

무당벌레 소화기관으로부터 산성 단백질 분해효소를 생산하는 *Staphylococcus* sp. CB2-3의 분리 및 특성

김세종¹ · 황경숙^{1,2*}

¹목원대학교 미생물나노소재학과, ²목원대학교 미생물생태자원연구소

Isolation and Characterization of Acid Protease Produced by *Staphylococcus* sp. CB2-3 from Digestive Organ of *Harmonia axyridis*

Se-Jong Kim¹ and Kyung-Sook Whang^{1,2*}

¹Department of Microbial & Nano Materials, ²Institute of Microbial Ecology and Resources, Mokwon University, Daejeon 302-729, Republic of Korea

(Received September 15, 2011 / Accepted September 28, 2011)

Six protein-degrading bacteria were isolated from digestive organ of *Harmonia axyridis*. These isolates were categorized as *Staphylococcus sciuri* subsp. *sciuri* (3 strains), *Bacillus subtilis* (1 strain), and *Bacillus thuringiensis* (2 strains) by 16S rRNA gene sequence analysis. The *Staphylococcus* sp. CB2-3 was selected as a protease-producing bacterium which showed the highest protease activity of 58.5 U/ml at the pH 5.0 medium. The optimal pH and temperature of protease activity were pH 5.0 and 40°C, respectively. This acid protease had a relatively high stability of 80% between 30-50°C at broad temperature range. The optimal medium compositions of carbon, nitrogen and mineral source for cell growth and protease activity were investigated. When sorbitol (0.5%) was used as carbon source, enzyme activity was increased about 2 times than that of the basal medium. When skim milk (0.5%) was used as nitrogen source, activity was increased about 2.5 times than that of the control. Cell growth and enzyme activity were increased by mineral source such as KCl, K₂HPO₄, FeSO₄, but was completely inhibited by divalent ions such as Co²⁺, Zn²⁺, Mn²⁺, Cu²⁺.

Keywords: *Harmonia axyridis*, *Staphylococcus* sp. CB2-3, acid protease, digestive organ

동물성(포식성, 기생성, 육식성, 시식성) 섭취 곤충 중 살아 있는 해충을 잡아먹는 대표적인 포식성 천적 곤충으로는 무당벌레, 풀잡자리, 노린재, 등애류 등이 있으며(37), 이들 포식성 천적 곤충들은 시설작물에 심한 피해를 주고 있는 진딧물, 응애, 온실가루이, 총채벌레 등과 같은 해충의 친환경 생물방제에 활용되고 있다(22). 최근에는 곤충의 생육과 밀접한 관련이 있는 공생 장내미생물에 대한 연구가 활발히 이루어지면서 분자생물학적 기법에 근거한 곤충 장내미생물의 계통학적 다양성에 관한 연구 결과가 보고되었으며(9, 14, 23), 소화기관 내 서식하는 장내미생물들이 곤충의 소화와 영양에 관여하고 있다는 사실을 밝혔다(8).

해충을 포식하는 무당거미(*Nephila clavata*)에서 분리한 *Serratia proteamaculans*가 생산하는 단백질 분해효소의 특성

(5, 6, 27, 33), 고추좀잠자리(*Sympetrum depressiusculum*)로부터 분리한 리그닌 분해세균 *Serratia marcescens*의 특성(24), 자일란(xylan)이 풍부한 식물의 줄기나 목질부를 주로 섭식하는 털두꺼비하늘소(*Moechotypa diphysis*)의 장으로부터 자일라나제를 생산하는 균주의 특성에 관한 보고(20) 등 곤충 소화기관으로부터 효소를 생산하는 균주를 분리하여 산업적으로 활용하고자 하는 연구들이 활발히 진행되고 있다. 특히, 무당거미의 장내 공생미생물로부터 분리한 고효율 단백질 분해 효소를 활용해 자연친화용 피부미용 종합관리제 아라자임(ARAZYME)을 개발하여 상업화한 바 있다(6).

대표적인 해충 포식성 곤충으로 알려진 딱정벌레목(Coleoptera) 무당벌레과(Coccinellidae)에 속하는 무당벌레(*Harmonia axyridis*)는 한국, 중국, 대만 및 일본을 비롯한 아시아 대륙과 일부 유럽지역에까지 널리 분포하고 있다(35). 무당벌레과의 65% 이상이 진딧물을 포식하는 것으로 알려져 있으며, 진딧

* For correspondence. E-mail: kswang@mokwon.ac.kr; Tel.: +82-42-829-7593; Fax: +82-42-829-7599

물뿐만 아니라 총채벌레, 배추 좀나방의 유충, 깍지벌레, 온실 가루이 등의 여러 미소 곤충을 포식하는 익충으로 생물학적 방제에 활용되고 있다(19). 이와 같은 포식성 무당벌레는 먹이의 영양성분 중 단백질의 종류와 조성에 따라 생리적 특성에 심한 차이를 나타내며(21, 31), 먹이의 양분조성에 따라 곤충의 장내에서 분비되는 효소의 종류와 양도 다른 것으로 알려져 있다(10, 11). 또한, 대부분의 곤충과 공생관계를 나타내는 장내미생물들은 주로 섭식과 관련되어 미생물 군집을 형성하며, 장내미생물들이 생산하는 세포외효소가 곤충의 소화와 영양에 관여하고 있는 것으로 다수 보고되었으나 다양한 해충을 포식하는 한국산 무당벌레의 소화기관 내 서식하는 장내미생물 군집이 생산하는 효소의 종류와 특성에 관한 연구는 매우 미흡한 형편이다. 최근, 공동연구자는 무당벌레 소화기관 내 서식하는 장내세균의 계통학적 다양성을 연구하고, 무당벌레의 소화기관으로부터 장내세균 116균주를 순수분리하였다(23). 또한, 무당벌레 소화기관 내 우점 세균군으로 밝혀진 *Staphylococcus* 속의 장내세균이 무당벌레의 발육에 미치는 영향에 관한 연구결과를 보고하였다(32).

