

배추흰나비 (*Pieris rapae* L.) 의 β -N-Acetylglucosaminidase의 특성과 기능

윤치영 · *한원동 · **김학열

대전대학교 이과대학 생물학과, *순천대학교 생물학과, **고려대학교 생물학과

곤충의 탈피작업에서 일어나는 키틴 분해대사를 구명하기 위한 목적으로 배추흰나비 (*Pieris rapae* L.)에서 3종의 β -N-acetylglucosaminidase(EI, EII, EIII)를 분리, 정제하였다. Polyacrylamide gel 상에서 이들 효소의 활성은 기질과 triphenyltetrazolium chloride와의 반응 결과 생기는 발색정도로 확인하였다. 각각의 분자량은 76,000, 55,000, 35,000 da, pI 값은 모두 5.8이었으며 pNp β GlcNAc와 pNp β GalNAc에 대해서 다같이 기질특이성을 나타내었다. 또한 EI과 EIII는 탈피 시기와 일치하는 전용 말기에 최대 활성을 나타내었으며 EII는 용화 직후에 최대 활성을 나타내었다.

KEY WORDS: *Pieris rapae* L., β -N-Acetylglucosaminidase, Chitinolytic enzymes, Moulting process

곤충의 탈피과정에서 큐티클 키틴은 일련의 효소들에 의하여 가수분해되고 90% 이상이 흡수된 후 새로운 큐티클의 합성에 재이용된다 (Surholt, 1975). 이러한 키틴 분해효소들은 주로 탈피액과 전용기의 체벽에서 분리되었다 (Bade, 1974; Kimura, 1976a; Spindler, 1976; Zielkowski and Spindler, 1978; Dziadik-Turner *et al.*, 1981a; Koga *et al.*, 1983).

키틴 분해효소들은 탈피과정 외에도 곤충에 따라서는 다른 기능을 나타내기도 한다. 바퀴의 타액, 개미의 labial gland 등의 chitinase는 키틴을 함유하는 먹이를 가수분해하며 (Waterhouse *et al.*, 1961; Kramer and Koga, 1986; Kramer *et al.*, 1985), 소화관, 소화액, 견사선, 지방체 및 정소에 존재하는 효소들은 유충에서 성충으로의 변태시기에 어떤 기능을 갖는 것으로 보고되었다 (Kimura, 1977, 1981; Koga *et al.*, 1982). 또 혈림프에 존재

하는 효소는 키틴의 분해보다는 당단백질이나 당지질과 같은 β -linked N-acetylglucosamine 화합물을 분해하는 것으로 추측되고 있다 (Kimura, 1976b; Dziadik-Turner *et al.*, 1981a; Chen *et al.*, 1982; Koga *et al.*, 1981).

키틴 분해효소들의 활성은 Kramer와 Koga (1986)에 의하여 세 가지 형태로 분류된 바 있는데, 하나는 native chitin, colloidal chitin, glycol chitin 등을 분해하여 N-acetylglucosamine의 oligosaccharide를 생성하며, 용해성 기질과 분해산물에 의해 활성이 억제되는 endoenzyme chitinase로서, *Manduca sexta*의 전용기 체벽과 탈피액에 존재하는 3종의 chitinase가 그 예이다. 또 하나는 exoenzyme β -N-acetylglucosaminidase로서, oligosaccharide를 비환원 말단으로부터 N-acetylglucosamine으로 분해시키며, 탈피액, 체벽 및 용시기의 혈림프에서 볼 수 있다. 마지막으로, 유충 및 용시기의 혈림프에서 발견되지만 체벽과 탈피액에는 존재하지 않으며 chitin oligosaccharide 보다 nitrophenylated N

*이 연구는 1991년도 한국과학재단 연구비지원에 의한 결과임.

*과제번호: 911-0408-088-1

acetylglucosamine에 대해 더 큰 반응성을 갖는 $\text{exo-}\beta\text{-N-acetylglucosaminidase}$ 가 있다 (Koga *et al.*, 1982).

국내에서는 배추흰나비 (*P. rapae* L.)와 미국 흰불나방 (*H. cunea* D.)에 대한 연구가 몇편 보고되었을 뿐, 곤충의 키틴 분해효소에 대한 연구가 매우 미진한 실정이다 (Yun and Kim, 1985, 1986, 1987; Yun *et al.*, 1987; Kim *et al.*, 1988). 배추흰나비에 대해서는 2종의 chitinase와 3종의 $\beta\text{-N-acetylglucosaminidase}$ 가 존재한다고 알려져 있다.

본 연구에서는 채소류의 해충인 배추흰나비의 키틴 분해효소 중 3종의 $\beta\text{-N-acetylglucosaminidase}$ 를 정제하고 이들의 생화학적 특성, 활성 분포, 활성 시기 등을 비교 조사하여 이러한 효소들의 기능과 유충 발생과의 상호관계를 구명하고자 하였다.

재료 및 방법

실험 재료

배추흰나비 (*Pieris rapae* L.)의 성충을 채집하여 비닐 포장에서 산란시킨 후, 부화된 유충을 케일 (kale)을 먹이로 하여 사육하였다. 5령 유충 이후는 발생시기 별로 구분하여 -20°C 에 보관하고 필요에 따라 실험에 사용하였다.

