



1999

The Application of Capillary Electrophoresis on the Characterization of Protein in Royal Jelly

Follow this and additional works at: <https://www.jfda-online.com/journal>

Recommended Citation

Lee, A.-L.; Yeh, M.-I.; Wen, H.-M.; Chern, J.-C.; Lin, J.; and Hwang, W.-I. (1999) "The Application of Capillary Electrophoresis on the Characterization of Protein in Royal Jelly," *Journal of Food and Drug Analysis*: Vol. 7 : Iss. 1 , Article 1.

Available at: <https://doi.org/10.38212/2224-6614.2879>

This Original Article is brought to you for free and open access by Journal of Food and Drug Analysis. It has been accepted for inclusion in Journal of Food and Drug Analysis by an authorized editor of Journal of Food and Drug Analysis.



毛細管電泳在蜂王漿蛋白質分析上之應用

李安玲¹ 葉美吟¹ 溫惠美^{1*} 陳景川¹ 林貞信¹ 黃文瑛²¹食品技術系 ²環保技術系

國立屏東科技大學 屏東縣內埔鄉91207學府路1號

摘 要

本研究採本省中南部以生產蜂王漿為主之義大利蜂種所生產之新鮮蜂王漿，進行蛋白質特性之探討。蜂王漿中總氮含量為2.46%，其中來自總胺基酸的氮含量為2.34%；而來自游離胺基酸的氮含量為0.11%，胺基態氮的含量為0.20%，顯示蜂王漿中的含氮化合物大部分是以蛋白質的型態存在。蜂王漿經離心、沉澱和透析等分離及純化後，可得65±5%之水溶性蛋白質，再經DEAE-Sephacel離子交換管柱分離，得到二部分之區分物質，F1和F2。將F1和F2分別以SDS-PAGE電泳分析，F1部分含二個染色帶，分子量分別為50及44 KDa，F2部分則僅含一個染色帶，分子量為55 KDa。毛細管電泳之分析模式，由於分離機制與解析度各不相同，可將蜂王漿蛋白質分離成不同區分。將F1和F2經毛細管區帶電泳分析，F1出現四個吸收峰，F2則有二個吸收峰；而經毛細管凝膠電泳分析，F1部分出現二個吸收峰，分子量分別為59及73 KDa，F2則僅出現一個吸收峰，分子量為118 KDa；但經毛細管等電聚焦來分離F1和F2，F1則出現六個吸收峰，等電點分別為6.9，6.7，6.3，5.9，5.7及5.5，F2出現二個吸收峰，等電點為4.8及4.7。

關鍵詞：蛋白質，蜂王漿，毛細管電泳。

前 言

蜂王漿為高經濟價值之蜂產品，臨床試驗發現，蜂王漿具有多種醫療效果(1~4)。蜂王漿的組成分複雜，被視為一種高貴的健康食品，主要是因為除了含豐富的蛋白質、礦物質及維生素等多種營養成分外，推測其尚有許多不明活性物質(unknown functional substances)，此不明物質之活性成分極可能是含有蛋白質成分之物質(5~9)。自1940年Townsend及Lucas⁽¹⁰⁾最早從事蜂王漿中蛋白質的區分研究以來，不少學者亦致力於此。從文獻資料顯示，不同的測定方法，得到的蛋白質種類互異，曾經使用過的方法包括溶劑萃取、濾紙電泳、區帶電泳及膠體過濾層

析等(10~18)。

毛細管電泳(capillary electrophoresis；簡稱CE)是近年來新開發之一種結合電泳和層析的分離技術，因具有高效率、分析時間短、再現性佳及樣品用量少等的多項優點，使其成為目前頗具前瞻性的分析儀器。根據研究報告，CE已廣泛應用在蛋白質、胺基酸、核酸、金屬離子、碳水化合物及藥物等之分析工作上。在蛋白質應用上，發展成功的實例已有牛奶蛋白^(19~21)、血清蛋白^(22~24)及雞蛋蛋白⁽²⁵⁾等，但目前尚無任何有關蜂王漿之應用報告。故本研究擬嘗試以CE分離蜂王漿之蛋白質，並與傳統之電泳分離技術比較，期望可進一步了解蜂王漿中蛋白質之生化特性。

材料與方法

一、材料

蜂王漿採自本省中南部以生產蜂王漿為主之義大利蜂種(*Apis mellifera ligustica*)所生產之新鮮蜂王漿，其養蜂花種以茶花及油菜花為主，其它雜花為輔。新鮮蜂王漿採購後隨即儲存於-18℃之冷凍庫備用。

