

저온 저장한 누에 비휴면란의 배발육기에 있어서 유리당류의 양적 변동

양원진 · 손흥대†

동아대학교 유전공학연구소

*동아대학교 생명자원과학대학 농생물학과

Quantitative Changes of Free Sugars and Glycogen during Embryonic Development of Non-diapause Eggs of the Silkworm, *Bombyx mori* L. which were Stored at Low Temperature

Won-Jin Yang and Hung-Dae Sohn†

Institute of Genetic Engineering and Dept. of Agricultural Biology, Dong-A University, Pusan, 604-714, Korea

Abstract

It was carried out to find the carbohydrate metabolism for the glycogen utilization and the effects of low temperature (1°C, 5°C) on embryonic development of the silkworm, *Bombyx mori* L. The content of sorbitol and glycerol in the chilling eggs stored at 5°C or 1°C on 24 hours after oviposition showed the highest level on the 50th day. After that, the corresponding value in the eggs stored at 5°C were decreased, and the value in the eggs stored at 1°C maintained the similar level. The trehalose level was rapidly increased on 50~60th day or thereabouts, and then, it was accumulated. When the eggs stored at low temperature were transferred and developed the embryo at 25°C, sorbitol and glycerol were respectively changed to glycogen. Furthermore, the content of trehalose and glucose showed specific patterns with each embryonic stage at low temperature. With the aforementioned results, the intermediary metabolism of carbohydrate was discussed with regard to embryonic development of non-diapause eggs of silkworms.

Key words : Silkworm, embryonic development, non-diapause eggs

서 론

곤충 알은 생체 구성에 필요한 난황단백질인 vitellin, 난 특이단백질, 30K단백질 등¹⁻⁵⁾과 에너지원으로 활용되는 저장형 탄수화물인 glycogen⁶⁻⁸⁾으로 구성되어 있으며, 이들 물질들은 유전정보와 함께 모친에서 유래된다⁹⁻¹⁰⁾.

누에는 알시기에 휴면을 하며 배발생기나 유충 초기에 경험한 환경조건의 영향이 뇌에 축적되었다가 성충기에 휴면호르몬을 분비하므로서 휴면란을 생산하며, 이 알은 휴면기동안 여러 가지 생리적 변화를 나타낸다.

누에 휴면란의 생화학적 특징으로는 휴면 개시와 동시에 알내의 glycogen이 sorbitol과 glycerol으로 변환되고, 휴면

† Corresponding author

각성시에는 이 polyol이 glycogen으로 재변환된다⁷⁻⁸⁾. 그리고 배발육의 에너지원으로서 필요한 glycogen은 누에 휴면란의 경우 약 40mg/g이며 비휴면란은 약 27mg/g 정도로 축적되어 배발육시기에 이용된다⁶⁾. 이와 같이 휴면란의 glycogen과 sorbitol의 축적에는 난소의 trehalase가 직간접적으로 관여하고 있다¹¹⁾. 특히 배발육 및 휴면 현상의 진행 과정에서 저장형 탄수화물은 glycogen→sorbitol→glycogen→trehalose 순으로 상호 변환하며, 이들의 대사 경로에는 특정한 효소가 관여한다는 사실은 이미 보고되었다^{7,11-13)}. 또한 누에알의 배발육기간중 배발육 전기에는 sorbitol이 증가하고 중, 후기에는 trehalose가 증가한다¹⁴⁻¹⁵⁾. 이와 같은 사실은 배발육기간중 glycogen은 해당 경로를 거쳐서 에너지를 생성하고, 유리당은 배발육단계의 특정한 시기에 출현한다는 사실로서 배발육기에는 특이한 대사 경로가 존재할 가능성을 시사하고 있다.

