



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년06월17일  
(11) 등록번호 10-2124060  
(24) 등록일자 2020년06월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C12N 1/20 (2006.01) A01N 63/10 (2020.01)  
C12R 1/07 (2006.01)  
(52) CPC특허분류  
C12N 1/20 (2013.01)  
A01N 63/10 (2020.01)  
(21) 출원번호 10-2018-0157369  
(22) 출원일자 2018년12월07일  
심사청구일자 2018년12월07일  
(56) 선행기술조사문헌  
KR1020140063268 A  
KR101190650 B1  
KR100781472 B1  
KR100995286 B1

(73) 특허권자  
환경대학교 산학협력단  
경기도 안성시 중앙로 327(석정동)  
(72) 발명자  
박경석  
전라북도 김제시 황산면 용마4길 184-14 ()  
남기웅  
경기도 안성시 중앙로 327, 환경대학교 제1농학관  
311호  
(뒷면에 계속)  
(74) 대리인  
신명건, 양성보

전체 청구항 수 : 총 7 항

심사관 : 김지연

(54) 발명의 명칭 신규한 바실러스 벨레젠시스 MWS28와 이를 포함하는 미생물 방제제 및 이를 생산하는 방법

(57) 요약

본 발명은 포도 흰얼룩병균인 *A. acutatum*과 *T. roseum*를 효과적으로 방제(억제) 할 수 있는 바실러스속 미생물 균주(MWS 28)를 식물근권으로부터 분리하고, 이를 바실러스 벨레젠시스(*Bacillus velezensis*)(균주기탁번호 KACC MWS 28)로 명명하고, 포도 흰얼룩병균을 방제하기에 적합한 미생물 제제와 그 제조방법에 관한 것이다.

(뒷면에 계속)

대표도 - 도2

Bacillus velezensis MWS28 16s RNA sequence

TCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAG  
TCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGC  
GGCGGACGGGTGAGTAACAGTGGGTAACCTGCCTGTG  
AGACTGGGATAACTCGGGAACCGGGGCTAATACCG  
GATGGTTGTTGAACCGCATGGTTCAGACATAAAGGTTG  
GCTTCGGCTACCTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTA  
GCTAGTTGGTGAAGTAACGGCTCACGAAGCGACGATG  
CGTAGCCGACCTGAGAGGGTGTATCGGCCACACTGGGA  
CTGAGACACGGCCGAGACTCTACGGGAGGCAGCAGT  
AGGGAATCTCCGCAATGGAAGAGTCTGACGGAGCA  
ACGCCGCTGAGTGATGAAGGTTTCGGATCGTAAAGCT  
CTGTTGTAGGGAAGAAAGTGCCTTCAAATAGGGC  
GGCACCTTGACGGTACCTAACGAAAGCCACGGCTAA  
CTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAG  
CGTTGCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGC  
GGTTTCTAAGTCTGATGTAAGCCCGGCTCAACCG  
GGGAGGGTCAATTGGAACCTGGGAACTTGAGTGCAGA  
AGAGGAGAGTGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGC  
GTAGAGATGTGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGCGGACT  
CTCTGGTCTGAATGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGG  
GGAGCGAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCCG  
TAAACGATGAGTGCTAAGTGTAGGGGGTTTCCGCCCT  
TAGTGTGACGCTAACGATTAAGCACTCCGCTGGGGGA  
GTACGGTGCAGAAAGCTGAACTCAAAGGAATTGACGG  
GGGCCCGCAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTGGA  
AGCAACGCGAAGAACCTTACAGGCTTGTACATCCTCTG  
ACAATCTAGAGATAGGACGTCCCTTCGGGGCGAGAG  
TGACAGGTGGTGCATGGTTGTCTGACGCTGTGTCTGTA  
GATGTTGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTTGAT  
CTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTTAAGGTGACT  
GCCGGTGACAAACCGGAGGAAGTGGGGATGACGTC  
AAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACAGTGTCT  
ACAATGGACAGAAACAAAGGCGAGCGAAACCGCGAGG  
TTAAGCCAAATCCCAAAATCTTCTCAGTTCGGATCGCA  
GTCTGAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGTAGTAA  
TCGCGGATCAGCATGTTCCGCTGTACACA<sub>c</sub>CGCCCGT  
CACACCCAGGtTTGTACGAAGTC

본 발명은 신규한 바실러스 벨레젠시스 MWS28 균주를 함유하여 포도 흰얼룩병균인 *A. acutatum*과 *T. roseum*를 효과적으로 방제하는 친환경적 미생물 방제제를 이용하여 포도 재배시 농가경제 큰 타격을 주는 포도 흰얼룩병균인 *A. acremonium*과 *T. roseum*의 두 가지 병원성 미생물균을 탁월하게 방제하는 효과를 가진다. 추가하여 바실러스 벨레젠시스 MWS28 균주를  $1 \times 10^8$  cfu/ml 이상 밀도의 유효성분으로 함유하게 하고 PEMS(PolyoxyEthylene Methylpoly Siloxane) 0.02 중량부와, 길항균 세포의 포도 표면 부착성을 증진하기 위해 0.3 중량부 알진염(Sodium alginate)을 더 첨가하여 혼합한 미생물 방제제는 화학방제제와 거의 유사한 탁월한 효과를 가진다.

(52) CPC특허분류

C12R 1/07 (2013.01)

(72) 발명자

진소라

충청북도 제천시 하소로 88, 206동 704호(하소주공 2단지)

이혜민

경기도 용인시 기흥구 용구대로 2469번길 20, 208호(보정동, 2동 208호(보정동, 죽전자이 2차)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 117121011SB010

부처명 농림축산식품부

연구관리전문기관 농림식품기술기획평가원(IPET)

연구사업명 프로바이오틱 바실러스균을 이용한 포도흰얼룩병 방제제 개발

연구과제명 프로바이오틱 바실러스균을 이용한 포도흰얼룩병 방제제 개발

기여율 1/1

주관기관 환경대학교 산학협력단

연구기간 2017.12.29 ~ 2018.12.28

공지예외적용 : 있음

**명세서**

**청구범위**

**청구항 1**

포도 흰얼룩병균을 방제할 수 있는 신규한 바실러스 벨레젠시스(*Bacillus velezensis*) MWS 28(균주기탁번호 KACC 81077BP).

**청구항 2**

제1항에 있어서, 상기 포도 흰얼룩병균은 *Trichothecium roseum* 또는 *Acremonium acutatum* 중 1종 이상인 것을 특징으로 하는 신규한 바실러스 벨레젠시스(*Bacillus velezensis*) MWS 28(균주기탁번호 KACC 81077BP).

**청구항 3**

제1항 또는 제2항의 상기 바실러스 벨레젠시스(*Bacillus velezensis*) MWS 28(균주기탁번호 KACC 81077BP)균주의 밀도는  $1 \times 10^8$  cfu/ml 이상으로 함유한 포도 흰얼룩병 미생물 방제제.

**청구항 4**

제3항에 있어서, 상기 바실러스 벨레젠시스(*Bacillus velezensis*) MWS 28(균주기탁번호 KACC 81077BP)균주에 PEMS(PolyoxyEthylene Methylpoly Siloxane) 0.02중량부를 혼합 제조한 것으로 상기 바실러스 벨레젠시스 MWS 28균주를 유효성분으로 함유한 포도 흰얼룩병 미생물 방제제.

**청구항 5**

제3항에 있어서, 상기 바실러스 벨레젠시스(*Bacillus velezensis*) MWS 28(균주기탁번호 KACC 81077BP)균주에 알진염(Sodium alginate) 0.3중량부를 더 추가하여 혼합 제조하여 상기 바실러스 벨레젠시스 MWS 28균주를 유효 성분으로 함유한 포도 흰얼룩병 미생물 방제제.

