

담배나방의 휴면 용 혈림프 Carboxylesterase의 생화학적 특성

김영관 · 이철철 · 박희윤 · 이옥경 · 유종명

한남대학교 이과대학 생물학과

(1998년 4월 9일 접수)

Biochemical Properties of Haemolymph Carboxylesterase in Diapausing Pupae of *Helicoverpa assulta* (Guenee)

Y. K. Kim*, H. C. Lee, H. Y. Park, O. K. Lee and C. M. Yoo

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

(Received April 9, 1988)

ABSTRACT : Haemolymph carboxylesterases induced in diapausing pupae of *Helicoverpa assulta* Guenee were investigated. Increase in the activity of the electrophoresed isozyme bands were observed during the diapausing pupae. The isozymatic composition exhibited remarkable alterations represented as disappearance and induction of some isozyme bands, which were identified as carboxylesterase (CE) on the basis of their specificities to inhibitors. Much higher activity of the induced CE was shown in reaction with β -naphthyl acetate (β -Na) than α -naphthyl butyrate (α -Nb), representing the high regioselectivity to β -naphthyl group. Optimal temperature for the enzyme activity was different to the substrates used 37°C in β -Na and 40°C in α -Nb, respectively. However, the optimal pH for the enzyme activity was the same as 7.5 regardless of the substrates used, and relatively high thermostability of the CE was demonstrated by showing the denaturation at high temperature (50~55°C).

Key words : carboxylesterase, diapausing pupa, *Helicoverpa assulta* Guenee

담배나방(*Helicoverpa assulta* Guenee)은 농가의 주요 재배작물인 담배와 고추 등의 대표적인 해충으로 분계시되고 있다(Boo 등, 1990). 특히 담배나방은 생활환 중 용상대로 땅속에서 월동하는 시기를 거치므로 월동기간 중 매우 낮은 온도에서 생존하기 위한 여러가지 생리적인 변화를 수반하게 되는데 많은 연구들에서 cold stress 결과 새로운 단백질이 합성되는 것으로 확인되었고(Horwath와 Duman,

1983; Yoo 등, 1996b), 그 중에서도 곤충의 생리 및 이화학반응을 수행하는데 필수적인 효소로 알려진 esterase가 중요한 역할을 수행함이 알려져 왔다(Tsumuki와 Kanehisa, 1979; Yoo 등, 1991). Esterase는 광범위한 기질의 대사에 관여하는 여러 종의 동위효소들로 구성되어 있으며(Sudderudin과 Tan, 1973; Geering과 Freyvogel, 1975), 특히 곤충에서는 살충제와 같은 외부에서 이입된 대사저해

* 연락저자 : 300-791, 대전광역시 대덕구 오정동 133번지, 한남대학교 이과대학 생물학과

* Corresponding author : Department of Biology, Han Nam University, Ojung-Dong, Taejon 300-791, Korea

물질을 분해시키며 유충호르몬의 수준을 조절하는 등 매우 중요한 역할을 한다(Whitmore 등, 1972; Ahmad와 Forgash, 1976). 현재 곤충의 esterase는 기질 및 억제제 특이성을 고려하여 carboxylesterase (CE), cholinesterase(ChE) 및 arylesterase(ArE) 등으로 분류되고 있다(Mounter와 Whittaker, 1953; Hideaki와 Ozaki, 1983). Ahmad(1976)는 *Musca domestica* 유충과 성충에 존재하는 carboxylesterase isozyme의 조성과 분포를 연구하였는데 carboxylesterase는 유충호르몬 수준의 조절과 지방체에서 지방대사의 조절, 비상근에서 지방산 ester의 이화 작용, cuticle wax의 합성 및 수송 그리고 불활성 ester의 분해 등 중요한 생리적 기능을 담당하는 것으로 보고하였고, Sheehan(1979)은 *Drosophila melanogaster*에서 양성간의 발생 단계별 carboxylesterase 활성을 비교 연구한 결과 수컷의 생식에 중요한 역할을 담당함을 밝힌 바 있다. Owusu 등(1994)은 *Aphis gossypii*에서 carboxylesterase를 정제하여 최적온도와 최적 pH 및 기질농도는 각각 40~45°C, pH 6.8, $5 \times 10^{-3} \sim 5 \times 10^{-2}$ M임을 확인하였으며, Whyard 등(1994)은 *Culex tarsalis*에서 유기인계 살충제인 malathion에 대한 저항성은 carboxylesterase의 작용에 의한 것이라 보고하였다.

본 연구에서는 인시목 곤충인 담배나방(*Helicoverpa assulta* Guenee)의 휴면 및 저온처리시 혈림프 esterase isozyme의 조성 변화 및 이때 유도되는 carboxylesterase를 부분 정제하여 그 특성을 조사하였다.

