

특집 : 미생물 자원을 이용한 신소재 개발 및 응용

## 곤충미생물의 산업적 이용

박 호 용

한국생명공학연구원 유전자원센터

### Utilization of Microorganisms from Insects

Ho-Yong Park

Genetic Resources Center, Korea Research Institute of Biscience and Biotechnology, Taejon 305-333, Korea

#### 서 론

현존 지구상의 생물중 가장 많은 종을 차지하고 있는 곤충(昆蟲, insects)은 지구생태적으로 인류보다 더 선점자이며 뛰어난 환경적응력으로 인해 전세계 도처에 걸쳐 성공적으로 서식하고 있다. 미생물 또한 흑한의 극지방부터 적도지방, 열수(熱水) 및 심해까지 다양하게 존재하고 있으며, 이들도 곤충과 마찬가지로 실제 존재하리라고 추정되는 종류 전체의 극히 일부만이 우리에게 알려져 있다. 따라서 확률적으로 곤충과 미생물은 서로의 생존방식에 있어 생태적으로나 진화적으로 어떤 형태로든 상호 밀접한 관계를 가지고 있을 가능성이 높다고 생각된다. 인류와 곤충은 생존의 경쟁자로서 또는 협력자로서 오랜 역사동안 함께 살아왔으며, 이러한 관점에서 곤충미생물을 인식하고 관련연구도 수행되었다. 곤충미생물(昆蟲微生物, insect-pathogenic microorganisms), 곤충공생미생물(昆蟲共生微生物 insect symbionts) 및 기타 공존미생물(co-existent microbes)로 구분할 수 있다. 여기에서는 곤충미생물의 산업적 이용을 위한 기본 정보제공 측면에서 곤충병원미생물과 곤충공생미생물의 특성, 관련 연구 및 이용 현황에 대해 간단히 소개하고자 한다.

#### 곤충병원미생물

다른 모든 생명체와 마찬가지로 거의 대부분의 곤충도 일생동안 태어나서 늙어가고 병들어 죽는 과정(生死病死)을 겪는다. 병(病)은 정상적인 건강상태가 유지되지 못한 경우를 일컫는데, 원인은 병원미생물(바이러스, 세균, 곰팡이, 리케차 등)에 의한 것과 비병원체(화학물질, 자외선, 고온, 저온, 높은 개체밀도, 영양부족, 먹이오염 및 기타 물리적 요인 등)에 의한 것이 있다. 그 가운데 좁은 의미의

병, 즉 질병(疾病)은 병원체에 의해 발생하는 것을 말한다. 곤충병원미생물은 곤충에 질병을 일으키는 미생물로서 기계적 손상이나 영양탈취, 독성물질 생산의 방법으로 숙주 곤충을 감염(infection), 발병(disease), 사망(death)시킨다.

곤충병원미생물에 대한 역사적 기록으로는 B.C. 330년 경 Aristoteles가 꿀벌의 병을 최초로 관찰, 문헌적으로 기록하기 시작한 후, Virgil(B.C.30년경), Pliny(A.D. 77년)가 꿀벌의 병을 보고하고, 백강병 누에관찰(920년)에 이어, 1834년 Bassi는 백강병균이 누에병의 원인이라는 것을 실험적으로 증명하였으며, 1865년 Pasteur는 누에미립자병과 연화병을 연구하고 병원미생물설을 확립하였다. 1899년 Metchnikoff는 흑강병균으로 해충방제를 시도하였으며, 1907년 von Prowazek은 다각체병 누에체액 여과액의 병원성을 증명하였다. 1908년 White는 꿀벌의 병원세균을 분리하였으며, 1911년 Berliner는 *Bacillus thuringiensis* (B.t)를분리하고, 1927년 B.t의 실용화 및 제제화실험을 시도하였다. 1934년 Bergold는 누에핵다각체로부터 바이러스입자를 분리하였다. 1947년 Steinhaus가 '곤충병리학원

Table 1. Biological diversity—crunching the number (Wilson, 1988)

주요 生物群	Number identified	% of estimated total
Micro-organism(微生物)	5,760	3~ 27%
Insects/Invertebrates (昆蟲 /無脊椎動物)	1,020,561	3~ 27%
Plants(植物)	322,311	67~ 100%
Fish(魚類)	19,056	83~ 100%
Birds(鳥類)	9,040	94~ 100%
Reptiles/Amphibians (爬蟲類 兩棲類)	11,757	90~ 100%
Mammals(哺乳類)	4,000	90~ 95%
Total	1,329,458	

E-mail: hypark@mail.kribb.re.kr  
Phone: 82-42-860-4650, Fax: 82-42-860-4659

리'를 저술하면서 더욱 학문적 체계를 갖추고, 1959년 J. Insect Pathology(후에 J. Invertebrate Pathology로 바뀜)가 창간되었고 1960년 미국에서 BT 제제가 농약으로 등록인가 되었다. 현재 세계적으로 여러 종류의 바이러스, 세균, 사상균, 리케차, 원생동물 등이 효과적이고 환경친화적 해충방제를 위한 산업적 균주로 이용되고 있다.

곤충병원미생물은 사람이나, 가축, 식물에는 전혀 해가 없으면서 대상 해충을 효과적으로 방제할 수 있는 특성으로 인해 선진각국에서는 비교적 오래전부터 자국의 환경에 적합한 곤충병원미생물을 발굴, 대량생산, 제제화하여 실용화하고 있다. 특히 최근 세계적인 화학 및 농약제품회사들이 화학분야에서 생물분야 집중 및 미생물살충제 시장 진출전략 강화 등의 움직임과 함께 국내기업 및 정부도 관련대책을 준비중이다. 특히 상대적으로 좁은 국토면적과 빈약한 부존자원을 지닌 우리나라의 경우, 그린라운드(GR) 등 WTO체제 출범이후의 세계적 개방화 흐름에 적극적으로 대응할 수 있는 국내 자생의 곤충병원미생물을 이용한 미생물살충제 개발등을 통해 국가경쟁력을 극대화시킬 필요성이 시급히 요청되고 있다. 현재 전세계 농약 시장에서 생물농약이 차지하고 있는 비중은 아직 미약하지만(약 5%), 전체 농약시장규모가 정체적인데 비해 생물농약은 중요성이 급격히 인식되어 연평균 약 20%이상의 성장을 하고 있어 수년내로 상당한 규모의 시장형성이 예측된다. 국내의 경우 일부 외국인산 생물농약이 사용되는 도입초기단계이며, 국내 전체 농약시장 약 8,000억원중 살충제가 약 3,000억원을 점유하고 있다(99, 농약연보).

곤충바이러스는 높은 숙주특이성과 강한 병원력으로 인해 발견이래 많은 주목을 받아왔다. 그 중 Baculovirus는 지금까지 약 500종의 곤충에서 발견되었으나 척추동물이나 식물에서는 전혀 발견되지 않고 이들을 감염시키지도 않는 장점이 있으며, circular supercoiled dsDNA의 핵산을 지닌 바이러스 입자가 거대한 크기의 다각체단백질(polyhedron)에 의해 약 알칼리성의 소화액등에 다각체단백질이 분해되어 방출(release)된 바이러스 입자가 증장세포를 통과하여 숙주세포로 이동하고, fusion이나 viropexis의 방법으로 세포막을 통과, 바이러스입자를 싸고 있는 coat protein을 벗고(uncoating), 핵내로 들어간다. 이렇게 침입한 바이러스는 감염된 숙주세포의 핵내에서 72시간내에 자신의 핵산과 단백질을 급격히 복제, 합성, 증식(replication)하고 이렇게 만들어진 바이러스입자들이 다시 많은 다각체를 형성(assembly)한다. 그 후 물리적 압력 등으로 감염세포는 파괴되고, 혈림프나 개체밖으로 방출된 바이러스 입자나 다각체는 다시 주변의 세포나 곤충의 2차 감염원으로 작용한다. Baculovirus는 주로 인시목 곤충의 지방체(脂肪體, fat body), cuticle, 혈구, 기관 및 생식조직

