



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년08월08일

(11) 등록번호 10-1886967

(24) 등록일자 2018년08월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/20 (2006.01) A01N 63/02 (2017.01)
C12R 1/01 (2006.01)

(52) CPC특허분류
C12N 1/20 (2013.01)
A01N 63/02 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2017-0063013

(22) 출원일자 2017년05월22일

심사청구일자 2017년05월22일

(56) 선행기술조사문헌

Current Trends in Biotechnology and Pharmacy,
Vol.7, pp.773-781(2013.07.)*

(뒷면에 계속) 기술이전 희망 : 기술양도

(73) 특허권자

경상대학교산학협력단

경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)

(72) 발명자

김진우

경상남도 진주시 석갑로53번길 10, 108동 1005호
(평거동, 들말대경아파트)

(74) 대리인

위병갑

전체 청구항 수 : 총 7 항

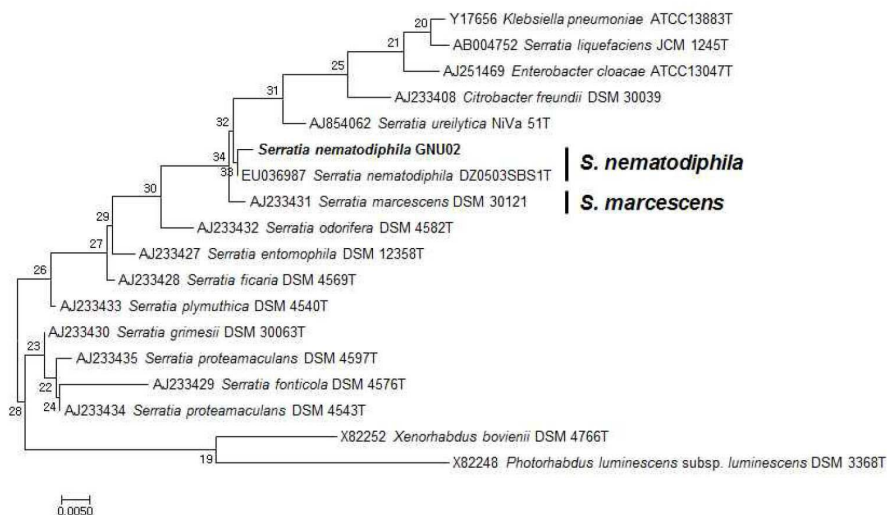
심사관 : 김지연

(54) 발명의 명칭 세라티아 네마토디필라 GNU02 균주 및 이를 포함하는 해충 방제용 조성물

(57) 요약

본 발명은 해충 방제 활성을 갖는 세라티아 네마토디필라 GNU02 균주, 이의 배양물, 이를 포함하는 해충 방제용 조성물 및 이를 이용한 해충 방제 방법에 관한 것으로, 해충에 대해 우수한 살충 효과를 나타내며, 화학 살충제 내성 해충의 출현을 막을 수 있는 친환경적 미생물 농약을 제공할 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류
C12R 1/01 (2013.01)

(56) 선행기술조사문헌
KR1020130016917 A
Parasitol Res., Vol.110, pp.1841-1847(2012.)
KR1020050114294 A
KR1020090038740 A
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2015R1A6A1A03031413
부처명	교육부
연구관리전문기관	한국연구재단
연구사업명	중점연구소지원(기초과학)
연구과제명	농생명산업 기후변화 대응기술개발
기 여 율	1/1
주관기관	경상대학교산학협력단
연구기간	2016.09.01 ~ 2017.08.31

명세서

청구범위

청구항 1

점박이응애의 방제 활성을 갖는, 세라티아 네마토디필라 GNU02 균주(기탁번호:KACC92175P).

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 세라티아 네마토디필라 GNU02는 왕담배나방 유충에서 분리된 것인 세라티아 네마토디필라 GNU02 균주.

청구항 3

삭제

청구항 4

제1항에 따른 점박이응애의 방제 활성을 갖는 세라티아 네마토디필라 GNU02 균주의 배양물.

