(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0075965
(43) 공개일자 2017년07월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A01N 63/02 (2017.01) *C12N 1/16* (2006.01)
C12N 1/20 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A01N 63/02 (2013.01)
C12N 1/16 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0185591
(22) 출원일자 2015년12월24일
심사청구일자 2015년12월24일

(71) 출원인
(주)농예가
충청남도 논산시 연무읍 감바위로 56
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
박기웅
대전광역시 유성구 엑스포로 448, 204동 1202호 (엑스포아파트)
원옥재
대전광역시 대덕구 비래동로 44, 103동 403호 (비래동, 금성백조아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
최규환

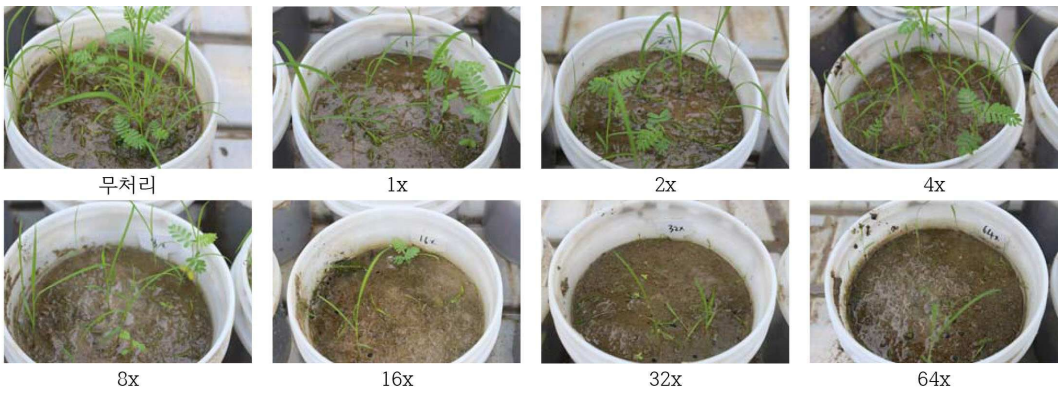
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 **락토바실러스 속 균주 및 효모 균주로 이루어진 혼합 균주를 이용하여 잡초의 종자 발아를 억제하는 방법**

(57) 요 약

본 발명은 락토바실러스 속 균주 및 효모 균주로 이루어진 혼합 균주를 이용하여 잡초의 종자 발아를 억제하는 방법에 관한 것으로, 본 발명에서는 특정 농도의 락토바실러스 속(*Lactobacillus* sp.) 균주 및 효모 균주로 이루어진 혼합 균주 배양액이 잡초 종자의 발아를 억제함으로써 잡초의 제초 효과가 우수한 점을 확인하였다. 따라서, 본 발명의 혼합 균주를 유효성분으로 함유하는 제초제는 친환경형 생물농약제로 널리 유용하게 사용될 수 있을 것이다.

대 표 도 - 도6



(52) CPC특허분류
C12N 1/20 (2013.01)
(72) 발명자
조재철
대전광역시 유성구 장대로71번길 34, 103동 904호 (장대푸르지오아파트)
염영호
대전광역시 유성구 엑스포로 448, 102동 306호 (엑스포아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2015-0830-07
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 [LINC]산학공동기술개발사업
연구과제명 혼합 미생물 균주의 잡초 종자 발아 억제 효과
기 여 율 1/1
주관기관 충남대학교
연구기간 2015.06.01 ~ 2015.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

락토바실러스 속(*Lactobacillus* sp.) 균주 및 효모 균주로 이루어진 잡초의 종자 발아 억제용 혼합 균주를 토양 1ha 기준으로 각각 $1\sim5\times10^{11}$cfu 및 $1\sim5\times10^{9}$cfu가 되게 토양에 처리하는 단계를 포함하는 잡초의 종자 발아를 억제하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 락토바실러스 속 균주는 락토바실러스 파라카제이 아종 톨러란스 LPC63(*Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans* LPC63) 균주(KCTC 12713BP) 및 락토바실러스 부크네리 LBN62(*Lactobacillus buchneri* LBN62) 균주(KCTC 12712BP)이고, 상기 효모 균주는 피치아 쿠드리아브제비 PKD-51(*Pichia kudriavzevii* PKD-51) 균주(KCTC 12714BP) 및 지고사카로마이세스 바일리 ZBA-22(*Zygosaccharomyces bailii* ZBA-22) 균주(KCTC 12716BP)인 것을 특징으로 하는 잡초의 종자 발아를 억제하는 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 잡초는 화본과 잡초 또는 광엽 잡초인 것을 특징으로 하는 잡초의 종자 발아를 억제하는 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 잡초는 피, 자귀풀, 올챙이고랭이, 여뀌바늘, 물달개비, 바랭이, 털비름, 개망초 또는 어저귀인 것을 특징으로 하는 잡초의 종자 발아를 억제하는 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 토양은 담수 토양인 것을 특징으로 하는 잡초의 종자 발아를 억제하는 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 락토바실러스 속 균주 및 효모 균주로 이루어진 혼합 균주를 이용하여 잡초의 종자 발아를 억제하는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 농업 생태계에서 잡초 종은 대단히 종류가 많고 그 피해는 막대하다. 잡초는 작물의 생장에 필수적인 수분, 영양분, 그리고 태양광선을 작물과 경쟁함으로써 작물의 질과 수량을 저하시켜 작물생산성을 떨어뜨리는 중요한 제한요인이 되고 있다. 현재 잡초방제를 위하여 여러 종류의 유기합성 제초제가 사용되고 있음에도 불구하고 잡초에 의한 작물의 생산 손실은 여전히 많은데, 이는 제초제의 지속적 사용에 따른 잡초군락의 생태학적 변화와 제초제에 대한 내성이 유발될 수 있기 때문이다. 지금까지 잡초방제를 위해 유기합성 제초제 즉 발아억제제 또는 경엽처리제의 다량 사용에 따른 환경오염 및 인축독성 문제가 매우 심각하므로 저독성이고 환경에 친화적인 새로운 미생물 제초제의 개발이 요구되어왔다.

[0003] 이러한 미생물 제초제는 기존의 합성제초제를 대체할 수 있는 자연친화적인 방제법으로 받아들여지고 있으며, 최근에는 잡초방제를 위해 미생물 유래의 식물독소(phytotoxins)를 응용한 연구가 많이 이루어지고 있다.

