



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0111528
(43) 공개일자 2015년10월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/20 (2006.01) *C04B 18/18* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2014-0034796
(22) 출원일자 2014년03월25일
심사청구일자 2015년03월04일

(71) 출원인
인하대학교 산학협력단
인천광역시 남구 인하로 100, 인하대학교 (용현동)
(72) 발명자
한상현
인천 남구 인하로 100, 3호관 209호 (용현동, 인하대학교)
강창호
인천광역시 서구 염곡로 330-3 2층 (뫼면에 계속)
(74) 대리인
김순웅

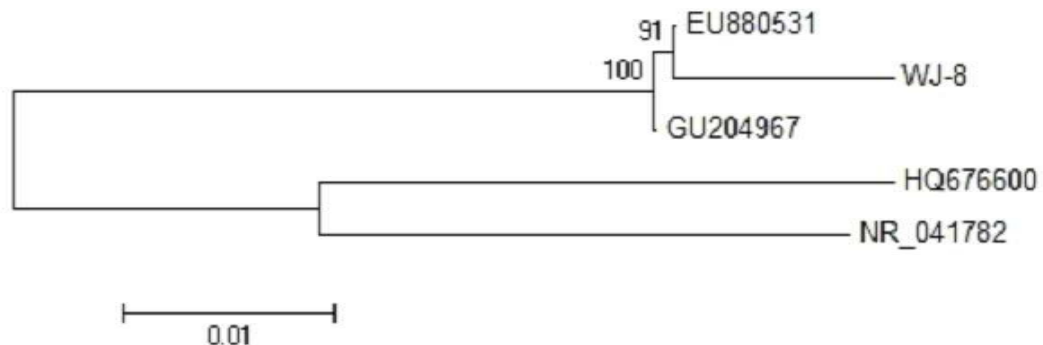
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 리시니바실러스 스파에리커스 및 이를 포함하는 조성물

(57) 요약

본 발명은 리시니바실러스 스파에리커스 WJ-8 균주(*Lysinibacillus sphaericus* WJ-8)를 제공한다. 본 발명의 리시니바실러스 스파에리커스 WJ-8 균주는 야생 콘크리트 환경에서 생존률이 우수하고, 탄산칼슘 형성능을 갖는바, 콘크리트에 적용하여 친환경적인 균열 보수 및 지반 강화가 가능하며, 토양 환경 산업 및 건설산업에 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

신유진

인천 연수구 해송로 143, 116동 1301호 (송도동, 송도웰카운티1단지)

염우성

서울 송파구 동남로18길 9, 5동 1104호 (가락동, 극동아파트)

정진훈

서울 양천구 목동동로 130, 1423동 1601호 (신정동, 목동신시가지아파트14단지)

소재성

서울 마포구 서강로 95, 104동 1601호 (창전동, 창전동삼성아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 48461-1

부처명 교육부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 기본연구

연구과제명 방사성 물질의 격리를 위한 미생물 생태공학적 연구

기 여 율 1/1

주관기관 인하대학교 산학협력단

연구기간 2013.09.01 ~ 2014.08.31

명세서

청구범위

청구항 1

리시니바실러스 스파에리쿠스 WJ-8 균주(*Lysinibacillus sphaericus* WJ-8, KCTC12559BP).

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 균주는 탄산칼슘 형성능, 염분 스트레스 내성, 열 스트레스 내성, 지반 강화능 및 포자 생성능을 갖는 것인 리시니바실러스 스파에리쿠스 WJ-8 균주(*Lysinibacillus sphaericus* WJ-8, KCTC12559BP).

청구항 3

제1항의 리시니바실러스 스파에리쿠스 WJ-8 균주(*Lysinibacillus sphaericus* WJ-8, KCTC12559BP), 상기 균주의 배양물, 상기 배양물의 농축물, 상기 배양물의 건조물 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나를 포함하는 시멘트 또는 콘크리트용 조성물.

청구항 4

제1항의 리시니바실러스 스파에리쿠스 WJ-8 균주(*Lysinibacillus sphaericus* WJ-8, KCTC12559BP), 상기 균주의 배양물, 상기 배양물의 농축물, 상기 배양물의 건조물 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나를 포함하는 시멘트 또는 콘크리트 충전용 조성물.

청구항 5

제1항의 리시니바실러스 스파에리쿠스 WJ-8 균주(*Lysinibacillus sphaericus* WJ-8, KCTC12559BP), 상기 균주의 배양물, 상기 배양물의 농축물, 상기 배양물의 건조물 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나를 포함하는 지반 강화용 조성물.

청구항 6

제1항의 리시니바실러스 스파에리쿠스 WJ-8 균주(*Lysinibacillus sphaericus* WJ-8, KCTC12559BP), 상기 균주의 배양물, 상기 배양물의 농축물, 상기 배양물의 건조물 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나를 유효성분으로 포함하는 조성물을 시멘트 또는 콘크리트 구조물에 처리하는 단계;를 포함하는 시멘트 또는 콘크리트 구조물의 보수 방법.

청구항 7

제1항의 리시니바실러스 스파에리쿠스 WJ-8 균주(*Lysinibacillus sphaericus* WJ-8, KCTC12559BP), 상기 균주의 배양물, 상기 배양물의 농축물, 상기 배양물의 건조물 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나를 유효성분으로 포함하는 조성물을 토양에 처리하는 단계;를 포함하는 지반 강화 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 탄산칼슘 형성미생물 및 상기 미생물을 포함하는 조성물에 관한 발명이다.

