

## 有鈎囊尾蟲 囊液의 아미노酸 및 遊離脂肪酸의 定量分析

高麗大學校 醫科大學 寄生蟲學教室 및 熱帶風土病研究所

文 俊 · 鄭明淑 · 朱炅煥 · 林漢鐘

### Quantitative Analysis of Cystic Fluid Components in *Cysticercus cellulosae*

Joon Moon, Myung-Sook Chung, Kyoung-Hwan Joo and Han-Jong Rim

*Department of Parasitology and the Institute for Tropical Endemic Diseases,  
College of Medicine, Korea University, Seoul, 136-705, Korea*

#### = ABSTRACT =

Free amino acid (FAA), free fatty acid (FFA), and amino acid obtained by hydrolysis of protein components of cystic fluid (CF) of *Cysticercus cellulosae* in pig and man were analyzed.

FFA was analyzed by gas chromatography using Varian model 2700, and flame ionization detector with 6 feet  $\times$  1/4 inch glass column. Flow rate of  $N_2$  was 30 ml/min,  $H_2$  was 30 ml/min, air was 350 ml/min respectively and chart speed was 1 cm/min.

Amino acid was analyzed by high performance liquid chromatography using Waters model 441, and fluorescence detector at 338nm/425nm with column of amino acid analyzer. Buffer A of mobile phase was pH 3.05 and pH of buffer B was 9.6 respectively.

The results obtained were as follows :

Seven FFAs containing 12~18 carbons were detected ; Saturated fatty acids were lauric acid ( $C_{12}$ ), myristic acid ( $C_{14}$ ), palmitic acid ( $C_{16}$ ), stearic acid ( $C_{18}$ ). Unsaturated fatty acids were oleic acid ( $C_{12}^{-1}$ ), linoleic acid ( $C_{12}^{-2}$ ), and one unidentified fatty acid was detected. Generally much more quantity of FFA was determined in CF obtained from pig than that from man. FFA of the largest quantity was palmitic acid ; 0.078 mg/ml.

Eighteen FAAs were detected and the largest quantity was alanine. Quantity of alanine was 386 ug/ml in CF from pig, 108 ug/ml in CF from man respectively, while histidine in CF from pig was 273 ug/ml, that from man was only 4.3 ug/ml.

Eighteen amino acids were identified by hydrolysis of protein in CF from man. But, histidine was not identified in CF from pig. Amino from pig and 392 ug/ml from man.

## 緒 論

윤충류의 구성성분 또는 중간대사산물인 단백질에 대해서는 잘 알려진 바가 없으나 단백질의 아미노산 성분을 정확하게 아는 것은 단백질의 구조를 연구하는데 있어서 매우 중요하다. Chitwood(1936)에 의해 최초로 선충류 cuticle 각각의 layer의 화학적 성분에 관한 연구가 시도되었으며, 선충류 및 조충류에서 총 14종의 아미노산을 확인하였다는 보고가 있었다(von Brand 1952). Aldrich들(1954)은 chromatography분석으로 *Hymenolepis diminuta*의 단백질을 酸加水分解하여 14종의 아미노산을 확인하였다. *A. lumbricoides*, *Toxocara mystax* 및 *Strongylus equinus*의 cuticle에서는 가수분해하여 16종의 아미노산이 검출되었다(Bird 1956, 1957).

*H. diminuta*의 성충 및 유충의 더러 조각을 酸加水分解하여 20종의 아미노산이 검출되었으며(Goodchild 및 Wells 1957), Lee들(1964)은 몇종(*A. lumbricoides*의 9종)의 윤충류에 대하여 아미노산 성분을 가수분해하여 종이크로마토그래피로 분석하였다.

Jaskoski(1962)는 *Ascaris suum*의 자충포장란에서 18종의 아미노산을, Johnson(1962)은 *Trichomonas foetus*의 원형질 추출물에서 유리아미노산을 Ma(1963)는 간디스토마에서 7종의 유리아미노산과 17종의 아미노산을 chromatography법으로 확인하였다. 이 밖에 Ancephalid cestoda 3종의 질소 및 아미노산 성분에 관한 연구(Campbell 1960), 조직화학적 기법을 이용한 cyclophyllidean tapeworm 충란의 화학적 조성에 관한 연구(Johri 1957; Waitz 1963), 조충류의 embryophore block을 형성하는 물질의 화학적 성질에 관한연구(Morseth 1966)가 있고, Smith 및 Brook(1969)은 민손주혈흡충충체에서 지질을 분석하였으며, Lee들(1977)은 간흡충충체에서 지질을 분석하여 보고하였다.

*Taenia solium*의 cysticerci에 대한 구성성분에 대하여는 Guerra들(1982)이 antigen B에서 17종의 아미노산을 확인하였고, Gran들(1982)은 인체의 뇌에 있는 석회화된 cysticerci에서 12종의 지방산을 확인하였다.

본 연구에서는 유구낭미충증 진단에 있어서 유

용한 *Cysticercus cellulosae* 낭액의 구성성분을 분석하고자 돼지의 인체에서 기생하는 *C. cellulosae*의 낭액을 채취하여 유리지방산 및 유리아미노산과 단백질을 가수분해한 아미노산의 종류 및 함량을 분석하였다.

## 材料와 方法

### 1. 實驗材料

사람과 돼지에 감염되어 있던 *Cysticercus cellulosae*의 낭액을 26호 주사침을 이용, 채취하여 사용하였다. 지방산과 아미노산의 표준시약과 용매로는 Merck Chemical Co.의 특급시약을 사용하였다.

### 2. 實驗方法

#### 1) 유리지방산의 분석

##### ① 시료의 제조

낭액 1ml에 0.5M KOH/MeOH 10ml를 가하여 가열하고 H<sub>2</sub>O 20ml를 넣은다음 pH 1의 HCl을 가하였다. Ether로 두번 추출하여 모두 혼합한 후 ether는 증발시켰다. 다음에 BF<sub>3</sub>/MeOH 10ml를 가하고 2~3분간 reflux하였고, 냉각시켜 H<sub>2</sub>O 50ml를 가한 후 hexane으로 두번 추출하여 이것을 시료 용액으로 사용하였다.

##### ② Gas chromatography(GC)에 의한 지방산 조성의 분석

제조한 시료를 GC분석에 사용하였다. 사용한 기기와 GC의 조건은 Table 1과 같다.

#### 2) 유리 아미노산 및 가수분해한 아미노산의 분석

##### ① 유리아미노산 시료의 제조

낭액 1g에 0.1% trifluoroacetic acid 1ml를 가하여 단백질들을 침전 시키고 침전물을 여과한 다음 시료로 사용하였다.

