

곤충 장내미생물로부터 lipase 생산능력이 우수한 *Burkholderia* sp. HY-10 균주의 분리 및 특성

박두상 · 오현우 · 배경숙 · 김향미 · 허선연 · 김남정¹ · 설광열¹ · 박호용*

한국생명공학연구원 곤충소재연구센터, ¹농업과학기술원 농업생물부

Screening of Bacteria Producing Lipase from Insect Gut: Isolation and Characterization of a Strain, *Burkholderia* sp. HY-10 Producing Lipase

Doo-Sang Park, Hyun-Woo Oh, Kyung Sook Bae, Hyangmi Kim, Sun-Yeon Heo, Namjung Kim¹, Kwang-Youl Seol¹ and Ho-Yong Park*

Insect Resources Research Center, KRIBB, Daejeon 305-806

¹Department of Agricultural Biology, NIAST, RDA, Suwon 441-853, Korea

ABSTRACT : From the course of screening of useful enzyme producing microorganism from insect guts, we isolated 9 lipase producing strains and their lipase producing activities were tested. 16S rDNA sequence analysis showed that they were Gram negative bacteria grouped on *Serratia* sp., *Pseudomonas* sp., and *Burkholderia* sp.. Among them, an excellent lipase producing strain, *Burkholderia* sp. HY-10 identified by 16S rDNA analysis and biochemical methods, was further studied its lipase producing characteristics. It was isolated from a longcorm beetle, *Prionus insularis* and showed cell density dependent lipase producing activity in the culture media that contained olive oil as a carbon source. Maximum lipase production was achieved in the M9 media containing 0.5% yeast extract and 0.5% olive oil when cultured at 30°C for 36-42 hrs.

KEY WORDS : *Prionus insularis*, *Burkholderia* sp. HY-10, lipase, Insect symbiotic microbe

초 록 : 곤충으로부터 유용 효소생산 미생물의 탐색 과정에서 우수한 lipase 생산균주 9종을 분리하고 lipase 생산능을 조사하였다. 16S rDNA 분석 결과 분리된 균주는 주로 *Serratia* 속, *Pseudomonas* 속, *Burkholderia* 속에 속하는 그람음성균들로 분석되었다. 그 중 lipase 생산능이 가장 우수한 균주를 선별하고 16S rDNA 서열분석 및 생리·생화학적 분석 결과를 바탕으로 *Burkholderia* sp. HY-10으로 동정하였으며 균주의 lipase 생산특성을 조사하였다. 이 균주는 톱하늘소의 장으로부터 분리되었으며 olive oil을 탄소원으로 포함하는 배지에서 배양하였을 때 세포밀도에 의존하여 lipase의 생산이 유도되는 특성을 나타내었고 0.5%의 yeast extract와 0.5%의 olive oil이 포함된 M9배지에서 30°C, 36-42시간의 배양에 의해 lipase의 생산이 최대치에 도달하였다.

검색어 : 톱하늘소, *Burkholderia* sp. HY-10, lipase, 곤충공생미생물

*Corresponding author. E-mail: hypark@kribb.re.kr

Lipase (EC 3.1.1.3, triacylglycerol acylhydrolase)는 지질과 물의 계면에 존재하는 장쇄 triglyceride를 가수분해하여 diglyceride, monoglyceride, glycerol 및 free fatty acid를 만드는 효소로서 다양한 종류의 lipase가 미생물로부터 발견되었다(Jaeger *et al.*, 1994). 미생물이 생산하는 lipase는 다양한 기질특이성, 내열성, 내알칼리성, 유기용매내성 및 입체특이성 등의 특성을 나타내어 의약산업, 식품산업, 세제산업 등에 널리 이용되고 있으며(Jaeger *et al.*, 1999; Gupta *et al.*, 2004) lipase의 넓은 기질특이성과 높은 입체이성질체에 대한 선택성을 이용하여 가수분해반응, 에스테르화 반응 및 트랜스에스테르화 반응으로서 의약적으로 중요한 키랄물질을 생산하는 다양한 연구가 이루어졌다(Jaeger and Eggert, 2002; Reetz, 2002). 특히 *Burkholderia cepacia* (formerly *Pseudomonas cepacia*)가 생산하는 lipase는 수용성환경과 비수용성 환경에서 우수한 효소활성을 나타내어 biocatalyst로서의 이용가능성이 증대되고 있다(Otero *et al.*, 2005).

