(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년08월09일
(11) 등록번호 10-2009174
(24) 등록일자 2019년08월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 7/00 (2006.01) *A01N 63/00* (2017.01)
(52) CPC특허분류
C12N 7/00 (2013.01)
A01N 63/00 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-0068700
(22) 출원일자 2018년06월15일
심사청구일자 2018년06월15일
(56) 선행기술조사문헌
Plant Pathol J. 2018.02.01., 34(1):59-64.
KR1020170059317 A
KR1020170059313 A
Stenotrophomonas phage IME-SM1, complete genome, GenBank: KR560069.1, 2015.07.07.

(73) 특허권자
부경대학교 산학협력단
부산광역시 남구 신선로 365 (용당동, 부경대학교)
(72) 발명자
최태진
부산광역시 해운대구 대천로103번길 29, 508동 1701호(좌동, 대동타운)
아리안 라히미 미다니
부산광역시 남구 용소로 45 부경대학교대연캠퍼스 세종관(대연동)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
최규환

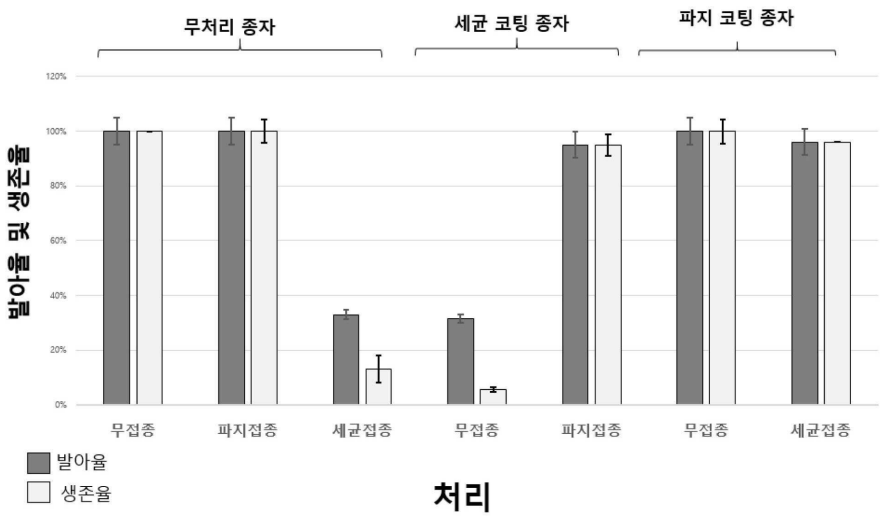
전체 청구항 수 : 총 7 항 심사관 : 김정희

(54) 발명의 명칭 **신규 박테리오파지 ACPWH 및 이의 용도**

(57) 요 약

본 발명은 애시도보락스 시트룰리(*Acidovorax citrulli*)에 대해 특이적인 사멸능을 갖는, 기탁번호 KCTC 13535BP인 박테리오파지 ACPWH, 상기 박테리오파지를 유효성분으로 포함하는 농약 조성물, 항균제, 소독제, 및 상기 박테리오파지를 식물체 또는 토양에 처리하는 단계를 포함하는 식물병 방제 방법에 관한 것이다.

대 표 도 - 도6



(52) CPC특허분류
C12N 2795/00031 (2013.01)
(72) 발명자
김민정
부산광역시 해운대구 선수촌로208번길 112(반여동)
김예린
경상남도 창녕군 유어면 승계새마길 88

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 317012-04-2-HD020
부처명 농림축산식품부
연구관리전문기관 농림식품기술기획평가원
연구사업명 농생명산업기술개발(R&D)
연구과제명 수박 과실썩음병 방제용 파지요법 기술 개발
기 여 율 1/1
주관기관 부경대학교 산학협력단
연구기간 2018.01.01 ~ 2018.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

애시도보락스 시트룰리(*Acidovorax citrulli*)에 대해 특이적인 사멸능을 갖는, 기탁번호 KCTC 13535BP인 박테리오파지 ACPWH.

청구항 2

제1항의 박테리오파지를 유효성분으로 포함하는 농약 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 박테리오파지는 수박 과일썩음병(bacterial fruit blotch)의 예방 또는 치료에 사용되는 것을 특징으로 하는 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 이상인 것을 특징으로 하는 농약 조성물.

청구항 5

제1항의 박테리오파지를 유효성분으로 포함하는 항균제.

청구항 6

제1항의 박테리오파지를 유효성분으로 포함하는 소독제.

청구항 7

제1항의 박테리오파지를 식물체 또는 토양에 처리하는 단계를 포함하는 수박 과일썩음병(bacterial fruit blotch)을 방제하는 방법.

청구항 8

삭제

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 수박 과일썩음병의 병원균인 애시도보락스 시트룰리(*Acidovorax citrulli*)에 대해 특이적인 사멸능을 갖는 신규한 박테리오파지 ACPWH 및 이의 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 수박 과일썩음병(bacterial fruit blotch)은 1980년대 미국의 여러 주에서 상업적 수박생산에 100% 손실을 일으키면서 관심을 가지게 된 병으로서, 국내에서는 1991년 전북 고창 수박 재배지역에서의 발병이 최초 보고된 이래 전국의 주요 수박 및 멜론 재배지에서 지속적으로 병발생과 그 피해가 보고되고 있다.

[0003] 수박 과일썩음병은 육묘기부터 전 생육기간 동안 발생하지만, 특히 과실 수확 1주전 쯤에 많이 발생하기 때문에 경제적 피해가 더욱 크며, 수박 과일썩음병 발병으로 모종을 교체한 농가에서는 수확시기를 앞당길 수 있는 촉성재배, 반촉성재배의 장점을 살리기 어려울 뿐만 아니라 일부 교체 비용까지 떠안아 경제적인 피해가 큰 식물병이다.

[0004] 수박 과일썩음병은 주 감염이 종자감염으로 알려져 있어, 병 발생의 원인 및 피해보상과 관련한 법적 책임에 대한 공방이 있을 수 있는데, 2011년 전북 고창 및 2103년 경북 영주에서 발생한 수박 과일썩음병의 발생 원인에 대한 종묘회사와 농민들간의 법적분쟁건이 알려져있다.

