



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2016년01월06일

(11) 등록번호 10-1583057

(24) 등록일자 2015년12월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 1/00 (2006.01) A01N 63/00 (2006.01)

C12N 1/16 (2006.01) C12N 1/20 (2006.01)

C12R 1/225 (2006.01) C12R 1/84 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0168369

(22) 출원일자 2014년11월28일

심사청구일자 2014년11월28일

(56) 선행기술조사문헌

JP2003231605 A*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

(주)농예가

충청남도 논산시 연무읍 감바위로 56

충남대학교산학협력단

대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)

(72) 발명자

박기웅

대전광역시 유성구 엑스포로 448 엑스포아파트

204동 1202호

염영호

대전광역시 유성구 엑스포로 448 엑스포아파트

102동 306호

조재철

대전광역시 유성구 장대로71번길 34, 103동 904호

(장대푸르지오아파트)

(74) 대리인

최규환

전체 청구항 수 : 총 11 항

심사관 : 이현석

(54) 발명의 명칭 식물의 종자 발아 억제용 혼합 균주 및 제조제로서의 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 유산균 균주 및 효모 균주로 이루어진 잡초 식물의 종자 발아 억제용 혼합 균주, 상기 혼합 균주, 상기 균주의 배양물 또는 상기 균주의 배양액의 농축액과 농약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 것을 특징으로 하는 제조제, 상기 혼합 균주를 배양하는 단계를 포함하는 제조제의 제조 방법, 상기 혼합 균주, 상기 균주의 배양물 또는 상기 균주의 배양액의 농축액을 토양에 처리하여 잡초를 제거하는 방법을 제공한다.

대표도 - 도1



무처리



농도 25

명세서

청구범위

청구항 1

락토바실러스 속(*Lactobacillus* sp.) 균주 및 효모 균주로 이루어진 잡초 식물의 종자 발아 억제용 혼합 균주.

청구항 2

삭제

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 락토바실러스 속 균주는 락토바실러스 플란타룸 아종 플란타룸 LPT30(*Lactobacillus plantarum* subsp. *plantarum* LPT30) 균주(KCTC 12710BP), 락토바실러스 브레비스 LBV-61(*Lactobacillus brevis* LBV-61) 균주(KCTC 12711BP), 락토바실러스 부크네리 LBN62(*Lactobacillus buchneri* LBN62) 균주(KCTC 12712BP) 및 락토바실러스 파라카제이 아종 톨러란스 LPC63(*Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans* LPC63) 균주(KCTC 12713BP)로 이루어진 균으로부터 선택되는 하나 이상의 균주인 것을 특징으로 하는 잡초 식물의 종자 발아 억제용 혼합 균주.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 효모 균주는 피치아 쿠드리야브제비 PKD-51(*Pichia kudriavzevii* PKD-51) 균주(KCTC 12714BP), 토룰라스포라 델브루에키 TDB-34(*Torulaspora delbrueckii* TDB-34) 균주(KCTC 12715BP), 지고사카로마이세스 바일리 ZBA-22(*Zygosaccharomyces bailii* ZBA-22) 균주(KCTC 12716BP) 및 지고사카로마이세스 비스포러스 ZBP-52(*Zygosaccharomyces bisporus* ZBP-52) 균주(KCTC 12717BP)로 이루어진 균으로부터 선택되는 하나 이상의 균주인 것을 특징으로 하는 잡초 식물의 종자 발아 억제용 혼합 균주.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 혼합 균주는 락토바실러스 브레비스 LBV-61(*Lactobacillus brevis* LBV-61) 균주(KCTC 12711BP), 락토바실러스 플란타룸 아종 플란타룸 LPT30(*Lactobacillus plantarum* subsp. *plantarum* LPT30) 균주(KCTC 12710BP) 및 토룰라스포라 델브루에키 TDB-34(*Torulaspora delbrueckii* TDB-34) 균주(KCTC 12715BP)로 이루어진 것을 특징으로 하는 잡초 식물의 종자 발아 억제용 혼합 균주.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 혼합 균주는 락토바실러스 파라카제이 아종 톨러란스 LPC63(*Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans* LPC63) 균주(KCTC 12713BP), 락토바실러스 부크네리 LBN62(*Lactobacillus buchneri* LBN62) 균주(KCTC 12712BP), 피치아 쿠드리야브제비 PKD-51(*Pichia kudriavzevii* PKD-51) 균주(KCTC 12714BP) 및 지고사카로마이세스 바일리 ZBA-22(*Zygosaccharomyces bailii* ZBA-22) 균주(KCTC 12716BP)로 이루어진 것을 특징으로 하는 잡초 식물의 종자 발아 억제용 혼합 균주.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 혼합 균주는 락토바실러스 파라카제이 아종 톨러란스 LPC63(*Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans* LPC63) 균주(KCTC 12713BP), 락토바실러스 부크네리 LBN62(*Lactobacillus buchneri* LBN62) 균주(KCTC 12712BP), 피치아 쿠드리야브제비 PKD-51(*Pichia kudriavzevii* PKD-51) 균주(KCTC 12714BP) 및 지고사카로마이세스 비스포러스 ZBP-52(*Zygosaccharomyces bisporus* ZBP-52) 균주(KCTC 12717BP)로 이루어진 것을 특징으로 하는 잡초 식물의 종자 발아 억제용 혼합 균주.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 잡초 식물은 화본과 잡초 또는 광엽 잡초인 것을 특징으로 하는 잡초 식물의 종자 발아 억제용 혼합 균주.