[0004] 한편, 한국공개특허 제2004-0034764호에서는 신균주 스트렙토마이세스 속 8E12 및 이를 이용한 제초제가 개시되어 있고, 한국공개특허 제2009-0005917호에서는 종자 발아 억제 조성물 및 그 생산방법이 개시되어 있으나, 본 발명에서와 같이, '락토바실러스 속 균주 및 효모 균주로 이루어진 혼합 균주를 이용하여 잡초의 종자 발아를 억제하는 방법'에 대해서는 밝혀진 바가 전혀 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명자는 식물에 처리하는 미생물 영양제를 식물 종자에 처리한 결과, 발아가 억제되는 것을 확인한 후, 상기 미생물 영양제로부터 4종의 락토바실러스 속 균주와 4종의 효모를 순수분리하였다. 이 균주들 중, 락토바실러스 파라카제이 아종 톨러란스 LPC63(*Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans* LPC63) 균주(KCTC 12713BP) 및 락토바실러스 부크네리 LBN62(*Lactobacillus buchneri* LBN62) 균주(KCTC 12712BP)인 2종 유산균과 피치아 쿠드리아브제비 PKD-51(*Pichia kudriavzevii* PKD-51) 균주(KCTC 12714BP) 및 지고사카로마이세스 바일리 ZBA-22(*Zygosaccharomyces bailii* ZBA-22) 균주(KCTC 12716BP)인 2종 효모균이 토양 1ha 기준으로 각각 3×10^{11}cfu 및 3×10^{9}cfu가 되도록 처리한 결과 각 잡초 종자의 발아가 억제되는 것을 확인하였고, 특히 담수 조건에서 잡초 종자의 발아가 현저히 억제되는 것을 확인하였다. 이를 통해, 본 발명의 혼합 균주는 잡초 종자의 발아를 억제하여 제초제로 매우 효과적으로 사용될 수 있는 점을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0006] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 락토바실러스 속(*Lactobacillus* sp.) 균주 및 효모 균주로 이루어진 잡초의 종자 발아 억제용 혼합 균주를 토양 1ha 기준으로 각각 $1\sim5\times10^{11}$cfu 및 $1\sim5\times10^{9}$cfu가 되게 토양에 처리하는 단계를 포함하는 잡초의 종자 발아를 억제하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0007] 본 발명에서는 특정 농도의 락토바실러스 속(*Lactobacillus* sp.) 균주 및 효모 균주로 이루어진 혼합 균주 배양액이 잡초 종자의 발아를 억제함으로써 잡초의 제초 효과가 우수한 점을 확인하였다. 따라서, 본 발명의 혼합 균주를 유효성분으로 함유하는 제초제는 친환경형 생물농약제로 널리 유용하게 사용될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

[0008] 도 1은 DAG-A 처리 1주일 후 피 잡초 종자의 발아모습을 나타낸다(왼쪽의 무처리는 DAG-A 무처리, 오른쪽의 25는 DAG-A 배양액을 1/4 희석하여 처리).

도 2는 DAG-B 처리 1주일 후 바랭이 잡초 종자의 발아모습을 나타낸다(왼쪽의 무처리는 DAG-B 무처리, 오른쪽의 12.5는 DAG-B 배양액을 1/8 희석하여 처리).

도 3은 DAG-A 처리 1주일 후 털비름 잡초 종자의 발아모습을 나타낸다(왼쪽의 무처리는 DAG-A 무처리, 오른쪽의 12.5는 DAG-A 배양액을 1/8 희석하여 처리).

도 4는 DAG-A 처리 1주일 후 개망초 잡초 종자의 발아모습을 나타낸다(왼쪽의 무처리는 DAG-A 무처리, 오른쪽의 12.5는 DAG-A 배양액을 1/8 희석하여 처리).

도 5는 DAG-A 처리 1주일 후 어저귀 잡초 종자의 발아모습을 나타낸다(왼쪽의 무처리는 DAG-A 무처리, 오른쪽의 3.13은 DAG-A 배양액을 1/32 희석하여 처리).

도 6은 본 발명에서 제조한 4종 혼합균주의 처리농도에 따른 논포장 조건에서 잡초종별 발아 억제를 분석한 결과이다.

도 7은 본 발명에서 제조한 4종 혼합균주 처리 후 담수유무에 따른 논포장 조건에서 잡초종별 발아 억제를 분석한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0009] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 락토바실러스 속(*Lactobacillus* sp.) 균주 및 효모 균주로 이루어진 잡초의 종자 발아 억제용 혼합 균주를 토양 1ha 기준으로 각각 $1\sim5\times10^{11}$cfu 및 $1\sim5\times10^{9}$cfu가 되게 토양에 처리하는 단계를 포함하는 잡초의 종자 발아를 억제하는 방법을 제공한다.

[0010] 본 발명의 일 구현 예에 따른 방법에서, 상기 락토바실러스 속(*Lactobacillus* sp.) 균주 및 효모 균주로 이루어

진 잡초의 종자 발아 억제용 혼합 균주는 가장 바람직하게는 토양 1ha 기준으로 각각 3×10^{11}cfu 및 3×10^{9}cfu가 되게 토양에 처리할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0011] 본 발명의 상기 락토바실러스 속(*Lactobacillus* sp.) 균주 및 효모 균주로 이루어진 잡초의 종자 발아 억제용 혼합 균주를 토양에 처리하는 방법으로는 구체적으로 토양 1ha 기준으로 10^{6}cfu/㎖의 락토바실러스 속(*Lactobacillus* sp.) 균주 배양액 5000㎖과 10^{4}cfu/㎖의 효모 균주 배양액 5000㎖을 혼합하여 제조된 1X 혼합균주 배양액 10000㎖을 60배의 양(60×10000㎖)으로 토양에 살포하여 결과적으로 토양 1ha 기준으로 최종 균주 수가 3×10^{11}cfu 및 3×10^{9}cfu가 되게 살포하는 것이다. 상기 균주량이 되도록 처리하기 위해서 배양액의 균주 농도 및 그에 따라 처리하는 배양액의 양은 조절이 가능하다.

[0012] 본 발명의 일 구현 예에 따른 방법에서, 상기 락토바실러스 속 균주는 락토바실러스 파라카제이 아종 톨러란스 LPC63(*Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans* LPC63) 균주(KCTC 12713BP) 및 락토바실러스 부크네리 LBN62(*Lactobacillus buchneri* LBN62) 균주(KCTC 12712BP)이고, 상기 효모 균주는 피치아 쿠드리아브제비 PKD-51(*Pichia kudriavzevii* PKD-51) 균주(KCTC 12714BP) 및 지고사카로마이세스 바일리 ZBA-22(*Zygosaccharomyces bailii* ZBA-22) 균주(KCTC 12716BP)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0013] 상기 2종의 락토바실러스 속 균주와 2종의 효모 균주는 2014년 11월 13일자로 한국생명공학연구원에 각각 기탁하였다. 기탁 번호는 각 균주명 뒤에 괄호 안에 표기한 바와 같다.

[0014] 본 발명의 일 구현 예에 따른 방법에서, 상기 잡초는 일년생의 잡초로, 화본과 잡초 또는 광엽 잡초일 수 있으며, 바람직하게는 피, 자귀풀, 올챙이고랭이, 여뀌바늘, 물달개비, 바랭이, 털비름, 개망초 및 어저귀로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 잡초일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0015] 특히, 경작예정지의 토양을 경운할 때 미리 시용하므로 시기적으로 재배하고자 하는 특정 작물의 종자의 발아에는 영향을 주지 않으며, 일반적으로 종자회사에서 공급하는 코팅종자를 사용하는 경우에는 더욱 그러하다.

