



中華民國專利證書

發明第 I 432142 號

發明名稱：自泥火山泥漿分離之液化澱粉芽孢桿菌菌株及其用途

專利權人：國立高雄師範大學

發明人：王惠亮、謝建元

專利權期間：自 2014 年 4 月 1 日至 2031 年 6 月 21 日止

上開發明業經專利權人依專利法之規定取得專利權

經濟部智慧財產局 局長 王美花

中華民國 103 年 4 月 1 日



【11】證書號數：I432142

【45】公告日：中華民國 103 (2014) 年 04 月 01 日

【51】Int. Cl. : A01N63/00 (2006.01)

發明

全 15 頁

【54】名稱：自泥火山泥漿分離之液化澱粉芽孢桿菌菌株及其用途

BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS AND USE OF THE SAME

【21】申請案號：100121910

【22】申請日：中華民國 100 (2011) 年 06 月 22 日

【11】公開編號：201300021

【43】公開日期：中華民國 102 (2013) 年 01 月 01 日

【72】發明人：王惠亮 (TW) WANG, HUI LIANG；謝建元 (TW) HSIEH, CHIEN YAN

【71】申請人：國立高雄師範大學

NATIONAL KAOHSIUNG NORMAL
UNIVERSITY

高雄市苓雅區和平一路 116 號

【74】代理人：陳金鈴

【83】生物材料寄存：

食品工業發展研究所生物資源保存及研究中心 BCRC910509 2011 年 03 月 17 日

【56】參考文獻：

TW 201002208

TW 201022439

CN 1946297A

審查人員：黃教威

[57]申請專利範圍

1. 一種自泥火山泥漿分離之液化澱粉芽孢桿菌菌株，寄存於財團法人食品工業發展研究所，寄存編號：BCRC910509，其命名為 YCMA1，具有獨特的 16S rRNA、Tet(L)、ItuA、ItuB、ItuC、ItuD 之基因序列。
2. 一種如申請專利範圍第 1 項所述之菌株用途，係用於生產下列組成群組中至少一種酵素，該組成群組包括：蛋白分解酵素(protease)、 β -葡聚醣分解酵素(β -glucanase)、幾丁質分解酵素(chitinase)。
3. 一種如申請專利範圍第 1 項所述之菌株用途，係用於植物保護、除污處理、動物飼料、廚餘處理及食品製造其中之一。
4. 一種如申請專利範圍第 1 項所述之菌株用途，係用於抑制植物病原真菌之活性，其中，該植物病原真菌至少包括下列其中一種：番石榴立枯病菌(*Myxosporium psidii* Sawada et Kurosawa)、胡麻葉枯菌[*Bipolaris oryzae* (Breda de Haan) Shoemaker]、蓮霧炭疽病菌[*Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc.]、檬果炭疽病菌[*Colletotrichum gloeosporioides* (Penz. & Sacc.)]、檬果蒂腐病菌[*Botryodiplodia theobromae* Pat. (Mango)]、木瓜炭疽病菌[*Colletotrichum gloeosporioides* Penzig]、木瓜疫病菌[*Phytophthora palmivora* (Butler) Butler.]、黃萎病菌(*Fusarium* sp.)、洋蔥黃萎病菌 (*Fusarium oxysporum* f.sp.cepae)、葵百合立枯絲核菌(*Rhizoctonia solani*)、蓮霧果腐病菌(*Pestalotia euginac*)、番石榴瘡痂病菌[*Pestalotiopsis psidii* (Pat.) Mordue]、棗子炭疽病菌(*Colletotrichum gloeosporioides*)、甘藍黑斑病菌[*Alternaria brassicae* (BERK) Sacc.]。
5. 一種如申請專利範圍第 1 項所述之菌株用途，係用於抑制植物病原細菌之活性，其中，該植物病原細菌至少包括下列其中一種：有蝴蝶蘭褐斑病菌(*Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae*)、柑桔潰瘍病菌(*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*)、番茄細菌性斑點病菌

(2)

(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)、芋頭細菌性軟腐(*Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*)、茄科青枯病菌(*Ralstonia solanacearum*)、瓜類細菌性果斑病菌(*Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*)、蝴蝶蘭軟腐病菌(*Pectobacterium chrysanthemi*)。

6. 一種如申請專利範圍第 1 項所述之菌株用途，係與殺真菌劑搭配使用以成植物保護組成物，其中，該殺真菌劑至少包括下列其中一種：脂烷氮類、醯胺類、胺醯酸類、苯甲醯胺類、苯甲醯苯胺類、磺胺類、抗生素類、嗜球果傘素類、芳香族、苯並咪唑類、苯併咪唑前驅物類、胺基甲酸鹽類、咪唑類、三唑類、銅類、二氯苯基二甲醯亞胺類、二硫代胺基甲酸鹽類、咪唑類、有機磷類、吡啶類、嘧啶類、 啉類、醯類、噻唑類、尿素類、三唑苯併噻唑類。
7. 一種如申請專利範圍第 1 項所述之菌株用途，係與殺蟲劑搭配使用以成植物保護組成物，其中，該殺蟲劑至少包括下列其中一種：三氮井系、有機氮與雜環類、抗生素類、氨基甲酸鹽、聯苯類、有機氯類、唑類、有機磷類、新尼古丁類、直鏈胺有機硫代磷酸鹽類、吡啶類。
8. 一種如申請專利範圍第 1 項所述之菌株用途，係與除草劑搭配使用以成植物保護組成物，其中，該除草劑至少包括下列其中一種：苯氧酸系、次磷酸系、聯苯醚系、二硝基苯胺系、四級胺類。
9. 一種如申請專利範圍第 1 項所述之菌株用途，係與殺細菌劑搭配使用以成植物保護組成物，其中，該殺細菌劑至少包括下列其中一種：銅類、抗生素類、 啉類殺菌劑。

圖式簡單說明

第一圖：採樣菌株以 16S universal primer 增幅結果

Lane M：14 kb DNA marker(promega,USA)

Lane 1~8：A group bacteria were isolated from No.5 mud.

Lane 9~14：B group bacteria were isolated from No.9 mud.

第二圖：ITS 序列 PCR 增幅之結果

Lane M：100 bp-3 kb DNA marker(promega,USA)

Lane 1：YCMYCMA1

第三圖：YCMA1 iturin A 基因序列增幅之結果

Lane M：100 bp-3 kb DNA marker(promega,USA)

Lane 1：YCMA1 ituA gene；Lane 2：YCMA1 ituB gene

Lane 3：YCMA1 ituC gene；Lane 4：YCMA1 ituD gene

第四圖：不同枯草菌 tetB 基因序列增幅之結果

Lane M：3000 bp DNA marker(promega,USA)

Lane 1：YCMA1 YyaO_F/TetB_R primer

Lane 2：YCMA1 YyaR_F/TetB_R primer

第五圖：YCMA1 在 LB 培養基之生長曲線

第六圖：YCMA1 經 UVB 照射後不同時間的 CFU 與存活率

第七圖：YCMA1 酵素擴散在 MS 固態培養基之結果

第八圖：YCMA1 培養三日之 protease、 β -glucanase 與 chitinase 之酵素活性

第九圖：YCMA1 對病原細菌在 LB 固態培養基抑制情形

A：瓜類細菌性果斑病菌(*Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*)

B：蝴蝶蘭褐斑病菌(*Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae*)

(3)

C : 芋頭細菌性軟腐病菌(*Pectobacterium carotovorum* subsp.*carotovorum*)