곤충은 지구상에서 가장 번성한 생물군으로서 다양한 먹이습성과 높은 생물학적 다양성을 나타내고 있다. 이러한 곤충의 생물특성을 고려한 곤충공생미생물을 유용한 생물자원으로 활용하고자 하는 연구가 증가되고 있으며, 특히 곤충의 생육과 밀접한 관련이 있는 장내 미생물에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다(Dillon and Dillon, 2004). 흰개미의 장내미생물들이 음식물의 소화와 영양에 관여한다는 사실은 널리 알려져 있으며(Breznak, 1982; Breznak and Brune, 1994) 최근 분자생물학적 기법을 활용한 곤충 장내미생물의 분포와 역할에 대한 연구와(Egert *et al.*, 2003; Broderick *et al.*, 2004) 목재를 가해하는 termite의 장내미생물 DNA library로부터 재조합 DNA 기술을 응용한 새로운 종류의 xylanase를 탐색하는 등의 연구가 진행되었다(Brennan *et al.*, 2004). 이와 더불어 곤충의 섭식특성을 고려한 특이적인 효소생산 미생물의 탐색에 의해 무당거미로부터 고효율의 단백질 분해효소 생산균주를 분리하고 효소의 특성을 규명하는 연구가 수행되었으며(Lee *et al.*, 2004), 자일란이 풍부한 식물의 줄기나 목질부를 섭식하는 털두꺼비하늘소의 장으로부터 고효율의 자일라나제를 생산하는 균주를 분리하고 특성을 규명한 사례(Heo *et al.*, 2006)등 곤충 장내미생물을 유용한 효소의 탐색 대상으로 하여 산업적으로 이용하고자 하는 연구가 이루어지고 있다.

본 연구에서는 곤충 장내미생물이 생산하는 효소의 산업적 이용 가능성에 대한 조사로서 10여종의 곤충 및 일부 무척추동물로부터 lipase를 생산하는 미생물을 탐색하였

으며, 그 중에서 톱하늘소의 장으로부터 우수한 lipase 생산균주를 분리하고 lipase의 생산 특성을 조사하였다.

재료 및 방법

대상곤충 및 장내미생물의 분리

Lipase 생산 활성을 가지는 미생물의 탐색에 이용된 곤충은 주로 5월-7월 사이에 대전 인근 야산에서 채집하여 살아있는 상태로 연구실로 운반하여 분류 후 사용하였으며, 울도하늘소(*Psacotha hilaris*)의 유충과 성충은 농업과학기술원의 설광렬 박사로부터, 줄지렁이(*Eisenia fetida*)는 대전대학교의 배운환 박사로부터 분양받아 이용하였다(Table 1). 대상곤충에서 미생물을 분리하기 위한 해부는 Heo등(2006)이 사용한 방법으로 실시하였다. 대상곤충을 멸균된 Petri-dish에 놓고 70% (w/w) 에탄올에 1-2분 정도 침지하여 충체 표면의 오염원을 제거한 후, 충체에 묻어있는 에탄올을 제거하기 위하여 멸균된 증류수로 2번 세척하였다. 증류수로 세척 한 후 핀셋과 해부셋트를 이용하여 대상곤충의 내장을 꺼내 100 μ l의 phosphate buffered saline (PBS, 0.8% NaCl, 0.02% KCl, 0.144% Na₂HPO₄, 0.024% KH₂PO₄, pH 7.4)에 넣고 분쇄하였으며, 여기서 얻어진 분쇄물을 10⁵까지 희석하여 1% 올리브오일과 0.001% Rhodamin B (Sigma, USA)를 첨가한 고체배지에 도말하여 25°C에서 2-3일간 배양 후 UV에서 관찰을 통해 자라난 콜로니 주변에 오렌지색의 환(plaque)을 형성하는 균주를 1차적으로 선별하였다.

상기의 방법으로 1차 선별된 균주들을 1% 올리브오일이 함유된 제한 배지(6.8 g/l Na₂HPO₄, 3 g/l KH₂PO₄, 0.5 g/l NaCl, 1 g/l NH₄Cl, 2 mM MgSO₄, 0.1 mM CaCl₂, 5 g/l yeast extract) 3 ml에 접종하여 25°C의 진탕 배양기에서 48시간 배양 및 원심분리한 후 상등액을 회수하여 lipase 활성을 측정하고, 그 중 lipase 활성이 가장 우수한 균주를 최종적으로 선별하였다.

Lipase 활성 측정

Lipase의 활성검정은 olive oil이 포함된 agar 배지에서 활성을 검정하는 agar plate method (Kouker and Jaeger, 1987)와 기질과 결합된 p-nitrophenol (pNP)이 효소에 의해 유리되는 양을 흡광도의 변화로 측정하는 microplate assay 방법(Ryu *et al.*, 2006)으로 측정하였다. Agar plate

Table 1. Identification of microorganisms isolated as lipase producing strains from insects gut

