

벌 유충창자의 효소가 화분에 미치는 영향

金 東 伸

慶北大學校 農科大學 酪農學科

Effect of Larva Gut Enzyme on Pollen

Dong-Shin Kim

Department of Dairy Science, College of Agriculture, Kyungpook National University

Abstract

This study was conducted to confirm amino acids from the filtrate of pollen treated by purified enzyme of bee larva gut for improving pollen food. The larva gut enzyme were purified by ammonium sulfate, ethanol and Sephadex gel filtration. The filtrate of pollen treated with enzyme purified by ammonium sulfate showed the highest amount of amino acids. The amount of amino acids of the filtrate from which the pollen was fermented with natural contaminants is 5.5 times as much as the pollen which was not fermented. The filtrate of pollen treated with enzyme of bee larva gut contained eighteen different amino acids as follows: aspartates, glutamate, serine, glycine, histidine, arginine, threonine, alanine, proline, tyrosine, valine, methionine, cysteine, isoleucine, leucine, phenylalanine, lysine and tryptophane.

Key words: pollen, bee larva gut enzyme, amino acid.

서 론

화분은 식물의 雄性體로서 꿀벌의 주된 영양원이다. 일반적으로 화분은 높은 수준의 단백질, K, Ca, Mg 을 함유하나 지방과 Na는 낮은 함량을 보이고 있다⁽¹⁾. 화분은 광물질, 비타민 B 그리고 비타민 C의 좋은 재원이 되나 비타민 B₁₂의 함량에 대하여는 과학적 증거가 미비하다⁽¹⁾.

화분이 갖고있는 각종 영양소를 사람이 유용하기 위하여는 화분의 단단한 외피(exine)^(3,4) 속에 있는 세포질의 유출이 잘 일어날 수 있도록 처리되어야 할 것이다. 화분의 외피는 대부분의 동물, 곤충, 그리고 꿀벌 등도 분해하지 못한다. Peng⁽⁵⁾은 벌 창자에서 화분의 세포질이 어떻게 유출되는가를 관찰하였다.

본 연구는 벌 유충이 화분을 섭취하여 영양물질을 이용하고 있으므로, 유충의 창자효소를 분리하여 그 효소 용액을 화분과 혼합하여 숙성시켜 화분내에 있는 아미노산의 유출을 조사하였다.

재료 및 방법

효소의 추출 및 정제

본 실험에 이용된 벌 유충은 Cornell 대학의 Dyce laboratory에서 *Apis Mellifera L.*의 5-7일령의 생유충을 봉소에서 빼내어 수집하였으며 화분 역시 동일한 연구소에서 벌이 수집한 것을 이용하였다.

효소의 추출은 유충 50g에 100ml의 냉각 증류수를 첨가하여 waring blender로서 최대속도로 2분간 균질화하였다. 이 균질액을 냉동원심분리기를 이용하여 12,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 상등액을 취하여 粗酵素液으로 사용하였다.

효소의 정제는 조효소액에 황산암모늄 분말을 서서히 첨가하여 저어주면서 50%의 포화용액을 만든 후 0°C, 12,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액을 취하였다. 이 상등액을 0.05 M citrate-phosphate(pH 6.4)로 16시간 투석하였다.

황산암모늄의 정제액에 다시 알콜(99.5%)을 첨가하여 50% 농도로 하고 0°C, 12,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액을 취하였다. 이 상등액을 0.05 M citrate-phosphate(pH 6.4)로 16시간 투석하였다.

Ethanol 정제물을 2°C의 냉장실에서 TCF-10 ul-

Corresponding author: Dong-Shin Kim, Department of Dairy Science Kyung-Pook National University, Daegu 702-701.

trafiltration unit(Amicon Co.)로서 질소압력 35 psig 와 매분 200ml 의 재회전속도를 유지하면서 농축 하였다.

Sephadex G-200 gel 을 2.2~50 cm column 에 충전하고 0.05 M citrate-phosphate 완충액을 유출시킨 후 ethanol 정제액을 넣어 5.6 ml 씩 159 분획을 받았다.

