تعیین اسیدآمینه‌های آزاد در ژله رویال، گرده زنبورعسل و گرده زنبور هیدرولیز شده

- **حسین محب‌الدینی***: گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران
- **عاطفه مقصودلو**: گروه شیمی مواد غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

تاریخ دریافت: آذر ۱۳۹۷ تاریخ پذیرش: اسفند ۱۳۹۷

چکیده

از میان محصولات مختلف گیاهی، محصولات زراعی و باغی مانند دانه‌های گرده به‌طور عمده به‌عنوان مواد دارویی و مکمل‌های غذایی به‌علت وجود مواد مغذی ضروری مثل اسیدآمینه، پروتئین، فلاونوئیدها و آلکالوئیدها به‌طور گسترده‌ای استفاده می‌شود. اسیدآمینه‌های ژله رویال طیف گسترده‌ای از عملکردهای دارویی و سلامت‌بخشی را در انسان دارند. مطالعه حاضر با هدف تعیین اسیدآمینه‌های آزاد ژله رویال، گرده زنبور عسل و گرده زنبور هیدرولیز شده می‌باشد. نتایج نشان داد که پرولین، لیزین، آسپارتیک اسید، گلوتامیک اسید، سرین و بتاآلانین اسیدآمینه‌های آزاد عمده در ژله رویال بودند. در این آزمایش مشخص شد که اسیدآمینه‌های آزاد آسپارتیک اسید، گلوتامیک اسید، آلانین، پرولین، تایروزین، متیونین، لوسین و ایزولوسین در گرده زنبورعسل وجود داشتند. مشخص شد که سه اسیدآمینه آزاد، آسپارتیک اسید، گلوتامیک اسید و پرولین در تمام نمونه‌های مورد مطالعه وجود داشتند. در این آزمایش گرده زنبورعسل هیدرولیز شده با آنزیم آلکالاز دارای بیش‌ترین تعداد آمینواسید آزاد (۲۲ اسیدآمینه) بود. علاوه بر اسیدآمینه‌های آزاد موجود در ژله رویال، گرده و گرده هیدرولیز شده زنبورعسل اسیدآمینه‌های آزاد دیگری نیز در کروماتوگرام‌ها وجود داشتند که نمی‌توان با اسید آمینه‌های استاندارد شناسایی کرد و به‌عنوان اسیدآمینه‌های آزاد ناشناخته درنظر گرفته شدند.

کلمات کلیدی: اسیدآمینه آزاد، ژله رویال، گرده، هیدرولیز

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: Mohebodini@yahoo.com

مقدمه

گرده گل که توسط زنبورعسل جمع‌آوری می‌شود، از آگلوتینه شدن گرده گل‌ها با شهد آن‌ها و بزاق زنبورعسل به‌دست می‌آید و پس از ذخیره در سبد گرده واقع در بند سوم پای زنبورعسل، در هنگام ورود زنبورعسل به‌درون کندو در تله گرده که توسط زنبوردار در آن‌جا تعبیه‌شده جمع‌آوری می‌گردد(Pascoal، ۲۰۱۳). گرده حاوی ۱۰ تا ۴۰ درصد پروتئین، ۱ تا ۱۳ درصد لیپید، ۱۳ تا ۵۵ درصد کربوهیدرات و ۲ تا ۶ درصد خاکستر می‌باشد (Bogdanov، ۲۰۱۴). ژله رویال که از هضم مستقیم گرده گل توسط آنزیم‌های پروتئازی و دیگر آنزیم‌های طبیعی زنبورعسل به‌وجود می‌آید، حاوی۲۷ تا ۴۱ درصد پروتئین، حدود ۳۰ درصد کربوهیدرات، ۸ تا ۱۹ درصد چربی، ۲ تا ۵ درصد خاکستر، بر حسب وزن خشک می‌باشد (Bogdanov، ۲۰۱۴). ازجمله ترکیبات مهم و فعال زیستی ژله رویال و گرده گل عبارتند از: هشت اسیدآمینه اصلی (به‌ویژه اسیدهای آمینه آزاد پرولین و لیزین) و ۱۰ اسیدآمینه فرعی، کلاژن (Morais و همکاران، ۲۰۱۱؛ Boselli و همکاران، ۲۰۰۳)، اسیدهای آلی آزاد با ساختار غیرمعمول وکم‌یاب درطبیعت مانند مونو و هیدروکسی اسیدها و دی‌هیدروکسی کربوکسیلیک اسیدها با ۸ و ۱۰ اتم کربن، اسید اصلی ژله رویال ۱۰-هیدروکسی۲- دسنوئیک اسید (HDA) (Bogdanov، ۲۰۱۴)، ویتامین‌ها و مواد معدنی و ترکیبات فرعی دیگر مانند پلی‌فنل‌ها، نوکلئوتیدها، استیل‌کولین و ترکیبات هورمونی (Ramadan و Al-Ghamdi، ۲۰۱۲؛ Crenguta و همکاران، ۲۰۱۱)، گلیکوپروتئین‌ها و پپتیدهای مختلف مانند آپیسیمین (Apisimin) (Miyamoto و همکاران، ۲۰۰۴). بیش از ۱۶ اسیدآمینه ضروری و غیرضروری در گرده زنبورعسل از منابع مختلف گیاهی یافت شده است. ۱۱ اسید آمینه (سیستئین، هیستیدین، ایزولوسین، لوسین، لیزین، متیونین، فنیل‌آلانین ترئونین، تریپتوفان، تیروزین و والین) نمی‌توانند توسط بدن انسان تولید شوند و باید در رژیم غذایی قرار گیرند. این‌ها اسید آمینه‌های ضروری نامیده می‌شوند و گرده زنبورعسل می‌تواند یکی از منابع مهم آن‌ها باشد. اسیدآمینه‌های ضروری برای زنبورعسل عبارتند از: آرژنین، هیستیدین، ایزولوسین، لوسین، لیزین، متیونین، فنیل آلانین، ترئونین، تریپتوفان و والین (De Groot، ۱۹۵۳). غلظت اسید آمینه‌های ضروری در گرده زنبورعسل، که به‌صورت درصد کل اسیدهای آمینه بیان می‌شود، بین ۳۴/۵۹٪ تا ۴۸/۴۹٪ می‌باشد (Nicolson و Human، ۲۰۱۳). گلوتامیک اسید، آسپارتیک اسید، پرولین، لوسین و لیزین بیش‌ترین فراوانی اسیدهای آمینه در پروتئین گرده‌را دارند (Nicolson و Human، ۲۰۱۳). حضور ترکیبات مختلف باعث ویژگی‌های عملکردی و سلامتی بخش در گرده گل و ژله رویال گردیده است (Estevinho و همکاران، ۲۰۱۲؛ Bogdanov، ۲۰۱۴). پپتیدهای تولیدی توسط هیدرولیز آنزیمی و اسیدهای آمینه آزاد می‌توانند ویژگی‌هایی مانند تقویت سیستم ایمنی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، کاهش‌دهندگی کلسترول و تشدید جذب مواد معدنی را دارا باشند (Pedroche و همکاران، ۲۰۰۷؛ Jamdar و همکاران، ۲۰۱۰). ترکیب ماده هیدرولیز شده، نوع و میزان اسیدهای آمینه آزاد بستگی به سوبسترای پروتئینی، آنزیم پروتئولیتیک، نسبت آنزیم به سوبسترا، شرایط فیزیکوشیمیایی، pH، تیمار حرارتی اولیه، مدت زمان هیدرولیز و درجه حرارت واکنش دارد (Power و همکاران، ۲۰۱۳). هم‌چنین آن‌ها گزارش کردند که تعیین محتوای آمینو اسیدی آزاد ممکن است یک روش موثر برای دستیابی به تازگی ژله‌رویال و گرده باشد. به‌عنوان مثال اسیدآمینه‌های آزاد در فرایند قهوه‌ای شدن که در طی ذخیره غذا اتفاق می‌افتد، دخالت دارند، بنابراین نقش موثری در کیفیت حسی این محصولات ایفا می‌کنند. با توجه به این‌که تحقیقات اندکی در زمینه بررسی اسید آمینه‌های آزاد ژله‌رویال و گرده صورت گرفته است هدف از انجام این آزمایش بررسی اسیدآمینه‌های آزاد پروتئین گرده هیدرولیز شده و ژله رویال بود.

