

AKTYWNOŚĆ KWAŚNYCH GLIKOZYDAZ W MLECZKU PSZCZELIM POZYSKIWANYM Z MATECZNIKÓW NA RÓŻNYCH ETAPACH ROZWOJU LARWY

Bogusław Droba, Maria Droba, Larisa Sibirnaja
Uniwersytet Rzeszowski

Streszczenie. Przedstawione badania dotyczą aktywności kwaśnych glikozydaz w mleczku pszczelim oraz w larwach matek na różnych etapach rozwoju. Aktywność kwaśnych glikozydaz oznaczano w mleczku pobieranym w trzecim (M I) i piątym (M II) dniu rozwoju larw oraz w odpowiadającym mu czasowo larwach (L I i L II). Największą aktywność w mleczku pszczelim wykazywały: β -glukozydaza, α -mannozydaza i β -N-acetylo-D-heksozaminidaza. W larwach matek pszczelich stwierdzono stosunkowo duże wartości aktywności α -mannozydazy, α -glukozydazy i β -N-acetylo-D-heksozaminidazy. Wartości aktywności enzymów w gruczołach podgardzielowych pszczół *Apis mellifera* wzięto z wyników badań Costy i Cruz-Landima opublikowanych w 2005 roku. W gruczołach podgardzielowych występował wysoki poziom aktywności β -glukozydazy, natomiast pozostałe z badanych enzymów występowały w ilościach śladowych. Na podstawie wyników badań własnych oraz badań Costy i Cruz-Landima opublikowanych w 2005 roku w pracy przedstawiono sugestię, że kwaśne glikozydazy w mleczku pszczelim mogą częściowo pochodzić z wydzielin larw. Rozważono również pozytywny wpływ wydzielin larw na składniki glikanowe mleczka pszczelego.

Słowa kluczowe: mleczko pszczele, larwy matek, kwaśne glikozydazy

WSTĘP

Ostatnio konsumenci wykazują zainteresowanie dodatkami do żywności, które redukują ryzyko zachorowań na różne choroby i pozwalają zachować zdrowie. W odniesieniu do tych suplementów diety używa się często nazw: żywność funkcjonalna, medyczna czy terapeutyczna [Nagai i Inoue 2004]. Żywność funkcjonalna może być pozyskiwana ze

Adres do korespondencji – Corresponding autor: Bogusław Droba, Uniwersytet Rzeszowski, Wydział Biologiczno-Rolniczy, Katedra Chemii i Toksykologii Żywności, ul. Ćwiklińskiej, 1A, bud. D3, 35-959 Rzeszów, e-mail: mdroba@univ.rzeszow.pl

źródeł naturalnych albo poprzez dodatek lub modyfikację niektórych komponentów żywności. Pośród żywności funkcjonalnej szczególne miejsce zajmują produkty pszczele, takie jak: miód, propolis i mleczko pszczele (ang. *royal jelly* – RJ). Mleczko pszczele ma wiele właściwości prozdrowotnych, m.in. wpływa na rozszerzenie naczyń krwionośnych, obniża ciśnienie krwi, ma działanie antyrakowe, przeciwważakanie, przeciwalergiczne, a także przeciwdziała zmęczeniu i przyspiesza gojenie się ran [Viuda-Martos i in. 2008].

Mleczko pszczele jest wydzieliną gruczołów podgardzielowych młodych pszczół robotnic, tzw. karmicielek. Mleczkiem tym karmione są wszystkie larwy w rodzinie pszczelej przez pierwsze trzy dni życia, a matka pszczelela w okresie całego stadium larwalnego. Mleczko pszczele podawane larwie matki ma bogatszy skład chemiczny niż to, które otrzymują pozostałe larwy. Zawiera więcej cukrów, hormonu juwenilnego oraz kwasów. W jego skład wchodzi kwas tłuszczowy (90%), sterole, glicerydy i fosfolipidy, glukoza, fruktoza, sacharoza, ryboza, ślady glikogenu, albuminy i globuliny, białka złożone (w tym glikoproteiny, lipoproteiny, nukleoproteiny), wszystkie aminokwasy, neurohormon acetylocholina, hormony płciowe (estradiol, progesteron i testosteron), roślinny hormon wzrostu oraz enzymy, makro- i mikropierwiastki (sód, potas, wapń, magnez, cynk, żelazo, kobalt), witaminy z grupy B, kwas pantotenowy, kwas nikotynowy oraz inozytol. Zawarte w mleczku kwasy organiczne powodują jego kwaśny odczyn (pH 4.1–4.8) [Wojtacki 1988, Wilde 2013].