청구항 9

제1항, 제3항 내지 제8항 중 어느 한 항의 혼합 균주, 상기 균주의 배양물 또는 상기 균주의 배양액의 농축액과 농약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 것을 특징으로 하는 제조제.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 제조제는 당밀 및 토마토 과즙으로 이루어진 미생물 영양제를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 제조제.

청구항 11

제1항, 제3항 내지 제8항 중 어느 한 항의 혼합 균주를 배양하는 단계를 포함하는 제조제의 제조 방법.

청구항 12

제1항, 제3항 내지 제8항 중 어느 한 항의 혼합 균주, 상기 균주의 배양물 또는 상기 균주의 배양액의 농축액을 토양에 처리하는 단계를 포함하는 잡초를 제거하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 식물의 종자 발아 억제용 혼합 균주 및 제조제로서의 이의 용도에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 유산균 균주 및 효모 균주로 이루어진 잡초 식물의 종자 발아 억제용 혼합 균주, 상기 혼합 균주, 상기 균주의 배양물 또는 상기 균주의 배양액의 농축액과 농약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 것을 특징으로 하는 제조제, 상기 혼합 균주를 배양하는 단계를 포함하는 제조제의 제조 방법, 상기 혼합 균주, 상기 균주의 배양물 또는 상기 균주의 배양액의 농축액을 토양에 처리하여 잡초를 제거하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[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 제조제가 사용되고 있음에도 불구하고 잡초에 의한 작물의 생산 손실은 여전히 많은데, 이는 제조제의 지속적 사용에 따른 잡초군락의 생태학적 변화와 제조제에 대한 내성이 유발될 수 있기 때문이다. 지금까지 잡초방제를 위해 유기합성 제조제 즉 발아억제제 또는 경엽처리제의 다량 사용에 따른 환경오염 및 인축독성 문제가 매우 심각하므로 저독성이고 환경에 친화적인 새로운 미생물 제조제의 개발이 요구되어왔다.

[0003]

이러한 미생물 제조제는 기존의 합성제조제를 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 8 E 1 2 및 이를 이용한 제조제가 개시되어 있고, 한국공개특허 제2009-0005917호에서는 종자 발아 억제 조성물 및 그 생산방법이 개시되어 있으나, 본 발명에서와 같이, '식물의 종자 발아 억제용 혼합 균주 및 제조제로서의 이의 용도'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 브레비스 LBV-61 균주, 락토바실러스 플란타륨 아종 플란타륨 LPT30 균주 및 토룰라스포라 텔브루에키 TDB-34 균주로 이루어진 혼합 균주의 배양액인 DAG-A 배양액과 락토바실러스 파라카제이 아종 툴리란스 LPC63 균주, 락토바실러스 부크네리 LBN62 균주, 피치아 쿠드리야브제비 PKD-51 균주 및 지고사카로마이세스 바일리 ZBA-22 균주로 이루어진 혼합 균주의 배양액인 DAG-B 배양액을 잡초 식물인 피, 바랭이, 털비름, 개망초 및 어저귀 식물의 종자에 각각 처리한 결과, 다른 락토바실러스 속 균

주와 효모 균주를 혼합하여 배양한 배양액을 처리한 경우보다 각 잡초 식물 종자의 발아가 현저히 억제되는 것을 확인하였다. 이를 통해, 본 발명의 2세트의 혼합 균주 각각은 잡초 식물 종자의 발아를 억제하여 제초제로 매우 효과적으로 사용될 수 있는 점을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

