



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0117019
(43) 공개일자 2014년10월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/20 (2006.01) C12P 3/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-0031697
(22) 출원일자 2013년03월25일
심사청구일자 2013년03월25일

(71) 출원인
인하대학교 산학협력단
인천광역시 남구 인하로 100, 인하대학교 (용현동)
(72) 발명자
한상현
인천 남구 인하로 100, 3호관 209호 (용현동, 인하대학교)
소재성
서울 마포구 서강로 95, 104동 1601호 (창전동, 창전동삼성아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김순웅

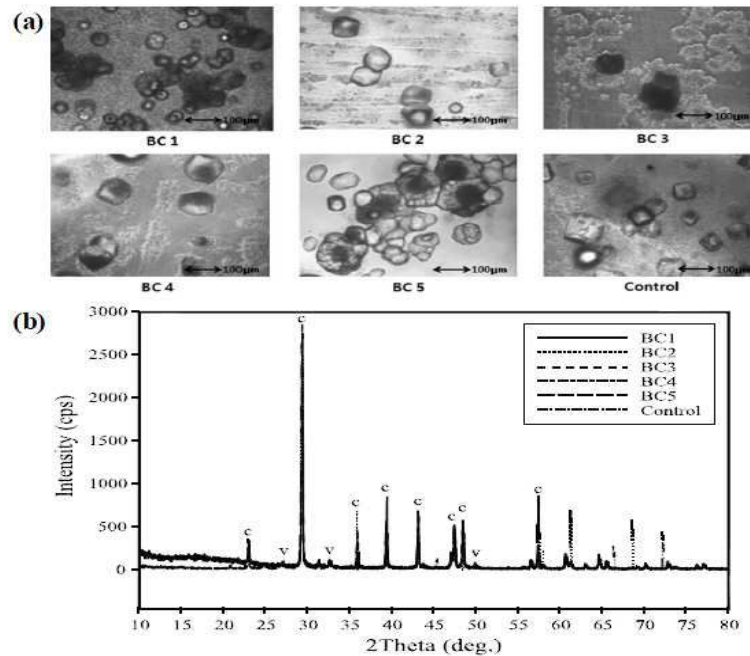
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 콘크리트에서 분리된 스포로살시나 파스테우리 WJ-4 균주 및 이를 이용한 탄산칼슘의 제조 방법

(57) 요약

본 발명은 콘크리트에서 분리한 스포로살시나 파스테우리 WJ-4 균주 및 이를 이용한 탄산칼슘 제조 방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 포로살시나 파스테우리 WJ-4 균주는 탄산칼슘을 생성하며, 온도, pH, 삼투압 스트레스에 대하여 높은 내성을 보여, 상기 균주를 콘크리트 구조물의 표면코팅, 균열보수, 압축강도 증진 및 자가 회복제로 이용 가능하다.

대표도 - 도2



(72) 발명자

정진훈

서울 양천구 목동동로 130, 1423동 1601호 (신정동, 목동14단지아파트)

박주영

인천광역시 연수구 동춘동 991-37 풍림아이원 아파트 609동 303호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 11기술혁신A04

부처명 국토해양부

연구관리전문기관 한국도로공사 도로교통연구원

연구사업명 건설 기술 혁신 사업

연구과제명 CO2 저감용 바이오 콘크리트 제조 및 포장기술 개발

기 여 율 1/1

주관기관 인하대학교

연구기간 2012.06.28 ~ 2013.04.27

특허청구의 범위

청구항 1

탄산칼슘 생성능이 있는 스포로살시나 파스테우리 WJ-4(*Sporosarcina pasteurii* WJ-4) 균주(수탁번호: KCTC 12374BP).

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 균주는 45℃ 내지 70℃에서 생존할 수 있는 것을 특징으로 하는, 스포로살시나 파스테우리 WJ-4(*Sporosarcina pasteurii* WJ-4) 균주(수탁번호: KCTC 12374BP).

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 균주는 요소 분해 활성능을 갖는 것을 특징으로 하는, 스포로살시나 파스테우리 WJ-4(*Sporosarcina pasteurii* WJ-4) 균주(수탁번호: KCTC 12374BP).

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 균주는 pH 10에서 65% 내지 75%의 생장률을 보이는 것을 특징으로 하는, 스포로살시나 파스테우리 WJ-4(*Sporosarcina pasteurii* WJ-4) 균주(수탁번호: KCTC 12374BP).

청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 균주는 1 M의 NaCl에서 65% 내지 80%의 생장률을 보이는 것을 특징으로 하는, 스포로살시나 파스테우리 WJ-4(*Sporosarcina pasteurii* WJ-4) 균주(수탁번호: KCTC 12374BP).

