(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0086798
(43) 공개일자 2024년06월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/20 (2006.01) *A01N 63/28* (2020.01)
A01P 3/00 (2006.01) *C12R 1/465* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 1/205 (2021.05)
A01N 63/28 (2022.01)
(21) 출원번호 10-2022-0170613
(22) 출원일자 2022년12월08일
심사청구일자 없음

(71) 출원인
경상국립대학교산학협력단
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
(72) 발명자
곽연식
경상남도 진주시 진주대로 1317(이현동, 이현하이클래스웰가아파트) 110-901
이수인
경상북도 성주군 성주읍 참별로 2652-14
(74) 대리인
특허법인 플러스

전체 청구항 수 : 총 7 항

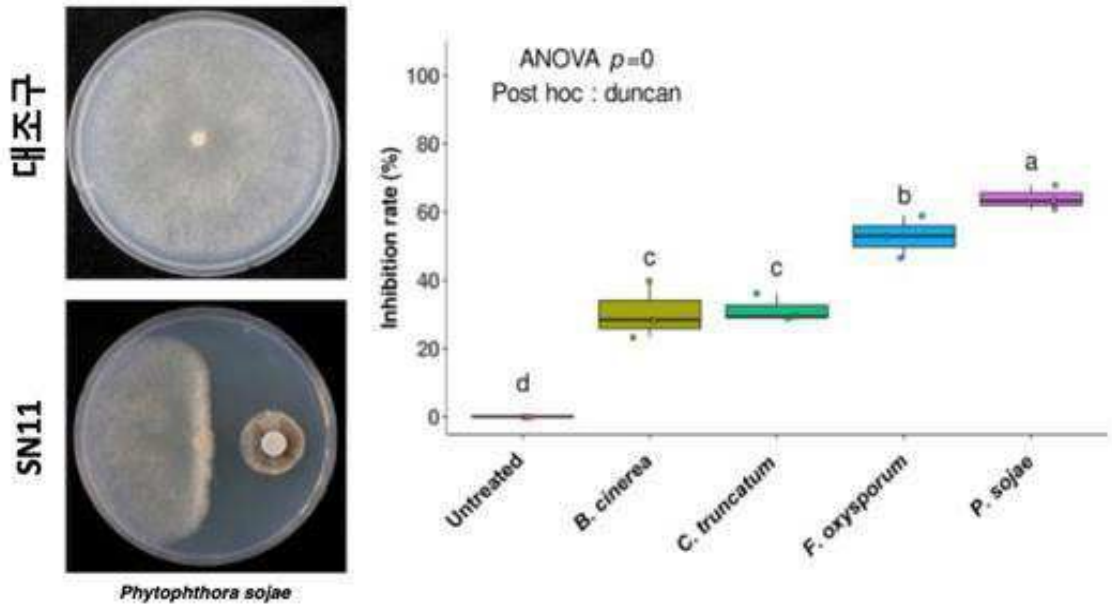
(54) 발명의 명칭 **신규 균주 스트렙토마이세스 서울렌시스 SN11 및 이를 유효성분으로 함유하는 식물병원균억제용 미생물 제제**

(57) 요 약

본 발명은 신규 균주 스트렙토마이세스 서울렌시스(*Streptomyces seoulensis*) SN11 및 이를 유효성분으로 함유하는 식물병원균 억제용 미생물 제제에 관한 것으로, 보다 상세하게는 작물에 발생하는 진균성 질병의 원인균에 대해 친환경적인 예방 및 방제 효과를 나타내는 신규한 방선균 균주를 분리하고, 다양한 탄소원 및 질소원의 활용

(뒷면에 계속)

대 표 도 - 도1



가능성을 파악하여 대량생산을 위한 배양 기법의 확립에 관한 것이다.

본 발명에 따른 스트렙토마이세스 서울렌시스(*Streptomyces seoulensis*) SN11(기탁번호: KCTC19052BP)은 항진균 효과를 가지는 균주로서 다양한 탄소원 및 질소원을 이용한 균주 배양액 또는 배양액 추출물에 의한 생물학적 방제를 달성할 수 있고, 항진균 대상인 보트리티스 시네레아(*Botrytis cinerea*), 콜레토트리쿰 트룬카툼(*Colletotrichum truncatum*), 툿리움 옥시포룸(*Fusarium oxysporum*) 및 파이토포라 소재(*Phytophthora sojae*) 등에 대한 항진균 효과가 매우 뛰어나다.

(52) CPC특허분류
A01P 3/00 (2021.08)
C12R 2001/465 (2021.05)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1395071802
과제번호	PJ016437012022
부처명	농촌진흥청
과제관리(전문)기관명	농촌진흥청
연구사업명	바이오그린 연계 농생명혁신기술개발사업
연구과제명	딸기 병방제 위한 핵심미생물 발굴 및 생물학적 특성 평가기술 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	주식회사 솔붐(Solvum Co.,Ltd.)
연구기간	2021.06.11 ~ 2022.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

스트렙토마이세스 서울렌시스 SN11(*Streptomyces seoulensis* SN11)(기탁번호:KCTC19052BP).

