

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2018년 4월 26일 (26.04.2018) WIPO | PCT



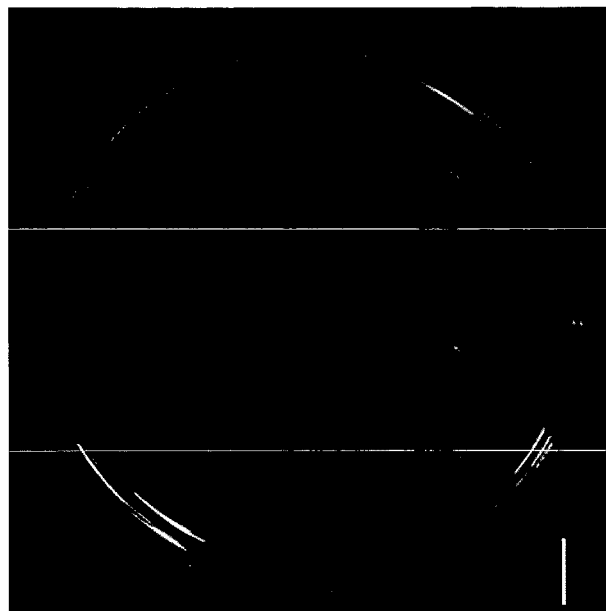
(10) 국제공개번호
WO 2018/074760 A1

- (51) 국제특허분류: C12N 1/18 (2006.01) C12R 1/645 (2006.01) A01N 63/04 (2006.01) 창구 중앙대로 300, 경상남도도청, Gyeongsangnam-do (KR).
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2017/010681
- (22) 국제출원일: 2017년 9월 27일 (27.09.2017)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2016-0137873 2016년 10월 21일 (21.10.2016) KR
- (71) 출원인: 한국 한의학 연구원 (KOREA INSTITUTE OF ORIENTAL MEDICINE) [KR/KR]; 34054 대전시 유성구 유성대로 1672, Daejeon (KR). 경상남도 (KYUNG SANG NAM DO) [KR/KR]; 51154 경상남도 창원시 의창구 중안대로 300, Gyeongsangnam-do (KR).
- (72) 발명자: 강영민 (KANG, Young Min); 34321 대전시 대덕구 대덕대로1520번길 55, 101동 504호, Daejeon (KR). 최지은 (CHOI, Ji Eun); 39569 경상북도 김천시 대항면 대룡1길 55-26, Gyeongsangbuk-do (KR). 문병철 (MOON, Byeong-Cheol); 34006 대전시 유성구 와룡로 136번길 15, 104동 401호, Daejeon (KR). 이가연 (LEE, Ka Youn); 61924 광주광역시 서구 경열로 148, Gwangju (KR). 강승미 (KANG, Seung Mi); 52550 경상남도 사천시 주공1길 50, 203동 1105호, Gyeongsangnam-do (KR). 김종익 (KIM, Jong Ik); 52619 경상남도 진주시 일반성면 남산길 189-14, Gyeongsangnam-do (KR).
- (74) 대리인: 최규환 (CHOI, Kyu Whan); 35209 대전시 서구 한밭대로 745, 12층 그린국제특허법률사무소, Daejeon (KR).

(54) Title: NOVEL YEAST *METSCHNIKOWIA PERSIMMONESIS* KIOM_G15050 STRAIN ISOLATED FROM OLD CALYX OF PERSIMMON AND USE THEREOF

(54) 발명의 명칭: 감나무 혹은 꽃받침에서 분리한 메치니코비아 퍼시모네시스 균주 KIOM_G15050 신규 효모 및 이의 용도

[도 12]



Scale bar=1 cm

(57) Abstract: The present invention relates to a novel *Metschnikowia persimmonesis* KIOM_G15050 strain (KCTC 12991BP) isolated from an old calyx of a persimmon and a use thereof. Specifically, the novel *Metschnikowia persimmonesis* KIOM_G15050 strain (KCTC 12991BP) has antibacterial activity, is susceptible to antibiotics, and is noncytotoxic, thereby being easily contained in cosmetic products, household products or the like or applied to food and medical products. In addition, the present invention relates to: a microbial preparation for antibacterial use or a composition for controlling plant diseases, both of which contain a novel *Metschnikowia persimmonesis* KIOM_G15050 strain (KCTC 12991BP) as an active ingredient; and a method for controlling plant diseases by treating



WO 2018/074760 A1

(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, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, 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.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, 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, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

plants or soil with the strain.

(57) 요약서: 본 발명은 감나무 목은 꽃받침에서 분리한 신규 메치니코비아 퍼시모네시스(*Metschnikowia persimmonesis*) KIOM_G15050 균주(KCTC 12991BP) 및 이의 용도에 관한 것으로, 상세하게는 상기 신규 메치니코비아 퍼시모네시스(*Metschnikowia persimmonesis*) KIOM_G15050 균주(KCTC 12991BP)는 항균 활성을 가지며, 항생제 감수성을 갖는 특징이 있을 뿐만 아니라, 세포독성이 없으므로, 화장품, 생활용품 등의 산업용에 함유되거나, 식품 또는 의약품으로의 응용이 용이한 것이다. 또한, 본 발명은 신규 메치니코비아 퍼시모네시스(*Metschnikowia persimmonesis*) KIOM_G15050 균주(KCTC 12991BP)를 유효성분으로 함유하는 항균용 미생물 제제 또는 식물병 방제용 조성물에 관한 것이며, 상기 균주를 식물 또는 토양에 처리하여 식물병을 방제하는 방법에 관한 것이다.

명세서

발명의 명칭: 감나무 목은 꽃받침에서 분리한 메치니코비아 퍼시모네시스 균주 KIOM_G15050 신규 효모 및 이의 용도 기술분야

- [1] 본 발명은 감나무 목은 꽃받침에서 분리한 메치니코비아 퍼시모네시스(*Metschnikowia persimmonesis*) 균주 KIOM_G15050 신규 효모 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 감나무는 감나무과 식물로서, 오랫동안 재배되어 온 과실수이며, 원산지는 온대 아시아 지역의 한국, 중국 및 일본이다. 국내의 중북부 및 산간지방을 제외한 전국에서 재배되고 있다.
- [3] 감나무의 높이는 6~14m이고, 줄기의 겉껍질은 비늘 모양으로 갈라지며, 작은 가지에 갈색 털이 있다. 잎은 어긋나고 타원상 난형이다. 잎의 길이는 7~17cm이고, 너비는 4~10cm이며, 톱니는 없다. 잎자루는 5~13cm의 길이이고, 털이 있다. 꽃은 양성 또는 단성으로 5~6월에 황백색으로 잎겨드랑이에 달린다. 수꽃은 16개의 수술이 있으나 양성화에는 4~16개의 수술이 있다. 암꽃의 암술 길이는 15~18mm이고 암술대에 털이 있으며 길게 갈라지고 씨방은 8실이며, 열매는 난원형 또는 편구형이고 10월에 황홍색으로 익는다. 근연종으로, 돌감나무 및 고욤나무가 있는데, 모두 감나무를 닮았으나 열매의 지름이 1~2cm로 작다. 재배품종의 대목으로 널리 이용되며, 접수를 어떤 수종으로 선정하는지에 따라, 감의 품질과 수확량의 차이가 있다.
- [4] 연평균 기온 11~15°C, 열매가 성숙하는 9~10월의 평균기온 21~23°C가 생육에 가장 적합하며, 번식은 접목 또는 아접 하는데 씨를 뿌려 묘목을 만들면 열매가 크게 퇴화하므로 반드시 접목해야 한다. 우리나라의 뽕은감 재배면적 및 생산량은 매년 급격히 증가하고 있고, 뽕은감 생산량은 1995년은 39.8천 톤 정도였으나 1997년부터 급격히 증가하여 2006년에는 146.3천 톤으로 1995년에 비해 368%가 증가하였으며, 단감 생산량은 2000년에 227천 톤으로 정점을 나타내었으나 지금은 감소추세이다.
- [5] 한편, 감잎은 비타민 C가 풍부한 차로 애용되며, 고혈압의 치료에도 효과가 있다. 감꼭지는 한방에서 딸꾹질, 구토 또는 야뇨증 등에 달여서 복용해 왔으며, 꽃감은 해소, 토혈, 객혈, 및 이질의 치료에 쓰이고, 꽃감의 시절은 진해 또는 거담에 효능이 있고, 자양 식품으로 쓰이고 있다.
- [6] 동의보감, 본초강목, 본초비효 등 고문헌에서 꽃감은 숙혈을 없애고, 폐혈, 혈토, 반위, 장풍과 치질을 다스린다고 기록되어 있으며, 민감요법과 대한민국약전에서 감꼭지는 딸꾹질, 감기 예방, 동맥경화, 심장병 예방, 혈관강화, 폐와 기관지질환 등에 대한 효과가 있다고 개시된 바 있으나,

과학적이고 체계적인 검증이 필요한 상태이다. 또한, 뚝은 감은 홍시와 꽃감으로 널리 이용되며, 가공시에 버려지는 감꼭지 또는 감껍질 등 부산물의 자원화를 위한 연구가 필요한 상황이다.

- [7] 일본등록특허 제1995-061258호에 항균활성을 가지는 효모에 대해 개시되어 있고, 일본등록특허 제5676591호에 살진균 활성을 가지는 효모 및 살진균제의 조합에 대하여 개시되어 있으나, 본 발명의 감나무 묵은 꽃받침에서 분리한 메치니코비아 퍼시모네시스 균주 KIOM_G15050 신규 효모 및 이의 용도에 대하여 개시된 바 없다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [8] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명은 감나무 묵은 꽃받침에서 분리한 메치니코비아 퍼시모네시스(*Metschnikowia persimmonesis*) KIOM_G15050 신규 효모를 제공하고, 상기 균주가 항균활성 및 항생제 감수성을 가지고 있는 균주라는 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제 해결 수단

- [9] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 신규 메치니코비아 퍼시모네시스(*Metschnikowia persimmonesis*) KIOM_G15050 균주(KCTC 12991BP)를 제공한다.
- [10] 또한, 본 발명은 상기 균주를 유효성분으로 함유하는 항균용 미생물 제제를 제공한다.
- [11] 또한, 본 발명은 상기 균주를 유효성분으로 함유하는 식물병 방제용 조성물을 제공한다.
- [12] 또한, 본 발명은 상기 균주를 식물 또는 토양에 처리하여 식물병을 방제하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [13] 본 발명은 감나무 묵은 꽃받침에서 분리한 신규 메치니코비아 퍼시모네시스[*Metschnikowia persimmonesis* Kang & Choi et al., sp. nov. (Type strain KIOM_G15050=KCTC 12991BP)] 균주 및 이의 용도에 관한 것으로, 상세하게는 항균 활성을 가지며, 항생제 감수성을 갖는 균주에 관한 것이고, 상기 균주를 유효성분으로 함유하는 항균용 미생물 제제에 관한 것이며, 상기 균주를 식물 또는 토양에 처리하여 식물병을 방제하는 방법에 관한 것이다.
- [14] 본 발명의 신규 메치니코비아 속 균주는 항균활성 및 항생제 감수성이 있는 균주로 다양한 유용성이 있는 것이므로, 관련 산업에 다양하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [15] 도 1은 뚝은 감 3품종의 사진이다. A: 산청 고종시 생감, B: 산청 단성시 생감, C: 밀양 반시 생감, D: 산청 고종시 꽃감, E: 산청 단성시 꽃감, F: 밀양 반시 꽃감 (말랭이) 이다.
- [16] 도 2는 국내외 유통품 감꼭지 사진으로, G: 국내 유통 약재 1 (감꼭지, 구입처:

좋은 약초), H: 국내 유통 약재 2 (감꼭지, 구입처: 청명 약초), I: 국외 유통 약재 1 (감꼭지, 구입처: 중국 수입품), J: 국외 유통 약재 2 (감꼭지, 구입처: 중국 수입품)이다.

- [17] 도 3은 본 발명의 13개 대상 시료로부터 미생물 배양 과정을 나타낸 것이다.
- [18] 도 4는 13개 대상 시료의 선정 및 미생물 배양 과정의 플레이트 사진이다.
- [19] 도 5는 13개 대상 시료의 선정 및 미생물 배양 과정(균집 분리)을 나타낸 개략도이다.
- [20] 도 6은 Pyrosequencing 분석을 위한 그룹별 미생물 확보 과정을 나타낸 것이다.
- [21] 도 7은 본 발명의 메치니코비아 퍼시모네시스(*Metschnikowiapersimmonesis*) KIOM_G15050 균주의 계통수(phylogenic tree)를 나타낸 것이다.
- [22] 도 8은 본 발명의 메치니코비아 퍼시모네시스(*Metschnikowiapersimmonesis*) KIOM_G15050 균주의 배지별 생육 여부를 확인한 사진이다.
- [23] 도 9는 본 발명의 메치니코비아 퍼시모네시스(*Metschnikowiapersimmonesis*) KIOM_G15050 균주의 최적생육 온도를 확인한 사진이다.
- [24] 도 10은 본 발명의 메치니코비아 퍼시모네시스(*Metschnikowiapersimmonesis*) KIOM_G15050 균주의 처리에 따른 세포 생존률(%)을 나타낸 그래프이다.
- [25] 도 11은 본 발명의 메치니코비아 퍼시모네시스(*Metschnikowiapersimmonesis*) KIOM_G15050 균주의 투여에 따른 동물모델의 체중변화를 나타낸 그래프이다.
- [26] 도 12는 본 발명의 메치니코비아 퍼시모네시스(*Metschnikowiapersimmonesis*) KIOM_G15050 균주의 보트리티스 시네리아(*Botrytis cinerea*)에 대한 항균활성을 확인한 사진이다.
- [27] 도 13은 본 발명의 메치니코비아 퍼시모네시스(*Metschnikowiapersimmonesis*) KIOM_G15050 균주의 푸사리움 옥시스포럼(*Fusarium oxysporum*)에 대한 항균활성을 확인한 사진이다.
- [28] 도 14는 메치니코비아속 균주에 대한 API 20C AUX(PDA)에서의 탄소원 이용성을 확인한 사진이다.
- [29] 도 15는 메치니코비아속 균주에 대한 API 20C AUX(TSA)에서의 탄소원 이용성을 확인한 사진이다.
- [30] 도 16은 메치니코비아속 균주에 대한 API 50CH(PDA)에서의 탄소원 이용성을 확인한 사진이다.
- [31] 도 17은 메치니코비아속 균주에 대한 API 50CH(TSA)에서의 탄소원 이용성을 확인한 사진이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [32] 본 발명은 신규 메치니코비아 퍼시모네시스(*Metschnikowiapersimmonesis*) KIOM_G15050 균주(KCTC 12991BP)에 관한 것이다. 상기 균주는 감나무 묵은 꽃받침에서 분리한 것으로, 항균활성 및 항생제 감수성을 가지고 있는 균주이며, 상기 균주를 한국생명공학연구원에 2016년 3월 16일자로 기탁하였다[

Metschnikowia persimmonesis Kang & Choi et al., sp. nov. (Type strain K10M_G15050 = KCTC 12991BP)] .