مواد و روش‌ها

تهیه مواد: گرده‌گل و ژله رویال از مراکز پرورش زنبورعسل واقع در استان اردبیل تهیه گردید. انجام آزمایشات در دانشگاه محقق اردبیلی و موسسه فناوری کشاورزی و مواد غذایی (IATA) شهر والنسیا در کشور اسپانیا انجام شد. آنزیم‌های آلکالاز و پپسین از شرکت سیگما (Sigma) و سایر محلول‌های شیمیایی و مواد آزمایشگاهی از شرکت مرک (Merck) و با درجه خلوص بالا و مناسب برای HPLC تهیه شدند.

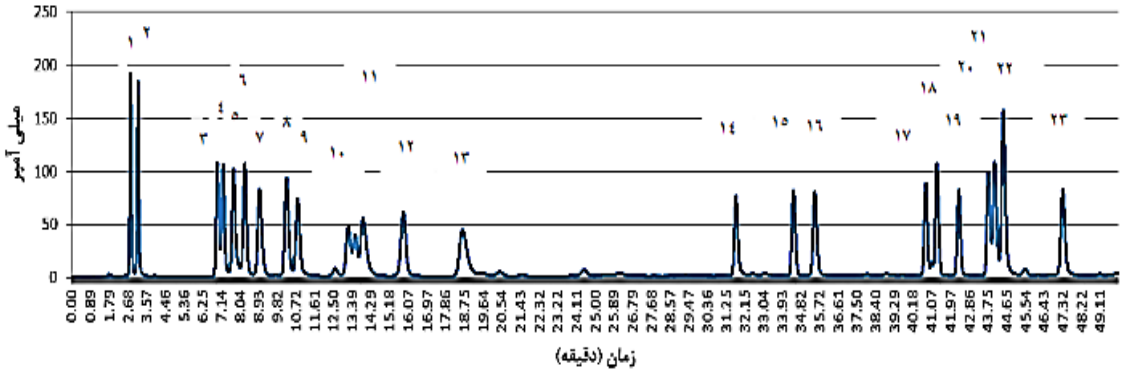
هیدرولیز گرده گل: هیدرولیز گرده گل با آنزیم‌های آلکالاز و پپسین در دما و pH مطلوب این آنزیم‌ها انجام شد. آنزیم‌ها با غلظت‌های ۱/۵ درصد وزنی به محلول پروتئینی اضافه شد و هیدرولیز در مدت زمان ۴ ساعت و دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد و pH=۸ برای آلکالاز، دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و pH=۳ برای پپسین در انکوباتورهای شیکردار و در دما و pH ثابت برای هر آنزیم انجام گرفت (Villanueva و همکاران، ۱۹۹۹). در انتها در دمای ۸۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ دقیقه واکنش آنزیمی متوقف شد. برای حذف ترکیبات اضافی، سانتریفیوژ کردن در ۴۰۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ انجام شد و سوپرناتانت پس از جمع‌آوری با خشک کن انجمادی خشک شد (Villanueva و همکاران، ۱۹۹۹؛ Guo و همکاران، ۲۰۰۵؛ Matsuoka و همکاران، ۲۰۱۲).

