

1. 표지

완결과제 최종보고서

일반과제(○), 보안과제()

(과제번호 : PJ010487)

기후변화와 꿀벌집단 이상현상에 미치는 요인분석 및 적응 대책

(Analysis of factors affecting colony disorders of honeybees caused by climate change
and adaptative measures)

인천대학교산학협력단

연구수행기간
2014.04 ~ 2016.12

농촌진흥청

2. 제출문

제 출 문

농촌진흥청장 귀하

본 보고서를 “기후변화와 끝벌집단 이상현상에 미치는 요인분석 및 적응 대책에 관한 연구”(개발기간 : 2014.04.~ 2016.12.) 과제의 최종보고서로 제출합니다.

제1세부연구과제 : 기후변화와 질병 및 독성물질 등의 스트레스 요인들에 의한 끝벌의
분자신경행동학적 변화 메커니즘 연구

제2세부연구과제 : 기후변화에 의한 끝벌 봉군집단의 특이발현 유전자의 기능 및 발현
기전

제3세부연구과제 : 기후변화에 의한 지역별 양봉산물의 생리활성 차이변화 연구

제1협동연구과제 : 기후변화 요인에 따른 끝벌의 병원체별 감수성 변화평가

제2협동연구과제 : 기후요인에 따른 끝벌 군집 외역활동 패턴 변화 연구

제3협동연구과제 : 등검은말벌의 기초 생태 및 봉군침입 조기경보시스템 개발

2017. 02. 28.

제1세부연구기관명 : 인천대학교

제1세부연구책임자 : 권형욱

참여연구원 : 최새움, 안태홍, 정제원

제2세부연구기관명 : 서울대학교

제2세부연구책임자 : 이시혁

참여연구원 : 김상현, 김경문, 이재호, 윤경재, 조영희

제3세부연구기관명 : 서울대학교

제3세부연구책임자 : 안용준

참여연구원 : 신혜민, 레누카, 청일철, 가루푸

제1협동연구기관명 : 농업과학원

제1협동연구책임자 : 강은진

참여연구원 : 이명렬, 변규호, 이만영, 김혜경, 최용수

제2협동연구기관명 : 인천대학교

제2협동연구책임자 : 김길원

참여연구원 : 최민석, 최병조, 김동인, 조창래, 김배성, 오대근

제3협동연구기관명 : 안동대학교

제3협동연구책임자 : 정철의

참여연구원 : 홍성민, 정성민, 마소희, 김병순, 전혜진, 수닐쿠마르

주관연구책임자 : 권형욱



주관연구기관장 : 김영관



농촌진흥청 농업과학기술 연구개발사업 운영규정 제51조에 따라 보고서
열람에 동의합니다.

* 반드시 기관장 직인을 받아서 스캔 첨부

3. 보고서 요약서

보고서 요약서

과제번호	PJ010487		연구기간 2014. 04. 01 - 2016. 12. 31 (33개월)
연구사업명	단위사업명	공동연구사업/농업기후변화 적응체계구축	
	세부사업명		
	내역사업명		
연구과제명	주관과제명	기후변화가 꿀벌 집단 이상현상에 미치는 요인 분석 및 적응대책	
	세부(협동) 과제명	(1세부)기후변화와 질병 및 독성물질 등의 스트레스 요인들에 의한 꿀벌의 분자신경행동학적 변화 메커니즘 연구 (2세부)기후변화에 의한 꿀벌 봉군집단의 특이발현 유전자의 기능 및 발현기전 분석 (3세부)기후변화에 의한 지역별 양봉산물의 생리활성 차이연구 (1협동)기후변화 요인에 따른 꿀벌의 병원체별 감수성 변화 평가 (2협동)기후요인에 따른 꿀벌 군집 외역활동 패턴 변화 연구 (3협동)기후변화와 꿀벌집단 이상현상에 미치는 요인분석 및 적응 대책	
연구책임자	구분	연구기관	소속 성명
	1세부	인천대학교	생명과학과 권형욱
	2세부	서울대학교	응용생물학과 이시혁
	3세부	서울대학교	응용생물학과 안용준
	1협동	농업과학원	잠사양봉소재과 장은진
	2협동	인천대학교	생명과학과 김길원
	3협동	안동대학교	식물의학과 정철의
총 연구기간 참여 연구원 수	총: 35 명 내부: 6 명 외부: 29 명	총 연구개발비	정부: 1,500,000천원 민간: 천원 계: 1,500,000천원
위탁연구기관명 및 연구책임자		참여기업명	
국제공동연구	상대국명:	상대국	연구기관명:
요약(연구개발성과를 중심으로 개조식으로 작성하되, 500자 이내로 작성합니다)			보고서 면수

4. 국문 요약문

〈 국 문 요 약 문 〉

연구의 목적 및 내용	<p>본 연구는 기후변화에 의한 꿀벌의 건강, 군집행동, 개체 통신 등 정상적인 사회성 행동과 봉군 유지를 위한 생리, 생태, 외래해충, 그리고 다른 방화곤충과의 관계를 이해하는데 목표를 두고 있다. 최근 급작스런 기후변화는 밀원식물의 개화시기나 밀원의 부족을 야기할 수 있으며, 이러한 예측불허의 상황에서 꿀벌이 어떤 행동특성을 가지고 봉군을 유지하며, 적절한 양봉관리기술을 어떻게 적용하는가는 상당히 중요한 부분으로 작용하고 있다. 기후변화와 꿀벌군집이상현상에 대한 보고는 현재 힘을 실어가고 있는 상황이나, 많은 부분은 과학적인 근거가 많이 부족한 상황이다. 따라서 이 연구의 최종목표는 기후변화와 꿀벌의 군집생활에서 나타나는 여러 표적을 현대 과학적인 접근방법과 전략으로 밝히며, 이러한 객관적인 증거들을 양봉기술에 적용함으로서 향후 기후변화를 예측하여 안정화된 봉군관리에 적용하는데 그 의의가 있다.</p> <p>이러한 문자신경생물학적, 행동학적 메커니즘은, 계절별 봉군의 행동 양상(육아, 외역 등) 및 기온 변화에 따른 분봉열 발생 패턴과 관련된 유전자군의 발현 양상 분석을 통해, 꿀벌 내부적인 영향을 조사할 수 있다. 이러한 방법은 최근 발전되고 있는 NGS (Next Generation sequencing) 방법을 통해서, 기후변화와 계절적인 변화에서 꿀벌의 행동적응에 대한 문자생물학적 메커니즘을 밝히고자 하였다. 본 주관연구에서는 또한 기후변화에 의한 특정 지역에서의 꿀벌의 밀도가 줄어드는 것을 추적함으로 꿀벌의 밀도 감소 추이와의 상관관계 및 기후변화와의 상호관계를 밝히고자 하였다. 나아가 기후변화에 의한 지역별 및 밀원식물별 벌꿀, 봉독, 프로폴리스 및 화분을 분리, 수거하여 여러가지 생리활성의 차이를 비교하는데 포인트를 두고 있는데, 이러한 이유는 여러가지 꿀벌의 방어물질이 기후변화에 의해서 어떤 영향을 받는지 또한 이러한 방어물질의 조성이 어떻게 달라지는지 조사함으로써, 전체적인 꿀벌집단의 유지와 어떤 영향이 있는지 파악하는데 중요한 단서를 제공할 수 있다. 본 외부연구는 현재 내부연구와 연계하여 기후 기온 변화의 요인과 꿀벌 주요 질병(노제마, 백묵병, 바이러스 병 등)과의 감수성에 대한 원인을 문자적, 행동학적, 생태학적, 신경생물학적인 융합적 다각도의 원인을 규명함으로써, 기후변화와 꿀벌 군집이상현상에 대한 대책을 마련하고자 한다.</p>
연구개발 성과	<ul style="list-style-type: none"> ○ 꿀벌 스트레스 관련 문자 마커로 활용 가능한 아세틸콜린에스터라제 1(AChE1) 발굴 ○ 육아 억제와 정상 육아 상태의 내역 및 외역봉의 전사체, 경로맵(pathway map), Gene-set enrichment analysis (GSEA) 분석 완료 ○ 분봉 직전, 분봉참여, 잔류 꿀벌 샘플을 확보하여 이들의 전사체, 경로맵(pathway map) 및 Gene-set enrichment analysis (GSEA) 분석 완료 알쓰하이며 초파리 모델을 구축 ○ 국내산 20종 프로폴리스의 생물활성 <ul style="list-style-type: none"> - 알쓰하이며 질환의 주요 원인인 BACE-1 및 아세칠콜린에스테라제에 대해, 이천과 충주산 프로폴리스는 브라질산, 중국산, 호주산보다 이들에 대한 활성이 현저히 강함 - 항산화 활성은 양평, 원주 및 고령산 프로폴리스가 브라질산, 중국산, 호주산보다 현저히 높음 - 항암활성은 이천, 양평, 원주, 충주, 제주 및 울진산 프로폴리스가 항암제인 Cisplatin 보다 강함 ○ 국내산 18종 화분의 생물활성 <ul style="list-style-type: none"> - 국내 18개 지역의 화분 에탄올 추출물의 BACE-1, 아세칠콜린에스테라제,

	<p>항산화, 암세포 증식저해 및 장내세균 생육저해 활성을 조사한 결과, 지역에 따라 활성에 현저한 차이를 나타냄</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 국내산 로얄젤리의 자외선 보호작용 <ul style="list-style-type: none"> - 국내산 로얄젤리로부터 순수 분리한 57 kDa 단백질은 100µg/mL 농도에서 인간 조골세포(Saos-2 세포주)에, 자외선에 대한 세포보호 효과를 보였을 뿐만 아니라 소기관이나 세포 형태가 정상세포와 비슷하게 유지되었다. 또한, 뼈 분화에 중요한 염기성 인산분해효소도 0.1 mg/mL 57 kDa 단백질 처리군이 자외선 또는 항산화제 NAC 처리군에 비하여 현저하게 증가하였음 ○ 개체 중심 실험 연구 기반 및 시스템 구축 ○ 봉군 내·외부와 먹이원 기후요인(온도, 습도, 조도, 윤량 등)에 따른 토종꿀벌과 서양꿀벌의 외역활동 일주기 및 빈도 변화에 대한 예측 모델 구축 ○ 개체 자동 인식 모니터링 시스템 개발 및 적용 ○ 바람의 영향에 따른 토종꿀벌의 먹이 섭취량 변화 ○ 집단 개체수와 온도가 토종벌의 생존률과 행동에 미치는 영향 비교 외래 침입 꿀벌 해충인 등검은말벌의 기초 생태를 파악하고 생태, 행동, 화학통신 등에 근거한 꿀벌 봉군 공격을 조기에 탐지할 수 있는 조기경보 시스템을 개발함 				
연구개발 성과의 활용계획 (기대효과)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 돌발적 기후변화에 따른 꿀벌 스트레스를 분자마커를 통하여 예측하며 이에 대한 대응 방안 마련 가능 ○ 분봉 관련 특이 유전자 정보를 통한 분봉 예찰 분자마커 제공으로 분봉의 사전 대응 가능 ○ 기후변화, 분봉 관련 유전 정보를 바탕으로 한 과학적인 봉군 관리 시스템 제공 ○ 비교 유전학적 정보의 추후 농업 분야 확대 적용 ○ 국내산 양봉산물의 지역별 맞춤형 상품 개발 <ul style="list-style-type: none"> - 국내산 프로폴리스 및 화분은 지역에 따라 생리활성에 차이가 있으나, 브라질산, 중국산, 호주산보다 각종 생물활성이 현저히 강해 국제 경쟁력이 높음. 따라서 이를 활성에 따른 지역별 맞춤형 상품 개발 가능 ○ 토종 봉군 내·외부와 먹이원의 기후요인(온도, 습도, 바람 등) 변화에 따른 방화활동에 대한 실험적 분석과 예측 모델은 실용적 측면과 학문적 측면에서 꿀벌군집이상현상과 관련된 개체 행동 규명에 기여할 것으로 사료됨 ○ 개체인식 자동 모니터링 시스템의 개발 적용을 통해 지속적인 연구 성과를 낼 수 있을 것으로 사료됨 ○ 외래 침입 해충의 생태 및 분포 범위 등에 대한 자료 확보를 통한 국내 생태계 영향 최소화 방안 도출 및 영농, 정책 제안 외래 침입 해충의 분포 범위 지도화 및 확대 예상도 제시를 통한 관리 방안 도출 ○ 외래 침입 꿀벌 해충의 조기 경보 시스템 개발을 통한 양봉 꿀벌 및 재래종 꿀벌의 보호는 생물다양성 보존 및 양봉 등 영세 산업 보호는 물론 화분매개자원의 보호를 통한 생태계 건전성 확보 ○ 말벌로 인한 양봉산업의 직접 피해는 년 2000억원 내외로 추정됨. ○ 등검은말벌 등 말벌 특이 유인물질의 개발 및 이를 통한 모니터링 기법 개발은 국제 시장 개척이 가능함. 				
중심어 (5개 이내)	기후변화	꿀벌군집 이상현상	사회성 행동	외래꿀벌천적	양봉기술대응

5. 영문 요약문

〈 Summary 〉

Purpose& Contents	<p>This proposed research focuses on the impact of climate change on normal social behaviors of honey bees such as hygienic behavior and colony level behavior and individual communications. This research also delves into the possible mechanisms of colony maintenance of honey bees at the physiological and ecological levels upon these pandemic effects. Although much evidence of climate change in beekeeping industries is manifest, the lack of scientific evidence and applications still unable beekeepers to deal with proper management in the apiaries. Therefore, the final aim of this proposed research is to find out the prominent evidence in bee colonies caused by climate change and application of this evidence to beekeeping management. Mechanisms of molecular neuroethology and behaviors such as nursing and foraging behaviors can be elucidated by expression levels of marker genes as well as diverse genes using NGS (Next Generation sequencing) technologies. In addition, this research also investigates the regional difference of biological activities of bee products such as honey, bee venom, and propolis, which might be linked with honey bee health and colony maintenance in certain areas. Finally this research also examine the effects of pathogens and other climate change-related with components such as nosema, acid rain, and fine dust on disease resistance and immune response of honey bees. Current multidisciplinary approaches to identify the impact of climate change on honey bee health and colony disorder will provide solid markers for better beekeeping strategies.</p>
Results	<ul style="list-style-type: none"> ○ Identification of the acetylcholinesterase 1 which can be used for molecular markers related with climate change ○ Transcriptomic, pathway and gene-set enrichment analysis (GSEA) of the nurse and forager bees under the suppressed and normal brood rearing condition, respectively, was finished ○ Transcriptomic, pathway and gene-set enrichment analysis (GSEA) of the pre-swarming, swarming and remaining (non-swarming) honey bee samples was finished ○ Construction of Drosophila models of Alzheimer's disease ○ Biological activities of 20 native Korean propolis samples <ul style="list-style-type: none"> - Propolis samples from Icheon and Chungju were more pronounced in the inhibitory activity of acetylcholinesterase (AChE) and BACE-1, the major causes of Alzheimer's disease, than propolis samples from either Australia, Brazil or China. - Propolis samples from Yangpyeong, Wonji, and Goryeong were more pronounced in the antioxidant activity than propolis samples from either Australia, Brazil or China. - Propolis samples from Icheon, Yangpyeong, Wonji, Chungju, Jeju, and Uljin were more pronounced in the antiproliferative

	<p>activity than an anticancer agent cisplatin toward three cancer cell lines.</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ Biological activities of 18 native Korean pollen samples Biological activities (BACE-1, Anti-AChE, antiproliferative, antioxidant, or antibacterial) of 18 native Korean pollen samples varied according to pollen examined. ○ Biological activities of a native Korean royal jelly sample Pretreatment of Saos-2 cells with 0.1 mg/ml of 57 kDa royal jelly (RJ) protein or 2 mM of NAC resulted in 79 and 77% protection toward UVB, respectively. The confocal microscopic observation revealed that the cells treated with 57 kDa RJ protein showed normal cell shapes and organelles being maintained. Pretreatment of Saos-2 cells with 0.1 mg/ml of 57 kDa RJ protein resulted in the significant increase in ALP activity from UVB induced cells. ○ System construction for the experimental manipulation of climate factors and individual based research ○ Establishment of a prediction model for the periodic and frequency changes of the external activities of the bees (<i>Apis mellifera</i> and <i>A. cerana</i>) according to climate factors (temperature, humidity, illumination, light, etc.) ○ Development and application of automatic individual recognition and behavioral monitoring system ○ Changes in food intake of honey bees affected by wind velocity ○ The effect of population size and temperature on the survival rate
Expected Contribution	<ul style="list-style-type: none"> ○ Honey bee stress due to the unexpected climate change can be predicted through the molecular markers (AChE1) and countermeasures can be prepared ○ Provide molecular markers for proacting the swarming through genetic information specific to swarming ○ Provide the scientific honey bee management system based on genetic information related to climate change and honey bee swarming ○ Expanded application of comparative genetic information to further agricultural research <ul style="list-style-type: none"> - The native Korean apicultural products (propolis and pollen) were more pronounced in the biological activity than those of Australian, Brazilian, and Chinese ones, although the activity varied according to collection site. - Development of local customized products will be needed. ○ The experimental analysis and prediction models on the honey bee activities according to changes in climate factors (temperature, humidity, wind, etc.) will contribute identification of individual behavior related to honey bee colony disorders in practical and academic aspects. ○ It is expected that more contributable results will be achieved through the application of the individual recognition automatic monitoring system.

Keywords	climate change	honeybee colony disorder	social behavior	apicultural managemen	exotic insect pests
----------	-------------------	--------------------------------	--------------------	--------------------------	------------------------

6. 본문목차

〈 목 차 〉

제 1 장 연구개발과제의개요	1
제 2 장 국내외 기술개발 현황	10
제 3 장 연구수행 내용 및 결과	18
제 4 장 목표달성을 및 관련분야에의 기여도	239
제 5 장 연구결과의 활용계획 등	243
제 6 장 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보	245
제 7 장 연구개발성과의 보안등급	246
제 8 장 국가과학기술종합정보시스템에 등록한 연구시설 · 장비현황 ..	247
제 9 장 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적 ..	249
제 10장 연구개발과제의 대표적 연구실적	250
제 11장 기타사항	257
제 12장 참고문헌	258

7. 본문

제 1 장 연구 개발 과제의 개요

제1절 연구 개발 목적

1. 기후변화에 의한 꿀벌의 건강, 군집행동, 개체 통신 등 정상적인 사회성 행동과 봉군 유지를 위한 생리, 생태, 외래해충, 그리고 다른 방화곤충과의 관계를 이해하는데 목표를 두고 있다. 최근 급작스런 기후변화는 밀원식물의 개화시기나 밀원의 부족을 야기할 수 있으며, 이러한 예측불허의 상황에서 꿀벌이 어떤 행동특성을 가지고 봉군을 유지하며, 적절한 양봉관리기술을 어떻게 적용하는가는 상당히 중요한 부분으로 작용하고 있다. 기후변화와 꿀벌군집이상현상에 대한 보고는 현재 힘을 실어가고 있는 상황이나, 많은 부분은 과학적인 근거가 많이 부족한 상황이다. 따라서, 이 연구의 최종목표는 기후변화와 꿀벌의 군집생활에서 나타나는 여러 표적을 현대 과학적인 접근방법과 전략으로 밝히며, 이러한 객관적인 증거들을 양봉기술에 적용함으로써, 향후 기후변화를 예측하여 안정화된 봉군관리에 적용하는데 그 의의가 있다.
2. 기후변화에 의한 꿀벌 봉군의 행동양상과 꿀벌의 대사 관련 유전자군의 유전적 접근법을 통한 분석 및 이들의 생리적 기능 구명한다.
3. 전사체, 단백체 data를 활용하여 분봉관련 유전자군의 선별한다.
4. 인간에 의해 초래된 지구온난화에 따른 기후변화는 농업생태계뿐 만아니라 사회 전반에 총체적인 변화를 야기할 것으로 예상되며, 특히 식물 종다양성 및 작물생산성은 기후요인에 따른 의존성이 높아 그 영향력이 클 것으로 예상된다.
5. 현재 한반도의 아열대화 기후대 변화에 대한 미기상요인들의 변화가 감지되고 있다.
6. 본 연구는 지역별 양봉산물의 성분 및 생리활성을 조사하여 향후 기후변화에 대한 기초자료를 제공함과 아울러 양봉산물의 지역 특성화 제품 개발에 그 목적이 있다.
7. 꿀벌 군집이상현상을 수만 또는 그 이상의 구성원으로 이루어진 복잡계(complex system)에서 개체 수준의 상호작용이 모여 창발된 속성으로 보고, 집단 역동성을 파괴하고 봉괴를 만드는 행동생태학적 메커니즘 규명하고자 한다.
8. 꿀벌 군집의 방화행동 정형 패턴을 분석하고 기후변화 요인에 따른 예측 모델을 도출하고자 한다.
9. 개체인식 시스템 구축을 통한 행동 패턴 모니터링과 먹이원 변인을 통제/조작 (manipulation) 등의 실험적 적용이 가능한 반자연상태 연구장 구축을 통한 개체-군집 정보 전달과 군집이상현상 메커니즘을 분석한다.
10. 기후요인, 병원체 등 환경요인에 포함된 군집이상현상 유발인자간의 시너지효과 분석 및 꿀벌 외역활동 양상에 미치는 역할 규명한다.
11. 등검은말벌 분포 예측 모델 개발 및 적용하여 기후변화 시나리오에 따른 분포 확대 및 추정 분포지도를 제시하며 내부 환경 모니터링 및 봉군 방어 행동 연구를 통한 말벌 공격에 대한 조기 경보 시스템을 개발한다.

제2절 연구 개발의 필요성

1. 꿀벌 산업의 경제적·산업적 가치

가. 꿀벌은 꿀과 밀랍, 화분, 로열젤리, 프로폴리스, 봉독, 수벌번데기 등 다양한 양봉산물을 생산할 뿐 아니라, 시설재배 과채류와 과수원의 꽃가루 수분을 촉진해 안정적 농업생산에 기여하고 있다.

(1) 국내에서 꿀벌이 농작물 수분에 기여하는 경제적 가치는 사과, 딸기 등 16개 작물에서 5조9천억 원으로 평가(한국양봉학회, 2008)하였다.

나. 국내 양봉 종사자는 4만명 이상이며, 꿀벌 봉군수는 200만군 이상으로, 약 3500억의 산물 소득과 그의 18배에 이르는 농작물 화분매개 경제효과를 유발한다(Jung, 2008).

다. 꿀벌은 가축으로써의 중요성 뿐만 아니라, 현재 100대 농작물 30-70% 가량의 수분을 위한 화분 매개체로써 기능하기 때문에 농업산업 및 식량산업 분야에서 중요한 기능을 하고 있다.

라. 사육규모(190만통)로 세계 11위, 벌꿀 생산(27,000톤)으로 세계 15위인 우리나라의 양봉 산물 시장 규모는 4,614억 원(한국양봉협회, 2012)이다.

2. 20세기 한반도의 기후변화 현황

가. 기온의 변화

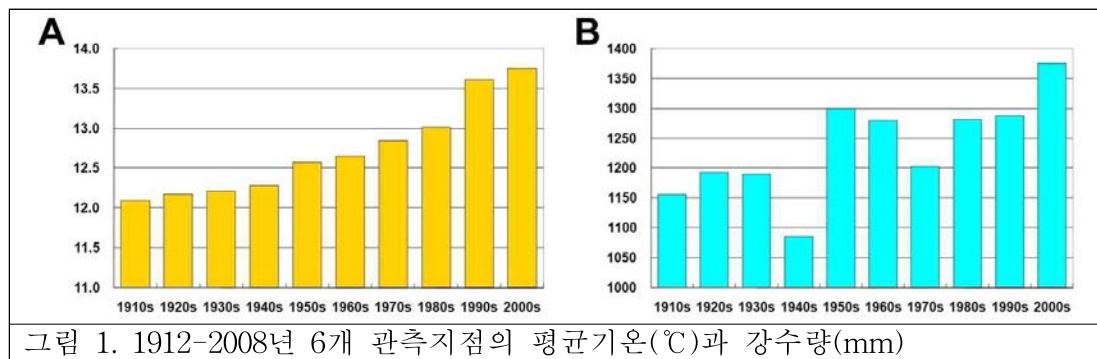
(1) 약 100년간(1912~2008년) 6개 관측지점(서울, 인천, 강릉, 대구, 목포, 부산)의 평균기온 상승률은 1.7°C 로 전지구 평균기온 상승률($0.74\pm0.03^{\circ}\text{C}$)에 비해 높으며, 기온상승값의 약 20-30%는 도시화 효과로 추정한다(그림 1A, 국립기상연구소 2009).

(2) 1950년대 이후에 기온 상승률은 20세기 전체 기간에 비하여 약 1.5배 이상 증가하였으며, 사계절 중 겨울에 가장 크게증가한 반면 여름철 평균 기온 상승 경향은 뚜렷하지 않다.

나. 강수의 변화

(1) 약 100년간(1912~2008년) 6개 관측지점의 평균 연강수량은 변동성이 매우 크고(최소 712 mm - 최대 1929 mm), 최근 10년 동안 20세기 초반 10년에 비해 약 19%(220mm) 증가하였다.

(2) 연 강수량은 계절적으로는 여름철 7-8월에, 공간적으로는 태백산맥 주변지역에서 집중 호우의 강도 증가에 의해 뚜렷하게 나타나고 있다. 반면 겨울철 강수량의 변화는 뚜렷하지 않으나 온난화에 의해서 강설에서 강우로 나타나는 비율이 점차 높아지고 있다(그림 1B, 국립기상연구소 2009).



3. 한반도의 기후변화 전망

가. 기온의 변화

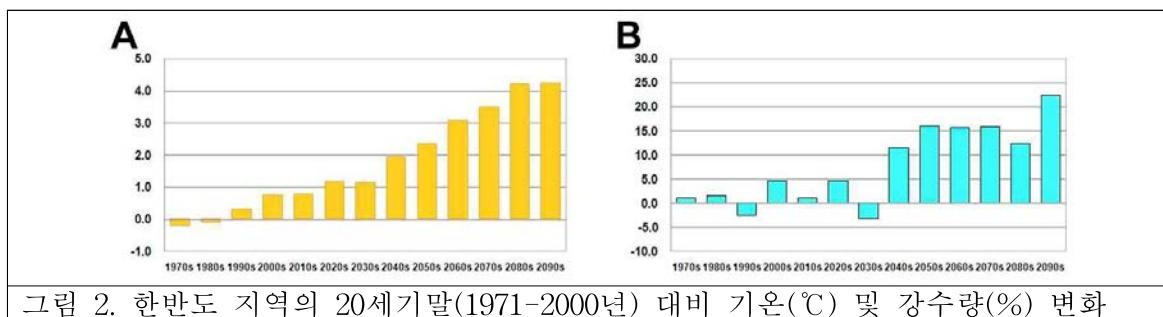
(1) 20세기 말(1971-2000년) 대비 21세기 말(2071-2100년) 한반도 연평균 기온은 4°C 상승하며, 특히 겨울에 두드러질 전망이다(그림 2A, 국립기상연구소 2009).

(2) 일최고기온보다 일최저기온의 상승이 뚜렷하여 기온연교차는 현재보다 감소할 것이다.

나. 강수의 변화

(1) 20세기 말(1971-2000년) 대비 21세기 말(2071-2100년) 한반도 연강수량은 17% 증가가 전망되며, 8월과 9월의 강수량 증가가 크다(그림 2B, 국립기상연구소 2009).

(2) 강수량의 시공간 변동성은 더 커질 것으로 예상되어 지역에 따라 가뭄 및 호우 현상과 같은 서로 상반된 강수현상이 심화될 가능성이 높다.



4. 기후 변화에 의한 꿀벌의 생태적 지위 및 생리적 대사 변화와 이에 따른 양봉농가를 비롯한 생태계 피해 현황

가. 군집붕괴현상(Colony collapse disorder, CCD)

(1) CCD(colony collapse disorder)로 불리는 꿀벌 군집의 붕괴 현상은 집단의 구성원인 일벌들이 말 그대로 ‘하루아침에’ 대량(한 군집의 50% 이상)으로 실종되는 현상이다.

(2) 최근 세계적으로 꿀벌 산업은 봉군집붕괴현상(Colony Collapse Disorder, CCD)이 발생하여 밀도가 감소하고 있으며, 국내에서는 바이러스 등 여러 질병이 만연하여 경제적 손실을 유발하고 있다.

(3) 우리나라에서는 아직 봉괴 수준의 현상은 밝혀지지 않고 있으나, 군집이상현상이 토종벌(*Apis cerana*; 동양종꿀벌)에 낭충봉아부패병(Sac brood virus)이 발생, 2010년에 피해율이 76.7%에 이르렀고, 현재도 발생 중이다.

(4) 2006년 양봉업자들의 보고로 북미지역에서 대량으로 발생한 것이 파악된 후 유럽, 남미 등 수많은 나라에서 심각한 피해가 발생하고 있는 것이 보고되고 있다.

(5) 미국에서는 1990년 이후 최소 25%의 꿀벌 군집이 이 현상에 의해 사라진 것으로 보고되고 있다.

(6) 국내에서도 매년 지역적인 밀도의 감소 현상이 발생하고 있다(그림 3).

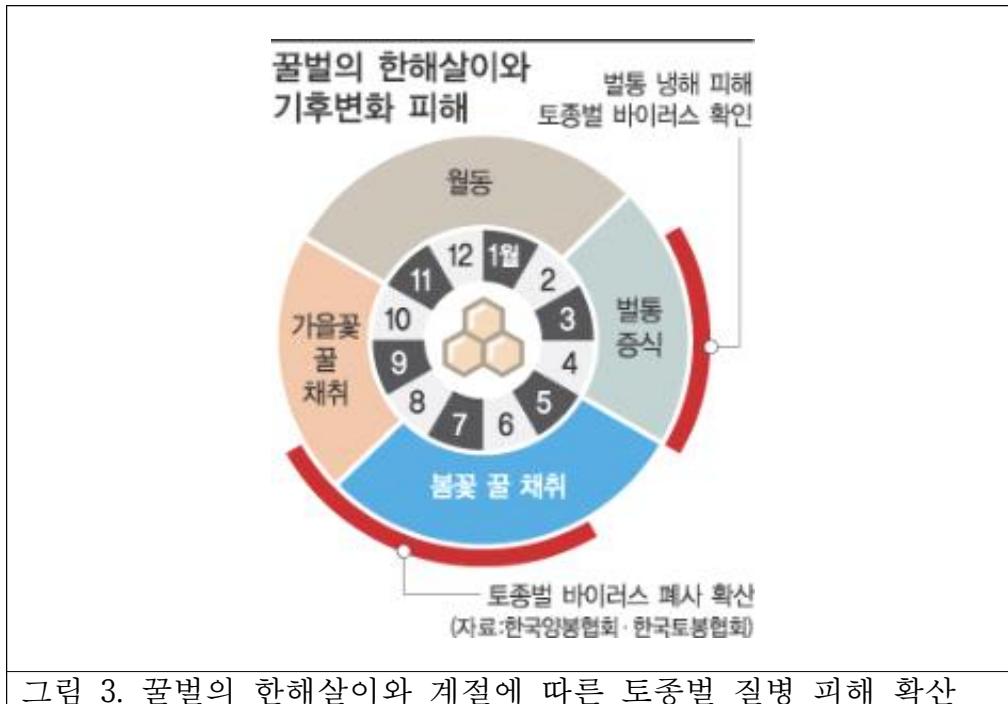


그림 3. 꿀벌의 한해살이와 계절에 따른 토종벌 질병 피해 확산

- (7) 2010년에는 낭충봉아부폐병 등으로 재래꿀벌의 75%가 폐사한 것으로 조사된 바 있으며 국내에서의 꿀벌질병 연구역량 강화 및 꿀벌연구 기능강화의 중요성이 대두되고 있다.
- (8) 2005년 이후 양봉 산업의 증가세가 뚜렷한 감소 현상을 나타내고 있는데 감소 원인은 불분명한 실정이다.
- (9) 꿀벌의 감소는 세계적 경제 위기를 초래할 수 있다. 꿀벌의 감소가 현재 년 \$5.7 billion의 경제적 손실을 가져올 것으로 추산된다.
- (10) 꿀벌의 감소는 식물 종자 형성을 감소시켜서 개체군의 감소를 초래 → 많은 식물종의 생존에 위협적인 요인으로 인식되고 있다.
- 나. 최근 기후변화 양상은 반복적인 혹한과 혹서를 동반하므로 이를 극한의 온도가 꿀벌의 개체생리 및 사회생활 전반에 미치는 영향 구명이 시급함. 따라서 기후변화에 의해 야기되는 극한 환경(고온, 저온, 건조 등) 하에서 외부의 화학적·생물학적 스트레스에 대한 방어체계(defense system)의 가소성에 대한 연구가 필요한 실정이다.
- 다. 극한 환경이 무독화체계(detoxification system) 및 면역체계(immune system) 자체에 미치는 영향과 이를 방어체계의 유도/활성화에 미치는 영향 구명이 필요하며, 이를 위해서는 혹한기(겨울)/혹서기(여름)와 같은 상반되는 계절적 요인이 방어체계에 미치는 영향 구명이 우선적으로 시도되어야 할 것으로 사료된다.
5. 최근 기후변화 양상은 반복적인 혹한과 혹서를 동반하므로 이를 극한의 온도가 꿀벌의 개체생리 및 사회생활 전반에 미치는 영향 구명이 시급하다. 따라서 기후변화에 의해 야기되는 극한 환경(고온, 저온, 건조 등) 하에서 외부의 화학적·생물학적 스트레스에 의한 방어체계(defense system)의 가소성에 대한 연구가 필요한 실정이다. 이를테면 극한 환경이 무독화체계(detoxification system) 및 면역체계(immune system) 자체에 미치는 영향과 이를 방어체계의 유도/활성화에 미치는 영향 구명이 필요하며, 이를 위해서는 혹한기(겨울)/혹서기(여름)와 같은 상반되는 계절적 요인이 방어체계에 미치는 영향 구명이 우선적

으로 시도되어야 할 것으로 사료된다.

6. 분봉은 봄철 여왕벌의 왕성한 산란으로 봉군이 강해지면 분봉열이 일어나 새로운 여왕벌을 산란하고, 종래에 있던 여왕벌이 일벌의 일부와 함께 본집을 떠나 새로운 집을 짓게 되는 현상이다. 분봉현상은 꿀벌의 번식을 위한 자연적인 현상이나 농가에서 관리하는 봉군의 상당부분을 잃어버리게 되므로 벌꿀 채취가 목적인 경우 양봉상 상당히 불리하다. 그러므로 분봉을 미연에 방지하여, 봉군을 강세로 유지한 채 많은 벌꿀 채집이 이루어지도록 하는 것이 상당히 중요하다. 분봉현상은 봉군밀도가 높은 시기에 예기치 않은 기후 조건에 의해 초래되는 화분/화밀 부족시 일반적으로 발생하므로, 분봉을 예측할 수 있는 문자마커는 밀원식물상의 변동 등과 같은 기후변화 요인이 봉세에 미치는 영향을 보다 효율적으로 추정하는데 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

7. 한반도의 기후변화 전망

가. 신기후변화 시나리오에 따르면 21세기말 한반도의 영향이 다른 국가들에 비해 더욱 민감하게 작용하여 아열대화 될 것으로 전망되고 있다.

(1) 기온은 3.4~6.0°C 상승하며 강수량은 17.3~20.4% 증가하여, 지구평균 상승폭인 기온 2.8~4.8°C, 강수량 4.5~6.0%에 비해 훨씬 더 민감함(기상청, 2011). 온도 상승은 특히 겨울에 두드러질 전망이며, 일최고기온보다 일최저기온의 상승이 뚜렷하여 기온연교차는 현재보다 감소할 것이다.

(2) 이에 따라 21세기말 무렵에는 제주도·부산·거제·통영·목포·완도·여수 등 남해안 지역이 아열대 기후지역에 포함된다.

(3) 또한, RCP4.5 시나리오에 따르면 미래(2077~2099년)에는 아열대 기후지역이 북위 36도에 이르고, RCP8.5 시나리오에서는 강원도 일부 내륙지역을 제외한 전국이 아열대 영향권으로 변화될 것으로 전망한다(국립기상연구소, 2011).

8. 기후변화에 따른 농업생태계 및 산림생태계 변화

가. 이와 같이 한반도 기후변화에 따른 잠재적인 영향은 직접적으로 남쪽부터 호온성 식물/작물로 대체될 가능성성이 크게 증가할 것으로 예측된다.

나. 이로 말미암아 농업생태계는 물론 산림생태계에 장·단기적 위해 요인으로 작용하여, 밀원식물 상에 커다란 변동을 야기할 것으로 예상된다.

9. 기후변화에 의한 밀원식물상 변화 및 꿀벌에 미치는 행동학적/생리학적 악영향은 벌꿀, 봉독, 프로폴리스 및 화분 등의 양봉산물의 성분 및 생리활성(항암, 항산화, 항바이러스 활성 등)에 영향을 미칠 것으로 예상되나, 이에 대한 국·내외적 연구는 거의 이루어진 바 없다.

10. 양봉(꿀벌)산업의 중요성

가. 꿀벌은 가축으로써의 중요성 뿐만 아니라, 현재 100대 농작물 30~70% 가량의 수분을 위한 화분 매개체로써 기능하기 때문에 농업산업 및 식량산업 분야에서 중요한 기능을 하고 있다.

나. 사육규모(190만통)로 세계 11위, 벌꿀 생산(27,000톤)으로 세계 15위인 우리나라의 양봉 산물 시장 규모는 4,614억 원(한국양봉협회, 2012)이다.

11. 군집이상현상(colony disorder)

가. 꿀벌 군집의 이상현상은 1900년대 초기 기록부터 발견되지만, 2000년 이후 전 세계적으로 확산 현상을 보이면서 심각한 문제로 대두되었다.

- 나. 군집이상현상 중 CCD(colony collapse disorder)로 불리는 꿀벌 군집의 붕괴현상은 집단의 구성원인 일벌들이 말 그대로 ‘하루아침에’ 대량(한 군집의 50% 이상)으로 실종되는 현상이다.
- 다. 2006년 양봉업자들의 보고로 북미지역에서 대량으로 발생한 것이 파악된 후 유럽, 남미 등 수많은 나라에서 심각한 피해가 발생하고 있는 것이 보고되고 있다.
- 라. 미국에서는 1990년 이후 최소 25%의 꿀벌 군집이 이 현상에 의해 사라진 것으로 보고되고 있다.
- 마. 국내에서도 매년 지역적인 밀도의 감소 현상이 발생하고 있다.
- 바. 2010년에는 낭충봉아부패병 등으로 재래꿀벌의 75%가 폐사한 것으로 조사된 바 있으며 국내에서의 꿀벌질병 연구역량 강화 및 꿀벌연구 기능강화의 중요성이 대두되고 있다.
- 사. 2005년 이후 양봉 산업의 증가세가 뚜렷한 감소 현상을 나타내고 있는데 감소 원인은 불분명한 실정이다.

12. 군집이상현상이 양봉산업에 중요한 이유

가. 경제적 산업적 가치

- (1) 미국에서만 년 \$15billion 이상의 농작물(곡물, 체소, 과일, 견과류 등)이 꿀벌에 의해 수분되고 있으며, 꿀 생산은 년 \$150million이다.
- (2) 꿀벌의 감소는 세계적 경제 위기를 초래할 수 있다. 꿀벌의 감소가 현재 년 \$5.7 billion의 경제적 손실을 가져올 것으로 추산된다.

나. 공익적 생태적 가치

- (1) 농작물의 수분매개 이상 문제가 되는 부분으로 야생 식물 군집의 많게는 90%가 꿀벌의 수분으로 번식하는 것으로 알려져 있다.
- (2) 꿀벌의 감소는 식물 종자 형성을 감소시켜서 개체군의 감소를 초래 → 많은 식물종의 생존에 위협적인 요인으로 인식되고 있다.

다. 의학적 가치

- (1) 천연항생물질 등의 의약품, 화장품 등 생산량이 감소될 수 있다.

13. 외래 침입종인 등검은말벌은 주로 중국, 베트남, 인도 등 아열대 지역에서 서식하는 종으로 2004년 국내에 유입된 후 급속도로 확산되고 있으며, 토종 꿀벌과 양봉 꿀벌을 사냥하는 꿀벌 킬러로서 1급 생태계 교란종으로 지정하였다(‘13, 환경부).

14. 꿀벌은 꿀과 밀랍, 화분, 로열젤리, 프로폴리스, 봉독, 수벌번데기 등 다양한 양봉산물을 생산할 뿐 아니라, 시설재배 과채류와 과수원의 꽃가루 수분을 촉진해 안정적 농업생산에 기여하고 있다.

가. 국내에서 꿀벌이 농작물 수분에 기여하는 경제적 가치는 사과, 딸기 등 16개 작물에서 5조9천억 원으로 평가하였다(한국양봉학회, 2008).

15. 최근 세계적으로 꿀벌 산업은 봉군붕괴현상(Colony Collapse Disorder, CCD)이 발생하여 밀도가 감소하고 있으며, 국내에서는 바이러스 등 여러 질병이 만연하여 경제적 손실을 유발하고 있다.

가. 우리나라 토종벌(*Apis cerana*; 동양종꿀벌)에 낭충봉아부패병(Sac brood virus)이 발생, 2010년에 피해율이 76.7%에 이르렀고, 현재도 지속 발생 중이다.

16. 우리나라의 경우 기후변화 영향평가를 위한 자료가 축적되어 있지 않아 꿀벌과 기타 화분매개 곤충류에 미치는 영향에 관한 자료가 극히 제한적이다.

- 가. 기후변화로 인한 꿀벌과 야생벌류의 생태계와 밀도변동의 부정적 영향에 관한 평가와 밀도감소 요인, 병리학적 변화를 추적, 분석하는 것이 중요하다.
- 나. 기후변화에 따른 꿀벌의 질병발생 변화와의 상관관계 및 분자생물학, 신경행동학적 메커니즘을 연구를 통해 꿀벌과 야생벌류의 적응방안을 마련하는 것이 시급하다.
17. 국내 양봉 종사자는 4만명 이상이며, 꿀벌 봉군수는 200만군 이상으로, 약 3500억의 산물 소득과 그의 18배에 이르는 농작물 화분매개 경제효과를 유발한다(Jung, 2008). 최근 부산 지역에 새로운 말벌이 나타났는데(Kim et al., 2006), 꿀벌에 피해를 주고 있으며, 최근 그 분포가 확대되고 있다(Jung et al., 2009). 국내에는 10종(아종포함)의 말벌이 분포하고 있으며(Kim et al., 2006), 양봉장에 출몰하는 것은 등검은말벌을 포함하여 7종으로 알려졌다 (Jung et al., 2007a, 2007b, 2009).
18. 등검은말벌은 양봉농가에 직접적인 피해를 준다. 양봉꿀벌을 포식함으로써 봉군을 폐사에 이르게 하며, 8~9월에 발생 최성기이기 때문에 본종의 공격으로 인해 봉세가 약군으로 전략하게 되어 월동을 하지 못하게 된다. 따라서 양봉농가에서의 등검은말벌을 방제하지 않을 경우, 양봉꿀벌 10봉군이 등검은말벌의 공격으로 폐사하는 데 1주일 정도 걸리며, 50군은 2~3주 내외에 폐사하는 것으로 보인다. 또한 사람의 노동력을 이용한 포획을 통한 방제를 하였어도 300봉군 중 약50봉군은 본종에 의해 폐사된 사례가 있다(Jung et al., 2009).
19. 꿀벌은 자연계의 가장 중요한 화분매개곤충 중 하나이며, 등검은말벌은 화분매개중인 다양한 곤충류를 포식함으로써 농작물의 화분매개 효율에도 영향을 미칠 수 있을 뿐 아니라 (Abrol, 1994), 야외 휴양객, 벌초 성묘객 등을 공격하여 인명 피해를 유발하기도 한다.
20. 말벌류의 피해를 방지하기 위해 양봉인들은 8월부터 11월까지 집중경계기간으로 설정하고 방제를 위한 다양한 방법을 시도하고 있으며, 착송농약법 등을 사용하여 주변 환경에 위해를 끼치기도 한다.
21. 등검은말벌에 대한 분류학적 보고는 Kim et al.(2006)에 의해 이루어 졌으며, 양봉 관련 기초 생물학적 정보가 Jung et al.(2009)에 의해 요약 정리된 바 있으나, 이 밖에 다른 연구는 진행된 바 없다. 따라서 이 종은 일일 약 10여 마리의 꿀벌을 공격하고(Tan et al., 2007), 일부 양봉장에서 15% 이상의 봉군이 피해를 받기도 하는 것으로 나타났다(Jung et al., 2009). 현재 등검은말벌에 대한 분포, 발생, 먹이범위 등 생태학적 정보와 관리 방안에 대한 연구결과는 전무한 실정이다.
22. Jung et al.(2009)에 따르면, 부산지역에서 분포가 확대되고 있으며, 야외 포식활동 시간이 길고 비행 속도가 빨라 기존의 국내 서식하는 말벌류와 다른 포식행동을 보이고 있음을 시사하였으며, 이에 따라 관리 방법의 연구가 필요함을 시사하였다. 또한 Abrol (1994)는 꿀벌 뿐 아니라 꽃을 방문하는 방화곤충을 포식함으로써 자연 생태계의 화분매개에도 영향을 미칠 수 있음을 보고하였다.

제3절 연구 개발 범위

- 본 연구의 주요 연구내용 및 방법은 기후 환경 변화 스트레스 요인 분석과 실내 실험 디자인 구축 및 신경생리학적 유전체 변화 연구와 계절별 실내외 기후 조건과 영양 상태에 따른 분자신경행동적 마커의 변화 연구 및 실내외 실험 결과를 바탕으로 봉군 사육 관리

현장 적용에 대한 관리 지침 마련하고, 현장 적용을 거친 꿀벌 시료의 분자신경행동학적 기능 비교한다. 또한 기후변화에 의한 꿀벌 군집이상현상을 수만 또는 그 이상의 구성원으로 이루어진 복잡계(complex system)에서 개체 수준의 상호작용이 모여 창발된 속성으로 보고, 집단 역동성을 파괴하고 붕괴를 만드는 행동생태학적 메커니즘 규명하고자 한다. 이러한 행동분석은 꿀벌 군집의 방화행동 정형 패턴을 분석하고 기후변화 요인에 따른 예측 모델을 도출하고, 개체인식 시스템 구축을 통한 행동 패턴 모니터링과 먹이원 변인 통제/조작(manipulation) 등의 실험적 적용이 가능한 반자연상태 연구장 구축을 통한 개체-군집 정보 전달과 군집이상현상 메커니즘 분석함으로써 실제로 기후변화에 의해서 꿀벌의 집단 행동이 어떻게 영향을 받는지 과학적인 방법으로 밝히게 된다. 또한 기후요인, 병원체 등 환경요인에 포함된 군집이상현상 유발인자간의 시너지효과 분석 및 꿀벌 외역활동 양상에 미치는 역할 규명하고자 한다.

2. 이러한 분자신경생물학적, 행동학적 메커니즘은, 계절별 봉군의 행동 양상(육아, 외역 등) 및 기온 변화에 따른 분봉열 발생 패턴과 관련된 유전자군의 발현 양상 분석을 통해, 꿀벌 내부적인 영향을 조사할 수 있다. 이러한 방법은 최근 발전되고 있는 NGS (Next Generation sequencing) 방법을 통해서, 기후변화와 계절적인 변화에서 꿀벌의 행동적응에 대한 분자생물학적 메커니즘을 밝히고자 한다. 본 주관연구에서는 또한 기후변화에 의한 특정 지역에서의 꿀벌의 밀도가 줄어드는 것을 과수원 및 토종벌 집산지역 및 산림 지역을 대상으로 여러가지 화분매개곤충의 종구성 변화를 추적함으로써, 꿀벌의 밀도 감소 추이와의 상관관계 및 기후변화와의 상호관계를 밝히고자 한다. 나아가 기후변화에 의한 지역별 및 밀원식물별 벌꿀, 봉독, 프로폴리스 및 화분을 분리, 수거하여 여러가지 생리활성의 차이를 비교하는데 포인트를 두고 있는데, 이러한 이유는 여러가지 꿀벌의 방어 물질이 기후변화에 의해서 어떤 영향을 받는지 또한 이러한 방어물질의 조성이 어떻게 달라지는지 조사함으로써, 전체적인 꿀벌집단의 유지와 어떤 영향이 있는지 파악하는데 중요한 단서를 제공할 수 있다. 본 외부연구는 현재 내부연구와 연계하여 기후 기온 변화의 요인과 꿀벌 주요 질병(노제마, 백묵병, 바이러스병 등)과의 감수성에 대한 원인을 분자적, 행동학적, 생태학적, 신경생물학적인 융합적 다각도의 원인을 규명함으로써, 기후변화와 꿀벌 군집이상현상에 대한 대책을 마련하고자 한다.
3. 본 연구는 유전자 측면에서 꿀벌 스트레스 진단을 시작으로 꿀벌 전체 전사체 분석을 통하여 육아 억제 및 분봉의 상황에 따른 분자생물학적 생리학적 변화를 거시적인 관점에서 종합적으로 확인하였다.
4. 이러한 연구 결과는 봉군 유지 및 관리에 필요한 기술 상품 개발에 있어 기초 정보를 제공할 것으로 예상되고, 뿐만 아니라 다른 농업 해충 방제 관리를 위한 연구에 확대 적용할 수 있을 것으로 판단된다.

5. 지역별 양봉산물 수집

- (1) 제주도를 포함한 한반도 전 지역을 대상으로 하여, 직접 양봉장을 운영하는 곳에서 양봉산물을 구입한다.
- (2) 양봉산물 : 프로폴리스(propolis), 화분(pollen), 벌꿀, 로얄젤리(royal jelly) 등.

6. 천연물의 약리활성

- (1) 식물은 상대적으로 인간에게 안전한 테르페노이드(terpenoids), 폐놀(phenols) 및 알칼로이드(alkaloids)와 같은 이차대사산물(secondary metabolites, secondary substances)을

함유하고 있으며, 이들 화합물들은 단독으로 또는 연합하여 약리작용을 나타낸다(Tang 과 Eisenbrand, 1992; Rates, 2001; Raskin 등, 2002; Wink, 2006).

- (2) 식물의 이차대사산물의 종류 및 함량은 식물의 종류, 지역, 채집시기 등에 따라 현저하게 다르다(Sukumar 등, 1991; Wink, 1993; Rates, 2001; Shaalan 등, 2005)
- (3) 따라서, 식물의 약리활성은 식물의 종류, 화학형(chemotypes), 식물 조직, 식물의 나이, 지리적 조건, 추출 용매의 종류 및 대상생물에 따라 크게 다르다(Rates, 2001; Wink, 2006).
- (4) 약리활성검정: 본 연구에서는 상기 양봉산물의 항산화·항바이러스·항치매·항세균·항암 등의 활성을 조사하였다.

7. 꿀벌 군집의 개체 수준의 조작적 실험이 가능한 기반 구축
8. 실험실-야외실험장-온실 기반 시스템 구축
9. 야외실험장(자연상태)과 온실(반자연상태)에서 봉군의 내부와 외부의 기후요인 자동 모니터링 시스템 구축
10. 봉군 내외부, 인공 먹이원에서 영상자료 녹화 시스템 구축
11. 인공 먹이원에 대한 개체 훈련과 군집 발달의 정상화
12. 연구개발을 위해 맞춤 설계-제작된 인공동지에 군집 적응 성공
13. 기후요인과 외역활동 데이터 수집 및 분석
14. 개체인식 자동 분석 방법론 도입 및 시작품 제작(영상 기반 꿀벌 추적 시스템 및 p-Chip 을 이용한 개체 행동 패턴 자동 모니터링 시스템 개발)
15. 방화행동 정형 패턴 모델 도출
16. 봉군 외부의 기후요인 변동에 따른 꿀벌 방화행동 변화 실험
17. 먹이원 환경 변화에 따른 꿀벌 개체의 방화행동 변화 실험
18. 개체인식 시스템을 이용한 일꾼들의 외역활동 연구
19. 영상 기반 꿀벌 추적 시스템 및 마이크로 2차원 태그를 이용한 개체 행동 패턴 자동 모니터링 시스템 개발
20. 개체인식 시스템을 이용한 일꾼들의 외역활동 연구
21. 모니터링을 통한 등검은말벌의 생태 연구, 분포 예측 모델 개발 그리고 말벌의 양봉장 침입을 탐지하여 경보할 수 있는 시스템 개발임

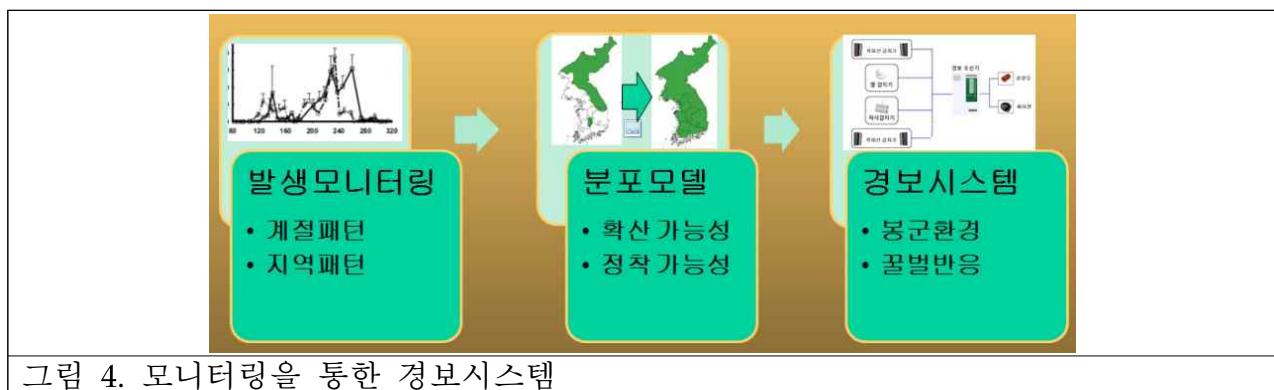
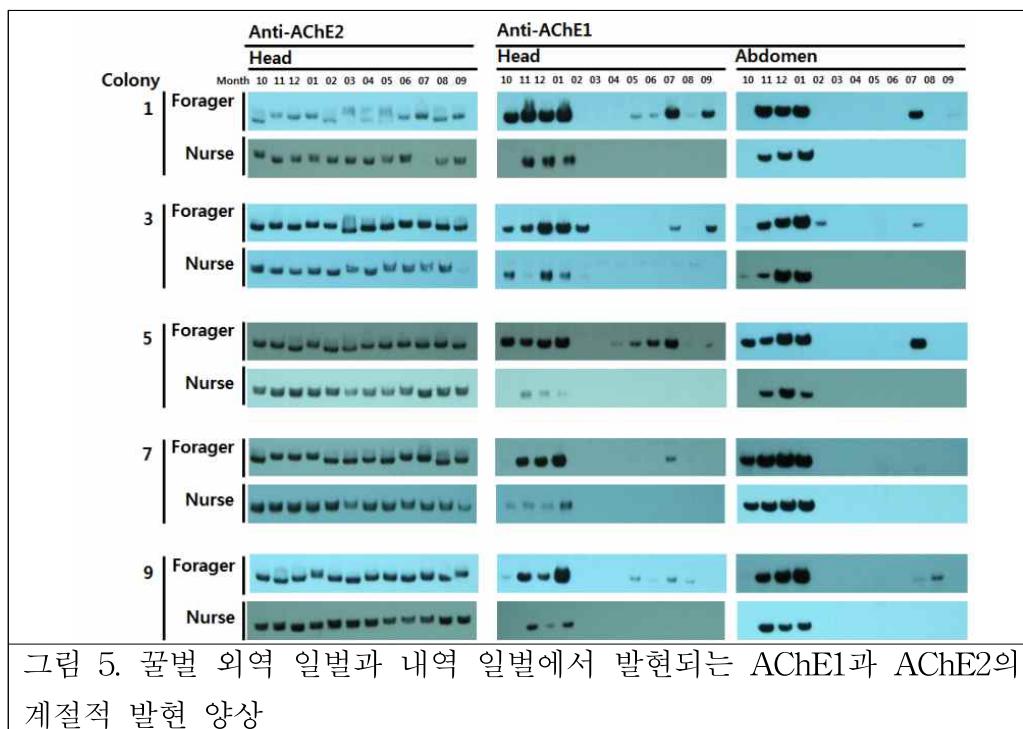


그림 4. 모니터링을 통한 경보시스템

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제1절 국내 연구 현황

- 국내에서 기후(기온)변화와 관련된 특이 유전자의 발현 양상에 대한 연구는 아직 활발하게 진행되고 있지 않으나, 최근 식물의 주변 온도를 감지하는 유전자의 발현 양상에 의해 개화 시기가 조절되는 연구 결과가 보고된 바 있으며(Lee 등, 2013), 곤충을 대상으로 발육영점온도와 상온에서 발현되는 특이 유전자의 변화 양상(최 등, 2013)을 보고하는 등 기후변화에 대응하여 생물체에서 나타나는 현상을 유전자 수준에서 규명하는 연구가 시작되고 있다. 최근 한국연구재단에서 지원하는 과제를 수행하고 있는 이시혁 교수팀에서는 꿀벌에서 계절 특이적으로 발현되는 아세틸콜린에스터라제1(AChE1)을 발견하였고(그림 1), 이 유전자의 발현이 꿀벌 사회성과 연관성이 있을 것으로 판단하여 이의 생리적 기능에 대한 연구를 수행하고 있다. 이를 제외하고 현재 국내에서는 꿀벌을 대상으로 한 기후변화 연구는 부재한 상황이다.
- 국내에서 분봉과 관련된 과학적 연구의 시도는 아직 없으나, 현재 양봉 농가에서 일벌수자의 급속한 증가, 산란 공간 부족, 여왕벌의 산란 중지와 새로운 여왕벌 유충의 발생 등의 분봉의 징후를 통해 본봉을 예측하는 수준에 머물고 있다.



- 갑작스런 기후변화에 의해 나타나는 유전자 변화를 포함한 꿀벌의 생체 변화에 대한 연구 역시 국제적으로 진행된 바는 없으나, 계절에 따라 insulin signaling (Ament 등, 2008)이나, juvenile hormone (Huang과 Robinson, 1995)의 변화 양상, 그리고 octopamine, serotonin과 같은 amine 농도 (Harris와 Woodring, 1992)의 변화 양상 연구가 진행되어 왔다.
- 분봉과 관련하여 1980~90년대에 여왕벌의 mandibular pheromone이나 tarsal gland 물질

이 분봉의 정후인 왕대(queen cup)의 생산이나, 여왕벌 보육 등 일벌의 분봉을 조절한다는 기초적인 연구가 있었으나(Lensky와 Slabezki, 1981; Winston 등, 1989; Winston 등, 1991), 그 후 전 세계적으로 심도있는 분봉의 과학적 근거에 대한 연구는 거의 없는 실정이다.

5. 화분의 항산화 활성은 화분에 존재하는 다량의 플라보노이드, 폴리페놀 물질들과 관련하여 연구가 진행되고 있으며, 화분은 루틴을 포함해서 인체에 유용한 13종의 피토스테롤 등 생리활성물질을 다량 함유하고 있다는 연구결과가 나왔다. 농촌진흥청에서는 식물의 화분에서 낭충봉아부패병을 일으키는 바이러스에 대해 항바이러스 활성을 갖는 알카로이드를 추출해 독성과 부작용이 없는 꿀벌 면역증강제를 개발하였다. 이 알카로이드 성분은 유채꽃·도토리꽃·밤꽃 등의 화분에서 추출한 것으로 항바이러스 작용을 통해 낭충봉아부패병 바이러스 증식을 억제하는 역할을 한다.
6. 조아제약에서는 주성분으로 꽃가루와 로열젤리, 맥아유, 꿀 등의 천연성분을 이용하여, 다양한 아미노산·미네랄·비타민·레시친·글루탐산에 의한 집중력 향상에 도움이 되는 제품을 개발하였다. 이렇듯 최근 화분을 이용한 연구로 항산화, 면역증강, 간 손상보호, 무기질 이용성 증진 등의 다양한 효능이 알려지고 있으나, 아직 화분에 대한 연구결과는 부족한 상황이다.
7. Ahn 등 (2004)은 국내의 칠곡·청주·고창·무주·포천·상주에서 수집한 프로폴리스의 에탄올 추출물의 항산화 활성을 조사하였다. 항산화 활성은 beta-carotene bleaching, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl free radical scavenging 및 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical cation decolorization 검정법을 이용하여 측정한 결과, 청주산과 무주산 프로폴리스의 에탄올 추출물은 상대적으로 강한 항산화 활성을 보였으며, 이는 높은 폴리페놀 함량과 관계가 있었다. 청주산 프로폴리스는 caffeic acid, kaempferol 및 phenethyl caffeoate과 같은 항산화 화합물을 다량 함유하고 있었으나, 포천산 프로폴리스는 다른 지역에서는 보이지 않는 화합물들을 함유하고 있었다.
8. 이와 같이 양봉 부산물에 대한 연구는 활발히 진행되어 오고 있었으나, 부족한 부분 역시 많은 편이다. 또한 중요한 것은 기후변화에 따라 어떻게 양봉 부산물들의 활성이 달라지고 어떻게 영향을 받게 되는지에 관한 선행연구는 국내 연구들에서 찾아보기 드물다. 천연물은 그 특성상 기후의 변화에 민감하게 되는데 천연물이 기후변화에 어떠한 영향을 받게 되는지, 그리고 생리활성물질의 효과가 증가되는지 감소되는지에 관한 연구가 필요하다.
9. 개체 행동 패턴 자동 모니터링 시스템 관련 공학적 기술은 현재 RFID 및 p-Chip 태그 및 리더들은 범용 부품 개념으로 판매되고 있으며 인식 거리가 10mm 미만으로 효과적인 모니터링을 위해 꿀벌 출입구의 크기를 제한할 필요가 있다.
10. 좁은 출입구로 인한 꿀벌 개체들의 행동 제한을 해소하기 위하여 출입구의 크기를 늘리고 자동으로 꿀벌을 추적하여 태그를 인식하는 시스템 개발이 필요하다.
11. 초소형 RFID 및 p-Chip 태그 및 리더가 상대적으로 고가여서 인식 가능 거리가 5~10cm 정도로 긴 영상 인식 기반 마이크로 2차원 태그 인식 시스템을 개발할 필요가 있다.
12. 군집이상현상은 군집의 내부에서 일어나는 구성원 간의 상호작용 그리고 둉지를 떠난 개체가 먹이원에서 겪는 경험과 의사결정에 미치는 영향 파악을 통해 접근할 필요성이 있다.

13. 먹이원에 대한 개체의 정보 전달과 구성원 간의 커뮤니케이션 메커니즘이 군집 전체에 미치는 영향이 중요한 진사회성 체제의 행동생태학적 특이성에 바탕을 둔 면밀한 실험 설계를 통한 원인 규명이 필요하다
14. 본 연구개발은 환경요인, 집단역동성, 개체변인과 행동생태학적 기제 등 통합적 규명에 도전하며, 개체차원에서 접근하는 방법론을 통해 파급력을 가진 성과를 도출하고자 한다.
15. 군집이상현상은 특정 인자에 의한 것보다는 다양한 인자들의 복합적 영향에 기인할 가능성이 크다. 따라서 이들 다양한 인자들의 독립적 영향-메커니즘 뿐만 아니라 복합/융합적 영향-메커니즘에 대한 규명도 필요하다.
16. 분자적 차원의 미시적 수준에서 행동학/생태학/진사회성 집단행동모델을 이용한 예측 등 거시적 차원들의 단계적 결합으로 구성된 연구방법론 도입이 유용할 것으로 사료된다.
17. 등검은말벌 국내 발생 현황 및 꿀벌에 대한 피해가 2008년에 국내 최초로 보고되었다(김, 이, 정, 2008).
18. 외래종의 침입 및 분포 확대 패턴 분석하였으며, 침입 외래종 등검은말벌의 생물적 특성의 일부를 연구하였다(정, 2012).
19. 토종 꿀벌과 양봉 꿀벌을 사냥하는 꿀벌 킬러로서 1급 생태계 교란종으로 지정하였다('13, 환경부).
20. 등검은말벌에 대한 분류학적 보고는 Kim et al.(2006)에 의해 이루어 졌으며, 양봉 관련 기초 생물학 정보가 Jung et al.(2009)에 의해 요약 정리된 바 있으나, 이 밖에 다른 연구는 진행된 바 없다. 따라서 이 종은 일일 약 10여마리의 꿀벌을 공격하고(Tan et al., 2007), 일부 양봉장에서 15% 이상의 봉군이 피해를 받기도 하는 것으로 나타났다(Jung et al., 2009). 현재 등검은말벌에 대한 분포, 발생, 먹이범위 등 생태학적 정보와 관리 방안에 대한 연구결과는 전무한 실정이다.
21. Jung et al.(2009)에 따르면, 부산지역에서 분포가 확대되고 있으며, 야외 포식활동 시간이 길고 비행 속도가 빨라 기존의 국내 서식하는 말벌류와 다른 포식행동을 보이고 있음을 시사하였으며, 이에 따라 관리 방법의 연구가 필요함을 시사하였다. 또한 Abrol (1994)는 꿀벌 뿐 아니라 꽃을 방문하는 방화곤충을 포식함으로써 자연 생태계의 화분매개에도 영향을 미칠 수 있음을 보고하였다

제2절 국외 연구 현황

- 꿀벌의 대사 및 영양, 면역 등 생물학 전반적 연구와 특이적 사회성 행동 모델 분석에 관한 연구는 서양벌을 대상으로 실험이 진행되었지만 기후변화요인에 따른 꿀벌의 생물학적 전반에 관한 연구는 전무한 실정.
 - 행동꿀벌을 모델로 한 연구는 1973년 Karl Ritter von Frisch가 꿀벌의 의사소통을 연구하여 노벨상을 수상하면서 단순히 동물학자들의 생태 연구를 뛰어넘어 고도로 지능화된 개체의 생체조절메커니즘을 이해하는데 적합한 모델로 연구되고 있으며 유전학을 기반으로 면역계, 대사계, 신경계 등을 연구하는데 모델 곤충으로 사용되어지고 있음
 - 꿀벌은 뇌와 중추신경계의 발달을 통해 행동을 조절하는 메커니즘을 이해하고, 뇌질환, 면역, 노화, 대사 등 유전자 기반연구 분야에 기여를 하고 있음. 이는 봉군의 조직화, 일벌들의 계급 분화, 일벌의 행동 발달의 과정을 기반으로 하여 다음과 같이 분류됨
 - 내분비 조절에 의한 사회성과 계급 분화

- (2) 계급 분화에 따른 학습 및 기억 발달
 (3) 유전자에 의한 계급분화 및 행동 조절
 (4) 척추동물과 유사한 꿀벌 중추 신경계에서의 시각과 후각 정보 프로세싱 과정을 연구하여 신경 메커니즘
 (5) 신경계의 변화와 행동 조절 관계에 대한 신경해부학 및 생리학적 이해 - 사회성 행동에 대한 연구로서 유전체 분석을 통한 사회성 곤충에서의 커뮤니케이션은 다방면으로 행동을 조절 할 수 있는 기능을 하고 있으며, 꿀벌의 행동 패턴이나 혹은 봉군 내외부를 통제 할 수 있는 커뮤니케이션에 대한 전반적인 연구가 현재 활발하게 진행 되고 있음.
- 다. 꿀벌의 안테나는 특이적인 기화성 화학물을 감지하는 기능을 가지고 있으며, 안테나에서 발현하는 단백질의 수는 107개로서 숫벌, 일벌, 여왕벌에 따라 발현 양상이 다름. 이러한 단백질의 발현 차이는 각 벌들이 행동학적으로 다른 행동을 보이는 데 기여할 것이라고 생각되며, 각 계급별로 가지는 단백질 발현 패턴은 다양한 행동, 사회성, 화학적 신호에 많은 기여를 한다고 보고되고 있음(그림 3. Fang Y et al, J Proteomics, 2012).

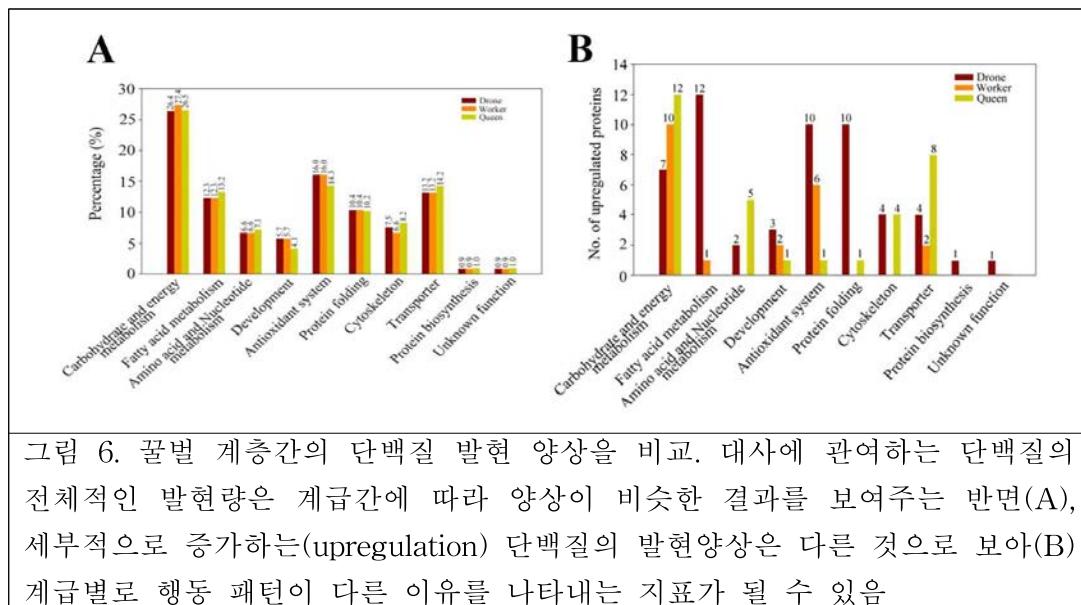


그림 6. 꿀벌 계층간의 단백질 발현 양상을 비교. 대사에 관여하는 단백질의 전체적인 발현량은 계급간에 따라 양상이 비슷한 결과를 보여주는 반면(A), 세부적으로 증가하는(upregulation) 단백질의 발현양상은 다른 것으로 보아(B) 계급별로 행동 패턴이 다른 이유를 나타내는 지표가 될 수 있음

- 갑작스런 기후변화에 의해 나타나는 유전자 변화를 포함한 꿀벌의 생체 변화에 대한 연구 역시 국제적으로 진행된 바는 없으나, 계절에 따라 insulin signaling (Ament 등, 2008)이나, juvenile hormone (Huang과 Robinson, 1995)의 변화 양상, 그리고 octopamine, serotonin과 같은 amine 농도 (Harris와 Woodring, 1992)의 변화 양상 연구가 진행되어 왔음
- 꿀벌의 독은 아피톡신(apitoxin)이라고 하며, 쓴 무색의 액체로 독의 활성 부분은 단백질의 복잡한 혼합물이다. 일벌의 복부에서 생산되는 아피톡신은 pH 4.5~5.5 산성 물질로서, 꿀벌은 침을 통해 독 0.1 mg을 주사할 수 있다. 꿀벌의 독은 항염증·진통효과뿐 아니라 고혈압·동맥경화증·정맥혈전증·혈전혈관염·동맥내막염 등에 치료 효과가 있으며, 2013년에 항HIV와 항암효과가 알려졌다. 멜리틴(melittin)은 독 웨티드의 52%를 구성하는 주성분으로서 강력한 항염증제로 알려져 있다. 웨티드인 아돌라핀(adolapin)은 2~5%를 구성하고 있으며, cyclooxygenase를 차단하기 때문에 항염증 및 진통 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 웨티드의 12 %를 포함하는 Phospholipase A2는 아피톡신의 가장 파괴적인 구성 요

소로서, 세포막을 생성하는 인지질 저해효소로도 알려져 있으며, 또한 혈압 감소의 원인이 되고 혈액 응고를 억제한다. 히스타민(histamine)은 0.5%를 포함하며 알레르기 반응에 관여하고 있다. 프로테아제 억제제는 2%를 포함하고 있으며, 소염제나 출혈을 멎추는 효과가 있다. 아피톡신은 에탄올로 비활성화 할 수 있다. 그러나, 1%의 인구가 벌침에 알레르기가 있는 것으로 추정되고 있어, 실제 인간에 적용하기 위해서는 아피톡신에 대한 더 많은 연구를 필요로 한다.

4. 꿀은 가장 널리 감미료로 사용하고 있고, 많은 문화에서 전통의학의 한 부분을 형성하고 있다(Bogdanov 등, 2008). 꿀은 항균·항바이러스·구충·항산화·항염증·항궤양·항종양 활성을 가지고 있는 것으로 알려져 있다(Molan, 2001; Bogdanov 등, 2008). 꿀은 적어도 181개 성분으로 구성되며, 기본적으로 당분 과포화 용액이고, 과당(38%) 및 글루코스(31%)를 포함, 수분 함량이 약 45.0%, 산 0.08%로 구성되어 있다(White, 1975; Bogdanov 등, 2008). 꿀의 주요 구성 요소인 설탕이 삼투압 효과로 항균 활성을 갖는 당이다(Molan, 1992a,b). 또한, 리소자임에는 강력한 항균물질이 함유되어 있는 것으로 알려져 있다. 먼저 1980년에 보고된 꿀의 항균 능력은, 꿀의 주요 생물학적 활성을 기여 하는 것으로 알려진 두 가지 중요한 효소는 꿀벌 유래 포도당산화효소와 꽃에서 유래하는 카탈라아제 있다. 이들 효소는 항균효능 및 기타 빛과 열 양쪽에 무관한 nonperoxide의 활동에 있다는 등 다양한 생물학적 기능을 이루는 벌꿀의 과산화 활성의 수준을 결정하는 데에 있어서 중요하며, 미생물의 성장을 억제하기도 한다.
5. 뉴질랜드에서 26종 꿀을 대상으로 하는 실험에서는, manuka (*Leptospermum scoparium*) 꿀이 대장균과 황색 포도상구균에 대해 높은 항균활성을 나타내었다(Molan, 2001). 또한 이집트산 꿀에 대한 최근의 연구에서는, 생체 외 및 생체 내에서 모두 살모넬라균보다 대장균에 대해 더 효과적인 것으로 나타났다. 꿀과 프로폴리스 모두의 항균 활성은 그람 양성 세균에 대해 기본적으로 효과가 있는 것으로 밝혀졌다.
6. 프로폴리스(propolis, bee glue)는 식물 수지부터 꿀벌에 의해 수집 된다(Marcucci, 1995). 프로폴리스는 항균·항산화·항궤양·항종양 활성을 가지고 있는 것으로 알려져 있다 (Marcucci, 1995; Burdock, 1998; Sforcin과 Bankova, 2011). 프로폴리스에는 300개 이상의 화합물들이 들어있으며, 폴리페놀·페놀알데히드·sequiterpene quinines·쿠마린·아미노산·스테로이드·무기화합물들이 프로폴리스의 성분으로 알려져 있다(Marcucci, 1995; Bankova 등, 2000). 프로폴리스의 채집 장소, 채집시기, 식물의 종류에 따라 조성물의 종류 및 함량에 차이를 보이며(Bankova 등, 2000; Salatino 등, 2011), 따라서 프로폴리스의 생물학적 특성 역시 매우 다양하다. 서양벌로 알려진 코카시안 (*Apis mellifera*) 벌만이 프로폴리스를 만들며, 아시아종의 꿀벌들은 프로폴리스를 만들지 못하는 것으로 알려져 있다 (Marcucci, 1995).
7. 터키 Mugla 성에서 채집한 45종 프로폴리스의 아세톤 및 디메틸суլ포시드 (dimethylsulfoxide, DMSO) 추출물 중, *Brucella melitensis*를 제외한 DMSO 추출물의 활성이 더 좋았고, *Shigella sonnei* 균주 및 그람양성균인 *Streptococcus mutans*는 모든 프로폴리스 추출물에 대해 민감하였다(Ugur와 Arslan, 2004). 프로폴리스는 세포 분열을 저해하여 세균의 증식을 억제 시킨다(Takasi-Kikuni와 Schilcher, 1994).
8. 프랑스의 쇼방 박사가 쥐를 이용한 동물실험과 사람에 대한 임상실험을 거치면서 화분의 영양학적 효능을 밝혀내면서 1970년대부터 제약원료로서의 연구가 시작되었다. 스웨덴의

AB 세르넬 SA사는 다년간의 연구 끝에, 화분은 사람의 체내에서 알레르기를 일으키는 알레르겐 독소를 지닌 스포로폴레닌이라는 유기물 껍질로 둘러싸여 있는데, 그 속에 신비로운 에너지로 여겨졌던 물질인 천연 에너지 결정체가 활성상태로 들어있음을 밝혀냈다. 이후 AB 세르넬 SA사는 수십년의 연구 끝에 신비의 생명물질 써니틴을 추출하는데 성공하였다. 이는 천연활성상태의 정핵세포 추출물로서 다양한 영양소와 생명유지 및 활력에 필연적인 활성인자는 물론 임상결과로도 확인되었다. 그 중 하나가 루틴으로, 인체에서는 모세혈관까지 침투해 혈액 순환을 왕성하게 하고 혈관 보강작용 및 뛰어난 생리 활성작용을 하는 것으로 알려졌다. 또한, 써니틴에는 호르몬 물질을 비롯해 항바이러스 및 항암 물질, 각종 효소, 다양하고 풍부한 비타민, 로열젤리의 10~17배에 달하는 아미노산군이 함유되어 있으며 간뇌세포를 부활시켜 인간 노화를 현저히 늦춰주며 새로운 세포의 생성을 활성화시킨다는 연구결과가 나왔다.

9. 꿀벌 군집이상현상을 규명하기 위해 일부 선진 국가에서 범정부적 노력이 이루어지고 있지만, 개체가 아닌 집단 수준에서 일어나는 현상 파악 등 피상적 접근에 그쳤다. 즉, 봉군의 붕괴에 영향을 미칠 수 있는 원인(what)의 개연성에는 접근하고 있지만, “어떻게(how), 왜(why) 이 현상이 일어나는가?”에 대한 통합적이고 설득력 있는 모델을 도출하는 데는 실패하고 있다.
10. 꿀벌 군집은 불임 일꾼들(암컷), 여왕 그리고 수컷들로 구성된 초유기체(super-organism)이며, 인간의 농사를 돋는 부지런한 일꾼이자 환경의 지표이며 인간과 공생을 포함해 진화적 성공담을 자랑하는 생물종이다.
11. 꿀벌의 체제는 가장 하부 단위인 개체 간의 상호작용이 집단 현상을 창발해 내는 하나의 복잡계(complex system)이다. 그동안의 세계적 연구 추이는 개체가 아닌 집단 수준에서 일어나는 현상 파악이 대부분을 차지해 왔다.
12. 등검은말벌 발생국 프랑스의 발생 현황, 확산예측, 생태 및 방제 기초 및 응용 연구 진행되었다.
13. 등검은말벌의 AIS 특성을 연구하였다(Villemante 그룹, 프랑스).
14. 등검은말벌은 북부 동남아, 홍콩 등 중국 남부지역이 원산지로 알려진 종으로 인도 북부 등지에서 생활사, 포식범위, 꿀벌에 대한 공격 행동 및 피해 등이 연구되었다(Abrol, 1994).
15. 이 종은 프랑스 남서부 지역에 2004년에 같은 종이 침입하여 점차 분포가 확대되고 있으며, 이에 따른 양봉 산업에 타격을 주고 있다. 현재 프랑스에서는 프랑스 국립자연사박물관 연구팀이 주도적으로 이에 대한 연구를 진행중이다(Villemante et al., 2008). 그 연구범위는 분포 지역의 확대, 꿀벌에 피해, 꿀벌의 방어 행동, 등검은말벌 방제를 위한 트랩 개발 및 기타 방제 기술 개발 등 응용적 측면과 기본 생물학 특성에 대한 연구가 동시에 진행 중이다. 그 결과 Perrard et al.(2009)는 등검은말벌의 일주기 활동, 연간 개체군 크기의 변화, 먹이의 구성에 대한 개략적인 결과를 발표하기도 하였다. 이에 따르면 등검은말벌의 가장 중요한 피식자는 꿀벌이었으며, 4월 이후 월동 여왕벌의 벌집 짓기를 시작하고, Abrol(1994)의 보고와 마찬가지로 등검은말벌의 포식활동은 아침 5시 경부터 오후 10시까지 이어지는 것으로 보고하였다. 또한 Tan et al.(2007)는 동양종꿀벌보다 서양종꿀벌이 등검은말벌의 공격에 더 취약하며, 일일 평균 10마리 이상이 피해를 받았으나 동양종꿀벌은 일종의 행동방어 능력이 있음을 보고하였다. 외국에서도 등검은말벌에 대한 연구결과

는 많이 집적되지 않았다.

제3절 국내·외 연구현황 비교 및 필요 연구 분야

- 국내외 연구는 활발히 진행되고 있는 것처럼 보이나, 국내에서의 연구 성과는 국외에 비해 미미한 편이다.
- 남미(특히, 브라질), 지중해 연안 국가, 유럽 등에서는 식물별, 지역별로 양봉산물의 외형, 생리활성물질의 종류 및 함량 등에 따라 양봉산물을 체계적으로 분류하고 있다.
- 국내에서는 외국과 비교하여, 어느 지역에서 생산되어지는 양봉산물들이 어떤 효과가 있으며 생리활성 효과의 비교와 같은 실험은 거의 없어, 품질관리 가능한 원료물질 확보가 어려운 실정에 있다. 지역별에 따른 생리활성이 구명된다면 지역별 맞춤형 상품화가 가능하리라 생각된다.
- 특히, 국내의 경우 외국과 비교하여 기후변화에 따라 양봉산물들의 생리활성 물질들이 어떻게 변화되고 변형이 되는지 연구가 이루어 진 바가 거의 없다.
- 외국(특히 인도)에서는 미국 FDA 등 제품 등록 유경험자들이 많아 미국 시장 진출이 활발하나, 국내의 경우에는 경험자가 거의 없어 미국 시장 진출에 어려움이 많다.

표 1. 연구별 국내 및 국외 기술

구 분	국외(%)	국내(%)	비고
원료물질 탐색 기술	100	50	지역별, 식물별 원료물질 확보 기술
품질관리	90	70	양봉산물의 출처가 불분명하여 품질관리가 어려운 실정
활성분체 탐색 및 동정 기술	100	100	국내의 기술은 양호하나 양봉산물에 대한 연구 미흡
양봉산물 제형화 기술	90	60	특히 수용성 프로폴리스 제조 기술 등 제형화 기술 관련
국내 제품 등록 능력	90	60	양봉산물의 산업화 미흡
국외 제품 등록 능력	90	60	미국 FDA 등 외국에서의 제품 등록 유경험자 부족
유효성 및 독성 검증	100	80	GLP 기관
기후변화에 따라 양봉산물들의 생리활성	70	20	북미지역, 유럽, 일본, 중국
지재권 확보	100	60	북미지역, 유럽, 일본, 중국

- 양봉 환경 및 말벌 환경이 상이한 한국에서 등검은말벌의 꿀벌 봉군 위해 요소 및 위해성 분석이 필요하다.
- 상위 포식자 군에 속하는 말벌 (특히 등검은말벌)의 먹이 범위 연구를 통한 국내 화분매개곤충에 대한 위해성 평가가 필요하다.
- 등검은말벌의 양봉 봉군 침입시 봉군 행동 연구를 통한 무인 감시 및 조기 경보 시스템 개발이 필요하다.

표 2. 국내 및 국외 연구내용 및 필요연구분야

외국	국내	필요연구분야
중국과 동남아지역의 분포가 알려짐 프랑스에서 신규 침입 지역과 분포 확대 모니터링이 이루어지고 있음. 이를 통한 분포 예상지도가 작성 중.	국내 부산 봉래산 주변에서 채집된 이후 지역 양봉장으로 확산되고 있으나 분포 지역에 대한 구체적 정보 없음. 국내 분포에 관한 자료 부족하고 개체군 동태에 관한 연구 미진.	분포 및 개체군 동태 조사
등검은말벌의 기초 생물학, 개체군 동태, 꿀벌공격 행동, 먹이 범위 연구됨.	기초 생물학, 꿀벌 공격 및 방어 행동 연구 안됨.	꿀벌 공격 및 방어 행동 연구
꿀벌 보호를 위한 양봉장 트랩 효율 및 관리 방안 개발 중.	등검은말벌 관리를 위한 연구 전무	관리 방안 개발

제 3 장 연구 수행 내용 및 결과

제1절 1세부: 기후변화와 질병 및 독성물질 등의 스트레스 요인들에 의한 꿀벌의 분자신경행동학적 변화 메커니즘 연구

1. 기온, 기후, 질병, 꿀벌해충, 영양 등 스트레스 관련 특이 유전자군의 발현 양상 분석

가. 꿀벌(성충, 유충)의 해충 인공 감염 및 인공 사육 시설 구축

(1) 꿀벌 질병의 주요 원인으로 알려진 응애 (*Varroa mite*)를 인공 감염 (그림 8, 9)시켜 꿀벌의 면역유전자 및 항균펩타이드의 발현 변화를 *Apis* 속의 두 종 (*Apis mellifera*, *Apis cerana*)을 대상으로 분석하였다(그림 10~12). 부화 후 7~8일이 경과한 서양벌 및 토종벌 유충에게 응애를 감염시키고, 실험실 조건에서 사육하며 접종 12시간, 24시간까지 대조군의 샘플과 함께 수집하였다. 이들 유충 및 성충에서 응애가 감염백터인 DWV를 검출하기 위하여 DWV RNA 중합효소에 특이적으로 결합하는 프라이머를 이용하여 RT-PCR을 수행하였고, 또한 바이러스 복제 특이 RNA 가닥을 검출하기 위해 5' 말단에 tag 시퀀스를 추가한 프라이머로 cDNA를 합성하여 qRT-PCR을 수행하였다. qRT-PCR 결과 동양벌, 서양벌에서 mite challenge 샘플군의 DWV증식이 심화되었음을 관찰하였다.

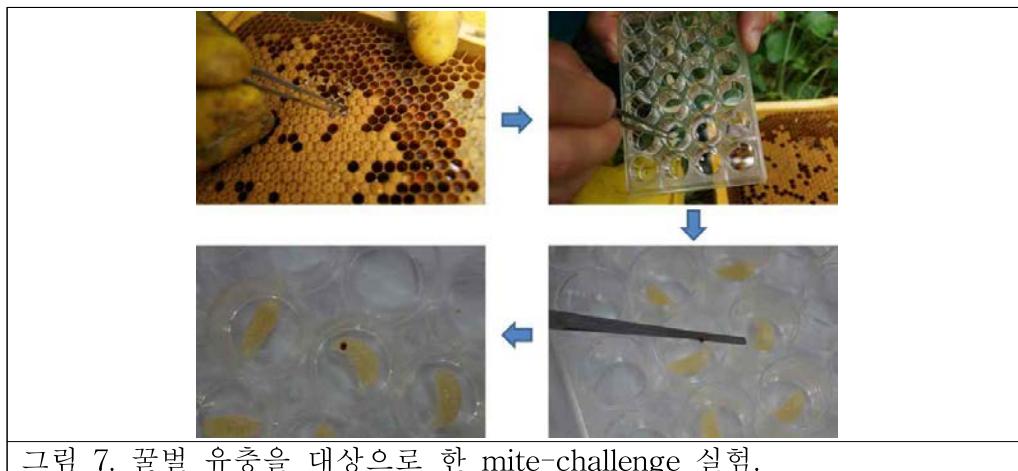


그림 7. 꿀벌 유충을 대상으로 한 mite-challenge 실험.



그림 8. 꿀벌 성충의 mite-challenge 실험.

나. 응애 감염에 대응하는 꿀벌 면역관련 유전자 발현 변화 분석

(1) 최근 국내 토종벌의 90% 이상이 낭충봉아부패병에 걸려 폐사한 것으로 알려져 있다. 또한 꿀벌 응애가 매개하는 서양벌의 DWV에 의한 바이러스 질병의 피해는 심각한 수준에 이르고 있다. 하지만 바이러스 질병으로 현재 예방 및 방제에 대한 아무런 과학적 연구가 이루어지지 않고 있는 실정이다. 또한 곰팡이성 병원균인 노제마균에 의한 피해

도 심각한 것으로 알려져 있는데 이에 대한 서양벌 및 토종벌의 면역방어 시스템에 대한 이해가 매우 부족하다. 서양벌의 경우, 2000년대 이후부터 꿀벌 CCD (군집붕괴현상)에 의한 농가들의 피해로 인해 국가적으로 꿀벌의 질병 방제 연구에 대한 많은 관심이 있어 다양한 연구 결과들이 보고되어 오고 있다. 이를 바탕으로 토종벌의 면역관련 유전자를 동정하기 위하여 서양벌의 면역 관련 유전자 시퀀스를 이용하여 유사성 검색을 통해 토종벌 내에서 관련 유전자를 연구하여 토종벌의 면역관련 유전자들의 시퀀스를 확인할 수 있었다. 대체적으로 서양벌과 비슷한 개수의 면역관련 유전자를 발현하는 것으로 보이지만, 몇 가지 유전자의 경우 여러 카피가 존재하는 것으로 보아 두 종간 면역방어 시스템에 차이가 있을 것으로 예상된다. 하지만 mite-challenge 실험을 통해 병원균에 대응하는 면역관련 유전자 및 항균 웹타이드의 발현패턴은 상당히 유사한 것으로 나타났다. 하지만 각각의 유전자 발현정도는 대조군에 비해 다른 발현률을 보여주고 있는 것으로 보아 직접적인 발현을 비교할 순 없지만 두 종간 유전학적 차이는 질병에 대한 서로 다른 민감성을 보이는 데에 중요한 이유가 될 것으로 생각된다(그림 10~13).

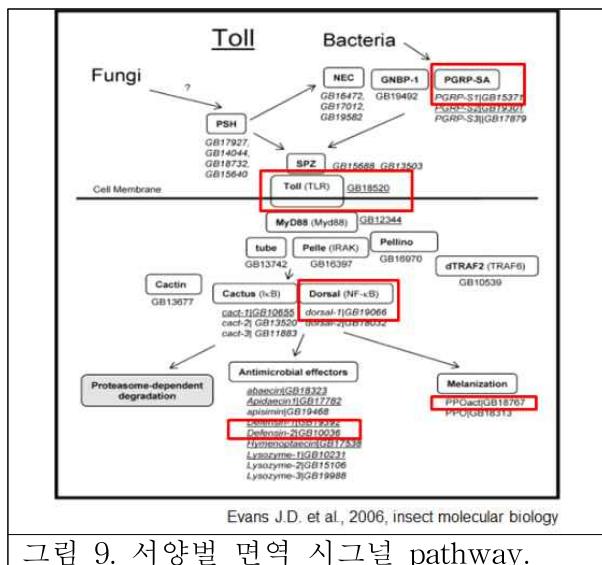


그림 9. 서양벌 면역 시그널 pathway.

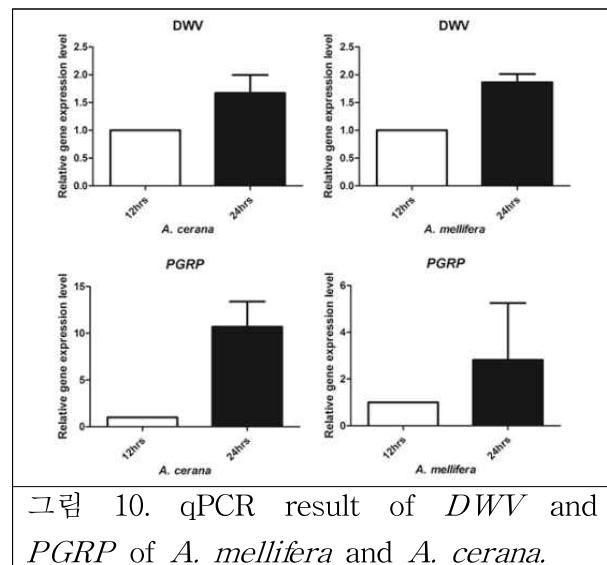


그림 10. qPCR result of *DWV* and *PGRP* of *A. mellifera* and *A. cerana*.

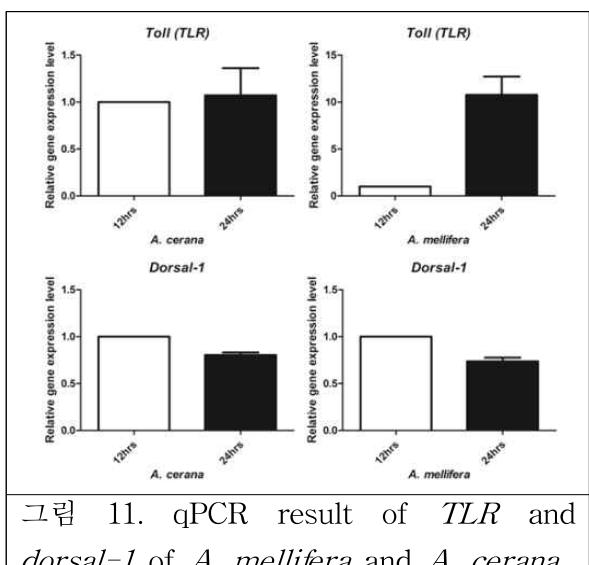


그림 11. qPCR result of *TLR* and *dorsal-1* of *A. mellifera* and *A. cerana*.

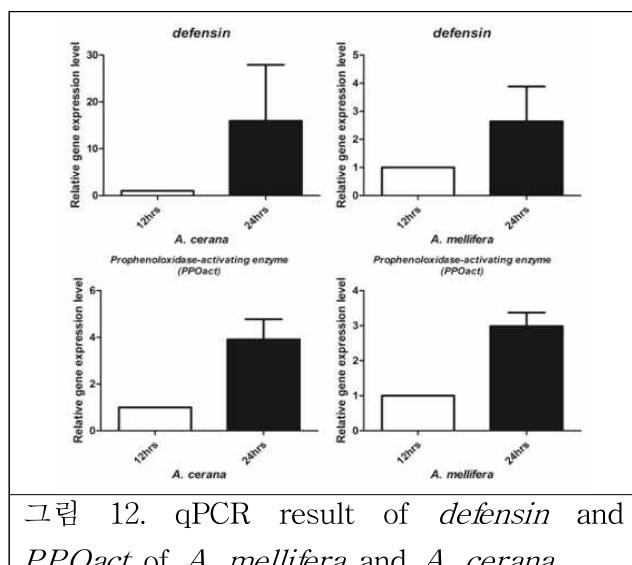
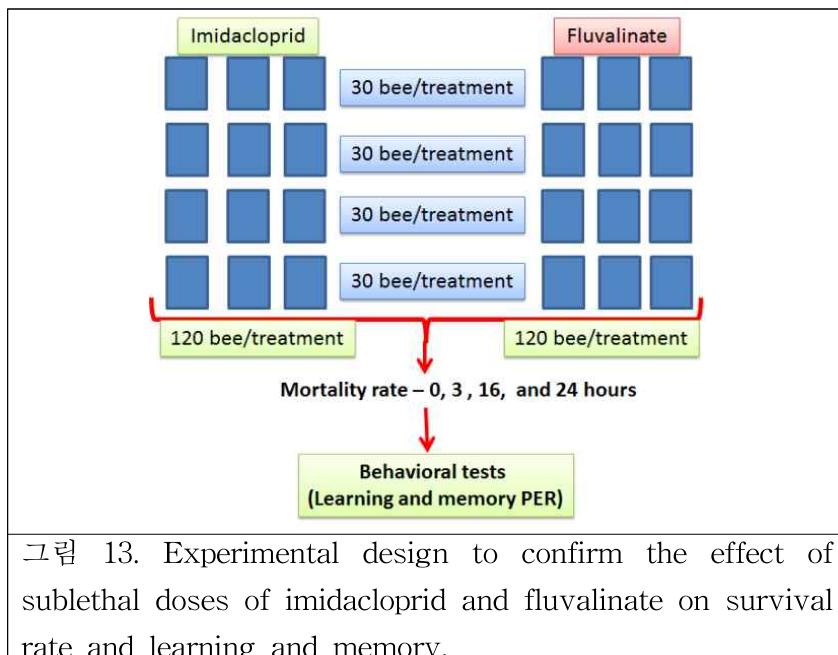


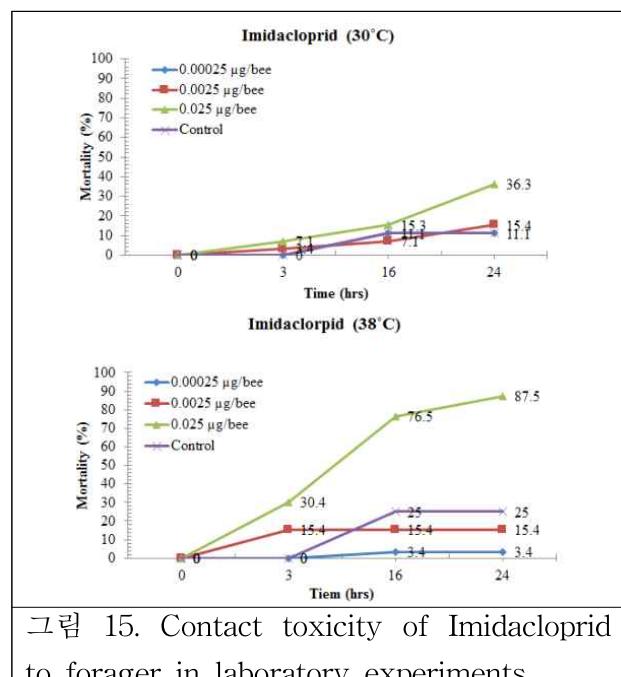
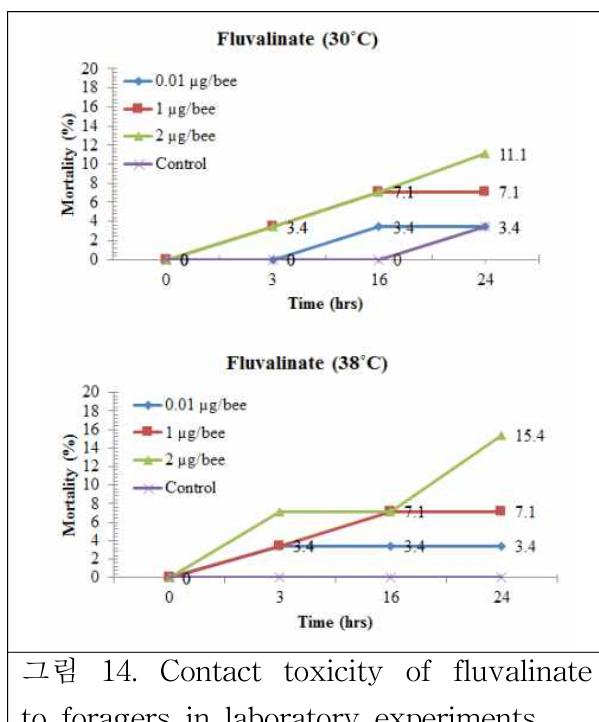
그림 12. qPCR result of *defensin* and *PPOact* of *A. mellifera* and *A. cerana*.

2. 기후변화 요인에 의한 스트레스 관련 물질에 따른 꿀벌의 생리 및 행동 변화 연구

가. 살충제 및 살비제 등 스트레스 물질 처리에 따른 꿀벌의 수명 변화: 최근 기온의 상승으로 인해 개체수가 증가한 해충을 제거하기 위해 쓰고 있는 neonicotinoid계열의 살충제와 살용애제는 꿀벌의 생리적 변화를 일으킨다고 알려져 있다. 본 연구는 대표적인 살충제인 imidacloprid와 살용애제인 fluvalinate를 꿀벌에 처리한 후 생존율을 측정하였다(그림 14).



나. 또한 기후변화에 따른 스트레스 요인에 대한 꿀벌의 생리적 대응을 확인하기 위해 스트레스원의 처리 후 30°C 및 38°C 조건으로 실내 사육을 진행하였다.



다. Imidacloprid와 미량으로도 꿀벌의 수명에 큰 영향을 주고 있음을 관찰하였으며(그림 15), 응애퇴치제인 Fluvalinate의 경도 미미하지만 꿀벌의 수명을 줄일 수 있는 것을 확인

하였다(그림 16). 하지만 기온 상승을 가정한 꿀벌 사육 온도를 높인 경우 imidacloprid의 꿀벌 사충율은 30°C에 비해 약 2.5배 증가하였음. 이는 스트레스원의 민감도가 온도 상승으로 인해 매우 높아졌음을 의미하거나 온도 상승 역시 하나의 주요 스트레스원으로 작용하고 있는 것을 시사한다. Fluvalinate 또한 온도상승에 따라 꿀벌 수명에 미세한 영향을 주고 있다. 응애퇴치 목적으로 쓰이는 농약성분이 꿀벌의 생리 변화도 영향을 미치고 있으므로 적정한 농도 및 사용량을 권장하는데 본 연구의 자료가 중요하게 쓰일 것이라고 사료된다.

3. 행동 실험을 통한 온도 변화에 따른 스트레스원에 대한 민감도 분석

가. 위의 사충률 실험과 동일한 방식으로 두 농약성분이 꿀벌의 행동에 미치는 영향을 확인하기 위하여 knockdown 효과 및 Proboscis extension reflex (PER) 실험을 온도를 다르게 하여 확인하였다(그림 17). Fluvalinate의 농도를 두 가지로 나누어 꿀벌에 처리한 후 온도 또한 두 가지 경우로 나누어 꿀벌의 knockdown 효과를 관찰하였더니 저농도의 fluvalinate처리는 온도 상승에도 knockdown 효과가 나타나지 않는 반면, 고농도의 농약 성분 접촉은 온도 상승에 따라 knockdown 효과 시점이 3배가량 빨라짐을 확인하였다(그림 18). 이는 온도 변화가 외부 유해환경 자극에 대한 민감도를 높이는 역할을 하고 있음을 유추할 수 있다.

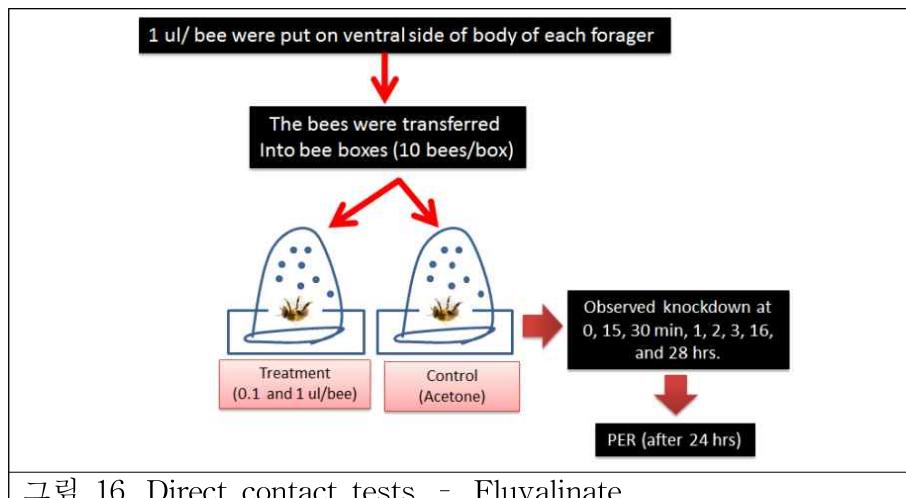
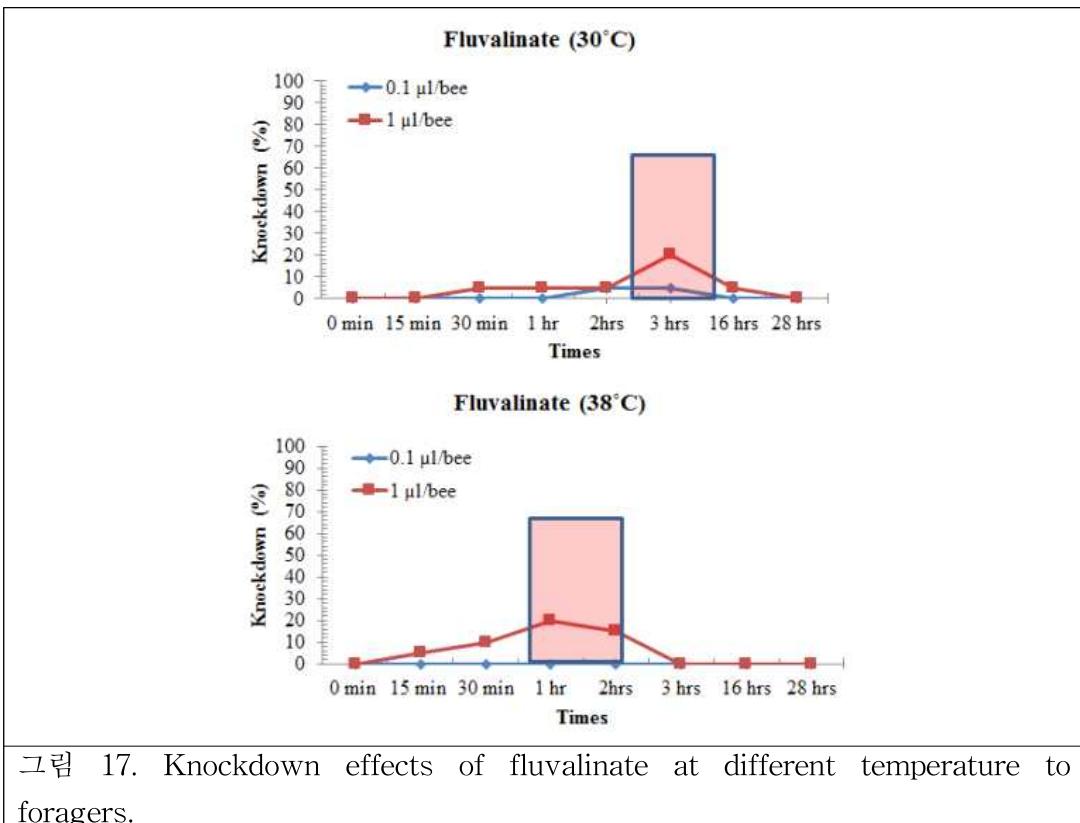


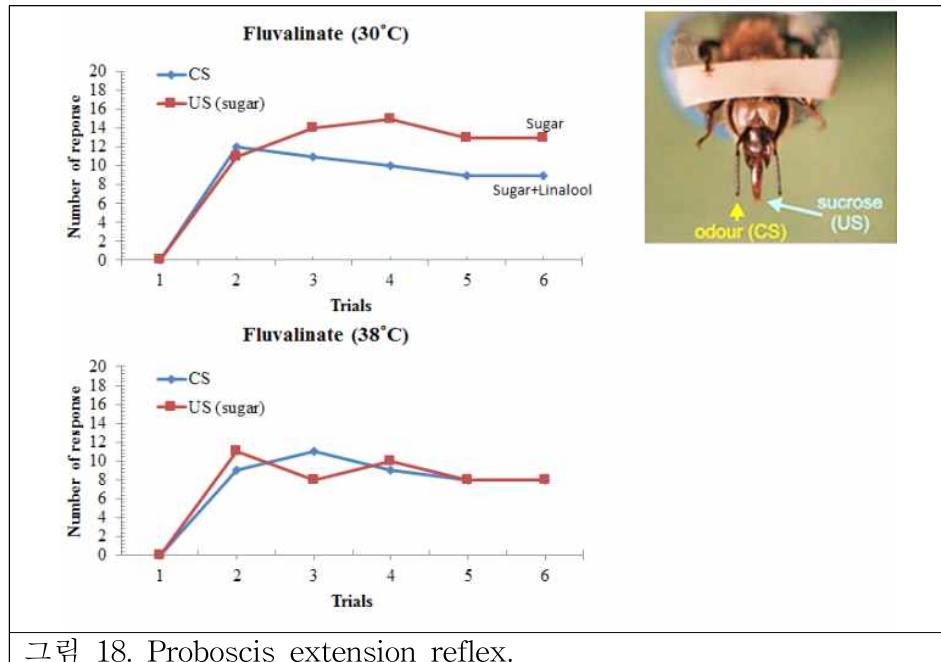
그림 16. Direct contact tests - Fluvalinate.

나. 스트레스 요인에 따른 꿀벌의 학습 및 sucrose 민감도 측정(그림 13): 꿀벌의 학습기억력 측정 실험으로 사용하는 Proboscis Extension Reflex (PER) 실험을 통하여 환경의 변화에 따라 꿀벌의 먹이에 대한 학습 능력 및 민감도 유지에 관하여 알아보았다. 스트레스 원의 자극에 대한 꿀벌의 변화는 온도변화에 따라 학습 능력 및 민감도에 영향을 주고 있음을 관찰하였다.

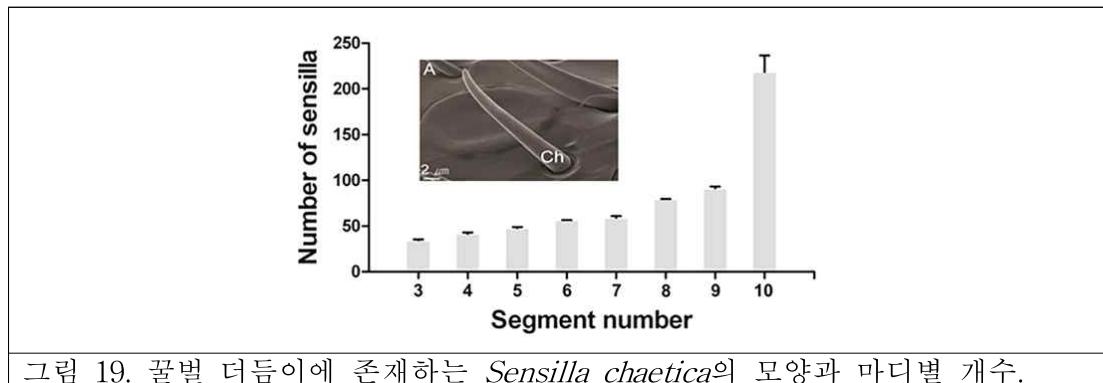


4. 꿀벌 집단 소통에 관련된 유전자 기능 분석

가. 꿀벌의 집단 소통에 관여하는 중요한 유전자는 화학감각기수용체이며 꿀벌은 화학감각기관을 통하여 외부환경을 인지하고 화밀이나 꿀의 특성, 성분 등을 후각, 미각 등을 통해 판단하게 된다. 꿀벌의 감각 수용체는 길을 찾고 먹이를 먹거나, 저장하는 데만 관련이 있을 뿐만 아니라, 집단 내 다른 동료들과 소통하는데 매우 중요한 것으로 알려져 있기 때문에, 이후 사회성을 연구하기 위한 도구로서 그 기능을 연구하는 것이 매우 중요할 것으로 생각된다. 또한 기후변화에 꿀벌이 외부적으로 가장 먼저 민감하게 반응 및 인지하는 부분이 화학감각기관이라고 생각할 때 화학감각기의 정보전달 기작에 관한 연구는 꿀벌의 생리 및 행동을 이해하는데 중요할 것으로 생각된다. 곤충의 감각 수용체는 크게 후각, 미각, 이온 수용체로 나뉘는데, 특히 벌에서 이러한 감각 수용체는 수용체 기능 특성 연구는 물론 학습과 기억 메커니즘 등을 연구하는데 매우 중요하다. 서양벌의 감각수용체에 대한 분석은 2006년 서양벌의 전장 유전체가 분석된 이후 활발히 연구되고 있다. 꿀벌의 화학감각기수용체 유전자군의 진화는 초파리와는 다소 다른 형태로 감각 수용체가 진화 한 것으로 보이며, 진화시기로 볼 때 벌목이 갈라져 나오기 이전부터 서로 다른 형태로 진화한 것으로 보인다. 미각 수용체의 경우, 초파리에서 그 기능연구가 많이 이루어져 있는데 단당류를 감지하는 것으로 알려진 초파리 미각 수용체와 서양벌, 동양벌에 존재하는 3가지의 미각 수용체가 매우 유사한 것으로 나타난다. 그러나 초파리에서 쓴맛을 감지하는 수용체는 꿀벌에는 존재하지 않는 것으로 보이며, 이는 꿀벌과 초파리의 서식지가 각각 다르고, 먹이나 생활양식이 매우 다른 데에서 기인한 것으로 보인다.



나. 본 연구는 꿀벌의 화학감각기관 중의 하나인 더듬이에서 꿀벌이 화학물질을 감지하는 원리를 알아보기 위해 시도되었다. 맛을 인지한다고 선행연구에서 알려진 더듬이에 존재하는 섬모를 동정하기 위해 전자현미경 사진을 찍었고, *Sensilla Chaetica*라고 알려진 섬모의 개수를 더듬이 마디마다 해아렸다(그림 20). 더듬이의 끝부분에서 미각을 담당하는 섬모의 개수가 많은 것은 꿀벌이 먹이를 찾는 행동이 주로 더듬이 끝부분에서 일어나고 있음을 알 수 있고, 이는 꿀벌이 맛을 인지하는 섬모를 이용하여 먹이의 성분을 확인한다고 생각할 수 있다. 따라서 화밀이나 꿀 속에 존재하는 Sucrose, Fructose, Glucose 등을 인지하는 미각수용체를 동정하기로 본 연구진이 시도하였다. 초파리에서 sugar를 인지하는 미각수용체군을 꿀벌의 유전자시퀀스와 매칭시켜보니 미각수용체 1과 2번이 상동성이 높다는 것을 알 수 있었다(그림. 21). 미각수용체 1번과 2번이 더듬이 끝에 많이 존재함을 관찰하면서(그림. 22), 꿀벌에서 sugar를 인지하는 미각수용체가 1, 2번일 것이라 예상하고 *Xenopus oocyte*에 미각수용체를 발현시켜 Two-voltage clamp 실험을 진행하였다.



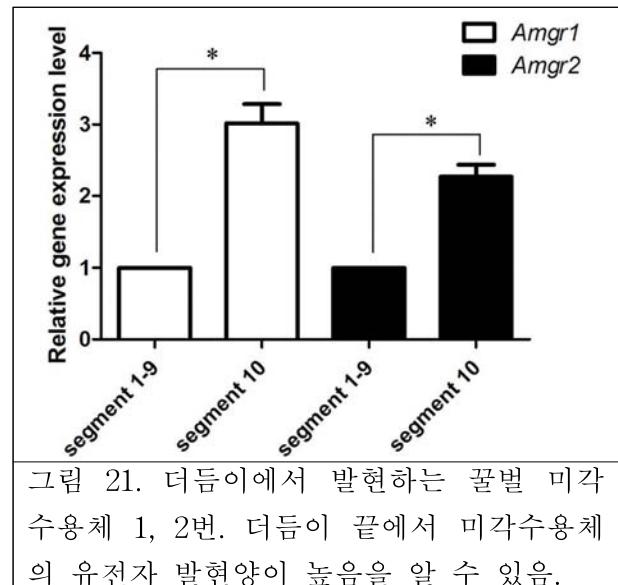
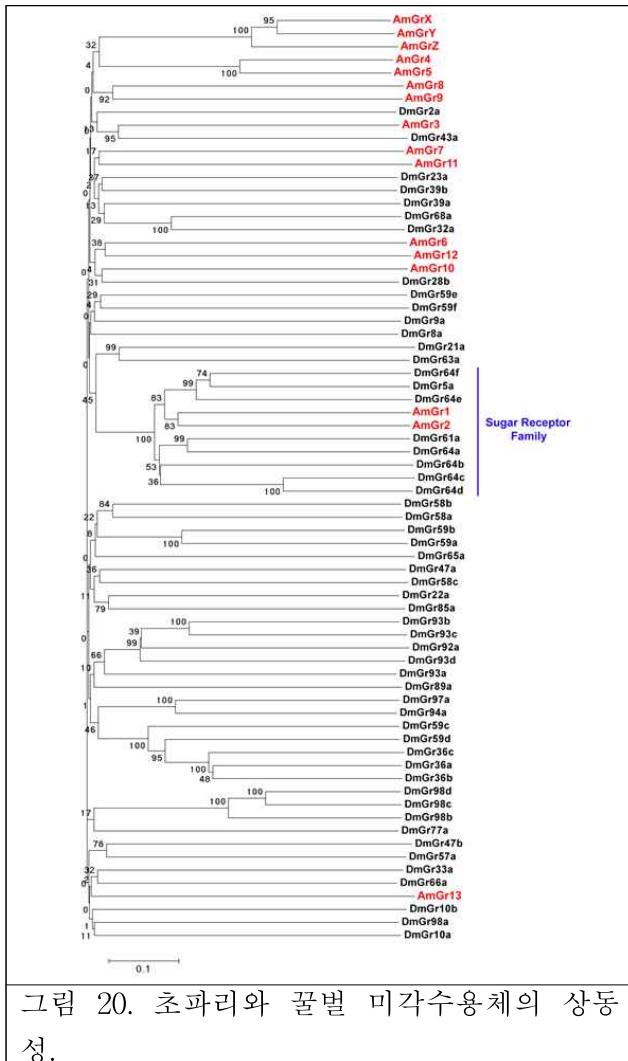


그림 21. 더듬이에서 발현하는 꿀벌 미각수용체 1, 2번. 더듬이 끝에서 미각수용체의 유전자 발현양이 높음을 알 수 있음.

다. 그림 23에서 보는 것처럼 꿀벌 미각수용체 1번이 sucrose, glucose, maltose, trehalose에 반응하였으며 미각수용체 2번은 반응하지 않음을 알 수 있다. 이는 미각수용체 1번이 단독으로 sugar sensing receptor neuron으로서 기능을 할 수 있음을 의미함과 아울러 fructose의 수용체는 다른 미각수용체가 담당하고 있을 것이라는 사실을 알려준다. 한편 미각수용체 1번과 2번을 동시에 발현시킨 데이터의 경우 각 물질의 반응이 미각수용체 1번 단독처리시 나타나는 결과와 다른 결과를 보여주는데 이는 미각수용체 2번이 곤충의 후각수용체 시스템과 구조적으로 유사한 heterodimer로서의 역할을 하고 있을 수 있다는 것을 암시한다.

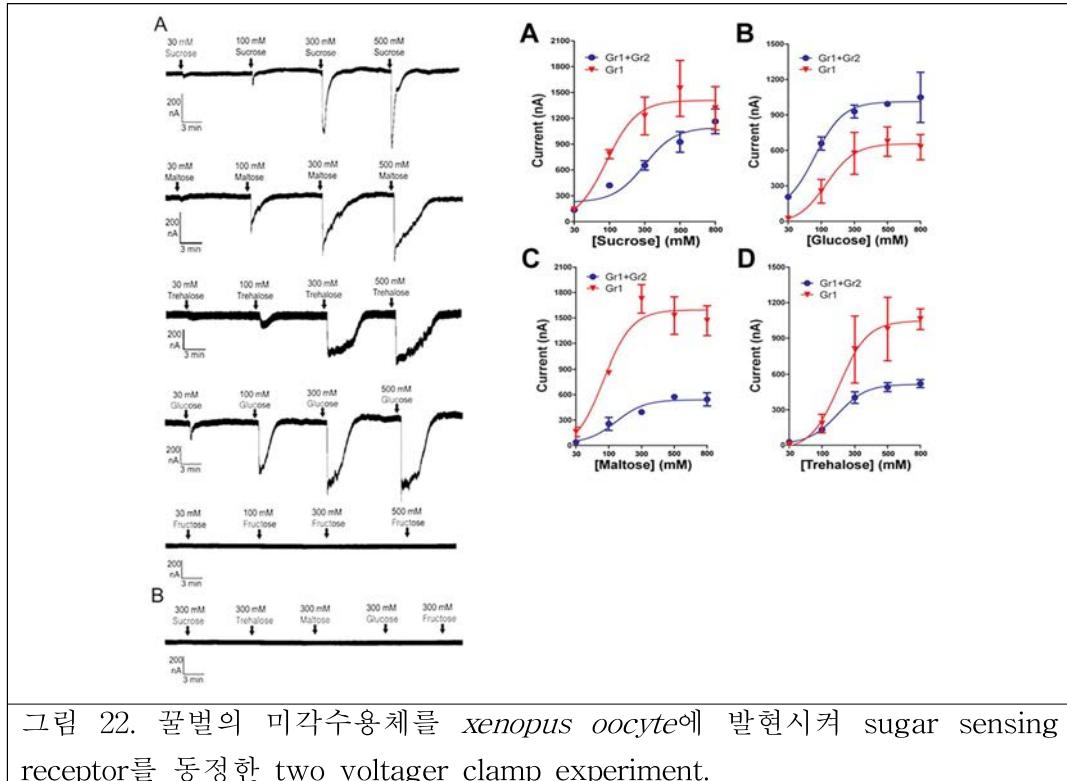


그림 22. 꿀벌의 미각수용체를 *xenopus oocyte*에 발현시켜 sugar sensing receptor를 동정한 two voltager clamp experiment.

라. 꿀벌에서 단맛을 느끼는 미각수용체를 동정한 후 본 연구진은 미각수용체 1, 2번이 꿀벌 더듬이에 어떤 형태로 존재하는 확인해보고자 면역염색법을 수행하였다. 미각수용체 1번 항체와 미각수용체 2번 mRNA은 서로 colocalization 하는 경우와 그렇지 않은 경우를 관찰할 수 있었으며, 이는 미각수용체 1번과 2번이 homodimer 혹은 heterodimer를 이루면서 단맛을 내는 물질에 대한 sensitivity를 다이내믹하게 조절하고 있음을 시사한다(그림 24).

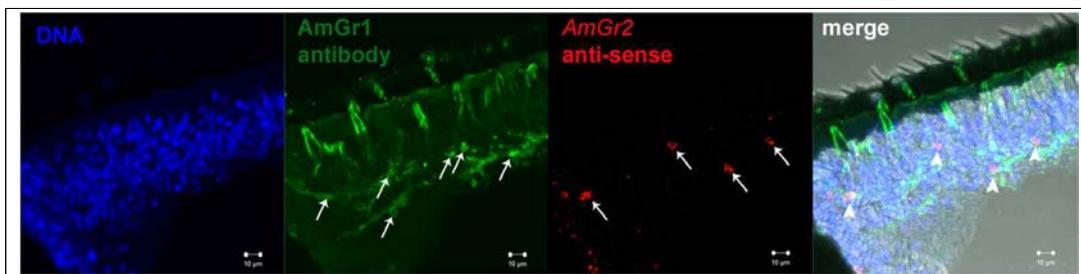


그림 23. 꿀벌 더듬이에서 발현하는 미각수용체 1, 2번.

마. Two-voltage clamp를 이용한 실험에서 본 연구진은 꿀벌의 단맛을 인지하는 미각수용체를 동정하고 기능을 분석하였다. 실제로 꿀벌이 *Sensilla chaetica*로 단맛을 인지하는지 확인해보기 위해 꿀벌 성충을 이용한 Tip recording을 수행하였다(그림 25).

바. 꿀벌 더듬이의 *S. chaetica*는 단맛을 인지하는 섬모로서 기능을 하고 있음을 본 tip recording을 통해 관찰하였고, 여러 곤충과 마찬가지로 sucrose에서 반응이 가장 높게 나왔다. Fructose에 대한 반응도 sucrose 다음으로 높게 나왔는데 미각수용체 1번과 2번이 fructose 수용체가 아닌, 다른 미각수용체가 *S. chaetica*에서 담당하고 있을 것이라고 추측할 수 있다.

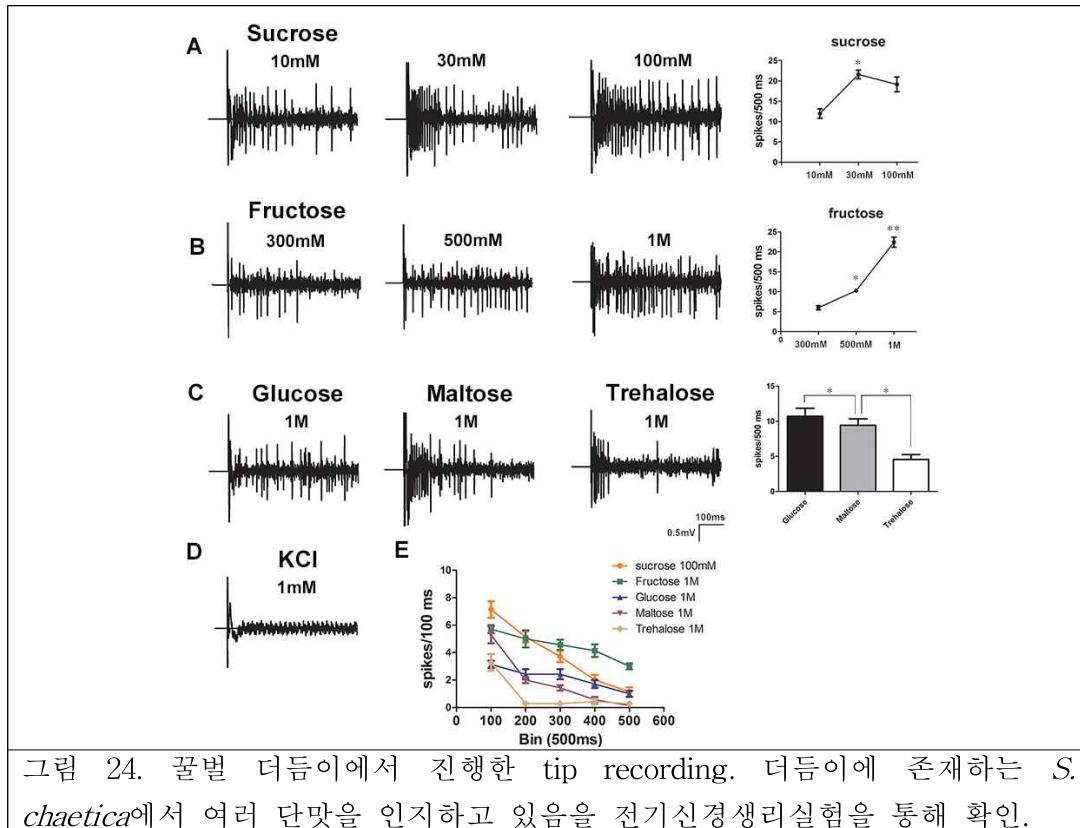


그림 24. 꿀벌 더듬이에서 진행한 tip recording. 더듬이에 존재하는 *S. chaetica*에서 여러 단맛을 인지하고 있음을 전기신경생리실험을 통해 확인.

사. 본 연구진은 또한 감칠맛을 인지(umami receptor)하는 미각수용체를 위와 동일한 실험 방식으로 진행하여 동정하였다(그림 26). umami receptor의 동정은 곤충모델에서는 거의 유일한 경우이며 초파리에서도 현재 발견하지 못하였다. 이러한 아미노산에 반응하는 미각수용체의 동정 및 향후 여러 아미노산 receptor의 동정은 꿀벌의 화학감각정보 처리 및 internal physiology를 연구하는데 아주 중요한 연구가 될 것으로 생각한다.

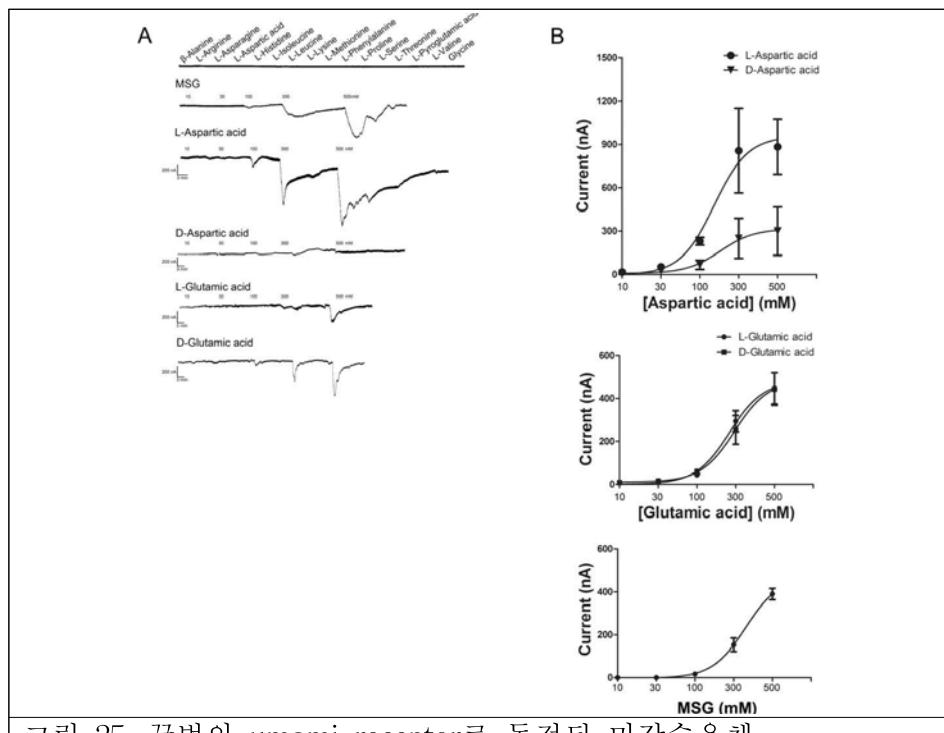
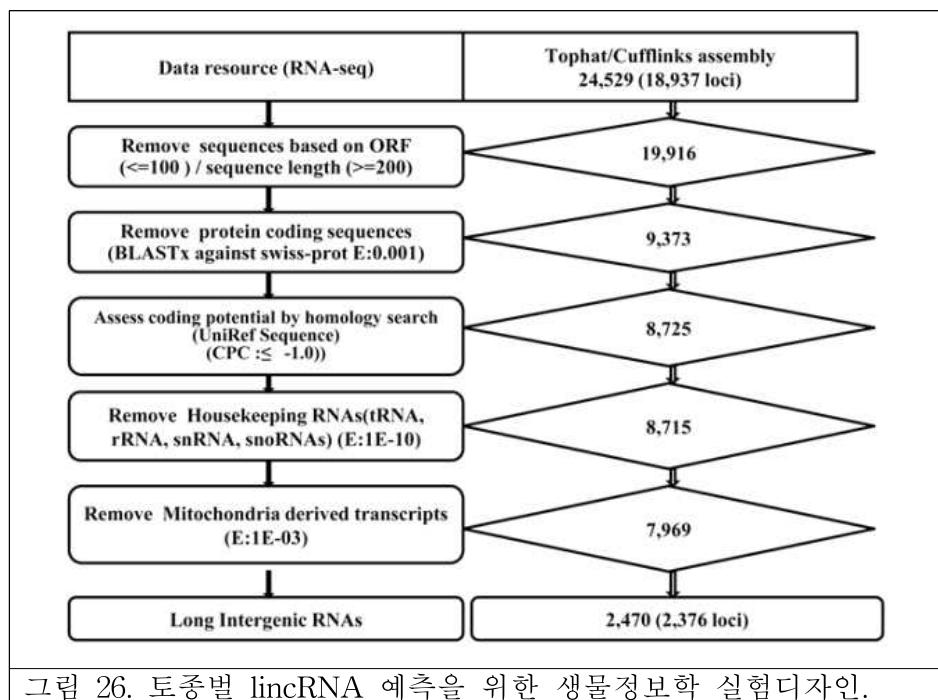


그림 25. 꿀벌의 umami receptor로 동정된 미각수용체.