- [33] 상기 항균 활성은 보트리티스 시네리아(*Botrytis cinerea*) 및 푸사리움 옥시스포럼(*Fusarium oxysporum*)에 대한 항균활성일 수 있으나, 이에 제한하지 않으며, 다양한 식물체의 병원균에 대한 항균활성을 나타낼 수 있다.
- [34] 상기 항생제 감수성은 나이스타틴(nystatin), 시클로헥사미드(cycloheximide), 살리노마이신(salinomycin), 암포테리신(amphotericin) 및 그라미시딘 S(gramicidin S) 중에서 선택된 하나 이상의 항생제에 대한 감수성인 것이 바람직하지만, 특별히 이에 제한하는 것은 아니다.
- [35] 본 발명에서, 항생제 감수성은 본 발명의 균주가 항생제에 반응하여 항생제 주변에서 본 발명의 균주가 자라지 못하는 것을 의미한다.
- [36] 또한, 본 발명은 상기 균주를 유효성분으로 함유하는 항균용 미생물 제제에 관한 것이다. 본 발명에 의한 미생물 제제는 액상 비료 형태로 제조될 수 있으며 이에 증량제를 첨가하여 분말의 형태로 이용하거나 이를 제형화하여 과립화시킬 수도 있다. 그러나 그 제형에 특별히 한정하지는 않는다. 즉 화학비료 공급이 제한된 친환경 유기농업에서 이를 극복하기 위한 생물비료로 제형화 하는 것이 가능하다.
- [37] 또한, 본 발명은 상기 균주를 유효성분으로 함유하는 식물병 방제용 조성물에 관한 것이다. 상기 식물병은 보트리티스 시네리아(*Botrytis cinerea*) 또는 푸사리움 옥시스포럼(*Fusarium oxysporum*)에 의해 유발되는 식물병인 것이 특징이지만 이에 제한하는 것은 아니다. 상기 식물병은 잣빛곰팡이병, 토마토 시들음병 등일 수 있으나, 이에 제한하는 것은 아니다.
- [38] 또한, 본 발명은 상기 균주를 식물 또는 토양에 처리하여 식물병을 방제하는 방법에 관한 것이다. 상기 식물은 감나무인 것이 바람직하지만 이에 제한하는 것은 아니다.
- [39] 상기 식물병을 방제하는 방법으로, 상기 균주, 상기 균주를 유효성분으로 포함하는 미생물 제제 또는 상기 균주를 유효성분으로 포함하는 식물병 방제용 조성물을 식물의 유묘에 침치 처리, 지상부에 경엽 처리 또는 토양 관주 처리하는 단계를 포함할 수 있으며, 상기 침치 처리의 경우, 배양액 및 미생물 제제를 식물체 주변의 통에 붓거나 또는 종자를 배양액 및 제제에 담가둘 수 있다.
- [40]
- [41] 이하, 실시예를 이용하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들에 의해 제한되지 않는다는 것은 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어 자명한 것이다.
- [42]
- [43] [재료]

- [44] 지역별 특성에 따른 뿔은 감의 형태학적 차이, 미생물의 다양성, 유용물질의 함량, 추출물의 독성 평가 및 한의학적 효능을 분석하기 위하여 지방 고유 품종인 산청 고종시, 산청 단성시 및 밀양 반시를 선별하였다. 경상남도 산림환경 연구원으로부터 상기 3종의 뿔은 감을 분양 받았으며, 생감과 꽃감의 감꼭지 및 감껍질을 분리하여 사용하였다(도 1).
- [45] 또한, 감나무 목은 꽃받침(감꼭지)로 사용되고 있는 국내외 유통약재를 수집하여 본 발명의 재료로 활용하였다(도 2).
- [46]
- [47] 실시예 1. 뿔은 감으로부터 미생물의 개별분리(Single culture)
- [48] 1) 시료의 배양
- [49] 13개 대상 시료는 멸균된 상태의 핀셋을 이용하여 생감꼭지 부분과 꽃감표면, 꽃감꼭지, 국내외 유통 약재시료로 구분하여 50ml 튜브에 넣어 4°C에서 보관하였다. LB(Luria-Bertani) broth 배지와 PD(Potato Dextrose) broth 배지에서 공동배양하였다. 배양 조건은 50ml 튜브에 15ml 배지를 넣은 후 100rpm 암 조건에서 48시간 incubation하였다. 현탁된 배양액 2ml을 transfer하여 아가(agar)가 포함된 LB와 PD 배지에 1차 계대 배양하였다(도 3).
- [50] 2) 미생물 분리
- [51] 1차적으로 계대 배양된 미생물들의 single colony를 얻기 위해 멸균된 streaking stick을 이용하여 3~4회 이상 지속적으로 계대 배양하였다. 최종적으로 LB에서 배양한 미생물과 PD에서 배양한 미생물들을 각각 1.5ml E-튜브에 보관하여 DNA 분리하기 전까지 -20°C에서 보관하였다(도 4).
- [52] 3) 미생물 DNA 추출 및 정량
- [53] 13개 대상 시료 중에서 LB에서 배양하여 single colony를 확보한 것은 L로 표시하여 numbering을 하였고, PD에서 배양되어 single colony를 확보한 것은 P로 표시하여 numbering하였다. 미생물 동정이 필요한 시료 최소 100mg을 샘플링하여 분쇄한 후, 200 μ l의 증류수를 넣어 100°C에서 10분간 가열하고, 원리분리하여 PCR template로 이용하였다. DNA 분리가 쉽지않은 진균성 곰팡이는 DNeasy Plant Mini Kit(Qiagen, Germany)를 이용하여 genomic DNA를 추출하였다. 이를 0.8% 아가로스겔에서 전기영동하여 추출된 genomic DNA의 양과 질 등의 상태를 확인하였으며, 농도는 NanoDrop 1000 분광광도계(spectrophotometer, NanoDrop, U.S.A.)를 이용하여 260nm에서 정량하였다.
- [54] 4) 16s rDNA 및 18s rDNA의 PCR 증폭 및 미생물 동정
- [55] 16s rDNA(세균성 미생물 DNA) 및 18s rDNA(진핵균 미생물 DNA: 곰팡이 등)의 PCR 증폭은 Solgent사의 Universal primer를 이용하여 최종 30 μ l의 반응액에서 수행하였다. 16s rDNA Universal primer는 27F (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3'; 서열번호 1), 1492R(5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3'; 서열번호 2)을 이용하였고, 18s rDNA Universal primer는 ITS1(5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG

G-3'; 서열번호 3), ITS4(5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3'; 서열번호 4)을 사용하였다. 약 20ng의 genomic DNA와 30pmole의 Universal primer 및 Solg 2X Taq PCR Pre-Mix(Solgent, Korea)를 각각 첨가한 뒤, 9700 Thermal Cycler (Applied Biosystems, Singapore)에서 95°C에서 15분간 pre-denaturation한 후 95°C에서 20초 변성(denaturation), 50°C에서 40초 어닐링(annealing), 72°C에서 1분 30초 연장(extension)을 30회 수행하고 마지막으로 72°C에서 5분간 연장(extension)시켰다. 반응이 끝난 증폭산물(1.5 Kb band로 확인된 16s rDNA와 600bp band로 확인된 18s rDNA) 중 10 μ l를 1.5% 아가로스 겔에서 전기영동 하여 DNA band를 UV상에서 확인하였다. 증폭된 단일 DNA 절편으로 확인된 산물은 PCR product purify kit(Solgent, Korea)을 이용하여 정제 후, pGEM-Teasy 벡터(Promega, USA)에 삽입하였다. 삽입된 증폭 산물은 XL1-Blue MRF competent cell(Stratagene, USA)에 형질전환하여 각 시료별 colony를 선발하였으며, T7과 SP6 primer 부위로부터 ABI3730 automatic DNA sequencer(Applied Biosystems, CA, USA)를 이용하여 분석된 염기서열을 NCBI(National Center for Biotechnology Information) Fenebank Database(www.ncbi.nlm.nih.gov)와 비교하여 최종적으로 동정하였다.

[56]

[57] 실시예 2. 뚝은 감으로부터 미생물의 집단분리(Pyrosequencing) 및 동정

[58] 1) 시료의 배양

[59] 13개 대상 시료는 멸균된 상태의 핀셋을 이용하여 생감꼭지 부분과 꽃감표면, 꽃감꼭지, 국내외 유통 약제시료로 구분하여 50ml 튜브에 보관하였다.

LB(Luria-Bertani) broth 배지와 PD(Potato Dextrose) broth 배지에서 공동배양하였다. 배양 조건은 50ml 튜브에 15ml 배지를 넣은 후, 100rpm이고 암조건에서 48시간 인큐베이션하였다. 현탁된 배양액 2ml를 transfer하여 아가(agar)가 포함된 LB와 PD 배지에 1차 계대 배양하였다(도 5).

[60] 미생물 개별 분리 방법과는 다르게 1차 계대 배양한 모든 배지 plate는 4개의 Group별로 각각 모아서 균집 분리를 실행하였다. Group 1은 생감꼭지(Sample 1~3), Group 2는 꽃감꼭지/표면(Sample 4~9), Group 3은 국내 유통 약제 (Sample 10, 11), Group 4는 국외 유통 약제(Sample 12 및 13)으로 총 4개의 그룹별 집단 분석을 하기 위해 도 6과 같이 분류하였다.

[61] 2) 미생물 분리

[62] 1차적으로 배양된 미생물들은 다량의 세균 및 진핵균들이 혼입된 상태로 colony 및 균사체를 형성하고 있어, 멸균된 streaking stick과 spoon을 이용하여 각 배지별 미생균체들을 50ml 튜브에 취합하였다. 미생물 생체시료는 Precellys™ Grinder(Bertin Technologies, France)를 이용하여 마쇄한 후, 원심분리 후 배지와 아가(agar)를 제거하여, 2-3회 1X PBS(Biowhittaker, Lonza, USA) 세척 후 최종 pellet을 dry한 후 Group별 미생물들은 각각 1.5ml E-튜브에 보관하여 DNA 분리하기 전까지 -20°C에 보관하였다.

- [63] **3) 미생물 DNA 추출, 정량 및 Pyrosequencing**
- [64] Group 1은 생감꼭지(Sample 1~3), Group 2는 꽃감꼭지/표면(Sample 4~9), Group 3은 국내 유통 약재(Sample 10, 11), Group 4는 국외 유통 약재(Sample 12, 13)로 총 4개의 Group 시료는 MagListo Genomic DNA Extraction kit(Bioneer, Korea)를 사용하여 genomic DNA를 추출하였다.
- [65] 추출한 DNA는 NanoDrop 1000 spectrophotometer(NanoDrop, U.S.A.)를 이용하여 260nm에서 정량하였다. 각 샘플에 대한 미생물의 분포를 알아보기 위해 GS Junior system(Roche, USA)을 이용하여 염기서열을 해독하고 분석하였다. 여러 종류의 샘플을 한 번에 확인하기 위한 방법으로 각각의 샘플에 adaptor와 MID 서열이 포함된 프라이머를 이용하여 PCR(Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler, U.S.A.)을 실시하였다. 먼저 세균 확인을 위해서는 27F-1, 27F-2, 27F-3, 27F-4 및 1492R을 이용하였고, 진균(곰팡이) 확인을 위해서는 ITS1F-1, ITS1F-2, ITS1F-3, ITRS1F-4 및 ITS4R을 이용하였다. 이로부터 획득한 PCR product들은 정제과정을 거쳐 라이브러리를 제작하고 GS Junior Titanium Sequencing Kit (Roche, USA)에 적용하여 염기서열을 해독하였다.
- [66] **4)Pyrosequencing** 의 DATA 분석 및 Taxonomic 분석
- [67] GS junior로부터 생산된 서열을 이용하여 NCBI-NT nucleotide sequence database에 BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (V2.2.30+)로 염기서열 데이터베이스에 비교하는 BLASTN을 이용하여 각 서열에 분류군 정보를 도출하였다.
- [68] 결과파일은 xml형식으로 저장하여 MEGAN (V5.10.6) 프로그램을 이용하여 BLAST 결과로 NCBI taxonomy 정보를 이용하여 taxonomic classification을 수행하였다. NCBI taxonomy는 660,000 이상의 taxon을 제공하고 있으며, 개별 종은 계층적(Superkingdom, Kingdom Phylum, Class, Order, Family, Genus, and Species)으로 분류하였고, MEGAN은 LCA-assignment algorithm (LCA=lowest common ancestor)으로 각 서열에 정의된 모든 taxon 중 가장 낮은 분류군을 그 서열의 taxon으로 할당하였다. 그 실례로, 한 서열이 a와 b 두 개의 다른 taxon에 정의될 때, a가 b의 ancestor일 경우, a보다 더 특이적으로 정의된 b가 그 서열의 taxon으로 정해진다. 모든 서열을 각 노드에 할당하여 rooted tree 형식의 phylogenetic tree를 완성하였다. 또한 ITS taxonomic counting heat map을 작성하여 각 Group별 미생물 동정결과를 완성하였다(도 7).
- [69] **5) 버기스 메뉴얼(Bergy's manual)에 따른 기질(substrate) 테스트**
- [70] 분리한 균주를 기질 테스트를 실시하고, 버기스 메뉴얼에 따라 분석하여 기존 균주와는 다른 신규주로 동정하였으며, 그 결과를 표 1 및 2에 개시하였다.

[71] [표 1]

		Substrate	24h	48h	72h	96h
Oxidation	A1	Water	-	-	-	-
Oxidation	A2	Acetic acid	-	-	-	v
Oxidation	A3	Formic acid	-	-	-	-
Oxidation	A4	Propionic acid	-	-	-	-
Oxidation	A5	Succinic acid	v	v	+	+
Oxidation	A6	Succinic Acid Mono-Methyl Ester	-	v	v	v
Oxidation	A7	L-Aspartic acid	-	-	-	-
Oxidation	A8	L-Glutamic acid	-	v	v	v
Oxidation	A9	L- Proline	-			v
Oxidation	A10	D-Gluconic acid	-	v	+	+
Oxidation	A11	Dextrin	-	-	-	-
Oxidation	A12	Inulin	-	-	-	-
Oxidation	B1	Cellobiose	+	+	+	+
Oxidation	B2	Genntiobiose	v	+	+	+
Oxidation	B3	Maltose	-	v	v	+
Oxidation	B4	Maltotriose	v	v	+	+
Oxidation	B5	D-Melezitose	-	v	+	+
Oxidation	B6	D-Melibiose	-	-	-	-
Oxidation	B7	Palatinose	-	v	v	+
Oxidation	B8	D-Raffinose	-	-	-	-
Oxidation	B9	Stachyose	-	-	-	-
Oxidation	B10	Sucrose	v	+	+	+
Oxidation	B11	D-Trehalose	-	-	-	-
Oxidation	B12	Turanose	-	v	+	+
Oxidation	C1	N-Acetyl-D-glucosamine	v	v	+	+
Oxidation	C2	α -D-Glucose	+	+	+	+
Oxidation	C3	D-Galactose	-	-	v	v
Oxidation	C4	D-Psicose	-	-	-	-
Oxidation	C5	L-Sorbose	v	v	+	+
Oxidation	C6	Salicin		v	v	v
Oxidation	C7	D-Mannitol	v	v	+	+
Oxidation	C8	D-Sorbitol	-	v	+	+
Oxidation	C9	D-Arabitol	-	-	-	-
Oxidation	C10	Xylitol	-	-	v	v
Oxidation	C11	Glycerol	-	-	-	-
Oxidation	C12	Tween 80	-	-	-	-

[72] [표 2]