본 연구에서는 무당벌레 소화기관으로부터 수집한 장내세균 중 단백질 분해미생물을 분리하고, 우수균주를 선발하여 계통학적 특성과 효소학적 특성을 조사함과 동시에 우수 균주의 생육과 단백질 분해효소 생산을 위한 최적의 배지 성분을 조사하고자 하였다.

재료 및 방법

사용 균주 및 배양

단백질 분해세균의 선발에는 10-fold diluted NB (0.1% peptone, 0.05% NaCl, 0.1% beef extract, pH 7.5)에 1.0% skim milk가 첨가된 영양한천배지를 사용하였으며, 30°C에서 3일간 배양한 후 단백질 분해능을 판별하였다. 배지성분에 따른 균체 생육과 효소 활성 실험에는 0.05% NaCl이 첨가된 기본배지를 사용하였으며, 실험균주는 30°C에서 24시간 전배양한 후 사용하였다.

단백질 분해세균의 계통해석

단백질 분해 우수세균의 계통해석을 위하여 NB 평판배지에 형성된 콜로니를 주형 DNA로 이용하였다. 16S rRNA PCR 증폭을 위해 *Escherichia coli* 16S rRNA 부분의 conserved sequence를 기초로 한 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 프라이머와 1492R (5'-AAGGAGGTGATC CAGCCGC-3') 프라이머를 사용하였다. PCR은 95°C에서 5분간 반응한 다음 94°C, denaturation 40초, 55°C, annealing 40초, 72°C, extension 1분의 조건으로 30회 반복하고, 72°C에서 7분간 final extension의 조건으로 PCR (Gene AMP PCR System 9700, Applied Biosystems, USA) 반응을 수행하였다. 16S rRNA의 PCR 증폭산물은 0.8% agarose gel, 0.5×TBE buffer (0.045 M Tris-borate, 0.001 M EDTA)에서 100 V, 25 mA로 30분 동안 전기영동(Mupid-21, Gel docu-

mentation system, Bio-Rad)한 다음, 10 mg/ml EtBr (ethidium bromide)로 15분간 염색하여 UV하에서 증폭 여부를 확인하고, QIAquick® PCR Purification Kit (QIAGEN Inc., Germany)를 이용하여 정제하였다. 정제된 PCR 증폭산물의 16S rRNA 염기서열 결정에는 ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems, USA)를 이용하여 cycle sequencing을 수행한 후, ABI PRISM 3700 Genetic Analyser (Applied Biosystems)로 1210-1389 bp의 16S rRNA 전 염기서열을 결정하였다(36). 각 균주의 염기서열은 RDP (<http://rdp.cme.msu.edu/>)에서 계통군을 확인하고 DDBJ/NCBI/RDP/GeneBank database의 BLAST program을 이용하여 16S rRNA 유전자 염기서열 상동성을 분석하였다.

단백질 분해효소 활성 측정

단백질 분해효소의 활성 측정은 10-fold diluted NB 기본배지에 30°C에서 3일 동안 배양된 균주의 배양 상등액을 사용하여 Anson의 방법(1)을 개량하여 다음과 같이 수행하였다. 각 시료의 배양액을 취해 spectrophotometer (UV-1650PC, Shimadzu, Japan)로 균의 성장을 흡광도 600 nm에서 측정하고, 배양액을 4°C, 7,920×g (Supra 22K, Hanil, Korea)로 20분간 원심 분리하여 균을 제거한 상등액을 조효소액으로 사용하였다. 표준반응에서 효소의 기질용액은 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.0)에 기질인 azocasein (Sigma, USA)을 0.6% (w/v) 첨가하고 녹여 사용하였다. 기질용액 2.5 ml과 조효소액 0.5 ml를 혼합하여 37°C에서 20분간 반응시킨 후 50% (w/v) trichloroacetic acid (TCA) 2.5 ml를 가하여 반응을 정지시켰다. 반응 정지액을 4°C, 22,250×g (Micro 17R, Hanil, Korea)에서 5분간 원심 분리하여 침전물을 제거한 상등액 1 ml에 0.55 M Na₂CO₃ 용액 2.5 ml과 6배로 희석한 Folin reagent 용액 0.5 ml를 혼합한 후 실온에서 30분간 반응시킨 다음 660 nm에서 흡광(UVICON Spectrophotometer 930, Kontron Instruments, USA)을 측정하였다. 효소 활성도(Unit)는 tyrosine 표준도표를 이용하여 상기 조건하에서 1분간 기질로부터 1 µg의 tyrosine에 해당하는 peptide를 생성하는 효소량으로 정의하였다. 효소의 활성 측정은 3회 반복 수행하여 평균값을 산출하고 상대 활성으로 표시하였다.

단백질 분해효소 활성 특성

단백질 분해효소의 최적 활성 pH를 조사하기 위하여 pH 3.0-10.0까지 효소 활성을 측정하였다. pH에 따른 효소 활성은 50 mM citrate-phosphate 완충용액(pH 3.0-6.0), 50 mM Tris-HCl 완충용액(pH 7.0-8.0)과 50 mM glycine-NaOH 완충용액(pH 9.0-10.0)에 녹여 사용하였다. 효소의 활성 측정은 각각의 pH 완충용액에 조효소액을 넣고 37°C에서 20분 동안 반응시킨 다음 효소 활성을 측정하였다. 효소의 최적 활성 온도를 조사하기 위하여 50 mM citrate-phosphate 완충용액(pH 5.0)의 기질용액에 조효소액을 가한 다음, 10-80°C까지 각각의 반응 온도에 20분간 반응시킨 후 효소 활성을 측정하였다.

효소의 열안정성 측정은 50 mM citrate-phosphate 완충용액 (pH 5.0)에 조효소액을 첨가하고 30-70°C 온도에서 10-60분 까지 10분 간격으로 효소액을 미리 반응시킨 다음 최적 온도에서 20분 동안 잔여 효소 활성을 측정하는 방법을 이용하였고, 각각의 효소 활성을 상대 활성으로 표시하였다.