배경 기술

[0002] 콘크리트는 널리 사용되는 건설재료 중 하나이지만, 잦은 미세균열과 수분 및 기타 화학물질의 침투로 인한 균열 확장으로 구조물의 내구도 및 수명에 있어 치명적인 결함이 존재한다. 이와 같은 콘크리트 문제점을 해결하기 위해 혼화제, 에폭시 등을 사용하지만 지속적인 사용이 필요하고 환경에 부정적인 영향을 주기 때문에 문제

시되고 있다.

[0003] 이에 대한 방안으로 최근 탄산칼슘 형성미생물을 콘크리트에 적용하여 균열보수, 압축강도증진, 투수성 감소 등의 효과를 보이는 연구가 진행되고 있다. 그러나 콘크리트의 pH 12 이상의 고알칼리 환경, 수화열에 의한 50 내지 60? 고온의 생육환경 및 제설제 등에 의한 높은 삼투압 환경 등에 의하여 적용 후 생존 가능한 탄산칼슘 형성미생물의 종류가 매우 제한된다는 문제점이 있다.

[0004] 따라서, 이를 극복하기 위해 탄산칼슘 형성미생물 중 포자 형성 능력을 보유한 미생물에 대한 연구가 요구되고 있다. 포자 형성 미생물은 그람 양성 미생물에서 그람 음성 미생물까지 다양하게 존재하고 있으며, 이들이 형성한 포자는 열, 방사선, 화학물질, 건조 등 다양한 스트레스에 대한 내성을 보여, 생물 분해, 복합 소화 효소, 비료제, 길항적 살균제 및 살충제 등 다양한 분야에 쓰이고 있다.

[0005] 본 연구에서는 한국형 기후에 맞는 콘크리트 적용을 위해 국내 지역의 콘크리트 도로에서 탄산칼슘 형성미생물을 분리하였다. 그 후 정성 및 정량적으로 탄산칼슘형성을 확인하였고 90% 이상의 포자 형성률을 유도하여 다양한 환경 스트레스에 대한 생존률 확인을 통해 분리 미생물의 콘크리트 적용 및 인근 지반의 강화를 위한 적용 가능성을 보였다.

[0006] 본 발명자들은 국내의 환경에 적합한 탄산칼슘 형성미생물에 대하여 연구하던 중, 콘크리트에 적용할 수 있으며, 포자 형성을 통해서 콘크리트 환경에서 생존이 우수한 미생물 균주를 확인하여, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 목적은 탄산칼슘 형성능, 콘크리트 환경 내성을 갖는 미생물 및 이를 이용한 콘크리트용 조성물 및 지반 강화용 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기와 같은 목적을 달성하기 위해서, 본 발명은 리시니바실러스 스파에리쿠스 WJ-8 균주(*Lysinibacillus sphaericus* WJ-8, KCTC12559BP)를 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 상기 리시니바실러스 스파에리쿠스 WJ-8 균주(*Lysinibacillus sphaericus* WJ-8, KCTC12559BP), 상기 균주의 배양물, 상기 배양물의 농축물, 상기 배양물의 건조물 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나를 유효성분으로 포함하는 시멘트용 또는 콘크리트용 조성물 및 시멘트 또는 콘크리트 충전용 조성물을 제공한다.

[0010] 또한, 본 발명은 상기 리시니바실러스 스파에리쿠스 WJ-8 균주(*Lysinibacillus sphaericus* WJ-8, KCTC12559BP), 상기 균주의 배양물, 상기 배양물의 농축물, 상기 배양물의 건조물 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나를 포함하는 지반 강화용 조성물을 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 상기 리시니바실러스 스파에리쿠스 WJ-8 균주(*Lysinibacillus sphaericus* WJ-8, KCTC12559BP), 상기 균주의 배양물, 상기 배양물의 농축물, 상기 배양물의 건조물 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나를 유효성분으로 포함하는 시멘트 또는 콘크리트 구조물에 처리하는 단계;를 포함하는 시멘트 또는 콘크리트 구조물의 보수 방법을 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 상기 리시니바실러스 스파에리쿠스 WJ-8 균주(*Lysinibacillus sphaericus* WJ-8, KCTC12559BP), 상기 균주의 배양물, 상기 배양물의 농축물, 상기 배양물의 건조물 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나를 유효성분으로 포함하는 조성물을 토양에 처리하는 단계;를 포함하는 지반 강화 방법을 제공한다.

[0013] 이하, 본 발명에 대하여 보다 상세히 설명한다.

[0014] 본 발명은 리시니바실러스 스파에리쿠스 WJ-8 균주(*Lysinibacillus sphaericus* WJ-8)를 제공한다.

[0015] 상기 리시니바실러스 스파에리쿠스 WJ-8 균주는 콘크리트 도로에서 분리된 균주된 것이다.

[0016] 상기 균주는 탄산칼슘 형성능, 열 스트레스 내성, 염분 스트레스 내성 및 포장 생성능을 가진다. 특히, 배양 후

24시간 내지 48 시간 사이에 가장 높은 포자 생성률을 가지며, 상기 균주가 형성한 포자는 매끈한 표면에 주로 구형을 가지고, 중간에 부속기와 외막을 가진다. 상기 균주는 최적 조건에서 97% 의 포자 생성률을 나타내며, 여름철 고온의 야외도로, 바닷가의 염분 환경에서도 효과적으로 생존할 수 있다.

