(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0072387
(43) 공개일자 2022년06월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/20 (2006.01) *A01N 63/28* (2020.01)
A01N 63/50 (2020.01) *C07K 14/36* (2006.01)
C12R 1/465 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 1/20 (2021.05)
A01N 63/28 (2022.01)
(21) 출원번호 10-2020-0159929
(22) 출원일자 2020년11월25일
심사청구일자 2020년11월25일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
전병준
경기도 수원시 권선구 서둔로 270-6, 201동 504호 (서둔동, 서수원 울트라참누리파크)
김범석
서울특별시 용산구 회나무로42길 39-17, 303호 (이태원동, SOD 10차빌라)
(74) 대리인
특허법인 남앤남

전체 청구항 수 : 총 10 항

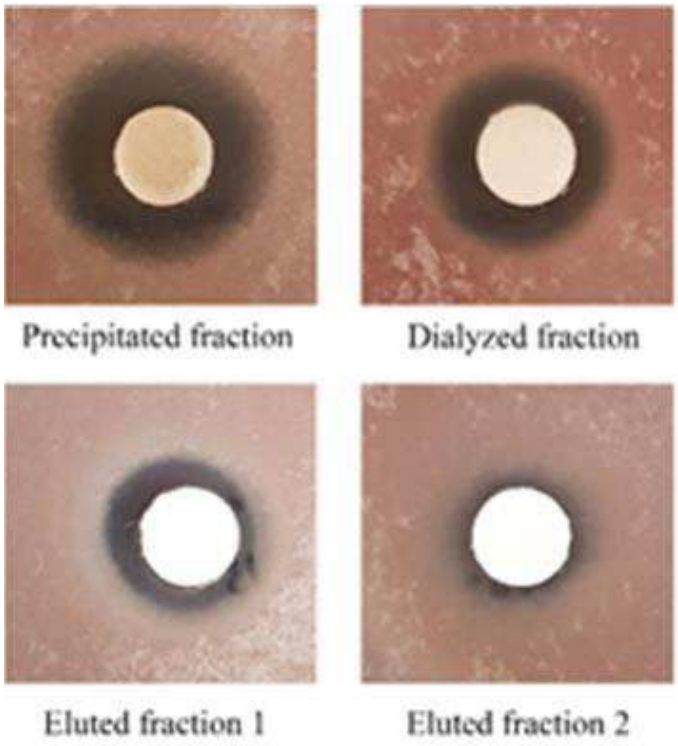
(54) 발명의 명칭 **식물병원균에 항균활성을 갖는 신규 스트렙토마이세스 시나모넨시스 KPP02129 균주 및 이를 이용한 식물병 방제용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 식물병원균에 항균활성을 갖는 신규 스트렙토마이세스 시나모넨시스 KPP02129 균주; 상기 균주 유래의 아비딘 유사 비오틴-결합 단백질; 이를 이용한 식물병 방제용 조성물; 및 식물병 방제방법에 관한 것이다. 본 발명의 스트렙토마이세스 시나모넨시스 균주 KPP02129(기탁번호: KACC 92313P) 및 이로부터 유래한 아비딘 유사 비

(뒷면에 계속)

대 표 도 - 도3a



오틴-결합 단백질은 알터나리움 브라시시콜라(*Alternaria brassicicola*), 보트리티스 시네레아(*Botrytis cinerea*) 및 푸자리움 옥시스포럼(*Fusarium oxysporum*)을 포함한 다양한 식물병원균에 대한 항진균 효과를 보이는바, 이를 유효성분으로 포함하는 본 발명의 조성물은 식물병 방제제로 유용하게 사용될 수 있다. 특히, 본 발명의 조성물은 천연물 소재를 기반으로 하는 식물병 방제제로서, 기존의 항생제 사용에 의한 저항성 식물병원균 출현 문제를 해결할 수 있는바, 유기합성 살균제를 대체하여 항생제 저항성 문제 및 환경에 대한 부작용을 낮출 수 있는 이점이 있다.

(52) CPC특허분류
A01N 63/50 (2022.01)
C07K 14/36 (2013.01)
C12R 2001/465 (2021.05)

명 세 서

청구범위

청구항 1

식물병원균에 대한 항진균 활성을 갖는, 스트렙토마이세스 시나모넨시스 KPP02129 균주(기탁번호: KACC 92313P).

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 식물병원균은 알터나리움 브라시시콜라(*Alternaria brassicicola*), 보트리티스 시네레아(*Botrytis cinerea*), 및 푸자리움 옥시스포럼(*Fusarium oxysporum*)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는, 스트렙토마이세스 시나모넨시스 KPP02129 균주(기탁번호: KACC 92313P).

청구항 3

스트렙토마이세스 시나모넨시스 KPP02129 균주(기탁번호: KACC 92313P) 유래의 아비딘 유사 비오틴-결합 단백질.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 아비딘 유사 비오틴-결합 단백질은 서열번호 1 또는 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열로 이루어지는 것을 특징으로 하는, 아비딘 유사 비오틴-결합 단백질.

청구항 5

제3항에 있어서,

상기 단백질은 식물병원균에 대한 항진균 활성을 갖는 것을 특징으로 하는, 아비딘 유사 비오틴-결합 단백질.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 식물병원균은 알터나리움 브라시시콜라(*Alternaria brassicicola*), 보트리티스 시네레아(*Botrytis cinerea*), 및 푸자리움 옥시스포럼(*Fusarium oxysporum*)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는, 아비딘 유사 비오틴-결합 단백질.

청구항 7

제1항의 균주; 이 균주의 배양물 또는 추출물; 또는 이 균주로부터 유래한 아비딘 유사 비오틴-결합 단백질을 유효성분으로 포함하는, 식물병 방제용 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 아비딘 유사 비오틴-결합 단백질은 서열번호 1 또는 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열로 이루어지는 것을 특징으로 하는, 식물병 방제용 조성물.

청구항 9

제7항에 있어서,

상기 식물병은 알터나리움 브라시시콜라(*Alternaria brassicicola*), 보트리티스 시네레아(*Botrytis cinerea*),

및 푸자리움 옥시스포럼(*Fusarium oxysporum*)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나에 의해 발생되는 것을 특징으로 하는, 식물병 방제용 조성물.

청구항 10

제7항의 조성물을 식물체 또는 토양에 처리하는 단계를 포함하는, 식물병 방제방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 식물병원균에 항균활성을 갖는 신규 스트렙토마이세스 시나모넨시스 KPP02129 균주; 상기 균주 유래의 아비딘 유사 비오틴-결합 단백질; 이를 이용한 식물병 방제용 조성물; 및 식물병 방제방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 토양에서 병해를 일으키는 푸사리움 옥시스포룸푸자리움 옥시스포럼 f. sp.(*Fusarium oxysporum* f. sp.)은 여러 작물 (오이, 수박, 참외, 메론, 토마토, 딸기, 무, 시금치, 양파 등)에 피해를 입히며 뿌리 및 줄기에 발병하며, 나중에는 포기 전체가 시들어 고사하게 만드는 대표적인 토양전염성 병원균으로 이를 구체적으로 설명하면 다음과 같다.

[0003] 푸자리움 옥시스포럼 f. sp.(*Fusarium oxysporum* f. sp.)은 토양 속에서 균사 혹은 후막포자 형태로 잔존하면서 전염원으로 작용하여 초기에 작물의 뿌리 및 줄기에 발병하며 지표부위로 확산되어 작물체 내의 도관부를 파괴하여 포기전체가 시들어 고사되게 한다. 피해 증상으로는 초기에 경엽이 활력을 잃고 시들게 되며, 발병부 줄기에는 암갈색의 수침상의 부분과 이곳의 표피가 벌어져 진을 분비하여 적갈색을 나타낸다. 병이 더욱 진전되면 마르면서 가늘게 되어 고사하게 된다.

[0004] 상기 식물병원균에 대한 예방은 가급적 연작을 피하며, 저항성 대목을 이용하여 접목 재배와 완숙한 양질의 유기물이 첨가한 상토를 사용함으로서 면역체계를 갖춰 튼튼한 개체를 만들어 병해에 대한 저항력을 길러주는 것이 바람직하다. 또한 취화메틸제, 다조메입제 등 토양소독제로 살균한 후에 가스를 충분히 제거하여 작물을 정식한다. 하지만 이러한 방법들은 본 병에 대하여 방제효과가 높지 않고, 많은 시간과 비용이 소비되며, 환경오염으로 인해 동, 식물에 심각한 부작용을 초래한다. 따라서 푸자리움 옥시스포럼 f. sp.(*Fusarium oxysporum* f. sp.)에 의한 병해에 대해 보다 효과적인 방제방법 개발이 필요하다.

