

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2012년 10월 18일 (18.10.2012)



(10) 국제공개번호
WO 2012/141391 A1

- (51) 국제특허분류:
A01N 1/02 (2006.01) A01N 63/02 (2006.01)
C12N 1/20 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2011/006988
- (22) 국제출원일: 2011년 9월 22일 (22.09.2011)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2011-0034743 2011년 4월 14일 (14.04.2011) KR
- (71) 출원인 (US 을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): **경북대학교 산학협력단 (KYUNGPOOK NATIONAL UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION)** [KR/KR]; 대구 북구 산격동 1370, 702-010 Daegu (KR).
- (72) 발명자: **권**
- (75) 발명자/출원인 (US 에 한하여): **신재호 (SHIN, Jae-Ho)** [KR/KR]; 대구 북구 침산 2동 코오롱하늘채아파트

103 동 103 호, 702-750 Daegu (KR). **장은경 (JANG, Eun-Kyung)** [KR/KR]; 대구 북구 복현동 복현화성 104 동 702 호, 702-765 Daegu (KR). **박건석 (PARK, Gun-Seok)** [KR/KR]; 경남 거제시 고현동 화인아트빌라 109 동 301 호, 656-775 Gyeongsangnam-do (KR).

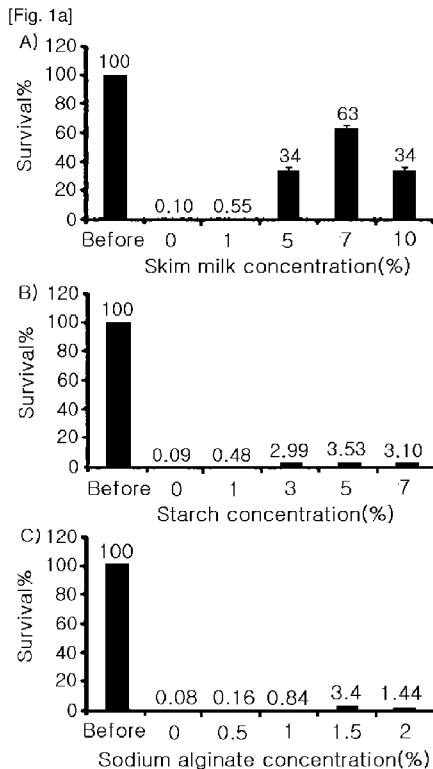
(74) 대리인: **김순웅 (KIM, Soon Woong)**; 서울시 구로구 구로동 197-22 번지 에이스테크노타워 5 차 601 호, 152-766 Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

[다음 쪽 계속]

(54) Title: *PHOTORHABDUS TEMPERATA* M1021 (DEPOSIT NO. KCTC12006BP) FREEZE-DRYING METHOD AND FREEZE-DRIED POWDER

(54) 발명의 명칭: 포투랍두스 템페라타 M1021 (수탁번호: KCTC 12006BP) 동결건조 방법 및 동결 건조 분말.



(57) Abstract: The present invention relates to a *Photorhabdus temperata* M1021 (Deposit No. KCTC12006BP) freeze-drying method comprising the addition of one or more preservatives selected from the group consisting of skim milk, sodium alginate, starch and glucose. The present invention also relates to a freeze-dried powder of a *Photorhabdus temperata* M1021 strain produced by means of such a freeze-drying method, and to a biological agrochemical which comprises the freeze-dried powder.

(57) 요약서: 본 발명은 스킴 밀크, 소듐 알지네이트, 전분(starch), 글루코스로 이루어진 군에서 1 이상 선택된 보존제를 첨가하는 것을 특징으로 하는 포투랍두스 템페라타 M1021(수탁번호: KCTC 12006BP) 동결건조 방법에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 상기와 같은 동결 건조 방법에 의하여 만들어진 포투랍두스 템페라타 M1021 균주의 동결 건조 분말과 이를 포함하는 것을 특징으로 하는 생물 농약에 관한 것이다.

WO 2012/141391 A1



(84) **지정국** (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의
역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM,
KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,
ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV,
MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK,

SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

명세서

발명의 명칭: 포투랍두스 템페라타

M 1 0 2 1 (수탁번호: K C T C 12006 B P) 동결 건조 방법 및 동결 건조 분말.

기술분야

- [1] 본 발명은 신규한 균주인 포투랍두스 템페라타 M1021(수탁번호: KCTC 12006BP)를 동결 건조하는 방법에 관한 것이다. 보다 상세하게는 보존제를 첨가하는 것을 특징으로 하는 동결 건조 방법에 관한 것이다.
- [2] 또한 본 발명은 상기와 같은 동결 건조 방법에 의하여 만들어진 포투랍두스 템페라타 M1021균주의 동결 건조 분말에 관한 것이며 이를 포함하는 것을 특징으로 하는 생물 농약에 관한 것이다.

배경기술

- [3] 그동안 해충을 방제하기 위하여 유기 화학적 합성 살충제가 널리 사용되고 있으나, 수십 년에 걸친 연용과 남용으로 인하여 해충 군의 이상격발 또는 저항성 해충의 출현, 인간을 비롯한 비목적 층에 대한 독성발현 및 환경 계의 오염 등의 많은 부작용을 야기하고 있다. 전 세계적으로 농약의 잔류 독성과 환경오염으로 인하여 여러 가지 문제점이 나타나자 인류의 건강을 지키기 위하여 우선 독성이 강한 유기합성 농약의 사용을 자제하기로 국제적인 합의가 도출되기도 하였다. 이러한 국제 협약에 의하여 전 세계는 2004년에 지난 10년 전에 사용하던 화학합성 유기인계, 유기염소계 살충제의 50%까지 생산이 감축되었고, 2010년까지 다시 유기인계, 유기염소계 살충제의 생산을 50% 감소시키기로 한 국제적 협의에 동의하여 현재 실행 단계에 있다.
- [4] 그러나 독성농약 감축생산 협의 이후, 현재 전 세계적으로 많은 연구진이 환경 친화적 살충제를 개발하려고 많은 노력을 했음에도 불구하고, 이제까지 사용하였던 유기인계, 유기염소계 농약을 대체할 새롭고 안전한 살충제를 개발하지 못하였기 때문에 전 세계적인 농약감축회의 의결내용이 지켜지기 어려운 상황이며, 조만간 안전한 살충제가 개발되어 생산되지 않으면 해충방제용 살충제뿐만 아니라 식량을 비롯한 농산물 생산에 관련된 농업용 살충제의 부족으로 인해 국내외적으로 큰 문제가 대두될 것으로 예상된다.
- [5] 최근에는 화학비료나 농약의 사용을 줄이거나 대체할 수 있으며, 인축에 위해가 적고 작물에 피해를 일으키지 않으며, 토양 생태계와 같은 환경에 대한 피해가 적은 생물학적 방제의 기술이 미생물에 의해 가능하다는 것이 국내외 여러 연구자들에 의해 입증됨에 따라, 화학농약의 폐단을 보완할 수 있는 생물 농약에 대한 관심과 연구가 증가하고 있는 추세이다.
- [6] 생물 농약에 있어서 미생물을 이용한 생물 농약의 이용이 기대된다. 이러한 미생물의 생물 농약 제제로의 이용을 위하여 동결 건조 방법을 사용할 수 있다.

