(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0059313
(43) 공개일자 2017년05월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 7/00 (2006.01) *A01N 63/00* (2017.01)
C11D 3/38 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 7/00 (2013.01)
A01N 63/00 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0163554
(22) 출원일자 2015년11월20일
심사청구일자 2015년11월20일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
오창식
경기도 수원시 영통구 효원로 363 매탄위브하늘채 123동 401호
유지강
경기도 안양시 동안구 일동로200번길 12 B01호
(74) 대리인
손민

전체 청구항 수 : 총 10 항

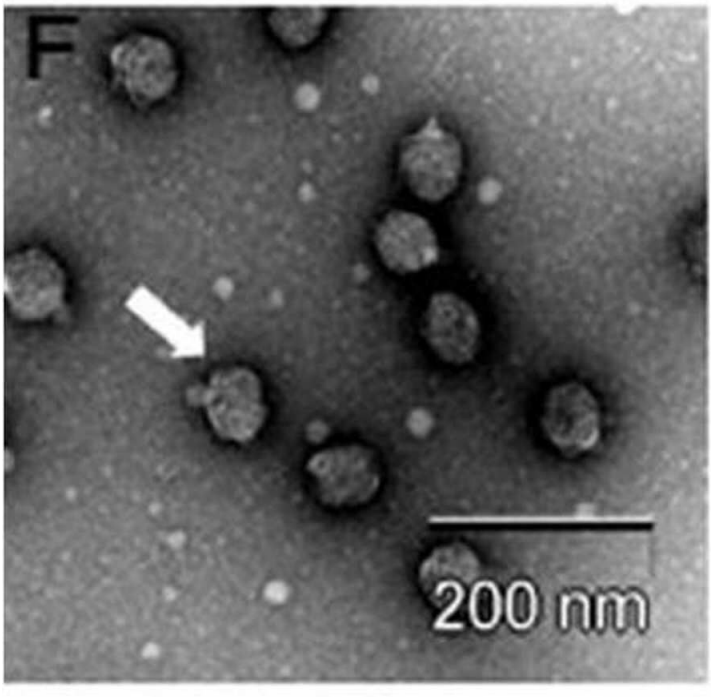
(54) 발명의 명칭 **신규 박테리오파지 및 이의 용도**

(57) 요 약

본 발명은 신규 박테리오파지 및 이의 용도에 관한 것으로, 구체적으로 *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (슈도모나스 시린게 pv. 액티니디애)에 특이적인 사멸능을 갖는 기탁번호 KFCC11634P인 분리된 박테리오파지, 상기 박테리오파지를 유효성분으로 포함하는 농약 조성물, 상기 박테리오파지를 유효성분으로 포함하는 항균제, 상

(뒷면에 계속)

대 표 도 - 도2



기 박테리오파지를 유효성분으로 포함하는 소독제 또는 세척제, 상기 박테리오파지를 처리하는 단계를 포함하는 박테리아를 용균하는 방법, 및 상기 박테리오파지를 처리하는 단계를 포함하는 식물병을 방제하는 방법에 관한 것이다.

본 발명의 신규 박테리오파지는 *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*(슈도모나스 시린게 pv. 액티니디애)에 특이적 사멸능을 가지며, 내산성, 내열성 및 내자외선성이 우수하므로, 상기 *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*에 의하여 야기되는 키위 궤양병의 예방 또는 치료에 활용할 수 있을 뿐만 아니라, 항균제, 소독제 또는 세척제 등에도 광범위하게 이용될 수 있다.

(52) CPC특허분류
C11D 3/381 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 PJ00932602
부처명 농촌진흥청
연구관리전문기관 농촌진흥청
연구사업명 농촌진흥청 아젠다과제
연구과제명 천연물과 박테리오파지를 이용한 새로운 참다래 궤양병 방제기술 개발
기 여 율 1/1
주관기관 경희대학교 산학협력단
연구기간 2013.02.01 ~ 2015.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

Pseudomonas syringae pv. *actinidiae*(슈도모나스 시린게 pv. 액티니디애)에 특이적인 사멸능을 갖는, 기탁번호 KFCC11634P인 분리된 박테리오파지.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 박테리오파지는 *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*(슈도모나스 시린게 pv. 액티니디애), *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*(슈도모나스 시린게 pv. 타바시), *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*(슈도모나스 시린게 pv. 토마토) 및 *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*(슈도모나스 시린게 pv. 파세올리콜라)로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 박테리아에 대하여 항균 활성을 갖는 것인, 박테리오파지.

청구항 3

제1항의 박테리오파지를 유효성분으로 포함하는 농약 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 박테리오파지는 키위 궤양병(kiwifruit canker disease)의 예방 또는 치료에 사용되는 것인, 농약 조성물.

청구항 5

제3항에 있어서, 상기 농약 조성물은 수간주사 조성물, 생물제제 조성물, 비료 조성물, 영양 조성물, 식물 강화 조성물, 식물 보호 조성물, 토양 개량 조성물(soil conditioner composition) 및 생산량 증가 조성물(yield enhancer composition)로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인 것인, 농약 조성물.

청구항 6

제1항의 박테리오파지를 유효성분으로 포함하는 항균제.

청구항 7

제1항의 박테리오파지를 유효성분으로 포함하는 소독제 또는 세척제.

청구항 8

제1항의 박테리오파지를 처리하는 단계를 포함하는 박테리아를 용균하는 방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 박테리아는 *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*(슈도모나스 시린게 pv. 액티니디애), *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*(슈도모나스 시린게 pv. 타바시), *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*(슈도모나스 시린게 pv. 토마토) 및 *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*(슈도모나스 시린게 pv. 파세올리콜라)로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인 것인, 방법.

청구항 10

제1항의 박테리오파지를 처리하는 단계를 포함하는 식물병을 방제하는 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 신규 박테리오파지 및 이의 용도에 관한 것으로, 구체적으로 *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*(슈도모나스 시린게 pv. 액티니디애)에 특이적인 사멸능을 갖는 기탁번호 KFCC11634P인 분리된 박테리오파지, 상기 박테리오파지를 유효성분으로 포함하는 농약 조성물, 상기 박테리오파지를 유효성분으로 포함하는 항균제, 상기 박테리오파지를 유효성분으로 포함하는 소독제 또는 세척제, 상기 박테리오파지를 처리하는 단계를 포함하는 박테리아를 용균하는 방법, 및 상기 박테리오파지를 처리하는 단계를 포함하는 식물병을 방제하는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*(슈도모나스 시린게 pv. 액티니디애)는 키위작물에서 세균성 궤양병을 야기하는 그람음성(Gram-negative) 식물병원균으로서, 4개의 다른 병원형(Pathovar)으로 분류된다. Psa1(biovar 1; 병원형 1)은 일본에서 처음 발견되었고, 파세올로독소(phaseolotoxin)를 분비하며; Psa2(biovar 2; 병원형 2)는 한국에서 발견되었고, 코로나틴(coronatine)을 분비하며; Psa3 (biovar 3; 병원형 3)은 신규한 균주로서, 병원성이 매우 강하고 다양한 단백질을 분비하며; Psa4(biovar 4; 병원형 4)는 약독화된(avirulent) 균주이다(Chapman JR, 2012, Phytopathology 102: 1034-1044).