[0005] 국내에서는 수박 과일썩음병 원인균에 대한 유전적 다양성 연구 등 기초연구가 일부 이루어졌으나, 병의 방제에 대한 연구가 미미하여 수박 과일썩음병이 발생하였을 경우, 초기방제에 사용할 방제용 약제 선택에 어려움을 겪고 있는 실정이다. 수박 과일썩음병을 일으키는 애시도보락스 시트룰리(*Acidovorax citrulli*)는 종자로부터 전파되는 것으로 알려져 있으나 감염된 종자를 검사하기 위하여 널리 이용되는 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction; PCR)에 의한 검사법은 종자에 감염된 PCR 억제 물질 때문에 그 검출이 용이하지 않으며, BIO-PCR, IMS-PCR(immunomagnetic separation-polymerase chain reaction), MCH-PCR(magnetic capture hybridization polymerase chain reaction) 등의 변형된 방법도 완전하지 않다. 따라서 종자 생산자는 생산된 종자 중 10,000-50,000개를 파종하여 발병여부를 확인하는 SGO(seedling grow-out)를 이용하여야하나 이 방법은 재배지와 숙련된 인력이 필요하고 시간도 많이 걸리며 실제 검출에서도 한계가 있는 것으로 알려져있다.

[0006] 스트렙토마이신(streptomycin), 차아염소산나트륨(sodium hypochlorite), 염산(hydrochloric acid) 등을 이용한 종자 소독은 세균을 완전하게 제거하지 못하거나, 발아에 영향을 줄 수 있는 것으로 알려져 있으며, 현재까지 알려진 애시도보락스 시트룰리에 대한 저항성 수박 계통은 알려져 있지 않아 수박 과일썩음병에 의한 패해 방제에 한계가 있다.

[0007] 식물병원세균 방제용 박테리오파지(bacteriophage) 분리 및 특성 규명에 대한 연구 및 기술 확보가 1990년대부터 진행되어 미국, 캐나다, 유럽 등지에서 여러 가지 제품이 출시되어 실용화가 진행되고 있으며, 특히 미국의 Omnilytics라는 회사에서 다양한 식물병원세균 방제용 박테리오파지 연구를 집중적으로 진행하고 있다.

[0008] 수박 과일썩음병을 일으키는 애시도보락스 시트룰리에 대한 특이적 사멸능을 가지는 박테리오파지는 본 발명자들에 의하여 2017년 처음 보고되었으며, 이전 연구에서 제시된 박테리오파지는 미리오비리대(Myoviridae) 과에 속하는 박테리오파지였다.

[0009] 한편, 한국공개특허 제2016-0044964호에는 '박테리오파지 PM-1 및 이를 포함하는 채소 무름병 방제용 조성물'이 개시되어 있고, 한국공개특허 제2014-0011918호에는 슈도모나스 톨라시(*Pseudomonas tolaasii*)에 대한 특이적 사멸능을 갖는 신규 박테리오파지에 관한 '박테리오파지를 이용한 버섯 갈반병 예방 또는 방제용 조성물'이 개시되어 있으나, 본 발명의 신규 박테리오파지 ACPWH 및 이의 용도에 대해서는 기재된 바가 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명자들은 다양한 식물 시료로부터 수박 과일썩음병의 병원균인 애시도보락스 시트룰리(*Acidovorax citrulli*)에 감염능을 가지는 박테리오파지를 분리하였고, 분리된 박테리오파지 중 애시도보락스 시트룰리에 대한 용균 활성 범위가 넓은 박테리오파지를 선별하여 분석한 결과, 분리된 박테리오파지가 시포비리대(Siphoviridae) 과의 신규한 박테리오파지임을 확인하였으며, 상기 박테리오파지를 수박종자에 처리한 결과 수박 과일썩음병이 효과적으로 예방되는 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 애시도보락스 시트룰리(*Acidovorax citrulli*)에 대해 특이적인 사멸능을 갖는, 기탁번호 KCTC 13535BP인 박테리오파지 ACPWH을 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 상기 박테리오파지를 유효성분으로 포함하는 농약 조성물을 제공한다.

[0013] 또한, 본 발명은 상기 박테리오파지를 유효성분으로 포함하는 항균제를 제공한다.

[0014] 또한, 본 발명은 상기 박테리오파지를 유효성분으로 포함하는 소독제를 제공한다.

[0015] 또한, 본 발명은 상기 박테리오파지를 식물체 또는 토양에 처리하는 단계를 포함하는 식물병을 방제하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0016] 본 발명의 신규 박테리오파지 ACPWH는 애시도보락스 시트룰리(*Acidovorax citrulli*)에 특이적인 사멸능을 가지며, 넓은 숙주 범위를 가지므로, 애시도보락스 시트룰리에 의하여 야기되는 수박 과일썩음병의 예방 또는 치료에 활용될 수 있을 뿐만 아니라, 항균제, 소독제 또는 세척제 등에도 광범위하게 이용될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

[0017] 도 1은 애시도보락스 시트룰리에 감염하는 파지의 존재를 확인하는 스폿 에세이의 결과로서 용균현상은 파지의 존재를 나타낸다.

도 2는 순수분리된 박테리오파지 ACPWH의 전자현미경 사진이다. bar; 50nm.

도 3은 박테리오파지 ACPWH의 성장 과정을 보여주는 원 스텝 성장 곡선이다.

도 4는 박테리오파지 ACPWH의 다양한 온도에서의 안정성을 보여주는 결과이다.

도 5는 박테리오파지 ACPWH의 다양한 pH에서의 안정성을 보여주는 결과이다.

도 6은 박테리오파지 ACPWH에 의한 수박 종자에서의 과일썩음병의 억제 효과를 확인한 결과로, 각 조건별 종자 발아율 및 생존율을 보여주는 그래프이다.

도 7은 박테리오파지 ACPWH에 의한 수박 종자에서의 과일썩음병의 억제 효과를 보여주는 사진이다. A: 세척 종자 + 세균 및 박테리오파지 비접종, B: 세척 종자 + 애시도보락스 시트룰리를 흙에 접종, C: APCWH 박테리오파지 코팅 종자 + 애시도보락스 시트룰리를 흙에 접종, D: 애시도보락스 시트룰리 코팅 종자 + APCWH 박테리오파지를 흙에 접종.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0018] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 애시도보락스 시트룰리(*Acidovorax citrulli*)에 대해 특이적인 사멸능을 갖는, 기탁번호 KCTC 13535BP인 박테리오파지 ACPWH를 제공한다. 애시도보락스 시트룰리는 이전에는 애시도보락스 아베내 아종 시트룰리(*Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*)로 명명되었으나 현재는 애시도보락스 시트룰리로 명명되고 있다.

[0019] 본 발명의 용어 "박테리오파지(bacteriophage)"란 박테리아를 숙주세포로 하는 바이러스를 의미하는 것으로, '파지'와 혼용되어 사용될 수 있다.