청구항 2

스트렙토마이세스 서울렌시스 SN11(*Streptomyces seoulensis* SN11)(기탁번호:KCTC19052BP), 스트렙토마이세스 서울렌시스 SN11(*Streptomyces seoulensis* SN11)(기탁번호:KCTC19052BP) 및 스트렙토마이세스 서울렌시스 SN11(*Streptomyces seoulensis* SN11)(기탁번호:KCTC19052BP)의 배양 여과액으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상을 유효성분으로 포함하는, 식물병원균 방제용 미생물 제제.

청구항 3

제 2항에 있어서,

상기 식물병원균은 보트리티스 시네레아(*Botrytis cinerea*), 콜레토트리쿰 트룬카툼(*Colletotrichum truncatum*), 푸사리움 옥시포룸(*Fusarium oxysporum*) 및 파이토포라 소재(*Phytophthora sojae*)로 이루어진 군에서 선택되는 것인, 식물병원균 방제용 미생물 제제.

청구항 4

스트렙토마이세스 서울렌시스 SN11(*Streptomyces seoulensis* SN11)(기탁번호:KCTC19052BP)에 탄소원 및 질소원 중 어느 하나 이상을 첨가한 후 배양하는 단계를 포함하는 식물병원균 방제용 미생물 제제의 제조방법.

청구항 5

제 4항에 있어서,

상기 탄소원은 D-만노스(D-mannose), L-말산(L-malic acid), D-만니톨(D-mannitol), D-갈락토스(D-galactose)로 이루어진 군에서 선택되는 것인, 식물병원균 방제용 미생물 제제의 제조방법.

청구항 6

제 4항에 있어서,

상기 질소원은 D-세린(D-Serine), D,L-α-아미노카프릴산(D,L-α-aminocaprylic acid), D-만노사민(D-mannosamine), L-아스파르트산(L-aspartic acid)로 이루어진 군에서 선택되는 것인, 식물병원균 방제용 미생물 제제의 제조방법.

청구항 7

제 4항에 있어서,

상기 배양은 25 내지 35℃에서 2 내지 5일간 수행되는 것인, 식물병원균 방제용 미생물 제제의 제조방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 신규 균주 스트렙토마이세스 서울렌시스(*Streptomyces seoulensis*) SN11 및 이를 유효성분으로 함유하는 식물병원균 억제용 미생물 제제에 관한 것으로, 보다 상세하게는 작물에 발생하는 진균성 질병의 원인균에 대해 친환경적인 예방 및 방제 효과를 나타내는 신규한 방선균 균주를 분리하고, 다양한 탄소원 및 질소원의 활용 가능성을 파악하여 대량생산을 위한 배양 기법의 확립에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 미생물에 기반한 친환경적인 생물학적 방제용 제제의 필요성은 더 이상의 설명이 필요 없을 정도로 절실한 상황이다. 현재 생물학적 방제용 미생물 제제로는 바실러스 기반의 살충제, 방선균 기반의 항진균제가 있으며, 상기 방선균 중 특히 스트렙토마이세스(*Streptomyces* sp.) 관련 종이 다수를 차지하고 있다.

[0003] 국내외에서 다양한 종류의 방선균 기반 생물학적 방제용 미생물 제제가 발견되고 있으며, 이를 이용하여 농작물을 포함하는 식물의 진균 감염 및 진균 공생 해충을 친환경적으로 제어하고자 하는 시도가 이루어지고 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0004] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허공보 제2313937호(2021.10.12).

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명은 신규 방선균인 스트렙토마이세스 서울렌시스(*Streptomyces seoulensis*) SN11(기탁번호: KCTC19052BP)을 제공하고, 이를 포함하는 항진균용 미생물 제제를 이용하여 식물에 발생하는 진균성 질병 및 공생 해충을 친환경적으로 제어할 수 있는 활용 방안을 제공한다.

과제의 해결 수단

[0006] 본 발명의 일 양태는 스트렙토마이세스 서울렌시스 SN11(*Streptomyces seoulensis* SN11)(기탁번호:KCTC19052BP)을 제공한다.

[0007] 본 발명의 다른 양태는 스트렙토마이세스 서울렌시스 SN11(*Streptomyces seoulensis* SN11)(기탁번호:KCTC19052BP), 스트렙토마이세스 서울렌시스 SN11(*Streptomyces seoulensis* SN11)(기탁번호:KCTC19052BP) 및 스트렙토마이세스 서울렌시스 SN11(*Streptomyces seoulensis* SN11)(기탁번호:KCTC19052BP)의 배양 여과액으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상을 유효성분으로 포함하는, 식물병원균 방제용 미생물 제제를 제공한다.

[0008] 본 발명의 일 예에 있어서, 상기 식물병원균은 보트리티스 시네레아(*Botrytis cinerea*), 콜레토트리쿰 트룬카툼(*Colletotrichum truncatum*), 푸사리움 옥시포룸(*Fusarium oxysporum*) 및 파이토포라 소재(*Phytophthora sojae*)로 이루어진 군에서 선택되는 것일 수 있다.

