



과제구분	기관고유	수행시기	전반기	
전략체계	2-2-2	기술분야 및 품목표준코드	H02 IN0342W8	
과제번호	LP0047022022			
과 제 명		수행기간	과제책임자	
장내미생물을 활용한 유용곤충 생산성 증대기술 개발		'21~'22	유용곤충연구소	장다현
1) 흰점박이꽃무지 생육증진용 장내미생물 이용 기술 개발		'21~'22	유용곤충연구소	장다현
색인용어	흰점박이꽃무지, 섬유소분해활성, 장내미생물			

흰점박이꽃무지 생육증진용 장내미생물 이용기술 개발 연구

Development of Technology for using Intestinal Microbes to Promote the Growth of White-spotted flower chafer Larvae

Da-Hyun Jang*, Sung-Mun Bae*, Kyong-Hee Joung*, Jong-Won Kim*, Seul-Bi Lee*, and Young-Han Lee*

*Gyeongnam Agricultural Research and Extension Services, Jinju, Korea

ABSTRACT : This study was conducted to improve the stable supply of insect feed and breeding efficiency by utilizing the intestinal microorganisms of white-spotted flower chafer Larvae. As a result of isolating microorganisms from the mid-gut and hind-gut of white-spotted flower chafer Larvae and measuring cellulose and xylan decomposing activities, it was found to be active in 4 strains in the mid-gut and five strains in the hind-gut. As a result of identifying these microbial strains, three species of the genus *Bacillus*, one species of the genus *Citrobacter*, and two genera of *Paenibacillus* were identified. As a result of a study using the isolated strain as a fermenting strain to improve the digestibility of fermented sawdust, when *B. licheniformis* was used, the larval weight increased by 18%, the yield increased by 5%, and the harvest days were shortened by ten days.

Key words : *Protaetia brevitarsis*, fibrinolytic activity, Intestinal microbes

1. 연구목표

식품원료로 승인된 흰점박이꽃무지, 장수풍뎡이 등 곤충의 일반식품 원료 전환에 따른 식용곤충 표준 관리 기술 등 품질관리기술 확립이 필요하다. 경남의 흰점박이꽃무지(*Protaetia brevitarsis*) 사육농가는 150호로 전체 267호의 56%, 연간 판매액은 1,770백만원으로 전체 식용곤충 연간 판매액 3,731백만원의 47%를 차지하는 등 흰점박이꽃무지 편중도가 심한 편이다. 흰점박이꽃무지의 먹이원 연구는 다양하게 이루어지고 있으나 흰점박이꽃무지 장내 미생물을 활용하여 생산성을 증가시키는 연구는 미비한 실정이다. 본 연구는 곤충의 성장 증가, 영양소 소화율 및 면역력 개선을 이해하는 장내미생물의 우량한 균주 선발과 급여 방법을 구명하고자 수행하였다.

2. 재료 및 방법

<시험 1> 흰점박이꽃무지 장내미생물 자원 분리 및 특성 분석

본 연구에 사용된 흰점박이꽃무지는 진주시 명석면에 위치한 태우농장에서 사육한 3령 유충을 사용하였고, 이들 유충의 장을 적출하고 중장과 후장을 분리하였다. 중장과 후장을 증류수로 헹탁하고 $10^{-3} \sim 10^{-6}$ 까지 희석한 후 Carboxy Methyl Cellulose(CMC) 및 xylan을 1% 첨가한 R2A와 LB배지에 100 μ L을 접종하고 평판 도말하여 37 $^{\circ}$ C, 24시간 동안 배양하였다. 배양 후, 0.1% congo red 용액으로 30분간 염색시키고, 1M NaCl 용액으로 10분 정도 탈색시킨 다음 clear zone이 나타난 단일 콜로니를 분리하여 액체배지에 배양하였다. 배양한 미생물 균주를 고체배지에 배양하고, 마크로젠에 동정 의뢰하였다.