二、方法

(-)含氮化合物之分析

1. 總氮之測定

係依 AOAC⁽²⁶⁾之法測定之。

2. 胺基態氮之測定

係由樣品中甲醛態氮⁽²⁷⁾減去揮發性鹽基態氮⁽²⁷⁾之計算值。

3. 游離胺基酸之氮含量測定

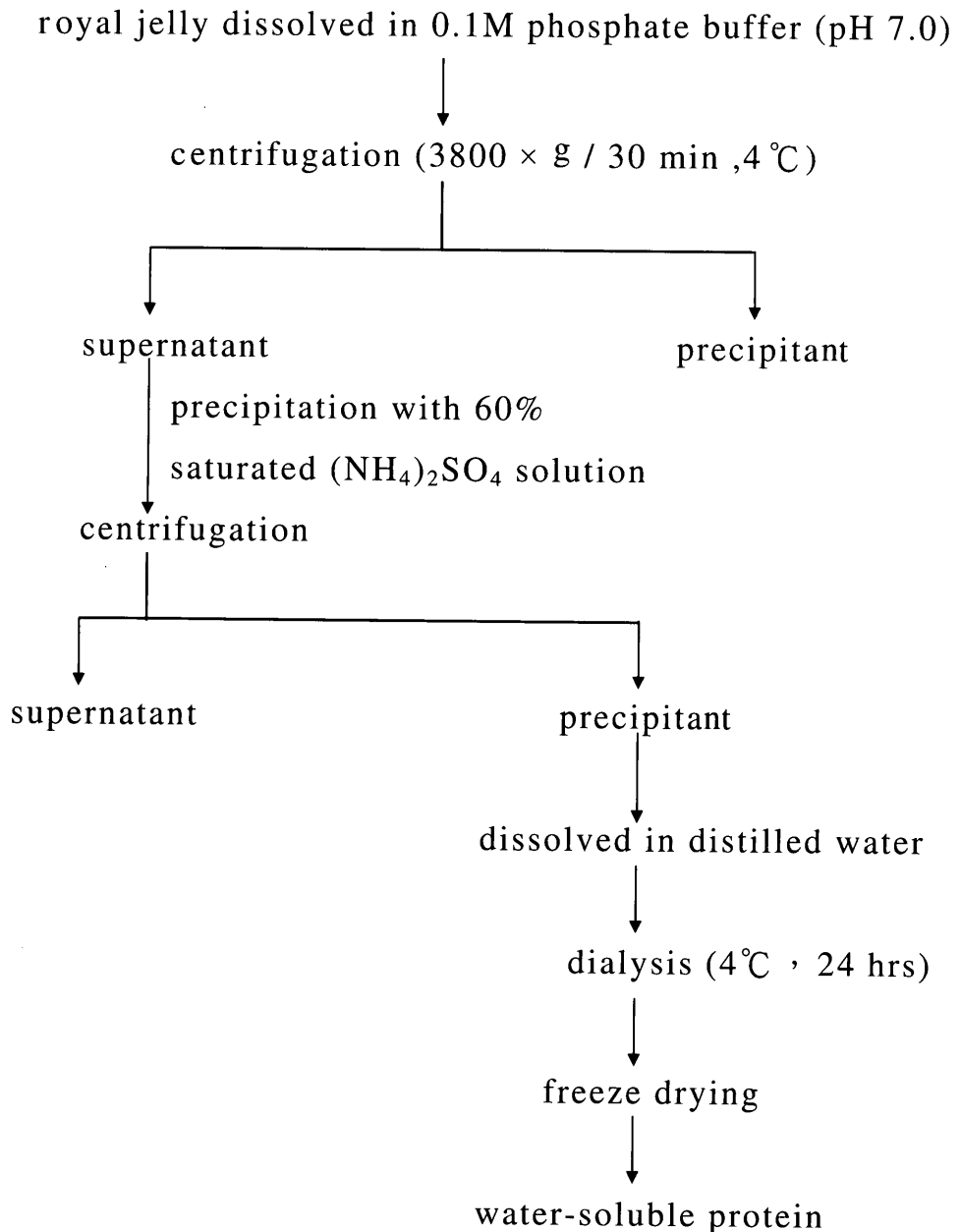


Figure 1. The flow chart of isolation of water-soluble protein from royal jelly.

取1g蜂王漿加入5 ml之2%的5-sulfosalicylic acid，經萃取、離心後，取上清液及過濾(0.45 μm)等步驟，再以胺基酸自動分析儀(Beckman)測定之⁽²⁸⁾。分析條件：管柱為ISC-07/S1504 Li Type；動相為0.15 N Lithium citrate (pH 2.6)、0.3 N Lithium citrate (pH 10.0)及0.2 N Lithium Hydroxide；流速為0.4 ml/min；管柱溫度為38~58°C；反應溫度為65°C；偵測器為可見光光度計RF-530 (348 nm及450 nm)。游離胺基酸之氮含量以總游離胺基酸之含量除以氮係數(6.25)計。

4. 總胺基酸之氮含量測定

取0.1 g蜂王漿加入3 ml之6 N HCl，抽真空後進行24小時水解。冷卻定量到50 ml，以0.45 μm 濾膜過濾處理後，再以胺基酸自動分析儀測定之，分析條件如同上述游離胺基酸之氮含量測定。而總胺基酸之氮含量亦為計算值，係將總胺基酸之含量除以氮係數(6.25)而得。

(二)蛋白質之分離

取蜂王漿40 g溶於0.1 M磷酸緩衝液(pH 7.0)，離心去除沉澱，上澄液經透析及冷凍乾燥等步驟，流程圖如圖一所示，製得凍乾的水溶性蛋白質，供進一步層析及電泳之用。