탄소원, 질소원 및 무기염류의 종류에 따른 균체생육 및 효소활성 측정

탄소원, 질소원, 무기염류가 균체의 생육과 효소 활성에 미치는 영향을 조사하기 위해 0.05% NaCl이 첨가된 기본배지를 대조구로 하고 16 종류의 탄소원(glucose, fructose, rhamnose, saccharose, maltose, lactose, glycerol, galactose, sorbitol, mannitol, starch, mannose, arabinose, raffinose, sucrose, CMC), 16 종류의 질소원(beef extract, casein, gelatin, peptone, skim milk, tryptone, yeast extract, urea, malt extract, soytone, (NH₄)₂PO₄, (NH₄)₂PO₄, NH₄Cl, NaNO₃, KNO₃, NH₄NO₃), 13 종류의 무기염류(CaCl₂, CaCO₃, CoCl₂, CuSO₄, FeSO₄, K₂HPO₄, KCl, KH₂PO₄, MgSO₄, MnSO₄, NaCl, ZnCl₂, ZnSO₄)를 각각 0.5% (w/v) 첨가하고 pH를 5.0으로 제조한 다음 30°C에서 3일 동안 배양한 후 균체 생육과 효소 활성을 측정하였다.

결과

단백질 분해 우수균주 선발

선행연구에서 국내 다양한 지역으로부터 수집한 무당벌레 소화기관으로부터 분리된 장내세균은 *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria* 그리고 *Deinococcus-Thermus* 등 다양한 계통군을 포함하는 세균으로(23), 수집된 이들 무당벌레 장내세균을 대상으로 1% 탈지유(Skim milk)가 함유된 평판배지 상의 단백질 분해능을 검토한 결과, 8-15 mm의 높은 분해능을 나타내는 6균주(CB2-2, CB2-3, SB2-1, CHB1-3, CB2-1, SAK3-2)를 1차 선발하였다.

상기의 단백질 분해능 우수 균주를 pH 3.0-7.0으로 각각 조정된 배지에 30°C에서 3일간 배양한 후 조효소의 활성을 측정하였다. CB2-3 균주의 경우 24.6-48.5 U/ml로 높은 활성능을 나타내었으며, 특히 pH 5.0 배지에서 48.5 U/ml로 효소 활성이 가장 높게 나타났다. 상기의 결과에 따라 CB2-3 균주를 단백질 분해효소 생성 우수 균주로 최종 선발하였다(Table 1).

Table 1. Comparison of protease activity of enterobacteria collected from digestive organ of *Harmonia axyridis*

Strain	Skim milk clear zone (mm)	Protease activity (U/ml)				
		3	4	5	6	7
CB2-2	8.0	1.1	2.3	5.7	3.3	0.4
CB2-3	8.5	24.6	38.0	48.5	40.3	35.2
SB2-1	9.0	1.9	4.5	10.7	9.1	5.6
CHB1-3	8.5	2.2	28.4	44.6	40.5	31.8
CB2-1	8.0	2.9	7.5	17.5	4.0	1.8
SAK3-2	9.0	0.9	1.9	24.3	3.8	1.7

3-7: Initial pH of basal (10-fold diluted NB) medium.

단백질 분해세균의 계통분류

무당벌레 소화기관으로부터 분리한 단백질 분해 우수균주의 16S rRNA 유전자 염기서열을 해석하여 계통학적 위치를 확인한 결과, 3균주(CB2-2, CB2-3, SB2-1)는 *Staphylococcus* 속에 속하는 균주로 *S. sciuri* subsp. *sciuri* DSM 20345^T와 99.93-100%의 상동성을 나타내었다. *Bacillus* 속에 속하는 3균주 중 CHB1-3은 *Bacillus subtilis* DSM10^T와 99.92%의 상동성을 나타내었으며, CB2-1과 SAK3-2 균주는 *Bacillus thuringiensis* ATCC10792^T와 98.8%의 상동성을 나타내었다 (Table 2). 상기 균주들의 염기서열은 NCBI GenBank에 각각 accession no. JN811561-JN811566로 등록하였다.

효소 활성에 대한 pH의 영향

Staphylococcus sp. CB2-3 균주가 생산하는 단백질 분해효소의 최적 활성 pH를 조사하기 위해 세 가지 완충용액에 기질을 녹여 pH를 3.0-10.0까지 변화시키면서 조효소액과 반응시킨 후 활성을 측정한 결과, pH 4.0-6.0까지 범위에서 55.6-59.8 U/ml로 90% 이상의 활성을 나타내었다. 효소의 최대 활성은 pH 5.0 (59.8 U/ml)이었으며, pH 7.0 (48.6 U/ml) 이상에서 효소 활성이 급격히 감소하는 경향을 나타내었다 (Fig. 1). 상기의 결과로부터 *Staphylococcus* sp. CB2-3 균주는 최적 pH가 4.0에서 6.0 사이인 산성 단백질 분해효소를 생산하는 것으로 나타났다.

단백질 분해효소의 최적온도

Staphylococcus sp. CB2-3 균주가 생산하는 산성 단백질 분해효소의 최적 온도를 조사하기 위해 기질을 녹인 50 mM citrate-phosphate 완충용액(pH 5.0)에 반응 온도를 10-80°C까지 변화시키면서 조효소액과 반응시켜 활성을 조사한 결과,

Table 2. 16S rRNA gene sequencing of protein degrading bacteria isolated from digestive organs of *Harmonia axyridis*

Strain	Accession no.	Closest microorganisms (Accession no.)	Sequence (bp)	Similarity (%)
CB2-2	JN811566	<i>Staphylococcus sciuri</i> subsp. <i>sciuri</i> DSM 20345 ^T (AJ421446)	1336/1337	99.93
CB2-3	JN811561	<i>Staphylococcus sciuri</i> subsp. <i>sciuri</i> DSM20345 ^T (AJ421446)	1389/1389	100
SB2-1	JN811562	<i>Staphylococcus sciuri</i> subsp. <i>sciuri</i> DSM20345 ^T (AJ421446)	1381/1381	100
CHB1-3	JN811563	<i>Bacillus subtilis</i> DSM10 ^T (AJ276351)	1210/1211	99.92
CB2-1	JN811564	<i>Bacillus thuringiensis</i> ATCC10792 ^T (AF290545)	1309/1310	99.92
SAK3-2	JN811565	<i>Bacillus thuringiensis</i> ATCC10792 ^T (AF290545)	1340/1341	99.93