D : 蝴蝶蘭軟腐病菌(*Pectobacteriaum chrysanthemi*)

E : 柑桔潰瘍病菌(*Xanthomonas axonopodis* pv.*citri*)

F : 番茄細菌性斑點病菌(*Xanthomonas campestris* pv.*vesicatoria*)

G : 番茄青枯病菌(*Ralstonia solanacearum*)

第十圖：YCMA1 對病原細菌的抑菌圈半徑

Aac : *Acidovorax avenae* subsp.*Cattleyae*

Xac : *Xanthomonas axonopodis* pv.*citri*

Xcv : *Xanthomonas campestris* pv.*Vesicatoria*

Rs : *Ralstonia solanacearum*

Pcc : *Pectobacterium carotovorum* subsp.*carotovorum*

Aa : *Acidovorax avenae* subsp.*Citrulli*

Pch : *Pectobacteriaum chrysanthemi*

第十一圖：YCMA1 在 PDA 培養基對峙抑菌情形

第十二圖：YCMA1 對病原真菌的對峙抑制活性

CK : ddH₂O 1 : *Fusarium* sp. ; 2 : *Colletotrichum gloeosporioides* Penzig ; 3 : *Phytophthora palmivora*(Butler)Butler. ; 4 : *Botryodiplodia theobromae* Pat.(Papaya) ; 5 : *Colletotrichum gloeosporioides*(Penz.& Sacc.) ; 6 : *Botryodiplodia theobromae* Pat.(Mango) ; 7 : *Fusarium oxysporum* f.sp.*cepae* ; 8 : *Bipolaris oryzae*(Breda de Haan)Shoemaker ; 9 : *Myxosporium psidii* Sawada et Kurosawa ; 10 : *Colletotrichum gloeosporioides*(Penz.)Sacc. ; 11 : *Rhizoctonia solani* (lily) ; 12 : *Pestalotia euginac*(wax apple) ; 13 : *Pestalotiopsis psidii*(Pat.)Mordue ; 14 : *Colletotrichum gloeosporioides*(jujube) ; 15 : *Alternaria brassicae*(BERK)Sacc.

第十三圖：YCMA1 在 PDA 培養基拮抗抑菌情形

第十四圖：YCMA1 上清液在 PDA 培養基抑菌情形

第十五圖：殺真菌劑對 YCMA1 存活率影響之結果

CK : ddH₂O

1 : 脂烷氮類-克熱淨 40% WP

2 : 醯胺類-撲克拉 25% EW

3 : 胺醯酸類-滅達樂 35% WP

4 : 苯甲醯胺類-白克列 50% WG

5 : 苯甲醯苯胺類-克枯爛 10% WP

6 : 磺胺類-賽座滅 9.4% SC

7 : 抗生素類-嘉賜黴素 2% SL

8 : 嗜球果傘素類-亞托敏 23% SC

9 : 芳香族-四氯異苯腈 75% WP

10 : 苯並咪唑類-免賴得 50% WP

11 : 苯併咪唑前驅物類-甲基多保淨 70% WP

12 : 胺基甲酸鹽類-百克敏 23.6% EC

13 : 咪唑類-依普同 23.7% SC

14 : 三唑類-待克利 10% WG

(4)

- 15：銅類-三元硫酸銅 27.12% SC
- 16：二氯苯基二甲醯亞胺類-撲滅寧 50% WP
- 17：二硫代胺基甲酸鹽類-得恩地 80% WP
- 18：聚合二硫代胺基甲酸鹽類-免得爛 80% WG
- 19：咪唑類-撲克拉錳 50% WP
- 20：有機磷類-福賽得 80% WG
- 21：吡啶類-扶吉胺 39.5% SC
- 22：嘧啶類-芬瑞莫 12% WP
- 23： 啉類-快諾芬 22.58% SC
- 24：醌類-腈硫醌 42.2% SC
- 25：噻唑類-依得利 25% EC
- 26：尿素類-賓克隆 25% WP
- 27：三唑苯併噻唑類-三賽唑 75% WP

第十六圖：殺細菌劑對 YCMA1 存活率影響之結果

CK：ddH₂O

- 1：銅類-氫氧化銅 53.8% WG
- 2：銅類-嘉賜銅 81.3% WP
- 3：抗生素類-鏈四環黴素 10% WP
- 4：抗生素類-鏈黴素 12.5% SL
- 5： 啉類殺菌劑-歐索林酸 20% WP

第十七圖：殺蟲劑對 YCMA1 存活率影響之結果

CK：ddH₂O

- 1：三氮井系-派滅淨 25% WP
- 2：有機氮與雜環類-益達胺 9.6% SL
- 3：抗生素類-密滅汀 1% EC
- 4：氨基甲酸鹽-納乃得 40% SP
- 5：有機氮與雜環類-達特南 20% SG
- 6：吡啶有機硫代磷酸鹽類-陶斯松 40.8% EC
- 7：聯苯類-新殺蟎 25% EC
- 8：有機氯類-培丹 50% WP
- 9：唑類-第滅寧 2.8% EC
- 10：有機磷類-愛殺松 46.5% EC
- 11：新尼古丁類-可尼丁 16% SG
- 12：有機磷類-芬殺松 50% EC
- 13：直鏈胺有機硫代磷酸鹽類-大滅松 44% EC
- 14：吡唑類-克凡派 10% SC
- 15：唑類-畢芬寧 2.8% EC
- 16：氨基甲酸鹽-加保扶 44% SC

第十八圖：除草劑對 YCMA1 存活率影響之結果

(5)

