

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2012년 8월 16일 (16.08.2012)



(10) 국제공개번호
WO 2012/108601 A1

- (51) 국제특허분류: C12N 1/20 (2006.01) A01N 63/02 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2011/006981
- (22) 국제출원일: 2011년 9월 21일 (21.09.2011)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2011-0012076 2011년 2월 10일 (10.02.2011) KR
- (71) 출원인 (US 을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): **경북대학교 산학협력단 (KYUNGPOOK NATIONAL UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION)** [KR/KR]; 대구 북구 산격동 1370, 702-010 Daegu (KR).
- (72) 발명자; 겸
- (75) 발명자/출원인 (US 에 한하여): **신재호 (SHIN, Jae-Ho)** [KR/KR]; 대구 북구 침산 2동 코오롱하늘채아파트 103동 103호, 702-750 Daegu (KR). **장은경 (JANG, Eun-Kyung)** [KR/KR]; 대구 북구 복현동 복현화성 104동 702호, 702-765 Daegu (KR). **신진호 (SHIN, Jin-Ho)** [KR/KR]; 대구 북구 칠성 2동 성광우방타운 105동 1705호, 702-777 Daegu (KR). **이윤하 (LEE, Yun-Ha)** [KR/KR]; 대구 북구 칠성동 2가 465-4, 702-062 Daegu (KR).

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

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

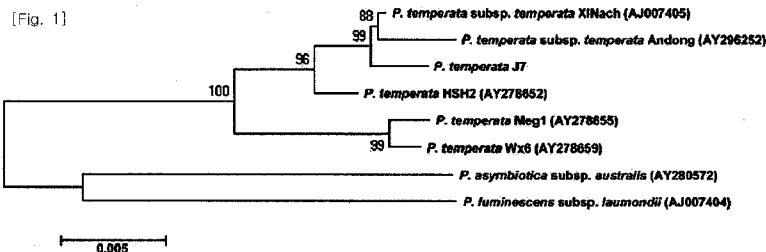
(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

(54) Title: NOVEL *PHOTORHABDUS TEMPERATA* J7 AND METHOD FOR PEST CONTROL USING SAME

(54) 발명의 명칭: 신규한 포토랍두스 템페라타 J 7 및 이를 이용한 해충의 방제 방법



(57) Abstract: The present invention relates to strains of *Photorhabdus temperata* J7 which have excellent insecticidal activity and simultaneous antimicrobial activity. The strains of the present invention show excellent insecticidal activity against insect pests and antimicrobial activity against pathogens, which lead to preparation of microbial formulations with the strains or culture media thereof as active ingredients.

(57) 요약서: 본 발명은 우수한 살충 활성과 항균 활성을 동시에 갖는 신규한 포토랍두스 템페라타 J7(*Photorhabdus temperata* J7) 균주, 이를 포함하는 해충 방제용 조성물 및 상기 균주를 이용하여 해충을 생물학적으로 방제하는 방법에 관한 것이다. 본 발명의 균주는 해충에 대한 살충력과 유해균에 대한 항균력이 우수하므로, 상기 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 한 미생물 제제를 제조할 수 있으며, 이를 이용하여 다양한 작물에서 해충에 의한 피해를 효과적으로 방제 및 예방할 수 있다.



WO 2012/108601 A1

명세서

발명의 명칭: 신규한 포토랍두스 템페라타 J 7 및 이를 이용한 해충의 방제방법

기술분야

- [1] 본 발명은 우수한 살충 활성과 항균 활성을 동시에 갖는 신규한 포토랍두스 템페라타 J7(*Photorhabdus temperata* J7) 균주, 이를 포함하는 해충 방제용 조성물 및 상기 균주를 이용하여 해충을 생물학적으로 방제하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 농작물과 산림보호 차원에서 해충에 대한 살충제의 살포는 증가하는 추세이다. 1939년 스위스에서 DDT가 발명된 이래, DDT는 저렴한 가격에 대량생산할 수 있고 특히 티푸스나 말라리아를 퇴치하는 데 효과적이었기 때문에 1940년대부터 살충제로서 널리 사용되었다. 그러나 1957년부터 DDT의 유해성에 대한 의문이 제기되기 시작하였고, DDT의 반감기는 2년에서 15년으로 잘 분해되지 않으며 체내의 지방 성분에 주로 쌓이고, 땅이나 물에 남아 있던 DDT는 식물에 흡수된 후 인간이 이를 음식을 통해 섭취할 경우에는 암이 유발될 수 있다는 연구결과가 나오면서 1970년대부터 현재까지 대부분의 국가에서 DDT를 농약으로 사용하는 것을 금지하였다.
- [3] 또한 염소 또는 벤젠을 원료로 하는 BHC의 경우, 원료가 풍부하고 값이 저렴하고 살충력이 강하며, 인축에는 해가 적기 때문에 미국에서 개발 및 합성을 주도하여 전세계적인 관심을 끌었으나, 사용량의 증가와 함께 최근 환경 오염 문제가 대두되면서 서양 각국과 오스트레일리아 등 여러 나라에서는 엄격하게 상기 농약 사용을 제한하고 있다.
- [4] 이와 같이 그동안 해충을 방제하기 위하여 유기 화학적 합성 살충제가 널리 사용되고 있으나, 수십년에 걸친 연용과 남용으로 인하여 해충군의 이상격발 또는 저항성 해충의 출현, 인간을 비롯한 비목적충에 대한 독성발현 및 환경계의 오염 등의 많은 부작용을 야기하고 있다. 전 세계적으로 농약의 잔류 독성과 환경오염으로 인하여 여러 가지 문제점이 나타나자 인류의 건강을 지키기 위하여 우선 독성이 강한 유기합성 농약의 사용을 자제하기로 국제적인 합의가 도출되기도 하였다. 이러한 국제 협약에 의하여 전 세계는 2004년에 지난 10년 전에 사용하던 화학합성 유기인계, 유기염소계 살충제의 50%까지 생산이 감축되었고, 2010년까지 다시 유기인계, 유기염소계 살충제의 생산을 50% 감소시키기로 한 국제적 협의에 동의하여 현재 실행 단계에 있다.
- [5] 그러나 독성농약 감축생산 협의 이후, 현재 전 세계적으로 많은 연구진이 환경 친화적 살충제를 개발하려고 많은 노력을 했음에도 불구하고, 이제까지 사용하였던 유기인계, 유기염소계 농약을 대체할 새롭고 안전한 살충제를 개발하지 못하였기 때문에 전 세계적인 농약감축회의 의결내용이 지켜지기

어려운 상황이며, 조만간에 안전한 살충제가 개발되어 생산되지 않으면 해충방제용 살충제뿐만 아니라 식량을 비롯한 농산물 생산에 관련된 농업용 살충제의 부족으로 인해 국내외적으로 큰 문제가 대두될 것으로 예상된다.

- [6] 최근에는 화학비료나 농약의 사용을 줄이거나 대체할 수 있으며, 인축에 위해가 적고 작물에 피해를 일으키지 않으며, 토양 생태계와 같은 환경에 대한 피해가 적은 생물학적 방제의 기술이 미생물에 의해 가능하다는 것이 국내외 여러 연구자들에 의해 입증됨에 따라, 화학농약의 폐단을 보완할 수 있는 생물 농약에 대한 관심과 연구가 증가하고 있는 추세이다.

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

- [8] 이에, 본 발명자들은 농작물에 대해 광범위한 피해를 주고 있는 해충에 대하여 광범위하고 우수한 살충력을 가지는 새로운 생물 농약의 개발을 목표로 신규 미생물을 탐색하기 위해 예의노력한 결과, 곤충병원성 선충으로부터 분리한 포토랍두스 템페라타 J7 균주가 나비목 해충에 대하여 우수한 살충 활성을 나타냄을 확인하였으며, 또한 상기 균주가 유해균에 대해서도 우수한 항균 활성을 보임을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [9] 본 발명의 목적은 곤충병원성 선충으로부터 분리된, 살충 활성과 항균 활성을 동시에 갖는 신규한 포토랍두스 템페라타 J7(수탁번호: KCTC12005BP) 균주를 제공하는 것이다.

[10] 본 발명의 다른 목적은 상기 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는 해충 방제용 조성물 또는 항균 조성물을 제공하는 것이다.

[11] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 해충 방제용 조성물을 나비목 해충의 숙주식물에 살포하는 단계를 포함하는, 나비목 해충의 방제방법을 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

[12] 상기 목적을 달성하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 곤충병원성 선충으로부터 분리된, 살충 활성과 항균 활성을 동시에 갖는 포토랍두스 템페라타 J7(수탁번호: KCTC12005BP)를 제공한다.

[13] 본 발명의 상기 균주는 곤충병원성 선충으로부터 분리 동정한 것으로서, 상기 균주의 16s rDNA 염기서열을 공지균주와 비교한 결과 포토랍두스 템페라타(*Photorhabdus temperata*)와 99%의 상동성을 나타내었다 (도 1 참조). 그러나 완전히 동일하지 않았기 때문에 상기 종에 속하는 신규한 균주임을 알 수 있었다. 이러한 분석결과에 따라 본 발명의 균주를 포토랍두스 템페라타 J7로 명명하고, 2011년 1월 4일자로 국립농업과학원 농업유전자원센터에 수탁번호 KACC 91626P로 기탁하였으며 2011년 08월 23일자로 국제 기탁 기관에 수탁번호 KCTC 12005BP로 기탁하였다.

[14] 상기 균주의 형태적, 생화학적 특성을 살펴보면, 그람 음성간균으로서 카탈라아제, 프로테아제, 리파아제 효소 활성을 나타내었으며 (도 3 내지 도 5 참조), 배양온도는 28°C 내지 30°C에서는 성장이 활발하고 배양온도가 높아짐에 따라 성장이 저해되며 35°C 이상에서는 성장이 거의 나타나지 않았다(도 8 참조).

