



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0122410
(43) 공개일자 2023년08월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/20 (2006.01) A01N 63/25 (2020.01)
C12R 1/12 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 1/205 (2021.05)
A01N 63/25 (2022.01)
(21) 출원번호 10-2022-0019048
(22) 출원일자 2022년02월14일
심사청구일자 2022년02월14일

(71) 출원인
경상국립대학교산학협력단
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
(72) 발명자
곽연식
경상남도 진주시 진주대로 1317, 110동 901호 (이현동, 이현하이클래스웰가아파트)
김수현
경상남도 진주시 진주대로 522, 626호(가좌동)
(74) 대리인
최규환

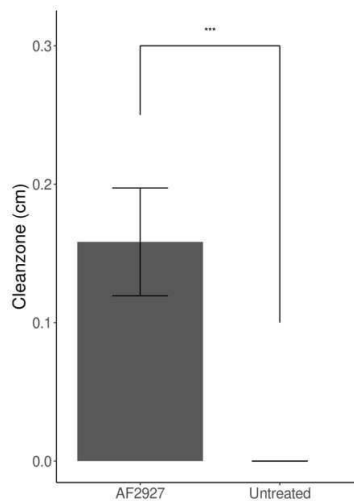
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 과수 화상병원균에 대한 항균 활성 및 세포외 효소 분비능이 있으며, 사이드로포어를 생산하는 패니바실러스 폴리믹사 AF2927 균주 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 과수 화상병원균에 대한 항균 활성 및 세포외 효소 분비능이 있으며, 사이드로포어를 생산하는 패니바실러스 폴리믹사 AF2927 균주 및 이의 용도에 관한 것으로, 본 발명의 패니바실러스 폴리믹사(*Paenibacillus polymyxa*) AF2927 균주가 과수 화상병(fire blight)의 원인균에 대해 항균 활성을 나타내고, 키틴나아제(chitinase), 프로테아제(protease) 및 셀룰라아제(cellulase) 분비능이 있으며, 사이드로포어(siderophore)를 생산하므로, 친환경적으로 과수 화상병의 확산과 이로 인한 피해를 줄이는데 유용하게 이용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류
C12R 2001/12 (2021.05)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	014934
과제번호	PJ01493401
부처명	농촌진흥청
과제관리(전문)기관명	농촌진흥청
연구사업명	과수화상병 등 현안 문제 병해충 피해 경감 기술 개발
연구과제명	과수화상병균 유전적 특성 구명 및 마이크로바이옴 연구를 통한 방제 기술개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	경상국립대학교
연구기간	2022.01.01 ~ 2022.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

항균 활성을 가지고, 세포외 효소 분비능이 있으며, 사이드로포어(siderophore)를 생산하는 패니바실러스 폴리믹사(*Paenibacillus polymyxa*) AF2927 균주(KCTC18976P).

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 항균 활성은 에르위니아 아밀로보라(*Erwinia amylovora*)에 대한 항균 활성인 것을 특징으로 하는 균주.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 효소는 키틴아제(chitinase), 프로테아제(protease) 및 셀룰라아제(cellulase)인 것을 특징으로 하는 균주.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 따른 패니바실러스 폴리믹사(*Paenibacillus polymyxa*) AF2927 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는 식물병 방제용 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 식물병은 과수 화상병(fire blight)인 것을 특징으로 하는 식물병 방제용 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서, 과수 화상병(fire blight)의 원인균은 에르위니아 아밀로보라(*Erwinia amylovora*)인 것을 특징으로 하는 식물병 방제용 조성물.

청구항 7

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 따른 패니바실러스 폴리믹사(*Paenibacillus polymyxa*) AF2927 균주를 배양하는 단계를 포함하는 식물병 방제용 조성물의 제조 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 식물병은 과수 화상병(fire blight)인 것을 특징으로 하는 식물병 방제용 조성물의 제조 방법.

청구항 9

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 따른 패니바실러스 폴리믹사(*Paenibacillus polymyxa*) AF2927 균주 또는 이의 배양액의 유효량을 식물 또는 토양에 처리하는 단계를 포함하는 식물병을 방제하는 방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 식물병은 과수 화상병(fire blight)인 것을 특징으로 하는 식물병을 방제하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

본 발명은 과수 화상병원균에 대한 항균 활성 및 세포외 효소 분비능이 있으며, 사이드로포어를 생산하는 패니바실러스 폴리믹사 AF2927 균주 및 이의 용도에 관한 것이다.