[0009] 본 발명의 또 다른 양태는 스트렙토마이세스 서울렌시스 SN11(*Streptomyces seoulensis* SN11)(기탁번호:KCTC19052BP)에 탄소원 및 질소원 중 어느 하나 이상을 첨가한 후 배양하는 단계를 포함하는 식물병원균 방제용 미생물 제제의 제조방법을 제공한다.

[0010] 본 발명의 일 예에 있어서, 상기 탄소원은 D-만노스(D-mannose), L-말산(L-malic acid), D-만니톨(D-mannitol), D-갈락토스(D-galactose)로 이루어진 군에서 선택되는 것일 수 있다.

[0011] 본 발명의 일 예에 있어서, 상기 질소원은 D-세린(D-Serine), D,L-α-아미노카프릴산(D,L-α-aminocaprylic acid), D-만노사민(D-mannosamine), L-아스파르트산(L-aspartic acid)로 이루어진 군에서 선택되는 것일 수 있다.

[0012] 본 발명의 일 예에 있어서, 상기 배양은 25 내지 35℃에서 2 내지 5일간 수행되는 것일 수있다.

발명의 효과

[0013] 본 발명에 따른 스트렙토마이세스 서울렌시스(*Streptomyces seoulensis*) SN11(기탁번호: KCTC19052BP)은 항진균 효과를 가지는 균주로서 다양한 탄소원 및 질소원을 이용한 균주 배양액 또는 배양액 추출물에 의한 생물학적 방제를 달성할 수 있고, 항진균 대상인 보트리티스 시네레아(*Botrytis cinerea*), 콜레토트리쿰 트룬카툼(*Colletotrichum truncatum*), 푸리움 옥시포룸(*Fusarium oxysporum*) 및 파이토포라 소재(*Phytophthora sojae*)

등에 대한 항진균 효과가 매우 뛰어나다.

도면의 간단한 설명

[0014] 도 1은 스트렙토마이세스 서울렌시스 SN11 균주의 식물병원성 진균에 대한 항진균 활성에 관한 것이고,

도 2는 16S rRNA 유전자를 이용한 스트렙토마이세스 서울렌시스 SN11의 분자생물학적 계통 분석 결과에 관한 것이고,

도 3은 스트렙토마이세스 서울렌시스 SN11균주의 (a) PM1 플레이트를 이용한 탄소원 이용성, 및 (b) PM3B 플레이트를 이용한 질소원 이용성에 관한 것이고,

도 4는 스트렙토마이세스 서울렌시스 SN11의 탄소원, 질소원 이용능력을 측정한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0015] 이하 첨부한 표 또는 도면들을 참조하여 본 발명의 신규 균주 스트렙토마이세스 서울렌시스 SN11 및 이를 유효성분으로 함유하는 식물병원균억제용 미생물 제제에 대해 상세히 설명한다.

[0016] 도면이 기재되어 있을 경우, 이는 당업자에게 본 발명의 사상이 충분히 전달될 수 있도록 하기 위해 예로서 제공되는 것이다. 따라서 본 발명은 제시되는 도면들에 한정되지 않고 다른 형태로 구체화될 수도 있으며, 상기 도면들은 본 발명의 사상을 명확히 하기 위해 과장되어 도시될 수 있다.

[0017] 이때, 사용되는 기술 용어 및 과학 용어에 있어서 다른 정의가 없다면, 이 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 통상적으로 이해하고 있는 의미를 가지며, 하기의 설명 및 첨부 도면에서 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있는 공지 기능 및 구성에 대한 설명은 생략한다.

[0018] 또한 본 발명의 명세서에서 사용되는 단수 형태는 문맥에서 특별한 지시가 없는 한 복수 형태도 포함하는 것으로 의도할 수 있다.

[0019] 또한 본 발명의 명세서에서 특별한 언급 없이 사용된 단위는 중량을 기준으로 하며, 일 예로 % 또는 비의 단위는 중량% 또는 중량비를 의미한다.

[0020] 또한 본 발명의 명세서에서, “포함한다”는 표현은 “구비한다”, “함유한다”, “가진다” 또는 “특징으로 한다” 등의 표현과 등가의 의미를 가지는 개방형 기재이며, 추가로 열거되어 있지 않은 요소, 재료 또는 공정을 배제하지 않는다. 또한 “실질적으로…로 구성된다”는 표현은 특정된 요소, 재료 또는 공정과 함께 열거되어 있지 않은 다른 요소, 재료 또는 공정이 발명의 적어도 하나의 기본적이고 신규한 기술적 사상에 허용할 수 없을 만큼의 현저한 영향을 미치지 않는 양으로 존재할 수 있는 것을 의미한다. 또한 “구성된다”는 표현은 기재된 요소, 재료 또는 공정만이 존재하는 것을 의미한다.

[0021] 본 발명에 있어 “샘플” 또는 “시료”는 분석을 위한 대상을 나타내는 것으로, 명세서에 걸쳐 동일한 의미로 사용되었다.

[0022] 이하 본 발명에 대해 상세히 설명한다.