**청구항 6**

바실러스 벨레젠시스(*Bacillus velezensis*) MWS 28(균주기탁번호 KACC 81077BP)균주를 토양으로부터 분리 동정하는 단계; 상기 동정하여 배양한  $1 \times 10^8$  cfu/ml 이상의 밀도로 함유한 바실러스 벨레젠시스 MWS 28균주를 배양액 제조하는 단계; 및 바실러스 벨레젠시스 MWS 28균주를 배양액에 PEMS(PolyoxyEthylene Methylpoly Siloxane) 0.02 중량부를 혼합하고 통상의 부형제를 더 첨가 혼합하여 미생물 제제로 제조하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 포도 흰얼룩병균 미생물 방제제의 제조방법.

**청구항 7**

제6항에 있어서, 바실러스 벨레젠시스 MWS 28균주를 배양액에 PEMS(PolyoxyEthylene Methylpoly Siloxane) 0.02중량부를 혼합하는 단계에서 길항균 세포의 포도 표면 부착성을 증진하기 위해 0.3중량부 알진염(Sodium alginate)을 더 첨가하고 통상의 부형제를 더 첨가 혼합하여 미생물 제제로 제조하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 포도 흰얼룩병균 미생물 방제제의 제조방법.

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] 본 발명의 신규한 바실러스속 미생물 균주를 이용한 미생물 방제제 및 그 제조방법에 관한 것으로서, 상세하게는 포도나무 근권의 토양으로부터 분리한 바실러스 벨레젠시스(*Bacillus velezensis*)를 배양한 후 제형화하고, 이를 포도에 처리함으로써 포도 흰얼룩병균인 *Acremonium acutatum*과 *Trichothecium roseum*을 효과적으로 방제하는 것이다.

**배경 기술**

- [0002] 최근 포도 주산지를 중심으로 결과지와 과실에 흰색곰팡이가 부착하여 얼룩이 생겨서 상품으로의 가치를 크게 떨어뜨리는 피해가 발생하고 있다. 포도는 강수량이 적고 온난한 기후에서 재배하는 과수로 여름철 습도가 높고 강우가 집중되는 우리나라의 경우 병해충에 의한 피해가 많다. 착색기 이후에 주로 발견되고 있는 이런 현상은 잦은 강우로 인해 습한 날씨가 이어질수록 심하고, 시설재배나 간이 비 가림 재배의 경우에 더 심한 경향이다. 또한 포도는 와인 제조용 보다는 주로 생식용으로 소비되는 특성상 과실의 당도와 외관은 포도품질과 등급을 결정한다. 특히 포도흰얼룩병은 *Acremonium acutatum*과 *Trichothecium roseum*에 의하여 주로 발생하는 것으로 밝혀졌으며 주로 습도가 높거나 환기가 불량한 시설 재배에서 발생하고, 가지, 잎, 줄기, 포도송이 등에서 발병하며 수확기에 접어들면 포도의 표면에 급격하게 증가하여 경제적 손실을 초래한다.
- [0003] 특히 포도흰얼룩병은 불량한 노지 및 시설하우스 포도농가에 피해가 많으며 수확기가 임박한 8월 중순 이후부터 발병이 크게 증가하는 것으로 알려져 있다. 최근 시설 재배지를 중심으로 친환경 포도 생산 면적이 증가하고 있지만 현재까지 이러한 포도 나무 흰얼룩증상 방제는 아직 등록된 약제가 없으며 수확기에 임박하여 발생하게 되므로 화학약제의 사용은 권장되지 않지만 부득이하게 사용되는 경우 유기 합성 약제(디페노코나졸유제)를 주로 이용하고 있어 소비자의 건강에 안좋은 영향을 미치는 문제점이 있다.
- [0004] 그래서 최근 과수의 경우 생물적 방제는 주로 바실러스 균주를 이용한 병해방제용으로 연구되어졌는데 그 중 *Bacillus subtilis*, *B. amyloliquefaciens* 등의 *Bacillus* 속 미생물을 이용한 포도노균병, 복숭아잣빛무늬병 등 다양한 병해에 대한 생물방제제의 연구가 시도되고 있다. 이와 관련하여 선행발명(공개번호 10-2009-0085815)에서는 토양에서 선발한 길항미생물 *Pseudomonas putida* biotype A (F84) 균주 또는 그 균주로부터 추출된 물질 및 이를 함유한 친환경 미생물관련제제가 선행기술이 개시된 바 있다.

**선행기술문헌**

**특허문헌**

- [0005] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허공보 10-2009-0085815  
 (특허문헌 0002) 발명의 명칭 : 포도 나무 흰얼룩증상 방제에 이용하는 슈도모나스 푸티다바이오타입 에이 균주 또는 그 균주로부터 추출된 물질

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

- [0006] 본 발명은 상기와 같은 종래 기술의 문제점을 해결하기 위하여 안출된 것으로서, 본 발명의 목적은 신규한 바실러스속 미생물 균주를 이용한 미생물제제 및 그 제조방법에 관한 것으로서, 특히 포도나무 근권의 토양으로부터 분리한 바실러스 벨레젠시스(*Bacillus velezensis*)를 배양한 후 제형화하고, 이를 포도에 처리함으로써 포도 흰얼룩병균인 *A. acutatum*과 *T. roseum*를 효과적으로 방제하고자 하는것이다.
- [0007] 본 발명의 다른 목적은 포도 흰얼룩병에 대한 MWS28 균주의 길항효과를 증진시키기 위해 신규한 바실러스 벨레젠시스 MWS28 균주의 밀도를  $1 \times 10^8$  cfu/ml 이상 유효한 성분으로 함유한 포도 흰얼룩병 미생물방제제를 제공하였다.
- [0008] 그리고 본 발명의 다른 목적은 바실러스 벨레젠시스 MWS 28균주를 배양액에 PEMS(Polyoxyethylene Methylpolysiloxane) 0.02중량부를 혼합하는 단계에서 길항균 세포의 포도 표면 부착성을 증진하기 위해 0.3중량부 알진염(Sodium alginate)을 더 첨가하고 통상의 부형제를 더 첨가 혼합하여 미생물 제제로 제조하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 포도흰얼룩병균 미생물 방제제의 제조방법을 제공하였다.

**과제의 해결 수단**

- [0009] 본 발명은 상기의 목적을 달성하기 위한 포도흰얼룩병균 미생물 방제제의 제조방법 및 포도흰얼룩병균 방제용 미생물제제에 있어서, 포도흰얼룩병균인 *A. acutatum*과 *T. roseum*를 효과적으로 방제할 수 있는 바실러스속 미생물 균주(MWS 28)를 식물근권으로부터 분리하고, 이를 바실러스 벨레젠시스 (*Bacillus velezensis* MWS 28)로 명

명하고, 포도 흰얼룩병균을 방제하기에 적합한 미생물 방제제를 제공하고자 하는 것이다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 신규한 바실러스 벨레젠시스(*Bacillus velezensis*) MWS 28(균주기탁번호 KACC 81077BP)균주를 밀도  $1 \times 10^8$  cfu/ml 이상 유효한 성분으로 함유한 포도 흰얼룩병 미생물 방제제를 제공하고자 하는 것이다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 신규한 바실러스 벨레젠시스(*Bacillus velezensis*) MWS 28(균주기탁번호 KACC 81077BP)균주에 PEMS(PolyoxyEthylene Methylpoly Siloxane) 0.02중량부를 혼합 제조한 포도 흰얼룩병균 미생물 방제제를 제공하고자 하는 것이다.

[0012] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 바실러스 벨레젠시스(*Bacillus velezensis*) MWS 28(균주기탁번호 KACC 81077BP)균주에 PEMS(PolyoxyEthylene Methylpoly Siloxane) 0.02중량부를 혼합 제조한 후 추가하여 알진염(Sodium alginate) 0.3 중량부를 더 혼합 제조한 포도 흰얼룩병균 미생물 방제제를 제공하고자 한다.

[0013] 본 발명의 또 다른 목적은  $1 \times 10^8$  cfu/ml 이상 밀도의 유효성분으로 함유한 바실러스 벨레젠시스 (*Bacillus velezensis*) MWS 28균주 배양액에 PEMS(PolyoxyEthylene Methylpoly Siloxane) 0.02중량부를 혼합하는 단계에서 길항균 세포의 포도 표면 부착성을 증진하기 위해 0.3중량부 알진염(Sodium alginate)을 더 첨가하고 통상의 부형제를 더 첨가 혼합하여 미생물 제제로 제조하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 포도흰얼룩병균 미생물 방제제의 제조방법을 제공하고자 한다.