[0001]

배경 기술

- [0002] 에르위니아 아밀로보라(*Erwinia amylovora*)는 배나무 또는 사과나무 등의 과수에서 화상병을 야기하는 그람 음성(Gram-negative) 식물병원균이다. 에르위니아 아밀로보라의 대표적인 증상으로 잎은 시들고 흑색으로 변하여 마르며, 줄기나 열매도 처음에는 수침상의 병반이 생기고 움푹 들어가며 열매가 시들어가며 화상을 입은 것처럼 검게 변한다. 에르위니아 아밀로보라는 미국에서 1780년에 처음 발견되었고, 유럽, 북미, 중동, 중앙아시아, 뉴질랜드 등 전 세계적으로 보고된 바 있다. 이 병원균은 한국에서는 2015년 사과와 배의 화상병을 통해 처음으로 보고되었다. 에르위니아 아밀로보라는 곤충이나 비바람에 의해 전염되어 꽃, 꿀샘, 기공, 피목, 상처 등을 통해 기주체로 침입하기 때문에 전염성이 높고 배나무, 사과나무, 살구나무 등 70여종의 식물을 침해할 수 있다는 특징이 있어 세계적으로 화상병에 대한 피해가 발생하고 있다.
- [0003] 화상병은 당해의 수확을 망칠 뿐만 아니라, 장기간의 타격도 줄 수 있다. 꽃의 감염은 과일을 말려 죽여, 당해의 수확을 감소시키고 어린가지의 화상은 다음해의 과수가 열릴 가능성을 감소시킨다. 많은 과수 품종의 뿌리와 줄기에 있어서 화상은 큰 가지나 나무 전체마저도 파괴할 수 있다. 과수 수확에 대한 화상병의 잠재적인 영향을 감안해 봤을 때, 이 질병에 대한 해결책이 절실한 상황이다.
- [0004] 화상병에 대응하기 위한 방법 중 하나는 원예적인 실시에 의해 질병 발생을 최소한으로 하는 것이다. 예를 들어 토양 수분을 감소시키고 비료 영양소의 균형을 유지함으로써 화상병의 감염 및 확산을 제어할 수 있는 방법이 있다. 그러나 이 방법은 본질적인 질병 발생을 제거할 수 없다.
- [0005] 다른 방법으로, 감염된 과수나 검게 변한 가지를 병원균이 휴지 기간을 갖는 겨울에 제거함으로써 화상병을 치료하는 것도 가능하다. 그러나 이러한 방법은 장비의 멸균에 주의하여 질병의 확산을 방지해야 하며, 이 방법은 작은 병변 또는 내부 감염을 다 검출할 수 없기 때문에 질병을 완전하게 근절할 수 없다.
- [0006] 또한, 화상병에 감염된 과수는 구리 화합물 또는 항생 물질을 정기적으로 살포하는 방법으로 화상병을 제어할 수 있다. 그러나 구리 화합물의 사용은 종종 효과적이지 않거나 과일의 갈반(russetting)을 일으키므로 보편적으로 사용하기에는 어려운 점이 있다. 항생물질의 사용, 특히 스트렙토마이신은 구리 화합물보다 효과적이고 과일에 대한 해가 적다. 그러나 에르위니아 아밀로보라는 캘리포니아, 오리건, 워싱턴, 미주리 및 미시간을 포함한 스트렙토마이신이 사용되고 있는 미국의 많은 주에서 스트렙토마이신에 대한 내성을 일으키고 있어 다른 방법이 필요한 상황이다.
- [0007] 한편, 과수 화상병 방제 관련 선행기술로는 한국공개특허 제2021-0001996호에 '브레비바실러스 브레비스 HK544 균주를 이용한 식물병 방제용 조성물'이 개시되어 있으며, 한국등록특허 제2025403호에 '과수 화상병 세균에 효과적인 신규한 박테리오파지 ΦEaP-8 및 이의 용도'가 개시되어 있다. 하지만, 본 발명의 '과수 화상병원균에 대한 항균 활성 및 세포의 효소 분비능이 있으며, 사이드로포어를 생산하는 패니바실러스 폴리믹사 AF2927 균주 및 이의 용도'에 대해서는 아직까지 개시된 바가 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0008] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명은 사과로부터 분리한 패니바실러스 폴리믹사(*Paenibacillus polymyxa*) AF2927 균주가 과수 화상병(fire blight)의 원인균에 대해 항균 활성을 나타내고, 키틴아제(chitinase), 프로테아제(protease) 및 셀룰라아제(cellulase) 분비능이 있으며, 사이드로포어(siderophore)를 생산하는 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

- [0009] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 항균 활성을 가지고, 세포의 효소 분비능이 있으며, 사이드로포어(siderophore)를 생산하는 패니바실러스 폴리믹사(*Paenibacillus polymyxa*) AF2927 균주(KCTC18976P)를 제공한다.
- [0010] 또한, 본 발명은 상기 패니바실러스 폴리믹사(*Paenibacillus polymyxa*) AF2927 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는 식물병 방제용 조성물을 제공한다.
- [0011] 또한, 본 발명은 상기 패니바실러스 폴리믹사(*Paenibacillus polymyxa*) AF2927 균주를 배양하는 단계를 포함하

는 식물병 방제용 조성물의 제조 방법을 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 상기 패니바실러스 폴리믹사(*Paenibacillus polymyxa*) AF2927 균주 또는 이의 배양액의 유효량을 식물 또는 토양에 처리하는 단계를 포함하는 식물병을 방제하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0013] 본 발명은 사과로부터 분리한 패니바실러스 폴리믹사(*Paenibacillus polymyxa*) AF2927 균주가 과수 화상병(fire blight)의 원인균에 대해 항균 활성을 나타내고, 키티나아제(chitinase), 프로테아제(protease) 및 셀룰라아제(cellulase) 분비능이 있으며, 사이드로포어(siderophore)를 생산하므로, 친환경적으로 과수 화상병의 확산과 이로 인한 피해를 줄이는데 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0014] 도 1은 사과로부터 분리한 패니바실러스 폴리믹사(*Paenibacillus polymyxa*) AF2927 균주의 과수 화상병(fire blight) 원인균에 대한 항균 활성을 나타낸 것이다. AF2927은 패니바실러스 폴리믹사 AF2927 균주이고, Untreated는 아무것도 처리하지 않은 것이다.

