(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0145392
(43) 공개일자 2020년12월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/20 (2006.01) *C12N 9/06* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 1/20 (2013.01)
B01D 53/56 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-0074347
(22) 출원일자 2019년06월21일
심사청구일자 2019년06월21일

(71) 출원인
이화여자대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)
(72) 발명자
박형주
경기도 파주시 숲속노을로 298, 103동 301호(문발동, 노을빛마을주공아파트)
권지현
대구광역시 서구 국채보상로38길 22, 211동 509호(중리동, 중리진달래2차아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김순웅

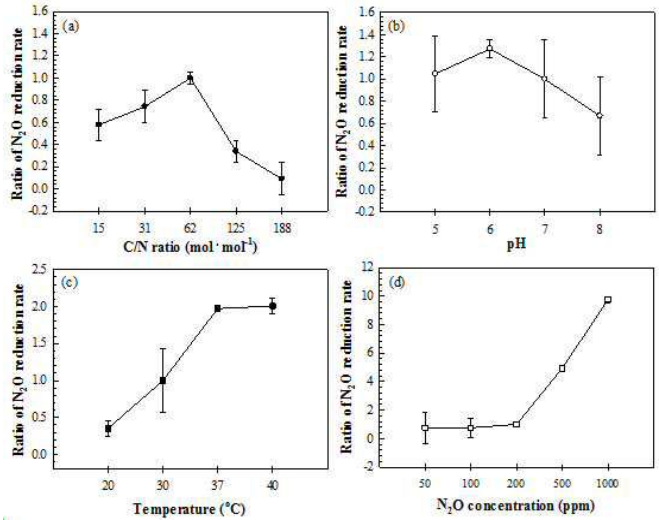
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 **신규한 아조스피라 속 미생물 및 이를 이용한 아산화질소의 저감방법**

(57) 요 약

본 발명은 아조스피라 속(*Azospira* sp.) HJ23 균주(KCTC13866BP), 상기 균주를 포함하는 아산화질소 저감용 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 아조스피라 속(*Azospira* sp.) HJ23 균주(KCTC13866BP)는 기존 아산화질소 환원 세균보다 아산화질소 환원능력이 최대 60배까지 높아, 농업 및 폐수처리시설과 같은 인위적 질소 배출원에서 2차적인 환경오염을 야기하지 않는 생물학적인 방법으로 온실가스를 효과적으로 저감시킬 수 있다.

대 표 도 - 도5



(52) CPC특허분류
C12N 9/0044 (2013.01)
C12Y 107/02001 (2013.01)
C12Y 107/02004 (2013.01)
C12Y 107/02005 (2013.01)
C12Y 107/99004 (2013.01)
C12R 1/01 (2013.01)
(72) 발명자
윤정희
서울특별시 마포구 독막로42길 2, 101동 1101호(염리동, 마포자이)
조경숙
서울특별시 서초구 동광로1길 87, 501호(방배동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711070721
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 개인기초연구(과기정통부)(R&D)
연구과제명 질소 제거 고도처리공정 성능, 기능성 유전자 및 메타전사체 정보의 상관관계 통합 분석을 통한 N2O 배출 저감 전략 도출
기 여 율 1/1
과제수행기관명 이화여자대학교
연구기간 2016.06.01 ~ 2019.05.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

아조스피라 속(*Azospira* sp.) HJ23 균주(KCTC13866BP).

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 균주는 아산화질소(N_2O) 환원 활성이 높은 것을 특징으로 하는, 균주.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 균주는 서열번호 3으로 표시되는 16S rDNA를 갖는 것을 특징으로 하는, 균주.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 균주는 narG(nitrate reductase gene), nirK(nitrite reductase gene), norB(nitric oxide reductase gene) 및 nosZ(nitrous oxide reductase gene) 유전자를 발현하는 것을 특징으로 하는, 균주.