5. 질병발생과 영양 상태에 따른 꿀벌 분자신경행동학 마커의 변화 연구

가. 토종벌 조직 별 Long noncoding RNA(lncRNA) sequencing 분석 및 바이러스 병 특이 적 lncRNA 동정: 토종벌 유전체 분석을 통해 밝혀진 scaffold를 이용하여 각 조직의 RNA sequences를 mapping하여 얻은 데이터를 이용하여 위에서 언급한 데이터와 같이 유전자를 담당하는 coding region의 기능 및 발현 패턴에 조직 특이적으로 알아보았다(그림 27). 또한 유전자가 아닌 sequence 데이터, 즉 non-coding region에 대한 비교분석을 통해 그 동안 실험적으로 밝히기 힘들었던, 하지만 생물학적으로 중요한 조절부위로 추정 되는 부분을 분석해 낼 수 있었다(그림 28, 29). 이 중 특히 long non-coding RNA(lncRNA)는 암과 같은 여러 질병에서 특이적으로 과발현하고 있음을 최근 연구를 통해 알게 되면서 각광 받고 있다. 본 연구에서는 SBV가 감염된 토종벌과 정상 토종벌의 lncRNA의 발현 분석을 진행하였다(그림 30). 아래 결과는 SBV에 감염된 토종벌에서 특이적으로 과발현하는 lncRNA가 다수 존재하고 있음을 밝혔고, 이러한 lncRNA region 은 질병 발병에 있어서 기능적으로 매우 중요한 역할을 하고 있음을 시사하고 있다. 따라서 향후 기후 변화 (계절별, 습도별, 환경스트레스원의 증가)에 따른 꿀벌의 영양상태와 바이러스 질병의 감염 정도 등을 측정할 수 있는 꿀벌 질병 진단 및 방제에 중요한 마커 가 될 것이라고 생각한다.



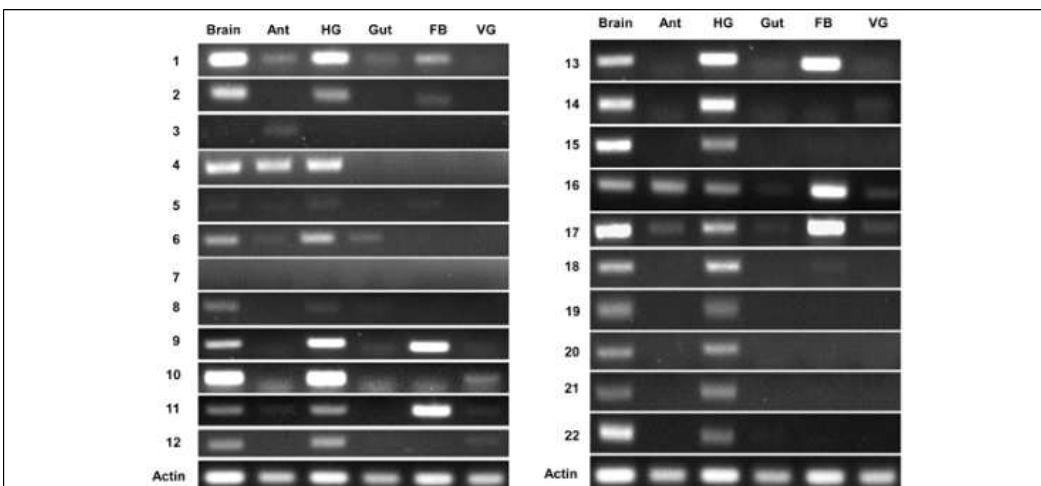


그림 27. RT-PCR validation of lincRNAs in Asian honeybee tissues. Twenty-two putative lincRNAs were selected for RT-PCR validation.

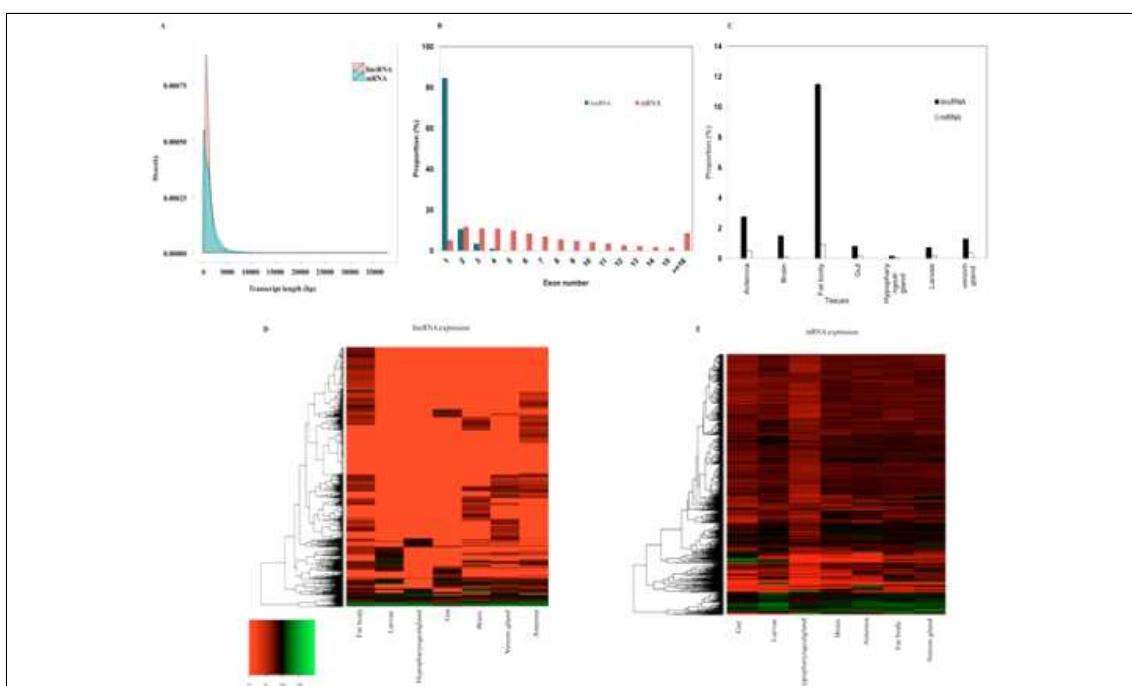
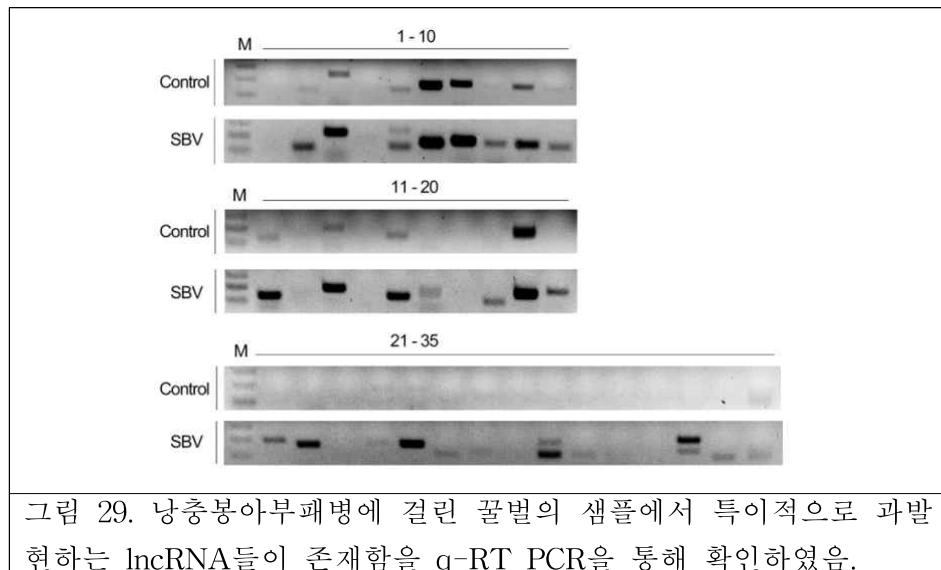


그림 28. Characteristics of Asian honeybee lincRNAs. (A) Length distribution of lincRNAs and mRNAs. (B) Number of exons in lincRNAs and mRNAs. (C) Number of lincRNAs showing tissue restricted expression. (D) Heatmap showing expression levels of all lincRNAs (including 464 tissue preferential lincRNAs with a cutoff of a two-fold change were identified by EdgeR) and (E) mRNAs based on FPKM in seven tissues (brain, antenna, hypopharyngeal gland, gut, fat body, larvae and venom gland).



6. 계절별 기온 조건과 영양 상태에 따른 꿀벌 분자신경행동학 마커의 변화 연구

가. 기후변화 요인에 의한 스트레스 관련 물질에 따른 꿀벌의 생리 및 행동 변화 연구

(1) 살충제 처리에 따른 꿀벌의 수명 변화: 최근 기온의 상승으로 인해 개체수가 증가한 해충을 제거하기 위해 쓰고 있는 Neonicotinoid계열의 살충제는 꿀벌의 생리적 변화를 일으킨다고 알려져 있다. 본 연구는 대표적인 살충제인 Imidacloprid를 꿀벌에 처리한 후 (그림 31) 생존율을 측정하였다(그림 32). 또한 기후변화에 따른 스트레스 요인에 대한 꿀벌의 생리적 대응을 확인하기 위해 스트레스원의 처리 후 30°C 및 38°C 조건으로 실내 사육을 진행하였다.

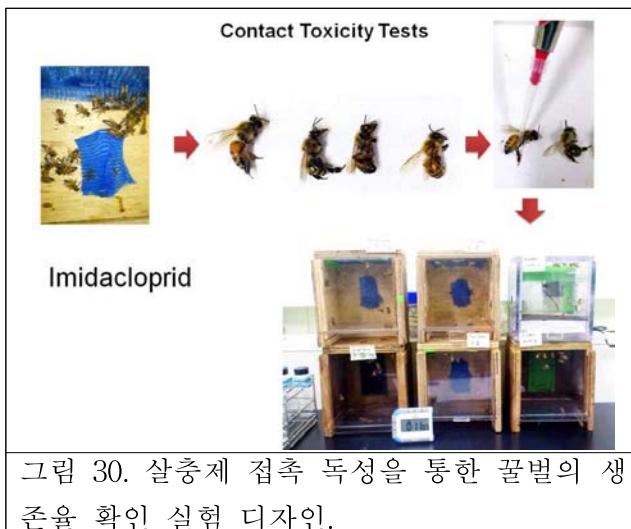
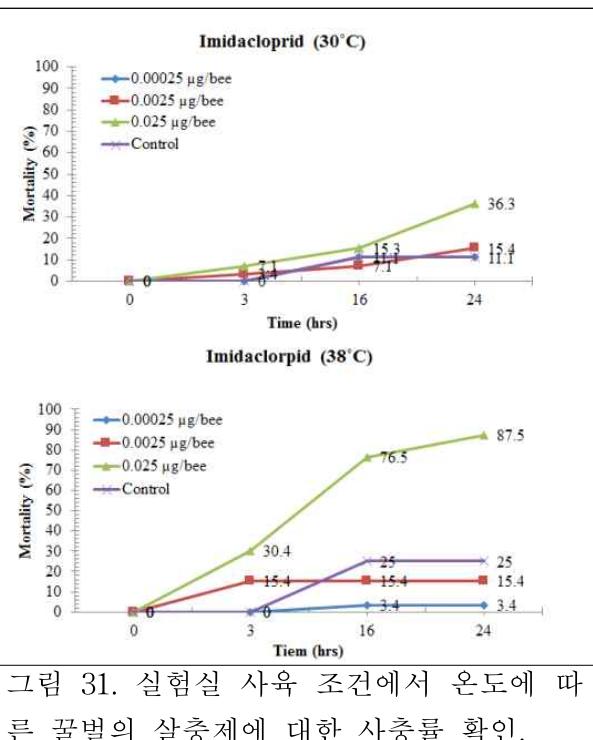


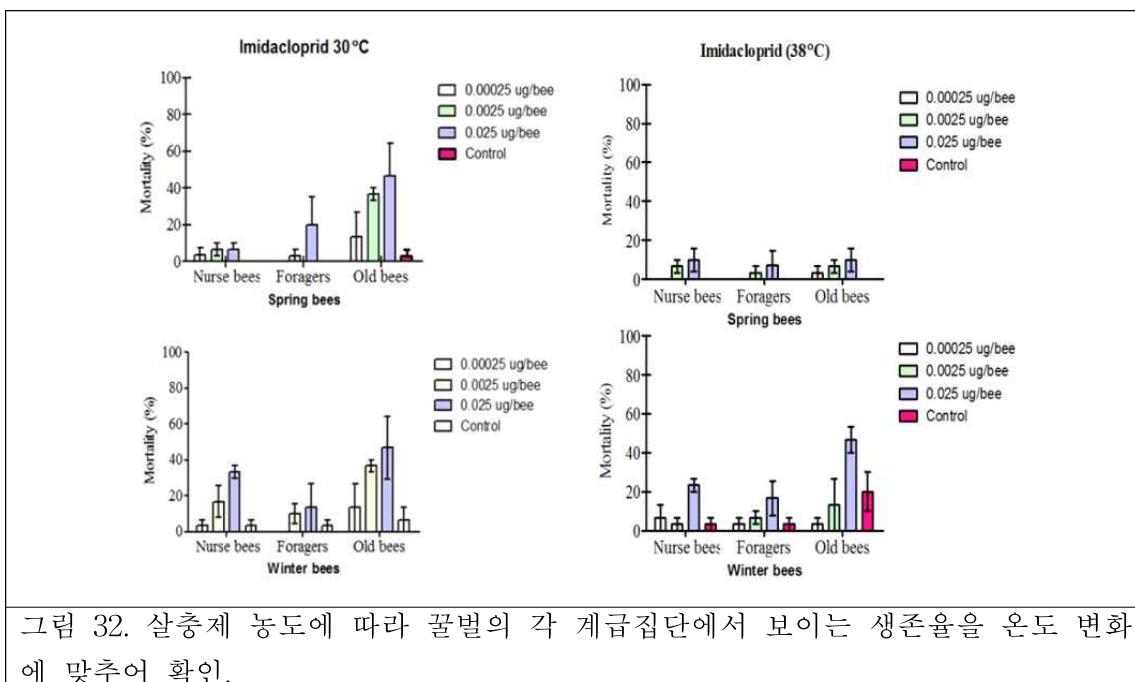
그림 30. 살충제 접촉 독성을 통한 꿀벌의 생존율 확인 실험 디자인.



(2) 그림 32에서 보듯이 Imidacloprid와 미량으로도 꿀벌의 수명에 큰 영향을 주고 있음을 관찰하였으며, 기온 상승을 가정한 꿀벌 사육 온도를 높인 경우 Imidacloprid의 꿀벌 사충율은 30°C에 비해 약 2.5배 증가하였다. 이는 스트레스원의 민감도가 온도 상승으로

인해 매우 높아졌음을 의미하거나 온도 상승 역시 하나의 주요 스트레스원으로 작용하고 있는 것을 시사한다. 이 결과는 기온 변화에 따른 꿀벌의 생리적 반응을 고려한 살충제의 적정한 농도 및 사용량을 권장하는데 본 연구의 자료가 중요하게 쓰일 것이라고 사료된다.

(3) 살충제 처리에 따른 꿀벌의 계절별 생존율 측정(그림 33): 또한 봄철과 겨울철에 꿀벌을 채집하여 동일한 실험을 진행한 결과 흥미롭게도 겨울철에 채집한 꿀벌의 경우 살충제에 대한 저항성이 훨씬 낮음을 확인할 수 있었다. 이는 혹한기 조건에서 꿀벌의 영양 상태 및 질병에 대한 감수성이 밀원이 풍부한 봄철의 꿀벌에 비해 낮기 때문에 동일한 자극에 대해서도 생존율이 낮을 것으로 생각된다.



(4) 스트레스 요인에 따른 꿀벌의 학습 및 기억력 측정(그림 34, 35): 꿀벌의 학습기억력 측정 실험으로 사용하는 Proboscis Extension Reflex (PER) 실험을 통하여 환경의 변화에 따라 꿀벌의 먹이에 대한 학습 능력 및 민감도 유지에 관하여 알아보았다. 스트레스 원의 자극에 대한 꿀벌의 변화는 온도변화에 따라 학습 능력 및 민감도에 영향을 주고 있음을 관찰하였다. 살충제의 농도가 증가함에 따라 꿀벌의 학습과 기억력은 감소하였으며 온도가 높아질 경우 꿀벌의 기억력 역시 떨어짐을 보여주고 있다.

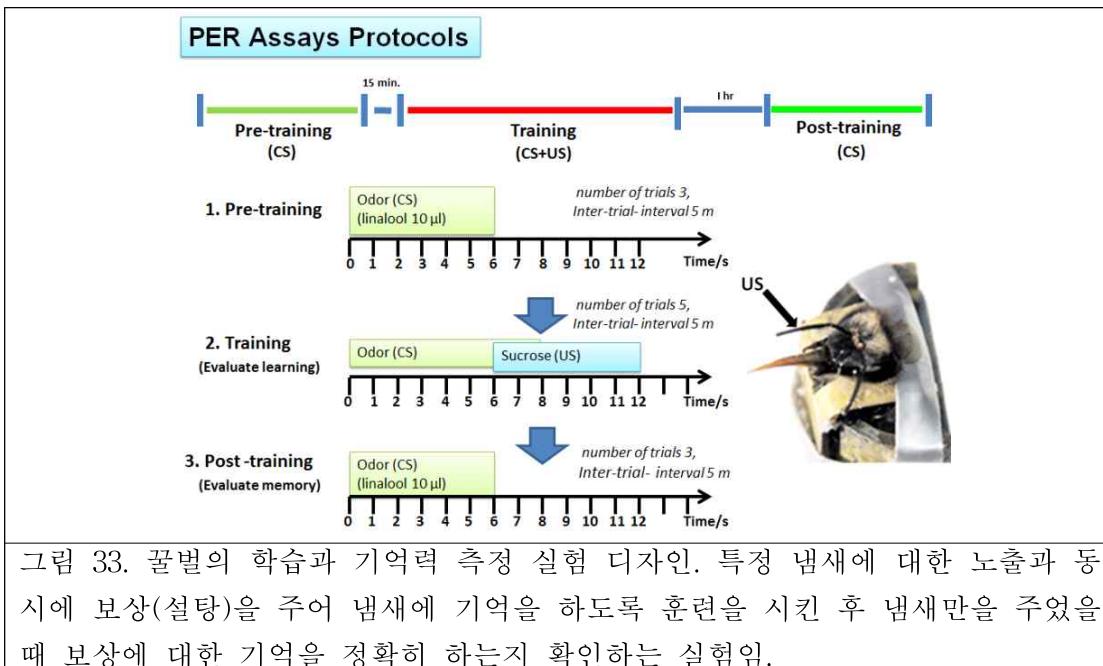


그림 33. 꿀벌의 학습과 기억력 측정 실험 디자인. 특정 냄새에 대한 노출과 동시에 보상(설탕)을 주어 냄새에 기억을 하도록 훈련을 시킨 후 냄새만을 주었을 때 보상에 대한 기억을 정확히 하는지 확인하는 실험임.

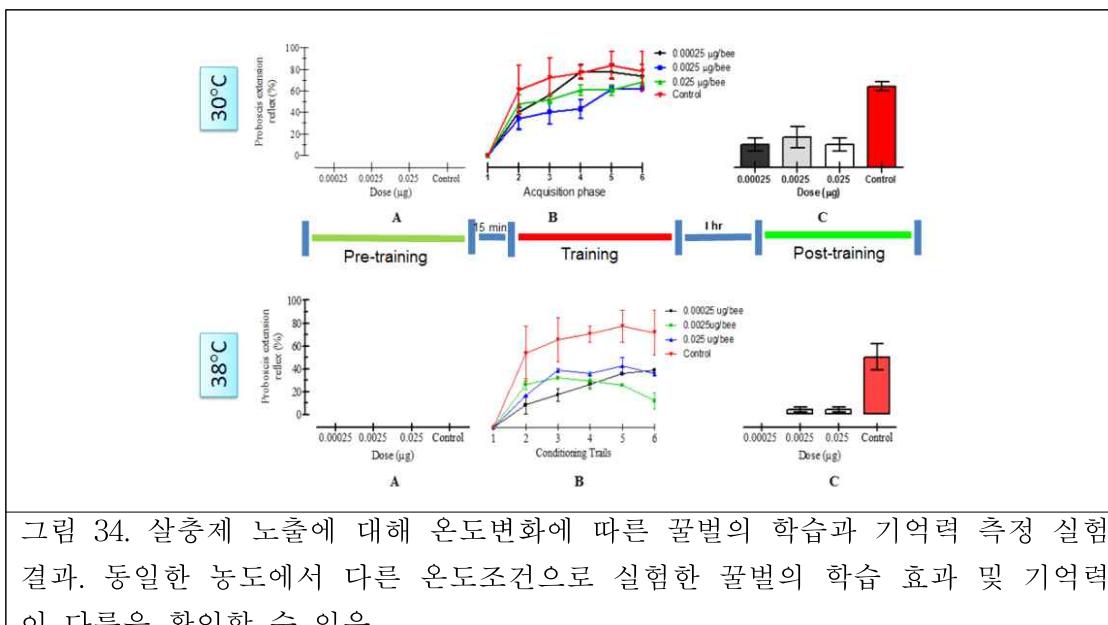


그림 34. 살충제 노출에 대해 온도변화에 따른 꿀벌의 학습과 기억력 측정 실험 결과. 동일한 농도에서 다른 온도조건으로 실험한 꿀벌의 학습 효과 및 기억력이 다름을 확인할 수 있음.

나. 꿀벌 분자신경행동학 마커의 변화 연구: 꿀벌 신경펩타이드 동정(그림 36, 37)

(1) 신경펩타이드는 신경조절물질(Neuromodulator)로서 뉴런에서 분비되어 신경전달물질보다 더 멀리, 더 넓게 퍼져나간다. 이러한 작용으로 인해 뇌의 특정 부분의 활성도에 영향을 미치게 되어 동물의 행동조절에 중요한 역할을 하게 된다. 대부분의 신경조절물질은 몇 개의 아미노산이 펩타이드 결합을 하고 있는 신경펩타이드이다. 따라서 외부 다양한 환경에 대한 꿀벌의 반응과 학습과 기억 등의 감각인지 과정에서 신경펩타이드는 다양한 기능을 수행하고 있다. 본 연구에서는 기후 변화, 환경 스트레스 등에 반응하는 꿀벌의 생리, 행동적 마커를 동정하기 위한 것으로 토종벌 및 서양벌에 존재하는 모든 신경펩타이드(32개)를 동정하고 여러 조직에 특이적으로 과발현하는 신경펩타이드의 구성을 생물정보학을 통해 확인하였다. 본 연구결과는 기존에 다른 곤충에서 알려진 신경펩타이드의 각 서열을 비교분석하여 꿀벌에서 서열이 알려지지 않은 여러 신경펩타이드를

동정한 것이다. 본 연구진의 선행 연구결과로서 다른 곤충에서 확인한 특정 신경펩타이드가 말초신경계 수준에서의 후각을 제어하는 메커니즘을 최초로 규명하였다. 따라서 본 연구진이 추진한 신경펩타이드의 동정은 꿀벌이 외부 환경 변화에 반응 및 적응하기 위한 주요 분자신경행동학적 마커를 발굴한 것으로서 차후 여러 다른 환경 조건에 반응하는 꿀벌의 신경행동 유전자의 기능을 확인하는데 주요 자료로 인용될 것이다.

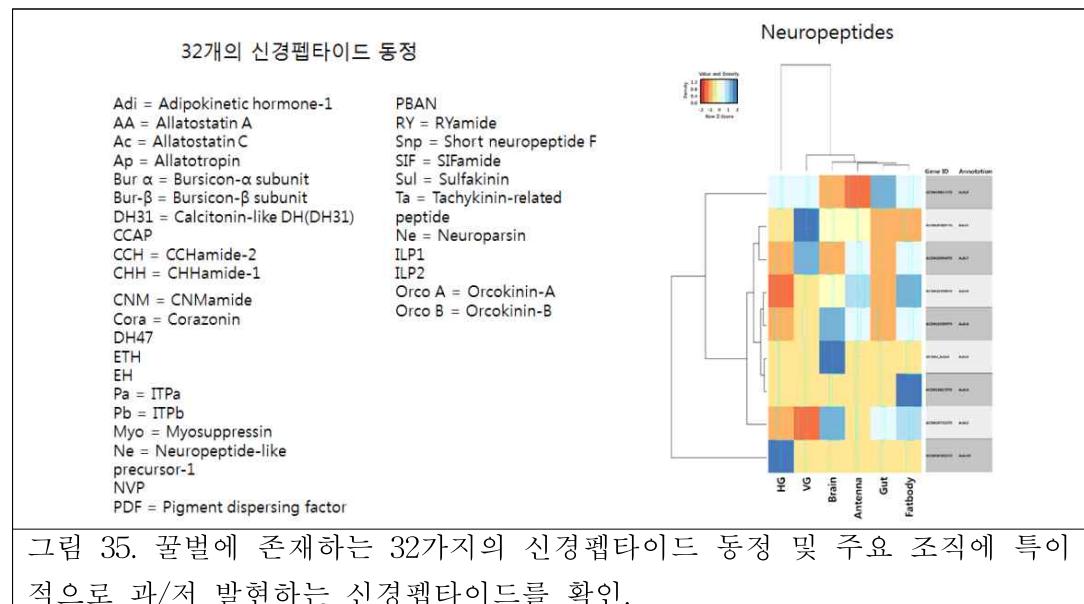


그림 35. 꿀벌에 존재하는 32가지의 신경펩타이드 동정 및 주요 조직에 특이적으로 과/저 발현하는 신경펩타이드를 확인.

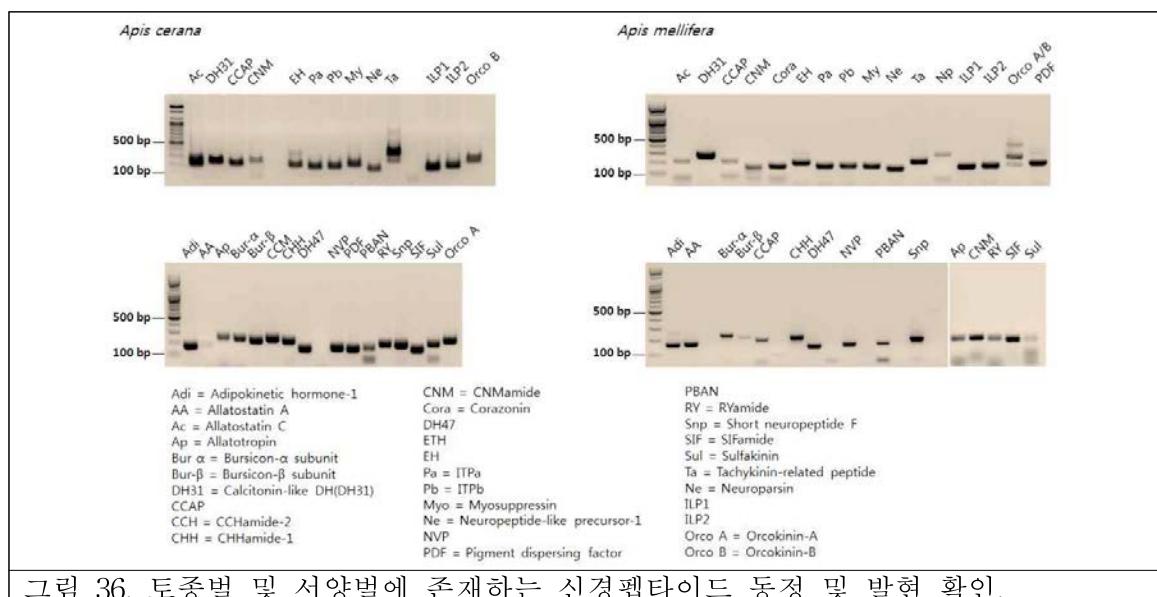


그림 36. 토종벌 및 서양벌에 존재하는 신경펩타이드 동정 및 발현 확인.

다. 봉군 내 꿀벌 밀도에 따른 봉군 온도 조절 변화 측정

(1) 꿀벌 봉군 내 온도의 항상적 조절은 사회구조의 유지는 물론 애벌레 양육의 안전성 제고, 더운 여름 또는 추운 겨울의 대규모 집단의 생존율 향상, 이른 봄의 봉군 활동 개시 용이 뿐 아니라 외역벌의 비행 전 체온 조절에도 큰 이득을 가져다준다. 이러한 온도 조절을 가능케 하기 위해서는 일벌 개체의 조직화된 온도 조절의 요구를 실현시켜 줄 메커니즘이 꿀벌 사회에 존재해야 한다. 선행 연구를 살펴보면 외부 환경의 온도는 20.8 ± 6.88 와 $18.9 \pm 6.10^{\circ}\text{C}$ 로 큰 폭으로 변함에도 불구하고, 봉군 내부의 육아권 온도는 35.1 ± 0.42 와 $35.2 \pm 0.30^{\circ}\text{C}$ 로 매우 안정되게 조절이 되었다. 외부 온도가 38°C 이상 높은

날의 경우 내부 온도도 36.6°C 까지 올라가기도 하나, 애벌레 발육에 해를 주는 37°C 에는 이르지 않았다. 또한 계상 벌통에서 1층 육아권의 온도는 35.2°C 로 2층 저밀권의 온도 (34.8°C)보다 높았으며, 저밀권에서 온도 변이 폭이 더 커졌다. 추운 지방의 겨울철 온도 조절은 더 세밀하다. 주로 성충으로 구성된 월동 꿀벌들은 저장해 놓은 탄수화물(벌꿀)을 섭취하고 가슴 근육의 진동을 통해서 열을 방출하고 개체들이 겹겹이 둘러쌈으로써 열을 보호하여 일정 온도 이상을 유지하면서 긴 겨울을 보낸다. 외부 온도가 18°C 가 되면 봉구가 형성되기 시작한다. 14°C 가 되면 봉구의 외곽은 더욱 단단해지고 내부는 느슨해져서 움직임이 가능해진다. 온도가 내려갈수록 봉구의 크기는 작아진다. 이때 꿀 섭취를 위해 내부의 벌들이 외부로 움직여야하기 때문에 봉구가 조금씩 깨어지기도 한다. 따라서 내부의 온도도 적지 않은 변이가 있다. 그러나 봉구 내부 온도가 최소 13°C 는 되어야 꿀벌의 봉구 유지 활동이 가능한 것으로 알려졌다. 본 연구는 우리나라 겨울철 벌통내부의 온도를 꿀벌의 밀도에 따라 측정한 결과이다. 서양종 꿀벌 단상 벌통을 대상으로 서울대학교 농업생명과학대학 옥상에서 2015년 1월-2월까지 1분단위로 실시한 온도의 측정결과는 그림 38과 같다. 외부기상은 변동이 매우 심하였다. 최저온도와 최고온도의 편차가 10°C 이상 차이가 났다. 소비 3장으로 구성된 첫 번째 실험봉군은 조사 후 5일 동안 평균 20°C 이상의 내부온도를 유지하고 있었지만 5일 이후 내부 온도는 감소하기 시작하여 최저 15°C 까지 떨어졌다. 이는 혹한기 봉군 내 온도조절을 위해서는 최소한의 꿀벌밀도가 필요함을 말해준다. 반면 소비 4장을 넣은 두 번째 실험 봉군은 내부온도가 평균 28°C 를 유지할 정도로 온도 변화의 폭도 줄여들었다. 또한 소비 5장을 넣은 세 번째 실험 봉군은 내부 온도를 30°C 를 꾸준히 유지하고 변화의 폭도 매우 적었다. 이는 외부의 온도는 크게 변하지만 벌통 내부의 온도는 혹한기에도 30°C 이상으로 매우 안정되게 조절되고 있음이 확인되었다. 따라서 본 연구결과는 봉군 내 적절한 꿀벌의 밀도가 형성되어 있다면 급격한 외부 온도 변화에도 서양종 꿀벌의 육아권 온도는 32°C 를 중심으로 세밀하게 조절되고 있음을 보여주었다.

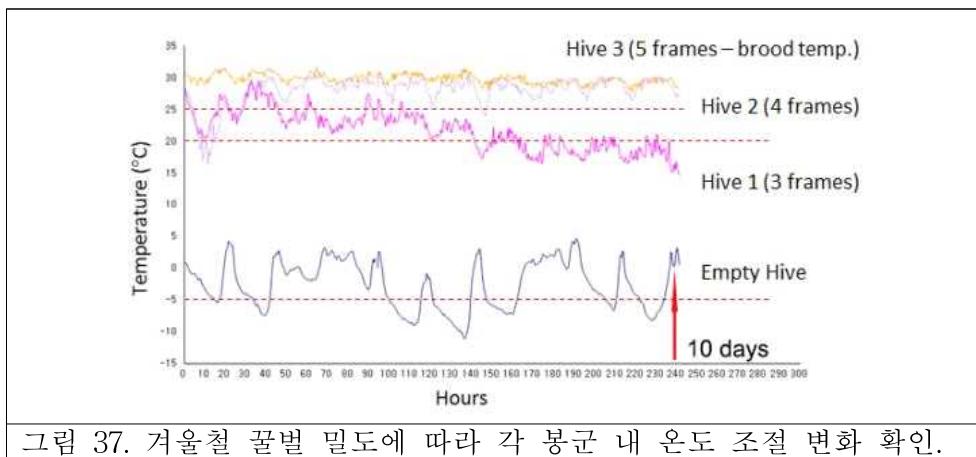


그림 37. 겨울철 꿀벌 밀도에 따라 각 봉군 내 온도 조절 변화 확인.

7. 외부 환경과 내부 영양 상태를 모니터링하는 꿀벌 분자신경행동학 마커의 변화 연구

가. 꿀벌 집단 소통에 관련된 유전자 기능 분석: 아미노산 인지 미각수용체 동정 및 기능 분석 (그림 39)

(1) 꿀벌의 집단 소통에 관여하는 중요한 유전자는 화학감각기수용체이며 꿀벌은 화학감각기관을 통하여 외부환경을 인지하고 화밀이나 꿀의 특성, 성분 등을 후각, 미각 등을 통

해 판단하게 된다. 꿀벌의 감각 수용체는 길을 찾고 먹이를 먹거나, 저장하는 데에만 관련이 있을 뿐만 아니라, 집단 내 다른 동료들과 소통하는 데에 매우 중요한 것으로 알려져 있기 때문에, 이후 사회성을 연구하기 위한 도구로서 그 기능을 연구하는 것이 매우 중요할 것으로 생각된다. 또한 기후변화에 꿀벌이 외부적으로 가장 먼저 민감하게 반응 및 인지하는 부분이 화학감각기관이라고 생각할 때 화학감각기의 정보전달 기작에 관한 연구는 꿀벌의 생리 및 행동을 이해하는데 중요할 것으로 생각된다. 곤충의 감각 수용체는 크게 후각, 미각, 이온 수용체로 나뉘는데, 특히 벌에서 이러한 감각 수용체는 수용체 기능 특성 연구는 물론 학습과 기억 메커니즘 등을 연구하는데 매우 중요하다. 서양벌의 감각수용체에 대한 분석은 2006년 서양벌의 전장 유전체가 분석된 이후 활발히 연구되고 있다. 꿀벌의 화학감각기수용체 유전자군의 진화는 초파리와는 다소 다른 형태로 감각 수용체가 진화 한 것으로 보이며, 진화시기로 볼 때 벌목이 갈라져 나오기 이전부터 서로 다른 형태로 진화한 것으로 보인다. 미각 수용체의 경우, 초파리에서 그 기능연구가 많이 이루어져 있는데 단당류를 감지하는 것으로 알려진 초파리 미각 수용체와 서양벌, 동양벌에 존재하는 3가지의 미각 수용체가 매우 유사한 것으로 나타난다. 그러나 초파리에서 쓴맛을 감지하는 수용체는 꿀벌에는 존재하지 않는 것으로 보이며, 이는 꿀벌과 초파리의 서식지가 각각 다르고, 먹이나 생활양식이 매우 다른 데에서 기인한 것으로 보인다. 본 연구진은 1차년도 선행연구로서 꿀벌 미각 수용체 1번이 sucrose, glucose, maltose, trehalose에 반응하였으며 미각수용체 2번은 반응하지 않음을 확인하였다. 이는 미각 수용체 1번이 단독으로 sugar sensing receptor neuron으로서 기능을 할 수 있음을 의미함과 아울러 fructose의 수용체는 다른 미각수용체가 담당하고 있을 것이라는 사실을 알려주었다. 본 연구는 감칠맛을 인지(umami receptor)하는 미각수용체를 동정하였다 (그림 39). 꿀벌 미각 수용체 10번은 20개의 아미노산 중 6개의 아미노산에 반응을 하였으며 그 종류는 Glutamate, Aspartate, Asparagine, Arginine, Lysine, Glutamine이다. 위 아미노산은 꿀벌의 주요 단백질원인 화분의 주요 구성성분으로 알려져 있다. 미각수용체 10번은 감칠맛을 띠는 glutamte를 인지하기 때문에 umami receptor라고 할 수 있는 이렇게 umami receptor의 동정은 곤충모델에서는 유일한 경우이며 초파리에서도 현재 발견하지 못하였다. 이러한 아미노산에 반응하는 미각수용체의 동정 및 향후 여러 아미노산 receptor의 동정은 꿀벌의 화학감각정보 처리 및 internal physiology를 연구하는데 아주 중요한 연구가 될 것으로 생각한다. 또한 꿀벌의 주요 밀원인 꿀과 화분을 인지하는 감각수용체의 동정은 향후 외부 환경 변화에 따라 감각수용체의 발현 및 기능 변화를 확인하여 생리적 메커니즘을 규명할 수 있는 주요 자료로 활용될 것이다.

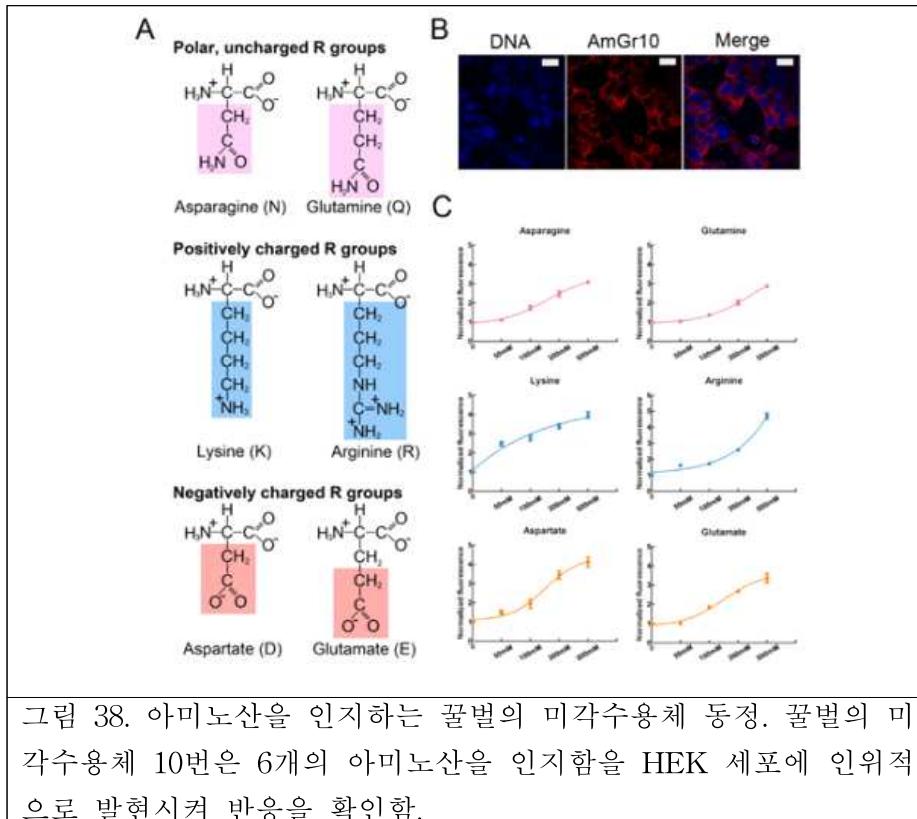


그림 38. 아미노산을 인지하는 꿀벌의 미각수용체 동정. 꿀벌의 미각수용체 10번은 6개의 아미노산을 인지함을 HEK 세포에 인위적으로 발현시켜 반응을 확인함.

나. 영양상태에 따른 꿀벌의 생리적 변화 연구: 꿀벌 아미노산 수용체의 체내 영양소 인지 및 조직 항상성 유지

(1) 꿀벌의 아미노산 인지 미각 수용체는 화학감각기관 뿐만 아니라 체내 조직에 전반적으로 발현하고 있었으며 특히 외부감각기관에 비해 내부 조직에서 그 발현이 높은 결과를 보여주었다(그림 40-A). 이는 아미노산 미각수용체의 역할이 단순히 외부 환경의 밀원을 인지하는데 그치는 것이 아니라 체내 각 조직에서 아미노산을 인지하여 세포신호전달에 상위 모니터링 역할을 할 것으로 예측된다. 실제로 로얄젤리를 분비하는 비하인두샘에서 미각수용체 10번의 발현은 다른 미각수용체보다 훨씬 높은 것으로 보아 그 역할이 체내 아미노산을 인지하는 것으로 짐작할 수 있다(그림 40-B).

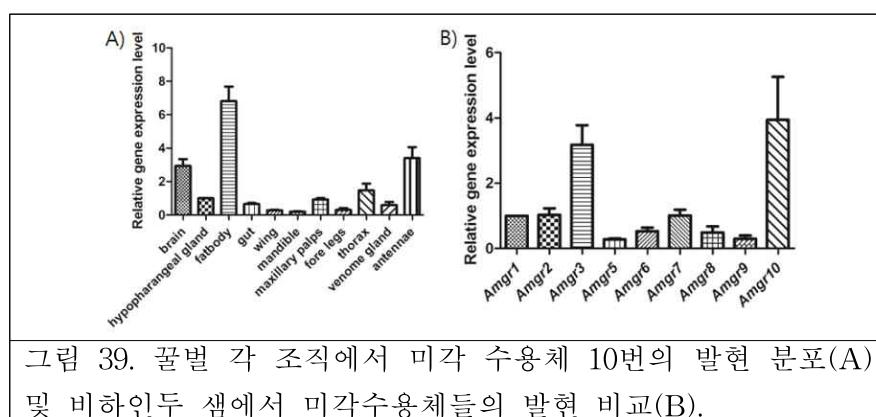
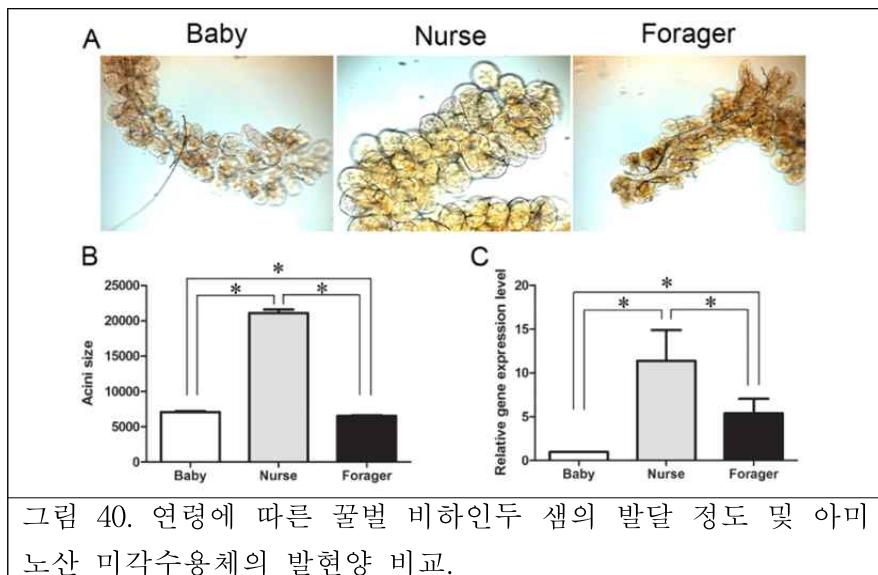


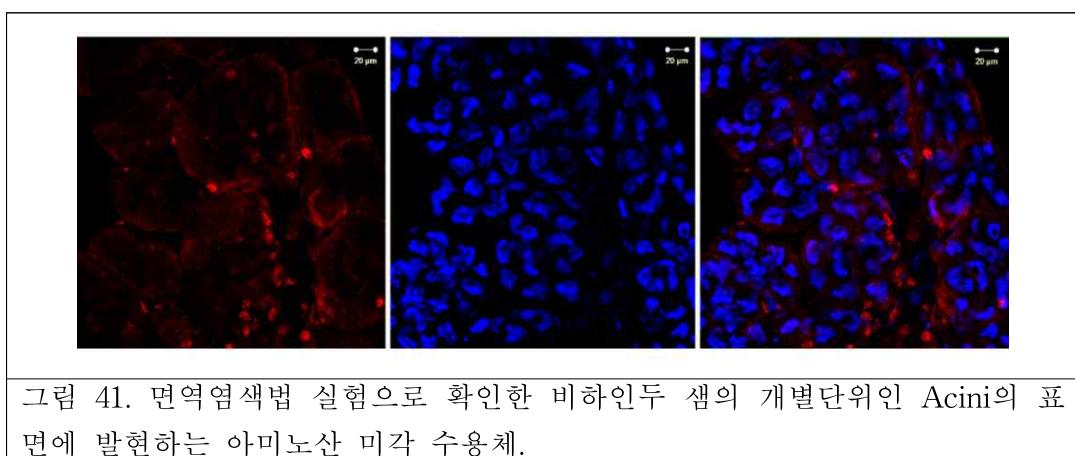
그림 39. 꿀벌 각 조직에서 미각 수용체 10번의 발현 분포(A) 및 비하인두 샘에서 미각수용체들의 발현 비교(B).

(2) 꿀벌의 비하인두 샘은 내역봉이 유충에게 로얄젤리를 분비하는 기관으로서 내역봉에서 발달한 기관이다. 따라서 외역봉의 경우는 방화행동이 주요 활동이므로 그들의 비하인두 샘이 퇴화하게 되는데 갓 태어난 꿀벌과 내역봉, 외역봉의 비하인두 샘을 비교해보면 발

달 정도를 한눈에 확인할 수 있다(그림 41-A). 갓 태어난 꿀벌과 외역봉에 비해 내역봉의 비하인두 샘은 약 3배 이상 Acini(비하인두 샘의 개별 기관 단위)의 크기가 큼을 알 수 있었다(그림 41-B). 본 연구진은 비하인두 샘에서 아미노산 인지 미각수용체의 기능을 확인하기 위해 꿀벌 각 계급에 따른 비하인두 샘에 존재하는 아미노산 미각수용체의 발현 정도를 비교하였다. 미각수용체 10번의 발현은 계급에 따른 비하인두 샘의 발달 정도와 동일하게 내역봉에서 발현이 가장 높은 반면 어린 꿀벌과 외역봉에서는 발현이 낮았다(그림 41-C). 이는 미각 수용체 10번이 내역봉의 비하인두 샘에서 중요한 역할을 할 것으로 예상된다.

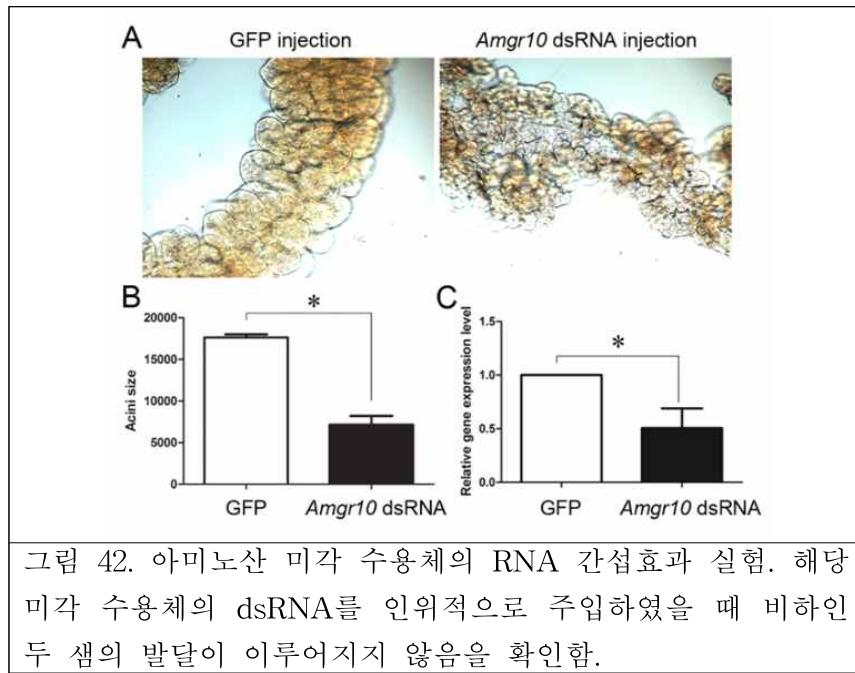


(3) 꿀벌의 비하인두 샘에서 아미노산을 인지하는 미각수용체 10번의 발현 분포 패턴을 확인하기 위해 polyclonal 항체를 제작하여 면역염색법 실험을 실시하였다(그림 42). 미각수용체 10번은 비하인두 샘의 개별 단위인 Acini의 표면 집중적으로 분포함을 확인하였다. 이는 Acini로 수송되는 아미노산을 인지하는 수용체 중 미각 수용체 10번이 그 중 하나임을 시사하는 것이다. Acini 표면에서 아미노산 수송에 관한 역할을 담당한다면 영양 상태에 따른 조직의 발달 및 성장, 세포 신호전달과정을 모니터링 할 것으로 생각할 수 있다.



(4) 꿀벌 비하인두 샘에서 아미노산 미각 수용체의 기능을 확인하기 위해 dsRNA 주입 기법을 이용하여 미각수용체의 발현을 인위적으로 낮추어 비하인두 샘의 발달을 확인하였

다. 미각수용체 10번의 서열의 길이는 약 1.3kb가 되며 이 가운데 0.6kb 서열을 선정하여 dsRNA를 *in vitro* transcription을 통하여 합성하였다. 합성한 dsRNA는 2ug/ul 농도로 꿀벌의 Abdomen에 주입한 후 실내외 사육을 통해 5일 후 비하인두샘을 해부하여 현미경으로 관찰하였다. 그림 43에서 보듯이 대조군으로 GFP dsRNA를 주입한 꿀벌의 경우 비하인두 샘은 정상적인 발달을 보인 반면 미각 수용체 10번의 dsRNA를 주입한 꿀벌은 비하인두 샘이 전혀 발달하지 못함을 확인하였다. 실제로 현미경으로 관찰한 비하인두 샘의 Acini는 크기가 정상군에 비해 2.5배 작았고, 미각수용체 10번의 dsRNA 주입으로 인해 미각수용체 10번의 발현 또한 비하인두 샘에서 낮음을 확인하였다. 이는 꿀벌의 아미노산 수용체의 인위적인 저발현이 꿀벌의 영양 기관의 발달과 성장 저하를 일으킴을 확인한 것이다. 비하인두 샘의 미발달 원인으로 미각 수용체에 의한 아미노산의 수송이 원활히 이루어지지 않아 발달이 이루어지지 않았다는 가정하에 꿀벌의 혈립프와 비하인두 샘에서 아미노산 함량을 분석하였다. 혈립프에서는 아미노산 함량이 대조군과 유의적인 차이가 나지 않은 반면, 비하인두 샘내 아미노산 함량은 아미노산 미각수용체 dsRNA 주입 꿀벌의 Acini에서 대조군에 비해 전반적으로 매우 낮은 수치를 보였다(그림 44). 이를 통해 미각수용체 10번은 조직 내로 수송되는 영양소를 감지하여 수송에 중요한 역할을 하여 조직이 발달하였다.



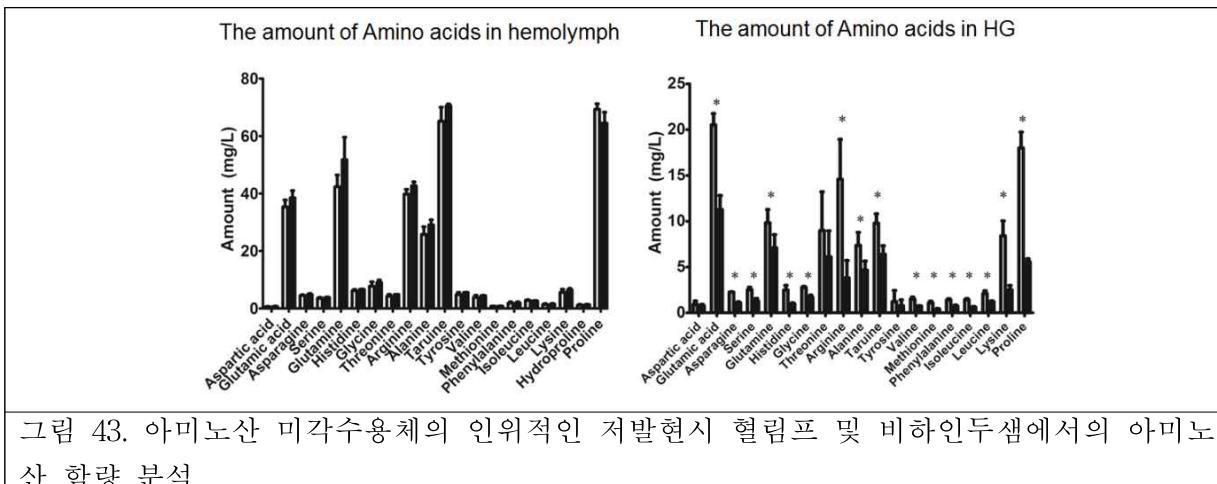


그림 43. 아미노산 미각수용체의 인위적인 저발현시 혈립프 및 비하인두샘에서의 아미노산 함량 분석.

다. 영양상태에 따른 꿀벌의 생리적 변화 연구: 꿀벌 아미노산 수용체의 발현에 따라 변화하는 꿀벌 유전자군 동정-전사체 분석

(1) 위의 결과를 토대로 꿀벌의 아미노산 수용체를 인위적으로 저발현시킨 꿀벌의 특정 조직에서 변화하는 유전자군을 선별하기 위해 RNA 전사체분석을 시도하였다(그림 45).

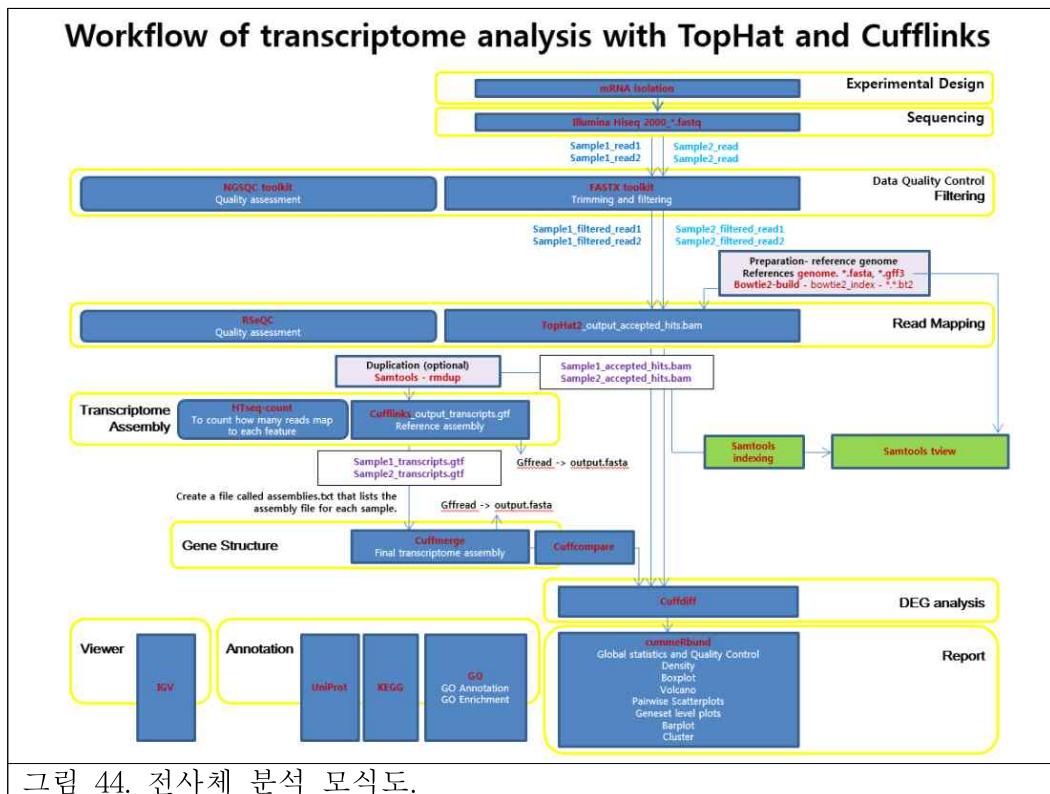


그림 44. 전사체 분석 모식도.

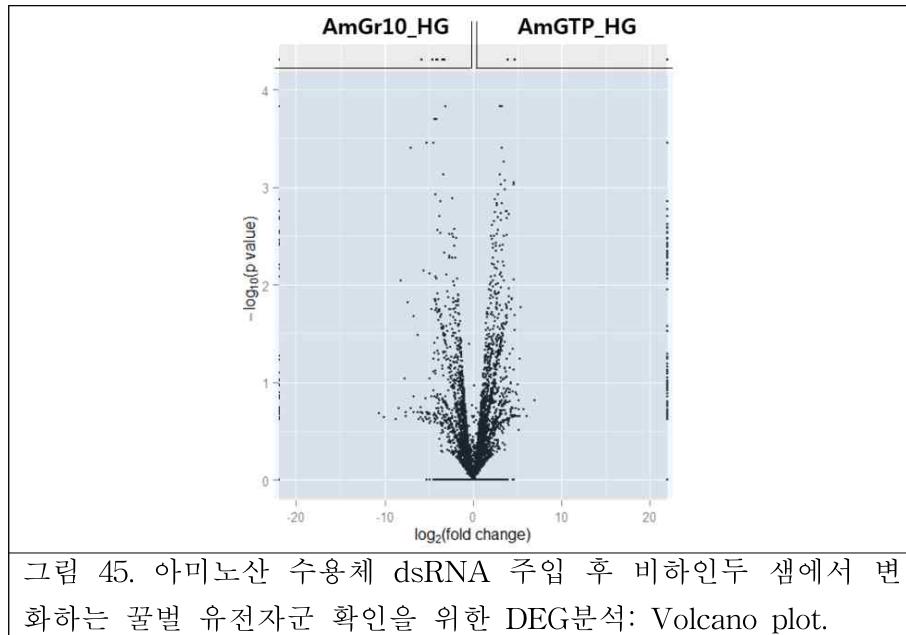


그림 45. 아미노산 수용체 dsRNA 주입 후 비하인두 샘에서 변화하는 꿀벌 유전자군 확인을 위한 DEG분석: Volcano plot.

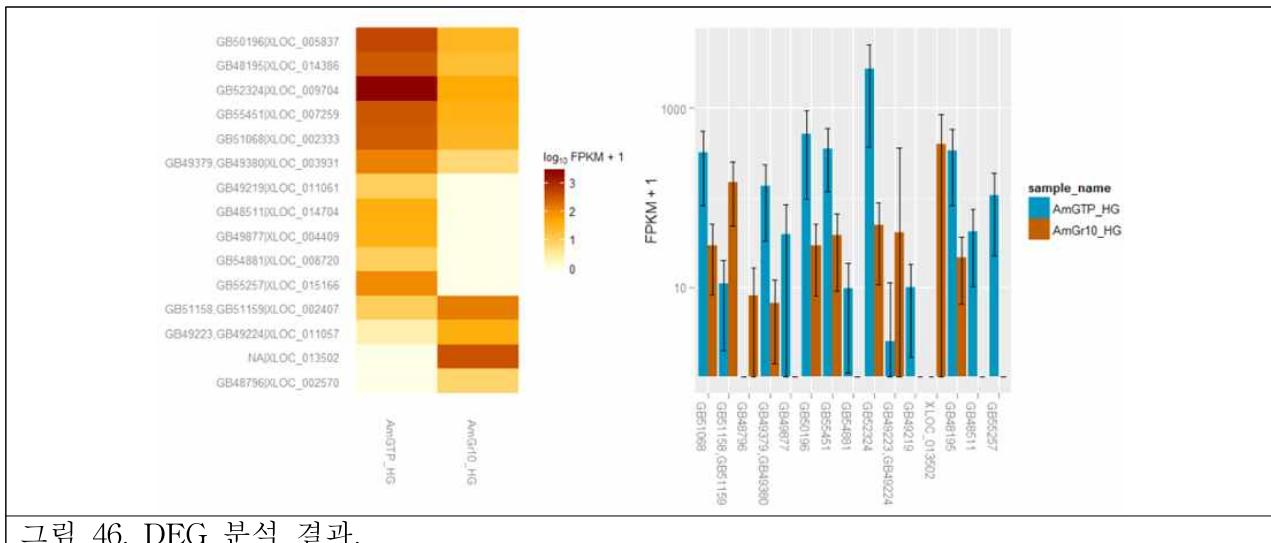


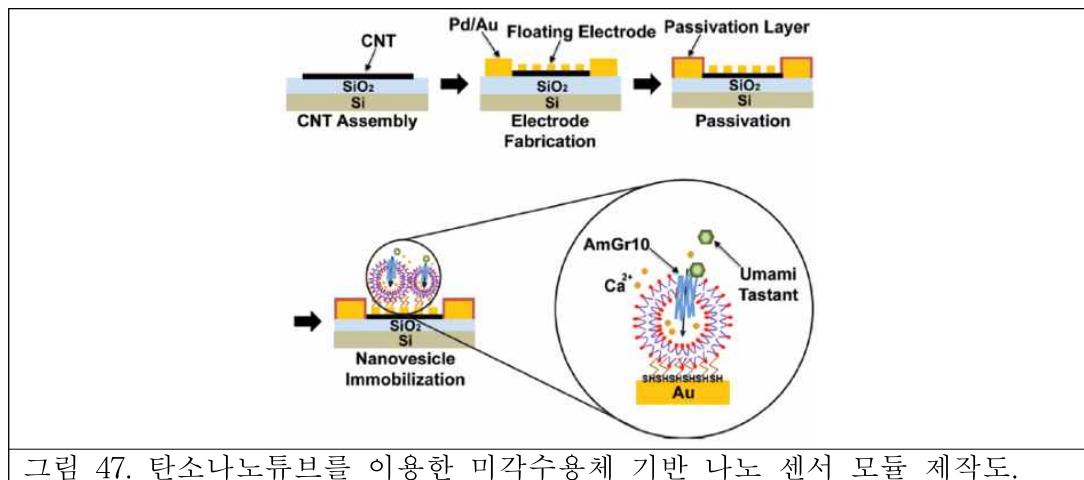
그림 46. DEG 분석 결과.

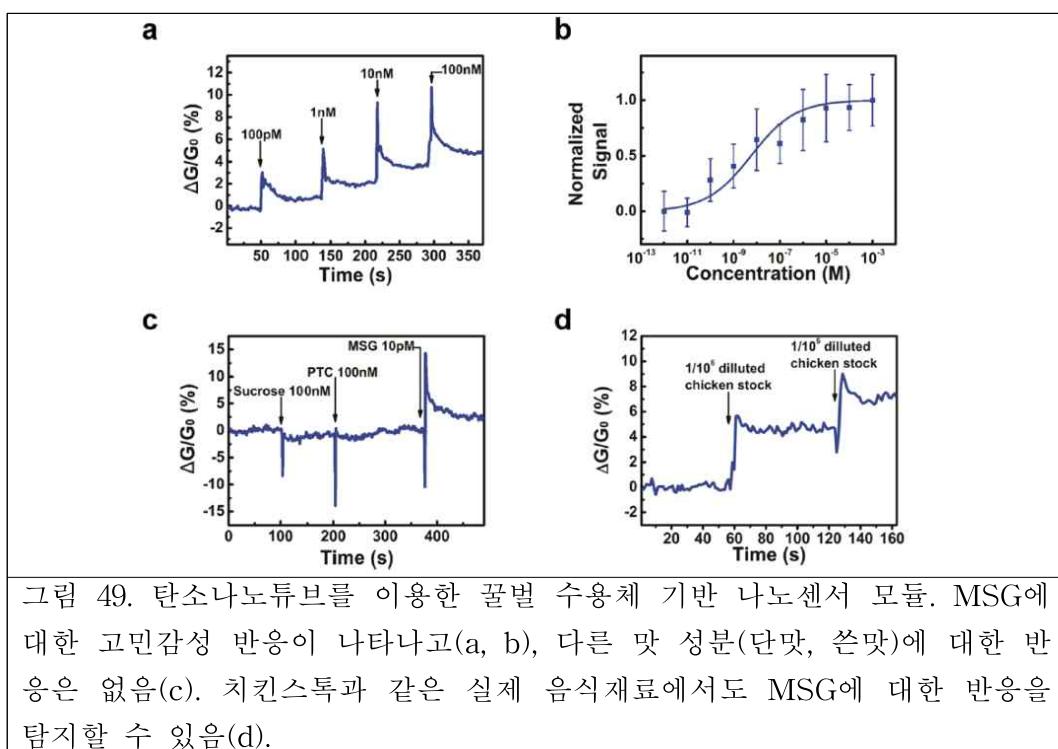
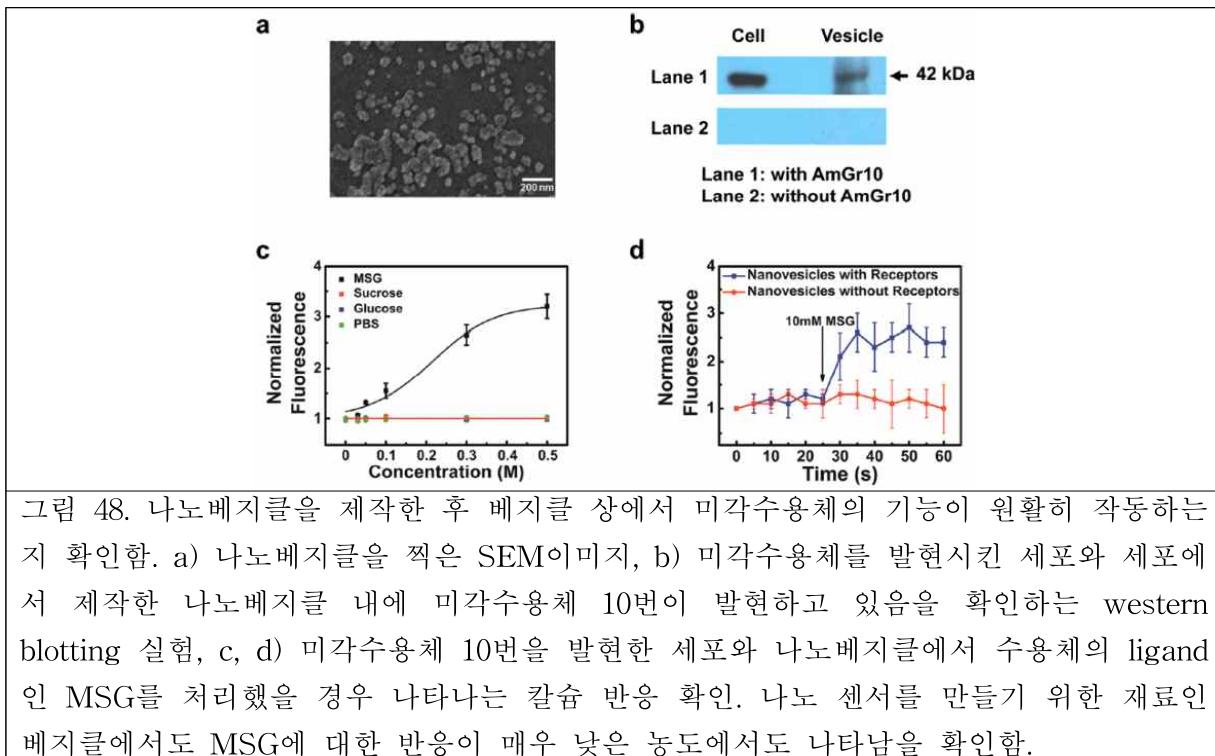
(2) 꿀벌 체내 영양소를 인지하고 수송에 관련하는 아미노산 수용체의 억제는 꿀벌의 발달 및 성장을 조절하였고, 위 결과에서 보듯 아미노산 수용체의 발현정도는 조직 발달과 성장 및 항상성 유지에 관여하는 많은 유전자군의 발현이 조절하는 것으로 확인하였다.

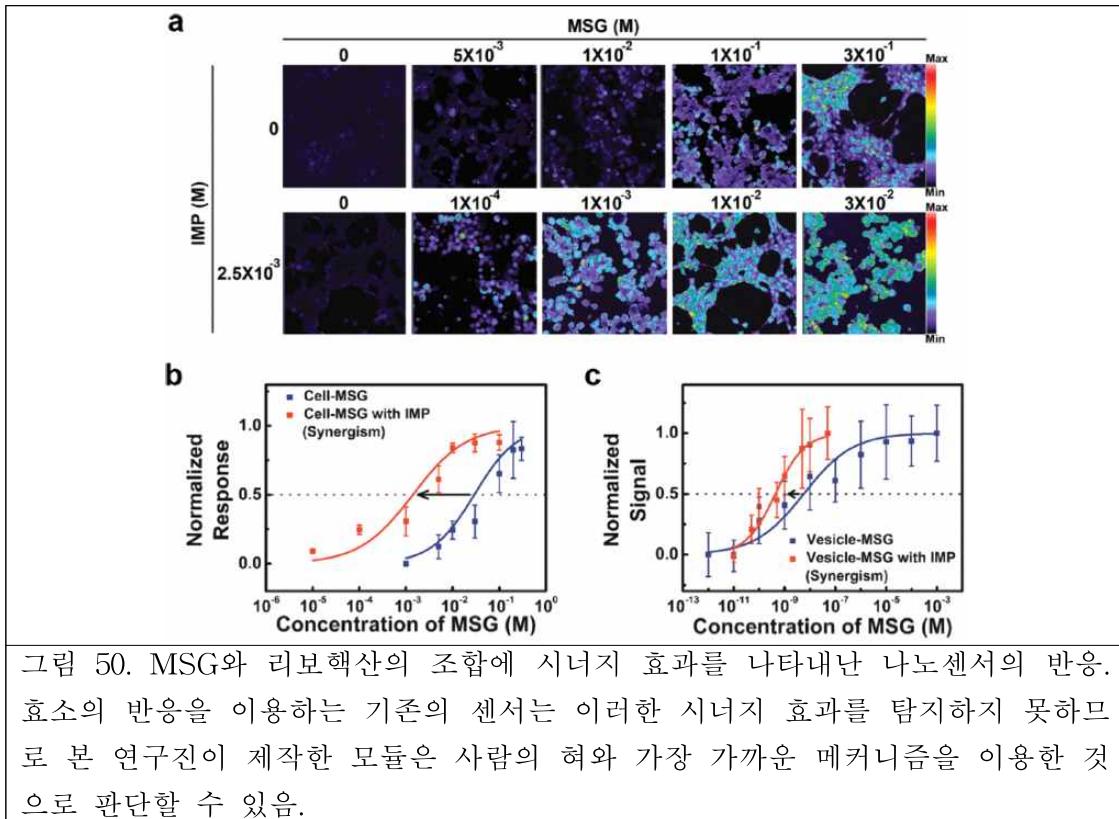
라. 꿀벌 미각수용체를 이용한 생체기반 바이오센서 제작 연구

(1) 본 연구진이 동정하고 기능을 분석한 꿀벌 아미노산 미각수용체는 포유류의 우마이 수용체와 그 기능이 같음을 확인하였다. 미각수용체 10번은 꿀벌의 내·외부 기관에 존재하면서 외부로는 밀원의 아미노산을 탐지하고, 내부로는 체내의 아미노산을 모니터링할 것으로 추측된다. 또한 미각수용체 10번은 영양분을 탐지하는 것뿐만 아니라 꿀벌의 계급 분화에도 밀접한 연관이 있는 것으로 밝혀졌다. 따라서 미각수용체 10번에 대한 생리학적 연구는 기후변화에 의한 꿀벌의 이상행동을 연구하는데 매우 중요한 마커가 될 것으로 생각한다. 본 연구진 이러한 연구 결과를 바탕으로 미각수용체 10번을 이용한 꿀벌 생체 기반 바이오센서를 개발하고자 하였다. 아래 그림과 같이 미각수용체 10번을 인위적으로 발현시킨 세포에서 나노 베지를 제작한 후 이를 탄소나노튜브에 붙여 물질에

대한 민감도를 높게 만드는 방식으로 진행하였다. 미각수용체 10번은 아미노산 중 우마미 수용체에서 반응하는 glutamate에 대한 반응이 매우 높기 때문에 식품의 조미료로 쓰이는 MSG에 대한 반응성을 확인하기로 하였다. 미각수용체 10번을 transfection한 세포에서 MSG에 대한 반응성을 칼슘의 농도 변화로 확인을 하고 세포에서 추출, 제작한 나노베지를에서 또한 MSG에 대한 반응을 확인하였다. 미각수용체를 발현시킨 세포와 나노베지를은 단맛, 쓴맛을 내는 물질에 반응하지 않고 MSG에 대한 선택적 반응을 보임으로서 selectivity가 높고, 나노베지를의 경우 낮은 농도에서도 반응이 나타남으로 민감도도 매우 높은 결과를 보여주었다. 나노베지를 탄소나노튜브에 접착시킨 후 금으로 만든 채널에 바이오센서 모듈을 제작하여 동일한 방식으로 MSG에 대한 반응성을 살펴보았다. 기존의 바이오센서와는 달리 본 연구진이 제작한 모듈은 MSG 100pm에서 반응성이 나와 매우 높은 민감도를 가지며, 기타 다른 맛 성분(단맛, 쓴맛 등)에 반응을 하지 않았다. 또한 바이오센서 모듈이 실제 음식에서도 MSG를 탐지하는지 알아보기 위해 서양 조미료(치킨스톡)를 희석하여 처리한 결과 실제 음식 성분에서도 쉽게 반응을 하였다. 끝으로 꿀벌 수용체 기반 바이오센서 모듈은 효소반응을 원리로 제작한 기존의 센서와는 달리 수용체 세포를 직접 이용하기 때문에 MSG와 리보핵산의 조합으로 나타나는 시너지 반응을 탐지할 수 있었다. 이는 사람의 혀와 매우 유사한 메커니즘으로 작동하는 방식이기이므로 본 연구는 사람의 혀를 모방한 민감도 높은 바이오센서를 제작한 것에 의의가 있다.







8. 기온의 변화에 따른 꿀벌의 봉군 온도 조절에 관한 연구

가. 월동기에 꿀벌의 생존에 적절한 온도와 봉군 내부의 온도 조절을 확인하기 위해 온실과 외부에 꿀벌 봉군을 각각 배치하고, 봉군에 들어간 소비판의 양을 조절하여 실험을 진행하였다.

- (1) 온실 배치 봉군: 소비 1매, 소비 2매, 소비 4매
- (2) 외부 배치 봉군: 소비 1매, 소비 2매, 소비 4매



그림 51. 월동기 온실과 외부에 봉군을 각각 배치하고 각 봉군의 소비의 양을 다르게 하여 꿀벌의 온도 조절을 확인함.



그림 52. 온도 감지 센서와 봉군 내 온도 감지 센서의 위치.

나. 온실 내 봉군 외부의 온도는 평균 6.77°C 이며 일조시간에 따라 기온의 변화가 심하게 나타난다. 반면 봉군 내의 온도는 비교적 일정하게 유지되고 있는데 소비의 양에 따라 평균온도가 상승($13.06^{\circ}\text{C} \rightarrow 16.15^{\circ}\text{C} \rightarrow 20.68^{\circ}\text{C}$)하고 기온의 변화폭도 현저히 낮은 수준으로 유지가 되고 있다.

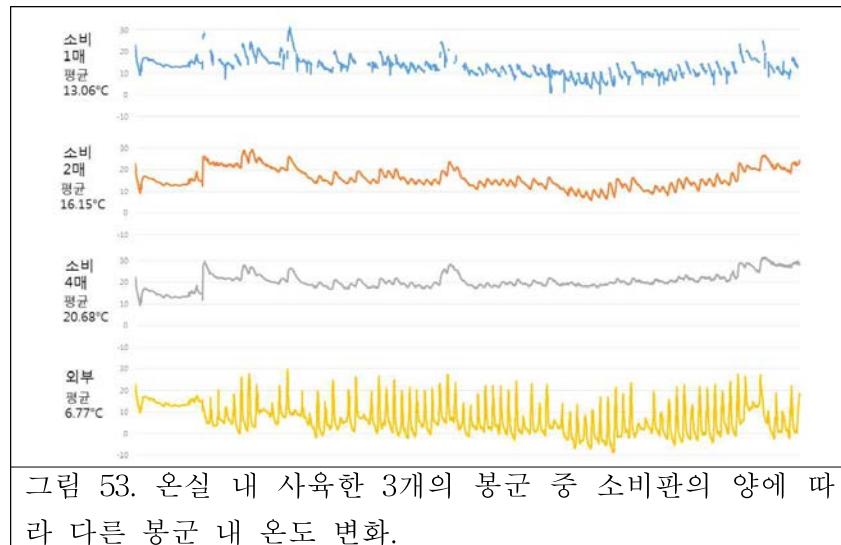


그림 53. 온실 내 사육한 3개의 봉군 중 소비판의 양에 따라 다른 봉군 내 온도 변화.

다. 반면 온실이 아닌 외부에 사육한 봉군은 외부 평균 온도 4.43°C 이며 봉군 내부의 온도는 외부 온도에 비해 약 6°C 이상 높지만 온실에 사육한 봉군에 비해 소비의 매수에 따라 각각 평균온도가 $2\sim6^{\circ}\text{C}$ 가량 낮은 것으로 확인되었다. 온실 봉군과 마찬가지로 소비가 4배 들어간 봉군이 가장 높은 온도를 보이며 변화의 폭이 낮은 것으로 나타났다.

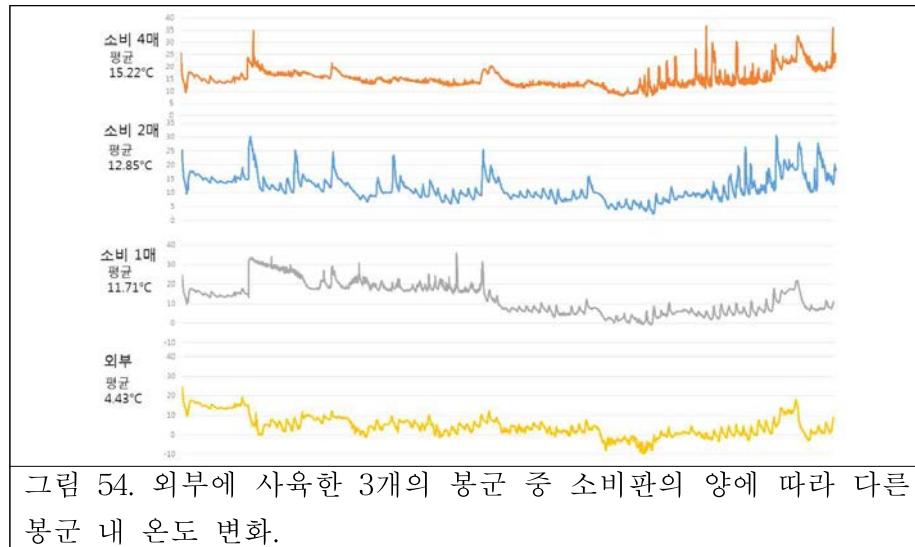


그림 54. 외부에 사육한 3개의 봉군 중 소비판의 양에 따라 다른 봉군 내 온도 변화.

라. 또한 온실 및 외부 봉군 내 꿀벌이 있는 소비 부분이외에 빈공간의 온도를 분석한 결과를 보면 각각의 봉군 외부 온도에 비해 1°C 이상 높아 꿀벌 봉구가 존재하는 소비 내 온도와 비교했을 때 봉군 내 빈공간의 온도는 봉군 외부 온도와 유사하다고 할 수 있었다. 이는 꿀벌 봉구가 조직 전체를 유지하기 위해 국소적으로 생체온도를 유지하는 시스템을 갖고 있다고 생각할 수 있다.

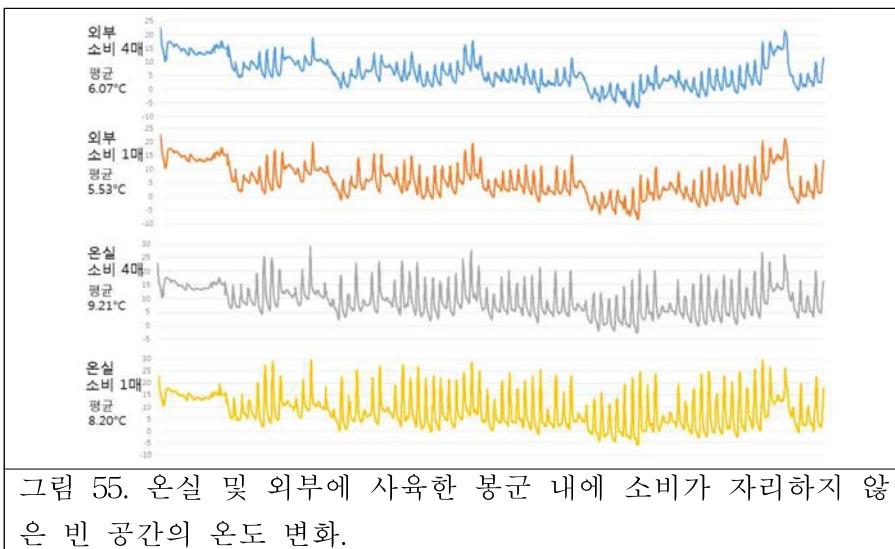


그림 55. 온실 및 외부에 사육한 봉군 내에 소비가 자리하지 않은 빈 공간의 온도 변화.

9. 기온의 변화에 따른 꿀벌의 생리학적 변화 확인

- 가. 봉군 중 상태가 안정한 봉군을 선정하여 유리온실에서 각 온도별(20°C, 30°C, 40°C)로 측정하였다
- 나. 5일에 한 번씩 봉군의 무게 및 소비판을 확인하였으며, 호보를 이용하여 벌통 내부의 온도를 측정하였다(그림 57). 화분떡은 각 봉군별로 넣어주었으며, 설탕물은 물과 설탕의 비율을 1:1로 섞어 벌통 반대편에 놓았다(그림 58).

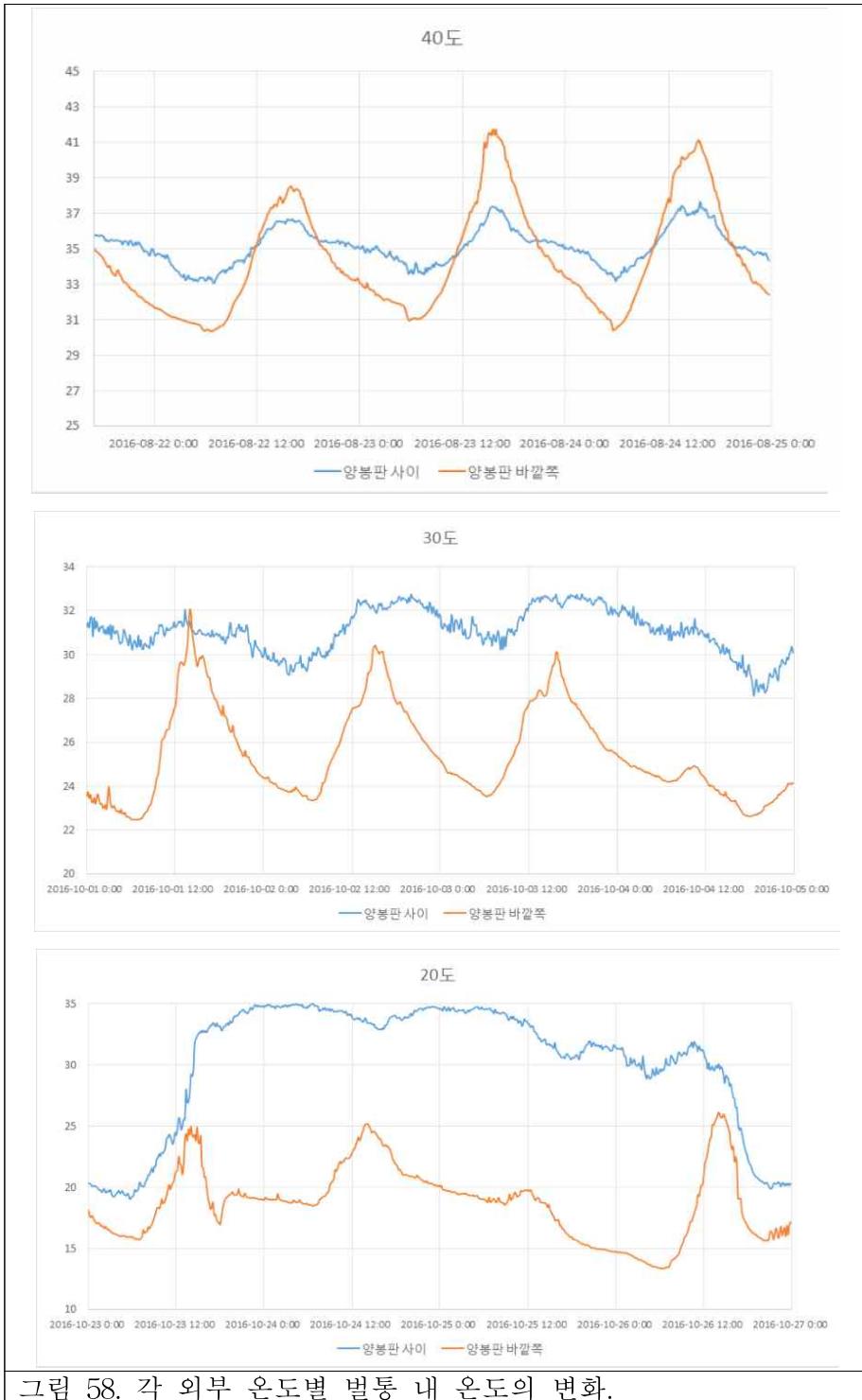


그림 56. 벌통 내부에 호보 센서를 넣고 측정.



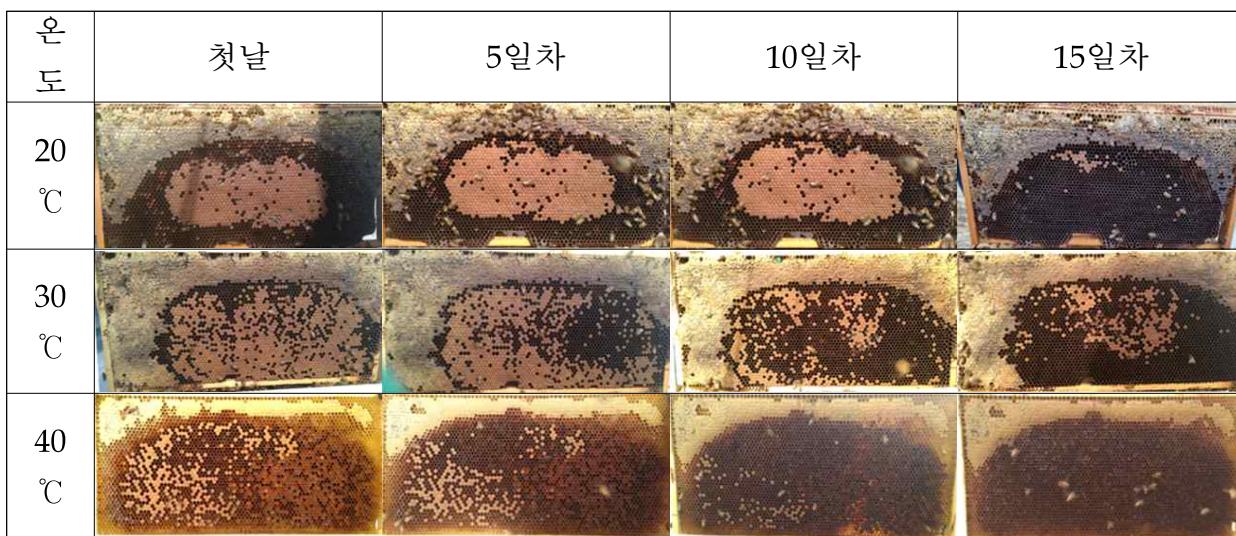
그림 57. 벌통과 설정물의 위치.

- 다. 소비판 사이는 외부온도와 상관없이 30~35°C를 유지하는 반면, 소비부분 이외의 빙공간은 외부온도와 상관관계가 있다는 것을 볼 수 있다(그림 59). 소비판 사이의 경우 주로 유충을 기르기 때문에 온도를 유지해야 하고, 소비부분 이외의 빙공간의 경우 유충이 없기 때문에 온도 유지를 하지 않는 것으로 보인다.

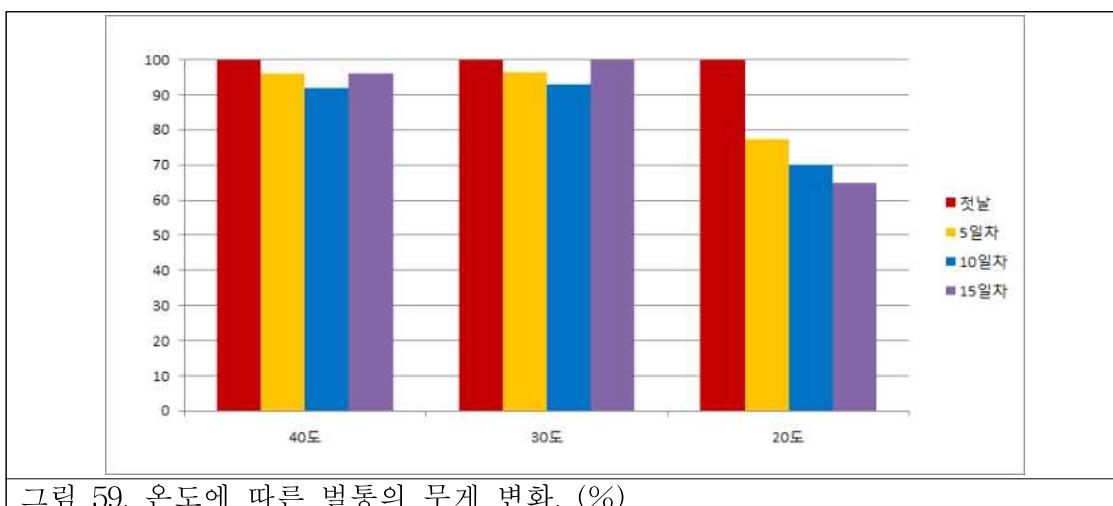


라. 하지만 소비판 사이의 온도가 유지가 되더라도, 소비판 내 우화 및 산란율은 외부온도와 관계가 있는 것으로 보인다(표 3). 온도가 낮으면 우화가 늦게 진행되고, 온도가 너무 높으면 우화는 되지만 알을 낳지 않는 것으로 확인되었다.

표 3. 온도별 양봉판의 변화.



마. 벌통의 무게의 경우 40°C, 30°C에서는 크게 차이가 없었으나, 20°C에서는 시간이 지날수록 벌통의 무게가 점점 줄어드는 것을 확인할 수 있다(그림 60). 40°C, 30°C에서는 설탕물을 채취해오는 횟수가 많았지만, 20°C에서는 설탕물을 채취하는 횟수가 많이 줄어들고 이로 인하여 벌통 내에 축적해 놓았던 설탕물이 많이 소모되어 무게가 줄어든 것으로 생각된다.



10. 기온의 변화에 따른 꿀벌의 유전자 발현 변화 확인

가. 기온의 변화에 대응하는 꿀벌의 유전자군을 확인하기 위해 RNA 전사체 분석을 진행하였다.

나. 샘플은 아래와 같은 방식으로 채집하였고, 월동시기에서 봄철 꿀벌의 활동이 시작되기 직전단계에 기온에 대한 꿀벌의 발육과 산란, 생존 등 꿀벌의 대응을 확인하기 위해 2016년 2월에 샘플을 채집하였다.

- (1) 온실 배치 봉군: 소비 1매, 소비 2매, 소비 4매에서 각각 30마리씩 꿀벌 채집
- (2) 외부 배치 봉군: 소비 1매, 소비 2매, 소비 4매에서 각각 30마리씩 꿀벌 채집

다. 샘플에서 추출한 RNA를 각각 동일 농도로 전사체 분석(Illumina highseq2000)후 DEG 분석을 진행하였다. 그림 64에서처럼 각 샘플 군마다 새로운 유전자의 발현이 상당히 높

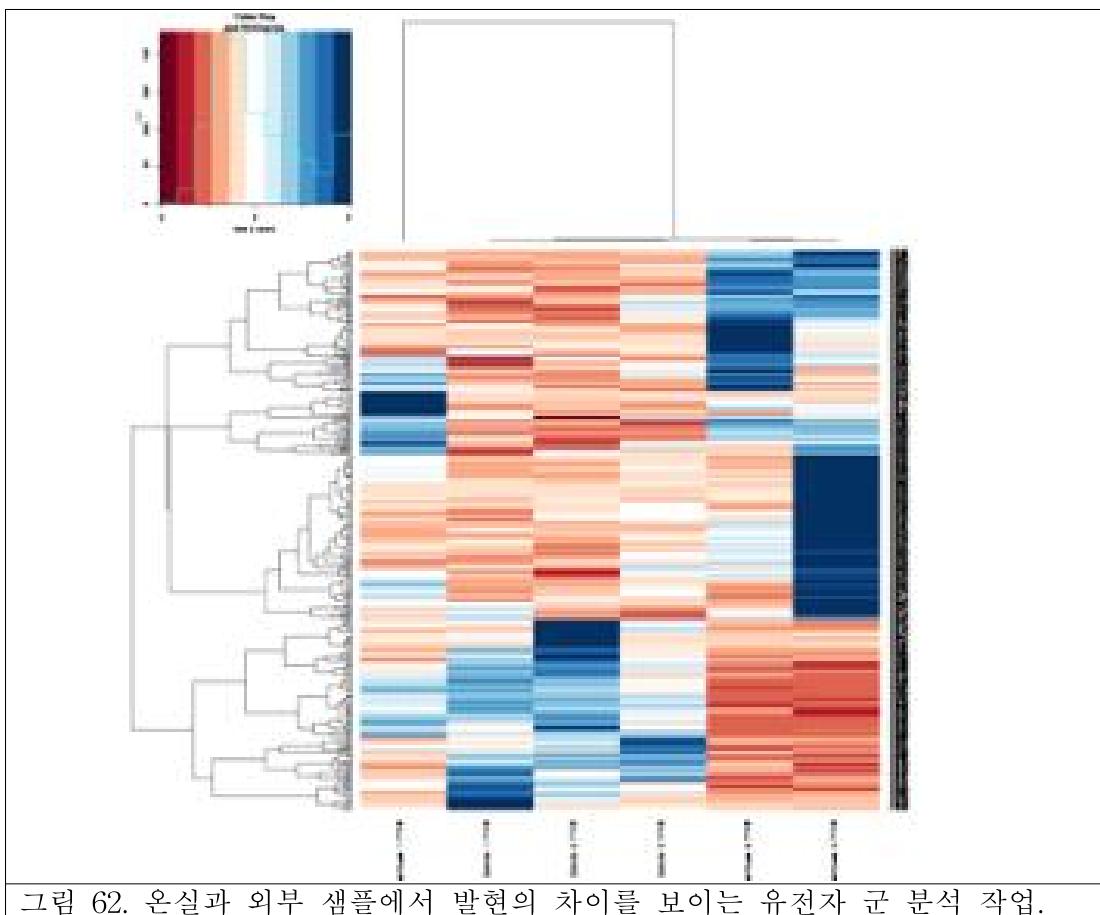
고 이를 annotation하는 작업이 진행 중인데 온실에서 채집한 꿀벌 샘플은 외부에서 채집한 샘플에 비해 육아와 관련된 유전자의 발현이 높은 것으로 나타났다. 꿀벌이 산란과 육아를 하려면 33~35°C의 온도, 즉 동태 온도를 가져야 하고 월동을 하려면 8~10°C의 온도, 즉 외기 온도가 38°C 이상으로 올라가면 거의 활동을 중지한다. 가을철이 되어 아침, 저녁으로 외기 온도가 21°C 이하로 떨어지면 봉구를 약간씩 이루기 시작한다. 외기 온도가 10°C만 되면 완전히 봉구를 이루고 중앙 소비 바닥 근방에 3~4겹으로 뭉친다. 겨울철 꿀벌은 소매 4장을 이루는 봉세가 유지되면 산란판 부근의 온도는 약 25°C 정도 유지되므로 일부 가능한 육아활동이 유지된다고 생각할 수 있다.

Name	Gene					Transcript				
	SUM	KNOWN	Novel	MOD	UNEXP	SUM	KNOWN	Novel	UNEXP	
Greenhouse_1	12,653	4,986	1,158	6,509	529	44,833	26,795	18,038	1,015	
Greenhouse_2	12,450	4,840	1,119	6,491	732	44,368	26,431	17,937	1,480	
Greenhouse_4	12,120	4,610	1,044	6,466	1,062	43,831	26,000	17,831	2,017	
Outside_1	12,621	4,967	1,148	6,506	561	44,828	26,797	18,031	1,020	
Outside_2	12,627	4,982	1,136	6,509	555	44,752	26,738	18,014	1,096	
Outside_4	12,439	4,801	1,148	6,490	743	44,395	26,418	17,977	1,453	

그림 60. 각 샘플에서 발견한 새로운 유전자 수 정보.

No	Name	Raw	Clean	Mapped	Uniquely Mapped	READ 1 / READ 2	Strand(+) / Strand(-)	Splice
1	Greenhouse_1	56,944,836	55,659,022 (97.7%)	50,198,400 (90.2%)	49,471,122 (88.9%)	24,721,068 24,750,054	24,708,437 24,762,685	13,630,174 (24.5%)
2	Greenhouse_2	55,068,870	53,917,986 (97.9%)	47,719,275 (88.5%)	45,893,782 (85.1%)	22,917,389 22,976,393	22,920,609 22,973,173	12,683,926 (23.5%)
3	Greenhouse_4	53,068,702	52,014,538 (98.0%)	46,243,988 (88.9%)	42,041,933 (80.8%)	21,064,479 20,977,454	20,986,986 21,054,947	14,724,361 (28.3%)
4	Outside_1	50,195,616	48,905,250 (97.4%)	43,514,146 (89.0%)	42,840,518 (87.6%)	21,433,528 21,406,990	21,411,744 21,428,774	11,368,866 (23.2%)
5	Outside_2	48,699,584	47,360,370 (97.3%)	41,124,945 (96.8%)	40,552,523 (85.6%)	20,265,984 20,286,539	20,263,294 20,289,229	10,574,353 (22.3%)
6	Outside_4	52,625,534	51,235,602 (97.4%)	45,658,670 (99.1%)	44,886,808 (87.6%)	22,447,040 22,439,768	22,385,109 22,501,699	12,607,729 (24.6%)

그림 61. 6개의 샘플에 대한 contig 분석.



Genelid	GeneName	Desc	Value_1	Value_2	log2fc
TBIG008753	MRJP4	Major royal jelly protein 4 [Source:SWISS;Acc:Q17061]	6.52E+03	27.9	-7.87
TBIG002435	Pbprp1	Pheromone-binding protein-related protein 1 [Source:SWISS;Acc:P54191]	41.3	0.185	-7.8
TBIG007797	-	-	45.2	0.249	-7.51
TBIG008305	RAP1GAP	Rap1 GTPase-activating protein 1 [Source:SWISS;Acc:P47736]	1.52E+03	11	-7.11
TBIG008747	MRJP4	Major royal jelly protein 4 [Source:SWISS;Acc:Q17061]	3.67E+03	29.8	-6.94
TBIG003713	-	-	1.45	0.0165	-6.46
TBIG000441	-	-	2.05	0.0279	-6.2
TBIG011934	-	-	0.678	0.0192	-5.14
TBIG003714	-	-	0.912	0.0268	-5.09
TBIG013534	-	-	1.65	0.0616	-4.75
TBIG001621	-	-	0.27	42.2	7.29
TBIG000500	-	-	0.124	12.3	6.63
TBIG013322	SETMAR	Histone-lysine N-methyltransferase SETMAR [Source:SWISS;Acc:Q53H47]	0.0166	1.48	6.48
TBIG001875	SSP	Probable salivary secreted peptide [Source:SWISS;Acc:D8KY57]	0.183	10.7	5.87
TBIG003841	-	-	0.0306	1.56	5.67
TBIG008106	-	-	0.521	24.5	5.56
YPF17_PLAF					
TBIG003910	7	Protein PF14_0175 [Source:SWISS;Acc:Q8ILR9]	0.0826	3.13	5.25
TBIG010238	-	-	0.00869	0.273	4.97
TBIG000762	Aper1	Peritrophin-1 [Source:SWISS;Acc:O76217]	0.539	16.4	4.92
TBIG010012	Or33b	Odorant receptor 33b [Source:SWISS;Acc:P81915]	0.0207	0.586	4.82

그림 63. DEG분석 결과 온실과 외부 샘플에서 특이적으로 과발현하는 유전자 중 가장 발현이 높은 각각의 유전자 10개에 대한 정보.

제2절 2세부: 기후변화에 의한 꿀벌 봉군집단의 특이 발현 유전자의 기능 및 발현기전 분석

1. 2015년 분석한 경로맵 분석 결과 중 통계학적으로 유의한 경로맵을 확보하기 위한 GSEA
 - 가. Gene Set enrichment Analysis (GSEA) 방법
 - (1) 전사체 분석을 통하여 획득한 모든 유전자(n=10,943)의 발현량을 GSEA에 적용하였다.
 - (2) 현재까지 알려진 132개의 꿀벌 각각의 KEGG pathway에 적용되는 각 유전자의 리스트를 발현량에 따라 순서대로 나열 후 enrichment scores를 계산하였다.
 - (3) 132개의 각 pathway에 관여하는 유전자 중 최소 15개 이상의 유전자가 확인된 pathway만들 선택하였다.
 - (4) 위의 방법과 동일한 방법으로 컴퓨터를 이용한 1,000번의 시뮬레이션을 통하여 유의성 확인하였다.
 - (5) 꿀벌 아세틸콜린에스터라제1(AChE1)의 발현과 관련이 있는 육아억제상태가 꿀벌에게 미치는 분자생물학 및 생리학적 요인을 구명하기 위하여 정상육아 외역봉 vs. 육아억제(외역억제) 외역봉, 정상육아 내역봉 vs. 정상육아 외역봉, 정상육아 내역봉 vs. 육아억제 내역봉, 육아억제 내역봉 vs. 육아억제(외역억제) 외역봉의 조건으로 각각의 GSEA 결과를 비교하고, 각 비교조건별 통계적 유의성이 있는 pathway (NOM p-value > 0.05, ES value > 0.5)를 확인하였다(표 4).

표 4. 정상육아와 육아억제(외역억제) 내역봉 및 외역봉간의 각 비교 조건별 통계적 유의성을 보이는 경로맵 분석 결과

경로맵	ES ²	NES ³	NOM p-val ⁴	FDR q-val ⁵
<정상육아 내역봉 vs 정상육아 외역봉>				
Glycerophospholipid metabolism	0.51	1.82	0.00	0.04
N-glycan biosynthesis	0.51	1.59	0.02	0.13
Fatty acid degradation (dme00071)	0.56	1.59	0.01	0.11
Glycosylphosphatidylinositol (GPI) – anchor biosynthesis	0.57	1.58	0.03	0.10
Phototransduction – fly	-0.58	-1.62	0.01	0.38
Cysteine and methionine metabolism	-0.51	-1.52	0.03	0.30
RNA degradation	-1.46	-1.46	0.03	0.27
<정상육아 내역봉 vs 육아억제(외역억제) 내역봉>				
Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchor biosynthesis	0.56	1.53	0.03	0.35
RNA polymerase	0.56	1.50	0.04	0.30
Proteasome	-0.54	-1.65	0.00	0.27
Cysteine and methionine metabolism	-0.50	-1.45	0.03	0.35
<정상육아 외역봉 vs 육아억제(외역억제) 외역봉>				
Aminoacyl-tRNA biosynthesis	-0.59	-1.78	0.00	0.09
Glycerophospholipid metabolism	-0.54	-1.75	0.00	0.06
Dorso-ventral axis formation	-0.64	-1.70	0.01	0.05
Fatty acid degradation	-0.61	-0.62	0.02	0.09
Proteasome	-0.52	-1.61	0.00	0.08
Valine, leucine and isoleucine degradation	-0.54	-1.56	0.03	0.10
N-glycan biosynthesis	-0.51	-1.52	0.02	0.12

Notch signaling pathway	-0.57	-1.47	0.05	0.16
Basal transcription factors	-0.50	-1.46	0.04	0.45

<육아억제(외역억제) 내역봉 vs 육아억제(외역억제)

내역봉>

Phagosome	0.58	1.71	0.00	0.08
Protein export	0.66	1.67	0.01	0.07
Aminoacyl-tRNA biosynthesis	-0.57	-1.64	0.01	0.32
Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	-0.61	-1.62	0.01	0.21

나. GSEA 결과의 해석

(1) 노동 역할에 따른 경로맵 차이

- (가) 내역봉은 하인두샘에서 육아에 사용되는 로얄젤리의 주성분 단백질을 합성하고 분비 한다. 로얄젤리의 주성분으로는 단백질이 가장 많은 양을 차지하고 있고, 지방산이 뒤를 잇기 때문에 Glycerophospholipid metabolism, N-glycan biosynthesis와 같은 동화 작용에 관련된 경로맵의 활성이 증가한 것으로 판단된다.
- (나) 정상육아 외역봉보다 정상육아 내역봉에서 fatty acid degradation의 활성이 높은 것은 내역봉이 에너지 생산을 위한 자원으로 지방산에 대한 의존도가 큰 것과 관련이 있다.
- (다) 정상육아 내역봉보다 정상육아 외역봉에서 phototransduction pathway의 활성이 높은 것을 확인하였다. 내역 활동은 빛이 차단된 어두운 봉군 내에서 일어나는 반면 외역 활동은 빛의 인지와 해석이 필요하기 때문에 phototransduction pathway의 활성이 높은 것으로 보여진다.
- (라) Cystein and methionine metabolism pathway는 정상육아 외역봉에서 정상육아 내역봉보다 높은 활성을 보인 결과는 단백질원을 섭취하지 않은 외역봉의 경우 황을 포함하는 필수 아미노산의 합성이 필요하고, 이를 위하여 다른 아미노산 자원으로부터 해당 경로맵을 이용하여 항상성을 유지하는 것으로 판단된다.
- (마) 고분자 분해와 관련 있는 경로맵인 RNA degradation pathway와 기준 값(0.5) 보다 약간 낮은 ES value (0.49)로 인하여 제시되지 않은 proteasome pathway 모두 정상육아 외역봉에서 정상육아 내역봉 보다 증가된 활성을 보였다. 이는 외역봉으로의 역할 수행에 있어 불필요하거나 손상된 단백질의 분해가 활발하게 이루어지는 것으로 보인다.
- (바) 특히 텐트 설치에 의하여 육아가 억제된 내역봉과 정상육아 내역봉을 비교한 GSEA 결과와 정상육아 내역봉과 정상육아 외역봉의 GSEA 결과를 확인하였을 때 위 두 경로맵(RNA degradation, proteasome)이 육아억제(외역억제) 내역봉과 정상육아 외역봉 모두에서 공통적으로 정상육아 내역봉보다 활성이 높은 것으로 나타났다. Cystein and methionine metabolism pathway 역시 정상육아 내역봉 보다 정상육아 외역봉과 육아억제(외역억제) 내역봉에서 공통적으로 높은 활성을 보여주었다.
- (사) 반면에 텐트 설치에 의하여 육아가 억제된 육아억제(외역억제) 외역봉과 정상육아 외역봉을 비교한 GSEA의 결과에서 높은 활성을 보여준 Glycerophospholipid metabolism (로얄젤리 합성 관련), N-glycan biosynthesis pathway (로얄젤리 합성 관련), fatty acid degradation (에너지 대사 관련)은 정상육아 내역봉과 정상육아 외

역봉을 비교하였을 때 정상육아 내역봉에서도 공통적으로 증가된 활성을 보였다.

(아) 요약하자면 어린 꿀벌의 내역 활동이 인위적으로 억제된 꿀벌들의 생리적 특성이 외역봉과 비슷하게 변하였고, 나이 많은 꿀벌의 외역 활동이 인위적으로 억제된 꿀벌들의 생리적 특성은 내역봉과 비슷하게 변하였다. 종합적으로 노동의 변화는 생리적으로 가역적임을 제시할 수 있는 결과라 할 수 있다.

(2) 육아 억제 상태에 영향을 받는 경로맵

(가) 위에서 언급한 것과 같이 정상육아 외역봉보다 육아억제(외역억제) 외역봉에서 높은 활성을 보여준 내역-경로맵(Glycerophospholipid, N-glycan biosynthesis and Fatty acid degradation)과 더불어 단백질 합성과 관련 있는 경로맵[aminoacyl-tRNA biosynthesis and RNA transport(기준보다 낮은 RS 값(0.39)으로 인하여 표에 제시하지 않음)]역시 육아억제(외역억제) 외역봉에서 높은 활성을 보였다. 뿐만 아니라 흥미롭게도 단백질과 아미노산의 분해와 관련 있는 경로맵(Proteasome and Valine, leucine and isoleucine degradation pathway) 또한 육아억제(외역억제) 외역봉에서 높은 활성을 보였다. 단백질 합성과 분해와 관련된 경로맵이 육아억제(외역억제) 외역봉에서 동시에 높은 활성을 보이는 현상은 천막을 통한 외역 억제가 이들 체내의 생리적 변화를 유도 하고 있기 때문으로 보인다. 이와 비슷한 형식으로 천막 설치에 의하여 육아가 억제된 육아억제(외역억제) 내역봉에서 정상육아 내역봉 보다 단백질 합성 관련 경로맵(Basal transcription factors and Ribosome pathway)과 단백질 분해 관련 경로맵(Proteasome and RNA dagradation pathway) 모두 높은 활성을 보임으로써 생리적 변화가 활발하게 진행됨을 다시 한 번 보여주었다.

(나) 정상육아 외역봉과 비교하였을 때 육아억제(외역억제) 외역봉에서 Notch signaling pathway의 활성이 증가하였다. Notch signaling pathway는 대부분의 다세포 생물에서 매우 잘 보존되어 있는 것으로써 배아 발생 단계 동안 세포 분화의 조절에 관여 할 뿐만 아니라 성체의 뇌 발달과 신경 기능에 있어 핵심 역할을 수행한다. 또한 초파리 성충 뇌에서 특정 자극에 반응하는 후각수용감각기를 자극하는 것으로 보아 후각적 자극의 반응에 관여하는 것으로 보인다. 종합 결과, 육아억제(외역억제) 외역봉과 정상육아 외역봉간 notch signaling pathway의 차이는 노동 분해 상태의 방해에 의하여 유도된 신경적 가소성의 결과로 해석 가능하다.

(다) 정상육아 외역봉과 비교하여 육아억제(외역억제) 외역봉에서 높은 활성을 보여준 Dorso-ventral axis formation은 곤충과 척추동물의 배아 발생 단계에서 중추신경계의 발달의 중요한 과정으로 알려져 있기 때문에 외역 상태에 따른 활성의 차이를 설명하기에 어려움이 있다. 하지만 육아억제(외역억제) 외역봉에서 확인하게 확인되는 활성의 증가($ES = -0.65; p=0.01$)로 미루어 볼 때 육아 활동의 억제가 꿀벌의 뇌에 어떤 중요한 변화를 가져오는 것으로 판단된다.

다. 각 조건별 차등 조절되는 Neuroactive ligand-receptor interaction pathways

GSEA 결과 통계적 유의성을 보이진 않았지만, neuroactive ligand-receptor interaction pathway를 구성하는 다양한 문자 요소들이 스트레스에 대한 생리적 반응과 관련된 것으로 알려진 neuroactive-ligand로 확인되었다. 각 비교 조건별로 다양한 유전자들이 모여 있는 것을 확인하였고 GSEA의 결과에서 이들은 0.05 이상의 낮은 p-value를 보여주었다. 그럼에도 불구하고 몇몇 유전자들은 각 조건별 비교 결과에서 2배가 넘은 발현 차이

를 보였다(표 5).

표 5. 각 비교 조건별 Neuroactive ligand-receptor interaction pathway에 관여하는 유전자들의 발현 양상

비교 조건	유전자 설명	증감(배)
정상육아 내역봉 / 정상육아 외역봉	GABA-gated ion channel	13.1
정상육아 외역봉	Serotonin receptor	6.26
	Serotonin 5-HT1 receptor	2.76
	Diuretic hormone receptor	2.47
	Adipokinetic hormone receptor	2.10
정상육아 외역봉 / 정상육아 내역봉	PREDICTED: partitioning defective 3 homolog	57.7
정상육아 내역봉	Adenosine receptor	10.2
	NMDA receptor 1	8.13
	Metabotropic glutamate receptor 2	8.00
	Ligand-gated chloride channel homolog 3	7.64
	D2-like dopamine receptor, transcript variant X2	5.12
	Metabotropic GABA-B receptor subtype 3	2.54
	Uncharacterized	2.28
	Dopamine receptor, D1	2.01
정상육아 내역봉 / 육아액제 내역봉	Muscarinic acetylcholine receptor DM1	27.1
육아액제 내역봉	Diuretic hormone 31 receptor 1	4.23
	Serotonin receptor	3.43
	Adipokinetic hormone receptor	3.13
	Diuretic hormone receptor	2.47
육아액제 내역봉 / 정상육아 내역봉	Translocator protein	88.2
정상육아 내역봉	PREDICTED: partitioning defective 3 homolog	59.2
	NMDA receptor 1	11.3
	Adenosine receptor	9.46
	Allatostatin-A receptor	6.78
	D2-like dopamine receptor, transcript variant X2	3.42
	Prolactin-releasing peptide receptor-like	2.93
	Metabotropic GABA-B receptor subtype 1	2.07
정상육아 외역봉 / 육아액제 외역봉	Serotonin receptor 7	14.0
육아액제 외역봉	Ligand-gated chloride channel homolog 3	7.64
	D2-like dopamine receptor, transcript variant X2	5.17
	Cys-loop ligand gated ion channel subunit 8916	3.28
육아액제 외역봉 / 정상육아 외역봉	Translocator protein	99.9
정상육아 외역봉	GABA-gated ion channel	14.7
	Allatostatin-A receptor	8.73
	Prolactin-releasing peptide receptor-like	8.13

	Serotonin receptor	7.17
	Diuretic hormone receptor	3.39
	Metabotropic glutamate receptor	2.10
육아억제 내역봉 /	Serotonin receptor 7	10.6
육아억제 외역봉	D2-like dopamine receptor, transcript variant X2	3.46
	Serotonin 5-HT1 receptor	3.45
	Cys-loop ligand-gated ion channel subunit 8916	2.52
육아억제 외역봉 /	Muscarinic acetylcholine receptor DMI	19.2
육아억제 내역봉	Diuretic hormone 31 receptor 1	5.83
	Serotonin receptor	3.93
	Diuretic hormone receptor	3.39
	Metabotropic glutamate receptor 2	2.31

(1) 정상육아 내역봉 vs. 정상육아 외역봉

- (가) Neuroactive ligand-receptor interaction을 구성하는 유전자들 중 정상육아 외역봉에 비하여 정상육아 내역봉에서 GABA-gated ion channel (Grd)가 13.1 배로 가장 과발현된 유전자임을 확인하였다. GABA-gated ion channel의 증가된 발현은 내역봉에서 신경적 흥분상태를 전체적으로 감소시키는 것으로 보이며 이는 육아 활동이 주가 되는 내역 활동에 있어 자연적이거나 이득이 되는 것으로 판단된다. 추가적으로 정상육아 외역봉보다 정상육아 내역봉에서 2.8, 6.3배의 증가된 발현량을 보이는 두 개의 serotonin receptor는 봉군 집단 내 구성원들 간의 스트레스(또는 공격성)를 조절하는 역할로 보여 지며 외역봉과 비교하였을 때 봉군의 제한된 내부 공간에서 행하여지는 내역 활동(육아 활동)에 중요할 것으로 생각된다.
- (나) 정상육아 내역봉에서 정상육아 외역봉 보다 약 2배의 과발현을 보여주는 adipokinetic hormone (AKH) receptor는 곤충의 corpora cardiac (CC)에서 생성되는 대표적인 대사 관련 호르몬으로서 혈액으로 분비되어 지방체로부터 곤충의 주된 에너지 자원(trehalose)을 사용하게 한다. 외역봉의 경우 비행 에너지원으로 crop에 저장된 꿀을 사용하고 이들의 지방체가 거의 소멸된 것으로 보아 AKH를 이용한 에너지의 사용은 외역봉에서 선호되지 않을 것으로 생각된다. 위 결과들을 종합한 결과 정상육아 내역봉에서의 AKH receptor 발현의 증가는 노동과 관련된 차별적 에너지 사용 방식을 설명한다. 이러한 관점에서 정상육아 내역봉에서 발현이 증가된 diuretic hormone (DH) receptor (2.5배) 역시 지방체로부터 에너지원(trehalose, glucose)의 공급을 촉진하는 역할로써 AKH과 동일한 해석이 가능하다.
- (다) 정상육아 내역봉에 비하여 정상육아 외역봉에서 adenosin receptor (AR)은 약 10 배 증가된 발현을 보인다. AR과 상호작용 하는 adenosine은 학습 및 기억에 관련된 뇌 부분에서 neurosignal의 통합과 synaptic palsticity의 조절(장기 강화 및 장기 억압) 모두에 관여하는 것으로 알려져 있고, 이를 통하여 AR은 인식의 조절 역할을 하는 것으로 제안되고 있다. 이 점을 바탕으로 정상육아 내역봉에 비하여 정상육아 외역봉에서 AR의 증가된 발현을 통한 신경조절이 외부 활동을 하는 외역봉의 학습 및 기

역 능력을 증대시키는데 필요한 것으로 판단된다.

- (라) AR과 마찬가지로 N-methyl-d-aspartate (NMDA)와 metabotropic glutamate receptor 모두 정상육아 내역봉에 비하여 정상육아 외역봉에서 약 8배 이상 과발현되었음을 확인하였다. Glutamate는 포유동물의 뇌에서 NMDA receptor를 통하여 학습과 기억에 관련된 synaptic function의 조절과 관련된 것으로 알려져 있다. 이와 유사하게 꿀벌 뇌의 glutamatergic neuron이 장기 후각 기억 과정에 관여하고, 기억 형성을 위하여 metabotropic glutamate receptor가 요구되는 것으로 조사 되었다. 그러므로 확연히 증가된 NMDA 및 glutamate receptor는 먹이 자원이 발견과 기억에 필수적인 후각의 학습과 기억 활동을 증가시키는데 관여할 것으로 생각된다.
- (마) LCCH3-type GABA-receptor 또한 정상육아 외역봉에서 7.64배 발현이 증가하였다. 꿀벌의 안테나에서 RDL- 또는 LCCH3-type GABA receptor에 의하여 조절되는 억제성 신호 전달은 후각 정보 처리에 있어 필수적인 기능을 수행하는 것으로 알려져 있는 것으로 보아 꿀과 화분을 채집하는 외역봉에서 LCCH-type receptor의 과발현은 당연한 것으로 보여진다. 흥미롭게도 metabotropic GABA-B receptor 역시 정상육아 외역봉에서 2.54배 발현이 증가하였는데, GABA-B receptor가 외역봉의 방어 활동 조절에 관련되어 있다는 연구결과를 통하여 볼 때, 외역봉에서의 과발현은 외역 활동과 관련된 것이라 할 수 있다.

(2) 육아억제(외역억제) 내역봉 vs. 육아억제(외역억제) 외역봉

- (가) 봉군 주변에 설치한 천막으로 인하여 일벌들의 정상적인 노동이 교란되었을 때, 육아억제(외역억제) 내역봉과 육아억제(외역억제) 외역봉 모두에서 몇몇 유전자들의 공통된 과발현을 확인하였다(표 6).

표 6. Neuroactive ligand-receptor interaction pathway에 관여하는 유전자 중 육아억제(외역억제) 내역봉 및 외역봉 모두에서 각각 정상육아 내영봉 및 외역봉 보다 과발현 된 유전자

유전자 설명	FC	
	육아억제 내역봉 / 정상육아 내역봉	육아억제 외역봉 / 정상육아 외역봉
Translocator protein	88.16	99.87
Allatostatin-A receptor	6.78	8.78
Prolactin releasing peptide receptor-like	2.93	8.13
GABA-gated ion channel	1.06	14.69
NMDA receptor 1	11.30	1.05
Metabotropic GABA-B receptor subtype 1	2.07	1.33
Metabotropic glutamate receptor	1.26	2.10

(나) 정상육아 내역봉 대비 육아억제(외역억제) 내역봉에서, 정상육아 외역봉 대비 육아억제(외역억제) 외역봉에서 allatostatin-A receptor (AAR)가 각각 6.78, 8.78배 증가하였고, 꿀벌의 corpora cardiac (CC)에서 발현되는 allatostatin-A type neuropeptide는 특히 만성 또는 급성 영양 스트레스 상태에서 에너지자원의 이용을 조절하는 역할을 할 것으로 상정할 수 있다. 천막 설치에 의하여 먹이 공급이 중단된 상태에 의하여 급성 영양 스트레스를 받게 된 꿀벌[육아억제(외역억제) 내역봉, 육아억제(외역억제) 외역봉]에게서 AAR에 의한 에너지의 이용은 반드시 필요한 것으로 보인다.

(다) 정상육아 내역봉보다 육아억제(외역억제) 내역봉에서 11.3배의 과발현을 보인

NMDA-receptor는 정상육아 외역봉에서 반응하는 특징(표 1)인 것으로 보여지며 정상 육아 활동이 억제 되었을 때 외역봉의 후각 학습과 기억의 전체적인 증가를 가리키는 것으로 생각된다. 육아억제(외역억제) 내역봉에서만 선택적인 과발현을 보이는 NMDA-receptor는 천막으로 인하여 내역봉에서 외역봉으로의 역할 변화가 애매해졌을 때 내역봉으로부터 이른 생리적 변화가 발생 하는 측면에서 생각해 볼 수 있다.

2. 봉군 스트레스 진단 분자마커 - AChE1

가. 샘플 채집

봉군 상태가 안정되고 활동이 왕성한 봉군에서 꿀벌을 채집하였다.

나. 인공 사육

각 온도 조건(33, 36, 38, 40 °C) 꿀벌 사육을 진행하였다. 각 온도 조건별 30~40마리의 꿀벌(3 반복)을 사육 케이지에 넣고 50 °C 설탕물과 화분떡 1g을 제공하여 24시간 사육하였다(그림 64).



그림 64. 꿀벌 사육

다. 단백질 추출

- (1) 0.1 M Tris-HCl pH 7.8 (+ 0.5 % Triton X-100) : Protease inhibitor cocktail의 비율을 100 : 1로 하여 protein extraction buffer를 만들었다(800 ul / 샘플)
- (2) 각 온도 조건별 사육한 꿀벌 중 무작위로 8마리를 선택하여 머리와 배를 분리하여 800 ul의 protein extraction buffer에 넣고, bead 100 mg을 넣은 후 bead blender를 이용하여 5 분간 갈아주었다.
- (3) 12,000 g, 4 °C에서 5분간 원심분리 하였다.
- (4) 2 ml tube에 단백질 추출용 column을 위치시키고 원심분리된 물질 중 상층액 400 ul를 취하여 column에 넣어준 뒤 1 분간 spin down 하였다.

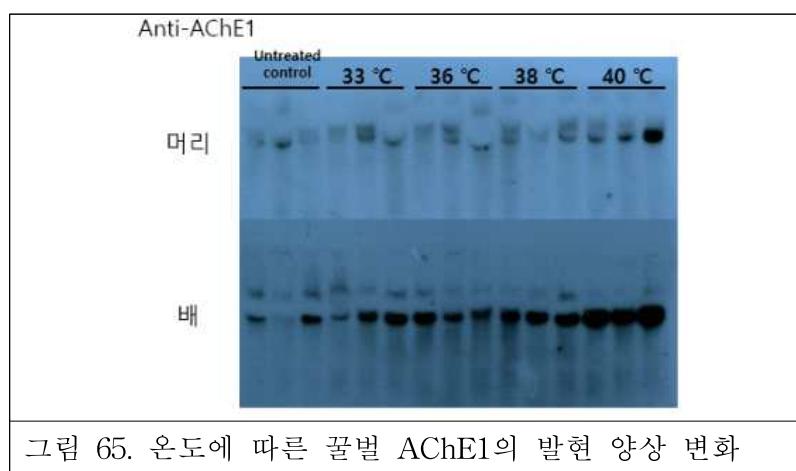
라. Native PAGE & Western blot

- (1) 7.5 % Native PAGE gel을 만든 후 전기영동 기계와 결합한 뒤 기계 내부를 1X Native PAGE running buffer로 채워주었다.
- (2) 전체 단백질의 농도가 15 ug / 15 ul가 되도록 샘플별 단백질과 5X Native PAGE sample buffer, 0.1 M Tris-HCl +0.5 % Triton을 혼합하였다.

- (3) 120 V, 200 mA, 4 °C에서 90분 동안 전기영동을 하였다.
- (4) Western blot을 위한 transfer chamber를 준비하고 전기영동이 완료된 gel을 꺼내어 아래에서부터 스펜지 3 장, filter paper, gel, membrane, filter paper, 스펜지 2장 순으로 transfer chamber내에 위치시켰다.
- (5) Transfer chamber를 전기영동 기계에 결합시키고 50 V, 250 mA, 상온에서 75분 동안 transfer를 하였다.
- (6) PBST를 이용하여 100 ml 5 % Skim milk 용액을 만들었다.
- (7) Transfer가 완료된 membrane을 꺼내어 통에 넣고 ‘4-6’에서 만든 skim milk 용액을 membrane이 살짝 잠길 정도로 넣어준 후 60 rpm, 상온에서 30분간 shaking 하였다.
- (8) PBST를 이용하여 membrane을 washing 하였다.
- (9) 10 ml 1'-antibody 용액(1'-antibody : PBST = 1 : 5,000)을 넣고 순서대로 60 rpm, 상온에서 3시간, 60 rpm, 4 °C에서 15시간, 60 rpm, 상온에서 40분 shaking 하였다.
- (10) PBST를 이용하여 10분씩 총 3번 washing 하였다.
- (11) 10 ml 2'-antobody 용액(2'-antibody : skim milk solution = 1 : 5,000)을 넣고 60 rpm, 상온에서 2시간 shaking 하였다.
- (12) PBST를 이용하여 10분씩 총 3번 washing 하였다.
- (13) X-ray 필름을 이용하여 20분간 현상을 하였다.

마. 고온 처리에 의한 꿀벌 AChE1의 발현 변화

33, 36, 38, 40 °C 각각의 온도에서 24시간 노출된 꿀벌의 western blot 결과 육아 억제 스트레스에 의하여 발현되는 꿀벌 AChE1이 온도가 증가할수록 발현이 증가하는 것을 확인하였다(그림 2). 이를 통하여 꿀벌 AChE1이 육아 스트레스뿐만 아니라 고온 스트레스에 대해서도 과발현 되는 것을 확인하였고, 고온 스트레스에 대한 마커로 사용 가능할 것으로 보인다.



3. 분봉 현상이 꿀벌 봉군에 미치는 분자생물학적 생리학적 변화 확인을 위한 GSEA

가. 샘플 채집

- (1) 분봉 전, 분봉 후 새로운 봉군 형성, 분봉후 기존 봉군에 잔류하는 집단의 꿀벌 채집 (그림 66)을 위하여 2016년 7월 11일 강원도에서 분봉열이 강한 두 개의 봉군을 서울대학교 농생대(200동) 건물 옥상으로 이전하였다.
- (2) A 봉군에서 7월 18일을 시작으로 7월 19일 까지 총 세 차례의 분봉이 발생하였고, B

봉군에서 7월 20일 분봉이 발생하였다(표 7).

- (3) 각 봉군에 대하여 분봉 전, 분봉 후(분봉 그룹, 잔류 그룹)의 개체들을 각각 400마리씩 채집한 뒤 액체 질소를 이용하여 급속 냉동 후 초저온 냉동고(-80°C)에 보관하였다.

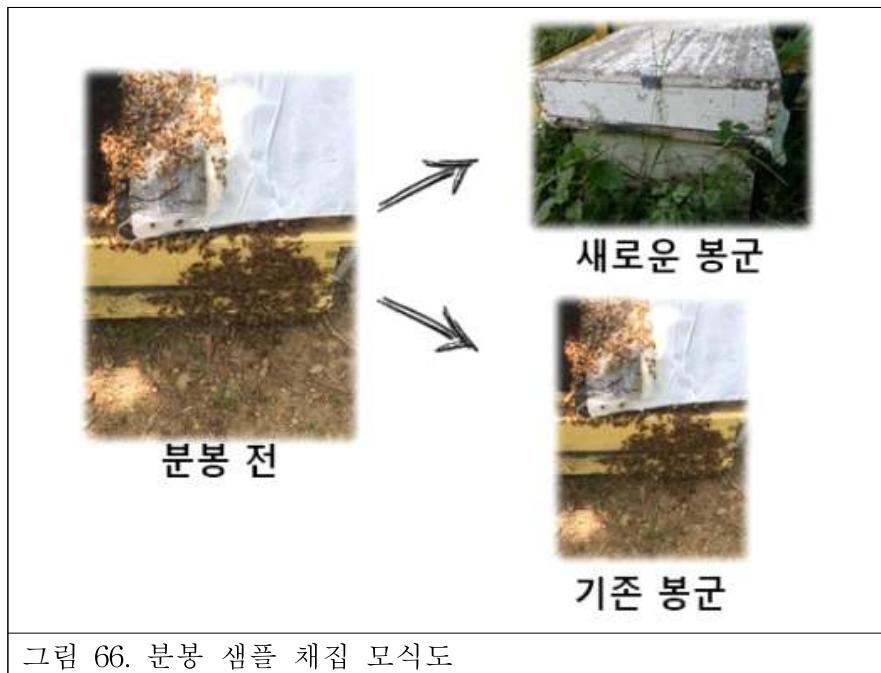


표 7. 분봉 샘플 채집

2016	A 봉군	B 봉군
07.11	샘플링(분봉 전 샘플) 후 서울대학교 농생대(200동) 건물 옥상으로 별통 이송	
07.18	- 오전 : 1차 분봉 발생(기존 여왕벌의 날 개 잘림으로 인하여 일벌만 복귀). 기존 봉군에서 신 여왕벌 확인	
	- 오후 : 2차 분봉 발생 (샘플링)	
07.19	3차 분봉 발생 (샘플링)	분봉 전 샘플 확보
07.20		분봉 발생 (샘플링)

나. 각 샘플별 RNA 추출

- (1) 각 샘플별 꿀벌 50 마리의 머리를 액체 질소와 막자사발을 이용하여 갈아주었다.
- (2) 막자사발에 5 ml Trizol을 넣고 샘플과 잘 섞어준 후 5 개의 1.5 ml tube에 1 ml씩 각각 넣은 후 상온에서 5분 동안 놓아두었다.
- (3) 100 ul BCP를 넣은 후 15초 동안 vortexing 하여 상온에 5분 동안 놓아두었다.
- (4) 12,000 g, 4 °C에서 15분 동안 원심분리 하였다.
- (5) 새로운 1.5 ml tube에 상층액만을 분리하여 넣어주었다.
- (6) 500 ul isopropanol을 넣은 후 vortexing 하여 잘 섞고 상온에 10분 동안 놓아두었다.
- (7) 12,000 g, 4 °C에서 10분 동안 원심분리 하였다.
- (8) 상층액을 제거하였다.