[0017] 상기 본 발명의 WJ-8 균주의 포자는 70 ℃ 이하의 온도 조건에서 생존 가능하고, 바람직하게는 60 ℃ 이하의 조건에서 생존 가능하다. 본 발명의 일 실시예에서 50 내지 60 ℃의 조건에서도 95 % 이상의 높은 생존률을 나타내는 것을 확인하였는바, 50 ℃ 내지 60 ℃의 콘크리트 수화열 조건에서도 생존할 수 있는, 열 스트레스 내성을 갖는다.

[0018] 상기 WJ-8 균주의 포자 형성 CFU는 $4 \sim 5 \times 10^8$, 포자형성률은 97.9 %로 매우 우수한바, 대규모 배양 또는 산업적으로 대량배양 하는 경우 미생물의 배양 효율이 우수하므로, 경제적으로도 유용하게 사용할 수 있다.

[0019] 상기 WJ-8 균주 및 그 포자는 염분 스트레스 내성도 갖는바, 3M 농도의 NaCl 용액에서도 95 % 정도의 높은 생존률을 갖는다. 따라서 상기 포자를 포함하는 콘크리트 또는 시멘트 보수용 조성물은 제설제 또는 해양 환경과 같은 고 염분 조건(지중해, 사해 또는 홍해 이상의 염도는 3M 이하) 하에서도 포자의 생존이 가능하며, 우수한 시멘트 또는 콘크리트 보수 효과를 갖는다.

[0020] 상기 WJ-8 균주 및 그 포자는 pH 9.0 내지 pH 13.0의 고 알칼리성 환경에서도 생존 가능하며, 특히 pH 12까지는 90% 이상의 높은 생존률을 갖는다.

[0021] 상기 WJ-8 균주는 16S rDNA 유전자 서열을 통하여 동정한 결과 리시니바실러스 스파에리쿠스 균주와 99%의 상동성을 가져 리시니바실러스 스파에리쿠스로 동정되었다. 상기 리시니바실러스 스파에리쿠스 WJ-8 균주는 한국유전자은행(KCTC, korean collection for type cultures)에 2014년 2월 25일자로 기탁되어, 수탁번호 KCTC 12559BP를 부여 받았다.

[0022] 상기 리시니바실러스 스파에리쿠스 WJ-8 균주는 통상의 배지에서 생육 가능하며, 일 예로 YA 배지에서 배양할 수 있다. 상기 배지는 특정 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. 상기 리시니바실러스 스파에리쿠스 WJ-8 균주는 통상의 배양방법에 따라 배양할 수 있다.

[0023] 상기 리시니바실러스 스파에리쿠스 WJ-8 균주는 포자 생성능이 있는바, 포자를 생산하는 효율이 우수하고, 상기 WJ-8 균주의 포자는 고온 및 고 염도 그리고 고 알칼리 환경에서 견디는 내성이 현저히 우수한바, 야생의 콘크리트 환경 또는 해양 환경에서도 콘크리트 구조물에 처리하여 균열의 보수, 구조물의 개선 등에 유용하게 이용될 수 있으며, 토양에 처리하는 경우 지반을 강화하는 효과를 갖는다.

[0024] 또한, 본 발명은 리시니바실러스 스파에리쿠스 WJ-8 균주(*Lysinibacillus sphaericus* WJ-8, KCTC12559BP), 상기 균주의 배양물, 상기 배양물의 농축물, 상기 배양물의 건조물 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나를 유효성분으로 포함하는 시멘트 또는 콘크리트용 조성물, 시멘트 또는 콘크리트 충전용 조성물 및 지반 강화용 조성물에 관한 것이다.

[0025] 상기 시멘트 또는 콘크리트용 조성물은 시멘트 또는 콘크리트 강도 증진용 조성물 또는 균열 보수용 조성물 일 수 있다.

[0026] 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 WJ-8 균주 또는 그 포자에 의하여 형성된 탄산칼슘이 채워져 연약지반을 강화시키는 효과가 있다.

[0027] 상기 균주의 배양물, 상기 배양물의 농축물, 상기 배양물의 건조물 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나에는 리시니바실러스 스파에리쿠스 WJ-8 균주에 의하여 형성된 균주를 포함될 수 있다.

[0028] 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.

[0029] 상기 배지는 특정 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 배양

액이라고도 하며, 천연배지, 합성배지 또는 선택배지를 모두 포함하는 개념이다.