[0004] 상기 *P. syringae* pv. *actinidiae*는 그린키위(*Actinidia deliciosa*) 및 골드키위(*A. chinensis*) 모두에 피해를 입히기 때문에 전 세계적으로 심한 경제적 손실을 야기한다. 상기 *P. syringae* pv. *actinidiae*는 1984년 일본에서 처음 분리되었으며(Takikawa Y, 1989, Annals Phytopathol.l Soc. Japan. 55: 437-444.), 이후 한국, 이탈리아, 포르투갈, 스페인, 프랑스 및 터키에서 보고되었다. 뉴질랜드에서는 키위 궤양병이 2010년에 처음 발견되었는데, 이로부터 3년 후에 키위 궤양병은 전국의 52%에 해당하는 1,400여 개의 과수원으로 전염되었다. 일본, 스페인, 포르투갈 및 프랑스의 키위 산업에서도 뉴질랜드와 유사한 키위 궤양병에 의한 피해가 발생되고 있다.

[0005] 상술한 *P. syringae* pv. *actinidiae*를 방제하기 위하여, 스트렙토마이신(streptomycin) 또는 구리 화합물을 작물에 뿌리는 방법이 사용되고 있다. 그러나, 스트렙토마이신은 항생제가 과실에 내재되는 문제를 야기하며, *P. syringae* pv. *actinidiae*는 상기 스트렙토마이신 또는 구리 화합물에 내성을 갖는 유전자를 가지고 있다는 것이 알려지면서, 효과적인 키위 궤양병의 방제방법의 개발이 시급한 실정이다.

[0007] 한편, 박테리오파지(bacteriophage)는 특정한 타겟 박테리아를 감염시키는 바이러스이다. 단백질 캡시드(capsid)로 싸여 있는 박테리오파지의 머리는 핵산 게놈으로 이루어져 있으며, 몇몇 박테리오파지는 지질 또는 단백질로 구성된 꼬리를 갖는다. 대부분의 박테리오파지는 유전 물질로서 이중나선 DNA를 포함한다.

[0008] 알려진 박테리오파지의 95% 이상이 카우도비랄레스(*Caudovirales*) 목(order)에 속한다(Maniloff J and Ackermann H-W. 1998. Arch. Virology. 143: 2051-2063.). 박테리오파지의 주요 세 가지 과(family)는 형태적인 특징으로 구분되며, 특히 꼬리 모양으로 구분된다. 마이오비리대(*Myoviridae*) 과에 속하는 파지는 이중층의 수축성 꼬리를 가지며, 시포비리대(*Siphoviridae*) 과에 속하는 파지는 긴 탄성의 꼬리를 가지며, 포도비리대(*Podoviridae*) 과에 속하는 파지는 짧고 뭉툭한 꼬리를 갖는다(Deveau H, 2006, Appl. Environ. Microbiol. 72: 4338-4346.).

[0009] 박테리오파지는 물, 흙, 및 식물의 안 또는 밖의 모든 환경에서 찾아볼 수 있다. 박테리오파지는 타겟 박테리아에 부착하여 숙주 안으로 자신의 DNA를 주입하며, 숙주 내에서 자가복제하여 박테리아의 죽음을 야기한다. 박테리오파지는 동물 또는 식물 세포에 대해서는 상대적으로 안전하며(Kutter E and Sulakvelidze A. 2004. CRC Press.), 다른 유익한 미생물에 대해서도 영향을 미치지 않는다. 또한, 박테리오파지는 숙주 박테리아성 환경에서 비교적 쉽게 분리된다.

[0011] 최근, 박테리오파지는 식물병원성 박테리아, 예를 들어 *Dickeya solani*(Czajkowski R,2014, Plant Pathol. 63: 758-772.), *Erwinia amylovora*(Boule J, 2011, Canadian J. Plant Pathol. 33: 308-317.), *Pectobacterium carotovorum*(Lim JA, J. Microbiol. Biotechnol. 19 23: 1147-1153.), 또는 *Ralstonia solanacearum*(Young BJ, J. Microbiol. Biotechnol. 22:16 1613-1620.)에 의하여 야기되는 식물 질병을 방제하기 위한 파지 테라피(phage therapy)의 물질로서 많이 연구되고 있다. 그러나, 키위 궤양병을 야기하는 박테리아인 *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*를 방제하기 위한 박테리오파지의 연구는 충분히 이루어지지 못하고 있는 실정이다.

[0013] 이러한 배경하에, 본 발명자들은 *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*의 방제방법을 개발하고자 예의 연구 노력한 결과, 한국의 키위 과수원에서 분리한 박테리오파지가 *P. syringae pv. actinidiae*에 대하여 용균 활성을 나타내고, 여러 환경적 요인(시간, 온도, pH, UV)에 대하여 저항성을 보여, 상기 박테리오파지는 키위작물에서 세균성 궤양병에 대한 파지 테라피로서 사용될 수 있음을 확인함에 따라, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0015] 본 발명의 하나의 목적은 *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*(슈도모나스 시린게 pv. 액티니디애)에 특이적인 사멸능을 갖는 기탁번호 KFCC11634P인 분리된 박테리오파지를 제공하는 것이다.

[0016] 본 발명의 다른 하나의 목적은 상기 박테리오파지를 유효성분으로 포함하는 농약 조성물을 제공하는 것이다.

[0017] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 상기 박테리오파지를 유효성분으로 포함하는 항균제를 제공하는 것이다.

[0018] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 상기 박테리오파지를 유효성분으로 포함하는 소독제 또는 세척제를 제공하는 것이다.

[0019] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 상기 박테리오파지를 처리하는 단계를 포함하는 박테리아를 용균하는 방법을 제공하는 것이다.

[0020] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 상기 박테리오파지를 처리하는 단계를 포함하는 식물병을 방제하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0022] 상기 목적을 달성하기 위한 하나의 양태는 *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*(슈도모나스 시린게 pv. 액티니디애)에 특이적인 사멸능을 갖는 기탁번호 KFCC11634P인 분리된 박테리오파지를 제공한다.

[0023] 본 발명자들은 한국의 키위 과수원 안팎에서 토양 샘플을 수집하였고, 상기 샘플에서 *P. syringae* pv. *actinidiae*에 특이적인 사멸능을 가지는 박테리오파지를 분리하였다. 또한, 상기 박테리오파지가 *P. syringae* pv. *actinidiae*에 속하는 18종의 균주뿐만 아니라, P. syringae의 다른 종인 *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*(슈도모나스 시린게 pv. 타바시), *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*(슈도모나스 시린게 pv. 토마토) 또는 *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*(슈도모나스 시린게 pv. 파세올리콜라)에 대하여도 용균 활성을 나타냄을 확인하였고(표 1 및 2), 투과 전자 현미경을 통해 관찰한 결과, 포도비리대(*Podoviridae*) 과에 속함을 확인하였다(표 3 및 도 2).