Bacterial strain	Agar plate assay ^a	Microplate assay (ABS ₄₀₅ nm)		Highly matched type strain	Accession No.	16S rDNA Similarity (%)	Source ^d
		pNP-C4 ^b	pNP-C16 ^c				
V-3	++	0.73	0.32	<i>Burkholderia fungorum</i> LMG 16225T	AF215705	99.8	<i>Grylotalpa africana</i> (E)
AT-3	+++	0.12	0.55	<i>Serratia marcescens</i> T	M59160	99.6	<i>Damaster jankovskii</i>
AL-1	++	0.15	0.20	<i>Pseudomonas costantini</i> CFBP 5705; HAMB1 2444T	AF374472	99.6	<i>Corymbia rubra</i> (F)
AL-2	+++	0.10	1.10	<i>Cedecea neteri</i> GTC1717 Endophyte sp.	AB086230	99.6	"
AL-3	++	1.82	0.99	<i>Serratia proteamaculans</i> DSM 4597T	AJ233435	99.5	"
X-6	++	1.48	0.72	<i>Burkholderia fungorum</i> LMG 16225T	AF215705	99.8	<i>Psacotha hilaris</i> (F)
AA-4	++++	0.24	0.85	<i>Pseudomonas mosselii</i> CIP 105259T	AF072688	100	<i>Psacotha hilaris</i> (L)
AQ-1	++	0.12	0.36	<i>Acinetobacter johnsonii</i> DSM 6963T	X81663	99.2	<i>Eisenia fetida</i>
HY-10	+++	3.14	3.20	<i>Burkholderia stabilis</i> LMG 14294T	AF148554	99.6	<i>Prionus insularis</i> (M)

^a: activities are represented as: +, 2-4 mm; ++, 4-8 mm; +++, 8-12 mm; +++++, over 12 mm.

^b: pNP-butyrate was used as substrate.

^c: pNP-palmitate was used as substrate.

^d: developmental stages of insect were represented as: E(egg), F(female adult), M(male adult), L(larvae).

assay는 고압멸균 한 R2A배지(0.5 g/l yeast extract, 0.5 g/l protease peptone, 0.5 g/l glucose, 0.5 g/l casamino acid, 0.5 g/l soluble starch, 0.3 g/l sodium pyruvate, 0.3 g/l K₂HPO₄, 0.05 g/l MgSO₄, 15 g/l agar)를 60°C로 식힌 다음 1% olive oil과 0.001% Rhodomin B를 첨가한 후 blender로서 현탁하여 Petri dish에 25 ml 씩 분주하였다. 이렇게 만들어진 배지에 미생물을 접종 후 24°C 또는 30°C에서 48시간 배양하여 생성되는 olive oil의 분해환을 UV light 위에서 관찰하였다. 활성의 크기는 오렌지색의 분해환의 지름을 상대적으로 나타내었다(+, 2-4 mm; ++, 4-8 mm; +++, 8-12 mm; +++++, 12 mm 이상). Microplate assay는 p-nitrophenyl-ester (pNP-ester)를 기질로 사용하여 유리되는 p-nitrophenol의 양을 분광광도계(SmartSpec 3000, Bio-Rad, USA)를 이용한 405 nm에서의 흡광도 증가량으로 측정하였으며 반응액은 기질의 종류에 따라 두 가지 방법으로 혼합하였다. Ester carbon의 길이가 12개 이하의 탄소수를 가지는 기질의 경우 (pNP-butyrate) acetonitrile로 녹인 10 mM pNP-butyrate 5 µl, ethanol 5 µl, 50 mM phosphate buffer (pH 7.4) 180 µl와 효소액 10 µl를 섞은 다음 37°C에서 10분간 반응 후 405 nm에서의 흡광도를 측정하였고 long chain

pNP-ester인 pNP-palmitate를 기질로 사용할 경우 10 µl의 효소액과 170 µl의 buffer 혼합액(50 mM phosphate buffer containing 0.1% gum arabic and 0.2% deoxycholate), 그리고 isopropanol로 녹인 8 mM의 기질 20 µl를 혼합하여 동일한 조건으로 반응을 실시하였다. 효소의 unit 측정 은 1분간 1 umol의 pNP를 생성하는 효소의 양을 1 unit로 하였다.

선별 균주의 동정

미생물의 동정은 16S rDNA 분석에 의해 실시되었으며 보다 자세한 분석을 위해 생리·생화학적 특성조사 및 미생물의 세포지방산 조사를 하였다. 미생물의 16S rDNA 증폭을 위한 PCR amplification은 균주로부터 분리한 total DNA를 template로 하여 FastStart Taq polymerase kit (Roche, Germany)을 이용하였으며 PCR에 이용된 primer는 27F: 5'-agagtttgatcmtggtcag-3', 1492R: 5'-ggttacctgttaccagctt-3'를 각각 forward 및 reverse primer로 사용하였다. PCR 반응은 94°C에서 5분간의 denaturation을 수행한 후 94°C에서 30초의 denaturation, 65°C에서 30초의 annealing, 72°C에서 3분의 extension을 30회 반복한 후 마지막으로

72°C에서 7분간 extension으로 마무리하고 4°C에서 유지되었다. 이렇게 확보된 PCR 산물의 염기서열을 결정하여 GenBank data base 검색을 통하여 16S rDNA의 상동성을 조사하였다. 생리·생화학적 조사는 30°C에서 수행하였으며, oxidase 활성, catalase 활성, indol 생성, nitrate 환원과 탈질산화는 Smibert and Krieg (1994)의 방법을 사용하였고, 추가적인 생화학실험은 API 20E (BioMerieux)의 상용되는 kit를 이용하였다. 세포지방산의 성분 분석과 정량은 MIS library generation software (Microbial ID)를 이용하여 수행하였으며, 결과는 MIDI Aerobe Library (ver. 3.8)와 비교하였다.