청구항 6

제 1항에 있어서, 상기 균주는 콘크리트에서 분리된 것을 특징으로 하는, 스포로살시나 파스테우리 WJ-4(*Sporosarcina pasteurii* WJ-4) 균주(수탁번호: KCTC 12374BP).

청구항 7

- 1) 스포로살시나 파스테우리 WJ-4(*Sporosarcina pasteurii* WJ-4) 균주를 배양하는 단계;
- 2) 상기 1) 단계에서 배양된 균주를 액체 배지에 배양 후, 여과기로 여과하여 여과액을 얻는 단계; 및
- 3) 상기 2) 단계에서 여과액에 CaCl_2 수용액을 첨가하여 탄산칼슘을 생성하는 단계;를 포함하는 포로살시나 파스테우리 WJ-4를 이용한 탄산칼슘을 제조하는 방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 콘크리트에서 분리된 스포로살시나 파스테우리 WJ-4 균주 및 이를 이용한 탄산칼슘 제조 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 콘크리트는 건설 분야에서 사용되는 가장 대표적인 건설재료로서 높은 강도와 내구성 및 상대적으로 저렴한 가격 때문에, 매년 세계적으로 60억 톤 이상 소비되고 있다. 콘크리트 생산 시 발생하는 이산화탄소는 연간 지구 이산화탄소 발생량의 7-8%를 차지한다. 콘크리트 파손 시 발생하는 황화물질 및 염소화합물 등은 환경적으로 매우 유해한 부산물로 알려져 있다. 이를 막기 위한 보수제인 에폭시(epoxy), 레진(resins), 에폭시 모타르(epoxy mortar) 등은 어느 정도 균열보수효과가 있지만, 보수제 자체가 환경에 유해하며, 그 효과가 짧아 지속적으로 보수제를 사용해야하는 단점이 있다. 이를 개선하기 위해 폐 콘크리트나 비산회를 이용한 재활용 콘크리트 개발

등의 연구가 진행되고 있으며, 최근 탄산칼슘 형성 미생물을 콘크리트 구조물의 표면코팅, 균열보수, 압축 강도 증진, 자가 회복제 등에 이용한 연구들이 발표되어 있다. 그러나 콘크리트 경화 시 발생하는 수화열(50 내지 60 ℃)과 콘크리트의 강 알칼리성(pH 12) 특성 등에 의한 미생물의 사멸로 탄산칼슘형성 미생물을 콘크리트에 적용 하는데 어려움을 갖게 한다. 따라서 극한 환경을 극복할 수 있는 포자 형성 미생물이 연구의 대상이 되어왔으며, 이 중 포자 형성 능력과 탄산칼슘 형성 능력이 우수한 스포로살시나 파스테우리(*Sporosarcina pasteurii*)가 주로 이용되어 왔다.

[0003] 이에 본 발명자들은 한국형 기후에 맞는 콘크리트 적용을 위해 콘크리트 포장도로로부터 탄산칼슘형성 미생물을 분리하여, 상기 미생물을 대조군인 스포로살시나 파스테우리 KCTC3558(*Sporosarcina pasteurii* KCTC3558)과 콘크리트 환경에 대한 성장률을 비교하고, 추가적으로 요소 분해 활성과 탄산칼슘 형성을 확인하여, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0004] 본 발명의 목적은 우수한 환경 스트레스 내성을 보유한 탄산칼슘 생성능이 있는 스포로살시나 파스테우리 WJ-4(*Sporosarcina pasteurii* WJ-4) 균주(수탁번호: KCTC 12374BP)를 제공함에 있다.

[0005] 본 발명의 다른 목적은 상기 균주를 이용한 탄산칼슘의 제조방법을 제공함에 있다.

과제의 해결 수단

[0006] 따라서, 본 발명은 우수한 환경 스트레스 내성을 보유한 탄산칼슘 생성능이 있는 스포로살시나 파스테우리 WJ-4(*Sporosarcina pasteurii* WJ-4) 균주(수탁번호: KCTC 12374BP)를 제공한다.

[0007] 또한, 본 발명은 상기 균주를 이용한 탄산칼슘의 제조 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0008] 본 발명의 스포로살시나 파스테우리 WJ-4 균주는 탄산칼슘을 생성하며, 온도, pH, 삼투압 스트레스에 대하여 높은 내성을 보여, 상기 균주를 콘크리트 구조물의 표면코팅, 균열보수, 압축강도 증진 및 자가 회복제로 이용 가능하다.