유충 창자효소에 의한 화분의 아미노산 유출

벌이 채취한 화분입자에는 꿀, 화밀, 그리고 타액 등이 혼합되어 있으므로 이들을 제거하기 위하여 화분 중량의 5배에 해당하는 증류수를 가하여 4°C, 3,000 rpm 으로 5분간 냉동 원심분리하였으며 동일한 방법으로 8회 이상 세척하여 침전된 화분을 수집하였다.

유충의 창자효소가 화분의 아미노산 유출에 미치는 영향을 조사하기 위하여 다음과 같은 시료를 만들었다.

a- 시료는 세척된 화분 5g 과 증류수 20 ml 를 시험관에 넣고 잘 혼합한 후 37°C에서 72시간 숙성시켜 membrane filter(pore size 10µm Jingo)로 진공여과하여 얻은 여과액이다.

a'- 시료는 화분 5g 과 증류수 20 ml 를 시험관에 넣고 혼합하여 숙성치 않고 즉시 membrane filter 로 여과하여 얻은 여과액이다.

b- 시료는 황산암모늄에 의한 창자효소 정제물 5ml 와 화분 5g 그리고 증류수 20 ml 를 시험관에 넣고 잘 혼합한 후 37°C에서 72시간 정제한 후 membrane filter 로 얻은 여과액이다.

b'- 시료는 다만 b 시료를 만드는 과정에서 37°C에서 72시간 숙성하지 않고 바로 membrane filter 로 얻은 추출액이다.

c- 시료는 알콜정제 효소물 5 ml, 화분 5g 그리고 증류수 20 ml 를 시험관에 넣고 37°C에서 72시간 숙성시킨 후 membrane filter 로 얻은 여과액이다.

c'- 시료는 c- 시료를 만드는 과정에서 다만 37°C에서 72시간 숙성치 않고 바로 membrane filter 로 여과하여 얻은 여과액이다.

d- 시료는 Sephadex G-200 gel 을 이용하여 정제한 유충창자 효소정제물 5 ml, 화분 5g 그리고 증류수 20 ml 를 시험관에 넣고 혼합한 후 37°C에서 72시간 숙성시킨 후 membrane filter 로 진공여과한 여과액이다.

d'- 시료는 Sephadex G-200 gel 정제효소물 5 ml, 화분 5g 그리고 증류수 20 ml 를 시험관에 넣고 혼합 후 즉시 membrane filter 로 진공여과시킨 여과액이다.

추출액 시료 a, a', b, b', c, c', d 그리고 d' 에 포함된 아미노산의 분석은 waters "Pico Tag" 시스템을 이용하였다. 시료를 10µm millipore filter 를 사용하여 여과시킨 여액 5µl 을 250µl 로 희석한 다음 그 용액 10µl 를 waters C-18 "Nova-Pack" column(4.5×100 mm)을 이용하여 waters "Pico Tay" 시스템으로 아미노산을 분석하였다. 다만 여과액속에 있는 유리 아미노산만을 분석할 목적으로 시료를 가수분해 처리하지 않고 주입하였다.