효소 용액

혈림프는 각 발생시기 별로 재료를 0.85% KCl 용액에 세척한 후, 날카로운 핀셋을 이용하여 추출하였다. 여기에 소량의 phenylthiourea를 첨가하고 원심분리하여 혈구 및 조직 절편을 제거한 후 상등액을 혈림프 효소 용액으로 이용하였다. 또한 총체 (whole body)는 발생시기 별로 재료를 막자사발에서 파쇄한 후 원심분리하여 상등액을 취하고 여과지를 이용하여 지질을 제거하였다. 이 용액을 acetone으로 침전시킨 후 효소 활성이 높은 25-50% 분획을 효소 용액으로 이용하였다.

효소 활성의 측정

효소 용액 0.1 ml (혈림프의 경우 20 μl), 0.05 M citrate-phosphate buffer (pH 6.5) 0.1 ml, 그리고 기질로서 0.3% *p*-nitrophenyl-N-acetyl $\beta\text{-D-glucosaminide}$ 0.1 ml을 혼합하여 40°C 에서 5분간 반응시킨 후, 0.01 N NaOH 6 ml을 가하여 반응을 종결시키고, 반응 결과 생성되는 *p*-nitrophenol을 spectrophotometer를 이용하여 파장 410 nm에서 흡광도를 측정하였다 (Mega *et al.*, 1970).

전기영동과 $\beta\text{-N-Acetylglucosaminidase}$ 의 발색

Davis 방법 (1964)에 의하여 5-8% polyacrylamide gel과 Tris-glycine buffer (pH 8.3)를 사용하여 gel당 3 mA의 전류로 전제시켰으며, tracking dye는 0.01% brom-phenol blue 용액을 사용하였고, Coomassie brilliant blue R-250 (0.25%)로 염색하였다. 전기영동상에서 $\beta\text{-N-acetylglucosaminidase}$ 를 확인하기 위하여 0.2 M potassium acetate buffer (pH 4.9)에 30분간 처리한 다음, 25 mM potassium citrate buffer (pH 5.5)에 용해시킨 5 mM *p*-nitrophenyl- $\beta\text{-N-acetylglucosaminide}$ (Sigma Chemical Co.)와 40°C 에서 20분간, 0.1 M iodoacetamide (Sigma Chemical Co.) 수용액에 실온에서 8분간 반응시켰다. 그리고 2% 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC, Merck Chemical Co.)와 100°C 에서 2분간 반응시킨 후 발색을 확인하고, 7% acetic acid로 고정시켰다 (Gabriel and Wang, 1969).

분자량과 등전점의 측정

분자량 측정은 Hedrick과 Smith 방법 (1968)을 이용하였다. Isoelectric focusing은 6% polyacrylamide gel과 1% ampholine을 이용하여 상, 하 chamber에 0.1% H_2PO_4 , 0.1 N NaOH를 각각 채우고, 25°C 에서 200 V로 30분간 pre-run 시킨 후, 시료 용액을 가하여 전기영동하였다 (Wrigley, 1968).

효소의 정제

전용중기(middle prepupa)의 유충 150 마리를 막자사발에서 파쇄한 후, 10,000 g에서 20분간 원심분리하였다. 이 상등액의 지질을 여과지를 이용하여 제거시키고 -20°C 에서 0-25%, 25-50%, 50-75% 되게 acetone으로 침전시켰다. 이 침전물을 0.02 M phosphate buffer(pH 6.5)에 재용해시켜 높은 활성을 나타내는 25-50% 분획을 Sephadex G-200 column(1.6 \times 50 cm)에서 gel filtration을 시행하였다. 유속은 12 ml/hr, 분획부피는 2ml로 하였다. 효소 활성 peak를 나타내는 분획을 Minicon으로 농축하여 최종 부피를 1 ml이 되게 하였다. 이 효소 용액을 5% polyacrylamide slab gel에서 전기영동하고 기질 처리 후 나타나는 발색 부위를 확인하여 그 부위를 2 mm 너비로 절단하였다. 이 gel 절편 내의 단백질을 위의 완충용액에서 24시간 용출시킨 후 재농축하였으며 이 방법을 반복 시행하였다.

결과

β -N-Acetylglucosaminidase의 확인, 분리 및 정제

Fig. 1은 전기영동상에서 gel 농도에 따라 β -N-acetylglucosaminidase 효소 단백질의 이동도가 달라짐을 나타낸 것이며 기질 처리 후 발색 부위를 가는 구리선으로 표시하였다. 6% gel에서의 Rm(relative migration) 값이 0.25, 0.32, 0.42를 각각 나타내었으며, gel 상단에서부터 β -N-acetylglucosaminidase I, II, III(EI, EII, EIII)라고 명명하였다.

