

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2013-0008673 (43) 공개일자 2013년01월23일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) C12N 1/20 (2006.01) A01N 63/02 (2006.01) C12R 1/07 (2006.01) (21) 출원번호 10-2011-0066771 (22) 출원일자 2011년07월06일 심사청구일자 2011년07월06일		(71) 출원인 고려대학교 산학협력단 서울 성북구 안암동5가 1 (72) 발명자 김범석 서울특별시 용산구 회나무로32길 45, SOD10차 30 3호 (이태원동) 강신애 서울특별시 성북구 중암로5길 9-19, RH동 House 203호 (중암동) (뒷면에 계속) (74) 대리인 김선애

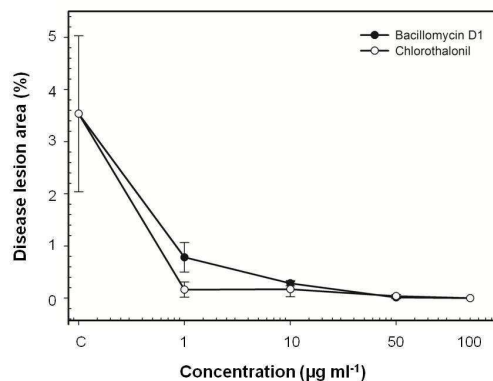
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 식물병원성 진균에 항균 활성을 갖는 바실러스 아밀로리퀴파시엔스 GYL 4 및 이를 이용한 항생물질의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 식물병원성 진균인 오이 탄저병균 등에 대해 항균효과를 가지는 항생물질인 바실로마이신을 생성, 분비하는 바실러스 아밀로리퀴파시엔스 GYL4 (*Bacillus amyloliquefaciens* strain GYL4) 및 이 균주로부터 생산되는 항생물질의 제조 방법에 관한 것이다. 상기한 본 발명에 의하면 자연환경에서의 미생물에 의한 생분해성이 큰 환경친화적 살균제 조성물을 제공하는 효과가 있고, 방제하기 힘든 병원균인 콜레토틱리쿰 오비쿨레어 (*Colletotrichum orbiculare*)가 일으키는 오이 탄저병 등에 대한 방제 효과가 있어 식물병 방제산업상 유용하게 이용될 수 있다.

대표도 - 도8



(72) 발명자

김정도

서울특별시 동대문구 안암로 84-14, 파인빌 306호
(제기동)

한재우

서울특별시 중랑구 신내로19길 42, 609동 402호 (신내동, 신내아파트)

이동호

서울특별시 성북구 정릉1동 1020번지 우성아파트
105-802

특허청구의 범위

청구항 1

식물병원성 진균에 항균 활성을 갖는 바실러스 아밀로리퀴파시엔스 GYL4 (*Bacillus amyloliquefaciens* GYL4, 수탁번호: KACC91655P).

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 식물병원성 진균은 푸자리움 옥시스포룸 f.sp. 라이코펠시사이(*Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*), 푸자리움 옥시스포룸 f.sp. 라이코펠시사이 JCM12575(*Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* JCM12575), 콜레토티리쿰 코코데스(*Colletotrichum cocodes*), 콜레토티리쿰 그로에오스포리오이데스(*Colletotrichum gloeosporioides*), 콜레토티리쿰 오비쿨레어(*Colletotrichum orbiculare*), 및 실린드로카르폰 데스트릭탄스(*Cylindrocarpon destructans*) 중에서 선택되는 것을 특징으로 하는 바실러스 아밀로리퀴파시엔스 GYL4.

청구항 3

바실러스 아밀로리퀴파시엔스 GYL4(*Bacillus amyloliquefaciens* GYL4, 수탁번호: KACC91655P)의 균체, 포자, 이들의 혼합물 또는 상기 균주의 배양액을 부탄올로 추출하는 단계; 및

상기 부탄올 추출물로부터 바실로마이신 D1을 분리 및 정제하는 단계를 포함하는 식물병원성 진균에 항균 활성을 갖는 항생물질 제조방법.

청구항 4

식물병원성 진균에 항균 활성을 갖는 바실러스 아밀로리퀴파시엔스 GYL4(*Bacillus amyloliquefaciens* GYL4, 수탁번호: KACC91655P)의 균체, 포자, 이들의 혼합물 또는 상기 균주의 배양액을 포함하는 식물병원성 진균 방제용 조성물.

청구항 5

바실로마이신 D1을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 콜레토티리쿰 오비쿨레어(*Colletotrichum orbiculare*)에 의한 오이 탄저병 방제용 조성물.

청구항 6

제1항의 바실러스 아밀로리퀴파시엔스 GYL4의 균체, 포자, 이들의 혼합물 또는 상기 균주의 배양액을 식물체 또는 토양에 처리하는 단계를 포함하는 식물병원성 진균의 방제방법.

명세서

기술분야

[0001]

본 발명은 식물병원성 진균에 항균 활성을 갖는 바실러스 아밀로리퀴파시엔스 GYL4 및 이를 이용한 항생물질의 제조방법에 관한 것이다. 더욱 상세하게, 본 발명은 토마토 시들음병균, 오이, 고추 탄저병균 등의 식물병원성 진균에 대해 항균활성이 우수한 바실로마이신을 생성, 분비하여 항균 활성을 가지는 바실러스 아밀로리퀴파시엔스 GYL4 균주 및 이 균주로부터 생산되는 항생물질의 제조방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002]

각종 식물병원균으로 인해 발생하는 식물병은 작물의 수확량을 감소시킬 뿐만 아니라 품질에도 나쁜 영향을 끼쳐 경제적으로 큰 손실을 가져올 수 있다. 이러한 식물병을 해결하기 위한 방안으로 현재까지 유기합성농약을 사용해 왔다. 유기합성농약의 사용은 농업생산성이 증가하고 인류를 기아로부터 해방시키는 등 큰 기여를 해왔

다. 그러나 유기합성농약의 긍정적인 측면보다는 농약의 오남용 및 잔류에 따른 인축 독성 및 환경오염 등의 문제가 크게 대두하고 있다. 따라서, 인축에 대한 독성이 거의 없고 환경친화적이어서 상기 유기합성농약을 대체할 수 있는 방법의 하나로 길항미생물을 이용한 식물방제법의 개발이 필요하다.

