



Original research article

# 열스트레스 조건에서 꿀과 설탕시럽 식이에 따른 꿀벌의 대사 및 면역 반응

김현지<sup>1,2</sup>, Olga Frunze<sup>1,2</sup>, 이정현<sup>1,2</sup>, 한상미<sup>3</sup>, 우순옥<sup>3</sup>, 권형욱<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>인천대학교 매개체감염병연구소, <sup>2</sup>인천대학교 생명과학부 생명과학전공, <sup>3</sup>국립농업과학원 농업생물부 양봉과

## Differential Metabolic and Immune Responses of Honey Bees to Honey- and Sugar Syrup-Based Diets under Heat Stress

Hyunjee Kim<sup>1,2</sup>, Olga Frunze<sup>1,2</sup>, Jeong-Hyeon Lee<sup>1,2</sup>, Sang Mi Han<sup>3</sup>, Soon Ok Woo<sup>3</sup> and Hyung-Wook Kwon<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>Convergence Research Center for Insect Vectors, Incheon National University, Incheon 22012, Republic of Korea

<sup>2</sup>Department of Life Sciences, College of Life Science and Bioengineering, Incheon National University, Incheon 22014, Republic of Korea

<sup>3</sup>Department of Agricultural Biology, National Institute of Agricultural Science, Rural Development Administration (RDA), Wanju 55365, Republic of Korea

### Abstract

Diet quality influences honey bee physiology and stress responses. This study examined the effects of different diets on metabolic and immune-related gene expression in newly emerged worker bees under normal and heat-stress conditions. Honey bees were fed for five days with S-syrup, S-honey, A-honey, or a control diet (Cont), followed by acute heat stress (45°C for 4 h). Under the 5-day feeding condition, S-syrup induced higher expression of nutrient-sensing genes (*ilp1* and *tor*), whereas *vg* was highest in the control group, indicating differences in physiological status among diets. Under heat stress conditions, S-syrup showed increased expression of immune-related genes (*defensin2* and *relish*), while stress-response gene expression was relatively lower, suggesting a shift toward immune activation rather than effective stress buffering. Honey-based diets showed more stable gene expression patterns compared to S-syrup. In particular, A-honey showed intermediate expression levels between S-honey and Cont, reflecting a transitional physiological response. These results suggest that sucrose syrup feeding alters metabolic regulation and may induce energetically costly immune activation under heat-stress conditions, whereas honey-based diets support more stable physiological responses. These findings highlight the importance of diet quality in maintaining the physiological stability and stress resilience of honey bees under increasing thermal stress conditions.

### Keywords

Honey bee, Heat stress, Diet quality, Metabolic regulation, Immune response

## 서론

꿀벌(*Apis mellifera* L.)은 화분매개를 통해 농업 생산성과 생태계 유지에 중요한 역할을 수행하는 핵심 곤충이다

(Brodtschneider and Crailsheim, 2010). 그러나 최근 기후 변화, 서식지 감소, 병원체 및 기생충 증가, 영양 불균형 등 다양한 스트레스 요인이 복합적으로 작용하면서 꿀벌 봉군의 건강성 저하와 생산성 감소가 전 세계적으로 보고되

고 있다(Goulson *et al.*, 2015). 특히 기후변화에 따른 이상 고온 현상은 꿀벌의 생리적 항상성을 교란시키는 주요 환경 스트레스 요인으로 작용하며, 봉군의 생존과 기능 유지 뿐 아니라 생리적 안정성에도 부정적인 영향을 미치는 것으로 알려져 있다(Deutsch *et al.*, 2008).

열스트레스는 꿀벌 체내에서 단백질 변성 및 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)의 증가를 유도하여 세포 손상을 일으키며, 이에 대응하기 위해 heat shock proteins (HSPs) 및 항산화 효소(superoxide dismutase, SOD)와 같은 스트레스 대응 기작이 활성화된다(Sagastume *et al.*, 2025). 동시에 꿀벌의 스트레스 대응 능력은 영양 상태에 크게 의존하며, 식이는 인슐린/인슐린 유사 신호전달 경로(insulin/insulin-like signaling, IIS)와 target of rapamycin (TOR) 경로를 포함한 대사 조절뿐만 아니라 면역 반응에도 중요한 영향을 미친다(Brunner *et al.*, 2014). 또한 꿀벌의 생리 조절에는 juvenile hormone (JH)이 중요한 역할을 하며, 이는 개체의 발달, 행동 전환, 대사 조절 및 스트레스 반응과 밀접하게 관련되어 있다. JH는 vitellogenin (vg)과 상호작용하며 꿀벌의 생리적 상태와 작업 분화(task allocation)를 조절하는 핵심 호르몬 체계로 알려져 있다(Corona *et al.*, 2007). 특히 JH 생합성에 관여하는 juvenile hormone acid methyltransferase (jhamt) 유전자는 영양 상태 및 환경 변화에 민감하게 반응하여 꿀벌의 생리적 항상성과 스트레스 적응 능력을 반영하는 지표로 활용될 수 있다(Corona *et al.*, 2007; Ament *et al.*, 2008). 또한 AmGr10은 아미노산에 반응하는 미각 수용체로, 영양 상태 감지 및 섭식 행동 조절에 관여하는 것으로 알려져 있어 본 연구의 분석 유전자에 포함하였다(Paerhati *et al.*, 2015; Lim *et al.*, 2019).

특히 꿀 및 화분과 같은 자연 식이는 다양한 당류, 아미노산 및 생리활성 물질을 포함하고 있어 꿀벌의 건강 유지에 기여하는 반면, 설탕시럽과 같은 인공 식이는 주로 단순 탄수화물로 구성되어 영양적 다양성이 제한적이며, 장기적인 생리 조절 및 항상성 유지에 한계가 있을 수 있다(Wheeler and Robinson, 2014).