[0020] 본 발명의 용어 "사멸"이란, "용균(lysis)"과 동일한 의미로 사용된 것으로, 박테리아의 세포벽 또는 세포질막이 파괴되어 박테리아가 용해되는 현상을 의미한다.

[0021] 본 발명자들은 한국의 여러 곳에서 수박, 호박 또는 오이 시료를 수집하였고, 상기 시료에서 애시도보락스 시트룰리(*Acidovorax citrulli*)에 특이적인 사멸능을 가지는 박테리오파지를 분리하였다. 또한, 상기 박테리오파지가 애시도보락스 시트룰리(*Acidovorax citrulli*)에 속하는 42종의 균주 중 39종의 균주에 대하여 용균 활성을 나타냄을 확인하였고(표 1), 전자 현미경을 통해 관찰한 결과, 시포비리대(Siphoviridae) 과에 속함을 확인하였다(도 2). 이에 본 발명자들은 상기 박테리오파지를 ACPWH라 명명하고, 2018년 5월 29일에 한국생명공학연구원 생물자원센터에 기탁하였다(수탁번호 KCTC 13535BP).

[0022] 본 발명의 상기 박테리오파지 ACPWH는 잠복기(latent period)는 12±5분의 성장 특성을 보였으며, 파지 입자 하나의 감염에 의하여 생산되는 새로운 파지의 수(burst size; 방출량)는 189이고, 온도 및 pH에 대한 안정성을 조사한 결과, -80℃ 내지 50℃의 온도 범위 및 pH 5.5 내지 pH 10 범위에서 안정하게 생존하는 특성을 가진 박테리오파지임을 확인하였다.

[0023] 또한, 본 발명은 상기 박테리오파지를 유효성분으로 포함하는 농약 조성물을 제공한다.

[0024] 본 발명의 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.

[0025] 본 발명의 농약 조성물은 애시도보락스 시트룰리(*Acidovorax citrulli*)에 대해 특이적인 사멸능을 갖는 기탁번호가 KCTC 13535BP인 박테리오파지를 유효성분으로 포함하므로, 상기 농약 조성물은 수박 과일썩음병(bacterial fruit blotch)의 예방 또는 치료에 사용될 수 있다.

[0026] 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.

[0027] 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.

[0028] 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. BASF, Witco, Rhone Poulenc, Westvaco 등에서 판매되는 다양한 분산제가 농약 조성물에 사용하기 위해 상업적으로 입수가능하다.

[0029] 상기 농약 조성물에 사용될 수 있는 분산제의 구체적인 예로, 폴리비닐피롤리돈, 폴리비닐알코올, 리그노술포네이트, 페닐 나프탈렌 술포네이트, 에톡시화(ethoxylated) 알킬 페놀, 에톡시화지방산, 알콕시화 선형 알코올, 환방향족(polyaromatic) 술포네이트, 소듐 알킬 아릴 술포네이트, 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 술포네이트, 에틸렌 옥시드와 지방산 에스테르의 첨가 반응 생성물, 에틸렌 옥시드와 지방산 에스테르의 첨가 반응 생성물의 염, 리그닌 유도체, 나프탈렌 포름알데히드 축합물, 이소데실술포숙신산 하프 에스테르(half ester)의 소듐 염, 폴리카르복실레이트, 소듐 알킬벤젠술포네이트, 술폰화 나프탈렌의 소듐 염, 술폰화 나프탈렌의 암모늄 염, 폴리아크릴산의 염, 페놀술폰산의 염 또는 나프탈렌 술폰산의 염일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0030] 또한, 상기 농약 조성물은 습윤제, 결합제, 충진제(filler) 또는 유기 첨가제를 추가로 포함할 수 있다.

[0031] 상기 습윤제는 상기 농약 조성물에 약 0.1 내지 5% 범위로 포함될 수 있으며, 구체적인 예로, 알킬 나프탈렌 술포네이트, 소듐 알킬 나프탈렌 술포네이트, 술폰화 알킬카르복실레이트의 소듐 염, 폴리옥시알킬화 에틸 페놀, 폴리옥시에톡시화(polyoxyethoylated) 지방성 알코올, 폴리옥시에톡시화 지방성 아민, 리그닌 유도체, 알칸 술포네이트, 알킬벤젠 술포네이트, 폴리카르복시산의 염, 술포숙신산의 에스테르의 염, 알킬나프탈렌술포네이트, 알킬벤젠술포네이트, 알킬폴리글리콜 에테르 술포네이트, 알킬 에테르 포스페이트, 알킬 에테르 술페이트 또는 알킬 술포숙신산 모노에스테르일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0032] 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.

[0033] 상기 충진제는 상기 농약 조성물에 약 0.1 내지 10%의 범위로 포함될 수 있으며, 구체적인 예로, 벤토나이트, 서브-벤토나이트(sub-bentonite), 아타풀자이트(attapulgite), 카올리나이트(kaolinite), 몬모릴로나이트, 보크사이트, 수화된 알루미나(hydrated alumina), 하소된(calcined) 알루미나, 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.

[0034] 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 군일 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.

[0035] 또한, 본 발명은 상기 박테리오파지를 유효성분으로 포함하는 항균제를 제공한다.

[0036] 본 발명의 용어 "항균제"란, 미생물을 사멸시키거나 혹은 발육을 억제하는 물질을 의미하며, 방부제, 살균제 및

항생제를 총칭한다.

[0037] 본 발명의 박테리오파지는 애시도보락스 시트룰리(*Acidovorax citrulli*)에 대하여 특이적으로 높은 항균 활성을 나타내므로, 본 발명의 박테리오파지를 유효성분으로 포함하는 상기 항균제는 기존의 항균물질에 비하여 약물 내성 또는 저항성을 유도하지 않아 안전하며, 제품수명(life cycling)이 긴 신규의 농업용 항균제로서 이용될 수 있다.

[0038] 또한, 본 발명은 상기 박테리오파지를 유효성분으로 포함하는 소독제를 제공한다.

[0039] 본 발명의 용어 "소독제"란, 병원성균의 살균을 목적으로 하는 약제를 의미하며, 세척제를 포함한다.

[0040] 본 발명의 박테리오파지는 애시도보락스 시트룰리(*Acidovorax citrulli*)에 대하여 특이적으로 높은 사멸능을 나타내므로, 본 발명의 박테리오파지를 유효성분으로 포함하는 상기 소독제는 신규의 농업용 소독제로 이용될 수 있고, 파종 전 식물체의 종자를 소독하는데 활용될 수 있다.

[0041] 또한, 본 발명은 상기 박테리오파지를 식물체 또는 토양에 처리하는 단계를 포함하는 식물병을 방제하는 방법을 제공한다.

