

# 韓國產 화랑곡 나방의 遊離 아미노酸에 關한 研究

李 敬 魯

(建國大·文理大·生物學科)

## Studies on the Free Amino Acids of Indian Meal Moth

LEE, Kyung-Ro

(Dept. of Biology, Kon-Kuk University)

(1964年 3月 19日 接受)

### SUMMARY

The free amino acid content of Indian meal moth (*Plodia interpunctella* HUBNER) was analysed at various developmental stages by means of paper chromatography.

- 1) The free amino acids present are alanine, arginine, aspartic acid, glutamic acid, glycine, histidine, leucine, methionine, proline, serine, threonine, tyrosine and valine.
- 2) Proline was detectable only in the acid-hydrolyzed Indian meal moth.
- 3) Arginine was clearly detected only in the larva stage.
- 4) Tyrosine, methionine and valine were increased in the pupa stage.
- 5) Serine, glycine and tyrosine were present in high concentrations in all stages.

### 緒 論

昆蟲類의 몸을 이루는 蛋白質 構成 아미노酸과 遊離 상태의 아미노酸은 高등한 동물에서 보다 높은 濃度를 보이고 있다(Sarlet *et al.* 1952). 昆蟲類의 아미노酸 分析과 蛋白質의 物質代謝에 關한 初期의 研究는 體液 또는 hemolymph를 材料로 한 部分의 일 것이 있다. 그러나 昆蟲의 發生에 따른 形態形成과 關連하여 研究된 것 은 그리 많지 않다.

Ussing (1945)은 *Colcoptera*의 一種인 *Melolontha incana* 를 材料로 體液에서 遊離性 asparagine을 檢出하고 生理的 作用을 調査했으며, Rudikin and Schultz (1947)는 *Drosophila melanogaster*의 飼育에 필요한 必需 아미노酸 을 調査報告하였다.

*Aeshna juncea* nymph의 hemolymph를 試料로 Raper and Shaw (1948)는 아미노酸을 分析報告하면서, glycine, alanine, valine, leucine 등이 높은 濃度를 보이고 serine 은 少量 檢出된다고 했다. Finlayson and Hamer (1949)는 *Calliphora erythrocephala*에서 11種의 아미노酸을 調査하고 特히 cystine이 檢出되지 않는다 하였고, Levenbook (1950)는 *Gastrophilus haemorrhoidalis*의 幼蟲 體液을 試料로 研究했는데, histidine, methionine, threonine 은 檢出되지 않으며 aspartic acid, glutamic acid 등이 高

적으로 分析되어 역시 모두 11種의 아미노酸을 報告 함으로서 昆蟲類에 있어서도 일반적인 아미노酸의 종류 가 알려지게 되었다. Fukuda (1950)는 *Bombyx mori*를 材料로 體液에서 遊離아미노酸을 分析檢出하고 아미노 酸은 昆蟲의 成長에 따라 特異한 消長關係를 나타낸다고 했으며 特히 全 窒素含有物의 2/5는 非蛋白質性窒素 라고 했다. Chetfurda and Williams (1951)는 *Platysamia cercopia*의 變態 stage에 따른 아미노酸의 分布에 關하여 檢出된 아미노酸 12種 外에는 aspartic acid, phenylalanine, threonine이 分析되지 않는다 했고, Wyatt *et al.* (1956)는 *Bombyx mori*의 아미노酸과 特히 有機化合物을 分析檢出하여 體液의 化學的 性質을 調査報告했다.

Benassi *et al.* (1961 a)는 *Anacridium aegyptium*에서, 또 Benassi *et al.* (1961 b)는 *Schistocerca gregaria*의 hemolymph 에서 各各 16種, 11種의 遊離아미노酸을 分析하고 그 들의 아미노酸 代謝를 살폈다. Florkin (1959)도 *Locusta migratoria*에서 16種의 遊離 아미노酸을 報告했고 最近 이 Ganti and Shanmugasundaram (1963)는 *Corcyra cephalonica*의 幼蟲과 蛹을 材料로 알에서 부터 成蟲으로 成長해 가는 變態 stage에 따른 遊離아미노酸 13種을 分析 檢出하고 幼蟲 stage로 부터 蛹, 成蟲으로 發生이 進行함에 따라 아미노酸의 濃度가 減退되었다가 器官形成 이 일어나는 時期에는 다시 增加한다고 했으며 threonine

이 檢出되지 않는다고 指摘했다.