(三)DEAE-Sephacel離子交換層析

裝填好一DEAE-Sephacel CL-6B (Pharmacia; Sweden)管柱(2.6 \times 10 cm)，先以50 mM磷酸鈉緩衝液(pH 7.0)平衡後，注入樣品2 ml (protein concentration 100 mg/ml)於管柱中，先以50 mM磷酸鈉緩衝液(pH 7.0)流洗至280 nm之吸光值平穩後，再開始以0~0.5 M NaCl (溶於50 mM磷酸鈉緩衝液，pH 7.0)沖提，每5 ml為一區分，並收集在280 nm有吸光之區分物。

(四)SDS-PAGE電泳分析 (Pharmacia-Hoefer SE 400)

依Weber及Osborn等學者之方法⁽²⁹⁾，經製膠、染色及脫色等步驟，其中樣品與樣品緩衝液以1:1混合均勻，而膠濃度為10%。高分子量標準蛋白質混合物，採Bio-Rad公司之組合產品，使用前以樣品緩衝液稀釋20倍。高分子量標準蛋白質混合物之組成蛋白質

為：myosin (200 KDa)， β -galactosidase (116 KDa)，phosphorylase b (97.4 KDa)，serum albumin (66 KDa)，ovalbumin (45 KDa)，carbonic anhydrase (31 KDa)。

(五)毛細管電泳分析(Beckman P/ACE 5000 System)

藥品及毛細管皆採用Beckman公司之產品。

1. 毛細管區帶電泳(capillary zone electrophoresis, 簡稱CZE)

採用之藥品為組合產品(Neutral Capillary Methods Development Kit/ Prote-ins)。分別使用pH 2.5之磷酸鈉，pH 4.5之醋酸鈉，pH 6.0之Citrate/Monohydrate (Cit/ MES)，pH 7.0之磷酸鈉及pH 8.0之Tris-HCl等五種緩衝液進行分析。樣品處理係將蜂王漿0.2 g加入10 ml蒸餾水，振盪均勻後，以12000 \times g (4°C)離心10 min，取澄清液經0.45 μm 濾膜過濾後，進行CZE之分析。分析條件：毛細管採50 μm \times 27 cm，內層為中性被覆物之管柱，電泳電壓為13.0 KV，電極方向為正相(normal)，樣品注入時間為10 sec，檢測溫度為25°C，檢測波長為214 nm。

2. 毛細管凝膠電泳(capillary gel electrophoresis, 簡稱CGE)

採用之藥品為組合產品(SDS14-200Kit)。標準品含myosin(205 kDa)， β -galactosidase(116 KDa)，phosphorylase b(97.4 KDa)，bovine serum albumin (66 KDa)，ovalbumin(45 KDa)，carbonic anhydrase (29 KDa)及 α -lactalbumin(14.2 KDa)等七種。樣品處理係將含0.1~1 mg水溶性蛋白質之樣品加入100 μl sample buffer, 10 μl reference standard(Orange G), 5 μl 2-mercaptoethanol及100 μl 的去離子水，充分振盪溶解，在100°C水浴加熱10 min後冷卻備用。分析條件：毛細管柱採100 μm \times 47 cm，電泳電壓為14.1 KV，電極方向為逆相(reverse)，樣品注入時間為60 sec，緩衝液為gel buffer，檢測溫度為20°C，檢測波長為214 nm。分子量計算方式為以標準品分子量之對數值對移動時間值(relative migration time, RMT)之倒數做圖，再經內插的方式，求得未知樣品物質之分子量。

3. 毛細管等電聚膠(capillary isoelectric focusing, 簡稱 CIEF)

採用之組合產品為 CIEF 3-10 Kit，標準品含 ribonuclease A (pI=9.45)，carbonic anhydrase (pI=5.90)， β -lactoglobulin A (pI=5.10) 及 CCK Flanking Peptide (pI=2.75) 等四種。樣品處理係將 5 ~ 10 μ l 之樣品溶液(含蛋白質濃度 1 ~ 5mg/ml)與 4 μ l Ampholyte，200 μ l 膠液和 2 μ l 之 1% Triton X-100 等溶液混合並充分振盪溶解後，以 7000 \times g 離心 10 min 備用。分析條件：毛細管柱採 neutral 50 μ m \times 27 cm，電泳電壓為 18.9 KV，電極方向為正相(normal)，陽極電解液為 91 mM 磷酸膠液，陰極電解液為 20 mM 氫氧化鈉水溶液，檢測溫度為 20 $^{\circ}$ C，檢測波長為 280 nm。pI 值之計算為將標準品之等電點對各尖峰之時間值做圖，再經內插的方式，可求得未知樣品物質之 pI 值。

結果與討論

一、蜂王漿中含氮化合物之分佈

本實驗為了解省產蜂王漿中蛋白質之特性，對其含氮化合物之分佈做一分析，結果顯示(表一)總氮的含量為 2.46%，其中來自總胺基酸的氮為 2.34%，占總氮的 95%；而來自游離胺基酸的氮為 0.11%，僅占總氮量之 4.5%。胺基態氮的含量(0.20%)和游離胺基酸之氮含量(0.11%)很接近，顯示蜂王漿中的含氮化合物大部份是以蛋白質的型態存在。蜂王漿經過硫酸銨沉澱及透析等步驟，所萃取之水溶性蛋白質，其總氮量占蜂王漿中總氮量之 65 \pm 5%，故知蜂王漿中蛋白質以水溶性蛋白質為主。與其它蜂王漿比較，由 Takenaka⁽¹⁶⁾之報告指出，蜂王漿中的蛋白質分為水溶性(75 ~ 85%)和非水溶性(15 ~ 25%)