청구항 5

제1항에 따른 세라티아 네마토디필라 GNU02 균주 또는 제4항에 따른 세라티아 네마토디필라 GNU02 균주의 배양물을 포함하는, 점박이응애의 방제용 조성물.

청구항 6

제5항에 따른 점박이응애의 방제용 조성물을 식물에 처리하는 것을 포함하는, 해충 방제 방법.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 식물은 채소류 또는 과채류를 포함하는 것인, 방법.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 식물은 강낭콩, 은행, 밤, 딸기, 참외, 메론, 파프리카, 고추, 감자, 가지, 오이, 토마토, 수박, 상추, 들깨, 참깨, 양파 및 이들의 조합들로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 해충 방제 활성을 갖는 세라티아 네마토디필라 GNU02 균주, 이의 배양물, 이를 포함하는 해충 방제용 조성물 및 이를 이용한 해충 방제 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

시설원에 작물의 재배에 있어서 병해충에 의한 피해는 생산량을 저해하는 주요 원인이 된다. 해충에 의한 피해는 매우 커서, 세계적으로 해충에 의한 피해로 매년 수조 달러가 손실되고 있다. 미세 해충인 응애는 채소류, 과채류 및 과수를 비롯한 거의 모든 작물에 피해를 주고 있다. 해충은 주로 화학 살충제를 이용한 성장, 영양공급이나 번식의 억제 또는 사멸을 통해 방제가 이루어지고 있다. 우수한 화학 살충제를 이용하여 해충 방제가 효과적으로 이루어질 수도 있으나 광범위한 화학물질의 사용은 종종 살충제 내성 해충의 출현을 일으킬 수 있다. 이는 다양한 내성 조정 방법으로 부분적으로 완화되고 있으나 대안적 해충 방제제에 대한 요구는 증가하고

있다.

[0003] 현재 응애에 대한 화학 살충제가 사용되고 있으나, 화학 살균제에 대한 사회적 관심이 부정적이고 환경 및 먹거리에 대한 안정성 측면을 고려할 때 그 사용량과 사용횟수의 감소는 필연적이다. 또한 광범위하고 지속적인 화학 살충제의 사용은 살충제에 대한 내성을 발생시켜 약효 저하 현상을 일으킨다. 따라서 화학 살충제 사용의 문제점을 해결하기 위한 방안으로 친환경적 방제방법에 대한 관심이 증대되고, 이와 함께 생물 농약에 대한 관심이 커지고 있으며, 특히 미생물을 직접적으로 이용하거나 그 대사산물의 이용방법에 관한 관심과 개발이 절실히 요구되는 상황이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0004] (특허문헌 0001) 한국공개특허 제10-2013-0016917호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 이에 본 발명의 발명자들은 왕담배나방 유충의 사체로부터 분리한 세라티아 네마토디필라 GNU02(*Serratia nematodiphila* GNU02)가 해충 방제 효과가 있음을 발견하여 본 발명을 완성하였다.

[0006] 따라서, 본 발명의 목적은 해충 방제 활성을 갖는 세라티아 네마토디필라 GNU02 균주, 이의 배양물, 이를 포함하는 해충 방제용 조성물 및 이를 이용한 해충 방제 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0007] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위해서, 본 발명은 해충 방제 활성을 갖는, 세라티아 네마토디필라 GNU02 균주(기탁번호: KACC92175P)를 제공한다.

[0008] 또한, 본 발명은 본 발명에 다른 세라티아 네마토디필라 GNU02 균주의 배양물을 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 본 발명에 다른 세라티아 네마토디필라 GNU02 균주 또는 이의 배양물을 포함하는 해충 방제용 조성물을 제공한다.