### 발명의 효과

[0014] 본 발명은 신규한 바실러스 벨레젠시스 MWS28 균주를 함유하여 포도 흰얼룩병균인 *A. acutatum*과 *T. roseum*를 효과적으로 방제하는 친환경적 미생물 방제제를 이용하여 포도 재배시 농가경제 큰 타격을 주는 포도 흰얼룩병균인 *A. acutatum*과 *T. roseum*의 두 가지 병원성 미생물균을 탁월하게 방제하는 효과를 가진다. 특히 우리나라 포도 농가의 경우는 와인생산을 위한 포도보다 식용을 위한 포도를 주로 재배하는데 고온다습한 기후조건과 비닐 등 시설재배를 하는 농가의 수확기에 포도의 품질을 떨어뜨리는 포도 흰얼룩병균의 병반 및 곰팡이와 같이 하얗게 퍼지는 포도송이로 인하여 농가소득에 많은 손해를 가져온다.

[0015] 특히 수확기에는 포도송이 등에 화학방제제를 사용하는 경우 화학물질이 잔류되는 경우가 있어 화학방제제 사용도 제한되므로, 이로 인하여 본 발명의 바실러스 벨레젠시스 MWS28 균주를 이용한 미생물 방제제는 수확기 포도 농가에 상당한 농가 소득을 가져오게 되었다.

[0016] 추가하여 본 발명의 실험효과에서 밝혀졌듯이 바실러스 벨레젠시스 MWS28 균주를  $1 \times 10^8$  cfu/ml 이상 밀도의 유효성분으로 함유하게 하고 PEMS(PolyoxyEthylene Methylpoly Siloxane) 0.02 중량부와, 길항균 세포의 포도 표면 부착성을 증진하기 위해 0.3 중량부 알진염(Sodium alginate)을 더 첨가하여 혼합한 미생물 방제제는 화학방제제와 거의 유사한 탁월한 효과가 나타난다는 것을 확인하였다.

### 도면의 간단한 설명

[0017] 도 1은 16S rRNA gene 염기서열 분석을 통한 본 발명에 따른 미생물 바실러스 벨레젠시스(*B. velezensis* MWS28)의 계통도이다.

도 2는 본 발명의 바실러스 벨레젠시스(*Bacillus velezensis*)MWS28의 결정된 16S rRNA gene 염기서열을 나타낸 도면이다.

도 3은 *B. velezensis* MWS28 처리에 의한 *A. acutatum*과 *T. roseum*의 두 가지 병원성 미생물균에 대한 항진균 활성을 나타낸 도면이다.

도 4는 어린 포도잎 절편을 이용한 생물검정 결과, *A. acutatum*에 MWS28균의 처리로 병변지역이 대폭 감소된 것을 나타낸 도면이다(좌 :대조구, 우 :MWS28처리구).

도 5는 어린 포도잎 절편을 이용한 생물검정 결과, *T. roseum*에 MWS28균의 처리로 병변지역이 대폭 감소된 것을 나타낸 도면이다(좌 :대조구, 우 :MWS28처리구).

도 6은 *B. velezensis* MWS28의 세포 및 곰팡이 포자 상등액을 ml 당  $1 \times 10^8$  세포 및 ml당  $1 \times 10^5$  포자로 각각 조정하거나 PEMS 0.02 중량% 또는 소디움알지 네이트 0.3 중량%의 혼합 병용하였고, 최종 처리에는 PEMS 0.02 중

량% 및 소듐 알지네이트 0.3 중량%의 혼합 첨가하였고. 수확기 후 포도 'Campbell early'에 *B. velezensis* MWS28 처리를 병용하여 *T. roseum*로 원인되는 포도흰얼룩병균의 억제에 대하여 나타낸 도면이다.

도 7은 *B. velezensis* MWS28의 세포 및 곰팡이 포자 상등액을 ml 당  $1 \times 10^8$  세포 및 ml당  $1 \times 10^5$  포자로 각각 조정하거나 PEMS 0.02 중량% 또는 소듐 알지네이트 0.3 중량%의 혼합 병용하였고, 최종 처리에는 PEMS 0.02 중량% 및 소듐 알지네이트 0.3 중량%의 혼합 첨가하였고. 수확기 후 포도 'Campbell early'에 *B. velezensis* MWS28 처리를 병용하여 *A. acutatum*이 원인되는 포도흰얼룩병균의 억제에 대하여 나타낸 도면이다.

도 8은 포도 흰얼룩병균에 걸린 (A) 대조군 처리구, (B) 디페노코나졸(Difenoconazole)의 화학방제제 스프레이 처리구, (C) *B. velezensis* MWS28의 세포상등액 처리구, (D) *B. velezensis* MWS28의 세포 상등액과 PEMS 0.02 중량% 및 소듐 알지네이트 0.3 중량%을 혼합 처리구에 포도 'Kyoho'의 포도 흰얼룩병의 억제에 대하여 나타낸 도면이다(처리 후 7일 후에 검사).

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

- [0018] 본 명세서 및 청구범위에 사용되는 용어나 단어는 통상적이거나 사전적인 의미로 한정 해석되지 않으며, 발명자는 그 자신의 발명을 가장 최선의 방법으로 설명하기 위해 용어의 개념을 적절하게 정의할 수 있다는 점에 입각하여, 본 발명의 기술적 사상에 부합하는 의미와 개념으로 해석되어야 한다. 따라서, 본 발명의 명세서에 기재된 실시예와 도면에 도시된 구성은 본 발명의 가장 바람직한 일 실시예에 불과할 뿐이고 본 발명의 기술적 사상을 모두 대변하는 것은 아닌바, 본 발명의 출원 시점에 있어서 이를 대체할 수 있는 다양한 균등물과 변형예들이 가능하거나 존재할 수 있음을 이해하여야 할 것이다.
- [0019] [실시예 1] 바실러스 벨레젠시스 MWS 28 균주의 동정 및 병원균의 배양
- [0020] 포도나무 근권의 토양으로부터 분리한 바실러스 균주 중 포도흰얼룩병에 억제효과가 우수한 MWS28 균주를 선발하여 16S rRNA 분석을 통하여 동정하였다. 그리고 공시병원균인 포도 흰얼룩병균은 한경대 원예학과 과수학 실험실에 보존 중인 *Tricothecium roseum* 과 *Acremonium acutatum* 균주를 PDA 사면배지에 보존하여 사용하였다.
- [0021] [실험예 1] 바실러스 벨레젠시스 MWS28 균주의 동정
- [0022] 토양으로부터 분리한 바실러스 균주 중 포도흰얼룩병에 억제효과가 우수한 MWS28 균주를 선발하여 16S rRNA 분석을 통하여 동정하는 실험을 하였다.
- [0023] 상기 신규한 바실러스 벨레젠시스(*Bacillus velezensis*) 길항미생물의 chromosomal DNA 추출은 3ml의 LB broth 배지에서 16시간 동안 배양시킨 배양액으로 InstaGenetm Matrix(BIORAD)을 이용하여 추출하였다. 16S rRNA 부분의 증폭을 위하여 universal primer인 27F 5 '(AGA GTT TGA TCM TGG CTC CTC AG)3'와 1492R primer5'(TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T)3'를 이용하였다. PCR은 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems, UK)를 사용하여 98℃에서 10분의 denaturation 후 98℃에서 10초, 55℃에서 30초, 72℃에서 1분 과정을 35회 반복한 후 마지막으로 72℃에서 7분간 반응시켰다. PCR 산물은 전기영동 후 UV-trans illuminator에서 밴드를 확인하였다. 확인된 밴드는 MEGA-spin™ Agarose Gel Extraction Kit(Intron, Korea)의 방법에 따라 정제한 후 염기서열 분석을 위해 시퀀싱 분석 서비스(Macrogen, South Korea)를 이용하였다. 16S rRNA를 결과를 MEGA X program에서 Clustal W를 이용하여 염기서열을 분석한 후 (Chenna et al., 2003) 염기서열의 homology는 천랩의 BLAST program(EzTaxon-e)을 이용하여 데이터를 비교 분석하였으며(Chun et al.,2007), MEGA X program을 이용하여 계통 분류도를 작성하였고(도 1), 그리고 본 발명의 바실러스 벨레젠시스(*Bacillus velezensis*)MWS28의 결정된 16S rRNA gene 염기서열을 도 2에서와 같은 MWS28 16s RNA sequence을 확인할 수 있었다(도 2). 선발길항균 MWS28은 16s rRNA 염기서열 분석 결과, *B. velezensis* CR-502T와 99.93%, *B. siamensis* KCTC13613T와 99.93%, *B. subtilis* subsp. *subtilis* NCIB3610T와 99.78%, *B. amyloliquefaciens* DSM7T와 99.70%의 매우 높은 유사성을 보였으며. 계통도 분석 결과, *B. amyloliquefaciens* group과 같은 계통인 것을 확인할 수 있었다(도 1). 계통도 작성은 Neighbor-joining 알고리즘(Saitou and Nei., 1987)을 사용하였고, 1000회 반복으로 bootstrapping (Felsenstein., 1985)을 수행하여 계통도를 작성하였다.
- [0024] *B. amyloliquefaciens* group의 정확한 동정을 위해 생화학검정을 실시하였다. 생화학 검정은 매뉴얼에 따라 API50CHB kit (BioMereux, France)를 이용하여 분석하였다. 선발된 균주는 20% glycerol이 포함된 TSB 배지가 담긴 cryovial (1.5ml Nalgene)에 담아 -70℃ 초저온 냉동고에 보존하였으며 TSA 배지에 옮겨 시험에 공시하였다. TSA 에 12시간 배양된 길항균은 멸균 증류수에 희석하여 농도 별로 포도에 살포하거나 접종원으로 사용하였다.

