

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2016년 12월 29일 (29.12.2016)



(10) 국제공개번호
WO 2016/208861 A1

- (51) 국제특허분류:
C12N 1/20 (2006.01) A01N 63/00 (2006.01)
C12R 1/465 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2016/004077
- (22) 국제출원일: 2016년 4월 20일 (20.04.2016)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2015-0088836 2015년 6월 23일 (23.06.2015) KR
- (71) 출원인: 경상대학교산학협력단 (INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY) [KR/KR]; 52828 경상남도 진주시 진주대로 501, Gyeongsangnam-do (KR).
- (72) 발명자: 광연식 (KWAK, Youn-Sig); 52667 경상남도 진주시 진주대로 1317, 110 동 901 호, Gyeongsangnam-do (KR). 김다란 (KIM, Da-Ran); 53045 경상남도 통영시 무전2길 36, 309 호, Gyeongsangnam-do (KR).
- (74) 대리인: 최규환 (CHOI, Kyu Whan); 35209 대전시 서구 한밭대로 745, 12층 그린국제특허법률사무소, Daejeon (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, BN, 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, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, 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.

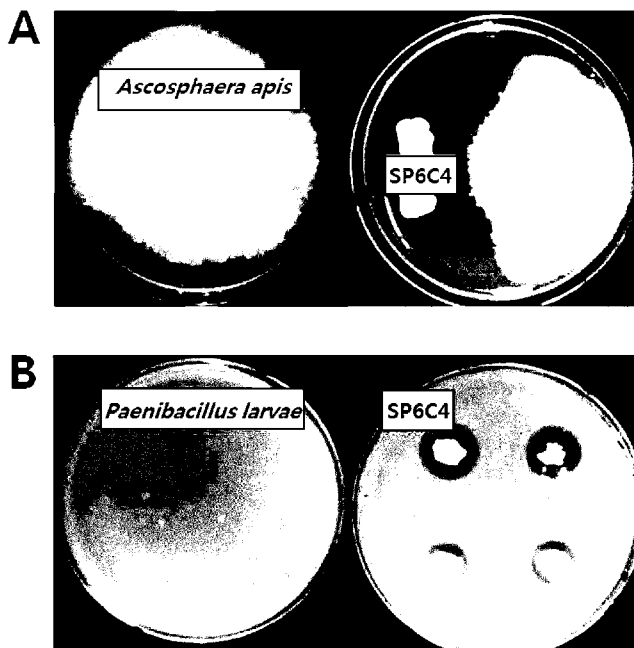
(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, 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 제 21 조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(54) Title: *STREPTOMYCES BADIUS* SP6C4 STRAIN ISOLATED FROM STRAWBERRY POLLEN AND HAVING ANTI-BACTERIAL ACTIVITY AGAINST INSECT PATHOGENS OR STRAWBERRY FUNGAL PATHOGENS, AND USE THERE-OF

(54) 발명의 명칭 : 딸기 화분으로부터 분리한 곤충병원균 또는 딸기 진균병 병원균에 대해 항균활성을 갖는 스트렙토마이세스 바디우스 SP6C4 균주 및 이의 용도



(57) Abstract: The present invention relates to a *Streptomyces badius* SP6C4 strain isolated from strawberry pollen and having an antibacterial activity against insect pathogens, and a use thereof. In the present invention, it was verified that the *Streptomyces badius* SP6C4 strain isolated from strawberry pollen inhibited the growth of insect pathogens and strawberry fungal pathogens. The *Streptomyces badius* SP6C4 strain of the present invention can be used as an eco-friendly biological pesticide, which has no risk of environmental contamination occurring due to side effects of pesticides and toxicity to the human body due to residual pesticides, and has an excellent control effect against American foulbrood, chalk brood, and strawberry blossom mold, and thus can be industrially very favorably used.

(57) 요약서: 본 발명은 딸기 화분으로부터 분리한 곤충 병원균에 대해 항균활성을 갖는 스트렙토마이세스 바디우스 SP6C4 균주 및 이의 용도에 관한 것으로, 본 발명에서는 딸기 화분으로부터 분리된 스트렙토마이세스 바디우스(*Streptomyces badius*) SP6C4 균주가 곤충병원균 및 딸기 진균병 병원균의 성장을 억제시키는 것을 확인하였다. 본 발명의 스트렙토마이세스 바디우스 SP6C4 균주는 농약의 부작용으로 발생하는 환경 오염 및 잔류 농약으로 인한 인체 독성의 위험성이 없는 친환경적인 생물 농약으로 사용될 수 있으며, 미국부저병, 백목병 및 딸기 꽃곰팡이병에 대한 방제 효과가 뛰어나므로, 산업적으로

매우 유용하게 이용될 수 있을 것이다.

WO 2016/208861 A1

명세서

발명의 명칭: 딸기 화분으로부터 분리한 곤충병원균 또는 딸기 진균병 병원균에 대해 항균활성을 갖는 스트렙토마이세스 바디우스 SP6C4 균주 및 이의 용도

기술분야

- [1] 본 발명은 딸기 화분으로부터 분리한 곤충병원균 또는 딸기 진균병 병원균에 대해 항균활성을 갖는 스트렙토마이세스 바디우스 SP6C4 균주 및 이의 용도에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 곤충병원균 또는 딸기 진균병 병원균에 대해 항균활성을 가지는 스트렙토마이세스 바디우스(*Streptomyces badius*) SP6C4 균주, 상기 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는 곤충병 또는 딸기 진균병 방제용 조성물, 상기 균주를 배양하는 단계를 포함하는 곤충병 또는 딸기 진균병 방제용 조성물의 제조 방법 및 상기 균주 또는 이의 배양액의 유효량을 곤충병원균 감염 지역, 식물 또는 토양에 처리하는 단계를 포함하는 곤충병 또는 딸기 진균병을 방제하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 꿀벌의 미국부저병(afb : American foul brood)은 꿀벌의 질병 중 가장 전염성이 강하고 피해가 심한 질병이다. 국내에서도 1950년대 이래 전국에서 지속적으로 발생하고 있다. 감염된 유충은 500만개 이상의 숙주를 만들어 2차 전염원이 되며, 포자가 내열성 및 내화학성이 강해 같은 장소에서 매년 연속적으로 발생하기도 한다. 부저병의 원인 세균은 그람양성의 간균($2.5\sim 5.0\mu\text{m}\times 0.7\sim 0.8\mu\text{m}$)인 패니바실러스 라바에(*Paenibacillus larvae*)이다. 편모에 의한 운동성이 있고, 내생포자를 만들기 때문에 열에 강하고 항생제에 저항성이 강하며, 건조상태에서 수십 년간 병원성을 보유한다. 포자가 유충의 입을 통하여 중장에서 발아하여 증식하며, 증식된 세균은 혈액을 통하여 온몸으로 퍼져 유충을 죽게 만들며, 부저병에 심각하게 감염되면 양봉장 전체가 삼시간에 전멸하는 경우도 있다. 꿀벌의 부저병에 대한 예방과 치료에 관해서는 많은 연구가 있었으나 아직 완전예방과 구제는 수립되어 있지 못하고 있다. 같은 양봉장 안에서는 벌통 간에 소비의 교환이 자주 있으므로 이 질병을 조기 진단하지 못할 경우, 소비의 교환이 되풀이되어 순식간에 전체 봉군에 병의 감염을 초래하게 되기 때문에, 선진국에서도 발병된 봉군은 소각하여 버리는 경우도 빈번하다.
- [3] 꿀벌의 백묵병(Chalk brood)은 벌통 내의 유충에 침입하여 유충을 미이라 형태로 만들고 이어 딱딱한 백묵 형태로 변화시켜 결국 꿀벌을 죽이는 병으로서 늦은 봄이나 초여름 사이에 벌통의 출입구나 바닥, 소방, 그리고 벌통 주변에서 백묵병에 감염된 벌들을 흔히 볼 수 있다. 이러한 꿀벌의 백묵병은 1913년에 독일의 마센(Massen)에 의하여 최초로 보고된 이래, 1957년에는 뉴질랜드에서,