		Substrate	24h	48h	72h	96h
Assimilation	D1	Water	-	-	-	-
Assimilation	D2	Fumaric acid	-	-	-	v
Assimilation	D3	L-Malic acid	-	-	v	v
Assimilation	D4	Succinic Acid Mono-Methyl Ester	-	-	-	-
Assimilation	D5	Bromo-succinic acid	-	-	-	-
Assimilation	D6	L-Glutamic acid	-	-	-	v
Assimilation	D7	γ -Amino-butyric acid	-	-	-	-
Assimilation	D8	α -Keto-glutaric acid	-	-	-	-
Assimilation	D9	2-Keto-D-gluconic acid	-	v	v	v
Assimilation	D10	D-Gluconic acid	-	v	v	v
Assimilation	D11	Dextrin	v	-	-	-
Assimilation	D12	Inulin	-	-	-	-
Assimilation	E1	D-Cellobiose	-	-	v	+
Assimilation	E2	Gentiobiose	-	-	v	v
Assimilation	E3	Maltose	-	-	-	-
Assimilation	E4	Maltotriose	-	-	-	-
Assimilation	E5	D-Melezitose	-	-	v	v
Assimilation	E6	D-Melibiose	-	-	-	-
Assimilation	E7	Palatinose	-	-	-	-
Assimilation	E8	D-Raffinose	-	-	-	-
Assimilation	E9	Stachyose	-	-	-	-
Assimilation	E10	Sucrose	-	-	-	-
Assimilation	E11	D-Trehalose	-	-	v	v
Assimilation	E12	Turanose	-	-	v	v
Assimilation	F1	N-Acetyl-D-Glucosamine	-	-	-	-
Assimilation	F2	D-Glucosamine	-	-	v	v
Assimilation	F3	α -D-Glucose	+	+	+	+
Assimilation	F4	D-Galactose	-	-	v	v
Assimilation	F5	D-Psicose	-	-	-	-
Assimilation	F6	L-Rhamnose	-	-	-	-
Assimilation	F7	L-Sorbose	-	-	-	-
Assimilation	F8	α -Methyl-D-Glucoside	-	-	v	v
Assimilation	F9	β -Methyl-D-Glucoside	-	-	v	v
Assimilation	F10	Amygdalin	-	-	-	-
Assimilation	F11	Arbutin	-	v	v	v
Assimilation	F12	Salicin	-	v	v	v
Assimilation	G1	Maltitol	-	-	v	v
Assimilation	G2	D-Mannitol	-	-	-	v
Assimilation	G3	D-Sorbitol	-	-	-	-
Assimilation	G4	Adonitol	-	-	v	v
Assimilation	G5	D-Arabitol	-	-	-	-
Assimilation	G6	Xylitol	-	-	v	v
Assimilation	G7	i-Erythritol	-	-	-	-
Assimilation	G8	Glycerol	-	-	v	v
Assimilation	G9	Tween 80	-	-	-	-
Assimilation	G10	L-Arabinose	-	-	-	-
Assimilation	G11	D-Arabinose	-	-	-	-
Assimilation	G12	D-Ribose	-	-	-	-
Assimilation	H1	D-Xylose	-	v	v	+
Assimilation	H2	Succinic Acid Mono-Methyl Ester plus D-Xylose	-	v	v	v
Assimilation	H3	N-Acetyl-L-Glutamic acid plus D-Xylose	-	v	v	v
Assimilation	H4	Quinic acid plus D-Xylose	-	v	+	+
Assimilation	H5	D-Glucuronic acid plus D-Xylose	v	v	v	v
Assimilation	H6	Dextrin plus D-Xylose	v	v	v	v
Assimilation	H7	α -D-Lactose plus D-Xylose	-	v	v	v
Assimilation	H8	D-Melibiose plus D-Xylose	v	v	v	v
Assimilation	H9	D-Galactose plus D-Xylose	v	v	+	+
Assimilation	H10	m-Inositol plus D-Xylose	v	v	v	v
Assimilation	H11	1,2- Propanediol plus D-Xylose	-	v	v	v
Assimilation	H12	Acetoin plus D-Xylose	v	v	v	v

[73]

[74] 실시예 3. 메치니코비아 퍼시모네시스(*Metschnikowia persimmonesis*)
 KIOM_G15050 균주(KCTC 12991BP)의 배지 종류, pH 및 NaCl 농도에 따른
 생육특성 분석

[75] (1) 균주의 계대배양 및 특성조사관련 배지 생육조사

- [76] 메치니코비아 퍼시모네시스(*Metschnikowia persimmonesis*) KIOM_G15050 균주(KCTC 12991BP)를 PDA 배지에 접종 즉시 계대배양하여 fresh한 상태의 균주를 특성조사에 사용되는 TSA(trypticase soy agar), NA(nutrient agar) 배지 및 LB 아가(agar)(Luria-Burtani agar), R2A, Bennett's agar, ISP2 등의 기타 배지에 50 μ l 씩 접종하여 생육여부를 측정하였다.
- [77] 그 결과, 메치니코비아 퍼시모네시스(*Metschnikowia persimmonesis*) KIOM_G15050 균주(KCTC 12991BP)는 PDA 배지에서 가장 잘 자랐으며, 특성조사에 사용할 TSA 및 NA 배지에서도 잘 성장하였다. 또한, LB, R2A, Bennett's agar, ISP2 등의 배지에서도 모두 잘 자랐으며, 24시간 정도에 균체가 눈에 보이게 잘 자란 상태였다. 한편, PDA를 비롯한 ISP2 배지 및 Bennett's agar 배지 등의 방선균 및 곰팡이 배양 배지에서는 배양 후 12시간 정도 후부터 색소를 형성하는 것으로 관찰되었다(도 8).
- [78] (2) pH에 따른 균주 생육 특성조사
- [79] 하기 표 3에 개시한 바와 같이, pH별 완충용액을 제조하여, 멸균한 20ml의 TSB 배지에 각각 125mM 농도가 되도록 하고, 0.2 μ m 필터로 제균한 후, 5ml씩 3번 반복으로 test 튜브에 분주하여 배양하였다.
- [80] 배양은 TSA 배지에 자란 균체를 모아 3ml TSB 배지에 현탁한 다음 100 μ l 씩 접종하여 28°C에서 150 rpm으로 2일간 진탕배양하였으며, 생육여부는 균체의 탁도를 분광광도계에서 595nm로 흡광도를 측정하여 결정하였다.

[81] [표3]

pH에 따른 메치니코비아 퍼시모네시스(*Metschnikowia persimmonesis*)
 KIOM_G15050 균주(KCTC 12991BP)의 생육결과

No.	pH	Buffer & 농도	Mean value of optical density at 595nm (OD _{595nm})
1	pH 2.6	125mM Citric acid-Na ₂ HPO ₄	0.508
2	pH 3.0	125mM Citric acid-Na ₂ HPO ₄	0.878
3	pH 3.6	125mM Citric acid-Na ₂ HPO ₄	0.940
4	pH 4.0	125mM Citric acid-Na ₂ HPO ₄	1.023
5	pH 4.6	125mM Citric acid-Na ₂ HPO ₄	1.663
6	pH 5.0	125mM Citric acid-Na ₂ HPO ₄	1.856
7	pH 5.6	125mM Citric acid-Na ₂ HPO ₄	1.872
8	pH 6.0	125mM Citric acid-Na ₂ HPO ₄	2.128
9	pH 6.0	125mM Na ₂ HPO ₄ -NaH ₂ PO ₄	1.998
10	pH 6.6	125mM Na ₂ HPO ₄ -NaH ₂ PO ₄	1.995
11	pH 7.0	125mM Na ₂ HPO ₄ -NaH ₂ PO ₄	1.984
12	pH 7.4	125mM Tris-HCl	1.974
13	pH 8.0	125mM Tris-HCl	1.913
14	pH 8.5	125mM Tris-HCl	1.852
15	pH 9.0	125mM Tris-HCl	1.257
16	pH 9.5	125mM Na ₂ CO ₃ -NaHCO ₃	0.545
17	pH 10.1	125mM Na ₂ CO ₃ -NaHCO ₃	0.283
18	pH 10.5	125mM Na ₂ CO ₃ -NaHCO ₃	0.243
19	pH 10.8	125mM Na ₂ CO ₃ -NaHCO ₃	0.217
Control	TSB	TSB	0.021

[82] (3) NaCl 농도에 따른 균주 생육 특성조사

[83] NaCl 농도에 따른 균주생육특성은 0% NaCl 배지로 일반적으로 사용되고 있는 NB 배지를 사용하였다. NaCl 농도를 0, 0.1, 0.3, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 7, 10, 12, 15, 18, 20, 24% (w/v)로 각각 20ml NB 배지에 제조하여 5ml 씩 3번 반복으로 test 튜브에 넣어 배양하여 실험하였다. 배양은 NA 배지에 자란 균체를 모아 3ml NB 배지에 현탁한 후, 100 μ l 씩 접종하여 28°C에서 150 rpm으로 2일간 진탕배양 하였으며,

생육 여부는 균체의 탁도를 분광광도계에서 595nm로 흡광도를 측정하여 결정하였다.

- [84] 메치니코비아 퍼시모네시스(*Metschnikowia persimmonesis*) KIOM_G15050 균주(KCTC 12991BP)는 NB 배지에서 NaCl 농도(v/v)에 따라 액체배양 하여 생육 정도를 흡광도로 조사한 결과 NaCl이 없이도 잘 성장하였고, 2% NaCl 농도에서 최대생육을 나타내었으며, 20% NaCl 농도까지 생육하는 것으로 관찰되었다(표 4).

- [85] [표4]

NaCl 농도에 따른 메치니코비아 퍼시모네시스(*Metschnikowia persimmonesis*) KIOM_G15050 균주(KCTC 12991BP)의 생육결과

No.	NaCl (%)	Mean value of optical density at 595nm (OD _{595nm})
1	0	1.056
2	0.1	0.694
3	0.3	0.708
4	0.5	0.810
5	1.0	0.816
6	2.0	0.899
7	3.0	0.797
8	4.0	0.790
9	5.0	0.656
10	7.0	0.508
11	10.0	0.294
12	12.0	0.209
13	15.0	0.165
14	18.0	0.154
15	20.0	0.147
16	24.0	0.105
17	Control	0.035

- [86] (4) 온도에 따른 균주생육특성조사

- [87] 메치니코비아 퍼시모네시스(*Metschnikowia persimmonesis*) KIOM_G15050 균주(KCTC 12991BP)를 TSA(tryptic soy agar) 배지에 계대배양하여 fresh한 상태의 균체를 모아 TSB 배지에 현탁한 다음 TSB 배지에 동일부피로 30 μ l 씩 3번 반복으로 loading 하여 일직선으로 흘려보낸 후 4, 10, 15, 18, 20, 24, 28, 30,

35, 37, 40, 45, 50°C에서 2일간 배양하여 생육밀도를 관찰하였다. 생육정도는 동일한 균체량을 일직선으로 흘려보내 형성된 동일 면적의 균체량의 밀도 및 농도를 관찰하여 비교하였다.

- [88] 메치니코비아 퍼시모네시스(*Metschnikowia persimmonesis*) KIOM_G15050 균주(KCTC 12991BP)를 TSA 배지에 접종하여 온도에 따라 배양하여 관찰한 결과 4~40°C에서 생육하였으며 45°C 및 50°C에서는 잘 자라지 않았다. 최적온도는 24~28°C로 판단되었다(도 9).
- [89]
- [90] 실시예 4. 메치니코비아 퍼시모네시스(*Metschnikowia persimmonesis*) KIOM_G15050 균주(KCTC 12991BP)의 *in vitro* 세포 생존률(%) 분석 및 *in vivo* 세포 독성 분석
- [91] (1) *in vitro* 세포 생존률(%) 분석
- [92] 메치니코비아 퍼시모네시스(*Metschnikowia persimmonesis*) KIOM_G15050 균주(KCTC 12991BP)의 세포 생존률(%)을 분석하였다.
- [93] 다양한 세포주(VERO(신장세포), HFL-1(폐세포), L929(섬유아세포), NIH 3T3(섬유아세포), CHO-K1(난소세포))를 $1.5 \times 10^4 \sim 2.5 \times 10^4$ 개가 되도록 96웰 플레이트에 분주하고, 37°C에서 24시간 동안 5%(v/v) CO₂ 환경하에서 배양하였다.
- [94] 동결건조된 본 발명의 메치니코비아 퍼시모네시스(*Metschnikowia persimmonesis*) KIOM_G15050 균주(KCTC 12991BP)를, 1mg/ml의 농도로 DMEM 배지에 녹여 저장용액을 제조한 후, 1/10배씩 희석하여 농도가 0.1~1000 µg/ml이 되도록 준비하였다. 이를 상기 배양한 세포주 각각에 농도별로 100 µl씩 넣어주고, 37°C에서 24시간 동안 5%(v/v) CO₂ 환경하에서 배양하였다.
- [95] 이후, 각각의 웰에 Cyto X™ cell viability assay kit (LPS solution) 10 µl를 첨가하여 37°C에서 1~4시간 동안 5%(v/v) CO₂ 환경하에서 추가 배양한 후, 450nm에서 흡광도를 측정하여 세포 생존률(%)을 분석하였다.
- [96] 그 결과 도 10에 개시한 바와 같이, 0.1~1000 µg/ml의 메치니코비아 퍼시모네시스 KIOM_G15050 균주(KCTC 12991BP)를 처리한 신장세포(VERO), 폐세포(HFL-1) 섬유아세포(L929, NIH 3T3), 난소세포(CHO-K1)의 세포 생존률이 90% 이상 유지되는 것을 확인하였다. 따라서 본 발명의 신 균주는 세포독성이 거의 없는 것으로 판단하였다.
- [97]
- [98] (2) *in vivo* 세포 독성 분석
- [99] [동물 모델]
- [100] 9주령 ICR 마우스(암컷 4마리, 수컷 4마리)를 (주)오리엔트바이오에서 공급받은 후, 22±2°C, 상대습도 50±10%, 환기횟수 10~20회/hr, 명암주기 12시간 간격 및 조도 150~300Lux의 조건으로 사육하였다. 사료는 실험동물용 고형사료(퓨리나코리아)를 방사선 멸균하여 자유 급이 하였고, 물은 상수도를

자외선 살균기로 소독시킨 후 자유 섭취시켰다.

[101] [투여]

[102] 본 발명의 동결 건조 분말의 메치니코비아 퍼시모네시스(*Metschnikowia persimmonesis*) KIOM_G15050 균주(KCTC 12991BP)를 DMEM 배지에 녹여 경구투여용 존데를 이용하여 33.3mℓ/kg의 용량으로 투여하였다. 투여 당일은 투여 후 1~6시간까지는 매 시간마다, 투여 다음날부터 7일 후 매일 1회 이상씩 일반 증상의 변화, 이상증상 및 사망동물의 유무를 관찰하였다. 또한, 시험에 사용된 모든 동물은 투여 전 및 투여 1, 3, 7, 14일 후에 체중을 측정하였으며, 실험동물이 사망할 경우 바로 부검하여 관찰하였고, 투여 14일까지 생존시에는 모든 생존 동물을 안락사시켜 개복하고 내부 장기의 이상 유무를 관찰하였다.

[103] 그 결과, 하기 표 5에 개시한 바와 같이 치사율(%)이 0%로, 14일 동안 모두 생존하였고, 사료 및 음수 섭취가 양호하였으며, 별다른 이상 증상이 관찰되지 않았다.

[104] [표5]

메치니코비아 퍼시모네시스(*Metschnikowia persimmonesis*) KIOM_G15050 균주(KCTC 12991BP)의 투여에 따른 치사율

성별	투여용량	치사율(%)
암(n=4)	33.3mℓ/kg	0
수(n=4)	33.3mℓ/kg	0

[105] 또한, 전체적으로 체중이 정상적으로 증가하는 양상을 나타내 메치니코비아 퍼시모네시스(*Metschnikowia persimmonesis*) KIOM_G15050 균주(KCTC 12991BP)가 동물모델에서 독성이 없는 것으로 판단되었다(도 11).

[106]

[107] 실시예 5. 메치니코비아 퍼시모네시스(*Metschnikowia persimmonesis*) KIOM_G15050 균주(KCTC 12991BP)의 항균 활성 분석

[108] 본 발명의 메치니코비아 퍼시모네시스(*Metschnikowia persimmonesis*) KIOM_G15050 균주(KCTC 12991BP)의 보트리티스 시네리아(*Botrytis cinerea*) 및 푸사리움 옥시스포럼(*Fusarium oxysporum*)에 대한 항균활성을 측정하였으며, 그 결과 도 12 및 도 13에 개시한 바와 같이, 보트리티스 시네리아(*Botrytis cinerea*) 및 푸사리움 옥시스포럼(*Fusarium oxysporum*)에 대하여 강력한 항균활성이 있다는 것을 확인하였다.

[109]

[110] 실시예 6. 메치니코비아 퍼시모네시스(*Metschnikowia persimmonesis*) KIOM_G15050 균주(KCTC 12991BP)의 항생제 감수성 분석

[111] 메치니코비아 퍼시모네시스(*Metschnikowia persimmonesis*) KIOM_G15050 균주(KCTC 12991BP)를 PDA(Potato dextrose agar) 및 TSA (tryptic soy agar)

평판배지에 계대하여 배양된 단독 세균집락을 PDB(Potato dextrose broth) 및 TSB(tryptic soy broth) 액체배지에 접종하여 배양하여 사용하였다.