CK : ddH₂O

1 : 苯氧酸系-二、四地鈉鹽 80% WP

2 : 次磷酸系-固殺草 13.5% SL

3 : 醯胺類-嘉磷賽異丙胺鹽 41% SL

4 : 聯苯醚系-復祿芬 22.3% EC

5 : 二硝基苯胺系-施得圃 38.7% CS

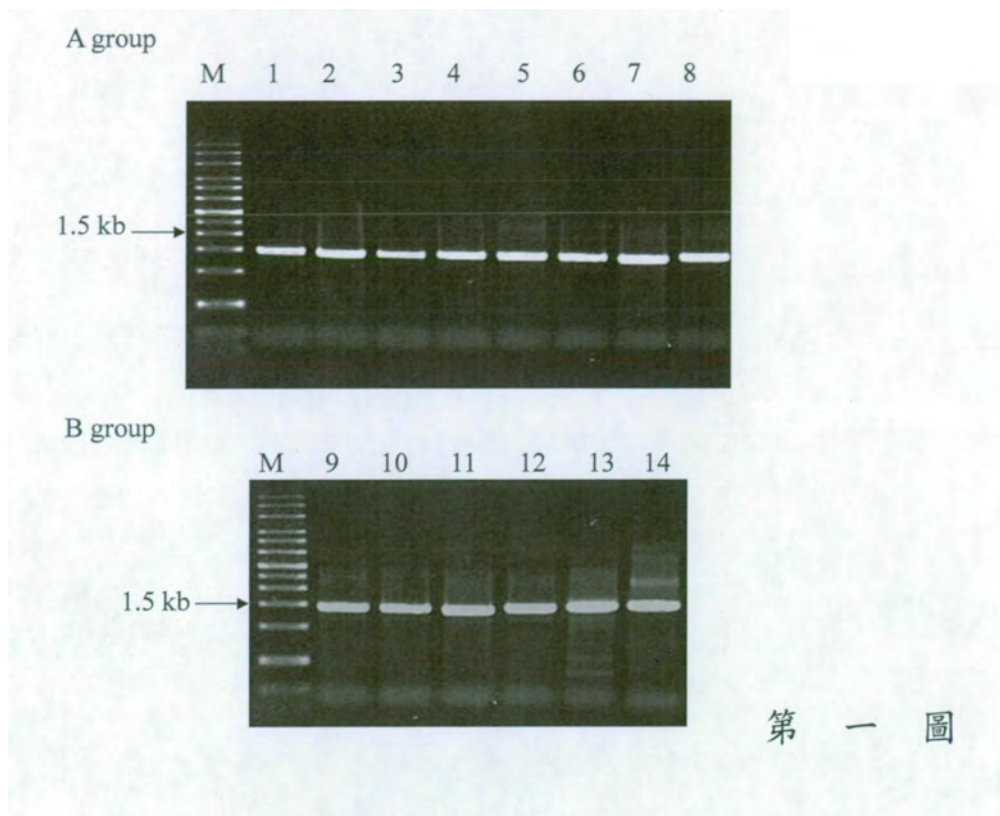
6 : 四級胺類-巴拉刈 24% SL

第十九圖：展著劑對 YCMA1 存活率影響之結果

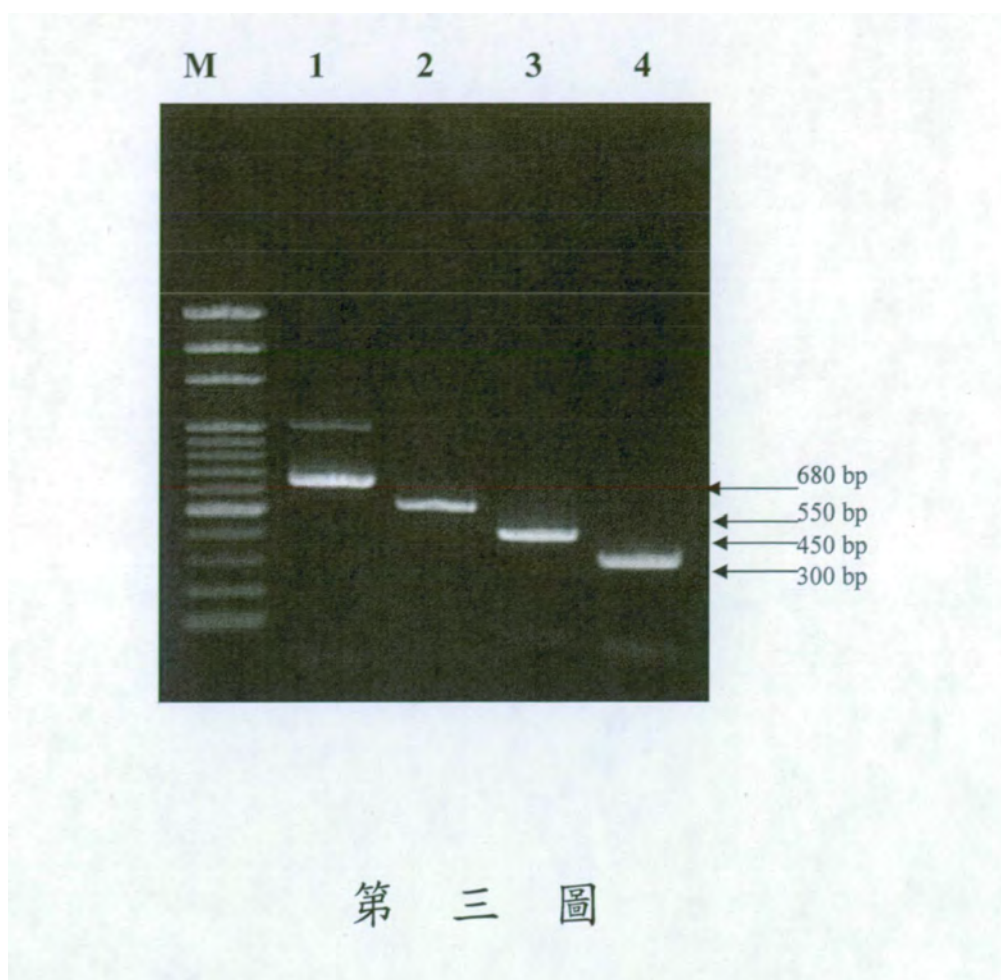
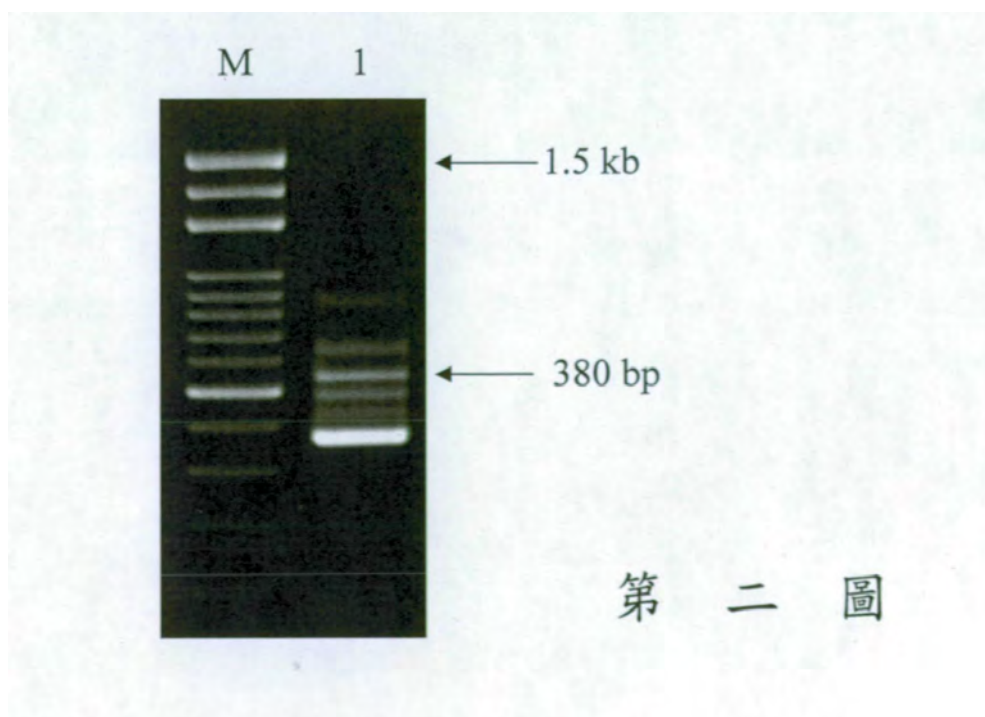
1 : 1,000 dilution of spreader

