(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2024 년 5 월 30 일 (30.05.2024)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2024/111908 A1

(51) 국제특허분류:
A23K 10/16 (2016.01) *C12N 1/14* (2006.01)
A23K 50/90 (2016.01) *C12N 1/20* (2006.01)
A23K 20/158 (2016.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2023/016712

(22) 국제출원일: 2023 년 10 월 26 일 (26.10.2023)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2022-0158138 2022 년 11 월 23 일 (23.11.2022) KR

(71) 출원인: 동아대학교 산학협력단 (**DONG-A UNIVERSITY RESEARCH FOUNDATION FOR INDUSTRY-ACADEMY COOPERATION**) [KR/KR]; 49315 부산광역시 사하구 낙동대로550번길 37, Busan (KR). 대한민국(농촌진흥청장) (**REPUBLIC OF KOREA(MANAGEMENT : RURAL DEVELOPMENTADMINISTRATION)**) [KR/KR]; 54875 전라북도 전주시 덕진구 농생명로 300, Jeollabuk-do (KR).

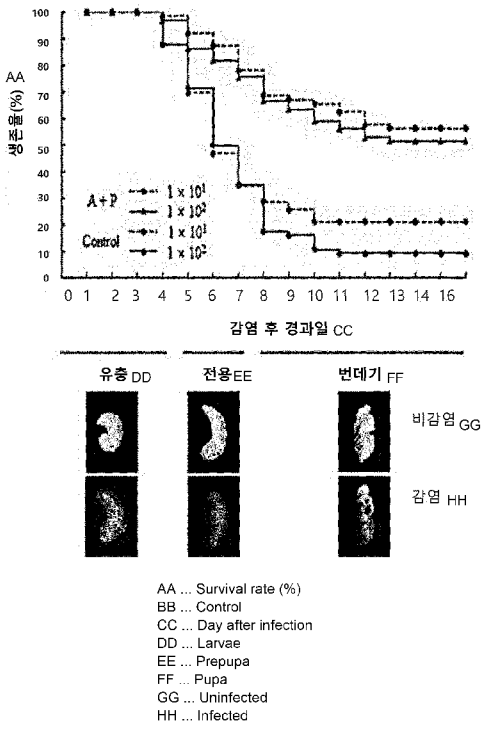
(72) 발명자: **최용수 (CHOI, Yong Soo)**; 54872 전라북도 전주시 덕진구 오공로 70, 105동 1203호, Jeollabuk-do (KR). **김경문 (KIM, Kyung Mun)**; 08562 서울특별시 금천구 독산로62길 30, 405호, Seoul (KR). **김동원 (KIM, Dong won)**; 55365 전라북도 완주군 이서면 갈산1로 71, 805동 702호, Jeollabuk-do (KR). **김주경 (KIM, Ju Gyeong)**; 54947 전라북도 전주시 완산구 온고을로 121, 107동 1006호, Jeollabuk-do (KR). **진병래 (JIN, Byung Rae)**; 49302 부산광역시 사하구 하신번영로 400, 116동 2501호, Busan (KR). **이광식 (LEE, Kwang Sik)**; 49302 부산광역시 사하구 하신번영로 400, 102동 2502호, Busan (KR). **김보연 (KIM, Bo Yeon)**; 49302 부산광역시 사하구 하신번영로 400, 102동 2502호, Busan (KR). **김윤희 (KIM, Yun Hui)**; 49324 부산광역시 사하구 낙동대로520번길 14, 101동 910호, Busan (KR).

(74) 대리인: **위병갑 (WIE, Byoung-Gap)**; 06141 서울특별시 강남구 테헤란로33길7, 대영빌딩 7층, 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, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW,

(54) **Title:** COMPOSITION CONTAINING CHALKBROOD AND FOULBROOD AS ACTIVE INGREDIENTS FOR IMMUNE ACTIVATION IN BEE

(54) **발명의 명칭:** 백묵병 및 부저병을 유효성분으로 포함하는 꿀벌 면역 활성화 조성물



(57) **Abstract:** The purpose of the present invention is to provide a composition containing agents causative of chalkbrood and foulbrood as active ingredients for immune activation in bees. It was found in the present invention that a mixture of heat-killed agents causative of chalkbrood and foulbrood enhances and activates the immune system of bees. It was also found that when fed with a peppermint oil-added mixture of the heat-killed agents causative of chalkbrood and foulbrood, bees increase in weight and showed the upregulated expression of development-related genes. Furthermore, pollen cakes and honey dilutions prepared from a mixture of heat-killed agents causative of chalkbrood and foulbrood increased the survival rate against foulbrood in brood larvae within the bee colony, and thus can be advantageously used for related businesses.

(57) **요약서:** 본 발명의 목적은 백묵병 및 부저병을 유효성분으로 포함하는 꿀벌 면역 활 성화 조성물을 제공하는 것으로서, 본 발명의 열처리로 사멸시킨 백묵병 및 부저병의 혼합물을 꿀벌의 면역증진 및 면역 활성화시키는 것을 확인하였다. 또한, 열처리로 사멸시킨 백묵병 및 부저병의 혼합물의 페퍼민트 오일을 첨가하여 꿀벌에 식이 하였을 시, 체중 증가 및 발육 관련 유전자의 발현을 증가시키는 것을 확인하였으며, 열처리로 사멸된 백묵병 및 부저병 혼합물로 화분떡 및 꿀 희석액을 제조하여 봉군 내 유충으로부터 부저병에 대한 생존율이 증가한 것을 확인하여, 이와 관련된 사업에 유용하게 사용될 수 있다.

WO 2024/111908 A1

[다음 쪽 계속]

SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) **지정국** (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, 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, ME, 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).

규칙 4.17에 의한 선언서:

— 신규성을 해치지 아니하는 개시 또는 신규성 상실의 예외에 관한 선언 (규칙 4.17(v))

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

명세서

발명의 명칭: 백묵병 및 부저병을 유효성 분으로 포함하는 꿀벌 면역 활성화 조성물

기술분야

[1] 본 발명의 목적은 백묵병 및 부저병을 유효성분으로 포함하는 꿀벌 면역 활성화 조성물을 제공하는 것이다.

배경기술

[2] 꿀벌은 다양한 작물의 주요한 수분매개자로써 세계 식량의 수분매개를 담당하고 있는 매우 중요한 산업곤충이였다. 하지만, 수만의 개체가 집단을 이루고 좁은 공간에서 생활하는 특성으로 인하여 미생물 등이 서식하기 적합한 환경을 제공하여 각종 질병의 발병 가능성이 높았다. 꿀벌의 여러 질병 발생에 관한 많은 피해는 국내 양봉 산업의 생산성이 낮은 원인 중의 하나로 여겨지고 있었다. 꿀벌에 발생하는 부저병은 세균성 질병이고 백묵병은 진균성 질병으로 봉군에 심각한 피해를 입힐 수도 있으며, 많은 경우 생산성의 결정적 피해로 문제가 되고 있었다.

[3] 백묵병은 발육 중인 꿀벌의 유충에 영향을 미치는 진균 *Ascosphoreara apis* 감염으로 발생하는데 먹이와 함께 곰팡이 포자를 섭취하게 되고 봉개 후 질병이 발병한다. 감염으로 인해 늘어진 유충은 시간이 지난 후 유충은 죽고 건조되어 작은 분필 조각을 연상시키는 미라 사체가 남게 된다. 곰팡이의 자실체가 형성되면 어두운 색으로 변함. 백묵병은 꿀벌의 질병의 감수성 상태(허약해진 상태)에서 잘 발병한다. 특히, 봉개 전 그리고 봉개 몇 시간 후인 5령 유충이 백묵병에 가장 취약하 다고 알려져 있다. 백묵병의 발병은 발병 포자의 양에 비례하고 꿀벌과 접촉하는 백묵병 포자가 포함된 물질은 질병전파를 할 수 있기 때문에 양봉가가 취할 수 있는 최선의 방법은 백묵병 감염된 벌과 포자가 포함된 소비를 봉군간에 옮기는 것을 피하는 것이다. 백묵병은 봉군에 치명적인 질병은 아니지만 봉군의 세력이 급속히 신장하는 봄에 만연하기 때문에 정상적인 봉군 형성에 지장을 초래하여 생산성을 크게 감소시키는 만성적 질병으로 문제가 되고 있다.

[4] 부저병(*Paenibacillus larvae*)은 꿀벌 유충의 장내 감염을 유발하며, 병원체 가 유충 체강에 침범하면 감염된 유충에게 치명적이다. 꿀벌 유충은 봉군내에서 꿀 벌에 의해 먹이가 공급되는데, 유충은 서로 직접 접촉하지 않지만, 많은 유충을 지속적으로 관리하고 먹이를 주는 꿀벌의 활동에 의해 감염된 유충에서 다른 유충으 로 질병이 전파될 수 있다. 유충들이 감염되기 위해서는 알에서 부화 후 첫 36시간 동안 포자에 오염된 먹이에 노출되어야 한다. 어린 유충이 섭취한 후 부저병 포자는 유충의 중장 내강에서 발아하고 결국 영양 세균은 중장 상피를 뚫고 체강내부로 침입하기 전에 대량으로 번식한다. 감염된 유충이 죽은 후에도 부저균은 여전히 번 성하여 사체를 완전히 분해한다. 영양소가 부족해지면 부저균은

포자를 형성하여 전염성이 높은 상태로 전환되고 봉군 내에서 다른 감염을 유도한다. 한 봉군 내에서 부저병이 진행됨에 따라 유충의 피해가 증가하고 결국 유충을 포함한 자손이 부족하게 되어 봉군이 붕괴된다. 이러한 현상으로 부저병의 치명적인 전염성과 치사율이 양봉업에서 경계해야 할 주요 질병중 하나이다.

[5] 이처럼 꿀벌 질병을 매개하는 세균 및 곰팡이는 꿀벌의 사회성 특성으로 인 한 개체 간 또는 세대 간 감염이 만연하게 되는데, 최근 꿀벌의 집단 면역형성 수 단으로 세대 간 면역 활성화(Transgenerational Immune Priming, TGIP)가 주목 받 고 있다. 꿀벌의 세대 간 면역력 전달에서 난황단백질(Vitellogenin, Vg)은 섭취한 병원균 조각(particle)을 여왕벌의 난소 또는 꿀벌의 하인두샘으로 운반하는 중요 한 역할을 하고 로열젤리(royal jelly)는 개체 간 병원체 조각을 전달하는 매개체 역 할을 한다. 최근 세균 감염 봉군의 로열젤리 단백체 질량 분석에서 로열젤리 단 백질 1~7(Major royal jelly protein 1~7) 및 디펜신-1(Defensin-1)의 변화가 보고 되었다. 또한, 열처리로 사멸된 부저병을 먹인 꿀벌의 지방체에서 난황단백질과 아 배신(Abaecin)의 발현이 증가하고, 하인두샘에서 로열젤리 단백질 1~7 및 디펜 신-1의 발현이 증가함이 밝혀졌다.