청구항 5

아조스피라 속(*Azospira* sp.) HJ23 균주(KCTC13866BP)를 포함하는 아산화질소 저감용 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 조성물은 액티노박테리아(Actinobacteria), 아키도박테리아(Acidobacteria), 바실러스 속(Bacillus sp.), 슈도모나스 속(Pseudomonas sp.), 파라콕쿠스 속(Paraccocus sp.), 아시네토박터 속(Acinetobacter sp.), 알칼리게네스 속(Alcaligenes sp.), 아시드보락스 속(Acidovora sp.) 및 겜마티모나스 속(Gemmatimonas sp.)으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 균주를 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 7

아조스피라 속(*Azospira* sp.) HJ23 균주(KCTC13866BP)를 아산화질소 발생원에 처리하는 단계를 포함하는 아산화질소 저감 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 아산화질소 발생원은 C/N 비율이 10 내지 100 $mol \cdot mol^{-1}$인 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 9

제7항에 있어서, 상기 아산화질소 발생원은 pH가 5 내지 7인 것을 특징으로 하는, 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 아조스피라 속(*Azospira* sp.) HJ23 균주(KCTC13866BP), 상기 균주를 포함하는 아산화질소 저감용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 아산화질소(nitrous oxide, N_2O)는 지구온난화 잠재력(global warming potential)이 이산화탄소보다 약 300배 이상 큰 온실가스로 성층권 오존층 파괴를 야기하는 원인물질로 대두되고 있다. 아산화질소는 질산화 및 종속영양탈질과 같은 생물학적 질소 순환 과정(Ali et al., 2016; Zhu et al., 2013; Philippot et al., 2011; Wunderlin et al., 2012) 및 하이드록실아민(Hydroxylamine)의 산화과정에서도 배출되는 것으로 보고된 바 있다(Caranto et al., 2017; Terada et al., 2017). 최근 몇 년간, 농업분야를 비롯하여 생물학적 폐수처리 시스템은 다량의 아산화질소가 배출되는 인위적 배출원의 하나로 향후 배출량이 지속적으로 증가할 것으로 예측되고 있다(Massara et al., 2017; Law et al.,2012). 이에 따라, 농업 및 폐수처리시설과 같은 인위적 질소 배출원에서의 아산화질소 발생 저감을 위한 다각적인 측면의 노력이 필요하다.

[0004] 아산화질소의 배출량을 저감하기 위해 수행되는 물리화학적 처리 방법은 2차적인 환경오염을 야기할 수 있기 때문에, 이러한 문제를 보완할 수 있는 생물학적 처리방법이 대두되고 있다. 생물학적인 방법은 혼합 미생물 군집을 이용하거나, 군집 내에서부터 분리한 아산화질소 환원균주를 이용해 실제 폐수처리공정 및 농경토양에서부터 배출되는 아산화질소의 양을 저감시키는 방안으로 활용되고 있다. 최근, 농경지의 질소비료 사용 증가로 인해 아산화질소의 배출이 급증하고 있는 추세이다. 또한, 폐수처리 공정에서 활용되는 질산화 및 탈질공정에서의 중간산물로 방출되는 아산화질소의 양을 저감하기 위해 전체적인 탈질공정을 기반으로 아산화질소의 배출을 저감할 수 있는 방안이 다각적으로 시도되고 있다.

[0005] 아산화질소는 주로 종속영양세균에 의한 탈질과정 내에서 NO가 환원됨과 동시에 배출된다. 실제 배출되는 아산화질소의 양은 지구온난화 물질인 메탄 및 이산화탄소의 배출량과 비교하였을 때 현저히 낮은 것으로 확인되었지만, 통계적으로 매년 일정량 증가하고 있기 때문에 대책수립이 필요하다. 따라서 생물학적 아산화질소 제거공정을 활용하여 이를 최적화 시킬 필요가 있다. 이를 위해, 다양한 환경으로부터 아산화질소 환원 미생물 군집을 확보하고, 군집 내에 아산화질소 환원을 수행하는 균주를 순수분리 할 필요가 있다. 지금까지 N_2O 환원균주가 일부 분리되었으나 아직 종류가 다양하지 못하므로, 다양한 N_2O 환원 균주 확보를 위한 노력이 필요하다.