재료 및 방법

실험재료

담배나방(*Helicoverpa assulta* Guenee)을 인공사료(옥수수가루, 콩가루, 고추씨기름, skim milk, yeast extract, multi-vitamin, agar)를 먹이로 하여 온도 25±1°C, 상대습도 60±5%, 광주기 16L:8D에서 누대사육하면서 실험재료로 사용하였다.

저온처리

2령 유충시부터 휴면 유도조건인 온도 19±1°C, 상대습도 65±5%와 10L:14D의 광주기 하에서 사

육하여 유도된 휴면 용을 Low temp. incubator (LTI- 600SD, EYELA)를 사용하여 4°C에서 1개월간 순응시킨 후(Boo 등, 1990), -2°C에서 10일간 저온처리하였다.

혈림프의 채취

휴면 용 및 대조군으로서 휴면유도처리를 하지 않은 종령유충과 용 및 성충에서 혈림프를 채취하였으며, 유충의 경우 복지를 절단하여, 용의 경우 두정부를 puncture하여 채취하였다. 혈림프의 채취 시에는 melanization의 방지를 위하여 소량의 phenylthiourea(PTU)를 첨가하였으며, 채취 직후 8,000rpm으로 10분간 원심분리(Backman, J2-21 centrifuge)를 통해 혈구 및 조직 절편을 제거시킨 후 상등액을 취하여 -20°C에 보관하면서 실험에 사용하였다.

Esterase의 활성도 측정

Esterase의 활성도는 Ozaki와 Koike(1965)의 방법을 일부 변형하여 측정하였다. 효소의 기질로서 β -naphthyl acetate(β -Na)를 사용하였으며, 각각의 시료 1ml(dilution into D.W.)에 0.3mM의 기질액을 5ml씩 혼합하여 37°C에서 15분간 반응시킨 다음, 0.4% naphthol diazo blue B 용액 1ml을 가하여 발색시켰다. 여기에 40% trichloroacetic acid 1ml와 ethyl acetate 10ml를 가한 후 3,500rpm에서 10분간 원심분리시킨 상등액을 추출하여 파장 540nm에서 OD값을 측정하고(Beckman, DU-8B Spectrophotometer), 이를 naphthol 방출량으로 환산하였다.

Esterase의 isozyme의 확인

Esterase isozyme의 분리를 위한 전기영동은 Laemmli(1970)의 native-PAGE 방법을 일부 변형하여 실시하였다. 즉, 7~15%의 gradient polyacrylamide gel에 각 단계 별 crude enzyme을 30 μ l씩 loading하여 처음 2시간은 5mA로, 그 이후는 10mA로 4°C에서 전기영동을 실시하였으며, buffer는 Tris-glycine buffer(pH 8.6)를 사용하였다. 전기영동 후 gel을 0.1M phosphate buffer(pH 6.6) 7ml, α -naphthyl acetate 4mg, Fast blue RR salt 7mg의

혼합액에 담가 1시간 동안 37℃에 incubation시킨 후, 다시 37℃의 ethanol:10% acetic acid(3:2)의 혼합액에서 30분간 반응시켜 isozyme band들을 확인하였다.

저온유도성 esterase의 분리 및 정제

전기영동을 통해 비휴면 발생시 혈림프 esterase isozyme의 pattern과 휴면 용의 pattern을 비교하여 휴면에 따라 유도된 isozyme band들을 확인하고 그들의 억제제 특이성을 조사하였다. 휴면시 유도되는 것으로 확인된 두 종류의 carboxylesterase를 정제하기 위해 휴면 용의 혈림프 단백질을 0~40, 40~55, 55~70, 70~85%의 ammonium sulfate에서 순차적으로 침전시킨 후 투석 및 농축하고, 농축된 각 fraction들을 전기영동하여 확인함으로써 다량의 두 휴면유도성 carboxylesterase가 포함된 fraction들을 확보하였다. 효소의 정제는 50mM sodium phosphate buffer(pH 7.0)로 평형시킨 DEAE Sepharose CL-6B column(2.5×20cm, 용출속도 0.3ml/min) 상에서 ion exchange chromatography를 실시한 후, 다시 Sephacryl S-100 column(2.5×20cm, 용출속도 0.25ml/min) 상에서 gel filtration을 실시하였다.