한편, 누에알을 장기간 저온 저장할 수 있는 방법의 개발은 잠중제조의 생력화와 유전자 보존의 능률 향상을 도모하는데 중요하다. 이와 관련된 연구로서는 장기 냉장란의 부화 능력에 밀접한 관계가 있는 Esterase A¹⁶⁻¹⁷⁾와 부화에 관여하는 특성¹⁸⁾, 그리고 알의 아미노산 축적량과 보호 온도와의 상관관계에 관한 연구보고¹⁹⁻²⁰⁾ 등이 있으나, 비휴면란을 저온에 장기간 저장할 때의 생리 생화학적 변화를 휴면란과 비교 검토하여 누에 비휴면란을 장기간 보호할 수 있는 저장법의 구명에 관한 연구보고는 많지 않다^{13-15,21-23)}. 따라서 본 실험은 저온 저장한 비휴면란의 배발육과 탄수화물 대사와의 관련성을 조사하여 곤충 알의 장기간 저온 저장 방법 및 배발육에 관한 대사 생리학적 기능을 밝히고자 수행하였다.

재료 및 방법

1. 재료

공시 잠품종은 다화성 N₄를 사육하여 산란 후 3시간 이내에 알을 채집하여 산란 24시간 후에 5℃와 1℃의 2가지 온도 조건으로 저장하였다.

2. Glycogen과 Free Sugars의 정량 방법

각기 다른 온도 조건하에서 저장한 알 50립의 무게를 측정 후 내부 표준 물질로서 Pentaerythritol 100μg를 첨가하고 5배량의 80% 에탄올을 사용하여 충분히 마쇄한다.

에탄올 가용 부분은 유리당의 정량에 사용하고 에탄올 불용 부분은 Glycogen의 정량에 사용한다.

3. Gas Chromatograph에 의한 Free Sugars의 정량

Furusawa *et al.*²¹⁾ 방법을 참고로 하여 다음과 같이 실시하였다. 80% 에탄올 추출물을 감압건고(減壓乾固)한 후 TMS화를 행한다. TMS화 방법은 무수 pyridine 5ml, hexamethyldisilazane 1ml, trimethylchlorosilane 1ml를 혼합하여 이것을 TMS화 시약으로 사용하였다. 이 TMS화 시약 0.2ml를 먼저 건조시킨 시료에 첨가한 후 Hot plate내에서 80℃, 30분간 반응을 시킨다. 이 반응액 3μl를 미량 주사기를 사용하여 3% silicone GE-SE30(Chromosorb W 80~90 mesh)을 사용한 glass column(3mm i. d.×2m)에 주입하여, 주입부 온도 280℃, carrier gas는 질소 40 ml/min, 수소 1.0kg/cm², 공기 0.4kg/cm² 조건으로 흘려 보낸다. 그런 후 100~260℃(4℃/min)승온법에 의해 분석을 한다. 크로마트팩(C-RIA, SHIMADZU)과 표준검량선(二点檢量直線)을 이용하여 산출하였다.

4. Glycogen의 정량

Dubois *et al.*²⁴⁾의 페놀황산법에 의한 비색 정량을 하였다. 발색의 정도를 분광광도계(UV-1201, SHIMADZU)를 사용해 파장 490nm에서 흡광도를 측정 후 미리 작성한 표준 검량선으로부터 glycogen량을 glucose량으로 산출하였다.

결 과

1. 비휴면란의 온도와 저장기간에 의한 Glycogen과 유리당류의 양적 변동

저온 저장한 비휴면란의 경우 polyol 이외의 유리당의 변화에 관한 연구 보고는 거의 없다. 그래서 비휴면란을 산란 24시간 후에 5℃와 1℃의 저온에 저장한 후 각 시기별 glycogen과 유리당류의 변동을 조사한 결과는 Fig. 1, 2와 같다.

Glycogen과 유리당류의 변동을 보면 5℃ 저장란의 경우 저장 30일까지는 glycogen이 감소한데 반하여 sorbitol과 glycerol량은 증가하였고, 저장 30일 이후부터는 반대로 glycogen은 증가하나 sorbitol과 glycerol량은 감소하기 시작하였다(Fig. 1A).

1℃ 저장란의 경우 glycogen은 저장 후 100일째까지 계

속 감소를 하였고 sorbitol과 glycerol량은 5°C 저장란과 달리 완만하게 증가하는 경향을 볼 수가 있었다(Fig. 2A).