[0010] 또한, 본 발명은 본 발명에 다른 해충 방제용 조성물을 식물에 처리하는 것을 포함하는, 해충 방제 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0011] 본 발명의 왕담배나방(*Helicoverpa armigera*) 유충의 사체로부터 분리한 세라티아 네마토디필라 GNU02 균주(*Serratia nematodiphila* GNU02)는 해충, 특히 응애에 대해 우수한 살비 효과를 갖는다. 이에 본 발명의 세라티아 네마토디필라 GNU02 균주(*Serratia nematodiphila* GNU02)는 딸기 및 파프리카 등의 시설원에 작물의 잎에 피해를 일으키는 점박이응애 등의 해충을 방제하기 위한 생물 농약으로 활용할 수 있다. 본 발명의 세라티아 네마토디필라 GNU02 균주(*Serratia nematodiphila* GNU02)는 점박이응애에 대해 특이적 살비 활성을 나타내며, 살충제 내성 해충의 출현을 막을 수 있는 친환경적 미생물 농약을 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0012] 도 1은 본 발명의 세라티아 네마토디필라 GNU02(*Serratia nematodiphila* GNU02) 균주의 16S rDNA 염기서열을 이용한 유전유연관계 분석 결과를 나타낸 것이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따라 분리된 세라티아 네마토디필라 GNU02(*Serratia nematodiphila* GNU02) 균주의 배양 결과를 나타낸 것이다.

도 3은 본 발명의 일 실시예에 있어서 세라티아 네마토디필라 GNU02(*Serratia nematodiphila* GNU02) 균주의 농도별 살비 효과를 나타낸 것이다. A, OD₆₀₀=0.8; B, OD₆₀₀=1.0; OD₆₀₀=1.2; OD₆₀₀=1.5; DAT, day after treatment.