Białka, w tym enzymatyczne, stanowią największy udział w składzie mleczka. Dziełi się je na: uczestniczące w syntezie innych białek (także glikoprotein), uczestniczące w metabolizmie węglowodanów, związane z procesami utleniania i redukcji, biorące udział w metabolizmie i transporcie lipidów itd. [Bin Han i in. 2011]. Według Bin Han i innych [2011] białka zaangażowane w metabolizm węglowodanów (takie jak np. oksydaza glukozowa, α -glukozydaza czy α -amylaza) stanowią 17% wszystkich białek, w procesy redox 10%, enzymy hydrolityczne 9,8%, białka wiążące 7%, a pozostałe około 2% [Bin Han i in. 2011].

Należące do hydrolaz glikozydazy są enzymami ściśle związanymi z biogenezą, transportem i katabolizmem glikokoniugatów. Stanowią one zróżnicowaną grupę enzymów, z których wiele jest glikoproteinami. Egzoglikozydazy katalizują odłączanie ściśle określonych monosacharydów od nieredukujących końców łańcuchów oligosacharydowych, endoglikozydazy hydrolizują zaś specyficzne sekwencje cukrowe w obrębie łańcuchów oligosacharydowych. Enzymy te hydrolizują również glikany związane z lipidami (glikolipidy) oraz z białkami (glikoproteiny). Glikozydazy rozpoznają stereokonfigurację cukrów D lub L i rozróżniają wiązania glikozydowe, hydrolizując wyłącznie wiązania glikozydowe α - lub β -.

Badane w tej pracy glikozydazy należą do egzoglikozydaz. Większość tych enzymów występuje powszechnie w różnych tkankach zwierząt, skąd mogą być wydzielane poza komórkę do płynów ustrojowych [Skudlarek i in. 1992]. W komórkach glikozydazy występują w lizosomach, w aparacie Golgiego oraz w cytozolu. W zależności od ich lokalizacji mogą wykazywać różne optima pH. Glikozydazy występujące w lizosomach wykazują optimum działania w kwaśnym zakresie pH, stąd ich nazwa – kwaśne glikozydazy.

Obecność wielu kwaśnych glikozydaz w mleczku pszczelim została opisana w pracy Droby i innych [2014]. Wykazano w niej znaczącą aktywność β -N-acetylo-D-heksozaminidazy (β -HEX), β -glukozydazy (β -GLU) i α -mannozydazy (α -MAN) oraz niewielką

aktywność α -glukozydazy (α -GLU); α - i β -galaktozydazy (α -GAL i β -GAL); α -fukozydazy (α -FUC) oraz β -mannozydazy (β -MAN). Inni autorzy w mleczku pszczelim wykryli tylko aktywność α -glukozydazy i glukocerebrozydazy [Bin Han i in. 2011].

Niektóre kwaśne glikozydazy zostały stwierdzone także w ekstraktach gruczołów podgardzielowych pszczół *Apis mellifera* [Costa i Cruz-Landim 2005]. Były to: α - i β -glukozydaza, α - i β -galaktozydaza, α -mannozydaza oraz β -*N*-acetylo-D-heksozaminidaza. W gruczołach pszczół karmicielek wszystkie te enzymy, poza β -glukozydazą, występowały w ilościach śladowych [Costa i Cruz-Landim 2005].

Przedstawione w tej pracy badania dotyczą aktywności kwaśnych glikozydaz w mleczku pszczelim oraz w larwach matek na różnych etapach rozwoju.

Celem pracy było podjęcie próby ustalenia pochodzenia aktywności kwaśnych glikozydaz w mleczku pszczelim na podstawie wyników badań własnych i innych autorów.