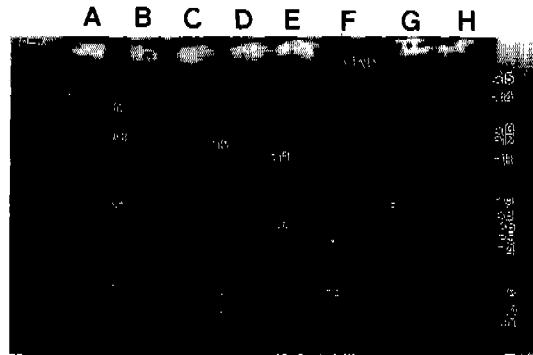


Fig. 1. Native-PAGE of haemolymph esterase during the development of *Helicoverpa assulta*. A: mature larvae, B: 1-day old pupae, C: 3-day old pupae, D: 5-day old pupae, E: 7-day old pupae, F: 1-day old adults, G: diapausing pupae, H: cold stressed pupae.

최적 pH 및 온도 측정

정제된 carboxylesterase 시료를 α -Nb 및 β -Na와 각각 반응시켜 효소활성의 최적 pH와 최적 온도를 조사하였다. 최적 반응온도는 31℃부터 3℃ 간격으로 43℃까지 조사하였으며, 최적 pH는 67mM phosphate buffer를 사용하여 pH 6~8 범위에서 실시하였다.

열안정성 조사

정제된 carboxylesterase의 열안정성을 알아보기 위하여 각 온도별(40, 45, 50, 55, 60, 65, 70℃)로 1시간씩 항온수조에서 반응시킨 후 10,000rpm에서 10분간 원심분리하여 침전물을 제거한 다음 상등액을 취하여 native-PAGE(7~15% gradient polyacrylamide gel)를 통해 그 변성여부를 확인하였다.

결 과

Esterase isozyme의 확인

담배나방의 혈림프를 전기영동하여 나타난 esterase isozyme의 pattern과 이를 종합한 zymogram은 Fig. 1 및 Fig. 2에 나타내었다. 비휴면시 혈림프 esterase band는 전 발생단계에 걸쳐 총 13개의 isozyme이 확인되었고, 휴면 용과 저온처리된 휴면 용에서도 13개 썩의 isozyme이 분리되었으나, 비휴면 발생군과 휴면 및 저온처리된 휴면 용 간에 band의 활성은 물론 출현여부에도 현저한 차이를 나타내었다(Fig. 1). 즉, 휴면 용 및 저온처리된 휴면 용에서 비휴면시 유출, 용 및 성충기에 모두 나타났던 band 7과 중령 유충에서 확인되는 band 10

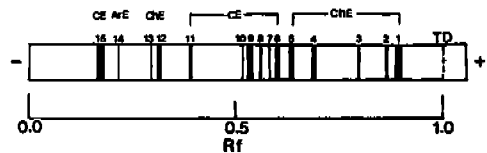


Fig. 2. Zymogram of haemolymph esterase isozymes detected throughout the non-diapause and diapause development of *Helicoverpa assulta*. CE: Carboxylesterase, ChE: Cholinesterase, ArE: Arylesterase.

이 소실되었으나, 비휴면시에 나타나지 않았던 band 6과 8이 새로이 유도되는 것으로 확인되었다 (Fig. 1). 또한 비휴면군에서는 비교적 강한 활성을 나타내는 band들이 일반적으로 gel의 중앙부위에 위치하고 있는데 비하여, 휴면 용 및 저온처리된 휴면 용(G, H)에서는 전반적으로 모든 band의 활성이 현저히 증가되었으며, 특히 중앙 및 하단 부위의 isozyme들이 매우 강한활성을 보임으로써 진하게 염색된 band로 나타났는데, 이는 esterase의 staining 특성상 기질과의 반응시 disperse된 것으로서 휴면 용의 esterase activity가 비휴면 용에 비하여 훨씬 높게 나타남을 알 수 있었다.

억제제 처리에 따른 혈림프 esterase band 활성의 저해효과를 기준으로 각 band들을 분류한 결과 (Fig. 2) band 6, 7, 8, 9, 10, 11 및 15는 carboxylesterase, band 1, 2, 3, 4, 5, 12 및 13은 cholinesterase 그리고 band 14는 arylesterase인 것으로 분류된 바, 휴면 용 및 저온처리된 휴면 용에서 새로이 유도되는 band 6과 8은 모두

carboxylesterase로 확인되었다.