<시험 2> 흰점박이꽃무지 생육증진을 위한 우수균주 구명 및 첨가 방법 개발

본 실험은 경상남도농업기술원 유용곤충연구소에 위치한 실내 사육실에서 1년간 수행하였다. 연구에 사용된 흰점박이꽃무지는 진주시 명석면에 위치한 태우농장에서 사육한 유충을 사용하였고 무게가 0.3 ± 0.1 g 인 유충을 선발하여 대상곤충으로 사용하였다. 참나무톱밥과 밀기울, 당밀을 시중에서 구입하여 사용하였고 발효균으로는 의령군농업기술센터 유용미생물배양센터에서 농민 대상으로 분양하고 있는 EM균과 1년차에 분리한 섬유소분해 활성 미생물 3종을 사용하였다. 재료별 배합비는 표 1과 같으며 수분은 60%로 맞추어 주었다. 준비된 먹이원에 각 부재료를 넣어 잘 혼합하여 뚜껑이 있는 100L 청색 플라스틱 통에 담아 항온 27 $^{\circ}$ C를 유지하는 실내 사육실에서 15일 간 숙성 시킨 후 뒤집기를 하여 발효시켰다. 발효가 완료된 먹이원은 흰점박이꽃무지 유충에 급여하며 실내 사육실(16L : 8D, 27 \pm 1 $^{\circ}$ C, 60 \pm 5% RH)에서 사육하였고 유충 무게 변화, 사충률 및 수확 일수 등을 3반복 조사하였다.

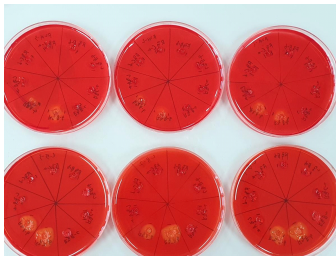
표 1. 처리 별 재료 배합 비

구분	참나무톱밥(kg)	밀기울(kg)	당밀(kg)	발효균(L)
대조구	25	25	2	1
T1	25	25	2	0.72
T2	25	25	2	0.72
T3	25	25	2	0.72

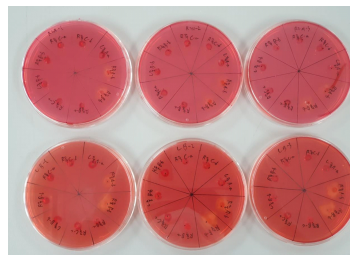
3. 주요결과

<시험 1> 흰점박이꽃무지 장내미생물 자원 분리 및 특성 분석

흰점박이꽃무지 3령충의 장내의 섬유소분해 활성을 갖는 미생물을 분리하기 위해 시험을 진행한 결과는 표 2 ~ 3에서 보는 바와 같다. 유충의 중장에서 4개, 후장에서 5개의 배지로 총 9개의 배지에서 섬유소분해 활성이 있는 것으로 확인되었다. 이들의 단일 콜로니를 분리한 후 cellulose 분해 활성을 clearzone을 크기로 비교한 결과 중장의 R2A 배지에서 배양한 A-b와 B-b 미생물이 각각 1.13mm, 1.33mm로 가장 높았고, xylan 분해 활성을 측정할 결과 후장의 R2A배지에 배양한 C-c를 제외한 cellulose분해 활성을 갖는 모든 균주에서 xylan분해 활성을 갖는 것으로 나타났다.



Cellulose 분해 활성



Xylan 분해 활성

그림 1. 흰점박이꽃무지 장내미생물 섬유소분해 활성 측정

표 2. 흰점박이꽃무지 장내미생물 cellulose분해 활성 결과

No.	Sample	CMC activity in R2A clearzone(mm)	CMC activity in LB clearzone(mm)
1	LB-mid-A-a	0.68c ¹⁾	0.68c
2	LB-mid-B-b	0.72c	0.70c
3	R2A-mid-A-b	1.05b	1.22b
4	R2A-mid-B-b	1.25a	1.42a
5	R2A-hind-B-b	0.65c	0.73c
6	R2A-hind-B-c	0.70c	0.67c
7	R2A-hind-C-a	0.67c	0.67c
8	R2A-hind-C-c	0.70c	0.70c
9	R2A-hind-C-d	0.73c	0.72c

¹⁾DMRT 5%.

표 3. 흰점박이꽃무지 장내미생물 xylan분해 활성 결과

No.	Sample	Xylan activity in xylan media clearzone(mm)
1	LB-mid-A-a	0.68
2	LB-mid-B-b	0.87
3	R2A-mid-A-b	0.60
4	R2A-mid-B-b	0.65
5	R2A-hind-B-b	0.65
6	R2A-hind-B-c	0.70
7	R2A-hind-C-a	0.75
8	R2A-hind-C-c	N.D.
9	R2A-hind-C-d	0.50

ND : Not Detected

섬유소분해 활성을 갖는 장내미생물을 동정한 결과는 표 4와 같다. 섬유소분해 활성이 확인된 미생물은 3가지의 *Bacillus* 속 3종, *Citrobacter* 속, 2가지의 *Paenibacillus* 속 1종으로 동정 되었으며 가장 활성이 높았던 R2A A-b와 B-b는 *Bacillus licheniformis* 균으로 나타났다.

