



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년09월25일
(11) 등록번호 10-2025411
(24) 등록일자 2019년09월19일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 7/00 (2006.01) A01N 63/02 (2017.01)
- (52) CPC특허분류
C12N 7/00 (2013.01)
A01N 63/02 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2018-0049052
- (22) 출원일자 2018년04월27일
심사청구일자 2018년04월27일
- (56) 선행기술조사문헌
Susan M. Lehman. Development of a Bacteriophage-based Biopesticide for Fire Blight, 2007, Faculty of Science, Brock University, St Catharines. Ontario, Thesis.*
Appl. Environ. Microbiol. 77 (17), 5945-5954 (2011).
J. Bacteriol. 193 (3), 795-796 (2011)
Appl. Environ. Microbiol. 75 (7), 2139-2147 (2009)
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

- (73) 특허권자
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
- (72) 발명자
오창식
경기도 수원시 영통구 효원로 363 123동 401호 (매탄동, 매탄 위브 하늘채)
- 박정금
서울특별시 강남구 일원동 653-9 청구빌라 101호
- (74) 대리인
손민

전체 청구항 수 : 총 9 항

심사관 : 김정희

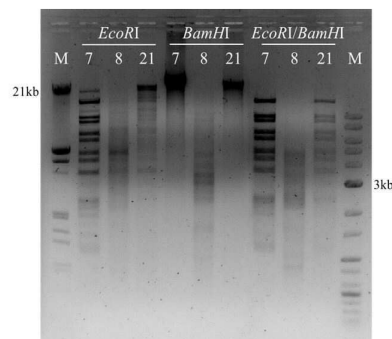
(54) 발명의 명칭 과수 화상병 세균에 효과적인 신규한 박테리오파지 Φ EaP-21 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 신규 박테리오파지 및 이의 용도에 관한 것으로, 구체적으로 *Erwinia amylovora* (에르위니아 아밀로보라)에 특이적인 사멸능을 갖는 기탁번호 KFCC11770P인 분리된 박테리오파지, 상기 박테리오파지를 유효성분으로 포함하는 농약 조성물, 상기 박테리오파지를 유효성분으로 포함하는 향균제, 상기 박테리오파지를 유효성분으로 포함하는 소독제 또는 세척제, 상기 박테리오파지를 처리하는 단계를 포함하는 박테리아를 용균하는 방법, 및 상기 박테리오파지를 처리하는 단계를 포함하는 식물병을 방제하는 방법에 관한 것이다

본 발명의 신규 박테리오파지는 *Erwinia amylovora* (에르위니아 아밀로보라)에 특이적인 사멸능을 가지며, 내산성, 내열성 및 내자외선성이 우수하므로, 상기 에르위니아 아밀로보라에 의하여 야기되는 과수 화상병의 예방 또는 치료에 활용될 수 있을 뿐만 아니라, 향균제, 소독제, 또는 세척제 등에도 광범위하게 이용될 수 있다.

대표도



(52) CPC특허분류

C12N 2795/00011 (2013.01)

C12N 2795/00031 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 PJ011758022018

부처명 농촌진흥청

연구관리전문기관 농촌진흥청

연구사업명 어젠다사업

연구과제명 과수 화상병 발병 예찰 및 병원세균 생태 특성 연구

기 여 율 1/2

주관기관 경희대학교 산학협력단

연구기간 2016.01.01 ~ 2018.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 317012-4

부처명 농림축산기술기획평가원

연구관리전문기관 농림축산기술기획평가원

연구사업명 농생명산업기술개발사업

연구과제명 파지테라피를 이용한 중요 식물세균병 제어법 개발 및 실용화

기 여 율 1/2

주관기관 경희대학교 산학협력단

연구기간 2017.04.21 ~ 2020.12.31

공지예외적용 : 있음

명세서

청구범위

청구항 1

Erwinia amylovora (에르위니아 아밀로보라) 및 *Erwinia pyrifoliae* (에르위니아 피리폴리아에)에 특이적으로 동시에 사멸능을 갖는, 기탁번호 KFCC11770P인 분리된 박테리오파지.

청구항 2

제1항의 박테리오파지를 유효성분으로 포함하는 농약 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 박테리오파지는 과수 화상병 (fire blight)의 예방 또는 치료에 사용되는 것인, 농약 조성물.

청구항 4

제2항에 있어서, 상기 농약 조성물은 수간주사 조성물, 생물제제 조성물, 비료 조성물, 영양 조성물, 식물 강화 조성물, 식물 보호 조성물, 토양 개량 조성물 (soil conditioner composition), 및 생산량 증가 조성물 (yield enhancer composition)로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 것인, 농약 조성물.

청구항 5

제1항의 박테리오파지를 유효성분으로 포함하는 항균제.

청구항 6

제1항의 박테리오파지를 유효성분으로 포함하는 소독제.

청구항 7

제1항의 박테리오파지를 박테리아에 처리하는 단계를 포함하는 *Erwinia amylovora* (에르위니아 아밀로보라) 및 *Erwinia pyrifoliae* (에르위니아 피리폴리아에)를 동시에 용균하는 방법.

청구항 8

제1항의 박테리오파지를 식물에 처리하는 단계를 포함하는 과수 화상병을 방제하는 방법.

청구항 9

제1항의 박테리오파지를 유효성분으로 포함하는 세척제.

발명의 설명

기술분야

- [0001] 본 발명은 신규 박테리오파지 및 이의 용도에 관한 것으로, 구체적으로 *Erwinia amylovora* (에르위니아 아밀로보라)에 특이적인 사멸능을 갖는 기탁번호 KFCC11770P인 분리된 박테리오파지, 상기 박테리오파지를 유효성분으로 포함하는 농약 조성물, 상기 박테리오파지를 유효성분으로 포함하는 향균제, 상기 박테리오파지를 유효성분으로 포함하는 소독제 또는 세척제, 상기 박테리오파지를 처리하는 단계를 포함하는 박테리아를 용균하는 방법, 및 상기 박테리오파지를 처리하는 단계를 포함하는 식물병을 방제하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

- [0003] *Erwinia amylovora* (에르위니아 아밀로보라)는 배나무 또는 사과나무 등의 과수에서 화상병을 야기하는 그람 음성 (Gram-negative) 식물병원균이다. 에르위니아 아밀로보라의 대표적인 증상으로 잎은 시들고 흑색으로 변하여 마르며, 줄기나 열매도 처음에는 수침상의 병반이 생기고 움푹 들어가며 열매가 시들어가며 화상을 입은 것처럼 검게 변한다. 에르위니아 아밀로보라는 미국에서 1780년에 처음 발견되었고, 유럽, 북미, 중동, 중앙아시아, 뉴질랜드 등 전 세계적으로 보고된 바 있다 (van der Zwet et al. 2012). 이 병원균은 한국에서는 2015년 사과와 배의 화상병을 통해 처음으로 보고되었다 (Myung et al., 2016; Park et al., 2016). 에르위니아 아밀로보라는 곤충이나 비바람에 의해 전염되어 꽃, 꽃샘, 기공, 피목, 상처 등을 통해 기주체로 침입하기 때문에 전염성이 높고 배나무, 사과나무, 살구나무 등 70여종의 식물을 침해할 수 있다는 특징이 있어 세계적으로 화상병에 대한 피해가 발생하고 있다.
- [0004] 화상병은 당해의 수확을 망칠 뿐만 아니라, 장기간의 타격도 줄 수 있다. 꽃의 감염은 과일을 말려 죽여, 당해의 수확을 감소시키고 어린가지의 화상은 다음해의 과수가 열릴 가능성을 감소시킨다. 많은 과수 품종의 뿌리와 줄기에 있어서 화상은 큰 가지나 나무 전체마저도 파괴할 수 있다. 과수 수확에 대한 화상병의 잠재적인 영향을 감안해 봤을 때, 이 질병에 대한 해결책이 절실한 상황이다.
- [0005] 화상병에 대응하기 위한 방법 중 하나는 원예적인 실시에 의해 질병 발생을 최소한으로 하는 것이다. 예를 들어 토양 수분을 감소시키고 비료 영양소의 균형을 유지함으로써 화상병의 감염 및 확산을 제어할 수 있는 방법이 있다. 그러나 이 방법은 본질적인 질병 발생을 제거할 수 없다.
- [0006] 다른 방법으로, 감염된 과수나 검게 변한 가지를 병원균이 휴지 기간을 갖는 겨울에 제거함으로써 화상병을 치료하는 것도 가능하다. 그러나 이러한 방법은 장비의 멸균에 주의하여 질병의 확산을 방지해야 한다. 또한 이 방법은 작은 병변 또는 내부 감염을 다 검출할 수 없기 때문에 질병을 완전하게 근절할 수 없다.
- [0007] 또한, 화상병에 감염된 과수는 구리 화합물 또는 항생 물질을 정기적으로 살포하는 방법으로 화상병을 제어할 수 있다. 그러나 구리 화합물의 사용은 종종 효과적이지 않거나 과일의 녹 (russetting)을 일으키므로 보편적으로 사용하기에는 어려운 점이 있다. 항생 물질의 사용, 특히 스트렙토마이신은 구리 화합물보다 효과적이고 과일에 대한 해가 적다. 그러나 에르위니아 아밀로보라는 캘리포니아, 오리건, 워싱턴, 미주리 및 미시간을 포함한 스트렙토마이신이 사용되고 있는 미국의 많은 주에서 스트렙토마이신에 대한 내성을 일으키고 있어 다른 방법이 필요한 상황이다.
- [0008] 이러한 배경하에, 본 발명자들은 에르위니아 아밀로보라의 방제 방법을 개발하고자 예의 연구 노력한 결과, 한국의 사과 과수원에서 분리한 박테리오파지가 에르위니아 아밀로보라에 대하여 용균 활성을 나타내고, 여러 환경적 요인 (온도, pH, UV)에 대하여 저항성을 보여, 상기 박테리오파지는 과수 작물에서 화상병에 대한 파지 테라피로서 사용될 수 있음을 확인하여, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0010] 본 발명의 하나의 목적은 *Erwinia amylovora* (에르위니아 아밀로보라)에 특이적인 사멸능을 갖는, 기탁번호 KFCC11770P인 분리된 박테리오파지를 제공하는 것이다.
- [0011] 본 발명의 다른 하나의 목적은 상기 박테리오파지를 유효성분으로 포함하는 농약 조성물을 제공하는 것이다.
- [0012] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 상기 박테리오파지를 유효성분으로 포함하는 향균제를 제공하는 것이다.
- [0013] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 박테리오파지를 유효성분으로 포함하는 소독제 또는 세척제를 제공하는 것이다.