Shotwell and Bennet (1963)은 *Popillia japonica*의 幼蟲을 材料로 20種의 아미노酸을 分析報告하고 glutamic acid가 가장 높은 濃度를 보이며 phenylalanine, methionine은 나타나지 않는다고 했다. Chen (1963)은 *Culex pipiens*의 幼蟲과 蛹을 材料로 遊離아미노酸을 發生 stage와 雌雄에 따라 比較 分析하여 16種을 얻었고 蟲에 있어서는  $\beta$ -alanine이, 우에서는 methionine이 蓄積되어 있으며 methionine은 成蟲에서는 卵成熟기간중 窒素含有 아미노酸의 代謝最終產物일 것이라고 報告했다.

以上の 報告에 의하면 昆蟲類의 아미노酸 分析에 의한 遊離 아미노酸의 종류는 비슷하고 濃度는 發生이 進行됨에 따라 그들의 代謝와 연관하여 어느 程度 감소하다가 어느 時期에 이르면 다시 增加하는 傾向을 보인다. 即 幼生器官의 解消와 蛹에 이르는 器官의 新生에 따라 濃度의 變化를 보이고 蛋白質合成에 필요한 아미노酸의 종류가 풍부해짐을 나타내고 있다.

本實驗은 貯藏穀類의 害蟲인 花랑곡나방의 病理學的 研究의 基礎調査 一部로 發生 stage에 따른 遊離아미노酸의 分布相의 變化와 持히 cuticle 形成過程을 比較檢討코져 paper chromatography 法으로써 幼蟲과 蛹의 發生에 따른 아미노酸의 變化를 定性的으로 調査했고, 形態 形成의 觀察을 위한 組織化學的 檢査도 같이 했다.

### 實驗材料 및 方法

實驗材料는 本教室에서 飼育한 ( $27^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) 成蟲이 産卵하여 孵化한 花랑곡나방 (*Plodia interpunctella* HUBNER)의 終合幼蟲과 蛹의 蟲을 使用하였다.

各 stage 別로 ethylalcohol로 即死케 한후  $80^{\circ}-90^{\circ}\text{C}$ 의 dry oven 內에서 完全 乾燥시킨후 motor로 갈아 1g씩 秤量하여 70% ethylalcohol 15cc를 加하고 homogenize한 다음 24時間동안 放置하였다가 10% trichloroacetic acid 溶液에 處理하여 蛋白質을 沈澱시키고  $50^{\circ}\text{C}$ 의 water bath 위에서 加熱濃縮하여 paper chromatography 用 試料로 使用했다.

加水分解는 各 stage 別로 1g을 秤量한후 12時間동안 ether에 넣고 soxhating하여 脂肪을 除去한후 6N HCl 12cc를 加하여  $120^{\circ}\text{C}$ 에서 24時間 加水分解하였다.

分解物을 濾過하여 5cc의 dist. water로 바꿔주며 加熱濃縮하여 HCl을 除去하고 水溶液을 만들어 paper chromatography 用 試料로 사용했다.

Paper chromatography 展開는 micropipette로 0.005 ml의 試料를 직경 5 mm로 spotting하여  $25^{\circ}-28^{\circ}\text{C}$ 에서 展開시켰다. 濾紙는 Whatman No. 1을 크기 25×25 cm로 잘라서 使用했고, 展開溶媒는 一次元에서 phenol: dist.

water (4:1)을, 二次元에서 n-butanol: acetic acid: dist. water (4:1:5)의 上澄液을 利用했으며, 一次元 展開所要 時間은 8時間 30分, 二次元 展開所要 時間은 7時間이었다.

Chromatogram의 乾燥는  $28^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 에서 24時間했으며, 0.2% ninhydrin 溶液을 噴霧하여  $80^{\circ}-100^{\circ}\text{C}$ 의 oven에서 約 10分間 加熱發色시켰고 標準 아미노酸을 같이 展開시켜 試料 아미노酸의 同定에 利用했다. 標準 아미노酸으로 사용된 것은 alanine, arginine, asparagine, aspartic acid, cysteine, glutamic acid, glycine, histidine, leucine, methionine, proline, serine, threonine, tyrosine, tryptophan, valine 등 16種이다.

組織化學的 檢査에는 10% formalin으로 固定한 것을 paraffin method를 써서 5 $\mu$ 으로 薄고 Mallory's triple stain을 利用했다.

### 結 果

韓國産 花랑곡 나방 幼蟲과 蛹의 alcohol 抽出物에 의한 遊離아미노酸과 鹽酸加水分解物을 試料로 하여 paper chromatography 法으로 檢出된 아미노酸의 종류와 spot의 크기, 그리고 color 농도로서 定한 比較含量은 table 1과 같다.

