

## PROTEINELE DIN LĂPTIȘORUL DE MATCĂ CA UNEALTĂ ÎN ELABORAREA INGREDIENTELOR NECESARE SĂNĂTĂȚII

J. ŠIMÚTH<sup>1</sup>, Katarína BÍLIKOVÁ<sup>1</sup>, Elena KOVÁČOVÁ<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Genetic Engineering, Institute of Chemistry, SK-84538 Bratislava, REPUBLICA SLOVACA

<sup>2</sup>Institute of Virology, Slovak Academy of Sciences, Dúbravská cesta 9, SK-84538 Bratislava, REPUBLICA SLOVACA  
E-mail: chemsim@savba.sk

### Rezumat

Calitatea produselor albinei melifere (*Apis mellifera* L.) a fost evaluată pe baza proprietăților statice care pot fi determinate prin analize chimice, fizice și instrumentale. Astăzi este acceptat în general că definirea calității produselor apicole ar trebui făcută în baza funcțiilor dinamice ale fiecărei componente. Lăptișorul de matcă a fost acceptat și folosit adesea ca o substanță care sprijină sănătatea. Se înmulțesc documentele științifice în sprijinul conceptului că cele mai atractive componente bioactive ale produselor apicole sunt proteinele din lăptișorul de matcă. Descoperirea recentă că proteinele din lăptișorul de matcă ar putea deține funcții fiziologice imunomodulatoare, supresoare ale reacțiilor alergice, dar și proprietățile lor antihipertensive și de stimulare a proliferării au deschis o nouă epocă în utilizarea lăptișorului de matcă și a mierii de albine. Studiul nostru sistematic molecular-biologic despre proteinele individuale și despre peptidele lăptișorului de matcă a relevat că proprietățile lor multifuncționale ar putea fi folosite ca markeri pentru standardizarea dozelor de utilizare a lăptișorului de matcă, care poate fi consumat în dieta zilnică și care după ingerare reglează sau afectează un anumit proces fiziologic. Efectele medicale și farmacologice ale produselor apicole vor fi evaluate și cuantificate mai exact pe baza cantității individuale ale proteinelor din lăptișorul de matcă folosit zilnic. Vor fi prezentate proprietățile proteinelor individuale ale lăptișorului de matcă și funcțiile lor fiziologice în timpul dezvoltării larvale și ca ingrediente ale unor alimente funcționale.

**Cuvinte cheie:** lăptișor de matcă al albinei melifere / proteină / peptide / purificare / proprietăți fiziologice

### Introducere

Colonia de albine melifere, un superorganism alcătuit din celule individuale care sunt de fapt însăși albinele melifere, este reflectată și în mecanismele cu ajutorul cărora culegătoarele culeg, procesează și conservă nectarul și polenul și asigură hrana puietului. Proteinele și peptidele sintetizate de către albinele melifere în glandele cefalice, joacă un rol important în procese ca hrănirea și protejarea puietului împotriva agenților patogeni.

Lăptișorul de matcă este un produs de secreție a glandelor cefalice ale albinelor doici și servește drept hrană pentru larvele albinelor melifere. Prin comportamentul profilactic el este distribuit între indivizii coloniei (CRAILSHEIM, 1992). Lăptișorul de matcă este un sistem de substanțe multiple, conținând proteine (12-15%), apă (60-70%), zaharuri totale (10-12%), lipide (3-7%), minerale, amino-acizi și vitamine (TAKENAKA, 1982; ŠIMÚTH, 2001). Lăptișorul de matcă este considerat a fi o hrană unică elaborată în natură în timpul evoluției animalelor.

