

家蠶卵 胚子發育 過程에서 Ascorbic acid와 Lipid의 變動에 關하여

金元敬 · 林永鎔 · 全璽元

Ascorbic acid and Lipid Contents of the Silkworm eggs(Bombyx mori)during its development of Emdryo.

Seoul Agricultural College.

Won Kyong kim. Young Woo Lim. Hyong Won Cheon

"SUMMARY"

As a result of investigating the change of Ascorbic acid and Lipid which have a relation with metabolism of a silkworm egg in the process of the growth of embryo is silkworm eggs. The following facts have been found

- 1) Ascorbic acid has gradually increased before the period of the Byong B embryo and it has decreased after period of Byong B embryo.
- 2) Triglycerids and Total cholesterol has gradually increased before the priod of the Byong B embryo and it has decreased after period of the Byong B embryo.
- 3) Phospholipid has gradually decreased befor the the period of the Byong A embryo and it increased during the Byong B embryo and decreased again at same stage. It has increased from the head pigment of embryo to hachting.
- 4) Free Fatty acid decreased during the Byong A embryo stage and increased from the Byong B embryo stage to the Ki A embryo stage and decreased again and increased shortly before the hachting.

家蠶의 胚子成長에 關하여는 일찌기 八木氏를 비롯하여 많은 學者들에 의해 研究된바 있으나 主로 形態學的 組織學的 變化에 對한 研究에 지나지 않고 1940年 山口 小林氏의 胚子の 量的發育速度에 對한 研究가 있으며 1940年 浦生¹⁾은 家蠶(幼虫)의 發育過程에서 溫度의 變化와 體內 Vitamin C의 生成에 關한 研究가 있을뿐 卵內 胚子形成 및 催育中 卵內物質代謝에 關係되는 生化學的 實驗報告가 微微하다.

本 實驗研究에서는 卵內胚子發育過程인 甲胚子에서 부터 孵化直前에 이르기까지에 酸化還元에 關係되어 지는 Ascorbic acid와 Lipid의 變動을 生化學的으로 調査하여 興味있는 結果를 얻었으므로 여기에 報告하는 바이다.

II. 研究史

1937年 黒田 李¹⁾은 卵胚子發育에 따라서 卵內水分量이 顯著하게 變化한다는 것을 報告하였고 1934年 井上 小林은²⁾ 蠶卵內 脂油는 Linolic acid이고 蛹體液의 脂油는 Isolinolic acid라는 幾何異性體 關係에 있다는 것이며 休眠期, 突眼發生期 및 蛹體發成直前에는 2-Lecithin이 많고 反轉期에서는 Kephalin이 많다는 報告가 있었다.

1938年 浦生은 家蠶發育에 따른 Vitamin C의 變動에 關하여 蠶兒 蛹體夜中에는 酸化型 Vitamin C가 많고 組織中에는 還元型의 Vitamin C가 많았다는 報告가 있다. 1951年 入戶野氏는³⁾ 催育卵의 DNA와 RNA에 關해서 Feulgen 反應과 Pyronine methyl green 複染色法에 의한 組織化學的 研究가 있다. 그 외에 1952年 E. M. Crook⁴⁾은 Ascorbic acid \rightleftharpoons Dehydroascorbic acid + 2H⁺ + 2e⁻으로 一般生物內 物質代謝에서 酸化還元에 關與된다는 報告가 있으며 1955年 S. O. Nielsen⁵⁾은 組織內 Liver cell의 mitochondria內에서 Ascorbic acid가 electron donor로

1) 서울農藥大學

서 Cytochrome을還元시켜 P/O ratio가 1에 가까우며 磷酸化反應에 關與한다는 報告가 있다.

1956년에 J. J. Burns² 또한 ¹⁴C가 2사람은 L-Ascorbic acid는 動物과 植物組織에서 D-glucose로부터 合成된다는 報告가 있다. 1954년에 S. Udefriend³는 Ascorbic acid가 Aromatic amino acid에 hydroxylation에 關與된다고 하였고 1952年 Tomkins G 21 22 23 등은 Lipid가 生體內에서 重要的 代謝過程에 關與하며 Liver의 Cholesterol 合成에 미치는 影響이 Fast Low Caloric diet로 因하여 低下된다고 하였다.

