intestinal digestion and absorption in the human, *Journal of Clinical Investigation*, 36, 10, 1521 – 1536.
- 17.BROUWERS, E. V. M., 1982, Measurement of Hypopharyngeal Gland Activity in the Honeybee, *Journal of Apicultural Research*, 4, 21, 193–198.
- 18.BRUDZYNSKI, K., SJAARDA, C., 2015a, Honey Glycoproteins Containing Antimicrobial Peptides , Jelleins of the Major Royal Jelly Protein 1 , Are Responsible for the Cell Wall Lytic and Bactericidal Activities of Honey, *PLoS ONE*, 4, 10, e0120238.
- 19.BRUDZYNSKI, K., SJAARDA, C., LANNIGAN, R., 2015b, MRJP1-containing glycoproteins isolated from honey , a novel antibacterial drug candidate with broad spectrum activity against multi-drug resistant clinical isolates, *Frontiers in Microbiology*, 6, 711.
- 20.BURGESS, R.R., DEUTSCHER, M.P., 2009, Methods in enzymology-Guide to protein purification, *ediția a 2-a, vol. 463, Edit. Academic Press by Elsevier*.
- 21.BUTTSTEDT, A., MORITZ, R. F. A., ERLER, S., 2014, Origin and function of the major royal jelly proteins of the honey bee (*Apis mellifera*) as members of the yellow gene family, *Biololgical Reviews*, 89, 2, 255 - 269.
- 22.BUTTSTEDT, A., MUREŞAN, C.I., LILIE, H., HAUSE, G., IHLING, C.H., SCHULZE, S.-H., PIETZSCH, M., MORITZ, R.F.A., 2018, How honeybees defy gravity with royal jelly to raise queens, *Current Biology* 28, 1095-1100.
- 23.BUTTSTEDT, A.; IHLING, C. H.; PIETZSCH, M.; MORITZ, R. F. A., 2016, Royalactin is not a royal making of a queen, *Nature*, 537, E10 - E12.
- 24.CAILLARD, I., TOMÉ, D., 1995, Transport of β -lactoglobulin and α -lactalbumin in enterocyte-like Caco-2 cells, *Reproduction, nutrition, development*, 2, 35, 179–88.
- 25.CAPARICA-SANTOS, C., MARCUCCI, M.C., 2007, Quantitative determination of trans-10-Hydroxy-2-Decenoic Acid (10-HDA) in Brazilian royal jelly and commercial products containing royal jelly, *Journal of Apicultural Research*, 46, 149-153.
- 26.CHABANCE, B., MARTEAU, P., RAMBAUD, J. C., MIGLIORE-SAMOUR, D., BOYNARD, M., PERROTIN, P., GUILLET, R., JOLLES, P., FIAT, A. M., 1998, Casein peptide release and passage to the blood in humans during digestion of milk or yogurt, *Biochimie*, 80, 2, 155–65.
- 27.CHEN, C.S., CHEN, S.Y., 1995, Changes in protein-components and storage stability of royal jelly under various condiitons, *Food Chemistry*, 54, 195-200.
- 28.CHEVALLET, M., LUCHE, S., RABILLOUD, T., 2006, Silver staining of proteins in polyacrylamide gels, *Nature Protocols*, 1, 1852–1858.
- 29.CHUA, L. S., LEE, J. Y., CHAN, G. F., 2015, Characterization of the Proteins in Honey, *Analytical Letters*, 4, 48, 697–709.
- 30.CIULU, M., FLORIS, I., NURCHI, V. M., PANZANELLI, A., PILO, M. I., SPANO, N., SANNA, G., 2013, HPLC determination of pantothenic acid in royal jelly, *Analytical Methods*, 23, 5, 6682.
- 31.CRAILSHEIM, K., 1992. The flow of jelly within a honeybee colony, *Journal of Comparative Physiology*, 162, 681–689.
- 32.CRUZ, G. C. N., GARCIA, L., SILVA, A. J. ., BARBOSA, J. A. R. G., RICART, C. A. O., FREITAS, S. M., SOUSA, M. V., 2011, Calcium effect and pH-dependence on self-association and structural stability of the *Apis mellifera* major royal jelly protein, *Apidologie*, 42, 252–269.

- 33.DA SILVA, P. M., GAUCHE, C., GONZAGA, L. V., COSTA, A. C. O., FETT, R., 2016, Honey: Chemical composition, stability and authenticity, *Food Chemistry*, 196, 309–323.
- 34.DALGALARRONDO, M.; DUFOUR, E.; CHOBERT, J.-M.; BERTRAND-HARB, C.; HAERTLÉ, T., 1995, Proteolysis of β -lactoglobulin and β -casein by pepsin in ethanolic medi, *International Dairy Journal*, 5, 1 - 14.
- 35.DE GROOT, A. P., 1952, Amino acid requirements for growth of the honeybee (*Apis mellifica* L.), *Experientia*, 5, 8, 192–4.
- 36.DEMAUREX, N., 2002, pH homeostasis of cellular organelles, *News in Physiological Sciences*, 17, 1–5.
- 37.DESEYN, J., BILLEN, J., 2005, Age-dependent morphology and ultrastructure of the hypopharyngeal gland of *Apis mellifera* workers (Ymenoptera, Apidae), *Apidologie*, 36, 49–57.
- 38.DETIENNE, G.; DE HAES, W.; ERNST, U. R.; SCHOFFS, L.; TEMMERMAN, L., 2014, Royalactin extends lifespan of *Caenorhabditis elegans* through epidermal growth factor signalling, *Experimental Gerontology*, 60, 129–135.
- 39.DI GIROLAMO, F., D'AMATO, A., RIGHETTI, P. G., 2012, Assessment of the floral origin of honey via proteomic tools, *Journal of Proteomics*, 12, 75, 3688–3693.
- 40.DIXON, M.; WEBB, E. C., 1964, Chapters VI: Enzyme specificity - Pepsin. In Enzymes, 2nd ed., Academic Press Inc., New York, New York, p. 241.
- 41.DRAPEAU, M. D., ALBERT, S., KUCHARSKI, R., PRUSKO, C., MALESZKA, R., 2006, Evolution of the Yellow/Major Royal Jelly Protein family and the emergence of social behavior in honey bees, *Genome Research*, 16, 1385–1394.
- 42.ENGLANDER, M. T., AVINS, J. L., FLEISHER, R. C., LIU, B., EFFRAIM, P. R., WANG, J., SCHULTEN, K., LEYH, T. S., GONZALEZ, R. L., CORNISH, V. W., 2015, The ribosome can discriminate the chirality of amino acids within its peptidyl-transferase center, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 19, 112, 6038–6043.
- 43.ERICSSON, U. B., HALLBERG, B. M., DETITTA, G. T., DEKKER, N., NORDLUND, P., 2006, Thermofluor-based high-throughput stability optimization of proteins for structural studies, *Analytical Biochemistry*, 2, 357, 289–298.
- 44.FAN, P., HAN, B., FENG, M., FANG, Y., ZHANG, L., HU, H., HAO, Y., QI, Y., 2016, Functional and Proteomic Investigations Reveal Major Royal Jelly Protein 1 Associated with Anti-hypertension Activity in Mouse Vascular Smooth Muscle Cells, *Scientific Reports*, 6:30230, 1–13.
- 45.FENG, M., FANG, Y., HAN, B., XU, X., FAN, P., HAO, Y., QI, Y., HU, H., HUO, X., MENG, L., WU, B., LI, J., 2015, In-Depth N Glycosylation Reveals Species-Specific Modifications and Functions of the Royal Jelly Protein from Western (*Apis mellifera*) and Eastern Honeybees (*Apis cerana*), *Journal of Proteome Research*, 14, 5327–5340.
- 46.FENG, M., FANG, Y., LI, J., 2009, Proteomic analysis of honeybee worker (*Apis mellifera*) hypopharyngeal gland development, *BMC Genomics*, 10, 1–12.
- 47.FERIOLI, F., ARMAFORTE, E., AND CABONI, M.F., 2014, Comparison of the Lipid Content, Fatty Acid Profile and Sterol Composition in Local Italian and Commercial Royal Jelly Samples, *Journal of the American Oil Chemists Society*, 91, 875–884.
- 48.FONTANA, R., MENDES, M. A., DE SOUZA, B. M., KONNO, K., CÉSAR, L. M. M., MALASPINA, O., PALMA, M. S., 2004, Jelleines: A family of antimicrobial peptides from the Royal Jelly of honeybees (*Apis mellifera*), *Peptides*, 25, 919–928
- 49.FUENMAYOR B, C., ZULUAGA D, C., DÍAZ M, C., QUICAZÁN DE C, M., COSIO, M., MANNINO, S., 2014, Evaluation of the physicochemical and functional properties of Colombian bee pollen, *Revista MVZ Córdoba*, 19, 1, 4003–4014.

- 50.FUJIWARA, S., IMAI, J., FUJIWARA, M., YAESHIMA, T., KAWASHIMA, T., 1990, A Potent Antibacterial Protein in Royal Jelly, *Journal of Biological Chemistry*, 265, 19, 11333–11337.
- 51.FURUSAWA, T., RAKWAL, R., NAM, H. W., SHIBATO, J., AGRAWAL, G. K., KIM, Y. S., OGAWA, Y., YOSHIDA, Y., KOUZUMA, Y., MASUO, Y., YONEKURA, M., 2008, Comprehensive Royal Jelly (RJ) Proteomics Using One- and Two-Dimensional Proteomics Platforms Reveals Novel RJ Proteins and Potential Phospho / Glycoproteins, *Journal of Proteome Research*, 7, 3194–3229.
- 52.GALLAGHER, S.R., 1999, One-dimensional electrophoresis using nondenaturing conditions, *Current Protocols in Molecular Biology* 47 (II). Unit 10.2B.1-10.2B.11.
- 53.GARCIA, L., SARAIVA GARCIA, C. H., CALÁBRIA, L. K., COSTA NUNES DA CRUZ, G., SÁNCHEZ PUENTES, A., BÁO, S. N., FONTES, W., RICART, C. A. O., SALMEN ESPINDOLA, F., VALLE DE SOUSA, M., 2009, Proteomic Analysis of Honey Bee Brain upon Ontogenetic and Behavioral Development, *Journal of Proteome Research*, 3, 8, 1464–1473.
- 54.GARCIA-AMOEDO, L.H., ALMEIDA MURADIAN L.B., 2007, Physicochemical composition of pure and adultered royal jelly, *Química Nova*, 30, 2, 257-259.
- 55.GARDNER, M. L. G., 1988, Gastrointestinal absorption of intact proteins, *Annual Review of Nutrition*, 8, 329 - 350.
- 56.GASTEIGER E., HOOGLAND C., GATTIKER A., DUVAUD S., WILKINS M.R., APPEL R.D., BAIROCH A., 2005, Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server, *The Proteomics Protocols Handbook*, Humana Press, 571-607
- 57.GATES, B. N., 1914, The temperature of the bee colony, *Bulletin of the US Department of Agriculture* 96, 1 - 29.
- 58.GOETZE, O., STEINGOETTER, A., MENNE, D., VAN DER VOORT, I. R., KWIATEK, M. A., BOESIGER, P., WEISHAUPP, D., THUMSHIRN, M., FRIED, M., SCHWIZER, W., 2007, The effect of macronutrients on gastric volume responses and gastric emptying in humans: a magnetic resonance imaging study, *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 1, 292, G11–G17.
- 59.GUYTON, A. C.; HALL, J. E., 2006, Chapters 64 & 65: Secretory Functions of the Alimentary Tract & Digestion and Absorption in the Gastrointestinal Tract. In *Textbook of Medical Physiology*, 11th ed.; Elsevier Inc.: Philadelphia, Pennsylvania, p. 791 – 817.
- 60.GUERRA, A., ETIENNE-MESMIN, L., LIVRELLI, V., DENIS, S., BLANQUET-DIOT, S., ALRIC, M., 2012, Relevance and challenges in modeling human gastric and small intestinal digestion, *Trends in Biotechnology*, 30, 11, 591–600.
- 61.HALBERSTADT, K., 1970, A study on the ultrastructure and functional cycle of the pharyngeal glands of the honey bee (*Apis mellifica* L.), *Cytobiologie* 2, 341–358.
- 62.HAN, B., LI, C., ZHANG, L., FANG, Y., FENG, M., LI, J., 2011, Novel Royal Jelly Proteins Identified by Gel-Based and Gel-free Proteomics, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 10346–10355.
- 63.HANES, J., ŠIMUTH, J., 1992, Identification and partial characterization of the major royal jelly protein of the honey bee (*Apis mellifera* L.), *Journal of Apicultural Research*, 1, 31, 22–26.
- 64.HAYAKAWA, K., KATSUMATA, N., HIRANO, M., YOSHIKAWA, K., OGATA, T., TANAKA, T., NAGAMINE, T., 2008, Determination of biotin (vitamin H) by the high-performance affinity chromatography with a trypsin-treated avidin-bound column, *Journal of Chromatography*, 1–2, 869, 93–100.
- 65.HAYDAK, M. H., 1957, Changes with age in the appearance of some internal organs of the honey bee, *Bee World*, 38, 197-207

- 66.HAYDAK, M. H., 1970, Honey Bee Nutrition, *Annual Review of Entomology*, 1, 15, 143–156.
- 67.HELBING, S., LATTORFF, H. M. G., MORITZ, R. F. A., BUTTSTEDT, A., 2017, Comparative analyses of the major royal jelly protein gene cluster in three *Apis* species with long amplicon sequencing, *DNA Research*, 3, 24, 279–287.
- 68.HOFFMANN, I., 1960, Untersuchungen über die Herkunft von Komponenten des Königinnenfuttersaftes der Honigbienen, *Zeitschrift für Bienenforschung*, 5, 101 - 111.
- 69.HOJO, M., KAGAMI, T., SASAKI, T., NAKAMURA, J., SASAKI, M., 2010, Reduced expression of major royal jelly protein 1 gene in the mushroom bodies of worker honeybees with reduced learning ability, *Apidologie*, 41, 194–202.
- 70.HU, F., BÍLIKOVÁ, K., CASABIANCA, H., DANIELE, G., ESPINDOLA, S., FENG, M., GUAN, C., HAN, B., KRAKOVÁ, T. K., LI, J., LI, L., LI, X., ŠIMÚTH, J., WU, L., WU, Y., XUE, Y., YAMAGUCHI, K., ZENG, Z., ZHENG, H., BÍLIKOVÁ, K., CASABIANCA, H., DANIELE, G., ESPINDOLA, S., FENG, M., GUAN, C., HAN, B., KRAKOVÁ, T. K., LI, J., LI, L., LI, A., ŠIMÚTH, J., WU, L., WU, Y., XUE, X., XUE, Y., YAMAGUCHI, K., GUAN, C., HAN, B., KRIS, T., 2017, Standard methods for *Apis mellifera* royal jelly research, *Journal of Apicultural Research*.
- 71.HUANG, Z.-Y., OTIS, G. W., TEAL, P. E. A., 1989, Nature of brood signal activating the protein synthesis of hypopharyngeal gland in honey bees, *Apis mellifera* (Apidae : Hymenoptera), *Apidologie*, 6, 20, 455–464.
- 72.ISIDOROV, V. A., BAKIER, S., GRZECH, I., 2012, Gas chromatographic-mass spectrometric investigation of volatile and extractable compounds of crude royal jelly, *Journal of Chromatography B*, 885–886, 109–116.
- 73.ISO/DIS 12824 Draft International Standard. Royal jelly - Specifications. ISO/TC 34.
- 74.JUNG-HOFFMANN I., 1966, Die Determination von Königin und Arbeiterin der Honigbiene, *Z Bienenforsch* 8, 9, 296-322.
- 75.KAMAKURA, M., SAKAKI, T., 2006, A hypopharyngeal gland protein of the worker honeybee *Apis mellifera* L. enhances proliferation of primary-cultured rat hepatocytes and suppresses apoptosis in the absence of serum, *Protein Expression and Purification*, 45, 307–314.
- 76.KAMAKURA, M., SUENOBU, N., FUKUSHIMA, M., 2001a, Fifty-seven-kDa Protein in Royal Jelly Enhances Proliferation of Primary Cultured Rat Hepatocytes and Increases Albumin Production in the Absence of Serum, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 282, 865–874.
- 77.KAMAKURA, M., FUKUDA, T., FUKUSHIMA, M., YONEKURA, M., 2001b, Storage-dependent degradation of 57-kDa protein in royal jelly: a possible marker for freshness, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 65, 277-284.
- 78.KANELIS, D., TANANAKI, C., LIOLIOS, V., DIMOU, M., GORAS, G., RODOPOULOU, M. A., KARAZAFIRIS, E., THRASYVOULOU, A., 2015, A suggestion for royal jelly specifications, *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, 4, 66, 275–284.
- 79.KARAALI, A., MEYDANOĞLU, F., EKE, D., 1988, Studies on Composition, Freeze-Drying and Storage of Turkish Royal Jelly, *Journal of Apicultural Research*, 3, 27, 182–185.
- 80.KASHIMA, Y., KANEMATSU, S., ASAI, S., KUSADA, M., WATANABE, S., KAWASHIMA, T., NAKAMURA, T., SHIMADA, M., GOTO, T., NAGAOKA, S., 2014, Identification of a Novel Hypocholesterolemic Protein, Major Royal Jelly Protein 1 , Derived from Royal Jelly, *PLoS ONE*, 8, 9, e105073.
- 81.KIMURA, M., KIMURA, Y., TSUMURA, K., OKIHARA, K., SUGIMOTO, H., YAMADA, H., YONEKURA, M., 2003, 350-kDa royal jelly glycoprotein (Apisin), which stimulates proliferation of human monocytes, bears the β 1-3galactosylated N-glycan: analysis of the N-glycosylation site, *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 9, 67, 2055–2058.