1968년에는 미국 캘리포니아주에서 발병되어 거의 모든 주(state)로 병이 만연된 바 있으며, 캐나다에서는 1971년에 발병되었다고 한다. 또한 일본에서는 1974년 아끼다현 및 캐나다산의 수입 양봉에서, 1979년에는 기후현에서도 백목병이 발견된 바 있으며, 이와 같은 백목병은 전 세계로 확산된 꿀벌 질병 중 가장 피해가 큰 병 중의 하나로 밝혀졌다. 백목병 원인균은 아스코스패라 아피스(*Ascosphaera apis*)로 명명되었으며, 꿀벌의 유충에만 감염되고, 특히 수벌의 유충에 감수성이 강하며, 백목병 원인균의 포자낭은 환경에 대한 저항성이 강하여 병원성이 15년 동안이나 유지된다고 한다. 이러한 백목병은 감염된 벌통의 오염된 화분 섭취, 감염된 벌통에서의 여왕벌의 리퀀닝(requeening), 여왕벌, 일벌 등의 이동과 감염된 벌통에서 건전한 벌통으로의 병의 전파 등의 다양한 방법에 의해 감염되는데, 우리나라에서는 1980년대 중반부터 급격히 만연되어 현재는 그 피해가 가장 큰 꿀벌의 질병으로서 벌꿀 생산에 많은 피해를 주고 있다. 현재까지 밝혀진 백목병의 방제법으로는 감염 벌통을 소각하는 방법이 가장 확실한 것으로 알려져 있으나, 이 방법은 경제적인 손실이 너무 크기 때문에 이를 대체할 수 있는 방법으로서 약제를 이용한 방제법과 병원균의 전파 경로 탐색을 통한 오염원 제거 방법 등에 관한 연구가 최근 활발히 진행되고 있다.

- [4] 또한, 식물병해에 의한 작물의 피해는 세계적으로 약 200조 원에 달할 만큼 경제적으로 매우 큰 손실을 주고 있다. 그 중에 딸기 꽃 곰팡이병은 일단 발생되면 바람이나 꿀벌 등에 의한 확산이 빨라 방제가 어렵고, 꽃의 수정을 방해해 기형과를 유발한다. 특히, 딸기 꽃 곰팡이병 원인균(*Cladosporium cladosporioides*)의 적온은 20-25°C이고 하우스 내 습도와 결로가 높은 경우나 일조가 부족한 환경에서 발생이 높은 경향을 보이며, 죽은 식물체, 토양, 유기물 등에서도 증식할 수 있다. 현재 딸기 꽃 곰팡이병의 방제 방법은 하우스 내 습도를 낮추고, 개화기 전에 딸기 흰가루병 또는 탄저병에 등록된 친환경 자제나 화분 발아에 영향이 적은 약제 등을 예방적으로 처리할 뿐이다. 따라서, 딸기 꽃 곰팡이병 원인균에 대한 직접적인 방제제가 필요하므로 잔류 독성과 환경오염의 문제가 없는 친환경 농약 개발에 관심이 집중되고 있다.

- [5] 한편, 한국공개특허 제2011-0092177호에는 미국부저병의 원인균에 대한 항균활성을 가지는 락토바실러스 폴란타룸 YML 001, 상기 미생물을 함유하는 항균성 미생물제제 및 상기 미생물을 이용한 방제방법에 대해 개시되어 있고, 한국등록특허 제1311192호에는 꿀벌의 전염성 예방 및 치료 조성물의 제조방법 및 이 방법에 의한 꿀벌용 영양조성물에 대해 개시되어 있으나, 본 발명의 딸기 화분으로부터 분리한 곤충병원균 또는 딸기 진균병 병원균에 대해 항균활성을 갖는 스트렙토마이세스 바디우스 SP6C4 균주 및 이의 용도에 대해서는 개시된 바가 없다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [6] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명의 딸기 화분으로부터 분리된 스트렙토마이세스 바디우스(*Streptomyces badius*) SP6C4 균주는 미국부저병 원인균(*Paenibacillus larvae*) 및 백묵병 원인균(*Ascosphaera apis*)의 생장을 억제하는 효과를 보였으며, 딸기 꽃 곰팡이병 원인균(*Cladosporium cladosporioides*)에 대해서도 항균 활성을 보였다. 이를 통해, 스트렙토마이세스 바디우스(*Streptomyces badius*) SP6C4 균주의 곤충병 및 딸기 진균병에 대한 방제 효과를 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제 해결 수단

- [7] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 곤충병원균 또는 딸기 진균병 병원균에 대해 항균 활성을 가지는 스트렙토마이세스 바디우스(*Streptomyces badius*) SP6C4 균주를 제공한다.
- [8] 또한, 본 발명은 상기 스트렙토마이세스 바디우스(*Streptomyces badius*) SP6C4 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는 곤충병 또는 딸기 진균병 방제용 조성물을 제공한다.
- [9] 또한, 본 발명은 상기 스트렙토마이세스 바디우스(*Streptomyces badius*) SP6C4 균주를 배양하는 단계를 포함하는 곤충병 또는 딸기 진균병 방제용 조성물의 제조 방법을 제공한다.
- [10] 또한, 본 발명은 상기 스트렙토마이세스 바디우스(*Streptomyces badius*) SP6C4 균주 또는 이의 배양액의 유효량을 곤충병원균 감염 지역, 식물 또는 토양에 처리하는 단계를 포함하는 곤충병 또는 딸기 진균병을 방제하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [11] 본 발명에서는 딸기 화분으로부터 분리된 스트렙토마이세스 바디우스(*Streptomyces badius*) SP6C4 균주가 곤충병원균 및 딸기 진균병 병원균의 생장을 억제시키는 것을 확인하였다. 본 발명의 스트렙토마이세스 바디우스(*Streptomyces badius*) SP6C4 균주는 농약의 부작용으로 발생하는 환경 오염 및 잔류 농약으로 인한 인체 독성의 위험성이 없는 친환경적인 생물 농약으로 사용될 수 있으며, 미국부저병, 백묵병 및 딸기 꽃 곰팡이병에 대한 방제 효과가 있으므로, 산업적으로 매우 유용하게 이용될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