한편 저온 저장한 알의 각 시기별 trehalose와 glucose의 양적 변동을 조사한 결과를 보면 먼저 5°C 저장란의 glucose량은 저온 저장한 전기간 동안 약 1 μ moles/g eggs 수준을 유지하였다. 그러나 trehalose량은 저장 후 50일까지 계속 증가를 하여 약 6 μ moles/g eggs 정도에 달한 후 이 수준이 계속 유지되었다(Fig. 1B). 그리고 1°C 저장란의 glucose량은 저장 후 60일부터 완만하게 증가하여 100일

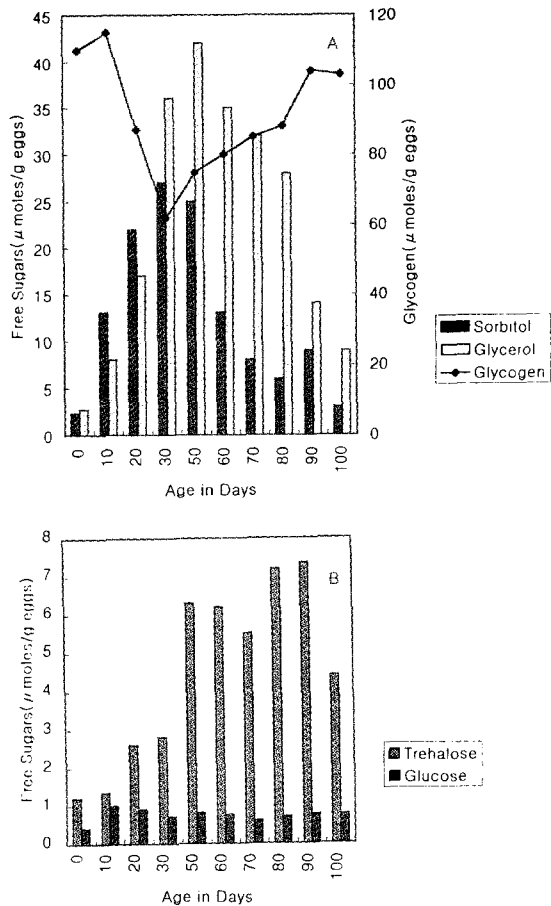


Fig. 1. Effects of low temperature on changes of free sugars and glycogen contents in non-diapause eggs of silkworm. The eggs were kept 25°C for the first 24 hours after oviposition, and then, transferred to 5°C.

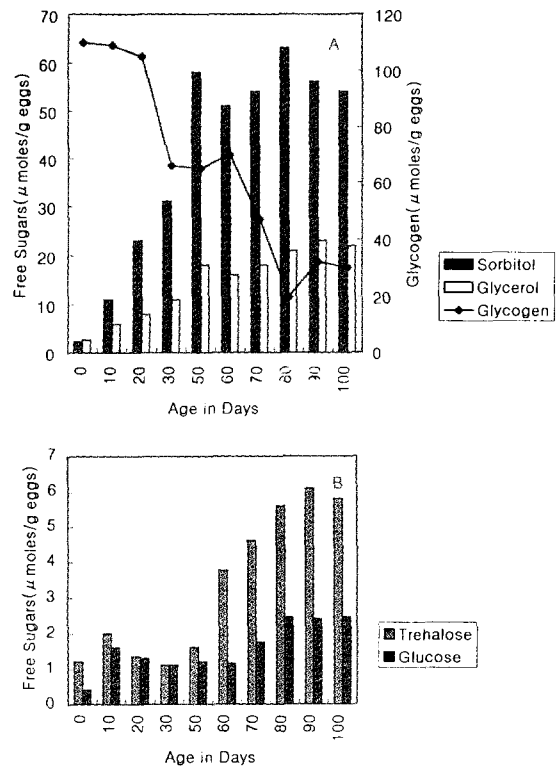


Fig. 2. Effects of low temperature on changes of free sugars and glycogen contents in non-diapause eggs of silkworm. The eggs were kept 25°C for the first 24 hours after oviposition, and then, transferred to 1°C.

째에는 약 2.5 μ moles/g eggs를 나타내었다. Trehalose량은 5°C 저장란과 다르게 저장 50일까지는 1.5 μ moles/g eggs 였지만, 그 후 증가를 하여 100일째에 약 6 μ moles/g eggs에 달하였다(Fig. 2B).