- [0003] 일반적으로, 오이 탄저병(Anthracnose)은 전국 오이 재배 지역에 발생하여 많은 피해를 주고 있는 대표적인 토양전염병해로서 이를 구체적으로 설명하면 다음과 같다.
- [0004] 식물 탄저병원균인 콜레토틱리쿰(*Colletotrichum*)은 불완전 균에 속하는 균으로 알려져 있었으나 최근 완전 세대가 *Glomellera* spp.로 밝혀진 식물병원균이다. 탄저병원균은 다양한 식물에서 병을 일으키는 일반적인 식물병원성 진균으로 오이, 수박, 고추, 딸기 등의 과채류와 같은 경제적으로 중요한 작물에 탄저병을 일으키는 대표적인 다범성 병원균이다.
- [0005] 여러 작물 중 오이는 대부분 시설재배를 하고 있고 한정된 재배지역에 매년 같은 작물을 연속하게 되므로 식물병원균의 피해를 많이 입는다. 이중에서도 오이에서 중요한 문제시 되는 병해증의 하나인 콜레토틱리쿰 오비클레어(*Colletotrichum orbiculare*)는 병반 위에 분생포자를 형성하고 형성된 포자가 비에 의해 비산되고 다른 오이의 잎에 도달한다. 분생포자가 발생하면 발아관의 끝에 보통 1개의 암갈색 부착기를 형성하여 표피를 뚫고 침입한다. 침입된 부착기는 조직 내에서 군사가 확대되어 영양분을 흡수하여 조직이 괴사되고 그 부분은 병반이 된다. 병원균은 주로 군사, 분생포자형으로 피해부위에 부착 또는 지주 등에 부착되어 월동하고 다음해 전염원이 된다. 오이 탄저병은 주로 잎, 줄기, 과일에 발생하는데 자엽에서 황백색의 원형 병반이 만들어지고 이후에 병반 위에는 선홍색의 점질물(분생포자)을 생성한다. 잎에는 초기에 작은 황색의 원형병반이 생기고 후에 확대되어 원형이 되고 주변은 갈색, 내부는 담색, 중심윤문형의 병반이 형성된다. 엽의 병반은 여러 차례 찢어져 구멍이 된다. 줄기는 황갈색으로 세로로 긴 병반이 생성되며 그 위에 작은 도톨도톨한 알맹이가 생긴다. 과일에도 초기에는 황색의 반점이 생성되고 후기에는 회색 또는 갈색의 움푹 들어간 병반이 되고, 선홍색의 점질물이 생긴다. 6-9월경 노지재배에 발생하며 하우스에도 발생이 많다. 습기가 많고 배수가 불량한 밭에 재배시 발생이 많으며, 질소질 비료의 과다시비에도 발병이 된다.
- [0006] 오이 탄저병을 예방하기 위해 건전한 종자를 파종하고, 무병묘를 이식한다. 또한 파종전 종자를 소독하여 파종하며, 탄저병에 잘 걸리는 않는 품종을 선택하여 재배한다. 탄저병의 발생초기에 고시약제를 살포한다.
- [0007] 탄저병의 방제는 주로 합성 화학 살균제에 의존하고 있으나, 유기합성 살균제로 인한 생태계 파괴, 환경오염 및 인축 독성 문제가 있고 동시에 약제 저항성 발생으로 방제 효과가 낮아지고 있다는 문제점이 있다. 이러한 화학 살균제의 문제점을 보완, 해결할 수 있는 방법의 하나로 오이 탄저병에 대한 길항 미생물을 이용한 생물학적 방제가 좋은 대안이라 할 수 있다.
- [0008] 토양 근권에 존재하는 길항미생물은 다양한 2차 대사 산물을 생산하고, 특히 바실러스 속의 세균은 불리한 환경에서 저항성인 내생포자를 형성하는 특징을 가지고 있어 제제화하기에 유리한 점이 많고 비교적 안전하여 생물적 방제로 많이 이용되고 있다. 하지만 도입된 길항미생물을 실제 포장에 사용하였을 때, 처리한 미생물이 식물의 뿌리에 정착하는 효율이 낮고 보호효과도 감소하여 식물병 방제에 어려움이 있다.
- [0009] 이러한 단점을 보완하는 식물내생세균은 생물적 방제제로서 효과적이다. 식물내생세균은 식물체에는 실질적인 해를 주지 않으면서 식물체 내에 거주하며 여러 가지 이점을 제공하는 세균이다. 대표적인 세균에는 슈도모나스, 바실러스, 엔테로박터 및 아그로박테리움 등이 있다.
- [0010] 식물내생세균은 연구 초기에는 병원성이 약한 식물병원균으로 생각되었지만 최근에는 기주식물 상에 식물병원균과 해충에 대한 저항성을 증가시킬 뿐만 아니라 식물생장 촉진, 식물의 내한성 증진, 식물의 정착력 증진, 식물의 채식동물에 대한 방어능력 증진 등의 기능을 하는 것으로 알려져 있다. 또한 다양한 구조와 약리 활성을 지닌 이차대사물질을 생산하며 이러한 물질은 바이오스피어(생물권)에서 쉽게 분해가 잘 된다고 보고 되어 있다(Tanaka and Omura, 1993). 그러므로, 식물 내생 미생물 유래 2차 대사산물은 가능성 있는 살균제의 원천으로서 중요하다.
- [0011] 바실러스 속의 세균은 대부분은 항생물질의 작용에 의해 병원균을 억제한다. 바실러스에서 생산하는 항곰팡이성 항생물질은 마이코섭틸린(mycosubtilin), 유마이신(eumycin), 바실로마이신(bacillomycin), 서팩틴(surfactin)

및 이투린 계열(iturin series)과 같은 싸이클릭 펩타이드(cyclic polypeptide)와 zwittermicin 같은 아미노폴리올(aminopolyol) 물질, 리포프로테인(lipoprotein) 물질 등 약 10여 종류가 알려져 있으며 바실러스 섭틸리스(*Bacillus subtilis*), 바실러스 세레우스(*Bacillus cereus*), 바실러스 폴리믹사(*Bacillus polymixa*) 등이 대표적인 균이다. 이런 바실러스가 생산하는 물질은 항진균 활성 및 항균활성 뿐만 아니라 계면활성제와 항암활성 등의 기능을 가지는 것이 보고 되어 있다(Kim et al., 1997; Bechard et al., 1998).

[0012] 바실로마이신 D(Bacillomycin D)는 싸이클릭 펩티드(cyclic peptide) 그룹의 하나인 이투린 계열에 속하는 물질이며, 바실로마이신 F, L, 바실로펩틴, 마이코셉틸린도 이투린 그룹에 속한다(Peypoux et al., 1981; Peypoux et al., 1984; Peypoux et al., 1985). 바실로마이신은 7개의 α -아미노산(2 Asx, Glx, Tyr, Pro, Ser, Thr)과 한 개의 β -아미노산으로 이루어진 고리 구조이다.

[0013] 발명의 배경이 되는 기술로 선행기술문헌에 기재된 바와 같이, 바실로마이신 D 아날로그는 아플라톡신을 생성하는 아스퍼질러스 플라버스와 다른 여러 식물병원성 병원균에 대하여 *in vitro*상에서 활성이 있다고 보고되어져 있다(비특허문헌 1: Moyne et al., 2001). 또한 broadleaf holly leaf(*Ilex latifolia* Thunb)의 줄기에서 분리한 바실러스 발리스모르티스 *zz185* 는 바실로마이신 D를 생성하고 이 균 배양액의 n-부탄올 추출액은 *in vitro* 상에서 다양한 식물병원성 곰팡이인 푸사리움 그라미네아룸(*Fusarium graminearum*), 알터나리아 알터네이트(*Alternaria alternate*), 라이족토니아 솔라니(*Rhizoctonia solani*), 크리포넥트리아 파라시티카(*Cryphonectria parasitica*), 파이토포소라 캡시사이(*Phytophthora capsici*)의 성장을 억제하였다(비특허문헌 2: Zhao et al., 2010). 또한 푸사리움 그라미네아룸 와알터나리아 알터네이트를 감염시킨 밀 유묘의 병징을 각각 90%, 50% 감소시키며 항진균 활성을 보여주었다.

[0014] 또한, 본 발명의 배경이 되는 기술로는 대한민국 특허공보 제10-0535912호(2005.12.09.)에 기재된 작물의 흰가루병에 방제효과가 뛰어나며, 식물병원성 진균에 광범위한 항균활성을 가지며 담배모자이크바이러스의 감염을 억제하는 신규한 미생물 바실러스 아밀로리퀴페이션스(*Bacillus amyloliquefaciens*) KTGB0202(수탁번호 : KCTC 10564BP)균과 이를 함유하는 친환경적 흰가루병 방제용 균 배양물에 관한 기술 및 대한민국 특허공보 제10-0325634호(2004.12.23)에 기재된 부패병 등 병원성 진균에 대한 항진균활성을 가지는 미생물, 이를 함유하는 항진균성 미생물 농약제 및 그의 제조방법에 관한 기술 등이 있다.

[0015] 하지만, 바실로마이신 D가 분리된 이래로 *in vivo* 상에서 콜레토트리쿰 오비쿨레어 식물병원균 방제 효과에 대한 보고는 없었다.

선행기술문헌

특허문헌

[0016] (특허문헌 0001) 대한민국 특허공보 제10-0535912호(2005.12.09.)
(특허문헌 0002) 대한민국 특허공보 제10-0325634호(2004.12.23)

비특허문헌

[0017] (비특허문헌 0001) Moyne et al., Bacillomycin D: an iturin with antifungal activity against *Aspergillus flavus*, Journal of applied microbiology, 2001.11.21
(비특허문헌 0002) Zhao et al., Study of the antifungal activity of *Bacillus vallismortis* ZZ185 *in vitro* and identification of its antifungal components, Bioresource Technology, 2010.08.29

발명의 내용

해결하려는 과제

[0018] 본 발명은 상기와 같은 종래기술의 문제점 및 요구를 해결하고자 하는 것으로, 그 목적은 방제하기 힘든 콜레토트리쿰 오비쿨레어가 일으키는 오이 탄저병을 포함한 식물병원성 진균에 대한 항균 활성을 가지는 저독성이고

환경에 해가 없는 친환경적인 살균제를 제조할 수 있는 바실러스 아밀로리퀴파시엔스 균주를 제공하고자 하는 것이다.