[0016] 본 발명의 혼합 균주는 상기한 피, 자귀풀, 올챙이고랭이, 여뀌바늘, 물달개비, 바랭이, 털비름, 개망초 및 어저귀 이외에도 일년생의 잡초 종자면 어느 것이나 발아 억제 활성을 나타낼 수 있다. 특히, 재배하고자 하는 특정 작물 종자의 경우, 일반적으로 종자 회사에서 이미 종자 코팅 등의 작업을 통해, 병해충 방제 처리를 수행하였으므로, 본 발명의 혼합 균주를 처리하더라도 잡초 종자 특이적으로 발아 억제 활성을 나타낼 수 있는 것이다.

[0017] 본 발명의 일 구현 예에 따른 방법에서, 상기 토양은 담수 토양일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0018] 이하 본 발명을 하기 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명하고자 한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 본 발명의 범위가 이들만으로 한정되는 것은 아니다.

[0019] **재료 및 방법**

[0020] **균주의 분리 및 동정**

[0021] 원예작물 경작지에 사용했던 미생물 영양제를 생리식염수로 희석한 다음, 그 현탁액 0.1㎖를 비씨피 배지(BCP, Eiken사의 BCP Plate Count Agar Plate)와 피디에이 배지(PDA, Difco사의 Bacto Potato Dextrose Agar Plate) 상에 각각 도말하고, BCP는 37℃, PDA는 30℃에서 배양하면서 생육하는 콜로니를 관찰하였다. BCP에서 콜로니주변을 노란색으로 변색시키는 콜로니를 채취하여 다시 BCP에서 계대 배양함으로서 유산균을 분리하였으며, 한편 PDA에서 생육한 콜로니를 계대 배양하여 효모를 분리하였다.

[0022] 유산균은 16S rDNA 서열에 따라 계통학적으로 분류하였다. 엠알에스 배지(MRS, Difco사의 Bacto Lactobacilli MRS Agar Plate)에서 37℃, 72시간 배양한 균체로부터 DNA를 추출하였으며, 이를 PCR (프라이머: 27F, 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3'(서열번호 9) 및 1492R, 5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3'(서열번호 10)/ 30 cycles: 95℃ 15 min, 95℃ 20 sec, 55℃ 40 sec, 72℃ 1 min 30 sec, 72℃ 5 min, 그 후 10℃ 무한)로 증폭시켜 정제하고 DNA 분석기 ABI 3730XL(Applied Biosystems)을 사용하여 염기서열을 분석한 다음, CLUSTAL X (Thomson *et al.*, 1994) 및 MEGA 프로그램으로 계통학적 위치를 확인하였다.

[0023] 한편 효모는 18S rDNA 서열에 따라 분류하였다. 즉 PDA에서 30℃, 48시간 배양한 균체로부터 DNA를 추출하였으며, 이를 PCR (프라이머: ITS1, 5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3'(서열번호 11) 및 ITS4, 5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3'(서열번호 12)/ 30 cycles: 95℃ 15 min, 95℃ 20 sec, 55℃ 40 sec, 72℃ 1 min 30 sec, 72℃ 5 min, 그 후 10℃ 무한)로 증폭시켜 정제하고 위와 같은 방법으로 염기서열을 분석한 다음, 계통학적 위치를 확인하였다.

[0024] **미생물의 배양방법**

[0025] 유산균류는 각각 엠알에스(MRS, Difco사의 Bacto Lactobacilli MRS Broth) 배지에 접종하여 32℃에서 96~120 시간 정치 배양하여 생균수 10^8 cfu/㎖ 수준의 전배양액을 얻었다. 효모류는 각각 피디비(PDB, Difco사의 Bacto Potato Dextrose Broth) 배지에 접종하여 30℃에서 48~72 시간 진탕배양하여 생균수 10^8 cfu/㎖ 수준의 전배양액을 얻었다. 앞에서 얻은 각 균주의 전배양액을 당밀 배지(Molasses Broth)에 각각 0.5%씩 접종하고, 24±2℃에서 4~6주간 정치배양하여 본 배양을 수행하였다. 본배양을 위한 당밀 배지는 효모추출물 5g, 당밀(Brix 79.8°) 50g, 토마토 과즙 10g을 물 1리터에 용해하여 제조하였다(pH 6.5±0.2, 25℃).

[0026] **배양액의 회수**

[0027] 배양기간 중 미생물의 생균수는 소장하여 배양 초기에 상승하고 중기 이후에 감소하였으며, 유산균류의 생균수에 비하여 효모류의 생균수는 항상 낮았다. 배양후기의 생균수는 유산균류 10^6 cfu/㎖ 수준, 효모류 10^4 cfu/㎖ 수준이었다. 배양기간 중 배양액의 pH는 pH 6.5로부터 점차적으로 감소하여 말기에 이르러 pH 3.2~4.2 범위에 도달하였다.

[0028] **혼합배양액 DAG-A 및 DAG-B의 제조**

[0029] 먼저 전술한 미생물의 배양방법에 따라 락토바실러스 브레비스 LBV-61(*Lactobacillus brevis* LBV-61) 균주(KCTC 12711BP) 및 락토바실러스 플란타룸 아종 플란타룸 LPT30(*Lactobacillus plantarum* subsp. *plantarum* LPT30) 균주(KCTC 12710BP)를 각각 엠알에스 배지에서 120 시간 정치 배양하고, 토룰라스포라 델브루에키 TDB-34(*Torulaspora delbrueckii* TDB-34) 균주(KCTC 12715BP)를 피디비 배지에서 60 시간 진탕 배양하였다. 여기서 얻은 배양액을 당밀 배지에 각각 0.5%씩 접종하고 다시 6주간 정치 배양하였으며, 이로부터 혼합배양액 DAG-A를 회수하였다.

[0030] 락토바실러스 파라카제이 아종 톨러란스 LPC63(*Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans* LPC63) 균주(KCTC 12713BP) 및 락토바실러스 부크네리 LBN62(*Lactobacillus buchneri* LBN62) 균주(KCTC 12712BP)를 각각 엠알에스 배지에서 120 시간 정치 배양하고, 피치아 쿠드리아브제비 PKD-51(*Pichia kudriavzevii* PKD-51) 균주(KCTC 12714BP), 지고사카로마이세스 바일리 ZBA-22(*Zygosaccharomyces bailii* ZBA-22) 균주(KCTC 12716BP) 또는 지고사카로마이세스 비스포러스 ZBP-52(*Zygosaccharomyces bisporus* ZBP-52) 균주(KCTC 12717BP)를 피디비 배지에서 60 시간 진탕 배양하였다. 여기서 얻은 배양액을 당밀 배지에 각각 0.5%씩 접종하고 다시 6주간 정치 배양하였으며, 이로부터 혼합배양액 DAG-B를 회수하였다.