2 : 2,000 dilution of spreader

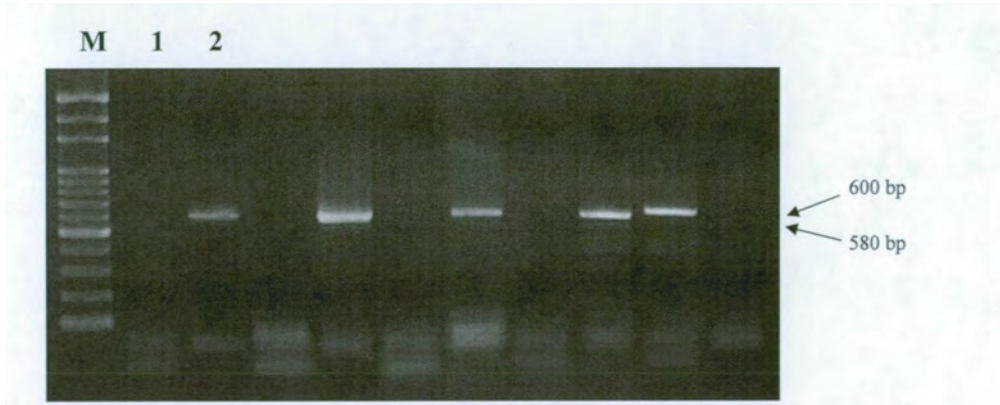
3 : 3,000 dilution of spreader



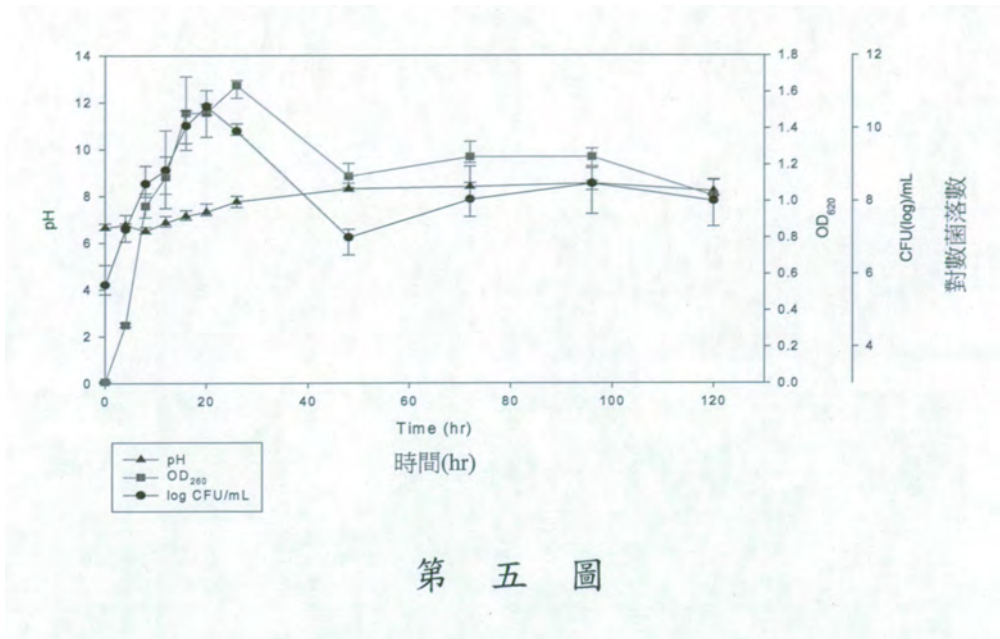
(6)



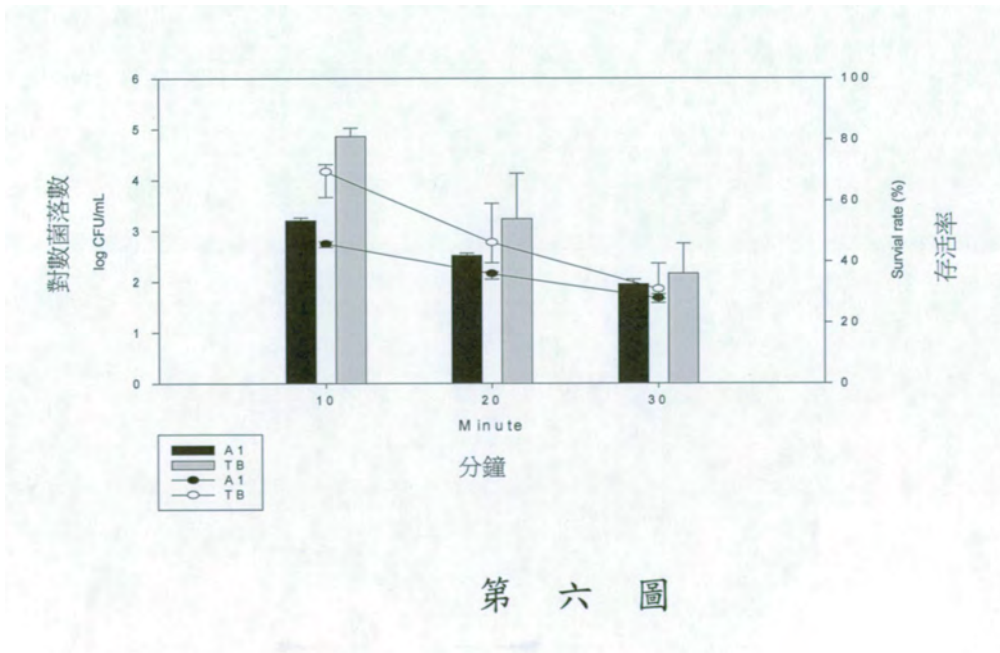
(7)



第四圖

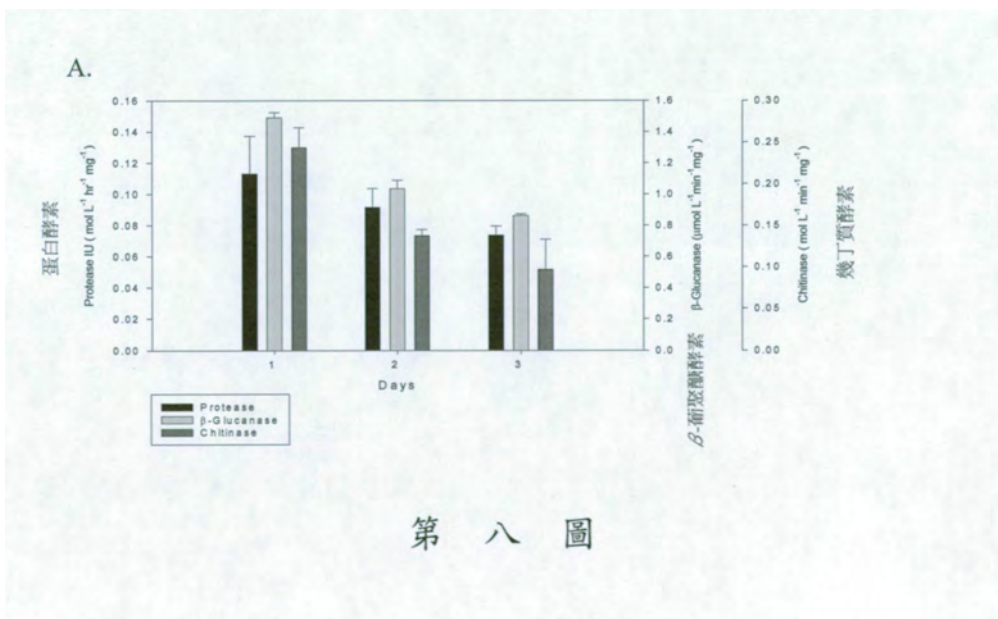
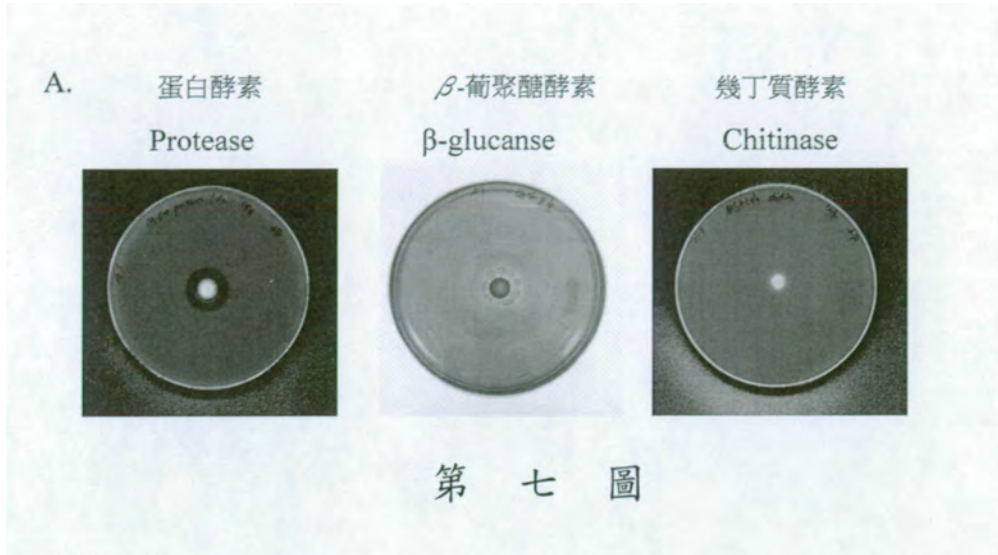