에 감염되며, 감염된 숙주곤충은 곧 행동이 느려지고, 섭식을 중단하며 체액에 충만한 바이러스다각체로 인해 몸마디가 기형적으로 붓고, 수일후엔 나뭇가지 등 주변의 높은 곳으로 이동하여 배다리를 부착한 채 역V자형으로 매달려 죽는다. Baculovirus는 현재 미생물살충제로 매우 효과적으로 널리 이용되고 있으며, 최근 생명공학 기술의 발달과 함께 다각체단백질(polyhedrin) 유전자 및 promotor를 이용한 외부유전자 발현벡터(expression vector)로도 대단히 각광을 받고 있기도 하다. Baculovirus 그룹에 속하는 핵다각체바이러스(NPV, nuclear polyhedrosis virus)나 과립병바이러스(GV, gramulosis virus)가 숙주세포의 핵에서 증식하는 것에 비해, Reovirus 그룹에 속하는 세포질다각체바이러스(CPV, cytoplasmic polyhedrosis virus)는 숙주세포의 중장피막세포에 주로 감염되며, 세포질에서 바이러스다각체가 형성된다. 감염된 곤충은 먹이를 섭취하지 못해 체형이 가늘어지고 축 늘어진 상태로 죽는다. 지금까지 해충방제용 농약으로 등록된 곤충바이러스는 주로 NPV이며 *Heliothis zea*(제품명 Biotrol VHZ, Elcar, Viron H), *Spodoptera exigua*(Biotrol VSE), *Trichoplusia ni*(Biotrol VTN, Viron T), *Autographa californica*(SAN 405), *Lymantria dispar*(Gypchek, Virin-Gkb), *Pieris rapae*(Virin-Gkb)를 대상해충으로 하고 있다. 바이러스제제는 숙주특이성과 병원력이 매우 우수한 장점도 있지만 생산비용이 다른 미생물살충제보다 높다는 단점도 있다.

곤충병원성 세균은 주로 내생포자(endospore)를 생산하는 간균 및 구균(*Bacillus*, *Clostridium*), 그람음성 통성 혐기성 간균(*Serratia*, *Proteus*, *Enterobacter*), 그람양성 통성호기성 간균 및 구균(*Pseudomonas*), 그람양성 구균(*Streptococcus*), 리케차(*Wolbachia*, *Rickettsiella*), 마이코플라스마(*Spiroplasma*) 등이 속한다. 그 중 곤충병원성이 강한 세균을 다수 포함하고 있는 세균군(群)이 Bacillus 그룹이며 *Bacillus popilliae*와 *Bacillus thuringiensis*가 각각 편성(obligate) 및 통성(facultative)혐기성 병원체를 대표하고 있다. B.t는 세포의 성장과정에서 여러 가지 독소단백질( $\alpha$ -exotoxin,  $\beta$ -exotoxin)을 만드는데, 그 중 가장 살충력이 강한 것이 결정성 독소단백질( $\delta$ -endotoxin)이다. 대부분 이중피라미드 모양의 독소단백질은 보통 세포당 하나의 결정을 형성하며, 주로 인시목 곤충의 장내에서 소화효소에 의해 분해되어 매우 강력한 독소작용을 한다. 숙주곤충이 독소단백질을 먹으면 독소에 의해 중장피막 조직이 손상을 받고 수분내 섭식을 정지하고 각종 장애가 나타난다. B.t 내생포자는 원래 소화액 pH 9.0이상의 곤충장내에서는 발아하지 못하지만 장(腸)이 손상되어 약산성 체액(hemolymph)와 알칼리성 소화액이 만나 장내 pH가 낮아지면 포자가 발아, 증식할 수 있게 된다. 영양형

세포(vegetative cells)는 장관의 손상부위를 통해 곤충의 혈체강에 침입하고 감염숙주곤충은 패혈증에 의해 수일 내에 죽으며, 누에의 경우 수심분이내에 죽기 때문에 줄도 병이라고도 불린다. B.t 결정성 독소단백질 자체는 곤충의 몸에 주사를 해도 살충력을 나타내지 않는데, 이는 분자량 약 230,000의 단백질(protoxin)이 소화액의 protease에 의해 70,000이하의 활성독소(toxin)로 변환되어야 곤충에 독성을 나타내기 때문이다.

지금까지 100종류 이상의 B.t가 보고되고 있으나 대부분 인시목 곤충(lepidopteran insects)과 모기등에 살충력을 나타내고 있고, 최근에 딱정벌레목 곤충(coleopteran insects)에 살충활성을 지닌 균주들이 일부 발견되었다. 따라서 딱정벌레목 곤충방제를 위해 효과적이거나 대량인 공배양에 문제점을 지닌 *B. popilliae*의 산업적 이용 한계를 극복할 수 있게 되었다. 곤충병을 일으키는 그밖의 *Bacillus* 세균들은 모기(*Culex*, *Aedes*, *Anopheles*)를 12시간 내에 죽이는 *Bacillus sphaericus*, 꿀벌패혈증(American foulbrood)를 일으키는 *B. larvae* 등이 있고, 포자를 형성하지 않는 병원체로 European foulbrood를 일으키는 *Streptococcus pluton*, 많은 온혈동물과 곤충의 장내에 있는 *S. faeculis*, *Serratia marcescens* 등이 있다.

곤충병원성 세균에 의한 살충메카니즘은 생리적 기아(*B. popilliae*), 독소에 의한 중독(*B. sphaericus*, *B. thuringiensis*), 수분대상 이상(*C. brevipaaciens*), 기계적 조직 파괴(*B. popilliae*)등이다. 리케차 혹은 mycoplasma는 곤충 체내에 공생하면서 수직전파에 의해 존속하는 경우가 많으며, 이들 미생물이 숙주의 수명을 단축시키고 생식(生殖)에 악영향을 미친다. BT제제는 현재 전세계 미생물농약시장의 상당부분을 점유하고 있고, 미국, 중국에서 가장 경제적인 상업적 생산을 하고 있으며, 현재 우리나라에서도 여러 연구소, 대학, 기업 등에서 관련연구를 진행중이지만, 대부분 외국으로부터 원제를 수입하여 4개 농약회사에서 제제화하는 수준이어서, 생산효율 증대와 함께 기존보다 더욱 효과적인 특성을 지닌 균주를 탐색, 개발하는 분야등으로 노력을 집중하는 개발전략을 취해야 시장경쟁력을 확보할 가능성이 높을 것으로 생각한다. 세균을 이용한 미생물살충제는 주로 BT이며 Japanese beetle(상품명 Doom, Japidermic), 인시목 곤충(Dipel, Thuricide, Bactur, Bastospeine, Plantibac, Biosper, Insektin, Entobaterin), 쌍시목 곤충(Teknar), 딱정벌레목 곤충(M-One, M-trak, Trident, Novodor)이 방제대상이다.

곤충병원성 곰팡이는 지금까지 약 500여종 이상이 보고되었는데 진균류(Eumycota)에서 편모균류(Mastigomycotina)의 *Coelomomyces*, *Lagenidium*, 접합균류(Zygomycotina)의 *Entomophthora*, *Massospora*, 자낭균류(As-

