

고추좀잠자리(*Sympetrum depressiusculum*)로부터 분리한 리그닌 분해균주, *Serratia marcescens* HY-5의 특성

김기덕 · 박두상 · 신동하¹ · 한보나 · 오현우 · 윤영남² · 박호용*

한국생명공학연구원 곤충소재연구센터, ¹㈜인섹트바이오텍, ²충남대학교 농업생명과학대학 응용생물학과

Characterization of a Ligninase Producing Strain, *Serratia marcescens* HY-5 isolated from *Sympetrum depressiusculum*

Ki-Duck Kim, Doo-Sang Park, Dong-Ha Shin¹, Bo-Na Han, Hyun-Woo Oh, Young-Nam Youn² and Ho-Yong Park*

Insect Resources Research Center, KRIBB, Daejeon, 305-806

¹Insect Biotech Co., Ltd., Daejeon, 305-811

²Department of Applied Biology, College of Agriculture & Life Sciences, Chungnam Nat'l. Univ., Daejeon, 305-764

ABSTRACT : A ligninolytic bacterial strain was isolated from the digestive tract of a red dragonfly, *Sympetrum depressiusculum*. It was identified as a *Serratia marcescens* HY-5 by 16S rDNA sequence analysis and physiological and biochemical analysis. The isolated strain showed proportional increase of ligninolytic activity to the cell growth in the culture media which include lignin compounds. It showed about 25-45% decomposition of lignin compound by 48 hr incubation especially, showed effective decomposition of monomer lignin compounds, vanillin and guaiacol, and a dimer, dealkaline lignin. PCR amplification of 16S rDNA followed by denaturing gradient gel electrophoresis analysis showed high density of *S. marcescens* HY-5 in the gut of the *S. depressiusculum* at both gut samples which collected at different site.

KEY WORDS : *Sympetrum depressiusculum*, *Serratia marcescens* HY-5, lignin, Insect symbiotic microbe, 16S rDNA, DGGE

초 록 : 고추좀잠자리의 장으로부터 리그닌 분해활성을 보이는 미생물을 분리하였으며 16s rDNA 서열분석 및 생리·생화학적 동정에 의해 *Serratia marcescens*에 속하는 새로운 균주로 밝혀졌다. 분리된 균주는 리그닌 화합물을 포함하는 배지에서 배양하였을 때 cell growth의 증가에 따라 리그닌 화합물에 대한 분해능이 증가하였으며 48시간의 배양에 의해 20-45%의 분해능을 나타내었고, 특히 monomer 화합물인 vanillin 및 guaiacol과 dimer 화합물인 dealkaline 리그닌에 대한 분해능이 높았다. 분리된 균주 *S. marcescens* HY-5는 PCR에 의한 16S rDNA의 증폭과 denaturing gradient gel electrophoresis에 의한 장내 세균의 분포를 조사하였을 때 높은 밀도의 분포를 나타내었으며 서로 다른 지역에서 채집된 고추좀잠자리에서 공통적으로 발견되는 특징을 보여주었다.

검색어 : 고추좀잠자리, 리그닌, 곤충공생미생물, 16S rDNA, DGGE

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

서 론

곤충은 지구상에서 가장 번성한 생물군으로서 다양한 먹이습성과 높은 생물학적 다양성을 나타내고 있다. 최근 이러한 곤충의 생물특성을 고려한 곤충의 공생 미생물을 유용한 생물자원으로 활용하고자 하는 연구가 증가되고 있으며, 특히 곤충의 생육과 밀접한 관련이 있는 장내 미생물에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다. 실례로, 장내 미생물이 흰개미의 소화 및 영양에 관여하고 있다는 연구(Breznak, 1982; Breznak and Brune, 1994)와 동물성 먹이를 포식하는 무당거미로부터 고효율의 단백질 분해 효소 생산 균주를 분리하여 산업적으로 응용하고 있는 사례(Lee *et al.*, 2004), 자일란(xylan)이 풍부한 식물의 줄기나 목질부를 섭식하는 털두꺼비하늘소의 장으로부터 고효율의 자일라나제(xylanase)를 생산하는 균주를 분리하고 특성을 규명한 사례(Heo *et al.*, 2006)와 그 외 나비목, 딱정벌레목을 포함하는 여러 가지 곤충에서 분자생물학적 기법을 활용한 장내 미생물의 생태적 연구들이 보고되고 있다(Egert *et al.*, 2003; Broderick *et al.*, 2004).