Îngrijirea și hrănirea larvelor eclozionate sunt asigurate de albinele melifere tinere care, prin secrețiile glandelor lor cefalice, aprovizionează larva viitoare a mătci cu lăptișor de matcă, larva viitoare a albine lucrătoare cu lăptișor de lucrătoare și larva viitorului trântore cu lăptișor de trântore. Aceste tipuri de lăptișor nu diferă unul de celălalt din punctul de vedere al compoziției chimice a componentelor de bază, precum proteinele, carbohidrații și lipidele. Diferența esențială constă în faptul că lăptișorul de matcă conține spre deosebire de lăptișorul de lucrătoare o componentă(te) care determină ce va deveni un ou diploid egal din punct de vedere genetic: o matcă sau, în absența acestei componente, o albină lucrătoare. Totuși, această componentă nu a fost încă identificată. Cheia acestui mecanism de reglare se află codificată în gene speciale ale albinei melifere, care sunt activate în stadiul inițial de dezvoltare larvară a viitoare a mătci și reprimată la larva viitoare a albine lucrătoare. Este vorba despre așa numita manifestare diferențiată a genelor, adesea reglată pe bază hormonală, și care este implicată și în reglarea manifestării altor gene responsabile pentru diferite semnale fenotipice care diferențiază matca de lucrătoare. Datorită acestei diferențieri și a faptului că albinele melifere hrănesc matca cu lăptișor de matcă pe parcursul întregii ei vieți, matca are o durată de viață lungă. Mătcile trăiesc 4 până la 5 ani, lucrătoarele doar 3-4 săptămâni. Acest fenomen a stat la baza ideii că lăptișorul de matcă ar putea fi sursa longevității oamenilor. Deși aceasta este doar o ipoteză nefondată experimental, descoperirile științifice recente sugerează că mai ales proteinele conținute în lăptișorul de matcă ar acționa ca factorul de revitalizare în nutriția oamenilor. Proteinele secretate de către albinele melifere în produsele lor au diferite funcții în crearea unor condiții optime de dezvoltare a coloniei de albine melifere. Glandele hipofaringiene, mandibulare și salivare reprezintă sursa celor mai importante proteine ale albinelor melifere. În aceste glande sunt sintetizate sute de diferite proteine și peptide care joacă un rol de neînlocuit în hrănirea puietului și în diferențierea acestuia, în procesarea polenului floral în ghemotoace de polen și apoi în păstură precum și în tehnologia unică de procesare a nectarului în miere. Aceste proteine, o secreție exogenă a albinelor melifere, înlesnesc contactul direct cu sursa de hrană (carbohidrații din nectar, proteinele din polen) și protecția (barieră de protecție față de agenții patogeni).

## Proteinele exogene ale albinei melifere

### Clasificarea proteinelor secretate de albina meliferă în lăptișorul de matcă și în produsele derivate din acesta

O cantitate importantă din lăptișorul de matcă este alcătuită din proteine, care formează aproximativ 50% din masa uscată a lăptișorului de matcă (ŠIMŮTH, 2001). Proteinele importante formează 90% din cantitatea totală a proteinelor cu masă moleculară de 49-87 kDa atribuită unei proteine și unei familii de genă (HANES și ŠIMŮTH, 1992; SCHMITZOVÁ et al., 1998; MALECOVÁ et al., 2003). Proteinele minore conținute de lăptișorul de matcă sunt alcătuite din proteine și peptide cu diferite funcții, inclusiv proprietăți antimicrobiene și antifungice (FUJIWARA et al., 1990; BÍLIKOVÁ et al., 2001; BÍLIKOVÁ et al., 2002; BACHANOVÁ et al., 2002).

Pe baza funcțiilor, proteinele și peptidele exogene ale albinelor melifere pot fi clasificate după cum urmează:

Enzimele tehnologice – ele sunt implicate în transformarea nectarului în miere:  $\alpha$ -glucozidaza, glucozoxidaza, catalaza și amilaza.

Proteinele nutritive – sunt secretate în hrana larvelor ca principala sursă proteică a larvelor de albine melifere.

Proteinele și peptidele protective – sunt secretate de albinele melifere în produsele lor și apără puietul în timpul dezvoltării împotriva agenților patogeni.

Proteinele și peptidele fiziologic active – îndeplinesc diferite funcții în cadrul coloniei de albine și influențează procesele din culturile de țesuturi ale celulelor de animale în condiții *in vitro*.