기존 연구에서는 식이 조성 또는 환경 스트레스가 각각 꿀벌 생리에 미치는 영향에 대해 개별적으로 보고되어 왔으나(Alaux *et al.*, 2010; Bach *et al.*, 2021), 서로 다른 식이가 열스트레스 조건에서 꿀벌의 대사 및 면역 반응에 미치는 상호작용적 영향에 대한 연구는 여전히 제한적이다. 특히 자연 유래 식이(꿀)와 설탕시럽 간의 생리적 차이를 열

스트레스 조건에서 분자 수준으로 체계적으로 비교한 연구는 매우 부족한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 아카시아꿀, 사양꿀 및 설탕시럽을 급여한 꿀벌을 대상으로 열스트레스 조건에서의 대사 및 면역 관련 유전자 발현 변화를 분석하여, 식이 조성이 꿀벌의 생리적 안정성과 스트레스 적응 능력에 미치는 영향을 평가하고자 하였다. 이를 통해 열스트레스 환경에서 꿀벌의 건강성을 유지하기 위한 최적 식이 전략 수립에 기초 자료를 제공하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험재료

본 연구에서는 식이 조성에 따른 꿀벌의 생리적 반응을 비교하기 위해 30% 설탕시럽(S-syrup), 사양꿀(S-honey), 아카시아꿀(A-honey)을 사용하였다. S-honey는 (주)산내들농원에서 시판된 사양꿀 제품으로, 주로 설탕 급이를 기반으로 생산된 벌꿀을 대표하는 시료로 사용하였다. A-honey는 한국양봉농협에서 판매한 국내산 인증 아카시아꿀로, 축산물품질평가원으로부터 1등급 판정을 받은 자연 유래 꿀 시료이다. 대조군(Cont)으로는 벌빵(beebread)과 30% 설탕시럽을 함께 급여한 처리구를 설정하였다. 벌빵은 인천대학교 양봉장에서 유지·관리 중인 건강한 봉군의 봉판에서 화분이 축적된 부분을 직접 채취한 것으로, 시판 제품이 아닌 자연 유래 발효 화분을 사용하였다. 채취 시 화분이 가득 저장된 봉판의 해당 부위를 5×5 cm 크기로 절취하여 케이지 내에 그대로 제공하였다. 30% 설탕시럽은 액체 탄수화물 공급원으로 15 mL 튜브에 담고, 뚜껑에 미세한 구멍을 내어 케이지 상단에 뒤집어 자유롭게 섭식할 수 있도록 제공하였으며, 벌빵은 단백질 및 복합 영양 공급원으로 동시에 제공되었다. 이러한 조합은 꿀벌이 자연 환경에서 화분(단백질원)과 꿀 또는 당류(탄수화물원)를 함께 섭취하는 영양 조건을 모사하기 위한 것으로, 이 대조식은 단일 영양소 기반 식이가 아닌 자연 상태에 가까운 복합 영양 조성을 반영하도록 구성하였다(Tsuruda *et al.*, 2021).

### 2. 케이지 실험 및 시료 채취

케이지 실험은 인큐베이터를 이용하여 온도 33±2°C,

상대습도  $55 \pm 5\%$ 의 조건에서 5일간 수행하였다. 실험에 사용된 꿀벌은 인천대학교 양봉장에서 사육 중인 건강한 3개 봉군에서 확보하였다. 각 봉군으로부터 봉개된 봉판을 채취하여 인큐베이터에서 성충으로 우화시켰다. 우화 후 24시간 이내의 일벌을 무작위로 선별하여 케이지( $17 \times 14.5 \times 9.5$  cm)에 30마리씩 넣었으며, 각 식이 처리구마다 3개의 독립된 케이지를 생물학적 반복으로 구성하였다. 각 케이지에는 실험 식이를 자유 섭식하도록 공급하였다. 물은 끓인 후 냉각한 증류수를 15 mL 튜브에 담아 공급하였으며, 뚜껑에 미세한 구멍을 내어 수분 공급을 조절하고 케이지 상단에 뒤집어 설치하였다. 실험 5일째, 열처리 조건에 따른 변화를 비교하기 위한 기준값(baseline)을 확보하기 위해 일부 개체를 정상 조건에서 1차 채취한 후, 남은 개체는  $45^\circ\text{C}$ 에서 4시간 동안 급성 열스트레스를 처리하였다(Alqarni *et al.*, 2019). 열스트레스 이후 즉각 추가 시료를 채취하여 유전자 발현 분석에 사용하였다. 모든 유전자 발현 분석은 케이지를 실험 단위로 하여 수행하였다.

### 3. RNA 추출 및 cDNA 합성

각 식이 처리구별로 3개의 케이지에서 꿀벌을 채취하여 유전자 발현 분석에 사용하였다. 케이지당 10마리를 채집하여 즉시 액체질소로 급속 동결한 후  $-80^\circ\text{C}$ 에 보관하였다. 케이지당 5마리를 유전자 발현 분석을 위한 시료로 사용하였다. 시료는 동결 상태에서 처리하였으며, 각 케이지에서 3마리는 머리를 분리하여 머리 조직 분석에 사용하고, 나머지 2마리는 전신 시료로 사용하였다. *jhamt*, *tor*, *ilp1*, *ilp2*, *hsp70*, *AmGr10*은 주로 신경내분비 조절, 스트레스 반응, 감각 관련 기능과 연관되어 있어 머리 조직에서 분석하였고, *vg*, *relish*, *defensin2*, *apid1*, *sod1*은 전신의 생리적 상태, 면역 반응 및 항산화 방어를 반영하는 유전자이므로 전신 시료에서 분석하였다(Elekonich, 2008; Christen, 2023). 총 RNA는 RNeasy Mini Kit (Qiagen)를 이용하여 추출하였으며, RNA의 농도와 순도(A260/A280, 1.8~2.0)는 분광광도계를 이용해 확인하였다. cDNA는

**Table 1.** Oligonucleotide primers used for qRT-PCR analysis

Gene	Primer direction	Sequence (5'-3')	Product size (bp)	Accession No.
<i>ilp1</i>	F	CGATAGTCCTGGTCGGTTTG	237	XM_026442144.1
	R	CAAGCTGAGCAT AGCTGC AC		
<i>ilp2</i>	F	TTCCAGAAATGGAGATGGATG	166	XM_026444890.1
	R	TAGGAGCGCAACTCCTCTGT		
<i>tor</i>	F	AACAAGTGTGCTGACGGTG	153	XM_006566642.3
	R	GTTGCAGTCCAGGCTTTTTG		
<i>jhamt</i>	F	TTGGACATAGGTTGCGGACC	302	NM_001327967.1
	R	AATCCTTTTCCTCCTGGCCG		
<i>vg</i>	F	GCAGAATACATGGACGGTGT	146	NM_001011578.1
	R	GAACAGTCTTCGGAAGCTTG		
<i>AmGr10</i>	F	TCTAGCGAACGCGACCGAAA	174	XM_006567110.3
	R	AGGTTCCACGCGAATCAGT		
<i>relish</i>	F	TCCATTGCATGCAGCACTTCG	264	XM_026444175.1
	R	ACACATGCACCAGCTTCAGGA		
<i>defensin2</i>	F	ACCGCTGCTACCACTACGACA	139	NM_001011638.1
	R	GCCATTTCTGCAACTACCGCCT		
<i>apid1</i>	F	TTGTTGTACCTTTGTAGTCGCGGT	70	NM_001011642.1
	R	AGGCGCGTAGGTCGAGTAGG		
<i>sod1</i>	F	GCAGTGTGCGTTCTTCAGGGT	86	NM_001178027.1
	R	TGACCGGTGACCTTCACGGA		
<i>hsp70</i>	F	ATCAACCTGGCGTCTTGATTC	104	NM_001160072.2
	R	AGGTGCAGGTGGAATGCCAG		
$\beta$ -actin	F	GGATTCCTATGTTGGTGTGAAGCCC	177	NM_001185145.1
	R	GGTGCCCTCAGTAAGAAGTACCGGATG		

RNA to cDNA EcoDry™ Premix kit (Takara)를 사용하여 합성하였다.