재료 및 방법에서 설명한 바와 같이 하여 얻은 acetone 25-50% 분획을 Sephadex G 200 column chromatography한 결과를 Fig.2에 나타내었다. 3개의 효소 활성을 나타내는 분획을 모아서 농축시킨 후, 5% gel을 이용하여 전기영동하였다(Fig.3). Gel 절단 방법에 의하여 분효소들을 정제한 결과는 Fig.4와 같았다. EII와

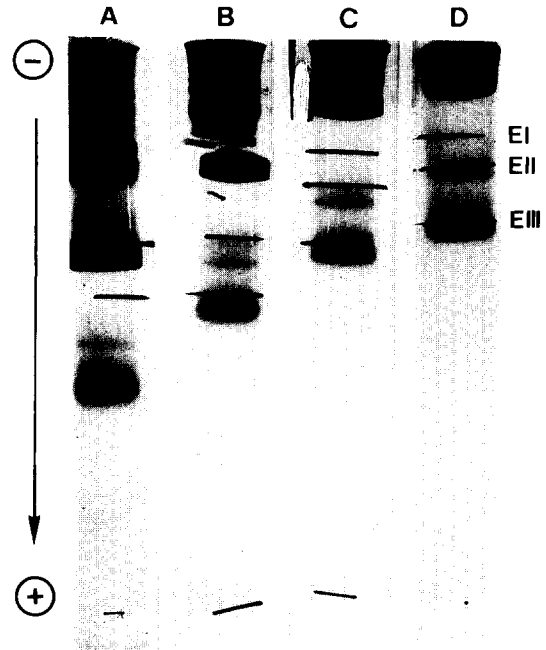


Fig. 1. Effect of different polyacrylamide gel concentrations on the electrophoretic migration of β -N-acetylglucosaminidases (EI, EII and EIII). A, B, C and D; 5, 6, 7 and 8% gel respectively.

EIII가 단일 밴드로 정제된 데 비해서 EI은 인접 단백질로 인하여 순수하게 정제되지 못했다.

분자량, 등전점 및 ρ Np β GalNAc에 대한 기질특이성

Hedrick과 Smith 방법(1968)에 의하여 전기영동으로 분석한 결과 EI, EII, EIII의 분자량은 각각 76,000, 55,000, 35,000 dalton으로 측정되었다(Fig.5). EI의 등전점은 5.8로 측정되었다(Fig.6). 또한 EI, EII, EIII 모두 ρ -nitrophenyl-N-acetyl- β -D-glucosaminide (ρ Np β GlcNAc)뿐만 아니라 ρ -nitrophenyl-N-acetyl- β -D-galactosaminide(ρ Np β GalNAc)에 대해서도 기질특이성을 나타내었다(Fig. 8).

효소의 활성변화

Fig. 9, 10은 발생단계에 따른 혈림프 내의 β -N-acetylglucosaminidase 효소 활성변화를 나타낸 것이다. EI의 활성은 미약하지만 전용발

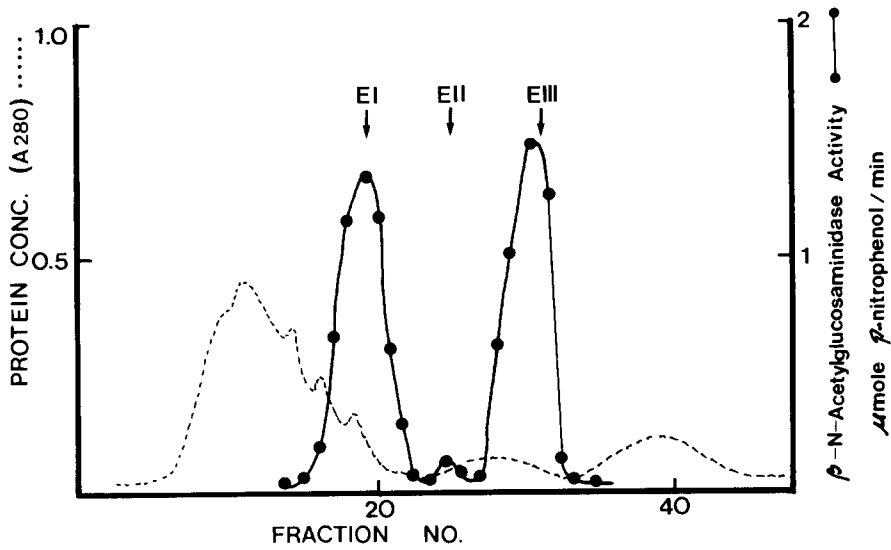


Fig. 2. Separation of β -N-acetylglucosaminidases by Sephadex G-200 column 25-50% acetone preparation of whole

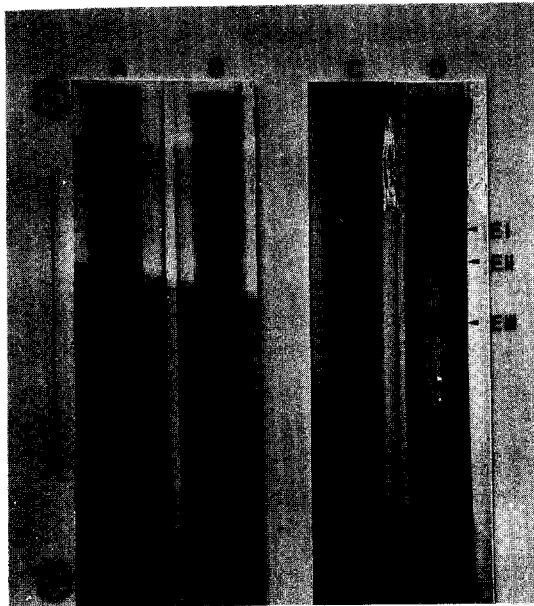


Fig. 3. 5% PAGE patterns of β -N-acetylglucosaminidas A, general proteins of preupal haemolymph by CBB; B, 25-50% acetone preparation; C, Sephadex G-200 preparation (No.15-34); D, β -N-acetylglucosaminidas of preupal haemolymph by TTC.