- [112] 배양 시험 균주의 고체배지 접종은 배양액의 균체의 농도가 1.5×10^6 c.f.u./ml이 되도록 배양한 다음, PDA 및 TSA 고체 평판배지를 121°C에서 15분간 멸균한 후 45~50°C로 식힌 후 5%(v/v) 농도로 접종하여 균일하게 교반한 후, 직경 90 mm의 페트리디쉬에 20ml씩 분주하여 식혔다.
- [113] 항균제 디스크 loading 및 항균력 측정은 각각의 항균제 디스크를 핀셋으로 균 배양액이 접종된 배지 위에 올려놓고, 28°C에서 48시간 동안 배양한 다음 항생제 디스크 주위에 균이 억제되어 자라지 않은 투명환의 존재 여부를 통해 감수성 유무를 평가하였다. 감수성 테스트에 사용한 항생제의 농도는 균주동정 시, 항균력 테스트에 일반적으로 적용하는 농도를 사용하였다.
- [114] 메치니코비아 퍼시모네시스(*Metschnikowia persimmonesis*) KIOM_G15050 균주(KCTC 12991BP)를 PDA 및 TSA 배지에 배양하여 각각의 항생제 디스크로 감수성을 테스트 한 결과, 하기 표 6에서와 같이 나이스타틴(nystatin, 50 μ g), 시클로헥사미드(cycloheximide, 30 μ g), 살리노마이신(salinomycin, 30 μ g), 암포테리신(amphotericin, 2 μ g) 및 그라미시딘 S(gramicidin S, 30 μ g)에서 감수성을 나타내었고, 나머지 항생제에 대해서는 저항성을 나타냈다. No. 8과 No. 33의 스트렙토마이신(Streptomycin, 10 μ g)은 중복 테스트한 것으로 동일하게 저항성이 있는 것으로 나타났다.
- [115] 배양배지에 따라서 감수성이 다소 차이를 보일 수 있으므로 두 가지 배지를 사용하였으며, 그 결과 암포테리신(No. 29) 및 그라미시딘 S(No. 30)에서와 같이 PDA 배지에서는 약하게 나타난 감수성이 TSA 배지에서는 명확하게 나타나서 감수성 유무를 정확하게 확인하였다.

[116] [표6]

메치니코비아 퍼시모네시스(*Metschnikowia persimmonesis*) KIOM_G15050
 균주(KCTC 12991BP)의 항생제 감수성 검사 결과

No.	항생제	Dose	감수성
1	테이코플라닌(Teicoplanin)	30 μ g	-
2	아미카신(Amikacin)	30 μ g	-
3	앰피실린(Ampicillin)	20 μ g	-
4	린코마이신(Lincomycin)	15 μ g	-
5	날리딕스산(Nalidixic acid)	30 μ g	-
6	카나마이신(Kanamycin)	30 μ g	-
7	젠타마이신(Gentamicin)	10 μ g	-
8	스트렙토마이신(Streptomycin)	10 μ g	-
9	네오마이신(Neomycin)	30 μ g	-
10	페니실린(Penicillin)	12U	-
11	반코마이신(Vancomycin)	30 μ g	-
12	에리트로마이신(Erythromycin)	15 μ g	-
13	올레안도마이신(Oleandomycin)	15 μ g	-
14	아목시실린(Amoxicillin)	10 μ g	-
15	스피라마이신(Spiramycin)	100 μ g	-
16	리팜피신(Rifampicin)	10 μ g	-
17	폴리믹신 B(Polymixin B)	50 μ g	-
18	나이스타틴(Nystatin)	50 μ g	+
19	바시트라신(Bacitracin)	10 μ g	-
20	테트라사이클린(Tetracycline)	30 μ g	-
21	시클로헥사미드(Cycloheximide)	30 μ g	+
22	록시트로마이신(Roxithromycin)	15 μ g	-
23	스핑고미엘린(Sphingomyelin)	30 μ g	-
24	아프라마이신(Apramycin)	30 μ g	-
25	살리노마이신(Salinomycin)	30 μ g	+
26	하이그로마이신 B(Hygromycin B)	30 μ g	-
27	카프레오마이신(Capreomycin)	30 μ g	-

28	시소마이신(Sisomycin)	10 μ g	-
29	암포테리신(Amphotericin)	2 μ g	+
30	그라미시딘 S(Gramicidin S)	30 μ g	+
31	포스포마이신(Phosphomycin)	30 μ g	-
32	클로람페니콜(Chloramphenicol)	10 μ g	-
33	스트렙토마이신(Streptomycin)	10 μ g	-

[117]

[118] 실시예 7. 메치니코비아 퍼시모네시스(*Metschnikowia persimmonesis*)

KIOM_G15050 균주(KCTC 12991BP)의 탄소원 이용성 분석

[119] 메치니코비아 퍼시모네시스(*Metschnikowia persimmonesis*) KIOM_G15050

균주(KCTC 12991BP)를 PDA 및 TSA 평판배지에 계대하여 배양된 균주를 사용하였다.

[120] 시험균주 동정 kit: 시험균주의 당이용성(탄소원 이용성)을 시험하기 위하여 효모 동정용으로 탄소원 이용 여부를 확인하기 위하여 건조된 기질 20개의 튜브로 된 'API 20 C AUX' (bioM, 표 7 및 8) 및 49가지의 탄수화물 대사를 검사할 수 있는 'API 50CH' (bioM, 표 9)를 병용하여 확인하였다.

[121] [표7]

효모(yeast) 동정 API 20C AUX test

Test	Active ingredients	Test	Active ingredients
0	None	SOR	D-SORbitol
GLU	GLUcose	MDG	α -Methyl-D-Glucoside
GLY	GLYcerol	NAG	N-Acetyl-D-Glucosamine
2KG	2-Keto-D-Gluconate	CEL	D-CELlobiose
ARA	L-ARAbinose	LAC	D-LACtose(bovine origin)
XYL	D-XYLose	MAL	D-MALtose
ADO	ADOnitol	SAC	D-SACcharose(Sucrose)
XLT	XyLiTol	TRE	D-TREhalose
GAL	D-GALactose	MLZ	D-MeLeZitose
INO	INOsitol	RAF	D-RAFFinose

[122] [상8]

API C medium (7mℓ ampoule)

Ammonium sulfate	5g
Monopotassium phosphate	0.31g
Dipotassium phosphate	0.45g
Disodium phosphate	0.92g
Disodium chloride	0.1g
Calcium chloride	0.05g
Magnesium sulphate	0.2g
L-Histidine	0.005g
L-Tryptophan	0.02g
L-Methionine	0.02g
Gelling agent	0.5g
Vitamin solution	1mℓ
Trace elements	10mℓ
Demineralized Water to make	1000mℓ
final pH (at 20-25°C)	6.4-6.8

[123] [표9]

API 50 CH test

튜브	Test	Active ingredients	QTY(mg/cup.)	튜브	Test	Active ingredients	QTY(mg/cup.)
0		CONTROL	-	25	ESC	Esculin ferric citrate	1.160.152
1	<u>GLY</u>	GLYcerol	1.64	26	SAL	SALicin	1.04
2	ERY	ERYthritol	1.44	27	<u>CEL</u>	D-CELoibiose	1.32
3	DAR A	D-ARABinose	1.4	28	<u>MA</u> <u>L</u>	D-MALtose	1.4
4	<u>LAR</u> <u>A</u>	L-ARABinose	1.4	29	<u>LAC</u>	D-LACtose (bovine origin)	1.4
5	RIB	D-RIBose	1.4	30	ME L	D-MELibiose	1.32
6	<u>DXY</u> <u>L</u>	D-XYLose	1.4	31	<u>SAC</u>	D-SACcharose (sucrose)	1.32
7	LXY L	L-XYLose	1.4	32	<u>TRE</u>	D-TREhalose	1.32
8	<u>ADO</u>	D-ADONitol	1.36	33	INU	INULin	1.28
9	MD X	Methyl-β-D-Xylopyranoside	1.28	34	<u>ML</u> <u>Z</u>	D-MeLeZitose	1.32
10	<u>GAL</u>	D-GALactose	1.4	35	<u>RAF</u>	D-RAFinose	1.56
11	<u>GLU</u>	GLUCose	1.56	36	AM D	AmiDon (starch)	1.28
12	FRU	D-Fructose	1.4	37	GLY G	GLYcoGen	1.28
13	MNE	D-MaNNosE	1.4	38	<u>XLT</u>	XyLiTol	1.4
14	SBE	L-SorBosE	1.4	39	GEN	GENTiobiose	0.5

15	RHA	L-RHAmnose	1.36	40	TUR	D-TURanose	1.32
16	DUL	DULcitol	1.36	41	LYX	D-LYXose	1.4
17	<u>INO</u>	INOsitol	1.4	42	TAG	D-TAGatose	1.4
18	MA N	D-MANntol	1.36	43	DFU C	D-FUCose	1.28
19	<u>SOR</u>	D-SORbitol	1.36	44	LFU C	L-FUCose	1.28
20	MD M	Methyl- α -D-Mannopyranoside	1.28	45	DA RL	D-ARabitol	1.4
21	<u>MD</u> <u>G</u>	Methyl- α -D-Glucopyranoside	1.28	46	LAR L	L-Arabitol	1.4
22	<u>NAG</u>	N-AceylGlucosamine	1.28	47	GNT	potassium GlucNaTe	1.84
23	AM Y	AMYgdalin	1.08	48	<u>2KG</u>	potassium 2-KetoGluconate	2.12
24	ARB	ARButin	1.08	49	5KG	potassium 5-KetoGluconate	1.8

- [124] 당이용성 (탄소원 이용성) 측정: PDA 및 TSA 평판배지에 배양된 균체를 모아 0.85% NaCl (saline sol'n)에 각각의 균체를 현탁하여 MacFarland 탁도를 만든 다음, API C 배지의 앰플 (효모 탄소원 이용성 측정을 위한 최소배지)을 열고 탁도를 맞춘 균액 100 μ l를 넣은 후, 잘 혼합하여 멸균 피펫으로 API C 배지의 균액을 API 20 C AUX 및 API 50CH 큐플까지 채워 tray 뚜껑을 덮고 30°C에서 24-48시간 배양하였다.
- [125] 24시간 및 48시간까지 배양한 후 '0' 큐플을 음성 대조군으로 해서 혼탁도가 더 있는 큐플을 양성 반응으로 결과지에 기록하여 결정하였다.
- [126] 메치니코비아 퍼시모네시스(*Metschnikowia persimmonesis*) KIOM_G15050 균주(KCTC 12991BP)를 PDA 및 TSA 배지에 배양하여 API 20 C AUX 및 API 50CH로 24~48시간 동안 탄소원 이용성을 테스트 한 결과, 하기 표 10 및

11에서와 같이 탄소원을 이용하는 것으로 나타났다.

[127] [표10]

효모(yeast) 동정 API 20C AUX (+; positive, -; negative, *; red-colour pigment)

Test	Active ingredients	
0	None	—
GLU	Glucose	+
GLY	Glycerol	+
2KG	2-Keto-D-gluconate	+
ARA	L-Arabinose	—
XYL	D-Xylose	+
ADO	Adonitol	+
XLT	Xylitol	+
GAL	D-Galactose	+
INO	Inositol	—
SOR	D-Sorbitol	+ *
MDG	α -Methyl-D-glucoside	+ *
NAG	N-Acetyl-D-glucosamine	+
CEL	D-Cellobiose	+
LAC	D-Lactose(bovine origin)	—
MAL	D-Maltose	+ *
SAC	D-Saccharose(Sucrose)	+ *
TRE	D-Trehalose	—
MLZ	D-Melezitose	+ *
RAF	D-Raffinose	—

[128] [표 11]

API 50 CH

튜브	Test	Active ingredients	
0		CONTROL	—
1	<u>GLY</u>	Glycerol	+
2	ERY	Erythritol	—
3	DARA	D-Arabinose	—
4	<u>LARA</u>	L-Arabinose	—
5	RIB	D-Ribose	—
6	<u>DXYL</u>	D-Xylose	+
7	LXYL	L-Xylose	—
8	<u>ADO</u>	D-Adonitol	+
9	MDX	Methyl-β-D-xylopyranoside	—
10	<u>GAL</u>	D-Galactose	+
11	<u>GLU</u>	Glucose	+
12	FRU	D-Fructose	+
13	MNE	D-Mannose	+
14	SBE	L-Sorbose	+
15	RHA	L-Rhamnose	—
16	DUL	Dulcitol	—
17	<u>INO</u>	Inositol	—
18	MAN	D-Mannitol	+
19	<u>SOR</u>	D-Sorbitol	+
20	MDM	Methyl-α-D-mannopyranoside	—
21	<u>MDG</u>	Methyl-α-D-glucoopyranoside	+
22	<u>NAG</u>	N-Aceylglucosamine	+
23	AMY	Amygdalin	+
24	ARB	Arbutin	+
25	ESC	Esculin	+
26	SAL	Salicin	+
27	<u>CEL</u>	D-Cellobiose	+

28	<u>MAL</u>	D-Maltose	+
29	<u>LAC</u>	D-Lactose (bovine origin)	—
30	MEL	D-Melibiose	—
31	<u>SAC</u>	D-Saccharose (sucrose)	+
32	<u>TRE</u>	D-Trehalose	+
33	INU	Inulin	—
34	<u>MLZ</u>	D-Melezitose	+
35	<u>RAF</u>	D-Rafinose	—
36	AMD	Amidon (starch)	—
37	GLYG	Glycogen	—
38	<u>XLT</u>	Xylitol	+
39	GEN	Gentiobiose	+
40	TUR	D-Turanose	+
41	LYX	D-Lyxose	—
42	TAG	D-Tagatose	—
43	DFUC	D-Fucose	—
44	LFUC	L-Fucose	—
45	DARL	D-Arabitol	+
46	LARL	L-Arabitol	—
47	GNT	Potassium glucoate	+
48	<u>2KG</u>	Potassium 2-ketogluconate	+
49	5KG	Potassium 5-ketogluconate	—

- [129] 'API 20 C AUX' 및 'API 50CH'를 합하여 총 49가지의 탄수화물에 대한 대사를 검사한 결과, 메치니코비아 퍼시모네시스(*Metschnikowia persimmonesis*) KIOM_G15050 균주(KCTC 12991BP)는 글리세롤(Glycerol), D-자일로스(D-Xylose), D-아도니톨(D-Adonitol), D-갈락토오스(D-Galactose), 글루코오스(Glucose), D-프럭토오스(D-Fructose), D-만노오스(D-Mannose), L-소르보오스(L-Sorbose), D-만니톨(D-Mannitol), D-소르비톨(D-Sorbitol), 메틸- α -D-글루코-피라노사이드(Methyl- α -D-glucopyranoside), N-아세틸글루코사민(N-Acetylglucosamine), 아미그달린(Amygdalin), 아르부틴(Arbutin), 에스쿨린(Esculin), 살리신(Salicin), D-셀로비오스(D-Cellobiose), D-말토오스(D-Maltose),