Lipase 생산균주의 배양특성

탄소원에 따른 배양시간별 lipase의 생산을 100 ml flask 배양으로 조사하였다. 미생물의 배양은 0.5% 탄소원이 첨가된 M9 minimal media (6.8 g/l Na₂HPO₄, 3 g/l KH₂PO₄, 0.5 g/l NaCl, 1 g/l NH₄Cl, 2 mM MgSO₄, 0.1 mM CaCl₂, 5 g/l)에 OD₆₀₀ = 1.0으로 전 배양 한 미생물을 0.5% (v/v)로 접종하여 25°C, 180 rpm으로 진탕 배양하면서 각 시간별로 시료를 채취하여 lipase 활성을 microplate assay로 검정하였다. 탄소원으로 이용된 olive oil의 첨가량에 따른 lipase의 생산을 조사하기 위하여 0.5%의 yeast extract가 첨가된 M9 minimal media에 olive oil을 0.1-1.0% 까지 첨가하여 48시간 배양을 실시하였으며 그 과정에서 lipase의 생산량을 측정하였다. 온도에 따른 lipase의 생산조건을 조사하기 위하여 0.5% yeast extract, 0.5% olive oil이 포함된 M9 media에 균주를 접종한 다음 각각 25, 30, 37°C에서 48시간 배양하며 lipase의 생산량을 측정하였다. 생균수의 측정은 0.5% yeast extract, 0.5% olive oil이 포함된 M9 media에서 25°C, 180 rpm의 조건으로 배양하며 각 시간별로 시료를 채취한 다음 단계적으로 희석하여 colony forming unit를 측정하였다.

결과 및 고찰

Lipase 생산 균주의 분리

곤충의 장내에 존재하는 lipase 생산 미생물의 탐색을 위하여 검정하늘소(*Spondylis buprestoides*), 땅강아지(*Gryllotalpa africana*), 멧쟁이딱정벌레(*Damaster jankovskii*),

붉은산꽃하늘소(*Corymbia rubra*), 울도하늘소(*Psacotha hilaris*), 재불이등에(*Tabanus trigeminus*), 꼽추재주나방(*Rabta cristata*), 줄지렁이(*Eisenia fetida*), 톱하늘소(*Prionus insularis*), 녹색박각시나방(*Callambulyx tatarinovi*)을 포함하는 10종의 곤충 성충 또는 유충으로부터 olive oil과 Rhodamin B가 포함된 R2A agar 배지에서 1차적으로 선별 후 액체배양을 통하여 9종의 우수한 lipase 생산균주를 분리하였다(Table 1). 분리된 균주의 16S rDNA partial sequencing과 data base 검색 결과 *Burkholderia* 속, *Serratia* 속, *Pseudomonas* 속, *Acinetobacter* 속 등 주로 G(-)의 균주들이 lipase 생산균주로 밝혀졌으며 균혈증(bacteraemia)에 관련된 균주로 알려진 *Cedecea neteri* (Farmer *et al.*, 1982)와 높은 상동성을 보이는 AL-2 균주 외에는 대부분이 extra-cellular protease나 lipase를 생산하는 균주들이 다수 보고 된 속(genus)에 포함되는 것을 볼 수 있다(Gupta *et al.*, 2004). pNP-butyrate와 pNP-palmitate를 기질로 이용하여 탐색된 lipase의 기질에 대한 분해능을 조사하였을 때 분리된 9종의 균주 중 6종의 균주에서 비교적 우수한 pNP-palmitate 분해능을 나타내는 true lipase를 생산하였으며 그 중 톱하늘소로부터 분리된 HY-10 균주가 가장 우수한 lipase 활성을 나타내었다. AT-3과 AA-4 균주의 경우 agar plate assay에서는 우수한 lipase 활성을 나타내었지만 배양상등액에서의 활성은 HY-10에 비해 낮게 나타났다. 각 균주의 protease 생산 활성을 조사하였을 때 AT-3과 AA-4 균주는 48시간 배양 상등액에서 비교적 높은 활성을 나타내어 48시간의 배양 과정에서 protease에 의한 lipase의 실패가 일어났을 가능성이 높은 것으로 판단된다(data not shown).