### Proprietățile structurale ale lăptișorului de matcă

În general lăptișorul de matcă este definit ca o emulsie. Investigarea lăptișorului de matcă proaspăt cu microscopul electronic de scanare (SEM) a relevat trăsăturile sale structurale unice (ŠIMŮTH, 2001).

Examinarea cu SEM a arătat că în unele zone stratul de lăptișor de matcă conține particule sferice globulare relativ mari (fig. 1). Dimensiunea acestora oscila de la 20 la 80  $\mu\text{m}$ . Aceste „globule” erau conectate între ele printr-un sistem de canale-filamente. Diametrul filamentelor este de aproximativ 2  $\mu\text{m}$ , iar lungimea variabilă. O mărire și mai mare a unui globul a arătat filamente care iradeau de la suprafața sa ca o scoică a globulei. A fost emisă ideea că structura fină a lăptișorului de matcă este generată de glandele hipofaringiene ale albinei melifere.

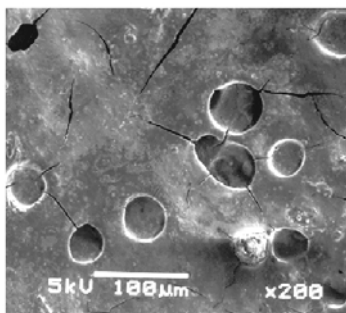


Fig. 1 – Vizualizare SEM a particulelor globulare tipice ale lăptișorului de matcă natural. O celulă de matcă cu o larvă de 2 zile (*Apis mellifera carnica* L.) a fost tăiată dintr-un fagure de la stupina particulară a autorului. Larva a fost înlăturată și lăptișorul de matcă din celulă a fost congelat la  $-20^{\circ}\text{C}$  pentru a investiga în mare caracteristicile structurale ai lăptișorului de matcă cu SEM. Pentru a preveni distrugerea structurii originale a lăptișorului de matcă au fost omise procedurile de fixare. Probele de lăptișor de matcă au fost prelevate din probele congelate. Ele au fost expuse la temperatura camerei timp de 72 de ore și au putut forma un strat subțire pe discurile din aluminiu cu un diametru de 1,2 cm. Probele au fost apoi colorate negativ cu Cu într-o cameră cu vid la  $10^{-3}$  Pascal și examinate cu SEM (Jeol, model JSM-580, Japonia).

### Prepararea proteinelor din lăptișorul de matcă în formă naturală

Pentru a putea izola proteinele într-un stadiu pe cât mai natural, am elaborat o metodă de fracționare a lăptișorului de matcă prin ultracentrifugare (ŠIMŮTH, 2001). Au fost obținute astfel trei straturi distincte din punct de vedere fizic. Frațiunea supranatantă a fost un fluid verde gălbui, numit plasmă și care reprezenta 61% (w/v) din lăptișorul de matcă nativ. O fracțiune vâscoasă gălbui maronie, numită lăptișor și care reprezenta stratul intermediar, avea o consistență gelatinoasă. Această fracțiune forma 32% din cantitatea de lăptișor de matcă (w/v). Sedimentul alb de la fund (7% w/v din lăptișorul de matcă) părea să fie o

substanță aproape stabilă. Cantități semnificative de acizi grași erau concentrate în fracțiuni cu un conținut mai scăzut de apă. La ultracentrifugare s-a obținut un gel semi-solid galben auriu, asemănător chihlimbarului. Analizele biochimice au arătat că era o proteina importantă a lăptișorului de matcă (numită anterior MRJP1) de tip albumină și de aceea a fost numită *apalbumina- $\alpha$* . Este așadar normal să sugerăm că din interacțiunea între *apalbumina- $\alpha$*  și acizii grași a rezultat fracțiunea proteică insolubilă în apă al lăptișorului de matcă. Este interesant că alte proteine ale lăptișorului de matcă, localizate predominant în fracțiunea supranatantă, cum ar fi *apalbumina- $\beta$*  (numită anterior MRJP2) și *apalbumin- $\gamma$*  (numită anterior MRJP3) nu pot forma un gel, deși sunt foarte asemănătoare cu *apalbumina- $\alpha$*  (SCHMITZOVÁ et al., 1998).