comycotina)의 *Cordyceps*, 담자균류(Basidiomycotina)의 *Sepotobasidium*, 불완전균류(Deuteromycotina)의 *Aspergillus*, *Beauveria*, *Metarhizium*, *Paecilomyces*, *Hirsutella*, *Nomuraea* 등이 대표적으로 알려져 있다. 곤충병원균은 불완전균류와 접합균류가 가장 많고, 편모균류와 자낭균류, 담자균류 순이다. 곤충기생균의 대부분은 내부기생성이며, 보통은 곤충표피의 cuticle로 침입을 하는데, 그 방법은 포자로부터 뚫어나온 발아관(發芽管)이 직접 cuticle을 관통하거나(*Entomophthora*), 선단의 부착기로부터 나온 침입사가 침입하는 경우가 있다(*Metarhizium*). 또한 균이 혈체강에 도달하여 증식하는 형태로는 무격막성의 균사체(*Coelomomyces*), 균사상의 생육(*Aspergillus*, *Entomophthora sphaerosperma*), 단균사가 체액중에 효모모양으로 증식(*Entomophthora*, *Codyceps*, 불완전균류) 등이 있다. 내부기생균의 포자는 주로 숙주사후에 형성되나, 하등균류에서는 생존중에 형성되기도 한다. 숙주의 직접적 사인(死因)은 독소에 의한 중독(*Beauveria*, *Aspergillus*), 호흡이나 체액순환 저해(모기에서 *Metarhizium*), 기계적 조직파괴, 생리적 기아(모기에서 *Lagenidium*) 등이다. *Aspergillus*, *Metarhizium* 등 통성병원균은 *Coelomomyces*, *Massospora* 등의 편성병원균들에 비해 상대적으로 배양이 용이하여 상업화가 진전되었다. 곤충병원성 곰팡이는 불완전균류가 주로 이용되며, 선충(상품명 Royal 300), 가루이(*Aseronijia*, Mycotal), 진딧물(*Vertalec*), 나방류(*Boverin*), 응애(*Mycar*)가 방제대상이다. 우리나라에서는 과거 솔나방 방제에 곤충병원성 곰팡이를 사용한 바 있으며, 최근 본 연구실에서 개발하여 (주)경농에 기술이전한 '솔잎혹파리 방제용 미생물살충제' 생산에 국내에서 분리한 *Beauveria bassiana* HY-1균주를 이용하고 있다. 숙주 체내로 곤충병원성 곰팡이의 침입 및 체외의 포자형성은 다습조건이 필수적인데, 우리나라의 특이한 기후를 고려할 때 상대적으로 저온과 건조에 견디는 힘이 강하면서도 우수한 살충력을 지닌 이러한 산업균주의 확보는 매우 중요하다. 숙주곤충을 기질로 병원성곰팡이가 침입하는 과정에서 생산하는 생리활성물질을 이용하는 것은 전통적인 약용곤충(藥用昆蟲)중 백강잠(白僵蠶, *Beauveria*), 동충하초(冬蟲夏草, *Cordyceps*) 등이 잘 알려져 있다. 백강잠의 경우 Beauvericin을 비롯한 여러 가지 활성물질이 분리되고 있으며, 전통의약서에서 거론하고 현재까지 각종 약재, 음식, 술 등에 귀하게 이용하는 동충하초(일명 蟲草)의 경우도 *Cordycepin* 등의 활성물질이 분리되었다. 참고적으로 중국과 일본에서 보고된 동충하초 균의 종류는 약 500여종 이상이며 우리나라에서도 50여종 이상이 보고되었지만 약용, 식용으로 통용되는 것은 2~3종 정도(*C. militaris*, *C. sinensis* 등)뿐이다. 참고적으로 현재 국내

에서 '눈꽃동충하초'로 불리며 동충하초 봄을 일으키고 있는 것의 균주는 전통적인 *Cordyceps*이 아니라 *Paecilomyces*이다.

**곤충공생미생물**

생명체들은 생태계의 물리적, 화학적 환경하에서 다양

한 종간, 개체간의 상관관계를 가지며 살아가고 있다. 이러한 상호관계는 한쪽이 다른 생물에 해를 끼치며 붙어사는 기생(寄生, parasitism), 한쪽만 이익을 얻는 편리공생(片利共生, commensalism), 그리고 서로 이익을 얻는 상리공생(相利共生, mutualism), 운반공생(運搬共生, phoresis)으로 나타난다. 그 중 두 생물 종간의 공생은 단순히 공간적, 영양적 관계만을 가지는 것이 아니라 서로의 종족

Table 2. Groups of viruses associated with insects

Family	Genus	Nucleic acid	Particle shape	Association with inclusion body	Biochemical and Biophysical similarities to plants found in	
					Vertebrate	Plants
Baculoviridae	Baculovirus	DNA	Rod	+	None	None
Poxviridae	Entomopoxvirus	DNA	Ovoid	+	Poxviruses	None
Reoviridae	Cytoplasmic polyhedrosis virus	RNA	Isometric	+	Reovirus	Rice dxarf, wound tumor
Iridoviridae	Iridovirus	DNA	Isometric	-	African swine fever	None
Parvoviridae	Densovirus	DNA	Isometric	-	Frog viruses 1-3	None
Picornaviridae	Unassigned	RNA	Isometric	-	Parvoviruses	None
Caliciviridae	Unassigned (Amyelosis virus)	RNA	Isometric	-	Picornaviruses	Many small RNA viruses
Nodaviridae	Nodavirus	RNA	Isometric	-	Caliciviruses	None
Rhabdoviridae	Sigmavirus	RNA	Bullet-shaped	-	*	None
Nudaurelia β virus group	Unassigned	RNA	Bacilliform Isometric	-	Rhabdoviruses	Rhabdoviruses
					None	None

\*Nodamura virus also replicates in various vertebrate cells and in suckling mice

표 3. 천적바이러스를 이용한 미생물살충제 상품화 현황

병원체	해충명	제품명	대상해충명	사용국
NPV	<i>Heliothis zea</i> (bollworm, corn earworm, tomato fruit moth)	Biotrol VHZ Elcar, Viron H	거세미나방의 일종	미 국
NPV	<i>Heliothis virescens</i> (tomato budworm)	Biotrol VHZ Elcar, Viron H	거세미나방의 일종	미 국
NPV	<i>Spodoptera exigua</i> (beet armyworm)	Biotrol VSE	파밤나방	미 국
NPV	<i>Trichoplusia ni</i> (cabbage looper)	Biotrol VTN Viron T		미 국
NPV	<i>Autographa californica</i> (alfalfa looper)	SAN 405	거세미나방의 일종	미 국
NPV	<i>Orgyia pseudotsugata</i> (douglass-fir tussockmoth)	TM-Bio Contral-1 Virtuss	독나방의 일종	미 국
NPV	<i>Lymantria dispar</i> (gypsy moth)	Gypchek Virin-Ensh	짚시나방	미 국 캐나다
NPV	<i>Necodiprion sertifer</i> (Pine sawfly)	Neocheck-S Vrin-Diprion	솔잎혹파리	미 국 러시아
NPV	<i>Necodiprion lecontei</i> (red-beaded-pine sawfly)	Lecontivirus	솔파리의 일종	미 국 러시아
CPV	<i>Dendrolimus spectabilis</i> (pine caterpillar)		솔나방	일 본
GV	<i>Pieris rapae</i> (imported cabbage worm)	Virin-Gkb	배추흰나비	러시아

보존과 경쟁자에 대한 우위의 획득 등의 다양하고 때로는 필수적인 관계를 보이는 경우도 있으며, 극단적인 공생의 결과 진핵생물의 미토콘드리아나 식물의 엽록체와 같은 한 종이 다른 종의 일부로 진화된 공생관계도 나타난다 (Schwemmler 등, 1989).

곤충과 공생하는 미생물은 발견되는 위치에 따라 크게 두가지 형태로 나누어 볼 수 있는데, 미생물이 곤충의 서식지나 표피에 나타나는 external microbiota(exosymbionts)와 곤충의 몸 안에 나타나는 internal microbiota

(endosymbionts)가 있다.

External microbiota의 대부분은 일시적이고 그들의 수에 있어서도 다양하지만, 어떤 경우에는 편리공생이나 상리공생의 형태로도 나타나는데, 딱이 또는 수분이나 적당한 환경을 유지하기 위한 목적으로 곤충이 배양하는 곰팡이(*Ascomycotinna* of beetles, *Attamyces* of leaf-cutting ants, *Termitomyces* of termites)가 그 대표적인 예라 할 수 있다(Tanada 등, 1993).

Internal microbiota는 곤충 소화기관의 내강(內腔), ca-

표 4. 세균을 이용한 미생물 살충제 상품화 현황

살충성 미생물	대상해충	약효	제품명	사용국 생산자
<i>Bacillus popilliae</i>	Japanes beetle		Doom, Japidemic Milky Spore Disease	일 본 미 국
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i>	lepidopteran		Dipel	미 국
	lepidopteran		Thuricide	미 국
	lepidopteran		Bactur	미 국
	lepidopteran		Bastospeine	프랑스
	lepidopteran		Plantibac	프랑스
	lepidopteran		Sporeine	프랑스
	lepidopteran		Biosper	서 독
	lepidopteran		Raktukal	유 고
	lepidopteran		Insektin	러시아
	lepidopteran		Entobacterin	러시아
B.t. var. <i>israelensis</i>	dipteran		Dendrobacillin	러시아
	(mosquitoes, black flies)		Teknar	미국외
B.t. <i>sandiego</i>	coleopteran		M-One	미 국
	(Colorado potato beetle)		M-Trak	Mycogen사
B.t. <i>tenebrionis</i>	coleopteran		Trident	스위스
	(Colorado potato beetle)		Novodor	Sandoz사 Novo사

