

보 문

## 목질섭식곤충의 장내 세균 다양성 분석 및 섬유소 분해균 탐색

최민영<sup>1,3</sup> · 안재형<sup>1</sup> · 송재경<sup>1</sup> · 김성현<sup>2</sup> · 배진우<sup>3</sup> · 원향연<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>국립농업과학원 농업미생물과, <sup>2</sup>국립농업과학원 곤충산업과, <sup>3</sup>경희대학교 생물학과

## Analysis of gut bacterial diversity and exploration of cellulose-degrading bacteria in xylophagous insects

Min-Young Choi<sup>1,3</sup>, Jae-Hyung Ahn<sup>1</sup>, Jaekyeong Song<sup>1</sup>, Seong-Hyun Kim<sup>2</sup>, Jin-Woo Bae<sup>3</sup>, and Hang-Yeon Weon<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Agricultural Microbiology Division, National Academy of Agricultural Science (NAAS), Rural Development Administration (RDA), Wanju 565-851, Republic of Korea

<sup>2</sup>Applied Entomology Division, NAAS, RDA, Wanju 565-851, Republic of Korea

<sup>3</sup>Department of Biology, Kyung Hee University, Seoul 130-701, Republic of Korea

(Received May 15, 2015; Accepted June 2, 2015)

**ABSTRACT:** In this study, gut bacterial communities in xylophagous insects were analyzed using the pyrosequencing of 16S rRNA genes for their potential biotechnological applications in lignocelluloses degradation. The result showed that operational taxonomic units (OTUs), species richness and diversity index were higher in the hindgut than in the midgut of all insect samples analyzed. The dominant phyla or classes were *Firmicutes* (54.0%), *Bacteroidetes* (14.5%), *γ-Proteobacteria* (12.3%) in all xylophagous insects except for *Rhinotermitidae*. The principal coordinates analysis (PCoA) showed that the bacterial community structure mostly clustered according to phylogeny of hosts rather than their habitats. In our study, the two carboxymethyl cellulose (CMC)-degrading isolates which showed the highest enzyme activity were most closely related to *Bacillus toyonensis* BCT-7112<sup>T</sup> and *Lactococcus lactis* subsp. *hordniae* NCDO 2181<sup>T</sup>, respectively. Cellulolytic enzyme activity analysis showed that  $\beta$ -1,4-glucosidase,  $\beta$ -1,4-endoglucanase and  $\beta$ -1,4-xylanase were higher in the hindgut of *Cerambycidae*. The results demonstrate that xylophagous insect guts harbor diverse gut bacteria, including valuable cellulolytic bacteria, which could be used for various biotechnological applications.

**Key words:** cellulolytic bacteria, lignocellulose degradation, pyrosequencing, xylophagous insect

천연가스, 원유, 석탄 등의 화석연료는 인간과 산업에 있어 서 중요한 자원이며, 석탄을 제외한 석유와 가스는 향후 40-50년 내에 거의 고갈될 것으로 예측된다(Konig *et al.*, 2013). 화석연료는 온실가스 방출, 사용비의 증가, 대기오염 등의 문제점이 있기 때문에, 인간에게 필요한 풍력, 수력, 태양에너지, 바이오가스, 바이오연료와 같은 재생 가능한 에너지의 개발이 필요하다(Hahn-Hagerdal *et al.*, 2006; Konig *et al.*, 2013). 당발효를 통해 생산되는 섬유소 기반 에탄올은 화석연료와는 달리 재생 에너지로서 환경친화적인 장점을 갖는다(Menon and Rao, 2012). 그러나 1세대 바이오 에탄올의 생산에 사용되던

바이오매스인 사탕수수나 전분은 인간과 동물의 식생활과 밀접하게 연결되어 있고, 증가하는 바이오 에탄올의 수요를 충족시키기에 충분하지 않았다(Farrell *et al.*, 2006). 뿐만 아니라 곡물의 가격이 상승함에 따라 식량으로 사용되지 않는 lignocellulose (셀룰로오스, 헤미셀룰로오스, 펙틴, 리그닌)를 통해 바이오연료를 생산하려는 시도가 활발하다(Sims *et al.*, 2010).

섬유소는 지구상에서 가장 풍부하게 존재하는 바이오매스 중 하나이며, 바이오에너지원으로서 큰 잠재력을 지니고 있기 때문에(Hamelinck *et al.*, 2005), 섬유소를 기반으로 얻을 수 있는 바이오연료가 주목을 받고 있다(Sun and Scharf, 2010). 바이오 에탄올은 바이오매스의 섬유소 부분을 가수분해하여 얻어진 당당류를 발효하여 생산되며(Hamelinck *et al.*, 2005), 미

\*For correspondence. E-mail: why@korea.kr;  
Tel.: +82-63-238-3042; Fax: +82-63-238-3834

생물을 이용한 발효 공정은 다른 방법들에 비해 경제적이고 환경친화적이라는 장점이 있다(Eijsink *et al.*, 2008). 다수의 가수분해 효소는 진균에서 유래되었으며, 낮은 pH와 고온 환경에서 불안정성과 낮은 효소활성 등의 한계가 존재하는 반면, 세균은 이와 같은 환경조건에서 견딜 수 있기 때문에 세균 유래의 새로운 효소를 분리하려는 연구가 수행되었다(Maki *et al.*, 2009). 국제적으로 바이오에너지 연구 계획의 주요 목표는 바이오매스를 다양한 화학물질과 연료로 전환시키는 효율을 향상시키는 것이다(Eriksson *et al.*, 2002). 특히 lignocellulose를 당으로 분해할 수 있는 새롭고 강력하며, 보다 경제적인 효소의 개발이 필요하다(Cook and Doran-Peterson, 2010).

곤충은 지구상에서 가장 다양하고 풍부한 동물 중 하나이며(Engel and Moran, 2013), 곤충의 장내에는 많은 미생물들이 서식하고 있다(Dillon and Dillon, 2004). 곤충의 장내에 공생하는 세균은 숙주의 생리 대사 조절, 섭식한 먹이의 소화 효율 촉진, 외부로부터 유입된 유해한 미생물의 억제 등의 중요한 역할을 수행하며(Kaufman and Klug, 1991; Dillon and Charnley, 2002; Engel and Moran, 2013), 인간의 장내 세균의 경우에는 영양분을 합성하고 면역체계와 관련한 상호작용 등의 역할을 수행한다(Clemente *et al.*, 2012). 대표적 목질 섭식 곤충인 흰개미의 경우, 장내미생물의 다양성과 장내에서 그들의 역할과 관련하여 많은 연구들이 수행되었지만, 상대적으로 다른 곤충들의 장내 시스템에 관한 연구는 부족한 실정이다(Shi *et al.*, 2011). 또한 목질을 섭식하는 고등 흰개미의 후장에는 목질 조각들이 풍부하지만, 이를 분해하는 활성 수준이 낮다는 이전 보고를 미루어 볼 때(Brune, 2014), 다른 곤충 종의 장내 미생물을 탐색해 볼 필요가 있다. 초식성 곤충은 먹이로써 다양한 수종을 이용할 수 있지만(Despres *et al.*, 2007), 대부분의 식물은 독성을 지니고 있으며 소화하기 힘든 lignocellulose로 구성되어 있어서 대부분의 동물들이 이용하기 어렵거나 불가능하다(Watanabe and Tokuda, 2010). 초식성 곤충의 장내에 공생하는 미생물들은 바이오매스를 분해하는 역할을 수행하며(Shi *et al.*, 2011), 이곳에서 발견한 새로운 미생물이 생산하는 효소를 바이오연료 분야에 적용할 수 있을 것이다(Cook and Doran-Peterson, 2010; Huang *et al.*, 2010). 이전 연구에서는 배양 의존적(Geib *et al.*, 2009; Gruenwald *et al.*, 2010; Arias-Cordero *et al.*, 2012), 배양 비의존적(Reid *et al.*, 2011; Colman *et al.*, 2012; Schauer *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2014; Yun *et al.*, 2014) 방법을 통해 곤충의 장내에 서식하는 미생물의 다양성을 분석하였다.

곤충 장내 미생물의 구조와 기능을 이해하기 위한 첫 번째 단계는 장내 미생물 군집을 분석하는 것이다(Koroiva *et al.*,

2013). 따라서 본 연구에서는 이전에 연구가 잘 되어있지 않은 목질 섭식 곤충의 곤충 종류 및 장 부위별 장내 세균 군집 조성 및 다양성을 분석하기 위해서 16S rRNA 유전자 염기서열 기반의 파이로시퀀싱 기법을 이용하였고, DNS (dinitrosalicylic acid) 방법을 이용하여 각 곤충의 장내 섬유소 분해능 시험을 수행하였다. 또한 향후 연구에 사용될 수 있는 섬유소 분해능을 가진 새로운 세균을 분리하기 위하여 곤충의 장 적출물을 희석평판 배양하였다.