[15] 본 발명의 균주는 해충에 우수한 살충 활성을 나타낼 수 있다. 본 발명에서 방제 대상인 해충은 나비목(*Lepidopter*) 해충일 수 있다. 바람직하게, 상기 해충은 꿀벌부채명나방(*Galleria mellonella*), 배추좀나방(*Plutella xylostella*), 담배거세미나방(*Spodoptera litura*), 털뿔가지나방(*Alcis angulifera*), 애모무늬잎말이나방(*Adoxophyes orana*), 감나무잎말이나방(*Ptycholoma lecheana*), 복숭아순나방(*Grapholita molesta*), 은무늬굴나방(*Lyonetia prunifoliella*), 복숭아심식나방(*Carposina sasakii*), 파밤나방(*Spodoptera exigua*), 목화바둑나방(*Diaphania indica*), 흑명나방(*Cnaphalocrocis medinalis*), 이화명나방(*Chilo suppressalis*), 및 왕담배나방(*Helicoverpa armigera*)으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있으나 나비목에 해당되는 해충이면 이에 제한되지 않는다. 더욱 바람직하게, 상기 해충은 꿀벌부채명나방일 수 있다.

[16] 본 발명에서 용어, “살충 활성”은 식물에 대한 해충의 사망률을 증가시키거나 성장률을 저해하는 본 발명의 미생물 또는 미생물로부터 분비된 내독소 단백질의 능력을 의미한다.

[17] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 배양시간에 따른 본 발명의 포토랍두스 템페라타 J7 균주의 배양 상등액의 5령 이상의 꿀벌부채명나방 유충에 대한

살충력을 조사한 결과, 배양 후 3 - 6 일째의 배양 상등액을 처리한 결과 80 - 100%의 높은 살충력을 나타내어, 고령기 유충에도 우수한 살충 활성을 가짐을 확인할 수 있었다 (도 9 참조).

- [18] 또한, 상기 본 발명의 포토랍두스 템페라타 J7 균주는 포유동물에 위해한 균에 대하여 우수한 항균 활성을 나타낼 수 있다. 상기 위해균은 살모넬라 티피뮤리움(*Salmonella typhimurium*), 살모넬라 콜레라데수이스(*Salmonella choleraesuis*), 대장균(*Escherichia coli*), 스트렙토코커스 아갈락티에(*Streptococcus agalactiae*), 또는 마이크로코커스 루테우스(*Micrococcus luteus*)일 수 있다. 바람직하게 상기 위해균은 살모넬라 티피뮤리움(*Salmonella typhimurium*)와 마이크로코커스 루테우스(*Micrococcus luteus*)일 수 있다. 상기 살모넬라 티피뮤리움은 장 루멘에서 볼 수 있는 병원성 그람 네거티브 박테리아로서, 외막에 있는 LPS에 의해 독성을 나타내며, 인간과 포유동물에 위장염이나 장티푸스와 유사한 증상을 초래한다고 알려져 있다. 또한, 상기 마이크로코커스 루테우스는 식품 부패에 관련된 전형적인 미생물로서 알려져 있다.
- [19] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 포토랍두스 템페라타 J7 균주는 상기 살모넬라 티피뮤리움과 마이크로코커스 루테우스에 대하여 우수한 항균 활성을 나타냄을 확인할 수 있었다 (도 7 참조).
- [20] 이와 같이, 본 발명의 포토랍두스 템페라타 J7 균주는 살충 활성뿐만 아니라 항균 활성도 동시에 가짐을 알 수 있다. 따라서, 본 발명의 균주는 해충 방제용 미생물 제제나 항균 제제의 유효성분으로서 이용될 수 있다. 상기 균주를 이용하여 방제하면 해충에 의한 식물의 식해가 중단되므로 보다 깨끗한 고품질 농산물을 생산할 수 있으며, 방제에 대한 노동력 절감과 경제적 이득을 가져올 수 있다.
- [21]
- [22] 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 상기와 같이 광범위한 나비목 해충에 우수한 살충 활성을 갖는 신규한 포토랍두스 템페라타 J7(수탁번호: KCTC12005BP) 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는 해충 방제용 조성물을 제공한다.
- [23] 본 발명의 해충 방제용 조성물을 적용할 수 있는 식물은 특별히 제한되지는 않으며, 배추, 양배추, 가지, 감, 복숭아, 오이, 결구상추(양상추), 딸기, 토마토, 파, 담배, 벼, 밤 등의 경제작물 이외에도 화훼 또는 특용작물 등의 나비목 해충의 숙주가 될 수 있는 식물 표면이나 이들 식물이 성장하고 있는 토양에 처리될 수 있으며 또는 재배하여 수송 또는 저장 중인 과실이나 채소 표면에도 처리될 수 있다.
- [24] 본 발명의 해충 방제용 조성물, 더욱 바람직하게는 나비목 해충 방제에 유용한 조성물은 포토랍두스 템페라타 J7 균주, 또는 이의 배양액이나 건조분말 5 내지 90 중량%에 계면활성제, 무기염류, 보조제, 결합제 및 증량제 등을 포함할 수 있다.

- [25] 상기 계면활성제는 분자 중에 친수성 분자단 및 친유성 분자단을 동시에 갖는 양친매성 물질로서, 세정력, 분산력, 유화력, 가용화력, 습윤력, 살균력, 기포력 및 침투력이 우수한 특징을 가지므로 본 발명에 따른 해충 방제용 조성물 중의 포토랍두스 템페라타 J7 균주가 효과적으로 약효를 발현하도록 수화, 현탁, 분산시키는 작용을 할 수 있다.
- [26] 상기 계면활성제로는 알킬벤젠설포네이트, 알킬나프탈렌설포네이트, 디알킬설포석시네이트, 리그닌설포네이트, 알킬나프탈렌설포네이트포르마린축합물, 폴리옥시알킬렌알킬페닐설포네이트와 같은 설포네이트의 나트륨염 또는 칼슘염, 알킬설페이트, 폴리옥시알킬렌알킬설페이트, 폴리옥시알킬렌알킬페닐설페이트와 같은 설페이트의 나트륨염 또는 칼슘염, 나프탈렌설포석시네이트, 폴리옥시알킬렌석시네이트와 같은 석시네이트의 나트륨염 또는 칼슘염 등의 음이온성 계면활성제, 에톡실화 알킬에테르, 폴리옥시알킬렌알킬페닐폴리머, 다중 알코올과 같은 비이온성 계면활성제가 단독으로 또는 2 종 이상 혼합되어 사용될 수 있으며, 이들은 모두 예시적으로 열거한 것들로서 이들 이외의 계면활성제가 사용될 수 있음은 당해 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게는 용이하게 이해될 수 있을 것이다.
- [27] 상기 무기염류는 포토랍두스 템페라타 J7의 내독소 단백질과 함께 해충의 중장에 들어가서 독소 단백질이 빠르게 활성독소의 형태로 전환되는 것을 도와주거나 중장벽에 물리적인 상처를 주어 독소의 활성을 증진시킬 뿐만 아니라, 해충의 체내에서 생리적인 변화를 유도하여 독소의 작용효과를 높일 수 있도록 작용하는 물질로서 당해 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 구입하여 사용할 수 있을 것이다.
- [28] 상기 결합제는 상기 활성성분인 포토랍두스 템페라타 J7 균주의 건조분말을 포함하여 약효 증진제, 증량제 등을 서로 결합시키는 역할을 하는 것으로서, 수용성 전분, 텍스트린, 카르복시메틸셀룰로오스, 폴리아크릴산나트륨, 폴리비닐알코올, 아라비아검 또는 잔탄검 등이 단독 또는 2 종 이상 혼합되어 사용될 수 있다.
- [29] 상기 증량제는 상기 계면활성제와 함께 사용되어 상기 계면활성제를 흡착, 분상화하고, 이 계면활성제, 약효 증진제, 포토랍두스 템페라타 J7 균주, 이의 배양액 또는 건조분말과 함께 조성물의 미립자 표면을 이루는 물질로 작용하며, 전분, 대두박, 밀기울, 입상 섬유질, 유안, 규조토, 제올라이트, 벤토나이트, 탈크, 카올린, 파이로필라이트, 화이트카본 등이 단독 또는 2 종 이상 혼합되어 사용될 수 있다.
- [30] 상기 조성물은 환경친화적인 미생물 농약으로 제형화하여 사용될 수 있다. 본 발명에서 용어 "미생물농약"은 식물의 해충, 병원 미생물 등을 방제하기 위하여, 자연에서 분리 선발하거나 용도에 맞게 변형시킨 미생물, 또는 미생물이 분비하는 화합물 등을 제품화한 것을 말하며, 바람직하게 본 발명의 포토랍두스

템페라타 J7, 또는 이의 배양액을 제품화하거나 본 발명의 균주가 생산하는 내분비 독소 단백질을 유효성분으로 포함하여 제품화할 수 있다.

- [31] 상기 해충 방제용 조성물은 입제, 분제, 액상수화제, 수화제 등의 형태로 제형화되어 살충제로 사용될 수 있는데 이에 한정되지는 않으나, 수화제가 바람직하다. 제형화된 살충제는 사용 전에 물에 500 내지 2,000 배, 바람직하게는 약 1,000 배로 희석하여 사용할 수 있다. 본 발명의 살충제가 농업용 살충제로 사용될 경우, 그것들의 적용량은 통상 10 에이커 당, 0.1 내지 100 g 이다. 물로 희석한 후 사용되는 유효가능한 농축물, 습윤성 분말, 유동물 및 기타 유사 제형물들의 경우, 그 적용 농도는 통상 1 내지 100,000 ppm의 범위이다. 이러한 적용 양 및 농도는, 제형물의 형태, 적용 시기, 장소 및 방법, 해충의 종류, 손해 정도 및 기타 요인들에 따라 다를 수 있으므로, 상기 범위에 한정되지 않고, 증감 가능하다.

- [32] 또한, 본 발명의 해충 방제용 조성물은 다른 살곤충제, 살선충제, 살진드기제, 살세균제, 살진균제, 제초제, 식물 성장 조절제, 시너지스트, 비료, 토양 컨디셔너 및/또는 동물 사료와 함께, 혹은 그것들과 별도로 하되 동시에 사용될 수 있다.

