

이산화염소 처리에 따른 화랑곡나방 아세틸콜린에스터레이즈 활성 증가와 음성주광성 행동 변화

김민현 · 권혁¹ · 권현식¹ · 김욱^{1*} · 김용균*

안동대학교 식물의학과, ¹고려대학교 바이오시스템공학과

Enhanced Acetylcholinesterase Activity of the Indianmeal Moth, *Plodia interpunctella*, Under Chlorine Dioxide Treatment and Altered Negative Phototaxis Behavior

Minhyun Kim, Hyeok Kwon¹, Hyunsik Kwon¹, Wook Kim^{1*} and Yonggyun Kim*

Department of Bioresource Sciences, Andong National University, Andong 36729, Korea

¹Department of Biosystems and Biotechnology, Korea University, Seoul 02841, Korea

ABSTRACT: Chlorine dioxide has been used as a disinfectant against microbial pathogens. Recently, its insecticidal activity has been known against stored insect pests by oxidative stress. However, any molecular target of the oxidative stress induced by chlorine dioxide has been not known in insects. This study assessed an enzyme activity of acetylcholinesterase (AChE) as a molecular target of chlorine dioxide in the Indianmeal moth, *Plodia interpunctella*. AChE activities were varied among developmental stages of *P. interpunctella*. Injection of chlorine dioxide with lethality-causing doses significantly increased AChE activity of the fifth instar larvae of *P. interpunctella*. Exposure of the larvae to chlorine dioxide fumigant also significantly increased AChE activity. The fifth instar larvae of *P. interpunctella* exhibited a negative phototaxis. However, chlorine dioxide treatment significantly interrupted the innate behavior. These results suggest that AChE is one of molecular targets of oxidative stress due to chlorine dioxide in *P. interpunctella*.

Key words: Chlorine dioxide, *Plodia interpunctella*, Phototaxis, Fumigant, Acetylcholinesterase

조 록: 이산화염소는 병원미생물에 대한 소독제로 사용되고 있다. 최근 저극해충에 대한 이산화염소의 산화적 스트레스에 의한 살충력이 확인되었다. 그러나 이산화염소의 산화적 스트레스에 의한 대상 곤충의 체내 분자 종말점에 대해서는 알려지지 않았다. 본 연구는 화랑곡나방(*Plodia interpunctella*)의 아세틸콜린에스터레이즈가 이산화염소의 분자표적으로 가정하고 노출에 따른 이 효소의 활성을 분석하였다. 아세틸콜린에스터레이즈 활성은 화랑곡나방 발육 시기에 따라 상이했다. 화랑곡나방 5령 유충에서 치사를 일으킬 수 있는 이산화염소 농도 처리는 아세틸콜린에스터레이즈 활성을 뚜렷하게 증가시켰다. 또한 혼중제 형태의 이산화염소 처리에서도 아세틸콜린에스터레이즈 활성 증가가 유발되었다. 화랑곡나방 5령 유충은 음성주광성을 보이는 데, 이산화염소 처리는 이 선천성 행동을 교란하였다. 이러한 결과는 아세틸콜린에스터레이즈가 이산화염소 처리에 따른 산화적 스트레스의 분자표적 가운데 하나라는 것을 제시하고 있다.

검색어: 이산화염소, 화랑곡나방, 주광성, 혼중제, 아세틸콜린에스터레이즈

이산화염소(ClO₂)는 높은 산화력을 지니고 있는 소독제 및 표백제로서 식용수 제조 과정에서 다양한 미생물의 멸균처리에

이용되고 있다(Volk et al., 2002). 이 물질은 또한 인체 식품류 오염을 일으키는 병원세균류(Bang et al., 2014; Sun et al., 2014), 구강 오염세균류(Taneja et al., 2014; Aung et al., 2015), 음용수 오염세균류(Vlad et al., 2014) 및 일반 식기 오염세균류(Nam et al., 2014)에 대해서 우수한 소독 효과를 지니고 있다. 특별히 여러 항생제에 대하여 내성을 보이는 세균류에 대해서

*Corresponding author: hosanna@anu.ac.kr

**Co-corresponding author: kwook@korea.ac.kr

Received December 23 2015; Revised January 5 2016

Accepted February 1 2016

이산화염소는 기존의 차아염소산나트륨(NaClO)에 비해 탁월한 항생능력을 나타냈다(Hinenoya et al., 2015). 또한 이산화염소는 세균뿐만 아니라 수족구병을 유발하는 엔테로바이러스 71 (EV71)을 비롯한 다양한 인체 병원바이러스에 대해서 바이러스 불활성화를 유발하였다(Sanekata et al., 2010; Jin et al., 2013).

이산화염소를 기체 상태로 변환하여 사람의 주거 환경에 피해를 주는 위생해충 및 저장곡물에 피해를 주는 저곡해충에 대한 살충 훈증제로서의 기능이 보고되고 있다. 병원 시설에 발생하는 빈대류(*Cimex lectularius*, *Cimex hemipterus*)에 대해서 비교적 높은 농도(약 1,000 ppm)의 이산화염소 노출에 대해서 속효성 방제 효과를 나타냈으며(Gibbs et al., 2012), 저곡류를 가해하는 화랑곡나방(*Plodia interpunctella*)에 대해서는 비교적 낮은 농도(200 ppm)의 노출에서 완전방제 효과를 나타냈다(Kumar et al., 2015). 또한 거저쌀도둑거저리(*Tribolium castaneum*)에 대해서도 이산화염소 훈증 처리는 높은 살충력을 나타냈다(Kim et al., 2015).