표 4. 흰점박이꽃무지 섬유소분해 활성 장내미생물 동정 결과

No.	Sample	Closest relative(GenBank accession no.)	Similarity(%)
1	LB-mid-A-a	<i>Bacillus niacini</i> (NR_024695.1)	99
2	LB-mid-B-b	<i>Citrobacter koseri</i> (NR_118105.1)	99
3	R2A-mid-A-b	<i>Bacillus licheniformis</i> (KX785171.1)	99
4	R2A-mid-B-b	<i>Bacillus licheniformis</i> (KX785171.1)	99
5	R2A-hind-B-b	<i>Paenibacillus cineris</i> (NR_042189.)	99
6	R2A-hind-B-c	<i>Bacillus niacini</i> (NR_024695.1)	99
7	R2A-hind-C-a	<i>Paenibacillus cineris</i> (NR_042189.)	99
8	R2A-hind-C-c	<i>Paenibacillus cookii</i> (NR_025372.1)	99
9	R2A-hind-C-d	<i>Bacillus ginsengihumi</i> (NR_041378.1)	99

**<시험 2> 흰점박이꽃무지 생육증진을 위한 우수균주 구명 및 첨가 방법 개발**

참나무톱밥에 발효균주로 장내미생물 3종을 처리 한 후 사육 배지와 유충의 무기성분을 분석 한 결과는 표 5 ~ 6과 같다. *B.licheniformis*를 이용한 사육배지의 P₂O₅, K₂O, MgO 함량은 대조구 사육배지에 비해 높았고, 흰점박이꽃무지에 급이하였을 때, 유충의 P₂O₅와 MgO 함량은 대조구에 비해 높았다.

표 5. 장내미생물 처리별 흰점박이꽃무지 유충 사육용 배지 무기성분

처리내용 ¹⁾	T-N	P ₂ O ₅	K ₂ O	CaO	MgO	Na ₂ O
	----- % -----					
대조구	0.40b	0.47c	0.38b	0.28ab	0.17b	0.02b
T1	0.41b	0.65a	0.51a	0.32a	0.25a	0.03a
T2	0.47a	0.57b	0.40b	0.26b	0.23a	0.03a
T3	0.41b	0.57b	0.37b	0.29ab	0.23a	0.02b

¹⁾대조구: EM, T1: *B. licheniformis*, T2: *B. ginsengihumi*, T3: *C. koseri*.

²⁾DMRT 5%.

표 6. 장내미생물 처리별 발효톱밥 급이 흰점박이꽃무지 유충 무기성분

처리내용 ¹⁾	P ₂ O ₅	K ₂ O	CaO	MgO	Na ₂ O
	----- % -----				
대조구	2.68b	3.58a	0.41a	0.86b	0.47a
T1	2.83a	3.39a	0.28b	0.99a	0.46a
T2	2.30c	3.24a	0.29b	0.70c	0.47a
T3	2.65b	3.48a	0.31b	0.84b	0.56a

¹⁾대조구: EM, T1: *B. licheniformis*, T2: *B. ginsengihumi*, T3: *C. koseri*.

²⁾DMRT 5%.

발효 균주에 따른 흰점박이꽃무지 유충의 생육특성은 표 7에서 보는 바와 같다. 유충 마리 당 무게는 *B.licheniformis*과 *C. koseri*를 발효균주로 한 유충이 각각 1.82g, 1.72g으로 가장 높았고, *B.ginsengihumi*를 이용한 유충은 1.58g으로 생육증진 효과는 좋지 않았다. 사충률은 *B.licheniformis*과 *C.koseri*로 발효한 배지를 급여한 유충이 19.4%, 12.9%으로 가장 낮았고 수확일수도 10일 단축되었다. 하지만 *C.koseri*는 인체에 유해한 균주로 알려져있어 발효 균주로 사용하기에 어려움이 있을 것으로 판단된다.