[33]

- [34] 또 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 상기와 같이 광범위한 나비목 해충에 우수한 살충 활성을 갖는 신규한 포토랍두스 템페라타 J7(수탁번호: KCTC12005BP) 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는 해충 방제용 조성물을 나비목 해충의 숙주식물에 살포하는 단계를 포함하는 나비목 해충의 방제방법을 제공한다.

- [35] 상기 숙주식물은 특별히 제한되지는 않으며, 배추, 양배추, 가지, 감, 복숭아, 오이, 결구상추(양상추), 딸기, 토마토, 파, 담배, 벼, 밤 등의 경제작물 이외에도 화훼 또는 특용작물 등의 나비목 유충의 숙주가 될 수 있는 식물을 말한다. 상기 조성물을 이들 표면이나 이들 식물이 성장하고 있는 토양에 처리할 수 있으며 또는 재배하여 수송 또는 저장 중인 과실이나 채소 표면에도 처리할 수 있다. 구체적인 일 양태에서, 본 발명의 해충의 방제방법은 살충제의 제형, 살충하고자 하는 해충의 종류, 살충 대상 개체, 장소 및 방법 등의 다양한 요인을 감안하여 본 발명의 살충제를 적용시키는 것을 포함한다.

[36]

- [37] 또다른 하나의 양태로서, 본 발명은 포토랍두스 템페라타 J7 균주(수탁번호: KCTC 12005BP) 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는 항균 조성물을 제공한다.

- [38] 본 발명의 상기 항균 조성물은 포유동물에 위해한 균에 대하여 항균 활성을 나타내며, 바람직하게 살모넬라 티피뮤리움(*Salmonella typhimurium*) 또는 마이크로코커스 루테우스(*Micrococcus luteus*)에 대하여 우수한 항균 활성을 나타낼 수 있다.

발명의 효과

- [39] 상기 상세히 설명한 바와 같이, 본 발명의 신규한 포토랍두스 템페라타 J7 균주는 해충에 대한 살충력과 유해균에 대한 항균력이 우수하므로, 상기 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 한 미생물 제제를 제조할 수 있으며, 이를 이용하여 다양한 작물에서 해충에 의한 피해를 효과적으로 방제 및 예방하는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

- [40] 도 1은 본 발명의 포토랍두스 템페라타 J7 균주의 16s rDNA 염기서열(1505bp)을 공지균주와 비교하여 계통발생학적 모식도로 나타낸 것이다.
- [41] 도 2는 본 발명의 포토랍두스 템페라타 J7 균주의 16s rDNA 염기서열 분석 결과이다.
- [42] 도 3은 본 발명의 포토랍두스 템페라타 J7 균주의 MacConkey agar에서의 콜로니(colony) 형태를 나타낸 것이다.
- [43] 도 4는 H₂O₂ 첨가에 따른 본 발명의 포토랍두스 템페라타 J7 균주의 카탈라아제 반응 결과를 나타낸 것이다.
- [44] 도 5는 본 발명의 포토랍두스 템페라타 J7 균주의 프로테아제 효소 활성(도 5a)와 리파아제 효소 활성(도 5b)을 확인한 결과를 나타낸 것이다. 프로테아제 활성 실험에서 E. coli DH5 α 는 negative control, B. subtilis 2232는 positive control로 사용하였으며, 도 5a에서 투명환의 생성은 skim milk를 분해하여 생긴 결과이다.
- [45] 도 6은 본 발명의 포토랍두스 템페라타 J7 균주의 지방산(fatty acids) 함량을 나타낸 것이다.
- [46] 도 7은 본 발명의 포토랍두스 템페라타 J7 균주의 antibiosis plate assay 결과로서 *Salmonella typhimurium* KCTC1926 (도 7a)과 *Micrococcus luteus* KACC 10488 (도 7b)에 대한 성장 저해능을 나타낸 것이다. KCTC1926과 KACC10488에 대한 성장저해 양성균(positive control)으로는 *Bacillus tequilensis* 23을 사용하였으며, 성장저해 음성균(negative control)로는 *Escherichia coli* DH5 α 를 사용하였다.
- [47] 도 8은 배양 온도에 따른 포토랍두스 템페라타 J7 균주의 성장 정도를 나타낸 것이며, 배양액 Tryptic soy broth 100ml에서 이틀 동안 배양시킨 후 측정하였다.
- [48] 도 9는 배양시간에 따른 포토랍두스 템페라타 J7 균주의 배양 상등액의 꿀벌부채명나방 유충에 대한 살충력을 나타낸 것이다.

[49]

발명의 실시를 위한 형태

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

[51]

[52] 실험재료 및 실험방법

[53]

[54] **1. 포토랍두스 템페라타 J7 균주의 분리 및 동정**

[55] 본 실시예에서는 곤충병원성 선충으로부터 살충 활성 또는 항균 활성을 갖는 미생물을 분리하기 위하여 전국에서 약 200여개의 토양시료를 수집하였으며, 토양시료로부터 분리한 선충들은 꿀벌부채명나방 유충에 baiting 시켜 곤충병원성선충을 분리하였다. 분리된 곤충병원성선충(*Heterorhabditidae* s p.)으로부터의 공생박테리아의 분리는 MacConkey agar와 NBTA(nutrient agar bromothymol blue triphenyltetrazolium chloride) 배지를 이용하였다. 분리된 공생박테리아의 동정(identification)을 위하여 genomic DNA를 분리하여 16s rDNA PCR 및 sequencing을 통하여 동정하였다.

[56] 상기 분리된 균주의 16S rDNA 염기서열의 분석을 위하여, 상기 균주의 TSB 배양액으로부터 균체를 회수한 다음, 회수한 균체로부터 genomic DNA를 추출하였다 (Thompson, 1980). 분리한 genomic DNA를 주형으로 사용하여 PCR(polymerase chain reaction) 방법에 의하여 16S rDNA를 증폭하였으며, 이 때 사용한 universal primer는 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')와 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')을 각각 사용하였다(Lane 1991). 증폭한 PCR 산물은 Gel Purification system (Solgent, Daejon, Korea)을 이용하여 정제하였다. 정제한 PCR 산물의 전체서열을 확인하기 위하여 T-Blunt PCR cloning kit (Solgent, Daejon, Korea)를 이용하여 클로닝하였으며, 전체 염기서열을 분석하기 위한 sequencing은 제노텍(Daejon, Korea)에 의뢰하여 실시하였으며, 전체 염기서열을 확보하기 위하여 16SF(5'-AATTAAACCACATGCTC-3') primer를 제작하여 사용하였다. 분석한 염기서열 결과는 NCBI의 BLASTN을 이용하여 비교하였으며, sequence의 상동성 및 phylogenetic tree는 Bioedit와 Mega2 program을 이용하여 비교분석하였다.

[57]

[58] **2. 균주의 형태적, 생화학적 특성**

[59] 균주의 형태적 특성은 TSB agar에서 48시간 배양한 균체를 Gram staining을 실시한 후 광학현미경을 이용하여 관찰하였으며, 균주의 생화학적 특성은 아래와 같이 조사하였다.

[60] ① Gram 음성 간균 - MacConkey agar에 streak 한 다음 분홍 또는 붉은 색의 콜로니를 형성하는 것을 그람음성 간균으로 판정하였으며, gram staining 후 광학현미경을 통하여 확인하였다. 대조군으로서 gram positive 균주로 *Bacillus subtilis* 2232 균주를 사용하였다.

[61] ② Catalase 활성 확인 - TSB agar plate에 키운 포토랍두스 템페라타 J7균주 표면에 3% (v/v) H₂O₂을 30ul씩 점적하여 표면의 기포생성 유무를 확인하였다. Catalase negative control로는 *Streptococcus agalactiae* ATCC13813을, positive control로는 *Escherichia coli* DH5α을 사용하였다.

[62] ③ Protease 활성 확인 - skim milk 를 10% (w/v) 함유한 고체배지에 포토랍두스

템페라타 J7 균주를 각각 접종하여 생성되는 투명환의 유무를 확인하였다. Protease positive 균주로는 *Bacillus subtilis* 2232를 사용하였으며, negative control로는 *Escherichia coli* DH5 α 를 사용하였다.

[63] ④ Lipase 활성 확인 - tween 20과 tween 80을 각각 1% (v/v)씩 함유한 LB agar 배지에 포토랍두스 템페라타 J7 균주를 접종하여 생성되는 투명환의 유무를 확인하였다. lipase positive 균주로는 *Bacillus subtilis* 2232를 사용하였으며, negative control로는 *Escherichia coli* DH5 α 를 사용하였다.

[64] ⑤ Pigmentation - TSB agar 배지에서 자란 균주의 색상을 확인하였다.

[65] ⑥ 지방산 분석 - 포토랍두스 템페라타 J7 균주의 지방산 성분 및 함량을 조사하기 위하여 tube에 reagent 1을 1ml 넣은 후 TSB agar 배지에서 배양한 각각의 균주를 40 loops 정도 넣고 vortex하였다. 100°C에서 5분간 반응한 다음 다시 vortex하여 100°C에서 25분간 반응하였다. 반응액을 냉각시킨 다음 reagent 2를 2ml 넣어 섞어준 뒤 80°C 항온수조에서 10분간 반응하였다. 반응액을 다시 냉각시킨 후 reagent 3을 1.25ml 첨가하여 orbital shaker를 이용하여 10분간 교반하였다. 교반 후 층의 분리가 완전히 일어나도록 정치하여 둔다. 상층액을 Pasteur pipette을 이용하여 새로운 tube으로 옮긴 후 reagent 4를 3ml 넣고 교반시킨 뒤 reagent 5를 5ml 넣어 다시 교반시킨다. 상층액은 Pasteur pipette을 이용하여 GC용 vial에 넣는다. 지방산 측정은 HP 6890 Gas Chromatograph를 사용하였으며, ultra2 capillary column을 사용하여 carrier gas로 H₂를 0.4ml/min의 유속으로 흘려주었고 column의 초기온도는 170°C에서 260°C까지 분당 5°C의 속도로 상승시켰다. Detector는 FID를 사용하였으며, 지방산 성분 및 함량의 분석은 MIS Sherlock software를 이용하여 분석하였다.

