

동양종과 서양종 꿀벌의 표피탄화수소 성분 분석

이창주 · 신경우¹ · 박승찬² · 심재한^{1*}

광주대학교 토목환경공학부, ¹전남대학교 응용생물공학부 농업기술연구소, ²전남대학교 산림자원조경학부

Chemical Analysis of Cuticular Hydrocarbons in *Apis mellifera* L. and *Apis cerana* F.

Chang-Joo Lee, Jing-Yu Shen¹, Seung-Chan Park² and Jae-Han Shim^{1*}

Division of Civil and Environmental Engineering, Kwangju University, Gwangju, 530-703, Republic of Korea

¹Division of Applied Bioscience and Biotechnology and Institute of Agricultural Science and Technology, Chonnam National University, Gwangju, 500-757, Republic of Korea

²Division of Forest Resources and Landscape Architecture, College of Agriculture and Life Sciences, Chonnam National University, Gwangju, 500-757, Republic of Korea

ABSTRACT : Cuticular hydrocarbons of antenna, legs and wings from two species of honeybee worker of *Apis mellifera* L. and *Apis cerana* F. can be analyzed directly with gas chromatograph and GC/MS without solvent extraction. The saturated hydrocarbons identified in selected part of both species were nC22, nC23, nC25-nC30, nC32 and nC34 except nC24. Two saturated hydrocarbons, nC26 (23.0-42.6%) and nC28 (16.8-54.8%), were major compounds in both species and others were minor compounds. *A. mellifera* L. can be distinguished from *A. cerana* F. by having higher proportion of nC30, nC32 and nC34 by having lower proportion of nC25 from three selected part of both species.

KEY WORDS : *Apis mellifera* L., *Apis cerana* F., Cuticular hydrocarbons, Saturated hydrocarbons, Gas chromatograph, Solid injection technique

초 록 : 꿀벌 2종 *Apis mellifera* L. (서양종)와 *Apis cerana* F. (동양종) 일벌의 안테나, 다리 그리고 날개의 표피 탄화수소를 용매추출을 거치지 않고 직접 GC와 GC/MS를 이용하여 분석 하였다. 동양종과 서양종 일벌의 세 부위에서 nC22, nC23, nC25-nC30, nC32 그리고 nC34와 같은 포화탄화수소를 검출하였고 nC24의 경우는 어느 종에서도 발견되지 않았다. 전체 포화탄화수소 중 nC26 (23.0-42.6%)과 nC28 (16.8-54.8%)의 함량비율이 높았고 나머지 포화탄화수소의 함량은 상대적으로 낮은 비율을 나타냈다. 서양종 일벌의 경우, 안테나, 날개 그리고 다리 부위에서 분석한 표피탄화수소 중 nC30, nC32 그리고 nC34가 항상 높은 함량비율로, nC25가 낮은 함량비율로 검출됨으로써 동양종 일벌과 구별할 수 있었다.

검색어 : *Apis cerana* F. (서양종 꿀벌), *Apis mellifera* L. (동양종 꿀벌), 표피탄화수소, 포화탄화수소, 기체크로마토그래프, 고체시료 주입 기술

곤충의 표피탄화수소 성분은 100여종의 화합물로 구성되어 있으며(Nelson *et al.*, 1981) 화학분류를 목적으로 종의 특성, 종간의 차이, 같은 종 내에서 군집간의 차이 등을 확인하고 식별하는데 이용되었을 뿐만 아

니라 사회적 곤충에서 그들의 중요한 역할에 대한 연구도 진행되어왔다(Haverty *et al.*, 1996a; Singer, 1998; Jackson and Blomquist, 1976). 곤충 표피탄화수소에 대한 연구는 그들의 중요한 작용과 역할이 점차 밝혀지

