

LAS PROTEINAS DE LA JALEA REAL COMO HERRAMIENTA PARA LA ELABORACION DE INGREDIENTES NECESARIOS A LA SALUD

J. ŠIMÚTH¹, Katarina BÍLÍKOVÁ¹, Elena KOVÁKOVÁ²

¹Laboratory of Genetic Engineering, Institute of Chemistry, SK-84 538 Bratislava, REPUBLICA ESLOVACA

²Institute of Virology, Slovak Academy of Sciences, Dúbravská cesta 9, SK-84 538 Bratislava, REPUBLICA ESLOVACA, E-mail: chemsim@savba.sk

Resumen

La calidad de los productos de la abeja melífera (*Apis mellifera* L.) se han evaluado teniendo en cuenta sus propiedades estáticas, determinables mediante análisis químicos, físicos e instrumentales. En la actualidad, se acepta, en general, que la calidad de los productos apícolas habría que definirse sobre la base de las funciones dinámicas de cada uno de sus componentes. La jalea real siempre ha sido valorada y muchas veces utilizada como sustancia saludable. Son cada día más los testimonios científicos que apoyan la idea de que los componentes bioactivos más atractivos de los productos apícolas son las proteínas de la jalea real. Un descubrimiento de fecha reciente, de acuerdo con el cual las proteínas de la jalea real podrían actuar fisiológicamente como inmunomoduladores y supresores de las reacciones alérgicas, y sus virtudes hipotensoras y estimulantes de la proliferación han abierto una nueva etapa en la utilización de la jalea real y la miel de abejas. Nuestro estudio sistemático molecular-biológico sobre las proteínas individuales y los péptidos de la jalea real relevó que sus propiedades multifuncionales se podrían aprovechar como marcadores para la estandarización de las dosis de uso de la jalea real, que pueda consumirse en la dieta diaria y que, después de ingerida, regule o influya en un determinado proceso fisiológico. Los efectos médicos y farmacológicos de los productos apícolas se evaluarán con más precisión y se cuantificarán en función de la cantidad individual de proteínas de la jalea real presentes en la dieta. Se presentan las propiedades de las proteínas individuales de la jalea real y sus funciones fisiológicas durante el desarrollo larval y como ingrediente de alimentos funcionales.

Palabras clave: jalea real de la abeja melífera/proteína/péptidos/purificación/propiedades fisiológicas

Introducción

Que la colonia de abejas melíferas es un superorganismo constituido por células individuales, que de hecho son las propias abejas, queda reflejado en los mecanismos a través de los cuales las pecoreadoras recolectan, elaboran, almacenan el néctar y el polen y se encargan de alimentar a la cría. A las proteínas y los péptidos sintetizados por las abejas melíferas en la glándula post-cerebral les corresponde un importante papel en los procesos de alimentación y protección de la cría contra los agentes patógenos.

La jalea real es un producto segregado por la glándula postcerebral de las abejas nodrizas y sirve de alimento a las larvas de abejas melíferas. Por trofalaxis es distribuida entre los individuos de la colonia (CRAILSHEIM, 1992). La jalea real es un sistema formado por multitud de sustancias, que contienen proteínas (12-15 %), agua (60-70 %), azúcares totales (10-12 %), lípidos (3-7 %), minerales, aminoácidos y vitaminas (TAKENAKA, 1982; ŠIMÚTH, 2001). Se considera que la jalea real es un alimento único elaborado en la naturaleza durante la evolución de los animales.