## 재료 및 방법

### 목질 섭식 곤충 채집 및 장 적출

본 연구에서는 총 12개 지역 60개 지점에서 목질 섭식 곤충이 서식하고 있는 부후목을 수집하였으나 모든 실험을 진행하기에는 장 적출물의 양이 적었기 때문에 제주, 울릉, 중부(설악산, 칠보산, 수원, 중원산, 용문산), 남부(계룡산, 팔공산) 지방에서 채집한 총 21개를 실험에 사용하였다. 부후목은 적당히 해체하여 유충이 확인되면 약 50 cm로 잘라 수집하였다. 수집한 부후목은 마르지 않게 수분을 보충해주면서 한 달 동안 25°C에서 유지시킨 후 나무를 해체하여 사슴벌레(*Lucanidae*)와 하늘소(*Cerambycidae*)는 성충으로 우화하기 1-2령전 정도의 유충을 크기에 따라 3-5마리, 갑옷바퀴(*Cryptocercidae*)는 2마리, 흰개미(*Rhinotermitidae*)는 약 150마리를 수집하였다. 곤충은 형태학적 특성과 mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I (CO I) 유전자 염기서열을 분석하여 종을 동정하였다(Hebert *et al.*, 2003). 수집한 곤충은 70% 에탄올로 1분간 표면을 살균한 뒤 멸균 증류수로 두 번 세척하였다. 멸균된 핀셋과 메스를 이용하여 항문에서 가슴까지 절개한 후 중장과 후장으로 나누어 적출하였고, 적출한 장을 부위별로 모아 1.5 ml Eppendorf tube에 넣고 pestle tip (OPTIMA)을 이용하여 균질화하였다. 초기희석액을 제조하기 위하여 장 적출물 0.1 g을 취해 멸균된 0.85% NaCl 0.9 ml가 들어있는 1.5 ml Eppendorf tube에 넣고 cute mixer (EYELA)을 이용하여 현탁(2,000 rpm, 20분)한 후 실험에 사용하였다.

### 희석평판 배양 및 장내 세균 밀도 측정

CMC (carboxymethyl cellulose, Sigma Aldrich)를 분해하는 장내 세균을 분리하기 위하여 0.85% NaCl 0.9 ml이 들어있는 Eppendorf tube에 초기희석액을 0.1 ml씩 넣고 10배씩 희석하면서  $10^{-6}$ 까지 희석액을 제조하였다. CMC를 분해하는 미생물의 밀도를 확인하기 위해서  $10^{-4}$ - $10^{-6}$ 의 희석계열액 0.1

ml를 1% CMC가 첨가된 R2A 배지(Difco)와 Media II 배지 (Cazemier *et al.*, 2003)에 3번복으로 도말 한 후 28°C에서 7일간 배양하였다. 콜로니 계수를 한 후 CMC를 분해하는 세균의 밀도를 측정하기 위하여 평판에 0.1% congo red 용액을 넣고 30분간 염색한 후 흘러버린 뒤 1 M NaCl 용액으로 10분간 탈색한 후 투명환이 생긴 콜로니를 계수하였다. 분리한 장내 세균의 CMC 분해능을 확인하기 위하여 congo red 염색법을 이용하여 위와 동일한 방법으로 실험하였으며, 투명환의 직경을 측정하였다.

장 적출물의 pH는 초기 희석액 0.1 ml를 1.5 ml Eppendorf tube에 넣고 pH meter (Eutech instruments)를 이용하여 측정하였다.

### 장내 세균 분리 및 표준균주 유사도 검증

콜로니 계수를 마친 plate에서 균주는 형태학적 특성을 고려하여 선별적으로 분리하였으며, R2A broth 0.3 ml가 첨가된 96-deep well plate에 이쭉시개를 이용하여 접종한 후 28°C에서 3일간 진탕배양을 하였다. 각 well 당 멸균된 30% glycerol 40 µl가 첨가된 96-well microplate에 진탕배양한 균주 40 µl를 넣고 잘 혼합한 후 SILVERseal™ (Greiner Bio-One)으로 덮고 -70°C에서 동결 보존하였다. 장내 세균을 동정하기 위하여, 보존 시 96-deep well plate에 남아있는 균주를 96-well PCR tube에 넣고 액체질소와 80°C에서 1분씩 5번 반복하는 freezing-thawing 방법으로 세포를 파괴시킨 후 thermal cycler (Biometra)를 이용하여 16S rRNA 유전자를 증폭하였다. PCR 반응액은 총 25 µl이었으며 1x PCR buffer (Roche), 4종의 dNTP 각 0.2 mM, 정방향 및 역방향 프라이머 0.4 µM, bovine serum albumin 1 mg/ml, *Taq* DNA polymerase 1.25 units (Roche), 세포용해액 1 µl로 구성되었다. PCR은 초기 denaturation (95°C, 5분) 후 denaturation (95°C, 1분)-annealing (58°C, 1분)-extension (72°C, 90초)을 30회 반복하였다. 정방향 프라이머로는 27F (5'-AGAGTTTGTATCCTGGCTCAG-3'), 역방향 프라이머로는 1492R (5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGC-3')를 사용하였다(Chun *et al.*, 2010). 96 well DNA clean-up plate (Millipore)를 이용하여 PCR 산물을 정제한 후 16S rRNA 염기서열 분석을 수행하였다. 염기서열 분석은 (주)제노텍에서 수행하였으며, 800R 프라이머(5'-TACCAGGGTATCTAATCC-3')를 사용하여 약 500-700 bp 크기의 염기서열을 얻었다. 분석된 염기서열 데이터는 Seqman (version. 5.05) 프로그램으로 가공 처리하였으며, EzBioCloud 데이터베이스 (<http://www.ezbiocloud.net/>)(Kim *et al.*, 2012)에서 표준균주들과 염기서열의 유사도를 분석하였다.

### 파이로시퀀싱 분석

장 적출물의 DNA는 초기 희석액 0.5 ml로부터 FastDNA spin kit for soil (MP biomedical)를 이용하여 추출하였다. Qubit fluorometer (Invitrogen)를 이용하여 DNA의 농도를 측정 후 농도를 1 ng/µl로 조절하였다. 파이로시퀀싱 분석을 위해 thermal cycler (Biometra)를 이용하여 추출된 DNA의 16S rRNA 유전자를 증폭하였다. PCR 반응액은 총 30 µl이었으며 1x PCR buffer (Roche), 4종의 dNTP 각 0.2 mM, 정방향 및 역방향 프라이머 0.4 µM, bovine serum albumin 1 mg/ml, *Taq* DNA polymerase 1.25 units (Roche), DNA 2 µl로 구성되었다. PCR은 touch-down 방식으로 수행되었으며 초기 denaturation (94°C, 5분) 후 denaturation (94°C, 30초)-annealing (60°C, 45초)-extension (72°C, 90초)을 10회 반복하였다. 이 때 1회 반복 시마다 annealing 온도를 0.5°C씩 낮추었다. 다음 단계에서 denaturation (94°C, 30초)-annealing (55°C, 45초)-extension (72°C, 90초)을 20회 반복하였다. 정방향 프라이머는 V1-9F (5'-X-AC-GAGTTTGTATCMTGGCTCAG-3'), 역방향 프라이머는 V3-541R (5'-X-AC-WTTACCGCGGCTGCTGG-3')을 사용하였다. 여기서 X는 7-11개의 뉴클레오타이드로 구성된 바코드이며, 시료를 구별하기 위해 사용되었다. 증폭된 PCR 산물은 아가로스 겔 전기영동을 통하여 약 500 bp 크기의 밴드를 확인한 후 메스를 이용하여 밴드부분의 겔을 절단하고 QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN)로 정제하였다. 정제한 DNA를 서울대학교 농생명과학공동기기원에 의뢰하여 454 GS FLX Titanium Sequencing System (Roche)을 이용한 파이로시퀀싱을 수행하였다. 염기서열은 UPARSE 파이프라인(Edgar, 2013)을 이용하여 OTU 클러스터링을 수행하였다. 클러스터링 후 생성된 \*\_otu\_table.txt 파일은 펄 스크립트를 이용하여 행열을 변환한 후 생성한 \*.shared 파일을 Mothur (version 1.27.1)(Schloss *et al.*, 2009) 프로그램을 이용하여 분석하였다. 다음으로 RDP database (version 9)(Cole *et al.*, 2009)를 이용하여 진핵생물, 고세균, 엽록체, 미토콘드리아, 계(kingdom) 수준에서 분류가 안된 염기서열들을 제거한 후 각 시료의 염기서열을 1510개(갑옷바퀴 샘플은 755개)로 표준화하였다. 시료간 유사성 기반의 베타 다양성 분석은 mothur 프로그램의 tree.shared와 pcoa 명령어를 이용하여 수행하였다. 분석한 곤충 장내 세균 유래의 파이로시퀀싱은 농업생명공학정보센터(NABIC)에 NN-1687-000001-000040의 번호로 등록하였다.