##### ② 가수분해 아미노산 시료의 제조

낭액 2g에 Conc. HCl을 가하여 110°C에서 24시간 가수분해 하였다. 가수분해 용액은 Ba(OH)<sub>2</sub>로 중화하고 남아있는 찌꺼기는 여과한 다음 시료로 사용하였다.

Table 1. Instrument and operating condition for G.C.

Instrument	Varian model 2700
Detector	Flame Ionization Detector
Column	6ft×1/4 inch glass
Packing material	Stainless column(Coiled oval type) 15% D.E.G.S. on 60/80 mesh Shimalite
Column temperature	170°C isothermal
Injection temperature	230°C
Carrier gas	30ml/min as nitrogen 350ml/min as air 30ml/min as hydrogen
Chart speed	1.0cm/min
Sample injection volume	5ul

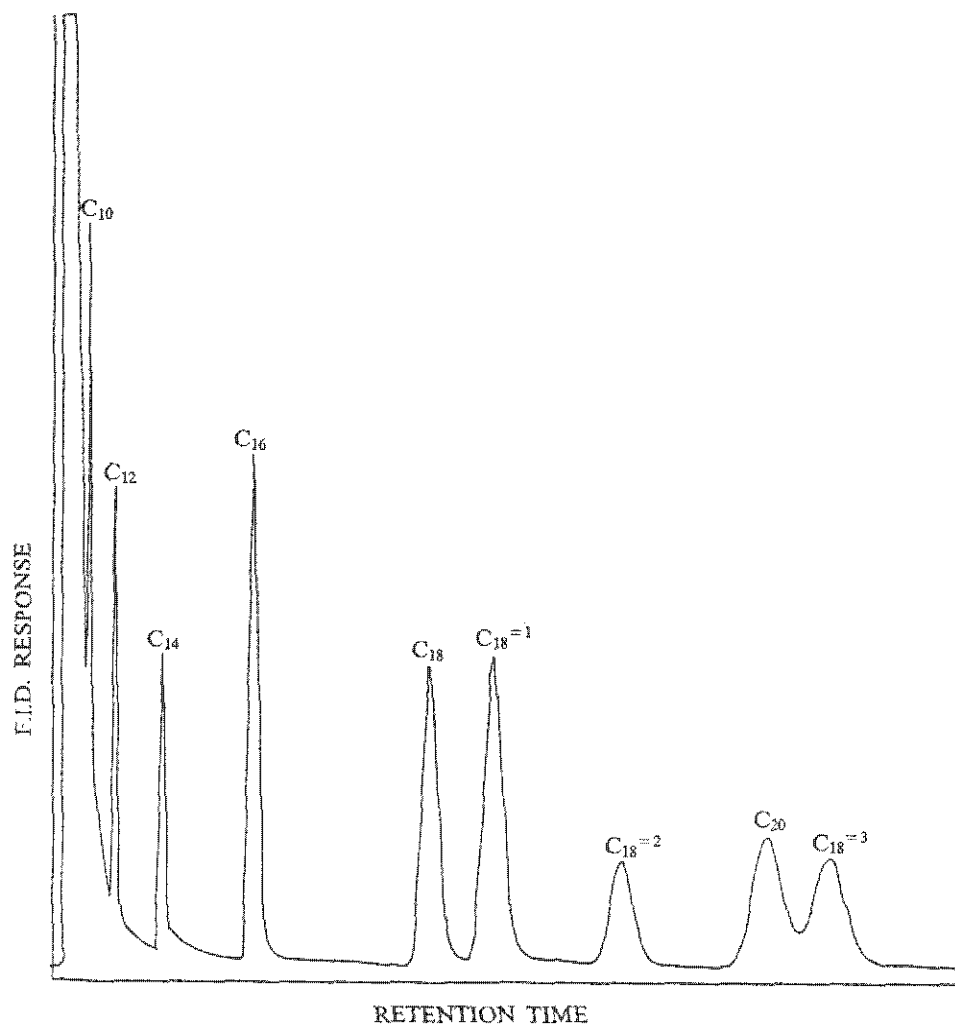


Fig. 1. GC chromatogram of standard methylated fatty acid.

3) High performance liquid chromatography (HPLC)에 의한 이미노산 조성의 분석

제조된 유리 아미노산 및 가수분해 아미노산을 HPLC로 분석하였다. 사용한 기기는 Waters Model 441이며, column은 amino acid analyzer, mobile phase는 buffer A(pH 3.05), buffer B(pH 9.6)이고, fluorescence detector로 338nm/425nm에서 측정하였다.

實驗成績

1. 유리지방산의 조성 및 함량

유리지방산은 탄소수 12-18개의 7종이 검출되었다.

즉, C<sub>12</sub>의 lauric acid, C<sub>14</sub>의 myristic acid, C<sub>16</sub>의 palmitic acid, C<sub>18</sub>의 포화지방산, stearic acid, C<sub>18</sub>의 불포화지방산, 2중결합이 하나인 oleic acid, 2중결