[6] 또한, 다양한 미생물에 작용하는 디펜신-1은 대다수 생물의 1차 방어 시스템을 구성하는 시스테인(cysteine)이 풍부한 양이온성 항균 펩타이드이다. 곤충 유래 디펜신이 가진 특징으로는 아미노산 말단의 loop 구조, α-헬릭스, 3개의 이황화 결합에 의해 안정된 구조 및 2개 역방향성 β-스트랜드를 포함하는 36~51개의 아 미노산으로 이루어진 펩타이드이다. 디펜신은 그람음성 세균, 그람양성 세균 및 진균에 대한 활성 등 광범위한 세균 및 진균에 대한 활성을 나태는 것으로 보고 되었다. 이러한 점을 고려할 때 곤충에서 디펜신은 1차 방어를 위한 항미생물 및 항진균 활성으로 곤충 질병 감염 및 방어를 확인할 수 있는 대표적인 유전자이 다.

[7] 동물의 체력에 영향을 미치는 요인들은 신체 크기를 조절하는 기본 메커니즘 과 관련성이 깊은데 꿀벌에서 크기의 변화는 온도, 유충 세포의 크기뿐만 아니 라 유충이 섭취하는 먹이와 밀접한 관련이 있다고 알려졌다. 특히 유충 성장을 위한 먹이 구성은 인슐린 유사 펩타이드(Insulin-like peptide, ILP) 및 라파마이 신 표적(Target of rapamycin, TOR) 경로를 포함한 영양 경로에 영향을 미치는 것 으로 보고되었다. 곤충에서 알려진 CCHamide-2는 2개의 시스테인 잔기를 가진 13개의 아미노산(GCQ(or A, or S)AFGHSCY(or F)GGHamide)으로 구성된다. 곤 충 유래 CCHamide-2는 중장, 뇌 및 지방체에서 발현이 되는데, 과실파리에서는 CCHamide-2가 인슐린 유사 펩타이드 생성을 조절하여 성장을 조절한다고 알려 져 있다. 꿀벌에서 먹이와 관련된 발달 조절은 로열젤리에 의해 조절되며, 이는 유충 기간 여왕벌이나 일벌의 발달이 결정된다. 로열젤리 내의 주요 단백질과 생 리활성 화합물이 유충의 발육 과정을 조절하는 것이 보고되었으며, 꽃가루에 존 재하는 파이토케미컬은 일벌 발육 및 유충 발달에 영향을 미친다는 것이 보고되 었다.

[8] 지금까지 꿀벌의 질병을 유발하는 세균 및 곰팡이 그리고 이들을 진단하는 방법에 대한 연구가 진행되었지만 이를 근본적으로 예방할 수 있는 연구는 진행되지 않았다. 또한, 체중 증가로 더 강한 꿀벌을 만들기 위한 파이토케미컬을 첨가한 먹이 공급에 따른 신체 변화에 어떤 영향을 미치는 지에 대한 결과는 없는 실정이다.

[9] 따라서 본 발명에서 꿀벌의 집단 내 세대 간 면역 활성화를 위해 열처리로 사멸시킨 백묵병 및 부저병 혼합물 제조하였다. 또한, 섭식 촉진을 위한 페퍼민트 오일(Peppermint oil)을 열처리로 사멸시킨 백묵병 및 부저병 혼합물을 유효성분으로 포함하는 화분떡 및 꿀 희석액 제조 방법을 확인하여, 본 발명을 완성하였다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[10] 본 발명의 목적은 열처리된 백묵병 및 부저병의 혼합물을 유효성분으로 포함하는 꿀벌 속(Apis)의 면역 증진 또는 면역 활성화 조성물을 제공하는 것이다.

[11] 아울러, 본 발명의 목적은 열처리된 백묵병 및 부저병의 혼합물을 유효성분으로 포함하는 꿀벌 속(Apis)의 발육 증진용 조성물을 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

[12] 본 발명은 열처리된 백묵병 및 부저병의 혼합물을 유효성분으로 포함하는 꿀벌 속(Apis)의 면역 증진 또는 면역 활성화 조성물을 제공한다.

[13] 아울러, 본 발명은 열처리된 백묵병 및 부저병의 혼합물을 유효성분으로 포함하는 꿀벌 속(Apis)의 발육 증진용 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[14] 본 발명의 열처리로 사멸시킨 백묵병 및 부저병의 혼합물을 꿀벌의 면역증진 및 면역 활성화시키는 것을 확인하였다. 또한, 열처리로 사멸시킨 백묵병 및 부저병의 혼합물의 페퍼민트 오일을 첨가하여 꿀벌에 식이 하였을 시, 체중 증가 및 발육 관련 유전자의 발현을 증가시키는 것을 확인하였으며, 열처리로 사멸된 백묵병 및 부저병 혼합물로 화분떡 및 꿀 희석액을 제조하여 봉군 내 유충으로부터 부저병에 대한 생존율이 증가한 것을 확인하여, 이와 관련된 사업에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[15] 도 1은 열처리로 사멸시킨 백묵병 또는 부저병의 혼합물을 10^3, 10^4, 10^5, 10^6, 10^7 ml 농도에 따라 첨가한 설탕액을 6일째 꿀벌에 먹인 후 지방체에서 난황단백질(Vitellogenin, Vg)의 발현량을 나타낸 도이다.

[16] (백묵병 세균: *A.apis, Ascosphaera apis*, 부저병 세균:*P.larvae, Paenibacillus larvae*)

[17] 도 2는 열처리로 사멸시킨 백묵병 또는 부저병의 혼합물을 10^3, 10^4, 10^5, 10^6, 10^7ml 농도에 따라 첨가한 설탕액을 6일째 꿀벌에 먹인 후 지방체에서 디펜신-1(Defensin-1)의 발현량을 나타낸 도이다.

[18] 도 3은 열처리로 사멸시킨 백묵병 및 부저병 혼합물의 혼합 비율 0.5:0.5, 0.5:1, 1:0.5, 1:1에 따라 첨가한 설탕액을 6일째 꿀벌에 먹인 후 지방체에서 난황단백질(Vitellogenin, Vg)의 발현량을 나타낸 도이다.

[19] 도 4는 열처리로 사멸시킨 백묵병 및 부저병 혼합물의 혼합 비율 0.5:0.5, 0.5:1, 1:0.5, 1:1에 따라 첨가한 설탕액을 6일째 꿀벌에 먹인 후 지방체에서 디펜신-1(Defensin-1)의 발현량을 나타낸 도이다.

[20] 도 5는 열처리로 사멸시킨 백묵병 및 부저병 혼합물이 첨가된 설탕액을 6일째 꿀벌에 먹인 후 지방체에서 24시간, 48시간 및 72시간에 따른 난황단백질(Vitellogenin, Vg)의 발현량을 나타낸 도이다.

[21] (A+P:백묵병 세균(*Ascosphaera apis*) + 부저병 세균(*Paenibacillus larvae*)혼합물)

[22] 도 6은 열처리로 사멸시킨 백묵병 및 부저병 혼합물이 첨가된 설탕액을 6일 째 꿀벌에 먹인 후 지방체에서 24시간, 48시간 및 72시간에 따른 디펜신-1(Defensin-1)의 발현량을 나타낸 도이다.

[23] 도 7은 열처리로 사멸시킨 백묵병 및 부저병 혼합물에 페퍼민트 오일이 첨가 된 설탕액을 6일째 꿀벌에 먹인 후 체중 변화를 나타낸 도이다.

[24] (control:대조군, A+P:백묵병 세균(*Ascosphaera apis*) + 부저병 세균(*Paenibacillus larvae*)혼합물, 0.05%: 페퍼민트 오일 0.05%, 0.05%+A+P:페퍼민트 오일 0.05% +백묵병 세균(*Ascosphaera apis*) + 부저병 세균(*Paenibacillus larvae*)혼합물)

[25] 도 8은 열처리로 사멸시킨 백묵병 및 부저병 혼합물에 페퍼민트 오일이 첨가된 설탕액을 6일째 꿀벌 먹인 후 뇌의 CCHamide-2 발현량을 나타낸 도이다.

[26] 도 9는 열처리로 사멸시킨 백묵병 및 부저병 혼합물에 페퍼민트 오일이 첨가된 설탕액을 6일째 꿀벌 먹인 후 지방체에서 난황단백질(Vitellogenin, Vg)의 발현량을 나타낸 도이다.

[27] 도 10은 열처리로 사멸시킨 백묵병 및 부저병 혼합물에 페퍼민트 오일이 첨가 된 설탕액을 6일째 꿀벌 먹인 후 지방체에서 디펜신-1(Defensin-1)의 발현량을 나타낸 도이다.

[28] 도 11은 열처리로 사멸시킨 백묵병 및 부저병 혼합물에 페퍼민트 오일이 첨 가 된 설탕액을 6일째 꿀벌에 먹인 후 지방체에서 인슐린 유사 펩타이드(Insulin-like peptide 2, ILP2)의 발현량을 나타낸 도이다

[29] 도 12는 열처리로 사멸시킨 백묵병 및 부저병 혼합물에 페퍼민트 오일이 첨가 된 화분떡 및 꿀 희석액을 봉군에 공급하여 7, 8, 9일째 꿀벌의 지방체에서 Vg의 발현을 나타낸 도이다.

[30] 도 13은 열처리로 사멸시킨 백묵병 및 부저병 혼합물에 페퍼민트 오일이 첨 가 된 화분떡 및 꿀 희석액을 봉군에 공급하여 7, 8, 9일째 꿀벌의 지방체에서 디펜신-1의 발현을 나타낸 도이다.

[31] 도 14는 열처리로 사멸시킨 백묵병 및 부저병 혼합물에 페퍼민트 오일이 첨가 된 화분떡 및 꿀 희석액을 봉군에 공급하여 1, 2, 3일째 유충체에서 디펜신-1의 발현을 나타낸 도이다.

[32] 도 15는 열처리로 사멸시킨 백묵병 및 부저병 혼합물에 페퍼민트 오일이 첨가된 화분떡 및 꿀 희석액을 공급한 봉군에서 유충을 대상으로 살아있는 부저병을 24 시간 먹인 후 생존율을 나타낸 도이다.