배발육상태를 알아보기 위해 sorbitol, glycerol, trehalose량이 최대치에 도달한 각 시점에서 알을 해부하여 배발육상태를 관찰한 결과 모두 월년성란의 스프운형기의 형태 이었으며, 비휴면란의 미절분화기의 배형태로 확인됨에 따라 저온 저장 전기간 동안에는 발육하지 않았다는 사실을 알 수가 있었다.

이상의 결과로 비휴면란을 저온에 저장을 하면 glycogen의 감소에 따라 sorbitol과 glycerol이 축적되며 trehalose와

glucose량의 변동 양상은 5°C와 1°C 저장란이 각기 다르다는 사실이 확인되었다. 그리고 저온 저장란 알의 trehalose의 축적량이 6~7 μ moles/g eggs이며, 이 양은 비휴면란의 배발육시 후반기 trehalose 축적량과 일치한다¹⁴⁻¹⁵⁾는 점에 주목 할 필요가 있다.

2. 저온 저장 30일째 비휴면란의 배발육기에 있어서 Glycogen과 유리당류의 양적 변동

저온 저장란 비휴면란에 축적된 유리당류가 배발육중에 어떻게 변하는지를 알고자 저온 저장 30일째 비휴면란을 25°C로 옮겨서 배발육 진행시의 glycogen과 유리당류의 변동을 Fig. 3, 4에 나타내었다.

5°C 저장란을 저장 30일째 25°C로 옮겨 배발육을 진행

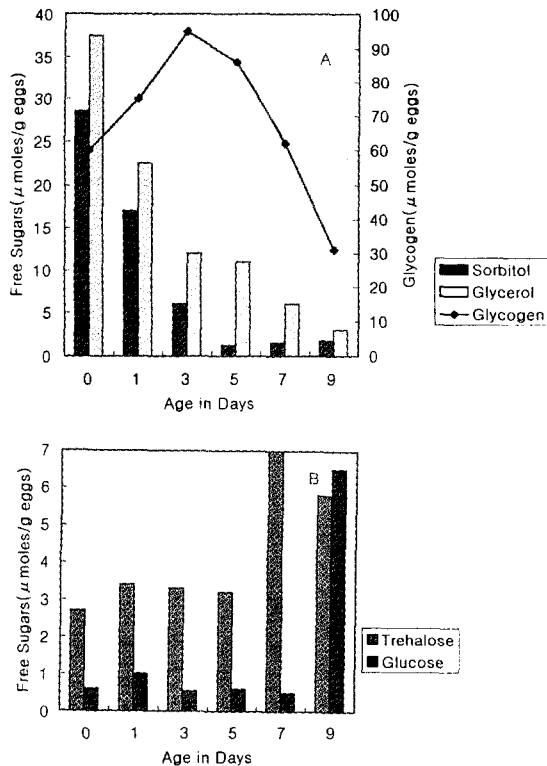


Fig. 3. Changes of free sugars and glycogen contents in non-diapause eggs of silkworm during embryonic development. The eggs were transferred from 5°C to 25°C on the 30th day after oviposition.

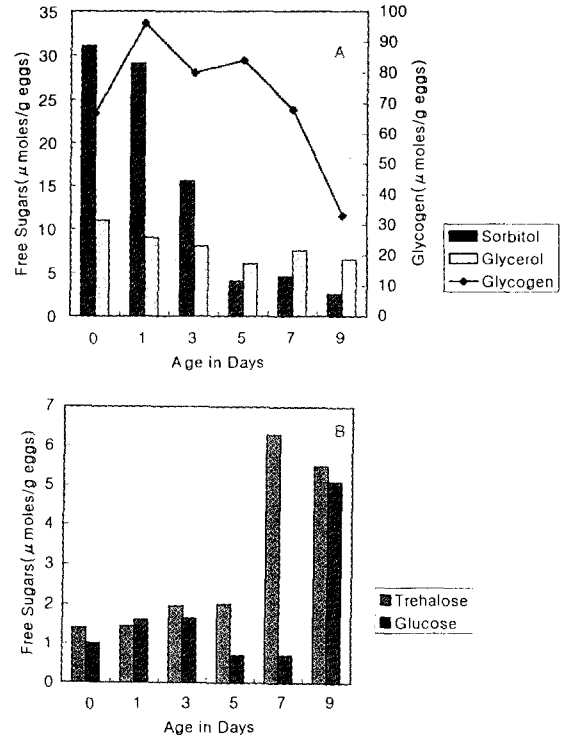


Fig. 4. Changes of free sugars and glycogen contents in non-diapause eggs of silkworm during embryonic development. The eggs were transferred from 1°C to 25°C on the 30th day after oviposition.