다.

[0014] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 상기 박테리오파지를 처리하는 단계를 포함하는 *Erwinia amylovora* (에르위니아 아밀로보라)를 용균하는 방법을 제공하는 것이다.

[0015] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 상기 박테리오파지를 처리하는 단계를 포함하는 과수 화상병을 방제하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0017] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 하나의 양태는, *Erwinia amylovora* (에르위니아 아밀로보라)에 특이적인 사멸능을 갖는, 기탁번호 KFCC11770P인 분리된 박테리오파지를 제공한다.

[0018] 본 발명에서의 용어, "박테리오파지(bacteriophage)"란 특정한 타겟 박테리아를 감염시키는 바이러스이다. 단백질 캡시드(capsid)로 싸여 있는 박테리오파지의 머리는 핵산 게놈으로 이루어져 있으며, 몇몇 박테리오파지는 지질 또는 단백질로 구성된 꼬리를 갖는다. 대부분의 박테리오파지는 유전 물질로서 이중나선 DNA를 포함한다.

[0019] 알려진 박테리오파지의 95% 이상이 카우도비랄레스(*Caudovirales*) 목(order)에 속한다(Maniloff J and Ackermann H-W. 1998. Arch. Virology. 143: 2051-2063.). 박테리오파지의 주요 세 가지 과(family)는 형태적인 특징으로 구분되며, 특히 꼬리 모양으로 구분된다. 마이오비리대(*Myoviridae*) 과에 속하는 파지는 이중층의 수축성 꼬리를 가지며, 시포비리대(*Siphoviridae*) 과에 속하는 파지는 긴 탄성의 꼬리를 가지며, 포도비리대(*Podoviridae*) 과에 속하는 파지는 짧고 뚱뚱한 꼬리를 갖는다(Deveau H, 2006, Appl. Environ. Microbiol. 72: 4338-4346.).

[0020] 박테리오파지는 물, 흙, 및 식물의 안 또는 밖의 모든 환경에서 찾아볼 수 있다. 박테리오파지는 타겟 박테리아에 부착하여 숙주 안으로 자신의 DNA를 주입하며, 숙주 내에서 자가복제하여 박테리아의 죽음을 야기한다. 박테리오파지는 동물 또는 식물 세포에 대해서는 상대적으로 안전하며(Kutter E and Sulakvelidze A. 2004. CRC Press.), 다른 유익한 미생물에 대해서도 영향을 미치지 않는다. 또한, 박테리오파지는 숙주 박테리아성 환경에서 비교적 쉽게 분리된다.

[0022] 최근, 박테리오파지는 식물병원성 박테리아, 예를 들어 *Dickeya solani*(Czajkowski R, 2014, Plant Pathol. 63: 758-772.), *Pectobacterium carotovorum*(Lim JA, J. Microbiol. Biotechnol. 19 23: 1147-1153.), 또는 *Ralstonia solanacearum*(Young BJ, J. Microbiol. Biotechnol. 22:16 1613-1620.)에 의하여 야기되는 식물 질병을 방제하기 위한 파지 테라피(phage therapy)의 물질로서 많이 연구되고 있다. 그러나, 박테리오파지의 유전적 다양성으로 인해, 식물 질병 방제를 위해서는 특정 박테리아 특이적으로 사멸능을 갖는 특정 박테리오파지를 규명하는 것이 필요하다.

[0023] 한편, 본 발명의 박테리오파지는 기존의 알려진 파지와 상이한 유전체 서열을 가지고 있는 신규한 파지로서 (도 9), 본 발명자들에 의해 에르위니아 아밀로보라에 특이적 사멸능을 갖는 것으로 최초로 규명되었다.

[0024] 본 발명자들은 한국의 사과 과수원에서 토양 샘플을 채집하였고, 상기 샘플에서 에르위니아 아밀로보라에 특이적인 사멸능을 가지는 박테리오파지를 분리하였다. 또한, 투과 전자현미경을 통해 관찰한 결과, 상기 박테리오파지가 마이오비리대(*Myoviridae*) 과에 속함을 확인하였다 (도 4).

[0025] 아울러, 상기 박테리오파지는 온도 및 pH 범위에서 안정성을 조사한 결과, 50℃까지의 온도 범위 및 pH 5 내지 10의 pH 범위에서 안정하게 생존할 뿐만 아니라, 자외선 노출 시에도 안정성을 유지할 수 있는 특성을 나타냄을 확인하였다(도 6 내지 8).

[0026] 이러한 에르위니아 아밀로보라에 특이적인 사멸능을 갖고, 안정성을 가지는 박테리오파지는 에르위니아 아밀로보라에 효과적인 항균 활성을 나타내고, 따라서 과수 화상병의 방제에도 유용한 효과를 가질 수 있다.

[0027] 이에 본 발명자는 에르위니아 아밀로보라에 특이적인 사멸능을 갖고 상기와 같은 특징을 갖는 상기 박테리오파지를 2018년 4월 19일 한국미생물보존센터 (Korean Culture Center of Microorganisms, 서울시 서대문구 홍제1동 361-221)에 기탁번호 제 KFCC11770P호로 기탁하였다.

[0028] 본 명세서에서 상기 기탁번호 KFCC11770P로 기탁된 박테리오파지는 Φ EaP-21 또는 Φ 21로 혼용하여 지칭될 수 있다.

[0030] 본 발명의 다른 하나의 양태는 상기 박테리오파지를 유효성분으로 포함하는 농약 조성물을 제공한다.