도 4는 본 발명의 일 실시예에 있어서 세라티아 네마토디필라 GNU02(*Serratia nematodiphila* GNU02) 균주의 살비 효과 검정 결과를 나타낸 것이다(DAT=day after treatment).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0013] 이하, 첨부한 도면을 참조하여 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있도록 본원의 구현예 및 실시예를 상세히 설명한다.
- [0014] 본 발명은 해충 방제 활성을 갖는, 세라티아 네마토디필라 GNU02 균주(기탁번호:)를 제공한다.
- [0015] 세라티아 네마토디필라(*Serratia nematodiphila*)는 그람 음성의 간상, 호기성 세균인 세라티아(*Serratia*) 속에 속하는 곤충기생성 선충 공생세균이다. 본 발명의 세라티아 네마토디필라는 왕담배나방(*Helicoverpa armigera*) 유충의 사체로부터 분리된 세라티아 네마토디필라 GNU02 균주(기탁번호: KACC92175P)로서, 응애와 같은 해충에 대해 특이적 살비 활성을 갖는다.
- [0016] 상기 해충은 응애, 진딧물, 흰가루이 등을 포함하며, 예를 들어, 응애일 수 있다. 응애는 거미강 진드기목 가운데 후기문아목(Metastigmata)을 제외한 거미류를 총칭하는 것으로, 다른 거미류와 달리 기생 습성이 고도로 진화하여 식물, 척추동물, 무척추동물 등에 기생하고 있다. 해충으로 분류되는 응애는 농작물, 가축 등에 기생하여 해를 끼치거나 동식물의 병원체를 옮기며, 예를 들어, 사과응애, 귤응애, 점박이응애, 차응애, 차면지응애, 가루응애 등을 포함할 수 있다.
- [0017] 또한, 본 발명은 세라티아 네마토디필라 GNU02 균주(기탁번호: KACC92175P)의 배양물을 제공한다.
- [0018] 상기 세라티아 네마토디필라 GNU02 균주는 인 비트로에서 세포 성장 및 생존을 지지할 수 있게 하는 배지라면 제한 없이 사용하여 배양할 수 있으며, 세포의 배양에 적절한 당 분야에서 사용되는 통상의 배지를 모두 포함한다. 세포의 종류에 따라 배지와 배양조건을 선택할 수 있다. 세포의 배양에 사용되는 기본배지는 바람직하게는 세포 배양 최소 배지(minimal medium: MM)로, 일반적으로 탄소원, 질소원 및 미량원소 성분을 포함한다. 이런 세포 배양 기본 배지에는 예를 들어, Potato Dextrose Broth(PDB), Nutrient Broth(NB), Casamino acid Peptone Glucose(CPG), Tryptic Soybean Broth(TSB), Brain Heart Infusion(BHI), Luria Bertani(LB) 등이 있으나, 이로 제한되지 않는다.
- [0019] 본 발명의 세라티아 네마토디필라 GNU02 균주는 현탁액 또는 세포 배양물의 형태로 사용될 수 있으며, 이 경우 세라티아 네마토디필라 GNU02 균주는 현탁액 또는 배양물 내에 유효 농도로 포함되어야 한다. 본 발명에서 “유효 농도”는 세라티아 네마토디필라 GNU02 균주가 해충을 살충할 수 있는 충분한 양을 의미하며, 예를 들어, 본 발명의 세라티아 네마토디필라 GNU02 균주는 현탁액 또는 배양물 내에서 OD₆₀₀이 0.5 내지 2, 예를 들어, 0.8 내지 1.5가 되도록 포함될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0020] 또한, 본 발명은 다른 세라티아 네마토디필라 GNU02 균주 또는 세라티아 네마토디필라 GNU02 균주의 배양물을 포함하는 해충 방제용 조성물 및 이 조성물을 식물에 처리하는 것을 포함하는 해충 방제 방법을 제공한다.
- [0021] 상기 조성물은 방제하고자 하는 해충 및 방제 대상인 식물의 종류에 따라 세라티아 네마토디필라 GNU02 균주 또는 세라티아 네마토디필라 GNU02 균주의 배양물의 함유량을 조절하여 포함할 수 있다.
- [0022] 상기 해충은 응애류, 진딧물, 흰가루이 등을 포함하며, 예를 들어, 응애일 수 있다. 상기 응애류는 예를 들어, 사과응애, 귤응애, 점박이응애, 차응애, 차면지응애, 가루응애 등을 포함할 수 있다.
- [0023] 상기 식물은 채소류 또는 과채류를 포함할 수 있으며, 예를 들어, 강낭콩, 은행, 밤, 딸기, 참외, 메론, 파프리카, 고추, 감자, 가지, 오이, 토마토, 수박, 상추, 들깨, 참깨, 양파 등을 포함할 수 있다.
- [0024] 상기 조성물은 식물체에 살포하거나 관주처리하여 처리될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0026] 본 발명의 이점 및 특징, 그리고 그것들을 달성하는 방법은 상세하게 후술되어 있는 실시예들을 참조하면 명확해질 것이다. 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명하기로 한다. 그러나 이들 실시예들은 본 발명을 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [0028] <실시예>
- [0030] 실시예 1. 세라티아 네마토디필라 GNU02 균주의 분리 및 동정
- [0031] 분자계통학적 분석

- [0032] 왕담배나방 유충의 사체로부터 분리한 미생물중 살충 활성이 우수한 균주를 선발하였다.
- [0033] 상기 선발된 균주의 분자계통학적 분석을 위하여, 16S rDNA 염기서열 분석을 하였다. 그 결과 서열번호 1로 표시되는 염기서열을 확인할 수 있었다. NCBI BLAST 분석을 통해 해당 염기서열은 세라티아 네마토디필라(*Serratia nematodiphila*)의 16S rDNA와 높은 상동성(99%)을 나타냈다. 16S rDNA 염기서열의 분자계통학적 유연관계 분석 결과는 도 1에 나타났다. 도 1에서 볼 수 있는 바와 같이, 상기 선발된 균주는 세라티아 네마토디필라(*Serratia nematodiphila*)와 동일한 그룹에 속하고 세라티아 마르세센스(*Serratia marcescens*)와 다른 그룹에 속하는 것으로 나타난다. 이로써, 상기 선발된 균주를 “세라티아 네마토디필라 GNU02(*Serratia nematodiphila* GNU02)”로 명명하고, 이를 2017년 4월 11일자로 국립농업과학원 농업유전자원센터(KACC)에 기탁하여 2017년 5월 1일자로 수탁번호 KACC92175P를 부여받았다.
- [0035] **세라티아 네마토디필라 GNU02 균주의 배양(생리)적 특성**
- [0036] 상기 선발된 균주의 생리적 특성을 파악하기 위하여 β -galactosidase, 구연산 이용능력, glucose를 포함하는 여러 당의 이용 여부, 젤라틴 액화능력, NO_2 생산능력, H_2S 생산능력 등의 여러 시험을 실시하고 그 결과를 표 1에 나타냈다. 또한, 세라티아 네마토디필라 GNU02가 배양배지에서 붉은색 색소를 만들음을 확인하였다(도 2).