[0019] 본 발명의 다른 목적은 상기 균주를 이용하여 저독성이고 친환경적인 항생물질을 제조할 수 있는 방법을 제공하는 것이다.

[0020] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 더욱 명확하게 된다.

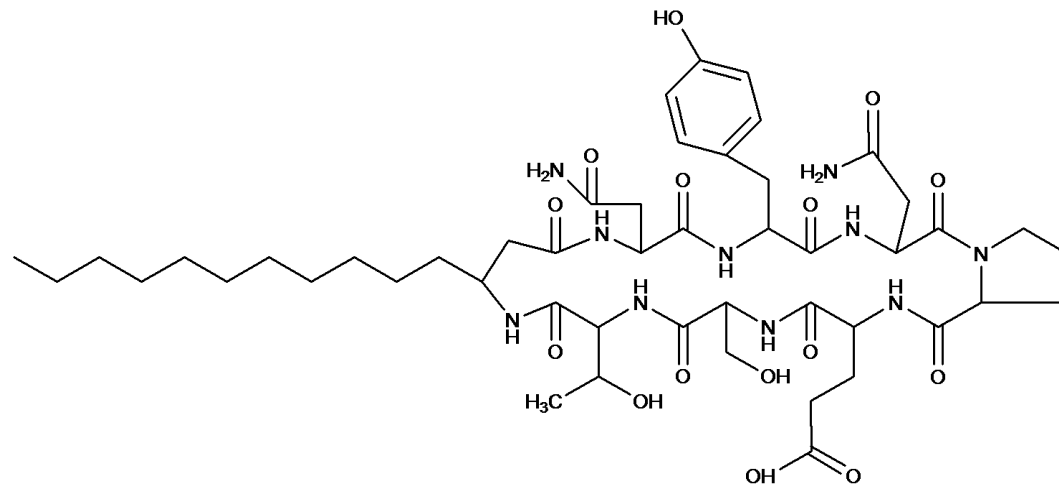
과제의 해결 수단

[0021] 본 발명은 식물병원성 진균에 대해 항균 활성을 갖는 바실러스 아밀로리퀴파시엔스 GYL4(*Bacillus amyloliquefaciens* GYL4, 수탁번호: KACC91655P)를 제공한다.

[0022] 본 발명에 있어서, 상기 식물병원성 진균은 푸자리움 옥시스포룸 f.sp. 라이코펠시사이(*Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*), 푸자리움 옥시스포룸 f.sp. 라이코펠시사이 JCM12575(*Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* JCM12575), 콜레토티리쿰 코코데스(*Colletotrichum cocodes*), 콜레토티리쿰 그로에오스포리오이데스(*Colletotrichum gloeosporioides*), 콜레토티리쿰 오비쿨레어(*Colletotrichum orbiculare*), 및 실린드로카르폰 데스트럭탄스(*Cylindrocarpon destructans*) 중에서 선택되는 것을 특징으로 한다.

[0023] 또한, 본 발명은 바실러스 아밀로리퀴파시엔스 GYL4 균주(*Bacillus amyloliquefaciens* GYL4, 수탁번호: KACC91655P)의 균체, 포자, 이들의 혼합물 또는 상기 균주의 배양액을 부탄올로 추출하는 단계; 및 상기 부탄올 추출물로부터 바실로마이신 D1(화학식 1)을 분리 및 정제하는 단계를 포함하는 식물병원성 진균에 항균 활성을 갖는 항생물질 제조방법을 제공한다.

화학식 1



[0024]

[0025] 본 발명은 식물병원성 진균에 항균 활성을 갖는 바실러스 아밀로리퀴파시엔스 GYL4(*Bacillus amyloliquefaciens* GYL4, 수탁번호: KACC91655P)의 균체, 포자, 이들의 혼합물 또는 상기 균주의 배양액을 포함하는 식물병원성 진균 방제용 조성물을 제공한다.

[0026] 또한, 본 발명은 바실로마이신 D1을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 콜레토티리쿰 오비쿨레어(*Colletotrichum orbiculare*)에 의한 오이 탄저병 방제용 조성물을 제공한다.

[0027] 본 발명은 상기 바실러스 아밀로리퀴파시엔스 GYL4의 균체, 포자, 이들의 혼합물 또는 상기 균주의 배양액을 식물체 또는 토양에 처리하는 단계를 포함하는 식물병원성 진균의 방제방법을 제공한다.

[0028] 이하, 본 발명에 대해 상세하게 설명한다.

[0029] 본 발명의 목적을 달성하기 위해, 본 발명자들은 한국 광양 지역의 토양에 심은 고추 식물로부터 33여 개의 내

생 세균을 분리하여 0.3% TSA 상에서 4가지 식물병원균에 대해 검정한 결과 항균활성이 뛰어난 리포 펩타이드 바실로마이신 D를 생산하는 균주 바실러스 아밀로리퀴파시엔스 GYL4를 선발하여 동정하고, 식물병원 진균에 대한 인비트로 상(*in vitro*)에서의 항균효과와 오이 탄저병에 대한 방제 효과를 온실조건하에서 생물검정한 결과 유의적으로 높은 수준의 항균활성을 확인하여 본 발명을 완성하였다(도 1 및 표 1).

[0030] 본 발명자들은 지속적인 연구를 통해 16S rDNA(서열번호 1) 분석 등을 기초하여 본 발명에 의한 균주를 길항 내생세균 바실로마이신 아밀로리퀴파시엔스 GYL4 균주로 동정하였고, 2011년 6월 15일자로 국립농업과학원 농업유전자원센터에 수탁번호 KACC91655P로 기탁하였다(도 3 및 도 4).

[0031] 상기 균주의 세포 추출물로부터 항균활성을 가진 물질을 순화, 정제하여 화학구조를 밝혔으며(도 5 ~ 도 7), 여러 식물병원성 진균에 대한 인비트로 상에서의 항균효과와 오이 탄저병에 대한 방제 효과를 온실조건하에서 생물검정하였다(도 8). 그 결과 확인된 항생물질인 바실로마이신이 오이 탄저병균, 토마토 시들음병균 뿐만 아니라 다른 여러 식물병원균에 대해서도 유의적으로 높은 수준의 항균활성이 있음을 확인하였다.

[0032] 또한, 본 발명은 바실러스 아밀로리퀴파시엔스 GYL4 균주 (*Bacillus amyloliquefaciens* GYL4, 수탁번호: KACC91655P)의 균체, 포자, 이들의 혼합물 또는 상기 균주의 배양액을 부탄올로 추출하는 단계; 및 상기 부탄올 추출물로부터 바실로마이신 D1을 분리 및 정제하는 단계를 포함하는 식물병원성 진균에 항균 활성을 갖는 항생물질 제조방법을 제공한다. 본 발명에 의한 균주를 이용하여 식물병원성 진균에 항균 활성이 우수한 바실로마이신 D1(화학식 1)을 분리하여 제조할 수 있다. 바실로마이신 D1(화학식 1)의 구체적인 분리 및 정제방법은 도 5에 나타나 있다.

[0033] 상기 제조방법은 바실러스 아밀로리퀴파시엔스 GYL4 균주 (*Bacillus amyloliquefaciens* GYL4, 수탁번호: KACC91655P)를 SCM 배지(starch calcium chloride MOPs medium)에서 배양하는 단계를 더 포함할 수 있다. 본 발명에 의한 균주는 SCM 배지에서 대량 배양되어 항생물질 생산량을 높일 수 있다(도 2).