### *Proprietățile fizice și chimice ale apalbuminei- $\alpha$*

*Apalbumina- $\alpha$*  a format o structură subunitară (ŠIMÚTH, 2001). Subunitatea de bază este de aproximativ 420 kDa și s-a format din monomerul de bază 55 kDa. Observațiile la microscop au arătat că *apalbumina- $\alpha$*  formează în soluții apoase structuri similare celor care se întâlnesc și în lăptișorul de matcă. În funcție de concentrația *apalbuminei- $\alpha$* , au fost generate diferite structuri cu o repetabilitate regulată (fig. 2). Este vorba despre o structură autoasamblatoare a proteinei, rezultat al oligomerizării subunităților acestea. Este interesant că alte proteine din lăptișorul de matcă nu au abilitatea oligomerizării, deși au un grad ridicat de asemănări secvențiale cu *apalbumina- $\alpha$* .

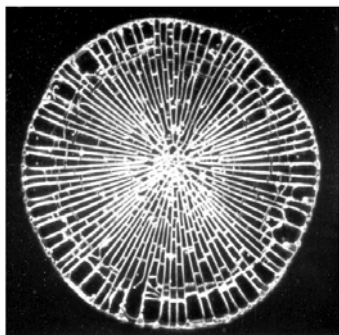


Fig. 2 – Autoasamblarea structurilor filamentoase regulate al *apalbuminei- $\alpha$* . Vizualizarea cu microscopul cu lumină a fost efectuată la 20 de minute după aplicarea unei picături (3  $\mu$ l) de *apalbumina- $\alpha$*  (80 mg per 1 ml apă) pe sticla de acoperire.

Care este funcția structurilor autoformatoare ale *apalbuminei- $\alpha$*  în colonia de albine melifere? Numeroase proteine sunt mult mai stabile în structuri supra-moleculare decât în forme monomerice. Dacă este luat în considerare conținutul ridicat în proteine al lăptișorului de matcă, atunci din punct de vedere teoretic nu poate fi presupus că toate proteinele hrănitoare din lăptișorul de matcă sunt metabolizate imediat. Concentrația ridicată de aminoacizi ar induce o presiune osmotică disproporționat de mare în tractul digestiv al larvei. Am mai constatat că *apalbumina- $\alpha$*  apare de asemenea în miere și în ghemotocul de polen. Albina meliferă poate folosi proprietățile structurale ale *apalbuminei- $\alpha$*  în procesarea polenului floral în ghemotocul de polen. S-ar părea că albina meliferă înfășoară polenul în *apalbumină* ca pe un servicii. *Apalbumina- $\alpha$*  este în lăptișorul de matcă un factor formatator de textură, de asemenea și în produsele cosmetice care conțin lăptișor de matcă. Se pare că în cadrul dezvoltării larvare *apalbumina- $\alpha$*  îndeplinește mai multe funcții decât rolul ei nutrițional.

### **Proprietățile fiziologice ale proteinelor din lăptișorul de matcă**

Pot fi făcute câteva generalizări referitoare la proprietățile fiziologice ale proteinelor majore din lăptișorul de matcă. Evidențele comportamentale atât de sugestive nu ne indică în mod direct dacă proteinele majore din lăptișorul de matcă au aceleași funcții în stadiul timpuriu și în cel târziu al dezvoltării larvare. Studiarea scindării proteinei din lăptișorul de matcă în intestinul mediu al larvei (TSAO and SHUEL, 1968) a arătat că unele proteine din lăptișorul de matcă au putut trece prin epiteliul intestinului fără să fi suferit vreoa schimbare. Conținutul ridicat de aminoacizi esențiali le-a predestinat rolul lor nutrițional în cadrul coloniei de albine.