표 1

배양(생리)적 조사항목	특성
β -Galactosidase	+
Arginine dihydrolase	+
Lysine decarboxylase	+
Ornithine decarboxylase	+
Citrate utilization	+
H ₂ S production	-
Urease	-
Tryptophane deaminase	-
Indole production	-
Acetoin production	+
Gelatinase	+
Glucose fermentation	+
Mannitol fermentation	+
Inositol fermentation	+
Sorbitol fermentation	+
Rhamnose fermentation	-
Sucrose fermentation	+
Melibiose fermentation	+
Amygdalin fermentation	+
Arabinose fermentation	-
Cytochrome oxidase	-
NO ₂ production	+
Pigmentation	+
Catalase	+

[0037]

[0038] 실시예 2. 세라티아 네마토디필라 GNU02 균주의 배양물 제조

[0039] 배양배지로는 Luria Bertani(LB) 배지를 사용하였고 그 조성은 카제인펩톤(casein peptone) 1%, 효모추출물(yeast extract) 0.5%, sodium chloride 0.5%를 함유하고, 고체배양을 위해 한천 1.5%를 사용하였다. 121℃에서 15분간 멸균하여 사용하였다. 배양조건은 28℃, 200~220rpm으로 24시간 배양하여 사용하였다.

[0041] 실험예 1. 세라티아 네마토디필라 GNU02 균주의 농도별 살비 효과 검정

[0042] 실시예 2에서와 같이 LB 한천 배지에서 24시간 배양된 세균을 면봉을 이용하여 균체를 수확한 후 살균수를 이용하여 다양한 농도의 세균 현탁액을 만들었다. 강낭콩 잎 디스크(직경 2 cm)에 점박이응애를 올려놓고 준비된 세균현탁액에 3초간 침지한 후 점박이응애가 탈출하지 못하도록 살균수로 과포화된 솜을 지름 9 cm 페트리 디시에 놓고 그 위에 강낭콩 잎 디스크를 올려놓았다. 24시간 간격으로 살충효과를 확대경과 해부현미경을 이용하여 조사하였다. 대조구는 살균수 처리로 설정하였다. 도 3에서 볼 수 있는 바와 같이, 세균 현탁액의 농도가

OD(optical density)₆₀₀이 0.8 이상일 때부터 확연한 효과를 나타냈다.

[0044] 실험예 2. 세라티아 네마토디필라 GNU02 균주의 살비 효과 비교

[0045] 실시예 2에서와 같이 LB한천 배지에서 24시간 배양된 세균을 면봉을 이용하여 균체를 수확한 후 살균수에 희석하여 흡광도(OD: optical density)를 이용하여 세균 현탁액(OD₆₀₀=0.8)을 만들었다. 강낭콩 잎 디스크(직경 2 cm)에 점박이응애를 올려놓고 준비된 세균현탁액에 3초간 침지한 후 점박이응애가 탈출하지 못하도록 살균수로 과포화 된 솜을 지름 9 cm 페트리 디시에 놓고 그 위에 강낭콩 잎 디스크를 올려놓았다. 24시간 간격으로 살비 효과를 확대경과 해부현미경을 이용하여 조사하였다. 대조구는 살균수 처리로 설정하였다. 도 4에서 볼 수 있는 바와 같이 세라티아 네마토디필라 GNU02 균주는 세라티아 마르센스 GNU05 균주보다 높은 살비 효과를 나타냈다.