도면의 간단한 설명

[0009] 도 1은 본 발명의 스포로살시나 파스테우리 WJ-4(*porosarcina pasteurii* WJ-4) 균주의 요소분해 활성능을 나타낸 도이다[BC 1:스포로살시나 루테올라 BC 1; BC 2:스포로살시나 파스테우리 BC 2; BC 3:스포로살시나 파스테우리 BC 3; BC 4: 스포로살시나 파스테우리 WJ-4(수탁번호: KCTC 12374BP); BC 5:스포로살시나 파스테우리 BC 5; control: *S. pasteurii* KCTC3558] .

도 2는 본 발명의 스포로살시나 파스테우리 WJ-4(*porosarcina pasteurii* WJ-4) 균주의 탄산칼슘 생성능을 나타낸 도이다[(a):광학 현미경 관찰 결과; (b):X-선 회절 분석 결과]

도 3은 본 발명의 스포로살시나 파스테우리 WJ-4(*porosarcina pasteurii* WJ-4) 균주의 온도 스트레스에 대한 내성을 나타낸 도이다.

도 4는 본 발명의 스포로살시나 파스테우리 WJ-4(*porosarcina pasteurii* WJ-4) 균주의 pH 스트레스에 대한 내성을 나타낸 도이다.

도 5는 본 발명의 스포로살시나 파스테우리 WJ-4(*porosarcina pasteurii* WJ-4) 균주의 삼투압 스트레스에 대한 내성을 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0010] 본 발명은 탄산칼슘 생성능이 있는 스포로살시나 파스테우리 WJ-4(*Sporosarcina pasteurii* WJ-4) 균주(수탁번호: KCTC 12374BP)를 제공한다.

[0011] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

- [0012] 강원도 원주 내 만중분기점 부근 제 7 지구대 전방의 광장영업소 콘크리트 도로 현장에서 도로 중앙, 방벽, 배수구 등 도로와 도로 주변에서 시료를 채취하여 멸균 스테인리스(stainless) 용기에 담아 냉장 상태로 운반하였고, 상기 채취한 시료는 분말상태로 만들어 인산염에 넣어 진탕하였다. 진탕한 시료를 포자형성이 되지 않는 미생물을 제거하기 위해 80℃에서 10분간 처리하여 28℃, 200 rpm에서 24시간 동안 배양하여 포자형성이 않되는 미생물을 제거하였다. 단일 콜로니를 얻기 위해 진탕 배양액을 취해 BPU 고체 배지에 분산 도말 하여 배양하였다. 이 후, 단일 콜로니 54종을 분리하였고, 상기 54종 중 탄산칼슘 형성능 및 요소활성능이 우수한 콜로니를 분리하여, 16S rDNA 염기서열 분석결과, 4종의 스포로살시나 파스테우리 (*Sporosarcina pasteurii*)와 1종의 *Sporosarcina luteola*로 분자동정 되었고, 이를 BC 1-5로 약칭하였고, 상기 균주 요소 분해 활성, 탄산칼슘 생성능, 환경스트레스에 내성이 높은 균주를 분리한 결과, BC 4 균주를 우수 미생물로 선택할 수 있었고, 상기 균주를 스포로살시나 파스테우리 WJ-4(*Sporosarcina pasteurii* WJ-4)로 재 명명하여, 이를 생명공학연구원에 2013년 2월 20일자로 기탁하여 KCTC 12374BP의 수탁번호를 수여받았다.
- [0013] 본 발명의 균주는 콘크리트에서 분리되는 것을 특징으로 하고, 온도 스트레스에 대하여 강한 내성을 갖는다. 바람직하게는 40℃ 내지 60℃에서 생존할 수 있고, 바람직하게는 45℃ 내지 50℃에서 생존능력이 우수하다.
- [0014] 또한, 본 발명의 균주는 요소 분해 활성능을 갖는 것을 특징으로 한다.
- [0015] 또한, 본 발명의 균주는 높은 pH에서 생존능력이 우수하고, 바람직하게는 pH 10에서 65% 내지 75%의 생장률을 보이는 것을 특징으로 한다.
- [0016] 또한, 본 발명의 균주는 해양환경의 염분보다 높은 염분에서 생존능력이 우수하며, 바람직하게는 1 M의 NaCl에서 65% 내지 80%의 생장률을 보이는 것을 특징으로 한다.
- [0017] 본 발명은
- [0018] 1)스포로살시나 파스테우리 WJ-4(*Sporosarcina pasteurii* WJ-4) 균주를 배양하는 단계;
- [0019] 2)상기 1)단계에서 배양된 균주를 액체 배지에 배양 후, 여과기로 여과하여 여과액을 얻는 단계; 및
- [0020] 3)상기 2)단계에서 여과액에 CaCl₂ 멸균 수용액을 첨가하여 탄산칼슘을 생성하는 단계;를 포함하는 스포로살시나 파스테우리 WJ-4를 이용한 탄산칼슘을 제조하는 방법을 제공한다.
- [0021] 이하, 단계를 구체적으로 설명한다.
- [0022] 상기 1)단계는 스포로살시나 파스테우리 WJ-4(*Sporosarcina pasteurii* WJ-4) 균주를 배양하는 단계로, CaCl₂-BPU 고체배지(BPU 배지, 1.5% agar, 50 mM CaCl₂)에 상기 균주를 희석 도말하여 25℃ 내지 30℃에서 2 내지 5일 동안 배양할 수 있다.
- [0023] 상기 2)단계는 미생물을 제거된 여과액을 얻는 단계로, 액체 배지로 3 내지 10 mL BPU 액체 배지에 1)단계에서 배양된 균주를 접종하여 20 내지 30시간 동안 배양한 후, 0.2 μm의 주사기 여과기(syringe filter)를 이용하여 여과액을 얻는 것이 바람직하다.
- [0024] 상기 3)단계는 탄산칼슘을 생성하는 단계로 바람직하게는 20 mM 내지 30mM의 CaCl₂ 용액 50 내지 150 μL를 첨가한 후 원심 분리하여 탄산칼슘을 생성할 수 있다.
- [0025] 이하에서는, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다. 하기의 실시예는 본 발명을 상세히 설명하기 위한 예시일뿐, 본 발명은 실시예에 의하여 한정되지 않는다.
- [0026] **[실시예 1]스포로살시나 파스테우리 WJ-4(*Sporosarcina pasteurii* WJ-4) 동정**
- [0027] 시료의 채취는 강원도 원주 내 만중분기점 부근 제 7 지구대 전방의 광장영업소 콘크리트 도로 현장을 답사하였고, 도로 중앙, 방벽, 배수구 등 도로와 도로 주변에서 시료를 채취, 멸균 스테인리스(stainless) 용기에 담아 냉장 상태로 운반하였다. 채취한 시료는 분말상태로 만들어 10 g을 계량, 10 mL 인산염 완충액(phosphate buffer; NaH₂PO₄: 0.10 g/L, Na₂HPO₄: 26.61 g/L, pH 9.0, 1 mM EDTA)에 넣어 진탕하였다. 포자를 형성할 수 없는 미생물을 제거하기 위해 진탕한 시료를 80℃에서 10분간 처리하여 28℃, 200 rpm에서 24시간 동안 배양하였