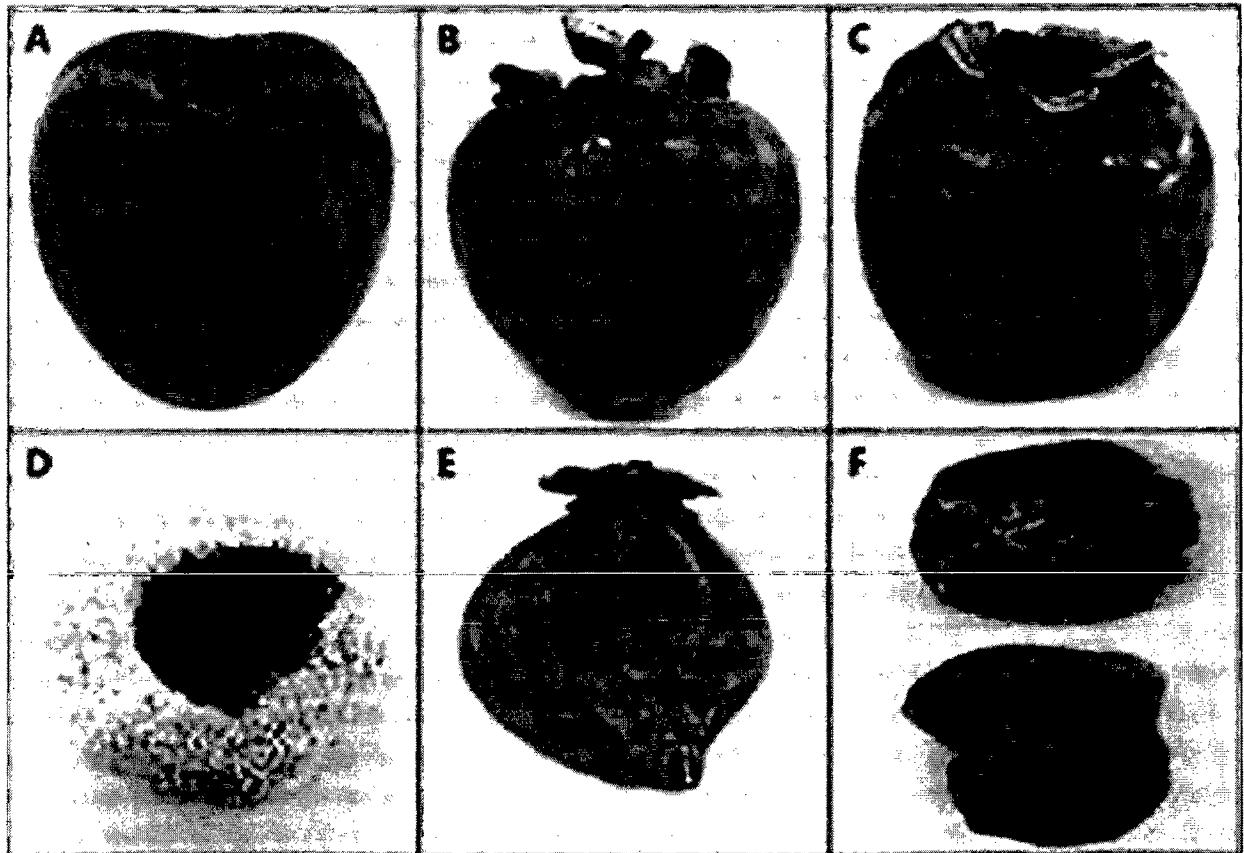
D-사카로오스(슈크로스)(D-Saccharose (sucrose)), D-트레할로오스(D-Trehalose), D-멜레지토오스(D-Melezitose), 자일리톨(Xylitol), 젠티오비오스(Gentiobiose), D-투라노오스(D-Turanose), D-아라비톨(D-Arabitol), 포타슘글루코네이트(Potassium gluconate) 및 포타슘 2-케토글루코네이트(Potassium 2-ketogluconate)의 탄수화물을 탄소원으로 이용하였으나, 에리트리톨(Erythritol), D-아라비노오스(D-Arabinose), L-아라비노오스(L-Arabinose), D-리보오스(D-Ribose), L-자일로오스(L-Xylose), 메틸- β -D-자일로피라노사이드(Methyl- β -D-xylopyranoside), L-람노오스(L-Rhamnose), 들시톨(Dulcitol), 이노시톨(Inositol), D-메틸- α -D-만노피라노사이드(D-Methyl- α -D-mannopyranoside), D-락토오스(D-Lactose (bovine origin)), D-멜리비오스(D-Melibiose), 인슐린(Insulin), D-라피노오스(D-Rafinose), 아미돈(전분)(Amidon(starch)), 글리코젠(Glycogen), D-릭소오스(D-Lyxose), D-타가토오스(D-Tagatose), D-푸코오스(D-Fucose), L-푸코오스(L-Fucose), L-아라비톨(L-Arabitol) 및 포타슘 5-케토글루코네이트(Potassium 5-ketogluconate)의 탄수화물은 탄소원으로 이용하지 않았다.

- [130] 한편, 효모(yeast) 동정 API 20 C AUX에서는 D-소르비톨(D-Sorbitol), α -메틸-D-글루코사이드(α -Methyl-D-glucoside), D-말토오스(D-Maltose), D-사카로오스(슈크로스)(D-Saccharose(Sucrose)) 및 D-멜레지토오스(D-Melezitose)가 탄소원으로 이용됨과 동시에 색소를 생성하는 것이 관찰되었다(도 14 내지 17).
- [131] [수탁번호]
- [132] 기탁기관명 : 한국생명공학연구원
- [133] 수탁번호 : KCTC12991BP
- [134] 수탁일자 : 20160316

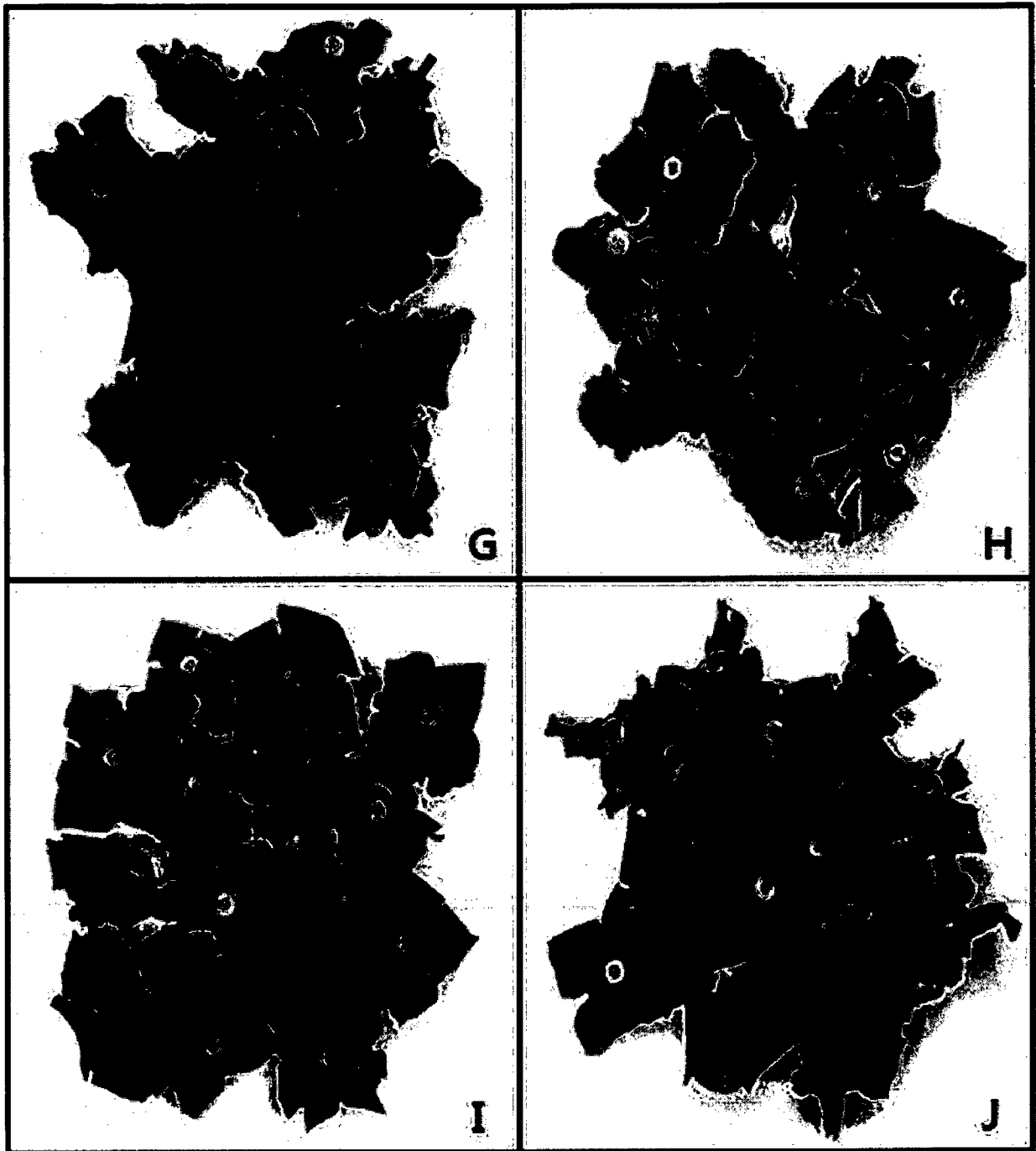
청구범위

- [청구항 1] 신규 메치니코비아 퍼시모네시스(*Metschnikowia persimmonesis*)
KIOM_G15050 균주(KCTC 12991BP).
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 균주는 항균 활성을 가지며, 항생제 감수성을 갖는 것을 특징으로 하는 균주.
- [청구항 3] 제2항에 있어서, 상기 항균 활성은 보트리티스 시네리아(*Botrytis cinerea*) 및 푸사리움 옥시스포럼(*Fusarium oxysporum*)에 대한 항균활성인 것을 특징으로 하는 균주.
- [청구항 4] 제2항에 있어서, 상기 항생제 감수성은 나이스타틴(nystatin), 시클로헥사미드(cycloheximide), 살리노마이신(salinomycin), 암포테리신(amphotericin) 및 그라미시딘 S(gramicidin S) 중에서 선택된 하나 이상의 항생제에 대한 감수성인 것을 특징으로 하는 균주.
- [청구항 5] 제1항에 있어서, 상기 균주는 감꼭지에서 분리한 것을 특징으로 하는 균주.
- [청구항 6] 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 균주를 유효성분으로 함유하는 항균용 미생물 제제.
- [청구항 7] 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 균주를 유효성분으로 함유하는 식물병 방제용 조성물.
- [청구항 8] 제7항에 있어서, 상기 식물병은 보트리티스 시네리아(*Botrytis cinerea*) 또는 푸사리움 옥시스포럼(*Fusarium oxysporum*)에 의해 유발되는 식물병인 것을 특징으로 하는 식물병 방제용 조성물.
- [청구항 9] 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 균주를 식물 또는 토양에 처리하여 식물병을 방제하는 방법.
- [청구항 10] 제9항에 있어서, 상기 식물은 감나무인 것을 특징으로 하는 식물병을 방제하는 방법.

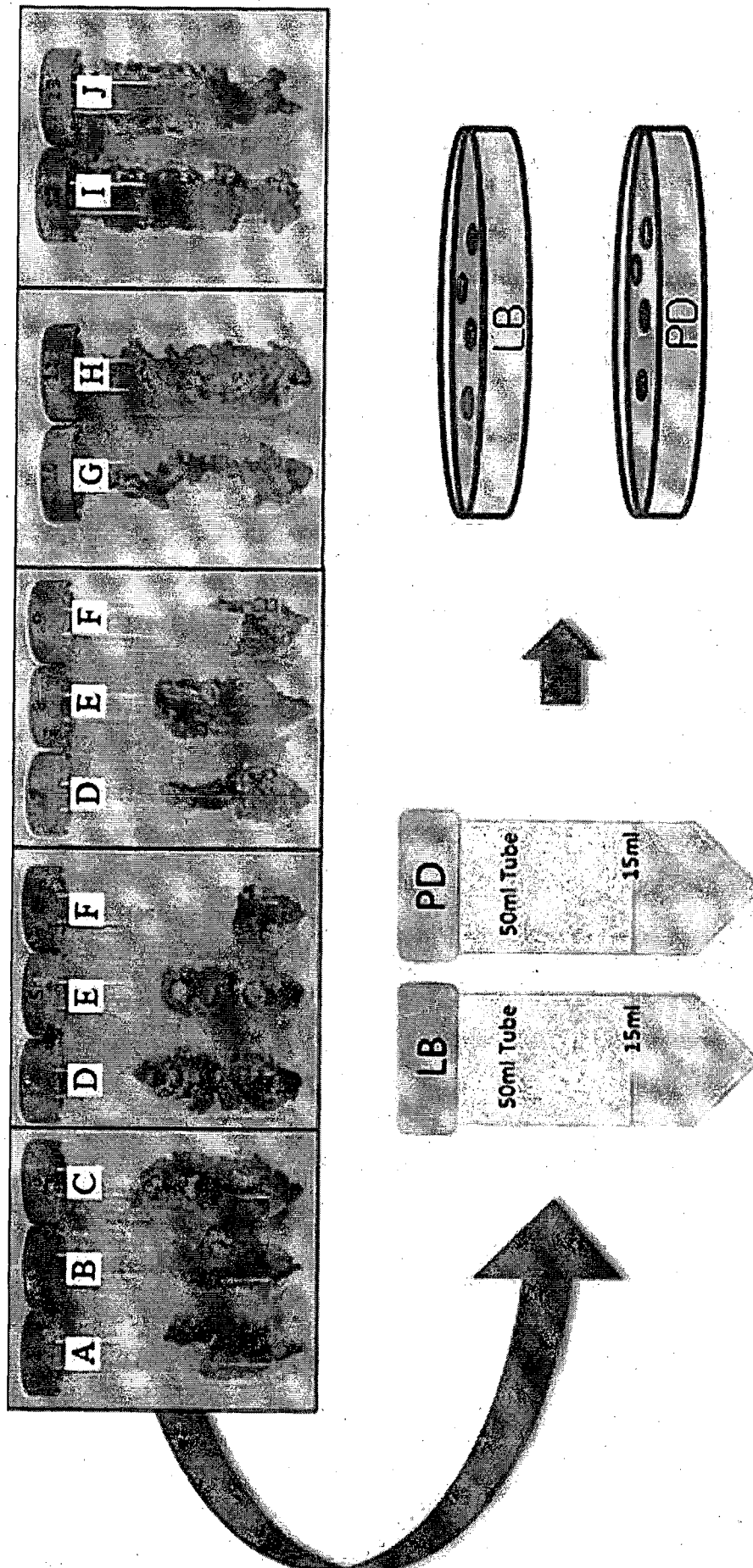
[도 1]