[33] (Larvae:유충, prepupa:전용, Pupa:번데기)

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[34] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 구현 예로 본 발명을 상세히 설명

[35] 하기로 한다. 다만, 하기 구현 예는 본 발명에 대한 예시로 제시되는 것으로, 당업자에게 주지 저명한 기술 또는 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에는 그 상세한 설명을 생략할 수 있고, 이에 의해 본 발명이 제한되지는 않는다, 본 발명은 후술하는 특허청구범위의 기재 및 그로부터 해석되는 균등 범주 내에서 다양한 변형 및 응용이 가능하다.

[36] 또한, 본 명세서에서 사용되는 용어 (terminology)들은 본 발명의 바람직한

[37] 실시예를 적절히 표현하기 위해 사용된 용어들로서, 이는 사용자, 운용자의 의도 또는 본 발명이 속하는 분야의 관례 등에 따라 달라질 수 있다. 따라서, 본 용어들에 대한 정의는 본 명세서 전반에 걸친 내용을 토대로 내려져야 할 것이다. 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함"한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.

[38] 본 발명은 열처리된 백묵병 및 부저병의 혼합물을 유효성분으로 포함하는 꿀벌속(Apis)의 면역 증진 또는 면역 활성화 조성물을 제공한다.

[39] 일 실시예에 있어서, 상기 백묵병은 백묵병의 세균 *Ascosphaera apis*인 것이 나, 이에 제한되지 않는다.

[40] 일 실시예에 있어서, 상기 부저병은 부저병의 세균 *Paenibacillus larvae*인 것이나, 이에 제한되지 않는다.

[41] 일 실시예에 있어서, 상기 백묵병 및 부저병 각각의 농도는 10 내지 10^7인 것이나, 이에 제한되지 않는다.

[42] 일 실시예에 있어서, 상기 백묵병 및 부저병의 혼합 비율은 0.5:0.5 내지 2:2인 것이나, 이에 제한되지 않는다.

[43] 일 실시예에 있어서, 상기 조성물의 섭취시기는 12시간 내지 100시간인 것이나, 이에 제한되지 않는다.

[44] 일 실시예에 있어서, 상기 조성물은 면역관련 유전자인 난황단백질 (Vitellogenin, Vg) 및 디펜신-1(Defensin-1)의 발현을 증가시키는 것이나, 이에 제한되지 않는다.

[45] 일 실시예에 있어서, 상기 꿀벌 속은 *A. andreniformis, A. mellifera, A. cerana, A. florea, A. dorsata, A. koschevnikovi* 및 *A. nigrocincta*으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것이나, 이에 제한되지 않는다.

[46] 일 실시예에 있어서, 상기 조성물은 페퍼민트 오일을 더 포함하는 것일 수 있다.

[47] 상기 페퍼민트오일은 백묵병 및 부저병 혼합물의 0.1 내지 0.01%을 첨가하는 것이나, 이에 제한되지 않는다.

[48] 일 구현예에 있어서, 본 발명은 열처리된 백묵병 및 부저병의 혼합물을 유효성분으로 포함하는 꿀벌 속(Apis)의 발육 증진용 조성물을 제공한다.

[49] 일 실시예에 있어서, 상기 조성물은 페퍼민트 오일을 더 포함하는 것일 수 있다.

[50] 일 실시예에 있어서, 상기 조성물은 섭식 촉진 펩타이드(CCHamide-2) 및 인슐린 유사 펩타이드(Insulin-like peptide 2, ILP2)의 발현을 증가시키는 것이나, 이에 제한되지 않는다.

[51] 일 실시예에 있어서, 상기 꿀벌 속은 *A. andreniformis, A. mellifera, A. cerana, A. florea, A. dorsata, A. koschevnikovi* 및 *A. nigrocincta*으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것이나, 이에 제한되지 않는다.

발명의 실시를 위한 형태

[52] 이하, 본 발명을 실시예를 통하여 더욱 상세히 설명하기로 한다. 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[53]

[54] **준비예 1. 화분떡 및 꿀 희석액의 조성물 제조**

[55] **준비예1-1. 부저병 및 백묵병 배양**

[56] 꿀벌 부저병의 원인균 및 백묵병의 원인균을 준비하였다. 구체적으로는 면역활성화를 위해 세균 *Paenibacillus larvae*는 LB 배지를 사용하여 37 ℃에서 48시간 동안 진탕배양을 실시하였다. 세균만을 수거하기 위하여 3,000 rpm에서 5분 동안 원심분리를 실시하고 PBS(140 mM NaCl, 27 mM KCl, 8 mM Na_2HPO_4, 1.5 mM KH_2PO_4, PH 7.4)를 사용하여 3회 세척한 후 다시 PBS에 세균을 현탁하여 평판계수법으로 세균의 수를 계산하였다. 백묵병 *Ascosphaera apis*는 PDA 배지를 사용하여 27 ℃에서 7일 동안 배양 후, 포자를 수거하였으며, 포자낭을 터뜨려 포자를 확보하였다. 확보한 포자는 PBS 용액으로 3회 세척하고 혈구계산반(hemocytometer)를 이용하여 포자의 수를 측정하였다.

[57]

[58] **준비예 1-2. 화분떡 및 설탕액 또는 꿀 희석액 제조**

[59] 꿀벌 면역 활성화를 위한 40% 설탕액은 10^3, 10^4, 10^5, 10^6 및 10^7/ml 부저병 세균 또는 백묵병 포자를 혼합하여 제조하였다. 또한 분석을 통해 선정한 적정 농도[백묵병(10^5/ml)과 부저병(10^4/ml)]의 적합한 혼합 비율을 선정하기 위하여 백묵병:부저병 비율을 0.5:0.5, 0.5:1, 1:0.5, 1:1로 설탕액에 혼합하여 제조하였다.

[60] 본 발명의 면역력 강화와 섭식 촉진를 위해 분석을 통해 선정한 백묵병:부저병 혼합물 혼합 비율(1:0.5)에 페퍼민트 오일 0.05%를 혼합하여 화분떡 및 설탕 희석액을 제조하였다.

[61] 또한, 봉군 실험을 위하여 화분떡은 시중에 판매되고 있는 화분떡(불로화분떡, 불로양봉원)에 백묵병은 2×10^9/1kg, 부저병은 1×10^8/1kg을 혼합하여 제조하였다. 40% 꿀 희석액의 경우 백묵병은 2×10^9/1L, 부저병은 1×10^8/1L을 혼합하여 제조하였다.

[62]

[63] **준비예 2. 성충 및 유충 꿀벌 준비**

[64] **준비예 2-1. 꿀벌 사육**

[65] 본 실험에 사용된 꿀벌(*Apis mellifera*)는 동아대학교 양봉장에서 사육되었다. 새로 우화한 일벌(성충 1일)은 가슴부위에 페인트 마커(Monami Co., Ltd., 서울, 한국)로 표시하고 다시 봉군에 넣어 사육되었다. 꿀벌의 성충 일벌 실험을 위하여 가슴에 표시한 6일째 일벌을 무작위로 선별하여 작은 케이지(11.3 × 7 × 4.3 cm) 안에 넣어 80% 습도, 34℃의 암실 조건에서 실험을 진행 하였다.

[66]

[67] **준비예 2-2. 봉군에서의 집단 면역 형성 분석**

[68] 본 실험에서 봉군에서 집단 면역형성 분석을 위하여 열처리로 사멸된 백묵병 및 부저병 혼합물이 첨가된 화분떡 및 40% 꿀 희석액을 봉군에 공급하였고 대조구에는 백묵병 및 부저병 혼합물이 포함되지 않은 일반 화분떡 및 40% 꿀 희석액을 공급하였다. 14일간 공급 후 7, 8, 9일째 꿀벌을 무작위로 선별하여 지방체로부터 난황단백질(Vitellogenin, Vg) 및 디펜신-1(Defensin-1) 발현 분석하였으며 유충의 경우 1, 2, 3일째 유충을 무작위로 선별하여 몸전체로부터 디펜신-1(Defensin-1) 발현을 분석하였다.

[69]

[70] **실시예 1. 꿀벌 백묵병 및 부저병 식이에 의한 꿀벌의 면역증진 및 활성화 효과**

[71] **실시예 1-1. 유전자 발현 분석**

[72] 꿀벌에 열처리로 사멸시킨 백묵병 및 부저병이 혼합된 설탕 희석액을 식이에 의한 유전자 발현 분석하기 위하여, 우선, 백묵병 또는 부저병 10^3, 10^4, 10^5, 10^6 및 10^7/ml이 포함된 40% 설탕(sucrose) 희석액을 6일째 성충(n=50)에 24시간 동안 먹이고 대조구의 경우 백묵병 또는 부저병이 포함되지 않은 40% 설탕 희석액을 먹인 후, 성충의 지방체에서 RNAiso Plus (TaKaRa Bio, 일본)을 이용하여 total RNA를 추출하였다. RNA 샘플의 농도와 순도는 NanoDrop One(Thermo Fisher Scientific, 미국)을 사용하여 분석하고 AccuPower RT PreMix(바이오니아, 대전, 한국)를 이용하여 2 ㎍의 RNA를 이용하여 cDNA를 합성하였다. TB Green Premix Ex Taq™(TaKaRa Bio) 시약과 CronoSTAR™ 96 real-time PCR system(Clontech, 미국)을 이용하여 난황단백질(Vitellogenin, Vg) 및 디펜신-1(Defensin-1) 발현량을 비교 분석하였다. 발현 분석을 위한 대조 유전자로 β-액틴(β-actin)을 이용하였다. RT-PCR에 사용한 프라이머 서열은 하기 표 1에 나타내었다.

[73] [표1]

유전자(Gene)	염기서열(sequence) (5` - 3`)
Vg	F: GCAGAATACATGGACGGTGT
	R: GAACAGTCTTCGGAAGCTTG
Defensin-1	F: TGTCGGCCTTCTCTTCATGG
	R: TGACCTCCAGCTTTACCCAAA
β-actin	F: ATGTGTGACGACGAAGTAGCA
	R: TCCTTTTGACCCATACCG

[74]

[75] **실시예 1-2. 백묵병 및 부저병 처리에 따른 면역증진 및 활성화 효과 농도**

[76] 도 1에 나타낸 바와 같이, 난황단백질(Vitellogenin, Vg)은 백묵병 10^3, 10^4 및 10^5 (ml 당)을 먹인 꿀벌의 지방체에서 대조구에 비해 2배 이상 발현량이 많았으며, 특히 10^3/ml를 먹인 지방체에서 가장 발현량이 높았다. 부저병을 먹인 경우 10^3/ml의 농도에서부터 발현이 증가하여 10^6/ml을 먹인 꿀벌의 지방체에서 가장 발현량이 높은 것을 확인 하였다.