مراحل آماده‌سازی نمونه جهت بررسی اسیدآمینه‌های آزاد: ابتدا ۱۰۰ میلی‌گرم از نمونه (گرده، ژله رویال و گرده هیدرولیز شده

با آلکالاز، گرده هیدرولیز شده با پپسین) با ۵۰۰ میکرولیتر اسید کلریدریک ۰/۰۱ نرمال مخلوط گردید. از مخلوط به‌دست آمده ۱۰۰ میکرولیتر برداشته شد و با ۵۰ میکرولیتر نورلوسین (۱۰ میلی‌مولار) و ۷۵۰ میکرولیتر استونیتریل مخلوط گردید. ورتکس انجام و به‌مدت یک ساعت در دمای محیط ثابت نگه داشته شد. سانتریفیوژ انجام شد (۵ دقیقه، ۱۲۰۰۰ rpm). سوپرناتانت برداشته شد و به اواپراتور سانتریفیوژی منتقل و فاز استونیتریل جدا شد، سپس به فریزدرایر منتقل و لیوفیلیزه صورت گرفت. ۵۰ میلی‌گرم از نمونه دپروتئینه شده با یک میلی‌لیتر اسیدکلریدریک(۰/۰۱ نرمال) مخلوط شد. سپس ۵۰ میکرولیتر از محلول بالا با ۵۰ میکرولیتر نورلوسین مخلوط شد. سپس در فریزدرایر خشک شد. به نمونه‌های به‌دست آمده از مرحله قبل ۱۵ میکرولیتر drying reagent (متانول، استات سدیم ۱ مولار، تری‌اتیل آمین) اضافه شد و دوباره در خشک‌کن انجمادی خشک گردید. به پودر به‌دست آمده ۱۵ میکرولیتر derivatization reagent (متانول، آب، تری‌اتیل‌آمین، فنیل ایزوتیوسیانید) اضافه گردید و ورتکس انجام شد. پس از ۲۰ دقیقه نگه‌داری با استفاده از خشک‌کن سانتریفیوژی متانول حذف شد. به مخلوط به‌دست آمده dilution reagent (۵ میلی‌مولار دی‌سدیم فسفات با ۵٪ استونیتریل) اضافه شد. پس از سانتریفیوژ سوپرناتانت جدا گردید و به ستون HPLC تزریق گردید. و در نهایت بررسی نمودارهای به‌دست آمده از HPLC صورت پذیرفت (Gonzalez-paramas و همکاران، ۲۰۰۶).

نتایج

اسیدآمینه‌های استاندارد: نمونه استاندارد شامل اسیدآمینه‌های آسپارتیک اسید، گلوتامیک اسید، سرین، آسپاراژین، گلایسین، گلوتامین، بتاآلانین، تائورین، هیستیدین، ترئونین، آلانین، آرژنین، پرولین، تیروزین، والین، متیونین، ایزولوسین، لوسین، نورلوسین (استاندارد داخلی)، فنیل‌آلانین، تریپتوفان، اورنیتین و لیزین بود (شکل ۱).

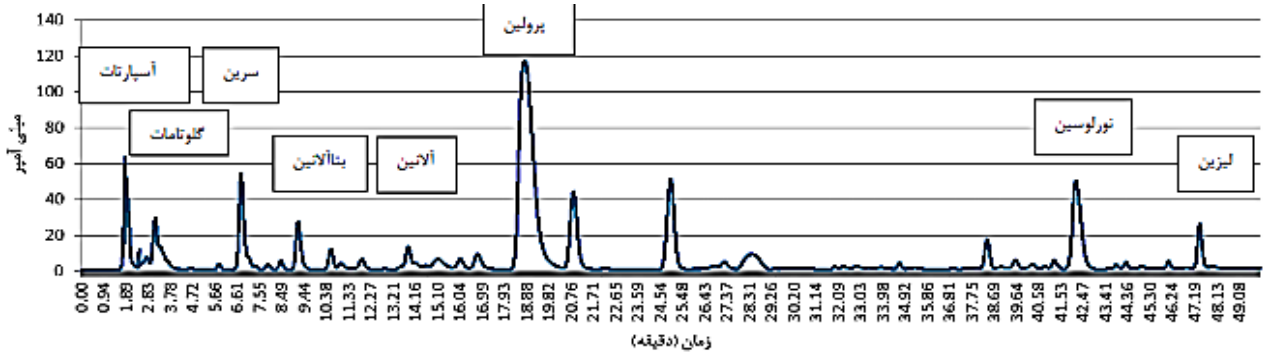


شکل ۱: کروماتوگرام مربوط به اسیدآمینه‌های استاندارد شامل: ۱. آسپارتات ۲. گلوتامات ۳. سرین ۴. آسپاراژین ۵. گلایسین۶. گلوتامین ۷. بتا-آلانین ۸. تائورین ۹. هیستیدین ۱۰. ترئونین ۱۱. آلانین ۱۲. آرژنین ۱۳. پرولین ۱۴. تیروزین ۱۵. والین ۱۶. متیونین ۱۷. ایزولوسین ۱۸. لوسین ۱۹. نورولوسین (استاندارد داخلی) ۲۰. فنیل‌آلانین ۲۱. تریپتوفان، ۲۲. اورنیتین ۲۳. لیزین