- [0006] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 유산균 균주 및 효모 균주로 이루어진 잡초 식물의 종자 발아 억제용 혼합 균주를 제공한다.
- [0007] 또한, 본 발명은 상기 혼합 균주, 상기 균주의 배양물 또는 상기 균주의 배양액의 농축액과 농약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 것을 특징으로 하는 제초제를 제공한다.
- [0008] 또한, 본 발명은 상기 혼합 균주를 배양하는 단계를 포함하는 제초제의 제조 방법을 제공한다.
- [0009] 또한, 본 발명은 상기 혼합 균주, 상기 균주의 배양물 또는 상기 균주의 배양액의 농축액을 토양에 처리하여 잡초를 제거하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0010] 본 발명에서는 유산균 균주 및 효모 균주로 이루어진 2세트의 혼합 균주 배양액 각각이 잡초 식물 종자의 발아를 억제함으로써 잡초 식물의 제초 효과가 우수한 점을 확인하였다. 따라서, 본 발명의 혼합 균주를 유효성분으로 함유하는 제초제는 친환경형 생물농약제로 널리 유용하게 사용될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0011] 도 1은 DAG-A 처리 1주일 후 피 잡초 식물 종자의 발아모습을 나타낸다(왼쪽의 무처리기는 DAG-A 무처리, 오른쪽의 25는 DAG-A 배양액을 1/4 희석하여 처리).
- 도 2는 DAG-B 처리 1주일 후 바랭이 잡초 식물 종자의 발아모습을 나타낸다(왼쪽의 무처리기는 DAG-B 무처리, 오른쪽의 12.5는 DAG-B 배양액을 1/8 희석하여 처리).
- 도 3은 DAG-A 처리 1주일 후 털비름 잡초 식물 종자의 발아모습을 나타낸다(왼쪽의 무처리기는 DAG-A 무처리, 오른쪽의 12.5는 DAG-A 배양액을 1/8 희석하여 처리).
- 도 4는 DAG-A 처리 1주일 후 개망초 잡초 식물 종자의 발아모습을 나타낸다(왼쪽의 무처리기는 DAG-A 무처리, 오른쪽의 12.5는 DAG-A 배양액을 1/8 희석하여 처리).
- 도 5는 DAG-A 처리 1주일 후 어저귀 잡초 식물 종자의 발아모습을 나타낸다(왼쪽의 무처리기는 DAG-A 무처리, 오른쪽의 3.13은 DAG-A 배양액을 1/32 희석하여 처리).
- 도 6은 모내기 2주 후 혼합 균주 배양액 무처리구 좌측논과 처리구 우측논의 모습을 나타낸다(B와 C는 혼합 균주 배양액 무처리구 좌측논(B)과 처리구 우측논(C)를 확대한 것임).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0012] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 유산균 균주 및 효모 균주로 이루어진 잡초 식물의 종자 발아 억제용 혼합 균주를 제공한다.
- [0013] 본 발명의 일 구현 예에 따른 혼합 균주에서, 상기 유산균 균주는 락토바실러스 속(*Lactobacillus* sp.) 균주일 수 있고, 바람직하게는 락토바실러스 플란타룸 아종 플란타룸 LPT30(*Lactobacillus plantarum* subsp. *plantarum* LPT30) 균주(KCTC 12710BP), 락토바실러스 브레비스 LBV-61(*Lactobacillus brevis* LBV-61) 균주(KCTC 12711BP), 락토바실러스 부크네리 LBN62(*Lactobacillus buchneri* LBN62) 균주(KCTC 12712BP) 및 락토바실러스 파라카제이 아종 톨러란스 LPC63(*Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans* LPC63) 균주(KCTC 12713BP)로 이루어진 균으로부터 선택되는 하나 이상의 균주일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0014] 본 발명의 일 구현 예에 따른 혼합 균주에서, 상기 효모 균주는 피치아 쿠드리야브제비 PKD-51(*Pichia kudriavzevii* PKD-51) 균주(KCTC 12714BP), 토룰라스포라 델브루에키 TDB-34(*Torulaspora delbrueckii* TDB-34) 균주(KCTC 12715BP), 지고사카로마이세스 바일리 ZBA-22(*Zygosaccharomyces bailii* ZBA-22) 균주(KCTC 12716BP) 및 지고사카로마이세스 비스포러스 ZBP-52(*Zygosaccharomyces bisporus* ZBP-52) 균주(KCTC 12717BP)