[77] 또한, 지방체에서 디펜신-1(Defensin-1)의 발현량을 비교 분석한 결과, 백묵병을 10^5/ml군에서 가장 높은 발현량을 나타낸 반면, 부저병의 경우에는 10^3 및 10^4/ml로 희석한 군에서 발현량이 가장 높았으며, 10^3 및 10^4/ml 발현량의 차이는 유사한 것을 확인하였다(도 2). 이러한 결과는 열처리로 사멸된 백묵병 및 부저병 첨가가 꿀벌의 면역관련 유전자의 발현을 높일 수 있음을 시사한다.

[78] 따라서, 도 1 및 도 2에 나타낸 바와 같이, 꿀벌 면역 활성화를 위한 첨가물로서 백묵병은 10^5/ml 농도, 부저병은 10^4/ml의 농도가 면역 활성화가 가장 적합하여 하기 농도로 실험 하였다.

[79]

[80] **실시예 1-3. 백묵병 및 부저병 혼합물 혼합 비율에 따른 면역증진 및 활성화 효과**

[81] 본 발명의 열처리로 사멸시킨 백묵병 및 부저병 혼합물의 혼합 비율을 선정하기 위하여, 설탕 희석액에 상기 실시예 1-2에서 결정된 농도인 백묵병(10^5/ml): 부저병(10^4/ml)을 0.5:0.5, 0.5:1, 1:0.5 및 1:1 비율로 혼합하여 6일째 꿀벌 성충(n=50)에 24시간 동안 먹인 후 지방체로부터 난황단백질(Vitellogenin, Vg) 및 디펜신-1(Defensin-1)의 발현량을 분석하였다.

[82] 그 결과, 난황단백질(Vg) 및 디펜신-1(Defensin-1)의 발현이 백묵병:부저병의 비율이 1:0.5에서 난황단백질(Vg)는 대조구에 비해 약 2배, 디펜신-1(Defensin-1)은 대조구에 비해 약 2.5배 발현이 높아 이후 실험에서는 1:0.5 혼합 비율로 실험을 실시하였다(도 3, 도 4).

[83]

[84] **실시예 1-4. 백묵병 및 부저병 혼합물 공급 이후의 꿀벌의 면역 증진 및 활성화 효과**

[85] 열처리로 사멸시킨 백묵병 및 부저병이 희석된 설탕액 먹이 섭취 시간에 따른 발현량을 조사하기 위하여 백묵병(10^5/ml):부저병(10^4/ml)을 1:0.5 비율로 첨가한 설탕 희석액을 우화 후 6일째 성충(n=40)에 공급하고 24시간, 48시간 및 72시간 째 난황단백질(Vg) 및 디펜신-1(Defensin-1)의 발현량을 분석하였다.

[86] 그 결과, 24시간, 48시간 및 72시간 모두 백묵병과 부저병 혼합물이 첨가된 설탕 희석액을 먹은 꿀벌 지방체에서 대조구에 비해 난황단백질(Vg) 및 디펜신-1(Defensin-1)의 발현량이 높았으며, 72시간까지 발현이 지속되어서 꿀벌의 면력 활성화가 유지되는 것을 확인 하였다(도 5,도 6).

[87]

[88] **실시예 2. 백묵병 및 부저병 혼합물의 페퍼민트 첨가에 의한 체중 변화, 면 역 증진 및 활성화**

[89] **실시예 2-1. 백묵병 및 부저병 혼합물의 페퍼민트 첨가에 의한 섭식 촉진 및 체중 변화 확인**

[90] 본 발명의 꿀벌 면역 활성화를 위한 열처리로 사멸시킨 백묵병 및 부저병 혼합물이 첨가된 설탕액 희석액에 페퍼민트 오일 0.05%를 첨가하여 섭식 촉진 및 체중이 증가되는지 알아 보기 위해, 우선, 열처리로 사멸시킨 백묵병 및 부저병 혼합물에 페퍼민트 오일 첨가에 대한 체중변화를 알아보았다.

[91] 우화 후 6일째인 꿀벌(n=50)을 대상으로 대조구, 열처리로 사멸시킨 백묵병 및 부저병 혼합물이 첨가된 설탕 희석액, 페퍼민트 오일 0.05%만 포함된 설탕 희석액, 열처리로 사멸시킨 백묵병 및 부저병 혼합물과 페퍼민트 오일 0.05%가 포함된 설탕 희석액을 48시간, 72시간 동안 먹인 후 꿀벌의 체중을 비교해 보았다.

[92] 그 결과, 대조구에 비해 페퍼민트 오일 0.05% 첨가된 설탕 희석액을 먹인 실험군에서 체중 증가를 나타내었으며, 또한 백묵병 및 부저병 혼합물이 첨가된 설탕 희석액을 먹인 실험군에서도 페퍼민트 오일 0.05% 첨가된 설탕 희석액을 먹인 실험군에 비해 체중이 증가하였다.

[93] 특히, 열처리로 사멸시킨 백묵병 및 부저병 혼합물과 페퍼민트 오일 0.05%가 포함된 설탕 희석액을 먹인 실험군에서 체중이 가장 많이 증가하는 것을 확인 하였다(도 7).

[94]

[95] **실시예 2-2. 백묵병 및 부저병 혼합물의 페퍼민트 첨가에 의한 발육 및 면역 관련 유전자 발현 분석**

[96] 본 발명의 열처리로 사멸시킨 백묵병 및 부저병 혼합물이 첨가된 설탕액 희석액에 페퍼민트 오일을 첨가하에 의한 발육 관련 유전자 및 면역 관련 유전자들의 발현을 분석하기 위하여, 우화 후 6일째인 꿀벌(n=20)을 대상으로 대조구, 열처리로 사멸시킨 백묵병 및 부저병 혼합물이 첨가된 설탕 희석액, 페퍼민트 오일 0.05%만 포함된 설탕 희석액, 열처리로 사멸시킨 백묵병 및 부저병 혼합물과 페

퍼민트 오일 0.05%가 포함된 설탕 희석액을 먹인 꿀벌의 뇌와 지방체 조직으로부터 발현을 분석하였다. CCHamide-2 및 ILP-2 발현량 분석에 사용한 프라이머 서열은 하기 표 2에 나타내었다.

[97] [표2]

유전자(Gene)	염기서열(sequence) (5` - 3`)
CCHamide-2	F: CGATCCAAATATACGGGAGAAA
	R: CTTTCTTCTCAGAGTCGTCAT
ILP-2	F: TGCGGTAGTGTTTATAATTCTCGAT
	R: GGCAACATTCTTCATGAATTCCTTT

[98] 그 결과, 섭식 촉진 펩타이드로 알려진 섭식 촉진 펩타이드(CCHamide-2)는 대조구에 비해 열처리로 사멸시킨 백묵병 및 부저병 혼합물이 첨가된 설탕 희석액, 페퍼민트 오일 0.05%만 포함된 설탕 희석액, 백묵병 및 부저병 혼합물과 페퍼민트 오일 0.05%가 포함된 설탕 희석액을 먹인 꿀벌의 뇌에서 발현이 현저하게 증가하는 결과를 확인 하였다(도 8).

[99] 인슐린 유사 펩티드인 인슐린 유사 펩타이드(Insulin-like peptide 2, ILP2)는 대조구 및 페퍼민트 오일 0.05%만 포함된 설탕 희석액을 먹인 실험군에 비해 열처리로 사멸시킨 백묵병 및 부저병 혼합물이 첨가된 설탕 희석액과 백묵병 및 부저병 혼합물과 페퍼민트 오일 0.05%가 첨가된 설탕 희석액을 먹인 꿀벌의 지방체에서 발현이 상대적으로 높았으며, 특히 열처리로 사멸시킨 백묵병 및 부저병 혼합물과 페퍼민트 오일 0.05%가 첨가된 설탕 희석액에서 발현이 가장 높은 것을 확인하였다(도 9).

[100] 또한, 난황단백질(Vg) 및 디펜신-1(Defensin-1)은 열처리로 사멸시킨 백묵병 및 부저병 혼합물이 첨가된 설탕 희석액에 비해 백묵병 및 부저병 혼합물과 페퍼민트 오일 0.05%가 첨가된 설탕 희석액을 먹인 꿀벌의 지방체에서 가장 높게 발현이 나타나는 것을 확인 하였다(도 10, 11).

[101] 따라서, 열처리로 사멸시킨 백묵병 및 부저병 혼합물이 첨가된 설탕 희석액에 비해 페퍼민트 오일을 첨가하여 섭식을 촉진시킴으로써 체중 증가와 함께 난황단백질(Vg) 및 디펜신-1(Defensin-1)의 발현이 더욱 증가하여, 면역 증진 및 활성화 효과가 나타남을 시사한다.

[102]

[103] **실시예 3. 봉군 내 실험을 통한 세대 간 면역 강화 분석**

[104] **실시예 3-1. 백묵병 및 부저병 혼합물을 섭취한 성충이 낳은 알에서 부화한 유충의 면역 증진 및 활성화 확인**

[105] 봉군 내에서 세대간 면역 활성화 여부를 알아보기 위하여, 열처리로 사멸시킨 백묵병 및 부저병 혼합물이 첨가된 화분떡 및 꿀 희석액을 봉군에 넣어주고 20

일간 공급한 후 꿀벌(n=20) 및 유충(n=50)을 대상으로 난황단백질(Vg) 및 디펜신-1(Defensin-1)의 발현량을 분석하였다.

[106] 실험적 유의성을 높이기 위하여 봉군 실험은 3회 반복 실시하였다. 7, 8 및 9일째 내역일벌 지방체 발현분석에서 대조구에 비하여 난황단백질(Vg)의 발현이 현저히 증가 하는 것을 확인하였다(도 12). 또한, 디펜신-1(Defensin-1)의 발현도 상대적으로 증가하는 결과을 확인 하였다(도 13).

[107] 유충의 경우 부화 후 1, 2 및 3일째 유충을 대상으로 디펜신-1(Defensin-1)의 발현량을 대조구와 비교하였다. 대조구는 디펜신-1(Defensin-1)의 발현의 변화가 미미한데, 본 발명의 열처리로 사멸시킨 백묵병 및 부저병 혼합물이 첨가된 화분떡 및 설탕 희석액을 공급한 봉군의 유충은 발육이 증가함에 따라 디펜신-1(Defensin-1)의 발현이 증가하였다(도 14).

[108] 이러한 결과는 본 발명의 열처리로 사멸시킨 백묵병 및 부저병 혼합물을 섭취한 후 꿀벌의 지방체에서 난황단백질(Vg)이 발현이 증가되었고 다시 난황단백질(Vg)가 병원체 조각을 하인두샘으로 운반하여 꿀벌이 유충에 먹이를 공급할 때 유충으로 병원체 조각이 전달됨으로써 디펜신-1(Defensin-1)의 발현이 증가였음을 확인 하였다.