- [0030] 상기 조성물의 pH는 조성물을 처리하는 콘크리트 환경에 따라서 용이하게 변경 가능하며, 바람직하게는 최대 pH 13 이하로 조성 할 수 있다.
- [0031] 상기 조성물은 조성물 총 중량에 대하여 상기 리시니바실러스 스파에리커스 WJ-8 균주, 상기 균주의 배양물, 상기 배양물의 농축물, 상기 배양물의 건조물 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나를 0.001 내지 99.99 중량%, 바람직하게는 0.1 내지 99 중량%로 포함할 수 있고, 상기 항진균 조성물의 사용방법 및 사용목적에 따라 유효성분의 함량을 적절히 조절할 수 있다.
- [0032] 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.
- [0033] 본 발명의 균주는 탄산칼슘 형성능 및 스트레스 환경에서의 내성이 강한바, 시멘트 구조물 또는 콘크리트 구조물을 제조하기 위한 조성물에 포함하여 사용될 수 있다.
- [0034] 또한 상기 시멘트 또는 콘크리트 충전용 조성물은 시멘트 또는 콘크리트 구조물에 생긴 균열을 채우기 위하여 처리하는 조성물로, 상기 균주를 포함하는 조성물을 구조물에 처리하는 경우 균주가 형성하는 탄산칼슘에 의하여 구조물의 균열 등을 채우는데 사용될 수 있고, 이로써 균열이 충전되고, 구조물의 강도를 증진시킬 수 있다.
- [0035] 또한, 본 발명은 리시니바실러스 스파에리커스 WJ-8 균주(*Lysinibacillus sphaericus* WJ-8, KCTC12559BP), 상기 균주의 배양물, 상기 배양물의 농축물, 상기 배양물의 건조물 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나를 유효성분으로 포함하는 조성물을 시멘트 또는 콘크리트 구조물에 처리하는 단계;를 포함하는 시멘트 또는 콘크리트 구조물의 보수 방법에 관한 것이다.
- [0036] 또한 본 발명은 본 발명은 리시니바실러스 스파에리커스 WJ-8 균주(*Lysinibacillus sphaericus* WJ-8, KCTC12559BP), 상기 균주의 배양물, 상기 배양물의 농축물, 상기 배양물의 건조물 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나를 유효성분으로 포함하는 조성물을 토양에 처리하는 단계;를 포함하는 지반 강화 방법에 관한 것이다.
- [0037] 상기 균주의 배양물, 상기 배양물의 농축물, 상기 배양물의 건조물 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나에는 리시니바실러스 스파에리커스 WJ-8 균주에 의하여 형성된 균주를 포함될 수 있다.
- [0038] 상기 조성물을 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.
- [0039] 또한, 상기 조성물을 토양에 처리하는 경우 상기 토양에 처리된 균주가 형성하는 탄산칼슘에 의하여 지반의 공극, 공동, 갈라진 틈 등이 채워져 연약지방을 강화시키고, 토양 입자를 견고화하는 효과를 통해서 토양 또는 지반의 강도를 증진시킬 수 있다
- [0040] 상기 균주를 포함하는 조성물의 경우 탄산칼슘 형성능, 열 스트레스 내성, 염분 스트레스 내성 및 포자 생성능이 우수한 WJ-8 균주에 의하여 포자를 형성하여 외부 환경의 변화에도 지속적으로 생존할 수 있고, 상기 균주의 포자는 열 내성, 염분 내성 및 고 알칼리성 환경에서도 생존가능하여 제설제를 처리하는 도로환경 또는 해양 구조물 등에서도 생존할 수 있고, 콘크리트 구조물 또는 시멘트 구조물의 균열 등을 보수하는 방법에 효과적으로 사용될 수 있고, 지반을 강화시키는 방법에 효과적으로 사용될 수 있다.

발명의 효과

- [0041] 본 발명의 리시니바실러스 스파에리커스 WJ-8 균주는 탄산칼슘 형성능 및 고 스트레스 내성을 갖는바 시멘트 또는 콘크리트 균열의 보수, 지반 강화 등에 사용될 수 있고, 이는 친환경적이며 비용절감을 꾀할 수 있어 산업분야에 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0042] 도 1은 리시니바실러스 스파에리커스 WJ-8 균주의 16S rRNA를 바탕으로 유전적 관계를 나타내는 계통수이다. 각

균주는 GenBank의 데이터베이스를 기준으로 확인된 염기서열을 기준으로 하였고, 하기와 같다; *Lysinibacillus spaericus* EU880531, *Lysinibacillus spaericus* GU204967, *Sporosarcina pasteurii* HQ676600, *Sporosarcina ureae* NR_041782

도 2a는 리시니바실러스 스파에리커스 WJ-8 균주에 의하여 형성된 탄산칼슘의 X-선 회절분석 결과를 나타내는 도로 C는 칼사이트(calcite), V는 배터라이트(vaterite)를 의미하며, 도 2b는 리시니바실러스 스파에리커스 WJ-8 균주의 탄산칼슘 형성율을 나타내는 그래프이고, 에러바는 표준편차를 나타내는 것으로 n=3이다.

도 3a는 시간에 따른 세포의 수와 포자의 수를 나타내는 그래프이고, 도 3b는 포자형성 브로스에서 28℃의 조건으로 2일동안 배양된 리시니바실러스 스파에리커스 WJ-8 균주의 주사전자현미경 사진을 나타내는 것이다.

도 4a는 온도에 따른 리시니바실러스 스파에리커스 WJ-8 균주의 포자의 생존율을 나타내는 것이고, 4b는 염농도에 따른 상기 포자의 생존율, 4c는 pH에 따른 상기 포자의 생존율을 나타내는 그래프이다. 채워진 막대는 포자를 나타내고, 채워지지 않은 막대는 베지테이티브 상태의 세포를 나타낸다. 에러바는 표준편차를 나타내는 것으로 n=3이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0043]

이하, 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0044]

실험예1. 배지, 시약 및 기기 균주의 분리 및 선별

[0045]

본 실험에서 완충 및 희석 용액으로 인산염 완충액(NaH₂PO₄: 0.10 g/L, Na₂HPO₄: 26.61 g/L, 1 mM EDTA; pH 9.0.)이 사용되었다. 탄산칼슘 형성미생물의 선별을 위해 BPU 배지(Beef extract: 3 g/L, Peptone: 5 g/L, Urea: 20 g/L; pH 9.0)가 사용되었으며, 배양 배지로는 변형된 YA 배지(Yeast: 20 g/L, Ammonium sulfate: 9.9 g/L; pH 9.0)가 사용되었다. 또한 Sasaki 등의 배지를 일부 변형한 변형된 포자형성(modified sporulating, MS) 배지(MnSO₄·5H₂O: 0.02 g/L, CaCl₂·H₂O: 0.2 g/L, MgCl₂: 1.02 g/L, KH₂PO₄: 0.5 g/L, Yeast extract: 10 g/L; pH 7.0)가 포자형성 배지로 사용하였다. 침전된 탄산칼슘 및 미생물 수거를 위해 원심분리기(VS-550, Vision Scientific Co., LTD, Korea)가 사용되었고, 미생물의 초기 균체 수 설정을 위해 분광광도계(Utrospec 2000, Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)를 사용하여 흡광도를 측정하였다.