시키면 glycogen량은 일단 증가한 후 급격히 감소하였다. 1°C 저장란은 25°C로 옮긴 후 5일간은 큰 변동이 없었지만 이후 급격히 감소하였다. 그리고 sorbitol과 glycerol량은 배발육 전기간에 걸쳐서 감소하였다(Fig. 3A, 4A). 이와 같은 사실은 저온 저장하에서 축적된 sorbitol과 glycerol이 배발육 개시와 더불어 glycogen으로 변환된 후 에너지원으로 이용되는 것으로 추정할 수 있다.

Trehalose량은 배발육 5일째까지는 5°C 저장란의 경우 약 3 μ moles/g eggs, 1°C 저장란은 약 2 μ moles/g eggs수준을 유지하다가 양자 모두 배발육 7일째에는 약 7 μ moles/g eggs정도로 증가한 후 감소하였다. 그리고 glucose량의 경우 약간의 변동을 나타내다가 배발육 9일째에 최대치에 달하였다(Fig. 3B, 4B). 한편 부화율을 조사한 결과 5°C 저장

란의 경우는 51%, 1°C 저장란은 26%만이 부화하였고 나머지는 최청사란(崔靑死卵)이었다.

3. 저온 저장 60일째 비휴면란의 배발육기에 있어서 Glycogen과 유리당류의 양적 변동

저온 저장 60일째 알을 25°C로 옮겨서 배발육 진행시의 glycogen과 유리당류의 변동을 Fig. 5와 6에 표시하였다.

5°C 저장 60일째 알의 배발육시 trehalose와 glucose량의 변동은 저온 저장 30일째 알의 배발육시 변동 양상과 일치한다(Fig. 5B). 그러나 1°C 저장란의 경우는 5°C 저장란과는 달리 trehalose량은 3~4μmoles/g eggs, glucose량은 1~2μmoles/g eggs 범위로 배발육기간 동안에는 큰 변동이 없었다(Fig. 6B). 마찬가지로 부화율을 조사한 결과 5°C 저

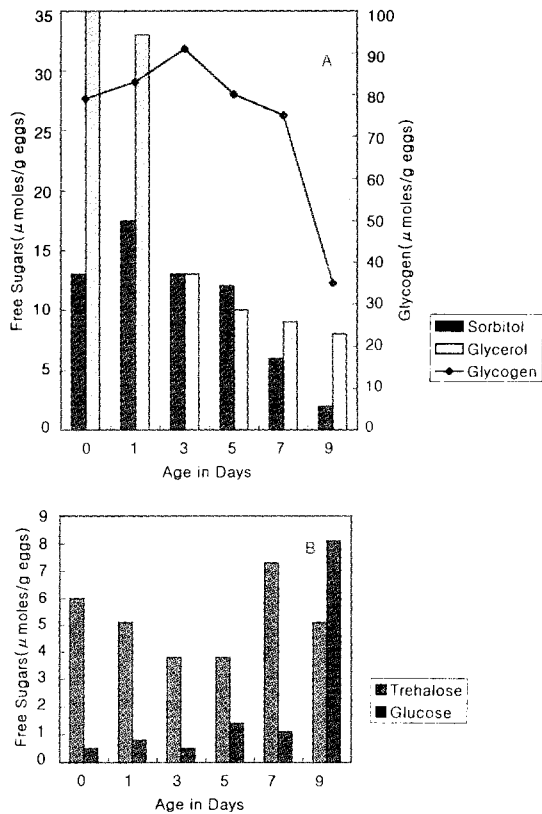


Fig. 5. Changes of free sugars and glycogen contents in non-diapause eggs of silkworm during embryonic development. The eggs were transferred from 5°C to 25°C on the 60th day after oviposition.