로 이루어진 균으로부터 선택되는 하나 이상의 균주일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [0015] 상기 4종의 락토바실러스 속 균주와 4종의 효모 균주는 2014년 11월 13일자로 한국생명공학연구원에 각각 기탁하였다. 기탁 번호는 각 균주명 뒤에 괄호 안에 표기한 바와 같다.
- [0016] 본 발명의 일 구현 예에 따른 혼합 균주에서, 상기 혼합 균주는 바람직하게는 락토바실러스 브레비스 LBV-61(*Lactobacillus brevis* LBV-61) 균주(KCTC 12711BP), 락토바실러스 플란타룸 아종 플란타룸 LPT30(*Lactobacillus plantarum* subsp. *plantarum* LPT30) 균주(KCTC 12710BP) 및 토룰라스포라 델브루에키 TDB-34(*Torulaspora delbrueckii* TDB-34) 균주(KCTC 12715BP)로 이루어질 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0017] 본 발명의 일 구현 예에 따른 혼합 균주에서, 상기 혼합 균주는 바람직하게는 락토바실러스 파라카제이 아종 톨러란스 LPC63(*Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans* LPC63) 균주(KCTC 12713BP), 락토바실러스 부크네리 LBN62(*Lactobacillus buchneri* LBN62) 균주(KCTC 12712BP), 피치아 쿠드리야브제비 PKD-51(*Pichia kudriavzevii* PKD-51) 균주(KCTC 12714BP) 및 지고사카로마이세스 바일리 ZBA-22(*Zygosaccharomyces bailii* ZBA-22) 균주(KCTC 12716BP)로 이루어질 수 있고, 또는 락토바실러스 파라카제이 아종 톨러란스 LPC63(*Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans* LPC63) 균주(KCTC 12713BP), 락토바실러스 부크네리 LBN62(*Lactobacillus buchneri* LBN62) 균주(KCTC 12712BP), 피치아 쿠드리야브제비 PKD-51(*Pichia kudriavzevii* PKD-51) 균주(KCTC 12714BP) 및 지고사카로마이세스 비스포리스 ZBP-52(*Zygosaccharomyces bisporus* ZBP-52) 균주(KCTC 12717BP)로 이루어질 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0018] 본 발명의 일 구현 예에 따른 혼합 균주에서, 상기 잡초 식물은 일년생의 잡초 식물로, 화본과 잡초 또는 광엽 잡초일 수 있으며, 바람직하게는 피, 바랭이, 털비름, 개망초 및 어저귀로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 잡초 식물일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0019] 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.
- [0020] 본 발명의 혼합 균주는 상기한 피, 바랭이, 털비름, 개망초 및 어저귀 이외에도 일년생의 잡초 식물 종자면 어느 것이나 발아 억제 활성을 나타낼 수 있다. 특히, 재배하고자 하는 특정 작물 종자의 경우, 일반적으로 종자회사에서 이미 종자 코팅 등의 작업을 통해, 병해충 방제 처리를 수행하였으므로, 본 발명의 혼합 균주를 처리하더라도 잡초 식물 종자 특이적으로 발아 억제 활성을 나타낼 수 있는 것이다.
- [0021] 또한, 본 발명은 상기 혼합 균주, 상기 균주의 배양물 또는 상기 균주의 배양액의 농축액과 농약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 것을 특징으로 하는 제초제를 제공한다. 이러한 담체는 특별히 제한되지 않으며, 약제학적으로 또는 영양학적으로 허용되는 담체 및 희석제 중에서 선택된다.
- [0022] 본 발명의 균주를 배양하는 단계에서 얻어지는 상기 균주 또는 상기 균주의 배양물 또는 상기 균주의 배양액의 농축액을 첨가물로 사용할 경우, 상기 균주 또는 상기 균주의 배양물 또는 상기 균주의 배양액의 농축액을 그대로 첨가하거나 다른 첨가제를 함께 사용할 수 있으며, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효 성분의 혼합양은 그의 사용 목적에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 바람직하게는 첨가제는 당밀 및 토마토 과즙으로 이루어진 상기 균주의 영양제일 수 있는데, 가장 바람직하게는 당밀(Brix 79.8°) 500g, 토마토 과즙 50g을 물 1리터에 용해하여 제조한 미생물 영양제일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0023] 또한, 본 발명은 상기 혼합 균주를 배양하는 단계를 포함하는 제초제의 제조 방법을 제공한다.
- [0024] 본 발명의 균주를 배양하는 방법은 당업계에 통상적으로 이용되는 방법에 따라 배양할 수 있다.
- [0025] 또한, 본 발명은 상기 혼합 균주, 상기 균주의 배양물 또는 상기 균주의 배양액의 농축액을 토양에 처리하여 잡초를 제거하는 방법을 제공한다.
- [0026] 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.

