Journal of the Korea Society of
Tobacco Science Vol. 21, No. 2, 160~170(1999)
Printed in Republic of Korea

화랑곡나방(*Plodia interpunctella* Hübner) Carboxylesterase-III의 정제 및 생화학적 특성

박희윤* · 유종명

한남대학교 이과대학 생물학과

(1999년 11월 25일 접수)

Purification and Biochemical Characterization of Carboxylesterase-III from *Plodia interpunctella* Hübner

Hee Yun Park* and Chong Myung Yoo

Department of Biology, Han Nam University, Taejon 300-791, Korea

(Received November 25, 1999)

ABSTRACT : Purification and biochemical experiments on the carboxylesterases-III (CE-III) from the indian meal moth, *Plodia interpunctella* (Hübner) were carried out to understand their enzymemological characteristics. The CE-III from the fifth instar larvae was purified by means of ammonium sulfate fractionation, gel permeation choromatography and ion exchange choromatography. The optimal temperature for the reaction of the CE-III on the 4 substrates (α-Na, α-Nb, β-Na and β-Nb) was confirmed at 40℃. The optimal pH for the reactions on the substrates α-Na and α-Nb was 7.5. But the optimal pH on the substrate β-Na and β-Nb was 8.0. The optimal substrate concentration for the reactions of the CE-III was 3.16×10^{-3} M in α-Na and β-Nb. On the substrate β-Na and α-Nb, the optimal substrate concentration was 1.0×10^{-3} M for CE-III. The V_{max} and K_m values of the carboxylesterases were varied by the substrates as followings : the V_{max} of CE-III was 45.9 for α-Na, 52.6 for β-Na, 36.4 for α-Nb, and 83.3 (μmol/min/㎎ protein) for β-Nb. The K_m of CE-III was 1.43×10^{-4} M for α-Na, 3.57×10^{-5} M for β-Na, 9.17×10^{-5} M for α-Nb, and 7.14×10^{-5} M for β-Nb, respectively. The CE-III seemed to have somewhat high thermostability considering that the temperature for effective denaturation on activity was about 50℃~60℃.

Key words* : carboxylesterase-III, pH, V_{max}, K_m, *Plodia interpunctella

화랑곡나방(*Plodia interpunctella* Hübner)은 저장곡물, 건과류 및 건조된 엽연초 등의 가해곤충으로 그 피해정도가 막대하며, 약제에 대한 내성기전이 고도로 발달되어있는 것으로 알려져있는데, 특히 약제 내성에 중추적인 역할을 담당하는 물질은 다수의 isozyme으로 존재하는 esterase임이 많은 연구를 통해 밝혀졌다(Zettler, 1982; Field 등, 1984; Kao 등, 1984; Ziegler 등, 1987; Whyard 등, 1994). 따라서 근래의 연구에서는 이들의 약제 저항기전을 파악하고자 해충의 특정 esterase isozyme의 기능 및 특성에 관한 연구가 전기영동 및 chromatography를 이용한 효소의 정제를 통하여 활발히

* 연락저자 : 300-791, 대전광역시 대덕구 오정동 133, 한남대학교 이과대학 생물학과
* Corresponding author : *Department of Biology, Han Nam University, Ojung Dong, Taejon 300-791, Korea*

진행되고 있다. Hemingway(1985)는 *Anopheles arabiensis*에서 carboxylesterase의 kinetics 연구로 malathion 저항성종과 감수성 종간의 차이를 비교하였고, Owusu 등(1994)은 *Aphis gossypii*의 carboxylesterase에 관한 효소의 반응최적온도, pH 및 기질의 농도 등에 대한 효소학적 연구를 수행하였다. 또한 Siegfried 등(1997)은 *Schizaphis graminum*로 부터 정제한 carboxylesterase 활성에 대한 기질특이성 연구에서 각 기질별 반응상의 차이가 존재함을 보고하는 등 정제된 효소를 대상으로한 효소학적인 연구가 활발히 수행되고 있다(Lester와 Gilbert, 1987; Belzunces 등, 1988; Siegfried와 Scott, 1990; Mamiya 등, 1997; Ohbayashi 등, 1997). 본 연구는 다수로 존재하는 화랑곡나방의 esterase isozyme(Park 등, 1998) 중 carboxylesterase-III(CE-III)를 분리 정제한 후, 정제된 효소의 생화학적 특성을 구명하고자 수행하였다.

재료 및 방법

실험재료

화랑곡나방(*Plodia interpunctella* Hübner)을 곤충사육실(온도: 27±2℃; 상대습도: 60±2%; 광주기: 16 h-light, 8 h-dark)에서 밀과 귀리를 먹이로 누대사육하였다(Silhacek 와 Miller, 1972). 실험재료는 5령 유충을 암수 구분없이 다량 수집하여 얻은 충체를 사용하였다. 모든 재료들은 사용시까지 초저온냉동고(-70℃)에 보관하였다.

시료의 준비

저온실(4℃)에서 채취한 충체의 무게를 측정한 다음, 10 μM phenylthiourea(PTU)가 포함된 67mM sodium phosphate buffer(pH 7.0)를 첨가한 후 glass grinder(Wheaton-33)로 마쇄하였다. 최종적으로 동일 buffer를 가하여 추출액을 40% (w/v)로 균질화시킨 후 4℃에서 10,000rpm으로 15분간 원심분리(Beckman, J2-21 centrifuge)하여 조직절편 및 부유물을 제거한 다음 상층액을 취하여 crude enzyme으로 사용하였다.