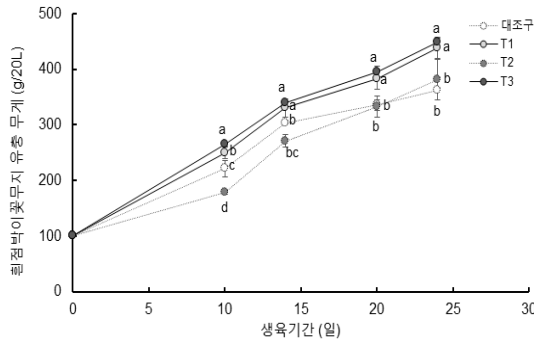


그림 1. 장내미생물 처리 발효톱밥 급이 흰점박이꽃무지 유충의 생육변화

표 7. 장내미생물 처리별 발효톱밥 급이 흰점박이꽃무지 유충의 생육 및 수량

처리내용 ¹⁾	생존율(%)	유충 중량(g/마리)	증체율(%)	수확 중량(g/20L)	수량지수
대조구	78.8b	1.54b	459b	363b	100
T1	80.6ab	1.82a	545a	438a	121
T2	80.4ab	1.58b	473ab	382b	105
T3	87.1a	1.72ab	515ab	449a	124

¹⁾대조구: EM, T1: *B. licheniformis*, T2: *B. ginsengihumi*, T3: *C. koseri*.

²⁾DMRT 5%.

발효 균주에 따른 흰점박이꽃무지 유충의 조단백, 조지방 및 중금속 함량을 측정된 결과는 표 8에서 보는 것과 같다. 조단백질 함량은 모든 처리구에서 약 68%로 유의적인 차이가 없었으나, *B.licheniformis*를 발효균주로 급이한 유충에서 12.3%로 가장 높았다. 중금속 함량은 모든 처리구에서 기준치 이하로 나타났다.

표 8. 장내미생물 처리별 발효톱밥 급이 흰점박이꽃무지 유충 조단백, 조지방 및 중금속 함량

처리내용 ¹⁾	조단백질	조지방	Cd	Pb	As
	----- % -----		----- mg/kg -----		
대조구	66.9a ²⁾	6.5b	0.0	0.0	0.0
T1	66.0a	12.3a	0.0	0.1	0.0
T2	69.1a	5.9b	0.0	0.0	0.0
T3	67.0a	6.2b	0.0	0.0	0.0

¹⁾대조구: EM, T1: *B. licheniformis*, T2: *B. ginsengihumi*, T3: *C. koseri*.

²⁾DMRT 5%.



흰점박이꽃무지 유충의 아미노산 함량을 측정한 결과는 표 9에서 보는 것과 같다. *Bacillus licheniformis* 처리구 급이시 흰점박이꽃무지 유충의 isoleucine, leucine, phenylalanine, tyrosine, aspartic acid, glutamic acid 함량이 대조구에 비해 높게 나타났다.

표 9. 장내미생물 처리별 발효톱밥 급이 흰점박이꽃무지 유충 아미노산 조성

Amino acid profile(g/100g)	대조구 ¹⁾	T1	T2	T3
Histidine	6.71ab ²⁾	6.32c	6.51bc	6.98a
Isoleucine	6.88b	7.06ab	7.14a	7.08ab
Leucine	9.30b	9.50ab	9.64a	9.55ab
Lysine	11.18ab	10.95b	11.25ab	11.38a
Methionine	2.53a	2.65a	2.65a	2.50a
Cystine	2.29a	2.32a	2.28a	2.43a
Phenylalanine	11.73ab	12.21a	12.06ab	11.66b
Tyrosine	11.23b	13.52a	13.66a	11.80b
Threonine	8.11a	7.25b	6.88c	6.91bc
Valine	6.54a	6.61a	6.69a	6.63a
Sum of essential amino acid	76.50	78.39	78.76	76.92
Alanine	8.10a	7.98a	8.14a	8.02a
Arginine	9.08b	9.19b	9.40ab	9.70a
Aspartic acid	11.33b	12.07a	12.02a	11.91a
Glutamic acid	17.47b	20.51a	20.63a	20.50a
Glycine	10.44b	10.47b	10.61b	10.86a
Proline	10.64d	13.71b	14.67a	11.70c
Serine	9.71a	8.81b	8.81b	8.38b
Sum of non-essential amino acid	76.77	82.74	84.28	81.07
Sum of total amino acid	153.27	161.13	163.04	157.99

¹⁾대조구: EM, T1: *B. licheniformis*, T2: *B. ginsengihumi*, T3: *C. koseri*.

²⁾DMRT 5%.

4. 결과요약

<시험 1> 점박이꽃무지 장내미생물 자원 분리 및 특성 분석

가. 흰점박이꽃무지 3령충의 장내의 섬유소분해 활성을 측정한 결과 증장에서 4개의 배지, 후장에서 5개의 배지로 총 9개의 배지에서 섬유소분해 활성이 있는 것으로 나타났다.

나. 이들의 단일 colony를 분리한 후 cellulose 분해 활성을 clearzone을 크기로 비교한 결과 증장의 R2A 배지에서 배양한 A-b와 B-b 미생물이 각각 1.13mm, 1.33mm로 가장 높았다.