[0024] 아울러, 상기 박테리오파지는 상기 균주에 대하여 24시간 이내의 빠른 용균 활성을 나타냄을 확인하였고(도 3),

온도 및 pH 범위에서 안정성을 조사한 결과, 40℃ 내지 50℃의 온도 범위 및 pH 3 내지 11의 pH 범위에서 안정하게 생존할 뿐만 아니라, 자외선 노출 시에도 안정성을 유지할 수 있는 특성을 나타냄을 확인하였다(도 4).

[0025] 이에, 본 발명자는 *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*에 특이적인 사멸능을 갖고 상기와 같은 특징을 갖는 상기 박테리오파지를 "KHU ϕ59"로 명명하고, 2015년 11월 13일 한국미생물보존센터(Korean Culture Center of Microorganisms, 서울시 서대문구 홍제1동 361-221)에 기탁번호 제KFCC11634P호로 기탁하였다.

[0027] 다른 하나의 양태는 상기 박테리오파지를 유효성분으로 포함하는 농약 조성물을 제공한다.

[0028] 이때, 상기 박테리오파지의 정의는 전술한 바와 같다.

[0029] 본 발명의 용어 "농약"이란, 농작물의 보호와 생장에 사용되는 약제를 의미하며, 농작물의 재배 또는 저장 중 발생하는 병충, 해충, 잡초 등을 방제하는데 사용하는 화학농약 및 생물농약, 농작물의 생리기능을 증진 또는 억제하는데 사용되는 생장조정제, 약효를 증진시키는 보조제 등을 총칭한다.

[0030] 본 발명의 농약 조성물은 *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*에 특이적인 사멸능을 갖는 박테리오파지를 유효성분으로 포함하므로, 상기 농약 조성물은 키위 궤양병(kiwifruit canker disease)의 예방 또는 치료에 사용될 수 있다.

[0031] 구체적으로, 상기 농약 조성물은 수간주사 조성물, 생물제제 조성물, 비료 조성물, 영양 조성물, 식물 강화 조성물, 식물 보호 조성물, 토양 개량 조성물(soil conditioner composition) 또는 생산량 증가 조성물(yield enhancer composition)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0032] 상기 농약 조성물의 제형으로는 수화제(wettable powder), 입상 수화제(water dispersible granule), 분제(dusting powder), 액상 수화제(suspension concentrate), 유제(emulsifiable concentrate), 정제(tablet), 액제(liquid) 또는 오일 현탁제(oil suspension)로 제제화될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0033] 상기 농약 조성물은 유효량의 물과 함께, 하나 이상의 분산제를 포함할 수 있으며, 상기 분산제는 약 2 내지 약 60%(w/w)의 범위로 포함될 수 있다. Rhone Poulenc, Witco, Westvaco, International Speciality products, Crodachemicals, Borregaard, BASF, Rhodia, 등에서 판매되는 다양한 분산제가 농약 조성물에 사용하기 위해 상업적으로 입수가능하다.

[0034] 상기 농약 조성물에 사용될 수 있는 분산제의 구체적인 예로, 폴리비닐피롤리돈, 폴리비닐알코올, 리그노술포네이트, 페닐 나프탈렌 술포네이트, 에톡시화(ethoxylated) 알킬 페놀, 에톡시화지방산, 알콕시화 선형 알코올, 환방향족(polyaromatic) 술포네이트, 소듐 알킬 아릴 술포네이트, 글리세릴에스테르, 말레산 무수물 공중합체, 포스페이트 에스테르, 아릴 술폰산과 포름알데히드의 축합반응 생성물, 알킬아릴 술폰산과 포름알데히드의 축합반응 생성물, 에틸렌 옥시드와 지방산 에스테르의 첨가 반응 생성물, 에틸렌 옥시드와 지방산 에스테르의 첨가 반응 생성물의 염, 축합된(condensed) 나프탈렌의 술포네이트, 에틸렌 옥시드와 지방산 에스테르의 첨가 반응 생성물, 에틸렌 옥시드와 지방산 에스테르의 첨가 반응 생성물의 염, 리그닌 유도체, 나프탈렌 포름알데히드 축합물, 이소데실술포숙신산 하프 에스테르(half ester)의 소듐 염, 폴리카르복실레이트, 소듐 알킬벤젠술포네이트, 술폰화 나프탈렌의 소듐 염, 술폰화 나프탈렌의 암모늄 염, 폴리아크릴산의 염, 페놀술폰산의 염 또는 나프탈렌 술폰산의 염일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0035] 또한, 상기 농약 조성물은 습윤제, 결합제, 충진제(filler) 또는 유기 첨가제를 추가로 포함할 수 있다.

[0036] 상기 습윤제는 상기 농약 조성물에 약 0.1 내지 5% 범위로 포함될 수 있으며, 구체적인 예로, 알킬 나프탈렌 술포네이트, 소듐 알킬 나프탈렌 술포네이트, 술폰화 알킬카르복실레이트의 소듐 염, 폴리옥시알킬화 에틸 페놀, 폴리옥시에톡시화(polyoxyethoylated) 지방성 알코올, 폴리옥시에톡시화 지방성 아민, 리그닌 유도체, 알칸 술포네이트, 알킬벤젠 술포네이트, 폴리카르복시산의 염, 술포숙신산의 에스테르의 염, 알킬나프탈렌술포네이트, 알킬벤젠술포네이트, 알킬폴리글리콜 에테르 술포네이트, 알킬 에테르 포스페이트, 알킬 에테르 술페이트 또는 알킬 술포숙신산 모노에스테르일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0037] 상기 결합제는 상기 농약 조성물에 약 0.1 내지 7%의 범위로 포함될 수 있으며, 구체적인 예로, 폴리비닐 알코올, 리그닌 유도체, 폴리비닐 피롤리돈, 폴리알킬피롤리돈, 카르복시메틸셀룰로오스, 크산탄 검, 폴리에톡시화 지방산, 폴리에톡시화 지방성 알코올, 에틸렌 옥시드 공중합체, 프로필렌 옥시드 공중합체, 폴리에틸렌 글리콜 또는 폴리에틸렌 옥시드일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0038] 상기 충진제는 상기 농약 조성물에 약 0.1 내지 10%의 범위로 포함될 수 있으며, 구체적인 예로, 벤토나이트, 서브-벤토나이트(sub-bentonite), 아타풀자이트(attapulgite), 카올리나이트(kaolinite), 몬모릴로나이트, 보크사이트, 수화된 알루미나(hydrated alumina), 하소된(calcined) 알루미나, 규조토(diatomaceous earth), 백악(chalk), 백토(fuller's earth), 돌로마이트, 규조토(kieselguhr), 황토(loess), 프로필리트(prophyllite), 탈크(talc), 버미큘라이트(vermiculite), 석회암(limestone), 천연 및 합성 실리케이트(silicate), 실리카(silica) 또는 고령토(china clay)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0039] 상기 유기 첨가제는 상기 농약 조성물에 약 0.01 내지 50%의 범위로 포함될 수 있으며, 구체적인 예로, 다량 영양소(macronutrient), 미량 영양소 퇴비 비료(micronutrient compost fertilizer), 천연 원소(natural element), 천연 유기체(natural organism), 트리코데르마(trichoderma), 부식산(humic acid) 추출물, 바실러스 투린지엔시스(bacillus thuringiensis), 바이러스, 천연 곰팡이, 식물 추출물, 제충국, 생물학적 제어 산물(biological control product), 천연 오일, 천연 추출물, 광물 또는 요소 군일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 미량 영양소는 아연, 철, 망간, 구리, 보론, 코발트, 바나듐, 셀레늄, 실리콘 또는 니켈일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 다량 영양소는 질소, 인, 칼륨, 칼슘 또는 마그네슘일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0041] 또 다른 하나의 양태는 상기 박테리오파지를 유효성분으로 포함하는 항균제를 제공한다.