#### 4. 정량적 실시간 역전사 PCR (qRT-PCR) 분석

총 11개 유전자 (*ilp1*, *ilp2*, *tor*, *jhamt*, *vg*, *AmGr10*, *relish*, *defensin2*, *apid1*, *sod1*, *hsp70*)의 발현량은 qRT-PCR을 통해 분석하였다. 반응은 총 20 µL로 구성하였으며, cDNA, SYBR Green qPCR Master Mix (Fermentas, Burlington, ON, Canada), primer 및 증류수를 포함하였다. PCR 반응은 95 °C에서 5분 초기 변성 (initial denaturation) 후, 95 °C 30초 (denaturation), 60 °C 30초 (annealing), 72 °C 30초 (extension)의 조건으로 40 cycle 수행하였다. 프라이머 서열은 Table 1에 제시하였다. 유전자 발현량은  $\beta$ -actin을 기준 유전자로 하여 2<sup>-ΔΔCt</sup> 방법으로 계산하였으며, 각 시료는 기술적 반복으로 3회 측정하였다.

#### 5. 통계 분석

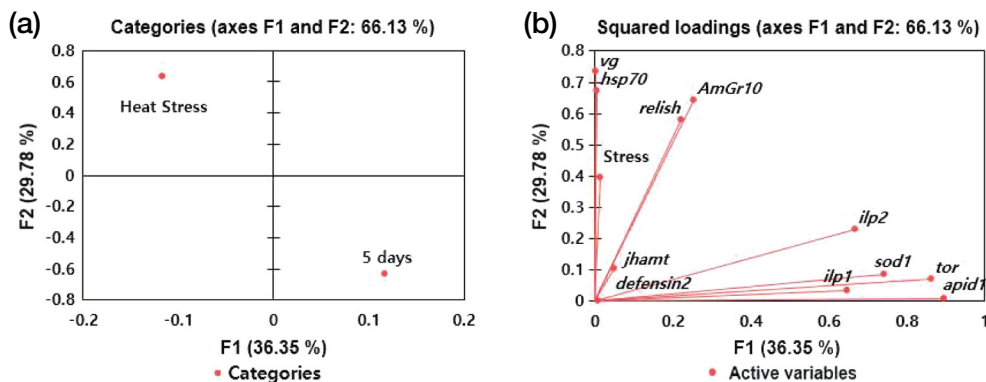
모든 통계 분석은 Microsoft Excel과 XLSTAT (Addinsoft, Paris, France)를 이용하여 수행하였으며, 케이지를 실험 단위로 설정하였다. 식이 및 열스트레스에 따른 전체 유전자 발현 패턴을 파악하기 위해 principal component analysis for mixed data (PCA-Mix)를 수행하였고, 조건별 식이 효과를 평가하기 위해 principal component analysis (PCA)를 추가로 실시하였다. 군집 간 유사성과 구조를 분석하기 위해 agglomerative hierarchical clustering (AHC)을 수행하였으며, 유클리드 거리 (Euclidean distance)와 Ward 방법 (Ward's linkage method)을 적용하였다. 또한, 유전자 발현 패턴을

시각화하기 위해 z-score transformation을 적용한 heatmap 분석을 실시하였다. 단변량 분석에서는 케이지 단위로 유전자 발현값을 정리한 후, 정규성 (Shapiro-Wilk test)과 등분산성 (Levene's test)을 확인하였다. 이후 one-way analysis of variance (ANOVA)를 실시하고, Tukey's honestly significant difference (HSD) test를 통해 집단 간 차이를 비교하였다. 통계적 유의수준은  $p < 0.05$ 로 설정하였다.

## 결 과

### 1. 식이 및 열스트레스에 따른 PCA-Mix 분석

식이 조건 (5일)과 열스트레스 처리에 따른 유전자 발현 변화를 통합적으로 평가하기 위해 PCA-Mix 분석을 수행하였다 (Fig. 1). 제1주성분 (F1)과 제2주성분 (F2)은 각각 36.35%와 29.78%의 분산을 설명하여 총 66.13%의 변이를 설명하였다. 범주형 변수 (category) 분석 결과, 5일 식이 조건은 F1의 양의 방향에, 열스트레스 조건은 F1의 음의 방향에 위치하여 두 처리 조건이 제1주성분을 따라 명확히 구분되었다 (Fig. 1a). 반면, F2 축에서는 열스트레스 조건이 양의 방향에, 5일 식이 조건이 음의 방향에 분포하여 두 요인이 상이한 방향으로 변이에 기여하는 것으로 나타났다. 변수 squared loading plot 분석 결과, F1 축은 *ilp1*, *ilp2*, *tor*, *apid1*, *sod1* 등과 높은 기여도를 보여 주로 영양 감지 및 대사 관련 유전자에 의해 설명되는 축으로 해석되었다 (Fig. 1b). 반면, F2 축은 *vg*, *hsp70*, *relish*, *AmGr10* 등과 높은 기여도를 나타내어 스트레스 및 면역 반응과



**Fig. 1.** PCA-Mix analysis of gene expression patterns under dietary (5-day feeding) and heat-stress conditions. (a) Distribution of categorical variables. (b) Squared loading plot of variables. F1 represents metabolic/nutritional variation, whereas F2 represents stress- and immune-related variation.

관련된 유전자들이 주요 변이를 설명하는 축으로 확인되었다.

### 2. 5일간 식이에 따른 유전자 발현의 PCA 분석

5일간 식이 처리에 따른 꿀벌의 유전자 발현 패턴을 평가하기 위해 PCA를 수행한 결과, 제1주성분(F1)과 제2주성분(F2)은 각각 63.00%와 33.96%의 분산을 설명하여 총 96.96%의 변이를 설명하였다(Fig. 2a). PCA score plot에서 식이 처리 간 뚜렷한 분리가 관찰되었다. S-syrup 처리군은 F1의 양의 방향에 위치하여 다른 식이군과 명확히 구분되었으며, 이는 S-syrup 식이가 다른 식이에 비해 상이한 전사적 반응을 유도함을 의미한다. 반면, S-honey와 A-honey는 F1의 음의 방향에 위치하며 서로 인접한 군집을 형성하여 유사한 유전자 발현 패턴을 보였다. Cont 처리군은 F2의 양의 방향에 위치하여 다른 처리군과 구별되었으며, 특히 두 번째 축에서의 차이가 두드러졌다.