- [0031] 이때, 상기 박테리오파지의 정의는 전술한 바와 같다.
- [0032] 본 발명에서의 용어, "농약"이란, 농작물의 보호와 생장에 사용되는 약제를 의미하며, 농작물의 재배 또는 저장 중 발생하는 병충, 해충, 잡초 등을 방제하는데 사용하는 화학농약 및 생물농약, 농작물의 생리기능을 증진 또는 억제하는데 사용되는 생장조정제, 약효를 증진시키는 보조제 등을 총칭한다.
- [0033] 본 발명의 농약 조성물은 에르위니아 아밀로보라에 특이적인 사멸능을 갖는 박테리오파지를 유효성분으로 포함하므로, 상기 농약 조성물은 과수 화상병(fire blight)의 예방 또는 치료에 사용될 수 있다.
- [0034] 구체적으로, 상기 농약 조성물은 수간주사 조성물, 생물제제 조성물, 비료 조성물, 영양 조성물, 식물 강화 조성물, 식물 보호 조성물, 토양 개량 조성물(soil conditioner composition) 또는 생산량 증가 조성물(yield enhancer composition)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0035] 상기 농약 조성물의 제형으로는 수화제(wettable powder), 입상 수화제(water dispersible granule), 분제(dusting powder), 액상 수화제(suspension concentrate), 유제(emulsifiable concentrate), 정제(tablet), 액제(liquid) 또는 오일 현탁제(oil suspension)로 제제화될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0036] 상기 농약 조성물은 유효량의 물과 함께, 하나 이상의 분산제를 포함할 수 있으며, 상기 분산제는 약 2 내지 약 60%(w/w)의 범위로 포함될 수 있다. Rhone Poulenc, Witco, Westvaco, International Speciality products, Crodachemicals, Borregaard, BASF, Rhodia, 등에서 판매되는 다양한 분산제가 농약 조성물에 사용하기 위해 상업적으로 입수가 가능하다.
- [0037] 상기 농약 조성물에 사용될 수 있는 분산제의 구체적인 예로, 폴리비닐피롤리돈, 폴리비닐알코올, 리그노설폰네이트, 페닐 나프탈렌 술폰네이트, 에톡시화(ethoxylated) 알킬 페놀, 에톡시화지방산, 알콕시화 선형 알코올, 환방향족(polyaromatic) 술폰네이트, 소듐 알킬 아릴 술폰네이트, 글리세릴에스테르, 말레산 무수물 공중합체, 포스페이트 에스테르, 아릴 술폰산과 포름알데히드의 축합반응 생성물, 알킬아릴 술폰산과 포름알데히드의 축합반응 생성물, 에틸렌 옥시드와 지방산 에스테르의 첨가 반응 생성물, 에틸렌 옥시드와 지방산 에스테르의 첨가 반응 생성물의 염, 축합된(condensed) 나프탈렌의 술폰네이트, 에틸렌 옥시드와 지방산 에스테르의 첨가 반응 생성물, 에틸렌 옥시드와 지방산 에스테르의 첨가 반응 생성물의 염, 리그닌 유도체, 나프탈렌 포름알데히드 축합물, 이소데실술폰옥신산 하프 에스테르(half ester)의 소듐 염, 폴리카르복실레이트, 소듐 알킬벤젠술폰네이트, 술폰화 나프탈렌의 소듐 염, 술폰화 나프탈렌의 암모늄 염, 폴리아크릴산의 염, 페놀술폰산의 염 또는 나프탈렌 술폰산의 염일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0038] 또한, 상기 농약 조성물은 습윤제, 결합제, 충전제(filler) 또는 유기 첨가제를 추가로 포함할 수 있다.
- [0039] 상기 습윤제는 상기 농약 조성물에 약 0.1 내지 5% 범위로 포함될 수 있으며, 구체적인 예로, 알킬 나프탈렌 술폰네이트, 소듐 알킬 나프탈렌 술폰네이트, 술폰화 알킬카르복실레이트의 소듐 염, 폴리옥시알킬화 에틸 페놀, 폴리옥시에톡시화(polyoxyethoylated) 지방성 알코올, 폴리옥시에톡시화 지방성 아민, 리그닌 유도체, 알칸 술폰네이트, 알킬벤젠 술폰네이트, 폴리카르복시산의 염, 술폰옥신산의 에스테르의 염, 알킬나프탈렌술폰네이트, 알킬벤젠술폰네이트, 알킬폴리글리콜 에테르 술폰네이트, 알킬 에테르 포스페이트, 알킬 에테르 술페이트 또는 알킬 술폰옥신산 모노에스테르일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0040] 상기 결합제는 상기 농약 조성물에 약 0.1 내지 7%의 범위로 포함될 수 있으며, 구체적인 예로, 폴리비닐 알코올, 리그닌 유도체, 폴리비닐 피롤리돈, 폴리알킬피롤리돈, 카르복시메틸셀룰로오스, 크산탄 검, 폴리에톡시화 지방산, 폴리에톡시화 지방성 알코올, 에틸렌 옥시드 공중합체, 프로필렌 옥시드 공중합체, 폴리에틸렌 글리콜 또는 폴리에틸렌 옥시드일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0041] 상기 충전제는 상기 농약 조성물에 약 0.1 내지 10%의 범위로 포함될 수 있으며, 구체적인 예로, 벤토나이트, 서브-벤토나이트(sub-bentonite), 아타풀자이트(attapulgit), 카올리나이트(kaolinite), 몬모릴로나이트, 보크사이트, 수화된 알루미늄(hydrated alumina), 하소된(calcined) 알루미늄, 규조토(diatomaceous earth), 백악(chalk), 백토(fuller's earth), 돌로마이트, 규조토(kieselguhr), 황토(loess), 프로필리트(prophyllite), 탈크(talc), 버미큘라이트(vermiculite), 석회암(limestone), 천연 및 합성 실리케이트(silicate), 실리카(silica) 또는 고령토(china clay)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0042] 상기 유기 첨가제는 상기 농약 조성물에 약 0.01 내지 50%의 범위로 포함될 수 있으며, 구체적인 예로, 다량 영양소(macronutrient), 미량 영양소 퇴비 비료(micronutrient compost fertilizer), 천연 원소(natural element), 천연 유기체(natural organism), 트리코데르마(trichoderma), 부식산(humic acid) 추출물, 바실러스

투린지엔시스(bacillus thuringiensis), 바이러스, 천연 곰팡이, 식물 추출물, 제충국, 생물학적 제어 산물(biological control product), 천연 오일, 천연 추출물, 광물 또는 요소 균일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 미량 영양소는 아연, 철, 망간, 구리, 보론, 코발트, 바나듐, 셀레늄, 실리콘 또는 니켈일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 다량 영양소는 질소, 인, 칼륨, 칼슘 또는 마그네슘일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [0044] 본 발명의 또 다른 하나의 양태는 상기 박테리오파지를 유효성분으로 포함하는 향균제를 제공한다.
- [0045] 본 발명에서의 용어, "향균제"란, 미생물을 사멸시키거나 혹은 발육을 억제하는 물질을 의미하며, 방부제, 살균제 및 항생제를 총칭하는 것이다.
- [0046] 본 발명의 박테리오파지는 에르위니아 아밀로보라에 대하여 특이적으로 높은 향균 활성을 나타낼 뿐만 아니라, 에르위니아 피리폴리아도 사멸시킬 수 있으며, 우수한 내열성, 내산성 및 내자외선성을 갖는다. 따라서, 상기 박테리오파지를 유효성분으로 포함하는 상기 향균제는 기존의 향균물질에 비하여 약물 내성 또는 저항성을 유도하지 않아 안전하며, 제품수명(life cycling)이 긴 신규 향균제로서 이용될 수 있다.
- [0048] 본 발명의 또 다른 하나의 양태는 상기 박테리오파지를 유효성분으로 포함하는 소독제 또는 세척제를 제공한다.
- [0049] 본 발명에서의 용어, "소독제"란, 병원세균의 살균을 목적으로 하는 약제를 의미하며, 본 발명에서의 용어, "세척제"란, 세정의 목적에 사용되는 약제를 의미한다.
- [0050] 본 발명의 박테리오파지는 에르위니아 아밀로보라에 대하여 특이적으로 높은 향균 활성을 나타낼 뿐만 아니라, 에르위니아 피리폴리아도 사멸시킬 수 있으며, 우수한 내열성, 내산성 및 내자외선성을 갖는다. 따라서, 상기 박테리오파지를 유효성분으로 포함하는 상기 소독제 또는 세척제는 기존의 약제에 비하여 우수한 살균 활성을 가지며, 제품수명(life cycling)이 긴 신규 소독제 또는 세척제로서 이용될 수 있다.
- [0052] 본 발명의 또 다른 하나의 양태는 상기 박테리오파지를 처리하는 단계를 포함하는 에르위니아 아밀로보라를 용균하는 방법을 제공한다.
- [0053] 본 발명에서의 용어, "용균"이란, 박테리아의 세포벽 또는 세포질막이 파괴되어 박테리아가 용해되는 현상을 의미하며, 박테리아가 사멸되는 현상을 의미한다.
- [0054] 구체적으로, 상기 박테리아를 용균하는 방법은 본 발명의 박테리오파지를 유효성분으로 포함하는 농약 조성물, 향균제, 소독제 또는 세척제의 유효량을 박테리아에 처리하는 단계를 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0056] 본 발명의 또 다른 하나의 양태는 상기 박테리오파지를 처리하는 단계를 포함하는 과수 화상병을 방제하는 방법을 제공한다.
- [0057] 본 발명에서의 용어, "과수 화상병"은 에르위니아 아밀로보라에 의해 발생하는 식물병으로, 꽃, 잎, 가지, 열매, 줄기에 발생하며 새 가지에 특히 발병이 많다. 처음 잎의 가장자리에서 발생하여 잎맥을 따라 진전하면 잎은 시들고 흑색으로 변하여 마른다. 꽃은 처음에 수침상(水浸狀)으로 되고 시들면서 흑갈색으로 변하여 떨어지거나 그대로 매달려 있다. 새 가지에 발병되면 처음에는 끝에서 시작하여 아래 쪽으로 진전되면서 갑자기 시들어 말라죽는다. 줄기나 열매도 처음에는 수침상의 병반이 생기고 움푹 들어가며 열매는 시든다. 또한, 곤충이나 비바람에 의해 전염되어 꽃, 꽃샘, 기공, 피목, 상처 등을 통해 기주체로 침입하기 때문에 전염성이 높다.
- [0058] 본 발명에서의 용어, "방제"란, 작물에 피해를 주는 각종 병해충을 예방하고 구제하는 것을 의미한다.
- [0059] 구체적으로, 상기 과수 화상병을 방제하는 방법은 본 발명의 박테리오파지를 유효성분으로 포함하는 농약 조성물, 향균제, 소독제 또는 세척제의 유효량을 식물의 기부(basal) 또는 식물의 잎 부분에 처리하는 단계를 포함할 수 있으며, 더욱 구체적으로 식물의 병증 부위에 처리하는 단계를 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