Table 1. Distribution of nitrogen-containing compounds in fresh royal jelly

N-Compounds	Content (%)
Total - N	2.46
Total amino acid - N	2.34
Free amino acid - N	0.11
Amino - N	0.20

兩大部份。另外之研究指出⁽¹⁷⁾，新鮮蜂王漿中，總氮的含量為 2.0%，其中 89% 為水溶性氮化合物，11% 為水不溶性氮化合物；而在水溶性氮化合物中，73.9% 來自蛋白質，14.9% 來自非蛋白質，2.3% 來自游離胺基酸，而 0.16% 則來自胍肽。故知蜂王漿之種類雖異，但主要皆以水溶性蛋白質為主。

二、蜂王漿中水溶性蛋白質之特性

將蜂王漿適量溶於 0.1 M 磷酸鈉緩衝液(pH 7.0)，經過離心、硫酸銨沉澱及透析等分離及純化後，可得到約 60 ~ 70% 之水溶性蛋白質，故本實驗著重在水溶性蛋白質之特性分析。將初步純化之水溶性蛋白質進行 DEAE-Sephacel 離子交換管柱分離，再收集其溶出物，進一步以 SDS-PAGE 與毛細管電泳之方式，鑑定其純化效果並計算各蛋白質之分子量大小及各蛋白質之等電點。

(一) DEAE-Sephacel 離子交換層析

圖二為蜂王漿中水溶性蛋白質溶於 pH 7.0 之磷酸鈉緩衝液(0.05 M)，經 DEAE-Sephacel 離子交換管柱分離之層析圖。由圖顯示，在 0 ~ 0.5 M NaCl 線性沖提下，收集在波長 280 nm 有吸光值之溶出物，得到二個區分物質(F1 及 F2)。DEAE-Sephacel 為陰離子交換管柱，F1 在經 0 ~ 0.5 M NaCl 沖提下先行溶出，F2 則在 0.5 M NaCl 沖提下溶出，顯示其 F1 及 F2 之胺基酸組成，皆為含較多酸性的胺基酸，pI 值皆比 7 小，故在 pH 7.0 之

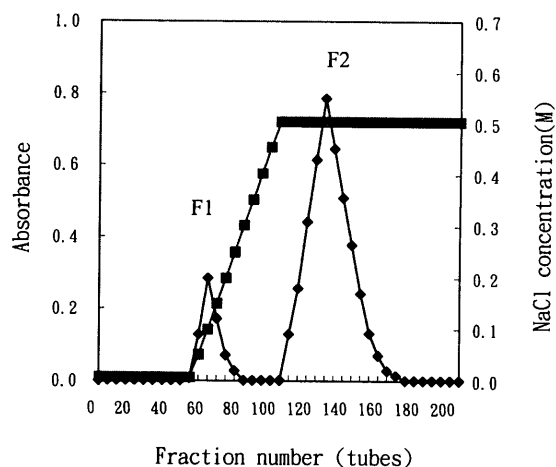


Figure 2. The DEAE-Sephacel chromatogram of water-soluble protein of royal jelly.

磷酸鈉緩衝液下，均被解離成帶負電荷之物質；而F1又比F2先溶出管柱，故F1的pI值應比F2大，此推論由下列(三)-3中，以CIEF分析之實驗結果可證明之。

(二)SDS-PAGE電泳分析

將水溶性蛋白質經DEAE-Sephacel離子交換管柱分離，得到二部份之區分物質(F1及F2)，分別以SDS-PAGE電泳分析，其結果如圖三中所示。圖中第二行為未經DEAE-Sephacel離子交換層析之水溶性蛋白質，由染色帶之結果觀之，顯示蛋白質之初步純化效果並不十分良好。圖中第三行為區分物質F1，有二個染色帶的出現，顯示在DEAE-Sephacel離子交換層析所得到之蛋白質，可能包括二個pI值相當接近之蛋白質，故在離子交換層析中難以分離。而第四行為區分物質F2，只有單一染色帶出現，表示其在DEAE-Sephacel離子交換層析中，可以被分離出單一物質。由上述結果得知，蜂王漿之水溶性蛋白質至少含有三種主要蛋白質。

在圖三之第一行樣品為蛋白質之標準品，由各種不同分子量之Rf值與分子量之對

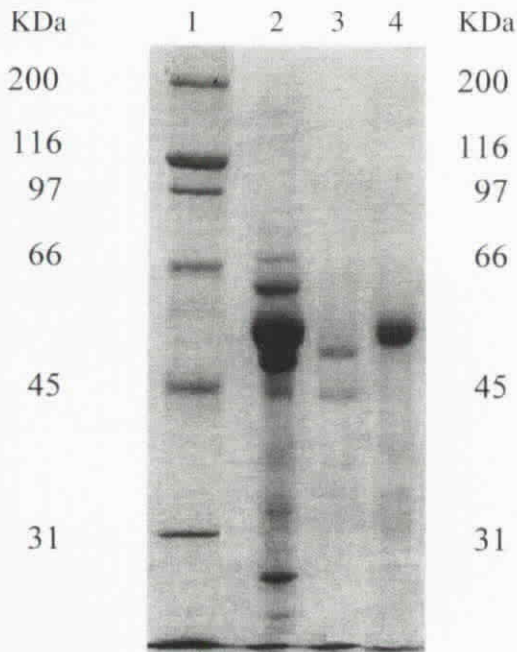


Figure 3. The SDS-PAGE (10 %) patterns of water-soluble protein of royal jelly (F1 and F2) fractionated by DEAE-Sephacel.