저온유도성 esterase의 분리 및 정제

저온처리한 휴면 용의 혈림프 단백질을 ammonium sulfate로 침전 및 투석 농축하여 native-PAGE를 실시한 결과, 40~55% ammonium sulfate 분획에서 6, 8번 carboxylesterase의 활성이 높게 나타나 (Fig. 3), 이들 분획을 대상으로 DEAE Sepharose CL-6B column 상에서 ion exchange chromatography를 실시하였다 (Fig. 4). Ion exchange chromatography 결과 나타난 4개의 esterase peak를 각각 취하여 전기영동을 실시한 바, D-c로 표시된 peak의 분획들(58~68)에 band 6, 8이 다량 존재함을 확인하였으며 (Fig. 5), 이들을 pooled하여 농축한 다음 Sephacryl S-100 column 상에서 gel filtration을 실시하였다 (Fig. 6). Gel filtration 결과 단일 esterase peak가 관찰되었고, 전기영동분석 결과 S-c로 표시된 peak의 분획(65~86)에서 band 6, 8이 부분 정제되었음이 확인되었다 (Fig. 7).

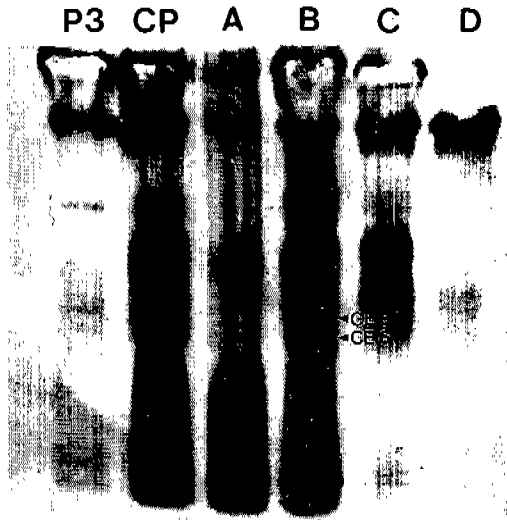


Fig. 3. Native-PAGE(7~15% gradient gel) of haemolymph esterases fractionated by precipitation in ammonium sulfate. P3: 3-day old non-diapausing pupae, CP: cold stressed diapausing pupae, A: 0~40%, B: 40~55%, C: 55~70%, D: 70~85% ammonium sulfate.

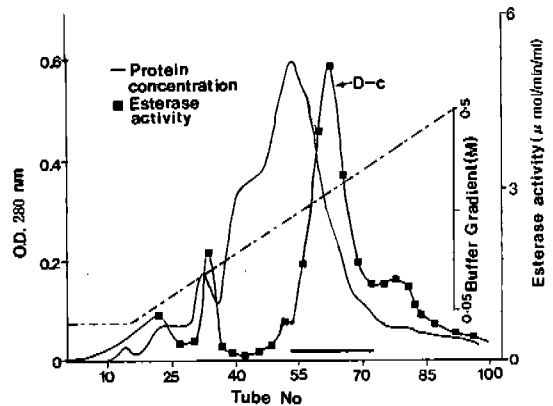


Fig. 4. Ion-exchange chromatography of haemolymph proteins precipitated with 40~55% ammonium sulfate in cold stressed diapausing pupa of *Helicoverpa assulta*. The proteins were loaded on a DEAE Sepharose CL-6B column (2.5×20cm), and then eluted with 0.05M to 0.5M sodium phosphate buffer(pH 7.0). Esterase activity: μmol of naphthol released/min/ml.

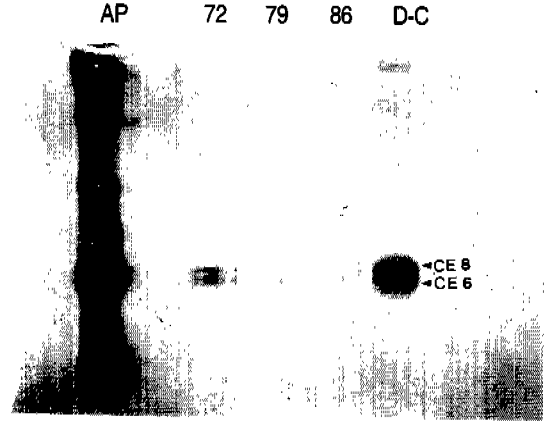
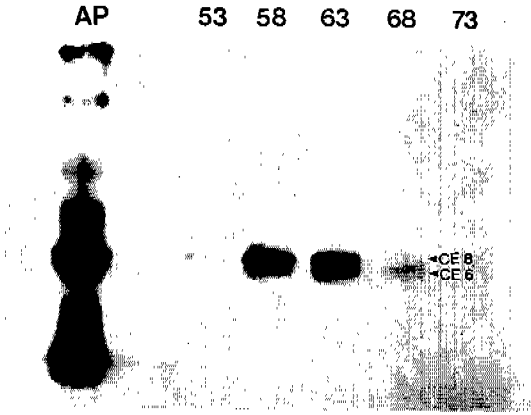


Fig. 5. Native-PAGE(7~15% gradient gel) of haemolymph esterases collected by ion exchange chromatography. Numbers indicate the tube numbers fractionated on DEAE Sepharose CL-6B column chromatography shown in Fig. 4. AP: Fraction of 40~55% ammonium sulfate.