표 5. 곰팡이를 이용한 미생물 살충제 개발현황

살충성 병원 곰팡이	표적해충	제품명	사용국
<i>Arthrotrrys robusta antipolis</i>	양송이재배상의 식균성 선충	Royal 300	프랑스
<i>Arthrotrrys irregularis</i> 1141	뿌리혹선충	Royal 350	프랑스
	감귤가루이		러시아
<i>Aschersonia placenta</i>	감귤가루이	Aseronijia	러시아
<i>Aschersonia aleyroidis</i>	코로라도잎벌레	Boverin	러시아
<i>Beauveria bassiana</i>	코드링나방		러시아
<i>Beauveria tenella</i>	European corn borer		중 국
	풍뎅이일종		프랑스
	구리풍뎅이		일 본
<i>Hirsutella thompsonii</i>	감귤녹응애	Mycar	미 국
<i>Metarhizium anisopliae</i>	거품벌레과	Metaguino	브라질
	바구미류		
<i>Nomuraea rilyi</i>	옥수수명나방류		미 국
<i>Verticillium lccanii</i>	온실의 진딧물	Vertalec	영 국
	온실가루이	Mycotal	영 국
	무화과각지벌레		체 코

vities, pouches 그리고 세포 내(intracellular)에 나타나는 것으로 곤충 내부의 환경(pH, enzyme, food)에 따라 미생물의 종류나 수가 다르다. 곤충 내부에는 Gram-negative의 rod형 세균이 대부분이고, 곰팡이(saprophytic fungi, yeast, yeast-like organism)나 곤충을 매개로 이용하는 식물 병원성 바이러스도 일부 존재한다(Tanada 등, 1993).

Internal microbiota 중 특히 intracellular 미생물을 endosymbiont라 하며, 이들의 대부분은 모계를 통해 다음 세대에 전달되며, 숙주 밖에서 분리가 어렵고, 어떤 것은 곤충의 성장 단계에 따라 형태나 크기가 변하기도 한다. 혈액을 흡즙하는 또는 식물 수액을 흡즙하는 곤충의 영양과 관련하여 mycetome의 특별한 구조에 서식하는 미생물과 생식 조직에 서식하며 곤충의 생식에 영향을 주는 미생물이 endosymbiont의 대표적인 예라 할 수 있다(Tanada 등, 1993).

곤충의 생식조직(ovaries and testes)에서 일반적으로 널리 알려진 *Wolbachia*는 1924년에 Hertig와 Wolbach에 의해 모기 *Culex pipiens*의 생식조직에서 처음 보고되었다. *Wolbachia*는 형태적으로 rickettsiae와 매우 유사한 Gram-negative의 세포벽을 갖는 rod형 세균으로서 type specie는 *C. pipiens*에서 알려진 *Wolbachia pipentis*이다(Emilio 등, 1956). 숙주와 *Wolbachia species*의 관계는 이 세균이 알려진 이후 오랜 동안 밝혀지지 않았다. 1950년대에, Ghelelovitch와 Laven은 모기 *Culex* 안에서 어떤 intra-specific crosses가 성립될 수 없다는 것을 발견하였으며, 이러한 현상이 세포질로 유전되는 incompatibility factor에 의해 일어난다는 것을 밝혔다. 이렇게 불화합성으로 자손을 거의 생산하지 못하는 이러한 현상을 cytoplasmic incompatibility(CI)라 하였는데, 1970년대 Yen과 Barr(Yen 등, 1971)가 항생제를 처리하여 대상 곤충으로부터 *Wolbachia*를 제거하는 것에 의해 CI현상이 *Wolbachia*와 관계가 있음을 밝혔다. 즉, *Wolbachia*가 감염된 strain의 female이 mating할 경우 불화합성으로 인해 자손의 증식이 거의 불가능하였다.

그 후, 이런 CI 현상은 flour beetles(Scott 등, 1989), alfalfa weevils 그리고 기생벌(Richardson 등, 1987)등의 여러 곤충에서 알려졌으며, 이와 관련된 연구로서 절지동물에서 세포질로(maternally or cytoplasmically) 전달되는 세균이 자손의 성 비율과 성 결정에 변화를 준다는 것이 알려졌다(Hurst 등, 1993). 최근 여러 중요한 곤충 목인 딱정벌레(Coleoptera), 파리목(Diptera), 벌목(Hymenoptera), 매미목(Hemiptera/Homoptera), 메뚜기목(Orthoptera) 그리고 나비목(Lepidoptera)등의 80여종에서 *Wolbachia*의 존재가 밝혀졌으며(Werren 등, 1995), 17종의 등각류(Rousset 등, 1992)와 진드기(Johanowicz 등, 1995)에서

도 *Wolbachia*가 관찰되었다. 또한 최근에는 선충에서 *Wolbachia*와 매우 유사한 세균이 발견되었다(Sironi 등, 1995).

*Wolbachia*에 의해 유도되는 CI는 정자와 난자 사이의 생식적 불화합성으로 diploid 종에서의 zygotic death(Yen 등, 1971)나 haplodiploid종에서 male 생성을 유도한다(Breeuwer 등, 1990). CI는 unidirectional CI와 bidirectional CI 두 가지 형태로 나타나는데, unidirectional CI와 *Wolbachia*에 감염된 male의 정자가 감염되지 않은 난과 수정할 때 일어난다. 반대의 경우(감염되지 않은 male과 감염된 female)에는 불화합성이 나타나지 않는다. Bidirectional CI는 서로 다른 *Wolbachia* 종에 감염된 male의 정자와 female의 난이 수정될 때 나타난다(Mercot 등, 1995; Scott 등, 1995). Breeuwer 등(1990)이 기생벌 *Nasonia vitripennis*에서 관찰한 것에 의하면, CI는 수정난의 초기 mitosis의 결합과 관계가 있는 것으로 보여진다. Mitosis 초기에 paternal chromosome이 diffusion되어 chromatin 덩어리를 형성하게 되어 염색체의 분리가 일어날 수 없게 되므로 paternal genome이 손실되어, haplodiploid성 결정을 갖는 곤충에서는 haploid(male) 자손의 발생을 유도하고 diploid 종에서는 embryo를 죽게 한다(Breeuwer 등, 1990).

현재 *Wolbachia*는 다양한 이유로 관심의 대상이 되어지고 있다. 첫째, *Wolbachia*가 여러 곤충 목에서 그들의 숙주에 미치는 영향으로 볼 때, 숙주의 빠른 종형성에 잠재적인 역할을 할 것으로 보여지기(Breeuwer 등, 1990; Coyne 등, 1992) 때문에, 그 기작과 관련하여 많은 연구가 이루어지고 있다. 둘째, 이 세포 내 세균들이 그들 숙주의 초기발생과 핵분열과정에 변화를 주는 기작에 대한 기본적인 연구를 위해(Glover 등, 1990), 셋째, 미생물 천적으로서 *Wolbachia*를 생물학적 제제(biological agent)로 사용하거나 곤충 집단의 유전적 변이(genetic modification)를 퍼뜨리기 위한 매개로 사용하기 위해 많은 연구가 진행 중이다.

*Wolbachia*와 같이 곤충과 특별한 관계를 가지며 세포 내 세균으로 존재하는 미생물들은 그들의 숙주 밖에서 배양이 불가능하여 이들의 생물학적 역할이나, 분류학적 위치를 결정하는 것이 매우 어려웠다. 그러나, 최근 분자생물학적 기법을 이용하여 원핵세균의 ribosomal RNA의 small subunit을 coding하는 유전자를 분리하고 이들의 계통분류를 통해 분류학적 위치를 결정하는 것이 가능하게 되었다(Gary, 1988; Rudolf 등, 1994; Rudolf 등, 1995), rRNA는 모든 생물체에서 기능적, 진화적으로 매우 유사할 뿐만 아니라, 전체적인 구조에 있어서도 극히 잘 보존되어 있고, 세포 내에 풍부하게 존재하므로 분리가 용이하고, 또 이들의 통계적 비교가 가능할 만큼 충분한 염기서

열정보를 가지고 있다(Gray 등, 1986). 특히 rRNA 염기서열의 유사성 정도는 원핵세균 사이의 계통분류학적 관계를 결정하는 데 중요한 역할을 한다. Polymerase chain reaction(PCR)의 기법을 이용하여 endosymbiotic 미생물 rDNA의 획득과 계통분류에의 이용은 곤충 내 공생미생물의 특성을 이해하는데 매우 유용하게 이용되었다(Breeuwer 등, 1992; Scott 등, 1992; Bruce 등, 1992; Jonathan 등, 1992).