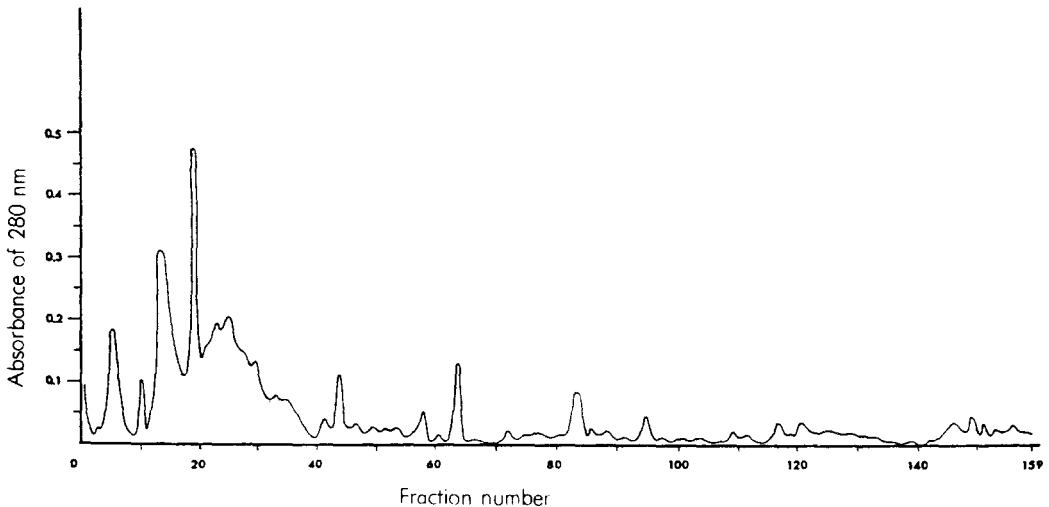


Fig. 1. Absorbance of Sephadex gel fractionation for larva gut enzyme from larva of *Apis mellifera* L.

결과 및 고찰

벌 유충의 창자에서 화분세포질의 유출에 영향을 미치는 효소를 황산암모늄, 알콜, 그리고 Sephadex G-200 gel을 이용하여 정제한다 Fig. 1에서 159개의 분획 중에서 19번째 분획이 가장 높은 흡광도를 보였다. 그러나 5번부터 30번 분획내에 다소의 차이가 있는 비교적 높은 흡광도를 보이고 있음은 유충창자에 다양한 효소의 존재를 예상할 수 있다.

8개 시료의 아미노산 분석을 보면 Table 1-3 그리고 4와 같다. Table 4에서 proline이 가장 많은 양으로 나타났으며 cysteine이 아주 적은 양으로 분석되었다. 그러나 18종 아미노산이 화분에서 유출됨을 볼 수 있다. a-시료는 세척된 화분에 단순히 증류수를 첨가하여 37°C에서 72시간 숙성하였으므로 유충의 창자효소와 무관함에도 불구하고 아미노산이 나타난 것은 화분의 세포질이 유출된 것이라고 볼 수 있다. 이 시료와 대조구인 a¹-시료는 화분에 증류수를 첨가하며 즉시 여과시킨 것으로 숙성시간을 두지않고 분석한 것이다. 이 시료에서는 화분의 세포질유출을 거의 무시할 정도로 아미노산이 분석되었다. 그러므로 a-시료와 a¹-시

료에 나타난 아미노산함량의 차이는 매우 의미있는 것이다. 즉 인간의 장관내에서 화분의 세포질이 용이하게 유출되어야 하므로 a-시료의 조리법이 응용될 수 있다. a-시료에서 이와 같은 화분세포질의 유출현상은 곧 bee bread를 연상케한다. bee bread는 벌집구멍에서 화분이 세균에 오염된 상태로서 꿀, 넥타와 혼합물이 되어 하절의 높은 온도에서 자연발효된 것으로 화분의 발아가 중지되고 수용성단백질이 증가된 벌의 양식이다⁽⁶⁾. 이는 화분의 자연발효된 a-시료에서 발효되지 않은 a¹-시료보다 유리아미노산의 함량이 5.5배 높게 나타남과 유관한 것이다. bee bread에는 특수한 미생물이 작용한 것으로 사료된다⁽⁷⁻⁹⁾. Beutler와 Opfinger⁽¹⁰⁾는 신선한 화분을 먹인 벌보다 bee bread를 먹인 벌이 수명이 길다고 보고하였는데 이는 자연발효를 받은 a-시료에서 유리아미노산이 월등히 증가한 결과가 나타났으므로 화분의 각종 영양소가 화분에서 쉽게 유출되어 벌에 공급되리라고 생각된다. Loper와 Cohen⁽¹¹⁾은 dandelion 화분에서 cysteine이 존재하지 않는다고 보고하였으며 본 실험에서도 a, c 시료에서 공히 cysteine 함량이 낮게 나타났다(Table 1, 3). 황산암모늄 정제효소를 처리한 화분에서 다른 시료보다