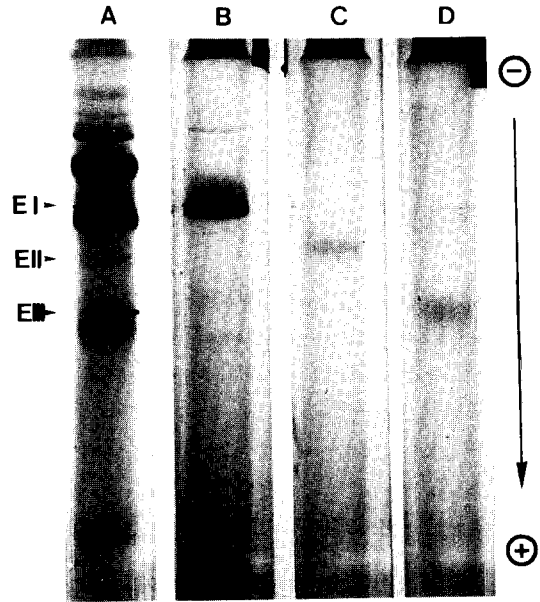


Fig. 4. 5% PAGE patterns of purified β -N-acetylglucosaminidas A, whole body; B, EI; C, EII; D, EIII.

기에 최대활성을 나타내었으며, EII는 전용 초기에서 증가하기 시작하여 용화 직후에 최대 활성을 나타내었다가 그 이후 급격히 감소하였다.

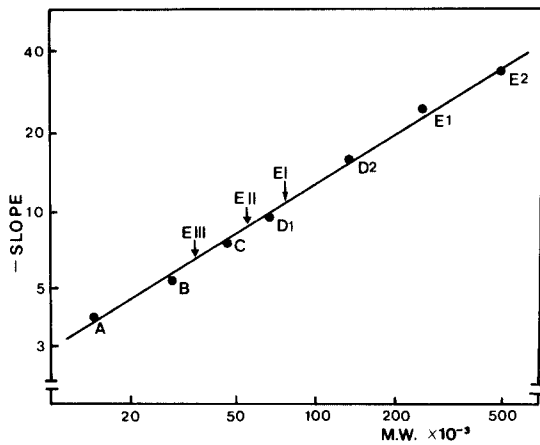


Fig. 5. Determination of M.W. of β -N-acetylglucosaminidases (EI, EII and EIII) by the method of Hedrick and Smith (1968). A, α -lactalbumin (14,000); B, carbonic anhydrase (29,000); C, chick egg albumin (45,000); D₁ and D₂, bovine serum albumin, monomer and dimer (66,000 and 132,000); E₁ and E₂, urease, dimer and tetramer (240,000 and 480,000); EI, 76,000; EII,

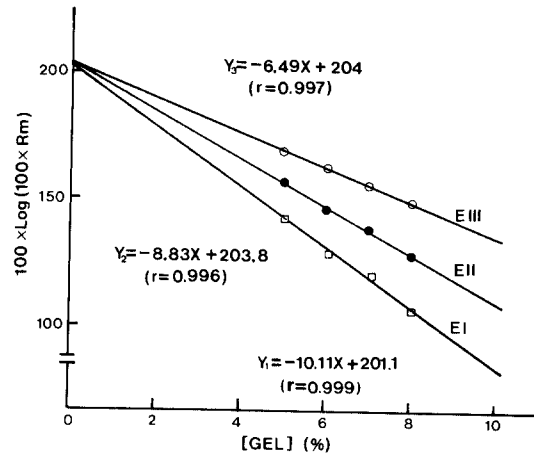


Fig. 7. Effect of different polyacrylamide gel concentrations on the electrophoretic migration of β -N-acetylglucosaminidases (EI, EII and EIII). r, correlation coefficient; Rm, electrophoretic migration of the enzyme in relation to the tracking dye.

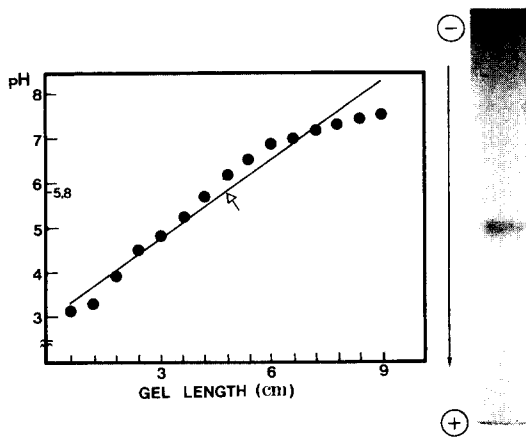


Fig. 6. Determination of isoelectric point of β -N-acetylglucosaminidase (EI) purified from prepupal

EIII는 전용 초기에서 증가하기 시작하여 전용 말기에 최대활성을 보였다. 대체로 EI와 EIII는 탈피 시기와 일치함을 나타내었고, EII는 탈피 시기를 지난 용화 직후에 뚜렷한 활성을 나타내었다.