### 장 적출물의 섬유소분해 효소활성시험

곤충별 장 적출물의 섬유소 분해활성을 측정하기 위하여

적출물 0.5 g을 sodium citrate buffer 500  $\mu$ l (50 mM, pH 7.0)가 첨가된 Eppendorf tube에 넣고 cute mixer (EYELA)을 이용하여 현탁(2,000 rpm, 10분)하였다. 샘플을 10,000  $\times$  g로 4°C에서 15분간 원심분리한 후 상층액을 새로운 1.5 ml Eppendorf tube에 옮기고, 단백질 농도를 측정하기 위해 Bradford assay (Bradford, 1976)를 수행하였다. 상층액 30  $\mu$ l와 sodium citrate buffer 270  $\mu$ l를 섞은 혼합물을 96-well microplate flat-bottom (Greiner bio-one)에 100  $\mu$ l씩 2반복으로 넣고, BSA (bovine serum albumin, Sigma Aldrich)를 standard (10–40  $\mu$ g/ml)로 하여 100  $\mu$ l씩 넣었다. 시료가 첨가된 모든 well에 Bradford working solution 100  $\mu$ l를 첨가한 후(Bradford, 1976) microplate reader (Infinite® 200 PRO NanoQuant, Tecan)에서 595 nm로 흡광도를 측정하였다. 측정된 시료와 standard의 값을 계산하여 각 시료에 sodium citrate buffer를 첨가하면서 단백질 농도를 60  $\mu$ g/ml로 조절하였다. 장 적출물 시료의 섬유소 분해활성을 측정하기 위하여, dinitrosalicylic acid (DNS) assay (Miller, 1959)를 이용하여 장 추출물과 기질이 반응할 때 생성되는 환원당의 양을 측정하였다. 섬유소 분해효소에 해당하는 4종류의 기질은 2% salicin ( $\beta$ -1,4-glucosidase), 2% CMC ( $\beta$ -1,4-endoglucanase), 1% Avicel ( $\beta$ -1,4-exoglucanase), 1% xylan ( $\beta$ -1,4-xylanase)이었고, 이를 대상으로 섬유소 분해활성을 측정하였다(Kukor *et al.*, 1988). Bradford assay를 이용하여 농도가 조절된 장 추출물 50  $\mu$ l와 기질 50  $\mu$ l를 PCR tube에 넣고 현탁한 뒤 thermal cycler (Biometra)를 이용하여 반응시켰고(37°C, 90분) 반응시키지 않은 것을 대조구로 사용하였다. 반응물과 포도당 표준 용액(50–1,000  $\mu$ g/ml)에 DNS 시약을 100  $\mu$ l 넣고 현탁한 뒤 thermal cycler를 이용하여 열처리(95°C, 5분)-급냉(4°C, 5분) 반응을 거쳐 microplate reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다(Miller, 1959).

## 결과 및 고찰

### 목질섭식 곤충의 종 풍부도 및 다양성 지수

본 연구에서 실험에 사용하기 위하여 국내의 총 10개 지역 내에 19개 지점에서 목질 섭식 곤충(사슴벌레, 하늘소, 갑옷바퀴, 흰개미)이 서식하고 있는 부후목을 수집하였다(Fig. 1 and Table 1). 목질 섭식 곤충에서 적출한 40개 장 시료(사슴벌레 중장과 후장 11개, 하늘소 중장과 후장 7개, 갑옷바퀴 중장과 후장 1개, 흰개미 장 2개) 유래의 파이로시퀀스를 분석한 결과, OTU 수는 사슴벌레 후장에서 405개로 가장 높았다(Table 2). 풍부도 추정치(Chao1, Ace)도 사슴벌레 후장(462.5, 464.7)에

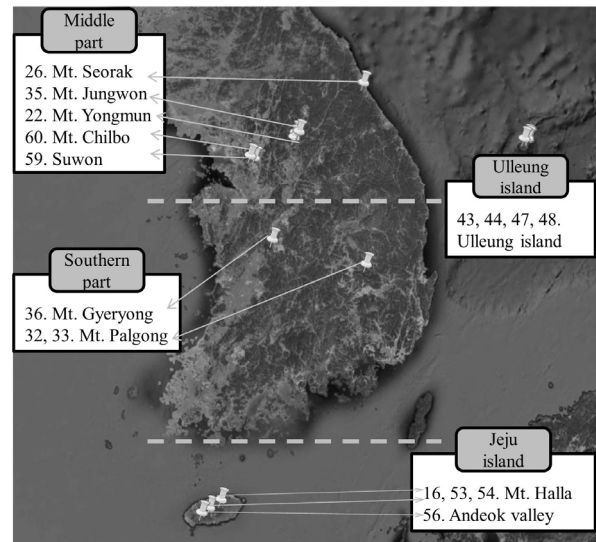


Fig. 1. Sampling locations of decayed tree-inhabiting xylophagous insects (*Lucanidae*, *Cerambycidae*, *Cryptoceridae* and *Rhinotermitidae*).

서 가장 높았고, 하늘소 중장(78.3, 115.4)에서 가장 낮았다. 다양성 지수(Shannon, inverse Simpson)는 흰개미 장(4.3, 30.9)에서 가장 높았으며, 하늘소 중장(1.7, 2.9)에서 가장 낮았다. OTU수, 종 풍부도, 다양성 지수는 모든 곤충 중에서 중장보다 후장이 더 높은 경향이 있었다. pH는 사슴벌레 중장(7.7)에서 가장 높았고 갑옷바퀴 후장(4.5)에서 가장 낮았다. 전체적으로 곤충의 장내 pH는 약산성-중성의 산도를 나타내었으며, 중장이 후장보다 더 높았다. 이전 연구에서 바퀴벌레 종인 *Shelfordella lateralis*의 장내 pH는 중장과 후장에서 각각 5.8과 6.8이었으며(Schauer *et al.*, 2012), 본 연구의 중장(5.4)과 후장(4.5)의 pH와 다른 경향이 있었다.

Rarefaction curve 분석 결과, 사슴벌레 후장에서 OTU 풍부도가 가장 높았으며, 갑옷바퀴 중장에서 가장 낮았다(Fig. 2). 하늘소와 사슴벌레의 중장과 후장, 갑옷바퀴 후장의 곡선은 샘플수가 커질수록 OTU 풍부도가 증가하는 반면에 갑옷바퀴 중장과 흰개미 장의 곡선은 상대적으로 완만한 곡선을 나타내었다.

### 세균 문 수준의 분포

문과 강 수준에서 파이로시퀀스를 분석한 결과(Fig. 3), 사슴벌레의 중장에서는 *Firmicutes* (58.2%)와  $\gamma$ -*Proteobacteria* (17.0%)가 우점하였고, 후장에서는 *Firmicutes* (78.2%)와 *Bacteroidetes* (12.3%)가 우점하였다. 하늘소의 중장에서는 *Firmicutes* (38.0%),  $\gamma$ -*Proteobacteria* (25.6%),  $\alpha$ -*Proteobacteria* (21.9%) 순으로 우점하였고, 후장에서는 *Firmicutes* (44.9%)와  $\gamma$ -



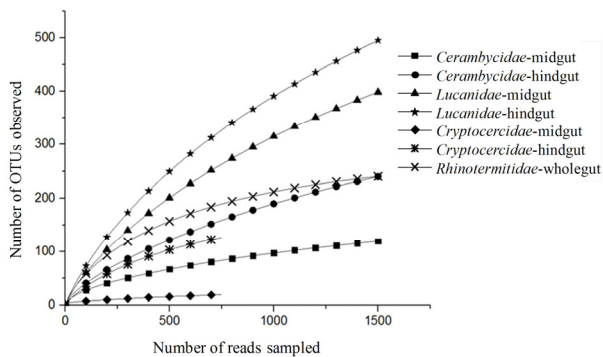
Table 1. Sample list of xylophagous insects collected