Table 1. Amino acids in a-sample which were a filtrate of pollen incubated with water for 72 hr at 37°C and a¹-sample which was not incubated of pollen with water

Amino acid	pmoles recovered (a-sample)	pmoles recovered (a ¹ -sample, control)
Aspartate	194.0	—
Glutamate	122.5	—
Serine	782.9	—
Glycine	942.2	12.5
Histidine	336.8	6.8
Arginine	411.6	—
Threonine	646.9	11.1
Alanine	1,618.8	18.3
Proline	1,828.9	24.1
Tyrosine	669.0	12.5
Valine	1,220.9	29.3
Methionine	495.0	12.6
Cysteine	10	—
Isoleucine	830.5	17.4
Leucine	1,616.2	34.8
Phenylalanine	709.0	14.6
Lysine	18.7	26.5
Tryptophan	412.4	25.0
Total average	714.8	13.6

Table 2. Amino acids in b-sample which were a filtrate of pollen incubated with ammonium sulfate fractionated larva enzyme and b¹-sample was a larva enzyme itself

Amino acid	pmoles recovered (b-sample)	pmoles recovered (b ¹ -sample, control)
Aspartate	42.4	—
Glutamate	53.4	—
Serine	442.7	—
Glycine	1,826.8	6.8
Histidine	550.0	—
Arginine	10	—
Threonine	1,131.3	—
Alanine	3,094.2	—
Proline	3,493.6	12.6
Tyrosine	505.9	4.0
Valine	2,124.1	12.6
Methionine	782.1	4.6
Cysteine	95.1	—
Isoleucine	1,454.4	9.1
Leucine	3,075.1	10.2
Phenylalanine	1,043.8	2.8
Lysine	33.1	—
Tryptophan	233.5	1.6
Total average	1,110.6	3.6

Table 3. Amino acids in c-sample which were a filtrate of pollen incubated with ethanol fractionated larva enzyme and c¹-sample was a filtrate of ethanol fractionated larva enzyme

Amino acid	pmoles recovered (c-sample)	pmoles recovered (c ¹ -sample, control)
Aspartate	342.0	2.5
Glutamate	132.2	4.8
Serine	705.9	2.6
Glycine	1,359.6	9.9
Histidine	455.1	—
Arginine	165.7	—
Threonine	919.8	2.7
Alanine	2,203.3	—
Proline	2,808.4	3.1
Tyrosine	786.5	3.2
Valine	1,640.2	6.0
Methionine	625.6	3.8
Cysteine	10	—
Isoleucine	1,136.9	4.7
Leucine	2,255.6	7.8
Phenylalanine	793.9	2.9
Lysine	17.9	6.1
Tryptophan	352.6	2.9
Total average	928.4	3.5

Table 4. Amino acids in d-sample which were a filtrate of pollen incubated with the larva enzyme treated with sephadex chromatography and d¹-sample was a filtrate of the larva enzyme treated with sephadex chromatography

Amino acid	pmoles recovered (d-sample)	pmoles recovered (d ¹ -sample, control)
Aspartate	182.3	53.6
Glutamate	71.1	—
Serine	136.41	—
Glycine	381.2	—
Histidine	146.6	—
Arginine	33.2	—
Threonine	292.3	—
Alanine	833.6	—
Proline	963.9	4.3
Tyrosine	303.5	—
Valine	553.2	—
Methionine	234.7	2.7
Cysteine	28.9	—
Isoleucine	375.2	—
Leucine	729.7	—
Phenylalanine	314.2	—
Lysine	10	—
Tryptophan	107.8	—
Total average	316.5	3.4

가장 높은 수준의 아미노산함량을 보였으며 (Table 1~4) 특히 proline 은 3493.6 pmol 로 이것의 대조구 보다 278배 더 많은 함량을 보였다 (Table 2).