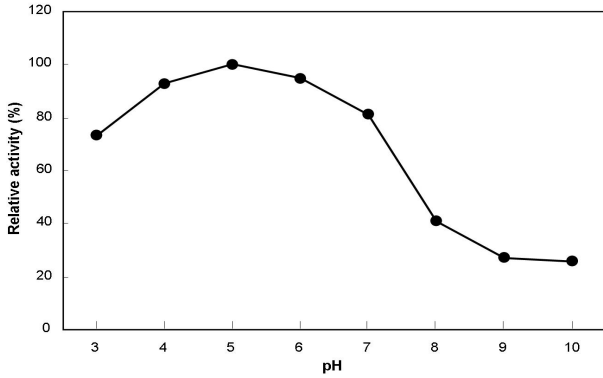


Fig. 1. Effect of reaction pH on the activity of protease produced by *Staphylococcus* sp. CB2-3. The protease activity was assayed at 37°C for 20 min in 50 mM citrate-phosphate (pH 3.0-6.0), 50 mM Tris-HCl (pH 7.0-8.0) and 50 mM glycine-NaOH (pH 9.0-10.0) buffer.

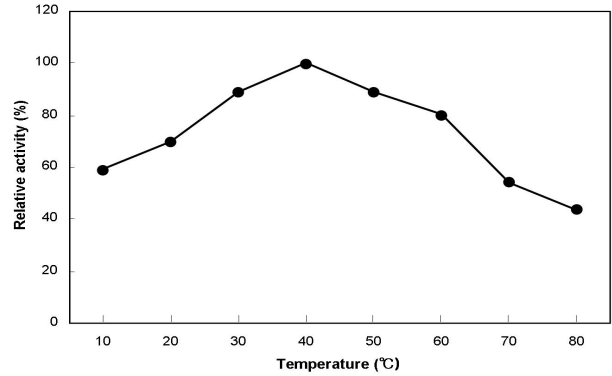


Fig. 2. Effect of reaction temperature on the activity of protease produced by *Staphylococcus* sp. CB2-3. The protease activity was assayed at various temperatures for 20 min in 50 mM citrate-phosphate buffer (pH 5.0).

30-60°C까지 범위에서 80% 이상의 효소 활성을 나타내었다. 효소의 활성은 20°C에서 증가하기 시작하여 40°C에서 63.5 U/ml로 최대 활성을 나타내었으나, 이 이상의 온도에서는 효소 활성이 급격히 감소되었다(Fig. 2).

효소의 열안정성을 조사하기 위해 기질을 녹인 50 mM citrate-phosphate 완충용액(pH 5.0)에 조효소액을 첨가하고 30-70°C에서 10-60분까지 10분 간격으로 미리 반응시킨 후 최적 반응 온도인 40°C에서 20분간 반응시켜 잔여 효소 활성을 측정하였다. 그 결과 Fig. 3에서 보는 바와 같이 40°C에서는 60분 동안 가열하여도 97% 이상의 활성을 유지하였다. 30°C에서는 88%의 잔존 활성을 보였으며, 50°C에서는 83%의 활성을 유지하였다. 60°C에서는 77%의 활성이 존재하였고, 70°C에 60분 동안 가열하여도 71%의 잔여 활성을 유지하였다.

이상의 결과로부터 *Staphylococcus* sp. CB2-3의 생육과 효

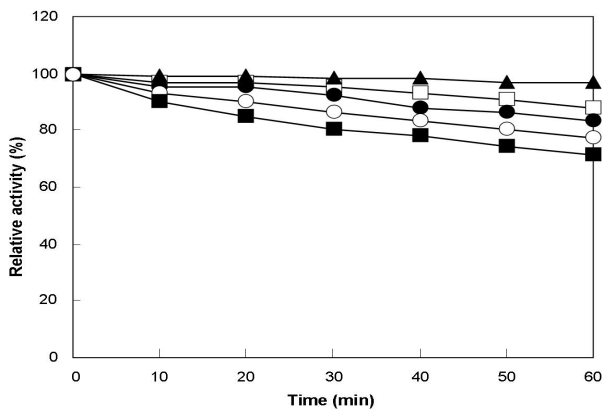


Fig. 3. Thermal stability of the acid protease produced by *Staphylococcus* sp. CB2-3. The protease activity was determined at optimal condition after preheating of the enzyme solution at the indicated various temperatures for the different time periods. Symbols: □, 30°C; ▲, 40°C; ●, 50°C; ○, 60°C; ■, 70°C.

소 활성을 위하여 기본배지의 pH를 5.0으로 조절하여 사용하였고, 효소 활성 측정은 최적 반응 온도인 40°C에서 수행하였으며, 50 mM citrate-phosphate 완충용액(pH 5.0)에 기질을 녹여 사용하였다.

미생물이 생산하는 Protease는 배지 내 탄소원과 질소원, 무기염류의 성분에 따라 효소 생산량의 차이가 크며 미생물의 종류에 따라 영향이 다르다(17). 따라서, *Staphylococcus* sp. CB2-3 균주의 생육과 효소 활성에 미치는 배지성분의 영향을 조사하기 위해 탄소원과 질소원, 무기염류가 각각 다른 영양 배지를 이용하여 배양된 균체의 생육과 조효소액의 활성 측정을 통하여 효소 생산성을 조사하였다.