- (9) 1 ml 75 % EtOH를 넣어주었다.
- (10) 8,000 g, 4 °C에서 5분 동안 원심분리 하였다.
- (11) 2-8 ~ 2-10 과정을 2 번 더 반복하였다.
- (12) EtOH를 제거하고 5분 동안 침전물을 건조하였다.
- (13) 50 ul DEPC-treated water를 넣고 잘 섞어주었다.

다. RNA QC, library construction, sequencing

- (1) 각 그룹에서 추출한 RNA의 품질을 Agilent TNA 6000 Nano kit (Agilent Technologies, CA)를 이용한 rRNA의 보존도 분석을 통하여 평가하였다.
- (2) cDNA construction에 앞서 2 ug total RNA와 oligo dT가 있는 bead를 사용하여 total RNA로부터 poly (A) mRNA만을 선택적으로 분리하였다.
- (3) 분리된 mRNA를 짧은 단편 조각으로 자른 후 cDNA를 합성하였다.
- (4) 합성된 cDNA는 end-repair, poly (A) addition의 대상이 되었고, TruSeq sample prep Kit (Illumina, CA)을 이용하여 sequencing adapter에 연결하였다.
- (5) 적합한 크기의 조각을 BluePippin 2% agarose gel cassette (Sage science, MA)를 이용하여 자동적으로 분리하고 이들을 PCR 증폭을 위한 template로 선택하였다.
- (6) 최종 library size와 품질을 Agilent High Esneitivity DNA kit (Agilent Technologies, CA)를 이용한 전기영동으로 평가하였고, 각 조각들의 크기는 350 ~ 450 bp로 확인되었다.
- (7) 최종 library에 대한 sequencing은 Illumina Hiseq2500 sequencer (Illumina, CA)로 진행하였다.

라. 전사체 데이터 분석

- (1) 낮은 품질의 read들은 몇몇 기준을 통하여 걸러내었다. 해당 기준으로는 10 % 이상의 skipped base를 갖는 read, 20보다 낮은 quality score를 갖는 base가 40 % 이상 포함된 read, 각 read에 대한 quality score가 20보다 낮은 경우가 있다.
- (2) 최종적으로 추려진 read들은 CLC Assembly Cell v4.2 (CLC Bio, Denmark)를 이용하여 꿀벌 genome analysis data (reference : Weinstock GM et al., 2006)와 mapping 작업을 수행하였다.

마. Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) 방법

- (1) 전사체 분석을 통하여 획득한 모든 유전자(n=13,995)의 발현량을 GSEA에 적용하였다.
- (2) 현재까지 알려진 132 개의 꿀벌 각각의 KEGG pathway에 적용되는 각 유전자의 리스트를 발현량에 따라 순서대로 나열 후 enrichment scores를 계산하였다.
- (3) 132 개의 각 pathway에 관여하는 유전자 중 최소 15개 이상의 유전자가 확인 된 pathway만을 선택하였다.
- (4) 위의 방법과 동일한 방법으로 컴퓨터를 이용한 1,000 번의 시뮬레이션을 통하여 유의성 확인하였다.

바. 분봉 샘플 GSEA 결과

- (1) 분봉 전 vs. 분봉 후(분봉 그룹, 잔류 그룹)
 - (가) 분봉 후(분봉 그룹, 잔류 그룹) 봉군에서 분봉 전에 비하여 공통적으로 변화한 경로 맵을 조사한 결과 Neuroactive ligand-receptor interaction은 공통적인 증가를, Proteasome, Drug metabolism - other enzyme은 공통적인 감소를 보였다(그림 4).

(나) 여러 호르몬과 neuropeptide들이 관여하는 receptor의 활성을 확인할 수 있는 Neuroactive ligand-receptor interaction (분봉 전보다 분봉 후 봉군 집단에서 활성 증가)은 꿀벌 체내의 전반적인 변화를 아우를 수 있을 것으로 판단하여 해당 경로맵에 포함된 유전자들을 자세히 조사할 계획이다. 분봉 전 보다 분봉 후 봉군에서 Neuroactive ligand-receptor interaction pathway에 포함되는 유전자들 중 과발현되는 유전자는 ‘표 5’에서 확인할 수 있다.

(다) 분봉 전보다 분봉 후(분봉 그룹, 잔류 그룹) 봉군에서 공통적인 증가를 보여준 dopamin D1-like receptor (DRD)는 분봉시 꿀벌들의 행동 조절에 관여하는 것으로 보여진다. 또한 gamma-aminobutyric acid receptor (GABR), glutamate receptor ionotropic [NMDA (GRI)]의 분봉 후 증가는 분봉에 의한 봉군 집단 구성원의 변화와 환경적 변화를 인지하는데 필요한 것으로 판단된다.

(2) 분봉 그룹 vs. 잔류 그룹

(가) 잔류 그룹에 비하여 분봉 그룹에서 Phototransduction - Fly의 활성이 증가되었고, Valine, leucine and isoleucine degradation, Citrate cycle (TCA cycle), Ribosome biogenesis in eukaryotes, Oxidative phosphorylation, Aminoacyl-tRNA biosynthesis, RNA transport, Pyrimidine metabolism, Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchor biosynthesis pathway의 활성은 감소되었다(그림 67).

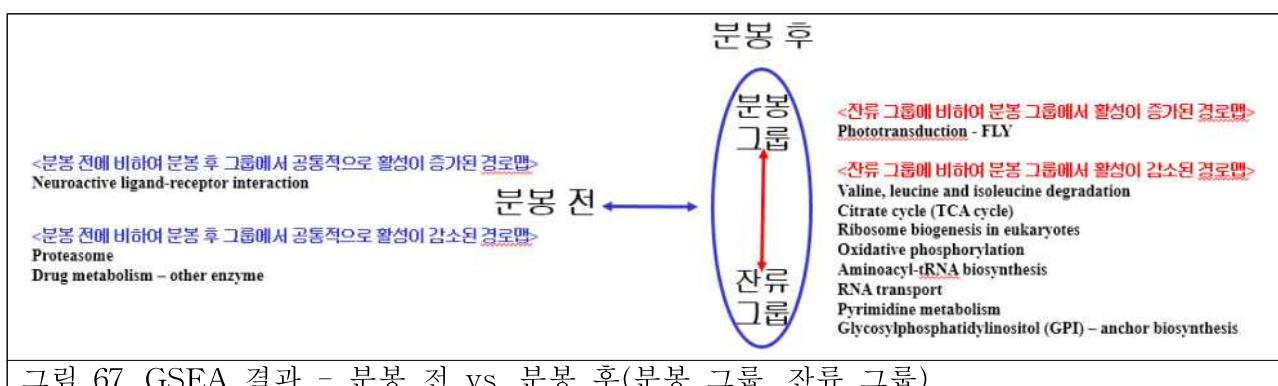


그림 67. GSEA 결과 – 분봉 전 vs. 분봉 후(분봉 그룹, 잔류 그룹)

표 8. 분봉 후(분봉 그룹, 잔류 그룹)에서 분봉 전 보다 공통적으로 활성이 증가된 Neuroactive ligand-receptor interaction에 관여하는 유전자

경로맵 명칭	설명	경로맵 명칭	설명
CHRM	Muscarinic acetylcholine receptor	GRM	Metabotropic glutamate receptor
DRD	Dopamine D1-like receptor	GABBR	Gamma-aminobutyric acid type B receptor
HCRTR	Hypocretin (orexin) receptor 2	GRIN	Glutamate receptor ionotropic, NMDA
TACR1	Tachykinin-like receptor	GABR	Gamma-aminobutyric acid receptor subunit beta
PAR	Partitioning defective protein 3	GRI	Glutamate receptor ionotropic, NMDA
GNRHR	Gonadotropin-releasing hormone receptor	BZRP	Benzodiazapine receptor
PTHR	Parathyroid hormone receptor 1		

4. 분봉 전, 분봉 후(분봉 그룹, 잔류 그룹) 봉군 간의 cuticular hydrocarbon (CHCs) 분석

가. 샘플 채집

GSEA를 위하여 채집 해놓은 꿀벌 시료를 사용하였다.

나. CHCs 추출

- (1) 1 ml pentane를 유리 바이알에 넣고 꿀벌을 1분간 용액 안에 담그어 주었다.
- (2) pentane 용매를 새로운 분석용 유리 바이알로 옮긴 후 질소 기체 blower를 이용하여 용매를 증발시켰다.
- (3) 150 ul pentane을 넣어주어 희석시켰다.

다. 추출한 CHCs의 GC-MS 결과

- (1) 분봉 전(PSC), 분봉 그룹(SG), 잔류 그룹(RG) 각각 5마리의 꿀벌 CHCs의 조성을 확인하기 위하여 GC-MS 분석을 진행한 결과 alkane이 가장 많은 것으로 확인 되었고, alkene 과 alkyl alcohol 계열의 compound가 그 뒤를 차지하고 있었다.
- (2) ‘그림 5, 6, 7’에서 확인할 수 있듯이 각 그룹별 CHCs의 분석 결과 pick가 발생하는 시간(retension time-RT)은 거의 동일하고 그 높이가 다른 것으로 보아 각 그룹 CHCs의 성분은 다르지 않으나 분봉이라는 상황에 따라서 특정 compound들의 분비량이 달라지는 것으로 확인되었다.

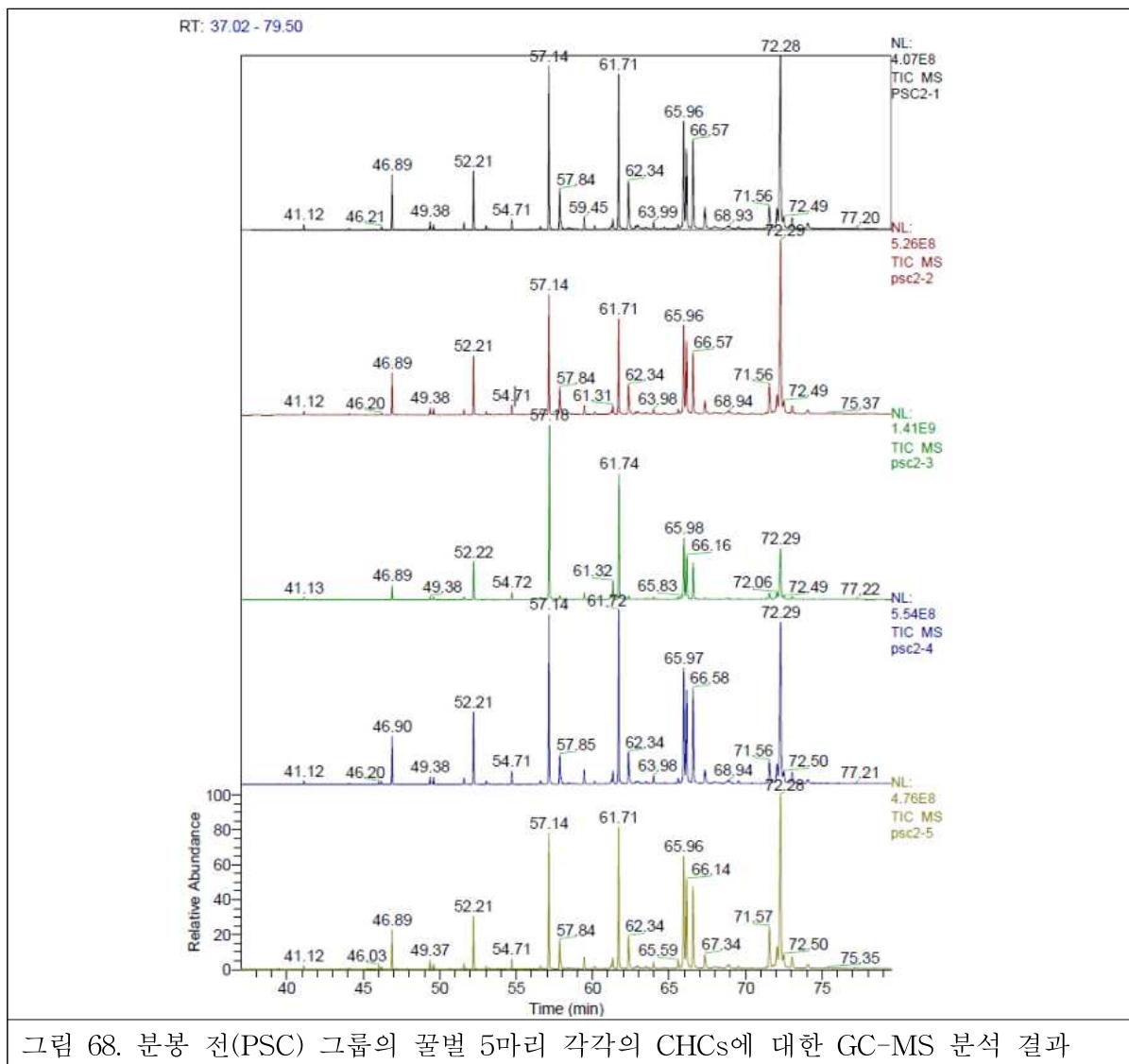
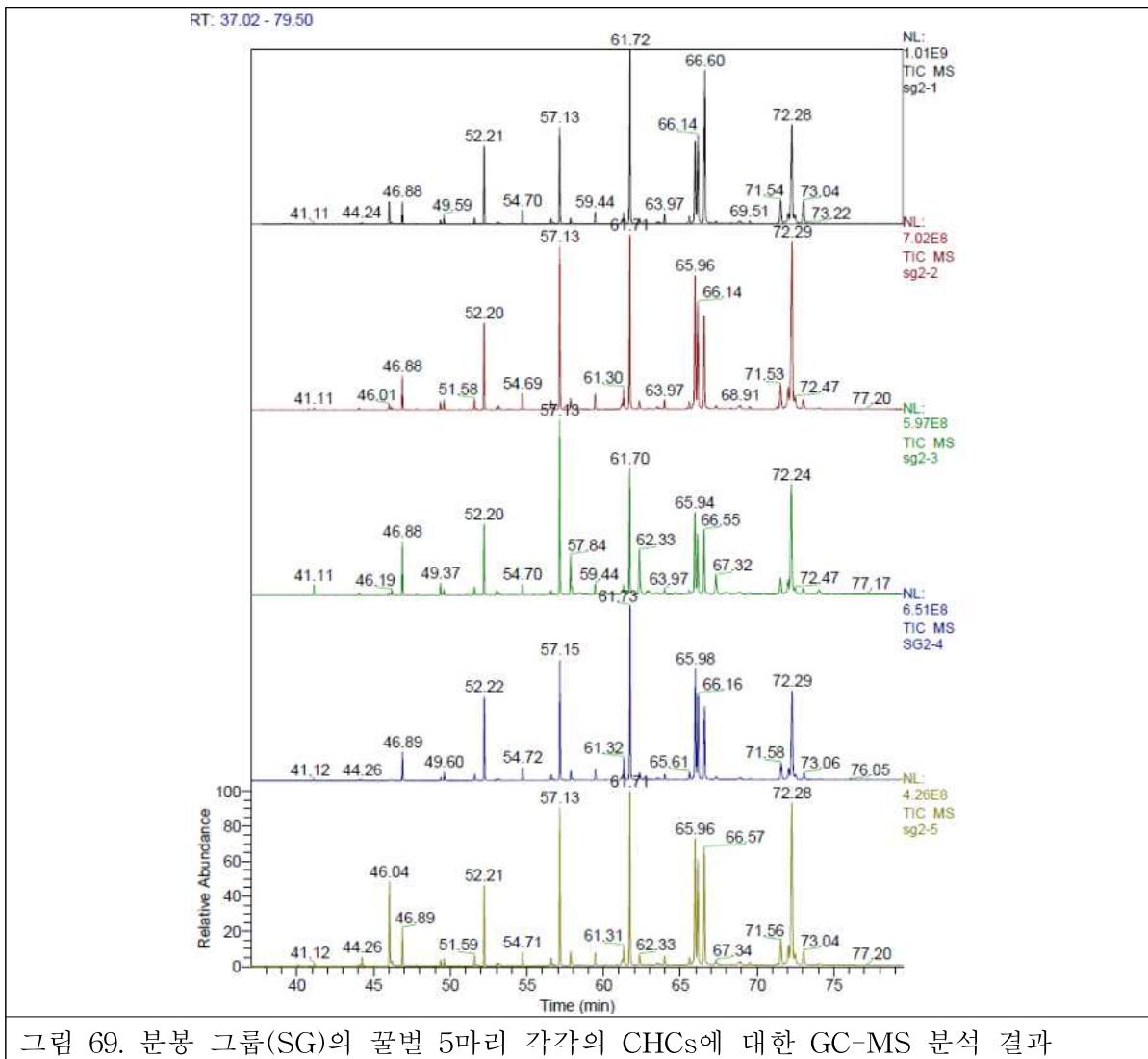


그림 68. 분봉 전(PSC) 그룹의 꿀벌 5마리 각각의 CHCs에 대한 GC-MS 분석 결과



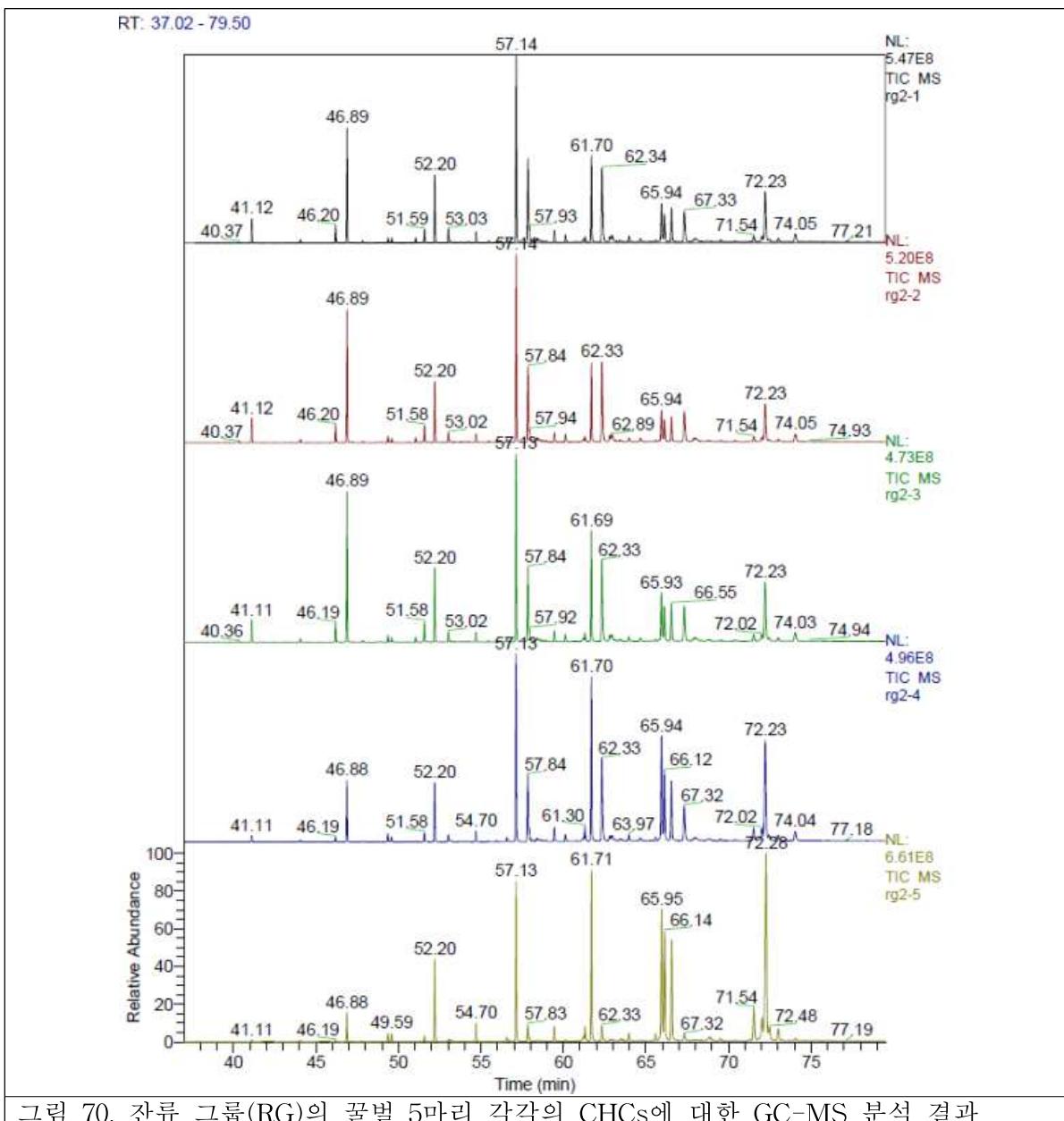


그림 70. 잔류 그룹(RG)의 꿀벌 5마리 각각의 CHCs에 대한 GC-MS 분석 결과

(3) 세 그룹의 결과를 비교하였을 때 분봉 현상에 의하여 가장 큰 변화를 보이는 CHCs는 heneicosane (RT : 46.88 - 46.90), nonacosane (RT : 61.69 - 61.74), octacosanol (RT : 72.23 - 72.29)로 확인이 되지만, 수많은 탄소 사슬로 이루어진 alkane, alkene, alkyl alcohol의 GC-MS 결과는 실질적으로 구분이 어렵기 때문에 해당 RT에서 detection된 compound가 위에서 확인된 compound인지에 대한 정확한 결과는 internal standard를 이용하여 반복수를 늘린 실험이 추가적으로 진행되어야 할 것이다.

제3절 3세부: 기후변화에 의한 지역별 양봉산물의 생리활성 차이 연구

1. 제1절 과향 (*Agastache rugosa*) 전초의 항치매활성

가. 머릿말

알츠하이머 질환(Alzheimer's disease, AD)은 선진국과 개발도상국에서 초기 노인성 치매와 관련된 가장 일반적인 병으로, 2006년 26,600,000명이며, 2050년 106,800,000명까지 증가할 것으로 예상되고 있다(Prince와 Jackson, 2009). 전세계적으로 직·간접적인 간병을 포함한 치매의 사회적 비용은, 2005년 315.4억불에서 2010년 604억불에 달할 것으로 추정되고 있다(Wimo와 Prince, 2010). AD는 치매 사례의 60~70%를 점하고 있다(Burns와 Iliffe, 2009; WHO, 2015). 베타아밀로이드(β -amyloid, A β) 펩티드의 축적과 침전이 특징인 AD는 뇌의 치명적인 신경 퇴행성 질환으로, 아밀로이드 작용 경로 중에서 A β 펩티드는 두 효소 베타세크레타제(β -secretase) (β -site amyloid precursor protein cleaving enzyme 또는 BACE-1)와 감마세크레타제 (γ -secretase)에 의해 아밀로이드 전구체 단백질 (amyloid precursor protein, APP)의 순차적인 단백질 가수분해 후에 생성된다(Hardy와 Selkoe, 2002; Suh와 Checler, 2002; Baptista 등, 2014).

AD에 대한 현재의 치료제는 아세틸콜린에스테라제(acetylcholinesterase) (AChE) 억제제 (Birks, 2012) 및 N-methyl-D-aspartate (NMDA) 수용체 길항제(Molinuevo 등, 2005; Danysz와 Parsons, 2012) 두 종류가 있다. 그러나, 이러한 약제들은 AD의 진행을 늦출 뿐 진행을 정지 시키거나 또는 신경 퇴행을 예방하지 않으며(Paris 등, 2011), 경우에 따라서는 심각한 부작용을 야기하고 있다(Thompson 등, 2004; Molinuevo 등, 2005). 따라서, AChE 외에, BACE-1은 AD의 예방 및 치료를 위한 중요한 작용점으로(Cole과 Vassar, 2007; Ghosh 등, 2008; Mancini 등, 2011), 중추신경시스템과 망막에서 A β 생산을 조절하여 AD 형질전환 초파리 모델이 개발되어 왔다. 실제로, 많은 펩티드 및 혼테로고리 화합물이 BACE-1 저해제로서 설계되고 평가되어 왔지만(Thompson 등, 2005; John, 2006; Orhan, 2012), 그들 중 그 어느 것도 성공적으로 AD 치료제로 개발되지 못하였다. 따라서, 새롭게 개선된 AD 치료제의 개발이 시급한 실정이다.

본 연구는 프로폴리스를 비롯한 양봉산물의 항AD 활성을 조사하기 위하여 AD 초파리 모델을 제작하고, 이에 대한 검증을 위하여, 본 연구실에서 활성이 인정된 과향(*Agastache rugosa*)을 실험재료로 하여 모델 초파리를 확립하였으며, 양성대조구로서는 BACE-1 inhibitor IV(Vassar, 2014) 및 epigallocatechin gallate(Jeon 등, 2003)를 이용하였다.

나. 재료 및 방법

(1) 실험용 초파리 그룹

본 연구에서는, 과향 전초에서 분리된 아카세틴(acacetin), 마스린산(maslinic acid) 및 올레아놀산(oleanolic acid)을 형광공명에너지전이효소검정법(fluorescence resonance energy transfer enzme assay, FRET enzme assay)을 이용하여 실험실 내에서 검정하였다. 이를 화합물 중에서 아카세틴이 마스린산 및 올레아놀산보다 BACE-1에 대하여 강한 저해 활성을 보여, 이 화합물로 실험을 수행하였다. 생체 내 연구를 위한 실험군을 그림 71에 나타내었다. 실험 초파리는 0.1% DMSO에 녹인 아카세틴을 첨가한 표준 메디아가 들어 있는 94 × 25 mm 폴리스틸렌제 초파리 사육용 바이알 (Hansol Tech, 서울)에서 알 단계부터 사육하

였다. 예비실험 결과, 모델 초파리의 행동 및 눈의 형태는 아카세틴 3 농도 (100, 300 및 500 μM)에서 조사하였다. 각 우화한 수컷 초파리의 섭식활성 분석을 위하여 상기 표준 메디아에서 사육하였다. *GMR-Gal4*는 인간 *APP* 및 *BACE-1* 유전자를 초파리 겉눈에 발현시켰으며, *GMR-Gal4⁺* 초파리를 대조구로 이용하였다. 초파리 일령에 따른 초파리 겉눈의 형태적 구조 변화를 광학현미경 및 주사전자현미경으로 관찰하였으며, 초파리 겉눈은 Carson's trichome 염색 및 콩고레드(Congo red) 염색을 포함한 조직학적 분석에 의해 관찰하였다. 아밀로이드 플라크(plaque)는 콩고레드 염색법으로 관찰하였고, *GMR-Gal4^{+/+}*는 대조군으로 하였다(그림 71A). *elav-Gal4*는 표적 유전자를 파리 신경계에서 동시 발현시켰으며, *elav-Gal4⁺* 초파리를 대조구로 이용하였다. 이들 초파리의 비행행동·수명·섭식·행동시험을 진행하였다(그림 71B). 아카세틴이 *APP* 및 *BACE-1* mRNA 발현에 미치는 영향이 Gal4 시스템의 프로모터 효과에 의한 것이 아님을 확인하기 위하여, *GFP* mRNA 함량을 정량적 역전사중합효소연쇄반응 (quantitative real-time polimerase chain reaction, qRT-PCR)을 이용하여 아카세틴을 섭식시킨 초파리와 DMSO를 섭식시킨 초파리와 비교하였다. 아카세틴의 항AD 메카니즘을 western blot 분석법을 이용하여 평가하였다(그림 71C).

(2) 기기분석

^1H 및 ^{13}C 핵자기공명(nuclear magnetic resonance, NMR) 스펙트라는 tetramethylsilane을 내부 표준품으로 하여 AVANCE 600 분광계(Bruker, Rheinspettem, 독일)로 각각 600과 150 MHz에서 DMSO- d_6 을 이용하여 얻었으며, 화학 시프트는 δ (ppm)으로 나타내었다. 자외선(ultraviolet, UV) 스펙트라는 메탄올에서 UVICON 933/934 분광광도계(Kontron, Milan, 이태리)를 이용하여 얻었으며, 질량 스펙트라는 JMS-DX 303 분광계(Jeol, Tokyo, 일본), 그리고 푸리에변환적외선분광(Fourier transform infrared spectroscopy, FT-IR) 스펙트라는 Nicolet Magna 550 series II 분광계(Midac, Irvine, CA)를 이용하여 얻었다. 칼럼크로마토그라피는 실리카겔 60 (0.063~0.2 mm) (Merck, Darmstadt, 독일)을 이용하였으며, 분석용 박층크로마토그라피(thin-layer chromatography, TLC)는 Kieselgel 60 F254를 이용하였다. 활성본체의 분리를 위하여 Isolera One 중압액체크로마토그라프 (Biotage, Uppsala, 스웨덴)와 Agilent 1200 고속액체크로마토그라프 (Agilent, Santa Clara, CA)를 이용하였다.

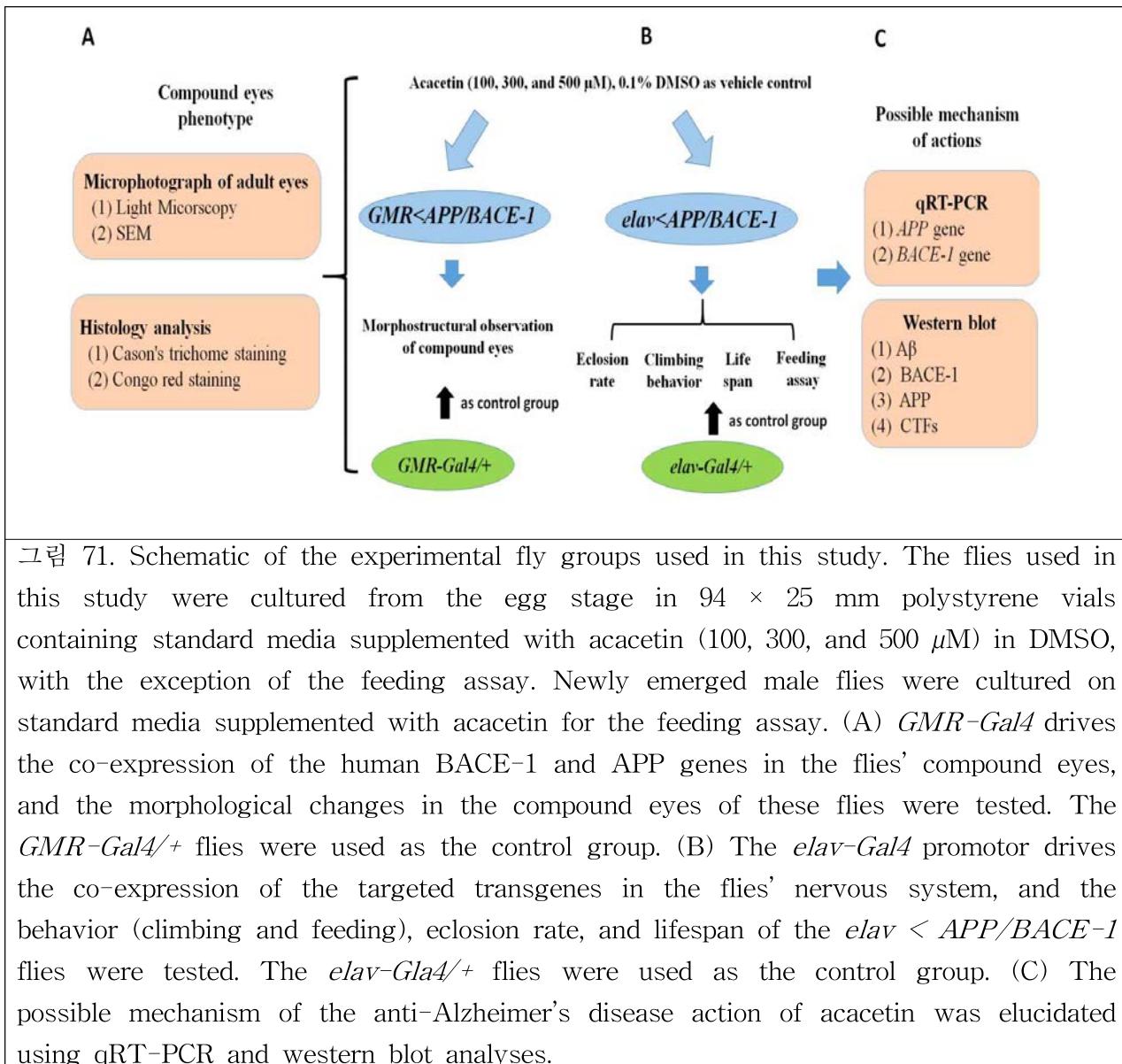


그림 71. Schematic of the experimental fly groups used in this study. The flies used in this study were cultured from the egg stage in 94 × 25 mm polystyrene vials containing standard media supplemented with acacetin (100, 300, and 500 μ M) in DMSO, with the exception of the feeding assay. Newly emerged male flies were cultured on standard media supplemented with acacetin for the feeding assay. (A) *GMR-Gal4* drives the co-expression of the human BACE-1 and APP genes in the flies' compound eyes, and the morphological changes in the compound eyes of these flies were tested. The *GMR-Gal4/+* flies were used as the control group. (B) The *elav-Gal4* promotor drives the co-expression of the targeted transgenes in the flies' nervous system, and the behavior (climbing and feeding), eclosion rate, and lifespan of the *elav < APP/BACE-1* flies were tested. The *elav-Gal4/+* flies were used as the control group. (C) The possible mechanism of the anti-Alzheimer's disease action of acacetin was elucidated using qRT-PCR and western blot analyses.

(3) 재료

아카세틴(acacetin)은 Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX)에서 구입하였다. BACE-1 Inhibitor IV와 Acid red는 각각 Merck (Darmstadt, 독일)와 Amresco (Solon, OH)에서 구입하였다. RIPA 완충액 및 mammalian cell protease inhibitor cocktail은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)에서, 재조합 human BACE-1 및 fluorogenic peptide substrate Mca-SEVNLDAEFRK (Dnp) RR-NH₂는 R&D system (Minneapolis, MN)에서 구입하였다. Bovine serum albumin (BSA)은 Santa Cruz Biotechnology에서, Page Ruler Prestained Protein Ladder 및 Spectra Multicolor Low Range Protein Ladder는 Thermo Scientific (Walldorf, 독일)에서 구입하였다. 기타 화합물 및 시약은 분석용을 사용하였다.

(4) 항체

일차항체인 APP carboxy-terminal antibody (A8717)는 Sigma-Aldrich에서 구입하였으며, anti-BACE-1 antibody (ab2077)와 anti-actin antibody (ab1801)는 Abcam (Cambridge, MA)에서, β -amyloid, 17-24 (4G8) monoclonal antibody (SIG-39240)는 Covance

(Princeton, NJ)에서 구입하였다. 이차항체인 goat anti-rabbit IgG H&L (HRP) (ab6721-1)는 Abcam에서, goat anti-mouse IgG-HRP (sc-2005)는 Santa Cruz Biotechnology에서 구입하였다.

(5) 실험식물

곽향(Korean mint, *Agastache rugosa* Fisch. & Mayer) 전초(그림 72)는 서울 동대문구 제기동 소재 경동시장 서울약령시 ‘보은’한약방에서 구입하였다. 바우처 표본 (AR-WP-01)은 서울대학교 농업생명과학연구원에 기탁하였다.



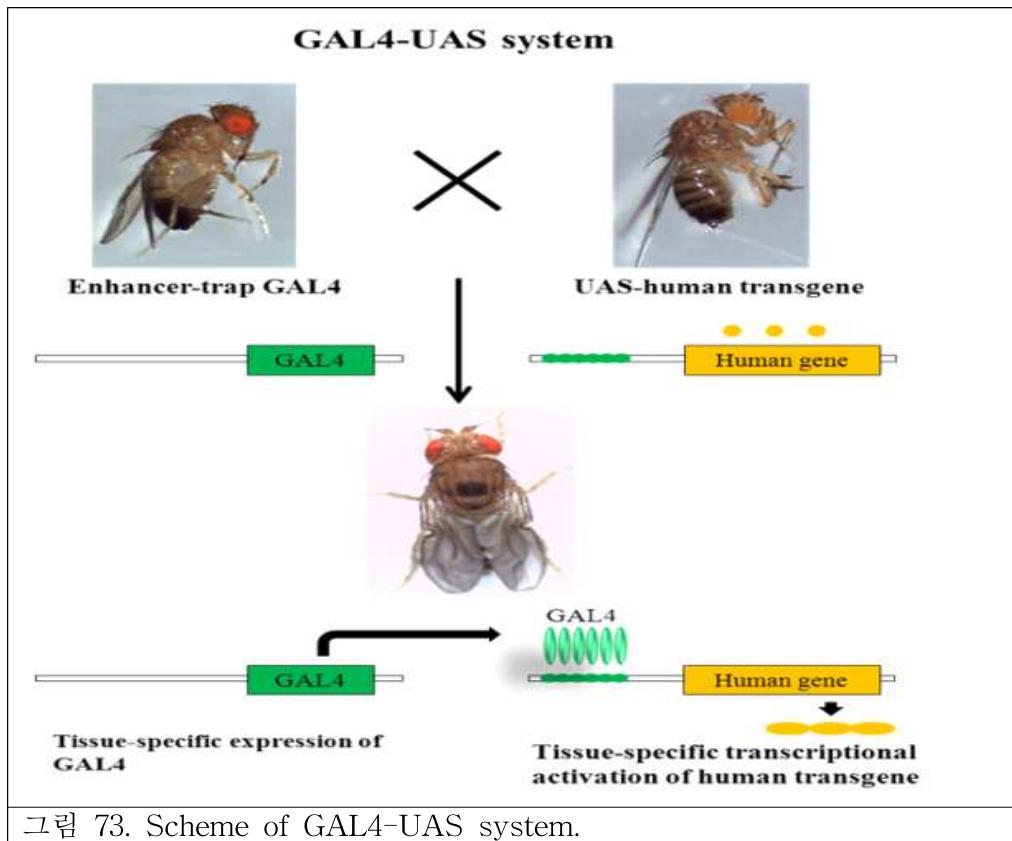
그림 72. Korean mint (*Agastache rugosa* Fisch. & Mayer).

(6) 실험초파리

초파리는 29°C, 상대습도 60%, 광주기 12:12 (명:암) 시간 조건 하에서 옥수수 가루 한천배지(Ren 등, 2009)를 이용하여 사육하였다. w1118 (스톡번호: 3605), UAS-APP/BACE-1 (#33797), elav-GAL4 (#8760), GMR-GAL4 (#1104) 초파리들은 인디애나대학 블루밍턴초파리스톡센터에서 구입하였다. 또한 GAL4/UAS 시스템은 초파리의 특정 조직에서의 목적 유전자의 과발현을 위해 사용하였다.

(7) 알츠하이머 질환 초파리 모델 구축

현재 신경 퇴행성 질환의 초파리 모델로는 GAL4-UAS 시스템을 이용하고 있는데, 이 시스템은 특정 조직이나 세포에서 인간 유전자의 자궁 외 발현을 가능하게 한다(그림 3.3). 실험을 위해 두 개의 형질전환 초파리를 제작하였다. 먼저, 인간 질병과 관련된 유전자는 GAL4가 붙는 위치를 구성하는 UAS 활성 도메인의 하위에 위치한다(UAS-human-transgenic fly). GAL4가 없을 경우, 유전자는 형질전환 초파리에서 발현되지 않는다. 유전자는 GAL4 (enhancer-trap GAL4 fly)를 발현하는 형질전환 초파리와 교배시켜 활성화 시켜 다양한 ‘driver’ 초파리들을 제작하였다. GAL4 유전자는 세포나 조직의 특정한 프로모터의 하위에 위치하는데, 예를 들면 pan-neural promoter elav (배아에 치명적이고 비정상인 시력을 가져다 줌) 또는 눈에 특정한 프로모터인 GMR (Glass Multimer Reporter)이 있다.



UAS 하위영역에 위치한 인간 질병 관련 유전자는 *GAL4*를 발현하는 형질전환 초파리에 의해 활성화 된다. 세포 또는 조직의 특이 프로모터의 하위영역에 위치하는 *GAL4* 유전자와 인간 유전자는 조직특이 전사가 활성화 되어, 인간 *APP*와 *BACE-1* 유전자를 같이 발현시킨 *GMR-GAL4* 초파리에 화합물을 첨가하면 눈의 형태학적 결함을 나타낸다(그림 74).

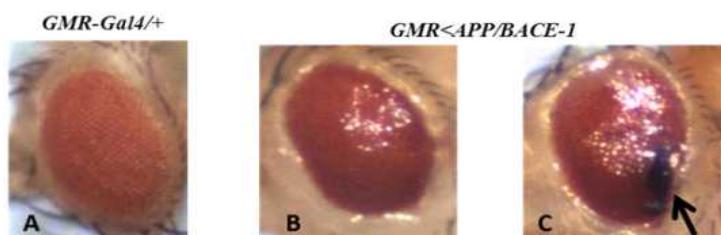


그림 74. Morphological defects in female and male fly expression APP/BACE-1 in compound eyes. (A) Control flies show wide type eye phenotype with smooth surface. (B, C) Flies expression *APP* and *BACE-1* gene show morphological defects, especially, dark deposits in C marked by arrow.

(8) 추출 및 분리

음건한 곽향 전초 5 kg을 분쇄기를 이용하여 마쇄한 후, 실온에서 메탄올 15 L로 2일 동안 침지시키고 나서 3회 여과하였다. 여과액을 합쳐 40°C에서 진공 농축하여 암황적색 타르 약 455 g을 얻었다. 메탄올 추출물(400 g)을 헥산(75.4 g), 클로로포름(55.1 g), 에틸아세테이트 (27.6 g), 부탄올(54.5 g) 및 수용성(187.4 g) 부분으로 순차 분획하였다(그림 75). 40°C에서 회전 농축기를 사용하여 유기용매 혼분을 농축하였으며, 물 혼분은 동결건조 하였다. 활성물질 분리를 위해 곽향 유래 물질 2 mg/mL으로, Lv 등 (2008) 및 Wang 등 (2014)의 방

법에 따라 FRET 효소분석법으로 검정하였다.

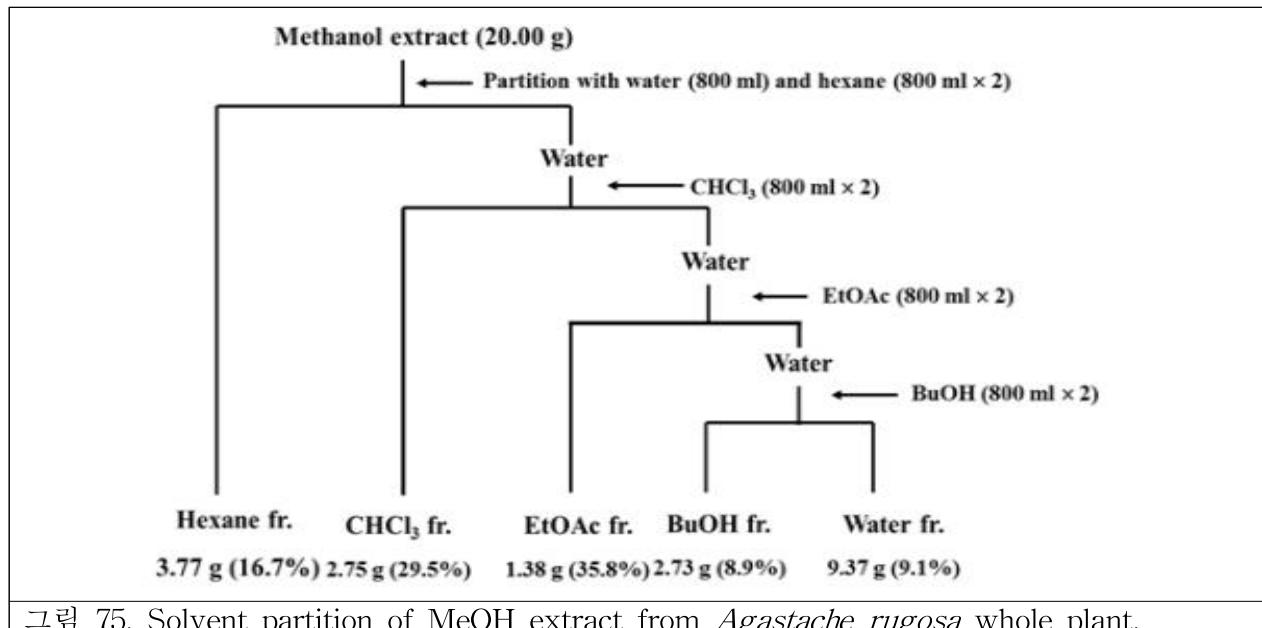


그림 75. Solvent partition of MeOH extract from *Agastache rugosa* whole plant.

상기 용매 획분 중에서 헥산 획분이 가장 높은 BACE-1 저해활성을 나타내어(표 3.1), 헥산 획분 10 g을 254 nm에서 UV 검출기 및 칼럼 용량이 132 mL 컬럼 카트리지 SNAP(340 g 실리카겔) Biotage Isolera 장치를 사용하여 중압액체크로마토그라피를 실시하였다(그림 76). 분리 과정은 헥산과 에틸아세테이트의 농도구배[100:0 (0.47 L), 85:15 (1 L), 70:30 (1.48 L), 60:40 (1.37 L), 50:50 (1.08 L), 30:70 (0.84 L), 10:90 (0.56 L), v/v]로, 그리고 최종적으로 메탄올 (1 L)로 분 당 유속 50 mL로 용출시켰다(각 획분 당 180 mL). 실리카겔 플레이트에서 헥산과 에틸아세테이트(6:4, v/v)를 이동상으로 하여 칼럼 분획물을 확인하였다. TLC 플레이트에서 유사한 R_f 값을 가진 분획을 합쳤으며, 2% 황산으로 살포한 다음, 핫 플레이트에서 검출하였다. 이 과정을 7번 반복하였다. 활성획분 17~20(H2) 및 28~33(H4)를 얻었다. H2 획분은 UV 검출기 및 칼럼 용량이 132 mL 컬럼 카트리지 SNAP(100 g 실리카겔)을 사용하여 중압액체크로마토그라피를 실시하였다. 분리 과정은 헥산과 에틸아세테이트의 농도구배[100:0, 90:10, 70:30, 60:40, 50:50, 30:70, v/v]로, 그리고 최종적으로 메탄올 (500 mL)로 분 당 유속 30 mL로 용출시켜 235 획분을 얻었다(각 획분 당 22 mL). 실리카겔 플레이트에서 앞에서 언급한 바와 같이 헥산과 에틸아세테이트를 이동상으로 하여 칼럼 분획물을 확인하였으며, 활성획분 1~34(H21) 및 35~120(H22)를 얻었다. H21 획분은 UV 검출기 및 칼럼 용량이 33 mL 컬럼 카트리지 SNAP(25 g 실리카겔)을 사용하여 중압액체크로마토그라피를 실시하였다. 분리 과정은 클로로포름과 에틸아세테이트의 농도구배(100:0, 95:5, 90:10, 85:15, 80:20, 70:30, 50:50, v/v)로, 그리고 최종적으로 메탄올(300 mL)로 분 당 유속 25 mL로 용출시켜 79 획분을 얻었다(각 획분 당 22 mL). H22 획분은 UV 검출기 및 칼럼 용량이 33 mL 컬럼 카트리지 SNAP (25 g 실리카겔)을 사용하여 중압액체크로마토그라피를 실시하였다. 분리 과정은 헥산과 에틸아세테이트의 농도구배[100:0, 95:5, 90:10, 85:15, 80:20, 70:30, 60:40, 40:60, 30:70, v/v]로, 그리고 최종적으로 메탄올(300 mL)로 분 당 유속 25 mL로 용출시켜 116 획분을 얻었다(각 획분 당 22 mL). H21로부터 활성획분 37~65(H213)을, H22로부터 활성획분 33~48(H222)를 얻었으며, 활성본체를 분리하기 위하여 고속액체크로마토그라피를 수행하였다. 칼럼은 7.8 mm × 300 mm μ Bondapak C18 (Waters,

Milford, MA) 이었으며, 이동상은 메탄올과 물(각각 80:20과 95:5, v/v)로 분당 1 mL 유속으로, 각각 217과 216 nm에서 분리하였다. 최종적으로, H213으로부터 활성분체 B1(7.26 mg)을 보지시간(retention time) 13.15분에서(그림 77), 그리고 H222로부터 활성분체 B2(12.52 mg)를 보지시간 16.86분에서(그림 78) 분리하였다. 또한, 획분 4를 -20°C 메탄올에서 재결정을 행하고 나서 고속액체크로마토그라피를 수행하였다. 이동상은 메탄올과 물(9:1, v/v)로 분당 1 mL 유속으로, 425 nm에서 분리하여 활성분체 B3(81.4 mg)을 보지시간 11.31분에서 (그림 79) 얻었다.

표 9. *In vitro* human BACE-1 inhibitory activity of each fraction obtained from the solvent partitioning of the methanol extract of the whole *Agastache rugosa* plants using a fluorescence resonance energy transfer-based enzyme assay

Material	Inhibition (%)		
	2 mg/mL	1 mg/mL	0.1 mg/mL
Methanol extract	75 ± 1.1	50 ± 1.4	24 ± 1.1
Hexane-soluble fraction	100	97 ± 1.3	47 ± 1.6
Chloroform-soluble fraction	0	0	0
Ethyl acetate-soluble fraction	20±0.9	3±0.9	0
Butanol-soluble fraction	0	0	0
Water-soluble fraction	0	0	0

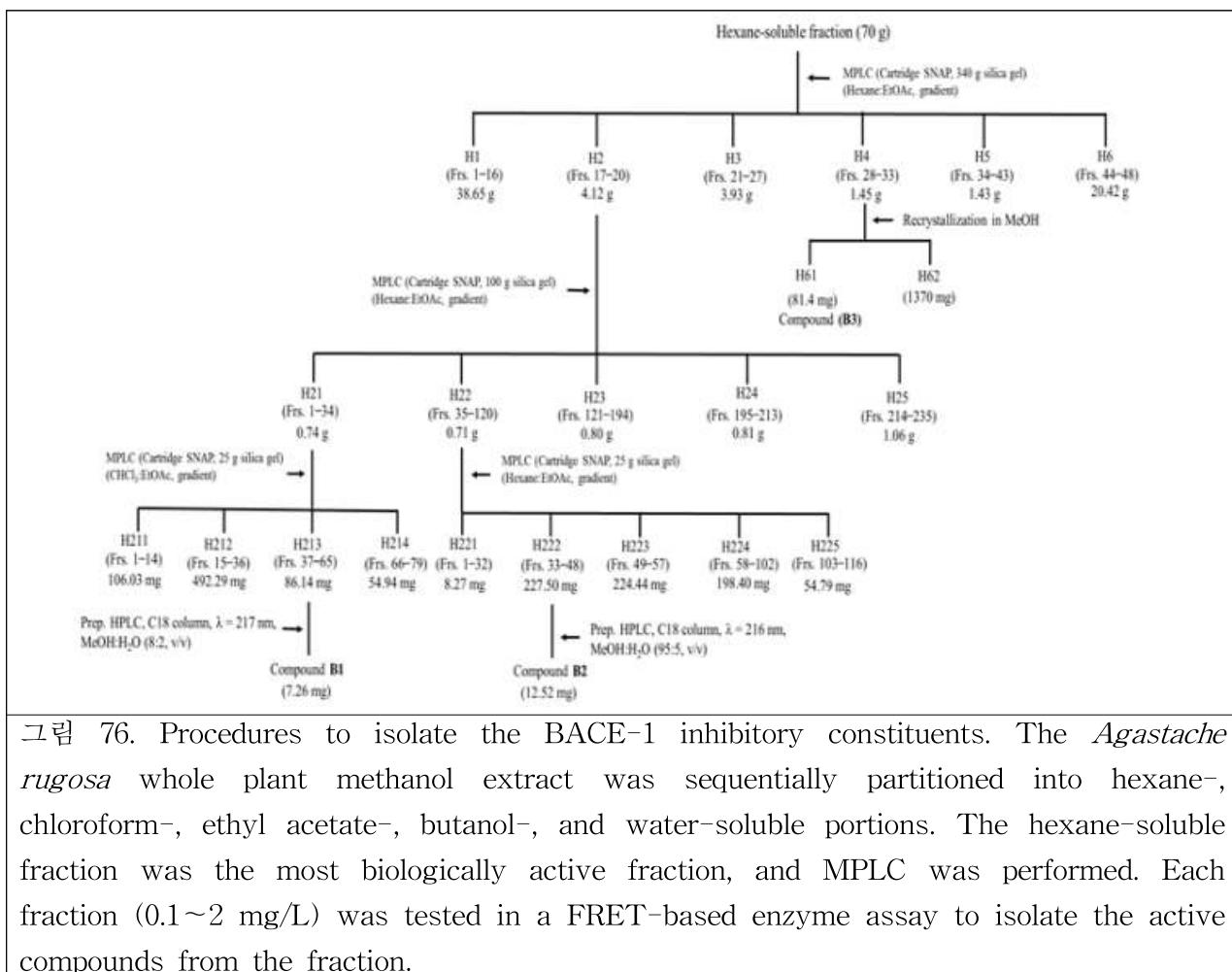


그림 76. Procedures to isolate the BACE-1 inhibitory constituents. The *Agastache rugosa* whole plant methanol extract was sequentially partitioned into hexane-, chloroform-, ethyl acetate-, butanol-, and water-soluble portions. The hexane-soluble fraction was the most biologically active fraction, and MPLC was performed. Each fraction (0.1~2 mg/L) was tested in a FRET-based enzyme assay to isolate the active compounds from the fraction.

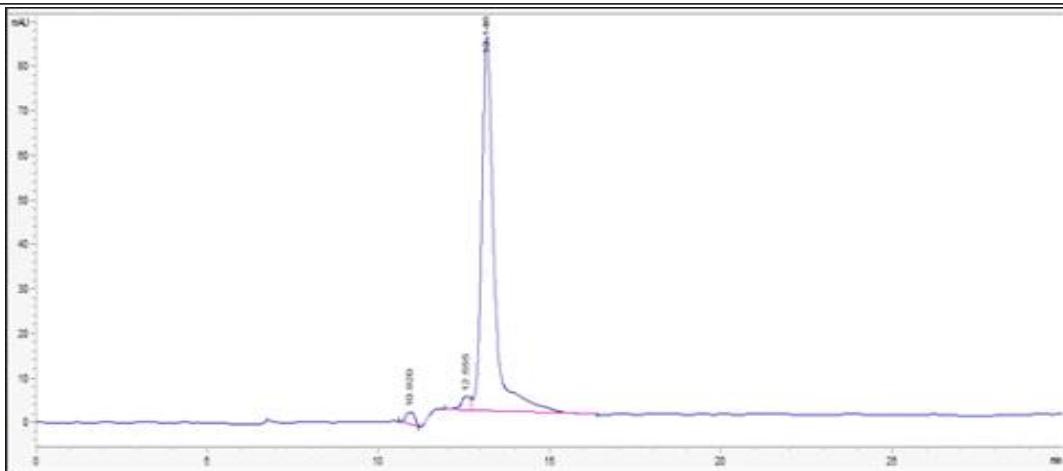


그림 77. HPLC chromatogram of compound B1.

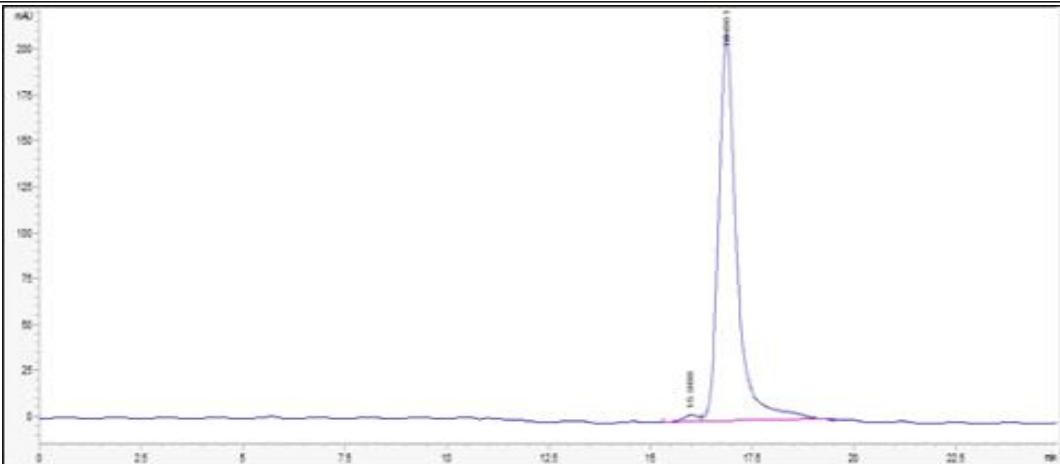


그림 78. HPLC chromatogram of compound B2.

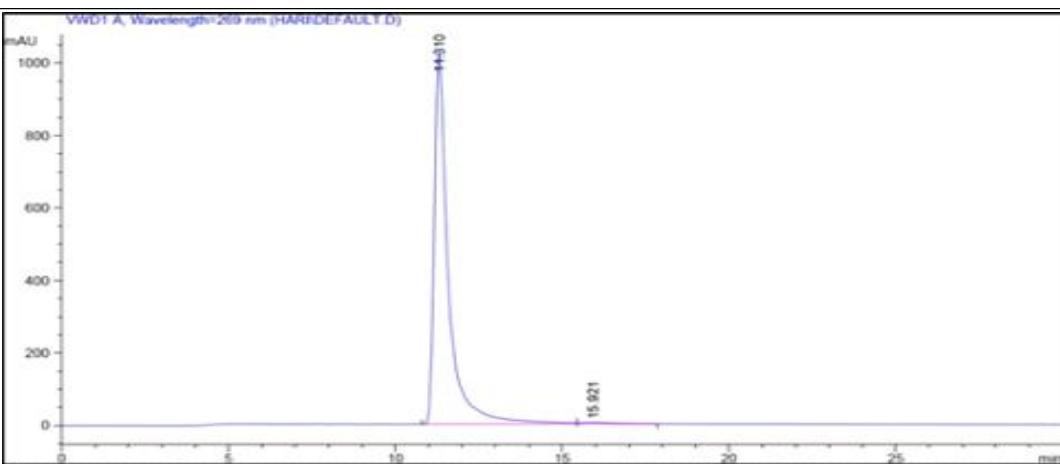


그림 79. HPLC chromatogram of compound B3.

(9) 형광공명에너지 전달 (FRET) 효소 분석법

시험 화합물의 BACE-1에 대한 저해활성은 Lv 등 (2008) 및 Wang 등 (2014)의 방법을 약간 변형하여 수행하였다. 간략하면, $0.5 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 의 재조합 인간 BACE-1 $1 \mu\text{L}$, $2.5 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 의 형광펩티드기판 $0.75 \mu\text{L}$, 50 mM 의 아세트산나트륨(pH 4.5) $47.25 \mu\text{L}$ 및 $2 \% \text{ DMSO}$ 에 녹인 분리 화합물($0.1 \sim 2000 \mu\text{L}/\text{mL}$)을 함유하는 혼합물을 1시간 동안 25°C , 암 조건에서 배양하였다. 그 후에 반응을 정지시키기 위해 2.5 M 아세트산나트륨 $16.6 \mu\text{L}$ 를 첨가하였다. BACE-1 Inhibitor IV를 양성 대조구로 하여 마찬가지로 조제하였다. 형광 강도는 355 nm 의 여기 및 405 nm 의 발광보기에서 SpectraMAX Gemini XS 플레이트 판독기(Molecular Devices, Sunnyvale, CA)를 사용하여 실온에서 측정하였다. 저해율은 다음과 같은 방정식으로 계산하였다.

$$\% \text{ 저해율} = 100 - [(F_s - F_{s0})/(F_c - F_{c0})] \times 100$$

여기서, F_s 와 F_{s0} 는 60분 및 0분에서의 샘플의 형광도이며, F_c 와 F_{c0} 는 60분 및 0분에서의 대조구의 형광도이다. 실험은 3 반복으로 수행하였다.

(10) 성충 눈의 광학현미경과 주사전자현미경 관찰

$\text{GMR} < \text{APP/BACE-1}$ 초파리는, 예비실험 결과, $0.1 \% \text{ DMSO}$ 에 녹인 아카세틴(100 , 300 및 $500 \mu\text{M}$) 첨가 표준 배지가 들어 있는 폴리스틸렌제 초파리 사육용 바이알에서 알 단계부터 사육하였다. 대조구는 $0.1 \% \text{ DMSO}$ 만을 공급하였다. 초파리 수컷 (1 , 10 , 20 및 30 일

령)은 얼음을 이용하여 마취시킨 후, 실온에서 광학현미경 슬라이드 위에 올려놓았다. 겹눈의 구조를 Integrated 3.0 Mega-Pixel CMOS 카메라를 장착 한 라이카 EZ4HD (Hicksville, 뉴욕)를 사용하여 35 배율로 관찰하였다.

주사전자현미경의 경우, 30일령의 초파리 수컷을 얼음에서 마취시킨 후, Greeve 등 (2004)의 방법에 따라 전도성 접착제로써 실버 페인트를 사용하여 구리 마운트에 부착시켰다. 그리고 나서, Hartman과 Hayes (1971)의 방법에 따라 사전 코팅 없이 직접 주사전자현미경의 뷰챔버에 넣었다. 15 kV에서 Carl Zeiss Supra 55VP 전계방출 주사전자현미경 (Karl Zeiss, Jena, 독일)으로 겹눈의 형태를 관찰하였다.

(11) 조직학적 분석

Perumalsamy 등 (2013)과 Wang 등(2014)의 방법에 Carson's trichome 염색을 실시하였다. 간략하면, 앞에서 언급한 바와 같이 바이알에서 사육한 우화 후 5일 및 15일 경과한 수컷 GMR < APP/BACE-1 초파리 머리를 4% 파라포름알데히드 완충액 (pH, 7.4)에 4°C에서 밤새 고정시키고 나서, HM 340E 마이크로톰 (Thermo Scientific Microm, Walldorf, 독일)를 사용하여 파라핀에 준비한 초파리 머리를 10 μm 두께로 잘랐다. 40°C에서 박편을 밤새 건조시킨 후 CitriSolv (Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ)로 왁스를 제거하고 나서, 인산완충 생리식염수와 에탄올로 재수화 시키고 나서 건조하였다. 재수화된 파라핀 절편을 15분간 Carson's trichome 염색액에 침지한 후, 슬라이드를 수돗물로 세척한 다음 증류수로 세 번 연속 세척하였다. 여분의 물을 제거하고 나서, 시료를 Vector shield H-1000 봉입제(Vector Laboratories, Burlingame, CA)에 봉입하였다.

AD 모델 초파리에 있어서의 아밀로이드 프레이크를 탐지하기 위하여 콩고레드 염색을 수행하였다. 이를 위해 파라핀으로 고정한 박편을 앞에서 언급한 바와 같이 왁스를 제거하고 나서 NovaUltra Special Stain 커트 (IHC World, Woodstock, MD)로 제조사의 사용법 설명서에 따라 염색하였다. 박편을 탈수시키고 나서 마운팅 메디움으로 마운트 한 후, EZ4 HD 스테레오 현미경을 사용하여 이미지를 관찰하고 촬영하였다.

(12) 우화율 측정

용화율과 우화율은 Tamura 등 (2011)의 방법에 따라 조사하였다. *elav* < *App/BACE-1* 초파리를 앞에서 언급한 바와 같이 알 단계부터 사육하였다. 바이알의 벽을 기어오르는 초파리 3령 유충 50마리씩을 신선한 배지가 들어 있는 바이알에 옮겼다. 처리구 및 대조구 (0.1% DMSO 처리) 초파리 사육조건과 동일한 조건 하에서 사육하였으며, 번데기와 성충의 숫자를 조사하였다. 모든 처리는 반복당 50 마리씩 4 반복으로 실시하였다.

(13) 수명 검정

갓 우화한 *elav* < *App/BACE-1* 초파리 수컷 200 마리를 0.1% DMSO에 녹인 100, 300 및 500 μM 아카세틴을 처리한 배지가 들어 있는 바이알에서 사육하였다. 대조군은 0.1% DMSO 만을 첨가하였다. 생존 파리는 4일마다 새로운 배지가 들어 있는 바이알에 옮겨 주었다. 중간생존기간(median survival time, T1/2)은 평균생존기간 보다 더 신뢰할 수 있다고 알려져 있기 때문에(Chakraborty 등, 2011) 50% 생존기간으로 측정하였다. 모든 처리는 반복당 수컷 20 마리씩 10 반복으로 수행하였다.

(14) 비행행동 검정

Crowther 등 (2005)와 Wang 등 (2014)의 방법에 따라 비행행동을 조사하였다. 0.1% DMSO에 녹인 100, 300 및 500 μM 아카세틴 함유 배지에서 사육한 *elav* < *App/BACE-1*

초파리 (1, 5, 10 및 15일령) 수컷 20 마리씩을 빈 바이알 (높이 95 × 지름 24 mm)에 넣고 나서 다른 바이알로 겹치게 덮은 후 (그림 80) 두 번 책상 바닥에 가볍게 두드렸다. 20초 후에, 바이알 바닥으로부터 9.5 cm 표시선을 기어오르는 숫자를 조사하였다. 대조군은 0.1% DMSO 만을 첨가하였다. 비행지수는 총 초파리 중에 9.5 cm의 선을 지내간 초파리수를 %로 나타내었다. 반복당 수컷 20 마리씩 4 반복으로 실험을 수행하였다.

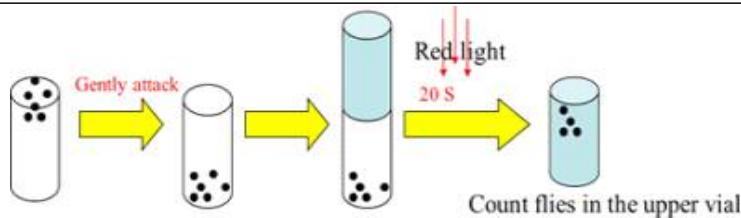


그림 80. *Drosophila* climbing behavior detection procedure.

(15) 섭식 분석

성충의 섭식활동은 Bahadorani 등 (2008)과 Wang 등 (2014)의 방법에 따라 조사하였다(그림 81). 잣 우화한 *elav*<*App/BACE-1* 초파리 (1, 5, 10 및 15일령) 수컷 15 마리씩을 3일 동안 배지에서 사육하고 나서 중류수로 적신 세 겹의 Whatman no. 2 여지(Whatman, Maidstone, 영국)가 들어 있는 바이알에 넣고 20시간 동안 굽긴 후, 0.1% DMSO에 녹인 100, 300 및 500 μ M acacetin을 공급한 배지 (0.2% Acid red 함유)가 들어 있는 바이알에 옮겼다. 대조군은 0.2% Acid red와 0.1% DMSO를 함유하는 배지를 공급하였다. 2시간 동안 섭식 시킨 후 파리는 마취시키고 복부를 분리하여 중류수 1 mL에서 마쇄하였다. 흡광도 값은 섭식량을 나타내는 지표이기 때문에(Min과 Tatar, 2006), 25°C, 5000 rpm에서 5분 동안 원심분리한 후, 상층액을 505 nm에서 측정하였다. 모든 처리는 반복당 수컷 15마리씩 3반복으로 실시하였다.

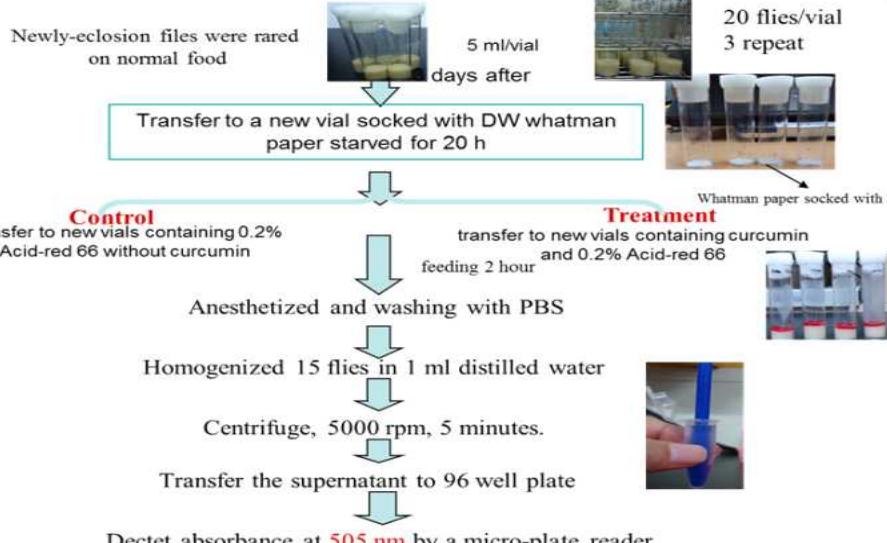


그림 81. *Drosophila* feeding assay procedure.

(16) 인간 *APP*와 *BACE-1* 유전자 형질전환 초파리의 RT-PCR 분석

아카세틴이 형질전환 초파리에 있어서 인간 *APP*와 *BACE-1* mRNA의 발현에 영향을 미

치는지를 qRT-PCR을 실시하였다. *elav < App/BACE-1* 초파리와 *elav < GFP* 초파리를 0.1% DMSO에 녹인 100, 300 및 500 μM 아카세틴을 공급한 배지가 들어 있는 바이알에서 알 단계부터 사육하였다. 대조구는 0.1% DMSO 만을 공급하였다. 제조사의 사용법 설명서에 따라 RNeasy Mini 컫트 (Qiagen, Hilden, 독일)을 사용하여 두 실험 초파리(20일령) 머리 30개 (30 mg)에서 총 RNA를 추출하였다. 각 시료에서 추출한 1 μg 을 SuperScript III Reverse Transcriptase 컫트의 프로토콜에 따라 올리고(dT) 12-18 프라이머 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 상보DNA (complementary DNA, cDNA) 합성에 이용하였다. StepOne Plus Real-Time PCR 시스템 (Applied Biosystems, Darmstadt, 독일)을 이용하여 96-well 플레이트에서 실시간 RT-PCR을 실시하였다. 각 반응 혼합물은 SYBR Green PCR Master Mix 컫트 (Applied Biosystems) 10 μL , 전향 및 반향 프라이머 (각 5 pmol) 각 2 μL , cDNA 25 ng 및 diethylpyrocarbonate 증류수로 최종 20 μL 로 하였다. 올리고뉴클레오티드 PCR 프라이머 쌍은 표 10에 나타내었으며, Pioneer (Daejeon)에서 구입하였다. PCR 증폭 프로그램은 95°C에서 5분간, 혼합물 증폭을 위해 40 주기 (30초 95°C, 30초 62°C 및 30초 72°C) 과정을 행하였다. 목표 유전자의 mRNA 발현 수준은 초파리의 리보솜단백질 49를 인코드 하는 housekeeping gene *rp 49*의 mRNA 발현 수준으로 정상화 하였으며, StepOne Software v2.3 및 DataAssist Software (Applied Biosystems)를 이용하여 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 방법에 의해 분석하였다. 실험 결과는 평균 \pm 표준오차로 표시하였으며, 3 반복으로 실시하였다.

표 10. Primer sequences, product sizes, and source used in this study

Gene name	Primer sequence	Product size (bp)	Reference
<i>APP</i>	5'-GCCGTGGCATTCTTTGGGGC-3' 5'-GTGGTCAGTCCTCGGTCGGC-3'	100	Pirooznia 등
<i>BACE-1</i>	5'-GCAGGGCTACTACGTGGAGA-3' 5'-GTATCCACCAGGATGTTGAGC-3'	66	Kwak 등
<i>RP49</i>	5'-CTGCTCATGCAGAACCGCGT-3' 5'-GGACCGACAGCTGCTTGGCG-3'	100	Pirooznia 등
<i>GFP</i>	5'-AAGTTCATCTGCACCACCG-3' 5'-TCCTTGAAGAAGATGGTGCG-3'		

(17) Western blot 분석

elav < APP/BACE-1 초파리는 0.1% DMSO에 녹인 100, 300 및 500 μM 아카세틴을 공급한 배지가 들어 있는 바이알에서 알 단계부터 사육하였다. 1% 단백질분해효소 저해제 칵테일을 함유하는 100 μL RIPA 완충액(pH 8.0)에 초파리 머리를 넣음으로서 수컷(20일령) 50 마리 머리에서 lysate를 얻었다(Chakraborty 등, 2011). 대조구는 0.1% DMSO 만을 공급하였다. 여액(lysate)을 30분, 4°C에서 14,000 rpm으로 원심분리 하였다. 상등액의 단백질 함량은 BSA를 표준품으로 하여, Bradford Protein Assay 컫트 (Sigma-Aldrich)를 이용하여 조사하였다. 총단백질 (APP 및 BACE-1 탐지를 위해 시료당 30 μg ; A β 탐지를 위해 시료당 70 μg)은 DL-dithiothreitol 40 mM을 함유하는 5 \times sample buffer (Bollag 등, 1996) 동량 부피로 혼합, 10분 가열하고 나서 Mini-Protean 3 electrophoresis cell (Bio-Rad, Hercules, CA)을 이용하여 APP, APP-C-terminal fragment (APP-CTF) (APP- α CTF 및 APP- β

CTF) 그리고 APP intracellular domain (AICD), BACE-1 및 β -amyloid (A β) 탐지를 위해, 각각 8, 10 및 12% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels에 로딩 하였다. 110 V에서 2시간 전기영동 후, 겔의 단백질은 electroblotting apparatus를 이용하여 polyvinyl difluoride 막 (Pall Corporation, Pensacola, FL)으로 옮겼다. 막은 5% skim milk (BD Difco, Franklin Lakes, NJ)와 0.1% (v/v) Tween-20(0.1% PBS-T)을 함유하는 PBS로 실온에서 1시간 블록하고 나서, 절단된 APP 생성물을 확인하기 위하여, anti-APP C-terminal antibody 1:4,000 희석액, anti-BACE-1 1:1,000 희석액 그리고 anti-amyloid (4G8) 1:1,000 희석액으로 4°C에서 밤새 배양하였다. 10분 간격으로 0.1% PBS-T로 세 번 세척한 후, APP 및 BACE-1의 경우 염소 anti-rabbit IgG H&L (HRP) 이차항체 1:4,000 희석액 그리고 A β 의 경우 염소 anti-mouse IgG-HRP 1:5,000 희석액으로 다시 2시간 막을 배양하였다. 마지막으로, 10분 간격으로 0.1% PBS-T로 세 번 세척한 후, 막을 ECL chemiluminescence reagent (Amersham Bioscience, Buckinghamshire, 영국)로 전개시키고 즉시 CP-PU X-ray film (AGFA, Mortsel, 벨기에)에 노출시켰다. 단백질 발현의 차이는 Molecular Imager Gel Doc XR system (Bio-Rad, Hercules, CA)을 이용하여 정량화 하였으며 동일 막에서 액틴 발현으로 정상화 하였다. 실험 결과는 평균 \pm 표준오차로 표시하였으며, 3 반복으로 실시하였다.

(18) 자료 분석

50% 저해농도 (50% inhibitory concentration, IC₅₀)는 BACE-1 활성의 50% 손실로 이끄는 화합물의 농도로 정의하였다. IC₅₀ 값은 GraphPad Prism 5.1 software (GraphPad Software, La Jolla, CA)을 이용하여 구하였다. 처리 간 IC₅₀ 값은 95% 신뢰구간이 중첩되지 않을 때 서로 간에 유의성이 있는 것으로 간주하였다. 평균치 간의 차이의 유의성은 one-way 또는 two-way 분산분석을 이용하여 GraphPad Prism 5.1 software로 구하였다.

다. 결과

(1) BACE-1 저해활성물질의 분획 및 동정

곽향 전초(全草)의 메탄올 추출물의 용매 분획으로부터 얻어진 획분들의 인간 BACE-1에 대한 저해활성을 FRET 효소검정법을 이용하여 조사하였다(표 9). 획분들 간에 저해활성에 현저한 차이를 보였으며, 다음 정제 단계를 위하여 피크 활성획분을 동정에 이용하였다. 1 mg/mL의 농도에서, 혁산 획분이 가장 강한 저해활성을 보였으며, 클로로포름, 에칠아세테이트, 부탄올과 수용성 획분은 저해활성을 보이지 않았다.

곽향 전초를 FRET 효소 검정법을 이용하여 분획하였을 때, 질량분석법 (electron ionized mass spectrometry, EI-MS) 및 핵자기공명분광법 등의 분광분석에 의해 세 개 활성 화합물이 동정되었다. 3개 BACE-1 억제 화합물들은 마스린산(maslinic acid) (B1), 올레아놀산(oleanolic acid) (B2) 및 아카세틴(acacetin) (B3) (그림 82) 이었다. Maslinic acid (B1)는 다음과 같은 자료에 의거하여 동정되었다 : 백색 결정; UV (MeOH): λ_{max} nm = 217; EI-MS (70 eV), m/z (% relative intensity): 472 [M]⁺ (1.9), 284 (3.0), 256 (2.8), 248 (100), 233 (8.6), 203 (73.5), 189 (8.1), 173 (3.4), 133 (10.2), 105 (5.1), 95 (4.4), 69 (6.2), 55 (5.3) (그림 83); ¹H NMR (MeOD, 600 MHz): δ 0.79 (3H, s), 0.86 (3H, s), 0.87 (3H, s), 0.94 (3H, s), 0.99 (3H, s), 1.10 (3H, s), 1.13 (3H, s), 2.89 (1H, m), 2.98 (1H, d, J = 9.54 Hz), 3.61 (1H, ddd, J = 4.50, 2.94, 3.90 Hz), 5.21 (1H, t, J = 6.72 Hz) (그림 84); ¹³C NMR (MeOD, 150 MHz): δ 17.2 q, 17.6 q, 18.3 q, 19.8 t, 24.5 q, 24.7 q, 24.8 t, 26.6 t, 29.4 t, 29.5 q, 30.9 s, 31.9 q, 34.1 t, 34.2 t, 34.5 t, 39.5 s, 40.6 s, 40.7 s, 43.2 s, 43.8 d, 48.3 t, 48.4 s, 48.7 t,

49.0 d, 56.9 d, 69.7 d, 84.7 d, 122.5 d, 146.9 s, 185.8 s (그림 85). Oleanolic acid (2)는 다음과 같이 동정되었다 : 백색 무정형 분말; UV (MeOH): λ_{\max} nm = 216; EI-MS (70 eV), m/z (% relative intensity): 456 [M]⁺ (4.3), 249 (18.8), 248 (100), 233 (6.0), 207 (17.3), 204 (11.3), 203 (59.7), 190 (10.0), 189 (10.6), 175 (7.4), 133 (15.0), 105 (6.7), 81 (6.1), 69 (8.0), 55 (7.6) (그림 86); ¹H NMR (MeOD, 600 MHz): δ 0.77 (3H, s), 0.85 (3H, s), 0.90 (3H, s), 0.95 (3H, s), 0.97 (3H, s), 1.12 (3H, s), 1.15 (3H, s), 1.38 (2H, m), 1.41 (2H, m), 1.56 (4H, m), 2.20 (3H, m), 2.85 (1H, dd, J = 9.9, 4.5 Hz), 3.15 (1H, dd, J = 15.78, 4.4 Hz), 3.17 (1H, t, J = 14.76 Hz), 3.34 (2H, s), 4.62 (2H, s), 5.23 (1H, s) (그림 87); ¹³C NMR (MeOD, 150 MHz): δ 16.0 q, 16.5 q, 16.5 q, 17.9 t, 21.7 t, 24.2 q, 24.3 t, 25.5 q, 26.5 t, 28.0 t, 28.9 q, 31.8 s, 33.8 t, 34.0 t, 34.2 q, 34.5 t, 35.1 s, 38.2 t, 38.3 s, 40.0 s, 40.7 d, 42.9 s, 43.0 s, 47.5 t, 47.9 d, 56.9 d, 79.8 d, 123.7 d, 145.5 s, 182.4 s (그림 88). Acacetin (3)은 다음과 같이 동정되었다 : 황색 바늘; UV (MeOH): λ_{\max} nm = 269, 315; EI-MS (70 eV), m/z (% relative intensity): 284 [M]⁺ (100), 283 (12.5), 241 (11.4), 152 (6.9), 132 (18) (그림 89); 고분해능 EI-MS: C₁₆H₁₂O₅ (관측) : 284.0683 (계산) : 284.0684; FT-IR ν_{\max} cm⁻¹: 3147 (-OH), 1651 (-C=O), 1605, 1560, 1503, 1428 (-C=C) (그림 90); ¹H NMR (DMSO-d₆, 600 MHz): δ 3.16 (3H, s), 6.20 (1H, d, J = 1.98 Hz), 6.51 (1H, d, J = 2.04 Hz), 6.87 (1H, s), 7.11 (2H, d, J = 8.88 Hz), 8.04 (2H, d, J = 8.88 Hz), 10.85 (1H, s), 12.92 (1H, s) (그림 91); ¹³C NMR (DMSO-d₆, 150 MHz): δ 55.6 q, 94.0 d, 98.9 d, 103.5 d, 103.8 s, 114.6 d, 114.6 d, 122.8 s, 128.3 d, 128.3 d, 157.3 s, 161.4 s, 162.3 s, 163.3 s, 164.2 s, 181.8 s (그림 92). 화합물 1, 2 및 3의 양성자와 탄소 시그널의 해석은 각각 Tanaka 등 (2003)과 Dam 등 (2010), Hossain과 Ismail (2013) 및 Gangwal 등 (2010), 그리고 Wawer와 Zielinska (2001) 및 Miyazawa와 Hisama (2003)의 그것과 대체로 일치하였다.

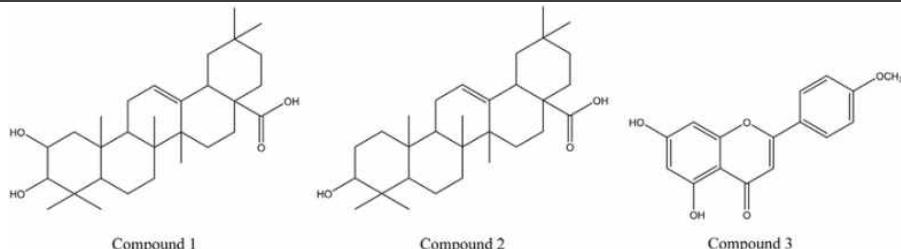


그림 82. Structures of maslinic acid, oleanolic acid, and acacetin. These compounds were identified in the whole *Agastache rugosa* plants in this study. The chemical formula of maslinic acid (B1) is C₃₀H₄₈O₄, with a molar mass of 472.70 g/mol; the chemical formula of oleanolic acid (B2) is C₃₀H₄₈O₃, with a molar mass of 456.70 g/mol; and the chemical formula of acacetin (B3) is C₁₆H₁₂O₅, with a molar mass of 284.26 g/mol.

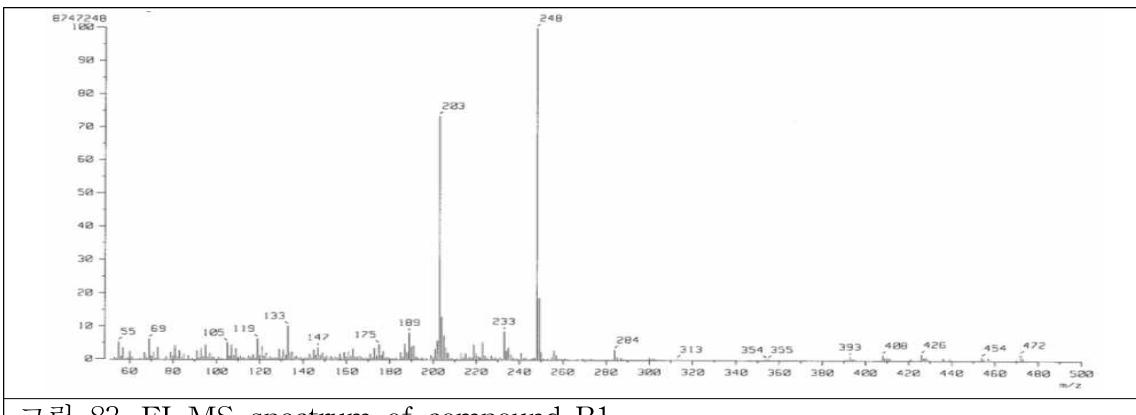
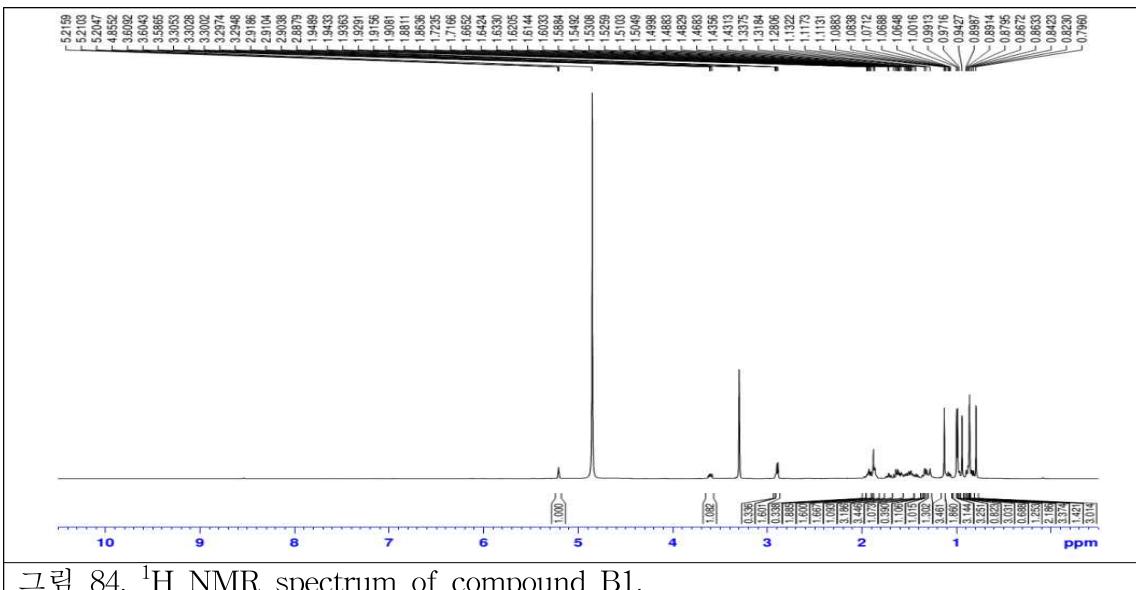


그림 83. EI-MS spectrum of compound B1.



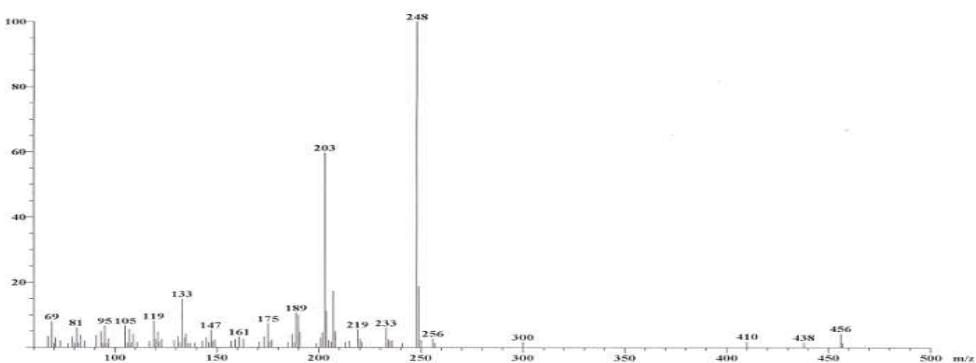


그림 86. EI-MS spectrum of compound B2.

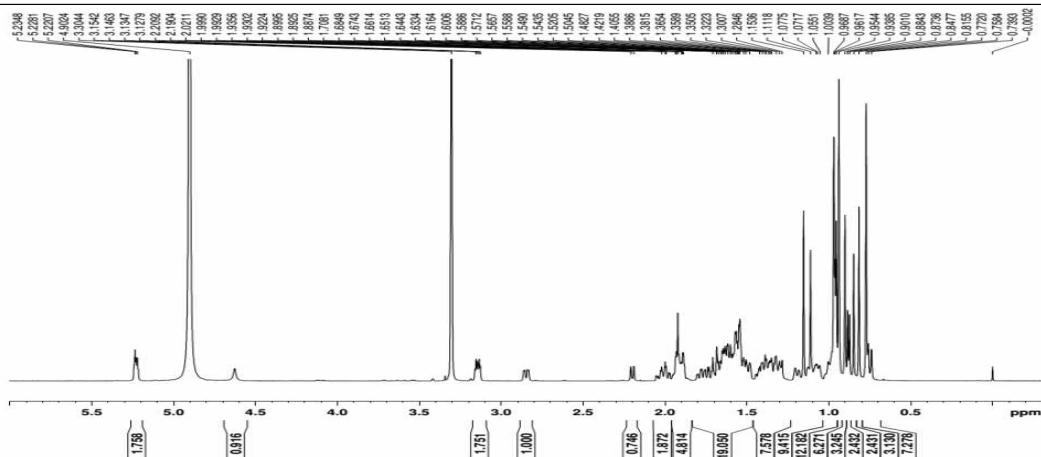


그림 87. ^1H NMR spectrum of compound B2.

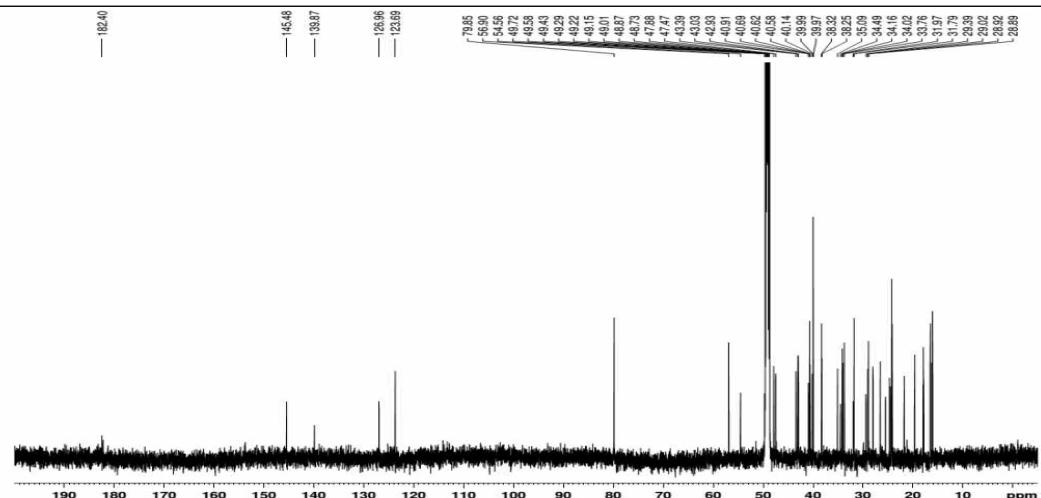


그림 88. ^{13}C NMR spectrum of compound B2.

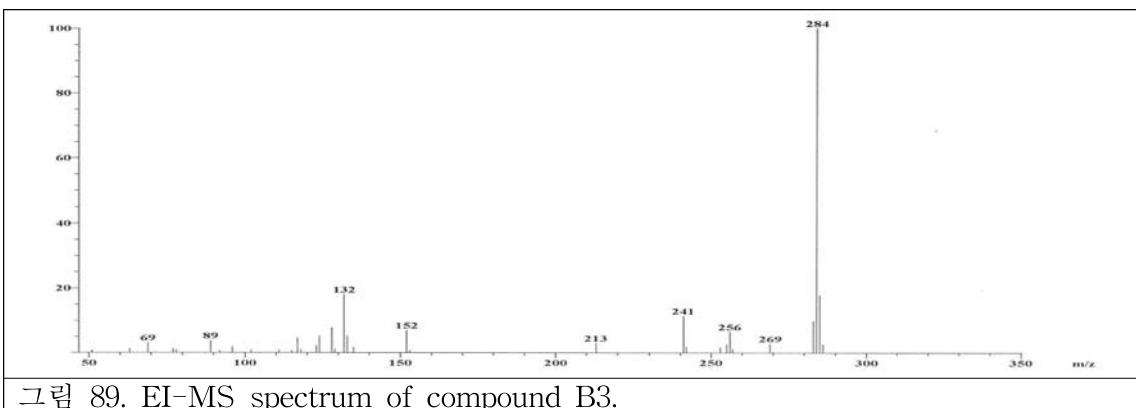


그림 89. EI-MS spectrum of compound B3.

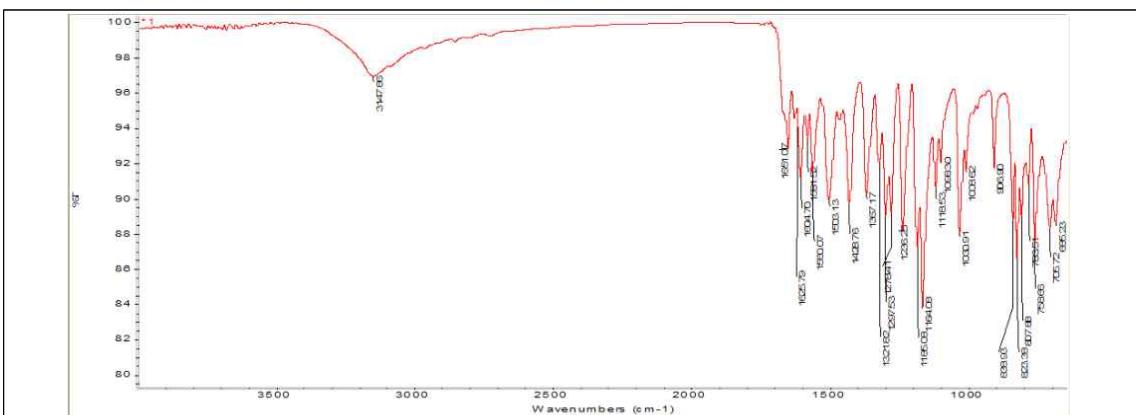


그림 90. FT-IR spectrum of compound B3.

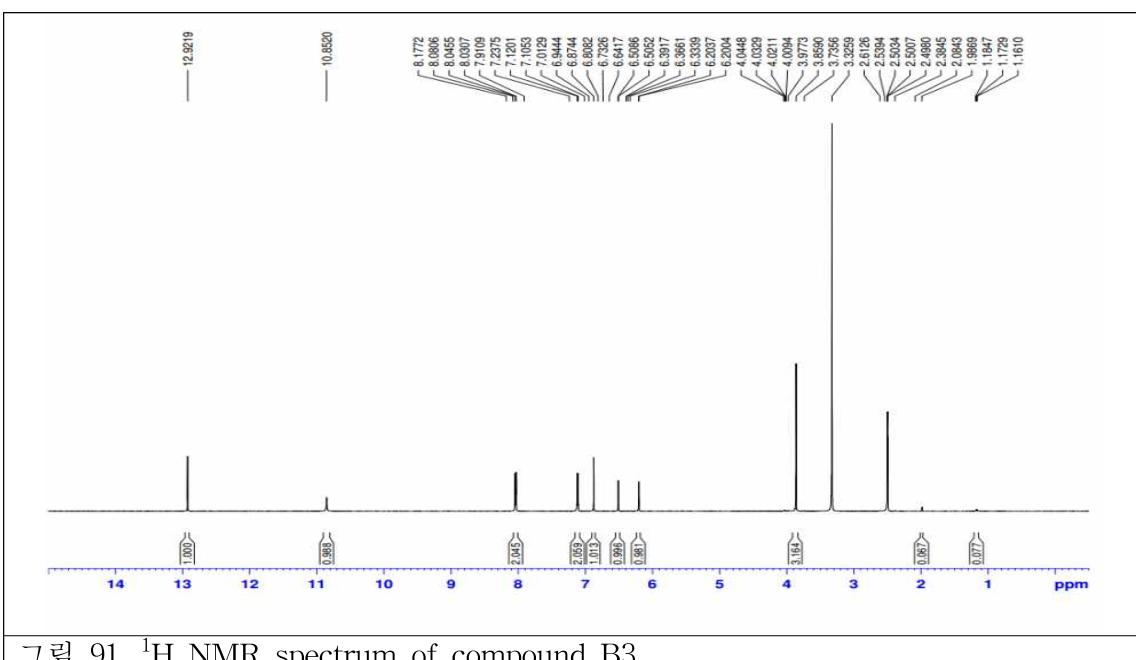


그림 91. ^1H NMR spectrum of compound B3.

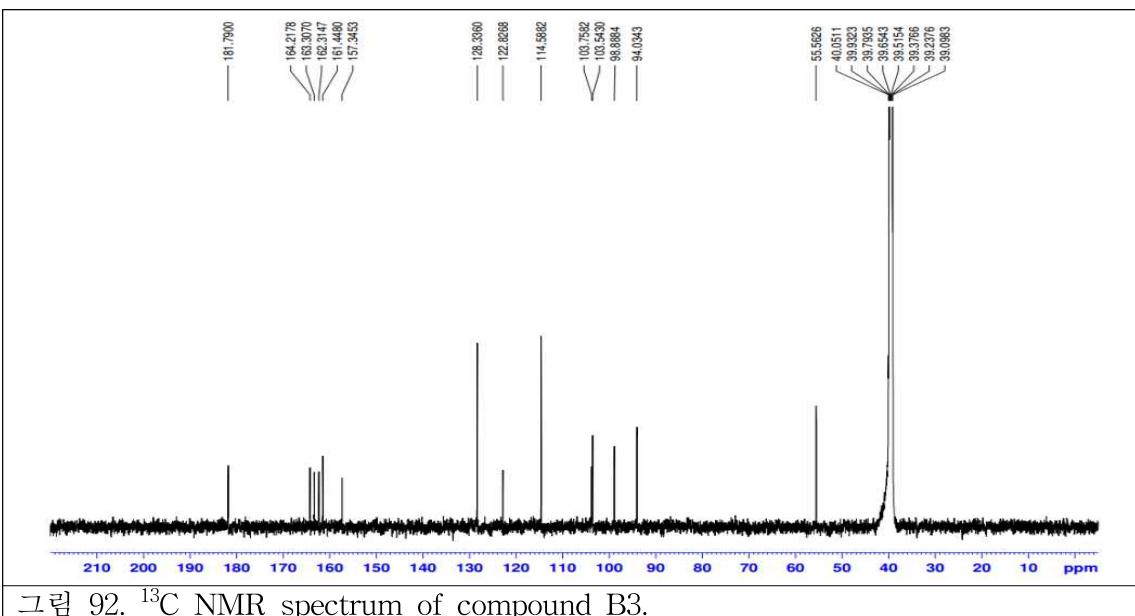


그림 92. ^{13}C NMR spectrum of compound B3.

(2) 분리 화합물의 BACE-1 저해활성

분리 화합물 (아카세틴, 마스린산 및 올레아놀산)과 순수 아카세틴 및 양성대조구인 BACE-1 저해제 IV와 epigallocatechin gallate (EGCG)의 BACE-1 억제활성을 FRET 효소 분석법으로 조사하였다(표 3.3). IC_{50} 값을 기준으로, 분리한 아카세틴과 순수 아카세틴의 값이 비슷한 것으로 확인되어, 분리 화합물이 아카세틴임이 확인되었다. 천연 아카세틴이 올레아놀산과 마스린산보다 각각 4배와 5.5배 높은 BACE-1 저해활성을 보였다. 아카세틴과 EGCG의 BACE-1 저해활성에는 현저한 차이를 나타내지 않았다. 전반적으로, 이들 화합물들은 BACE-1 저해제 IV 보다 현저히 약한 저해활성을 보였다.

표 11. *In vitro* human BACE-1 inhibitory activity of three isolated compounds (acacetin, maslinic acid, and oleanolic acid), pure organic acacetin, and two BACE-1 inhibitors IV and epigallocatechin gallate using a fluorescence resonance energy transfer-based enzyme assay.

Compound	$\text{IC}_{50}, \mu\text{M} (95\% \text{CL})$	Slope \pm SE	χ^2	P -value
Natural acacetin	88.5 (60.1–130.5)	0.4 \pm 0.04	5.64	0.940
Pure acacetin	81.2 (59.4–111.0)	0.4 \pm 0.03	5.41	0.936
Oleanolic acid	355.1 (327.3–385.4)	1.9 \pm 0.12	4.07	0.989
Maslinic acid	487.6 (439.3–542.4)	1.4 \pm 0.09	4.35	0.984
Epigallocatechin gallate	96.2 (72.1–128.2)	0.4 \pm 0.02	3.48	0.965
BACE-1 inhibitor IV	0.079 (0.073–0.085)	1.2 \pm 0.07	3.25	0.993

(3) 아카세틴의 초파리 일령에 따른 겹눈의 형태에 미치는 효과

대조구 *GMR-GAL4* 초파리 수컷은 야생형의 정상적인 눈 형태를 보였다(그림 93A). 그러나, 인간 *BACE-1*과 *APP*의 과발현은 초파리 눈의 발달 단계 동안 $\text{GMR} < \text{APP/BACE-1}$ 초파리 수컷 (우화 1일째)에 있어서 이상형의 거친 눈의 형태를 보였으며(그림 93B,C), 특히 눈에 검은 침적이 나타났다(그림 93C의 화살표). $\text{GMR} < \text{APP/BACE-1}$

초파리 암컷에서도 비슷한 결과가 관찰되었다. 아카세틴의 검은 침적이 보이는 눈에 형태적 결함에 미치는 영향을 조사하였다(그림 93D). 검은색 침적이 있는 비율은 암컷과 수컷 간에 커더란 차이를 보였으나, 비율의 유의한 차이가 아카세틴을 섭식시킨 암수 초파리 사이에서는 관찰되지 않았다. 0.1% DMSO를 먹인 초파리 암컷은 검은색 침적을 보이는 초파리 비율(12.0%)에 비해, 100, 300 및 500 μM 아카세틴을 섭식시킨 초파리 비율(6.3~8.0%)은 많이 감소되었다. 또한, 0.1% DMSO 처리 초파리 수컷은 검은색 침적을 보이는 초파리 비율(18.7%)에 비해, 100, 300 및 500 μM 아카세틴을 섭식시킨 초파리 비율(5.0~7.0%)에서 많이 감소되었다.

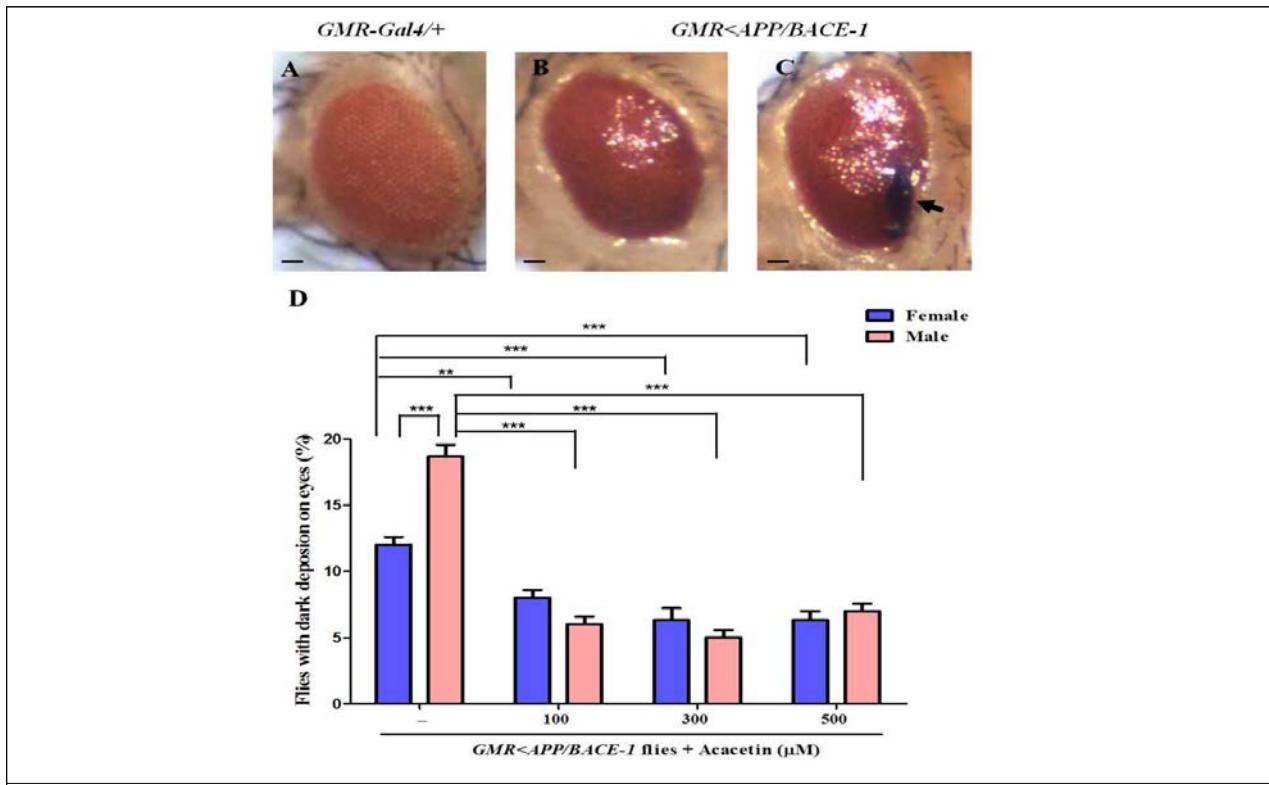


그림 93. Effect of acacetin on the morphological defects in the compound eyes of the transgenic flies. Human APP and BACE-1 transgenic flies (*GMR<APP/BACE-1*) were cultured from the egg stage in polystyrene vials containing standard media supplemented with acacetin (100, 300, and 500 μM) in 0.1% DMSO. The morphology of the compound eyes of male and female flies (1 day old) was observed with a stereo microscope ($\times 35$). The flies with aberrant eye phenotypes were collected, and the number of flies with dark deposits in the eyes was counted. (A) Control male *GMR-Gal4* flies with a wild-type phenotype of a smooth surface compound eye. (B) Transgenic male *GMR<APP/BACE-1* flies with a compound eye with an abnormal appearance. (C) Male *GMR<APP/BACE-1* flies with morphological defects, particularly dark deposits in the eyes. (D) Quantitation of the phenotype of male and female flies showing serious morphological defects with dark deposits in the eyes. Each bar represents the mean \pm SE from three independent experiments ($^{***}P < 0.001$; ns, no significant difference, using Bonferroni's multiple comparison test). The scale bars represent 20 μm .

인간 *APP*와 *BACE-1* 유전자의 공발현은 초파리 겹눈에 있어서 광수용체의 일령 의존적 신경퇴화를 유도한다는 것이 보고되어 있다(Greeve 등, 2004). 시간이 경과함에 따라 아카세틴이 초파리 눈의 퇴화에 영향을 미치는지를 확인하기 위하여, 우선 1, 10, 20 및 30일령 초파리의 눈 형태학적 변화를 조사하였다. 대조 초파리 *GMR-GAL4*는 정상적이며 잘 조직된, 부드러운 눈 표면을 보였으며, 시간의 경과에 따른 명확한 변화는 없었다(그림 94A1-4). 반면, 인간 *APP*와 *BACE-1*을 공발현 시킨 초파리에서 외적 변화가 관찰되었으며, 이들 변화는 시간이 경과함에 따라 더욱 현저하였다(그림 94B-E). 검은색 침적은 0.1 % DMSO를 먹인 초파리 겹눈의 가장자리에서 우화 1일째 초파리 수컷에서도 관찰되었으며(그림 94B1에 화살표로 표시), 이 침적은 10일된 초파리 수컷에서 증가하였다(그림 94B2에 화살표로 표시). 시간이 경과함에 따라 눈에 검은 반점을 가진 초파리들은 반점이 없는 초파리 보다 조기 사망을 초래한다. 또한, 홀눈의 융합 숫자는, 우화 1일째 초파리 눈에 비하여 20일령 초파리 눈에서 증가하였으며(그림 94B3에 별표로 표시), 30일령 초파리 눈에서 더욱 악화되었다(그림 94B4에 별표로 표시).

다음으로, *GMR < APP/BACE-1* 초파리의 알 단계에서부터 0.1% DMSO에 녹인 아카세틴(100, 300 및 500 μ M) 침가 배지에서 사용하였다. 아카세틴을 먹인 1 및 10일령 초파리 눈의 명확한 외적 구조 변화가 없을지라도(그림 94C1-E1, C2-E2), 아카세틴은 1일된 초파리 눈에 검은 반점이 있는 초파리 숫자를 감소시켰다(그림 93). 그러나, 20일령 또는 30일령 초파리에서 얇은 적색에서 진한 적색으로 가시적인 눈색 변화가 있었다(그림 94C3-E3, C4-E4). 아카세틴은 완전히 *GMR < APP/BACE-1* 초파리 눈의 변성 표현형을 억제하지 않았다. 그럼에도 불구하고, 아카세틴의 보호효과는 10, 20 및 30일 된 초파리에서 분명하게 관찰되었다(그림 93). 또한, 보다 얕은 초파리보다 일령이 오래된 초파리의 겹눈은 보다 거친 표면과 더욱 더 심각한 홀눈 융합을 가지고 있었으며, 이는 특히 30일령 초파리에서 현저하였다(그림 94C4-E4에 별표로 표시). 아카세틴 100, 300 및 500 μ M 농도에서, 아카세틴은 대조구에 비하여 초파리 눈의 중앙 부위에 홀눈 융합을 현저하게 억제하였다(그림 94B3-E3, B4-E4에 별표로 표시). 특히, 300 및 500 μ M 아카세틴은 초파리 눈의 가장자리에서 홀눈 융합을 현저하게 개선하였다. 아카세틴이 눈의 형태적 변화를 완전하게 억제하지는 못할지라도, 일령 의존적인 퇴화 과정을 지연시켰다.

아카세틴의 *GMR < APP/BACE-1* 초파리 수컷(30일령)의 겹눈의 보호효과를 주사전자 현미경을 이용하여 조사하였다. 대조 초파리 *GMR-GAL4/+*의 홀눈 크기(그림 94F1)와 강모(그림 94G1)의 결함이 없는 부드러운 외형을 보였다. 반면, 형질전환 *GMR < APP/BACE-1* 초파리는 불규칙적 겹눈 형태를 보였다. 처리하지 않은 초파리 홀눈의 봉괴(그림 94F2에 화살로 표시), 홀눈 융합(그림 94G2에 화살촉으로 표시), 홀눈의 크기 감소(그림 94G2에 별표로 표시)와 홀눈의 강모 부재(그림 94G2)를 보여 주었다. 이들 눈의 결함은 부분적으로 아카세틴 3 농도(100, 300 및 500 μ M)를 섭식시킨 초파리 수컷에서 억제되었다(그림 94F3-5, G3-5). 특히, 300 μ M 아카세틴을 섭식시킨 초파리에서는 홀눈 봉괴를 보이지 않았으나(그림 94F4), 100 또는 500 μ M 아카세틴을 섭식시킨 초파리의 눈에서 여전히 일부 봉괴가 관찰되었다(그림 94F3,F5에 화살로 표시). 홀눈의 외부 표면 융합은 아카세틴을 섭식 시킨 초파리에서는 관찰되지 않았으나, 농도에 관계없이 홀눈의 크기는 감소하였다(그림 94G3-5에 별표로 표시).

(4) 아카세틴의 일령 의존적 눈신경 퇴행 보호 효과

아카세틴의 인간 *APP* 및 *BACE-1*의 공발현에 의해 유도된 일령 의존적인 신경 퇴행의 보호 효과를 조사하였다. 형질전환 *GMR<APP/BACE-1* 초파리에 있어서 광수용체 퇴행은 일령에 달려 있으나, 대조 *GMR-Gal4/+* 초파리에서는 그렇지 않았다(그림 95). 우화 5일과 15일된 *GMR-Gal4/+* 초파리 수컷 복안을 절단한 결과, Carson's trichome 염색으로 5일과 15일된 대조 초파리 눈은 잘 조직된 광수용체를 가지고 있었다(그림 95A1,A2). 대조적으로, 광수용체 퇴행은 어린 형질전환 초파리(그림 95B1-E1)와 15일령 초파리에서 관찰되었다(그림 95B2-E2). 0.1% DMSO를 먹인 형질저환 초파리에서, 우화 후 5일된 초파리에서 조차 현저한 망막 붕괴 현상이 관찰되었으며(그림 95B1), 광수용체의 외표면 붕괴가 15일령 초파리에서 관찰되었다(그림 3.25B2에 화살촉으로 표시). 100, 300 및 500 μM 아카세틴은 5일령 초파리(그림 95C1-E1)와 15일령 초파리(그림 95C2-E2)의 광수용체 퇴행을 부분적으로 억제하였다. 특히, 아카세틴은 현저하게 광수용체 붕괴를 억제하였다(그림 95C2-E2). 아카세틴이 광수용체 퇴행을 완전하게 억제하지는 못할지라도, 이러한 일령 의존적인 과정을 늦추었다.

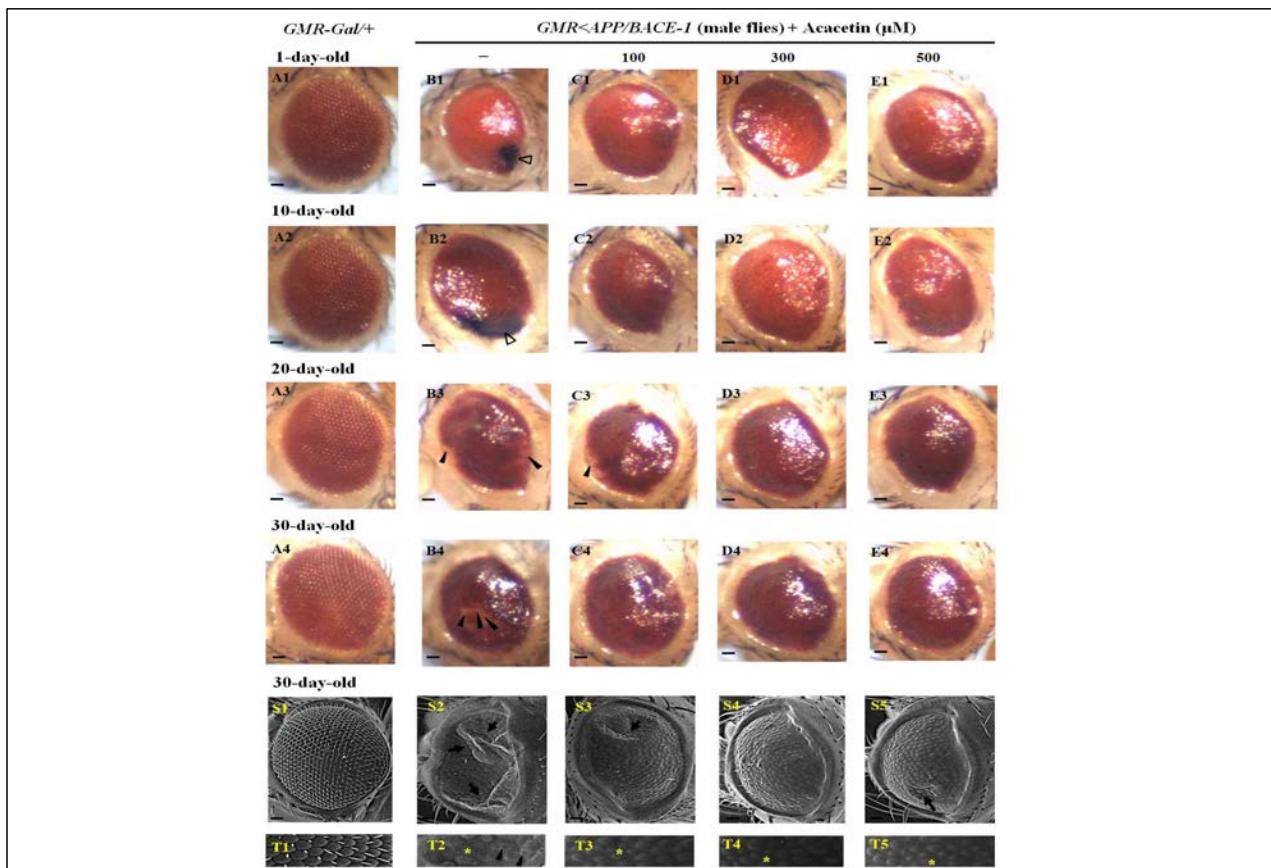


그림 94. Effect of acacetin on the aberrant eye phenotype associated with age-dependent eye development. Human APP and BACE-1 transgenic flies (*GMR<APP/BACE-1*) were cultured from the egg stage in polystyrene vials containing standard media supplemented with acacetin (100, 300, and 500 μ M) in 0.1% DMSO. Light micrographs. (A) The control male *GMR-GAL4/+* flies (1, 10, 20, and 30 days old) had a normal and well-organized eye morphology. There were no obvious morphological changes as time elapsed. (B) The vehicle-fed male *GMR<APP/BACE-1* flies exhibited dark deposits at the edge of the compound eye, even at the youngest age evaluated (marked with an arrow in Fig. 3B1); the size of the deposits had increased at 10 days (marked with an arrow in Fig. 3B2). As time passed, the flies with dark spots in their eyes tended to die earlier than the control flies, and more ommatidial fusions were observed in 20-day-old fly eyes with deposits (marked with asterisks in Fig. 3B3), with further exacerbation of these fusions in 30-day-old fly eyes (marked with asterisks in Fig. 3B4). (C-E) Acacetin partially suppressed the morphological defects in the eyes. Scanning electron micrographs. (F1,G1) Thirty-day-old male *GMR-GAL4/+* flies with smooth surface compound eyes, without any defects in the ommatidia size, ommatidial bristles, or fused ommatidia. (F2,G2) Vehicle-fed male *GMR<APP/BACE-1* flies (30 days old) with abnormal phenotypes, characterized by the collapse (marked with arrows) and fusion of ommatidia (marked with arrowheads), and the absence of ommatidial bristles (marked with an asterisk). (F3 - 5,G3 - 5) Acacetin partially suppressed these eye defects. The scale bars represent 20 μ m.

아밀로이드 축적이 일령 의존적인지 또는 아카세틴이 이들 축적물에 미치는 영향 때문인지를 조사하기 위하여 Congo red 염색을 수행하였다. 콩고레드 염색에 의해 5일령과 15일령 된 형질전환 *GMR-GAL4/+* 초파리 수컷의 겹눈에서 아밀로이드 플라크는 감지되지 않았다 (그림 95A3,A4). 그러나, 0.1% DMSO를 섭식시킨 우화 5일된 초파리 눈에 아밀로이드 플라크 축적이 관찰되었으며(그림 95B3에 화살표로 표시), 15일령 초파리에서 된 *GMR < APP/BACE-1* 초파리 눈의 가장자리에 더 축적된 아밀로이드 플라크가 관찰되었다(그림 95B4에 화살표로 표시). 흥미롭게도, 콩고레드 염색을 통해, 100과 300 μM 아카세틴을 섭식 시킨 5일령 초파리(그림 95C3,D3) 및 형질전환 된 15일령 초파리(그림 95C4,D4)에서의 아밀로이드 축적물 수를 현저하게 감소시켰다. 그러나, 아카세틴 500 μM 을 섭식시킨 5일령 초파리(그림 95E3에 화살표로 표시) 및 형질전환 15일령 초파리(그림 95E4에 화살표로 표시)에서 약간의 아밀로이드 플라크가 검출되었다. 아카세틴은 초파리 광수용체에서의 아밀로이드 축적을 완전하게는 억제하지 못하였으나, 아밀로이드 축적물 숫자를 감소시켰다.

(5) 아카세틴의 초파리 우화에 미치는 영향

아카세틴이 형질전환 초파리의 발육에 영향을 미치는지의 여부를 알아보기 위하여, 용화율 및 우화율을 조사하였다. 대조 *GAL4-elav/+* 초파리에 비해, 신경계에 있어서 인간 *APP* 및 *BACE-1*의 공발현은 용화에 영향을 미치지 않았다. 아카세틴을 섭식시킨 초파리는 처리 농도(100, 300 및 500 μM)에 관계없이 거의 용화하였으며, 용화율은 0.1% DMSO를 먹인 형질 전환 초파리의 용화율과 현저한 차이를 보이지 않았다(그림 96A). 이는 인간 *APP* 및 *BACE-1* 유전자 발현을 드라이브하는데 이용된, 상대적으로 약한 프로모터인 *elav*에 기인 할 수 있다. 그러나, 담체를 섭식시킨 *elav < APP/BACE-1* 초파리의 우화율(76%)은 *elav-GAL4/+* 초파리의 우화율(99%)과 현저한 차이를 보였다(그림 96B). 이 결과는 인간 *APP* 및 *BACE-1*의 공발현은 초파리 발육 동안, 특히 우화 단계에서, 어느 정도 독성이 있다는 것을 나타내고 있다. 대조구의 우화율(76%)과 비교하여, 100, 300 및 500 μM 아카세틴은 우화율(82~86%)에 유의한 차이를 보이지 않았으나 약간 증가하였다.

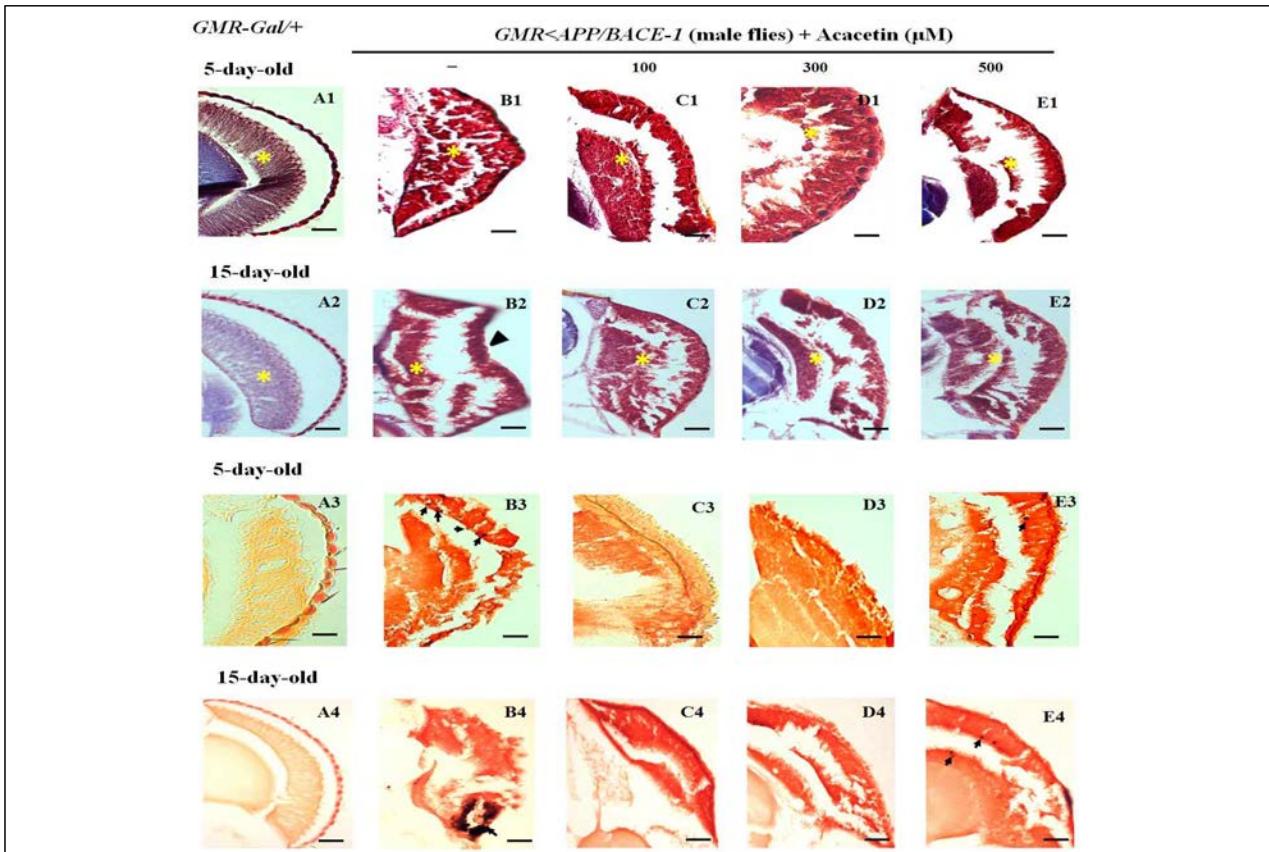


그림 95. Protective effect of acacetin on age-dependent eye degeneration induced by co-expression of human BACE-1 and APP. Human APP and BACE-1 transgenic flies (*elav<APP/BACE-1*) were cultured from the egg stage in polystyrene vials containing standard media supplemented with acacetin (100, 300, and 500 μ M) in 0.1% DMSO. Carson's trichrome staining. (A1,A2) Staining of the photoreceptors of control male *GMR-Gal4/+* flies (5 and 15days old). (B1,B2) Staining of the photoreceptors of vehicle-fed transgenic male *GMR<APP/BACE-1* flies (5 and 15days old). Remarkable retinal collapse (marked with an asterisk in B1) was observed even in young flies (5 days old), and more severe external surface collapse of the photoreceptors was detected in 15-day-old flies (marked with an arrowhead in B2) compared to 5-day-old flies. (C1-E1) The photoreceptor degeneration was partially suppressed in 5-day-old acacetin-fed transgenic flies. (C2-E2) The external surface collapse of the photoreceptors was significantly suppressed in 15-day old acacetin-fed flies. Congo red staining. (A3,A4) Amyloid plaques were not observed in the control male *GMR-Gal4/+* flies (5 and 15 days old). (B3,B4) Scattered amyloid plaque deposits were apparent in the 5-day-old vehicle-treated transgenic flies (marked with arrows in B3). Many amyloid plaque deposits (marked with an arrowhead in B4) had accumulated in the 15-day-old flies. (C3-E3) Acacetin reduced the number of scattered amyloid plaque deposits in the photoreceptors of 5-day-old transgenic flies. (C4-E4) Acacetin reduced the number of amyloid plaque deposits in the 15-day-old transgenic flies. The images were observed and captured using a stereo-microscope. The scale bars represent 20 μ m.

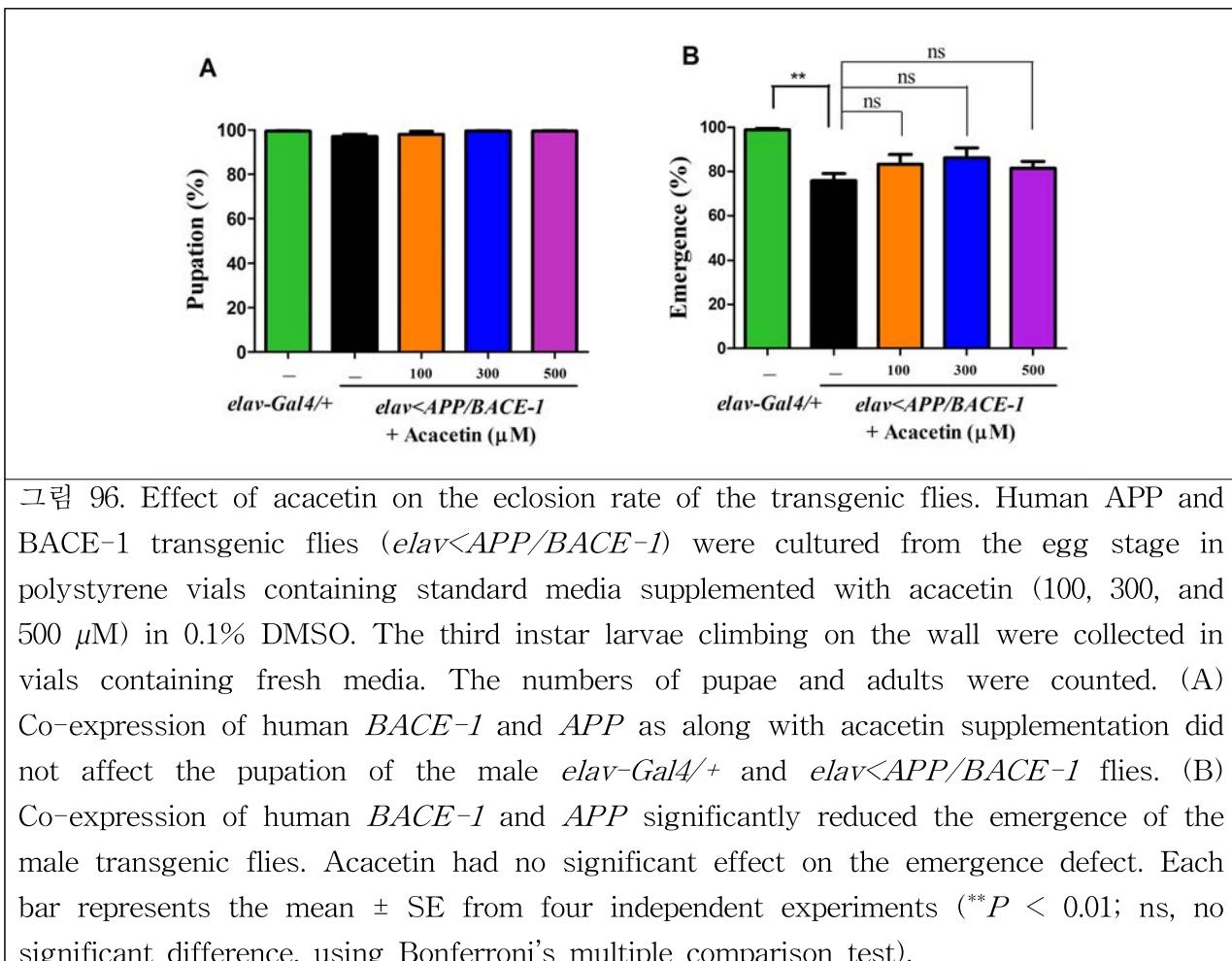


그림 96. Effect of acacetin on the eclosion rate of the transgenic flies. Human APP and BACE-1 transgenic flies (*elav<APP/BACE-1*) were cultured from the egg stage in polystyrene vials containing standard media supplemented with acacetin (100, 300, and 500 μM) in 0.1% DMSO. The third instar larvae climbing on the wall were collected in vials containing fresh media. The numbers of pupae and adults were counted. (A) Co-expression of human *BACE-1* and *APP* as along with acacetin supplementation did not affect the pupation of the male *elav-Gal4/+* and *elav<APP/BACE-1* flies. (B) Co-expression of human *BACE-1* and *APP* significantly reduced the emergence of the male transgenic flies. Acacetin had no significant effect on the emergence defect. Each bar represents the mean \pm SE from four independent experiments (** $P < 0.01$; ns, no significant difference, using Bonferroni's multiple comparison test).