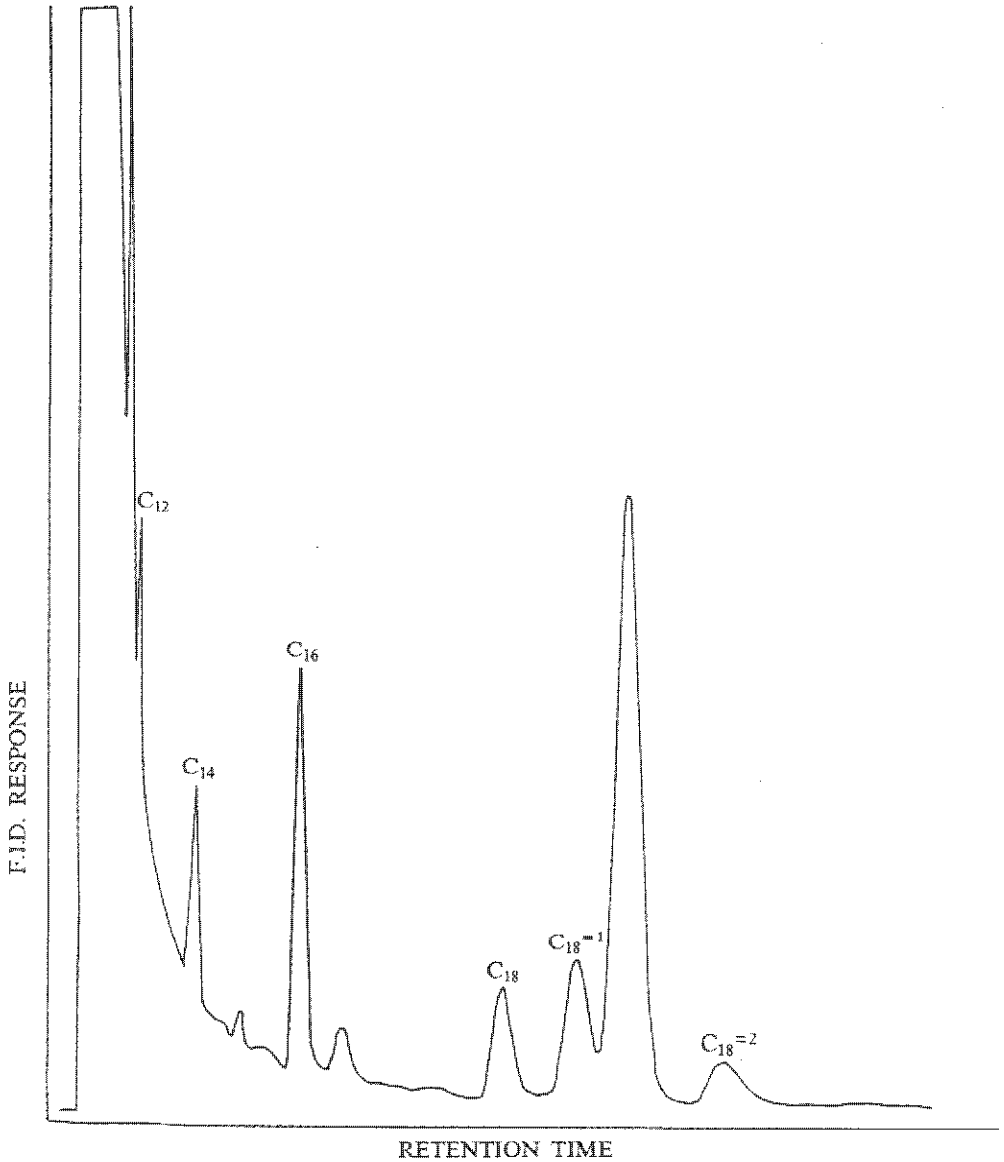


Fig. 2. GC chromatogram of methylated fatty acid in cystic fluid of *C.cellulosae* obtained from swine.

합이 2개인 linoleic acid 및 미확인 1종이었다(Fig. 2 및 Fig. 3).

각 지방산의 함량은 돼지에서 채취한 낭액이나 사람에게서 채취한 낭액 모두 palmitic acid, oleic acid, stearic acid, myristic acid, linoleic acid, lauric acid의 순으로 많은 것으로 나타났다(Table 2)

## 2. 아미노산의 조성 및 함량

유리아미노산의 18종, 즉 aspartic acid, threonine, serine, glutamic acid, proline, glycine, alanine, cysteine, valine, methionine, isoleucine, leucine, tyrosine, phenylalanine, histidine, tryptophan, lysine, arginine이 검출되었다. 각 유리아미노산의 함량은 Table 3과 같다.

돼지에서 채취한 낭액의 유리아미노산 함량이 사람에게서 채취한 것보다 전반적으로 많았으며

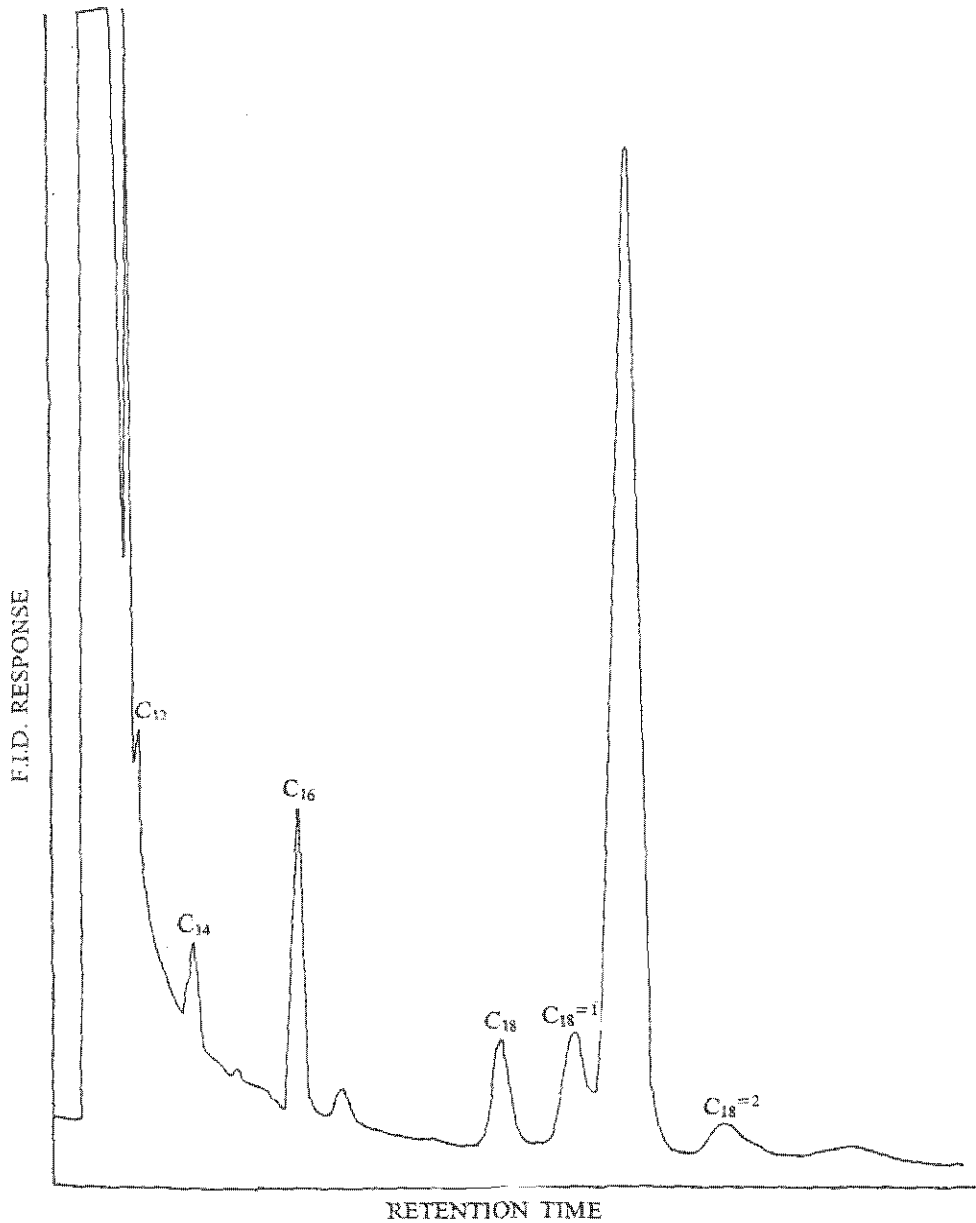


Fig. 3. GC chromatogram of methylated fatty acid in cystic fluid of *C.celulosae* obtained from man.