Line 1 : protein marker. Line 2 : water-soluble protein. Line 3 : F1. Line 4 : F2.

數值，作出一標準曲線圖。蜂王漿蛋白質之Rf值則可經此標準曲線之內插而求得其分子量。F1中出現之二個染色帶，經計算求得分子量大小分別為50 KDa和44 KDa，而F2則為55 KDa。在Takenaka^(17,18)之研究中曾確認蜂王漿中水溶性蛋白質之分子量，分別為46 KDa及55 KDa，此與本實驗之部份結果(44 KDa及55 KDa)相當接近。

(三)CE之分析

1. CZE之分析

本實驗使用pH 2.5~8.0五種不同pH之緩衝液進行分析。以pH 2.5之磷酸鈉緩衝液的分離效果較好，其他四種緩衝液之解析力均不理想。圖四是蜂王漿中水溶性蛋白質及其經DEAE-Sephacel離子交換層析之區分物質(F1和F2)於磷酸鈉緩衝液(pH 2.5)之CZE層析圖。本實驗採用之毛細管內被覆一層中性的修飾物質，和一般毛細管不同的是其在進行分析之際，不會產生電滲流(electroosmotic

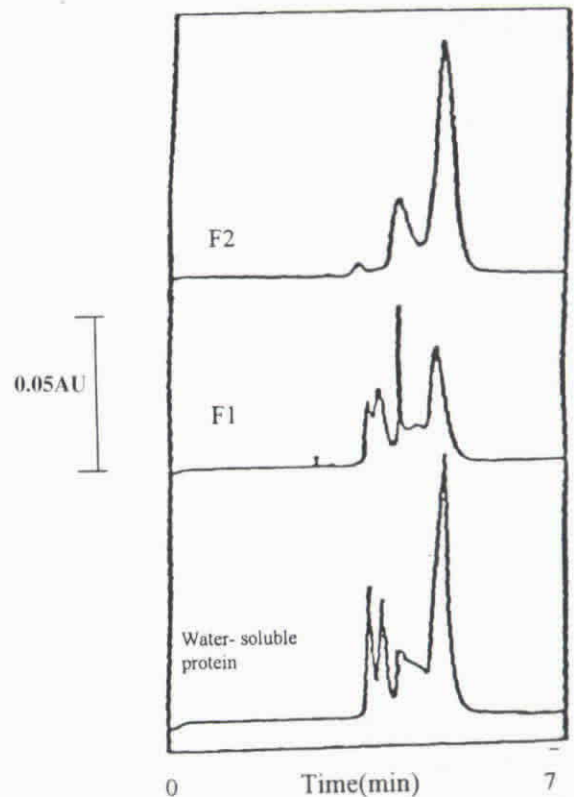


Figure 4. The CZE chromatogram of water-soluble protein of royal jelly (F1 and F2) fractionated by DEAE-Sephacel.

flow), 僅靠樣品物質本身的電泳遷移(electrophoretic migration), 來達到分離之目的。樣品物質在不同 pH 之緩衝液下, 呈現不同之帶電性, 在 pH 2.5 之磷酸鈉緩衝液下, 樣品物質大部份以帶正電荷之型式存在。由圖四之結果顯示, 水溶性蛋白質在 pH 2.5 之磷酸

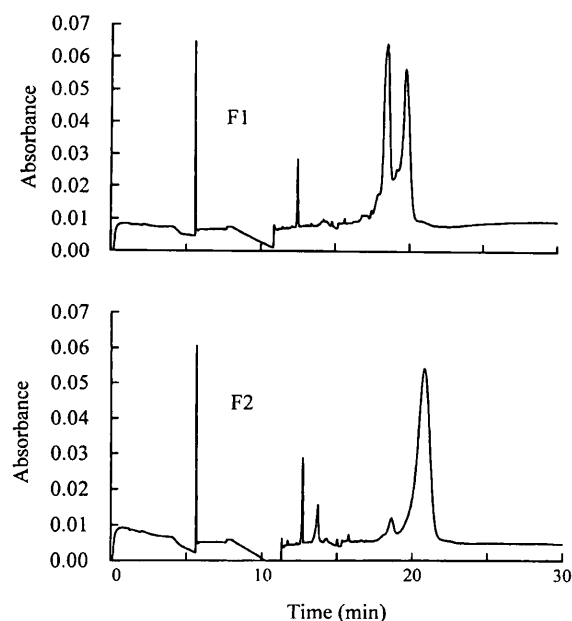


Figure 5. The CGE chromatogram of water-soluble protein of royal jelly fractionated by DEAE-Sephacel.