이러한 항균 및 살충 효과를 보이는 이산화염소의 작용기작은 아직 정확히 규명되고 있지 않다. 그러나 이 화합물이 갖는 높은 산화력에 의해 항균 및 살충력을 발휘하는 것으로 해석되고 있다. 즉, 이산화염소 노출은 방향성 아미노산류를 산화시켜 단백질의 변성을 유도하고 이를 통해 단백질의 기능을 상실하게 한다(Ogata, 2007). 또한 이산화염소는 직접 DNA 또는 RNA의 핵산을 변화시키는 작용을 갖는 것으로 보고되고 있다(Jin et al., 2013). 최근 이산화염소가 처리된 곤충에서 활성산소를 다량 유발시켜 처리된 곤충의 높은 치사율을 초래한다는 보고가 있으며(Kumar et al., 2015), 활성산소는 비교적 다양한 생체분자에 영향을 주는 것으로 알려져 있으나 이산화염소 처리를 통한 살충효과에 미치는 활성산소의 분자표적은 규명되지 않고 있다.

본 연구는 이산화염소의 노출에 따라 살충력이 검증된 화랑곡나방(*P. interpunctella*)에 대해서 체내 분자표적을 추적하는데 궁극적 목표를 두었다. 화랑곡나방에 대해서 이산화염소 훈증 처리에 따라 24 시간 이내에 급성 독성을 보인 점과 거저쌀도둑거저리에 대해서는 회피행동 유발을 시킨 것을 바탕으로 중추신경계에서 신경활동을 조절하는 아세틸콜린에스테라아제(acetylcholinesterase: AChE)를 대상으로 추적하였다. 즉, 이산화염소 처리에 따라 화랑곡나방 AChE의 활성변화가 유발되는 지에 연구의 목표를 두었다. 이를 위해 화랑곡나방 발육 시기에 따른 AChE의 활성 변이를 분석하였고, 이후 특정 시기를 대상으로 이산화염소 노출에 따른 활성변이를 비교하였다. 또한 이러한 AChE의 활성 변이가 화랑곡나방의 행동 이상 유발과의 인과관계를 추적하기 위해 화랑곡나방이 갖는 음성주

광성을 이산화염소 노출 실험과 연계하였다.

재료 및 방법

공시충 사육

본 연구에 사용된 화랑곡나방은 실내 누대 사육충으로 1994년 대구의 건조 채소류 저장창고에서 채집되었다. 이후 유충은 인공사료(800 g rice bran, 200 g 이스트 추출물, 500 mL 글리세롤, 2 g sorbic acid, 2 g methyl *p*-hydroxybenzoate)를 이용하여 온도 $28 \pm 1^\circ\text{C}$, 상대습도 65-75%, 일장 16:8 (L:D) h 조건의 배양기에서 누대 사육되었다. 소집단이 겪는 임의 유전적부동을 줄이기 위해 매 세대 100 마리 이상의 암수를 교미시켜 차세대를 형성하였다. 성충은 10% 설탕물을 제공받았다.

이산화염소 생체 주입 처리

본 연구에 이용된 이산화염소는 800 ppm의 저장 용액이었다. 이 시약은 프루고팜(화성, 한국)에서 제공되었다.

이산화염소 훈증 처리

이산화염소는 전기분해 방식으로 제조하였다. 물에 녹여놓았다가 가스 형태로 훈증시키는 것이기 때문에 농도조절이 가능하였고 이를 아크릴판으로 특수 제작한 밀폐된 챔버에 가스 발생장치(푸르고팜)를 이용하여 투여했다. 시험 곤충은 50 mL 튜브(Falcon, Tamaulipas, Mexico)에 소량(약 10 개) 현미와 함께 투여되었다. 이 용기의 윗면은 망사로 씌어 훈증제 처리가 가능하게 하였다. 이 곤충 용기를 이산화염소 처리 챔버에 넣고 처리 시간 동안 가스누출검지기(Gas leak detector C16, Analytical technology, Collegeville, PA, USA)로 이산화염소 농도를 지속적으로 모니터링해서 처리 농도를 확인하였다.

이산화염소 처리에 따른 생물검정

이산화염소 액상 주입 처리는 0, 50, 100, 200, 400 및 800 ppm을 이용하였다. 혈강 주입은 유리 모세관을 이용하여 초미량 펌프가 장착된 미세조정장치(SYS-microcontroller, World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA)를 이용하여 주입하였다. 유리 모세관은 micropipette puller (PN-30, Narishige, Tokyo, Japan)를 이용하여 제조하였다. 훈증 처리는 이산화염소 50 ppm 농도로 0, 2, 3, 4일 동안 각각 처리하였다. 각 농도 처리는 3 반복으

로 실시하였으며, 각 반복은 10 마리의 5령충을 대상으로 실시하였다. 처리 후 25°C 실내 조건에서 24 시간 방치 후 치사율을 조사하였다. 사망 판정은 핀셋으로 복부를 가볍게 눌렀을 때 자의적 행동이 없는 상태로 규정하였다.