Fracțiunea proteică a lăptișorului de matcă produs de albinele melifere conține numeroase componente valoroase și substanțe biologic active. În afară de proteinele majore ale lăptișorului de matcă sunt prezente în el mai multe proteine minore în cantități reduse, inclusiv peptide antibiotice (FUJIWARA et

al., 1990; BILIKOVA et al., 2001; BILIKOVA et al., 2002). De un interes deosebit sunt proteinele și peptidele bioactive prezente în secvența aminoacidă a proteinelor din hrană. Aceste peptide, inactive în cadrul secvenței proteinei parentale, pot fi eliberate de către proteoliza enzimatică, de exemplu în timpul digestiei gastrointestinale sau în cel al procesării hranei. Odată eliberate în corp, peptidele bioactive pot acționa ca niște componente reglatoare cu o activitate asemănătoare celei a hormonilor. Structurile secvențelor biologice active nu au fost încă obținute și este necesară în continuare cercetarea digestiei enzimatice *in vitro* și/sau a digestiei gastrointestinale *in vivo* a proteinelor specifice.

Componentele bioactive ale lăptișorului de matcă nu au fost complet evaluate, dar oricum studii recente *in vitro* demonstrează că unele proteine majore ale lăptișorului de matcă influențează procese fiziologice foarte importante. Peptidele bioactive din lăptișorul de matcă și din proteinele majore ale acestuia ar trebui luate în calcul ca potențiali modulatori ai diferitelor procese reglatoare din organism. Relația dintre activitate și structură și mecanismul prin care proteinele majore din lăptișorul de matcă își exercită efectele lor imunomodulatoare nu au fost încă stabilite. Totuși rezultatele obținute cu proteinele 350 kDa și 55 kDa din lăptișorul de matcă sugerează că proteinele majore ale lăptișorului de matcă ar putea afecta procese celulare importante. Proteinele 350 kDa cu o secvență aminoacidă cu terminal N, cum ar fi apalbumina- $\alpha$  (SCHMITZOVÁ et al., 1998) stimulează proliferarea monocitelor umane (linia de celule U 937) și hibridomele uman-uman (linia de celule HB4C5) (KIMURA et al., 1995). Autorii citați au descoperit că structurile lanțurilor de zahăr cu legătură N a proteinei 350 kDa au de fapt structura tipică al manozei (Man9-GlcNAc2), întâlnită frecvent la animale, plante și insecte. Proteina 55 kDa al lăptișorului de matcă cu terminal N al secvenței aminoacide și care este identică cu a doua proteină importantă ca abundență din lăptișorul de matcă, și anume apalbumina- $\beta$  (SCHMITZOVÁ et al., 1998; BILIKOVA et al., 1999), menține viabilitatea ridicată a culturii primare de celule de șobolan, dar nu stimulează proliferarea monocitelor umane (KIMURA et al., 1996). Estimarea structurilor chimice ale proteinelor majore bioactive din lăptișorul de matcă este primul pas spre descoperirea mecanismului molecular al activităților lor fiziologice în sinergie cu alte componente bioactive ale lăptișorului de matcă.

Din punctul de vedere al activității fiziologice, poziția dominantă este deținută de proteinele albuminoidelor cele mai abundente în lăptișorul de matcă: apalbumina- $\alpha$  acidă (ŠIMUTH, 2001) și apalbumina- $\beta$  bazică (BILIKOVA et al., 1999), care apar și în creierul albinei melifere (KIMURA et al., 1995; KUCHARSKI and MALESZKA, 2002). Aceste descoperiri ca și similaritățile dintre sistemul imun al insectelor și al mamiferelor (DUSHAY et al., 1966; IMLER and HOFFMANN, 2001; BAUD and KARIN, 2001) au arătat că proteinele din lăptișorul de matcă ar putea fi factorul care este implicat în reglarea proceselor fiziologice importante.