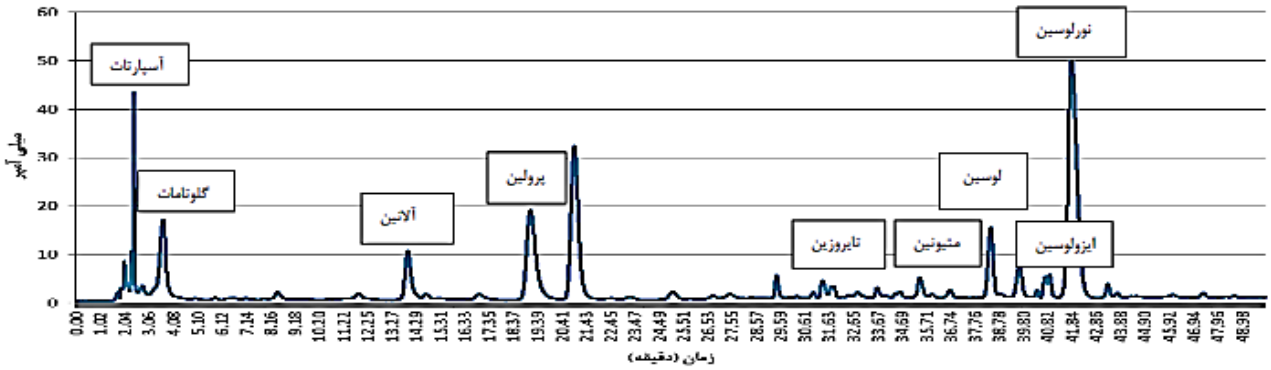
اسیدآمینه‌های آزاد ژله رویال: در این آزمایش آنالیز اسید آمینه‌های آزاد ژله رویال در شکل ۲ آورده شده است. با توجه به نمودار مهم‌ترین اسیدآمینه آزاد در ژله رویال مربوط به اسیدآمینه پرولین (Pro) می‌باشد. اسیدآمینه‌های آزاد دیگر شامل آسپارتات، گلوتامات، سرین، لیزین، بتا آلانین و آلانین بودند. نورلوسین نیز به عنوان استاندارد داخلی به نمونه تزریق شده بود.

اسیدآمینه‌های آزاد گرده: اسیدآمینه‌های آزاد موجود در گرده زنبورعسل در شکل ۳ نشان داده شده است. این اسیدآمینه‌ها شامل آسپارتات، گلوتامات، آلانین، پرولین، تایروزین، متیونین، ایزولوسین و لوسین بودند.

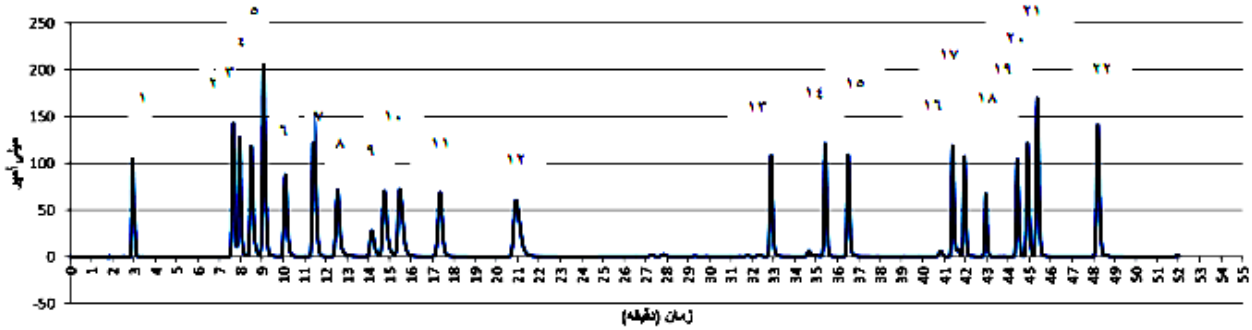
اسیدآمینه‌های آزاد گرده هیدرولیز شده با آنزیم آلکالاز: اسیدهای آمینه آزاد موجود در گرده گل هیدرولیز شده با آنزیم آلکالاز در شکل ۴ آورده شده است. با مقایسه نمودار اسیدآمینه‌های گرده هیدرولیز شده با آنزیم آلکالاز و نمونه استاندارد شباهت زیادی در اسیدآمینه‌های آن‌ها وجود داشت. به‌طوری‌که به‌جز اسیدآمینه آسپارتات که در نمونه آلکالاز مشاهده نگردید بقیه اسیدآمینه‌های آزاد با پیک‌های مشخص در هر دو نمونه وجود داشتند. اسیدآمینه‌های موجود در نمونه گرده هیدرولیز شده با آلکالاز شامل گلوتامات، سرین، آسپاراژین، گلایسین، گلوتامین، بتاآلانین، تائورین، هیستیدین، ترئونین، آلانین، آرژنین، پرولین، تیروزین، والین، متیونین، ایزولوسین، لوسین، نورلوسین (استاندارد داخلی)، فنیل‌آلانین، تریپتوفان، اورنیتین و لیزین بودند که شباهت زیادی با نمونه استاندارد داشتند.



