

不同蛋白水平的饲料对蜂王浆腺苷含量的影响

张 含¹, 胥保华², 王改英², 耿 越^{1,*}

(1. 山东师范大学生命科学学院 动物抗性生物学省重点实验室, 山东 济南 250014;

2. 山东农业大学动物科技学院, 山东 泰安 271018)

摘 要: 采用不同蛋白含量的人工饲料喂食蜜蜂, 观察对蜂王浆中腺苷含量的影响。实验组喂食不同蛋白含量(15%、20%、25%、30%、35%、40%)的饲料, 以油菜花粉作对照, 每3d取浆1次, 测定第0、6、12、18、24天所取蜂王浆中腺苷的含量。结果表明: 饲料蛋白含量对蜂王浆中腺苷的影响存在最适剂量, 蛋白含量35%水平的为蛋白饲料组蜂王浆中腺苷的含量在第12天和第18天均为最高, 油菜花粉组所产的蜂王浆中腺苷的含量几乎是最低的。

关键词: 蛋白质; 饲料; 蜂王浆; 腺苷

Effect of Protein Level in Bee Diet on Adenosine Content of Royal Jelly

ZHANG Han¹, XU Bao-hua², WANG Gai-ying², GENG Yue^{1,*}

(1. Key Laboratory of Animal Resistance Biology of Shandong Province, College of Life Science, Shandong Normal University, Jinan 250014, China; 2. College of Animal Science and Technology, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China)

Abstract: Artificial diets with different protein levels were used to feed bees to explore the effect on adenosine content of royal jelly. Six trial groups were established by feeding diets containing different protein concentrations (15%, 20%, 25%, 30%, 35% and 40%) and the control group was fed on rape pollen. Royal jelly was collected once every three days for determining adenosine content of royal jelly. The results showed that the highest adenosine content was observed in royal jelly harvested at the 12th and 18th day from bees fed 35% protein ($P < 0.01$ vs. the control), while royal jelly from the rape pollen group showed nearly the lowest adenosine content.

Key words: protein; diet; royal jelly; adenosine

中图分类号: TS201.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)19-0075-04

蜂王浆是由工蜂头部咽下腺和上颚腺共同分泌的, 并且与蜂王浆的形成有相当重要的关系^[1]。蜜蜂必须在充足的蜜粉源条件下才能正常产浆。蜂王浆中的多种生物活性成分大部分来源于其食物中的营养素, 因此, 蜂王浆的质量和活性成分受蜜粉源的影响非常明显^[2]。食用不同的蜜粉源, 蜂王浆的色泽、气味和成分差别比较大^[3]。

有关蜂王浆生产阶段用人工代用饲料饲喂蜜蜂的效果已有不少报道, 其主要目的是提高蜂王浆产量和降低生产成本。生产实践证明, 蛋白质饲料的质量对蜂群的消长和蜂王浆质量有很大的影响。罗建能等^[4]研究表明, 饲喂纯花粉与饲喂大豆粉的蜂群相比, 其所生产蜂王浆产量和王浆酸10-HAD的含量差异显著; 而饲喂纯花粉与饲喂鲜牛奶的蜂群相比, 其所产蜂王浆产量和10-HAD的含量差异不显著。励建荣^[5]报道, 由脱脂大豆粉、大米粉、色拉油、营养素及生物活性物质组成的用于蜂王浆

生产阶段的人工饲料饲喂蜂群, 以天然蜂花粉为对照, 人工饲料组所生产的蜂王浆产量与天然蜂花粉组接近, 其颜色、光泽、味道、气味等均与天然蜂花粉组无大差别。程艳华等^[2]采用不同配比的茶花粉和黄豆粉饲喂蜜蜂, 所产蜂王浆中10-HAD、粗蛋白、粗脂肪和部分脂肪酸的含量差异不显著, 且蜂王浆产量差异也不显著。目前人们大多数是在研究不同蛋白水平饲料对一些能够衡量蜂王浆品质的成分如10-HAD、粗蛋白、粗脂肪等物质含量的影响, 虽然Xue Xiaofeng^[6]、Kim^[7]及陈兰珍^[8]等研究探讨了测定蜂王浆中腺苷含量的方法, 但是尚未见关于不同蛋白水平饲料对蜂王浆腺苷含量影响方面研究的报道。

腺苷为合成三磷酸腺苷、腺嘌呤、腺苷酸等的重要中间体, 是多种酶的反应底物, 并且能在细胞外调节细胞的活性^[9]。人体内部腺苷的分泌在各个器官发挥着相当重要的作用^[10-11]。研究表明^[12], 腺苷主要对心血管系统起