- [12] 도 1은 딸기 화분으로부터 분리한 스트렙토마이세스 바디우스(*Streptomyces badius*) SP6C4 균주를 PDA 평판배지에 계대배양하여 순수배양 균주임을 확인한 결과이다.
- [13] 도 2는 딸기 화분으로부터 메타게놈(metagenome)을 분석한 결과이다.
- [14] 도 3은 딸기 화분으로부터 분리한 스트렙토마이세스 바디우스(*Streptomyces badius*) SP6C4 균주의 16S rRNA 염기서열을 나타낸 결과이다.

- [15] 도 4는 딸기 화분으로부터 분리한 스트렙토마이세스 바디우스(*Streptomyces badius*) SP6C4 균주의 곤충병원균에 대해 항균 활성을 나타낸 결과이다. A는 백묵병 원인균(*Ascosphaera apis*), B는 미국부저병 원인균(*Paenibacillus larvae*)에 대해 항균 활성을 나타낸 것이다.
- [16] 도 5는 딸기 화분으로부터 분리한 스트렙토마이세스 바디우스(*Streptomyces badius*) SP6C4 균주의 딸기 꽃 곰팡이병 원인균(*Cladosporium cladosporioides*)에 대해 항균 활성을 나타낸 결과이다.
- [17] 도 6은 16S rRNA 염기서열에 기초한 딸기 화분으로부터 분리한 스트렙토마이세스 바디우스(*Streptomyces badius*) SP6C4 균주의 유연관계를 분석한 결과이다.
- [18] 도 7은 딸기 꽃에서 스트렙토마이세스 바디우스(*Streptomyces badius*) SP6C4 균주의 생존능력을 분석한 결과이다. 처리 1은 스트렙토마이세스 바디우스 SP6B4 균주를 처리한 실험군; 처리 2는 스트렙토마이세스 바디우스 SP6C4 균주를 처리한 실험군; 처리 3은 스트렙토마이세스 바디우스 SP12C7 균주를 처리한 실험군을 나타낸 것이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [19] 본 발명을 달성하기 위하여, 본 발명은 곤충병원균 또는 딸기 진균병 병원균에 대해 항균 활성을 가지는 스트렙토마이세스 바디우스(*Streptomyces badius*) SP6C4 균주를 제공한다.
- [20] 상기 스트렙토마이세스 바디우스(*Streptomyces badius*) SP6C4 균주는 딸기 화분에서 분리하였으며, 곤충병원균인 백묵병 원인균(*Ascosphaera apis*) 및 미국부저병 원인균(*Paenibacillus larvae*)과 딸기 진균병 병원균인 딸기 꽃 곰팡이병 원인균(*Cladosporium cladosporioides*)에 대해 항균활성이 뛰어난 균주로 선발되었다. 상기 스트렙토마이세스 바디우스(*Streptomyces badius*) SP6C4 균주를 한국미생물보존센터(Korean Culture Center of Microorganisms, KCCM)에 2015년 06월 03일자로 기탁하였다(기탁번호 : KCCM11703P).
- [21] 본 발명의 일 구현 예에 따른 방법에서, 상기 곤충병원균은 미국부저병 원인균 또는 백묵병 원인균일 수 있으며, 바람직하게는 패니바실러스 라바에(*Paenibacillus larvae*) 또는 아스코스페라 아피스(*Ascosphaera apis*)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [22] 본 발명의 일 구현 예에 따른 방법에서, 상기 딸기 진균병 병원균은 딸기 꽃 곰팡이병 원인균일 수 있으며, 바람직하게는 클라도스포리움 클라도스포리오이데스(*Cladosporium cladosporioides*)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [23] 또한, 본 발명은 상기 스트렙토마이세스 바디우스(*Streptomyces badius*) SP6C4 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는 곤충병 또는 딸기 진균병 방제용 조성물을 제공한다. 상기 곤충병 또는 딸기 진균병 방제용 조성물은

미생물 농약의 의미로 사용될 수 있다.

- [24] 본 발명에 따른 곤충병 또는 딸기 진균병 방제용 조성물은 예를 들어, 직접 분사가 가능한 용액, 분말 및 현탁액의 형태 또는 고농축 수성, 유성 또는 다른 현탁액, 분산액, 에멀전, 유성 분산액, 페이스트, 분진, 흠뿌림 물질 또는 과립제로 제조할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [25] 본 발명의 곤충병 또는 딸기 진균병 방제용 조성물은 다양한 형태로 제제화할 수 있다. 상기 제제는 예를 들어 용매 및/또는 담체를 첨가함으로써 제조될 수 있다. 종종, 비활성 첨가제 및 표면-활성 물질, 예를 들어 유화제 또는 분산제를 제제에 혼합한다. 적합한 표면-활성 물질은 방향족 술폰산(예를 들어 리그노술폰산, 페놀-술폰산, 나프탈렌- 및 디부틸나프탈렌술폰산), 지방산, 알킬- 및 알킬아릴술포네이트, 알킬 라우릴 에테르, 지방 알코올 술페이트의 알칼리 금속, 알카라인 토금속, 암모늄염, 술페이트화 헥사-, 헵타- 및 옥타데칸올, 지방 알코올 글리콜 에테르의 염, 술포네이트 나프탈렌 및 이의 유도체, 포름알데히드의 축합물, 나프탈렌 또는 나프탈렌술폰산, 페놀 및 포름알데히드의 축합물, 폴리옥시에틸렌옥틸 페놀 에테르, 에톡실화 이소옥틸-, 옥틸- 또는 노닐페놀, 알킬페닐 또는 트리부틸페닐 폴리글리콜 에테르, 알킬아릴폴리에테르 알코올, 이소트리데실 알코올, 지방 알코올/에틸렌 옥사이드 축합물, 에톡실화 피마자유, 폴리옥시에틸렌 알킬에테르 또는 폴리옥시프로필렌, 라우릴 알코올 폴리글리콜 에테르 아세테이트, 소르비톨 에스테르, 리그닌-술파이트 페액 또는 메틸셀룰로오스일 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.
- [26] 적합한 고형 담체 물질은 원칙적으로, 모두 다공성이고, 농업적으로 허용가능한 담체, 예를 들어 광물토류(예컨대 실리카, 실리카 겔, 실리케이트, 활석, 고령토, 석회암, 석회, 초크, 보울, 황토, 점토류, 백운석, 규조 토류, 황산칼슘, 황산 마그네슘, 산화마그네슘, 분쇄 합성물질), 비료(예컨대 황산암모늄, 인산암모늄, 질산암모늄, 우레아), 식물성 제품(예컨대 곡물 가루, 나무 껍질 가루, 목분(wood meal) 및 견과 껍질 가루) 또는 셀룰로오스 분말일 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 또한, 상기 고형 담체는 1종류 또는 2종류 이상을 혼합하여 사용할 수도 있다.
- [27] 본 발명의 곤충병 또는 딸기 진균병 방제용 조성물은 관수용, 엽면 살포용, 종자 소독용 또는 농기구 소독용으로 사용될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [28] 본 발명의 곤충병 또는 딸기 진균병 방제용 조성물은 유효성분으로서 스트렙토마이세스 바디우스(*Streptomyces badius*) SP6C4 균주를 단독으로, 또는 2종 이상의 다른 항진균, 항균 또는 항바이러스성 물질 등과 혼합하여 사용할 수 있다.
- [29] 본 발명의 곤충병 또는 딸기 진균병 방제용 조성물은 작물체 흡수 및 효과를 증진시키기 위하여 확산제 및 침투제, 또는 계면활성제와도 혼용이 가능하다.
- [30] 또한, 본 발명은 상기 스트렙토마이세스 바디우스(*Streptomyces badius*) SP6C4