발명의 효과

- [0061] 본 발명의 신규 박테리오파지는 *Erwinia amylovora* (에르위니아 아밀로보라)에 특이적인 사멸능을 가지며, 내산성, 내열성 및 내자외선성이 우수하므로, 상기 에르위니아 아밀로보라에 의하여 야기되는 과수 화상병의 예방 또는 치료에 활용할 수 있을 뿐만 아니라, 향균제, 소독제, 또는 세척제 등에도 광범위하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0063] 도 1은 박테리오파지의 분리, 증식 및 정제 과정을 개략적으로 나타낸 도면이다.
- 도 2는 분리된 21개 박테리오파지의 제한효소 절단 패턴을 나타낸 도면이다.
- 도 3은 선택된 세 박테리오파지의 제한효소 절단 패턴을 나타낸 도면이다.
- 도 4는 투과 전자현미경으로 확인한 박테리오파지의 형태를 나타낸 도면이다.
- 도 5는 에르위니아 속 균주에 대한 박테리오파지의 용균 활성을 나타낸 도면이다.
- 도 6은 다양한 온도에 대한 박테리오파지의 안정성 분석 결과를 나타낸 그래프이다.
- 도 7은 365nm UV 노출에 대한 박테리오파지의 안정성 분석 결과를 나타낸 그래프이다.
- 도 8은 다양한 pH값에 대한 박테리오파지의 안정성 분석 결과를 나타낸 그래프이다.
- 도 9는 세 박테리오파지의 유전체 정보를 기존 박테리오파지의 유전체 정보와 비교한 결과를 나타낸 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0064] 이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0066] 실험방법 1. 세균 균주 및 토양 샘플링

- [0067] 박테리오파지는 주위의 토양, 물 및 숙주 박테리아가 존재할 수 있는 식물과 같은 자연에 존재한다. 그래서 박테리오파지 분리를 위한 사과와 배 과수원의 토양을 채취하였다. 토양 샘플은 제천, 충주, 경희대학교의 사과 과수원에서 채취하였다. 총 18개의 토양 샘플을 동일한 지역에 속하는 3개의 그룹으로 나누어, 12개의 에르위니아 아밀로보라 및 3개의 에르위니아 피리폴리아 (*Erwinia pyrifoliae*) 균주에 대해 박테리오파지를 분리하기 위해 스크리닝 하였다.

[0069] 실험방법 2. 박테리오파지의 분리 및 정제

- [0070] 토양 샘플을 혼합한 후 30분 동안 흔들어 박테리오파지가 증류수로 잘 추출될 수 있도록 하였다. 상등액을 얻기 위해 혼합된 샘플을 원심분리 (10,000rpm, 10분, 4℃)하고 여과하였다 (0.22μm pore size filter; Sartorius, Germany). 박테리오파지는 26℃의 진탕 배양기에서 5ml의 상층액, 10ml의 LB 및 500ul의 박테리아 현탁액 (10^9 CFU/ml)을 하룻밤 동안 배양하여 농축시켰다. 배양된 균체를 30분 동안 클로로포름 (최종 부피의 1%) 처리하여 숙주 세균 및 잔여물을 제거한 후 원심분리 (3,000g, 15min, 4℃)하고 여과하였다 (0.22um pore size filter, Futechs, South Korea). 박테리오파지 농축액은 선택된 4개의 에르위니아 아밀로보라 균주 및 2개의 에르위니아 피리폴리아 균주를 증식시키고 도팅 어세이 (dotting assay)를 사용하여 박테리오파지의 존재 여부를 확인 하였다. 박테리오파지를 분리하기 위해 박테리오파지의 크기와 모양을 달리 선택하는 플라크 피킹 (plaque picking) (Vidaver et al., 1973; Vidaver and Schuster, 1969)을 적어도 5번 반복하였다.

- [0071] CsCl 구배 초 원심분리를 통해 박테리오파지가 정제되었다. CsCl 구배 초 원심분리는 CsCl층 (1.3g/ml, 1.45g/ml, 1.5g/ml 및 1.75g/ml)의 4 가지 밀도로 구성되었다. 박테리오파지와 샘플은 초 원심분리 (25,000rpm, 2h, 4℃)되었으며, 박테리오파지는 1.45g/ml 및 1.5g/ml의 CsCl 밀도에 위치하였다. 박테리오파지를 채취하여 염화나트륨-황산 마그네슘 (SM) 완충액 (50mM Tris-HCl (pH 7.5), 10mM NaCl, 10mM MgSO₄)을 사용하여 투석(1시간, 2회) 후 정제하였다. 개략적인 박테리오파지의 분리, 증식 및 정제는 도 1에 나타내었다.

[0073] 실험방법 3. 스팟팅 (spotting) 및 오버레이 (overlay) 어세이

- [0074] 스팟팅 어세이 (spotting assay)는 공지된 방법에 약간의 변형을 가하여 수행하였다 (Kropinski et al., 2009; Yu et al., 2016). 숙주 박테리아는 하룻밤 동안 배양하였으며, 이후 상기 샘플의 200μl(10^9 CFU/ml)를 5ml의 soft LB 아가(0.4% 아가)와 혼합하였다. 상기 혼합물을 준비된 LB 고체 배지 플레이트에 부었고, 실온에서 건조하였다. 이후, 10μl의 박테리오파지 스탁 (stock) 희석액을 아가 층의 위에 떨어트렸고, 상기 플레이트를 30분 동안 실온에서 건조하였다. 상기 배양액은 26℃에서 하룻밤 동안 배양하였고, 다음날 플라크를 조사하였다.

- [0075] 오버레이 어세이 (Overlay assay)는 공지된 방법에 약간의 변형을 가하여 수행하였다 (Yu et al., 2016). 0.4%

의 soft LB 아가(0.4% 아가)와 하룻밤 동안 배양한 박테리아 배양액 (10^9 CFU/ml) $200\mu\text{l}$ 및 $100\mu\text{l}$ 의 희석된 박테리오파지 (10^4 PFU/ml)를 혼합하였고, 고체 LB 배지에 상기 혼합액을 부어 30분 동안 실온에 두어 건조하였다. 상기 플레이트를 26℃에서 배양한 뒤, 다음날 플라스크를 조사하였다.

[0077] 실험방법 4. 박테리오파지의 증식

[0078] 박테리오파지의 증식은 공지된 방법에 약간의 변형을 가하여 수행하였다(Kim and Ryu, 2011). LB 액체 배지와 혼합된 에르위니아 아밀로보라의 단일 콜로니는 26℃에서 하룻밤 동안 진탕배양기로 배양하였다. 배양된 에르위니아 아밀로보라 박테리아 현탁액 ($OD_{600}=0.5\sim1.0$)에 박테리오파지의 용해물을 첨가하고 26℃에서 하룻밤 동안 진탕배양기로 배양하였다. 배양된 샘플을 원심분리 (10,000rpm, 10min, 4℃)하고 여과하였다 (0.22 μm pore size, Sartorius, Germany). 여과된 샘플 30ml, PEG 6000 5g, 5M NaCl 10ml를 30분 동안 흔들여 혼합하고 4℃ 냉장고에서 하룻밤 동안 배양하였다. 배양한 샘플을 원심분리 (9,000g, 20min, 4℃)한 후, 상등액을 버리고 펠릿을 SM 완충액 3ml에 용해시켰다.