벌 유충의 창자효소가 화분의 세포질유출에 영향을 미치고 있는 결과를 보이므로 (Table 2~4) 소화효소로 분해되지 않은 화분외피속에 있는 영양소의 섭취를 위해서 꿀벌 및 그것의 유충이 갖고있는 효소를 대량생산 하여 화분에 응용함이 요청된다.

벌 유충의 창자효소의 정제물과 화분을 혼합해서 숙성시켜서 만든 여과액과 화분에 증류수를 첨가하여 숙성시킨 여과액에서 분석한 아미노산은 aspartate, glutamate, serine, glycine, histidine, arginine, threonine, alanine, proline, tyrosine, valine, methionine, cysteine, isoleucine, leucine, phenylalanine, lysine, tryptophan 등의 18종류로서 Loper와 Cohen⁽¹¹⁾은 dandelion 화분에서 cysteine 이 존재하지 않다고 보고하였다.

요 약

본 연구는 벌 유충의 창자로부터 효소를 정제하여 화

분에 작용시킨 후 그것의 여액에 있는 유리아미노산의 함량을 조사하였다.

황산암모늄 정제효소를 작용시킨 화분여액에서 작용시키지 않은 여액보다 아미노산의 함량이 970배 많이 나타났다. 알콜 정제효소를 작용시킨 화분의 여액에서 작용시키지 않은 여액보다 아미노산의 함량이 309배 더 많이 나타났다. Sephadex gel 정제효소를 작용한 화분의 여액에서 작용하지 않은 여액보다 아미노산의 함량이 105배 더 많이 나타났다. 화분에 증류수를 첨가하여 오염균으로 발효시킨 여액에서 발효시키지 않은 여액보다 아미노산의 함량이 5.5배 더 많이 나타났다. 벌 유충의 장관효소를 작용시킨 모든 화분의 여액에서 분석된 아미노산은 aspartate, glutamate, serine, glycine, histidine, arginine, threonine, alanine, proline, tyrosine, valine, methionine, cysteine, isoleucine, leucine, phenylalanine, lysine, tryptophan 등 18종이다.

문 헌

1. Herber, E.W., and Shimanuki, H., Chemical com-

- position and Nutritive value of Bee-collected and Bee-stored pollen. *Apidologie*, **9**(1), 33-40(1978)
2. Schmidt, J.O. and Schmidt, P.J.: Pollen digestability and its potential nutritional value. *Gleanmgs in bee cultue* (1984)
 3. Brooks, J. and Shaw, G.: Recent developments in the chemistry, biochemistry, geochemistry and Post-tetrad ontogeny of sporopollenins derived from pollen and spore exine Heslop-Harrison, J(ed) pollen: development and physiology Butterworths, London, p.99-114(1971)
 4. Stanley, R.G. and Wilson, H.F.: Pollen biology, biochemistry. Management springer New York (1974)
 5. Peng, Y.S., Nasr, M.E. and Marston, J.M.: Release of alfalfa, Medicago Sativa, Pollen Cytoplasm in the gut of the honey bee, Apis mellifera (Hymenoptera: Apidae) (1986)
 6. Morse, R. and Hooper, T.: The illustrated encyclopedia of beekeeping, Dutton, p.40(1985)
 7. Egorova, A.I.: Preservative microflora in stored pollen Veterinariya **8**, 40-41(1971)
 8. Gilliam, M.: Microbiology of pollen and bee bread. The yeast. *Apidologie* **10**, 40-53(1979a)
 9. Gilliam, M.: Microbiology of pollen and bee bread. The genus Bacillus. *Apidologie*, **10**, 269-274 (1979b)
 10. Beutler, K. and Opfinger, E.: Pollenernahrung and Nosemabeball der Honigbiene. *Z. Vergel Physiol.* **32**, 383-421 (1979).
 11. Loper, G.M. and Chohen, A.C.: Amino acid content of dandelion pollen, Honey bee (Apidae) Nutritional evaluation. *J. Econ. Entomal.* **80**, 14-17 (1987)

(1989년 2월 22일 접수)