[0031] **발아 억제 활성의 측정**

[0032] 대상 잡초 종자로 화본과 잡초로서 피, 바랭이, 광엽 잡초로서는 털비름, 개망초, 어저귀의 종자를 대상으로 하였다. 처리농도는 시험 약제 즉 배양액 원액을 100으로 기준하고, 이를 1/2배씩 희석하여 사용하였다. 즉 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.13, 1.56, 0.78, 0.39, 0.20, 0.10, 0.05 등으로 순차희석하여 시험하였다. 60×15㎜ 패트리디쉬에 55㎜ 여지 2장을 깔고 잡초종자를 10-20개 치상 후 혼합배양액을 농도별로 5㎖씩 처리하였으며, 배양액 대신에 증류수 5㎖를 처리하여 대조시험(무처리구) 하였다. 패트리디쉬는 파라필름으로 밀봉한 다음 생장상에 넣고 보관하면서 관찰하였으며, 이때 생장상은 광조건 12시간(30℃)/암조건 12시간(25℃)으로 조정하였다. 처리 1주일 후 발아된 개체수 즉 유근이 발생한 숫자를 관찰 계수하였으며 무처리구에서의 발아율에 대한 처리구의 발아율을 백분율로 표시하였다.

[0033] **논포장 조건에서 처리하고자 하는 4종 혼합균주의 제조 방법과 제조된 4종 혼합균주의 처리농도 및 담수유무에 따른 잡초종별 발아 억제 분석 방법**

[0034] 유산균류 락토바실러스 파라카제이 아종 톨러란스 LPC63(*Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans* LPC63) 균주(KCTC 12713BP) 및 락토바실러스 부크네리 LBN62(*Lactobacillus buchneri* LBN62) 균주(KCTC 12712BP)는 각각 엠알에스(MRS, Difco사의 Bacto Lactobacilli MRS Broth) 배지에 접종하여 32℃에서 96~120 시간 정치 배양하여 생균수 10^8 cfu/㎖ 수준의 전배양액을 얻었다. 효모류 피치아 쿠드리아브제비 PKD-51(*Pichia kudriavzevii* PKD-51) 균주(KCTC 12714BP) 및 지고사카로마이세스 바일리 ZBA-22(*Zygosaccharomyces bailii* ZBA-22) 균주(KCTC 12716BP)는 각각 피디비(PDB, Difco사의 Bacto Potato Dextrose Broth) 배지에 접종하여 30℃에서 48~72 시간 진탕배양하여 생균수 10^8 cfu/㎖ 수준의 전배양액을 얻었다. 앞에서 얻은 각 균주의 전배양액을 당밀 배지(Molasses Broth)에 각각 0.5%씩 접종하고, 24±2℃에서 4~6주간 정치배양하여 본 배양을 수행하였다. 본 배양을 위한 당밀 배지는 효모추출물 5g, 당밀(Brix 79.8°) 50g, 토마토 과즙 10g을 물 1리터에 용해하여 제조하였다(pH 6.5±0.2, 25℃).

[0035] 상기 방법을 통해 최종 농도가 10^6 cfu/㎖ 유산균류 배양액 5000㎖ 및 10^4 cfu/㎖ 효모류 배양액 5000㎖을 혼합하여 10,000m^2 (1ha) 처리 기준인 1X로 하였으며, 2X, 4X, 8X, 16X, 32X, 64X와 무처리를 함께 비교하였다. 농도별 혼합균주 처리 이후 피(EC), 자귀풀(AI), 여뀌바늘(LP), 물달개비(MV)를 20개씩 각각 파종하였으며, 이후 수도용 상토를 이용하여 복토하였다. 또한, 담수유무에 따른 잡초종별 발아 억제 분석을 위해서는 별도로 상기 혼합균주 1X 및 60X를 담수 유무로 처리를 해주었다. 상기 시험은 4 반복하여 수행하였다. 조사시 자연 발생한 잡초종을 포함하여 조사하였다. 처리 1주일 후 발아된 개체를 쌍떡잎과 외떡잎 잡초로 구분하여 조사하였으며, 처리 2주일 후 발생한 잡초종의 초종을 분류하여 개수를 측정하였고, 72℃에서 72시간 건조한 후 건물중을 측정하였다. 이후 무처리구 건물중과 처리구 건물중의 비율인 방제가를 통하여 잡초종별 발아 및 생장 억제 효과를 알아보았다. 본 시험은 2015년 대전광역시 유성구 충남대학교 유리온실에서 실시하였다.

[0036] **실시예 1. 균주의 분리 및 동정 결과**

[0037] 앞에서 기술한 방법에 따라 유산균 4종, 효모 4종을 분리하고, 이들의 rDNA 염기서열을 분석하여(서열번호 1 내지 8 참고) 계통학적으로 분류하였다. 그 결과 유산균 LBV-61 균주는 락토바실러스 브레비스 (*Lactobacillus brevis*)로, LPT30는 락토바실러스 플란타룸 아종 플란타룸 (*Lactobacillus plantarum* subsp. *plantarum*)으로, LPC63은 락토바실러스 파라카제이 아종 톨러란스 (*Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans*)로, LBN62는 락토바실러스 부크네리 (*Lactobacillus buchneri*)로 각각 동정되었다. 효모 TDB-34 균주는 토룰라스포라 델브루에키 (*Torulaspora delbrueckii*)로, PKD-51는 피치아 쿠드리아브제비 (*Pichia kudriavzevii*)로, ZBA-22는 지고사카로마이세스 바일리 (*Zygosaccharomyces bailii*)로, ZBP-52는 지고사카로마이세스 비스포러스 (*Zygosaccharomyces bisporus*)로 동정되었다.

[0038] **실시예 2. 발아 억제 활성을 가지는 혼합 균주의 선발**

[0039] 본 발명에서 분리한 4종의 락토바실러스 속 균주와 4종의 효모를 혼합하여 배양하였을 경우 발아 억제 활성이 있음을 확인하였고, 이를 통해 하기 표 1과 같이 12개의 경우로 조합하여 혼합균주를 제조하여 혼합 배양액을 얻었다.

[0040] 이들 혼합배양액의 화본과 잡초(피), 광엽 잡초(털비름) 종자에 대한 발아 억제 활성을 비교하였으며 그 결과를 표 1에 나타내었다. 여기서 종자발아 억제농도는 발아율 0%를 나타내는 혼합배양액의 희석배율로 표시한 것이다. 즉 100은 배양액을 그대로, 50은 배양액을 1/2 희석하여 시험한 것을 의미한다. 표 1에서 보는 바와 같이 균주의 조합에 따라 발아 억제 활성에 차이가 있었으며, 3번 조합 (락토바실러스 브레비스 LBV-61(*Lactobacillus brevis* LBV-61) + 락토바실러스 플란타룸 아종 플란타룸 LPT30(*Lactobacillus plantarum* subsp. *plantarum* LPT30) + 토룰라스포라 델브루에키 TDB-34(*Torulaspora delbrueckii* TDB-34)) 균주와 10번 조합 (락토바실러스 파라카제이 아종 톨러란스 LPC63(*Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans* LPC63) + 락토바실러스 부크네리 LBN62(*Lactobacillus buchneri* LBN62) + 피치아 쿠드리아브제비 PKD-51(*Pichia*

kudriavzevii PKD-51) + 지고사카로마이세스 바일리 ZBA-22(*Zygosaccharomyces bailii* ZBA-22)) 균주에서 비교적 활성이 높았다. 또한 10번 조합의 경우, 지고사카로마이세스 바일리 ZBA-22를 지고사카로마이세스 비스포러스 ZBP-52(*Zygosaccharomyces bisporus* ZBP-52) 균주로 대체하여도 같은 결과를 나타내었다.