*Corresponding author. E-mail: jhshim@chonnam.ac.kr

면서 많은 곤충학자들의 관심을 끌었으며 최근 들어 이를 이용한 화학분류에 관한 연구가 계속 증가하고 있다(Grunshaw *et al.*, 1990; Haverty *et al.*, 1996b; Wagner *et al.*, 2000; Patricia *et al.*, 2001; Tissot *et al.*, 2001). 이러한 연구는 일반적으로 대량의 곤충시료를 채집하여 pentane, hexane, dichloromethane 또는 chloroform 등 유기용매를 사용하여 추출, 분리 및 정제과정을 거쳐 기체크로마토그래프 분석방법을 사용하고 있다. 그러나 이러한 방법은 곤충이 작고 분석목적성분의 함량이 소량인 경우가 많으므로 추출, 분리 및 정제과정을 거치고 나면 극히 미량의 분석물질만을 얻을 수 있어 분석이 불가능한 경우가 발생하기도 하고(Morgan, 1990) 또한 불필요한 부위의 많은 복잡한 성분이 섞여 분석물질이 오염되므로 분석하고자 하는 물질을 순수하게 분리하기 위하여 여러 단계의 분리 및 정제과정을 거치는 동안 많은 시간과 대량의 유기용매가 소요되는 문제점을 갖고 있다(Bagnères and Morgan, 1990).

이러한 약점들을 극복하기 위하여 Morgan 등(1972, 1990)은 기체크로마토그래피를 이용한 개미의 생체조직의 휘발성물질 연구에서 한 마리의 개미 시료조직을 모세관에 넣고 제작한 주입구 보조기구를 사용하여 용매추출을 거치지 않고 직접 생체시료를 분석하는 “고체시료 주입 기술”(solid sample injection technique)을 개발하여 곤충의 활성물질 연구분야에 활용하여왔다. 고체시료주입기술은 아주 미량의 생체시료를 직접 모세관에 넣고 휘발성성분을 보존하기 위하여 모세관의 다른 한끝을 봉하여 시료를 주입기에 넣고 시료를 기화시키기 위하여 일정온도에서 수분동안 preheating한 후 모세관을 파쇄하여 기화된 성분을 분석하는 방법이다.

대부분의 곤충 연구자들은 곤충의 표피 탄화수소 중 곤충의 호르몬 및 페로몬과 관련되는 메틸-알칸이나 메틸-알켄, 에스테르 및 알코올 성분에 관심을 가져왔으나 많은 곤충 표피 탄화수소 성분 중 포화탄화수소의 비율은 상당히 높으며 중간에 함유하고 있는 성분은 비슷하나 함량은 현저한 차이를 보이는 것으로 밝혀지고 있다. 그 동안 많은 곤충(개미, 모기, 딱정벌레, 땅벌, 말벌 그리고 파리 등)들의 표피 탄화수소에 대한 연구가 진행되어왔지만(Blomquist *et al.*, 1980; Hadley *et al.*, 1981; Nelson *et al.*, 1981; Lockey, 1984; Pappas *et al.*, 1994) 꿀벌 동양종과 서양종의 표피 탄화수소에 대한 연구는 많지않은 실정이며 특히

고체시료주입 기술을 이용한 연구는 드문 실정이다.

본 연구에서는 Morgan 등이 개발한 기체크로마토그래피에서 곤충의 생체시료를 직접 분석하는 방법을 이용하여 국내에서 주로 기르고 있는 동양종과 서양종 일벌의 안테나, 날개 그리고 다리 등 부위의 표피 탄화수소 중 포화탄화수소의 정성, 정량분석을 고체시료주입기술을 통하여 수행하였다.

재료 및 방법

실험곤충과 분석재료

실험에 사용한 동양종과 서양종꿀벌의 일벌은 2001년 6월 중순 전라남도 장성군 북하면과 북이면 양봉업자로부터 각기 5개 봉군을 구입하여 각 봉군별로 1개체의 안테나, 다리, 날개 등 세 부위를 분리하여 모세관에 넣어 -24°C 에서 냉동 보관하여 사용하였다. 모세관(i.d., 1.1-1.2 mm; length, 75 mm)은 Chase (U.S.A.)사, 포화탄화수소 표준품(nC20-nC34)은 Sigma (U.S.A.)사 제품을 사용하였다.

고체시료주입과 분석

냉동 보관한 동양종과 서양종 일벌을 깨끗한 유리판 위에 놓고 안테나, 날개 그리고 다리를 예리한 핀셋을 이용하여 각 조직을 분리하여 한쪽 끝을 봉한 모세관(length, 20-25 mm)에 넣은 다음 다른 한 쪽을 봉하고 모세관 외부를 LC용 hexane에 씻어내어 건조한 다음 고체시료 주입장치(Bagnères and Morgan, 1990)를 이용하여 기체크로마토그래피 분석에 사용하였다.