AChE 효소 활성 측정

AChE 활성은 Ellman et al. (1961)의 방법을 따라 실시하였다. 화랑곡나방 유충 몸 전체 단백질을 인산완충용액으로 추출하고, 포함된 단백질의 함량은 Bradford (1976) 방법으로 측정하였다. 이 단백질 추출물(500 µL)을 기질용액(500 µL)과 혼합하고, 시간별 405 nm의 흡광도 변화를 측정하였다. 흡광도 변화를 분당으로 산출하고, 이를 효소 추출물 500 µL에 포함된 단백질량으로 나누어 효소 활성치를 산출하였다. 기질 용액은 56.4 mL 물에 1.2 mL의 100 mM acetylthiocholine iodide와 2.4 mL의 12 mM 5,5-dithio bis(nitrobenzoic acid)를 혼합하여 조제하였다.

음성주광성 행동분석

음성주광성 행동분석기는 2 개의 50 mL Falcon 튜브를 연결하여 제작하였다(Fig. 3A 참조). 한쪽 튜브는 검정색 테이프로 감싸서 빛이 투과하지 못하게 하여 암조건을 유지하였으며, 다른 튜브는 약 300 Lux 밝기의 백열등 아래 두어 명조건을 설정하였다. 두 튜브의 중앙은 개폐장치를 두어 여기에 실험충을 투입하였으며, 매 행동분석은 10 마리의 5령 유충으로 실시되었다. 투입 후 20 분 경과 후 각 양쪽 말단으로 움직인 개체수를 산출하였다. 50 mL 튜브의 25 mL 지점을 통과한 개체수를 빛에 대한 반응을 보인 것으로 간주하였다. 각 처리는 3 반복하여 실시되었다.

통계분석

모든 살충효과 실험결과는 백분율 자료로서 arsine 변환 후 SAS의 PROC GLM (SAS Institute, 1989)을 이용하여 ANOVA 분석 및 처리 평균 간 비교를 실시하였다.

결과

이산화염소 혈강 독성

이산화염소의 혈강 주입은 화랑곡나방의 혈구세포 치사를

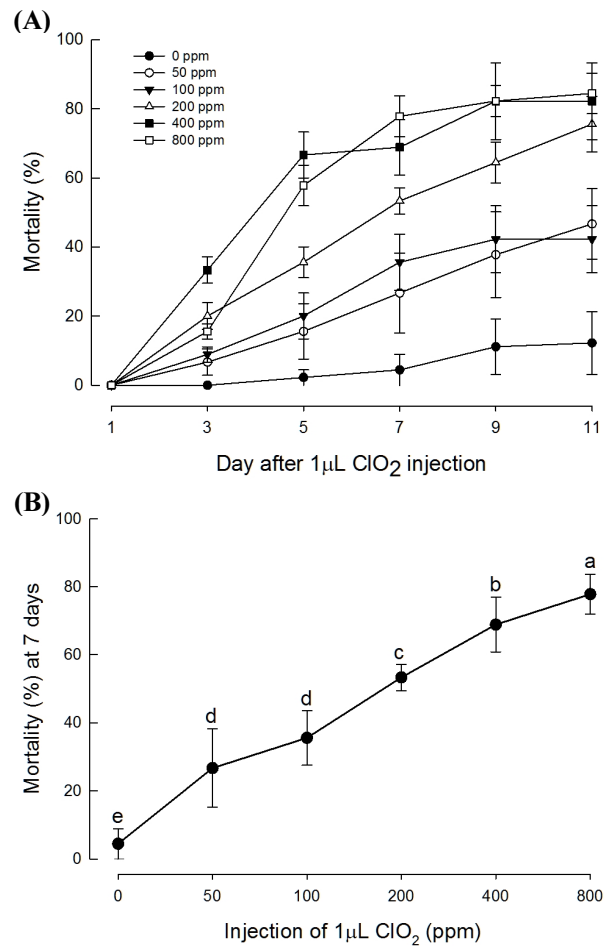


Fig. 1. Toxicity of chlorine dioxide to *P. interpunctella* by intrahemocoelic injection. Fifth instar larvae were injected in a volume of 1 µL. (A) Toxicity change with time after injection of different chlorine dioxide doses. Each dose was replicated three times with 10 larvae per replication. (B) Assessment of toxicity at 7 days after treatment. Different letters above standard deviation bars indicate significant difference among means at $\alpha = 0.05$ (LSD test).

일으켰다(Kim et al., 2015). 즉, 액상의 이산화염소 주입은 화랑곡나방의 생리적 변화를 유발할 수 있기에 상이한 농도를 주입하면서 반수치사약량의 독성 자료를 결정하였다(Fig. 1). 화랑곡나방 유충에 대한 이산화염소의 독성은 분석 농도의 최하인 50 ppm 처리에서도 나타났다(Fig. 1A). 이러한 독성은 이산화염소 처리 농도와 처리 후 경과 일수가 증가함에 따라 살충력도 증가하였다. 처리 후 7일이 경과하면 최대 살충력을 보였고, 이후는 살충력의 차이를 나타내지 않아, 이후의 독성 분석은 처리 경과 후 7일로 설정하였다(Fig. 1B). 이를 기준으로 처리 농도별 반수치사약량(LC₅₀)은 196.5 ppm (95% 신뢰구간: 125.6~301.5)으로 나타났다.