다. 단일 콜로니를 얻기 위해 진탕 배양액 100 μ L를 취해 크리스탈린 소 혈청 알부민(crystalline bovine serum albumin; TaKaRa, Kyoto, Japan)이 포함된 BPU 고체 배지(Beef extract: 3 g/L, Peptone: 5 g/L, Urea: 20 g/L, pH: 9.0)에 분산 도말 하였고, 28℃로 72시간 동안 배양하였다. 형성된 단일 콜로니의 탄산칼슘 형성을 확인하기 위해 액체 배지에서 28℃, 200 rpm으로 72시간 동안 배양한 후, 이를 0.2 μ m 주사기 여과기로 여과하여 미생물을 제거하였다. 여과액 1 mL에 100 μ L의 50 mM CaCl_2 멸균 수용액을 첨가하여 침전반응을 통한 탄산칼슘 형성을 확인하였다. 요소 분해 활성, 탄산칼슘 확인, 다양한 환경 스트레스에 대한 생존률 비교를 위해 기존에 연구된 *S. pasteurii* KCTC3558을 대조군으로 사용하였다. 추가적으로 분리된 미생물들 중 요소 분해 활성이 좋은 5종의 미생물을 선택하여 16S rDNA 염기서열분석을 통하여 분자 동정하였다. 분리 미생물의 16S rDNA 염기서열 분석결과, 4종의 *Sporosarcina pasteurii*와 1종의 *Sporosarcina luteola*로 분자동정 되었으며, 이를 BC 1-5로 약칭하였다. 이 후의 실험에서 효과가 우수하였던 균주를 *S. pasteurii* BC 4로 칭하였고, 이를 *sporosarcina pasterurii* WJ-4로 재명명하여, 2013년 2월 20일자로 생명공학연구원에 기탁하여, KCTC 12374BP의 수탁번호를 수여받았다(이하, *S. pasteurii* BC 4는 *porosarcina pasterurii* WJ-4임).