기체크로마토그래피 분석은 Hewlett Packard 4890 기기와 캐필러리 칼럼은 Bpx-5 (i.d., 0.32 mm; length, 12 m)를 사용하였고, 주입구 온도는 250°C 로 하고 칼럼 온도는 150°C 에서 10분간 유지하고 분당 3°C 씩 275°C 까지 승온하고 5분간 유지하였으며 검출기온도는 300°C 로 설정하고 이동상 질소의 유속은 분당 2 ml로 하였다. 모세관에 넣은 시료는 고체시료 주입장치에서 4-5분간 가열되어 충분히 기화시킨 후 모세관을 부수어 시료성분이 이동상과 함께 칼럼으로 흘러가게 하였다.

GC/MS분석은 Hewlett Packard 6890기기를 이용하여 electron impact (70 eV)법을 사용하였고 이동상 헬

컵의 유속은 분당 0.8 ml로 흘리면서 GC 분석과 동일한 칼럼과 온도조건에서 실시 하였다. nC20-C34 포화탄화수소 표준용액은 hexane용액으로 조제하여 1 µl를 모세관에 넣고 용매를 충분히 휘발시킨 다음 밀봉하여 분석에 사용하였다.

각 포화탄화수소는 GC 머무름 시간과 분자이온 질량스펙트럼의 양상 그리고 내부 표준물질을 주입하는 방법으로 확인하였으며 시료의 매 개체별 세 부위는 모두 5반복 분석하여 평균값을 취하였으며 그 결과는 X² 검증법으로 종간 및 종내의 부위별 포화탄화수소의 함량을 분석하여 유의성 검증을 실행하였다.

결과 및 고찰

Lockey (1984)는 거저리과 딱정벌레(tenebrionid beetle) 두 종의 성충(*Metriopus depressus*와 *Renatiella scrobipennis*)에서 포피탄화수소 성분 중 nC23-nC35 포화탄화수소를 분석하였는데 *M. depressus*에서는 nC34가 검출되지 않았으며 nC28과 nC29의 함량이 비슷하고 기타 11가지 성분들은 두 종 사이에서 현저한 함량차이를 나타냈다고 보고하였다. 그 외 여러 가지 곤충의 포피 탄화수소를 조사한 결과 종간, 성별간 포화탄화수소의 함량비율은 차이가 있는 것으로 밝혀졌다(Hadley et al., 1981; Nelson and Carlson, 1986; Haverty et al., 1990; Pappas et al., 1994).

본 연구에서 서양종과 동양종 일벌의 포피탄화수소 중 포화탄화수소의 차이를 안테나, 날개 그리고 다리 등 부위별로 분석하여 그 결과를 Figs. 1, 2, 3에 나타내었다. GC와 GC/MS를 이용하여 확인된 전체 포화탄화수소에 대한 각각의 포화탄화수소의 함량비율을 Table 1에 정리하였다. 부위별로 두 종간의 공통점과 차이점을 살펴본 결과는 다음과 같다.

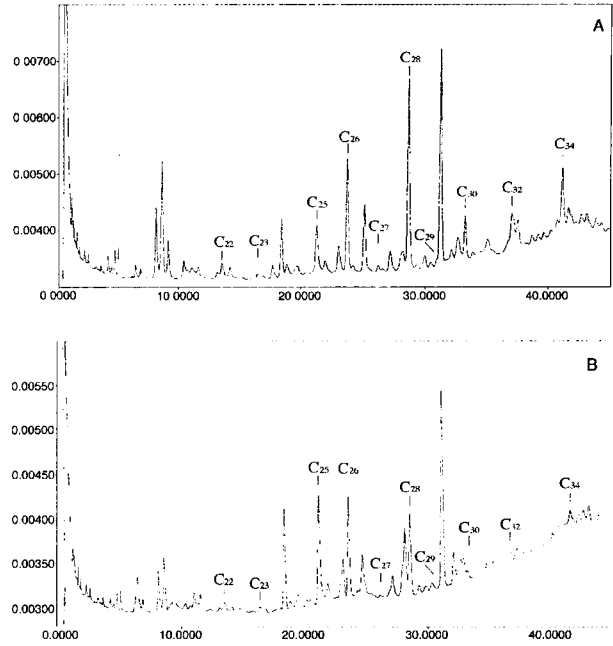


Fig. 1. Gas chromatogram of cuticular hydrocarbons from antenna of worker of the honeybee of *Apis mellifera* L. (A) and *Apis cerana* F. (B) by the solid injection technique.