[0023] 본 발명의 일 양태는 스트렙토마이세스 서울렌시스 SN11(*Streptomyces seoulensis* SN11)(기탁번호:KCTC19052BP)을 제공한다.

[0024] 상기 스트렙토마이세스 서울렌시스 SN11(*Streptomyces seoulensis* SN11)(기탁번호:KCTC19052BP)은 백두대간 덕유산에서 채취한 토양에서 분리하여, 항진균 활성이 가장 우수한 콜로니 중에서 선별 및 동정하고, 스트렙토마이세스 서울렌시스 SN11(*Streptomyces seoulensis* SN11)로 명명하여, 2022년 12월 08일 자로 한국생명공학연구원 한국생물자원센터에 기탁번호 KCTC19052BP로 기탁하였다.

[0025] 본 발명의 신규 균주인 스트렙토마이세스 서울렌시스 SN11(*Streptomyces seoulensis* SN11)(기탁번호:KCTC19052BP)은 스트렙토마이세스 서울렌시스 NBRC16668(NCBI GenBank 서열 ID: NR_041432.1)과 와 연관성이 높은 것으로 조사되었으며, 본 발명의 일 실시예에 따른 계통 분석을 통해 스트렙토마이세스 서울렌시스 균주로 동정되었다.

[0026] 본 발명의 다른 양태는 스트렙토마이세스 서울렌시스 SN11(*Streptomyces seoulensis* SN11)(기탁번호:KCTC19052BP), 스트렙토마이세스 서울렌시스 SN11(*Streptomyces seoulensis* SN11)(기탁번호:KCTC19052BP)

및 스트렙토마이세스 서울렌시스 SN11(*Streptomyces seoulensis* SN11)(기탁번호:KCTC19052BP)의 배양 여과액으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상을 유효성분으로 포함하는, 식물병원균 방제용 미생물 제제를 제공한다.

[0027] 본 발명의 일 실시예에 따르면 상기 균주 및 상기 균주의 배양액 또는 배양 여과액 또한 항진균 활성을 가지며, 상기 균주의 배양액 및 배양액의 여과액 외에도 배양액의 동결건조 분말, 배양 여과액의 동결건조 분말 또는 동결건조 분말을 용해한 용액 등도 다양한 제형 및 용도로 활용할 수 있다.

[0028] 상기 배양액은 특별히 한정되는 것은 아니나, 균체를 배지에 배양하여 균체가 생성한 물질, 균체 자체 및 배지를 포함할 수 있으며, 상기 배양 여과액은 배양액을 원심분리하여 얻은 상등액, 상층액을 여과하여 얻은 액체를 포함할 수 있다.

[0029] 상기 식물병원균은 특별히 한정되는 것은 아니나, 알터나리아 알터나타(*Alternaria alternata*), 알터나리아 말리 (*Alternaria mali*), 아스퍼질러스 오라이제(*Aspergillus oryzae*), 보트리티스 시네리아(*Botrytis cinerea*), 콜레토트리쿰 트룬카툼(*Colletotrichum truncatum*), 콜레토트리쿰 코코데스(*Colletotrichum coccodes*), 콜레토트리쿰 그로에오스포리오이데스(*Colletotrichum gloeosporioides*), 콜레토트리쿰 오비큘레어(*Colletotrichum orbiculare*), 실린드로카르폰 데스트럭탄스(*Cylindrocarpon destructans*), 푸사리움 옥시포룸(*Fusarium oxysporum*), 푸사리움 옥시스포룸 f. sp. 라이코펄시사이 (*Fusariumoxyporum* f. sp. *lycopersici*), 마그나포르테 오리재(*Magnaporthe oryzae*), 라이족토니아 솔라니(*Rhizoctonia solani*), 라이조퍼스 스토로니퍼 var. 스토로니퍼(*Rhizopus stolonifer* var. *stolonifer*) 및 파이토포라 소재(*Phytophthora sojae*) 등으로 이루어진 군에서 선택되는 것일 수 있으며, 바람직하게는 보트리티스 시네레아(*Botrytis cinerea*), 콜레토트리쿰 트룬카툼(*Colletotrichum truncatum*), 푸사리움 옥시포룸(*Fusarium oxysporum*) 및 파이토포라 소재(*Phytophthora sojae*) 등으로 이루어진 군에서 선택되는 것일 수 있다.

[0030] 상기 진균에 의해 발병한 식물은 검은곰팡이썩음병, 잎 점무늬, 마름증상, 궤양, 가지마름, 뿌리썩음 등의 병징을 나타내며, 잎이나 줄기가 시들게 되고, 열매의 질이 떨어지게 된다.

[0031] 상기 진균에 의해 발생하는 식물 곰팡이병(plant fungal diseases)의 종류는 본 발명에서 특별히 제한되는 것은 아니나, 상기 미생물 제제를 통해 방제될 수 있는 곰팡이에 의해 발명할 수 있는 곰팡이병을 포함할 수 있으며, 구체적인 일예로, 흰가루병, 잿빛곰팡이병 또는 잎곰팡이병 등의 곰팡이에 의한 식물병 등을 들 수 있다.