- 82.KIMURA, Y., WASHINO, N., YONEKURA, M., 1995, N -Linked Sugar Chains of 350-kDa Royal Jelly Glycoprotein, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 3, 59, 507–509.
- 83.KLAUDINY, J., HANES, J., KULIFAJOVÁ, J., ALBERT, Š., ŠIMÚTH, J., 1994, Molecular cloning of two cDNAs from the head of the nurse honey bee (*Apis mellifera L.*) for coding related proteins of royal jelly, *Journal of Apicultural Research*, 2, 33, 105–111.
- 84.KNECHT, D., KAATZ, H. H., 1990, Patterns of larval food production by hypopharyngeal glands in adult worker honey bees, *Apidologie*, 21, 457–468.
- 85.KOHNO, K., OKAMOTO, I., SANO, O., ARAI, N., IWAKI, K., IKEDA, M., KURIMOTO, M., 2004, Royal Jelly Inhibits the Production of Proinflammatory Cytokines by Activated Macrophages, *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 1, 68, 138–145.
- 86.KUBO, T., SASAKI, M., NAKAMURA, J., SASAGAWA, H., OHASHI, K., TAKEUCHI, H., NATORI,S., 1996, Change in the Expression of Hypopharyngeal-Gland Proteins of the Worker Honeybees (*Apis mellifera L.*) with Age and / or Role, *Journal of Biochemistry*, 119, 291–295.
- 87.KUCHARSKI, R., MALESZKA, R., HAYWARD, D. C., BALL, E. E., 1998, A Royal Jelly Protein Is Expressed in a Subset of Kenyon Cells in the Mushroom Bodies of the Honey Bee Brain, *Naturwissenschaften*, 7, 85, 343–346.
- 88.LAEMMLI, U.K., 1970, Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4, *Nature* 227, 680–685.
- 89.LAZAREVSKA, S., & MAKRESKI, P., 2015, Insights into the infrared and raman spectra of fresh and lyophilized Royal Jelly and protein degradation IR spectroscopy study during heating, *Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering*, 34, 1, 87–93.
- 90.LERCKER, G., CABONI, M.F., VECCHI, M.A., SABATINI, A.G., NANETTI, A., 1992, Caratterizzazione dei principali costituenti della gelatina reale, *Apicoltura*, 8, 11–21.
- 91.LERCKER, G., CAPELLA, P., CONTE, L. S., RUINI, F., GIORDANI, G., 1981, Components of royal jelly: I. Identification of the organic acids, *Lipids*, 12, 16, 912–919.
- 92.LERCKER, G., CAPELLA, P., CONTE, L. S., RUINI, F., GIORDANI, G., 1982, Components of Royal Jelly II . The Lipid Fraction , Hydrocarbons and Sterols. *Journal of Apicultural Research*, 3, 21, 178–184.
- 93.LI, J., FENG, M., ZHANG, L., ZHANG, Z., PAN, Y., 2008, Proteomics analysis of major royal jelly protein changes under different storage conditions, *Journal of Proteome Research* 7, 3339–3353.
- 94.LIMING, W., JINHUI, Z., XIAOFENG, X., YI, L., JING, Z., 2009, Fast determination of 26 amino acids and their content changes in royal jelly during storage using ultra-performance liquid chromatography, *Journal of Food Composition and Analysis*, 3, 22, 242–249.
- 95.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 Agricultural and Food Chemistry*, 23, 56, 11447–11452.
- 96.MAJTAN, J., KOVACOVA, E., BILIKOVA, K., SIMUTH, J., 2006, The immunostimulatory effect of the recombinant apalubmin 1 – major honeybee royal jelly protein – on TNF a release, *International Immunopharmacology*, 2, 6, 269–278.
- 97.MARCIANI, L., GOWLAND, P. a, SPILLER, R. C., MANOJ, P., MOORE, R. J., YOUNG, P., FILLERY-TRAVIS, A. J., 2001, Effect of meal viscosity and nutrients on satiety, intragastric dilution, and emptying assessed by MRI, *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 6, 280, G1227–G1233.

- 98.MATSUI, T., YUKIYOSHI, A., DOI, S., SUGIMOTO, H., YAMADA, H., MATSUMOTO, K., 2002, Gastrointestinal enzyme production of bioactive peptides from royal jelly protein and their antihypertensive ability in SHR, *Journal of Nutritional Biochemistry*, 13, 2, 80-86.
- 99.MATYSIAK, J., HAJDUK, J., MAYER, F., HEBELER, R., KOKOT, Z. J., 2016, Hyphenated LC-MALDI-ToF/ToF and LC-ESI-QToF approach in proteomic characterization of honeybee venom, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 121, 69-76.
- 100.MAZZOLINI R.G., 1985, Adam Gottlob Schirach's Experiments on Bees. In: North J.D., Roche J.J. (eds) *The Light of Nature. International Archives of the History of Ideas*, vol 110. Springer, Dordrecht
- 101.MELAMPY, R.M., JONES, D.B., 1939, Chemical composition and vitamin content of royal jelly, *Experimental Biology and Medicine*, 41, 382-388.
- 102.METHENY, N. A., STEWART, B. J., SMITH, L., HUA YAN, DIEBOLD, M., CLOUSE, R. E., 1997, pH and Concentrations of Pepsin and Trypsin in Feeding Tube Aspirates as Predictors of Tube Placement, *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, 5, 21, 279-285.
- 103.MISHIMA, S., SUZUKI, K.M., ISOHAMA, Y., KURATSU, N., ARAKI, Y., INOUE, M., MIYATA, T., 2005 Royal jelly has estrogenic effects in vitro and in vivo, *Journal of Ethnopharmacology* 101, 215-220.
- 104.MORESCHI, E. C. P., ALMEIDA-MURADIAN, L. B., 2009, Vitamins B 1, B 2, B 6 and PP contents in royal jelly, *Rev Inst Adolfo Lutz*, 2, 68, 187-191.
- 105.MORIYAMA, T., ITO, A., OMOTE, S., MIURA, Y., TSUMOTO, H., 2015, Heat resistant characteristics of major royal jelly protein 1 (MRJP1) oligomer, *PLoS ONE*, 5, 10, 1-17.
- 106.MUDIE, D. M., MURRAY, K., HOAD, C. L., PRITCHARD, S. E., GARNETT, M. C., AMIDON, G. L., GOWLAND, P. A., SPILLER, R. C., AMIDON, G. E., MARCIANI, L., 2014, Quantification of Gastrointestinal Liquid Volumes and Distribution Following a 240 mL Dose of Water in the Fasted State, *Molecular Pharmaceutics*, 9, 11, 3039-3047.
- 107.MUREŞAN, C. I., SCHIERHORN, A., BUTTSTEDT, A., 2018, The Fate of Major Royal Jelly Proteins during Proteolytic Digestion in the Human Gastrointestinal Tract, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 16, 66, 4164-4170.
- 108.NEUHOFF, V., AROLD, N., TAUBE, D., EHRHARDT, W., 1988, Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250, *Electrophoresis* 9, 255-262.
- 109.NIESEN, F. H., BERGLUND, H., VEDADI, M., 2007, The use of differential scanning fluorimetry to detect ligand interactions that promote protein stability, *Nature Protocols*, 9, 2212-2221.
- 110.NIU, C.; LUO, H.; SHI, P.; HUANG, Y.; WANG, Y.; YANG, P.; YAO, B., 2016, N-Glycosylation Improves the Pepsin Resistance of Histidine Acid Phosphatase Phytases by Enhancing Their Stability at Acidic pHs and Reducing Pepsin's Accessibility to Its Cleavage Sites, *Applied and Environmental Microbiology*, 82, 1004 - 1014.
- 111.OHASHI, K., SAWATA, M., TAKEUCHI, H., NATORI, S., KUBO, T., 1996, Molecular Cloning of cDNA and Analysis of Expression of the Gene for α -Glucosidase from the Hypopharyngeal Gland of the Honeybee *Apis mellifera* L., *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2, 221, 380-385.
- 112.OHASHI, K., NATORI, S., KUBO, T., 1997, Change in the mode of gene expression of the hypopharyngeal gland cells with an age-dependent role change of the worker honeybee *Apis mellifera* L., *European Journal of Biochemistry*, 3, 249, 797-802.
- 113.OHASHI, K., NATORI, S., KUBO, T., 1999, Expression of amylase and glucose oxidase in the hypopharyngeal gland with an age-dependent role change of the worker honeybee (*Apis mellifera* L.), *European Journal of Biochemistry*, 1, 265, 127-133.

- 114.OKAMOTO, I., TANIGUCHI, Y., KUNIKATA, T., KOHNO, K., IWAKI, K., IKEDA, M., 2003, Major royal jelly protein 3 modulates immune responses in vitro and in vivo, *Life Sciences*, 16, 2029 - 2045.
- 115.PALMA, M. S., 1992, Composition of freshly harvested Brazilian royal jelly: Identification of carbohydrates from the sugar fraction, *Journal of Apicultural Research*, 1, 31, 42–44.
- 116.PANTOLIANO, M.W., PETRELLA, E.C., KWASNOSKI, J.D., LOBANOV, V.S., MYSLIK, J., GRAF, E., CARVER, T., ASELE, E., SPRINGER, B.A., LANE, P., SALEMME, F.R., 2001, High-density miniaturized thermal shift assays as a general strategy for drug discovery, *Journal of Biomolecular Screening*, 6, 429–440.
- 117.PATEL, N. G., HAYDAK, M. H., GOCHNAUER, T. A. 1960, Electrophoretic components of the proteins in honey bee larval food, *Nature*, 186, 633- 34
- 118.PAVEL, C. I.; MĂRGHITAS, L. A.; DEZMIREAN, D. S.; TOMOS, L. I.; BONTA, V.; SAPCALIU, A.; BUTTSTEDT, A., 2014, Comparison between local and commercial royal jelly - use of antioxidant activity and 10-hydroxy-2-decenoic acid as quality parameter, *Journal of Apicultural Research*, 53, 116 - 123.
- 119.PEIREN, N., VANROBAEYS, F., DE GRAAF, D. C., DEVREESE, B., VAN BEEUMEN, J., JACOBS, F. J., 2005, The protein composition of honeybee venom reconsidered by a proteomic approach, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1, 1752, 1–5.
- 120.POMMIE, C., LEVADOUX, S., SABATIER, R., LEFRANC, G., LEFRANC, M.-P., 2004, IMGT standardized criteria for statistical analysis of immunoglobulin V-REGION amino acid properties, *Journal of Molecular Recognition*, 2004, 17, 17–32.
- 121.PRESOTO, A.E.F., RIOS, M.D.G., DE ALMEIDA-MURADIAN, L.B., 2004, Simultaneous high performance liquid chromatographic analysis of vitamins B-1, B-2 and B-6 in royal jelly, *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 15, 136-139.
- 122.RAMADAN, M. F., AL-GHAMDI, A., 2012, Bioactive compounds and health-promoting properties of royal jelly: A review, *Journal of Functional Foods*, 1, 4, 39–52.
- 123.RAMANATHAN, A. N. K. G., NAIR, A. J., SUGUNAN, V. S., 2018, A review on Royal Jelly proteins and peptides, *Journal of Functional Foods*, 44, 255–264.
- 124.RANDOLT, K., GIMPLE, O., GEISSENDÖRFER, J., REINDERS, J., PRUSKO, C., MUELLER, M. J., ALBERT, S., TAUTZ, J., BEIER, H., 2008, Immune-related proteins induced in the hemolymph after aseptic and septic injury differ in honey bee worker larvae and adults, *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 4, 69, 155–167.
- 125.REMBOLD, H., 1965, Biologically active substances in royal jelly, *Vitamins and Hormones*, 23, 359-382.
- 126.ROBINSON, G. E., 1987, Regulation of honey bee age polyethism by juvenile hormone, *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 5, 20, 329–338.
- 127.ROMANELLI, A., MOGGIO, L., MONTELLA, C., CAMPIGLIA, P., IANNACCONE, M., CAPUANO, F., CAPPARELLI, R., 2011, Peptides from Royal Jelly : studies on the antimicrobial activity of jelleins , jelleins analogs and synergy with temporins, *Journal of Peptide Science*, 17, 348–352.
- 128.ROSMILAH, M., SHANAZ, M., PATEL, G., LOCK, J., RAHMAN, D., MASITA, A., NOORMALIN, A., 2008, Characterization of major allergens of royal jelly *Apis mellifera*, *Tropical Biomedicine*, 3, 25, 243–251.
- 129.SABATINI, A. G., MARCAZZAN, G. L., CABONI, M. F., BOGDANOV, S., ALMEIDA-MURADIAN, L. B., 2009, Quality and standardisation of Royal Jelly, *Journal of ApiProduct and ApiMedical Science*, 1, 1, 1–6.
- 130.SANDERSON, I. R.; WALKER, W. A., 1993, Uptake and Transport of Macromolecules by the Intestine: Possible Role in Clinical Disorders (an Update), *Gastroenterology*, 104, 622 - 639.

- 131.SANO, O., KUNIKATA, T., KOHNO, K., IWAKI, K., IKEDA, M., KURIMOTO, M., 2004, Characterization of Royal Jelly Proteins in both Africanized and European Honeybees (*Apis mellifera*) by Two-Dimensional Gel Electrophoresis, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 15-20.
- 132.SCARSELLI, R., DONADIO, E., GIUFFRIDA, M. G., FORTUNATO, D., CONTI, A., BALESTRERI, E., FELICIOLE, R., PINZAUTI, M., SABATINI, A. G., FELICIOLE, A., 2005, Towards royal jelly proteome, *Proteomics*, 5, 769-776.
- 133.SCHMITZOVÁ, J., KLAUDINY, J., ALBERT, Š., SCHRÖDER, W., SCHRECKENGOST, W., HANES, J., JÚDOVÁ, J., ŠIMÚTH, J., 1998, A family of major royal jelly proteins of the honeybee *Apis mellifera* L., *Cellular and Molecular Life Sciences*, 9, 54, 1020-1030.
- 134.SESTA, G., ODDO, L. P., NISI, F., RICCI, L., 2006, Effects of artificial sugar feeding on sugar composition of royal jelly , *Apicta*, 41, 60-70.
- 135.SHEN, L., ZHANG, W., JIN, F., ZHANG, L., CHEN, Z., LIU, L., PARSELL, L., LAI, C.-Q., LI, D., 2010, Expression of Recombinant AccMRJP1 Protein from Royal Jelly of Chinese Honeybee in Pichia pastoris and Its Proliferation Activity in an Insect Cell Line, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 9190-9197.
- 136.SHEN, L.-R., WANG, Y.-R., ZHAI, L., ZHOU, W.-X., TAN, L.-L., LI, M.-L., LIU, D.-D., XIAO, F., 2015, Determination of royal jelly freshness by ELISA with a highly specific anti-apalbumin 1, major royal jelly protein 1 antibody, *Journal of Zhejiang University-Science B (Biomedicine & Biotechnology)*, 2, 16, 155-166.
- 137.SIMUTH, J., 2001, Some properties of the main protein of honeybee (*Apis mellifera*) royal jelly, *Apidologie*, 32, 69-80.
- 138.SIMUTH, J., BILIKOVA, K., KOVÁČOVÁ, E., KUZMOVÁ, Z., SCHRODER, W., 2004, Immunochemical Approach to Detection of Adulteration in Honey: Physiologically Active Royal Jelly Protein Stimulating TNF- α Release Is a Regular Component of Honey, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 8, 52, 2154-2158.
- 139.SNODGRASS, R. E., 1984, Anatomy of the honey bee. *Cornell University Press*.
- 140.STOCKER, A., SCHRAMEL, P., KETTRUP, A., BENGSCH, E., 2005, Trace and mineral elements in royal jelly and homeostatic effects, *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 19, 183-189.
- 141.SU, S., ALBERT, S., CHEN, S., ZHONG, B., 2005, Molecular cloning and analysis of four cDNAs from the heads of *Apis cerana* nurse honeybees coding for major royal jelly proteins, *Apidologie*, 36, 389-401.
- 142.TALLEY, K., ALEXOV, E., 2010, On the pH-optimum of activity and stability of proteins, *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 12, 78, 2699-2706.
- 143.TAMURA, S., AMANO, S., KONO, T., KONDOH, J., YAMAGUCHI, K., KOBAYASHI, S., AYABE, T., MORIYAMA, T., 2009, Molecular characteristics and physiological functions of major royal jelly protein 1 oligomer, *Proteomics*, 24, 9, 5534-5543.
- 144.TIAN, W., LI, M., GUO, H., PENG, W., XUE, X., HU, Y., LIU, Y., ZHAO, Y., FANG, X., WANG, K., LI, X., TONG, Y., CONLON, M. A., WU, W., REN, F., CHEN, Z., 2018, Architecture of the native major royal jelly protein 1 oligomer, *Nature Communications*, 1, 9, 3373.
- 145.UENO, T., TAKEUCHI, H., KAWASAKI, K., KUBO, T., 2015, Changes in the gene expression profiles of the hypopharyngeal gland of worker honeybees in association with worker behavior and hormonal factors, *PLoS ONE*, 10, 6, e0130206.
- 146.VEZETEU, T. V.; BOBIS, O.; MORITZ, R. F. A.; BUTTSTEDT, A., 2017, Food to some, poison to others - honeybee royal jelly and its growth inhibiting effect on European Foulbrood bacteria, *MicrobiologyOpen*, 6, e00397.

- 147.VITTEK, J., SLOMIANY, B. L.. 1984, Testosterone in royal jelly, *Experientia*, *1*, 40, 104–106.
- 148.VON PLANTA, A., 1888, Ueber den Futtersaft der Bienen, *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie*, *12*, 327–354.
- 149.WATANABE, K., SHINMOTO, H., KOBORI, M., TSUSHIDA, T., SHINOHARA, K., KANAEDA, J., YONEKURA, M., 1998, Stimulation of cell growth in the U-937 human myeloid cell line by honey royal jelly protein. *Cytotechnology*, *26*, 23–27.
- 150.WATANABE, K., SHINMOTO, H., KOBORIZ, M., TSUSHIDA, T., SHINOHARA, K., KANAEDA, J., YONEKURA, M., 1996, Growth stimulation with honey royal jelly DIII protein of human lymphocytic cell lines in a serum-free medium, *Biotechnology Techniques*, *12*, 10, 959–962.
- 151.WEI, W., WEI, M., KANG, X., DENG, H., LU, Z., 2009, A novel method developed for acetylcholine detection in royal jelly by using capillary electrophoresis coupled with electrogenerated chemiluminescence based on a simple reaction, *ELECTROPHORESIS*, *11*, 30, 1949–1952.
- 152.WEITSCHIES, W.; KOSCH, O.; MÖNNIKES, H.; TRAHMS, L., 2005, Magnetic Marker Monitoring: An application of biomagnetic measurement instrumentation and principles for the determination of the gastrointestinal behavior of magnetically marked solid dosage forms, *Advanced Drug Delivery Reviews.*, *57*, 8, 1210 - 1222.
- 153.WINSTON, M., 1987, The Biology of the Honey Bee, *Harvard Univ Press: Cambridge, MA*.
- 154.WICKHAM, M., FAULKS, R., MILLS, C., 2009, In vitro digestion methods for assessing the effect of food structure on allergen breakdown, *Molecular Nutrition and Food Research*, *53*, 8, 952–958.
- 155.WON, S. R., LI, C. Y., KIM, J. W., RHEE, H. I., 2009, Immunological characterization of honey major protein and its application, *Food Chemistry*, *4*, 113, 1334–1338.
- 156.WONGCHAI, V., RATANAVALACHAI, T., 2002, Seasonal variation of chemical composition of royal jelly produced in Thailand, *Thammasat International Journal of Scientific Technology*, *2*, 7, 1–8.
- 157.WU, L.M., CHEN, L.Z., SELVARAJ, J.N., WEI, Y., WANG, Y., LI, Y., ZHAO, J., XUE, X.F., 2015, Identification of the distribution of adenosine phosphates, nucleosides and nucleobases in royal jelly, *Food Chemistry* *173*, 1111-1118.
- 158.ZHANG, L., FANG, Y., LI, R., FENG, M., HAN, B., ZHOU, T., LI, J., 2012, Towards posttranslational modification proteome of royal jelly, *Journal of Proteomics*, *75*, 5327–5341.
- 159.ZHANG, Q.; CUNDIFF, J. K.; MARIA, S. D.; MCMAHON, R. J.; WICKHAM, M. S.; FAULKS, R.M.; VAN TOL, E. A., 2014, Differential digestion of human milk proteins in a simulated stomach model, *Journal of Proteome Research*, *13*, 1055 - 1064.