第五圖

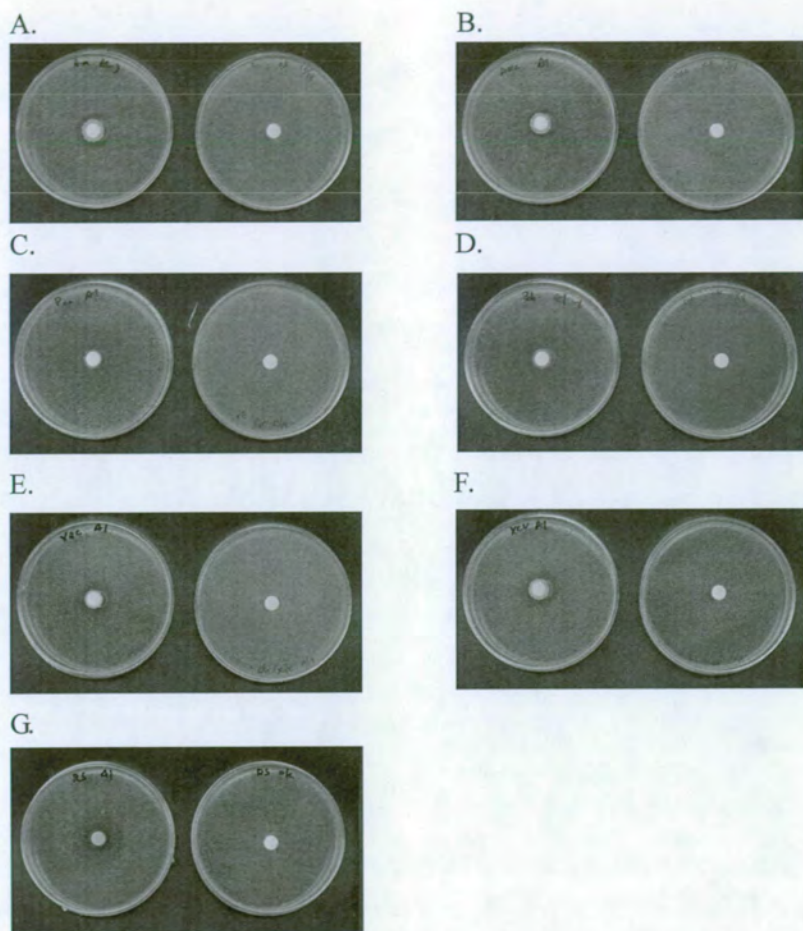


第六圖

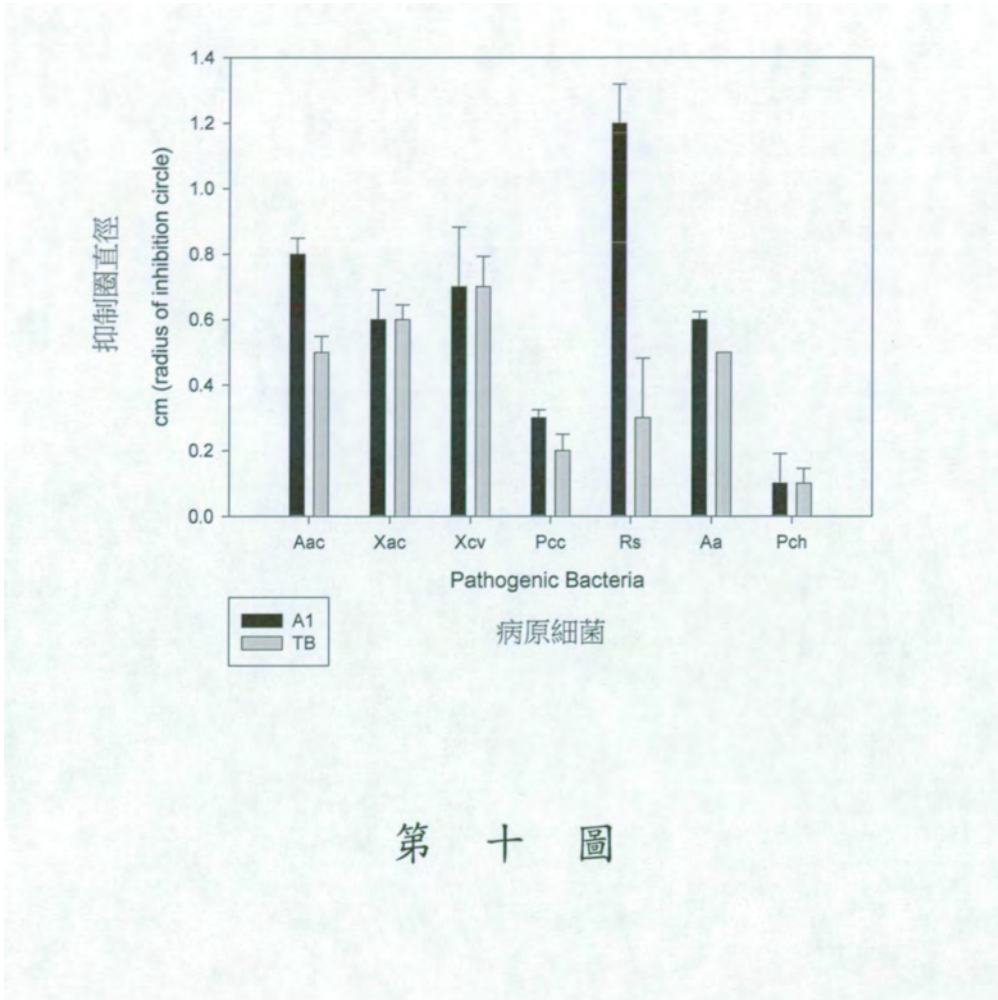
(8)