MATERIAŁ I METODY

Mleczko pszczele było zbierane w okresie maja i czerwca w specjalistycznej pasiece hodowlanej „Wojtuś” zlokalizowanej w miejscowości Breń Osuchowski, gmina Czermin koło Mielca. Mleczko pobierano przy użyciu strzykawki, przenoszono do probówek Eppendorfa i tymczasowo przechowywano w lodówce (w temperaturze 4°C). Mleczko pobierane w trzecim dniu rozwoju larw oznaczono jako M I, natomiast pobierane w piątym dniu rozwoju larw – jako M II. Pobrane mleczko tego samego dnia przewożono do laboratorium w termosach z lodem, porcjowano na próbki o objętości około 1 cm³ i zamrażano w temperaturze –78°C. Po odmrożeniu, próbkę mleczka do badań ważono, rozcieńczano trzykrotną objętością soli fizjologicznej (0,9% NaCl) z dodatkiem 0,1% Tritonu X-100 i homogenizowano.

Larwy matek pszczelich wydobywano z mateczników w trzecim dniu rozwoju – L I oraz w piątym dniu rozwoju – L II. Na tych etapach rozwoju średnia masa larw wynosiła odpowiednio 30 mg oraz 180 mg. Naważki pochodzące od pięciu larw homogenizowano z trzykrotną objętością soli fizjologicznej z dodatkiem 0,1% Tritonu X-100.

Aktywność kwaśnych glikozydaz była oznaczana metodą spektrofotometryczną według Barretta i Heatha [1977]. Mieszanina inkubacyjna składała się z odpowiedniego substratu *p*-nitrofenyloglikozydowego rozpuszczonego w 0,2M buforze cytrynianowym o optymalnym dla danego enzymu pH oraz z próbki odpowiednio rozcieńczonego mleczka lub homogenatu larw. Stężenia substratów w mieszaninie inkubacyjnej wynosiły: dla β -HEX – 5,84 mM, dla α -FUC – 3,5 mM, zaś dla α - i β -GAL, α - i β -MAN oraz α - i β -GLU – 6,64 mM.

Próbki inkubowano w temperaturze 30°C przez 10–30 min, w zależności od aktywności enzymu. Reakcję zatrzymywano, dodając 0,25M NaOH. Absorbancję uwolnionego *p*-nitrofenolu (*p*-NP) mierzono przy $\lambda = 400$ nm (A_{400}).

Przyjęto, że jednostką aktywności enzymatycznej (U) jest taka aktywność enzymu, która przekształca 1 μ mol substratu w czasie 1 min w temperaturze 30°C. Aktywność enzymatyczną podawano w mU na 1 mg mleczka lub 1 mg masy larw.

Aktywności enzymów w gruczołach podgardzielowych pszczół *Apis mellifera* podano za autorami Costą i Cruz-Landimem [2005], którzy oznaczali je za pomocą testu Api

Zym (Bio Merieux). Według tej metody aktywność badanych glikozydaz w gruczołach podgardzielowych pszczół karmicielek, zbieraczek i świeżo wylętych robotnic podawano w specjalnych, umownych jednostkach: od 0 do 5 jednostek – brak aktywności, 5 jednostek – aktywność śladowa, 30 i 40 jednostek – aktywność maksymalna.

Optimum pH badanych glikozydaz oznaczano inkubując próbki mleczka lub homogenatu larw z substratem i 0,2M buforem cytrynianowym o odpowiedniej wartości pH (od 3,0 do 5,5) przez 10–30 min w zależności od aktywności enzymu.

Do obliczeń statystycznych użyto programu Statistica 8.0 (Stat. Soft. Inc., Tulsa, OK., USA).

Wykorzystując wyniki obliczeń aktywności właściwej dla różnych enzymów w mleczku pszczelim oraz w larwach dla sporządzania wykresów użyto program Microsoft Excel 2003.

WYNIKI I DISKUSJA

Aktywność glikozydaz była badana w mleczku pszczelim w trzecim (M I) i w piątym dniu (M II) rozwoju larw oraz w odpowiadającym im czasowo larwom (L I i L II). Aktywność w gruczołach podgardzielowych pszczół karmicielek przedstawiono na podstawie wyników pracy Costy i Cruz-Landima [2005]. Z naszych badań wynika, że największą aktywność w mleczku pszczelim wykazywały enzymy: β -GLU > α -MAN > β -HEX.