Sample ID <sup>a</sup>	Sampling date	Sampling location	Insect species	Sample type
14CH	3/28/14	Andeok valley	<i>Megopis sinica</i>	Hindgut
14CM	3/28/14	Andeok valley	<i>Megopis sinica</i>	Midgut
16LH	3/29/14	Mt. Halla	<i>Dorcus titanus</i>	Hindgut
16LM	3/29/14	Mt. Halla	<i>Dorcus titanus</i>	Midgut
20LH	4/9/14	Mt. Yongmun	<i>Prismognathus dauricus</i>	Hindgut
20LM	4/9/14	Mt. Yongmun	<i>Prismognathus dauricus</i>	Midgut
22CH	4/9/14	Mt. Yongmun	<i>Megopis sinica</i>	Hindgut
22CM	4/9/14	Mt. Yongmun	<i>Megopis sinica</i>	Midgut
26KH	4/19/14	Mt. Seorak	<i>Cryptocercus kyebeangensis</i>	Hindgut
26KM	4/19/14	Mt. Seorak	<i>Cryptocercus kyebeangensis</i>	Midgut
32LH	5/1/14	Mt. Palgong	<i>Prismognathus dauricus</i>	Hindgut
32LM	5/1/14	Mt. Palgong	<i>Prismognathus dauricus</i>	Midgut
33RG	5/1/14	Mt. Palgong	<i>Reticulitermes speratus</i>	Wholegut
35LH	5/10/14	Mt. Jungwon	<i>Prismognathus dauricus</i>	Hindgut
35LM	5/10/14	Mt. Jungwon	<i>Prismognathus dauricus</i>	Midgut
36CH	5/15/14	Mt. Gyeryong	<i>Megopis sinica</i>	Hindgut
36CM	5/15/14	Mt. Gyeryong	<i>Megopis sinica</i>	Midgut
40LH	5/20/14	Ulleung island	<i>Dorcus rectus</i>	Hindgut
40LM	5/20/14	Ulleung island	<i>Dorcus rectus</i>	Midgut
43RG	5/21/14	Ulleung island	<i>Reticulitermes speratus</i>	Wholegut
44LH	5/21/14	Ulleung island	<i>Dorcus rectus</i>	Hindgut
44LM	5/21/14	Ulleung island	<i>Dorcus rectus</i>	Midgut
47CH	5/21/14	Ulleung island	<i>Psephactus remiger</i>	Hindgut
47CM	5/21/14	Ulleung island	<i>Psephactus remiger</i>	Midgut
48LH	5/22/14	Ulleung island	<i>Lucanidae</i> sp.	Hindgut
48LM	5/22/14	Ulleung island	<i>Lucanidae</i> sp.	Midgut
53LH	6/11/14	Mt. Halla	<i>Figulus venustus</i>	Hindgut
53LM	6/11/14	Mt. Halla	<i>Figulus venustus</i>	Midgut
54CH	6/11/14	Mt. Halla	<i>Cerambycidae</i> sp.	Hindgut
54CM	6/11/14	Mt. Halla	<i>Cerambycidae</i> sp.	Midgut
54LH	6/11/14	Mt. Halla	<i>Dorcus rectus</i>	Hindgut
54LM	6/11/14	Mt. Halla	<i>Dorcus rectus</i>	Midgut
56LH	6/12/14	Mt. Halla	<i>Dorcus rectus</i>	Hindgut
56LM	6/12/14	Mt. Halla	<i>Dorcus rectus</i>	Midgut
59MH	7/9/14	Suwon	<i>Monochamus alternatus</i>	Hindgut
59MM	7/9/14	Suwon	<i>Monochamus alternatus</i>	Midgut
60CH	7/8/14	Mt. Chilbo	<i>Cerambycidae</i> sp.	Hindgut
60CM	7/8/14	Mt. Chilbo	<i>Cerambycidae</i> sp.	Midgut
60LH	7/8/14	Mt. Chilbo	<i>Dorcus titanus</i>	Hindgut
60LM	7/8/14	Mt. Chilbo	<i>Dorcus titanus</i>	Midgut

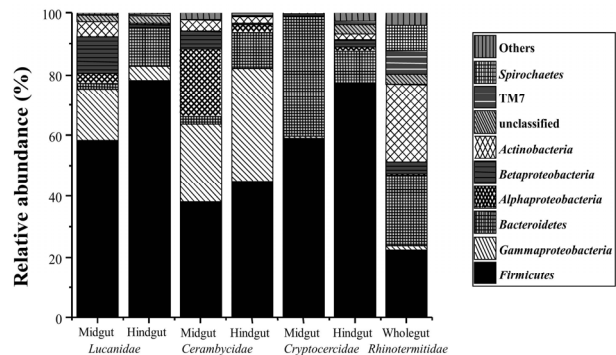
<sup>a</sup> Sample ID: number, sampling order; alphabet, acronyms for the insect species and sample type

**Table 2.** Summary of the pyrosequencing data and pH values of xylophagous insects guts

Insect family	Sample type	No. of OTUs <sup>a</sup>	Species richness <sup>a</sup>		Diversity index <sup>a</sup>		pH
			Chao1	Ace	Shannon	Inverse Simpson	
<i>Lucanidae</i> (N <sup>c</sup> =11)	Midgut	211 (81-547) <sup>b</sup>	286.3 (104.1-593.5)	302.1 (106.9-604.5)	3.5 (2.2-5.1)	18.2 (3.6-65.5)	7.7 (6.4-9.5)
	Hindgut	405 (95-607)	462.5 (116.4-664.3)	464.7 (121.4-671)	4.2 (2-5.2)	29.7 (2.5-84.5)	7.0 (6.3-7.8)
<i>Cerambycidae</i> (N=7)	Midgut	44 (12-84)	78.3 (33-202)	115.4 (36.8-379.7)	1.7 (0.8-2.5)	2.9 (1.7-4.5)	6.5 (5.5-7.8)
	Hindgut	116 (15-373)	156.8 (33-439.3)	166.1 (38.6-429.2)	2.3 (1-4.3)	8.8 (2.3-26.5)	6.3 (5.0-7.2)
<i>Cryptoceridae</i> (N=1)	Midgut	41	91	168.3	1.6	4.1	5.4
	Hindgut	237	304.5	310.3	3.1	6.1	4.5
<i>Rhinotermitidae</i> (N=2)	Wholegut	193 (177-208)	228.7 (205.7-251.7)	235.1 (216.5-253.7)	4.3 (4.2-4.4)	30.9 (23.7-38)	6.5 (6.4-6.7)

<sup>a</sup> Calculated at a 97% 16S rRNA similarity cut-off<sup>b</sup> Brackets: minimum and maximum values<sup>c</sup> N, the number of samples**Fig. 2.** Rarefaction curves indicating the observed number of OTU<sub>0.03</sub> within the 16S rRNA gene pyrosequences derived from xylophagous insects guts.

*Proteobacteria* (37.1%)가 우점하였다. 하늘소 두 종의 장내 세균 군집을 분석한 이전 연구에서 유리알락하늘소(*Anoplophora glabripennis*)의 경우에는 *Firmicutes*,  $\alpha$ -*Proteobacteria*,  $\gamma$ -*Proteobacteria* 순으로 우점하였고, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*,  $\beta$ -*Proteobacteria*는 낮은 비율로 존재하였는데(Schloss et al., 2006), 이 결과는 본 연구에서 하늘소 증장의 분포 비율과 유사했다. 갑옷바퀴의 증장에는 *Firmicutes* (59.1%), *Bacteroidetes* (39.3%)가 우점하였고, 후장에서는 *Firmicutes* (77.2%), *Bacteroidetes* (10.5%)가 우점하였다. 4가지의 먹이(chicken feed, soy, wheat bran, bran-cellulose)를 먹인 바퀴벌레(*Shelfordella lateralis*) 후장의 장내 세균 군집을 분석한 이전 연구에 의하면 bran-cellulose를 먹인 *S. lateralis*를 제외하고는 *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*가 우점하였으며, bran-cellulose를 먹인 *S. lateralis*에서는 *Firmicutes*와 *Bacteroidetes*만 우점하였다(Schauer et al., 2014). 흰개미의 경우는 *Actinobacteria* (25.5%), *Bacteroidetes* (23.0%), *Firmicutes* (22.4%)가 우점하

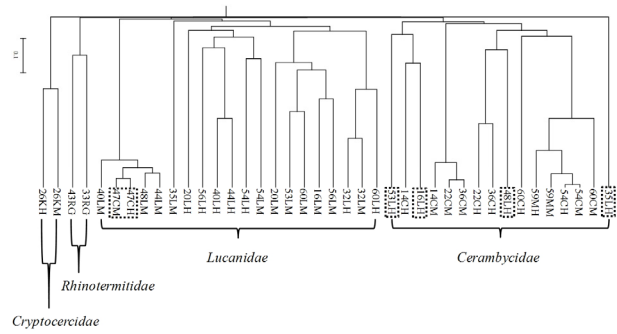
**Fig. 3.** Phyla distributions of gut bacteria in the insect families *Lucanidae*, *Cerambycidae*, *Cryptoceridae* and *Rhinotermitidae*. For *Proteobacteria*, class distribution is indicated.