[0080] 실험방법 5. 박테리오파지의 형태 분석

[0081] 정제된 박테리오파지 스톱이 부착된 탄소 코팅 구리 그리드 (grid)와 2% 수성 우라닐 아세테이트 (uranyl acetate, pH 4.0)를 30초 동안 첨가하여 파지 입자를 염색하였다 (Ackermann and Heldal, 2010; Brum and Steward, 2010). KBSI (Korea Basic Science Institute)에서 120kV의 투과 전자현미경 (Transmission Electron Microscope, TEM)을 사용하여 5개의 박테리오파지 ($\Phi 7$, $\Phi 8$, $\Phi 19$, $\Phi 20$, $\Phi 21$)의 형태를 확인하였다. 박테리오파지는 International Committee on Taxonomy of Viruses의 기준에 따라 분류되었다.

[0083] 실험방법 6. 박테리오파지 DNA 추출 및 제한효소 절단

[0084] 분리된 박테리오파지 21개를 파지 DNA 분리 키트 (Norgen Biotek, Canada)를 사용하여 유전체 DNA를 추출하였다. 37℃에서 2시간 동안 효소 (EcoRI와 BamHI 각각 또는 모두)로 박테리오파지 DNA $3\mu\text{l}$ 를 사용하여 제한효소 절단을 수행하였다. 절단된 박테리오파지 DNA 샘플은 EcoDye를 함유하는 0.7% 아가로스를 포함하는 겔 전기영동으로 조사하였다.

[0086] 실험방법 7. 다양한 온도, pH 및 UV 조건에서 박테리오파지의 안정성 분석

[0087] 3개의 박테리오파지가 온도, pH 및 UV 조건과 같은 다양한 조건에서 안정성을 갖는지를 조사하였다. 온도의 경우, 30℃, 40℃, 50℃ 및 60℃에서 1시간 처리하였다. pH의 경우, pH 조건을 HCl 및 NaOH로 조정한 3 내지 12의 pH 범위에서 1시간 동안 처리하였다. UV의 경우, 365nm의 UV 조건을 1시간 동안 처리하고 매 15분마다 측정하였다. 실험에 사용된 박테리오파지의 농도는 10^5 PFU/ml이었다. 도팅 어세이를 위해 남은 박테리오파지가 측정되었다.

[0089] 이상, 상기 실험방법을 통해 확인한 내용을 하기 실시예로 정리하였다.

[0091] 실시예 1. 사과 과수원 토양에서 박테리오파지의 분리

[0092] 숙주 세균 균주 및 분리된 장소에 관한 정보를 포함한 박테리오파지 목록은 표 1에 있다. 경희대학교의 사과 과수원을 제외한 모든 사과 과수원에서 채취한 토양 시료는 에르위니아 아밀로보라에 감염되었다. 분리된 박테리오파지 21개를 플라크 크기와 모양을 통해 관찰하였다. 분리된 장소로 분류할 경우, 제천은 4개의 박테리오파지가 분리되었으며, 충주는 단 한 개의 박테리오파지만 분리되었으며 경희대학교의 사과 과수원 토양에서는 16개의 박테리오파지가 분리되었다. 숙주 세균 균주로 분류할 경우, 에르위니아 아밀로보라 균주 73으로부터 7개의 박테리오파지가 분리되었고, 에르위니아 아밀로보라 균주 Ea-k1(79)로부터 10개의 박테리오파지가 분리되었으며, 에르위니아 피리폴리에 균주 81로부터 3개의 박테리오파지가 분리되었고, 에르위니아 피리폴리에 균주 Epk1/15(81)로부터 1개의 박테리오파지가 분리되었다.

표 1

Phage No.	Host	Strain	Soil sampling sites
1	<i>E. amylovora</i>	73	Kyung Hee University
2	<i>E. amylovora</i>	73	Kyung Hee University
3	<i>E. amylovora</i>	73	Kyung Hee University
4	<i>E. amylovora</i>	73	Kyung Hee University

5	<i>E. amylovora</i>	73	Kyung Hee University
6	<i>E. amylovora</i>	73	Kyung Hee University
7	<i>E. amylovora</i>	73	Jecheon
8	<i>E. amylovora</i>	Ea-K1(79)	Kyung Hee University
9	<i>E. amylovora</i>	Ea-K1(79)	Kyung Hee University
10	<i>E. amylovora</i>	Ea-K1(79)	Kyung Hee University
11	<i>E. amylovora</i>	Ea-K1(79)	Kyung Hee University
12	<i>E. amylovora</i>	Ea-K1(79)	Kyung Hee University
13	<i>E. amylovora</i>	Ea-K1(79)	Kyung Hee University
14	<i>E. amylovora</i>	Ea-K1(79)	Chungju
15	<i>E. amylovora</i>	Ea-K1(79)	Jecheon
16	<i>E. amylovora</i>	Ea-K1(79)	Jecheon
17	<i>E. amylovora</i>	Ea-K1(79)	Jecheon
18	<i>E. pyrifoliae</i>	81	Kyung Hee University
19	<i>E. pyrifoliae</i>	81	Kyung Hee University
20	<i>E. pyrifoliae</i>	81	Kyung Hee University
21	<i>E. pyrifoliae</i>	Epk1/15(81)	Kyung Hee University

[0096] 실시예 2. 기주 범위의 결정

[0097] 다양한 박테리아에 대한 기주 범위를 결정하기 위해, 대표적인 5개의 박테리오파지 (Φ7, Φ8, Φ19, Φ20, Φ21)를 오버레이 어세이를 사용하여 기주 범위 시험을 진행하였다. 3개의 선택된 박테리오파지 (Φ7, Φ8, Φ21)의 숙주 범위는 20개의 에르위니아 아밀로보라 균주, 8개의 에르위니아 피리폴리아 균주, 껍토박테리움 카로토보룸(*Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*), 디케이아 제애(*Dickeya Zeae*) 및 3개의 판토에아(*Pantoea*) 균주 (이전에는 에르위니아 균주)를 통해 결정되었다. 분리된 장소와 관계없이, 세가지 모든 박테리오파지는 에르위니아 아밀로보라 및 에르위니아 피리폴리아 균주에만 효과적인 것을 확인하였다 (표 2).

[0099] 실시예 3. 정제된 박테리오파지의 유전체 DNA 패턴 분석

[0100] 분리된 박테리오파지가 동일한지의 여부를 확인하기 위해 실험방법 6을 통해 분리된 박테리오파지의 유전체 DNA를 추출하고 제한효소 절단을 수행하여 박테리오파지의 유전체 DNA 패턴을 제한효소 절단 결과와 비교하였다. 21개의 박테리오파지 DNA 패턴은 EcoRI만을 절단하거나, BamHI만을 절단하거나, EcoRI 및 BamHI를 절단하는 3가지 유형이었다 (도 2). DNA 패턴에 따라 각 그룹의 대표적인 박테리오파지를 Φ7, Φ8, Φ21로 선택하였다 (도 3). 모든 박테리오파지의 게놈 DNA를 EcoRI로 소화 시켰으나 하나의 박테리오파지 (Φ8) 만 BamHI로 소화시켰다. 박테리오파지 Φ7, Φ8, Φ21의 게놈 DNA의 추정 크기는 각각 약 70kb, 50kb, 80kb였다.