[66]

[67] 3. Antibiosis plate assays

[68] Antibiosis assays는 *Salmonella typhimurium* KCTC 1926 (세균성설사), *Salmonella choleraesuis* KCTC 2929 (유행성설사), *Escherichia coli* KCCM 11234 (가금류의 대장균증), *Streptococcus agalactiae* ATCC 13813(젖소유방염)과 *Micrococcus luteus* KACC 10488 에 대하여 실시하였다. 먼저, 상기 5종의 위해균을 각각 5ml의 TSB 에 배양한 다음 TSB agar plate에 수 차례 교차 streak 한 다음, 포토랍두스 템페라타 J7 균주의 배양액을 TSB agar plate에 일정 간격을 두어 각각 spotting 하여 28°C에서 1-2일간 배양하였다. negative control로는 *E. coli* DH5 α 를 사용하였으며, positive control 균주로는 본 실험실에서 각각의 균주에 대한 길항력을 가지는 *Pseudomonas putida* 93-16(KCCM 11234에 대한 길항균), 55-30(ATCC13813에 대한 길항균), 3과 *Bacillus tequilensis* 23(KCTC1926 및 KCTC2929에 대한 길항균) 균주를 분리하여 각각 사용하였다. 저해능은 생성되는 투명환의 크기로 확인하였다.

[69]

[70] 4. 배양온도 및 배지조건에 따른 균주의 성장 확인(Determination of growth

threshold temperature for *Photorhabdus temperata* J7)

- [71] 포토랍두스 템페라타 J7 균주의 성장에 영향을 미치는 온도를 확인하기 위하여, 배양온도는 28°C, 30°C, 34°C, 35°C, 36°C로 각각 하였으며, 배지는 TSB 을 각각 사용하였으며 5일간 배양하였다.

[72]

[73] **5. Bioassay**

- [74] 포토랍두스 템페라타 J7 균주 배양액의 살충성을 확인하기 위하여 배양시간별로 확보한 배양상등액을 꿀벌부채명나방 유충(5령 이상)의 혈체강 내로 3 μ l씩 주사하여 살충성 여부를 확인하였다. 실험은 3회 반복하여 실시하였으며, 유충은 각각 10마리씩 사용하였다.

[75]

[76] **실험결과**

[77]

[78] **1. 포토랍두스 템페라타 J7 균주의 16S rRNA gene의 확보 및 서열확인**

- [79] 16S rRNA gene sequencing 결과, Photorhabdus type strain과의 16S rRNA gene 서열 비교를 통해 neighbor-joining methods을 사용하여 작성한 계통발생학적 모식도(phylogenetic tree)는 도 1과 같다. NCBI의 Blastn search 결과, 기존에 보고된 포토랍두스 템페라타(*Photorhabdus temperata*)와 99%의 상동성을 나타내었다. 그러나 완전히 동일하지 않았기 때문에 상기 종에 속하는 신규한 균주임을 확인할 수 있었다. 또한 상기 균주의 16S rRNA gene 서열을 NCBI의 GenBank에 등록하였으며 (GenBank accession number: HQ 659754), 상기 균주를 포토랍두스 템페라타 J7로 명명하고, 국립농업과학원 농업유전자원센터에 2011년 1월 4일에 수탁번호 KACC 91627P로 기탁하였으며, 국제 기탁 기관에 2011년 8월 23일자로 수탁번호 KCTC 12005BP로 기탁하였다.

[80]

[81] **2. 포토랍두스 템페라타 J7 균주의 형태적, 생화학적 특성**

- [82] ① 포토랍두스 템페라타 J7 균주는 MacConkey agar에서 분홍 또는 옅은 붉은색의 콜로니를 나타내었으며, gram staining 결과 gram 음성 간균으로 나타났다.

[83] **② Catalase test**

- [84] TSB agar plate위에 자란 포토랍두스 템페라타 J7의 표면에 H₂O₂를 가한 결과 기포생성이 관찰되어 catalase 양성임을 확인하였다. 그 결과를 도 4에 나타내었다. Catalase test에서는 negative 와 positive control로 각각 *Streptococcus agalactiae* ATCC13813와 *Escherichia coli* DH5 α 를 사용하였다.

- [85] ③ Protease 활성 확인 - 포토랍두스 템페라타 J7 균주는 skim milk 함유 배지에서 clear zone을 형성하였으며, protease 활성을 확인하였다. 그 결과를 도 5a에 나타내었으며, negative control으로 *E. coli* DH5 α 를 사용하였다.

- [86] ④ lipase 활성 확인 - 포토랍두스 템페라타 J7 균주는 tween 20과 tween 80을

함유한 LB agar 배지에서 투명환을 생성하였다. 그 결과를 도 5b에 나타내었으며, negative control으로 *E. coli* DH5 α 를 사용하였다.

[87] ⑤ Pigmentation - 포토랍두스 템페라타 J7 균주가 나타내는 고유의 색상을 TSB agar에서 2일간 배양하여 관찰한 결과, 어두운 오렌지색(dark-orange)으로 나타났다.

[88] ⑥ 지방산 분석

[89] 포토랍두스 템페라타 J7 균주의 지방산 함량을 분석하여 하기 표 1 및 도 6에 나타내었다. 상기 지방산 함량은 Sherlock MIDI system을 제조사의 매뉴얼대로 사용하여 분석하였다.

[90]

[91] 표 1

Fatty acids	Composition(%) among total fatty acids <i>Photorhabdus temperata</i> strain
	J7
12:0	3.13
13:0 ISO	3.11
14:0	8.94
15:1 ISO F	2.65
15:0 ISO	16.34
15:0 ANTEISO	2.28
16:0	15.47
15:0 ISO 30H	1.17
ISO 17:1 w9c	5.72
17:0 ISO	3.52
17:0 CYCLO	4.29
18:1 w7c	6.31
18:0	0.46
20:4 w6, 9, 12, 15c	0.47

[92] **3. Antibiotic production assay**

[93] 본 발명의 분리균주인 포토랍두스 템페라타 J7 균주의 항균효과를 확인하기 위하여 위해미생물인 *Salmonella typhimurium* KCTC 1926, *Salmonella choleraesuis* KCTC 2929, *Escherichia coli* KCCM 11234, *Streptococcus agalactiae* ATCC 13813과 *Micrococcus luteus* KACC 10488를 사용하였으며, 각각의 위해미생물과

대치 배양한 결과, 살모넬라 티피뮤리움(*Salmonella typhimurium*)와 마이크로코커스 루테우스(*Micrococcus luteus*)에 대한 저해효과를 확인할 수 있었다. 저해능은 대치배양한 각각의 plate에 생성되는 투명환의 크기로 확인하였으며, 그 결과는 도 7과 같다. 도 7에서와 같이 항균활성이 없는 대장균(*E. coli* DH5a)의 경우는 *S. typhimurium*과 *M. luteus*에 대한 투명환이 생성되는 않으므로 성장저해능이 없다는 것이며, 또한 이 두 세균에 대한 성장 저해 물질, 즉 항균물질을 만들어내는 J7 균주와 positive control의 경우는 성장저해능으로 인하여 투명환이 형성됨을 알 수 있으며, 투명환의 크기에 따라 그 균주의 항균활성능도 알 수 있다.

[94]

[95] **4. 배양온도 및 배지조건에 따른 균주의 성장**

[96] 포토랍두스 템페라타 J7 균주는 배양온도 28°C와 30°C에서는 성장이 활발하였으나 배양온도가 높아짐에 따라 성장이 저해되는 것으로 나타났으며, 35°C이상에서는 성장이 나타나지 않았다 (도 8 참조).

[97]

[98] **5. 꿀벌부채명나방 유충에 대한 살충력**[99] 포토랍두스 템페라타 J7 균주의 배양시간에 따른 배양 상등액의 꿀벌부채명나방(*Galleria mellonella*) 유충에 대한 살충력을 도 9에 나타내었다. 도 9에서 보듯이, 대수증식기후반(배양 3 - 4일)의 배양 상등액에서는 80 - 100%의 높은 살충력을 나타내었다.

[100]

산업상 이용가능성

[101] 본 발명의 신규한 포토랍두스 템페라타 J7 균주는 해충에 대한 살충력과 유해균에 대한 항균력이 우수하므로 이를 이용하여 다양한 작물에서 해충에 의한 피해를 효과적으로 방제 및 예방할 수 있다.

[102]

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

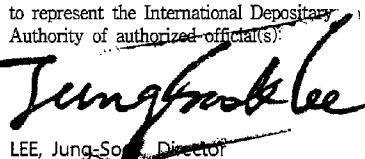
INTERNATIONAL FORM

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT

issued pursuant to Rule 7.1

TO : **SHIN, Jae-Ho**

School of Applied Biosciences, Kyungpook National University
1370 Sankyuk 3-dong, Buk-gu, Daegu 702-701
Republic of Korea

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification reference given by the DEPOSITOR: <i>Photorhabdus temperata</i> J7	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: KCTC 12005BP
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION	
The microorganism identified under I above was accompanied by: ☒ a scientific description ☐ a proposed taxonomic designation (Mark with a cross where applicable)	
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I above, which was received by it on August 23, 2011 .	
IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION	
The microorganism identified under I above was received by this International Depositary Authority on _____ and a request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on _____	
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name: Korean Collection for Type Cultures Address: Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB) 111 Gwahangno, Yuseong-gu, Daejeon 305-806 Republic of Korea	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority of authorized official(s):  LEE, Jung-Sook, Director Date: August 31, 2011

번역문

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

원기탁에 대한 수탁증

To : 신 재 호

대구광역시 북구 산격3동 1370번지 경북대학교 응용생명과학부

1. 미생물의 특징	
기탁자가 부여한 특정표시 포토랍두스 템페라타 J7	국제기탁기관이 부여한 수탁번호 KCTC 12005BP
2. 과학적 성질 및/또는 분류학상위치	
1.로 특징된 미생물은 [X] 과학적 성질 [] 분류학상 위치로 기재하였다(적용되는 부분에 표시한다)	
3. 수탁	
국제기관은 1로 특정되는 미생물을 2011년 8월 23일에 수탁하였다	
4. 수탁전환의 청구	
1로 특정된 미생물은 국제기탁기관 _____ 에 수탁되었고, 동 미생물에 대한 원기탁을 부다페스트 조약에 의한 기탁으로 전환 청구가 접수되었다	
5. 국제기탁기관	
명칭: 한국생명공학연구소 유전자은행 (KCTC) 주소: 대한민국 대전시 유성구 과학로111 한국생명공학연구원(KRIBB) (305-806)	국제 기탁 기관을 대표할 권한이 있는 자의 서명 담당자: 이 정 석 날짜: 2011.08.31