동결 건조는 미생물을 장기 보존하거나 효소 또는 기능성 단백질 등과 같이 수용액 상태에서 온도 등의 조건에 따라 상대적으로 불안정한 활성 물질을 보존하거나, 식품의 향과 성상을 원형을 그대로 보존하기 위하여 사용되는 건조 방법 중의 하나이다.

- [7] 한편, 나비목(*Lepidopter*)에는 나비 류와 나방 류가 포함되며, 상기 목에 속하는 종들은 알, 유충, 번데기, 성충 4단계를 거쳐 완전변태를 하는데, 이 중 나비목 유충은 초식성이어서 광범위한 농작물에 대하여 큰 경제적 피해를 일으키는 대표적인 해충이다. 특히, 나비 목에 속하는 꿀벌부채명나방(*Galleria mellonella*)의 유충은 벌집에 가해하는 해충으로서 나방 성충이 벌통 안에 낳은 알에서 부화한 애벌레는 벌집과 꿀을 먹고 자라기 때문에 가해를 당한 꿀벌집은 너덜너덜한 상태가 되고 결국 무너지게 되어 꿀 농가에 막대한 경제적 손실을 주고 있다. 또한, 나비 목에 속하는 담배거세미나방은 가해하는 기주의 종류가 100 여종 이상인 광식성 및 잡식성 해충으로 이 유충은 선천적으로 약제에 대한 높은 내성과 낮은 감수성으로 어린 유충기를 제외한 중령 이상의 유충은 약제방제가 매우 어려운 대표적인 난방제 해충으로 알려져 있다 (Choi et al., Kor. J. Appl. Entomol., 1996, 35: 249-253; Bae et al., Kor. J. Appl. Entomol., 2003, 42: 225-231). 밤에기잎말이나방은 유충이 밤송이 속으로 뚫고 들어가 밤의 과육을 식해하며, 혹명나방은 벼의 주요 해충으로서 벼잎이 세로로 말리면서 그 속에서 잎살을 갉아 먹으므로 곡식의 낱알이 잘 여물지 않는 피해를 주는 등 경제작물에 큰 피해를 주고 있다. 따라서, 상기와 같이 농가에 경제적 손실을 안겨주는 나비목 해충에 대하여 생물학적으로 방제할 수 있는 우수한 살충력을 갖춘 저독성의 환경친화적 미생물 제제의 개발이 요구되고 있는 실정이다.

- [8] 이에 본 발명자들은 나비 목 해충을 효과적으로 방제할 수 있는 생물 농약을 개발하기 위하여 예의 노력한 결과 신규한 균주인 포투랍두스 템페라타 M1021(수탁번호:KCTC 12006BP)를 밝히고 이를 효율적으로 생물 농약으로 사용하기 위하여 균주에 가장 적합한 동결 건조 방법을 찾아내어 이를 생물학적 농약 제제로 제공하기 위하여 본 발명을 완성하였다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [9] 본 발명의 목적은 신규한 균주인 포투랍두스 템페라타 M1021 균주에 가장 적합한 동결 건조 방법을 제공하는 것이다.
- [10] 또한, 본 발명은 상기와 같은 동결 건조 방법으로 제조된 포투랍두스 템페라타 M1021균주의 동결 건조 분말과 이를 포함하는 것을 특징으로 하는 생물 농약을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제 해결 수단

- [11] 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 스킴 밀크, 소듐 알지네이트, 전분(starch), 글루코스로 이루어진 군에서 1이상 선택된 보존제를 첨가하는 것을

특징으로 하는 포토랍두스 템페라타 M1021(수탁번호: KCTC 12006BP) 동결건조 방법을 제공한다.

[12] 또한 본 발명은 상기와 같은 동결 건조 방법에 의하여 제공되는 포토랍두스 템페라타 M1021의 동결 건조 분말을 제공한다.

[13] 본 발명은 또 다른 양태로써, 상기와 같은 동결 건조 분말을 포함하는 생물 농약을 제공한다.

발명의 효과

[14] 본 발명에 따르면 환경 친화적인 미생물 농약 제제로써 포토랍두스 템페라타 M1021 균주를 이용하여 나비목 해충을 방제할 수 있으며 특히 신규한 균주인 포토랍두스 템페라타 M1021 균주에 가장 적합한 동결 건조 방법을 발명함으로써 균주의 생존율을 높이고 제제화를 용이하게 함으로써 생물 농약으로의 이용가능성을 증대할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[15] 도 1a 및 도 1b는 동결건조 후의 포토랍두스 템페라타 M1021의 생존에 미치는 보존제의 효과를 도시한다. (A: 스킴밀크, B: 전분 C: 소듐 알지네이트 D: 소듐 글루타메이트, E: 글루코스)

[16] 도 2는 4°C에서 동결 건조 분말 포토랍두스 템페라타 M1021의 생존력에서의 스킴밀크의 효과를 도시한다. (스킴밀크는 25배 세포 현탁액에 첨가되었다. 첨가한 농도는 각각 ■: 0%, ○: 1%, △: 5%, ▲: 7%, ●: 10% 을 나타낸다.)