[0032] 본 발명의 또 다른 양태는 스트렙토마이세스 서울렌시스 SN11(*Streptomyces seoulensis* SN11)(기탁번호:KCTC19052BP)에 탄소원 및 질소원 중 어느 하나 이상을 첨가한 후 배양하는 단계를 포함하는 식물병원균 방제용 미생물 제제의 제조방법을 제공한다.

[0033] 상기 탄소원은 특별히 한정되는 것은 아니나, D-만노스(D-mannose), L-말산(L-malic acid), D-만니톨(D-mannitol), D-갈락토스(D-galactose)로 이루어진 군에서 선택되는 것일 수 있다.

[0034] 또한, 상기 질소원은 특별히 한정되는 것은 아니나, D-세린(D-Serine), D,L-α-아미노카프릴산(D,L-α-aminocaprylic acid), D-만노사민(D-mannosamine), L-아스파르트산(L-aspartic acid)로 이루어진 군에서 선택되는 것일 수 있다.

[0035] 상기 배양은 특별히 한정되는 것은 아니나, 25 내지 35℃에서 2 내지 5일간, 좋게는 25 내지 33℃에서 2 내지 4일간, 더욱 좋게는 25 내지 30℃에서 2 내지 4일간 수행되는 것일 수 있다.

[0036] 상기 제조방법은 특별히 한정되는 것은 아니나, 배양액을 원심분리하여 층분리가 일어난 배양액의 상등액을 얻어 상등액을 제형화하는 단계 또는 배양액을 원심분리하여 층분리가 일어난 배양액의 상등액을 여과하여 얻은 배양 여과액을 제형화하는 단계 등을 더 포함할 수 있다.

[0038] 이하, 본 발명의 내용을 실시예를 통하여 보다 구체적으로 설명한다. 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것일 뿐, 본 발명의 권리범위가 이들에 의해 한정되는 것은 아니다.

실 시 예 1

[0040] **균주의 동정**

[0041] **실시예 1-1. 새로운 균주의 동정을 위한 샘플링 및 배양**

[0042] 백두대간 중 덕유산에서 토양을 채취하였다. 채취한 샘플은 멸균된 50 mL 원추형 튜브에 옮기고 4℃에 보관하였다. 곰팡이 균은 연속 희석 평판법(serial dilution plating method)으로 분리하였다. 구체적으로, 샘플인 물 1 mL을 멸균 증류수 9 mL과 혼합한 후, 실온에서 15분간 흔들어 섞은 다음 10^{-1}에서 10^{-4}의 농도까지 단계별로 희석하였다. 희석된 시료 각 0.1 mL을 TSA(Tryptic Soy Agar; 1L 당 30g Trypic Soy Broth 및 20g 한천(agar); Sigma-Aldrich) 배지에 도말하였다.

[0043] 시료가 도말된 TSA 배지는 27℃ 배양기에서 5일 동안 배양하였다.

[0044] 미생물 단일 콜로니는 살균된 이쑤시개를 이용하여 96-웰 플레이트(1/5 TSB)의 각 웰에 하나씩 옮겨 도말한 후, 27℃ 배양기에서 3일 동안 배양하였다.

[0046] **실시예 1-2. 항균 활성 검정 및 균주 선별**

[0047] 상기 과정을 통해 배양된 96-웰 플레이트를 진균성 병원균인 보트리티스 시네레아(*Botrytis cinerea*), 콜레토트리쿰 트룬카툼(*Colletotrichum truncatum*), 푸사리움 옥시포룸(*Fusarium oxysporum*) 및 파이토포라 소재(*Phytophthora sojae*) (분양처: 국립농업과학원 미생물은행)에 대해 이하 방법으로 대치배양하였다.

[0048] 항균 활성의 검정을 위해 PDK(1L당 10g Potato Dextrose, 10g 펩톤, 20g 한천) 배지 상에서 28℃의 배양온도로 배양하였다. 90mm 페트리디쉬에, 분리된 균주를 OD_{600} 0.6으로 PDK 배지의 중심으로부터 3cm 떨어진 위치에 중심선과 직각이 되도록 8mm 페이퍼-디스크에 20 μL 분주하였다.

[0049] 분주 후 28℃ 배양기에서 5일 동안 배양한 후, 상기 4종의 진균성 병원균을 각각 중심부에 접종하고, 28℃에서 10일 동안 대치배양한 후, 병원균 균사 생장 억제력을 평가하기 위해 균사 길이를 측정하였다.

[0050] 병원균 억제력은 총 3회 실시하여, 최종적으로 균사 생장 억제력이 가장 우수한 한 균주 SN11을 선발하였다(도 1 참조).

[0052] **실시예 1-3. DNA 추출 및 시퀀싱(sequencing) 및 계통발생분석(Phylogenetic analysis)**

[0053] 선발된 균주로부터 Solgent Genomic DNA prep kit(Solgent Co. Ltd., 대전, 한국)를 이용하여 총 게놈 DNA를 추출하였다. DNA 시퀀싱은 ABI 3700 automated DNA sequencer(Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, USA)를 이용하여 수행하였다.