화랑곡나방의 발육시기별 AChE 활성 차이와 이산화염소 처리 효과

화랑곡나방의 발육시기별 AChE 활성이 분석되었다(Fig. 2A). 신경계가 완전히 발달된 1령 유충부터 성충까지 분석한 결과 최종령과 번데기를 제외하고 모두 유사한 활성을 나타냈다. 최종령과 번데기 시기에는 다른 발육 시기에 비해 낮은 AChE 활성을 나타냈다.

최종령인 5령을 대상으로 이산화염소 혈강 주입에 따른 AChE 활성 변화를 추적하였다(Fig. 2B). 낮은 이산화염소 농도(0.8 ppm) 처리에서는 AChE의 활성 변화가 없는 반면에 8 ppm 이상의 처리에서는 처리 농도와 상관없이 약 2 배 이상의 활성 증가를 보였다.

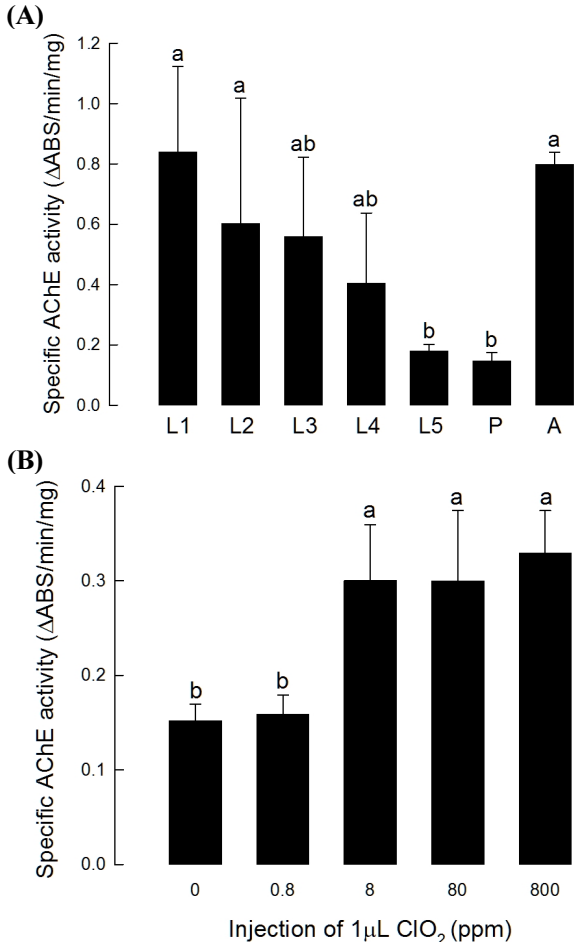


Fig. 2. Effect of chlorine dioxide on acetylcholinesterase (AChE) of *P. interpunctella* fifth instar larvae. (A) Developmental change in AChE activity: first-fifth instar ('L1-L5'), pupa ('P'), and adult ('A'). (B) Influence of chlorine dioxide on AChE activity of fifth instar *P. interpunctella* by intrahemocoelic injection in a volume of 1 μL. Different letters above standard deviation bars indicate significant difference among means at $\alpha = 0.05$ (LSD test).

이산화염소 처리와 화랑곡나방의 음성주광성 교란

화랑곡나방 5령 유충은 빛 노출에 대해서 회피하는 음성주광성을 보였다(Fig. 3A). 이산화염소(8 ppm, 혈강 주입) 처리하고 경과 시기에 따라 음성주광성 행동을 분석하였다(Fig. 3B). 처리 후 시간이 경과함에 따라 음성주광성 행동이 교란되었다. 처리 후 6 시간이 경과할 때까지는 대조구와 큰 차이를 보이지 않지만($P = 0.7139$), 12 시간과 24 시간 처리구에서는 대조구에 비해 비교적 큰 차이를 나타냈다($P = 0.0676$).

이산화염소 혼증 처리와 AChE 활성 변화

저 농도의 이산화염소 혼증 처리에 대해서 AChE의 활성 변화를 분석하였다(Fig. 4). 화랑곡나방 5령 유충에 대해서 50 ppm의 이산화염소 혼증 처리에 대해서 처리 시간이 증가할수록 살충력이 증가하였다(Fig. 4A). 각 처리 5 일후 생존한 개체를 살펴보면 대부분 번데기 또는 전용 단계이었다(Fig. 4B). 이 생존한 개체를 대상으로 AChE 활성을 분석한 결과, 대조구에 비해 이산화염소 처리구에서는 2배에서 4배 이상의 활성 증가를 보였다(Fig. 4C).