Table 2. Content of fatty acid in cystic fluid of *Cysticercus cellulosae* obtained from swine and man(mg/ml)

Sample	C <sub>12</sub>	C <sub>14</sub>	C <sub>16</sub>	C <sub>18</sub>	C <sub>18</sub> <sup>=1</sup>	C <sub>18</sub> <sup>=2</sup>
A	0.018	0.03	0.078	0.041	0.062	0.025
B	0.0045	0.013	0.029	0.018	0.028	0.0088

A : obtained from swine

B : obtained from man

Table 3. Content of amino acid in cystic fluid of *Cysticercus cellulosae* obtained from swine and man(mg/ml)

No.	Compound name	Free A.A.		Amino acid*	
		A	B	A	B
1	Aspartic acid	7.6	<2.0	944	248
2	Threonine	85	23	125	45
3	Serine	33	4.7	183	57
4	Glutamic acid	140	14	1016	392
5	Proline	87	64	209	45
6	Glycine	118	38	351	71
7	Alanine	386	108	280	88
8	Cystine	<2.0	11	38	21
9	Valine	102	33	154	48
10	Methionine	20	4.5	106	36
11	Isoleucine	53	16	159	34
12	Leucine	89	22	437	132
13	Tyrosine	19	8.7	181	45
14	Phenylalanine	48	9.6	180	58
15	Histidine	273	4.3	—	21
16	Tryptophan	27	7.1	9	0.9
17	Lysine	56	9.1	610	143
18	Arginine	12	<2.0	26	79

A : obtained from swine

B : obtained from man

\* : hydrolysate

가장 많은 것은 alanine으로서 돼지의 것이 386ug/ml, 사람이 것이 108ug/ml이었다. 돼지에서 얻은 낭액내 histidine 함량이 273ug/ml인데 반해 사람의 낭액내 histidine 함량은 4.3ug/ml에 불과하였다.

단백질을 가수분해하여 얻은 각 아미노산의 조성 및 함량을 보면 Table 3과 같은 바, 사람에서 얻은 낭액의 경우 glutamic acid 등 18종이 검출되었으며, 돼지 낭액에 있어서는 histidine이 검출되지 않아 17종이 검출되었다. 가장 많은 양을 차지하고 있는 것은 사람, 돼지 모두 glutamic acid로서 돼지의 경우 1016ug/ml, 사람의 경우 392ug/ml가 검출되었다 (Table 3).

### 考 察

기생충에 흡수된 지방산은 유리지방산으로서 뿐

아니라 sterol ester, mono, di 및 triglyceride 또는 인지질이나 glycolipid로서 총체 조직내에 존재하는데 Smith 및 Brook(1969)는 만손주혈충충체에서 건조된 총체량의 34.1%가 총 지질량이며 인지질은 36.6%, glyceride와 유리지방산은 31.0%가 검출되었다고 보고하였다. 추들(1977)은 간흡충충체에서 wet weight중 37.56mg/gm이 총 glyceride이며, 총 cholesterol은 3.30mg/gm, 인지질은 22.40 mg/gm이 함유되어 있다고 보고하였다. Grau들(1982)은 회화된 *Taenia solium* cysticerci의 brown-white solid에서 13종의 유리지방산을 가스크로미토그래피법으로 검출하였다고 보고하였다. Randle들(1973)은 triglyceride가 합성될 때 유리지방산이 감소된다고 하였다.

본 실험에서 밝혀진 유리지방산은 총 7종으로 사람에서 채취한 유구낭미충의 낭액 보다 돼지에서

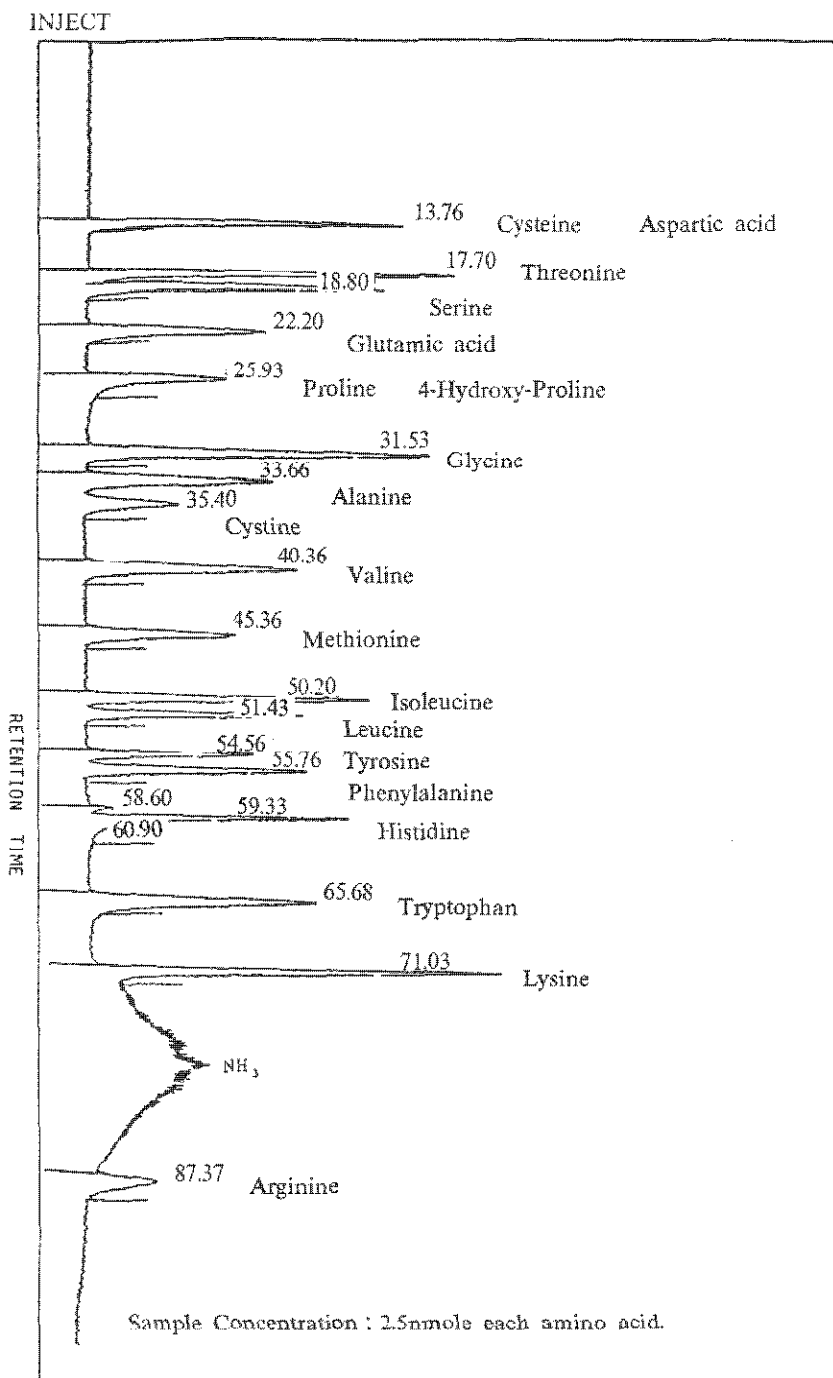


Fig. 4. HPLC chromatogram of standard amino acid.

