(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0121683
(43) 공개일자 2019년10월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/20 (2006.01) *C04B 28/02* (2006.01)
C04B 103/00 (2006.01) *C04B 111/72* (2006.01)
C12R 1/07 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 1/20 (2013.01)
C04B 28/02 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-0021964
(22) 출원일자 2019년02월25일
심사청구일자 2019년02월25일
(30) 우선권주장
1020180045064 2018년04월18일 대한민국(KR)

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
성균관대학교산학협력단
경기도 수원시 장안구 서부로 2066 (천천동, 성균관대학교내)
(72) 발명자
박우준
서울특별시 강남구 언주로 420, 101동 2105호 (역삼동, 역삼자이아파트)
이윤석
광주광역시 남구 효덕로300번길 8-10 (진월동)
이광명
서울특별시 서초구 서초중앙로 188, C동 1610호 (서초동, 아크로비스타)
(74) 대리인
특허법인 남앤남

전체 청구항 수 : 총 10 항

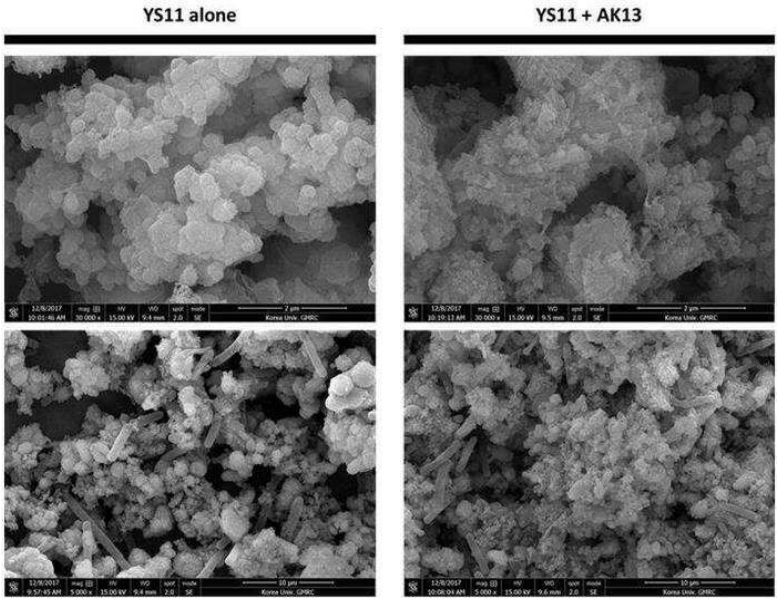
(54) 발명의 명칭 **라이시니바실러스 보로니톨러란스 YS11 균주 및 바실러스 속 AK13 균주의 혼합배양을 통한 탄산칼슘 생성 및 이의 용도**

(57) 요 약

본 발명은 탄산칼슘 형성 촉진능을 갖는 호알칼리성 신규 미생물 바실러스 속 AK13(*Bacillus* sp. AK13) 균주; 상기 균주와 라이시니바실러스 보로니톨러란스 YS11(*Lysinibacillus boronitolerans* YS11) 균주 혼합물을 이용한 시멘트 또는 콘크리트의 내구성 증진 및 균열 보수용 조성물; 및 상기 균주 혼합물을 구조물의 균열 부위에 처리

(뒷면에 계속)

대 표 도 - 도12



함으로써 시멘트 또는 콘크리트 구조물의 내구성 증진시키고 및 균열을 보수하는 방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 신규한 미생물 바실러스 속 AK13 균주는 탄산칼슘 형성능을 갖는 라이시니바실러스 보로니톨러란스 YS11 균주와 혼합 배양하는 경우 표면부착능이 높은 생물막 형성에 탁월하고 생물막 기저로부터 균일하게 작은 입자의 탄산칼슘을 형성하기 때문에, 콘크리트 균열에 대하여 완고하고 내구성이 높은 탄산칼슘을 석출하며, 바실러스 속 AK13 균주의 호알칼리성 특성으로 강알칼리의 극한 환경인 콘크리트 구조물 내에서의 생존율을 높이기 때문에, 콘크리트 내부 적용 균열 치유에 있어서 유리하다는 장점이 있다. 따라서, 본 발명에 따른 바실러스 속 AK13 균주와 라이시니바실러스 보로니톨러란스 YS11 균주의 혼합적용은 친환경적인 자기치유 콘크리트 또는 건설재료로 활용가능성이 높으며, 기존의 시멘트, 폴리머 수지 표면처리 기법 등의 단기적인 치유 기술을 대체할 수 있는 지속 가능한 기술로 기대된다.

(52) CPC특허분류
C04B 2103/0001 (2013.01)
C04B 2111/72 (2013.01)
C12R 1/07 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 18SCIP-B103706-04
부처명 국토교통부
연구관리전문기관 국토교통과학기술진흥원
연구사업명 건설기술연구사업
연구과제명 박테리아 활용 균열 자기치유 콘크리트 개발
기 여 율 1/1
주관기관 고려대학교 산학협력단
연구기간 2018.01.01 ~ 2018.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

pH8 ~ 11의 조건에서 생장하며 탄산칼슘 형성 촉진능을 갖는 신규 미생물 바실러스 속 AK13(*Bacillus sp.* AK13) 균주 (수탁번호 KACC 81070BP).

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 균주는 서열번호 2의 염기서열을 갖는 16S rRNA 유전자를 포함하는 것을 특징으로 하는 바실러스 속 AK13 균주.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 균주는 탄산칼슘 형성능을 갖는 라이시니바실러스 속(*Lysinibacillus* sp.) 미생물과 공동배양하는 경우 탄산칼슘 형성을 촉진시키는 것을 특징으로 하는 바실러스 속 AK13 균주.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 라이시니바실러스 속 균주는 라이시니바실러스 보로니톨러란스 YS11(*Lysinibacillus boronitolerans* YS11) 균주 (수탁번호 KACC 81048BP)인 것을 특징으로 하는 바실러스 속 AK13 균주.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 라이시니바실러스 보로니톨러란스 YS11 균주는 비요소분해 메커니즘을 통해 탄산칼슘을 석출하는 것을 특징으로 하는 바실러스 속 AK13 균주.

청구항 6

바실러스 속 AK13(*Bacillus sp.* AK13) 균주 (수탁번호 KACC 81070BP) 및 라이시니바실러스 보로니톨러란스 YS11(*Lysinibacillus boronitolerans* YS11) 균주 (수탁번호 KACC 81048BP)의 혼합물; 상기 두 균주의 혼합 배양물; 상기 두 균주의 혼합 배양물의 농축물; 상기 두 균주의 혼합 배양물의 건조물; 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나를 포함하는, 시멘트 또는 콘크리트용 조성물.

청구항 7

바실러스 속 AK13(*Bacillus sp.* AK13) 균주 (수탁번호 KACC 81070BP) 및 라이시니바실러스 보로니톨러란스 YS11(*Lysinibacillus boronitolerans* YS11) 균주 (수탁번호 KACC 81048BP)의 혼합물; 상기 두 균주의 혼합 배양물; 상기 두 균주의 혼합 배양물의 농축물; 상기 두 균주의 혼합 배양물의 건조물; 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나를 포함하는, 시멘트 또는 콘크리트 충전용 조성물.

청구항 8

바실러스 속 AK13(*Bacillus sp.* AK13) 균주 (수탁번호 KACC 81070BP) 및 라이시니바실러스 보로니톨러란스 YS11(*Lysinibacillus boronitolerans* YS11) 균주 (수탁번호 KACC 81048BP)의 혼합물; 상기 두 균주의 혼합 배양물; 상기 두 균주의 혼합 배양물의 농축물; 상기 두 균주의 혼합 배양물의 건조물; 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나를 포함하는, 지반 강화용 조성물.

청구항 9

바실러스 속 AK13(*Bacillus sp.* AK13) 균주 (수탁번호 KACC 81070BP) 및 라이시니바실러스 보로니톨러란스 YS11(*Lysinibacillus boronitolerans* YS11) 균주 (수탁번호 KACC 81048BP)의 혼합물; 상기 두 균주의 혼합 배양물; 상기 두 균주의 혼합 배양물의 농축물; 상기 두 균주의 혼합 배양물의 건조물; 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나를 시멘트 또는 콘크리트 구조물의 균열 부위에 처리하는 단계를 포함하는, 시멘트 또는 콘크리트 구조물의 균열 보수 방법.

청구항 10

바실러스 속 AK13(*Bacillus sp.* AK13) 균주 (수탁번호 KACC 81070BP) 및 라이시니바실러스 보로니톨러란스 YS11(*Lysinibacillus boronitolerans* YS11) 균주 (수탁번호 KACC 81048BP)의 혼합물; 상기 두 균주의 혼합 배양물; 상기 두 균주의 혼합 배양물의 농축물; 상기 두 균주의 혼합 배양물의 건조물; 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나를 시멘트 또는 콘크리트 구조물의 균열 부위에 처리하는 단계를 포함하는, 시멘트 또는 콘크리트 구조물의 내구성 증진 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 탄산칼슘 형성 촉진능을 갖는 호알칼리성 신규 미생물 바실러스 속 AK13(*Bacillus* sp. AK13) 균주; 상기 균주와 라이시니바실러스 보로니톨러란스 YS11(*Lysinibacillus boronitolerans* YS11) 균주 혼합물을 이용한 시멘트 또는 콘크리트의 내구성 증진 및 균열 보수용 조성물; 및 상기 균주 혼합물을 구조물의 균열 부위에 처리함으로써 시멘트 또는 콘크리트 구조물의 내구성 증진시키고 및 균열을 보수하는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 미생물에 의해 유도되는 탄산칼슘 형성(MICP; microbially induced calcium carbonate precipitation)은 자연계 도처에서 일어나는 현상으로 지구의 원소 순환에 일조하는 생지화학적 과정이다. 미생물은 pH 또는 용존무기탄소(dissolved inorganic carbon; DIC) 농도를 높이는 대사과정을 통하여 주변에 칼슘이온이 존재 시 탄산칼슘 석출을 유도한다. 이러한 대과정에는 광합성, 요소분해, 탈질화, 탈아미노 작용, 황산염 감소, 메탄 산화 작용 등이 알려져 있다. 미생물의 세포막 또는 엑소폴리사카라이드(EPS)는 핵형성점을 제공함으로써 미생물의 탄산칼슘 형성을 촉진한다. 미생물에 의한 탄산칼슘 형성은 최근 10년간 건축물의 보수, 토양 기반 강화, 탄소 고정, 석조물 문화유산 보존 및 중금속 흡착 등의 환경공학 분야에서 활발히 응용되고 있다. 특히 탄산칼슘형성미생물은 자기치유콘크리트 기술에 활용됨으로써 콘크리트의 내구성을 증진시키고 균열을 보수하여 수명을 연장시킬 수 있다.

[0003] 콘크리트는 오늘날 가장 많이 쓰이는 건축자재 중 하나로 현대 건축에 있어서 대체 불가한 재료이다. 콘크리트의 보편적 사용에도 불구하고 콘크리트는 균열이 발생하는 빈도가 높다는 단점을 가지고 있다. 콘크리트에 균열이 발생하면 건축물의 내구성에 치명적인 축소를 가져오고 그에 따른 대체 비용이 든다. 또한, 콘크리트의 광범위한 사용에 따른 환경문제가 대두되는데 현재 시멘트 생산은 인류에 의해 발생되는 이산화탄소 중 7%를 차지하는 것으로 알려져 있다. 따라서 자기치유콘크리트는 이러한 문제들에 대응하여 중요한 해결책으로 주목받고 있고 탄산칼슘형성미생물이 균열 치유를 목적으로 콘크리트 내·외부에 적용되고 있다. 기존에 사용되던 화학적인 자기치유물질들과 비교하여 미생물의 탄산칼슘 석출을 활용한 자기치유 기술은 대기 중 탄소를 고정함으로써 더욱 친환경적이고, 보수 및 유지에 있어 경제적이라는 장점을 가지고 있다.

[0004] 탄산칼슘 석출 메커니즘 중 요소분해 대사는 요소 공급의 용이성으로 인하여 활발히 응용되고 있다. 요소분해능을 보유한 미생물은 주변 환경에 요소가 있을 때 유레이스(urease)라는 요소분해효소를 활용하여 요소를 암모니아와 탄산으로 수화하여 탄산칼슘 형성에 적합한 환경을 조성한다. 그러나 요소분해과정에서 생성되는 대사물질인 암모니아는 장기적인 콘크리트 내구성을 저하시키며 환경유해물질 및 독성물질로 작용하여 사람에 의한 접촉이 많은 콘크리트 시설물에 바람직하지 못하다. 따라서 비요소분해 메커니즘을 활용하여 탄산칼슘을 형성하는 미생물에 대한 연구가 필수적이다.

[0005] 한편, 미생물을 콘크리트 내부에서 적용하는 자기치유 기술의 경우 탄산칼슘형성미생물이 콘크리트 내부에서 생존 가능하며 콘크리트에 균열이 발생했을 때 충분한 생리적 활성으로 탄산칼슘을 형성할 수 있어야 한다. 콘크

리트 내부는 pH 13까지 올라가는 알칼리 환경이자 산소 공급이 적은 극한의 환경이다. 따라서 자기치유콘크리트에 활용될 미생물 균주는 알칼리 환경에 견디고 포자를 형성하는 특성을 가져야만 콘크리트 구조물의 극한 환경에서 생존 가능하게 된다. 포자를 형성하며, 내알칼리를 띠고 그람양성균에 해당하는 박테리아는 콘크리트 응용에 주로 고려되어 왔다. 미생물 균주는 각기 다른 대사과정을 이용하여 탄산칼슘의 석출을 유도할 뿐만 아니라 세포막과 엑소폴리사카라이드(EPS) 성분이 다르기 때문에 균주에 따라 다른 형태의 탄산칼슘 결정이 생성된다고 알려져 있다.