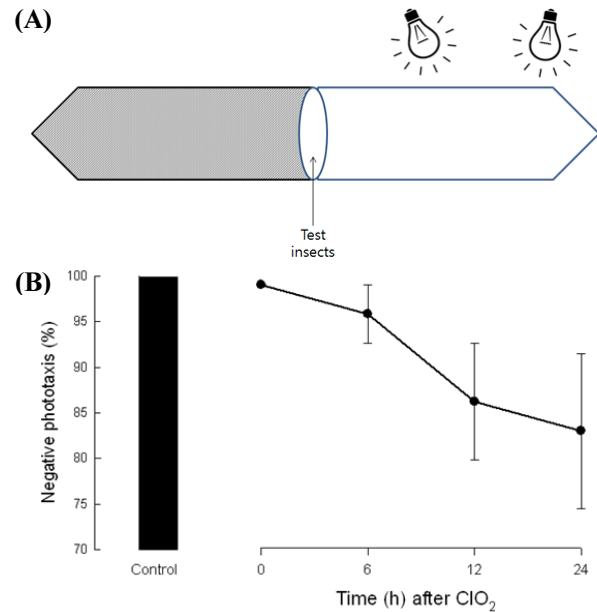


Fig. 3. Behavioral change of *P. interpunctella* fifth instar larvae after chlorine dioxide treatment. (A) An apparatus testing negative phototaxis of *P. interpunctella*. Two 50 mL tubes are joined, in which one tube is illuminated and the other is masked with black tape to keep dark condition. Each run used 10 larvae in the middle of the apparatus. (B) Alteration of negative phototaxis of *P. interpunctella* larvae by injection of 8 ppm chlorine dioxide in a volume of 1 μL. The behavioral test was performed at different time after the chemical injection. Each treatment was replicated three times.

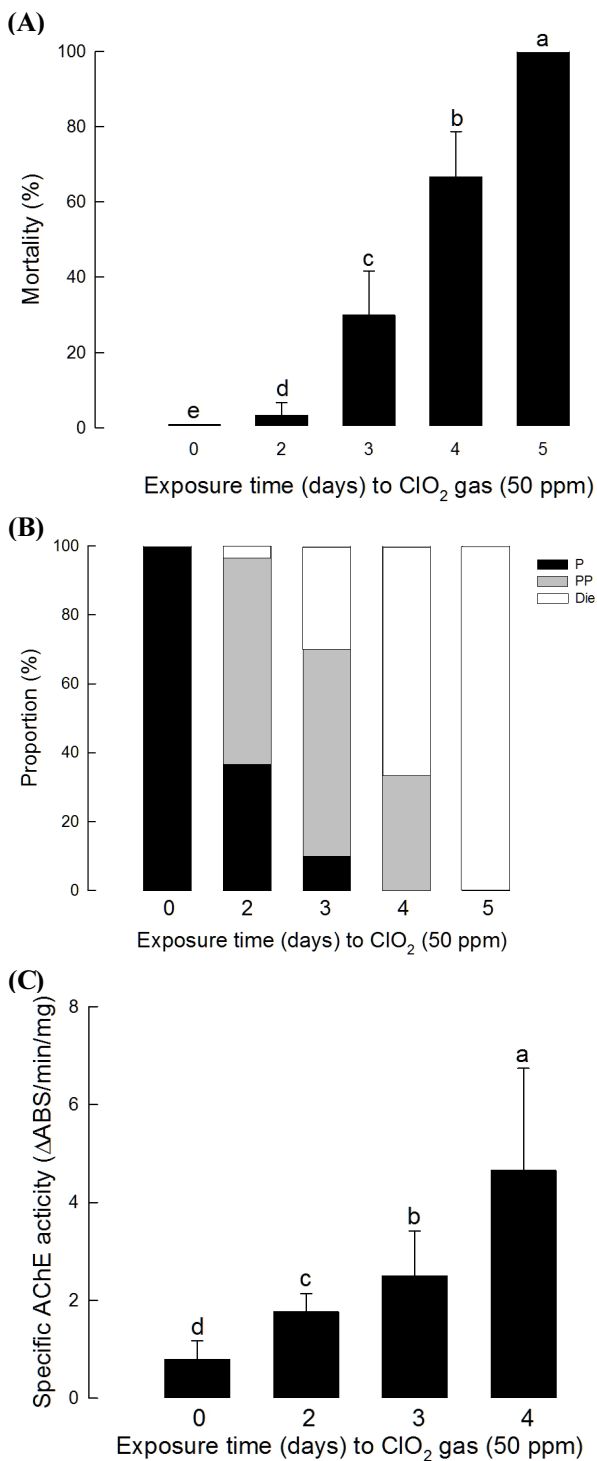


Fig. 4. Effect of chlorine dioxide fumigant on acetylcholinesterase (AChE) activity of *P. interpunctella* fifth instar larvae. (A) Toxicity of 50 ppm chlorine dioxide fumigant with different exposure time. Each dose was replicated three times with 10 larvae per replication. (B) Age distribution of live insects after 50 ppm chlorine dioxide treatment. (C) Influence of the fumigant on AChE activity of the alive individuals. Different letters above standard deviation bars indicate significant difference among means at $\alpha = 0.05$ (LSD test).