Lipase 생산균주의 동정

톱하늘소의 장으로부터 분리한 우수한 lipase 활성 균주를 *Burkholderia* sp. HY-10이라 명명하고(Fig. 1A) 분자생물학적, 생리·생화학적 동정을 실시하였다. HY-10 균주는 G(-)의 간구균으로서 0.5-0.7 × 1.2-1.5 μm의 cell size를 가지며 2-4개의 극모형 편모를 가지고 있다(Fig. 1B). 16S rDNA 염기서열의 결정 및 data base 상동성 검색 결과 *Burkholderia stabilis* 균주와 99.65%의 가장 높은 상동성을 보여주었으며 *B. cepacia*, *B. pyrrocinia*, *B. vietnamiensis* 등의 균주와도 높은 상동성을 나타내었다(Table 2). 16S rDNA sequence를 이용한 phylogenetic tree 분석에 의하면 *B. pyrrocinia*, *B. vietnamiensis* 등의 균주

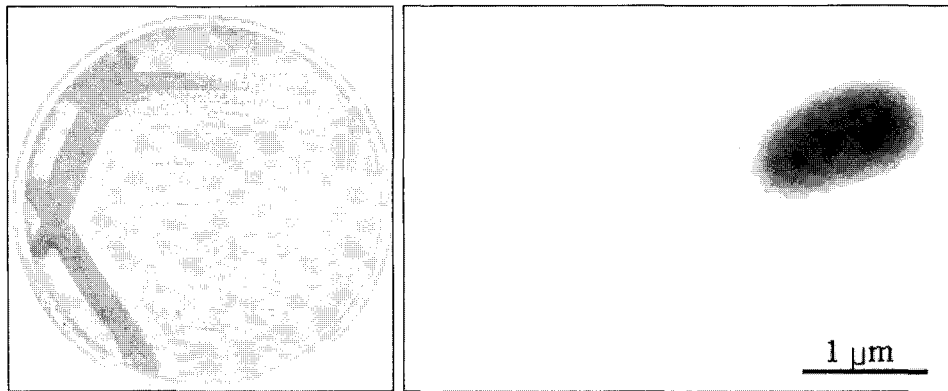


Fig. 1. Isolation of lipase producing strain, *Burkholderia* sp. HY-10. A: isolated strain HY-10 was cultured on a tributyrin agar at 25°C for 48 hrs. B: transmission electron microscope image of HY-10.

Table 2. 16S rDNA sequence similarity values between *Burkholderia* sp. HY-10 and closely related species

Names	Similarity to strain HY-10	No. of nucleotide difference/ total no. of compared
<i>Burkholderia stabilis</i> LMG 14294T	99.65	5/1422
<i>Burkholderia pyrrocinia</i> LMG 14191TT	99.50	7/1400
<i>Burkholderia vietnamiensis</i> AMMDT	99.15	12/1418
<i>Burkholderia cepacia</i> T	99.07	13/1401
<i>Burkholderia cepacia</i> ATCC 25416TT	99.01	14/1408
<i>Burkholderia vietnamiensis</i> TVV75 TT	98.86	16/1407
<i>Burkholderia cenocepacia</i> LMG 16656T	98.85	16/1392
<i>Burkholderia multivorans</i> LMG 13010TT	98.81	17/1424
<i>Burkholderia glumae</i> LMG 2196TT	98.81	17/1412
<i>Burkholderia gladioli</i> ATCC 10248, pathovar gladioliT	98.66	19/1418

와 가까운 group을 형성하는 것을 볼 수 있었다(Fig. 2). 1992년부터 기존의 *Pseudomonas* 속으로부터 새로운 속으로 분류되기 시작한 *Burkholderia* 속의 세균들 중 *B. cepacia* complex에 속하는 균주들이 종간의 16S rDNA 상동성이 97.7% 이상으로 매우 높게 나타나는 특징이 있으므로(Coenye *et al.*, 2001; Yabuuchi *et al.*, 1992) 생리·생화학적 동정을 통해 자세한 동정을 시도하였다. 그 결과 HY-10 균주는 Biolog를 이용한 carbon source assimilation test에서 Tween 40, Tween 80, N-acetyl-D-glucosamine, adonitol, D-arabitol, D-fructose, L-fucose, D-galactose, α-D-glucose, m-inositol, D-mannitol, D-mannose, D-raffinose, D-sorbitol, D-trehalose, xylitol, methyl pyruvate, mono-methyl succinate, acetic acid (weak), cis-aconitic acid, citric acid, formic acid, D-galactonic acid lactone, D-galacturonic acid, D-gluconic acid, D-glucosaminic acid, D-glucuronic acid, α-hydro-

xybutyric acid, β-hydroxybutyric acid, p-hydroxyphenylacetic acid, α-ketobutyric acid, α-ketoglutaric acid, DL-lactic acid, malonic acid, propionic acid, D-saccharic acid, sebacic acid, succinic acid, bromosuccinic acid, D-alanine, L-alanine, L-alanyl glycine, L-asparagine, L-aspartic acid, L-glutamic acid, L-histidine, hydroxy-L-proline, L-ornithine (weak), L-phenylalanine, L-proline, L-pyroglutamic acid, L-serine, L-threonine, DL-carnitine, γ-aminobutyric acid, urocanic acid, thymidine, phenylethylamine, putrescine, 2-aminoethanol, glucose 6-phosphate 등에 대해 positive로 나타났으며 API 50CH에 의한 carbone assimilation은 D-arabinose, L-arabinose, adonitol, glucose, galactose, mannose, dulcitol, inositol, mannitol, sorbitol, esculine, cellobiose, maltose, lactose, trehalose, xylitol, gentiobiose, D-fucose, L-fucose, D-arabitol, L-arabitol에 대해 positive로 나타났다. 세포내



Fig. 2. Phylogenetic tree of the *Burkholderia* sp. HY-10 and closely related *Burkholderia* species on the basis of 16S rDNA sequences. The tree was generated by neighbor-joining algorithm of PHYLIP. The bar corresponds to 0.1 substitutions per nucleotide position.