[0006] 본 발명자들은 비요소분해 메커니즘으로 탄산칼슘을 형성하는 라이시니바실러스 보로니톨러란스(*Lysinibacillus boronitolerans*) YS11 균주와 호알칼리성 세균 바실러스 속(*Bacillus* sp.) AK13 균주를 혼합배양 했을 때 자기치유콘크리트에 더욱 활용 적합한 탄산칼슘을 형성하고 콘크리트 내부에서의 생존율을 높인다는 점을 확인한 바, 이에 기초하여 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제10-1310634호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 따라서 본 발명의 목적은 알칼리 환경에서 활발히 생장가능하며 탄산칼슘 형성능을 가진 미생물과 공동 배양시 탄산칼슘 형성을 효과적으로 촉진시킬 수 있는 신규 미생물을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은, 미생물을 이용하여 탄산칼슘 형성을 효과적으로 이끌어낼 수 있는 시멘트 또는 콘크리트 제조용 조성물을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은, 미생물을 이용하여 탄산칼슘 형성을 효과적으로 이끌어낼 수 있는 시멘트 또는 콘크리트 충전용 조성물을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은, 미생물을 이용하여 탄산칼슘 형성을 효과적으로 이끌어낼 수 있는 지반 강화용 조성물을 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 또 다른 목적은, 미생물을 이용하여 탄산칼슘 형성을 효과적으로 이끌어낼 수 있는 시멘트 또는 콘크리트 구조물의 균열 보수 방법을 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 또 다른 목적은, 미생물을 이용하여 탄산칼슘 형성을 효과적으로 이끌어낼 수 있는 시멘트 또는 콘크리트 구조물의 내구성 증진 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0014] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위해서,

[0015] 본 발명은 pH8 ~ 11의 조건에서 생장하며 탄산칼슘 형성 촉진능을 갖는 신규 미생물 바실러스 속 AK13(*Bacillus sp.* AK13) 균주 (수탁번호 KACC 81070BP)를 제공한다.

[0016] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 균주는 서열번호 2의 염기서열을 갖는 16S rRNA 유전자를 포함할 수 있다.

[0017] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 균주는 탄산칼슘 형성능을 갖는 라이시니바실러스 속(*Lysinibacillus* sp.) 미생물과 공동배양하는 경우 탄산칼슘 형성을 촉진시킬 수 있다.

[0018] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 라이시니바실러스 속 균주는 라이시니바실러스 보로니톨러란스 YS11(*Lysinibacillus boronitolerans* YS11) 균주 (수탁번호 KACC 81048BP)일 수 있다.

[0019] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 라이시니바실러스 보로니톨러란스 YS11 균주는 비요소분해 메커니즘을 통해 탄산칼슘을 석출할 수 있다.

[0020] 또한, 본 발명은 바실러스 속 AK13(*Bacillus sp.* AK13) 균주 (수탁번호 KACC 81070BP) 및 라이시니바실러스 보

로니톨러란스 YS11(*Lysinibacillus boronitolerans* YS11) 균주 (수탁번호 KACC 81048BP)의 혼합물; 상기 두 균주의 혼합 배양물; 상기 두 균주의 혼합 배양물의 농축물; 상기 두 균주의 혼합 배양물의 건조물; 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나를 포함하는, 시멘트 또는 콘크리트용 조성물을 제공한다.

[0021] 또한, 본 발명은 바실러스 속 AK13(*Bacillus sp.* AK13) 균주 (수탁번호 KACC 81070BP) 및 라이시니바실러스 보로니톨러란스 YS11(*Lysinibacillus boronitolerans* YS11) 균주 (수탁번호 KACC 81048BP)의 혼합물; 상기 두 균주의 혼합 배양물; 상기 두 균주의 혼합 배양물의 농축물; 상기 두 균주의 혼합 배양물의 건조물; 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나를 포함하는, 시멘트 또는 콘크리트 충전용 조성물을 제공한다.

[0022] 또한, 본 발명은 바실러스 속 AK13(*Bacillus sp.* AK13) 균주 (수탁번호 KACC 81070BP) 및 라이시니바실러스 보로니톨러란스 YS11(*Lysinibacillus boronitolerans* YS11) 균주 (수탁번호 KACC 81048BP)의 혼합물; 상기 두 균주의 혼합 배양물; 상기 두 균주의 혼합 배양물의 농축물; 상기 두 균주의 혼합 배양물의 건조물; 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나를 포함하는, 지반 강화용 조성물을 제공한다.

[0023] 또한, 본 발명은 바실러스 속 AK13(*Bacillus sp.* AK13) 균주 (수탁번호 KACC 81070BP) 및 라이시니바실러스 보로니톨러란스 YS11(*Lysinibacillus boronitolerans* YS11) 균주 (수탁번호 KACC 81048BP)의 혼합물; 상기 두 균주의 혼합 배양물; 상기 두 균주의 혼합 배양물의 농축물; 상기 두 균주의 혼합 배양물의 건조물; 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나를 시멘트 또는 콘크리트 구조물의 균열 부위에 처리하는 단계를 포함하는, 시멘트 또는 콘크리트 구조물의 균열 보수 방법을 제공한다.

[0024] 또한, 본 발명은 바실러스 속 AK13(*Bacillus sp.* AK13) 균주 (수탁번호 KACC 81070BP) 및 라이시니바실러스 보로니톨러란스 YS11(*Lysinibacillus boronitolerans* YS11) 균주 (수탁번호 KACC 81048BP)의 혼합물; 상기 두 균주의 혼합 배양물; 상기 두 균주의 혼합 배양물의 농축물; 상기 두 균주의 혼합 배양물의 건조물; 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나를 시멘트 또는 콘크리트 구조물의 균열 부위에 처리하는 단계를 포함하는, 시멘트 또는 콘크리트 구조물의 내구성 증진 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0025] 본 발명에 따른 신규한 미생물 바실러스 속(*Bacillus* sp.) AK13 균주는 탄산칼슘 형성능을 갖는 라이시니바실러스 보로니톨러란스(*Lysinibacillus boronitolerans*) YS11 균주와 혼합 배양시 YS11 균주 단일배양보다 콘크리트 균열 치유에 더욱 적합한 작은 탄산칼슘 결정을 생성하는바, 상기 두 균주의 혼합 배양은 자기치유콘크리트 기술 적용에 유리하다. 이에 따라, 친환경적으로 콘크리트의 내구성을 증진시켜 콘크리트의 사용수명을 증가시키며, 콘크리트 구조물의 균열을 보수할 수 있다.

[0026] 또한, 상기 라이시니바실러스 보로니톨러란스 YS11 균주와 바실러스 속 AK13 균주의 혼합 배양시 YS11 균주 단일배양 대비 많은 표면 부착용 생물막을 형성하며 탄산칼슘이 생물막의 기저면부터 형성되는바, 자기치유콘크리트 기술에 있어 더욱 견고한 탄산칼슘을 균열면에 생성 가능하다. 따라서 기존 단일 균주를 적용한 콘크리트 치유 기술 대비 향상된 자기치유효과를 기대할 수 있다.

[0027] 또한, 상기 바실러스 속 AK13 균주는 호알칼리성 특성을 가지고 있는 바, 강알칼리 환경인 콘크리트구조물이 생존율이 높아 라이시니바실러스 보로니톨러란스 YS11 균주와 혼합 배양시 효과적으로 콘크리트 구조물의 균열을 보수할 수 있고, 상기 두 균주의 혼합 배양에서 콘크리트 균열 내부에서 탄산칼슘을 석출함으로써 콘크리트 구조물의 외부 균열은 물론 내부 균열의 보수에도 활용할 수 있다.

[0028] 또한, 상기 두 균주의 혼합 배양은 비요소분해(non-ureolytic) 메커니즘으로 탄산칼슘 석출이 가능하여 요소를 콘크리트 배합 재료로 포함할 필요가 없어 경제적이고, 또한 요소 분해과정에서 생성되는 환경 유해물질인 암모니아를 방출하지 않아 친환경적이며, 암모니아에 의한 콘크리트의 화학적 부식을 막을 수 있어 효율적이고, 콘크리트 시설물에 접촉하는 인체에 무해하다는 장점이 있다.

[0029] 따라서, 본 발명에 따른 신규한 미생물 바실러스 속 AK13 균주와 라이시니바실러스 보로니톨러란스 YS11 균주의 혼합 배양 기술은 친환경적인 자기치유 콘크리트 또는 건설재료로서 활용가능성이 높으며, 기존의 시멘트 및 폴리머 수지 표면처리 기법 및 담체 적용 콘크리트 내부 적용 등의 장·단기적인 치유 기술을 대체할 수 있는 지속 가능한 기술로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0030] 도 1은 종래 요소 가수분해를 통해 탄산칼슘을 석출하는 미생물의 탄산칼슘 석출 반응과정을 도식화한 것이다.

도 2는 본 발명의 비요소분해 탄산칼슘형성 박테리아의 분리과정을 도식화한 것이다.

도 3는 라이시니바실러스 보로니톨러란스 YS11 균주의 16S rRNA 유전자 서열을 나타낸 것이다.

도 4는 라이시니바실러스 보로니톨러란스 YS11 균주의 16S rRNA를 암호화 하고 있는 유전자(rDNA)를 이용한 계통분류학적 모식도이다.

도 5는 라이시니바실러스 보로니톨러란스 YS11 균주에 의해 석출된 탄산칼슘을 전자주사현미경을 이용하여 관찰한 것을 나타낸 것이다.

도 6a 및 도 6b는 라이시니바실러스 보로니톨러란스 YS11 균주의 탄산칼슘 석출능을 에너지 분산 X선 분광 분석 및 X선 회절 분석으로 검증한 결과를 나타낸 것이다.

도 7a는 산소 조건에서 라이시니바실러스 보로니톨러란스 YS11 균주의 생장, 주변부의 pH, 및 잔여 칼슘이온 농도의 변화를 나타낸 것이다.

도 7b는 저산소 조건에서 라이시니바실러스 보로니톨러란스 YS11 균주의 생장, 주변부의 pH, 및 잔여 칼슘이온 농도의 변화를 나타낸 것이다.

도 7c는 무산소 조건에서 라이시니바실러스 보로니톨러란스 YS11 균주의 생장, 주변부의 pH, 및 잔여 칼슘이온 농도의 변화를 나타낸 것이다.

도 8a 및 도 8b는 라이시니바실러스 보로니톨러란스 YS11 균주의 내알칼리성 및 내염성 특징을 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 9는 본 발명의 라이시니바실러스 보로니톨러란스 YS11 균주의 포자 및 내생포자 형성을 확인한 사진이다.

도 10은 본 발명의 신규 미생물 바실러스 속 AK13 균주의 16S rRNA 유전자 서열을 나타낸 것이다.

도 11은 본 발명의 신규 미생물 바실러스 속 AK13 균주의 16S rRNA를 암호화 하고 있는 유전자(rDNA)를 이용한 계통분류학적 모식도이다.

도 12는 라이시니바실러스 보로니톨러란스 YS11 균주 단일 배양; 및 상기 YS11 균주와 바실러스 속 AK13 균주를 혼합 배양시 상기 균주들에 의해 석출된 탄산칼슘을 전자주사현미경을 이용하여 비교관찰한 것을 나타낸 것이다.

도 13은 라이시니바실러스 보로니톨러란스 YS11 균주 단일 배양; 및 상기 YS11 균주와 바실러스 속 AK13 균주 혼합시 형성되는 생물막을 크리스탈 바이올렛 염색하여 정량 측정한 결과를 나타낸 것이다.

도 14a 및 14b는 라이시니바실러스 보로니톨러란스 YS11 균주 단일 배양(도 14a); 및 상기 YS11 균주와 바실러스 속 AK13 균주 혼합 배양시(도 14b) 형성되는 생물막 및 탄산칼슘의 발달양상을 공초점 레이저 주사현미경(CLSM)을 이용하여 비교관찰한 결과를 나타낸 것이다.

도 15는 라이시니바실러스 보로니톨러란스 YS11 균주 단일 배양; 및 상기 YS11 균주와 바실러스 속 AK13 균주 혼합 배양시 생성된 탄산칼슘을 푸리에 변환 적외선(FTIR) 기술로 검증한 결과를 나타낸 것이다.

도 16은 탄산칼슘을 형성하는 조건에서 라이시니바실러스 보로니톨러란스 YS11 균주와 바실러스 속AK13 균주를 각각 단일 배양 및 혼합 배양시의 생장곡선, pH 변화, 잔여 칼슘이온 농도의 변화를 나타낸 것이다.

도 17은 바실러스 속 AK13 균주의 호알칼리성 특징을 확인한 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0031] 미생물의 탄산칼슘 석출능을 활용한 콘크리트 균열 치유는 최근 10년간 집중적으로 연구 개발이 진행되어 왔지만, 미생물의 요소 분해능을 활용한 치유 기술이 주를 이루고 있는 실정이다. 요소 분해능을 보유한 미생물의 유레이스(urease)는 탄산칼슘 석출 반응을 촉진시킨다는 장점이 있지만, 요소 분해과정에서 생성되는 환경 유해물질인 암모니아는 콘크리트의 내구성을 저하시킬 뿐만 아니라 인체에도 악영향을 미친다는 단점이 있다.

[0032] 본 발명자들은 요소 가수분해 과정을 활용하지 않는 탄산칼슘 석출 미생물을 찾기 위해 예의 연구하던 중, 서울시 성북천(37° 34'44.9"N 127° 01'28.8"E)의 물억새(*Miscanthus sacchariflorus*) 근권(rhizosphere)의 토양으로부터 분리된 라이시니바실러스 속(*Lysinibacillus* sp.) YS11 균주가 요소 분해능을 활용하지 않고 탄산칼슘을 석출하는 것을 확인하였으며, 본 발명의 상기 라이시니바실러스 속 YS11 균주는 서열번호 1의 16S rRNA 유전자

를 포함하며, average nucleotide identity(ANI) 분석을 통해 라이시니바실러스 보로니톨러란스와 99.87% 상동성을 갖는 것을 확인하였다.