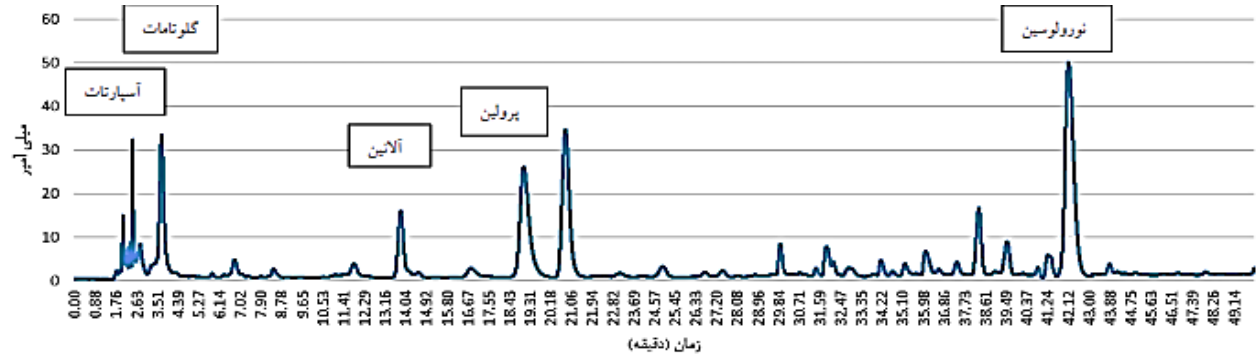
شکل ۲: کروماتوگرام مربوط به اسیدآمینه‌های آزاد ژله رویال



شکل ۳: کروماتوگرام مربوط به اسیدآمینه‌های آزاد موجود در گرده زنبورعسل



شکل ۴: کروماتوگرام مربوط به اسید آمینه‌های آزاد موجود در گرده زنبورعسل هیدرولیز شده با آنزیم آلکالاز شامل: ۱. گلوتامات۲. سرین ۳. آسپاراژین ۴. گلایسین۵. گلوتامین ۶. بتا-آلانین ۷. تائورین ۸. هیستیدین ۹. ترئونین ۱۰. آلانین ۱۱. آرژنین ۱۲. پرولین ۱۳. تیروزین ۱۴. والین ۱۵. متیونین ۱۶. ایزولوسین ۱۷. لوسین ۱۸. نورولوسین (استاندارد داخلی) ۱۹. فنیل‌آلانین ۲۰. تریپتوفان، ۲۱. اورنیتین ۲۲. لیزین



شکل ۵: کروماتوگرام مربوط به اسید آمینه‌های آزاد گرده هیدرولیز شده با آنزیم پپسین؛ نورولوسین به عنوان استاندارد داخلی به نمونه تزریق شده است.

اسیدآمینه‌های آزاد گرده هیدرولیز شده با آنزیم پپسین: اسیدآمینه‌های آزادگرده گل هیدرولیزشده با پپسین در شکل ۵ آورده شده است. مقایسه نمودار اسیدآمینه‌های آزاد گرده گل هیدرولیز شده با پپسین با نمودار استاندارد نشان داد که اسید آمینه‌های آزاد کم‌تری در نمونه گرده هیدرولیز شده با پپسین وجود دارد.

بحث

اسیدآمینه‌های استاندارد: نمونه استاندارد شامل اسیدآمینه‌های آسپارتیک‌اسید، گلوتامیک‌اسید، سرین، آسپاراژین، گلایسین، گلوتامین، بتاآلانین، تائورین، هیستیدین، ترئونین، آلانین، آرژنین، پرولین، تیروزین، والین، متیونین، ایزولوسین، لوسین، نورلوسین (استاندارد داخلی)، فنیل‌آلانین، تریپتوفان، اورنیتین و لیزین بود (شکل ۱). همان‌طورکه مشخص است در دقایق ابتدایی، اسیدهای آمینه‌ای که در ساختار زنجیره جانبی خود حاوی گروه‌های باردار بوده ازجمله آسپارتیک اسیدو گلوتامیک اسید از ستون HPLC خارج شدند. اما با نزدیک شدن به دقایق انتهایی، اسیدهای آمینه‌ای که در ساختار زنجیره جانبی خود حاوی گروه‌های آبگریز بودند، خارج گردیدند. به‌عنوان مثال فنیل‌آلانین و تریپتوفان که در زنجیره جانبی خود دارای حلقه‌های بنزن و ایندول هستند در دقایق انتهایی مشاهده شدند. در این زمینه Lassoued و همکاران (۲۰۱۵) به‌منظور تقسیم‌بندی کروماتوگرام به نواحی آبگریز و آبدوست، دو اسیدآمینه تیروزین و تریپتوفان را به صورت جداگانه به HPLC تزریق نمودند و با توجه زمان خروج آن‌ها از ستون، کروماتوگرام را به سه ناحیه تقسیم نمودند: ناحیه ۱) قبل از تیروزین(اسیدهای‌آمینه آبدوست)، ناحیه ۲) بین تیروزین و تریپتوفان (اسیدهای آمینه اندکی آبگریز)و ناحیه ۳) پس از تریپتوفان (اسیدهای آمینه بسیار آبگریز). در واقع RP-HPLC به‌دلیل تغییر قطبیت فاز متحرک به‌صورت گرادیانی، اسیدهای آمینه را براساس میزان آبگریزی نسبی جدا می‌کند، بنابراین انتظار می‌رود اسیدهای آمینه‌ای که دیرتر از ستون خارج می‌شوند نسبت به اسیدهای آمینه ابتدایی حاوی مقدار بیش‌تری اسیدآمینه آبگریز و آروماتیک باشد. این مساله توسط Pownall و همکاران (۲۰۱۰) گزارش شده است.