였고, 다른 곤충과는 달리 *Spirochaetes* (8.3%)가 특이적으로 검출되었다. 목질을 섭식하는 하등흰개미인 *Reticulitermes speratus*의 장내 *Spirochaetes*의 비율(42-63%)은 본 연구 결과와는 차이가 있지만, *Bacteroidetes* (3-19%)와 *Firmicutes*은 유사한 비율로 분포하였다(Grieco et al., 2013; Brune, 2014). 이전 연구에서는 목질을 섭식하는 고등흰개미의 장 부위인 후위(paunch, third proctodeal segment)에서는 *Spirochaetes* 문에 속하는 *Treponema* 속의 비율이 높았으며, 목질의 구성성분인 cellulose와 xylan의 분해, CO<sub>2</sub>-환원을 통한 acetate 합성, 질소 고정 등의 역할을 수행한다고 보고되었다(Warnecke et al., 2007). 화본성(수수, 옥수수)과 목본성(소나무, 포플러) 먹이를 먹인 흰개미의 장내 세균 군집을 비교한 이전 연구에서는, *Firmicutes*와 *Spirochaetes*는 화본, 목본성 식물을 먹는 모든 곤충에서 공유하고 있기 때문에, 이들이 식물의 lignocellulose를 분해하는 역할을 수행할 것으로 추정되며(Huang et al., 2013), 이들 분류군은 본 연구에서 31%의 비율을 차지하고 있

었다. 곤충 목 수준에서 사슴벌레와 하늘소가 속한 *Coleoptera* 목과 갑옷바퀴와 흰개미가 속한 *Blattodea* 목의 세균 분포를 비교하면,  $\gamma$ -*Proteobacteria*는 갑옷바퀴 증장(0.5%)과 후장(0%), 흰개미 장(1.4%)보다 사슴벌레 증장(17.0%)과 후장(4.6%), 하늘소 증장(25.6%)과 후장(37.1%)에서 점유 비율이 높은 반면, *Bacteroidetes*는 사슴벌레 증장(1.8%)과 후장(12.3%), 하늘소 증장(2.6%)과 후장(11.8%)보다 갑옷바퀴 증장(39.3%)과 후장(10.5%), 흰개미 장(23.0%)에서 점유 비율이 높았다. 흰개미를 제외한 나머지 곤충에서는 *Firmicutes* (38.0–78.2%)의 비율이 가장 높았으며, 사슴벌레와 하늘소의 *Bacteroidetes*의 비율은 증장(1.8%, 2.6%)에 비해 후장(12.3%, 11.8%)에서 높았다.  $\gamma$ -*Proteobacteria* 강의 *Enterobacteraceae* 과는 인간과 곤충의 장내에서 빈번하게 확인되며 비타민의 합성, 페로몬 생산, 먹이를 분해한다고 보고되었으며(Xu and Gordon, 2003), 이는 본 연구의 사슴벌레(21.5%)와 하늘소(61.6%)의 장에 공생하고 있었다. *Actinobacteria*에 속한 많은 종들은 cellulase와 xylanase를 생산한다고 보고되었으며(Lykidis *et al.*, 2007; Park *et al.*, 2007), 본 연구에서 분석한 모든 곤충(0.3–25.5%)의 장에 공생하고 있었다.

**곤충 장 내 군집 구조 분석**

곤충의 장내세균에 대한 군집구조간의 비교는 16S rRNA 염기서열간의 계통분류학적 유사도를 고려한 방법인 unweighted UniFrac 분석과 공유 또는 비공유되는 OTU의 풍부도에 근거한 Theta-YC distance index를 이용하였다. Theta-YC distance index를 이용한 클러스터링 분석 결과, 사슴벌레 후장시료 4개(16LH, 35LH, 48LH, 53LH) 시료와 울릉도에서 채집한 하늘소 2개(47CM, 47CH) 시료를 제외한 나머지 시료들 중 하늘소와 사슴벌레는 곤충 과별로 클러스터가 형성되었으며, 곤충 시료 내에서 증장과 후장의 차이는 없었다(Fig. 4). Unweighted UniFrac-PCoA 분석에서도 울릉도 하늘소를 제외하고 각 곤충 종으로 그룹핑 되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 5). 따라서 지역보다는 곤충 종류가 장내 세균 군집구조에 더 큰 영향을 미치는 것임을 알 수 있었다. 벌노린재과(*Pyrrhocoridae*) 증장의 세균 군집 다양성을 분석한 이전 연구에서도 군집 구조는 5개 지역 간 큰 차이가 없었지만 곤충의 먹이에 따라 변화한다고 보고하였다(Sudakaran *et al.*, 2012). 또한 목질 섭식( xylophagous) 흰개미의 장내 세균 군집은 서로 클러스터를 형성하는 반면에, 잔사식생(detritivorous) 흰개미는 딱정벌레목(*Coleoptera*)과 파리목(*Diptera*)과 같은 서로 다른 목의 잔사식생 곤충과 장내 세균 군집이 유사하다고 보고되었고(Colman *et al.*, 2012), 또한 초본성과 목본성 식물을 먹인 흰개

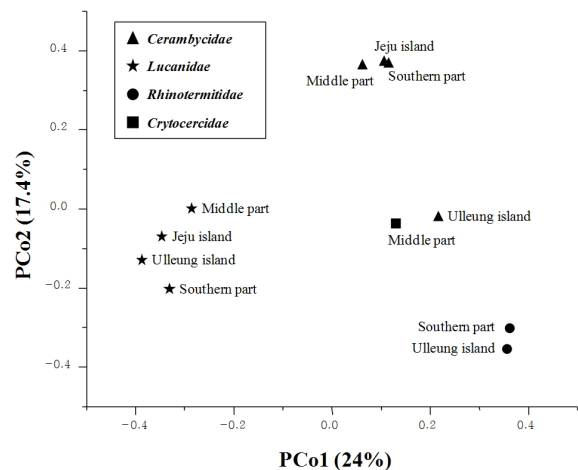


**Fig. 4.** UPGMA dendrogram constructed using Theta-YC distance indices showing similarities among the bacterial community structure in the insect families *Lucanidae*, *Cerambycidae*, *Cryptocercidae* and *Rhinotermitidae*.

미(*Reticulitermes flavipes*)에서 같은 먹이를 먹인 곤충간에 장내 세균 군집이 유사하다는 연구를 미루어볼 때(Huang *et al.*, 2013), 곤충의 장내 세균 군집은 먹이에 의한 영향이 큰 것으로 판단되었다.

**장 적출물의 섬유소 분해활성 측정 결과**

하늘소와 사슴벌레의 장 적출물을 4개의 서로 다른 기질(salicin,  $\beta$ 1,4-glucosidase; CMC,  $\beta$ 1,4-endoglucanase; Avicel,  $\beta$ 1,4-exoglucanase; xylan,  $\beta$ 1,4-xylanase)과 반응시켜 섬유소 효소 활성을 측정하였다(Fig. 6).  $\beta$ 1,4-glucosidase (salicin) 효소 활성은 14 CM, 20 CM, 22 CM, 54 CM에서는 측정이 불가능할 정도로 높은 수치를 나타냈지만, 측정 가능한 시료에서는 36 CM, 47 CM, 60 CM에서 25.2–31.5 mg glucose/g gut extract로 가장 높았고, 다른 시료에서는 0.7 mg/g 이하로 활성이 낮았다.  $\beta$ 1,4-endoglucanase (CMC) 효소 활성은 하늘소



**Fig. 5.** Communities clustered using PCoA of the unweighted UniFrac distance matrix. The percentage of variation explained by the plotted principal coordinates is indicated on the axes.

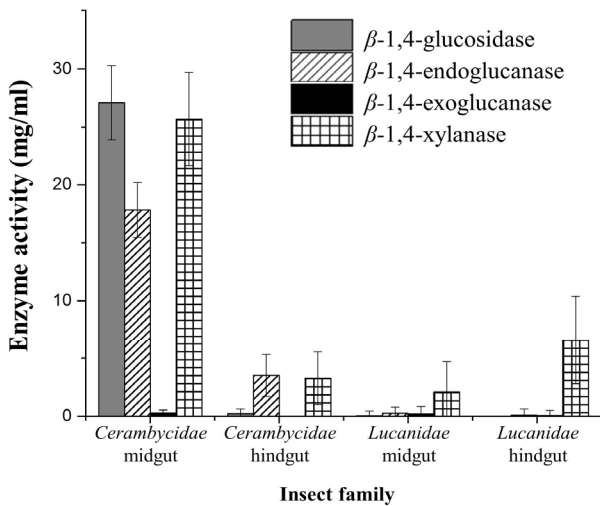


Fig. 6. Cellulolytic enzyme activities ( $\beta$ -1,4-glucosidase,  $\beta$ -1,4-endoglucanase,  $\beta$ -1,4-exoglucanase and  $\beta$ -1,4-xylanase) from larval insect gut extracts.