[0028] [실시예 2]스포르살시나 파스테우리 WJ-4 균주의 요소 분해 활성 측정

[0029] 본 연구에는 K. R. Natarajan *et al.* 이 사용한 요소 효소 측정을 변형하여 요소 분해 활성을 측정하고, 계산하였다. 분리된 탄산칼슘형성 미생물과 스포로살시나 파스테우리 KCTC3558를 5 mL YA 배지에 접종하여 28℃, 200 rpm 24시간 동안 전 배양하였다. 전 배양이 완료된 후, 배양액을 5 mL YA 배지(Yeast: 20 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$: 9.9 g/L, pH 9.0; 121℃, 15분의 조건에서 멸균)에 1% 접종하여 28℃, 200 rpm 8시간 배양하였다. 그 후 원심분리기 (VS-550, Vision Scientific Co., LTD, Bucheon, Korea)를 이용하여, 인산염 완충액으로 3회 세척하였고, 분광광도계 (Utrospec 2000, Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)로 $\text{O.D}_{600} = 0.1$ 이 되도록 미생물 시료를 인산염 완충액으로 희석하였다. 각 미생물의 요소분해 활성 측정을 위해 250 μ L 미생물시료, 500 μ L 요소 용액(urea solution; 3 M urea), 및 250 μ L 인산염 완충액(Phosphate buffer; NaH_2PO_4 : 0.10 g/L, Na_2HPO_4 : 26.61 g/L, pH 9.0, 1 mM EDTA)을 혼합하여 37℃에서 5분간 반응시킨 후 페놀-니트로프러사이드 용액(phenol-nitroprusside solution; $\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$: 43.90 ml/L, $\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 60 mg/L)과 차아 염소산 용액(hydrochlorite solution; NaOH : 20 g/L, 8% NaOCl : 46.875 g/L)을 각각 2 mL씩 가하였다. 50℃에서 혼합물을 5분간 배양한 후 O.D_{600} 에서 흡광도를 측정하였다. 표준 곡선은 0.1 mM 내지 1 M의 NH_4Cl 을 사용하여 측정하였으며, 시료의 흡광도를 표준 곡선에 적용시켜 암모늄의 농도를 산출하였다. 실험에 사용된 미생물의 단백질 양을 측정하기 위해 브래드포드 반응물(Bradford reagent; SIGMA, St. Louis, MO, USA)을 사용하여 M. M. Bradford의 단백질 어세이(protein assay)를 이용하여 측정하였다. 이의 결과를 도 1에 나타내었다.

[0030] 도 1에 나타난 바와 같이, 대조군으로 사용된 *S. pasteurii* KCTC3558 균주의 요소 분해 활성이 16.1 U으로 높았으며, 나머지 분리한 상기 5종의 미생물(스포르살시나 파스테우리 BC 1 내지 BC 5)은 0.5-5 U 사이의 요소 분해 활성이 있는 것으로 측정되었다.

[0031] 탄산칼슘형성 미생물은 요소(urea)의 가수분해 시 발생하는 탄산염 이온 (CO_3^{2-})과 칼슘이온 (Ca^{2+})이 결합하여, 탄산칼슘을 만드는 기작을 갖고 있다. 이때, 요소 분해 활성이 좋을수록 요소 분해에 의한 탄산염이온 (CO_3^{2-})의 형성이 증가하여 탄산칼슘 (CaCO_3)생성이 촉진된다. 결과적으로 요소분해효소가 활성화되면, 암모늄이온 방출량이 촉진되어 pH가 높아지게 되므로, 결국 미생물학적 탄산칼슘이 증가하게 된다. 따라서, 본원 발명의 균주는 높은 탄산 칼슘 형성능을 갖는 것으로 생각된다.

[0032] [실시예 3]스포르살시나 파스테우리 WJ-4 균주의 탄산칼슘형성 확인

[0033] 본원 발명의 균주의 탄산칼슘 형성능을 확인하기 위하여, Park *et al.* [20]에서 연구된 배지를 일부 변형하여 CaCl_2 -BPU 고체배지 (BPU 배지, 1.5% agar, 50 mM CaCl_2)에 미생물을 희석 도말하여 28℃에서 3일간 배양한 후, 광학현미경(LEICA DMLS, Leica, Weitzlar, German) 으로 탄산칼슘 형성여부를 확인하였다. 5 mL BPU 액체배지에 탄산칼슘 형성 미생물을 접종하여 24시간 동안 배양한 후, 0.2 μ m 주사기 여과기를 이용하여 여과액을 회수하였다. 25 mM CaCl_2 100 μ L를 첨가한 후 원심 분리 (16179 $\times$ g, 5 min)하여 침전물을 획득하였다. 100 μ L 멸

균 증류수를 첨가한 후 진탕 혼합하였고, 커버 글래스에 30 μ L의 혼합액을 떨어뜨려 50℃에서 완전히 건조시킨 다음 X-선 회절 분석기 (DMAX-2500, Rigaku, Tokyo, Japan)의 10-90°에서 2 θ 간격으로 탄산칼슘을 확인하였다. 광학현미경 (LEICA DMLS, Leica, Weitzlar, German)을 이용하여 콜로니 주변에 형성된 광물결정을 관찰한 결과를 도 2의 a)에 나타내었고, X-선 회절분석 결과를 도 2)의 b)에 나타내었다.