리그닌(lignin)은 식물세포벽의 중엽층과 1차 세포벽에 많이 분포하는 고분자 화합물로 cellulose 그리고 hemicellulose와 함께 식물세포벽을 구성하는 성분 중의 하나이다(Tuncer *et al.*, 1999). 리그닌은 매우 복잡한 구조를 가지고 있으며 이런 복잡한 구조를 가진 리그닌 분해를 쉽게 해명하기 위하여 리그닌과 유사한 모델 화합물을 이용하였다. 그리고 리그닌 구조에 대한 모델 화합물은 생화학적 분해에 대한 연구에 널리 이용되었다(Kinya *et al.*, 1998). 자연상태의 리그닌은 페놀구조와 대다수의 식물로 이루어진 비페놀구조로 나눌 수 있으며(Claudia *et al.*, 1996) 리그닌에 발견되는 결합들이 다양성을 가지고 있기 때문에 리그닌은 잘 분해가 되지 않을 뿐만 아니라 미생물에 의한 리그닌 분해기작을 연구하는데 있어서 상당한 어려움을 겪고 있다(Kirk, 1984). 이러한 난분해성 물질인 리그닌을 분해할 수 있는 곤충관련 미생물로는, 흰개미(*Nasutitermes takasagoensis*) 내장에서 French (1976) 등이 *Enterobacter agglomerans*를 분리하였으며, Kinya (1998) 등은 *Burkholderia cepacia*가 ligninase를 생산한다고 보고하였다. 그러나 흰개미(*Macrotermes gilvus*) 내장에서 리그닌 분해에 있어 박테리아의 관련여부는 아직 정확하게 밝혀지지 않았다(Hyodo *et al.*, 2000).

본 연구에서는 다수의 곤충으로부터 유용 효소를 생산하는 미생물을 탐색하였으며, 그 중에서 고추좀잠자리의 장으로부터 난분해성 물질인 리그닌을 효율적으로 분해하는 미생물을 분리하고 특성을 조사하였다.

재료 및 방법

대상곤충

리그닌 분해활성을 가지는 미생물의 탐색에 이용된 고추좀잠자리(*Sympetrum depressiusculum*)는 7월~8월 사이에 한국생명공학연구원의 잔디밭과 계룡산 인근에서 채집한 성충을 분류 동정하여 이용하였다.

장내미생물의 분리 및 선별

대상곤충에서 미생물을 분리하기 위한 해부는 Kinya (1998)등이 사용한 방법을 바탕으로 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 LB한천배지(0.5% yeast extract, 1% trypton, 1% NaCl, 1.8% agar)에 도말 한 다음 37°C에서 24-48시간 배양하였다. 여기서 나온 colony 각각의 성상 및 형태를 확인 후 균주를 선별하였다.

리그닌 분해균주의 선별

리그닌 분해능은 Sundman과 Nase (1971)가 개발한 simple plate test방법에 따라 조사하였다. 0.025-0.1% 리그닌(lignosulfonate)을 기본배지(glucose 0.5%, NH₄-tartrate 0.5%, malt extract 0.1%, CaCl₂·H₂O 0.001%, NaCl 0.01% FeCl₃ 0.001%, pH 5.8)에 첨가한 고체배지에 균을 배양한 후 배지에 자란 colony들을 증류수로 세척하여 1% FeCl₃와 1% K₃[Fe(CN)₆]을 동량 혼합한 시약을 한천배지 위에 처리하여 colony주위의 clear zone을 확인하였으며 그 결과 우수한 리그닌 분해활성을 보이는 균주를 선택하여 동정하고 *Serratia marcescens* HY-5라 명명하였다.