단백질의 농도 측정

단백질 농도의 정량은 Lowry 등(1951)의 방법을 이용하여 실시하였다. 표준단백질은 bovine serum albumin을 사용하였으며, 시료의 반응액을 Spectronic Genesys 5 Spectrophotometer(Milton Roy Co.)를 이용하여 파장 750㎚에서 흡광도를 측정여 단백질의 농도를 산출하였다.

Esterase의 활성도 측정

Esterase의 활성도는 Ozaki and Koike(1965)의 방법을 이용하여 측정하였다. 반응액을 spectronic Genesys 5 spectrophotometer(Milton Roy Co.)를 이용하여 파장 540㎚에서 흡광도를 측정하였다. Esterase의 활성도는 정제된 β-naphthol(Sigma, USA)을 사용하여 작성한 표준곡선의 함수에 적용하여 산출하였으며, esterase의 활성도 값은 효소의 작용으로 가수분해되어 방출된 β-naphthol의 유리량(μg)으로 나타내었다.

Esterase isozyme의 확인

Esterase isozyme의 band 확인은 Laemmli(1970)의 native-PAGE 방법을 일부 변형하여 실시하였다. 즉 7.5% 농도의 polyacrylamide gel에 시료 15 μℓ 씩을 loading하여 처음 2시간은 5 mA로, 그 이후는 10㎃로 4℃에서 전기영동을 실시하였으며 running buffer는 250mM Tris-glycine(pH 8.6)을 사용하였다. 전기영동에 의해 분리된 isozyme band들의 확인은 Van Der Geest와 Borgsteede (1969)의 방법에 준하여 염색한 후 확인하였다.

Carboxylesterase-III의 분리 및 정제

5령 유충에서 채취한 충체의 추출액 100㎖에 단계별로 ammonium sulfate를 0~40%, 40~50%, 50~60%, 60~70%의 농도로 각각 포화시켜 4℃에서 단백질을 침전시킨 후 8,000rpm에서 20분간 원심분리하였다. 상층액을 제거하고 침전된 단백질에 동량의 50mM sodium phosphate buffer(pH 7.0)를 첨가, 혼합시킨 다음 투석하여 native-PAGE를 통해 각각의 ammonium sulfate 분획별 esterase isozyme band를 분리, 확인하였다. 분획중 다량의 CE-III를 포함하는 40~50% ammonium sulfate 침전 단백질을 membrane filter(Sartorius Co.,

Germany)로 여과한 다음 동일 buffer로 평형시킨 DEAE Sepharose CL-6B column(2.5×20cm)에 시료를 loading한 후 용출속도 0.4mℓ/min로 tube당 2.0mℓ씩 분획하였다. Bound protein은 0.05~0.25M sodium phosphate buffer(pH 7.0)의 linear gradient 상에서 용출시켰다. 분획 중 CE-III를 포함하는 fraction(D-3: No. 73~89)을 native-PAGE를 통하여 확인한 다음 투석시킨 후 Centriprep(Amicon Co., USA)을 이용 농축하여 0.05M sodium phosphate buffer(pH 7.0)에 평형시킨 Sephadex G-200 column(2.5×30cm)으로 분리하였다. 용출속도는 0.25mℓ/min으로 tube당 2mℓ씩 분획한 다음 부분정제가 확인된 fraction(S-2: No. 50~62)을 모아 농축하여 동일 buffer로 평형시킨 Sephadex G-150 column(2.5×30cm)에 용출속도 0.2mℓ/min으로 tube당 2mℓ씩 분획하여 최종적으로 gel permeation chromatography하였다. 정제된 CE-III를 함유하는 높은 효소활성을 보이는 peak의 fraction(S-5: No. 38~45)들을 tube별로 모아 농축한 후 7.5% polyacrylamide gel에서 전기영동을 실시하여 CE-III의 단일 band를 나타내는 fraction을 확인하였고, 단일 band로 확인된 fraction만을 수집하여 농축한 후 정제된 CE-III의 시료로 사용하였다.

반응최적온도 측정

정제된 효소(CE-III)의 반응최적온도를 알아보기 위하여 4종의 기질 α-naphthyl acetate(α-Na), β-naphthyl acetate(β-Na), α-naphthyl butyrate(α-Nb) 그리고 β-naphthyl butyrate(β-Nb)을 각각 0.54mM의 농도로하여 pH 7.0에서 온도별로 반응시켜 확인하였다. 반응온도 조건은 5℃ 간격으로 20℃에서 55℃까지로 하였으며, protein 1mg당 1분동안 나타내는 효소 활성도로 그 역가를 환산하여 분석하였다(Zhu 와 Brindley, 1990; Owusu 등, 1994).

반응최적 pH 측정

정제된 효소(CE-III)의 반응최적 pH를 알아보기 위하여 4종의 기질액(α-Na, β-Na, α-Nb, β-Nb) 0.54 mM의 농도에서 37℃의 온도조건으로 반응시켜 각각 확인하였다. pH 반응범위는 pH 0.5 간격으로 pH 5.5 에서 pH 9.0 까지로 하였으며, protein 1mg당 1분동안 나타내는 효소 활성도로 그 역가를 환산하여 최적 pH 조건을 확인하였다(Kapin 과 Ahmad, 1980).