1959年 申²⁰은 韓國人과 美國人의 血清內脂質의 差異로 因하여 遺傳 因子 食養血管壁의 形態學的 乃至 組織學的으로 年齡別 性別로 重要的을 暗示하였다는 等等的 報告가 本 研究實驗에 補充的인 基礎가 되었다.

III. 實驗方法 및 材料

1. 材料

品種: 雪岳 × 昭陽

設卵日: 1967年 6月 30日 採種한 것을 慣例의으로 自然溫室에서 保護하고 冬期間 露地保護庫에 保護한 露地 25g을 翌年 2月 13日 甲胚子에 達하였을 때부터 供試材料로 表에서와 같이 胚子發育程度를 현미鏡下에서 檢査하면서 各期 4g씩 取하여 供試材料로 하였다.

Sample

No	Embryo Stage
1	甲 胚子
2	丙A 胚子
3	丙B 胚子
4	己A 胚子
5	己B 胚子
6	己C 胚子

※ 催育은 漸進法에 依한

2. Ascorbic acid의 測定方法^{17, 18}

設卵 1g을 秤量하여 酸에 處理한 glass powder와 함께 5% TCA를 加하고 粉碎한 다음 4°C에서 8~12時間 放置後 遠沈하여 上清液을 1ml 試驗管에 取하고 2個의 試驗管에 標準液 1ml를 넣고 여기에 蒸溜水 1ml을 넣었다. 다음에 다시 2% Dinitrophenylhydroxine 0.5ml를 넣고 38°C에서 4時間동안 放置시킨 다음 冷却을 기다려 65% H₂SO₄液 2.5ml를 加하고 잘 混合한後 Coleman Electrophotometer를 利用하여 filter 540m μ 에서 比色 測定한 것이다.

3. Triglyceride의 測定方法⁹

設卵 1g을 秤量하여 酸에 處理한 glass powder와 chloroform을 加한 다음 粉碎하고 遠沈하여 上清液을 取하고 4°C에서 濾過한 다음 濾液을 使用하였다. zeolite 80~100 mesh 1g을 取하여 15ml를 遠沈管에 넣고 1ml의 chloroform을 加하고 強하게 振盪하여 4時間동안 放置한後 4°C에서 濾過하여 濾液 3ml씩 2個의 試驗管에 分取하고 其中 하나는 盲驗用으로 하고 標準用은 標準液 3ml를 取하여 80°C의 水浴上에서 蒸發시키고 0.4% alcoholic KOH 0.5ml를 盲驗用을 除外하고 0.5ml씩 加한 다음 60~70°C에서 20分間 鹼化하고 0.2N-H₂SO₄ 0.5ml를 加한後 80°C의 水浴內에서 10~20分間 加酸하고 冷却시킨 다음 0.5% Sodium Periodate 0.05ml를 加하고 10分後 0.5M-Sodium Arsenite 0.05ml를 加한 다음 10分後 0.2% chromotropic acid 5ml를 加한후 잘 混合하여 100°C~105°C에서 加熱하고 570m μ 에서 Electrophotometer로 測定하였다.

4. phospholipid의 測定¹⁰

Triglyceride에서와 같이 設卵 1g을 處理하여 濾液 0.2ml를 glass-stoper管에 取하고 5% TCA 5ml를 1滴씩 加하면서 잘 混合한 다음 遠沈後 沈物에 1ml의 digestion mixture를 加하고 無色이 될때까지 加熱한 다음 冷却하고 1ml의 蒸溜水를 加하여 다시 1ml Sodium acetate 溶液을 加하여 最終溶液이 10ml가 되게 蒸溜水로 채워 만들고 2.5%의 ammonium molybdate 1ml를 加하고 잘 混合한後 1ml의 Elon 試藥을 加하여 700m μ 에서 比色 測定하였다.