선별 균주의 동정

선발된 균주의 동정을 위하여 생리·생화학적 특성조사 및 미생물의 세포지방산 조사를 실시하였다. 미생물의

생리·화학적 실험은 30±2°C에서 수행하였으며, oxidase 활성, catalase 활성, indol 생성, nitrate 환원과 탈질산화는 Smibert와 Krieg 방법(1994)을 사용하였고, 추가적인 생화학 실험은 API 20E (BioMerieux St. Louis, Missouri USA)의 상용되는 kit를 이용하여 수행하였다. 세포지방산의 성분 분석과 정량은 MIS library generation software (Microbial ID)를 이용하여 수행하였으며, 결과는 MIDI Aerobe Library (version 3.8)와 비교하였다.

리그닌 모델 화합물을 이용한 리그닌 분해활성의 측정

분리된 균주 *S. marcescens* HY-5의 리그닌 화합물에 대한 분해능을 조사하기 위하여 몇 가지 리그닌 모델 화합물을 배양액에 첨가하여 배양시간에 따른 모델화합물의 분해정도를 측정하였다. LB배지에 단량체 리그닌 화합물로서 vanillic acid, guaiacol, phenol 및 *p*-coumaric acid를, 이량체 리그닌 화합물로서 dealkaline 리그닌을 배양액에 200 µg/ml (w/w)이 되도록 첨가하고 37°C에서 배양하면서 각 시간별로 시료를 채취하여 원심분리한 상등액에 존재하는 리그닌 화합물의 감소율을 조사하였다. 감소율은 배양전의 리그닌 compounds의 양에서 시간이 지남에 따라서 감소되는 양을 spectrophotometer (Smartspec™ 3000, Bio-Rad, USA)를 사용하여 275 nm에서 측정하였다.

미생물에서의 DNA 분리

HY-5의 genomic DNA는 Rochell (1992) 등의 방법을 변형하여 분리하였다. 미생물을 LB고체배지에서 37°C에서 24시간 배양한 후, single colony를 이용하여 genomic DNA를 분리하였다. 미생물을 STES 완충용액(0.5 M NaCl, 0.2 M Tris-HCl, 0.01 M EDTA, 1% SDS, pH 7.6) 100 µl에 현탁 후, 전체 부피의 80%정도의 glass bead를 넣어 미생물을 파쇄하였다. 파쇄된 미생물용액에 200 µl의 TE (10 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 8.0) 완충액과 300 µl의 phenol-chloroform를 첨가하여 잘 혼합한 후 12,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액을 취하였다. 분리한 상등액은 1 µl RNase가 들어있는 새로운 튜브에 상등액을 250 µl가 되도록 맞춰준 후, 37°C에서 30분간 반응시켰다. 25 µl의 3 M sodium acetate를 섞고, 100% 에탄올 500 µl 첨가하여, 4°C에서 20분간 방치한 후 12,000 rpm에서 10분간 원심분리하였다. 원심분리 후 상등액을 제거하고 침전물을 70% 에탄올로 2회 반복 세척하였다. 분리한 genomic DNA에서 16S rDNA를 얻

기 위해 PCR 반응을 수행하였다. 16SrDNA의 conserved region인 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG (27Fprimer)를 정방향 primer로 5'-GGTTACCTTGTTA CGACTT (1492R)를 역방향 primer로 사용하였다. PCR의 반응온도는 초기에 94°C에서 5분간 가열하여 denaturation 후, 94°C에서 1분간 denaturation, 55°C에서 1분간 annealing 및 72°C에서 1분 50초간 반응하였으며 이 반응을 30회 반복 후 종료하였다. 반응이 끝난 PCR 산물의 염기서열을 결정하여 GenBank data base 검색을 통하여 16S rDNA 상동성을 조사하였다.