반응최적기질농도 측정

정제된 효소(CE-III)의 반응최적기질농도 및 기질과의 특이성을 알아보기 위하여 4종의 기질(α-Na, β-Na, α-Nb, β-Nb)을 각각 1.0×10^{-5}(-log 5.0M)에서 1.0×10^{-2}(-log 2.0 M) 범위로 희석하여 37℃의 온도조건으로 반응시켜 확인하였다. 기질의 농도 조건은 log 0.5 씩 단계별로 증가시켜 기질별로 각각 반응시킨 후, protein 1mg당 1분동안 나타내는 효소 활성도로 그 역가를 환산하여 분석하였다(Sudderuddin, 1973; Owusu 등, 1994).

Kinetics 조사

정제된 효소(CE-III)의 기질 가수분해에 따른 기질농도와 반응속도의 역학적인 관계를 4종의 기질(α-Na, β-Na, α-Nb, β-Nb)을 이용하여 분석하였다. 각 효소활성에 따른 기질농도와 반응속도에 의거 double reciprocal plot 값(1/[S], 1/v)을 각각 산출, Lineweaver-Burk방법에 따라 1/v을 1/[S]에 대하여 도시하고, 이를 분석하여 기질에 따른 각 효소의 K_m 및 V_{max}값을 산출하였다.

열안정성 조사

정제된 carboxylesterase-III의 열안정성을 조사하기 위해 효소를 10℃ 간격으로 30℃~80℃의 온도 범위에서 각각 1시간씩 preincubation 하였다. 열처리결과 변성된 단백질은 10,000rpm에서 10분간 원심분리하여 제거하였으며, 잔존하는 효소의 활성도를 측정, 대조군과 비교한 다음 % inhibition값을 산출하여 열안정성을 분석하였다.

결 과

Carboxylesterase-III의 정제

화랑곡나방 5령 유충의 주요 carboxylesterase로 밝혀진(Park 등, 1998) CE-III를 정제하기 위하여

ammonium sulfate로 포화시켜 분획한 결과 40~50% ammonium sulfate 분획에서 CE-III가 다량 검출되었다(Fig. 1). 따라서 본 연구에서는 CE-III을 정제하기 위하여 40~50% ammonium sulfate에 침전된 fraction을 선택하여 사용하였다.

CE-III가 다량 포함된 40~50% ammonium sulfate분획(Fig. 1)을 투석하고 농축한 후 DEAE sepharose CL-6B column 상에서 ion exchange chromatography(Fig. 2)를 실시한 후 native-PAGE로 분리한 결과 D-3로 표시된 73~89번 fraction에서 CE-III가 다량 함유되어 있었다(Fig. 3). 이들 fraction을 모아 다시 투석하고 농축시킨 다음 Sephadex G-200 column으로 gel permeation chromatography를 실시하였다(Fig. 4). Gel permeation을 통해 얻어진 3개의 esterase peak중 두 번째 peak인 S-2 fraction(No. 50~62)에서 다량의 CE-III가 존재함이 전기영동을 통해서 확인되었다(Fig. 5). 부분정제된 fraction들을 모아 농축한 후 최종적으로 Sephadex G-150 column으로 gel perme-

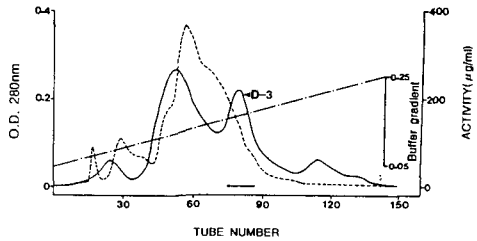

Fig. 2. DEAE-Sepharose CL-6B ion exchange chromatography of 40~50% ammonium sulfate fration of whole body esterase from the fifth instar larva of *Plodia interpunctella*. The fractionated protein was applied on to column (2.5× 20cm) equilibrated with 0.05 M sodium phosphate buffer (pH 7.0). The elution was carried out using 0.05 M~0.25 M sodium phosphate buffer (pH 7.0) at a flow rate of 0.4 mℓ/min. Fractions of 2mℓ per tube were collected and assayed for esterase activity. Protein concentration was monitored by absobance at 280 nm. ——, esterase activity; -----, protein concentration.

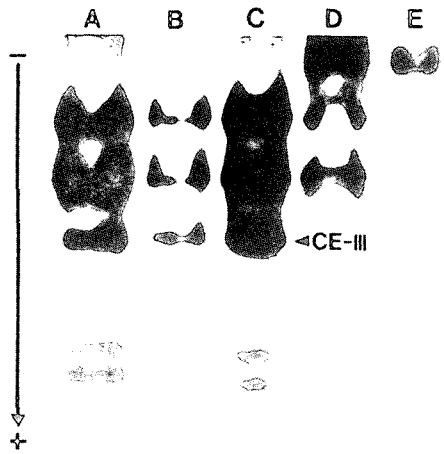

Fig. 1. Native-PAGE (7.5%) patterns of whole body esterase from the fifth instar larva of *Plodia interpunctella*. The esterases were fractionated by precipitation after addition of ammonium sulfate. A, the fifth instar larva; B, 0~40%; C, 40~50%; D, 50~60%; E, 60~70% ammonium sulfate {$(NH_4)_2SO_4$} fraction; CE-III, carboxylesterase-III.