[0034] 본 발명에서 상기 식물병원성 진균은 푸자리움 옥시스포룸 f.sp. 라이코펠시사이(*Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*), 푸자리움 옥시스포룸 f.sp. 라이코펠시사이 JCM12575(*Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* JCM12575), 콜레토티리쿰 코코데스(*Colletotrichum cocodes*), 콜레토티리쿰 그로에오스포리오이데스(*Colletotrichum gloeosporioides*), 콜레토티리쿰 오비클레어(*Colletotrichum orbiculare*), 및 실린드로카르폰 데스트럭탄스(*Cylindrocarpon destructans*)로 이루어진 그룹에서 선택되는 하나 이상의 병원균임이 바람직하고, 콜레토티리쿰 오비클레어가 가장 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0035] 또한, 본 발명은 식물병원성 진균에 항균 활성을 갖는 바실러스 아밀로리퀴파시엔스 GYL4(*Bacillus amyloliquefaciens* GYL4, 수탁번호: KACC91655P)의 균체, 포자, 이들의 혼합물 또는 상기 균주의 배양액을 포함하는 식물병원성 진균 방제용 조성물을 제공한다. 바실러스 속의 세균은 불리한 환경에서 저항성인 내생포자를 형성하는 특징을 가지고 있어 제제화하기에 유리한 점이 많고 비교적 안전하고 지속적으로 생물적 방제를 할 수 있다.

[0036] 본 발명에 의한 식물병원성 진균 방제용 조성물은 본 발명에 의한 균주의 균체 등을 유효량 함유하고 농화학적으로 허용되는 담체를 포함한다. 본 발명에 의한 조성물은 당업계에 공지된 방식의 미생물 농약 제제화 방식에 따라, 예컨대 배양된 균체의 배양액, 동결건조 균체와 전분, 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 병원균 및 작물에 따라 적용하기 용이한 다른 성분을 부가함으로 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. 항진균성 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.

[0037] 본 발명은 상기 바실로마이신 D1을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 콜레토티리쿰 오비클레어(*Colletotrichum orbiculare*)에 의한 오이 탄저병 방제용 조성물을 제공한다. 본 발명에 의한 조성물에 있어서 상기 바실로마이신 D1은 $1 \sim 500 \mu\text{g mL}^{-1}$ 을 함유하는 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 바실로마이신 D1의 함유량이 $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ 미만이면 방제효과가 낮으며, $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ 를 초과하는 경우 부작용이 있을 수 있으며 살균제 조성물의 생산단가가 높아진다.

[0038] 또한, 본 발명에 의한 바실러스 아밀로리퀴파시엔스 균주의 균체, 포자, 이들의 혼합물 또는 상기 균주의 배양액을 식물체 또는 토양에 처리하여 식물병원성 진균을 친환경적으로 방제할 수 있다.

발명의 효과

[0039] 이상에서 살펴본 바와 같이, 본 발명에 의한 바실러스 아밀로리퀴파시엔스 균주 GYL4은 광범위한 항균력을 가진 내생세균으로, 상기 균주를 이용하여 내생세균 유래의 천연물질인 항균물질 바실로마이신 D1을 제조할 수 있어 상용 살균제인 클로로탈로닐 수준의 방제효과를 가지고 있으면서도 자연환경에서의 미생물에 의한 생분해성이 큰 환경친화적 살균제 조성물을 제공하는 효과가 있고, 방제하기 힘든 공기전염성 병원균이 콜레토티리쿰 오비쿨레어가 일으키는 오이 탄저병 방제 등에 효과가 있어 식물병 방제산업상 유용한 발명인 것이다.

도면의 간단한 설명

[0040] 도 1은 4종류의 식물병원성 진균에 대한 본 발명에 의한 바실러스 아밀로리퀴파시엔스 균주 GYL4의 항균활성을 나타내는 도면이다. A: 모잘록병균 B: 토마토 시들음병균, C: 고추 역병균, D: 오이 탄저병

도 2는 본 발명에 의한 바실러스 아밀로리퀴파시엔스 균주 GYL4의 배지별 조추출물의 오이 탄저병균과 토마토 시들음병균에 대한 저지원 크기를 나타내는 그래프이다.

도 3은 본 발명에 의한 바실러스 아밀로리퀴파시엔스 균주 GYL4의 16S rDNA 염기서열을 보여주는 도면이다.

도 4는 본 발명에 의한 바실러스 아밀로리퀴파시엔스 균주 GYL4의 계통도이다.

도 5는 본 발명에 의한 바실러스 아밀로리퀴파시엔스 균주 GYL4의 균사 추출액에서 바실로마이신 D1을 정제하는 과정을 보인 블록도이다.

도 6은 본 발명에 의한 바실러스 아밀로리퀴파시엔스 균주 GYL4의 ESI-MS와 UV 스펙트럼을 나타낸 것이다.

도 7은 본 발명에 의한 바실러스 아밀로리퀴파시엔스 균주 GYL4의 H-NMR 스펙트럼을 나타낸 것이다.

도 8은 온실조건의 풋트 실험에서 본 발명에 의한 항균물질인 바실로마이신 D1의 오이 탄저병에 대한 방제효과를 상용살균제인 클로로탈로닐과 비교 실험한 결과를 도시한 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0041] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0042] <실시예 1> 바실러스 아밀로리퀴파시엔스 균주의 분리

[0043] 길항 식물내생세균을 선별하기 위하여 고추를 심을 토양을 광양 지역의 표토로부터 20 cm 깊이에서 채취하였다. 채취된 토양을 플라스틱 풋트(18.5cm 직경, 15cm 높이)에 담고 고추종자를 파종하고 온실조건에서 재배하였다. 건전한 고추식물의 이분지기가 시작될 때 샘플링하여 고추의 잎으로부터 GYL4을 분리하였다.

[0044] 보다 구체적으로는 고추 식물을 흐르는 물에 잘 씻고 표면을 건조시킨 후 잎을 0.5g로 자르고 표면 살균하였다. 고추 잎 조각을 차례로 70% 에탄올에 1분, 1% 소듐 하이포클로라이트에 1분, 70% 에탄올에 30초 동안 침지하여 표면을 살균하고 멸균수로 1분간 세번에 걸쳐 세척하였다. 표면살균된 고추 잎조각을 멸균된 막자와 막자사발에서 마쇄한후 120mM 소듐 포스페이트 버퍼 3ml에 혼합하고 회전 진탕기(120 rpm)에서 2시간 동안 진탕하였다. 상기 식물 현탁액을 멸균수로 1:10 (v:v) 비율로 10^{-5} 까지 희석하였다.

[0045] 각각의 희석액 100 μ L를 0.3% TSA배지(tryptic soy agar medium: 3.0g tryptic soy broth, 15g agar, 1 L H₂O; cycloheximide were filter-sterilized)에 접종하고, 접종된 TSA 배지를 28℃ 배양기에서 7일간 균총(colony)이 발생될 때까지 배양시켰다. 상술한 바와 같이하여 발생한 균총을 고추 역병균, 오이 탄저병균, 토마

토 시들음병균 및 모잘록병균에 대한 항균 활성을 시험하였다.

[0046] 이를 위하여 선발된 내생세균을 3% TSA (tryptic soybean agar)의 중앙에 접종하고 (streaking)하고 28℃에서 2일간 배양한 후, 그 배지 중앙으로부터 30mm 떨어진 곳에 식물 병원균인 고추 역병균, 오이 탄저병균 및 모잘록병균의 균사절편 (mycelia disk, 직경 4mm)을 놓고 다시 7일간 배양한 뒤 저지원을 측정하였다.

[0047] 그 결과 오이 탄저병등 식물 병원성 진균의 균사 생장을 강하게 저해하는 것으로 나타났다 (도 1).

[0048] 한편, 상기 선발된 길항 내생세균의 보관방법은 다음과 같다. 일일 사용을 위해서는 3% TSA 배지에 접종하여 사용하였고, 장기보관을 위해서 3% TSB에서 2일간 순수배양하여 40% 그리세롤과 혼합하고 -80℃에서 보관하였다.

[0049] <실시예 2> 길항 내생세균이 생성하는 항생물질의 항균활성 검정과 항생물질 생산을 위한 최적 배지 결정

[0050] 선발된 길항 내생세균이 생성하는 항생물질의 항균활성과 항생물질 생산을 위한 최적 배지를 미리 검정하기 위하여 다음과 같은 방법으로 항생물질 조추출물을 추출하여 제조하였다.