그 밖의 endosymbionts에 대한 연구로는 벼멸구(*Nilaparvata lugens*) 등 식물의 수액을 흡즙하는 곤충에 있어서 질소대사 등 섭취한 영양분의 대사효율을 높여주는 역할을 하는 것으로 알려져 있으며, 기생봉(parasite wasp)이 숙주곤충에 산란할 때 면역메카니즘을 극복하는 수단으로서 연구도 진행되는 등 다양한 관점에서의 접근이 시도되고 있다.

세포질로 전달되는 미생물과 그 숙주 곤충과의 관계는 많은 곤충의 생태학이나 생식생물학에 기초가 되므로, 본 연구실에서는 우리나라 산림에 가장 심각한 피해를 주고 있는 솔잎혹파리(*Thecodiplosis japonensis*)를 대상으로 16S rDNA 증폭, 염기서열분석, similarity 및 phylogenetic tree 분석등을 수행하여 솔잎혹파리에 존재하는 공생미생물의 존재를 확인하고 RT-PCR 및 현미경적 조직관찰을 통한 후속연구를 수행하고 있다.

곤충의 exosymbionts는 상대적으로 다루기가 용이하여 몇가지 분야에서 관련연구결과들이 보고되었다. 대표적인 것으로 목질부를 가해하는 흰개미의 일종인 termite의 장내에서 분리된 몇종의 미생물이 amylase, cellulase, lignase, xylanase 등의 효소를 강력하게 분비하고 있는 것은 대단히 잘 알려져 있다.

### 곤충공생미생물 유래 단백질분해효소의 분리 및 특성

본 연구실에서는 상대적으로 다루기 용이한 곤충의 exosymbionts의 연구로, 국내 자생 곤충들로부터 관련미생물을 탐색, 분리하는 연구를 하고 있다. 그 대표적인 연구로서 거미의 장으로부터 단백질 분해효소를 생산하는 미생물을 탐색·분리하였다.

거미의 먹이 습식 mechanism은 거미줄에 걸린 먹이가 되는 곤충 등 작은 동물들의 체내에 마취액과 거미 자체의 소화액을 주입하게 된다. 거미의 먹이는 순식간에 마취가 되어 움직이지 못하게 되고 짧은 시간안에 먹이의 내부는 거미에 의해 주입된 소화액에 의해서 분해되어 버리고 이런 상태에서 거미는 분해된 먹이의 체액을 섭취하게 된다. 이런 거미의 먹이 습식 mechanism을 생각한다면 거미 장내에 거미 자체의 단백질 분해효소 뿐만 아니라 장내에

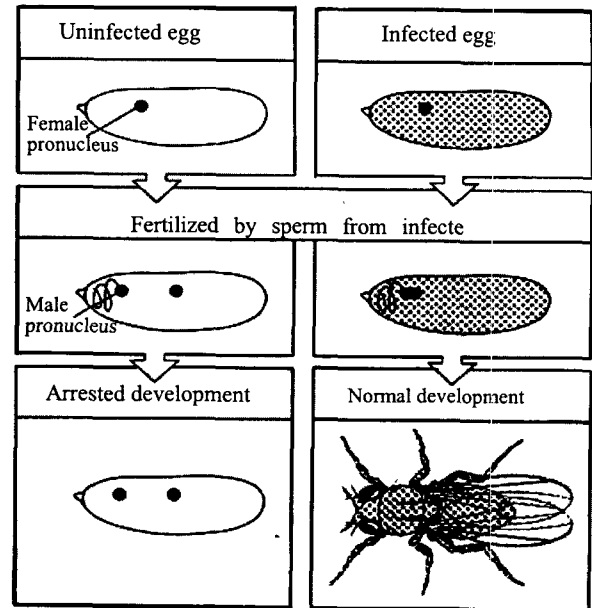


Fig. 1. Cytoplasmic incompatibility.

An uninfected egg fertilized by sperm from an infected male fails to complete karyogamy and/or the first few cleavage divisions. By contrast, an egg from an infected female fertilized by sperm from an infected male completes karyogamy and develops normally.

분해를 도와주는 단백질 분해효소를 생산하는 공생미생물이 있을 것으로 예측하여 동물성 생물을 주 먹이원으로 하는 한국산 무당거미 (*Nephila clavata*)를 실험 재료로 사용하여 단백질 분해효소를 생산하는 새로운 미생물을 분리하고, 그 미생물이 생산하는 효소의 특성을 조사하였다.

단백질 분해효소는 인간이 오랫동안 접해왔던 효소로서 식품의 연화, 조미료 생산, 치즈 숙성과 같은 식품산업, 소염제 및 소화제와 같은 제약산업, 가죽의 연화를 위한 피혁 가공산업, 유기물 분해용 환경처리제 등의 용도제 및 음식물 쓰레기 처리를 위한 제제 등의 용도가 있는 환경산업, 그리고 세제 산업 등 다방면의 산업에 이용되어 왔으며, 오늘날 전체 공업용 효소시장의 약 70% 이상을 차지하고 있다(Aunstrup 등, 1974).

단백질 분해효소는 단백질 또는 펩타이드(peptide)에서 펩타이드 결합의 가수분해를 촉매하는 효소로, 모든 생명체에 존재하며 다양한 생리화학적 기능을 수행한다. 미생물이 생산하는 단백질 분해효소는 대부분이 세포외로 분비되며, 그 특이성을 기초로 하여 다양하게 구분되며 각각의 특성에 따라 산업적 용도도 달라진다. 예를들어, 활성부위(active site)의 잔기에 따라서는 serine 잔기를 가지는 serine 단백질 분해효소, thiol(SH) 잔기를 갖는 cysteine 단백질 분해효소, aspartic acid 잔기를 가지는 aspartic 단백질 분해효소, 그리고 이가 금속 양이온의 존

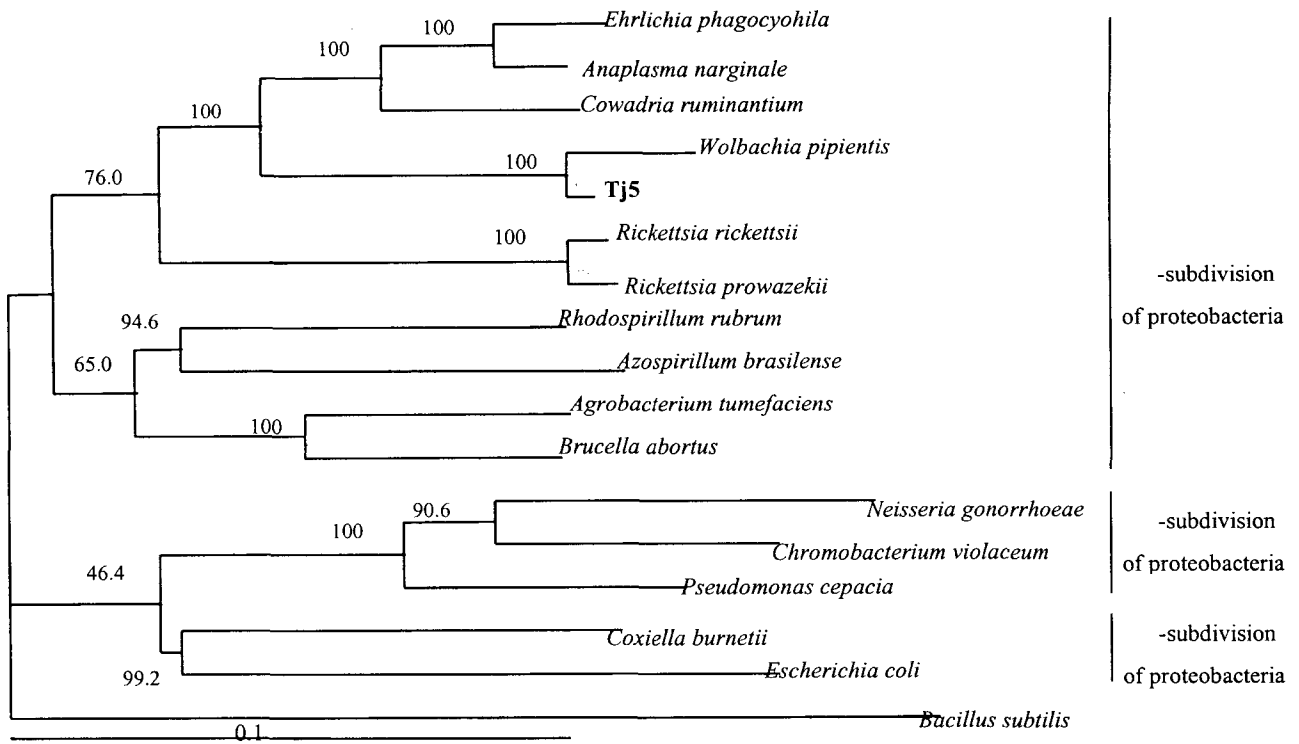


Fig. 2. Phylogenetic tree (based on 16S rDNA sequence) derived from Neighbor-joining analysis of a Tj5 from *Thecodiplosis japonensis* and other representative proteobacteria from the  $\alpha$ ,  $\beta$ , and  $\gamma$  subdivisions. The Gram positive bacterium *Bacillus subtilis* was used as the outgroup.