[0042] 본 발명의 용어 "항균제"란, 미생물을 사멸시키거나 혹은 발육을 억제하는 물질을 의미하며, 방부제, 살균제 및 항생제를 총칭하는 것이다.

[0043] 본 발명의 박테리오파지는 *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*에 대하여 특이적으로 높은 항균 활성을 나타낼 뿐만 아니라, 다른 종의 *P. syringae*도 사멸시킬 수 있으며, 우수한 내열성, 내산성 및 내자외선성을 갖는다. 따라서, 상기 박테리오파지를 유효성분으로 포함하는 상기 항균제는 기존의 항균물질에 비하여 약물 내성 또는 저항성을 유도하지 않아 안전하며, 제품수명(life cycling)이 긴 신규 항균제로서 이용될 수 있다.

[0045] 또 다른 하나의 양태는 상기 박테리오파지를 유효성분으로 포함하는 소독제 또는 세척제를 제공한다.

[0046] 본 발명의 용어 "소독제"란, 병원세균의 살균을 목적으로 하는 약제를 의미하며, 본 발명의 용어 "세척제"란, 세정의 목적에 사용되는 약제를 의미한다.

[0047] 본 발명의 박테리오파지는 *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*에 대하여 특이적으로 높은 항균 활성을 나타낼 뿐만 아니라, 다른 종의 *P. syringae*도 사멸시킬 수 있으며, 우수한 내열성, 내산성 및 내자외선성을 갖는다. 따라서, 상기 박테리오파지를 유효성분으로 포함하는 상기 소독제 또는 세척제는 기존의 약제에 비하여 우수한 살균 활성을 가지며, 제품수명(life cycling)이 긴 신규 소독제 또는 세척제로서 이용될 수 있다.

[0049] 또 다른 하나의 양태는 상기 박테리오파지를 처리하는 단계를 포함하는 박테리아를 용균하는 방법을 제공한다.

[0050] 본 발명의 용어 "용균"이란, 박테리아의 세포벽 또는 세포질막이 파괴되어 박테리아가 용해되는 현상을 의미하며, 박테리아가 사멸되는 현상을 의미한다.

[0051] 본 발명에서, 상기 박테리아는 구체적으로 *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*(슈도모나스 시린게 pv. 액티니디애), *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*(슈도모나스 시린게 pv. 타바시), *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*(슈도모나스 시린게 pv. 토마토) 또는 *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*(슈도모나스 시린게 pv. 파세올리콜라)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0052] 구체적으로, 상기 박테리아를 용균하는 방법은 본 발명의 박테리오파지를 유효성분으로 포함하는 농약 조성물, 항균제, 소독제 또는 세척제의 유효량을 박테리아에 처리하는 단계를 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0054] 또 다른 하나의 양태는 상기 박테리오파지를 처리하는 단계를 포함하는 식물병을 방제하는 방법을 제공한다.

[0055] 본 발명의 용어 "식물병"이란, 식물의 정상적인 생활을 저해하는 병해를 의미한다.

[0056] 본 발명에서, 상기 식물병은 구체적으로 *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*에 의하여 발병되는 키위 궤양병(kiwifruit canker disease)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0057] 본 발명의 용어 "방제"란, 작물에 피해를 주는 각종 병해충을 예방하고 구제하는 것을 의미한다.

[0058] 구체적으로, 상기 식물병을 방제하는 방법은 본 발명의 박테리오파지를 유효성분으로 포함하는 농약 조성물, 항균제, 소독제 또는 세척제의 유효량을 식물의 기부(basal) 또는 식물의 잎 부분에 처리하는 단계를 포함할 수 있으며, 더욱 구체적으로 식물의 병증 부위에 처리하는 단계를 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

발명의 효과

[0060] 본 발명의 신규 박테리오파지는 *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*(슈도모나스 시린게 pv. 액티니디애)에 특이적 사멸능을 가지며, 내산성, 내열성 및 내자외선성이 우수하므로, 상기 *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*에 의하여 야기되는 키위 궤양병의 예방 또는 치료에 활용할 수 있을 뿐만 아니라, 항균제, 소독제 또는 세척제 등에도 광범위하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0062] 도 1은 *Eco*RI으로 절단한 박테리오파지 KHUφ59의 게놈 DNA 패턴을 보여주는 이미지이다. 박테리오파지의 게놈 DNA(1 ㎍)를 24시간 동안 *Eco*RI으로 처리하였고, 절단 패턴은 겔 전기영동을 통해 가시화하였다. M은 1-kb ladder를 의미한다.

도 2는 박테리오파지 KHUφ59의 형태를 투과 전자 현미경(TEM)을 통해 관찰한 이미지이다. 상기 이미지는 음성 염색을 수행한 후, LEO 912AB 투과 전자 현미경(Carl Zeiss)을 통해 촬영하였으며, 화살표는 대표 파지를 가리킨다.

도 3은 박테리오파지 KHUφ59의 *P. syringae* pv. *actinidiae* 균주 KBE9에 대한 용균 활성을 보여주는 그래프이다. 각 박테리오파지(0.01 MOI)는 초기 증식기의 박테리아 현탁액(10^8 CFU/㎖)에 첨가하였고, 지정한 시간에서 OD_{600}을 측정하였다. 대조군(Con)은 동일한 박테리아 현탁액에 SM 버퍼를 첨가한 박테리오파지의 성장을 나타내며, 오차막대는 표준오차를 가리킨다.

도 4는 다양한 환경 조건에 대한 박테리오파지 KHUφ59의 안정성을 나타내는 그래프이다. A는 온도, B는 pH 값, C는 365 nm 자외선의 노출, 및 D는 306 nm 자외선의 노출에 대한 영향을 보여준다. 상기 조건의 처리 후에 살아있는 박테리오파지의 역가(pfu/㎖)는 플라크(plaque) 어세이를 통해 측정하였다. 오차막대는 표준오차를 가리킨다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0063] 이하, 하기 실시예에 의하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐 본 발명의 범위가 이들만으로 한정되는 것은 아니다.