[17] 도 3은 포토랍두스 템페라타 M1021 동결 건조의 살충 효과를 나타낸다. (투약 농도는 각각 ■: 2.02×10^4 , ◇: 2.02×10^3 , ▲: 2.02×10^2 , ◆: 2.02×10^1 , ●: 2.02×10^0 , △: 2.02×10^{-1} , ○: 대조군을 나타낸다.)

[18] 도 4는 동결 건조한 포토랍두스 템페라타 M1021을 처리시 살충 효과를 나타낸다. (왼쪽 대조군, 오른쪽 처리군)

[19]

발명의 실시를 위한 형태

[20] 이하 본 발명을 상세하게 설명한다.

[21] 본 발명은 포토랍두스 템페라타 M1021(수탁번호: KCTC 12006BP)의 동결건조방법을 제공한다.

[22] 본 발명에 사용된 포토랍두스 템페라타 M1021(수탁번호: KCTC 12006BP)은 곤충병원성 선충으로부터 분리 동정한 것으로서, 상기 균주의 16s rDNA 염기서열(1493bp)을 공지 균주와 비교한 결과 포토랍두스 템페라타(*Photorhabdus temperata*)와 99%의 상동성을 나타내는 것을 특징으로 한다. 본 균주는 종래 존재하는 균주와 완전히 동일하지 않은 균주로 해당 종에 속하는 신규한 균주이며, 이러한 분석결과에 따라 본 발명의 균주를 포토랍두스 템페라타 M1021로 명명하고, 2011년 1월 4일자로 국립농업과학원 농업유전자원센터에 수탁번호 KACC 91627P로 기탁하였다. 또한 2011년 8월

23일자로 국제 기탁기관에 KCTC 12006BP으로 기탁하였다.

- [23] 본 발명의 균주의 형태적, 생화학적 특성을 살펴보면, 그람 음성 간균으로서 카탈라아제, 프로테아제, 리파아제 효소 활성을 나타내며, 배양 온도는 28°C 내지 30°C에서 성장이 활발하며 배양 온도가 높아짐에 따라 성장이 저해됨을 특징으로 할 수 있다.
- [24] 이러한 포투랍두스 템페라타 M1021의 효율적인 동결 건조를 위하여 본 발명은 스킴 밀크, 소듐 알지네이트, 전분(starch), 글루코스로 이루어진 균에서 1이상 선택된 보존제를 첨가한다.
- [25] 본 발명의 “보존제”란, 영양분의 고갈, 삼투압 등의 다양한 물리 화학적 외부 충격으로부터 세포를 보호하고, 특히 동결하는 동안 형성된 얼음 결정으로부터 세포를 보호하는 작용을 하는 것을 말한다.
- [26] 본 발명에 사용된 “스킴 밀크”란 우유에서 지방분을 원심 분리하고 남은 부분으로써, 본 발명의 스킴 밀크는 1% 내지 10%(w/v) 농도로 첨가하여 동결 건조에 의한 균주의 사멸을 방지하는 보존제로 사용할 수 있다. 바람직하게는 7%(w/v) 농도로 첨가할 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [27] 또한 본 발명의 “소듐 알지네이트”란, 식품의 점착성 및 점도를 증가시키고 유화안정성을 증진하며 식품의 물성 및 촉감을 향상시키기 위한 식품 첨가물으로써, 화학식은 $(C_6H_7O_6Na)_n$ 임을 특징으로 한다.
- [28] 본 발명은 소듐 알지네이트를 0.5% 내지 1.5%(w/v)농도로 첨가하여 포투랍두스 템페라타 M1021을 동결 건조하는 방법에 관한 것이다. 이러한 첨가는 1.5%(w/v)가 가장 바람직하나 이에 제한되지 않으며 보존제로서 전분의 추가 역시 바람직하게는 1% 내지 7%(w/v)농도로 더욱 바람직하게는 5%(w/v)로 첨가할 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [29] 본 발명에서 “글루코스”란, 대표적인 알도헥소스 (탄소 6개를 가지며 알데하이드기를 가지는 단당류)이며 탄수화물 대사의 중심적 화합물로서 한 분자당 38개의 ATP를 합성할 수 있는 것을 특징으로 한다. 본 발명에서는 글루코스를 보존제로 첨가할 수 있으며 바람직하게는 0.5% 내지 1.5%(w/v)농도로 첨가할 수 있다. 이 이상의 농도의 경우 글루코스는 분말 형성의 어려움이 있을 수 있다.
- [30] 본 발명에서는 동결 건조 방법을 수행하는 데 있어서 포투랍두스 템페라타 M1021을 바람직하게는 방법은 -60 °C 내지 -80°C, 더욱 바람직하게는 -70°C에서 동결할 수 있으며 48 내지 72시간 동안 동결과정을 수행할 수 있다.
- [31] 본 발명의 또 다른 양태로써 상기와 같은 동결 건조 방법을 수행하여 포투랍두스 템페라타 M1021 균주의 동결 건조 분말을 제공한다.
- [32] 본 발명에서의 분말화 하는 단계를 위해서 당업계에서 공지된 분말화의 방법을 제한 없이 사용할 수 있다. 예를 들어 분말화는 300 mesh의 체를 90% 이상 통과하도록 수행될 수 있다. 분말화를 할 때에는 핀(pin)밀러, 에어제트(airjet) 밀러, 해머(hammer)밀러 등을 사용할 수 있으며, 특히 핀(pin) 밀러를 사용하여

조분쇄한 후 일부 미분쇄된 입자의 경우 에어제트(airjet) 밀러를 사용하여 분쇄할 수 있다. 이렇게 분쇄하여 수화제(WP), 고상제(GM), 입상수화제(WG), 입제(GR), 분제(DP) 및 종자처리수화제(WS)로 이루어진 군에서 선택된 제형으로 제조할 수 있다. 상기 제형 외에도 생물농약으로 사용될 수 있는 제형이라면 모두 가능하다.

[33] 상기 수화제는 분상으로서 물에 희석하였을 때 수화되는 농약의 제형을, 상기 고상제는 미생물 배양액을 고상의 물질에 혼합하거나 흡착시킨 제제로 분제, 입제 및 수화제에 해당되지 않는 제형을 의미한다. 또한, 상기 입상 수화제는 과립상으로서 물에 희석하여 사용되는 농약의 제형을, 상기 입제는 입상으로서 원상태로 사용되는 농약의 제형을, 상기 분제는 분상으로서 원상태로 사용되는 농약의 제형을 상기 종자처리수화제는 분상으로서 종자에 처리하기 전에 수화시켜 현탁액으로 사용되는 농약의 제형을 의미한다.