[0033] 이러한 탄산칼슘 형성능을 갖는 상기 균주는 2017년 6월 13일자로 농촌진흥청 농업유전자원센터에 기탁하여 수탁번호 KACC 81048BP를 부여받고, 본 발명과는 별도로 특허출원(2017년 6월 21일)을 진행한 상태이다.

[0034] 별도의 특허출원(2017년 6월 21일)으로 진행한 본 발명의 라이시니바실러스 보로니톨러란스 YS11 균주에 대한 내용은 다음과 같다.

[0035] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 라이시니바실러스 보로니톨러란스 YS11 균주를 B4 배지에 액체 배양한 후 전자주사현미경으로 관찰하고 에너지 분산 X선 분광 분석(Energy-dispersive X-ray spectroscopy) 및 X선 회절(X-ray diffraction)을 통해 상기 YS11 균주가 탄산칼슘을 주성분으로 하는 미네랄을 생성하는 것을 확인하였다(도 5 내지 도 6 참조). 이는 본 발명의 YS11 균주가 탄소를 탄산칼슘 형태로 석출함을 통해 대기 중에 이산화탄소 저감 효과를 나타내며 탄소순환에 큰 역할을 수행함을 시사한다.

[0036] 기존에 공지된 탄산칼슘 석출 미생물은 요소 분해능을 이용하여 탄산칼슘을 생성할 수 있었으므로(도 1 참조), 미생물을 이용한 콘크리트의 내구성 증가 및 콘크리트 구조물의 균열 보수에 있어 탄산칼슘 석출 미생물과 함께 요소를 포함하여야 했다. 또한, 상기 공지된 미생물은 요소를 분해하는 과정에서 질산염 또는 암모니아를 분비하는데, 암모니아는 독성물질로 콘크리트의 내구성을 저하시킬 뿐만 아니라 환경오염을 유발하고 인체에도 악영향을 미친다.

[0037] 이에 반해, 본 발명의 라이시니바실러스 보로니톨러란스 YS11 균주는 요소 분해과정을 활용하지 않는 탄산칼슘 석출 미생물로, 콘크리트에 적용 시 요소를 추가하는 비용을 절감할 수 있으며, 탄산칼슘 석출 과정 중에 발생하는 유해 2차 대사 산물을 최소화할 수 있어, 친환경적이고 인체 무해한 자기치유 콘크리트(self-healing concrete)를 제공할 수 있으며, 또한 콘크리트 구조물의 균열 보수에도 이용할 수 있는 이점을 갖는다.

[0038] 본 발명의 다른 실시예에서, 라이시니바실러스 보로니톨러란스 YS11 균주가 탄산칼슘 석출 시 주변부의 pH를 상승시키는지 관찰하기 위하여 탄산칼슘 석출 조건에서의 생장 변화, 주변부의 pH 변화, 및 잔여 칼슘이온 농도의 변화를 관찰하였다. 또한, 기존에 탄산칼슘을 석출한 220 rpm 교반을 준 산소 조건 외에도 저산소 및 무산소 조건에서도 상기 모니터링 실험을 진행하여 탄산칼슘 형성에 있어서 산소가 중요한 역할을 수행하는지 확인하였다. 그 결과, 오직 산소 조건에서만 상기 YS11 균주가 탄산칼슘을 형성하는 것이 확인되었다. 구체적으로, 산소 조건에서 상기 YS11 균주는 pH 8.9 까지의 알칼리 환경을 조성하였으며, 최초 주어진 칼슘이온의 95%를 소진하였다(도 7a 참조). 또한, 저산소 및 무산소 조건에서는 탄산칼슘을 형성하지 않는 바, 산소의 유입이 탄산칼슘 석출에 매우 중요하다는 점을 알 수 있었다(도 7b 및 도 7c 참조).

[0039] 본 발명의 또 다른 실시예에서, 라이시니바실러스 보로니톨러란스 YS11 균주는 그람 양성(gram-positive)의 간균(rod shape)의 형태를 가지고, 내염 및 내알칼리성 특징을 보유하고 있음을 확인하였다(도 8a, 도 8b 참조). 구체적으로, 염(NaCl) 농도 6%, pH 11까지의 환경에서 생존 및 생장 가능하여 다양한 환경적 스트레스에 저항성을 보이는바, 고염, 고알칼리 환경인 콘크리트에 적용 가능성이 높으며, 콘크리트 구조물의 외부 균열은 물론 내부 균열의 보수에도 적용될 수 있다.

[0040] 한편, 본 발명자들은 상기 라이시니바실러스 보로니톨러란스 YS11 균주를 분리했던 장소인 서울시 성북천(37° 34'44.9"N 127° 01'28.8"E)의 물억새 근권(rhizosphere)의 토양으로부터 새롭게 호알칼리성 세균 바실러스 속(*Bacillus* sp.) AK13을 분리하였으며, 상기 신규 바실러스 속 AK13 균주가 라이시니바실러스 속 YS11 균주의 탄산칼슘 형성을 효과적으로 촉진시킬 수 있음을 본 발명에서 확인하였다.

[0041] 이에, 본 발명은 신규 미생물 바실러스 속 AK13(*Bacillus* sp. AK13) 균주 (수탁번호 KACC 81070BP)를 제공한다.

[0042] 본 발명의 상기 바실러스 속 AK13 균주는 pH8 ~ 11의 조건에서 활발히 생장하는 호알칼리성 균주로서, 탄산칼슘 형성능을 갖는 균주와 혼합 배양시 탄산칼슘 형성을 촉진시킬 수 있는 특징을 갖는다.

[0043] 본 발명의 상기 바실러스 속 AK13 균주는 서열번호 2의 16S rRNA 유전자를 포함하며, 상기 16S rRNA 염기서열이 공시균주인 바실러스 오시멘시스(*Bacillus oshimensis*)와 99.88% 유사성을 보여 신규한 균주로 인정되었다.

[0044] 본 발명자들은 상기 바실러스 속 AK13 균주를 서울시 성북천(37° 34'44.9"N 127° 01'28.8"E)의 물억새(*Miscanthus sacchariflorus*) 근권(rhizosphere)의 토양으로부터 분리하였으며, 이렇게 분리한 바실러스 속 균주를 '바실러스 속 AK13'이라 명명하고, 2018년 3월 28일자로 기관에 기탁하였으며, 기탁기관으로부터 2018년

8월 23일자 기탁번호 KACC 81070BP를 부여받았다.

[0045] 본 발명의 일 실시예에서, 신규 미생물 바실러스 속 AK13(*Bacillus* sp. AK13) 균주 (수탁번호 KACC 81070BP)와 라이시니바실러스 보로니톨러란스 YS11(*Lysinibacillus boronitolerans* YS11) 균주 (수탁번호 KACC 81048BP)를 혼합배양한 경우 라이시니바실러스 보로니톨러란스 YS11 균주 단독 배양 대비 월등하게 우수한 탄산칼슘 형성 효과가 나타나는 것을 확인하였다. 즉, 상기 두 균주의 공동 배양시 단독 배양 대비 콘크리트 균열 치유에 적합한 더욱 작은 결정의 탄산칼슘이 형성되며, 그 탄산칼슘이 생물막 기저부터 완고하게 형성된다는 점을 확인하여, 본 발명을 완성하였다.

[0046] 본 발명의 다른 실시예에서, 콘크리트 내구성에 영향을 최소화하며 탄산칼슘 형성을 촉진하는 YL 배지(yeast extract 0.4%, calcium lactate 0.25%)에 라이시니바실러스 보로니톨러란스 YS11 균주 단일 배양 조건에 대해서는 각 2×10^6 colony-forming units(CFU)/ml을 접종하여 배양하고, YS11 균주와 바실러스 속 AK13 혼합 배양에 대해서는 두 균주를 각각 1×10^6 colony-forming units(CFU)/ml씩 총 2×10^6 colony-forming units(CFU)/ml으로 합하여 접종하여 배양한 후 전자주사현미경 관찰을 통해 혼합배양 조건에서 콘크리트 균열 치유에 유리한 작은 결정의 탄산칼슘이 석출되는 것을 확인하였다(도 12 참조). 이는 본 발명의 YS11 균주와 AK13 균주의 다종 혼합 배양을 통한 탄산칼슘 형성 기술이 기존 YS11 균주의 단일 적용보다 자기치유콘크리트 활용에 있어서 더욱 긍정적인 역할을 수행함을 시사한다. 두 조건에서 생성된 결정은 푸리에 변환 적외선(FTIR) 기술 분석을 통하여 모두 탄산칼슘임이 검증되었다(도 15 참조).

[0047] 본 발명의 또 다른 실시예에서, YS11 균주 단일 배양 및 YS11 균주와 AK13 균주의 혼합 배양 조건에서 표면부착 기능을 갖으며 탄산칼슘 석출에 있어서 핵형성점을 제공하는 엑소폴리사카라이드(EPS)가 포함된 생물막의 형성 정도를 비교하였다. 그 결과 혼합 배양시 YS11 균주의 단일 배양 보다 더 많은 생물막이 형성된다는 점을 확인할 수 있었다(도 13 참조). 또한, 공초점 레이저 주사현미경(CLSM)을 이용해 시간에 따른 생물막과 탄산칼슘의 형성과정을 관찰한 바, YS11 균주 단일 배양 조건에서는 탄산칼슘이 균일하게 생성되지 않는 데에 비해 YS11 균주와 AK13 균주 혼합 배양 조건에서는 탄산칼슘이 균일하게 생물막의 기저에서부터 발달하여 생성된다는 것을 파악하였다(도 14a 및 14b 참조). 이는 자기치유콘크리트 기술적용에 있어 혼합배양 조건에서 더욱 균열 표면에 잘 부착하는 완고한 탄산칼슘을 형성한다는 점을 시사한다.

[0048] 기존에 공지된 탄산칼슘 석출 미생물은 주로 요소 분해능을 이용하여 탄산칼슘을 생성할 수 있었으므로 미생물을 이용한 콘크리트의 내구성 증가 및 콘크리트 구조물의 균열 보수에 있어 탄산칼슘 석출 미생물과 함께 요소를 포함하여야 했다. 또한, 상기 공지된 미생물은 요소를 분해하는 과정에서 질산염 또는 암모니아를 분비하는데, 암모니아는 독성물질로 사람이 사용하는 건축물 적용에 부적절하다. 본 발명의 YS11 균주와 AK13 균주의 혼합 배양을 통한 탄산칼슘 석출은 요소 분해과정을 활용하지 않기에 콘크리트에 적용 시 요소를 추가하는 비용을 절감할 수 있으며, 탄산칼슘 석출 과정 중에 발생하는 유해 2차 대사산물을 최소화할 수 있어, 친환경적이고 인체 무해한 자기치유 콘크리트(self-healing concrete)를 제공할 수 있으며, 또한 콘크리트 구조물의 균열 보수에도 이용할 수 있다.

[0049] 본 발명의 또 다른 실시예에서, 본 발명의 YS11 균주와 AK13 균주의 혼합배양 메커니즘을 파악하기 위하여 탄산칼슘 석출 조건에서 YS11 균주와 AK13 균주를 각각 단일 배양 및 혼합 배양할 때 생장곡선, 주변부의 pH 변화 및 잔여 칼슘이온 농도의 변화를 측정하였다(도 16 참조). 탄산칼슘 석출 조건인 YL 배지는 중성이기 때문에 AK13 균주 단일 배양시 생존이 불가능했다. 그러나 YS11 균주와 혼합 배양해 주었을 때 YS11 균주가 시간에 따라 pH를 상승시켜 AK13 균주의 생장을 가능하게 한다는 점을 확인하였다. 또한, 혼합 배양 조건에서 YS11 균주 단일 배양보다 초기 잔여 칼슘이온의 농도가 더욱 빨리 감소한다는 점을 확인하였다.

[0050] 본 발명의 또 다른 실시예에서, 그람양성균이며 포자를 형성하는 본 발명의 AK13 균주가 호알칼리성 특징을 보유하고 있음을 확인하였다(도 17 참조). 구체적으로, AK13 균주는 pH 6에서 생장이 불가능하였고, pH 7에서는 생장이 저하되었다. 그러나 pH 8을 최적 생장조건으로 하며 pH 8 - 11에서는 생장이 활발하게 일어나는 등 알칼리 환경에서 높은 생리활성도를 보이는 바, 강알칼리 환경인 콘크리트 구조물에 적용 가능성이 높으며, 콘크리트 구조물의 외부 균열은 물론 내부 균열의 보수에도 적용될 수 있다.

[0051] 따라서 본 발명의 YS11 균주와 AK13 균주의 혼합물은 시멘트 또는 콘크리트를 제조하거나 충전하기 위한 조성물 및 지반을 강화하기 위한 조성물의 유효성분으로 사용될 수 있다.

[0052] 또한, 본 발명은 바실러스 속 AK13(*Bacillus sp.* AK13) 균주 (수탁번호 KACC 81070BP) 및 라이시니바실러스 보로니톨러란스 YS11(*Lysinibacillus boronitolerans* YS11) 균주 (수탁번호 KACC 81048BP)의 혼합물; 상기 두 균

주의 혼합 배양물; 상기 두 균주의 혼합 배양물의 농축물; 상기 두 균주의 혼합 배양물의 건조물; 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나를 유효성분으로 포함하는 시멘트 또는 콘크리트용 조성물, 시멘트 또는 콘크리트 충전용 조성물, 및 지반 강화용 조성물을 제공한다.

[0053] 상기 시멘트 또는 콘크리트용 조성물은 시멘트 또는 콘크리트 강도 증진용 조성물 또는 균열 보수용 조성물 일 수 있다.