탄소원이 *Staphylococcus* sp. CB2-3의 생육과 효소 생산에 미치는 영향

탄소원의 종류에 따른 *Staphylococcus* sp. CB2-3의 생육과 효소 활성을 조사하기 위해 기본배지를 대조구로 하고 기본배지에 glucose, fructose, rhamnose, saccharose, maltose, lactose, glycerol, galactose, sorbitol, mannitol, starch, mannose, arabinose, raffinose, sucrose, CMC (carboxymethyl cellulose)를 각각 0.5% (w/v) 첨가하여 제조하고 30°C에서 3일 동안 배양한 후 균체 생육과 조효소액의 활성을 측정한 결과 Table 3과 같다. 탄소원의 첨가에 따른 균주의 생육도를 측정할 결과, sorbitol 사용시 가장 높은 생육을 나타내었다. 효소 활성을 측정하여 대조구와 상대 평가한 결과, sorbitol 첨가시 196%, saccharose 첨가시 185%, fructose 첨가시 179%로 효소 활성이 높게 나타났다. 상기의 결과로 볼 때 *Staphylococcus* sp. CB2-3 균주의 최적 탄소원은 sorbitol이 가장 적합하다고 판단된다.

질소원이 *Staphylococcus* sp. CB2-3의 생육과 효소 생산에 미치는 영향

질소원의 종류에 따른 *Staphylococcus* sp. CB2-3의 생육과

Table 3. Effect of carbon sources on the cell growth and protease production by *Staphylococcus* sp. CB2-3

Source (0.5%, w/v)	Cell growth (OD ₆₀₀)	Relative activity (%)
Control	0.245	100
Glucose	0.789	145
Fructose	1.108	179
Rhamnose	0.591	121
Saccharose	1.171	185
Maltose	1.041	160
Lactose	0.625	115
Glycerol	0.871	124
Galactose	0.484	110
Sorbitol	1.387	196
Mannitol	1.108	169
Starch	0.944	155
Mannose	1.001	150
Arabinose	0.493	117
Raffinose	0.776	136
Sucrose	0.979	145
CMC	0.304	97

효소 활성을 조사하기 위해 기본배지를 대조구로 하고 기본배지에 유기질소원(beef extract, casein, gelatin, peptone, skim milk, tryptone, yeast extract, urea, malt extract, soytone)과 무기질소원[(NH₄)H₂PO₄, (NH₄)₂PO₄, NH₄Cl, NaNO₃, KNO₃, NH₄NO₃]을 각각 0.5% (w/v) 첨가하여 제조하고 30°C에서 3일 동안 배양한 후 균체 생육과 조효소액의 활성을 측정된 결과 Table 4와 같다. 질소원의 첨가에 따른 균주의 생육도를 측정된 결과, skim milk 사용시 가장 높은 생육도를 나타내었

Table 4. Effect of nitrogen sources on the cell growth and protease production by *Staphylococcus* sp. CB2-3

Source (0.5%, w/v)	Cell growth (OD ₆₀₀)	Relative activity (%)
Control	0.231	100
Beef extract	0.664	142
Casein	0.747	148
Gelatin	0.549	137
Peptone	0.480	128
Skim milk	1.989	248
Tryptone	1.639	212
Yeast extract	1.617	198
Urea	0.192	78
Malt extract	1.416	175
Soytone	1.852	220
(NH ₄)H ₂ PO ₄	0.291	98
NH ₄ Cl	0.422	105
NaNO ₃	0.233	97
KNO ₃	0.207	85
NH ₄ NO ₃	0.411	108
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.275	101

다. 효소 활성을 측정하여 대조구와 상대 평가한 결과, skim milk 첨가시 248%, soytone 첨가시 220%, tryptone 첨가시 212%로 효소 활성이 높게 나타났으며, urea와 KNO₃첨가 시는 활성이 크게 저하되었다. 또한, 대부분의 무기질소원은 유기질소원보다 균체 생육과 효소 활성이 상대적으로 낮아 효소를 생산하는데 사용되는 영양원으로는 부적합한 것으로 판단된다. 따라서, *Staphylococcus* sp. CB2-3 균주의 최적 질소원은 skim milk가 가장 적합하다고 판단된다.

무기염류가 *Staphylococcus* sp. CB2-3의 생육과 효소 생산에 미치는 영향

무기염류의 종류에 따른 *Staphylococcus* sp. CB2-3의 생육과 효소 활성을 조사하기 위해 기본배지를 대조구로 하고 기본배지에 무기염류(CaCl₂, CaCO₃, CoCl₂, CuSO₄, FeSO₄, K₂HPO₄, KCl, KH₂PO₄, MgSO₄, MnSO₄, NaCl, ZnCl₂, ZnSO₄)를 각각 0.5% (w/v) 첨가하여 제조하고 30°C에서 3일 동안 배양한 후 균체 생육과 조효소액의 활성을 측정된 결과 Table 5와 같다. 무기염류의 첨가에 따른 균주의 생육도를 측정된 결과, KCl 사용시 가장 높은 생육도를 나타내었다. 효소 활성에서는 대조구와의 상대 평가 결과, KCl 첨가시 155%, K₂HPO₄ 첨가시 152%, FeSO₄ 첨가시 141%로 효소 활성이 높게 나타났으며, CoCl₂, ZnCl₂, MnSO₄, CuSO₄, ZnSO₄ 첨가 시는 대조구에 비해 활성이 크게 저하되는 것으로 보아 균체의 생육과 효소 생산에 큰 영향을 미치는 것으로 사려된다. 따라서, 효소 생산을 위하여 무기염류를 사용할 시에는 KCl, K₂HPO₄, FeSO₄이 가장 적합할 것으로 판단된다.

고찰

포식성 곤충 소화기관 내 서식하는 장내미생물을 산업적으로 중요한 미생물 유전자원으로 인식하면서 곤충 장내미생물

Table 5. Effect of mineral sources on the cell growth and protease activity produced by *Staphylococcus* sp. CB2-3

Mineral source (0.5%, w/v)	Cell growth (OD ₆₀₀)	Relative activity (%)
Control	0.286	100
CaCl ₂	0.364	118
CaCO ₃	0.412	132
CoCl ₂	0.032	12
CuSO ₄	0.081	38
FeSO ₄	0.531	141
K ₂ HPO ₄	0.609	152
KCl	0.634	155
KH ₂ PO ₄	0.324	120
MgSO ₄	0.464	138
MnSO ₄	0.095	35
NaCl	0.314	105
ZnCl ₂	0.069	23
ZnSO ₄	0.112	54

Table 6. Comparison of characteristics with other staphylococcal proteases from various environment.