1) 幼蟲 stage에서는 遊離아미노酸 alanine, arginine, aspartic acid, glutamic acid, glycine, histidine, leucine, methionine, serine, threonine, tyrosine, valine 등이 檢出되었고, 蛹 stage에서는 arginine을 除外한 11種이 檢出 同定되었다.

2) 鹽酸 加水分解物에서는 幼蟲 stage에서 alanine, arginine, aspartic acid, glutamic acid, glycine, histidine, leucine, methionine, proline, serine, threonine, tyrosine, valine 등이 檢出되었고 蛹 stage에서는 arginine을 除外한 12種과 未知物 1種이 檢出되었다.

3) Proline은 加水分解物에서만 檢出되었다.

4) Arginine은 蛹 stage에서는 檢出되지 않았다.

5) Valine, methionine, tyrosine은 蛹化하면서 幼蟲 stage 보다 增加하였다.

6) 아미노酸의 spot 크기와 color 등으로 比較해 보면 serine, glycine, tyrosine, valine, alanine 등이 높은 농도를 보이고 있다.

7) 쌀·콩을 飼料로 飼育한 個體間에는 外部形態上으로는 體長과 體重에 差가 있었으나 cuticle의 形成過程, 기타의 組織化學的 檢査에는 差가 없었고 定性的으로도 別差가 없었다.

Table 1. Free amino acids (A) and amino acids of hydrolyzed extracts (B) of *Plodia interpunctella*.

amino acids	(A)		(B)	
	Larva stage	Pupa stage	Larva stage	Pupa stage
Alanine	+++	+++	++	++
Arginine	+		+	
Aspartic acid	+	+	+	++
Glutamic acid	+	+	++	++
Glycine	+++	+++	+++	+++
Histidine	+	+	++	+
Leucine	+	++	++	++
Methionine	+	++	+	++
Proline			++	++
Serine	+++	+++	+++	+++
Threonine	+	+	+	+
Tyrosine	++	+++	++	+++
Valine	++	+++	++	+++
Total	12	11	13	12
Unknown	1	1	1	1

+: very small    ++: small    +++: large.

考 察

Table 1 과 같이 14 種(未知物 1 種 包含)의 아미노酸이 檢出되었는데 이는 다른 昆蟲의 아미노酸類와 큰 差가 없었다. 本實驗은 幼蟲 stage와 蛹 stage의 發生에 따른 cuticle 形成過程과 이에 關係하는 아미노酸의 物質代謝와 機能을 考察하는데 中점을 두었다.

House (1961)에 依하면 alanine 은 transamination 에 의하여 pyruvic acid 로 부터 形成되고 만일 부족하면 昆蟲의 全體의인 成長을 阻礙한다고 했는데 本實驗에서는 幼蟲 stage 를 통해 檢出되었다. Hinton (1954)은 arginine 이 肌肉에서 筋肉의 energy store 로 作用한다고 했으며 부족할 때는 citrulline 에 의하여 보충된다고 했는데 화랑곡나방에서 筋肉이 形成되어 가는 pupa stage에서 檢出되지 않는 것은 의문점이다. 그러나 arginine 의 作用이 transamination 에 의해 調節되는 것 같이 생각된다.

Aspartic acid 와 glutamic acid 와의 關係는 高等한 動物에서와 같이 下等한 昆蟲類에서도 transamination 에 쓰인다고 Green (1945) 이 報告하였는데 本實驗에서 檢出된 아미노酸도 비슷한 作用을 하는 것 같다.

本實驗에서는 cysteine 이 分析되지 않았는데 Finlayson and Hamer (1949)는 *Calliphora* 에서 cysteine 은 檢出되지 않는다 했고 Goldberg (1948)도 *Aedes* 에서 cysteine 이 결핍하면 幼蟲에서 脫皮와 蛹化가 妨礙된다고 報告하면서 methionine 이 대신 cysteine-cystathione-homocysteine-methionine 의 연관에 의하여 轉換될 수 있다고 했다. 화랑곡나방에서도 脫皮와 蛹化에 關係 있는 cysteine 이 檢出되지 않는 것은 역시 위의 相互轉換에 의해 解決되는 것 같다. 한편 De Meillon (1948)는 cysteine 이 昆蟲에서 detect 되기 보다는 昆蟲의 먹이에 의한 成分인 것이라고 했다. Hilchey (1953)는 methionine 은 昆蟲類의 organic sulfur 의 source 로서 器官新生에 필요하고 부

족할 때는 成長이 늦어진다고 지적했는데, 本實驗에서 幼蟲器官이 溶解되고 成蟲器官이 新生되는, 即 蛹化하면서 methionine 이 增加하는 것은 methionine 이 sulfhydryl group 과 methyl group 의 source 로써 作用하는 것 같고 위에 말한 cysteine 의 결핍까지도 이 시기에 調節되는 것 같다.