변수 loading plot 분석 결과(Fig. 2b), F1 축은 *ilp1*, *ilp2*, *tor*, *apid1*, *sod1*, *relish*와 양의 상관관계를 보여 영양 감지 및 대사 조절과 관련된 전사적 변이를 주로 설명하는 축으로 해석되었다. 반면, *vg*, *jhamt*, *hsp70*은 F1의 음의 방향에 위치하여 영양 저장 및 생리적 항상성과 관련된 조절 경향을 반영하는 것으로 해석된다. F2 축에서는 *AmGr10*, *vg*, *jhamt*가 양의 방향에 기여한 반면, *defensin2*는 음의 방향에 크게 기여하여 면역 및 생리적 상태 변화와 관련된 변이를 설명하는 축으로 해석되었다.

계층적 군집분석 결과(Fig. 2c), S-honey와 A-honey는 Cont와 함께 동일 군집으로 묶인 반면, S-syrup은 이들과 분리된 독립적인 군집을 형성하였다. 이는 설탕시럽 식이

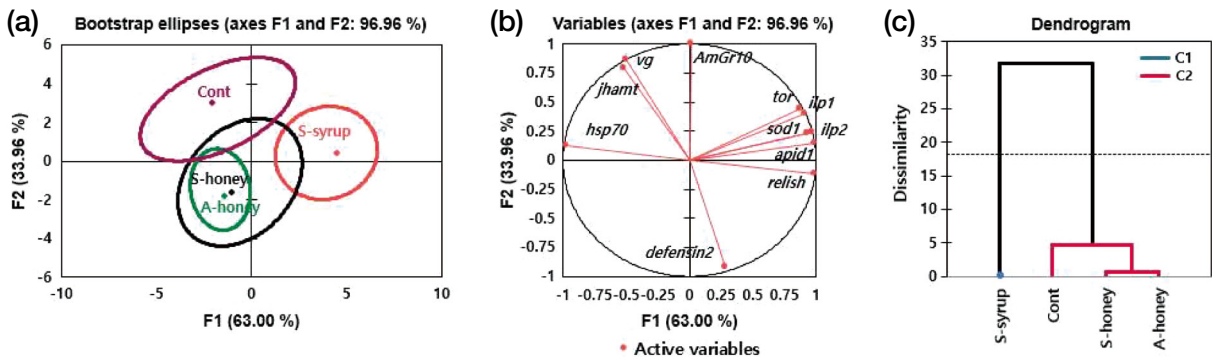
가 꿀 기반 식이 및 대조군과 비교하여 상이한 전사적 프로파일을 유도함을 뒷받침한다.

### 3. 열스트레스 후 식이에 따른 유전자 발현의 PCA 분석

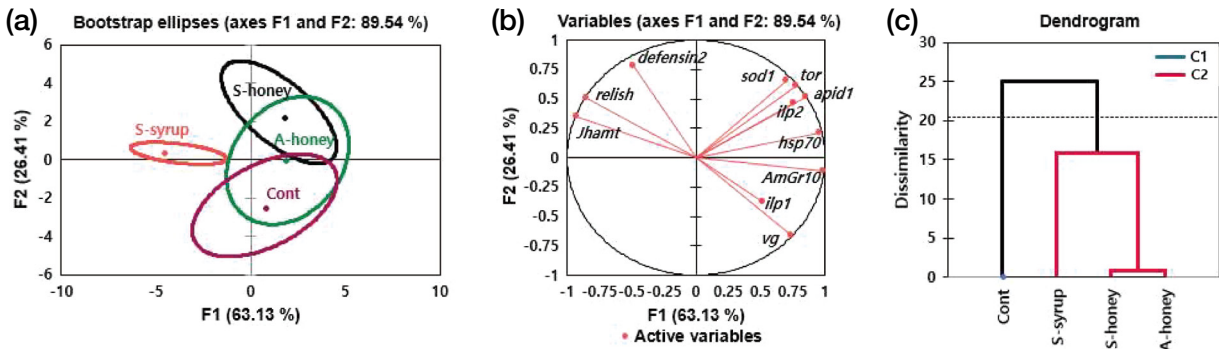
열스트레스 처리 후 식이에 따른 꿀벌의 유전자 발현 변화를 평가하기 위해 PCA를 수행한 결과, 제1주성분(F1)과 제2주성분(F2)은 각각 63.13%와 26.41%의 분산을 설명하여 총 89.54%의 변이를 설명하였다(Fig. 3a). PCA score plot에서 식이 처리 간 군집 구조는 유지되었으나, 5일간 식이 조건과 비교하여 군집의 상대적 분포가 재편성되었다. S-syrup 처리군은 F1의 음의 방향에 위치하여 다른 식이군과 명확히 분리되었으며, 열스트레스 조건에서도 독립적인 전사적 반응을 나타냈다. 반면, S-honey와 A-honey는 F1의 양의 방향에서 서로 근접한 군집을 형성하여 유사한 전사적 반응을 나타냈다. 특히 A-honey는 F2 축을 기준으로 S-honey와 Cont 사이에 위치하여 두 처리군 간 전사적 특성의 중간적인 양상을 보였다.

변수 loading plot 분석 결과(Fig. 3b), F1 축은 *ilp1*, *ilp2*, *tor*, *apid1*, *sod1*, *hsp70*, *AmGr10*, *vg*와 양의 상관관계를 보여, 열스트레스 하에서 영양 감지 및 대사·스트레스 관련 반응이 주요 변이 요인으로 작용함을 나타냈다. 반면, *jhamt*와 *relish*는 F1의 음의 방향에 위치하여 상반된 조절 양상을 보였다. F2 축에서는 *defensin2*가 양의 방향에 크게 기여한 반면, *vg*와 일부 대사 관련 유전자는 음의 방향에 위치하여 면역 반응과 생리적 상태 변이를 반영하는 축으로 해석되었다.