도 2는 사과로부터 분리한 패니바실러스 폴리믹사(*Paenibacillus polymyxa*) AF2927 균주의 16S rRNA, *gapA*(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase A), *pgi*(Glucose-6-phosphate isomerase) 유전자의 염기서열 분석을 통해 계통도를 나타낸 것이다.

도 3은 사과로부터 분리한 패니바실러스 폴리믹사(*Paenibacillus polymyxa*) AF2927 균주 처리에 따른 과수 화상병의 발병 억제 효과를 나타낸 것이다. *Erwinia amylovora*는 과수 화상병 원인균을 처리한 균이고, AF2927 + *Erwinia amylovora*는 패니바실러스 폴리믹사 AF2927 균주를 전처리하고 과수 화상병 원인균을 처리한 균이며, AF2927는 패니바실러스 폴리믹사 AF2927 균주를 처리한 균이다.

도 4는 사과로부터 분리한 패니바실러스 폴리믹사(*Paenibacillus polymyxa*) AF2927 균주의 셀룰라아제(A), 키티나아제(B) 및 프로테아제(C) 분비능과 사이드로포어 생산능(D)을 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0015] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 항균 활성을 가지고, 세포외 효소 분비능이 있으며, 사이드로포어(siderophore)를 생산하는 패니바실러스 폴리믹사(*Paenibacillus polymyxa*) AF2927 균주(KCTC18976P)를 제공한다.

[0016] 본 발명의 균주는 사과로부터 분리되었으며, 과수 화상병의 원인균에 대해 항균 활성을 가지고, 세포외 효소 분비능이 있으며, 사이드로포어를 생산하는 균주로, 상기 패니바실러스 폴리믹사 AF2927 균주는 한국생명공학연구원 생물자원센터에 2022년 02월 03일자로 기탁되었다(기탁번호: KCTC18976P).

[0017] 본 발명의 일 구현 예에 따른 균주에서, 상기 항균 활성은 에르위니아 아밀로보라(*Erwinia amylovora*)에 대한 항균 활성일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0018] 본 발명의 일 구현 예에 따른 균주에서, 상기 효소는 키티나아제(chitinase), 프로테아제(protease) 및 셀룰라아제(cellulase)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0019] 본 발명은 또한, 상기 패니바실러스 폴리믹사(*Paenibacillus polymyxa*) AF2927 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는 식물병 방제용 조성물을 제공한다.