[0051] 조추출물을 추출하는 것은 미생물이 생성하는 항생물질의 완전 순화에는 시간과 비용이 많이 투자되므로 검정 초기 단계에서 항생물질 생산을 위한 최적배지를 결정하고, 과연 이 균주가 생성하는 물질이 실제로 식물상에서 병 방제 효과가 있는지를 검정하기 위한 것이다. 바실러스 아밀로리퀴파시엔스 GYL4가 생성하는 이차 대사산물을 회수하기 위해서는 부탄올을 사용한 유기용매 추출법을 사용한다.

[0052] 상기 길항 내생세균은 진탕 플라스크 배양으로 3% tryptic soy broth (Bacto™), production medium (PM : 30 g glucose, 30 g soybean meal, 5 g pharmamedia, 1 g yeast extract, 3 g CaCO₃, in 1 L distilled water, pH to 8.0), glucose starch molasses medium (GSM : 10 g soluble starch, 20 g glucose, 5 mL molasses, 5 g yeast extract, 5g peptone, 2g CaCO₃ in 1 L distilled water, pH to 7.0), glucose starch soybean meal medium (GSS : 10 g starch, 20 g glucose, 25 g soybean meal, 4 g yeast extract, 1 g beef extract, 2 g NaCl, 0.5 g KH₂PO₄ in 1 L distilled water, pH to 7.0), yeast extract malt extract broth (ISP2 : 10 g malt extract, 4 g glucose, 4 g yeast extract and 1L distilled water pH 7.3)와 starch calcium chloride MOPS medium (SCM : 15 g soluble starch, 20 g soytone(Difco), 0.1 g CaCl₂, 1.5 g yeast extract, 10.5 g MOPS in 1 L distilled water, pH to 7.2)에서 발효시켜, 28℃에서 3일간 배양한 후, 상기 배양액들을 10000g 로 원심분리(centrifuge)하여 가라 앉은 세포는 버리고 상등액에 부탄올을 사용하여 추출하였다. 또한, 상기 유기용매 층은 37℃ 감압 증류기에서 농축한 후, 남아있는 잔류물을 최소량의 메탄올에 용해시켜 4℃에서 보관하였다.

[0053] 이렇게 제조된 길항 내생세균의 항생물질 조추출물들을 가지고 다음과 같은 방법으로 생물학적 검정(bioassay)을 실시하였다. 항생물질 조추출물들의 생물학적 검정은 오이 탄저병균과 토마토 시들음병균이 접종된 PDA(potato dextrose agar: 24g potato dextrose, 0.7% agar and distilled water 1 L) 배지에서 페이퍼디스크법(paperdisk method)을 이용하여 수행한 것으로, 이를 좀 더 구체적으로 설명하면 다음과 같다.

[0054] 오이 탄저병과 토마토 시들음병균의 경우 각각의 100 mL PDA (agar 0.7%) 배지에 오이 탄저병균의 분생포자 현탁액(10^8 conidia mL⁻¹) 1 mL과 토마토 시들음병균의 분생포자 현탁액 (10^8 conidia mL⁻¹)을 각각 혼합하여 생물검정 평판 배지를 만들었다. 그리고 상기 항생물질 조추출물들을 적신 멸균여과지 (filter paper disk, 8mm)을 상온에서 1시간 건조하여 대상 병원진균이 접종된 배지(seeded media)에 올려놓고, 그 평판을 28℃ 배양기에서 24시간 배양한 결과 생성된 저지원의 지름으로 저지원 크기를 평가하였다 (도 2).

[0055] <실시예 3> 16S rDNA 분석을 기초로 한 길항 내생세균 GYL4의 동정

[0056] 동정 방법은 길항 내생세균의 DNA를 추출하고 16s rDNA를 27F(5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3': 서열번호 2), 1492R (5'-GGATACCTTGTTACGACTT-3': 서열번호 3) primer를 이용하여 증폭시켜 blast를 이용하여 염기서열의 상동성을 비교한 결과 16S rDNA 염기서열 (서열번호 1)은 *Bacillus amyloliquefaciens* 균주 C6-1의 염기서열과 100.00% 일치하였다(GeneBank accession number: AB244462)(도 3, 4). 100% 상동성을 보이지만 GeneBank 등록된 C6-1은 곤충인 antlion의 한 종(species)인 *Myrmeleon bore*의 소화기관에서 분리된 균으로 식물과 전혀 다른 분류학적인 개념에 속한 샘플에서 분리된 균이므로 GYL4 균주를 바실러스 아밀로리퀴파시엔스로 신균주로 동

정하였다. 본 발명자들은 이 신균주를 바실러스 아밀로리퀴파시엔스 GYL4으로 명명하여 2011년 6월 15일자로 국립농업과학원 농업유전자원센터에 수탁번호 KACC91655P로 기탁하였다.

[0057] 상기와 같이 GYL4 균주의 16S rDNA 염기서열(서열번호 1)을 분석한 결과, 본 균주는 바실러스 아밀로리퀴파시엔스(*Bacillus amyloliquefaciens*)로 바실러스 속에 속하는 균주임을 알 수 있었다. 보다 정확한 GYL4 균주의 동정을 위하여 국제미생물분류학회지(ISSEM: International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology)에 등록된 타입 스트레인 균주들과 계통수 분석(phylogenetic tree)을 통하여 생물간 유연관계를 알 수 있었다. 계통분석 결과 GYL4 균주는 C6-1 균주와 가장 가까운 유연관계를 보였다(도 4).

[0058] <실시예 4> 항생물질 바실로마이신의 분리 및 정제

[0059] 본 발명자들은 고추식물의 잎, 줄기, 뿌리로부터 약 60여 개의 미생물을 분리하여 3% TSA 배지에서 병방제 효과를 검정한 결과 오이 탄저병에 대하여 항균효과가 뛰어난 균주를 선발하여 항균활성 물질 바실로마이신(bacillomycin)을 분리, 정제하고, 그 구조를 결정하였다.

[0060] 내생세균 균주 바실러스 아밀로리퀴파시엔스 (*Bacillus amyloliquefaciens*) GYL4를 28℃에서 3일간 starch calcium chloride MOPs medium (SCM: 15 g soluble starch, 20 g soytone (bactoTM), 0.1 g CaCl₂, 1.5 g yeast extract, 10.5 g MOPs and 1L distilled water pH 7.2) 에서 배양한 후 원심분리하여 상등액을 부탄올을 이용하여 추출하였다.

[0061] 분리한 추출액은 감압 농축한 후 Diaion[®]

HP-20 크로마토그래피를 행하였다. 각 분획은 물과 메탄올을 일정비율로 섞어 전개 시켰으며, 그 중 활성분획을 모아 C18 크로마토그래피를 실시하였다. 각 분획은 물과 메탄올을 일정비율로 섞어 전개시켰으며, 그중 활성분획을 모아 동결 건조기를 사용하여 건조시킨 후 DMSO(dimethylsulfoxide)로 녹인 후 유속 2 mL min⁻¹, UV 검출기 220nm, 용매 0.1% 포믹엑시드를 포함한 50% 아세톤나이트릴을 이용하는 분취 조건으로, C18 역상 column을 이용한 HPLC 시스템을 통해 항균물질 바실로마이신 D1을 분리 정제 하였다(도 5).

[0062] 분리된 활성물질의 UV 스펙트럼과 분자량(Mass)을 알기 위해 정제된 시료를 용매 MeOH에 녹여 ESI-MS 방법으로 측정하였다(도 6). 또한, 물질의 구조를 알기 위해 핵자기공명(NMR)을 이용하여 H-NMR 스펙트럼(피리딘(C₅H₅N) 용매, Varian 500 NMR 분광기)을 분석하였다(도 7). 상기 분석을 통하여 본 발명에서 분리된 물질의 화학식은 C₄₈H₇₄N₁₀O₁₅이며 분자량이 1030인 이투린(iturin)계 항생물질인 바실로마이신 D1 (bacillomycin D1)임을 확인하였다.