[0042] 본 발명의 용어 "방제"란, 작물에 피해를 주는 각종 병해충을 예방하고 구제하는 것을 의미한다.

[0043] 본 발명의 일 구현 예에 따른 식물병 방제 방법에 있어서, 상기 식물병은 애시도보락스 시트룰리(*Acidovorax citrulli*)에 의해 발병되는 수박 과일썩음병(bacterial fruit blotch)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0044] 본 발명의 상기 식물병을 방제하는 방법은 본 발명의 기탁번호가 KCTC 13535BP인 박테리오파지를 유효성분으로 포함하는 농약 조성물, 항균제, 또는 소독제의 유효량을 식물체의 종자에 처리하거나, 식물이 식재된 토양에 처리하는 단계를 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0045] 본 발명의 일 구현 예에 따른 식물병 방제 방법에 있어서, 기탁번호가 KCTC 13535BP인 박테리오파지를 수박 종자에 코팅한 후 파종하고, 애시드보락스 시트룰리를 토양에 접종한 결과, 박테리오파지 무처리 종자의 세균 접종군에 비해 박테리오파지로 코팅된 종자의 세균 접종군에서 발아율 및 생존율이 모두 현저히 증가되어 박테리오파지에 의한 세균병의 예방 효과를 확인할 수 있었다. 또한, 애시드보락스 시트룰리를 수박 종자에 코팅한 후 파종하고, 본 발명의 박테리오파지를 토양에 접종한 결과, 세균 코팅 종자의 박테리오파지 무접종군에 비해 발아율 및 생존율이 모두 현저히 증가되어 본 발명의 박테리오파지에 의한 세균병의 치료 효과를 확인할 수 있었다.

[0046] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0047] **재료 및 방법**

[0048] **1. 박테리오파지의 분리를 위한 숙주세균**

[0049] 박테리오파지를 분리하기 위하여 사용한 애시도보락스 시트룰리(*Acidovorax citrulli*)는 경희대학교 원예생명공학과의 오창식 교수로부터 제공받았으며, 이들 균주에 대한 유전자형 분석은 Zivanovic와 Walcott(Phytopathology, 2016, 107:29-35)가 사용한 세 개의 프라이머, G2AcFwd(5'-CGATAGGGTTGGGTTCAAG-3'; 서열번호 1), G12AcFwd(5'-CCGAAGAGATAACACTGCATC-3'; 서열번호 2) 및 G12AcRev(5'-ACGTACTGCCGATTTTTGC-3'; 서열번호 3)를 이용한 PCR법을 통해 분석하였으며, 그 결과는 표 1에 제시하였다. 애시도보락스 시트룰리는 KB(King's medium B Base) 한천배지에서 34℃ 온도 조건으로 배양하였다.

[0050] **2. 시료의 채취 및 박테리오파지의 분리**

[0051] 박테리오파지 분리를 위한 시료는 국내의 36곳에서 수집한 수박, 호박 및 오이의 잎을 이용하였다. 먼저 약 10g의 잎을 50㎖ 튜브에 넣은 후 10㎖의 멸균 증류수를 추가하고 서린과학의 SLMR-2M 믹서를 이용하여 30분간 균질화하였다. 균질액을 3,000x*g*에서 20분간 원심분리한 후 0.2㎛ Manisart 여과지로 여과하였다. 시료에 존재하는 파지의 수를 늘리기 위하여 상기 여과액과 애시도보락스 시트룰리 혼합액을 섞어서 배양하였다. 구체적으로는 42개의 애시도보락스 시트룰리 균주 배양액 각 5㎖을 합한 90㎖과 160㎖의 KB 배지를 혼합하여 34℃에서 대수증식기까지 배양하였다. 배양된 혼합액 10㎖과 상기 여과액 10㎖을 섞은 후 34℃에서 2일간 배양하였다. 배양액을 3,000x*g*에서 20분간 원심분리한 후 0.2㎛ Manisart 여과지로 여과하였다.

[0052] 상기 여과액 내의 박테리오파지의 존재 여부는 스폿 어세이(spot assay)를 이용하여 결정하였다. 구체적으로는

42개의 애시도보락스 시트룰리 각 균주별로 대수증식기의 배양액 300㎕를 50℃, 0.7% KB 한천 4㎖과 섞은 후 미리 만들어져 있는 KB 한천배지 위에 부었다. 한천이 굳도록 상온에서 20-30분간 보관한 후, 상기 여과액 3㎕를 한천배지 위에 접종하고 34℃에서 하루 동안 배양하였다. 배양 24시간 후 파지에 의한 용균현상(clearing)이 나타나면, 그 시료에 박테리오파지가 있는 것으로 간주하여 3번의 플라크 분리법(plaque isolation)을 통하여 순수한 박테리오파지를 확보하였다. 플라크 분리를 위해서는 스폿 어세이에서 박테리오파지에 의한 용균이 확인된 세균 배양액 300㎕, 박테리오파지 증식 여과액 100㎕, 그리고 50℃의 4㎖ 0.7% KB 한천을 섞은 후 미리 만들어져 있는 KB 한천 배지 위에 부은 후 한천이 굳으면 34℃에서 하루 동안 배양하였다. 배양 24시간 후 플라크가 보이면 끝이 절단된 파이펫 팁을 이용하여 플라크를 회수하여 1.5㎖ 튜브에 넣은 후 여기에 1㎖의 SM 완충액(NaCl 100mM, $MgSO_4$ 8mM, Tris-Cl 50mM)을 첨가하여 박테리오파지를 추출하였으며, 이러한 과정을 2회 더 반복하여 순수한 박테리오파지들을 분리하였다.

[0053] **3. 박테리오파지의 증식 및 순수분리**

[0054] 분리된 박테리오파지 중 ACPWH으로 명명된 파지를 증식하여 순수분리 하였다. 구체적으로는, 박테리오파지 용액 10㎖과 애시도보락스 시트룰리 배양액 15㎖을 감염다중도(Multiplicity of Infection, MOI)가 1이 되도록 혼합하고 여기에 25㎖의 20.7% KB 한천(50℃)를 섞은 후 직경 138.5mm의 페트리 접시에 부었다. 34℃에서 24시간 배양 후 30㎖의 SM 완충액을 첨가하고, 30분 후 SM 완충액을 회수하여 4℃에서 20분간 2,600x*g*에서 원심분리한 후 상등액을 회수한 후, 박테리오파지의 농도(titer)는 전술한 플라크 분석법에 의하여 결정하였다. 박테리오파지의 순수분리를 위해서는 상기에서 회수한 상등액에 10%(w/v)의 폴리에틸렌글리콜(polyethylene glycol)을 첨가하고 4℃에서 8시간 동안 섞어준 후 4℃, 8,300x*g*에서 45분간 원심분리하여 침전시켰다. 침천물을 1㎖의 SM 완충액으로 재현탁한 후 1.25, 1.37, 및 1.50g/㎖으로 구성된 염화세슘(caesium chloride) 농도구배 조건에서 169,000x*g*, 2시간 동안 원심분리하였다. 원심분리 후, 박테리오파지층을 회수하여 SM 완충액으로 희석한 후 169,000x*g*에서 2시간 30분 원심분리하여 박테리오파지 침전물(pellet)을 얻었다. 농축된 박테리오파지는 SM 완충액에 녹여 4℃에서 보관하였다.