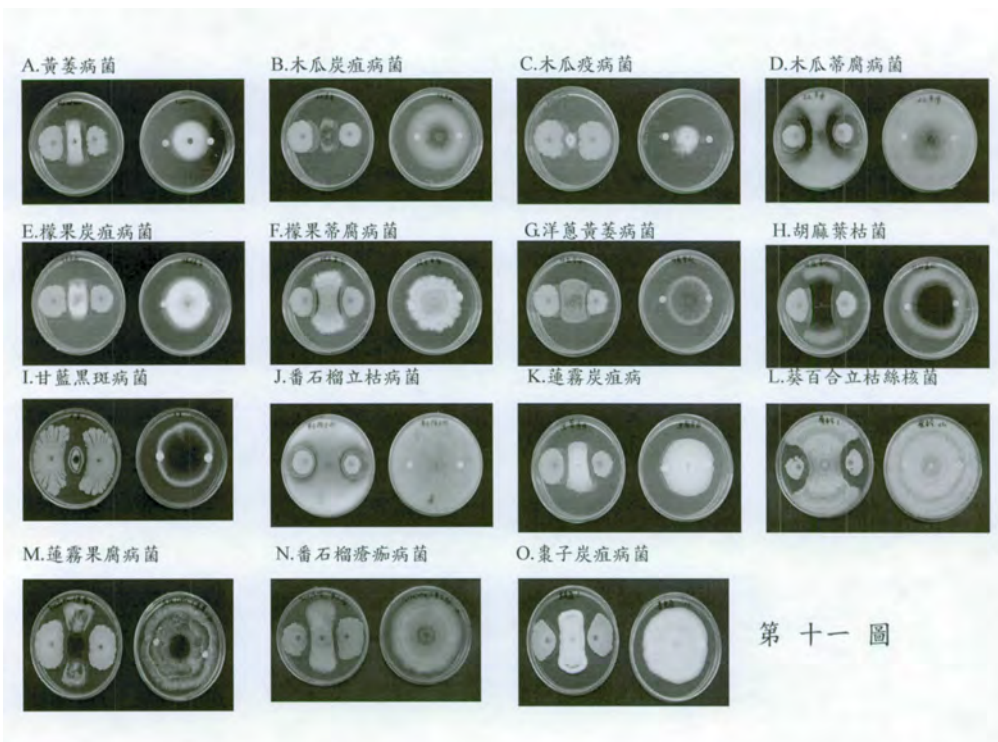
(9)