[0006] 이러한 배경 하에서, 본 발명자들은 생물학적 아산화질소 제거 기술 개발을 위하여 예의 노력한 결과, 아산화질소 환원능력이 우수하고, 고농도 아산화질소 처리가 가능한 신규 아조스피라 속(*Azospira* sp.) 균주를 확보하여, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 아조스피라 속(*Azospira* sp.) HJ23 균주(KCTC13866BP)를 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 아조스피라 속(*Azospira* sp.) HJ23 균주(KCTC13866BP)를 포함하는 아산화질소 저감용 조성물을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 균주를 아산화질소 발생원에 처리하는 단계를 포함하는 아산화질소 저감 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0012] 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 아조스피라 속(*Azospira* sp.) HJ23 균주(KCTC13866BP)를 제공한다.

[0013] 또한, 본 발명은 아조스피라 속(*Azospira* sp.) HJ23 균주(KCTC13866BP)를 포함하는 아산화질소 저감용 조성물을 제공한다.

[0014] 또한, 본 발명은 아조스피라 속(*Azospira* sp.) HJ23 균주(KCTC13866BP)를 아산화질소 발생원에 처리하는 단계를 포함하는 아산화질소 저감 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0016] 본 발명의 아조스피라 속(*Azospira* sp.) HJ23 균주(KCTC13866BP)는 기존 아산화질소 환원세균보다 아산화질소 환원능력이 최대 60배까지 높아, 농업 및 폐수처리시설과 같은 인위적 질소 배출원에서 2차적인 환경오염을 야기하지 않는 생물학적인 방법으로 온실가스를 효과적으로 저감시킬 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0018] 도 1은 아조스피라 속 HJ23 균주(*Azospira* sp. HJ23)의 계통발생학적 연관 관계를 보인 도이다(*는 분리 균주의 아산화질소 환원 불활성화를 의미).

도 2는 아조스피라 속 HJ23 균주(*Azospira* sp. HJ23), 바실러스 속 42 균주(*Bacillus sp.* 42), 상기 두 균주의 혼합물(1:1, v/v)의 N_2O 환원 특성을 나타낸 그래프이다.

도 3은 아조스피라 속 HJ23 균주(*Azospira* sp. HJ23)의 16s rDNA 및 탈질에 관여하는 기능성 유전자 4종(narG, nirK, norB, nosZ)의 발현량을 나타낸 도이다.

도 4는 서로 다른 C/N 비율(질소에 대한 탄소) 하에서 아조스피라 속 HJ23 균주(*Azospira* sp. HJ23)의 N_2O 환원 특성을 나타낸 그래프이다.

도 5는 (a) 서로 다른 C/N 비율, (b) pH, (c) 온도 및 (d) N_2O 농도 하에서 아조스피라 속 HJ23 균주(*Azospira* sp. HJ23)의 N_2O 환원 특성을 나타낸 그래프이다.

도 6은 아조스피라 속 HJ23 균주(Azospira sp. HJ23)의 질산염 및 아질산염 탈질 활성을 확인한 결과를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0019] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.

[0020] 본 발명은 아조스피라 속(*Azospira* sp.) HJ23 균주(KCTC13866BP)를 제공한다.

[0021] 상기 아조스피라 속 HJ23 균주는 본 발명자들에 의해 새로이 동정된 미생물로서, 기존 아산화질소 환원세균보다 아산화질소 환원능력이 현저히 높아, 생물학적인 방법으로 효과적으로 온실가스를 저감시킬 수 있는 미생물이다.