ANEXE

SUPPLEMENTARY

Figura 1. Alinierea secvențelor de aminoacizi ale celor mai abundente proteine din lăptișorul de matcă produs de *Apis mellifera*. Alinierea s-a efectuat cu ajutorul Clustal Omega (www.uniprot.org/align/). Gri-peptida semnal, Galben-site teoretic de N-glicozilare, Verde-regiuni repetitive.

Figure 1. Amino acid sequence alignment of the most abundant proteins found in royal jelly from *Apis mellifera*. The alignment was done using Clustal Omega (www.uniprot.org/align). Grey—signal peptide, Yellow—theoretical N-glucosylation site. Green—repetitive regions.

MRJP1	-MTRLFMLVCLGIVCGGTG	NILR----GESLN <u>K</u> SLPILH	WKFDFYDFFGSDE	RQDAI	54
MRJP2	MTRWFLWACLGIAQCQAVR --	--ENSPRNLKESLNVIE	HEWKYDFFGSE	RQAAI	55
MRJP3	MTRKLWLLVWCLGIAQCQDVT	SAAVNHHQRKSANNNLAHSMKV	HMKVIEWKHDFDFFGSDE	RRAAI	56
MRJP5	MTWLLLVCLGIAQCQGITSV	--RNSPRKLANSNMV	IHEWKLYDFFGSDE	RQAAM	58
MRJP1	LSGEYDYYKNNPSPSIDQWHDKIFVTLMLRYNGVPSSLNVISKKVGDGGPLQPYPDW	DWSFAK			114
MRJP2	QSGEYDHDKNYPFVDQDWDRKTFVTLRYDGVPSLTNVISGSKTGKGRRLKPYPDW	SFAE			115
MRJP3	KSGEFDTHDKNYPFVDWRDRKTFVTLERNNGVPSSLNVNVTKKGKGGLPRLPWFSAK				120
MRJP5	QSGEYDHDKNYPFVDQWRMFVTVPTYRKGVPSLNVISEKNGNRGLRQYPDW	SFAK			118
MRJP1	YDDCSGIVSASKLAIKDCKDLWLDSLGLV	<u>N</u> NTQPMCSPKLLTDLTSOLLKQV	EIPHDV		174
MRJP2	FKDCSKIVSAFKIADKFDRLWLDSLGLV	NTRTVPCAPKLHVFDLTKTSNHLKQ	EIPHD		175
MRJP3	YEDCSGIVSASFKAIVADKFDRLWLDSLGLV	NNNNQPMCSPKLLTDLTSKLVRQ	VPHN		180
MRJP5	UKDCSGIVSAYKIAIDKFDRLWLDSLGLV	<u>N</u> NTQPMCSPKLHVDPDTSHQKLVQVMHPDI			178
MRJP1	AVATTGKGRLLSLLAVQSLCDNTNSDMVY	IADEGKEGLIVYHNSSDFHRLTSNTF	DYD		234
MRJP2	AVATTGKGLVLVSQAVQIDL--	ANTLVYMAHKGDALIVYQVNADDSF	HRLTSNTF	DYD	232
MRJP3	AVATTGKGLVLVSQAVQADIR--	TNTMVYIADEKKGELIMYQNSSDSF	HRLTSNTF	DYD	237
MRJP5	AVATTGNGLVLVSQAVQADMP--	VNTIVMAMDKGDALKLIVYQNSDSE	FHRLTSNTF	DYD	235
MRJP1	PKFTKMTIDGESYTAQDGQISGMALSPMTNNLYSPVASTSLYYVNT	EQFRTSQYQNDIH			294
MRJP2	PYRAKMTIDGESFTLKGNCIGMALSPVTNNLYSP	FLASHGLYVNTAPFMKSQFG	ENNNVQ		292
MRJP3	PRYAKTTLVAGESFTVKNGIYGI	ALSPTVNTNLYSPPLSHGLYV	VDTEQFSNPQYE	ENNNVQ	297
MRJP5	PKYIKMMDDAGESFTAQDGIFGMALSPMTNNLYSPFSSRSLLYVNTKPFM	KSEYGA	NNNNVQ		295
MRJP1	YEGVQN1LDTQSAAKVVSKSGVLFGLVGDSALGCNEHRTLERHNIRTVQ	AQSDE	TLQMI		354
MRJP2	YQGSDEDINTQSLSAKAVSKNGVLFVGVLGNNSAVG	CWNHEHSQLRQNLEMVA	ONQDR		352
MRJP3	YEGSQDILNTQSFGKVVSKNGVLFGLGVNSGIA	CVACNEHQLVQRESF	DVVAQNE	TLQMI	357
MRJP5	YQGQDIFNTESIAKIMSKNGVLFFGLV	<u>N</u> NSAIGCWNEHQPLQREN	MDMVAQNE	TLQTV	355
MRJP1	ASMKIKEALPHWPIFDR--				371
MRJP2	AGMKIKEELPHFVG--				366
MRJP3	VSMKIMEENLPQSGR--				371
MRJP5	VAMKMMHL-PQS	<u>N</u> KNRMHRMNRNVRNBNMDRMDRIDRMDRMDRMDTMDRIDRMDR			414
MRJP1	--				371
MRJP2	--				366
MRJP3	--				371
MRJP5	<u>D</u> RIDRMDRHTMDTMDRIDKMS3MDRMDRMDRMDRV	DMDTMDRIDKMS3MDRMDRMDR			474
MRJP1	--				371
MRJP2	--				366
MRJP3	--				371
MRJP5	<u>T</u> HDIDTUDRDRDMDMDMDMDMDTMDRIDKMS3MDRMDRMDRMDRMDR	DMDTMDRIDKMS3MDRMDRMDR			534
MRJP1	---				371
MRJP2	---				366
MRJP3	---				371
MRJP5	<u>T</u> HDIDTUDRDRDMDMDMDMDMDTMDRIDKMS3MDRMDRMDRMDR	DMDTMDRIDKMS3MDRMDRMDR			534
MRJP1	---				427
MRJP2	-SNKPVKDEYMLVLSNRMQKIVNDDFNFDVNFRILGANVKELRNTHC	VNN	<u>N</u> ON-ONIC		424
MRJP3	-INDEPEGYMLALSNRMQKIVNDDFNFDVNFRILGANVDLMRNTRCR	GHY	<u>N</u> ONAGNO		544
MRJP5	<u>N</u> RMNRGMEYMMALSMKLQKIVNDDFNFDVNFRILGANVDLMRNTRCANSNDNNNN				544
MRJP1	ISIHL-				432
MRJP2	<u>N</u> TN-----NQNDNNQNNFKNNNNQKNNNNQDN				452
MRJP3	<u>N</u> ADNNQADNNQNNNNQADNNQANKQGNBQNDRNDRDNKQGNBQNDRNQ				490
MRJP5	KNHN-				598

Tabelul 1. Rezultatele analizei fragmentelor de 26 kDa, respectiv 21 kDa ale proteinei MRJP2 cu ajutorul spectrometriei de masă**Table 1. Mass spectrometry results of the 26 kDa fragment, respectively the 21 kDa fragment of MRJP2 analysis**

ESI-QTOF-MS/MS									
F r a g m e n t	Peptide	Start	End	Modifiers	Calculated Peptide Mass (Da)	Control m/z	Control Charge State	Control Mass (Da)	Control Mass Error (ppm)
2 6 k D a	YFDYDFGSEER	23	33		1426.5677	714.2923	2	1426.5687	0.7
	QAAIQSGEYDHTK	35	47		1446.674	483.2325	3	1446.6736	-0.3
	NYPFDVDQWR	48	57		1338.5992	670.3068	2	1338.5977	-1.1
	DKTFVTILR	58	66		1091.6339	546.8245	2	1091.6332	-0.6
	TFVTILR	60	66		848.512	425.2633	2	848.5108	-1.4
	YDGVPSTLNVISGK	67	80		1448.7511	725.3836	2	1448.7513	0.1
	IVSFK	105	110		663.3956	332.7054	2	663.3949	-1.1
	IAIDKFDR	111	118		976.5342	326.5189	3	976.5328	-1.4
	TPVPCAPK	130	137	Carbamidomethyl C(1)	870.4633	436.239	2	870.4622	-1.3
	LTSNTFDYDPR	207	217		1327.6045	664.8098	2	1327.6036	-0.7
2 1 k D a	MTIDGESFTLK	221	231		1240.601	621.3087	2	1240.6016	0.5
	QNLEMVAQNDR	320	330	Oxidation M(1)	1332.6093	667.3126	2	1332.6094	0.1
	IKEELPHFVGNSNPKVK	340	355		1821.0148	456.2609	4	1821.0118	-1.6
	IVNDDFNFDVNFR	369	382		1728.7743	865.3945	2	1728.7732	-0.6

MALDI-TOF/TOF-MS

	Peptide	Start	End	Modifiers	(M+H)+ Theoretical	m/z Experimental	Control Mass Error (Da)
2 6 k D a	GDALIVYQNADDSFHR	191	206		1820.856	1820.551	-0.306
	LLKPYPDWSFAEFK	87	100		1740.9	1740.654	-0.246
	YDGVPSTLNVISGK	67	80		1449.758	1449.543	-0.216
	QAAIQSGEYDHTK	35	47		1447.681	1447.498	-0.184
	YFDYDFGSEER	23	33		1427.575	1427.388	-0.188
	NYPFDVDQWR	48	57		1339.607	1339.445	-0.162
	LTSNTFDYDPR	207	217		1328.612	1328.413	-0.199
	MTIDGESFTLK	221	231		1241.608	1241.426	-0.182
	SLNVIHEWK	14	22		1125.605	1125.464	-0.142
	DKTFVTILR	58	66		1092.641	1092.485	-0.156
	IAIDKFDR	111	118		977.541	977.387	-0.155

Caracterizarea biochimică a proteinelor majoritare purificate din lăptișorul de matcă (*Apis mellifera*)

	TFVTILR	60	66		849.519	849.395	-0.125
2 1 k D a	NGVLFGLVGNSAVGCWNEH QSLQR	295	319	Carbamidomethyl C(1)	2741.358	2741.051	-0.307
	SQFGEENNQYQGSEDLNTQS LAK	267	290		2670.264	2669.906	-0.358
	IVNDDFNFDVNFR	369	382		1729.782	1729.632	-0.151
	QNLEMVAQNDR	320	330	Oxidation M(1)	1333.616	1333.489	-0.128
	NNNQNDN	429	435		832.318	832.256	-0.063

Tabelul 2. Rezultatele analizei fragmentului de 44 kDa al proteinei MRJP2 rezultat după o oră de digestie în prezența pepsinei cu ajutorul spectrometriei de masă**Table 2. Mass spectrometry results of the 44 kDa fragment of MRJP2 obtained after one hour pepsin digestion**

ESI-QTOF-MS/MS								
Peptide	Start	End	Modifiers	Molecular weight (Da) Theoretical	m/z	Charge state	Molecular weight (Da) Experimental	Mass error (ppm)
SLNVIHEWK	14	22		1124.5978	375.8737	3	1124.5974	-0.4
NVIHEWK	16	22		924.4818	463.2487	2	924.4815	-0.3
YFDYDFGSEER	23	33		1426.5677	714.2918	2	1426.5677	0
RQAAIQSGEYDHTK	34	47		1602.7775	535.2672	3	1602.7778	1.7
QAAIQSGEYDHTK	35	47		1446.674	483.2328	3	1446.6746	0.4
NYPFDVVDQWR	48	57		1338.5992	670.3079	2	1338.6	0.6
DKTFVTILR	58	66		1091.6339	546.8253	2	1091.6346	0.6
TFVTILR	60	66		848.512	425.2638	2	848.5118	-0.2
YDGVPSTLNVISGK	67	80		1448.7511	725.3845	2	1448.7531	1.4
YDGVPSTLNVISGKTG K	67	83		1734.9152	579.3136	3	1734.917	1
LLKPYPDWSFAEFK	87	100		1739.8922	580.972	3	1739.8922	0
PYPDWSFAEFK	90	100		1385.6292	693.8237	2	1385.6315	1.7
IVSAFK	105	110		663.3956	332.7063	2	663.3967	1.7
IAIDKFDR	111	118		976.5342	326.52	3	976.5362	2
IAIDK	111	115		558.3377	280.1773	2	558.3388	2
AIDKFDR	112	118		863.4501	432.7331	2	863.4503	0.2
IDKFDR	113	118		792.413	397.2142	2	792.4126	-0.5
TVPVCAPK	130	137	Carbamido methyl C(1)	870.4633	436.2391	2	870.4624	-1
PVCAPK	132	137	Carbamido methyl C(1)	670.3472	336.1812	2	670.3465	-1
LHVFDLK	138	144		870.4963	436.2562	2	870.4966	0.3
HVFDLK	139	144		757.4122	379.7138	2	757.4117	-0.7
TSNHLK	145	150		698.3712	350.1929	2	698.3699	-1.9
GGLVSLAVQAIDLANT LVYMADHK	167	190		2498.3203	833.7823	3	2498.3232	1.2
GDALIVYQNADDSFHR	191	206		1819.8489	607.624	3	1819.8483	-0.3
LTSNTFDYDPR	207	217		1327.6045	664.8111	2	1327.6063	1.4
YAKMTIDGESFTLK	218	231		1602.7963	535.274	3	1602.7982	1.2
MTIDGESFTLK	221	231		1240.601	621.3084	2	1240.601	0
MTIDGESFTLK	221	231	Oxidation M(1)	1256.5958	629.3067	2	1256.5975	1.4
QNLEMVAQNDR	320	330	Oxidation M(1)	1332.6093	667.3134	2	1332.6108	1.1
QNLEMVAQNDR	320	330		1316.6143	659.3152	2	1316.6146	0.2
TLQMIAGMK	331	339		991.5195	496.7681	2	991.5204	0.9
TLQMIAGMK	331	339	Oxidation M(1)	1007.5143	504.7651	2	1007.5143	0
IKEELPHFVGNSNK	340	352		1496.7987	499.9405	3	1496.7977	-0.7
EELPHFVGNSNPKVK	342	355		1579.8358	527.6205	3	1579.8376	1.1
PKDEYMLVLSNR	353	365		1562.8126	521.9455	3	1562.8127	0.1

Caracterizarea biochimică a proteinelor majoritare purificate din lăptișorul de matcă (*Apis mellifera*)

MALDI-TOF/TOF-MS							
Peptide	Modifiers	Start	End	m/z Experimental	(M+H)+ Theoretical	Mass error (Da)	
DEYMLVLSNR	356	365		1238.5966	620.3065	2	1238.5972 0.5
DEYMLVLSNR	356	365	Oxidation M(1)	1254.5914	628.3034	2	1254.5909 -0.4
IVNDDFNFDVNFR	369	382		1728.7743	865.3961	2	1728.7764 1.2
ILGANVK	383	389		713.4435	357.7299	2	713.4439 0.6
ILGANVKELIR	383	393		1224.7554	409.2591	3	1224.7535 -1.6
GANVK	385	389		487.2754	488.283	1	487.2751 -0.6
ELIR	390	393		529.3224	530.3294	1	529.3215 -1.7
MALDI-TOF/TOF-MS							
SQFGENNVQYQGSEDLNTQLAK	Carbamido methyl C(1)	295	319	2741.159	2741.358		-0.199
GGLVSLAVQAIDLANTLVYMADHK		267	290	2670.101	2670.264		-0.164
GDALIVYQNADDASFHR		167	190	2499.107	2499.328		-0.221
LLKPYPDWSFAEFK		191	206	1820.844	1820.856		-0.013
IVNDDFNFDVNFR		87	100	1740.884	1740.9		-0.016
YDGVPSTLNVISGK		369	382	1729.78	1729.782		-0.002
QAAIQSGEYDHTK		67	80	1449.736	1449.758		-0.023
YFDYDFGSEER		35	47	1447.664	1447.681		-0.018
NYPFDVDQWR		23	33	1427.546	1427.575		-0.03
QNLEMVAQNDR	Oxidation M(1)	48	57	1339.587	1339.607		-0.02
LTSNTFDYDPR		320	330	1333.581	1333.616		-0.037
MTIDGESFTLK		207	217	1328.579	1328.612		-0.033
DEYMLVLSNR		221	231	1241.577	1241.608		-0.031
SLNVIHEWK		356	365	1239.568	1239.604		-0.037
DKTFVTILR		14	22	1125.582	1125.605		-0.024
TLQMIAGMK		58	66	1092.6	1092.641		-0.041
IAIDKFDR		331	339	992.505	992.527		-0.022
LHVFDLK		111	118	977.514	977.541		-0.028
TFVTILR		138	144	871.465	871.504		-0.04
TVPVCAPK	Carbamido methyl C(1)	130	137	871.465	871.471		-0.007
NNNQNDN		60	66	849.466	849.519		-0.053
IVSAFK		429	435	832.271	832.318		-0.047

Tabelul 3. Rezultatele analizei fragmentului de 44 kDa al proteinei MRJP3 rezultat după o oră de digestie în prezența pepsinei cu ajutorul spectrometriei de masă**Table3. Mass spectrometry results of the 44 kDa fragment of MRJP3 obtained after one hour pepsin digestion**