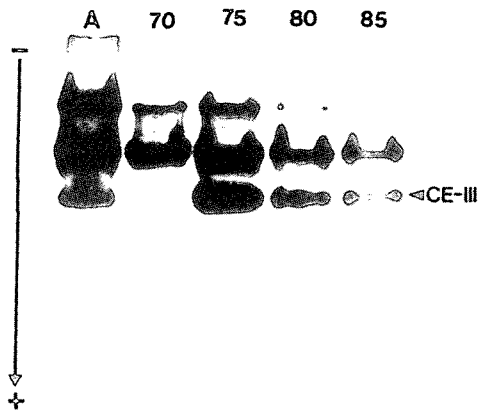

Fig. 3. Native-PAGE (7.5%) patterns of esterases from *Plodia interpunctella* collected by DEAE Sepharose CL-6B ion exchange chromatography. Numbers indicate the tube number fractionated on ion exchange chromatography shown in Fig. 2. A, the fifth instar larva; CE-III, carboxylesterase-III.

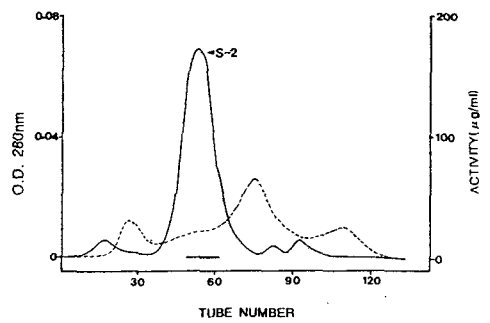

Fig. 4. Sephadex G-200 gel permeation chromatography of DEAE Sepharose CL-6B fraction (D-3). The protein fraction was applied to the column (2.5×30cm) equilibrated with 0.05 M sodium phosphate buffer (pH 7.0) and the elution was carried out with the same buffer at a flow rate of 0.25 mℓ/min. Fractions of 2mℓ per tube were collected and assayed for esterase activity. Protein concentration was measured by absobance at 280 nm. ——, esterase activity; -----, protein concentration.

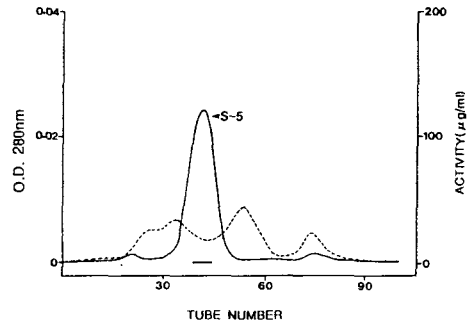

Fig. 6. Sephadex G-150 gel permeation chromatography of Sephadex G-200 fraction (S-2). The protein fraction was applied to the column (2.5× 30cm) equilibrated with 0.05 M sodium phosphate buffer (pH 7.0) and the elution was carried out with the same buffer at a flow rate of 0.2 mℓ /min. Fractions of 2mℓ per tube were collected and assayed for esterase activity. Protein concentration was measured by absobance at 280 nm. ——, esterase activity; -----, protein concentration.

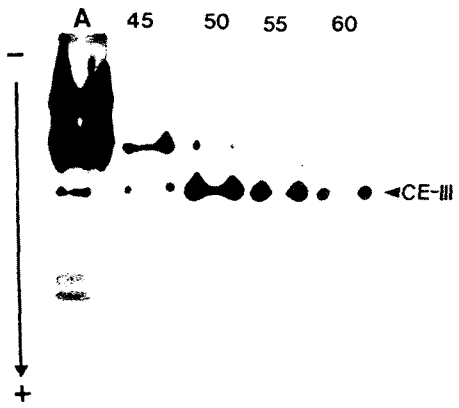

Fig. 5. Native-PAGE (7.5%) patterns of esterases from *Plodia interpunctella* collected by Sephadex G-200 gel permeation chromatography. Numbers indicate the tube number fractionated on gel permeation chromatography shown in Fig. 4. A, the fifth instar larva; CE-III, carboxylesterase-III.

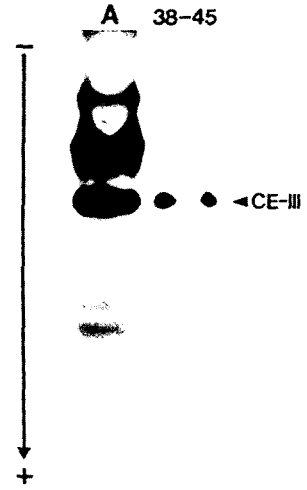

Fig. 7. Native-PAGE (7.5%) pattern of purified carboxylesterase-III from *Plodia interpunctella* collected by Sephadex G-150 gel permeation chromatography. Numbers indicate the tube number fractionated on gel permeation chromatography shown in Fig. 6. A, the fifth instar larva; CE-III, carboxylesterase-III.

ation chromatography(Fig. 6)한 다음 peak S-5(No. 38~45)의 분획을 농축한 후 순수정제 상태를 확인하기 위하여 native-PAGE를 실시한 결과 CE-III이 단일 band로 나타나 CE-III의 정제시료를 얻었다(Fig. 7).