균주 또는 이의 배양액의 유효량을 곤충병원균 감염 지역, 식물 또는 토양에 처리하는 단계를 포함하는 곤충병 또는 딸기 진균병을 방제하는 방법을 제공한다.

[31] 상기 곤충병 또는 딸기 진균병을 방제하는 방법으로는 상기 스트렙토마이세스 바디우스(*Streptomyces badius*) SP6C4 균주 및 이의 배양액의 유효량을 이용한 방제용 조성물을 곤충병원균 감염지역인 감염 벌통이나 봉균에 살포하거나, 또는 식물이나 토양에 분무 및 살포 또는 식물을 상기 방제용 조성물에 침지하여 수행할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[32] 본 발명의 '유효량'은 유익한 또는 원하는 결과를 일으키기에 충분한 양으로, 곤충병 또는 딸기 진균병을 방제하기 위해 방제용 조성물을 물로 균일하게 희석한 후 동력살포기와 같은 적절한 살포장치를 이용하여 식물체 및 경작지에 살포할 수 있다. 본 발명의 수화제 또는 액상 수화제를 물에 희석하는 경우 수화제 또는 액상 수화제의 농도는 유효성분이 생물학적으로 유효한 범위가 될 수 있도록 10^5 내지 10^{10} cfu/ml으로, 바람직하게는 10^8 cfu/ml 내외로, 더욱 바람직하게는 10^6 cfu/ml으로 조절할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[33] 또한, 본 발명은 스트렙토마이세스 바디우스(*Streptomyces badius*) SP6C4 균주를 배양하는 단계를 포함하는 곤충병 또는 딸기 진균병 방제용 조성물의 제조 방법을 제공한다.

[34] 상기 균주의 배양 방법은 당업계에 공지된 임의의 방법을 이용할 수 있으며, 특정 방법에 특별히 제한되는 것은 아니다.

[35]

[36] 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.

[37]

[38] 실시예 1. 스트렙토마이세스 바디우스(*Streptomyces badius*) SP6C4 균주의 분리

[39] 양봉 벌에 발생하는 백목병 원인균 및 미국부저병 원인균에 대해 항균 활성을 지닌 균주를 찾기 위하여, 경남 진주시 수곡면 딸기 재배지의 포장에서 딸기 화분(strawberry pollen)을 확보하였다. 확보된 화분 과립 1g을 PBS 버퍼 20ml에 녹인 후, 초음파 분산기(ultrasonic homogenizer)에 시료(화분 과립 1g + PBS 버퍼 20ml)를 넣고 10분간 진행하였다. 시료 희석을 위하여 시료 1ml를 멸균수 9ml에 첨가하여 1/10배씩 8번 반복하여, 10^1 부터 10^8 까지 시료를 희석하였다. 각각의 희석된 시료 100 μ l를 ISP2(효모 추출물 4g, 맥아 추출물 10g, 글루코스 4g 및 아가 20g, pH 7.3) 및 TSA(Tryptic soy agar) 배지에 희석도말법을 이용하여 미생물을 분리하였다(도 1).

[40]

[41] 실시예 2. 딸기 화분으로부터 메타게놈(Metagenome) 분석

[42] 딸기 화분으로부터 메타게놈(metagenome)을 분석하기 위하여, 화분 과립 1g을 PBS 버퍼 20ml에 녹인 다음, 시료(화분 과립 1g + PBS 버퍼 20ml) 3ml을 원심분리하여 획득한 펠릿(pellet)을 CTAB(Cetyl trimethyl ammonium bromide) 기법을 이용하여 게놈 DNA를 추출하였다. 파이로시퀀싱(Pyrosequencing)을 수행하기 위해, 추출한 게놈 DNA를 -20°C에 보관하였다. 세균의 16S rRNA 부분을 증폭하고, Macrogen사(한국)에서 파이로시퀀싱(Pyrosequencing) 분석을 실시하였다. 모든 염기서열은 Silva rRNA database(<http://www.arb-silva.de/>)를 이용하여 동정하였다. 그 결과, 도 2에 개시된 바와 같이, 딸기 화분으로부터 메타게놈(metagenome) 분석을 통하여 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.)이 포함된 악티노박테리아(Actinobacteria) 문(phylum)의 세균이 존재하는 것을 확인하였다.

[43]

[44] 실시예 3. 스트렙토마이세스 바디우스(*Streptomyces badius*) SP6C4 균주의 동정
[45] 분리된 미생물의 분자 생물학적 동정을 실시하고자 게놈 DNA를 분리하여 16S rRNA 염기서열(서열번호 1)을 분석하였다. 스트렙토마이세스 바디우스(*Streptomyces badius*) SP6C4 균주의 게놈 DNA를 CTAB(Cetyl trimethyl ammonium bromide) 기법을 이용하여 추출하였다. 시퀀싱 분석에는 16S rRNA의 V1 내지 V3 영역을 타겟으로 하는 하기 표 1의 프라이머를 사용하였다. 그 결과, 도 3에 개시된 바와 같이 16S rRNA 염기서열은 NCBI의 BLAST 검색을 통하여 스트렙토마이세스 바디우스(*Streptomyces badius*)로 동정되었다. 또한, 상기 균주를 스트렙토마이세스 바디우스 SP6C4(Strawberry pollen 6C4) 균주로 명명하였다.