ESI-QTOF-MS/MS								
Peptide	Start	End	Modifiers	Molecular weight (Da) Theoretical	m/z	Charge state	Molecular weight (Da) Experimental	Mass error (ppm)
SANNLAHSMK	9	18		1071.5132	358.1786	3	1071.5118	-1.3
VIYEWK	19	24		836.4432	419.2288	2	836.4418	-1.7
SGEFDHTK	42	49		919.4036	460.7092	2	919.4026	-1.1
NYPFDVDR	50	57		1024.4614	513.2384	2	1024.4609	-0.5
DKTFVTIER	60	68		1107.5924	554.8032	2	1107.5905	-1.7
TFVTIER	62	68		864.4705	433.2428	2	864.4698	-0.8
NNGVPSSLNVVTNK	69	82		1441.7524	721.8837	2	1441.7515	-0.6
GGPLLRPYPDWSFAK	86	100		1702.8831	568.6365	3	1702.8856	1.5
GGPLLR	86	91		611.3755	306.6957	2	611.3756	0.2
PYPDWSFAK	92	100		1109.5182	555.7668	2	1109.5178	-0.4
YEDCSGIVSAFK	101	112	Carbamido methyl C(1)	1374.6125	688.3137	2	1374.6116	-0.7
IAVDKFDR	113	120		962.5185	321.8477	3	962.5194	0.9
VDFKDR	115	120		778.3973	390.2067	2	778.3975	0.3
LWVLDSGLVNNNQP MCSPK	121	139	Carbamido methyl C(1),Oxida tion M(1)	2187.0452	730.024	3	2187.0483	1.4
LLTFDLK	140	146		848.5007	425.2579	2	848.5	-0.8
TNTMVKYIADEK	182	192	Oxidation M(1)	1299.6017	650.809	2	1299.6022	0.4
GEGLIMYQNSDDSFH R	193	208	Oxidation M(1)	1883.8108	628.9453	3	1883.812	0.6
GEGLIMYQNSDDSFH R	193	208		1867.8159	623.6142	3	1867.8188	1.6
LTSNTFDYDPR	209	219		1327.6045	664.8101	2	1327.6044	-0.1
LTVAGESFTVK	223	233		1150.6234	576.3188	2	1150.6218	-1.4
ESFDVVVAQNEETLQM IVSMK	322	341	Oxidation M(2)	2329.0818	777.3694	3	2329.0845	1.2
ESFDVVVAQNEETLQM IVSMK	322	341		2297.0918	766.7062	3	2297.095	1.4
ESFDVVVAQNEETLQM IVSMK	322	341	Oxidation M(1)	2313.0869	772.0381	3	2313.0906	1.6
IMENLPQSGR	342	351	Oxidation M(1)	1159.5656	580.7911	2	1159.5664	0.7
INDPEGNEYMLALSN R	352	367	Oxidation M(1)	1850.8468	926.4321	2	1850.8484	0.9
INDPEGNEYMLALSN R	352	367		1834.8519	918.4348	2	1834.8536	0.9
IINNDFNFNDVNFR	371	384		1740.822	871.4201	2	1740.8243	1.3
ILGANVDDLMR	385	395	Oxidation M(1)	1231.623	616.8195	2	1231.623	0

MALDI-TOF/TOF-MS

Caracterizarea biochimică a proteinelor majoritare purificate din lăptișorul de matcă (*Apis mellifera*)

Peptide	Modifiers	Start	End	m/z Experimental	(M+H)+ Theoretical	Mass error (Da)
NGVLFLGLVGNNSGIACVNEHQVLQR	Carbamidomethyl C(1)	297	321	2694.663	2694.414	0.248
ESFDVVAAQNEETLQMIVSMK	Oxidation M(2)	297	321	2330.576	2330.089	0.487
ESFDVVAAQNEETLQMIVSMK	Oxidation M(1)	297	321	2314.514	2314.094	0.419
ESFDVVAAQNEETLQMIVSMK		322	341	2298.522	2298.099	0.422
LWVLDSLGVNNNQPMCSPK	Carbamidomethyl C(1), Oxidation M(1)	121	139	2188.407	2188.053	0.354
GEGLIMYQNSDDSFHR	Oxidation M(1)	193	208	1885.006	1884.818	0.188
INDPEGNEYMLALSNR	Oxidation M(1)	352	367	1852.075	1851.854	0.22
INDPEGNEYMLALSNR		352	367	1836.035	1835.859	0.176
IINNDNFNFNDVNFR		371	384	1741.944	1741.829	0.114
GGPLLRPPYPDWSFAK		86	100	1704.003	1703.89	0.112
YEDCSGIVSAFK	Carbamidomethyl C(1)	101	112	1375.65	1375.62	0.03
HIDFDFGSDER		25	35	1337.668	1337.576	0.092
LTSNTFDYDPR		209	219	1328.651	1328.612	0.039
ILGANVDDLMR	Oxidation M(1)	385	395	1232.649	1232.63	0.018
IMENLPQSGR	Oxidation M(1)	342	351	1160.662	1160.573	0.088
LTVAGESFTVK		223	233	1151.625	1151.631	-0.006
DKTFVTIER		60	68	1108.595	1108.6	-0.005
NYPFDVDR		50	57	1025.443	1025.469	-0.026
IAVDKFDR		113	120	963.509	963.526	-0.018
SGEFDHTK		42	49	920.364	920.411	-0.047
LLTDFDLK		140	146	849.436	849.508	-0.073
VIYEWK		19	24	837.395	837.451	-0.056

Tabelul 4. Rezultatele analizei cu ajutorul spectrometriei de masă a formei oligomerice a proteinei MRJP1**Table 4. Mass spectrometry results of the MRJP1 in oligomeric form**

Sequence	Modifications	PSMs	Missed cleavages	Theo. MH+ [Da]	XCorr Sequest HT
LSSLAVQSLDCNTNSDTMVIADEKGEGLIVYHN SDDSFHR	1xCarbamidomethyl [C11]; 1xOxidation [M18]	52	8	4617,114	7,994558
GRLSSLAVQSLDCNTNSDTMVIADEKGEGLIVY HNSDDSFHR	1xCarbamidomethyl [C13]; 1xOxidation [M20]	3	9	4830,237	6,963669
RQDAILSGEYDYKNNYPSIDQWHDKIFVTMLR		28	9	4030,939	6,859424
KVGDGGPLLQPYPDWSFAKYDDCSGIVSASK	1xCarbamidomethyl [C23]	19	6	3357,61	6,457936
RQDAILSGEYDYKNNYPSIDQWHDKIFVTMLR	1xOxidation [M31]	1	9	4046,934	6,417473
SGVLFFGLVGDSALGCWNEHR	1xCarbamidomethyl [C16]	30	2	2321,113	6,043955
KGEGLIVYHNSDDSFHR			9	4	1973,946
YDYKNNYPSIDQWHDKIFVTMLR			3	6	3061,451
TMVIADEKGEGLIVYHNSDDSFHR	1xOxidation [M2]	3	6	2912,352	5,8605
RQDAILSGEYDYKNNYPSIDQWHDK		2	8	3170,445	5,801974
IDQWHDKIFVTMLR			2	3	1801,942
EKGEGLIVYHNSDDSFHR			5	5	2102,989
AIALSGEYDYKNNYPSIDQWHDKIFVTMLR			1	7	3631,753
SGVLFFGLVGDSALGCWNEHRTLE	1xCarbamidomethyl [C16]	3	3	2664,287	5,371833
SYTAQDGISGMALSPMTNNLYYSPVASTSLYYV NTEQFR	1xOxidation [M16]	1	2	4356,011	5,284027
MTIDGESYTAQDGISGMALSPMTNNLYYSPVAS TSLYYVNTE	2xOxidation [M1; M17]	1	3	4587,041	5,187418
KGEGLIVYHNSDDSFHRLTSNTFDYDPK			2	7	3255,534
KVGDGGPLLQPYPDWSFAK			41	3	2075,06
CENPDNDRTPKISIHL	1xCarbamidomethyl [C1]		9	5	2055,992
SGVLFFGLVGDSALGCWNE	1xCarbamidomethyl [C16]		48	1	2027,953
NNYPSIDQWHDKIFVTMLR			10	4	2492,203
TVAQSDETLQMIASMK	1xOxidation [M11]	44	2	1768,846	4,664711
LSSLAVQSLDCNTNSDTMVIADEKGEGLIVYHN SDDSFHR	1xCarbamidomethyl [C11]	1	8	4601,12	4,638166
YKNNYPSIDQWHDKIFVTMLR			1	5	2783,361
VVSKGVLFFGLVGDSALGCWNE	1xCarbamidomethyl [C20]		4	2	2441,217

Caracterizarea biochimică a proteinelor majoritare purificate din lăptișorul de matcă (*Apis mellifera*)

GLIVYHNSDDSFHR		31	2	1659,787	4,50863
LSSLAVQSLDCNTNSDTMVYIAEKGE	1xCarbamidomethyl [C11]; 1xOxidation [M18]	23	5	2976,345	4,487096
KVGDGGPLLQPYPDWSFAKYD		1	4	2353,15	4,483993
VGDGGPLLQPYPDWSFAKYDDCSGIVSASK	1xCarbamidomethyl [C22]	10	5	3229,515	4,424127
KVGDGGPLLQPYPDWSFAKYDD		1	5	2468,177	4,421322
LTSNTFDYDPKFTK		9	3	1676,817	4,320222
MQKVMNNDFNFDDVNFR	2xOxidation [M1; M4]	2	4	2165,938	4,319701
YDDCSGIVSASKLAIDKCDR	2xCarbamidomethyl [C4; C18]	2	6	2273,054	4,296478
TVAQSDETLQMIASMK	2xOxidation [M11; M15]	7	2	1784,84	4,261378
MVNNDNFNFDDVNFR	1xOxidation [M1]	38	3	1762,749	4,169691
GGPLLQPYPDWSFAKYDDCSGIVSASK	1xCarbamidomethyl [C19]	1	4	2958,398	4,154127
LLTFDLTTSQLLK		35	1	1492,862	4,149846
GEGLIVYHNSDDSFHR		2	3	1845,851	4,121984
QVEIPHDVAVNATTGK		1	2	1678,876	4,091473
GESYTAQDGISGMALSPMTNNLYYSPVASTSLYYVNTEQFR	1xOxidation [M]	2	3	4542,075	4,058831
GLIVYHNSDDSFHRLTSNTFDYDPK		1	5	2941,375	4,022925
YNGVPSSLNVISKK		3	1	1505,832	3,969055
GVQNILDQTSSAKVVSK		1	2	1773,971	3,957014
WKFFDYDFGSDER		24	5	1711,739	3,911666
IKEALPHVPIFDR		3	3	1534,874	3,864708
TSDYQQNDIHYEGVQNILDTQSSAK		2	4	2854,313	3,859952
VGDGGPLLQPYPDWSFAK		19	2	1946,965	3,839276
WKFFDYDFGSDEERR		2	6	1867,84	3,830835
FFDYDFGSDEERRQDAILSGE		1	7	2367,052	3,814501
YDDCSGIVSASK	1xCarbamidomethyl [C4]	5	2	1301,568	3,774898
TSDYQQNDIHYE		27	2	1512,624	3,761147
GVQNILDQTSSAK		33	1	1360,707	3,724065
LTSNTFDYDPK		21	2	1300,606	3,720816
QVEIPHDVAVNATTGKGR		1	3	1891,998	3,706012
IMMANVNELILNTR		1	1	1614,863	3,659883
IHYEGVQNILDTQSSAK		1	2	1902,956	3,656911
WKFFDYDFGSDE		1	4	1555,638	3,634414
IKEALPHVPIFDRYINRE		2	5	2210,208	3,580081

YILVLSNKMVK	1xOxidation [M9]	5	1	1352,761	3,551299
WKFFDYDFGSD		1	3	1426,595	3,538707
WKFFDYDFGSDERRQDAILSGE		1	8	2681,227	3,534897
IKEALPHVPIFDRYINR		1	4	2081,165	3,496795
LILNTRCENPDNDRTPK	1xCarbamidomethyl [C7]	2	5	2203,092	3,440716
NNYPSIDQWHDKIFVTMLR	1xOxidation [M18]	1	4	2508,198	3,440451
LSSLAVQSLDCNTNSD	1xCarbamidomethyl [C11]	1	1	1723,78	3,388072
LSSLAVQSLDCNTNSDTMVYIADE	1xCarbamidomethyl [C11]; 1xOxidation [M18]	13	3	2662,186	3,33792
ALPHVPIFDR		47	1	1164,652	3,297516
QFRRTSDYQQNDIHYE		1	3	1943,852	3,2927
GLIVYHNSDDSFHRLTSNTFDYD		1	4	2716,227	3,278186
TVAQSDETLQMIASMKIKE	2xOxidation [M11; M15]	1	4	2155,062	3,24285
SYTAQDGISGMALSPMTNNLYYSPVASTSLYYVNTE	1xOxidation [M]	2	1	3924,783	3,148481
LSSLAVQSLDCNTNSDTMVYIADEK	1xCarbamidomethyl [C11]; 1xOxidation [M18]	1	4	2790,281	3,080603
FFDYDFGSDER		15	4	1397,564	3,07072
LAIDKCDRLWVLD	1xCarbamidomethyl [C6]	5	4	1616,846	3,070054
EYILVLSNKMVK	1xOxidation [M10]	2	2	1481,803	3,054968
CENPDNDRTPK	1xCarbamidomethyl [C1]	6	4	1492,649	3,019843
SALGCWNEHR	1xCarbamidomethyl [C5]	2	1	1229,548	2,990003
YNGVPSSLNVISK		4	0	1377,737	2,980482
WKFFDYDFGSDERRQD		2	7	2110,925	2,978183
FNFDDVNFR		1	2	1173,532	2,977014
ETLQMIASMK	1xOxidation [M5]	1	1	1167,575	2,973669
TLQMIASMK	1xOxidation [M4]	30	0	1038,532	2,958114
LILNTRCENPD	1xCarbamidomethyl [C7]	1	2	1344,658	2,95358
KVGDGGLPLQPYPD		1	2	1455,748	2,879754
QDAILSGEYDYKNNYPSIDQWHDKIFVTMLR		1	8	3874,838	2,872073
RHNIRTVAQSDETLQMIASMK	1xOxidation [M16]	1	4	2445,234	2,849993
LAIDKCDR	1xCarbamidomethyl [C6]	8	3	990,5037	2,741513
TMVYIADEKGE	1xOxidation [M2]	1	3	1271,582	2,685178
TLQMIASMK	2xOxidation [M4; M8]	4	0	1054,527	2,679101
WSFAKYDDCSGIVSASK	1xCarbamidomethyl	2	3	1920,88	2,666297

Caracterizarea biochimică a proteinelor majoritare purificate din lăptișorul de matcă (*Apis mellifera*)

	[C9]				
RQDAILSGEYD		1	3	1266,596	2,657055
TPFKISIHL		2	1	1055,625	2,647389
MTIDGESYTAQD	1xOxidation [M1]	1	2	1346,542	2,62936
KIFVTMLR		1	1	1007,607	2,608065
VGDGGPLLQPYPD		2	1	1327,653	2,581074
LTTSQLLK		1	0	903,551	2,537565
CSGIVSASK	1xCarbamidomethyl [C1]	1	0	908,4506	2,458312
WKFFDYD		1	2	1020,446	2,440011
TLQMIASMK		1	0	1022,537	2,428473
LILNTRCE	1xCarbamidomethyl [C7]	1	1	1018,535	2,423735
RQDAILSGEYDYK		1	4	1557,754	2,398166
ALPHVPIFDRYINRE		1	3	1839,986	2,929649
FFDYDFGSDERRQDAILSGEYDYK		1	9	2936,301	2,883485
FFDYDFGSDERR		1	5	1553,666	2,453434
YILVLSNK		6	0	949,5717	2,314768
SLPILHEWKFFDYDFGSDER		1	6	2501,177	2,302881
GRLSSLAVQSLD		1	1	1245,68	2,288467
AILSGEYDYK		1	2	1158,568	2,282684
SGVLFFGLVGD		1	0	1110,583	2,272678
LILNTRCENPDND	1xCarbamidomethyl [C7]	1	3	1573,727	2,233052
ALPHVPIFD		2	0	1008,551	2,225728
SLPILHEWK		1	1	1122,631	2,178486
IMNANVNE	1xOxidation [M2]	1	0	920,4142	2,036708
GGPLLQYPDPWSFAK		1	1	1675,848	2,023843

Tabelul 5. Rezultatele analizei cu ajutorul spectrometriei de masă a formei monomerice a proteinei MRJP1**Table 5. Mass spectrometry results of the MRJP1 in oligomeric form**

Sequence	Modifications	PSMs	Missed Cleavages	Theo. MH+ [Da]	Xcorr Sequest HT
LSSLAVQSLDCNTNSDTMVIADEKGEGL IVYHNSDDSFHR	1xOxidation [M18]; 1xCarbamidomethyl [C11]	61	8	4617,114	8,089077
KGEGLIVYHNSDDSFHR		9	4	1973,946	7,17379
KVGDGGPLLQPYPDWSFAKYDDCSGIVSA SK	1xCarbamidomethyl [C23]	27	6	3357,61	6,907482
QDAILSGEYDYKNNYPSIDQWHDKIFVT MLR		2	8	3874,838	6,821283
RQDAILSGEYDYKNNYPSIDQWHDKIFV TMLR		31	9	4030,939	6,620851
TMVIADEKGEGLIVYHNSDDSFHR	1xOxidation [M2]	3	6	2912,352	6,598225
YKNNYPSIDQWHDKIFVTMLR		2	5	2783,361	6,274914
RQDAILSGEYDYKNNYPSIDQWHDK		1	8	3170,445	6,246096
RQDAILSGEYDYKNNYPSIDQWHDKIFV TMLR	1xOxidation [M31]	3	9	4046,934	6,107114
GRLSSLAQSLDCNTNSDTMVIADEKGE GLIVYHNSDDSFHR	1xOxidation [M20]; 1xCarbamidomethyl [C13]	2	9	4830,237	6,084708
EKGEGLIVYHNSDDSFHR		2	5	2102,989	5,922403
SYTAQDGISGMALSPMTNNLYYSPVASTS LYYVNTEQFR	1xOxidation [M16]	2	2	4356,011	5,604164
VGDGGPLLQPYPDWSFAKYDDCSGIVSA SK	1xCarbamidomethyl [C22]	19	5	3229,515	5,597458
SGVLFFGLVGDSALGCWNEHR	1xCarbamidomethyl [C16]	32	2	2321,113	5,486529
KGEGLIVYHNSDDSFHRLTSNTFDYDPK		2	7	3255,534	5,400636
GEGLIVYHNSDDSFHR		4	3	1845,851	5,20948
WKFFDYDFGSDERRQDAILSGE		2	8	2681,227	5,207651
SGVLFFGLVGDSALGCWNEHRTLE	1xCarbamidomethyl [C16]	2	3	2664,287	5,171377
YDYKNNYPSIDQWHDKIFVTMLR		2	6	3061,451	5,131891
VVKSGVLFFGLVGDSALGCWNE	1xCarbamidomethyl [C20]	10	2	2441,217	5,063663
KVGDGGPLLQPYPDWSFAK		50	3	2075,06	5,061996
TSDYQQNDIHYEGVQNILDQTSSAK		3	4	2854,313	4,999026
IHYEGVQNILDQTSSAK		2	2	1902,956	4,791694
NNYPSIDQWHDKIFVTMLR		17	4	2492,203	4,694307
IDQWHDKIFVTMLR		1	3	1801,942	4,649198
YDDCSGIVSASKLAIDKCDR	2xCarbamidomethyl [C4; C18]	1	6	2273,054	4,610933
CENPDNDRTPKISIHL	1xCarbamidomethyl [C1]	24	5	2055,992	4,596321