Strain	Isolation source	Protease	Mol mass (kDa)	Optimum pH	Temperature (°C)	
					Optimum	Stable
<i>S. aureus</i> V8	Patient with chronic furunculosis	Metalloprotease	38	7.0		
<i>S. aureus</i> V8	Patient with chronic furunculosis	Metalloprotease III	28	7.4		40
<i>S. hyicus</i> subsp. <i>hyicus</i>	Exudative epidermitis	ShpI	42	7.9	55	42
<i>S. hyicus</i> subsp. <i>hyicus</i>	Exudative epidermitis	ShpII	34	7.4	55	60
<i>S. caseolyticus</i>	Milk of cattle	Neutral protease	38	7.4		40
<i>S. epidermidis</i>	Patient with native valve endocarditis	Metalloprotease	33	7.0	37	50
<i>Staphylococcus</i> sp. CB2-3	Digestive organ of <i>Harmonia axyridis</i>			5.0	40	30-50

탐색과 함께 이들 미생물들이 생산하는 다양한 종류의 유용 효소, 미생물유래 항생물질과 더불어 생물농약, 곤충 유인성 페로몬 개발 등 많은 연구가 진행되어왔다(5, 6, 27, 39, 43, 44).

공동연구자가 무당벌레 소화기관으로부터 수집한 장내세균 중 34균주를 대상으로 5 종류의 효소(protease, cellulase, amylase, chitinase, lipase) 생성능에 대해 조사한 결과, protease 생성균주는 29균주로 85%를 차지하였으며, amylase 생성균주는 13 균주를 나타내었다. Moon 등(33)의 보고에 의하면 식충성인 무당거미(*Nephila clavata*)의 경우 중장에서 분리된 장내미생물의 약 63%가 단백질 또는 지질 분해능이 있는 것으로 밝혔다. 한편, French 등(16)은 대표적인 식식성인 흰개미(*Nasutitermes takasagoensis*) 내장에서 리그닌을 분해할 수 있는 *Enterobacter agglomerans*를 분리하였으며, Kinya 등(25)은 *Burkholderia cepacia*가 리그닌 분해효소를 생산한다고 보고한 바 있다. 이와 같은 곤충의 장에 서식하는 우점미생물이 생산하는 효소는 곤충이 섭식한 먹이의 분해와 밀접한 관계가 있는 것으로 사료된다.

본 연구를 통해 *Staphylococcus* 속에 속하는 균주가 단백질 분해 우수세균으로 다수 분리되었다. 선행연구에서 무당벌레 소화기관 내 우점 장내세균은 *Staphylococcus*속 계통군임을 밝힌 바 있다(23). 이상의 결과로부터 *Staphylococcus*속 계통군은 무당벌레 소화기관내에서 미생물 유전생태학적으로 중요한 의미를 부여하는 것으로 판단되었다.

Staphylococcus 속에 속하는 세균류가 응애류(*Dermanyssus gallinae*), 나방류(*Manduca sexta*)의 중장 및 흰개미류 소화기관에서 발견된 바 있으나(15, 34, 42), 이들 공생균들이 분비하는 효소에 관하여 보고되지 않았다. 현재 다양한 환경으로부터 분리된 *Staphylococcus* 속의 protease 생성균주와 본 연구를 통해 선별된 *Staphylococcus* sp. CB2-3 균주의 효소학적 특성을 비교하여 Table 6에 정리하였다. 만성종기증에서 분리한 *S. aureus* V8 (2, 7, 13), 돼지삼출성표피염에서 분리한 *S. hyicus* subsp. *hyicus* (3, 4), 소 우유에서 분리한 *S. caseolyticus* (12), 자연관막 심내막염에서 분리한 *S. epidermidis* (41) 균주가 보고되었다. *S. aureus* V8 균주가 생성하는 protease는 metalloprotease, metalloprotease III이며, *S. hyicus* subsp. *hyicus*는 ShpI, ShpII, *S. caseolyticus*는 neutral protease, *S. epidermidis*는 metalloprotease로 28-42 kDa 정도의 크기를

갖는 것으로 보고되었다. 이들 균주의 효소 활성 최적 pH는 7.0-7.9로 중성 단백질 분해효소였으며 40-60°C에서 효소 활성이 안정한 것으로 보고되었다.

본 연구에서 분리된 *Staphylococcus* sp. CB2-3 균주가 생성하는 단백질 분해효소는 pH 5.0 배지에서 최대 활성을 나타내었으며, 효소는 pH 3.0-7.0에서 70% 이상, 30-50°C에서 80% 이상의 활성을 유지하며 매우 안정한 중온성 산성 단백질 분해효소로 상기의 다양한 환경으로부터 분리된 *Staphylococcus*속 균주가 생성하는 protease와는 상이한 특성을 나타내었다. 한편, 무당거미의 중장에서 분리한 *Serratia proteamaculans*가 생산하는 단백질 분해효소의 경우 최대 활성은 pH 8.0-8.5, 37°C 이었으며, 25-45°C에서 80% 이상의 활성을 유지하는 serralysin 균에 속하는 단백질 분해효소를 생산하는 것으로 보고되었다(28).

미생물 유래 단백질 분해효소는 전체 공업효소 판매량의 70% 이상을 차지하는 상업적으로 매우 유용한 효소이다(38). 현재 산업분야에서 이용되는 단백질 분해효소는 알칼리성 효소들이 대부분을 차지하며 피혁의 탈모 공정과 세제 성분으로 많이 사용되고 있다(18). 산성 단백질 분해효소는 생선, 간장, 치즈 등 식품 발효산업에 이용되고 치즈 제조과정에서 우유응고효소제로 가장 많이 사용된다. 산성 단백질 분해효소를 생산하는 세균으로는 *Xanthomonas* sp., *Pseudomonas* sp. (26), *Bacillus* sp. (30), *Sulfolobus acidocaldarius* (29), *Thermoplasma volcanium* (40) 등이 보고된 바 있다. 이들 균주가 생산하는 산성 단백질 분해효소는 대부분 고온성으로 *Staphylococcus* sp. CB2-3 균주의 효소는 30-50°C 범위에서도 최대 활성도의 80% 이상을 유지하여 산업적으로 응용 가능성이 클 것으로 사료된다.