[0054] 상기 지반 강화용 조성물은 지반의 침하, 균열 또는 파손을 방지하기 위하여 토양에 처리하는 조성물을 모두 포함하는 것으로, 본 발명의 지반 강화용 조성물을 토양에 처리하는 경우 지반의 공극, 공동, 갈라진 틈 등에 본 발명의 균주 또는 그 포자에 의하여 형성된 탄산칼슘이 채워져 연약지반을 강화시키는 효과가 있다.

[0055] 상기 배양물이란 특정 미생물을 배양배지 또는 배양액에서 배양한 것을 의미하며, 배양물의 농축물도 포함한다. 상기 배양물은 상기 특정 미생물 또는 그의 부산물을 포함하는 것을 의미하고, 그 제형이 한정되지 아니하며, 일 예로 액체 또는 고체일 수 있다.

[0056] 상기 배지는 특성 미생물을 배양하기 위하여 배양대상 즉 배양체가 되는 미생물이 필요로 하는 영양물질을 포함하는 것으로 특수한 목적을 위한 물질이 추가로 첨가되어 혼합된 것일 수 있다. 상기 배지는 배양기 또는 배양액이라고도 하며, 천연배지, 합성배지 또는 선택배지를 모두 포함하는 개념이다.

[0057] 상기 조성물의 pH는 조성물을 처리하는 콘크리트 환경에 따라서 용이하게 변경 가능하며, 바람직하게는 최대 pH 13 이하로 조성할 수 있다.

[0058] 상기 조성물은 조성물 총 중량에 대하여 본 발명의 AK13 균주와 YS11 균주의 혼합물; 상기 두 균주의 혼합 배양물; 상기 두 균주의 혼합 배양물의 농축물; 상기 두 균주의 혼합 배양물의 건조물; 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나를 0.001 내지 99.99 중량%, 바람직하게는 0.1 내지 99 중량%로 포함할 수 있고, 상기 조성물의 사용방법 및 사용목적에 따라 유효성분의 함량을 적절히 조절할 수 있다.

[0059] 상기 시멘트 또는 콘크리트용 조성물이란 시멘트 구조물 또는 콘크리트 구조물의 제조에 이용되는 조성물을 이용하고, 칼슘을 주성분으로 하는 자재를 의미하고, 상기 콘크리트는 시멘트에 물, 모래 자갈을 더 혼합한 것을 의미한다.

[0060] 본 발명의 YS11 균주는 탄산칼슘 형성능 및 스트레스 환경에서의 내성이 강하며, 본 발명의 AK13 균주는 pH가 높은 조건에서 최적의 생장을 하는 호알칼리성 특성을 가진 미생물인바, 상기 두 균주는 시멘트 구조물 또는 콘크리트 구조물을 제조하기 위한 조성물에 포함하여 사용될 수 있다.

[0061] 상기 시멘트 또는 콘크리트 충전용 조성물은 시멘트 또는 콘트리트 구조물에 생긴 균열을 채우기 위하여 처리하는 조성물로, 상기 두 균주(YS11, AK13)를 포함하는 조성물을 구조물에 처리하는 경우 균주가 형성하는 탄산칼슘에 의하여 구조물의 균열 등을 채우는데 사용될 수 있고, 이로써 균열이 충전되고, 구조물의 강도를 증진시킬 수 있다.

[0062] 또한, 본 발명은 바실러스 속 AK13(*Bacillus sp.* AK13) 균주 (수탁번호 KACC 81070BP) 및 라이시니바실러스 보로니톨러란스 YS11(*Lysinibacillus boronitolerans* YS11) 균주 (수탁번호 KACC 81048BP)의 혼합물; 상기 두 균주의 혼합 배양물; 상기 두 균주의 혼합 배양물의 농축물; 상기 두 균주의 혼합 배양물의 건조물; 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나를 시멘트 또는 콘크리트 구조물의 균열 부위에 처리하는 단계를 포함하는 시멘트 또는 콘크리트 구조물의 균열 보수 방법, 및 시멘트 또는 콘크리트 구조물의 내구성 증진 방법을 제공한다.

[0063] 본 발명의 AK13 균주와 YS11 균주의 혼합물; 상기 두 균주의 혼합 배양물; 상기 두 균주의 혼합 배양물의 농축물; 상기 두 균주의 혼합 배양물의 건조물; 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나를 시멘트 또는 콘크리트 구조물에 처리하는 경우 상기 구조물에 처리된 균주가 형성하는 탄산칼슘에 의하여 구조물의 균열 등을 채우는데 사용될 수 있고, 이로써 균열이 충전되고, 구조물의 강도를 증진시킬 수 있다.

[0064] 본 발명의 AK13 균주와 YS11 균주의 혼합물; 상기 두 균주의 혼합 배양물; 상기 두 균주의 혼합 배양물의 농축물; 상기 두 균주의 혼합 배양물의 건조물; 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나를 토양에 처리하는 경우 상기 토양에 처리된 균주가 형성하는 탄산칼슘에 의하여 지반의 공극, 공동, 갈라진 틈 등이 채워져 연약지반을 강화시키고, 토양 입자를 견고화하는 효과를 통해서 토양 또는 지반의 강도를 증진시킬 수 있다

[0065] 본 발명의 YS11 균주는 탄산칼슘 형성능, 열 스트레스 내성, 염분 스트레스 내성이 우수하며, 본 발명의 AK13 균주는 고알칼리성 환경에서도 생존 가능하므로 이들 균주는 외부 환경의 변화에도 지속적으로 생존할 수 있는 바, 제설제를 처리하는 도로환경 또는 해양 구조물 등에서도 생존할 수 있고, 콘트리트 구조물 또는 시멘트 구조물의 균열 등을 보수하는 방법에 효과적으로 사용될 수 있다.

[0066] 상기 처리는 스프레이를 이용하여 도말하는 방법으로 수행될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0068] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0070] **<실시예 1>**

[0071] **라이니시바실러스 속 YS11 균주의 순수 분리**

[0072] 비요소 분해(non-ureolytic) 탄산칼슘 석출 미생물을 분리하기 위하여, 물억새 근권의 토양 시료 0.1 g을 채취하여 인산염 완충 식염수(phosphate-buffered saline, PBS, pH 7.5) 1 ml 에 재현탁(resuspension)한 다음, 상온에서 13,200 rpm의 속도로 1분간 원심분리하여 씻어냈다(wash). 이하 wash 과정을 두 번 반복하여 마지막 샘플 현탁액을 100 μL씩 영양 평판 배지인 Luria-Bertani broth (LB), tryptic soy broth (TSB), 및 tryptone yeast glucose broth (TYG)에 희석하여 처리하고, 30℃의 온도에서 12 내지 24 시간 동안 배양하였다. 상기 평판 배지 위에 나타난 미생물 군집(colony)을 탄산칼슘 석출 유도 배지인 영양 평판배지 B4(0.25% calcium-acetate, 0.4% yeast extract, 0.5% glucose)에 접종하여 탄산칼슘 석출 여부를 확인하였고, 다른 균주에 비해 빠른 속도의 탄산칼슘 석출능을 보인 미생물을 선별하여 이를 YS11 균주로 명명하였다.

[0074] **<실시예 2>**

[0075] **라이니시바실러스 속 YS11 균주의 16S rRNA 유전자 염기서열 및 그 계통 확인**

[0076] 순수 분리를 통해 얻은 상기 YS11 균주의 특성을 알아보기 위하여, 먼저 YS11 균주의 16S rRNA 유전자 염기서열을 분석하고 그 계통분류를 파악하여 속명을 확인하였다. 구체적으로, YS11 균주의 16S rRNA 유전자를 27F(5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3')와 1492R(5'- TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3')의 유니버설 프라이머를 이용하여 58℃의 어닐링(annealing) 조건하에서 중합효소 연쇄반응 (polymeric chain reaction, PCR)을 수행하였다. 보다 상세하게는 94℃- 90초, [94℃- 45초, 58℃- 45초, 72℃- 45초] X 25 사이클을 통해 16S rRNA 유전자의 PCR 산물을 얻었다. 상기 PCR 산물을 이용하여 YS11 균주의 16S rRNA 유전자의 염기서열(sequence)을 파악하고(도 3 참조), EzTaxon 프로그램을 활용하여 타 균주와 염기서열 유사도를 비교하여 YS11 균주의 계통을 확인하였다.

[0077] 그 결과, 도 4에 나타낸 바와 같이, YS11 균주의 16S rRNA 유전자는 *Lysinibacillus macroides*의 16S rRNA 유전자와 99.64%의 염기서열 유사성을 보이므로, YS11 균주는 열과 염에 대한 저항성이 있다고 알려진 라이니시바실러스 속(*Lysinibacillus* sp.)에 속하는 것으로 파악되었다.

[0078] 본 발명의 상기 라이니시바실러스 속 YS11 균주는 2017년 6월 13일자로 기관에 기탁하였으며, 기탁기관으로부터 2017년 6월 14일자 기탁번호 KACC 81048BP를 부여받았다.

[0080] **<실시예 3>**

[0081] **라이니시바실러스 속 YS11 균주의 탄산칼슘 석출 특성 확인**

[0082] 순수 분리를 통해 얻은 상기 라이시니바실러스 속 YS11 균주를 B4 배지에 5일 동안 220 rpm으로 액체 배양을 한 후 배양액 1 ml을 원심분리(13,200 rpm, 1 min)했으며, 전자주사현미경(field-emission scanning electron microscopy; FE-SEM) 및 에너지 분산 X선 분광 (energy dispersive X-ray) 분석을 위해 미생물 고정 전처리 단계를 거쳤다. 구체적으로, 4℃에서 2시간 동안 카르노프스키 고정(Karnovsky's fixation: 2% paraformaldehyde, 2.5% glutaraldehyde, 0.1 M phosphate buffer, pH 7.2)을 수행하고, 상기 시료를 5,000rpm으로 2분 동안 원심분리하여 미생물 고정 전처리를 수행하였다. 고정된 미생물 시료를 두 차례 0.01 M

potassium phosphate (pH 7.8)로 상온에서 씻었으며, 오즈미움 테트라옥사이드 솔루션 (2% osmium tetroxide)을 이용한 두 번째 시료 고정단계를 4℃에서 2시간 동안 수행하였다. 두 차례 고정된 미생물을 3차 증류수로 두 번 씻었으며, 30%, 50%, 70%, 및 100%의 에탄올 용액에 재현탁(resuspension)하여 각각 10분 동안 탈수시켰다. 완성된 시료는 알루미늄 스터브(stub)에 올려 3-4일간 건조시켰으며, 전자현미경 관찰 직전에 플라티늄(platinum)으로 70초 동안 코팅하여 전도도를 높였다. 또한, 상기 YS11 균주를 B4 배지에 5일 동안 220 rpm으로 액체 배양한 후, 배양물을 동결건조하여 X선 회절(X-ray diffraction) 분석을 수행하였다.

[0083] 상기 고정된 시료를 전자주사현미경으로 관찰한 결과, 도 5에 나타낸 바와 같이, 라이시니바실러스 속 YS11 균주는 간균 형태로 미네랄과 응집되어 있으며, 일부 YS11 균주의 세포벽 외피는 미네랄로 뒤덮여 있음을 확인할 수 있었다.

[0084] 또한, 에너지 분산 X선 분광과 X선 회절을 통해 분석을 한 결과, 도 6a 및 도 6b에 나타낸 바와 같이, 상기 미네랄은 탄산칼슘을 주요성분으로 포함하고 있음을 확인하였다. 상기 실험 결과는 라이니시바실러스 속 YS11 균주에 탄산칼슘 석출능이 있음을 시사한다.

[0086] **<실시예 4>**

[0087] **폭기(aeration) 정도에 따른 라이니시바실러스 속 YS11 균주의 탄산칼슘 형성 확인**

[0088] 상기 라이시니바실러스 속 YS11 균주가 탄산칼슘 석출한 220 rpm의 교반을 준 산소 조건(aerobic condition)에서 시간이 지남에 따라 상기 YS11 균주의 생장, 주변부의 pH, 및 잔여 칼슘이온 농도 변화를 확인하였다. 또한 콘크리트 내부의 환경과 같이 산소의 유입이 적은 경우에도 산소 조건과 동일하게 탄산칼슘이 석출되는지 확인하고자 저산소 조건(hypoxia condition)과 무산소 조건(anaerobic condition)을 설정하여 시간이 지남에 따라 상기 YS11 균주의 생장, 주변부의 pH, 및 잔여 칼슘이온 농도 변화를 확인하였다. 구체적으로, 저산소 조건은 B4 배지에 상기 YS11 균주를 접종한 직후 파라핀유를 덮고 정치 상태에서 배양하였다. 무산소 조건은 유리병에 B4 배지를 가득 채운 뒤 뚜껑(closed top cap)으로 밀봉하였다. 이때, 무산소 조건에 산소가 유입되지 않음은 완전 호기성균인 슈도모나스 푸티다 KT2440(Pseudomonas putida KT2440)를 상기 무산소 조건에서 배양하여 생존하지 못하는 것을 확인함으로써 검증하였다.

[0089] 그 결과 도 7a 내지 7c에 나타낸 바와 같이, 상기 YS11 균주는 상기 모든 조건에서 생장하지만 산소가 부족한 조건으로 갈수록 생장이 줄어드는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 산소 조건에서만 시간이 지날수록 칼슘이온의 농도가 줄어드는 것을 확인할 수 있었고, 최종적으로는, 최초 칼슘이온의 95%가 소진됨을 확인할 수 있었다. 이와 더불어 산소 조건에서만 유의한 pH의 상승을 확인할 수 있었고, 최종적으로는, pH 8.9의 염기성 환경이 조성되었다. 다만, 무산소 조건에서는 초기에 칼슘이온의 농도가 줄어들었으나 시간이 지나 다시 원상태로 돌아왔으며 pH 상승은 매우 미미함을 확인하였다. 또한, 무산소 조건에서는 pH와 칼슘이온 농도의 변화가 관찰되지 않고 일정하게 유지됨을 확인할 수 있었다. 상기에 따라, 상기 YS11 균주는 산소 조건에서만 유의한 탄산칼슘 형성이 가능함을 확인하였으며, 이는 탄산칼슘 형성에 있어서 폭기가 중요한 인자라는 점을 의미한다.