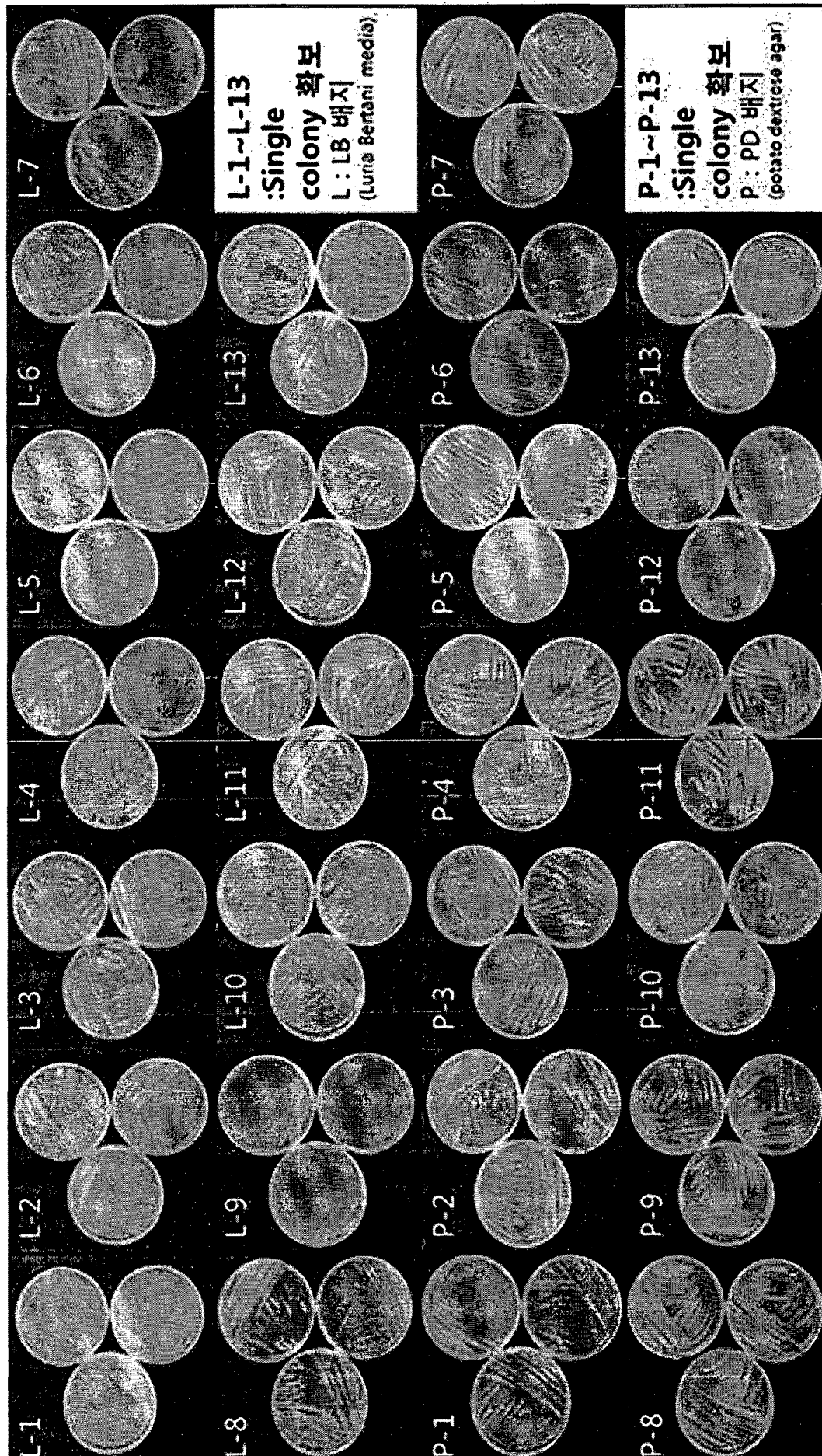
[도 2]



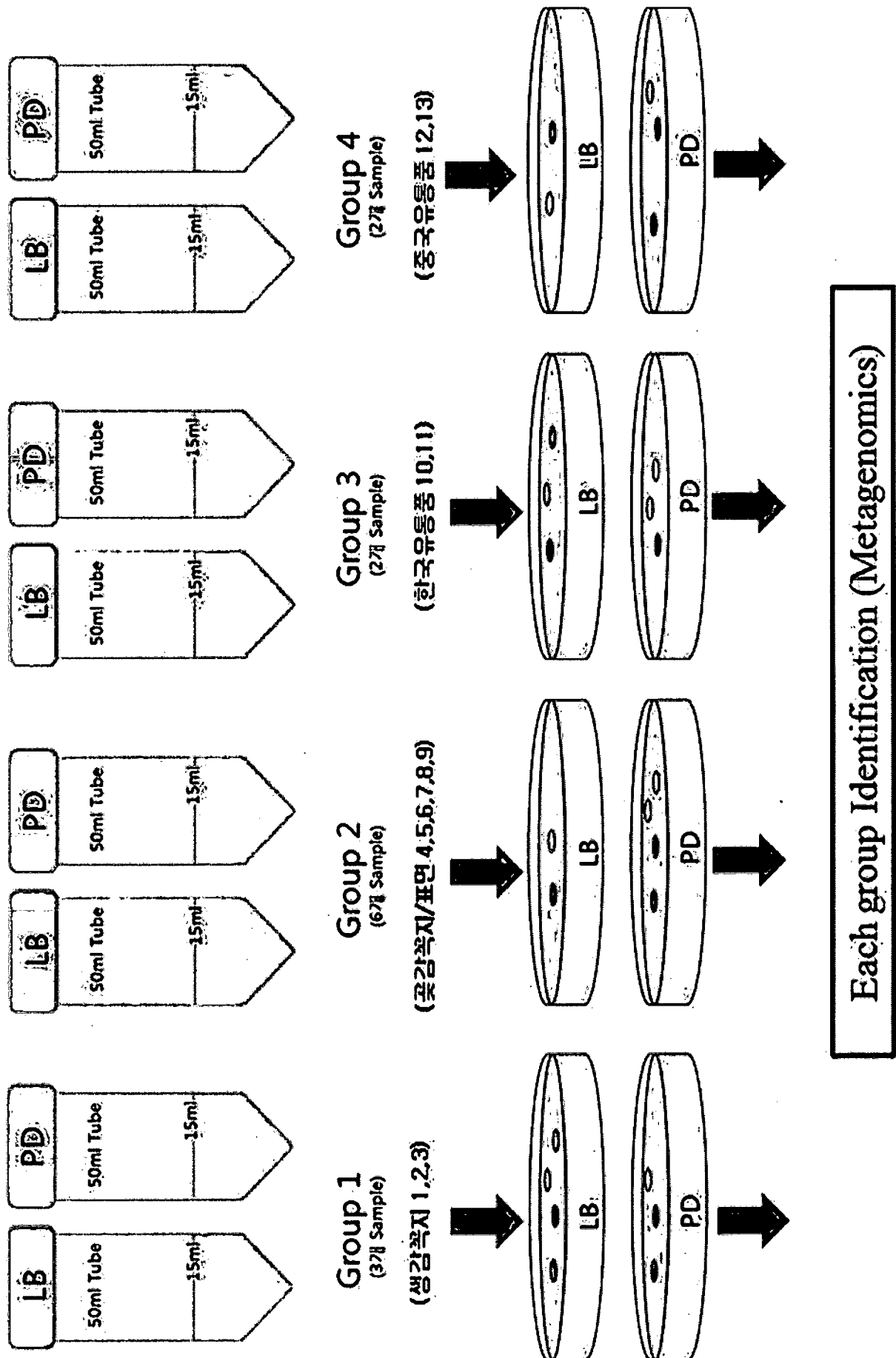
[도 3]



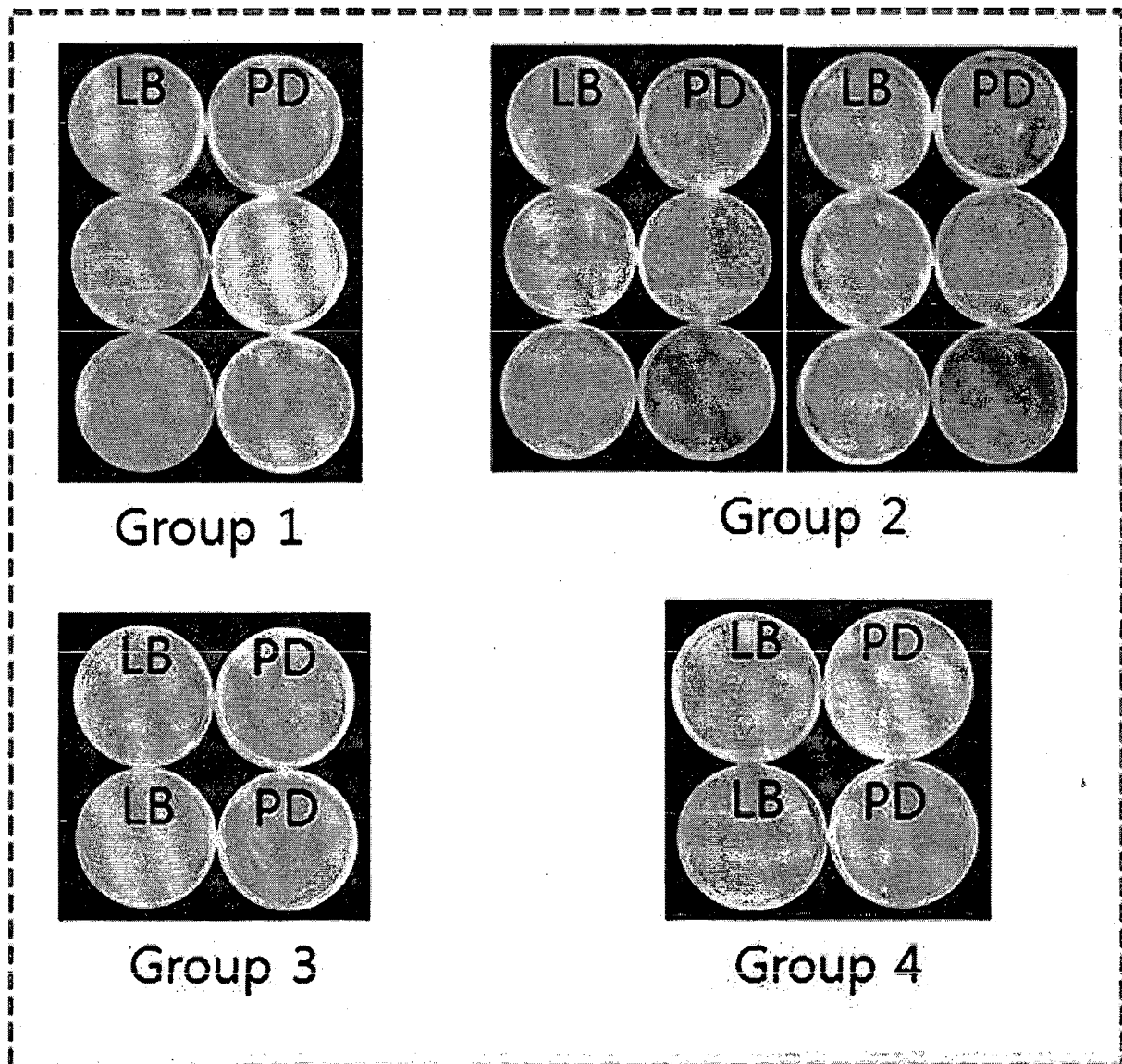
[도 4]



[5]

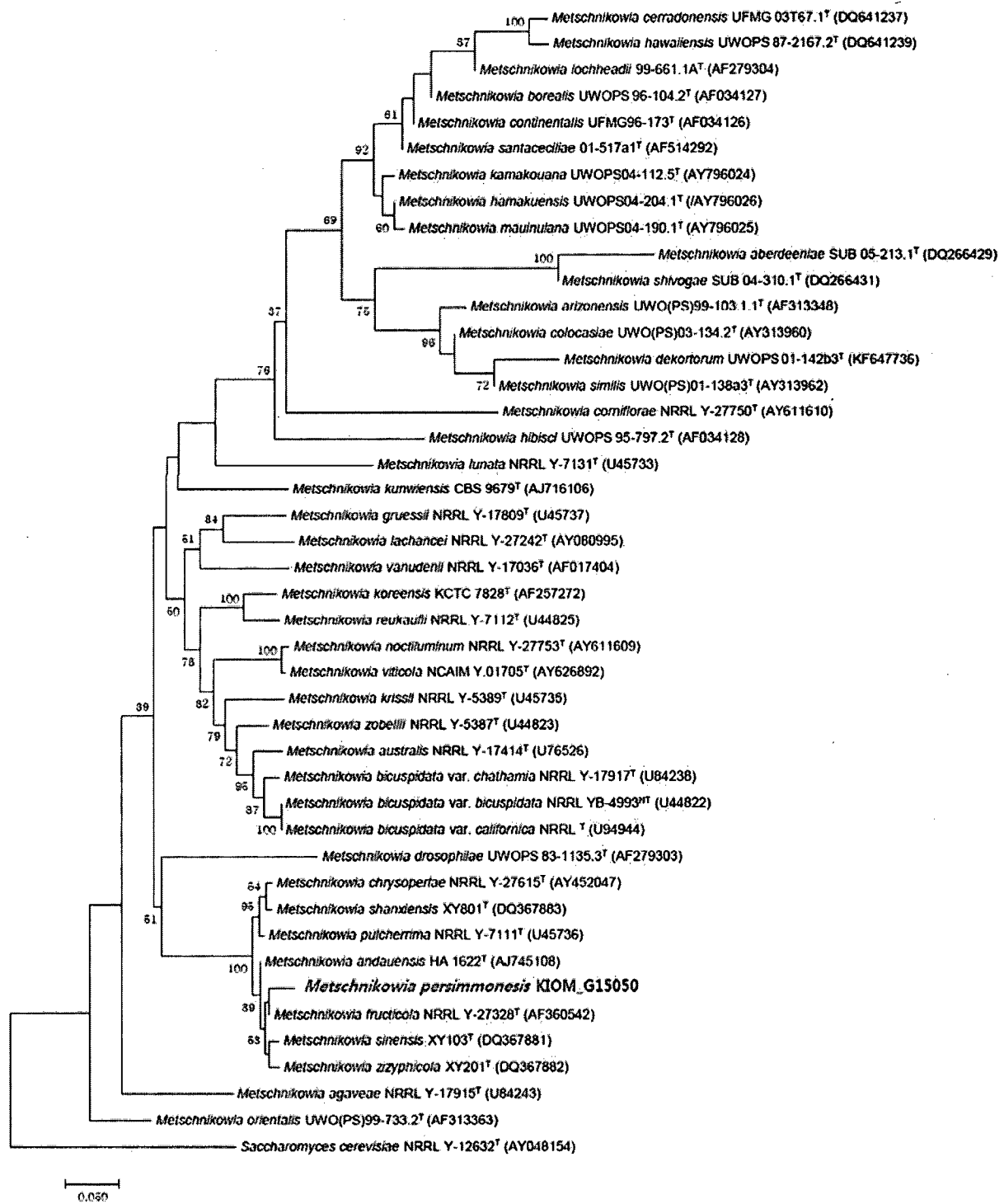


[도 6]

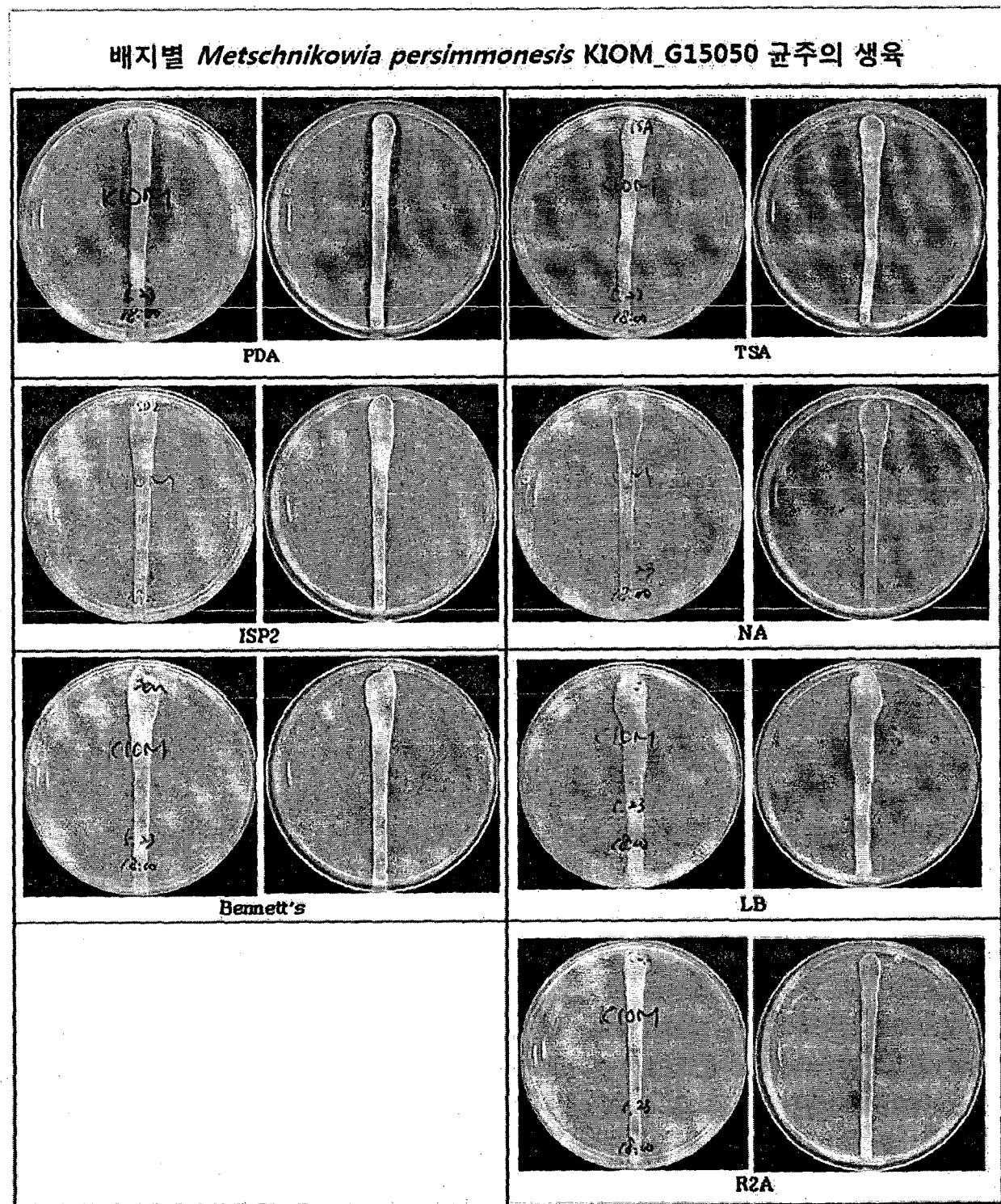


Each group Identification (Metagenomics)