[0005] 식물, 균류, 박테리아, 곤충 및 동물이 생산하는 항진균성 단백질 및 폴리펩타이드 (PR-1 proteins, (1,3)β-glucanase, chitinases, chitin-binding proteins, thaumatin-like (TL) proteins, lipid-transfer proteins (LTPs), killer proteins, protease inhibitor)는 곰팡이 세포벽 폴리머 분해, 막 채널 및 기공 형성, 세포 리보솜의 손상, DNA 합성의 억제 및 세포주기의 억제를 포함하는 다양한 작용기작과 마이크로몰 수준에서 극히 넓은 항진균 활성을 나타낸다. 구체적으로, 그 중 Aburana과 유래의 디펜신(defensin)은 다양한 식물병원균(*Botrytis cinerea, Alternaria brassicola, Fusarium culmorum, Fusarium oxysporum, Fusarium solani*)과 인체병원균 (*Candida albicans*)에 대하여 항균 활성을 가짐으로써 병해저항성 부여에 유용한 단백질로서 연구가 진행되고 있다. 또한 곰팡이, 식물 , 세균에서 분리된 키티나아제(chitinase) 및 글루카네이즈(glucanse)와 같은 용해효소는 인체병원균 및 식물병원균 (*Trichoderma reesei, Alternaria solani, A. radicina, F oxysporum, Rhizoctonia solani, Guignardia bidwellii, B. cenerea, Coprinus comatus*)에 대한 항진균 활성을 갖는 단백질로 알려져 있으며, 시험관내 실험에서 단독으로 처리 시 마이크로몰 수준에서 방제가 가능하며, 두 효소를 함께 처리 시 시너지 효과로 인해 강한 방제 효과를 얻을 수 있다. 그러므로 다양한 생물에서 생산되어지는 항진균성 단백질 및 폴리펩타이드는 새롭고, 가능성 있는 살균제의 원천으로서 가능성을 보여준다.

[0006] 한편, 비오틴은 중요 대사경로에 관여하는 여러 카복실라아제(carboxylase)의 필수적인 보조인자로서 모든 원핵생물과 진핵생물의 필요한 비타민이다. 비오틴의 생합성은 식물과 일부 미생물로 제한되며, 동물 및 기타 유기체는 식이요법, 환경, 장내 미생물로부터의 흡수에 의존한다. 비오틴 결합 단백질은 세균, 새, 양서류, 곰팡이, 어류 등을 포함한 다양한 유기체에서 확인되었다. 이들 단백질들 중 일부는 단백질과 작은 리간드(ligand) 사이에서 자연적으로 알려진 가장 강력한 비공유 결합을 형성한다 (KD [dissociation constant] = 10^{-14} ~ 10^{-16}). 따라서 비오틴 결합 단백질은 비오틴이 없는 구역을 형성함으로서 광범위한 항균제로서 제안되어지고 있다. 예를 들어 아비딘(Avidin) 과 스트렙트아비딘(Streptavidin)은 광범위한 항균 및 살충 효과를 가지고 있다고 알려져

있으며, 탐아비딘(Tamavidin)은 배양배지에서 식물병원균 마그네포르테 그리시아(*Magnaporthe grisea*)의 성장을 억제하고, 탐아비딘(Tamavidin)이 도입된 형질전환 벼(transgenic rice)에서 마그네포르테 그리시아에 저항성을 보였다. 브라아비딘(Bradavidin)은 미생물 및 곤충으로부터 기주식물을 보호한다고 알려져 있다.

[0007] 천연물 유래 항진균성 단백질 및 폴리펩타이드를 기반으로 하는 식물병 방제제 개발은 기존의 항생제 사용에 의한 저항성 식물 병원균 출현 문제를 해결하는 역할을 하며, 친환경적 식물병 방제법을 제공한다. 따라서 천연물 유래한 대사산물을 통한 식물 병원균 억제제의 발굴은 유기합성 살균제를 대체하여 항생제 저항성 문제 및 환경에 대한 부작용을 낮출 수 있다.

[0008] 이러한 배경 하에, 본 발명자는 한국 청산도 지역 토양에서 분리된 스트렙토마이세스 시나모넨시스 균주 KPP02129(기탁번호: KACC 92313P)로부터 식물병원균에 활성을 갖는 단백질을 분리 및 정제하였으며, 이렇게 분리된 상기 단백질이 아비딘 유사 비오틴-결합 단백질로서 다양한 식물병원균에 대한 항진균 활성을 갖는 바, 식물병 방제를 위한 소재로서의 유용성을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0009] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제10-0604203호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 따라서 본 발명의 목적은 식물병원균에 대한 항진균 활성을 갖는, 신규한 스트렙토마이세스 시나모넨시스 균주를 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 다른 목적은, 신규한 스트렙토마이세스 시나모넨시스 균주 유래의 아비딘 유사 비오틴-결합 단백질을 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 또 다른 목적은, 상기 균주 또는 균주로부터 유래한 아비딘 유사 비오틴-결합 단백질을 이용한 식물병 방제용 조성물을 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 또 다른 목적은, 상기 식물병 방제용 조성물을 이용하여 식물병을 효과적으로 방제할 수 있는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0014] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위해서,

[0015] 본 발명은 식물병원균에 대한 항진균 활성을 갖는, 스트렙토마이세스 시나모넨시스 균주 KPP02129(기탁번호: KACC 92313P)를 제공한다.

[0016] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 식물병원균은 알터나리움 브라시시콜라(*Alternaria brassicicola*), 보트리티스 시네레아(*Botrytis cinerea*), 및 푸자리움 옥시스포럼(*Fusarium oxysporum*)으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

[0017] 또한, 본 발명은 스트렙토마이세스 시나모넨시스 균주 KPP02129(기탁번호: KACC 92313P) 유래의 아비딘 유사 비오틴-결합 단백질을 제공한다.

[0018] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 아비딘 유사 비오틴-결합 단백질은 서열번호 1 또는 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열로 이루어질 수 있다.

[0019] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 단백질은 식물병원균에 대한 항진균 활성을 가질 수 있다.

[0020] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 식물병원균은 알터나리움 브라시시콜라(*Alternaria brassicicola*), 보트리티스 시네레아(*Botrytis cinerea*), 및 푸자리움 옥시스포럼(*Fusarium oxysporum*)으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

[0021] 또한, 본 발명은 상기 균주; 이 균주의 배양물 또는 추출물; 또는 이 균주로부터 유래한 아비딘 유사 비오틴-결합 단백질을 유효성분으로 포함하는, 식물병 방제용 조성물을 제공한다.

[0022] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 아비딘 유사 비오틴-결합 단백질은 서열번호 1 또는 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열로 이루어질 수 있다.

[0023] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 식물병은 알터나리움 브라시시콜라(*Alternaria brassicicola*), 보트리티스 시네레아(*Botrytis cinerea*), 및 푸자리움 옥시스포럼(*Fusarium oxysporum*)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나에 의해 발생될 수 있다.

[0024] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 조성물을 식물체 또는 토양에 처리하는 단계를 포함하는, 식물병 방제방법을 제공한다.

발명의 효과

[0025] 본 발명의 스트렙토마이세스 시나모넨시스 균주 KPP02129(기탁번호: KACC 92313P) 및 이로부터 유래한 아비딘 유사 비오틴-결합 단백질은 알터나리움 브라시시콜라(*Alternaria brassicicola*), 보트리티스 시네레아(*Botrytis cinerea*) 및 푸자리움 옥시스포럼(*Fusarium oxysporum*)을 포함한 다양한 식물병원균에 대한 항진균 효과를 보이는바, 이를 유효성분으로 포함하는 본 발명의 조성물은 식물병 방제제로 유용하게 사용될 수 있다. 특히, 본 발명의 조성물은 천연물 소재를 기반으로 하는 식물병 방제제로서, 기존의 항생제 사용에 의한 저항성 식물병원균 출현 문제를 해결할 수 있는바, 유기합성 살균제를 대체하여 항생제 저항성 문제 및 환경에 대한 부작용을 낮출 수 있는 이점이 있다.

도면의 간단한 설명

[0026] 도 1은 본 발명의 스트렙토마이세스 시나모넨시스 KPP02129 균주의 16S rRNA의 계통도 분석을 나타낸 것이다.

도 2는 본 발명에 의한 스트렙토마이세스 시나모넨시스 KPP02129 균주의 상등액에서 항진균성 단백질을 정제하는 과정을 보인 블록도이다.

도 3a 및 3b는 본 발명에 의한 스트렙토마이세스 시나모넨시스 KPP02129 균주의 상등액에서 각 정제과정의 항진균 활성(도 3a) 및 Q-ion 컬럼에 의해 분리된 단백질 분획의 SDS-PAGE 전기영동패턴을 나타낸 것이다(도 3b). M: marker, Ft: Flow through, W: washing, E1: Tris 20 mM, DTT 1mM, Nacl 100 mM, E2: Tris 20 mM, DTT 1 mM, Nacl 150 mM.

도 4a 및 4b는 이형단백질 발현을 통해 대량 생산된 본 발명의 스트렙트아비딘 C1(Streptavidin C1)과 스트렙트아비딘 C2(Streptavidin C2)를 정제하는 과정을 나타낸 것이다.

도 5a 및 5b는 비오틴화에 따른 본 발명의 스트렙트아비딘 C1(Streptavidin C1)과 스트렙트아비딘 C2(Streptavidin C2)의 항진균 효과(도 5a) 및 결합 친화도(도 5b)를 보여주는 사진이다. Lane 1: protein ladder, Lane 2: streptavidin C1 (50 μM), Lane 3: streptavidin C1 (50 μM) + biotin (1 μM), Lane 4: streptavidin C1 (50 μM) + biotin (5 μM), Lane 5: streptavidin C1 (50 μM) + biotin (25 μM), Lane 6: streptavidin C2 (50 μM), Lane 7: streptavidin C2 (50 μM) + biotin (1 μM), Lane 8: streptavidin C2 (50 μM) + biotin (5 μM), Lane 9: streptavidin C2 (50 μM) +biotin (25 μM), Lane 10: biotin (1 μM), Lane 11: biotin (5 μM), Lane 12: biotin (25 μM).