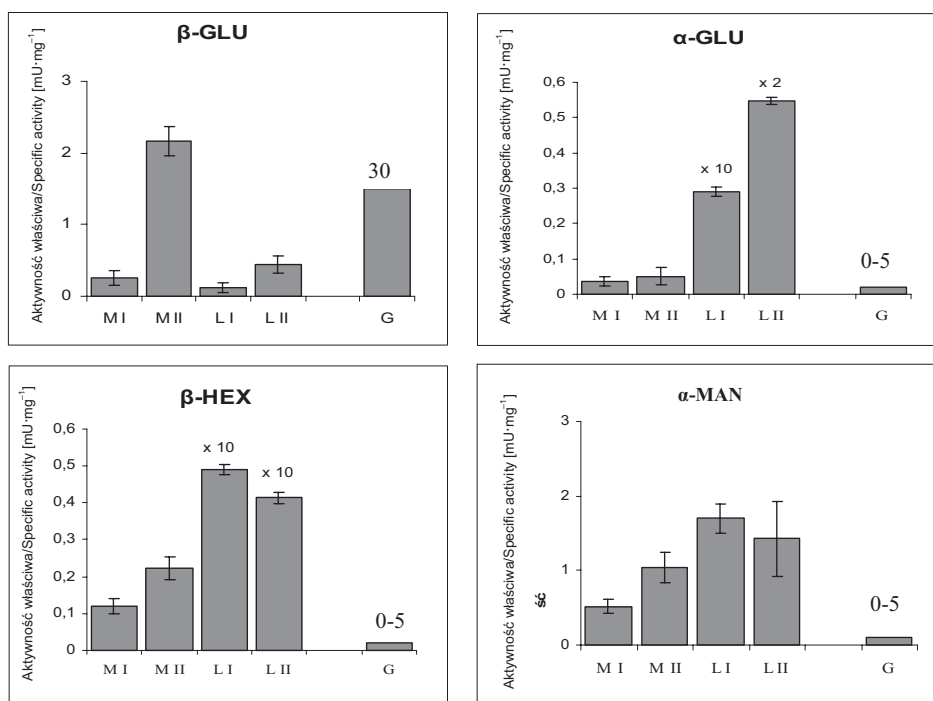
Wysoki poziom aktywności β -GLU w gruczołach podgardzielowych pszczół koreluje z wysokim poziomem aktywności tego enzymu w mleczku pszczelim (rys. 1), jest natomiast bardzo niski w larwach w porównaniu z innymi enzymami (β -HEX, α -MAN, α -GLU). Również z pracy Costy i Cruz-Landima [2005] wynika, że poziom aktywności tego enzymu u świeżo wylętych pszczół robotnic jest śladowy.

Enzym β -GLU hydrolizuje cukry takie jak celobioza, hemiceluloza, gentianoza oraz węglowodanowe komponenty glikoprotein. Obecność tego enzymu u pszczół karmicielek i zbieraczek wspomaga proces trawienia pyłku.

Mleczko I i II wykazuje najmniejszą aktywność α -GLU spośród prezentowanych na rysunku 1 enzymów. Również gruczoły podgardzielowe pszczół karmicielek wykazują śladową aktywność α -GLU, natomiast w gruczołach pszczół zbieraczek aktywność tego enzymu jest bardzo duża (40 jednostek). W larwach L I oraz L II aktywność α -GLU jest również stosunkowo duża (rys. 1), podobnie jak w gruczołach podgardzielowych świeżo wylętych pszczół robotnic (10 jednostek) [Costa and Cruz-Landim 2005].

Enzym α -GLU katalizuje hydrolizę polisacharydów i przeprowadza końcowy etap trawienia skrobi, dlatego jest aktywny u zbieraczek w fazie, gdy zbierają nektar, bierze również udział w komórkowych procesach trawiennych i występuje w dużych ilościach w lizosomach, gdzie zachodzi końcowy etap trawienia oligosacharydów i disacharydów znajdujących się w pokarmie. To tłumaczy dużą aktywność tego enzymu u rozwijających się larw I i II.