[0047] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

수탁번호

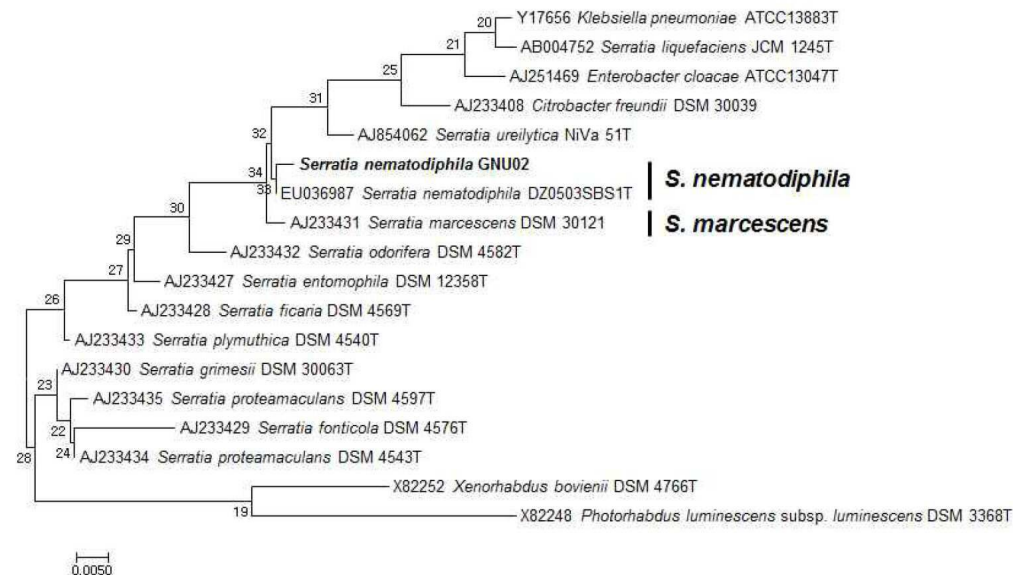
기탁기관명 : 국립농업과학원 농업유전자원센터

수탁번호 : KACC92175P

수탁일자 : 20170501

도면

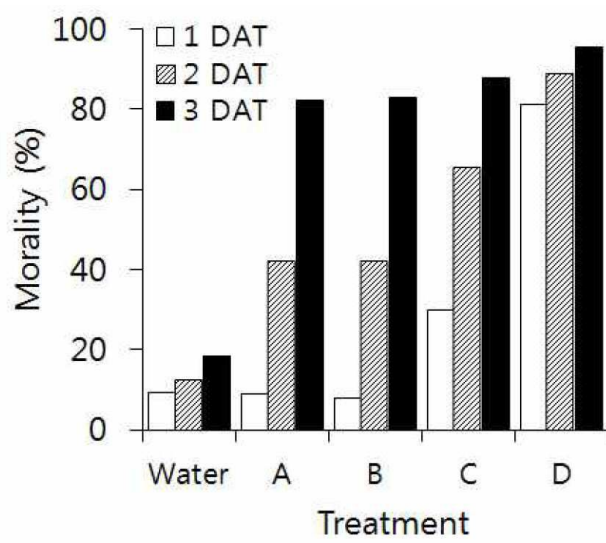
도면1



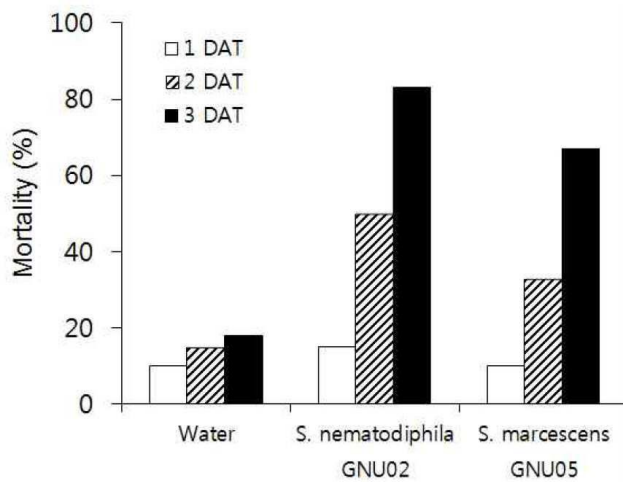
도면2



도면3



도면4



서열 목록

- <110> INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY
- <120> SERRATIA NEMATODIPHILA GNU02 STRAIN AND COMPOSITION AS ACARICIDE
AGAINST HARMFUL INSECTS CONTAINING THE SAME
- <130> PN1703-108
- <160> 1
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 1503
- <212> DNA
- <213> Serratia sp.
- <400> 1

```

agagtttgat catggctcag attgaacgct ggccggcaggc ttaacacatg caagtcgagc      60
ggtagcacag gggagcttgc tccccgggtg acgagcggcg gacgggtgag taatgtctgg      120

gaaactgcct gatggagggg gataactact ggaaacggta gctaataccg cataacgtcg      180
caagacaaaa gaggggggacc ttccgggcctc ttgccatcag atgtgccccag atgggattaa      240
ctagtaggtg gggtaaatggc tcacctaggc gacgatccct agctgggtctg agaggatgac      300
cagccacact ggaactgaga cacggtccag actcctacgg gaggcagcag cggggaatat      360
tgcacaatgg gcgcaagcct gatgcagcca tgccgcgtgt gtgaagaagg ccttcggggtt      420
glaaagcact ttcagcgagg aggaaggtgg tgagcttaat acgctcatca attgacgtta      480