[46]

[표1]

본 발명에 사용된 프라이머

프라이머 이름	서열번호	정방향(5'-3') 프라이머 염기서열	프라이머 이름	서열번호	역방향(5'-3') 프라이머 염기서열
27F	2	AGAGTTTGATCMT GGCTCAG	1492R	3	GGYTACCTTGTTA CGACTT

[47]

[48] 실시예 4. 스트렙토마이세스 바디우스(*Streptomyces badius*) SP6C4 균주의 곤충병원균에 대한 길항력 확인

[49] 상기 실시예 1 및 3에서 분리 및 동정한 스트렙토마이세스 바디우스(*Streptomyces badius*) SP6C4 균주의 곤충병원균에 대한 항균 활성을 확인하기 위하여, 곤충병원균인 백묵병 원인균(*Ascosphaera apis*) 및 미국부저병 원인균(*Paenibacillus larvae*)을 이용하였다. 항균 활성을 검증하기 위하여 PDA(감자 텍스트로스 10 g, 펩톤 10g, 아가 20g) 평판 배지에서 스트렙토마이세스 바디우스 SP6C4 균주와 백묵병 원인균(*Ascosphaera apis*) 및 미국부저병 원인균(*Paenibacillus larvae*)을

Paenibacillus larvae)을 각각 대치배양하였다. 이때, 각종 병원균의 생육 온도인 28°C로 배양한 후, 저지대(Inhibition zone)를 관찰하였다. 그 결과, 도 4에 개시된 바와 같이 본 발명의 스트렙토마이세스 바디우스 SP6C4 균주는 대상 병원균에 대하여 강력한 항균 활성을 나타내는 것으로 확인되었다.

[50]

[51] 실시예 5. 스트렙토마이세스 바디우스(*Streptomyces badius*) SP6C4 균주의 딸기 꽃 곰팡이병 원인균에 대한 길항력 확인

[52] 상기 실시예 1 및 3에서 분리 및 동정한 스트렙토마이세스 바디우스(*Streptomyces badius*) SP6C4 균주의 딸기 꽃 곰팡이병 원인균에 대한 항균 활성을 확인하기 위하여, PDA(감자 텍스트로스 10 g, 펩톤 10g, 아가 20g) 평판 배지에서 스트렙토마이세스 바디우스 SP6C4 균주와 딸기 꽃 곰팡이병 원인균(*Cladosporium cladosporioides*)을 대치배양하였다. 이때, 저온성 균의 특성에 따라 20°C에서 배양한 후, 저지대(Inhibition zone)를 관찰하였다. 그 결과, 도 5에 개시된 바와 같이 본 발명의 스트렙토마이세스 바디우스 SP6C4 균주는 딸기 꽃 곰팡이병 원인균에 대하여 강력한 항균 활성을 나타내는 것으로 확인되었다.

[53]

[54] 실시예 6. 스트렙토마이세스 바디우스(*Streptomyces badius*) SP6C4 균주의 유연관계 분석

[55] 상기 실시예 3의 결과를 바탕으로 NCBI에 등록되어있는 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.)에 속하는 균주들의 16s RNA 염기서열의 유사성을 이용하여 유연관계를 분석하였다. 유연관계 분석에는 Mega 6 프로그램을 이용하였다. 그 결과, 도 6에 개시된 바와 같이 스트렙토마이세스 바디우스 SP6C4 균주는 스트렙토마이세스 바디우스 strain CB00830과 99%의 유연관계를 보이는 것으로 확인되었다.

[56]

[57] 실시예 7. 스트렙토마이세스 바디우스(*Streptomyces badius*) SP6C4 균주의 딸기 꽃에서의 생존능력 검증

[58] 스트렙토마이세스 바디우스 SP6C4 균주의 딸기 꽃에서의 생존능력을 검증하기 위하여 실험실 내에서 실험을 실시하였다. 딸기 포장으로부터 꽃을 채집하여 줄기 부분을 오아시스에 고정시킨 다음, 혼합액(0.1% 메틸 셀룰로오스, 균주배양액 10⁸cfu/ml, 멸균수 10ml)의 접종농도를 10⁶cfu/ml로 조정하여 딸기 꽃에 분주법(Spray) 및 침지법(dipping)으로 접종하였다. 그 다음, 접종 5일 차에 꽃을 1X PBS 버퍼에 넣고 5분간 초음파 처리한 후 멸균수에 10¹부터 10⁹(cfu/ml)까지 희석한 다음, 10⁴부터 10⁶(cfu/ml)까지 각각 희석도말법을 통해 CFU를 측정하였다.

[59]

그 결과, 도 7에 개시된 바와 같이 분주법(Spray)에서는 스트렙토마이세스 바디우스 SP6C4 균주(처리 2)를 처리하였을 때, 딸기 꽃에서의 생존률이 가장 높았으며, 침지법(dipping)에서는 스트렙토마이세스 속 SP12C7 균주(처리 3)를

처리하였을 때, 딸기 꽃에서의 생존률이 가장 높았다.

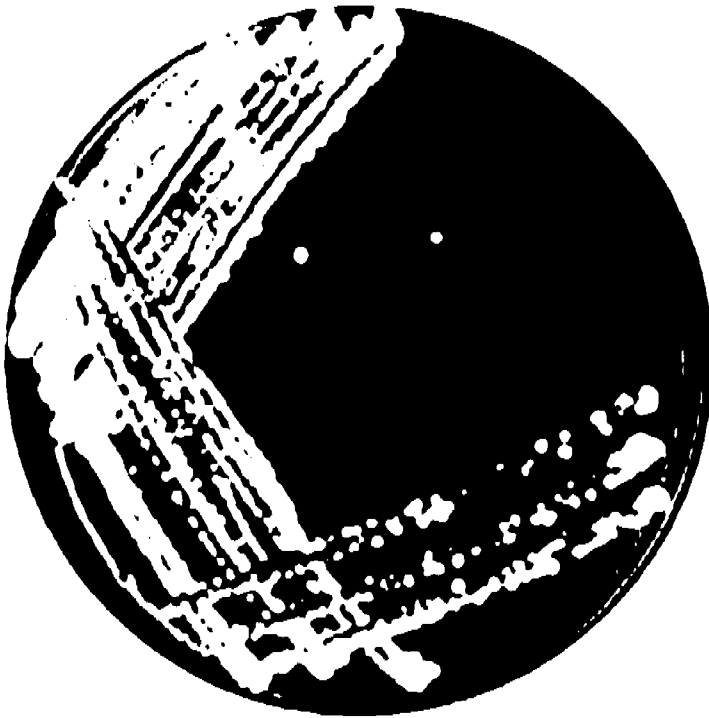
- [60] 따라서, 본 발명은 곤충병 및 식물병 방제를 위해 사용되는 미생물의 항균능력을 나타내는 밀도인 $10^5(\text{cfu}/\text{ml})$ 을 유지하고 있었으므로, 미생물제제로서의 개발 가능성이 확인되었다. 또한, 약제살포방법과 유사한 분주법(Spray)에서 높은 생존률을 보임으로써, 스트렙토마이세스 바디우스(*Streptomyces badius*) SP6C4 균주의 상품개발가치성이 높은 것으로 사료된다.