[0065] **실험방법 1. 박테리아 균주 및 성장 조건 분석**

[0067] 총 18종의 *P. syringae* pv. *actinidiae* 균주를 본 발명에 사용하였으며, 사용한 상기 균주는 하기 표 1에 나열하였다. 18종 중에서 10종은 한국의 다양한 지역에서 분리하였고, 추가적인 8종의 균주는 농촌진흥청의 한국농업미생물자원센터(Korean Agricultural Culture Collection)로부터 제공받았다. 이외의 본 발명에 사용한 모든 균주는 하기 표 2에 나열하였으며, 26℃의 TSB(tryptic soy broth, Difco, USA) 액체 배지 또는 아가 플레이트에서 배양하였다.

[0069] **실험방법 2. *P. syringae* pv. *actinidiae* 균주의 확인**

[0071] 본 발명에서 사용한 모든 *P. syringae* pv. *actinidiae* 균주는 multiplex-polymerase chain reaction(m-PCR)을 이용하여 그들의 병원형을 재확인하였다. 두 프라이머 쌍(*Psa*-F: 5'-CAGAGGCGCTAACGAGGAAA-3' (서열번호 1) 및 *Psa*-R: 5'-CGAGCATACATCAACAGGTCA-3' (서열번호 2); 및 *Tac*-F: 5'-CGGGCTAGACAGTACGCTGT-3' (서열번호 3) 및 *Tac*-R: 5'- CAGGCCCTTCTACCGCTAC-3' (서열번호 4))을 본 발명에 사용하였다. m-PCR 혼합액은 25 ㎕의 PCR smart mix 2(Solgent, South Korea), 5 ㎕의 박테리아 현탁액(10^8 CFU/㎖) 및 1 μM의 프라이머 쌍을 포함하도록 하였으며, 멸균 증류수로 최종 부피를 50 ㎕로 맞추었다. T100 thermal cycler(Bio-Rad, USA)를 이용하여 증폭하였으며(처음 변성 단계: 94℃에서 5분, 변성 단계: 94℃에서 30초; 어닐링 단계: 65℃에서 30초; 및 연장 단계: 72℃에서 30초의 30 사이클 반복, 및 최종 연장 단계: 72℃에서 5분), 증폭한 생성물 중에서 5 ㎕의 증폭된 혼합액을 1x Tris-acetate-EDTA 버퍼가 포함된 1.5% 아가로스 겔을 이용한 전기영동을 통해 분석하였다. 이후, 상기 겔을 EcoDye DNA Staining Solution(Biofact, South Korea)으로 염색하였다.

[0073] **실험방법 3. 박테리오파지의 분리 및 정제**

[0075] 한국의 82개 키위 과수원으로부터 약 100g의 토양 샘플을 수집하였다. 박테리오파지 분리는 공지된 방법에 약간의 변형을 가하여 수행하였다(Kim M and Ryu S. 2011. Appl. Environ. Microbiol. 77: 2042-2050.). 5g의 토양 샘플을 45㎖의 증류수에서 30초 동안 혼합하여 균질화하였다. 배양액의 원심분리(9,000 x *g*, 10분, 4℃) 후, 투명한 상층액을 여과하였고(0.2-㎛-pore-size filter; Pall, United States), 상기 여과액(5㎖)을 25㎖ TSB 용액 및 500 ㎕의 *P. syringae* pv. *actinidiae*의 배양액과 혼합하였다. 박테리아-파지 혼합액을 26℃에서 18시간 동안 200rpm으로 혼합하면서 배양하였고, 이후 원심분리 및 여과를 수행하였다. 박테리오파지가 존재하는지 확인하기 위하여, 10배로 계열희석한 상기 여과액을 *P. syringae* pv. *actinidiae*를 이용한 스팟팅 어세이(spotting assay)에 사용하였다. 또한, 박테리오파지를 분리 및 정제하기 위하여, 공지된 방법에 따라 오버레이 어세이(overlay assay)를 수행하였다(Kropinski AM, Mazzocco A, Waddell TE, Lingohr E, and Johnson RP. 2009. p. 69-76. Bacteriophages, Springer). 독특한 형태를 보이는 각 플라크(plaque)를 멸균된 팁을 이용하여 수집하였고, 박테리오파지를 SM 버퍼(sodium chloride-magnesium sulfate buffer; 50 mM Tris-HCl [pH 7.5], 100 mM NaCl, 및 10 mM $MgSO_4$)로 용균하였다. 상기 과정은 각 플라크당 적어도 세 번 반복하였다.

[0077] **실험방법 4. 스팟팅(spotting) 및 오버레이(overlay) 어세이**

[0079] 스팟팅 어세이(spotting assay)는 공지된 방법에 약간의 변형을 가하여 수행하였다(Kim M and Ryu S. 2011. Appl. Environ. Microbiol. 77: 2042-2050.). 숙주 박테리아는 하룻밤 동안 배양하였으며, 이후 상기 샘플의 100 ㎕(10^9 CFU/㎖)를 5㎖의 soft TSA 아가(0.4% 아가)에 첨가하였다. 와류 믹서(vortex mixer)로 혼합한 뒤, 준비된 TSA 아가 플레이트에 배양액을 부었고, 실온에서 놔두어 고체화시켰다. 이후, 10 ㎕의 박테리오파지 스탁(stock) 희석액을 아가 층의 맨 위에 떨어트렸고, 상기 플레이트를 30분 동안 실온에서 건조시켰다. 상기 배양액은 bacterial lawns를 생산하도록 26℃에서 하룻밤 동안 배양하였고, 다음날 플라크 또는 박테리아 성장 저해 구역을 조사하였다.

[0080] 오버레이 어세이(Overlay assay)는 공지된 방법에 약간의 변형을 가하여 수행하였다(Kim M and Ryu S. 2011. Appl. Environ. Microbiol. 77: 2042-2050.). 구체적으로, 5㎖의 soft TSA 아가(0.4% 아가)에 100 ㎕의 박테리오파지 스탁 용액과 하룻밤 동안 배양한 박테리아 배양액(10^9 CFU/㎖) 100 ㎕를 혼합하였고, 플레이트에 상기 혼합액을 부었다. 상기 배지를 30분 동안 실온에 두어 고체화시켰고, 상기 플레이트를 26℃에서 하룻밤 동안 배양한 뒤, 다음날 플라크를 조사하였다.

[0082] **실험방법 5. 박테리오파지의 증식(propagation) 및 정제**

[0084] 박테리오파지의 증식은 공지된 방법에 약간의 변형을 가하여 수행하였다(Kim M and Ryu S. 2011. Appl. Environ. Microbiol. 77: 2042-2050.). 구체적으로, 단일 박테리오파지 플라크의 용해물을 *P. syringae* pv. *actinidiae* 배지(600 nm에서의 광학 밀도 [OD_{600}] = 0.5에서 0.6)에 첨가하였고, 26℃에서 배양하였다. 세포 잔해(숙주 박테리아의 용해물)를 제거한 배양액에 클로로포름(chloroform, 최종 부피의 1%)을 처리하여 5분 동안 26℃에서 배양하였고, 원심분리(15,000 x *g*, 10분, 4℃)하였다. 여과된 상층액에 포함된 박테리오파지 입자(0.22-㎛-pore-size 필터로 여과함)는 1 M NaCl에 포함된 10%(w/v) 폴리에틸렌글리콜(PEG) 6000을 이용하여 10시간 동안 4℃에서 침전시켰다. 원심분리 후(10,000 x *g*, 15분, 4℃), 침전된 박테리오파지를 SM 버퍼에 다시 재현탁하였고, CsCl 밀도 구배 초원심분리기(78,500 x *g*, 2시간, 4℃)로 분리하였다. 각 박테리오파지 밴드를 초원심분리기 튜브로부터 추출하였고, SM 버퍼에서 투석하였다. 박테리오파지 스탁은 사용할 때까지 4℃에서 유리 튜브에 보관하였다.