[0054] 시퀀싱 결과로부터, 16S rRNA 유전자의 염기서열은 정방향 프라이머 27F (5 '-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') 및 역방향 프라이머 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3')를 사용하여 확인하였다. 확보된 16S rRNA 염기서열을 Basic Local Alignment Search Tool(BLASTn)(NCBI)을 이용하여 분석한 결과, 스트렙토마이세스 서울렌시스 NBRC16668(NCBI GenBank ID: NR_041432.1)과 유사성이 가장 높은 것으로 나타났다.

[0055] 계통 발생 분석은 MEGA 10 소프트웨어(Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, KumarS. MEGA10:0 molecular evolutionary genetics analysis version 10.0.)를 사용하여 수행되었다. 내부 브랜치의 신뢰성은 1000 부트 스트랩 복제(1000 bootstrap replicates)를 사용하는 p-거리 대체 모델을 사용하여 평가하였다.

[0056] SN11 및 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.)에 속하는 후보군 종을 포함하는 계통 발생 수는 최대 우도 분석(the maximum likelihood analysis)에 의해 복합 데이터 세트를 사용하여 구성한 후, MEGA 10 프로그램으로 유사성 검증을 통해 계통발생분석을 수행한 결과, SN11 균주는 스트렙토마이세스 서울렌시스로 동정되었다(도 2 참조).

[0058] 새로운 균주를 스트렙토마이세스 서울렌시스(*Streptomyces seoulensis*) SN11로 명명하고 이를 한국생명공학연구원 생물자원센터(KCTC)에 기탁하였다.

[0059] 수탁번호 : KCTC19052BP

[0060] 수탁일자 : 2022.12.08.

[0061] 기탁처 : 한국생명공학연구원 생물자원센터

실 시 예 2

[0063] **실시예 2-1. 신규 스트렙토마이세스 서울렌시스(*Streptomyces seoulensis*) SN11의 탄소원 및 질소원 활용 측정**

[0064] 탄소원 및 질소원의 활용 측정을 위해 바이오로그 플레이트(Biolog, USA)를 구입하였다.

[0065] 탄소원은 PM1 플레이트를, 질소원은 PM3B 플레이트를 사용하였다.

[0066] 실시예 1에서 분리 동정된 스트렙토마이세스 서울렌시스 SN11 균주를 MS 배지(Sigma-Aldrich)에서 28° C로 5일 동안 배양하였다.

[0067] 배양한 균주의 단일 균체를 새로운 MS 배지에 접종하고 10일 동안 배양한 후, 생성된 포자를 1 mL 멸균수에 현탁하여 포자 현탁액을 제조하였다. 제조한 포자 현탁액을 PM1 플레이트는 20 mL IF-0a 시약, 240 μL Mix F시약 및 2 mL 120X 스탁(stock)과 혼합하였고, PM3B 플레이트는 40 mL IF-0a 시약, 480 μL Mix F시약 및 4 mL 120X 스탁과 혼합하였다.

[0068] 포자 현탁액은 각 포자 플레이트별로 PM1 플레이트는 1.76 mL, PM3B 플레이트는 3.52 mL를 혼합하였으며, 제조한 용액을 96 웰에 100 μL씩 분주하였다. 플레이트를 28° C에서 3일 동안 배양한 후, OD_{590}에서 24시간 간격으로 흡광도를 측정하였다.

[0069] 탄소원 또는 질소원의 이용성에 대해, 색상변화 및 OD_{590}값의 변화를 조사하여 이하 기술하는 방법으로 평가하였다.

[0070] 측정된 OD_{590}값을 스피어만 상관 분석을 통해 p 값을 산출하였으며, 산출된 값 중 0.6이상의 값을 선발하였다.

[0071] 그 결과를 도 3에 도시하였다.

[0072] 이로부터 탄소원에서는 D-만노스(D-mannose), L-말산(L-malic acid), D-만니톨(D-mannitol), D-갈락토스(D-galactose)의 이용성이 높은 것을 확인하였으며, 질소원에서는 D-세린(D-Serine), D,L-α-아미노카프릴산(D,L-α-aminocaprylic acid), D-만노사민(D-mannosamine), L-아스파르트산(L-aspartic acid)의 이용성이 높은 것을 확인하였다.

표 1

[0074] 스트렙토마이세스 서울렌시스 SN11 균주의 이용 탄소원 선발

플레이트 사이트	탄소원	$p > 0.6$
A11	D-Mannose	0.9557896
G12	L-Malic Acid	0.8453829
B11	D-Mannitol	0.8335869
A6	D-Galactose	0.8139268

표 2

[0075] 스트렙토마이세스 서울렌시스 SN11 균주의 이용 질소원 선발

플레이트 사이트	질소원	$p > 0.6$
C8	D-Serine	0.7220365
G10	D,L-α-AminoCaprylic Acid	0.7054591
E10	D-Mannosamine	0.6428335
A10	L-Aspartic Acid	0.6095857

[0076] **실시예 2-2. 스트렙토마이세스 서울렌시스 SN11의 탄소원, 질소원을 통한 균주생장 촉진효과 검정**

[0077] 스트렙토마이세스 서울렌시스 SN11 균주의 이용성이 높은 탄소원 및/또는 질소원을 이용하는 경우, 균주의 생장이 촉진되는지를 평가하였다.