[34] 본 발명은 상기 건조법으로 얻어진 건조 분말 및 이를 포함하는 생물농약도 포함할 수 있다. 상기 건조 분말은 수화제(WP), 고상제(GM), 입상수화제(WG), 입제(GR), 분제(DP) 및 종자처리수화제(WS)로 이루어진 군에서 선택된 제형으로 생물 농약을 제조할 수 있다.

[35] 이하, 본 발명을 실시예 및 시험 예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예 및 시험 예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예 및 시험 예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[36]

[37] 실시예 1. 재료 및 방법.

[38] 1.1 사용 배지 및 시약

[39] 스킴 밀크, 전분, 소듐 알지네이트, dextrose, 소듐-글루타메이트 등은 Sigma사로부터 구입하여 사용하였다. 미생물 배양용 배지인 Tryptic Soy Broth(TSB), Bacto-trypton, Bacto-yeast extract은 Difco에서 구입하여 사용하였고, 기타 시약은 특급시약을 사용하였다.

[40]

[41] 1.2 사용 균주 및 배양

[42] 사용된 곤충병원성 미생물은 곤충병원성 선충에서 분리한 포투랍두스 템페라타M1021을 사용하였으며, 16S rDNA sequencing을 통하여 동정하였다(GenBank accession number HQ647119). 균주는 TSB(Difco, France) agar 배지를 이용하여 28°C에서 48시간 배양한 다음, 본 배양에 접종하기 전에 단일 콜로니를 100 ml TSB 액체 배지에 접종하여 진탕 배양하였다(28°C, 200rpm). 본 배양은 1L TSB 액체배지를 이용하여 28°C에서 48시간 배양한 다음 동결건조시료의 제조에 사용하였다.

[43]

[44] 실시예2. 동결건조 시료의 제조.

[45] 동결건조에 사용할 균체는 본 배양에서 48시간 배양한 포투랍두스

템페라타M1021의 배양액을 원심 분리(10,000rpm, 4°C, 20 min)하여 균체만을 회수한 뒤 멸균생리식염수(0.85% NaCl)에 1회 세척한 후 동일한 식염수에 본 배양액의 25배되게 현탁하였다. 동결건조 시 균체의 생존율에 영향을 미치는 보존제의 효과를 확인하기 위하여, 스킴 밀크, 전분, 소듐 글루타메이트는 각각 15% (w/v) 되게 제조하였으며, 소듐 알지네이트는 점성이 높은 관계로 4%(w/v)로 제조하여 사용하였다.

- [46] 현탁액 7 ml에 첨가하는 보존제의 최종농도는 전분과 소듐 글루타메이트는 각각 1, 3, 5, 7%(w/v), 스킴 밀크는 1, 5, 7, 10%(w/v), dextrose는 0.5, 1%(w/v), 소듐 알지네이트는 0.5, 1, 1.5% (w/v) 씩 첨가하였다. 보존제를 첨가하여 균일하게 혼합한 다음 -70°C에서 완전히 동결한 후, 동결건조기 (LABCONCO, USA)를 사용하여 3일간 동결 건조하였다.
- [47] 동결건조가 완료된 시료는 시료의 무게를 측정된 다음 균일하게 분쇄하여 냉장 보관(4°C)하였다.

[48]

[49] **시험예1. 동결에 따른 균의 생존율 변화**

- [50] 동결에 따른 포투랍두스 템페라타M1021의 생존율을 실험한 결과, 동결 전은 3.03×10^6 colony forming unit(CFU)/ml을 나타내었으며, 동결 후에는 2.63×10^3 CFU/ml을 나타내어 동결에 따른 균의 생존율은 0.09%에 불과하였다.

- [51] 따라서, 동결에 따른 균의 생존율을 향상시키고 최적화된 동결 건조 방법을 찾기 위하여 보존제 첨가에 의한 균의 생존율 변화를 살펴보았다.

[52]

[53] **시험예2. 보존제 종류 및 농도에 따른 균의 생존율**

- [54] 각각의 보존제가 농도 별로 함유된 포투랍두스 템페라타M1021 균주의 동결건조 시료를 각각 0.1 g씩 취하여 10 ml의 멸균생리식염수에 완전히 현탁시킨 후, 멸균생리식염수를 이용하여 단계별($10^1 \sim 10^6$)로 희석하였다. 단계별로 희석한 시료를 TSB agar plate에 100 μ l씩 도말 한 다음 28°C에서 48시간 배양하여 균 수를 측정하였다.

- [55] 동결건조에 따른 세포의 손실을 최소화하기 위해 첨가한 보호제로 고분자 물질인 스킴 밀크, 전분, 소듐 알지네이트와 소듐 글루타메이트를 각각 사용하였다.

- [56] 스킴 밀크의 경우 첨가 농도가 증가할수록 동결건조 시료에서의 포투랍두스 템페라타M1021 균주의 생존율도 점차 증가하여 7%(w/v) 일 때 가장 높은 63%의 생존율을 나타내었으며, 10% 이상에서는 급격하게 감소하였다 (도 1a의 A).

- [57] 전분의 경우 5%에서, glucose는 1%(w/v)에서 각각 3.53과 2.11%의 생존율을 나타내어 비처리구에 비하여 각각 약 4배, 약 21배로 나타났다. 이는 포투랍두스 템페라타M1021균주의 동결 건조시 균의 생존율을 높일 수 있는 것을 보여주나 스킴 밀크 첨가시료에 비해서는 동결 건조 시 세포보호능력이 상대적으로 낮은 것으로 나타났다. (도1a의 B)