[0063] <실시예 5> 항균물질 바실로마이신의 여러 가지 식물병원성 진균에 대한 억제시험

[0064] 토마토 시들음병균인 푸자리움 옥시스포룸 f.sp. 라이코펠시사이(*Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*)를 비롯하여 오이 탄저병원균 콜레토티리쿰 오비쿨레어(*Colletotrichum orbiculare*), 푸자리움 옥시스포룸 f.sp. 라이코펠시사이 JCM12575(*Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* JCM12575), 알터나리아 브라시콜라(*Alternaria brassicola*), 콜레토티리쿰 코코데스(*Colletotrichum cocodes*), 콜레토티리쿰 그로에오스포리오이데스(*Colletotrichum gloeosporioides*), 실린드로카르폰 데스트럭탄스(*Cylindrocarpon destructans*), 보트라이티스 시네리아(*Botrytis cinere*) 및 파이토포소라 캡시사이(*Phytophthora capsici*) 등의 식물병원 진균들을 2.4% PDA (potato dextrose agar) 배지에서 배양하고 식물병원 세균들을 3% TSA(Tryptic soybean agar)에서 배양했다.

[0065] 상기 실시예 4에서 분리 및 정제한 바실로마이신을 마이크로 웰 플레이트(micro-well plate)에 4 X PDA 또는 4 X TSA 및 멸균수와 섞어 일련의 농도 (1 ~ 100 μg mL⁻¹) 로 담은 후, 각각의 분생포자 및 세균 현탁액을 4 X 10⁶ 개 mL⁻¹의 농도로 맞추어서 각각의 웰 (well)에 넣었다. 접종된 마이크로 웰 플레이트는 28℃에서 1일 내지 3일간 배양한 후, 곰팡이 또는 세균의 생장이 일어나지 않는 농도 중 가장 낮은 농도를 최소억제농도 (minimum inhibitory concentration; MIC)로 평가하였으며, 그 결과는 하기 표 1에 여러 식물병원성 진균에 대한 바실로마이신 D1의 최소억제 농도 (MIC)로 나타났다. 상기 바실로마이신 D1은 알터나리아 브라시콜라 (*Alternaria*

brassicola), 캡시사이 (*Phytophthora capsici*)와 보트라이티스 시네리아(*Botrytis cinere*)를 제외한 식물병원균 대해 높은 수준의 항균활성을 보여주는 것을 확인하였다.

표 1

식물병원 미생물	최소억제 농도($\mu\text{g mL}^{-1}$) ^a
	Bacillomycin D1
<i>Alternaria brassicola</i>	>100
<i>Botrytis cereuse</i>	>100
<i>Colletotrichum cocodes</i>	100
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	50
<i>Colletotrichum orbiculare</i>	25
<i>Cylindrocarpon destructans</i>	100
<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i>	50
<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i> JCM12575	100
<i>Phytophthora capsici</i>	>100

<실시예 6> 온실조건의 오이 유묘에서 바실로마이신 D1과 오이 탄저병 방제용 살균제인 클로로탈로닐의 방제효과 비교

온실조건하에서 오이 유묘에서의 오이 탄저병에 대한 바실로마이신 D1과 농용살균제인 클로로탈로닐과의 방제효과를 비교하기 위하여, 바실로마이신 D1과 클로로탈로닐을 오이 탄저병균을 접종한 후 농도별로 5 mL씩 처리하여 각 처리구와 약제 처리를 하지 않은 무처리구에서의 병피해도를 평가하였다. 병피해도는 오이에 병반이 나타나는 면적을 평가하여 비교하였다.

보다 구체적으로 살펴보면, 오이 식물에서 오이탄저병균의 감염에 대한 길항 내생세균 GYL4 균주가 생성하는 항진균 활성물질인 바실로마이신 D1의 병 발생 억제 효과는 다음과 같이 평가하였다.

먼저, 오이 탄저병에 이병성 품종인 오이 종자 (품종: 춘심)를 고압 증기 멸균한 혼합토양(peat moss, perlite, and vermiculite, 5:3:2. v/v/v)이 담긴 36-플라스틱 포트에 파종하였다. 2엽기까지 자란 유묘(seedling)의 바실로마이신 D1과 클로로탈로닐을 농도별 희석하여 오이의 잎에 분사하였다. 약제를 처리하고 24시간이 지난후 오이 탄저병균의 분생포자 현탁액(5×10^5 개)을 유묘의 잎에 분사하였다. 식물병원균이 처리된 오이 유묘는 하루동안 습식처리하였다. 그 후, 병피해도 (disease severity)는 오이 탄저병균을 접종한 후 7일 후에 바실로마이신 D1을 처리한 오이유묘의 잎에 나타난 병징을 보고 병반의 면적을 계산하여 병반 면적비로 피해율을 나타내었으며 실험은 3반복 실시하였다.

실험 결과, 살균제와 바실로마이신을 처리하지 않은 무처리구에서는 오이 유묘의 잎에 탄저병원균의 황색의 원형 병반이 나타났으나, 살균제와 바실로마이신을 $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ 와 $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ 으로 처리한 유묘의 경우 갈수록 병반의 면적이 감소하였다. $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ 처리한 오이 식물에서 병반이 거의 나타나지 않았으며 그 이상의 농도에서는 뚜렷한 병징이 관찰되지 않았다

이상과 같은 시험결과를 볼 때, 본 발명에 사용되는 바실로마이신은 상용 살균제인 클로로탈로닐과 비교하여 오이 탄저병 방제효과의 면에서 차이를 보이지 않았다. 따라서 바실로마이신 D1은 오이 탄저병 방제용 약제로서 탁월한 효과를 가지고 있음을 확인할 수 있었다.

이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였으나, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따

라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 균등물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

수탁번호

[0074]