[0020] 본 발명의 식물병 방제용 조성물에서, 상기 식물병은 과수 화상병(fire blight)일 수 있으나, 이에 제한되지 않으며, 상기 과수 화상병(fire blight)의 원인균은 에르위니아 아밀로보라(*Erwinia amylovora*)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0021] 본 발명의 조성물에 있어서, 상기 '배양액'은 패니바실러스 폴리믹사 AF2927 균주의 배양액, 상기 배양액의 농축액, 또는 상기 배양액의 건조물을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0022] 상기 배양액은 통상적인 미생물의 배양방법에 의해 대량으로 배양하여 수득할 수 있으며, 배양배지로는 탄소원, 질소원, 비타민 및 미네랄을 포함하는 배지를 사용할 수 있으며, 상기 탄소원으로는 전분, 슈크로즈, 시트레이트, 말토스, 글루코스, 만니톨, 글리세롤 또는 자일로스를 사용할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [0023] 본 발명의 균주를 배양하는 방법은 당업계에 통상적으로 이용되는 방법에 따라 배양할 수 있으며, 특별한 방법에 한정되는 것은 아니다.
- [0024] 본 발명의 식물병 방제용 조성물은 직접 분사가 가능한 용액, 분말 및 현탁액의 형태 또는 고농축 수성, 유성 또는 다른 현탁액, 분산액, 에멀전, 유성 분산액, 페이스트, 분진, 흠뿌림 물질 또는 과립제로 제조할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 상기 식물병 방제용 조성물은 분사, 분무, 살포, 흠뿌림 또는 붓기에 의해 사용될 수 있다. 사용 형태는 의도한 목적에 의존하는데, 모든 경우에 본 발명에 따른 조성물의 분포가 가능한 미세하고 균일하도록 해야 한다.
- [0025] 본 발명의 식물병 방제용 조성물은 당업계에 공지된 방식의 미생물 농약제제화 방식에 따라, 예컨대 배양된 균체의 배양액, 동결건조 균체와 진분, 조단백질 및 암석분 등을 포함하도록 분말, 펠렛 또는 과립, 마이크로캡슐 등으로 제형화하여 그대로 사용할 수 있다. 상기 조성물은 표면 활성화제, 비활성 담체, 보존제, 습윤제, 공급 촉진제, 유인제, 캡슐화제, 결합제, 유화제, 염료, U.V 보호제, 완충제 등 목적 선충 및 작물에 따라 적용하기 용이한 다른 성분을 부가함으로써 수득할 수 있다. 본 발명의 조성물은 적용하기 전에 적당한 양의 물 또는 다른 희석제로 희석을 하여 직접 적용하기에 적합한 형태 또는 농축액 또는 1차 조성물일 수 있다. 살충성 농도는 특히 농축 또는 직접 사용하거나 하는 것은 특정 제제의 성질, 적용 식물의 종류, 재배지역의 토양 및 기후 등에 따라 다양할 수 있음은 당업계에 명백히 이해될 것이다.
- [0026] 또한, 본 발명의 식물병 방제용 조성물은 농업적으로 허용가능한 담체를 추가로 포함할 수 있다. 적합한 고형 담체 물질은 원칙적으로, 모두 다공성이고, 농업적으로 허용가능한 담체, 예를 들어 광물토류(예컨대 실리카, 실리카 겔, 실리케이트, 활석, 고령토, 석회암, 석회, 초크, 보울, 황토, 점토류, 백운석, 규조 토류, 황산칼슘, 황산 마그네슘, 산화마그네슘, 분쇄 합성물질), 비료(예컨대 황산암모늄, 인산암모늄, 질산암모늄, 우레아), 식물성 제품(예컨대 곡물 가루, 나무 껍질 가루, 목분(wood meal) 및 견과 껍질 가루) 또는 셀룰로오스 분말일 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 또한, 상기 고형 담체는 1종류 또는 2종류 이상을 혼합하여 사용할 수도 있다.
- [0027] 본 발명의 식물병 방제용 조성물은 유효성분으로서 패니바실러스 폴리믹사 AF2927 균주를 단독으로, 또는 2종 이상의 다른 항균 또는 항바이러스성 물질 등과 혼합하여 사용할 수 있다.
- [0028] 본 발명의 식물병 방제용 조성물은 작물체 흡수 및 효과를 증진시키기 위하여 확산제 및 침투제, 또는 계면활성제와도 혼용이 가능하다.
- [0029] 본 발명은 또한, 상기 패니바실러스 폴리믹사(*Paenibacillus polymyxa*) AF2927 균주를 배양하는 단계를 포함하는 식물병 방제용 조성물의 제조 방법을 제공한다.
- [0030] 본 발명의 식물병 방제용 조성물의 제조 방법에서, 상기 식물병은 전술한 바와 같다.
- [0031] 본 발명의 기탁번호가 KCTC18976P인 패니바실러스 폴리믹사 AF2927 균주는 과수 화상병(fire blight) 방제용 조성물을 제조할 수 있다.
- [0032] 본 발명의 균주를 배양하는 방법은 당업계에 통상적으로 이용되는 방법에 따라 배양할 수 있다.
- [0033] 본 발명은 또한, 상기 패니바실러스 폴리믹사(*Paenibacillus polymyxa*) AF2927 균주 또는 이의 배양액의 유효량을 식물 또는 토양에 처리하는 단계를 포함하는 식물병을 방제하는 방법을 제공한다.
- [0034] 상기 식물병을 방제하는 방법으로는 상기 패니바실러스 폴리믹사 AF2927 균주, 이의 배양액, 상기 배양액의 농축액 또는 그의 건조물의 유효량을 이용한 조성물을 식물이나 식물의 종자에 침지하거나 관주, 즉, 분무하여 수행할 수 있다. 침지하는 방법의 경우, 상기 AF2927 균주, 이의 배양액, 상기 배양액의 농축액 또는 그의 건조물의 유효량을 식물 주변의 토양에 붓거나 또는 종자를 배양액 및 조성물에 담가둘 수 있다.
- [0035] 본 발명의 식물병을 방제하는 방법에서, 상기 식물병은 전술한 바와 같다.
- [0036] 이하, 본 발명의 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [0037] **실시예 1. 사과 농가에서 패니바실러스 폴리믹사(*Paenibacillus polymyxa*) AF2927 균주의 분리 및 과수 화상병 원인균에 대한 항균활성 확인**
- [0038] 과수 화상병 원인균에 대해 항균 활성을 가지는 균주를 분리 및 선택하기 위해, 충청북도 음성군 농가에서 사과

시료를 채집하였다. 해당하는 시기에 잎 봉오리, 꽃 봉오리, 꽃, 잎 및 과실을 채집하였다. 내생 미생물 분리를 위해 채집한 시료는 PBS(10X PBS; 80g/L NaCl, 2g/L KCl, 14.4g/L Na₂HPO₄, 2.4g/L KH₂PO₄, pH 7.4) 버퍼를 이용하여 초음파 세척(35 kHz)을 진행하였다. 세척한 시료는 70%(v/v) 에탄올 30초, 1% NaOCl(Sodium hypochlorite) 30초간 침지한 후, 멸균수로 2회 세척하여 표면살균을 진행하였으며, 무균대 내에서 약 1시간 건조하였다. 건조된 시료에 5mL의 PBS 버퍼를 첨가하여 막자사발로 갈아 50%(v/v) 글리세롤과 1:1로 혼합하여 -20℃에 보관하였다.