El cuidado y la alimentación de las larvas eclosionadas corren a cargo de las abejas melíferas jóvenes, que con las secreciones de sus glándulas postcerebrales suministran jalea de reina a la larva de la futura reina, jalea de obrera a la larva de la futura abeja obrera y jalea de zángano al futuro zángano. Estos tipos de jalea no difieren en cuanto a la composición química de sus componentes básicos, tales como proteínas, carbohidratos y lípidos. La principal diferencia consiste en que la jalea de reina, a distinción de la jalea de obrera, contiene un componente que determina en qué se va a convertir un huevo diploide genéticamente igual: en una reina o, en defecto de tal componente, en una abeja obrera. Pero a este componente aún no se le ha identificado. La clave de este mecanismo regulador se halla codificada en genes especializados de la abeja melífera, que lo activan en la fase inicial del desarrollo larval de la futura reina y lo reprimen en la larva de la futura abeja obrera. Se trata de la llamada manifestación diferencial de los genes, regulada a menudo por las hormonas, implicadas asimismo en la regulación de la manifestación de otros genes responsables por varias señales fenotípicas que diferencian a la reina de las obreras. Por esta diferenciación y debido a que las abejas melíferas alimentan a la reina con jalea real a lo largo de toda su vida, ésta tiene una larga vida. Las reinas viven de 4 a 5 años, las obreras sólo 3-4 semanas. Este fenómeno sugiere que la jalea real pudiera ser un recurso para la longevidad de los humanos. Aun siendo una hipótesis todavía no comprobada experimentalmente, descubrimientos científicos de fecha reciente sugieren que particularmente las proteínas contenidas en la jalea real podrían ser el factor revitalizante en la nutrición humana. Las proteínas segregadas por las abejas melíferas en sus productos desempeñan diferentes funciones para crear óptimas condiciones de desarrollo de la colonia de abejas melíferas. Las glándulas hipofaríngeas, mandibulares y salivales son fuente de las proteínas más importantes de las abejas melíferas. En estas glándulas se sintetizan cientos de proteínas y péptidos diferentes, con un papel insustituible en la alimentación de la cría y su diferenciación, en la transformación del polen floral en pelotillas de polen y luego en pan de abejas, lo mismo que en la tecnología única de transformación del

néctar en miel. Estas proteínas como secreción exógena de las abejas melíferas favorecen el contacto directo con la fuente de alimento (los carbohidratos del néctar, las proteínas del polen) y la protección (barrera protectora) contra los agentes patógenos.

Proteínas exógenas de la abeja melífera

Clasificación de las proteínas segregadas por la abeja melífera en la jalea real y los productos de ella derivados

Gran parte de la jalea real está constituida por proteínas, que representan un 50 % de la materia seca de la jalea real (ŠIMŮTH, 2001). Las proteínas importantes representan 90 % de la cantidad total de proteínas con masa molecular de 49-87 kDa atribuida a una proteína y a la familia de gen (HANES y ŠIMŮTH, 1992; SCHMITZOVÁ et al., 1998; MALECOVÁ et al., 2003). Las proteínas menores contenidas en la jalea real están constituidas por proteínas y péptidos con distintas funciones, entre las cuales propiedades antimicrobianas y antifúngicas (FUJIWARA et al., 1990; BÍLIKOVÁ et al., 2001; BÍLIKOVÁ et al., 2002; BACHANOVÁ et al., 2002).

Atendiendo a sus funciones, las proteínas y los péptidos exógenos de las abejas melíferas se pueden clasificar como sigue:

Enzimas tecnológicas - involucradas en la transformación del néctar en miel: α -glucosidasa, glucosa-oxidasa, catalasa y amilasa.

Proteínas nutritivas - segregadas en el alimento larval como principal fuente proteica de las larvas de abejas melíferas.

Proteínas y péptidos protectivos - segregados por las abejas melíferas en sus productos y que protegen a la cría en desarrollo contra los agentes patógenos.

Proteínas y péptidos fisiológicamente activos - cumplen diferentes funciones dentro de la colonia de abejas e influyen en los procesos de los cultivos de tejidos celulares de animales *in vitro*.

Propiedades estructurales de la jalea real

En general, a la jalea real se le define como emulsión. El examen de la jalea real fresca bajo el microscopio electrónico de escaneo (SEM) evidenció sus características estructurales únicas (ŠIMŮTH, 2001).

El examen con el SEM mostró que en ciertas zonas la capa de jalea real contiene partículas esféricas globulares relativamente grandes (Fig. 1). Su tamaño oscila entre 20 y 80 μm . Estos "glóbulos" estaban interconectados a través de un sistema de canales filamentosos. El diámetro de los filamentos es de más o menos 2 μm y su longitud variable. El aumento de un glóbulo evidenció filamentos que irradiaban desde la superficie como una concha del glóbulo. Se emitió la idea de que la fina estructura de la jalea real es generada por las glándulas hipofaríngeas de la abeja melífera.