(6) 아카세틴의 비행 행동에 미치는 영향

나이에 따른 운동 조정 능력의 퇴화는 AD 등의 신경 퇴행성 질환의 특징이다(Ali 등, 2011). Crowther 등 (2005)과 Wang 등 (2014)이 보고한 바와 같이, 중력에 저항하여 올라갈 수 있는 특징을 이용하여 AD 초파리 모델에서의 운동은 주지성 검정을 행함으로써 정량화 할 수 있다. 예비실험에서 암컷보다 수컷 초파리의 비행 행동 결함이 더 심각함을 보였기 때문에, 본 연구에서는 수컷 초파리를 실험에 사용하였다. 표준 배지에서 사육한 대조구 초파리(*elav-GAL4/+*)의 행동지수가 일령이 진행됨에 따라 명확한 감소를 보였는데, 우화 후 2일, 6일, 10일 및 15일된 암컷 초파리의 비행지수는 각각 80, 66, 53 및 35%를 나타내었다(그림 97A-D). 이와는 대조적으로, *elav < APP/BACE-1*의 비행능력에 심각한 결함을 나타내었는데, 우화 후 2일, 6일, 10일 및 15일된 암컷 초파리의 비행지수는 각각 47, 39, 36 및 11% 이었다(그림 97A-D). 아카세틴 농도(100, 300 및 500 μM) 와 관계없이, 아카세틴은 우화 1일 초파리의 운동 이상을 약 68% 개선하였다(그림 3.27A). 아카세틴을 섭식시킨 5일과 10일된 초파리의 비행지수는 각각 60~66%(그림 97B)과 53~54%(그림 97C) 이었다. 15일된 초파리에서 아카세틴(100, 300 및 500 μM)은 비행능력 결함을 개선하였다(비행지수, 27~30%) (그림 97D).

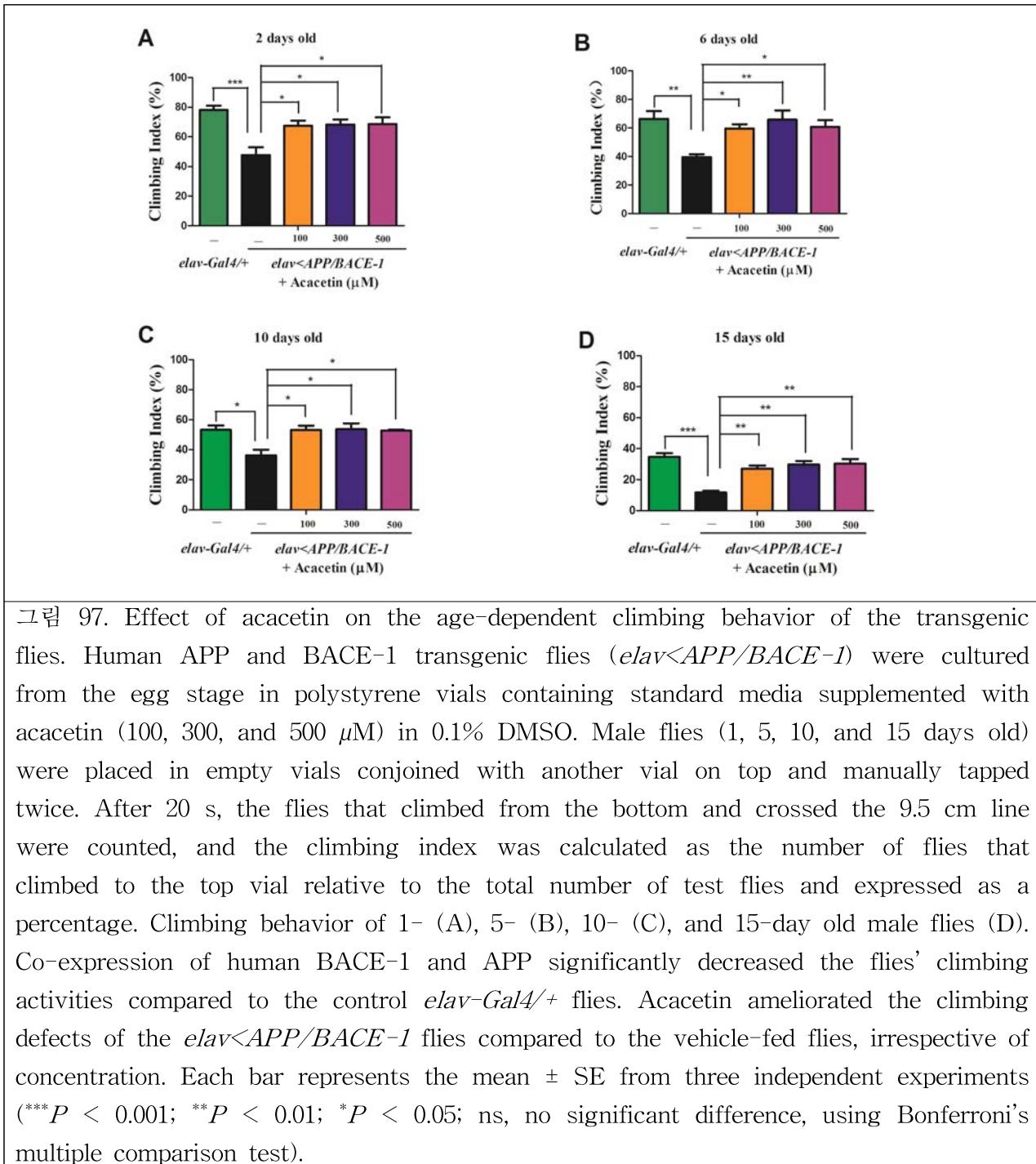


그림 97. Effect of acacetin on the age-dependent climbing behavior of the transgenic flies. Human APP and BACE-1 transgenic flies (*elav<APP/BACE-1*) were cultured from the egg stage in polystyrene vials containing standard media supplemented with acacetin (100, 300, and 500 μ M) in 0.1% DMSO. Male flies (1, 5, 10, and 15 days old) were placed in empty vials conjoined with another vial on top and manually tapped twice. After 20 s, the flies that climbed from the bottom and crossed the 9.5 cm line were counted, and the climbing index was calculated as the number of flies that climbed to the top vial relative to the total number of test flies and expressed as a percentage. Climbing behavior of 1- (A), 5- (B), 10- (C), and 15-day old male flies (D). Co-expression of human BACE-1 and APP significantly decreased the flies' climbing activities compared to the control *elav-Gal4/+* flies. Acacetin ameliorated the climbing defects of the *elav<APP/BACE-1* flies compared to the vehicle-fed flies, irrespective of concentration. Each bar represents the mean \pm SE from three independent experiments ($^{***}P < 0.001$; $^{**}P < 0.01$; $^*P < 0.05$; ns, no significant difference, using Bonferroni's multiple comparison test).

(7) 아카세틴의 수명 및 섭식에 미치는 영향

섭식 행위는, 파리와 다른 동물들의 수명을 결정하는 중요한 요인 중 하나이기 때문에 (Carvalho 등, 2005; Deshpande 등, 2014), 아카세틴이 형질전환 *elav < APP/BACE-1* 초파리 수컷의 음식 섭취의 양에 미치는 영향을 조사하였다. 아카세틴 농도 (100, 300 및 500 μ M)에 관계없이, 아카세틴은 형질전환 초파리의 섭식에 영향을 미치지 않았다(그림 98A). 이 결과는 초파리의 행동에 있어서의 어떤 변화가 아카세틴이 초파리의 식욕에 의한 효과라 기보다 먹이 섭취에 의한 화합물의 소화에 의한 것임을 나타내고 있다.

$T_{1/2}$ 이 평균생존시간보다 더 신뢰할 수 있는 수명 측정치라고 알려져 있다(Chakraborty 등, 2011). *BACE-1* 및 *APP* 공발현은 초파리 성충의 수명을 감소시키는 것으로 보고되어

있기 때문에(Chakraborty 등, 2011), 아카세틴이 초파리 모델의 수명 및 $T_{1/2}$ 에 미치는 영향을 조사하였다. 100, 300 및 500 μM 아카세틴은 대조 *elav-Gal4/+* 와 *elav<APP/BACE-1* 초파리의 수명에 영향을 미치지 않았으나(그림 98B), 인간 *APP* 및 *BACE-1* 공발현은, *elav-Gal4/+* 초파리에 비해($T_{1/2}$, 36일), 담체를 먹인 초파리의 $T_{1/2}$ 를 현저하게 감소시켰다($T_{1/2}$, 26일) (그림 98C). 형질전환 초파리에 100 μM 아카세틴을 섭식시키면, $T_{1/2}$ (31일)은 증가하였으나, 300 또는 500 μM 아카세틴 처리는 $T_{1/2}$ 을 연장시키지 못하였다. 이들 결과는 아카세틴 100 μM 이 *elav < APP/BACE-1* 초파리의 $T_{1/2}$ 에 영향을 미친다는 것을 의미하나, 이는 어린 성충에 국한된다. 총체적으로, 이들 결과들은 *BACE-1*이 *elav < APP/BACE-1* 초파리의 생존에 있어서 주요 요인이 아닐 수 있다는 것을 의미하고 있다.

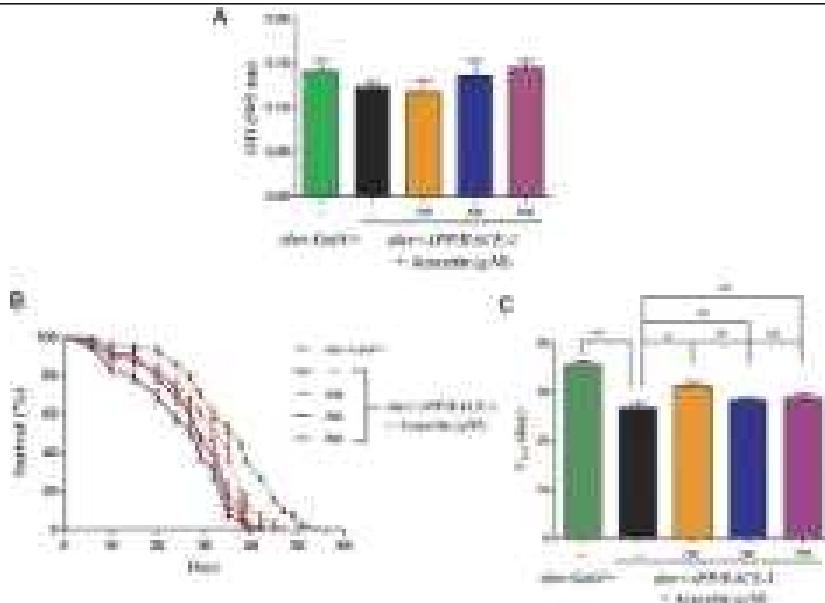
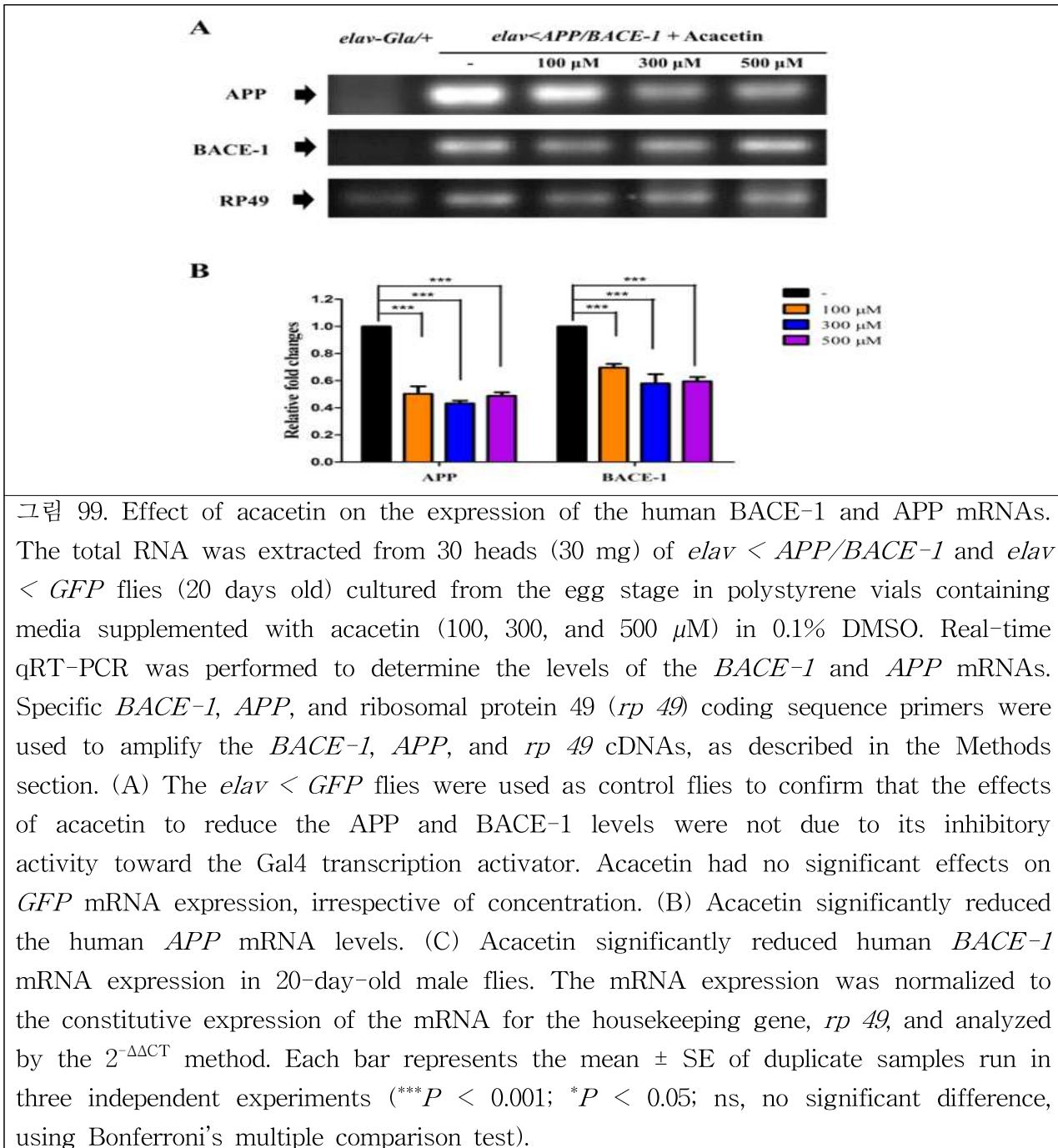


그림 98. Effect of acacetin on the feeding and longevity of the transgenic flies. Human APP and BACE-1 transgenic flies (*elav<APP/BACE-1*) were cultured from the egg stage in polystyrene vials containing standard media supplemented with acacetin (100, 300, and 500 μ M) in 0.1% DMSO to determine the lifespan and median life time ($T_{1/2}$). (A) To determine feeding behavior, newly emerged transgenic male flies were cultured on standard media for 3 days, and then starved for 20 h. The flies were transferred into vials containing media (with 0.2% Acid red) supplemented with acacetin. The control flies were fed with media containing 0.2% Acid red and vehicle. The abdomens of flies fed with Acid red were cut and homogenized in distilled water, and the optical density (OD) of the supernatant was measured at 505 nm as the index of amount of food consumed by the flies. Acacetin did not affect the feeding behavior of the flies. (B) Acacetin did not significantly prolong the transgenic flies' lifespan compared to the vehicle-fed male transgenic and *elav-Gal4/+* flies. (C) Co-expression of human *BACE-1* and *APP* reduced the $T_{1/2}$ of the male flies compared to that of the control male *elav-Gal4/+* flies. Supplementing the diet with 100 μ M acacetin only significantly extended the $T_{1/2}$ of the male *elav<APP/BACE-1* flies. Each bar represents the mean \pm SE from 10 independent experiments for longevity and from three independent experiments for feeding (**P < 0.001; **P < 0.01; ns, no significant difference, using Bonferroni's multiple comparison test).

(8) 아카세틴의 인간 *APP* 및 *BACE-1* mRNA 레벨에 미치는 영향

AD 치료를 위한 타겟으로서 APP 단백질분해 및 A β 생성에 연구가 집중되고 있으며 (Haass, 2004), APP 저해제 역시 A β 펩티드 레벨을 저하시키는데 이용되고 있다(Utsuki 등, 2006). 아카세틴이 인간 *BACE-1* 및 *APP* 유전자 전사에 영향을 미치는지를 조사하기 위하여, *elav<APP/BACE-1* 초파리 수컷(20일령)에서 real-time qRT-PCR을 이용하여

APP 및 *BACE-1* mRNA 레벨을 분석하였다. 어떤 화합물은 간접적으로 *elav* 프로모터를 저해함으로서, 인간 *APP* 및 *BACE-1* mRNA 레벨을 감소시킬 수 있다. 이를 위해, *elav* 프로모터에 의한 *UAS-GFP* 서열을 가지는 초파리를 이용하였고, 이들 초파리를 아카세틴으로 처리하였으며, *GFP* mRNA 레벨 역시 정량하였다. 담체를 섭식시킨 초파리와 아카세틴을 섭식시킨 초파리 간에 *GFP* mRNA 레벨에 현저한 차이를 보이지 않았다(그림 99A). 그러나, 담체를 섭식시킨 초파리에 비해, 아카세틴(100, 300 및 500 μM)을 섭식시킨 *elav*<*APP/BACE-1* 초파리 수컷에서 *APP* mRNA 레벨 (69~82%)의 현저한 감소가 관찰되었다(그림 99B). 마찬가지로, 아카세틴 처리 후 인간 *BACE-1* mRNA 함량은 대조구의 82~89% 감소하였다(그림 99C). 종합하면, 이들 결과들은 아카세틴이 *GFP* mRNA 레벨에는 영향을 미치지 않았으나, 간접적으로 *elav* 프로모터를 저해한다기보다 인간 *APP* 및 *BACE-1* mRNA 레벨을 감소시킨다는 것을 의미하고 있다.



(9) 아카세틴의 인간 APP 단백질 분해 및 BACE-1의 발현 저해에 의한 A β 수준 감소

Western blot 분석을 통해, 아카세틴의 농도에 따라 반응이 달리 나타날지라도, 이 화합물이 A β 발현을 억제한다는 것이 확인되었는데, A β (약 4 kDa)는 대조 *elav-Gal4/+* 초파리에서 탐지되지 않았다(그림 100A). 100, 300 및 500 μ M 아카세틴 처리에서 각각 71, 72 및 47% A β 레벨을 감소시켰다(그림 100B). 아카세틴의 항아밀로이드 효과가 APP 단백질분해

과정 또는 BACE-1 발현의 조절을 통해 중재되는지를 결정하기 위해 BACE-1과 APP의 단백질 레벨을 분석하였다. 아카세틴 100, 300 및 500 μM 처리에서 BACE-1의 발현이 감소하였는데(그림 100C), 단백질 수준은 각각 대조구 레벨의 81, 75 및 74%로 현저하게 감소하였다(그림 100D). BACE-1(약 70 kDa)에 상응하는 밴드가 형질전환 초파리에서 볼 수 있었으나, 대조 *elav-Gal4/+* 초파리에서는 탐지되지 않았다. 본 실험에 있어서, APP 단량체 밴드(약 100 kDa) 및 이량체 밴드(약 200 kDa)는 western blot으로 확인하였으며(Jung 등, 2014), Groth 등 (2010)이 보고한 바와 같이 대조 *elav-Gal4/+* 초파리에서도 관찰되었다(그림 100E). APP 레벨은 300 및 500 μM 아카세틴 처리에서 각각 대조구 레벨의 70와 69%로 감소하였으나, 100 μM 아카세틴은 APP 레벨을 86% 감소시켰으며, 대조구 APP 레벨과 현저한 차이를 보이지 않았다(그림 100F). APP-CTF 레벨은 APP 처리의 유전적 조작이 어떻게 A β 생성 및 축적에 영향을 미치는 가를 이해하는데 유용하기 때문에, 아카세틴의 APP-alpha C-terminal fragment (α CTF) (14 kDa, 그림 100G에서 푸른 화살표로 표시)와 APP- β CTF (14.5 kDa, 그림 3.30G에서 붉은 화살표로 표시)의 형성에 미치는 영향을 조사하였다. 아카세틴은 APP 개열(대조구 레벨의 약 80%)에 영향을 미침으로서 APP-CTF의 생성을 저해하였다(그림 100H). AICD 단편은 다양한 신호전달 과정에 관여하고 있으며, AD 병리학과 관계가 있고, 그리고 AICD 레벨은 Branca 등 (2014)이 보고한 바와 같이 인간 AD 뇌에서 증가한다. 따라서, 아카세틴이 AICD 레벨에 미치는 영향을 조사하였다. 대조 *elav-Gal4/+* 초파리 및 형질전환 *elav < APP/BACE-1* 초파리 모두 단일 밴드가 탐지되었으며, 아카세틴은 형질전환 초파리에서의 AICD 레벨(약 7 kDa)을 감소시켰다(그림 100G). Western blot을 통해 AICD 레벨은 100, 300 및 500 μM 아카세틴 처리 후, 각각 대조구 레벨의 68, 27 및 37%로 감소하였다(그림 100I).

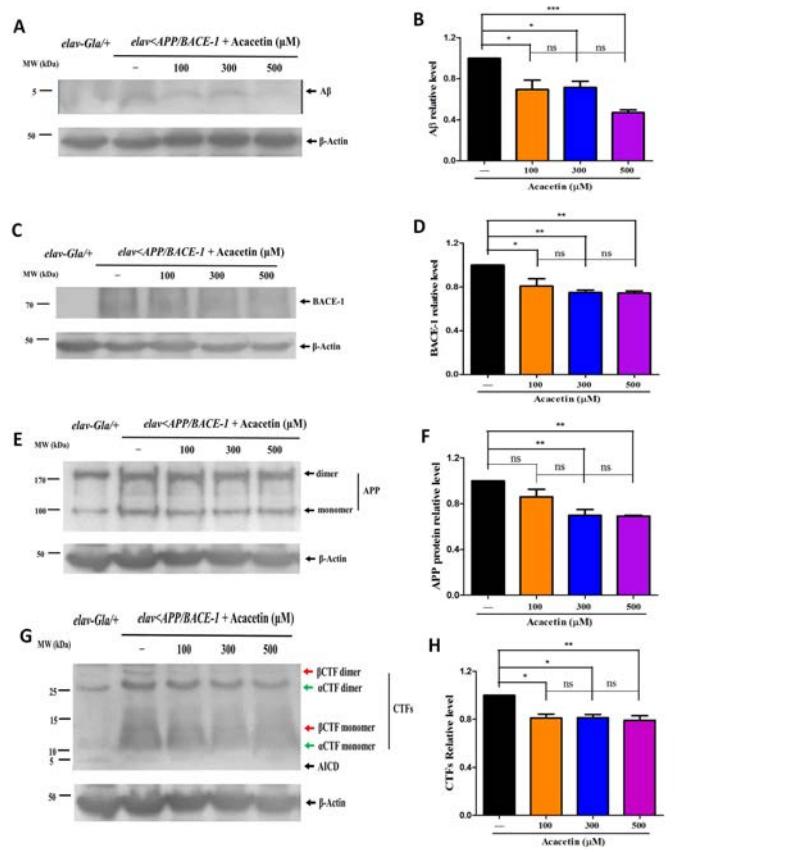


Fig. 100. Effect of acacetin on A β , BACE-1, and APP processing in the transgenic flies. Human APP and BACE-1 transgenic flies (*elav < APP/BACE-1*) were cultured from the egg stage in polystyrene vials containing media supplemented with acacetin (100, 300, and 500 μ M) in 0.1% DMSO. Western blot analyses were performed to determine the levels of the A β , BACE-1, APP, APP-CTFs, and AICD proteins, as described in the Methods section. (A) A β was immunoblotted with an Ad β , 17-24 (4G8) monoclonal antibody, and each lane contained 70 μ g of protein. (B) The relative amounts of total A β were detected by western blotting. (C) BACE-1 was probed with an anti-BACE-1 antibody, and each lane contained 30 μ g of protein. (D) Protein levels of human BACE-1 in the transgenic flies. (E) Human APP was detected by western blotting with an anti-APP C-terminal antibody. Each lane contained 30 μ g of protein. (F) Quantification of the human APP protein levels in the transgenic flies. (G) The APP proteolytic processing products β CTF, α CTF, and AICD were detected by western blotting with an anti-APP C-terminal antibody; each lane contained 30 μ g of protein. (H) The levels of the CTFs resulting from APP processing in the transgenic flies. (I) The levels of the AICD fragment resulting from APP processing in the transgenic flies. β -Actin was used as a loading control. The differences in protein expression were quantified using a Molecular Imager Gel Doc XR system and normalized to the actin expression on the same membrane. Each bar represents the mean \pm SE of duplicate samples of three independent experiments ($^{***}P < 0.001$; $^{**}P < 0.01$; $^*P < 0.05$; ns, no significant difference, using Bonferroni's multiple comparison test).

라. 고찰

아밀로이드 캐스케이드 가설은 뇌의 아밀로이드 플라크의 축적이 AD의 원인으로 생각하여 AD를 치료하는 약물의 개발이 촉진되었다(Hardy와 Selkoe, 2002; Karan 등, 2011). 아밀로이드 플라크를 생성하는 APP 분해 관련 단백질 분해 효소는, α -secretase, β -secretase 및 γ -secretase 세 가지가 있다(De Strooper 등, 2010). 그 중에서 β -secretase는 AD 치료의 주요 타겟이다. 식물성 화학물은 선택적인 활성을 보이며, 비독성 물질로 생분해 될 수 있기 때문에(Fabry 등, 1996), AD 치료를 위해 주목받고 있다. 이러한 항AD 제품은 종래의 의약품과 마찬가지로 인체에 적용할 수 있다. 식물은 다양한 화합물 즉, 알칼로이드, 페놀 및 테르페노이드 등이 함유되어 있고, 이들 화합물을 단독으로 또는 다양한 물질들이 포함되어 섞인 형태로 BACE1 억제에 기여하고 있다(Ghosh 등, 2008; Mancini 등, 2011). 인간의 BACE-1을 억제하는 식물성 화학물은, 알칼로이드[예를 들어, epiberberi과 groenlandica, 각각, IC₅₀, 8.55와 19.68 μ M (Jung 등, 2009a)], 테르페노이드[16 α -hydroxy-17-isovaleroyloxy-ent-kauran-19-oic acid과 10종의 다른 디테르펜 화합물, IC₅₀, 18.58~92.20 μ M (Jung 등, 2009b); bakuchiol, IC₅₀, 21.38 μ M (Choi 등, 2008)], 플라보노이드[epigallocatechin gallate와 다른 2종 카테킨, IC₅₀ 1.6~4.5 μ M (Jeon, 2003); neocorylin 및 기타 5종 플라보노이드, IC₅₀, 0.7~10.2 μ M (Choi 등, 2008); kurarinidin과 기타 2종 칼콘, IC₅₀, 6.03~7.19 (Jung 등, 2010); leachianone G와 기타 6종 플라보논 화합물, IC₅₀, 8.56~60.88 μ M (Jung 등, 2010)], benzopyranoids [aloeresin D과 C-2'-decoumaroyl-aloresin G, 각각, IC₅₀, 39.0와 20.5 μ M (Lv 등, 2008); imperatorin과 4종 유도체, IC₅₀, 91.8~359.2 μ M (Marumoto와 Miyazawa, 2010)], 페닐프로파노이드[D-coumaric acid, IC₅₀, 90 μ M (Youn과 Jun, 2012)], 스틸 베노이드 [resveratrol과 8종 유도체, IC₅₀, 0.34~19.80 μ M (Choi 등, 2011)], diarylalkyls [bisdemethoxycurcumin과 2종 유도체, IC₅₀, 17~340 μ M (Wang 등, 2014)] 그리고 탄닌 [geraniin과 corilagin, 각각, IC₅₀, 4와 34 μ M (Youn과 Jun, 2013)] 등을 포함한다.

본 연구는 FRET을 기반으로 한 효소분석법을 사용하여 과향 전초 추출물에서 BACE-1 저해성분을 확인하였다. 활성성분은 *o*-methylated flavone 화합물인 아카세틴과 oleanane triterpenoid 화합물인 마스린산과 올레아놀산으로 동정되었다. 올레아놀산의 화학 구조는 탄소 2 위치에 hydroxyl 그룹이 결여되어 있다는 점에서 마스린산의 구조와 차이가 있다. 이들 성분의 IC₅₀ 값은 88.5~487.6 μ M 이었으며, 위에서 언급한 천연 화합물들의 IC₅₀ 값은 0.34~359.2 μ M 이었다. 아카세틴은 인간 BACE-1 저해제 IV보다 BACE-1 저해효과가 약하지만, 마스린산 또는 올레아놀산 보다 더 강한 BACE-1 저해활성을 보였다. 그러나, 펩티드 유래 BACE-1 저해제 IV 및 기타 BACE-1 저해제들은 뇌혈관 침투력이 낮아서 경구 투여 시 흡수가 잘 되지 않아 결과적으로 생체 내에서 거의 약리활성을 나타내지 못한다(Vassar, 2014). 낮은 분자량과 좋은 세포막 투과성을 가진 저분자 BACE-1 저해제는 신약개발에 있어 대단히 중요하다. 플라보노이드가 경구 투여시의 흡수, 뇌혈관장벽 통과 그리고 중추신경계에서 효과가 있다는 것이 알려져 있다(Jäger와 Saaby, 2011, Faria 등, 2014). 아카세틴은 항산화(Cholbi 등, 1991), 항염증(Pan 등, 2006), 항암(Shen 등, 2010) 및 중추 신경계의 신경계 보호 효과를 구비하고 있는 것으로 보고되었으며, 또한 혼분 독성과 관련한 신경 질환 치료를 위한 가능성을 가지고 있다(Lin 등, 2014).

AD의 근본적인 발병을 시뮬레이션하기 위해, 아밀로이드의 독성과 Tau 초파리 모델이 개발되었다(Prüßing 등, 2013). 식물성 화합물들이 초파리 AD 모델에서 치료 효과가 있는지 여

부를 여러 연구자들은 평가한 바 있는데, Caesar 등 (2012)은 5종 형질전환 초파리 AD 모델에서 A β 독성을 완화하는 약물 후보로서 커큐민(curcumin)의 기작을 연구한 바 있다. 커큐민 처리는 형질전환 초파리에서 수명 개선 활성(최대 75%) 및 클라이밍(climbing) 활성을 확인하였으나, A β 축적은 감소되지 않았다. 또한, APP와 BACE-1 공동 발현 AD 모델은 커큐민 또는 bisdemethoxycurcumin 하나에 장기간 노출 후에 겹눈 결합(예를 들어, 겹눈의 가장 자리의 낱눈 위축, 낱눈 모의 부재, 낱눈 융합)을 완화 할 수 있으며, 또한 *elav < BACE-1* 과 *elav < APP/BACE-1*에서 클라이밍 행동의 개선에 큰 효과가 있다고 보고되었다(Wang 등, 2014).

본 연구에서, 인간 APP 및 BACE-1 유전자는 *elav* 및 *gmr* 프로모터의 제어 하에 공동 발현되었다. *GMR < APP/BACE-1* 초파리의 겹눈에서 검은 반점이 관찰되었다. Chakraborty 등 (2011)은 *elav < APP/BACE-1* 초파리 복부와 주둥이에 멜라닌 종양을 나타내었으며, γ -secretase 저해제 L-685,458 처리 후에 초파리 몸에 종양 수는 상당히 감소하였다. 그들은 종양이 A β 로 이루어졌거나 또는 A β 에 의해 유도되었다고 하였다. β -아밀로이드의 축적은 *GMR < APP/BACE-1* 초파리의 망막 외부에서 일어난다 (Greeve 등, 2004). 이 연구 결과에 따르면, 인간 APP와 BACE-1 유전자 발현으로 인하여, 초파리 겹눈의 검은 반점들은 A β 로 구성되었다고 하였다(Greeve 등, 2004). 여기서, A β 는 Toll 경로를 활성화하여 면역 반응을 유도할 수 있으며(Lemaitre, 등, 1995; McGeer와 McGeer, 1998), 이 면역 반응은 초파리 겹눈 표면에 검은 반점의 형성을 초래한다. 본 연구에서, 아카세틴이 APP와 BACE-1 공발현 AD 모델 *GMR < APP/BACE-1* 초파리 겹눈의 형태학적 결함(검은 침착, 광 수용체의 봉괴와 융합 및 홀눈의 강모의 부재)을 개선할 수 있다는 것을 밝혔다. 또한, 아카세틴은 *elav < APP/BACE-1* 초파리 섭식에는 아무런 영향을 미치지 않았으며, 초파리의 등반행동을 개선하고 T_{1/2}를 연장시켰다. 이러한 연구 결과와 아카세틴의 BACE-1 저해 작용은 과향 전초 유래 물질이 새롭고 효과적인 천연 항AD제로 개발 가능성을 가졌음을 나타낸다.

천연 항AD 화합물의 작용 메카니즘에 대한 조사는 신규 작용점을 가지고 있는 선택적 항AD 치료 대체제의 개발을 위한 유용한 정보를 제공할 수 있다. 작용점 및 식물 이차대사산물의 항치매 작용 메카니즘은 Howes와 Perry (2011)에 의해 상세히 기술되어 있다. 아밀로이드 경로에서, APP는 BACE-1에 의해 분해되어 APP와 APP- β CTF의 큰 가용성 ectodomain을 방출하며, 이어 γ -secretase에 의해 분해되어 독성 A β 를 생성한다(Cole과 Vassar, 2007; Tian 등, 2010). AD 뇌에서 BACE-1의 단백질 농도 및 효소 활성을 증가되기 때문에 비정상적인 BACE-1 조절은 AD 병리에 기여할 수 있다. Utsuki 등 (2006)은 효소면 역분석법을 사용하여, 강력한 아세틸콜린에스테라제 저해활성을 보유하지 않고, APP 단백질 합성 및 이후의 A β 생성을 저해하는 저분자 화합물을 동정하기 위해, 144종 physostigmine 유도체인 phenserine 유도체를 스크리닝 하여, 세포 독성을 유발하지 않고 용량 의존적 APP 및 A β 생산을 감소시킬 수 있는 phenserine의 (-)-거울상이성질체인 posiphen을 포함하여 8 종 유도체를 보고하였는데, 이를 유도체는 APP 합성을 억제하기 때문에 아밀로이드 플라크 수를 감소시켰다. 천연 플라보노이드인 미리세틴(myricetin)과 케르세틴(quercetin) 역시 BACE-1 활성의 강력한 저해제로서, 대뇌 피질 신경 세포에서 A β 의 수준을 감소하는 것으로 보고되어 있다(Shimmyo 등, 2008). 형질전환 AD 생쥐 모델에서 EGb761 은행잎 추출물의 장기 투여는 APP 단백질 수준을 감소시키는데, 이는 EGb761의 강력한 신경 보호 특성은 적

어도 부분적으로 APP 저해 활성과 관련 될 수 있다는 것을 나타내고 있다(Augustin 등, 2009). 또한, 일부 플라보노이드와 그 대사물들은 신경 신호 전달경로(PI3K/Akt, 티로신 키나아제, 단백질 키나아제 C, MAPK신호 전달 경로 및 세포핵 factor- κ B경로)를 통해 신경 작용에 유익한 효과를 발휘한다. 이러한 경로에 대한 억제 또는 자극 효과는 유전자 발현을 완화함으로서 신경 기능에 큰 영향을 미칠 수 있다(Baptista 등, 2014).

본 연구에서, 실시간 qRT-PCR 분석을 통해 아카세틴은 유전자 변형 초파리 AD 모델에서 *GFP* mRNA 수준에 큰 영향을 미치지는 않았으나, 인간 *APP*와 *BACE-1* mRNA 수준을 모두 감소시킬 수 있음을 보여 주었다. 이 결과는 아카세틴은 유전자 전사를 조절함으로써 인간 *BACE-1* 및 *APP*를 억제하는 중요한 역할을 하며, UAS 활성화 도메인과 전사활성화인자 Gal4의 결합을 차단하지 않는다는 것을 의미하고 있다. Western blot 분석 결과, 아카세틴은 *BACE-1* 활성 및 *APP* 합성을 방해함으로써, A β 생산을 감소시켜 APP-CTF와 AICD 수준을 감소시켰다. 따라서, A β 생산에 대한 아카세틴의 보호 효과는 *BACE-1* 및 *APP* 유전자의 전사 조절에 의해 매개되며, *APP* 수준 및 *BACE-1* 활성을 감소시킨다. 아카세틴은 *BACE-1* 활성의 직접적인 저해제 역할을 하며, *APP*와 *BACE-1*의 발현을 조절한다. 플라보노이드는 무세포 및 세포 기반 시스템에서 *BACE-1*에 대한 저해 활성을 나타낸다(Shimmyo 등, 2008; Jung 등, 2010). 플라보노이드 화합물인 에피카테킨(epicatechin)과 에피갈로카테킨(epigallocatechin)은 *APP* 작용과정의 강력한 저해제로 알려져 있다(Cox 등, 2015). 또한, 플라보노이드 화합물인 icariin은 형질전환 생쥐 모델에서 *APP* 및 *BACE-1* 발현을 감소시킴으로써 아밀로이드 침착을 감소시킨다(Zhang 등, 2014). 아카세틴은 NF- κ B 신호전달경로의 억제를 통해 친염증 매개체를 조절함으로써 항염증 활성을 나타낸다는 것이 알려져 있다(Kim 등, 2012). 또한, 아카세틴은 Ras/MAPK 경로를 활성화시키는 p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK)의 인산화를 강화시킴으로서 신경질 생성과 신경 분화를 유도하기 때문에(Nishina 등, 2013), 아카세틴은 AD 치료제로서의 가능성이 있다.

결론적으로, 과향 전초와 그 성분(특히 아카세틴)은 AD 예방 또는 치료를 위한 잠재적인 치료제 또는 선도화합물로서 사용할 수 있다. 아카세틴의 항AD 작용은 과향의 약리학적 작용 중 적어도 하나를 나타낸다. 새로운 항AD 제품으로서 과향 유래 조제물의 실제적 적용을 위해서는, 인간에 대한 안전성을 확립하여야 하며, 또한 초파리에서 측정된 활성이 과향 전초를 섭취한 후에 사람 생체 내에서도 동일한 효과가 발휘되는지 여부를 결정하기 위한 더 많은 연구가 필요하다. 과향은 전통적인 치료법에서 야생 식물과 약초로 사용되고 있다(Zielinska와 Matkowski, 2014). 또한, 최종 상업적 개발을 위해 과향에서 분리된 화합물의 항AD 역할과 안정성을 개선하는 방법을 이해하기 위해서 보다 상세한 연구가 필요하다.

2. 지역에 따른 프로폴리스(propolis)의 약리활성 차이

가. 머릿말

프로폴리스는 서양벌로 알려진 코카시안 벌(*Apis mellifera*)에 의해 식물(가지·꽃·화분·봉오리)에서 채집되는 천연 수지성 물질로서(Marcucci, 1995), 세계 도처에서 전통의약의 인기 있는 천연 치료제로서 이용되어 왔다. 꿀벌들은 프로폴리스를 벌집의 작은 틈을 메꾸는 데 사용하여 유해한 미생물로부터 자신들을 보호하고 있다(Bankova 등, 2000; Burdock, 1998). 일반적으로, 프로폴리스는 레진 및 발삼 50%, 밀랍 30%, 정유 및 방향성유 10%, 화분 5% 및 기타 물질 5%로 구성되어 있으나(Burdock, 1998), 그 정확한 조성은 출처에 따라 다르다. 아

시아종의 꿀벌들은 프로폴리스를 만들지 못하는 것으로 알려져 있다.

프로폴리스는 폭 넓은 활성, 즉 항암·항보체·항고혈압·간보호·항염증·항산화·항미생물·항구충작용을 가지고 있다(Marcucci, 1995; Burdock, 1998; Sforcin과 Bankova, 2011). 프로폴리스의 화학적 변이성, 방향성 및 색(갈색, 녹색, 적색 및 황색)은 그 채집 장소, 채집시기, 식물의 종류에 따라 현저하게 다르다(Bankova 등, 2000; Ahn 등, 2007; Salatino 등, 2011). 브라질의 남동부 지역과 아마존 유래 프로폴리스는 각각 주로 phenylpropanoid 화합물과 polyprenylated benzophenone 화합물을 함유하고 있는 반면, 대만이나 오키나와와 같은 태평양 지역 유래 프로폴리스는 geranyl flavonone 화합물을 함유하고 있다(Salatino 등, 2011). 그리스, 크레타 및 터키와 같은 동지중해 연안 지역 유래 프로폴리스는 주로 디테르페노이드(diterpenoid) 화합물을 함유하고 있다(Salatino 등, 2011). 프로폴리스에는 방향산 및 에스테르, 플라보노이드, 테르페노이드 등을 포함하는 300종 이상의 화합물들이 함유되어 있으며, 채집 위치, 시간 및 식물에 따라 화합물질의 종류와 함량이 다르다(Marcucci, 1995; Bankova 등, 2000). 따라서, 프로폴리스의 생물학적 특성은 식물지리학적 영역과 수집기간에 따라 매우 다양하다(Salatino 등, 2011). 브라질산 프로폴리스는 그 식물기원 및 생물학적 특성에 따라 12군으로 명확하게 분류되고 있다(Park 등, 2000).

본 연구는 국내 20개 지역에서 수집한 프로폴리스의 총페놀 함량과 총플라보노이드 함량을 조사하였으며, 또한, 이들 프로폴리스의 항산화·항바이러스·항치매·항세균·항암 등의 활성을 조사하여, 브라질산, 중국산 및 호주산 프로폴리스와 비교하였다.

나. 재료 및 방법

(1) 재료

아스코르빈산(ascorbic acid), (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) (MTT), DPPH, 갈산(gallic acid), 캐르세틴과 sulforhodamine B (SRB)는 Sigma-Aldrich사(St. Louis, MO)로부터 구입하였다. 5,5-Dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB), Folin-Ciocalteu's phenol reagent와 acetylthiocholine iodide (ATChI)는 Sigma-Aldrich사로부터 구입하였다. 항생제 ciprofloxacin, 항암제 cisplatin 그리고 acetylcholinesterase (AChE) 저해제인 donepezil hydrochloride, huperzine A 및 tacrine은 Sigma-Aldrich사로부터 구입하였다. 리바비린(ribavirin)은 Tokyo Chemical Industry (Tokyo, 일본)로부터 구입하였다. Anitbiotic-antimycotic은 Invitrogen사(Grand Island, NY)로부터 구입하였다. 재조합 인간 BACE-1 및 fluorogenic peptide substrate (FPS) Mca-SEVNLDAEFRK (Dnp) RR-NH₂는 R&D system사(Minneapolis, MN)로부터 구입하였다. Brain Heart Infusion (BHI) broth와 Eggerth-Gagnon (EG) agar는 각각 Becton, Dickinson and Company (Sparks, MD)와 Eiken Chemical (Tokyo)로부터 구입하였다. Minimum essential medium (MEM), RPMI 1640 medium과 fetal bovine serum (FBS)은 Life Technologies (Grand Island, NY)로부터 구입하였다. 기타 화합물 및 시약은 분석용을 사용하였다.

(2) 프로폴리스 시료

지역에 따른 프로폴리스의 활성을 비교하기 위해 국내 총 20개 지역의 양봉장에서 프로폴리스 시료 (P1~20)를 구입하였다(표 12, 그림 101). 국내산 프로폴리스 시료와 비교하기 위하여, 호주, 브라질 및 중국산 프로폴리스를 각각 Australia Pharma (Silverwater, 호주), Uniflora Apicultores Associados (Olimpia, 브라질) 및 KangSiNong Biotechnology (Wuhan, 중국)으

로부터 구입하였다.

표 12. Propolis samples supplied by 20 different apiaries in various geographic regions of South Korea

Sample no.	Apiary site (Province)	Coordinates
P1	Anseong (Gyeonggi)	37°00'30"N, 127°16'30"E
P2	Icheon (Gyeonggi)	37°15'50"N, 127°29'03"E
P3	Yangpyeong (Gyeonggi)	37°29'32"N, 127°29'16"E
P4	Goyang (Gyeonggi)	37°39'30"N, 126°49'50"E
P5	Wonju (Gangwon)	37°20'15"N, 127°56'47"E
P6	Goesan (Chungbuk)	36°48'45"N, 127°47'20"E
P7	Chungju (Chungbuk)	36°58'12"N, 127°57'09"E
P8	Daejeon	36°22'08"N, 127°22'27"E
P9	Dangjin (Chungnam)	36°53'54"N, 126°37'51"E
P10	Goryeong (Gyeongbuk)	35°43'36"N, 128°15'56"E
P11	Uljin (Gyeongbuk)	36°59'30"N, 129°24'46"E
P12	Jinju (Gyeongnam)	35°09'49"N, 128°02'24"E
P13	Changnyeong (Gyeongnam)	35°32'52"N, 128°29'35"E
P14	Geochang (Gyeongnam)	35°41'19"N, 127°54'44"E
P15	Imsil (Jeonbuk)	35°36'44"N, 127°17'07"E
P16	Buan (Jeonbuk)	35°43'46"N, 126°42'59"E
P17	Jeonju (Jeonbuk)	35°49'17"N, 127°09'17"E
P18	Gunsan (Jeonbuk)	35°58'06"N, 126°44'14"E
P19	Gwangju	35°09'35"N, 126°51'11"E
P20	Jeju (Jeju)	33°14'46"N, 126°33'55"E



그림 101. Propolis collected from 20 sites in South Korea.

(3) 추출

프로폴리스 에탄올 추출물이 페놀 화합물 및 플라보노이드 화합물들을 가장 많이 함유하고 있는 것으로 보고되어 있어(Watanabe 등, 2011), 본 실험에서도 이를 프로폴리스 시료들을 에탄올로 추출하였다. 각각의 프로폴리스 샘플을 삼각플라스크에 넣어 시료무게의 약 5 배 정도의 75% 에탄올을 혼합하여 잘 섞은 뒤 암조건 하에서 추출하였다. 추출은 각 시료 당 3일 동안 3회 수행하였다. 이 추출액은 여지로 여과하였으며, 회전감압농축기(EYELA NAJ-160, 일본)를 사용하여 40°C에서 감압농축하여 프로폴리스의 에탄올 추출물을 얻었다. 이들 추출물들은 -20°C에서 보관하였다.

20종 프로폴리스 에탄올 추출물은 실리카겔 플레이트에서 이동상으로 클로로포름과 메탄올 (95:5, v/v)을 이용하여 확인하였다. 2% H₂SO₄로 살포 한 다음, 핫 플레이트에서 검출한 결과(그림 102), 제주도산 프로폴리스를 제외한 다른 지역 산 프로폴리스의 구성 성분에 커다란 차이를 보이지 않았으나, 제주도산 프로폴리스는 다른 지역 산 프로폴리스에 비해 구성 요소에 차이를 보였다.

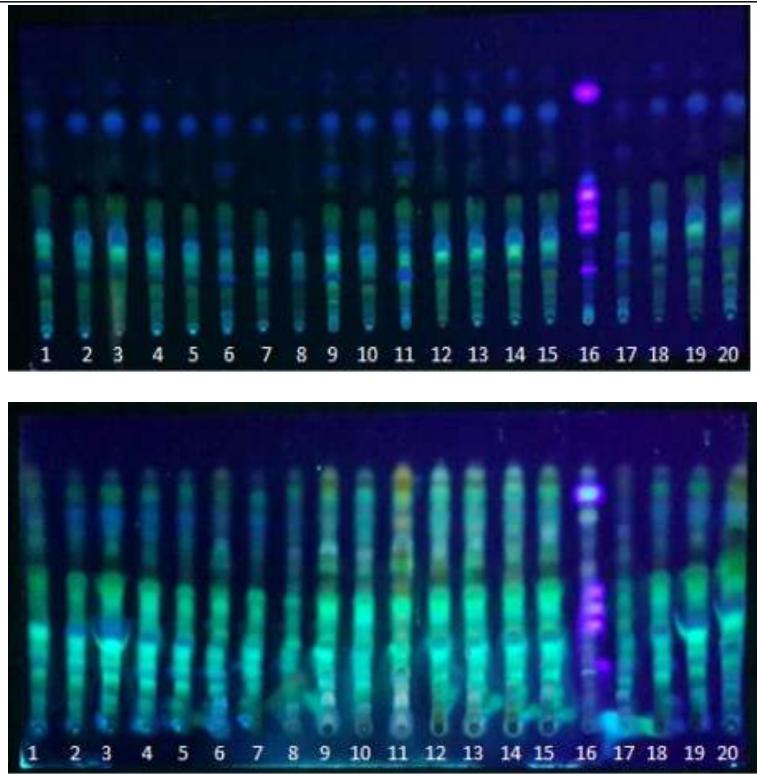


그림 102. TLC patterns of propolis collected from 20 sites in South Korea. Up: TLC pattern before spraying H_2SO_4 under 365 nm. Bottom: TLC pattern after spraying 2% H_2SO_4 and heating under 365 nm.

(4) 폴리페놀 및 플라보노이드 함량 측정

프로폴리스 에탄올 추출물을 총 폴리페놀 함량은 Zongo 등 (2010)의 Folin-Ciocalteu 비색법을 약간 변형하여 측정하였다. 간략하면, 0.2 N Folin - Ciocalteu 시약 100 μL 를 각각의 프로폴리스 에탄올 추출물 20 μL 가 들어 있는 96-well plate (SPL Life Sciences, 포천, 경기도)에 첨가하여 암흑 조건 하에서 실온에서 5분 동안 방치하였다. 탄산나트륨(75 g/L) 80 μL 를 각 골에 첨가하고 나서, 플레이트는 암흑 조건 하에서 실온에서 30분 동안 진탕하면서 배양하였다. 흡광도는 SoftMax Pro 5 Software (serial no. SMP500-18672-LWHU)가 장착된 VersaMax 마이크로플레이트 판독기(Molecular Devices, Sunnyvale, CA)를 이용하여 735 nm에서 측정하였다. 프로폴리스 에탄올 추출물을 최종농도 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 조사하였다. 갈산(0~62.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)을 표준물질로서 처리하였으며, 방정식은 $Y = 0.0454 X - 0.0056$ ($R^2 = 0.9993$) (그림 103)으로서, X는 갈산 농도 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)이며 Y는 735 nm에서의 흡광도이다. 총 폴리페놀 함량은 gallic acid equivalents (GAE)/프로폴리스 에탄올 추출물 시료 (g)로 mg으로 표시하였다.

프로폴리스 에탄올 추출물 시료의 총플라보노이드 함량은 96-well plate에서 AlCl_3 비색법 (Zongo 등, 2010)을 이용하여 조사하였다. 간략하면, 2% AlCl_3 100 μL 를 75% 에탄올에 녹인 각 프로폴리스 에탄올 추출물 100 μL 에 첨가하고 나서, 플레이트를 암흑조건 하에서 실온에서 15분 동안 배양하였다. 흡광도는 앞에서 언급한 마이크로플레이트 판독기를 이용하여 435 nm에서 측정하였다. 프로폴리스 에탄올 추출물들은 최종농도 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 평가하였다. 케르세틴(0~50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)을 표준물질로서 이용하였으며, 방정식은 $Y = 0.0343 X + 0.0177$ ($R^2 = 0.9995$) (그림 104) 이었으며, X는 quercetin 농도 ($\mu\text{g}/\text{mL}$), Y는 435 nm에서

측정한 흡광도 이다. 총플라보노이드 함량은 quercetin equivalents (QE)/프로폴리스 에탄올 추출물 시료 (g)로 mg으로 표시하였다.

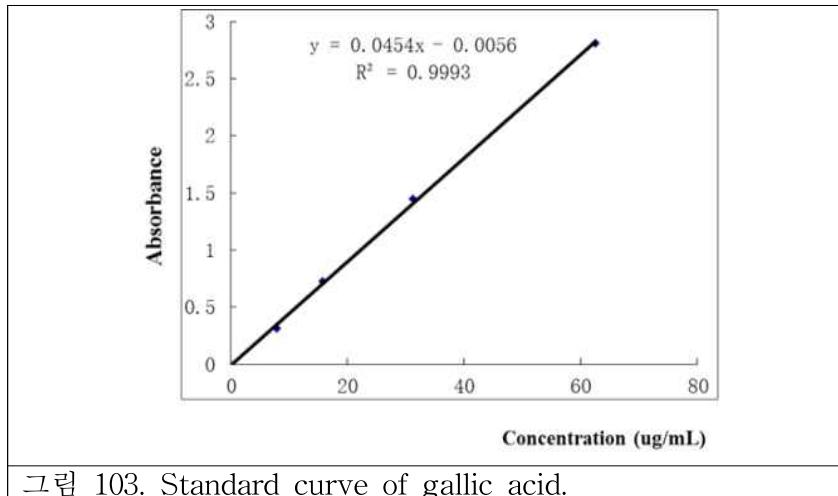


그림 103. Standard curve of gallic acid.

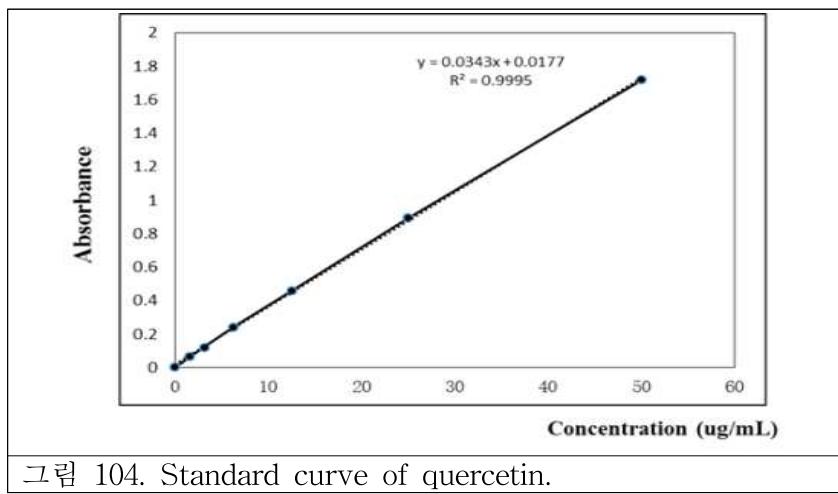


그림 104. Standard curve of quercetin.

(5) 형광공명에너지전달(FRET) 효소 분석법

프로폴리스 에탄올 추출물 시료의 BACE-1 저해활성을 Lv 등 (2008) 및 Wang 등 (2014)의 방법에 따라 조사하였다. 검정용 혼합물을 재조합 인간 BACE-1 ($0.5 \mu\text{g}/\mu\text{L}$) $1 \mu\text{L}$, FPS ($2.5 \mu\text{g}/\mu\text{L}$) $0.75 \mu\text{L}$, 50 mM sodium acetate (pH 4.5) $47.25 \mu\text{L}$ 및 2% DMSO에 녹인 프로폴리스 에탄올 추출물 ($10\sim2000 \mu\text{g}/\text{mL}$)로 이루어져 있다. 이들 혼합물을 25°C 암 조건 하에서 1시간 배양하였으며, 반응을 종료시키기 위해 2.5 M sodium acetate $16.6 \mu\text{L}$ 를 첨가하였다. 형광의 강도는 Pro PC/MAC Software (serial no. US 02947)를 장착한 SpectraMax Gemini XS 플레이트 판독기로 여기 355 nm 와 방출 405 nm 로 실온에서 측정하였다. % 저해는 다음과 같이 구하였다.

$$\% \text{ inhibition} = 100 - [(F_S - F_{S0})/(F_C - F_{C0})] \times 100$$

여기서 F_S 와 F_{S0} 는 각각 60분과 0시간에서의 시료의 형광 흡광도이며, F_C 와 F_{C0} 는 각각 60분과 0시간에서의 대조구의 형광 흡광도이다(Zongo 등, 2010).

(6) 아세틸콜린에스테라제(AChE) 저해활성 검정

제조사의 프로토콜에 따라 재조합 인간 AChE (R&D system, Minneapolis, MN)을 이용하여 검정을 실시하였다. 간략하면, 반응 혼합물은 AChE (0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.5)에 녹인 $0.044 \mu\text{g}/\text{mL}$) $50 \mu\text{L}$ 와 1% DMSO에 녹인 프로폴리스 에탄올 추출물 ($10\sim$

2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$)로 이루어져 있다. 50 μL 기질/DNTB 혼합물 (400 μM DTNB를 함유하는 검정 용 완충액에 녹인 800 μM ATChI)을 첨가함으로서 반응을 개시하였다. 반응 혼합물은 37°C에서 1시간 배양하였다. 흡광도는 VersaMax 마이크로플레이트 판독기를 이용하여 410 nm에서 기록하였다. 저해제인 donepezil hydrochloride, tacrine 및 huperzine A (Čolović 등, 2013)를 양성대조구로 이용하였다.

(7) DPPH 라디칼 소거 검정

프로폴리스 에탄올 추출물 시료의 DPPH 라디칼 소거 활성을 Blois (1958)의 방법을 약간 수정하여 평가하였다. 간략하면, 0.4 mM DPPH 메탄올 용액 100 μL 를 메탄올에 녹인 각 프로폴리스 에탄올 추출물 시료를 함유하는 96-well 플레이트에 첨가하였다. 예비실험 결과에 따라, 프로폴리스 에탄올 추출물 시료의 라디칼 소거 활성은 5~7개 농도 (5~2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$)로 측정하였다. 암 조건 하에서 실온에서 30분 배양하고 나서, VersaMax 마이크로플레이트 판독기를 이용하여 518 nm에서 흡광도를 측정하였다. Ascorbic acid를 양성대조구로 이용하였다. 라디칼 소거 활성은 다음과 같이 구하였다:

$$\% \text{ DPPH 라디칼 소거 활성} = (1 - As/Ac) \times 100$$

여기서 Ac 는 시료가 없는 대조구의 흡광도이며, As 는 시료의 흡광도이다.

(8) 암세포주 및 세포증식 검정

본 시험에서 이용한 암세포주는 다음과 같다: PC-3 (human prostate adenocarcinoma cell line) 및 MCF-7 (human breast adenocarcinoma cell line)은 Korean Cell Line Bank (Seoul)에서 구입하였으며, A549 (human lung carcinoma cell line)은 American Type Culture Collection (ATCC) (Manassas, VA)에서 구입하였다. PC-3 및 MCF-7 세포주는 5% CO₂와 95% 공기, 및 37°C 조건 하에서 10% FBS와 1% antibiotic-antimycotic 용액을 함유하는 RPMI 1640 배지에서 배양하였으며, A549 세포주는 10% FBS, 1% antibiotic-antimycotic 용액 및 1% 글루타민을 함유하는 MEM 배지에서 배양하였다. 세포는 SPL Life Science 제품인 세포배양접시에서 배양하였다.

프로폴리스 에탄올 추출물 시료의 실험 암세포주에 대한 항증식활성은 Morgan (1998)의 MTT 검정법으로 조사하였다. 간략하면, MTT (5 mg/mL)를 PBS (pH 7.4)에 녹이고 나서 멀균 필터를 이용하여 여과하였다. 세포는 DMSO Hybri-Max에 녹인 프로폴리스 에탄올 추출물 시료를 함유하는 완전배양배지 100 μL 가 들어 있는 96-well 배양 플레이트에서 2 × 10⁴ cells/well 밀도로 평판배양 하였다. 모든 검정에서 DMSO Hybri-Max의 최종농도는 0.1% 이하 이었다. 예비실험결과에 따라, 각 프로폴리스 에탄올 추출물 시료 (15~1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$)의 항증식활성은 5~7개 농도에서 조사하였다. 배양 플레이트는 2일 동안 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하고 나서, 플레이트는 100 μL PBS로 세척하였다. 0.05% MTT를 함유하는 배지 100 μL 를 각 골(well)에 첨가하고 나서, 4시간 동안 앞에서 언급한 조건 하에서 배양하였다. MTT 용액을 제거하고 DMSO 200 μL 를 각 골에 첨가하였다. 최종적으로 플레이트를 형성된 진홍색 formazan 결정을 녹이기 위하여 10분 동안 진탕시켰다. Cisplatin을 양성대조구로, DMSO 용액을 음성대조구로 하여 앞에서와 같이 마찬가지로 조제하였다. 흡광도는 VersaMax 마이크로플레이트 판독기를 이용하여 560 nm 및 670 nm에서 기록하였다.

(9) 인간 rhinovirus 혈청형 및 항바이러스 검정

인간 epithelial adenocarcinoma cervix 세포주인 HeLa (ATCC CCL-2)를 가습 항온기 (37°C and 5% CO₂)를 이용하여 10% FBS와 0.01% antibiotic-antimycotic 용액을 첨가한

MEM 배지에서 배양하였다(Vichai와 Kirtikara, 2006; Ngan 등, 2015). HRV-2 (ATCC VR-1112AS/GP) 및 HRV-4 (ATCC VR-1114AS/GP)를 37°C에서 HeLa 세포에서 증식시켰다. 바이러스 적정량(titer) HeLa 세포에 있어서 세포병변효과(cytopathic effects)를 이용함으로서 구하였으며, Vichai와 Kirtikara (2006)와 Ngan 등 (2015)이 보고한 바와 같이 50% cell culture infective dose (CCID₅₀)/mL로 나타내었다.

프로폴리스 에탄올 추출물 시료의 인간 rhinovirus에 대한 항바이러스 활성은 CPE 환원(Vichai와 Kirtikara, 2006; Ngan 등, 2015)을 이용하여 SRB 검정법으로 평가하였다. 간략하면, HeLa 세포를 1일 동안 96-well 배양 플레이트에서 3×10^4 cells/well의 밀도로 접종하였다. 배양 배지를 제거하고 나서 플레이트를 PBS로 세척하였다. 이어서, 바이러스 스톡의 CCID₅₀을 함유하는 희석 바이러스 혼탁액 90 μL를 well에 넣고 나서, 0.1% DMSO에 녹인 각 프로폴리스 에탄올 추출물 시료 4~5개 농도(0.1~200 μg/mL)를 함유하는 30 mM MgCl₂ 첨가 MEM 10 μL를 접종 후 2일 내에 적당한 CPE를 구하기 위하여 첨가하였다. 2일 동안 37°C, 5% CO₂ 조건 하에서 배양한 후, 플레이트를 PBS 200 μL로 1회 세척한다. 1% 초산 용액에 녹인 0.057% (w/v) SRB 100 μL를 각 골에 첨가하고 나서, 실온에서 30분 방치하였다. 흡광도는 VersaMax 마이크로플레이트 판독기를 이용하여 562 nm 와 620 nm에서 측정하였다. Ribavirin을 양성대조구로, DMSO 용액을 음성대조구로 하여, 마찬가지로 조제하였다. 바이러스 저해율 (Viral inhibition rate, VIR) (%)은 다음과 같이 산출하였다(Ngan 등, 2015) :

$$\% \text{ VIR} = (OD_{tV} - OD_{cV}) / (OD_{cd} - OD_{cV}) \times 100$$

여기서 OD_{tV} 는 HRV 감염 세포에 있어서의 프로폴리스 에탄올 추출물 시료의 주어진 농도에서 측정된 흡광도, OD_{cV} 는 HRV 감염 세포에 있어서의 대조구의 흡광도, OD_{cd} 는 HRV 비감염 세포에 있어서의 무처리 대조구의 흡광도이다.

(10) 장내세균 계통 및 생육저해 검정

본 연구에서 사용한 세균은, 5종 유해세균, 2종 비병원성 세균, 6종 유산균 및 1종 산성 세균으로 표 3.5에 나타내었다. 이를 세균들은 25% glycerol (v/v)를 함유하는 BHI 액체배지(pH 7.6)로 -70°C에 보관하였다. *Escherichia coli* ATCC 11775와 *Staphylococcus aureus* ATCC 12600 37°C, 1일간 호기조건 하에서 배양하였으며, 나머지 12종 세균들은 5% H₂, 15% CO₂ 및 80% N₂ 조건 하에서, 37°C, 1일간 FA-6 anaerorator (serial no. 98072851) (Hirayama, Tokyo, 일본)에서 배양하였다(Ngan 등, 2012). 생물검정을 위하여, 1×10^5 colony-forming unit (CFU)/mL를 함유하는 세균 혼탁액을 EG 배지에서 조제하였다.

프로폴리스 에탄올 추출물 시료의 실험세균에 대한 최소억제농도 (minimal inhibitory concentrations, MICs)를 결정하기 위하여 멸균한 96 웰 플레이트에서 Sarker 등 (2007)의 방법에 따라 생물검정을 실시하였다. 간략하면, 우선 프로폴리스 에탄올 추출물 시료를 DMSO를 이용하여 조제하고 나서, BHI 액체배지 50 μL를 이용하여 2배 희석액 계열을 조제하였다. 이어서, 실험세균 혼탁액 10 μL를 첨가하였다. Ciprofloxacin을 양성대조구로, DMSO 용액을 음성대조구로 하였다. 처리 및 무처리 대조구의 플레이트를 앞에서 언급한 세균 배양 조건과 마찬가지로 24시간 배양하고 나서, resazurin 용액(멸균 중류수 40 mL에 resazurin 270 mg을 녹임) 10 μL를 각 골에 첨가하였다.

표 13. List of human intestinal bacteria tested for growth inhibitory activity

Harmful or nonpathogenic bacteria	Beneficial bacteria
Gram-positive	Gram-positive lactic acid-producing bacteria
<i>Clostridium difficile</i> ATCC 9689	<i>Bifidobacterium bifidum</i> ATCC 29521
<i>Clostridium paraputrificum</i> ATCC 25780	<i>Bifidobacterium breve</i> ATCC 15700
<i>Clostridium perfringens</i> ATCC 13124	<i>Bifidobacterium infantis</i> ATCC 25962
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 12600	<i>Bifidobacterium longum</i> ATCC 15707
	<i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4356
	<i>Lactobacillus casei</i> ATCC 393
Gram-negative	Gram-positive acidulating bacterium
<i>Bacteroides fragilis</i> ATCC 25285a	<i>Clostridium butyricum</i> ATCC 25779d
<i>Escherichia coli</i> ATCC 11775a	
<i>Salmonella enterica</i> serovar <i>Typhimurium</i> ATCC 13311	

^a Nonpathogenic bacteria.

(11) 자료분석

MIC (mg/mL)는 resazurin 지시약을 이용하여 육안으로 세균의 생육을 저해하는 프로폴리스 에탄올 추출물 시료의 가장 낮은 농도로 정의 하였다. BACE-1 저해, AChE 저해 그리고 라디칼 소거 활성은 각각 50% BACE-1, AChE 및 DPPH 저해를 유발하는데 필요한 프로폴리스 에탄올 추출물의 50% 저해농도 (IC_{50} , $\mu\text{g}/\text{mL}$)로 표시하였다. 항증식활성은 대조구와 비교하여 세포 활력을 50% 저하시키는데 필요한 프로폴리스 에탄올 추출물의 50% 저해농도 (IC_{50} , $\mu\text{g}/\text{mL}$)로 표시하였다. 프로폴리스 에탄올 추출물 시료의 IC_{50} 값은 Prism5 software program (GraphPad Software, LaJolla, CA)을 이용하여 산출하였다. IC_{50} 값은 95% 신뢰구간이 중첩되지 않으면 서로 유의성이 있는 것으로 간주하였다. 결과는 평균 \pm 표준오차로 표시하였으며, 실험은 3 반복으로 수행하였다. 프로폴리스 에탄올 추출물 시료들 간 총폴리페놀 함량 및 총 플라보노이드 함량 차이를 SAS 9.13 program (SAS Institute, Cary, NC)을 이용하여 Bonferroni multiple-comparison method로 분석하였다. 프로폴리스 에탄올 추출물 시료의 생물활성의 상관계수(r)의 분석은 20종 국산 프로폴리스 에탄올 추출물 시료에서 IC_{50} 또는 MIC 값 그리고 폴리페놀이나 플라보노이드 함량을 이용하여 산출하였다.

다. 결과

(1) 프로폴리스 시료의 총폴리페놀 및 플라보노이드 함량

20종 국산 프로폴리스 에탄올 추출물 시료의 총폴리페놀 및 플라보노이드 함량을 호주산, 브라질산 및 중국산 프로폴리스 에탄올 추출물 시료와 비교하였다 (표 14). 23종 프로폴리스 에탄올 추출물 시료에서, 총폴리페놀 함량 ($F = 92.79$; $df = 22, 46$; $P < 0.0001$) 및 총플라보노이드 함량 ($F = 68.66$; $df = 22, 46$; $P < 0.0001$)은 현저한 차이를 보였다. 20종 국산 프로폴리스 에탄올 추출물 시료의 총폴리페놀 함량은 48.5~238.9 mg GAE/g EEP 이었다. 고령(P10), 창녕(P13), 양평(P3) 및 안성(P1) 프로폴리스 시료는 다른 지역의 시료보다 더 높은

총폴리페놀 함량(238.9~219.5 mg GAE/g EEP)을 나타내었다. 제주(P20) 시료의 총폴리페놀 함량은 실험 프로폴리스 중에서 가장 낮았다. 호주산, 브라질산 및 중국산 프로폴리스 시료의 총폴리페놀 함량은 127~142 mg GAE/g EEP 이었다.

국산 프로폴리스 에탄올 추출물 시료의 총플라보노이드 함량은 20.8~49.8 mg QE/g EEP 이었다. 당진(P9), 제주(P20) 및 이천(P2) 시료는 다른 지역의 시료보다 더 높은 총플라보노이드 함량 (49.8~40.5 mg QE/g EEP)을 보였다. 전주(P17) 시료의 총플라보노이드 함량이 가장 낮았다. 호주산, 브라질산 및 중국산 프로폴리스 에탄올 추출물 시료의 총플라보노이드 함량은 33~53 mg QE/g EEP 이었다.

(2) BACE-1 저해활성

알쯔하이머 질환 환자의 뇌에 있어서의 주요 성분 아밀로이드 프라크 (amyloid plaque) (Suh와 Checler, 2002)인 β -amyloid 생성시키는 APP amyloidgenic pathway에서 중요한 효소이기 때문에, 프로폴리스 에탄올 추출물 시료의 BACE-1 저해활성을 FRET 효소검정법을 이용하여 평가하였다 (표 15). IC₅₀ 값에 근거하여, 20종 국산 프로폴리스 에탄올 추출물 시료의 BACE-1 저해활성은 25.7~291.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이었다. 충주(P7) (IC₅₀, 26 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 시료가 가장 활성이 높았으며, 이어서 이천(P2), 원주(P5), 안성(P1), 괴산(P6), 고령(P10) 및 부안(P16) (IC₅₀, 36.3~64.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 시료가 높은 활성을 나타내었다. 호주산, 브라질산 및 중국산 프로폴리스 에탄올 추출물 시료의 IC₅₀ 값은 116.4~476.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이었다.

(3) 인간 아세틸콜린에스테라제 (AChE) 저해활성스 에탄올 추출물 시료의 AChE 저해활성

AChE은 알쯔하이머 질환의 주요 타겟의 하나이기 때문에 (Čolović 등, 2013), 프로폴리스가 되고 있는 3종 항암제와 비교하였다(표 16). IC₅₀ 값에 근거하여, 20종 국산 프로폴리스 에탄올 추출물 시료의 항AChE 활성은 15.6~327.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이었다. 이천(P2) (IC₅₀, 15.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 시료가 가장 활성이 높았으며, 이어서 제주(P20) (26.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$)과 부안(P16) (33.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$)이 높은 활성을 나타내었다. 이들 시료들의 AChE 저해활성은 huperzine A, donepezil hydrochloride 또는 tacrine (IC₅₀, 0.2~1.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 보다 현저하게 낮았다. 호주산, 브라질산 및 중국산 프로폴리스 에탄올 추출물 시료의 IC₅₀ 값은 47.0~242.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이었다.

표 14. Total polyphenol and flavonoid contents in 20 Korean, Australian, Brazilian, and Chinese propolis ethanol extracts

Sample no.	Total polyphenol (mg GAE/g EEP)	Total flavonoid (mg QE /g EEP)
P1	219.5 ± 5.31 a-c	29.7 ± 0.77 f-h
P2	148.0 ± 4.32 f-i	40.5 ± 0.77 b,c
P3	229.0 ± 4.82 a,b	23.5 ± 0.15 i,j
P4	202.4 ± 4.11 b-d	30.4 ± 0.36 e-g
P5	196.5 ± 4.28 c-e	26.3 ± 0.57 g-i
P6	135.9 ± 5.70 h,i	23.6 ± 0.38 i,j
P7	205.6 ± 5.48 b-d	35.9 ± 0.57 c-e
P8	151.9 ± 5.01 f-h	26.5 ± 0.56 g-i
P9	205.0 ± 5.98 b-d	49.8 ± 0.79 a
P10	238.9 ± 4.61 a	36.5 ± 0.61 b-d
P11	132.3 ± 2.78 h,i	25.3 ± 1.27 g-j
P12	125.1 ± 5.37 i	28.7 ± 0.17 f-i
P13	233.5 ± 4.39 a,b	28.3 ± 2.13 f-i
P14	181.7 ± 4.20 d,e	27.6 ± 0.29 f-i
P15	183.2 ± 5.75 d,e	26.6 ± 0.07 g-i
P16	168.7 ± 5.68 e-g	37.8 ± 2.02 b-d
P17	190.3 ± 5.45 c-e	20.8 ± 0.17 j
P18	171.6 ± 6.21 e,f	26.6 ± 0.20 g-i
P19	148.3 ± 5.77 f-i	24.4 ± 2.01 h-j
P20	48.5 ± 4.08 j	42.2 ± 1.75 b
Australia	142.4 ± 3.61 g-i	38.0 ± 0.90 b-d
Brazil	126.8 ± 4.12 h,i	53.0 ± 0.22 a
China	132.1 ± 3.28 h,i	32.5 ± 0.53 d-f

GAE, gallic acid equivalent; QE, quercetin equivalent; EEP, ethanol extract from propolis.

Means followed by the same letter in the column are not significantly different ($P = 0.05$, Bonferroni method).

표 15. BACE-1 inhibitory activity of 20 Korean, Australian, Brazilian, and Chinese propolis ethanol extracts

Sample	IC ₅₀ , µg/mL (95%CL)	Slope ± SE	χ ^{2a}	P-value
P1	55.8 (47.7–63.9)	1.8 ± 0.15	2.67	0.996
P2	36.3 (25.2–52.3)	0.9 ± 0.10	7.32	0.961
P3	70.0 (55.9–87.5)	1.1 ± 0.10	5.07	0.983
P4	101.1 (84.7–120.6)	1.6 ± 0.29	5.74	0.981
P5	52.9 (37.3–75.0)	0.9 ± 0.12	8.74	0.931
P6	58.2 (48.8–69.5)	1.5 ± 0.15	3.98	0.991
P7	25.7 (21.8–30.4)	1.2 ± 0.07	3.56	0.989
P8	99.1 (91.4–107.5)	1.6 ± 0.12	2.55	0.997
P9	115.4 (99.7–133.6)	3.4 ± 1.50	2.77	0.997
P10	61.4 (49.1–76.8)	1.4 ± 0.15	6.90	0.974
P11	291.9 (278.0–306.6)	1.3 ± 0.03	1.41	0.999
P12	140.0 (122.0–160.6)	1.2 ± 0.08	3.56	0.992
P13	122.5 (110.9–135.4)	2.5 ± 0.42	3.36	0.995
P14	140.5 (125.5–157.2)	2.2 ± 0.24	3.65	0.994
P15	141.1 (127.8–155.8)	2.0 ± 0.18	3.27	0.995
P16	64.6 (52.1–80.2)	1.7 ± 0.26	4.87	0.987
P17	96.7 (91.4–102.2)	2.3 ± 0.39	2.40	0.997
P18	117.5 (108.7–127.1)	2.0 ± 0.21	2.91	0.996
P19	97.8 (92.3–103.6)	2.3 ± 0.41	2.57	0.997
P20	128.7 (112.6–147.2)	1.3 ± 0.09	3.99	0.997
Australian	127.5 (114.2–142.3)	1.7 ± 0.15	3.60	0.993
Brazilian	476.5 (458.5–495.2)	1.6 ± 0.05	1.30	0.999
Chinese	116.4 (105.4–128.6)	2.7 ± 0.66	3.23	0.995

^a Pearson's chi-square goodness-of-fit test.

표 16. Human acetylcholinesterase inhibitory activity of 20 Korean, Australian, Brazilian, Chinese propolis ethanol extracts and three commercial anti-Alzheimer's disease agents

Sample	IC ₅₀ , µg/mL (95%CL)	Slope ± SE	X ^{2a}	P-value
P1	70.0 (56.9–86.1)	1.0 ± 0.12	7.33	0.9113
P2	15.6 (11.2–21.6)	0.6 ± 0.05	3.04	0.9321
P3	55.7 (44.7–69.4)	1.1 ± 0.14	7.71	0.9018
P4	47.9 (39.0–59.0)	1.1 ± 0.14	6.96	0.9128
P5	119.9 (98.2–146.4)	2.4 ± 0.48	12.2	0.9066
P6	89.8 (80.1–100.6)	2.2 ± 0.23	6.75	0.9685
P7	48.0 (40.8–56.55)	1.2 ± 0.12	5.88	0.9406
P8	79.3 (72.6–86.6)	4.8 ± 0.67	6.67	0.9760
P9	103.2 (91.8–116.1)	2.6 ± 0.33	7.56	0.9665
P10	104.2 (89.2–121.7)	2.0 ± 0.26	8.59	0.9459
P11	123.4 (115.1–132.2)	2.6 ± 0.20	4.49	0.9878
P12	61.6 (56.4–67.2)	2.5 ± 0.25	5.57	0.9724
P13	101.6 (84.8–121.7)	2.0 ± 0.32	10.29	0.9242
P14	102.1 (84.8–122.8)	1.8 ± 0.26	9.87	0.9245
P15	104.9 (85.6–128.6)	1.8 ± 0.30	11.04	0.9070
P16	33.9 (26.5–43.2)	1.1 ± 0.13	6.39	0.9012
P17	130.8 (122.5–139.6)	4.1 ± 0.60	5.58	0.9842
P18	124.8 (101.7–153.2)	1.6 ± 0.22	9.94	0.9094
P19	327.3 (297.7–359.7)	2.6 ± 0.26	6.04	0.9785
P20	26.7 (20.7–34.5)	0.9 ± 0.09	4.85	0.9213
Australian	242.9 (231.9–254.5)	3.2 ± 0.22	3.39	0.9940
Brazilian	147.0 (139.4–155.1)	2.9 ± 0.19	3.66	0.9930
Chinese	230.9 (208.7–255.5)	3.6 ± 0.62	7.88	0.9696
Tacrine	1.2 (0.9–1.6)	0.4 ± 0.02	3.87	0.9712
Huperzine A	0.2 (0.1–0.3)	0.4 ± 0.03	5.33	0.9246
DH	0.4 (0.3–0.6)	0.3 ± 0.02	4.78	0.9466

DH, donepezil hydrochloride.

^a Pearson's chi-square goodness-of-fit test.

(4) DPPH 자유라디칼 소거활성

프로폴리스 에탄올 추출물 시료의 항산화 활성을 DPPH 라디칼 소거 검정법을 이용하여 항산화제인 아스코르브산(ascorbic acid)과 비교하였다(표 17). IC₅₀ 값에 근거하여, 20종 국산 프로폴리스 에탄올 추출물 시료의 라디칼 소거활성은 43.4~269.0 µg/mL 이었다. 안성(P1) 시료가 가장 높은 라디칼 소거활성을 보였으며, 양평(P3), 원주(P5) 및 고령(P10) 시료도 높은 소거활성을 나타내었다. 이들 프로폴리스 에탄올 추출물 시료의 소거활성은 아스코르브산(IC₅₀, 14 µg/mL) 보다 각각 3.1, 3.8, 4.0 및 4.2배 활성이 낮았다. 호주산, 브라질산 및 중국산 프로폴리스 에탄올 추출물 시료의 IC₅₀ 값은 73.8~179.0 µg/mL 이었다.

표 17. DPPH free radical scavenging activity of 20 Korean, Australian, Brazilian, Chinese propolis ethanol extracts and commercial antioxidant agent ascorbic acid

Sample	IC ₅₀ , µg/mL (95%CL)	Slope ± SE	X ^{2a}	P-value
P1	43.4 (36.6–51.4)	1.7 ± 0.16	5.32	0.983
P2	115.3 (100.1–132.9)	1.3 ± 0.11	4.29	0.989
P3	52.7 (44.0–63.3)	1.6 ± 0.17	5.71	0.981
P4	80.2 (69.4–92.7)	1.3 ± 0.10	4.28	0.989
P5	56.1 (47.6–66.1)	1.5 ± 0.14	5.10	0.985
P6	97.4 (79.9–118.7)	1.2 ± 0.13	5.76	0.980
P7	73.5 (62.7–86.2)	1.4 ± 0.13	4.87	0.986
P8	159.9 (139.7–183.1)	1.9 ± 0.18	4.44	0.990
P9	81.7 (69.8–95.6)	1.9 ± 0.31	5.76	0.983
P10	58.3 (47.1–72.1)	2.2 ± 0.32	6.73	0.976
P11	161.1 (141.8–183.3)	1.9 ± 0.16	4.20	0.991
P12	235.0 (219.6–251.5)	1.3 ± 0.04	1.96	0.998
P13	67.2 (56.0–80.6)	1.7 ± 0.24	6.03	0.979
P14	135.4 (117.1–156.3)	1.7 ± 0.18	4.80	0.988
P15	98.7 (87.1–111.8)	1.4 ± 0.11	3.89	0.991
P16	81.6 (71.8–92.8)	1.4 ± 0.11	4.00	0.991
P17	74.0 (63.7–86.0)	1.6 ± 0.16	4.89	0.987
P18	96.2 (85.0–109.0)	1.5 ± 0.13	4.05	0.991
P19	202.0 (175.0–233.1)	1.5 ± 0.11	4.39	0.989
P20	269.0 (248.3–291.4)	1.5 ± 0.06	2.44	0.996
Australian	73.8 (49.3–110.5)	0.9 ± 0.12	9.76	0.922
Brazilian	148.1 (121.2–180.9)	1.6 ± 0.22	6.51	0.976
Chinese	179.0 (136.8–234.2)	1.8 ± 0.29	8.59	0.958
Ascorbic acid	14.0 (12.4–15.8)	1.8 ± 0.17	4.45	0.983

^a Pearson's chi-square goodness-of-fit test.

(5) 암세포주에 대한 항증식역제효과

프로폴리스 에탄올 추출물 시료의 항증식활성을 MTT 검정법을 이용하여 현재 이용되고 있는 항암제인 cisplatin과 비교하였다(표 18). IC₅₀ 값에 근거하여, 20종 국산 프로폴리스 에탄올 추출물 시료의 PC-3 세포주에 대한 항증식활성은 15.9~331.6 µg/mL 이었다. 이천(P2) 시료가 가장 높은 항증식활성을 보였으며, 이어서 충주(P7)와 진주(P12) 시료가 활성이 높았다. 이들 프로폴리스 에탄올 추출물 시료의 저해활성은 항암제인 cisplatin (IC₅₀, 61 µg/mL) 보다 각각 3.8, 2.0 및 1.6배 높았다. 호주산, 브라질산 및 중국산 프로폴리스 에탄올 추출물 시료의 IC₅₀ 값은 92.8~121.9 µg/mL 이었다. 20종 국산 프로폴리스 에탄올 추출물 시료의 MCF-7 세포주에 대한 IC₅₀ 값은 17.7~218.2 µg/mL 이었다. 진주(P12)와 제주(P20) 시료는 가장 높은 항증식활성을 보였으며, 이들 시료들의 항증식활성은 cisplatin과 커다란 차이를

보이지 않았다. 호주산, 브라질산 및 중국산 프로폴리스 에탄올 추출물 시료의 IC₅₀ 값은 61.7~144.8 μg/mL 이었다. A549 세포주에 대해, 20종 국산 프로폴리스 에탄올 추출물 시료의 항증식활성은 6.5~365.3 μg/mL 이었다. 안성(P1), 중주(P7), 대전(P8)과 당진(P9) (IC₅₀, 6.46~11.0 μg/mL) 시료는 가장 높은 항증식활성을 보였으며, 이들 시료들의 A549 세포주에 대한 항증식활성은 cisplatin과 커다란 차이를 보이지 않았다. 호주산, 브라질산 및 중국산 프로폴리스 에탄올 추출물 시료의 IC₅₀ 값은 152.2~452.8 μg/mL 이었다.

(6) 항rhinovirus 활성

프로폴리스 에탄올 추출물 시료의 항바이러스 활성을 SRB 검정법을 이용하여 항바이러스 제인 ribavirin과 비교하였다(자료 생략). 브라질산 프로폴리스 에탄올 추출물 시료는 HRV-2 (IC₅₀, 12.6 μg/mL) and HRV-4 (IC₅₀, 15.4 μg/mL)에 대하여 ribavirin보다 각각 5.9 와 5.1배 높은 항rhinovirus 활성을 보였다. 나머지 22종 프로폴리스 에탄올 추출물 시료의 두 종 rhinovirus에 대한 IC₅₀은 >100 μg/mL 이었다.

표 18. Antiproliferative activity of 20 Korean, Australian, Brazilian, Chinese propolis ethanol extracts and a commercial anticancer agents cisplatin toward three cancer cell lines

Sample	IC ₅₀ , µg/mL					
	PC-3 cell		MCF-7 cell		A549 cell	
	IC ₅₀ , µg/mL (95% CL)	Slope ± SE	IC ₅₀ , µg/mL (95% CL)	Slope ± SE	IC ₅₀ , µg/mL (95% CL)	Slope ± SE
P1	54.0 (44.6 - 65.4)	0.7 ± 0.07	58.0 (50.6 - 66.4)	1.5 ± 0.14	6.5 (4.4 - 9.5)	0.8 ± 0.10
P2	15.9 (13.7 - 18.4)	1.2 ± 0.10	38.6 (33.6 - 44.3)	2.5 ± 0.35	20.2 (17.1 - 23.8)	0.7 ± 0.05
P3	49.8 (42.1 - 59.0)	0.9 ± 0.08	87.9 (71.0 - 108.8)	1.0 ± 0.13	164.5 (141.6 - 191.2)	0.7 ± 0.05
P4	69.7 (62.8 - 77.3)	0.9 ± 0.05	218.2 (184.9 - 257.4)	1.4 ± 0.14	61.1 (49.1 - 76.1)	0.9 ± 0.09
P5	44.2 (37.0 - 53.0)	1.1 ± 0.11	134.2 (106.1 - 169.6)	1.1 ± 0.14	40.9 (33.6 - 49.8)	0.9 ± 0.08
P6	58.2 (49.5 - 68.5)	1.1 ± 0.10	56.4 (49.7 - 64.0)	2.0 ± 0.22	16.3 (12.5-21.2)	0.9 ± 0.11
P7	29.9 (24.3 - 36.8)	1.2 ± 0.13	31.1 (28.2 - 34.4)	1.5 ± 0.09	9.8 (7.4 - 13.1)	0.7 ± 0.07
P8	59.6 (47.3 - 75.0)	1.1 ± 0.14	78.8 (73.6 - 84.4)	4.4 ± 0.42	11.0 (8.5 - 14.2)	0.7 ± 0.08
P9	77.9 (68.3 - 88.8)	0.9 ± 0.07	47.7 (41.8 - 54.4)	1.8 ± 0.19	9.9 (8.0 - 12.2)	1.0 ± 0.12
P10	228.8 (189.5 - 276.3)	0.7 ± 0.06	109.5 (90.2 - 132.9)	1.2 ± 0.15	365.3 (298.5 - 447.1)	1.2 ± 0.15
P11	44.0 (35.1 - 55.1)	1.4 ± 0.19	98.3 (82.6 - 116.9)	1.3 ± 0.15	65.3 (61.1-69.8)	4.6 ± 0.91
P12	36.7 (29.5 - 45.6)	1.1 ± 0.14	17.7 (15.5 - 20.2)	2.0 ± 0.23	70.7 (57.9 - 86.3)	0.5 ± 0.05
P13	106.6 (90.9 - 125.0)	0.7 ± 0.05	75.9 (68.3 - 84.5)	1.2 ± 0.08	262.1 (225.9 - 304.2)	1.2 ± 0.11
P14	75.3 (68.9 - 82.3)	1.4 ± 0.21	26.0 (22.8 - 29.6)	4.5 ± 1.17	176.1 (143.5 - 215.9)	1.2 ± 0.14
P15	70.2 (56.8 - 86.9)	0.7 ± 0.06	104.1 (91.3 - 118.7)	0.8 ± 0.05	73.5 (60.6-89.1)	5.9 ± 2.76
P16	331.5 (266.7 - 412.2)	0.6 ± 0.05	79.2 (70.8 - 88.6)	1.9 ± 0.02	127.1 (103.4 - 156.3)	1.0 ± 0.12
P17	331.6 (279.8 - 392.9)	0.8 ± 0.06	98.1 (81.3 - 118.3)	1.3 ± 0.02	86.7 (73.4 - 102.4)	2.2 ± 0.35
P18	76.4 (66.3 - 88.0)	1.0 ± 0.07	145.1(122.6 - 171.8)	1.2 ± 0.01	115.0 (97.6 - 135.6)	2.3 ± 0.37
P19	161.0 (131.4 - 197.1)	0.5 ± 0.03	49.8 (48.0 - 51.8)	3.9 ± 0.23	64.9 (54.1 - 78.0)	0.7 ± 0.07
P20	17.1 (13.9 - 21.1)	1.0 ± 0.11	19.8 (17.6 - 22.3)	2.2 ± 0.28	43.8 (38.8 - 49.3)	2.7 ± 0.39
AU	92.8 (78.5 - 109.7)	2.0 ± 0.29	144.8 (134.3 - 156.1)	3.2 ± 0.32	152.2 (126.3 - 183.3)	1.9 ± 0.30
BA	105.2 (96.8 - 114.3)	2.1 ± 0.16	61.7 (54.7 - 69.7)	1.8 ± 0.16	330.2 (287.7 - 379.1)	4.9 ± 0.89
CN	121.9 (115.1 - 129.1)	1.5 ± 0.06	122.5 (108.1 - 138.7)	1.7±0.15	452.8 (361.8 - 566.5)	1.1 ± 0.13
CPN	61.5 (50.9 - 74.4)	1.1 ± 0.11	17.6 (15.3 - 20.3)	1.5 ± 0.15	6.2 (4.6 - 8.5)	1.0 ± 0.14

AU, Australian; BA, Brazilian; CN, Chinese; CPN, cisplatin.

(7) 장내세균에 대한 생육억제효과

프로폴리스 에탄올 추출물 시료의 5종 유해세균 및 2종 비병원성 세균뿐만 아니라 6종 유산균 및 1종 산성 세균에 대한 생육저해효과를 현재 사용되고 있는 항생제 ciprofloxacin과 비교하였다(표 19). 생육저해 반응은 실험세균의 종류 및 실험 프로폴리스에 따라 달리 나타났다. MIC 값에 근거하여, 괴산(P6), 당진(P9) 및 울진(P11) 시료는 *C. difficile* ATCC 9689에 대하여 강한 생육저해활성을 보였으나, 이들 시료들의 생육저해활성을 ciprofloxacin보다 낮았다. 진주(P12), 당진(P9) 및 광주(P19) 시료들의 MIC는 *C. paraputiricum* ATCC 25780, *C. perfringens* ATCC 13124과 *S. enterica* serovar *Typhimurium* ATCC 13311에 대하여

각각 1.84, 14.7과 14.7 mg/mL 이었다(ciprofloxacin의 MIC, 0.062, 0.031 및 0.125 mg/mL). *B. fragilis* ATCC 25285에 대하여, 대전(P8), 진주(P12)와 제주(P19) 시료들의 MIC는 각각 3.7, 1.84과 1.84 mg/mL 이었다(ciprofloxacin의 MIC, 0.062 mg/mL). 당진(P9), 진주(P12), 고창(P14) 및 제주(P19) 시료들의 *E. coli* ATCC 11775에 대한 MIC는 1.84 mg/mL 이었다(ciprofloxacin의 MIC, 0.062 mg/mL). 대전(P8)과 제주(P19) 시료들의 *B. bifidum* ATCC 29521와 *B. longum* ATCC 15707에 대한 MIC는 14.7 mg/mL 이었다(ciprofloxacin의 MIC, 0.016과 0.031 mg/mL). 진주(P12)와 제주(P19) 시료들의 *B. infantis* ATCC 25962에 대한 MIC는 14.7 mg/mL 이었으며, *C. butyricum* ATCC 25779에 대한 MIC는 각각 14.7과 7.4 mg/mL 이었다(ciprofloxacin의 MIC, 0.031 mg/mL). 나머지 프로폴리스 에탄올 추출물 시료들은 모든 실험세균에 대하여 효과를 보이지 않았다(MIC, >30 mg/mL).

(8) 상관관계

상관계수 (r) 분석을 통해, 총폴리페놀 함량과 DPPH 자유라디칼 소거활성은 부의 상관관계($r = -0.872$)를 보였으며, 총플라보노이드 함량과는 상관관계를 보이지 않았다 ($r = 0.071$) (표 20). BACE-1 저해, AChE 저해 또는 항증식활성과 총폴리페놀 함량또는 총플라보노이드 함량과는 직접적인 상관관계를 보이지 않았다.

표 19. Minimal inhibitory concentrations (MICs) of Korean propolis ethanol extracts and commercial antibiotic ciprofloxacin toward four harmful and two nonpathogenic intestinal bacteria

Test bacteria	No. active propolis	Propolis sample ^a (MIC,mg/mL)
<i>C. difficile</i> ATCC 9689 ^b	3	P6 (1.84), P9 (1.84), P11 (1.84), CF ^d (0.031)
<i>C. paraputrificum</i> ATCC 25780 ^b	1	P12 (1.84), CF ^d (0.062)
<i>C. perfringens</i> ATCC 13124 ^b	1	P9 (14.7), CF ^d (0.031)
<i>S. aureus</i> ATCC 12600 ^b	0	CF ^d (0.031)
<i>B. fragilis</i> ATCC 25285 ^c	3	P8 (3.7), P12 (1.84), P19 (1.84), CF ^d (0.062)
<i>E. coli</i> ATCC 11775 ^c	4	P9 (1.84), P12 (1.84), P14 (1.84), P19 (1.84), CF ^d (0.062)
<i>S. enterica Typhimurium</i> ATCC 13311 ^c	1	P19 (14.7), CF ^d (0.125)
<i>B. bifidum</i> ATCC 29521 ^b	1	P8 (14.7), CF ^d (0.016)
<i>B. infantis</i> ATCC 25962 ^b	2	P12 (14.7), P19 (14.7), CF ^d (0.031)
<i>B. breve</i> ATCC 15700 ^b	0	CF ^d (0.031)
<i>B. longum</i> ATCC 15707 ^b	1	P19 (14.7), CF ^d (0.031)
<i>L. acidophilus</i> ATCC 4356 ^b	0	CF ^d (0.062)
<i>L. casei</i> ATCC 393 ^b	0	CF ^d (0.031)
<i>C. butyricum</i> ATCC 25779 ^b	2	P12 (14.7), P19 (7.4), CF ^d (0.031)

^a The other Korean propolis samples and three foreign (Australian, Brazilian, and Chinese) samples were ineffective (MIC, >30 mg/mL).

^b Gram-positive bacteria.

^c Gram-negative bacteria.

^d Ciprofloxacin.

표 20. Pearson correlation coefficients for total polyphenol or flavonoid content and biological activities

Activity	Correlation coefficient (r)		
	Total	polyphenol	Total flavonoid
BACE-1 inhibition	- 0.337		- 0.194
Acetylcholinesterase inhibition	0.056		- 0.413
DPPH free radical scavenging activity	- 0.872		0.071
Antiproliferative activity			
PC-3	0.263		- 0.076
MCF-7	0.386		- 0.301
A549	0.453		- 0.078

(9) 프로폴리스 화합물의 BACE-1 억제활성

기존에 알려진 프로폴리스 14종 화합물을 1 mg/mL로 처리하였을 때의 BACE-1 억제활성을 같은 방법으로 조사한 결과(표 21), isorhamnetin만 75% 저해활성을 보였으나, 기타 13종 화합물의 저해활성은 40% 미만 이었다.

Acacetin 구조와 관련이 있는 8종 플라보노이드 화합물들의 BACE-1대한 IC₅₀ 값을 BACE-1 저해제 IV와 비교하였다(표 22). Luteolin의 IC₅₀ 값이 3.11 μM로서 가장 저해활성이 높았다.

표 21. Inhibitory acticity of compouds in propolis toward human BACE-1

Compound	Inhibition (%) (\pm SE)
	(1 mg/mL)
p-Anisic acid	23.2 \pm 1.11
Anisic acid	17.0 \pm 1.46
Ferulic acid	12.9 \pm 1.60
Benoic acid	2.9 \pm 1.18
Protocatechuic acid (old)	6.1 \pm 3.04
caffeic acid	35.1 \pm 0.66
(\pm)-Naringenin	31.2 \pm 2.4
Isorhamnetin	74.5 \pm 0.94
trans-Cinnamic acid	19.2 \pm 4.86
Pinostrobin	40.3 \pm 3.84
Sakuranetin	39.5 \pm 3.97
Gallic acid	2.5 \pm 0.77
Salicylic acid	0
Vanillic acid	0
Inhibitor IV (2 μM)	99.5 \pm 0.03

표 22. Human BACE-1 inhibitory of test compounds and BACE-1 Inhibitor IV

Flavonoids	Compound	IC ₅₀ , μM (95% CL)	Slope ± SE	χ^2 ^a	P-value
Flavonone	Natural acacetin	124 (109–142)	0.70 ± 0.04	3.808	0.9766
	Pure acacetin	114 (98–132)	0.80 ± 0.04	4.563	0.9776
	Luteolin	3.11 (2.43–3.99)	0.4 ± 0.03	2.453	0.9652
	Chrysin	277 (197.6–388.7)	1.5 ± 0.26	7.458	0.9704
	Baicalein	>2000			
	Flavone	>2000			
Flavonol	Kaempferol	462 (382.3–559.2)	1.7 ± 0.24	7.434	0.9657
	Galangin	577 (549–607)	2.7 ± 0.19	3.017	0.9923
	Fisetin	>2000			
Flavonoid glycoside	Linarin	929 (855–1011)	1.5 ± 0.09	3.611	0.9799
	BACE-1 Peptide inhibitor IV	0.085 (0.075–0.095)	1.2 ± 0.07	3.252	0.9927

^a Pearson's chi-square goodness-of-fit test.

라. 고찰

프로폴리스는 다양한 폐놀, 주로 플라보노이드, 폐놀산 및 에스테르 등의 화합물을 함유하고 있다. 프로폴리스의 생물학적 특성은 플라보노이드와 기타 다른 폐놀 화합물에 들어 있는 폐농 조성과 관련되어 있다. 플라보노이드 함량은 꿀벌에 의해 수집된 식물체에 따라 다르다. 플라보노이드의 항산화·간 보호·항균·항염증·항암 등의 광범위한 생물학적 활성을 Nijveldt 등 (2001) 및 Kumar와 Pandey (2013)에 상세히 기술되어 있다. 총폴리페놀(TP)과 플라보노이드(TF) 함량은, 알제리[TP, 55~279 mg/g; TF, 10~69 mg/g (Boufadi 등, 2014)], 아르헨티나[TP, 257~393 mg/g; TF, 66~133 mg/g (Lima 등, 2009)], 브라질[TP, 94~149 mg/g; TF, 6~21 mg/g (Schmidt 등, 2014)], 중국[TP, 43~302 mg/g; TF, 8~162 mg/g (Ahn 등, 2007)], 그리스와 키프로스[TP, 80~338 mg/g; TF, 9~183 mg/g (Kalogeropoulos 등, 2009)], 인도[TP, 159.10 mg/g; TF, 57.25 mg/g (Laskar 등, 2010)], 일본[TP, 53~431 mg/g; TF, 18~113 mg/g (Hamasaka 등, 2004)], 모로코[TP, 0.74~91.22 mg/g; TF, 0.20~34.27 mg/g (da Graça Miguel 등, 2014)], 폴란드[TP, 150~197 mg/g; TF, 36~62 mg/g (Socha 등, 2015)], 포르투갈[TP, 151~329 mg/g (Moreira 등, 2008)], 한국[TP, 85~283 mg/g; TF, 16~135 mg/g (Ahn 등, 2004)] 및 터키[TP, 115~210 mg/g (Aliyazicioglu 등, 2013)] 프로폴리스에서 보고되었다. 앞에서 기술한 프로폴리스의 총폴리페놀과 플라보노이드 함량은 각각 31~431 mg/g, 3~183 mg/g 이었으나, 본 연구에서는 20종 국내산 EEP 시료의 총 폴리페놀과 플라보노이드 함량은 각각 49~232 mg/g, 21~50 mg/g 이었다. 호주산·브라질산·중국산 프로폴리스 샘플과 비교하였을 때, 국내산 프로폴리스 시료들은 상당히 높은 폴리페놀 및 플라보노이드 함량을 가지고 있었다. 폐놀과 플라보노이드의 생물학적 중요성으로 인하여, 폴리페놀과 플라보노이드 함량이 높은 프로폴리스를 선택하여 제품화할 필요가 있다.

BACE-1 (Mancini 등, 2011)과 AChE (Čolović 등, 2013)는 AD관련 주요 타겟이다. 인산화된 tau단백질로 구성된 시뉴 텩글(tangle)과 β 아밀로이드 웹티드로 구성된 세포 외 아밀로이드 플라크는 AD의 두 가지 주요 신경 병리학적 특징을 갖고 있다. APP 아밀로이드 처리 경로에서 BACE-1과 γ -secretase가 순차적으로 APP 단백질 분해 처리를 하여 β -아밀로이드가 생성된다(Hardy와 Selkoe, 2002; Liebscher와 Meyer-Luehmann, 2012). BACE-1은 β -아밀로이드를 생성을 하기 때문에(Vassar, 2014) β -아밀로이드 생성을 저해하는 약물의 주요 타겟이다. 그러나, 프로폴리스의 BACE-1 억제 활성에 대한 정보는 아직 알려져 있지 않다. 브라질 프로폴리스는 인지 장애 환자에 대한 효과가 있는 것이 보고되어 있다(Zhu 등, 2014), 또한, 신경 시냅스에서 아세틸콜린의 분해에 관여하는 효소인 AChE 억제제는 인지 기능 및 정신 위축의 감소로 AD 치료를 가능하게 한다. 폐놀 및 플라보노이드는 AChE를 억제하기 때문에, 높은 폐놀 함량을 갖고 있는 프로폴리스는 AD 증상의 예방 및/또는 치료에 대한 활성을 갖고 있다(Orhan 등, 2007). 프로폴리스의 항AChE 활성은 인도[IC₅₀, 43.46 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Thirugnanasampandan 등, 2012)]와 모로코[43~743 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (da Graça Miguel 등, 2014)] 프로폴리스에서 보고되었다. 본 연구에서, 20 종 한국산 EEP 시료의 AChE 저해활성은 donepezil hydrochloride, tacrine 및 huperzine A 보다 낮았으나, IC₅₀ 값 15.6~327.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 확인되었다. 국내산 프로폴리스 시료 중에 수 좋은 호주, 브라질 및 중국 프로폴리스보다 더 높은 BACE-1 저해활성(IC₅₀, <100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)을 나타내었다. 다양한 peptidomimetics와 heterocyclic 화합물들이 BACE-1 억제제로 평가되고 있지만, 이들 중 어느 것도 성공적으로 AD 치료제로서 개발되지 않았다. 이러한 결과를 보면 국내산 프로폴리스는 항AD 제로서 상당한 가치가 있는 것으로 보인다.

Superoxide (O_2^-), hydroxyl (OH) 및 peroxyxl (OOH, ROO) 라디칼 등의 자유 라디칼 유리기를 소거하는 항산화제는 자유 라디칼에 의해 발생된 노화·심혈관 질환·류마티스 관절염·암·당뇨·신경 질환 (AD와 파킨슨병)·염증 등의 질환을 예방하는데 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Valko 등, 2007). 플라보노이드는 자유 라디칼을 소거할 수 있는 강력한 항산화제이다(Nijveldt 등, 2001; Kumar와 Pandey, 2013). 프로폴리스의 DPPH 자유 라디칼 소거 활성은, 아르헨티나[IC₅₀, 25~37.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Isla 등, 2009)], 브라질[IC₅₀, 17.13~83.60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Schmidt 등, 2014)], 알제리[IC₅₀, 19.4~>50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Boufadi 등, 2014)], 중국[IC₅₀, 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Yang 등, 2011)], 그리스[IC₅₀, 138~1557 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Lagouri 등, 2014)], 인도[IC₅₀, 70 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Laskar 등, 2010)], 모로코[IC₅₀, 8~1813 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (da Graça Miguel 등, 2014)], 포르투갈[IC₅₀, 6.22~52 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Moreira 등, 2008)] 프로폴리스에서 보고되었다. 앞에서 기술한 프로폴리스의 IC₅₀ 값은 6~1813 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 보고되었지만, 본 연구에서의 20종 국내산 EEP 시료의 IC₅₀ 값은 43~269 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 확인되었다. 일부 특정 지역의 국내산 프로폴리스 시료는 강한 항산화 활성 (IC₅₀, <100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)을 나타내었으며, 이들 시료들과 호주산 프로폴리스 시료간 활성에는 서로 크게 다르지 않았다. 본 연구 결과를 보면 국내산 프로폴리스 시료들의 활성이 아스코르브산보다 낮았지만 잠재적인 항산화제로서의 추가적인 연구가 필요하다.

프로폴리스 및 그 성분들의 여러 암 세포주에 대한 항증식활성은 Watanabe 등 (2011) 및 Chan 등 (2013)에 의해 잘 정리되어 있다. PC-3 세포주에 대한 프로폴리스의 항증식활성은 브라질[최적 용량, 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Li 등, 2007)]과 인도[IC₅₀, 41.8~134.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Shubharani 등, 2014)] 프로폴리스에서 보고되었다. MCF-7 세포주에 대한 활성은 쿠바[IC₅₀, 1~25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Popolo 등, 2009)], 인도[IC₅₀, 13 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Thirugnanasampandan 등, 2012); IC₅₀, 26.88~104

$\mu\text{g}/\text{mL}$ (Shubharani 등, 2014)], 인도네시아[IC_{50} , 47.45 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Syamsudin 등, 2010)], 자바 [IC_{50} , 37.8~276.45 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Syamsudin 등, 2009)], 몰타[IC_{50} , 67 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Zammit 등, 2013)], 포르투갈[IC_{50} , 36~182 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Calhelha 등, 2014)] 및 터키[(IC_{50} , 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Vatansever 등, 2010)] 프로폴리스에서 보고되었다. A549 세포주에 대한 활성은 쿠바[IC_{50} , 35.48~99.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Frion-Herrera 등, 2013)], 인도[IC_{50} , 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Thirugnanasampandan 등, 2012)] 및 튀니지[IC_{50} , 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Kouidhi 등, 2010)] 프로폴리스에서 보고되었다. 앞에서 기술한 프로폴리스의 PC-3, MCF-7 및 A549 세포주에 대한 항증식활성 IC_{50} 값은 각각, 41.8~134.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 1~276.45 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 10~200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이었으나, 본 연구에서 20종 국내산 EEP 시료의 PC-3, MCF-7 및 A549 세포주에 대한 IC_{50} 값은 각각 15.9~331.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 17.7~218.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 및 6.5~365.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이었다. 특정 지역의 국내산 프로폴리스 시료는 양호한 항증식활성을 나타내었으며, 호주·브라질·중국산 프로폴리스 시료보다 더 강한 활성을 나타내었다. PC-3, MCF-7 및 A549 세포주에 대한 항증식활성을 갖는 수 종 시료는 항암제인 시스플라틴과 비슷한 수준이었다. 본 연구 결과를 보면 국내산 프로폴리스는 항암제로서 더 많은 연구 가능성을 가지고 있다고 생각된다.

다양한 병원균에 대한 프로폴리스의 항균 활성이 잘 알려져 있다(Burdock, 1998; Farooqui와 Farooqui, 2010; Sforcin과 Bankova, 2011). 인간 체내에서 많은 세균(500~1000 종)들이 복잡하고 역동적인 생태계로서 존재하고 있다(Sears, 2005). 미생물의 주요 기능은 에너지 회수, 영양 흡수, 장 상피 세포에 대한 영양 효과(세포의 증식과 분화), 면역 구조와 기능, 외부 미생물 침입에 대한 기주의 보호(차단 효과)를 나타내는 대사활성들이 포함되어 있다(Guarner와 Malagelada, 2003). 미생물은 또한 다중 시스템 장기 부전, 대장 암, 염증성 장 질환을 포함하는 특정 병리학적 질환에 필수적인 요소가 될 수 있다(Guarner와 Malagelada, 2003). 또한, 항생제 장기간의 치료는 종종 병원성 미생물의 약물에 대한 저항성이 발생하기도 하면서 항생제는 선진국과 개발도상국 모두에 세계적인 주요 보건 문제가 되고 있다(Guilfoile와 Alcamo, 2007). 때때로 미각 장애·구토·설사·소화 불량·두통·혈관 부종뿐 만 아니라 인간의 위장 장애 등 항생제의 심각한 부작용이 발생한다(Dunn 등, 1997; Guilfoile와 Alcamo, 2007). 따라서, 새로운 작용기작과 낮은 독성을 가진 새로운 항생제 개발이가 절실히 요구되고 있다. 아르헨티나(Moreno 등, 1999), 프랑스(Davey와 Grange, 1990) 및 그리스와 키프로스(Kalogeropoulos 등, 2009) 프로폴리스 시료는 그람양성세균에 대해 효과적이라고 보고되고 있다. 불가리아 EEP는 그람양성균(30종에 29 균주)과 그람음성균 (44종에 40균주)에 대해 각각 97%와 91% 억제한다고 보고되었다(Boyanova 등, 2006).

본 연구에서, 장내세균 그룹 중 ciprofloxacin의 감수성에 크게 차이가 보이지 않았으나, 그람양성균과 그람음성균을 조사한 결과를 보면 EEP 시료에 대한 항균 감수성의 상이한 정도를 관찰하여. EEP 시료 괴산(P6), 당진(P9) 및 울진(P11)과 진주(P12)는 각각 병원성 그람양성세균 *C. difficile* ATCC 9689와 *C. paraputiricum* ATCC 25780의 생육저해활성을 나타내었다. EEP 시료 대전(P8)과 당진(P9) 및 고창(P14)은 각각 비병원성 그람음성세균 *B. fragilis* ATCC 25285와 *E. coli* ATCC 11775에 대해 생육저해활성을 나타냈고, EEP 시료 진주(P12)와 제주(P19)는 모두 그람음성세균에 대해 생육저해활성을 보였다. 그러나, 호주·브라질·중국산 프로폴리스 시료들은 다섯 유해 세균과 두 비병원성 박테리아에 대한 생육저해효과를 나타내지 않았다. 불가리아산 EEP는 클로스트리디움 균주의 35%(20종에 7종 균주) 및 *B. fragilis* 그룹 균주의 82%(11종에 9종 균주)를 억제한다는 결과가 있다(Boyanova 등, 2006).

브라질, 불가리아산 EEP 시료는 *E. coli* MU 8, MU 11 및 MU 23를 억제하지만(Ugur 등, 2000), 아르헨티나산 EEP 시료는 *E. coli* ATCC 25922에 대한 생육저해활성을 나타내지 않았다(Moreno 등, 1999). 흥미롭게도, 6개의 유산균은 국내산 EEP 시료에 대해 유해 또는 비병원성 세균보다 덜 민감하였다. 본 연구 결과에서 보면, 활성 있는 국내산 프로폴리스 추출물의 낮은 농도를 선택적으로 병원성 세균의 증식을 억제하는 것을 목표로 발효 또는 비발효 제품 및 음료 제품에 사용될 수 있다.

생물학적 활성과 폐놀 화합물 함량 간의 상관관계에 관한 연구가 많이 진행되고 있다. 폐놀과 플라보노이드의 총 함량과 자유 라디칼 소거 활성 사이의 높은 상관관계에 대하여 아르헨티나(Isla 등, 2009), 그리스와 키프로스(Kalogeropoulos 등, 2009), 일본(Hamasaka 등, 2004) 및 폴란드(Socha 등, 2015) 프로폴리스에서 보고되었고, 네가티브 상관관계는 모로코 프로폴리스에서(da Graça Miguel 등, 2014), 그리고 직접적인 상관관계가 없다는 것이 브라질 프로폴리스(da Silva 등, 2006) 및 그리스 프로폴리스(Lagouri 등, 2014)에서 보고되었다. AChE 저해활성의 경우, 총폐놀과 플라보노이드 함량 및 IC₅₀ 값 사이의 부정적인 상관관계가 모로코산 프로폴리스 시료(da Graça Miguel 등, 2014)에서 보고되었다. MCF-7 세포주에 대한 항증식활성의 경우, 총폴리페놀 함량과 IC₅₀ 사이에 네가티브 상관관계가 보고된 반면에, 총플라보노이드 함량과 IC₅₀ 사이의 포지티브 상관관계가 보고된 바 있다(Calhelha 등, 2014). 장내미생물 생육저해활성의 경우, 스페인산 프로폴리스에서 총폐놀과 플라보노이드 함량 및 MIC 사이의 강한 상관관계를 나타낸 반면에(Bonheví와 Gutiérrez, 2012), 브라질 프로폴리스(da Silva 등, 2006) 그리고 그리스와 키프로스산 프로폴리스(Kalogeropoulos 등, 2009)에서는 직접적인 관계가 없다고 보고되었다. 본 연구에서, 상관계수(r) 분석을 통해 총폴리페놀 함량 및 DPPH 자유 라디칼 IC₅₀ 값이 사이에 상관관계를 보이지 않았으며(r = 0.071), 총 플라보노이드 함량과는 네가티브상관을 보였다(r = -0.872) (표 3.12). 한국산 EEP 시료와 BACE-1 저해, AChE 저해 또는 암세포주에 대한 항증식활성 및 총폴리페놀 또는 총플라보노이드 함량 사이에 직접적인 상관관계가 발견되지 않았다.

인간에게 프로폴리스를 투여하면 부작용을 유발하지 않기 때문에(Watanabe 등, 2011), 국내산 프로폴리스는 활성산소, 신경 퇴행성 원인 또는 병원성 세균이 관여하는 각종 질병을 예방하기 위해 음식과 음료에 사용하면 도움이 될 수 있다. 프로폴리스를 상품으로 개발하기 위해서는, 인간에 대한 안전성뿐 만 아니라, 이들 상품을 인간이 섭식하였을 때 약리활성을 발휘하는지에 관한 추가 연구를 필요로 한다. 프로폴리스는 알레르기 유발물질로서 작용한다는 것이 임상적으로는 확인되었지만, 프로폴리스를 2주 동안 마우스에 4000 mg/kg/day로 경구 투여한 결과 독성이 없는 것으로 보고된 바 있다(Burdock, 1998). 마지막으로, 프로폴리스를 최종 상업 개발을 위한 생물학적 효능 및 안정성에 관련된 보다 상세한 시험이 필요하다.

3. 충북 충주산 프로폴리스의 BACE-1 억제활성

가. 머릿말

알츠하이머 질환은 선진국과 개발도상국에서 초기 노인성치매와 관련된 가장 일반적인 병으로, 2006년 26,600,000 명이며, 2050년 106,800,000 명까지 증가할 것으로 예상되고 있다. β 아밀로이드(β amyloid) ($A\beta$) 웨პ티드의 축적과 침전이 특징인 AD는 뇌의 치명적인 신경 퇴행성 질환이다. 아밀로이드 작용 경로 중에서 $A\beta$ 웨პ티드는 두 효소 β -세크레타제(β -secretase) (β -site APP cleaving enzyme 또는 BACE-1)와 γ -세크레타제 (γ -secretase)에

의해 아밀로이드 전구체 단백질 (amyloid precursor protein, APP)의 순차적인 단백질 가수분해 후에 생성된다. BACE-1은 AD의 예방 및 치료를 위한 중요한 타겟이기 때문에 충북 충주산 프로폴리스의 추출 및 분리 화합물의 BACE-1 저해활성을 조사하였다.

나. 재료 및 방법

(1) 추출

충북 충주산 프로폴리스 시료를 삼각플라스크에 넣어 시료무게의 약 5배 정도의 75% 에탄올을 혼합하여 잘 섞은 뒤 암 조건 하에서 추출하였다. 추출은 각 시료당 3일 동안 3회 수행하였다. 이 추출액은 여지로 여과하였으며, 감압농축기(EYELA NAJ-160, 일본)를 사용하여 40°C에서 감압 농축하여 프로폴리스의 에탄올 추출물을 얻었다.

(2) 분리

충북충주 프로폴리스 (287 g)는 분쇄하고 실온에서 메탄올 ($3 \times 1.435 \text{ L}$)로 2 일 동안 담근 후에 추출여과 하였다. 이들 여과액을 합쳐서 40°C에서 진공 농축, 암황적색 타르 약 120 g을 얻었다. 생물검정을 위해, 추출물(80 g)을 순차 헥산(1.82 g), 클로로포름(65.57 g), 에틸아세테이트(7.97 g), 부탄올(0.74 g) 및 수용성(3.90 g) 획분으로 분획하였다(그림 105). 유기 용매 획분은 40°C에서 감압농축하였으며, 수용성 부분은 동결 건조시켰다. 활성 물질을 분리하기 위해, 충북충주 프로폴리스 유래 물질을 FRET 효소분석법으로 시험하였다.

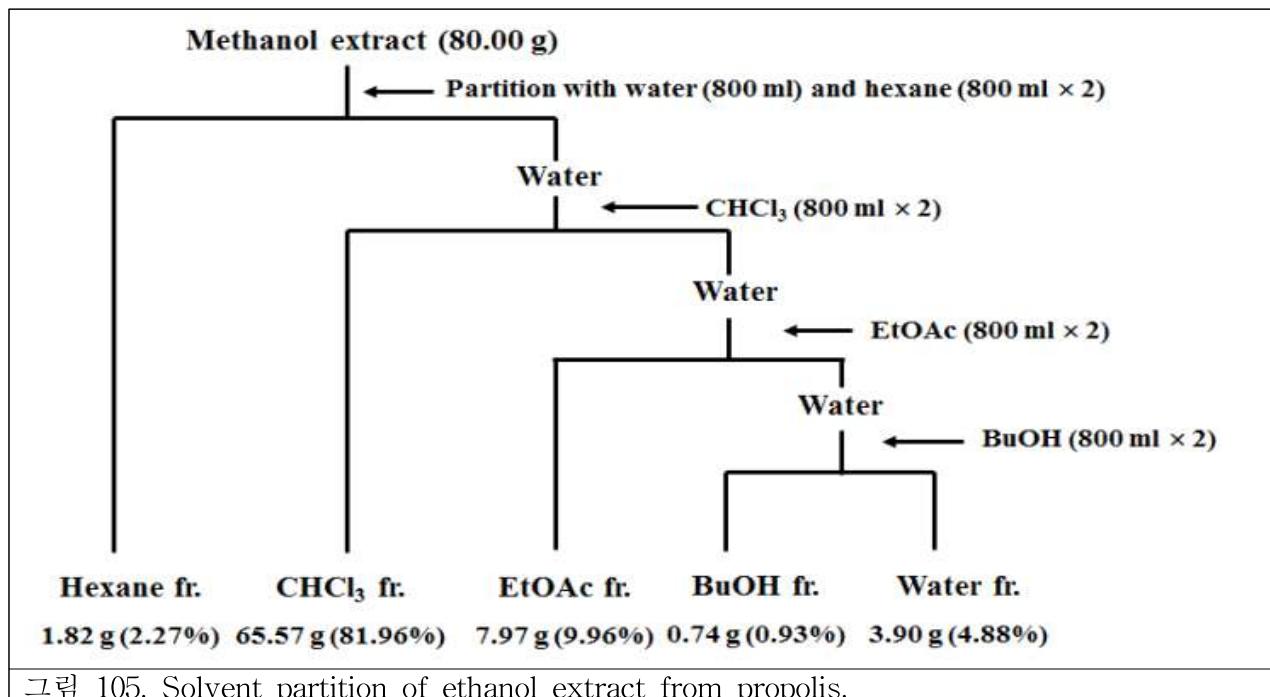


그림 105. Solvent partition of ethanol extract from propolis.

활성이 좋은 클로로포름 획분(표 23) 50 g을, 254 nm에서 UV 검출기 및 칼럼 용량이 132 mL인 컬럼 카트리지 SNAP (340g 실리카겔) Biotage Isolera 장치를 사용하여 중압액체크로마토그라피를 실시하였다(그림 106). 분리에 사용한 용매는 클로로포름과 메탄올 유속 50 mL/min로 분획하였다(각 180 mL). 실리카겔 플레이트에서 클로로포름과 메탄올 (95:5, v/v)을 이동상으로 하여 칼럼 분획물을 확인하였다. TLC 플레이트에 유사한 R_f 값을 가진 획분을 합쳤으며, 총 6개 획분을 얻었다. 활성을 보이는 C2, C3 및 C4 획분을 메탄올에 의한 재결정방법, 중압액체크로마토그라피, Glass-TLC 및 고속액체크로마토그라피를 통해서 화합물 1~7까지 총 7개 화합물을 얻었다.

표 23. *In vitro* human BACE-1 inhibitory activity of each fraction obtained from the solvent partitioning of the methanol extract of Chungju propolis using a fluorescence resonance energy transfer-based enzyme assay

Sample	Weight/g	IC ₅₀ , µg/mL (95%CL)	Slope ± SE	x ^{2a}	P-value
Hexane-soluble fraction	1.82	22.23	1.1 ± 0.12	6.58	0.9389
CHCl ₃ -soluble fraction	66.57	33.76	1.2 ± 0.11	4.67	0.9677
EtOAc-soluble fraction	7.97	51.87	1.1 ± 0.11	6.71	0.9561
BuOH-soluble fraction	0.74	>500			
Water-soluble fraction	3.90	N.D.			

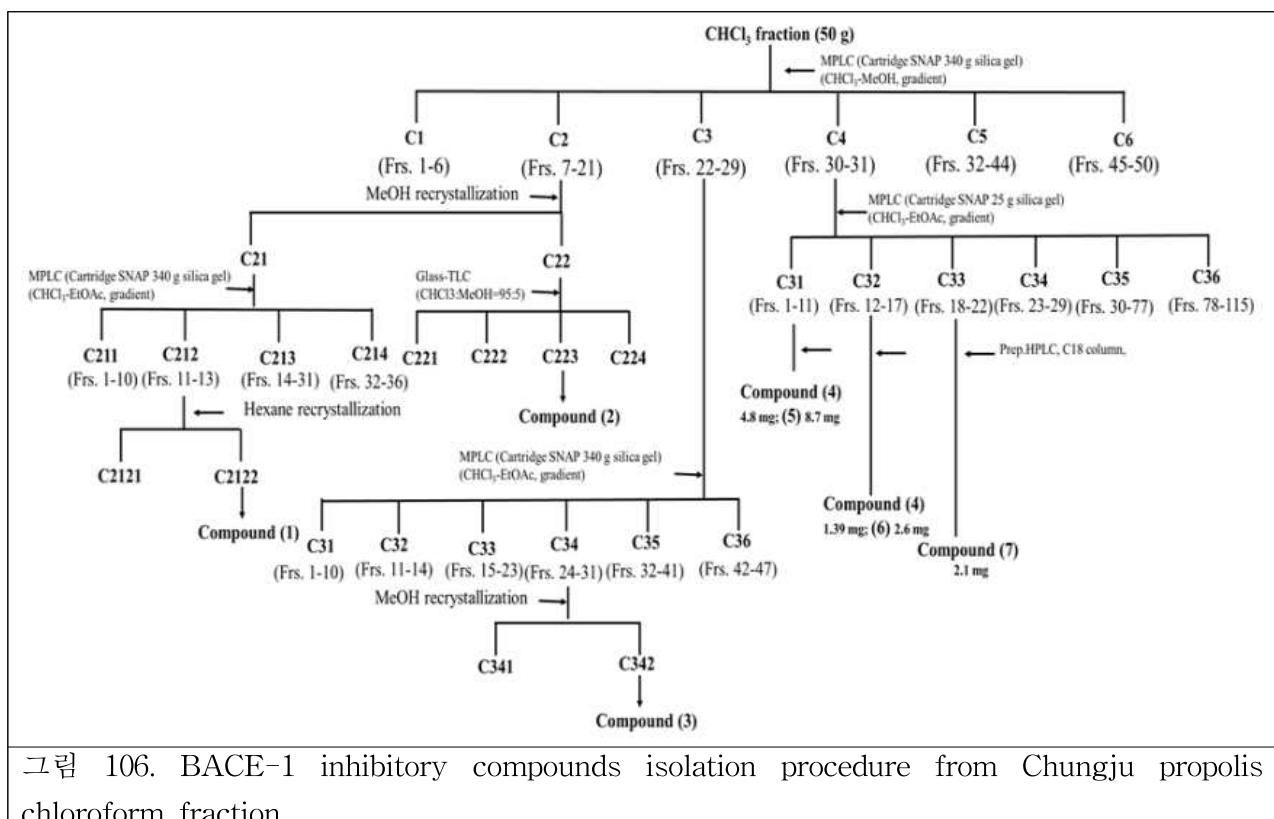


그림 106. BACE-1 inhibitory compounds isolation procedure from Chungju propolis chloroform fraction.

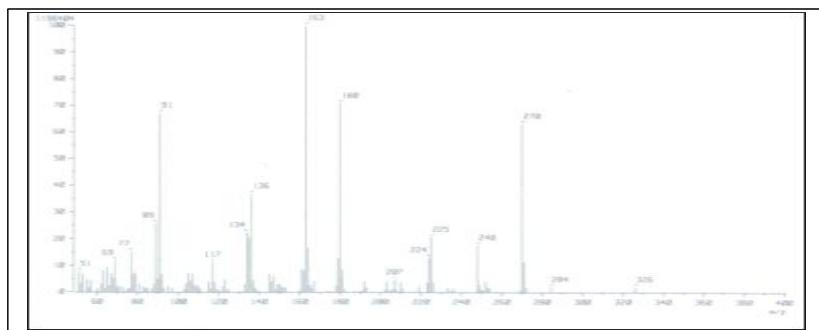
다. 결과 및 고찰

충북 충주산 프로폴리스 에탄올 추출물의 용매 분획으로부터 얻어진 희분들의 인간 BACE-1에 대한 저해활성을 FRET 효소검정법을 이용하여 조사하였다(표 24). 희분들 간에 저해활성에 현저한 차이를 보였으며, 다음 정제 단계를 위하여 피크 활성희분을 동정에 이용하였다. IC₅₀ 값을 기준으로, 헥산층과 클로로포름층이 가장 좋은 저해활성을 보였으며, 부탄올층과 물층은 억제활성을 보이지 않았다.

충주산 프로폴리스를 FRET 효소 검정법을 이용하여 분획하였을 때, 질량분석법 및 핵자기 공명분광법 등의 분광분석에 의해 7개 활성 화합물을 분리하였다.

화합물 1의 EI-MS, ¹H NMR 및 ¹³C NMR 데이터를 각각 그림 107, 그림 108 및 그림 109에 나타내었다. 화합물 2의 EI-MS, ¹H NMR 및 ¹³C NMR 데이터를 각각 그림 110, 그림 111 및 그림 112에 나타내었다. 화합물 3의 ¹H NMR 및 ¹³C NMR 데이터를 각각 그림 113과

그림 114에 나타내었다. 화합물 4의 ^1H NMR 및 ^{13}C NMR 데이터를 각각 그림 115과 그림 116에 나타내었다. 화합물 5의 ^1H NMR 및 ^{13}C NMR 데이터를 각각 그림 117과 그림 118에 나타내었다. 화합물 6의 ^1H NMR 및 ^{13}C NMR 데이터를 각각 그림 119과 그림 120에 나타내었다. 화합물 7의 ^1H NMR 및 ^{13}C NMR 데이터를 각각 그림 121과 그림 122에 나타내었다.



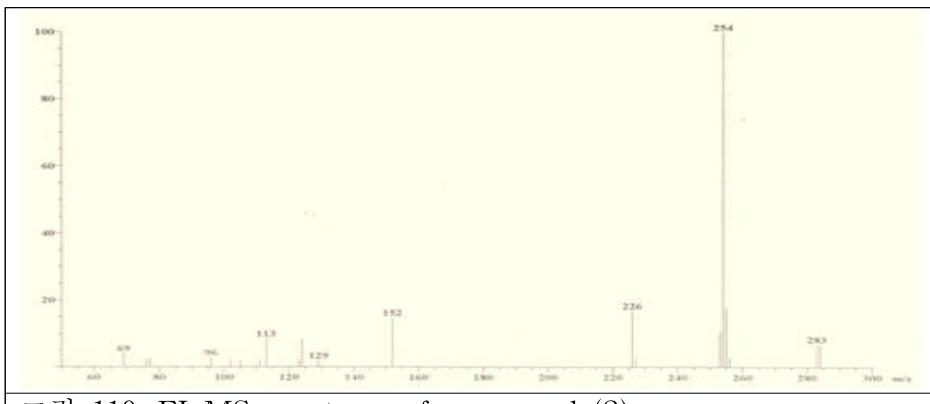


그림 110. EI-MS spectrum of compound (2).

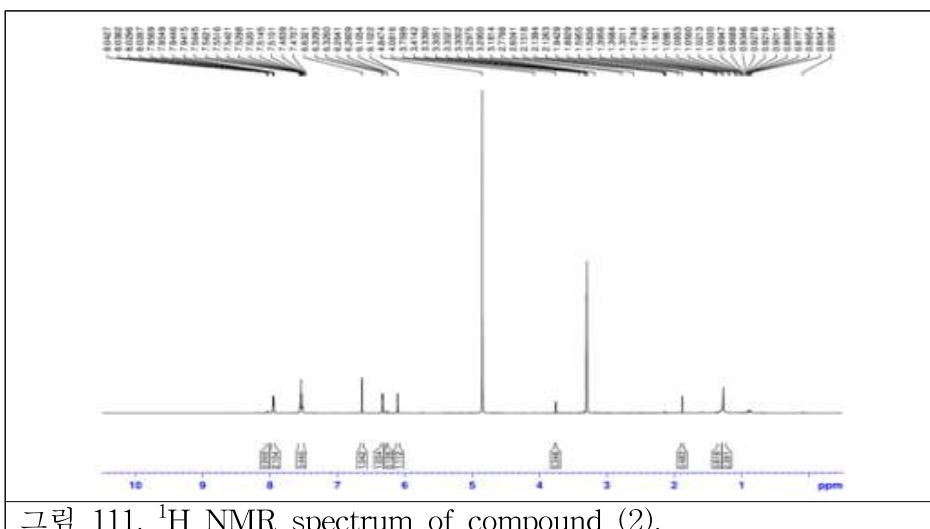


그림 111. ^1H NMR spectrum of compound (2).