구성 지방산 함량은 C18:1 straight-chain monounsaturated fatty acid가 24.3%, C16:0 straight-chain saturated fatty acid가 18.5%, C17:0 unsaturated cyclic fatty acid가 12.8%로 다수를 차지하였다(Table 3). 그 외 기타 생리 생화학적 결과를 종합하면 Table 4와 같이 요약할 수 있다. 이상의 결과들로 보아 본 균주는 *B. cepacia* complex에 속하는 종으로 보여지나 정확한 동정을 위해서는 DNA-DNA hybridization 등을 통한 추가적인 연구가 필요하다.

***Burkholderia* sp. HY-10 균주의 lipase 생산 특성**

Burkholderia sp. HY-10에 의한 lipase의 생산조건을 검정하기 위하여 M9 배지에 glucose, citric acid, olive oil을 각각 0.5%가 되도록 탄소원을 첨가한 다음 lipase의 생산을 조사하였을 때 glucose와 citric acid 첨가 시 60시간 배양과정에서 lipase의 생산이 매우 낮은 것을 볼 수 있으며 olive oil 첨가 시 우수한 lipase 생산이 일어남을 볼 수 있었다. 또한 M9 배지 대신 rich media인 LB 배지를

Table 3. Cellular fatty acid composition of *Burkholderia* sp. HY-10

Fatty acids	Compositions (%)
C14:0	5.0±0.4
Summed Feature 2 ^a	6.7±0.9
Summed Feature 3 ^b	11.2±4.0
C16:0	18.5±2.6
C17:0 cyclo	12.8±1.8
C16:1 2OH	2.0±0.6
C16:0 2OH	1.5±0.7
C16:0 3OH	6.0±0.9
C18:1 w7c	24.3±3.4
C19:0 cyclo w8c	7.7±4.4
C18:1 2OH	2.1±1.1

^a, Summed feature 2 : C12:0 alde + Unknown 10.928 + C16:1 iso I/ C14:0 3OH

^b, Summed feature 3 : C16:1 w7c/ C15:0 iso 2OH

Table 4. Morphological and physiological characterization of HY-10

Characteristics	<i>Burkholderia</i> sp. HY-10
Gram staining	-
Motility	+
Cell from	Rod-cocci
Spore formation	-
Arginine dehydrolase	-
Lysine decarboxylase	-
Ornithine decarboxylase	+
Citrate	-
Phenylacetate	+
Urease	-
Oxidative utilization of glucose	-
Indole	-
β-Glucosidase	-
Proteolysis of gelatin	+
β-Galactosidase	-

+: positive, -: negative

사용하였을 때에도 lipase의 생산이 저해되는 것으로 보아 HY-10 lipase의 생산은 catabolic repression을 받는 것으로 보여진다(Fig. 3A). 첨가하는 olive oil의 양은 검토된 0.1-1.0%의 농도 중 0.5%의 첨가 시 가장 우수한 lipase의 생산을 볼 수 있었다(Fig. 3B). 배양온도에 따른 lipase의 생산의 영향을 조사하기 위하여 25°C, 30°C, 37°C에서 각각 48시간 배양하였을 때 30°C에서 가장 우수한 효소의 생산이 이루어짐을 볼 수 있으며 37°C에서는 lipase의 생산이 상대적으로 감소함을 볼 수 있었다(Fig. 3C). HY-10 균주는 배양액 내 균체의 수가 10⁷/ml - 10⁸/ml 이상이 되었을 때 lipase 생산이 유도되는 것을 볼 수 있었다(Fig. 3D).