[0091] **<실시예 5>**

[0092] **라이니시바실러스 속 YS11 균주의 내염, 내알칼리 특성 확인**

[0093] 상기 라이시니바실러스 속 YS11 균주의 내염 및 내알칼리 특성을 확인하기 위하여, YS11 균주를 LB 액체 배지에 12시간 동안 220 rpm, 30℃에서 배양한 후 배양액 1 ml을 원심분리 (13,200 rpm, 1 min)하여 샘플 펠렛(pellet)을 두 차례 인산염 완충 식염수로 씻어냈다. 600nm 파장대를 이용해 1 ml 펠렛-PBS 용액의 흡광도를 측정했으며 해당 값을 기반으로 106 cell/ml를 구했다. 96 웰 플레이트(96-well plate)를 준비해 각 열(row)당 내염 및 내알칼리성 특징을 파악하기 위해 해당 액체 배지에 (내염성 테스트: 0%, 1%, 2%, 3%, 5%, 6%, 7% NaCl, 내알칼리성 테스트: pH6, pH 7, pH 9, pH 10, pH 11, pH 12) 200 μL씩 넣었다. 보다 상세하게는 기존 LB 액체배지의 NaCl 농도, 혹은 pH를 NaOH로 적정하여 200 μL씩 취하여 사용하였다. 그 후 상기 YS11 균주를 106 cell/ml 농도가 되도록 96 웰 플레이트에 각각 접종하여 배양하고, 마이크로타이터 기기를 사용하여 생장률을 모니터링하였다. 흡광도 측정 전에는 1,000 rpm으로 흔들고(shaking) 측정 직전에는 100 rpm으로 흔들어 1시간 마다 흡광도를 측정하였다.

[0094] 그 결과, 도 8a 및 도 8b에서 확인할 수 있는 바와 같이, 라이시니바실러스 속 YS11 균주는 내염 및 내알칼리

특성을 나타내었다. 구체적으로, 도 8a에서 확인할 수 있는 바와 같이, 상기 YS11 균주는 pH 11의 환경에서도 생장하였고, 도 8b에서 확인할 수 있는 바와 같이, 염(NaCl) 농도 6%의 환경에서도 생존하여 생장하였다.

[0096] **<실시예 6>**

[0097] **라이니시바실러스 속 YS11 균주의 포자 및 내생포자 형성 확인**

[0098] 포자는 다양한 스트레스 조건에서도 저항성을 나타내 미생물의 장기간 생존 유지를 위한 하나의 phenotype으로, 내열성 특징을 지닌 상기 YS11 균주의 포자 및 내생포자 형성 여부를 확인하였다. 구체적으로, YS11 균주를 액체 B4 배지에 배양하여 미생물이 사용할 수 있는 영양분의 고갈을 유도해 포자 혹은 내생포자 형성 여부를 파악하였다.

[0099] 그 결과, 도 9에 나타낸 바와 같이, 상기 YS11 균주는 포자를 형성하였고 내생포자는 center endospore 형태를 띠고 있음을 확인하였다.

[0101] **<실시예 7>**

[0102] **라이시니바실러스 속 YS11 균주의 구체적인 종(species) 동정**

[0103] 라이시니바실러스 속 YS11 균주의 구체적인 종을 동정하기 위하여 average nucleotide identity(ANI) 분석을 진행하였다. ANI는 컴퓨터에서 유전체 데이터를 이용하여 인 실리코(*in silico*) 방법으로 종을 동정하는 방법이다.

[0104] 그 결과 본 발명의 YS11 균주는 *Lysinibacillus boronitolerans* NBRC 103108^{T} 균주와 99.87% 상동성을 나타내어, 본 발명의 YS11 균주가 “라이시니바실러스 보로니톨러란스” 종인 것을 확인하였다.

[0105] 한편, 본 발명의 라이시니바실러스 보로니톨러란스 YS11 균주의 전체 지놈 시퀀스는 NCBI GenBank 수탁번호 CP026007.1로 저장되었다.

[0107] **<실시예 8>**

[0108] **신규 호알칼리성 바실러스 속 AK13 균주의 순수 분리**

[0109] 호알칼리성(alkaliphilic) 미생물을 분리하기 위하여, 물억새 근권의 토양 시료 1g을 채취하여 인산염 완충 식염수(phosphate-buffered saline, PBS, pH 7.5) 100 ml에 재현탁(resuspension)한 다음 그중 1 ml를 1.7 ml microtube에 옮기고 상온에서 13,200 rpm의 속도로 1분간 원심분리하여 씻어냈다(wash). 이하 wash 과정을 두 번 반복하여 마지막 샘플 현탁액을 10n으로 순차적인 희석을 시켜준 뒤 각각 100 μL씩 pH 13으로 조정한 영양 평판 배지인 Luria-Bertani broth(LB)에 처리하고, 30℃의 온도에서 12 내지 24시간 동안 배양하였다. 상기 평판 배지 위에 나타난 미생물 군집(colony)을 분리하여 각각 탄산칼슘을 형성하는 YS11 균주와 함께 탄산칼슘 석출 유도 배지인 YL 배지(0.4% yeast extract, 0.25% calcium lactate)에 접종하여 탄산칼슘 형성능 향상 여부를 확인하였고, 다른 균주에 비해 혼합배양에서 빠른 속도의 탄산칼슘 석출능을 보인 미생물을 선별하여 이를 바실러스 속 AK13 균주로 명명하였다.

[0111] **<실시예 9>**

[0112] **바실러스 속 AK13 균주의 16S rRNA 유전자 염기서열 및 그 계통 확인**

[0113] 순수 분리를 통해 얻은 상기 AK13 균주의 특성을 알아보기 위하여, 먼저 AK13 균주의 16S rRNA 유전자 염기서열을 분석하고 그 계통분류를 파악하여 속명을 확인하였다. 구체적으로, AK13 균주의 16S rRNA 유전자를 27F(5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'))와 1492R(5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3'))의 유니버설 프라이머를 이용하여 58℃의 어닐링(annealing) 조건하에서 중합효소 연쇄반응 (polymeric chain reaction, PCR)을 수행하였다. 보다 상세하게는 94℃- 90초, [94℃- 45초, 58℃- 45초, 72℃- 45초] X 25 사이클을 통해 16S rRNA 유전자의 PCR 산물을 얻었다. 상기 PCR 산물을 이용하여 AK13 균주의 16S rRNA 유전자의 염기서열(sequence)을 파악하고(도 10 참

조), EzTaxon 프로그램을 활용하여 타 균주와 염기서열 유사도를 비교하여 AK13 균주의 계통을 확인하였다.

[0114] 그 결과, 도 11에 나타낸 바와 같이, AK13 균주의 16S rRNA 유전자는 바실러스 오시멘시스(*Bacillus oshimensis*)의 16S rRNA 유전자와 99.88%의 염기서열 유사성을 보였고, AK13 균주는 호알칼리성인 상기 균주와 가까운 바실러스 속(Bacillus sp.)에 속하는 것으로 파악되었다.

[0115] 본 발명의 상기 바실러스 속 AK13 균주는 2018년 3월 28일자로 기관에 기탁하였으며, 기탁기관으로부터 2018년 8월 23일자 기탁번호 KACC 81070BP를 부여받았다.

[0117] **<실시예 10>**

[0118] **라이니시바실러스 보로니톨러란스 YS11 균주와 바실러스 속 AK13 균주의 혼합 배양을 통해 형성된 탄산칼슘 형태 확인**

[0119] LB 배지(Luria-Bertani)에서 overnight 배양한 YS11 균주 seed culture (30℃, 220 rpm) 1ml를 1.7 ml microtube에 옮기고 인산염 완충 식염수(phosphate-buffered saline, PBS, pH 7.5)로 2번 씻어준다. 순수 분리를 통해 얻은 AK13 균주도 pH 8 LB 배지에서 overnight 배양한 후 같은 과정을 반복한다. 그 후, 콘크리트 내구성에 영향을 최소화하며 탄산칼슘 형성을 촉진하는 YL 배지(yeast extract 0.4%, calcium lactate 0.25%)에 라이시니바실러스 보로니톨러란스 YS11 균주 단일배양 조건에 대해서는 각 2×10^6 colony-forming units(CFU)/ml을 접종하여 배양하고, YS11 균주와 바실러스 속 AK13 혼합배양에 대해서는 두 균주를 각각 1×10^6 colony-forming units(CFU)/ml씩 총 2×10^6 colony-forming units(CFU)/ml으로 합하여 접종하여 30℃에서 5일 동안 220 rpm으로 배양한다. 배양액 1 ml을 원심분리(13,200 rpm, 1 min)했으며, 전자주사현미경(field-emission scanning electron microscopy; FE-SEM) 분석을 위해 미생물 고정 전처리 단계를 거쳤다. 구체적으로, 4℃에서 2시간 동안 카르노프스키 고정(Karnovsky's fixation: 2% paraformaldehyde, 2.5% glutaraldehyde, 0.1 M phosphate buffer, pH 7.2)을 수행하고, 상기 시료를 5,000 rpm으로 2분 동안 원심분리하여 미생물 고정 전처리를 수행하였다. 고정된 미생물 시료를 두 차례 0.01 M potassium phosphate (pH 7.8)로 상온에서 씻었으며, 오즈미움 테트라옥사이드 솔루션 (2% osmium tetroxide)을 이용한 두 번째 시료 고정단계를 4℃에서 2시간 동안 수행하였다. 두 차례 고정된 미생물을 3차 증류수로 두 번 씻었으며, 30%, 50%, 70%, 및 100%의 에탄올 용액에 재현탁(resuspension)하여 각각 10분 동안 탈수시켰다. 완성된 시료는 알루미늄 스터브(stub)에 올려 3-4일간 건조시켰으며, 전자현미경 관찰 직전에 플라티늄(platinum)으로 70초 동안 코팅하여 전도도를 높였다. 푸리에 변환 적외선 (FTIR) 분석의 경우, 상기 명시된 바와 동일한 과정으로 배양한 탄산칼슘과 세균을 oven dry한 후 ATR 방법으로 진행하였다.

[0120] 상기 고정된 시료를 전자주사현미경으로 관찰한 결과, 도 12에 나타낸 바와 같이, 라이시니바실러스 속 YS11 균주 단일배양 조건에서는 입자가 큰 탄산칼슘 결정이 생성되는 반면, YS11 균주와 바실러스 속 AK13 균주의 혼합배양 조건에서는 입자가 작은 탄산칼슘 결정이 생성됨 확인할 수 있었다. 또한, 푸리에 변환 적외선 기술을 통해 확인한 결과, 도 15에 타낸 바와 같이, 상기 미네랄은 탄산칼슘을 주요성분으로 포함하고 있음을 확인하였다.

[0122] **<실시예 11>**

[0123] **라이니시바실러스 보로니톨러란스 YS11 균주와 바실러스 속 AK13 균주의 혼합배양에서의 생물막 발달양상 파악**

[0124] LB 배지(Luria-Bertani)에서 overnight 배양한 YS11 균주 seed culture (30℃, 220 rpm) 1ml를 1.7 ml microtube에 옮기고 인산염 완충 식염수(phosphate-buffered saline, PBS, pH 7.5)로 2번 씻어준다. 순수 분리를 통해 얻은 AK13 균주도 pH 8 LB 배지에서 overnight 배양한 후 같은 과정을 반복한다. 그 후, 콘크리트 내구성에 영향을 최소화하며 탄산칼슘 형성을 촉진하는 YL 배지(yeast extract 0.4%, calcium lactate 0.25%)가 담긴 confocal plate에 라이시니바실러스 보로니톨러란스 YS11 균주 단일배양 조건에 대해서는 각 2×10^6 colony-forming units(CFU)/ml을 접종하여 배양하고, YS11 균주와 바실러스 속 AK13 혼합배양에 대해서는 두 균주를 각각 1×10^6 colony-forming units(CFU)/ml씩 총 2×10^6 colony-forming units(CFU)/ml으로 합하여 confocal plate에 접종한다. 30℃에서 24, 48, 72시간 정치배양하여 바이오필름을 형성시킨 뒤 Biofilm Tracer: Ruby

staining을 통하여 biofilm을 염색하고 탄산칼슘은 340 nm 영역의 파장을 쬐어 시간에 따른 형성 과정을 공초점 레이저 주사현미경 분석을 통해 이미지화하였다.

[0125] 생물막 정량 실험을 통하여 YS11 균주 단일배양보다 YS11+AK13 균주 혼합배양에서 더욱 많은 양의 생물막이 형성된다는 점을 측정할 수 있었다(도 13 참조). 이때 생물막과 탄산칼슘의 발달양상을 공초점 레이저 주사현미경을 이용하여 비교관찰한 결과, YS11 균주 단일배양 조건에서는 탄산칼슘이 균일하게 생성되지 않는 데에 비해 YS11 균주와 AK13 균주 혼합배양 조건에서는 탄산칼슘이 균일하게 생물막의 기저에서부터 발달하여 생성된다는 것을 파악하였다(도 14a 및 14b 참조). 상기 실험결과는 자기치유콘크리트 기술 적용에 있어 혼합배양 조건에서 더욱 균열 표면에 잘 부착하는 완고한 탄산칼슘을 형성한다는 점을 시사한다.