[0034] 도 2의 a)에 나타난 바와 같이, 3가지 형태의 탄산칼슘결정이 관찰되었다. BC 2, BC 4, 및 대조군에서 각주형태의 결정모양이 관찰되었고, BC 1과 BC 5에서는 둥근 형태의 결정모양이 관찰되었으며, BC 3의 경우, 다른 광물에 비해 다소 작은 형태의 광물이 관찰되었다. 다양한 광물결정의 모양과 크기는 콜로니 형태 및 분비되는 외부 물질의 분자적 특이성에 기인하기 때문이다.

[0035] 도 2)의 b)에 나타난 바와 같이, 본원 발명의 BC 4 균주가 탄산칼슘을 생성하는 것을 확인하였고, 탄산칼슘의 이성질체인 바테라이트도 미량 발견되었다. 이와 같은 결과를 통해 0.3 M 이상의 Ca^{2+} 에서는 탄산칼슘만 형성되지만 그 이하의 농도에서는 바테라이트도 존재한다는 사실을 알 수 있었다.

[0036] [실시예 4]스포르살시나 파스테우리 WJ-4 균주의 환경 스트레스 (pH, 염분, 온도)에 대한 생장을 비교

[0037] 온도 (40-55℃), pH (9.0-13.0), 염분 (0-2.0 M)의 조건에서 미생물의 스트레스 내성을 분석하기 위해 환경 스트레스(pH, 염분, 온도)에 대한 생장률을 비교하였다. pH와 염분 스트레스 실험은 24시간 배양한 미생물을 4045 $\times$ g에서 5분간 원심 분리하여, 인산염 완충액으로 0.D₆₀₀ = 1.0이 되도록 현탁하였다. 해당 스트레스 조건이 처리된 5 mL YA 액체 배지에 미생물을 1% 접종하여, 28℃에서 200 rpm으로 24시간 배양하였다. 그리고 24시간이 지난 후 0.D₆₀₀에서 흡광도를 측정하여 생장률을 계산하였다 (처리군 배양액의 흡광도/비처리군 배양액의 흡광도). 온도 스트레스 실험을 위해 24시간 배양한 미생물을 4045 $\times$ g에서 5분간 원심 분리 후 인산염 완충액으로 세척하여 0.D₆₀₀ = 1.0이 되도록 설정하였다. 그 후 YA 한천 배지에 도말하였고, 각 온도의 조건에서 24시간 동안 배양하여 CFU (Colony Forming Unit)를 측정, 생장률을 계산하였다(처리군 CFU/28℃ 배양된 CFU). 본원 발명의 BC 4 균주(WJ-4)의 온도에 대한 내성을 도 3에 나타내었고, pH에 대한 내성을 도 4에 나타내었고, 염분에 대한 내성을 도 5에 나타내었다.

[0038] 도 3에 나타난 바와 같이, 열 스트레스에 대한 생장률은 5개의 분리 미생물 모두 대조군보다 높은 것으로 나타났다. 40℃에서 대조군이 모두 사멸함에도 불구하고 분리 미생물 모두 60-80%의 높은 생장률을 나타내었으며, 본원 발명의 BC 4 및 BC 5의 경우 50℃에서 40%의 생장률을 보였다. 이를 통해 분리 미생물 자체가 수화열 최저 온도인 50℃에서 증식이 가능함을 알 수 있었다. 열에 대한 내성이 강한 미생물일수록 포자 형성 시 더 높은 열 저항성을 보유하여 포자 형성 시 수화열 최고 온도인 60℃ 이상에서 생장할 수 있다는 가능성을 보였다.

[0039] 도 4에 나타난 바와 같이, pH에 대한 생장률은 분리 미생물 BC 1-3과 BC 5의 경우 pH 10에서 30%의 생장률을 보였으며, BC 4 및 대조군에서는 각각 68.1%와 65.9%의 생장률을 보였다. 그러나 pH 10을 초과한 환경에서는 생장을 확인할 수 없었다.