[0027] 재료 및 방법

[0028] 균주의 분리 및 동정

- [0029] 원예작물 경작지에 사용했던 미생물 영양제를 생리식염수로 희석한 다음, 그 현탁액 0.1ml를 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 콜로니 주변을 노란색으로 변색시키는 콜로니를 채취하여 다시 BCP에서 계대 배양함으로써 유산균을 분리하였으며, 한편 PDA에서 생육한 콜로니를 계대 배양하여 효모를 분리하였다.
- [0030] 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 DNA분석기 ABI 3730XL(Applied Biosystems)을 사용하여 염기서열을 분석한 다음, CLUSTAL X (Thomson *et al.*, 1994) 및 MEGA 프로그램으로 계통학적 위치를 확인하였다.
- [0031] 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.
- [0032] **미생물의 배양방법**
- [0033] 유산균류는 각각 엠알에스(MRS, Difco사의 Bacto Lactobacilli MRS Broth) 배지에 접종하여 32℃에서 96~120 시간 정치 배양하여 생균수 10^8 c.f.u. ml⁻¹ 수준의 전배양액을 얻었다. 효모류는 각각 피디비(PDB, Difco사의 Bacto Potato Dextrose Broth) 배지에 접종하여 30℃에서 48~72 시간 진탕배양하여 생균수 10^8 c.f.u. ml⁻¹ 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℃).
- [0034] **배양액의 회수**
- [0035] 배양기간 중 미생물의 생균수는 소장하여 배양 초기에 상승하고 중기 이후에 감소하였으며, 유산균류의 생균수에 비하여 효모류의 생균수는 항상 낮았다. 배양후기의 생균수는 유산균류 10^6 cfu/ml 수준, 효모류 10^4 cfu/ml 수준이었다. 배양기간 중 배양액의 pH는 pH 6.5로부터 점차적으로 감소하여 말기에 이르러 pH 3.2~4.2 범위에 도달하였다.
- [0036] **혼합배양액 DAG-A 및 DAG-B의 제조**
- [0037] 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.
- [0038] 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 쿠드리야브제비 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 배양

하였으며, 이로부터 혼합배양액 DAG-B를 회수하였다.

[0039]

발아 억제 활성의 측정

[0040]

대상 잡초 식물 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. 60×15mm 패트리디쉬에 55mm 여지 2장을 깔고 잡초종자를 10-20개 치상 후 혼합배양액을 농도별로 5ml씩 처리하였으며, 배양액 대신에 증류수 5ml를 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.

[0041]

미생물 영양제를 포함하는 혼합균주 배양액의 제조

[0042]

혼합배양액을 사용하기 위해서는 논 면적 1 단보(10a)에 대하여 300ℓ의 물을 준비하고 여기에 DAG-B 500ml와 영양제 1,000ml를 넣고 혼합한 다음, 표면 살포하였다. 이때 영양제는 당밀(Brix 79.8°) 500g, 토마토 과즙 50g을 물 1리터에 용해하여 제조하였다(pH 6.5±0.2, 25℃). 영양제의 첨가는 혼합배양액의 희석과정과 살포 후 혼합균주의 토양정착에 있어서 안정성 향상을 위한 것이다.

[0043]

혼합균주의 배양액을 이용한 포장시험

[0044]

답작에 대한 제조효과를 확인하기 위하여 충남 논산시 연무읍 양지리에 위치한 논에서 2014년 봄에 수행하였다. 논 관리의 방법은 상법에 준하였다. 즉 4월 중순 논토양을 경운한 다음 5월10일경 물대기와 씨레질을 하고 모내기(삼광벼)하였다. 남북으로 낸 논둑을 중심으로 좌측은 무처리구, 우측은 처리구로 구분하였으며(도 6 참고), 처리구에 대하여는 4월 중순 논토양을 경운한 다음 즉시 혼합배양액 DAG-B와 영양액을 사용하였다. 단보(10a)당 DAG-B 500ml와 영양제 1,000ml를 물 300ℓ에 희석하여 토양표면에 고르게 분무 살포하였다. 모내기 후 무처리구와 처리구에 있어서의 잡초발생 상태를 비교관찰하였다.