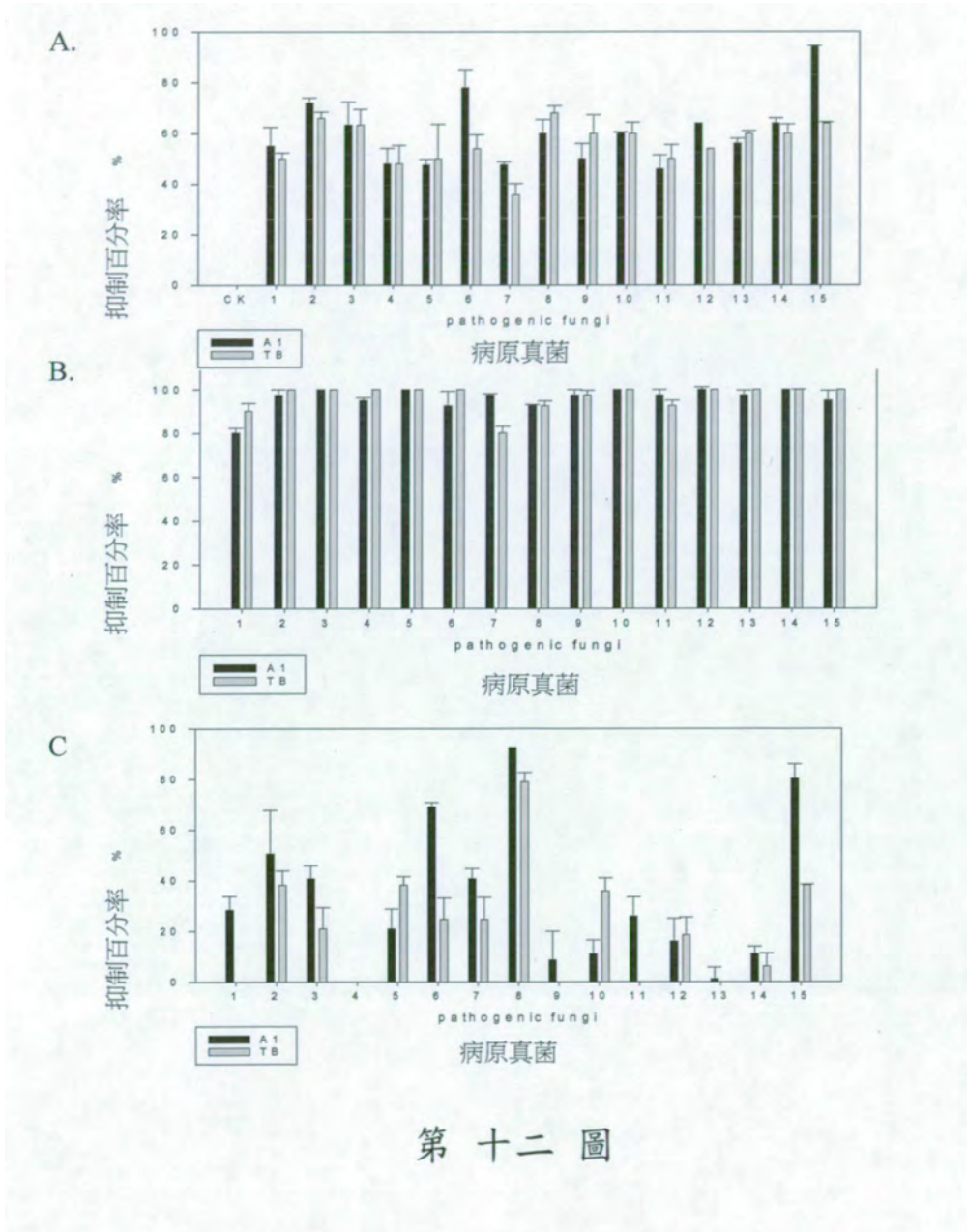
第九圖

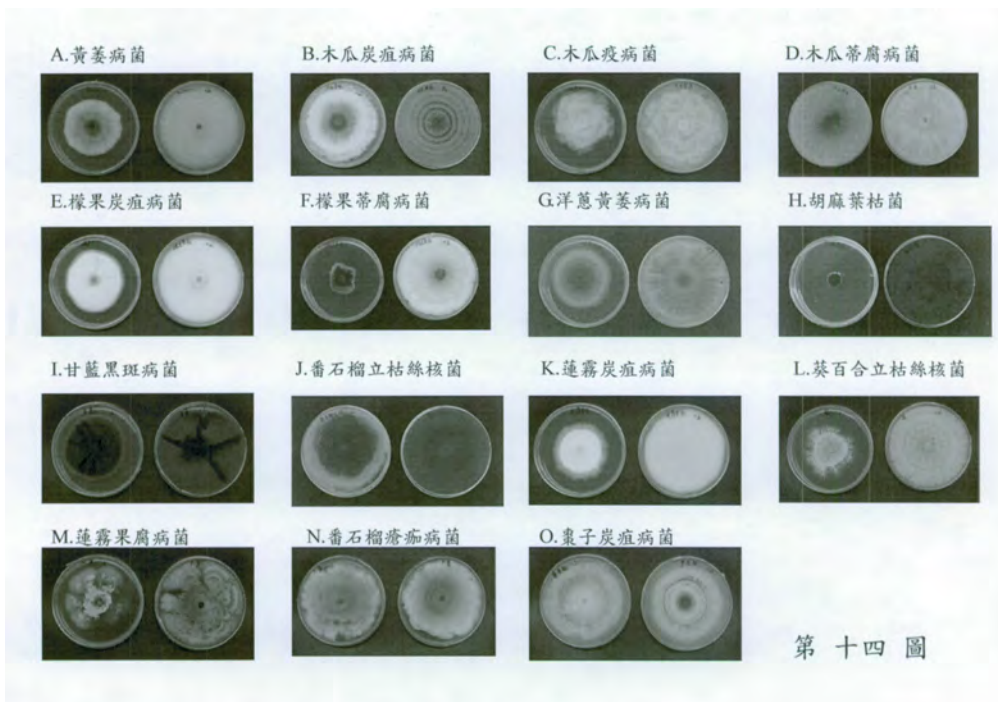
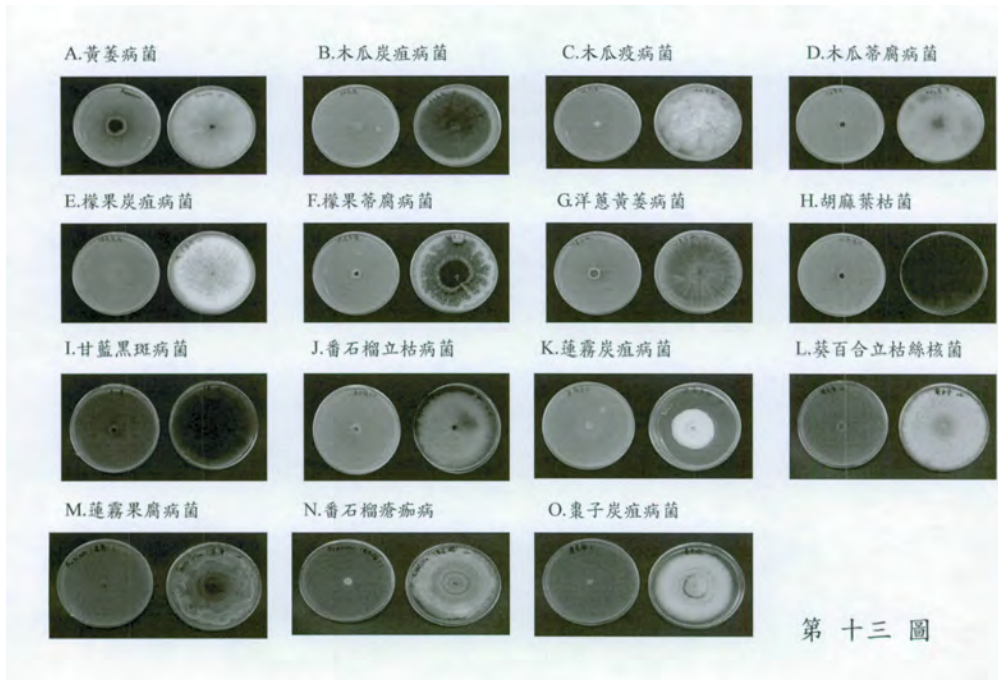


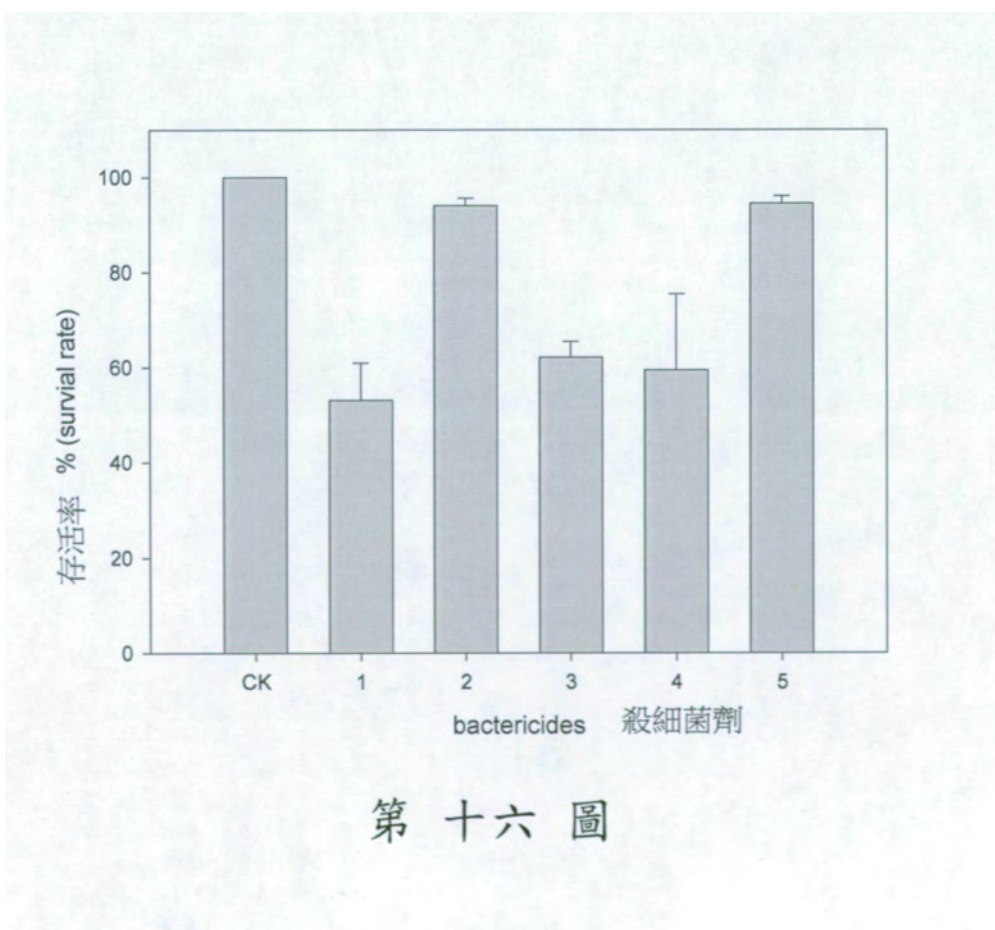
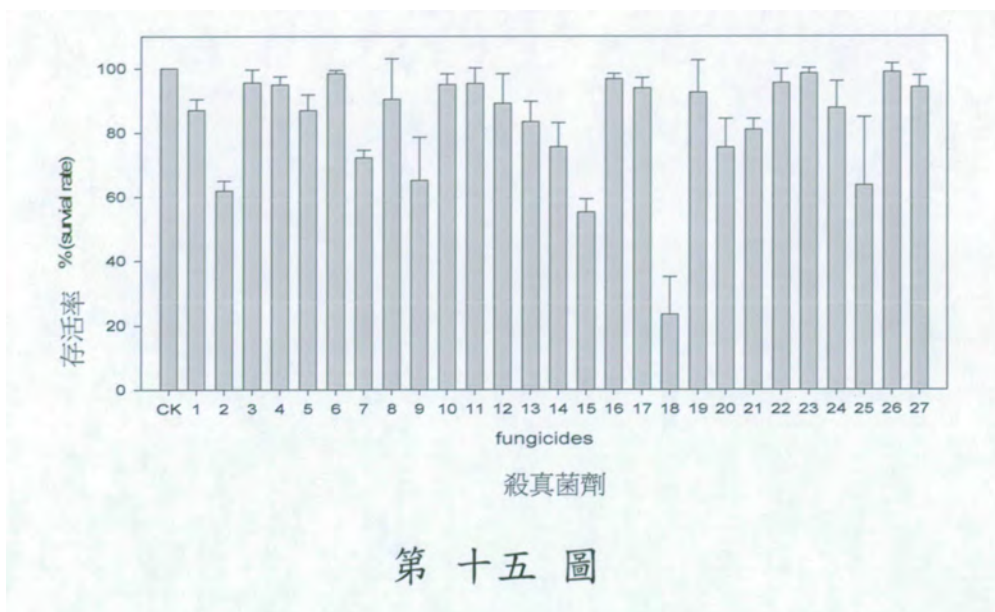
第十圖