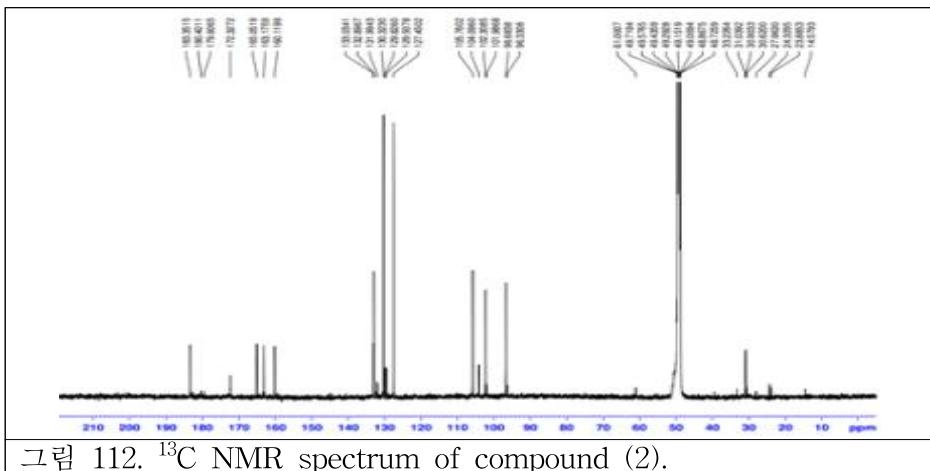
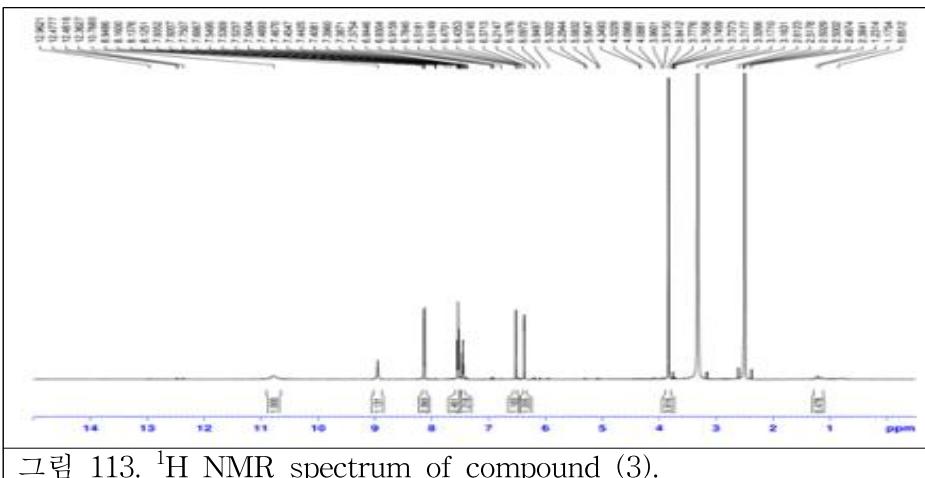


그림 112. ^{13}C NMR spectrum of compound (2).



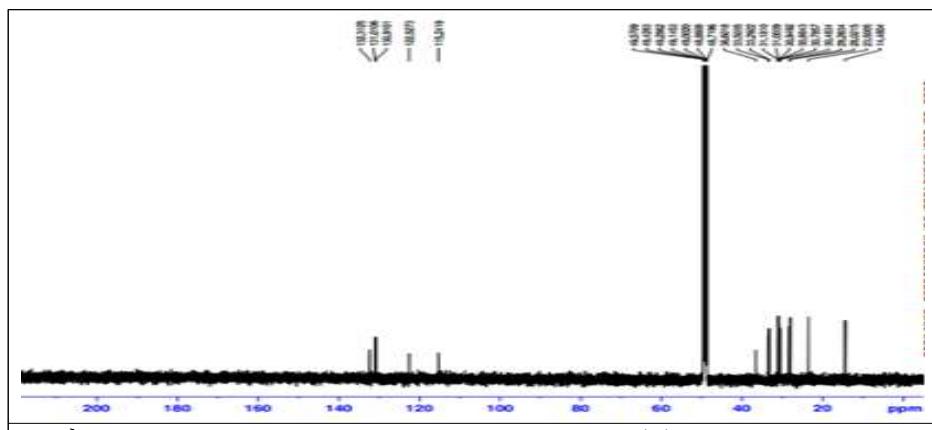


그림 116. ^{13}C NMR spectrum of compound (4).

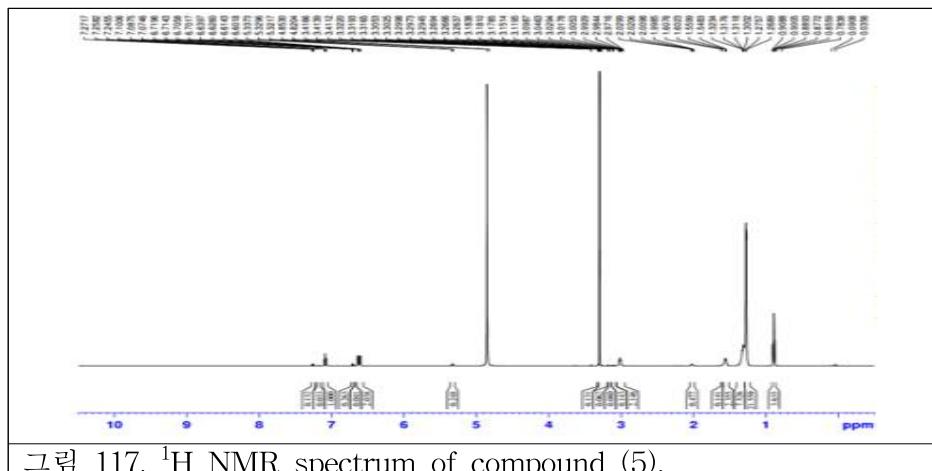


그림 117. ^1H NMR spectrum of compound (5).

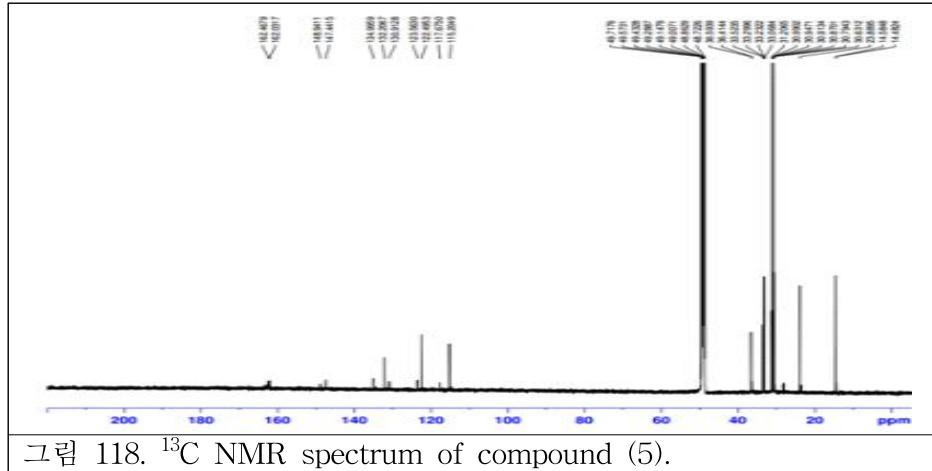
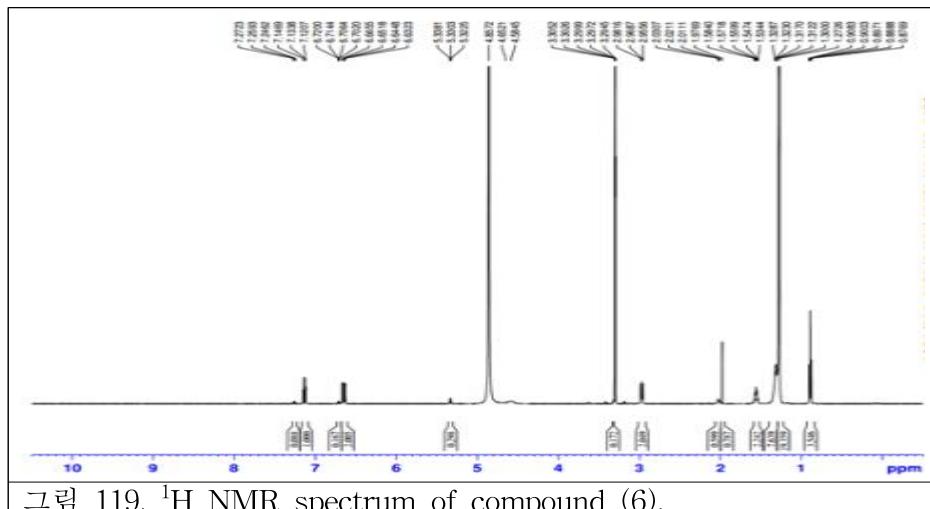
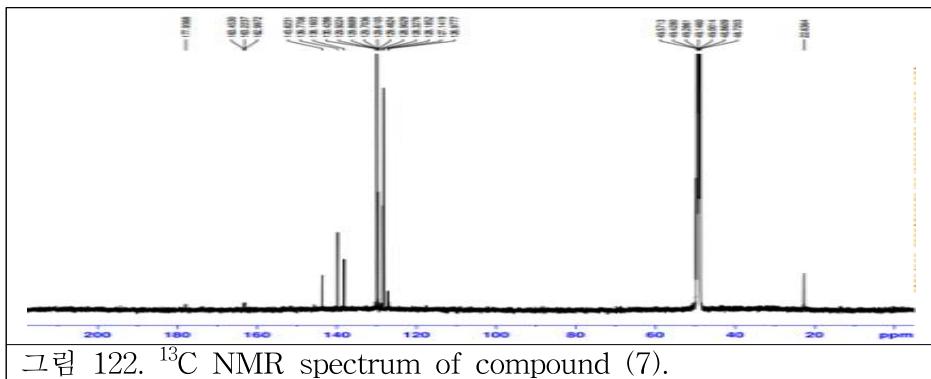


그림 118. ^{13}C NMR spectrum of compound (5).





충북 충주산 프로폴리스에서 분리된 7종 화합물의 BACE-1 저해활성을 FRET 효소 분석법으로 조사하였다(표 24). IC_{50} 값은 $3.70 \mu\text{g}/\text{mL}$ 부터 $80.72 \mu\text{g}/\text{mL}$ 이었으며, 화합물 4의 IC_{50} 값이 $3.7 \mu\text{g}/\text{mL}$ 으로서 가장 강한 저해활성을 나타내었다.

표 24. Inhibitory activity of seven isolated compounds from Chungju propolis against humam BACE-1

Compound	$\text{IC}_{50}, \mu\text{g}/\text{mL}$ (95%CL)	Slope \pm SE	χ^2	P-value
1	36.24	1.3 ± 0.08	5.013	0.9749
2	73.90	1.3 ± 0.15	6.458	0.9543
3	80.72	1.2 ± 0.13	5.858	0.9694
4	3.70	1.2 ± 0.15	7.325	0.9203
5	7.47	0.8 ± 0.04	2.996	0.9797
6	5.33	0.8 ± 0.08	6.270	0.9166
7	72.07	0.9 ± 0.06	4.738	0.9636

4. 지역에 따른 화분(pollen)의 약리활성 차이

가. 머릿말

화분은 꿀벌의 beebread를 생산하는 원료로서, 일벌은 식물 꽃밥에서 꽂가루를 수집하고 침샘이나 넥타 분비의 적은 용량의 분비물과 함께 혼합하는데, 뒷다리 경골에 위치한 화분바구니(corbiculae)라 불리는 특수 바구니에 위치하고 있다(Almeida-Muradiana 등, 2005, Komosinska-Vassev 등, 2015). 화분 덩어리는 담황색에서 흑색에 이르기까지 다양하며 (Komosinska-Vassev 등, 2015), 화분 낱알은 원통형·원형·삼각형·종모양·가시 모양 등 다양한 형태적 특징을 가지고 있다(Shubharani 등, 2013). 화분 낱알은 색·형태·크기·무게가 다른 해도, 이들 다양한 특성들은 형질유전으로서, 기후 변화나 환경요인에 영향을 받지 않는다 (Barth 등, 2010).

화분의 정확한 조성은 식물의 출처와 지리적 위치뿐만 아니라 토양의 유형, 양봉가의 활동 및 기후 조건과 같은 관련 요인과 밀접한 관계가 있다(Feás 등, 2012). 화분의 주 구성성분은 40.7%의 환원당(3.7% 자당 포함), 32.8% 단백질 (11.5% 필수 아미노산 포함), 12.8% 지질, 4.0% 생체원소, 0.19% 비타민 C, 0.07% 베타카로틴 이다(Komosinska-Vassev 등, 2015). 화

분은 영양학적 및 생물학적 성질로 인하여 전통의약 및 식품 첨가물로서 오랫동안 이용되어 왔다(Kroyer와 Hegedus. 2001). 화분은 항산화(Almaraz-Abarca 등, 2007; Lee 등, 2009; Graikou 등, 2011), 항염증(Lee 등, 2009), 항미생물(Graikou 등, 2011), 항종양(Wang 등, 2013), 정액 질 및 수정율 개선(Attia 등, 2011) 및 간 보호활성 등의 치료 효과를 구비하고 있다. 또한, 궤양, 감기나 독감을 완화시키거나 치료하는데 이용되고 있다(Hanssen, 1979). 본 연구는 국내 18개 지역에서 수집한 화분의 총폐놀 함량과 총플라보노이드 함량을 조사하였으며, 또한, 이들 화분의 항산화·항치매·항세균·항암 등의 활성을 조사하여, 중국산 화분과 비교하였다.

나. 재료 및 방법

(1) 꿀벌화분 소재 및 추출물

꿀벌 화분 수집방법은 그림 3.53에 나타내었으며, 18종 국내 꿀벌화분 시료(No. 1~18)의 수집 위치와 에탄올 추출 수율을 각각 그림 3.54와 표 3.17에 나타내었다. 꿀벌 화분(bee pollen)의 70% 에탄올 추출물(ethanol extract) (EEBP) 수율은 46.85~63.8% 이었다. 시료들은 국내 여러 지역에서 수집하였다. 중국의 꿀벌 화분 시료는 연꽃 화분(Lotus Pollen)으로서 Zhiguo Xinfudong Apiculture 사(산동, 중국)에서 구입하였다. 꿀벌 화분 시료를 실온에서 2일 동안 70% 에탄올로 추출하고 여과하였다. 여과액을 40°C에서 감압 농축 하였으며, -20°C에 보관하였다.

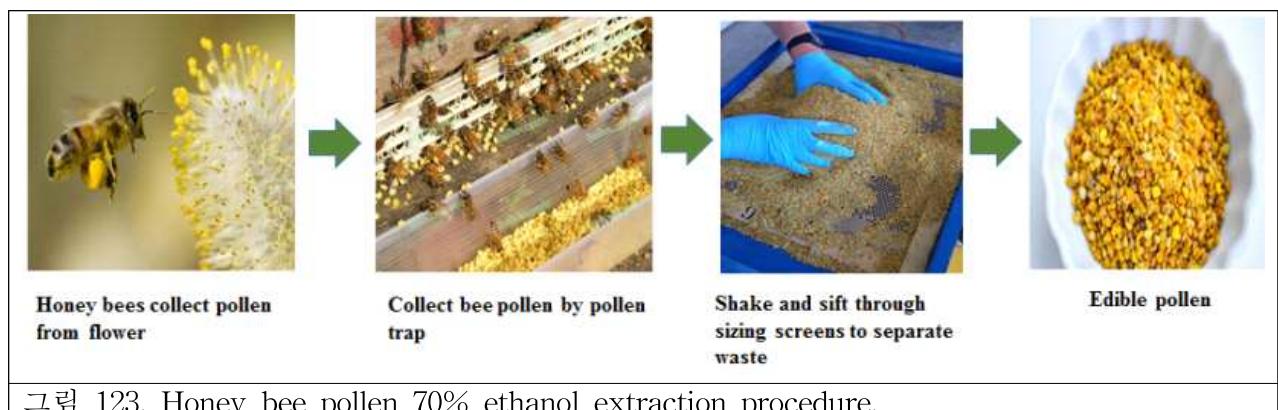


그림 123. Honey bee pollen 70% ethanol extraction procedure.



그림 124. The locations map of bee pollen collected. 18 different bee pollen collected from 16 different locations from six Provinces of South Korea.

표 25. List of 18 bee pollen samples examined from 16 different locations of South Korea and the yield of their ethanol extraction

Sample No.	Locality	Coordinates	Yield (%)
BP1	Yeoju (Gyeonggi)	37°17'52.89"N 127°38'13.79"E	56.07
BP2	Yeoju (Gyeonggi)	37°22'16.2"N 127°35'45.2"E	58.65
BP3	Yeoju (Gyeonggi)	37°22'16.2"N 127°35'45.2"E	56.48
BP4	Gapyeong (Gyeonggi)	37°49'53.55"N 127°30'35.58"E	60.44
BP5	Hwaseong (Gyeonggi)	37°11'58.18"N 126°49'52.28"E	49.20
BP6	Uiwang (Gyeonggi)	37°20'40.92"N 126°58'5.92"E	61.18
BP7	Paju (Gyeonggi)	37°45'35.53"N 126°46'48.64"E	63.83
BP8	Samcheok (Gangwon)	37°26'59.53"N 129°9'54.74"E	59.06
BP9	Yangyang (Gangwon)	38°4'31.41"N 128°37'7.86"E	62.80
BP10	Goryeong (Gyeongbuk)	35°43'34.11"N 128°15'46.63"E	58.93
BP11	Andong (Gyeongbuk)	36°34'6.08"N 128°43'45.69"E	46.85
BP12	Gunwi (Gyeongbuk)	36°14'34.25"N 128°34'21.99"E	54.73
BP13	Jeongeup (Jeonbuk)	35°34'11.59"N 126°51'21.22"E	55.74
BP14	Sancheong (Gyeongnam)	35°24'56.12"N 128°52'24.59"E	51.68
BP15	Yeosu (Jeonnam)	34°45'37.35"N 127°39'44.00"E	54.33
BP16	Jindo (Jeonnam)	34°29'12.74"N 126°15'48.55"E	55.40
BP17	Damyang (Jeonnam)	35°19'16.10"N 126°59'17.40"E	61.32
BP18	Hampyeong (Jeonnam)	35°03'57.38"N 126°30'59.59"E	58.77

(2) 꿀벌 꽂가루의 형태

Barth 등 (2010)의 방법에 따라 꿀벌 화분의 형태를 분석하였다. 화분 시료 2 g을 15 mL의 팔콘 튜브에 첨가하고 나서, 70% 에탄올과 혼합하여 13 mL로 한 다음 30 분 동안 방치하였다. 이어서 시료를 5분 동안 초음파 처리하였다. 1500 rpm에서 3분 동안 원심 분리하였으며, 얻어진 침전물을 70% 에탄올로 추출한 후 다시 초음파 처리하였다. 글리세롤 및 중류수 용액 (1 : 1, v/v) 13 mL를 침전물에 첨가하여 혼탁시킨 후 30분 동안 방치하였다. 잘 혼합하고 나서, 화분-글리세린-중류수 혼탁액 한 방울을 현미경 슬라이드 위에 놓고 슬라이드 덮개로 커버하였다. 각각의 슬라이드에 지역명을 표시하고 매니큐어로 밀봉하였다. 꿀벌 화분 슬라이드의 조제를 마친 후, 각 꿀벌 화본 알갱이 시료 슬라이드는 400 배율 현미경 하에서 분석하였다(그림 125).

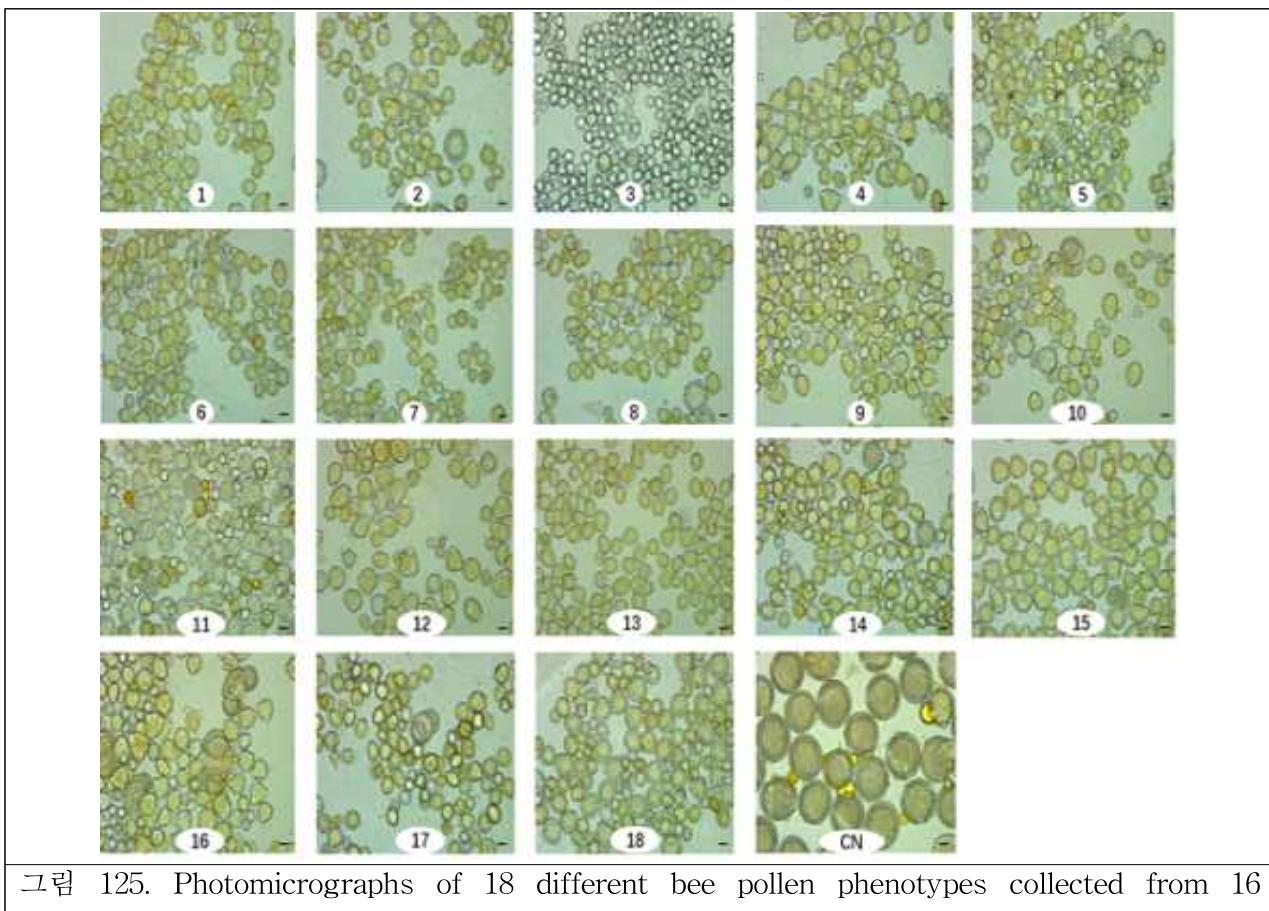


그림 125. Photomicrographs of 18 different bee pollen phenotypes collected from 16 different locations of South Korea and 1 Chinese sample. CN: China. Scale bar = 40 μm .

(3) 총폴리페놀과 플라보노이드의 함량 측정

EEBP 샘플의 총폴리페놀 함량은 Folin-Ciocalteu 방법을 사용하여 측정하였다. 0.2 N Ciocalteu Folin 시약 100 μL 와 EEBP 80% 에탄올 용액 20 μL 를 각각 96 well 플레이트에 넣고, 암 조건으로 하여 실온에서 5분 동안 배양하였다. 그 후에, 탄산나트륨 80 μL (75g/L) 을 각 웰에 첨가하였으며, 플레이트는 암 조건하에서 약한 진탕 상태로 실온에서 30분 동안 배양하였다. 흡광도는 VersaMax 마이크로플레이트 판독기를 사용하여 735 nm에서 측정하였다. EEBPs는 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 최종 농도로 평가하였다. 갈산(0~62.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)을 표준품으로 사용하였으며, 보정식은 $Y = 0.2265X + 0.0888$ ($R^2 = 0.9950$)로 측정되었다. X는 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 갈산 농도이고, Y는 735 nm에서 흡광도이다. 총폴리페놀 함량은 EEBP 시료 g 당 갈산 당량

(GAE) mg으로 표현 하였다.

EEBP 시료의 총플라보노이드 함량을 96 웰 플레이트에서 AlCl₃ 비색법(Zongo 등, 2010)을 사용하여 측정하였다. 2%의 AlCl₃ 100 μL와 75% 에탄올 EEBP 용액 100 μL를 각각 96 웰 플레이트에 넣고, 암 조건 하에서 실온에서 15분 동안 배양하였다. 흡광도는 VersaMax 마이크로 플레이트 판독기를 사용하여 435 nm에서 측정하였다. EEBPs는 100 μg/mL의 최종 농도로 평가하였다. 케르세틴(0~50 μg/mL)을 표준품으로 사용하였으며, 보정식은 Y = 0.1774X + 0.0433 ($R^2 = 0.9996$)로 측정되었다. X는 μg/mL 케르세틴 농도이고, Y는 435 nm에서의 흡광도이다. 총플라보노이드 함량은 EEBP 시료 g 당 케르세틴 당량 (QE) mg으로 나타내었다.

(4) 형광공명에너지전달 (FRET) 효소분석법

모든 EEBP 샘플의 BACE-1에 대한 저해활성을 Lv 등 (2008) 및 Wang 등 (2014)의 방법을 약간 수정하여 측정하였다. 간략하게, 0.5 μg/μL의 재조합 인간 BACE-1 1 μL, 2.5 μg/mL의 형광펩티드기판 0.75 μL, 50 mM의 아세트산 나트륨(pH 4.5) 47.25 μL 및 2% DMSO에 녹인 EEBP(0.1~2000 μg/mL)로 이루어져 있다. 이를 혼합물을 1시간 동안 25°C에서 배양하고 나서, 반응을 정지시키기 위하여 2.5 M 아세트산 나트륨 16.6 μL를 첨가하였다. BACE-1 억제제 IV를 양성대조구로 하여 마찬가지로 조제하였다. 실온에서 형광 강도는 320 nm의 여기 및 405 nm의 발광보기에서 Molecular Devices SpectraMAX Gemini XS 플레이트 판독기로 측정하였다. 저해율은 다음의 방정식으로 계산하였다.

$$\% \text{ inhibition} = 100 - [(F_S - F_{S0})/(F_C - F_{C0})] \times 100$$

방정식에 있는 F_S 와 F_{S0} 는 각각 1시간 배양 후와 배양하기 전 샘플의 흡광도이고, F_C 와 F_{C0} 는 각각 BACE-1 효소, 기판 및 DMSO 혼합물의 1시간 배양 후와 배양하기 전 흡광도이다(Zongo 등, 2010).

(5) DPPH 라디칼 소거활성 측정

모든 EEBP 시료들의 DPPH 라디칼 소거 활성을 Blois (1958)의 방법을 약간 수정하여 측정하였다. 요약하면, 0.4 mM DPPH 메탄올 용액 100 μL와 EEBP 시료 50 μL를 각각 96 웰 플레이트에 첨가하였다. 예비실험 결과에 따라, 각 EEBP 시료의 활성은 5~2000 μg/mL 농도로 조제하였다. 암 조건 하에서 실온에서 30분 동안 배양한 후, VersaMax 마이크로 플레이트 판독기를 사용하여 흡광도 518 nm에서 측정하였다. 양성 대조군으로는 아스코르브산을 이용하였다. 라디칼 소거 활성은 다음 식으로 계산하였다.

$$\% \text{ DPPH 라디칼 소거 활성} = (1 - A_s/A_c) \times 100$$

여기서 A_c 는 시료가 없는 대조구의 흡광도이며, A_s 는 시료의 흡광도이다.

(6) 아세틸콜린에스테라제(AChE) 저해활성 검정

본 시험에서 이용한 재조합 인간 AChE는 제2절 ‘지역에 따른 프로폴리스(propolis)의 약리 활성 차이’의 재료 및 방법에서 언급한 바와 같으며, 꿀벌 화분 에탄올 추출물 시료의 AChE 저해활성은 마찬가지로 제조사의 프로토콜에 따라 검정을 실시하였다. AChE 저해제인 donepezil hydrochloride, tacrine 및 huperzine A (Čolović 등, 2013)를 양성대조구로 이용하였다.

(7) 암 세포주 및 세포증식 검정

본 시험에서 이용한 암 세포주는 제2절 ‘지역에 따른 프로폴리스(propolis)의 약리활성 차이’의 재료 및 방법에서 언급한 바와 같으며, 꿀벌 화분 에탄올 추출물 시료의 암 세포주에

대한 항증식활성은 마찬가지로 Morgan (1998)의 MTT 검정법으로 조사하였다. 간략하면, MTT (5 mg/mL)를 PBS (pH 7.4)에 녹이고 나서 멸균 필터를 이용하여 여과하였다. 세포는 DMSO Hybri-Max에 녹인 꿀벌 화분 추출물 시료를 함유하는 완전배양배지 100 μL 가 들어 있는 96 웰 배양 플레이트에서 2×10^4 cells/well 밀도로 평판배양 하였다. 예비실험결과에 따라, 각 꿀벌 화분 추출물 시료(0.78~25 mg/mL)의 항증식활성은 5~7개 농도에서 조사하였다.

(8) 장내세균 균주 및 생육저해활성 분석

본 시험에서 이용한 장내세균 균주는 제2절 ‘지역에 따른 프로폴리스(propolis)의 약리활성 차이’의 재료 및 방법에서 언급한 바와 같으며(표 3.5), 꿀벌 화분 에탄올 추출물 시료의 실험세균에 대한 최소억제농도 (minimal inhibitory concentrations, MICs)를 결정하기 위하여 멸균한 96 웰 플레이트에서 Sarker 등 (2007)의 방법에 따라 생물검정을 실시하였다.

다. 결과

(1) 총폴리페놀과 플라보노이드의 함량

총 18종 국내산 EEBP 시료들의 총플라보노이드(TF)와 총폴리페놀(TP)의 함량을 중국산 EEBP의 그것과 비교하였다(표 26). 18종 국내산 EEBP 시료들의 총플라보노이드 함량은 1.84~6.66 mg QE/g EEBP 이었다. BP2(여주), BP5(화성), BP7(파주), BP9(양양) 및 BP13(정읍) 시료들은 다른 지역의 EEBP 시료보다 높은 총플라보노이드 함량(5.00~6.66 mg QE/g EEBP)을 나타내었다. BP3(여주)와 BP11(안동)의 총플라보노이드 함량이 가장 낮았으며(1.84, QE/g EEBP), 중국산 EEBP 시료의 총플라보노이드 함량은 2.98 mg QE/g EEBP 이었다.

18종 국내산 EEBP 시료들의 총폴리페놀 함량은 6.33~37.55 mg GAE/g EEBP 이었다. BP7(파주), BP13(정읍) 및 BP17(담양) EEBP 시료들은 다른 지역의 EEBP 시료보다 높은 총폴리페놀 함량(22.91~37.55 mg GAE/g EEBP)을 보였다. 국내산 EEBP 시료 중에서 BP11(안동)의 총폴리페놀 함량이 가장 낮았다. 중국산 EEBP 시료의 총폴리페놀 함량은 가장 낮은 0.37 mg GAE/g EEBP로 나타났다.

표 26. Total flavonoid and polyphenol contents in 18 different ethanol extracts of bee pollen samples from 16 different locations in South Korea and an ethanol extract of Chinese bee pollen

Sample	Total flavonoid (mg QE /g EEBP)	Total polyphenol (mg GAE /g EEBP)
BP1	4.74 ± 0.094	17.81 ± 2.680
BP2	5.38 ± 0.339	17.98 ± 0.920
BP3	1.84 ± 0.169	13.28 ± 1.255
BP4	4.31 ± 0.058	17.84 ± 1.267
BP5	5.00 ± 0.063	16.14 ± 1.422
BP6	4.62 ± 0.037	17.52 ± 1.149
BP7	6.66 ± 0.100	37.55 ± 2.983
BP8	4.37 ± 0.434	19.37 ± 1.040
BP9	5.14 ± 0.170	18.51 ± 0.687
BP10	3.53 ± 0.084	17.99 ± 1.679
BP11	1.84 ± 0.161	6.33 ± 0.740
BP12	3.62 ± 0.098	15.85 ± 1.501
BP13	5.59 ± 0.149	22.91 ± 0.533
BP14	4.40 ± 0.073	17.33 ± 0.217
BP15	3.95 ± 0.115	15.95 ± 0.835
BP16	4.74 ± 0.972	15.24 ± 1.041
BP17	3.53 ± 0.077	23.36 ± 0.800
BP18	2.31 ± 0.202	17.71 ± 1.425
Chinese	2.98 ± 0.079	0.37 ± 0.275

(2) 꿀벌 화분의 DPPH 라디칼 소거활성

모든 EEBP 시료의 항산화 활성은 아스코르브산과 비교하였다 (표 27). IC₅₀ 값을 기준으로, 18종 국산 EEBP 시료들 중에서 활성을 보이지 않은 BP3(여주)와 BP11(안동) 시료를 제외한 16종 EEBP 시료들의 활성은 290.9~667.6 μg/mL을 나타내었다. BP18(함평) 시료가 가장 좋은 활성을 보였으며, 다음으로 BP7(파주), BP9(양양), BP6(의왕) 및 BP17(담양) 시료 순으로 활성을 나타내었다. 이들 시료들의 활성은 아스코르브산(IC₅₀, 13.8 μg/mL)보다 각각 23.1~29.2, 29.4 및 29.5배 낮았다. 하지만 중국산 EEBP 시료는 항산화 활성을 보이지 않았다.

표 27. DPPH free radical scavenging activity of 18 Korean and Chinese bee pollen ethanol extracts and commercial antioxidant agent ascorbic acid

Sample	EC ₅₀ , µg/mL (95% CL)	Slope ± SE	X ^{2a}	P-value
BP1	468.0 (424.0–516.6)	1.8 ± 0.15	5.259	0.9694
BP2	449.4 (415.1–486.5)	2.2 ± 0.17	4.719	0.9796
BP3	>1000			
BP4	667.6 (621.8–716.8)	1.7 ± 0.09	3.727	0.9872
BP5	445.9 (383.0–519.2)	1.7 ± 0.20	7.579	0.9388
BP6	406.0 (347.4–474.5)	1.6 ± 0.18	7.549	0.9393
BP7	318.4 (287.2–353.0)	1.5 ± 0.11	4.928	0.9747
BP8	451.5 (375.8–542.4)	1.5 ± 0.20	8.653	0.9141
BP9	403.1 (354.8–458.1)	1.6 ± 0.14	6.125	0.9586
BP10	511.8 (437.1–599.3)	1.6 ± 0.19	7.438	0.9295
BP11	>1000			
BP12	400.7 (327.7–490.0)	1.3 ± 0.17	8.720	0.9026
BP13	446.1 (380.0–523.7)	1.3 ± 0.14	6.908	0.9346
BP14	406.9 (333.9–495.9)	1.3 ± 0.16	8.252	0.9062
BP15	473.0 (392.7–569.8)	1.3 ± 0.15	7.729	0.9111
BP16	491.5 (416.5–580.1)	1.2 ± 0.12	6.426	0.9307
BP17	407.8 (368.4–451.4)	1.7 ± 0.13	5.183	0.9746
BP18	290.9 (266.3–317.6)	2.0 ± 0.16	4.912	0.9788
Chinese	>1000			
Ascorbic acid ^b	13.8 (12.0–15.5)	1.8 ± 0.15	4.67	0.989

^a Pearson's chi-square goodness-of-fit test.

^b Ascorbic acid used as positive control.

(3) BACE-1 저해활성

AD 환자의 뇌에 있어서의 주요 성분 아밀로이드 프라크(amyloid plaque) (Suh와 Checler, 2002)인 β-amyloid를 생성시키는 아밀로이드 전구체 단백질(amyloid precursor protein, APP)은 아밀로이드 생성 경로에서 중요한 효소이기 때문에, EEBP 시료의 BACE-1 저해활성을 FRET 효소검정법을 이용하여 평가하였다. IC₅₀ 값에 근거하여, 18종 국내산 EEBP 시료의 BACE-1 저해활성은 236.0~1487 µg/mL 이었다 (표 28). BP7 (IC₅₀, 236.0 µg/mL) 시료가 가장 활성이 높았으며, 이어서 BP1(여주) (IC₅₀, 369.6 µg/mL)과 BP6(의왕) (IC₅₀, 415.6 µg/mL) 시료가 높은 BACE-1 저해활성을 나타내었다. 중국산 EEBP 시료의 IC₅₀ 값은 322.5 µg/mL 이었다.

표 28. *In vitro* human BACE-1 inhibitory activity of 18 different ethanol extracts of bee pollen samples from 16 different regions in South Korea and an ethanol extract of Chinese bee pollen

Sample	IC ₅₀ , µg/mL (95% CL)	Slope ± SE	X ^{2a}	P-value
BP1	369.6.0 (309.1–442.0)	0.9 ± 0.09	6.193	0.9278
BP2	642.2 (588.9–700.3)	1.0 ± 0.05	3.109	0.9816
BP3	669.6 (611.3–733.4)	0.9 ± 0.05	3.136	0.9795
BP4	1009 (898.9–1132)	1.1 ± 0.08	4.265	0.9673
BP5	497.5 (431.7–573.2)	0.9 ± 0.07	4.935	0.9525
BP6	415.6 (385.5–448.1)	1.1 ± 0.05	3.028	0.9865
BP7	236.0 (216.3–257.4)	1.2 ± 0.07	3.400	0.9809
BP8	635.5 (568.4–710.6)	1.1 ± 0.07	4.428	0.9696
BP9	881.1 (763.9–1016)	1.0 ± 0.08	4.905	0.9500
BP10	1487 (1291–1713)	0.8 ± 0.06	3.406	0.9637
BP11	760.6 (718.5–805.2)	0.9 ± 0.03	1.862	0.9921
BP12	1085 (918.9–1280)	1.1 ± 0.10	5.706	0.9415
BP13	1004 (904.9–1113)	1.0 ± 0.06	3.435	0.9742
BP14	511.1 (459.5–568.5)	1.0 ± 0.06	4.044	0.9731
BP15	851.5 (755.0–960.3)	1.1 ± 0.08	4.532	0.9637
BP16	584.6 (491.0–696.2)	1.0 ± 0.09	6.356	0.9269
BP17	496.1 (450.8–546.0)	1.1 ± 0.06	3.728	0.9775
BP18	830.1 (753.0–915.2)	0.9 ± 0.05	3.217	0.9768
Chinese	322.5 (283.7–366.7)	0.6 ± 0.04	3.190	0.9605

^a Pearson's chi-square goodness-of-fit test.

(4) 꿀벌 화분의 아세칠콜린에스테라제 저해활성

18종 국내산 EEBP 시료들과 중국산 EEBP 시료 모두 2 mg/mL에서 처리에서 아세칠콜린에스테라제 저해 활성을 보이지 않았다.

(5) 꿀벌 화분의 장내세균 생육저해활성

18종 국산 EEBP 시료들과 중국산 EEBP 시료는 25 mg/mL 처리에서 장내세균에 대한 생육저해활성을 보이지 않았다.

(6) 암세포 증식억제효과

MTT 분석을 이용하여 18종 국내산 EEBP 시료와 1개 중국산 시료의 3종 인간 암 세포주에 대한 항증식 효과를 항암제 시스플라틴과 비교하였다(표 3.21). IC₅₀ 값에 기초하여, PC-3 세포주에 대한 항증식 효과는 2.91~14.41 mg/mL 이었다. BP5(화성), BP8(삼척)과 BP11(안동)에탄올 추출물이 가장 강한 활성을 보였다(IC₅₀, 2.91~3.31 mg/mL). MCF-7 세포주에 대한 18종 국내산 EEBP 시료의 IC₅₀ 값은 0.91~12.73 mg/mL 이었으며, BP7(파주) 시료가 가장 강한활성을 보였다. A549 세포주에 대한 국내산 EEBP 시료의 IC₅₀ 값은 4.84~20.42 mg/mL 이었으며, BP7(파주), BP5(화성), BP6(의왕) 및 BP9(양양) 시료는 IC₅₀ 값이 4.84~

8.94 mg/mL로 강한 항증식 활성을 나타내었다. 중국산 EEBP 시료의 PC-3, MCF-7와 A549 암 세포주 대한 IC_{50} 값은 각각 3.31, 2.72와 16.18, mg/mL 이었다. 그러나, 이들 3종 암세포에 대한 화분 시료의 항증식 효과는 항암제 시스플라틴보다 낮았다.

NCI-H727 및 AGS 세포주에 대한 18종 국내산 EEBP 시료의 항증식 효과를 마찬가지로 조사하였다(표 3.22). 국내산 EEBP 시료의 NCI-H727 세포주에 대한 IC_{50} 값은 2.71~17.71 mg/mL으로 이었으며, BP2(여주) 시료가 가장 강한 활성($IC_{50} = 2.71$ mg/mL)을 나타내었다. AGS 세포주에 대한 18종 국내산 EEBP 시료의 IC_{50} 값은 2.41~8.18 mg/mL 이었으며, 그중에서 BP11(안동) 시료가 가장 강한 활성을 보였다. 중국산 EEBP 시료의 NCI-H727와 AGS 세포주에 대한 IC_{50} 값은 각각 2.72와 1.76 mg/mL 이었다.

라. 고찰

화분은 항산화제·항생제·지사제·항신생물제를 포함하는 중요한 치료활동과 관련된 폐놀 및 플라보노이드 화합물들을 함유하고 있다(Campos 등, 2008). 화분에 있는 총폐놀(TP)과 총플라보노이드(TF) 함량은 브라질[TP, 41.5~213.2 mg/g (Freire 등, 2012)], 브라질[TP, 19.28~48.90 mg/g; TF, 2.10~28.33 mg/g (Carpes 등, 2009)], 알제리[TP, 30.46 mg/g; TF, 8.92 mg/g (Rebiai와 Lanez, 2012)], 발트 해 연안 지역[TP, 24.1~45.5 mg/g; TF, 6.1~11.6 mg/g (Kaškonienė 등, 2015)], 포르투갈[TP, 10.5~16.8 mg/g (Morais 등, 2011)], 베네수엘라[TP, 3.96~12.867 mg/g (Pérez-Pérez 등, 2012)], 그리스[TP, 10.49 mg/g (Graikou 등, 2011)], 터키[티파자 TP, 22.68 mg/g; 블리다 TP, 21.9 mg/g (Rebiai 및 Lanez, 2013)] 화분에서 보고되었다. 앞에서 언급한 EEBP의 총폐놀 및 플라보노이드 함량은 각각 3.96~213.2 mg/g과 2.1~28.33 mg/g 이었으나, 본 연구에서는 18종 국내산 EEBP 시료의 플라보노이드와 폐놀 함량은 각각 1.84~6.66 mg/g 및 6.33~37.55 mg/g 이었다. 본 연구에서 대부분 국내산 EEBP 시료들은 중국산 EEBP 시료보다 플라보노이드 함량이 높았으며, 국내산 EEBP 시료의 총폐놀 함량은 중국산 시료보다 17~101배 높았다.

표 29. Antiproliferative activity of 18 different EEBP samples from 16 regions in South Korea and an ethanol extract of Chinese bee pollen toward three cancer cell lines

Sample	PC-3 cell ^a	MCF-7 cell ^b	A549 cell ^c
	IC ₅₀ , mg/mL (95% CL)	IC ₅₀ , mg/mL (95% CL)	IC ₅₀ , mg/mL (95% CL)
BP1	6.76 (6.29–7.27)	1.57 (1.38–1.78)	15.33 (14.13–16.64)
BP2	5.17 (4.59–5.81)	1.37 (1.22–1.54)	15.46 (14.42–16.57)
BP3	6.84 (5.53–8.47)	12.73 (11.84–13.68)	>25
BP4	14.41 (14.17–14.64)	4.92 (4.08–5.92)	16.78 (15.44–18.24)
BP5	2.91 (2.49–3.39)	3.83 (3.28–4.47)	7.99 (7.43–8.60)
BP6	8.88 (8.33–9.46)	2.78 (2.41–3.20)	8.79 (8.12–9.82)
BP7	4.05 (3.86–4.23)	0.91 (0.75–1.10)	4.84 (4.52–5.17)
BP8	2.99 (2.00–4.46)	6.04 (5.52–6.60)	13.18 (12.62–13.77)
BP9	3.76 (3.08–4.58)	3.25 (2.76–3.82)	8.94 (8.07–9.91)
BP10	6.71 (5.99–7.52)	3.67 (3.05–4.42)	15.14 (13.52–16.95)
BP11	3.31 (2.83–3.86)	1.93 (1.67–2.23)	12.58 (10.75–14.72)
BP12	3.39 (2.70–4.26)	4.38 (3.60–5.32)	15.35 (13.22–17.82)
BP13	8.89 (7.98–9.90)	7.06 (6.21–8.03)	17.47 (15.83–19.28)
BP14	6.89 (6.61–7.18)	3.98 (3.46–4.57)	17.81 (17.36–18.28)
BP15	8.13 (7.01–9.44)	5.25 (4.35–6.33)	>25
BP16	5.90 (5.15–6.77)	2.45 (2.07–2.90)	20.42 (19.00–21.96)
BP17	4.27 (4.04–4.52)	2.27 (1.97–2.62)	11.85 (11.20–12.54)
BP18	4.31 (4.10–4.53)	2.26 (1.98–2.56)	18.67 (17.97–19.40)
Chinese	3.31 (2.79–3.93)	2.72 (2.44–3.01)	16.18 (15.59–16.79)
Cisplatin	0.078 (0.065–0.095)	0.022 (0.020–0.025)	0.022 (0.019–0.026)

^a Human prostate adenocarcinoma cell line.

^b Human breast adenocarcinoma cell line.

^c Human lung carcinoma cell line.

표 30. Antiproliferative activity of 18 different EEBP samples from 16regions in South Korea and an ethanol extract of Chinese bee pollen toward NCI-H727 and AGS cancer cell lines

Sample	NCI-H727 cell ^a	AGS cell ^b
	IC ₅₀ , mg/mL (95% CL)	IC ₅₀ , mg/mL (95% CL)
BP1	4.60 (3.74–5.66)	6.83 (6.49–7.18)
BP2	2.71 (2.27–3.25)	6.92 (6.52–7.34)
BP3	6.83 (5.58–8.35)	6.76 (6.35–7.20)
BP4	9.53 (8.75–10.38)	6.81 (6.55–7.08)
BP5	3.27 (3.05–3.50)	3.43 (3.08–3.82)
BP6	3.87 (3.66–4.09)	3.44 (3.19–3.71)
BP7	4.70 (4.39–5.04)	2.45 (2.21–2.71)
BP8	5.41 (4.91–5.95)	4.21 (3.97–4.47)
BP9	3.35 (2.70–4.14)	3.38 (3.19–3.58)
BP10	9.25 (8.14–10.52)	6.35 (5.78–6.98)
BP11	5.29 (4.74–5.90)	2.41 (1.98–2.92)
BP12	17.71 (16.57–18.93)	8.18 (7.00–9.56)
BP13	10.95 (9.16–13.08)	7.91 (7.14–8.77)
BP14	7.09 (6.68–7.53)	6.10 (5.32–6.97)
BP15	12.92 (12.23–13.66)	6.68 (6.41–6.95)
BP16	11.35 (10.64–12.10)	7.17 (6.44–8.00)
BP17	5.97 (4.93–7.24)	5.97 (5.60–6.35)
BP18	7.85 (7.13–6.64)	3.73 (3.45–4.02)
Chinese	2.72 (2.49–2.98)	1.76 (1.69–1.83)
Cisplatin	0.004 (0.003–0.005)	0.035 (0.032–0.039)

^a Human lung non-small cell carcinoma.

^b Human gastric carcinoma.

DPPH 라디칼은 다양한 시료의 자유 라디칼 소거 능력을 판단하기 위해 널리 사용되어 왔다(Morais 등, 2011). EC₅₀는 DPPH 초기 농도의 50% 억제하는데 필요한 산화 방지제의 양이고, 이것은 시료의 라디칼 소거 능력을 측정하기 위해 사용되었다. DPPH 라디칼 소거 능력에 대한 EC₅₀ 값은 뉴질랜드산 및 포르투갈산에서 화분 시료에서 40~500 µg/mL(Campos 등, 2003), 브라질 남부 지역 화분 시료에서 810~4690 µg/mL(Carpes 등, 2009), 포르투갈산 화분 시료에서는 2.16~5.87 mg/mL(Morais 등, 2011)로 보고되었다. 앞에서 언급한 화분 시료의 EC₅₀ 값은 40~5870 µg/mL 이었으나, 본 연구에서, 15종 한국산 EBBP 시료의 EC₅₀ 값은 290.9~667.6 µg/mL 이었으며, 나머지 3종 시료의 EC₅₀ 값은 1000 µg/mL 보다 높았다. BP3(여주)와 BP11(안동)을 제외한 국내산 화분 시료의 대부분은 중국산 시료보다 더 강한 DPPH 라디칼 소거 능력을 보였다. 본 연구에서 이들 국내산 화분 시료들은 아스코르브산보다 낮았지만 잠재적인 항산화제로서의 가능성을 보였다.

아밀로이드 플라크는 AD의 주요 신경 병리학적 지표인 Aβ의 축적이다. BACE-1은 뇌에서

비정상적인 APP 아밀로이드 작용 경로인 주요 β -secretase 이다(Hardy와 Selkoe, 2002). AD 환자의 대뇌 피질 기저 전뇌에 콜린성 결핍은 인지 장애를 일으키고, AChE은 아세틸콜린을 콜린과 아세트산으로 분해하여 아세틸콜린을 감소시킨다 (McGleenon 등, 1999). A β (Vassar, 2014) 형성을 감소시키는 BACE-1 저해제와 콜린성 전달을 증가시키는 AChE 억제제 (McGleenon 등, 1999)는 AD 치료에 중요한 타겟이 될 수 있다. 그러나, 인간 BACE-1과 AChE에 대한 화분 추출물의 억제활성과 관련된 정보는 없다. 본 연구에서, 화분 추출물이 인간 BACE-1 저해 활성이 가지고 있다는 것을 처음으로 보고하였다(IC_{50} , 236.0~1487 μ g/mL). 하지만, 모든 화분 시료들이 2 mg/mL 농도에서 AChE에 대해 저해활성을 나타내지 않았다. 이 결과는 통해 AChE 저해 활성이 아니라 BACE-1 저해활성 때문에 국내산 화분의 잠재적인 항AD 효과가 있는 것으로 생각된다.

화분 추출물의 암 세포에 대한 항증식 활성이 알려져 있다. Omar 등 (2016)은 말레이시아 산 화분의 MCF-7 암세포 대한 IC_{50} 값이 15 mg/mL로 보고하였다. 인도네시아산 화분 추출물의 5종 암 세포 BT474, ChaGo I, HepG2, KATO-III 및 SW620에 대한 항증식 활성은 추출에 사용되는 용매뿐 만 아니라, 꿀벌 종 및 꿀벌 생산물질에 따라 달리 나타나는데, 대부분의 화분 추출물에서 20 μ g/mL의 농도에서 항증식 활성을 보이지 않았다(Kustiawan 등, 2014). 중국에서 수집 한 해당화(rugosa rose, beach rose) (*Rosa rugosa*) 화분에 있는 다당류(WRAP)는 0~5 mg/mL의 농도에서 용량 의존적 항증식 활성을 갖는 것으로 보고되었고, WRPP는 5 mg/mL 농도에서 HT-29 및 HCT116 암세포 대해 70%의 항증식 활성을 보였다 (Wang 등, 2013). 독일산 화분 시료의 C26 마우스 대장 종양세포에 대한 항증식 효과는 1 mg/mL농도에서 약 60~70% 저해활성을 나타내었다(Mărgăoan 등, 2016). 본 연구에서는, 18 종 국내산 EEBP 시료들의 항증식 효과는 지역에 따라 다른 것으로 확인되었고, 18종 국내산 EEBP 시료들은 인간 암세포 PC-3, MCF-7, NCI-H727 및 AGS에 대해 강한 항증식 효과를 나타냈으며, IC_{50} 값은 각각 2.91~14.41 mg/mL, 0.91~12.73 mg/mL, 2.71~17.71 mg/mL 및 2.41~8.18 mg/mL로 확인되었다. 그리고, A549 세포에 대한 16종 EEBP 샘플의 세포 독성 활성은 IC_{50} 4.84~20.42 mg/mL으로 나타난 반면에 BP3(여주) 및 BP15(여수)에 대해서는 낮은 세포 항증식 활성을 보였다.

생물학적 기능과 페놀 또는 플라보노이드의 함량에 사이의 상관관계에 대한 연구가 잘 알려져 있다. 항산화 및 페놀 또는 플라보노이드의 함량 사이의 높은 상관관계가 있다는 것을 보여 주었다. 콩과식물의 일종인 mesquite 화분 추출물의 항산화 활성은 플라보노이드 함량과 관련되어 있다(Almaraz-Abarca 등, 2006). 라디칼 소거 활성은 페놀 화합물의 함유량과 관련되었고 상관계수 r 는 0.95 이었다(Kaškonienė 등, 2015). 본 연구에서, 항산화 활성은 페놀 함량($r = -0.3896$)과는 네가티브의 약한 상관관계를 보였으며, 플라보노이드 함량($r = 0.0077$)과 항산화 활성간에는 유의한 관계가 관찰되지 않았다. 또한, 국내산 EEBP 시료의 BACE-1의 저해 또는 항증식 활성과 총페놀 또는 플라보노이드 함량과 직접적인 상관관계는 관찰되지 않았다.

국내산 꿀벌 화분의 에탄올 추출물은 DPPH 라디칼 소거활성 및 BACE-1에 대한 저해활성을 보였으며, 또한 5종 인간 암세포에 대한 항증식 활성을 나타내었다. 국내산 화분 유래 산물은 건강식품으로서, 신경 퇴행성 원인과 관련된 다양한 질병을 예방할 수 있을 것으로 생각된다. 화분의 생물학적 활성은 환경 조건, 지리적 위치, 식물 출처에 의존하기 때문에, 고 품질 화분의 식별과 선택은 필수적이다. 또한, 호흡 곤란, 두드러기, 부종 및 아나필락시스 등

의 심각한 알레르기 반응를 나타내기 때문에, 인간에 안전성 연구가 필요하다.

5. 57-kDa 로얄젤리 단백질의 자외선 조사 조글세포주에 대한 보호효과

가. 머릿말

자외선(ultraviolet)에 의해 야기되는 다양한 질병이나 질환의 유행 및 염증함은 전지구상에서 가장 심각한 건강 문제 중의 하나로서, 계속 증가하고 있으며 클로로플루오르카본(chlorofluorocarbons), 클로로카본(chlorocarbons) 및 유기취화물(organobromides)과 같은 대기 오염물질들의 방출 때문에 오존 감소에 의한 지구 표면에 있어서의 자외선 발생율 증가와 밀접한 관계가 있다(MacDonald, 1990; Leaf, 1993). 포유동물 세포가 자외선에 노출되면 세포 조성물이 손상을 받게 되어, 결국 유전자 유도 및 다양한 신호전달경로의 혼란과 같은 복잡한 세포 반응으로 나타난다(Bender 등, 1997; Schwarz, 1998; Rastogi 등, 2010). DNA는 직접적 또는 간접적 자외선 유도 세포손상의 주요 타겟이다(Rastogi 등, 2010).

자외선은 파장의 크기에 따라 UVA (320~400 nm), UVB (290~320 nm) 및 UVC (200~290 nm) 세 종류로 나누는데(Tobiska와 Nusinov), 학자들 중에는 UVA와 UVB의 경계를 320 nm가 아닌 315 nm를 사용하기도 한다. UVB는 전 태양에너지의 1% 미만일지라도 (Rastogi 등, 2010), 그 위험효과 때문에 가장 당면한 대표적인 환경 위험요인 중의 하나이다 (Schwarz, 1998; Rastogi 등, 2010; Rass와 Reichrath, 2008). 또한, UVB 조사는 세포에 있어서 활성산소종(reactive oxygen species) 생성을 통해 산화적 스트레스를 일으키는 것으로 알려져 있다(Wlaschek 등, 2001; Heck 등, 2003). 활성산소종은 단백질·지질·핵산·세포막과 같은 세포 구조에 심각한 손상을 야기할 수 있으며, 노화 과정 및 여러 질병의 병인론과 관계가 있다(Devasagayam 등, 2004; Bergamini 등, 2004). 또한, 조글세포의 분화를 저해함으로서 그리고 용골세포발생을 향상시킴으로서 뼈 손실을 증가시킨다(Wauquie 등, 2009; Filaire와 Toumi, 2012). 조글세포 세포외 Ca^{2+} -센싱 수용체는 뼈 발달 및 무기화를 조절한다(Brown과 MacLeod, 2001; Dvorak-Ewell 등, 2011). UVB는 세포 표면을 교란시키거나 또는 수용체 구조를 바꾼다(Rosette와 Karin, 1996). 알칼리성포스파타제(alkaline phosphatase)는 조글세포 뼈 형성의 가장 빈번하게 이용되는 생화학적 마커 중 하나로서(Magnusson 등, 1998), 산화적 스트레스는 알칼리성포스파타제 활성 저해의 주요인 중의 하나이다(Bai 등, 2004).

천연물(동물, 식물 및 미생물)은 자외선 보호제의 출처로 제시되고 있는데(Svobodová 등, 2003; Anitha, 2012; Pongcharoen 등, 2013), 이는 상대적으로 인체에 안전하다고 인식된 활성이차대사산물을 함유하고 있으며, 이를 대사산물들은 새로운 다양한 작용점에 작용한다(Dettner, 2011; Raskin 등, 2002). 이들은 상용 자외선 보호제를 위한 출처로 간주되고 있다. 꿀벌 일벌의 머리샘의 분비산물인 로얄젤리(royal jelly)가 그 비범한 특성과 건강 효과로 수세기 동안 사용되어 왔음에도 불구하고, 자외선 유도 손상을 처리하거나 예방하기 위한 로얄젤리 유래 물질의 이용에 관한 연구는 없다. 로얄젤리의 탁월한 약리작용은 Crenguța 등(2011)에 의해 잘 정리되어 있다.

본 연구에서는 UVB 50 mJ/cm^2 을 조사하기 전에, 전처리된 로얄젤리 및 royalactin (Kamakura, 2011)이라 불리는 로얄젤리의 57-kDa 단백질(royalactin)이 조글세포의 특성을 구비한 Saos-2 세포(Rodan 등, 1987)에 미치는 영향을 (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxy phenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H tetrazolium) inner salt (MTS)를 이용하여 평가하였다. 시험물질의 보호활성은 항산화제 *N*-acetyl-L-cysteine (NAC) (Jun 등, 2008)와

비교하였다. 알칼리성포스파타제 함량 및 활성은 뼈에 있어서 각 종 질환상태와 연관되어 있기 때문에(Rustico 등, 2014), UVB 조사 전 시험물질로 처리된 Saos-2 세포의 알칼리성포스파타제 활성은 *p*-nitrophenyl phosphate (pNPP) Alkaline Phosphatase Assay Kit를 사용하여 조사하였다. 마지막으로, Ca^{2+} 분포 및 미토콘드리아 활성은 공초점현미경(confocal laser scanning microscope)을 이용하여 조사하였다.

나. 재료 및 방법

(1) 로얄젤리

국내산 로얄젤리는 양봉원에서 구입하여 사용할 때까지 -70°C 에 보관하였다. 바우처 표본 (AR-WP-01)은 서울 대학교, 농업생명과학연구원에 기탁하였다.

(2) 재료

MTS와 Coomassie Brilliant Blue R-250은 각각 Promega (Madison, WI)와 Bio-Rad Life Sciences (Hercules, CA)에서 구입하였다. RPMI 1640과 fetal bovine serum는 Invitrogen (Carlsbad, CA)에서 구입하였다. pNPP Alkaline Phosphatase Assay Kit와 CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation assay kit는 각각 AnaSpec (Fremont, CA)과 Promega (Madison, WI)에서 구입하였다. MitoTracker Red FM과 Fluo-4/AM은 Invitrogen Molecular Probes (San Diego, CA)에서, protein molecular weight standards (Precision Plus Protein all blue standards)는 Bio-Rad Life Sciences에서 구입하였다. DEAE FF 16/10 칼럼, Mono Q 칼럼 및 Superdex 75 겔여과 칼럼은 GE Healthcare Life Sciences (Pittsburgh, PA)에서 구입하였다. Collagen IV로 코팅된 96 웰 플레이트는 BD Biosciences (Bedford, MA)에서 구입하였다. 기타 화합물 및 시약은 분석용을 사용하였다.

(3) 세포주 및 배양조건

인간 골육종(osteosarcoma) 세포주 KCLB 30085는 한국세포주은행(Korean Cell Line Bank)에서 구입하였다. 세포주는 37°C , 5% CO_2 조건 하의 배양기에서 10% charcoal dextran 처리 FBS 및 1% 항생제 (penicillin + streptomycin) 용액을 함유한 RPMI 1640에서 유지하였다. 세포주는 사용할 때까지 -70°C 에 보관하였다.

(4) 폴리아크릴아미드겔전기영동법(Polyacrylamide gel electrophoresis)

Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)는 Laemmli (1970) 방법에 따라 수행하였다. 단백질 시료는 15% 폴리아크릴아미드겔에 로딩 하였으며, 겔 상의 단백질은 Coomassie Brilliant Blue R-250으로 염색하였다.

(5) 단백질 정제

단백질 정제는 Kamakura 등 (2001)의 방법에 따라 수행하였다. 국내산 로얄젤리(30 g)를 20 mM Tris-HCl 완충액 (pH 7.0) 1 L에 녹인 다음 Supra 25K ultra vacuum speed centrifuge(한일과학, 인천)를 이용하여 4°C , $5000 \times g$ 에서 10분 원심분리한 후, Advantec 240 mm 여지(Advantec MFS, Dublin, CA)를 이용하여 여과하였다. 상등액은 10000 nominal molecular weight cut-off polysulfone Hollow Fiber Cartridge [Xampler Ultrafiltration Cartridges (UFP-1-C-4X2M), 1400 cm^2 , from (140) 0.5 mm ID fibers] 부착 QuixStand Benchtop System (GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, UK)으로 20 mL로 하였다. 농축액은 동일 완충액 80 mL에 첨가하였다. 이 농축 과정을 5회 반복하였다. 최종 여과 시료는 Amicon Ultra-15mL centrifuge tube (EMD Millipore, Darmstadt, Germany)에 옮겨 4°C , $3000 \times g$ 에서 30분 원심분리 하였다.

앞에서 언급한 초원심분리에 의해 얻어진 상동액은 AKTA Fast protein liquid chromatography system (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, 스웨덴)을 이용해서, NaCl 0에서 1.0 M의 농도구배로 유속 5 mL/min로 하여, 미리 20 mM Tris-HCl 완충액 (pH 7.0)으로 맞춘 DEAE FF 16/10 칼럼에 처리하였다(그림 126A). 5 mL씩 받았으며, 각 획분의 시료를 취해 SDS-PAGE를 수행하였다(그림 126B).

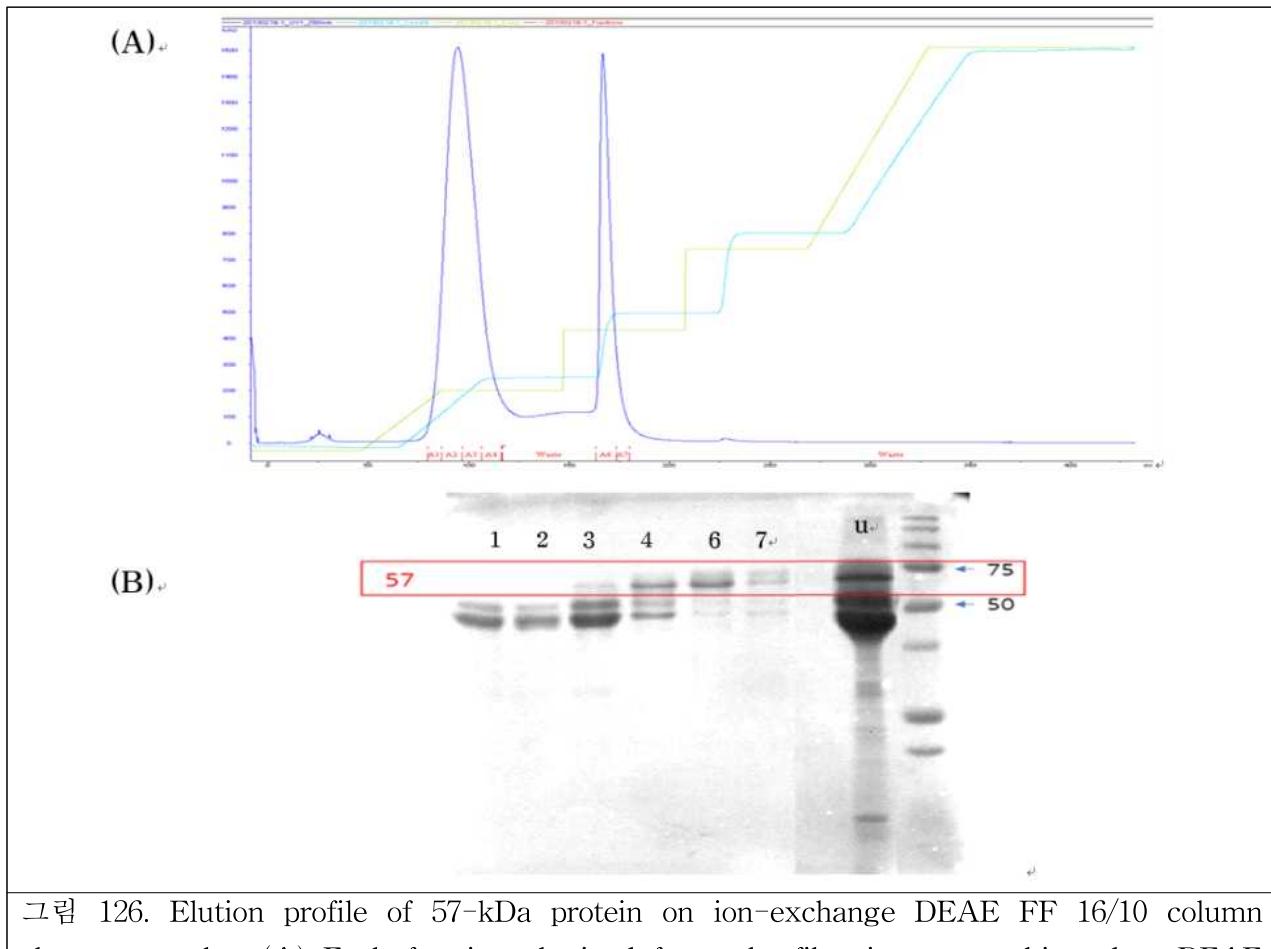


그림 126. Elution profile of 57-kDa protein on ion-exchange DEAE FF 16/10 column chromatography. (A) Each fraction obtained from ultrafiltration was subjected to DEAE FF 16/10 column. Six fractions (1~6) were collected, and absorbance was read at 280 nm. (B) SDS-PAGE profile. Lane U, fraction from ultrafiltration; Lanes 1-1 - 1~6 represent the fraction obtained from DEAE FF 16/10 column. The position of 57-kDa protein is indicated by red box.

DEAE FF 16/10 칼럼크로마토그라피에 의해 얻어진 획분은 미리 20 mM Tris-HCl 완충액으로 맞춘 Mono Q 칼럼 (5×50 mm)에 처리하였다. 칼럼은 NaCl 0 M에서부터 1.0 M까지의 농도구배로 유속 5 mL/min (그림 127A) 용출시켰으며, 5 mL씩 모았다. 각 획분의 시료를 취해 SDS-PAGE를 수행하였다(그림 127B).

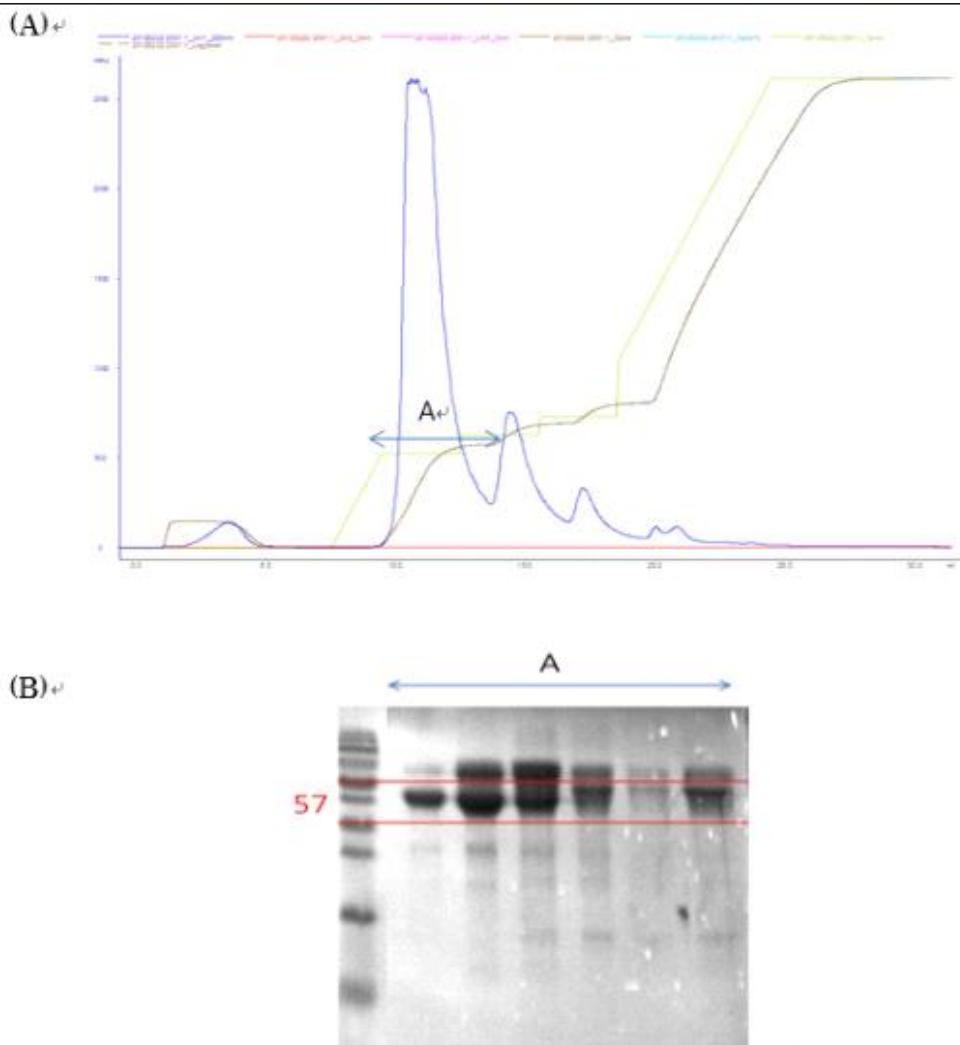


그림 127. Elution profile of 57-kDa protein on ion-exchange chromatography Mono Q. (A) Each fraction obtained from DEAE FF 16/10 column was subjected to Mono Q column. The fraction 2-2 was collected and absorbance was read at 280 nm. (B) SDS PAGE profile of the fraction 2-2. The position of 57-kDa protein is indicated by red box.

상기 Mono Q 칼럼크로마토그라피에 의해 얻어진 회분은 미리 0.15 M NaCl을 함유한 50 mM 인산완충액(pH 7.0)으로 맞춘 Superdex 75 칼럼에 처리하였다. 동일 완충액으로 유속 1.0 mL/min로 용출시켰으며, 1 mL씩 모았다(그림 128A). 각 회분의 시료를 취해 SDS-PAGE를 수행하였다(그림 128B). Hybrid LC/MS/MS system (Applied Biosystems, Foster, CA)으로 분석한 결과, 분리 정제한 단백질과 Protein Bank의 원 단백질 간에 94%의 상동성을 보였다.

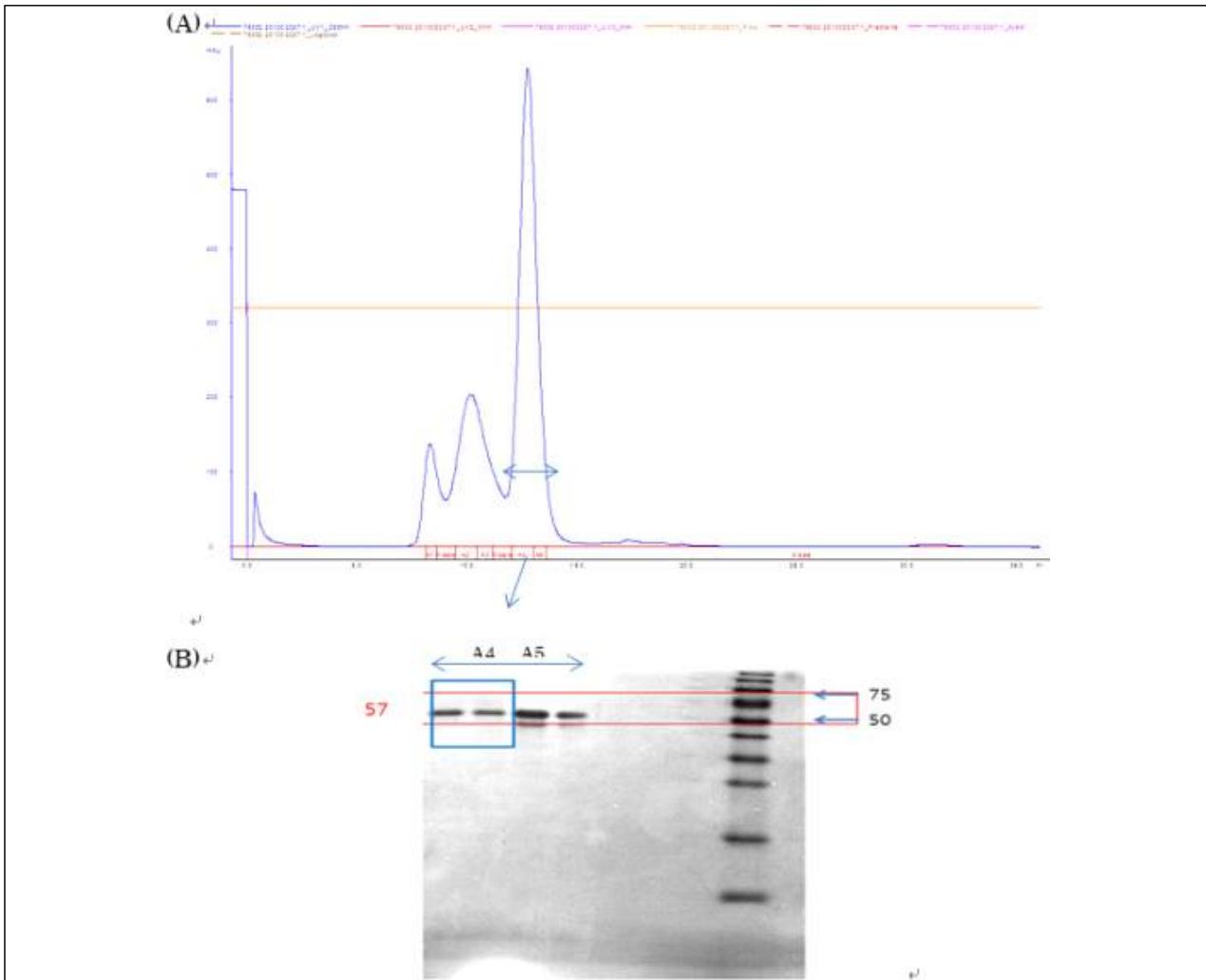


그림 128. Elution profile of 57-kDa protein on Superdex 75 gel filtration. (A) The fraction from Mono Q column was subjected to Superdex 75 gel filtration. Four fractions were collected and absorbance was read at 280 nm. (B) SDS-PAGE profile of each fraction. The position of 57-kDa protein is indicated by red box.

(6) 단백질 함량

단백질 농도는 BSA를 표준품으로 하여 Bradford 등(1976)의 방법에 따라 분석하였다.

(7) Saos-2 세포 보호효과 및 활력 측정

자외선 B 조사는 302 nm를 방출하는 UVM-225D Mineralight (UVP, Phoenix, AZ)를 이용하여 Saos-2 세포에 처리하였다. 자외선 강도는 HD2102-2 UV meter (Delta OHM, Padova, 이태리)로 측정하였다. 실내실험에서, 세포는 50 mJ/cm²의 자외선 B로 처리하였다. Saos-2 세포는 96-well microtiter plate를 이용하여 10⁴ cell/well 농도로 10% FBS 함유 RPMI1640 200 μL에서 24시간 배양하였다. 예비실험 결과에 따라, 국내산 로얄젤리 1.5 mg/mL 또는 57 kDa 단백질 0.1 mg/mL으로 사전 처리된 세포는 24시간 배양 후, 자외선 B를 조사하였다. 실험물질들의 세포 활력은 MTS의 formazan에로의 환원에 의거하여 측정하였다. 배지를 제거한 후, MTS 함유 RPMI 200 μL를 각각의 웰에 첨가하고 나서 37°C에서 1시간 배양하였다. NAC(2 mM)를 양성대조구로 하였다. VersaMax 마이크로플레이트 판독기를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

(8) 공초점현미경 관찰

Saos-2 세포는 10^5 cell/dish 농도로 24시간 confocal dishes (35×10 mm)에서 배양한 후, 배지를 제거하고 나서 평판을 phosphate-buffered saline (PBS) (pH 7.4)로 3회 세척한 다음, 국내산 로얄젤리 1.5 mg/mL, 57 kDa 단백질 0.1 mg/mL 또는 2 mM NAC를 함유한 혈청 제거 배지로 대체하였다. 24시간 후, 배지를 제거하고 나서 PBS로 3회 세척하였다. 미토콘드리아를 탐지하기 위하여, 세포를 $10 \mu\text{M}$ Mitotracker Red (excitation/emission spectra for Mitotracker Red, 578/598 nm)에서 45분간 배양하였다. 세포질 칼슘 농도를 측정하기 위하여 Ca^{2+} 지시 염색약 Fluo-4/AM (excitation/emission maxima, 488/520 nm)을 이용하였다. Fluo-4AM으로 세포를 염색하고 나서 37°C 에서 45분간 배양한 후, AM 에스테르의 완벽한 탈에스테르화를 위하여 유리 염색약을 제거하기 위하여 PBS로 3회 세척하였다. Fluoview FV10i Confocal Laser Scanning Microscope (Olympus, Tokyo, 일본)을 이용하여 형광 생존 세포 이미지로부터 Ca^{2+} 및 미토콘드리아 수준을 측정하였다.

(9) 알칼리성 인산분해효소(Alkaline phosphatase) 분석

시험물질들의 알칼리성 인산분해효소 활성은 pNPP Alkaline Phosphatase 분석 키트를 이용하여 측정하였다. Saos-2 세포는 96-well microtiter plate를 이용하여 10^4 cell/mL 농도로 37°C 와 5% CO_2 조건 하에서 24시간 배양하고 나서, 배지를 제거한 다음 평판을 국내산 로얄젤리 1.5 mg/mL, 57 kDa 단백질 0.1 mg/mL 또는 2 mM NAC를 함유한 혈청 제거 배지로 대체한 후, 24시간 더 배양하였다. 배지를 제거하고 나서 PBS로 3회 세척하였다. 24시간 배양 후, VersaMax 마이크로플레이트 판독기를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

(10) 자료분석

결과는 평균 \pm 표준오차로 표시하였으며, 모든 실험은 3 반복으로 실시하였다. 통계분석은 GraphPad Prism 5 software (La Jolla, CA)를 이용하여 행하였으며, 평균치간 유의성 검정은 분산분석을 이용하여 분석하였다.

다. 결과

(1) Saos-2 세포 활력에 미치는 영향

국내산 로얄젤리로부터 분리 정제한 57 kDa 단백질의 농도 의존적인 효과를 MTS 검정법으로 평가하였다 (그림 129). 57 kDa 단백질 $10 \sim 100 \mu\text{g/mL}$ 농도에서는 단백질 농도와 세포 활력 간에 높은 상관관계를 보였다(상관계수, $R^2 > 0.85$). 이 결과는 57 kDa 단백질이 실험농도 범위에서는 세포에 독성이 없다는 것을 나타내고 있다.

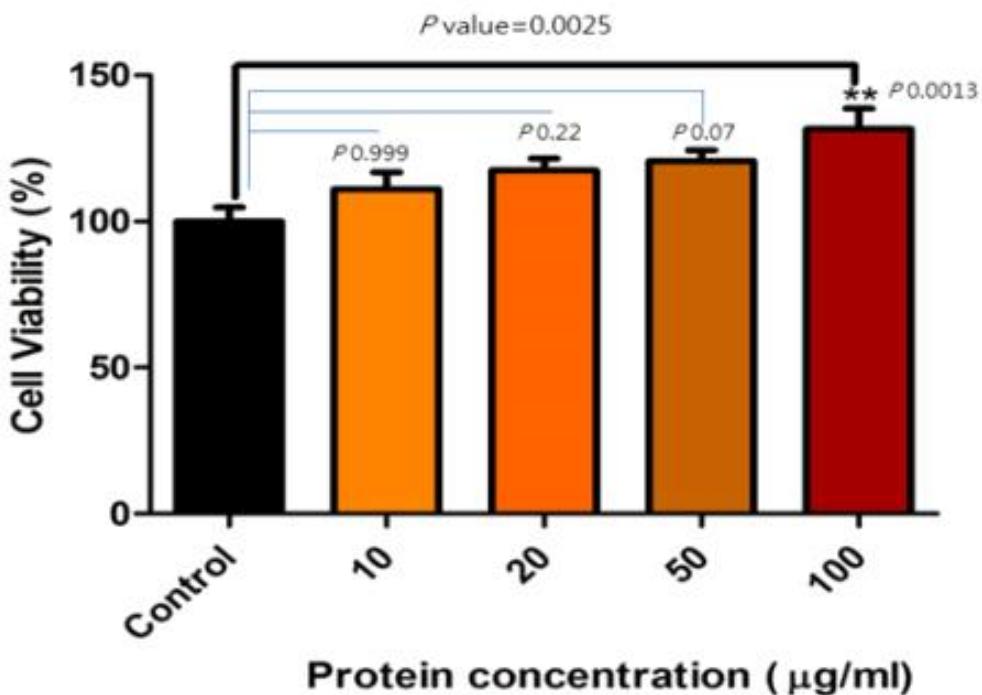


그림 129. Concentration-dependent effect of 57-kDa protein on Saos-2 cell viability. The 57-kDa proteins were added to culture medium at various concentrations (10, 20, 50, and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and cell viability was measured at 490 nm using a MTS assay. The data are expressed as a percentage of control. Each bar represents the mean \pm SE of triplicate samples of three independent experiments. ** Significant at $P < 0.01$, according to a Bonferroni multiple comparison post-hoc test.

(2) 자외선 B 조사 Saos-2 세포 활력에 미치는 영향

Saos-2 세포에 실험물질을 처리하거나 처리하지 않고 자외선 B를 조사한 후, 이들 세포의 활력을 동일한 방법으로 조사하였다 (그림 130). Saos-2 세포에 자외선을 조사하기 24시간 전에 57 kDa 단백질 0.1 mg/mL 또는 2 mM NAC를 사전 처리하였을 때, 이들 세포는 57 kDa 단백질 및 NAC 처리에 의해 자외선 조사 세포사로부터 각각 79와 77% 보호 효과를 보였으나, 국내산 로얄젤리 1.5 mg/mL 처리에서는 현저한 보호작용을 나타내지 않았다.

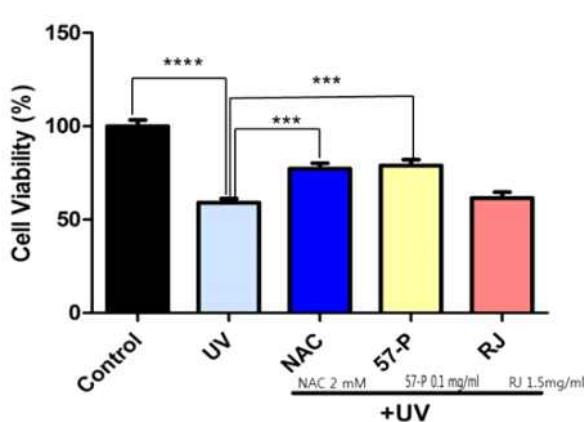


그림 130. Cell viability of Saos-2 cells following UVB irradiation either with or without the test materials. Saos-2 cells were cultured at 1×10^4 cells/well. Plates were irradiated with UVB 50 mJ/cm², the Saos-2 was killed at level of 40.91%. The 1.5 mg/mL RJ, 0.1 mg/mL 57-kDa protein, and 2 mM NAC were added to each well, and their viability was measured by MTS assay at 24 h. Each bar represents the mean \pm SE of duplicate samples of three independent experiments. *** Significant at $P < 0.001$, according to a Bonferroni multiple comparison post-hoc test.

(3) 자외선 B 조사 Saos-2 세포의 Ca²⁺ 및 미토콘드리아 보호효과에 미치는 영향

조골세포에 있는 세포의 Ca²⁺ 수용체는 뼈 발육이나 무기질 침착 등을 조절하며, 또한 미토콘드리아 역시 살아 있는 세포에서 세포 에너지를 발생시키고 세포 대사를 조절하는 주요 세포 소기관이기 때문에, 57 kDa 단백질의 Ca²⁺ 및 미토콘드리아 보호 효과에 미치는 영향을 confocal laser scanning microscope를 이용하여 평가하였다(그림 131). 대조군은 가장 높은 밀도 및 강한 적색 형광과 산재한 청색 형광을 보였다. 그러나, 처리군이 무처리 대조군보다 낮은 밀도 및 형광을 보였을지라도, 57-kDa 단백질 0.1 mg/mL, 1.5 mg/mL 국내산 로얄젤리 또는 2 mM NAC 처리군은 자외선 B 처리군보다 더 많은 증식과 Ca²⁺ 분포 및 미토콘드리아 활성을 보였다.

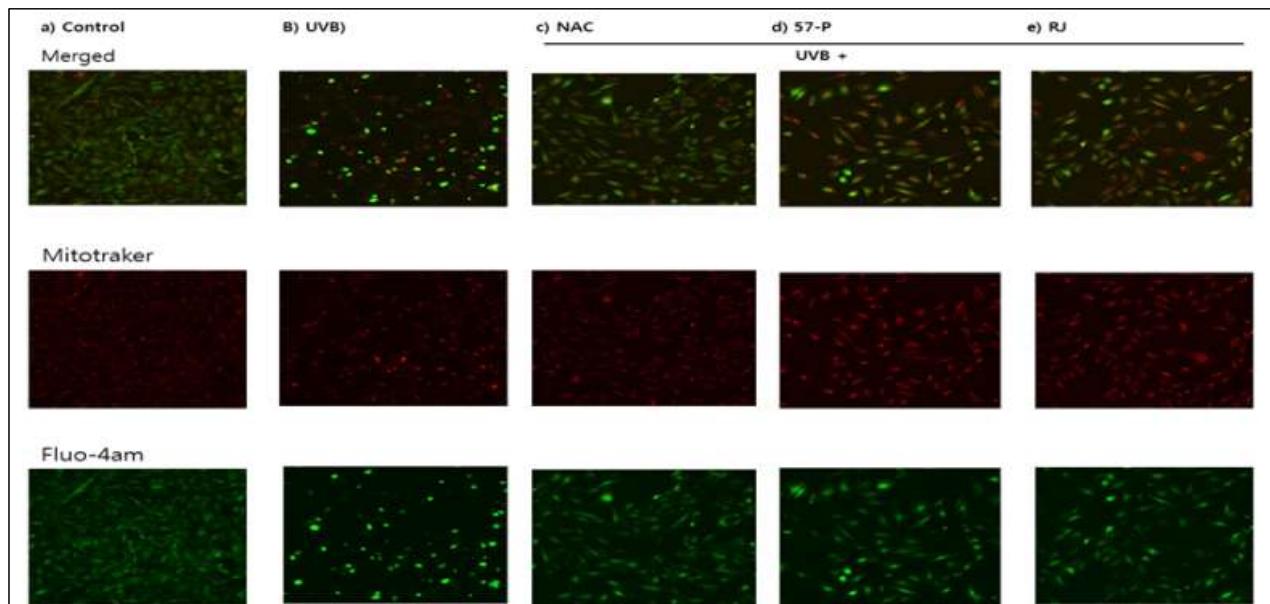
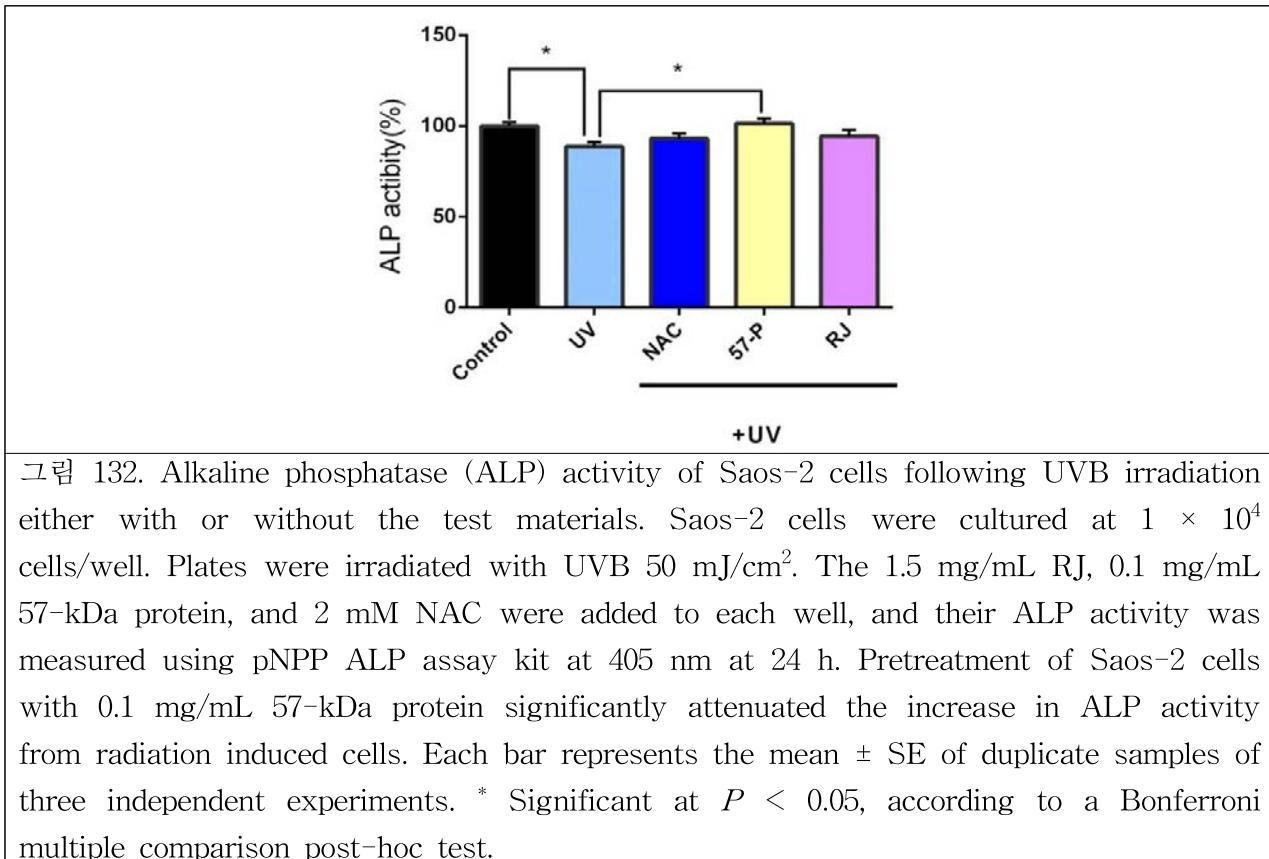


그림 131. Cytoprotective effect of 57-kDa protein on UVB stress using two different dyes. Cells were seeded 1×10^5 in confocal dishes for 24 h and then washed with phosphate-buffered saline (PBS) three times for treating with 57-kDa protein, royal jelly (RJ), and NAC in no supplemented media. After another 24 h, cells were stained by Fluo-4 AM (Ca^{2+} sensitive dye) and MitoTracker (excitation/emission spectra for MitoTracker Red, 578/598 nm) and incubated about 45 min at 37°C. They were then rinsed by PBS three times to remove any free dye to allow complete deesterification of AM ester (excitation, 485 nm; emission, 512 nm). Ca^{2+} and mitochondria levels on cell damage induced by UVB measured from fluorescence live cell images using a Fluoview FV10i Confocal Microscope. The confocal microscopic image showed that the control group had the highest density and strong red fluorescence and distributed green fluorescence.

(4) 자외선 B 조사 Saos-2 세포의 알칼리성 인산분해효소 활성에 미치는 영향

Saos-2 세포에 시험물질을 처리하거나 처리하지 않고 자외선 B를 조사한 후, 이들 세포의 알칼리성 인산분해효소 활성을 MTS 검정법으로 조사하였다(그림 132). Saos-2 세포에 자외선을 조사하기 24시간 전에 57 kDa 단백질 0.1 mg/mL를 사전 처리하였을 때, 이들 세포의 알칼리성 인산분해효소 활성을 감소시켰다. 그러나, 국내산 로얄젤리 1.5 mg/mL 및 2 mM NAC 처리는 알칼리성 인산분해효소 활성의 현저한 증가를 보이지 않았다.



라. 고찰

식물 및 그 성분들은 자외선의 해로운 영향에 대해 보호작용을 나타내고 있어, 광보호제로서 제시되어 왔다. 천연 광보호 화합물들은 폐놀성 산[hydroxycinnamic acid derivatives (예, caffeic acid and ferulic acid) 및 hydroxybenzoic acid 유도체], 플라보노이드[benzo-γ-pyrone 유도체(예, quercetin and apigenin)], 고분자 폴리페놀(예, resveratrol, nordihydroguaiaretic acid 및 차 폴리페놀류) 및 탄닌[축합탄닌류(예, proanthocyanidins)과 수용성 탄닌류(예, gallotannins과 ellagotannins)] 등을 포함하고 있다(Svobodová 등, 2003). 그러나, 로얄젤리는 10-hydroxy-2-decenoic acid과 350-kDa 단백질과 같은 많은 활성물질과 함께, 단백질 및 텐타드, 탄수화물, 지질, 미네랄, 비타민 및 기타 미량 성분을 함유하고 있으나(Ramadana와 Al-Ghamdib, 2012; Bogdanov, 2014), 로얄젤리 유래 물질의 광보호활성과 관련해서는 아직 알려진 바 없다. 로얄젤리는 대사·항산화·항노화·항당뇨·항피로·난포호르몬·항암·항세균활성과 같은 다양한 생리활성을 구비하고 있다(Crenguña 등, 2011; Ramadana 와 Al-Ghamdib, 2012; Bogdanov, 2014). 본 연구에 있어서, UVB는 인간 골육종 (osteosarcoma) 세포주 Saos-2의 세포 활력을 감소시켰으나, 그 독성 효과는 24시간 동안 0.1 mg/ml of 57-kDa 로얄젤리 단백질을 사전 처리하였을 때 어느 정도 회복되었다. 57-kDa 단백질과 산화제 NAC의 Saos-2 보호활성은 거의 비슷하였다. 이들 결과는 57-kDa 로얄젤리 단백질이 새롭고 효과적인 천연 광보호제품 개발 가능성을 보여 주고 있다.

UVB 조사는 ROS 생성의 강력한 유발인자로 알려져 있다(Wlaschek 등, 2001; Heck 등, 2003). 그 결과 일어나는 산화적 스트레스는 세포상 항산화제의 결함, DNA 손상 유도 및 세포자멸사의 발생을 포함한다(Salucci 등, 2013). UVB 노출 후 산화적 스트레스의 감소는 UV 방사 위험을 줄이기 위한 기본 메카니즘의 하나이다. 미토콘드리아는 진핵세포의 생사에 있

어서 주요 소기관으로서, 포유동물의 세포에 있어서 ROS 주요 생산자겸 타겟이다(Orrenius 등, 2007). 또한, 미토콘드리아는 세포상 에너지 생산 및 칼슘 신호표시, 세포 대사, 노화 및 세포자멸사를 포함하는 다양한 세포활성 조절에 관여하고 있다(McBride 등, 2006, Ivannikov 등, 2013, Otera 등, 2013). 그들은 생육과 분열에 의해 증식되며, 따라서 융합 및 분열은 미토콘드리아 수와 기능 유지에 중요하다(Otera 등, 2013). 미토콘드리아 형태의 불완전한 조절은 신경퇴행성질병, 근질환, 비만, 당뇨병 및 암을 포함하는 수많은 인간 질병과 연관되어 있다(Otera 등, 2013). Ca^{2+} 은 이온 채널에 있어서 신호전달의 활성화제로서 또는 간접적인 신호 전달경로에 의해 야기된 제이전령으로서 탁월한 역할을 할 수 있다. 칼슘 항상성 유지에 책임이 있는 G 단백질 결합 수용체인 세포외 Ca^{2+} -센싱 수용체는 골격대사의 조절에 관련되어 있다(Dvorak과 Riccardi, 2004). Dvorak-Ewell 등 (2011)은 폭넓은 조골세포 집단에 있어서 Ca^{2+} -센싱 수용체 신호표시는 뼈 발육과 개조에 필수이며, 뼈의 재흡수 및 무기화의 조정자의 분화 및 발현에 중요한 역할을 한다고 보고하였다. 알칼리성포스파타제는 초기 분화의 마커이며, 골기질의 무기화를 조절하는데 중요하다(Hessle, 등, 2002). 산화적 스트레스는 알칼리성포스파타제 활성 저해의 주요 원인 중 하나이다(Bai 등, 2004).

본 연구에 있어서, UVB 조사는 Saos-2 세포의 Ca^{2+} 분포, 미토콘드리아 활성 및 ALP 활성을 현저하게 감소시켰다. 57-kDa 로얄젤리 단백질로 사전 처리된 Saos-2 세포는, 정상 세포와 마찬가지로 정상적인 세포 형상과 소기관을 유지하였다. 57-kDa 로얄젤리 단백질, 로얄젤리 또는 NAC로 처리된 집단은 UVB만 조사한 집단보다 더 많은 증식과 Ca^{2+} 분포 및 미토콘드리아 활성을 보였다. 이들 결과는 57-kDa 로얄젤리 단백질이 살아 있는 조골세포에 있어서 세포외 Ca^{2+} -센싱 수용체와 미토콘드리아 활성에 영향을 미친다는 것을 의미하고 있다. 또한, UVB 조사 24시간 전에 Saos-2 세포에 57-kDa 단백질 0.1 mg/mL을 전처리하면, 세포 ALP 활성의 현저한 증가를 약화시킨다. 따라서, 57-kDa 단백질은 조골세포의 세포 보호능과 활력을 개선시키거나 또는 특수 기능을 개선시킬 수 있다. Azab 등 (2011)은 Wister Albino 수컷 쥐에 있어서, 로얄젤리가 감마선 유도 산화적 스트레스와 생화학적, 혈액학적 및 조직학적 변화에 미치는 영향을 조사하여, 로얄젤리 처리된 감마선 조사 쥐에 있어서의 생화학적, 혈액학적 및 조직학적 개선은 로얄젤리 활성성분에 의한 것이라고 하였다. 57-kDa 단백질의 작용 메카니즘을 구명하기 위해서는 보다 상세한 시험을 필요로 한다.

결론적으로, 57-kDa 로얄젤리 단백질은 자외선 유도 스트레스로부터 보호에 이용할 수 있다. 실제로 새로운 광보호제품으로서 로얄젤리 유래 물질을 이용하기 위해서는, 인간에 대한 안전성 확립과, 광보호활성이 인간의 피부에 바르거나 또는 섭취한 후에 발휘되는지 여부에 관한 연구를 필요로 한다. 역사적으로, 로얄젤리는 상용 약용제품, 건강식품 및 화장품에서 널리 사용되어 왔다(Ramadana와 Al-Ghamdib, 2012; Bogdanov, 2014). 로얄젤리 그 자체는 얼렸을 때 또는 냉동이나 건조 상태에서 매우 안정할 지라도(Masaki 등, 2001), 최종적으로 상용을 위해서 어떻게 자외선 유도 스트레스 또는 안정성을 개선할 것인가에 대한 연구가 필요하다.

제4절 1협동: 기후변화 요인에 의한 꿀벌 병원체별 감수성 변화 평가

1. 재료 및 방법

가. 산성비와 황사처리에 의한 질병 감수성 평가

시험 꿀벌은 농촌진흥청 국립농업과학원 실험 양봉장에서 연중 계대 사육 중인 이탈리안 서양종 꿀벌(*A. mellifera ligustica*) 봉군 중 광학현미경(x400)을 통해 노제마 감염여부를 확인 후 노제마 감염이 없는 봉군을 선발하였다. 봉군 내 벤데기가 운집한 벌집을 꺼내어 온도 34°C, 습도 75% 조건의 인큐베이터에서 우화를 유도하여갓 출방한 어린 일벌(24h 이내)을 채집하여 시험 꿀벌로 사용하였으며, 사육케이지(W10cm×L12cm×H15cm)에 각각 시험 꿀벌을 50마리씩 넣어 사육하였다(그림 133).



그림 133. 산성비, 황사 영향 평가를 위한 꿀벌 실내검정 케이지

노제마 비감염 꿀벌에 접종하기 위한 노제마 포자는 국립농업과학원 실험양봉장 서양종꿀벌에서 채집하였으며 특히 유전자 분석에 의한 동정 결과, 균주의 종(種; *Nosema ceranae*)이 이전의 분류 결과와 일치함을 확인할 수 있었고(이 등, 2003), 실험 전에 감염봉군에 있는 일벌의 중장에서 노제마 포자를 수집하여 24시간 이내에 접종 실험에 사용하였다(그림 134).

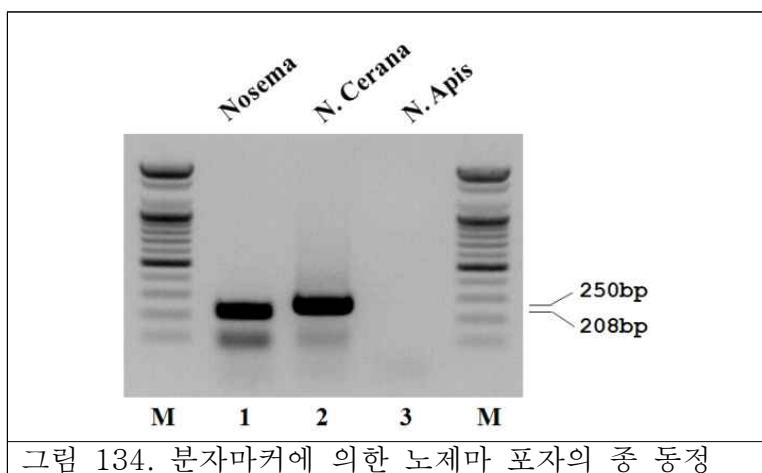


그림 134. 분자마커에 의한 노제마 포자의 종 동정

환경 조건에 따른 노제마 감염률과 감염정도를 조사하기 위해 35°C 사육 시점에서 어린 일벌 각 마리당 104개의 노제마 포자를 먹이(50% 설탕용액 200μl)를 통해 접종하였다. 각 시험은 50마리 3반복으로 하였으며, 20일 동안 5일 간격으로 일벌 5마리씩 채집하여 광학현미경(x400)으로 노제마 포자의 수를 계수하였다(Cantwell, 1970). 황사는 국립농업과학원에서 시험용으로 사용하는 미세 토양분말(2~40μm)을 확보하여 실험에 사용하였다. 황사는 케이지 당 500mg, 250mg, 100mg, 1,000mg을 처리하여 생존일수와 노제마 감염 수준을 조사하였다. 산성비는 관행적 인공산성비를 조제하여 사용하였는데, 1M H₂SO₄와 1M HNO₃를 동일 비율

로 희석하여 pH 2, pH 3, pH 4의 용액을 시험에 사용하였다. 인공산성비 용액은 첫째 날, 5일, 10일, 15일에 각각 5ml씩 분무하였으며 무처리구는 같은 분량의 증류수를 분무하였고, 처리구에서는 먹이도 산성비 용액으로 설탕용액을 만들어 급이하며 35°C에서 사육하였다.

나. 온도가 꿀벌의 수명과 질병 발생에 미치는 영향

시험에 사용한 꿀벌과 사육케이지, 노제마 감염방법 및 조사방법은 산성비와 황사처리에 의한 질병 감수성 평가와 동일한 방법으로 수행하였다. 온도가 미치는 영향을 조사하기 위해 *A. mellifera* 사육 온도는 25, 30, 35, 40°C, 그리고 습도 75% 조건의 항온기에 사육하였다. 야외 봉군 시험은 간이 하우스 안과 외부에 각각 벌수와 소비수가 동일한 3개의 봉군의 온도, 봉군중량, 노제마 및 바이러스의 감염 여부를 조사하였다.



그림 135. 야외 봉군 시험

다. 온실가스가 꿀벌의 수명과 질병 발생에 미치는 영향

온실가스가 꿀벌의 수명과 질병 발생에 미치는 영향을 조사하기 위해 시험꿀벌 및 노제마 감염방법과 조사방법은 앞서 기술한 시험과 동일한 방법으로 수행하였다. 온실가스는 메탄가스와 아산화가스를 이용하였으며, 메탄가스는 기상청에서 발표한 2013년 기준 우리나라 연평균농도인 1,957ppb를 기준으로 10배, 100배, 1000배인 1.957ppm, 19.57ppm, 195.7ppm을 대신하여, 실험의 편의를 위해 2ppm, 20ppm, 2000ppm의 농도로 처리하였다. 메탄가스가 유충발육에 영향을 조사하기 위해 이충한 유충에 먹이를 제공하고, 메탄가스에 노출시켜 성충이 될 때까지 유지키면서 발육기간 및 생존율을 조사하였다. 아산화질소는 2013년 연평균 농도를 기준으로 10배, 100배, 1000배인 3ppm, 30ppm, 300ppm의 농도로 처리하였다. 성충을 대상으로 한 시험의 대조군은 자연적으로 사망하는 개체의 정도를 확인하기 위해 노제마를 감염시키지 않은 실험군(control 1)과 노제마의 감염으로 인해 사망하는 개체의 정도를 확인하기 위해 노제마를 감염시킨 실험군(control 2)을 설정하였다.

2. 연구결과

가. 산성비와 황사처리에 의한 질병 감수성 평가

산성비의 기준은 국내의 경우 빗물이 산도 pH 5.6 미만인 경우에 산성비로 판단하지만, 일부 국가에서는 일반적인 대기의 영향으로 산성화되는 것을 고려하여 pH 5.0 이하인 비를 산성비로 정의한다. 산성비의 원인 물질로 자동차에서 배출되는 질소산화물과 공장이나 발전소, 가정에서 석탄, 석유 등이 연소되면서 나오는 황산화물이 있다. 황산화물이 대기 중에서 수증기와 만나 황산이나 질산으로 바뀌어 산성을 띠게 된다. 이러한 산성비가 성충 꿀벌의 수명과 노제마 감염에 미치는 영향을 파악하고자 표준화된 인공 산성비를 조제하여 갓 출방한 어린 일벌에 처리한 결과는 다음과 같다. pH 2, 3, 4의 인공 산성비를 분무했을 때에는 pH 3과 pH 4 처리 간에는 다소 차이를 보였지만 무처리에 비해 사망률 증가 경향은 보이지 않았다

(그림 136).

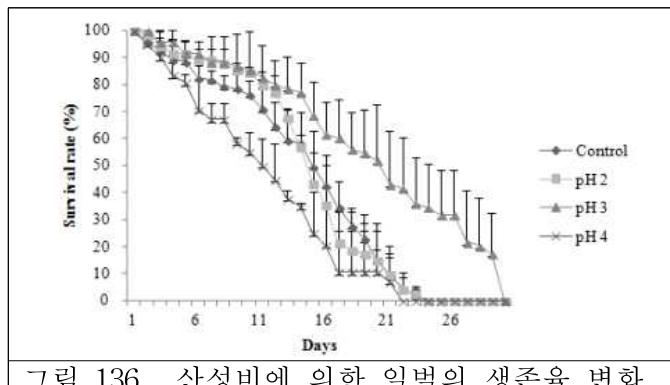


그림 136. 산성비에 의한 일벌의 생존율 변화

산성비 처리 후 노제마(*Nosema ceranae*)에 대한 일벌 체내 포자수와 감염률은 증가하는 경향을 보였지만 변이가 심하여 유의성은 나타나지 않았다. 이 실험에서 일시적인 산성비 1회 분무로 인해 그 영향이 적었던 것으로 생각되며 주기적인 산성비 접촉 조건을 만들어 그 유해성에 대해 추가 조사할 필요가 있다(그림 137).

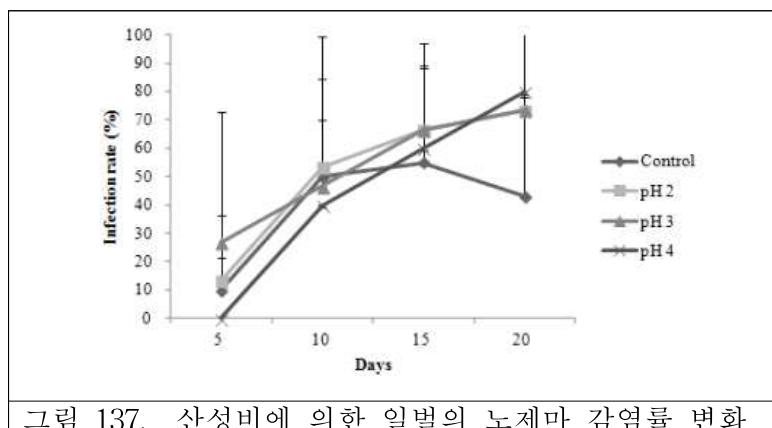


그림 137. 산성비에 의한 일벌의 노제마 감염률 변화

황사는 $40\mu\text{m}$ 이하(평균 $20\mu\text{m}$)의 모래먼지로서 일반적으로 황사가 발생하는 지역은 고배사막이나 타클라마칸 사막이다. 그러나 최근 몽골초원지대의 사막화가 급속히 진행되고 이곳의 대기가 불안정해지면서 이 지역의 강한 황사가 한반도로 유입되면서 새로운 환경보건 문제를 야기하고 있다. 황사의 농도에 따른 성충 꿀벌(일벌)의 생존율에 미치는 영향을 알아보기 위하여 사육케이지 내 $1,000\text{mg}$ (일벌 당 4.4mg)의 인공 황사를 접촉시켰을 때에 시험 일벌 모두 처리 이튿날에 사망하였다(그림 138). 사망한 일벌의 호흡기관(trachea)에서 황사 입자가 검출됨으로써 호흡장애를 일으킨 것으로 보인다(그림 139). 황사 처리 20일 후 조사에서 케이지 당 500mg (일벌 당 2.2mg) 이하의 황사와 접촉했을 경우에는 무처리와 비교하여 뚜렷한 생존율 감소 경향은 보이지 않았다(그림 138).

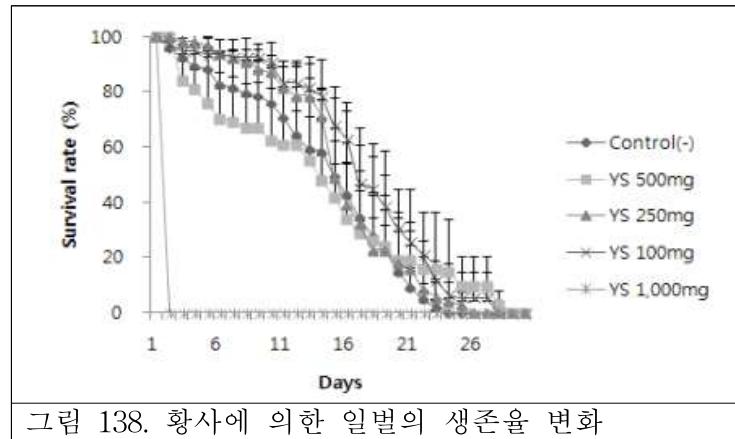


그림 138. 황사에 의한 일벌의 생존율 변화

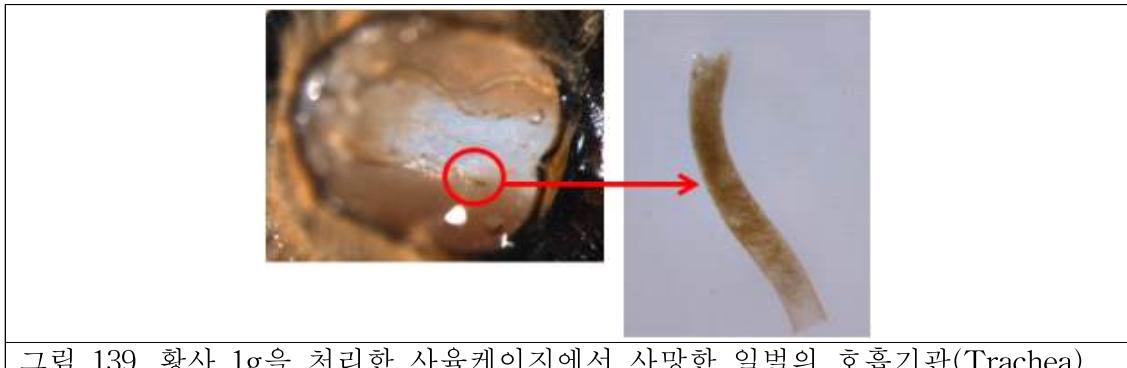


그림 139. 황사 1g을 처리한 사육케이지에서 사망한 일벌의 호흡기관(Trachea)

노제마에 대한 감염률의 경우 무처리에 비해 증가하는 경향을 보였지만 통계적으로 유의성은 없었다(그림 140). 최근 몽골 지역에서 발생하여 우리나라로 유입되는 황사보다는 대기오염물질에 의한 미세먼지가 생물에 더 유해한 것으로 나타나고 있어, 향후 미세먼지의 꿀벌에 대한 유해성에 대한 심도 있는 연구가 필요하다.

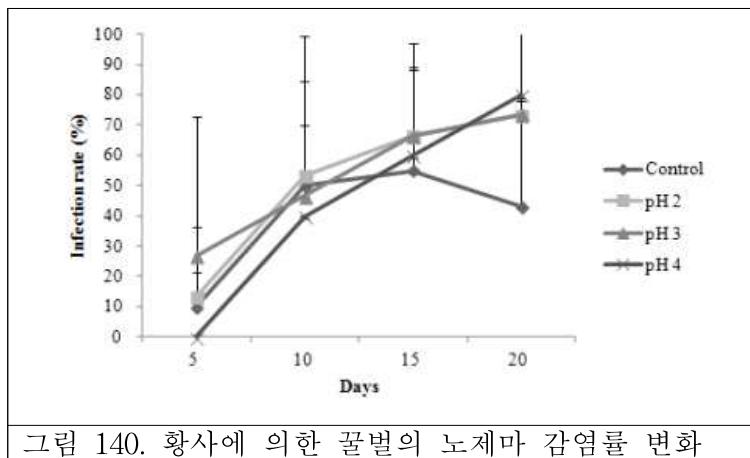


그림 140. 황사에 의한 꿀벌의 노제마 감염률 변화

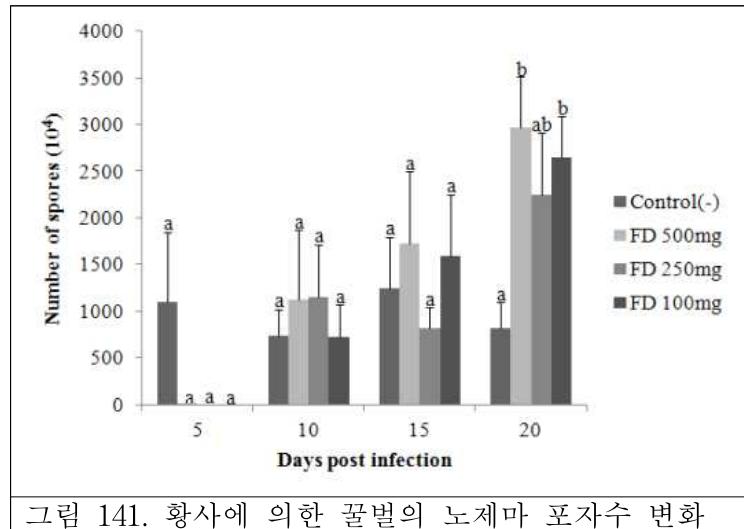


그림 141. 황사에 의한 꿀벌의 노제마 포자수 변화

나. 온도가 꿀벌의 수명과 질병 발생에 미치는 영향

온도 조건이 일벌의 수명에 미치는 영향을 알아보고자 실내에서 충분한 설탕액을 공급하며 25°C , 30°C , 35°C , 40°C , 항온(상대습도 75%)에서갓 출방한 어린 일벌을 키우며 생존 일수를 조사한 결과는 그림 142와 같다. 30°C , 35°C 에서는 34일을 생존했지만 고온 40°C 에서는 8일 이내에 전부 사망하였고, 상대적 저온 25°C 에서는 17일 이후에 사망 수가 증가하여 23일째 모두 사망하는 것으로 나타났다. 이번 실험과 같이 여왕벌과 어린 유충이 없고, 자유롭게 날지 못하는 실내 폐쇄 환경에서는 34일을 최대 수명으로 볼 수가 있었다. 일반적으로 봉군 내 육아권 온도는 $35\pm0.5^{\circ}\text{C}$ 를 유지하는 것으로 알려져 있어, 이 온도조건이 시험 온도들 중 사육 기간 중 가장 높은 생존율을 보인 것으로 나타났다. 30°C 조건은 16일까지는 35°C 와는 같은 생존율을 보이다가 이후에 생존율이 급격히 떨어졌다. 능동적인 운동열 발생에 의해 극복 할 수 있는 저온 조건과는 달리 35°C 이상의 고온 조건에서는 수동적인 수분 증발에 의한 냉각이 한계에 달할 수밖에 없어, 스스로 온도조절이 불가능한 것을 확인할 수 있다 (Southwick, 1992). 즉, 35°C 이상에서는 체온 조절능력이 한계에 달하여 고온에 의한 체내 단백질 변성 등 생리장애에 의해 사망 수가 급격히 증가하는 것으로 볼 수 있다. 기후 변화에 의해 기온이 상승하고, 한반도와 같이 습도가 높은 상태에서 고온 기간(특히 35°C) 이상이 상당 기간 지속된다면 많은 생물 좋은 물론 우리나라 꿀벌도 거의 생존이 불가능할 것으로 예측된다. 따라서 온난화로 인한 고온 피해를 막기 위한 적절한 꿀벌봉군 사육시설과 관리기술에 대한 연구가 필요할 것이다.

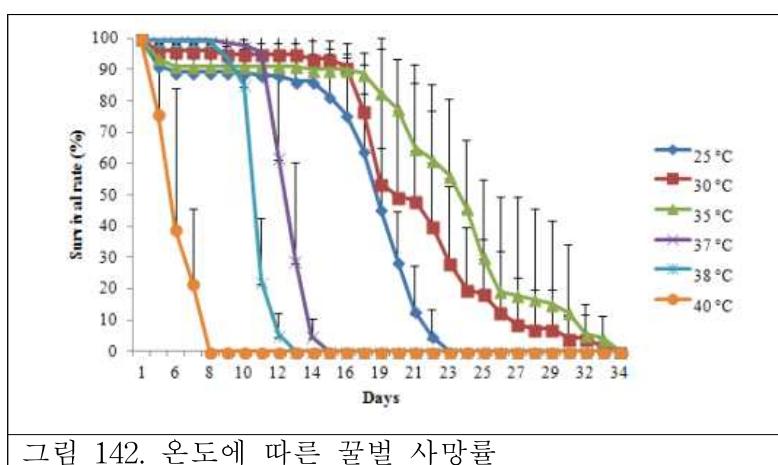


그림 142. 온도에 따른 꿀벌 사망률

하지만 생존율이 가장 높았던 사육최적온도인 35°C에서 개체 당 포자수가 200개 이하로 아주 낮게 나타남으로써 봉군 육아 온도인 35°C가 노제마 억제에 가장 효과적으로 보인다(그림 143, 144).

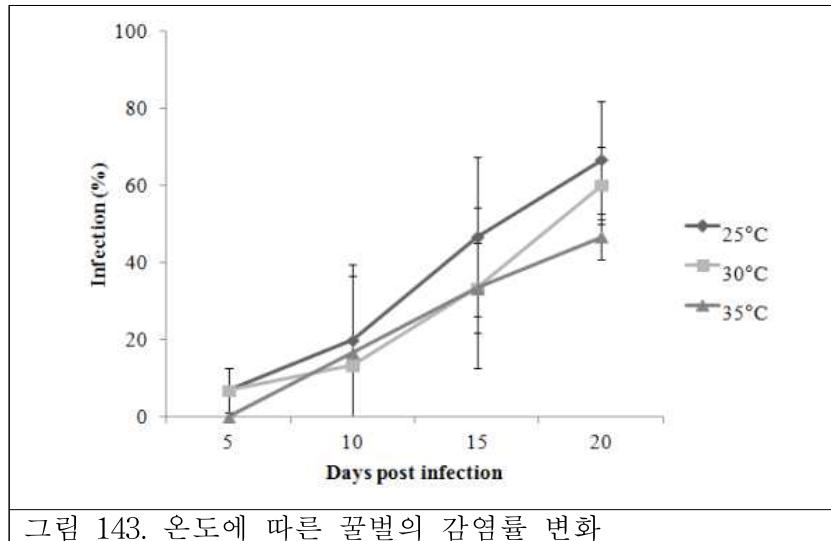


그림 143. 온도에 따른 꿀벌의 감염률 변화

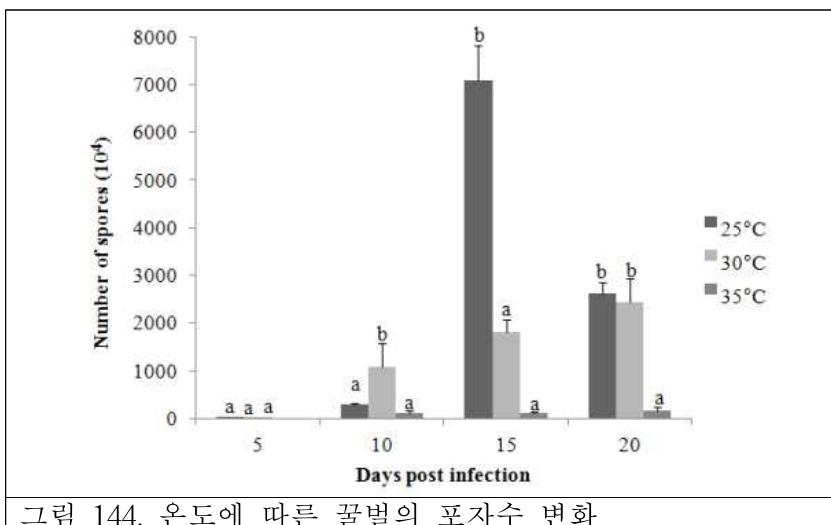


그림 144. 온도에 따른 꿀벌의 포자수 변화

고온 조건에서 꿀벌의 대사량 변화와 노제마 및 바이러스의 발병 정도를 확인하기 위해, 온실 외부와 내부에서 동일한 조건의 봉군으로 시험하였다. 고온 조건에서의 꿀벌의 대사량 변화는 온실 외부와 내부의 봉군 중량의 측정을 통해 시험하였다. 꿀벌 봉군의 중량은 먹이의 저장 정도를 의미하며, 먹이의 증감을 통해 꿀벌의 대사량의 변동을 확인한 결과는 그림 145과 같다. 온실 내부에 위치한 봉군은 온실 외부에 위치한 봉군에 비해 중량의 감소폭이 크게 나타남을 알 수 있었다.

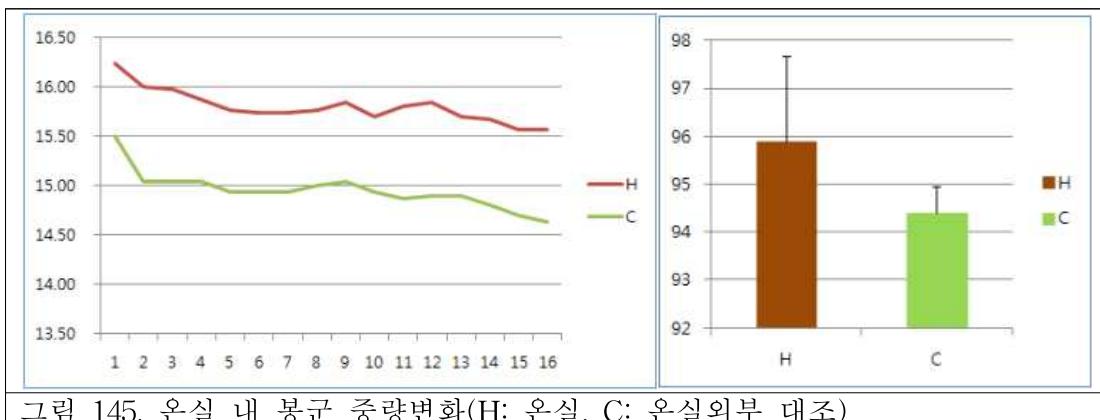


그림 145. 온실 내 봉군 중량변화(H: 온실, C: 온실외부 대조)

고온 조건에서의 바이러스 발병 정도를 확인하기 위해, 시험 초기와 시험 시작 20일이 지나고 난 뒤의 온실 외부와 내부에 위치한 봉군의 바이러스 감염 여부를 확인하였다(그림 146). 시험 초기의 바이러스의 감염 여부를 조사한 결과, 온실 외부에 위치한 3개의 봉군 중 2개의 봉군에서 여왕벌흑색병 바이러스(BQCV)가 확인되었으며, 낭충봉아부페병 바이러스(KSBV)는 1개의 봉군에서 확인되었다. 온실 내부에 위치한 3개의 봉군 중 3개의 봉군에서 여왕벌흑색병 바이러스가 감염되었다. 20일이 지난 후의 조사 결과는 온실 외부에 위치한 봉군 중 3개의 봉군에서 여왕벌흑색병 바이러스와 2개의 봉군에서 낭충봉아부페병 바이러스가 검출되었으며, 온실 내부에 위치한 봉군 중 1개의 봉군에서 여왕벌흑색병 바이러스와 1개의 봉군에서 낭충봉아부페병 바이러스가 검출되었다(표 31). 여왕벌흑색병 바이러스는 온실 외부 조건에서는 20일 동안 지속적으로 발생하였으나, 온실 내부 조건에서는 20일 후 발생이 감소함을 알 수 있었으며, 여왕벌흑색병 바이러스와 같은 열에 약한 바이러스의 경우 온실의 고온 환경에서 발생이 다소 감소함을 알 수 있었다. 고온 조건에서의 시험을 종합해보면 고온 조건은 꿀벌의 대사량에 영향을 미치는 것으로 보이며, 노제마를 비롯한 일부 바이러스의 발병에 영향을 미치는 것으로 보인다.

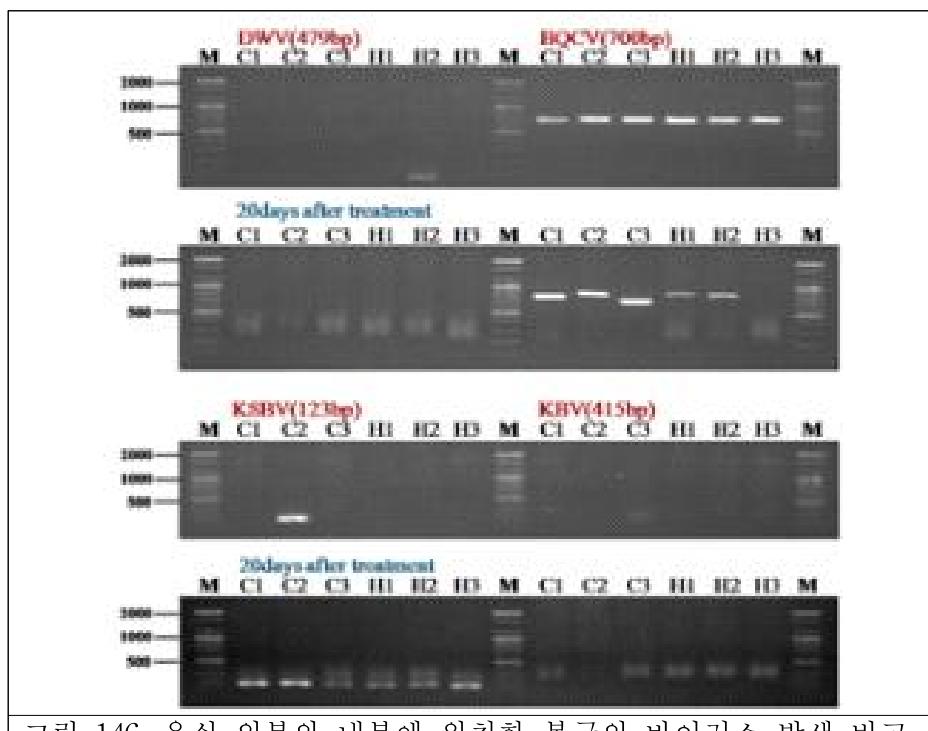


그림 146. 온실 외부와 내부에 위치한 봉군의 바이러스 발생 비교

표 31. 온실외부와 내부에 위치한 봉군의 바이러스 발생 봉군 수

시기	온실 외부						온실 내부					
	DWV	BQCV	KSBV	KBV	CBPV	IAPV	DWV	BQCV	KSBV	KBV	CBPV	IAPV
초기	-	++	+	-	-	-	-	+++	-	-	-	-
20일 후	-	+++	++	-	-	-	-	+	+	-	-	-

다. 온실가스가 꿀벌의 수명과 질병 발생에 미치는 영향

메탄가스가 일벌의 수명에 미치는 영향을 알아보기로 2ppm, 20ppm, 200ppm에서 갓 출방한 어린 일벌을 키우며 생존일수를 조사한 결과는 그림 147과 같다. 메탄가스를 처리한 모든 실험군에서 10일 이후부터 급격히 생존율이 감소하였으며, 대기 중 메탄가스 농도의 약 1,000배인 200ppm에서는 30일째 모두 사망하였으며, 100배인 20ppm과 10배인 2ppm에서는 각각 31일째와 32일째에 모두 사망하는 것으로 나타났다. 기후변화요인 중 하나인 온도조건의 경우, 꿀벌의 생육 적온인 35°C 보다 고온인 40°C에서는 8일 이내에, 25°C에서는 23일 째 모든 개체가 사망하는 경향을 나타내는 것에 비해, 메탄가스 처리구에서는 비교적 긴 생존일수가 나타남을 알 수 있었다.