[0127] **<실시예 12>**

[0128] **라이니시바실러스 보로니톨러란스 YS11 균주와 바실러스 속 AK13 균주의 혼합배양 메커니즘 구명**

[0129] LB 배지(Luria-Bertani)에서 overnight 배양한 YS11 균주 seed culture (30℃, 220 rpm) 1ml를 1.7 ml microtube에 옮기고 인산염 완충 식염수(phosphate-buffered saline, PBS, pH 7.5)로 2번 씻어준다. 순수 분리를 통해 얻은 AK13 균주도 pH 8 LB 배지에서 overnight 배양한 후 같은 과정을 반복한다. 그 후, 콘크리트 내구성에 영향을 최소화하며 탄산칼슘 형성을 촉진하는 YL 배지(yeast extract 0.4%, calcium lactate 0.25%)에 라이시니바실러스 보로니톨러란스 YS11 균주 단일배양 조건에 대해서는 각 2×10^6 colony-forming units(CFU)/ml을 접종하여 배양하고, YS11 균주와 바실러스 속 AK13 혼합배양에 대해서는 두 균주를 각각 1×10^6 colony-forming units(CFU)/ml씩 총 2×10^6 colony-forming units(CFU)/ml으로 합하여 접종하여 온도 30℃, 220 rpm 교반 조건에서 24시간 동안 일정한 간격으로 pH를 달리한 pH 6.8과 pH 12의 selective 배지를 이용하여 CFU를 측정하고, pH 미터기를 이용하여 pH 측정하며, 칼슘 전극을 이용하여 잔여 칼슘 이온의 농도를 측정한다.

[0130] 그 결과, 도 16에서와 같이, 탄산칼슘 석출 조건인 YL 배지는 중성이기 때문에 AK13 균주 단일배양시 생존이 불가능했다. 그러나 YS11 균주와 혼합배양해주었을 때 YS11 균주가 시간에 따라 pH를 상승시켜 AK13 균주의 생장을 가능하게 한다는 점을 확인하였다. 또한, 혼합배양 조건에서 YS11 균주 단일배양보다 초기 잔여 칼슘이온의 농도가 더욱 빨리 감소한다는 점을 확인하였다

[0132] **<실시예 13>**

[0133] **바실러스 속 AK13 균주의 호알칼리성 특성 검증**

[0134] 상기 바실러스 속 AK13 균주의 호알칼리성 특성을 확인하기 위하여, LB 배지(Luria-Bertani)에서 overnight 배양한 AK13 균주 seed culture (30℃, 220 rpm) 1ml를 1.7 ml microtube에 옮기고 인산염 완충 식염수(phosphate-buffered saline, PBS, pH 7.5)로 2번 씻어준다. 600nm 파장대를 이용해 1 ml 펠렛-PBS 용액의 흡광도를 측정했으며 해당 값을 기반으로 각 1×10^6 colony-forming units(CFU)/ml을 다음 96-well plate에 접종할 수 있도록 계산하였다. 96-well plate 각 열(row)당 서로 다른 pH의 LB 액체 배지(pH 6, pH 7, pH 9, pH 10, pH 11, pH 12)를 200 μL씩 넣었다. 보다 상세하게는 기존 LB 액체 배지의 pH를 KOH로 적정하여 200 μL씩 취하여 사용하였다. 그 후 상기 AK13 균주를 10^6 cell/ml 농도가 되도록 96 웰 플레이트에 각각 접종하여 배양하고, 마이크로타이터 기기를 사용하여 생장률을 모니터링하였다. 흡광도 측정 전에는 1,000 rpm으로 흔들고(shaking) 측정 직전에는 100 rpm으로 흔들어 1시간 마다 흡광도를 측정하였다.

[0135] 그 결과, 도 17에서 확인할 수 있는 바와 같이, 바실러스 속 AK13 균주는 pH 6에서 생장이 불가능하였고, pH 7에서는 생장이 저하되었다. 그러나 pH 8을 최적 생장조건으로 하며 pH 8 - 11에서는 생장이 활발하게 일어나는 등 알칼리 환경에서 높은 생리활성도를 보이는바, 강알칼리 환경인 콘크리트 구조물에 적용 가능성이 높으며, 콘크리트 구조물의 외부 균열은 물론 내부 균열의 보수에도 적용될 수 있음을 의미한다.

[0137] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고

려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

수탁번호

[0138]

기탁기관명 : 농업생명공학연구원

수탁번호 : KACC81048BP

수탁일자 : 20170613

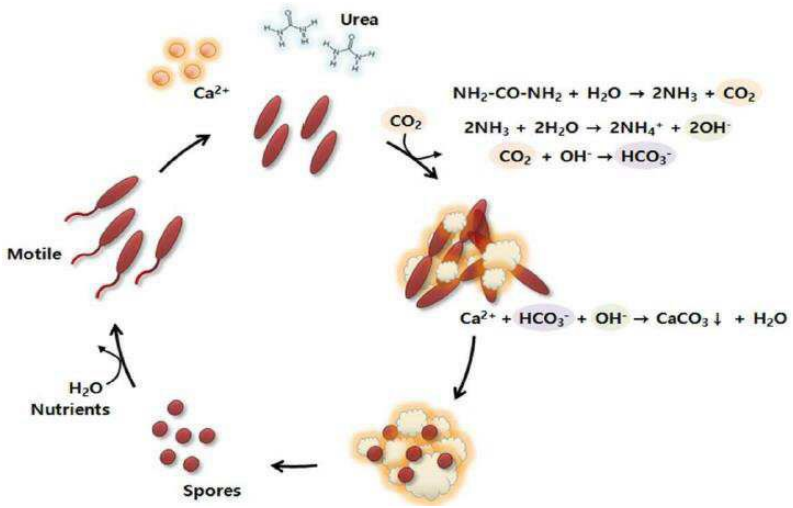
기탁기관명 : 농업생명공학연구원

수탁번호 : KACC81070BP

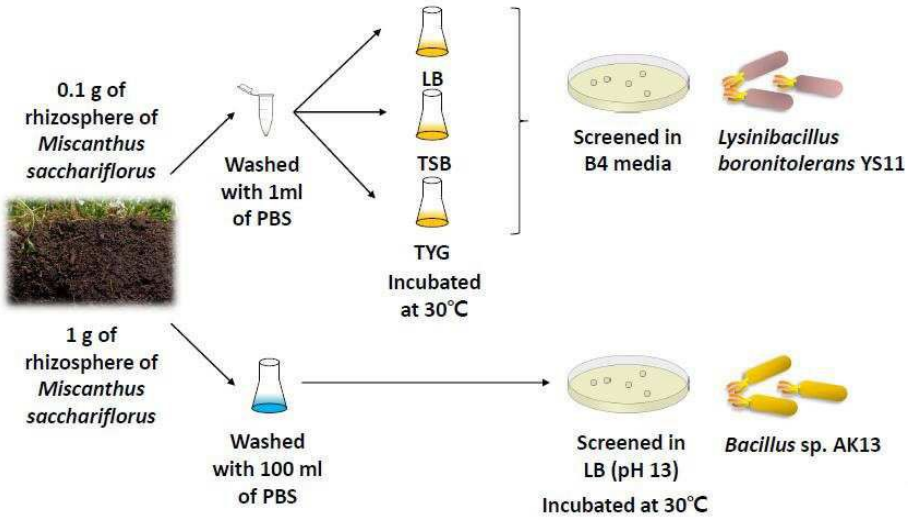
수탁일자 : 20180328

도면

도면1



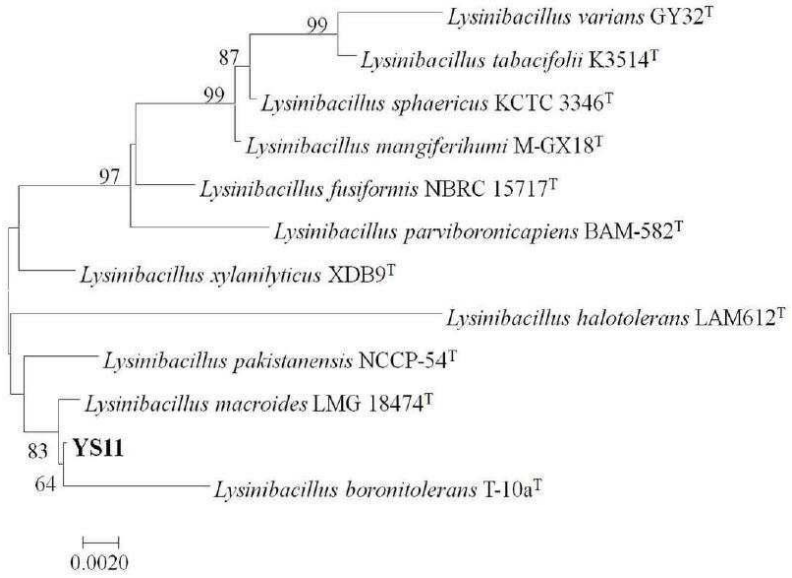
도면2



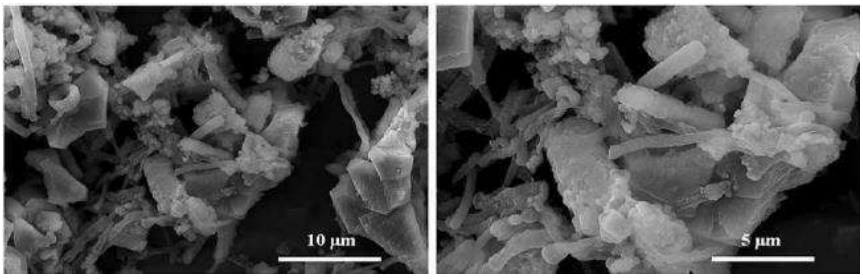
도면3

GGAGCTTGCTCCTTTGACGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTACCCTATAGTTTGGGATAACTCC
GGGAAACCGGGGCTAATACCGAATAATCTCTTTTGCTTCATGGTGAAAGACTGAAAGACGGTTTCGGCTGTCGCTATA
GGATGGGCCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAG
GGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGG
GCGAAAGCCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTCGGATCGTAAAACTCTGTTGTAAGGGAAGAAC
AAGTACAGTAGTAACTGGCTGTACCTTGACGGTACCTTATTAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGT
AATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTCCTTTAAGTCTGATGTGAAA
GCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAATTCCAAGT
GTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATTTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAACTGACGCTGAGG
CGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGG
GGTTTCCGCCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAA
AGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTC
TTGACATCCCGTTGACCACTGTAGAGATATAGTTTCCCCTTCGGGGGCAACGGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCA
GCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCATCATTTAGTTGGGCAC
TCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCT
ACACACGTGCTACAATGGACGATACAAACGGTTGCCAACTCGCGAGAGGGAGCTAATCCGATAAAGTCGTTCTCAGT
TCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACG
TTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTT

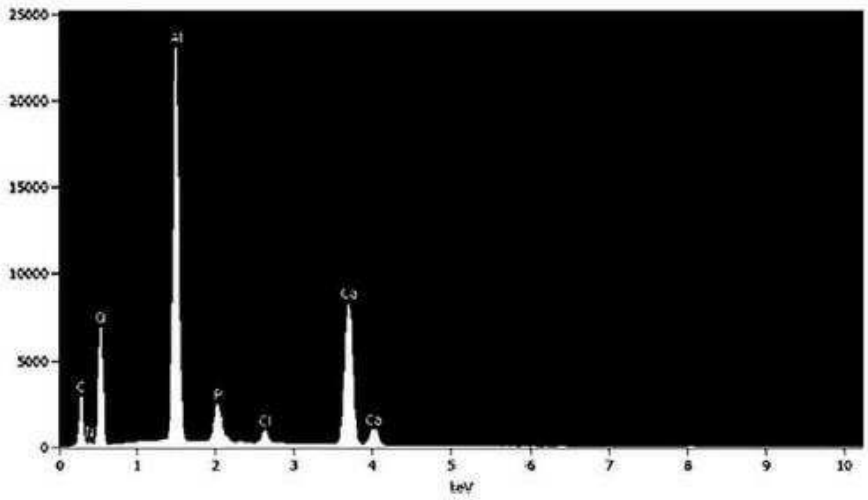
도면4


99
87
99
97
83
64
Lysinibacillus varians GY32T
Lysinibacillus tabacifolii K3514T
Lysinibacillus sphaericus KCTC 3346T
Lysinibacillus mangiferihumi M-GX18T
Lysinibacillus fusiformis NBRC 15717T
Lysinibacillus parviboronicapiens BAM-582T
Lysinibacillus xylanilyticus XDB9T
Lysinibacillus halotolerans LAM612T
Lysinibacillus pakistanensis NCCP-54T
Lysinibacillus macroides LMG 18474T
YS11
Lysinibacillus boronitolerans T-10aT
0.0020