Fig. 7. Native-PAGE(7~15% gradient gel) of haemolymph carboxylesterases collected by gel filtration. Numbers indicate the tube numbers fractionated on Sephacryl S-100 column chromatography shown in Fig. 6. AP: Fraction of 40~55% ammonium sulfate.

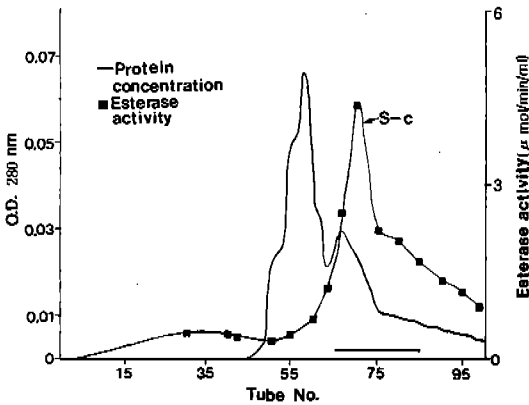


Fig. 6. Gel filtration of D-c fraction(Fig. 4) containing carboxylesterase(band 6, 8) on Sephacryl S-100 column(2.5×50cm). Elution was carried out in flow rate 0.3ml/min with 0.05M sodium phosphate buffer(pH 7.0). Esterase activity: μmol of naphthol released/min/ml.

와 같다.

부분 정제된 carboxylesterase의 활성에 대한 최적 온도는 기질에 따라 다르게 나타나 α -Nb와의 반응시에는 40 $^{\circ}\text{C}$, β -Na와의 반응시에는 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 가장 높은 활성을 나타내었다. 한편, 최적 pH는 두 기질과의 반응시 모두 7.5로 나타났으나, α -Nb의 경우 pH 증가에 따라 pH 6.0~6.5의 범위에서는 완만하게 증가한 후 pH 6.5~7.0 범위에서 급격히 증가한 다음 pH 7.5 이상에서는 감소하는 경향을 나타내었는데 비해, β -Na를 기질로 사용시 pH 6.0~7.0범위에서 완만하게 증가하였으며 pH 7.0에서 7.5까지는 급격히 증가한 다음 pH 7.5 이상에서 감소하는 경향을 나타내었다.

열안정성

정제된 carboxylesterase의 변성온도를 조사하기 위해 40~70 $^{\circ}\text{C}$ 사이에서 5 $^{\circ}\text{C}$ 간격으로 1시간동안 각각의 온도에서 열처리한 후 전기영동을 통해 그 활성을 확인한 결과(Fig. 10), 40 $^{\circ}\text{C}$ 에서는 비교적 강한 활성을 보였으며, 55 $^{\circ}\text{C}$ 이상에서는 활성이 더 이상 검출되지 않는 것으로 나타나 휴면 용에서 유도된 CE는 그 변성온도가 50~55 $^{\circ}\text{C}$ 인 것으로

최적 온도와 pH

담배나방의 휴면에 따라 유도되는 carboxylesterase 활성에 대한 최적 온도 및 pH를 α -Nb 또는 β -Na를 기질로 조사한 결과는 Fig. 8 및 9

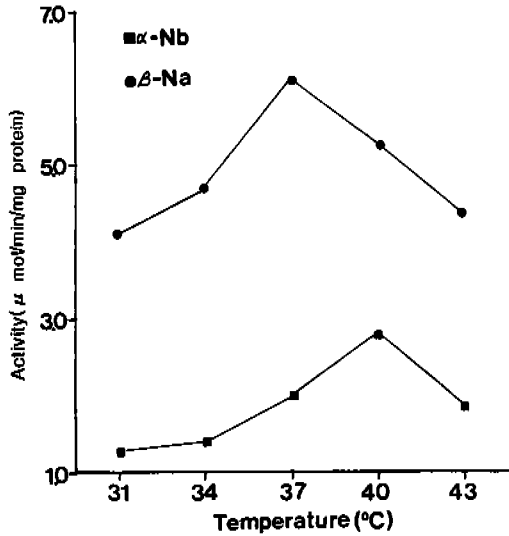


Fig. 8. Effects of temperature on the activity of haemolymph carboxylesterase in each reaction with two kinds of substrates(0.3mM, α -Nb or β -Na) at pH 7.0. Activity: μ mol of naphtol released/min/mg protein.