[0022] 본 발명의 일 실시예에서는, 본 발명의 아조스피라 속 HJ23 균주가 아질산염에서 일산화질소를 거쳐 아산화질소로 환원시키는 과정에 관여하는 nirK 및 norB 유전자에 대하여 상대적으로 높은 발현량을 나타냄을 확인하고, 아울러 narG 및 nirK 유전자의 발현을 확인하여 질산염 및 아질산염에 대한 환원 활성을 확인하고 있다.

[0023] 본 발명자들은 하수처리장으로부터 수득한 활성 슬러지로부터 아산화질소 환원 활성이 현저히 우수한 신규 아조스피라 속을 분리하여 균체의 DNA를 추출하고, 16S rDNA 부분 염기서열을 분석한 결과 아조스피라 속의 신규 균주임을 밝혔으며, 이를 HJ23 균주라 명명하였다. 본 발명자들은 상기 균주를 2019년 06월 19일자로 한국생명공학연구원에 기탁하여 수탁번호 KCTC13866BP를 부여받았다.

[0024] 상기 아조스피라 속 HJ23 균주의 16S rDNA 염기서열은 서열번호 3으로 표시하였다.

[0025] 또한, 본 발명은 아조스피라 속(*Azospira* sp.) HJ23 균주(KCTC13866BP)를 포함하는 아산화질소 저감용 조성물을

제공한다.

[0026] 본 발명에 있어서, 상기 조성물은 액티노박테리아(*Actinobacteria*), 아키도박테리아(*Acidobacteria*), 바실러스 속(*Bacillus* sp.), 슈도모나스 속(*Pseudomonas* sp.), 파라콕쿠스 속(*Paraccocus* sp.), 아시네토박터 속(*Acinetobacter* sp.), 알칼리게네스 속(*Alcaligenes* sp.), 아시드보락스 속(*Acidovora* sp.) 및 겜마티모나스 속(*Gemmatimonas* sp.)으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 균주를 더 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다. 바람직하게는, 상기 조성물은 아조스피라 속(Azospira sp.) HJ23 균주(KCTC13866BP) 외에 바실러스 속(*Bacillus* sp.) 균주를 더 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0027] 상기 추가적으로 포함될 수 있는 균주는 탈질 활성이 없는 균주일 수 있다.

[0028] 본 발명의 일 실시예에서는, 본 발명의 아조스피라 속 HJ23 균주와 탈질 활성이 없는 바실러스 속 균주(구체적으로, *Bacillus* sp. 42)를 혼합하는 경우 아조스피라 속 HJ23 균주 단독 처리시보다 N_2O 환원 속도가 더 빠름을 확인하여, 본 발명의 아조스피라 속 HJ23 균주 외 탈질 활성을 보유하고 있지 않은 균주를 혼합하는 경우 N_2O 환원을 향상시키는 시너지 효과를 나타낼 수 있음을 확인하였다.

[0029] 상기 조성물은 미생물 제제인 것을 특징으로 할 수 있다. 본 발명의 미생물 제제는 유효성분으로 아조스피라 속(*Azospira* sp.) HJ23 균주(KCTC13866BP) 또는 그 배양액을 함유하는 것을 특징으로 하며, 상기 균주 또는 그 배양액을 함유하기만 하면 다양한 형태로, 다양한 부형제를 첨가하여 제조될 수 있다. 즉, 미생물 제제의 제조를 위해 필요하다면 담체 등을 사용할 수 있고, 미생물의 초기 생육을 담보할 수 있는 영양원 등이 같이 첨가될 수 있다. 또한, 제형의 제조에 있어서 필요할 경우, 전분을 비롯한 다양한 형태의 바인더를 사용하여 펠렛 형태로 제조할 수도 있다. 미생물 제제의 제조에 관한 일반적인 사항은 당업계의 통상의 지식을 이용할 수 있음은 당업자에게 자명할 것이다.

[0030] 상기 미생물 제제는 아산화질소 발생원의 정화용일 수 있고, 상기 아산화질소 발생원은 농업 및 폐수처리시설과 같은 인위적 아산화질소 배출원 등 아산화질소를 발생시키는 자연적, 인위적 발생원을 제한 없이 포함한다.