[109]

[110] **실시예 3-2. 백묵병 및 부저병 혼합물을 섭취한 유충의 번데기시기 까지 면역증진 및 활성화 확인**

[111] 본 발명의 열처리로 사멸시킨 백묵병 및 부저병 혼합물이 첨가된 화분떡 및 꿀 희석액을 봉군에 20일 동안 공급하고 봉군에 20일 동안 공급하였고, 2일째 유충(n=20)을 48-well에 옮겨 살아있는 부저병 1×10^{1}/larva 및 1×10^{2}/larva를 먹이에 넣어 24시간 동안 공급한 후 부저병이 없는 깨끗한 먹이를 공급하였다.

[112] 대조군의 경우는 일반 화분떡과 꿀 희석액을 공급한 봉군의 유충을 대상으로 같은 방법으로 실험을 실시하였다. 이후 성충 때까지 생존율을 분석하였으며 3회 반복 실험하였다.

[113] 그 결과, 유충시기에는 부저병으로 인한 사충율의 변화가 크지 않았지만, 전용 시기 대조군은 지속적으로 사충율이 증가하여 전용 3일째 열처리 사멸된 백묵병 및 부저병 혼합물이 첨가된 화분떡 및 꿀 희석액을 먹인 전용의 생존율이 75~78% 그리고 대조군의 생존율이 34~35%로 나타났다. 또한, 번데기 시기 6일째 부저병 1×10^{1}/larva 및 1×10^{2}/larva를 먹인 대조군의 경우 생존율이 각각 9% 및 21%로 나타난 반면, 본 발명의 열처리 사멸 백묵병 및 부저병 혼합물이 첨가된 화분떡 및 꿀 희석액을 공급한 번데기는 51% 및 56%로 나타났다(도 15).

[114] 이러한 결과는 열처리 사멸된 백묵병 및 부저병 혼합물이 첨가된 화분떡 및 꿀 희석액 공급이 꿀벌 질병에 대한 면역력을 높임으로서 질병에 대한 저항성을 가질 수 있음을 나타낸다.

[115] 따라서, 본 발명의 실시예를 통해 열처리 사멸된 백묵병 및 부저병 혼합물과 페퍼민트 오일 0.05%가 첨가된 화분떡 및 꿀 희석액의 공급은 꿀벌에서 성충뿐만 아니라 유충에도 전달될 수 있는 세대 간 면역 활성화를 위해 활용될 수 있음을 시사한다.

청구범위

[청구항 1] 열처리된 백묵병 및 부저병의 혼합물을 유효성분으로 포함하는 꿀벌속(Apis)의 면역 증진 또는 면역 활성화 조성물.

[청구항 2] 제 1항에 있어서,
상기 백묵병은 백묵병의 세균 *Ascosphaera apis*인 것인, 조성물.

[청구항 3] 제 1항에 있어서,
상기 부저병은 부저병의 세균 *Paenibacillus larvae*인 것인, 조성물.

[청구항 4] 제 1항에 있어서,
상기 백묵병 및 부저병 각각의 농도는 10 내지 10^7인 것인, 조성물.

[청구항 5] 제 1항에 있어서,
상기 백묵병 및 부저병의 혼합 비율은 0.5:0.5 내지 2:2인 것인, 조성물.

[청구항 6] 제 1항에 있어서,
상기 조성물의 섭취시기는 12시간 내지 100시간인 것인, 조성물.

[청구항 7] 제 1항에 있어서,
상기 조성물은 면역관련 유전자인 난황단백질(Vitellogenin, Vg) 및 디펜신-
1(Defensin-1)의 발현을 증가시키는 것인, 조성물.

[청구항 8] 제 1항에 있어서,
상기 꿀벌 속은 *A. andreniformis, A. mellifera, A. cerana, A. florea, A. dorsata, A. koschevnikovi* 및 *A. nigrocincta*으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이
상인 것인, 조성물.

[청구항 9] 제 1항에 있어서,
상기 조성물은 페퍼민트 오일을 더 포함하는 것인, 조성물.

[청구항 10] 제 9항에 있어서,
상기 페퍼민트오일은 백묵병 및 부저병 혼합물의 0.1 내지 0.01%을 첨가하는
것인, 조성물.

[청구항 11] 열처리된 백묵병 및 부저병의 혼합물을 유효성분으로 포함하는 꿀벌속(Apis)의 발육 증진용 조성물.

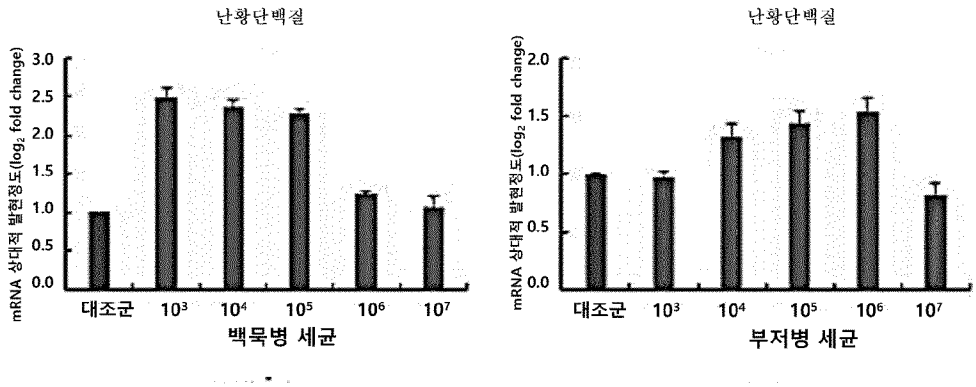
[청구항 12] 제 11항에 있어서,
상기 조성물은 페퍼민트 오일을 더 포함하는 것인, 조성물.

[청구항 13] 제 11항에 있어서,
상기 조성물은 섭식 촉진 펩타이드(CCHamide-2) 및 인슐린 유사 펩타이드(Insulin-like peptide 2, ILP2)의 발현을 증가시키는 것인, 조성물.

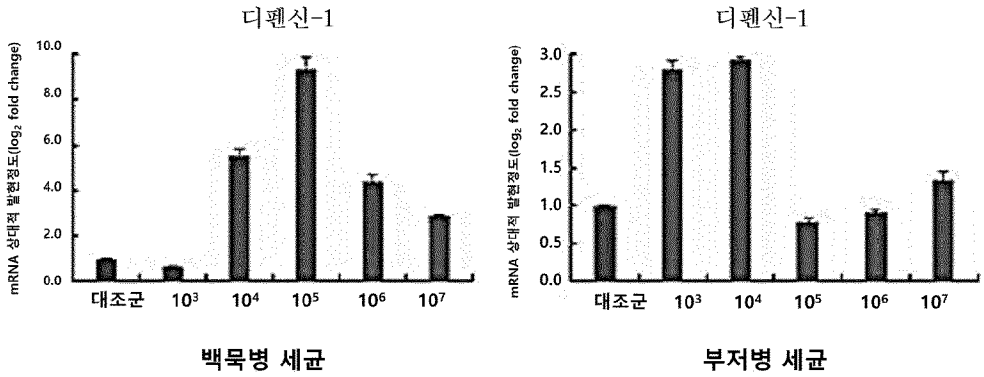
[청구항 14] 제 11항에 있어서,

상기 꿀벌 속은 *A. andreniformis, A. mellifera, A. cerana, A. florea, A. dorsata, A. koschevnikovi* 및 *A. nigrocincta*으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것인, 조성물.

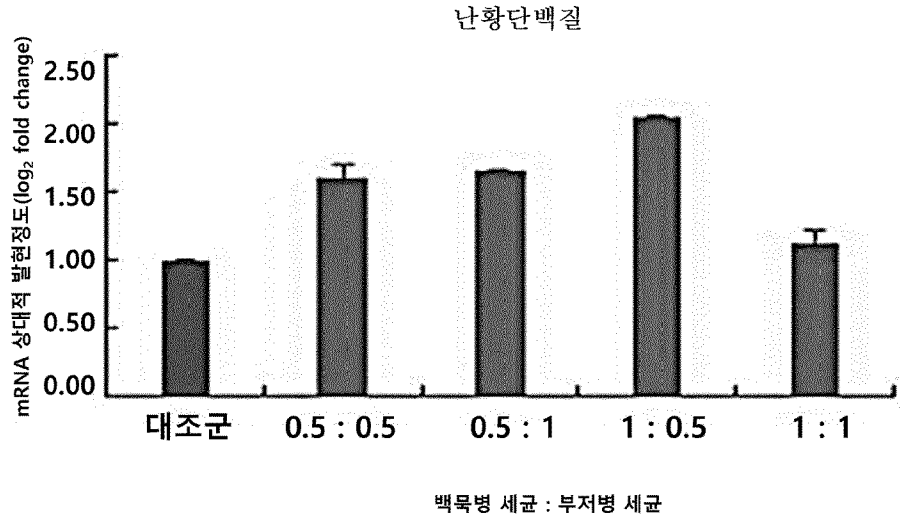
[도1]


난황단백질
mRNA 상대적 발현정도(log2 fold change)
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
대조군
10³
10⁴
10⁵
10⁶
10⁷
백묵병 세균
난황단백질
mRNA 상대적 발현정도(log2 fold change)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
대조군
10³
10⁴
10⁵
10⁶
10⁷
부저병 세균

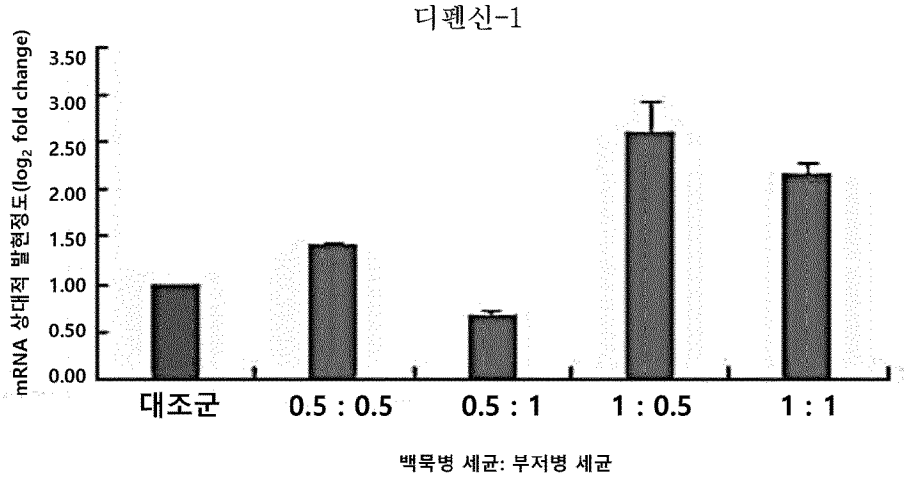
[도2]