청구범위

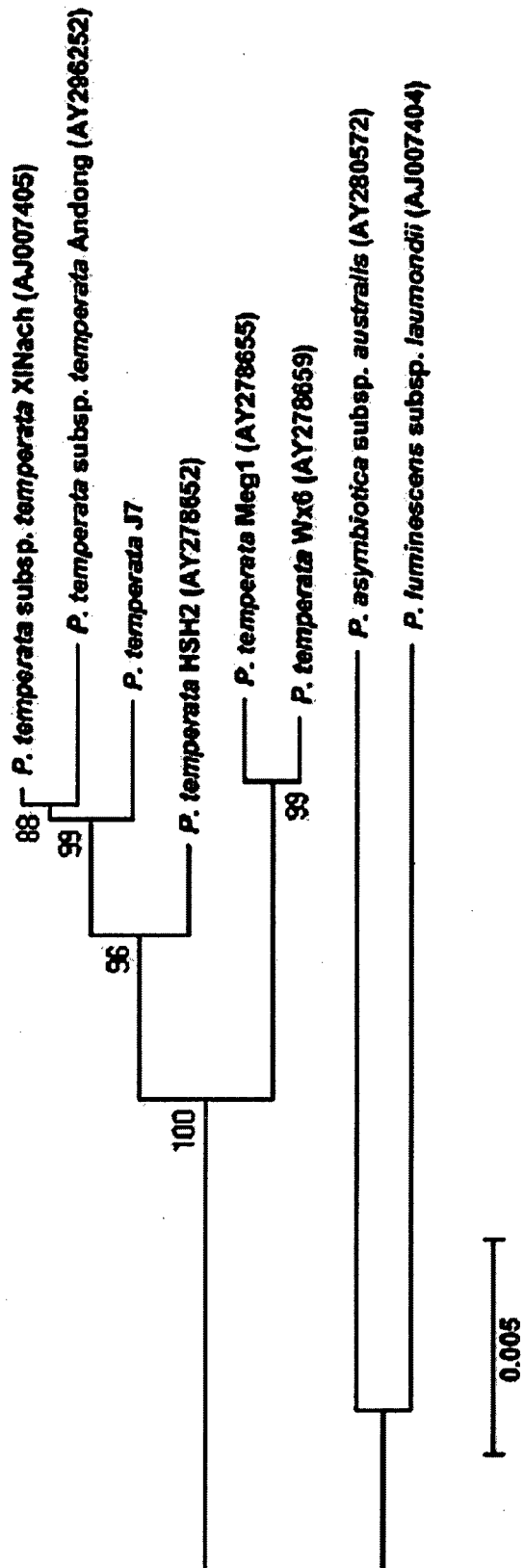
- [청구항 1] 곤충병원성 선충으로부터 분리된, 살충 활성과 항균 활성을 갖는 포토랍두스 템페라타 J7(수탁번호: KCTC 12005BP).
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 나비목 해충에 대해 살충 활성을 갖는 균주.
- [청구항 3] 제2항에 있어서, 상기 나비목 해충은 꿀벌부채명나방(*Galleria mellonella*), 배추좀나방(*Plutella xylostella*), 담배거세미나방(*Spodoptera litura*), 털빨가지나방(*Alcis angulifera*), 애모무늬잎말이나방(*Adoxophyes orana*), 감나무잎말이나방(*Ptycholoma lecheana*), 밤애기잎말이나방(*Cydia Kurokoi*), 복숭아순나방(*Grapholita molesta*), 은무늬굴나방(*Lyonetia prunifoliella*), 복숭아심식나방(*Carposina sasakii*), 파밤나방(*Spodoptera exigua*), 목화바둑나방(*Diaphania indica*), 흑명나방(*Cnaphalocrocis medinalis*), 이화명나방(*Chilo suppressalis*), 및 왕담배나방(*Helicoverpa armigera*)으로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 균주.
- [청구항 4] 제1항에 있어서, 살모넬라 티피뮤리움(*Salmonella typhimurium*) 또는 마이크로코커스 루테우스(*Micrococcus luteus*)에 대한 항균 활성을 갖는 균주.
- [청구항 5] 제1항의 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는 해충 방제용 조성물.
- [청구항 6] 제5항에 있어서, 상기 해충은 나비목 해충인 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 7] 제6항에 있어서, 상기 나비목 해충은 꿀벌부채명나방(*Galleria mellonella*), 배추좀나방(*Plutella xylostella*), 담배거세미나방(*Spodoptera litura*), 털빨가지나방(*Alcis angulifera*), 애모무늬잎말이나방(*Adoxophyes orana*), 감나무잎말이나방(*Ptycholoma lecheana*), 밤애기잎말이나방(*Cydia Kurokoi*), 복숭아순나방(*Grapholita molesta*), 은무늬굴나방(*Lyonetia prunifoliella*), 복숭아심식나방(*Carposina sasakii*), 파밤나방(*Spodoptera exigua*), 목화바둑나방(*Diaphania indica*), 흑명나방(*Cnaphalocrocis medinalis*), 이화명나방(*Chilo suppressalis*), 및 왕담배나방(*Helicoverpa armigera*)으로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 조성물.
- [청구항 8] 제1항의 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는 항균 조성물.
- [청구항 9] 제8항에 있어서, 살모넬라 티피뮤리움(*Salmonella typhimurium*) 또는 마이크로코커스 루테우스(*Micrococcus luteus*)에 대한 항균

[청구항 10]

활성을 갖는 것을 특징으로 하는 항균 조성물.

제5항의 조성물을 나비목 해충의 숙주식물에 살포하는 단계를 포함하는, 나비목 해충의 방제방법.

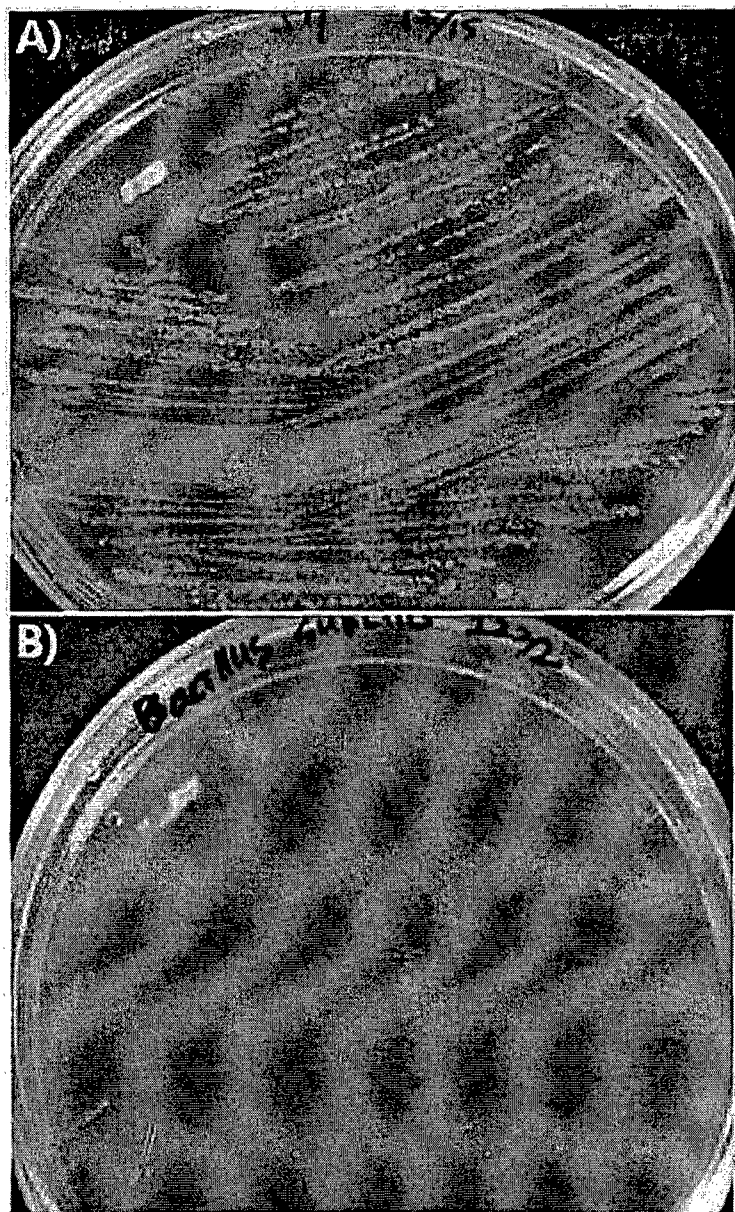
[Fig. 1]