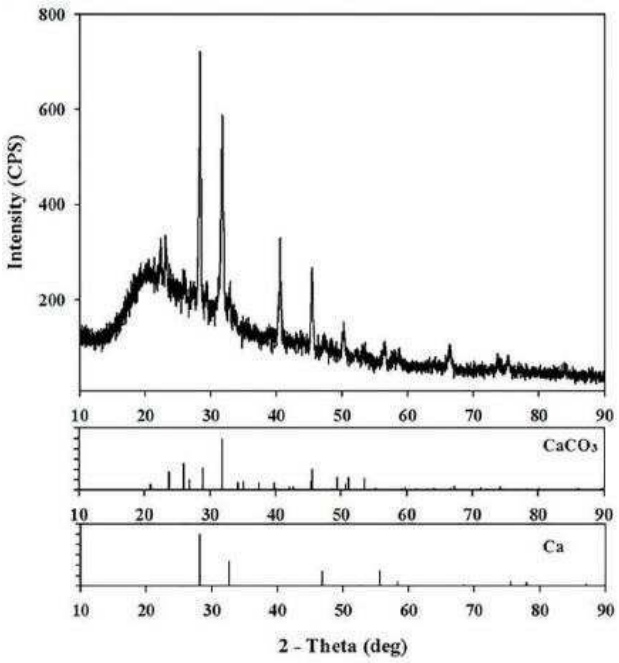
도면5


10 μm
5 μm

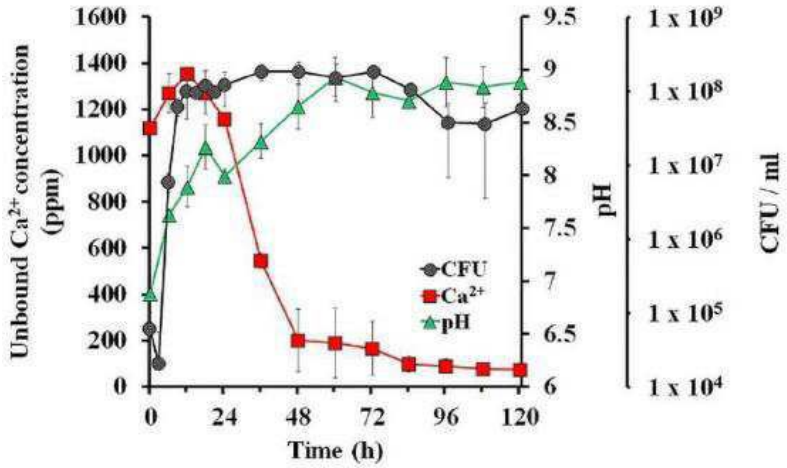
도면6a


25000
20000
15000
10000
5000
0
Al
O
C
N
P
Cl
Ca
Ca
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
keV

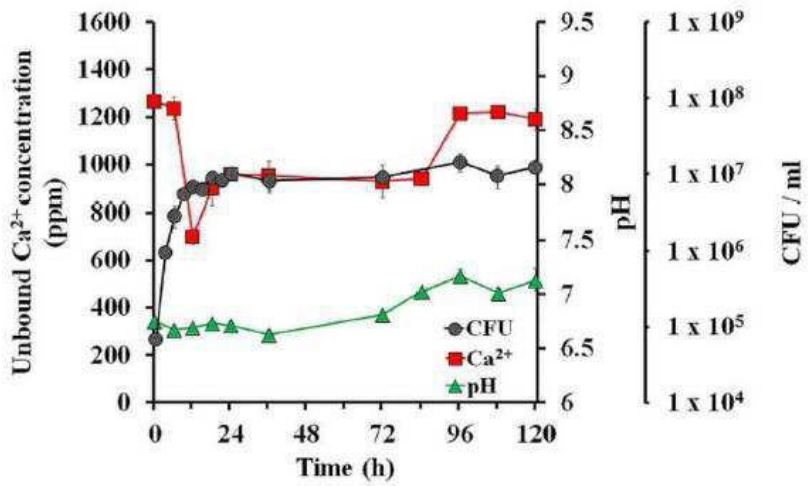
도면6b


Intensity (CPS)
800
600
400
200
10 20 30 40 50 60 70 80 90
CaCO3
Ca
2 - Theta (deg)

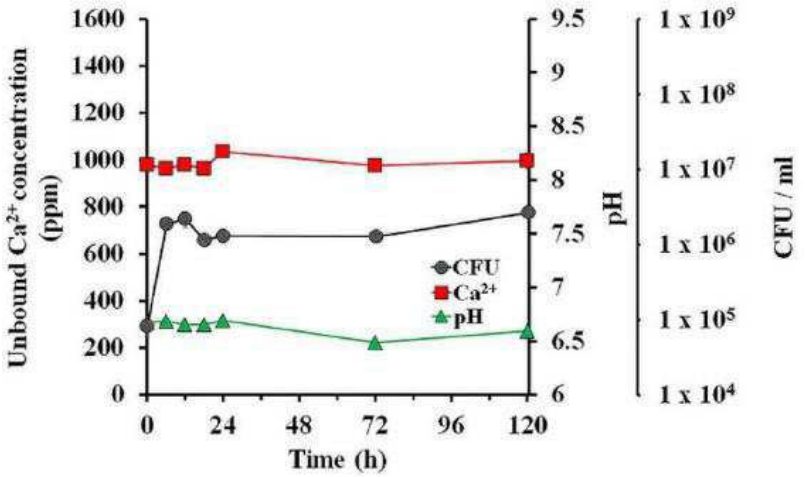
도면7a


Unbound Ca2+ concentration (ppm)
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
9.5
9
8.5
8
7.5
7
6.5
6
pH
1 x 10^9
1 x 10^8
1 x 10^7
1 x 10^6
1 x 10^5
1 x 10^4
CFU / ml
CFU
Ca2+
pH
0 24 48 72 96 120
Time (h)

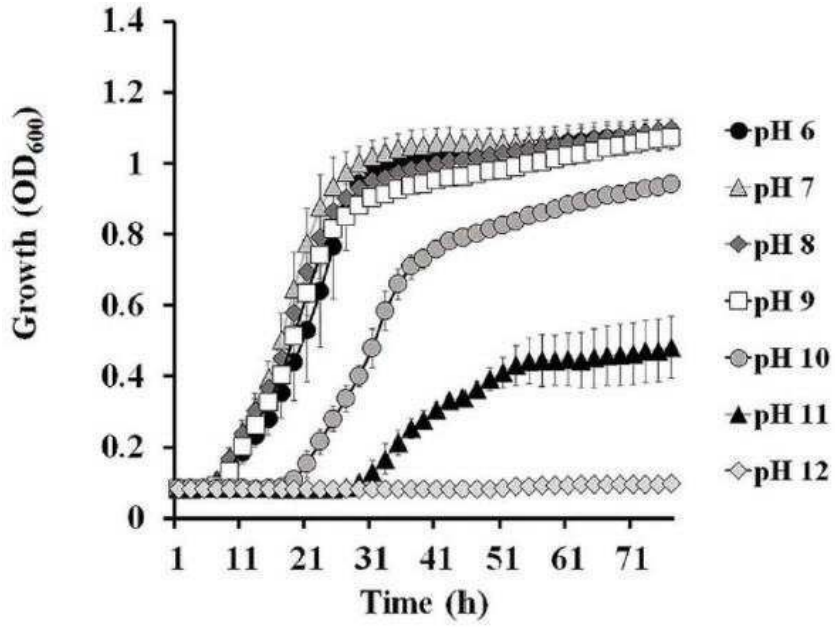
도면7b


Unbound Ca^{2+} concentration (ppm)
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
9.5
9
8.5
8
7.5
7
6.5
6
pH
1 x 10^9
1 x 10^8
1 x 10^7
1 x 10^6
1 x 10^5
1 x 10^4
CFU / ml
CFU
Ca^{2+}
pH
0
24
48
72
96
120
Time (h)

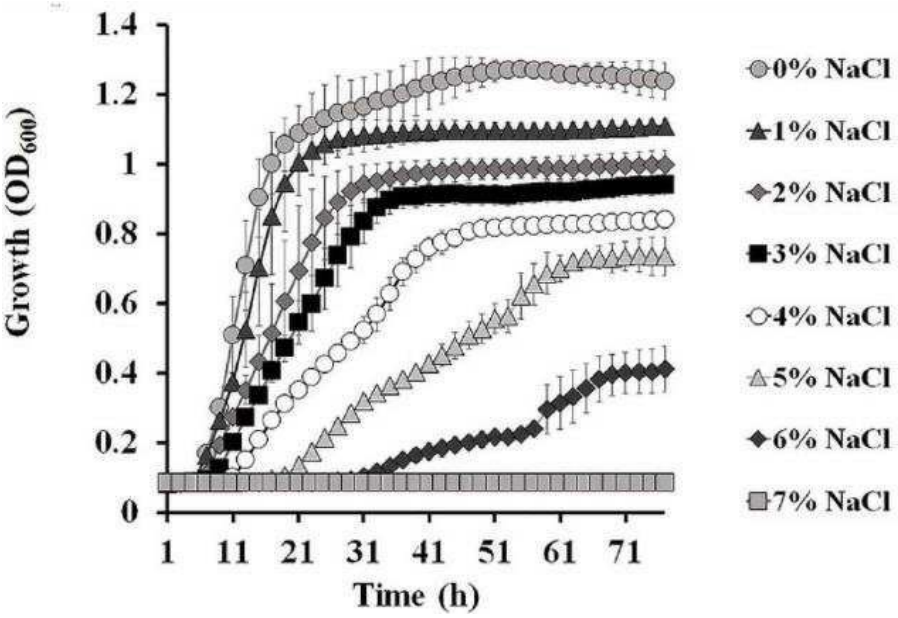
도면7c


Unbound Ca^{2+} concentration (ppm)
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
9.5
9
8.5
8
7.5
7
6.5
6
pH
1 x 10^9
1 x 10^8
1 x 10^7
1 x 10^6
1 x 10^5
1 x 10^4
CFU / ml
CFU
Ca^{2+}
pH
0
24
48
72
96
120
Time (h)

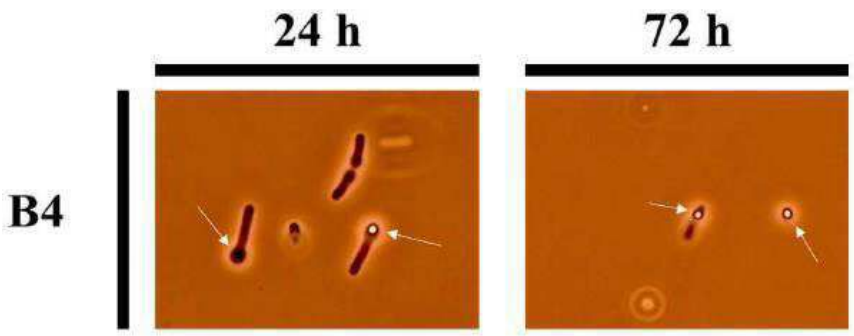
도면8a



도면8b



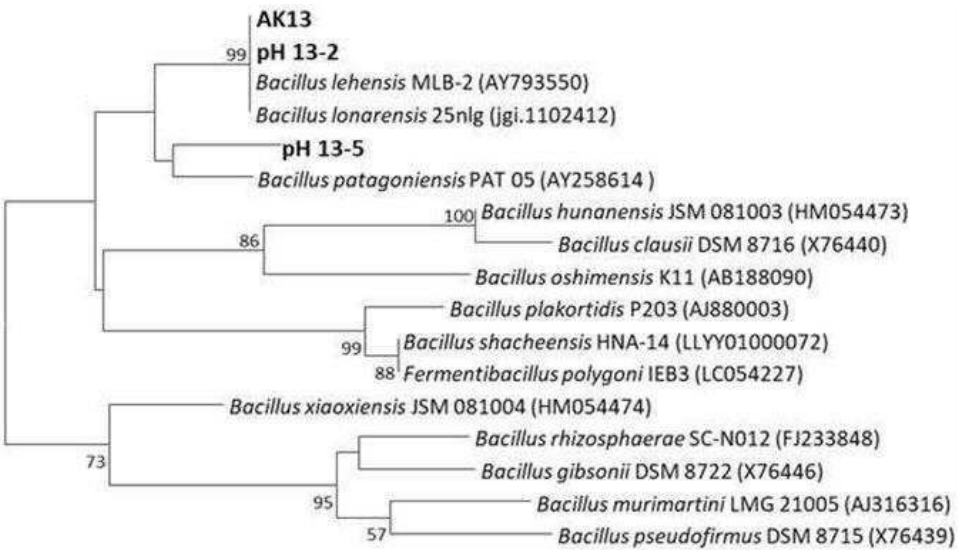
도면9



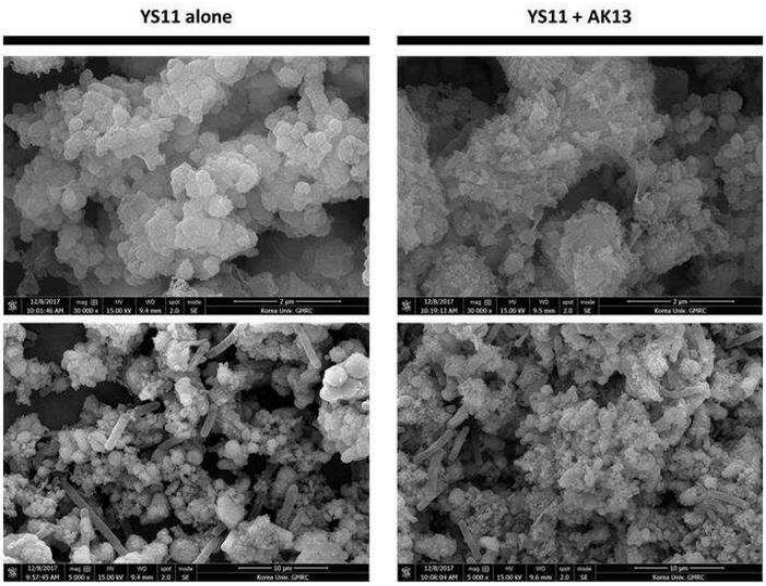
도면10

GGAGCTTGCTCCTTTGACGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTACCCTATAGTTTGGGATAACTCC
GGGAAACCGGGGCTAATACCGAATAATCTCTTTTGCTTCATGGTGAAAGACTGAAAGACGGTTTCGGCTGTCGCTATA
GGATGGGCCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAG
GGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGG
GCGAAAGCCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTCGGATCGTAAAACTCTGTTGTAAGGGAAGAAC
AAGTACAGTAGTAACTGGCTGTACCTTGACGGTACCTTATTAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGT
AATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTCCTTTAAGTCTGATGTGAAA
GCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAATTCCAAGT
GTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATTTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAACTGACGCTGAGG
CGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGG
GGTTTCCGCCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAA
AGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTC
TTGACATCCCGTTGACCACTGTAGAGATATAGTTTCCCCTTCGGGGGCAACGGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCA
GCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCATCATTTAGTTGGGCAC
TCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCT
ACACACGTGCTACAATGGACGATACAAACGGTTGCCAACTCGCGAGAGGGAGCTAATCCGATAAAGTCGTTCTCAGT
TCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACG
TTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTT