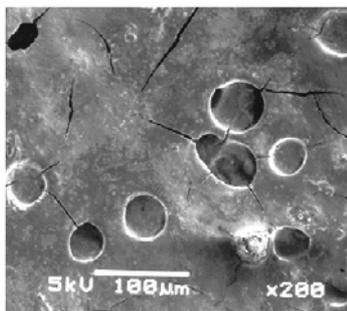


Fig. 1 - Visualización SEM de las partículas globulares específicas de la jalea real natural. Una celda de reina con larva de 2 días (*Apis mellifera carnica* L.) fue recortada de un panal del apiario particular del autor. Se apartó la larva y la jalea real de la celda se congeló a -20°C , con el fin de investigar a grandes rasgos las características estructurales de la jalea real con SEM. Al efecto de evitar que se destruyera la estructura original de la jalea real, se omitieron los procedimientos de fijación. Las muestras de jalea real se tomaron de las muestras congeladas. Se expusieron a la temperatura ambiente por 72 horas y pudieron formar una capa fina sobre discos de aluminio de 1,2 cm de diámetro. Luego se colorearon negativamente las muestras con Cu en una cámara de vacío a 10^{-3} Pascal y se examinaron con SEM (Jeol, modelo JSM-580, Japón).

Preparación de las proteínas de la jalea real en forma natural

Para poder aislar las proteínas en un estado lo más natural posible, pusimos a punto un método de fraccionamiento de la jalea real por centrifugación (ŠIMŮTH, 2001). Así obtuvimos tres capas netamente distintas bajo el aspecto físico. La fracción sobrenadante era un fluido verdiamarillo, denominado plasma, y que representaba el 61 % (w/v) de la jalea real nativa. Una fracción viscosa amarillo amarronada, denominada jalea y que representaba la capa intermedia, tenía una consistencia gelatinosa. Esta fracción representaba el 32 % de la cantidad de jalea real (w/v). El sedimento blanco del fondo (7 % w/v de la jalea

real) parecía ser una sustancia casi sólida. Cantidades significativas de ácidos grasos estaban concentradas en fracciones de menor contenido de agua. Por ultracentrifugación se obtuvo un gel semi-sólido amarillo de oro, parecido al ámbar. Los análisis bioquímicos mostraron que se trataba de una importante proteína de la jalea real (antiguamente denominada MRJP1) tipo albúmina, razón por la cual recibió el nombre de apalbumina- α . Por tanto, es lógico sugerir que por la interacción entre apalbumina- α y ácidos grasos resultó la fracción proteica insoluble en agua de la jalea real. Lo interesante es que otras proteínas de la jalea real, localizadas predominantemente en la fracción sobrenadante, como apalbumina- β (antiguamente denominada MRJP2) y apalbumina- γ (denominada antiguamente MRJP3) no pueden formar un gel, a pesar de su gran semejanza a la apalbumina- α (SCHMITZOVÁ et al., 1998).

Propiedades físicas y químicas de la apalbumina- α

Se comprobó que apalbumina- α formó una estructura subunitaria (ŠIMÚTH, 2001). La subunidad básica es de aproximadamente 420 kDa y se formó del monómero básico de 55 kDa. Las observaciones microscópicas mostraron que apalbumina- α en soluciones acuosas forma estructuras similares a las encontradas también en la jalea real. En función de la concentración de la apalbumina- α , se generaron diferentes estructuras con repetibilidad regular (Fig. 2). Se trata de una estructura autointegradora de la proteína, producto de la oligomerización de sus subunidades. Lo interesante es que otras proteínas de la jalea real no tienen habilidad para la oligomerización, pese al alto grado de similitud secuencial con apalbumina- α .

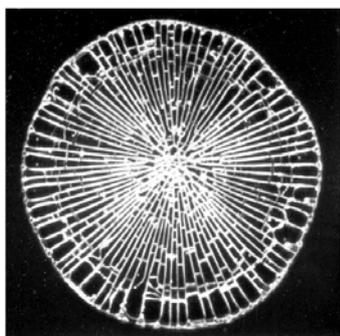


Fig. 2 - Autointegración de las estructuras filamentosas regulares de apalbumina- α . La visualización con el microscopio de luz se efectuó a los 20 minutos de la aplicación de una gota (3 μ l) de apalbumina- α (80 mg por 1 ml de agua) sobre el cubreobjetos.