[0078] 이를 위해, 반응기(Bioreactor)를 이용하여 낮은 농도의 스트렙토마이세스 서울렌시스 SN11 균주와 상기 실시예 2-1의 표 1 및 표 2에서 선별한 탄소원 및 질소원을 함께 배양하였다.

[0079] 비교를 위한 음성대조군으로는 TSB배지에 멸균수만 처리한 것을 사용하였고, 실험군으로는 TSB배지에 최종 농도가 2%가 되도록 탄소원과 질소원을 처리한 것을 사용하였다.

[0080] 모든 실험군에 스트렙토마이세스 서울렌시스 SN11를 OD_{600} 0.02가 되도록 처리하고, 30° C, 20 mL 부피, 1000 rpm에서 역스핀 60초로 24 시간 동안 배양하였다.

[0081] 배양 후 균주 생장 촉진 효과를 생균수를 측정하여 확인하였다.

[0082] 그 결과, 상기 음성대조군에서는 ~10^6 cfu/mL의 생균수가 확인된 반면 질소원과 탄소원을 함께 처리한 실험군에서는 10^6-10^8 cfu/mL 범위로 더 높은 생균수를 나타내는 것을 확인하였다.

[0083] 상기 결과의 통계적 유의성 확인을 위해 크루스칼-월리스 랭크 섬 테스트(Kruskal-Wallis Rank Sum Test)를 진행한 결과, p 값이 2.956377 x 10^{-9}로 0.05보다 낮은 값을 나타는 것을 확인하였으며, 이로부터, 상기 대조군과 실험군의 생균수는 통계적으로 유의한 차이를 나타내는 것을 알 수 있었다.

[0084] 또한, 사후 분석으로 Tukey HSD (Tukey's honestly significant difference test) 분석을 수행한결과, p 값이 0.05보다 낮은 것을 확인 할 수 있으며, 상기 대조군과 실험군의 생균수는 통계적으로 유의한 차이를 나타내는 것을 확인하였다(도 4 참조).

[0086] 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

[0087]

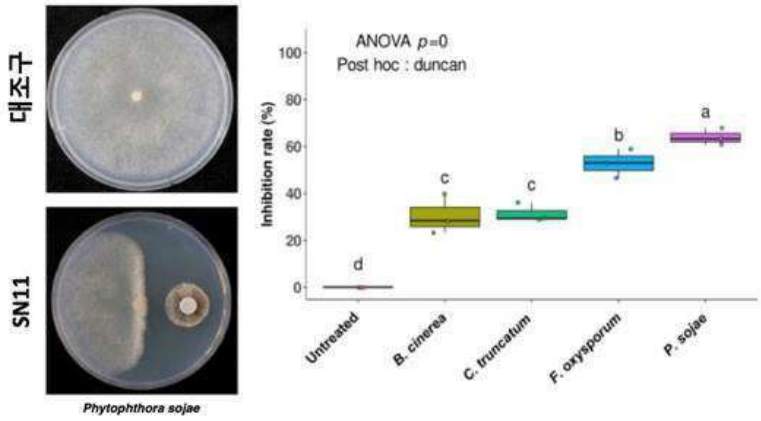
기탁기관명 : 한국생명공학연구원 생물자원센터(KCTC)