표 1

[0025] 생화학검정에 따른 4개의 균주 간의 표현형 차이

Assimilation	<i>amyloliquefaciens</i> DSM7	<i>siamensis</i> KCTC 13613	<i>velezensis</i> LMG22478	<i>velezensis</i> LMG22478
L-Arabinose	w	+	+	+
D-Xylose	w	+	+	+
Mannose	+	w	+	+
Trehalose	-	-	+	+

[0026] w: weak, +: positive growth, -: negative growth

[0027] 상기 표 1에 나타난 바와 같이 *B. amyloliquefaciens* group은 16S rRNA 염기서열의 유사성이 매우 높은 group으로 이를 통해 정확한 동정이 불가능하며 유전체 분석을 통해 구별할 수 있음을 보고된바 있다(Dunlap et al. 2016). 그러나 최근 연구에서 이들 group이 대사 경로에서 차이가 있음을 비교 유전체 분석을 통해 확인하였으며, L-arabinose, D-xylose, mannose, trehalose 이용성을 통해 확인한 바 있다(Chun et al. 2019). 선발길항균 MWS28의 API50CHB의 생화학적 검정 결과, *B. velezensis* 와 더 높은 유사성을 보였다(표 1). 따라서 선발길항균을 *B. velezensis* MWS28로 동정하였다.

[0028] 공시병원균인 포도 흰얼룩병균은 한경대 원예학과 과수학 실험실에 보존 중인 *Tricothecium roseum* (이하 '*T. roseum*'라 함)과 *Acremonium acutatum*(이하 '*A. acutatum*' 라 함) 균주를 PDA 사면배지에 보존하여 사용하였다. *T. roseum* 과 *A. acutatum* 균주는 PDA 페트리디쉬에서 28℃로 1주간 배양하여 형성된 분생포자를 헤마사이토메타로 포자수를 계측하여  $1.0 \times 10^5$  spore/ml 로 하여 시험하였다.

[0029] [실시에 2] 바실러스 벨레젠시스 MWS28 균주의 항균력 검정

[0030] 선발된 MWS28 균주의 항균력 측정을 위하여  $1 \times 10^5$  spore/ml 농도로 조절한 *A. acutatum* 과 *T. roseum* 의 포자현탁액을 PDA plate에 각각 100  $\mu$ l를 도말하였다. MWS28 균의 배양여액은 TSB (Tryptic Soy Broth)에 24시간 배양한 길항균을 8,000rpm으로 5분간 원심분리(CT15RE, Hitachi Koki Co.,Ltd., Japan)후, 1ml의 상등액을 취하여 0.25  $\mu$ m syringe filter (AD. 13CP045AS, Advantec, Houston, TX, USA)를 이용하여 여과하였다. 직경 8mm의 paper disc(Toyo Co. Japan)에 50  $\mu$ l의 길항균 배양액을 분주하고 1분간 완전히 흡수시킨 후에 PDA plate의 중앙을 기준으로 3cm 떨어진 3지점에 치상하였다. 28℃ incubator(DS-14MC, Dasol Scientific Co., Ltd., Hwaseong, Korea)에서 3일간 배양 후 paper disc 둘레에 나타난 생장 저지대(inhibition zone)의 직경을 디지털 밀림자(Digimetic caliper, Mitutoyo Co., Tokyo, Japan)를 이용하여 측정하였다.

[0031] [실험예 2] 바실러스 벨레젠시스 MWS28 균주배양 상등액 처리에 의한 포도흰얼룩병균 포자 발아억제

[0032] *B. velezensis* MWS28에 의한 포도 흰얼룩병균의 포자억제를 구명하기 위하여 TSB에서 배양한 길항균 MWS28균주 배양액을 10,000G로 10분간 원심분리하여 얻어진 MWS28 균체를 살균증류수에 희석하여  $1 \times 10^6$  cell/ml,  $1 \times 10^8$  cell/ml,  $1 \times 10^9$  cell/ml 농도로 하였으며 원심분리로부터 얻어진 배양 상등액은 배양원액, 10배, 100배, 1000배로 희석하여 공시균주인 *A. acutatum* 과 *T. roseum* 포자를 PDA에서 7일간 배양한 균사체로부터 수확하여 준비된 MWS28 배양액 처리에  $1 \times 10^5$  spore/ml이 되도록 각각 첨가하였다. 처리 총량은 1ml로 하였으며 24 well plate를 이용하였다. 처리가 끝난 시료는 암조건으로 28C 항온기에 배양시키면서 24시간, 48시간, 72시간 간격으로 포자 발아율을 hemocytometer를 이용하여 측정하였다. 포자발아율(%)은 (발아한 포자수/전체 포자수)  $\times$  100 으로 하였다.

[0033] 표2에서 보는 바와 같이 *B. velezensis* MWS28 균주 배양액에 대한 *A. acutatum* 포자발아억제는 원심분리하여 Bacterial cell을 제거한 배양원액(상등액) 처리에서 가장 좋았으며 24시간 후에는 포자발아가 거의 이루어지지 않다가 48, 72시간 후에는 점차 발아율이 증가하였다(표 2). 한편 하기와 같이 배양액을 제거한 Bacterial live cell 처리에서는 길항균 배양액 처리와 동일하게 매우 낮은 발아율을 나타내었으며, Live cell of MWS28( $1 \times 10^8$  cell/mL)의 처리구에서는 72시간 후에도 발아율 10% 정도의 우수한 발아억제력을 나타내었다(표 3).

표 2

[0034] 바실러스 벨레젠시스 MWS28균주 배양 상등액에 대한 *A. acutatum* 포자발아억제

Treatment	포자발아억제(%)a)		
	24h	48h	72h
Control	97.2 a	99.1 a	100.0 a
Live cell of MWS28 ( $1 \times 10^8$ cell/mL)	6.3 d	8.2 c	10.2 d
Cell-free 상등액 (x1)	8.2 d	11.1 c	25.5 c
Cell-free 상등액 (x10)	56.8 c	57.8 b	77.7 b
Cell-free 상등액 (x100)	80.5 b	90.3 a	93.2 a
Cell-free supernatant (x1000)	93.4 a	98.2 a	99.1 a

[0035] ※ a) 처리구 간의 유의성검정은 SAS 9.3(SAS Institute Inc, USA)을 이용한 Duncan의 다중검정방법(Duncan's multiple range test)으로 5% 수준에서 통계 분석하였다.