[0039] 항균 활성을 가지는 미생물 선별은 총 3회에 걸쳐 진행하였다. -20℃에 보관된 시료를 녹여 1/5 TSA(Tryptic soya broth 30g/L, agar 20g/L) 배지에 100μL 분주하여 도말한 후, 28℃에서 2일 동안 배양하였다. 대치배양에 사용할 과수 화상병 원인균인 에르위니아 아밀로보라(*Erwinia amylovora*, 국립농업과학원)를 사용하였으며, TSB 액체배지에 2일 동안 배양 후, OD₆₀₀ 값을 0.2로 조절하여 0.2% 카라기난(carrageenan; Sigma-Aldrich, USA)과 1:1로 혼합하였다. 2mL의 에르위니아 아밀로보라 배양액(OD₆₀₀= 0.2)을 1차 선별된 미생물을 도말한 플레이트에 분주하여 무균대에서 1시간 동안 건조하였다. 건조된 플레이트는 28℃에서 2일 동안 배양하여 항균 능력을 나타내는 균주들을 1차 선별하였다. 2차 대치배양은 TSA 배지에 1차에서 선별된 4~5종의 균주를 희석도말하여 28℃에서 배양하였다. 배양된 플레이트는 1차와 동일하게 2mL의 에르위니아 아밀로보라 배양액(OD₆₀₀= 0.2)을 분주하여 건조한 후, 28℃에서 2일간 배양하였다. 2차 대치배양 결과로 항균능력을 나타낸 균주들은 3차 대치배양을 진행하였다. 3차 대치배양은 균주를 동일한 농도로 접종하여 실험을 수행하였다. 모든 균주는 OD₆₀₀ 값을 0.3으로 조절하여 MGY(D-mannitol 10g/L, L-glutamic acid 2g/L, KH₂PO₄ 0.5g/L, NaCl 0.2g/L, MgSO₄·7H₂O 0.2g/L, Yeast extract 1g/L, agar 15g/L, pH 7.0) 배지가 담긴 플레이트의 필터 디스크에 10μL를 접종하였다. 접종 1~5일 후, 에르위니아 아밀로보라 배양액(OD₆₀₀= 0.3)과 카라기난을 1:1 비율로 혼합하여 하룻밤새 동안 두고 건조하여 28℃에서 2일간 배양하였다. 3차 대치배양 결과로, 에르위니아 아밀로보라에 대해 우수한 항균 활성을 나타내는 균주를 최종 선별하였으며, 최종 선별된 균주와 에르위니아 아밀로보라를 대치배양하여 우수한 항균 활성을 확인하였다(도 1).

[0040] **실시예 2. 패니바실러스 폴리믹사 AF2927 균주의 동정**

[0041] 실시예 1에서 최종 선별된 균주의 분자 생물학적 동정을 실시하고자 CTAB(Cetyltrimethylammonium bromide) 방법을 이용해 게놈 DNA를 분리하여 16S rRNA(서열번호 1), *gapA*(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase A, 서열번호 2) 및 *pgi*(Glucose-6-phosphate isomerase, 서열번호 3) 유전자의 염기서열을 분석하였다. 확보된 각 염기서열은 NCBI의 BLAST 검색을 통하여 패니바실러스 폴리믹사(*Paenibacillus polymyxa*)로 동정되었으며(도 2), 상기 균주를 패니바실러스 폴리믹사 AF2927 균주로 명명하였다.

[0042] **실시예 3. 패니바실러스 폴리믹사 AF2927 균주의 과수 화상병 방제효과 확인**

[0043] 최종 선별된 패니바실러스 폴리믹사 AF2927 균주의 화상병 방제 효과를 확인하기 위해, 사과이용연구소에서 사과(홍로 품종) 어린 잎을 채집하였다. 채집한 잎은 표면살균을 위해 70%(v/v) 에탄올 10초, 0.5%(v/v) NaOCl 10초 침지한 후, 멸균수로 2회 세척하여 무균대 내에서 건조하였다. 사과 잎에 처리할 본 발명의 AF2927 균주를 TSB 액체배지에 배양한 후 OD₆₀₀ 값을 0.3으로 조절하고, 1%(w/v) CMC(carboxy methyl cellulose)와 9:1 비율로 혼합하였다. 사과 잎은 CMC와 혼합한 AF2927 균주 배양액에 10분간 침지하여 무균대에서 건조하였다. 그런 다음, 필터 페이퍼 위에 잎을 놓고 과수 화상병 원인균인 에르위니아 아밀로보라(*Erwinia amylovora*) 배양액(OD₆₀₀=0.1)을 스프레이 형식으로 분주하였고, 30분 동안 건조하였다. 건조된 잎에 처리한 AF2927 균주 및 에르위니아 아밀로보라를 배양하기 위해, 잎을 15cm 페트리 디쉬(SPL, Republic of Korea)에 넣었고 랍으로 싸주어 28℃에서 5일 동안 보관하였다. 페트리 디쉬안에는 필터 페이퍼를 깔고 멸균수를 넣어 수분을 유지시켰으며, 잎이 직접적으로 물에 닿지 않게 나무젓가락을 놓고 잎을 올려주었다. 5일 후, 본 발명의 AF2927 균주를 전처리한 사과 잎의 병 발생 정도를 확인하였다.