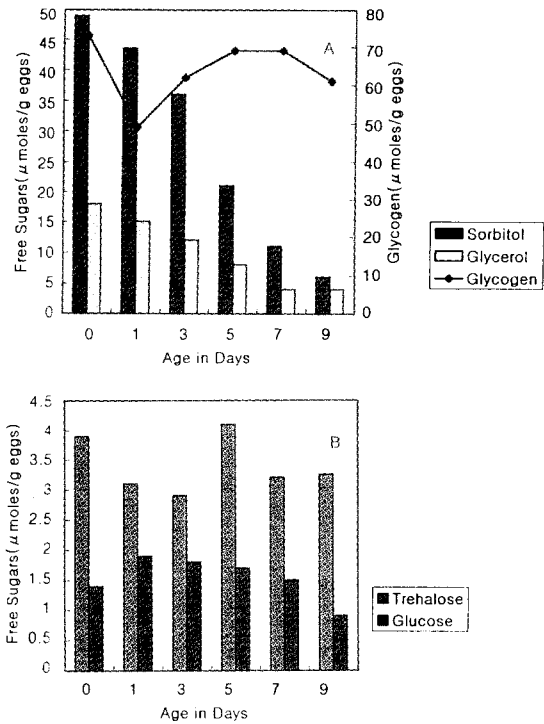


Fig. 6. Changes of free sugars and glycogen contents in non-diapause eggs of silkworm during embryonic development. The eggs were transferred from 1°C to 25°C on the 60th day after oviposition.

장란은 35%, 1°C 저장란은 0%의 부화율을 나타내었고 나머지는 최청사란이었다. 이와 같은 결과는 비휴면란을 저온에 저장함으로써 축적되는 sorbitol과 glycerol이 배발육 진행에 의해 glycogen으로 재변환되어 에너지원으로 이용된다는 사실을 뒷받침한다. 그리고 5°C와 1°C에 저장한 비휴면란의 부화율 차이는 배발육시 trehalose와 glucose양적 변동의 차이에 기인하는 것으로 생각된다.

고 찰

본 보고에서 에너지원으로 비휴면란에 축적된 glycogen의 이용 형태를 조사한 결과 5°C 저장 비휴면란의 경우 저온 저장한 휴면란과 같은 glycogen ↔ sorbitol+glycerol의 상호 변환(가역 반응)²¹⁻²³을 볼 수가 있지만, 1°C 저장 비휴면란에서는 glycogen→sorbitol+glycerol의 한쪽 방향

으로만 진행되는 변환(비가역 반응)을 볼 수가 있다. 저온 저장한 비휴면란에서도 휴면란과 마찬가지로 polyol 대사 경로가 작동하고 있음을 알 수가 있다.

5°C 저장 비휴면란은 저장 30일째 이후부터 sorbitol과 glycerol의 감소에 따라 glycogen이 축적되었고, 1°C 저장 비휴면란은 5°C 저장란과 달리 sorbitol은 높은 수준으로 축적 유지되었다²²⁾. 이와 같은 사실은 5°C 저장란에서는 NAD-sorbitol dehydrogenase(NAD-SDH)활성이 상승하지만, 1°C 저장란에서는 본 효소 활성이 나타나지 않는데 그 원인이 있다^{12, 13, 23)}. 그러므로 5°C와 1°C의 polyol 대사 경로의 차이는 NAD-SDH활성이 온도에 의해 영향을 받는 것으로 추측된다.

Storey²³⁾보고에 의하면 phosphofructokinase(PFK)의 활성은 저온에서 감소한다. 그래서 저온 저장한 비휴면란의 PFK활성이 감소하든지 아니면 불활성화로 인하여 glycogen → glycolysis 대사 경로 중에서 glucose-6-phosphate → fructose-6-phosphate → fructose-1,6-diphosphate 단계로 들어가지 못하고, glucose-6-phosphate → sorbitol-6-phosphate → sorbitol에 이르는 대사 경로가 작동하여 sorbitol이 생성, 축적되는 것으로 생각된다. 이와 같은 결과는 저온이 비휴면란의 탄수화물 대사 경로에 영향을 미친다는 사실을 뒷받침한다.