중장 시료 모두에서 14.6–21.5 mg/g 이상으로 다른 곤충에 비해 높았다. 모든 하늘소 후장 시료의 분해 활성은 1.6–5.2 mg/g 이었고, 그 외의 시료에서는 1.1 mg/g 이하로 하늘소 시료와 비교하여 낮았다.  $\beta$ -1,4-exoglucanase (Avicel) 효소 활성은 사슴벌레 후장(44LM)에서 1.2 mg/g로 다른 장 적출물들에 비해 높았으나, 다른 기질의 분해 활성에 비해 현저히 낮았다.  $\beta$ -1,4-xylanase (Xylan) 효소 활성은 다른 3개의 효소 활성 보다 대부분 높았다. 특히 하늘소 중장 시료에서 가장 활성이 높았으며, 장 부위별로는 하늘소의 후장(1.4–5.8 mg/g) 보다 중장(21.0–33.8 mg/g)에서 활성이 높았고, 사슴벌레는 장 부위별로 효소 활성의 차이가 크지 않았다. 세 종류의 기질(salicin, CMC, Avicel)을 분해하는 유리알락하늘소(*Anoplophora glabripennis*)의 장내 효소 활성을 측정하던 이전 연구와 비교하였을 때(Geib *et al.*, 2009), 본 연구의 효소 활성 결과와는  $\beta$ -1,4-endoglucanase >  $\beta$ -1,4-glucosidase >  $\beta$ -1,4-exoglucanase 순으로 일치하였다. 하늘소(*Cerambycidae*), 누에(*Bombicidae*), 메뚜기(*Acrididae*)의 장내 공생균에 대한 이전 연구는 곤충 장내 섬유소 분해 효소 활성이 일반적으로 섭취한 먹이의 섬유소 조성 결과와 연관되어 있을 것이라고 보고하였다(Shi *et al.*, 2011).

### 장내 세균 및 섬유소 분해균의 밀도

하늘소 7개 시료와 사슴벌레 9개 시료의 장내 세균 밀도를 측정하기 위하여 R2A 배지와 Media II 배지를 사용하여 장 부위별로 희석평판을 수행하였다(Table 3). 장내 세균의 밀도는 R2A에 배양한 하늘소(447.1)의 후장에서 가장 높았다. R2A와 Media II 배지에서 장내 세균의 밀도는 하늘소가 사슴벌레

Table 3. Colony counts per g gut extract of two insect families on R2A medium and media II ( $\times 10^7$  CFU/g gut extract)

Gut type	Medium	<i>Cerambycidae</i> (N=7)			<i>Lucanidae</i> (N=9)		
		Mean	Min.	Max.	Mean	Min.	Max.
Midgut	R2A	55.3	0.7	138.7	13.9	1.0	101.0
	Media II	44.6	0.8	145.7	12.4	0.3	89.7
Hindgut	R2A	447.1	8.5	896.0	29.9	1.2	219.3
	Media II	326.4	7.9	779.3	27.0	0.6	221.3

Table 4. CMC-hydrolyzing colony counts per g gut extract of two insect families on R2A and media II ( $\times 10^7$  CFU/g gut extract)

Gut type	Medium	<i>Cerambycidae</i> (N=7)			<i>Lucanidae</i> (N=9)		
		Mean	Min.	Max.	Mean	Min.	Max.
Midgut	R2A	5.1	ND <sup>a</sup>	36.0	0.3	ND	2.3
	Media II	10.6	ND	65.3	5.1	ND	45.7
Hindgut	R2A	9.5	ND	30.7	4.0	ND	35.7
	Media II	3.8	ND	18.3	19.8	ND	178.3

<sup>a</sup> ND: not detected

보다 약 3-15배 가량 높았으며, 배지 별로는 Media II 배지(12.4–326.4)보다 R2A 배지(13.9–447.1)에서 높았고, 장 부위 별로는 중장(13.2, 50.0)보다 후장(28.5, 386.8)에서 두 배지 모두에서 높았다. 이전 연구에 따르면 바퀴벌레의 중장보다 후장에서 세균 밀도가 높았으며(Schauer *et al.*, 2014), 풍뎅이과(*Scarabaeidae*)에서도 세 가지 탄소원(포도당, CMC, xylan)이 함유된 배지에서 배양된 호기성, 혐기성 세균의 밀도가 후장에서 더 높았다(Cazemier *et al.*, 2003). 이 장내세균 중에서 섬유소 분해균의 밀도를 측정하기 위하여, CMC가 첨가된 2 종류의 배지(R2A, Media II)에 희석평판 한 뒤, congo red 용액을 사용하여 분해능을 갖는 콜로니를 계수하였다(Table 4). 그 결과, 후장의 Media II 배지에서의 밀도를 제외하고는 사슴벌레(0.3–5.1)보다 하늘소(5.1–10.6)에서 섬유소 분해균의 밀도가 높았으며, 하늘소의 후장을 제외하고는 R2A (0.3–5.1)보다 Media II 배지(5.1–19.8)에서 섬유소 분해균의 밀도가 높았다. 곤충의 장내 세균 밀도와 섬유소 분해균의 밀도는 사슴벌레보다 하늘소에서 높았지만, 전체 분리균에 대한 섬유소 분해균의 비율은 하늘소(9.1%) 보다 사슴벌레(32.5%)가 R2A (6.7%) 보다 Media II 배지(34.8%)에서 높았기 때문에 Media II 배지를 이용하여 사슴벌레 장에서 섬유소 분해균을 분리하는 것이 더 효과적일 것으로 판단되었다.

### 장내세균의 동정 및 CMC 분해능

하늘소(135 균주), 사슴벌레(136 균주), 갑옷바퀴(9 균주),



**Table 5. Distributions at the genus level of cellulose-degrading bacteria isolated from xylophagous insect guts (%)**

Genus	<i>Cerambycidae</i>		<i>Lucanidae</i>		<i>Cryptocercidae</i>		<i>Rhinotermitidae</i>
	M <sup>a</sup> (72) <sup>b</sup>	H (63)	M (72)	H (64)	M (5)	H (4)	W (19)
<i>Raoultella</i>	22.2	9.5	11.1	14.1	-	-	10.5
<i>Burkholderia</i>	9.7	1.6	16.7	10.9	40.0	-	15.8
<i>Serratia</i>	1.4	17.5	8.3	4.7	-	-	10.5
<i>Cedecea</i>	8.3	6.3	13.9	3.1	-	-	-
<i>Gryllotalpicola</i>	5.6	-	8.3	10.9	-	-	5.3
<i>Lactococcus</i>	12.5	4.8	-	-	-	-	31.6
<i>Enterococcus</i>	9.7	7.9	4.2	-	-	-	-
<i>Klebsiella</i>	2.8	12.7	1.4	4.7	-	-	-
<i>Escherichia</i>	-	1.6	1.4	12.5	-	-	-
<i>Dyella</i>	4.2	-	2.8	1.6	-	25.0	5.3
<i>Cellulomonas</i>	1.4	9.5	-	-	-	-	-
<i>Pantoea</i>	2.8	1.6	5.6	-	-	-	-
<i>Weissella</i>	1.4	-	-	-	60.0	50.0	-
<i>Bacillus</i>	-	1.6	-	6.3	-	-	-
Others	18.1	25.4	26.4	31.3	-	25.0	21.1

<sup>a</sup> Symbols: M, midgut; H, hindgut; W, wholegut

<sup>b</sup> Brackets: the number of isolates

**Table 6. Analysis of 16S rRNA gene sequence of highly cellulolytic bacteria isolated from xylophagous insect gut samples**