- [61] [수탁번호]
[62] 기탁기관명 : 한국미생물보존센터(국외)
[63] 수탁번호 : KCCM11703P
[64] 수탁일자 : 20150603

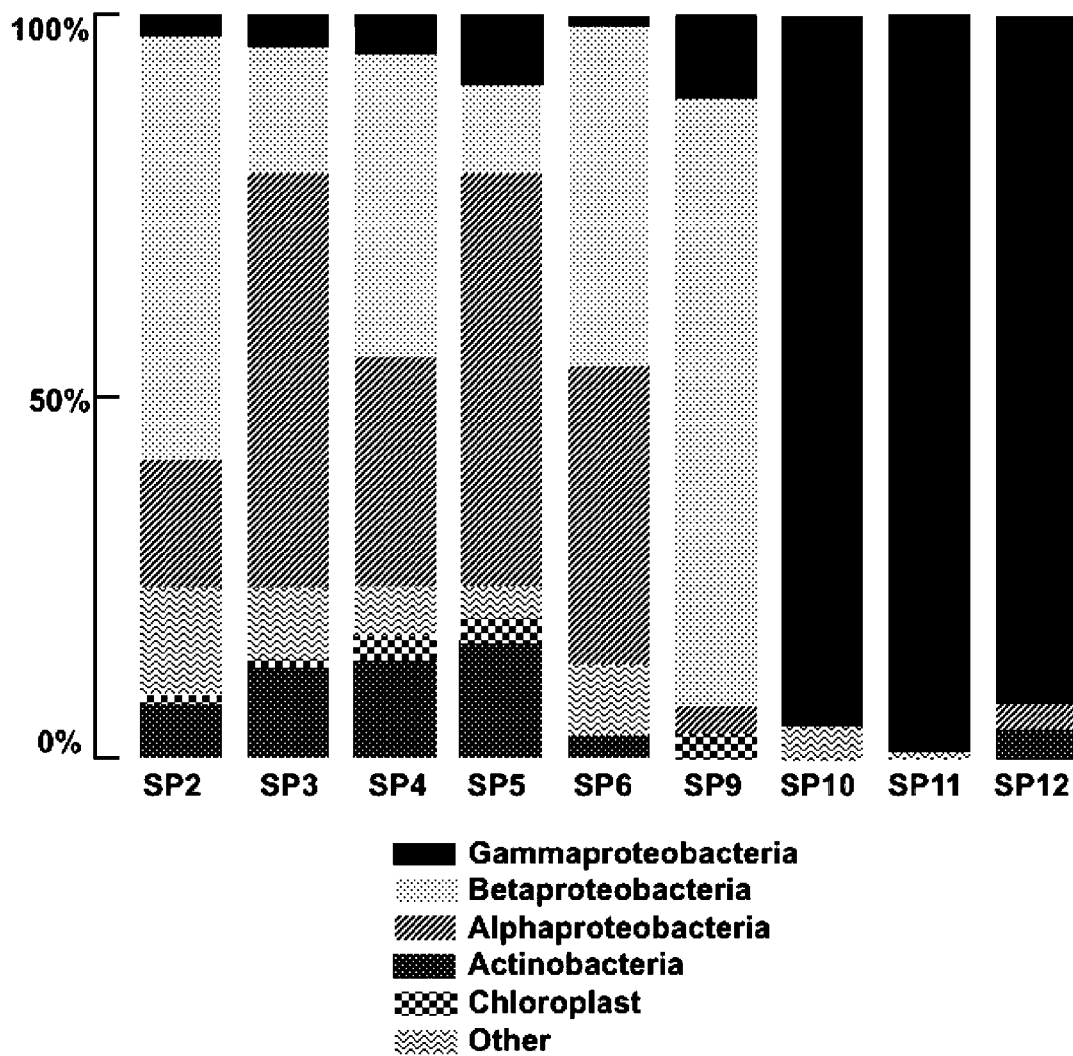
청구범위

- [청구항 1] 곤충병원균 또는 딸기 진균병 병원균에 대해 항균 활성을 가지는 스트렙토마이세스 바디우스(*Streptomyces badius*) SP6C4 균주.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 균주는 기탁번호가 KCCM11703P인 것을 특징으로 하는 균주.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 곤충병원균은 미국부저병 원인균 또는 백묵병 원인균인 것을 특징으로 하는 균주.
- [청구항 4] 제3항에 있어서, 상기 미국부저병 원인균은 패니바실러스 라바에(*Paenibacillus larvae*)이고, 백묵병 원인균은 아스코스페라 아피스(*Ascosphaera apis*)인 것을 특징으로 하는 균주.
- [청구항 5] 제1항에 있어서, 상기 딸기 진균병 병원균은 딸기 꽃 곰팡이병 원인균인 것을 특징으로 하는 균주.
- [청구항 6] 제5항에 있어서, 상기 딸기 꽃 곰팡이병 원인균은 클라도스포리움 클라도스포리오이데스(*Cladosporium cladosporioides*)인 것을 특징으로 하는 균주.
- [청구항 7] 제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 따른 스트렙토마이세스 바디우스(*Streptomyces badius*) SP6C4 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는 곤충병 또는 딸기 진균병 방제용 조성물.
- [청구항 8] 제7항에 있어서, 상기 곤충병은 미국부저병 또는 백묵병인 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 9] 제7항에 있어서, 상기 딸기 진균병은 딸기 꽃 곰팡이병인 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 10] 제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 따른 스트렙토마이세스 바디우스(*Streptomyces badius*) SP6C4 균주를 배양하는 단계를 포함하는 곤충병 또는 딸기 진균병 방제용 조성물의 제조 방법.
- [청구항 11] 제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 따른 스트렙토마이세스 바디우스(*Streptomyces badius*) SP6C4 균주 또는 이의 배양액의 유효량을 곤충병원균 감염 지역, 식물 또는 토양에 처리하는 단계를 포함하는 곤충병 또는 딸기 진균병을 방제하는 방법.