Fig. 11, 12은 총체의 효소 활성변화를 나타

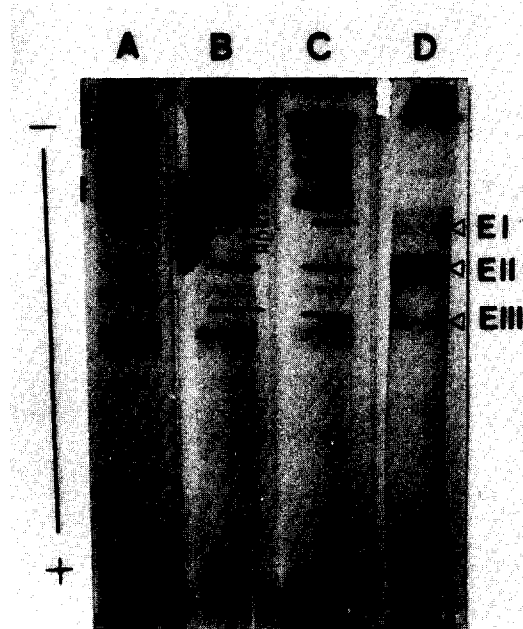


Fig. 8. Substrate specificity for *p*-nitrophenyl-N-acetyl- β -D-galactosaminide (*p*Np β GalNAc) of β -N-acetylglucosaminidases in late prepupal haemolymph. A, protein pattern by CBB; B, treatment with *p*Np β GlcNAc as substrate; C, treatment with *p*Np β GalNAc as substrate; D, EI, EII and EIII with *p*Np β GlcNAc by TTC staining.

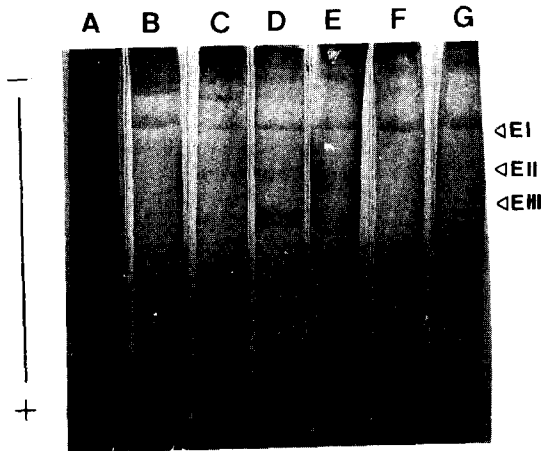


Fig. 9. The patterns of β -N-acetylglucosaminidases in haemolymph during development. A and B, middle and late 5th instar larva; C and D, early and middle prepupa; E, pupa just after pupation; F and G, 1 and 3 day-old

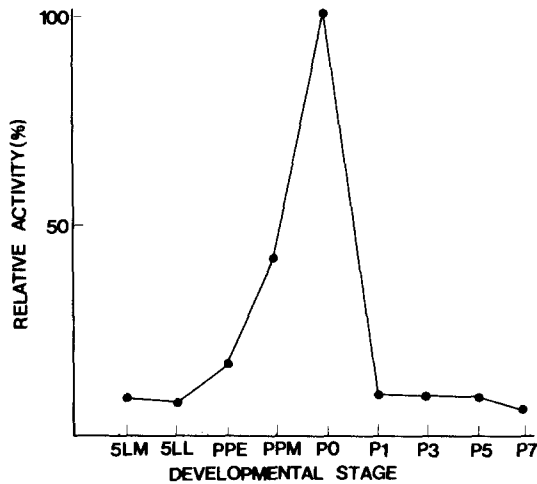


Fig. 10. The change of the β -N-acetylglucosaminidase activity in haemolymph during development. 5 LM and 5 LL, middle and late th instar larva; PPE and PPM, early and middle prepupa; PO, pupa just after pupation; P1-P7, 1-7 day-old pupa.

낸 것인데, EII는 5령 중기에서부터 뚜렷한 활성증가를 보였으며 전용초기에서 용화후 3일까지는 아주 높은 활성을 유지하였다. 이것은 전용초기 이전에는 보이지 않았던 혈림프 내의 효소활성(Fig. 9)과 비교하여 볼 때, EII는 혈림프 이외의 체내 다른 조직에도 존재함을 알 수 있었

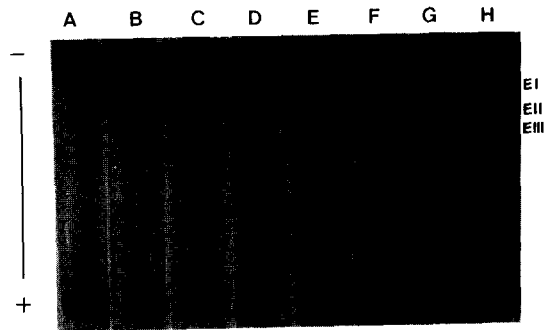


Fig. 11. The patterns of β -N-acetylglucosaminidases in the whole body during development. A and B, middle and late 5th instar larva; C and D, early and middle prepupa; E, pupa just after pupation; F, G and H, 1, 3 and 5 day-old pupa, respectively.