Isolate	CMCase activity <sup>a</sup>	Closest relative (GenBank accession no.)	Similarity (%)
32LH-43	+++	<i>Bacillus toyonensis</i> BCT-7112 <sup>T</sup> (CP006863)	99.9
60CM-43	+++	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>hordniae</i> NCDO 2181 <sup>T</sup> (AB100804)	99.7
08LM-32	++	<i>Pseudoxanthomonas spadix</i> IMMIB AFH-5 <sup>T</sup> (AM418384)	99.3
14CH-01	++	<i>Serratia fonticola</i> LMG 7882 <sup>T</sup> (AVAH01000293)	97.0
14CH-02	++	<i>Raoultella ornithinolytica</i> JCM 6096 <sup>T</sup> (AJ251467)	99.2
16LH-03	++	<i>Burkholderia caballeronis</i> TNe-841 <sup>T</sup> (EF139186)	98.1
16LH-05	++	<i>Dysgonomonas oryzaevi</i> Dy73 <sup>T</sup> (AB547446)	96.4
20CH-04	++	<i>Raoultella planticola</i> DSM 3069 <sup>T</sup> (X93215)	100.0
20CH-21	++	<i>Raoultella planticola</i> DSM 3069 <sup>T</sup> (X93215)	100.0
20CM-02	++	<i>Raoultella planticola</i> DSM 3069 <sup>T</sup> (X93215)	100.0
20CM-22	++	<i>Raoultella planticola</i> DSM 3069 <sup>T</sup> (X93215)	99.5
20CM-23	++	<i>Raoultella planticola</i> DSM 3069 <sup>T</sup> (X93215)	99.3
20CM-24	++	<i>Raoultella planticola</i> DSM 3069 <sup>T</sup> (X93215)	99.2
24EG-41	++	<i>Raoultella planticola</i> DSM 3069 <sup>T</sup> (X93215)	99.5
35LM-41	++	<i>Raoultella planticola</i> DSM 3069 <sup>T</sup> (X93215)	99.5
43RG-04	++	<i>Pseudoxanthomonas sacheonensis</i> BD-c54 <sup>T</sup> (EF575564)	94.1
48LH-07	++	<i>Stenotrophomonas panacihumi</i> MK06 <sup>T</sup> (GQ856217)	97.2
54LM-44	++	<i>Raoultella planticola</i> DSM 3069 <sup>T</sup> (X93215)	99.5
59MH-21	++	<i>Pluralibacter gergoviae</i> JCM 1234 <sup>T</sup> (AB004748)	99.9
59MM-21	++	<i>Pluralibacter gergoviae</i> JCM 1234 <sup>T</sup> (AB004748)	99.2
60CM-42	++	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>hordniae</i> NCDO 2181 <sup>T</sup> (AB100804)	99.5

<sup>a</sup> Cellulase activities are represented as the size of the clear zone diameter: ++, 2-5 mm; +++, 5-8 mm

흰개미(19균주) 4종의 곤충에서 총 299균주의 장내세균을 분리하였으며, 16S rRNA 유전자 염기서열 분석을 통하여 속 수준까지 동정하였다(Table 5). 그 결과, 하늘소 증장에서는 *Raoultella* (22.2%)와 *Lactococcus* (12.5%), 후장에서는 *Serratia* (17.5%)와 *Klebsiella* (12.7%)가 주로 분리되었고, 사슴벌레 증장에서는 *Bulkholderia* (16.7%), *Cedecea* (13.9%), *Raoultella* (11.1%), 후장에서는 *Raoultella* (14.1%), *Escherichia* (12.5%), *Gryllotalpica*와 *Bulkholderia* (10.9%)가 주로 분리되었다. 갑옷바퀴의 증장과 후장에서는 *Weissella*가 각각 60%, 50%를 차지하였으며, 흰개미에서는 *Lactococcus* (31.6%)와 *Bulkholderia* (15.8%)가 주로 분리되었다.

이들 곤충 장내 분리 세균 중 총 21균주가 CMC 분해능을 가지는 것으로 확인되었다(Table 6). 특히 활성이 가장 높았던 균주는 사슴벌레 후장과 하늘소 증장에서 분리한 32LH-43 균주와 60CM-43 균주로 이들은 각각 *Bacillus toyonensis* BCT-7112<sup>T</sup> (CP006863)와 *Lactococcus lactis* subsp. *hordniae* NCDO 2181<sup>T</sup> (AB100804)와 유연관계가 높은 것으로 확인되었다. 분리한 균주 중 모든 곤충에서 *Raoultella planticola* (23균주)와 유연관계가 높은 균주가 가장 많이 분리되었으며, 이들 균주에서 14CH-01, 16LH-05, 43RG-04, 48LH-07, 36CH-24 균주는 표준 균주의 유사도를 근거로 하여 새로운 속이나 종일 가능성이 높은 것으로 확인되었다.

## 적 요

목질 섭식 곤충에 관한 장내 세균 군집의 연구를 이용한 lignocellulose의 분해는 생명 공학적 응용에 있어 큰 잠재력을 갖는다. 본 연구에서 목질 섭식 곤충의 장내 세균 군집은 16S rRNA 유전자를 기반으로 한 파이로시퀀싱 방법을 이용하여 분석되었다. 분석된 모든 곤충에서 증장보다 후장에서 OTU 수, 종 풍부도, 다양성 지수가 높았다. 세균 문 또는 강 수준의 다양성을 분석한 결과, 흰개미를 제외한 곤충의 장내 군집에는 *Firmicutes*, *Bacteroidetes*,  $\gamma$ -*Proteobacteria*가 우점하였다. PCoA (principal coordinates analysis)를 이용하여 세균의 군집 구조를 분석한 결과, 서식지보다는 곤충의 과별로 클러스터링 되는 경향이였다. CMC 분해 활성이 가장 높은 두 균주는 *Bacillus toyonensis* BCT-7112<sup>T</sup>와 *Lactococcus lactis* subsp. *hordniae* NCDO 2181<sup>T</sup>과 유연관계가 높았다. 장 적출물의 섬유소 분해활성 실험 결과, 하늘소 후장에서  $\beta$ -1,4-glucosidase,  $\beta$ -1,4-endoglucanase,  $\beta$ -1,4-xylanase의 효소활성이 가장 높았다. 본 연구에서는 목질 섭식 곤충의 장내에 다양하고 풍부

한 세균이 서식하며, 섬유소를 분해하는 세균이 존재한다는 사실을 확인하였고, 이로부터 다양하고 유용한 섬유소 분해균을 분리할 수 있을 것으로 판단되었다.

## 감사의 말

본 연구는 농촌진흥청 국립농업과학원 농업과학기술 연구개발사업(과제번호: PJ01003501)의 지원에 의해 수행되었습니다.

## References

- Arias-Cordero, E., Ping, L.Y., Reichwald, K., Delb, H., Platzer, M., and Boland, W. 2012. Comparative evaluation of the gut microbiota associated with the below- and above-ground life stages (larvae and beetles) of the forest cockchafer, *Melolontha hippocastani*. *PLoS ONE* 7, e51557.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Brune, A. 2014. Symbiotic digestion of lignocellulose in termite guts. *Nat. Rev. Microbiol.* 12, 168-180.
- Cazemier, A.E., Verdoes, J.C., Reuhsaet, F.A.G., Hackstein, J.H.P., van der Drift, C., and den Camp, H. 2003. *Promicromonospora pachmodae* sp. nov., a member of the (hemi)cellulolytic hindgut flora of larvae of the scarab beetle *Pachmoda marginata*. *Antonie van Leeuwenhoek* 83, 135-148.
- Chun, J., Kim, K.Y., Lee, J.H., and Choi, Y. 2010. The analysis of oral microbial communities of wild-type and toll-like receptor 2-deficient mice using a 454 GS FLX Titanium pyrosequencer. *BMC Microbiol.* 10, 101.
- Clemente, J.C., Ursell, L.K., Parfrey, L.W., and Knight, R. 2012. The impact of the gut microbiota on human health: an integrative view. *Cell.* 148, 1258-1270.
- Cole, J.R., Wang, Q., Cardenas, E., Fish, J., Chai, B., Farris, R.J., Kulam-Syed-Mohideen, A.S., McGarrell, D.M., Marsh, T., Garrity, G.M., et al. 2009. The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic Acids Res.* 37, D141-D145.
- Colman, D.R., Toolson, E.C., and Takacs-Vesbach, C.D. 2012. Do diet and taxonomy influence insect gut bacterial communities? *Mol. Ecol.* 21, 5124-5137.
- Cook, D.M. and Doran-Peterson, J. 2010. Mining diversity of the natural biorefinery housed within *Tipula abdominalis* larvae for use in an industrial biorefinery for production of lignocellulosic ethanol. *Insect Sci.* 17, 303-312.
- Despres, L., David, J.P., and Gallet, C. 2007. The evolutionary ecology