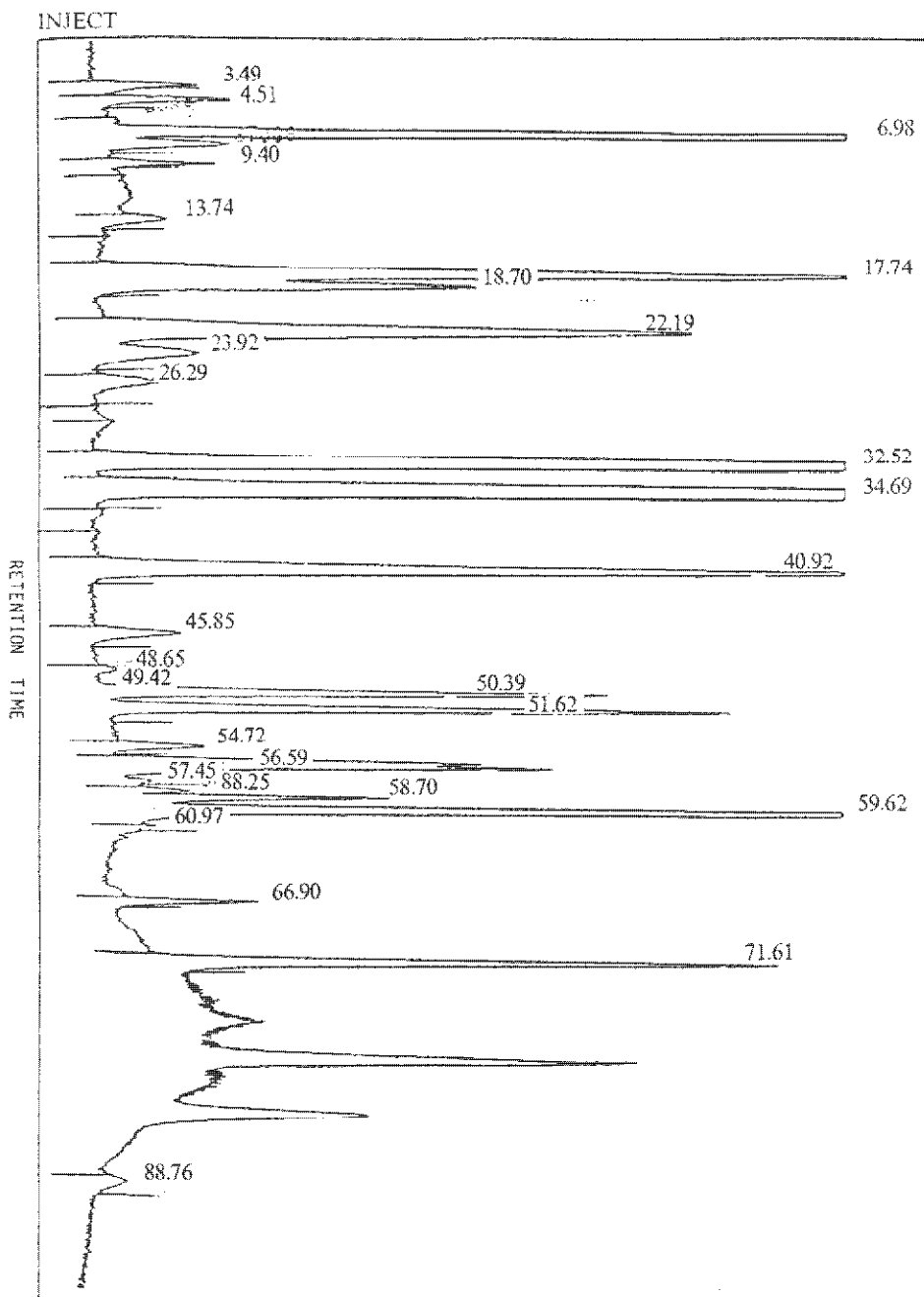


Fig. 5. Chromatogram of cystic fluid components using HPLC(Free amino acid, obtained from swine).