W przypadku β -HEX oraz α -MAN największą aktywność tych enzymów wykazywały larwy I i II (rys. 1). Aktywność ta była wielokrotnie większa niż w mleczku pszczelim I i II (przy czym aktywność w mleczku II była prawie dwukrotnie większa niż w mleczku I). W gruczołach podgardzielowych pszczół karmicielek, aktywność β -HEX i α -MAN



Rys. 1. Aktywność właściwa β -GLU, α -GLU, β -HEX i α -MAN w mleczku M I, M II, larwach L I i L II oraz w gruczołach podgardzielowych pszczół (G). Podany nad słupkiem mnożnik wskazuje, ile razy rzeczywista aktywność enzymu jest większa od podanej. Dla każdego enzymu podano średnią \pm SE (n = 5). Aktywność enzymów w gruczołach podgardzielowych pszczół karmicielek została podana na podstawie danych z pracy Costy i Cruz-Landima [2005]. Jest ona śladowa dla β -HEX, α -MAN i α -GLU, w przypadku β -GLU jest sześciokrotnie większa

Fig. 1. Specific activity of β -GLU, α -GLU, β -HEX and α -MAN in royal jelly M I, M II, larvae L I, L II and in hypopharyngeal glands of bee's (G). (X) means, that presented activity should be x-time multiplied. Values are given as mean \pm SE (n = 5). Activity of enzymes in hypopharyngeal glands of nurse bee's was cited from Costa and Cruz-Landim [2005] article. β -HEX, α -MAN and α -GLU were detected in trace amounts; activity of β -GLU was six-fold higher

została stwierdzona w śladowych ilościach [Costa and Cruz-Landim 2005]. W wymienionej pracy stwierdzono równocześnie dużą aktywność β -HEX u świeżo wylęglých pszczół robotnic (30 jednostek). Co interesujące w przypadku spokrewnionego gatunku *Scaptotrigona postica*, świeżo wylęglę osobniki pszczół robotnic i karmicielki wykazywały wyjątkowo dużą aktywność tego enzymu (40 jednostek).

Hydrolizę nieredukującego końca zawierającego reszty β -N-acetyloglukozaminy lub β -N-acetylogalaktozaminy w cząsteczkach glikolipidów, glikoprotein oraz glikozaminoglikanów katalizuje lizosomowy β -HEX. Lizosomowa α -MAN jest z kolei odpowiedzialna za degradację glikopolimerów (w tym glikoprotein) zawierających mannozę. Enzymy te należą do najbardziej aktywnie zaangażowanych w komórkowe procesy trawienne (tzw. ang. *house keeping enzymes*). Oba te enzymy występują powszechnie w tkankach

zwierząt, skąd w różnym stopniu mogą być wydzielane do płynów fizjologicznych [Skudlarek i in. 1992].

W mleczku pszczelim M I i M II oraz w larwach L I i L II stwierdzono także aktywność innych glikozydaz: α -FUC, α -GAL, β -GAL oraz β -MAN. Aktywności tych enzymów były niewielkie w mleczku M I i larwach L I. W larwach o większej masie (L II) aktywności wymienionych enzymów były już znacznie wyższe, dotyczyło to również mleczka II (tab.).

Tabela. Aktywność właściwa α -FUC, α -GAL, β -GAL i β -MAN [$\text{mU}\cdot\text{mg}^{-1}$] w mleczku I i II, larwach I i II oraz w gruczołach podgardzielowych pszczół karmicielek. Dla każdego enzymu podano średnią \pm SE (n = 5)

Table. Specific activity of α -FUC, α -GAL, β -GAL and β -MAN [$\text{mU}\cdot\text{mg}^{-1}$] in royal jelly I and II, larvae I and II and in hypopharyngeal glands of nurse bee's. Values ave given as mean \pm SE (n = 5)