고추좀잡자리 장내 미생물의 분석

고추좀잡자리의 장내 미생물 분석을 위하여 16S rDNA 단편의 PCR 증폭과 DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis)를 수행하였다(Hastings, 1999). 고추좀잡자리에서 장을 분리한 다음 전체 DNA를 추출하여(Ultra-Clean Soil DNA kit, Mo Bio) PCR에 이용하였다. PCR은 1 µl의 전체 DNA 추출물(50-500 ng/µl)에 10배의 Taq DNA 중합효소 완충액 5 µl, 2.5 mM의 dNTPs (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) 5 µl, 3.2 pmol의 정방향 primer와 역방향 primer를 각각 5 µl, 1-2 단위의 Taq DNA 중합효소(Promega, USA)를 첨가하여 최종 50 µl 반응액이 되도록 증류수를 더하였다. Primers는 진핵세균의 16S rDNA의 V3 부위에 해당하는 193 뉴클레오티드 증폭을 위해 합성하였다. DGGE를 위한 특이 primer로서 G-C 클램프 서열을 포함하는 정방향 프라이머와 G-C 클램프 서열을 포함하지 않는 역방향 프라이머를 사용하여 PCR를 수행하였다. 상기 프라이머는 두 쌍으로 그 염기서열 및 대장균에서의 16S rRNA 유전자에 해당하는 염기번호는 하기와 같이 표시하였다.

정방향 priemr : 5'-CCT ACG GGA GGC AGC AGC GCC CGG GGC GCG CCC CGG GCG GGG CGG GGG CAC GGG GGG-3' (*E. coli* 16s rDNA position 341-358),

역방향 priemr : 5'-ATT ACC GCG GCT GCT GG-3' (*E. coli* 16s rDNA position 534-517)

PCR 반응은 94°C에서 5분간의 denaturation을 수행한 후 94°C에서 5분의 denaturation, 65°C에서 1분의 annealing, 72°C에서 3분의 extension을 20회 반복하였고 이 반복구간에서 2반복 당 annealing 온도가 1°C씩 감소시켰다. 다시 94°C에서 5분의 denaturation과 55°C에서 1분의 annealing, 72°C에서 3분의 extension을 10회 반복하고

마지막으로 72°C에서 10분간 extension으로 마무리하고 4°C에서 유지되었다. PCR 산물의 DGGE 분석은 Dcode 시스템(Bio-Rad, USA)을 이용하여 분석하였으며, 30%-70% (100% = 7 M urea, 40% deionized formamide)의 화학적 선형 구배가 형성된 8% (w/v) 아크릴아마이드 젤(acrylamide : bis-acrylamide 37.5 : 1 w/w)을 이용하였다. 전기영동은 20 µl의 PCR 산물을 loading 후 TAE 완충액(40 mM Tris, 20 mM HoAc, 1 mM EDTA, pH 7.4)에서 60°C, 12시간 동안 60 V의 전압하에서 실시하고 전기영동 후 젤을 SYBR green 1에서 30분간 염색하였다.

결과 및 고찰

리그닌 분해 균주의 분리

야외에서 채집한 다수의 곤충으로부터 장을 분리하여 리그닌 분해균주의 분리를 시도하였으며 그 중 고추즙잡자리 성충의 장으로부터 simple plate test 방법에 의해 우수한 리그닌 분해균주를 선별하였다. 리그닌 분해균주의 선별에 이용된 simple plate test 방법은 ferrichloride와 potassium ferricyanide가 페놀기와 반응하여 리그닌에서 페놀기의 분해정도만을 측정할 수 있다는 단점이 있지만 다른 리그닌 분석법과는 달리 빠르고 쉽게 육안으로 그 활성을 확인할 수 있는 장점이 있다.

균주의 생리·생화학특성 조사

선별된 균주의 동정을 위하여 균주의 genomic DNA를 분리하였고, 이를 주형으로 하고 16S rDNA를 PCR로 cloning 한 다음 전체 염기서열을 결정하고 이를 Gen-Bank data base 검색을 실시한 결과 *Serratia* sp.의 16S rDNA와 97.3-98.2%의 높은 상동성을 가짐을 알 수 있었다(Table 1).