5. Cholesterol¹⁶

設卵의 處理는 Triglyceride와 같이 하여 濾液 0.2ml를 試驗管에 取하고 alcohol:acetone(1:1) 10ml를 加한 다음 잘 混合하여서 70°C의 水浴上에서 加熱한後 冷却하고 다시 alcohol acetone 混合液으로 25ml가 되게 稀釋한 다음 4°C에서 濾過하고 濾液을 分取하여 total cholesterol과 free cholesterol을 分離 測定하였다.

가) Total cholesterol

濾液 2.5ml를 試驗管에 取하고 3ml 水浴上에서 蒸發乾燥시키고 冰卓산 3ml를 加하여 沈澱 부착물을 씻고 2ml

의 Color reagent를 가한後 冷却하고 560m μ 에서 比色定量 하였음.

나) Free cholesterol

濾液 2.5ml를 取하여 80°C의 水浴上에서 加熱 蒸發시키고 digitonin溶液 1ml를 加하고 10分後 遠沈한 다음 沈澱物에 다시 4ml의 acetone를 加하고 充分히 混合한後 遠沈하고 上清液을 取하여 Free cholesterol을 測定한 것 이다.

6. Free fatty acid의 測定

Duncombe의 比色測定法 原理를 利用한 金¹⁴ 등의 變法에 따라서 測定하였다. 卽 組織 Homogenate를 triglyceride 類와 同一하게 處理하고 磷脂質이 除去된 Doucil 濾液를 脂肪酸의 銅鹽으로 만들고 여기에 銅을 測定하여 遊離 脂肪酸量으로 換算하였다.

IV. 實驗結果 및 考察

Table 1에서 보는 바와 같이 ascorbic acid가 dehydroascorbic acid¹⁵로 되어 生體內 物質代謝에서 酸化 還元에 關與된다는 報告와 赤尾¹가 報告한 蠶卵의 무게는 産卵後부터 孵化에 이르기까지 漸進的으로 減少한다고 하였고 黒田 幸¹⁷ 등은 不越年卵과 越年卵의 胚子發育에 따르는 水分含量變化가 催青 第四日 또는 第五日에인 丙A

Table 1. 胚子發育過程에서 Ascorbic acid의 變動

Sample No	1	2	3	4	5	6
Ascorbic acid	307.5 r/g	315.0 r/g	319.5 r/g	297.5 r/g	262.5 r/g	240.0 r/g

와 丙B 胚子에서 最高로 되는 것을 보았으므로 이때에 生體內 物質代謝가 旺盛하다는 것이 Ascorbic acid의 含量과도 關係되어 지는 것으로 생각된다. 또한 赤尾¹의 報告에 依하면 不越年卵의 催青四日이 反轉期前日로서 還元糖과 遊離 Amino 酸, 窒素, 無機磷, Purine類, Cholesterol 磷脂質 등이 이 時期를 前後로 해서 顯著的 變動이 있다고 하고 L-Ascorbic acid가 動物 組織에서 D-glucose로부터 合成된다는 報告와 아울러 蠶兒가 食桑時期에는 桑葉으로 부터 吸收 利用하고 胚子時期와 蛹體時期에서는 體內 脂肪組織에서 合成된다는 蒲生¹⁸의 研究에 비추어 催青第一日에인 甲胚子에서부터 丙胚子인 反轉期 前日에 가장 增加됨을 나타낸 것은 赤尾氏의 研究와 一致되며 그後 차차 減少하는 것은 胚子が 發育함에 따라 物質代謝가 緩慢하여 體內合成이 減少되는 所致라고 生覺된다.

또한 Energy source로 利用되는 Triglyceride는 Table 2에서 Cholesterol은 Table 3에서와 같이 甲胚子 時期로 부터 漸次的으로 增加하여 丙A胚子에 이르러 急激한 增加를 나타낸 것은 反轉期 以前에서 細胞活性化에 利用되기 爲한 養分이며 丙胚子時期에 있어서는 細胞의 活性으로 인한 "에너지"소모로 減少傾向을 나타낸 것으로 生覺된다.