디펜신-1
mRNA 상대적 발현정도(log2 fold change)
10.0
8.0
6.0
4.0
2.0
0.0
대조군
10³
10⁴
10⁵
10⁶
10⁷
백묵병 세균
디펜신-1
mRNA 상대적 발현정도(log2 fold change)
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
대조군
10³
10⁴
10⁵
10⁶
10⁷
부저병 세균

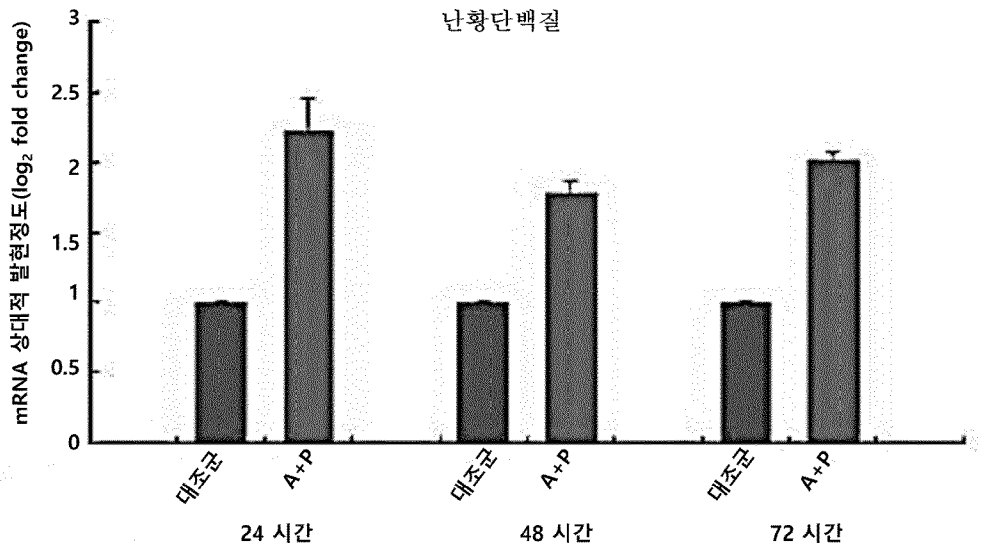
[도3]


난황단백질
mRNA 상대적 발현정도(log2 fold change)
2.50
2.00
1.50
1.00
0.50
0.00
대조군
0.5 : 0.5
0.5 : 1
1 : 0.5
1 : 1
백묵병 세균 : 부저병 세균

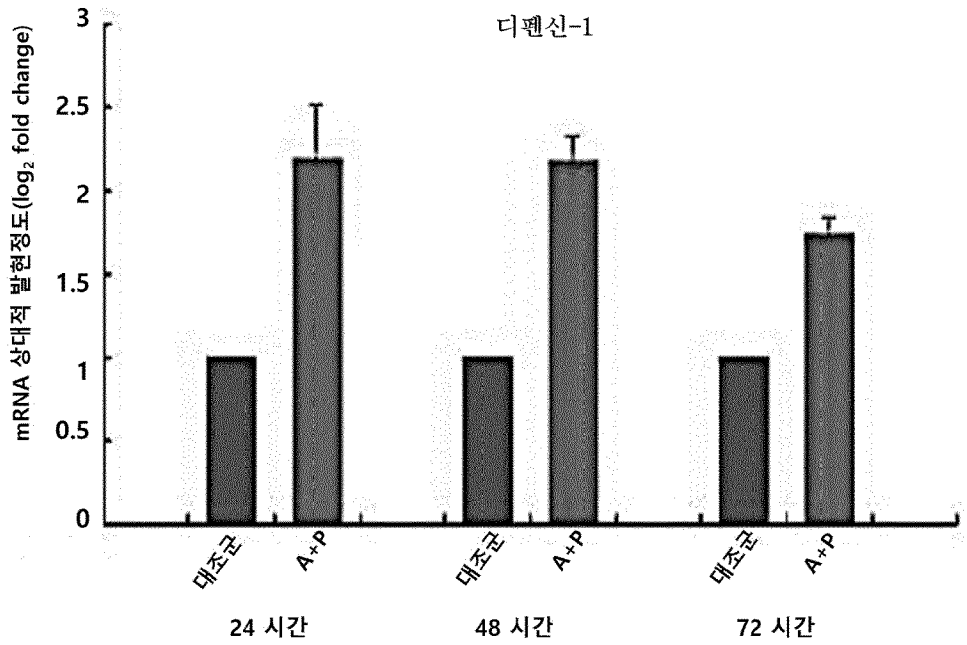
[도4]


디펜신-1
mRNA 상대적 발현정도(log2 fold change)
3.50
3.00
2.50
2.00
1.50
1.00
0.50
0.00
대조군
0.5 : 0.5
0.5 : 1
1 : 0.5
1 : 1
백묵병 세균: 부저병 세균

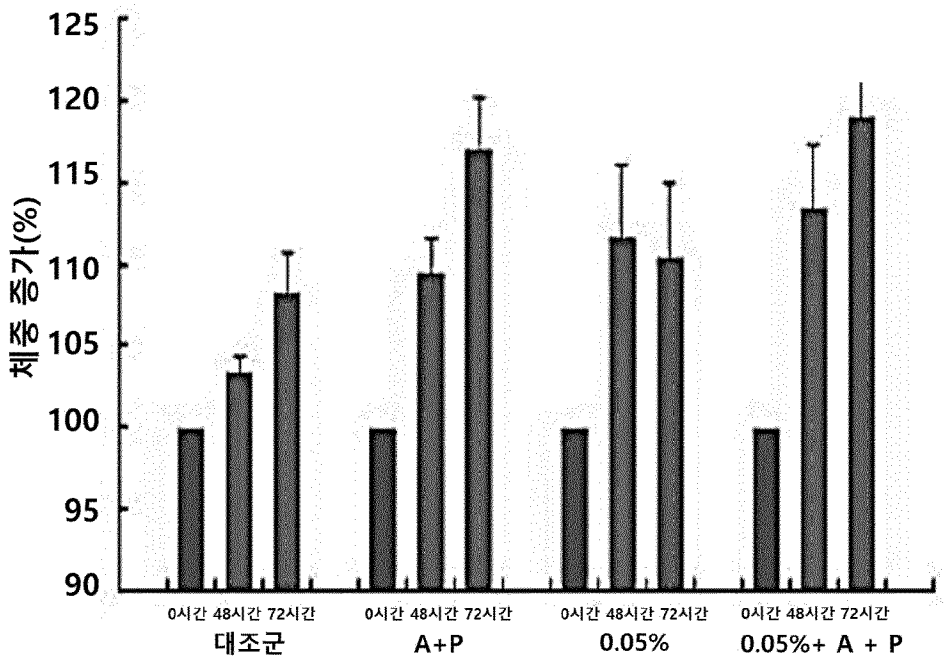
[도5]


난황단백질
mRNA 상대적 발현정도(log2 fold change)
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
대조군
A+P
대조군
A+P
대조군
A+P
24 시간
48 시간
72 시간

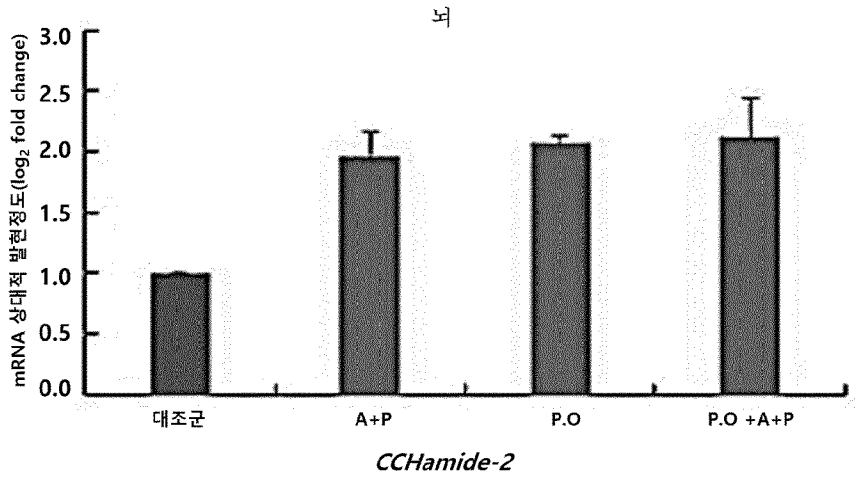
[도6]


디펜신-1
mRNA 상대적 발현정도(log2 fold change)
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
대조군
A+P
대조군
A+P
대조군
A+P
24 시간
48 시간
72 시간

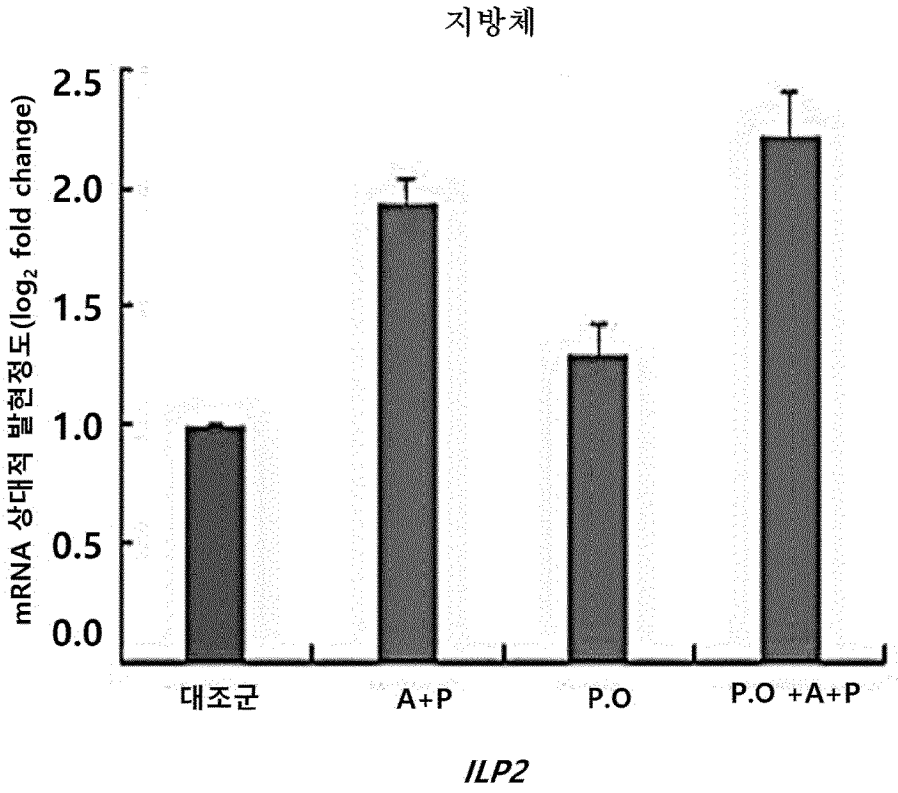
[도7]