안테나

고체시료 주입장치로 분석한 서양종과 동양종 일벌의 안테나에 있는 포화탄화수소의 GC 크로마토그램을 Fig. 1에 나타내었다. 두 종의 일벌은 모두 nC22-nC34 (nC24를 제외)를 함유하고 있고 서양종의 경우 nC30, nC32, 그리고 nC34가 동양종에 비해 5.1-23.7배 정도의 높은 함량비율을 나타냈다(Table 1). 특히 nC25의 경우 동양종이 서양종보다 4배 높은 함량비율을 갖고 있는 것으로 나타났다.

날개

서양종과 동양종 일벌의 날개에 있는 포화탄화수소

Table 1. A percent composition of n-alkanes from antenna, wings and legs of the honeybee *Apis mellifera* L. and *Apis cerana* F.

Tissue	Species	C22	C23	C24	C25	C26	C27	C28	C29	C30	C32	C34	Total (%)
Antenna	A.m*	2.3	0.5	—	8.8	23.0	0.8	41.5	0.3	7.1	6.6	9.1	100
	A.c**	1.0	0.6	—	34.7	38.0	0.3	22.2	trace	0.3	1.3	1.6	100
Wing	A.m	0.2	0.2	—	2.4	29.5	0.6	16.8	0.4	11.8	7.8	30.3	100
	A.c	0.1	0.2	—	10.0	42.1	0.5	43.8	trace	2.1	0.2	1.0	100
Leg	A.m	0.9	0.2	—	0.7	42.6	0.3	21.5	0.4	10.1	4.2	19.1	100
	A.c	0.2	0.1	—	0.9	42.4	0.4	54.8	0.1	0.9	0.1	0.1	100

**Apis mellifera* L.

***Apis cerana* F.

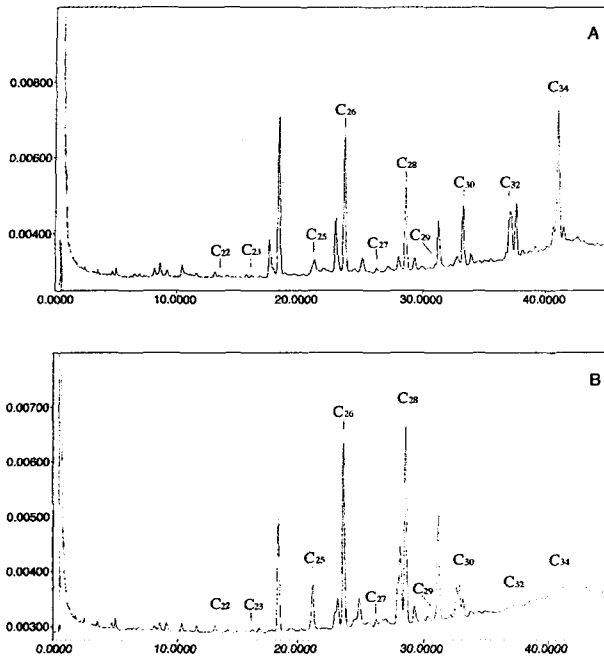


Fig. 2. Gas chromatogram of cuticular hydrocarbons from wing of worker of the honeybee of *A. mellifera* L. (A) and *A. cerana* F. (B) by the solid injection technique.