[0041] 결론적으로, 본 발명에서 분리한 4종의 락토바실러스 속 균주와 4종의 효모를 혼합한 혼합 균주는 종자 발아 억제 활성에 있어서 정도의 차이는 있으나 모든 조합에서 종자 발아 억제 활성이 있었다.

표 1

[0042] 혼합배양 균주의 조합과 종자발아 억제 농도(희석배율)

번호	혼 합 배 양 균 주		종자발아 억제농도*		비고
	유 산 균	효 모	피	털비름	
1	LBV-61	TDB-34	100	50	
2	LPT-30	TDB-34	100	50	
3	LBV-61/LPT-30	TDB-34	25	12.5	혼합배양1군 DAG-A
4	LPC-63	PKD-51	100	50	
5	LPC-63	ZBA-22	100	100	
6	LBN-62	PKD-51	100	50	
7	LBN-62	ZBA-22	100	100	
8	LPC-63/LBN-62	PKD-51	50	12.5	
9	LPC-63/LBN-62	ZBA-22	50	25	
10	LPC-63/LBN-62	PKD-51/ZBA-22 또는 ZBP-52	12.5	1.56	혼합배양2군 DAG-B
11	LPC-63	PKD-51/ZBA-22	100	100	
12	LBN-62	PKD-51/ZBA-22	100	100	

[0043] *종자발아 억제 농도는 발아율 0%를 나타내는 혼합배양액의 희석배율로 표시하였음. 즉 100: 배양액을 그대로; 50: 배양액을 1/2 희석하여 사용한 것임.

[0044] **실시예 3. 선발된 혼합균주 배양액의 발아 억제 활성**

[0045] 실시예 2에 따라 비교적 높은 활성을 나타낸 3번 및 10번 조합에 대하여 추가시험을 수행하였다. 3번 조합에 의한 배양액을 DAG-A, 10번 조합의 배양액을 DAG-B로 명명하고 대상 잡초를 확대하여 즉 피, 바랭이(화본과 잡초) 및 털비름, 개망초, 어저귀(광엽 잡초)의 종자에 대하여 발아 억제 활성을 시험하였다.

[0046] DAG-A 및 DAG-B의 농도에 따른 잡초 종자의 발아율을 표 2 내지 표 6에 나타내었으며, 처리 1주일 후의 발아모습을 도 1 내지 도 5에 사진으로 제시하였다. DAG-A 및 DAG-B 혼합 균주는 농도에 따른 종자 발아 억제 활성에 있어서 차이는 있으나 모든 화본과 잡초 및 광엽 잡초에 대해 종자 발아 억제 활성이 우수하였다.

표 2

[0047] DAG-A 및 DAG-B의 농도에 따른 피의 발아율

DAG농도	DAG-A	DAG-B
50.00	0.0*	0.0
25.00	0.0	0.0
12.50	82.6	0.0
6.25	87.0	77.8
3.13	95.7	105.6
1.56	100.0	111.1
0.78	104.3	100.0
0.39	104.3	94.4
0.20	95.7	105.6
0.10	95.7	111.1

0.05	91.3	100.0

[0048] * 무처리구에서의 발아율에 대한 처리구의 발아율

표 3

[0049] DAG-A 및 DAG-B의 농도에 따른 바랭이의 발아율

DAG농도	DAG-A	DAG-B
50.00	0.0*	0.0
25.00	0.0	0.0
12.50	0.0	0.0
6.25	87.5	0.0
3.13	81.3	75.0
1.56	81.3	100.0
0.78	93.8	80.1
0.39	106.3	90.0
0.20	81.3	85.3
0.10	93.8	100.0
0.05	100.0	95.0

[0050] * 무처리구에서의 발아율에 대한 처리구의 발아율

표 4

[0051] DAG-A 및 DAG-B의 농도에 따른 털비름의 발아율

DAG농도	DAG-A	DAG-B
50.00	0.0*	0.0
25.00	0.0	0.0
12.50	0.0	0.0
6.25	76.0	0.0
3.13	95.5	0.0
1.56	90.5	0.0
0.78	104.8	14.5
0.39	100.0	28.5
0.20	104.5	102.0
0.10	95.5	85.5
0.05	81.0	102.0

[0052] * 무처리구에서의 발아율에 대한 처리구의 발아율

표 5

[0053] DAG-A 및 DAG-B의 농도에 따른 개망초의 발아율

DAG농도	DAG-A	DAG-B
50.00	0.0*	0.0
25.00	0.0	0.0
12.50	40.0	0.0
6.25	87.5	62.5
3.13	95.2	62.5
1.56	100.0	105.0
0.78	81.0	100.0

0.39	100.0	87.5
0.20	104.8	97.5
0.10	95.2	105.0
0.05	104.8	110.0

[0054] * 무처리구에서의 발아율에 대한 처리구의 발아율

표 6

[0055] DAG-A 및 DAG-B의 농도에 따른 어저귀의 발아율

DAG농도	DAG-A	DAG-B
50.00	0.0*	0.0
25.00	0.0	0.0
12.50	0.0	0.0
6.25	83.4	0.0
3.13	110.0	52.1
1.56	104.0	106.0
0.78	96.0	94.0
0.39	98.2	102.6
0.20	104.0	100.0
0.10	94.4	98.0
0.05	100.0	100.0

[0056] * 무처리구에서의 발아율에 대한 처리구의 발아율

[0057] **실시예 4. 논포장 조건에서 4종 혼합균주 처리농도에 따른 잡초종별 발아 억제 분석**

[0058] 혼합균주의 논조건 포트에서 발아억제에 따른 효과를 확인하기 위한 실험을 수행하였다. 발아 초기인 처리 1주일 후 외떡잎 잡초가 쌍떡잎 잡초보다 많이 발견되었다(표 7). 처리 2주일 후 조사에서 물달개비와 피가 우점하여 발생을 하였다(표 8). 우점 잡초를 제외할 경우 16X부터 방제효과가 보이며, 64X 수준에서 발생 잡초에 대한 방제효과를 보였다(표 9, 표 10). 도 6을 보면, 32X 및 64X에서 피를 제외한 잡초에 대해서는 방제가 가능하였다.