체중 증가(%)
125
120
115
110
105
100
95
90
0시간 48시간 72시간
대조군
0시간 48시간 72시간
A+P
0시간 48시간 72시간
0.05%
0시간 48시간 72시간
0.05%+ A + P

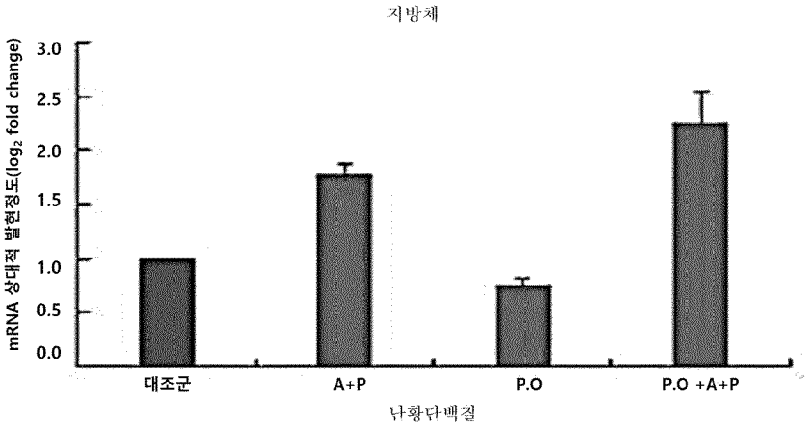
[도8]


뇌
mRNA 상대적 발현정도(log2 fold change)
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
대조군
A+P
P.O
P.O +A+P
CCHamide-2

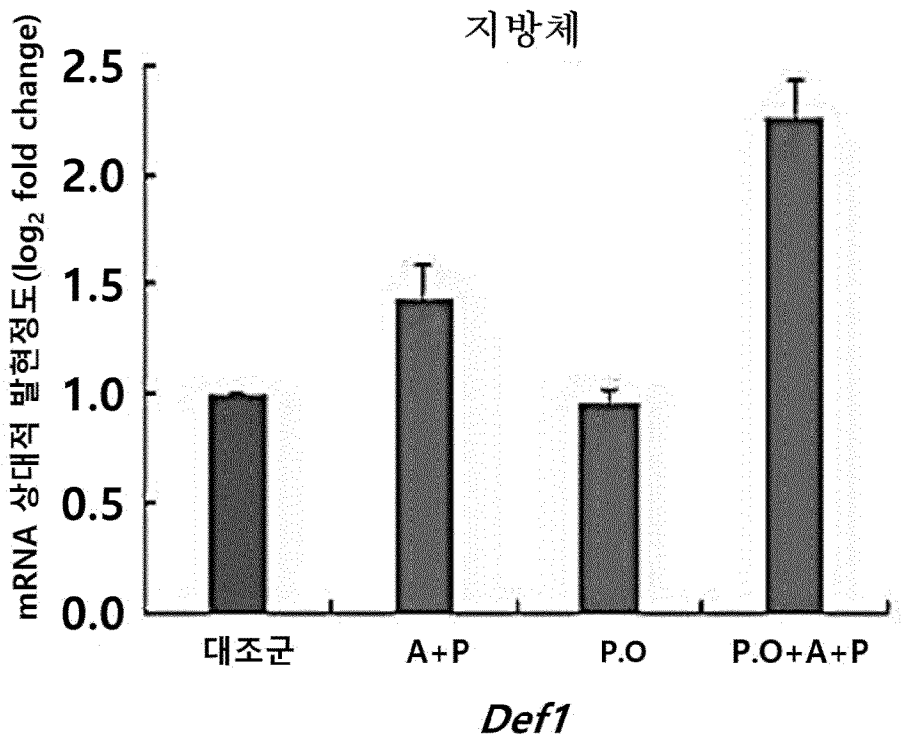
[도9]


지방체
mRNA 상대적 발현정도(log2 fold change)
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
대조군
A+P
P.O
P.O +A+P
ILP2

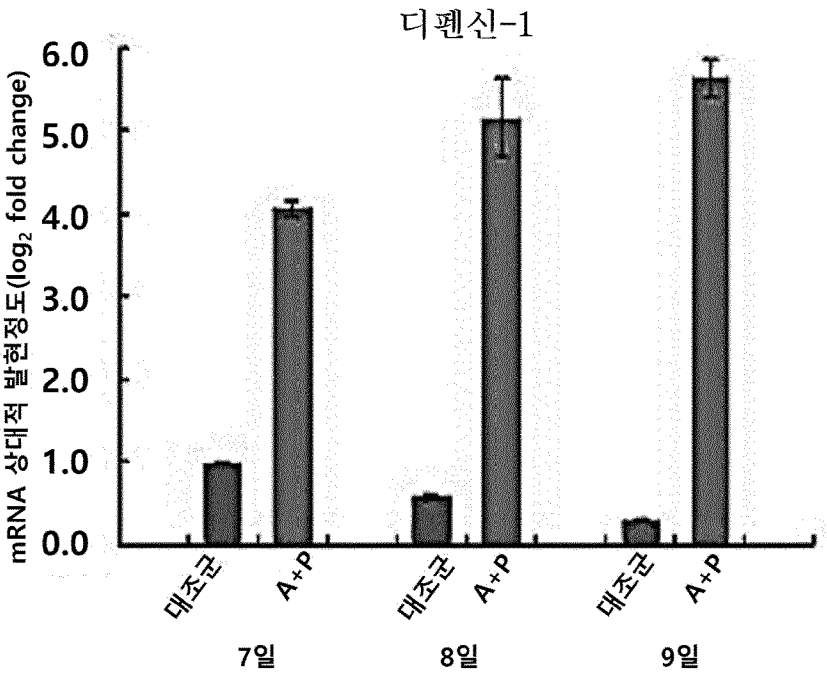
[도10]


지방체
mRNA 상대적 발현정도(log2 fold change)
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
대조군
A+P
P.O
P.O +A+P
나황단백질

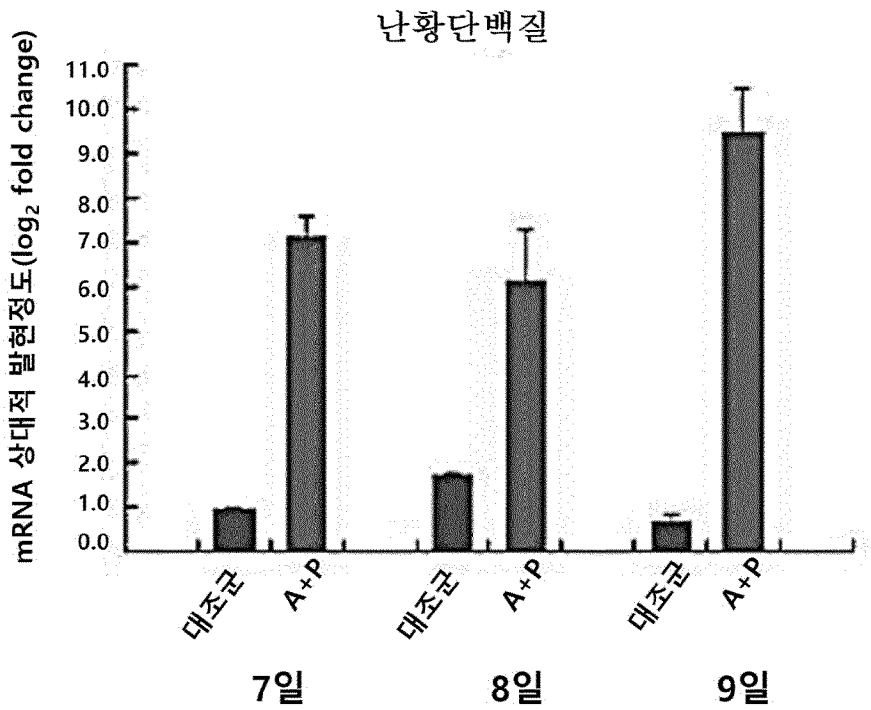
[도11]


지방체
mRNA 상대적 발현정도(log2 fold change)
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
대조군
A+P
P.O
P.O+A+P
Def1

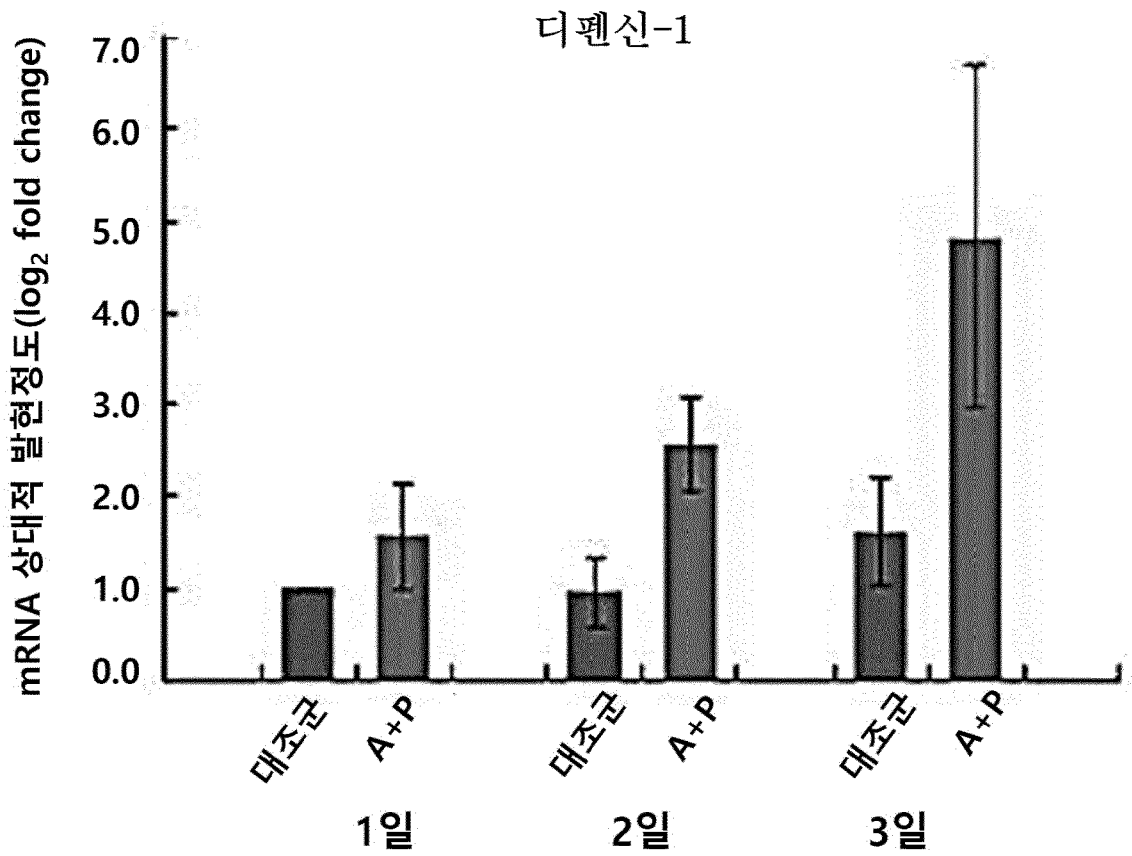
[도12]