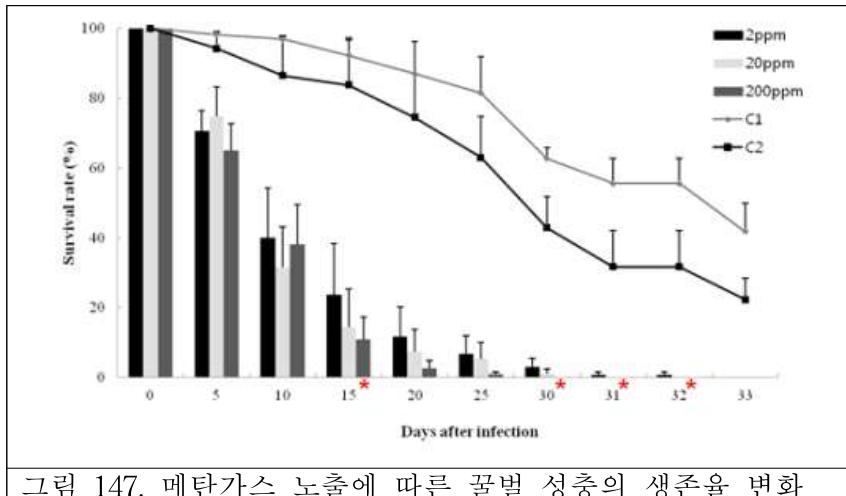


그림 147. 메탄가스 노출에 따른 꿀벌 성충의 생존율 변화

메탄가스 생존율에 있어 유의한 차이($P=0.03$)를 보이기 시작하는 농도별 사육 15일 후 사망률과 노제마 감염율의 차이를 비교한 결과, 사망률과 노제마 감염률은 control 1에서는 각각 7.7%, 7.4%($p=0.36$), control 2에서는 16.2%와 30%($p=0.39$)로 나타났다. 메탄가스 농도별로 처리했을 때 2ppm, 20ppm, 200ppm을 처리했을 때의 사망률과 노제마 감염률은 각각 76.4%와 76%($p=0.36$), 85.6%와 75%($p=0.13$), 89.1%와 83%($p=0.12$)로 나타나 처리구별 유의차가 확인되지 않아 사망률과 감염률 간의 연관성을 확인할 수 없었다(그림 148). 이는 또 다른 기후요인인 황사나 산성비를 처리한 결과에서도 동일한 결과를 확인할 수 있었다. 메탄가스 저감이 기후변화를 막을 새로운 화두로 떠오를 만큼 지구 온난화와 메탄가스는 매우 밀접한 관련이 있다. 고농도의 메탄가스가 유지된다면 기온상승은 물론 불량한 환경조건으로 인한 질병 감수성 변화로 인해 꿀벌을 비롯한 많은 생물들의 생존이 불가능할 것이라 생각한다.

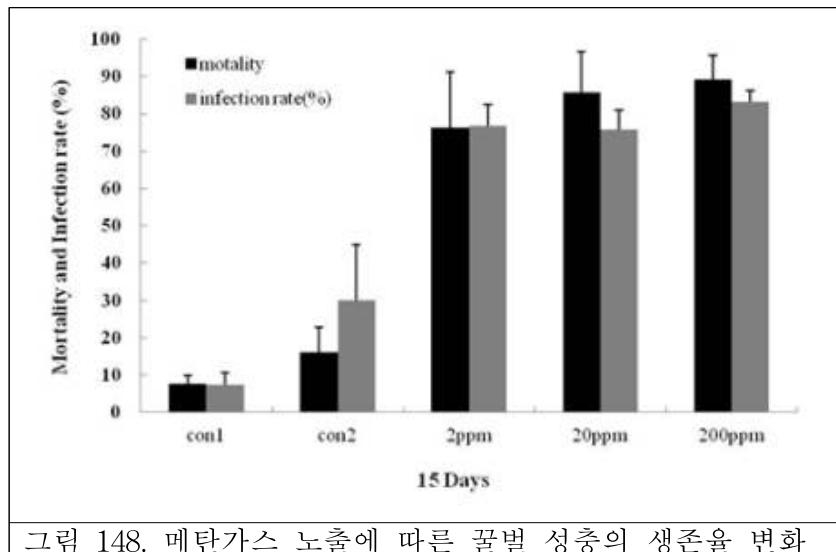


그림 148. 메탄가스 노출에 따른 꿀벌 성충의 생존율 변화

메탄가스의 농도변화에 따른 노제마 감염 여부를 조사한 결과는 그림 149와 같다. 노제마에 대한 감염률의 경우 노제마를 처리하지 않은 대조군에 비해 증가하는 경향을 보였으며, 처리 20일 후 감염률은 control 1, control2, CH4 2ppm, 20ppm, 200ppm에서 각각 23.3%, 86.7%, 90.0%, 83.3%, 100.0%로 나타났으며 통계적으로 유의한 차이가 확인되었으나($p=0.002$), 메탄가스의 농도 순으로 증가하지는 않았다.

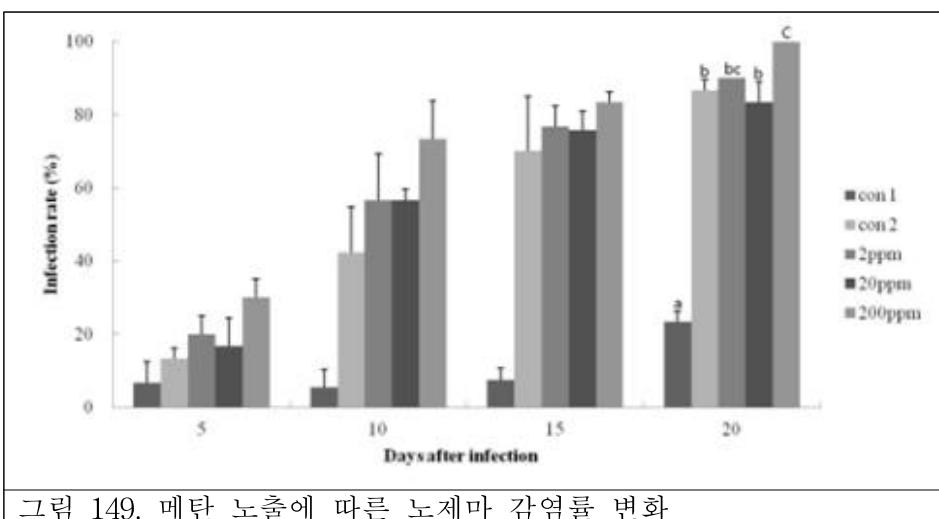


그림 149. 메탄 노출에 따른 노제마 감염률 변화

메탄가스 농도별 노제마 감염 정도에서 포자수는 감염 15일 후 통계적으로 유의한 차이를 보였으나, 노제마를 감염시킨 대조군(control 2)과 메탄가스에 노출시킨 실험군 사이의 차이를 확인할 수 없었다. 또한 포자의 감염 20일 후, 2ppm에서 2038×10^4 (spores/ml)로 가장 많은 포자수가 관찰되었으며 20ppm을 제외한 대부분의 농도에서 시간이 경과함에 따라 포자수가 증가하는 경향을 보였다(그림 150). 황사나 산성비를 처리했을 경우 포자수는 농도에 따라 증가하는 경향을 보였지만 유의한 차이는 확인되지 않았다. 그러나 온도의 경우 최적 온도인 35°C 에서 포자수가 아주 낮게 나타남을 알 수 있어, 이러한 노제마 감염 양상의 차이는 각 개체의 면역기능, 영양상태 등의 요인에 의해 영향을 받는 것으로 생각된다.

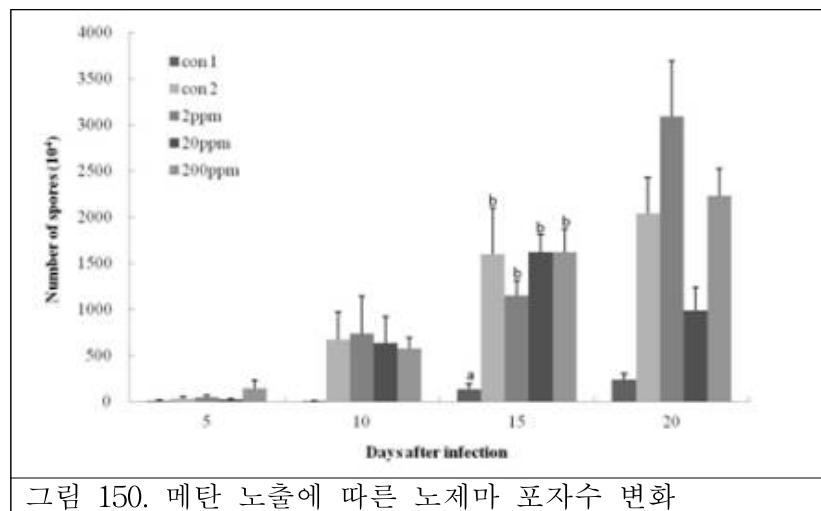


그림 150. 메탄 노출에 따른 노제마 포자수 변화

메탄가스가 꿀벌 유충의 발육에 미치는 영향을 조사한 결과는 표 2와 같다. 메탄가스의 농도가 증가함에 따라 전 발육단계에서 대조군에 비해 유충의 생존율, 용화율, 우화율이 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 발육기간 동안 메탄에 노출되었던 우화 성충의 무게를 조사한 결과(표 33), 메탄가스의 농도가 증가할수록 성충의 무게도 감소함으로 메탄가스는 꿀벌 유충의 발육 전반에 있어 영향을 미침을 알 수 있었다.

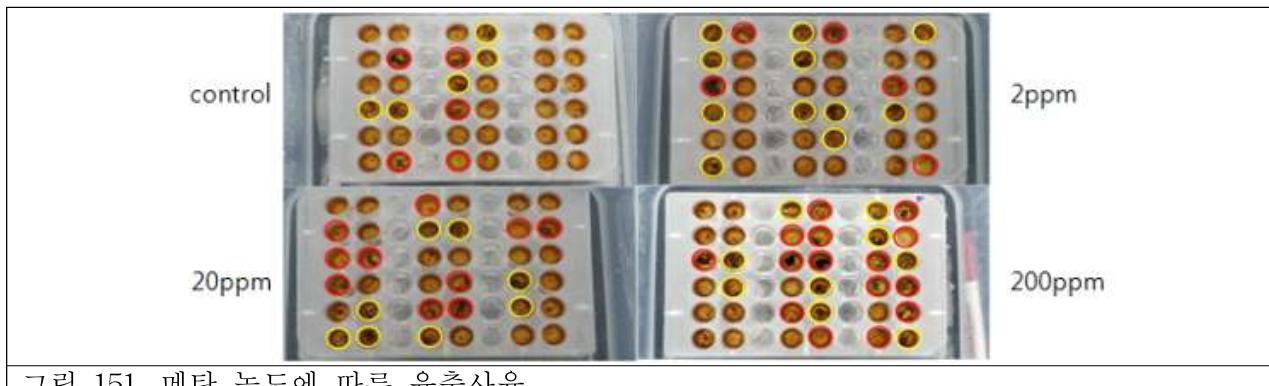


그림 151. 메탄 농도에 따른 유충사육

표 32. 메탄가스 농도에 따른 유충 생존율

	No. of grafted larvae	No. of pre-pupae	No. of emerged adults	Survival rates (%)		
				Larvae to prepupae	Prepupae to adults	Larvae to adults
Control	36	31	26	97.2	88.6	72
CH4 gas 2ppm	36	31	20	100	86.2	55.4
CH4 gas 20ppm	36	26	18	88.9	81.3	49.9
CH4 gas 200ppm	36	21	12	91.7	36.6	33.2

표 33. 메탄가스 농도에 따른 우화 성충의 무게

Group	Number	Adults weights (mg)		
		X±SD	Min	Max
Control	26	86.6±13.3	39.6	140.7
CH4 gas 2ppm	20	87.5±9.7	59.7	129.4
CH4 gas 20ppm	18	73.2±7.5	46.8	104.3
CH4 gas 200ppm	12	71.9±6.9	43.1	95.0

온실가스인 아산화질소가 일별의 수명에 미치는 영향을 알아보고자 3ppm, 30ppm, 300ppm에서 갓 출방한 어린 일벌을 키우며 생존일수를 조사한 결과는 그림 20과 같다. 아산화질소에 노출시킨 꿀벌의 생존일수는 아산화질소에 노출되지 않은 대조구에 비해 생존일수에 큰 차이가 없었다.

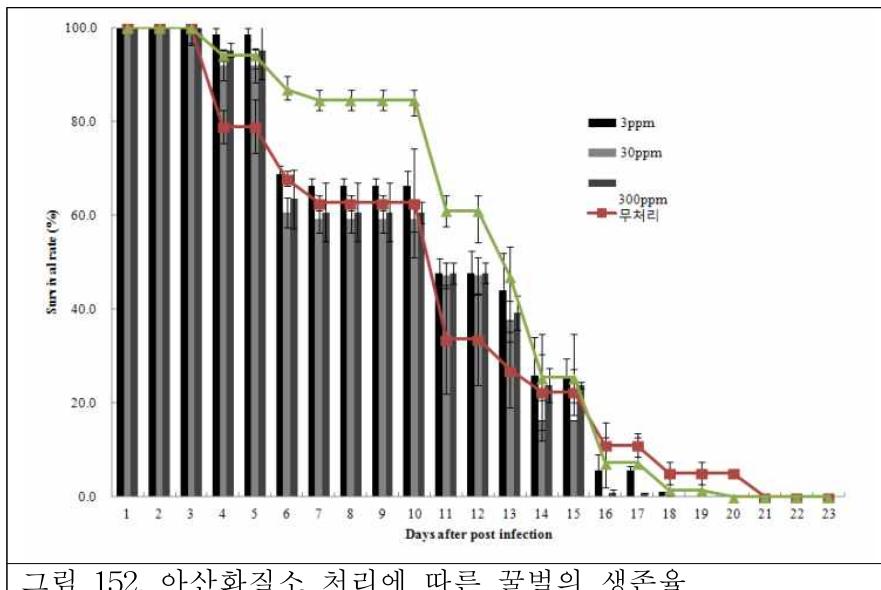


그림 152. 아산화질소 처리에 따른 꿀벌의 생존율

아산화질소가 꿀벌의 노제마 발병에 미치는 영향을 알아보기 위해 노제마 감염률과 포자수를 조사하였다. 꿀벌의 노제마 감염률은 시간이 경과함 따라 감염률이 증가하였으나(그림 153), 감염 정도를 나타내는 포자수는 증가하지 않았다(그림 154). 또한 감염률과 포자수에서 모두 농도별 유의차는 확인할 수 없었다.

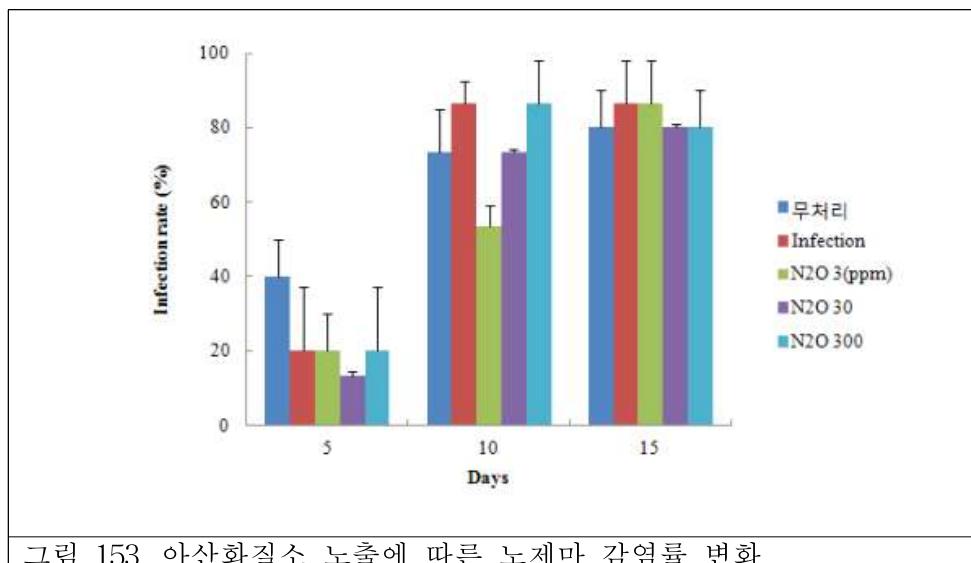


그림 153. 아산화질소 노출에 따른 노제마 감염률 변화

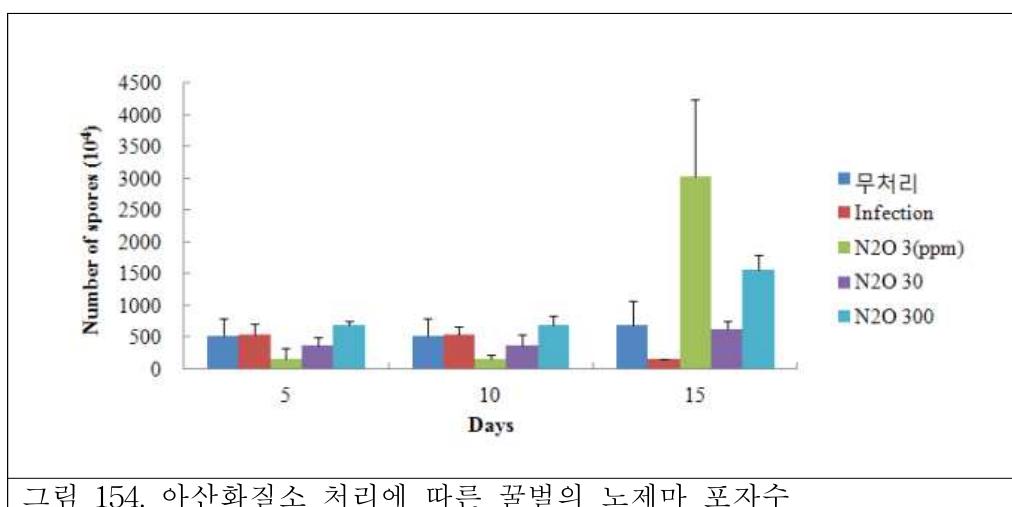


그림 154. 아산화질소 처리에 따른 꿀벌의 노제마 포자수

제5절 2협동: 기후요인에 따른 꽃벌 군집 외역활동 패턴 변화 연구

1. 개체 중심 실험 연구 기반 및 시스템 구축

가. 조작적 실험 연구를 위한 기반 구축: 야외실험장, 온실, 저온실험실, 항온항습실

개방된 장소에서 수행해야 하는 실험 연구를 위해 야외실험장(field station)을 구축하였다. 야외실험장은 다른 동물과 사람에 의한 방해가 없는 곳, 관찰과 장비 이동이 용이한 곳 등의 조건을 고려하여 결정하였다 (그림 155).



그림 155. 봉군 사육 및 관찰을 위한 야외실험장(field station). 다른 동물과 사람에 의한 방해가 없고, 관찰과 장비 이동이 용이한 장소로 인천대학교 캠퍼스 내부 건물 옥상에 조경을 하고 봉군을 설치하였다. 일반인의 출입을 통제할 수 있는 장소로 여러 개의 군집 관리와 관찰에 용이하다.

환경 조건을 통제하여야 하는 실험 연구의 경우 온실(그림 156)에서 진행하였다. 창문과 환풍기, 천정 전동 스크린 또한 온·습도 조절에 이용하였다. 온실에서 진행하는 실험은 봉군 내·외부 조건을 통제하기 용이하며, 사망 개체 수 측정, 사망 개체 시료 확보 등에 유용하였다. 더불어 연구 수행과정 동안 주변 다른 곤충에 의한 영향을 배제할 수 있으며, 바람과 비의 영향을 안 받으며, 사람에 의한 방해가 없는 점도 중요하게 작용했다.



그림 156. 실험 연구 수행을 위한 온실(16.5x6.5x4m). 냉·난방 시설을 통한 온도 조절과 대형 가습기와 제습기를 이용한 습도 조절이 가능 해서 온·습도 요인을 인공적으로 변화시키는 실험을 할 수 있고, 인공 먹이원에 대한 훈련을 통해 꽃꿀의 성분, 질(quality) 조절, 꽃꿀 섭식 활동 중 일꾼 개체의 인위적 감염 유발 등의 실험이 가능하다.

온실에서 이루어지는 온도 조절의 경우보다 세밀한 온도 조절과 온도 유지를 위해 PVC Shelter (65x120x77cm; 그림)를 제작하여 그 안에 벌통을 설치하였다. PVC Shelter로 인해 온도조절의 폭을 낮추고 온도유지를 가능하게 하고, PVC Shelter입구(23x53x20cm)를 통해 드나들 수 있도록 하여 관찰에 용이하도록 하였다.

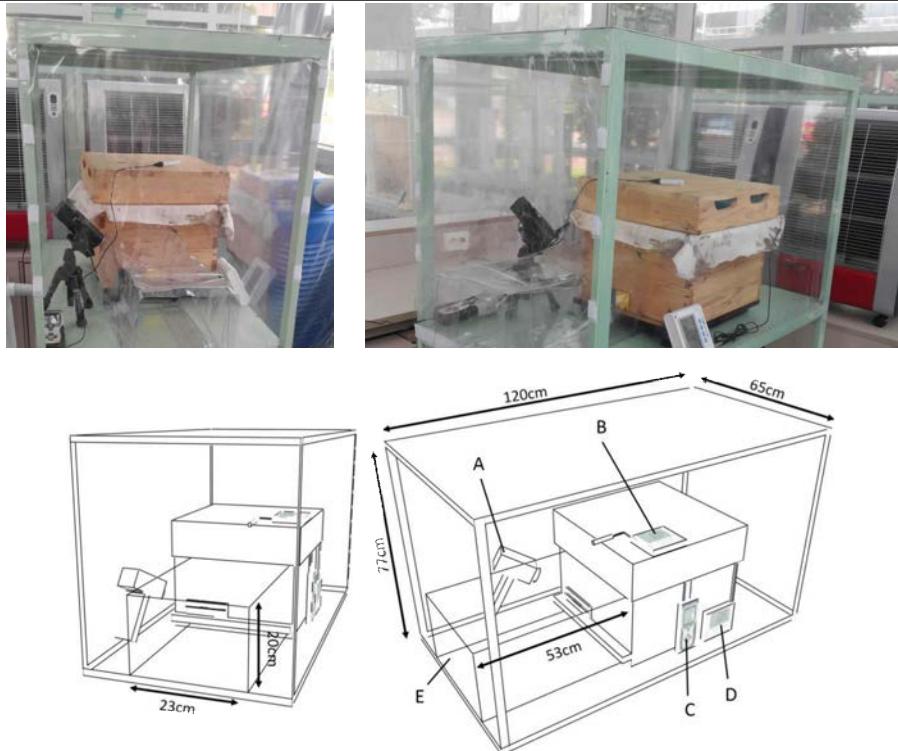


그림 157. Shelter (65x120x77cm) 도식(위)과 사진(아래). 보다 세밀한 봉군 내·외부 조건 통제를 위해 소형 shelter 내부에 봉군을 설치하였다. 온도 조절과 온도 유지가 용이하고 입구로 드나드는 개체 관찰이 용이하였다. A: 벌통 입구 촬영 캠코더(Sony, HDR-CX380), B: PVC shelter 내부 온·습도계(Iondo, S500-EX), C: 벌통 내부 온도계(CEM, DT-8991C), D: 벌통 내부 온·습도계(Iondo, S500-EX), E: PVC shelter 입구(23x53x20cm)

온실 내부에는 망사 스크린(2.5x12x4m)을 설치하여 창문에 부딪혀 죽는 개체를 줄이고, 사망 개체 수 파악에 용이하도록 하였다. 수분 공급원으로는 벌통의 소문을 통하여 물을 보충해주는 급수기를 사용하였고, 인공먹이원의 경우 벌통과 약10m 떨어진 지점에 두 개의 인공먹이원을 설치하고 1mol의 fructose 용액을 제공하였다(그림 158).



그림 158. 온실 내부에 망사 스크린(net screen; 2.5x12x4m)을 설치하여 온실 내부 유리에 개체가 부딪혀 죽는 현상을 방지하였다.

저온 환경에서 개체의 실험적 조작이 필요한 실험, 강제 동면 등을 위해 저온실험실 ($5 \times 2.5 \times 2.4\text{m}$; 연구 수행 중 $7 \pm 2^\circ\text{C}$ 로 유지)이 이용되었다 (그림).



그림 159. 저온실험실. 10°C 이하의 저온 실험을 수행할 수 있는 소형 실험실 모습($5 \times 2.5 \times 2.4\text{m}$). 개체의 활동성을 줄이는 실험적 조작이 가능하고 낮은 온도에서 행동을 관찰할 수 있다.

항온항습실($7.5 \times 4\text{m}$)은 일정한 온도에서 진행되어야 할 실험 연구에 이용되었다. 항온항습기 (Constant temperature and humidity controllers; 범양냉방공업(주), USV10, 냉방10RT)와 실험 맞춤형 인공 둥지 등이 설치되었다(그림 160).



그림 160. 항온항습실에서 온도와 집단성에 대한 실험 진행 중.

나. 기후요인 측정 및 통제 실험을 위한 시스템 구축

온실 및 실험 장소에서 봉군 내·외부의 기후 요인 조건의 측정 및 통제를 위해 온·습도 등을 주어진 시간 간격으로 자동으로 기록하는 data logger를 설치하였다. 온·습도 data logger(Iondo, S500EX & DT-172; 온도범위: -40~100 °C, 습도범위: 0~100 %; 로그인 인터벌 시간: 2초~24시간)를 봉군의 내·외부, 온실 내부, 쉘터 내부, 먹이원 등에 설치하였다. 온도 data logger(DT-8891C)를 소비의 중앙과 가장자리에 설치하여 중앙과 가장자리의 온도를 측정하였다. 봉군 내부에 설치 시 data logger 케이블은 6개의 소비판중 중앙에 설치하였다. 그리고 두 data logger는 10분 간격으로 온·습도를 측정하도록 설정하였다. 조도측정의 경우 조도계(TES, TES-1332A)를 사용하며 측정은 벌통 입구를 기준으로 1시간 간격으로 측정하였다. 또한 국지적인 온도 변화에 따른 행동 양상 변화를 알아보기 위하여, 쉘터 내부 온도 변화 없이 먹이원 온도를 3단계로 나누어 변화를 주어 실험을 진행하였다. 33°를 control로 놓고 각각 ±10° 변화를 주어 진행하였다. 온도 조절에는 난방기(AH-730S) 및 냉방기(HSC-1160)를 사용하였다.

다. 자동 모니터링을 위한 온/습도 자동기록장치 설치

온·습도 등 기후요인을 주어진 시간 간격으로 자동으로 기록하는 date logger를 봉군의 내부와 외부에 설치할 것이다. 온·습도 date logger(S500EX)의 온도범위는 -40~100°C, 습도범위는 0~100 %이고, 로그인 인터벌 시간은 2초~24시간으로 사용할 수 있다. 벌통 내부에 설치 시 date logger 케이블은 벌통 중앙에 설치한다. 온도 date logger(DT-8891C)의 온도범위는 -30°C~500°C이다.



그림 161. 벌통 내부에 온습도 측정 장비(S500EX) 센서를 장착한 경우

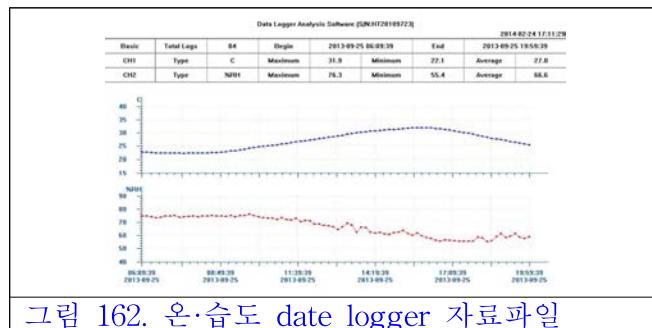


그림 162. 온·습도 date logger 자료파일

조도측정의 경우 조도계(TES-1332A)를 사용하며 측정은 벌통 입구를 기준으로 일정 시간 간격으로 측정한다.

벌통 내부 외각 소비판과 중간 소비판에는 온도 date logger(DT-8891C)설치하였고, 벌통 외각에는 온·습도 date logger(S500EX)설치하였다(그림 163).



그림 163. 온/습도 data logger 설치 위치(왼쪽 사진, 빨간점) 및 온도 data logger(가운데사진, DT-8891C)와 온/습도 data logger(왼쪽사진, s500-EX)

라. 봉군 외부 온도 조절 및 행동기록

봉군 외부 온도 조절은 비닐쉘터 안에 설치한 토종벌 벌통의 외부기온을 난방기와 이동식 에어컨을 이용 컨트롤 하고 싶은 온도범위의 $\pm 1^{\circ}\text{C}$ 로 조절한다. take off와 landing 행동기록의 경우 벌통 입구에 영상기록장치를 설치하여 촬영한다(그림 164).



그림 164. 벌통입구 촬영모습

□ 실험설계A 일정 및 분석 방법 - 토종벌의 일주기 패턴의 경우

- 야외실험장과 온실을 동시에 촬영, 당일 날씨에 따라 촬영기간을 변경: am 06:00~pm 08:00, 들고나는 꿀벌들을 10분 단위로 카운팅하였다.
- 통계 방법은 MANOVA(다변량분산분석)과 PCA(주성분분석)을 이용, 정리된 영상 분석 자료에 대한 통계적 처리는 SigmaPlot / SYSTAT 이용하였다.

마. 행동의 기록과 데이터 수집

개체 행동 기록을 위해 개체인식 모니터링 시스템 탑재 실험 맞춤형 인공 둥지와 먹이원에 영상 기록 장치를 설치하였다. 먹이원에는 영상 기록 장치를 한대 설치하며, 둥지에는 입구에 1대, 둥지 좌·우에 1대씩, 통로에 1대를 설치하여 총 5대를 설치하였다. 캠코더(Sony, HDR-CX380) 등이 사용되었다.



그림 165. 실험을 위해 제작된 둥지의 영상 데이터 기록을 위한 장비 설치(왼쪽), 인공 먹이 원에서 개체의 행동 기록 장비 설치 모습(중앙), 그리고 인공 둥지 내부의 촬영 모습(오른쪽).

바. 데이터 분석

촬영한 영상기록을 이용하여 데이터를 수집하였다. 수집 변수으로는 둥지 내부의 행동, 먹이원에서의 행동 및 방문 빈도수, 시간대별 들고 나는 빈도수, p-Chip® 인식률 등이 수집되었다. EthoVision XT으로 추적관찰 및 반복패턴 분석, 속도측정 등을 분석할 예정이며, SigmaPlot / SYSTAT 이용한 통계 분석을 수행하였다.

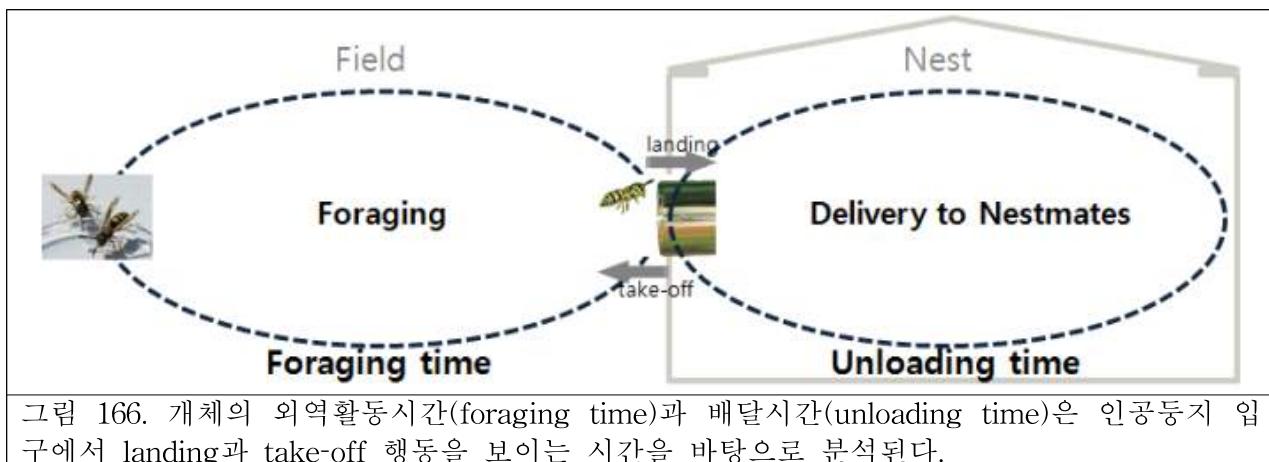


그림 166. 개체의 외역활동시간(foraging time)과 배달시간(unloading time)은 인공둥지 입구에서 landing과 take-off 행동을 보이는 시간을 바탕으로 분석된다.



그림 167. EthoVision XT 8를 이용한 영상 자료 분석 및 처리

2. 주요 결과

가. 기후요인에 따른 토종꿀벌과 서양꿀벌의 외역활동 빈도 변화에 대한 실험 연구

토종꿀벌(Asiatic honey bee, *Apis cerana*)과 서양꿀벌(Western honey bee, *Apis mellifera*)에서 봉군 내·외부 온도가 외역활동을 할 것인지 등지에 머물 것인지에 대한 의사결정에 미치는 영향을 분석하고, 실험적으로 봉군 내·외부의 온도를 조작하여 일벌들의 외역활동 의사결정 빈도에 미치는 영향을 파악하였다. 본 연구는 토종꿀벌과 서양꿀벌에서 봉군 내·외부의 급격한 온도변화가 집단 구성원에게 스트레스 요인으로 작용하고, 집단의 생산성과 효율성 유지를 위해 구성원의 외역활동을 변화시킨다는 아이디어에 기반을 두고 있다. 꿀벌의 일주활동과 기후요인(온도, 습도, 조도)과의 관계, 봉군 외부 온도에 따른 벌통 내부 온도를 검토하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

- 꿀벌의 일주활동은 오전 6시에 시작하여 오후 8시에 끝났으며, take-off는 오후 2시에서 3시에 최고에 달하였고, 5시에서 6시 이후 landing수가 take-off하는 일벌의 수보다 많아지게 되며, 시간에 따라 take-off와 landing 수가 감소하다 귀소활동이 끝났다.
- 서양꿀벌의 외역활동과 온도의 상관은 take-off $r=(0.532\sim 0.858)$, landing $r=(0.504\sim 0.941)$ 으로 유의하였고, 습도는 부적 상관관계로 나타났다. 조도는 take-off $r=(0.577\sim 0.849)$, landing $r=(0.201\sim 0.803)$ 으로 유의하였다. 토종꿀벌의 외역활동과 온도의 상관은 take-off $r=(0.411\sim 0.703)$, landing $r=(0.275\sim 0.631)$ 으로 유의하였고, 습도는 부적 상관관계로 나타났다. 조도는 서양꿀벌과 다르게 상관관계를 나타나지 않았다.
- 외역활동에 영향을 주는 주성분으로는 서양꿀벌, 토종꿀벌 모두 제 1성분으로는 온도가, 제 2성분으로는 습도, 제 3성분으로 벌통온도가 나왔다.
- 봉군 외부 온도에 따른 외역활동의 변화는 오전 시간대 벌통 외부 온도가 높을수록 take-off가 많아졌으며, 오후 시간대는 38°C 보다 낮은 온도에서 take-off가 많이 나타났다.
- 벌통 외부 온도가 33°C에서 38°C증가 할 경우 벌통 내부 중앙 온도에 변화가 없고, 28°C 감소 할 경우 벌통 내부 중앙온도가 감소하였다.

(1) 시간 / 온도에 따른 꿀벌의 일주기 활동

서양꿀벌은 2013년 9월 14일부터 9월 20일 까지, 토종꿀벌은 2014년 9월 5일부터 9월 12일 까지 7일에 걸쳐 am06:00~pm08:00 일출일몰 시간에 맞춰 촬영된 영상을 10분 간격으로 들고나는 벌들을 수동식 카운터로 계수하였다. 서양꿀벌과 토종꿀벌의 일주일 시간/온도에 따른 들고나는 꿀벌의 행동 그래프는 그림 168과 같다. 서양꿀벌(그림 168 a)의 시간대별 들고나는 꿀벌의 수를 보면 am06시에 take-off를 시작하였고 pm3시경에 최고 피크에 다하였으며, pm5~6시 이후 take-off하는 벌이 급격히 줄어들었다. landing하는 일벌의 경우도 take-off와 유사한 형태를 나타내었다. pm1시 이후부터는 landing하는 일벌의 수에 비하여 take-off하는 일벌의 수가 많았으나 그 이후 pm4부터는 landing하는 일벌의 수가 take-off와 비슷해졌다. 토종꿀벌(그림 168 b)는 서양꿀벌처럼 am06시에 take-off가 시작되고, 서양꿀벌 보다 빠르게 pm2시경에 최고 피크에 달한다. 그리고 pm5시 이후부터는 landing수가 take-off하는 일벌의 수보다 많아지게 되며, 시간에 따라 take-off와 landing 수가 감소한다.

pm3시경 서양꿀벌의 take-off 최고 피크에 도달하였을 때의 온도는 31°C이고, pm5~6시 이후 take-off하는 벌이 줄어드는 시간대의 온도는 26~29°C 범위에 해당하였다. 토종꿀벌의 take-off가 최고에 달하는 pm2시경에 온도는 34°C였다. 그리고 pm5시 이후부터는 landing 수

가 take-off하는 일별의 수보다 많아지게 되는 시간대의 온도는 26~28°C 해당하였다(그림 168).

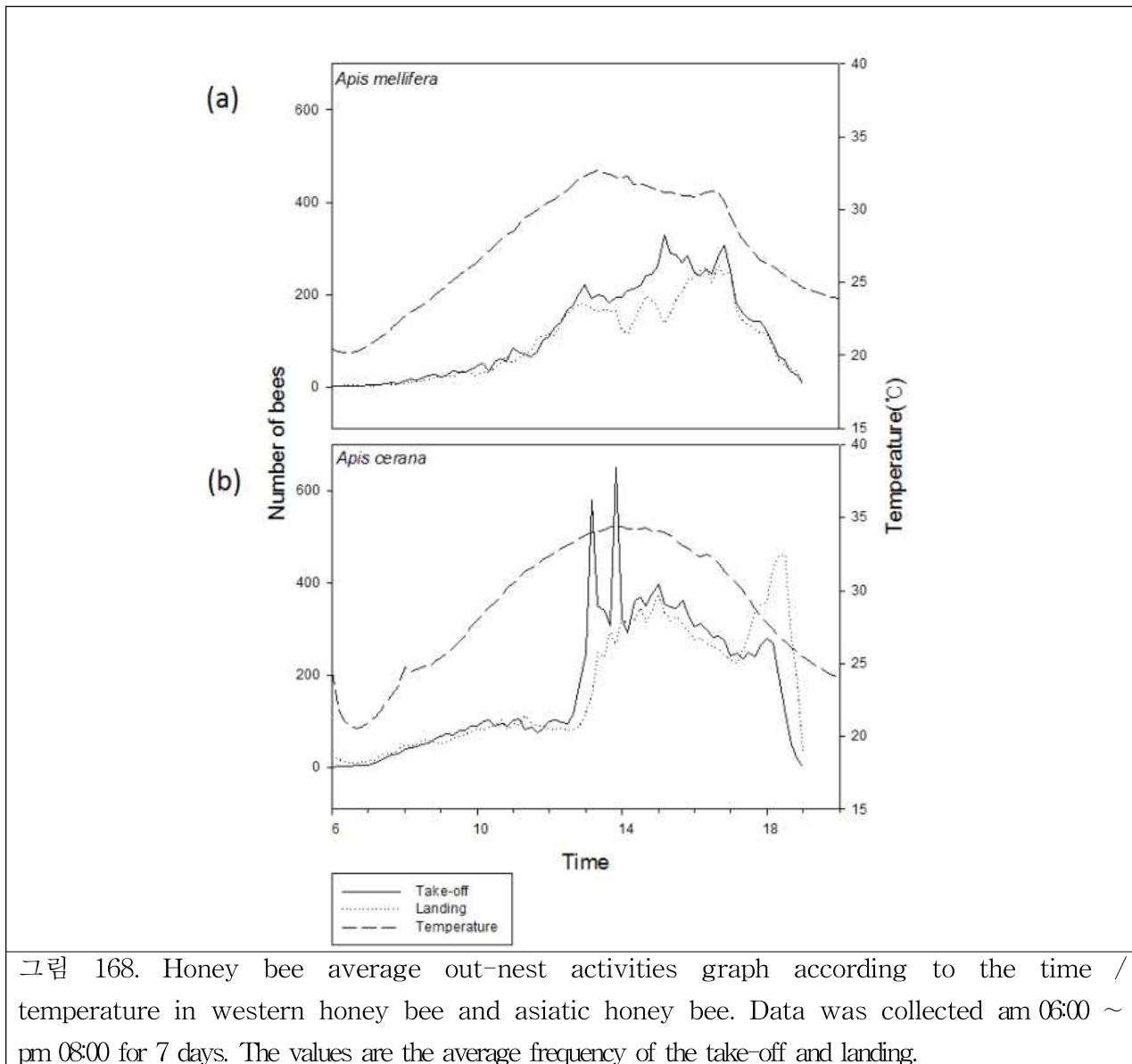


그림 168. Honey bee average out-nest activities graph according to the time / temperature in western honey bee and asiatic honey bee. Data was collected am 06:00 ~ pm 08:00 for 7 days. The values are the average frequency of the take-off and landing.

(2) 꿀벌 일주활동과 기후요인의 상관

서양꿀벌과 토종꿀벌의 각 조사일의 시간별 외역활동(take-off와 landing)과 기후요인인 온도, 습도, 조도의 상관관계수를 구하였고, 표 34와 같다. 본 연구에 있어서 서양꿀벌의 온실온도 take-off의 상관계수는 $r=(0.532\sim 0.858)$ 과, landing의 상관계수는 $r=(0.504\sim 0.941)$ 으로, 조사일 모두 꿀벌의 외역활동이 온도와 유의성을 보였으며, 별통온도의 경우도 take-off의 상관계수 $r=(0.684\sim 0.900)$ 과 landing의 상관계수 $r=(0.771\sim 0.959)$ 도 유의성을 보였다. 습도(온실습도, 별통습도)의 경우 두 변수가 서로 다른 방향으로 변화하는 부적 상관관계로 나타났다. 한편, 조도의 take-off의 상관계수 $r=(0.577\sim 0.849)$ 과, landing의 상관계수 $r=(0.201\sim 0.803)$ 은 유의성을 보였다(표 34).

표 34. Western honey Bee out-nest activities and climatic factors of coefficient correlation. The following is a correlation analysis of Western honeybee between out-nest activities (take-off, landing) and greenhouse temperature, humidity, hive temperature, humidity and illumination over a week of speculation. The correlation coefficients of greenhouse temperature on take-off and landing were $r=(0.532\sim 0.858)$ and $r=(0.504\sim 0.941)$, which were significant. hive temperature also came out to be significant, as take-off $r=(0.684\sim 0.900)$ and landing $r=(0.577\sim 0.849)$. Both greenhouse and hive humidity demonstrated negative correlation. Illumination gave take-off $r=(0.577\sim 0.849)$ and landing $r=(0.201\sim 0.803)$, which were significant as well.

Date	Meteorlogical factor				
	Greenhouse temperature	Greenhouse humidity	Hive temperature	Hive humidity	Illumination
2013.9.14	Take-off	.786**	-.776**	.684**	-.031
	Landing	.827**	-.812**	.880**	-.317**
9.15	Take-off	.794**	-.714**	.900**	-.234*
	Landing	.840**	-.815**	.956**	-.386**
9.16	Take-off	.532**	-.473**	.888**	-.381**
	Landing	.504**	-.455**	.869**	-.322**
9.17	Take-off	.801**	-.819**	.885**	-.274*
	Landing	.577**	-.539**	.771**	-.324**
9.18	Take-off	.805**	-.639**	.858**	-.048
	Landing	.799**	-.644**	.893**	-0.30
9.19	Take-off	.858**	-.725**	.896**	.409**
	Landing	.901**	-.789**	.959**	.371**
9.20	Take-off	.736**	-.733**	.688**	.180
	Landing	.941**	-.910**	.820**	.298**

**p<0.01, *p<0.05

토종꿀벌의 온실온도 take-off의 상관계수는 $r=(0.411\sim 0.703)$ 와, landing의 상관계수는 $r=(0.275\sim 0.631)$ 으로, 서양꿀벌과 마찬가지로 조사일 모두 꿀벌 외역활동이 온도와 유의성을 보였다. 벌통온도의 경우도 take-off의 상관계수 $r=(0.501\sim 0.749)$ 와 landing의 상관계수 $r=(0.541\sim 0.731)$ 가 유의성을 보였다. 습도(온실습도, 벌통습도)의 경우 서양꿀벌과 마찬가지로 두 변수가 서로 다른 방향으로 변화하는 부적 상관관계로 나타났고, 조도는 서양꿀벌과 다르게 유의한 상관관계를 찾을 수 없었다(표 35).

표 35. Asiatic honey Bee out-nest activities and climatic factors of coefficient correlation. The following is a correlation analysis of Asiatic honeybee, between out-nest activities (take-off, landing) and greenhouse temperature, humidity, hive temperature, humidity and illumination. The correlation coefficients of greenhouse temperature on take-off and landing were $r=(0.411\sim 0.703)$ and $r=(0.275\sim 0.631)$, which were significant. Hive temperature also came out to be significant, as take-off $r=(0.501\sim 0.749)$ and landing $r=(0.541\sim 0.731)$. Both greenhouse and hive humidity demonstrated negative correlation, while illumination did not show of significant correlation.

Date	Meteorlogical factor				
	Greenhouse temperature	Greenhouse humidity	Hive temperature	Hive humidity	Illumination
2014. 9. 5	Take-off	.712**	-.733**	.749**	-.725**
	Landing	.483**	-.546**	.664**	-.696**
9. 7	Take-off	.662**	-.647**	.691**	-.568**
	Landing	.538**	-.541**	.685**	-.633**
9. 8	Take-off	.685**	-.676**	.690**	-.522**
	Landing	.577**	-.665**	.722**	-.716**
9. 9	Take-off	.411**	-.470**	.501**	-.486**
	Landing	.275*	-.515**	.541**	-.588**
9.10	Take-off	.611**	-.567**	.651**	-.504**
	Landing	.566**	-.559**	.679**	-.606**
9.11	Take-off	.617**	-.588**	.700**	-.751**
	Landing	.522**	-.535**	.710**	-.821**
9.12	Take-off	.703**	-.618**	.706**	-.579**
	Landing	.631**	-.605**	.731**	-.827**

**p<0.01, *p<0.05

(3) 꿀벌 일주활동에 대한 독립변수별 선형 회귀분석

서양꿀벌 평균 take-off에 대한 독립변수별 선형 회귀분석을 하였을 때 독립변수마다 상관관계가 다르게 나타났다. 각 독립변수별로는 0.0651 - 0.8701 의 R^2 값을 나타내고 있다. 별통내부 온도의 경우 상관관계가 가장 높게 나타났으며, 온실내부 온도와 온실내부 습도, 조도에서 상관관계가 높게 나타났고, 별통내부 습도에서는 낮은 상관관계를 나타내는 것으로 판측 되었다(그림 169).

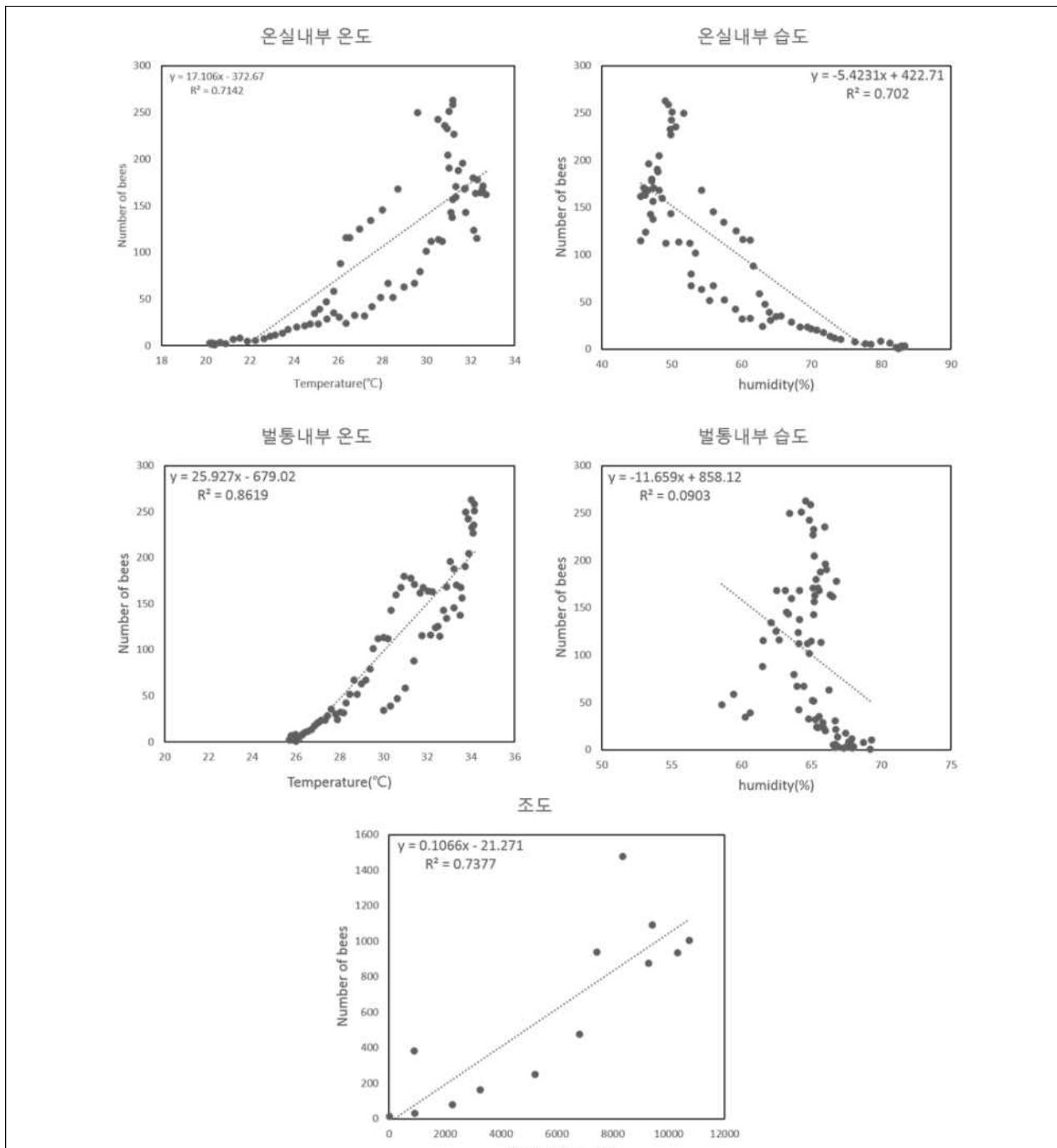


그림 169. The results of each independent variable linear regression analysis of the western honey bee average landing. A weekly average of R^2 value of Western honey bee from linear regression analysis of temperature, humidity, and illumination on landing was 0.0903~0.8619. The inside temperature of hive had greatest correlation, illumination , greenhouse temperature and greenhouse humidity showed moderate correlations in decreasing order, while inside humidity of hive demonstrated the lowest correlation.

평균 landing에 대한 독립변수별 선형 회귀분석을 하였을 때 독립변수마다 상관관계가 다르게 나타났다. 각 독립변수별로는 0.0903 - 0.8619 의 R^2 값을 나타내고 있다. 벌통내부 온도의 경우 상관관계가 가장 높게 나타났으며, 조도, 온실내부 온도, 온실내부 습도 순으로 상관관계가 높게 나타났고, 벌통내부 습도에서는 낮은 상관관계를 나타내는 것으로 판측 되었다(그림 170).

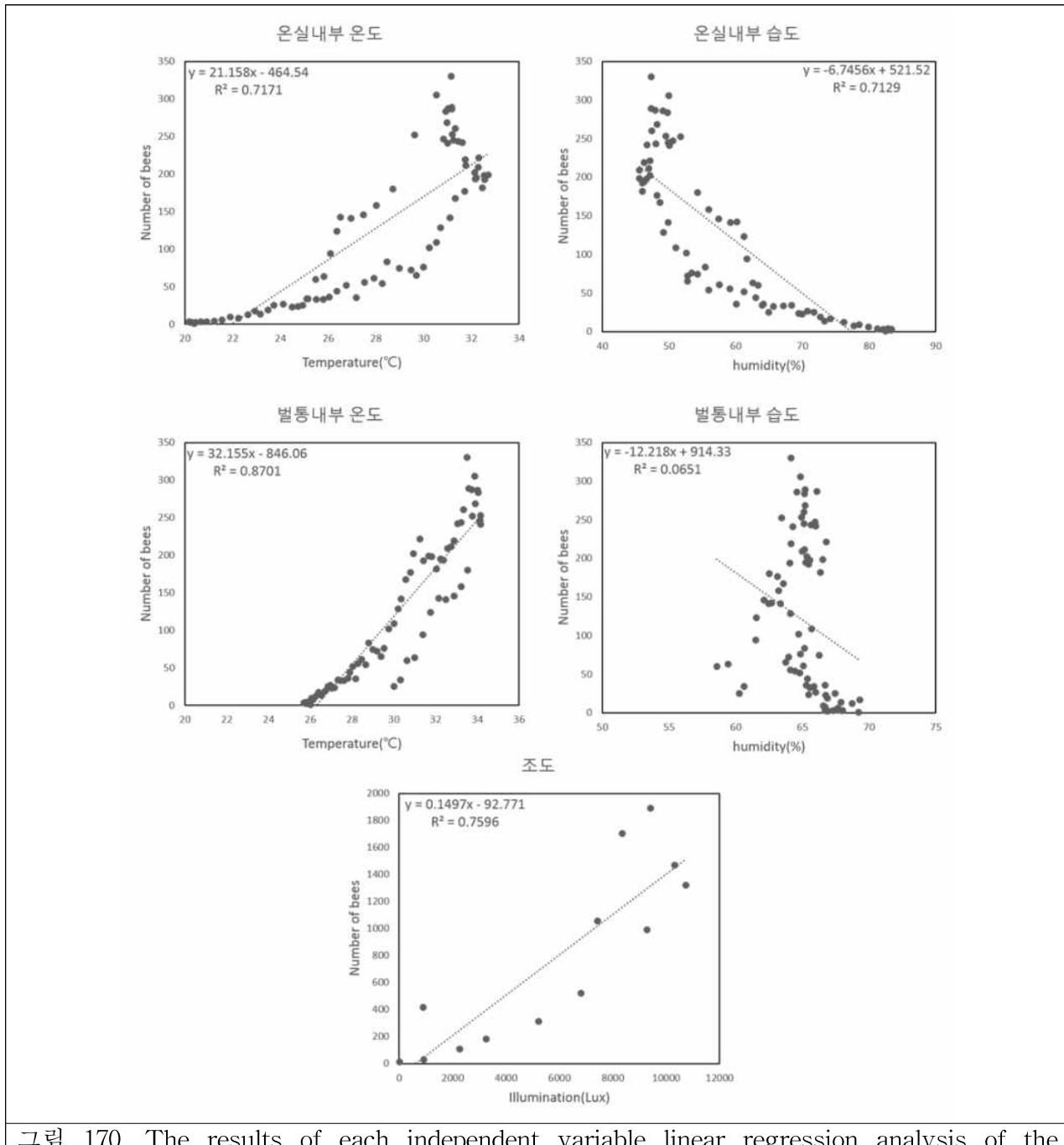


그림 170. The results of each independent variable linear regression analysis of the western honey bee average take-off. A weekly average of R^2 value of Western honey bee from linear regression analysis of temperature, humidity, and illumination on take-off was 0.0651~0.8701. The inside temperature of hive had greatest correlation, greenhouse temperature, humidity and illumination showed moderate correlations in decreasing order, while inside humidity of hive demonstrated the lowest correlation.

토종꿀벌 평균 take-off에 대한 독립변수별 선형 회귀분석을 하였을 때 독립변수마다 상관관계가 다르게 나타났다. 각 독립변수별로는 0.1225 - 0.71 의 R^2 값을 나타내고 있다. 벌통내부 온도의 경우 상관관계가 가장 높게 나타났으며, 다음으로는 벌통내부 습도 그리고 온실내부 온도, 온실내부 습도 등으로 나타났고 조도의 경우 상관관계가 낮게 나타내는 것으로 관측 되었다(그림 171).

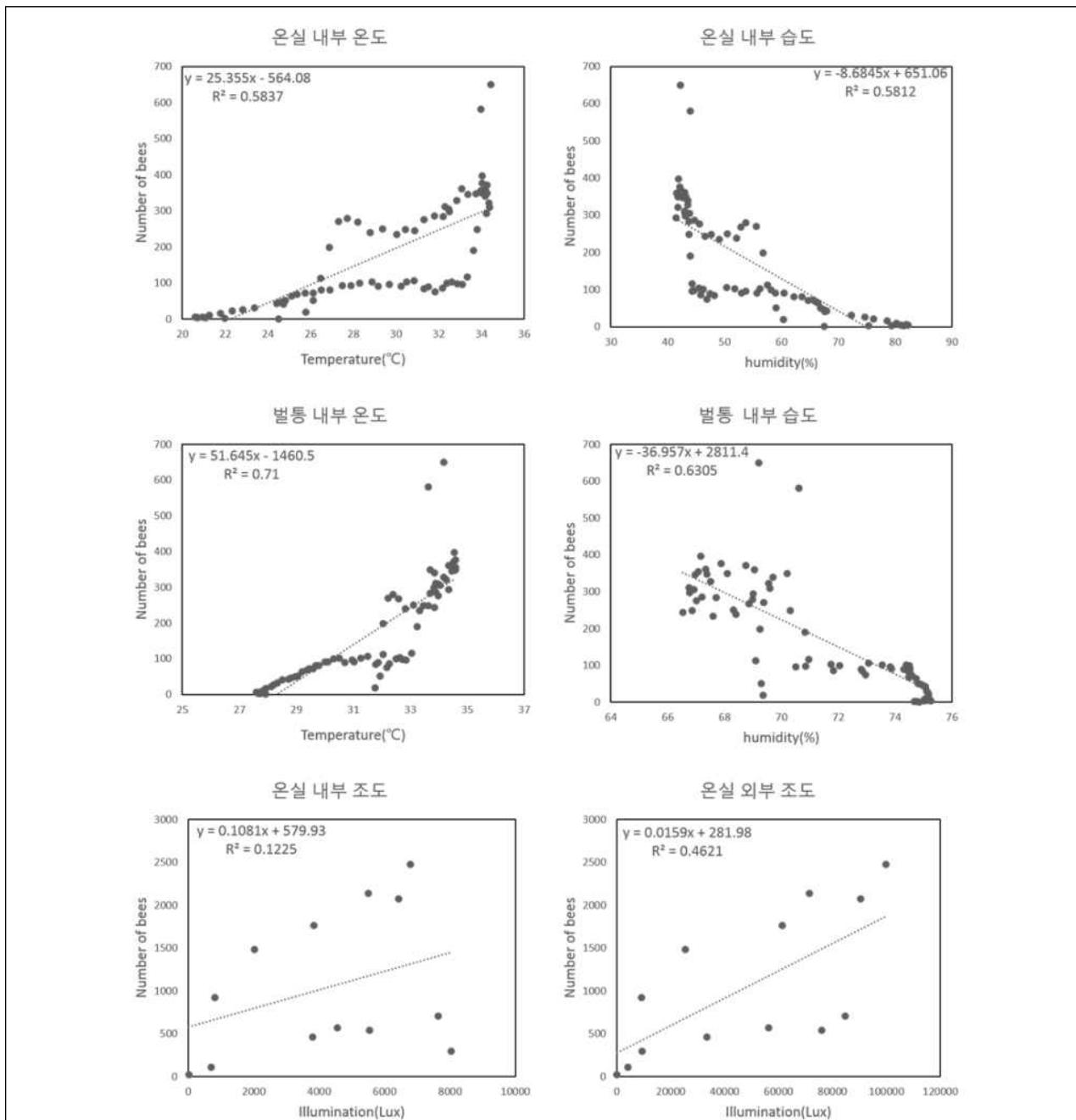


그림 171. The results of each independent variable linear regression analysis of the asiatic honey bee average take-off. A weekly average of R^2 value of Asiatic honey bee from linear regression analysis of temperature, humidity, and illumination on take-off was 0.1125~0.71. The inside temperature of hive had greatest correlation, hive humidity, greenhouse temperature and greenhouse humidity showed moderate correlations in decreasing order, while illumination demonstrated the lowest correlation.

평균 landing에 대한 독립변수별 선형 회귀분석을 하였을 때 독립변수마다 상관관계가 다르게 나타났다. 각 독립변수별로는 $0.0009 \sim 0.7566$ 의 R^2 값을 나타내고 있다. 벌통내부 습도의 경우 상관관계가 가장 높게 나타났으며, 다음으로 벌통내부 온도, 온실내부 습도, 온실내부 온도로 나타났으며, 조도에서는 낮은 상관관계를 나타내는 것으로 판측 되었다(그림 172).

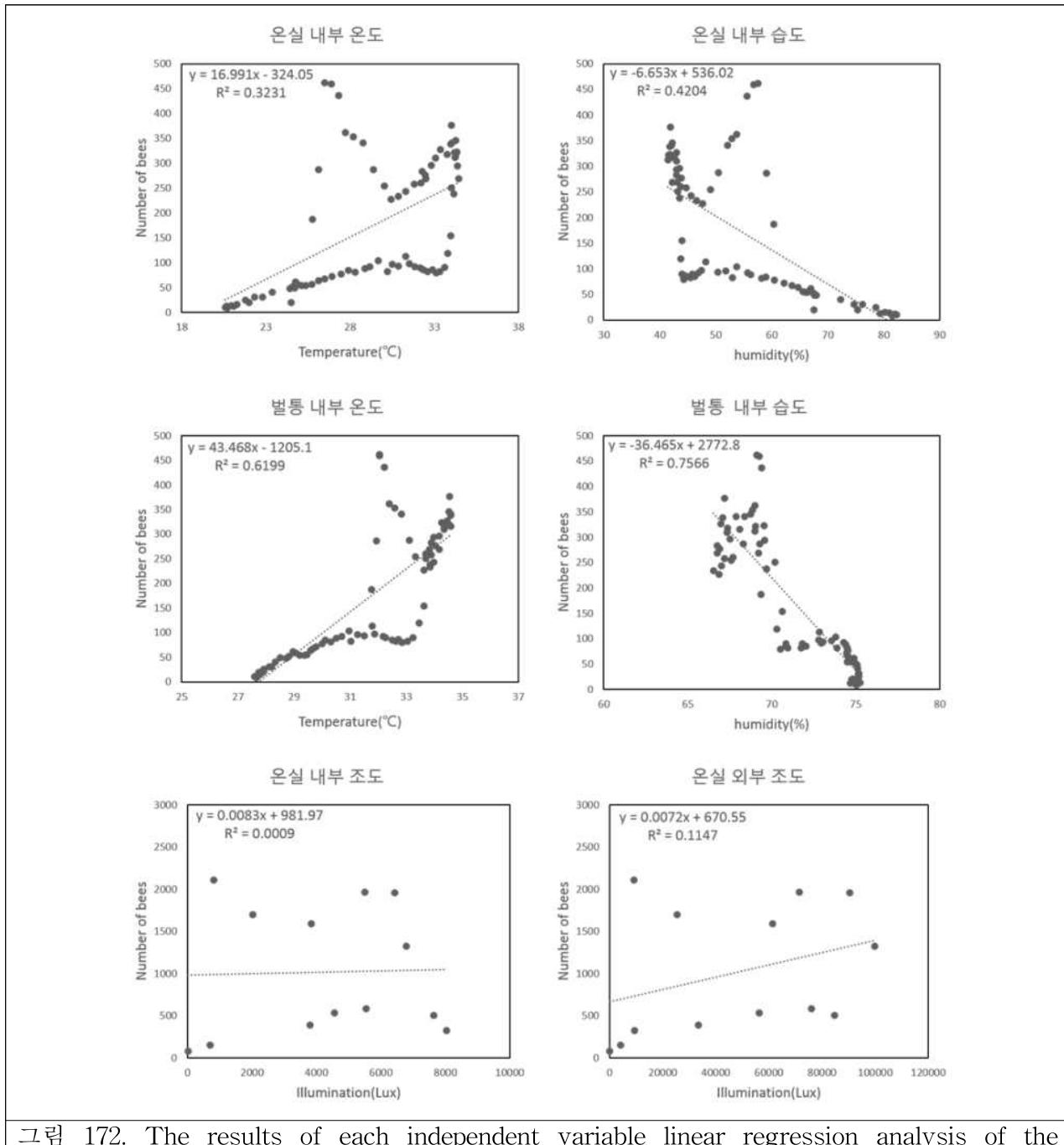


그림 172. The results of each independent variable linear regression analysis of the asiatic honey bee average landing. A weekly average of R^2 value of Asiatic honey bee from linear regression analysis of temperature, humidity, and illumination on landing was $0.0009 \sim 0.7566$. The inside humidity of hive had greatest correlation, hive temperature, greenhouse humidity and greenhouse temperature showed moderate correlations in decreasing order, while illumination demonstrated the lowest correlation.

(4) 외역활동에 영향을 주는 성분 예측

다음 표 36은 서양꿀벌의 외역활동 즉 들고나는 수에 영향을 주는 성분을 나타낸다. 아인겐값의 경우 각 요인이 기준변수의 정보를 어느 정도 설명하는지를 나타내는 지표로 성분1의 고유 값은 3.382, 성분2의 고유 값은 0.898, 성분3의 고유 값은 0.433을 나타낸다. 두 개의 축 모두를 고려하면 총 분산의 약 85.59% 설명되며, 세 개의 축 모두를 고려하면 총 분산의 약 94.24%로 설명된다. 즉, 5개 성분을 3개로 줄였지만, 그 3개 성분의 분산의 94.248%를 설명한다는 의미이다. 일반적으로 60%이상의 누적 설명력을 보이면, 설명력이 높다고 판단한다. 그리고 성분행렬에 나와 있는 숫자를 적재치(적재값)이라고 한다. 적재값이 0.4 이상이고, 한쪽이 더 크다면, 그 해당 성분으로 분류할 수 있다. 제1성분에서는 온실온도, 벌통온도, 온실조도, 제2성분에서는 벌통습도, 제3성분에서는 벌통온도가 적재값이 높은걸 알 수 있다. 각각의 성분에 이름을 붙이기 위해 계수가 큰 변수들을 묶은 후 변수들이 나타내는 지표(index)를 이용해 이름을 부여한 결과 서양꿀벌의 외역활동에 영향을 주는 성분으로 제1성분은 온도(온실온도, 벌통온도)라 하였고, 제2성분은 습도(벌통습도), 제3성분은 벌통온도로 분류로 되었다.

표 37은 토종꿀벌의 외역활동에 영향을 주는 성분 표로, 서양꿀벌 표와 마찬가지이다. 성분1의 고유값은 6.270, 성분2의 고유값은 1.749, 성분3의 고유값은 1.218를 나타내며, 10개의 성분을 3개로 줄였지만, 3개 성분의 분산의 92.368%를 설명 한다. 제1성분에서는 온실온도, 웰터온도, 벌통온도T2, 벌통온도T3, 온실외부조도, 제2성분에서는 벌통습도, 벌통온도T1, 온실조도, 제3성분에서는 벌통온도T1가 적재값이 높은걸 알 수 있다. 계수가 큰 변수들을 묶은 후 변수들이 나타내는 지표(index)를 이용해 이름을 부여한 결과 토종꿀벌의 외역활동에 영향을 주는 성분으로 제1성분은 온도, 제2성분은 습도, 제3성분으로는 벌통온도T1로 분류되었다.

표 36. Western honey bee out-nest activities in ingredient that influence. In order to find variables influencing Western honey bee out-nest activities, we ran Principal Component Analysis, which reduces mutually dependent variables. Indicator values of component 1,2, and 3 were 3,382, 0,898, and 0,433, and considering all three axis explain 94.248% of the entire variance. Component 1, 2, and 3 were classified as temperature (greenhouse and hive), humidity (hive) and hive temperature.

항목	성분		
	1	2	3
온실온도	.928	.224	.046
벌통온도	.822	.235	.497
온실습도	-.912	.188	.213
벌통습도	-.524	.836	-.096
온실조도	.858	.243	-.358
아이겐값	3.382	0.898	0.433
공변량(%)	67.632	17.965	8.651
누적변량(%)	67.632	85.597	94.248

요인추출방법: 주성분분석

표 37. Asiatic honey bee out-nest activities in ingredient that influence. In order to find variables influencing Asiatic honey bee out-nest activities, we ran Principal Component Analysis, which reduces mutually dependent variables. Indicator values of component 1,2, and 3 were 6,270, 1,749, and 1,218, and considering all three axis explain 92.368% of the entire variance. Component 1, 2, and 3 were classified as temperature (greenhouse, shelter, and hive temperature T2,T3), humidity (hive) and hive temperature T1.

항목	성분		
	1	2	3
온실온도	.959	.137	.048
쉘터온도	.976	.117	.042
벌통온도T1	.148	.595	.714
벌통온도T2	.909	.067	.340
벌통온도T3	.943	.061	.240
온실습도	-.881	.291	.117
쉘터습도	-.896	.396	.072
벌통습도	-.574	.754	-.010
온실조도	.456	.597	-.592
온실외부조도	.738	.435	-.402
아이겐값	6.270	1.749	1.218
공변량(%)	62.701	17.490	12.176
누적변량(%)	62.701	80.191	92.368

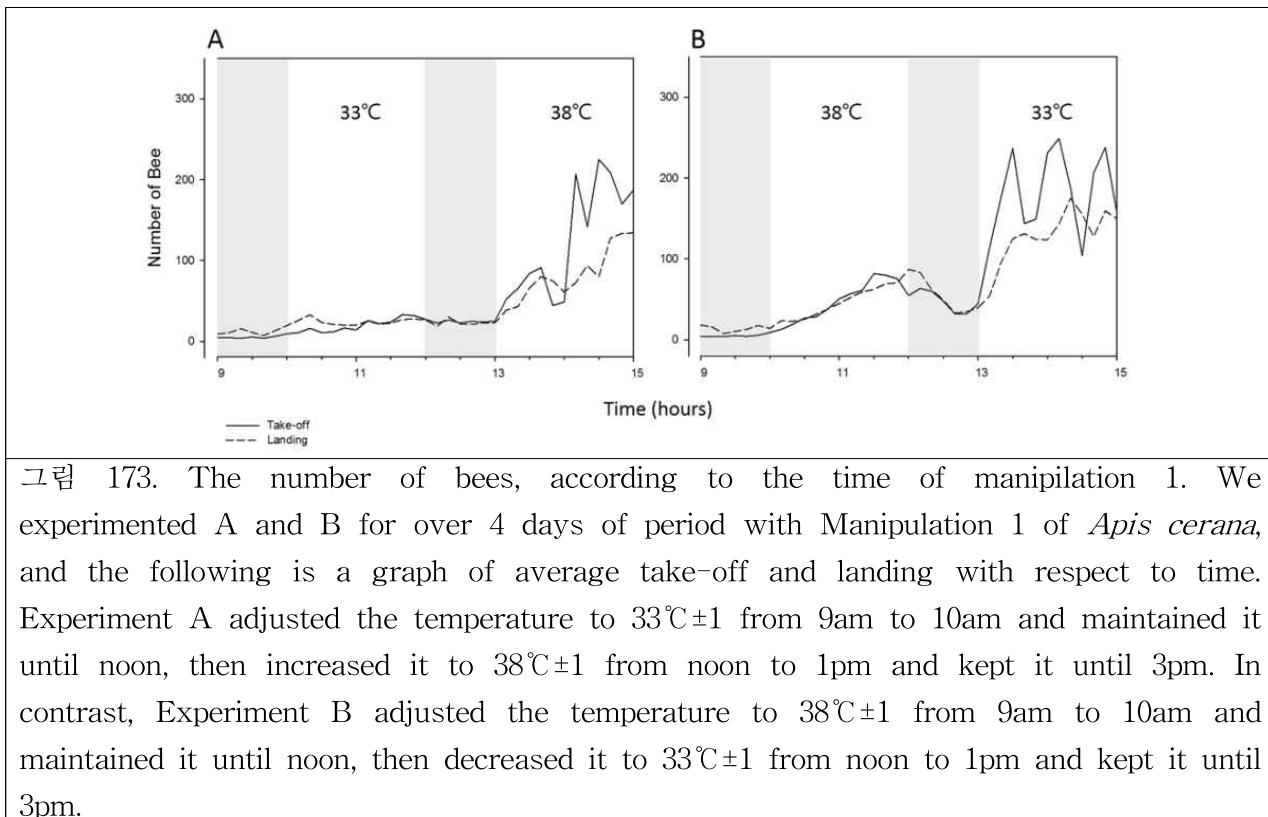
요인추출방법: 주성분분석

나. 토종꿀벌 봉군 내외부 온도 변동에 따른 군집의 외역활동 변화

(1) 시간에 따른 꿀벌의 수

(가) Manipulation 1

벌통 외부 온도 차이에 따른 외역활동 변화를 파악하기 위해 PVC Shelter 내부 온도를 조절하였다. 촬영기간의 경우 Manipulation 1실험 8일, Manipulation 2 8일 총 16일을 촬영 하였으며, 촬영시간은 외역활동이 활발해지는 시간을 포함한 am09:00 ~ pm03:00에 촬영하였다. Manipulation 1은 벌통 외부 온도를 5°C 올리는 실험을 하였고, 두번의 실험으로 나눠서 실험당 4일씩 촬영하였다. Manipulation 1의 첫번째 A실험은 9:00 ~ 10:00 까지는 3 3°C±1로 만들고 12시까지 유지하였으며, 12:00부터 13시까지는 38°C±1로 올린 후 15시 까지 유지하였다. 두 번째 B실험은 9:00 ~ 10:00 까지는 38°C±1로 만들고 12시까지 유지하였으며, 12:00부터 13시까지는 33°C±1로 만들고 15시 까지 유지하였다.



(나) Manipulation 2

Manipulation 2은 Manipulation 1과 반대로 벌통 외부 온도를 5°C 내리는 실험을 하였고, 이 실험도 마찬가지로 두 번의 실험으로 나뉘서 실험당 4일씩 촬영하였다. 첫번째 A 실험은 9:00~10:00까지는 $33^{\circ}\text{C} \pm 1$ 로 만들고 12시까지 유지하였으며, 12:00부터 13시까지는 $28^{\circ}\text{C} \pm 1$ 로 내린 후 15시까지 유지하였다. 두번째 B 실험은 9:00~10:00까지는 $28^{\circ}\text{C} \pm 1$ 로 만들고 12시까지 유지하였으며, 12:00부터 13시까지는 $33^{\circ}\text{C} \pm 1$ 로 만들고 15시까지 유지하였다.

Manipulation 1 실험을 4일씩 나눠 두 번의 실험으로 하였고, Manipulation 2 실험도 Manipulation 1과 마찬가지로 나눠 실험 하였다. Figure는 Manipulation 1의 첫 번째 A실험과 두 번째 B실험의 시간에 따른 꿀벌의 수 그래프이다. A의 그래프는 9:00~10:00까지 $33^{\circ}\text{C} \pm 1$ 로 만들고 12시까지 유지, 12:00부터 13시까지는 $38^{\circ}\text{C} \pm 1$ 로 올린 후 15시까지의 기록이다. B의 그래프는 9:00~10:00까지 $38^{\circ}\text{C} \pm 1$ 로 만들고 12시까지 유지, 12:00부터 13시까지는 $33^{\circ}\text{C} \pm 1$ 로 만들고 15시까지의 기록이다. A 와 B의 그래프를 보면 시간대별 꿀벌의 들고 나는 수는 앞서 말한 꿀벌의 일주활동 그림 174와 같이 13시 이후 증가를 볼 수 있다. Manipulation 1은 5°C 올리는 실험으로 오전 시간대인 10~12시 사이의 take-off는 2.4배 증가하는 경향을 보였고, landing은 1.7배 증가하였다. 오후시간대인 13시에서 15시의 38°C 에서 33°C 로 내리는 시간대의 take-off는 1.4배 증가하는 경향을 보였고, landing은 1.5배 증가하였다.

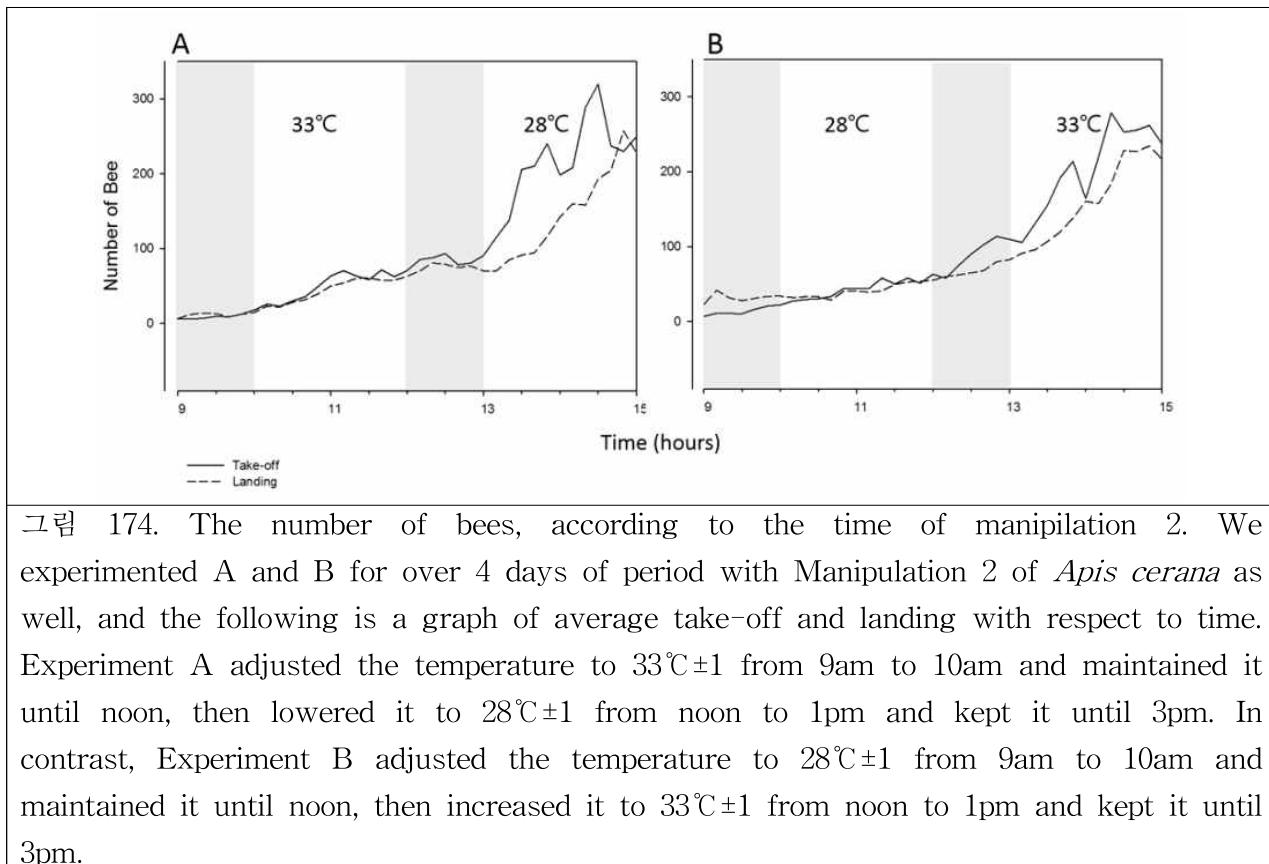


그림 174. The number of bees, according to the time of manipulation 2. We experimented A and B for over 4 days of period with Manipulation 2 of *Apis cerana* as well, and the following is a graph of average take-off and landing with respect to time. Experiment A adjusted the temperature to $33^{\circ}\text{C} \pm 1$ from 9am to 10am and maintained it until noon, then lowered it to $28^{\circ}\text{C} \pm 1$ from noon to 1pm and kept it until 3pm. In contrast, Experiment B adjusted the temperature to $28^{\circ}\text{C} \pm 1$ from 9am to 10am and maintained it until noon, then increased it to $33^{\circ}\text{C} \pm 1$ from noon to 1pm and kept it until 3pm.

그림 174는 Manipulation 2의 실험으로 Manipulation 1과 반대로 벌통 외부 온도를 5°C 내리는 실험이다. A그래프는 9:00~10:00까지는 $33^{\circ}\text{C} \pm 1$ 로 만들고 12시까지 유지, 12:00부터 13시까지는 $28^{\circ}\text{C} \pm 1$ 로 내린 후 15시까지의 기록이다. B그래프는 9:00~10:00까지는 $28^{\circ}\text{C} \pm 1$ 로 만들고 12시까지 유지, 12:00부터 13시까지는 $33^{\circ}\text{C} \pm 1$ 로 만들고 15시까지의 기록이다. 이 그래프도 마찬가지로 13시 이후 들고나는 꿀벌의 수가 증가하는 것을 볼 수 있다. 오전시간대인 10~12시 사이의 take-off는 1.2배 감소하는 경향을 보였고, landing은 1.1배 감소하였다. 오후시간대인 13시 ~ 15시의 take-off는 1.1배 감소하는 경향을 보였고, landing은 1.1배 증가하였다.

(2) 봉군 외부 온도에 따른 외역활동 변화

(가) shelter 내부 온도에 따른 take-off

그림 175는 Manipilation 1의 shelter 내부 온도에 따른 take-off 그래프로 오전 시간대를 비교해보면 33°C 때보다 38°C에 늘어난 것을 볼 수 있으며, 통계적으로 유의한 차이가 보였다(Mann-Whitney U test: $U=683.0$, $P<0.001$). 오후 시간대도 두 그룹 사이의 중간 값 차이가 커서 통계적으로 유의한 차이를 보였다(Mann-Whitney U test: $U=890.5$, $P=0.003$).

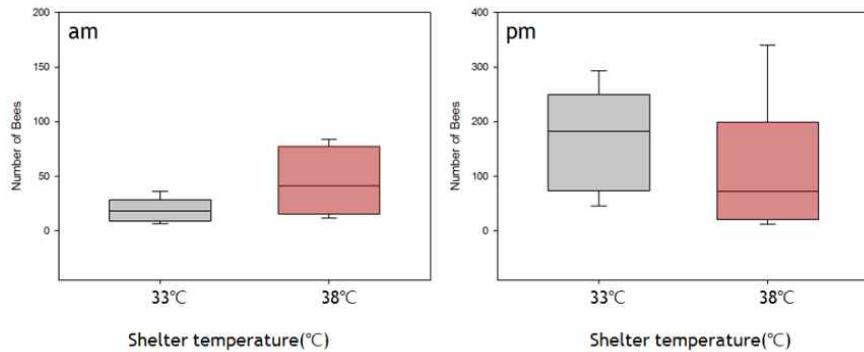


그림 175. Take-off, according to the temperature inside the shelter of manipulation 1. We tried to confirm a statistical significance of before noon take-off and afternoon take-off with respect to inside shelter temperature of manipulation 1 experiment by using Mann-Whitney U test. Before noon result (Mann-Whitney U test: $U=683.0$, $P<0.001$) and afternoon result (Mann-Whitney U test: $U=890.5$, $P=0.003$) both proved their statistical significance.

그림 176는 Manipilation 2의 shelter 내부 온도에 따른 take-off 그래프로 오전 시간대를 비교해보면 28°C 때보다 33°C에 늘어난 것으로 보이지만, 두 그룹 사이의 차이가 통계적으로 유의한 차이가 없다고 나왔고(Mann-Whitney U test: $U=1229.0$, $P=0.426$), 오후 시간대인 두 그룹도 통계적으로 유의하지 않게 나왔다(Mann-Whitney U test: $U=2829.5$, $P=0.520$).

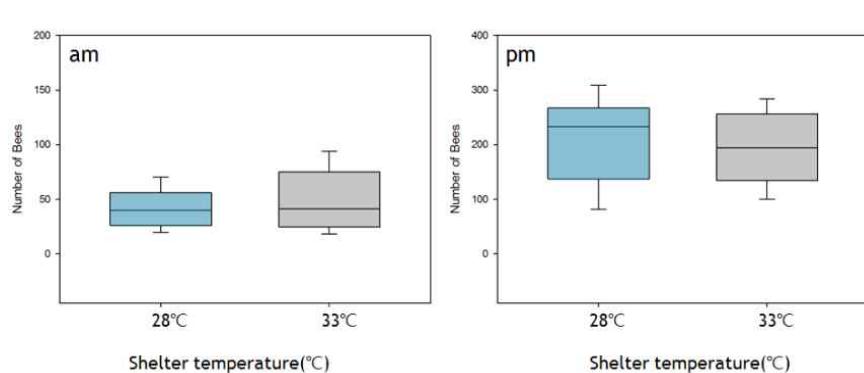


그림 176. Take-off, according to the temperature inside the shelter of manipulation 2. We tried to confirm a statistical significance of before noon take-off and afternoon take-off with respect to inside shelter temperature of Manipulation 2 experiment by using Mann-Whitney U test. Before noon result (Mann-Whitney U test: $U=1229.0$, $P<0.0426$) and afternoon result (Mann-Whitney U test: $U=2829.5$, $P=0.520$) were both statistically insignificant.

(나) shelter 내부 온도에 따른 landing

Manipulation 1 의 오전 시간대는 33°C보다 높은 온도의 38°C에서 두 그룹의 차이가 통계적으로 유의한 차이를 보였고(Mann-Whitney U test: $U=671.5$, $P<0.001$), 오후시간대도 마찬가지로 유의한 차이를 보였다(Mann-Whitney U test: $U=750.5$, $P<0.001$)(그림 177).

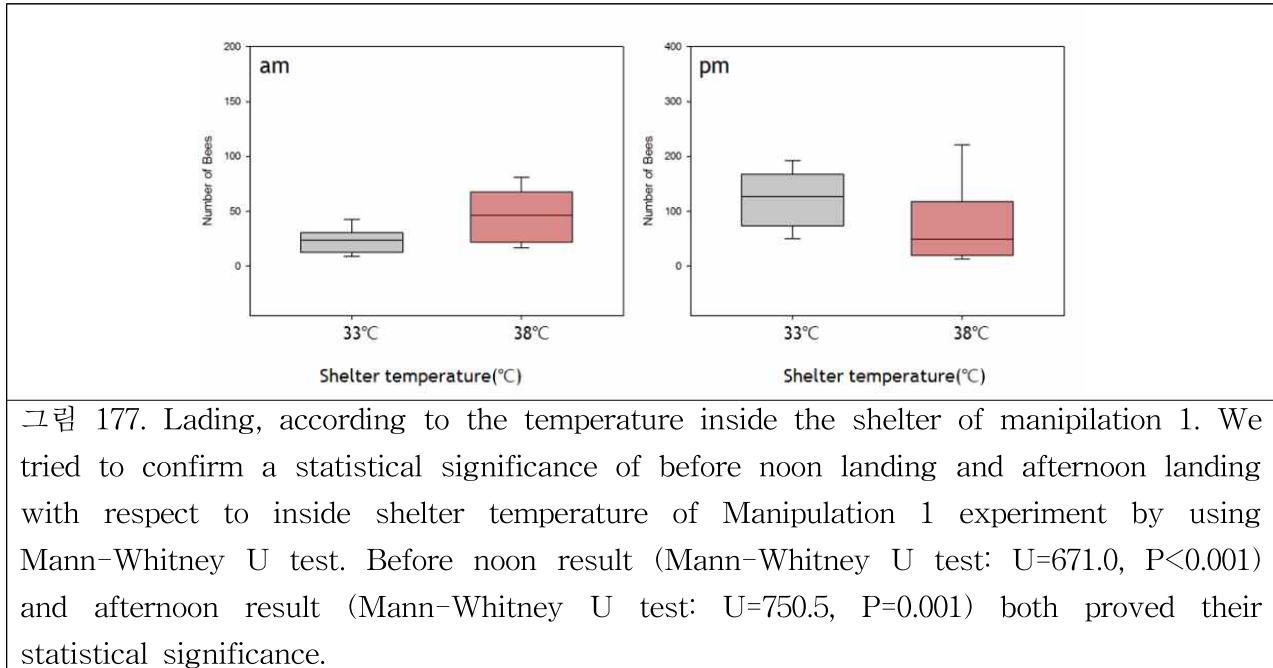


그림 177. Lading, according to the temperature inside the shelter of manipulation 1. We tried to confirm a statistical significance of before noon landing and afternoon landing with respect to inside shelter temperature of Manipulation 1 experiment by using Mann-Whitney U test. Before noon result (Mann-Whitney U test: $U=671.0$, $P<0.001$) and afternoon result (Mann-Whitney U test: $U=750.5$, $P=0.001$) both proved their statistical significance.

Manipulation 2 의 오전시간대는 28°C보다 높은 온도의 33°C에서 두 그룹의 차이가 있어 보이지만 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았고(Mann-Whitney U test: $U=1312.5$, $P=0.800$), 오후시간대도 유의한 차이를 볼 수 없었다(Mann-Whitney U test: $U=1188.50$, $P=0.288$)(그림 178).

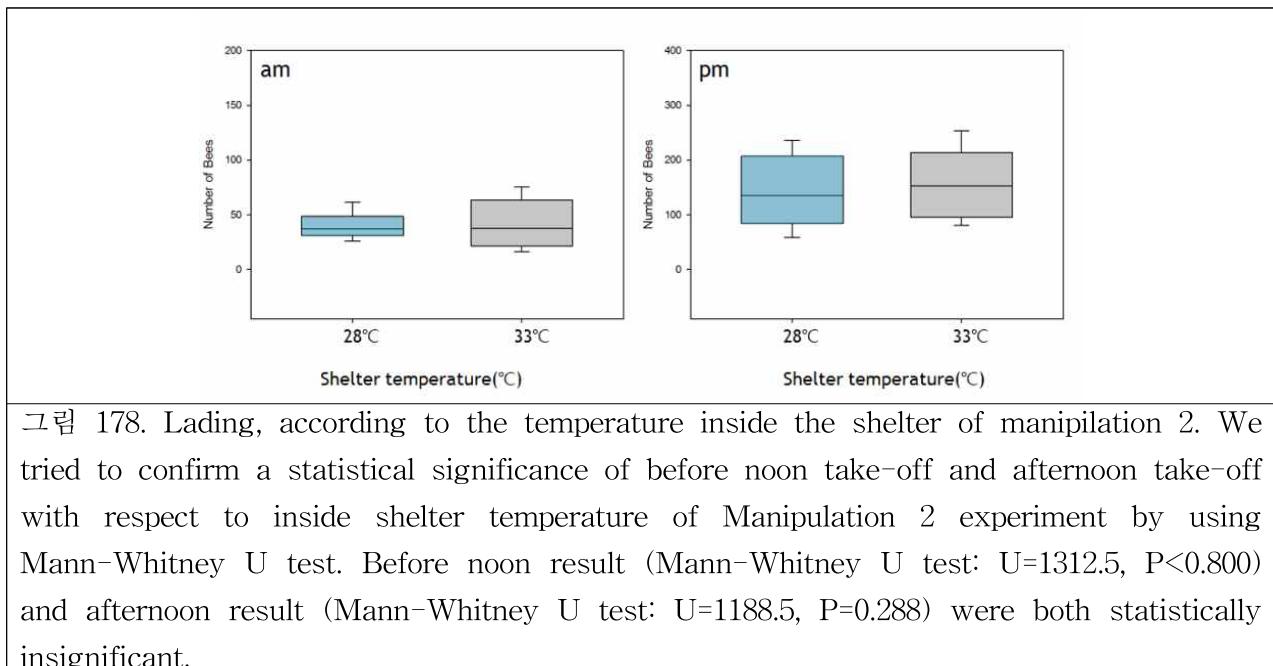


그림 178. Lading, according to the temperature inside the shelter of manipulation 2. We tried to confirm a statistical significance of before noon take-off and afternoon take-off with respect to inside shelter temperature of Manipulation 2 experiment by using Mann-Whitney U test. Before noon result (Mann-Whitney U test: $U=1312.5$, $P<0.800$) and afternoon result (Mann-Whitney U test: $U=1188.5$, $P=0.288$) were both statistically insignificant.

(다) 봉군 외부 온도에 따른 벌통 내부 온도 변화

Shelter 내부 온도에 따른 벌통 내부 온도 변화를 나타내는 그림 179이며, T1 경우 5°C 올리는 실험에서 통계적으로 유의하지 않게 나왔으며(Mann-Whitney U test: $U=5360.0$, $P=0.913$), 5°C 내리는 실험에서는 두 군의 평균값 차이가 나타나 통계적으로 유의한 차이를 보였다(Mann-Whitney U test: $U=3327.5$, $P<0.001$). T2의 경우에는 33°C/38°C 일 때 통계적으로 유의한 차이를 보였고(Mann-Whitney U test: $U=3973.0$, $P<0.001$), 33°C/28°C 일 때도 유의한 차이를 보였다(Mann-Whitney U test: $U=2498.0$, $P<0.001$). T3도 33°C/38°C 일 때의 온도변화가 통계적으로 유의하였고(Mann-Whitney U test: $U=362.0$, $P<0.001$), 33°C/28°C 일 때의 온도변화도 유의하였다(Mann-Whitney U test: $U=193.5$, $P<0.001$)(그림 179).

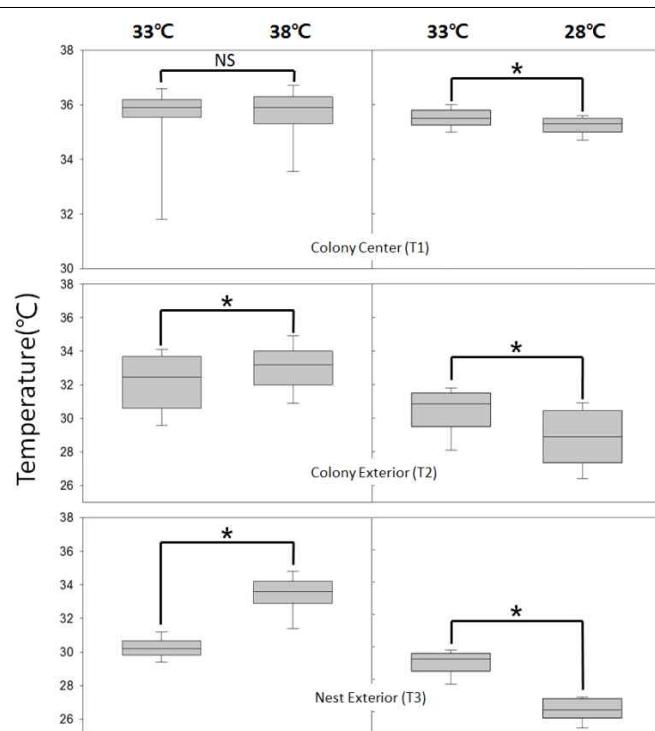


그림 179. The hive internal temperature change according to the temperature of shelter
The following is a graph representing average hive temperature variations with respect to the temperature inside the shelter, over the course of Manipulation 1 and 2 experiments. 3 3°C/38°C of T1 was not significant (Mann-Whitney U test: $U=5360.0$, $P=0.913$), while 33°C/28°C was statistically significant. (Mann-Whitney U test: $U=3327.5$, $P<0.001$). Both 33°C/38°C (Mann-Whitney U test: $U=3973.0$, $P<0.001$) and 33°C/28°C (Mann-Whitney U test: $U=2498.0$, $P<0.001$) of T2 came out to be statistically significant. Also, both 33°C/38°C (Mann-Whitney U test: $U=362.0$, $P<0.001$) and 33°C/28°C (Mann-Whitney U test: $U=193.5$, $P<0.001$) of T3 came out to be statistically significant.

다. 개체 자동 인식 모니터링 시스템 개발 및 적용

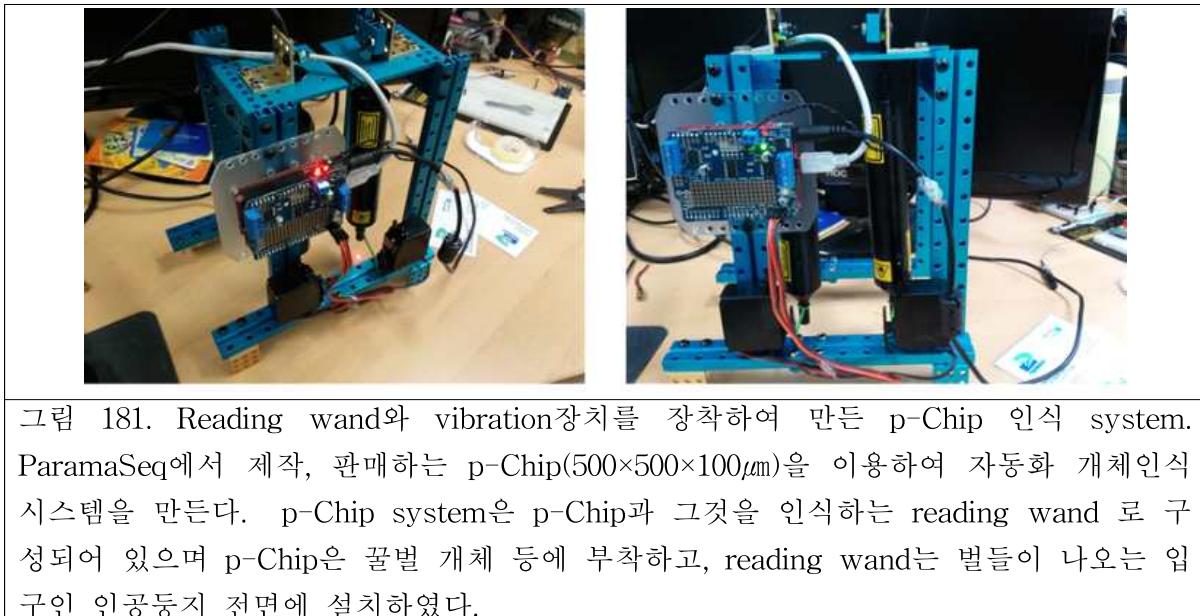
개체인식 모니터링 시스템 탑재를 위해 자체 제작한 둥지를 사용한다. 자체 제작된 둥지는 소비 1매가 들어가기 용이하며, 내부 관찰이 가능하도록 투명한 아크릴 소재의 판을 옆면에 부착하여 관찰이 용이하도록 하였다. 개체인식 모니터링 시스템 탑재 둥지는 쉘터 내부에 넣어 보다 정밀한 온도 조절이 가능하도록 하였다. 먹이원의 경우 쉘터에서 7m 떨어진 위치에 자동사양기를 설치하여 벌들이 찾아 먹을 수 있도록 하였다.

- Control - 먹이원 온도 33°
- 쉘터 내부는 33°로 유지해주고 먹이원 온도를 쉘터 내부 온도와 동일한 33°로 유지하여 control 값을 진행하였다.
- Experiment 1 - 먹이원 온도 23°
- 쉘터 내부 온도는 control과 동일하게 유지하여 주고 먹이원 온도를 23°로 10° 낮추어 주어 10° 낮아 졌을 때의 실험을 진행하였다.
- Experiment 2 - 먹이원 온도 43°와 쉘터 내부 온도는 control과 동일하게 유지하여 주고 먹이원 온도를 43°로 10° 높여주어 실험을 진행하였다.

p-Chip® 기반 개체인식 자동 모니터링 시스템 개발, p-Chip®을 이용한 개체인식의 경우 레이저를 통한 개체인식임으로 인식 범위가 좁아 입구 디자인을 통한 인식률 상승을 높이는 방향으로 설계하였다. 실험을 위해 이틀간 외역활동을 하는 개체 18마리를 채집하여 p-Chip®부착 및 개체표지를 하였다. 개체의 채집은 외역활동이 활발한 13:00~17:00 사이에 채집하였으며, 마취는 얼음을 통해 마취 시켰다. 마취시킨 개체를 무게 측정 및 p-Chip®을 부착, ~을 이용하여 개체표지 한 뒤 사진촬영을 통해 개체 데이터를 수집하였다. p-Chip® 부착에는 UHU 친환경 접착제를 사용하여 부착하였는데, 사전 개체 사망률 비교를 통해 벌에 영향을 주지 않는 UHU 친환경 접착제를 사용하였다. 데이터 수집이 완료된 개체는 먹이원에 훈련시켰다.



그림 180. 훈련시킨 인공 먹이원(왼쪽)과 개체 인식 자동 모니터링 시스템의 센서 장치(오른쪽).



라. 바람의 영향에 따른 토종꿀벌의 먹이 섭취량 변화

꿀벌이 먹이원에서 얼마간의 시간 동안 머물렀는지를 먹이 섭취량으로 보고, 동영상 촬영으로 꿀벌이 먹이원에서 머문 시간을 분석하였다. 외부 방해 요인(사람, 바람, 다른 곤충 등)을 방지하기 위해 온실에서 실험 실시하였다. 바람의 세기는 바람이 없을 때, 약 2m/s의 바람, 약 3m/s의 바람 총 3가지로 구성하였으며, 선풍기를 이용하여 바람을 일으켜 풍속계로 바람의 세기를 측정하였다. 선풍기의 세기와 먹이원과의 거리를 조절하여 풍속을 맞추었다. 12시부터 17시까지 하루 5시간 동안 촬영하였다. 동영상 캠코더의 위치는 꿀벌이 비행하고 먹이 활동을 하는데 방해되지 않게 설치하였다. 각각 바람 세기 별로 하루씩 촬영하였다. 바람원(선풍기), 먹이원, 벌통은 순서대로 일직선 상으로 배열하여 실험하였다.

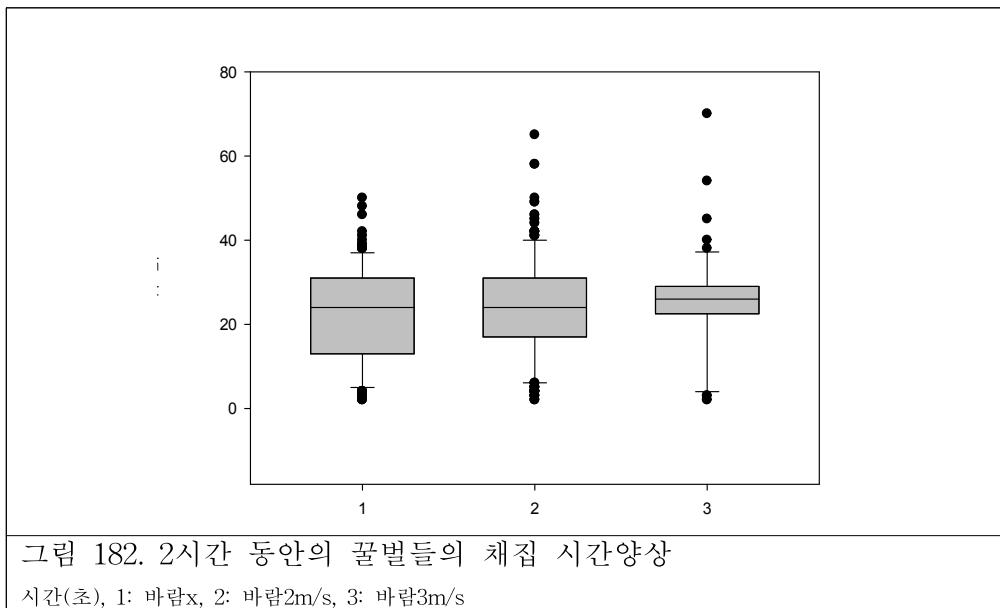
꿀벌들이 먹이원의 위치를 파악하도록 2일간 방치하였고, 빠른 위치파악을 위하여 먹이원 주변에 사양기 뚜껑을 배치해 주었다.

꿀벌이 먹이활동을 하는 것을 확인 후, 3일차부터 바람이 없는 것부터 실험에 들어감. 바람이 2m/s, 3m/s일 때와 같이 선풍기는 틀어서 선풍기에 대한 영향을 동일하게 하였고, 바람의 방향은 먹이원을 향하지 않게 하였다. 11시 55분부터 촬영을 시작하였고, 매 시간마다 촬영이 잘 되고 있는지 확인하였다. 17시에 촬영을 종료하고, 실험 종료 하였다. 2일차에는 선풍기를 먹이원 방향으로 바람이 약 2m/s(1.29~2.18m/s)이 되게 작동시킴. 11시 57분에 촬영을 시작하고, 매 시간마다 확인, 17시에 종료 하였다. 3일차에는 바람세기를 약3m/s(2.82~3.04m/s)으로 세팅하였고, 11시 55분에 촬영을 시작하여 매 시간 확인 후, 17시에 종료하였다. 실험을 하는 동안 설탕물의 농도는 동일하게 계속 공급하였다. 각각 5시간의 동영상을 12~14시까지, 2시간을 시그마플롯12.0을 사용하여 분석하였다.

실험 결과는 바람이 없을 때 2시간 동안 151마리가 먹이활동을 하였으며, 평균 23초 동안 먹이원에 머물러 설탕물을 먹었다. 바람 2m/s에서는 2시간동안 총 230마리가 먹이활동을 하였고, 평균 24초동안 설탕물을 먹었다. 바람 3m/s에서는 2시간동안 총 52마리가 먹이활동을 하였고, 평균 25초간 설탕물을 먹었다. 평균 온도는 각각 31.7°C, 37.6°C, 33.9°C도였고, 평균습도는 각각 74.2%, 53.1%, 60.3%였다. 시그마플롯12.0을 이용하여 그래프로 나타낸 결과로는 0~3m/s 까지의 바람에 대해서는 꿀벌의 먹는 시간은 큰 차이를 보이지 않았다. 하지만

꿀벌이 먹이원 근처를 머무는 시간과 동료 꿀벌에게 방해 받은 시간 등을 고려해 분석한 결과가 아니므로 추가적인 실험을 통해 먹이원에 앉아서 먹기 시작할 때의 시간과 먹이는 먹지 않으나 먹이원에 머문 시간 등을 분석해 보다 확실한 결과를 추측해 볼 것이다.

문제점은 온실의 특성상 온도가 너무 올라가는 경향이 있는데, 온실에 있는 에어컨으로는 온도를 내리기 힘들고, 습도를 조절 할 수 없다는 점이다. 다른 문제점은 촬영 시 좁은 시야로 촬영하여 먹이를 채집 중에 잠시 날아갔다가 다시 오는 벌들을 측정 할 수 없었다.



마. 집단 개체수, 온도 차이에 따른 토종벌의 생존률과 행동 변화 비교 실험 연구: 1차 온도 요인에 변화를 주기 위해서 암실 상태의 항온항습실, 암실상태의 저온실험실, 암실 상태의 인큐베이터(IB-15G)에서 각각 동일한 실험을 진행하였다.

토종벌 일벌들을 무작위로 벌통에서 채집하여 1마리, 2마리, 10마리씩 각각 petri dish에 넣고 암실상태에서 먹이와 물을 공급하지 않고, 시간의 경과에 따른 사망률의 차이를 보고자 하였다. 1마리 dish가 32개, 2마리 dish가 17개, 10마리 dish가 17개로 하여 3가지 온도 하에서 실험하였다. 2마리 dish와 10마리 dish에는 개체간 거리를 파악하기 위하여 A4용지에 그림을 인쇄하여 dish 뒤에 붙여서 실험하였다. 온도는 H(42°C), N(26°C), C(6.5°C)로 표기하였고, 마리수는 A(1마리), B(2마리), C(10마리)로 표기하여 dish 윗면에 표시하였다. 온도는 장소에 따라 냉장창고가 $6.5 \pm 1^\circ\text{C}$, 사육실이 $26 \pm 0.5^\circ\text{C}$, 인큐베이터가 42 ± 0.5 이다. 소음지수는 냉장창고, 사육실, 인큐베이터 순서로 각각 62.8, 64.8, 60.6이었으며, 습도는 냉장창고 91~95%, 사육실 36~37%, 인큐베이터 45~55%이었다. 3가지온도로 실험을 하여 1마리*32, 2마리*17, 10마리*17이 총 3세트로 실험하였다. 토종벌의 채집은 소비판 수가 5개인 강한 군집을 선정하여, 채집 전 날 온실에 내려 하루 대기한 후에 냉장창고로 소비판 2개을 꺼내서 10분간 방치하여 토종벌들의 활동을 둔화시켜 편сет을 이용하여 5명의 인원이 무작위로 채집하여 petri dish에 벌들을 옮겼으며, 1마리 dish 1명, 2마리 dish 1명, 10마리 dish 2명이 토종벌 이동작업을 하였다. 인큐베이터에 넣을 세트부터 먼저 작업하였고, 두 번째로 사육실에 넣을 세트, 세 번째로 냉장창고에서 실험할 세트를 작업하였다. 실험 시작 시간은 15분 간격으로 pm 10시 15분부터, 30분, 45분에 시작하였다. 냉장창고는 1시간 간격으로 사망 수를 측정하였고, 사육실과 인큐베이터에서는 2시간 간격으로 사망 수를 측정하였다. 측정 시는 불을 켜고 측정

하였으며, 2마리 10마리 dish는 사진 촬영도 하였다. 인큐베이터 안은 좁아서 꿀벌이 들은 접시를 꺼내서 사망 수 측정과 촬영을 하였다. 냉장창고에서의 실험은 8시간 동안 진행되었고, 사육실과 인큐베이터에서의 실험은 52시간 동안 진행되었다.

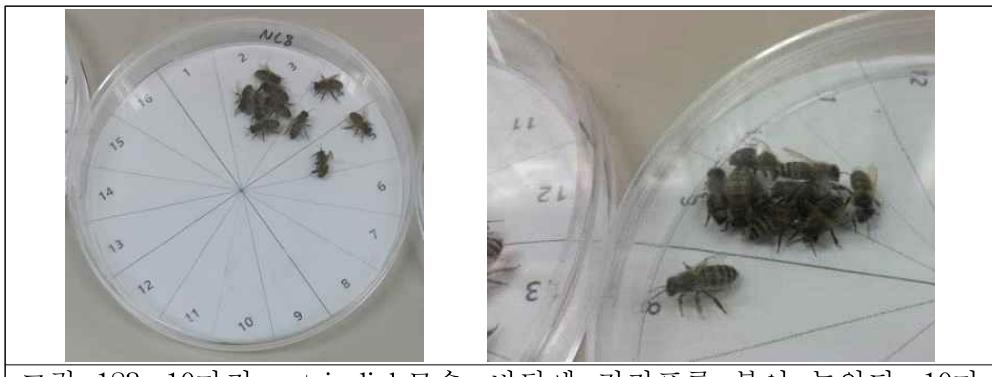


그림 183. 10마리 petri dish모습, 바닥에 거리표를 붙여 놓았다. 10마리. 2마리 이상 개체들은 서로 뭉쳐있는 것이 많이 관찰 되었다.

저온실험실의 개체들은 냉동창고 안에서 실험 시작 후 약 1시간만에 1마리, 2마리 들은 모두 동면상태(움직임 정지)에 들어갔고, 10마리들도 서로 뭉쳐서 최대 6시간까지 견딘 개체들도 있었으나 많은 개체들이 2시간을 못 넘기고 동면상태에 들어가서 사망 유무를 파악하기 어려웠다. 저온실험실의 개체들은 실험 시작 후 60시간이 지나 상온으로 이동시킨 결과 거의 대부분이 다시 움직이며 살아나는 것을 볼 수 있었으며, 인큐베이터와 사육실의 개체들과는 사망률 비교가 어려워 추후 따로 분석 할 예정이다.

사망률의 비교는 인큐베이터(42°C)와 항온항습실(26°C)의 개체들로 비교 하였다. 사망한 수를 52시간동안 누적 기록하여 각각의 그룹(1마리, 2마리, 10마리)의 2시간당 사망수의 평균을 2시간당 사망률로 변환하였고, 이를 Sigma plot 12.0을 이용하여 그래프화 하였다.

그래프 상에서는 항온항습실의 1마리 그룹이 가장 빠른 시간에 높은 사망률을 보여주었고, 항온항습실의 10마리 그룹이 가장 낮은 사망률을 보여주었다. 대체로 1마리 그룹이 초반 높은 사망률을 보여 주었다. 인큐베이터에서의 1마리 그룹은 일정한 사망률의 증가를 보였으나, 사육실의 1마리 그룹은 16시간 이후에 급격히 사망률이 높아졌다. 1마리 그룹에서는 50시간이 경과 되었을 때 모두 사망 하였다. 2마리 그룹간 비교에서는 사육실의 2마리 개체들이 조금 더 빠른 시간에 높은 사망률을 보였다. 3마리간 비교에서는 초반 사망률은 1마리, 2마리 그룹에 비해 비교적 낮았다. 중반에는 항온항습실의 10마리 개체들의 사망률이 조금 더 높았지만 32시간부터는 인큐베이터의 10마리 개체들이 급격하게 사망률이 올라갔다. 인큐베이터의 10마리 개체들은 실험종료시간(52시간 경과)에 약 94%의 사망률을 보였고, 그에 반해 항온항습실의 개체들은 약 56%의 사망률을 보였다. 두 그룹 사이의 이런 결과는 인큐베이터의 10마리 개체들이 높은 비율로 환풍 활동을 한 것이 관찰 되었는데, 환풍 활동으로 많은 에너지를 소모해 더 높은 사망률이 측정 된 것으로 보여진다. 아래 그래프는 10마리 그룹간 평균 사망수 만들어진 그래프이며, SE값이 적용되어진 그래프이다.

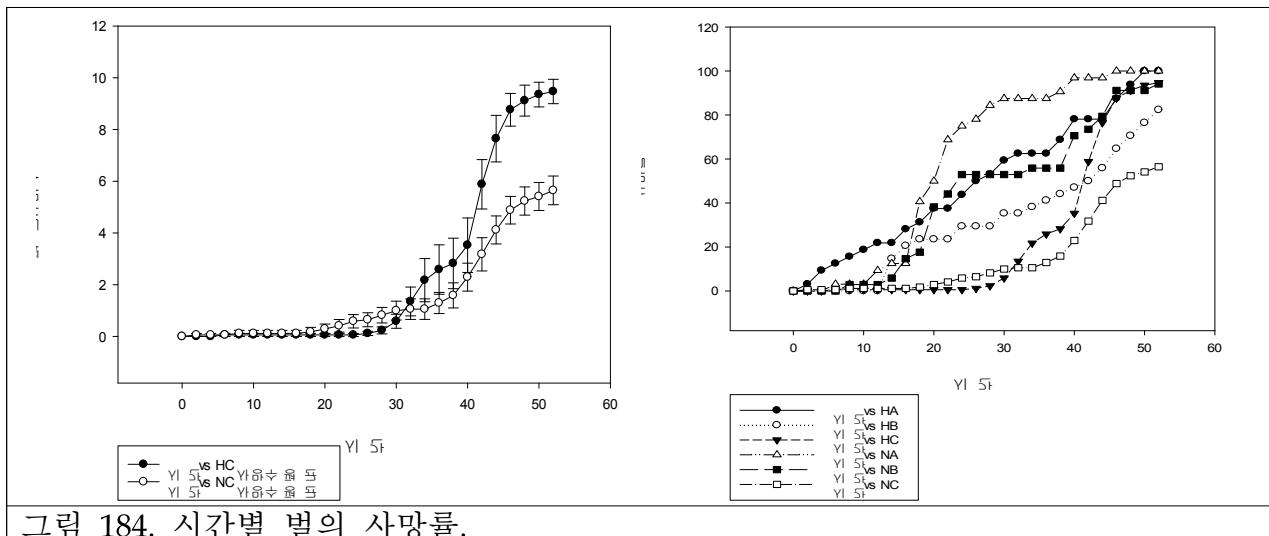


그림 184. 시간별 별의 사망률.

바. 집단 개체수, 온도 차이에 따른 토종벌의 생존률과 행동 변화 비교 실험 연구: 2차

실험은 3가지 장소를 사용하였다. 온도를 $42 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 로 맞춘 인큐베이터 배양기, $26 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 로 맞춘 항온항습실, $6.5 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 인 저온실험실에서 실험을 진행하였다. 각각 장소의 습도는 인큐베이터 배양기 45~55%, 항온항습실 36~37%, 저온실험실 91~95%로 유지되었다. 각 실험실의 특성상 습도는 통제하지 못하였다. 소음지수는 순서대로 60dB, 60.5dB, 62.8dB로 크게 차이 나지 않았다. 모든 실험장소는 별집과 비슷한 환경을 만들기 위하여 암실로 만들었다.

실험에 사용할 토종벌 군집은 실험을 진행하기 하루 전날 저온실험실과 가까운 야외온실로 이동시켰다. 이동시킨 이유는 하루 전에 벌통을 내려 토종벌들을 안정시키기 위함과 실험을 위해 토종벌 개체를 채집하여 실험에 사용할 petry dish에 이동시키는 작업을 저온 실험실에서 하기 때문이다. 저온실험실($6 \sim 7^{\circ}\text{C}$)에서 토종벌 개체의 채집 및 petry dish로 이동을 시행한 이유는 낮은 온도에서는 꿀벌의 활동성이 떨어져 채집하기 쉽기 때문이다.

Petry dish의 크기는 150X20mm를 사용하였으며 각각 온도에 따른 실험군마다 1마리 접시 32개, 2마리접시 17개, 10마리접시 17개를 사용하였다. 총 3개의 온도 실험군이 있으므로 사용된 petry dish의 개수는 198개이다. 1마리 실험군을 다른 실험군보다 많은 32개로 설정한 것은 채집 시 상처로 죽거나 개체의 노화로 인하여 발생 할 수 있는 개체 사망에 대한 데이터 상 오류를 최소화하기 위함이다.

(1) 개체 채집

저온실험실($6 \sim 7^{\circ}\text{C}$)에서 이루어 졌으며, 꿀벌이 야외활동을 하지 않는 시간대인 pm9시에 채집을 시작하였다. 총 5명의 인원이 동시에 채집을 하였다. 핀셋을 사용하여 토종벌들이 다치지 않게 진행하였다. 실험에 사용할 벌통을 저온실험실로 이동시켜 10분간 방치하여 꿀벌들의 활동성을 저하시킨 후 인큐베이터 배양기에서 실험할 실험군부터 채집하여 항온항습실, 저온실험실 순으로 채집하였다. 여왕벌과 숫벌이 아닌 일벌만 채집하였고, 2개의 소비판에 붙어 있는 벌들을 무작위로 채집하였다. 5명의 인원이 나누어 10마리 실험군을 2명, 2마리 실험군을 2명, 1마리 실험군을 1명이 동시에 채집하였으며 1마리 실험군의 채집이 끝나면 바로 10마리 실험군 채집을 도와주었다. 채집 시간은 각 실험장소에 따른 실험군마다 약 20분 정도가 소요 되었으며, 채집을 마친 실험군은 상온에서 대기 시켰다. 채집한 개체의 총 수는 708마리이다.

(2) 실험 세팅

인큐베이터 배양기(H), 항온항습실(N), 저온실험실(C) 각각 1세트씩 총 3세트를 준비하였다. 하나의 세트는 1마리(A) X 32 dish, 2마리(B) X 17 dish, 10마리(C) X 17 dish로 구성하였다. 각 Petry dish에는 알아보기 쉽게 인큐베이터 배양기에 들어갈 dish는 H, 항온항습실에 들어갈 dish는 N, 저온실험실에 들어갈 dish는 C로 유성매직펜을 사용하여 접시의 덮개에 표시하였고, 마리수를 표현하기 위해 1마리 A, 2마리 B, 10마리 C로 표기하였다. 두 가지 문자를 합쳐서 dish마다 각각 숫자로 분별하였다. 예를 들면 인큐베이터 배양기에 들어갈 2마리 개체 접시의 4번째는 HB-4로 표기하였다.

1마리 dish를 제외한 2마리 dish와 10마리 dish 밑바닥에는 개체간의 거리를 측정하기 위하여 거리 표지를 제작하여 붙여주었다.

인큐베이터 배양기 안이 접시를 1겹으로 다 놓기에는 좁아서 접시를 쌓아서 실험을 하였고, 나머지 실험군들에서는 무작위로 1겹으로 놓아서 실험을 진행하였다.

(3) 실험 시간

pm11시 15분을 시작으로 15분 간격으로 실험 실시하였다. 인큐베이터 배양기를 pm11:15분, 항온항습실을 pm11:30분, 저온실험실을 pm11:45분에 시작하였다. 15분의 텀을 두고 시작한 이유는 2시간 간격으로 관찰할 시 한번에 관찰할 수 없기에 시간적 차이를 주었다. 실험 시작과 동시에 소동하여 암실로 만들었다.

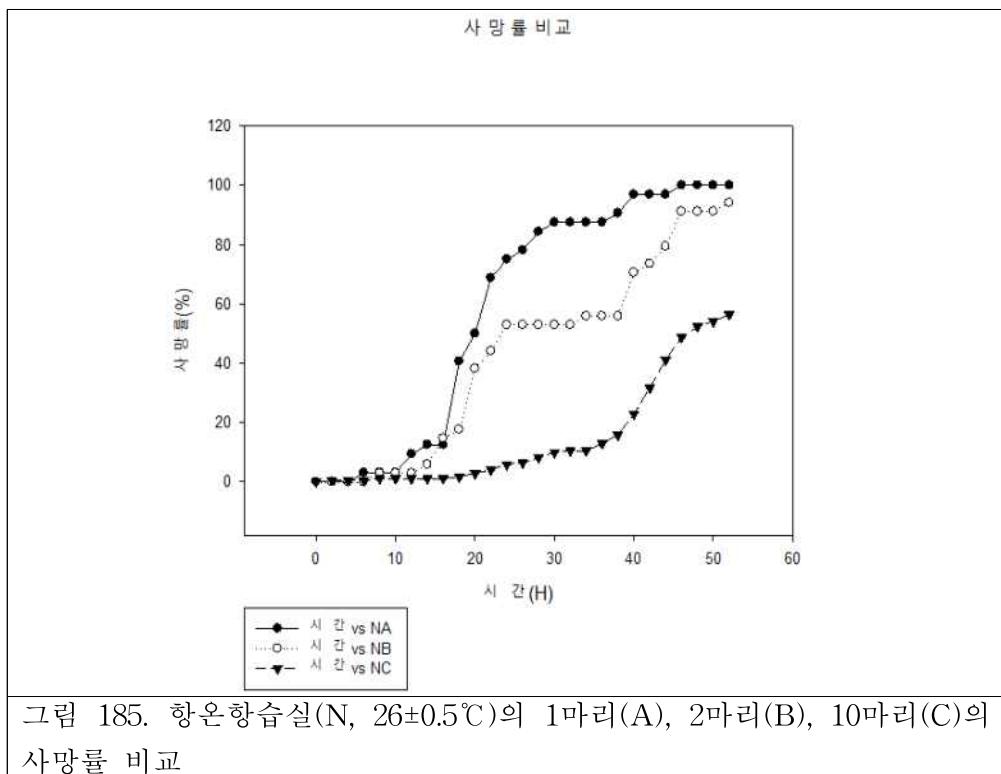
(4) 측정

실험 시작 후 2시간 간격으로 사망률과 개체간 거리를 측정하였다. 저온실험실은 조금 더 좁은 시간간격인 1시간씩 측정하였다. 이유는 저온에서는 토종벌들이 다른 온도에 비해 더 빠른 사망률을 보일 수 있기 때문이다. 사망률과 개체간 거리 측정 시간은 약 5분 동안 진행 되었으며, 연구자 3명이 빠르게 측정하였다. 2명은 사망률을 측정하였으며, 1명은 개체간 거리를 측정하였다. 사망률 측정은 사망 수를 카운트하였고, 개체간 거리 측정은 접등 후 빠르게 2마리와 10마리 접시를 핸드폰 카메라로 촬영하였다. 실험에 사용된 일벌들의 사망은 직접 만져 보아서 체크 할 수 없음으로, 사망 기준을 만들어 기준에 충족한 벌들은 사망으로 측정하였다. 사망기준은 움직이지 않으며 쓰러져 있고, 날개가 등뒤로 접혀있고 배가 움직이지 않는 개체를 죽은 개체로 판단하였다. 혀를 내밀지 않아도 쓰러져서 날개가 뒤로 접혀 있어도 죽은 개체로 측정하였다. 실험은 실험 시작 후 52시간 동안 진행하였으며, 그 이후 대다수의 벌들이 사망하여 실험을 종료하였다.

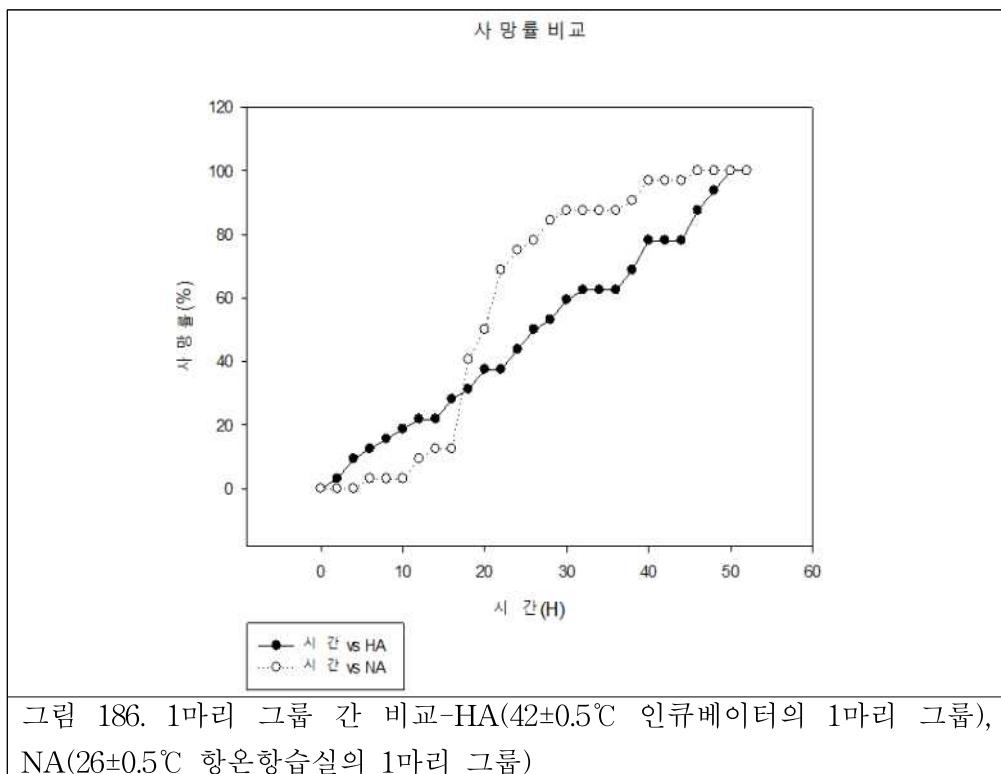
(5) 데이터 산출

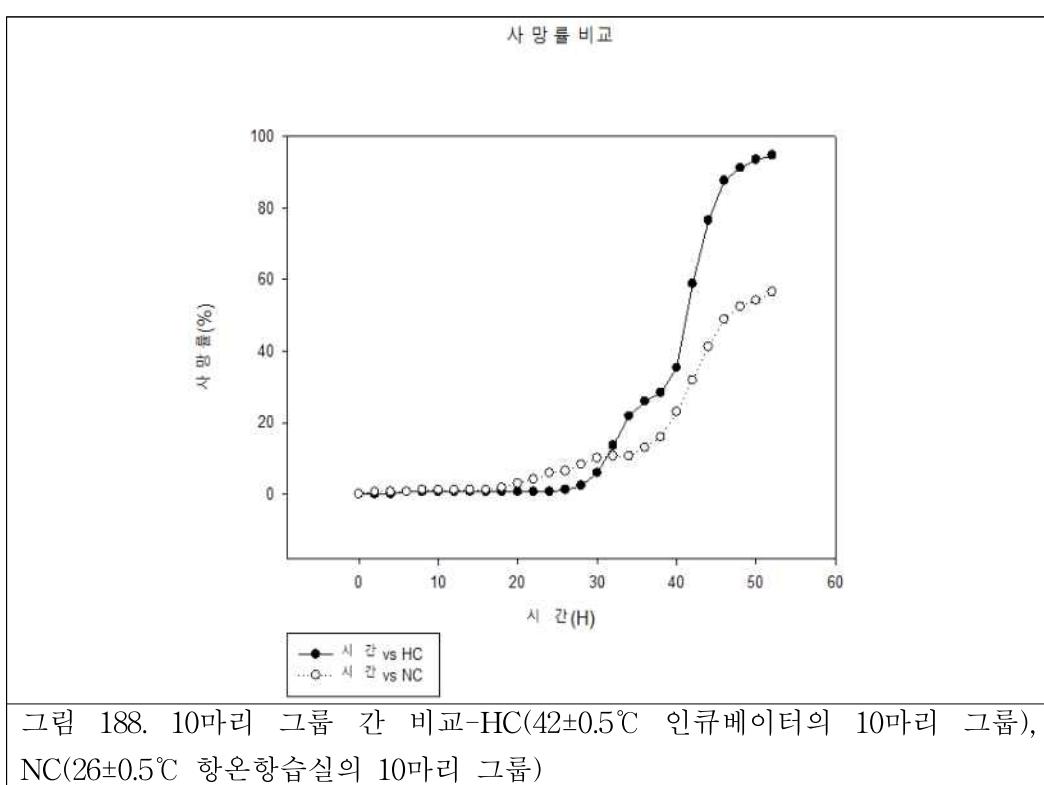
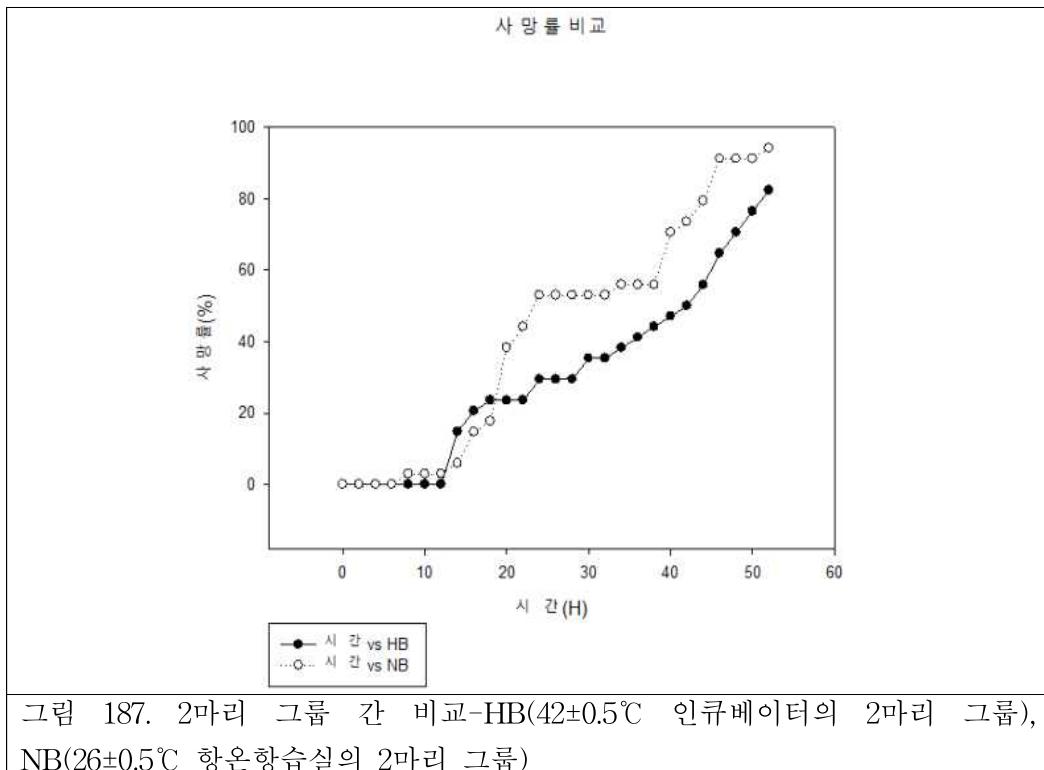
데이터 분석은 SigmaPlot12.0과 Excel 2013을 이용하였다. Excel 2013을 이용하여 시간당 사망수의 평균을 구하여 시간당 사망률을 구하였고, 데이터를 바탕으로 SD값과 SE값도 구하였다. 데이터들을 바탕으로 SigmaPlot12.0에 대입하여 그래프화 하여 각각의 데이터를 비교하기 쉽도록 하였다.