اسیدآمینه‌های آزاد ژله رویال: در این آزمایش آنالیز اسید آمینه‌های آزاد ژله رویال در شکل ۲ آورده شده است. با توجه به نمودار مهم‌ترین اسیدآمینه آزاد در ژله رویال مربوط به اسیدآمینه پرولین (Pro) می‌باشد. اسیدآمینه‌های آزاد دیگر شامل آسپارتات، گلوتامات، سرین، لیزین، بتا آلانین و آلانین بودند. نورلوسین نیز به عنوان استاندارد داخلی به نمونه تزریق شده بود. نتایج پژوهش حاضر با گزارشات Boselli و همکاران (۲۰۰۳) مطابقت داشت. Boselli و همکاران (۲۰۰۳) گزارش کردند که اسیدآمینه‌های اصلی موجود در ژله رویال پرولین، لیزین، بتاآلانین، فنیل آلانین، سرین، آسپارتات و گلوتامات می‌باشند.آن‌ها پرولین و لیزین را به‌عنوان بیش‌ترین و کم‌ترین اسیدآمینه یافت شده در ژله رویال اعلام کردند. Crailsheim و Leonhard (۱۹۹۷) گزارش کردند که پرولین آزاد در همولنف زنبور عسل بیش‌ترین غلظت را داشت. به‌نظر می‌رسد که پرولین آزاد در ژله رویال از همولنف زنبورهای کارگر انتقال یافته است. اسیدآمینه‌های گلایسین، لوسین، آسپاراژین، گلوتامین، آلانین، ایزولوسین، تریپتوفان، فنیل‌آلانین، تیروزین، لیزین، متیونین، آسپارتات، سیستئین و هیستیدین اسیدهای آمینه آزاد دیگر یافت شده در ژله رویال بود. بر اساس گزارش‌های Liming و همکاران (۲۰۰۹) پرولین آمینواسید اصلی با میانگین غلظت ۳/۲ و ۳/۵ میلی‌گرم در گرم بود. محققان گزارش‌های مشابهی از اسیدآمینه‌های آزاد اصلی ژله رویال ارائه دادند که شامل پرولین، لیزین، گلوتامین، گلوتامات بودند. آن‌ها اعلام کردند که اسیدآمینه‌ها می‌توانند یک معرف یا نشانگر خوب از منشا ژله رویال باشند.

اسیدآمینه‌های آزاد گرده: اسیدآمینه‌های آزاد موجود در گرده زنبورعسل در شکل ۳ نشان داده شده است. این اسیدآمینه‌ها شامل آسپارتات، گلوتامات، آلانین، پرولین، تایروزین، متیونین، ایزولوسین و لوسین بودند. Nicolson و هیومن (۲۰۱۳) گزارش کردند که اسید آمینه‌های گلوتامات، آسپارتات، پرولین، لوسین و لیزین بیش‌ترین فراوانی را در پروتئین گرده دارند. با توجه به پروفایل اسیدهای آمینه آزاد ژله رویال، اسیدآمینه‌های آزاد گلوتامات، آسپارتات، پرولین و آلانین می‌توانند مستقیماً از گرده تأمین شوند. سایر اسیدآمینه‌های آزاد ژله رویال احتمال دارد در نتیجه تجزیه پروتئین‌های گرده و تبدیل اسیدآمینه‌ها به یکدیگر تولید شوند.اسیدآمینه‌های آزاد مختلفی در گرده گیاهان مختلف و ژله رویال مشاهده شدند که این اسید آمینه‌ها به‌وسیله اسیدآمینه‌های استاندارد قابل تشخیص نیستند و به همین دلیل به‌عنوان اسیدآمینه‌های ناشناخته طبقه‌بندی می‌شوند (Ismile و همکاران، ۲۰۱۲). Kim و همکاران (۱۹۸۷) گزارش کردند که سطوح آرژنین، آمیدها (مانند آسپاراژین و گلوتامین) و پرولین به‌طور قابل توجهی در گرده‌ها در اثر استفاده از کودهای ازته افزایش می‌یابند. از سوی دیگر، اسیدگلوتامیک به‌عنوان سوبسترای عمومی گلوتامین، آرژنین و پرولین و گیرنده اصلی NH^+ و هم‌چنین تولید آمونیاک است. بنابراین، انباشت پرولین در گرده با عدم حضور آرژنین در آن می‌تواند به‌دلیل رقابت با سوبسترای آنزیم‌های بیوسنتز آرژنین و پرولین، انباشت محصولات مربوط به تعادل فعالیت آنزیم و قابلیت دسترسی سوبسترا باشد (Ismile و همکاران، ۲۰۱۲).

اسیدآمینه‌های آزاد گرده هیدرولیز شده با آنزیم آلکالاز:
اسیدهای آمینه آزاد موجود در گرده گل هیدرولیز شده با آنزیم آلکالاز در شکل ۴ آورده شده است. با مقایسه نمودار اسیدآمینه‌های گرده هیدرولیز شده با آنزیم آلکالاز و نمونه استاندارد شباهت زیادی در اسیدآمینه‌های آن‌ها وجود داشت. به‌طوری که به‌جز اسیدآمینه آسپارتات که در نمونه آلکالاز مشاهده نگردید بقیه اسیدآمینه‌های آزاد با پیک‌های مشخص در هر دو نمونه وجود داشتند. اسیدآمینه‌های موجود در نمونه گرده هیدرولیز شده با آلکالاز شامل گلوتامات، سرین، آسپاراژین، گلایسین، گلوتامین، بتاآلانین، تائورین، هیستیدین، ترئونین، آلانین، آرژنین، پرولین، تیروزین، والین، متیونین، ایزولوسین، لوسین، نورلوسین (استاندارد داخلی)، فنیل‌آلانین، تریپتوفان، اورنیتین و لیزین بودند که شباهت زیادی با نمونه استاندارد داشتند، این مسئله بیانگر آن است که اسیدهای آمینه آزاد موجود در گرده هیدرولیز شده با آلکالاز، از تنوع بالایی برخوردار هستند که دلیل آن را می‌توان به عملکرد غیر اختصاصی آنزیم الکالاز نسبت داد. آنزیم آلکالاز به‌عنوان یک پروتئاز سرینی، در جایگاه فعال خود دارای اسیدآمینه‌های آسپاراژین، هیستیدین و سرین می‌باشد. گروه کربوکسیلی موجود در اسیدآمینه آسپاراژین با نیترژون موجود در حلقه ایمیدازول اسیدآمینه هیستیدین پیوند هیدروژنی برقرار می‌کند. نیتروژن دیگر موجود در اسیدآمینه هیستیدین با پروتون موجود در گروه هیدروکسیل اسیدآمینه سرین پیوند هیدروژنی برقرار کرده و باعث ایجاد بار منفی جزئی بر اتم اکسیژن موجود در اسیدآمینه سرین می‌گردد. وجود اتم اکسیژن با بار منفی جزئی، این توانایی را برای آنزیم آلکالاز ایجاد می‌کند که با حمله نوکلئوفیلی به باندهای آمیدی، باعث شکسته شدن پروتئین و تولید پپتیدها و اسیدهای آمینه آزاد مختلف شود. غیراختصاصی عمل کردن آنزیم آلکالاز در حمله به باندهای آمیدی باعث افزایش بازدهی آن در پیشرفت هیدرولیز و تولید پپتیدهایی با طول زنجیره‌های مختلف و تعداد زیادی اسیدهای آمینه آزاد می‌گردد (Oveisi pour و همکاران، ۲۰۰۹؛ Polgar، ۱۹۸۷).