Caracterizarea biochimică a proteinelor majoritare purificate din lăptișorul de matcă (*Apis mellifera*)

TVAQSDETLQMIASMK	1xOxidation [M11]	47	2	1768,846	4,586487
GLIVYHNSDDSFHR		55	2	1659,787	4,584635
SGVLFFGLVGDSALGCWNE	1xCarbamidomethyl [C16]	47	1	2027,953	4,567698
MVNNDNFNDDVNFRIMNANVNE	2xOxidation [M1; M16]	3	4	2664,145	4,565863
KVGDGGPLLQPYPDWSFAKYD		1	4	2353,15	4,472503
LTSNTFDYDPKFTK		14	3	1676,817	4,388196
GLIVYHNSDDSFHRLTSNTFDYDPKFTK		1	6	3317,586	4,30556
WSFAKYDDCSGIVSASK	1xCarbamidomethyl [C9]	2	3	1920,88	4,192026
YNGVPSSLNVISKK		8	1	1505,832	4,180462
NNYPSDIDQWHDK		3	3	1631,708	4,165694
GEGLIVYHNSDDSFHRLTSNTFDYDPK		1	6	3127,439	4,151936
LLTFDLTTSQLLK		37	1	1492,862	4,14684
LSSLAVQSLDCNTNSDTMVYIADEKGE	1xOxidation [M18]; 1xCarbamidomethyl [C11]	32	5	2976,345	4,13589
MVNNDNFNDDVNFR	1xOxidation [M1]	45	3	1762,749	4,10518
TVAQSDETLQMIASMK	2xOxidation [M11; M15]	9	2	1784,84	4,045151
WKFFDYDFGSDER		34	5	1711,739	4,010048
IKEALPHVPIFDR		3	3	1534,874	3,995661
YKNNYPSDIDQWHDK		1	4	1922,867	3,955868
QVEIPHVDVAVNATTGK		2	2	1678,876	3,931111
VGDGGPLLQPYPDWSFAK		20	2	1946,965	3,892085
LSSLAVQSLDCNTNSDTMVYIADE	1xOxidation [M18]; 1xCarbamidomethyl [C11]	15	3	2662,186	3,890865
YILVLSNKMQK	1xOxidation [M9]	12	1	1352,761	3,889918
GVQNILDQTSSAK		34	1	1360,707	3,862472
LTSNTFDYDPK		24	2	1300,606	3,854589
NNYPSDIDQWHDKIFVTMLR	1xOxidation [M18]	2	4	2508,198	3,819469
TLQMIASMKIKE	1xOxidation [M4]	2	2	1408,754	3,731004
QFRRTSDYQQNDIHYE		1	3	1943,852	3,700739
YDDCSGIVSASK	1xCarbamidomethyl [C4]	4	2	1301,568	3,667855
WKFFDYDFGSDER		1	6	1867,84	3,577326
IKEALPHVPIFDRYINR		2	4	2081,165	3,559403
CENPDNDRTPK	1xCarbamidomethyl [C1]	17	4	1492,649	3,545796
WKFFDYDFGSD		1	3	1426,595	3,504151
TSDYQQNDIHYE		23	2	1512,624	3,488657
YNGVPSSLNVISK		3	0	1377,737	3,431153
EALPHVPIFDR		3	2	1293,695	3,349828

QVEIPHDVAVNATTGKGR		2	3	1891,998	3,330721
IKEALPHVPIFDRYINRE		1	5	2210,208	3,315054
FFDYDFGSDERRQDAILSGEYDYK		1	9	2936,301	3,304705
QWHDKIFVTMLR		2	2	1573,831	3,302874
ALPHVPIFDR		52	1	1164,652	3,294068
SGVLFFGLVGD		1	0	1110,583	3,289543
WKFFDYDFGSDE		1	4	1555,638	3,26229
KIFVTMLR		2	1	1007,607	3,189636
LAIDKCDRLWVLD	1xCarbamidomethyl [C6]	15	4	1616,846	3,162076
FFDYDFGSDER		25	4	1397,564	3,156363
WKFFDYDFGSDERRQD		2	7	2110,925	3,098729
IMMANVNELILNTR	1xOxidation [M2]	1	1	1630,858	3,032041
TPFKISIHL		2	1	1055,625	3,02654
FNFDDVNFR		1	2	1173,532	3,020113
TVAQSDETLQMIASMKIKE	2xOxidation [M11; M15]	1	4	2155,062	2,919977
TLQMIASMK	1xOxidation [M4]	29	0	1038,532	2,878664
TVAQSDETLQMIASMKIKE	1xOxidation [M11]	1	4	2139,067	2,860759
IMMANVNELILNTR		1	1	1614,863	2,78098
GRLSSLAQSLDCNTNSDTMVYIADEKGE	1xOxidation [M20]; 1xCarbamidomethyl [C13]	1	6	3189,467	2,750814
ETLQMIASMK	1xOxidation [M5]	1	1	1167,575	2,727678
TLQMIASMK	2xOxidation [M4; M8]	3	0	1054,527	2,684798
LAIDKCDR	1xCarbamidomethyl [C6]	16	3	990,5037	2,671096
TLQMIASMK		1	0	1022,537	2,650648
RQDAILSGEYDYK		1	4	1557,754	2,605679
MVNNDNFDDVNFR		1	3	1746,754	2,573613
EYILVLSNK		1	1	1078,614	2,532928
RHNIRTVAQSDETLQMIASMK	1xOxidation [M16]	1	4	2445,234	2,492968
WKFFDYD		1	2	1020,446	2,472554
MQKMFVNNDNFDDVNFR	2xOxidation [M1; M4]	1	4	2165,938	2,406584
CSGIVSASK	1xCarbamidomethyl [C1]	1	0	908,4506	2,399119
RQDAILSGEYD		1	3	1266,596	2,383116
LTSNTFDYD		1	1	1075,458	2,326523
YILVLSNK		16	0	949,5717	2,30802
SLPILHEWK		1	1	1122,631	2,303153
FTKMTIDGESYTAQD	1xOxidation [M4]	1	3	1722,753	2,294545

Caracterizarea biochimică a proteinelor majoritare purificate din lăptișorul de matcă (*Apis mellifera*)

ALPHVPIFD		3	0	1008,551	2,201253
GGPLLQPYPDWSFAK		1	1	1675,848	2,13592
IFVTMLR		7	0	879,5121	2,115685
IMNANVNE		1	0	904,4193	2,098476
SYTAQDGISGMALSPMTNNLYYSPVASTS LYYVNTE	1xOxidation [M16]	1	1	3924,783	4,131922
MTIDGESYTAQDGISGMALSPMTNNLYYS PVASTSLYYVNTE	2xOxidation [M1; M17]	1	3	4587,041	3,781385
ALPHVPIFDRYINRE		4	3	1839,986	3,008056
FFDYDFGSDERRQD		1	6	1796,751	2,428158
LILNTRCENPDNDR	1xCarbamidomethyl [C7]	1	4	1729,829	2,307348
LSSLAVQSLDCNTNSD	1xCarbamidomethyl [C11]	1	1	1723,78	2,065329
LILNTRCENPD	1xCarbamidomethyl [C7]	1	2	1344,658	2,064616
CNTNSDTMVYIADEKGE	1xOxidation [M8]; 1xCarbamidomethyl [C1]	1	4	1962,806	2,056128

Figura 2. Rezultatele spectrometriei de masă pentru apisimină. Deoarece această proteină are doar două puncte teoretice de scindare de către tripsină, s-a decis efectuarea digestiei enzimaticice cu ajutorul chimotripsinei care e posibil să fi generat fragmente de digestie hidrofobe, iar din cauza fragmentelor de digestie enzimatică de caracter foarte hidrofobic a fost dificilă eluarea de pe coloana de separare și eluare. Din toate benzile de proteină a celor trei probe diferite de lăptișor de matcă a fost posibilă identificarea unei secvențe de aminoacizi reprezentând capătul N-terminal (KTSISVKGESNVD). Această secvență a fost evidențiată cu culoarea verde în secvență intactă a apisiminei preluată de pe UniProt (ID: Q8ISL8).

Figure 2. Mass spectrometry results from apisimin analysis. Due to the fact that the protein has only two theoretical cleavage sites for trypsin, the digestion step was done with chymotrypsin which may have generated hydrophobic digestion fragments. Due to the very hydrophobic character it was difficult to elute the fragments from the column. From all the three different samples of royal jelly it was possible to identify the amino acid sequence of the N-terminal end (KTSISVKGESNVD). This sequence is highlighted with green colour in the whole amino acid sequence of apisimin obtained from UniProt (ID: Q8ISL8).

KTSISVKGESNVDVVSQINSLVSSIVSGANVSAVLLAQTLVNLQILIDANVFA

Figura 3. Electroforeza Native PAGE a proteinelor totale (1, 2) și a proteinei MRJP1 în forma oligomerică (3, 4), respectiv monomerică (5, 6) din două probe diferite de lăptișor de matcă : LM1 (1, 3, 5) și LM2 (2, 4, 6). Gelurile au fost colorate cu metoda Colloidal Coomasie.

Figure 3. Native PAGE electrophoresis of total proteins (1,2), of MRJP1 in oligomeric form (3,4) and MRJP1 in monomeric form (5,6) from two different samples of royal jelly: LM1 (1,3,5) and LM2 (2,4,6). The gels were stained using Colloidal Coomasie.

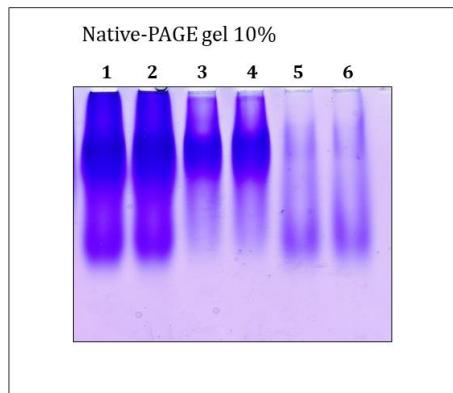
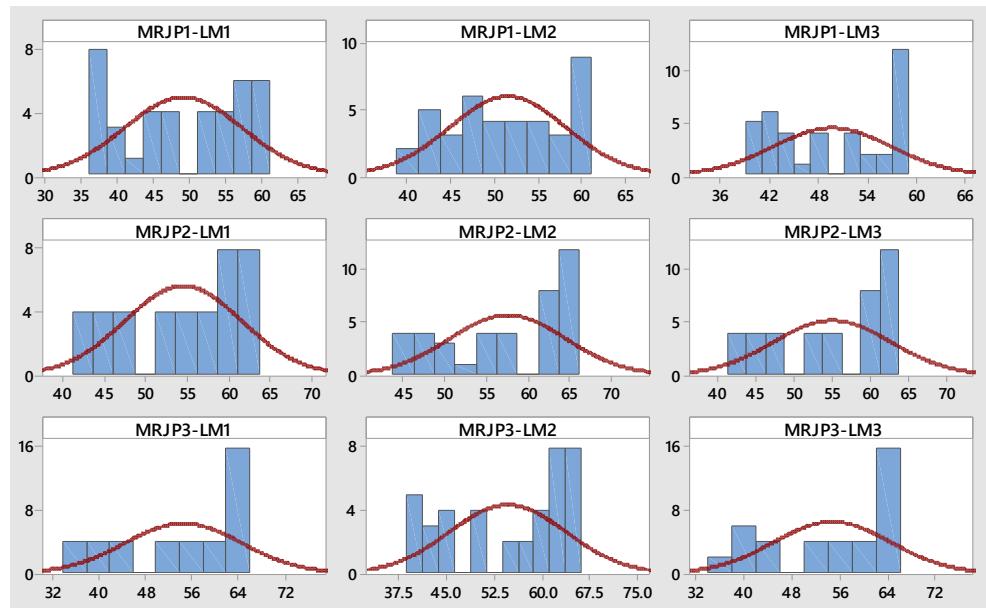


Figura 4. Histogramele distribuției seriei de valori Tm pentru toate valorile de pH testate a fiecărui replicat biologic (LM1-LM3), respectiv pentru fiecare proteină testată cu metoda Thermofluor (MRJP1 monomeric, MRJP2 și MRJP3). Histogramele au fost realizate cu ajutorul Minitab 18. Pe axa X este Tm, iar pe axa Y este frecvența variabilelor.

Figure 4. Distribution histograms for the Tm values across all tested pH values of each biological replicate (LM1-3), respectively for each protein tested with the Thermofluor method (MRJP1 monomeric, MRJP2 and MRJP3). The histograms were made using Minitab 18. The x axis represents the Tm values, the y axis represents the variable frequency.



Tabelul 6. Valorile Tm ale proteinelor MRJP1 monomeric, MRJP2 și MRJP3 în funcție de pH determinate cu ajutorul metodei ThermoFluor. Au fost folosite trei replicate biologice (trei probe diferite de lăptișor de matcă LM1-3 din care au fost purificate proteinele) și patru replicate tehnice pentru fiecare valoare de pH.

Table 6. Tm values for the proteins MRJP1 monomeric, MRJP2 and MRJP3 depending on pH as determined using the ThermoFluor method. Three biological replicates (three different samples of royal jelly LM1-3 were used for protein purification) and four technical replicates for each pH values were used.

pH	MRJP1 monomeric			MRJP2			MRJP3		
	LM1	LM2	LM3	LM1	LM2	LM3	LM1	LM2	LM3
3.5	58.7	59.3	57.7	59.9	62.9	61.0	62.8	61.7	62.5
3.5	58.8	59.4	57.7	60.0	63.1	61.0	62.8	61.8	62.4
3.5	58.8	59.3	57.7	59.8	62.9	61.0	62.8	61.8	62.4
3.5	58.7	59.2	57.7	59.8	62.9	60.9	62.9	61.9	62.5
4	59.4	59.7	58.6	61.8	64.8	63.0	64.4	63.8	64.3
4	59.3	59.7	58.5	61.8	64.8	63.1	64.4	63.8	64.3
4	59.3	59.7	58.8	61.7	64.8	63.0	64.5	63.9	64.3
4	59.4	59.9	58.8	61.7	64.8	62.8	64.5	63.8	64.5
4.5	57.6	58.7	57.6	62.3	65.1	63.2	64.9	64.4	65.1
4.5	57.5	58.7	57.6	62.3	65.2	63.1	65.0	64.1	65.1
4.5	57.5	58.7	57.7	62.3	65.1	63.2	65.0	64.2	65.0
4.5	57.5	58.8	57.8	62.3	65.2	63.3	65.1	64.2	65.1
5	54.8	56.2	55.1	61.1	64.1	61.6	63.7	63.1	63.6
5	55.0	56.1	54.9	61.2	64.1	61.5	63.7	63.1	63.9
5	55.0	56.1	54.8	61.2	64.0	61.6	63.7	63.1	63.8
5	55.1	56.2	55.2	61.0	64.0	61.7	63.8	63.1	63.8
5.5	51.8	53.3	51.1	58.4	61.6	59.2	60.2	59.9	60.1
5.5	51.4	53.3	51.7	58.4	61.4	59.2	60.3	59.7	60.1
5.5	51.4	53.5	52.0	58.4	61.5	59.4	60.2	59.7	60.1
5.5	51.6	53.5	52.4	58.5	61.5	59.2	60.2	59.9	60.1
6	47.6	50.4	48.0	55.3	58.3	55.9	56.1	56.0	55.9
6	47.7	50.3	47.4	55.3	57.9	55.8	56.1	56.2	55.9
6	47.6	50.1	47.3	55.1	57.9	55.8	56.1	56.3	55.9
6	47.7	50.4	47.6	55.2	58.1	56.0	56.1	56.3	56.0
6.5	45.6	47.6	44.2	51.8	54.9	51.8	50.9	50.7	50.5
6.5	45.3	47.3	44.1	51.9	54.4	51.7	50.9	50.7	50.5
6.5	44.9	47.7	44.2	51.8	54.6	51.7	51.1	50.9	50.5

6.5	44.5	47.3	45.4	52.0	54.7	51.9	51.2	51.0	50.7
7	40.8	45.9	42.3	48.3	51.3	47.7	46.0	45.6	45.1
7	41.4	46.3	42.7	48.0	51.1	47.6	45.8	45.4	45.5
7	41.2	45.7	42.2	48.0	50.5	47.5	45.6	45.5	45.6
7	40.8	47.4	43.4	48.4	50.8	48.1	45.9	45.7	45.2
7.5	38.7	42.4	40.2	45.7	48.1	44.3	41.2	41.2	41.1
7.5	38.5	43.1	41.1	45.2	48.2	44.2	40.8	41.6	41.4
7.5	38.6	43.5	41.1	45.3	48.0	44.5	41.2	42.4	41.5
7.5	38.4	44.0	41.0	45.4	48.0	44.6	41.3	41.8	42.0
8	37.2	41.8	40.1	41.8	46.0	42.1	36.5	39.5	38.7
8	37.1	39.1	39.2	42.0	45.5	41.6	36.6	38.8	37.5
8	37.5	41.5	39.3	42.5	45.5	41.8	36.7	39.7	38.6
8	37.8	40.7	40.3	42.2	46.1	42.1	36.4	40.0	37.9

REZUMAT AL TEZEI DE DOCTORAT

Caracterizarea biochimică a proteinelor majoritare purificate din lăptișorul de matcă (*Apis mellifera*)

Doctorand **Carmen Ioana Mureșan**

Conducător de doctorat **Prof. univ. dr. Liviu Al. Mărghitaș**



1. INTRODUCERE

Lăptișorul de matcă este o secreție a glandelor hipofaringeale și mandibulare ale albinelor lucrătoare, fiind un produs nutritiv de bază în dieta mătciilor de albine și a larvelor de albine în primele trei zile după ecloziunea din ouăle depuse de matcă. Acest produs de secreție complex are în compoziție proteine, glucide, lipide (majoritari fiind acizii grași), vitamine, minerale, ATP și cataboliții săi (SABATINI, 2009).