收稿日期: 2011-08-04

基金项目: 国家现代农业产业技术体系建设专项(CARS-45-KXJ15)

作者简介: 张含(1988—), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品科学。E-mail: zhanghanfoodscience@126.com

*通信作者: 耿越(1965—), 男, 教授, 博士, 研究方向为食品科学。E-mail: gengy@sdnu.edu.cn

作用,可以扩张冠状血管和体循环血管、保护心脏、影响心脏的传导功能等。由于腺苷的心肌保护作用,临床上腺苷可用于终止室上性心动过速、心肌缺血的药物预处理以及作为体外循环心脏停搏液的辅剂等^[13]。腺苷还能够用于治疗肺高压,对心脏术后、原发行以及顽固性肺高压均有良好疗效^[14]。另外研究还表明,腺苷除了具有明显的扩张血管、改善微循环、增强组织细胞营养、改善缺血缺氧的作用,同时还具有抗血小板聚集、降低全血黏度的作用^[15]。

本研究利用不同蛋白含量的人工饲料喂食蜂群,在相关研究的基础上^[6-8]优化RP-HPLC测定蜂王浆腺苷的条件,探究不同蛋白含量的饲料对蜂王浆中腺苷含量变化的影响。

1 材料与方法

1.1 蜜蜂分组与饲养

在山东农业大学实验蜂场进行,选择35群群势相当、蜂王年龄一致的意大利蜂(*Apis mellifera ligustica*),随机分成7组,每组5群蜂,其中A~F组分别喂食不同蛋白含量的饲料(蛋白含量分别为15%、20%、25%、30%、35%、40%),实验期间安装脱粉器,饲料的配比见表1。喂食油菜花粉的蜂群为对照组(G组)。

表1 基础日粮的成分组成
Table 1 Ingredients in bee diets with different protein levels

原料	组别					
	A	B	C	D	E	F
大豆粕	18.00	24.80	35.00	44.00	50.20	59.40
玉米粉	31.00	23.00	20.00	16.00	10.00	4.00
花生分离蛋白粉	0.00	1.00	3.00	5.00	7.00	8.00
玉米蛋白粉	8.60	12.00	10.00	9.00	11.00	12.00
白砂糖	40.40	37.20	30.00	24.00	19.80	14.60
柠檬酸钠	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
预混料	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
磷酸氢钙	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
合计	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00

实验开始后,每3d取浆1次,将第0、6、12、18、24天取得的蜂王浆作为样品进行腺苷含量的测定。

1.2 试剂与仪器

三蒸水、甲醇为色谱纯,其余试剂均为分析纯。

Agilent 1100高效液相色谱仪 美国Agilent Technologies有限公司; BS 124 S电子天平(感量0.1mg) 德国Sartorius集团; QL-902涡旋振荡器 海门市其林贝尔仪器制造有限公司; AG 22331离心机 德国Eppendorf公司; 腺苷标准品 美国Sigma公司。

1.3 腺苷的测定

1.3.1 样品预处理

精密称取各蜂王浆样品0.4g,准确加入体积分数50%乙醇溶液定容至10mL,超声15min,取出,摇匀,10000r/min离心10min,0.45μm滤膜过滤,待测。

1.3.2 色谱条件

色谱柱: Dikma C₁₈反相色谱柱(4.6mm×150mm, 5μm); 流动相: 三蒸水-甲醇; 梯度洗脱条件: 0~10min, 体积分数10%甲醇; 10~15min, 甲醇体积分数由10%上升到100%; 15~20min, 体积分数100%甲醇; 20~25min, 甲醇体积分数由100%降至10%; 25~30min, 体积分数10%甲醇; 检测波长: 259nm; 流速1.0mL/min; 柱温: 室温。

1.3.3 标准曲线、检出限及定量限的测定

精密称取腺苷标准品10mg,加入色谱纯甲醇溶液定容至50mL,摇匀,依次稀释成100、50、10、5、1μg/mL的溶液,按1.3.2节色谱条件测定,分别吸取5μL溶液上样,每个质量浓度平行测定3次,以进样质量浓度为横坐标(x),峰面积为纵坐标(y)进行线性回归分析。

1.3.4 精密度、稳定性及加样回收率实验

精密度实验: 精密吸取上述腺苷10μg/mL标准品溶液5μL,连续进样6次,记录腺苷峰面积,计算其相对标准偏差(RSD)。稳定性实验: 精密吸取上述腺苷10μg/mL标准品溶液5μL,在室温条件下放置2、5、10、24h后测定,记录峰面积,计算其RSD。加样回收率实验: 精密称取18份已知含量的同一批样品0.400g,分3组分别准确加入相当于样品中腺苷含量的0.6、1.0、1.6倍腺苷标准品,按溶液提取方法提取,并按1.3.2节色谱条件测定腺苷含量,计算回收率、RSD。