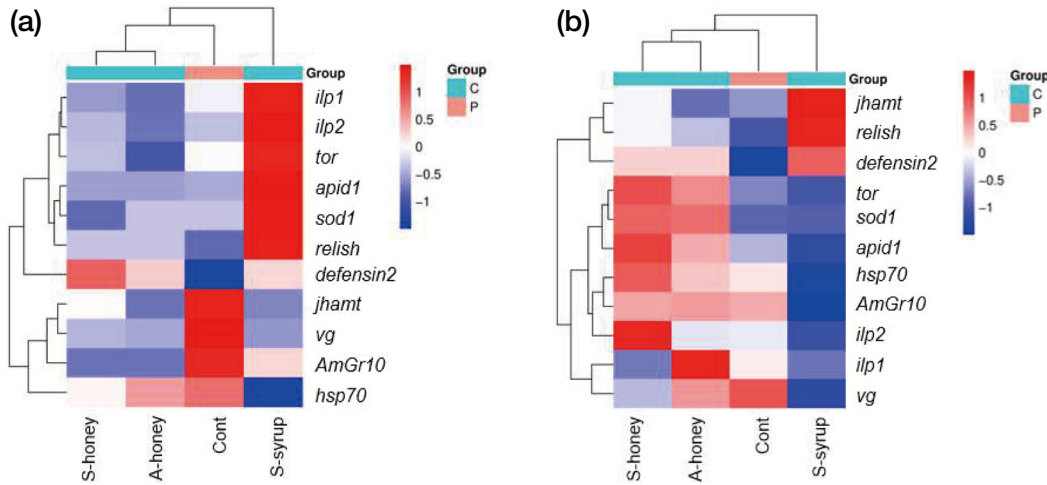
계층적 군집분석 결과(Fig. 3c), S-honey와 A-honey는 밀접한 군집을 형성하였으며, S-syrup은 동일 군집 내에



**Fig. 2.** Multivariate analysis of gene expression under 5-day diets. (a) PCA showing separation among diets (F1: 63.00%, F2: 33.96%). (b) Variable loading plot. (c) S-honey, A-honey, and Cont grouped together, while S-syrup formed a distinct cluster. F1 represents metabolism-related variation, whereas F2 represents immune- and physiological response-related variation.



**Fig. 3.** Multivariate analysis of gene expression under heat-stress conditions. (a) PCA showing separation among diets (F1: 63.13%, F2: 26.41%). (b) Variable loading plot. (c) S-honey and A-honey formed a close cluster, while S-syrup grouped at a higher dissimilarity level and Cont was more distant. F1 represents metabolism-related variation, whereas F2 represents immune- and physiological responses-related variation.



**Fig. 4.** Heatmap of gene expression under (a) 5-day dietary treatments and (b) heat-stress conditions. Values were standardized (z-score transformation), where red indicates higher expression and blue indicates lower expression relative to the mean. Dietary groups were classified based on nutritional composition: C (carbohydrate-based diets) includes S-honey, A-honey, and S-syrup, whereas P (protein-containing diet) corresponds to Cont.

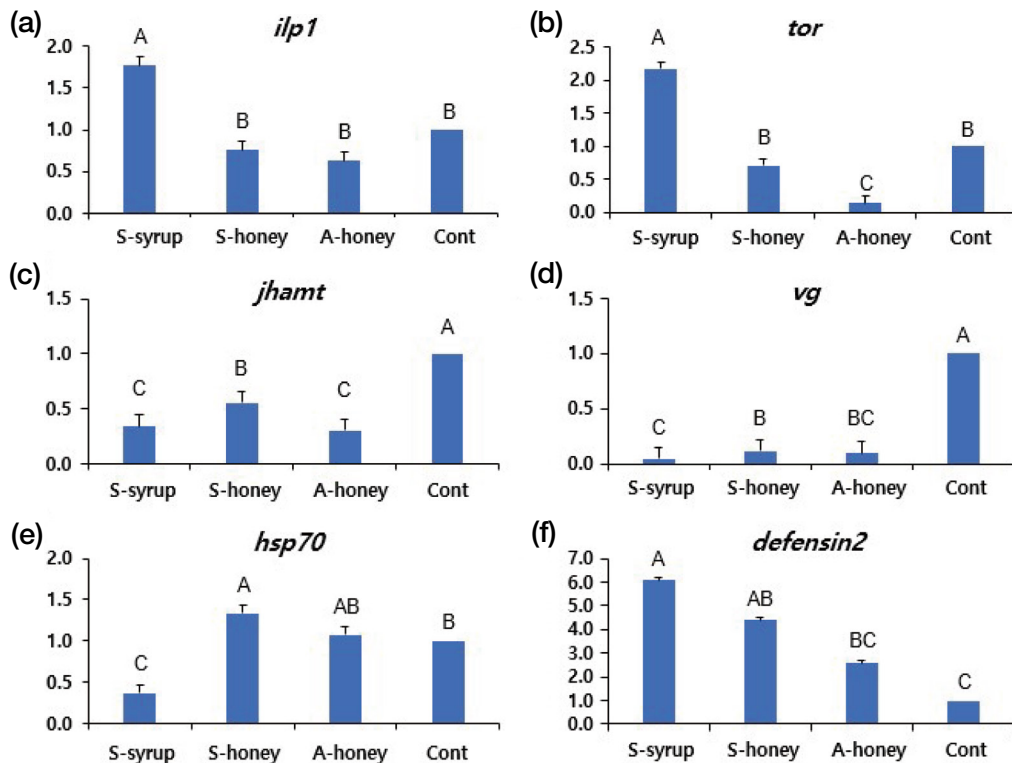
포함되었으나 더 높은 거리에서 결합되어 상대적으로 큰 차이를 나타냈다. Cont는 다른 처리군과 비교하여 상대적으로 더 큰 이질성을 보였다.

#### 4. 식이 및 열스트레스에 따른 유전자 발현 패턴의 heatmap 분석

Heatmap 분석 결과, 5일간 식이 조건과 열스트레스 조건에서 식이에 따른 유전자 발현 패턴의 차이가 뚜렷하게 나타났다(Fig. 4). 5일간 식이 조건에서는 S-syrup 처리군에서 *ilp1*, *ilp2*, *tor*, *apid1*, *sod1*, *relish*의 발현이 상대적으로 높게 나타난 반면, *jhamt*, *vg*, *AmGr10*, *hsp70*의 발현은 낮게 나타났다. S-honey와 A-honey는 전반적으로 유사한

발현 양상을 보였으며, Cont는 *jhamt*, *vg*, *AmGr10*, *hsp70*에서 다른 식이군과 구별되는 발현 패턴을 나타냈다(Fig. 4a).

열스트레스 조건에서는 유전자 발현 패턴이 재편성되는 경향을 보였다. S-syrup 처리군에서는 *jhamt*, *relish*, *defensin2*의 발현이 상대적으로 높게 나타난 반면, *tor*, *sod1*, *apid1*, *hsp70*, *AmGr10*, *ilp2*, *vg*의 발현은 낮게 나타났다. 반면 S-honey와 A-honey는 서로 유사한 발현 양상을 보였으며, A-honey는 *hsp70* 및 *vg*뿐만 아니라 일부 대사 및 스트레스 관련 유전자(*tor*, *ilp2*, *sod1*)에서도 S-honey와 Cont 사이의 중간적인 발현 수준을 나타냈다(Fig. 4b).