Pe lângă rolul nutritiv, lăptișorul de matcă este de asemenea implicat în subiectul controversat al diferențierii pe caste a albinelor, subiect care a atras atenția oamenilor încă din Antichitate.

De asemenea, lăptișorului de matcă i s-au atribuit diverse proprietăți biologice precum efect antioxidant, stimularea creșterii celulare, acțiune antibacteriană, acțiune imunomodulatoare, efect antiinflamator, efect hipocolesterolemiant, efect antialergic etc (LIU, 2008; WATANABE, 1998; FONTANA, 2004; OKAMOTO, 2003; KASHIMA, 2014). În principal proteinele, compusii fenolici și acizii grași sunt implicați în proprietățile funcționale atribuite lăptișorului de matcă.

Cele mai abundente proteine din lăptișorul de matcă aparțin familiei Major royal jelly proteins (MRJPs) care reprezintă 82-90% din proteinele totale (SCHMITZOVA, 1998). Aceste proteine sunt sintetizate de familia de gene *mrjps* și au secvențe ale aminoacizilor înrudite. Expresia genelor *mrjps* nu este exclusivă glandelor hipofaringeale (sursa lăptișorului de matcă), existând tipare caracteristice ale expresiei genelor la nivel de țesuturi, etape de dezvoltare a organismului albinei sau la nivel de caste.

Importanța studierii proteinelor din lăptișorul de matcă contribuie atât la înțelegerea diferențierii pe caste în cadrul sistemului de reproducere al albinelor, cât și pentru a contura și înțelege funcțiile pe care moleculele proteice le dețin, atât cu implicații în fiziologia albinelor cât și a consumatorului care este consumator în scop terapeutic al lăptișorului de matcă.

2. STRUCTURA TEZEI

Teza de doctorat este structurată în două părți principale. Prima parte intitulată "Stadiul actual al cunoașterii" include informații rezultate din studiul bibliografic și este formată din două capitole. Primul capitol numit "Lăptișorul de matcă" cuprinde informații referitoare la sursa lăptișorului de matcă și proprietățile fizico-chimice ale lăptișorului de matcă. Lăptișorul de matcă este o combinație a secrețiilor rezultate din glande specializate localizate la nivelul capului albinei: glandele hipofaringeale și glandele mandibulare. Capitolul al doilea "Proteinele din lăptișorul de matcă" se focusează pe proteinele specifice lăptișorului de matcă.

Proteinile se găsesc într-un procent ridicat de 9-18% în lăptișorul de matcă (SABATINI, 2009), reprezentând aproape 50% din substanța uscată. În ultimii ani proteomul lăptișorului de matcă a fost investigat intens, iar rezultatele au arătat că majoritatea sunt proteine hidrosolubile care fac parte din familia Major royal jelly proteins (MRJPs) și care reprezintă 82-90% din proteinele totale regăsite în lăptișorul de matcă (SCHMITZOVÁ, 1998). MRJPs sunt codificate de genele *mrjps* care codifică membri omologhi. Omologia acestor proteine rezultă din faptul că au în comun 111 aminoacizi, iar identitatea secvențelor de aminoacizi variază între 47 și 74 %. Inițial s-a considerat că genele *mrjps* sunt active doar în glandele hipofaringeale ale albinelor lucrătoare doici, însă pe parcurs s-a demonstrat că genele *mrjps* sunt prezente și în trântori, matcă sau albine culegătoare și că aceste gene nu sunt exclusive glandelor hipofaringeale, ele fiind identificate și în alte părți ale corpului albinei, în abdomen, hemolimfă și creier ceea ce implică o multifuncționalitate a proteinelor MRJPs și nu doar un rol nutrițional. Experimentele *in vivo* și *in vitro* au demonstrat diverse proprietăți biologice ale proteinelor MRJPs: stimularea creșterii celulare (WATANABE, 1998), efect imunostimulator și proinflamator prin stimularea eliberării de citokine, precum factorul de necroză tumorală TNF- α (SIMUTH, 2004), acțiune antibacteriană (VEZETEU, 2017), efect antihipertensiv (KASHIMA, 2014).

A doua parte a tezei intitulată "Contribuții personale" cuprinde informații referitoare la obiectivele urmărite, materialul biologic folosit pentru experimente, metodele utilizate, rezultatele, discuțiile, concluziile și recomandările, respectiv originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei.

3. SCOPUL ȘI OBIECTIVELE TEZEI

Deși rolul nutrițional al proteinelor din familia MRJPs este recunoscut, aceste proteine sunt considerate a deține o gamă variată de funcții fiziologice, iar pentru a înțelege aceste funcții, studierea proteinelor este imperativă.

Scopul a fost utilizarea proteomicii pentru obținerea și caracterizarea biochimică a proteinelor majoritare din lăptișorul de matcă.

Pentru a împlini acest scop, au fost vizate diferite obiective, primul fiind acela al necesității obținerii proteinelor individuale pure care au fost fractionate prin metode cromatografice. Odată obținute, aceste fracțiuni proteice au fost incluse în experimente ale căror obiective au fost acelea de a testa stabilitatea proteinelor la diferite valori de pH precum și în prezența proteazelor care se găsesc la nivelul tractului gastro-intestinal uman (Fig. 1).

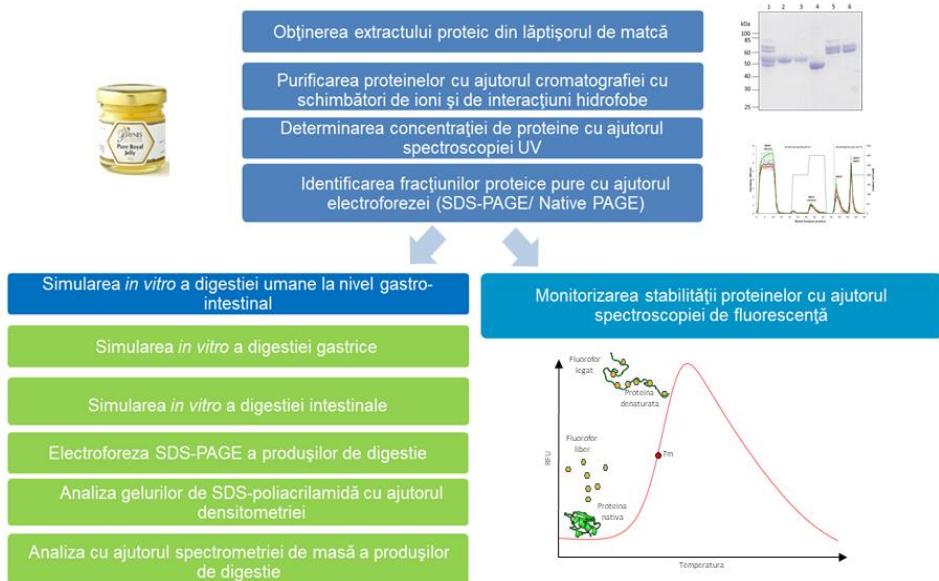


Fig. 1. Designul experimental pentru obținerea și caracterizarea biochimică a proteinelor majoritare din lăptișorul de matcă.

4. REZULTATE ȘI DISCUȚII

4.1. Obținerea proteinelor majoritare individuale și pure din lăptișorul de matcă

Un prim pas în procesul de caracterizare a proteinelor este izolarea acestora din materialul biologic. Obiectivul a fost acela de a purifica proteinele majoritare din lăptișorul de matcă la valori de pH apropriate de cele ale sursei acestor proteine, adică la pH-ul lăptișorului de matcă (pH 4.0), folosind metode cromatografice care separă proteinele de interes pe baza proprietăților lor fizico-chimice.

Cu ajutorul cromatografiei schimbătoare de cationi a fost posibilă purificarea proteinei MRJP1 în formă oligomerică și în formă monomerică. Forma oligomerică nu a fost imobilizată pe coloana de purificare la pH de 4.0 fiind obținută deja de la aplicarea extractului proteic pe coloană. Forma monomerică a MRJP1 a fost imobilizată pe suportul cromatografic și a fost obținută prin eluare cu o concentrație crescută de sare (300 mM NaCl). MRJP2 a eluat de pe coloană numai prin schimbarea pH-ului de la pH 4.0 la pH 7.0. MRJP3 a co-eluat cu MRJP5 odată cu creșterea gradientului de sare (200 mM NaCl).

Am încercat eluarea proteinei MRJP3 din amestecul cu MRJP5 folosind diferite concentrații de NaCl sau sulfat de amoniu folosind tot cromatografia de schimb ionic, însă nu a fost posibil. Așadar am ales un alt tip de cromatografie, cromatografia de interacțiuni hidrofobe. Am utilizat medii de hidrofobicitate diferită (Phenyl-sepharose

6 Fast Flow, Butyl-sepharose 4 Fast Flow sau Octyl-sepharose 4 Fast Flow), diferite soluții tampon (citrat de sodiu/acid citric, fosfat de sodiu), diferite valori de pH (4.0, 7.0) și diferite concentrații de sare (NaCl, sulfat de amoniu).

În urma încercărilor am reușit să dezvolt un protocol prin care MRJP3 a fost purificat din amestecul cu MRJP5 cu ajutorul cromatografiei de interacțiuni hidrofobe pe mediul cromatografic Butyl-sepharose. Amestecul MRJP3/MRJP5 a fost aplicat pe coloana de purificare în soluție de 50 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, 1.5 M (NH₄)₂SO₄, pH 7.0. MRJP3 a fost obținută încă din primele fracțiuni proteice, precum și în etapa de spălare sau de eluare cu concentrație mai scăzută de sulfat de amoniu (1 M).

Purificarea cu schimbători de cationi a fost realizată din trei probe diferite de lăptișor (LM1, LM2 și LM3). A fost construită câte o chromatogramă din valorile medii a trei purificări independente pentru fiecare probă ceea ce a demonstrat repetabilitatea acestui protocol de purificare.

Puritatea fracțiunilor a fost verificată cu ajutorul electroforezei în gel de dodecilsulfat de sodiu-poliacrilamidă (SDS-PAGE) în condiții denaturante (Fig.2). Benzile proteinelor au fost excizate de pe gel și analizate cu ajutorul spectrometriei de masă. Rezultatele spectrometriei de masă au confirmat identitatea proteinelor obținute în urma purificării. Forma oligomerică sau monomerică au fost evidențiată cu ajutorul electroforezei în condiții nedenaturante (Native-PAGE).

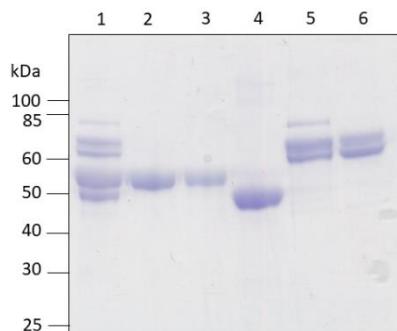


Fig.2. Electroforeza în gel de concentrație 12% de SDS-poliacrilamidă a fracțiunilor proteice obținute în urma purificării folosind cromatografia de schimb cationic (2-5), respectiv cromatografia de interacțiuni hidrofobe (6). Standardul de proteine este reprezentat cu linii orizontale, iar masa lor moleculară este dată în kDa, 1-extract proteic din lăptișor de matcă, 2-MRJP1 în forma oligomerică, 3-MRJP1 în forma monomerică, 4-MRJP2, 5-MRJP3 împreună cu MRJP5, 6-MRJP3.

4.2. Stabilitatea proteinelor majoritare din lăptișorul de matcă în timpul simulării *in vitro* a digestiei umane

Lăptișorul de matcă este un produs apicol complex care nu este important numai pentru dezvoltarea puietului de albine și pentru nutriția reginei coloniei de albine, ci poate avea și efecte benefice asupra sănătății omului. Proteinele din familia MRJPs sunt cele mai abundente proteine din lăptișorul de matcă cărora li s-au atribuit

diverse funcții biologice în urma studiilor pe culturi de celule sau pe animale. Însă o condiție pentru a avea efecte asupra sănătății omului este aceea de a supraviețui digestiei pe parcursul tractului gastro-intestinal. Obiectivul acestui experiment a fost acela de a testa stabilitatea celor mai abundente trei proteine din lăptișorul de matcă, MRJP1, MRJP2 și MRJP3, pe parcursul simulării *in vitro* a digestiei umane.

Albumina serică bovină folosită cu rol de control pozitiv a fost degradată total de către pepsină în primele 15 minute ceea ce a dovedit eficacitatea protocolului de digestie.

Prin digestia controlului negativ cu enzime intestinale, adică a pepsinei fără proteinele MRJPs, au fost identificate fragmentele de digestie care nu aparțin digestiei proteinelor de interes.

În etapa gastrică proteinele din lăptișorul de matcă au fost mult mai stabile în comparație cu albumina serică bovină (controlul pozitiv). În prezența pepsinei benzile proteinei MRJP1 au dispărut treptat fără produși de scindare, monomerul MRJP1 fiind detectat în stare nativă timp de 3 ore, iar oligomerul timp de 6 ore. Proteina MRJP2 în stare nativă a fost detectată în prezența pepsinei până la sfârșitul experimentului, adică pentru o perioadă de 24 de ore. De asemenea, în etapa gastrică MRJP2 se scindează treptat într-un produs de digestie de masă moleculară 44 kDa care este de asemenea stabil până la sfârșitul etapei gastrice. MRJP3 în stare nativă au fost detectată până la 3 ore în prezența pepsinei din stomac și a fost scindată de pepsină într-un singur produs de digestie de masă moleculară 44 kDa care a apărut la 15 minute de digestie cu pepsină și a fost stabil în etapa gastrică pentru 60 de minute, după care a fost degradat treptat, fiind nedetectabil după 24 de ore. În timpul digestiei cu pepsina atât pentru MRJP2 cât și pentru MRJP3 a rezultat un fragment de aproximativ 44 kDa, iar benzile corespunzând acestui fragment după o oră de digestie cu pepsina au fost excizate de pe gelul de electroforeză și analizate cu ajutorul spectrometriei de masă. Rezultatele spectrometriei de masă arată că pentru ambele proteine lipsesc terminațiile N și C din lanțul polipeptidic ceea ce indică o accesibilitate ridicată la solvent a terminațiilor acestor proteine la pH acid (pH 2.0). După o oră de digestie în prezența pepsinei proteinele majoritare din lăptișorul de matcă sunt încă detectabile în stare lor nativă și vor ajunge în intestin $12.0 \pm 1.0\%$ în cazul monomerului MRJP1, $27.7 \pm 1.7\%$ în cazul oligomerului MRJP1, $84.5 \pm 2.8\%$ în cazul MRJP2 și $18.0 \pm 4.6\%$ în cazul MRJP3 din cantitatea ingerată. În consecință, se poate afirma că proteinele majoritare din lăptișorul de matcă pot ajunge la nivelul intestinului uman deoarece sunt încă detectabile până la 3 ore de digestie la nivel gastric.

În etapa intestinală proteinele MRJPs sunt digerate rapid, proteina MRJP2 având din nou stabilitatea cea mai ridicată fiind detectabilă în stare nativă până la 40 de minute ($1.5 \pm 0.7\%$ din cantitatea inițială) în prezența tripsinei și chimotripsinei.

4.3. Influența pH-ului asupra stabilității proteinelor purificate din lăptișorul de matcă

Influența variațiilor de pH asupra proteinelor este bine cunoscută. Chiar și diferențe insignificante de pH pot determina modificări ale funcțiilor biologice ale proteinelor.

MRJPs trebuie să fie stabile în medii de diferite valori ale pH-ului, de locul de sinteză al acestora în reticulul endoplasmatic al celulelor secretoare ale glandelor hipofaringeale care are pH-ul în jur de 7.0 (DEMAUREX, 2002), la veziculele secretorii care au un pH de 5.1-5.5 (DEMAUREX, 2002) până la produsul final, lăptișorul de matcă cu pH în jur de 4.0. Mai mult decât atât, deși aceste proteine au fost descoperite inițial în lăptișorul de matcă, sursa lor nu se limitează la acesta, pe parcurs fiind descoperite și în alte părți ale albinei, precum veninul de pH 4.5-5.5 (PEIREN, 2005), hemolimfa de pH 6.8 (BISHOP, 1923) și creierul de pH 7.2 (KUCHARSKI, 1998) sau în alte produse ale stupului, de exemplu miere de pH 3.2-4.5 (DA SILVA, 2016) și polen de albine de pH 4.4-5.4 (SIMUTH, 2004). Prin urmare, proteinele MRJPs trebuie să fie stabile într-un spectru larg de pH și la temperaturi diferite, de la 20°C în timpul iernării albinelor, până la 35°C în perioada creșterii de puieți (GATES, 1914).

Așadar, obiectivul a fost acela de a testa stabilitatea proteinelor MRJP1, MRJP2 și MRJP3 în regiunea de pH 2.5-11.0 cu ajutorul unei metode bazată pe fluorescență.

Acest studiu a permis evaluarea efectului pH-ului asupra cineticii de denaturare a proteinelor MRJPs. Rezultatele experimentului au arătat că cele mai abundente proteine din lăptișorul de matcă au o stabilitate ridicată în mediu acid, cu stabilitate maximă la pH 4.0 (MRJP1 monomeric: $59.3 \pm 0.5^\circ\text{C}$) sau 4.5 (MRJP2: $63.6 \pm 1.3^\circ\text{C}$; MRJP3: $64.8 \pm 0.4^\circ\text{C}$), adică la valori ale pH-ului apropiate de pH-ul lăptișorului de matcă. Toate proteinele testate au fost mai stabile termic la pH 4.0 în comparație cu pH 7.0 ($\Delta T_m = 14.2 - 18.6^\circ\text{C}$), proteinele fiind susceptibile denaturării în mediu bazic.