Carboxylesterase의 생화학적 특성

1. 온도

온도에 따른 carboxylesterase-III의 활성도와 기질 특이성은 Fig. 8과 같다. α-Na, β-Na, α-Nb 및 β-Nb를 기질로 사용하여 20℃부터 온도를 5℃씩 상승시켜 반응시킨결과 효소 및 기질별로 반응최적온도에 많은 특이성이 존재하였는데, 온도가 상승됨에 따라 효소의 활성도가 증가하여 효소의 반응최적온도는 4종의 기질 모두 40℃ 에서 최대의 활성도를 나타냄으로써(Fig. 8) 반응최적온도상의 동질성이 있음이 관찰되었다. 최적온도 이상에서는 대체적으로 효소활성이 급격히 감소하는 경향을 보였고, 최대활성도는 β-Na가 246.3 μmol/min/㎎ protein으로 가장 높았으며, 기질별 효소활성도에 다소 차이가 관찰되었는데, CE-III는 naphthyl group의 기질 α와 β-form 중 β-form에 보다 강하게 작용하는 것으로 밝혀졌다.

2. pH

pH에 따른 CE-III의 활성도와 기질특이성은 Fig. 9와 같다. α-Na, β-Na, α-Nb 및 β-Nb를 기질로 사용하여 37℃의 온도에서 pH 5.5에서부터 pH를 0.5씩 증가시켜 반응시킨 결과 일반적으로 4종의 기질에서 모두 pH 6.5~8.0 범위에서 유의적인 활성도가 관찰되었으나, pH 6.0 이하의 산성조건이나 pH 8.5 이상의 알칼리성 조건에서는 효소활성도가 급격히 감소됨이 확인되었다. 효소(CE-III) 와 기질별 최적 pH조건은 α-Na와 α-Nb의 경우 pH 7.5에서 최대의 활성도를 보였으나 β-Na와 β-Nb의 경우는 pH 8.0에서 각각 최대의 효소활성도값을 보였으며, 효소 및 기질별 최적 pH에 따른 활성도는 α-Na에서 57.4, α-Nb에서 59.4, β-Na에서 86.7 그리고 β-Nb에서 74.7(μmol/min/㎎ protein)로 가각 나타나 효소와 기질 α와 β-form간의 반응최적 pH상에 차이가

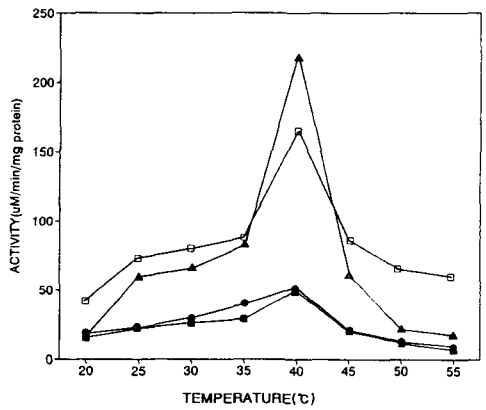

Fig. 8. Effects of temperature on the hydrolysis of 4 substrates by purified carboxylesterase-III from the fifth instar larva of *Plodia interpunctella*. Enzyme was reacted with different temperatures (20℃~55℃) for 15 min, and pH of the reaction mixture 7.0. Each point represents the mean of three determinations. (■, α-Na; ▲, β-Na; ●, α-Nb; □, β-Nb).

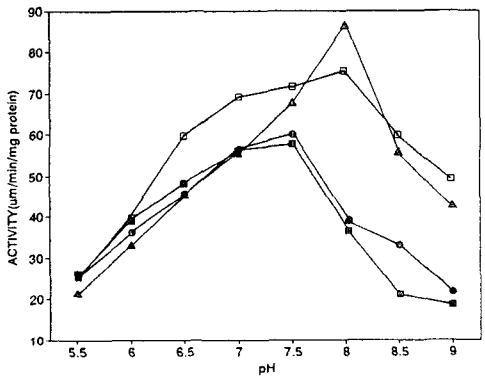

Fig. 9. Efects of pH on the hydrolysis of 4 substrates by purified carboxylesterase-III from the fifth instar larva of *Plodia interpunctella*. The reaction mixtures were incubated for 15 min at 37℃ (pH 5.5~9.0). Each point represents the mean of three determinations. (■, α-Na; ▲, β-Na; ●, α-Nb; □, β-Nb).

있음이 확인되었다.

3. 기질의 농도

기질의 농도에 따른 CE-III의 활성도와 기질 특이성은 Fig. 10과 같다. 기질 α-Na, β-Na, α-Nb 및 β-Nb를 각각 1.0×10^{-5} M~1.0×10^{-2} M 범위내에서 농도별 구배를 적용하여 반응액 pH 7.0, 온도 37℃에서 15분간 반응시켜 효소활성도를 분석한 결과 기질별 반응최적농도는 α-Na와 β-Nb의 경우 3.16×10^{-3} M에서, β-Na와 α-Nb는 1.0×10^{-3} M에서 최대의 활성을 나타냄으로써 각 기질별 반응최적농도가 확인되었다(Fig. 10).

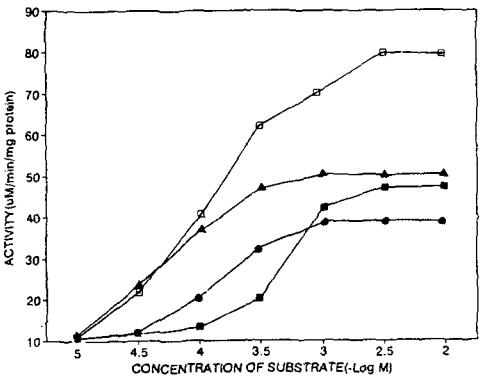

Fig. 10. Effects of substrate concentration on the hydrolysis of 4 substrates by purified carboxylesterase-III from the fifth instar larva of *Plodia interpunctella*. The reaction mixtures were incubated for 15 min at 37℃ (pH 7.0). Each point represents the mean of three determinations.(■, α-Na; ▲, β-Na; ●, α-Nb; □, β-Nb).