¿Cuál es la función de las estructuras autoformadoras de apalbumina- α en la colonia de abejas melíferas? Numerosas proteínas son mucho más estables en estructuras supramoleculares que en formas monoméricas. Si se toma en cuenta el alto contenido en proteínas de la jalea real, teóricamente no se puede suponer que todas las proteínas nutritivas de la jalea real son metabolizadas inmediatamente. La elevada concentración de aminoácidos induciría una presión osmótica desproporcionalmente alta en el tracto digestivo de la larva. Comprobamos asimismo que apalbumina- α aparece también en la miel y el polen. La abeja melífera puede aprovechar las propiedades estructurales de apalbumina- α en la transformación del polen floral en pelotilla de polen. Al parecer la abeja melífera envuelve el polen en apalbumina como un emparedado. Apalbumina- α es en la jalea real un factor formador de textura, pero lo es también en los cosméticos que contienen jalea real. Parece que apalbumina- α cumple más funciones que su papel nutricional en el desarrollo de la larva.

Propiedades fisiológicas de las proteínas de la jalea real

Se pueden hacer varias generalizaciones en relación con las propiedades fisiológicas de las proteínas importantes de la jalea real. Las manifestaciones comportamentales tan sugerentes no dicen directamente si las proteínas importantes de la jalea real cumplen las mismas funciones en el estadio temprano y en el tardío del desarrollo larval. El estudio de la escisión de la proteína de la jalea real en el intestino medio de la larva (TSAO y SHUEL, 1968) mostró que algunas de las proteínas de la jalea real pudieron traspasar el epitelio del intestino sin sufrir ningún cambio. El alto contenido en aminoácidos esenciales le predestinó el papel nutricional que asume en la colonia de abejas.

La fracción proteica de la jalea real producida por las abejas melíferas contiene numerosos componentes valiosos y substancias biológicamente activas. Además de las proteínas importantes, en la jalea real hay escasas cantidades de otras proteínas menores y también de péptidos antibióticos (FUJIWARA et al., 1990; BÍLIKOVÁ et al., 2001; BÍLIKOVÁ et al., 2002). Particular interés presentan las proteínas bioactivas y los péptidos presentes en la secuencia aminoácido de las proteínas de la papilla.

Estos péptidos, inactivos en la secuencia de la proteína parental, pueden ser liberados por proteólisis enzimática, por ejemplo en la digestión gastrointestinal o durante la elaboración del alimento. Una vez liberados en el cuerpo, los péptidos bioactivos pueden actuar como componentes reguladores con actividad similar a la de las hormonas. Las estructuras de las secuencias biológicamente activas aún no han sido obtenidas y hay que seguir investigando sobre la digestión enzimática *in vitro* y/o la digestión gastrointestinal *in vivo* de las respectivas proteínas.

Los componentes bioactivos de la jalea real no están completamente evaluados. De cualquier forma, un reciente estudio *in vitro* demuestra que algunas proteínas importantes de la jalea real influyen en procesos fisiológicos muy importantes. Habría que tomar en cálculo los péptidos bioactivos de la jalea real y de sus proteínas importantes como moduladores en potencia de los distintos procesos reguladores del organismo. La relación entre actividad y estructura y el mecanismo a través del cual las proteínas importantes de la jalea real ejercen sus efectos inmunomoduladores aún no han sido determinados. No obstante, los resultados obtenidos con las proteínas 350 kDa y 55 kDa de la jalea real sugieren que sus proteínas importantes podrían influir en importantes procesos celulares. Las proteínas 350 kDa con una secuencia de aminoácido con terminal N, como apalbumina- α (SCHMITZOVA et al., 1998) estimulan la proliferación de los monocitos humanos (línea de células U 937) y los hibridomas humano-humano (línea de células HB4C5) (KIMURA et al., 1995). Los autores citados descubrieron que las estructuras de las cadenas de azúcar con enlace N de la proteína 350 kDa son de hecho la estructura típica de la manosa (Man9-GlcNAc2), frecuentemente detectada en animales, plantas e insectos. La proteína 55 kDa de la jalea real con terminal N de la secuencia de aminoácido y que es idéntica a la segunda proteína importante en abundancia de la jalea real, eso es apalbumina- α (SCHMITZOVA et al., 1998; BÍLIKOVÁ et al., 1999), mantiene la gran viabilidad del cultivo primario de células de ratón, pero no estimula la proliferación de los monocitos humanos (KIMURA et al., 1996). La evaluación de las estructuras químicas de las importantes proteínas bioactivas de la jalea real es el primer paso hacia el descubrimiento del mecanismo molecular de sus actividades fisiológicas sinérgicas con otros componentes bioactivos de la jalea real.