[0055] **4. 전자현미경 관찰**

[0056] 순수 분리된 박테리오파지는 포름바(formvar)로 표면 처리된 400-메쉬 구리 그리드(grid)에 올린 후 4% 우라닐 아세테이트(uranyl acetate) 5㎕로 1분간 염색하고 여과지를 이용하여 우라닐 아세테이트를 제거한 후 다시 5㎕의 우라닐 아세테이트로 1분 30초간 염색하였다. 전자현미경 관찰은 일본 Hitachi사의 H-7500 전자현미경을 이용하여 이루어졌으며, 박테리오파지의 크기는 ImageJ 프로그램(https://imagej.nih.gov/ij/)을 이용하여 결정하였다.

[0057] **5. 숙주 범위의 결정**

[0058] 분리된 박테리오파지의 숙주 범위를 조사하기 위하여 상기에서 설명한 스폿 어세이를 이용하였다. 세균 배양액 300㎕를 50℃의 0.7% KB 한천 4㎖과 섞은 후 미리 만들어져 있는 KB 한천 배지 위에 부었다. 한천이 굳도록 상온에서 20-30분간 보관한 후 박테리오파지 용균액 3㎕를 한천배지 위에 접종하고 34℃에서 8시간 동안 배양하여 박테리오파지에 의한 용균현상의 발생여부를 조사하였다.

[0059] **6. 박테리오파지의 성장 곡선 결정**

[0060] 박테리오파지의 성장 곡선은 Ellis와 Delbruck의 방법을 이용하여 조사하였다. 간략하게 요약하면, 농도가 7.15 x 10^8 PFU/㎖인 박테리오파지액 200㎕를 대수증식기의 애시도보락스 시트룰리 NWB SC196 균주의 배양액 25㎖(OD_{600}:0.7, 약 6.15 x 10^8 CFU/㎖)과 혼합한 후, 박테리오파지가 숙주 세포에 결합할 수 있도록 상온에서 보관한 후 3,476x*g*, 4℃에서 30분간 원심분리하였다. 상등액을 제거한 후 침전물에 25㎖의 KB 배지를 첨가한 후 34℃에서 배양하였다. 이 후, 매 10분 간격으로 500㎕의 배양액을 2번 취하여 500㎕는 상기에서 설명한 플라크 분석법에 의하여 박테리오파지의 농도를 조사하였으며, 용균되지 않은 세균 내부의 박테리오파지 입자의 숫자를 알아보기 위하여 500㎕에는 5㎕의 클로로포름을 첨가하고 섞어준 후 17,700x*g*에서 5분간 원심분리한 후 상등액을 취하여 플라크 분석을 실시하였다.

[0061] **7. 박테리오파지의 안정성 조사**

[0062] 박테리오파지 ACPWH의 열과 pH에 대한 안정성을 조사하였다. 박테리오파지 ACPWH 용액을 SM 완충액을 이용하여 약 4.0 x 10^5 PFU/㎖로 희석한 후 -80, -20, 4, 25, 34, 37, 45, 50, 55, 및 60℃에서 24시간 동안 보관한 후

애시도보락스 시트룰리 KACC 17000 균주를 이용하여 플라크 분석법에 의하여 살아남은 박테리오파지의 수를 결정하였다. 다양한 pH에서의 ACPWH의 안정성을 알아보기 위하여 SM 완충액을 pH 2, 5, 5.5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 및 12로 조정한 후 여기에 박테리오파지 ACPWH를 최종농도 4.0 x 10^5 CFU/㎖로 첨가한 후 상온에서 24시간 보관한 후 위와 같은 방법으로 살아남은 박테리오파지 ACPWH의 수를 결정하였다.

[0063] **8. 박테리오파지를 이용한 수박 과일썩음병의 방제 효과 조사**

[0064] 박테이오파지 ACPWH의 수박 과일썩음병에 대한 방제효과를 확인하기 위해 사용한 수박종자는 동원농산종묘의 동방꿀 품종으로 온라인으로 구입하여 사용하였다. 구입한 수박종자는 1% 차아염소산나트륨 용액에서 5분간 담근 후 멸균 증류수로 5회 세척하였다. 종자의 세균 또는 박테리오파지 코팅은 50립의 종자를 1.0 x 10^7 CFU/㎖의 애시도보락스 시트룰리 KACC 17000가 들어 있는 증류수 또는 1.0 x 10^8 PFU/㎖의 ACPWH가 들어 있는 SM 완충액에 30분간 담근 후 꺼내어 음건하였다. 종자 파종에 사용한 상토는 주식회사 부농의 상토 2호를 사용하였으며, 사용 전에 습윤멸균기를 이용하여 121℃에서 20분간 멸균하였다. 표면 세척한 종자, 박테리오파지로 코팅한 종자 및 세균으로 코팅한 종자는 플라스틱 포트(가로 x 높이 x 세로, 30.5 x 12 x 15cm)에 700g의 상토를 넣고 포트 당 6-8종자씩 파종하였다. 표면세척만 하고 아무것도 코팅하지 않은 종자와 박테리오파지로 코팅한 종자가 파종된 포트에는 100㎖의 애시도보락스 시트룰리 KACC 17000 배양액(1.0 x 10^7 CFU/㎖)으로 접종하였고, 세균으로 코팅한 종자가 파종된 포트는 포트 당 100㎖의 ACPWH 파지(1.0 x 10^8 PFU/㎖)를 접종하였다. 대조군으로는 표면세척만 하고 아무것도 코팅하지 않은 종자와 ACPWH 파지로 코팅한 종자 및 세균으로 코팅한 종자를 파종하고 별도의 세균 또는 박테리오파지 접종을 하지 않은 그룹을 사용하였다. 파종한 포트는 식물용 LED 등을 이용하여 12시간 명/12시간 암의 광주기로 빛을 비추어주면서 26℃에서 2주간 배양시키며 관찰하였다.