저온실험실의 실험결과는 대부분의 개체가 1시간이 지난 후 활동정지에 들어갔기 때문에 그래프화 하지 못하였다. 활동정지라고 칭한 이유는 실험이 종료되고 상온으로 토종벌들을 옮겼을 때 90%이상의 토종벌들이 다시 움직이기 시작했기 때문이다.



(6) 연구 결과: 온도 차이에 따른 사망률 비교





(7) 결론

(가) 저온실험실

본 실험은 토종별 사이에서의 의사소통과 온도에 대한 행동의 변화를 사망률을 지표로 측정해 보고자 한 실험이다. 안타깝게도 저온실험실(C, $6.5\pm1^{\circ}\text{C}$)에서 진행한 실험은 낮은 온도로 인해 토종별들이 2시간도 채 되지 않는 시간에 움직임을 멈추어 사망률을 측정할

수 없었다. 그렇기 때문에 의사소통과 온도의 변화로 인한 행동의 변화를 다른 온도의 그룹과 비교할 수 없었다. 하지만 저온실험실의 10마리 실험군의 일벌들은 최대한 서로 뭉쳐 공처럼 만들어 서로의 체온을 유지하려는 모습이 관찰되었다. 항온 항습실의 10마리 실험군에서도 서로 가깝게 뭉쳐 있는 것이 관찰 되었지만, 낮은 온도에 더 개체간 거리가 가깝게, 지면에 발을 대고 뭉쳐있는 것이 아닌 서로서로 모여서 공 형태를 만들고 있는 것이 다른 점이다. 10마리 군집이 서로 간 뭉침으로써 1마리 실험군과 2마리 실험군에 비하여 조금 더 긴 시간 동안 저온실험실 내에서의 움직임을 보였다.

저온 실험실에서 실험한 개체들을 다른 실험이 종료된 52시간 이후에 상온에 꺼내두었더니 90%이상이 다시 활동을 시작하는 것이 관찰되었다. 낮은 온도($6.5\pm1^{\circ}\text{C}$)에서 52시간을 활동 정지 상태에서 보냈지만, 상온으로 돌아오고 다시 활동을 한다는 것은 따로 연구해 볼만한 가치가 있다고 생각된다. 추후 꿀벌 개체가 낮은 온도에서 어느 정도 시간 동안 활동 정지했다가 상온으로 돌아와 움직일 수 있는지 알아보는 실험도 할 수 있을 것이다.

(나) 개체수에 따른 사망률비교

토종벌 일벌들의 사망률의 비교는 같은 온도내의 개체수 차이에 따른 비교와 다른 온도에서의 같은 개체수간의 비교를 하였다. 개체수의 차이에 따른 비교는 서로간의 의사소통의 유무와 의사소통의 정도에 따라 사망률이 달라지는지를 보고자 하였다. ‘의사소통을 하면 생존률이 늘 것이다.’라는 전제하에 실험을 하였다.

인큐베이터 배양기(H, $42\pm0.5^{\circ}\text{C}$)에서의 개체수 차이에 따른 사망률은 1마리 실험군은 비교적 일정하게 사망률이 증가하는 모습을 보여주었다. 2마리 실험군은 1마리 실험군 보다 조금 낮은 사망률의 증가를 보여주었다. 10마리 실험군은 28시간 까지는 가장 낮은 사망률을 나타냈지만 그 이후 다른 그룹보다 더 높은 기울기로 사망률이 증가하는 모습을 보여주었다. 42시간 전까지는 1마리 실험군 2마리 실험군 10마리 실험군 순으로 사망률이 후자로 갈수록 높아 졌지만, 그 이후에는 10마리 실험군의 사망률이 급격히 증가하여 1마리 실험군의 사망률과 조금의 차이 밖에 나지 않을 정도로 증가하였다. 42시간 전까지는 토종벌 개체가 많을수록 사망률이 낮다는 것을 확실히 보여주지만 그 이후에는 그렇지 못하다. 개체수가 많을수록 사망률이 낮다면 꿀벌 개체의 서로간의 의사소통은 생존이 필수적으로 필요한 것이란 말이 된다. 하지만 42시간 이후부터는 그렇지 못하였다. 관찰 결과 그 이유를 조금이나마 추측해 볼 수 있었다. 다른 실험군에 비해 10마리 군집의 토종벌들은 무엇인가 다른 행동 양상을 보였다. 그것은 바로 환풍 활동을 했다는 것이다. 환풍 활동은 일벌들이 높은 외부 온도로 군집내의 온도가 높아질 시 온도의 항상성을 유지하기 위하여 하는 꿀벌들의 온도 조절 작용이다. 이런 환풍 활동이 1마리 실험군과 2마리 실험군에서는 비교적 적게 관찰된 반면, 10마리 실험군의 개체들은 많은 개체가 환풍 활동을 하는 모습을 보여주었다. 서로 간에 일정한 거리를 두고 날개 짓을 하고 있는 것을 관찰할 수 있었다. 다른 군집과는 다르게 10마리 군집에서 환풍 활동이 나타난 것은 개체간 의사소통의 결과라고 생각될 수 있다. 개체 사이의 무언가가 각 개체들을 환풍 활동을 하게 만들었다. 제한된 환경, 즉 먹이가 공급되지 않는 상황에서의 격렬한 움직임이 수명 단축의 결과로 이어진 것으로 보여 진다. 그렇기 때문에 1마리 2마리 실험군의 일정한 사망률의 증가와는 다른 급격한 사망률의 증가가 나타났다.

항온항습실(N, $26\pm0.5^{\circ}\text{C}$)의 실험 결과는 또 다른 그래프 양상을 보여준다. 1마리 실험군의 경우 10시간이 지난 후부터 사망률의 증가를 보이다가 16시간 이후에 급격하게 사망률

이 증가 한 것을 보였다. 2마리 실험군 또한 조금의 시간차이는 있지만 18시간 이후부터 급격한 사망률을 보이다가 24시간부터 38시간까지 사망률이 크게 증가하지 않는 상태를 유지하다가 이후 다시 증가하는 양상을 보였다. 반면에 10마리 실험군에서는 초반부터 낮은 사망률 증가를 보였고, 40시간 이후에 약간 증가하는 추세를 보였지만 1마리, 2마리 실험군에 비하여 낮은 사망률을 유지하였다. 그래프(항온항습실 실험군비교)를 볼 때 개체수가 많은 것이 낮은 사망률을 유지한다는 것을 보여준다. 이는 서로간의 의사소통이 생존률에 큰 영향을 준다는 것을 보여준다. 10마리의 실험군은 실험 종료까지도 다른 실험군과는 확실히 비교될 만큼 낮은 사망률(최종 56%)을 보여주었다. 실험을 하면서 관찰을 한 결과 1마리 실험군의 개체들은 활발한 움직임을 보이며 dish 내에서 안정적이지 못한 모습으로 계속 이동하며 돌아다녔다. 그에 비해 2마리 개체 실험군은 움직임이 더 적었으며 2마리가 서로 모여 있는 모습이 관찰되었다. 10마리 실험군에서는 10마리 개체가 모두 모여 있거나 1~2마리만 활발히 움직이는 모습을 관찰하였다. 한마리 개체군의 안정적이지 못한 급한 움직임은 많은 에너지를 소모시켰을 것이고, 혼자 있다는 불안감을 가중 시켰을 것이다. 그로인해 가장 높은 사망률의 증가와 실험 종료시 가장 높은 사망률을 보여주었다. 2마리 군집은 각 개체가 자신 이외에 한마리의 개체가 더 있었지만, 확실한 안정을 주지 못하였는지 많은 움직임을 보였다. 그렇지만 서로 모여 있는 모습이 관찰되었고 몸과 더듬이의 터치로 하는 의사소통 또한 확인 할 수 있었다. 이 한정된 의사소통이 그것을 하지 못하는 1마리 실험군 보다 낮은 사망률을 갖게 하지 않았나 생각된다. 10마리 실험군에서는 거의 모든 dish의 개체들이 서로 모여 있었고, 의사소통을 하거나 혀를 맞대는 모습이 관찰되었다. 혀를 맞대는 모습은 뱃속에 먹이를 충분히 가지고 있는 개체들이 그렇지 않은 개체들에게 자신의 먹이를 나눠주는 것이라 추측된다. 그것들은 생존률의 증가로 나타났다. 온도가 높지 않아 환풍 활동은 하지 않았으며 서로 뭉쳐서 적은 에너지 소모를 하였을 것이다.

(다) 온도에 따른 사망률 비교

Ⓐ 1마리 그룹(A)간 비교

이 두 그룹간의 사망률 그래프 양상은 확연히 다르게 나타났다. 인큐베이터 배양기(HA)의 경우 지속적으로 일정한 증가 추세를 보인 반면, 항온항습실의 경우 18시간 전까지는 인큐베이터 배양기의 그룹보다 낮은 사망 증가 추세를 보였으나 18시간 이후부터는 급격하게 사망률이 증가하는 양상이 나타났다. 항온항습실의 1마리 그룹(NA)의 사망률이 급격하게 높아진 이유는 $26\pm0.5^{\circ}\text{C}$ 에서의 활동성이 인큐베이터 배양기의 $42\pm0.5^{\circ}\text{C}$ 보다 높아서 토종별들이 에너지 소비를 더 많아 그런 것으로 추측된다. 관찰결과 항온항습실의 1마리 실험군의 별들은 dish안에서 활발히 배회하는 반면에 인큐베이터 배양기의 1마리 실험군의 별들은 비교적 약한 활동성을 보였다.

항온항습실의 1마리 실험군은 실험시작 46시간 만에 100%의 사망률에 도달하였고, 인큐베이터 배양기의 1마리 실험군은 50시간 만에 사망률 100%에 도달하였다.

Ⓑ 2마리 그룹(B)간 비교

2마리 실험군의 사망률 증가는 1마리 실험군의 사망률 증가보다 낮은 추세로 증가하는 모습을 보여주었다. 특히 12시간까지의 사망률 증가는 확연히 낮은 것을 확인할 수 있다. 이는 같은 환경에서 개체수의 차이가 개체 생존에 영향을 준다는 것으로 볼 수 있다.

인큐베이터 배양기의 2마리 실험군(HB)은 12~14시간에 급격한 증가 추세를 보이다가 그 이후로는 HA 실험군과 비슷한 비교적 일정한 사망률의 증가를 보여주었다. 또한 실험

종료 시간인 52시간 경과 후에도 82%의 사망률을 보였다. 반면 항온항습실의 2마리 실험군(NB)은 24시간까지 급격한 사망률 증가를 보였지만 그 이후 38시간 까지는 사망률의 증가가 거의 보이지 않았다. 사망률이 증가하지 않는 이 구간이 나타나는 확실한 이유는 알아내지 못하였다. 38시간 이후에는 다시 높은 사망률 증가를 보이며 실험종료시의 사망률은 94%까지 증가 하였다. 최종사망률은 NB가 12%더 높게 나타났다.

④ 10마리 그룹(C)간 비교

10마리 실험군 사이에서는 확연한 차이가 보인다. 실험 종료 시 항온항습실의 10마리 실험군(NC)은 사망률이 54%밖에 되지 않는 반면, 인큐베이터 배양기의 10마리 실험군(HC)은 94%의 높은 사망률을 기록하였다. 1마리 2마리 실험군과는 다르게 인큐베이터 배양기의 실험군이 더 높은 사망률 증가를 보였다. 그 이유는 앞에서 이야기한 환풍 작용 때문으로 생각된다. 결국 높은 온도로 인하여 일벌들은 환풍 활동을 해야 한다는 것을 인지하고 온도를 내리기 위하여 날개 짓을 하여 과다한 에너지 소모로 인한 수명이 단축 된 것으로 보여 진다. 이런 현상은 인큐베이터 배양기의 10마리 그룹에서만 발견되었다. 꿀벌들의 환풍 활동은 개체의 수와 관련이 있다는 것을 추측할 수 있다.

꿀벌의 생존에 온도와 개체수의 차이는 분명한 영향이 있다는 것으로 생각된다. 온도의 차이에 따라 사망률의 증가 양상이 달라졌고, 개체수의 차이에 따라서도 사망률의 증가 양상이 달라졌다. 이번 실험은 먹이를 통제함으로서 개체가 체내에 한정 된 에너지만으로 살아가야 했다. 개체마다 체내에 보유한 에너지의 고갈이 사망에 가장 큰 영향 이었을 것이다. 먹이를 공급하는 실험으로 진행하였다면 아마 다른 결과가 나왔으리라 생각된다.

실험진행에 있어서 많은 요소들을 통제하였지만 각 온도 그룹 간 습도는 통제하지 못하였다. 습도의 차이가 개체들의 사망률에 어느 정도 차이를 주는지는 추가 연구를 통하여 알아 봐야 할 것 같다. 각 온도에서의 습도를 똑같이 맞추지 못하였지만, 한 온도 내에서는 습도를 비교적 일정하게 유지 하였기에 같은 온도 간 개체수의 차이에 따른 데이터가 더 신뢰 할 수 있다고 생각된다.

사. 바람과 온도의 변화가 토종벌(*Apis cerana*)의 먹이활동에 미치는 영향 실험

꿀벌의 비행활동은 습도, 온도, 풍속, 광도와 깊은 상관이 있고 이들이 복합적으로 작용하여 비행에 영향을 미친다. 그 중에서 풍속과 온도를 선택하여, 이 두 가지 기후요인에 의한 토종벌의 먹이 수집시간과 먹이 수집량의 차이에 대하여 알아보고자 하였다.

1차 2차 바람실험에서는 바람세기를 달리하여 토종벌 일벌이 먹이원에서 먹이를 섭취하는 시간을 측정하였다

섭취량 측정실험에서는 바람세기와 온도에 따른 토종벌 일벌의 섭취량 변화를 측정하였다.

(1) 실험 장소

(가) 온실

바람을 통제해야하는 실험 특성상 바람이 불지 않는 곳에서 진행하여야 하므로 사방이 막혀 바람이 들어오지 않는 온실(16.5x6.5x4.5m)을 사용하였다. 추가로 온실 내부에 망사 스크린(12x2.5x4m)을 설치하여 실험에 사용된 토종벌 군집이 불필요한 곳으로 퍼지는 것을 방지함과 동시에 토종벌 일벌들의 생존에 위험요소인 것들을 차단하였다. 고온의 온도(38.8°C)가 필요한 실험에 적합하며, 온도유지와 습도 유지가 용이하다.

(나) 상온실험실

상온의 온도(25.8°C)에서 실험이 적합하고, 토종벌 일벌의 관리가 쉬우며 실험 전 일벌을

기절시키기 위한 CO₂ 의 사용이 쉬운 실험실을 사용하였다. 온도의 유지가 쉬우며 습도 유지가 비교적 용이하다.

(다) 저온 실험실

저온의 온도(16.4~17.4°C)에서 실험이 적합하다. 온도를 떨어트리는 기기가 작동하여 일정한 저온을 유지시킬 수 있다.

(2) 사용 군집

(가) 1차 바람실험

야외 사육장에서 사육중인 토종별 군집 중 군세가 강하고 여왕별과 알들이 확인된 군집을 사용하였다. 벌통은 나무로 된 계량 벌통이며, 5매였던 소비 판을 2판을 제거하여 3판으로 만들어 실험에 사용하였다. 그 이유는 일벌들이 너무 많으면 실험 시 벌들의 행동을 캠코더를 이용하여 촬영한 데이터 분석이 어렵기 때문이다. 벌들을 안정시키기 위해 실험을 진행하기 2일전에 소문(입구)을 닫고, 일벌들이 활동하지 않는 야간시간대에 실험이 진행되는 온실로 벌통을 이동시켰다.

(나) 2차 바람실험:

1차 실험과 마찬가지로 야외 사육장에서 사육중인 토종별 군집 중 군세가 강하고 여왕별과 알들이 확인된 군집을 사용하였다. 소비판은 3판으로 전 실험과 동일하게 조치하였다. 또한 실험 2일전에 온실로 이동시켜 적응시켰다.

(다) 섭취량 측정 실험:

벌통 전체를 이용하는 실험이 아니기 때문에 야외 사육장에서 사육중인 군집 중 여왕별이 있고, 알이 확인되며 군세가 강한 벌통을 선택하여 그 벌통에서 야외활동을 하러 나오는 일벌을 포충망으로 채집하여 실험에 사용하였다. 바람의 세기에 따른 섭취량 실험에 사용할 일벌은 바람이 없을 때와 바람세기가 4.5m/s일 때 각각 32마리씩 채집하였고, 3가지 온도에서의 섭취량 측정 실험에 사용할 일벌을 각각 32마리씩 채집하였다. 총 채집한 일벌의 수는 160마리이다.

(3) 실험 방법

(가) 1차 바람 실험:

실험 시작 2일전 실험을 하기 위해 먹이원 인지 훈련을 일벌들에게 시켰다. 설탕물 급여기를 사용하여 벌통과 7.6m 떨어진 지점의 테이블 위에 먹이원을 위치시키고, 설탕물(물1:설탕1)을 급여하였다. 설탕물 급여기는 노란색과 파란색으로 되어있어 벌들에게 인지되기 쉽게 하였다. 훈련 방법은 벌통에서 나오는 일벌 30마리를 포충망으로 채집하여 CO₂로 기절시켜 먹이원 위에 일벌의 입이 설탕물에 닿게끔 옮겨놓는 것이다. 일벌들은 깨어난 후 먹이원에 있는 설탕물을 섭취 후 벌통으로 돌아가 먹이원의 위치를 다른 꿀벌에게 전달함으로서 훈련이 이뤄진다. 이 훈련은 2틀간 하루에 한번 진행하여 총 60마리의 일벌을 훈련시켰다.

2일간의 먹이원 인지 훈련을 마치고 본 실험을 실시하였다. 실험은 3가지 바람조건에서 일벌이 먹이원에 방문하여 설탕물을 먹는 시간을 캠코더로 촬영하였다. 바람조건 별로 하루씩 진행하였다. 바람 없음, 2m/s(1.92~2.18m/s), 3m/s(2.82~3.04m/s)의 바람세기 순서로 실험을 진행하였다. 바람은 풍량 측정기로 먹이원의 바로 위에서 측정하였다. 먹이원에서 일벌들이 설탕물을 섭취하는 모습이 보이게 캠코더를 설치하고 먹이원과 벌통의 수직선상에 바람을 일으킬 선풍기를 설치하였다. 각 실험은 일벌들이 활발한 시간대인 12:00~14:00

에 총 2시간동안 진행하였다. 온습도계를 먹이원 옆에 설치하여 캠코더 촬영 시 먹이원과 같이 보이게 세팅하여 온도 습도를 측정하였다.

(나) 2차 바람 실험:

1차 실험을 보완하여 2차 실험을 실시하였다. 1차 실험에서는 바람세기를 각각 하루씩 배정하여 실험을 한 반면, 2차 실험에서는 한 번의 실험에서 먹이원을 2개를 테이블 양쪽 위에 놓아 하나는 바람이 있게 하고 다른 하나는 바람이 없게 설치하였다. 이렇게 실험을 설계함으로써 두 가지 바람세기간에 온도와 습도를 동일하게 맞출 수 있다. 먹이원은 1차와 마찬가지로 설탕물 공급기를 사용하였고, 설탕물은 물과 설탕 1:1비율로 급여하였다.

먹이원 인지 훈련 또한 실험 전 2일간 진행하였으며 먹이원 훈련 시에는 테이블 중앙에 먹이원 하나만 놓아두어 훈련시켰다. 훈련 방법은 1차와 같은 방법인 벌통에서 나오는 일벌들을 채집하여 CO_2 로 기절시켜 먹이원에 입이 설탕물에 닿도록 놓아두었다. 1일차에 60마리, 2일차에 20마리의 일벌을 훈련시켰다. 훈련시킨 벌들은 마킹 팬으로 등에다 마킹하여 추후 알아볼 수 있게 하였다.

1차 실험과 마찬가지로 먹이원이 있는 테이블과 벌통과의 거리는 7.6m로 하였다. 실험은 12:00에 시작하여 18:00에 종료하여, 총 6시간동안 실험을 진행하였다. 앞의 3시간 동안은 벌통이 바라보는 방향에서 왼쪽에 있는 먹이원에 $4.5 \pm 0.1 \text{ m/s}$ 의 바람을 선풍기를 이용하여 생성하였다. 오른쪽 먹이원에는 바람이 없이 진행하였다. 뒤의 3시간은 앞과는 반대로 왼쪽 먹이원에 바람을 없애고, 오른쪽 먹이원에 $4.5 \pm 0.1 \text{ m/s}$ 의 바람을 생성하였다. 바람은 풍량 측정기로 먹이원의 바로 위에서 측정하였다. 실험시작과 동시에 양쪽 먹이원을 캠코더를 이용하여 촬영하였고, 1차 실험때 보다 광각으로 촬영하여 먹이원에서 섭취를 하다가 다른 일벌에 의해 방해 받아 날아올랐다가 다시 섭취하는 벌들까지 확인할 수 있게 하였다. 온도와 습도는 1시간 단위로 온습도계를 이용하여 측정하였다.

(다) 섭취량 측정 실험:

섭취량 측정 실험은 기후요건 중 2가지를 가지고 실험을 진행하였다. 첫 번째로는 바람의 세기에 따른 먹이 섭취량을 측정하였고, 두 번째로는 온도의 차이에 따른 먹이 섭취량을 측정하였다.

실험을 위하여 플라스틱으로 사각형의 통로를 만들었다. 통로 앞쪽에는 선풍기를 설치하여 바람을 발생하게 하였으며 반대쪽으로는 바람이 나갈 수 있도록 하였다. 통로 안에는 온습도계를 설치하여 온도와 습도를 체크하였다. 상자로 인하여 일벌들이 도망가는 것을 방지할 수 있었다. 먹이원은 플라스틱접시 위에 벌들이 딛을 수 있는 발판을 올려놓고 물과 설탕 1:1 비율의 설탕물을 공급하였다. 일벌들이 발판에서 설탕물을 쉽게 먹을 수 있는 구조로 만들어 주었다. 통로 안에는 일벌들을 관찰할 수 있게 캠코더를 설치하였다.

(라) 바람세기에 따른 먹이 섭취량 측정 실험

야외 사육장에서 채집해온 일벌들을 열음으로 마취시킨 후, 마킹팬 4가지 색깔(흰색, 녹색, 청색, 빨간색)을 이용하여 각각의 일벌의 등에 점을 찍어 마킹하였다. 마킹순서는 왼쪽 위, 오른쪽 위, 왼쪽 아래, 오른쪽 아래 순으로 하였으며 총 32마리의 등에 마킹되었다. 마취되고 마킹된 일벌을 마취에서 깨어나기 전에 전자저울로 무게를 측정하고 먹이원의 발판에 올려 두었다. 먹이를 먹는 시간에 제한을 두지 않았고, 일벌이 깨어나 먹이를 먹고 날아오르거나 먹이원 밖으로 벗어나면 다시 채집하여 CO_2 로 기절시킨 후 전자저울로 무게를 측정하였다. 2번째 기절시키는데 CO_2 를 사용한 이유는 일벌이 더 빨리 기절하기 때문이

다. 빨리 기절시켜 섭취한 먹이의 변화를 최소화하였다. 일별의 먹은 후 무게와 먹기 전 무게를 비교하여 먹이 섭취량을 측정하였다. 먼저 바람이 없는 조건에서 32마리의 일별로 실험을 하였으며, 그 다음 바람세기 4.5m/s의 세기로 바람을 틀어놓고 32마리의 일별로 실험을 진행하였다. 실험은 각각 하루씩 오후 3시부터 6시까지 진행하였다. 각 실험에 사용된 일별은 같은 일별이 아니다. 실험 도중 온도는 24~25°C로 유지했고, 습도는 63~56%로 유지하였다. 온도와 습도는 온습도계를 이용하여 측정하였다.

(마) 온도 차이에 따른 먹이 섭취량 측정 실험

바람의 세기와는 다르게 3가지온도 저온(16.4~17.4°C), 상온(25.8°C), 고온(38.8°C)에서의 먹이 섭취량을 측정하는 실험을 하였다. 실험 장소는 온실에서 고온실험, 상온실험실에서 상온실험, 저온실험실에서 저온실험을 진행하였다. 습도의 조절과 일별의 컨트롤을 쉽게 하기 위하여 플라스틱 박스를 제작하여 그 안에서 실험을 진행하였다. 먹이원은 앞 실험과 동일하게 세팅하였고, 설탕물 또한 비율(1:1)을 유지하였다. 각 실험마다 32마리의 일별을 사용하였고, 채집한 일별들은 얼음으로 기절시켜 앞 실험과 동일하게 4가지 색의 마킹펜으로 일별의 등에 마킹하여 개체를 알아볼 수 있게 하였다. 표지된 기절한 일별들은 전자저울로 무게를 측정하고, 먹이원의 발판에 올려 두어 깨어난 후 설탕물을 섭취하게 하였다. 섭취시간에 제한을 두지 않았다. 설탕물을 섭취하고 먹이원에서 벗어나거나 날아가는 별을 다시 채집하여 CO₂로 기절시켜 다시 무게를 측정하였다. 두 번의 측정한 무게를 비교하여 각 개체당 먹이 섭취량을 측정하였다. 이러한 방법으로 3가지온도에서의 측정을 하였으며 저온에서의 실험에서는 얼음에 기절한 일별들 다수가 표지 후 먹이원 위의 발판에 두었을 때 다시 깨어나지 않아 실험을 중지하였다.

(4) 데이터 분석

(가) 1차 바람 실험:

기후요인중 하나인 바람의 영향이 꿀벌의 섭식활동에 어떠한 영향을 주는지 알아보기 위하여 먹이원에서 설탕물을 섭취하는 꿀벌을 캠코더로 동영상 촬영하였다. 바람의 세기에 따라 각각의 먹이섭취시간과 먹이원 방문 빈도수를 측정하였다. 촬영시간은 각 실험의 시작 시간인 pm12:00보다 5분 빠른 am11:55분부터 시작하였고 pm2:00에 종료하였다. 촬영된 동영상에서 일별이 먹이원에 방문하여 설탕물에 입을 대는 시간부터 입을 때는 시간을 먹이 섭취시간으로 정하였고, 먹이원에 방문한 회수를 측정하였다. 섭취시간 측정은 동영상 재생 플레이어인 곰플레이어의 재생시간으로 측정하였으며, 일별이 먹이원에서 입을 땐 시간에서 입을 땐 시간을 빼서 구하였다. 영상을 분석하여 측정한 일별들의 먹이섭취 시간은 Microsoft사의 Exel 2013 프로그램을 이용하여 기록하였다. 바람의 세기에 따라 각각의 먹이섭취시간과 먹이원 방문 빈도수를 측정하였다.

(나) 2차 바람 실험:

1차 실험과 동일하게 먹이원에 캠코더를 설치하여 촬영하였으며, 촬영 시간은 실험시간과 동일한 pm12:00 ~ pm6:00 까지 이다. 2차 실험에서는 바람이 있는 먹이원과 없는 먹이원을 동시에 두고 실험에 진행하였으므로 동시에 2대의 캠코더로 동영상을 촬영하였다. 촬영한 영상은 곰플레이어를 이용하여 재생하였고, 재생된 영상에서 앞의 실험과 같은 방법으로 일별들의 먹이 섭취 시간과 방문 빈도를 Exel 2013을 이용하여 기록하였다.

(다) 섭취량 측정 실험:

기후요인에 따른 먹이섭취량 변화 측정 실험에서는 일별 각각 개체를 정밀저울을 이용하

여 무게를 측정한 후 주어진 기후요인에서 먹이를 섭취 시킨 후 다시 무게를 측정하여 먹이 섭취량을 측정하였다. 먹이 섭취 후 무게에서 먹이 섭취 전 무게를 빼서 섭취량을 산출하였다. 무게는 그램(g) 단위에서 소수점 4째 자리까지 측정하였다. 측정한 값은 Exel 2013을 사용하여 기록하였고, 섭취 평균을 구하였다.

(5) 연구 결과

(가) 1차 바람실험:

각 3가지 바람조건에서의 12시부터 2시까지의 동영상을 분석한 결과, 바람이 없는 실험군, 2m/s의 바람조건의 실험군, 3m/s의 바람 조건의 실험군의 순서로 각각 151마리, 230마리, 53마리의 일벌이 다녀갔다. 또한 일벌들의 평균 채집 시간은 앞의 순서대로 23초, 24초, 25초순으로 나왔다.

바람 없이 진행한 1일차 실험 시 10분 간격 평균온도는 31.5°C이고 최고온도 33.4°C, 최저온도 29.9°C이다. 10분 간격 평균습도는 75%이고 최고습도 80%, 최저습도 70%이다. 2m/s의 바람의 세기로 진행한 2일차 실험 시 10분 간격 평균온도 37.6, 최고온도 38.6°C, 최저온도 36.2°C이다. 10분 간격 평균습도는 53%, 최고습도 56%, 최저습도 51%이다. 3m/s의 바람세기로 진행한 3일차 실험 시 10분 간격 평균온도 33.7°C, 최고온도 34.7°C, 최저온도 31.3°C이다. 10분 간격 평균습도는 60.3% 최고습도 67%, 최저습도 57%이다.

표 38. 먹이원에 방문한 일벌의 마리수와 평균 먹이 섭취시간.

	방문마리수	평균 섭취시간
바람 없음	151	23
2m/s	230	24
3m/s	53	25

섭취시간 그래프

y축: 채집시간(s)

x축: 1-바람 없음, 2-바람 2m/s, 3-바람 3m/s

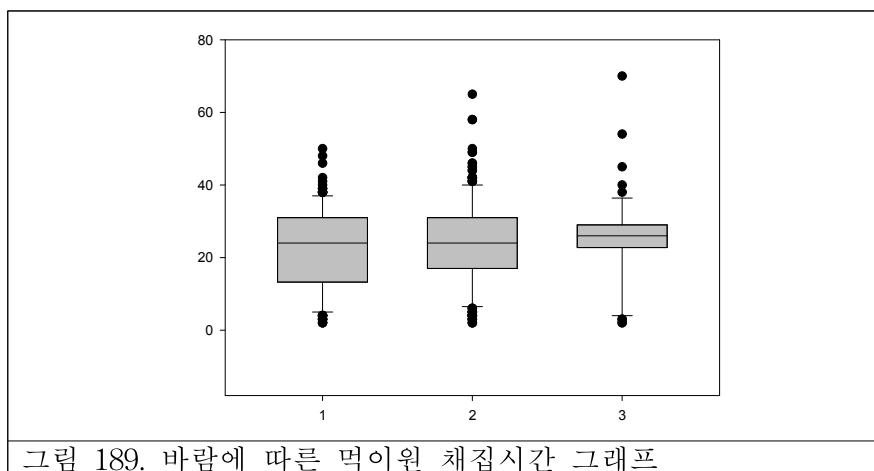


그림 189. 바람에 따른 먹이원 채집시간 그래프

(나) 2차 바람 실험:

총 6시간의 실험 중 앞의 3시간은 벌통에서 바라보는 관점에서 왼쪽 먹이원에는 바람 4.5m/s을 불게 하였고, 오른쪽의 먹이원에는 바람이 없이 실험하였다. 바람세기 4.5m/s의 왼쪽 먹이원에는 3시간동안 총 8마리의 일벌이 방문하였으며, 총 섭취시간의 평균은 27초이다. 바람이 없는 오른쪽 먹이원에는 3시간동안 총 257마리가 방문하였으며, 평균 섭취시간은 28초이다.

후반의 3시간 실험은 바람 여건을 바꿔 왼쪽 먹이원에는 바람이 없게, 오른쪽 먹이원에는 4.5m/s의 세기의 바람을 주었다. 바람이 없는 왼쪽 먹이원에는 총 209마리의 일벌이 방문 하였으며, 섭취시간의 평균은 38초 이다. 4.5m/s의 바람이 있는 오른쪽 먹이원에서는 총 69 마리의 일벌이 방문하였으며, 평균 섭취시간은 33초이다.

표 39. 6시간 동안 2개의 먹이원의 바람 세기와 일벌의 방문 빈도, 먹이섭취 평균시간.

2차 바람실험	앞의 3시간			뒤의 3시간		
	바람세기 (m/s)	방문 마리수	평균 섭취시간 (s)	바람세기 (m/s)	방문 마리수	평균 섭취시간 (s)
왼쪽 먹이원	4.5	8	27	바람 없음	209	38
오른쪽 먹이원	바람 없음	257	28	4.5	69	33

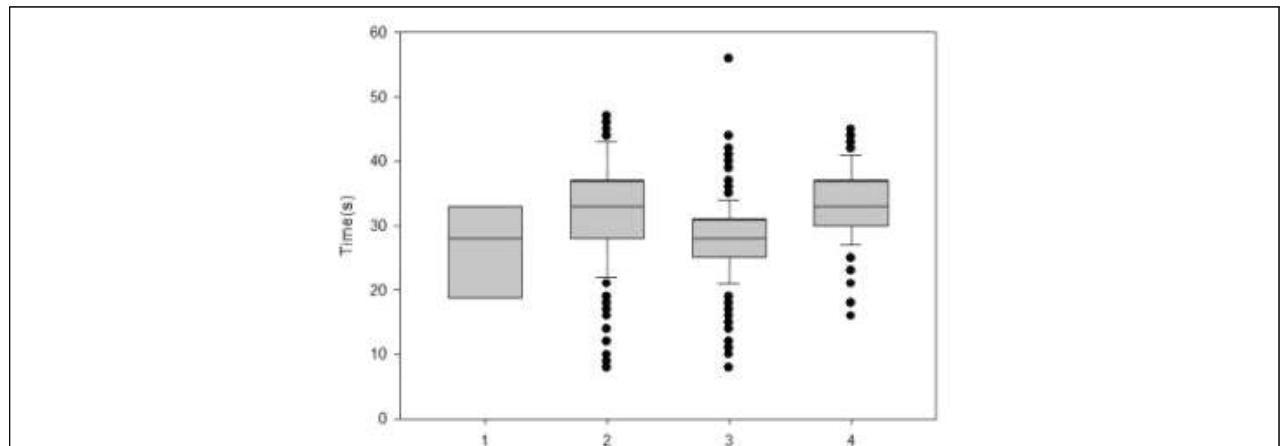


그림 190. 바람에 따른 먹이 섭취시간 그래프. 1,2 번은 왼쪽 먹이원(1: 바람O-앞의 3시간, 2:바람X-뒤의 3시간), 3,4번은 오른쪽 먹이원(3:바람X-앞의 3시간, 4:바람O-뒤의 3시간)

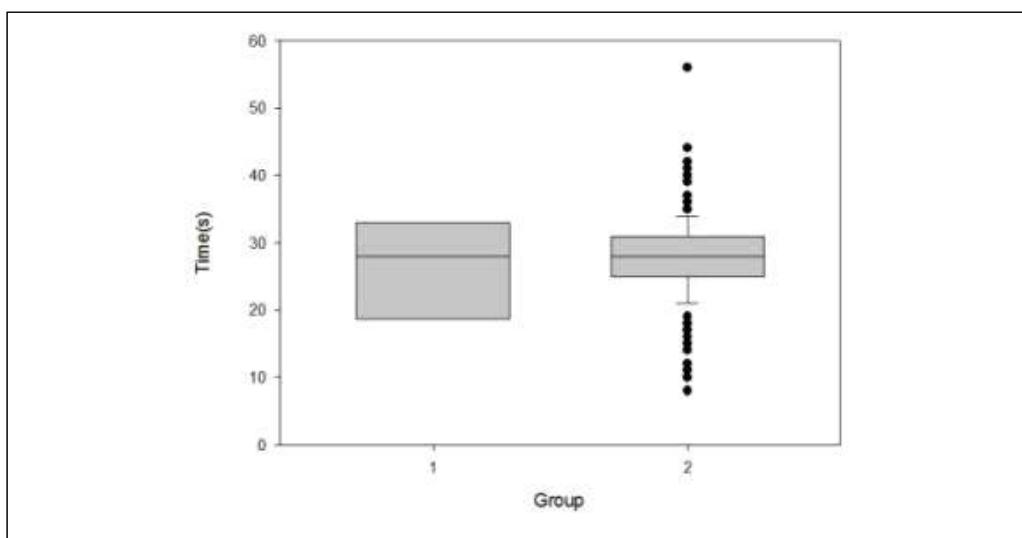
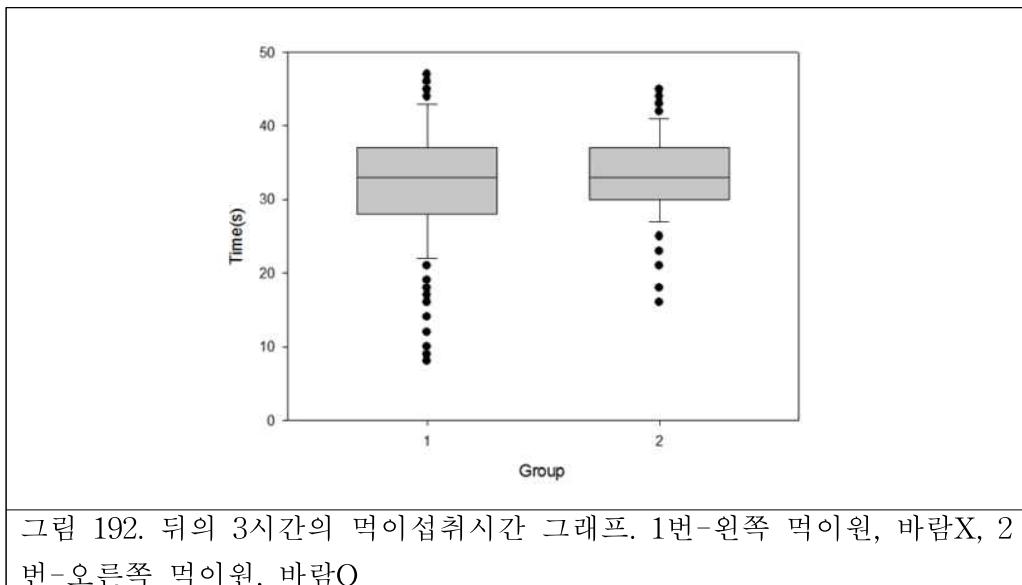


그림 191. 앞의 3시간의 먹이섭취시간 그래프. 1번-왼쪽 먹이원, 바람O, 2 번-오른쪽 먹이원, 바람X



(6) 섭취량 측정 실험

(가) 바람세기에 따른 먹이 섭취량 측정 실험

바람 없는 실험 그룹과 바람세기 4.5m/s의 실험 그룹 각각 32마리의 일별을 사용하였다. 바람 없는 실험 그룹의 일별들의 먹기 전 몸무게의 평균은 약0.065g이고 4.5m/s의 바람세기 실험 그룹은 약0.061g이다. 각 조건에서 먹이 섭취 후 일별들의 몸무게 평균은 바람 없는 실험 그룹은 약0.089g, 4.5m/s의 바람세기 실험 그룹은 약0.091g이다. 각각의 섭취량을 구하여 평균을 구하면 바람 없는 실험 그룹은 약0.024g, 4.5m/s의 바람세기 실험 그룹은 약0.030g으로 구해졌다. 두 그룹간 섭취량 평균의 차이는 약0.006g이다. 4.5m/s의 바람세기의 실험 그룹이 약0.006g 많은 먹이를 섭취하였다.

표 40. 바람 세기에 따른 일별의 먹이 섭취 전 몸무게, 먹이 섭취 후 몸무게, 먹이 섭취량

바람 없음	먹기전	먹은후	먹은량	바람 4.5m/s	먹기전	먹은후	먹은량
1	0.058	0.0751	0.0171	1	0.0594	0.0847	0.0253
2	0.0598	0.0704	0.0106	2	0.0566	0.0996	0.043
3	0.0633	0.0698	0.0065	3	0.0646	0.0837	0.0191
4	0.0537	0.0865	0.0328	4	0.0588	0.0918	0.033
5	0.078	0.0914	0.0134	5	0.0559	0.1028	0.0469
6	0.0709	0.103	0.0321	6	0.0563	0.0949	0.0386
7	0.0546	0.1062	0.0516	7	0.0599	0.0865	0.0266
8	0.0805	0.1388	0.0583	8	0.0551	0.0809	0.0258
9	0.0606	0.0948	0.0342	9	0.0613	0.1171	0.0558
10	0.0581	0.0877	0.0296	10	0.0737	0.1026	0.0289
11	0.0621	0.0688	0.0067	11	0.0611	0.0898	0.0287
12	0.06	0.0728	0.0128	12	0.0572	0.0716	0.0144
13	0.0714	0.0788	0.0074	13	0.062	0.0841	0.0221
14	0.0608	0.0783	0.0175	14	0.0583	0.1141	0.0558
15	0.0625	0.1076	0.0451	15	0.0693	0.0839	0.0146
16	0.0996	0.1255	0.0259	16	0.0512	0.0702	0.019
17	0.0563	0.1154	0.0591	17	0.0636	0.0765	0.0129
18	0.0734	0.0801	0.0067	18	0.0727	0.1021	0.0294
19	0.062	0.0864	0.0244	19	0.0623	0.1416	0.0793
20	0.0617	0.0905	0.0288	20	0.0693	0.0932	0.0239
21	0.0724	0.0745	0.0021	21	0.0574	0.0911	0.0337
22	0.0606	0.0619	0.0013	22	0.0713	0.099	0.0277
23	0.0631	0.0767	0.0136	23	0.0624	0.0813	0.0189
24	0.059	0.0837	0.0247	24	0.055	0.1088	0.0538
25	0.0684	0.0848	0.0164	25	0.067	0.0833	0.0163
26	0.0825	0.088	0.0055	26	0.0601	0.0741	0.014
27	0.0685	0.0724	0.0039	27	0.053	0.0917	0.0387
28	0.0598	0.0695	0.0097	28	0.0557	0.0945	0.0388
29	0.06	0.1191	0.0591	29	0.0615	0.0935	0.032
30	0.056	0.0585	0.0025	30	0.0574	0.0744	0.017
31	0.0656	0.1275	0.0619	31	0.0748	0.076	0.0012
32	0.0568	0.1049	0.0481	32	0.0586	0.0913	0.0327
평균	0.065	0.089044	0.024044	평균	0.061338	0.091584	0.030247

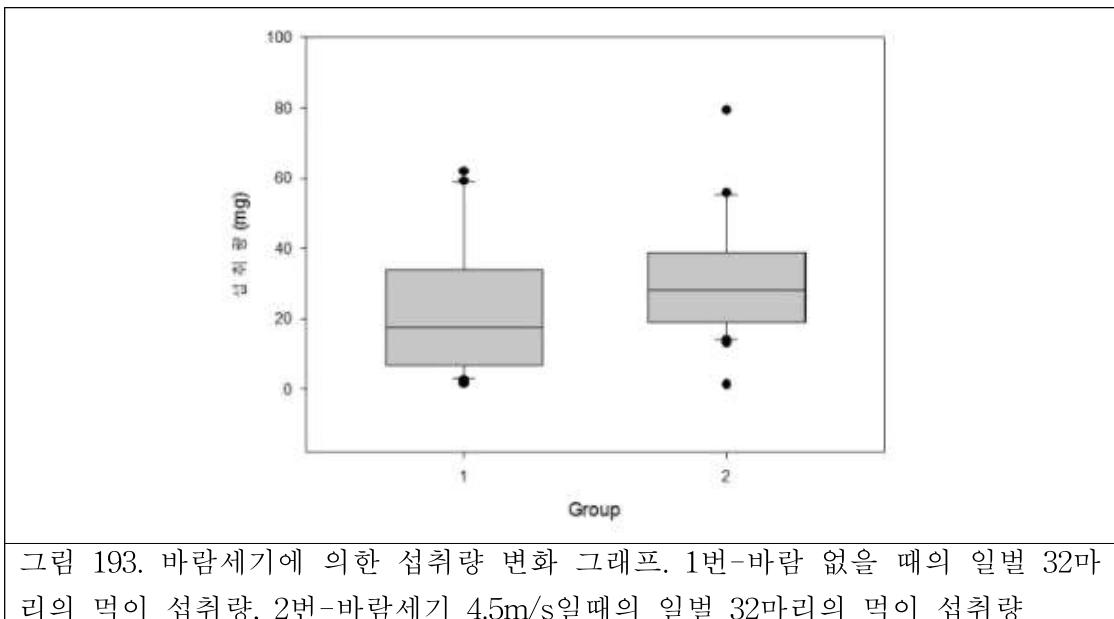


그림 193. 바람세기에 의한 섭취량 변화 그래프. 1번-바람 없을 때의 일별 32마리의 먹이 섭취량, 2번-바람세기 4.5m/s일 때의 일별 32마리의 먹이 섭취량

(나) 온도 차이에 따른 먹이 섭취량 측정 실험

25.8°C의 실험 그룹과 38.8°C의 실험 그룹에 각각 32마리의 일별을 사용하였다. 25.8°C의 실험 그룹의 먹기 전 몸무게 평균은 약0.062g, 먹은 후 몸무게는 약0.084g, 계산된 섭취량의 평균은 약0.017g이다. 38.8°C의 실험 그룹의 먹기 전 몸무게 평균은 약0.065g, 먹은 후 몸무게 평균은 약0.078g, 계산된 섭취량의 평균은 약0.013g이다. 두 그룹간 섭취량평균의 차이는 약 0.004g으로, 25.8°C의 실험 그룹이 약0.004g 더 많은 먹이를 섭취하였다.

표 41. 온도에 따른 일별의 먹이 섭취 전 몸무게, 먹이 섭취 후 몸무게, 먹이 섭취량.

25.8°C	먹기전	먹은후	먹은량	38.8°C	먹기전	먹은후	먹은량
1	0.0614	0.0741	0.0127	1	0.0621	0.0917	0.0296
2	0.0687	0.0734	0.0047	2	0.0664	0.0666	0.0002
3	0.0721	0.0758	0.0037	3	0.0648	0.0697	0.0049
4	0.0648	0.0658	0.001	4	0.0545	0.0538	-0.0007
5	0.0564	0.0612	0.0048	5	0.0919	0.093	0.0011
6	0.0643	0.1023	0.038	6	0.0701	0.0699	-0.0002
7	0.0614	0.0681	0.0067	7	0.066	0.0653	-0.0007
8	0.0621	0.0647	0.0026	8	0.0631	0.0771	0.014
9	0.0623	0.0734	0.0111	9	0.0645	0.0659	0.0014
10	0.0591	0.0686	0.0095	10	0.0577	0.0917	0.034
11	0.069	0.0753	0.0063	11	0.0685	0.0699	0.0014
12	0.0695	0.0836	0.0141	12	0.0638	0.0749	0.0111
13	0.0631	0.0969	0.0338	13	0.0703	0.0752	0.0049
14	0.0842	0.0861	0.0019	14	0.0625	0.0635	0.001
15	0.0695	0.077	0.0075	15	0.0586	0.1226	0.064
16	0.0887	0.1001	0.0114	16	0.0659	0.0662	0.0003
17	0.0583	0.1073	0.049	17	0.0611	0.0614	0.0003
18	0.0633	0.0726	0.0093	18	0.0599	0.0619	0.002
19	0.0697	0.0824	0.0127	19	0.0652	0.0741	0.0089
20	0.0596	0.0861	0.0265	20	0.0703	0.0715	0.0012
21	0.0638	0.0708	0.007	21	0.0639	0.1398	0.0759
22	0.0782	0.096	0.0178	22	0.0661	0.1238	0.0577
23	0.0587	0.1194	0.0607	23	0.0684	0.0816	0.0132
24	0.0644	0.0865	0.0221	24	0.0582	0.062	0.0038
25	0.0731	0.0818	0.0087	25	0.0645	0.1052	0.0407
26	0.0656	0.1141	0.0485	26	0.0758	0.08	0.0042
27	0.0675	0.0739	0.0064	27	0.0683	0.072	0.0037
28	0.0615	0.0713	0.0098	28	0.0608	0.062	0.0012
29	0.0587	0.1195	0.0608	29	0.0606	0.0847	0.0241
30	0.0685	0.0749	0.0064	30	0.0626	0.0751	0.0125
31	0.0625	0.1152	0.0527	31	0.0632	0.0678	0.0046
32	0.0684	0.0701	0.0017	32	0.0607	0.0633	0.0026
평균	0.0662	0.084009	0.017809	평균	0.065009	0.078225	0.013216

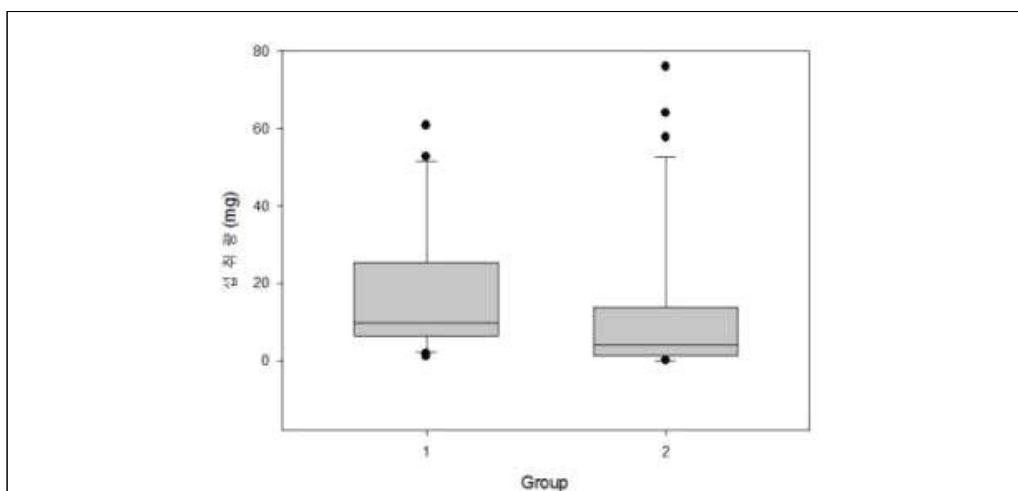


그림 194. 온도에 따른 섭취량 변화 그래프. 1번-25.8°C에서 일별 32마리의 먹이 섭취량, 2번-38.8°C에서 일별 32마리의 먹이 섭취량.

(7) 결론

토종별의 먹이활동에 영향을 주는 요인들 중 바람과 온도를 선택하여 그 영향에 대하여 실험하였다. 다른 여러 가지 요인들도 있지만 선행 연구를 바탕으로 이 두 요인이 가장 큰 영향을 줄 것으로 생각되었다. 바람의 세기는 비행하는 곤충에게 있어서 야외 활동 시에 큰 영향을 줄 것이다. 목표를 향해 날아가기 위해서는 바람이 적을수록 더 적은 에너지를 사용하고 목표에 도달하기 쉽기 때문이다. 곤충인 토종별이 바람세기를 인지하여 비행에 적합한 정도의 무게의 먹이 수집을 할 것인가를 알아보고 싶었다. 바람이 강하다면 몸무게가 많이 나가는 것은 비행에 안 좋은 영향을 줄 것이라는 생각에서 시작되었다. 온도는 비행하는 곤충에게 있어 중요하다. 날개 근육이 일정온도 이상이 되어야 작동할 수 있기 때문이다. 또한 생물체의 활동성에 온도는 중요한 역할을 미친다.

바람 요인이 토종별의 먹이활동(비행, 끌 수집 등)에 어떠한 영향을 주는지 알아보기 위하여 바람세기를 3가지로 나누어 첫 번째 실험을 진행하였다. 바람의 세기는 바람 없음, 바람 세기 약 2m/s, 바람세기 약 3m/s으로 설정하였다. 이 실험에서는 오직 바람 세기만을 통제하여 의미 있는 결과를 얻지 못하였다. 각각 하루씩 3일동안 실험을 진행하였지만 실험을 할 때마다 습도와 온도가 달랐다. 그것으로 인해 각 실험에서 먹이원을 방문한 일벌들의 마리 수 차이와 섭취 시간의 차이가 있음에도 불구하고, 그 차이가 바람의 세기에서 오는 차이인지를 확정할 수 없었다. 또한 동영상 캠코더를 먹이원과 너무 가깝게 위치시켜 동영상의 시야가 넓지 못하여 먹이를 먹다가 다른 벌의 방해로 다시 날아갔다가 돌아오는 벌들을 확실하게 카운팅하여 측정할 수 없는 점이 문제점으로 다가왔다. 이런 여러 가지 문제점을 개선하여 2차 바람실험에 들어갔다.

2차 바람실험에서는 1차 실험에서 문제점이었던 온,습도의 통일, 먹이원 동영상 촬영의 시야등의 문제점을 개선하여 실험을 시작하였다. 바람이 없는 먹이원과 바람이 있는 먹이원을 동시에 실험을 하였다.

2차 바람실험을 진행하는 동안 특이점을 관찰할 수 있었다. 그것은 먹이원에서 먹이를 먹은 일벌이 집으로 돌아가는 것이 아닌 밖에 나와 뭉쳐있는 일벌들에게로 날아간다는 것이다. 그것도 한번 그런 것이 아니라 같은 벌이 여러 번 먹이원과 벌집 밖에 일벌들이 뭉쳐있는 곳으로 왔다 갔다 하는 점이다. 같은 벌임을 알 수 있었던 이유는 먹이원 훈련 시 훈련시킨 벌은 등에 개체마킹을 했는데 그 일벌이 이러한 행동을 보여주었기 때문이다. 이러한 행동의 이유를 추측해보면 일벌들은 자신이 수집한 먹이를 꼭 벌집으로 가져가는 것이 아닌 어떤 이유에선가 밖에 나와 모여 있는 무리에게 먹이를 공급하는 것으로 보여 진다. 밖에 나와 있는 무리에 여왕벌이 같이 있었는지는 알 수 없지만, 이러한 행동을 하는 이유를 차후 연구해 볼 수 있을 것 같다.

섭취량 실험의 결과를 보면 바람 없을 때보다 있을 때 좀 더 많은 량의 먹이를 섭취하는 것으로 나타났다. 바람이 있을 때 더 많은 량의 먹이를 먹는다는 결과는 처음 생각과는 반대 되는 결과였다. 처음에는 바람이 불면 비행하기가 어렵고 그것 때문에 많은 량의 먹이를 먹기보다는 적은량의 먹이를 먹을 것이라 생각하였다. 하지만 결과는 바람이 있을 때 더 많은 량의 먹이를 섭취하였다. 이런 결과의 이유를 생각해보면 바람이 불 때에 비행을 하면 더 많은 량의 에너지가 소모될 것이고 그렇기 때문에 한 번에 많은 량을 섭취하여 벌집으로 돌아 갈 것이라는 생각이 든다.

온도가 38.8°C일 때 보다 10°C이상 온도가 낮은 25.8°C일 때 더 많은 량의 먹이를 섭취하

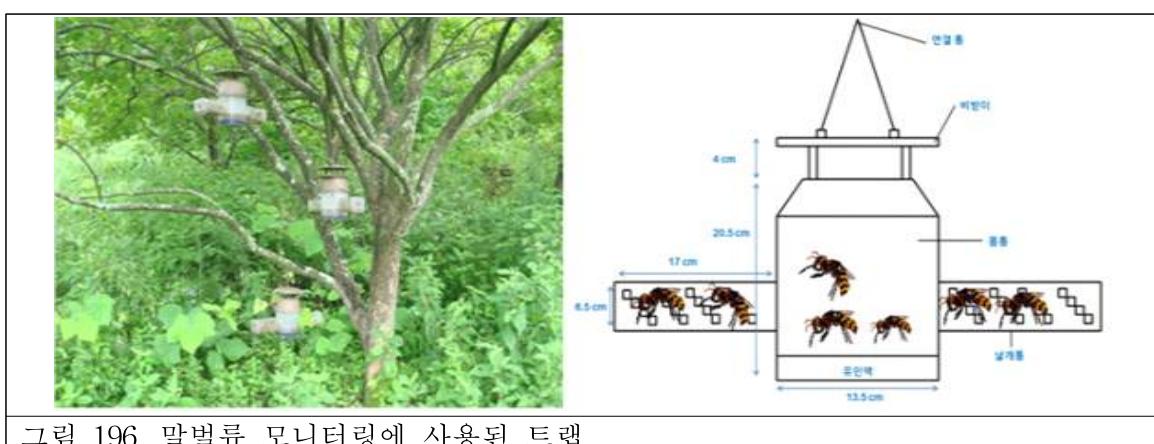
는 것으로 나타났다. 이 결과로 보아 높은 온도보다 적당히 낮은 온도에서 더 많은 먹이섭취를 한다는 것으로 보인다. 하지만 저온(16.4~17.4°C)에서의 실험은 아이스 쇼킹으로 기절시킨 벌들이 저온상황에서 깨어나는데 시간이 오래 걸리고, 깨어난 대다수의 벌들이 먹이를 먹지 않아 실험을 진행하지 못하였다. 또한 32마리라는 비교적 적은 숫자의 일벌들로 실험을 하여 각각 일벌간에 섭취량의 차이가 클 수가 있다. 좀 더 많은 수의 일벌들을 이용하여 실험을 한다면 더욱 정확한 결과가 나올 것으로 예상된다. 또한 일벌을 마비시켰다가 깨어나는 즉시 먹이를 섭취하게 한 실험이므로 실제 자연에서의 섭취량과는 차이가 있을 수 있을 것이다. 이 실험은 추가적으로 온도를 더욱 세분화하여 어느 온도에서 가장 많은 먹이를 섭취하는지 알아보는 실험을 진행하여도 좋을 것 같다. 또한 바람과 온도뿐만 아니라 여러 가지 기후요건들의 변화를 주고 토종벌의 먹이 섭취량을 측정해보는 실험도 진행해 보면 더 많은 토종벌 연구에 기초되는 자료를 얻을 것이다.

제6절 3협동: 등검은말벌의 기초 생태 및 봉군침입 조기경보시스템 개발

1. 등검은말벌 발생 생태 연구 및 포획기술 개발

가. 말벌류 생태 모니터링

- (1) 트랩: 양측 날개터널이 있는 상업용 플라스틱 터널형 펀넬트랩은 백색이며 유인액의 휘발성과 포획 말벌의 가두리가 용이하다(Jung et al., 2007b). 유인액은 참나무수액을 기본으로 하였다(다목생태기술 자료 참조).
- (2) 조사 지역: 안동대학교 식물의학과 실험양봉장 주위 야산에 10개의 트랩을 설치함(그림 195).
- (3) 조사 시기: 2016년 4월 중순에 트랩 설치를 하며 트랩간 거리는 최소 100m 이상으로 하여, 설치 위치를 선정한다. 설치 후 일주일 간격으로 11월 말까지 트랩에 포획된 말벌을 수거하였다.
- (4) 조사 내용: 트랩에 포획된 말벌을 수거하여 70% 알콜병에 옮겨 담은 뒤에 냉장보관하면서 안동대학교 곤충생태연구실에서 표본화, 계수 및 종 동정을 한다. 포획된 말벌류는 표본제작 후 Carpenter(1987), Carpenter and Kojima(1997), Kim et al.(1994, 2006), Jung et al.(2007a)와 Choi et al.(2012)를 바탕으로 분류 동정하고, 동정된 표본은 안동대학교 곤충생태 표본실에 보관하였다.



(5) 4월 말경 트랩에 채집이 되기 시작하였다. 월동에서 깨어난 여왕벌들이 활발하게 새로운 집을 찾으려 돌아다니는 중에 당분이 필요하여 트랩에 포획되는 것으로 판단된다. 5/20일부터 채집이 줄어든 이유는 애벌레 사육에 여왕벌이 중점을 두고 있어 당분보다는 단백질 먹이원이 필요한 시점이라 채집이 멀어지는 것으로 예측된다. 또한 8/18까지 말벌은 유충사육 시기로 인해 채집은 적게 나타난 것으로 판단된다. 8월 말부터 모든 종의 채집량이 증가하는 추세로 나타났다. 이러한 이유는 유충 사육기간이 끝나가며 월동준비로 인해 8월 말 당분을 섭취하는 비율이 늘어나는 것으로 판단된다(그림 197).

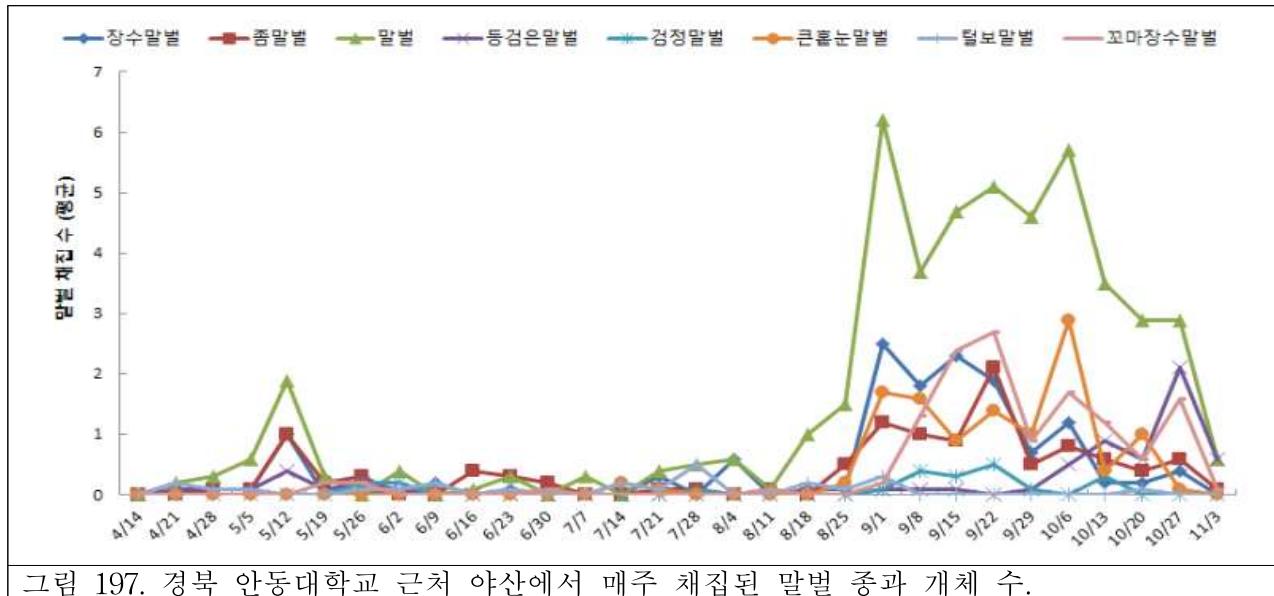


그림 197. 경북 안동대학교 근처 야산에서 매주 채집된 말벌 종과 개체 수.

(6) 2016년도 채집된 말벌의 비율을 보면 44%로 말벌이 가장 많이 나타났으며, 그 다음으로 장수말벌 13%, 꼬마장수말벌 12%, 좀말벌 11%순으로 나타났다. 등검은말벌의 경우 6%로 나타났으며, 가장 적게 나타난 종은 검은말벌로 나타났다(그림 198).

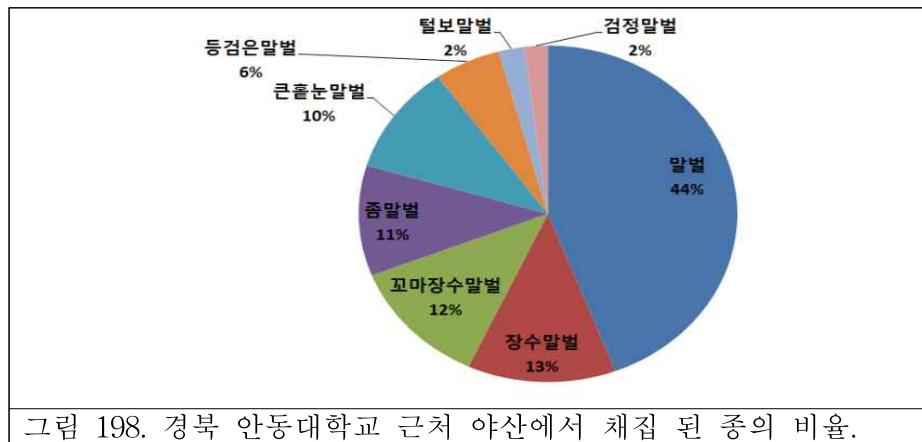


그림 198. 경북 안동대학교 근처 야산에서 채집 된 종의 비율.

나. 등검은말벌 특이 포획기술 개발

(1) 작년 연구에서 사용한 주)다목의 유인액은 꿀벌 또한 유인이 되어 농가에 피해가 우려된다는 문제점이 나타났다. 예측 모델 등검은말벌(*Vespa velutina*)의 특이포획기의 문제점 보안 효과를 확인하기 위해 등검은말벌 트랩과 개선된 트랩을 같은 양봉장에 설치했다. 등검은말벌 특이포획기는 정 등(2015)에서 제안한 트랩을 참고하여 철망으로 제작하였고, 철망 메쉬는 기존에 사용되던 것이 0.5×0.5cm이였으며 개선된 트랩의 철망 크기는

0.6×0.6cm를 이용하여 35×35×45cm(가로×세로×높이)의 직육면체 트랩을 제작하고 상단 면은 열고 닫을 수 있는 개폐형으로 제작하였다(그림. 3). 유인액 종류의 선정으로는 1) 오렌지 주스와 막걸리 1:1 비율의 혼합액, 2) 참나무 혼합액(물 40L, 흑설탕 40kg, 참나무 60kg, 드라이아이스트 25g 발효) 3) 주)다목에코텍에서 판매중인 말벌유인액을 선정하였다(그림. 198).

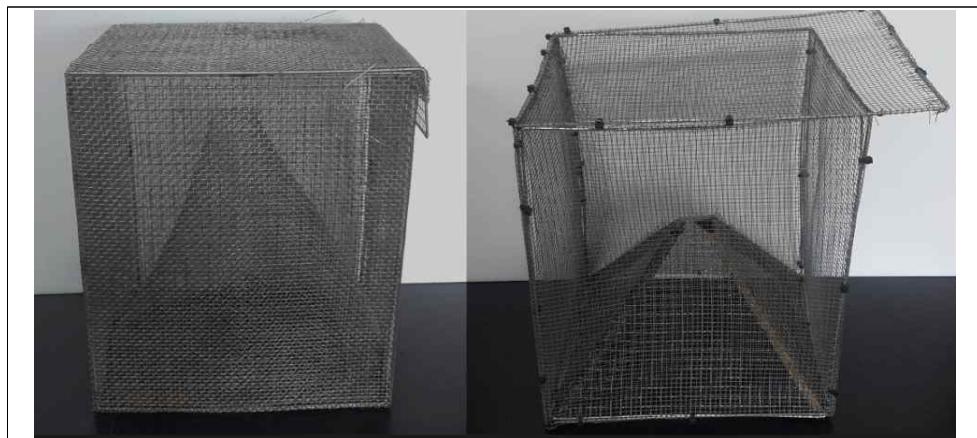


그림 197. 등검은말벌(*Vespa velutina*)의 특이포획기 5mm(좌), 새롭게 제작된 특이포획기 6mm(우).



그림 198. 트랩에 사용된 유인액인 오렌지주스+막걸리((1:1 v/v, 왼쪽), 다목생태 기술의 장수말벌유인액(중간), 참나무 발효액(오른쪽)).

(2) 조사 장소는 영덕군 강구면 금진리, 경주시 양남면 하서리로 두 장소 모두 바다가 2km 내외이며, 내륙에 비해 비교적 따뜻하여 등검은말벌의 서식지로 적합한 지역이라 판단되었다. 두 장소의 양봉장에서는 200봉군 이상을 사육하는 양봉장으로 매년 등검은 말벌의 피해가 나타나는 지역이다. 트랩은 메쉬 사이즈가 다른 트랩 2종과 유인액 3종을 교호 배치하였다. 설치장소는 각 양봉장 소문 정면을 중심으로 좌, 우측과 뒤편에 설치하였다. 특이 포획기에는 비가 올 경우 유인액이 희석될 경우를 대비하여 각 트랩에 45×45cm(가로×세로)의 비가림막을 설치하였다. 실험 기간은 10월 9~14일 까지 영덕지역 양봉 농가에서, 11월 3~8일까지 영덕, 경주지역 양봉농가에서 실험을 실시하였다. 포획된 말벌은 Kim et al.(2006)와 Jung et al.(2006)을 참고하여 동정하였다.

(3) 시험 기간은 10월 9일 - 10월 14일 까지 영덕지역에서 진행하였다. 가장 많은 꿀벌이 사망한 유인액으로는 다목으로 132마리가 사망하였으며, 오-막 12마리, 참나무발효액 0 마리로 다목이 가장 많은 사망 꿀벌이 나타났다. 이는 전년도 시험에서 나타난 것과 동일하게 나타났으며, 다목 유인액의 경우 말벌도 유인하지만 그에 못지않게 꿀벌도 많이 유인하는 것으로 나타났다(그림 198).

(4) 유인액과 철망크기에 따른 꿀벌의 사망 수를 보았다. 시험 기간은 10월 9일 - 10월 14일 까지 영덕지역에서 진행하였다. 가장 많은 사망 수가 나타난 다목 유인액에서는 5mm에서 많은 사망을 보였으며 비교적 6mm에서 적은 사망 수를 보였다. 오렌지&막걸리 역시 동일하게 6mm에서 비교적 적은 사망 수를 보였으며, 참나무발효액에서는 사망 꿀벌이 나타나지 않았다. 새로 개량된 6mm 철망트랩에서 5mm보다 비교적 낮게 채집되는 것으로 나타났다(그림 199).

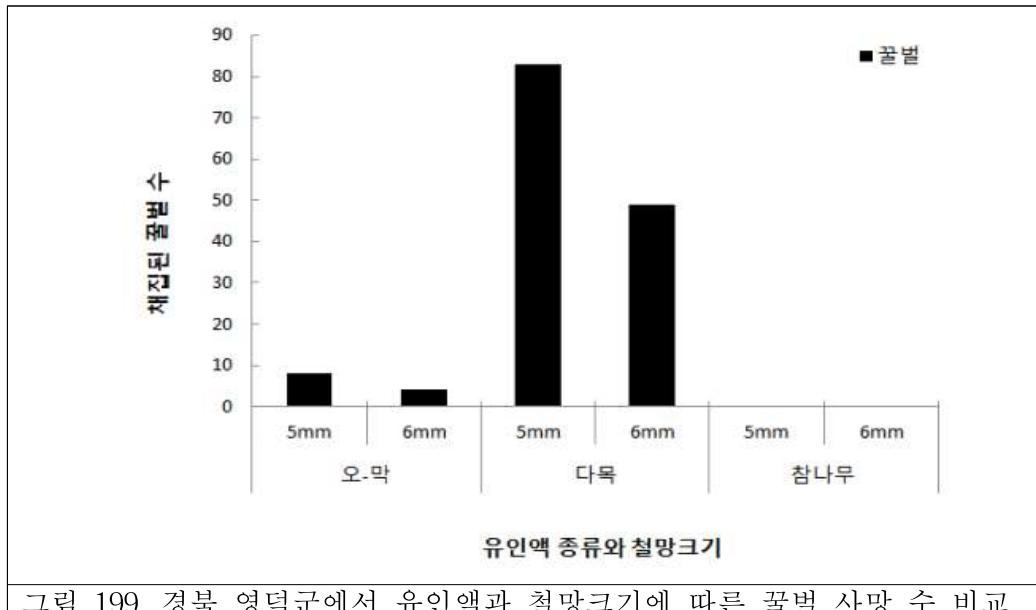


그림 199. 경북 영덕군에서 유인액과 철망크기에 따른 꿀벌 사망 수 비교.

(3) 11월 3일 - 11월 8일까지 영덕과 경주에서 채집하였다. 영덕에서 채집된 등검은말벌은 5mm에서 가장 많이 채집되었으며, 유인액으로는 참나무 유인액에서 가장 많은 등검은 말벌이 채집되었다. 경주에서 채집된 등검은말벌은 6mm에서 가장 많이 채집되었으며, 유인액으로는 5mm 다목 유인액, 6mm 참나무 유인액에서 가장 많은 등검은말벌이 채집되었다(그림 200).

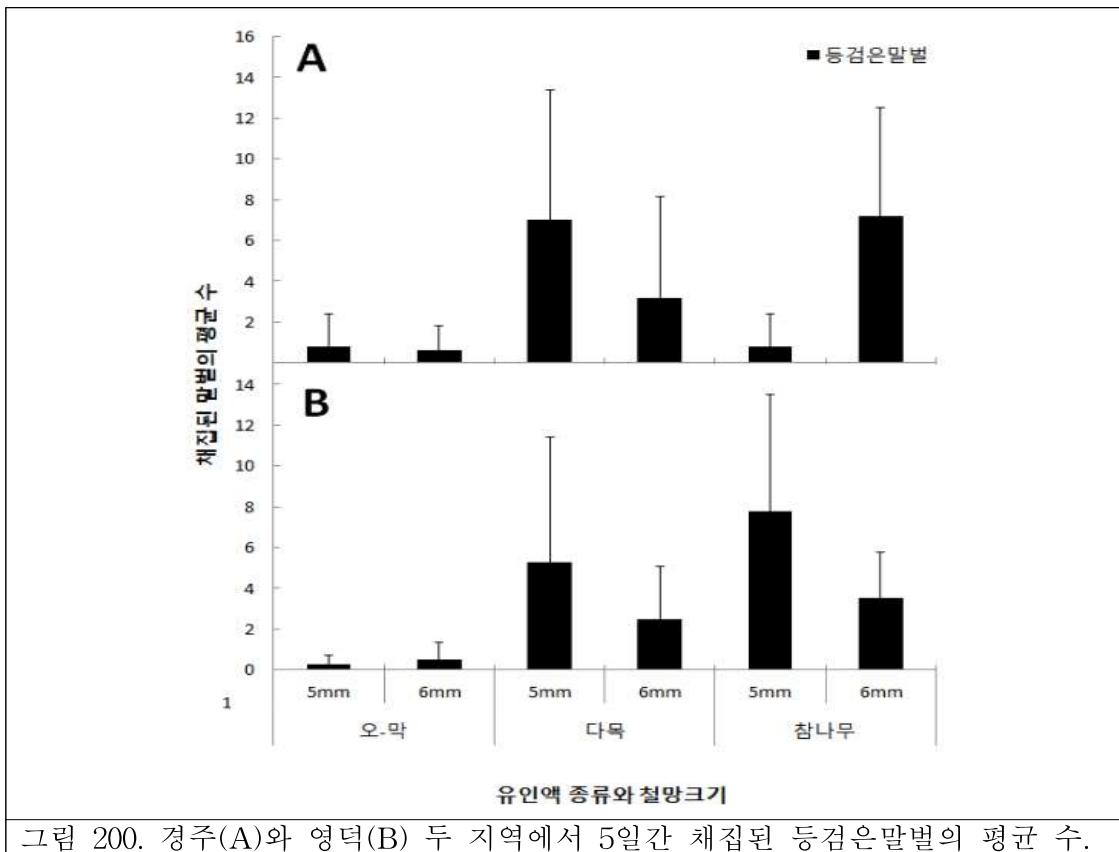


그림 200. 경주(A)와 영덕(B) 두 지역에서 5일간 채집된 등검은말벌의 평균 수.

2. 등검은말벌 분포 예측 모델 개발

가. 등검은말벌 분포 자료의 획득 및 분석

- (1) 2003년에 국내 침입한 것으로 확인되는 등검은말벌의 분포 지역에 관한 2011년까지의 자료는 Jung (2012a)와 Choi et al. (2012)를 재정리하였다. 그리고 2014년 약 225명의 양봉가를 대상으로 등검은말벌의 사진을 보여준 후 지역 내 분포 여부를 설문 조사하였다(Jeong et al., 2016). 추가 문현으로 Sim et al. (2014), Choi et al. (2013), Choi et al. (2015)에서 발생 보고 지역을 포함하였으며, 등검은말벌의 출현 여부에 대한 양봉인 대상 설명회 또는 개별 접촉, 부정기적 현장 조사를 통해 자료를 수집하였다. 전국적 분포 자료화를 위하여 발생지점이 포함된 행정단위(시군)를 기본 단위로 설정하였다.
- (2) 분포 확대 속도를 추정하기 위하여 침입지점인 부산시 영도구에서 분포가 확인된 지점 까지의 직선거리(Km)를 구하였다. 그리고 분포 지역(시군 단위)의 농지 및 산림의 면적을 말벌의 서식가능면적으로 보고, 그 면적을 국토지리원 자료를 활용하여 추정하였다. 침입 후 시간(년도)에 따른 거리와 면적의 관계를 선형회귀를 이용하여 추정하였다. 분포가 확인된 시군은 ArcGIS 시스템을 활용하여 지도화하였다.
- (3) 등검은말벌은 2003년 국내 침입 이후 2006년 울산 4개 지역에서 발견되기 시작했다. 국내 최초 발견은 부산 영도 봉래산에서 2003년에 채집된 개체들이며(Kim et al., 2006), 2008년까지 부산지역을 중심으로 해운대, 동래, 기장, 김해, 밀양, 울산 등에서 출몰이 확인되었다(Jung et al., 2008). 2008년에는 밀양 등 18개, 2011년 29개 시군으로 분포가 넓어졌으나, 백두대간 동부지역 또는 남부 지역에 국한되어 발생하였다. 그러다가 2014년 서울경기 및 충청 일부 지역을 제외한 전국 103개 시군으로 확대되었다가 2015년에는 155개 시군으로 확대되었다. 최초 침입지인 부산 영도에서 직선거리 300Km가 넘는 인

천시까지 확산하였다(그림. 201). 실질적으로 구체 자료는 부족하지만 2010년에 이미 대구 및 경북 남부 일대까지, 2014년에는 경남북, 전남 남부는 모두 확인되었다는 의견도 있다(최문보, 개인의견). 초기 확산은 해안가와 도로를 통해 이루어진 것으로 보인다. 국내에는 이미 다양한 종류의 말벌들이 분포하고 있으며, 특히 산림생태계 내에서는 장수 말벌을 중심으로 한 말벌류의 먹이사슬이 안정되어 있다(Kim et al. 2006; Jung et al. 2008, Choi et al. 2012). 따라서 외래침입 말벌인 등검은말벌의 산림 깊숙이 침입하거나, 백두대간의 산림지역을 통과하는 데 상당한 기간이 소요된다. 이는 등검은말벌이 주로 주거지나 산기슭을 중심으로 등지를 건설하고 먹이활동을 하며, 밀도가 꾸준히 증가함에 따라 주민들에게 쉽게 노출되며, 소방 활동의 주 대상이 되고 있음이 반증한다고 볼 수 있다. 또한 토착종중에는 털보말벌, 좀말벌 등과 생태적 지위가 중첩될 수 있고 경쟁관계가 형성될 소지가 높다는 보고와도 연관이 있다(Choi et al., 2012).

(4) 등검은말벌의 분포 면적은 지수함수적으로 증가하였다. 분포 시군의 면적은 침입 9년 차까지만 해도 100만ha 내외이었으나, 그 후 3년 사이에 분포 면적은 5배 늘었다(그림. 202). 침입지인 부산 영도구에서부터 현 분포지역까지의 거리는 매년 9.4Km씩 증가하는 것으로 나타났다(그림. 202). 그리고 년 최대 확산거리는 14-28.7 Km/yr로 추정되었다. Jung (2012)는 초기 자료를 바탕으로 등검은말벌의 국내 확산계수는 12.4 Km/yr로 프랑스에서의 67.3 Km/yr보다 느리지만, 향후 확산의 속도는 더 빨라질 것으로 예측한 바 있다. 본 연구의 결과는 등검은말벌이 개체군 확산은 침입초기와 비교하여 더디어지지 않았으며, 오히려 최근에 그 속도가 빨라짐을 볼 수 있다. 외래에서 생물이 침입하면, 일정 정도의 잠복기를 거치면서 현지 환경에 적응하고 정착하게 된다. 그 후 개체군의 크기가 커지면서 수평적 확대 즉 분포 확대가 이루어진다. 분포 확대는 초기 빠른 속도로 진행되나, 일정 기간이 지나면서 안정화 단계로 접어든다(Kiritani and Yamamura, 2003). 그러나 등검은말벌의 확산은 현재 진행 중인 상태이다. 생물의 확산은 개체군 크기의 증가의 결과이기도 하다. 즉 등검은말벌이 지속적으로 확산된다는 것은 개체군 밀도가 높아지고 번식력이 유지되고 있다는 것이다. 최근의 기후변화는 따뜻한 겨울로 인해 말벌 월동 성공률을 높여주고 있으며, 장마철의 감소 및 무더운 여름 날씨는 말벌류의 빠른 번식을 가능케 한다. 등검은말벌의 주 먹이는 꿀벌이다(Abril, 1994; Tan et al., 2007). 국내의 높은 양봉꿀벌의 봉군밀도는 등검은말벌에게 충분한 양분을 공급하고 있는 셈이다(Jung and Cho, 2015).

나. CLIMEX 모델 이용 분포 적합성 예측

(1) 호주 CSIRO에서 개발된 CLIMEX 모형을 이용하여 등검은말벌의 국내 분포를 예측하였다. CLIMEX 모의실험에 필요한 기본 자료는 생물정보와 기상정보이다. 모형 모의를 위한 등검은말벌의 생물자료는 별도로 추정된 바 없다. 대신, 등검은말벌의 기초 생태가 땅벌류와 일부 유사하므로, 땅벌류(*Vespula vulgaris* 또는 *Vespula germanica*)의 CLIMEX 기본 모수에 등검은말벌의 기후 연관(climate-matching) 연구 결과(Perrard et al., 2009) 등을 보정하였으며, 이는 Ibanez-Justicia and Loomans (2012)가 제시한 바 있다(표 42). 그러나 본 연구에서는 다양한 모의결과를 바탕으로, Hot-wet stress 변수를 재조정하여, 국내 기후조건에 적합 시켰다.

(2) 예측에 필요한 기상자료는 기상청 기상자료개발 포털(<http://data.kma.go.kr>)에서 수집한 2000년, 2012년 일기상자료(최고기온, 최저기온, 강수량, 평균 상대습도)를 월별 평균

하여 70개 관측지점별로 구축하였다(Park et al., 2014). 미래예측을 위한 기후예측 자료는 기상청 기후정보포털(<http://www.climate.go.kr>)에서 제공하는 12.5km격자의 RCP8.5 시나리오 월별 기후자료를 현재와 동일한 70개 관측지점별로 추출하였다. 추출된 기상자료는 2050년과 2080년 두 기간을 대상으로 하였다. CLIMEX 모형은 관측지점의 위치정보를 기후자료와 구분하여 입력하게 되어있으므로 관측지점의 위도, 경도 및 고도를 입력하였으며(표 43), 추출된 기상자료를 이용하여 기후자료의 구축을 위해 CLIMEX가 필요로 하는 월 평균, 최저, 최고 기온, 강수량, 오전 9시 및 3시의 상대습도를 준비하였다. 기상청 자료의 경우 평균 상대습도가 제공되지만, 오전과 오후 상대습도를 따로 제공하지 않으므로, 기상청 자료를 오전 9시 상대습도로 하여, 오후 3시의 상대습도는 CLIMEX 모형 내부처리과정을 통해 오전 9시 상대습도의 85%로 계산하여 입력하였다 (Sutherst et al., 2007; Park et al., 2014). CLIMEX 모형 모의실험결과 도출되는 EI(Ecoclimatic index) 값은 기상관측자료가 입력된 지점의 값으로 나오므로, ArcGIS의 Inverse Distance Weighted(IDW) 방법을 이용하여 내삽을 통해 지도화하였다(Park et al., 2014). 또한 현장조사 등에서 등검은말벌의 발생된 지역을 분포경과년수로 단순가중치를 두어, 추정된 EL값과 회귀분석을 실시하였다.

(3) CLIMEX 시뮬레이션의 지점별 결과는 표 44에 나타내었다. 2000년과 2012년 EI 추정치는 실측기상자료를 바탕으로 한 것으로, 2000년에는 다수의 “0”값이 나타나지만, 2012년에는 추정치가 증가하는 것으로 보인다. RCP8.5 기반 미래기후상황에서 시뮬레이션 결과는 2050년 평균 20.2, 2080년 26.1로 뚜렷하게 증가하였음을 볼 수 있다(그림. 16). CLIMEX 시뮬레이션의 경우 대체로 EI값이 10이상이면 유의미하게 생물의 정착이 이루어질 수 있을 것으로 판단한다. 2000년에는 전체 시뮬레이션한 70개 지역 중 6곳, 8.5% 가 분포가능역으로 추정되었으나, 2012년 이후에는 74%가, 그리고 2080년대에는 전 조사지역이 분포가능역임을 보여줌으로써, 우리나라 전역이 등검은말벌의 서식환경이 될 수 있다는 전망이다. 이는 지도에서도 뚜렷하다(그림. 204). 2000년에는 등검은말벌의 서식가능지역은 부산 일부에 국한되었으나, 2012년 시뮬레이션 결과는 위도가 낮은 남해안을 비롯한 해안가를 통한 분포확대가 가능할 것으로 제시하였다. 실제 등검은말벌의 분포 확대 과정에서, 부산지역에서 울산, 경주, 영덕, 울진으로 향하는 동해안축과 밀양, 창원, 진주를 거쳐 구례군으로 향하는 남해안축이 두드러지게 나타났던 점은 본 연구 결과와 유사점을 보인다. 비슷한 방식으로 Maxent 모형을 이용하여 Villemante et al. (2011)은 유럽과 타대륙의 침입위험을 예측한 바 있으며, 그 접근법과 결과는 본 연구방식과 유사하다.

(4) 본 연구에 사용한 CLIMEX 모형 계수들은 기본적으로는 한반도가 속한 온대지역 기본 제공 값인 Temperate template를 사용하였으며, 실제 분포지역의 온도, 습도조건 및 생물적 특성에 맞추어 그 값을 조정하였다(Sutherst et al., 2007; 표 1). 조정하는 방법으로는 현재 확인된 등검은말벌의 분포지역과 현재 온도조건상 시뮬레이션 결과를 비교하면서 초기값을 조금씩 조절하는 방법을 이용하였다. 특히 대상 생물의 분포를 제어하는 인자인 Stress 값에 온대지역에서 잘 사용하지 않는 Hot-wet stress를 모형에 포함시켰는데, 이는 말벌의 분포를 주로 결정하는 말벌의 비행이 공기중 습도와 강우에 제한되기 때문이며, 등검은말벌의 분포제한조건(Stress)을 세밀화 하여 최적의 분포 적합도를 구하기 위해 여름철 고온다습한 상황에서 제한조건인 Hot-wet stress를 추가로 사용하였

다. Light index는 식물종에서 사용하고, 겨울철 월동이 휴면형태가 아니므로 Diapause index역시 사용을 하지 않았으며, 복합제한조건 중 고온다습한 상황이외의 조건은 말벌의 생물적 특징과 한반도 기후의 특징을 감안하여 모형에서 제외시켰다(Sutherst et al., 2007; 표 42).

- (5) 대개의 외래 생물은 다른 생태계로의 침입 이후 잠복기를 가지면서 현지 적응, 생존과 번식을 이어가면서 국부적으로 정착하게 된다. 침입이 이루어졌다고 해도 정착에 이르는 종은 대개 10% 내외이다. 정착 이후 개체군이 팽창하고 확산되다가 어느 정도 생태계 내 생태적 지위를 획득하게 되면 안정화된다(Ruiz and Carton, 2003). 정착 개체군 등 일부(약 10%)는 개체군 확장 과정에 밀도가 부분적으로 높아지면서 사회/경제적 문제를 야기하기도 하고, 심각한 해충화 경향도 보이게 된다(10-10 rule, Williamson, 1996).
- (6) 등검은말벌은 이미 국내 침입 이후 확산과정에서 양봉산업에 막대한 피해를 주고 있을 뿐 아니라(Jung, 2012; Choi et al., 2015), 도심지 출몰로 인해 인명사고도 발생하고 있다. 그러나 등검은말벌의 개체군 증가와 확산은 아직 안정기에 이르지 않은 것으로 보인다. 그럼, 205는 현재 등검은말벌이 분포하는 지역에 가중치를 부여한 점수와 CLIMEX 시뮬레이션을 통해 추정한 2012년 정착가능성(EI 값)간의 상관관계를 나타내며, 그 결과 의미있는 상관관계가 보이지 않는다. 즉 EI값이 20보다 높은 지역, 즉 등검은말벌 분포 가능지역임에도 불구하고 아직 등검은말벌이 분포하지 않고 있으며, 이는 공간적으로 등검은말벌이 없는 폐치가 존재한다는 것을 나타낸다. CLIMEX결과는 지리적으로 대상생물의 생리적 존재 가능 여부를 보여주고 있으므로, 이러한 결과는 EI값이 높은 대상지역으로 이동을 못하던가, 대상지역에 봉군밀도가 없거나 충분하지 않을 가능성을 배제할 수 있으며, 향후 등검은말벌의 이동에 따라 분포가능한 지역이 늘어날 수 있다는 것을 나타낸다.
- (7) 지금까지의 논의는 등검은말벌의 분포가능한 기상환경의 범위에 국한되었다. 향후 등검은말벌의 국내 생태계 내 지위 점유 및 안정화 과정에서 다양한 생물적 상호작용의 영향을 받을 가능성성이 있다. 특히 국내 서식하는 장수말벌, 꼬마장수말벌, 말벌 등과의 서식처간 경쟁, 좀말벌, 텔보말벌 등과의 서식처 내의 경쟁 (Jung et al., 2007a,b) 및 각종 세균, 곰팡이 등의 미생물적 길항인자 및 포식자 등의 관계는 등검은말벌의 국내 생태계 내 정착에 영향을 미칠 수 있다(Jung et al., 2008). 말벌과의 생물 중 땅벌류는 다른 생태계 침입 사례가 보고되곤 하지만 Vespa속에 속하는 말벌의 예는 흔치 않다 (Shaw and Weidhaas, 1959; Beggs, 2011; Beggs et al., 2011). 등검은말벌은 특이한 사례에 속하며, 2003-4년에 한국과 프랑스에 침입하였다(Jung et al., 2008; Villemante et al.. 2008). 이 두 개체군은 모두 중국 저장성 개체군과 유전형이 가장 비슷하고, 아마도 다중교미한 여왕벌 한 마리에 의해서 개체군이 시작되었을 것으로 추정하고 있다(Arca et al., 2015). 그럼에도 불구하고 등검은말벌은 새로운 환경에 적응하는 다양한 기재를 가지고 있다. 높은 곳에 둑지를 만들어 포식자를 피하고, 봉군 증식 속도가 빨라 개체군 크기가 크기 때문에 다양한 경쟁에서 수적 우위를 차지할 수 있고, 일주가 활동기간이 길며, 늦가을까지 활동하기 때문에 토종 말벌들이 활동하지 않는 기간을 확보할 수 있다 (Jung et al., 2008; Choi et al., 2012; Jung, 2012). 또한 사회성 생물로써, 집단 내 행동의 가변성, 집단의 내외부 환경조절 능력, 분화된 생식계급으로 인해 단일 봉군만으로도 집단 형성 가능성 등은 침입종의 생존 가능성을 높여주는 주요 특질이 될 수 있다

(Mack et al., 2000; Beggs, 2001). 등검은말벌은 경제적인 면 뿐 아니라 사회적으로도 매우 중요한 이슈를 제공하고 있다. 본 연구에서는 개체군 확산 속도에 관한 정보를 제공하고, 이 말벌의 분포에 적합한 기상환경 요인을 분석하여, 미래 기후상황에서 등검은 말벌의 분포지역을 추정하여 지도화 하였다. 또한 등검은말벌의 분포확산은 당분간 꾸준히 지속될 것으로 전망하는 바, 지속적인 분포와 계절상 모니터링은 물론, 사회경제적 피해 방지 방안, 생태계 영향 평가 방안에 대한 새로운 대책이 연구 개발되어야 할 것으로 판단된다.

표 42. Parameters used in CLIMEX for *Vespa velutina nigrithorax* in Korean environment

Moisture index	SM0 0.2	SM1 0.6	SM3 1.5	SM4 2.5		
Temperature index	DV0 10	DV1 18	DV2 26	DV3 31		
Light index						
Diapause index					Indices are not applied in model	
Cold stress	TTCS 0	THCS 0	DTCS 10	DHCS -0.00014	TTCSA 0	THCSA 0
Heat stress	TTHS 32	THHS 0.0035	DTHS 0	DHHS 0		
Dry stress	SMDS 0.15	HDS -0.008				
Wet stress	SMWS 2.5	HWS 0.002				
Cold-dry stress						
Cold-wet stress					Indices are not applied in model	
Hot-dry stress						
Hot-wet stress	TTHW 28	MTHW 0.8	PHW 0.03			
DayDegree >DV0	DV0 10	DV3 31	MTS 7			
DayDegree >DVCS	DVCS 10	*DV4 100	MTS 7			
DayDegree >DVHS	DVHS 31	*DV4 100	MTS 7			
DayDegree per Generation	PDD 462					

표 43. Geographical information of simulated locations in Korea

Location	Latitude	Longitude	Elevation (m)	Location	Latitude	Longitude	Elevation (m)
Sokcho	N38°15'00"	E128°34'12"	17.79	Chupungnyeong	N36°13'12"	E128°00'00"	242.53
Cheorwon	N38°09'00"	E127°18'36"	154.22	Gumi	N36°07'48"	E128°19'12"	47.86
Inje	N38°03'36"	E128°10'12"	198.60	Geumsan	N36°06'00"	E127°28'48"	171.26
Chuncheon	N37°54'00"	E127°44'24"	76.82	Pohang	N36°01'48"	E129°22'48"	1.88
Dongducheon	N37°54'00"	E127°03'36"	112.49	Gunsan	N35°59'24"	E126°42'36"	25.57
Gangneung	N37°45'00"	E128°53'24"	25.91	Yeongcheon	N35°58'12"	E128°57'00"	94.10
Ganghwa	N37°42'00"	E126°27'00"	45.65	Daegu	N35°52'48"	E128°37'12"	57.64
Daegwallyeong	N37°40'48"	E128°45'36"	842.52	Jeonju	N35°49'12"	E127°09'36"	53.48
Hongcheon	N37°40'48"	E127°52'48"	140.59	Buan	N35°43'48"	E126°43'12"	10.68
Seoul	N37°34'12"	E126°58'12"	86.02	Geochang	N35°40'12"	E127°54'36"	220.88
Donghae	N37°30'00"	E129°07'48"	39.60	Jangsu	N35°39'00"	E127°31'12"	407.01
Yangpyeong	N37°29'24"	E127°30'00"	47.01	Imsil	N35°36'36"	E127°17'24"	246.85
Ulleungdo	N37°28'48"	E130°54'00"	221.00	Ulsan	N35°33'36"	E129°19'12"	34.69
Incheon	N37°28'12"	E126°37'48"	68.85	hapcheon	N35°33'36"	E128°10'12"	32.66
Wonju	N37°19'48"	E127°57'00"	150.00	Jeongeup	N35°33'36"	E126°52'12"	44.11
Suwon	N37°16'12"	E126°59'24"	33.58	Miryang	N35°29'24"	E128°45'00"	12.60
Icheon	N37°15'36"	E127°29'24"	77.79	Sancheong	N35°24'36"	E127°52'48"	138.57
Yeongwol	N37°10'48"	E128°27'36"	239.79	Namwon	N35°24'00"	E127°20'24"	89.70
Taebaek	N37°10'12"	E128°59'24"	713.45	Jinju	N35°12'36"	E128°07'12"	21.32
Jecheon	N37°09'36"	E128°12'00"	263.21	Masan	N35°11'24"	E128°34'12"	12.50
Uljin	N36°59'24"	E129°25'12"	49.42	Gwangju	N35°10'12"	E126°53'24"	70.53
Chungju	N36°58'12"	E127°57'00"	113.10	Busan	N35°06'00"	E129°01'48"	69.23
Bonghwa	N36°56'24"	E128°55'12"	321.52	Geoje	N34°53'24"	E128°36'36"	45.27
Yeongju	N36°52'12"	E128°31'12"	210.21	Tongyeong	N34°50'24"	E128°26'24"	31.70
Cheonan	N36°46'48"	E127°07'12"	24.89	Namhae	N34°48'36"	E127°55'48"	44.41
Seosan	N36°46'12"	E126°30'00"	25.93	Mokpo	N34°48'36"	E126°22'48"	37.88
Cheongju	N36°38'24"	E127°26'24"	57.36	Yeosu	N34°44'24"	E127°44'24"	66.05
Mungyeong	N36°37'12"	E128°09'00"	170.36	Jangheung	N34°41'24"	E126°55'12"	45.22
Andong	N36°34'12"	E128°42'36"	139.39	Heuksando	N34°40'48"	E125°27'00"	73.80
Yeongdeok	N36°31'48"	E129°24'36"	41.23	Goheung	N34°37'12"	E127°16'48"	53.27
Boeun	N36°28'48"	E127°44'24"	174.10	Haenam	N34°33'00"	E126°34'12"	13.74
Daejeon	N36°22'12"	E127°22'12"	68.28	Wando	N34°23'24"	E126°42'00"	34.87
Uiseong	N36°21'00"	E128°41'24"	81.09	Jeju	N33°30'36"	E126°31'48"	19.97
Boryeong	N36°19'12"	E126°33'36"	15.29	Gosan	N33°16'48"	E126°10'12"	71.70
Buyeo	N36°16'12"	E126°55'12"	11.35	Seogwipo	N33°14'24"	E126°34'12"	50.47

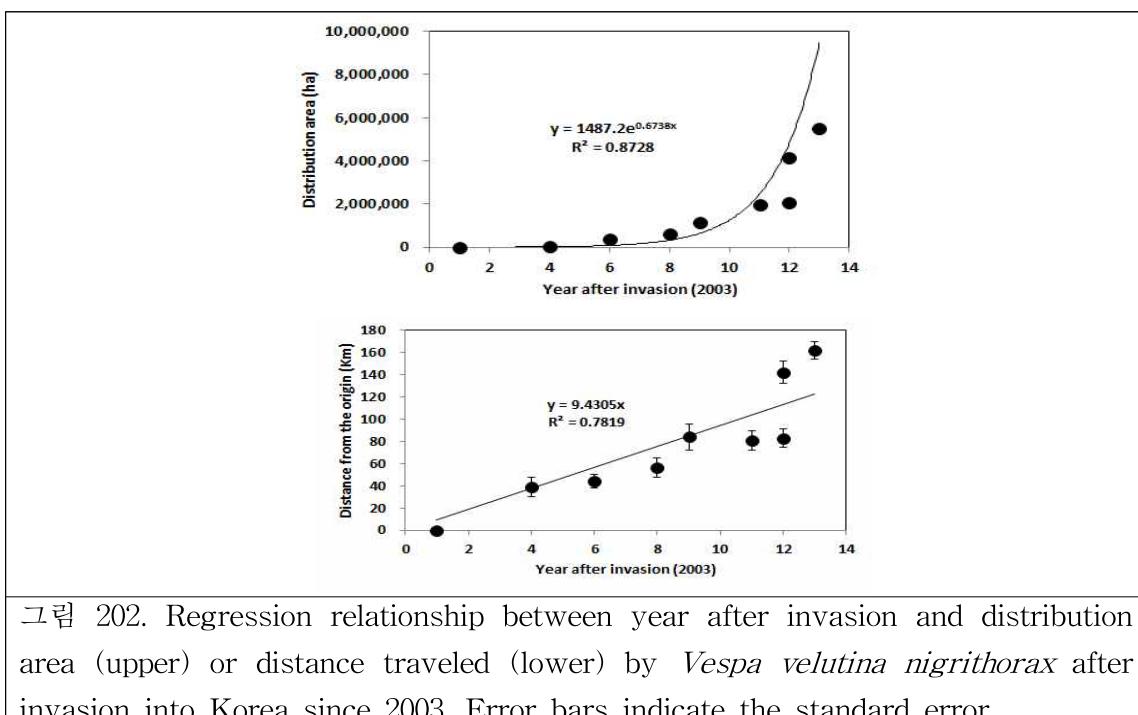
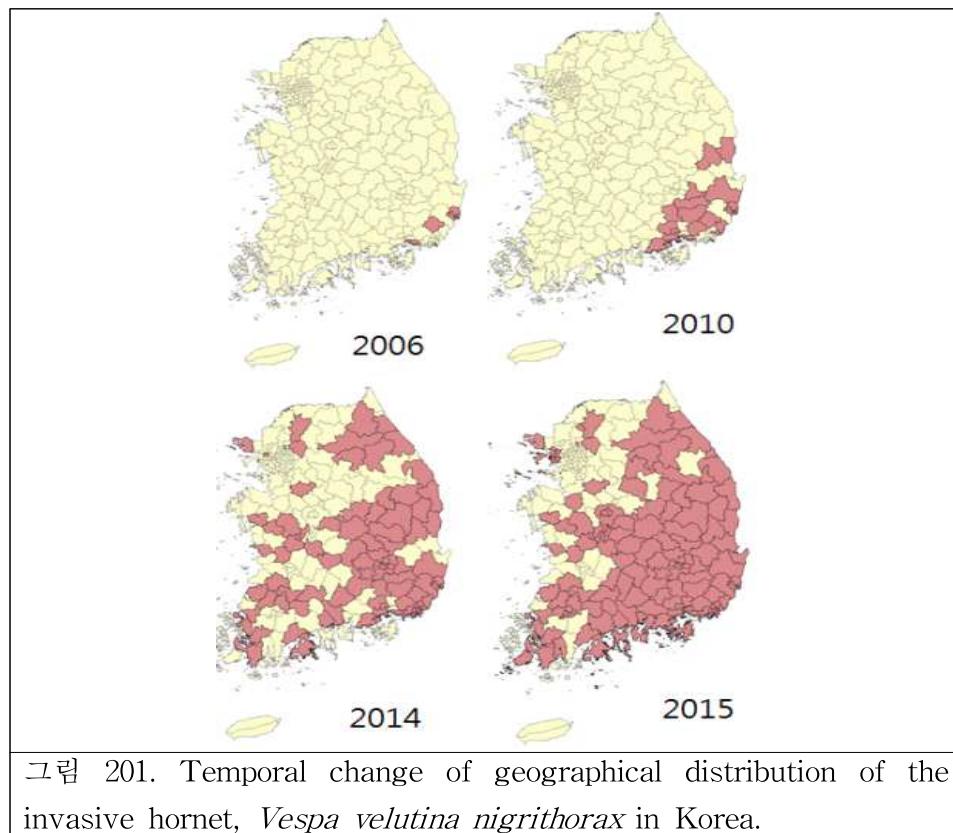


표 44. EIs from CLIMEX modeling for *Vespa velutina* in some selected locations Korea based on the past and future weather conditions. Future weather conditions were simulated based on RCP8.5 scenario

Location	Past weather		future weather		Location	Past weather		future weather	
	2000	2012	2050	2080		2000	2012	2050	2080
Andong	3	17	17	19	Inje	3	12	13	19
Boeun	7	15	18	19	Jangheung	6	20	21	28
Bonghwa	7	13	13	19	Jangsu	13	17	16	23
Boryeong	8	18	30	33	Jecheon	6	14	13	19
Buan	6	21	24	29	Jeju	11	27	34	50
Busan	17	25	31	39	Jeongeup	5	21	19	23
Buyeo	0	18	18	20	Jeonju	1	20	17	20
Cheonan	8	18	17	19	Jinju	0	22	16	25
Cheongju	6	17	18	18	Masan	7	21	21	26
Cheorwon	3	13	15	17	Miryang	0	21	18	21
Chuncheon	0	13	14	18	Mokpo	11	23	36	44
Chungju	2	18	16	18	Mungyeong	1	18	16	20
Chupungnyeong	4	16	16	20	Namhae	1	22	21	28
Daegu	2	19	16	19	Namwon	3	19	14	21
Daegwallyeong	12	4	8	17	Pohang	0	24	22	24
Daejeon	7	18	18	19	Sancheong	0	18	15	26
Dongducheon	1	14	15	17	Seogwipo	30	29	43	57
Donghae	6	17	22	20	Seosan	8	16	26	36
Ganghwa	7	13	22	33	Seoul	3	16	17	17
Gangneung	0	8	12	17	Sokcho	5	8	12	18
Geochang	4	17	15	23	Suwon	4	18	17	21
Geoje	14	22	30	37	Taebaek	8	4	7	18
Geumsan	6	18	17	20	Tongyeong	18	25	34	43
Goheung	7	25	30	39	Uiseong	0	17	17	19
Gosan	27	27	45	60	Uljin	6	17	20	24
Gumi	0	18	18	20	Ulleungdo	16	25	40	53
Gunsan	11	18	29	33	Ulsan	1	22	22	28
Gwangju	4	18	15	22	Wando	14	19	22	31
Haenam	7	21	27	35	Wonju	2	15	15	17
Hapcheon	0	21	16	23	Yangpyeong	0	15	15	17
Heuksando	18	22	41	53	Yeongcheon	0	21	17	22
Hongcheon	1	14	14	18	Yeongdeok	6	18	21	25
Icheon	3	18	15	17	Yeongju	0	15	15	21
Imsil	8	18	16	22	Yeongwol	3	14	14	18
Incheon	3	14	22	33	Yeosu	14	23	28	37

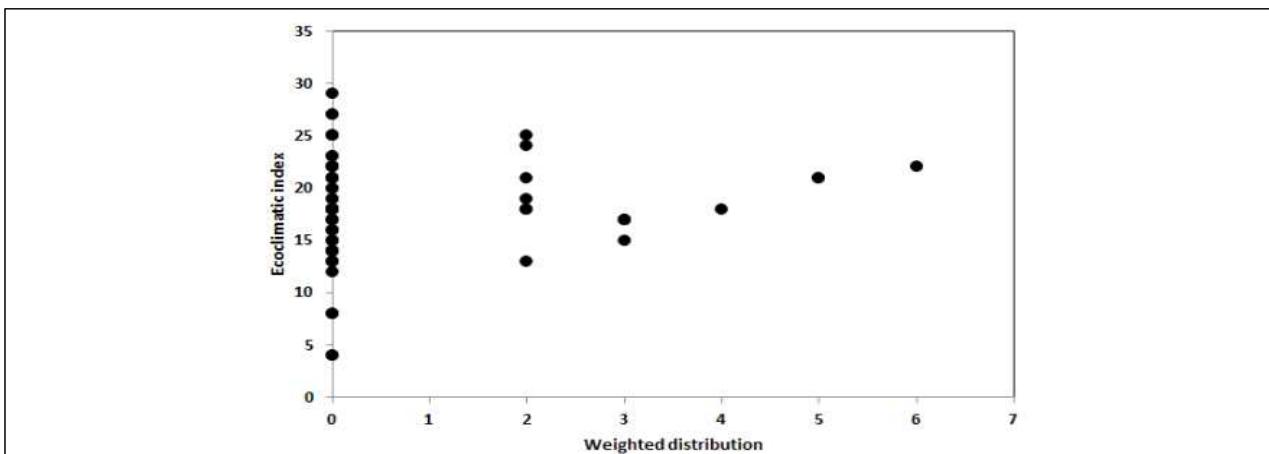


그림 203. Relationship between weighted distribution values of *Vespa velutina nigrithorax* and predicted possible establishment (ecoclimatic index) simulated in 2012 in Korea. Regression analysis showed no significant relationship ($P>0.05$, $R^2=0.03$).

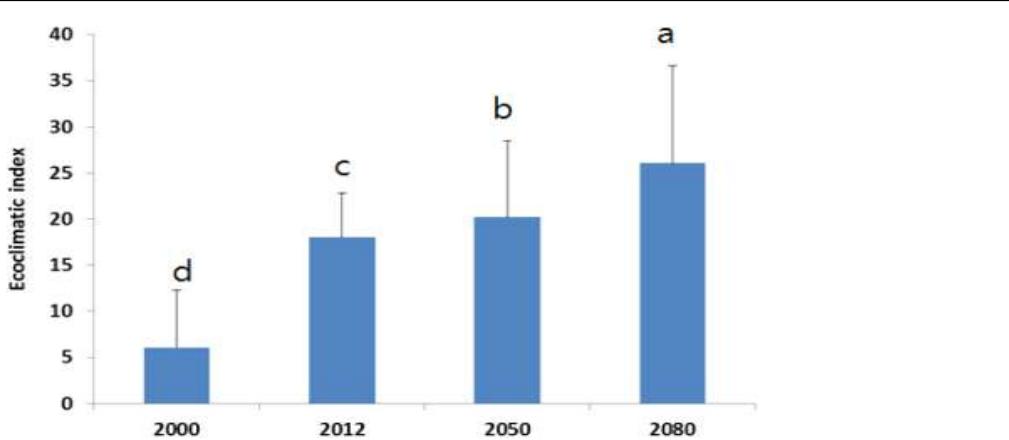
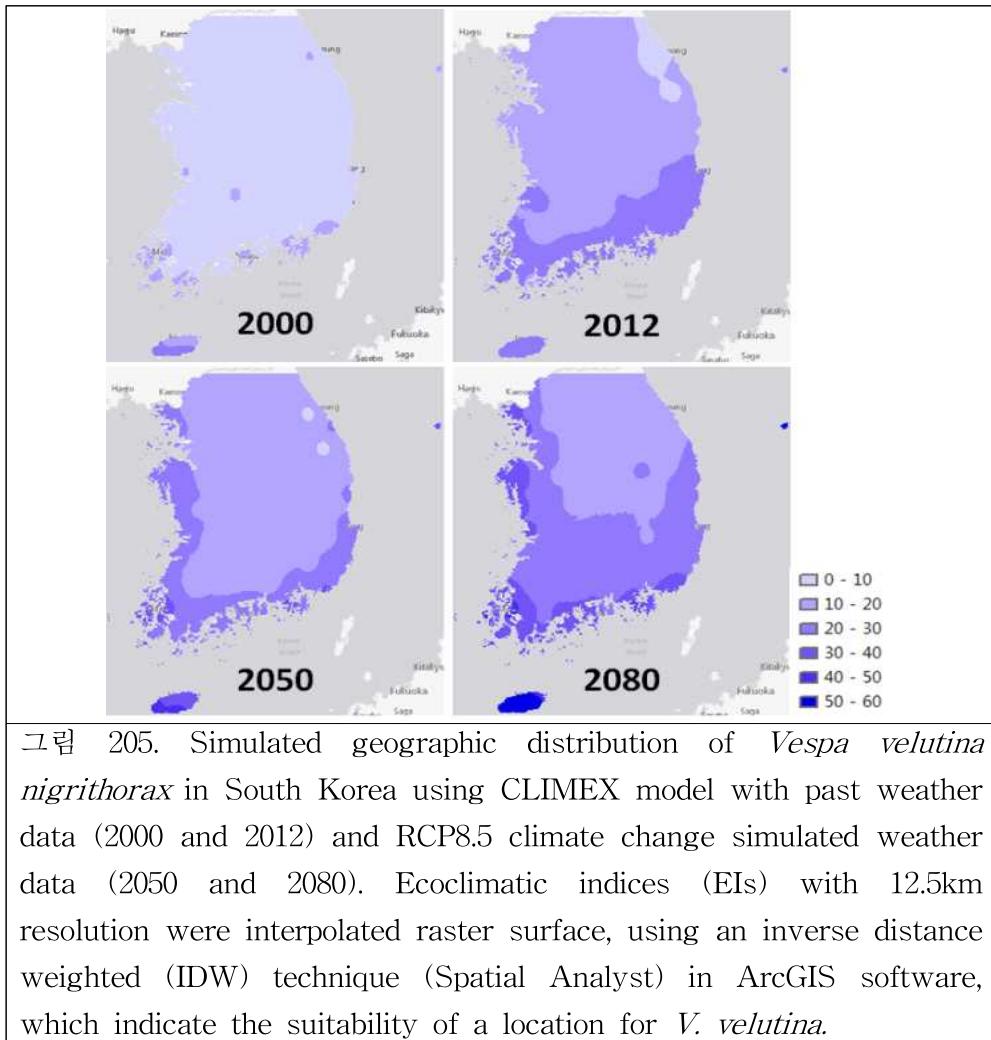


그림 204. Change of ecoclimatic index (EI) estimated by CLIMEX modeling using the past and future weather data. Future weather data was simulated based on RCP8.5 climate change scenario. Error bars indicate the standard deviation of the simulated variables.



3. 말벌 경보시스템 개발

가. 봉군 환경 모니터링

(1) 온도는 봉군의 건강과 생육에 있어 가장 기본적으로 유지되어야 한다. 또한 대표적 사회성 곤충인 꿀벌에게 열이란 생존과도 연관이 있다. 변온동물인 꿀벌은 비행근육을 사용함으로써 몸을 덥히며, 유충과 겨울 동면에서도 사용된다. 하지만 단독개체가 10°C 이하인 환경을 만나면 몸의 기능은 저하되며, 움직이지 못하게 된다. 평상시 봉군의 온도는 32°C에서 36°C를 유지하며 정상적인 봉군을 유지하기 위해서는 약 35°C를 유지해야 된다(Jones et al. 2004). 온도의 중요성에 대한 연구는 국내외에서 진행되었다. Flores et al. 1996의 연구에서 온도의 따른 꿀벌 봉군에서 나타나는 질병에 대한 실험으로 인위적으로 냉각을 하였을 경우, 백목병 감염은 25°C에서 가장 높게 나타났다. Tautz et al. 2003의 연구에 따르면 꿀벌 번데기가 사육되는 온도는 꿀벌 댄스와 냄새 학습 능력에 영향을 미치는 것으로 나타나 온도에 따른 봉군의 영향에 대해 다양한 연구가 일어나며 중요성 또한 중시되었다. 봉군내의 온도 및 습도를 측정하기 위해 그림 6와 같이 시스템을 구성하였다. SHT25 센서를 통해 수집된 온습도 데이터는 지그비 무선 기술을 통해 클라우드 서버에 저장되고, 이 정보는 웹이나 스마트폰 앱을 통해 실시간으로 확인할 수 있는 기능을 제공한다(그림 206).

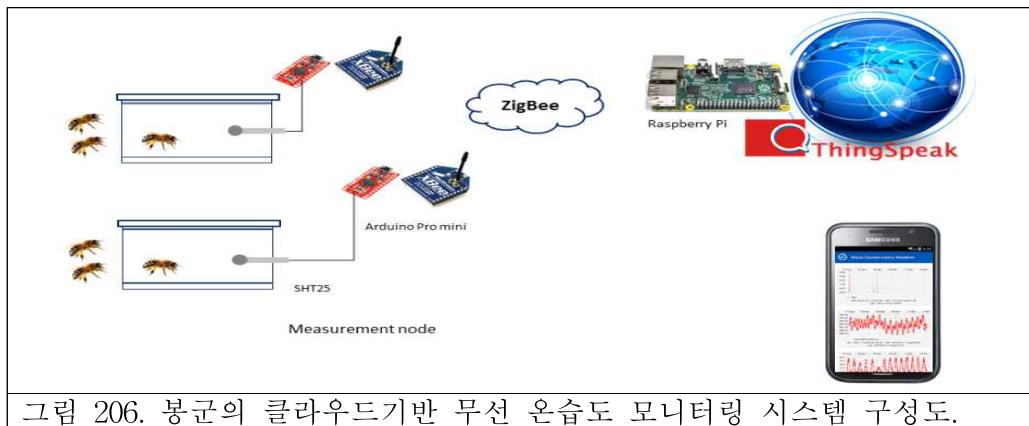
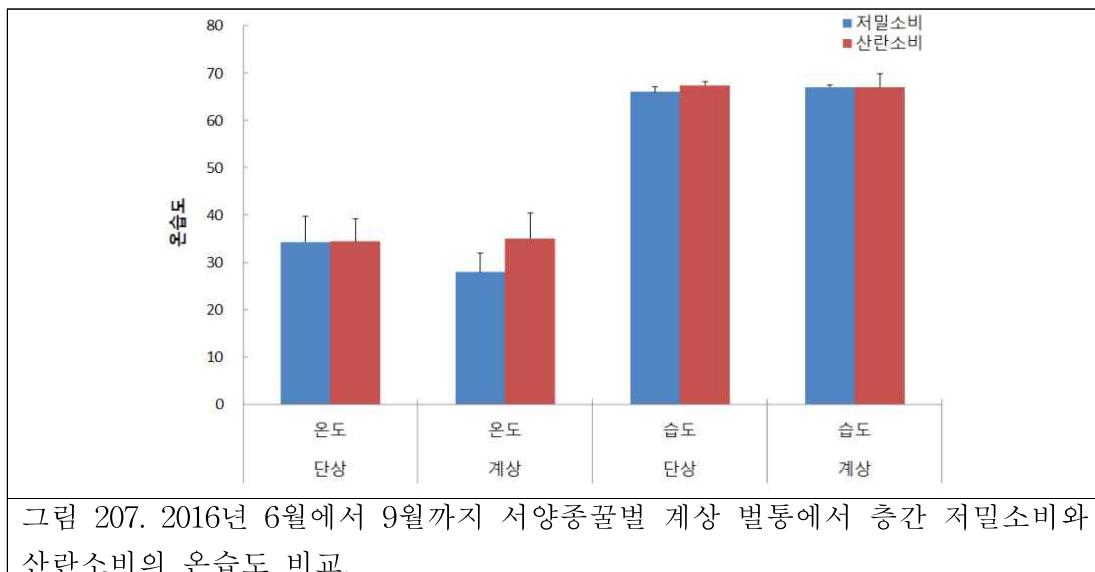


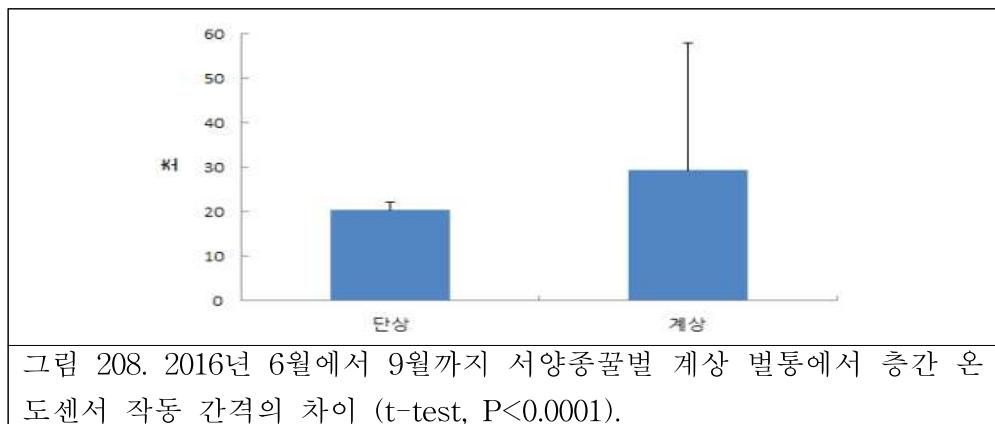
그림 206. 봉군의 클라우드기반 무선 온습도 모니터링 시스템 구성도.

(2) 봉군환경 모니터링 자동화

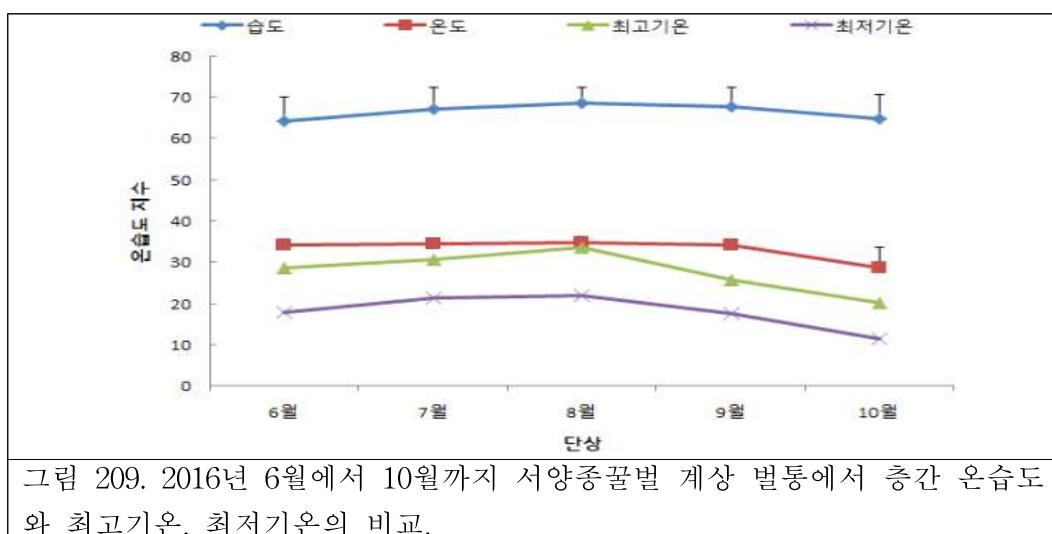
(가) 단상에서 평균 습도의 차이는 저밀소비로 유지하였을 경우 $66 \pm 5.4\%$ 로 나타나며, 산란소비로 유지하였을 경우 $67 \pm 4.6\%$ 로 나타났다. 평균 온도의 차이는 저밀소비 $34 \pm 1.0^\circ\text{C}$, 산란소비 $34 \pm 0.7^\circ\text{C}$ 로 나타났다. 계상에서 평균 습도의 차이는 저밀소비로 유지하였을 경우 $67 \pm 4.0\%$ 로 나타나며, 산란소비로 유지하였을 경우 $67 \pm 5.4\%$ 로 나타났다. 평균 온도의 차이는 저밀소비 $28 \pm 0.4^\circ\text{C}$, 산란소비 $34 \pm 2.7^\circ\text{C}$ 로 나타났다(그림 207).



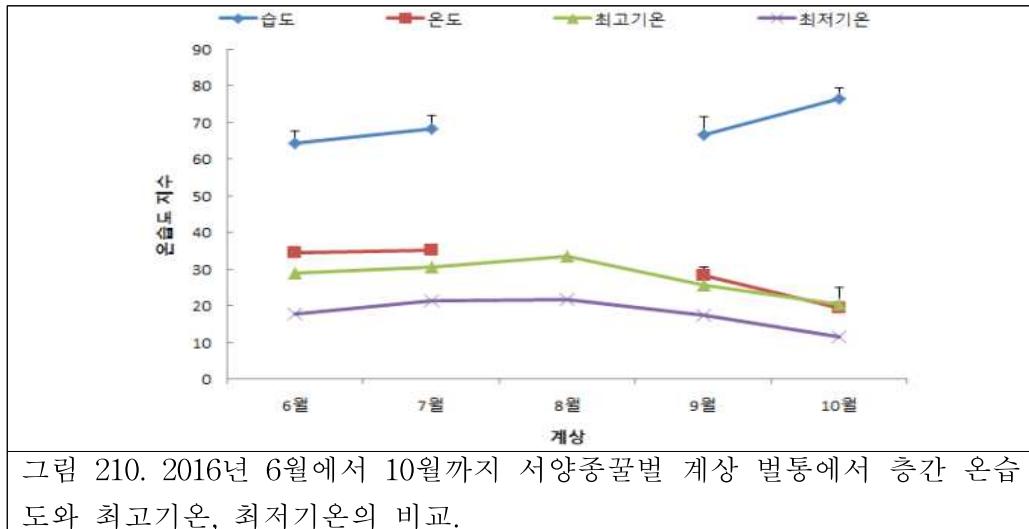
(나) 설치한 센서 DS18B20에서 기능 중 하나인 측정간격은 온도차이가 날 때 측정간격이 줄어든다. 온도의 차이가 나타나는 경우 8초에 한번 씩 측정을 한다. 단상에서 측정간격은 20 ± 1.9 초로 나타났으며, 계상에서는 29 ± 28 초로 나타났다. 계상의 온도 환경이 단상보다 훨씬 안정되어 있음을 보여준다(그림. 208).



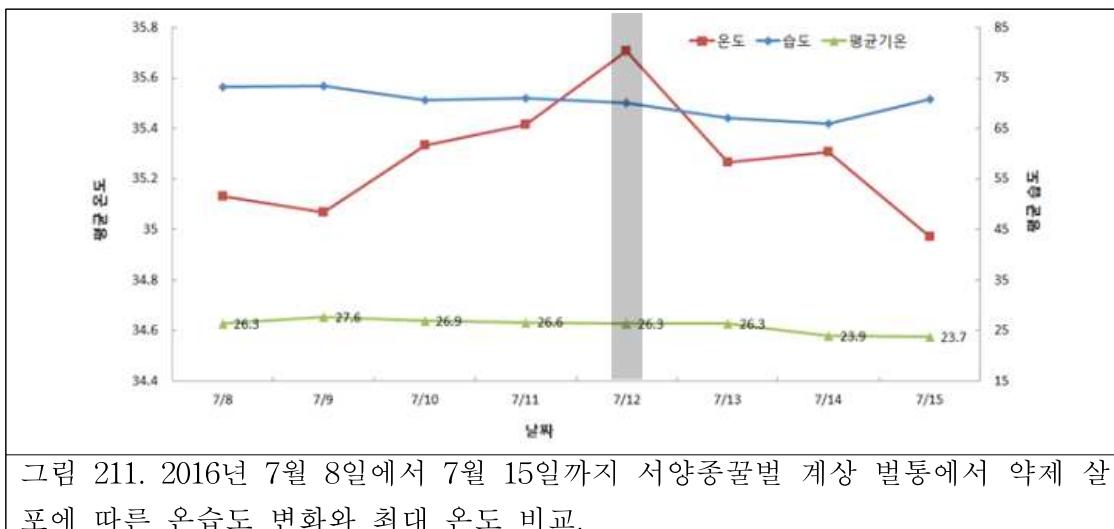
(다) 단상에서 나타난 온습도와 기상자료를 비교해 보았다. 최고기온은 8월까지 증가하는 추세를 보이며, 9월에 26°C로 떨어졌다. 최저기온의 경우도 8월까지 증가하며, 9월 17°C로 떨어지는 양상을 보였다. 단상에서 측정된 온도는 8월에 $35\pm1.0^{\circ}\text{C}$ 로 가장 높게 나타났으며 6월 $34\pm0.7^{\circ}\text{C}$, 7월 $34\pm1.1^{\circ}\text{C}$, 9월 $34\pm0.4^{\circ}\text{C}$ 로 나타났다. 6월에서 7월은 단상에 봉개된 소비가 없지만 온도를 34°C 로 유지하였다. 습도의 경우 8월 $69\pm3.6\%$ 를 유지하며, 9월 $68\pm4.5\%$ 로 나타나 큰 변화는 나타나지 않았다(그림 209).



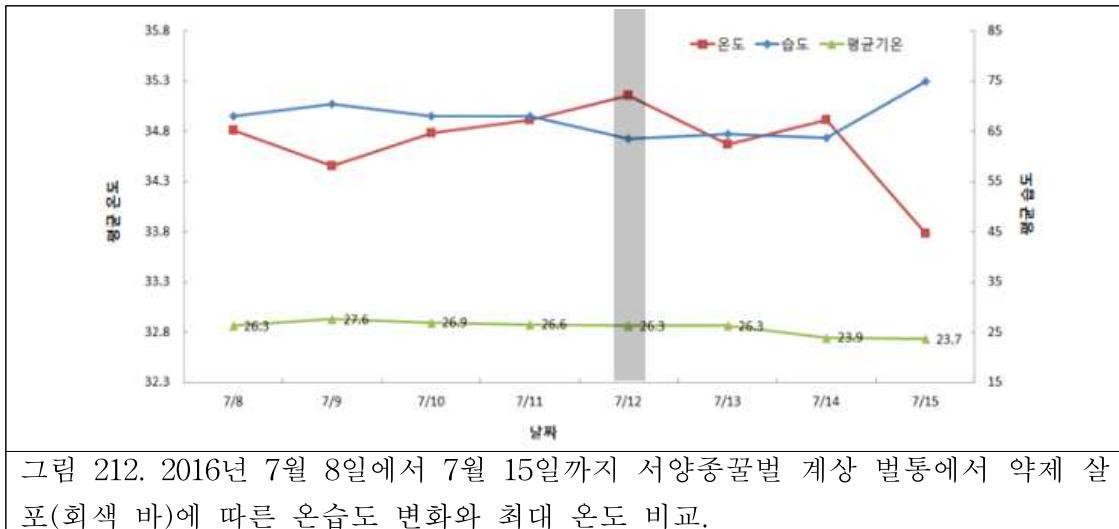
(라) 계상에서 나타난 온습도와 기상자료를 비교해 보았다. 계상에서 측정된 온도는 7월에 $35.2\pm0.2^{\circ}\text{C}$ 로 가장 높게 나타났으며, 6월 $34\pm0.3^{\circ}\text{C}$, 9월 $28\pm2.3^{\circ}\text{C}$ 로 나타났다. 8월에서 9월은 계상에 봉개권이 유지되지 않았으며, 저밀소비가 유지되었다. 9월 28°C 로 떨어지는 것으로 나타났다. 습도의 경우 8월까지 64-68%를 유지하며, 9월 66%로 나타나 큰 변화는 나타나지 않았다(그림 210).



(마) 7월 단상의 내용은 저밀소비로만 구성이 돼 있으며, 평균온도 34.3°C , 평균습도 66.8%로 나타나며, 평균기온은 24.8°C 로 나타났다. 약제 설치일인 7월 12일 가장 높은 온도인 $35.1 \pm 0.4^{\circ}\text{C}$ 로 나타났다. 평균기온은 7월 11일 26.6°C , 7월 12일 26.3°C , 7월 13일 26.3°C 으로 비교적 안정적으로 나타났다(그림 211).