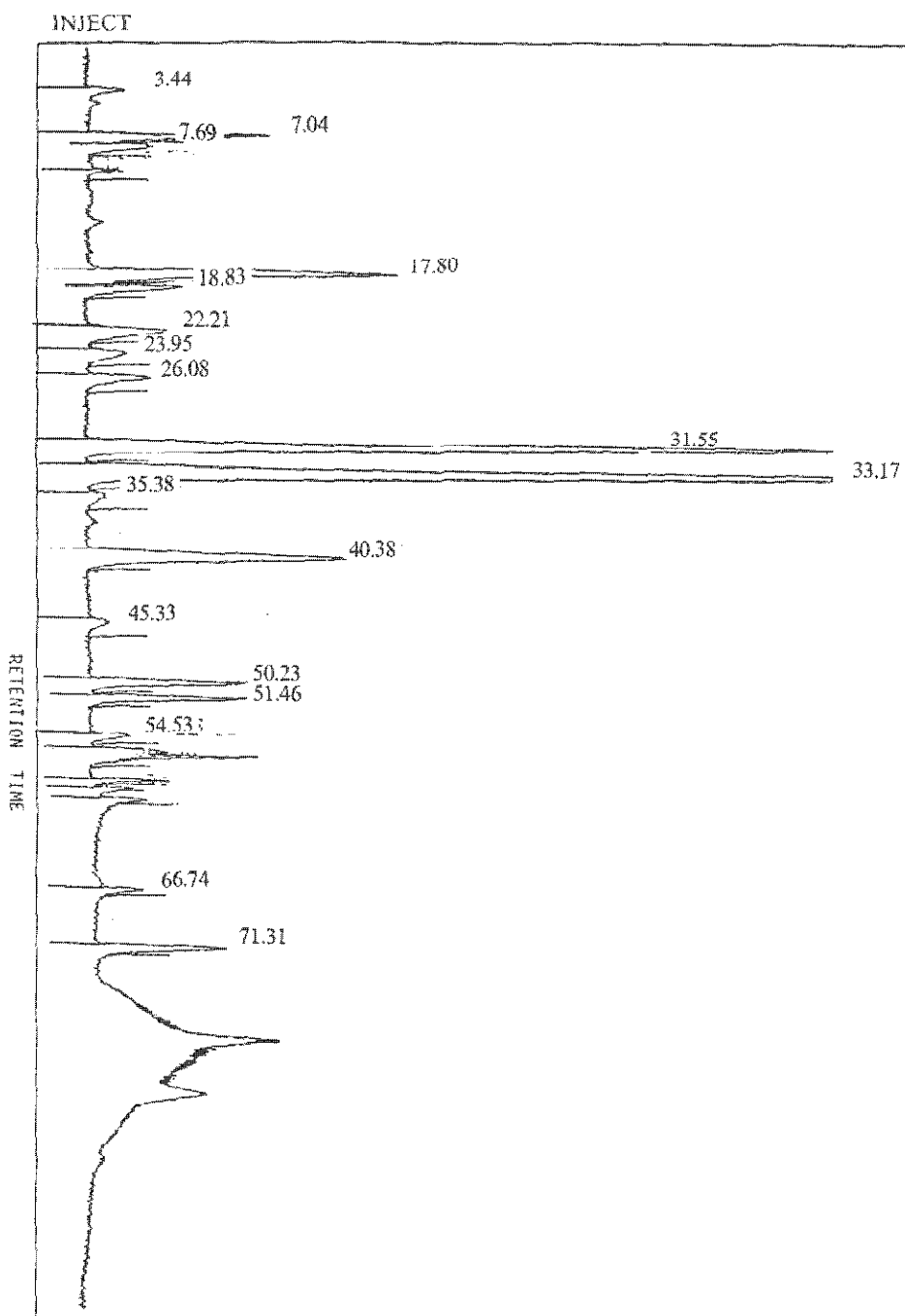


Fig. 6. Chromatogram of cystic fluid components using HPLC(Free amino acid, obtained from man).

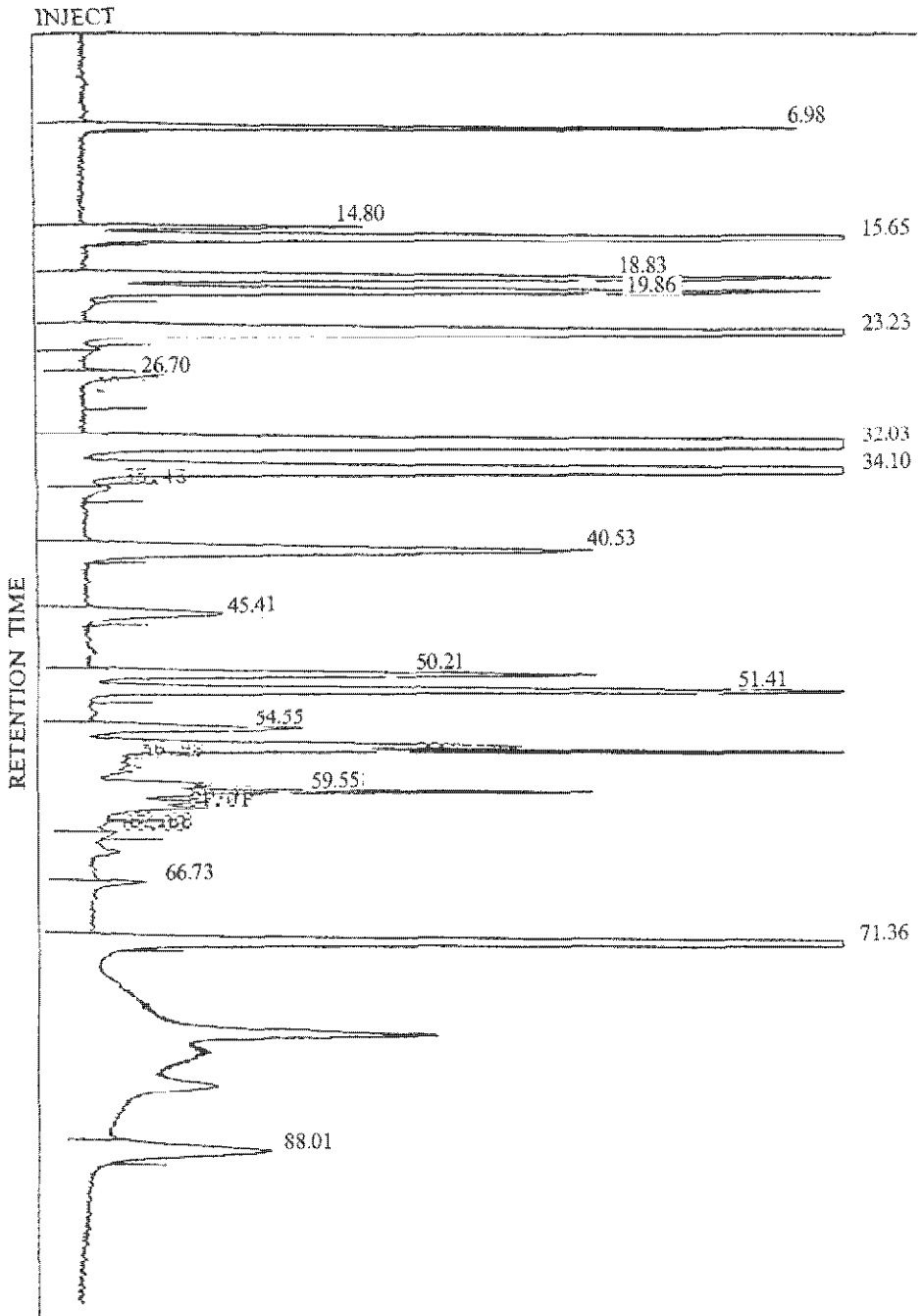


Fig. 7. Chromatogram of cystic fluid components using HPLC(Hydrolysate, obtained from swine).