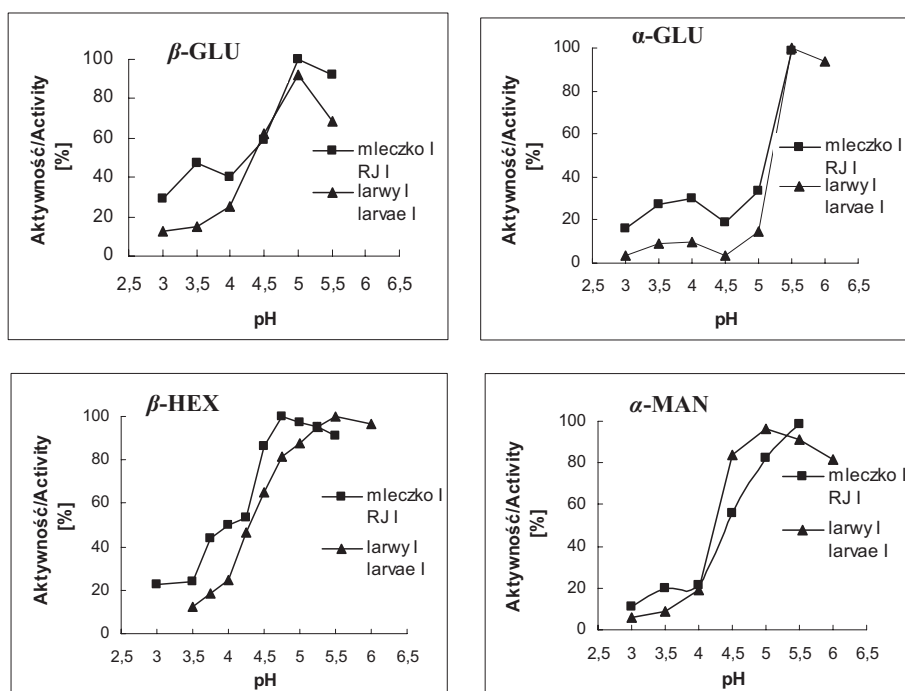
Enzym Enzyme	Mleczko I RJI	Mleczko II RJII	Larwy I Larvae I	Larwy II Larvae II	*Gruczoły *Glands
α -FUC	0,021 \pm 0,01	0,045 \pm 0,02	0,074 \pm 0,02	0,334 \pm 0,11	0–5 (brak)
α -GAL	0,025 \pm 0,02	0,111 \pm 0,02	0,031 \pm 0,01	0,373 \pm 0,15	0 (brak)
β -GAL	0,028 \pm 0,01	0,048 \pm 0,02	0,158 \pm 0,05	0,404 \pm 0,21	5 (ślady)
β -MAN	0,006 \pm 0,01	0,053 \pm 0,02	0,052 \pm 0,02	0,364 \pm 0,05	–

* Dane zaczerpnięte z pracy Costy i Cruz-Landim [2005]. Aktywność wyrażona w jednostkach umownych/
/Results was cited from Costa and Cruz-Landim [2005]. The activity was expressed in conventional units.

Glikozydazy często charakteryzuje się na podstawie optimum pH ich działania, dzieląc je na kwaśne i neutralne. Glikozydazy występujące w lizosomach są aktywne w pH 5.0 i niższym, natomiast neutralne w pH 6.0–6.5. Glikozydazy mleczka pszczelego i larw wykazują optima aktywności w pH kwaśnym i zbliżonym do neutralnego (3.5–4.0 oraz 4.5–5.5), co zostało przedstawiono na rysunku 2. Profile zależności aktywności badanych enzymów od pH w mleczku I i larwach I są bardzo podobne o ile nie identyczne, co wskazuje że prawdopodobnie występują w nich te same formy enzymów (rys. 2).

Biorąc pod uwagę fakt, że w gruczołach podgardzielowych odpowiedzialnych za wytwarzanie mleczka aktywność większości glikozydaz (za wyjątkiem β -GLU) jest bardzo mała, albo wręcz niewykrywalna, pochodzenie znaczących aktywności badanych enzymów w mleczku pszczelim jest niejasne. Możliwym źródłem niewielkiej aktywności kwaśnych glikozydaz w mleczku pszczelim może być jajo, ponieważ podczas wydostawania się larwy z jaja wydziela ona płyn zawierający enzymy hydrolityczne rozpuszczające otoczkę jaja [Wilde 2013]. W procesie tym oprócz proteinaz mogą brać udział glikozydazy.