[0045]

실시예 1. 균주의 분리 및 동정 결과

[0046]

앞에서 기술한 방법에 따라 유산균 4종, 효모 4종을 분리하고, 이들의 rDNA 염기서열 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 쿠드리야브제비 (*Pichia kudriavzevii*)로, ZBA-22는 지고사카로마이세스 바일리 (*Zygosaccharomyces bailii*)로, ZBP-52는 지고사카로마이세스 비스포러스 (*Zygosaccharomyces bisporus*)로 동정되었다.

[0047]

실시예 2. 발아 억제 활성을 가지는 혼합 균주의 선발

[0048]

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.

[0049]

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 쿠드리야브제비 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.

[0050]

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

[0051]

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	

[0052]

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

[0053]

실시예 3. 선발된 혼합균주 배양액의 발아 억제 활성

[0054]

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 잡초 식물을 확대하여 즉 피, 바랭이(화본과 잡초) 및 털비름, 개망초, 어저귀(광엽 잡초)의 종자에 대하여 발아 억제 활성을 시험하였다.

[0055]

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

[0056]

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

[0057] * 무처리구에서의 발아율에 대한 처리구의 발아율

표 3

[0058] 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

[0059] * 무처리구에서의 발아율에 대한 처리구의 발아율

표 4

[0060] 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

[0061] * 무처리구에서의 발아율에 대한 처리구의 발아율

표 5

[0062] 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

[0063]

* 무처리구에서의 발아율에 대한 처리구의 발아율

표 6

[0064]

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

[0065]

* 무처리구에서의 발아율에 대한 처리구의 발아율

[0066]

실시에 4. 혼합균주의 배양액을 이용한 포장시험 결과

[0067]

4월 중순 시험약제의 처리 후 모내기까지 4월17일에는 20mm, 27-29일에는 60mm수준의 강우가 있어서 토양의 습윤상태를 유지하였으며, 물대기를 한 다음 5월11일 10mm이상의 강우가 있어서 모내기는 13일에 하였다. 모내기 이후 처리구와 무처리구에 있어서의 잡초 발생상태를 비교관찰하였다. 모내기 15일 이후의 모습을 촬영하여 도 6에 제시하였다. 도 6에서 보는 바와 같이 좌측 무처리구에서는 잡초가 움터 올라와 논전체가 녹색을 띠는데 반하여, 우측 처리구에서는 잡초발생이 현저히 감소하였고 논바닥도 비교적 깨끗하게 보였다. 처리구에서는 더이상 김매기를 하지 않아도 지장 없었으며 출수기까지 그대로 지속되었다.

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



서 열 목 록

- <110> Nongyega Co., Ltd.
The Industry & Academic Cooperation in Chungnam National University (IAC)
- <120> Mixed strain for inhibiting germination of weed plant seed and
uses thereof as herbicide
- <130> PN14301
- <160> 12
- <170> KopatentIn 2.0
- <210> 1
- <211> 1216
- <212> DNA
- <213> Lactobacillus plantarum subsp. plantarum LPT30
- <400> 1

ccatggccac agctataatg cagtcgaacg aactctggta ttgattgggtg cttgcatcat 60

gatttacatt tgagtgagtg gcgaactggt gagtaacacg tgggaaacct gcccagaagc 120

gggggataac acctggaaac agatgctaata accgcataac aacttggacc gcatgggtccg 180

agcttgaaag atggcttcgg ctatcacttt tggatgggtcc cgcggcggtat tagctagatg 240

gtggggtaac ggctcaccat ggcaatgata cgtagccgac ctgagagggt aatcgccac 300

attgggactg agacacggcc caaactccta cgggaggcag cagtagggaa tcttcacaa 360

tggacgaaag tctgatggag caacgccgcg tgagtgaaga agggtttcgg ctcgtaaaac 420

tctgttgta aagaagaaca tatctgagag taactgttca ggtattgacg gtatttaacc 480

agaaagccac ggctaactac gtgccagcag ccgcggtaat acgtagggtg caagcgttgt 540

ccggatttat tgggcgtaaa gcgagcgag gcggtttttt aagtctgatg tgaaagcctt 600

cggctcaacc gaagaagtgc atcggaaact gggaaacttg agtgcagaag aggacagtgg 660

aactccatgt gtagcggtag 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 cgggggcccc cacaagcggg ggagcatgtg gtttaattcg aagctacgag 960