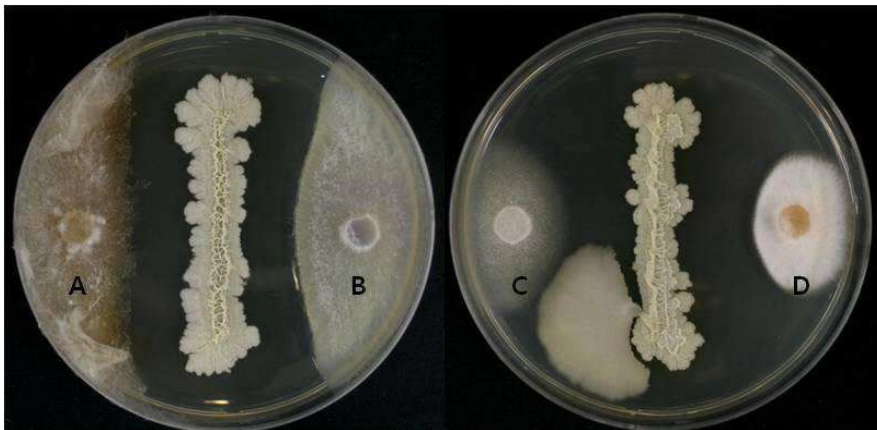
기탁기관명 : 농업생명공학연구원

수탁번호 : KACC91655P

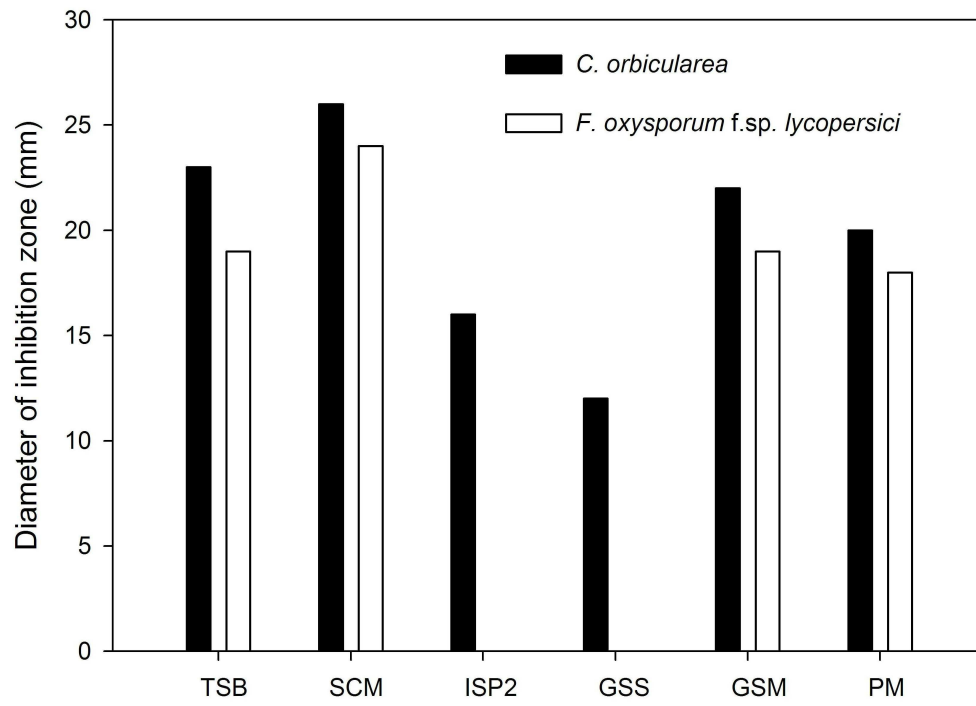
수탁일자 : 20110615

도면

도면1



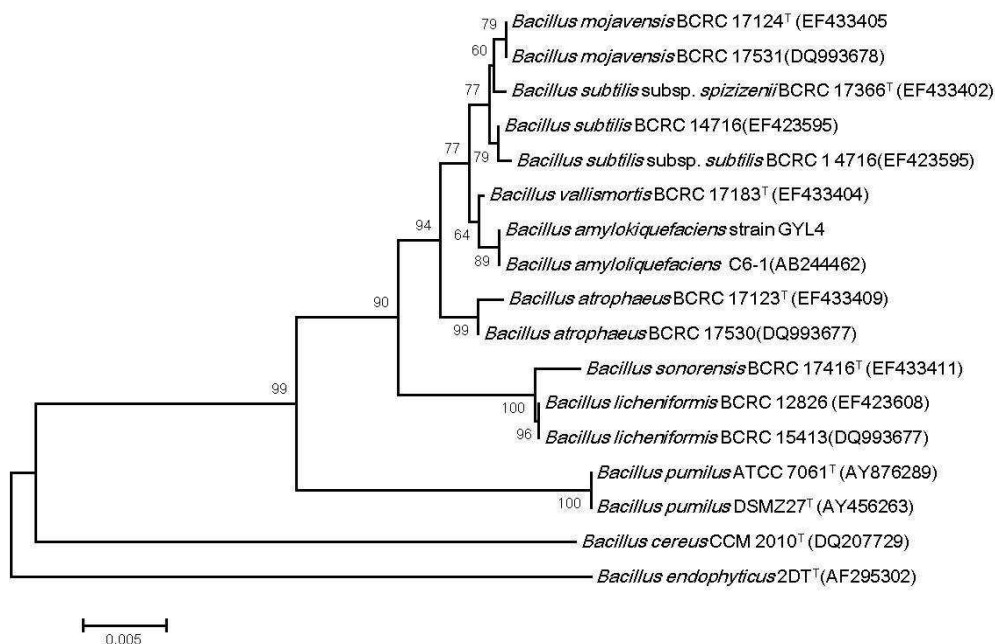
도면2



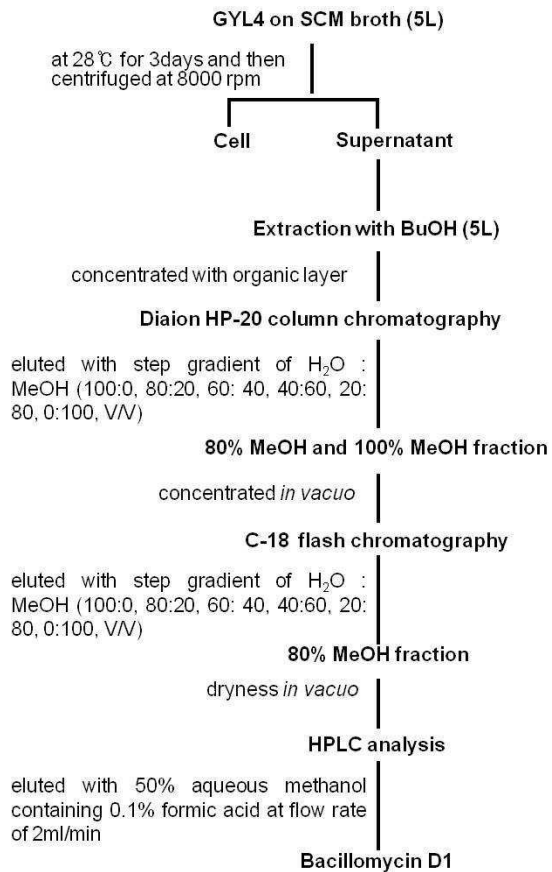
도면3

1 aaaaggttac ctcaccgact tcgggtgtta caaactctcg tgggtgacg ggcgggtgtg
 61 acaaggcccc ggaacgtatt caccgcggca tgctgatccg cgattactag cgattccagc
 121 ttcacgcagt cgagttgcag actgcgatcc gaactgagaa cagatttggt ggattggctt
 181 aacctgcggg ttctgctgcc cttgttctg tccattgtag cacgtgtgta gccaggtca
 241 taaggggcat gatgatttga cgtcatcccc acctctctcc ggtttgtcac cggcagtcac
 301 cttagagtgc ccaactgaat gctggcaact aagatcaagg gttgcgctcg ttgcgggact
 361 taaccaaca tctcacgaca cgagctgacg acaaccatgc accacgtgc actctgcccc
 421 cgaaggggag gtcctatctc taggattgtc agaggatgtc aagacctggt aaggtttctc
 481 gcgttgcttc gaattaaacc acatgctcca ccgcttggtc gggccccgt caattcctt
 541 gagtttcagt cttgcgaccg tactccccag gcggagtgtc taatgcgtta gctgcagcac
 601 taaggggagg aaaccccta acacttagca ctcatcgttt acggcgtgga ctaccagggt
 661 atctaactct gttcgtccc cagcgttctg ctctcagcg tcagttacag accagagagt
 721 cgcctctgcc actggtgttc ctccacatct ctacgcattt caccgtaca cgtggaattc
 781 cactctctc ttctgactc aagtccccca gtttcaatg acctccccg gttgagccgg
 841 gggctttcac atcagactta agaaaccgcc tgcgagccct ttacgcccc taattccgga
 901 caacgctgc cactacgta ttaccgcggc tgcgtgcacg tagttagccg tggtttctg
 961 gttaggtagc gtcaagggtc cgcctattt gaacggcact tgttcttccc taacaacaga
 1021 gctttacgat ccgaaaacct tcatcactca cgcggcgttg ctccgtcaga ctttctcca
 1081 ttgcggaaga ttccctactg ctgcctcccg taggagtctg ggccgtgtct cagtcccagt
 1141 gtgcccgatc acctctcag gtcggtacg catcgttgcc ttggtgagcc gttacctcac
 1201 caactagcta atgcgcccgc ggtccatctg taagtgttag ccgaagccac ctttatgtc
 1261 tgaacctgc ggttcaaaca accatccggt attagcccc gtttccgga gttatccag
 1321 tcttacaggc aggttaccca cgtgttactc acctgtccgc cgtaacatc agggagcaag
 1381 ctcccatctg tccgctcgac