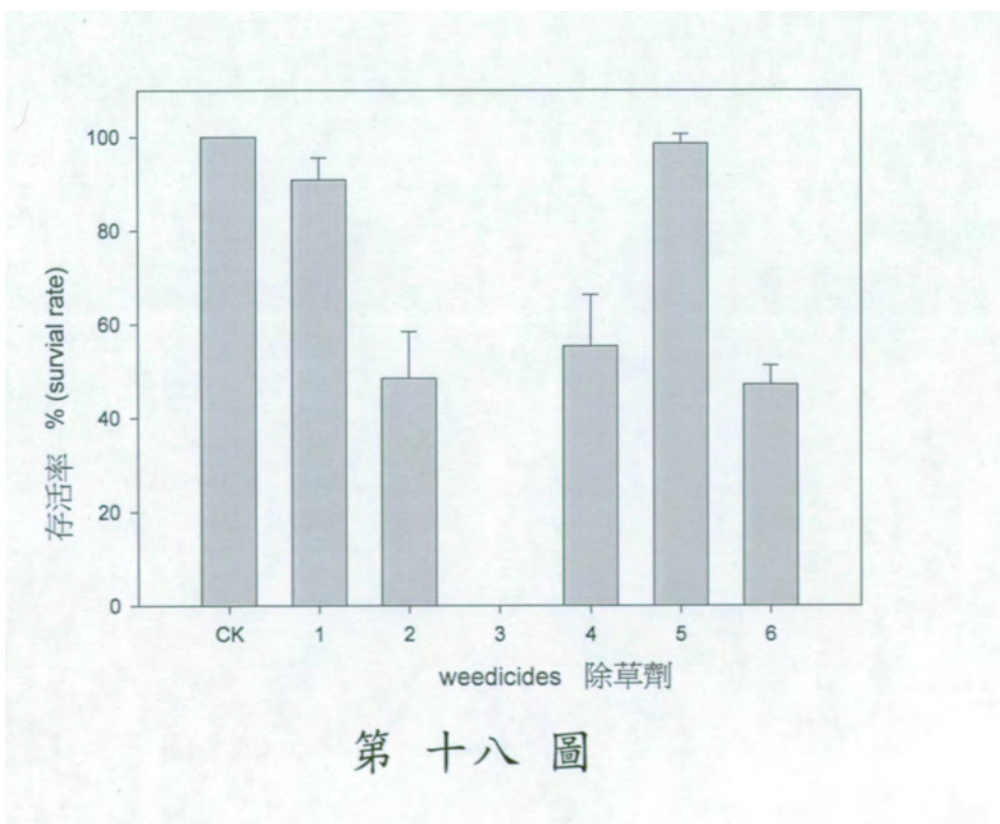
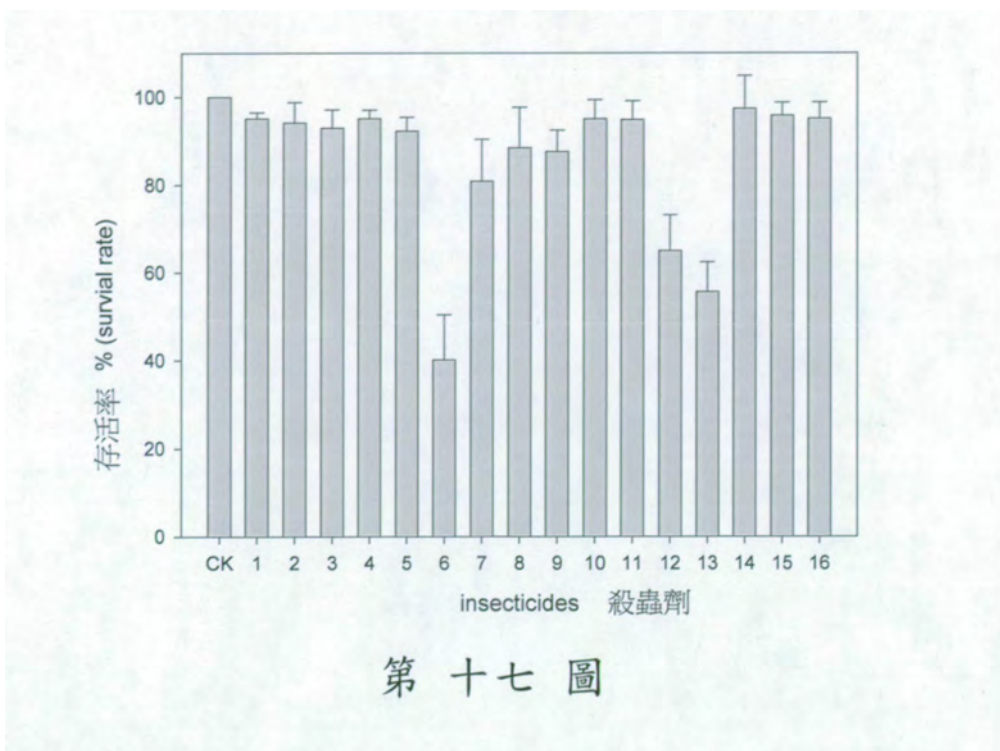


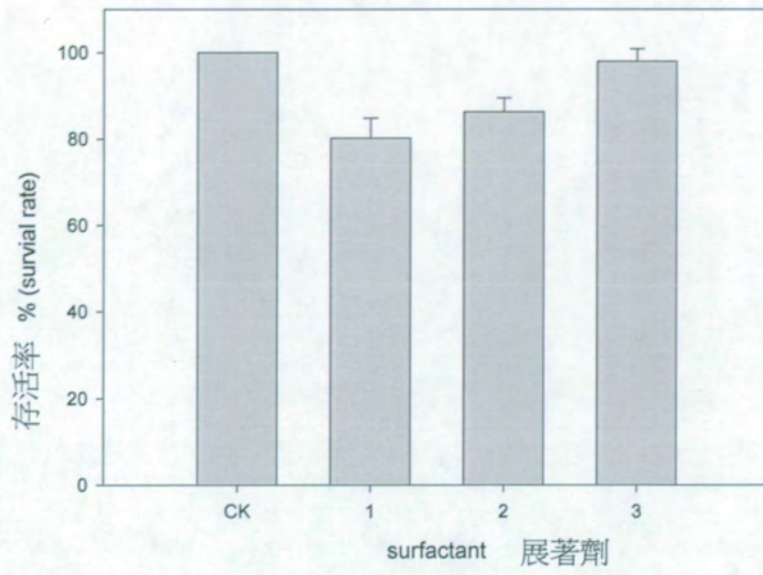
第十一圖











第十九圖