Datele referitoare la proprietățile fiziologice ale proteinelor din lăptișorul de matcă, precum stimularea proliferării monocitelor umane (KIMURA et al., 1995), sau proprietățile imunomodulatoare ale lăptișorului de matcă (ŠVER et al., 1996), suprimarea reacțiilor alergice (OKA et al., 2001), sau activitatea antihipertensivă a peptidelor bioactive din lăptișorul de matcă (MATSUI et al., 2002) largesc potențialul aplicării acestuia în farmaceutică și indică funcția lor naturală în evoluția albinei melifere, unde pot juca un rol de inducere a mecanismului de apărare în timpul dezvoltării larvare. Dacă această presupunere este corectă, atunci proteinele din lăptișorul de matcă ar putea induce producerea de bioreglatori de tipul citokinei, care au o funcție importantă în cadrul sistemului imunitar, al proceselor inflamatorii, și ar putea să participe și la controlul proliferării, diferențierii și apoptozei celulelor. Această presupunere a fost coroborată de experimentele noastre preliminare, în cadrul cărora am detectat inducerea de citokine în macrofagele murine de către proteinele din lăptișorul de matcă. Observațiile noastre indică faptul că proteinele din lăptișorul de matcă sunt responsabile de stimularea *in vitro* a producerii de TNF- $\alpha$  în monocitele umane de o soluție apoasă de miere 1% (TONKS et al., 2001). Acestea indică de asemenea că acțiunea proteinelor din albina melifere poate stimula un sistem specific (rețeaua de citokine) care activează genele responsabile de producerea de substanțe defensive, înaintea apariției infecției bacteriene.

Albina meliferă, la fel ca și alte insecte, răspunde la infecțiile bacteriene prin inducerea mărită de gene codate pentru peptide antimicrobiene, care sunt secretate ulterior în hemolimfă. Un asemenea „răspuns imun” este foarte rapid (apare în câteva ore), dar adesea nespecific (CASTEELS, 1997; ZASLOFF, 2002). Anumite peptide antimicrobiene ale albinelor melifere (apidecina, abecina și himenoptecina) sunt induse în mod specific și eliberate în hemolimfă abia după infecția bacteriană, în timp ce defensina-royalizina (FUJIWARA et al., 1990) și apisimina (BILIKOVÁ et al., 2002), descoperite în lăptișorul de matcă, sunt probabil sintetizate pe tot parcursul vieții albinei melifere. Proteinele și peptidele din lăptișorul de matcă pot participa la mecanismul defensiv al albinei melifere împotriva agenților patogeni printr-o inactivare directă a microorganismelor apărute în produsele apicole, ca și prin inducerea de citokine cu participare la reglarea transcrierii proteinelor și peptidelor defensive.

Datele obținute pe baza proprietăților biochimice și biologice ale proteinelor din lăptișorul de matcă vor servi ca bază pentru genomele funcționale ale sistemului de apărare al albinei melifere contra bolilor și la o mai bună înțelegere a proprietăților fiziologice ale produselor apicole ca componente al hranei funcționale. Este încă dificilă aprecierea eficacității clinice ale lăptișorului de matcă, dar există speranța ca cercetările să descopere condițiile de activitate ale lăptișorului de matcă, mecanismul de acționare sau dozele potrivite și perioada lor de aplicare. Acest studiu experimental la nivel molecular despre proteinele secretate de albinele

melifere în produsele lor este o încercare de a defini bioactivitatea proteinelor și peptidelor din lăptișorul de matcă ca nutrienți importanți.