(바) 7월 계상의 내용은 산란소비로만 구성이 돼 있으며, 평균온도 35.2°C , 평균습도 68.4%로 나타나며, 평균기온은 24.8°C 로 나타났다. 약제 설치일인 7월 12일 가장 높은 온도인 $35.7 \pm 0.3^{\circ}\text{C}$ 로 나타났다. 평균기온은 7월 11일 26.6°C , 7월 12일 26.3°C , 7월 13일 26.3°C 로 비교적 안정적으로 나타났다(그림 212).



(3) 적응형 온도 데이터 로거

(가) 꿀벌 둥지의 온도 변화를 모니터링하기 위해 많은 수의 온도 센서를 부착할 수 있고, 온도 변화에 따라 측정 간격을 조절할 수 있는 적응형 온도 모니터링 시스템을 설계하였다. 그림. 26은 설계한 시스템의 레이아웃을 나타낸 것이다. 정밀한 온도 모니터링을 위해 디지털 온도 센서를 사용하고, 측정된 데이터를 시간과 함께 메모리 카드에 저장할 수 있도록 RTC(Real-Time Clock)와 microSD(Secure Digital) 메모리 카드 슬롯을 가진 장치를 포함한다. 또한 데이터 처리가 단순하여 저속의 중앙처리장치이며 저전력을 소비하고, ZigBee 혹은 WiFi 무선 네트워크로의 확장이 용이한 Arduino Fio 마이크로 컨트롤러를 사용하였다.

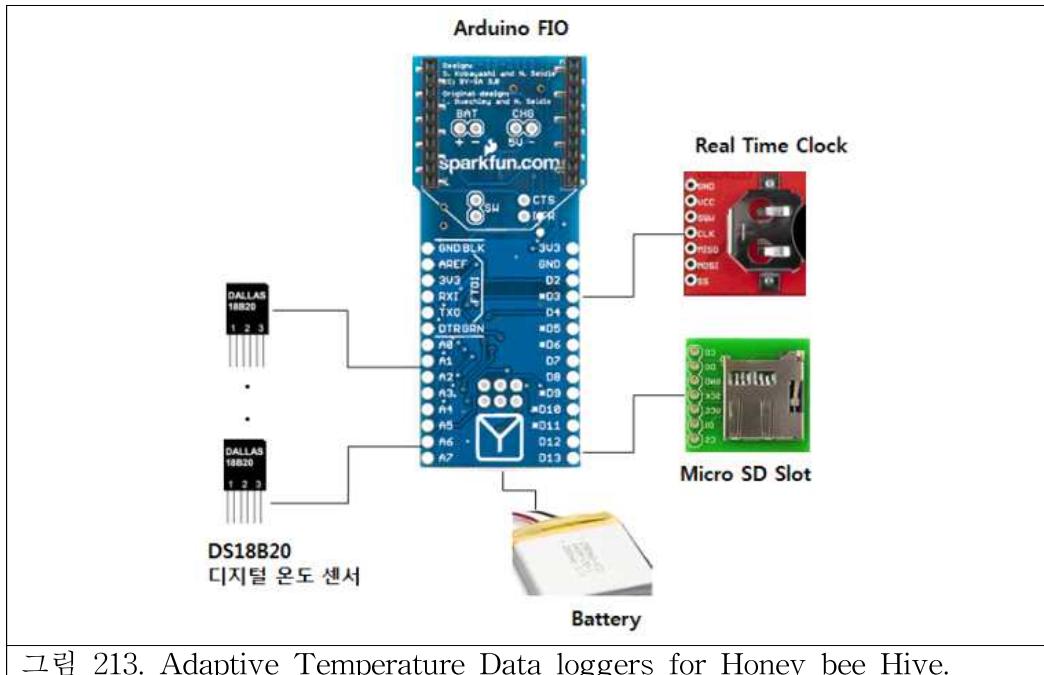


그림 213. Adaptive Temperature Data loggers for Honey bee Hive.

(나) 표 45의 부품을 사용하여 적응형 온도 로그 시스템을 구현하였다.

표 45. System Parts

Parts	Device name
Temperature	DS18B20
RTC	DS1307
Microcontroller	Arduino FIO(Arduino 328)
SD memory	INT106D1P
Battery	Polymer Lithium Ion Battery(2000mAh)

(다) 그림 214은 적응형 온도 모니터링 시스템을 위한 알고리즘을 의사 코드로 표현한 것이다.

```

1) threshold1 ← maximum difference temperature;
2) threshold2 ← maximum monitoring interval time;
3) threshold3 ← maximum loop count during the
   constant temperature;
4) Initialize timer;
5) Initialize MicroSD card;
6) Create a log file;
7) while (true) {
8)     Read temperatures from sensors;
9)     Read the current time;
10)    Write the temperatures and time to the log file;
11)    Compute the average temperature;
12)    if ( difference between previous and current
        temperature > threshold1)
13)        monitoring interval value =
            monitoring interval value / 2;
14)    else if (monitoring interval value != threshold2
            && loop count > threshold3)
15)        interval value = interval value * 2;
16)    sleep during the interval time
17) }
```

그림 214. Algorithm for the Adaptive Temperature Data Loggers.

(라) 먼저 실시간 타이머와 마이크로SD 카드를 초기화하고, 데이터를 기록할 파일을 생성한다. 그리고 온도 센서로부터 데이터를 읽고, 현재 시간을 읽은 후 파일에 기록한다. 현재 온도의 평균값을 구한 후 이전 온도와의 차이가 임계치 온도 이상이면 측정 간격의 값을 1/2로 줄인다. 만일 반으로 줄인 측정 간격 값이 0이면 1로 설정한다. 측정 간격 값이 최대 임계치와 같지 않고 온도의 변화가 안정적이면 측정 간격 값을 두 배로 한다. 마지막으로 배터리 수명을 절약하기 위해 측정 간격 시간동안 시스템은 수면 모드로 전환한다. 이 알고리즘은 그림 215과 같이 Arduino 프로그래밍 언어를 사용하여 알고리즘을 구현하였다.

```

...
    if (first) {
        first = false;
    } else if (abs(avgTemperature - oldAvgTemperature) >
IntervalThreshold) {
        // we make the interval time short to be half
        if (intervalTime > 1) intervalTime /= 2;
        stableCount=0;
    } else { // The temperature is stable
        if (intervalTime != setIntervalTime && ++stableCount >
stableLimit) {
            intervalTime *= 2;
            if (intervalTime > setIntervalTime) intervalTime =
setIntervalTime;
            stableCount=0;
        }
        if (stableCount > stableLimit) stableCount=0;
    }
    oldAvgTemperature = avgTemperature;
...

```

그림 215. Adaptive control function program.

(마) 구현한 시스템의 동작을 실험하기 위해 두 가지 환경에서 실시하였다. 첫째로, 그림 29와 같이 16개의 온도 센서를 연결하고 실험실의 창가에 위치시켜 6 일간의 온도 데이터를 기록하였다.

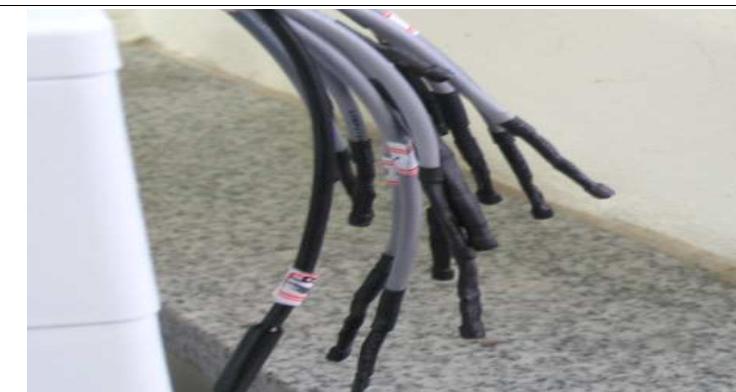


그림 216. Laboratory Setup besides Windows.

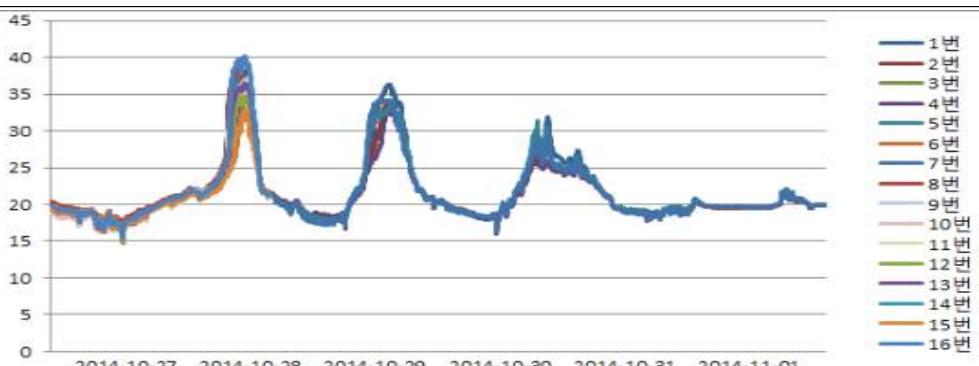


그림 217. Temperature Variations as Function of the Measured Date.

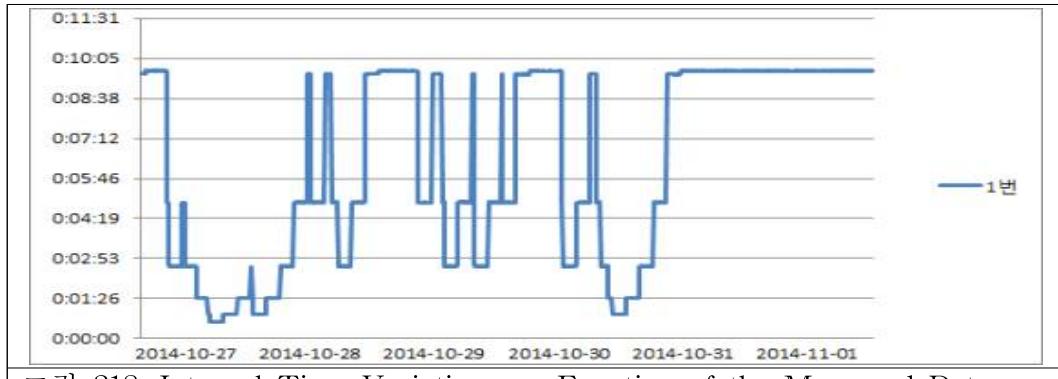


그림 218. Interval Time Variations as Function of the Measured Date.

- (바) 그림 30은 16 개의 온도 센서의 온도 변화를 나타낸 것이고, 그림 31은 1번 온도 센서에 대해서만 측정 간격 시간의 변화를 나타낸 것이다. 온도 센서를 창가에 위치한 관계로 밤낮의 차이가 많이 발생하였음을 알 수 있고, 기온의 변화에 따라 온도 측정 간격 또한 1분에서 10분 사이에서 변화하였음을 확인할 수 있다.
- (사) 두 번째 실험은 벌통에 설치하기 전의 환경과 동일하게 센서들을 그림 32와 같이 설치하였다. 하나의 막대에 3개의 온도 센서를 부착하여 총 27개의 센서를 연결하여 연구실 실내를 4일간 측정하였다.



그림. 219. Laboratory Setup in a Room.

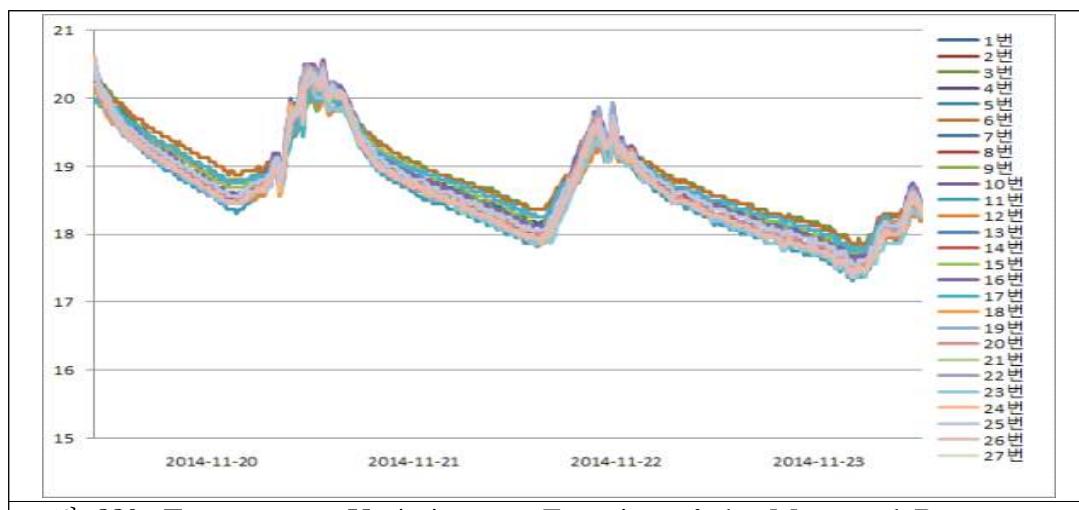


그림 220. Temperature Variations as Function of the Measured Date.

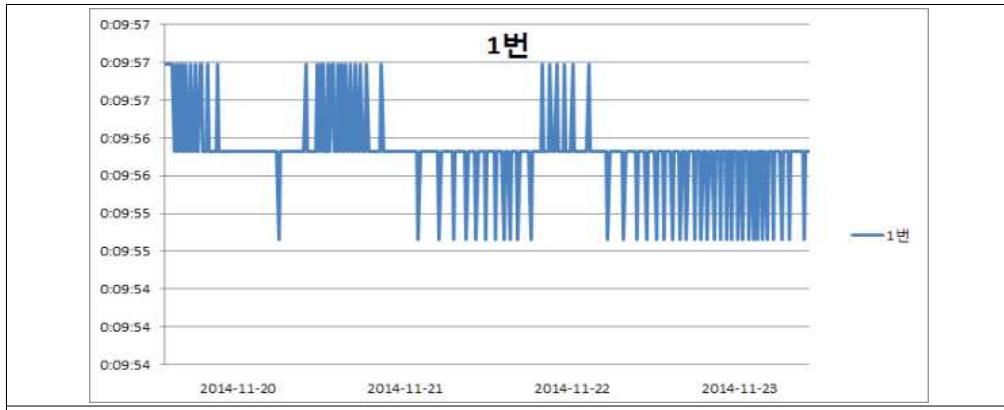


그림 221. Interval Time Variations as Function of the Measured Date.

(아) 그림 33은 27 개의 온도 센서의 온도 변화를 나타낸 것이고, 그림 34는 1번 온도 센서에 대해서만 측정 간격 시간의 변화를 나타낸 것이다. 온도의 변화가 안정적으로 변화했고(그림. 33), 측정 간격 시간 변화 (그림. 34) 역시 약 10 분으로 변화하지 않았음을 알 수 있다. 그림 33의 그래프 변화는 타이머의 오차로 인해 ± 1 초가 발생하였기 때문이다. 두 가지의 실험 환경에서 실시한 실험 결과를 통해 우리가 구현한 적응형 온도 알고리즘 시스템이 급격한 온도 변화에 따라 측정 간격 시간 또한 동적으로 변화하면서 올바르게 동작함을 확인할 수 있었다.

나. 음파 분석을 통한 경보시스템 개발

(1) 경보시스템의 개념: 양봉과 ICT(Information and Communication Technology)의 융합으로 양봉가들은 개별적인 꿀벌 봉군의 행동에 대한 정보를 쉽게 파악할 수 있고, 이에 따라 양봉의 효율성이 점차 증가하고. ICT를 사용하여 꿀벌 봉군 내 환경을 측정함으로써 꿀벌 봉군의 건강 상태를 확인하며(그림. 223), 봉군 앞에 소리 분석 시스템을 설치하여, 봉군에 말벌이 침입할 시 말벌이 가진 고유 주파수를 이용하여 침입여부를 확인하였다.



그림 222. 말벌 경보시스템 조사지역.



그림 223. 계상 봉군에 설치된 모니터링 시스템.

(2) 봉군의 온도와 습도를 추정하기 위해 온도 오차율이 낮은 DS18B2 온도 센서를 갖는 AM2315 센서를 사용하였으며, 소리의 주파수 분석을 위해 소리 분석 소프트웨어 (Sygyt Overtone Analyzer)를 사용하여 소리의 주파수 및 크기를 표시함. 말벌 종에 따라 날개소리의 고유 주파수를 찾으면 야외에서 채집한 말벌을 실험실에서 끈에 매달아 날개소리를 측정하였다.

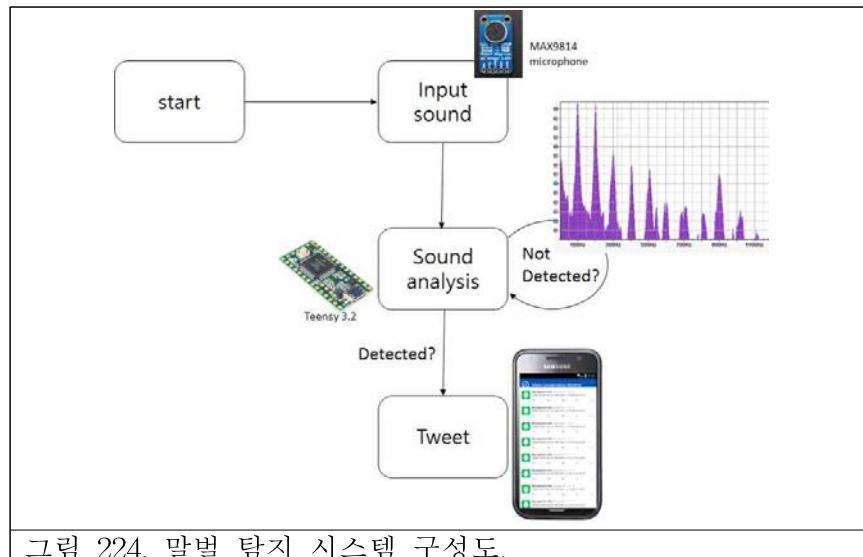


그림 224. 말벌 탐지 시스템 구성도.

(3) 말벌 탐지를 위한 시스템의 구성도는 그림과 같다. MAX9814 마이크로부터 소리를 입력받아 ARM Cortex-M4 Teensy 3.2 보드에서 소리의 주파수를 분석함. 말벌이 탐지되면 스마트폰으로 트위터를 사용하여 말벌이 출현했다는 메시지를 전송하였다(그림. 225).

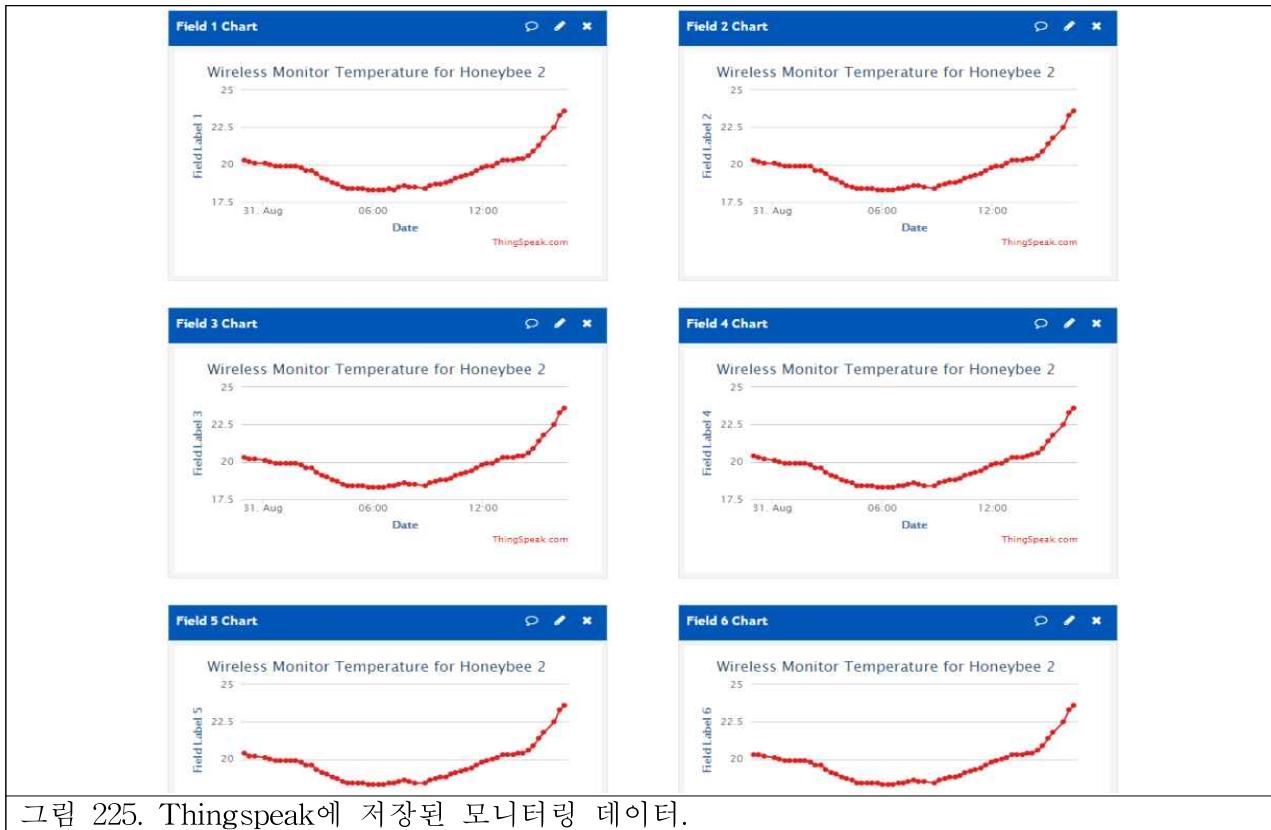


그림 225. ThingSpeak에 저장된 모니터링 데이터.

- (4) 말벌 탐지를 위한 시스템의 구성도는 그림과 같다. MAX9814 마이크로부터 소리를 입력받아 ARM Cortex-M4 Teensy 3.2 보드에서 소리의 주파수를 분석함. 말벌이 탐지되면 스마트폰으로 트위터를 사용하여 말벌이 출현했다는 메시지를 전송한다.
- (5) 그림 227, 228의 데이터는 등검은말벌을 녹음하여 나타난 주파수 스펙트럼 값을 나타낸 것이다. 붉은색 선이 등검은말벌의 주파수 스펙트럼 값으로 166~200, 366~400, 466~500Hz에서 주파수 대역이 강함을 알 수 있으며, 166~200Hz에서 가장 강한 주파수가 나타났다. 그림 37은 장수말벌의 녹음소리에 대한 주파수 스펙트럼 값으로, 133~200, 300~366, 466~500Hz에서 주파수 대역이 강함을 알 수 있었다.

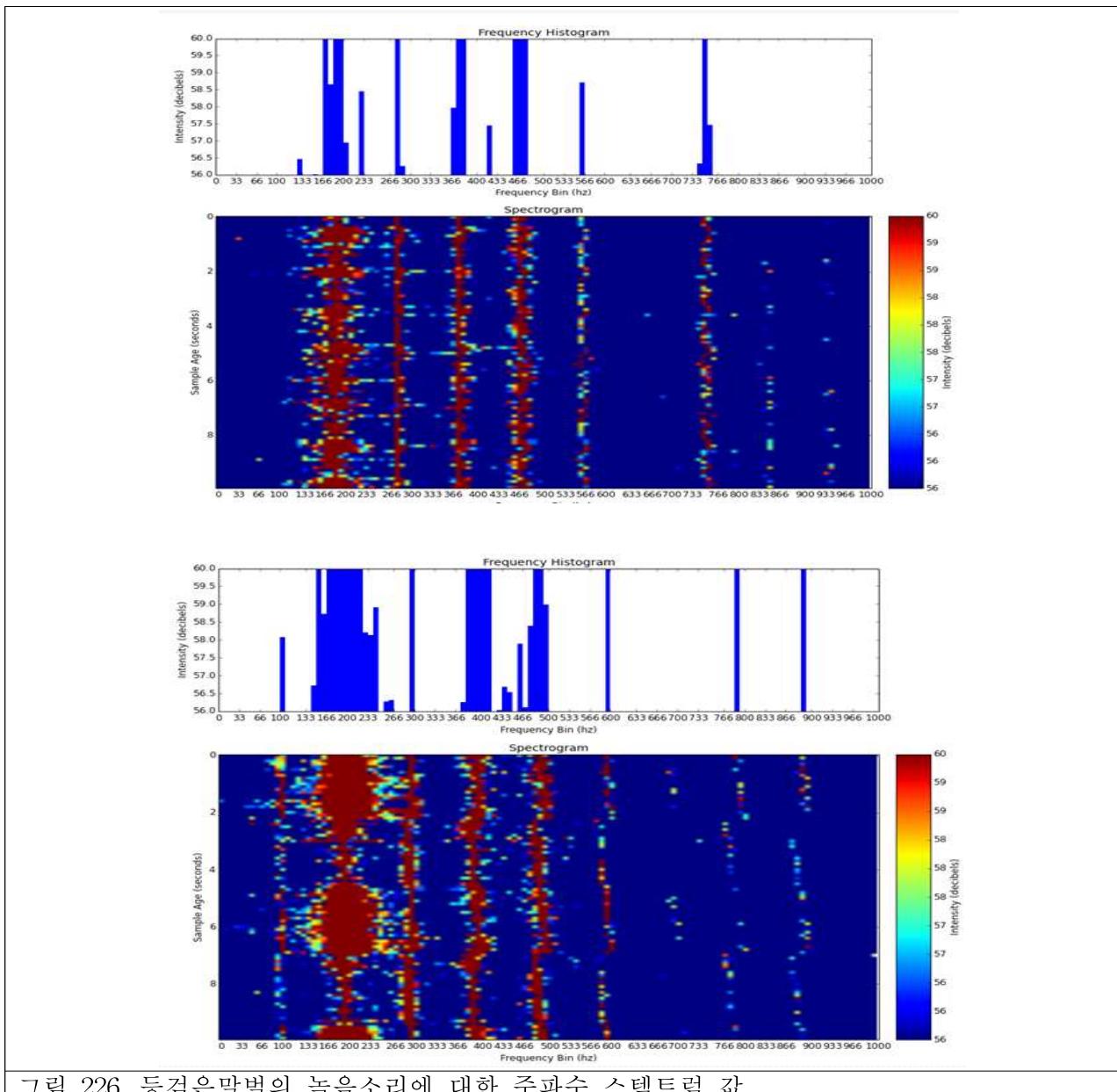


그림 226. 등검은말벌의 녹음소리에 대한 주파수 스펙트럼 값.

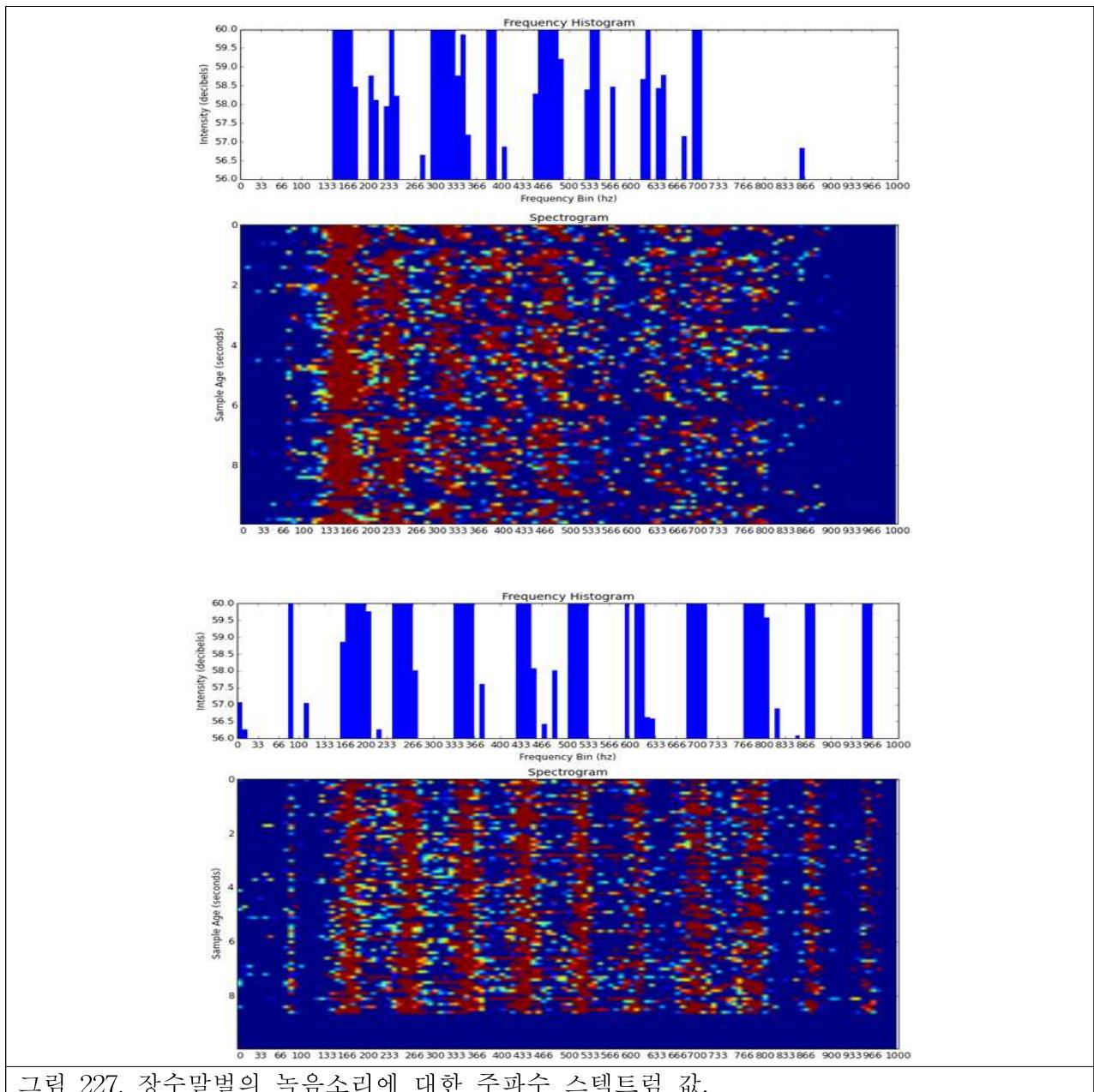
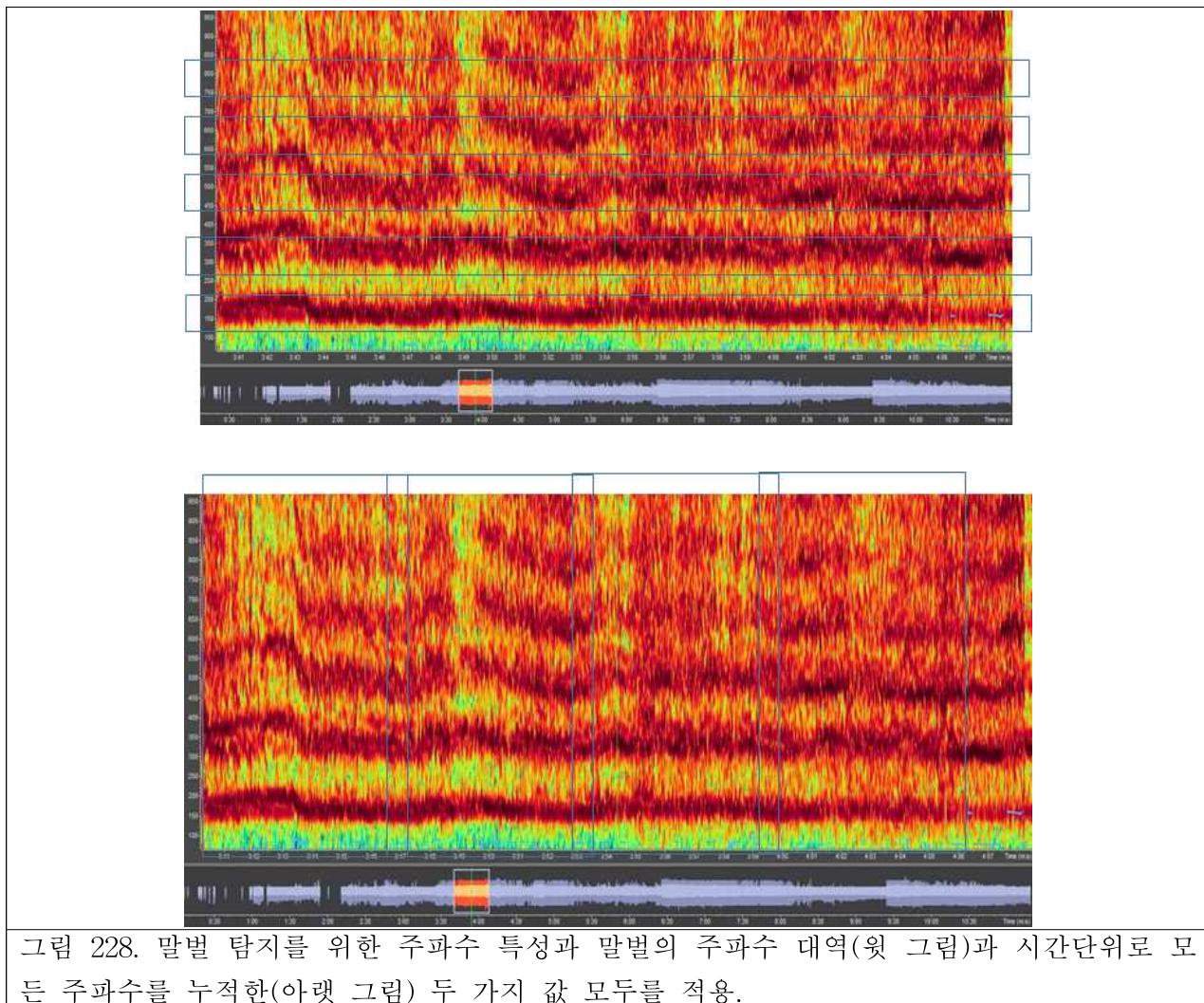


그림 227. 장수말별의 녹음소리에 대한 주파수 스펙트럼 값.



- (6) 말벌이 탐지되면 탐지 시스템의 LED가 깜박이도록 하였는데, 장수말벌이 날아 움직일 때 그림의 하단(우)에 있는 보드의 LED가 켜져 있음을 확인할 수 있다. 그리고 트위터를 통해 스마트폰으로 메시지 전송되어 왔음을 확인할 수 있었다(그림. 230).



그림 229. 실험실 내의 테스트 장면(윗 그림)과 탐지시 LED 작동(아랫 그림, 좌) 트위터를 통해 전송된 탐지 메시지(아랫 그림, 우).

제 4 장 목표달성도 및 관련분야 기여도

제1절 목표대비 달성도

당초 목표	가중치(%)	개발 내용	달성도(%)
봉군 사육에 직접적인 영향을 주는 기후변화 요인 분석	10	- 계절별, 돌발성 기후변화를 가정하여 봉군 유지에 피해를 줄 수 있는 기후 요인을 분석, 분류	100
환경 스트레스 요인별 실내 실험 디자인 구축 (온도, 습도, 영양, 살충성분)	10	- 환경 스트레스 요인에 대한 꿀벌의 생리 변화를 확인하기 위한 실내 실험 수행	100
실내 실험 꿀벌 시료 확보 및 신경행동 관련 유전자군 분석	20	- 스트레스 요인 별 꿀벌 샘플 확보 및 유전체 분석	100
계절별 기온 조건과 영양 상태에 따른 꿀벌 문자신경행동학 마커의 변화 연구	20	- 기온 조건에 따라 변화하는 꿀벌의 생리 및 문자 마커의 기능 연구	100
장마철 습도 조건과 영양 상태에 따른 꿀벌 문자신경행동학 마커의 변화 연구	10	- 영양상태 조건을 인지하는 꿀벌의 생리적 기능 분석	100
질병발생과 영양 상태에 따른 꿀벌 문자신경행동학 마커의 변화 연구 (응애 대발생에 대비한 virus 질병 감수성 분석)	10	- 질병 감염원과 상호작용하는 꿀벌의 문자 마커 발굴	100
시뮬레이션 결과를 통해 기후변화에 대비한 봉군 사육 가이드라인 마련을 통한 봉군 사육 관리 현장 적용	5	- 혹한 및 혹서기의 꿀벌 사육 관리를 위한 연구 수행	100
실제 apiary management 적용 전, 후 꿀벌 생리에 대한 문자신경행동학적 검증	5	- 기후변화에 따른 꿀벌의 유전체 및 생리적 변화를 확인하고 유전적 요인을 변화할 경우 꿀벌의 행동이 변동됨을 확인함	100
1. 혹한 환경(기농)에서의 꿀벌 적응 현상을 유전자 수준에서 분석	30	1. 계절별 발현의 차이를 보이는 꿀벌 AChE1이 억제된 육아 스트레스로 인한 꿀벌 신경계의 혼분 완화와 연관되어 있음을 확인함으로써 혹한 환경에 적응 현상을 유전자 수준에서 구명하였다.	100

2. 분봉 관련 유전자와 그 기능을 추적하여 효율적인 분봉관리	40	2. 인위적으로 육아가 억제된 꿀벌과 정상 육아 상태의 꿀벌 집단의 내역봉과 외역봉 각각에 대한 전사체 분석을 통하여 각 조건별 차등 발현 유전자의 서열과 경로맵 분석을 통한 분자생물학적 생리적 변화 자료를 확보하였다. 위 분석 자료로부터 돌발 기후 발생으로 인한 밀원식물의 갑작스런 부재 상황을 가정하였고 이에 따른 육아 억제 상태가 꿀벌에게 가져다주는 변화들을 확인하였다.	100
3. 기후변화에 대한 꿀벌 유전자 정보 확보 및 과학적인 꿀벌의 기후변화 적응/피해 진단	30	3. 어느 때 분봉이 진행될지 모르는 상황에서 분봉 전, 후의 샘플 채집을 완수하였고 이들 샘플로부터 전사체 분석을 진행하여 각 샘플별 차등 발현 유전자의 서열과 경로맵을 통한 분자생물학적 생리적 변화 자료를 확보하였다.	100
1) 지역별 및 밀원식물별 별 꿀·봉독·프로폴리스·화분의 생리활성 차이 비교		1) 지역별 20종 프로폴리스 및 18종 화분의 생리활성 조사 결과 지역별로 현저한 차이를 보임	100
2) 항바이러스 활성 및 항균 (가스피저균, 대장균 등) 활성 조사		2) 국내산 양봉시료의 항바이러스 효과는 없었으나, 장내유해세균의 생육을 저해. 저해효과는 지역별로 현저한 차이를 보임	100
3) 항암활성을 폐암·전립선암·유방암·대장암 등에 대한 활성 조사		3) 특정 지역의 국내산 프로폴리스 시료는 양호한 항증식활성을 나타내었으며, 호주·브라질·중국산 프로폴리스 시료보다 더 강한 활성을 나타냄	100

1)환경스트레스(황사,산성비)요인에 의한 꿀벌의 생육장애 구명 2)환경스트레스 요인별 꿀벌 질병 발생 추이 분석	30%	1)산성비와 황사처리에 의한 꿀벌 생존률 변화 조사 2)산성비와 황사처리에 의한 꿀벌 노제마병 감염률 조사	100%
1)온도변화에 따른 꿀벌 유충의 생육 장애 구명 2)온도변화에 따른 병원체에 대한 감수성 변화 분석	40%	1)온도에 따른 생존율 조사 2)온실 내 봉군의 노제마 감염률 조사 3)온실 내 바이러스 발생 여부 조사	100%
1)온실가스(메탄, 아산화질소)에 의한 꿀벌의 생육 장애 조사 2)온실가스(메탄, 아산화질소)에 의한 꿀벌의 질병 감수성 변화 분석	30%	1)메탄 농도별 생존율, 감염률 조사 및 유충발육영향 평가 2)아산화질소 농도별 생존율, 감염률 조사	100%
1)봉군 주변 기후요인(온도, 습도) 변동에 따른 꿀벌 개체 방화 행동 정형 패턴 모델 도출 2)먹이원 환경 요인에 따른 꿀벌 개체 방화행동 변화 분석 3)개체 인식 자동 모니터링 시스템 개발 4)영상 기반 꿀벌 추적 시스템 및 마이크로 2차원 태그를 이용한 개체 행동 패턴 분석 시스템 개발 5)개체 인식 자동 모니터링 시스템 적용 기후요인 실험 연구 수행	30	1)봉군 내·외부의 온도, 습도, 조도 변동에 따른 서양꿀벌과 토종꿀벌의 방화행동 측정 실험 연구 수행 및 패턴 도출 2)먹이원 환경 요인(바람의 세기)에 따른 꿀벌 방화행동 변화 실험 수행 3)개체 인식 자동 모니터링 시스템 개발 및 적용 실험 데이터 분석 (개체인식률을 높이기 위한 보완 작업 중) 4)영상 기반 꿀벌 추적 시스템 및 마이크로 2차원 태그를 이용한 개체 행동 패턴 분석 시스템 개발 및 적용 실험 중 5)개체 인식 시스템을 이용한 일꾼들의 외역활동 연구 수행	25 10 25 10 5
1)등검은말벌 분포예측지도 및 봉군침입조기경보체계개발	100%	1)등검은말벌 분포예측지도 및 봉군침입조기경보체계개발	100%

제2절 정량적 성과(논문게재, 특허출원, 기타)를 기술

성과지표명	연도	당초 목표 (전체)	실적	달성을 (%)	가중치 (%)
논문게재	SCI	12	8	67	35
	비SCI	9	9	100	30
학술발표	국제	14	22	100	10
	국내	23	23	100	5
정책자료 기관제출		2	1	50	5
영농기술·정보 기관제출		2	2	100	5
영농기술·정보 채택		0	1	100	-
생물자원 등록 · 기탁		20	23	100	5
홍보성과 (점수)		2	33.2	100	5
교육훈련 대내외 활동 건수		0	1	100	-
계		84	123.2	100	100

제 5 장 연구 결과의 활용 계획

1. 위 연구를 통하여 혹한기, 혹서기 특이 발현 유전자 정보(마커)인 AChE1를 확인하였고, 이를 토대로 돌발기후 발생에 의한 꿀벌 스트레스를 조기에 판명하여 대응 방안 마련을 가능하게 하고 양봉 산업의 피해를 최소화한다.
2. 분봉 관련 특이 유전자 정보를 바탕으로 하여 분봉 예찰 문자 마커를 제공하고 채밀기 봉군의 밀도를 줄임으로써 꿀 수확량에 손실의 원인이 되는 분봉을 미연에 방지할 수 있도록 하여 양봉 농가의 안정적인 양봉 유지에 기여한다.
3. 분봉시기 특이적으로 발현량의 변화를 보이는 CHCs 물질(alkane, alkene, alkyl alkylalcohol) 처리함으로써 분봉의 가능성 있는 봉군 내 꿀벌의 remote sensing system 교란을 통하여 분봉의 발생을 미연에 지연 및 방지할 수 있을 것으로 예상 한다.
4. 이들 유전자군 또는 단백질군의 특이 발현으로 나타날 수 있는 꿀벌의 표현형(또는 발현형)을 통한 기후변화 및 분봉 피해를 예찰할 수 있고 해당 연구를 통하여 기후변화와 분봉을 조절하는 유전자군의 선별을 위한 비교 유전학적 연구 경험을 추후 다른 농학 분야에 적용 가능하다. 또한 기후변화, 분봉 관련 유전 정보를 바탕으로 한 과학적 봉군 관리 시스템 제공할 수 있다.
5. 봉군의 육안 관찰과 더불어 유전자 검사를 통한 추후 봉세를 예측하여 효율적인 봉군 관리에 도움을 줄 수 있고 유전자 검사에 기반한 기후변화와 분봉 피해 예찰을 통한 효과적인 양봉 산업 관리에 도움이 될 것이다.
6. “Expression of acetylcholinesterase 1 is associated with brood rearing status in the honey bee, *Apis mellifera*” 논문의 Scientific report 저널에 대한 개재가 확정 되었고, 2017년 1월 3일 온라인 출판 예정이다.
7. 밀원식물의 종류에 따른 양봉산물의 생리활성물질의 정성적/정량적 분석을 하였다.
8. 동일 밀원식물의 지역에 따른 양봉산물의 생리활성물질의 정성/정량적 분석을 하였다.
9. 국내산 프로폴리스 및 활성물질의 BACE-1 저해활성을 이용하여 건강보조식품으로 개발 예정이다.
10. 기후변화에 따라 발생하게 되는 꿀벌 관련 질병 저항성 연구에 연구기반 마련 기대한다.
11. 단일 기후변화요인 발생 시 꿀벌의 생존 여부에 대한 기초자료로의 이용한다.
12. 본 협동과제의 지원에 힘입어 봉군 내외부 그리고 벌이원의 기후요인(온도, 습도, 바람 등)과 관련하여 꿀벌 개체 행동 규명을 위한 상당한 실험 연구를 수행하였고 개체의 외역활동 관련하여서는 빅데이터 수준의 데이터를 얻었다. 또한 서양꿀벌과 토종꿀벌의 비교 연구, 집단크기-온도-사망률 등의 실험 수행에서도 의미있는 결과를 도출하였다. 일련의 실험들이 모두 마무리되어야 데이터를 통합적으로 해석할 수 있는 어려움이 있어서 주어진 연구기간 내에 논문 출간을 마무리하지 못했다. 현재 다수의 논문을 파급력있는 국제 학술지에 게재하려고 노력하고 있다. 결과보고서에 포함된 성과가 미진하지만 추진 중인 논문 개재를 조속히 마무리하여 지원에 보답할 수 있는 성과를 내고자한다.
13. 개체인식 자동 모니터링 시스템의 개체 인식률 향상을 위해 시스템 더 보완하여 후속 실험 연구에 적용하고자 하며, 이를 통해 지속적인 연구 성과를 낼 수 있을 것으로 기대한다.
14. 등검은말벌의 개체군 동태 파악을 통한 관리 시기, 방안의 개발 가능하다.
15. 외래침입 생물의 국내 농산업 피해 최소화 방안을 개발한다.

16. GIS 기법 등을 도입한 등검은말벌 분포 현황도 및 분포 예상도 제작 등 첨단 생태 연구, 향후 분포 확대 대비 가능하다.
17. 꿀벌의 신규 해충에 대한 적시적인 관리 방안의 연구를 통한 농업 연구의 현장성 강화한다.
18. 남방계인 등검은말벌의 분포 및 분포확대 예상을 통한 기후변화 적응 체계 확충이 가능하다.
19. 경남지역 양봉장에서 약 15% 내외에 달하는 봉군 피해 최소화 방안 개발이 가능하다.
20. 신규 말벌 해충인 등검은말벌의 밀도 관리 기술 개발을 통한 양봉산업의 피해를 축소시킨다.
21. 야외 휴양객의 안전 도모 및 말벌집 제거 등을 위한 사회적 경비를 감소시킨다.
22. 꿀벌의 신규 해충에 대한 적시적인 관리 방안의 연구를 통한 농업 연구의 현장성을 강화한다.
23. 등검은말벌 전용 트랩 또는 관리 방안의 개발을 통한 신농업시장의 창출을 이룩한다.

제 6 장 연구 과정에서 수집한 해외 과학 기술 정보

1. 2006년 미국에서 봉군붕괴현상(Colony collapse disorder, CCD)의 보고를 시작으로 전 세계적인 문제로 발전하였다. 대부분의 꿀벌 관련 연구들의 궁극적으로 CCD를 해결하기 위한 것이고, 이번 과제의 궁극적인 목표 역시 안전한 봉군 관리에 도움이 되는 것이다.
2. 꿀벌 연구에 사용되는 기술적인 측면에서 새로운 보고는 아직까지 없었으나 CCD의 원인 규명을 위한 연구들은 활발히 지속되고 있다. Neonicotinoid 계열 살충제인 imidacloprid가 꿀벌에 미치는 독성 평가(Gary Rondeau 등, 2014)를 시작으로 아치사량의 imidacloprid에 의하여 꿀벌 외역봉의 외역 활동과 봉군 활동에 악영향을 미치는 것으로 확인되었으며(Galen P. Dively 등, 2015), 비정상적인 신경 연결에 의한 후각 학습능력의 감소와 유충 단계 동안 후각 및 시각을 담당하는 신경계 발달을 저해하는 것과 관련이 있음이 연구되었다(Yi-Cahn Peng 등, 2016).
3. 돌발적인 기후요인에 의해 봉군내 먹이부족, 질병 등에 의한 스트레스가 누적이 될 경우에 상대적으로 연령이 높은 외역봉 밀도가 치사하게 되면 감소된 외역봉의 수를 보충하기 위해 내역봉의 급격한 외역봉으로의 전환이 발생하게 되는데, 미숙 외역봉의 경우 첫 비행에서 대부분 사망하게 되어 봉군의 구조가 급격히 파괴되고 이로써 봉군붕괴현상(CCD)이 발생한다는 보고가 있다(Clint J. Perry 등, 2015).
4. 본 결과는 급격한 기후변화 요인이 봉군붕괴현상의 직접적인 원인이 될 수 있음을 시사한다.
5. 브라질산 프로폴리스의 체계적인 분류: 브라질 각 지역에서 아프리카화된 서양벌에 의해 수집된 400종 프로폴리스를 에탄올로 추출한 후, 추출물의 외형, 자외선 분광광도법, 역상박층 크로마토그라피, 역상고속액체크로마토그라피 등의 이화학적 방법을 이용하여 이들 추출물의 항산화활성, 항균활성, 암세포에 대한 증식억제활성 및 HIV 생육저해활성 등을 조사한 결과, 12군으로 분류할 수 있었다(Park 등, 2000). 12군 중에서, 5군은 남부지역에서, 6북동지역에서, 나머지 1군은 남동지역에서 채집된 것으로서, 이들 프로폴리스의 다양성은 식물 생태와 관련이 있다. 12군 프로폴리스의 생리활성 역시 다양하며 지역 의존적으로서, 이 결과는 프로폴리스의 화학적 조성이 식물의 화학 조성과 관계에 의한 것으로 해석된다.
6. 프로폴리스의 화학적 특성: 프로폴리스는 그 조성에 따라 2개 집단으로 분류되는데, 하나는 브라질형(*Baccharis*-type)이며, 다른 하나는 유럽형(*poplar*-type)이다(Fujimoto 등, 2001). 브라질형 프로폴리스는 *p*-coumaric acid 유도체들이 풍부하며, 브라질산 프로폴리스에서만 발견된다. 반면에, 유럽형 프로폴리스는 플라보노이드 화합물이 풍부하며, 유럽뿐만 아니라 중국 및 다른 국가에서도 채집된다(Fujimoto 등, 2001). 국내산 프로폴리스는 유럽 및 중국 산 프로폴리스와 비슷하여 *poplar*-type을 나타낸다(Ahn 등, 2004). 포플라 나무 봉오리의 수지 분비물들은 유럽, 북미 및 남미 그리고 서부 아시아산 프로폴리스의 주요 기원식물로서 언급된다(Bankova 등, 1992; Bankova 등, 2000; 53). 중국, 항가리, 불가리아, 우루과이 및 알르헨티나산 프로폴리스의 특징적인 화합물은 pinocembrin, chrysin, galangin 및 tectochrysin으로서, 그 기원 식물은 포플라(*Populus* spp.)라고 보고한 바 있다(Fujimoto 등, 2001). Ahn 등 (2004)은 국내산 프로폴리스도 이들 화합물을 함유하고 있기 때문에, 포플라가 주요 기원식물이라 하였다.

제 7 장 연구 개발 결과의 보안 등급

1. 본 연구를 통해 발굴된 분봉관련 유전자는 최초 보고이므로 출판 전까지는 보안유지가 필요하다.
2. 논문 게재 중인 데이터가 많아서 당분간 보안을 요구한다.

제 8 장 국가과학기술종합정보시스템에 등록한 연구시설·장비 현황

구입 기관	연구 시설/ 연구 장비명	규격 (모델명)	수량	구입 연월일	구입 가격 (천 원)	구입처 (전화번호)	비고 (설치장소)	NTIS장비 등록 번호
한백 과학	Shaking incubator	HB-201S	1	2001.12.05	1,760,000		서울대학교	미생물 종 배양
다솔 과학	Autoclave	KR/DS-60 A	1				서울대학교	시료灭균
광동 산업	Clean bench	KD-CB114	1				서울대학교	무균작업
DVRISI centific	Dry Oven	KR/SF-135 D	1	1995.01.08	1,100,000		서울대학교	시료건조
Versa max	Spectrophotometer		1				서울대학교	시료 정량분석
광동 산업	Hood		1				서울대학교	물질분리
OWL	Electrophoresis system	US/P9DS-1	3	2007.02.14	574,000		서울대학교	DNA 분리 및 확인
MJ Research, INC	PCR Thermal controller	US/PTC-200 DNA engine	2	2007.02.14	11,000,000		서울대학교	DNA 생성
테마 파크	Real-time PCR Thermal controller	Chromo4, Real Time PCR	1	2005.07.22	10,000,000		서울대학교	실시간 DNA 증폭량 확인
한일 과학	Refrigerated centrifuge	KR/Micro 17R	2	2001.11.1	2,970,000		서울대학교	저온 고속 원심분리
한일 과학	Microcentrifuge	Micro12	1				서울대학교	원심분리
CHALIS	전자 저울	US/GT210	1				서울대학교	시약 배분
ORION	PH meter	US/520A	1	1998.10.29	1,000,000		서울대학교	PH 측정
LG, Samsung	저온 냉장고		4				서울대학교	시약보관
	자기믹서	HY-HS11	1				서울대학교	물질혼합
서린 사이언스	Image analyzer	SL-20	1	2001.11.14	1,760,000		서울대학교	DNA 확인
Nihon Freezer	초저온 냉동고		2	2007.02.14	3,800,000		서울대학교	시료보관

구입 기관	연구 시설/ 연구 장비명	규격 (모델명)	수량	구입 연월일	구입 가격 (천 원)	구입처 (전화번호)	비고 (설치장소)	NTIS장비 등록 번호
한백 과학	Incubator	HB-201SF	1	2001.12.05	1,760,000		서울대학교	미 생물 배양
Amer sham	Power supplier	EPS1001	2	2007.02.14	4,635,000		서울대학교	단백질 전기영동
농과원	흡광광도분 석기	Fosstecator, SE/2010, Fibertec	1	2013-03-25	36,608	-	농업생물부 336호	NFEC-2013 -04-178493

제 9 장 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적

1. 일일안전점검 항목을 만들어 시약 및 실험폐기물 관리상태, 정리정돈 상태 등을 수시로 점검하였다(점검자 : 과제 참여 연구원 및 연구실 책임자).
2. 본 실험실은 미생물 및 곤충을 이용하는 실험실로써 연 1회 이상 시약 보관 상태와 보호구 착용 및 관리 상태 등을 점검함으로써 실험자의 안전을 도모하였다(점검자 : 과제 참여 연구원 및 연구실 책임자). 정기점검 결과 정밀 진단이 요구될 경우 가스 누출, 전기 과부하, 접지 상태, 화학약품 반응 위험도 등을 본교 시설관리팀에게 의뢰 또는 정밀안전진단 전문 기관에 위탁, 점검하여 위험요소 제거에 만전을 기하였다.
3. 연구실 및 꿀벌 야외 사육 장소인 본 실험실 건물 옥상과 경기도 광주 태화산 학술림 양봉장에 대한 관리 상태, 일일점검일지 작성 여부 확인을 통한 관리, 감독을 강화하여 안전 점검에 소홀함이 없도록 하였다(점검자 : 연구실 책임자 및 시설관리팀).
4. Human rhinovirus, 장내세균 등의 미생물을 취급함으로 생물검정을 위한 별도의 실험실을 운영하고, 클린벤치 내에서 실험 수행하였다.
5. 활성물질을 분리하기 위하여 용매를 많이 취급함으로, 대형 환기장치를 실험실에 설치하였다.
6. 용매의 인화성으로 인하여 화재 대비 소방기구 비치하였다.
7. 꿀벌에 쏘이 경우를 대비, 구급약(항히스타민 제 등) 및 주의경고문 비치하였다.
8. 당초 연구계획서에 명시했던 안전조치 이행 계획에 따라 연구를 수행하였다.

제 10 장 연구개발과제의 대표적 연구실적

번호	구분 (논문 /특허 /기타)	논문명/특허명/기타	소속 기관명	역할	논문제재지 / 특허등록국 가	Impact Factor	논문제재일 /특허등록 일	사사여부 (단독사사 또는 중복사사)	특기사항 (SCI여부 /인용횟수 등)
1	논문	Discrimination of umami tastants using floating electrode-based bioelectronic tongue mimicking insect taste systems	인천대학교	교신	ACS Nano	13.33	2015.11.15	중복	SCI
2	논문	A novel olfactory pathway is essential for fast and efficient blood-feeding in mosquitoes	인천대학교	교신	Scientific Reprots	5.228	2015.08.26	단독	SCI
3	논문	Genome-wide characterization of long intergenic non-coding RNAs (lncRNAs) provides new insight into viral diseases in honey bees <i>Apis cerana</i> and <i>Apis mellifera</i>	인천대학교	교신	B M C Genomics	3.867	2015.09.04	단독	SCI
4	논문	Uncovering the novel characteristics of Asian honey bee, <i>Apis cerana</i> , by whole genome sequencing	인천대학교	교신	B M C Genomics	3.867	2015.01.02	단독	SCI

번호	구분 (논문 /특허 /기타)	논문명/특허명/기타	소속 기관명	역할	논문제재지 / 특허등록국 가	Impact Factor	논문제재일 /특허등록 일	사사여부 (단독사사 또는 중복사사)	특기사항 (SCI여부 /인용횟수 등)
5	논문	De novo transcriptome profiling and characterization of voltage-sensitive sodium channel gene of <i>Tropilaelaps mercedesae</i> parasitizing honey bees	서울대학교		Journal of Asia-Pacific Entomology	0.946	2016.03	단독사사	SCI
6	기타	꿀벌 분봉에 의한 transcript 발현의 변화(분봉전 꿀벌 vs. 분봉 후 잔류 그룹)	서울대학교		국가생명연구자원정보센터(KOBIC)		2016.11.16	단독사사	
7	기타	꿀벌 분봉에 의한 transcript 발현의 변화(분봉전 꿀벌 vs. 분봉 그룹)	서울대학교		국가생명연구자원정보센터(KOBIC)		2016.11.16	단독사사	
8	기타	꿀벌 분봉에 의한 transcript 발현의 변화(분봉 그룹 vs. 잔류 그룹)	서울대학교		국가생명연구자원정보센터(KOBIC)		2016.11.16	단독사사	
9	기타	(NGS SRA) <i>Apis mellifera</i> , (European honey bee) , NGS transcriptome sequences of nursing honey bee, NN-2393-000001	서울대학교				2015.11.13	단독사사	

번 호	구분 (논문 /특허 /기타)	논문명/특허명/기타	소속 기관명	역 할	논문 게재지 / 특허등록국 가	Impact Factor	논문 게재일 /특허등록 일	사사여부 (단독사사 또는 중복사사)	특기사항 (SCI여부 /인용횟수 등)
10	기타	(NGS SRA) Apis mellifera, (European honey bee) , NGS transcriptome sequences of the non-color changing honey bees before swarming, NN-2387-000001	서울대 학교				2015.11.13	단독사사	
11	기타	(NGS SRA) Apis mellifera, (European honey bee) , NGS transcriptome sequences of the color changing honey bees before swarming, NN-2386-000001	서울대 학교				2015.11.13	단독사사	
12	기타	(NGS SRA) Apis mellifera, (European honey bee) , NGS transcriptome sequences of the remaining honey bees in original colony after swarming, NN-2389-000001	서울대 학교				2015.11.13	단독사사	

번 호	구분 (논문 /특허 /기타)	논문명/특허명/기타	소속 기관명	역할	논문제재지 / 특허등록국 가	Impact Factor	논문제재일 /특허등록 일	사사여부 (단독사사 또는 중복사사)	특기사항 (SCI여부 /인용횟수 등)
13	기타	(NGS SRA) <i>Apis mellifera</i> , (European honey bee) , NGS transcriptome sequences of the new colony making honey bees after swarming, NN-2388-000001	서울대 학교				2015.11.13	단독사사	
14	기타	(NGS SRA) <i>Apis mellifera</i> , (European honey bee) , NGS transcriptome sequences of foraging honey bee, NN-2392-000001	서울대 학교				2015.11.13	단독사사	
15	논문	Effects and possible mechanisms of action of acacetin on the behavior and eye morphology of <i>Drosophila</i> models of Alzheimer's disease	서울대 학교	교신 저자	Scientific Reports	5.578	2015.11.04	단독	SCI/1회

번호	구분 (논문 /특허 /기타)	논문명/특허명/기타	소속 기관명	역할	논문제재지 / 특허등록국 가	Impact Factor	논문제재일 /특허등록 일	사사여부 (단독사사 또는 중복사사)	특기사항 (SCI여부 /인용횟수 등)
16	논문	Relationship between total phenolic contents and biological properties of propolis from 20 different regions in South Korea	서울대학교	교신저자	B M C Complementary and Alternative Medicine	2.02	2016.02.18	단독	SCI
17	국제 학술 발표	Application of an ultrasonic sound device to mosquito repellents	서울대학교		International Conference on Biopesticides 7, Antalya, Turkey		2014, 10.19		
18	국내 학술 발표	Relationship between total phenolic contents and biological properties of propolis from 20 different regions in South Korea	서울대학교		2015한국 응용곤충 학회 추계학술 발표회, 군산GSCO (군산새만 금컨벤션 센터)		2015.10.15		

번호	구분 (논문 /특허 /기타)	논문명/특허명/기타	소속 기관명	역할	논문제재지 / 특허등록국 가	Impact Factor	논문제재일 /특허등록 일	사사여부 (단독사사 또는 중복사사)	특기사항 (SCI여부 /인용횟수 등)
19	국내 학술 발표	Effects and possible mechanisms of action of acacetin on the behavior and eye morphology of <i>Drosophila</i> models of Alzheimer's disease.	서울대 학교		2016한국 응용곤충 학회 국제심포 지엄, 제주국제 컨벤션센 터		2016.04.27		
20	국내 학술 발표	Biological properties of bee pollen from different regions of South Korea	서울대 학교		2016한국 응용곤충 학회 추계학술 발표회, 롯데 부여리조 트		2016.10.20		
21	논문	서양종꿀벌의 노제마 감염률과 수명에 미치는 온도, 황사, 산성비의 영향	농과원		Journal of Apiculture		2015. 11	단독사사	
22	논문	서양종꿀벌의 노제마 감염률과 수명에 미치는 CH4의 영향	농과원	주저 자	Journal of Apiculture		2016. 11.	단독사사	
23	논문	Nutritional value and chemical composition of larvae, pupae, and adults of worker honey bee, <i>Apis mellifera ligustica</i> as a sustainable food source	안동대 학교		Journal of Asia-Pacific Entomology / Korea	0.875	2016.05.16	단독사사	SCI

번 호	구분 (논문 /특허 /기타)	논문명/특허명/기타)	소속 기관명	역 할	논문 게재지 / 특허등록국 가	Impact Factor	논문 게재일 /특허등록 일	사사여부 (단독사사 또는 중복사사)	특기사항 (SCI여부 /인용횟수 등)
24	논문	Automatic Environmental Monitoring of Honeybee Hive: Prototype Design	안동대 학교		Journal of Apiculture / Korea	0.37	2014.09.29	단독사사	
25	논문	Design and Implementation of Cloud Based Realtime Temperature and Humidity Monitoring System of Honey Bee Colony	안동대 학교		Journal of Apiculture / Korea	0.37	2015.11.30	단독사사	

제 11 장 기타사항

1. 1년차(2014)년 당초 계획 중 하나였던 ‘분봉관련 유전자군 분석을 위한 분봉 참여 꿀벌과 잔류 꿀벌 샘플링, RNA 및 단백질 시료 확보’를 2년차로 연기하였다.
2. 해당 계획을 연기한 이유는 분봉의 가능성을 보인 봉군들에서 돌연 분봉을 진행하지 않았기 때문이다(외부 환경 및 봉군 내부의 여러 복합적인 문제로 추정). 봉군 내부의 상황으로 분봉의 가능성을 어느정도 예측할 수는 있으나 인간이 온전히 조절할 수 있는 현상이 아닌 외부 환경 및 봉군 내부의 여러 복합적인 요인으로 인하여 이루어지는 자연적 현상이기 때문에 당시 발생한 돌발 상황을 미리 예측하고 준비 및 대처를 할 수 없었다.
3. 연기된 분봉 관련 꿀벌의 채집 및 채집한 꿀벌에 대한 RNA 및 단백질 시료 확보는 2년차 (2015)에 성공적으로 완수하였다.
4. 제 1 협동과제 책임자 변경

연차	항 목	당초계획	변경사항	근거문서
3년차 (2016)	세부과제 책임자	이명렬	강은진	잠사양봉소 재과-1035 (2016.4.18.)

제 12 장 참고문헌

- Robyn Lee, Samantha Baldwin, Fernand Kenel, Jhon McCallum and Richard Macknight. (2013) Flowering LOCUS T genes control onion bulb formation and flowering. *Nature Communication.* 4, 2884
- Bongki Choi, Youngjin Park and Yonggyun Kim. (2013) Suppression of gene expression in the fifth instar larvae of *Spodoptera exigua* at low development threshold temperature. *Korean J. Appl. Entomol.* 52(4), 295–304
- Seth A. Ament, Miguel Corona, Henry S. Pollock and Gene E. Robinson. (2008). Insulin signaling is involved in the regulation of worker division of labor in honey bee colonies. *PNAS.* 105–11.
- Z. Y. Huang, G. E. Robinson. (1995) Seasonal changes in juvenile hormone titers and rates of biosynthesis in honey bees. *J Comp Physiol B.* 165, 18–28
- Jeffrey W. Harris and Joseph Woodring. (1992) Effects of stress, age, season, and source colony on levels of octopamine, dopamine and serotonin in the honey bee (*Apis mellifera* L.) brain. *J. Insect Physiol.* 38, 29–35
- Yaakov Lensky, Yossi Slabekzi. (1981) The inhibiting effect of the queen bee (*Apis mellifera* L.) foor-prinr pheromone on the construction of swarming queen cups. *J. insect Physiol.* 27, 313–323
- Kenna E. Mackenzie, Mark L. Winston. (1989) Effects of sublethal exposure to diazinon on longevity and temporal division of labor in the honey bee (Hymenoptera: Apidae). *J. Econ. Entomol.* 82(1), 75–82
- Ken Naumann, Mark L. Winston, keith N. Slessor, Glenn D. Prestwich and Francis X. Webster. (1991) Production and transmission of honey bee queen (*Apis mellifera* L.) mandibular gland pheromone. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 29, 321–332
- Gary Rondeau, Francisco Sanchez-Bayo, Henk A. tennekes, Axel Decourtey, Ricardo Ramirez-Romero and Nicolas Desneux. (2014) Delayed and time-cumulative toxicity of imidacloprid in bees, ants and termites. *Sci. Rep.* 4, 5566
- Galen P. Dively, Michael S. Embrey, Alaa kamel, David J. Hawthorne and Jeffery S. Pettis. (2015) Assessment of chronic sublethal effects of imidacloprid on honey bee colony health. *Plos one.* 10(3), e0118748
- Ti-Chan Peng and En-Cjeng Yang. (2016) Sublethal dosage of imidacloprid reduces the microglomerlar density oh honey bee mushroom bodies. *Sci. Rep.* 6, 19298
- Clint J. Perry, Eirik Socik, Mary R. Myerscough and Andrew B. Barron. (2016) Rapid behavioral maturation accelerates failure of stressed honey bee colinies. *PNAS.* 112–11
- Ahn, M. R., Kumazawa, S., Hamasaka, T., Bang, K. S. and Nakayama, T. 2004. Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of Korea. *J. Agric. Food Chem.* 52: 7286–7292.
- Ahn, M. R., Kumazawa, S., Usui, Y., Nakamura, J., Matsuka, M., Zhu, F. and Nakayama,

- T. 2007. Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of China. *Food Chem.* 101: 1383–1392.
- Ali, Y. O., Escala, W., Ruan, K. and Zhai, R. G. 2011. Assaying locomotor, learning, and memory deficits in *Drosophila* models of neurodegeneration. *J. Vis. Exp.* 49: e2504.
- Aliyazicioglu, R., Sahin, H., Erturk, O., Ulusoy, E. and Kolayli, S. 2013. Properties of phenolic composition and biological activity of propolis from Turkey. *Int. J. Food Prop.* 16: 277–287.
- Almaraz-Abarca, N., Campos, M. G., Ávila-Reyes, J. A., Naranjo-Jiméneza, N., Corrala, J. H. and González-Valdeza, L. S. 2007. Antioxidant activity of polyphenolic extract of monofloral honeybee-collected pollen from mesquite (*Prosopis juliflora*, Leguminosae). *J. Food Comp. Anal.* 20: 119–124.
- Almeida-Muradiana, L. B., Pamplonaa, L. C., Coimbraa, S. and Barth, O. M. 2005. Chemical composition and botanical evaluation of dried bee pollen pellets. *J. Food Comp. Anal.* 18: 105–111.
- Anitha, T. 2012. Medicinal plants used in skin protection. *Asian J. Pharm. Clin. Res.* 5(Suppl 3): 35–38.
- Attia, Y. A., Al-Hanoun, A., El-Din, A. E., Bovera, F. and Shewika, Y. E. 2011. Effect of bee pollen levels on productive, reproductive and blood traits of NZW rabbits. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 95: 294–303.
- Augustin, S., Rimbach, G., Augustin, K., Schliebs, R., Wolffram, S. and Rainer Cermak, R. 2009. Effect of a short- and long-term treatment with *Ginkgo biloba* extract on amyloid precursor protein levels in a transgenic mouse model relevant to Alzheimer's disease. *Arch. Biochem. Biophys.* 481: 177–182.
- Azab, K. S., Bashandy, M., Salem, M., Ahmed, O., Tawfik, Z. and Helal, H. 2011. Royal jelly modulates oxidative stress and tissue injury in gamma irradiated male Wister Albino rats. *N. AM. J. Med. Sci.* 3: 268–276.
- Bahadorani, S., Bahadorani, P., Phillips, J. P. and Hilliker, A. J. 2008. The effects of vitamin supplementation on *Drosophila* life span under normoxia and under oxidative stress. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 63: 35–42.
- Bai, X., Lu, D., Bai, J., Zheng, H., Ke, Z., Li, X. and Luo, S. 2004. Oxidative stress inhibits osteoblastic differentiation of bone cells by ERK and NF- κ B. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 314: 197–207.
- Bankova, V., Dyulgerov, A., Popov, S., Evstatieva, L., Kuleva, L., Pureb, O. and Zamjansan, Z. 1992. Propolis produces in Bulgaria and Mongolia: phenolic compounds and plant origin. *Apidologie* 23: 79–85.
- Bankova, V. S., de Castro, S. L. and Marcucci, M. C. 2000. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie* 31: 3–15.
- Baptista, F. I., Henriques, A. G., Silva, A. M. S., Wiltfang, J. and da Cruz e Silva, O. A. B. 2014. Flavonoids as therapeutic compounds targeting key protein involved in Alzheimer's disease. *ACS Chem. Neurosci.* 5: 83–92.

- Barth, O. M., Freitas, A. S., Oliveira, E. S., Silva, R. A., Maester, F. M., Andrella, R. R. and Cardozo, G. M. 2010. Evaluation of the botanical origin of commercial dry bee pollen load batches using pollen analysis: a proposal for technical standardization. An. Acad. Bras. Cienc. 82: 893–902.
- Bender, K., Blattner, C., Knebel, A., Iordanov, M., Herrlich, P. and Rahmsdorf, H. J. 1997. UV-induced signal transduction. J. Photochem. Photobiol. B 37: 1–17.
- Bergamini, C. M., Gambetti, S., Dondi, A. and Cervellati, C. 2004. Oxygen, reactive oxygen species and tissue damage. Curr. Pharm. Design 10: 1611–1626.
- Birks, J. 2012. Cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease (review). The Cochrane Library, Issue 5.
- Blois, M. S. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. Nature 181: 1199–1200.
- Bogdanov, S. 2014. Royal jelly, bee brood: composition, health, medicine: a review. Bee Product Science www.bee-hexagon.net.
- Bogdanov, S., Jurendic, T., Sieber, R. and Gallmann, P. 2008. Honey for nutrition and Health: a review. J. Am. College of Nutrition 27: 677–689.
- Bollag, D. M., Rozycki, M. D. and Edelstein, S. J. 1996. Protein Methods. Wiley-Liss.
- Bonheví, J. S. and Gutiérrez, A. L. 2012. The antimicrobial effects of propolis collected in different regions in the Basque Country (Northern Spain). World J. Microbiol. Biotechnol. 28: 1351–1358.
- Boufadi, Y. M., Soubhye, J., Riazi, A., Rousseau, A., Vanhaeverbeek, M., Nève, J., Boudjeltia, K. Z. and Antwerpen, P. V. 2014. Characterization and antioxidant properties of six Algerian propolis extracts: ethyl acetate extracts inhibit myeloperoxidase activity. Int. J. Mol. Sci. 15: 2327–2345.
- Boyanova, L., Kolarov, R., Gergova, G. and Mitova, I. 2006. In vitro activity of Bulgarian propolis against 94 clinical isolates of anaerobic bacteria. Anaerobe 12: 173–177.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72: 248–254.
- Branca, C., Sarnico, I., Ruotolo, R., Lanzillotta, A., Visconti, A. R., Benarese, M., Porrini, V., Lorenzini, L., Calzà, L., Imbimbo, B. P., Ottonello, S. and Marina Pizzi, M. (2014). Pharmacological targeting of the β -amyloid precursor protein intracellular domain. Sci. Rep. 4: 4618.
- Brown, E.M. and MacLeod, R. J. 2001. Extracellular calcium sensing and extracellular calcium signaling. Physiol. Rev. 81: 239–297.
- Burdock, G. A. 1998. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). Food Chem. Toxicol. 36: 347–363.
- Burns, A. and Iliffe, S. 2009. Alzheimer's disease. BMJ 338:b158.
- Caesar, I., Jonson, M., Nilsson, K. P. R., Thor, S. and Hammarström, P. 2012. Curcumin promotes A-beta fibrillation and reduces neurotoxicity in transgenic *Drosophila*. PLoS

ONE 7: e31424.

- Calhelha, R. C., Falcão, S., Queiroz, M. J. R. P., Vilas-Boas, M. and Ferreira, I. C. F. R. 2014. Cytotoxicity of Portuguese propolis: the proximity of the in vitro doses for tumor and normal cell lines. BioMed. Res. Int. 2014: 897361.
- Campos, M. G. R., Bogdanov, S., Almeida-Muradian, L. B., Szczesna, T., Mancebo, Y., Frigerio, C. and Ferreira, F. 2008. Pollen composition and standardization of analytical methods. J. Apicult. Res. 47: 154–161.
- Carpes, S. T., Mourão, G. B., Alencar, S. M. and Masson, M. L. 2009. Chemical composition and free radical scavenging activity of *Apis mellifera* bee pollen from Southern Brazil. Braz. J. Food Technol. 12: 220–229.
- Carvalho, G. B., Kapahi, P. and Benzer, S. 2005. Compensatory ingestion upon dietary restriction in *Drosophila melanogaster*. Nat. Methods 2: 813–815.
- Chakraborty, R., Vepuri1, V., Mhatre, S. D., Paddock, B. E., Miller, S., Michelson, S. J., Delvadia, R., Desai, A., Vinokur, M., Melicharek, D. J., Utreja, S., Khandelwal, P., Ansaloni, S., Goldstein, L. E., Moir, R. D., Lee, J. C., Tabb, L. P., Saunders, A. J., Marenda, D. R. 2011. Characterization of a *Drosophila* Alzheimer's disease model: pharmacological rescue of cognitive defects. PLoS ONE 6: e20799.
- Chan, G.C., Cheung, K.W. and Sze, D.M. 2013. The immunomodulatory and anticancer properties of propolis. Clin. Rev. Allergy Immunol. 44: 262–273.
- Chen, Y., Zhou, K., Wang, R., Liu, Y., Kwak, Y. D., Ma, T., Thompson, R. C., Zhao, Y., Smith, L., Gasparini, L., Luo, Z., Xu, H. and Liao, F. F. 2009. Antidiabetic drug metformin (GlucophageR) increases biogenesis of Alzheimer's amyloid peptides via up-regulating BACE1 transcription. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 106: 3907–3912.
- Choi, Y. H., Yon, G. H., Hong, K. S., Yoo, D. S., Choi, C. W., Park, W. K., Kong, J. Y., Kim, Y. S. and Ryu, S. Y. 2008. *In vitro* BACE-1 inhibitory phenolic components from the seeds of *Psoralea corylifolia*. Planta Med. 74: 1405–1408.
- Choi, C. W., Choi, Y. H., Cha, M. R., Kim, Y. S., Yon, G. H., Hong, K. S., Park, W. K., Kim, Y. H. and Ryu, S. Y. 2011. *In vitro* BACE1 inhibitory activity of resveratrol oligomers from the seed extract of *Paeonia lactiflora*. Planta Med. 77: 374–376.
- Cholbi, M. R., Paya, M. and Alcaraz, M. J. 1991. Inhibitory effects of phenolic compounds on CCl₄-induced microsomal lipid peroxidation. Experientia 47: 195–199.
- Cole, S. L. and Vassar, R. 2007. The Alzheimer's disease β -secretase enzyme, BACE 1. Mol. Neurodegener. 2: 22.
- Čolović, M. B., Krstić, D. Z., Lazarević-Pašti, T. D., Bondžić, A. M., Vasić, V. M. 2013. Acetylcholinesterase inhibitors: pharmacology and toxicology. Curr. Neuropharmacol. 11: 315–335.
- Cox, C. J., Choudhry, F., Peacey, E., Perkinton, M. S., Richardson, J. C., Howlett, D. R., Lichtenthaler, S. F., Francis, P. T. and Robert J. Williams, R. J. 2015. Dietary (-)-epicatechin as a potent inhibitor of $\beta\gamma$ -secretase amyloid precursor protein processing. Neurobiol. Aging 36: 178–187.

- Crenguța, I. P., Liviu, A. I. M., Otilia, B., Daniel, S., D., Agripina, Ş., Ion, R. and Mariana, N. M. 2011. Biological activities of royal jelly – review. *Anim. Sci. Biotech.* 44: 108–118.
- Crowther, D. C., Kinghorn, K. J., Miranda, E., Page, R., Curry, J. A., Duthie, F. A. I., Gubb, D. C. and LOMAS, D. A. 2005. Intraneuronal A β , non-amyloid aggregates and neurodegeneration in a *Drosophila* model of Alzheimer's disease. *Neuroscience* 132: 123–135.
- da Graça Miguel, M., Doughmi, O., Aazza, S., Antunes, D. and Lyoussi, B. 2014. Antioxidant, anti-inflammatory and acetylcholinesterase inhibitory activities of propolis from different regions of Morocco. *Food Sci. Biotechnol.* 23: 313–322.
- da Silva, J. F. M., de Souza, M. C., Matta, S. R., de Andrade, M. R. and Vidal, F. V. N. 2006. Correlation analysis between phenolic levels of Brazilian propolis extracts and their antimicrobial and antioxidant activities. *Food Chem.* 99: 431–435.
- Dam, N. P., Dung, T. D., Van Long, L. H. and Phi Phung, N. K. 2010. Four triterpenoids from *Hedyotis tenelliflora* (Rubiaceae) growing in Vietnam. *J. Chem.* 48(4B): 250–254.
- Danysz, W. and Parsons, C. G. 2012. Alzheimer's disease, β -amyloid, glutamate, NMDA receptors and memantine – searching for the connections. *Br. J. Pharmacol.* 167: 324–352.
- Davey, R. W. and Grange, J. M. 1990. Antibacterial properties of propolis (bee glue). *J. R. Soc. Med.* 83: 159–161.
- Deshpande, S. A., Carvalho, G. B., Amador, A., M. Phillips, A. M., Hoxha, S., Keith J. Lizotte, K. J. and Ja, W. W. 2014. Quantifying *Drosophila* food intake: comparative analysis of current methodology. *Nat. Methods* 11: 535–540.
- De Strooper, B., Vassar, R. and Golde, T. 2010. The secretases: enzymes with therapeutic potential in Alzheimer disease. *Nat. Rev. Neurol.* 6: 99–107.
- Dettner, K. 2011. Potential pharmaceuticals from insects and their co-occurring microorganisms. In: Vilcinskas, A. (ed.) *Insect Biotechnology*, vol. 2, Springer, New York, pp. 95–119.
- Devasagayam, T. P. A., Tilak, J. C., Boloor, K. K., Sane, K. S., Ghaskadbi, S. S. and Lele, R. D. 2004. Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. *J. Assoc. Physicians India* 52: 794–804.
- Dunn, B. E., Cohen, H. and Blaser, M. J. 1997. *Helicobacter pylori*. *Clin. Microbiol. Rev.* 10: 720–741.
- Dvorak, M. M. and Riccardi, D. 2004. Ca $^{2+}$ as an extracellular signal in bone. *Cell Calcium* 35: 249–255.
- Dvorak-Ewell, M. M., Chen, T. H., Liang, N., Garvey, C., Liu, B., Tu, C., Chang, W., Bikle, D. D., Shoback, D. M. 2011. Osteoblast extracellular Ca $^{2+}$ -sensing receptor regulates bone development, mineralization, and turnover. *J. Bone Miner. Res.* 26: 2935–2947.
- Fabry, W., Okemo, P. and Ansborg, R. 1996. Activity of East African medicinal plants against *Helicobacter pylori*. *Chemotherapy* 42: 315–317.
- Faria, A., Meireles, M., Fernandes, I., Santos-Buelga, C., Gonzalez-Manzano, S., Duenas,

- M., de Freitas, V., Mateus, N., Conceicao Calhau, C. 2014. Flavonoid metabolites transport across a human BBB model. *Food Chem.* 149: 190–196.
- Farooqui, T. and Farooqui, A. A. 2010. Molecular mechanism underlying the therapeutic activities of propolis: a critical review. *Curr. Nutr. Food Sci.* 6: 186–199.
- Feás, X., Vázquez-Tato, M. P., Estevinho, L., Seijas, J. A., Iglesias, A. 2012. Organic bee pollen: botanical origin, nutritional value, bioactive compounds, antioxidant activity and microbiological quality. *Molecules* 17: 8359–8377.
- Filaire, E. and Toumi, H. 2012. Reactive oxygen species and exercise on bone metabolism: Friend or enemy? *Joint Bone Spine* 79: 341–346.
- Freire, K. R. L., Lins, A. C. S., Dórea, M. C., Santos, F. A. R., Camara, C. A. and Silva, T. M. S. 2012. Palynological origin, phenolic content, and antioxidant properties of honeybee-collected pollen from Bahia, Brazil. *Molecules* 17: 1652–1664.
- Frion-Herrera, Y., Diaz-Garcia, A., Rodríguez-Sánchez, H., Ruiz-Fuentes, J., Monzote-Fidalgo, L., Morier-Diaz, L. and Setzer, W. N. 2013. Cytotoxic effect of Cuban propolis extracts against tumor cells lines. *American Journal of Essential Oils and Natural Products* 1: 112–117.
- Fujimoto, T., Nakamura, J. and Matsuka, M. Diversity of propolis. Part 1. Propolis from the world. *Honeybee Sci.* 2001, 22, 9–16 (in Japanese).
- Gangwal, A., Parmar, S. K. and Sheth, N. R. 2010. Triterpenoid, flavonoids and sterols from *Lagenaria siceraria* fruits. *Der Pharmacia Lettre* 2: 307–317.
- Ghosh, A. K., Gemma, S. and Tang, J. 2008. beta-Secretase as a therapeutic target for Alzheimer's disease. *Neurotherapeutics* 5: 399–408.
- Graikou, K., Kapeta, S., Aligiannis, N., Sotirodis, G., Chondrogianni, N., Gonos, E. and Chinou, I. 2011. Chemical analysis of Greek pollen – antioxidant, antimicrobial and proteasome activation properties. *Chem Cent J.* 5: 33.
- Greeve, I., Kretzschmar, D., Tschäpe, J. A., Beyn, A., Brellinger, C., Schweizer, M., Nitsch, R. M. and Reifegerste, R. 2004. Age-dependent neurodegeneration and Alzheimer-amyloid plaque formation in transgenic *Drosophila*. *J. Neurosci.* 24: 3899–3906.
- Groth, C., Alvord, W. G., Quiñones, O. A. and Fortini, M. E. 2010. Pharmacological analysis of *Drosophila melanogaster* γ -secretase with respect to differential proteolysis of Notch and APP. *Mol. Pharmacol.* 77: 567–574.
- Guarner, F. and Malagelada, J. R. 2003. Gut flora in health and disease. *Lancet* 361: 512–519.
- Guilfoile, P. G. and Alcamo, I. E. 2007. Antibiotic-Resistant Bacteria. Infobase Publishing, New York.
- Haass, C. 2004. Take five—BACE and the gamma-secretase quartet conduct Alzheimer's amyloid beta-peptide generation. *EMBO J.* 23: 483–488.
- Hamasaka, T., Kumazawa, S., Fujimoto, T. and Nakayama, T. 2004. Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of Japan. *Food Sci. Technol. Res.*

- 10: 86–92.
- Hanssen, M. 1979. The Healing Power of Pollen and Other Products from the Beehive, Propolis, Royal Jelly, Honey. Thorsons, Wellingborough, Northamptonshire.
- Hardy, J. and Selkoe, D. J. 2002. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297: 353–356.
- Hartman, H. and Hayes, T. L. 1971. Scanning electron microscopy of *Drosophila*. *J. Hered.* 62: 41–44.
- Heck, D. E., Vetrano, A. M., Mariano, T. M. and Laskin, J. D. 2003. UVB light stimulates production of reactive oxygen species: unexpected role of catalase. *J. Biol. Chem.* 278: 22432–22436.
- Hessle, L., Johnson, K. A., Anderson, H. C., Narisawa, S., Sali, A., Goding, J. W., Terkeltaub, R. and Milla, J. L. 2002. Tissue–nonspecific alkaline phosphatase and plasma cell membrane glycoprotein-1 are central antagonistic regulators of bone mineralization. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 99: 9445–9449.
- Hossain, M. A. and Ismail, Z. 2013. Isolation and characterization of triterpenes from the leaves of *Orthosiphon stamineus*. *Arabian J. Chem.* 6: 295–298.
- Howes, M. J. and Perry, E. 2011. The role of phytochemicals in the treatment and prevention of dementia. *Drugs Aging* 28: 439–468.
- Isla, M. I., Zampini, I. C., Ordóñez, R. M., Cuello, S., Juárez, B. C., Sayago, J. E., Moreno, M. I., Alberto, M. R., Vera, N. R., Bedascarrasbure, E., Alvarez, A., Cioccini, F. and Maldonado, L. M. 2009. Effect of seasonal variations and collection form on antioxidant activity of propolis from San Juan, Argentina. *J. Med. Food* 12: 1334–1342.
- Ivannikov, M.V., Sugimori, M. and Llinás, R.R. 2013. Synaptic vesicle exocytosis in hippocampal synaptosomes correlates directly with total mitochondrial volume. *J. Mol. Neurosci.* 49: 223–230.
- Jäger, A. K. and Saaby, L. 2011. Flavonoids and the CNS. *Molecules* 16: 1471–1485.
- Jeon, S. Y., Bae, K., Seong, Y. H. and Song, K. S. 2003. Green tea catechins as a BACE1 (β -secretase) inhibitor. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 13: 3905–3908.
- John, V. 2006. Human beta-secretase (BACE) and BACE inhibitors: progress report. *Curr. Top. Med. Chem.* 6: 569–578.
- Jun, J. H., Lee, S. H., Kwak, H. B., Lee, Z. H., Seo, S. B., Woo, K. M., Ryoo, H. M., Kim, G. S. and Baek, J. H. 2008. *N*-acetylcysteine stimulates osteoblastic differentiation of mouse calvarial cells. *J. Cell. Biochem.* 103: 1246–1255.
- Jung, H. A., Min, B. S., Yokozawa, T., Lee, J. H., Kim, Y. S. and Choi, J. S. 2009a. Anti-Alzheimer and antioxidant activities of *Coptidis Rhizoma* alkaloids. *Biol. Pharm. Bull.* 32: 1433–1438.
- Jung, H. A., Lee, E. J., Kim, J. S., Kang, S. S., Lee, J. H., Min, B. S. and Choi, J. S. 2009b. Cholinesterase and BACE1 inhibitory diterpenoids from *Aralia cordata*. *Arch. Pharm. Res.* 32: 1399–1408.
- Jung, H. A., Yokozawa, T., Kim, B. W., Jung, J. H. and Choi, J. S. 2010. Selective

- inhibition of prenylated flavonoids from *Sophora flavescens* against BACE1 and cholinesterases. AM. J. Chin. Med. 38: 415–429.
- Jung, J. I., Premraj, S., Cruz, P. E., Ladd, T. B., Kwak, Y., Koo, E. H., Felsenstein, K. M., Golde, T. E. and Ran, Y. 2014. Independent relationship between amyloid precursor protein (APP) dimerization and γ -secretase processivity. PLoS ONE 9: e111553.
- Kalogeropoulos, N., Konteles, S. J., Troullidou, E., Mourtzinos, I. and Karathanos, V. 2009. Chemical composition, antioxidant activity and antimicrobial properties of propolis extract from Greece and Cyprus. Food Chem. 116: 452–461.
- Kamakura, M. 2011. Royalactin induces queen differentiation in honeybees. Nature 473: 478–483.
- Kamakura, M., Fukuda, T., Fukushima, M. and Yonekura, M. Storage-dependent degradation of 57-kDa protein in royal jelly: a possible marker for freshness. Biosci. Biotechnol. Biochem. 2001. 65: 277–284.
- Karran, E., Mercken, M. and De Strooper, B. 2011. The amyloid cascade hypothesis for Alzheimer's disease: an appraisal for the development of therapeutics. Nat. Rev. Drug Discov. 10: 698–712.
- Kaškonienė V, Ruočkuvienė G, Kaškonas P., Akuneca, I. and Audrius Maruška, A. 2015. Chemometric analysis of bee pollen based on volatile and phenolic compound compositions and antioxidant properties. Food Anal. Method. 8: 1150–1163.
- Kim, H. G., Ju, M. S., Ha, S. K., Lee, H., Lee, H., Kim, S. Y. and Oh, M. S. 2012. Acacetin protects dopaminergic cells against 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced neuroinflammation *in vitro* and *in vivo*. Biol. Pharm. Bull. 35: 1287–1294.
- Komosinska-Vassev, K., Olczyk, P., Kaźmierczak, J., Mencner, L. and Olczyk, K. 2015. Bee pollen: chemical composition and therapeutic application. Evid. Based Complement. Alternat. Med. 2015: 297425.
- Kouidhi, B., Zmantar, T. and Bakhrouf, A. 2010. Anti-cariogenic and anti-biofilms activity of Tunisian propolis extract and its potential protective effect against cancer cells proliferation. Anaerobe 16: 566–571.
- Kroyer, G. and Hegedus, N. 2001. Evaluation of bioactive properties of pollen extracts as functional dietary food supplement. Innov. Food Sci. Emerg. Technol. 2: 171–174.
- Kumar, S. and Pandey, A. K. 2013. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. Scientific World J. 2013: 162750.
- Kustiawan, P. M., Puthong, S., Arung, E. T. and Chanchao, C. 2014. In vitro cytotoxicity of Indonesian stingless bee products against human cancer cell lines. Asian Pac J Trop Biomed. 4: 549–556.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680– 685.
- Lagouri, V., Prasianaki, D. and Krysta, F. 2014. III: Antioxidant properties and phenolic composition of Greek propolis extracts. Int. J..Food Prop. 17:511–522.

- Laskar, R. A., Ismail, S. K., Roy, N. and Begum, N. A. 2010. Antioxidant activity of Indian propolis and its chemical constituents. *Food Chem.* 122: 233–237.
- Leaf, A. 1993. Loss of stratospheric ozone and health effects of increased ultraviolet radiation. In: Chivian, E., McCally, M., Hu, H., Haines, A. (eds.) *Critical Condition: Human Health and Environment*. MIT Press, Cambridge, pp. 139–150.
- Lee, K. H., Kim, A. J. and Choi, E. M. 2009. Antioxidant and antiinflammatory activity of pine pollen extract in vitro. *Phytother. Res.* 23: 41–48.
- Lemaitre, B., Meister, M., Govind, S., George, P., Steward, R., Reichhart, J. M. and Hoffmann, J. A. 1995. Functional analysis and regulation of nuclear import of *dorsal* during the immune response in *Drosophila*. *EMBO J.* 14: 536–545.
- Li, H., Kapur, A., Yang, J. X., Srivastava, S., McLeod, D. G., Paredes-Guzman, J. F., Daugsch, A., Park, Y. K. and Rhim, J. S. 2007. Antiproliferation of human prostate cancer cells by ethanolic extracts of Brazilian propolis and its botanical origin. *Int. J. Oncol.* 31: 601–606.
- Liebscher, S., Meyer-Luehmann, M. 2012. A peephole into the brain: neuropathological features of Alzheimer's disease revealed by in vivo two-photon imaging. *Front. Psychiatry* 3: 26.
- Lima, B., Tapia, A., Luna, L., Fabani, M. P., Schmeda-Hirschmann, G., Podio, N. S., Wunderlin, D. A. and Feresin, G. E. 2009. Main flavonoids, DPPH activity and metal content allow determination of the geographical origin of propolis from the province of San Juan (Argentina). *J. Agric. Food Chem.* 57: 2691–2698.
- Lin, T. Y., Huang, W. J., Wu, C. C., Lu, C. W. and Wang, S. J. 2014. Acacetin inhibits glutamate release and prevents kainic acid-induced neurotoxicity in rats. *PLoS ONE* 9: e88644.
- Lv, L., Yang, Q. Y., Zhao, Y., Yao, C. S., Sun, Y., Yang, E. J., Song K. S., Mook-Jung, I. and Fang, W. S. 2008. BACE1 (beta-secretase) inhibitory chromone glycosides from *Aloe vera* and *Aloe nobilis*. *Planta Med.* 74: 540–545.
- MacDonald, G. J. Overview of global atmospheric change. In: White, J. C., Wagner, W., Beal, C. N. (eds.) *Global Atmospheric Change and Public Health*. Elsevier, New York, pp. 1–21.
- Magnusson, P., Larsson, L., Englund, G., Larsson, B., Strang, P. and Selin-Sjögren, L. 1998. Differences of bone alkaline phosphatase isoforms in metastatic bone disease and discrepant effects of clodronate on different skeletal sites indicated by the location of pain. *Clin. Chem.* 44: 1621–1628.
- Mancini, F., De Simone, A. and Andrisano, V. 2011. Beta-secretase as a target for Alzheimer's disease drug discovery: an overview of in vitro methods for characterization of inhibitors. *Anal. Bioanal. Chem.* 400: 1979–1996.
- Marcucci, M. C. 1995. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie* 26: 83–99.
- Mărgăoan, R., Zăhan, M., Mărghitaş, L. A., Dezmirean, D. S., Erler, S. and Bobiş, O. 2016.

- Antiproliferative activity and apoptotic effects of *Filipendula ulmaria* pollen against C26 mice colon tumor cells. *J. Apicul. Sci.* 60: 135–144.
- Marumoto, S. and Miyazawa, M. 2010. β -secretase inhibitory effects of furanocoumarins from the root of *Angelica dahurica*. *Phytother. Res.* 24: 510–513.
- Masaki, K., Toshiyuki, F., Makoto, F. and Masami, Y. 2001. Storage-dependent degradation of 57-kDa protein in royal jelly: a possible marker for freshness. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65: 277–284.
- McBride, H. M., Neuspiel, M. and Wasiak, S. 2006. Mitochondria: more than just a powerhouse. *Curr. Biol.* 16: R551–R560.
- McGeer, E. G. and McGeer, P. L. 1998. The importance of inflammatory mechanisms in Alzheimer disease. *Exp. Gerontol.* 33: 371–378.
- McGleenon, B. M., Dynan, K. B. and Passmore, A. P. 1999. Acetylcholinesterase inhibitors in Alzheimer's disease. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 48: 471–480.
- Min, K. J. and Tatar, M. 2006. *Drosophila* diet restriction in practice: do flies consume fewer nutrients? *Mech. Ageing Dev.* 127: 93–96.
- Miyazawa, M. and Hisama, M. 2003. Antimutagenic activity of flavonoids from *Chrysanthemum morifolium*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67: 2091–2099.
- Molan, P. C. 1992a. The antibacterial activity of honey. 1. The nature of the antibacterial activity. *Bee World* 73: 5–28.
- Molan, P. C. 1992b. The antibacterial activity of honey. 2. Variation in the potency of the antibacterial activity. *Bee World* 73: 59–76.
- Molan, P. 2001. Why honey is effective as a medicine. 2. The scientific explanation of its effects. *Bee World* 82: 22–40.
- Molinuevo, J. L., Lladó, A. and Rami, L. 2005. Memantine: targeting glutamate excitotoxicity in Alzheimer's disease and other dementias. *Am. J. Alzheimers Dis. Other Demen.* 20: 77–85.
- Morais, M., Moreiraa, L., Feásb, X. and Estevinho, L. M. 2011. Honeybee-collected pollen from five Portuguese Natural Parks: palynological origin, phenolic content, antioxidant properties and antimicrobial activity. *Food Chem. Toxicol.* 49: 1096–1101.
- Moreira, L., Dias, L. G., Pereira, J. A. and Estevinho, L. 2008. Antioxidant properties, total phenols and pollen analysis of propolis samples from Portugal. *Food Chem. Toxicol.* 46: 3482–3485.
- Moreno, M. I. N., Isla, M. I., Cudmani, N. G., Vattuone, M. A. and Sampietro, A. R. 1999. Screening of antibacterial activity of Amaicha del Valle (Tucumán, Argentina) propolis. *J. Ethnopharmacol.* 68: 97–102.
- Morgan, D. M. L. 1998. Tetrazolium (MTT) assay for cellular viability and activity. *Methods Mol. Biol.* 79: 179–183.
- Mukherjee, P. K., Kumar, V., Mal, M. and Houghton, P. J. 2007. Acetylcholinesterase inhibitors from plants. *Phytomedicine* 14: 289–300.
- Ngan, L. T. M., Moon, J. K., Kim, J. H., Shibamoto, T. and Ahn, Y. J. 2012.

- Growth-inhibiting effects of *Paeonia lactiflora* root steam distillate constituents and structurally related compounds on human intestinal bacteria. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 28: 1575–1583.
- Ngan, L. T. M., Jang, M. J., Kwon, M. J. and Ahn, Y. J. 2015. Antiviral activity and possible mechanism of action of constituents identified in *Paeonia lactiflora* root toward human rhinoviruses. *PLoS ONE* 10(4): e0121629.
- Nijveldt, R. J., van Nood, E., van Hoorn, D. E. C., Boelens, P. G., van Norren, K. and van Leeuwen, P. A. M. 2001. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am. J. Clin. Nutr.* 74: 418–425.
- Nishina, A., Kimura, H., Tsukagoshi, H., Kozawa, K., Koketsu, M., Ninomiya, M. and Furukawa, S. 2013. Neurite outgrowth in PC12 cells stimulated by components from *Dendranthema × grandiflorum* cv. "Mottenohoka" is enhanced by suppressing phosphorylation of p38MAPK. *Evid. Based Complement Alternat. Med.* 2013: 403503.
- Omar, W. A. W., Azhar, N. A., Fadzilah, N. H., Kamal, N. N. S. N. M. 2016. Bee pollen extract of Malaysian stingless bee enhances the effect of cisplatin on breast cancer cell lines. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 6: 265–269.
- Orhan, I. E. 2012. Current concepts on selected plant secondary metabolites with promising inhibitory effects against enzymes linked to Alzheimer's disease. *Curr. Med. Chem.* 19: 2252–2261.
- Orhan, I., Karta, M., Tosun, F. and Sener, B. 2007. Screening of various phenolic acids and flavonoid derivatives for their anticholinesterase potential. *Z. Naturforsch. C Bio. Sci.* 62: 829–832.
- Orrenius, S., Gogvadze, V. and Zhivotovsky, B. 2007. Mitochondrial oxidative stress: implications for cell death. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 47: 143–183.
- Otera, H., Naotada, Ishihara, N. and Mihara, K. 2013. New insights into the function and regulation of mitochondrial fission. *Biochim. Biophys. Acta* 1833: 1256–1268.
- Pan, M. H., Lai, C. S., Wang, Y. J. and Ho, C. T. 2006. Acacetin suppressed LPS-induced up-expression of iNOS and COX-2 in murine macrophages and TPA-induced tumor promotion in mice. *Biochem. Pharmacol.* 72: 1293–1303.
- Paris, D., Mathura, V., Ait-Ghezala, G., Beaulieu-Abdelahad, D., Patel, N., Bachmeier, C., Mullan, M. 2011. Flavonoids lower Alzheimer's A β production via an NF κ B dependent mechanism. *Bioinformation* 6: 229–236.
- Park, Y. K., Ikegaki, M., Alencar, S. M. and Moura, F. F. 2000. Evaluation of Brazilian propolis by both physicochemical methods and biological activity. *Honeybee Sci* 21: 85–90.
- Pérez-Pérez, E. M., Vit, P., Rivas, E., Sciortino, R., Sosa, A., Tejada, D. and Rodríguez-Malaver, A. J. 2012. Antioxidant activity of four color fractions of bee pollen from Mérida, Venezuela. *Arch. Latinoam. Nutr.* 62: 375–380.
- Perumalsamy, H., Kim, J. R., Oh, S. M., Jung, J. W., Ahn, Y. J. and Kwon, H. W. 2013. Novel histopathological and molecular effects of natural compound pellitorine on larval

- midgut epithelium and anal gills of *Aedes aegypti*. PLoS ONE 8: e80226.
- Phelps, C. B. and Brand, A. H. 1998. Ectopic gene expression in *Drosophila* using GAL4 system. Methods 14: 367–379.
- Pongcharoen, S., Warnnissorn, P., Lertkajornsin, O., Limpeanchob, N. and Sutheerawattananonda, M. 2013. Protective effect of silk lutein on ultraviolet B-irradiated human keratinocytes. Biol. Res. 46: 39–45.
- Popolo, A., Piccinelli, L. A., Morello, S., Cuesta-Rubio, O., Sorrentino, R., Rastrelli, L. and Pinto, A. 2009. Antiproliferative activity of brown Cuban propolis extract on human breast cancer cells. Nat. Prod. Commun. 4: 1711–1716.
- Prince, M. and Jackson, J. 2009. World Alzheimer Report 2009. Alzheimer's Disease International.
- Prüßing, K., Voigt, A. and Schulz, J. B. 2013. *Drosophila melanogaster* as a model organism for Alzheimer's disease. Mol. Neurodegener. 8: 35.
- Ramadana,, M.F. and Al-Ghamdib, A. 2012. Bioactive compounds and health-promoting properties of royal jelly: a review. J. Funct. Foods 4: 39–52.
- Raskin, I., Ribnicky, D.M., Komarnyts, S., Ilic, N., Poulev, A., Borisjuk, N., Brinker, A., Moreno, D.A., Ripoll, C., Yakoby, N., O'Neal, J.M., Cornwell, T., Pastor, I. and Fridlender, B. 2002. Plants and human health in the twenty-first century. Trends Biotechnol. 20: 522–531.
- Rass, K. and Reichrath, J. 2008. UV damage and DNA repair in malignant melanoma and nonmelanoma skin cancer. In: Reichrath, J. (ed.) Sunlight, Vitamin D and Skin Cancer. Landers Bioscience/Springer Science+Business Media, New York, pp. 162–178. [Cohen IR, Lajtha NSA, Paoletti R, Lambris JD (Series Editors): Advances in Experimental Medicine and Biology, vol 624.]
- Rastogi, R. P., Richa, Kumar, A., Tyagi, M. B. and Sinha, R. P. 2010. Molecular mechanisms of ultraviolet radiation-induced DNA damage and repair. J. Nucleic Acids 2010: 592980.
- Rates, S. M. K. 2001. Plants as source of drugs. Toxicon 39: 603–613.
- Rebiai, A. and Lanez, T. 2012. Chemical composition and antioxidant activity of *Apis mellifera* bee pollen from northwest Algeria. J. Fundam. Appl. Sci. 4: 155–163.
- Rebiai, A. and Lanez, T. 2013. A facile electrochemical analysis to determine antioxidant activity of bee pollen. Int. Lett. Chem. Phys. Astron. 9: 31–38.
- Ren, C., Finkel, S. E. and Tower, J. 2009. Conditional inhibition of autophagy genes in adult *Drosophila* impairs immunity without compromising longevity. Exp. Gerontol. 44: 228–235.
- Rodan, S. B., Imai, Y., Thiede, M. A., Wesolowski, G., Thompson, D., Bar-Shavit, Z., Shull, S., Mann, K., Rodan, G. A. 1987. Characterization of a human osteosarcoma cell line (Saos-2) with osteoblastic properties. Cancer Res. 47: 4961–4966.
- Rosette, C. and Karin, M. 1996. Ultraviolet light and osmotic stress: activation of the JNK cascade through multiple growth factor and cytokine receptors. Science 15: 1194–1197.

- Rustico, S. E., Calabria, A. C. and Garber, S. J. 2014. Metabolic bone disease of prematurity. *J. Clin. Transl. Endocrinol.* 1: 85–91.
- Salatino, A., Fernandes-Silva, C. C., Righi, A. A. and Salatino, M. L. F. 2011. Propolis research and the chemistry of plant products. *Nat. Prod. Rep.* 28: 925–936.
- Salucci, S., Burattini, S., Battistelli, M., Baldassarri, V., Maltarello, M.C. and Falcieri1, E. 2013. Ultraviolet B (UVB) irradiation-induced apoptosis in various cell lineages *in vitro*. *Int. J. Mol. Sci.* 14: 532–546.
- Sarker, S. D., Nahar, L. and Kumarasamy, Y. 2007. Microtitre plate-based antimicrobial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the *in vitro* antibacterial screening of phytochemicals. *Methods* 42: 321–324.
- Schmidt, E. M., Stock, D., Chada, F. J. G., Finger, D., Sawaya, A. C. H. F., Eberlin, M. N., Felsner, M. L., Quináia, S. P., Monteiro, M. C. and Torres, Y. R. 2014. A comparison between characterization and biological properties of Brazilian fresh and aged propolis. *BioMed. Res. Int.* 2014: 257617.
- Schwarz, T. 1998. UV light affects cell membrane and cytoplasmic targets. *J. Photochem. Photobiol. B* 44: 91–96.
- Sears, C. L. 2005. A dynamic partnership: celebrating our gut flora. *Anaerobe* 11: 247–251.
- Sforcin, J. M. and Bankova, V. 2011. Propolis: is there a potential for the development of new drugs? *J. Ethnopharmacol.* 133: 253–260.
- Shaalan, E. A. S., Canyon, D., Younes, M. W. F., Abdel Wahab, H. and Mansour, A. H. 2005. A review of botanical phytochemicals with mosquitocidal potential. *Environ. Int.* 31: 1149–1166.
- Shen, K. H., Hung, S. H., Yin, L. T., Huang, C. S., Chao, C. H., Liu, C. L. and Yuan-Wei Shih, Y. W. 2010. Acacetin, a flavonoid, inhibits the invasion and migration of human prostate cancer DU145 cells via inactivation of the p38 MAPK signaling pathway. *Mol. Cell. Biochem.* 333: 279–291.
- Shimmyo, Y., Kihara, T., Akaike, A., Niidome, T. and Sugimoto, H. 2008. Flavonols and flavones as BACE-1 inhibitors: structure–activity relationship in cell-free, cell-based and *in silico* studies reveal novel pharmacophore features. *Biochim. Biophys. Acta* 1780: 819–825.
- Shubharani, R., Roopa, P. and Sivaram, V. 2013. Pollen morphology of selected bee forage plants. *Global Journal of Bio-Science and Biotechnology* 2: 82–90.
- Shubharani, R., Sivaram, V. and Kishore, B. R. 2014. In-vitro cytotoxicity of Indian bee propolis on cancer cell lines. *Int. J. Pharm. Bio. Sci.* 5: 698–706.
- Socha, R., Gałkowska, D., Bugaj, M. and Juszczak, L. 2015. Phenolic composition and antioxidant activity of propolis from various regions of Poland. *Nat. Prod. Res.* 29: 416–422.
- Suh, Y. H. and Checler, F. 2002. Amyloid precursor protein, presenilins, and alpha-synuclein: molecular pathogenesis and pharmacological applications in Alzheimer's disease. *Pharmacol. Rev.* 54: 469–525.

- Sukumar, K., Perich, M. J. and Boobar, L. 1991. Botanical derivatives in mosquito control: a review. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 7: 210–237.
- Svobodová, A., Psotová, J. and Walterová, D. 2003. Natural phenolics in the prevention of UV-induced skin damage: a review. *Biomed. Papers* 147: 137–145.
- Syamsudin, Wiryowidagdo, S., Simanjuntak, P. and Heffen, W. L. 2009. Chemical composition of propolis from different regions in Java and their cytotoxic activity. *Am. J. Biochem. Biotechnol.* 5: 180–183.
- Syamsudin, Simanjuntak, P., Djamil, R. and Heffen, W. L. 2010 Apoptosis of human breast cancer cells induced by ethylacetate extracts of propolis. *Am. J. Biochem. Biotechnol.* 6: 84–88.
- Takasi-Kikuni, N. B. and Schilcher, H. 1994. Electron microscopic and microcalorimetric investigations of the possible mechanism of the antibacterial action of propolis povenance. *Planta Med.* 60: 222–227.
- Tamura, T., Sone, M, Iwatsubo, T., Tagawa, K., Wanker, E. E. and Okazawa, H. 2011. Ku70 alleviates neurodegeneration in Drosophila models of Huntington's disease. *PLoS ONE* 6: e27408.
- Tanaka, J. C. A., Vidotti, G. J. and da Silva, C. C. 2003. A new tormentic acid derivative from Luehea divaricata Mart. (Tiliaceae). *J. Braz. Chem. Soc.* 14: 475–478.
- Tang, W. and Eisenbrand, G. 1992. Chinese Drugs of Plant Origin. Springer, NewYork, 1056 pp.
- Thirugnanasampandan, R., Raveendran, S. B. and Jayakumar, R. 2012. Analysis of chemical composition and bioactive property evaluation of Indian propolis. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 2: 651–654.
- Tomás-Barberán, F. A., García-Viguera, C., Vit-Olivier, P., Ferreres, F. and Tomás-Lorente, F. 1993. Phytochemical evidence for the botanical origin of tropical propolis from Venezuela. *Phytochemistry* 34: 191–196.
- Thompson, S., Lanctôt, K. L. and Herrmann, N. 2004. The benefits and risks associated with cholinesterase inhibitor therapy in Alzheimer's disease. *Expert Opin. Saf.* 3: 425–440.
- Thompson, L. A., Bronson, J. J. and Zusi, F. C. 2005. Progress in the discovery of BACE inhibitors. *Curr. Pharm. Des.* 11: 3383–3404.
- Tian, Y., Bassit, B., Chau, D. and Li, Y. M. 2010. An APP inhibitory domain containing the Flemish mutation residue modulates γ-secretase activity for Aβ production. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 17: 151–158.
- Tobiska, W.K., Nusinov, A.A. Status of ISO Draft International Standard for Determining Solar Irradiances (DIS 21348) [http://spacewx.net/pdf/CO1_0014_04.pdf]Ugur, A., Barlas, M., Ceyhan, N. and Turkmen, V. 2000. Antimicrobial effects of propolis extracts on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* strains resistant to various antibiotics and some microorganisms. *J. Med. Food* 3: 173–180.
- Ugur, A. & Arslan, T. 2004. An *in vitro* study on antimicrobial activity of propolis from

- Mugla Province of Turkey. J. Med. Food 7: 90–94.
- Utsuki, T., Yu, Q., Davidson, D., Chen, D., Holloway, H. W., Brossi, A., Sambamurti, K., Lahiri, D. K., Greig, N. H. and Giordano, T. 2006. Identification of novel small molecule inhibitors of amyloid precursor protein synthesis as a route to lower Alzheimer's disease amyloid-beta peptide. J. Pharmacol. Exp. Ther. 318: 855–862.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T. D., Mazur, M. and Telser, J. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. Int. J. Biochem. Cell. Biol. 39: 44–84.
- Vassar, R. 2014. BACE1 inhibitor drugs in clinical trials for Alzheimer's disease. Alzheimers Res. Ther. 6: 89.
- Vatansever, H. S., Sorkun, K., Gurhan, S. I. D., Ozdal-Kurt, F., Turkoz, E., Gencay, O. and Salih, B. 2010. Propolis from Turkey induces apoptosis through activating caspases in human breast carcinoma cell lines. Acta Histochem. 112: 546–556.
- Vichai, V. and Kirtikara, K. 2006. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. Nat. Protoc. 1: 1112–1116.
- Wang, B., Diao, Q., Zhang, Z., Liu, Y., Gao, Q., Zhou, Y. and Li, S. 2013. Antitumor activity of bee pollen polysaccharides from *Rosa rugosa*. Mol. Med. Rep. 7: 1555–1558.
- Wang, X., Kim, J. R., Lee, S. B., Kim, Y. J., Jung, M. Y., Kwon, H. W. and Ahn, Y. J. 2014. Effects of curcuminoids identified in rhizomes of *Curcuma longa* on BACE-1 inhibitory and behavioral activity and lifespan of Alzheimer's disease *Drosophila* models. BMC Complement. Altern. Med. 14: 88.
- Watanabe, M. A. E., Amarante, M. K., Contib, B. J. and Sforcin, J. M. 2011. Cytotoxic constituents of propolis inducing anticancer effects: a review. J. Pharm. Pharmacol. 63: 1378–1386.
- Wauquie, F., Leotoing, L., Coxam, V., Guicheux, J. and Wittrant, Y. 2009. Oxidative stress in bone remodelling and disease. Trends Mol. Med. 15: 468–477.
- Wawer, I. and Zielinska, A. 2001. ¹³C CP/MAS NMR studies of flavonoids. Magn. Reson. Chem. 39: 374–380.
- White, J. W. 1975. Composition of honey. In: Crane, E. (ed) Honey. A Comprehensive Survey. Heinemann Edition, London, United Kingdom, pp. 157–206.
- WHO. 2015. Dementia Fact sheet №362. World Health Organization. Available at <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs362/en/>.
- Wimo, A. & Prince, M. 2010. World Alzheimer Report 2010: The global economic impact of dementia. Alzheimer's Disease International.
- Wink, M. 1993. Production and application of phytochemicals from an agricultural perspective. In: van Beek, T. A., Breteler, H. (eds.) Phytochemistry and Agriculture. Clarendon Press, Oxford, pp. 171–213.
- Wink, M. 2006. Importance of plant secondary metabolites for protection against insects and microbial infections. In: Rai, M., Carpinella, M. C.(eds.) Naturally Occurring Bioactive Compounds. Elsevier, San Diego, CA, USA, pp. 251–68.

- Wlaschek, M., Tantcheva-Poór, I., Naderi, L., Ma, W., Schneider, L. A., Razi-Wolf, Z., Schüller, J. and Scharffetter-Kochanek, K. 2001. Solar UV irradiation and dermal photoaging. *J. Photochem. Photobiol. B* 63: 41–51.
- Yang, H., Dong, Y., Du, H., Shi, H., Peng, Y. and Li, X. 2011. Antioxidant compounds from propolis collected in Anhui, China. *Molecules* 16: 3444–3455.
- Youn, K. and Jun, M. 2012. Inhibitory effects of key compounds isolated from *Corni fructus* on BACE1 activity. *Phytother Res* 26: 1714–1718.
- Youn, K. and Jun, M. 2013. *In vitro* BACE1 inhibitory activity of geraniin and corilagin from *Geranium thunbergii*. *Planta Med.* 79: 1038–1042.
- Zammit, E. J., Theuma, K. B., Darmanin, S., Muraglia, M., Camilleri-Podesta, M. T., Buhagiar, J. A., Calleja-Agius, J., Adami, M. Z., Micallef, M., Franchini, C. and Schembri-Wismayer, P. 2013. Total content and cytotoxicity varies significantly in different types of propolis. *Res. J. Pharm. Biol. Chem. Sci.* 4: 1047–1058.
- Zhang, L., Shen, C., Chu, J., Zhang, R., Li, Y. and Lin L. 2014. Icariin decreases the expression of APP and BACE-1 and reduces the β-amyloid burden in an APP transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Int. J. Biol. Sci.* 10: 181–191.
- Zhu, A., Wu, Z., Huang, Y., Nakanishi, H. and Wu, S. 2014. Brazilian propolis improves cognitive functions and regulates serum cytokine balances in patients with mild cognitive impairment at high altitude. *Alzheimers Dement.* 10: S619–620.
- Zielinska, S. and Matkowski, A. 2014. Phytochemistry and bioactivity of aromatic and medicinal plants from the genus *Agastache* (Lamiaceae). *Phytochem. Rev.* 13: 391–416.
- Zongo, C., Savadogo, A., Ouattara, L., Bassole, I. H. N., Ouattara, C. A. T., Ouattara, A. S., Barro, N., Koudou, J. and Traore, A. S. 2010. Polyphenols content, antioxidant and antimicrobial activities of *Ampelocissus grantii* (Baker) Planch. (Vitaceae): a medicinal plant from Burkina Faso. *Int. J. Pharmacol.* 6: 880–887.
- 국립기상연구소. 2011. IPCC 5차 평가보고서 대응을 위한 기후변화 시나리오 보고서 2011.
- 기상청. 2011. 새로운 미래 전지구 기후변화 전망 자료 산출. http://web.kma.go.kr/notify/press/kma_list.jsp;jsessionid=N5sWf1Fh3a6eylG6sSvINV3NXd8lOphXXR5XnTpTYQiHRw1BeF7oNxvRIjDtahNb?printable=true&mode=view&num=1191956.
- 농촌진흥청. 2011. 기후변화와 우리 농업, RDA Interrobang, 17: 1–20.
- 기상청. 2014. 한국 기후변화 평가보고서 2014. 기후변화 과학적 근거. 28p. 37p. 305p.
- 김혜경, 홍인표, 트란 반 또안, 이명렬, 최용수, 심하식, 변규호, 강아랑. 2015. 동충하초 배지 추출물을 이용한 꿀벌 노제마병 방제. *한국양봉학회지* 30(2): 119–126.
- 이명렬, 최지영, 이만영, 김영수. 2003. 국내 꿀벌 노제마병의 감염수준. *한국양봉학회지* 18: 151–154.
- 이명렬, 변규호, 이만용, 최용수, 김혜경. 2015. 서양종 꿀벌(*Apis mellifera* L.)의 노제마 감염률과 수명에 미치는 온도, 황사, 산성비의 영향. *한국양봉학회지* 30(4):269–274.
- 최용수, 이만영, 홍인표, 우순옥, 심하식, 변규호, Ratna Thapa, 이명렬. 2013. 동양종 꿀벌(*Apis cerana* F.) 밀랍을 이용한 여왕벌 양성 기술. *한국양봉학회지* 28:191–197.

- Allen, W. G., P. Bernhardt, R. Bitner, A. Burquez, S. Buchmann, J. Cane, P.A. Cox, V. Dalton, P. Feinsinger, M. Ingram, D. Inouye, C. E. Jones, K. Kennedy, P. Kevan, H. Koopowitz, R. Medellin, M. S. Medellin, G. P. Nabhan, B. Pavlik, V. Tepedino, P. Torchio and S. Walker. 1998. The potential consequences of pollinator declines on the conservation of biodiversity and stability of food crop yields. *Conserv. Biol.* 12(1): 8–17.
- Bailey, L. and B. V. Ball. 1991. *Honey Bee Pathology*, second ed., Academic Press, London, UK.
- Chen, Y., J. D. Evans, I. B. Smith and J. S. Pettis. 2008. *Nosema ceranae* is a long-present and wide-spread microsporidian infection of the European honey bee (*Apis mellifera*) in the United States. *J. Invertebr. Pathol.* 97(2):186–188.
- Conte, Y. L. and M. Navajas. 2008. Climate change: impact on honey bee populations and diseases. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 27: 499–510.
- Corbet, S.A., M. Fussell, R. Ake, A. Fraser, C. Gunson, A. Savage and K. Smith. 1993. Temperature and the pollinating activity of social bees. *Ecol. Entomol.* 18: 17–30.
- Cox Foster, D. and E. vanEngelsdorp. 2009. Saving the honeybee. *Life Science*. April 2009, 24–31.
- Edward, B. M., N. T. Michelle, S. A. Caroline and Richard, L. L. 2004. Divergent pheromone mediated insect behaviour under global atmospheric change. *Global Change Biology*. 10: 1820–1824.
- Ellis, J., J. D. Evans and J. S. Pettis. 2009. Reviewing colony losses and Colony Collapse Disorder in the United States. *J. Apic. Res.* 49: 134–136.
- Furgala, B. and E. C. Mussen, 1978. Protozoa. pp. 63–77. In Pest, predators, and diseases, ed. by R. A. Morse. 430pp. Cornell University, Ithaca.
- IPCC. 2007. Summary for Policymakers. In: Climate Change 2007: The Physical Science Basis, Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA, IPCC.
- Johnson, R. 2007. Recent honey bee colony declines. Congressional Research Service Report for Congress. Available at:www.fas.org/sgp/crs/misc/RL33938.pdf.
- Le Conte Y. and M. Navajas. 2008. Climate change: impact on honey bee populations and diseases. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 27: 499–510.
- May, R. M. 1990. How many species? *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* 330: 293–304.
- Michener, C. 2000. *The bees of the world*. Johns Hopkins University Press, Baltimore.
- Mussen, E. C., B. Furgala and R. A. Hyser. 1975. Enzootic levels of nosema disease in the continental United States (1974). *Am. Bee. J.* 115: 48–50.
- Neumann, P. and N. L. Carreck. 2010. “Honey bee colony losses”, *Journal of Apicultural Research* 49: 1–6.
- Oldroyd, B. P. 2007. What’s killing American honey bees? *PLoS Biol.* 5(6): e168.

- Pettis, J., Vanengelsdorp D. & Cox-Foster D. 2007. Colony collapse disorder working group pathogen sub-group progress report. Am. Bee J. 147(7): 595–597.
- Prasannakumar, N. R., C. Subhash and P. Madan. 2012. Assessment of impact of climate change with reference to elevated CO₂ on rice brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Stål.) and crop yield. Cur. Sci. 103: 1201–1205.
- Ruttner F. 1988. Biogeography and taxonomy of honeybees. Springer, New York.
- Sable, M. G. and D. K. Rana. 2016. Impact of global warming on insect behavior—A review. Agricultural Reviews. 37: 81–84
- Steinfeld, H. P. Gerber, T. Wassenaar, V. Castel, M. Rosales, C. D. Haan. 2006. Livestock's long shadow; environmental issues and options Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations. 414 p.
- Southwick, E. 1992. Physiology and social physiology of the honey bee. In The Hive and the Honeybee. pp. 171–196. Dadant & Sons, Inc., Hamilton, Illinois.
- UNEP. 2010. UNEP Emerging Issues: Global Honey Bee Colony Disorder and Other Threats to Insect Pollinators. 120p.
- VanEngelsdorp, D., R. Underwood, D. Caron and Jr J. Hayes. 2007. An estimate of managed colony losses in the winter of 2006 2007: A report commissioned by the apiary inspectors of America. Am. Bee. J. 147: 599–603.
- Webster, T. C., K. W. Pomper, G. Hunti, E. M. Thackerk and S.C. Jones. 2004. *Nosema apis* infection in worker and queen *Apis mellifera*. Apidologie. 35(1): 49–54.
- Yamamura, K. and K. Kiritani. 1998. A simple method to estimate the potential increase in the number of generations under global warming in temperate zones. Appl. Entomology Zool. 33: 289–298.
- White, G. F. 1919. Nosema disease. USDA Bulletin 431.
- Zander, E. 1909. Animal parasites as disease producers in bees. Leipziger Bienenzeitung 24: 147–150, 164–166.
- Abrol, D.P. 1994. Ecology, behaviour and management of social wasp, *Vespa velutina* Smith (Hymenoptera:Vespidae), attacking honey beecolonies. Korean J. Apic. 9: 5–10.
- Arca, M., F. Mougel, T. Guillemaud, S. Dupas, Q. Rome, A. Perrard, F. Muller, A. Fossoud, C. Capdevielle-Dulac, M. Torres-Leguizamon, X. X. Chen, J. L. Tan, C. Jung, C. Villemant, G. Arnold and J. F. Silvain 2015. Reconstructing the invasion and the demographic history of the yellow-legged hornet, *Vespa velutina*, in Europe. Biological Invasions. 17: 2357–2371.
- Beggs, J. 2001. The ecological consequences of social wasps (Vespula spp.) invading an ecosystem that has an abundant carbohydrate resource. Biological Conservation. 99: 17–28.
- Beggs, J. R., E. G. Brockerhoff, J. C. Corley, M. Kenis, M. Masciocchi, F. Muller, Q. Rome and C. Villemant. 2011. Ecological effects and management of invasive alien Vespidae. BioControl. 56: 505–526.
- Choi, M. B., K. K. Jeong and J. W. Lee. 2013. Checklist and distribution of Korean

- Vespidae revisited. Korean J. Appl. Entomol. 52: 85–91.
- Choi, Y. S., M. L. Lee, M. Y. Lee, H. K. Kim, M. Y. Yoon and A. R. Kang. 2015. Trapping of *Vespa velutina* nigrithorax Buysson (Hymenoptera: Vespidae) queen near apiaries honeybee comb extract in south region of Korea. Korean J. Apic. 30: 281–285.
- Ibáñez-Justicia, A and A. J. Loomans. 2011. Mapping the potential occurrence of an invasive species by using CLIMEX: case of the asian hornet (*Vespa velutina* nigrithorax) in the netherlands. In Proceedings of the Netherlands Entomological Society Meeting 22: 39–46.
- Jeong, S., C. Lee, D. Kim and C. Jung. 2016. Questionnaire study on the overwintering success and pest management of honeybee and damage assessment of vespa hornets in Korea. Korean J. Apic. 31: 201–210.
- Jones, M. 2004. Health policy in britain's model colony: ceylon, 1900–1948 (Vol. 10). Orient Blackswan.
- Jung, C., Kim, D.W., Lee, H.S., Baek, H. .2009. Some Biological Characteristics of a New Honeybee Pest, *Vespa velutina* nigrithorax Buysson, 1905 (Hymenoptera: Vespidae). Kor. J. Apic. 24: 61–65.
- Jung, C and S. K. Cho. 2015. Relationship between honeybee population and honey production in Korea: A Historical Trend Analysis. Korean J. Apic 30: 7–12.
- Jung, C. 2008. Economic value of honeybee pollination on major fruit and vegetable crops in Korea. Korean J. Apic. 23: 147–152.
- Jung, C. 2012. Initial stage risk assessment of an invasive hornet, *Vespa velutina* nigrithorax Buysson (Hymenoptera: Vespidae) in Korea. Korean J. Apic. 27: 95–104.
- Jung, C., D. Kim, H. S. Lee and H Baek. 2009. Some biological characteristics of a new honeybee Pest, *Vespa velutina* nigrithorax Buysson, 1905 (Hymenoptera: Vespidae). Korean J. Apic. 24: 61–65.
- Jung, C., M. S. Kang, D. Kim and H. S. Lee. 2007a. Vespid wasps (Hymenoptera) occurring around apiaries in Andong, Korea I. Taxonomy and life history. Korean J. Apic. 22: 53–62.
- Jung, C., M. S. Kang, D. Kim and H. S. Lee. 2007b. Vespid wasps (Hymenoptera) occurring around apiaries in Andong, Korea I. Taxonomy and life history. Korean J. Apic. 22: 53–62.
- Kim, B. S., Y. K. Park, Y. H. Lee, M. H. Jeong, A. S. You, Y. J. Yang, J. B. Kim, O. K. K and Y. J. Ahn. 2008. Honeybee acute and residual toxicity of pesticides registered for strawberry. Korean J. Pestic. Sci. 12: 229–235.
- Kim, J. K., I. B. Yoon and T. Y. Moon. 1994. Systematics of vespine wasps from Korea-(1)-Genus *Vespa* linnaeus (Vespidae; hymenoptera5). Korean Journal of Entomology 24: 107–115.
- Kim, J. K., M. B. Choi and T. Y. Moon. 2006. Occurrence of *Vespa velutina* Lepeletier from Korea, and arevisedkey for Korean Vespa species (Hymenoptera: Vespidae). Entomological Research 36: 112–115.

- Kiritani, K and K. Yamamura. 2003. Exotic insects and their pathways for invasion. Invasive species: vectors and management strategies. Island Press, Washington, 44–67.
- Mack, R. N., D. Simberloff, W. Mark Lonsdale, H. Evans, M. Clout and F. A. Bazzaz. 2000. Biotic invasions: causes, epidemiology, global consequences, and control. Ecological applications. 10: 689–710.
- Perrard, A., J. Haxaire, A. Rortais, and C. Villemant. 2009. Observations on the colony activity of the Asian hornet *Vespa velutina* Lepeletier 1836 (Hymenoptera: Vespidae: Vespinae) in France. In Annales de la Société entomologique de France. 45: 119–127.
- Shaw, F. R and J. Weidhaas. 1956. Distribution and habits of the giant hornet in North America. Journal of Economic Entomology. 49: 275–275.
- Sim, H., M. L, Y. Choi, H. Kim, I, Hong, S. Woo, K. Byeon and M. Lee. 2014. Pattern of emergence of *Vespa velutina nigrithorax* Bulysson (Hymenoptera: Vespidae) on spring in south part of Korea. Korea J. Apic. 29: 353–358.
- Sutherst, R. W., G. F. Maywald and D. J. Kriticos. 2007. CLIMEX version 3: user's guide. Hearne Scientific Software Pty Ltd.
- Tan, K., S. E. Radloff, J. J. Li, H. R. Hepburn, M. X. Yang, L. J. Zhang and P. Neumann. 2007. Bee-hawking by the wasp, *Vespa velutina*, on the honeybees *Apis cerana* and *A. mellifera*. Naturwissenschaften. 94: 469–472.
- Tutz, J., S. Maier, C. Groh, W. Rössler and A. Brockmann. 2003. Behavioral performance in adult honey bees is influenced by the temperature experienced during their pupal development. Proceedings of the National Academy of Sciences, 100: 7343–7347.
- Villemant, C., A. Perrard, Q. Rome, O. Gargominy, J. Haxaire, E. Darrouzet and A. Rortais. 2008. A new enemy of honeybee in Europe: the invasive Asian hornet *Vespa velutina*. In the Proceeding of 10th International Congress of Zoology. Paris, France.
- Williamson, M. 1996. Biological invasions (Vol. 15). Springer Science & Business Media.