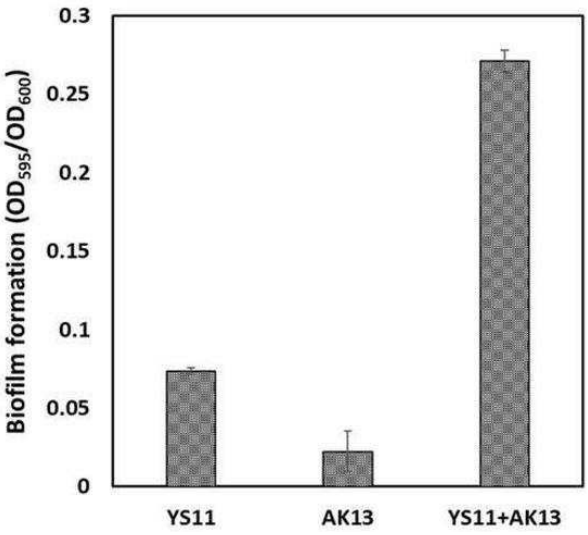
도면11



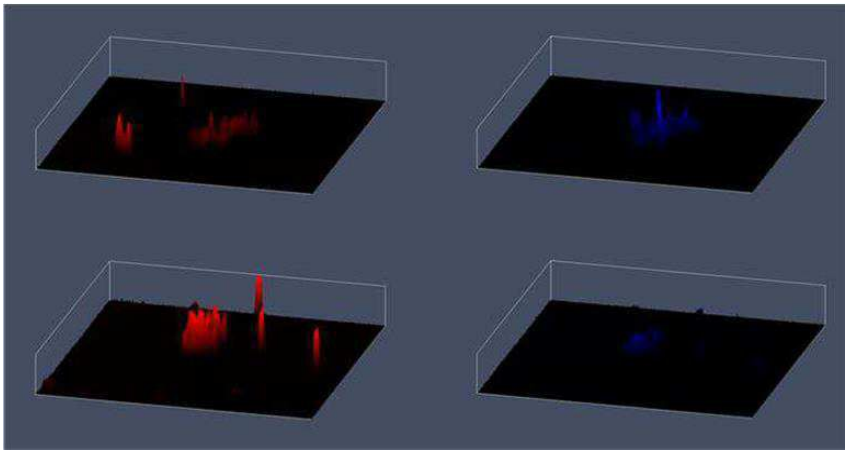
도면12


YS11 alone
YS11 + AK13

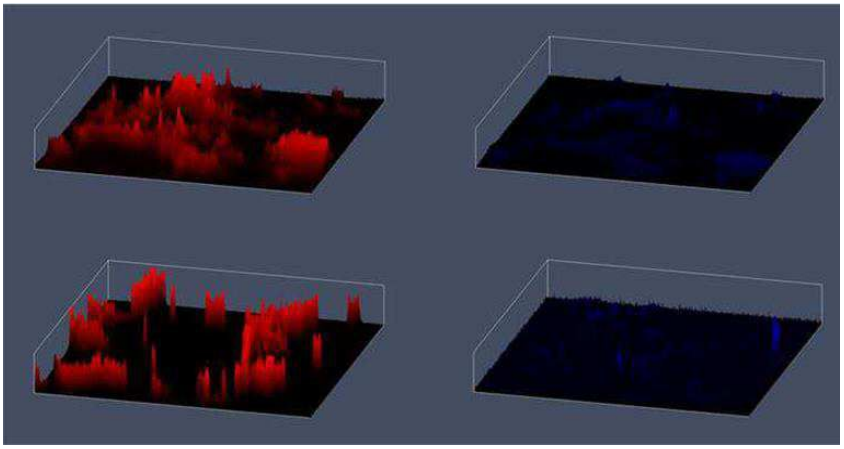
도면13


Biofilm formation (OD595/OD600)
0.3
0.25
0.2
0.15
0.1
0.05
0
YS11
AK13
YS11+AK13

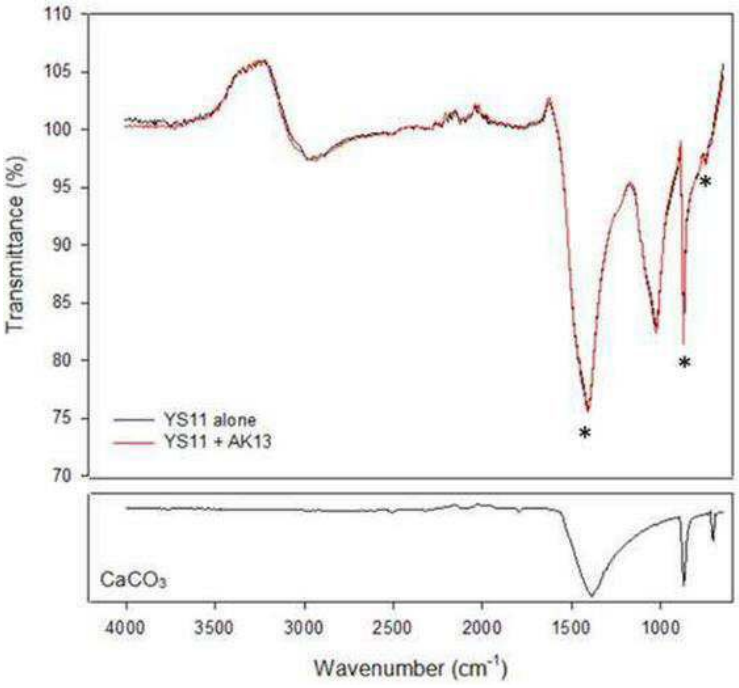
도면14a



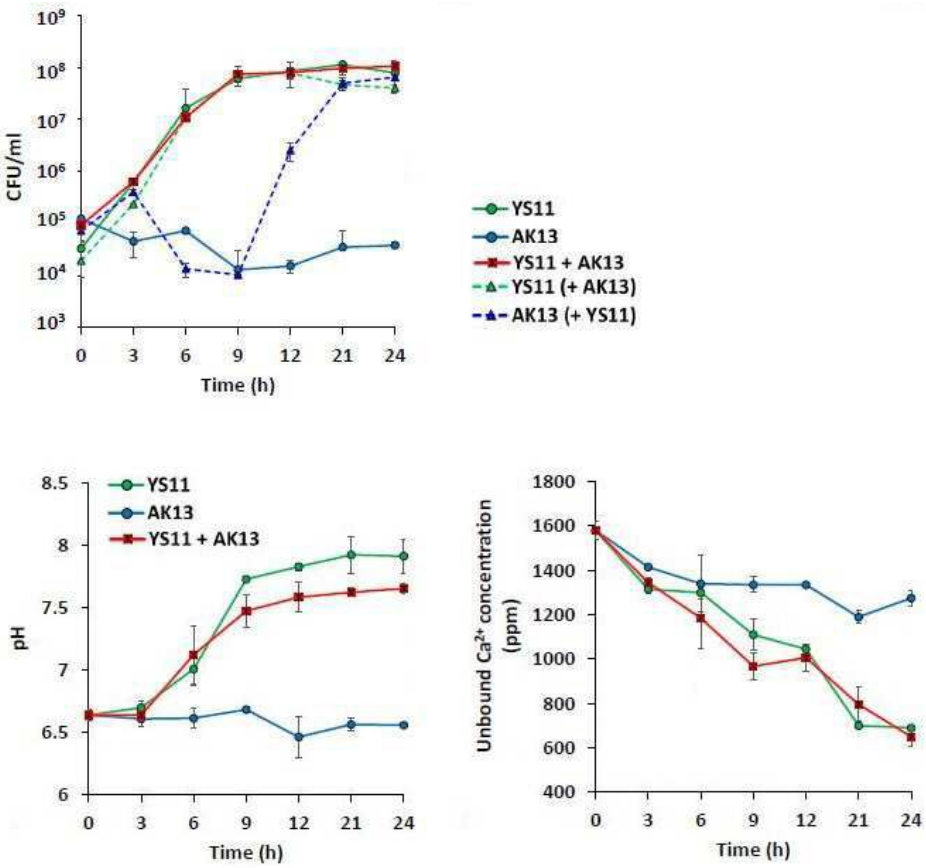
도면14b



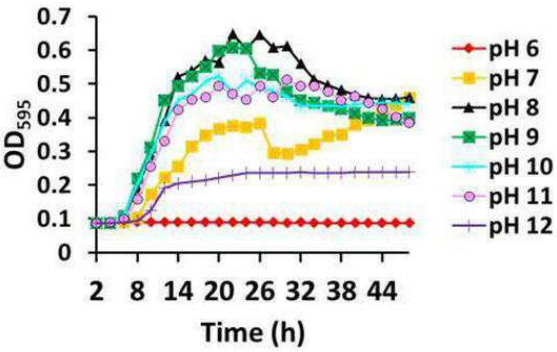
도면15



도면16



도면17



서 열 목 록

<110> Korea University Industry and Academy Cooperation Foundation

<120> Calcium carbonate production through Lysinibacillus boronitolerans YS11 and Bacillus sp. AK13 and use thereof

<130> NPDC-68528.01

<150> KR 10/2018/0045064

<151> 2018-04-18

<160> 2

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 1385

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Lysinibacillus boronitolerans YS11 16S rRNA

<400> 1

ggagcttgct cctttgacgt tagcggcgga cgggtgagta acacgtgggc aacctaccct 60

atagtttggg ataactccgg gaaaccgggg ctaataccga ataatctctt ttgcttcatg 120

gtgaaagact gaaagacggt ttcggctgtc gctataggat gggcccgcgg cgcattagct 180

agttggtgag gtaacggctc accaaggcga cgatgcgtag ccgacctgag agggtgatcg 240

gccacactgg gactgagaca cggcccagac tcctacggga ggcagcagta gggaatcttc 300

cacaatgggc gaaagcctga tggagcaacg ccgcgtgagt gaagaaggtt ttcggatcgt 360

aaaactctgt tgtaagggaa gaacaagtac agtagtaact ggctgtacct tgacggtacc 420

ttattagaaa gccacggcta actacgtgcc agcagccgcg gtaatacgta ggtggcaagc 480

gttgtccgga attattgggc gtaaagcgcg cgcaggcggt cctttaagtc tgatgtgaaa 540

gcccacggct caaccgtgga gggtcattgg aaactggggg acttgagtgc agaagaggaa 600

agtggaattc caagtgtagc ggtgaaatgc gtagagattt ggaggaacac cagtggcgaa 660

ggcgactttc tggtctgtaa ctgacgctga ggcgcgaaag cgtggggagc aaacaggatt 720

agataccctg gtagtccacg ccgtaaacga tgagtgctaa gtgttagggg gtttccgccc 780

cttagtgctg cagctaacgc attaagcact ccgcctgggg agtacggtcg caagactgaa 840

actcaaagga attgacgggg gcccgcacaa gcggtggagc atgtggttta attcgaagca 900

acgcgaagaa ccttaccagg tcttgacatc ccgttgacca ctgtagagat atagtttccc 960

cttcgggggc aacggtgaca ggtggtgcat ggttgtcgtc agctcgtgtc gtgagatgtt 1020

gggttaagtc ccgcaacgag cgcaaccctt gatcttagtt gccatcattt agttgggcac 1080

tctaaggtga ctgccggtga caaaccggag gaaggtgggg atgacgtcaa atcatcatgc 1140

cccttatgac ctgggctaca cacgtgctac aatggacgat acaaacggtt gccaactcgc 1200

gagagggagc taatccgata aagtcgttct cagttcggat tgtaggctgc aactcgccta 1260

catgaagccg gaatcgctag taatcgcgga tcagcatgcc gcggtgaata cgttcccggg 1320

ccttgtacac accgcccgtc acaccacgag agtttgtaac acccgaagtc ggtgaggtaa 1380

ccttt 1385

<210> 2

<211> 959

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Bacillus sp. AK13 16S rRNA

<400> 2

ctacgggagg cagcagtagg gaatcttccg caatggacga aagtctgacg gagcaacgcc 60

gcgtgagtga ggaaggcctt cgggtcgtaa agctctgttg tgagggaaga acaagtaccg 120

gcgtaactac cggtaccttg acggtacctc accagaaagc cacggctaac tacgtgccag 180

cagccgcggt aatacgtagg tggcaagcgt tgtccggaat tattgggcgt aaagcgcgcg 240

caggcggctt cttaagtctg atgtgaaatc tcggggctca accccgagcg gccattggaa 300

actgggaagc ttgagtgcag aagaggagag tggaattcca cgtgtagcgg tgaaatgcgt 360

agatatgtgg aggaacacca gtggcgaagg cgactctctg gtctgtaact gacgctgagg 420

cgcgaaagcg tggggagcaa acaggattag ataccctggt agtccacgcc gtaaacgatg 480

agtgctaggt gttaggggtt tcgatgcccg tagtgccgaa gtaaacacat taagcactcc 540

gcctggggag tacggccgca aggctgaaac tcaaaggaat tgacggggac ccgcacaagc 600

agtggagcat gtggtttaat tcgaagcaac gcgaagaacc ttaccaggtc ttgacatcct 660

ttgaccactc tggagacaga gcttcccctt cgggggcaaa gtgacaggtg gtgcatggtt 720

gtcgtcagct cgtgtcgtga gatgttgggt taagtcccgc aacgagcgca acccttgatc 780

ttagttgcca gcattcagtt gggcactcta aggtgactgc cggtgacaaa ccggaggaag 840

gtggggacga cgtcaaatca tcatgcccct tatgacctgg gctacacacg tgctacaatg 900

gatggtacaa agggcagcga aaccgcgagg tggagccaat cccataaagc cattctcag 959