4. Kinetics

CE-III의 기질농도별 활성에 따른 활성도를 분석하여 Lineweaver-Burk plot 방법으로 도시한 결과 효소와 기질간의 반응역학상 각기 다른 고유의 기울기, X 및 Y절편을 갖는 것으로 나타났다. 이를 근거로한 각 효소의 기질별 kinetics 분석결과는 Table 1 및 2와 같다. CE-III은 기질 β-Nb와 반응하여 83.3 μmol/min/㎎ protein으로 최대의 활성도(V_{max})를 보임으로써 β-form의 naphthyl group 기질에 효과적으로 작용함이 확인되었다. 한편, K_m 값 역시 기질 β-Na에서 3.57×10^{-5} M로 가장 낮아 최대의 친화력을 나타내는것으로 확인되었다.

Table 1. Optimal concentration and V_{max} value of substrate specificity on the activity of purified CE-III from the fifth instar larva of *Plodia interpunctella*

Substrates	Optimal concentration	V_{max} value*
α-naphthyl acetate	3.16×10^{-3} M	45.9
β-naphthyl acetate	1.00×10^{-3} M	52.6
α-naphthyl butyrate	1.00×10^{-3} M	36.4
β-naphthyl butyrate	3.16×10^{-3} M	83.3

*V_{max} values are expressed μmol/min/㎎ protein.

Table 2. K_m value of substrates on the activity of purified CE-III from the fifth instar larva of *Plodia interpunctella*

Substrates	K_m value*
α-naphthyl acetate	1.43×10^{-4} M
β-naphthyl acetate	3.57×10^{-5} M
α-naphthyl butyrate	9.17×10^{-5} M
β-naphthyl butyrate	7.14×10^{-5} M

*K_m values are expressed as substrate concentration.

열안정성

CE-III의 열안정성 조사는 정제된 효소들을 30℃~80℃ 범위의 각 온도에서 1시간동안 변성시킨 다음, 잔존 효소활성을 측정한 후 % inhibition값을 산출하여 Fig. 11에 나타내었는데 50℃~60℃ 사이에서 효소활성이 급격히 감소하였으며 50℃를 기준으로 35.6%의 저해율을 나타내었고, 70℃ 이상에서는 효소활성이 거의 확인되지 않았다.

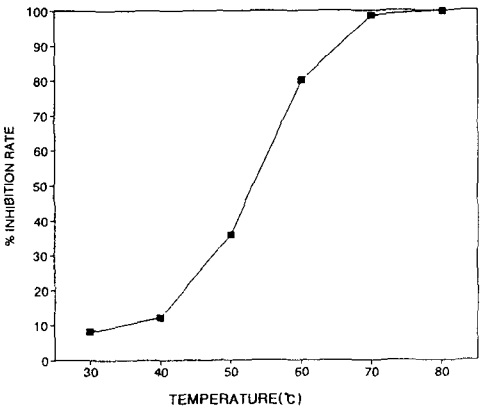

Fig. 11. Thermostability of purified CE-III from the fifth instar larva of *Plodia interpunctella*. The enzyme was preincubated with at different temperatures between 30℃ and 80℃ for 1 h. Each point represents the mean of three determinations.

고 찰

본 연구는 화랑곡나방에서 활성이 매우 강한 isozyme으로 확인된(Park *et al.*, 1998) carboxylesterase-III(CE-III)의 생화학적 특성을 알아보기 위하여 ammonium sulfate fractionation, ion exchange chromatography 그리고 gel permeation chromatography 방법을 적용하여 CE-III을 정제하였다. 정제된 carboxylesterase-III의 생화학적 특성을 4종의 기질(α-Na, β-Na, α-Nb, β-Nb)과 반응시켜 분석한 결과, 반응최적온도는 기질에 관계없이 40℃로 관찰되었다(Fig. 8). 이는 Owusu 등(1994)이 *Aphis gossypii*의 carboxylesterase를 대상으로 연구한 반응최적온도와 대부분 일치하였다. 한편 Zhu와 Brindley(1992)는 *Lygus hesperus*의 acetylcholinesterase에서 반응최적온도가 35℃~40℃ 임을 보고하였는데, 본 연구의 carboxyleaterase와는 다소 상이하게 나타난점으로 보아 esterase의 isozyme간에 있어서 반응최적온도에 효소별 특이성이 있음을 잘 시사해주고 있다. 또한 기질별 반응최적온도상의 활성도에 naphthyl group 기질 α와 β-form간의 차이가 다소 존재하는 것으로 확인되었다(Detra 와 Collins, 1986; Belzunces 등, 1988; Zhu 와 Brindley, 1990). 반응최적 pH는 기질에따라서 7.5~8.0의 범위로 나타나 그 범위가 대부분의 곤충들에서 보고되어진 pH 7.0~8.0에 포함됨을 확인하였으나(Fig. 9), α-Na와 α-Nb의 경우 pH 7.5에서 최대 활성도를 보인 반면 β-Na와 β-Nb의 경우는 pH 8.0에서 최대의 활성도를 보임으로써 naphthyl group의 기질 α와 β-form간에 pH에 따른 반응특이성이 존재하였다(Kapin 과 Ahmad, 1980). 4종 기질의 반응최적농도는 1.0×10^{-3} M~3.16×10^{-3} M로 나타나(Fig. 10, Table, 1), Sudderuddin(1973)이 *Myzus persicae*을 연구하여 보고한 3.15×10^{-4} M 보다는 높은 농도로, Owusu 등(1994)이 *Aphis gossypii*을 대상으로 연구한 carboxylesterase의 반응최적기질농도 5.0×10^{-3} M~5.0×10^{-2} M 보다는 낮은 농도범위를 보였는데, 이는 곤충의 종간, 혹은 반응조건 등의 차이에서 기인된 것으로 생각되며, 또한 곤충에 존재하는 esterase isozyme들의 활성 pattern이 고도로 세분화 되어있음을 의미하는 것으로 사료된다.