#### BIBLIOGRAFIE

- Bachanová K., Klaudiny J., Kopernický J., Šimúth J. (2002) Identification of honeybee peptide active against *Paenibacillus larvae larvae* through bacterial growth-inhibition assay on polyacrylamide gel. *Apidologie* 33, 259-269
- Baud V., Karin M. (2001) Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends in Cell Biology* 11, 372-377
- Bíliková K., Klaudiny J., Šimúth J. (1999) Characterization of the basic major royal jelly protein MRJP2 of honeybee (*Apis mellifera* L.) and its preparation by heterologous expression in *E. coli*. *Biológia*, Bratislava 54, 733-739
- Bíliková K., Wu G., Šimúth J. (2001) Isolation of peptide fraction from honeybee royal jelly as antifaulbrood factor. *Apidologie* 32, 275-283
- Bíliková K., Hanes J., Nordhoff E., Saenger W., Klaudiny J., Šimúth J. (2002) Apisimin, a new serine valin-rich peptide from honeybee (*Apis mellifera* L.) royal jelly: purification and molecular characterization. *FEBS Letters* 528, 125-129
- Casteels P. (1997) Immune response in Hymenoptera, in: Molecular mechanisms of immune responses in insects. Breay, P. T., 24. Hultmark, D. (ed), Chapman and Hall, London, 92-110
- Crailsheim K. (1992) The flow of jelly within a honeybee colony. *J. Comp. Physiol. B.* 162, 681-689
- Dushay M. S., Asling B., Hultmark D. (1966) Origin of immunity: Relish, a compound Rel-like gene in the antibacterial defense. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 1034-1047
- Fujiwara S., Imai J., Fujiwara J., Yaeshima T., Kawashima T., Kobayashi K. (1990) A potent antibacterial protein in royal jelly. *J. Biol. Chem.* 265, 11333-11337
- Hanes J., Šimúth J. (1992) Identification and partial characterization of the major royal jelly protein of the honey bee (*Apis mellifera* L.). *J. Apic. Res.* 31, 22 - 26
- Imler J. L., Hoffmann J. A. (2001) Toll receptors in innate immunity. *Trends in Cell Biology* 11, 304-310
- Kimura Y., Washino N., Yonekura M. (1995) N-linked sugar chains of 350 kDa royal jelly glycoprotein. *Biosci. Biotech. Biochem.* 59, 507-509
- Kimura Y., Kajiyama S., Kanaeda J., Izukawa T., Yonekura M. (1996) N-linked sugar chain of 55 kDa royal jelly glycoprotein. *Biosci. Biotech. Biochem.* 12, 2099-2102
- Kucharski R., Maleszka R. (2002) Evaluation of differential gene expression during behavioral development in the honeybee using microarrays and northern blots. *Genome Biology* 3, research 0007.1-0007.9.
- Malecová B., Ramser J., O'Brien J. K., Janitz M., Jůdová J., Lehrach H., Šimúth J. (2003) Honeybee (*Apis mellifera* L.) mrjp gene family: computational analysis of putative promoters and genomic structure of mrjp1, the gene coding for the most abundant protein of larval food. *Gene* 303, 165-175
- Matsui T., Ykiyoshi A., Doi S., Sugimoto H., Yamada H., Matsumoto K. (2002) Gastrointestinal enzyme production of bioactive peptides from royal jelly protein and their antihypertensive activity. *Journal of Nutritional Biochemistry* 13, 80-86
- Oka H., Emori Y., Kobayashi N., Hayashi Y., Nomoto K. (2001) Suppression of allergic reactions by royal jelly in association with the restoration of macrophage function and improvement of Th1/Th2 cells responses. *International Immunopharmacology* 1, 521-532
- Schmitzová J., Klaudiny J., Albert Š., Schröder W., Schreckengost W., Hanes J., Šimúth J. (1998) A family of major royal jelly proteins of the honeybee *Apis mellifera* L. *Cell Mol. Life. Sci.* 54, 1020-1030
- Šimúth J. (2001) Some properties of the main protein honeybee (*Apis mellifera* L.) royal jelly. *Apidologie* 32, 69-80
- Šver L., Oršolič N., Tadič Z., Njari I. B., Vaplotič I., Bašič I. (1996) A royal jelly as a new potential immunomodulator in rats and mice. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.* 19, 31-38
- Takenaka T. (1982) Chemical composition of royal jelly. *Honeybee Sci.* 3, 69-74
- Tonks A., Cooper R. A., Price P. C., Molan P. C., Jones K. P. (2001) Stimulation of TNF $\alpha$ -release in monocytes by honey. *Cytokine* 14, 240-242
- Tsao W., Shuel R. W. (1968) Breakdown of royal jelly protein in the midgut of the larval honeybee. *J. Apic. Res.* 7 119-128
- Zasloff M. (2002) Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 415, 389-395