향후 본 균주의 정제된 효소를 대상으로 *Staphylococcus*속 균주가 생산하는 metalloprotease에 관한 연구와 산성 단백질 분해효소의 병원성 여부 및 안정성에 관한 연구를 통하여 *Staphylococcus* sp. CB2-3 균주의 실용화를 위한 기반연구가 필요하다고 판단된다.

적요

무당벌레 소화기관으로부터 단백질 분해 우수세균 6균주를 분리하였다. 단백질 분해세균의 16S rRNA 유전자 염기서열

을 해석하여 계통학적 특성을 검토한 결과, *Staphylococcus sciuri* subsp. *sciuri* (3균주), *Bacillus subtilis* (1균주), *Bacillus thuringiensis* (2균주)로 확인되었다. 이들 균주 중 pH 5.0 배지에서 58.5 U/ml의 높은 효소 활성을 나타내는 *Staphylococcus* sp. CB2-3을 최종 선발하였다. 효소의 특성을 조사한 결과, pH 4.0-6.0에서 높은 활성을 나타내어 산성 단백질 분해효소임이 확인되었다. 효소의 최적 반응 온도는 40°C 이었으며, 30-50°C의 범위에서 80% 이상의 효소 활성을 유지하였다. *Staphylococcus* sp. CB2-3 균주의 생육과 효소 활성을 위한 최적의 배지성분을 조사하였다. 탄소원으로 0.5% 솔비톨을 첨가하였을 때 효소 활성이 2배로 증가되었으며, 질소원으로 0.5% 탈지유를 첨가한 경우 효소 활성이 2.5배 증가되는 것으로 나타났다. 무기염류로는 KCl, K₂HPO₄, FeSO₄를 첨가하였을 때 효소 활성이 가장 높은 반면에 2가 금속이온인 Co²⁺, Zn²⁺, Mn²⁺, Cu²⁺를 첨가하였을 때는 균의 성장과 효소 활성이 심하게 저해되는 것으로 나타났다.

감사의 말

본 연구는 농촌진흥청 국가연구개발사업의 지원에 의해 이루어진 결과의 일부로서 이에 감사 드립니다.

참고문헌

- Anson, M.L. 1938. The estimation of pepsin, trypsin, papain, and cathepsin with hemoglobin. *J. Gen. Physiol.* 22, 79-89.
- Arvidson, S. 1973. Studies on extracellular proteolytic enzymes from *Staphylococcus aureus*. II. Isolation and characterization of an EDTA-sensitive protease. *Biochim. Biophys. Acta.* 302, 149-157.
- Ayora, S. and F. Gotz. 1994. Genetic and biochemical properties of an extracellular neutral metalloprotease from *Staphylococcus hyicus* subsp. *hyicus*. *Mol. Gen. Evol.* 242, 421-430.
- Ayora, S, P.E. Lindgren, and F. Gotz. 1994. Biochemical properties of a novel metalloprotease from *Staphylococcus hyicus* subsp. *hyicus* involved in extracellular lipase processing. *J. Bacteriol.* 176, 3218-3223.
- Bae, K.S. and H.Y. Park. 2004. Biochemical characterization of an extracellular protease in *Serratia proteamaculans* isolated from a spider. *Kor. J. Microbiol.* 40, 269-274.
- Bersanetti, P., H.Y. Park, K.S. Bae, K.H. Son, D.H. Shin, I.Y. Hirata, M.A. Juliano, A.K. Carmona, and L. Juliano. 2005. Characterization of arazyme, and exocellular metalloprotease isolated from *Serratia proteamaculans* culture medium. *Enzyme Microb. Technol.* 37, 574-581.
- Bjorklind, A. and H. Jornvall. 1974. Substrate specificity of three different extracellular proteolytic enzymes for *Staphylococcus aureus*. *Biochim. Biophys. Acta.* 370, 524-529.
- 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. Gensu of the bacterial community of the gypsy moth larval midgut by using culturing and culture-independent methods. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 293-300.
- Chapman, C.F. 1985. Coordination of digestion. In *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology* (Edited by Kerkut G. A. and Gilbert L.I.). Pergamon Press, New York. 4, 213-240.
- Christopher, M.S.M. and S. Mathavan. 1985. Regulation of digestive enzyme activity in the larvae of *Catopsilia crocale* (Lepidoptera). *J. Insect Physiol.* 31, 217-221.
- Desmazeaud, M.J. and J.H. Hernier. 1971. Specificite de la protease neutre de *Micrococcus caseolyticus*. *Eur. J. Biochem.* 19, 51-55.
- Drapeau, G.R. 1978. Role of a metalloprotease in activation of the precursor of staphylococcal protease. *J. Bacteriol.* 136, 607-613.
- 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.
- Eutick, M.L., R.W. O'Brien, and M. Slaytor. 1978. Bacteria from the gut of Australian termites. *Appl. Environ. Microbiol.* 35, 823-828.
- French, J.R.J., G.L. Turner, and J.F. Bradbury. 1976. Nitrogen fixation by bacteria from the hindgut of termites. *J. Gen. Microbiol.* 95, 202-206.
- Giesecke, U.E., G. Bierbaum, H. Rudde, U. Spohn, and C. Wandrey. 1991. Production of alkaline protease with *Bacillus licheniformis* in a controlled fed-batch process. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 35, 720-724.
- Godfrey, T. and S. West. 1996. Industrial enzymology. 2nd ed. New York, N.Y., Macmillan Publishers Inc. p.3.
- Hagen, K.S. 1962. Biology and ecology of predaceous Coccinellidae. *Annu. Rev. Entomol.* 7, 289-326.
- 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 *Paenibacillus* sp. HY-8 isolated from an herbivorous longicorn beetle. *J. Microbiol. Biotechnol.* 16, 1753-1759.
- Hokusima, S. and S. Takeda. 1975. Artificial diets for larvae of *Harmonia axyridis* Pallas (Coleoptera: Coccinellidae), an insect predator of aphids and scale insect. *Res. Bull. Agr. Gifu Univ.* 38, 49-53.
- Iperti, G. 1999. Biodiversity of predaceous coccinellidae in relation to bioindication and economic importance. *Agricul. Ecosys. Environ.* 74, 323-342.
- Kim, K.K., S.I. Han, C.W. Moon, Y.M. Yu, and K.S. Whang. 2011. Biodiversity and isolation of gut microbes from digestive organs of *Harmonia axyridis*. *Kor. J. Microbiol.* 47, 66-73.
- Kim, K.D., D.S. Park, D.H. Shin, B.N. Han, H.W. Oh, Y.N. Youn, and H.Y. Park. 2006. Characterization of a ligninase producing strain, *Serratia marcescens* HY-5 isolated from *Sympetrum depressiusculum*. *Kor. J. Appl. Entomol.* 45, 301-307.
- Kinya, K., S. Kozaki, and M. Sakuranaga. 1998. Degradation of lignin compounds by bacteria from termite guts. *Biotechnol. Lett.* 20, 459-462.
- Kohei, O., S. Masafumi, F. Kenichi, and M. Sawao. 1987. Purification and properties of a pepstatin-insensitive carboxyl-proteinase from a gram negative bacterium. *Biochim. Biophys. Acta.* 923, 463-469.
- Kwak, J., D.H. Lee, Y.D. Park, S.B. Kim, J.S. Maeng, H.W. Oh, H.Y. Park, and K.S. Bae. 2006. Polyphasic assignment of a highly proteolytic bacterium isolated from a spider to *Serratia proteamaculans*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 16, 1537-1543.
- Lee, K.E., C.H. Kim, H.J. Kwon, J.Y. Kwak, D.H. Shin, D.S. Park, K.S. Bae, and H.Y. Park. 2004. Biochemical characterization of an extracellular protease in *Serratia proteamaculans* isolated from a spider. *Kor. J. Microbiol.* 40, 269-274.