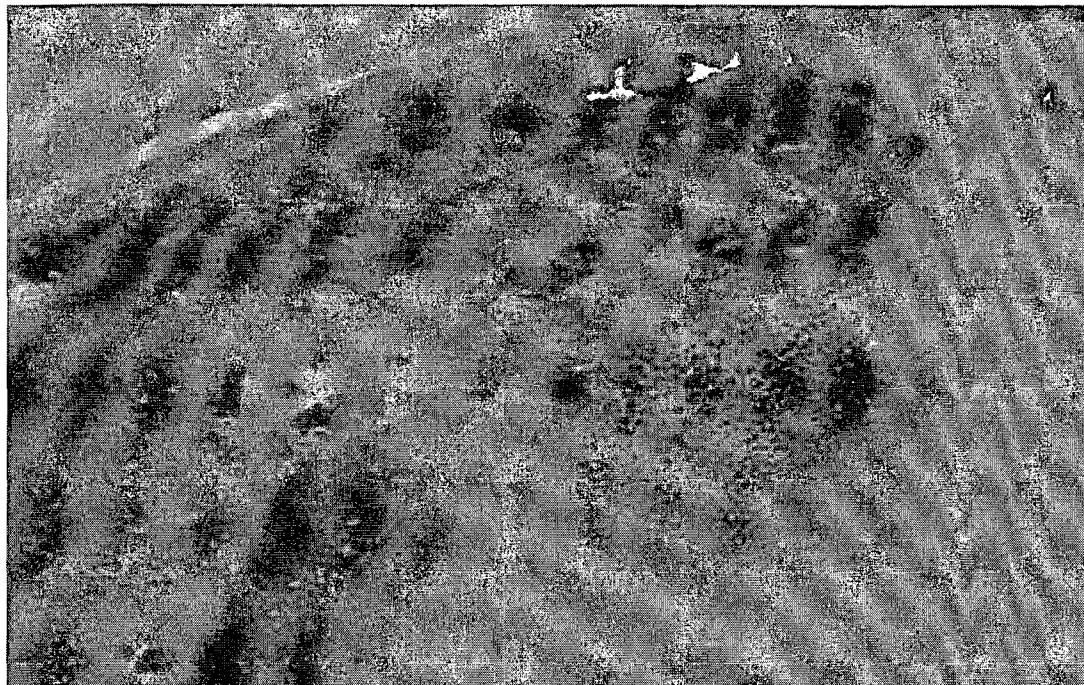
[Fig. 2]

1	ggctaacttg	ttacgacttc	acccagtgca	tgaatcacaa	agtgggtcagc	gcoctcccaa
61	aggttaagct	acgactttct	tttgcaaac	actoccatgg	tgtgacgggc	gggtgtgtaca
121	aggcooogga	acgtattcac	cgtagcattc	tgatctaoga	ttactagoga	ttcoagacttc
181	atggagtoga	gttgcaagact	ccaatcoogga	ctacgacaga	cittatgtgt	tcogcttgct
241	ctcogaggt	cgcttcaact	tgtatcoogc	attgtagcac	gtgtgtagcc	ctactogtaa
301	gggccaatgat	gacttgagct	catcccccacc	ttcctccggt	ttatcacogg	cagttctcctt
361	tgagttcoog	ccattaaogc	ctggcaacaa	aggataaggg	ttgogctogt	tgogggactt
421	aacccaacat	ttcacaacac	gagctgaoga	cagccatgca	gcaactgtct	cagagctcgc
481	gaaggcacaa	ccacatctct	gtggtcttct	ctggatgtca	agagtaggta	aggttctctcg
541	ogttgcacog	aattaaoca	catgctocac	ogcttgtgog	ggcooooocto	aattoatttg
601	agtttttaacc	ttgoggcogt	actcoocagg	oggtogattt	aacgogttag	ctcooggaagc
661	cactootcta	gggaacaaac	tocaaatoga	catogtttac	ogogtggaot	acacgggttat
721	ctaatoctgt	ttgctococa	ogctttogca	coctgagogto	agtottogto	caggggggcoo
781	octtogocac	oggtattcoct	ccacatctct	aogcatttca	coogtacaca	tggaaattcta
841	cccooctcta	ogagactcta	gcaaacccagt	cttagatgoc	gttccacagt	taagcccggg
901	gatttcacat	ctaacttaat	tgaacogctg	ogtgcgcttt	aogccacgtc	attcoagatta
961	acgcttgcac	cctcogtatt	acogcggctg	ctggcacogga	gttagccoggt	gcttcttctbg
1021	cggttaaozt	caaaaattcaa	coctgttcag	gctaacaocot	tcctccocgc	tgaagtagct
1081	ttacaacocg	aaggcoottct	tcatacaogc	ggcatggctg	catcaggctt	gogoccatbg
1141	tgoaatatto	ccactbgctg	coctcoogtag	gagtotgggc	ogtgtotoag	toocagtgctg
1201	gctggtoato	ctctcagaco	agotagggat	ogtogoctog	gtaggcoatt	acootaacoga
1261	ctagotaaao	ccatctbggt	tcatoogogg	gogtgaggco	ctttcaggtc	coocactttg
1321	gtctbtogac	attatgoggt	attagocacc	gtttccagtg	gttatccccc	gcoctogggc
1381	agatccccag	acattactca	ccogtcoogc	gctogtcagc	aaaaatgcaa	gcactttcct
1441	gttacoogctc	gacttgcatg	tgttaggctt	gcgcgcagcg	ttcaatctga	gcacbtgata
1501	aactc					

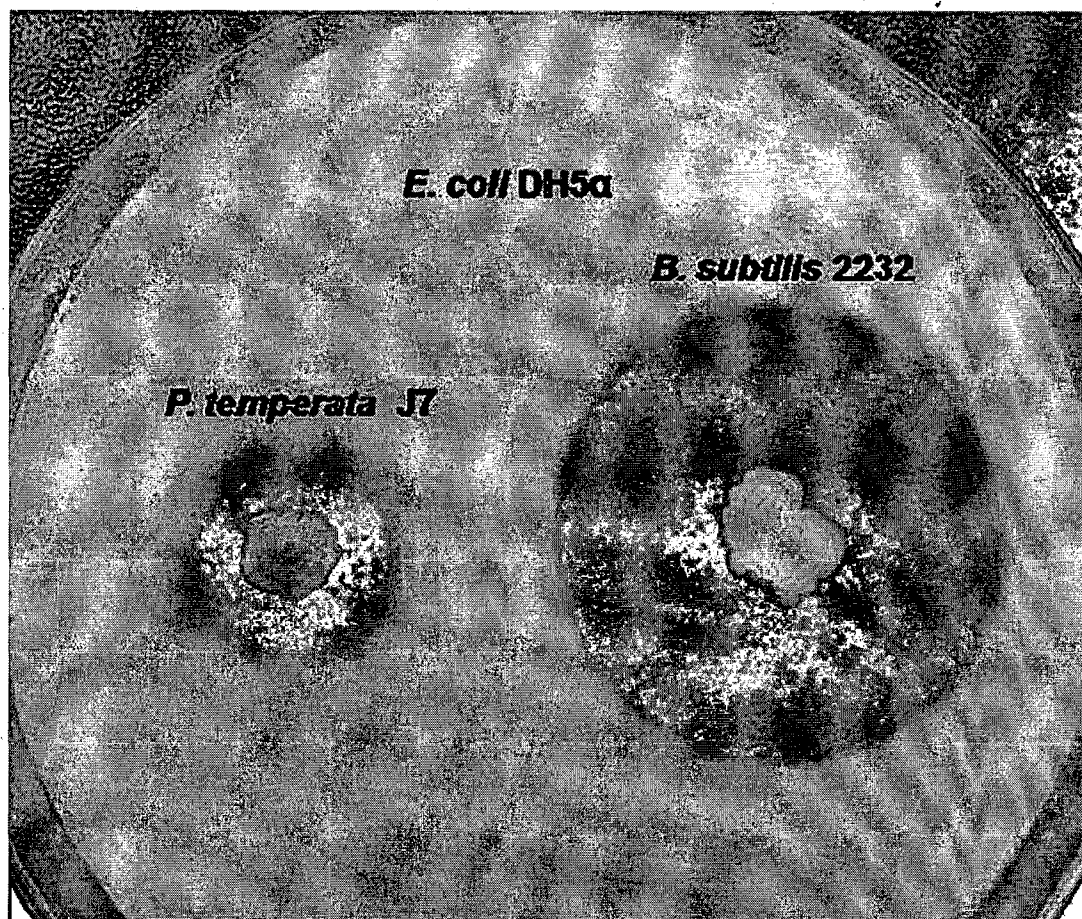
[Fig. 3]



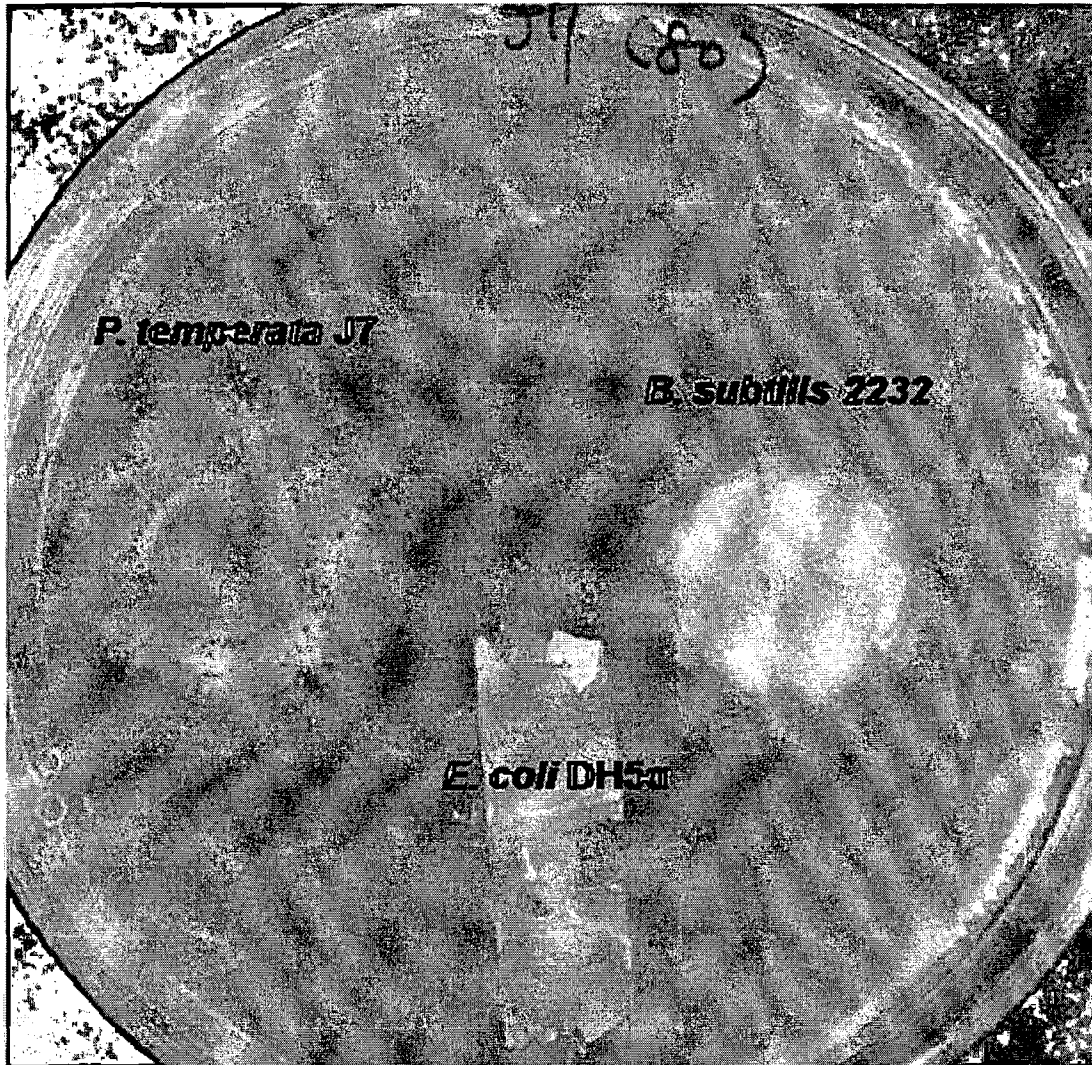
[Fig. 4]