1.3.5 样品的测定

取处理后的样品溶液5μL上样,测定每组样品的腺苷峰面积,代入回归方程计算腺苷含量。

2 结果与分析

2.1 色谱结果

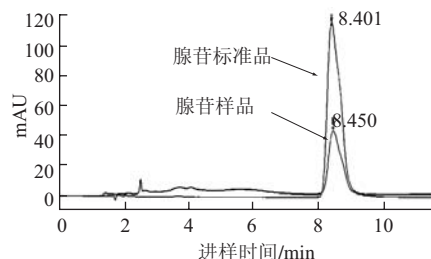


图1 腺苷标准品与样品的色谱图

Fig.1 HPLC-UV chromatogram of adenosine standard and royal jelly

表3 不同蛋白水平的饲料对蜂王浆腺苷含量的影响
Table 3 Effect of different protein levels in bee diet on adenosine content in royal jelly

组别	第0天	第6天	第12天	第18天	第24天
A	200.21±69.33	146.99±16.06	223.38±11.43 ^{ac}	124.42±7.13 ^a	129.99±40.96
B	247.97±45.55 ^{ac}	143.03±37.71	187.21±10.46	159.91±2.87	160.01±37.69
C	160.82±50.91 ^b	116.23±24.57	195.31±49.64	163.20±16.40	120.71±39.17
D	296.88±22.67 ^a	125.31±23.73	197.98±38.30	151.49±18.70	137.54±16.55
E	209.33±41.01	174.16±34.73	241.49±14.40 ^a	219.94±37.60 ^{b*}	133.02±7.29
F	126.38±19.81 ^{b*}	115.51±42.54	158.62±22.73 ^b	163.57±44.67	185.41±37.17
G	167.20±10.33 ^b	117.23±2.12	133.09±24.69 ^{b*}	138.36±25.60 ^a	113.47±34.66

注：同列字母不同表示差异显著 ($P < 0.05$)；*，与肩标为a的组相比有极显著性差异 ($P < 0.01$)。

由图1可知，测定样品中腺苷出峰时间与标准品一致，对称性高，且与其他组分分离效果好。

2.2 标准曲线、检出限及定量限结果

腺苷在1~200 $\mu\text{g/mL}$ 范围内具有良好的线性关系，其回归方程为 $y = 15.409x - 8.6436$ ($R^2 = 0.9999$)，其中， x 为腺苷质量浓度/($\mu\text{g/mL}$)， y 为峰面积。以信噪比 $R_{\text{SN}} = 3$ 、 $R_{\text{SN}} = 10$ 分别计算检出限、定量限，得出检出限为0.406 $\mu\text{g/mL}$ 、定量限为1.353 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.3 精密度、稳定性及加标回收率结果

表2 腺苷回收率测定结果

Table 2 Results obtained for the determination of spike recoveries of adenosine

标样加入量	平均加标回收率/%	稳定性RSD/%
加0.6倍	104.2	4.65
加1.0倍	101.3	2.84
加1.6倍	95.9	4.39

由表2可知，精密度RSD为2.81% ($n = 6$)、稳定性RSD为2.84% ($n = 5$)。该方法具有较好的回收率(加标回收率在允许范围内，高于或者低于100%可能是由于提取过程中的误差所致)，良好的精密度高、较强的稳定性，可以进行样品测定。

2.4 各组蜂王浆中腺苷含量结果

由表3可知，各实验组第0天王浆样品中腺苷的含量有较大差别，但在第6天腺苷含量明显比第0天的含量低；蛋白含量为35%的饲料饲养蜜蜂，所产的蜂王浆中腺苷含量在第12天和第18天均为最高，分别比对照组提高81.20% ($P < 0.01$)和58.70% ($P < 0.05$)。而油菜花粉对照组所产的蜂王浆中腺苷的含量基本上是各个采样时间最低的。

3 讨论

以三蒸水-甲醇作流动相梯度洗脱，在259nm波长处检测蜂王浆中的腺苷，具有分离效果好、杂质峰干扰

少、线性范围宽、分析时间短等优点，具有较高的回收率及良好的精密度。

蛋白含量对腺苷合成的影响可能与氨基酸的供应有关。关于氨基酸对芽孢杆菌ATCC21616产腺苷的影响进行的研究显示^[16]谷氨酸对腺苷合成的促进作用最大，谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸和甲硫氨酸也能促进腺苷合成。谷氨酸降解生成大量的 α -酮戊二酸，补充了TCA循环中有机酸的供应，节省了葡萄糖进入TCA的代谢流，能够使更多的碳源流向HMP途径，从而促进产苷。另外添加谷氨酸后，胞内 NAD^+ 浓度较高，可能表明菌体的氧化呼吸作用强，能量供应比较充足。另外，糖酵解产物丙酮酸能顺利地进入TCA循环，解决了腺苷合成后期的代谢溢流现象。TCA循环为腺苷的合成提供充足的前体和能量，从而使腺苷产量提高。根据以上对芽孢杆菌的研究，推测不同的蛋白组成提供的氨基酸含量差异可能影响蜜蜂体内TCA及HMP代谢途径，进而影响到所产的蜂王浆中腺苷的含量。