[0046]

실험예2. 균주의 분리 및 선별

[0047]

강원도 원주 내 만종분기점 부근 제 7 지구대 전방의 광장영업소 콘크리트 도로 현장에서 도로 중앙, 방벽, 배수구 등 도로와 도로 주변에서 콘크리트 시료를 채취하여 미생물을 분리하였다. 분리 미생물을 BPU 액체 배지에 접종하였으며 28 ℃, 200 rpm, 48시간 배양한 후 배양액을 0.2 μm 주사기형 여과기(syringe filter)로 여과하여 미생물을 제거하였다. 여과액 1 mL에 100 μL의 100 mM CaCl₂를 첨가하여 광물질의 침전반응을 통해 1차 선별하였다. 선별된 미생물은 25% 글리세롤 스탁(glycerol stock)으로 만들어 -70 ℃에서 보관하였으며 16S rRNA 유전자 서열을 분석(gene sequencing)하여 미생물을 동정하였다. 동정 및 서열분석(sequence) 결과를 토대로 PHYDIT(<http://plaza/snu.ac.kr/~jchun/phydit/>) 프로그램을 이용하여 계통수를 작성하였다. 그 결과를 도 1에 나타내었다.

[0048]

상기에 채취한 시료에서 20여 개의 단일 콜로니를 얻었고, 이 중 1개의 콜로니가 탄산칼슘 형성능이 있음을 확인하였다. 탄산칼슘을 형성하는 콜로니의 16S rRNA 유전자 서열분석 결과, 리시니바실러스 스파에리커스(*Lysinibacillus sphaericus*)로 동정(도 1)되어, 리시니바실러스 스파에리커스(*Lysinibacillus sphaericus*) WJ-8로 명명하였고, National Center of Biotechnology Information으로부터 accession number KC211298을 부여 받았다.

[0049]

실험예 3. 탄산칼슘 형성 확인

[0050]

선별된 미생물(WJ-8)이 탄산칼슘을 형성하는지 확인하기 위해, 분리 미생물들을 BPU액체 배지에 접종하여 28 °C, 200 rpm, 48시간 동안 배양한 후 0.2 μm 주사기형 여과기(syringe filter)로 여과하여 미생물을 완전히 제거하였다. 여과액 500 μl와 500 μl의 여과 멸균된 350 mM CaCl₂ 수용액을 반응시켜 백색 침전 형성을 확인한 후 원심 분리(16179 x g, 5 min)를 통해 침전물을 얻었다. 침전물을 50 °C, 24시간 동안 건조시킨 후 X-선 회절 분석기(DMAX-2500, Rigaku, Tokyo, Japan)를 이용하여 10 ° - 90 °에서 2θ 간격으로 측정하였다. 탄산칼슘을 정량적으로 측정하기 위해 선별된 미생물을 BPU액체 배지에서 28 °C, 200 rpm으로 배양하였다. 0시간부터 24시간까지는 3시간단위로 배양액을 채취하였고, 그 이후로는 48, 72, 96시간에 각각 배양액을 채취하였다. 그 후 채취한 배양액을 0.2 μm 주사기형 여과기(syringe filter)로 여과하여 미생물을 완전히 제거하였다. 여과액 500 μl에 500 μl의 여과 멸균된 350 mM CaCl₂ 수용액을 첨가하여 침전반응을 유도하였으며 원심 분리(16179 x g, 5 min)를 통해 침전물을 획득하였다. 획득한 침전물을 50°C, 24시간 동안 건조시켜 중량을 측정하였다. 그 결과로도 2에 나타내었다.

[0051]

도 2a에 나타난 바와 같이, X-선 회절분석을 통한 탄산칼슘의 정성적 확인 결과 탄산칼슘과 그 이성질체인 미량의 배터라이트가 형성됨을 확인하였다. Gorospe등의 연구를 통해 본 실험에서 미생물에 의해 형성된 탄산 칼슘이 기존의 탄산 칼슘 형성 미생물에 의해 형성된 탄산칼슘과 동일한 물질임을 알 수 있었다(Gorospe, C. M., S. H. Han, S. G. Kim, J. Y. Park, C. H. Kang, J. H. Jeong, J. S. So (2013) Effects of Different Calcium Salts on Calcium Carbonate Crystal Formation by *Sporosarcina pasteurii* KCTC 3558. *Biotechnol. Bioproc. Eng.* 18: 903-908.). 또한 추후 콘크리트 적용을 위해, WJ-8이 배양 기간에 따라 생성하는 탄산 칼슘을 정량적으로 확인한 결과, 배양 초기에는 생성되지 않았으나, 배양 후 6시간 경과 시에는 2.3 mg/mL의 탄산칼슘이 생성되었으며, 48시간 경과 한 후에는 탄산칼슘이 최대 10.0 mg/mL 형성됨을 알 수 있었다(도 2b).