29. Lin, X.L. and J. Tang. 1990. Purification, characterization, and gene cloning of thermopsin, a thermostable acid protease from *Sulfolobus acidocaldarius*. *J. Biol. Chem.* 265, 1490-1495.
30. Mark, P., P. Keith, and D. Roy M. 1995. Characterization of a thermostable pepstatin-insensitive acid proteinase from a *Bacillus* sp. *Int. J. Biochem.* 27, 729-739.
31. Matsuka, M. and I. Okada. 1975. Nutritional studies of an aphidophagous coccinellid, *Harmonia axyridis* (I) Examination of artificial diets for the larval growth with special reference to drone honeybee powder. *Bull. Fac. Arg. Tamagawa Univ.* 15, 1-9.
32. Moon, C.W., K.K. Kim, K.S. Whang, M.J. Seo, Y.N. Youn, and Y.M. Yu. 2011. Characteristics of enterobacteria from *Harmonia axyridis* and effects of *Staphylococcus* spp. on development of *H. axyridis*. *Kor. J. Appl. Entomol.* 50, 157-165.
33. Moon, E.Y., H.W. Oh, P.J. Maeng, and K.S. Bae. 2001. Identification of enteric bacteria from *Nephila clavata*. *Kor. J. Microbiol.* 37, 1-8.
34. Moro, C.V., J. Thioulouse, C. Chauve, P. Normand, and L. Zenner. 2009. Bacterial taxa associated with the hematophagous mite *Dermanyssus gallinae* detected by 16S rRNA PCR amplification and TTGE fingerprinting. *Res. Microbiol.* 160, 63-70.
35. Park, H.C. 1993. Systematics and ecology of Coccinellidae (Insecta: Coleoptera) in Korea. *Ph. D. Thesis. Korea University.*
36. Park, K.T. and Y.C. Park. 1994. Survey on the aphidivorous predators for biological control agents. *RDA. J. Agri. Sci.* 36, 109-118.
37. Park, J.S., K.S. Whang, and J.S. Cheon. 2005. Procedure of microbial classification and identification, pp. 58-103. World Science Korea.
38. Rao, M.B., A.M. Tanksale, M.S. Ghatge, and V.V. Deshpande. 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62, 597-635.
39. Scharf, M.E. and A. Tartar. 2008. Termite digestomes as sources for novel lignocellulases. *Biofuels. Bioprod. Bioref.* 2, 540-552.
40. Semra, K. and O. Hatice. 2007. An extracellular-Pepstatin insensitive acid protease produced by *Thermoplasma volcanium*. *Biores. Technol.* 98, 112-117.
41. Teufel, P. and F. Gotz. 1993. Characterization of an extracellular metalloprotease with elastase activity from *Staphylococcus epidermidis*. *J. Bacteriol.* 175, 4218-4224.
42. van der Hoeven, R., G. Betrabet, and S. Forst. 2008. Characterization of the gut bacterial community in *Manduca sexta* and effect of antibiotics on bacterial diversity and nematode reproduction. *FEMS. Microbiol. Lett.* 286, 249-256.
43. Ward, O.P. 1985. Proteolytic enzymes, pp. 789-818. In M.Y. Murray (ed.), *Comprehensive Biotechnology : The principles, applications and regulations of biotechnology in industry, agriculture and medicine*, vol. 3. Pergamon press Inc., Maxwell House, Fairview Park, Elmsford, New York, USA.
44. Wheeler, M.M., M.R. Tarver, M.R. Coy, and M.E. Scharf. 2010. Characterization of four esterase genes and esterase activity from the gut of the termite *Reticulitermes flavipes*. *Arch. Ins. Biochem. Physiol.* 73, 30-48.