한편 비휴면란을 저온에서 저장하면 trehalose는 축적되고 그 양은 약 6μmoles/g eggs 정도이며 25°C에서 배발육을 진행시킨 경우의 축적량과 거의 같았다¹⁴⁻¹⁵⁾. 그리고 앞에서 논한 것과 같이 glycogen → glycolysis의 대사 경로는 저온의 영향을 받으나 glycogen → trehalose → glucose → glycolysis의 대사 경로는 저온의 영향을 받지 않는 것으로 추정된다. 더우기 저온 저장 상태에서는 배발육이 거의 진행되지 않는 사실로서도 이 대사 경로는 난황내에서 발생 하는 것으로 추정할 수 있다.

저온 저장 30일째와 60일째에 25°C로 옮겨서 배발육을 진행시켰을 때 5°C 저장란의 경우 어느 정도까지 부화 가능성이 유지되고 있지만, 1°C에서 장기간 저장할 경우 배발육 효과는 약해지며 저온 저장 기간이 길수록 최청사란이 증가하였다²²⁾. 그리고 배발육시 sorbitol량이 감소하며 이 감소가 NAD-SDH에 의한 것이라면 본 효소의 활성 상승과 배발육의 진행이 일치하지 않아 최청사란의 증가를 가져온다고 추정할 수 있다. 이와 같은 사실은 배발육기에 있어서

NAD-SDH의 중요성을 시사한다. 즉 5°C와 1°C에서의 polyol 대사 경로가 다르다는 사실은 polyol량과 부화율이 밀접한 관계가 있음을 시사한다. 한편, trehalose와 glucose량의 변동은 저장 일수와 온도에 따라 큰 차이를 보여 이와 같은 결과로 trehalose와 glucose는 배발육 후기에 중요한 역할을 하는 것으로 생각된다. 따라서 유리당류중 sorbitol, glycerol, trehalose와 glucose가 배발육기의 중요한 물질이라는 사실을 확인함과 동시에 앞으로 누에의 배발육기에 있어서 발생 분화에 관여하는 유리당을 에너지 대사의 차원에서 검토와 온도 이외의 보존 기간과 유리당류의 조절요인을 조사함에 의해 잠종의 장기 보호에 도움이 되는 자료를 얻을 수 있을 것으로 기대된다.

요 약

누에 비휴면란의 배발육기에 있어서 glycogen의 이용 형태를 알기 위해 유리당류의 양적 변동과 저온이 미치는 영향에 관하여 검토를 하였다.

산란 24시간 후에 저온(5°C와 1°C) 저장한 비휴면란의 sorbitol과 glycerol의 함량은 50일째에 최대치에 달하며 이후 5°C의 경우 감소하였고 1°C에서는 비슷한 수준을 유지하였다. Trehalose의 양은 저온에서 50~60일경에 급격히 증가한 후 점진적으로 축적되었다. 저온 저장란을 25°C로 옮겨 배발육을 진행시키면 sorbitol과 glycerol은 glycogen으로 변환되었고, trehalose와 glucose 함량은 저온조건에 따라 배발육 과정동안 특이한 변동을 나타내었다. 이와 같은 결과에서 누에 비휴면란의 배발육기에 대한 탄수화물의 중간 대사 경로를 고찰을 하였다.

감사의 글

본 논문은 1992년도 동아대학교 교비지원 연구비에 의해 이루어졌으며, 이를 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. Engelmann, F. : Insect vitellogenin : Identification, biosynthesis, and role in vitellogenesis. *Adv. Insect Physiol.*, **14**, 49(1979).
2. Hagedorn, H. H. and Kunkel, J. G. : Vitellogenin and vitellin in insects. *Annu. Rev. Entomol.*, **24**, 475(1979).