aagaaccctt accaggtctt gacatactat gcaaatctaa gagattagac gttcccttcg 1020

gggacatgga tacaggtggt gcatggttgt cgtcagctcg tgtcgtgaga tgttgggtta 1080

agtccgcac gagcgcaacc ttattatcag ttgccagcaa tagtgggcac tctgggtgga 1140

gactgcggtg aacaaaccgc 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 gtgcttgca	60
tgatttcaac aatgaagcga gtggcgaact ggtgagtaac acgtgggaaa tctgcccaga	120
agcaggggat aacacttgga aacaggtgct aataccgtat aacaacaaaa tccgatgga	180
ttttgtttga aaggtggctt cggctatcac ttctggatga tcccgcgcg tattagttag	240
ttggtgaggt aaagcccac caagacgatg atacgtagcc gacctgagag ggtaatcggc	300
cacattggga ctgagacacg gcccaaacct 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 cagcggttt ttaagtctg atgtgaaagc	600
cttcggctta accggagaag tgcacggaa actgggagac ttgagtgcag aagaggacag	660
tggaactcca tgtgtagcgg tggaaatgcgt agatatatgg aagaacacca gtggcgaagg	720
cggctgtcta gtctgtaact gacgtgagg ctgaaaagca tgggtagcga acaggattag	780
ataccctggt agtccatgcc gtaaacgatg agtgctaagt gttggagggt ttccgccctt	840
cagtgtgca 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	
ggcagtgctg cgtgctatac atgcaagtcg aacgcgtctc cgtaaatgat tttaggtgct	60
tgcacttgaa agatttaaca ttgagacgag tggcgaactg gtgagtaaca cgtgggtaac	120
ctgcccttga agtaggggat aacacttgga aacaggtgct aataccgtat aacaacaaaa	180

accacctggt tttggtttaa aagacggctt cggctgtcac ttaggatgg acccgggcg	240
tattagcttg ttgtaaggt aacggcttac caaggcgtg atacgtagcc gacctgagag	300
ggtaatcggc cacattggga ctgagacacg gcccaaaactc 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 tgtccggtt tattgggcgt aaagcgagcg cagcggttt ttaggtctg	600
atgtgaaagc cttcggtta accggagaag tgcacggaa accgggagac ttgagtgcag	660
aagaggacag tggaactcca tgtgtagcgg tgaatgcgt agatatatgg aagaacacca	720
gtggcgaagg cggctgtctg gtcgtgaact gacgtgagg ctgaaagca tgggtagcga	780
acaggattag ataccctggt agtccatgcc gtaaacgatg agtgctaagt gttggagggt	840
ttccgccctt cagtgtgca gctaacgcat taagcactcc gcctggggag tacgaccgca	900
aggttgaaac tcaaaggaat tgacgggggc ccgcacaagc ggtggagcat gtggtttaat	960
tcgatgctac gcgaagaacc ttaccagtc	990
<210> 4	
<211> 1005	
<212> DNA	
<213> Lactobacillus paracasei subsp. tolerans LPC63	
<400> 4	
ggcgggggcg ggtgctataa tgcagtcgaa cgagttctcg ttgatgatcg gtgcttgac	60
cgagattcaa catggaacga gtggcggacg ggtgagtaac acgtgggtaa cctgccctta	120
agtgggggat aacatttga aacagatgct aataccgcat agatccaaga accgcatggt	180
tcttggtga aagatggcgt aagctatcgc ttttggatgg acccgggcg tattagctag	240
ttggtgaggt aatggctcac caaggcgtg atacgtagcc gaactgagag gttgatcggc	300
cacattggga ctgagacacg gcccaaaactc ctacgggagg cagcagtagg gaatcttcca	360
caatggacgc aagtctgatg gagcaacgcc gcgtgagtga agaaggcttt cgggtcgtaa	420
aactctgttg ttggagaaga atggtcggca gagtaactgt tgcggcgtg acggtatcca	480
accagaaagc cacggctaac tacgtgccag cagccgcggt aatacgtagg tggcaagcgt	540
tatccggtt tattgggcgt aaagcgagcg cagcggttt ttaagtctg atgtgaaagc	600
cctcggtta accgaggaag cgcatcgaa actgggaac ttgagtgcag aagaggacag	660
tggaactcca tgtgtagcgg tgaatgcgt 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 cgcacaagc 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 ctaaaatgt	60
ggaatatagc atatagtcga caagagaaat ctacgaaaaa caaacaaaac tttcaacaac	120
ggatctcttg gttctcgcgt cgatgaagag cgcagcgaaa tgcgatacct agtgtgaatt	180
gcagccatcg tgaatcatcg agttcttgaa cgcacattgc gccctcggc attccggggg	240
gcatgcctgt ttgagcgtcg tttccatctt gcgcgtgcgc agagttgggg gagcggagcg	300
gacgacgtgt aaagagcgtc ggagctgcga ctgcctgaa agggagcgaa gctggccgag	360
cgaactagac ttttttcag ggacgcttgg cggccgagag cgagtgttc 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 ttttttggga	180
agatagctct tgtgcgtgct tcccagaggt gacaaacaca aacaactttt tattattata	240
aaccagtcaa aaccaatttc gttatgaaat taaaaatatt taaaactttc aacaacggat	300
ctcttggttc tcgcatcgat gaagaacgca gcgaaatcgc atacgtaatg tgaattgcag	360
aattccgtga atcatcgaat ctttgaacgc acattgcgcc ccttggtatt ccagggggca	420