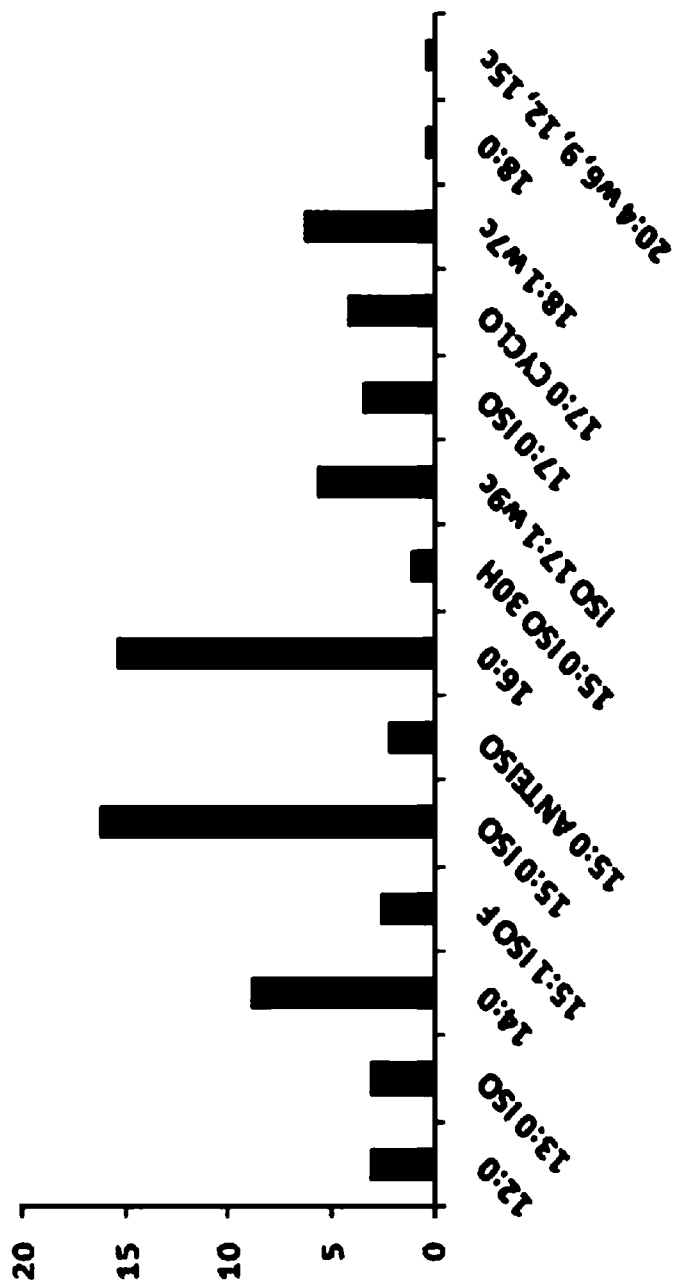
[Fig. 5a]



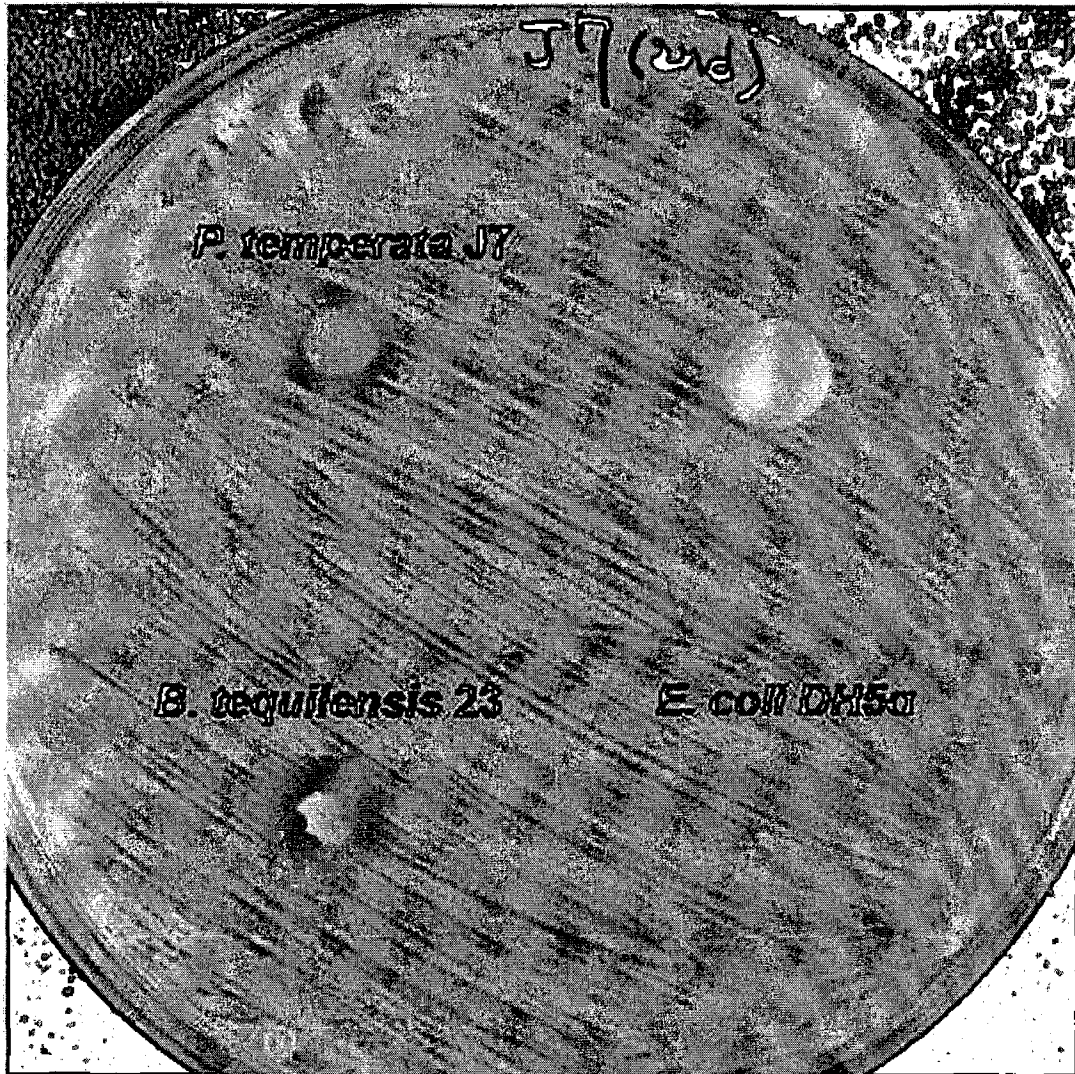
[Fig. 5b]



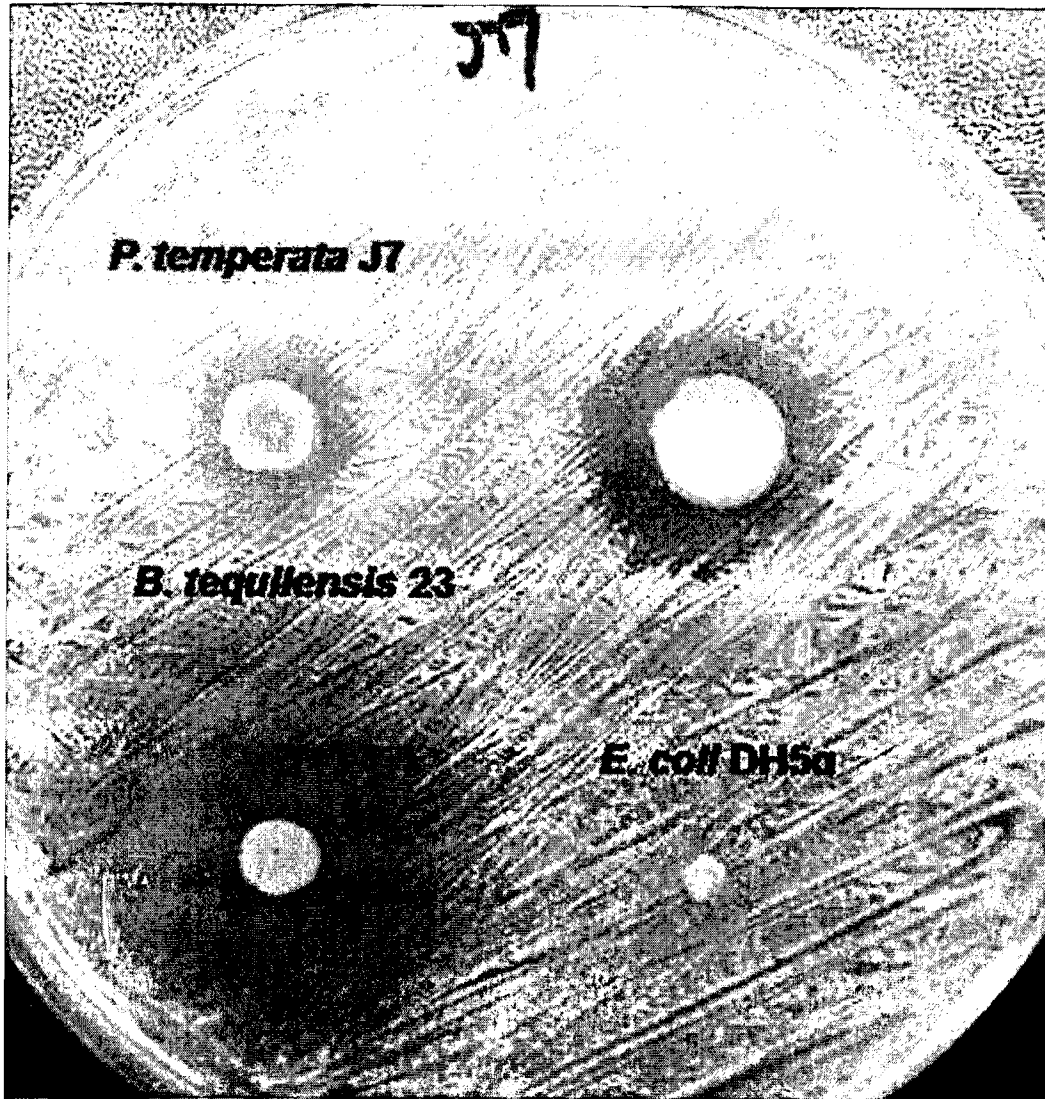
[Fig. 6]