Białka stanowią frakcję o największym udziale procentowym suchej masy mleczka pszczelego. Wśród tych białek występują różne enzymy (w tym glikozydazy) oraz glikany, stanowiące również komponenty białek i lipidów (glikoproteiny i glikolipidy) [Tiemeyer i in. 2008, Varki i Lowe 2008, Varki i in. 2008]. Kolejne prace na temat składu mleczka donoszą o coraz to nowych, jeszcze niescharakteryzowanych składni-



Rys. 2. Optimum pH aktywności β -GLU, α -GLU, β -HEX i α -MAN
 Fig. 2. Optimum pH activity for β -GLU, α -GLU, β -HEX and α -MAN

kach zawierających komponenty glikanowe. Przykładem może być glikoproteina RJ-P1 ulegająca stopniowemu rozkładowi podczas przechowywania mleczka [Kamakura i in. 2001]. Jest ona podjednostką większego białka stymulującego proliferację ludzkich monocytów [Kimura i in. 2003, Bin Han i in. 2011]. Przepuszcza się, że białko to może być zaangażowane w namnażanie i różnicowanie się komórek larwy pszczelej [Haltiwanger i Lowe 2004].

Mleczko pszczele zawiera wiele substancji bioaktywnych, których funkcja może być regulowana przez składnik glikanowy [Varki i Lowe 2008, Varki i in. 2008]. Część glikanowa bioaktywnych cząsteczek może być modyfikowana przez glikozydazy zawarte w mleczku. Kwaśne pH mleczka powinno sprzyjać działaniu tych enzymów. Modyfikacja części glikanowej biocząsteczek nie ogranicza się tylko do odłączania, ale i do przyłączania jednostek cukrowych, ponieważ glikozydazy pełnią również funkcje transferaz [Varki i Lowe 2008, Varki i in. 2008]. Glikoproteiny stanowią istotną część produktów bioterapeutycznych; w ich skład wchodzi, np.: erytropoetyna, cytokiny, przeciwciała, glikozylotransferazy i glikozydazy. Rynek światowy tych produktów ocenia się na miliard dolarów [Bertozzi i in. 2008]. Jeżeli obecność kwaśnych glikozydaz w produkcie takim jak mleczko pszczele jest korzystna, można zakładać, że wzbogacenie mleczka w ekstrakty z młodych larw uzupełni jego skład o wiele cennych składników bioaktywnych.

WNIOSKI

1. W pracy przedstawiono sugestie, że kwaśne glikozydazy obecne w mleczku pszczelim mogą częściowo pochodzić z wydzielin larw.
2. Dodatek wyciągów larw do mleczka pszczelego może wzbogacić je w wiele cennych składników bioaktywnych.

LITERATURA

- Barrett A., Heath M., 1977. Lysosomal enzymes. W: Lysosomes: a laboratory handbook. Red. J. Dingle. Elsevier/ North-Holland Biomedical Press, Amsterdam.
- Bertozzi C.R., Freeze H.H., Varki A., Esko J.D. 2008. Glycans in Biotechnology and the pharmaceutical industry. W: Essentials of Glycobiology. Wydanie II. Red. A. Varki, R.D. Cummings. Gold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 719–732.
- Bin Han, Chenxi Li, Lan Zhang, Yu Fang, Mao Feng, Jianke Li, 2011. Novel Royal Jelly Proteins Identified by Gel-Based and Gel-free Proteomics. J. Agric. Food Chem. 59, 10346–10355.
- Costa R.A.C., Cruz-Landim C., 2005. Hydrolases in the hypopharyngeal glands of workers of *Scaptotrigona postica* and *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apinae). Genetics and Molecular Research 4(4), 616–623.
- Droba B., Droba M., Sibirnaja L., 2014. Enzymy hydrolityczne z grupy kwaśnych glikozydaz występujące w mleczku pszczelim. W: Właściwości produktów i surowców żywnościowych, Wybrane zagadnienia. Polskie Towarzystwo Technologów Żywności, Kraków, 125–135.
- Haltiwanger R.S., Lowe J.B., 2004. Role of glycosylation in development. Annu. Rev. Biochem. 73: 491–537.
- Kamakura M., Fukuda T., Fukushima M., Yonekura M., 2001. Storage-dependent degradation of 57-kDa protein in royal jelly: a possible marker for freshness. Biosci. Biotechnol. Biochem. 65(2), 277–284.
- Kimura M., Kimura Y., Tsumura K., Okihara K., Sugimoto H., Hamada 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. Biosci. Biotechnol., Biochem. 67(9), 2055–2058.
- Nagai T., Inoue R., 2004. Preparation and functional properties of water extract and alkaline extract of royal jelly. Food Chem. 84, 181–186.
- Skudlarek, M.D., Tulsiani D.R., Orgebin-Crist M.C., 1992. Rat epididymal luminal fluid acid β -D-galactosidase optimally hydrolyses glycoprotein substrate at neutral pH. Biochem. J. 15 907–914.
- Tiemeyer M., Selleck S.B., Esko J.D. 2008. Arthropoda. W: Essentials of Glycobiology. Wydanie II. Red. A. Varki, R.D. Cummings. Gold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 347–362.
- Varki A., Lowe J.B., 2008. Biological Roles of glycans. W: Essentials of Glycobiology. Wydanie II. Red. A. Varki, R.D. Cummings. Gold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 75–88.
- Varki A., Freeze H., Vacquier V., 2008. Glycans in Development and Systemic Physiology. W: Essentials of Glycobiology. Wydanie II. Red. A. Varki, R.D. Cummings. Gold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 531–536.