3. Postlethwait, J. H. and Giorgi, F. : *Vitellogenesis in insects*. In *Developmental Biology*, pp. 85-126, In A Comprehensive Synthesis (Ed. Browder, W. L.), Vol I, Oogenesis. Plenum Press, New York(1985).
4. Raikhel, A. and Dhadialla, T. S. : Accumulation of yolk proteins in insect oocytes. *Annu. Rev. Entomol.*, **37**, 217(1992).
5. Izumi, S., Yano, K., Yamamoto, Y. and Takahashi, S. Y. : Yolk proteins from insect eggs : Structure, biosynthesis and programmed degradation during embryogenesis. *J. Insect Physiol.*, **40**, 735(1994).
6. Yamashita, O. and Hasegawa, K. : Mobilization of carbohydrate in tissue of female silkworm, *Bombyx mori* during metamorphosis. *J. Insect. Physiol.*, **20**, 1749(1974).
7. Yamashita, O., Suzuki, K. and Hasegawa, K. : Glycogen phosphorylase activity in relation to diapause initiation in *Bombyx mori* eggs. *Insect. Biochem.*, **5**, 707(1975).
8. Yamashita, O. and Hasegawa, K. : *Embryonic diapause*, pp. 407-434, In Comprehensive Insect Physiology. Biochemistry and Pharmacology(Eds. Kerkut, G. A. and Gilbert, L.L.), Vol. I, Pergamon, Oxford(1985).
9. Suzuki, Y. : Genes that are involved in Bombyx body plan and silk gene regulation. *Int. J. Dev. Biol.*, **38**, 231(1994).
10. 大西英爾, 園部治之, 高橋進 : 昆蟲の生化學 分子生物學. In *カイコ胚の形態形成および組織分化に關わる遺傳子群*(鈴木義昭編) pp. 301-315, 名古屋大學出版會.(1995).
11. Ikeda, M., Su, Z. H., Saito, H., Imai, K., Sato, Y., Isobe, M. and Yamashita, O. : Induction of embryonic diapause and stimulation of ovary trehalase activity in the silkworm, *Bombyx mori* by synthetic diapause hormone. *J. Insect Physiol.*, **39**, 889(1993).
12. Yaginuma, T. and Yamashita, O. : NAD-dependent sorbitol dehydrogenase activity in relation to the termination of diapause in eggs of *Bombyx mori*. *Insect. Biochem.*, **9**, 547(1979).
13. Yaginuma, T., Kobayashi, M. and Yamashita, O. : Distinct effects of different low temperatures on the induction of NAD-sorbitol dehydrogenase activity in diapause eggs of the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Comp. Physiol.*, **160**, 227(1990).
14. 梁元鎮, 清水喜一, 東政明, 古澤壽治 : 家蠶非休眠卵の胚發育に伴う遊離糖類の量的變動と低溫の影響 日蠶關西支部大會 要旨集(1985).
15. 梁元鎮 : *カイコの發生・變態に伴う炭水化物代謝*. 京都工藝纖維大學 學位論文(1987).
16. Kai, H., Kawashiri, K., Nakashima, S. and Azuma, M. : Fixed minimum duration of chilling to the termination of diapause, and effects of longer chilling on hatching mode in eggs of *Bombyx mori*. *J. Seric. Sci. Jpn.*, **64**(2), 132(1995).
17. Kai, H., Kotani, Y., Miao, Y. and Azuma, M. : Time interval measuring enzyme for the resumption of embryonic development in the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Insect Physiol.*, **41**, (1995).
18. Takei, R., Nagashima, E. and Nakagaki, M. : Some factors related to hatching ability of long-term chilled eggs of the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Seric. Sci. Jpn.*, **58**(5), 387(1989).
19. Furusawa, T., Narutaki, A. and Mitsuda, K. : Changes in amino acid pools during embryonic development of the Japanese oak silkworm, *Antheraea yamami*(Lepidoptera : saturniidae). *Appl. Entomol. Zool.*, **28**, 234(1993).
20. Furusawa, T. and Ishihara, R. : Influence of low temperature on amino acid pool in the eggs of the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Seric. Sci. Jpn.*, **63**(2), 130(1994).
21. Furusawa, T., Shikata, M. and Yamashita, O. : Temperature dependent sorbitol utilization in diapause eggs of the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Comp. Physiol.*, **147**, 21(1982).
22. 古澤壽治, 清水喜一, 矢野竹男 : 家蠶非休眠卵におけるポリオール蓄積. *日蠶雜*, **56**(2), 150(1987).
23. Furusawa, T., Yaginuma, T., and Yamashita, O. : Temperature-induced metabolic shifts in diapause and non-diapause eggs of the silkworm, *Bombyx mori*. *Zool. Jb. Physiol.*, **96**, 169(1992).
24. Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Berbers, P. A. and Smith, F. : Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, **28**, 350(1958).
25. Storey, K. B. : Phosphofructokinase from the overwintering gall fly larva, *Eurosta solidaginis*. Control of cryoprotectant polyol synthesis. *Insect Biochem.*, **12**, 501(1982).