[0040] 도 5에 나타난 바와 같이, 해양환경과 같은 높은 삼투압조건에서의 바이오콘크리트 적용을 위해 삼투압 스트레스 조건 (0-2 M NaCl)에 미생물을 노출시켰고, 그 결과 1 M의 NaCl에서, BC 1과 BC 4는 대조군보다 각각 60.4%와 70.4%의 높은 생장률을 보였다. 평균 해수 염도보다 높은 염도 (평균 해수 염도: 3.4-3.5%, 1M NaCl: 5.8%)에서도 위 미생물들이 생장률을 유지함을 고려하면, 해양환경에서도 높은 생장률을 유지할 수 있을 것으로 판단된다.

수탁번호

[0041]

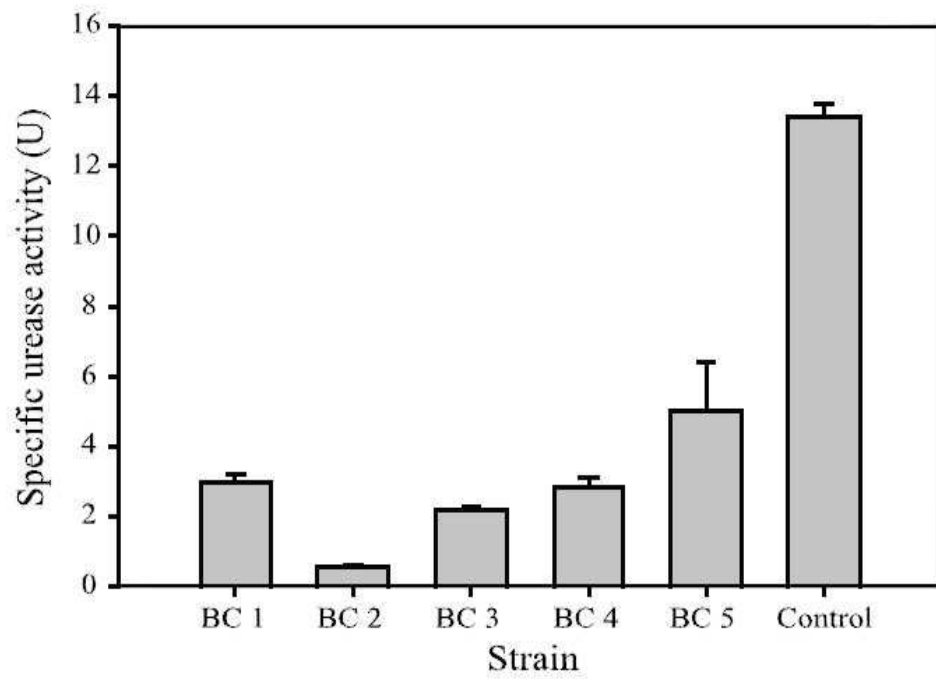
기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC12374BP