도 6은 본 발명에 의한 토양실험에서 스트렙토마이세스 시나모넨시스 KPP02129 균주로부터 토양병원균 푸자리움 옥시스포럼 f. sp. 쿠쿠모리눔(*Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*)의 방제 효과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0027] 본 발명은 식물병원균에 대한 항진균 활성을 갖는, 스트렙토마이세스 시나모넨시스 KPP02129 균주(기탁번호: KACC 92313P)를 제공함에 그 특징이 있다.

[0028] 본 명세서에서 언급하는 '스트렙토마이세스 시나모넨시스(*Streptomyces cinnamonensis*)'는 스트렙토마이세스 속의 박테리아 종으로, 항생물질인 모넨신 A, 모넨신 B, 모넨신 C, 모넨신 D, 악티티아즈산(actithiazic acid)을 생산하는 것으로 알려져 있다.

[0029] 본 발명자는 식물병원균에 대한 항균 활성을 갖는 미생물 유래의 단백질을 찾기 위해 예의 연구하던 중, 한국

청산도 지역 토양에서 분리한 균주가 스트렙토마이세스 시나모넨시스 종(species)인 것을 확인하였으며, 상기 균주를 스트렙토마이세스 시나모넨시스 KPP02129 균주로 명명하고 2020년 9월 2일자 국립농업과학원에 기탁하여 수탁번호 KACC 92313P를 부여받았다.

[0030] 본 명세서에서 언급하는 '식물병원균'은 식물에 병을 일으킬 수 있는 원인균을 의미한다.

[0031] 본 발명의 상기 식물병원균은 식물에 병을 일으킬 수 있는 원인균이라면 그 종류를 제한하지 않으나, 바람직하게는, 알터나리움 브라시시콜라 (*Alternaria brassicicola*), 보트리티스 시네레아(*Botrytis cinerea*), 및 푸자리움 옥시스포럼(*Fusarium oxysporum*) 등과 같은 진균(fungi)일 수 있다.

[0032] 또한, 본 발명은 스트렙토마이세스 시나모넨시스 KPP02129 균주(기탁번호: KACC 92313P) 유래의 아비딘 유사 비오틴-결합 단백질을 제공한다.

[0033] 본 발명의 스트렙토마이세스 시나모넨시스 KPP02129 균주는 아비딘 유사 비오틴-결합 단백질(스트렙트아비딘 C1 및 C2)을 생산하며, 상기 아비딘 유사 비오틴-결합 단백질이 푸자리움 옥시스포럼(*Fusarium oxysporum*)을 포함하는 다양한 식물병원균에 대한 항균활성을 갖는 것을 확인하였다. 또한, 본 발명의 아비딘 유사 비오틴-결합 단백질(스트렙트아비딘 C1 및 C2)이 각각 서열번호 1 및 2를 갖는 아미노산 서열로 이루어지는 것을 분석을 통해 최초로 규명하였다.

[0034] 본 명세서에서 언급하는 '아비딘 유사 비오틴-결합 단백질'이라 함은, 아비딘과 유사한 구조를 갖는 단백질로서 비오틴에 결합할 수 있는 단백질을 의미한다.

[0035] 본 명세서에서 언급하는 '스트렙트아비딘 C1 및 스트렙트아비딘 C2'는 본 발명의 아비딘 유사 비오틴-결합 단백질의 다른 명칭으로, 상기 단백질이 스트렙토마이세스 시나모넨시스 균주로부터 유래한 아비딘 패밀리 단백질이라는 점에서, 본 발명에서는 이들을 각각 '스트렙트아비딘 C1(Streptavidin C1)' 및 '스트렙트아비딘 C2(Streptavidin C2)'로 명명하였다.

[0036] 본 발명의 스트렙토마이세스 시나모넨시스 KPP02129 균주가 생산하는 아비딘 유사 비오틴-결합 단백질(스트렙트아비딘 C1 및 C2)은 알터나리움 브라시시콜라(*Alternaria brassicicola*), 보트리티스 시네레아(*Botrytis cinerea*), 및 푸자리움 옥시스포럼(*Fusarium oxysporum*) 등의 식물병원균에 대한 강한 항진균 활성을 보이며, 특히 스트렙트아비딘 C1 대비 스트렙트아비딘 C2의 경우 푸자리움 옥시스포럼(*Fusarium oxysporum*)에 대한 항진균 활성이 더욱 우수한 것을 확인하였다.

[0037] 한편, 본 발명의 스트렙토마이세스 시나모넨시스 KPP02129 균주 유래의 아비딘 유사 비오틴-결합 단백질(스트렙트아비딘 C1 및 C2)은 식물병원성 미생물로서 세균에 해당하는 에위니아 카로토보라 subsp.아트로셉티카 BAA672(*Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* BAA672); 에위니아 카로토보라 subsp.카로토보라 ATCC39048(*Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* ATCC39048); 슈도모나스 시린게 pv. 토마토 DC3000(*Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000); 크산토모나스 캄페스트리스 pv. 베시카토리아 Ds1(*Xnathomonas campestris* pv. *vesicatoria* Ds1)에 대해서는 항균 활성을 보이지 않았다.

[0038] 그러므로 본 발명의 스트렙토마이세스 시나모넨시스 KPP02129 균주 유래의 아비딘 유사 비오틴-결합 단백질(스트렙트아비딘 C1 및 C2)은 항세균이 아닌 항진균 활성을 갖는다 하겠다.

[0039] 또한, 본 발명은 스트렙토마이세스 시나모넨시스 KPP02129 균주; 상기 균주의 배양물 또는 추출물; 또는 상기 균주로부터 유래한 아비딘 유사 비오틴-결합 단백질을 유효성분으로 포함하는, 식물병 방제용 조성물을 제공한다.

[0040] 본 명세서에서 언급하는 '추출물'은 균주의 용해물을 포함하는 개념으로서, 당업계에 공지된 추출 및 분리하는 방법을 사용하여 스트렙토마이세스 시나모넨시스 KPP02129 균주로부터 추출 및 분리하여 수득할 수 있다. 예를 들어, 상기 균주의 조추출물, 극성용매 가용 추출물 또는 비극성용매 가용 추출물을 모두 포함한다.

[0041] 본 발명의 균주 추출물을 추출하기 위한 적절한 유기용매로는 약학적으로 허용되는 균주 용해를 위한 유기용매라면 어느 것을 사용해도 무방하며, 바람직하게는 메탄올을 사용하는 것이 좋다.

[0042] 예를 들면, 본 발명의 균주 추출물은 균주를 배양한 후 배양물을 부수고 메탄올에 침지시켜 초음파 처리한 다음, 메탄올 추출물을 필터에 여과하고 농축한 후 증류수에 녹여 제조할 수 있다.

[0043] 따라서 본 발명에 있어서 균주 추출물은 추출, 분획 또는 정제의 각 단계에서 얻어지는 모든 추출액, 분획 및 정제물, 그들의 희석액, 농축액 또는 건조물을 모두 포함하는 개념이다.

[0044] 한편, 본 발명의 스트렙토마이세스 시나모넨시스 KPP02129 균주로부터 유래한 아비딘 유사 비오틴-결합 단백질(스트렙트아비딘 C1 및 C2)은 서열번호 1 또는 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 가질 수 있다.

[0045] 본 발명의 하기 실시예에서는 스트렙토마이세스 시나모넨시스 KPP02129 균주 배양물을 원심분리하여 배양여액을 분리하고, 분리된 배양여액을 황산암모늄 95% 포화농도를 처리하여 단백질을 침전시킨 다음, 침전된 단백질을 원심분리하여 트리스 버퍼에 녹여 수득한 후, 여과 및 투석과정을 거쳐 항진균 활성을 갖는 조단백질을 수득하였다. 상기 조단백질은 음이온 교환 크로마토그래피를 수행하여 분획물을 분리하고, 각 분획들은 항균활성 검정을 실시한 다음, SDS-PAGE를 통해 분획물 내의 단백질을 크기별로 분리한 후 단백질에 대한 ID 분석을 진행하였다. 최종적으로 분리된 두 개의 단백질이 *Streptomyces* sp.의 아비딘 패밀리 단백질(Avidin family protein)로 동정되었다. 본 발명에서는 동정된 상기 두 개의 단백질을 스트렙토마이세스 시나모넨시스 균주로부터 유래한 아비딘 패밀리 단백질이라는 점에서, 이들을 각각 '스트렙트아비딘 C1(Streptavidin C1)' 및 '스트렙트아비딘 C2(Streptavidin C2)'로 명명하였다.

[0046] 본 발명의 상기 단백질(스트렙트아비딘 C1 및 C2)은 식물병 방제용 조성물에 1~100000㎛M 농도로 포함될 수 있으나, 특별히 그 수치를 한정하는 것은 아니다.