[표 2-1]

No.	박테리아	균주	Φ7	Φ8	Φ19	Φ20	Φ21
1	<i>Erwinia amylovora</i>	73	○	○	○	○	○
2	<i>Erwinia amylovora</i>	74	○	○	○	○	○
3	<i>Erwinia amylovora</i>	75	○	○	○	○	○
4	<i>Erwinia amylovora</i>	76	○	○	○	○	○
5	<i>Erwinia amylovora</i>	77	○	○	○	○	○
6	<i>Erwinia amylovora</i>	78	○	○	○	○	○
7	<i>Erwinia amylovora</i>	Ea-K1(79)	○	○	○	○	○
8	<i>Erwinia amylovora</i>		○	○	○	○	○
9	<i>Erwinia pyrifoliae</i>	81	○	○	○	○	○
10	<i>Erwinia pyrifoliae</i> 9-1	EpK1/15(81)	○	○	○	○	○
11	<i>Erwinia pyrifoliae</i> 9-4		○	○	○	○	○
12	<i>Erwinia amylovora</i>	2016-1	○	○	○	○	○
13	<i>Erwinia amylovora</i>	2016-2	○	○	○	○	○
14	<i>Erwinia amylovora</i>	2016-3	○	○	○	○	○
15	<i>Erwinia amylovora</i>	2016-4	○	○	○	○	○
16	<i>Erwinia amylovora</i>	YKB 12316 (TS 3128)	○	○	○	○	○
17	<i>Erwinia amylovora</i>	YKB 12317 (TS3133)	○	○	○	○	○

[0102]

[0103]

[표 2-2]

No.	박테리아	균주	Φ7	Φ8	Φ19	Φ20	Φ21
18	<i>Erwinia amylovora</i>	YKB 12318 (TS 3240)	○	○	○	○	○
19	<i>Erwinia amylovora</i>	YKB 12319 (TS 3241)	○	○	○	○	○
20	<i>Erwinia amylovora</i>	YKB 12320 (TS 3315)	○	○	○	○	○
21	<i>Erwinia amylovora</i>	YKB 12321 (TS 3325)	○	○	○	○	○
22	<i>Erwinia amylovora</i>	YKB 12322 (TS 3371)	○	○	○	○	○
23	<i>Erwinia amylovora</i>	YKB 12323 (TS 3373)	○	○	○	○	○
24	<i>Erwinia pyrifoliae</i>	YKB 12324 (TS 2743)	○	○	○	○	○
25	<i>Erwinia pyrifoliae</i>	YKB 12325 (TS 2744)	○	○	○	○	○
26	<i>Erwinia pyrifoliae</i>	YKB 12326 (TS 3239)	○	○	○	○	○
27	<i>Erwinia pyrifoliae</i>	YKB 12327 (TS 3340)	○	○	○	○	○
28	<i>Erwinia pyrifoliae</i>	YKB 12328 (TS 3342)	○	○	○	○	○
29	<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	Pec21	-	-	-	-	-
30	<i>Dickeya Zeae</i>		-	-	-	-	-
31	<i>Pantoea dispersa</i>		-	-	-	-	-
32	<i>Pantoea agglomerans</i>		-	-	-	-	-
33	<i>Pantoea stewartii</i>		-	-	-	-	-

실시예 4. 박테리오파지의 형태

박테리오파지를 특성화하고 분류하기 위해, 정제된 박테리오파지의 형태를 확인하였다. 세가지 선택된 박테리오파지의 형태는 투과 전자현미경을 사용하여 확인하였다. 그 결과, Φ7, Φ8 및 Φ21은 Caudovirales 목에 속하는 것을 확인하였고, Φ7과 Φ21은 Myoviridae 과에 속하며 Φ8은 Podoviridae 과에 속하는 것을 확인하였다 (도 4). Φ7의 머리 길이는 88.8nm, Φ8의 머리 길이는 75nm, Φ21의 머리 길이는 63nm로 추정되었다.

상기 박테리오파지 Φ21를 2018년 4월 19일 한국미생물보존센터에 기탁번호 KFCC11770P로 기탁하였다.

실시예 5. 박테리오파지의 용균활성 분석

박테리오파지의 용균 활성은 식물 질병을 통제하기 위한 파지 테라피로써 적용할 수 있는 가장 중요한 요인이므로, 박테리오파지의 용균 활성을 분석하였다.

실험방법 4의 방법으로 수득한 에르위니아 아밀로보라 또는 에르위니아 피리폴리에에 박테리오파지 용해액을 접

중하고 26℃에서 배양하며 용균활성을 분석하였다.

[0113] 그 결과, 도 5에 나타난 바와 같이, 박테리오파지 Φ7, Φ8, Φ19, Φ20, Φ21은 모두 에르위니아 아밀로보라 또는 에르위니아 피리폴리에에 대한 우수한 용균 활성을 나타냄을 확인할 수 있었다.

[0115] **실시예 6. 박테리오파지의 온도, pH 및 UV에 대한 안정성**

[0116] 박테리오파지를 대체 제제로 사용하기 위해서는 박테리오파지의 온도, 토양 pH 및 자외선과 같은 다양한 환경 조건에 대한 안정성이 중요하다. 이에, 각 환경 조건을 처리한 후 도팅 어세이를 수행하여 생존 가능한 박테리오파지를 확인하였다 (도 6, 7, 8). 온도 조건의 경우, Φ7과 Φ8은 1시간 동안 50℃까지 안정하였으나 50℃ 이상에서 생존력이 감소하기 시작하여 60℃에서 완전히 비활성화되었다. Φ21은 40℃까지 안정하고 40℃ 이상에서 생존력이 감소하기 시작하였으며 60℃에서 완전히 비활성화되었다. pH 조건의 경우, Φ7 및 Φ21은 pH 4-11에서 안정하였고, Φ8은 pH 5-10에서 안정하였다. UV의 경우 365nm의 자외선은 3개의 모든 박테리오파지에서 안정했다.

[0117] 상기 결과를 통해, 본 발명의 박테리오파지는 다양한 온도, 다양한 pH 범위 및 자외선에 대하여 안정적이라는 것을 알 수 있었다.

[0119] **실시예 7. 유전체 정보 분석**

[0120] 실험방법 6을 통해 추출한 박테리오파지 DNA를 통해 유전체 정보를 획득한 후, 기존에 알려진 에르위니아 특이적 박테리오파지의 유전체 정보와 비교하였다. 그 결과, Φ8이 Φ7 또는 Φ21에 비해 낮은 서열의 동일성을 나타내었고, Φ8과 Φ21이 기존에 보고된 박테리오파지들과도 상동성이 낮아, 신규한 박테리오파지임을 확인하였다 (도 9).

[0122] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

[0124] [수탁번호]

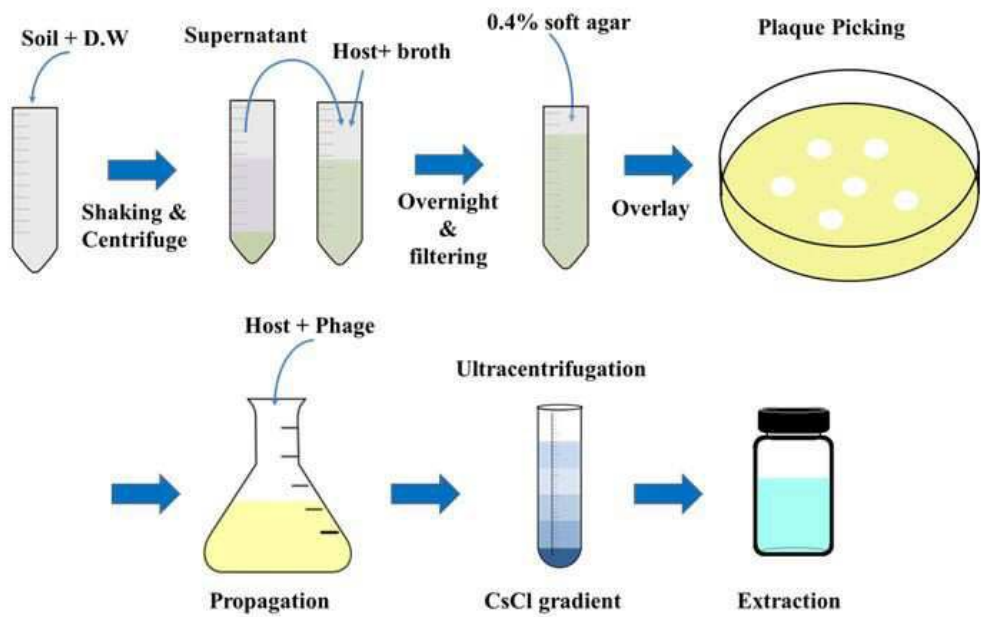
[0125] 기탁기관명 : 한국미생물보존센터(국내)