[0031] 또한, 본 발명은 아조스피라 속(*Azospira* sp.) HJ23 균주(KCTC13866BP)를 아산화질소 발생원에 처리하는 단계를 포함하는 아산화질소 저감 방법을 제공한다.

[0032] 본 발명에 있어서, 상기 방법은 아산화질소 발생원의 C/N 비율이 10 내지 100 $mol \cdot mol^{-1}$ 및/또는 pH가 5 내지 7인 조건에서 수행되는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0033] 본 발명의 일 실시예에서는, 본 발명의 아조스피라 속 HJ23 균주의 아산화질소 환원 속도를 증가시키는 최적 조건은 C/N 비율 62 $mol \cdot mol^{-1}$, pH 5 내지 7, 온도 37℃ 내지 40℃, N_2O 농도 500 ppm 이상임을 확인하고 있다.

[0035] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0037] **실시예 1. N_2O(아산화질소) 환원 세균 컨소시움 확보**

[0038] 중랑물재생센터로부터 활성 슬러지를 채취하여 12,000 rpm으로 10분간 원심분리 후, 증류수를 가하여 염분 및 영양소를 제거하여 펠렛(pellet)을 얻었다. 상기 펠렛을 KH_2PO_4 169.7 $mg \cdot L^{-1}$, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 751.1 $mg \cdot L^{-1}$, $CaCl \cdot 2H_2O$ 451.6 $mg \cdot L^{-1}$, EDTA 5.0 $mg \cdot L^{-1}$, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 5.0 $mg \cdot L^{-1}$ 및 1 $mL \cdot L^{-1}$의 미량원소 용액($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.43 $mg \cdot L^{-1}$, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.24 $mg \cdot L^{-1}$, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 0.99 $mg \cdot L^{-1}$, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.25 $mg \cdot L^{-1}$, $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 0.22 $mg \cdot L^{-1}$, $NiCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.19 $mg \cdot L^{-1}$, Na_2SeO_4 0.21 $mg \cdot L^{-1}$)을 포함하는 합성폐수(Vangsgaard and Anna, 2013)에 재부유시켰다. 배지는 1M HCL과 1M NaOH 용액으로 pH 7이 되게 조절하였고, 균주 성장 및 활성을 위해 글루코스(100 mg COD $\cdot L^{-1}$) 및 소듐 아세테이트(100 mg COD $\cdot L^{-1}$)를 탄소원 및 전자 공여자로서 첨가하였다. 1.2 L 혈청 병에 세포 부유액(3000 mg-MLVSS $\cdot L^{-1}$) 200 mL를 질소(N_2) 가스로 퍼지(purge)하고 혐기성 조건을 유지하

기 위해 부틸고무마개로 밀봉하였다. 헤드스페이스(headspace)의 최종 농도가 1000 ppm (v/v)가 되도록 시린지(syringe)를 이용하여 밀봉된 혈청병에 N_2O 가스를 주입하고, 혈청병을 30℃에서 120 rpm으로 진탕배양하였다. 가스 크로마토그래피(gas chromatograph, GC; Agilent 7890 Series, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)를 이용하여 일정 시간 간격으로 N_2O 농도를 분석하고, N_2O 환원이 컨펌되면 농화 배양액을 새로운 배양액으로 옮겨 2:8 비율로 혼합하고, 상기와 같은 조건에서 재배양하였다. 이러한 방식으로 재배양을 5회 수행하였다.

[0040] **실시예 2. N_2O(아산화질소) 환원 균주의 분리 및 동정**

[0041] N_2O(아산화질소) 환원 균주를 순수 분리하기 위해 멸균 증류수를 사용하여 농화 배양액을 단계적으로 희석시켜 Letheen 아가 플레이트에 도말하였다. 상기 플레이트를 질소 가스를 채운 혐기 챔버에 넣은 후, 30℃에서 정치 배양하면서 콜로니가 충분히 형성될 때까지 균주의 성장을 관찰하였다(48시간 이상). 각 콜로니를 새로운 Letheen 아가 플레이트에 옮긴 뒤 상기와 같은 조건에서 재배양하였다. 이를 순수균이 얻어질 때까지 반복하였다.