표 7

[0059] 4종 혼합균주 처리 1주일 후 발아 개체수(No)

	무처리	1X	2X	4X	8X	16X	32X	64X
쌍떡잎 잡초	3.5	1.8	1.8	1.0	0.8	0.5	0.0	0.0
외떡잎 잡초	14.8	10.3	9.3	8.0	4.5	3.0	2.8	2.5
합계	18.3	12.0	11.0	9.0	5.3	3.5	2.8	2.5

표 8

[0060] 4종 혼합균주 처리 2주일 후 발아 개체수(No)

	무처리	1x	2x	4x	8x	16x	32x	64x
물달개비	17.5	7.5	14.5	21.5	9.8	5.0	12.3	3.3
여뀌바늘	3.5	4.8	4.8	7.3	3.5	1.0	0.8	0.0
올챙이고랭이	3.5	4.5	2.0	0.5	0.3	0.0	0.0	0.0
자귀풀	5.8	2.0	0.5	1.0	0.5	0.8	0.0	0.0
피	26.8	14.0	17.3	13.3	6.5	5.5	10.0	11.5
총계	57.0	32.8	39.0	43.5	20.5	12.3	23.0	14.8

표 9

[0061] 4종 혼합균주 처리 2주일 후 건물중(g)

	무처리	1x	2x	4x	8x	16x	32x	64x
물달개비	0.08	0.02	0.04	0.05	0.02	0.02	0.02	0.01
여뀌바늘	0.02	0.01	0.02	0.01	0.01	0.01	0.01	0.00
올챙이고랭이	0.02	0.01	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
자귀풀	0.12	0.05	0.02	0.02	0.01	0.01	0.00	0.00
피	0.10	0.06	0.08	0.06	0.02	0.01	0.02	0.02
총계	0.34	0.17	0.16	0.15	0.06	0.04	0.04	0.03

표 10

[0062] 4종 혼합균주 처리 2주일 후 방제가(%)

	1x	2x	4x	8x	16x	32x	64x
물달개비	68.3	42.3	28.0	72.0	78.7	69.0	84.0
여뀌바늘	41.1	24.4	50.0	51.1	77.8	77.8	100.0
올챙이고랭이	36.4	42.9	87.0	98.7	100.0	100.0	100.0
자귀풀	57.5	87.6	82.4	93.8	92.0	100.0	100.0
피	39.1	25.7	45.6	78.2	89.6	85.4	81.3
총계	52.1	52.6	57.7	81.9	87.9	87.4	90.9

[0063] **실시예 5. 논포장 조건에서 4종 혼합균주 처리 후 담수유무에 따른 잡초종별 발아 억제 분석**

[0064] 혼합균주 처리 후 담수 유무에 따른 차이를 알아보기 위한 실험을 수행하였다. 담수유무에 따른 잡초 초종의 발생수는 큰 차이를 보였으며(도 7), 혼합균주를 처리할 경우 담수 유무에 대한 발생 잡초수에도 차이를 보였다. 담수의 경우 발생의 시기를 보다 늦추며, 생육에 대해서 억제되는 모습을 보였다(표 11). 담수유무에 따른 건물중의 경우 물달개비(MV)의 경우에서만 담수시 높은 건물중을 보이고 있었으며, 나머지 피(EC), 자귀풀(AI), 여뀌바늘(LP)의 경우 비담수에서 보다 왕성한 생육을 보였다(표 12). 혼합균주 처리에 따른 잡초의 방제효과는 물달개비(MV)의 경우 담수시 방제가 어려웠으며, 나머지 초종의 경우 담수할 경우 비담수보다 우수한 방제를 보였다(표 13).

표 11

[0065] 4종 혼합균주 처리 후 담수 유무에 따른 발아수(No)

		MV	EC	AI	LP	Total
담수	60X	17.8	9.3	0.0	3.0	30.1
	무처리	17.0	14.3	1.8	3.0	36.1
비담수	60X	7.0	12.8	5.5	10.8	36.1
	무처리	9.3	13.5	4.8	24.3	51.9

표 12

[0066] 4종 혼합균주 처리 후 담수 유무에 따른 건물중(mg)

		MV	EC	AI	LP	Total
담수	60X	52.8	71.3	0.0	3.5	127.6
	무처리	72.8	136.0	14.8	6.3	229.9
비담수	60X	8.8	131.8	38.8	30.5	209.9
	무처리	17.8	155.5	69.3	51.0	293.6

표 13

[0067] 4종 혼합균주 처리 후 담수 유무에 따른 방제가(%)

		MV	EC	AI	LP	
담수	60X	27.5	47.6	100.0	44.4	44.5%
비담수	60X	50.7	15.3	44.0	40.2	28.5%

수탁번호

[0068]

기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC12710BP

수탁일자 : 20141113

기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC12711BP

수탁일자 : 20141113

기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC12712BP

수탁일자 : 20141113

기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC12713BP

수탁일자 : 20141113

기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC12714BP

수탁일자 : 20141113

기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC12715BP

수탁일자 : 20141113

기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC12716BP

수탁일자 : 20141113

기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC12717BP

수탁일자 : 20141113

도면

도면1



무처리



농도 25

도면2



무처리



농도 12.5

도면3



무처리



농도 12.5

도면4



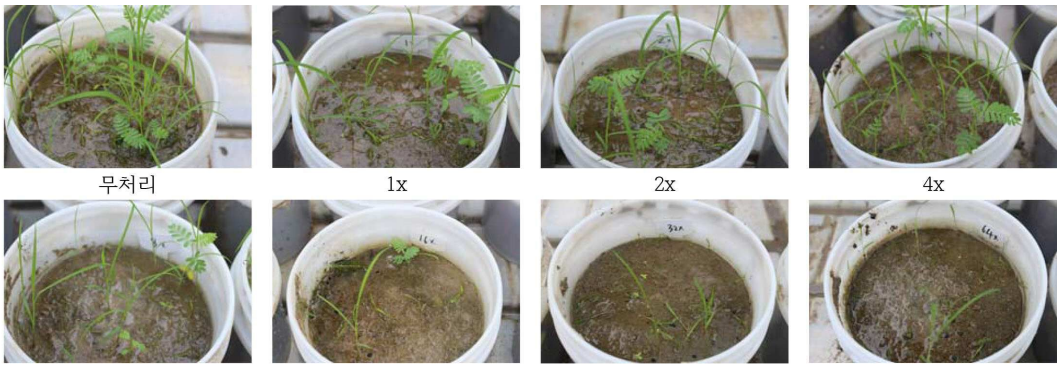
무처리 농도 12.5

도면5



무처리 농도 3.13

도면6



도면7



무처리 60X
담수



무처리 60X
비담수

서 열 목 록

<110> Nongyega Co., Ltd.