[0126] 수탁번호 : KFCC11770P

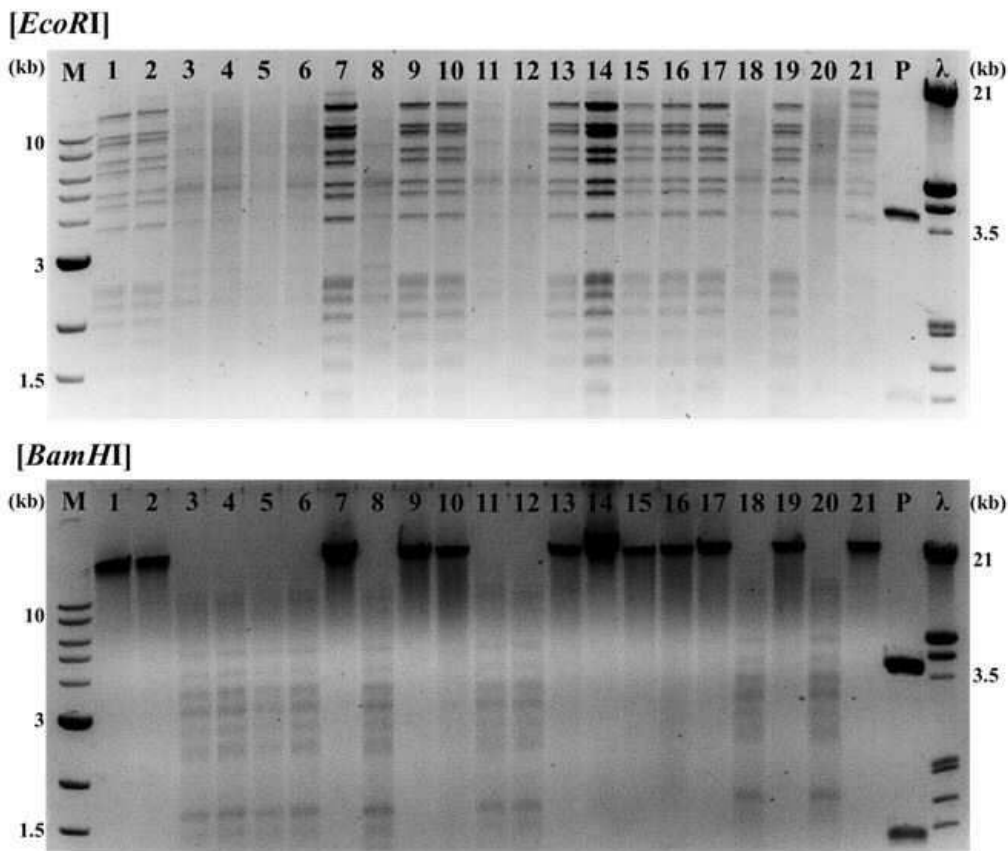
[0127] 수탁일자 : 20180419

도면

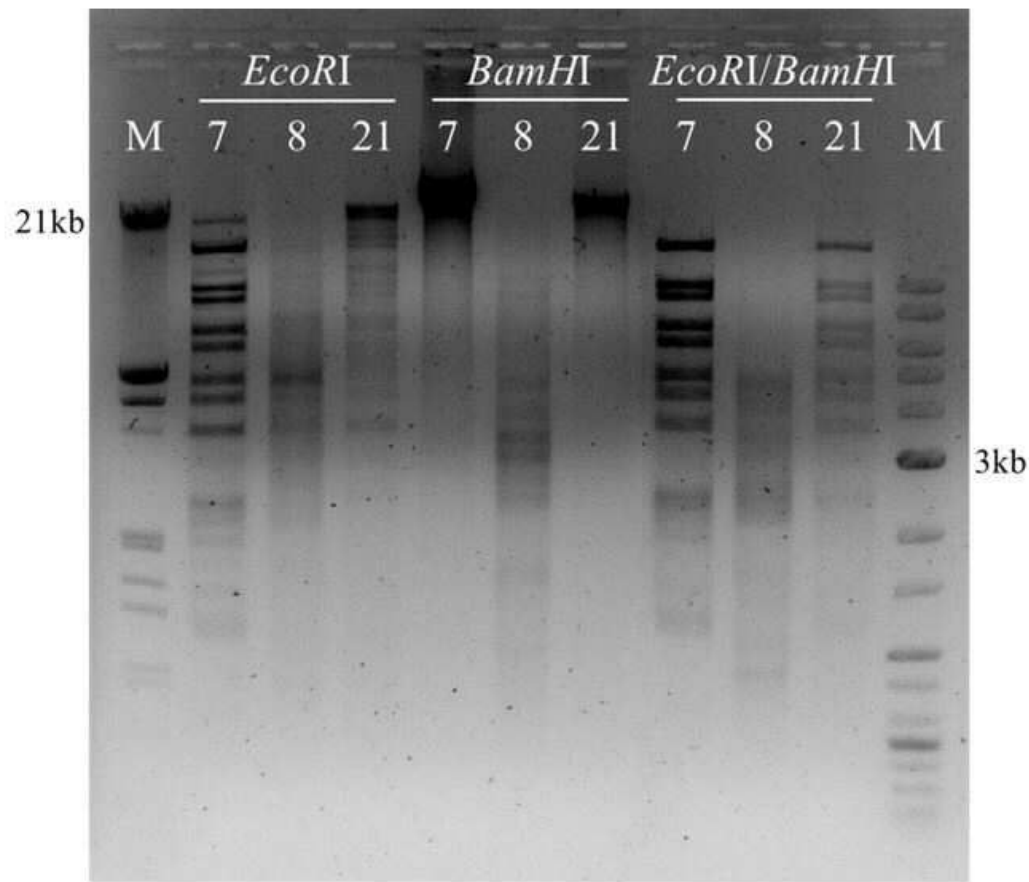
도면1



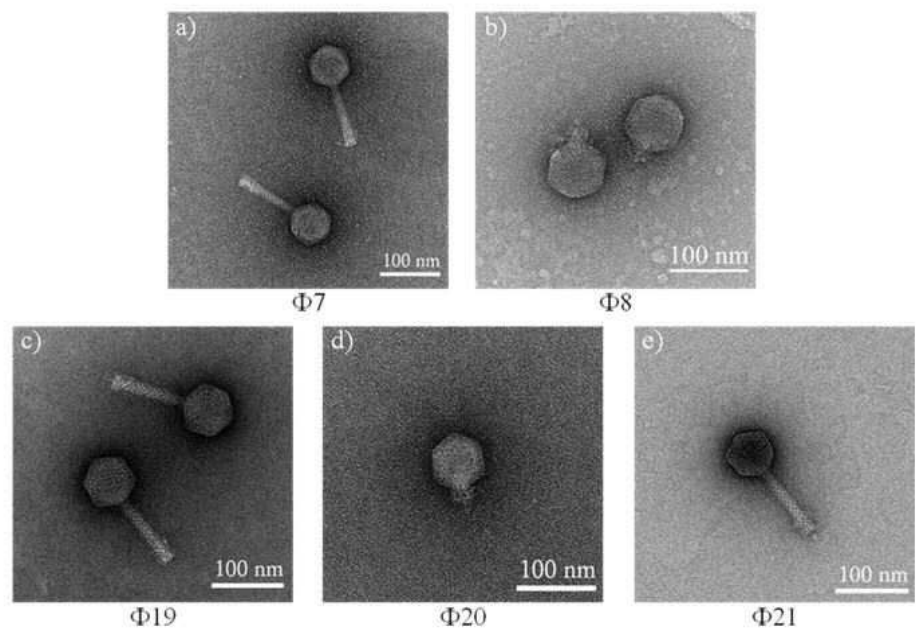
도면2



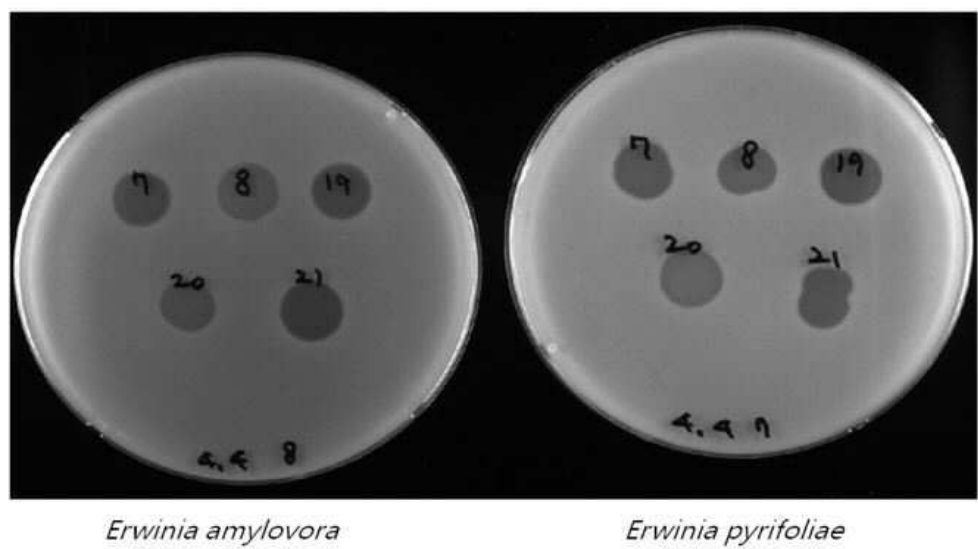
도면3



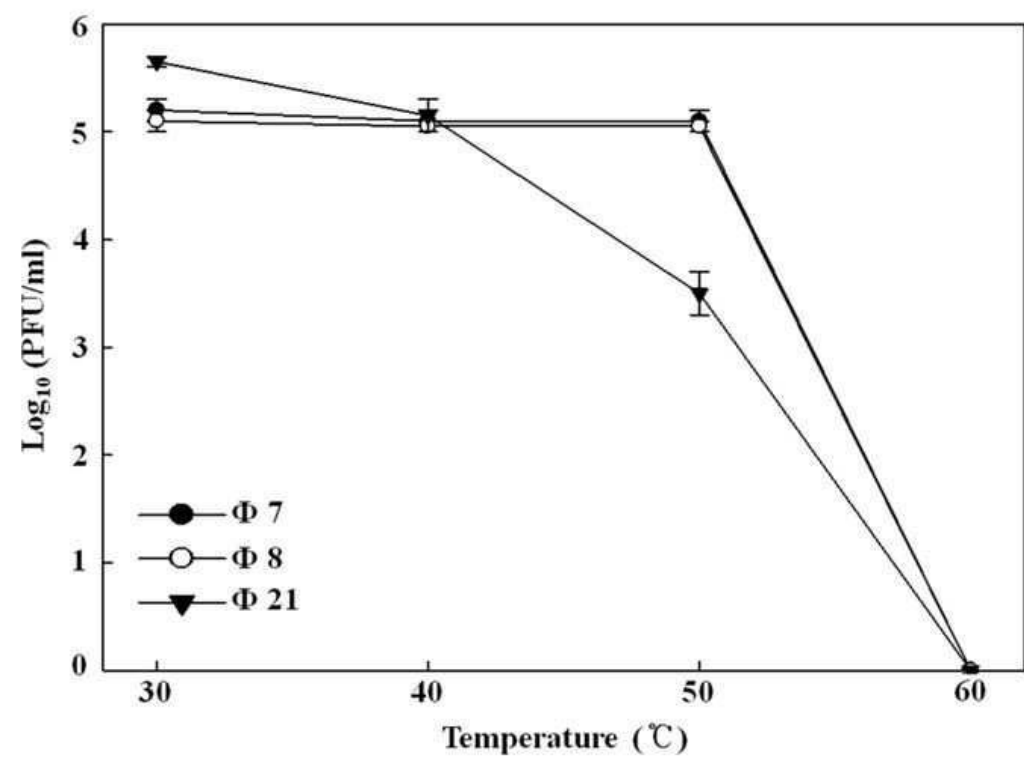
도면4



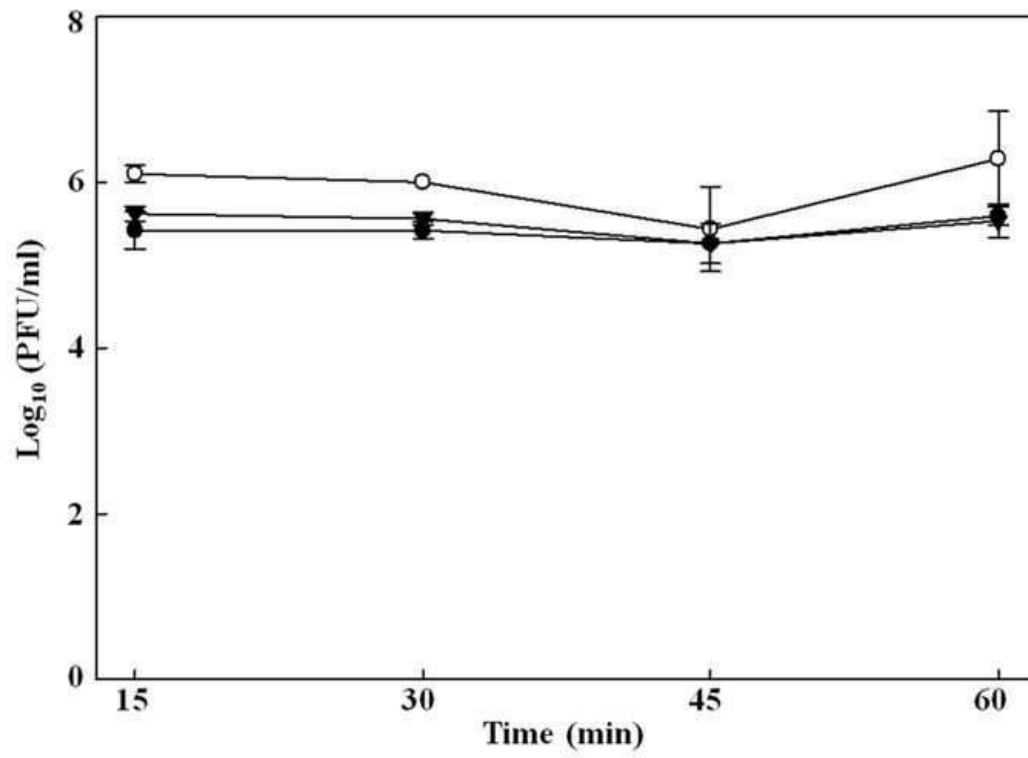
도면5



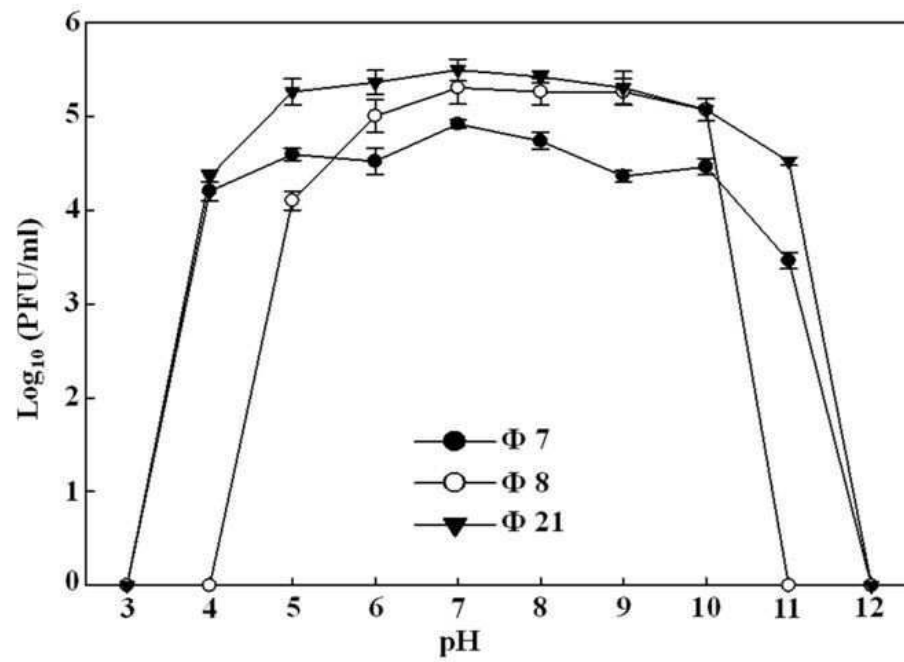
도면6



도면7



도면8



도면9

Query		Subject			
Name	Length	Description	Length	Accession	Ident
7	84,539	Erwinia amylovora phage phiEa104 complete genome	84,565	FQ482083.1	98%
		Erwinia phage phiEa21-4, complete genome	84,576	EU710883.1	99%
		Erwinia phage vB_EamM-M7, complete genome	84,694	HQ728263.1	88%
8	75,929	Erwinia phage vB_EamP_Frozen, complete genome	75,147	KX098389.2	85%
		Erwinia phage vB_EamP_Gutmeister, complete genome	71,173	KX098391.1	85%
		Erwinia phage Ea9-2, complete genome	75,568	KF806588.1	85%
21	84,541	Erwinia phage phiEa21-4, complete genome	84,576	EU710883.1	99%
		Erwinia amylovora phage phiEa104 complete genome	84,565	FQ482083.1	98%
		Erwinia phage vB_EamM-M7, complete genome	84,694	HQ728263.1	88%