고찰

저곡해충에 대한 이산화염소의 방제효과가 보고되고 있으며, 이러한 살충기작은 궁극적으로 이산화염소의 활성산소 생성에 의한 산화적 스트레스에 기인된 것으로 설명되었다. 그러나 이산화염소에 의해 발생된 활성산소가 어떠한 분자표적을 통해 살충효과에 이르는 지에 대한 연결고리가 부재하였다. 본 연구는 이러한 인과관계를 연결하는 분자표적으로 AChE를 주목하였다. 액상 또는 훈증 처리를 통한 본 연구 결과들은 공통적으로 이산화염소가 AChE의 활성을 변화시켰고, 흥분된 AChE는 신경계의 정상적 활동을 변경하여 화랑곡나방의 선천성 행동에 교란을 유발하는 것으로 나타났다.

화랑곡나방의 AChE의 활성은 발육시기에 따라 다양하였다. 특히 중령 유충과 번데기 기간에는 AChE의 활성이 현격하게 둔화되었다. AChE는 곤충의 중추신경계에서 신경전달물질인 아세틸콜린을 분해하는 역할을 담당하고, AChE의 활성 억제제는 살충력과 연계된다(Devonshire, 1975). 유기인계 및 카바메이트 살충제의 분자표적은 바로 AChE로서 이 효소활성의 억제는 신경계의 과흥분을 유도하여 대상 곤충을 치사에 이르게 하는 것으로 해석하였다(Colović et al., 2013). 발육에 관련된 AChE 활성 차이는 파밤나방(*Spodoptera exigua*)에서 이미 보고되어 유충의 발육이 진행될수록 이 효소의 활성이 둔감해져 궁극적으로 유기인계 및 카바메이트 살충제에 대한 감수성 저하와 연계하였다(Han et al., 1997; Byrne and Toscano, 2001). 그러나 아직 이러한 발육에 따른 AChE의 활성 저하에 대한 분자 기작 및 생리적 의의에 대해서는 정확히 밝혀진 바가 없다. 한편 여러 곤충류에서 AChE는 한 개 이상의 유전자(*ace1*, *ace2*)로 발현된다(Cha and Lee, 2015). 배추좀나방(*Plutella xylostella*)의 경우 이들 각각을 RNA 간섭 기술로 발현을 억제한 경우 33.9%와 22.9%의 살충력을 나타냈고, 더불어 발육 지연 및 행동 지연을 유발하였다(He et al., 2012). 즉, 두 유전자에서 비롯된 AChE의 변이형은 상이한 생리적 기능을 가질 수 있고, 생화학적 성질을 지닐 수 있다. 따라서 화랑곡나방의 발육에 따라 이들 두 유전자에서 비롯된 상이한 *ace* 유전자들의 발현량 차이가 일어나고, 이는 AChE 활성 차이로 연계될 수 있다. 이에 대한 후속 연구가 필요하다.

이산화염소 처리에 따라 AChE의 활성이 증가하였다. 체내 주입된 이산화염소는 화랑곡나방 유충에 살충효과를 유발하였다. AChE 활성 증가는 이러한 살충효과를 낼 수 있는 이산화염소 농도인 8 ppm 이상에서 나타났다. 이산화염소 처리에 따라 화랑곡나방 집단이 2%의 살충효과(LC₂)의 값이 4.86 (95% 신뢰구간: 0.30-15.54) ppm을 고려하면, 이산화염소 8 ppm 처리

는 화랑곡나방에게 생리적 장애를 줄 수 있는 농도로 해석된다. 그리고 생리적 장애는 생체 내에서 이산화염소의 활성산소 유발로 이어질 수 있다(Kumar et al., 2015). 활성산소에 의한 AChE 활성 증가에 대한 기작은 거의 밝혀져 있지 않다. 오히려 기존의 보고는 AChE의 활성을 억제할 경우(유기인계 및 카바메이트계 살충제 처리 따라) 에너지 생산을 보충하기 위해 체내 산소 요구도가 높아지고 이에 따라 활성산소의 유발이 증가하는 것으로 보고하였다(Milatovic et al., 2006). 따라서 본 연구에서 밝혀진 이산화염소 노출에 따라 AChE 활성 증가는 보다 폭넓은 생리적 작용 기작에서 고찰해 볼 수 있다. 즉, AChE의 활성 증가는 이산화염소가 유발한 활성산소가 이 효소의 유전자의 발현 증가를 유도하여 이 효소량이 절대적으로 많아지는 간접적 영향과 활성산소가 이 효소에 직접적으로 작용하여 효소의 구조변경을 통하여 촉매력을 상승시키는 가능성으로 나누어 생각해 볼 수 있다. 인체에서 활성산소에 의해 유발되는 알차이머병은 높아진 AChE의 활성과 연관성이 있는 것으로 보고되고 있다(Yamchuen et al., 2014). 이산화염소는 높은 산화력으로 생체막을 구성하는 지질과 단백질 구조를 변경시켜 다양한 미생물에 대해서 높은 독성을 발휘하는 것으로 알려지고 있다(Huang et al., 1997; Gordon and Rosenblatt, 2005). 또한 이산화염소 노출은 방향성 아미노산류를 산화시켜 단백질의 변성을 유도하고 이를 통해 기능을 상실하게 한다(Ogata, 2007). 예를 들어, 감기 바이러스인 influenza virus에 대해서 이산화염소는 이 바이러스가 기주의 수용체에 결합하는 데 중요한 아미노산인 153째 트립토판을 N-formylkynurenine으로 산화시켜 기능을 잃게 한다(Ogata, 2012). 따라서 AChE의 일정 부위에서 유사한 산화반응은 오히려 이 효소의 활성 증가를 유도할 수 있을 것으로 추정할 수 있다. 이에 대한 생화학적 분석 연구가 필요하다.