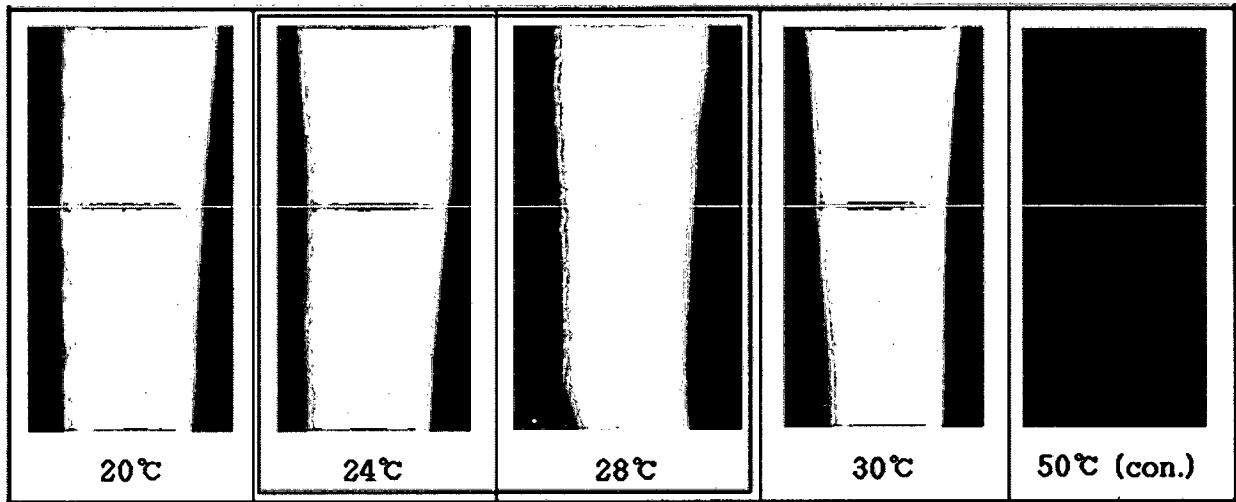
[도 7]



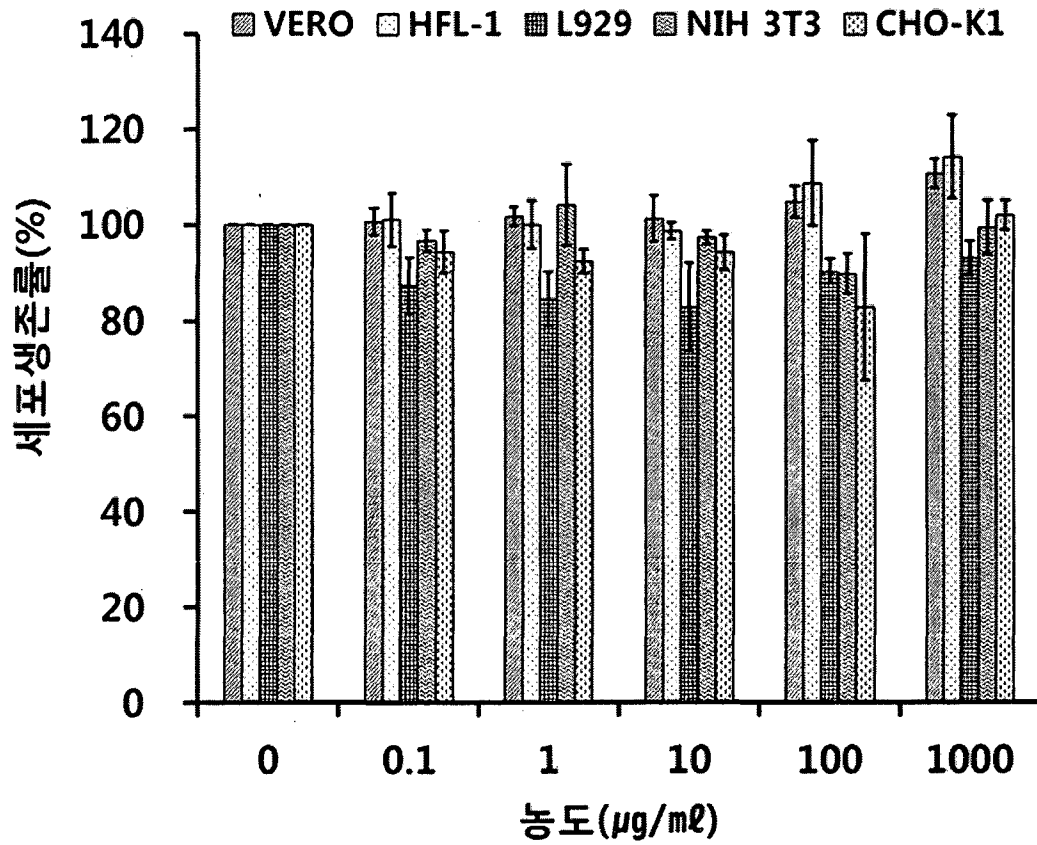
[도 8]



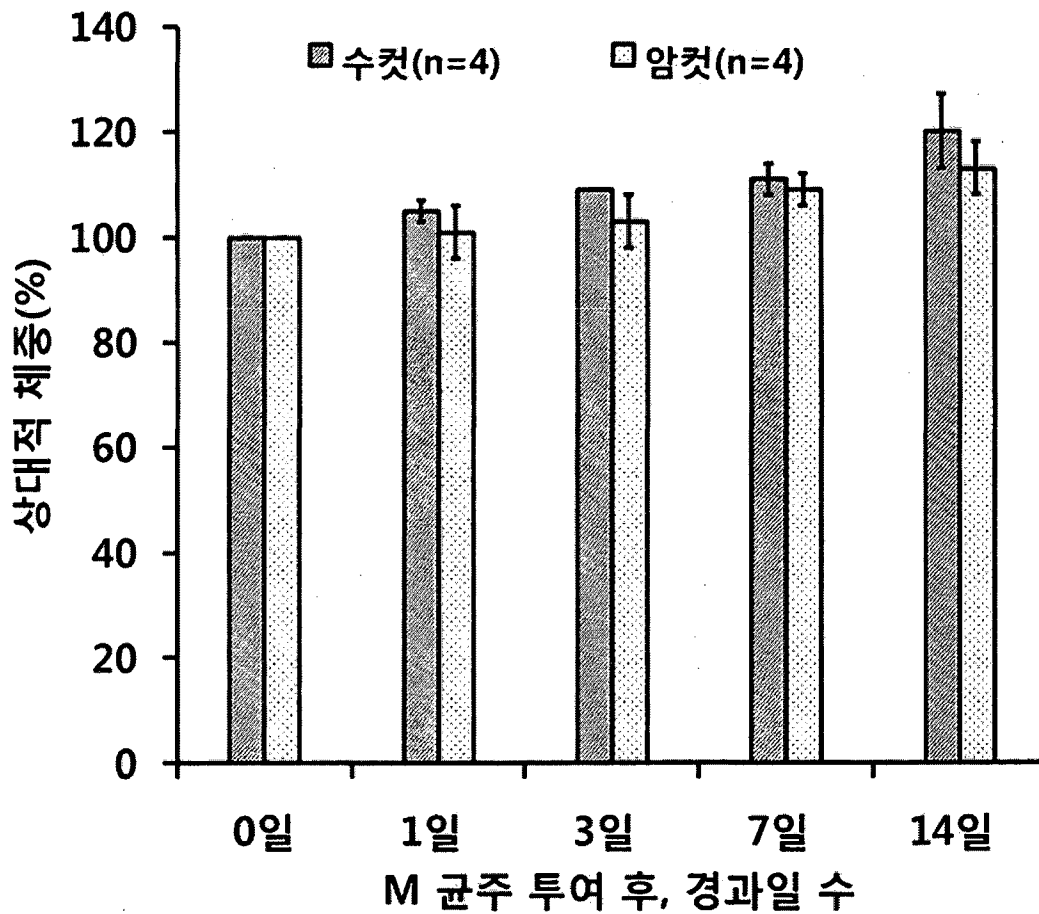
[도 9]

***Metschnikowia persimmonesis* KIOM_G15050 균주의 최적생육 온도**

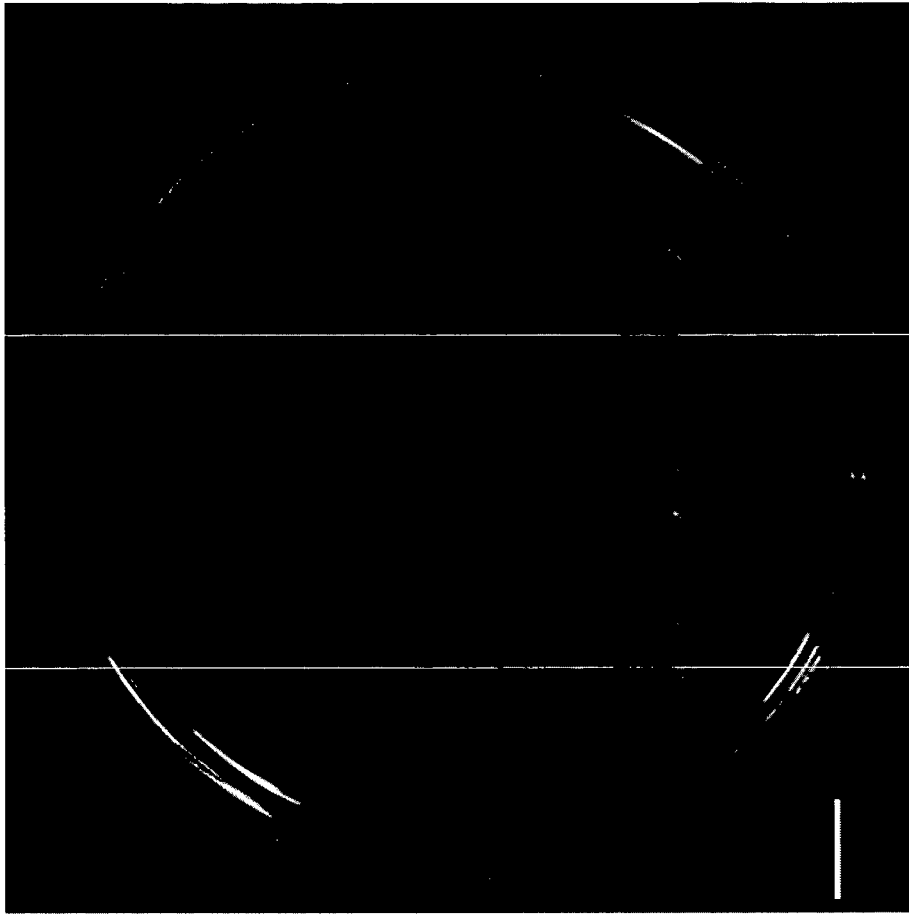
[도 10]



[도 11]

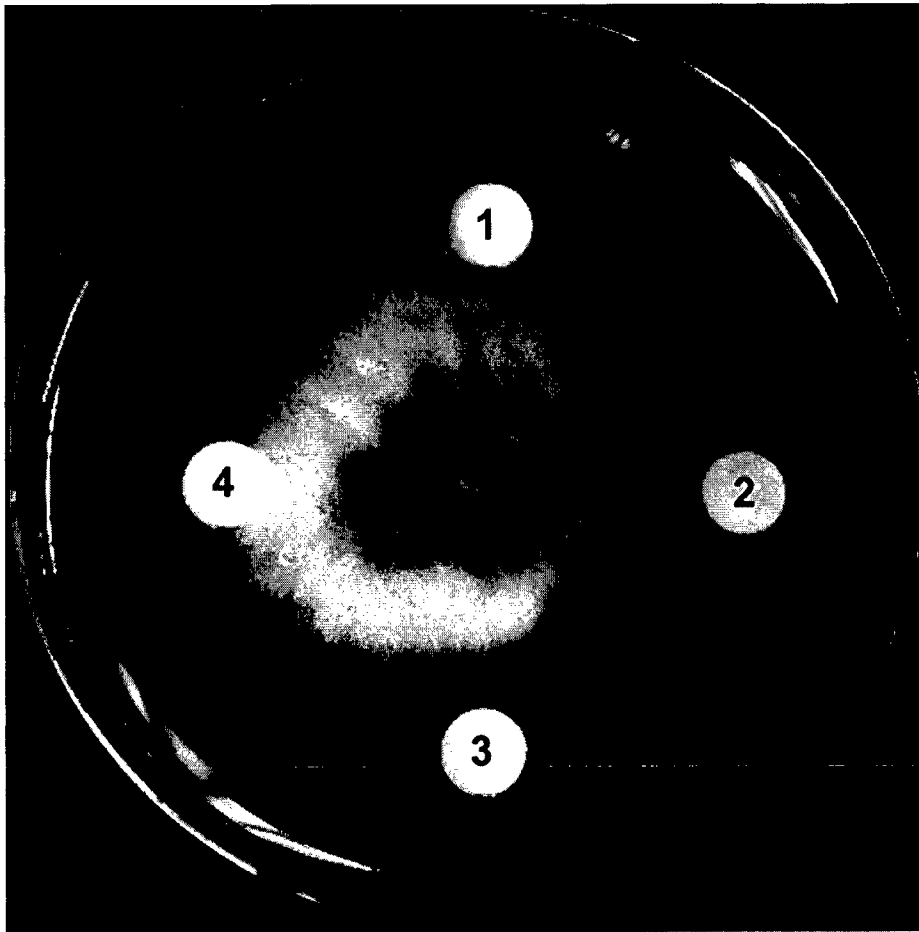


[도 12]



Scale bar=1 cm

[도 13]

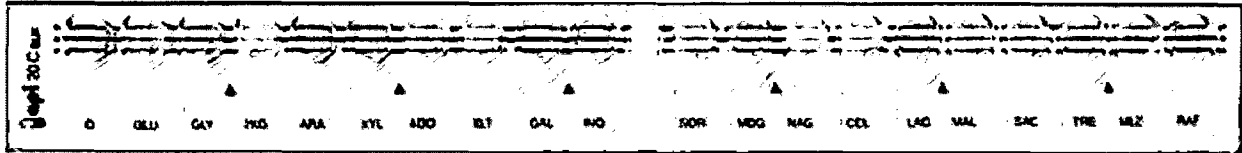


- 1-Sample (KIOM 균)
- 2-GB03
- 3-Km (100ug/ml)
- 4-Control

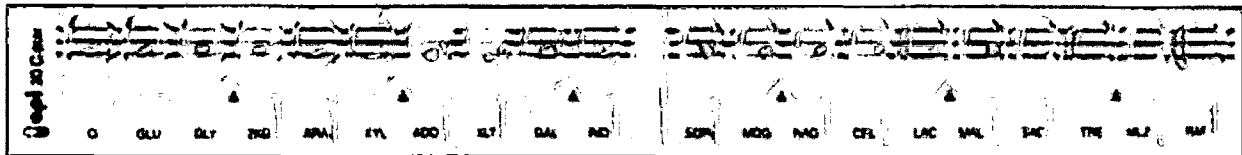
[도 14]