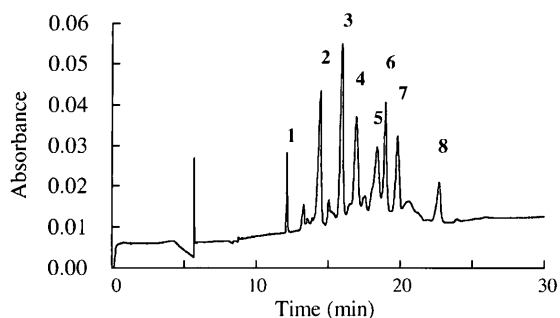


Figure 6. The CGE chromatogram of seven protein standards.

- 1 = Orange G (reference standard).
- 2 = α -Lactalbumin (14.2 KDa).
- 3 = Carbonic anhydrase (29 KDa).
- 4 = Ovalbumin (45 KDa).
- 5 = Bovine serum albumin (66 KDa).
- 6 = Phosphorylase b (97.4 KDa).
- 7 = β -Galactosidase (116 KDa).
- 8 = Myosin (205 KDa).

鈉緩衝溶液條件下, 主要出現有三個吸收峰, 經 DEAE-Sephacel 離子交換層析分離之區分物質 F1, 出現四個分離效果並不十分良好之吸收峰, 而 F2 則有二個吸收峰。

2. CGE 之分析

由於傳統電泳操作費時, 須製膠、染色

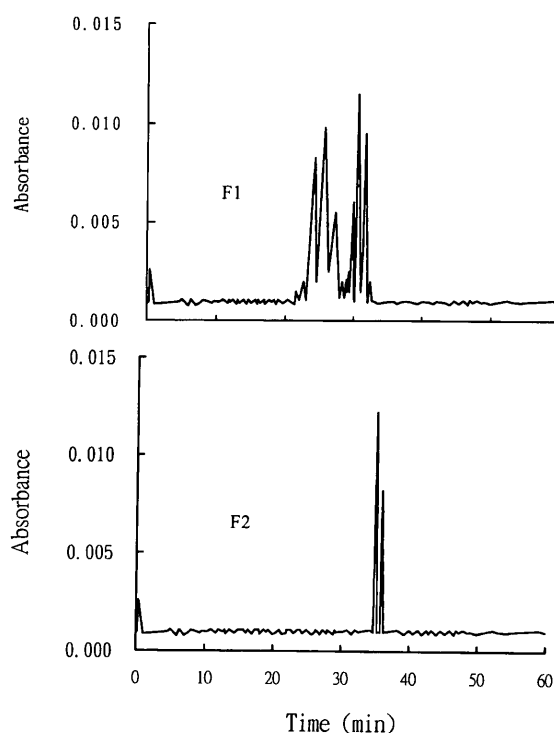


Figure 7. The CIEF chromatogram of water-soluble protein of royal jelly fractionated by DEAE-Sephacel.

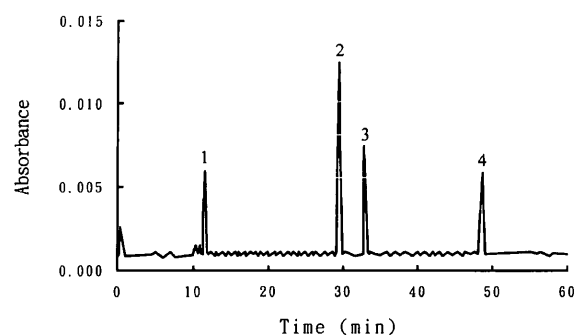


Figure 8. The CIEF chromatogram of four protein standards.

- 1 : Ribonuclease A (pI=9.45).
- 2 : Carbonic anhydrase (pI=5.90).
- 3 : β -Lactoglobulin A (pI=5.10).
- 4 : CCK Flanking peptide (pI=2.75).

及脫色等複雜的步驟，且分離時間長，而CGE可直接線上偵測(on-line detection)，更可定量大分子物質，故本研究為確認蛋白質吸收峰之分子量大小，進一步以CGE來分離F1和F2。結果如圖五所示。F1部分出現二個吸收峰，而F2則僅出現一個吸收峰。圖六是七種不同蛋白質標準品之電泳層析圖，分別將七種蛋白質標準品之分子量的對數值與移動時間值的倒數做圖，可得到相當良好之線性關係(迴歸方程式 $y = -3.7127x + 7.2602$ ； $R^2 = 0.9959$)。由標準曲線之內插法求得F1所出現之吸收峰的分子量約為59 KDa和73 KDa；F2則為118 KDa。其與SDS-PAGE電泳法之結果出入頗大。本實驗曾以標準牛血清蛋白質(Bovine serum albumin)於CGE下分離，以校正其正確性，結果由CGE估計出之實驗值與標準值非常相近，故可確認本實驗在CGE操作上之正確性。