[0044] 그 결과, 도 3에 개시한 바와 같이, 본 발명의 AF2927 균주를 처리하지 않고 과수 화상병 원인균만을 처리하였을 때, 잎이 시들고 흑색으로 변하여 마르는 심각한 병징이 발생하였으나, 본 발명의 패니바실러스 폴리믹사 AF2927 균주를 전처리하고 과수 화상병 원인균을 처리하였을 때에는 잎이 시들거나 흑색으로 변하는 양상을 보이지 않고 정상적인 잎 형태로 나타나, 패니바실러스 폴리믹사 AF2927 균주가 과수 화상병에 대해 우수한 방제 효과를 나타내는 것을 알 수 있었다(도 3).

[0045] 실시예 4. 패니바실러스 폴리믹사 AF2927 균주의 세포외 효소 분비능 및 사이드로포어 생산 확인

[0046] 본 발명의 패니바실러스 폴리믹사 AF2927 균주의 셀룰라아제(cellulase), 키틴나아제(chitinase) 및 프로테아제(protease) 분비능과 사이드로포어(siderophore) 생산능을 확인하기 위해, 해당 배지를 제작하여 클리어존(clear zone) 크기를 측정하였다. 셀룰라아제 및 키틴나아제 분비능을 확인하기 위해, 하기 표 1에 개시된 해당 배지를 제작하였다. 제작한 배지가 담긴 플레이트에 90mm 필터 디스크(ADVANTEC, Taiwan)를 올린 후, OD₆₀₀ 값을 0.3으로 조절한 본 발명의 AF2927 균주 배양액 10 μ l를 접종하였다. 접종한 플레이트는 28℃에서 7일간 배양하였다. 그 후, 0.1%(cellulase 배지) 및 0.2%(chitinase 배지) 콩고레드 용액(congo red solution) 1ml을 각각 분주하여 20분 동안 건조시켰다. 건조된 플레이트는 1M NaCl로 세척하여 플레이트상 클리어존 크기를 측정하였다. 프로테아제 분비능 및 사이드로포어 생산능 확인은 해당 배지(표 1)에 OD₆₀₀ 값을 0.3로 조절한 본 발명의 AF2927 균주를 접종하여 5일간 배양한 후, 플레이트상 클리어존 크기를 측정하였다.

[0047] 그 결과, 본 발명의 패니바실러스 폴리믹사 AF2927 균주는 셀룰라아제, 키틴나아제 및 프로테아제 분비능과 사이드로포어를 생산능이 있었으며, 특히 키틴나아제 및 프로테아제 분비능이 우수한 것을 확인할 수 있었다(도 4).

표 1

[0048] 효소 분비능 및 사이드로포어 생산 확인용 배지 조성

	배지 조성(L)
셀룰라아제	yeast extract 1g, CMC 1g, KH ₂ PO ₄ 4g, MgSO ₄ g, MnSO ₄ 0.05g, FeSO ₄ 0.05g, CaCl ₂ 2g, NH ₄ Cl 2g, Agar 18g, pH 7.0~7.4
키틴나아제	Chitin 5ml, Yeast 5g, KH ₂ PO ₄ 0.7g, K ₂ HPO ₄ 0.05g, MgSO ₄ 0.3g, FeSO ₄ 0.1g, NaCl 0.1g, Agar 20g, pH 6.5~7.0
프로테아제	skim milk 10g, Agar 20g
사이드로포어	MM9 salt solution 100ml, ddH ₂ O 750ml, PIPES 32.24g, Agar 15g, pH 6.5 고압증기멸균 후, 50℃에서 casamino acid solution 30ml, 20% glucose solution 10ml, blue dye solution 100ml

수탁번호

[0049]

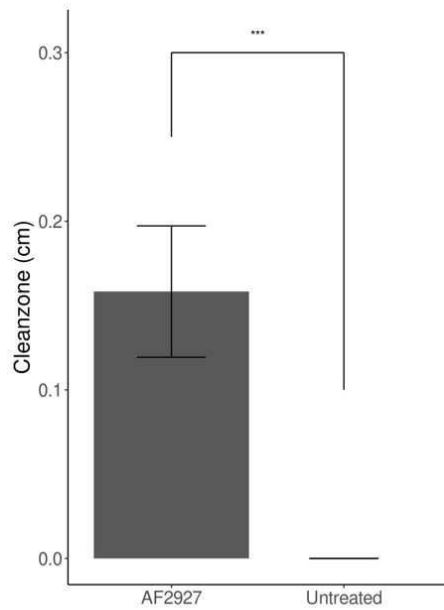
기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC18976P