Table 2. 胚子發育過程에서 Triglyceride의 變動

Sample No	1	2	3	4	5	6
Triglyceride	19.84 mg/g	27.54 mg/g	23.40 mg/g	21.16 mg/g	20.84 mg/g	21.40 mg/g

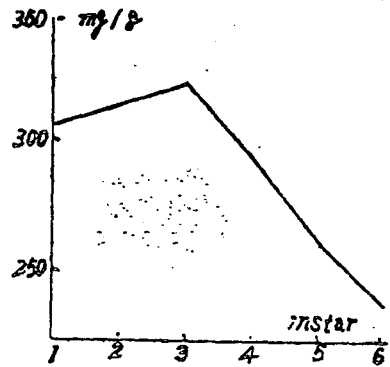


Fig 1. Curve of ascorbic acid in the silkworm eggs during its development

Fig 2. Curve of triglyceride in the silkworm eggs during its development

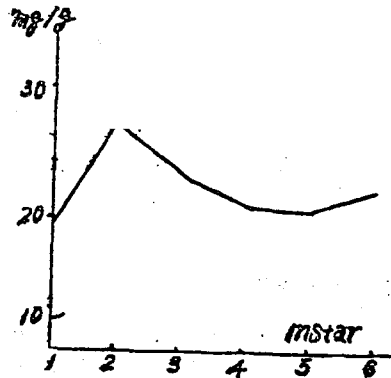


Table 3. 胚子發育過程에서 Cholesterol의變動

Sample		1	2	3	4	5	6
	Total	mg/g 3.40	4.26 mg/g	3.58 mg/g	3.88 mg/g	3.62 mg/g	3.84 mg/g
Cholesterol	free	mg/g 1.22	1.20 mg/g	1.09 mg/g	1.24 mg/g	1.22 mg/g	1.30 mg/g

다음 Table 4에서와 같이 phospholipid는 一般적으로 細胞增殖 및 細胞의 活性에 따라서 增加되어 金¹⁰ 등이 報告한 蠶卵 胚子發育過程에서 細胞分裂과 蛋白質合成에 關與되는 RNA의 增加와 一致하였으며 磷酸化反應에 關係되는 P/O率이 1이라는 것에 비추어 phospholipid와 RNA增加는 細胞의 活性을 意味하며 反轉期 後日에 急激한 變動은 磷酸化反應이 活發함을 意味한다.

Fig 3. Curve of cholesterol total and free in the Silkworm eggs during its development

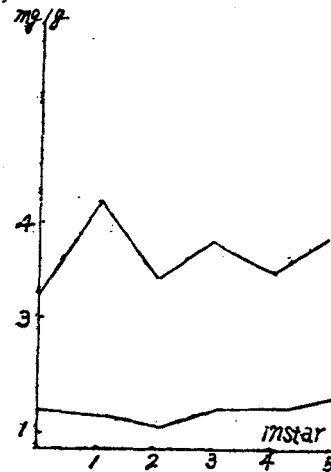


Table 4. 胚子發育過程에서 Phospholipid의變動

Sample No	1	2	3	4	5	6
Phospholipid	5.36 mg/g	4.85 mg/g	6.31 mg/g	6.31 mg/g	6.00 mg/g	8.42 mg/g

다음 Free Fatty acid는 Table 5에서와 같은變動을 나타냈으나 아직까지 確實한 機構은 알 수 없으나 普遍的으로 보아 glucose와 相反된 作用을 한다는 견에 비추어 丙A 胚子에서 急激한 減少는 反對로 glucose가 가장 많은 時期라고 生覺되며 다시 己A 胚子에서 增加는 丙A 胚子에서 보다 glucose를 生理的으로 必要치 않는 時期라고 生覺할 수 있다.