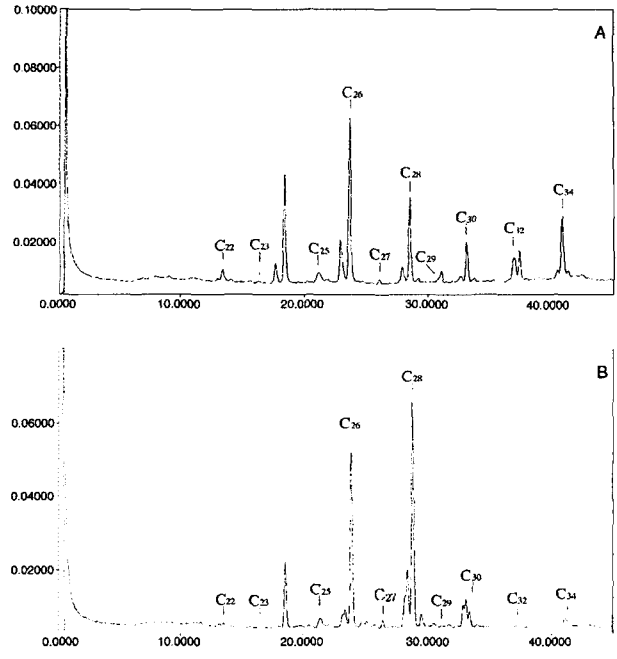


Fig. 3. Gas chromatogram of cuticular hydrocarbons from leg of worker of the honeybee of *A. mellifera* L. (A) and *A. cerana* F. (B) by the solid injection technique.

의 GC 크로마토그램을 Fig. 2에 나타내었다. Table 1에서 보면 서양종은 nC30, nC32 그리고 nC34의 함량 비율이 동양종 보다 5.6-39.0배 정도 높게 나타났고 동양종은 nC26과 nC28이 85.9%로 높은 함량을 보여주었고 서양종에서는 이들의 함량이 상대적으로 낮은 46.3%의 비율을 보여주었다.

다리

서양종과 동양종 일벌의 다리에 있는 포화탄화수소의 GC 크로마토그램을 Fig. 3에 나타내었다. Table 1에서 보면 서양종은 nC30, nC32 그리고 nC34가 동양종에 비하여 11.2-191.0배 정도 높은 함량비율을 나타냈고 서양종은 전체 포화탄화수소 중 nC26과 nC28이 64.0%이었고 동양종은 97.2%로 높은 함량비율로 검출되었다.

두 가지 일벌 모두 같은 종에서 부위별 포화탄화수소 함량비율은 고도의 유의성을 나타내었으며($X^2 A.m = 44.7$, $X^2 A.c = 60.5$, $P < 0.001$) 두 종간의 각 부위별 포화탄화수소의 함량비율도 고도의 유의성을 나타내었다($X^2 A = 41.1$, $X^2 W = 60.8$, $X^2 L = 45.6$, $P < 0.0001$). 그 중 nC25의 경우 동양종은 안테나의 함량비율이 다리에 비해 38.6배, 서양종의 경우 12.6배 높았으며

두 종간에는 안테나에서 동양종은 서양종보다 3.9배, 날개에서는 4.2배로 높게 나타났다.

이러한 결과를 바탕으로 서양종과 동양종 일벌의 특정 부위에 있는 포화탄화수소들의 특징적인 함량비율 차이는 비록 두 종의 꿀벌이 형태, 행동에서 쉽게 식별이 가능하지만 고체시료주입기술을 활용하여 포화탄화수소 함량차이를 분석하여 두 종간의 생리적 분화, 외적 방어기작 등의 행동양식의 차이를 연구하는데 기초자료로 활용할 수 있을 뿐만 아니라 방법론적으로 본 방법이 다른 곤충이나 꿀벌의 다른 부위(샘)의 화학성분조성의 차이를 밝히고자 할 때는 유용하게 활용될 수 있는 연구로서의 가치가 있는 것으로 생각된다.