또한 균주의 추가적인 동정을 위하여 생리·생화학특성조사를 하였다. 그 결과 분리된 균주는 urease, β-galactosidase, citrate 및 acetone 생성능이 있으며 glucose, mannitol, saccharose 등에 대한 산 생성능력이 있었다(Table 2). 탄소원의 이용능을 조사한 결과 dextrin, fructose, galactose, maltose, glycerol 등을 탄소원으로 이용하였다(Table 3). 세포내 구성 지방산 함량은 C16:0 straight-chain saturated fatty acid는 32.3%, C18:1 straight-chain monounsaturated fatty acid가 13.3% 그리고 C17:0 straight-chain saturated fatty acid가 11.9%로 대부분을 차지하였

Table 1. Similarity matrix based on 16S rDNA sequence of *S. marcescens* HY-5 and other bacterial strains

Strain	Accession No.	Similarity (%)
<i>S. marcescens</i>	DSM 30121T	98.26
<i>S. marcescens</i>	ATCC 13880T	97.35
<i>K. pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i>	JCM 1662T	95.81
<i>K. planticola</i>	ATCC 33531T	95.65
<i>K. pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i>	ATCC 13883T	95.50
<i>K. oxytoca</i>	JCM 1665T	95.33
<i>K. pneumoniae</i> subsp. <i>ozaenae</i>	ATCC 11296T	95.33
<i>S. ficaria</i>	JCM 1241T	95.21
<i>S. liquefaciens</i>	JCM 1245T	95.18
<i>S. rubidaea</i> str. Ewing	2199-JCM 1240T	95.05

Table 2. Physiological characterization of *S. marcescens* HY-5

Physiological property	
Orthonitroiphenyl β-D galactopyranoside	+
Arginine dehydrolyase	-
Lysine decarboxylase	-
Ornithine decarboxylase	+
Citrate	+
Production of H ₂ S	-
Urease	+
Tryptophan deaminase	-
Indole	-
Acetone	-
Proteolysis of gelatin	+
Acid production from	
Glucose	+
Mannitol	+
Inositol	+
Sorbitol	+
Rhamnose	-
Saccharose	+
Melibiose	+
Amygdaline	+
Arabinose	+
Osidade	+

+, Positive reaction; -, Negative reaction

다(Table 4).

또한, 분리된 균주의 형태적 특성을 살펴본 결과, 포자

Table 3. Assimilation of carbon sources by *S. marcescens* HY-5

Carbon compound	Assimilation
Dextrin	+
Glycerol	-
Cellobiose	-
D-galactose	+
α -D-lactose	-
Maltose	+
D-sorbitol	+
Sucrose	+
Xylitol	+
D-raffinose	-
L-rannose	-

Table 4. Cellular fatty acid composition of *S. marcescens* HY-5

Fatty acids	Compositions (%)
C12:0	4.1
C14:0	4.9
C14:0 2OH	3.3
C16:0	32.3
C17:0 cyclo	11.9
C18:1 w7c	13.3
C19:0 cyclo w8c	2.1

를 생성하지 않는 그람 음성균이며, 0.3 내지 0.5 μm 의 폭과 0.7 내지 1.2 μm 의 길이를 갖는 막대형의 세포로서, 운동성이 강하여 장내세균류(Enterobacteriaceae)와 유사한 형태적 특징을 가지고 있음을 확인하였다.

이상과 같이 생리·화학적 및 미생물의 세포지방산 조사 결과 *S. marcescens*의 유연군으로 분류되었으며, 최종적으로 *S. marcescens* HY-5 (KCTC 1009BP)로 동정하였다.

리그닌 모델 화합물에 의한 분해능력 검정

고추참잠자리의 장으로부터 분리된 *S. marcescens* HY-5 균주에 대하여 저분자 방향족 화합물인 리그닌 모델화합물에 의한 분해능을 조사하였다. 우선 기본배지인 LB 배지에 선별된 균주를 각각의 리그닌 monomer화합물인 vanillic acid, vanillin, guaiacol 그리고 p -coumaric acid를 dimer 화합물로서는 dealkaline 리그닌을 200 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 37°C 조건하에 각 시간별 분해능을 측정하였다. 배양 결과 cell growth는 배양 6시간 후부터 증가하기 시작하여 배양 30시간에 대수증식기에 이르러 감소하였다가 배양