3. CIEF之分析

為確認各蛋白質之等電點，進一步以毛細管等電聚焦來分離F1和F2。結果如圖七所示，F1出現六個分離效果相當良好之吸收峰，表示至少含有六種蛋白質；F2則有二個吸收峰，表示含二種蛋白質。為計算各蛋白質之pI值，將四種不同蛋白質標準品經CIEF分離，得到層析圖，如圖八所示。各標準品之等電點對各尖峰之時間值做圖，可得到極佳之線性關係(迴歸方程式 $y = -0.18149x + 11.3537$ ； $R^2 = 0.9920$)。F1及F2之吸收峰經計算結果顯示，F1含等電點分別為6.9，6.7，6.3，5.9，5.7及5.5之六種蛋白質；F2則含等電點4.8和4.7之二種蛋白質。在Takenaka^(17,18)之研究中曾以DEAE-Cellulose層析方法確認蜂王漿中水溶性蛋白質之分子量大小及等電點，分別為46 KDa及55 KDa，而等電點則為6.0及4.6。由於CIEF之解析力較傳統SDS-PAGE電泳更佳，故本實驗可分離得到較多pI值相近之蛋白質。比較CZE與CIEF等不同模式之測定，兩者在F1及F2之圖形中雖有類似的結果，但CZE之分離效果較差，推測其原因，可能是F1在CZE的分離模式中，不同蛋白質之電荷/質量的比值相當相近，導致分離效果並不十分良好。相較之下，CIEF之解析力則比CZE為佳。

結 論

本實驗首次嚐試以毛細管電泳分離蜂王漿之蛋白質成份，在CZE之分離模式中雖受限於現有緩衝液(商品化產品)之選擇性不多，分離效果不十分良好；而藉CGE之分離模式，由吸收峰觀之，雖有相當不錯的分離效果，但其分子量之測定結果卻與傳統電泳(SDS-PAGE)所得的結果出入頗大，原因尚不明確，仍待進一步之研究確認；但經由CIEF之模式，則可得到非常良好之分離效果。傳統之IEF曾被應用在魚種及穀類等品種之鑑定^(30,31)，以及牛肉攪假的檢定工作^(32,33)，但目前尚無任何有關應用在蜂王漿方面之報告。由本研究之結果顯示CIEF在蜂王漿之蛋白質的分離及鑑定方面，的確可發揮更為快速及靈敏之分析及鑑定的功能。

參考文獻

1. Nakajin, S., Okiyama, K., Yamashita, S., Akiyama, Y. and Shinoda, M. 1982. Effect of royal jelly on experimental hypercholesterolemia in rabbits. *Shoyakugaku Zasshi*. 36: 65-69.
2. Shen, X., Lu, R. and He, G. 1995. Effects of lyophilized royal jelly on experimental hyperlipidemia and thrombosis. *J. Chin. Prev. Med.* 29: 27-29.
3. Tamura, T., Fujii, A. and Kuboyama, N. 1987. Antitumor effects of royal jelly. *Nippon Yakurigaku Zasshi*. 89: 73-80.
4. Vittek, J. 1995. Effect of royal jelly on serum lipids in experimental animals and humans with atherosclerosis. *Experientia* 51: 927-935.
5. Albert, S., Kludiny, J. and Simuth, J. 1996. Newly discovered features of the updated sequence of royal jelly protein Rjp571. Longer repetitive region on C-terminus and homology to drosophila melanogaster yellow protein. *J. Apicult Res.* 35: 63-68.
6. Fujiwara, S., Imai, J., Fujiwara, M., Yaeshima, T., Kawashima, T. and Kobayashi, K. 1990. A potent antibacterial protein in royal jelly. *J. Biol. Chem.* 265: 11333-11337.
7. Hanes, J. and Simuth, J. 1992. Identification