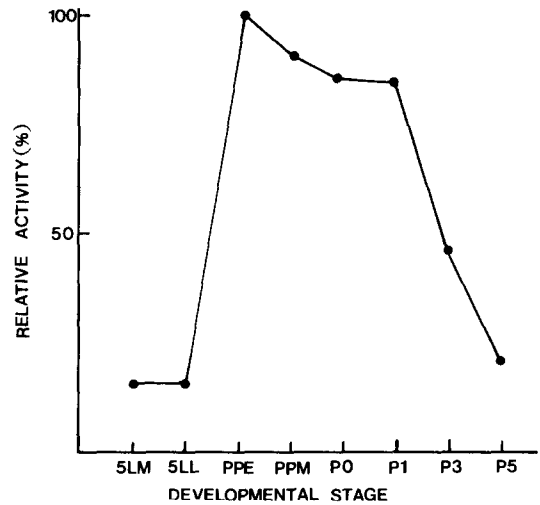


Fig. 12. The change of β -N-acetylglucosaminidase activity in whole body during development. 5 LM and 5 LL, middle and late 5th instar larva; PPE and PPM, early and middle prepupa; PO, pupa just after pupation; P1-

다. EIII는 전용 초기에서 최대 활성을 나타내었다가 용화직후 이후에는 활성을 보이지 않았지만 성충으로의 탈피 직전인 용화 후 5일에 다시 출현하였다. EI는 전기영동상에서의 불안정성으로 발색 정도가 미약했지만 EIII와 활성시기가 거의 동일하였으며 이 활성시기는 탈피시기와 같았다.

고찰

키틴 분해효소는 분해양상에 따라 endochitinase와 exochitinase로 구분되며 exochitinase는 다시 oligomer를 비환원 말단에서부터 dimer로 분해하는 것과 monomer로 분해하는 것으로 구분되기도 한다. Chitobiase(EC 3.2.1.29)는 현재 β -N-acetyl-D-glucosaminidase(EC 3.2.1.30)에 포함시켰는데(Dixon and Webb, 1979), 특히 곤충의 β -N-acetylglucosaminidase는 뚜렷한 기질특이성을 나타내고 있다. 또한 ρ Np β GlcNAc와 ρ Np β GalNAc에 대한 기질특이성은 가지면서 N,N'-diacetylchitobiose에 대한 기질특이성이 없는 효소는 chitinase(chitobiase)가 아니라 β -N-acetylhexosaminidase이다(Kramer and Koga, 1986). 본 실험에서 EI, EII, EIII는 ρ Np β GlcNAc와 ρ Np β GalNAc에 모두에 대해 기질특이성을 나타내었지만(Fig. 8), chitobiose에 대한 조사는 시행하지 못하였다.

Kimura(1976a)는 *B. mori*의 탈피액에서 DEAE-column을 이용하여 3종의 chitobiase를 분리하였으며, Spindler(1976)는 *D. hydei*의 체벽에서 1종의 β -N-acetylglucosaminidase를 확인하였다. *M. sexta*의 체벽, 탈피액, 유충 및 용기의 혈림프에는 분자량이 61,000이면서 소단위 분자량이 다른 2종의 β -N-acetylglucosaminidase가 존재하는 것으로 보고되어 있다(Fukamizo and Kramer, 1985a, b; Dziadik-Turner *et al.*, 1981a; Koga *et al.*, 1982, 1983). *P. rapae*에 대한 본 연구에서는 3종의 β -N-acetylglucosaminidase가 Sephadex G-200 column에 의해 분리되었으며 이 3종의 β -N-acetylglucosaminidase의 활성은 전기영동상에서 TTC에 의한 발색으로 확인되었다. 이 방법은 특정시기의 각각의 효소 활성을 조사하는데 매우 효과적인 분석 방법이라 생각되는데 곤충 β -N-acetylglucosaminidase의 연구에는 아직까지 이용되지 않고

있다.

지금까지 조사된 곤충들의 β -N-acetylglucosaminidase는 63,500-150,000에 비하여 EI, EII, EIII의 분자량은 각각 76,000, 55,000, 35,000으로 측정되었다. pI 값은 *B. mori*의 체벽 β -N-acetylglucosaminidase가 5.0, 혈림프 효소가 5.1, 소화관 효소가 4.8, 탈피액 효소가 4.9 등으로 알려져 있으며(Kramer *et al.*, 1985), *M. sexta*의 체벽과 탈피액에 존재하는 β -N-acetylglucosaminidase의 pI 값은 5.9, 유충 및 용기 혈림프 효소가 5.1인 것으로 보고되어 있다(Dziadik-Turner *et al.*, 1981a; Koga *et al.*, 1982, 1983). 본 연구에서는 EI의 등전점이 5.8인 것으로 나타났으며, gel 농도(%)를 달리한 전기영동상에서 분자량과 등전점의 상호관계에 의하여 EII와 EIII 역시 EI와 등전점(5.8)이 동일한 것으로 측정되었다(Fig. 7, Espinoza Fuentes and Terra, 1986; Santos and Terra, 1986)

주로 혈림프에서 활성을 나타내는 EII는 전용 초기에서 증가하기 시작하여 용화직후에 최대활성을 나타내며 그 이후 급격히 감소하였는데, 이것은 탈피시기와는 다름을 보여주는 결과이다. EII는 큐티클 키틴의 분해보다는 변태시기에 다른 기능을 수행하는 것으로 추정되었다. 총체의 EII는 전용초기 유충에서 급격히 증가하여 용화 후 1일까지 높은 활성을 유지하였다. 이것은 EII 활성이 혈림프의 체내 다른 조직에도 존재함을 말해 준다. 반면에 EI와 EIII는 서로 유사한 활성시기를 보여 주었으며, 또한 이것은 탈피시기와 일치함으로서 탈피작용과 관련하여 키틴을 분해하는 것으로 추정된다.