اسیدآمینه‌های آزاد گرده هیدرولیز شده با آنزیم پپسین:
اسیدآمینه‌های آزاد گرده گل هیدرولیز شده با پپسین در شکل ۵ آورده شده‌است. مقایسه نمودار اسیدآمینه‌های آزاد گرده گل هیدرولیز شده با پپسین با نمودار استاندارد نشان داد که اسیدآمینه‌های آزاد کم‌تری در نمونه گرده هیدرولیز شده با پپسین وجود دارد، که دلیل آن را می‌توان به عملکرد اختصاصی آنزیم پپسین نسبت داد. جایگاه فعال آنزیم پپسین حاوی گروه تیول است. بنابراین تنها باندهای مجاور اسیدآمینه تریپتوفان، تیروزین و فنیل‌آلانین موجود در پروتئین را می‌شکند. بنابراین اسیدهای آمینه آزاد محدودتری را ایجاد می‌کند (Khantaphant و همکاران، ۲۰۰۸؛ Je و همکاران، ۲۰۰۹). در این پژوهش اسیدآمینه‌های آزاد گرده گل هیدرولیز شده با پپسین شامل آسپارتیک، گلوتامیک، آلانین، پرولین و نورولوسین (استاندارد داخلی) بودند. با مقایسه شکل ۲ و ۴ می‌توان دریافت که کروماتوگرام اسید آمینه‌های آزاد گرده هیدرولیز شده با آنزیم پپسین و کروماتوگرام مربوط به اسیدآمینه‌های آزاد موجود در گرده زنبورعسل شباهت بسیار زیادی به‌هم دارند، بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که در اثر هیدرولیز گرده گل با پپسین، اسیدآمینه آزاد جدیدی تولید نشده و تقریباً تمامی اسیدهای آمینه آزاد یافت شده در گرده هیدرولیز شده با پپسین، قبل از هیدرولیز نیز در گرده یافت شده‌اند.

با توجه به نتایج به‌دست آمده بسیار دشوار است که براساس اطلاعات مربوط به محتوای اسیدآمینه‌های آزاد گرده و ژله رویال در مورد آن‌ها نتیجه‌گیری کلی انجام داد، زیرا ترکیبات اسیدآمینه‌های آزاد با شرایط آب و هوایی و تغذیه و هم‌چنین الگوهای نگه‌داری متفاوت است. پرولین در گرده گل در ارتباط نزدیک با قدرت باروری آن‌ها است و در تشکیل لوله گرده و سایر واکنش‌های متابولیکی مرتبط با روند جنسی دخیل است. غلظت پرولین اغلب تحت استرس فیزیولوژیکی افزایش می‌یابد و در چنین شرایطی دیگر اسیدآمینه‌ها به پرولین تبدیل می‌شوند تا به‌عنوان مخزن اسید آمینه‌های گرده‌ای عمل کنند. وجود پرولین در ژله رویال نیز در نتیجه برداشت مستقیم از گرده می‌باشد.

با این وجود یکسری از اسیدآمینه‌های آزاد در ژله رویال وجود دارند که در گرده وجود ندارند و به احتمال زیاد توسط خود زنبور عسل یا به‌واسطه تجزیه پروتئینی و پپتیدی ساخته می‌شوند. نمونه گرده هیدرولیز شده با آلکالاز بیش‌ترین اسیدآمینه‌های آزاد را داشت و در همه نمونه‌ها اسیدآمینه‌های آزاد پرولین، گلوتامیک و آلانین حضور داشتند. پروفایل اسیدآمینه گرده و هیدرولیز شده با پپسین با هم مشابهت زیادی داشتند و می‌توان گفت که در اثر هیدرولیز گرده با پپسین اسیدآمینه آزاد جدیدی تولید نشده است. علاوه بر اسید آمینه‌های آزاد موجود در گرده، ژله رویال و گرده هیدرولیز شده اسید آمینه‌های آزاد دیگری نیز در کروماتوگرام‌ها وجود داشتند که نمی‌توان با اسیدآمینه‌های استاندارد شناسایی کرد و به‌عنوان اسید آمینه‌های آزاد ناشناخته درنظر گرفته شدند.

منابع

۱. **Bogdanov, S., 2014.** Royal Jelly, Bee Brood: Composition, Health, Medicine: A Review. Bee Product Science. Vol. 28, No. 3, pp: 118-153.

٢. **Boselli, E.; Caboni, M.; Sabatini, A.G.; Marcazzan, G.L. and Lercker, G., 2003.** Determination and changes of free amino acids in royal jelly during storage. Apidologie. Vol. 34, No. 2, pp: 129-137.