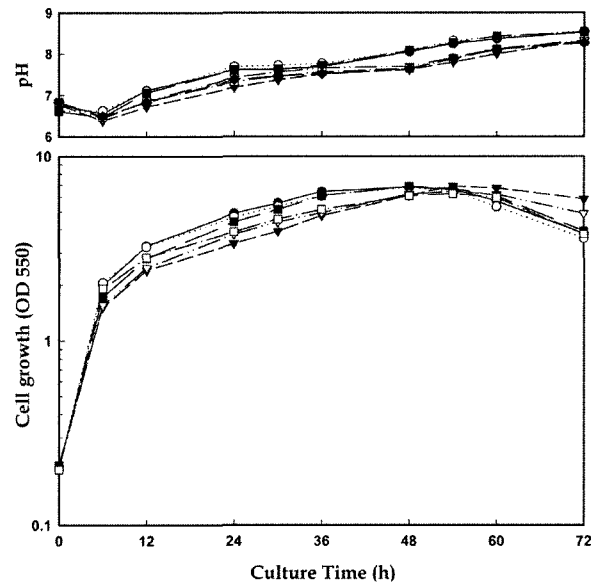


Fig. 1. Time profiles of cell growth and pH changes of *S. marcescens* HY-5 on LB medium contained each lignin model compound at 37°C. Symbols are : ●, dealkaline lignin; ○, Vanillic acid; ▼, vanillin; ▽, guaiacol; ■, p -coumaric acid; □, phenol.

48시간에 정지기에 도달하는 양상을 보였다. 또한 pH는 배양 6시간에 pH 6.5를 유지하다가 pH 7~8의 범위에서 상승하는 양상을 보였다(Fig. 1). 리그닌 모델 화합물에 의한 분해능은 배양 결과 vanillic acid, p -coumaric acid 그리고 phenol을 함유한 배지에서는 낮은 분해능을 나타내는 양상을 보였으나 vanillin, guaiacol 그리고 dealkaline 리그닌의 배지에서 그 분해능이 보였다. 즉, 선별된 균주를 12시간별로 72시간 동안 배양한 후 그 분해능을 조사한 결과, 20~45%의 분해능을 나타내었다. 또한 cell growth에서와 같이 배양 48시간에 그 분해능이 정지함을 알 수 있었다(Fig. 2).

현재까지 리그닌 분해효소를 생산하는 미생물로는 대부분 곰팡이류가 보고 되어 있으며 세균으로는 가장 잘 알려져 있는 것은 흰개미의 장으로부터 분리한 *Burkholderia cepacia*가 있다. 이상의 결과로 고추참잠자리의 장으로부터 분리된 *S. marcescens* HY-5 균주는 Kinya등 (1998)의 논문에서 보인 *Burkholderia cepacia* KK01의 분해능에 비해 낮은 분해능을 보였지만, 배양시간에 있어서 비교적 짧은 배양기간 내에 우수한 리그닌 분해능을 나타내어 본 균주가 생산하는 리그닌분해효소에 대한 특성규명과 이용가능성에 대한 진전된 연구가 기대된다.