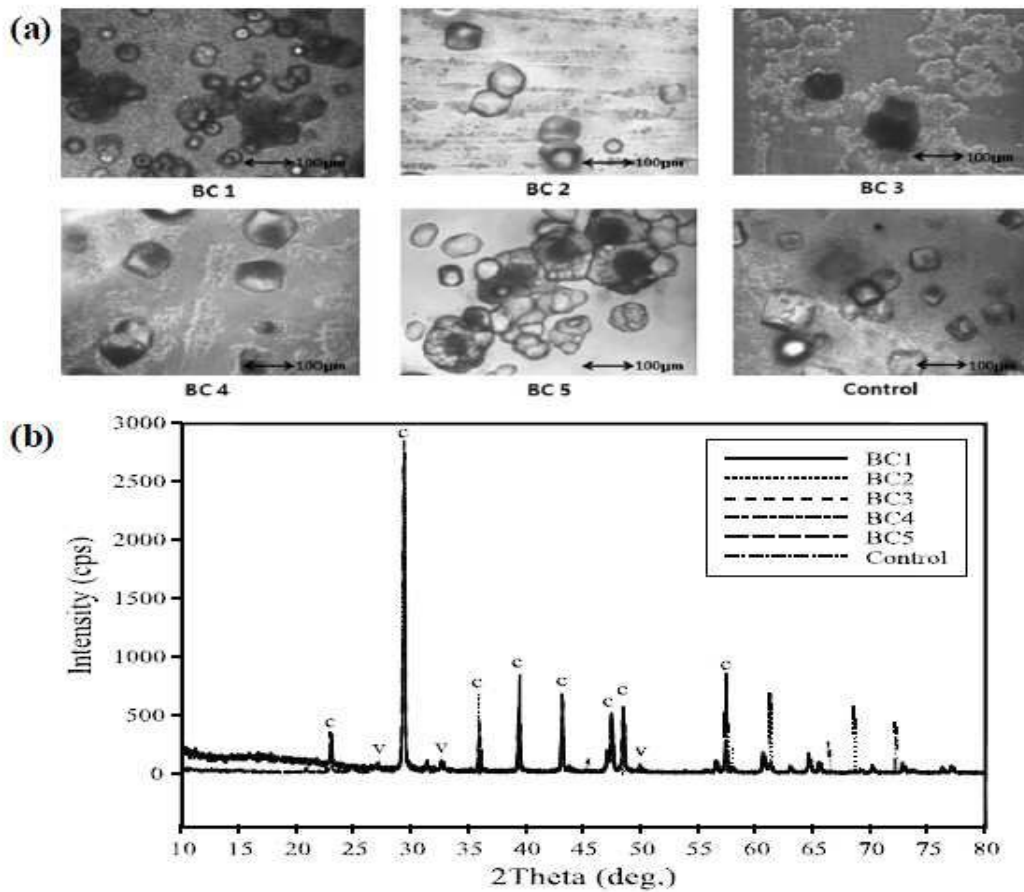
수탁일자 : 20130220

도면

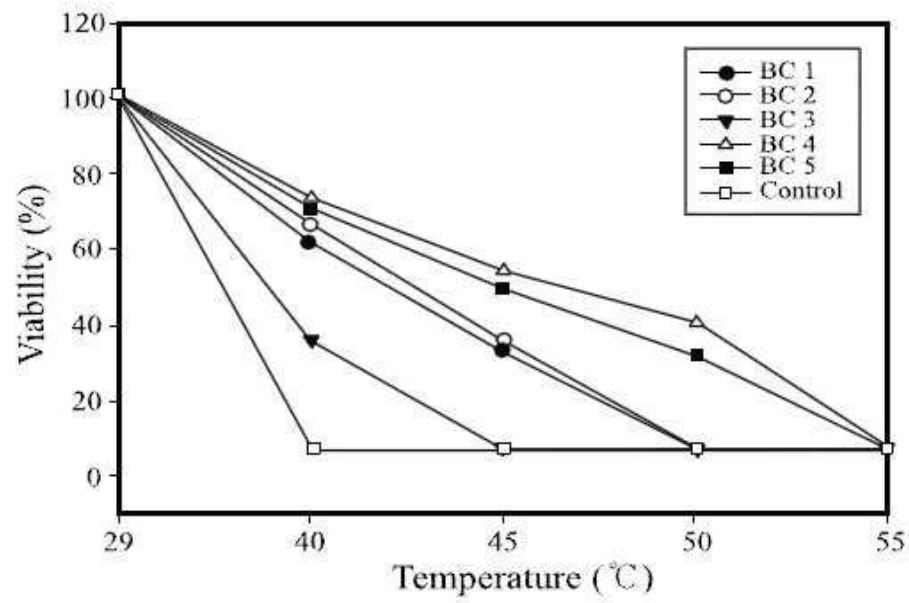
도면1



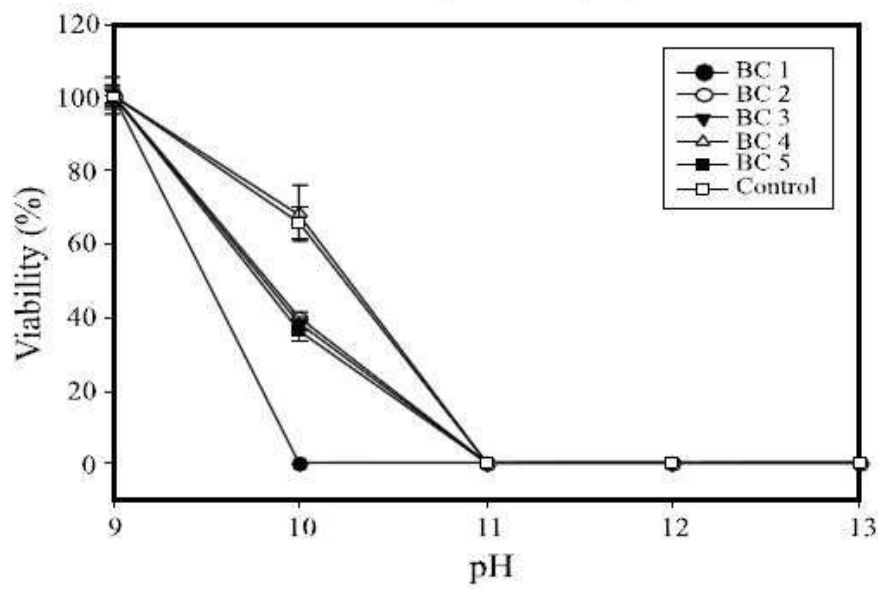
도면2



도면3



도면4



도면5