[0086] **실험방법 6. 박테리오파지의 형태 분석**

[0088] 박테리오파지를 포함하는 용액을 탄소가 코팅된 구리 그리드(grid)에 두고, 이후 파지 입자를 염색시키기 위하여 2% 수용 우라닐아세테이트(uranyl acetate, pH 4.0)를 20초 동안 첨가하였다. 정제한 박테리오파지를 투과형 전자현미경(TEM; LEO 912AB, Carl Zeiss)을 이용하여 관찰하였고, Proscan 1,024 × 1,024 픽셀의 고체촬상소자카메라(pixel charge coupled device camera)를 이용하여 이미지를 스캔하였다. 박테리오파지는 국제 바이러스 분류 위원회(International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV))의 지침에 따라 분류하였다.

[0090] **실험방법 7. 박테리오파지 게놈 DNA의 추출 및 제한효소 절단**

[0092] 박테리오파지 게놈 DNA(genome DNA)는 phage DNA isolation kit(Norgen Biotek, Canada)를 이용하여 추출하였다. 제한효소 절단은 제조자의 설명(Promega Korea, 8 Seoul, Korea)에 따라 *Eco*RI, *Sph*I 또는 *Nhe*I를 이용하여 수행하였으며, 1 ㎍의 박테리오파지 게놈 DNA를 이용하였다. 분해 후, 각 샘플을 EcoDye를 포함하는 1% 아가로스를 이용하여 분석하였다.

[0094] **실험방법 8. 박테리오파지의 용균 활성 분석**

[0096] 박테리오파지의 증식(Propagation)은 공지된 방법에 약간의 변형을 가하여 수행하였다(Lim JA, Lee DH, Jung KS, and Heu S. 2013. 19 23: 1147-1153.). 하룻밤 동안 배양한 *P. syringae* pv. *actinidiae* 배지를 TSB 용액에 접종하였고, 4℃에서 교반하면서 배양하였다. 배양액이 초기 증식기(10^8 CFU/㎖)에 도달할 때, 박테리오파지 용해물을 0.01의 감염다중도(MOI)를 가질 때 첨가하였다. OD_{600}은 TECAN microplate reader(TECAN, Mannedorf, Switzerland)를 이용하여 80시간 동안 측정하였다. 음성 대조군으로서, 박테리아 배양액에 박테리오파지 용해물 대신에 동일한 부피의 SM 버퍼를 접종하였다.

[0098] **실험방법 9. 다양한 조건에서 박테리오파지의 안정성 분석**

[0100] 다양한 온도에서의 박테리오파지의 안정성을 조사하기 위하여, SM 버퍼에 포함된 파지 분취물(10^6 PFU/㎖)을 1시간 동안 30, 40, 50 또는 60℃에서 배양하였다. 배양 후, 생존한 파지의 역가(titers)를 플라크 어세이를 통해 열거하였다. pH 안정성을 조사하기 위하여, 박테리오파지 분취물을 HCl 또는 NaOH를 이용하여 pH 범위 3 내

지 12로 조정한 SM 버퍼에 첨가하였고, 1시간 동안 실온에서 배양하였다. 배양 후, 파지 생존능을 플라크 어세이를 통해 조사하였다. 자외선 감수성을 조사하기 위하여, SM 버퍼에 포함된 박테리오파지 분취물을 아무것도 포함되지 않은 페트리디쉬에서 배양하였고, 306nm 또는 365nm의 UV lamp(8W, dual UV transilluminator, Core Bio, South Korea)에 두었다. 박테리오파지는 1시간 동안 매 15분 마다 샘플링하였고, 각 생존한 파지 역가는 플라크 어세이를 통해 열거하였다.

[0102] 이상, 상기 실험방법을 통해 확인한 내용을 하기 실시예로 정리하였다.

[0104] **실시예 1. *P. syringae* pv. *actinidiae*에 대해 특이적인 사멸능을 갖는 박테리오파지의 분리**

[0106] 박테리오파지는 숙주 박테리아가 존재할 만한 곳, 구체적으로 토양, 물, 키위 과수원의 작물 등의 주변에 존재한다. 이에, 본 발명자들은 *syringae* pv. *actinidiae*에 대해 특이적인 사멸능을 나타내는 박테리오파지를 분리하기 위하여 키위 과수원의 토양을 수집하였다.

[0107] 구체적으로, 한반도 남쪽에 위치한 서로 다른 11개 지역의 과수원 안팎에서 총 82개의 토양 샘플을 수집하였고, 실험방법 1에 따라 한국에서 분리한 10종의 다른 *P. syringae* pv. *actinidiae* 균주에 대하여 용균 활성을 나타내는 박테리오파지를 실험방법 3에 따라 선별하였다.

[0108] 그 결과, 총 261개의 플라크가 관찰되었으며, 그 중에서 ++(투명한 플라크) 그룹에 속하는 70개의 플라크를 개별의 박테리오파지를 정제하는데 사용하였다.

[0110] **실시예 2. 박테리오파지 게놈 DNA의 제한효소 절단 패턴 분석**

[0112] 박테리오파지의 유전적 특징을 파악하기 위하여, 상기 실시예 1에 따라 분리한 박테리오파지 KHU ϕ59 게놈 DNA의 제한효소 절단 패턴을 분석하였다.

[0113] 구체적으로, 파지 DNA 분리 kit를 이용하여 게놈 DNA를 추출하였으며, 상기 실험방법 7에 따라 상기 박테리오파지의 게놈 DNA를 *Eco*RI, *Sph*I 및 *Nhe*I 제한효소로 절단하였다.

[0114] 그 결과, 도 1에서 볼 수 있듯이, 박테리오파지 KHU ϕ59의 게놈 DNA는 *Eco*RI으로 절단되어 서로 다른 크기를 갖는 4 내지 5개의 밴드를 나타냄을 확인하였다.

[0116] **실시예 3. 박테리오파지의 기주 범위 분석**

[0118] **실시예 3-1. *P. syringae* pv. *actinidiae* 균주에 대한 분석**

[0120] 박테리오파지 KHU ϕ59를 파지 테라피에 이용 가능한지 여부를 조사하기 위하여, 키위 궤양병세균인 *P. syringae* pv. *actinidiae* 18종의 균주에 대하여 상기 박테리오파지의 기주 범위를 조사하였다.

[0121] 구체적으로, 상기 실험방법 4에 따른 방법을 통해 각 숙주 균주에 대한 박테리오파지의 유효성을 확인하였으며, 그 결과를 하기 표 1에 정리하였다.