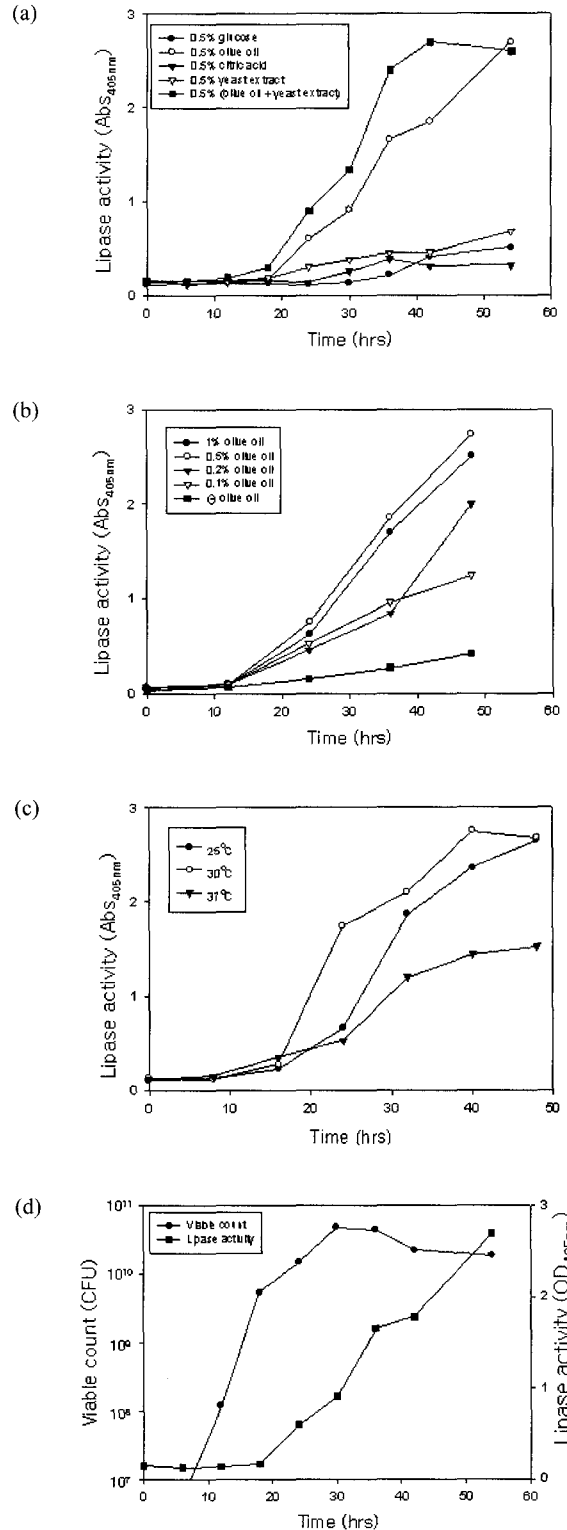


Fig. 3. Time profiles of lipase production of *Burkholderia* sp. HY-10 at various conditions. A: lipase production through cultivation of HY-10 on M9 medium contained different carbon sources. B: effect of olive oil contents on lipase production. C: effect of temperatures on lipase production. D: cell growth and lipase production.

이러한 현상은 현재까지 알려진 많은 종의 *Burkholderia* 속의 세균들이 동물이나 식물 등에 병원성을 나타내며 (Gilligan, 1995) 그 병원성의 발현이나 lipase의 생산이 세균의 밀도 인식에 따른 유전자 발현 조절 메커니즘인 quorum sensing에 의해 조절된다는 보고들을(Lewenza *et al.*, 1999; Conway and Greenberg, 2002) 고려할 때 HY-10 균주의 lipase 생산 또한 이와 유사한 조절 mechanism을 보일 가능성이 매우 높다. 한편으로 흰개미의 장내에서 발견된 *B. cepacia* 균주가 리그닌의 분해효소를 생산한다는 연구(Kinya *et al.*, 1998)와 trichloroethylene과 toluene의 분해능을 가진 *B. vietnamiensis* G4 균주들이 보고되어 있는 등(Nelson *et al.*, 1986) 난분해성 물질을 분해하는 연구에도 이들 *Burkholderia* 속의 균주들이 이용되고 있다는 점 등을 고려할 때 곤충의 장내에 공생적으로 존재할 것으로 판단되는 *Burkholderia* sp. HY-10 균주의 병원성 관련 여부와 숙주와의 상호관계에 대한 보다 깊은 연구가 지속적으로 필요할 것으로 사료된다. 현재 진행되고 있는 연구 결과들로 보아 *Burkholderia* sp. HY-10 lipase는 높은 내열성과 유기용매에 대한 안정성, 넓은 기질특이성을 나타내는 유용한 산업적 효소로 이용될 가능성이 매우 높은 것으로 판단된다.

사 사

본 연구는 농촌진흥청에서 지원하는 바이오그린21 사업(ABM1600612)에 의해 지원되었습니다.