The Industry & Academic Cooperation in Chungnam National University (IAC)

<120> Method for inhibiting germination of weed seed using mixed strain comprising Lactobacillus sp. strain and yeast strain

<130> PN15444

<160> 12

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 1216

<212> DNA

<213> Lactobacillus plantarum subsp. plantarum LPT30

<400> 1

ccatggccac agctataatg cagtcgaacg aactctggta ttgattggtg cttgcatcat 60

gatttacatt tgagtgagtg gcgaactggt gagtaacacg tgggaaacct gcccagaagc 120

ggggggataac acctggaaac agatgctaat accgcataac aacttggacc gcatggtccg 180

agcttgaaag atggcttcgg ctatcacttt tggatggtcc cgcggcgtat tagctagatg 240

gtggggtaac ggctcaccat ggcaatgata cgtagccgac ctgagagggt aatcggccac 300

attgggactg agacacggcc caaactccta cgggaggcag cagtagggaa tcttccacaa 360

tggacgaaag tctgatggag caacgccgcg tgagtgaaga agggtttcgg ctcgtaaaac 420

tctgttgtta aagaagaaca tatctgagag taactgttca ggtattgacg gtatttaacc 480

agaaagccac ggctaactac gtgccagcag ccgcggtaat acgtaggtgg caagcgttgt 540

ccggatttat tgggcgtaaa gcgagcgcag gcggtttttt aagtctgatg tgaaagcctt 600

cggctcaacc gaagaagtgc atcggaaact gggaaacttg agtgcagaag aggacagtgg 660

aactccatgt gtagcggtga aatgcgtaga tatatggaag aacaccagtg gcgaaggcgg 720

ctgtctggtc tgtaactgac gctgaggctc gaaagtatgg gtagcaaaca ggattagata 780

ccctggtagt ccataccgta aacgatgaat gctaagtgtt ggagggtttc cgcccttcag 840

tgctgcagct aacgcattaa gcattccgcc tggggagtac ggccgcaagg ctgaaactca 900

aaggaattga cgggggcccg cacaagcggt ggagcatgtg gtttaattcg aagctacgcg 960

aagaaccctt accaggtctt gacatactat gcaaatctaa gagattagac gttcccttcg 1020

gggacatgga tacaggtggt gcatggttgt cgtcagctcg tgtcgtgaga tgttgggtta 1080

agtcccgcac gagcgcaacc ttattatcag ttgccagcaa tagtgggcac tctgggtgga 1140

gactgcggtg aacaaacccg gcaggaaggg tggggatgac gtcaatcatt ccattgcccc 1200

ttatagaacc gttggg 1216

<210> 2

<211> 1001

<212> DNA

<213> Lactobacillus brevis LBV-61

<400> 2

ctgcaatggc ggctgctata atgcagtcga acgagcttcc gttgaatgac gtgcttgcac 60

tgatttcaac aatgaagcga gtggcgaact ggtgagtaac acgtgggaaa tctgcccaga 120

agcaggggat aacacttgga aacaggtgct aataccgtat aacaacaaaa tccgcatgga 180

ttttgtttga aaggtggctt cggctatcac ttctggatga tcccgcggcg tattagttag 240

ttggtgaggt aaaggcccac caagacgatg atacgtagcc gacctgagag ggtaatcggc 300

cacattggga ctgagacacg gcccaaactc ctacgggagg cagcagtagg gaatcttcca 360

caatggacga aagtctgatg gagcaatgcc gcgtgagtga agaagggttt cggctcgtaa 420

aactctgttg ttaaagaaga acacctttga gagtaactgt tcaagggttg acggtattta 480

accagaaagc cacggctaac tacgtgccag cagccgcggt aatacgtagg tggcaagcgt 540

tgtccggatt tattgggcgt aaagcgagcg caggcggttt tttaagtctg atgtgaaagc 600

cttcggctta accggagaag tgcatcggaa actgggagac ttgagtgcag aagaggacag 660

tggaactcca tgtgtagcgg tggaatgcgt agatatatgg aagaacacca gtggcgaagg 720

cggctgtcta gtctgtaact gacgctgagg ctcgaaagca tgggtagcga acaggattag 780

ataccctggt agtccatgcc gtaaacgatg agtgctaagt gttggagggt ttccgccctt 840

cagtgctgca gctaacgcat taagcactcc gcctggggag tacgaccgca aggttgaaac 900

tcaaaggaat tgacgggggc ccgcacaagc ggtggagcat gtggtttaat tcgaagctac 960

gcgaagaacc ttaccaggtc ttgacatctt ctgccaatct t 1001

<210> 3

<211> 990

<212> DNA

<213> Lactobacillus buchneri LBN62

<400> 3

ggcagtgcgg cgtgctatac atgcaagtcg aacgcgtctc cgttaatgat tttaggtgct 60

tgcacttgaa agatttaaca ttgagacgag tggcgaactg gtgagtaaca cgtgggtaac 120

ctgcccttga agtaggggat aacacttgga aacaggtgct aataccgtat aacaaccaaa 180

accacctggt tttggtttaa aagacggctt cggctgtcac tttaggatgg acccgcggcg 240

tattagcttg ttggtaaggt aacggcttac caaggcgatg atacgtagcc gacctgagag 300

ggtaatcggc cacattggga ctgagacacg gcccaaactc ctacgggagg cagcagtagg 360

gaatcttcca caatggacga aagtctgatg gagcaacgcc gcgtgagtga tgaagggttt 420

cggctcgtaa aactctgttg ttggagaaga acaggtgtca gagtaactgt tgacatcttg 480

acggtatcca accagaaagc cacggctaac tacgtgccag cagccgcggt aatacgtagg 540

tggcaagcgt tgtccggatt tattgggcgt aaagcgagcg caggcggttt tttaggtctg 600

atgtgaaagc cttcggctta accggagaag tgcatcggaa accgggagac ttgagtgcag 660

aagaggacag tggaactcca tgtgtagcgg tgaaatgcgt agatatatgg aagaacacca 720

gtggcgaagg cggctgtctg gtctgtaact gacgctgagg ctcgaaagca tgggtagcga 780

acaggattag ataccctggt agtccatgcc gtaaacgatg agtgctaagt gttggagggt 840

ttccgccctt cagtgctgca gctaacgcat taagcactcc gcctggggag tacgaccgca 900

aggttgaaac tcaaaggaat tgacgggggc ccgcacaagc ggtggagcat gtggtttaat 960

tcgatgctac gcgaagaacc ttaccaggtc 990

<210> 4

<211> 1005

<212> DNA

<213> Lactobacillus paracasei subsp. tolerans LPC63

<400> 4

gggcggggcg ggtgctataa tgcagtcgaa cgagttctcg ttgatgatcg gtgcttgcac 60

cgagattcaa catggaacga gtggcggacg ggtgagtaac acgtgggtaa cctgccctta 120

agtgggggat aacatttgga aacagatgct aataccgcat agatccaaga accgcatggt 180

tcttggctga aagatggcgt aagctatcgc ttttggatgg acccgcggcg tattagctag 240