[0052]

실험예 4. 포자 형성 확인

[0053]

분리된 탄산칼슘 형성미생물을 5 mL YA 배지에 접종하여 28 °C, 200 rpm, 24시간 동안 전 배양하였으며, 전배양이 완료된 후 배양액을 5 mL YA 배지에 10% 접종하여 8시간 본 배양하였다. 본배양액 500 μl를 50 mL의 MS 액체 배지에 접종하여 28 °C, 200 rpm, 96시간 동안 배양하였다. 배양 중 24시간 단위로 배양액을 채취하여 YA 한천 배지에 도말 후 총 균체 수(영양세포+포자)를 확인하였고, 채취한 배양액을 포자 계수를 위해 80 °C, 15분 동안 열처리하여 영양세포를 제거한 후 YA 한천 배지에 도말하였다. 도말된 YA 한천 배지를 28°C, 24시간 배양하여 CFU(Colony Forming Unit)를 측정하였으며 하기 실험식을 이용하여 포자형성률을 계산하였다.

[0054]

[실험식 1]

[0055]

포자형성률(%) = 열처리 후 CFU/열처리 전CFU X 100(%)

[0056]

또한 수집한 포자를 1% 글루타알데하이드(glutaraldehyde, Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) 용액에 4 °C, 24시간 동안 고정화 과정을 거친 후, 에탄올에 탈수시켜 전계방출형 주사전자현미경(field emission scanning electron microscope, S-4300, Hitach, Tokyo, Japan)을 이용하여 포자를 관찰하였다(15kV X 6.00K, 5.0 μm scale). 그 결과를 도 3에 나타내었다.

[0057]

도 3에 나타난 바와 같이, WJ-8을 MS 배지에 배양하여 포자형성을 비교 분석한 결과, 24시간에는 총 균체(영양세포 + 포자)의 수가 5.13×10^8 CFU/mL로 관찰된 반면 포자 수는 관찰되지 않아 24시간 동안에는 영양세포만이 존재함을 확인할 수 있었다. 48시간에는 총 균체 수와 포자 수는 각각 4.80×10^8 CFU/mL와 4.79×10^8 CFU/mL로 97.9%의 포자형성률을 보였다(도 3a). 그리고 24시간에 비해 3.3×10^7 CFU/mL만큼 균체 수가 감소한 것은 포자가 되지 않은 대부분의 영양 세포가 사멸되어 감소된 총 균체 수를 보인 것으로 판단하였다. 도 3b에 나타난 바와 같이, 매끈한 표면의 구형 포자가 대부분 존재하며 중간에 부속기와 외막이 나타나있음을 보아, WJ-8이

MS 배지에 의해 대부분 포자를 형성함을 알 수 있었다.

[0058] 실험예 5. 환경 스트레스 하에서 포자의 생존률 확인

[0059] 포자의 스트레스 저항성을 분석하기 위해 온도(40, 50, 60℃), pH(9, 10, 11, 12, 13), NaCl(1, 2, 3 M)의 조건에 대한 생존률을 비교 분석하였다.

[0060] 48시간 동안 MS액체 배지에 배양된 미생물을 원심분리(4045 x g, 5 min) 후 인산염 완충액으로 세척하여 OD₆₀₀=1.0이 되도록 현탁하였다. 그 후 80 ℃, 15분 동안 열을 가하여 YA 한천 배지에 도말한 후 초기 포자를 계수하였다.

[0061] pH 와 염분 스트레스 실험을 위해, 선별된 포자를 해당 스트레스 조건의 인산염 완충액에 10% 접종하여 28 ℃, 48 시간 동안 정치배양하였다. 배양 후 배양액 200 μl 를 YA 고체 배지에 분산 도말하였으며, 도말된 YA고체 배지를 28℃, 24시간 동안 배양하여 CFU(Colony Forming Unit)를 측정으로 포자의 생존률을 계산하였다.

[0062] 온도 스트레스 실험을 위해, 선별된 포자를 인산염 완충액에 10 % 접종하여 40 ℃, 50 ℃, 60 ℃에서 각각 48시간 동안 정치배양 하였다. 48시간 배양 후, 배양액 200 μl를 YA 고체 배지에 분산 도말하였으며, 도말된 YA 고체 배지를 28 ℃, 24시간 동안 배양하여 CFU(Colony Forming Unit) 측정으로 생존률을 계산하였다.

[0063] 포자생존률은 상기 실험식 1과 같은 방식으로 계산하였다(포자생존률(%) =접종 후 CFU/접종 전CFU X 100(%)). 대조군으로서 MS 액체 배지에 24시간 동안 배양된 영양 세포가 사용되었으며, 위와 동일한 조건으로 OD₆₀₀=1.0이 되도록 현탁하였고 열처리(80℃, 15분) 없이 스트레스 조건들을 가하였다. 대조군인 영양 세포의 생존률은 다음과 같이 계산하였다(영양 세포 생존률(%) = 접종 후 CFU/접종 전CFU X 100(%)). 그 결과를 도 4에 나타내었다.

[0064] 도 4에 나타낸 바와 같이, 50 ℃와 60 ℃에서 포자의 열 스트레스에 대한 생존률이 84-97 %로 매우 높은 생존률을 보였다(도 4a). 이 결과는 형성된 포자가 콘크리트의 수화열(50-60℃)을 효과적으로 견딜 수 있음을 나타내는 것으로, 본 발명의 균주의 열 스트레스 내성이 현저히 우수함을 확인 하였다. 반면 영양 세포인 경우 50 ℃와 60 ℃에서 대부분 사멸함을 보여 영양 세포를 콘크리트 환경에 처리하는 것은 부적절함을 확인하였다.