[0047] 본 발명의 상기 단백질(스트렙트아비딘 C1 및 C2)은 알터나리움 브라시시콜라(*Alternaria brassicicola*), 보트리티스 시네레아(*Botrytis cinerea*), 및 푸자리움 옥시스포럼(*Fusarium oxysporum*) 등과 같은 진균에 항균활성을 보이는바, 상기 진균에 의해 발생되는 식물병(예를 들면, 검은무늬병, 잿빛곰팡이병, 시들음병, 덩굴쪼김병, 파나마병 등) 방제에 효과적으로 사용될 수 있다.

[0048] 본 발명의 상기 조성물은 유효성분(스트렙토마이세스 시나모넨시스 KPP02129 균주; 상기 균주의 배양물 또는 추출물; 또는 상기 균주로부터 유래한 아비딘 유사 비오틴-결합 단백질) 외에 농약 제제로 사용가능한 담체를 함께 사용하여 제조될 수 있다. 담체로는 통상적으로 사용되는 농약 제형으로 허용 가능한 담체이면 모두 사용할 수 있으나, 특히 동결보존제 스킴밀크(skim milk), 효모 추출물(yeast extract), 전착제 SOF70, 트윈20, 계면활성제 TD20A, AS65D 등을 사용하는 것이 바람직하다.

[0049] 본 발명에 따른 유효성분(스트렙토마이세스 시나모넨시스 KPP02129 균주; 상기 균주의 배양물 또는 추출물; 또는 상기 균주로부터 유래한 아비딘 유사 비오틴-결합 단백질)은 전체 식물병 방제제 조성 100 중량%에 대하여 0.001 ~ 99 중량%로 포함될 수 있다. 상기 유효성분은 분말화해서 사용하거나, 액상으로도 사용 가능하며, 사용시 10 ~ 1000배로 희석하여 사용할 수 있다. 그러나 상기 유효량은 병원균의 감염 정도 및 주변 환경 조건 등에 따라 조절될 수 있다. 이때, 희석제로는 정제수를 포함하여 통상적으로 사용되고 있는 것을 사용한다.

[0050] 본 발명은 또한, 본 발명의 상기 조성물을 식물체 또는 토양에 처리하는 단계를 포함하는 식물병 방제방법을 제공한다.

[0051] 본 발명의 일 구체예에서, 조성물은 작물을 정식한 후 30 ~ 40일부터 또는 발명 직전 시기에 식물체 지상부 또는 토양에 처리할 수 있다.

[0052] 상기 식물체는 알터나리움 브라시시콜라(*Alternaria brassicicola*), 보트리티스 시네레아(*Botrytis cinerea*), 및 푸자리움 옥시스포럼(*Fusarium oxysporum*)과 같은 원인균이 감염될 수 있는 식물체라면 그 종류를 특별히 제한하지는 않는다.

[0054] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0056] **<실시예 1>**

[0057] **스트렙토마이세스 시나모넨시스 KPP02129 균주의 순수 분리**

[0058] 방선균 균주를 분리하기 위해 청산도지역 토양 1 g을 멸균수 10 mL에 현탁시켜 28℃, 200 rpm, 1시간 동안 배양하였다. 배양된 토양 현탁액은 연속희석법을 (10-fold) 사용하여 10^{-5} 농도로 희석되었다. 희석된 토양샘플의 100 ㎕는 humic acid vitamin agar medium (HVA: 1.0 g humic acid, 0.5 g Na_2HPO_4, 1.71 g KCl, 0.05 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.01 g $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.02 g $CaCO_3$, 0.5 mg thiamine-HCl, 0.5 mg riboflavin, 0.5 mg niacin, 0.5 mg

pyridoxine-HCl, 0.5 mg inositol, 0.5 mg Ca-pantothenate, 0.5 mg *p*-aminobenzoic acid, 0.25 mg biotin, 50 mg cyclohexamide, 18 g agar, 1 L H_2O, pH7.2)에 도말되었다. 도말된 배지는 4~14일동안 28℃에 배양되었으며 생성된 방선균 균총들은 tryptic soy agar에 옮겨져 3~5일 배양되었다. 순수 분리된 스트렙토마이세스 시나모넨시스 KPP02129는 glycerol 스탁을 만들어 -80℃에 보관되었다.

[0060] **<실시예 2>**

[0061] **스트렙토마이세스 시나모넨시스 KPP02129 균주의 16S rRNA 유전자 염기서열 및 그 계통 확인**

[0062] 본 발명자들은 KPP02129 균주의 16S rRNA(서열번호 5) 토대로 계통학적 분석을 수행 하여 본 발명에 의한 균주가 스트렙토마이세스 시나모넨시스라는 것을 동정하였다.

[0063] TSA배지에서 5일 동안 28℃에 배양된 KPP02129 균주의 균총을 수확하여 boiling 방법을 이용하여 gDNA를 추출하였다. 추출된 gDNA와 포워드 프라이머 fD1 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', 리버스 프라이머 rp2 5'-ACGGCTACCTTGTTACGACTT-3' 및 MG 2X Taq PreMix를 사용하여 95℃ 5분 × 1, 94℃ 1분 55℃ 1분 72℃ 1분 × 30, 72℃ 3분 × 1 조건으로 PCR을 수행하였다. 증폭된 산물은 염기서열 분석이 수행되어졌고 1407개의 염기서열을 획득하였다. 획득한 KPP02129의 16S rRNA 염기서열을 NCBI BLAST network service를 사용하여 비교분석하였다. 분석되어진 염기서열들은 Mega software version 5.05 프로그램을 사용하여 neighbor-joining 방법 및 kimura 2-parameter 모델을 적용하여 계통 분석을 진행하였다.

[0064] 본 발명 KPP02129 균주의 계통도는 도 1에서 자세히 나타내었다.

[0066] **<실시예 3>**

[0067] **스트렙토마이세스 시나모넨시스 KPP02129 균주로부터 항진균성 단백질 분리 및 정제**

[0068] 본 발명자들은 한국 청산도 지역 토양에서 분리된 스트렙토마이세스 시나모넨시스 KPP02129 균주로부터 식물병원진균에 활성을 갖는 단백질을 분리 및 정제하고, 단백질 ID를 결정하였다.

[0069] 항진균성 단백질을 효과적으로 배양하기 위해 스트렙토마이세스 시나모넨시스 KPP02129 균주의 단일 균총을 100 mL tryptic soy broth (TSB)에 접종하여 28℃ 200 rpm 3일간 배양한 후, 배양된 배지의 1%를 1/4 TSB (tryptone 4 g, soytone 0.5 g, glucose 2.5 g, sodium chloride 5 g, dipotassium hydrogenphosphate 2.5 g and distilled water 1 L) 에 접종하여 28℃ 200 rpm 5일간 2 L 배양하였다. 배양한 후, 상기 배양액들을 8,000 g 4℃ 30분간 원심분리하여 배양여액과 세포를 분리하였다. 분리된 배양여액은 황산암모늄 95% 포화농도를 처리하여 단백질을 침전하였다. 침전된 단백질은 8,000 g 4℃에서 1시간 원심분리하여 Tris 20 mM (pH 8.0) 버퍼에 녹여져 회수하였고, 0.45 ㎛로 여과한 후, 상기 동일한 버퍼에 18시간 투석 (Float-A-Lyzer G2 Dialysis Device) 하였다. 수득한 조단백질(crude protein)의 항균활성 검정은 오이 덩굴쪼김병원균의 포자 현탁액 (10^7 conidia mL-1)을 100 mL PDA(potato dextrose agar) (agar 0.7%) 배지에 분주하여 생물검정 평판배지를 만들어 페이퍼디스크법을 이용하여 검정하였다. 확인된 항진균성 단백질은 음이온 교환 크로마토그래피 (HiTrap Q HP 5 mL)를 수행하였다. 각 분획은 Tris 20 mM (pH 8.0) DTT (다이티에노티오펜) 1 mM Buffer와 NaCl (염화나트륨) 100 mM, 150 mM, 250 mM, 300 mM, 400 mM, 1M을 일정비율로 섞어 수행하였다 (도 2 참조). 크로마토그래피를 통해 수득한 각 분획들은 항균활성 검정을 실시하였고, SDS-PAGE 15% gel에 의해 분리되었다 (도 3a 및 3b 참조). 이후 단백질을 포함하는 SDS-PAGE band를 자른 후, 단백질 ID 분석을 수행하였다.

[0070] 단백질 ID 분석 결과, 두 개의 단백질이 *Streptomyces* sp.의 아비딘 패밀리 단백질(Avidin family protein)로 동정되었다.

[0071] 본 발명에서는 동정된 상기 두 개의 단백질을 스트렙토마이세스 시나모넨시스 균주로부터 유래한 아비딘 패밀리 단백질이라는 점에서, 이들을 각각 '스트렙트아비딘 C1(Streptavidin C1)' 및 '스트렙트아비딘 C2(Streptavidin C2)'로 명명하였다.

[0073] **<실시예 4>**

[0074] **단백질을 암호화하는 서열 결정 및 이형단백질 발현**

[0075] 본 실험에서는 상기 실시예 3을 통해 동정된 스트렙트아비딘 C1(Streptavidin C1) 과 스트렙트아비딘 C2(Streptavidin C1) 단백질을 암호화하는 서열을 결정하고, 단백질 대량생산을 위해 이형단백질 발현을 시켰다.