Desde el punto de vista de la actividad fisiológica, la posición dominante corresponde a las proteínas albuminoides más abundantes de la jalea real: apalbumina- α ácida (ŠIMŮTH, 2001) y apalbumina- β básica (BÍLIKOVÁ et al., 1999), que aparecen también en el cerebro de la abeja melífera (KIMURA et al., 1995; KUCHARSKI y MALESZKA, 2002). Estos descubrimientos y las similitudes entre el sistema inmune de los insectos y en de los mamíferos (DUSHAY et al., 1966; IMLER y HOFFMANN, 2001; BAUD y KARIN, 2001) mostraron que las proteínas de la jalea real podrían ser el factor involucrado en la regulación de los procesos fisiológicos importantes. Esto quedó indirectamente confirmado al descubrirse que la solución de miel pura al 1 % induce la liberación de TNF α de 6 células unprimed monomac, en tanto que la miel artificial no lo hace (TONKS et al., 2001).

Los datos relativos a las propiedades fisiológicas de las proteínas de la jalea real, así como la activación de la proliferación de los monocitos humanos (KIMURA et al., 1995), o las propiedades inmunomoduladoras de la jalea real (ŠVER et al., 1996), la supresión de las reacciones alérgicas a la jalea real (OKA et al., 2001), o la actividad hipotensora de los péptidos bioactivos de la jalea real (MATSUI et al., 2002) amplían el potencial de su aplicación en la farmacéutica e indican su función natural en la evolución de la abeja melífera, donde pueden desempeñar el papel de inducir el mecanismo de defensa durante el desarrollo larval. Si esta suposición es correcta, las proteínas de la jalea real podrían inducir la producción de biorreguladores tipo citokina, con importante función en el sistema inmunitario, en los procesos inflamatorios, y podría colaborar también al control de la proliferación, diferenciación y apoptosis celular. Esta suposición fue confirmada por nuestros experimentos preliminares, en los que comprobamos la inducción de citokinas en los macrófagos murinos por las proteínas de la jalea real. Nuestras observaciones indican que las proteínas de la jalea real son las responsables por el estímulo *in vitro* de la producción de TNF- α en los monocitos humanos por una solución acuosa de miel al 1 % (TONKS et al., 2001). Indican asimismo que la acción de las proteínas de las abejas melíferas pueden estimular un sistema específico (la red de citokinas) que activa los genes responsables de la producción de sustancias defensivas, antes de que aparezca la infección bacteriana.

La abeja melífera, igual que otros insectos, responde a las infecciones bacterianas por la inducción acrecentada de genes codificados para péptidos antimicrobianos, secretados ulteriormente en la hemolinfa. Esta "respuesta inmune" es muy rápida (se produce dentro de un par de horas), pero muchas veces no es específica (CASTEELS, 1997; ZASLOFF, 2002). Algunos péptidos antimicrobianos de las abejas melíferas (apidecina, abecina e himenoptecina) son inducidos específicamente y liberados en la hemolinfa apenas después de la infección bacteriana, mientras que defensin-royaliyina (FUJIWARA et al., 1990) y apisimina (BÍLIKOVÁ et al., 2002), descubiertas en la jalea real, se sintetizan probablemente a lo largo de toda la vida de la abeja melífera. Las proteínas y los péptidos de la jalea real pueden participar en el mecanismo defensivo de la abeja melífera contra los agentes patógenos, inactivando directamente los microorganismos que aparecen en los productos de la abeja melífera e induciendo citokinas con participación en la regulación de la transcripción de las proteínas y los péptidos defensivos.

Los datos obtenidos en relación con las propiedades bioquímicas y biológicas de las proteínas de la jalea real servirán de base para los genomas funcionales del sistema defensivo de la abeja melífera contra

las enfermedades y también para el mejor entendimiento de las propiedades fisiológicas de los productos apícolas en tanto que componentes del alimento funcional. Aún es difícil valorar la eficacia clínica de la jalea real, pero existe la esperanza de que la investigación descubra el mecanismo de actuación o las dosis apropiadas y su período de aplicación. Esta presentación de un estudio experimental a nivel molecular sobre las proteínas segregadas por las abejas melíferas en sus productos es un intento de definir la bioactividad de las proteínas y los péptidos de la jalea real como importante nutrimento.

BIBLIOGRAFÍA

- Bachanová K., Klauđiny 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., Klauđiny 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*. *Biología*, 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., Klauđiny 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., Klauđiny 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 α -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
- Zaslöf M. (2002) Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 415, 389-395