**Fig. 5.** Relative expression of representative genes under 5-day dietary treatments and heat-stress conditions. (a~d) Expression levels of metabolism- and nutrient-sensing-related genes (*ilp1*, *tor*, *jhamt*, and *vg*) after 5 days of feeding. (e, f) Expression levels of stress- and immune-related genes (*hsp70* and *defensin2*) under heat-stress conditions (45°C, 4 h). Bars represent mean  $\pm$  SE. Different uppercase letters indicate significant differences among dietary treatments (one-way ANOVA followed by Tukey's HSD test,  $p < 0.05$ ).

### 5. 식이 및 열스트레스에 따른 주요 유전자 발현 분석

5일간 식이 조건에서 대사 및 영양 감지 관련 유전자 발현은 식이에 따라 유의한 차이를 나타냈다(Fig. 5). *ilp1*과 *tor*는 S-syrup 처리군에서 가장 높은 발현을 보였으며, 다른 식이군(S-honey, A-honey, Cont)에서는 상대적으로 낮은 수준을 나타냈다(Fig. 5a, b). 반면, *jhamt*와 *vg*는 Cont 처리군에서 가장 높은 발현을 나타냈다(Fig. 5c, d). 특히 *vg*의 발현이 Cont에서 가장 높고 S-syrup에서 가장 낮게 나타난 것은 식이 조성에 따라 영양 저장 및 생리적 항상성 유지 능력이 달라질 수 있음을 보여준다.

열스트레스 조건에서는 스트레스 및 면역 관련 유전자 발현이 식이에 따라 상이하게 나타났다(Fig. 5e, f). *hsp70*은 S-honey에서 가장 높은 발현을 보였으며, A-honey와 Cont에서 중간 수준, S-syrup에서 가장 낮은 발현을 나타냈다(Fig. 5e). 반면, *defensin2*는 S-syrup에서 가장 높은 발현을 보였고, S-honey, A-honey, Cont 순으로 감소하는 경향을 나타냈다(Fig. 5f). 이러한 결과는 설탕시럽 식이가

열스트레스 조건에서 면역 반응을 상대적으로 과도하게 유도하는 반면, 꿀 기반 식이는 보다 안정적인 스트레스 반응을 유지함을 시사한다.

## 고 찰

본 연구에서는 식이 조성과 열스트레스가 꿀벌의 대사 및 면역 관련 유전자 발현에 미치는 영향을 분석하였다. PCA 및 PCA-Mix 분석 결과, 식이 조건과 열스트레스는 서로 다른 전사적 변이를 유도하며, 각각 대사 조절과 스트레스·면역 반응과 관련된 축을 형성하는 것으로 나타났다. 이는 영양 상태와 환경 스트레스가 꿀벌의 생리 조절을 독립적이면서도 상호작용적으로 변화시킬 수 있음을 시사한다.

5일간 식이 조건에서 설탕시럽(S-syrup)은 *ilp1*과 *tor*의 발현을 증가시켜 영양 감지 및 대사 신호 경로를 강하게 활성화하는 경향을 보였다. 이는 단순 탄수화물 위주의 식

이가 인슐린/TOR 신호계를 과도하게 자극할 수 있음을 의미하며, 에너지 이용이 특정 경로로 치우칠 가능성을 시사하며 장기적인 생리적 안정성을 저해할 가능성이 시사된다(Ament *et al.*, 2008; Wheeler and Robinson, 2014). 설탕 시럽은 신속한 에너지원으로는 유용하지만, 장기적인 생리적 안정성을 유지하는 데 필요한 다양한 영양소(단백질, 비타민, 미네랄 등)를 충분히 제공하지 못한다(Palmer-Young *et al.*, 2019; Bugarova *et al.*, 2021).

특히, *vg*는 지방체에서 합성되어 혈림프를 통해 운반되며, 유충 먹이 생산에 기여할 뿐만 아니라 항산화 방어, 면역 조절 및 수명 유지에 핵심적인 역할을 수행한다(Schlicher and Scheiner, 2023). 또한 꿀벌의 영양 상태와 생리적 안정성을 반영하는 핵심 지표로, 꿀벌의 천연 단백질원인 화분이 포함된 대조군(Cont)에서 높은 발현을 보여, 꿀벌의 건강 상태가 비교적 양호한 상태를 반영하는 것으로 해석할 수 있다(Seehuus *et al.*, 2006).

다만, 본 연구에서 대조군(Cont)은 벌빵(단백질원)과 설탕시럽을 함께 공급한 반면, 다른 처리군은 단일 탄수화물 원만 제공되었기 때문에, 이러한 영양 조성의 차이가 유전자 발현 결과에 영향을 미쳤을 가능성을 배제할 수 없다. 특히 Cont에서 관찰된 *vg*의 높은 발현은 화분 유래 단백질 공급에 기인한 결과일 가능성이 있으며, 이는 식이 간 직접적인 비교 해석에 있어 고려되어야 할 중요한 한계점이다.

본 연구에서 나타난 결과를 종합하면, ‘안정적인 생리 상태’란 특정 대사 경로의 과도한 활성화 없이, 영양 저장 및 항상성 관련 유전자가 적절히 유지되고, 스트레스 및 면역 반응 또한 필요 이상으로 활성화되지 않는 균형 상태를 의미한다(Sagastume *et al.*, 2025). 즉, 에너지 대사, 영양 저장, 호르몬 조절, 스트레스 대응 및 면역 반응이 서로 조화를 이루는 상태로 해석할 수 있다. 이러한 관점에서 Cont 처리군은 화분(단백질) 공급에 기인할 가능성으로 인해 *vg*의 높은 발현을 통해 생리적 항상성과 호르몬 조절이 상대적으로 안정적으로 유지된 기준 상태(baseline physiological state)를 반영하는 것으로 해석된다(Corona *et al.*, 2007). 또한, 꿀 기반 식이(S-honey, A-honey)는 이러한 Cont의 특성과 대체로 유사한 방향의 유전자 발현 패턴을 보이며, 대사·면역·스트레스 반응이 균형 있게 조절된 상태를 유지하는 경향을 나타냈다(Wheeler and Robinson, 2014).