- [58] 소듐 알지네이트는 미생물의 보존 및 캡슐화에 많이 사용되는 고분자 물질로 알려져 있다. 소듐 알지네이트의 첨가농도가 1.5%(w/v)일 때 대조군(무첨가)에 비하여 3.4%의 생존율을 나타내었다. (도1a의 C)
- [59] 한편, 하기 비교예에서 사용된 소듐 글루타메이트의 경우 동결건조에 따른 세포 보호 효과가 전혀 나타나지 않았다. (도1b의 D)
- [60] Glucose는 1.5%(w/v)이상 첨가하였을 때 동결 건조 후 정상적인 분말을 형성하기 어려워 최종 첨가농도 1%(w/v)에서 생존율 평가를 수행하였다. (도1b의 E)
- [61]
- [62] **비교예1. 소듐 글루타메이트 보존제 첨가시 균의 생존율**
- [63] 일반적으로 동결 건조 시 보존제로 널리 사용되는 소듐 글루타메이트는 본 발명의 신규한 균주인 포투랍두스 템페라타 M1021의 동결건조에 적합하지 않은 보존제로 나타났다.
- [64] 도1b의 D에서 나타난 것과 같이 소듐 글루타메이트를 1 내지 10%(w/v)첨가 시 균주의 생존율은 10% 첨가시 0.01%로 나타났고, 최대 생존율 0.13%이 비처리구에서 나타나 보존제의 효과가 전혀 없었다.
- [65] 이와 비교하여 스킴 밀크, 전분, 소듐 알지네이트, 글루코스는 각각 최대 63%, 3.53%, 3.4%, 2.11%로 나타남으로써 비처리 구와 비교하여 최대 630배의 보존 효과(스킴 밀크의 경우)를 보임으로써 포투랍두스 템페라타M1021균주의 동결 건조에 적합한 보존제로 나타났다.
- [66]
- [67] **시험예3. 동결건조에 따른 살충력 평가**
- [68] 7%(w/v) 스킴 밀크를 함유한 포투랍두스 템페라타M1021의 동결건조분말 시료를 이용하여 꿀벌부채명나방 유충에 대한 주사 독성을 실시하였으며, 포투랍두스 템페라타M1021 균주의 수에 따른 유충의 사멸 정도를 시간에 따라 측정하였다.
- [69] 포투랍두스 템페라타M1021 균주의 주사량이 2.02×10^3 cells 이상일 때는 주사 후 24시간 내에 모두 사멸하였으며, 적어도 2.02×10^1 cells 이상을 주사할 경우 유충의 대부분이 2일 이내에 사멸하는 것으로 나타났다(도 3). 또한, 2.02×10^0 cells의 아주 낮은 농도에서도 유충의 50%가 주사 후 4일만에 사멸하는 것으로 보아, 포투랍두스 템페라타M1021 균주의 꿀벌부채명나방 유충에 대한 LD (lethal dose, 치사량) 값은 매우 낮은 것으로 나타났다.
- [70] 포투랍두스 템페라타M1021 균주에 의하여 꿀벌부채명나방 유충이 죽은 후 몸이 붉게 변하며 팽압을 상실하였다.(도 4) 이것은 포투랍두스 균주가 생산하는 anthraquinone 색소에 의한 것으로, *P. luminescens*와 포투랍두스 템페라타균주만의 특징으로 본 발명에 의한 동결 건조 균주의 처리에 의하여 높은 살충력이 나타남을 확인하였다.

[71]

- [72] 시험예4. 저장 기간에 따른 균주의 안정성 평가.
- [73] 동결건조 시료의 저장기간에 따른 포투랍두스 템페라타M1021균주의 안정성은 생존율이 가장 높게 나타난 스kim 밀크를 농도별로 첨가하여 실험하였다.
- [74] 저온(4°C)에서 2주 간격으로 8주 동안 균의 생존량을 측정하였으며, 동결건조 전·후의 균수를 100으로 나타내었을 때, 스kim 밀크가 첨가되지 않은 경우 2주 만에 모두 사멸하는 것으로 나타났다.
- [75] 스kim 밀크 농도가 5%와 10%(w/v)의 경우, 동결건조 4주 후에 각각 24.38%와 36.74%의 생존율을 나타내었으며, 저장 6주 후에 모두 사멸하였다. 그러나 스kim 밀크 7%(w/v) 시료는 포투랍두스 템페라타M1021 균주의 75% 이상이 저장 4주까지도 유지되는 것으로 나타났으나 저장기간이 늘어남에 따라 생존 균수의 지속적인 감소를 보였으며, 저장 8주시 생존율이 18.53%를 나타내었다.

[76]

산업상 이용가능성

- [77] 본 발명에 따르면 환경 친화적인 미생물 농약 제제로 사용 가능한 포투랍두스 템페라타 M1021 균주에 가장 적합한 동결 건조 방법을 이용함으로써 균주의 생존율이 향상되고 제제화가 용이해지게 되어 생물 농약으로써의 이용 가능성이 증대될 수 있다.

[78]

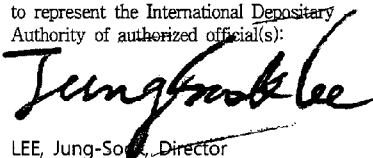
BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL RECOGNITION OF THE DEPOSIT
OF MICROORGANISMS FOR THE PURPOSE OF PATENT PROCEDURE

INTERNATIONAL FORM

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT

issued pursuant to Rule 7.1

TO : **SHIN, Jae-Ho**
 School of Applied Biosciences, Kyungpook National University
 1370 Sankyuk 3-dong, Buk-gu, Daegu 702-701
 Republic of Korea

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification reference given by the DEPOSITOR: <i>Photorhabdus temperata</i> M1021	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: KCTC 120068P
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION	
The microorganism identified under I above was accompanied by: ☒ a scientific description ☐ a proposed taxonomic designation (Mark with a cross where applicable)	
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I above, which was received by it on August 23, 2011.	
IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION	
The microorganism identified under I above was received by this International Depositary Authority on _____ and a request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on _____	
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name: Korean Collection for Type Cultures Address: Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB) 111 Gwahangno, Yuseong-gu, Daejeon 305-806 Republic of Korea	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority of authorized official(s):  LEE, Jung-Sook, Director Date: August 31, 2011