표 3

[0036] 바실러스 벨레젠시스 MWS28균주 배양 상등액을 제거한 *B. velezensis* MWS28 live cell에 대한 *A. acutatum* 포자발아억제

Treatment	포자발아억제(%)a)		
	24h	48h	72h
Control(살균증류수)	97.2 a	99.1 a	100.0 a
Live cell of MWS28( $1 \times 10^8$ cell/mL)	6.3 de	8.2 d	10.2 d
Live cell of MWS28( $1 \times 10^7$ cell/mL)	9.0 d	22.4 c	29.1 c
Live cell of MWS28( $1 \times 10^6$ cell/mL)	61.1 c	67.3 b	68.3 b
Live cell of MWS28( $1 \times 10^5$ cell/mL)	71.2 b	96.3 a	99.1 a

[0037] ※ a) 처리구 간의 유의성검정은 SAS 9.3(SAS Institute Inc, USA)을 이용한 Duncan의 다중검정방법(Duncan's multiple range test)으로 5% 수준에서 통계 분석하였다.

[0038] 이와 같은 결과를 보아 MWS28 균의 포자발아억제는 배양액에 포함된 항균 활성물질뿐만 아니라 MWS28균체가 병원균의 포자접촉에 의한 균사체 용해효소의 생산 혹은 미 동정 억제물질이 작용 할 것으로 생각된다. 길항균 MWS28의 밀도는 높을수록 *A. acutatum* 균주의 포자발아가 억제되는 것으로 보아  $1 \times 10^8$  cfu/ml 이상의 밀도유지가 포도 흰얼룩병 생물방제에 중요한 요인임을 알 수 있다.

[0039] 그리고 상술한 실험과 관련하여 동일한 실험조건하에서 *B. velezensis* MWS28 균주 배양액(상등액)에 대한 *T. roseum* 포자발아억제와 *B. velezensis* MWS28배양액을 제거한 *B. velezensis* MWS28 live cell에 대한 *T. roseum* 포자발아억제 시험에도 하기 표 4, 5와 같이 유사한 효과를 나타내었다. 즉, *T. roseum* 처리의 경우에도 *A. acutatum*의 포자억제 양상과 같은 경향을 나타내었는데, *T. roseum*균 무처리의 포자 발아율은 *A. acutatum* 보다 매우 낮은 경향을 보였다(표 4, 5). Lee 등 (2013b)의 결과를 보면 *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* CC110 배양액과 bacterial cell 처리가 오이 노균병을 동일하게 억제하였다는 연구 결과를 발표하였는데 포자발아억제에는 길항균 배양액에 포함된 항균 활성물질 뿐만 아니라 증류수에 Bacterial cell만 희석하여 처리한 병원균의 포자발아억제 활성도 동일한 억제 활성을 나타낸다고 할 수 있다. 따라서 길항균이 갖는 식물병원균에 대한 생물방제효과는 항균활성 뿐 아니라 길항균이 직접 병원균에 접촉하여 포자발아 억제물질을 내거나 균사체 분해효소의 생산 등의 작용기전이 있을 것으로 생각된다.

표 4

[0040] 바실러스 벨레젠시스 MWS28균주 배양 상등액에 대한 *T. roseum* 포자발아억제

Treatment	포자발아억제(%)a)		
	24h	48h	72h
Control	11.4 a	20.1 a	41.2 a

Live cell of MWS28 ( $1 \times 10^8$ cell/mL)	0.0 b	9.1 c	16.3 b
Cell-free 상등액 (x1)	0.0 b	11.2 c	21.3 b
Cell-free 상등액 (x10)	0.0 b	17.1 b	32.3 a
Cell-free 상등액 (x100)	0.0 b	22.2 a	34.2 a
Cell-free supernatant (x1000)	0.0 b	32.2 a	39.6 a

[0041] ※ a) 처리구 간의 유의성검정은 SAS 9.3(SAS Institute Inc, USA)을 이용한 Duncan의 다중검정방법(Duncan's multiple range test)으로 5% 수준에서 통계 분석하였다.

**표 5**

[0042] 바실러스 벨레젠시스 MWS28균주의 배양 상등액을 제거한 *B. velezensis* MWS28 live cell에 대한 *T. roseum* 포자발아억제

Treatment	포자발아억제(%)a		
	24h	48h	72h
Control(살균증류수)	11.4 a	20.1 b	41.2 a
Live cell of MWS28( $1 \times 10^8$ cell/mL)	0.0 b	9.1 c	16.3 b
Live cell of MWS28( $1 \times 10^7$ cell/mL)	0.0 b	20.2 b	36.2 a
Live cell of MWS28( $1 \times 10^6$ cell/mL)	0.0 b	26.3 b	38.2 a
Live cell of MWS28( $1 \times 10^5$ cell/mL)	0.0 b	32.2 a	41.1 a

[0043] ※ a) 처리구 간의 유의성검정은 SAS 9.3(SAS Institute Inc, USA)을 이용한 Duncan의 다중검정방법(Duncan's multiple range test)으로 5% 수준에서 통계 분석하였다.

[0044] [실험예 3] 포도잎을 이용한 포도흰얼룩병 억제효과

[0045] 포도잎을 이용한 포도 흰얼룩병 억제시험을 위하여 포도원 노지포장의 캠벨얼리 품종의 직경 7-8cm의 어린잎을 채취하여 세척 후 4°C에서 12시간 안정화 시킨 다음 22.5mm cork borer (Cork Borer No 12)를 사용하여 잎을 원형 디스크로 절취하였다. 200x200x15.0mm 크기의 플라스틱 사각 플레이트에 습실처리 후 한 처리당 6개의 잎 디스크를 정렬한 다음 PDA에서 1주간 배양된 *A. acutatum*과 *T. roseum* 균의 콜로니 디스크(직경 5.0mm)를 어린 잎 디스크 절편 가운데에 접종하였다. 27°C incubator에서 5일간 배양 후, 병반 면적율을 조사하였다.

[0046] 포도 흰얼룩병이 자연 발생하는 상습 포장의 포도송이에 길항균을 분무 살포하였다. 공시 길항균인 MWS28은 TSA에 24시간 동안 30°C incubator에서 배양된 균주를 살균증류수에  $1 \times 10^8$  cells/ml로 희석하여 사용하였으며, 실험 0.02% PEMS와 0.3% 알진염을 혼합하여 처리구 당 2리터를 분무 살포하였다. 대조약제는 Difenoconazole (푸르젠, 경농)를 2000배로 희석하여 살포하였다. 처리 7일 후, 발병율 및 방제가를 조사하였다.

**표 6**

[0047] 바실러스 벨레젠시스 MWS28균주 처리에 따른 *A. acutatum* *T. roseum* 포도흰얼룩병균에 대한 어린 잎의 병반감 소영역

처리	병반감소영역(%)a	
	<i>A. acutatum</i>	<i>T. roseum</i>
대조구	96.0 ± 8.20	89.1 ± 7.20
MWS28 균주처리	38.3 ± 9.70	20.0 ± 6.10

[0048] 잎 절편을 이용한 생물검정 결과, MWS28 무처리구에서는 *A. acutatum*에 대하여 병반면적율이 96.0%였으며 MWS28 처리구에서는 38.3%로 MWS28균의 처리로 병반면적율이 대폭 감소하였다(도 3, 표 6). *T. roseum* 균에 의한 병 발생은 89.1%인 반면, 길항균인 MWS28 처리 포도 잎에서 20.0%의 발병면적율로 대폭 감소되었을 확인할 수 있었다(Table 6). 포도흰얼룩병균인 *A. acutatum* 과 *T. roseum*에 대한 길항균 MWS28 균주의 처리효과를 방제가로 환산해보면 각각 60%, 78%로 MWS28 처리가 포도흰얼룩병의 포도잎 절편 검정에서도 효과적이었으며 항균

활성 검정에서의 결과와도 일치하는 경향이었다 (도 4, 표 6).