열스트레스 조건(45°C에서 4시간 동안의 급성 열스트레스)은 꿀벌에서 heat shock response 및 생리적 스트레스

반응을 유도하는 조건으로 보고된 바 있으며, 단기간 내 스트레스 반응을 평가하기 위해 설정하였다(Alqarni *et al.*, 2019; McMenamin *et al.*, 2020). 이러한 조건에서 식이에 따른 유전자 발현 구조가 재편성되었으며, 영양 상태가 스트레스 대응 방식에 중요한 영향을 미치는 것으로 나타났다. S-syrup 처리군에서는 *defensin2*와 *relish*와 같은 면역 관련 유전자의 발현이 증가한 반면, *hsp70*의 발현은 상대적으로 낮게 나타났다. 이는 스트레스 상황에서 방어 반응이 면역 활성화 쪽으로 치우치는 반면, 세포 보호 및 단백질 안정화와 관련된 HSP 계열 스트레스 대응 능력은 상대적으로 부족할 수 있음을 시사한다(Sagastume *et al.*, 2025). 다른 연구에서도 병원체 감염 또는 *Varroa destructor* 기생 상황에서도 유사한 전사적 반응이 보고된 바 있으며, 이때 면역 경로의 활성화는 향상된 면역 기능보다는 생리적 스트레스를 반영하는 경우가 많다(Kuster *et al.*, 2014). 따라서 설탕시럽 급여에서 나타난 면역 유전자 발현 증가는 생리적 회복력 향상보다는 에너지 비용이 수반될 수 있는 스트레스 유도 반응으로 해석될 수 있다(Barroso-Arévalo *et al.*, 2019). 이러한 불균형은 장기적으로 에너지 자원의 비효율적 사용, 산화 스트레스 증가 및 수명 단축으로 이어질 가능성을 시사하나, 본 연구는 단기 실험(5일)에 기반한 결과이므로 장기적인 영향에 대해서는 향후 추가적인 연구가 필요하다(Jang *et al.*, 2022). 또한 본 결과는 mRNA 발현 수준에서 관찰된 것으로, 단백질 활성화 수준에서의 추가적인 검증이 필요하다.

반면, 꿀 기반 식이는 열스트레스 조건에서도 비교적 안정적인 발현 패턴을 유지하였다. A-honey는 S-honey와 Cont 사이의 중간적인 발현 양상(*relish*, *tor*, *sod1*, *apid1*, *hsp70*, *ilp2*, *vg*)을 보이며, 대사 및 스트레스 반응 간의 균형적인 조절 상태를 반영하는 것으로 해석된다(Fig. 4b). 이러한 중간적 발현 양상은 A-honey가 S-honey에 비해 다양한 미량 생리활성 물질(폴리페놀, 플라보노이드 등)을 포함하는 특성에 기인할 가능성이 있다(Bugarova *et al.*, 2021). 즉, A-honey는 단순 당 중심의 S-honey보다 복합적인 생리활성 성분을 포함하고 있으나, Cont와 같은 단백질 공급원이 없기 때문에, 이러한 조성 차이가 대사 및 면역 반응에서 중간적인 전사적 패턴을 유도했을 가능성을 시사한다. 이는 꿀이 단순 당뿐 아니라 다양한 미량 영양소와 생리활성 물질을 포함하고 있어, 복합적인 생리 조절, 항산화 및 면역 조절에 영향을 미칠 수 있음을 시사한다

(Nanda *et al.*, 2003; Palmer-Young *et al.*, 2019).

이러한 결과는 대사 조절, 스트레스 반응, 면역 반응 간의 상호작용이 식이에 의해 크게 영향을 받을 수 있음을 보여준다. 설탕시럽 식이는 대사 신호(인슐린/TOR axis)를 과도하게 활성화하는 동시에, 스트레스 상황에서 면역 관련 유전자의 발현을 증가시키는 경향을 보이며, 이는 생리적 균형이 무너진 상태로 해석될 수 있다(Wheeler and Robinson, 2014). 반면, 꿀 기반 식이는 대사 신호의 과도한 자극을 완화하면서도, *hsp70* 발현을 적절히 유지하여 열스트레스에 대한 세포 보호 능력과 면역 조절을 함께 지지하는 것으로 나타났다(Sagastume *et al.*, 2025). 이는 꿀 기반 식이가 설탕시럽 식이에 비해 스트레스 노출 하에서 꿀벌의 생리적 안정성과 회복력을 유지하는 데 보다 유리할 가능성을 시사한다(Bugarova *et al.*, 2021).

따라서 본 연구는 양봉 현장에서 널리 사용되는 설탕시럽이 단기적인 에너지 공급원으로는 유용할 수 있으나, 장기적으로는 꿀벌의 생리적 안정성과 스트레스 저항성 측면에서 한계를 가질 수 있음을 시사한다. 특히 기후변화로 인한 고온 스트레스 증가 상황에서, 꿀 또는 영양적으로 복합적인 식이를 적절히 조합하여 제공하는 것이 꿀벌의 건강 유지, 봉군 수명 연장 및 생산성 향상에 중요한 역할을 할 것으로 판단된다. 향후 연구에서는 봉군 수준에서 장기적 생리 지표(수명, 꿀 생산량 및 월동 성공률)를 포함한 통합적 평가를 통해, 실제 양봉 현장에서 적용 가능한 최적 식이 전략을 보다 구체적으로 제안할 필요가 있다.

## 적 요

본 연구를 통해 꿀벌의 식이 조성이 열스트레스 하에서 대사·면역 조절과 생리적 안정성 유지에 핵심적 역할을 한다는 것을 분자 수준에서 확인하였다. 설탕시럽은 인슐린/TOR 경로를 과도하게 자극하면서 *vg*와 *hsp70* 발현이 낮아져, 장기적인 생리적 균형을 저해할 수 있는 경향을 보였다. 반면, 대조식이와 꿀 기반 식이(아카시아꿀, 사양꿀)는 *vg*와 *hsp70* 발현을 유지하는 등 균형 잡힌 유전자 발현 패턴을 보여, 생리적 안정성과 스트레스 저항성이 높은 조건을 반영한다.

열스트레스 하에서는 설탕시럽 급여 시 면역 유전자만 과도하게 증가하고 *hsp70* 발현이 낮은 불균형이 나타난

면, 꿀 기반 식이는 *hsp70*와 면역 유전자를 조화롭게 조절하여 세포 보호와 회복을 동시에 지원하는 경향을 보였다. 따라서 양봉 현장에서는 단기적 에너지 보충에 설탕시럽을 활용할 수 있으나, 봉군의 장기 건강과 스트레스 저항성을 고려할 때에는 꿀 또는 영양적으로 복합적인 식이를 적절히 활용하는 것이 바람직하며, 특히 고온 스트레스가 빈발하는 환경에서 이러한 식이 전략이 봉군 생존율과 생산성 향상에 기여할 가능성이 있다.