[0065] 해양환경 적용 및 NaCl 계열 제설제 노출과 같이 높은 삼투압조건에의 적용을 위해 삼투압 스트레스 조건(1-3 M NaCl)에 미생물을 노출시켰다. 그 결과 포자는 모든 조건에서 87 - 95%로 매우 높은 생존률을 보였으나, 영양세포의 경우, 2 M과 3 M NaCl의 조건에서 12 시간 이후 생존률이 급감함을 알 수 있었다(도 4b). 따라서 콘크리트 적용 시 영양세포와 비교하여 본 발명의 미생물에 의하여 형성된 포자가 해양환경이나 NaCl 계열 제설제에 노출과 같은 극한 염기성 환경에서도 다른 미생물보다 현저히 높은 생존률을 유지할 수 있음을 보였다. 도 3c에서 염기 조건(pH 9-12)에 대한 생존률을 확인한 결과 영양 세포와 포자 모두 각각 82-91%와 84-97%의 생존률을 보였다. 이는 분리원이 고알칼리성인 콘크리트이기 때문에 영양 세포 자체가 pH 12에 대한 저항성을 보유함을 알 수 있으며, 영양 세포와 포자 모두 시멘트의 최저 염기성인 pH 12에서 생존 가능성을 보였다. 그러나 pH 13에서는 영양 세포는 대부분 사멸하였고, 포자인 경우 24시간 이후 30-40%의 생존률을 보였다(도 4c). 이는 포자를 형성하는 본 발명의 미생물은 강염기 조건인 콘크리트(pH 12-13) 에도 적용 가능한 것으로 확인 되었다.

[0066] 따라서 본 발명의 미생물을 포자형태로 콘크리트 환경 조건에서 현저히 우수한 생존률을 갖는 것을 확인 하였고, Han 등의 연구 [16]에서 분리된 미생물들이 24시간만에 55℃, pH 11, 1.5M NaCl에서 모두 사멸한 반면 본 연구에서 분리 미생물로부터 생성된 포자는 더 긴 스트레스 처리시간인 48시간에서 60 ℃, pH 12, 3 M NaCl에서 83-97% 생존함을 알 수 있어 콘크리트의 균열 보수 등을 위하여 포자를 처리하는 것이 야생 콘크리트 환경에서 생존률이 높아져, 균열 보수 등의 효율을 높일 수 있음을 확인 하였다.

수탁번호

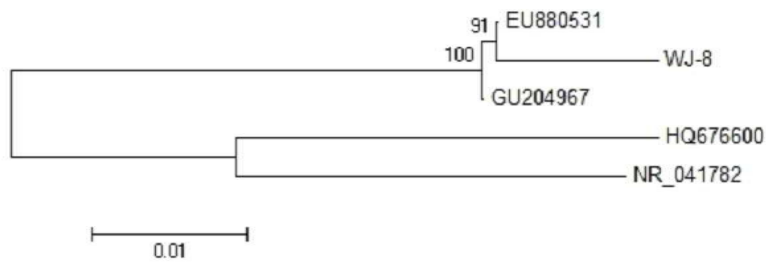
[0067] 기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC12559BP