[0049] [실시에 3] *B. velezensis* MWS28 균주와 증량제 혼용처리에 의한 포도흰얼룩병 억제효과 증진

[0050] 수확한 포도송이를 이용한 생물검정실험에서 포도 흰얼룩병에 대한 MWS28 균주의 길항효과를 증진시키기 위해 계면활성제인 PEMS(Polyoxy Ethylene Methylpoly Siloxane, Makupica SL, Hankook Samgong Co., Ltd.) 0.02%를 사용하였고, 길항균 세포의 포도표면 부착성 증진을 위하여 0.3% 알진염(Sodium alginate, Junsei Chemical Co., Ltd., Tokyo, Japan)을 사용하였다. 병 발생을 위하여 PDA에 접종하여 28℃ 항온기에서 1주간 배양시킨 *A. acutatum* 과 *T. roseum*을 살균증류수로 희석하여 각각의 농도가  $1 \times 10^5$  spores/ml 이 되도록 조정하였다. 준비된 길항균을 처리별로 분무 살포한 다음 24시간 풍건한 다음 병원균을 분무 접종하였다. 각각의 시료는 습도 90%, 온도 27℃인 incubator에 보관하였으며, 7일 후에 처리구 당 10알을 채취하여 병반수를 조사하였다.

[0051] [실험예 4] 길항균 MWS28과 PEMS+ sodiumalginate 혼용처리에 의한 포도흰얼룩병 억제효과

[0052] 아래 도 5, 6, 7과 표 6, 7에 나타난 실험 결과를 살펴보면, MWS28를 단독 살포한 경우에는 65.5%의 발병률을 나타낸 것으로 보아 MWS28균주 단독처리보다 그리고 0.02중량% PEMS만을 처리한 경우와 0.3중량% sodium alginate만을 처리한 경우 보다, MWS28균주에 0.02중량% PEMS와 0.3중량% sodium alginate 2개를 같이 혼합처리 할 경우에 포도흰얼룩병에 대한 방제효율이 크게 상승됨을 확인 할 수 있었다. 포도과실을 이용한 기내실험에서 MWS28균주 처리효과는 *A. acutatum*에 의한 포도 흰얼룩병의 억제는 0.02중량% PEMS와 0.3중량%의 sodium alginate를 혼합한 처리가 병 발생을 19.6%로 가장 낮았다 (도 6). 이와 같은 결과는 *T. roseum*에 의한 포도흰얼룩병 방제 시험에서도 동일한 패턴을 보여 매우 효과적인 방제가 확인할 있었다(도 7). 사용된 PEMS는 유기실리콘계열의 전착제로 국내 농약허용기준에서 면제되는 유효성분으로 화학농약의 전착제로 사용되고 있다. Sodium alginate는 해초류에서 분리한 천연 성분으로 물리화학적으로 안정적일 뿐만 아니라 인체에 해가 없어 고착성 증진을 위한 농식품류의 원료로 빈번하게 사용된다 (Bashan Y.; 1987). 수확기에 가까운 포도의 과실표면은 분상의 효모로 덮여있고 또한 매끄러워 전착제인 PEMS를 사용하여도 표면에 미생물을 다량부착 시키기 어려웠다. 따라서 포도표면에 고착성을 증가시키기 위한 sodium alginate의 사용은 길항세균의 포도표면 고착성 증대에 효과적 이었으며 농도가 높아질수록 길항균의 부착밀도도 높았다.

[0053] 포도흰얼룩병이 자연발생하는 포도농장에서 길항균 MWS28을 실험한 결과, 무처리의 병 발생은 71%였으며 대조약제인 Difenoconazole 처리는 15.3%로 억제효과가 처리 중 가장 우수하였으며 길항균 단독처리는 35%, MWS28과 0.02중량% PEMS 및 0.3중량% sodium alginate를 복합살포한 처리는 20%로 화학농약인 difenoconazole과 유사한 포도흰얼룩병 방제 효과를 나타내었다(도 7, 표 7). MWS28 균주의 포도과실 처리는 포도흰얼룩병균을 억제할 뿐만 아니라 포도의 생체중, antocyanin함량 및 당도(브릭스)증가 등의 부수적인 기능이 조사되었으며 차후의 시험 결과에 따라 포도의 품질개선용으로도 활용될 수 있을 것이다(data not shown). 이러한 결과로 보아 MWS28균주는 포도흰얼룩병의 생물방제와 포도 품질 증진제로 친환경 농가의 포도재배에 활용될 것으로 생각된다.

**표 7**

[0054] MWS28 균주처리에 따른 교호( 'Kyoho' )포도에 대한 포도 흰얼룩병균의 억제효과

처리	Diseased berry(%)a)	No. 흰얼룩병균
	포도송이(per)	berry(per)
대조구	71±4.50	15±1.50a
Difenoconazole	15±2.20c	2±0.30c
MWS28	35±7.60b	8±1.00b
MWS28+0.3중량%알지네이트	20±2.90c	2±0.50c
LSD(p=0.05)	15.1	1.9

[0055] ※ a) 처리구 간의 유의성검정은 SAS 9.3(SAS Institute Inc, USA)을 이용한 Duncan의 다중검정방법(Duncan' s multiple range test)으로 5% 수준에서 통계 분석하였다. Duncan의 multiple range test (DMRT)에 따라 상기 문자에 따르는 값은 유의차가 없다(P = 0.05). 본 실험은 처리구 당 6 번의 반복을 하였고 실험은 두 번 실시되었다. 포도에 MWS28 세포 상등액 ( $10^8$  CFU / ml)을 스프레이로 뿌려 자연적인 질병의 조건에서 다른 처리구들을 실험하였다. 각 처리구 경우, 병이 있는 포도과육(berry)과 포도송이(bunch) 당 병변의 수를 평가함으로써 결정

하였다.

[0056] [ 실시예 4 ] 본 발명의 미생물 방제제의 제조방법

[0057] 바실러스 벨레젠시스(*Bacillus velezensis*) MWS 28(균주기탁번호 KACC 81077BP)균주를 토양으로부터 분리 동정하는 단계 후 TSB에서 배양한 길항균 MWS28균주 배양액을 10,000G로 10분간 원심분리하여 얻어진 MWS28 균체를 살균증류수에 희석하여  $1 \times 10^6$  cell/ml,  $1 \times 10^8$  cell/ml,  $1 \times 10$  cell/ml 농도로 하였다. 특히 상기 동정하여  $1 \times 10^8$  cfu/ml 이상의 밀도로 함유한 바실러스 벨레젠시스 MWS 28균주를 배양액 제조하였고, 상기 바실러스 벨레젠시스 MWS 28균주를 배양액에 포도 흰얼룩병에 대한 MWS28 균주의 길항효과를 증진시키기 위해 계면활성제인 PEMS(Polyoxyethylene Methylpoly Siloxane) 0.02 중량부를 혼합하면서 길항균 세포의 포도 표면 부착성을 증진하기 위해 0.3중량부 알진염(Sodium alginate)을 더 첨가하고 통상의 부형제를 더 첨가 혼합하여 미생물 제제로 혼합하여 미생물 제제로 제조하는 것을 포도 흰얼룩병균 미생물 방제제를 제조하였다.

[0058] ※통계분석

[0059] 길항미생물 처리를 통한 병원균의 균사생장, 발아율, 포도잎 및 과실을 이용한 처리구 간의 유의성검정은 SAS 9.3(SAS Institute Inc, USA)을 이용한 Duncan의 다중검정방법(Duncan's multiple range test)으로 5% 수준에서 통계 분석하였다.