곤충에서 β -N-acetylglucosaminidase의 중요한 출처는 탈피액(체벽)과 혈림프이다. *B. mori*의 혈림프 효소는 탈피액 효소에 비해 aryl glycoside에 대해서 친화력이 큰 반면에, chitobiose에 대해서는 탈피액 효소가 보다 친화력이 크다(Berger and Reynolds, 1958; Kimura, 1973). 또한 면역학적으로 탈피액 효소는 체벽의 효소와 동일하며 탈피시기의

chitinase 활성의 출현과 일치한다. 따라서, 탈피액 효소는 chitinase, 혈림프 효소는 β -N-acetylglucosaminidase이며 이 두 효소는 면역학적으로 다르다(Kimura, 1974, 1976a, 1977). *M. sexta*에서도 탈피액, 체벽 및 용시기 혈림프의 효소는 exochitinase(chitobiase) 활성을 나타내었고, 유충 및 용시기의 혈림프 효소는 β -N-acetylglucosaminidase 활성을 나타내었으며 이 두 효소는 생화학적 특성이 서로 다름을 보여주었다. 유충 및 용시기 혈림프에 존재하는 효소의 기능은 체내에서 tissue processing과 restructuring 등에 관련되어 있으며 지방체와 같은 조직에서 합성되어 체벽 등에 의해 특이하게 흡수되는 것으로 추측된다고 하였다(Koga *et al.*, 1982; Dziadik-Turner *et al.*, 1981a, b).

이상의 내용들을 종합하여 볼 때, EI과 EIII는 체벽, 탈피액, 용시기의 혈림프에 존재하며 활성시기가 탈피과정과 같은 것으로 보아 탈피시 큐티클 키틴의 분해에 직접 관여하는 것으로 추정되며(exochitinase), EII는 주로 유충과 용시기 전반의 혈림프에 존재하며 활성시기가 탈피시기와는 다른 것으로 보아 큐티클 키틴의 분해보다는 당단백질이나 당지질과 같은 β -linked GlcNAc 화합물의 분해 대사(Kramer and Koga, 1986; Kramer *et al.*, 1985) 등 체내에서 다른 생리 기능을 갖는 β -N-acetylglucosaminidase인 것으로 추정되었다.

인용문헌

- Bade, M.L., 1974. Localization of moulting chitinase in insect cuticle. *Biochem. Biophys. Acta.*, **372**: 474-477.
- Berger, L.R. and D.M.Reynolds, 1958. The chitinase system of a strain of *Streptomyces griseus*. *Biochem. Biophys. Acta.*, **29**: 522-534.
- Chen, A.C., R.Mayer and J.Deloach, 1982. Purification and characterization of chitinase from the stable fly, *Stomoxys calcitrans*. *Arch. Biochem. Biophys.*, **216**: 314-321.
- Davis, B.J., 1964. Disc electrophoresis-II, Methods and application to human serum proteins. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **121**: 404-427.
- Dixon, M. and E.C.Webb, 1979. *Enzymes* (3rd ed.), Bungay: Longman, pp 1116.
- Dziadik-Turner, C., K. Koga, M.S.Mai and K.J. Kramer, 1981a. Purification and characterization of two β -N-acetylhexosaminidases from the tobacco hornworm, *Manduca sexta* (L). *Arch. Biochem. Biophys.*, **212**: 546-560.
- Dziadik-Turner, C., D. Koga and K.J. Kramer, 1981b. Secretion of exo- and endo- β -N-acetylglucosaminidases by insect cell lines. *Insect Biochem.*, **11**: 215-219.
- Espinoza-Fuentes, F.P. and W.R. Terra, 1986. Properties of larval and imaginal membrane-bound digestive enzymes from *Trichosia pubescens*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, **3**: 181-192.
- Fukamizo, T. and K.J. Kramer, 1985a. Mechanism of chitin oligosaccharide hydrolysis by the binary enzyme chitinase system in insect moulting fluid. *Insect Biochem.*, **15**: 1-7.
- Fukamizo, T. and K.J. Kramer, 1985b. Mechanism of chitin hydrolysis by the binary chitinase system in insect molting fluid. *Insect Biochem.*, **15**: 141-145.
- Gabriel, O. and S.F. Wang, 1969. Determination of enzymatic activity in polyacrylamide gels-I. Enzymes catalyzing the conversion of non-reducing substrates to reducing products. *Analyt. Biochem.*, **27**: 545-554.
- Hedrick, J.L. and A.J. Smith, 1968. Size and charge isomer separation and estimation of molecular weights of proteins by disc-gel electrophoresis. *Arch. Biochem. Biophys.*, **126**: 155-164.
- Kim, E.Y., C.Y. Yun and H.R. Kim, 1988. Properties of β -N-acetylglucosaminidase of *Hyphantria cunea* Drury. *Ent.Res.Bulletin*, **14**: 1-11.
- Kimura, S., 1973. Chitinolytic enzymes in the larval development of the silkworm, *Bombyx mori*. *Appl. Ent.Zool.*, **8**: 234-236.
- Kimura, S., 1974. The β -N-acetylglucosaminidase of *Bombyx mori* L. *Comp. Biochem. Physiol.*, **29B**: 345-351.
- Kimura, S., 1976a. The chitinase system in the cuticle of the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem.*, **6**: 479-482.
- Kimura, S., 1976b. Insect haemolymph exo- β -N-acetylglucosaminidase from *Bombyx mori*. *Biochem. Biophys. Acta.*, **446**: 399-406.
- Kimura, S., 1977. Exo- β -N-acetylglucosaminidase and chitobiase in *Bombyx mori*. *Insect Biochem.*, **7**: 237-