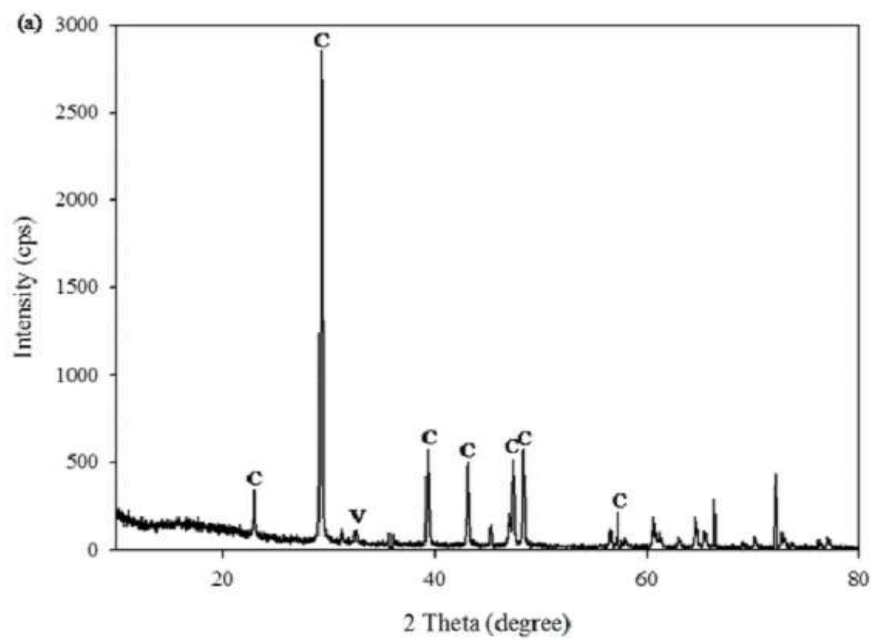
수탁일자 : 20140225

도면

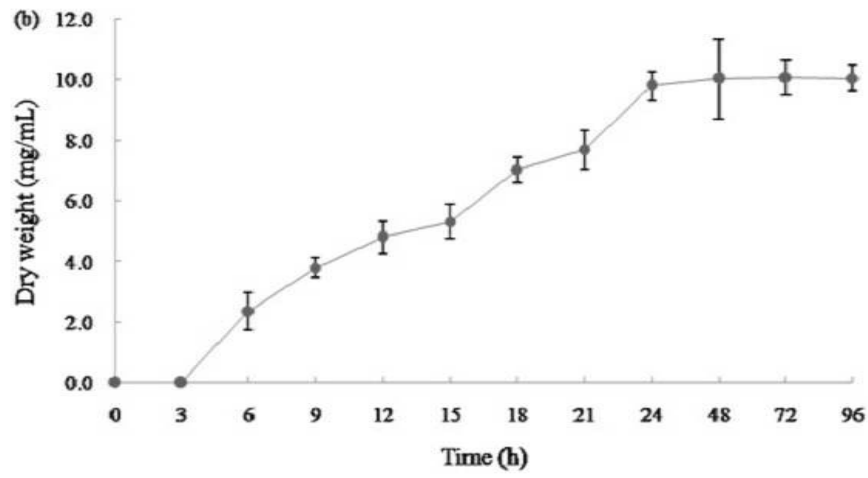
도면1



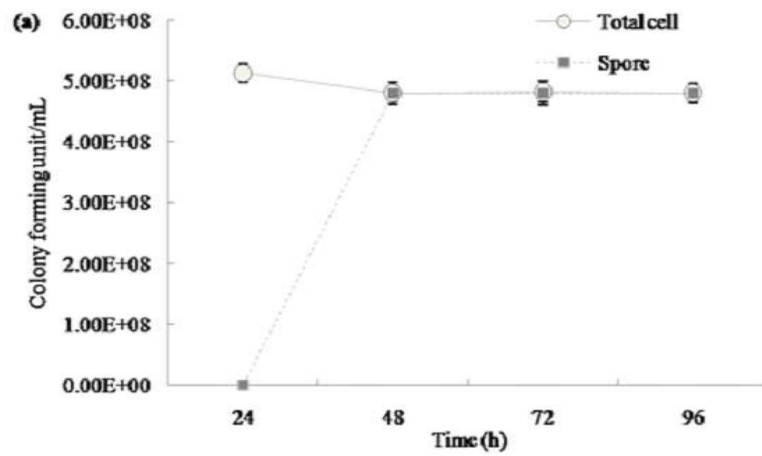
도면2a



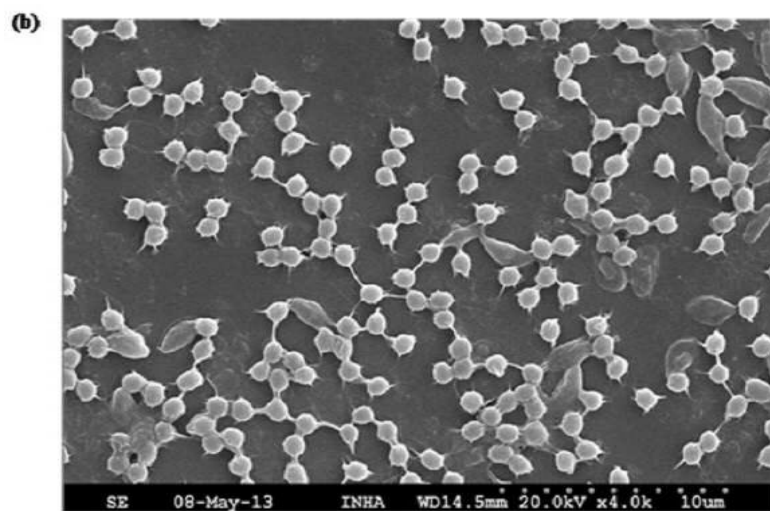
도면2b



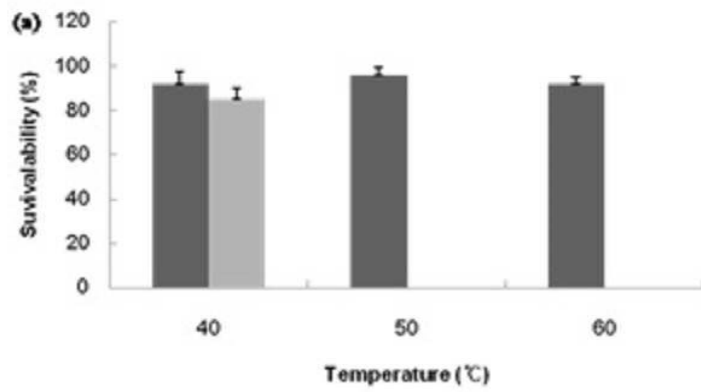
도면3a



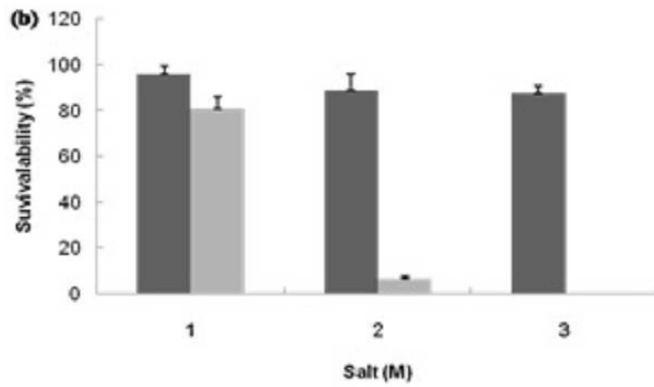
도면3b



도면4a



도면4b



도면4c