다. 또한 이들의 xylan 분해 활성을 측정한 결과 후장의 R2A배지에 배양한 C-c를 제외한 cellulose분해 활성을 갖는 모든 균주에서 xylan분해 활성이 있는 것으로 나타났다.

라. 섬유소분해 활성이 확인된 미생물은 3가지의 *Bacillus* 속 3종, *Citrobacter* 속, 2가지의 *Paenibacillus* 속 1종으로 동정 되었으며 가장 활성이 높았던 R2A A-b와 B-b는 *Bacillus licheniformis* 균으로 확인되었다.

<시험 2> 흰점박이꽃무지 생육증진을 위한 우수균주 구명 및 첨가 방법 개발

- 가. 흰점박이꽃무지 *Bacillus licheniformis* 처리 사육배지의 P₂O₅, K₂O, MgO 함량은 대조구 사육배지에 비해 높았다.
- 나. 흰점박이꽃무지 *Bacillus licheniformis* 처리구 급이시 흰점박이꽃무지의 P₂O₅와 MgO 함량은 대조구에 비해 다소 높았다.
- 다. 흰점박이꽃무지 *Bacillus licheniformis* 처리구 급이시 1유충 중량이 1.82g/마리로 대조구 1.54g/마리에 비해 18%, 수확중량은 382g/20L으로 무처리구 363g/20L에 비해 5% 증대되었고 수확일수도 10일 정도 단축되었다.
- 라. 흰점박이꽃무지 *Bacillus licheniformis* 처리구 급이시 흰점박이꽃무지의 조단백질 함량은 대조구와 유의적인 차이는 없었고, 조지방 함량은 12.5%로 대조구 보다 높게 나타났으며, 중금속 함량은 기준치 이하로 나타났다.
- 마. *Bacillus licheniformis* 처리구 급이시 흰점박이꽃무지 유충의 Isoleucine, Leucine, Phenylalanine, Tyrosine, Aspartic acid, Glutamic acid 함량이 대조구에 비해 높게 나타났다.

5. 인용문헌

- Kang, S.J., Park, C. W., Han, S.C., Yi, Y.K., Kim, Y.G., 2005. A grub (*Protaetia brevitarsis seulensis*) rearing technique using cellulose- digesting bacteria and natural recycling of rearing byproduct to an organic fertilizer. Korean J. Appl. Entomol. 44, 189-197.
- Song, M.H., Han, M.H., Lee, S.H., Kim, E.S., Park, K.H., Kim, W.T., Choi, J.Y., 2017. Growth Performance and Nutrient Composition in the White-spotted Flower Chafer, *Protaetia brevitarsis*(Coleoptera: Scarabaeidae) Fed Agricultural By-product Soybean Curd Cake Korean JLS. 27, 1185-1190.
- Hyung-Cheol Moon, Ju-Rak Lim, Na-Young Park, Hyong-Gwon Chon, 2018. Development and Oviposition Characteristics of *Protaetia brevitarsis* (Coleoptera: Cetoniidae) Fed Fermented Mulberry Sawdust. Korean J. Appl. Entomol. 57(4), 373-379.

6. 연구결과 활용

연도 (연차)	활용구분	제 목
2021년도 (1년차)	학 술 발 표	○ 흰점박이꽃무지 섬유소분해 활성 장내미생물 분리 및 동정
2022년도 (2년차)	영 농 기 정 보 학 술 발 표	○ <i>Bacillus licheniformis</i> 를 활용한 흰점박이꽃무지 사료 제조방법 ○ 장내미생물 활용한 먹이원 급이에 따른 흰점박이꽃무지 유충 생육특성 비교
	특 허 출 원	○ 흰점박이꽃무지 유충의 생육 증진 효과를 가지는 장내 미생물 및 이의 용도



7. 연구원 편성

세부과제	구분	소속	직급	성명	수행업무	참여년도	
						'21	'22
1) 흰점박이꽃무지 생육증진용 장내미생물 이용기술 개발	책임자	유용곤충연구소	농업연구사	장다현	연구총괄	○	○
	공동연구자	유용곤충연구소	농업연구사	배성문	자료분석	○	○
	공동연구자	유용곤충연구소	농업연구사	정경희	자료분석	○	○
	공동연구자	유용곤충연구소	농업연구사	김중원	자료분석	○	○
	공동연구자	유용곤충연구소	농업연구사	이슬비	자료분석	○	○
	공동연구자	유용곤충연구소	농업연구관	이영한	업무조정	○	○