본 연구에서 사용한 고체시료 주입방법은 한 마리의 곤충의 아주 작은 생체부위나 인편을 분리하여 직접 GC와 GC/MS에서 분석이 가능하기 때문에 기존에 사용되었던 용매추출 방법에 비하여 용매에 의한 오염방지, 극히 소량의 시료사용 그리고 분석시간 단축 등 여러 가지 장점을 갖고 있어 이러한 연구방법을 이용하여 다른 곤충의 생리활성물질의 연구분야에 널리 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

Literature Cited

- Bagnères, A.G. and E.D. Morgan. 1990. A simple method for analysis of insect cuticular hydrocarbons. *J. Chem. Ecol.* 16: 3263~3276.
- Blomquist, G.J., A.J. Chu and S. Remaley. 1980. Biosynthesis of wax in the honeybee, *Apis mellifera* L. *Insect Biochem.* 10: 313~321.
- Grunshaw, J.P., H. Guermouche, S. Guermouche, N.D. Jago, R. Jullien, E. Knowles and F. Perez. 1990. Chemical taxonomic studies of cuticular hydrocarbons in locusts of the schistocercana complex (Acrididae: Cyrtacanthacridinae): Chemical relationships between new world and old world species. *J. Chem. Ecol.* 16: 2835~2856.
- Hadley, N.F., G.J. Blomquist and U.N. Lanham. 1981. Cuticular hydrocarbons of four species of colorado hymenoptera. *Insect Biochem.* 11: 173~177.
- Haverty, M.I., B.T. Forschler and L.J. Nelson. 1996a. An assessment of the taxonomy of reticulitermes (Isoptera: Rhinotermitidae) from the southeastern united states based on cuticular hydrocarbons. *Sociobiology.* 28: 287~318.
- Haverty, M.I., B.L. Thorne and L.J. Nelson. 1996b. Hydrocarbons of *nasutitermes acajutlae* and comparison of methodologies for sampling cuticular hydrocarbons of caribbean termites for taxonomic and ecological studies. *J. Chem. Ecol.* 22: 2081~2109.
- Haverty, M.I., B.L. Thorne and P. Marion. 1990. Surface hydrocarbon components of two species of *Nasutitermes* from trinidad. *J. Chem. Ecol.* 16: 2441~2450.
- Jackson, L.L. and G.J. Blomquist. 1976. Insect waxes. pp: 201~233. in *Chemistry and Biochemistry of Natural Waxes*, Eds. P.E. Kolattukudy. Elsevier, Amsterdam.
- Lockey, K.H. 1984. Hydrocarbons of *Metriopus* (haag) and *Renatiella scrobipennis* (haag) (Coleoptera: Tenebrionidae). *Insect Biochem.* 14: 65~75.
- Morgan, E.D. and L.J. Wadhams. 1972. Gas chromatography of volatile compounds in small samples of biological materials. *J. Chromatogr. Sci.* 10: 528~529.
- Morgan, E.D. 1990. Preparation of small-samples from insects for chromatography. *Analytica Chimica Acta.* 236: 227~235.
- Nelson, D.R., J.W. Dillwith and G.J. Blomquist. 1981. Cuticular hydrocarbons of the house fly, *Musca domestica*. *Insect Biochem.* 11: 187~197.
- Nelson, D.R. and D.A. Carlson. 1986. Cuticular hydrocarbons of the tsetse flies *Glossina morsitans morsitans*, *G. Austeni* and *G. Pallidipes*. *Insect Biochem.* 16: 403~416.
- Pappas, C.D., B.J. Bricker, J.A. Christen and S.A. Rumbaugh. 1994. Cuticular hydrocarbons of *Aedes hendersoni* cockerell and *A. triseriatus* (SAY)1. *J. Chem. Ecol.* 20: 1121~1136.
- Patricia Juarez, G.J. Blomquist and C.J. Schofield. 2001. Hydrocarbons of *Rhodnius prolixus*, a chagas disease vector. *Com. Biochem. Physiol. B.* 129: 733~746.
- Singer, T.L. 1998. Role of hydrocarbons in the recognition systems of insects. *Am. Zool.* 38: 394~405.
- Tissot, M., D.R. Nelson and D.M. Gordon. 2001. Qualitative and quantitative differences in cuticular hydrocarbons between laboratory and field colonies of *Pogonomyrmex barbatus*. *Com. Biochem. Physiol. B.* 130: 349~358.
- Wagner, D., M. Tissot, W. Cuevas and D.M. Gordon. 2000. Harvester ants utilize cuticular hydrocarbons in nestmate recognition. *J. Chem. Ecol.* 26: 2245~2257.

(Received for publication 4 September 2002;
accepted 21 February 2003)