[0076] 본 발명의 스트렙토마이세스 시나모넨시스 KPP02129 균주의 아비딘 패밀리 단백질(Avidin family protein)을 암호화하는 서열을 결정하기 위해, 상기 실시예 3에서 단백질 ID 분석 결과를 통해 프라이머를 제작하였다. 20.1 kDa 해당하는 스트렙트아비딘 C1의 포워드 프라이머는 5'-CATATGGTGACGCGTGTACGCCAA-3', 리버스 프라이머는 5'-CTCGAGCTCCCCGTCGGAGGC-3'이며, 19.3 kDa 해당하는 스트렙트아비딘 C2의 포워드 프라이머는 5'-CATATGGTGTCGCACATGCGCAAGATCG-3', 리버스 프라이머는 5'-CTCGAGCTGCTGGACGGCGTCGAGCG-3'로 제작되었으며, 엔자임 사이트는 NdeI과 XhoI을 사용하였다. 상기 제작된 프라이머, 스트렙토마이세스 시나모넨시스 KPP02129 균주의 gDNA와 MG 2X Taq PreMix를 사용하여 95℃ 5분 × 1, 94℃ 1분 60℃ 1분 72℃ 1분 × 30, 72℃ 3분 × 1 조건으로 PCR을 수행하였다. 증폭된 단편들은 TA클로닝이 수행되어졌고, 염기서열 분석을 실시하였다. 분석을 통해 규명한 스트렙트아비딘 C1과 스트렙트아비딘 C2의 염기서열은 서열번호 3 및 4로 각각 표시하였다.

[0077] 확인된 스트렙트아비딘 C1과 스트렙트아비딘 C2의 염기서열은 pET21a(+) 벡터로 클로닝한 다음 과발현을 유도하기 위해 *E.coli* BL21에 형질전환되었다. 스트렙트아비딘 C1과 스트렙트아비딘 C2가 형질전환된 BL21은 암피실린 최종농도 100 μg/mL을 포함하는 Luria-Bertani (LB) 100 mL에 접종되어 37℃ 200 rpm에 하룻밤 동안 전배양 되어졌고, LB 2 L에 1%로 접종되어 37℃ 200 rpm에서 배양되어 O.D (600 nm) 0.6~0.8에 도달했을 때 IPTG 최종농도 1 mM을 넣어준 후 18℃ 200 rpm에서 18시간 배양되었다. 상기 배양된 세포들은 3500 rpm 20분 4℃에서 원심분리기에 의해 수확되어졌고, 음파처리에 의해서 용해되어졌다. 용해된 세포들은 13000 rpm 1시간 4℃에서 원심분리기에 의해 수확되어져 상등액은 0.22 ㎛에 여과되었다.

[0078] 단백질 정제를 위해, 여과된 단백질들은 Ni-affinity, anion exchange와 gel-filtration 크로마토그래피가 수행되었다. Ni-affinity 크로마토그래피는 유속 5 mL min-1, UV 검출기 280 nm, 버퍼A (Tris 20 mM, NaCl 100 mM, β-mercaptoethanol 2 mM, pH 8.0), 버퍼B (Tris 20 mM, NaCl 100 mM, β-mercaptoethanol 2 mM, Imidazole 500 mM, pH 8.0)을 이용하는 조건으로 수행되었다. 모아진 분획은 5 mL min-1, UV 검출기 280nm, 버퍼A (Tris 20 mM, DTT 2 mM, pH 8.0), 버퍼B (Tris 20 mM, DTT 2 mM, NaCL 1 M, pH 8.0)을 이용하여 anion exchange 크로마토그래피를 수행하였고, gel filtration 크로마토그래피는 1 mL min-1, UV 검출기 280 nm, 버퍼 (Tris 20 mM, DTT 2 mM, NaCl 100 mM, pH 8.0)을 이용하여 분리 정제하였다. 각 크로마토그래피 단계에서는 SDS-PAGE 15% gel을 통해 각 타겟 단백질 사이즈를 확인하고 수행하였다 (도 4a 및 4b 참조).

[0079] 본 발명의 스트렙트아비딘 C1(Streptavidin C1) 과 스트렙트아비딘 C2(Streptavidin C2)는 *E.coli* BL21에 도입하여 이형단백질 발현 시, 종래 스트렙트아비딘 계열의 단백질과는 달리 soluble protein 특징을 가지는바, 별도의 추가적인 과정 없이도 이형발현을 통해 다량의 단백질을 확보하는데 유리하다. 참고로, 종래 알려진 스트렙트아비딘 계열의 단백질은 이형발현 시 insoluble protein 특징을 가지는바, 이를 다시 soluble protein 형태로 만들기 위해서는 추가적인 과정이 필요한 단점이 있어 왔다. 이에 반해, 본 발명의 스트렙트아비딘 C1(Streptavidin C1) 과 스트렙트아비딘 C2(Streptavidin C2)는 이형발현 시에도 soluble한 형태의 단백질로 수득이 가능한바, 이형발현을 통해 다량의 단백질을 확보하는데 유리한 이점을 갖는다.

[0081] **<실시예 5>**

[0082] **비오틴화에 의한 스트렙트아비딘 C1과 스트렙트아비딘 C2의 항진균 활성 효과 및 결합친화도 실험**

[0083] 본 실험에서는 이형단백질 발현으로부터 정제된 스트렙트아비딘 C1과 스트렙트아비딘 C2 단백질의 식물병원진균에 대한 항진균 활성 및 비오틴화에 의한 항진균 활성 여부를 확인하였다.

[0084] 스트렙트아비딘 C1과 스트렙트아비딘 C2를 96-웰 플레이트에 일련에 농도 (1~80 μg/mL)로 분주한 후, 각 최종농도 1/2 PDB와 *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* 포자 현탁액 10^3 로 맞춰서 각각의 웰에 분주하였다. 접종된 96-웰 플레이트는 28℃에서 2일간 배양되었고 곰팡이 생장이 일어나지 않는 가장 낮은 농도를 최소억제농도로 평가하였다.

[0085] 그 결과, 스트렙트아비딘 C1 및 C2의 최소억제농도는 각각 10 μg/mL, 5 μg/mL인 것으로 나타났다.

[0086] 한편, 비오틴화에 의한 스트렙트아비딘 C1과 스트렙트아비딘 C2의 항진균 활성 여부를 확인하기 위해 96-웰 플레이트에 비오틴 4 μg/mL과 스트렙트아비딘 C1의 최소억제농도 10 μg/mL 및 스트렙트아비딘 C2의 최소억제농도 5 μg/mL로 분주한 후, 상기와 같은 방법으로 수행되었고 비오틴이 스트렙트아비딘 C1 및 스트렙트아비딘 C2와 결합 시 활성이 없어지는 것을 확인하였다. 이러한 결과는 항진균 활성을 갖는 스트렙트아비딘 C1과 스트렙트아비딘 C2가 비오틴-결합 단백질이라는 것을 나타내는 것이다(도 5a 참조).

[0087] 또한, 스트렙트아비딘 C1 및 스트렙트아비딘 C2의 비오틴 결합 여부를 확인하기 위해, 이형발현된 두 단백질의 최종농도 50 μM과 형광 dye가 표지된 biotin-4-fluorescent (invitrogen)의 최종농도 1, 5, 25 μM을 혼합하여 10분간 실온에서 인큐베이션한 뒤, 15 % native-gel에 로딩하여 전기영동을 진행하였다. 상기 gel은 fluorescent blot image와 ImageLab software (Biorad)와 결합된 ChemiDoc MP imaging system (Biorad)를 통해 분석되었다. 이 분석은 native-gel에서 안정한 사량체의 두 단백질에서 비오틴화된 형광을 침출하여 결합친화도를 감지할 수 있다.

[0088] 그 결과 스트렙트아비딘 C1 및 스트렙트아비딘 C2는 biotin-4-fluorescent와 결합하는 것으로 나타나, 본 발명의 스트렙트아비딘 C1 및 C2가 아비딘-유사 비오틴-결합 단백질임을 확인할 수 있었다(도 5b 참조).

[0090] **<실시예 6>**

[0091] **다양한 식물병원균에 대한 스트렙트아비딘 C1과 스트렙트아비딘 C2의 항세균 및 항진균 활성 효과 실험**

[0092] 이형단백질 발현으로부터 정제된 스트렙트아비딘 C1 및 C2 단백질의 다양한 식물병원균에 대한 항세균 및 항진균 활성을 확인하였다.

[0093] 스트렙트아비딘 C1과 스트렙트아비딘 C2 각각을 96-웰 플레이트에 일련에 농도 (Serial dilution), (최종농도 1~64 μg/mL)로 분주한 후, 각 최종농도 1/2 PDB와 *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* BAA672, *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* ATCC39048, *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000, *Xnathomonas campestris* pv. *vesicatoria* Ds1의 세균 농도 10^4 및 *Aspergilus oryzae, Alternaria brassicicola, Botrytis cinerea, Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, *Rhizopus stolonifer* var. *stolonifer* 포자 현탁액 4×10^3 로 맞춰서 각각의 웰에 분주하였다. 접종된 96-웰 플레이트는 28℃에서 2일간 배양되었고, 세균 및 곰팡이 생장이 일어나지 않는 가장 낮은 농도를 최소억제농도로 평가하였다.