- 245.
- Kimura, S., 1981. The occurrence of chitinase in the alimentary canal of the silkworm, *Bombyx mori*. **50**: 101-108.
- Koga, D., C. Dziadik-Turner, M.S. Mai and K.J. Kramer, 1981. Purification and properties of exochitinase from insect molting fluid and haemolymph. *Fed. Proc.*, **40**: 777.
- Koga, D., J. Kilka and K.J. Kramer, 1983. Insect endochitinase: glycoproteins from molting fluid, integument and pupal haemolymph. *Insect Biochem.*, **13**: 295-305.
- Koga, D., M.S. Mai, C. Dziadik-Turner and K.J. Kramer, 1982. Kinetics and mechanism of exochitinase and β -N-acetylhexosaminidase from the tobacco hornworm, *Manduca sexta* L.. *Insect Biochem.*, **12**: 493-499.
- Kramer, K.J., C. Dziadik-Turner and D. Koga, 1985. Chitin metabolism in insects, *In*: Comprehensive Insect Biochemistry and Pharmacology (G.A. Kerkut and L.I. Gilbert, editors). Pergamon Press, New York, Vol.3, pp. 75-115.
- Kramer, K.J. and D. Koga, 1986. Insect chitin: physical state, synthesis, degradation and metabolic regulation. *Insect Biochem.*, **16**: 851-877.
- Mega, T., T. Ikenaka and Y. Matsushima, 1970. Studies on N-acetyl- β -D-glucosaminidase of *Aspergillus oryzae*. I. Purification and characterization of N-acetyl- β -D-glucosaminidase obtained from Takadiastase. *J. Biochem. (Tokyo)*, **68**: 109-117.
- Santos, C.D. and W.R. Terra, 1986. Distribution and characterization of oligomeric digestive enzymes from *Erinnyis ello* larval and inferences concerning secretory mechanisms and the permeability of the peritrophic membrane. *Insect Biochem. Biophys.*, **111**: 358-364.
- Spindler, K.D., 1976. Initial characterization of chitinase and chitobiase from the integument of *Drosophila hydei*. *Insect Biochem.*, **6**: 663-667.
- Surholt, B., 1975. Formation of glucosamine-6-phosphate in chitin synthesis during ecdysis of the migratory locust, *Locusta migratoria*. *Insect Biochem.*, **5**: 585-593.
- Waterhouse, K.F., R.H. Hackman and J.W. Mckellar, 1961. An investigation of chitinase activity in cockroach and termite extracts. *J. Insect Physiol.*, **6**: 96-112
- Wrigley, C.W., 1968. Gel electrofocusing—A technique for analyzing multiple protein samples by isoelectric focusing. *Sci. Tools.*, **15**: 17-23.
- Yun, C.Y. and H.R. Kim, 1985. Chitinolytic enzymes in integument of the last instar larva to the pupa of *Pieris rapae* L. *Korean J. Entomol.*, **15(2)**: 53-56.
- Yun, C.Y. and H.R. Kim, 1986. β -N-Acetylglucosaminidase in haemolymph of cabbage whitebutterfly, *Pieris rapae* L. *Ent. Res. Bulletin*, **12**: 41-48.
- Yun, C.Y. and H.R. Kim, 1987. Purification and characterization of β -N-acetyl-glucosaminidase from haemolymph of the cabbage butterfly, *Pieris rapae*. *Korean J. Zool.*, **30(2)**: 167-176.
- Yun, C.Y., W.D. Han and H.R. Kim, 1987. An immunological study on β -N-acetylglucosaminidase I, II, III of cabbage whitebutterfly, *Pieris rapae* L. *Ent. Res. Bulletin*, **13**: 85-92.
- Zielkowski, R. and K.D. Spindler, 1978. Chitinase and chitobiase from the integument of *Locusta migratoria*; Characterization and titer during the fifth larval instar. *Insect Biochem.*, **8**: 67-71.

(Accepted December, 30)

**Properties and Functions of β -N-Acetylglucosaminidase from Cabbage Whitebutterfly,
Pieris rapae L.**

Chi Young Yun, *Weon Dong Han and **Hak Ryul Kim (Department of Biology, Taejon University, Taejon 300-716; *Department of Biology, Suncheon National University, Suncheon 540-070; **Department of Biology, Korea University, Seoul 136-701, Korea)

For the study of chitin degradation metabolism associated with moulting process of cabbage whitebutterfly, *Pieris rapae* L., three β -N-acetylglucosaminidases (EI, EII and EIII) were isolated by column chromatography and gel slicing method. The activities of the enzymes on a polyacrylamide gel were confirmed by specific staining method with triphenyltetrazolium chloride. EI, EII and EIII had substrate specificity for both p Np β GlcNAc and p Np β GalNAc and their molecular weights were estimated to be 76,000, 55,000 and 35,000 daltons, respectively. pI values of these enzymes were 5.8.

The activities of EI and EIII appeared to be maximum at the late prepupal stage and seemed to be related with moulting process. On the other hand, EII was detected mainly in haemolymph and its highest activity was detected just after pupal ecdysis.