Threherence (1959)는 *Locust* 에서 serine, glycine 등이 높은 농도를 보인다고 報告했고 Shemin (1946)에 의한 C<sup>14</sup>-serine 의 연구결과 glycine 으로 轉換할 수 있다 했는데 이들은 모두 代謝의 最終産物이거나 또는 先驅誘導物質이기 때문에 높은 농도를 보이는 것 같다. Lemond and Bernard (1951)는 *Tribolium* 에서 蛹化하는데 valine 이 필요하고 valine 의 부족이 있을 때는 正常的인 脫皮와 蛹化가 실패한다고 했다. 화랑곡나방에서도 蛹化하면서 valine 의 增加를 보이고 있는데 脫皮와 蛹化에 關係 있는 것 같고 이 時期의 組織化學的 檢査에 의하면 낡은 cuticle 의 脫皮와 새 cuticle 의 新生을 볼 수 있다.

Hackman and Goldberg(1958)은 *Schistocera*에서 tyrosine 은 dark pigment, melanine, cuticle 의 形成을 위한 物質이고 tyrosine 이나 phenylalanine 이 부족할 때는 lighter pigmentation 인 幼蟲이나 蛹이 誘導된다고 했다. 本實驗에서 cuticle 은 幼蟲 stage에서 色이 濃고 부드러운 것이 蛹化하면서 단단해지고 褐色으로 變하는데 組織化學的 檢査에 의하면 兩 stage에서 볼수 있는 epicuticle, exocuticle, endocuticle, dermal gland 등이 正常的이고 幼蟲 stage에서 moulting fluid 에 의하여 old cuticle 이 外部로 바뀐 나 오고, procuticle 등의 新生하는 內容을 觀察할 수 있는 것은 tyrosine 의 代謝와 關係 있는것 같다. 또한 飼料에 따른 두 群의 cuticle 形成은 別差가 없었다.

Fukuda (1950)는 *Bombyx mori*에서 phenylalanine 은 tyrosine 으로 轉換될 수 있다고 報告했는데 화랑곡나방에서 phenylalanine 은 檢出되지 않고 tyrosine 은 높은 농

도를 보이므로 phenylalanine 이 transamination 되어 사용되지 않나 생각한다.

Threonine 이 많은 他 昆蟲類에서 檢出되지 않았는데 화랑곡나방에서는 少量 檢出되었다.

Butenandt (1954)의 *Calliphora* 를 材料로 한  $C^{14}$ -tryptophan 의 실험결과와 Noland and Baumann (1951)의 報告에 의하면 tryptophan 은 昆蟲의 pigment 構成 蛋白質로 必要하고 昆蟲體內에 bacteria 의 activity 가 억제된 조건아래서는 合成이 可能하다고 했는데 蛹化되어 가고 卵의 形成이 進行되는 時期에 tryptophan 이 檢出되지 않는 것은 흥미 있는 일이다.

以上の 아미노酸은 화랑곡나방이 發生하고 成長하는데 필요하며, 發生이 進行됨에 따라 各 器官形成에 필요한 아미노酸의 分布에 差를 나타내는 것 같다.

## 要 約

本實驗은 韓國產 화랑곡나방의 發生 stage 에 따른 遊離 아미노酸의 分布相의 變化와 cuticle 의 形成過程을 paper chromatography 法과 組織化學的 檢査로 調査했다. 調査 結果 幼蟲 stage 에서 13 種(未知物 1 種 包含), 蛹 stage 에서 14 種(未知物 1 種 包含)이 檢出되었고 發生이 進行됨에 따라 valine, methionine, tyrosine 등이 增加하였다.

Serine, glycine, tyrosine, valine 등이 높은 濃度를 보이고, arginine 은 蛹 stage 에서는 檢出되지 않았다.