Literature Cited

- Brennan, Y., W.N. Callen, L. Christoffersen, P. Dupree, F. Goubet, S. Healey, M. Hernandez, M. Keller, K. Li, N. Palackal, A. Sittenfeld, G. Tamayo, S. Wells, G.P. Hazlewood, E.J. Mathur, J.M. Short, D.E. Robertson and G.A. Steer. 2004. Unusual microbial xylanases from insect guts. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 3609-3617.
- Breznak, J.A. 1982. Intestinal microbiota of termites and other xylophagous insects. *Annu. Rev. Microbiol.* 36: 323-343.
- Breznak, J.A. and A. Brune. 1994. Role of microorganisms in the digestion of lignocellulose by termites. *Annu. Rev. Entomol.* 39: 453-487.
- Broderick, N.A., K.F. Raffa, R.M. Goodman and J. Handelsman. 2004. Census of the bacterial community of the gypsy moth larval midgut by using culturing and culture-independent methods. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 293-300.
- Coenye, T., P. Vandamme, J.R.W. Govan and J.J. Lipuma. 2001. Taxonomy and identification of the *Burkholderia cepacia* complex. *J. Clin. Microbiol.* 39: 3427-3436.
- Conway, B.A. and E.P. Greenberg. 2002. Quorum-sensing signals and quorum-sensing genes in *Burkholderia vietnamiensis*. *J. Bacteriol.* 184: 1187-1191.
- Dillon, R.J. and V.M. Dillon. 2004. The gut bacteria of insects: nonpathogenic interactions. *Annu. Rev. Entomol.* 49: 71-92.
- Egert, M., B. Wagner, T. Lemke, A. Brune and M. Friedrich. 2003. Microbial community structure in the midgut and hindgut of the humus-feeding larva of *Pachnoda ephippiata* (Coleoptera: Scarabaeidae). *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 6659-6668.
- Farmer, J.J. 3rd, N.K. Sheth, J.A. Hudzinski, H.D. Rose and M.F. Asbury. 1982. Bacteremia due to *Cedecea neteri* sp. nov.. *J. Clin. Microbiol.* 16: 775-778.
- Gilligan, P.H. 1995. *Pseudomonas* and *Burkholderia*. pp. 509-519 in *Manual of Clinical Microbiology*, 6th ed. eds by R.R. Murray, E.J. Baron, M.A. Tenover and R.H. Tenover. Washington, D.C. American Society for Microbiology.
- Gupta, R., N. Gupta and P. Rath. 2004. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 64: 763-781.
- Heo, S., J. Kwak, H.W. Oh, D.S. Park, K.S. Bae, D.H. Shin and H.Y. Park. 2006. Characterization of an extracellular xylanase in *Panibacillus* sp. HY-8 isolated from an herbivorous longicorn beetle. *J. Microbiol. Biotechnol.* 16: 1753-1759.
- Jaeger, K.E., S. Ransac, B.W. Dijkstra, C. Colson, M. Heuvel and O. Misset. 1994. Bacterial lipases. *FEMS Microbiol. Rev.* 15: 29-63.
- Jaeger, K.E., B.W. Dijkstra and M.T. Reetz. 1999. Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipase. *Annu. Rev. Microbiol.* 53: 315-351.
- Jager, K.E. and T. Eggert. 2002. Lipases for biotechnology. *Curr. Opin. Biotechnol.* 13: 390-397.
- Kinya, K., S. Kozaki and M. Sakuranaga. 1998. Degradation of lignin compounds by bacteria from termite guts. *Biotechnol. Lett.* 20: 459-462.
- Kouker, G and Jaeger, K.E. 1987. Specific and sensitive assay for bacterial lipases. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 211-213.
- Lee, G.E., C.H. Kim, H.J. Kwon, J. Kwak, D.H. Shin, D.S. Park, K.S. Bae and H.Y. Park. 2004. Biochemical characterization of an extracellular protease in *Serratia proteomaculans* isolated from a spider. *Kor. J. Microbiol.* 40: 269-274.
- Lewenza, S., B. Conway, D.P. Greenberg and P.A. Sokol. 1999. Quorum sensing in *Burkholderia cepacia*: identification of the LuxRI homologs CepRI. *J. Bacteriol.* 181: 748-756.
- Nelson, M.J.K., S.O. Montgomery, E.J. O'Neill and P.H. Pritchard. 1986. Aerobic metabolism of trichloroethylene by a bacterial isolate. *Appl. Environ. Microbiol.* 52: 383-384.
- Otero, C., M.A. Berrendero, F. Cardenas, E. Alvarez and S.W. Elson. 2005. General characterization of noncommercial microbial lipases in hydrolytic and synthetic reactions. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 120: 209-223.
- Reetz, M.T. 2002. Lipases as practical biocatalysts. *Curr. Opin. Biotechnol.* 6: 145-150.
- Ryu, H.S., H.K. Kim, W.C. Choi, M.H. Kim, S.Y. Park, N.S. Han, T.K. Oh and J.K. Lee. 2006. New cold-adapted lipase from *Photobacterium lipolyticum* sp. nov. that is closely related to filamentous fungal lipases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 70: 321-326.

Smibert, R.M. and N.R. Krieg. 1994. Phenotypic characterization. pp 607-654 in *Methods for general and molecular bacteriology*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

Yabuuchi, E., Y. Kosako, H. Oyaizu, I. Yano, H. Hotta, Y. Hashimoto, T. Ezaki and M. Arakawa. 1992. Proposal of *Burk-*

holderia gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homoloty group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov. *Microbiol. Immunol.* 36: 1251-1257.

(Received for publication January 5 2007;
accepted January 29 2007)