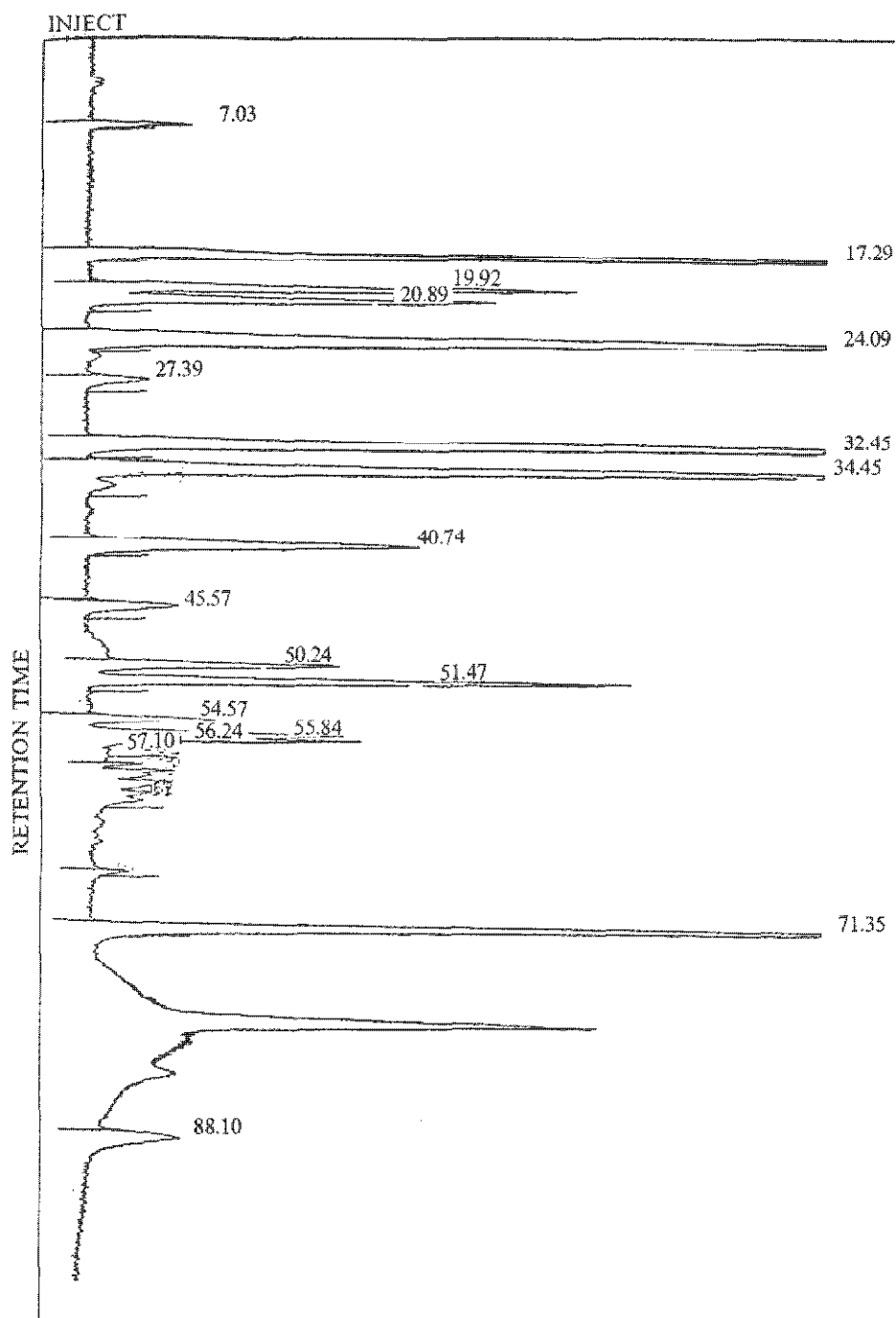


Fig. 8. Chromatogram of cystic fluid components using HPLC (Hydrolysate, obtained from man).

채취한 유구낭미충의 낭액에서 더 많은 양의 유리지방산이 검출되었는데 palmitic acid가 0.078mg/ml로 가장 많았다.

Bird(1956, 1957)는 *A. lumbricoides*, *T. mystax* 및 *S. equinus*의 cuticle을 가수분해하여 각각에서 16종의 아미노산을 확인하였는데 정량적으로 분석하지는 못하였다. Cuticle의 성질은 아직 뚜렷하지 않으나 아미노산 구성성분과 일치하는 지는 미지수이다. Jaskoski(1962)는 *A. suum*의 embryonated egg, vitelline membrane, egg fluid와 유충의 아미노산 성분을 분석하였는데 유충과 embryonated egg에서 총 18종의 아미노산, vitelline membrane에서 9종을 확인하였다.

Rogers(1955)는 *A. lumbricoides*와 *A. galli*에서 아미노산과 배설물의 peptide가 유사하다는 것을 발견하였으며, *Trichinella spiralis*에서 배설된 것과 유리아미노산도 거의 같다는 것을 발견하였다.

Lee(1963)는 *F. hepatica*와 *E. pancreaticum*의 조직을 가수분해하여 14종의 아미노산을 확인하였다.

Lee등(1964)은 *P. westermani*에서 9종의 아미노산을, *C. sinensis*에서 histidine을 제외한 13종의 아미노산을 검출하였다.

Salsbury 및 Anderson(1939)은 *C. fasciolaris*에서 약 15%의 질소를 함유하고 있음을 측정하였으며, *Rallientina cesticillus*와 *H. diminuta*에서 유리아미노산 및 결합된 아미노산에 관하여 Foster 및 Daugherty(1959)에 의하여 연구되었다.

Aldrich등(1954)은 *H. diminuta*의 단백질을 가수분해하여 14종의 아미노산을 확인하였다.

Morseth(1966)은 *T. hydatigena*, *T. ovis*, *T. pisiformis*의 embryophoric block을 구성하는 단백질의 아미노산 성분을 종이크로마토그래피로 분석하여 18종이 있음을 보고하였는데 *T. pisiformis*에서는 typtophan을 확인할 수 없었다.

Torre-Blanco는 *T. solium* cysticerci에서 연결부분의 조직성분은 collagen이라고 하였으며, 수용성 collagen의 구성성분인 아미노산은 17종임을 확인하였는데 glycine이 가장 많았다.

Cancedo등(1982)은 인체의 뇌낭미충의 Racemose form에서의 vesicular fluid에서 1.27mg/ml의 단백질을 검출하였다.

Guerra등(1982)은 인체 뇌낭미충에서 antigen B

를 만들고 가수분해하여 17종의 아미노산을 확인하였다. 여기서 proline과 hydroxyproline은 mole percent가 0이었고, typtophan과 cysteine은 검출되지 않았으며 glutamic acid가 가장 많았다.