표 1

[0095] 식물병원성 미생물에 대한 스트렙트아비딘 C1과 스트렙트아비딘 C2의 최소억제농도

식물병원성 미생물	최소억제농도 (μg/mL)	
	Streptavidin C1	Streptavidin C2
Erwinia carotovora subsp. *atroseptica* BAA672	>64	>64
Erwinia carotovora subsp. *carotovora* ATCC39048	>64	>64
Pseudomonas syringae pv. tomato DC3000	>64	>64
Xnathomonas campestris pv. *vesicatoria* Ds1	>64	>64
Aspergilus oryzae	>64	>64
Alternaria brassicicola	32	32
Botrytis cinerea	16	16
Fusarium oxysporum f. sp. *cucumerinum*	64	16
Fusarium oxysporum f. sp. *lycopersici*	64	16
Rhizopus stolonifer var. *stolonifer*	>64	>64

[0097] 그 결과 표 1에서 나타낸 바와 같이, *A. brassicicola, B. cinerea, F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum, F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*에 대한 스트렙트아비딘 C1의 최소억제농도는 16~64 μg/mL이며, 스트렙트아비딘 C2의 최소억제농도는 16~32 μg/mL로 확인되었다. 반면에, *A. oryzae, R. stolonifer* var. *stolonifer* 및 검정

된 모든 세균에서는 활성을 보이지 않았다.

[0099] **<실시예 7>**

[0100] **스트렙토마이세스 시나모넨시스 KPP02129 균주로부터 토양에서 병해를 일으키는 *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*의 성장 억제 효과 실험**

[0101] 스트렙토마이세스 시나모넨시스 KPP02129 균주로부터 토양병원균 *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*의 방제 효과 실험을 토양에서 확인하였다.

[0102] 스트렙토마이세스 시나모넨시스 KPP02129 균주는 tryptic soy agar (TSA) 50 mL 배지에 접종되어 3일 동안 28℃에서 배양되었다. 배양된 플레이트는 잘게 부수고 메탄올 50 mL에 침지시켜 90분 동안 음파처리 되었다. 대조군 아가 배지 (TSA 50 mL)는 상기와 같은 방법과 동일하게 처리하였다. 상기 메탄올 추출물들은 필터 되어지고 감압농축기를 이용하여 농축되어 멸균된 3차 증류수 50 mL에 녹였다. 접종원 *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*의 50 mL (포자농도 1×10^6) 은 토양 50 g에 혼합되어 60분 동안 28℃에서 배양된 후, KPP02129 균주 추출물과 아가 배지 추출물을 각각 혼합하였다. 처리된 토양은 1, 2, 3, 10일에 Colony-forming unit (CFU)이 측정되었다.

[0103] 그 결과 도 6 및 표 2에서 나타낸 바와 같이, 본 발명의 KPP02129 균주 추출물은 대조군과 비교 했을 때, 토양에서 병해를 야기하는 상기 병원균의 population density를 2일째에 67.1%, 3일째에 57.5% 감소시키는 것을 나타냈다.

표 2

[0105] KPP02129 균주 추출물 처리 후 시간 경과에 따른 토양병원균 성장 억제 효과(Log_{10} CFU/gram of soil)

	1일	2일	3일	10일
대조군	5.477±0.085	6.050±0.022	6.072±0.028	6.037±0.014
실험군	5.220±0.122	5.566±0.053	5.702±0.018	5.921±0.067

[0107] 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

[0108]

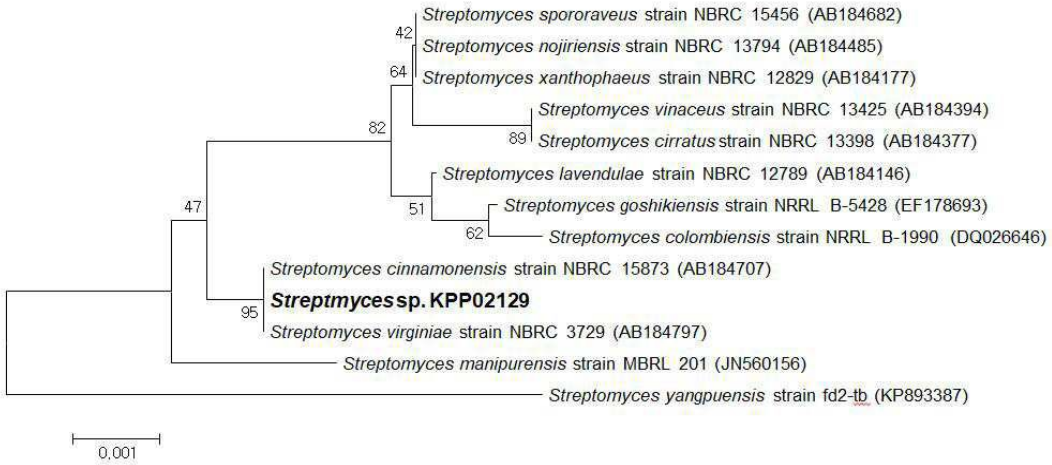
기탁기관명 : 농업생명공학연구원

수탁번호 : KACC92313P

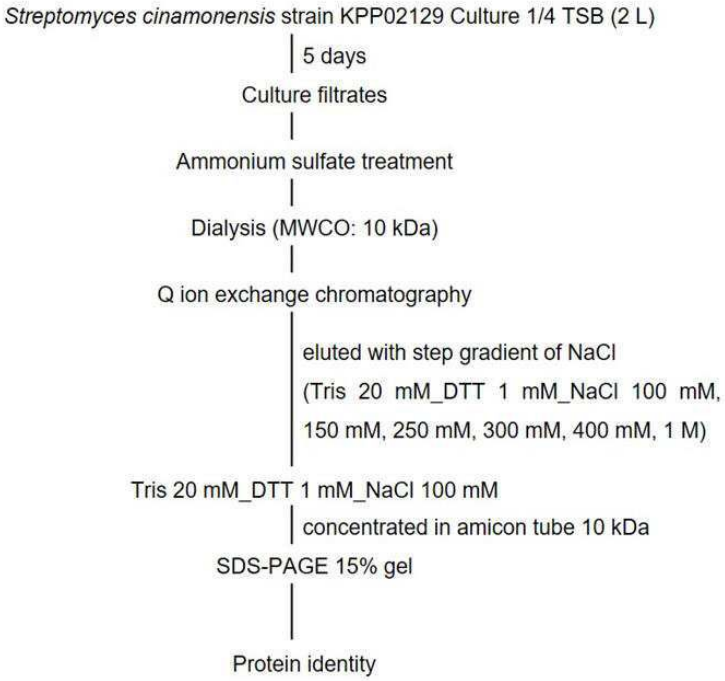
수탁일자 : 20200902

도면

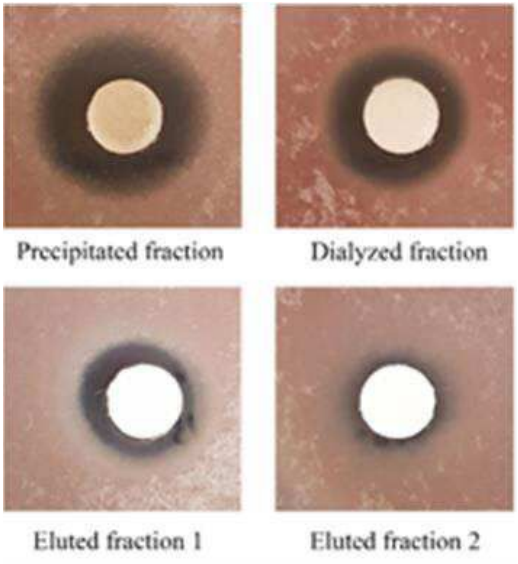
도면1


Streptomyces spororaveus strain NBRC 15456 (AB184682)
Streptomyces nojiriensis strain NBRC 13794 (AB184485)
Streptomyces xanthophaeus strain NBRC 12829 (AB184177)
Streptomyces vinaceus strain NBRC 13425 (AB184394)
Streptomyces cirratus strain NBRC 13398 (AB184377)
Streptomyces lavendulae strain NBRC 12789 (AB184146)
Streptomyces goshikiensis strain NRRL B-5428 (EF178693)
Streptomyces colombiensis strain NRRL B-1990 (DQ026646)
Streptomyces cinnamonensis strain NBRC 15873 (AB184707)
Streptmyces sp. KPP02129
Streptomyces virginiae strain NBRC 3729 (AB184797)
Streptomyces manipurensis strain MBRL 201 (JN560156)
Streptomyces yangpuensis strain fd2-tb (KP893387)
42
64
82
89
47
51
62
95
0.001