번역문

특허절차상 미생물 기탁의 국제적 승인에 관한
부다페스트 조약
국제서식
규칙 7.1에 의한

원기탁에 대한 수탁증

To : 신 재 호

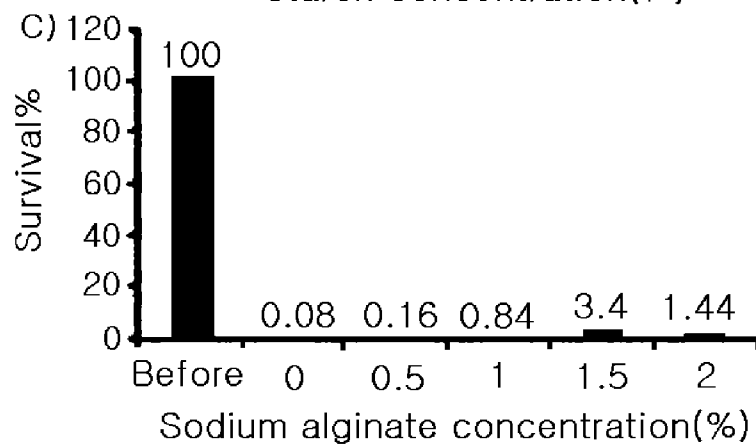
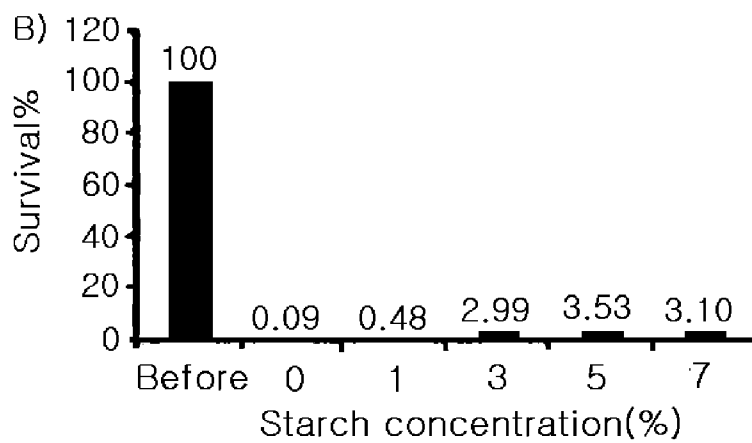
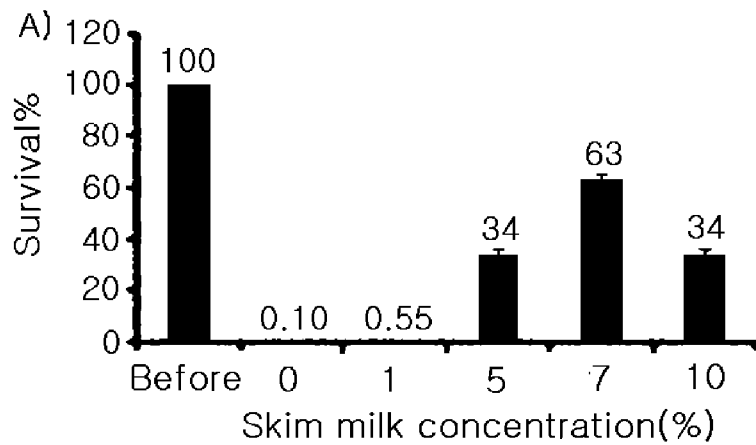
대구광역시 북구 산격3동 1370번지 경북대학교 응용생명과학부

1. 미생물의 특징	
기탁자가 부여한 특정표시 포토랍두스 템페라타 M1021.	국제기탁기관이 부여한 수탁번호 KCTC 12006BP
2. 과학적 성질 및/또는 분류학상위치	
1로 특징된 미생물은 [X] 과학적 성질 [] 분류학상 위치로 기재하였다(적용되는 부분에 표시한다)	
3. 수탁	
국제기관은 1로 특정되는 미생물을 2011년 8월 23일에 수탁하였다	
4. 수탁전환의 청구	
1로 특정된 미생물은 국제기탁기관 _____ 에 수탁되었고, 동 미생물에 대한 원기탁을 부다페스트 조약에 의한 기탁으로 전환 청구가 접수되었다	
5. 국제기탁기관	
명칭: 한국생명공학연구소 유전자은행 (KCTC) 주소: 대한민국 대전시 유성구 과학로111 한국생명공학연구원(KRIBB) (305-806)	국제 기탁 기관을 대표할 권한이 있는 자의 서명 담당자: 이 정 석 날짜: 2011.08.31

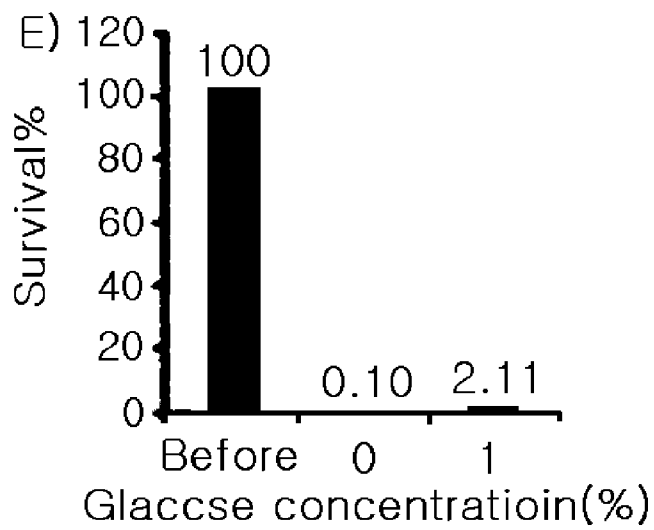
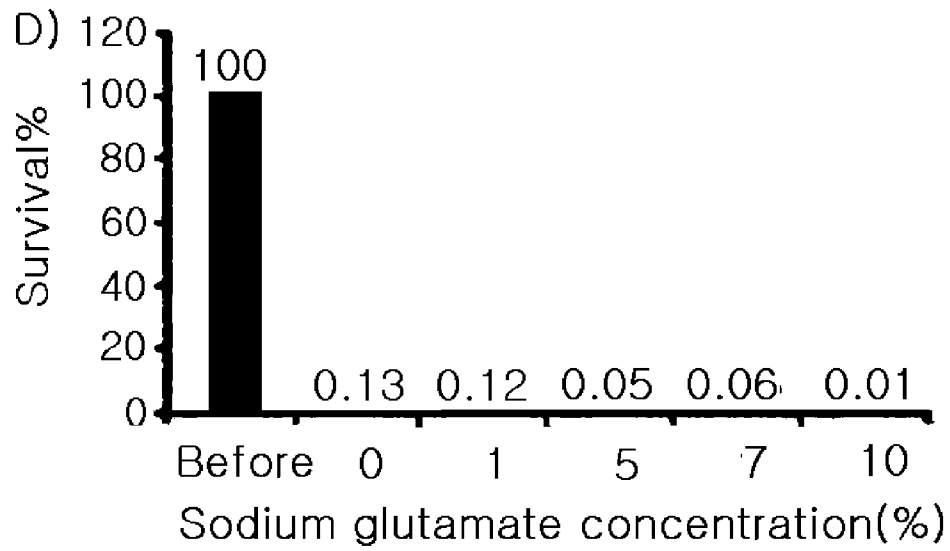
청구범위