수탁번호 : KCTC19052P

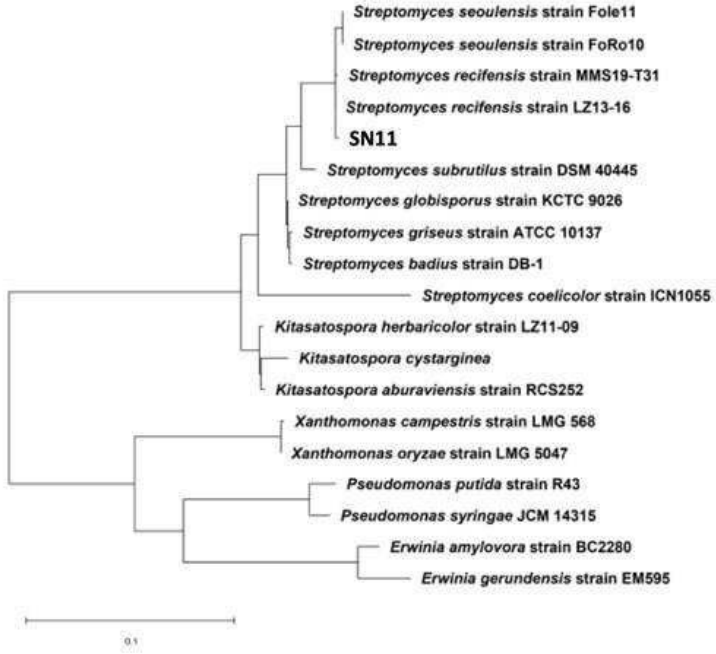
수탁일자 : 20221208

도면

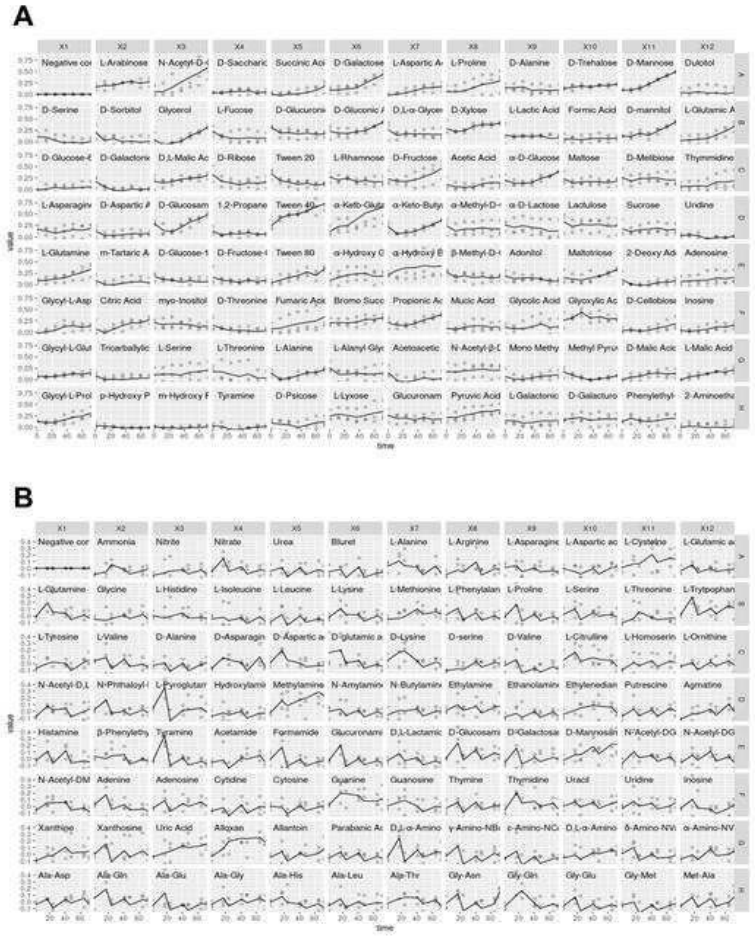
도면1


대조구
SN11
Phytophthora sojae
ANOVA p=0
Post hoc : duncan
Inhibition rate (%)
100
80
60
40
20
0
a
b
c
c
d
Untreated
B. cinerea
C. truncatum
F. oxysporum
P. sojae

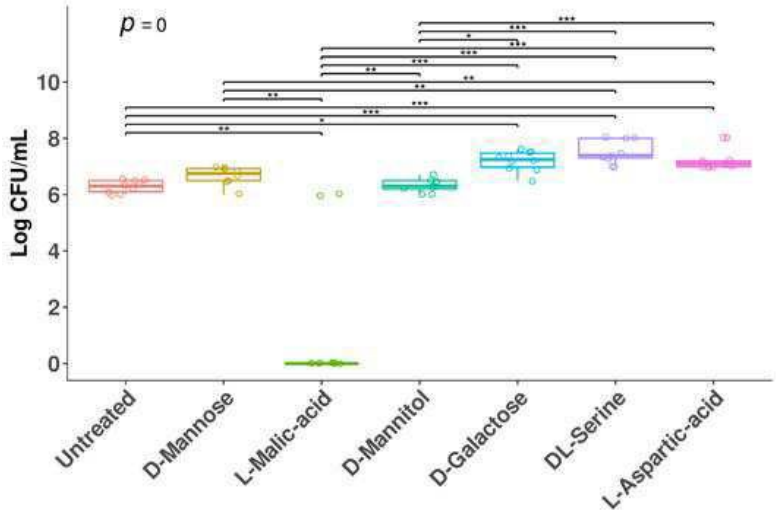
도면2


Streptomyces seoulensis strain Fole11
Streptomyces seoulensis strain FoRo10
Streptomyces recifensis strain MMS19-T31
Streptomyces recifensis strain LZ13-16
SN11
Streptomyces subrutilus strain DSM 40445
Streptomyces globisporus strain KCTC 9026
Streptomyces griseus strain ATCC 10137
Streptomyces badius strain DB-1
Streptomyces coelicolor strain ICN1055
Kitasatospora herbaricolor strain LZ11-09
Kitasatospora cystarginea
Kitasatospora aburaviensis strain RCS252
Xanthomonas campestris strain LMG 568
Xanthomonas oryzae strain LMG 5047
Pseudomonas putida strain R43
Pseudomonas syringae JCM 14315
Erwinia amylovora strain BC2280
Erwinia gerundensis strain EM595
0.1

도면3


A
B

도면4


p = 0
Log CFU/mL
0
2
4
6
8
10
Untreated
D-Mannose
L-Malic-acid
D-Mannitol
D-Galactose
DL-Serine
L-Aspartic-acid

서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.