재에 의하여 효소의 활성에 영향을 받으며, 대부분이 Zn을 포함하는 단백질로 효소활성을 위해  $Zn^{2+}$ 을 필요로 하는 metalloprotease로 분류한다(Hase 등, 1993).

최근 알칼리성 단백질 분해효소의 연구와 더불어 내열성 또는 저온성 등의 특성을 가지고 있는 단백질 분해효소 생산 미생물의 탐색이 이루어지고 있으며 단백질 분해효소에 대한 연구는 많이 이루어지고 있으나, 산업적으로 적용시키기 위해서는 알칼리 내성뿐만 아니라 넓은 범위의 온도에서도 높은 활성을 가질 수 있어야 한다(Ok 등, 2000). 산업화된 단백질 분해효소의 대부분의 경우 자연계 특히, 폐수 및 토양에서 분리된 미생물이 생산한 단백질 분해효소를 이용하였으며 이렇게 분리된 단백질 분해효소를 이용하는 곳으로는 덴마크의 NOVO사와 미국의 Genencor사의 2개의 거대 효소생산업체가 있다. 이 2개사를 포함한 대부분의 산업용 효소를 생산하는 업체는 새로운 미생물로부터 단백질 분해효소를 개발하는 경쟁이 치열해지고 있다. 특히 Gram 양성 및 음성 세균, 방선균, 그리고 곰팡이 등 매우 다양한 범위의 미생물을 탐색대상으로 하고 있다(Rao 등, 1998. Wilkes 등, 1978). 그러나 앞에서 설명하였듯이 미생물의 탐색은 일반 토양이나 해수 등 한정적인 지역에서 하는 실정이므로 새로운 미생물의 탐색에는 한계를 가지고 있다. 또한, 특이한 특성을 지닌 단백

질 분해효소를 포함한 산업용 효소를 생산하는 미생물을 탐색하기 위해 극지, 열수 및 심해등지에서 새로운 미생물의 탐색에 많은 연구가 되고 있다. 그러나 일반적으로 극한 환경 속에서 성장하는 미생물은 생장이 느리고 취급이 어려운 점이 많기 때문에 실제 산업에 이용되지 못하는 실정이다. 이에 반해서 곤충과 관련한 미생물은 생장이 빠르며 취급하는 조건도 용이하다. 또한 관련 미생물은 곤충의 섭식 조건, 서식처 및 생태와 관련이 있기에 관련 미생물로부터 생성된 효소 또한 다양한 특이적인 성질을 가지고 있는 것이 많이 있다. 그러나, 곤충으로부터 새로운 미생물의 탐색은 세계적으로 극히 적은 소수의 연구자에 의해서 연구가 되어지고 있으며 흰개미의 일종인 termite의 장내에서 분리된 몇 종의 미생물에 의해서 생산된 amylase, cellulase, xylase, 그리고 ligninase에 대한 연구가 있다. 곤충에서 분리한 단백질 분해효소는 극히 드물며 다만 곤충으로부터 분리한 미생물에 의해 생산된 단백질 분해효소의 예로, 누에 장에서 분리된 *Serratia marcescens* ATCC 21074에서 생산된 serrapeptase가 있다. 이 효소는 fibroin 분해능 및 inflammatory peptide인 bradykinin, histamin에 대한 가수분해능 때문에 소염효소제로 사용되고 있다(Henriett 등, 1993).

이러한 관점에서 본 연구실에서는 한국산 무당거미



(*Nephila clavata*)의 장으로부터 분리한 단백질 분해효소를 생산하는 미생물을 동정하였다. 형태학적, 생리·생화학 및 균체화학적 특성, 16S rDNA를 이용한 분자계통학적 분류를 실시한 결과, Eubacteria, Proteobacter, gamma-subdivision, Enterobacteriaceae에 속하는, 기존에 전혀 보고된 적이 없는 새로운 미생물인 것으로 나타났다. 따라서, 본 미생물 균주는 학명의 명명체계에 따라서 거미에서 유래된 단백질 분해효소를 생산하는 세균이라는 뜻으로 *Aranicola proteolyticus* HY-3라 명명하였다.

*Aranicola proteolyticus*는 단백질 분해효소를 배양 12시간에서 18시간안에 최대 생산을 완료하며 탄소원 보다는 질소원에 의존해서 단백질 분해효소의 생산이 증가하는 양상을 보였다. 또한 단백질 분해효소의 생산의 저해는 glucose의 농도와 시간에 의존함을 알 수 있었다. 또한 전체 생산하는 단백질 분해효소의 98%를 밖으로 분비하는 높은 분비효율을 보여 주었다.

*A. proteolyticus*에서 생산된 단백질 분해효소는 효소 저해제에 대한 영향을 조사해본 결과 metalloprotease의 저해제인 EDTA(Ethylene diamine tetraacetic acid)와 phenanthroline 1mM의 농도에서 약간의 상대적 활성 저해를 보일 뿐 대부분의 경우 매우 안정하였다. 또한 균주로부터 단백질 분해효소 생성 유전자를 분리하고 그 유전자를 조사해 본 결과 metalloprotease의 특성중 하나인 metal ion의 결합부위 및 효소활성부위가 잘 보존되어 있는 것을 확인하였다. 이상의 결과로 *A. proteolyticus*에서 생산된 단백질 분해효소는 metalloprotease(EC 3.4.24.4)임을 알 수 있었다.

단백질 분해효소의 여러 가지 기질 즉, albumin, casein, collagen, elastin, gelatin, 그리고 hemoglobin의 분해능을 알아보았다. 30분 동안 반응을 행하였을 경우 collagen의 분해능이 가장 우수한 편이었으며 gelatin에 대해서는 다른 비교 단백질보다 낮은 분해능을 보였다. 그러나 2시간

정도 반응이 진행되면서 모든 단백질에 대해서 분해 양상이 나타났으며, 24시간 후에는 albumin이 가장 많은 분해율을 보였다. 24시간 후의 albumin의 분해율을 100으로 보았을 경우 다른 모든 단백질에서 40이상의 분해능을 보여주었다.

효소 활성에 미치는 온도의 영향을 조사한 결과 37°C에서 최대 활성을 보이는 반면에 45°C 이상의 온도에서는 급격히 감소하였으나 4°C에서 15°C 사이의 저온에서는 상대적으로 50% 이상의 높은 활성을 나타냈다. 열에 대한 안정성 실험에서는 30°C 까지 180분간 80% 이상의 열안정성을 보였으며 열안정성에 대한 Arrhenius plot을 조사한 결과 4~37°C에서의 azo-casein을 기질로 사용하였을 경우의  $E_a$ 는 2.432 kcal/mol을 보였다.

pH에 대한 영향은 최적 pH가 8.0~8.5로 약 알칼리성을 보여 약 염기성 protease인 것으로 나타났으며, pH가 5~12까지 80%정도의 상대적인 활성을 보이고 있어 넓은 범위의 pH안정성을 가지고 있음을 알 수 있었다. 특히 놀라운 일은 높은 염분농도에서도 매우 안정한 효소활성을 나타내는 것인데, 10%의 NaCl 용액에서도 기존 단백질 분해 활성의 85% 정도를 유지하였다.

이상의 결과와 같이 한국산 무당거미(*Nephila clavata*)의 장으로부터 분리한 신규 미생물 *A. proteolyticus*에서 생산하는 단백질 분해효소는 특이한 특성을 가지고 있다. 즉, 10°C이하의 저온에서도 효소의 활성을 가지며 넓은 범위의 pH 조건과 높은 염분농도에서의 활성의 증가는 다양한 산업적 이용범위 및 용도를 가능하게 한다.