ctcgcagaag aagcaccggc taactccgtg ccagcagccg cggtaatacg gagggtgcaa      540

gcgttaatcg gaattactgg gcgtaaagcg cacgcaggcg gtttgtaag tcagatgtga      600

```

aatccccggg ctcaacctgg gaactgcatt tgaactggc aagctagagt ctcgtagagg	660
ggggtagaat tccagggtga gcggtgaaat gcgtagaggt ctggaggaat accggtggcg	720
aagcgggccc cctggacgaa gactgacgct cagggtgcga agcgtgggga gcaaacagga	780
ttagataccc tggtagtcca cgctgtaaac gatgtcgatt tggaggttgt gcccttgagg	840
ctgggttcc ggagctaacg cgttaaatcg accgcctggg gagtacggcc gcaaggttaa	900
aactcaaatg aattgacggg ggcccgacaca agcgggtggag catgtggttt aattcgatgc	960
aacgcgaaga accttaccta ctcttgacat ccagagaact ttccagagat ggattggtgc	1020
cttcgggaac tctgagacag gtgctgcatg gctgtcgtca gctcgtgttg tgaaatgttg	1080
ggttaagtcc cgcaacgagc gcaaccctta tcctttgttg ccagcggttc ggccgggaac	1140
tcaaaggaga ctgccagtga taaactggag gaaggtgggg atgacgtcaa gtcacatgg	1200
cccttacgag tagggctaca cacgtgctac aatggcgtat acaaagagaa gcgacctcgc	1260
gagagcaagc ggacctcata aagtacgtcg tagtccgat tggagtctgc aactcgactc	1320
catgaagtcg gaatcgctag taatcgtaga tcagaatgct acggtgaata cgttcccggg	1380
ccttgtagac accgcccgtc acaccatggg agtgggttgc aaaaggagta gtagcttaa	1440
ccttcgggag ggcgcttacc actttgtgat tcatgactgg ggtgaagtcg taacaaggta	1500
acc	1503