ttggtgaggt aatggctcac caaggcgatg atacgtagcc gaactgagag gttgatcggc 300

cacattggga ctgagacacg gcccaaactc ctacgggagg cagcagtagg gaatcttcca 360

caatggacgc aagtctgatg gagcaacgcc gcgtgagtga agaaggcttt cgggtcgtaa 420

aactctgttg ttggagaaga atggtcggca gagtaactgt tgtcggcgtg acggtatcca 480

accagaaagc cacggctaac tacgtgccag cagccgcggt aatacgtagg tggcaagcgt 540

tatccggatt tattgggcgt aaagcgagcg caggcggttt tttaagtctg atgtgaaagc 600

cctcggctta accgaggaag cgcatcggaa actgggaaac ttgagtgcag aagaggacag 660

tggaactcca tgtgtagcgg tgaaatgcgt agatatatgg aagaacacca gtggcgaagg 720

cggctgtctg gtctgtaact gacgctgagg ctcgaaagca tgggtagcga acaggattag 780

ataccctggt agtccatgcc gtaaacgatg aatgctaggt gttggagggt ttccgccctt 840

cagtgccgca gctaacgcat taagcattcc gcctggggag tacgaccgca aggttgaaac 900

tcaaaggaat tgacgggggc ccgcacaagc ggtggagcat gtggtttaat tcgaagcaac 960

gcgaagaacc ttaccaggtc ttgacatctt ttgatcacct gagag 1005

<210> 5

<211> 484

<212> DNA

<213> Pichia kudriavzevii PKD-51

<400> 5

gnncttctgt gatagtacta cactgcgtga gcggaacgaa aacaacaaca cctaaaatgt 60

ggaatatagc atatagtcga caagagaaat ctacgaaaaa caaacaaaac tttcaacaac 120

ggatctcttg gttctcgcat cgatgaagag cgcagcgaaa tgcgatacct agtgtgaatt 180

gcagccatcg tgaatcatcg agttcttgaa cgcacattgc gcccctcggc attccggggg 240

gcatgcctgt ttgagcgtcg tttccatctt gcgcgtgcgc agagttgggg gagcggagcg 300

gacgacgtgt aaagagcgtc ggagctgcga ctcgcctgaa agggagcgaa gctggccgag 360

cgaactagac tttttttcag ggacgcttgg cggccgagag cgagtgttgc gagacaacaa 420

aaagctcgac ctcaaatcag gtaggaatac ccgctgaact taagcatatc aaaaggcgga 480

ggaa 484

<210> 6

<211> 755

<212> DNA

<213> Torulaspora delbrueckii TDB-34

<400> 6

ctatgatgag ttagaggacg tctaaagata ctgtaagaga ggatcaggtt caagaccagc 60

gcttaattgc gcggttgcgg cttggttcgc cttttgcgga acatgtcttt tctcgttgtt 120

aactctactt caacttctac aacactgtgg agttttctac acaacttttc ttctttggga 180

agatacgtct tgtgcgtgct tcccagaggt gacaaacaca aacaactttt tattattata 240

aaccagtcaa aaccaatttc gttatgaaat taaaaatatt taaaactttc aacaacggat 300

ctcttggttc tcgcatcgat gaagaacgca gcgaaatgcg atacgtaatg tgaattgcag 360

aattccgtga atcatcgaat ctttgaacgc acattgcgcc ccttggtatt ccaggggcca 420

tgcctgtttg agcgtcattt ccttctcaaa caatcatgtt tggtagtgag tgatactctg 480

tcaagggtta acttgaaatt gctagcctgt tatttggttg tgattttgct ggcttggatg 540

actttgtcca gtctagctaa taccgaattg tcgtattagg ttttaccaac ttcggcagac 600

tgtgtgttgg ctcgggcgct ttaaagactt tgtcgtaaac gatttatcgt ttgtttgagc 660

ttttcgcata cgcaatccgg cgaacaatac tctcaaagtt tgacctcaaa tcaggtagga 720

atacccgctg aacttaagca tatcaataag gcggg 755

<210> 7

<211> 689

<212> DNA

<213> Zygosaccharomyces bailii ZBA-22

<400> 7

gaattactga ttgacgagtc tggagtagtt gtgttctctc tgtttttttca aggcctgcgc 60

ttaattgcgc ggtctagagc ggagggagtt aagcatagtt actctggctt tcaatttaca 120

cacagtggag tttctacttt ttttattctt ctttgggagg atgggttcgt cccactccca 180

gaggtaaaaa cacaaacaat ttttttttttt ttttttttaaa attacacagc caaaaacaaa 240

aacaaaaaaa caaaatattc aaaattttca acaacggatc tctgggttcc cccatcaata 300

aaaaacccac caaaaggcaa aacgaaaggg gaattgcaaa attccgggaa tcatcaaatc 360

tttaaacccc ctttgccccc ctgggaattc cgggggggcag gccggtttga gcgtcttttc 420

cttcccaaac attcgggttg ggaagggagg gatacccggt ttttcattgg ggtaaacttg 480

aaattgcaac ccttttggga acgcgtgtgg ggagtttagg cggaacgtct tgctctccct 540

ttcctaccaa tgtcgaatag gtttaccgac tccacagacg gatagagatt ggtgatgata 600

caaatcgagc tcgcctaatt ttttttggcg cctggcaaca actcccaagt tgactcaatc 660

ggagaatccc gtgacttaca atcatacca 689

<210> 8

<211> 728

<212> DNA

<213> Zygosaccharomyces bisporus ZBP-52

<400> 8

aatctgattg gcagtcatgg ggcagtagag tttttcggct ctttcttttg cttttgggcc 60

tgcgcttagt tgcgcggtct agagtagagg gagcttctac tgcttcggct tacaatttac 120

acacagtgga gtttctacta tttttcttct ttgggaggat gatgaaaatc tatctactcc 180

cagaggtaaa cacaaacaat atttttattt tttattttac acacagtcaa atgaatacaa 240

aaaaaaaatt ataatattca aaactttcaa caacggatct cttggttctc gcatcgatga 300

aaaacgcagc gaaatgcgat acgtaatgtg aattgcaaaa ttccgtgaat catcgaatct 360

ttgaacgcac attgcgcccc ttggtattcc aggggggcatg cctgtttgag cgtcatttcc 420

ttctcaaaca cttgtgtttg gtagtgagtg atactctgtt aaaactgggt tagcttgaaa 480

ttgcaagcct tttggggatg cgtctagaga agagttttag gcggaaacgt ctggctcctc 540

ctctattttc ctttaaccaa atgtcgtatt aggttttacc gactcggcag acaggttgct 600

ggagactgag gtgggtgata gaaatatcga acttttctgc gcgcctttgg caaacaatac 660

tctctaagct tgacctcaaa tcaggtagga ttacccgctg aacttaagca tatcaaaaag 720

cgggagga 728

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 9

agagtttgat cctggctcag 20

<210> 10

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 10

ggttaccttg ttacgactt 19

<210> 11

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 11

tccgtaggtg aacctgcgg 19

<210> 12

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 12

tcctccgctt attgatatgc 20