Yeast 동정 API 20C AUX (PDA)

24h



48h



CE 0221 C REF: _____

api[®] 20 C AUX Origine / Source / Herkunft / Origen / Origen / Προέλευση / Ursprung / Oprindelse / Pochodzenie: **PDA**

DIOMÉRIEUX

Substrate	0	1	2	4
O	-	+	+	+
GLU	-	+	+	+
GLY	-	+	+	+
ZKG	-	+	+	+
ARA	-	+	+	+
XYL	-	+	+	+
ADO	-	+	+	+
XLT	-	+	+	+
GAL	-	+	+	+
INO	-	+	+	+
SOR	-	+	+	+
MDG	-	+	+	+
NAG	-	+	+	+
CEL	-	+	+	+
LAC	-	+	+	+
MAL	-	+	+	+
SAC	-	+	+	+
TRE	-	+	+	+
MLZ	-	+	+	+
RAF	-	+	+	+

Autres tests / Other tests / Andere Tests / Otras pruebas / Altri test / Outros testes / Άλλες εξετάσεις / Andre tests / Inne testy : _____

Ident. / Ταυτοποίηση : _____

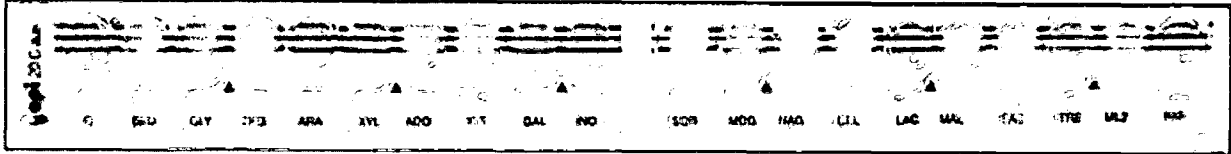
Imported in France / Importé en France

+ ; positive, - ; negative, * ; red-colour pigment

[15]

Yeast 동정 API 20C AUX (TSA)

24h



48h



api° 20 C AUX		07221 C		REF.: 		//////////									
		Origine / Source / Herkunft / Origen / Origen / Προέλευση / Ursprung / Oprindelse / Pochodzenia :				TSA									
24h 48h		⊖ ⊕ ⊕ ⊕ ⊖ ⊕		⊕ ⊕ ⊕ ⊕ ⊕ ⊕		⊖ ⊕ ⊕ ⊕ ⊕ ⊕		⊕ ⊕ ⊖ ⊕ ⊕ ⊖		⊕ ⊕ ⊕ ⊕ ⊕ ⊕		⊕ ⊖ ⊕ ⊖			
		0 GLU GLY 2KB ARA XYL		ADO XLY GAL CHO SOR KDC		NAG CEL LAC MAL SAC TRE		MLZ RAF Partial Pseudo- Hyphes							
		1 2 4 1 2 4		1 2 4 1 2 4		1 2 4 1 2 4		1 2 4 1 2 4							

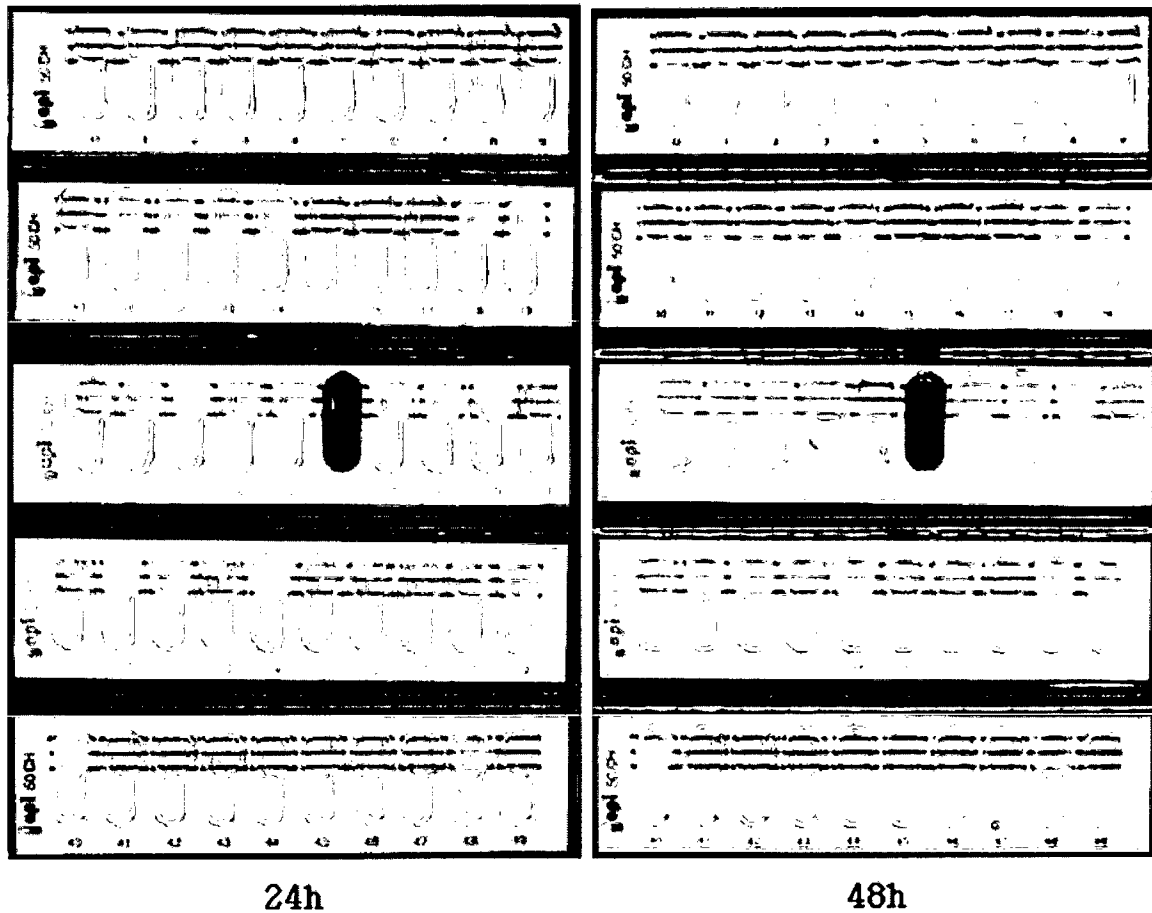
Autres tests / Other tests / Andera Tests /
 Otras pruebas / Altri test / Outros testes /
 Άλλες εξετάσεις / Andra tester /
 Andra tests / Inne testy :

Ident. / Ταυτοποίηση :

+; positive, -; negative, *; red-colour pigment

[도 16]

API 50CH (PDA)



api° 50 CH CE 12123A		REF : _____	
		Origin / Source / Herkunft / Origen / Origen / Προέλευση / Ursprung / Oryndelisa / Pochodzenie : PDA	
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49		BIOMERIEUX	
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49		0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49	
Inoc./Inok./Υλοδ ενοβαλκισμοδ : Incub./Inkub./Θερμοκρασία επώασης :		Autres tests / Other tests / Andere Tests / Otras pruebas / Altri test / Outras testes / Άλλες εξετάσεις / Andra tester / Andra tests / Inne testy :	
Ident. / Ταυτοποίηση :		Ident. / Ταυτοποίηση :	

[도 17]

API 50CH (TSA)

24h

48h

API 50 CH

CE 12133A

REF: _____

Origina / Sources / Herkunft /
 Origen / Origen / Προέλευση /
 Ursprung / Oprindelse / Pochodzenie: **TSA**

BIOMERIEUX

	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49		
24h	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
48h	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Inoc./Inok./Υλικό ενοφθαλμισμού :

Incub./Inkub./Οιμοκρασία επώασης :

**Autres tests / Other tests / Andere Tests /
 Otras pruebas / Altri test / Outros testes /
 Άλλες εξετάσεις / Andra tester /
 Andra tests / Inna testy :**

Ident. / Ταυτοποίηση :

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2017/010681**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER*****C12N 1/18(2006.01)i, A01N 63/04(2006.01)i, C12R 1/645(2006.01)n***

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)

C12N 1/18; A01N 63/02; A01N 43/40; A01N 63/04; C12R 1/645

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: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

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

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: Metschnikowia persimmonesis KIOM_G15050, KCTC 12991BP, diospyros kaki calyx, antibacterial, pest control

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KUAN, C. S. et al., "Isolation and Characterization of an Atypical Metschnikowia Sp. Strain from the Skin Scraping of a Dermatitis Patient", PLOS ONE, 09 June 2016, vol. 11, no. 6, e0156119(inner pages 1-14) See abstract; page 2, first paragraph.	1-10
A	CHOI, Jieun et al., "Analysis of Tannic Acid Contents from Astrigent Persimmon (Diospyros kaki Thunb.) as Traditional Korean Medicine (Kaki Calyx) on Geongnam Province in Korea", Korean Herbal Medicine Informatics, March 2016, vol. 4, no. 1, pages 35-42 See the entire document.	1-10
A	CHOI, Jieun et al., "Analysis of Tannic Acid Contents from Astrigent Persimmon (Diospyros kaki Thunb.) as Traditional Korean Medicine (Kaki Calyx) on Geongnam Province in Korea", Horticulture Abstracts, May 2016, vol. 34, Suppl. I, pages 162-163 See the entire document.	1-10
A	XIE, C. et al., "Persimmon (Diospyros kaki L.) Leaves: a Review on Traditional Uses, Phytochemistry and Pharmacological Properties", Journal of Ethnopharmacology, (Electronic publishing)28 January 2015, vol. 163, pages 229-240 See the entire document.	1-10
A	US 2014-0112899 A1 (JESCHKE, Peter et al.) 24 April 2014 See claims 1, 4 and 10.	1-10



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

18 JANUARY 2018 (18.01.2018)

Date of mailing of the international search report

19 JANUARY 2018 (19.01.2018)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

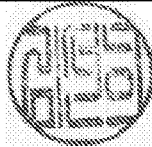
Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2017/010681

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
US 2014-0112899 A1	24/04/2014	EP 2720543 A1	23/04/2014
		US 9241493 B2	26/01/2016
		WO 2012-171914 A1	20/12/2012

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C12N 1/18(2006.01)i, A01N 63/04(2006.01)i, C12R 1/645(2006.01)n																				
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C12N 1/18; A01N 63/02; A01N 43/40; A01N 63/04; C12R 1/645 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: 메치니코비아 퍼시모네시스 KIOM_G15050, KCTC 12991BP, 감꼭지, 향균, 방제																				
C. 관련 문헌 <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 10%;">카테고리*</th> <th style="width: 70%;">인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재</th> <th style="width: 20%;">관련 청구항</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center;">A</td> <td>KUAN, C. S. 등, 'Isolation and characterization of an atypical <i>Metschnikowia</i> sp. strain from the skin scraping of a dermatitis patient', PLOS ONE, 2016.06.09, 제11권, 제6호, e0156119(내부 페이지 1-14) 초록; 페이지 2, 첫 번째 단락 참조.</td> <td style="text-align: center;">1-10</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">A</td> <td>최지은 등, '경남 지방의 뽕은감에서 유래한 한약재 시체 (柿口, 감꼭지)의 탄닌산 함량 분석', 한약정보연구회지, 2016.03, 제4권, 제1호, 35-42 페이지 전체 문헌 참조.</td> <td style="text-align: center;">1-10</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">A</td> <td>최지은 등, '경남 지방의 뽕은감에서 유래한 한약재 시체 (柿口, 감꼭지)의 탄닌산 함량 분석', 한국원예학회 학술발표요지, 2016.05, 제34권, Suppl. 1, 162-163 페이지 전체 문헌 참조.</td> <td style="text-align: center;">1-10</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">A</td> <td>XIE, C. 등, 'Persimmon (<i>Diospyros kaki</i> L.) leaves: a review on traditional uses, phytochemistry and pharmacological properties', Journal of Ethnopharmacology, (전자공개)2015.01.28, 제163권, 229-240 페이지 전체 문헌 참조.</td> <td style="text-align: center;">1-10</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">A</td> <td>US 2014-0112899 A1 (JESCHKE, PETER 등) 2014.04.24 청구항 1, 4 및 10 참조.</td> <td style="text-align: center;">1-10</td> </tr> </tbody> </table>			카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항	A	KUAN, C. S. 등, 'Isolation and characterization of an atypical <i>Metschnikowia</i> sp. strain from the skin scraping of a dermatitis patient', PLOS ONE, 2016.06.09, 제11권, 제6호, e0156119(내부 페이지 1-14) 초록; 페이지 2, 첫 번째 단락 참조.	1-10	A	최지은 등, '경남 지방의 뽕은감에서 유래한 한약재 시체 (柿口, 감꼭지)의 탄닌산 함량 분석', 한약정보연구회지, 2016.03, 제4권, 제1호, 35-42 페이지 전체 문헌 참조.	1-10	A	최지은 등, '경남 지방의 뽕은감에서 유래한 한약재 시체 (柿口, 감꼭지)의 탄닌산 함량 분석', 한국원예학회 학술발표요지, 2016.05, 제34권, Suppl. 1, 162-163 페이지 전체 문헌 참조.	1-10	A	XIE, C. 등, 'Persimmon (<i>Diospyros kaki</i> L.) leaves: a review on traditional uses, phytochemistry and pharmacological properties', Journal of Ethnopharmacology, (전자공개)2015.01.28, 제163권, 229-240 페이지 전체 문헌 참조.	1-10	A	US 2014-0112899 A1 (JESCHKE, PETER 등) 2014.04.24 청구항 1, 4 및 10 참조.	1-10
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항																		
A	KUAN, C. S. 등, 'Isolation and characterization of an atypical <i>Metschnikowia</i> sp. strain from the skin scraping of a dermatitis patient', PLOS ONE, 2016.06.09, 제11권, 제6호, e0156119(내부 페이지 1-14) 초록; 페이지 2, 첫 번째 단락 참조.	1-10																		
A	최지은 등, '경남 지방의 뽕은감에서 유래한 한약재 시체 (柿口, 감꼭지)의 탄닌산 함량 분석', 한약정보연구회지, 2016.03, 제4권, 제1호, 35-42 페이지 전체 문헌 참조.	1-10																		
A	최지은 등, '경남 지방의 뽕은감에서 유래한 한약재 시체 (柿口, 감꼭지)의 탄닌산 함량 분석', 한국원예학회 학술발표요지, 2016.05, 제34권, Suppl. 1, 162-163 페이지 전체 문헌 참조.	1-10																		
A	XIE, C. 등, 'Persimmon (<i>Diospyros kaki</i> L.) leaves: a review on traditional uses, phytochemistry and pharmacological properties', Journal of Ethnopharmacology, (전자공개)2015.01.28, 제163권, 229-240 페이지 전체 문헌 참조.	1-10																		
A	US 2014-0112899 A1 (JESCHKE, PETER 등) 2014.04.24 청구항 1, 4 및 10 참조.	1-10																		
☐ 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 신구성 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 2018년 01월 18일 (18.01.2018)	국제조사보고서 발송일 2018년 01월 19일 (19.01.2018)																			
ISA/KR의 명칭 및 우편주소  대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578	심사관 김선희 전화번호 +82-42-481-5405 																			

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호

PCT/KR2017/010681

국제조사보고서에서
인용된 특허문헌

공개일

대응특허문헌

공개일

US 2014-0112899 A1

2014/04/24

EP 2720543 A1

2014/04/23

US 9241493 B2

2016/01/26

WO 2012-171914 A1

2012/12/20