[0060] 이상에서는 본 발명의 바람직한 실시예에 대하여 도시하고 설명하였지만, 본 발명은 상술한 특정의 실시예에 한정되지 아니하며, 청구범위에서 청구하는 본 발명의 요지를 벗어남이 없이 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 변형 실시 또는 추가 실시가 가능한 것은 물론이고, 이러한 변형 실시 또는 추가 실시들은 본 발명의 기술적 사상이나 전망으로부터 개별적으로 이해되어져서는 안될 것이다.

**수탁번호**

[0061]

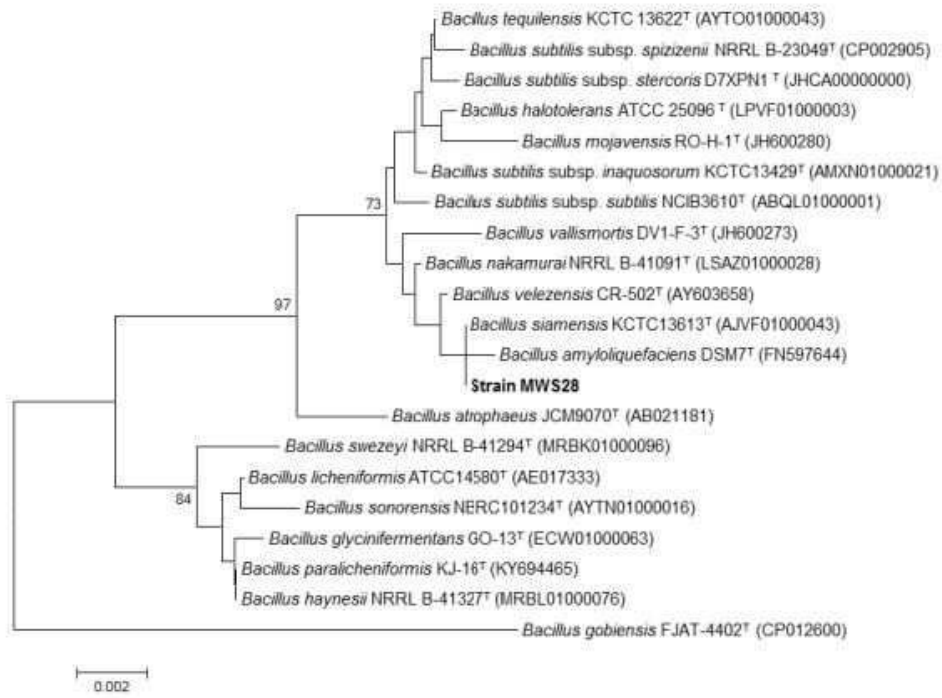
기탁기관명 : 농업생명공학연구원

수탁번호 : KACC81077

수탁일자 : 20181126

도면

도면1

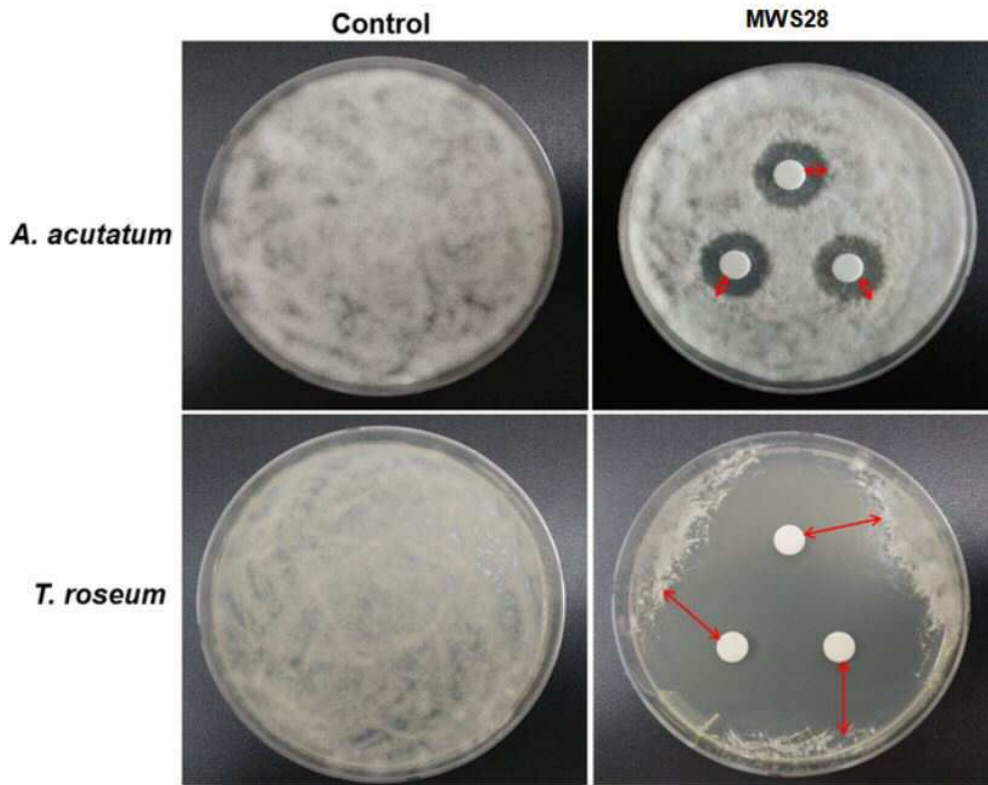


도면2

*Bacillus velezensis* MWS28 16s RNA sequence

TCAGGACGAACGCTGGCGGGCGTGCCTAATACATGCAAG  
 TCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGC  
 GGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTA  
 AGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCG  
 GATGGTTGTTTGAACCGCATGGTTCAGACATAAAAGGTG  
 GCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGGCGCATT  
 GCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATG  
 CGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGA  
 CTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGT  
 AGGGAATCTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCA  
 ACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCT  
 CTGTTGTTAGGGGAAGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGC  
 GGCACCTTGACGGTACCTAACCCAGAAAGCCACGGCTAA  
 CTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAG  
 CGTTGTCCGGAATTATTGGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGC  
 GGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCG  
 GGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAACCTGAGTGCAGA  
 AGAGGAGAGTGGAATCCACGTGTAGCGGTGAAATGC  
 GTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACT  
 CTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGG  
 GGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCG  
 TAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTCCGCCCT  
 TAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGA  
 GTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGG  
 GGGCCCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGA  
 AGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTG  
 ACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCCTTCGGGGGCAGAG  
 TGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTA  
 GATGTTGGGTTAAGTCCCAGAACGAGCGCAACCCTTGAT  
 CTTAGTTGCCAGCATTGAGTTGGGCACTCTAAGGTGACT  
 GCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTC  
 AAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCT  
 ACAATGGACAGAACAAAGGGCAGCGAAACCGCGAGG  
 TTAAGCCAATCCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCA  
 GTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAA  
 TCGCGGATCAGCATGTTCCGGCCTTGACACA<sub>c</sub>CGCCCGT  
 CACACCACGGtTTGTACGAAGTC