Aceste rezultate corespund cu rezultatele simulării *in vitro* a digestiei umane asupra proteinelor MRJPs care au avut o stabilitate ridicată față de acțiunea pepsinei în mediul acid, proteinele MRJPs fiind labile în mediu bazic, implicit fiind mai ușor degradate de enzimele intestinale.

5. CONCLUZII ȘI RECOMANDĂRI

5.1. Concluzii privind obținerea proteinelor majoritare individuale și pure din lăptișorul de matcă

Proteina MRJP1 a fost purificată atât în forma oligomerică cât și în forma monomerică, ambele forme fiind studiate mai departe. Faptul că proteina a putut fi purificată ca și complex oligomeric înseamnă că pentru purificare s-au folosit condiții care au păstrat proprietățile necesare oligomerizării intacte obținându-se o proteină în

stare nativă. Acest lucru este important deoarece pentru a determina activitatea unei proteine este necesar ca proteina să fie în conformația ei nativă. Abilitatea de a forma oligomeri a MRJP1 poate fi esențială din punct de vedere biologic luând în considerare faptul că funcțiile anumitor proteine sunt dependente de forma monomerică sau oligomerică a acestora.

Purificarea proteinelor MRJPs din probe diferite de lăptișor de matcă este reproductibilă. De asemenea, protocolul de purificare cromatografică este optim pentru separarea complexului oligomeric al proteinei MRJP1 din lăptișorul de matcă.

5.2. Concluzii privind stabilitatea proteinelor majoritare din lăptișorul de matcă în timpul simulării *in vitro* a digestiei umane

Din acest experiment a reieșit că proteinele MRJP1, MRJP2 și MRJP3 sunt în general stabile în mediul acid și instabile în mediu alcalin.

La nivel gastric, aceste proteine au rezistență diferită față de scindarea sub acțiunea pepsinei din stomac, proteina MRJP2 având stabilitatea cea mai ridicată, urmată de MRJP3 și MRJP1.

La nivel intestinal toate proteinele MRJPs în stare nativă și produșii lor de digestie sunt degradați în mai puțin de o oră sub acțiunea proteazelor, MRJP2 având din nou stabilitatea cea mai ridicată (40 de minute).

În concluzie, aceste proteine pot ajunge în starea lor nativă în intestinul subțire uman, însă trebuie asimilate rapid pentru a avea un efect benefic sănătății omului. Probabilitatea ca aceste proteine să ajungă în starea lor nativă în intestin este crescută în situația în care lăptișorul de matcă este consumat pe stomacul gol, trecerea din stomac în intestine fiind în acest caz de câteva secunde.

5.3. Concluzii privind influența pH-ului asupra stabilității proteinelor purificate din lăptișorul de matcă

Temperatura de denaturare termică (T_m) este corelată cu stabilitatea conformației unei proteine, iar de conformație depinde funcția biologică. Stabilitatea conformațională poate fi studiată cu diferite metode precum dicroism circular, FTIR (Fourier-transform infrared spectroscopy) sau spectroscopie Raman, însă aceste metode sunt complexe și necesită o cantitate importantă de probă.

În cadrul acestui studiu un protocol simplu și sensibil bazat pe metoda Thermofluor (PANTOLIANO, 2001) a fost dezvoltat pentru a caracteriza cele mai abundente proteine purificate din lăptișorul de matcă în ceea ce privește stabilitatea acestora la diferite valori ale pH-ului. Rezultatele experimentului au arătat că proteinele MRJP1 în forma monomerică, MRJP2 și MRJP3 sunt mai stabile în mediul acid (pH 4.0) în comparație cu pH 7.0 (diferența ΔT_m fiind de 14.3-18.6°C).

5.4. Recomandări

5.4.1. Stabilitatea proteinelor este un factor crucial în producția lor, păstrarea, precum și testarea *in vivo* sau *ex vivo*. Am dezvoltat un protocol bazat pe metoda Thermofluor (PANTOLIANO, 2001) pentru testarea stabilității proteinelor MRJPs la diferite valori de pH care deschide calea spre analiza diverselor factori care pot stabiliza sau destabiliza aceste proteine (diferite soluții tampon, aditivi, interacțiunilor cu liganzi, etc). Totuși temperatura de denaturare Tm nu a putut fi calculată în cazul complexului oligomeric format din MRJP1 și apisimină care a avut hidrofobicitate ridicată în toate condițiile de testare. Așadar stabilitatea acestui complex ar trebui testată cu o altă metodă, precum dicroismul circular, FTIR sau spectroscopie Raman.

5.4.2. Lăptișorul de matcă este un produs valoros care își pierde proprietățile terapeutice pe parcursul păstrării motiv pentru care familia de proteine MRJPs este considerată un potențial indicator de prospetime datorită corelației dintre degradarea acestor compuși de-a lungul păstrării și condițiile de păstrare. Proteinele MRJPs ar putea fi folosite ca parametri de calitate. Metode corespunzătoare pentru a determina prospetimea lăptișorului de matcă ar putea fi stabilite astfel încât să se împiedice intrarea produselor de calitate inferioară pe piață.

5.4.3. Biodisponibilitatea unui nutrient necesită îndeplinirea a trei condiții: bioaccesibilitate, transport la nivel intestinal și metabolizare. Cu ajutorul simulării *in vitro* a digestiei umane am demonstrat condiția bioaccesibilității celor mai abundente proteine din lăptișorul de matcă. Dacă proteinele majoritare din lăptișorul de matcă pot fi transportate în sistemul circulator unde să aibă efecte benefice asupra sănătății omului necesită studii cu ajutorul unor sisteme model pentru testarea absorpției la nivel intestinal precum celulele epiteliale Caco-2. Aceste viitoare studii ar putea demonstra celelalte două condiții ale biodisponibilității proteinelor MRJPs în stare nativă.

5.4.4. Produsii de digestie ai proteinelor MRJPs pot avea semnificație nutrițională și fiziologică cu potențiale aplicații pentru utilizarea lor în produse funcționale de promovare a sănătății consumatorului. Eventualele peptide bioactive rezultate în urma proteolizei MRJPs pot avea efecte benefice asupra sănătății consumatorului precum acțiune antioxidantă, antihipertensivă, antibacteriană, și.

6. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei

Deși studiul MRJPs a început acum mai bine de 40 de ani, informațiile referitoare la funcțiile biologice ale acestora sunt limitate. În cadrul acestui studiu, MRJP1, MRJP2 și MRJP3 au fost purificate pentru ca mai apoi să fie studiate folosind diferite metode biochimice. Pentru a studia proteinele este necesar a le obține în stare nativă. Am reușit să dezvolt un protocol de purificare în stare nativă a celor mai abundente MRJPs din lăptișorul de matcă folosind cromatografia de schimb cationic la

pH 4.0 (nivelul natural al pH-ului lăptișorului de matcă) și chromatografia de interacțiuni hidrofobe la pH 7.0.

În continuare, cu ajutorul unui experiment *in vitro* care a reprodus condițiile procesului digestiv uman la nivel gastro-intestinal a fost analizată stabilitatea proteinelor purificate față de acțiunea proteazelor. Cu ajutorul acestei simulări *in vitro* am demonstrat bioaccesibilitatea proteinelor majoritare din lăptișorul de matcă, ceea ce înseamnă că aceste proteine au potențialul de a ajunge la nivelul intestinelor în corpul uman unde pot eventual exercita efecte biologice.

Structura moleculei proteice este rezultatul legăturilor chimice dintre aminoacizii care intră în componența proteinei, iar energiile acestor legături chimice sunt influențate de diversi factori, printre care și pH-ul. Așadar, structura proteinei poate fi destabilizată prin modificarea pH-ului, iar destabilizarea structurii poate însemna pierderea funcțiilor biologice ale proteinei. Am dezvoltat un protocol bazat pe fluorescență cu ajutorul căruia a fost testată stabilitatea la diferite valori de pH ale celor mai abundente proteine din lăptișorul de matcă. Complexul oligomeric dintre MRJP1 și apăsimină a demonstrat o hidrofobicitate crescută în toate condițiile de testare, motiv pentru care temperatura de denaturare Tm nu a putut fi estimată pentru acest complex proteic. Proteinele MRJP1 în forma monomerică, MRJP2 și MRJP3 au fost mult mai stabile la pH 4.0 față de pH 7.0 ($\Delta T_m = 14.3\text{-}18.6^\circ\text{C}$), având temperaturi de denaturare Tm la pH 4.0 cuprinse între 59.3°C și 64.2°C . În condiții alcaline la valori de $\text{pH} \geq 9.0$ proteinele testate au tendință de destabilizare încă de la temperatura de numai 20°C .

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. BISHOP, G. H., 1923, Body fluid of the honey bee larva, *Journal of Biological Chemistry*, 58, 543–565.
2. DA SILVA, P. M., GAUCHE, C., GONZAGA, L. V., COSTA, A. C. O., FETT, R., 2016, Honey: Chemical composition, stability and authenticity, *Food Chemistry*, 196, 309–323.
3. DEMAUREX, N., 2002, pH homeostasis of cellular organelles, *News in Physiological Sciences*, 17, 1–5.
4. FONTANA, R., MENDES, M. A., DE SOUZA, B. M., KONNO, K., CÉSAR, L. M. M., MALASPINA, O., PALMA, M. S., 2004, Jelleines: A family of antimicrobial peptides from the Royal Jelly of honeybees (*Apis mellifera*), *Peptides*, 25, 919–928.
5. GATES, B. N., 1914, The temperature of the bee colony, *Bulletin of the US Department of Agriculture* 96, 1 - 29.
6. KASHIMA, Y., KANEMATSU, S., ASAII, S., KUSADA, M., WATANABE, S., KAWASHIMA, T., NAKAMURA, T., SHIMADA, M., GOTO, T., NAGAOKA, S., 2014, Identification of a Novel Hypocholesterolemic Protein, Major Royal Jelly Protein 1 , Derived from Royal Jelly, *PLoS ONE*, 8, 9, e105073.
7. KUCHARSKI, R., MALESZKA, R., HAYWARD, D. C., BALL, E. E., 1998, A Royal Jelly Protein Is Expressed in a Subset of Kenyon Cells in the Mushroom Bodies of the Honey Bee Brain, *Naturwissenschaften*, 7, 85, 343–346.
8. 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 Agricultural and Food Chemistry*, 23, 56, 11447–11452.
9. OKAMOTO, I., TANIGUCHI, Y., KUNIKATA, T., KOHNO, K., IWAKI, K., IKEDA, M., 2003, Major royal jelly protein 3 modulates immune responses in vitro and in vivo, *Life Sciences*, 16, 2029 - 2045.
10. PANTOLIANO, M.W., PETRELLA, E.C., KWASNOSKI, J.D., LOBANOV, V.S., MYSLIK, J., GRAF, E., CARVER, T., ASEI, E., SPRINGER, B.A., LANE, P., SALEMME, F.R., 2001, High-density miniaturized thermal shift assays as a general strategy for drug discovery, *Journal of Biomolecular Screening*, 6, 429–440.
11. PEIREN, N., VANROBAEYS, F., DE GRAAF, D. C., DEVREESE, B., VAN BEEUMEN, J., JACOBS, F. J., 2005, The protein composition of honeybee venom reconsidered by a proteomic approach, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1, 1752, 1–5.
12. SABATINI, A. G., MARCAZZAN, G. L., CABONI, M. F., BOGDANOV, S., ALMEIDA-MURADIAN, L. B., 2009, Quality and standardisation of Royal Jelly, *Journal of ApiProduct and ApiMedical Science*, 1, 1, 1–6.
13. SCHMITZOVA, J., KLAUDINY, J., ALBERT, Š., SCHRÖDER, W., SCHRECKENGOST, W., HANES, J., JÚDOVÁ, J., SIMUTH, J., 1998, A family of major royal jelly proteins of the honeybee *Apis mellifera* L., *Cellular and Molecular Life Sciences*, 9, 54, 1020–1030.
14. SIMUTH, J., BILIKOVA, K., KOVÁČOVÁ, E., KUZMOVÁ, Z., SCHRODER, W., 2004, Immunochemical Approach to Detection of Adulteration in Honey: Physiologically Active Royal Jelly Protein Stimulating TNF- α Release Is a Regular Component of Honey, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 8, 52, 2154–2158.
15. VEZETEU, T. V.; BOBIS, O.; MORITZ, R. F. A.; BUTTSTEDT, A., 2017, Food to some, poison to others - honeybee royal jelly and its growth inhibiting effect on European Foulbrood bacteria, *MicrobiologyOpen*, 6, e00397.
16. WATANABE, K., SHINMOTO, H., KOBORI, M., TSUSHIDA, T., SHINOHARA, K., KANAEDA, J., YONEKURA, M., 1998, Stimulation of cell growth in the U-937 human myeloid cell line by honey royal jelly protein, *Cytotechnology*, 26, 23–27.

SUMMARY OF Ph.D. THESIS

Biochemical characterization of the most abundant proteins purified from royal jelly (*Apis mellifera*)

Ph.D. student **Carmen Ioana Mureşan**

Scientific coordinator **Prof. univ. dr. Liviu Al. Mărghităş**



1. INTRODUCTION

Royal jelly is a secretion of the hypopharyngeal and mandibular glands of young nurse bees and is the basic food for the queenbee for her entire life and for the growing bee larvae in the first three days after hatching from the eggs laid by the queen. This complex secretion product has in its composition proteins, carbohydrates, lipids (mainly fatty acids), vitamins, minerals, ATP and its catabolites (SABATINI, 2009).

Besides its nutritional role, royal jelly is also involved in the controversial topic of caste differentiation, topic that attracted the attention of humans from ancient times.

Moreover, diverse biological properties were assigned to royal jelly: antioxidant effect, cellular growth stimulation, antibacterial activity, immunomodulatory effect, anti-inflammatory effect, cholesterol-lowering effect, anti-allergic effect (LIU, 2008; WATANABE, 1998; FONTANA, 2004; OKAMOTO, 2003; KASHIMA, 2014). In principal, proteins, phenolic compounds and fatty acids are involved in the functional properties assigned to royal jelly.

The most abundant proteins in royal jelly belong to the Major royal jelly proteins family (MRJPs) which represent 82-90% of the total proteins (SCMITZOVA, 1998). These proteins are synthesized by the *mrjps* genes and they have amino acid sequences similarity. The *mrjps* genes expression is not exclusive to the hypopharyngeal glands (royal jelly source), they have characteristic expression patterns across diverse tissues, development stages of bee organism or caste differentiation.

The study of proteins from royal jelly brings contributions to understanding the caste differentiation and the reproduction status of honey bees, and moreover the functions that the proteins perform, with implications on the honey bee physiology and the human as a consumer of royal jelly for therapeutic reasons.

2. THESIS STRUCTURE

The thesis is divided into two main parts. The first part entitled " Literature review" includes information derived from the bibliographic study and consists of two chapters. The first chapter called "Royal Jelly" contains information on the source of royal jelly and the physico-chemical properties of royal jelly. Royal Jelly is a combination of secretions resulting from specialized glands located in the head of the bee: the hypopharyngeal glands and the mandibular glands. The second chapter "Royal jelly proteins" is focusing on specific proteins of royal jelly. The proteins are found in a

high percentage of 9-18% in the royal jelly (SABATINI, 2009), accounting for nearly 50% of the dry matter. In the last years royal jelly proteome has been intensively investigated and the results showed that most proteins are soluble proteins belonging to the family of Major royal jelly proteins (MRJPs) which represents 82-90% of the proteins in royal jelly (SCHMITZOVA, 1998). MRJPs are encoded by the *mrjps* genes that synthesize homologues members. The homology of these protein results from the fact that they have 111 amino acids in common, and the identity of the amino acid sequences varies between 47 and 74%. Initially it was thought that the genes *mrjps* are only active in the hypopharyngeal glands of worker nurse bees, but over time it was shown that the *mrjps* genes are also present in drones, queen bees or foraging bees and that these genes are not exclusive for the hypopharyngeal glands, the genes being identified in other parts of the bee like the abdomen, hemolymph and brain implying a multifunctionality of MRJPs not only a nutritional role. *In vivo* and *in vitro* experiments showed diverse biological properties of the MRJPs: stimulation of cell growth (WATANABE, 1998), immunostimulatory and pro-inflammatory effect by stimulating the release of cytokines such as tumor necrosis factor TNF- α (SIMUTH, 2004), antibacterial activity (VEZETEU, 2017), antihypertensive effect (KASHIMA, 2014).

The second part of the thesis entitled "Personal Contributions" includes information on the objectives, the biological material used for experiments, the methods, results, discussion, conclusions and recommendations, respectively originality and innovative contributions of the thesis.

3. PURPOSE AND OBJECTIVES OF THE THESIS

Although the nutritional role of MRJPs is recognized, these proteins are considered to have a wide range of physiological functions and in order to understand these functions, the study of proteins is imperative.

The aim was to use proteomics to obtain and biochemically characterize the most abundant proteins found in royal jelly.

In order to accomplish this, different objectives were set, the first being that of obtaining individual and pure proteins from royal jelly which were fractionated by chromatographic methods. Once purified, the proteins were included in the experiments whose objectives were to test the stability of the proteins at different pH values and in the presence of proteases that are found in the human gastrointestinal tract (Fig.1).

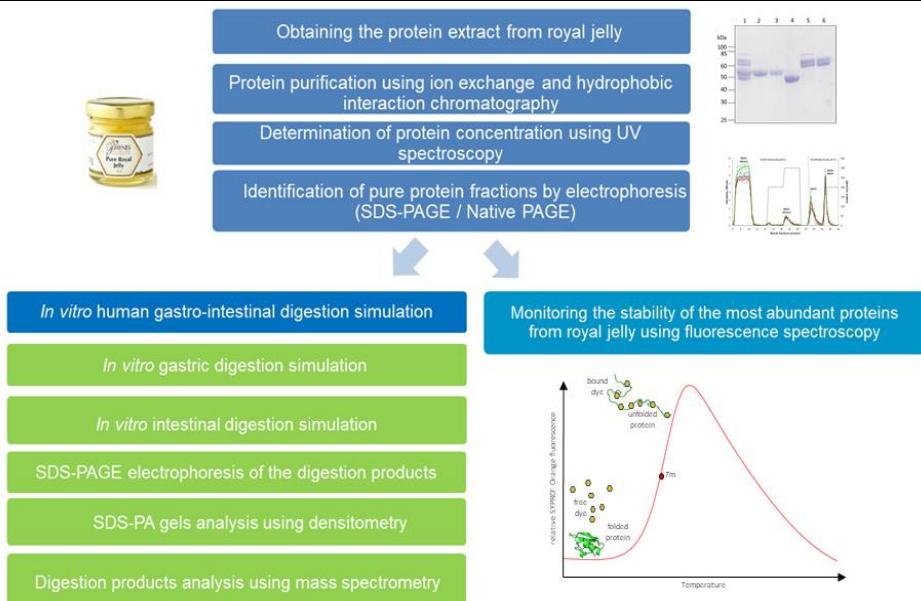


Fig. 1. Experimental design for obtaining and biochemically characterizing the most abundant proteins from royal jelly

4. RESULTS AND DISCUSSION

4.1. Obtaining individual and pure proteins from royal jelly

A first step in the characterization of the proteins is their isolation from the biological material. The objective was to purify the most abundant proteins of royal jelly at pH values close to those of the protein source, namely the pH of royal jelly (pH 4.0), by using chromatographic methods which separate the proteins of interest on the basis of their physico-chemical properties. By using the cation exchange chromatography it was possible to purify MRJP1 in oligomeric and monomeric form. Already after applying the protein extract on the column at pH 4.0 the oligomeric MRJP1 was not immobilized on the purification column and was found in the flow through. The monomeric MRJP1 was immobilized on the chromatographic column and was eluted by increasing the salt concentration to 300 mM NaCl. MRJP2 only eluted from the column by changing the pH from pH 4.0 to pH 7.0. MRJP3 co-eluted with MRJP5 with increasing salt gradient (200 mM NaCl).