CE-III의 반응속도 및 기질특이성은 Lineweaver-Burk 방법에 의거 kinetics 상수 분석결과 기질별로 각기 다른 고유의 K_m 및 V_{max}값을 갖는 것으로 확인되었다(Tables, 1, 2), Hemingway(1985)는 *Anopheles arabiensis* 연구 결과 naphthyl group의 기질에서 carboxylesterase의 K_m값이 6.4×10^{-5} M~2.8×10^{-4} M의 범위로 다양하게 나타난다고 하였는데, 본 연구에서도 3.57×10^{-5} M~1.43×10^{-4} M 범위에서 확인된 바(Table 2) 그 범위가 어느정도 일치하였으나 각 기질별로 고유의 값을 가지고 있는 것으로 확인되어 기질에 대한 반응특이성이 존재함을 잘 나타내 주고있다. 그리고, V_{max}값 역시 기질별로 고유의 값을 나타내었는데(Table 1) α-Na가 36.4 μmol/min/㎎ protein 으로 가장 낮았고 β-Nb가 83.3 μmol/min/㎎ protein 으로 제일 높은 것으로 확인되었으며, CE-III는 전반적으로 naphthyl group 기질중 β-form에 보다 효과적으로 작용하여 α-form에 비하여 기질 가수분해에 따른 효소활성도가 약 1.7배 높은 것으로 나타나 V_{max}값에서도 효소와 기질간의 반응특이성이 존재함이 확인되었다(Kao 등, 1985; Siegfried 등, 1997).

이와같이 화랑곡나방의 CE-III에서 다소의 생화학적 특성이 확인되는 것으로 보아, 앞으로 여러가지 esterase isozyme을 대상으로한 분자생물학 및 면역학적 연구 등을 적용하여 보다 자세한 효소의 특성을 밝힐 수 있을 것으로 생각된다. 한편 효소의 열안정성에 관한 연구에서 Belzunces와 Debras (1997)는 *Apis mellifera*의 acetylcholinesterase는 52℃ 이상에서 효소활성이 감소된다고 주장하는 등, 일반적으로 곤충의 esterase isozyme들은 높은 열안정성을 갖는 것으로 보고되고 있다. 본 연구에서도 CE-III를 열 처리한 후 잔존 효소활성도를 조사한 결과 약 50℃~60℃ 사이에서 효소활성도 값이 급격히 저하됨이 관찰되었고(Fig. 11), 70℃ 이상에서 대부분의 효소활성이 소실되는 것으로 확인됨으로써 CE-III의 열안정성은 비교적 높은 것으로 사료된다.

결 론

화랑곡나방(*Plodia interpunctella*)의 carboxylesterase-III(CE-III)를 확인하고 이를 정제한 후 일부 생화학적 특성을 조사하였다.

정제된 CE-III의 반응최적온도는 4 종류의 기질 모두에서 40℃임이 확인되었다. 반응최적 pH는 기질 α-Na와 α-Nb에서 pH 7.5로 나타났고, β-Na와 β-Nb에서 pH 8.0임이 확인되었다. 반응최적 기질농도는 α-Na와 β-Nb의 경우 3.16×10^{-3} M, β-Na와 α-Nb는 1.0×10^{-3} M로 각각 나타났다.

최고반응속도(V_{max})는 α-Na가 45.9, β-Na가 52.6, α-Nb가 36.4, 그리고 β-Nb가 83.3(μmol/min/㎎ protein)임이 각각 확인되었다. 각 효소와 기질별 K_m값은 α-Na가 1.43×10^{-4} M, β-Na가 3.57×10^{-5} M, α-Nb가 9.17×10^{-5} M, 그리고 β-Nb가 7.14×10^{-5} M로 각각 확인되었다.

정제된 CE-III는 50℃에서 효소활성상 35.6%의 저해율을 보였으며, 약 50℃~60℃ 사이에서 효소활성이 급격히 감소됨이 확인되어 비교적 열안정성이 높은 것으로 나타났다.

감사의 말씀

이 논문은 1999년도 한남대학교 학술연구조성비 지원에 의하여 연구되었음.

참 고 문 헌

Belzunces, L. P. and J. F. Debras (1997) Comparison of properties of native and lytic forms of acetylcholinesterase from *Apis mellifera*. Archiv. *Insect Biochem. Physiol.* 34; 143-157.