[도1]



[도2]

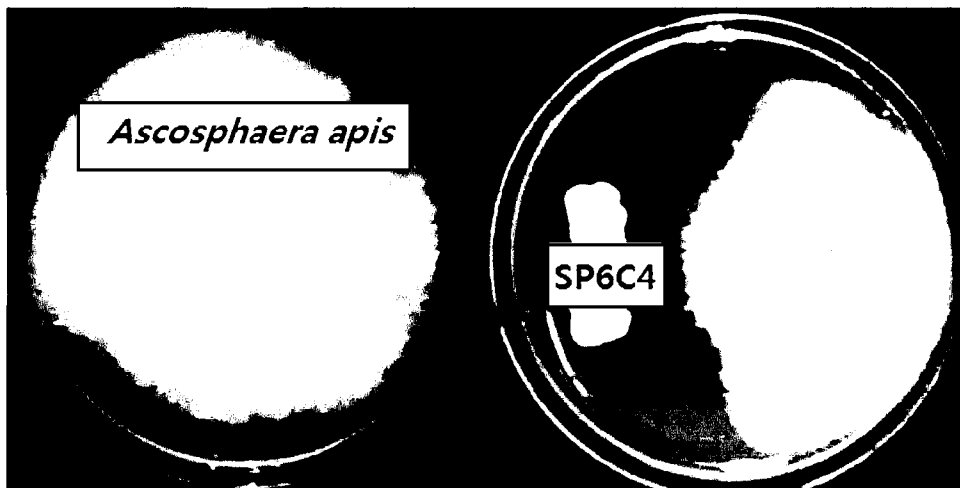


[도3]

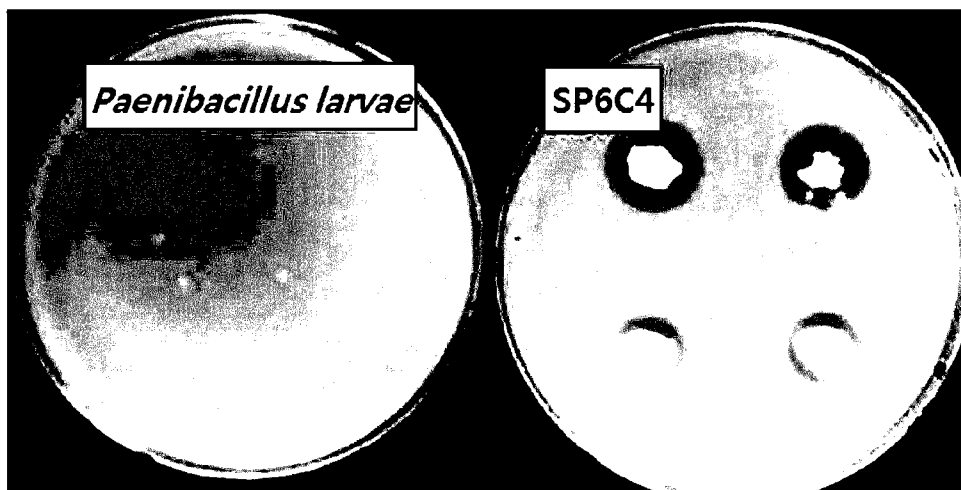
GCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGATGAAGCCCTTCGGGGTG
 GATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTTCACTCTGGGACAAGCCCTGGA
 AACGGGGTCTAATACCGGATAACACTCTGTCCCGCATGGGACGGGGTTGAAAGCTCCGGCGGTGA
 AGGATGAGCCC GCGGCTATCAGCTTGTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAG
 CCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAG
 CAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCT
 TCGGGTTGTAAACCTCTTTAGCAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCG
 GCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCG
 TAAAGAGCTCGTAGGCGGCTTGTACGTGCGATGTGAAAGCCCGGGGCTTAACCCCGGGTCTGCA
 TTCGATACGGGCTAGCTAGAGTGTGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGC
 AGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCATTACTGACGCTGAGGAGCGA
 AAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGTTGGGAACTAGGT
 GTTGGCGACATTCCACGTGTCGGTGCCGAGCTAACGCATTAAGTTCCCCGCCTGGGGAGTACGG
 CCGCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGCAAGCAGCGGAGCATGTGGCTTAAT
 TCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATATACCGGAAAGCATCAGAGATGGTGCCC
 CCCTTGTGGTTCGGTATACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTGAGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTAA
 GTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGTCTGTGTTGCCAGCATGCCCTTCGGGGTGATGGGGACTCAC
 AGGAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTGAGTCATCATGCCCTTATGTC
 TTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGCCGGTACA

[도4]