화랑곡나방 유충은 음성주광성 행동을 보였고, 이산화염소 처리는 이러한 선천성 행동을 억제하였다. 화랑곡나방 유충은 음성 주광성을 갖고, 이러한 행동을 이용하여 유충 수거에 이용되어 왔다(Rutter and Ferkovich, 1973). 이 유충에 대해서 이산화염소의 AChE 활성 증가는 신경연접에 신경전달물질인 아세틸콜린 양을 감소시킬 수 있다. 즉, 화랑곡나방 유충이 빛에 반응하여 반대 방향으로 움직이려는 음성주광성의 행동을 보이기 위해서는 신경연접을 통한 체내 신경신호의 전달이 필요한데 이산화염소에 의해 AChE의 활성이 증가하면, 신경연접의 신호전달물질이 쉽게 분해되어 신경전달을 저해할 수 있다. 이러한 신경 전달 저하는 본 연구에서 분석한 음성주광성의 행동 저하로 이어질 수 있다. 선천성 고정행동양식인 화랑곡나방의 음성주광성이 AChE 활성 변화와 연계된 것은 유기인계 살충

제 노출에 따라 제브라피시(Zebra fish)의 유영운동 변화와 연계될 수 있다(Jin et al., 2015). 유기인계 살충제인 chlorpyrifos를 노출시킨 결과 체내 활성산소가 유발되어 항산화반응의 변화를 일으켰고, 궁극적으로 AChE 활성 변화를 유발시켰다. 이러한 변화는 제브라피시의 유영운동 변화를 유발하였다. 즉, AChE 활성 변화는 동물계 고정행동양식의 변화를 유발할 수 있다는 것을 내포하고 있다. 본 연구 결과의 흥미로운 점은 기존에 해충류에 대해서 살충제가 이 AChE 효소의 억제에 초점이 맞추어 이를 통해 오히려 과흥분 상태를 유도하여 치사에 이르게 하는 것으로 해석하지만, 본 연구의 이산화염소는 AChE 활성을 오히려 증가시켜서 살충효과를 나타나게 하였다. 즉, 정상적 상태의 AChE 활성 상태를 교란하는 것은 곤충에 치명적이라는 것을 의미하는 것이다.

본 연구는 궁극적으로 이산화염소 처리가 기체 상태로 저극해충에 대한 훈증 처리를 감안하여 훈증 처리에 따른 AChE 활성 증가를 보였다. 즉, 이산화염소의 훈증 처리에 따라 화랑곡나방의 살충효과를 보이는 데 체내 하나의 분자표적은 AChE이고 이 효소의 활성 증가는 생리적 행동 교란 및 다양한 체내 신경 조절을 억제하여 치사에 이르게 할 수 있다고 해석된다. 이상의 결과는 이산화염소의 보다 종합적 살충기작을 이해하기 위해서는 이 물질의 궁극적 살충 기작을 설명할 수 있는 활성산소에 비추어 이에 대한 다양한 분자표적의 변화를 분석할 필요가 있다.

사 사

본 결과물은 농림축산식품부의 재원으로 농림수산식품기술평가원의 농생명산업기술개발사업(114063-03)의 지원을 받아 연구되었다.

Literature Cited

- Aung, E.E., Ueno, M., Zaitso, T., Furukawa, S., Kawaguchi, Y., 2015. Effectiveness of three oral hygiene regimes on oral malodor reduction: a randomized clinical trial. *Trials* 16, 31.
- Bang, J., Hing, A., Kim, H., Beuchat, L.R., Rhee, M.S., Kim, Y., Ryu, J.H., 2014. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in biofilm on food-contact surfaces by sequential treatments of aqueous chlorine dioxide and drying. *Int. J. Food Microbiol.* 191, 129-134.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye finding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Byrne, F.J., Toscano, N.C., 2001. An insensitive acetylcholinester-