표 1

[0122] *P. syringae* pv. *actinidiae* 18종 균주에 대한 박테리오파지의 기주 범위

균주	병원형	기주 범위
		KHU ϕ59
KBE9	2	++

KGY4	2	-
PJC7	2	++
YCS3	2	++
JJ18	2	++
JYS5	2	++
SYS1	3	-
SYS2	3	++
SYS3	3	-
SYS4	3	-
KACC 10584	2	-
KACC 10587	2	++
KACC 10592	2	++
KACC 10593	2	++
KACC 10595	2	++
KACC 16847	2	++
KACC 16848	2	++
KACC 16849	2	++

[0123] (++[a]: 투명한 플라크, +: 탁한 플라크, -: 플라크 없음)

[0125] 그 결과, 상기 표 1에서 볼 수 있듯이, 박테리오파지 KHUφ59는 KGY4 또는 KACC 10584를 제외한 병원형 2에 속한 *P. syringae* pv. *actinidiae* 12개의 균주에 대하여 효과적이며, 병원형 3에 속한 SYS1, SYS3 또는 SYS4에 대하여는 플라크를 형성하지 않았음에도 불구하고, 병원형 3에 속하는 SYS2 대하여는 효과적인 용균 활성을 나타냄을 확인하였다.

[0126] 상기 결과를 통해, 본 발명에서 분리한 상기 박테리오파지는 타겟 박테리아인 *P. syringae* pv. *actinidiae*에 대하여 특이적인 사멸능을 가지며, 상기 특이성은 상기 박테리아의 균주 수준까지 이어짐을 알 수 있었다.

[0128] **실시예 3-2. 다른 박테리아 종에 대한 대한 분석**

[0130] 박테리오파지가 파지 테라피에 이용 가능한지 여부를 조사하기 위하여, 다른 *P. syringae* 종을 포함한 13종의 박테리아에 대하여 상기 박테리오파지의 기주 범위를 조사하였다.

[0131] 구체적으로, 상기 실험방법 4에 따른 방법을 통해 각 숙주 균주에 대한 박테리오파지 KHUφ59의 유효성을 확인하였으며, 그 결과를 하기 표 2에 정리하였다.

표 2

[0132]

균주	기주 범위
	KHUφ59
Pseudomonas syringae pv. *tabaci*	++
Pseudomonas syringae pv. *tomato*	++
Pseudomonas syringae pv. *phaseolicola*	++
Pseudomonas fluorescens	-
Acidovorax citrulli	-
Acidovorax valerianellae	-
Ralstonia solanacearum	-
Pectobacterium carotovorum subsp. *carotovorum*	-
Dickeya zeae	-
Escherichia coli	-
Xanthomonas campestris pv. *campestris*	-
Agrobacterium tumefaciens	-

Clavibacter michiganesis subsp. *michiganesis*	-

[0133] (++[a]: 투명한 플라크, +: 탁한 플라크, -: 플라크 없음)

[0135] 그 결과, 상기 표 2에서 볼 수 있듯이, 박테리오파지 KHUφ59는 3종의 *P. syringae*에 대해서는 투명한 플라크를 형성하여 용균 활성을 나타냄을 확인하였지만, 다른 박테리아에 대해서는 플라크를 형성하지 않아 용균 활성을 나타내지 않음을 확인하였다. 이를 통해, 분리한 박테리오파지는 병원형에 상관없이 *P. syringae* 종을 타겟한다는 것을 알 수 있었으며, 상기 *P. syringae* 종들에 대하여 용균 활성을 가짐을 알 수 있었다.

[0136] 아울러, 몇몇 박테리오파지들은 *P. syringae* 병원형에 대하여 효과적이라는 연구 결과가 발표된 바 있으며, *P. syringae* 종에 대하여 효과적인 상기 박테리오파지는 *P. viridiflava* 및 *P. fluorescens*와 같은 다른 슈도모나스(*Pseudomonas*) 종에 대해서도 타겟할 수 있음이 발표된 바 있다(Frampton RA, Appl. Environ. Microbiol. 80: 2216-2228.). 이에 따라, 본 발명에서 분리한 박테리오파지의 유효성을 *P. fluorescens*, *Acidovorax* 종 및 *Ralstonia solanacearum*에 대하여도 검증하였으나, 분리한 박테리오파지는 상기 박테리아 종에 대하여 용균 활성을 나타내지 않음을 확인하였다. 이를 통해, 본 발명의 박테리오파지는 *P. syringae* 종에 대하여 특이적임을 알 수 있었다.

[0138] **실시예 4. 박테리오파지의 형태 분석**

[0140] 마이오비리대(*Myoviridae*), 시포비리대(*Siphoviridae*) 및 포도비리대(*Podoviridae*) 등의 박테리오파지의 세 가지 주요 과는 형태적인 특징에 의해 구분되므로, 박테리오파지 KHUφ59의 형태를 관찰하였다.

[0141] 구체적으로, 실험방법 6에 따른 방법을 수행하였으며, 투과 전자 현미경을 통해 관찰하였다.

[0142] 그 결과, 박테리오파지 KHUφ59는 *Caudovirales* 목에 속함을 알 수 있었다. 또한, 도 2에서 볼 수 있듯이, 꼬리의 모양 및 머리의 크기를 통해 상기 박테리오파지는 포도비리대 과에 속함을 확인하였다. 분리 지역, 머리 크기 및 꼬리 길이를 포함한 박테리오파지의 상기 특징들은 하기 표 3에 나열하였으며, 상기 실시예 2에 따라 절단된 게놈 DNA 밴드의 크기에 기초하여 박테리오파지의 게놈 크기를 예측한 결과 또한 하기 표 3에 정리하였다.

표 3

[0143]

파지 이름	분리 지역	분류	머리 크기 (nm)	총 길이 (nm)	예측한 게놈 크기(kb)[a]
KHU φ59	고흥	포도비리대	69	87	41.5

[0145] **실시예 5. *P. syringae* pv. *actinidiae*에 대한 박테리오파지의 용균 활성 분석**

[0147] 박테리오파지의 용균 활성은 식물 질병을 통제하기 위한 파지 테라피로써 적용할 수 있는 가장 중요한 요인이므로, 박테리오파지 KHUφ59의 용균 활성을 분석하였다.

[0148] 구체적으로, 실험방법 8에 따른 방법을 수행하였으며, 박테리오파지는 *P. syringae* pv. *actinidiae* 균주 KBE9에 대하여 효과를 나타내었기 때문에 상기 균주를 본 실시예에 사용하였다.

[0149] 그 결과, 도 3에서 볼 수 있듯이, 상기 박테리오파지는 처리 24시간 이내에 유의한 용균 활성을 나타내었지만 24시간 이후에는 OD_{600} 값이 증가하였다. 이는, 박테리아 세포들이 상기 박테리오파지에 대하여 허용성 또는 저항성을 획득하였다는 것을 의미한다.

[0150] 상기 결과를 통해, 본 발명의 박테리오파지는 24시간 이내에 빠른 용균 활성을 나타내므로, 파지 테라피로서 키

위 궤양병을 관리하는데 매우 유용하게 사용될 수 있음을 알 수 있었다.