[0065] **실시예 1. 박테리오파지의 분리 및 전자현미경 관찰**

[0066] 채집된 식물 잎 시료 102점에 대하여 42개의 애시도보락스 시트룰리(*Acidovorax citrulli*) 균주 혼합 배양액을 이용하여 박테리오파지를 증식시킨 후 각 균주별로 스폿 어세이를 실시하여 박테리오파지의 존재를 확인하였으며(도 1), 3번의 플라크 분석법을 이용하여 각각의 박테리오파지를 분리하였다. 분리된 박테리오파지 중 크기가 가장 큰 플라크를 형성하는 파지를 *Acidovorax citrulli* phage, ACPWH이라 명명하고 추후 실험에 이용하였다. ACPWH은 대구 달성지역에서 채집한 수박 잎에서 분리되었다. 또한, 본 발명자들의 이전의 연구를 통해 애시도보락스 시트룰리에 대해 특이적인 사멸능을 갖는 것으로 확인된 박테리오파지 ACP17(수탁번호 KCTC18593P)을 대조 박테리오파지로 사용하여 용균 현상을 분석하였다.

[0067] 그 결과, 신규한 박테리오파지 ACPWH는 하기 표 1에 나타난 바와 같이 숙주 범위 조사에서 42개의 애시도보락스 시트룰리 균주 중 LB10-232, NWB SC205와 KACC18649를 제외한 39개에 대하여 용균 현상을 보여, ACP17에 비해 넓은 숙주 범위를 가지는 것을 알 수 있었다.

표 1

박테리오파지 ACPWH 와 ACP17(KCTC18593P)의 용균활성 분석

	Bacteria	Strain	Genetic group	ACPWH	ACP17
1	*Acidovorax Citrulli*	KHU	Ⅱ	+	-
2	*Acidovorax Citrulli*	AC37	Ⅰ	+	+
3	*Acidovorax Citrulli*	AC42	Ⅱ	+	+
4	*Acidovorax Citrulli*	LB09-308	Ⅰ	+	+
5	*Acidovorax Citrulli*	LB09-309	Ⅱ	+	-
6	*Acidovorax Citrulli*	LB10-232	Ⅰ	-	-
7	*Acidovorax Citrulli*	LB10-233	Ⅰ	+	+
8	*Acidovorax Citrulli*	LB10-234	Ⅱ	+	-
9	*Acidovorax Citrulli*	KACC17000	Ⅱ	+	+
10	*Acidovorax Citrulli*	KACC17002	Ⅰ	+	+
11	*Acidovorax Citrulli*	KACC17005	Ⅱ	+	+
12	*Acidovorax Citrulli*	KACC17909	Ⅱ	+	+
13	*Acidovorax Citrulli*	KACC17913	Ⅱ	+	-
14	*Acidovorax Citrulli*	JBARES-1	Ⅱ	+	+
15	*Acidovorax Citrulli*	JBARES-2	Ⅱ	+	+
16	*Acidovorax Citrulli*	NWB SC107	Ⅰ	+	+
17	*Acidovorax Citrulli*	NWB SC108	Ⅰ	+	+
18	*Acidovorax Citrulli*	NWB SC109	Ⅰ	+	+
19	*Acidovorax Citrulli*	NWB SC111	Ⅰ	+	+
20	*Acidovorax Citrulli*	NWB SC172	Ⅰ	+	+
21	*Acidovorax Citrulli*	NWB SC196	Ⅰ	+	+
22	*Acidovorax Citrulli*	NWB SC202	Ⅰ	+	+
23	*Acidovorax Citrulli*	NWB SC205	Ⅰ	-	-
24	*Acidovorax Citrulli*	NWB SC206	Ⅰ	+	+
25	*Acidovorax Citrulli*	NWB SC212	Ⅰ	+	+
26	*Acidovorax Citrulli*	NWB SC238	Ⅰ	+	+
27	*Acidovorax Citrulli*	NWB SC58	Ⅰ	+	+
28	*Acidovorax Citrulli*	NWB SC076	Ⅰ	+	+
29	*Acidovorax Citrulli*	NWB SC175	Ⅰ	+	+
30	*Acidovorax Citrulli*	NWB SC195	Ⅰ	+	+
31	*Acidovorax Citrulli*	KHU	Ⅱ	+	+
32	*Acidovorax Citrulli*	CHNU-1	Ⅰ	+	+
33	*Acidovorax Citrulli*	CHNU-2	Ⅰ	+	-
34	*Acidovorax Citrulli*	CHNU-3	Ⅱ	+	-
35	*Acidovorax Citrulli*	CHNU-4	Ⅰ	+	+
36	*Acidovorax Citrulli*	PKNU-1	Ⅱ	+	+
37	*Acidovorax Citrulli*	PKNU-2	Ⅱ	+	+
38	*Acidovorax Citrulli*	KACC17001	Ⅰ	+	-
39	*Acidovorax Citrulli*	KACC17910	Ⅱ	+	-
40	*Acidovorax Citrulli*	KACC17911	Ⅱ	+	-
41	*Acidovorax Citrulli*	KACC17912	Ⅱ	+	-
42	*Acidovorax Citrulli*	KACC18649	Ⅰ	-	-

[+: 용균 활성있음, -: 용균활성없음]

[0068]

[0069] 또한, 순수분리된 ACPWH의 전자현미경 관찰결과, ACPWH 박테리오파지는 머리의 크기가 60±5nm이고 꼬리의 길이가 180±5nm이며, 가늘고 긴, 유연성을 보이는 꼬리부분이 있는 특성의 시포비리대(Siphoviridae) 과에 속하는 바이러스로 확인되었다(도 2). 이에 본 발명자들은 상기 ACPWH 박테리오파지를 한국생명공학연구원 생물자원센터에 2018년 5월 29일자로 기탁하였다(기탁번호 KCTC 13535BP).

[0070] **실시예 2. 박테리오파지 ACPWH의 특성**

[0071] 박테리오파지 ACPWH를 애시도보락스 시트룰리 KACC 17000 균주에 접종하여 ACPWH의 성장 특성을 조사한 결과, ACPWH의 잠복기(latent period)는 12±5분이었으며, 파지 입자 하나의 감염에 의하여 생산되는 새로운 파지의 수(burst size; 방출량)는 189로 확인되었다(도 3). ACPWH의 다양한 온도에서의 안정성을 조사한 결과 ACPWH은 -80℃에서 50℃까지 안정성을 보였으나, 60℃에서는 불활성화되는 것으로 나타났다(도 4). 다양한 pH에서 ACPWH의 안정성을 조사한 결과 ACPWH는 pH 5.5 내지 pH 10에서는 안정하였으나, pH 5에서는 감염성이 감소하였고, pH 11에서는 불활성화되어 감염성이 없어지는 것으로 확인되었다(도 5).