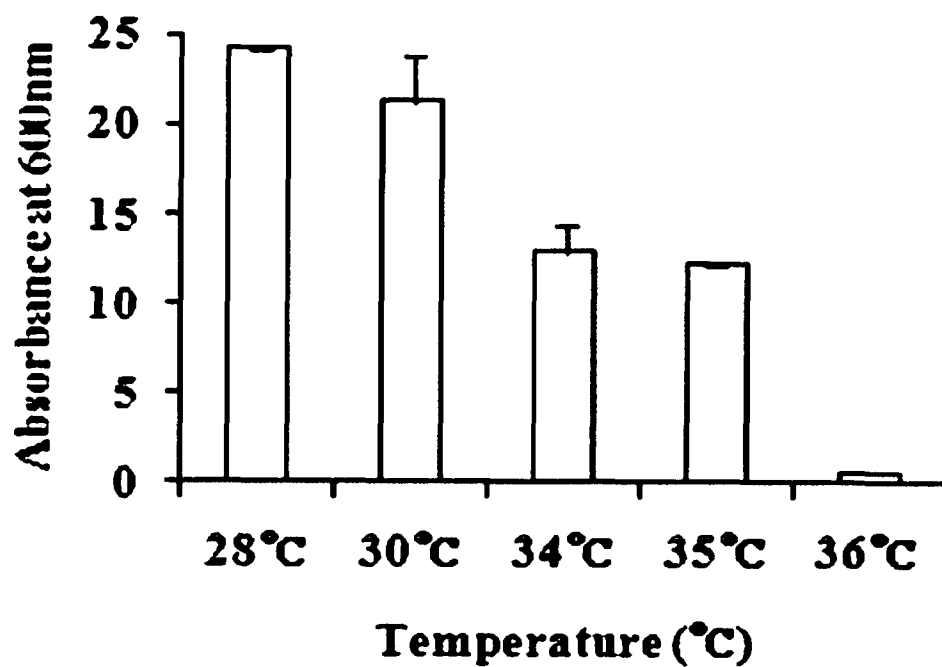
[Fig. 7a]



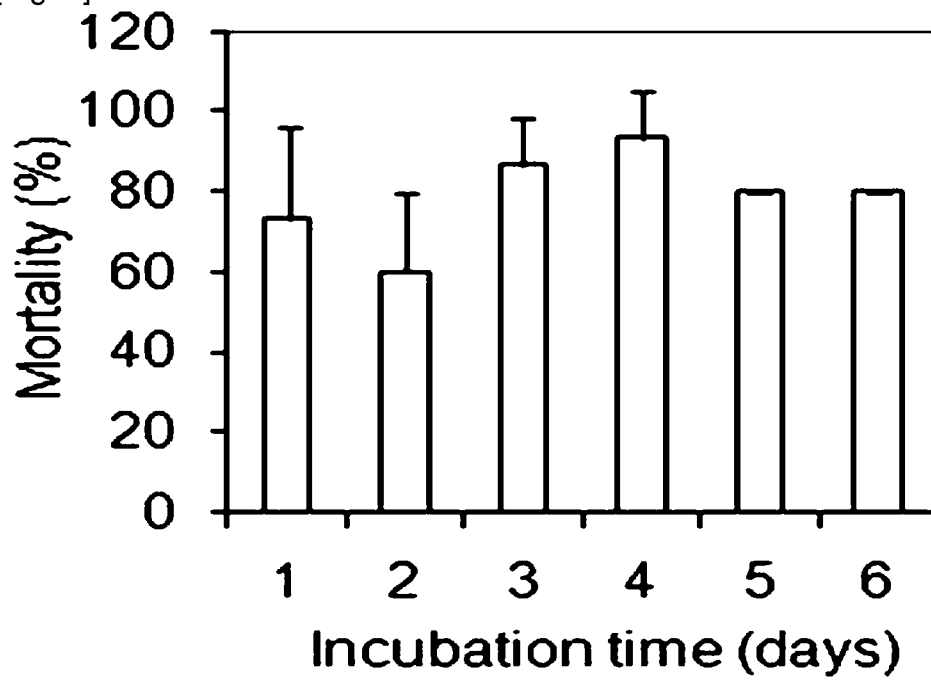
[Fig. 7b]



[Fig. 8]



[Fig. 9]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2011/006981**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER*****C12N 1/20(2006.01)i, A01N 63/02(2006.01)i***

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N 1/20

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

Korean Utility models and applications for Utility models: 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), Google & PubMed

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SHRESTHA, YAM KUMAR et al. , "Oral toxicity of symbiotic bacteria <i>Photorhabdus</i> spp. against immature stages of insects", Journal of Asia-Pacific Entomology, Epub 29 October 2010, Vol. 14, pages 127-130	1-7,10
A	See abstract; tables 1, 2; page 128 left column; page 130 left column.	8,9
X	KR 10-0522667 B1 (KIM, YONG GYUN et al.) 20 October 2005 See abstract; table 10.	1-10
X	Samyeol Seo et al., "Comparative Analysis of Immunosuppressive Metabolites Synthesized by an Entomopathogenic Bacterium, <i>Photorhabdus temperata</i> ssp. <i>temperata</i> , to Select Economic Bacterial Culture Media", Han Eung Gon Ji., 2010, Vol. 49, No. 4, pages 09-416	1-7,10
A	See abstract.	8,9
X	Jang Eun-Kyung et al., "Insecticidal Toxin and Research Trends of <i>Photorhabdus</i> , Entomopathogenic Bacteria.", Kor. J. Microbiol. Biotechnol., 2010, Vol. 38, No. 2, pages 117-123	1-7,10
A	See page 120 left column; figure 4.	8,9



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

20 APRIL 2012 (20.04.2012)

Date of mailing of the international search report

23 APRIL 2012 (23.04.2012)

Name and mailing address of the ISA/KR



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

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2011/006981

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	Jang Eun-kyung, "Molecular biological characterization of the toxin complexes and their insecticidal activity of the symbiotic bacteria <i>Photorhabdus temperata</i> M1021 isolated from an entomopathogenic nematode", thesis of D.Agr. in Kyungpook National University, June 2011 See pages 25, 52-70	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2011/006981

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-0522667 B1	20.10.2005	KR 10-2004-0104872 A	13.12.2004

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) <i>C12N 1/20(2006.01)i, A01N 63/02(2006.01)i</i>		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C12N 1/20 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템), Google & PubMed		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	SHRESTHA, YAM KUMAR 외 5명, 'Oral toxicity of symbiotic bacteria Photorhabdus spp. against immature stages of insects', Journal of Asia-Pacific Entomology, Epub 2010년 10월 29일, 14권, 127-130 페이지	1-7,10
A	초록; 표 1, 2; 128 페이지 왼쪽 컬럼; 130 페이지 왼쪽 컬럼 참조.	8,9
X	KR 10-0522667 B1 (김용균 외 1인) 2005년 10월 20일 초록; 표 10 참조.	1-10
X	서삼열 외 3명, '곤충병원세균(Photorhabdus temperata ssp. temperata) 유래 곤충 면역 억제물질 생성 비교 연구를 통한 저렴한 세균 배지 선발', 한용곤지, 2010년, 49권, 4호, 409-416 페이지	1-7,10
A	초록 참조.	8,9
X	장은경 외 1명, '곤충살충성 세균 Photorhabdus의 Insecticidal Toxin과 연구동향', Kor. J. Microbiol. Biotechnol., 2010년, 38권, 2호, 117-123 페이지	1-7,10
A	120 페이지 왼쪽 컬럼; 도 4 참조.	8,9
☒ 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 2012년 04월 20일 (20.04.2012)	국제조사보고서 발송일 2012년 04월 23일 (23.04.2012)	
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (302-701) 대전광역시 서구 청사로 189, 정부대전청사 팩스 번호 82-42-472-7140	심사관 박정민 전화번호 82-42-481-8291 	

C (계속). 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
PX	장은경, ‘곤충병원성 선충에서 분리한 공생세균 <i>Photorhabdus temperata</i> M1021의 살충성과 그 독소 복합체에 대한 분자생물학적 특성’, 경북대학교 농학박사 학위 논문, 2011년 6월 25, 52-70 페이지 참조.	1-10

국제조사보고서에서
인용된 특허문헌

공개일

대응특허문헌

공개일

KR 10-0522667 B1

2005. 10. 20

KR 10-2004-0104872 A

2004. 12. 13