본 실험에서는 유리아미노산 18종 즉 aspartic acid, threonine serine, glutamic acid, proline, glycine, alanine, cystine, valine, methionine, isoleucine, leucine, tyrosine, phenylalanine, histidine, tryptophan, lysine, arginine이 검출되었다. 돼지와 인체에서 채취한 낭액에서 alanine이 386 $\mu$ g/ml, 108 $\mu$ g/ml로 각각에서 가장 많았으며, 돼지에서 얻은 낭액에서는 histidine이 273 $\mu$ g/ml인데 비해 인체에서 얻은 낭액에서는 4.3 $\mu$ g/ml밖에 검출되지 않았다.

단백질을 가수분해하여 얻은 아미노산은 돼지에서 채취한 낭액에서는 histidine은 검출되지 않고 나머지 17종만 검출되었으며, 인체에서 채취한 낭액에서는 18종이 검출되었다. Glutamic acid가 1,016  $\mu$ g/ml, 392 $\mu$ g/ml로 각각의 낭액에서 가장 많이 검출되었다. 이는 Guerra등(1982)의 결과와 비슷하였다.

아미노산의 종류 및 함량은 항체와 반응하는 항원 단백질의 구조 및 반응자리를 연구하는데 기초자료가 되리라고 생각한다.

## 結 論

돼지와 人體에 寄生한 *Cysticercus cellulosae*의 囊液을 구성하고 있는 유리 아미노산과 단백질을 가수분해하여 얻은 아미노산 및 유리지방산의 종류와 함량을 비교분석하였다.

유리지방산은 gas chromatography로 분석하였으며 기기는 Varian Model 2700, 검출기는 FID(flame ionization detector), column은 6feet $\times$ 1/4inch glass, flow rate  $N_2$  : 30ml/min,  $H_2$  : 30ml/min, air : 350 ml/min, chart speed는 1cm/min으로 하였다. 아미노산은 high performance liquid chromatography로 분석하였다. 사용한 기기는 WATERS model 441이며, column은 amino acid analyzer, mobile phase는 buffer A(pH 3.05), buffer B(pH 9.6)이고 fluorescence detector로 338nm/425nm에서 측정하였다.

결과, 유리지방산은 탄소수 12~18개의 7종이 검출되었는데  $C_{12}$ 의 lauric acid,  $C_{14}$ 의 myristic acid

C<sub>16</sub>의 palmitic acid, C<sub>18</sub>의 포화지방산 stearic acid, C<sub>18</sub>의 불포화지방산, 이중결합이 하나인 oleic acid, 이중결합이 2개인 linoleic acid 및 미확인 1종이 검출되었다. 전반적으로 돼지에서 채취한 낭액에서 더 많은 양이 검출되었으며 palmitic acid가 0.078 mg/ml로 가장 많았다.

유리아미노산은 18종이 검출되었으며 alanine이 돼지 : 386µg/ml, 사람 : 108µg/ml로 가장 많았다. Histidine은 돼지의 경우 273µg/ml인데 비해 사람의 것은 4.3µg/ml에 불과하였다.

단백질을 가수분해하여 얻은 아미노산은 돼지에서 채취한 낭액에서는 histidine이 검출되지 않아 17종이, 사람에게서는 18종이 검출되었다. Glutamic acid가 1016µg/ml, 392µg/ml로 각각의 낭액에서 가장 많이 검출되었다.

### References

- 1) Aldrich DV, Chandler AC and Daugherty JW : *Intermediary protein metabolism in helminths. II. Effect of host castration on amino acid metabolism in Hymenolepis diminuta.* *Exp Parasit* 3 : 173-184, 1954
- 2) Bird AF : *Chemical composition of the nematode cuticle. Observation of the whole cuticle.* *Exp Parasit* 5 : 350-358, 1956
- 3) Bird AF : *Chemical composition of the nematode cuticle. Observation on individual layers and extracts from these layers in Ascaris lumbricoides cuticle.* *Exp parasit* 6 : 383-403, 1957
- 4) von Brand, T : *Chemical physiology of endoparasitic animals.* *Academic Press, New York, 1952*
- 5) Chitwood BG : *Observations on the chemical nature of the cuticle of Ascaris lumbricoides.* *Proc Helminthol Soc Wash DC,* 3 : 39-49, 1936
- 6) Foster WB and Daugherty JW : *Establishment and distribution of Raillientina cesticillus in the fowl and comparative studies on amino acid metabolism of R. cesticillus and Hymenolepis diminuta.* *Exp Parasit* 8 : 413-426, 1959

- 7) Goodchild, CG and Wells OC : *Amino acid in larval and adult tapeworms(Hymenolepis diminuta) and in the tissues of their rat and beetle hosts.* *Exp. parasit,* 6 : 575-585, 1957
- 8) Grau E, Garrido F and Canedo L : *Calcification of the cysticerci of Taenia solium in the human brain.* *in Cysticercosis, Academy Press Inc. p499, 1982*
- 9) Guerra G, Flisser A, Canedo L and Lacleite J : *Biochemical and immunological characterization of antigen B of Taenia solium.* *in Cysticercosis, Academy Press Inc. p427, 1982*
- 10) Jaskoski BJ : *Paper chromatography of some fraction of Ascaris suum eggs.* *Exp. Parasit.,* 21 : 19-24, 1962
- 11) Johri LN : *A morphological and histochemical study of egg formation in a cyclophyllidean cestode.* *Parasitology* 47 : 21-29, 1957
- 12) Lee SH : *Paper chromatographic study on the amino acids of trematodes.* *MS thesis, Seoul National University, 1963*
- 13) Lee SH, Yoon JS and Seo BS : *Paper chromatographic study on the amino acids of some parasitic helminths.* *Korean J Parasit* 2(1) : 91-96, 1964
- 14) 李純炯 · 宋哲鏞 · 曹秉夏 : 肝吸蟲(Clonorchis sinensis)의 脂質에 關한 研究. *기생충학잡지* 15(2) : 109-114, 1977
- 15) Ma L : *Trace elements and polyphenol oxidase in Clonorchis sinensis.* *J Parasit,* 49 : 197-203, 1963
- 16) Randle PJ, Gerland PB, Hales CN and Newholme, EA : *The glucose-fatty acid cycle.* *Lancet* 1 : 785-789, 1973
- 17) Rogers WP : *Amino acids and peptides excreted by nematode parasites.* *Exp Parasit,* 46 : 33-41, 1955
- 18) Salisbury LH and Anderson RJ : *Concerning the chemical composition on Cysticercus fasciolaris.* *J Biol Chem* 129 : 505-517, 1939
- 19) Smith TM and Brooks TJ : *Lipid fractions in adult Schistosoma mansoni.* *Parasitology* 59 : 293-298, 1969
- 20) Torre-Blanco A : *The collagen of Cysticercus cellulosae : A study in the comparative biochemistry of collagen.* *in Cysticercosis, Academy Press Ins P423, 1982*