예를 들어, 저온에서도 세탁 가능한 세제용 효소로서의 단백질 분해효소를 이용할 수 있으며 높은 염분 농도를 포함하고 있는 가정용 음식물 쓰레기의 처리 및 다량의 metal 이온을 함유한 공업 폐수의 처리, 그리고 섭취하기 어려운 고형분의 가수분해를 통해 가축의 소화율을 증진시키는 사료첨가제 및 고기 육질의 연화와 같은 식품용

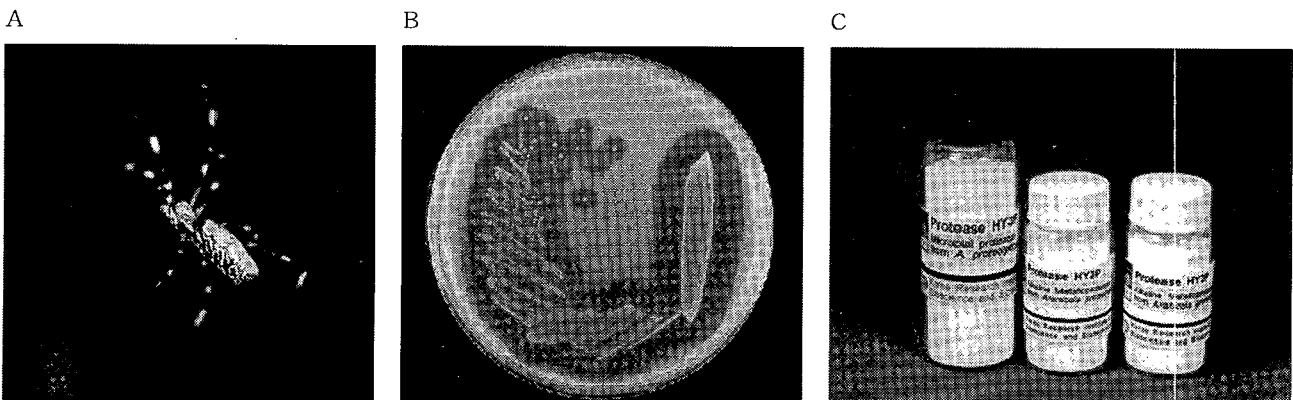


Fig. 3. Morphology of spider, *Nephila clavata* (A), proteolytic halo by *A. proteolyticus* on 2% skim-milk agar plate (B) and product of protease from *A. proteolyticus* (C).

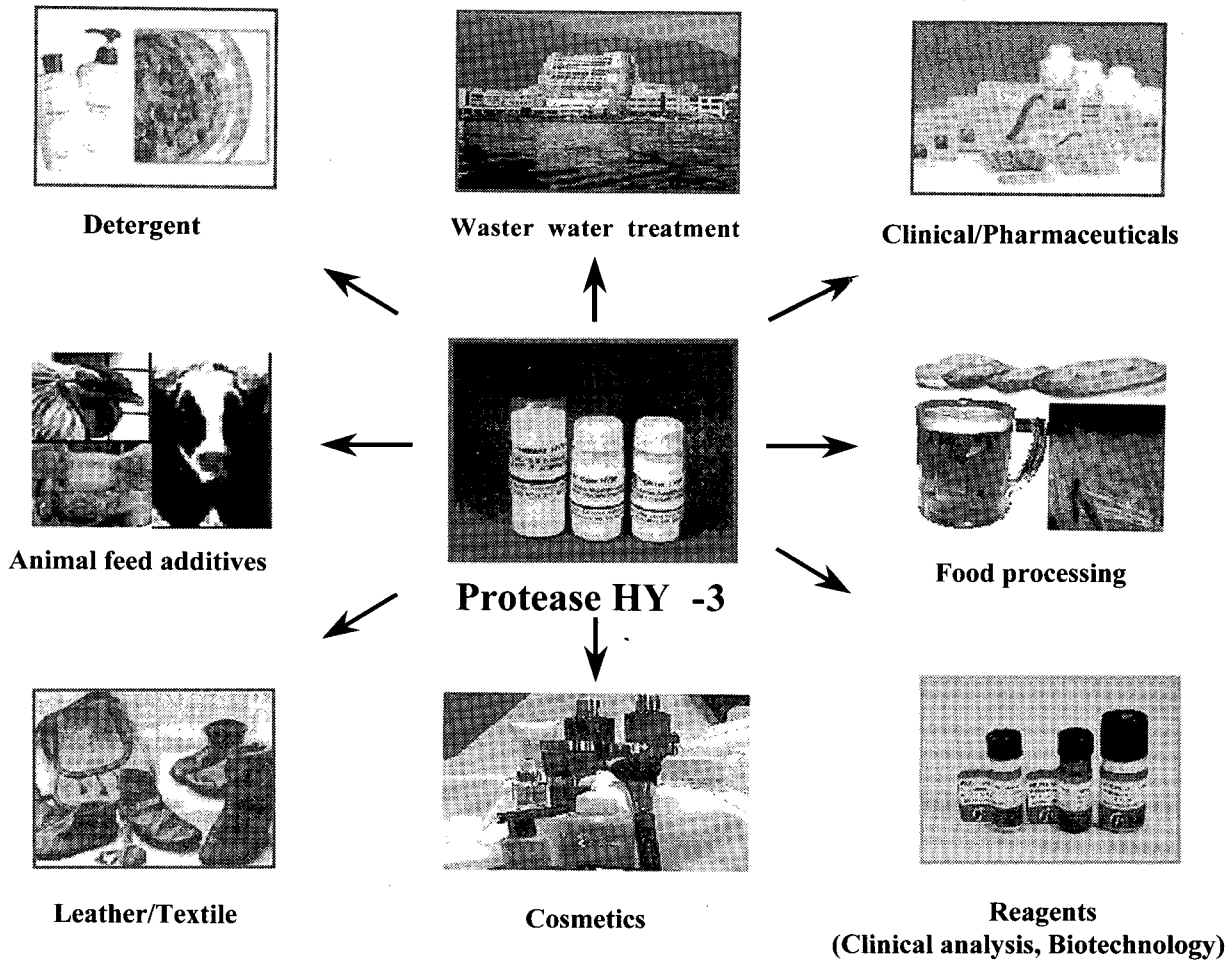


Fig. 4. Application of protease.

등 여러 관련 분야에 광범위하게 이용할 수 있을 것으로 기대한다.

결론적으로, 본 연구는 아이디어부터 관련 연구개발 및 산업적 이용까지 연결되는 전주기적 과정이 국내에서 독자적으로 수행된 대표적인 사례로서 현재 관련 바이오벤처 기업에 기술이전을 완료하고 용도확대 및 대량생산을 통한 국내의 시장진출을 눈앞에 두고 있어, 상대적으로 좁은 국토면적과 빈약한 부존자원을 지닌 우리나라의 상황을 고려할 때 국가 보유 생물자원의 부가가치 제고 및 활용의 중요성을 더욱 절실히 느끼게 하고 있다.

참 고 문 헌

1. Amann, R.I., Ludwig, W. and Schleifer, K.H.: Identification of uncultured bacteria, A challenging task for molecular taxonomists. *ASM News*, **60**, 360-365 (1994)
2. Amann, R.I., Ludwig, W. and Schleifer, K.H.: Phylogenetic identification and In Situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.*, **59**, 143-169 (1995)
3. Aunstrup, K. and Andresen, O.: Enzyme products. U.S. Patent 3,827,933 (1974)
4. Barr, A.R.: Cytoplasmic incompatibility in natural populations of a mosquito, *Culex pipiens* L. *Nature*, **283**, 71-72 (1980)
5. Bensaadimerchermek, N., Salvado, J.C., Cagnon, C., Karama, S. and Mouches, C.: Characterization of the unlinked 16S rDNA and 23S-5S ribosomal-RNA operon of *Wolbachia pipientis*, a prolarvotic parasite of insect gonads. *Gene*, **165**, 81-86 (1996)
6. Brakenhoff, R.H., Schoenmakers, J.G.G. and Lubsen, N.H.: Chimeric cDNA clones: a novel PCR artifact. *Nucleic Acids Research*, **19**, 1949 (1991)
7. Breeuwer, J.A.J. and Werren, J.H.: Microorganisms associated with chromosome destruction and reproductive isolation between two insect species. *Nature*, **346**, 558-560 (1990)
8. Breeuwer, J.A.J., Stouthamer, R., Burns, D.A., Pelletier, D.A., Weisburg, W.G. and Werren, J.H.: Phylogeny of cytoplasmic incompatibility microorganisms in the parasitoid wasp genus *Nasonia* (Hymenoptera: Pteromalidae) based on 16S ribosomal DNA sequences. *Insect. Mol.*