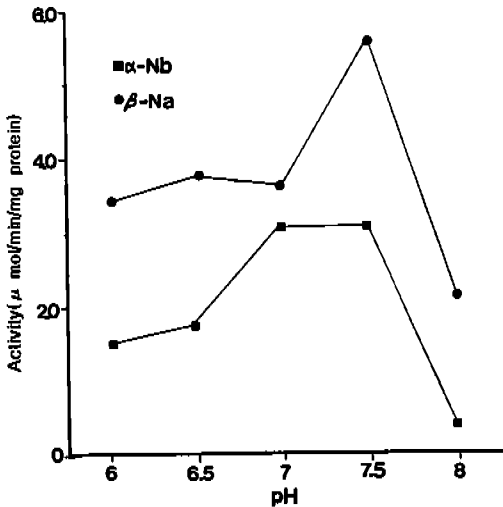


Fig. 9. Effects of pH on the activity of haemolymph carboxylesterase in each reaction with two kinds of substrates(0.3mM, α -Nb or β -Na) at 37°C. Activity: μ mol of naphtol released/min/mg protein.

판단됨으로 비교적 높은 열 안정성을 갖는 효소임이 확인되었다.

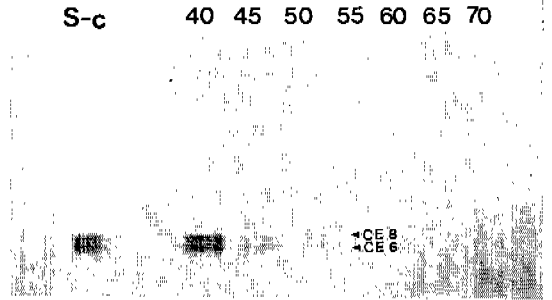


Fig. 10. Native-PAGE of haemolymph carboxylesterase from cold stressed pupae of *Helicoverpa assulta*. The numbers represent temperature(°C), and the enzymes were preexposure at stated temperature for 1 hr.

고 찰

곤충에서 혈림프는 모든 체조직과 직접적으로 접촉하면서, 각 조직 및 세포내의 대사에 필요한 물질의 수송은 물론 자체적인 각종 중간대사를 수행함에 따라 혈림프에는 다양한 종류의 대사효소들이 존재한다. 특히 곤충의 esterase는 매우 광범위한 기질의 대사에 관여하면서 곤충 특유의 배후 발생과 관련된 중요한 역할들을 수행함에 따라, 휴면, 변태 및 분화와 관련하여 독특한 조성을 보인다(Whitmore 등, 1972; Vedbrat와 Whitt, 1974).

곤충에서 esterase isozyme의 조성상은 종에 따라 다양하게 나타나 곤충에 따라 6~16개의 esterase isozyme이 존재함이 보고되었으며(Eguchi와 Yoshitake, 1967; Yoo, 1979; Ugaki 등, 1983; Prabhakaran과 Kamble, 1995), 본 연구결과에서도 담배나방 혈림프에 총 15개의 esterase isozyme이 존재함이 확인되었다(Fig. 1, 2). 이는 곤충의 변태, 주위환경 및 다양한 생리학적 특성 등에 의한 고도의 유전적변이 결과 수반되는 효소의 polymorphism 현상에 기인된 것으로 판단된다(Freyvogel 등, 1968; Kojima 등, 1970; Sell 등, 1974).

또한 본 연구에서는 담배나방을 2령 유충 시기부터 저온에서 발생시켜 유도된 휴면 용 혈림프의

esterase isozyme 조성상을 비휴면시와 비교하였는데, 전기영동 pattern 상에서 band들의 활성은 물론 그 출현여부에도 큰 변화를 나타내었다(Fig. 1). 즉, 휴면 용과 저온처리된 휴면 용에서 전반적으로 혈림프 esterase band들의 활성이 강화되었고, 비휴면 발생시 존재하는 band 7과 band 10이 휴면 용에서는 소실되었으며, 특히 비휴면시에는 나타나지 않는 band 6과 8이 휴면시에 유도되었다.

휴면시 유도되는 esterase들을 억제제 특이성을 기준으로 분류한 결과 모두 carboxylesterase인 것으로 판명되어, 휴면시에 혈림프 esterase의 활성이 크게 증가하는 현상은 대부분의 isozyme들이 활성 증가와 더불어, 새로이 유도되는 휴면 유도성 carboxylesterase의 출현에 의한 것으로 보여지며, 곤충에서 carboxylesterase는 휴면작동과 연관되는 생리활성 작용에 관련이 있는 것으로 생각된다. 또한 cold stress protein(CSP)과의 연관성도 배제할 수 없으며, 담배나방의 월동시 유도되는 것으로 알려져있는 결빙유도성 단백질과도 연관이 있는 것으로 추측되나(Yoo 등, 1996b), 본 효소를 순수정제한 후 면역학적 연구를 통해 휴면이나 cold stress 유도성 단백질과 비교하여야 동질성을 확인할 수 있을 것으로 사료된다.