I tried to elute MRJP3 separately from MRJP5 by using different NaCl concentrations and also by using ammonium sulfate, but it was not successful. Thus, I tried another type of chromatography, the hydrophobic interaction chromatography. I used different hydrophobicity chromatography media (Phenyl-sepharose 6 Fast Flow, Butyl-sepharose 4 Fast Flow or Octyl-sepharose 4 Fast Flow), different buffers (sodium

citrate/citric acid, sodium phosphate), different pH values (4.0, 7.0) and different salt concentrations (NaCl, ammonium sulfate). After all the attempts, I managed to develop a protocol for purifying MRJP3 by using hydrophobic interaction chromatography on Butyl-sepharose media. The mixture of proteins MRJP3/MRJP5 was applied on the chromatographic column in 50 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, 1.5 M (NH₄)₂SO₄, pH 7.0. MRJP3 was obtained already in the flow through, as well as in the washing or elution step with low concentrations of ammonium sulfate (1 M).

The purification by cation exchange chromatography was done for three different samples of royal jelly (LM1, LM2 and LM3). For each of the three different samples a purification chromatogram was constructed from the average values of three independent purifications of each one sample demonstrating the repeatability of the purification protocol.

The purity of the fractions was verified by gel electrophoresis in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide (SDS-PAGE) under denaturing conditions (Figure 2). The protein bands were excised from the gel and analyzed by mass spectrometry. The results of mass spectrometry confirmed the identity of the proteins obtained after purification. Oligomeric or monomeric form were highlighted by electrophoresis in non-denaturing conditions (Native-PAGE).

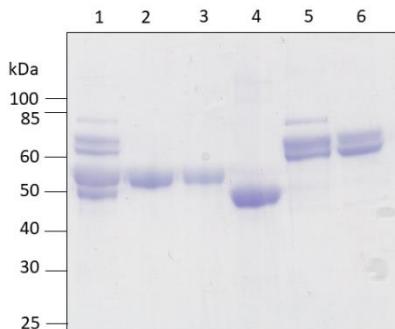


Fig.2. Electrophoresis in 12% SDS-polyacrylamide gel of the protein fractions obtained after cation exchange chromatography (2-5) and after hydrophobic interaction chromatography (6), respectively. The protein standard is represented by horizontal lines, while the molecular weight is given in kDa, 1-protein extract from royal jelly, 2-MRJP1 in oligomeric form, 3-MRJP1 in monomeric form, 4-MRJP2, 5-MRJP3 together with MRJP5, 6-MRJP3.

4.2. Stability during *in vitro* human digestion of the most abundant proteins from royal jelly

Royal jelly is a complex bee product which is not only important for the development of the brood and for the queen bee nutrition, as it can also have beneficial effects on human health. MRJPs are the most abundant proteins in royal jelly to whom various biological functions have been assigned from studies on cell cultures or animals. Still, a prerequisite for having health effects on humans is to survive the digestion throughout the gastrointestinal tract. The objective of this experiment was to

test the stability of the most abundant three proteins in royal jelly, MRJP1, MRJP2 and MRJP3 during *in vitro* simulation of the human digestion.

Bovine serum albumin was used as positive control and was totally digested by pepsin in the first 15 minutes, which proved the effectiveness of the digestion protocol.

By digesting the negative control, consisting in pepsin without MRJPs, with intestinal enzymes, it was possible to identify digestion fragments that do not belong to the digestion of proteins of interest.

In the gastric phase the proteins from royal jelly were much more stable compared with bovine serum albumin (positive control). In the presence of pepsin MRJP1 protein bands disappeared gradually without any digestion products, while the MRJP1 monomer was detected in the native state for 3 hours, while the oligomer was detected for 6 hours. MRJP2 native protein was detected in the presence of pepsin until the end of the experiment, respectively for a period of 24 hours. Also, in the gastric step MRJP2 was gradually cleaved to a digestion product of 44 kDa which was also stable up to the end of the gastric step. MRJP3 native protein was detectable up to 3 hours in the presence of pepsin in the gastric step and was cleaved by pepsin to a single digestion product of 44 kDa which occurred after 15 minutes of digestion with pepsin and has been determined during the gastric phase for 60 minutes, after which it was slowly degraded, being undetectable after 24 hours. During digestion with pepsin both MRJP2 and MRJP3 were cleaved in a digestion fragment of approximately 44 kDa, and the bands corresponding to the fragment after one hour pepsin digestion were excised from the gel electrophoresis and analyzed by mass spectrometry. Mass spectrometry results showed that both proteins lack the N and C termini of the polypeptide chain which indicates a high solvent accessibility of the terminals of these proteins at acidic pH (pH 2.0). After one hour of digestion in the presence of pepsin the most abundant proteins of royal jelly are still detectable in their native form and from the ingested amount will reach the intestine: $12.0 \pm 1.0\%$ the monomer MRJP1, $27.7 \pm 1.7\%$ the oligomer MRJP1, $84.5 \pm 2.8\%$ the MRJP2 and $18.0 \pm 4.6\%$ the MRJP3. Therefore, it can be stated that the most abundant proteins of royal jelly can reach the human intestine because they are still detectable up to 3 hours of digestion in the stomach.

In the intestinal phase MRJPs are digested quickly, while MRJP2 has again the highest stability and was detectable in native state up to 40 minutes ($1.5 \pm 0.7\%$ from the ingested amount) in the presence of trypsin and chymotrypsin.

4.3. The influence of pH on the stability of the most abundant proteins purified from royal jelly

The influence of pH on proteins is well known. Even insignificant differences in pH can cause changes in the biological functions of proteins.

MRJPs must be stable at various values of pH, from the synthesis in the endoplasmic reticulum of the secretory cells in the hypopharyngeal glands which have a pH of around 7.0 (DEMAUREX, 2002), to the secretory vesicles that have a pH of 5.1-5.5 (DEMAUREX, 2002) to the final product, royal jelly, with pH around 4.0. Moreover, although these proteins were initially discovered in royal jelly, their source is not limited to it, the proteins were discovered also in other parts of the bee, in the venom of pH 4.5-5.5 (PEIREN, 2005), bee hemolymph of pH 6.8 (BISHOP, 1923) and bee brain of pH 7.2 (KUCHARSKI, 1998) or in other products of the hive, such as honey of pH 3.2-4.5 (DA SILVA, 2016) and bee pollen of pH 4.4-5.4 (SIMUTH 2004). Therefore, MRJPs should be stable in a wide pH range and at different temperatures ranging from 20 °C during overwintering to 35 °C during the growth of brood (GATES, 1914).

The objective was to test the stability of the proteins MRJP1, MRJP2 and MRJP3 in the pH range of 2.5-11.0 using a fluorescence-based method.

This study allowed the assessment of the effect of pH on the denaturation kinetics of MRJPs. The results showed that the most abundant proteins from royal jelly have a high stability in acidic environment, having the maximal stability at pH 4.0 (monomeric MRJP1: $59.3 \pm 0.5^\circ\text{C}$ or 4.5 (MRJP2: $63.6 \pm 1.3^\circ\text{C}$; MRJP3: $64.8 \pm 0.4^\circ\text{C}$), which are pH values close the royal jelly pH. All the tested proteins were much more stable at pH 4.0 compared to pH 7.0 ($\Delta T_m = 14.2 - 18.6^\circ\text{C}$), meaning that the proteins are susceptible to denaturation in basic environment.

These results correspond to the results of the *in vitro* human digestion simulation showing that MRJPs have a high stability against the action of pepsin in the acidic conditions, and that MRJPs are basic labile, thus were easily degraded by intestinal enzymes.

5. CONCLUSIONS AND RECOMMENDATIONS

5.1. Conclusions regarding the purification of the most abundant proteins from royal jelly

MRJP1 was purified in both oligomeric and monomeric form, both forms being studied further. The fact that MRJP1 could be purified as an oligomeric complex means that the purification maintained the required conditions to have the oligomerization of the protein in its native state. This is important because for determining the activity of a protein it is required that the protein is in its native conformation. The ability to form oligomers may be essential biologically considering the fact that certain functions are dependent on the oligomeric or monomeric form.

The protein purification from different royal jelly samples is reproducible. Also, the purification protocol is optimal for obtaining the oligomeric complex of MRJP1.

5.2. Conclusions regarding the stability of the most abundant proteins from royal jelly during *in vitro* human digestion simulation

This experiment showed that the proteins MRJP1, MRJP2 and MRJP3 are generally stable in acidic conditions, while being unstable in basic environment.

At the gastric level these proteins have different resistance to cleavage under the action of pepsin from the stomach, MRJP2 had the highest stability, followed by MRJP3 and MRJP1.

At the intestinal level all native MRJPs and their digestion products are degraded in less than one hour under the action of the proteases, MRJP2 having again the highest stability (40 minutes).

In conclusion, these proteins can reach the human small intestine in their native state but they have to be assimilated quickly in order to have beneficial effect on human health. The probability that MRJPs reach the intestine in their native state is higher when royal jelly is consumed on an empty stomach, when the passing from the stomach to the intestine is of only few seconds.

5.3. Conclusions regarding the influence of pH on the stability of purified proteins from royal jelly

The temperature of thermal denaturation (T_m) is linked to the protein conformational stability and the protein biological function depends on its conformation. Conformational stability can be studied by various methods such as circular dichroism, FTIR (Fourier-transform infrared spectroscopy) or Raman spectroscopy, but these methods are complex and require a significant amount of sample.

In this study a simple and sensitive protocol based on the Thermofluor method (PANTOLIANO, 2001) was developed to characterize the most abundant proteins purified from royal jelly in terms of stability at different pH values. The results of the experiment showed that the MRJP1 monomeric form, MRJP2 and MRJP3 are more stable in acidic conditions (pH 4.0) compared to pH 7.0. ($\Delta T_m = 14.2 - 18.6^\circ\text{C}$).

5.4. Recommendations

5.4.1. Protein stability is a crucial factor for protein production, storage and *in vivo* or *ex vivo* testing. I developed a protocol based on Thermofluor method (PANTOLIANO, 2001) for testing MRJPs stability at different pH values which opens the way to analyze the various factors that can stabilize or destabilize the proteins (different buffers, additives, ligand interactions, etc). However, the denaturation temperature T_m could not be calculated for the oligomeric complex of MRJP1 which had high hydrophobicity in all tested conditions. Therefore the stability of the complex

should be evaluated by another method, for example circular dichroism, Raman spectroscopy or FTIR (Fourier-transform infrared spectroscopy).

5.4.2. Royal jelly is a valuable product that loses its therapeutic properties during storage. MRJPs are considered a potential indicator of freshness due to the correlation between the degradation of these compounds and storage conditions. MRJPs could be used as quality parameters. Suitable methods to determine the freshness of royal jelly could be set for preventing the entry of inferior goods on the market.

5.4.3. Bioavailability requires three characteristics: bioaccessibility, intestinal transport and metabolism (uptake and absorption). Using *in vitro* human digestion simulation I showed the bioaccessibility of the most abundant proteins from royal jelly. If the royal jelly proteins can be transported into the bloodstream where they can have beneficial effects on human health require studies using model systems for testing the intestinal absorption, like the epithelial cells Caco-2. These future studies could demonstrate the other two conditions for the bioavailability of native MRJPs.

5.4.4. The digestion products of MRJPs can have nutritional and physiological significance with potential applications for use in functional products that promote consumer health. The bioactive peptides resulting from the MRJPs proteolysis may have beneficial effects on consumer health, for example antioxidant, cholesterol-lowering or antibacterial effect etc.

6. Originality and innovative contributions of the thesis

Although the study of MRJPs began more than 40 years, information on their biological functions are limited. In this study, MRJP1, MRJP2 and MRJP3 were purified and afterwards were studied using biochemical methods. In order to be studied, proteins have to be firstly obtained in their native state. I managed to develop a purification protocol of the most abundant MRJPs from royal jelly in their native state by using cation exchange chromatography at pH 4.0 (natural pH of royal jelly) and hydrophobic interaction chromatography at pH 7.0.

Next, by using an *in vitro* experiment which reproduced the human gastrointestinal digestion I analyzed the stability of the purified MRJPs against the action of proteases. With this *in vitro* simulation I demonstrated the bioavailability of the most abundant MRJPs from royal jelly, which means that these proteins have the potential to reach the intestines in the human body where they may possibly exert biological effects.

The structure of the protein molecule is the result of chemical bonds between the amino acids constituting the protein, and the energy of these chemical bonds are influenced by various factors, including the pH. Therefore, the structure of the protein can be destabilized by altering the pH and the destabilization of the structure can mean the loss of the biological functions of the protein. I developed a fluorescence method

which allowed testing the stability at different pH values of the most abundant proteins from royal jelly. The oligomeric complex of MRJP1 showed increased hydrophobicity in all tested conditions, which is why the denaturation temperature Tm could not be estimated for this protein complex. Monomeric MRJP1, MRJP2 and MRJP3 were more stable at pH 4.0 compared to pH 7.0 ($\Delta T_m = 14.3\text{-}18.6\text{ }^{\circ}\text{C}$), while the denaturation temperatures Tm at pH 4.0 were between 59.3 and 64.2 °C In alkaline conditions at pH values ≥ 9.0 the tested MRJPs have a tendency to destabilize already at only 20 °C

REFERENCES

1. BISHOP, G. H., 1923, Body fluid of the honey bee larva, *Journal of Biological Chemistry*, 58, 543–565.
2. DA SILVA, P. M., GAUCHE, C., GONZAGA, L. V., COSTA, A. C. O., FETT, R., 2016, Honey: Chemical composition, stability and authenticity, *Food Chemistry*, 196, 309–323.
3. DEMAUREX, N., 2002, pH homeostasis of cellular organelles, *News in Physiological Sciences*, 17, 1–5.
4. FONTANA, R., MENDES, M. A., DE SOUZA, B. M., KONNO, K., CÉSAR, L. M. M., MALASPINA, O., PALMA, M. S., 2004, Jelleines: A family of antimicrobial peptides from the Royal Jelly of honeybees (*Apis mellifera*), *Peptides*, 25, 919–928.
5. GATES, B. N., 1914, The temperature of the bee colony, *Bulletin of the US Department of Agriculture* 96, 1 - 29.
6. KASHIMA, Y., KANEMATSU, S., ASAII, S., KUSADA, M., WATANABE, S., KAWASHIMA, T., NAKAMURA, T., SHIMADA, M., GOTO, T., NAGAOKA, S., 2014, Identification of a Novel Hypocholesterolemic Protein, Major Royal Jelly Protein 1 , Derived from Royal Jelly, *PLoS ONE*, 8, 9, e105073.
7. KUCHARSKI, R., MALESZKA, R., HAYWARD, D. C., BALL, E. E., 1998, A Royal Jelly Protein Is Expressed in a Subset of Kenyon Cells in the Mushroom Bodies of the Honey Bee Brain, *Naturwissenschaften*, 7, 85, 343–346.
8. 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 Agricultural and Food Chemistry*, 23, 56, 11447–11452.
9. OKAMOTO, I., TANIGUCHI, Y., KUNIKATA, T., KOHNO, K., IWAKI, K., IKEDA, M., 2003, Major royal jelly protein 3 modulates immune responses in vitro and in vivo, *Life Sciences*, 16, 2029 - 2045.
10. PANTOLIANO, M.W., PETRELLA, E.C., KWASNOSKI, J.D., LOBANOV, V.S., MYSLIK, J., GRAF, E., CARVER, T., ASEL, E., SPRINGER, B.A., LANE, P., SALEMME, F.R., 2001, High-density miniaturized thermal shift assays as a general strategy for drug discovery, *Journal of Biomolecular Screening*, 6, 429–440.
11. PEIREN, N., VANROBAEYS, F., DE GRAAF, D. C., DEVREESE, B., VAN BEEUMEN, J., JACOBS, F. J., 2005, The protein composition of honeybee venom reconsidered by a proteomic approach, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1, 1752, 1–5.
12. SABATINI, A. G., MARCAZZAN, G. L., CABONI, M. F., BOGDANOV, S., ALMEIDA-MURADIAN, L. B., 2009, Quality and standardisation of Royal Jelly, *Journal of ApiProduct and ApiMedical Science*, 1, 1, 1–6.
13. SCHMITZOVA, J., KLAUDINY, J., ALBERT, Š., SCHRÖDER, W., SCHRECKENGOST, W., HANES, J., JÚDOVÁ, J., SIMUTH, J., 1998, A family of major royal jelly proteins of the honeybee *Apis mellifera* L., *Cellular and Molecular Life Sciences*, 9, 54, 1020–1030.
14. SIMUTH, J., BILIKOVA, K., KOVÁČOVÁ, E., KUZMOVÁ, Z., SCHRODER, W., 2004, Immunochemical Approach to Detection of Adulteration in Honey: Physiologically Active Royal Jelly Protein Stimulating TNF- α Release Is a Regular Component of Honey, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 8, 52, 2154–2158.
15. VEZETEU, T. V.; BOBIS, O.; MORITZ, R. F. A.; BUTTSTEDT, A., 2017, Food to some, poison to others - honeybee royal jelly and its growth inhibiting effect on European Foulbrood bacteria, *MicrobiologyOpen*, 6, e00397.