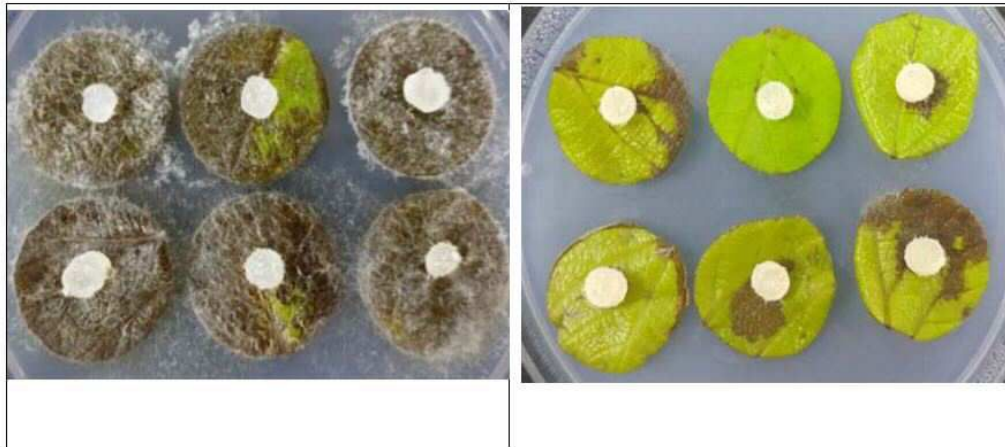
도면3



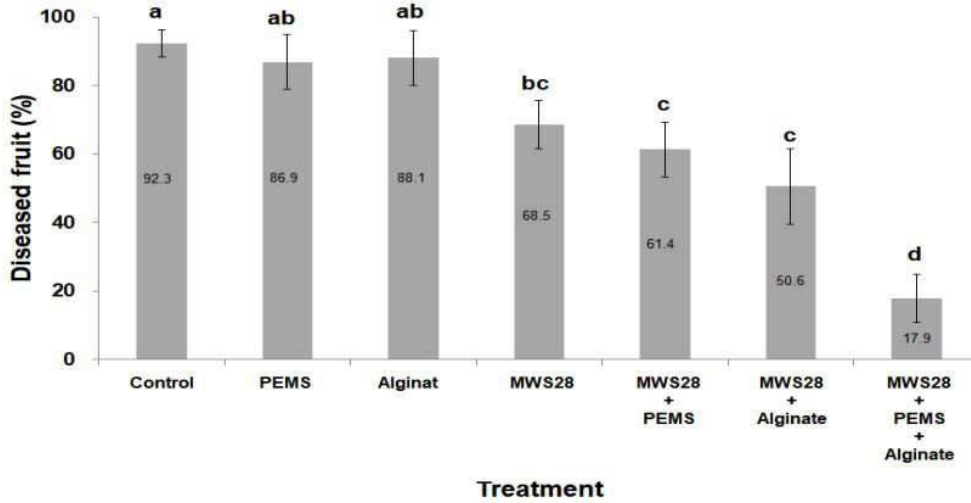
도면4



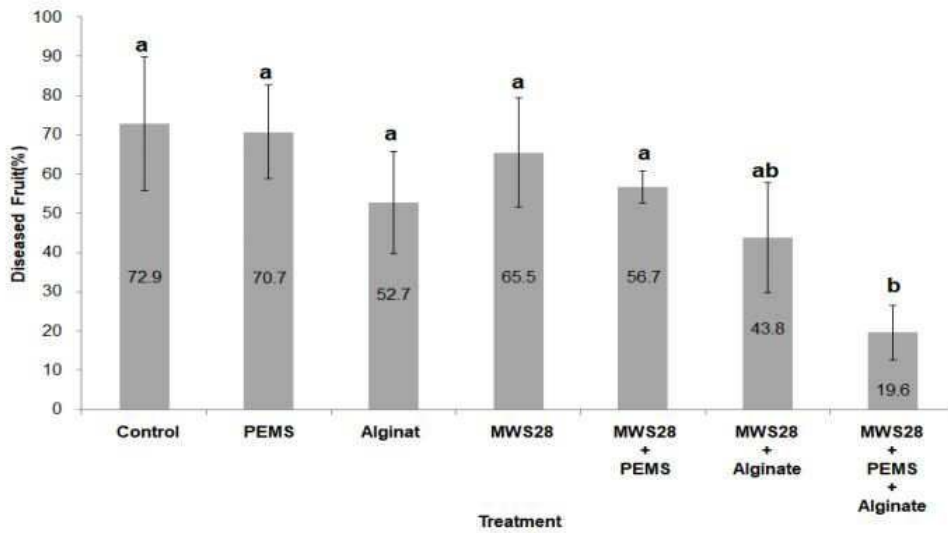
도면5



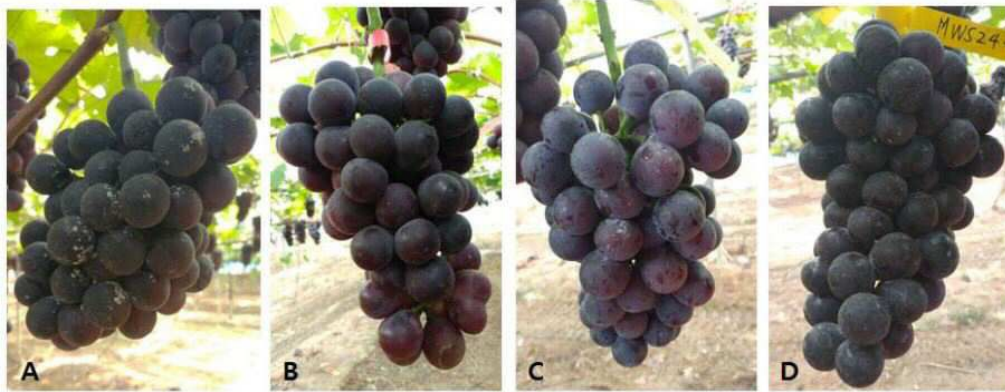
도면6



도면7



도면8



서열 목록

- <110> Hankyong Industry Academic Cooperation Center
- <120> NOVEL *Bacillus velezensis* MWS28, A BIOLOGICAL CONTROL AGENT  
 COMPRISING *Bacillus velezensis* MWS28, AND MANUFACTURING METHOD  
 THEREOF
- <130> phan01
- <160> 1
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 1396
- <212> RNA
- <213> Unknown
- <220><223> *Bacillus velezensis*
- <400> 1
- |  |     |
|--|-----|
| t caggacgaa cgctggcggc gtgcctaata catgcaagtc gagcggacag atgggagctt | 60  |
| gctccctgat gttagcggcg gacgggtgag taacacgtgg gtaacctgcc tgtaagactg  | 120 |
| ggataactcc gggaaaccgg ggctaatacc ggatggttgt ttgaaccgca tggttcagac  | 180 |
| ataaaaggtg gcttcggcta ccacttacag atggaccgc ggcgcattag ctagttggtg   | 240 |
| aggtaacggc tcaccaaggc gacgatgctg agccgacctg agagggtgat cggccacact  | 300 |
| gggactgaga cacggcccag actcctacgg gaggcagcag tagggaatct tccgcaatgg  | 360 |
| acgaaagtct gacggagcaa gcgccgtga gtgatgaagg ttttcggatc gtaaagctct   | 420 |
| gttgtaggg aagaacaagt gccgttcaa tagggcggca ccttgacgtg acctaaccag    | 480 |
| aaagccacgg ctaactactg gccagcagcc gcggaatac gtaggtggca agcgttgtcc   | 540 |

ggaattattg ggcgtaaagg gctcgcaggc ggtttcttaa gtctgatgtg aaagcccccg	600
gctcaaccgg ggagggatcat tggaaactgg ggaacttgag tgcagaagag gagagtggaa	660
ttccacgtgt agcggtgaaa tgcgtagaga tgtggaggaa caccagtggc gaaggcgact	720
ctctggtctg taactgacgc tgaggagcga aagcgtgggg agcgaacagg attagatacc	780
ctggtagtcc acgccgtaaa cgatgagtgc taagtgttag ggggtttccg cccttagtg	840
ctgcagctaa cgcattaagc actccgcctg gggagtacgg tgcgaagact gaaactcaaa	900
ggaattgacg ggggcccga caagcgggtg agcatgtgtt ttaattcgaa gcaacgcgaa	960
gaaccttacc aggtcttgac atcctctgac aatcctagag ataggacgtc cccttcgggg	1020
gcagagtgac aggtggtgca tggttgtcgt cagctcgtgt cgtgagatgt tgggttaagt	1080
cccgaacga gcgcaaccct tgatcttagt tgccagcatt cagtgggca ctctaaggtg	1140
actgccggtg acaaaccgga ggaaggtggg gatgacgtca aatcatcatg cccttatga	1200
cctgggctac acacgtgcta caatggacag aacaaagggc agcgaaacg cgaggttaag	1260
ccaatccac aaatctgttc tcagttcgga tcgcagtctg caactcgact gcgtgaagct	1320
ggaatcgcta gtaatcgagg atcagcatgt tcggccttgt acacaccgcc cgtcacacca	1380
cggtttgtac gaagtc	1396