- [청구항 1] 스킴 밀크, 소द्य 알지네이트, 전분(starch), 글루코스로 이루어진 군에서 1이상 선택된 보존제를 첨가하는 것을 특징으로 하는 포투랍두스 템페라타 M1021(수탁번호: KCTC 12006BP) 동결 건조 방법.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 스킴 밀크는 1% 내지 10%(w/v) 농도로 첨가하는 것을 특징으로 하는 동결 건조 방법.
- [청구항 3] 제 2항에 있어서, 상기 스킴 밀크는 7%(w/v)농도로 첨가하는 것을 특징으로 하는 동결 건조 방법.
- [청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 소द्य 알지네이트는 0.5% 내지 2%(w/v)농도로 첨가하는 것을 특징으로 하는 동결 건조 방법.
- [청구항 5] 제1항에 있어서, 상기 전분은 1% 내지 7%(w/v)농도로 첨가하는 것을 특징으로 하는 동결 건조 방법.
- [청구항 6] 제1항에 있어서, 상기 글루코스는 0.5% 내지 1.5%(w/v)농도로 첨가하는 것을 특징으로 하는 동결 건조 방법.
- [청구항 7] 제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 동결 건조가 -60 °C 내지 -80°C에서 48 내지 72시간 동안 수행되는 것을 특징으로 하는 동결 건조 방법.
- [청구항 8] 제1항 내지 제6항 중 어느 하나의 방법으로 제조된 포투랍두스 템페라타 M1021 균주의 동결 건조 분말.
- [청구항 9] 제8항의 동결 건조 분말을 포함하는 것을 특징으로 하는 생물 농약.
- [청구항 10] 제9항에 있어서, 상기 생물 농약은 나비 목 해충 방제를 위한 농약임을 특징으로 하는 생물 농약.
- [청구항 11] 제10항에 있어서, 상기 나비 목 해충은 꿀벌부채명나방(*Galleria mellonella*), 배추좀나방(*Plutella xylostella*), 담배거세미나방(*Spodoptera litura*), 털뿔가지나방(*Alcis angulifera*), 애모무늬잎말이나방(*Adoxophyes orana*), 감나무잎말이나방(*Ptycholoma lecheana*), 밤에기잎말이나방(*Cydia Kurokoi*), 복숭아순나방(*Grapholita molesta*), 은무늬굴나방(*Lyonetia prunifoliella*), 복숭아심식나방(*Carposina sasakii*), 과밤나방(*Spodoptera exigua*), 목화바둑나방(*Diaphania indica*), 흑명나방(*Cnaphalocrocis medinalis*), 이화명나방(*Chilo suppressalis*), 및 왕담배나방(*Helicoverpa armigera*)으로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 생물 농약.

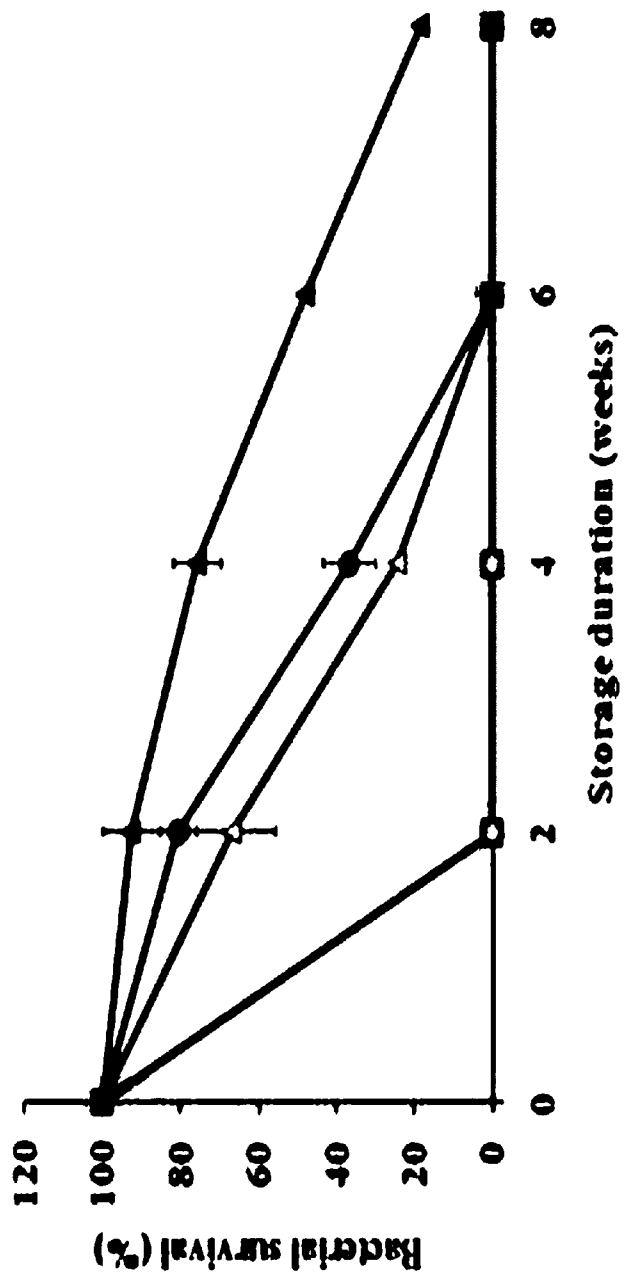
[Fig. 1a]