리그닌 분해균주 *S. marcescens* HY-5 균주의 장내분포

HY-5 균주의 고추좀잠자리의 장내존재를 확인하기 위하여 잠자리 장으로부터 total DNA를 분리하고 PCR과 DGGE에 의한 16S rDNA 단편의 패턴을 분석하였다(Fig. 3). 분리된 균주 HY-5는 DGGE 분석 시 3개의 band 패턴을 보여주고 있으며 서로 다른 지역(한국생명공학연구원, 계룡산 인근)에서 채집된 개체로부터 분리한 고추좀잠자리의 total DNA에 대한 DGGE 분석 시 이와 동일한 위치에서 3개의 band가 관찰되며 더구나 이들 band가 다른 세균들에 비해 매우 강하게 나타난 것으로 보아 HY-5 균주가 고추좀잠자리 장내에서 우점종으로 존재하는 미생물인 것으로 판단된다. *Serratia* 속의 세균들 중 많은 종들이 면역능이 저하된 환자에게 잘 감염하는 그람음성 세균이며 장내에서 기생하는 기회적인 병원성 세균이다 (Marty *et al.*, 2002). *Serratia*는 또한 많은 곤충으로부터 분리되었으며 공생관계를 가지거나 병원성 관계를 가지는 것으로 알려져 있어서(Schmitz and Braun, 1985; Grkovic *et al.*, 1995) 많은 연구의 관심의 대상이 되고 있다. 또한 이 속의 미생물들 중에서 단백질 가수분해효소, 키틴 분해효소, 지방분해효소 등 산업적으로 유용한 다양한 종류의 가수분해효소를 세포 외 환경으로 분비하여 산업적으로 많이 이용되고 있다(Hines *et al.*, 1988; Kawai *et al.*, 1998). 날벌레등의 작은 곤충을 섭식하는 식충성의 고추좀잠자리의 장내 환경에서 리그닌 물질의 분해에 관여하는 *Serratia* 속의 균주가 분리되었으며 이 균주가 매우 높은 밀도로 존재하는 것으로 추정되는 결과는 의외의 경우라 할 수 있다. 곤충의 표피는 polyphenol complex인 리그닌과 유사한 구조를 가지는 큐티클층을 가지며 이는 phenoloxidase라는 효소에 의해 phenolic compound 산화에 의해 구성된다. 또한 이 효소는 생체방어기작과정에서 외부 이물질의 침입이나 상처에 의해 활성화되어 phenolic compound인 quinone 등으로부터 불활성의 흑갈색물질인 melanin을 합성하여 상처부위를 막거나 외부침입자의 주변에 nodule을 형성하기도 하며 또한 곤충 체벽의 구성성분이 되는 것으로 알려져 있다 (Lai-Fook, 1966; Ashida and Brey, 1997; Park *et al.*, 1997). 이러한 관점에서 본 연구에서 분리된 리그닌 분해균주가 장내에서 고추좀잠자리가 섭식한 먹이에 존재하는 phenolic compound의 분해에 관련되어 있을 가능성이 있으며 곤충과의 공생적 기능에 있어서 어떤 역할을 담당할 지에 대한 보다 많은 연구가 필요할 것으로 생각한다.

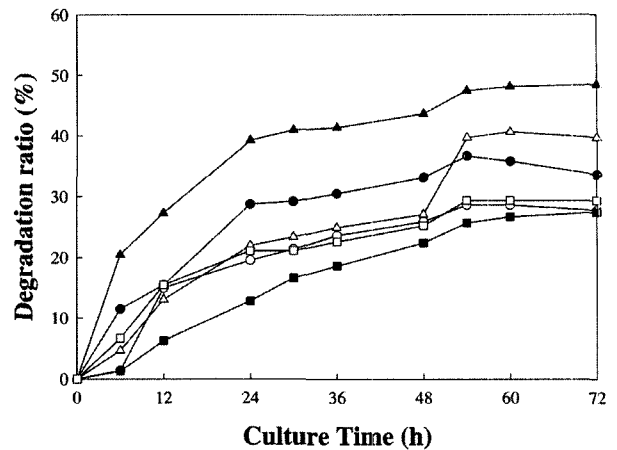


Fig. 2. Time profiles of lignin model compound degradation through the cultivation of *S. marcescens* HY-5 on LB medium contained each lignin model compound at 37°C. Symbols are : ●, dealkaline lignin; ○, Vanillic acid; ▼, vanillin; ▽, guaiacol; ■, p-coumaric acid; □, phenol.

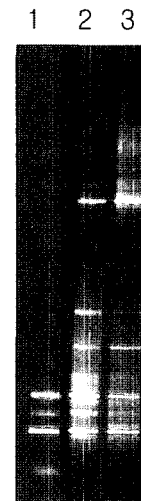


Fig. 3. DGGE profiles of 16S rDNA fragment amplified by PCR using two primers designed based on the 16S rDNA sequence of *E. coli*. Forward, nt 341-358 with GC clamp; reverse, nt 534-517 without GC clamp. Lane 1, PCR amplified from genomic DNA of *S. marcescens* HY-5; Lane 2, total DNA isolated from the intestine of *S. depressiusculum* collected near KRIBB; Lane 3, total DNA isolated from the intestine of *S. depressiusculum* collected near Gyeryong Mt.