٣. **Crailsheim, K. and Leonhard, B., 1997.** Amino Acids. Vol. 13, 141 p.

٤. **Crenguța, L.P.; Liviu, A.l.; Mărghitaș, O.; Daniel, S.; Dezmirean, A.; Șapcaliu, I.R. and Mariana, N., 2011.** Biological Activities of Royal Jelly, Review. Animal Science and Biotechnologies. Vol. 44, No. 2, pp: 108-118.

٥. **De Groot, A.P., 1953.** Protein and amino acid requirements of the honey bee (*Apis mellifera* L.). Physiologia Comparataet Oecologia. Vol. 3, pp: 197-285.

٦. **Estevinho, L.M.; Rodrigues, S.; Pereira, A.P. and Feás, X., 2012.** Portuguese bee pollen: Palynological study nutritional and microbiological evaluation. International Journal of Food Science and Technology. Vol. 47, pp: 429-435.

٧. **Gonzalez-paramas, A.M.; Alfonso, G.B.J.; Cordon, M.C.; Garcia-Villanova, R.J. and Sánchez, J.S., 2006.** HPLC fluorimetric method for analysis of amino acids in products of the hive (honey and bee-pollen). Food Chemistry. Vol. 95, pp: 148-156.

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

٩. **Ismile, H.; Talukder, G.; Roy, N. and Shaha, R.K., 2012.** Analysis of the free amino acid content in pollen of Bangladeshi common fruits flower of known allergenic activity. Agricultural Science Research Journal. Vol. 2, No. 3, pp: 11-16.

١٠. **Jamdar, S.N.; Rajalakshmi, V.; Pednekar, M.D.; Juan, F. and Arun Sharma, V.Y., 2010.** Influence of degree of hydrolysis on functional properties, antioxidant activity and ACE inhibitor activity of peanut protein hydrolysate. Food Chemistry. Vol. 121, pp: 178-184.

١١. **Je, J.Y.; Lee, M.H.; Lee, K.H. and Ahn, C.B., 2009.** Antioxidant and hypertensive protein hydrolysates produced from tuna liver by enzymatic hydrolysis. Food Research International. Vol. 42, pp: 1266-1272.

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

١٣. **Kim, V.T.; Glerum. C.; Stoddart, J. and Columbo, S.J., 1987.** Effect of fertilization on free amino acid concentration in black spruce and jack pine containerized seedlings. Can. J. For. Res. Vol. 17, pp: 27-30.

١٤. **Lassoued, I.; Mora, L.; Barkia, A.; Aristoy, M.C.; Nasri, M. and Toldra, F., 2015.** Bioactive peptides identified in thornback ray skin's gelatin hydrolysates by proteases from *Bacillus subtilis* and *Bacillus amyloliquefaciens.* Journal of Proteomics, Vol. 128, pp: 8-17.

١٥. **Liming, W.; Jinhui, Z.; Xiaofeng, X.; Yi, L. and Jing, Z.J., 2009.** Food Comp. Anal. Vol. 22, 242 p.

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

١٧. **Miyamoto, M.; Tsumura, K.; Kimura, M.; Okihara, S.; Sugimoto, H. and Yamada, H., 2004.** N-glycans bearing beta-1,3-galactosyl residue in royal jelly glycoproteins. Glycobiology. Vol. 14, No. 11, pp: 241.

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

١٩. **Nicolson, S.W. and Human, H., 2013.** Chemical composition of the 'low quality' pollen of sunflower (*Helianthus annuus* L., Asteraceae). Apidologie. Vol. 44, pp: 144-152.

۲۰. **Oveisi pour, M.; Abedian, A.M.; Motamedzadegan, A.; Rasco, B.; Safari, R. and Shahiri, H., 2009.** The effect of enzymatic hydrolysis time and temperature on the properties of protein hydrolysates from the Persian sturgeon *(Acipenser persicus*) viscera. Food Chemistry. Vol. 115, pp: 238-242.

۲۱. **Pascoal, A.; Rodrigues, S.; Teixeira, A.; Feás, X.L. and Estevinho, M., 2013.** Biological activities of commercial bee pollens: antimicrobial, antimutagenic, antioxidant and anti inflammatory. Food and Chemical Toxicology. Vol. 45, pp: 121-130.

۲۲. **Pedroche, J.; Yust, M.M.; Lqari, H.; Megias, C.; Giro´ n Calle, J.; Alaiz, M.; Vioque, J. and Millan, F., 2007.** Obtaining of Brassica carinataproteinhydrolysates enriched in bioactive peptides using immobilized digestive proteases. Food Research International. Vol. 40, pp: 931-938.

۲۳. **Polgár, L., 1987.** Structure and function of serine proteases. In: New Comprehensive Biochemistry, Neuberger, A. and Brocklehurst, K., Ed. Vol. 16, pp: 1-423.

۲۴. **Power, O.; Jakeman, P. and FitzGerald, R., 2013.** Antioxidative peptides: enzymatic production, in vitro and in vivo antioxidant activity and potential applications of milk-derived antioxidative peptides. Amino Acids. Vol. 44, No. 3, pp: 797-820.

۲۵. **Pownall, T.L.; Udenigwe, C.C. and Aluko, R.E., 2010.** Amino acid composition and antioxidant properties of pea seed (*Pisum sativum* L.) enzymatic protein hydrolysate fractions. Journal of agricultural and food chemistry. Vol. 58, No. 8, pp: 4712-4718.

۲۶. **Ramadan, M.F. and Al-Ghamdi, A., 2012.** Bioactive compounds and health-promoting properties of royal jelly: A review. Journal of Functional Foods. Vol. 4, pp: 39-52.

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