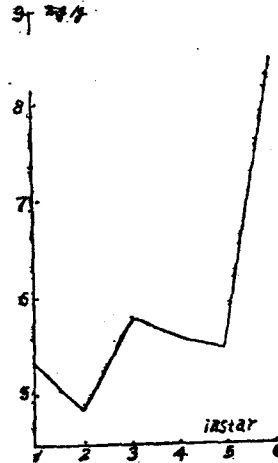
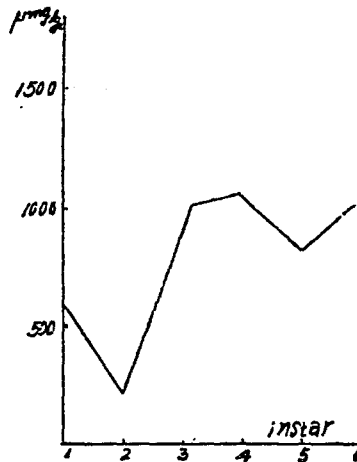


Fig 4. Curve of phospholipid in the silkworm eggs during its development

Table 5. 胚子發育過程에서 Free Fatty acid의變動

Sample No	1	2	3	4	5	6
Free Fatty acid	640.0 $\mu\text{mole/g}$	257.4 $\mu\text{mole/g}$	1,020.0 $\mu\text{mole/g}$	1,076.0 $\mu\text{mole/g}$	842.0 $\mu\text{mole/g}$	1,020.0 $\mu\text{mole/g}$

Fig 5. Curve of free fatty acid in the silkworm eggs its development



V. 摘要

1. Ascorbic acid는 丙B 胚子까지는 漸次的으로 增加하고 그 後에는 減少함을 알 수 있었다.
2. Triglyceride 및 total cholesterol은 丙A 胚子까지 增加하고 그 後는 減少함을 알 수 있었다.
3. Phospholipid는 丙A 胚子에서 減少하고 丙B 胚子에서 增加 다시 減少하였다가 點青期胚子에서 孵化直前까지 增加함을 알 수 있었다.
4. Free Fatty acid는 丙A 胚子에서 減少하고 丙B 胚子와 己A 胚子에서 增加를 나타내고 다시 減少하였다가 孵化直前に 增加하는 것을 알 수 있었다.

VI. 引用 文獻

1. A. Akao; Keijo. J. Med. 3. 250~261(1932)
2. J. J. Burns et al. J. Biol Chem, 221. 107(1956)
3. E. M. Crook et al. Biochem J. 38. 10(1944)
4. Dunurube, W. G. Biochem J. 88. 7(1963)
5. B. EAK et al. AM, J. Clin path. 24 1307(1954)
6. Edward H et al. Clinical chem 7. 37(1961)
7. S. L. M. Gibson, et al. British Medical. J. 1. 52. 1(1966)
8. E. Van, Handel. Clinical chemistry, 7, 249(1964)
9. H. H. Horowitz et al. J. Biol chem 199. (1952)
10. F. A. Isherood et al. Biochem J. 56. 1. 26(1956)
11. 井上吉之, 小出又雄. 日本薬理雑誌. 5. 80(1934)
12. Y. Itōsi J. Ser. Japan 40 182~185(1951)
13. 蒲生俊興. 日本薬理學雑誌. 11(3), 206~207(1940)
14. H. Kim. et al. Seoul Univ Medicine J 1968.
15. 金智赫, Seoul Univ Medicine J. 10(1968)
16. H. S. Kim, The Seri J Korea, 3(1963)
17. K Kuroda; K. Lee, J. plant Animal 11, 17~20(1937)
18. L. W. Mapson et al. Biochem J. 62, 248(1956)
19. S. O. Nielsen et al. J. Biol chem 215~555(1955)
20. H. K. Sin, Korean medicine, 2. 6(1959)
21. Tonkins G. M et al. J. Biol chem 201 137(1953) 22
22. ———— " ———— 196. 569(1952)
23. S. Udenfriend et al. J. Biol chem, 208 731(1954)
24. Walker A. P J. Clin. invest 33 1358 (1954)
25. 山口定次郎, 小林敏. 日本薬理學雑誌 11(3):204~205 (1940)