[0152] **실시예 6. 환경적인 영향에 대한 박테리오파지의 안정성 분석**

[0154] 식물 질병을 통제하기 위한 파지 테라피로써 박테리오파지를 이용하기 위해서는 온도, 토양의 pH, 또는 자외선 등의 특정 환경적인 영향에 대한 박테리오파지의 안정성이 필수적이다. 따라서, 다양한 온도, pH, 또는 자외선 노출에 대한 상기 박테리오파지 KHUφ59의 안정성을 분석하였다.

[0155] 구체적으로, 실험방법 9에 따른 방법을 수행하였으며, 상술한 환경적인 영향을 처리한 이후에 살아남는 박테리오파지의 수를 셈으로써 안정성을 평가하였다.

[0156] 그 결과, 도 4의 A에서 볼 수 있듯이, 박테리오파지 KHUφ59는 40℃에서 1시간 동안 안정하였고, 50℃에서 생존능이 감소하기 시작하였으며, 60℃에서 완전히 불활성화됨을 확인하였다.

[0157] 또한, 도 4의 B에서 볼 수 있듯이, 상기 박테리오파지는 pH 3 내지 11에서는 1시간 동안 안정하였으나, pH 12에서는 불활성화됨을 확인하였다.

[0158] 아울러, 도 4의 C 및 D에서 볼 수 있듯이, 상기 박테리오파지는 365nm(UV-A) 또는 306nm(UV-B) 자외선에서 적어도 60분 동안 높은 용균 활성을 유지함을 확인하였다.

[0159] 상기 결과를 통해, 본 발명의 박테리오파지 KHUφ59는 다양한 온도, 다양한 pH 범위 및 자외선에 대하여 안정적이라는 것을 알 수 있었다.

[0161] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로서 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

수탁번호

[0163]

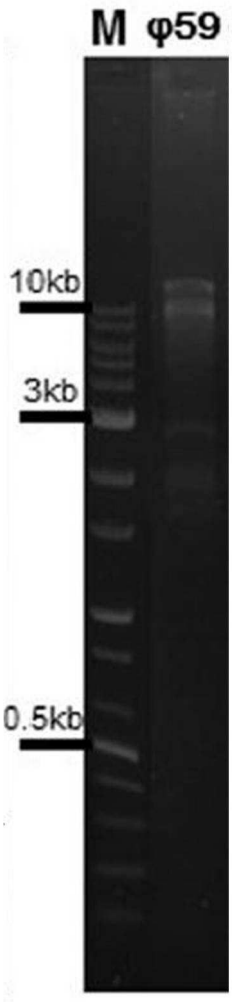
기탁기관명 : 한국미생물보존센터(국내)

수탁번호 : KFCC11634P

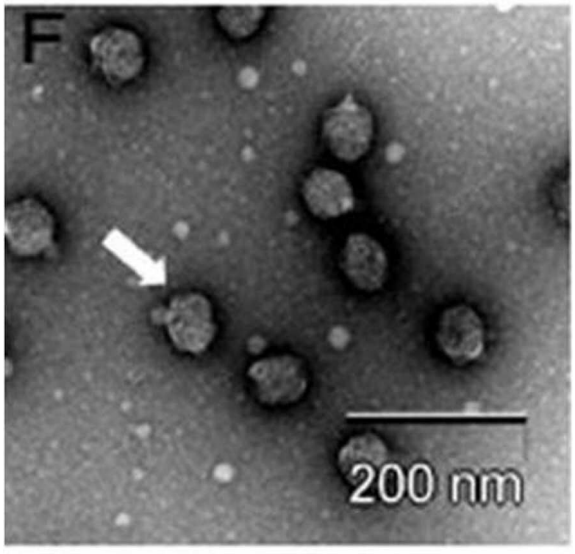
수탁일자 : 20151113

도면

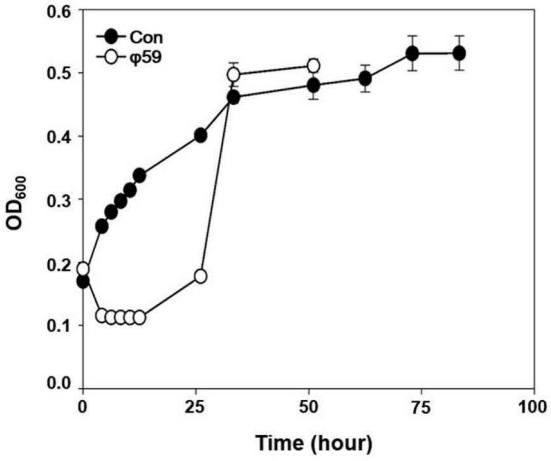
도면1



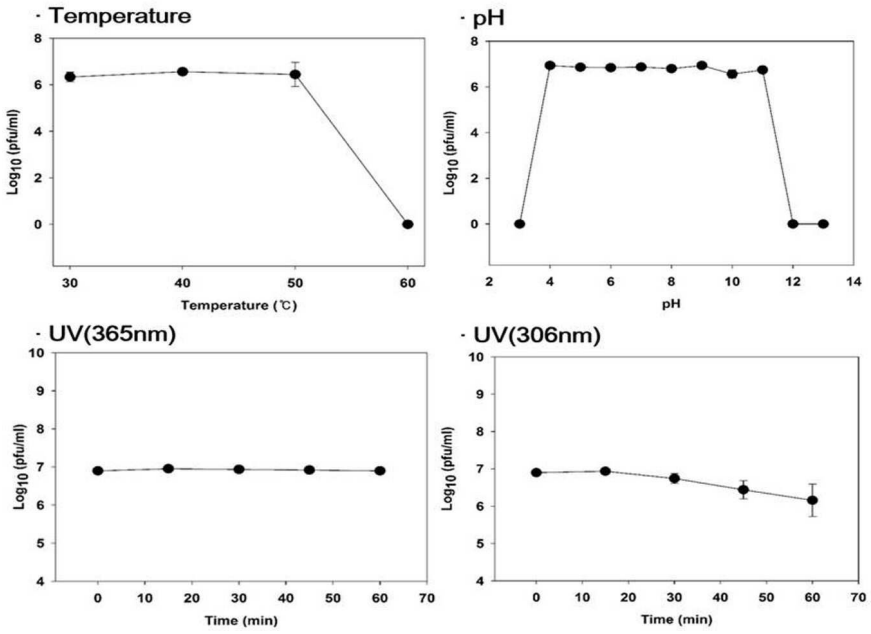
도면2



도면3



도면4



서 열 목 록

<110> University-Industry Cooperation Group of Kyung Hee University

<120> Novel bacteriophage and use thereof

<130> KPA151148-KR

<160> 4

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward primer for Psa

<400> 1

cagaggcgct aacgaggaaa 20

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse primer for Psa

<400> 2

cgagcataca tcaacaggtc a 21

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward primer for Tac

<400> 3

cgggctagac agtacgctgt 20

<210> 4

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse primer for Tac

<400> 4

caggcccttc taccgctac 19