본 연구에서는 담배나방의 휴면시 유도되는 혈림프 carboxylesterase의 특성을 알아보기 위해 이들 효소의 활성이 높게 나타나는 저온처리된 휴면 용의 혈림프를 ammonium sulfate로 분획한 후 높은 효소활성을 보이는 fraction을 대상으로 순차적으로 ion exchange chromatography와 gel filtration을 실시하여 정제하였다. 부분 정제된 휴면 유도성 carboxylesterase의 효소활성에 대한 최적온도와 pH는 두 가지의 기질과 반응시켜 조사하였는데, 조사된 온도 및 pH 범위내에서 모두 α -Nb와의 반응시보다 β -Na와의 반응시에 전반적으로 효소 활성이 두 배 이상 높게 나타나(Figs. 8, 9), naphthyl group에 대한 높은 regioselectivity를 보였다(Lester와 Gilbert, 1987; Yoo 등, 1996a). 최적 반응온도는 α -Nb와의 반응시에는 40°C로 그리고 β -Na와의 반응시에는 37°C로서 각각 다르게 나타났으며(Fig. 8), 다른 곤충들에서 esterase 활성의 최적온도 범위가 40~45°C인 것과 비교해 볼 때(Zhu와 Brin-

dley, 1990; Owusu 등, 1994), 담배나방의 휴면 유도성 carboxylesterase는 비교적 낮은 최적 온도를 보인다. 그러나 최적 pH는 α -Nb 및 β -Na와의 반응시 모두 pH 7.5로 확인되어(Fig. 9) Kapin과 Ahmad(1980)가 보고한 *Lymantria dispar* esterase의 최적 pH 7.5~7.7의 범위내에서 일치하였다. 부분 정제된 효소를 각각의 온도에서 1시간 동안 incubation시킨 후 전기영동을 실시하여 그 활성을 확인한 결과, 50~55°C에서 활성이 소실되는 것으로 판단됨으로 비교적 높은 열안정성을 나타내는 효소인 것으로 확인되었다(Fig. 10).

결론

담배나방(*Helicoverpa assulta* Guenee)의 휴면 용 혈림프 esterase isozyme 조성의 변화 및 휴면시 유도되는 carboxylesterase의 특성을 조사하였다.

전기영동결과 휴면 용 혈림프 esterase isozyme band들은 전반적으로 활성이 증가하였으며, isozyme의 조성상에서 일부 isozyme들(band No. 7, 10)이 소실된 반면 새로이 유도되는 isozyme(band No. 6, 8)이 확인되었다. 억제제 특이성에 기초하여 새로이 출현한 band는 모두 carboxylesterase(CE)인 것으로 밝혀졌고, 휴면시 유도된 carboxylesterase의 최적반응 온도는 β -Na와의 반응시에는 37°C, α -Nb와의 반응시에는 40°C로서 기질에 따라 다르게 나타났다. 한편 최적활성 pH는 두 가지 기질과의 반응시 모두 pH 7.5로서 동일하게 나타났으며, 변성 온도가 50~55°C의 범위인 것으로 나타나 비교적 열에 안정한 효소임이 확인되었다.

참고 문헌

- Ahmad, S. (1976) Larval and adult housefly carboxylesterase: Isozymatic composition and tissue pattern. *Insect Biochem.* 6: 541-547.
- Ahmad, S. and A. J. Forgash (1976) Nonoxidative enzymes in the metabolism of insecticides. *Drug. Metab. Rev.* 5: 141-164.
- Boo, K. S., H. C. Shinn, M. W. Han and M. H. Lee (1990) Initiation and termination of pupal