- of insect resistance to plant chemicals. *Trends Ecol. Evol.* **22**, 298–307.
- Dillon, R. and Chamley, K.** 2002. Mutualism between the desert locust *Schistocerca gregaria* and its gut microbiota. *Res. Microbiol.* **153**, 503–509.
- Dillon, R.J. and Dillon, V.M.** 2004. The gut bacteria of insects: Nonpathogenic interactions. *Annu. Rev. Entomol.* **49**, 71–92.
- Edgar, R.C.** 2013. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. *Nat. Methods* **10**, 996–998.
- Eijsink, V.G.H., Vaaje-Kolstad, G., Varum, K.M., and Horn, S.J.** 2008. Towards new enzymes for biofuels: lessons from chitinase research. *Trends Biotechnol.* **26**, 228–235.
- Engel, P. and Moran, N.A.** 2013. The gut microbiota of insects - diversity in structure and function. *FEMS Microbiol. Rev.* **37**, 699–735.
- Eriksson, T., Borjesson, J., and Tjerneld, F.** 2002. Mechanism of surfactant effect in enzymatic hydrolysis of lignocellulose. *Enzyme Microb. Technol.* **31**, 353–364.
- Farrell, A.E., Plevin, R.J., Turner, B.T., Jones, A.D., O'Hare, M., and Kammen, D.M.** 2006. Ethanol can contribute to energy and environmental goals. *Science* **311**, 506–508.
- Geib, S.M., Jimenez-Gasco, M.D.M., Carlson, J.E., Tie, M., and Hoover, K.** 2009. Effect of host tree species on cellulase activity and bacterial community composition in the gut of larval asian longhorned beetle. *Environ. Entomol.* **38**, 686–699.
- Grieco, M.A., Cavalcante, J.J., Cardoso, A.M., Vieira, R.P., Machado, E.A., Clementino, M.M., Medeiros, M.N., Albano, R.M., Garcia, E.S., de Souza, W., et al.** 2013. Microbial community diversity in the gut of the south American termite *Cornitermes cumulans* (Isoptera: Termitidae). *Microb. Ecol.* **65**, 197–204.
- Gruenwald, S., Pilhofer, M., and Hoell, W.** 2010. Microbial associations in gut systems of wood- and bark-inhabiting longhorned beetles [Coleoptera: Cerambycidae]. *Syst. Appl. Microbiol.* **33**, 25–34.
- Hahn-Hagerdal, B., Galbe, M., Gorwa-Grauslund, M.F., Liden, G., and Zacchi, G.** 2006. Bio-ethanol - the fuel of tomorrow from the residues of today. *Trends Biotechnol.* **24**, 549–556.
- Hamelinck, C.N., van Hooijdonk, G., and Faaij, A.P.C.** 2005. Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle- and long-term. *Biomass Bioenerg.* **28**, 384–410.
- Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L., and DeWaard, J.R.** 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. R. Soc. B-Biol. Sci.* **270**, 313–321.
- Huang, X.F., Bakker, M.G., Judd, T.M., Reardon, K.F., and Vivanco, J.M.** 2013. Variations in diversity and richness of gut bacterial communities of termites (*Reticulitermes flavipes*) fed with grassy and woody plant substrates. *Microb. Ecol.* **65**, 531–536.
- Huang, S.W., Zhang, H.Y., Marshall, S., and Jackson, T.A.** 2010. The scarab gut: A potential bioreactor for bio-fuel production. *Insect Sci.* **17**, 175–183.
- Kaufman, M.G. and Klug, M.J.** 1991. The contribution of hindgut bacteria to dietary carbohydrate utilization by crickets (Orthoptera, Gryllidae). *Comp. Biochem. Physiol.* **98**, 117–123.
- Kim, O.S., Cho, Y.J., Lee, K., Yoon, S.H., Kim, M., Na, H., Park, S.C., Jeon, Y.S., Lee, J.H., Yi, H., et al.** 2012. Introducing EzTaxon-e: A prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **62**, 716–721.
- Konig, H., Li, L., and Frohlich, J.** 2013. The cellulolytic system of the termite gut. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **97**, 7943–7962.
- Koroiva, R., Souza, C.W.O., Toyama, D., Henrique-Silva, F., and Fonseca-Gessner, A.A.** 2013. Lignocellulolytic enzymes and bacteria associated with the digestive tracts of *Stenochironomus* (Diptera: Chironomidae) larvae. *Genet. Mol. Res.* **12**, 3421–3434.
- Kukor, J.J., Cowan, D.P., and Martin, M.M.** 1988. The role of ingested fungal enzymes in cellulose digestion in the larvae of cerambycid beetles. *Physiol. Zool.* **61**, 364–371.
- Lykidis, A., Mavromatis, K., Ivanova, N., Anderson, I., Land, M., DiBartolo, G., Martinez, M., Lapidus, A., Lucas, S., Copeland, A., et al.** 2007. Genome sequence and analysis of the soil cellulolytic actinomycete *Thermobifida fusca* YX. *J. Bacteriol.* **189**, 2477–2486.
- Maki, M., Leung, K.T., and Qin, W.S.** 2009. The prospects of cellulase-producing bacteria for the bioconversion of lignocellulosic biomass. *Int. J. Biol. Sci.* **5**, 500–516.
- Menon, V. and Rao, M.** 2012. Trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals & biorefinery concept. *Prog. Energy Combust. Sci.* **38**, 522–550.
- Miller, G.L.** 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**, 426–428.
- Park, D.S., Oh, H.W., Jeong, W.J., Kim, H., Park, H.Y., and Bae, K.S.** 2007. A culture-based study of the bacterial communities within the guts of nine longicorn beetle species and their exo-enzyme producing properties for degrading xylan and pectin. *J. Microbiol.* **45**, 394–401.
- Reid, N.M., Addison, S.L., Macdonald, L.J., and Lloyd-Jones, G.** 2011. Biodiversity of active and inactive bacteria in the gut flora of wood-feeding huhu beetle larvae (*Prionoplus reticularis*). *Appl. Environ. Microbiol.* **77**, 7000–7006.
- Schauer, C., Thompson, C., and Brune, A.** 2014. Pyrotag sequencing of the gut microbiota of the cockroach *Shelfordella lateralis* reveals a highly dynamic core but only limited effects of diet on community structure. *PLoS ONE* **9**, e85861.
- Schauer, C., Thompson, C.L., and Brune, A.** 2012. The bacterial community in the gut of the cockroach *Shelfordella lateralis* reflects the close evolutionary relatedness of cockroaches and termites. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**, 2758–2767.
- Schloss, P.D., Delalibera, I., Handelsman, J., and Raffa, K.F.** 2006. Bacteria associated with the guts of two wood-boring beetles: *Anoplophora glabripennis* and *Saperda vestita* (Cerambycidae). *Environ. Entomol.* **35**, 625–629.
- Schloss, P.D., Westcott, S.L., Ryabin, T., Hall, J.R., Hartmann, M., Hollister, E.B., Lesniewski, R.A., Oakley, B.B., Parks, D.H., Robinson, C.J., et al.** 2009. Introducing mothur: Open-source,

- platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**, 7537–7541.
- Shi, W., Ding, S.Y., and Yuan, J.S.** 2011. Comparison of insect gut cellulase and xylanase activity across different insect species with distinct food sources. *Bioenerg. Res.* **4**, 1–10.
- Sims, R.E.H., Mabee, W., Saddler, J.N., and Taylor, M.** 2010. An overview of second generation biofuel technologies. *Bioresour. Technol.* **101**, 1570–1580.
- Sudakaran, S., Salem, H., Kost, C., and Kaltenpoth, M.** 2012. Geographical and ecological stability of the symbiotic mid-gut microbiota in European firebugs, *Pyrrhocoris apterus* (Hemiptera, Pyrrhocoridae). *Mol. Ecol.* **21**, 6134–6151.
- Sun, J.Z. and Scharf, M.E.** 2010. Exploring and integrating cellulolytic systems of insects to advance biofuel technology. *Insect Sci.* **17**, 163–165.
- Wang, A.L., Yao, Z.C., Zheng, W.W., and Zhang, H.Y.** 2014. Bacterial communities in the gut and reproductive organs of *Bactrocera minax* (Diptera: Tephritidae) based on 454 pyrosequencing. *PLoS ONE* **9**, e106988.
- Wamecke, F., Luginbuhl, P., Ivanova, N., Ghassemian, M., Richardson, T.H., Stege, J.T., Cayouette, M., McHardy, A.C., Djordjevic, G., Aboushadi, N., et al.** 2007. Metagenomic and functional analysis of hindgut microbiota of a wood-feeding higher termite. *Nature* **450**, 560–565.
- Watanabe, H. and Tokuda, G.** 2010. Cellulolytic systems in insects. *Annu. Rev. Entomol.* **55**, 609–632.
- Xu, J. and Gordon, J.I.** 2003. Honor thy symbionts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 10452–10459.
- Yun, J.H., Roh, S.W., Whon, T.W., Jung, M.J., Kim, M.S., Park, D.S., Yoon, C., Nam, Y.D., Kim, Y.J., Choi, J.H., et al.** 2014. Insect gut bacterial diversity determined by environmental habitat, diet, developmental stage, and phylogeny of host. *Appl. Environ. Microbiol.* **80**, 5254–5264.