- ase confers resistance to methomyl in the beet armyworm *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Econ. Entomol.* 94, 524-528.
- Cha, D.J., Lee, S.H., 2015. Evolutionary origin and status of two insect acetylcholinesterase and their structural conservation and differentiation. *Evol. Dev.* 17, 109-119.
- Colović, M.B., Krstić, D.Z., Lazarević-Pašti, T.D., Bondžić, A.M., Vasić, V.M., 2013. Acetylcholinesterase inhibitors: pharmacology and toxicology. *Curr. Neuropharmacol.* 11, 315-335
- Devonshire, A.L., 1975. Studies of the acetylcholinesterase from houseflies (*Musca domestica* L.) resistant and susceptible to organophosphorus insecticides. *Biochem. J.* 149, 463-469.
- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V., Featherstone, R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7, 88-95.
- Gibbs, S.G., Lowe, J.J., Smith, P.A., Hewlett, A.L., 2012. Gaseous chlorine dioxide as an alternative for bedbug control. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 33, 495-499.
- Gordon, G., Rosenblatt, A.A., 2005. Chlorine dioxide: the current state of the art. *Ozone Sci. Eng.* 27, 203-207.
- Han, S.C., Kim, Y., Lee, J., Kang, S.Y., 1997. Variation in insecticide susceptibilities of the beet armyworm, *Spodoptera exigua* (Hubner): esterase and acetylcholinesterase activities. *Kor. J. Appl. Entomol.* 36, 172-178.
- He, G., Sun, Y., Li, F., 2012. RNA interference of two acetylcholinesterase genes in *Plutella xylostella* reveals their different functions. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 79, 75-86.
- Hinenoya, A., Awasthi, S.P., Yasuda, N., Shima, A., Morino, H., Koizumi, T., Fukuta, T., Miura T, Shibata T, Yamasaki S. 2015. Chlorine dioxide is a superior disinfectant against multi-drug resistant *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. *Jpn. J. Infect. Dis.* 68, 276-279.
- Huang J, Wang L, Nanqi R, and Junli H. 1997. Disinfection effect of chlorine dioxide on bacteria in water. *Wat. Res.* 31, 607-613.
- Jin, M., Shan, J., Chen, Z., Guo, X., Shen, Z., Qiu, Z., Xue, B., Wang, Y., Zhu, D., Wang, X., Li, J., 2013. Chlorine dioxide inactivation of enterovirus 71 in water and its impact on genomic targets. *Environ. Sci. Technol.* 47, 4590-4597.
- Jin, Y., Liu, Z., Peng, T., Fu, Z., 2015. The toxicity of chlorpyrifos on the early life stage of zebrafish: a survey on the endpoints at development, locomotor behavior, oxidative stress and immunotoxicity. *Fish Shellfish Immunol.* 43, 405-414
- Kim, Y., Park, J., Kumar, S., Kwon, H., Na, J., Chun, Y., Kim, W., 2015. Insecticidal activity of chlorine dioxide gas by inducing an oxidative stress to the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *J. Stored Prod. Res.* 64, 88-96.
- Kumar, S., Park, J., Kim, E., Na, J., Chun, Y.S., Kwon, H., Kim, W., 2015. Oxidative stress induced by chlorine dioxide as an insecticidal factor to the Indian meal moth, *Plodia interpunctella*. *Pesti. Biochem. Physiol.* 124, 48-59.
- Milatovic, D., Gupta, R.C., Aschner, M., 2006. Anticholinesterase toxicity and oxidative stress. *Sci. World J.* 28, 295-310.
- Nam, H., Seo, H.S., Bang, J., Kim, H., Beuchat, L.R., Ryu, J.H., 2014. Efficacy of gaseous chlorine dioxide in inactivating *Bacillus cereus* attached to and in a biofilm on stainless steel. *Int. J. Food Microbiol.* 188, 122-127.
- Ogata, N., 2007. Denaturation of protein by chlorine dioxide: oxidative modification of tryptophan and tyrosine residues. *Biochemistry* 46, 4898-4911.
- Ogata, N., 2012. Inactivation of influenza virus haemagglutinin by chlorine dioxide: oxidation of the conserved tryptophan 153 residue in the receptor-binding site. *J. Gen. Virol.* 93, 2558-2568.
- Rutter, R.R., Ferkovich, S.M., 1973. A rapid separation of larvae of the Indianmeal moth from rearing medium. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 66, 919-920.
- Sanekata, T., Fukuda, T., Miura, T., Morino, H., Lee, C., Maeda, K. Araki, K., Otake, T., Kawahata, T., Shibata, T., 2010. Evaluation of the antiviral activity of chlorine dioxide and sodium hypochlorite against feline calicivirus, human influenza virus, measles virus, canine distemper virus, human herpesvirus, human adenovirus, canine adenovirus and canine parvovirus. *Biocontrol Sci.* 15, 45-49.
- SAS Institute, Inc., 1989. SAS/STAT user's guide. SAS Institute, Inc., Cary, NC.
- Sun, X., Bai, J., Ference, C., Wang, Z., Zhang, Y., Narciso, J., Zhou, K., 2014. Antimicrobial activity of controlled-release chlorine dioxide gas on fresh blueberries. *J. Food Prot.* 77, 1127-1132.
- Taneja, S., Mishra, N., Malik, S., 2014. Comparative evaluation of human pulp tissue dissolution by different concentrations of chlorine dioxide, calcium hypochlorite and sodium hypochlorite: an *in vitro* study. *J. Conserv. Dent.* 17, 541-545.
- Vlad, S., Anderson, W.B., Peldszus, S., Huck, P.M., 2014. Removal of the cyanotoxin-a by drinking water treatment processes: a review. *J. Water Health* 12, 601-617.
- Volk, C.J., Hofmann, R., Chauret, C., Gagnom, G.A., Ranger, G., Andrews, R.C., 2002. Implementation of chlorine dioxide disinfection: effects of the treatment change on drinking water quality in a full-scale distribution system. *J. Environ. Eng. Sci.* 1, 323-330.
- Yamchuen, P., Aimjongjun, S., Limpeanchob, N., 2014. Oxidized low density lipoprotein increases acetylcholinesterase activity correlating with reactive oxygen species production. *Neurochem. Int.* 78, 1-6.