- and partial characterization of the major royal jelly protein of the honey bee (*Apis Mellifera L.*). J. Apicult. Res. 31: 22-26.
8. Takenaka, T. and Echigo, T. 1984. Protein peptides and free amino acid in royal jelly. Honeybee Sci. 5 :7-12.
 9. Takenaka, T. and Echigo, T. 1983. Proteins and peptides in royal jelly. Nippon Nogeikagaku Kaishi. 57 : 1203-1209.
 10. Townsend, G. F. and Lucas, C. C. 1940. The chemical nature of royal jelly. J. Biochem. 34: 1155-1162.
 11. Ishiguro, I., Naito, J. and Harade, H. 1963. Nutritional investigation on royal jelly IV. Bull. Gifu. Pharm. Univ. 13: 15-17.
 12. Patel, N. G., Haydak, M. H. and Cochna-uter, T. A. 1960. Electrophoretic component of the proteins in honeybee larval food. Nature 186: 633-634.
 13. Tsao, W. and Shuel, R. W. 1968. Breakdown of royal jelly protein in the midgut of the larval honeybee. J. Apicult. Res. 7: 119-128.
 14. Tomoda, G., Matsuyama, J., Shibana, A. and Yaaki, E. 1974. Studies on protein in royal jelly (I). Solvent fractionation of protein and amino acid composition of each fraction. Bull. Fac. Agric. Tamagawa Univ. 14: 86-89.
 15. Tomoda, G., Matsuyama, J. and Matauka, M. 1977. Studies on protein in royal jelly 2. Fractionation of water-soluble protein by DEAE-cellulose chromatography, gel filtration and disc electrophoresis. J. Apicult. Res. 16: 125-130.
 16. Takenaka, T. 1982. Chemical compositions of royal jelly. Honeybee Sci. 3 : 69-74.
 17. Takenaka, T. and Echigo, T. 1984. Protein, peptides and free amino acid in royal jelly. Honeybee Sci. 5 : 7-12.
 18. Takenaka, T. and Echigo, T. 1983. Proteins and peptides in royal jelly. Nippon Nogeikagaku Kaishi. 57: 1203-1209.
 19. Lin, G. J. 1994. Application of Capillary Electrophoresis on the Analysis of Milk Protein. Master Thesis. Dept. of Applied Chem., Nat'l. Chiao Tung Univ. (in Chinese)
 20. Chen, F.-T. A. and Zang, J.-H. 1992. Determination of milk proteins by capillary electrophoresis. J. AOAC Int. 75: 905-909.
 21. Jong, N., Visser, S. and Olieman, C. 1993. Determination of milk proteins by capillary electrophoresis. J. Chromatogr. A. 652: 207-213.
 22. Chen, F.-T. A. 1991. Rapid protein analysis by capillary electrophoresis. J. Chromatogr. A. 559: 445-453.
 23. Chen, F.-T. A. and Sternberg, J. C. 1994. Characterization of proteins by capillary electrophoresis in fused-silica columns: Review on serum protein analysis and application to immunoassays. Electrophoresis 15: 13-21.
 24. Zhu, M., Rodriguez, R., Wehr, T. and Siebert, C. 1992. Capillary electrophoresis of hemoglobins and globin chains. J. Chromatogr. 608: 225-237.
 25. Chen, F.-T. A. and Tusak, A. 1994. Characterization of food proteins by capillary electrophoresis. J. Chromatogr. A. 685: 331-337.
 26. AOAC. 1984. Chapt.2 Fertilizers. In "Official Methods of Analysis". p.15. Horwitz, W. ed. Assoc. Off. Anal. Chem, Washington. D. C., U.S.A.
 27. Ministry of Economic Affairs. National Bureau of Standards. 1976. Methods of Test for Soy Sauce. CNS 955N6008. (in Chinese)
 28. Spackman, D. H., Stein, W. H. and Moore, S. 1958. Automatic recording apparatus for use in the chromatograph of amino acids. Anal. Chem. 30: 1190-1206.
 29. Weber, K. and Osborn, M. 1969. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. J. Biol. Chem. 244: 4406-4412.
 30. Macgregor, A. W., Marchylo, B. A. and Kruger, J. E. 1988. Multiple α -amylase components in germinated cereal grains determined by isoelectric focusing and chromatofocusing. Cereal Chem. 65: 326-333.
 31. Schwer, C. and Lottspeich, F. 1992. Analytical and micropreparative separation of peptides by capillary zone electrophoresis using discontinuous buffer system. J. Chromatogr. 623:

345-355.

32. King, N. L. and Kurth, L. 1982. Analysis of raw beef samples for adulterant meat species by enzyme staining of isoelectric focusing gels. *J. Food Sci.* 47: 1608-1612.
33. Wintero, A. K. and Thomsen, P. D. 1990. A comparison of DNA-hybridization, immunodiffusion, countercurrent immunoelectrophoresis and isoelectric focusing for detect-

ing the admixture of pork to beef. *Meat Sci.* 27: 75-85.

The Application of Capillary Electrophoresis on the Characterization of Protein in Royal Jelly

ANN-LYNE LEE¹, MEI-ING YEH¹, HWEI-MEI WEN^{1*}, JIING-CHUAN CHERN¹,
JENSHINN LIN¹ AND WEN-ING HWANG²

¹ Department of Food Science & Technology

² Department of Environmental Protection

National Pingtung University of Science & Technology, 1 Husen Fu Road,

Nei Pu Hsiang, 91207, Ping-Tung Hsine, Taiwan, R.O.C.

ABSTRACT

The objective of this study was to characterize the protein fractions in royal jelly made from *Apis mellifera ligustica* from middle and southern areas of Taiwan. The total nitrogen content of fresh royal jelly was 2.46 %, and the total amino acid nitrogen was 2.34 %, suggesting that the nitrogen compound in royal jelly was mostly derived from protein. The nitrogen content of free amino acid in royal jelly was 0.11 %, and the amino type nitrogen was 0.20 %, indicating that the protein in royal jelly existed mainly in the form of large moleculars. To characterize the protein, royal jelly was dissolved in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0), followed by centrifugation, ammonia sulfate precipitation and dialysis to separate the protein into water soluble and water insoluble fractions. Water soluble fraction accounts for more than 60 % of the total protein in royal jelly, and was further investigated by DEAE-Sephacel, SDS-PAGE and capillary electrophoresis. By DEAE-Sephacel, two fraction peaks (F1 and F2) were identified and collected. By SDS-PAGE, F1 fraction was further separated into two bands, and the molecular weight was determined to be 50 KDa and 44 KDa, whereas F2 fraction was shown to have only one band with molecular weight of 55 KDa. By capillary zone electrophoresis, four poorly-separated peaks were observed in F1 fraction, and two well-separated peaks in F2 fraction. By capillary gel electrophoresis, two peaks were identified in F1 fraction, of which the molecular weight was estimated to be 59 KDa and 73 KDa. By contrast, only one peak was identified in F2 fraction, of which the molecular weight was estimated to be 118 KDa. However, by capillary isoelectric focusing, 6 peaks were identified in F1 fraction with pI of 6.9, 6.7, 6.3, 5.9, 5.7 and 5.5, respectively. Of that, pI of 4.8 and 4.7 were identified in F2 fraction.

Key words: protein, royal jelly, capillary electrophoresis.