## 감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 사업(과제번호: RS-2023-0023 2749)과 교육부 대학중점연구소지원사업(과제번호: 2020 R1A6A1A03041954)의 지원으로 수행되었다.

## 인용 문헌

- Alaux, C., F. Ducloz, D. Crauser and Y. L. Conte. 2010. Diet effects on honeybee immunocompetence. *Biol. Lett.* 6: 562-565. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2009.0986>
- Alqarni, A. S., H. Ali, J. Iqbal, A. A. Owayss and B. H. Smith. 2019. Expression of heat shock proteins in adult honey bee (*Apis mellifera* L.) workers under hot-arid subtropical ecosystems. *Saudi J. Biol. Sci.* 26: 1372-1376. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2019.08.017>
- Ament, S. A., M. Corona, H. S. Pollock and G. E. Robinson. 2008. Insulin signaling is involved in the regulation of worker division of labor in honey bee colonies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105: 4226-4231. <https://doi.org/10.1073/pnas.0800630105>
- Bach, D. M., M. A. Holzman, F. Wague, J. L. Miranda, A. J. Lopatkin, J. H. Mansfield and J. W. Snow. 2021. Thermal stress induces tissue damage and a broad shift in regenerative signaling pathways in the honey bee digestive tract. *J. Exp. Biol.* 224: jeb242262. <https://doi.org/10.1242/jeb.242262>
- Barroso-Arévalo, S., M. Vicente-Rubiano, F. Puerta, F. Molero, and J. M. Sánchez-Vizcaíno. 2019. Immune related genes as markers for monitoring health status of honey bee colonies. *BMC Vet. Res.* 15: 72. <https://doi.org/10.1186/s12917-019-1823-y>
- Brodschneider, R. and K. Crailsheim. 2010. Nutrition and health in honey bees. *Apidologie* 41: 278-294.
- Brunner, F. S., P. Schmid-Hempel and S. M. Barribeau. 2014. Protein-poor diet reduces host-specific immune gene expres-

- sion in *Bombus terrestris*. Proc. Biol. Sci. 281: 20140128. <https://doi.org/10.1098/rspb.2014.0128>
- Bugarova, V., J. Godocikova, M. Bucekova, R. Brodschneider and J. Majtan. 2021. Effects of the carbohydrate sources nectar, sucrose and invert sugar on antibacterial activity of honey and bee-processed syrups. Antibiotics 10: 985.
- Christen, V. 2023. Different effects of pesticides on transcripts of the endocrine regulation and energy metabolism in honeybee foragers from different colonies. Sci. Rep. 13: 1985.
- Corona, M., R. A. Velarde, S. Remolina, A. Moran-Lauter, Y. Wang, K. A. Hughes and G. E. Robinson. 2007. Vitellogenin, juvenile hormone, insulin signaling, and queen honey bee longevity. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 104: 7128-7133. <https://doi.org/10.1073/pnas.0701909104>
- Deutsch, C. A., J. J. Tewksbury, R. B. Huey, K. S. Sheldon, C. K. Ghalambor, D. C. Haak and P. R. Martin. 2008. Impacts of climate warming on terrestrial ectotherms across latitude. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 105: 6668-6672. <https://doi.org/10.1073/pnas.0709472105>
- Elekonich, M. M. 2008. Extreme thermotolerance and behavioral induction of 70-kDa heat shock proteins and their encoding genes in honey bees. Cell Stress Chaperones 14: 219-226.
- Goulson, D., E. Nicholls, C. Botías and E. L. Rotheray. 2015. Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. Science 347: 1255-1257.
- Jang, T., H. Moon and K. P. Lee. 2022. Current research trends in honey bee nutrition. J. Apic. 37: 275-289.
- Kuster, R. D., H. F. Boncristiani and O. Rueppell. 2014. Immune gene and viral transcript dynamics during parasitic *Varroa destructor* mite infection of developing honey bee (*Apis mellifera*) pupae. J. Exp. Biol. 217: 1710-1718.
- Lim, S., J. Jung, U. Yunusbaev, R. Ilyasov and H. W. Kwon. 2019. Characterization and its implication of a novel taste receptor detecting nutrients in the honey bee, *Apis mellifera*. Sci. Rep. 9: 11620.
- McMenamin, A. J., K. F. Daughenbaugh and M. L. Flenniken. 2020. The heat shock response in the western honey bee (*Apis mellifera*) is antiviral. Viruses 12: 245. <https://doi.org/10.3390/v12020245>
- Nanda, V., B. C. Sarkar, H. K. Sharma and A. S. Bawa. 2003. Physico-chemical properties and estimation of mineral content in honey produced from different plants in Northern India. J. Food Compos. Anal. 16: 613-619.
- Paerhati, Y., S. Ishiguro, R. Ueda-Matsuo, P. Yang, T. Yamashita, K. Ito, H. Maekawa, H. Tani and K. Suzuki. 2015. Expression of *AmGR10* of the gustatory receptor family in honey bee is correlated with nursing behavior. PLoS One 10: e0142917. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0142917>
- Palmer-Young, E. C., I. W. Farrell, L. S. Adler, N. J. Milano, P. A. Egan, R. R. Junker, R. E. Irwin and P. C. Stevenson. 2019. Chemistry of oral rewards: intra- and interspecific variability of nectar and pollen secondary metabolites across taxa. Ecol. Monogr. 89: 1-23. <https://doi.org/10.1002/ecm.1335>
- Sagastume, S., G. Cilia, D. Henriques, C. Yadró, M. Corona, M. Higes, M. A. Pinto, A. Nanetti and R. Martín-Hernández. 2025. Climate change-induced stress in the honey bee *Apis mellifera* L. - a genetic review. Front. Physiol. 16: 1623705. <https://doi.org/10.3389/fphys.2025.1623705>
- Schilcher, F. and R. Scheiner. 2023. New insight into molecular mechanisms underlying division of labor in honeybees. Curr. Opin. Insect Sci. 59: 101080. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2023.101080>
- Seehuus, S., K. Norberg, U. Gimsa, Y. Krekling and G. V. Amdam. 2006. Reproductive protein protects functionally sterile honey bee workers from oxidative stress. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 103: 962-967. <https://doi.org/10.1073/pnas.0502681103>
- Tsuruda, J. M., P. Chakrabarti and R. R. Sagili. 2021. Honey bee nutrition. Vet. Clin. Food Anim. Pract. 37: 505-519. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2021.06.006>
- Wheeler, M. M. and G. E. Robinson. 2014. Diet-dependent gene expression in honey bees: Honey vs. sucrose or high fructose corn syrup. Sci. Rep. 4: 5276.