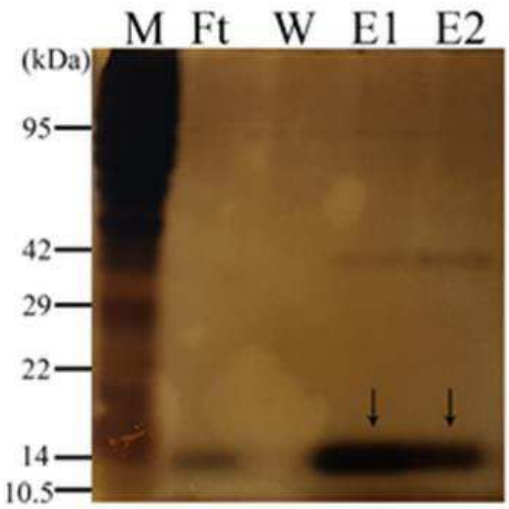
도면2


Streptomyces cinamonensis strain KPP02129 Culture 1/4 TSB (2 L)
5 days
Culture filtrates
Ammonium sulfate treatment
Dialysis (MWCO: 10 kDa)
Q ion exchange chromatography
eluted with step gradient of NaCl
(Tris 20 mM_DTT 1 mM_NaCl 100 mM,
150 mM, 250 mM, 300 mM, 400 mM, 1 M)
Tris 20 mM_DTT 1 mM_NaCl 100 mM
concentrated in amicon tube 10 kDa
SDS-PAGE 15% gel
Protein identity

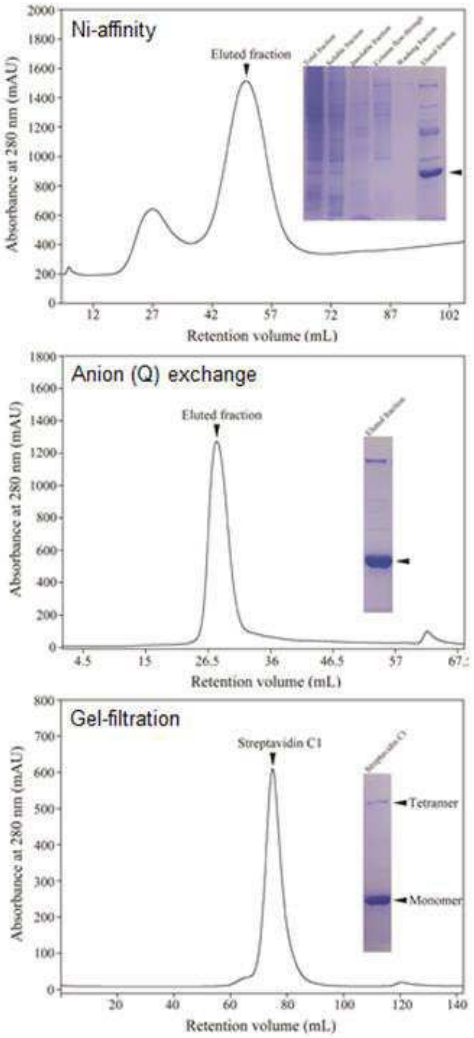
도면3a


Precipitated fraction
Dialyzed fraction
Eluted fraction 1
Eluted fraction 2

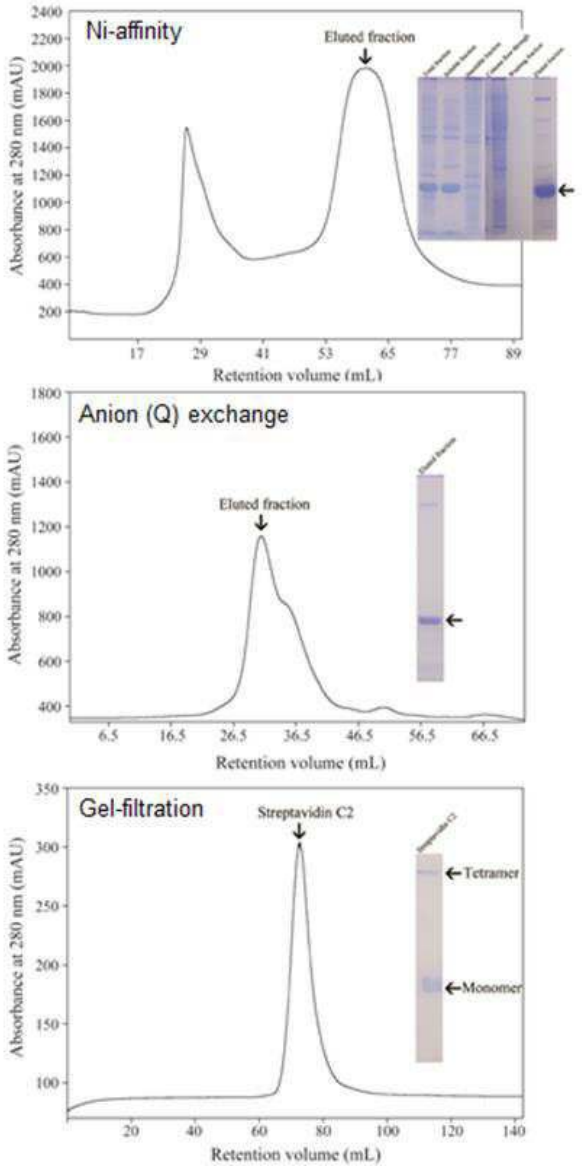
도면3b


M
Ft
W
E1
E2
(kDa)
95
42
29
22
14
10.5

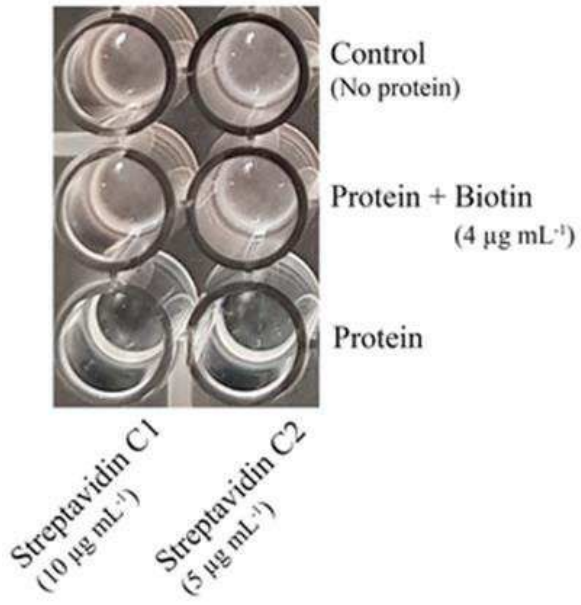
도면4a


Ni-affinity
Eluted fraction
Absorbance at 280 nm (mAU)
Retention volume (mL)
Anion (Q) exchange
Eluted fractioo
Absorbance at 280 nm (mAU)
Retention volume (mL)
Gel-filtration
Streptavidin C1
Tetramer
Monomer
Absorbance at 280 nm (mAU)
Retention volume (mL)

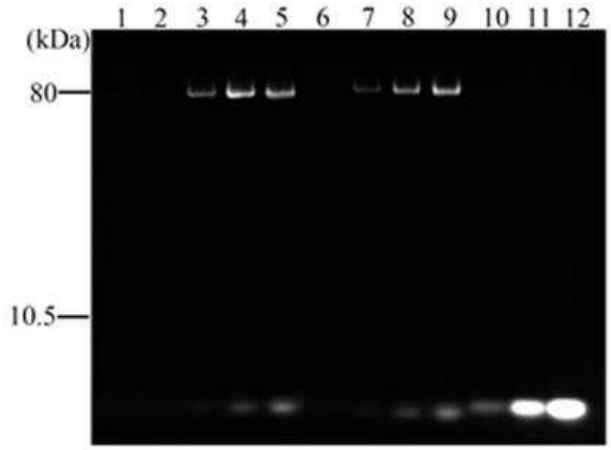
도면4b


Ni-affinity
Eluted fraction
Absorbance at 280 nm (mAU)
Retention volume (mL)
Anion (Q) exchange
Eluted fraction
Absorbance at 280 nm (mAU)
Retention volume (mL)
Gel-filtration
Streptavidin C2
Tetramer
Monomer
Absorbance at 280 nm (mAU)
Retention volume (mL)

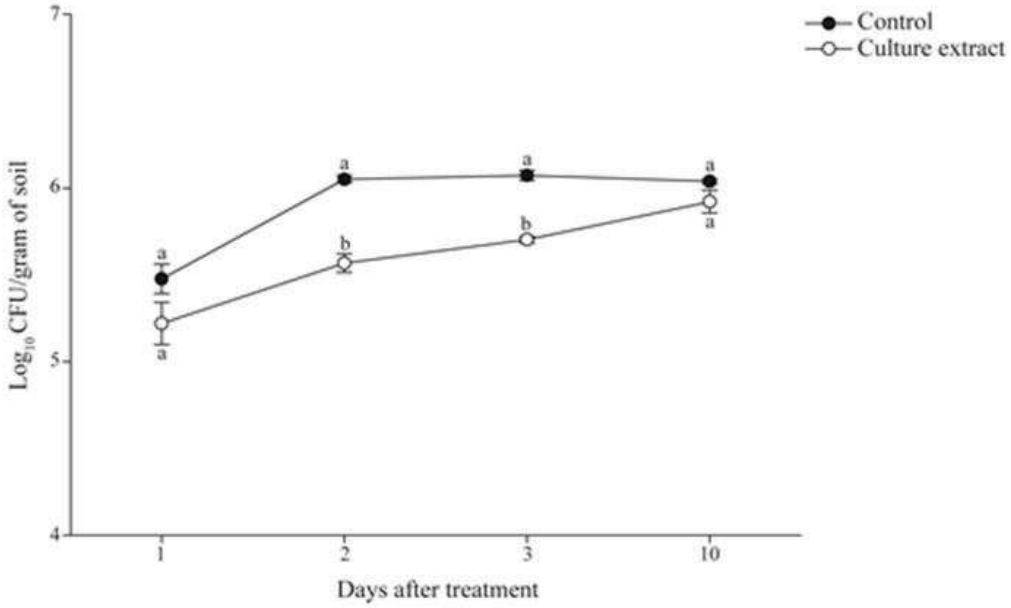
도면5a


Control
(No protein)
Protein + Biotin
(4 μg mL-1)
Protein
Streptavidin C1
(10 μg mL-1)
Streptavidin C2
(5 μg mL-1)