Belzunces, L. P., J. L. Rousseaux and M. Bounias (1988) Properties of acetylcholinesterase from *Apis mellifera* heads. *Insect Biochem.* 18(8) ; 811-819.

Detra, R. L. and W. J. Collins (1986) Characterization of cholinesterase activity in larval *Chironomus riparius* Meigen. *Insect Biochem.* 16(4); 733-739.

Field, W. N., J. M. Hitchen and A. T. Ress (1984) Esterase activity in strains of *Ades aegypti*(Deptera: Culicidae) tolerant and susceptible to the organophosphate in insecticide malathion. *J. Med. Ent.* 21(4); 412-418.

Hemingway, J. (1985) Malathion carboxylesterase enzymes in *Anopheles arabiensis* from Sudan. *Pesti. Biochem. Physiol.* 23; 309-313.

Kao, L. R., N. Motoyama and W. C. Dauterman (1984) Studies on hydrolases in various housefly strains and their role in malathion resistance. *Pesti. Biochem. Physiol.* 22: 86-92.

Kao, L. R., N. Motoyama and W. C. Dauterman (1985) The purification and characterization of esterase from insecticide-resistant and susceptible house flies. *Pesti. Biochem. Physiol.* 23; 228-239.

Kapin, M. A. and S. Ahmad (1980) Esterases in larval tissues of gypsy moth, *Lymantria*

dispar(L.); Optimum assay conditions, quantification and characterization. *Insect Biochem.* 10; 331-337.

Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacterophage T_4. *Nature* 227; 680-685.

Lester, D. S. and L. I. Gilbert (1987) Characterization of acetylcholinesterase activity in the larval brain of *Manduca sexta*. *Insect Biochem.* 17(1); 99-109.

Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193; 265-276.

Mamiya, A., Y. Ishikawa and Y. Kono (1997) Acetylcholinesterase in insecticide resistant *Culex tritaeniorhynchus*: Charcteristics accompanying insensitivity to inhibitors. *Appl. Ent. Zool.* 32(1); 37-44.

Ohbayashi, H., T. N. Pandharipande, J. Mitsuhashi and K. Sato (1997) Acetylcholinesterase activity of insect cells in particular flesh fly cells, cultureed *in vivo*. *Appl. Ent. Zool.* 32(1); 227-233.

Owusu, E. O., K. Komi, M. Horike and C. Hirano (1994) Some properties of carboxylesterase from *Aphis gossypii* Glover(Homopter: Aphididae). *Appl. Entomol. Zool.* 29(1); 47-53.

Ozaki, K. and H. Koike (1965) Naphthyl acetate esterase in the green rice leafhopper, *Nephotettix cincticeps* Uhler, with special reference to the resistant colony of the organophosphorus insecticide. *Appl. Entomol. Zool.* 9; 53-59.

Park, H. Y., H. C. Lee and C. M. Yoo (1998) Changes of esterase isozymes during the development from *Plodia interpunctella*. *J. Kor. Soc. Tobacco Sci.* 20(1); 80-86.

Siegfried, B. D. and J. G. Scott (1990) Properties and inhibition of acetylcholinesterase in resistant and susceptible German cockroaches (*Blatella germanica* L.). *Pesti. Biochem. Physiol.* 38; 122-129.

Siegfried, B. D., M. Ono and J. J. Swanson (1997) Purification and characterization of a carboxylesterase associated with organophosphate resistance in the greenbug, *Schizaphis graminum*. *Insect Biochem. Physiol.* 36; 229-240.

Silhacek, D. L. and G. L. Miller (1972) Growth and development of the indian meal moth, *Plodia interpunctella*(Lepidoptera: Phycitidae) under laboratory massrearing conditions. *Ann. Ent. Soc. Ame.* 65(5); 1084-1087.

Sudderuddin, K. I. (1973) An *in vitro* study of esterases hydrolyzing non-specific substrates, of an OP-resistant strain of the green peach aphid, *Myzus persicae*(Sulz.). *Comp. Biochem. Physiol.* 44B; 1067-1076.

Van Der Geest, L. P. S. and F. H. M. Borgsteede (1969) Protein changes in the haemolymph of *Piers brassicae* during the last larval instars and the beginning of the pupal stage. *J. Insect Physiol.* 15; 1687-1963.

Whyard, S., A. E. R. Downe and V. K. Walker (1994) Isolation of an esterase conferring insecticide resistance in the mosquito *Culex tarsalis*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 24(8); 819-827.

Zettler, J. L. (1982) Insecticide resistance in selected stored-product insects infesting peanuts in the southeastern United State. *J. Econ. Ent.* 75; 359-362.

Zhu, K. Y. and W. A. Brindley (1990) Properties of esterases from *Lygus hesperus* Knight (Hemiptera: Miridae) and the roles of the esterases in insecticide resistance. *J. Economic Entomol.* 83(3); 725-732.

Zhu, K. Y. and W. A. Brindley (1992) Enzymological and inhibitory properties of acethy-

lcholinesterase purified from *Lygus hesperus* Knight(Hemiptera: Miridae). *Insect Biochem. Mol. Biol.* 22(3); 245-251.

Ziegler, R., S. Whyard, A. E. R. Downe, G. R. Wyatt and V. K. Walker (1987) General esterase, malathion carboxylesterase and malathion reistance in *Culex tarsalis*. *Pesti. Biochem. Physiol.* 28; 279-28.