- Viuda-Martos M., Ruiz-Navajas Y., Fernandez-Lopez J., Perez-Alvarez J.C., 2008. Function Properties of Honey, Propolis, and Royal Jelly. DOI:10.1111/j.
- Wilde J. (red.), 2013. Encyklopedia pszczelarska. PWRiL, Warszawa.
- Wojtacki M., 1988. Produkty pszczele i przetwory miodowe. Wydanie VI. PWRiL. Warszawa.

THE ACTIVITY OF ACID GLYCOSIDASES IN ROYAL JELLY COLLECTED FROM QUEEN BEE'S CELLS AT DIFFERENT STAGES OF LARVAE DEVELOPMENT

Summary. Royal jelly (RJ) is a secretion of hypopharyngeal glands of young worker bees 'nurses'. It is used to feed all the larvae in the bee colony during the first 3 days of their life, and the mother bee for the whole stage of larvae. Within the royal jelly there is a number of enzymes from the group of acid glycosidases. Their main purpose is digestion of carbohydrates and carbohydrate components of glycoconjugates. The aim of the study was an attempt to determine the origin of the activity of acid glycosidases in royal jelly. Royal jelly was collected in May and June in the breeding apiary "Wojtek" in the village of Breń Osuchowski, community Czermín close to Mielec. Royal jelly was harvested, placed in a thermos with ice, and transported to the laboratory. Than samples of approximately 1 cm³ were prepared and frozen at -78°C. After thawing, the samples were weighed, diluted with 3-fold volume of saline (0.9% NaCl) containing 0.1% Triton X-100 and homogenized. Larvae of mother bees were extracted from nurseries. Than test portion from 5 larvae were homogenized with 3-fold volume of saline containing 0.1% Triton X-100. Enzyme activity was determined in royal jelly that was collected in the third (M I) and fifth (M II) day of larval development and from larvae at the corresponding time (L I and L II). The optimal pH for the investigated acid glycosidases in royal jelly and in larvae homogenates was determined. Activity of acid glycosidases was determined using spectrometric method by Barrett and Heath from 1977. It was assumed that the unit of enzyme activity (U) is the activity of enzyme which converts 1 μmol of substrate during 1 min at 30°C. The enzyme activity was given in mU for 1 mg of royal jelly or 1 mg weight of larvae. The statistical calculations were conducted using Statistica 8.0 (Stat. Soft., Inc., Tulsa, OK., USA). The highest activity of enzymes in royal jelly was observed for β-glucosidase, α-mannosidase and β-N-acetyl-D-hexosaminidase. However, in the larvae from queen bee's cells activity α-mannosidase, β-N-acetyl-D-hexosaminidase and α-glucosidase were relatively high. Activity of these enzymes in the hypopharyngeal glands of the honey bee *Apis mellifera* was given by the authors Costa and Cruz-Landim in publication from 2005. In the hypopharyngeal glands there is a high level of β-glucosidase activity, while the other of the enzymes were detected in trace amounts only. Based on our results and on the results presented by Costa and Cruz-Landim in 2005, it is suggested, that acid glucosidase in royal jelly may partly come from the secretions of the larvae. Also the positive influence of larvae secretion on glycan ingredients of royal jelly was considered.

Key words: royal jelly, larvae from queen bee's cells, acid glycosidases