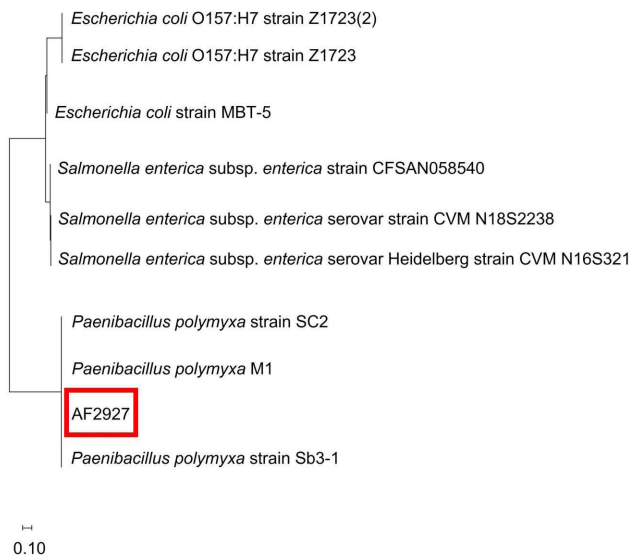
수탁일자 : 20220203

도면

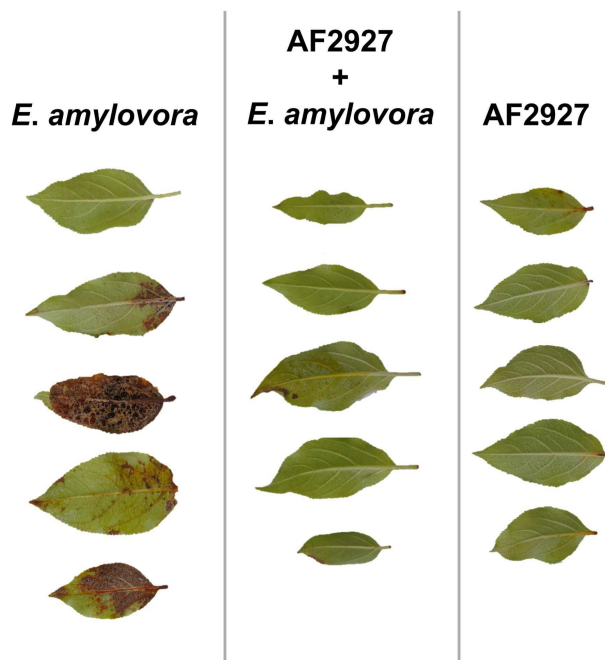
도면1



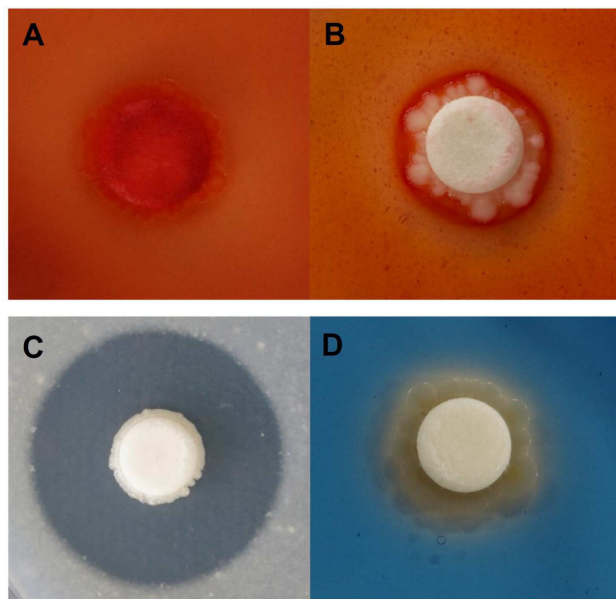
도면2



도면3



도면4



서열 목록

- <110> INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY
- <120> Paenibacillus polymyxa AF2927 strain having antimicrobial activity against Erwinia amylovora, extracellular enzyme secretion activity and siderophore production activity and uses thereof
- <130> PN22009
- <160> 3

<170> KoPatent In 3.0

<210> 1

<211> 1475

<212> DNA

<213> Paenibacillus polymyxa

<400> 1

ctggcggcgt gcctaataca tgcaagtcga gcgggattat atagaagctt gcttctatat	60
aatctagcgg cggacgggtg agtaacacgt aggcaacctg cccacaagac agggataact	120
accggaaacg gtagctaata cccgatacat ccttttcctg catgggagaa ggaggaaagg	180
cggagcaatc tgtcacttgt ggatgggcct gcggcgcatt agctagttag tggggtaatg	240
gcctaccaag gcgacgatgc gtagccgacc tgagagggtg atcggccaca ctgggactga	300
gacacggccc agactcctac gggaggcagc agtagggaat cttccgcaat gggcgaaagc	360
ctgacggagc aacgccgcgt gagtgatgaa ggttttcgga tcgtaaagct ctgttgccag	420
ggaagaacgt cttgtagagt aactgctaca agagtgcagg tacctgagaa gaaagccccg	480
gctaactacg tgccagcagc cgcggttaata cgtagggggc aagcgttgtc cggaattatt	540
gggcgtaaag cgcgcgcagg cggctcttta agtctggtgt ttaatccga ggctcaactt	600
cgggtcgcac tggaactgg ggagcttgag tgcagaagag gagagtggaa ttccacgtgt	660
agcggtgaaa tgcgtagaga tgtggaggaa caccagtggc gaaggcgact ctctgggctg	720
taactgacgc tgaggcgcga aagcgtgggg agcaaacagg attagatacc ctggtagtcc	780
acgccgtaaa cgatgaatgc taggtgttag gggtttcgat accctcggtg ccgaagttaa	840
cacattaagc attccgcctg gggagtacgg tcgcaagact gaaactcaaa ggaattgacg	900
gggacccgca caagcagtgg agtatgtggt ttaattcgaa gcaacgcgaa gaaccttacc	960
aggtcttgac atccctctga ccggtctaga gatagacctt tccttcggga cagaggagac	1020
aggtggtgca tggttgtcgt cagctcgtgt cgtgagatgt tgggttaagt cccgcaacga	1080
gcgcaaccct tatgcttagt tgccagcagg tcaagctggg cactctaagc agactgccgg	1140
tgacaaaccg gaggaagggt gggatgacgt caaatcatca tgccccttat gacctgggct	1200
acacacgtac tacaatggcc ggtacaacgg gaagcgaagc cgcgagggtg agccaatcct	1260
agaaaagccg gtctcagttc ggattgtagg ctgcaactcg cctacatgaa gtcggaattg	1320
ctagtaatcg cggatcagca tgccgcggtg aatacgttcc cgggtcttgt acacaccgcc	1380
cgtcacacca cgagagttta caacaccgga agtcgggtgg gtaaccgca agggggccag	1440
ccgccgaagg tggggtagat gattggggtg aagtc	1475