디펜신-1
mRNA 상대적 발현정도(log2 fold change)
6.0
5.0
4.0
3.0
2.0
1.0
0.0
대조군
A+P
대조군
A+P
대조군
A+P
7일
8일
9일

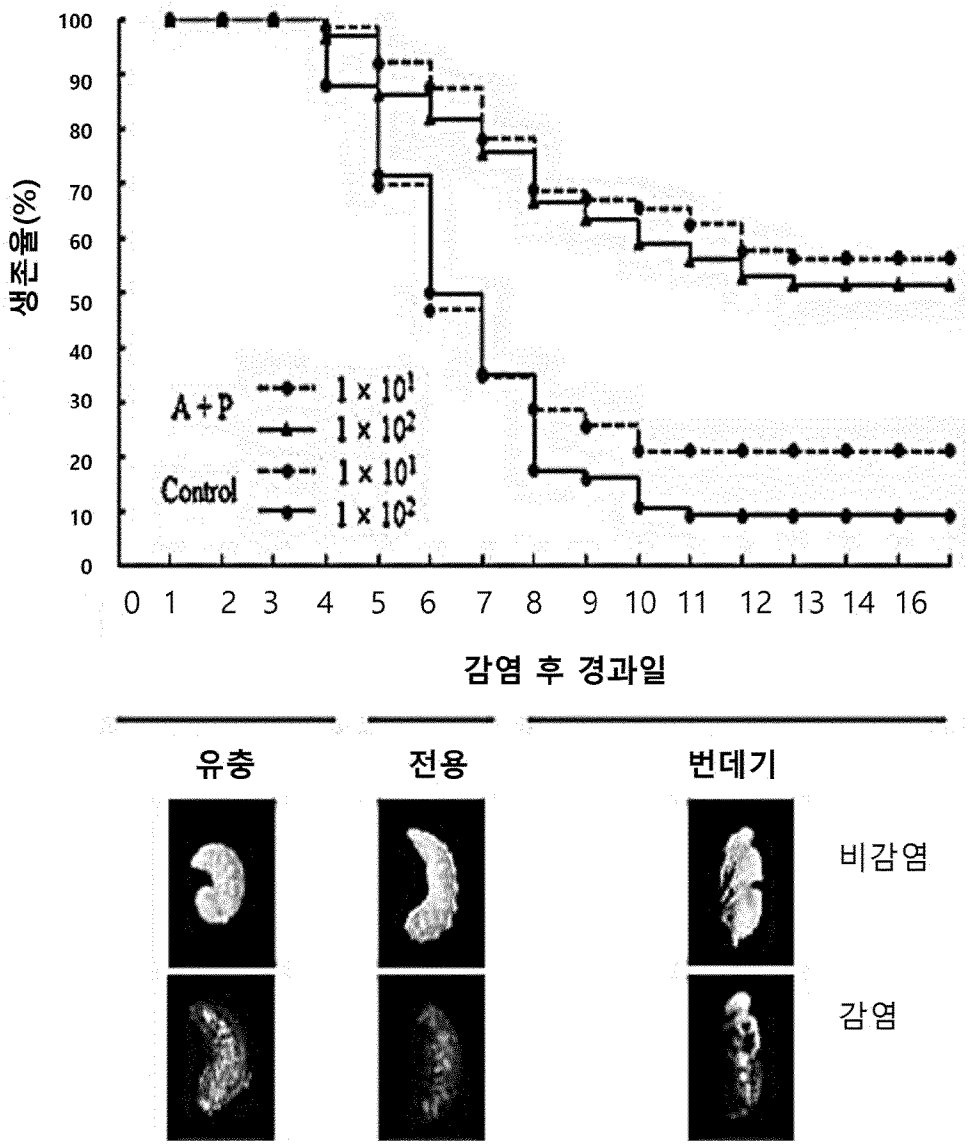
[도13]


난황단백질
mRNA 상대적 발현정도(log2 fold change)
11.0
10.0
9.0
8.0
7.0
6.0
5.0
4.0
3.0
2.0
1.0
0.0
대조군
A+P
대조군
A+P
대조군
A+P
7일
8일
9일

[도14]


디펜신-1
mRNA 상대적 발현정도(log2 fold change)
7.0
6.0
5.0
4.0
3.0
2.0
1.0
0.0
대조군
A+P
대조군
A+P
대조군
A+P
1일
2일
3일

[도15]


생존율(%)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
A+P
1 x 10¹
1 x 10²
Control
1 x 10¹
1 x 10²
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 16
감염 후 경과일
유충
전용
번데기
비감염
감염

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2023/016712

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A23K 10/16(2016.01)i; **A23K 50/90**(2016.01)i; **A23K 20/158**(2016.01)i; **C12N 1/14**(2006.01)i; **C12N 1/20**(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)

A23K 10/16(2016.01); A01K 51/00(2006.01); A23K 10/30(2016.01); A23K 20/10(2016.01); A61K 36/07(2006.01); A61K 39/02(2006.01); A61K 39/09(2006.01); A61K 45/06(2006.01)

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: 꿀벌(honey bee), 면역(immunity), 백묵병(chalk brood), 부저병(foulbrood), 세균(bacteria)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2021-0275658 A1 (DALAN ANIMAL HEALTH INC.) 09 September 2021 (2021-09-09) See claims 24-25; and paragraphs [0039]-[0098].	1-6,8-12,14
A		7,13
Y	LOPEZ, J. H. et al. Trans-generational immune priming in honeybees. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences. 2014, vol. 281, issue 1785, pp. 1-8. See abstract; and page 2.	1-6,8-12,14
Y	KR 10-2021-0028138 A (HEALTHY BEES LLC) 11 March 2021 (2021-03-11) See claim 1; and paragraphs [0069]-[0120].	9-10,12
A	US 2017-0035820 A1 (STAMETS, Paul Edward) 09 February 2017 (2017-02-09) See entire document.	1-14
A	US 2007-0026765 A1 (RENN, R. M.) 01 February 2007 (2007-02-01) See entire document.	1-14

☑ 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
"D" document cited by the applicant in the international application
"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	Date of mailing of the international search report
20 February 2024	**20 February 2024**

Name and mailing address of the ISA/KR	Authorized officer
Korean Intellectual Property Office **Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon 35208**	
Facsimile No. **+82-42-481-8578**	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2023/016712

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KIM, Y. H. et al. Transgenerational immune priming in honeybees through heat-killed pathogen cocktail feeding. 2022년도 한국응용곤충학회 (2022 Korean Society of Applied Entomology). G18 (publication date: 26 October 2022). See entire document. * This document is a known document declaring exceptions to lack of novelty by the applicant.	1-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2023/016712

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
US 2021-0275658 A1	09 September 2021	EP 3325007 A1	30 May 2018
		US 10994001 B2	04 May 2021
		US 2018-0214529 A1	02 August 2018
		WO 2017-017313 A1	02 February 2017
KR 10-2021-0028138 A	11 March 2021	US 10925920 B2	23 February 2021
		US 2019-0209640 A1	11 July 2019
		US 2021-0052685 A1	25 February 2021
		WO 2019-138344 A1	18 July 2019
US 2017-0035820 A1	09 February 2017	US 10813960 B2	27 October 2020
		US 10821145 B2	03 November 2020
		US 2018-0243356 A1	30 August 2018
US 2007-0026765 A1	01 February 2007	None	

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2023/016712

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A23K 10/16(2016.01)i; **A23K 50/90**(2016.01)i; **A23K 20/158**(2016.01)i; **C12N 1/14**(2006.01)i; **C12N 1/20**(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A23K 10/16(2016.01); A01K 51/00(2006.01); A23K 10/30(2016.01); A23K 20/10(2016.01); A61K 36/07(2006.01); A61K 39/02(2006.01); A61K 39/09(2006.01); A61K 45/06(2006.01)

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: 꿀벌(honey bee), 면역(immunity), 백묵병(chalk brood), 부저병(foulbrood), 세균(bacteria)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	US 2021-0275658 A1 (DALAN ANIMAL HEALTH INC.) 2021.09.09 청구항 24-25; 단락 [0039]-[0098]	1-6,8-12,14
A		7,13
Y	LOPEZ, J. H. 등, "Trans-generational immune priming in honeybees", Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 2014, 제281권, 제1785호, 1-8쪽 초록; 2쪽	1-6,8-12,14
Y	KR 10-2021-0028138 A (헬씨 비즈 엔엔씨) 2021.03.11 청구항 1; 단락 [0069]-[0120]	9-10,12
A	US 2017-0035820 A1 (PAUL EDWARD STAMETS) 2017.02.09 전문	1-14
A	US 2007-0026765 A1 (RENN, R. M.) 2007.02.01 전문	1-14

☑ 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
"D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 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 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.
"Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.
"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일
2024년02월20일(20.02.2024)	**2024년02월20일(20.02.2024)**

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

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

팩스 번호 **+82-42-481-8578**

심사관

허주형

전화번호 **+82-42-481-5373**

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2023/016712

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	KIM, Y. H. 등, "Transgenerational immune priming in honeybees through heat-killed pathogen cocktail feeding", 2022년도 한국응용곤충학회, G18 (공개일: 2022.10.26) 전문 * 위 문헌은 출원인이 신규성 상실의 예외로서 선언한 공지문헌임	1-14

국 제 조 사 보 고 서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2023/016712

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 2021-0275658 A1	2021/09/09	EP 3325007 A1	2018/05/30
		US 10994001 B2	2021/05/04
		US 2018-0214529 A1	2018/08/02
		WO 2017-017313 A1	2017/02/02
KR 10-2021-0028138 A	2021/03/11	US 10925920 B2	2021/02/23
		US 2019-0209640 A1	2019/07/11
		US 2021-0052685 A1	2021/02/25
		WO 2019-138344 A1	2019/07/18
US 2017-0035820 A1	2017/02/09	US 10813960 B2	2020/10/27
		US 10821145 B2	2020/11/03
		US 2018-0243356 A1	2018/08/30
US 2007-0026765 A1	2007/02/01	없음	