tgccgtgttg agcgtcatTT ccttctcaaa caatcatgtt tggtagtgag tgatactctg	480
tcaagggtta acttgaaatt gctagcctgt tatttggttg tgattttgct ggcttggatg	540
actttgtcca gtctagctaa taccgaattg tcgtattagg ttttaccac ttcggcagac	600
tgtgtgttgg ctcgggcgct ttaaagactt tgtcgtaaac gatttatcgt ttgtttgagc	660
ttttcgcata cgcaatccgg cgaacaatac tctcaaagt ttgacctcaa tcaggtagga	720
ataccgctg aacttaagca tatcaataag gcggg	755

<210> 7

<211> 689

<212> DNA

<213> *Zygosaccharomyces bailii* ZBA-22

<400> 7

gaattactga ttgacgagtc tggagtagtt gtgttctctc tgttttttca aggctgcgc	60
ttaattgcgc ggtctagagc ggaggagatt aagcatagtt actctggctt tcaatttaca	120
cacagtggag tttctacttt ttttattctt ctttgggagg atgggttcgt cccactccca	180
gaggtaaaaa cacaacaat tttttttttt ttttttttaa attacacagc caaaaacaaa	240
aacaaaaaaa caaatattc aaaattttca acaacggatc tctgggttcc cccatcaata	300
aaaaaccac caaaggcaa aacgaaagg gaattgcaa attccgggaa tcatcaaatc	360

tttaaaccct cttgccctc ctgggaattc cggggggcag gccggtttga gcgtctttc	420
cttcccaaac attcgggttg ggaaggagg gatacccggt ttttcattgg ggtaacttg	480
aaattgcaac ctttttgga acgctgttgg ggagtttagg cggaacgtct tgctctccct	540
ttctaccaa tgcgaatag gtttaccgac tccacagacg gatagagatt ggtgatgata	600
caaatcgagc tcgctaatt ttttttgcg cctggcaaca actcccaagt tgactcaatc	660
ggagaatccc gtgacttaca atcatacca	689

<210> 8

<211> 728

<212> DNA

<213> *Zygosaccharomyces bisporus* ZBP-52

<400> 8

aatctgattg gcagtcattg ggtagtagag ttttcggct ctttcttttg cttttgggcc	60
tgcgcttagt tgcgcgtct agagtagagg gagcttctac tgcttcggct tacaatttac	120
acacagtgga gtttctacta tttttcttct ttgggaggat gatgaaaac tatctactcc	180
cagaggtaaa cacaacaat atttttatit ttatitttac acacagtcaa atgaatacaa	240

aaaaaaaatt ataatttca aaactttcaa caacggatct cttggttctc gcatcgatga 300
 aaaacgcagc gaaatgcgat acgtaatgtg aattgcaaaa ttccgtgaat catcgaatct 360

ttgaacgcac attgcgcccc ttggtattcc agggggcatg cctgtttgag cgtcatttcc 420
 ttctcaaaca cttgtgtttg gtagtgagtg atactctgtt aaaactgggt tagcttgaaa 480
 ttgaagcct tttggggatg cgtctagaga agagtttttag gcggaaacgt ctggctcctc 540
 ctctattttc ctttaaccaa atgtcgtatt aggttttacc gactcggcag acaggttgct 600
 ggagactgag gtgggtgata gaaatatcga acttttctgc gcgcctttgg caaacaatac 660
 tctctaagct tgacctcaaa tcaggtagga ttaccgctg 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