- diapause in the oriental tobacco budworm (*Heliothis assulta*). *Korean J. Appl. Entomol.* 29; 277-285.
- Eguchi, M. and N. Yoshitake (1967) Comparative studies on esterase zymograms among various tissues in the silk worm, *Bombyx mori* L. (Lepidoptera: Bombycidae). *Appl. Ent. Zool.* 2; 163-167.
- Freyvogel, T. A., R. L. Hunter and E. M. Smith (1968) Nonspecific esterases in mosquitos. *J. Histochem. Cytochem.* 16; 765-790.
- Geering, K. and T. A. Freyvogel (1975) The distribution of acetylcholine and unspecific esterases in the midgut of female *Aedes aegypti* L. *Comp. Biochem. Physiol.* 49B; 775-784.
- Hideaki, H. and K. Ozaki (1983) Electrophoretic esterase patterns in the brown planthopper *Nilaparavarta lugens* Stal. (Hemiptera: Delphacidae) which developed resistance to insecticides. *Appl. Entomol. Zool.* 18; 52-58.
- Horwath, K. L. and J. G. Duman (1983) Photoperiodic and thermal regulation of antifreeze protein levels in the beetle *Dendroides canadensis*. *J. Insect Physiol.* 29; 907-917.
- 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.
- Kojima, K., J. Gillespie and Y. N. Tobar (1970) A profile of *Drosophila* species enzymes assayed by electrophoresis-I. Number of alleles, heterozygosity, and linkage disequilibrium in glucose-metabolizing systems and some other enzymes. *Biochem. Genet.* 4; 627-637.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T₄. *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; 99-109.
- Mounter, L. A. and V. P. Whittaker (1953) The hydrolysis of esters of phenol by cholinesterases and other esterases. *Biochem. J.* 54; 551-559.
- Owusu, E. O., K. Komi, M. Horiike and C. Hirano (1994) Some properties of carboxyl esterase from *Aphis gossypii* Glover (Homoptera: Aphididae). *Appl. Ent. Zool.* 29; 47-53.
- Ozaki, K. and H. Kokie (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.
- Prabhakaran, S. K. and S. T. Kamble (1995) Biochemical characterization and purification of esterases from three strains of german cockroach, *Blattell germanica* (Dictyoptera: Blattellidae). *Insect Biochem. Physiol.* 31; 73-86.
- Sell, D. K., G. S. Whitt, R. L. Metcalf and L. P. Lee (1974) Enzyme polymorphism in the corn earworm, *Heliothis zea* (Lepidoptera: Noctuidae). Haemolymph esterase polymorphism. *Can. Ent.* 106; 701-709.
- Sheehan, K., R. C. Richmond and B. J. Cochrane (1979) Studies of esterase 6 in *Drosophila melanogaster*. III. The developmental pattern and tissue distribution. *Insect Biochem.* 9; 443-450.
- Sudderudin, K. I. and H. H. Tan (1973) Some hydrolase and their involvement in insecticide resistance. *Pest. Art. News. Summ.* 19; 24-35.
- Tsumuki, H. and K. Kanehisa (1979) Enzyme associated with glycogen metabolism in larvae of the rice stem borer *Chilo suppressalis* Walker: Some properties and changes in activities during hibernation. *Appl. Ent. Zool.* 14; 270-277.
- Ugaki, M., T. Abe, J. Fukami and Shono (1983) Electrophoretic analysis of nonspecific ester-

- ases and acetylcholinesterases from the housefly, *Musca domestica* L.(Diptera: Muscidae), with reference to organophosphorus insecticide resistance. *Appl. Ent. Zool.* 18: 447-455.
- Vedbrat S. S. and G. S. Whitt (1974) Isozyme ontogeny of the mosquito, *Anopheles albimanus*. In *Isozymes: III. Developmental biology* Markert, C. L. (Editor). Academic Press, N. Y.
- Whitmore, D., Jr., E. Whitmore and L. I. Gilbert (1972) Juvenile hormone induction of esterases: A mechanism for the regulation of juvenile hormone titre. *Proc. Natl. Sci. U. S. A.* 69:1592-1595.
- 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: 819-827.
- Yoo, C. M. (1979) Nonspecific esterase patterns of camphor silk moth *Dictyoploca japonica* Moore. *Korean J. Ento.* 11: 36-43.
- Yoo, C. M., C. B. Bak and H. C. Lee (1996a) Substrate and inhibitor specificities of esterase in *Lucilia illustris* Meign. *Korean J. Zool.* 39: 190-197.
- Yoo, C. M., E. D. Yoo, S. H. Kim and H. C. Lee (1996b) Identification and purification of cold stress protein(CSP) in *Helicoverpa assulta*. *J. Sci. Res. Han Nam Univ.* 26: 259-271.
- Yoo, C. M., S. E. Jeong and H. R. Kim (1991) The changes of organic compounds and the related enzymes of overwintering larva in the pine needle gall midge, *Thecodiplosis japonensis*. *Kor. J. Entomol.* 21: 19-28.
- Zhu, K. Y. and W. A. Brindley (1990) Properties of esterases from *Lygus esperus* Knight (Hemiptera : Miridae) and the roles of the esterases in insecticide resistance. *J. Econ. Entmol.* 83: 725-732.