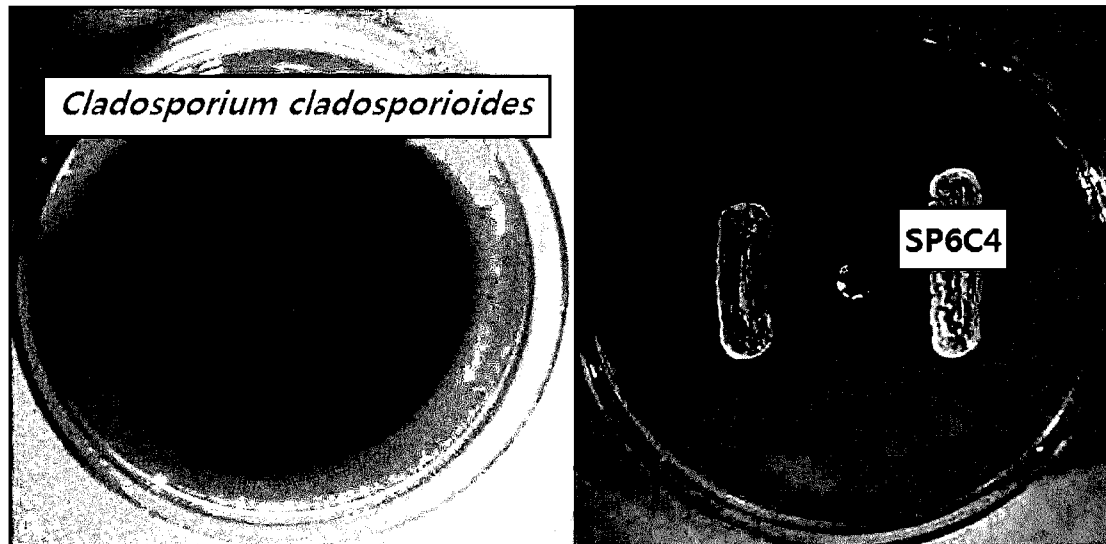
A



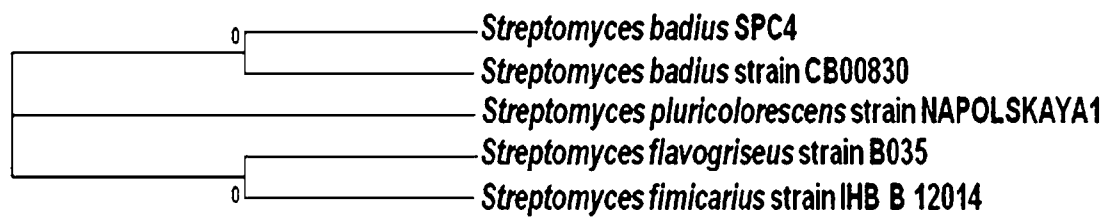
B



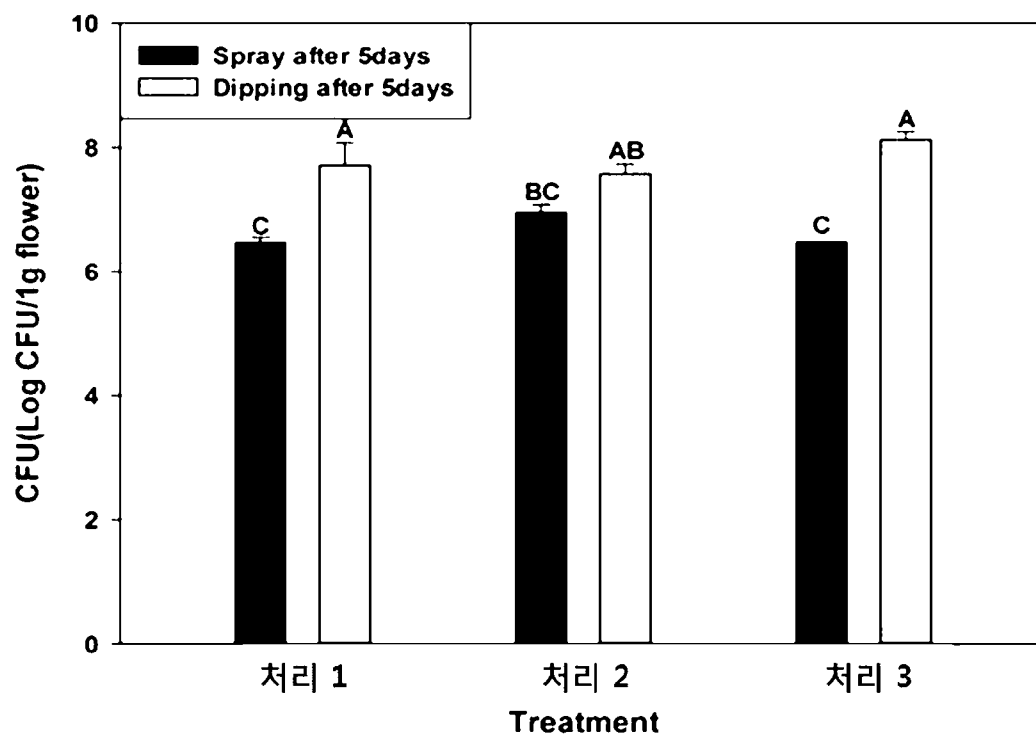
[도5]



[도6]



[도7]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2016/004077**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER*****C12N 1/20(2006.01)i, C12R 1/465(2006.01)n, A01N 63/00(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; C12R 1/465; A01N 63/02; A01N 63/00

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: Streptomyces badius, Bacillus thuringiensis, Fungal Pathogens of strawberry, antifungal activity, KCCM11703P

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	RIFAAT, Hala M. et al., "Taxonomical Studies on Certain Streptomyces Exhibiting Antimicrobial Activity Isolated from Egyptian Soils", Journal of Culture Collections, 2006-2007, vol. 5, no. 1, pages 25-34 See abstract; and page 33.	1-11
A	KR 10-2011-0012607 A (MYONGJI UNIVERSITY INDUSTRY AND ACADEMIA COOPERATION FOUNDATION) 09 February 2011 See abstract; claims 1-3; and paragraph [0011].	1-11
A	KR 10-2012-0053321 A (MYONGJI UNIVERSITY INDUSTRY AND ACADEMIA COOPERATION FOUNDATION) 25 May 2012 See abstract; and claims 1-10.	1-11
A	KR 10-2015-0044831 A (DANKOOK UNIVERSITY CHEONAN CAMPUS INDUSTRY ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) 27 April 2015 See the entire document.	1-11
A	JP 2011-188761 A (MIE UNIVERSITY) 29 September 2011 See the entire document.	1-11



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

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

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

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

26 JULY 2016 (26.07.2016)

Date of mailing of the international search report

29 JULY 2016 (29.07.2016)

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. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2016/004077

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2011-0012607 A	09/02/2011	NONE	
KR 10-2012-0053321 A	25/05/2012	NONE	
KR 10-2015-0044831 A	27/04/2015	KR 10-1493426 B1 WO 2015-053482 A1	16/02/2015 16/04/2015
JP 2011-188761 A	29/09/2011	NONE	

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12N 1/20(2006.01)i, C12R 1/465(2006.01)n, A01N 63/00(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C12N 1/20; C12R 1/465; A01N 63/02; A01N 63/00

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: 스트렙토마이세스 바디우스, 곤충병원균, 딸기 진균병 병원균, 향균 활성, KCCM11703P

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	RIFAAT, HALA M. 등, 'Taxonomical studies on certain streptomycetes exhibiting antimicrobial activity isolated from Egyptian soils', Journal of Culture Collections, 2006-2007, 5권, 1호, 페이지 25-34 요약; 및 페이지 33 참조.	1-11
A	KR 10-2011-0012607 A (명지대학교 산학협력단) 2011.02.09 요약; 청구항 1-3; 및 문단 [0011] 참조.	1-11
A	KR 10-2012-0053321 A (명지대학교 산학협력단) 2012.05.25 요약; 및 청구항 1-10 참조.	1-11
A	KR 10-2015-0044831 A (단국대학교 천안캠퍼스 산학협력단) 2015.04.27 전체 문헌 참조.	1-11
A	JP 2011-188761 A (MIE UNIVERSITY) 2011.09.29 전체 문헌 참조.	1-11

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

“A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2016년 07월 26일 (26.07.2016)

국제조사보고서 발송일

2016년 07월 29일 (29.07.2016)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

조기윤

전화번호 +82-42-481-5655



국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2011-0012607 A	2011/02/09	없음	
KR 10-2012-0053321 A	2012/05/25	없음	
KR 10-2015-0044831 A	2015/04/27	KR 10-1493426 B1 WO 2015-053482 A1	2015/02/16 2015/04/16
JP 2011-188761 A	2011/09/29	없음	