## 文 獻

Agrell, I., 1949. Amino acids in metamorphosis. *Acta Physiol. Scand.* 18, 247-258.  
 Awapara, J., 1948. Application of paper chromatography to the estimation of free amino acids in tissues. *Arch. Biochem.* 19, 172-173.  
 Benassi, C.A., G. Colombo and G. Peretti, 1961 a. Free amino acids of the hemolymph of *Anacridium aegyptium* L. *Experientia* 15, 457-458.  
 Benassi, C.A., G. Colombo and G. Allegri, 1961b. Free amino acids of the hemolymph of *Schistocerca gregaria* FÖRSK. *Biochem. J.* 80, 332-336.  
 Butenandt, A., 1954. *Ann. Chem.* 590, 75.  
 Chefurda, W. and C. M. Williams, 1951. Biochemical changes in blood during metamorphosis of *Platysamia cecropia*. *B. Anat. Rec.* 3, 100-101.  
 Chen, P. S., 1963. Studies on the protein metabolism of *Culex pipiens* L. IV. Separation of free amino acids and peptides in adult mosquitoes by column chromatography. *J. Insect Physiol.* 9, 453-462.  
 Finlayson, L.H. and L. Hamer, 1949. Amino acids in hemolymph of *Calliphora* (Diptera). *Nature* 163, 843-844.  
 Florkin, M., 1959. The free amino acids of insect hemolymph. *Proc. 4th Int. Congr. Biochem.* 12, 63-77.

Fukuda, T., 1950. Chromatography of amino acids of blood proteins of silkworm. *J. Japan Sericultural Soc.* 19, 305-307.  
 Ganti, Y. and E.R.B. Shanmugasundaram, 1963. A study on the free amino acids during growth and metamorphosis of *Corcyra cephalonica* St. *Exp. Zool.* 152, 1-4.  
 Green, D.E., 1945. *J. Biol. Chem.* 161, 559.  
 Goldberg, L. and De Meillon, 1948. The nutrition of the larva of *Aedes aegypti* Linnacus. *Biochem. J.* 48, 379-387.  
 Hackman, R.H. and M. Goldberg, 1958. *J. Insect Physiol.* 2, 221.  
 Hilehey, J.D., 1953. Qualitative amino acids requirements for the German roach. *Contribs. Boyce Thompson Inst.* 17, 203-219.  
 Hinton, H.E., 1954. *Sci. Progr.* 42, 684-96.  
 House, H.L., 1961. Insect nutrition. *Ann. Rev. Ent.* 6, 13-26.  
 金昌煥·柳鍾鳴, 1963. 松虫의 아미노酸에 關한 研究. 原子力院論文集 3, 143-149.  
 Kondo, Y. and T. Watanabe, 1957. The free amino acids and related compounds in the silkworm. II. The free amino acids and related compounds in silkworm larvae. *Nippon Sanshigaku Zasshi* 26, 298-305.  
 Lemonde, A. and R. Bernard, 1951. *Can. J. Zool.* 29, 80.  
 Levenbook, L., 1950. Composition of blood of *Gastrophilus* (Diptera) larva. *Biochem. J.* 47, 336-346.  
 Ludwig, D., 1951. Composition of blood of Japanese beetle. *Physiol. Zool.* 24, 329-334.  
 Noland, J.L. and C.A. Baumann, 1951. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 44, 184.  
 Raper, R. and J. Shaw, 1948. Amino acids in hemolymph of dragonfly nymph. *Nature* 162, 999.  
 Rudikin, G.T. and J. Schultz, 1947. Essential amino acids of *Drosophila*. *Anat. Rec.* 99, 57.  
 Sarlet, H., G. Duchateau, M.N. Carmien and M. Florkin, 1952. *Biochem. et Biophys. Acta* 8, 571.  
 Shotwell, O.L. and G.A. Bennett, 1963. Amino acids in the haemolymph of *Popillia japonica* (Newman) larvae. *J. Insect Physiol.* 9, 35-42.  
 Stevens, T.M., 1961. Free amino acids in the hemolymph of the American cockroach, *Periplaneta americana* L. *Comp. Biochem. Physiol.* 3, 304-309.  
 Threherence, J.E., 1959. *J. Exp. Biol.* 36, 533-545.  
 Ussing, H.H., 1945. Asparagine in hemolymph of *Melolontha* (Coleoptera) larvae. *Nature* 155, 481.  
 Wyatt, G.R., T.C. Loughheed and S. S. Wyatt, 1956. The chemistry of insect hemolymph of the silkworm *Bombyx mori* and two other species. *J. Gen. Physiol.* 39, 853-868.  
 Wyatt, G.R., 1961. The chemistry of insect hemolymph. *Ann. Rev. Ent.* 6, 75-102.