감사의 글

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

Literature Cited

- Ashida, M and P.T. Brey. 1997. Recent advances in prophenoloxidase research. pp. 135-172 in *Molecular Mechanisms of the Insect Immune Response*, eds. by P.T. Brey and D. Hultmark, Chapman and Hall, London.
- 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.
- Claudia, E., T. Ulrike, and L. Karl-Erik. 1996. The ligninolytic system of the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: Purification and characterization of the laccase. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 1151-1158.
- 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.
- 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.
- Grkovic, S., T.R. Glare, T.A. Jackson, and G.E. Corbett. 1995. Genes essential for amber disease in grass grubs are located on the large plasmid found in *Serratia entomopila* and *Serratia proteamaculans*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 2218-2223.
- Hastings, R. 1999. Application of denaturing gradient gel electrophoresis to microbial ecology. pp 175-186. in *Environmental monitoring of bacteria*. eds by C. Edwards. 333 pp. Humana Press, New Jersey.
- 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.
- Hines, D.A., P.N. Saurugger, G.M. Ihler, and M.J. Benedik. 1988. Genetic analysis of extracellular proteins of *Serratia marcescens*. *J. Bacteriol.* 170: 4141-4146.
- Hyodo, F., T. Inoue, J.I. Azuma, I. Tayasu and T. Abe. 2000. Role of the mutualistic fungus in lignin degradation in the fungus-growing termite *Macrotermes gilvus* (Isoptera; Macrotermitinae). *Soil Biology & Biochemistry* 32: 653-658.
- Kawai, E., H. Akatsuka, A. Idei, T. Shibatani, and K. Omori. 1998. *Serratia marcescens* S-layer protein is secreted extracellularly via an ATP-binding cassette exporter, the Lip system. *Mol. Microbiol.* 27: 941-952.
- Kinya, K., S. Kozaki and M. Sakuranaga. 1998. Degradation of lignin compounds by bacteria from termite guts. *Biotechnol. Lett.* 20: 459-462.
- Kirk, T.K. 1984. Degradation of lignin. pp 399-437 in *Microbial degradation of organic compounds*. eds. by Gibson, D.T., Marcel Dekker, New York.
- Lai-Fook. 1966. The repair of wounds in the integument of insects. *J. Insect Physiol.* 12: 195-226.
- 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 proteamaculans* isolated from a spider. *Kor. J. Microbiol.* 40: 269-274.
- Marty, K.B., C.L. Williams, L.J. Guynn, M.J. Benedik, and S.R. Blanke. 2002. Characterization of a cytotoxic factor in culture filtrates of *Serratia marcescens*. *Infect. Immun.* 70: 1121-1128.
- Park, D.S., S.W. Shin, M.G. Kim, S.S. Park, W.J. Lee, P.T. Brey, and H.Y. Park. 1997. Isolation and characterization of the cDNA encoding the prophenoloxidase of fall webworm, *Hyphantria cunea*. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 27: 983-992.
- Rochelle, P.A., J.C. Fry, R.J. Parkes and A.J. Weightman. 1992. DNA extraction for 16S rRNA gene analysis to determine genetic diversity in deep sediment communities. *FEMS Microbiol. Lett.* 100: 59-66.
- Schmitz, G. and V. Braun. 1985. Cell-bound and secreted proteases of *Serratia marcescens*. *J. Bacteriol.* 161: 1002-1009.
- 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.
- Sundman, V. and L. Nase. 1971. A simple plate test for direct visualization of biological lignin degradation. *Paper och Tra.* 53: 67-71.
- Tuncer, M., A.S. Ball, A. Rob and T.W. Michael. 1999. Optimization of extracellular lignocellulolytic enzyme production by a thermophilic actinomycete *Thermomonospora fusca* BD25. *Enzyme and Microb. Technol.* 25: 38-47.

(Received for publication 9 August 2006;
accepted 18 December 2006)