各实验组第0天蜂王浆样品中腺苷的含量有较大差别，但在第6天腺苷含量明显比第0天的含量低，推测可能是改用人工饲料喂食蜜蜂后，由于饲料的改变蜜蜂有应激反应，而且产蜂王浆的代谢过程中生成腺苷这一途径有一定的适应缓冲过程。

4 结论

饲料蛋白含量对蜂王浆中腺苷的影响存在最适剂量，蛋白含量为35%的饲料组蜂王浆中腺苷的含量在第12天和第18天均为最高，花粉组所产的蜂王浆中腺苷的含量几乎是最低的。生产蜂王浆是一个比较复杂的生理过程，蜂王浆中各种营养成分的含量会受饲料的影响，虽然腺苷不在蜂王浆营养成分规定指标范围内，但是如有特殊需要或者限制，研究人工饲料时需要多方面考虑。

参考文献:

- [1] NAGAI T, INOUE R. Preparation and the functional properties of water extract and alkaline extract of royal jelly[J]. Food Chemistry, 2004, 84: 181-186.
- [2] 程艳华, 刘亚男, 胡福良, 等. 蛋白质营养水平对蜂王浆产量和成分的影响[J]. 蜜蜂杂志, 2008, 28(4): 7-9.
- [3] 胡福良, 李英华, 朱威. 影响蜂王浆 质量的因素-兼析春季油菜王浆质优的原因[J]. 蜜蜂杂志, 2004(6): 28-29.
- [4] 罗建能, 沈生初, 金汤东. 蜜蜂蛋白质饲料对工蜂初生重和蜂王浆生产的影响研究[J]. 浙江畜牧兽医, 2009, 34(5): 5-6.
- [5] 励建荣. 新型蜜蜂饲料的研究[J]. 粮食与饲料工业, 1994 (7): 24-25.
- [6] XUE Xiaofeng, ZHOU Jinhui, WU Liming, et al. HPLC determination of adenosine in royal jelly[J]. Food Chemistry, 2009, 115(2): 715-719.
- [7] KIM J, LEE J. Observation and qualification of self-associated adenosine extracted from royal jelly products purchased in USA by HPLC[J]. Food Chemistry, 2011, 12 (1): 347-352.
- [8] 陈兰珍, 李桂芳, 薛晓峰, 等. 蜂王浆中磷酸腺苷的提取及超高效液相色谱分析[J]. 色谱, 2008, 26(6): 736-739.
- [9] ALAM M N, SZYMUSIAK R, GONG Hui, et al. Adenosynergic modulation of rat basal forebrain neurons during sleep and waking: neuronal recording with microdialysis[J]. Journal of Physiology, 1999, 521: 679-690.
- [10] OLAH M E, STILES G L. Adenosine receptors[J]. Annual Reviews of Physiology, 1992, 54: 211-25.
- [11] OLAH M E, STILES G L. Adenosine receptor subtypes: characterization and therapeutic regulation[J]. Annual Reviews of Pharmacology and Toxicology, 1995, 35: 581-606.
- [12] 贾如意. 腺苷在心血管系统中的作用及其临床应用进展[J]. 国外医学: 心血管疾病分册, 1999, 26(1): 18-20.
- [13] 吴镜湘, 徐美英. 腺苷心肌保护作用研究进展[J]. 中国心血管杂志, 2002, 7(5): 364-366.
- [14] 蔡及明, 陈玲. 腺苷用于肺高压治疗的进展[J]. 国外医学: 麻醉学与复苏分册, 2003, 24(1): 17-19.
- [15] ZHENG Xiaoke, FENG Weisheng, BI Yuefeng, et al. Determination of adenosine in *Selaginella tamariscina* (Beauv.) Spring by RP-HPLC[J]. 上海中医药大学学报, 2003, 17(2): 42-44.
- [16] 高淑红, 陈长华, 莫绯, 等. 氨基酸对芽孢杆菌ATCC21616产腺苷的影响[J]. 华东理工大学学报, 2007, 33(3): 336-339.