도면5b


1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
(kDa)
80
10.5

도면6



서 열 목 록

<110> Korea University Industry and Academy Cooperation Foundation

<120> Streptomyces cinnamonensis strain KPP02129 effective against plant pathogens and composition for controlling plant diseases using the same

<130> NPDC-89998

<160> 5

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 191

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> streptavidin C1 polypeptide sequence

<400> 1

Met Thr Arg Val Arg Gln Ala Leu Val Ala Leu Cys Ala Leu Ser Leu
1 5 10 15

Thr Phe Val Thr Val Ser Ala Ser Ala Ser Ala Asp Pro Arg Glu Thr
20 25 30

Val Ser Ala Asp Ala Ala Glu Thr Gly Ser Ala Thr Glu Ser Arg Pro
35 40 45

Gly Ile Leu Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Val Met Val Val
50 55 60

Thr Arg Ala Ala Asn Gly Gly Phe Val Gly Thr Tyr Glu Ser Ala Val
65 70 75 80

Gly Asn Ala Glu Lys Arg Tyr Val Met Thr Gly Arg Tyr Asp Ser Ala

85 90 95

Pro Ala Asp Gly Thr Gly Thr Ala Val Gly Trp Thr Val Ala Tyr Arg
100 105 110

Asn Ala His Arg Asn Ala His Ser Val Ala Thr Trp Ser Gly Gln Tyr
115 120 125

Val Gly Gly Ser Gln Glu Arg Ile Val Thr Gln Trp Leu Leu Ser Tyr
130 135 140

Gly Thr Thr Pro Ala Asp Gln Trp Lys Ser Thr Phe Leu Gly His Asp
145 150 155 160

Glu Phe Thr Arg Val Lys Pro Ser Ala Ala Asp Val Glu Lys Ala Arg
165 170 175

Gln Leu Gly Val Thr Ser Ala Asn Pro Pro Ala Ser Asp Gly Glu
180 185 190

<210> 2

<211> 186

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> streptavidin C2 polypeptide sequence

<400> 2

Met Ser His Met Arg Lys Ile Val Val Ala Ala Ile Ala Val Ser Leu
1 5 10 15

Thr Thr Val Gly Ile Thr Ala Ser Ala Ser Ala Asp Pro Ser Lys Asp
20 25 30

Thr Lys Ala Gln Ala Ala Val Ala Glu Ala Gly Ile Thr Gly Thr Trp
35 40 45

Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe Ile Val Thr Ala Gly Ala Asp Gly
50 55 60

Ser Leu Thr Gly Thr Tyr Glu Ser Ala Val Gly Asn Ala Glu Ser Arg
65 70 75 80
Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp Ser Thr Pro Ala Thr Asp Gly Ser

85 90 95
Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val Ala Trp Lys Asn Asn Tyr Arg Asn
100 105 110
Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser Gly Gln Tyr Val Ala Gly Ser Glu
115 120 125
Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu Leu Thr Ser Gly Thr Thr Glu Ala
130 135 140
Asn Asn Trp Lys Ser Thr Leu Val Gly His Asp Thr Phe Thr Lys Val
145 150 155 160

Lys Pro Ser Ala Ala Ser Ile Asp Ala Ala Lys Lys Ala Gly Ile Asn
165 170 175
Asn Gly Asn Pro Leu Asp Ala Val Gln Gln
180 185

<210> 3
<211> 576
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> streptavidin C1 polynucleotide sequence
<400> 3

gtgacgcgtg tacgccaagc cttagtcgca ctgtgcgccc tgtccctgac cttcgtcacc 60
gtatccgcga gcgcctcggc ggacccccgg gagaccgtgt ccgcggacgc cgcggagacc 120

ggttccgcga cggagtcccg cccgggcatc ctgggcacct ggtacaacca gctcggctcg 180
gtcatggtcg tgacgcgggc cgcgaacggc ggattcgtcg ggacctacga gtccgcggtc 240
ggcaacgccg agaagcgcta cgtcatgacg ggccgctacg acagcgcgcc cgccgacggc 300
accgggaccg ccgtcggatg gaccgtcgcc taccgcaacg cccaccgcaa cgcccactcc 360
gtcgccacct ggagcggcca gtacgtcggc ggcagccagg agcggatcgt cacccagtgg 420
ctgctgagct acggcacgac tcccgccgac cagtggaagt cgaccttcct cggccacgac 480
gagttcaccc gggtcaagcc ctccgccgcc gacgtcgaga aggcgcgcca gctgggcgtg 540

acatctgcga atccgccggc ctccgacggg gagtga 576

<210> 4

<211> 561

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> streptavidin C2 polynucleotide sequence

<400> 4

gtgtcgcaca tgcgcaagat cgtcgttgca gccattgccg tttcgctgac caccgtcggt 60

attacggcca gcgcctccgc ggacccgtcg aaggacacca aggcccaggc cgccgtggcc 120

gaggccggca tcaccggcac ctggtacaac cagctcggtt cgaccttcat cgtgaccgcg 180

ggcgcggacg gcagcctcac cggcacctac gagtcggccg tcggcaacgc cgagagccgc 240

tacgtcctga ccggtcgtta cgacagcacc ccggccaccg acggcagcgg caccgccctc 300

ggctggacgg tggcgtggaa gaataactac cgcaacgccc actccgccac cacgtggagc 360

ggccagtacg tcgccggctc cgaggcccgc atcaacaccc agtggctgct gacctcgggt 420

accaccgagg ccaacaactg gaagtccacg ctggtcggcc acgacacctt caccaaggtg 480

aagccgtcgg ccgcgtccat cgacgccgcc aagaaggccg gcatcaacaa cggcaacccg 540

ctcgacgccg tccagcagta g 561

<210> 5

<211> 1407

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> KPP02129 16S rRNA

<400> 5

tgcttaacac atgcaagtcg aacgatgaag cccttcgggg tggattagtg gcgaacgggt 60

gagtaacacg tgggcaatct gcccttcact ctgggacaag ccctggaaac ggggtctaat 120

accggatacc actcctgcct gcatgggcgg gggttgaaag ctccggcggt gaaggatgag 180

cccgcggcct atcagcttgt tggtggggta atggcctacc aaggcgacga cgggtagccg 240

gcctgagagg gcgaccggcc acactgggac tgagacacgg cccagactcc tacgggaggc 300

agcagtgggg aatattgcac aatgggcgaa agcctgatgc agcgacgccg cgtgagggat 360

gacggccttc gggttgtaaa cctctttcag cagggaagaa gcgaaagtga cggtacctgc 420

agaagaagcg ccggctaact acgtgccagc agccgcggta atacgtaggg cgcaagcgtt 480

gtccggaatt attgggcgta aagagctcgt aggcggcttg tcacgtcgga tgtgaaagcc 540

cgaggcttaa cctcgggtct gcattcgata cgggctagct agagtgtggt aggggagatc 600

ggaattcctg gtgtagcggt gaaatgcgca gatatcagga ggaacaccgg tggcgaaggc 660

ggatctctgg gccattactg acgctgagga gcgaaagcgt ggggagcgaa caggattaga 720

taccctggta gtccacgccg taaacgttgg gaactaggtg ttggcgacat tccacgtcgt 780

cggtgccgca gctaacgcat taagttcccc gcctggggag tacggccgca aggctaaaac 840

tcaaaggaat tgacgggggc ccgcacaagc ggcggagcat gtggcttaat tcgacgcaac 900

gcgaagaacc ttaccaaggc ttgacatata ccggaaagca ttagagatag tgccccccctt 960

gtggtcggta tacaggtggt gcatggctgt cgtcagctcg tgtcgtgaga tgttgggtta 1020

agtcccgcaa cgagcgcaac ccttgtcctg tgttgccagc atgcccttcg gggtgatggg 1080

gactcacagg agaccgccgg ggtcaactcg gaggaaggtg gggacgacgt caagtcatca 1140

tgcccccttat gtcttgggct gcacacgtgc tacaatggcc ggtacaatga gctgcgatac 1200

cgtgaggtgg agcgaatctc aaaaagccgg tctcagttcg gattggggtc tgcaactcga 1260

ccccatgaag tcggagtcgc tagtaatcgc agatcagcat tgctgcggtg aatacgttcc 1320

cgggccttgt acacaccgcc cgtcacgtca cgaaagtcgg taacacccga agccggtggc 1380

ccaacccttg tggagggagc tgtcgaa 1407