- Biol.*, **1**, 25-36 (1992)
9. Campbell, B.C., Bragg, T.S. and Turner, C.E.: Phylogeny of symbiotic bacteria of four weevil species (Coleoptera: curculionidae) based on analysis of 16S ribosomal DNA. *Insect. Biochem. Molec. Biol.*, **22**, 415-421 (1992)
  10. Coyne, J.A.: Genetics and speciation. *Nature*, **355**, 511-515 (1992)
  11. Eisen, J.A., Smith, S.W. and Cavanaugh, C.M.: Phylogenetic relationships of chemoautotrophic bacterial symbionts of *Solemya velum* say (Mollusca: Bivalvia) determined by 16S rRNA gene sequence analysis. *J. Bacteriol.*, **174**, 3416-3421 (1992)
  12. Giordano, R., Jackson, J.J. and Robertson, H.M.: The role of *Wolbachia* bacteria in reproductive incompatibilities and hybrid zones of *Diabrotica* beetles and *Gryllus* crickets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 11439-11444 (1997)
  13. Giordano, R., O'Neill, S.L. and Robertson, H.M.: *Wolbachia* infections and the expression of cytoplasmic incompatibility in *Drosophila schellia* and *D. mauritiana*. *Genetics*, **140**, 1307-1317 (1995)
  14. Glover, D.M., Raff, J., Karr, T.L., O'Neil, S.L., Lin, H. and Wolfner, M.F.: Parasites in *Drosophila* embryos. *Nature*, **348**, 117 (1990)
  15. Hase, C.C. and Finkelstein, R.A.: Bacterial extracellular zinc-containing metalloproteases. *Microbiol. Rev.*, **57**, 823-837 (1993)
  16. Henriette, C.S., Zinbi, M.F., Aumaitre, E., Petitedmang, H. and Petitedmange, C.: Protease and lipase production by a strain of *Serratia marcescens* (532S). *Industrial Microbiol.*, **12**, 129-135 (1993)
  17. Hurst, L.D.: The incidences, mechanisms and evolution of cytoplasmic sex ratio distorters in animals. *Biol. Rev.*, **68**, 121-193 (1993)
  18. Johanowicz, D.L. and Hoy, M.A.: Molecular evidence for A-*Wolbachia* endocytobiont in the predatory mite *Metaseiulus occidentalis*. *J. Cell Biochem.*, **21A**, 198 (1995)
  19. Kopczyński, E.D., Bateson, M.M. and Ward, D.M.: Recognition of cimeric small-subunit ribosomal DNAs composed of genes from uncultivated microorganisms. *Appl. Env. Microbiol.*, **60**, 746-748 (1994)
  20. Larsen, N., Olsen, G.J., Maidak, B.L., McCaughey, M.J., Macke, T.J., Marsh, T.L. and Woese, C.R.: The ribosomal database project. *Nucleic Acids Research*, **21**, 3021-3023 (1993)
  21. Lee, B., O'Neill, S.L., Robertson, H.M. and Karr, T.L.: Interspecific and intraspecific horizontal transfer of *Wolbachia* in *Drosophila*. *Science*, **260**, 1796-1799 (1993)
  22. Mercot, H., Llorente, B., Jacques, M., Atlan, A. and Montchamp-Moreau, C.: Variability within the seychelles cytoplasmic incompatibility system in *Drosophila simulans*. *Genetics*, **141**, 1015-1023 (1995)
  23. Ok, M., Kim, M.S., Seo, W.S., Cha, J.Y. and Cho, Y.S.: Characterization of extracellular protease of *Bacillus* sp. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **6**, 329-333 (2000)
  24. O'Neill, S.L., Giordano, R., Colvert, A.M.E., Karr, T.L. and Robertson, H.M.: 16S rRNA phlogenetic analysis of the bacterial endosymbionts associated with cytoplasmic incompatibility in insects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 2699-2702 (1992)
  25. Olsen, G.J., Lane, D.J., Giovannoni, S.J. and Pace, N.R.: Microbial ecology and evolution: A ribosomal RNA approach. *Ann. Rev. Microbiol.*, **40**, 337-365 (1986)
  26. Olsen, G.J.: Bidirectional incompatibility between conspecific populations of *Drosophila simulans*. *Nature*, **348**, 178-180 (1988)
  27. Park, H.Y., Lim, J.Y., Han, C.H., Park, S.S., Oh, H.W., Bae, K.S., Lee, D.H., Lee, M.S., Lee, K.H. and Son, K.H.: Korea Patent, 97-6150 (1997)
  28. Rao, M.B., Tanksale, A.M., Ghatge, M.S. and Deshpande, V.V.: Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **62**, 597-635 (1998)
  29. Richardson, P.M., Holmes, W.P. and Saul, G.B.: II. The effect of tetracycline on nonreciprocal cross incompatibility in *Moroniella*[=*Nasonia*] *vitripennis*. *J. Inverte. Pathol.*, **50**, 176-183 (1987)
  30. Rousset, F., Bouchon, D., Pintureau, B., Juchault, P. and Solignac, M.: *Wolbachia* endosymbionts responsible for various alterations of sexuality in arthropods. *Proc. R. Soc. London Ser., B* **250**, 91-98 (1992)
  31. Schwemmler, W. and Gassner, G.: Insect endocytobiosis: Morphology, Physiology, Genetics, Evolution. CRC Press, Inc. p.217-254 (1989)
  32. Sironi, M., Bandi, C., Sacchi, L., Di Sacco, B., Damiani, G. and Genchi, C.: Molecular evidence for a close relative of the arthropod endosymbiont *Wolbachia* in a filarial worm. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **74**, 223-227 (1995)
  33. Stouthamer, R. and Werren, J.H.: Microbes associated with parthenogenesis in wasps of the genus *Trichogramma*. *J. Inverte. Pathol.*, **61**, 6-9 (1993)
  34. Stouthamer, R., Breeuwer, J.A.J., Luck, R.F. and Werren, J.H.: Molecular identification of microorganisms associated with parthenogenesis. *Nature*, **361**, 66-68 (1993)
  35. Stowe, R.A. and Mayer, R.P.: Efficient screening of process variables. *Ind. Eng. Chem.*, **58**, 36-40 (1966)
  36. Tanada, Y. and Kaya, H.K.: *Insect pathology*. Academic press, Inc. p.12-51 (1993)
  37. Weisburg, W.G., Barmes, S.M., Delletier, D.A. and Lane, D.J.: 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.*, **173**, 697-703 (1991)
  38. Weiss E., Dasch, G.A. and Chang, K.P.: Tribe III. *Wolbachiae* Philip. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Krieg, N.R. and Holt, J.G. (eds.), Vol. 1, p.711-713 (1956)
  39. Werren, J.H.: Biology of *Wolbachia*. *Annu. Rev. Entomol.*, **42**, 587-609 (1997)
  40. Werren, J.H., Guo, L., Hurst, G.D.D., Zhang, W., Breeuwer, J.A.J., Stouthamer, R. and Majerus, M.E.N.: Rickettsial

- relative associated with male-killing in the ladybird beetle (*Adalia bipunctata*). *J. Bacteriol.*, **176**, 388-394 (1994)
41. Werren, J.H., Guo, L.R. and Windsor, D.W. : Distribution of *Wolbachia* in neotropical arthropods. *Proc. R. Soc. London Ser. B* **262**, 147-204 (1995)
42. Werren, J.H., Zhang, W. and Guo, L.R. : Evolution and phylogeny of *Wolbachia* : reproductive parasites of arthropods. *Proc. R. Soc. Lond. B* **261**, 55-71 (1995)
43. Woese, C.R. : Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.*, **51**, 221-271 (1987)
44. Wilkes, M., and Harder, W. : A continuous culture study of the regulation of extracellular protease production in *Vibrio SAI*. *Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol. Serol.*, **44**, 141-155 (1978)
45. Yen, J.H. and Barr, A.R. : New hypothesis of the cause of cytoplasmic incompatibility in *Culex pipiens*. *Nature*, **232**, 657-658 (1971)