[0072] **실시예 3. 박테리오파지 ACPWH에 의한 수박 과일썩음병 방제 효과**

[0073] 신규한 박테리오파지 ACPWH에 의한 수박 과일썩음병 병제 효과를 분석한 결과, 표면 세척만 하고 별도의 코팅을

하지 않은 종자의 경우 세균 및 박테리오파지를 접종하지 않은 무접종군과 박테리오파지만 접종한 파지접종군에서 파종한 종자 수를 기준으로 발아율과 발아 3주 후 생존율이 모두 100%로 나타났으나, 애시도보락스 시트룰리를 접종한 세균접종군의 경우에는 발아율과 생존율이 각각 33%와 13%로 감소된 것을 확인할 수 있었다(도 6, 무처리 종자). 애시도보락스 시트룰리로 코팅한 종자의 발아율은 박테리오파지를 접종하지 않은 경우(무접종)에는 발아율이 31.5%였으나 파지를 접종한 경우(파지접종)에는 95%로 증가되었으며, 발아 3주 후 생존율의 경우 파지를 접종하지 않은 경우에는 6%였으나 파지를 접종한 경우에는 95%로 증가된 것을 알 수 있었다(도 6, 세균 코팅 종자). 또한 파지 ACPWH로 종자를 코팅한 경우 애시도보락스 시트룰리의 접종 여부에 상관없이 발아율은 100%를 보였으며, 발아 3주 후 생존율은 세균을 접종하지 않은 경우에는 100%, 세균을 접종한 경우에는 98%를 나타내었다(도 6, 파지 코팅 종자). 이의 결과를 통해, 신규한 박테리오파지 ACPWH에 의하여 애시도보락스 시트룰리에 의한 수박 과일썩음병을 효과적으로 방제 및 치료할 수 있음을 알 수 있었다(도 6 및 도 7).

수탁번호

[0074]

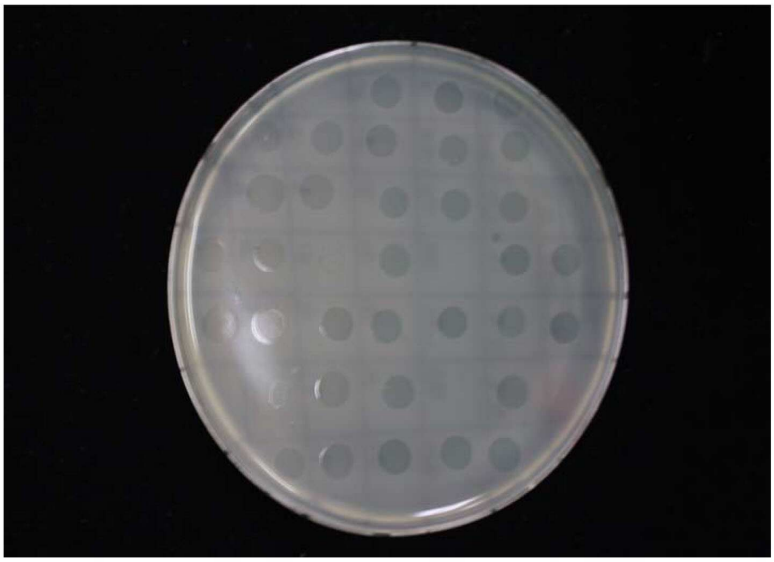
기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC13535BP