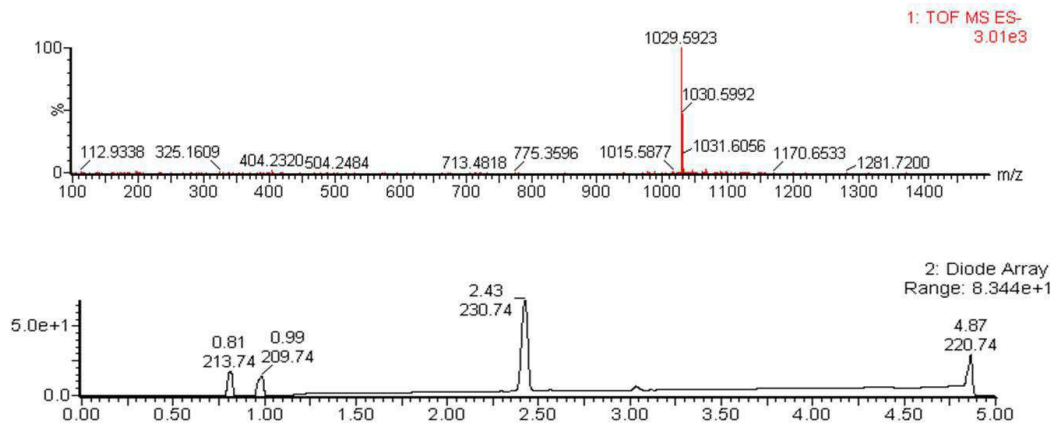
도면4



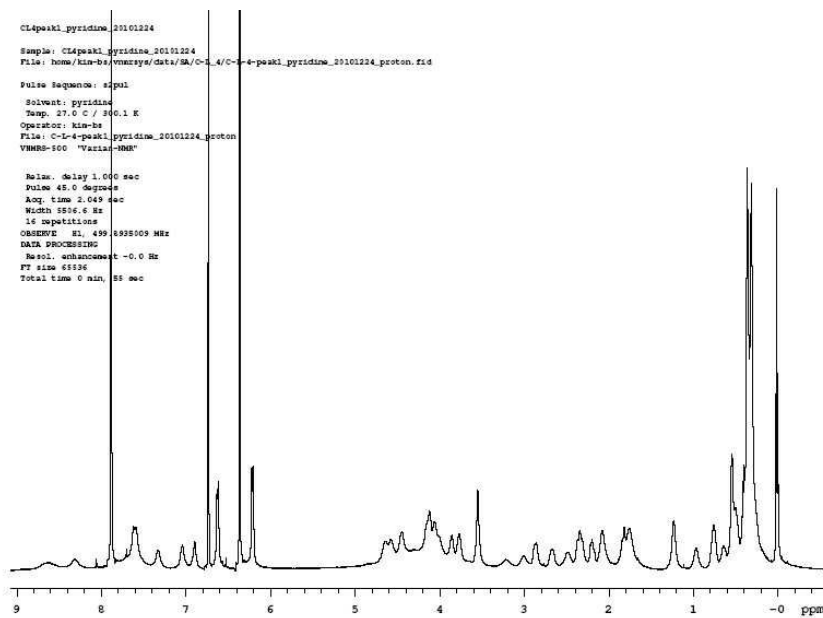
도면5



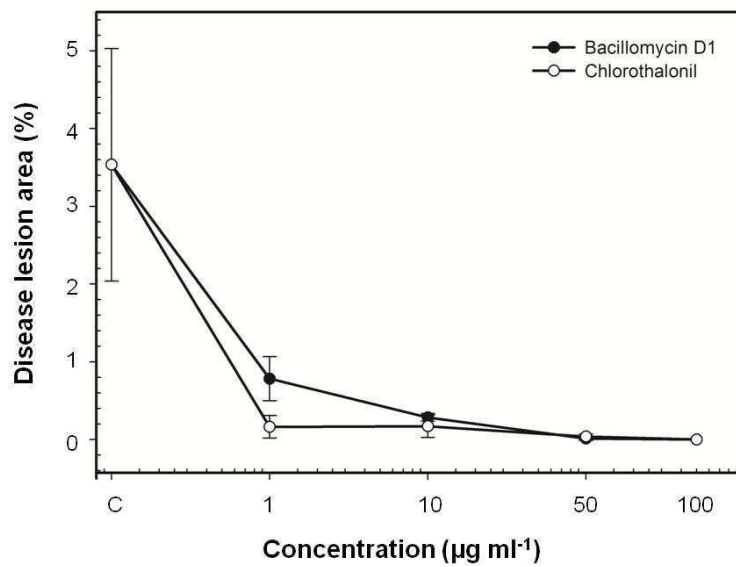
도면6



도면7



도면8



서열 목록

- <110> KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION
- <120> Bacillus amyloliquefaciens GYL4 effective against plant pathogenic fungi and method for preparing antibiotics using the same
- <130> P11-110609-02
- <160> 3

<170>	Kopatent In 1.71	
<210>	1	
<211>	1400	
<212>	DNA	
<213>	Bacillus amyloliquefaciens GYL4	
<400>	1	
AAAAGGTTAC CTCACCGACT TCGGGTGTTA CAAACTCTCG TGGTGTGACG GCGGGTGTGT		60
ACAAGGCCCC GGAACGTATT CACCGCGGCA TGCTGATCCG CGATTACTAG CGATTCCAGC		120
TTCACGCAGT CGAGTTGCAG ACTGCGATCC GAACTGAGAA CAGATTTGTG GGATTGGCTT		180
AACCTCGCGG TTTCGCTGCC CTTTGTTCCTG TCCATTGTAG CACGTGTGTA GCCCAGGTCA		240
TAAGGGGCAT GATGATTGA CGTCATCCCC ACCTTCCTCC GGTTTGTAC CCGCAGTCAC		300
CTTAGAGTGC CCAACTGAAT GCTGGCAACT AAGATCAAGG GTTGCCTCG TTGCGGGACT		360
TAACCAACA TCTCAGACA CGAGCTGACG ACAACCATGC ACCACCTGTC ACTCTGCCCC		420
CGAAGGGGAC GTCCTATCTC TAGGAATGTC AGAGGATGTC AAGACCTGGT AAGGTTCTTC		480
GCGTTGCTTC GAATTAAACC ACATGCTCCA CCGCTTGTGC GGGCCCCCGT CAATTCCTTT		540
GAGTTTCAGT CTTGCGACCG TACTCCCCAG GCGGAGTGCT TAATGCGTTA GCTGCAGCAC		600
TAAGGGGCGG AAACCCCTA ACACTTAGCA CTCATCGTTT ACGGCGTGGA CTACCAGGGT		660
ATCTAATCCT GTTCGCTCCC CACGCTTTCG CTCCTCAGCG TCAGTTACAG ACCAGAGAGT		720
CGCCTTCGCC ACTGGTGTTC TCACACATCT CTACGCATTT CACCGCTACA CGTGGAATTC		780
CACTCTCCTC TTCTGCACTC AAGTTCCCCA GTTTCCAATG ACCCTCCCCG GTTGAGCCGG		840
GGGCTTTCAC ATCAGACTTA AGAAACCGCC TCGGAGCCCT TTACGCCCAA TAATTCCGGA		900
CAACGCTTGC CACCTACGTA TTACCGCGGC TGCTGGCACG TAGTTAGCCG TGGCTTCTG		960
GTTAGGTACC GTCAAGGTGC CGCCCTATTT GAACGGCACT TGTTCTTCCC TAACAACAGA		1020
GCTTTACGAT CCGAAAACCT TCATCACTCA CGCGGCGTTG CTCCGTCAGA CTTTCGTCCA		1080
TTGCGGAAGA TTCCCTACTG CTGCCTCCCG TAGGAGTCTG GGCCGTGTCT CAGTCCCAGT		1140
GTGGCCGATC ACCCTCTCAG GTCGGCTACG CATCGTTGCC TTGGTGAGCC GTTACCTCAC		1200
CAACTAGCTA ATGCGCCGCG GGTCCATCTG TAAGTGGTAG CCGAAGCCAC CTTTTATGTC		1260
TGAACCATGC GGTTCAAACA ACCATCCGGT ATTAGCCCCG GTTTCCCGGA GTTATCCCAG		1320
TCTTACAGGC AGGTTACCCA CGTGTTACTC ACCCGTCCGC CGCTAACATC AGGGAGCAAG		1380
CTCCCATCTG TCCGCTCGAC		1400
<210>	2	

<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	PCR PRIMER	
<400>	2	
agagtttgat catggctcag		20
<210>	3	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	PCR PRIMER	
<400>	3	
ggataccttg ttacgactt		19