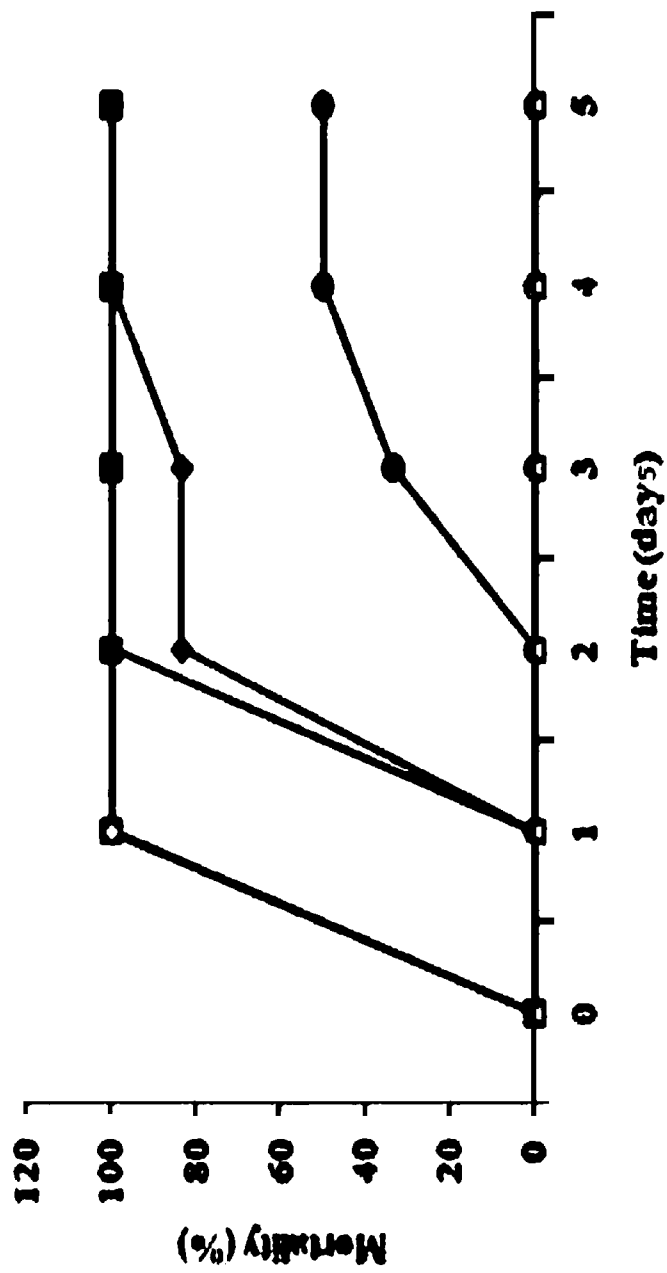
[Fig. 1b]



[Fig. 2]



[Fig. 3]



[Fig. 4]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2011/006988**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER****A01N 1/02(2006.01)i, C12N 1/20(2006.01)i, A01N 63/02(2006.01)i**

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A01N 1/02; C12M 1/00; C12N 1/04; C12N 1/20

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models

Japanese Utility models and applications for Utility models

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: Photorhabdus temperata, freeze-drying

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y A	KR 10-2004-0104872 A (KIM, YONG GYUN et al.) 13 December 2004 See page 3, lines 39-51.	1-2,4-11 3
Y A	JP 2005-168424 A (NATIONAL INSTITUTE FOR AGRO-ENVIRONMENTAL SCIENCE) 30 June 2005 See paragraphs [0004]-[0009].	1-2,4-11 3
A	SEO, SAMYEOL et al. "Comparative analysis of immunosuppressive metabolites synthesized by an entomopathogenic bacterium, Photorhabdus temperata ssp. temperata, to select economic bacterial culture media". Kor. J. Appl. Entomol. 02010, Vol. 49, No. 4, pages 409-416. See abstract.	1-11
A	KR 10-2004-0067492 A (LEE, JIN WOO) 30 July 2004 See abstract.	1-11



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

17 APRIL 2012 (17.04.2012)

Date of mailing of the international search report

18 APRIL 2012 (18.04.2012)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 139 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

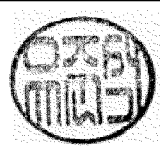
INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2011/006988

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2004-0104872 A	13.12.2004	KR 10-0522667 B1	20.10.2005
JP 2005-168424 A	30.06.2005	JP 3937019 B2	27.06.2007
KR 10-2004-0067492 A	30.07.2004	KR 10-0464825 B1	05.01.2005

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) A01N 1/02(2006.01)i, C12N 1/20(2006.01)i, A01N 63/02(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) A01N 1/02; C12M 1/00; C12N 1/04; C12N 1/20 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC		
국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 포투랍두스 템페라타, 동결건조		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y A	KR 10-2004-0104872 A (김용균 외 1명) 2004.12.13 페이지 3, 라인 39-51 참조.	1-2,4-11 3
Y A	JP 2005-168424 A (NATIONAL INSTITUTE FOR AGRO-ENVIRONMENTAL SCIENCE) 2005.06.30 식별번호 [0004]-[0009] 참조.	1-2,4-11 3
A	SEO, SAMYEOL et al. 'Comparative analysis of immunosuppressive metabolites synthesized by an entomopathogenic bacterium, Photorhabdus temperata ssp. temperata, to select economic bacterial culture media'. Kor. J. Appl. Entomol. 02010, Vol. 49, No. 4, pages 409-416. 초록 참조.	1-11
A	KR 10-2004-0067492 A (이진우) 2004.07.30 초록 참조.	1-11
☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. ☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: “A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 “E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 “L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 “O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 “P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 “T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 “X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. “Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. “&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2012년 04월 17일 (17.04.2012)	국제조사보고서 발송일 2012년 04월 18일 (18.04.2012)	
ISA/KR의 명칭 및 우편주소  대한민국 특허청 (302-701) 대전광역시 서구 청사로 189, 정부대전청사 팩스 번호 82-42-472-7140	심사관 유준석 전화번호 82-42-481-5627 	

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2004-0104872 A	2004. 12. 13	KR 10-0522667 B1	2005. 10. 20
JP 2005-168424 A	2005. 06. 30	JP 3937019 B2	2007. 06. 27
KR 10-2004-0067492 A	2004. 07. 30	KR 10-0464825 B1	2005. 01. 05