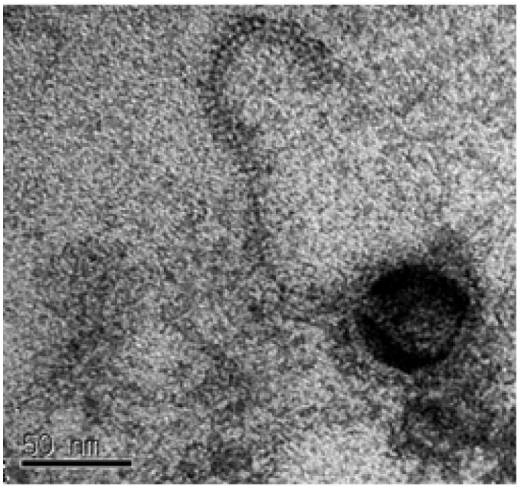
수탁일자 : 20180529

도면

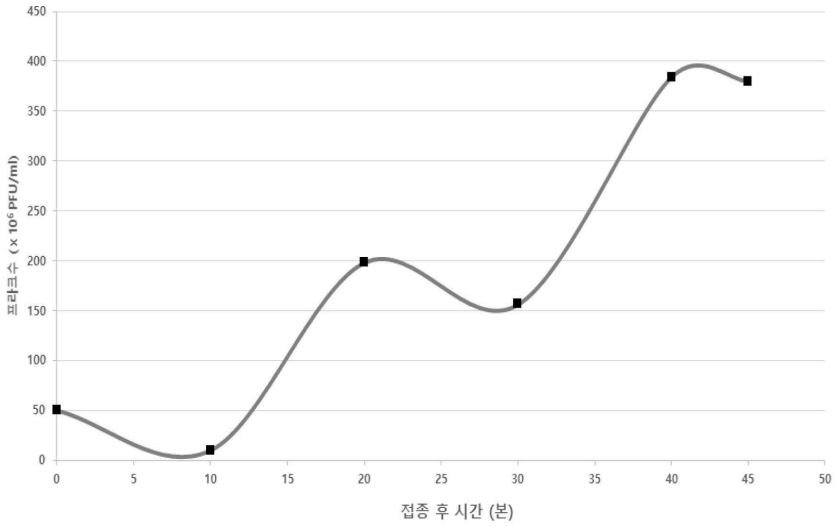
도면1



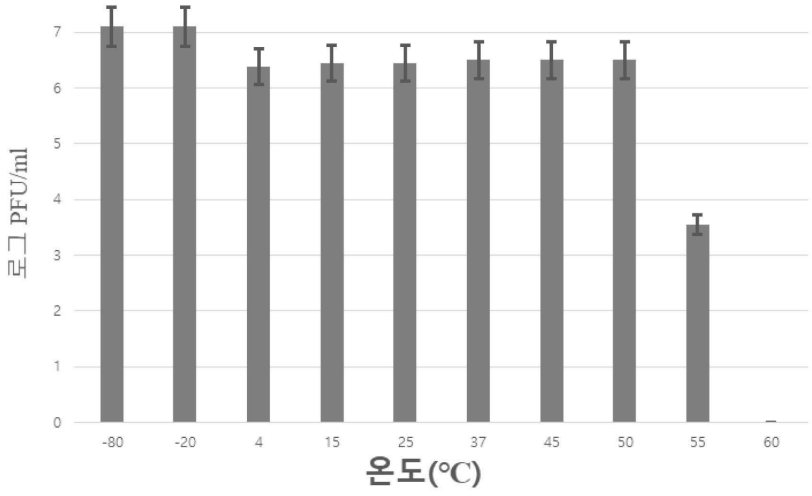
도면2


50 nm

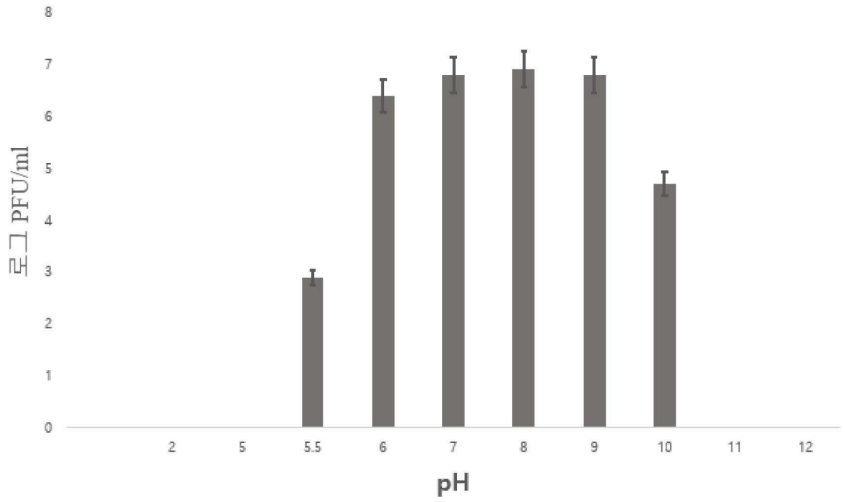
도면3


450
400
350
300
250
200
150
100
50
0
프라크수 (x 10⁶ PFU/ml)
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
접종 후 시간 (분)

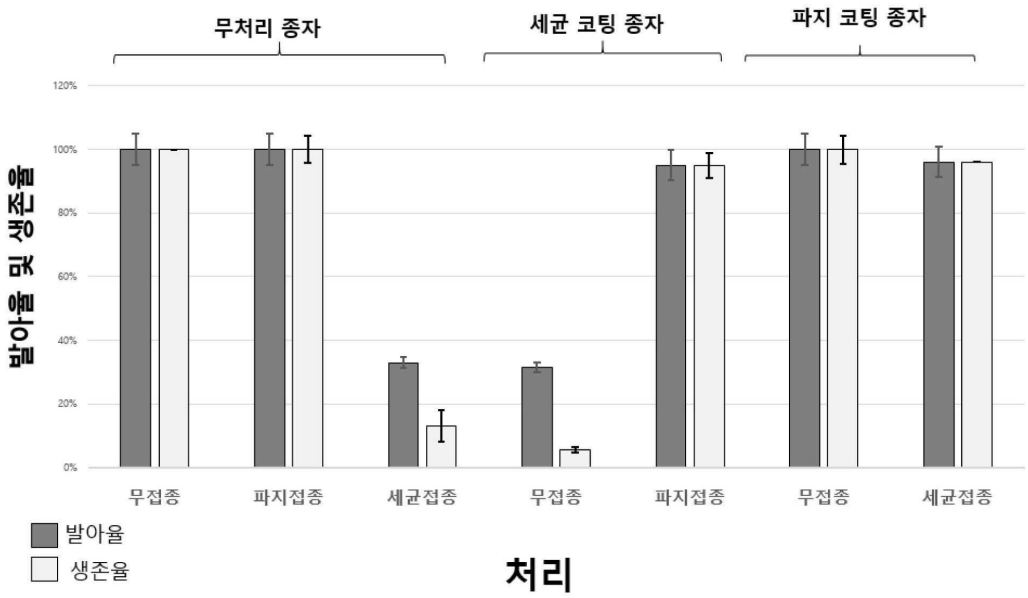
도면4


7
6
5
4
3
2
1
0
로그 PFU/ml
-80
-20
4
15
25
37
45
50
55
60
온도(℃)

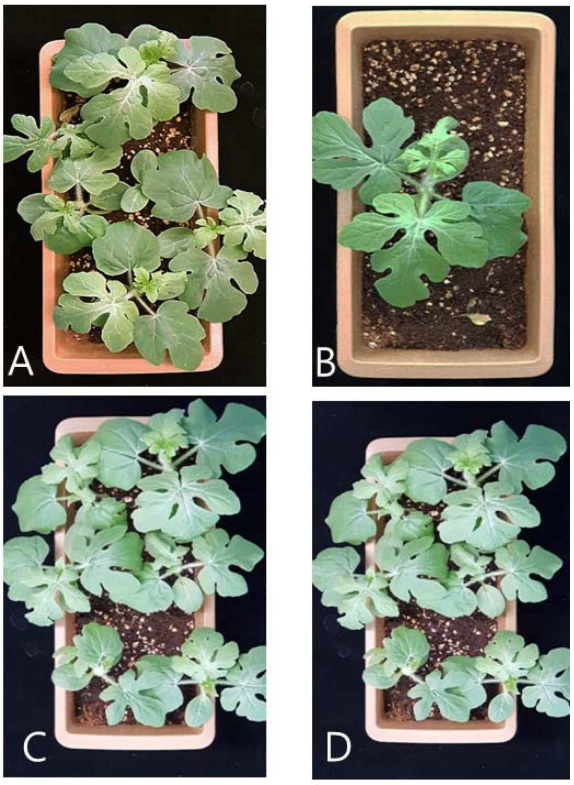
도면5


로그 PFU/ml
0
1
2
3
4
5
6
7
8
2
5
5.5
6
7
8
9
10
11
12
pH

도면6


무처리 종자
세균 코팅 종자
파지 코팅 종자
발아율 및 생존율
120%
100%
80%
60%
40%
20%
0%
무접종
파지접종
세균접종
무접종
파지접종
무접종
세균접종
발아율
생존율
처리

도면7



서 열 목 록

<110> Pukyong National University Industry-University Cooperation Foundation

<120> Novel bacteriophage ACPWH and uses thereof

<130> PN18176

<160> 3

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 1

cgatagggtt gggttcaag 19

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 2

ccgaagagat aacactgcat c 21

<210> 3

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 3

acgtactgcc gatttttgc 19