<210> 2

<211> 904

<212> DNA

<213> *Paenibacillus polymyxa*

<400> 2

attgttaaag taggtattaa cggtttcgga cgtattggac gccttgcttt ccgccgtatt 60

caagacgtag aaggtattga agtagtagca attaacgact tgacagattc caaaatgctg 120

gcacatctgt tgaataatga tacaatacaa ggtactttcc aaggggaagt agaagtacat 180

gacggtttct tcaaagtaaa tggtaaagaa gttaaagttt tggctaaccg taaccctgaa 240

gaattgcctt ggggagacct ggggtgtagac atcgttctgg aatgcacagg tttcttcaca 300

actaaagaag ctgctgagaa acatttgaaa ggcggcgcta aaaaagttgt tatctccgct 360

ccagctactg gcgacatgaa aactgtcgtt tacaacgtaa accatgaaat tctggacgga 420

tctgaaactg taatttcggg tgcttcttgc acaactaact gcctggctcc tatggctaaa 480

acattgcaag acaaatttgg tatcgttgaa ggcttgatga ctacaattca cgcttacact 540

ggcgacaaaa acactttgga tgctccacat gctaaagggtg acttccgtcg tgctcgcgca 600

gcagctgaaa acatcatccc taacactact ggtgctgcta aagcaatcgg tctggttatac 660

cctgagctga aaggtaaatt ggatggcgca gctcaacgtg ttccagtacc aacaggttcc 720

ctgactgagc tggtaacagt tctggagaaa aacgtaactg ctgaagaaat caacgcagcg 780

atgaaagaag cttccgatcc tgaaacttac ggatacactg aagatcaaat cgtttcttct 840

gacatcaaag gtctgacttt cggatccctg ttgatgcaa ctcaaactaa agttctgact 900

gttg 904

<210> 3

<211> 1166

<212> DNA

<213> *Paenibacillus polymyxa*

<400> 3

tagtatgaca aagaagagtt tgccgcgcatc caaaaggctg ctgctaaaaat tcaaagcgat 60

tccgaggtat tgattgtaat cggtatitgtt ggttcttacc ttggagcagc tgctgcgatac 120

gaaatgctgt cgattcttt ctacaatgcg ctgcctaaag atcaacgcaa ggttccagct 180

atctattttg caggcaacaa catcagctct acatatgtga atcatctgtt ggaactgatt 240

gaaggaaaag acttctctgt gaatgtcatc tccaaatcag gtacgacaac agagccagct 300

atcgctttcc gcgtattccg tgcggctctg gagaaaaaat acggtaaaga agaagcgcgc	360
aaacgtatatt acgcgacaac ggacaaagaa cgtggcgctt tgaaaaagct cgctaacgag	420
gaaggttatg aatccttcat tattcctgat gatgtgggtg gccgttactc cgtgctgaca	480
gcagtaggct tgttgccgat tgctacagca ggcatcaaca tcgaagaaat gatgcaaggt	540
gcggcggacg cttccaaaga atacagcaat ccgaatgtag ctgagaacga ggcataccaa	600
tatgcagccg ttcgtaacgc tttgtaccgt aaaggtaaag caattgaaat tctcgtaaac	660
tatgagccgt ctttgcatat cgtatctgag tgggtggaac agctgtacgg agaaagcgaa	720
ggtaaggatt ataaaggcat ttatctgct tctgttgact tctcgacaga cctgcactct	780
atgagacaat tcattcagga aggtagccgt aacattttcg aaacggtaat ccaagtagaa	840
aatgtaccta gtcacatcac catcgaagca gatgaggatg atctggatgg actgaatatt	900
ctggcaggca aaacggtgga ttttgtaaac aaaaaagcat tccaaggtag attgctggct	960
cacacagacg gacaagtacc gaacctgatt gtaaatattc ctgacttgag cccttactct	1020
tttggtacc ttgcttattt cctcgaagag gcttgcggca tcagcggcta cctgttgggc	1080
gtaaatccgt tcgateaacc cggcgtcgaa gcttacaaaa agaacaatgtt cgcgttgctt	1140
ggcaaaccag gctaatact agtgaa	1166