[0042] 배양하고 생성된 콜로니를 순수분리하여 총 23개의 분리 균주 중 N_2O 환원 능력을 유지하는 균주를 선별하고 콜로니 PCR 방법을 이용하여 DNA를 추출하였다. 순수균 및 멸균 증류수를 포함하는 분취량을 95℃ heat block에서 3분 동안 반응시키고 이를 3회 반복하였다. 상층액(supernatant)을 회수하여 PCR 주형(template)으로 사용하고, 16S rDNA 유전자 증폭을 위해 서열번호 1 및 서열번호 2로 기재된 프라이머를 사용하여 PCR에 의해 증폭하였다.

[0043] 5'-TCCTACGGG AGGCAGCAG-3' (서열번호 1, 340F)

[0044] 5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3' (서열번호 2, 805R)

[0045] 증폭 조건은 첫 번째 단계에서 초기변성이 95℃ 에서 3분, 그 후 95℃ 에서 30초, 55℃에서 30초, 72℃에서 30초를 35회 수행하였고, 이후 72℃에서 5분동안 연장 반응을 수행하였다. 증폭한 PCR 산물을 시퀀싱하여 염기서열을 분석하였다(Macrogen, Seoul, Korea). 분석된 염기서열은 Basic Local Alignment Search Tool(BLAST) 알고리즘을 사용하여 진뱅크 데이터베이스(GenBank database)와 비교함으로써 유사성이 가장 높은 균주를 검색하였다.

[0046] 검색 결과, 상기 균주는 아조스피라 속(*Azospira* sp.)으로 동정되었고, 이를 아조스피라 속 HJ23로 명명하였다. 아조스피라 속 HJ23 균주의 16S rDNA 염기서열(서열번호 3)에 대한 분석 결과는 하기 표 1과 같다. 상기 분석한 염기서열에 대하여 Clustral X 소프트웨어 (version 2.1) 및 neighbor-joining 방법을 사용하여 염기서열 간 진화적 거리와 계통도를 추론하고, 그 결과로서 HJ23 균주와 유사한 N_2O 환원 균주와의 계통발생학적 트리를 도 1에 나타내었다.

표 1

[0047]

TGAGCGTCAGTACTAACCCAGGGGGCTGCCTTCGCCATCGGTATTCCTCCACATCTCTACGCATTTCACTGCTACACGTGGAATTCTACCCCC CTCTGCCGTACTCTAGCCTCGCAGTCACAAACGCAGTTCCCAGGTTGAGCCCGGGGATTTCACGTCTGTCTTACGAAACCGCCTGCGCACGCT TTACGCCCAGTAATTCCGATTAACGCTCGCACCCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGGTGCTTCTTATGCGGGTACCGTC ATCAACAACGGATATTAGCCGTTGCCATTTCTTCCCCGCCGAAAGAGCTTTACAACCCGAAGGCCTTCTTCACTCACGCGGCATGGCTGGATC AGGGTTGCCCCCATTGTCCAAAATTCCACACTGCTGT (서열번호 3)

[0049] 계통발생학적 분석 결과, 도 1에 나타낸 바와 같이 본 발명의 아조스피라 속 HJ23 균주는 로도박터 속(*Rhodobacter* sp.)과 유사도가 가장 높음을 알 수 있었다. 본 발명자들은 상기 균주를 "*Azospira* sp. HJ23"으로 명명하였으며, 한국생명공학연구원에 2019년 06월 19일자로 기탁하였다(KCTC13866BP).

[0051] **실시예 3. 본 발명의 아조스피라 속 HJ23 균주의 N_2O 환원 활성**

[0052] 본 발명의 아조스피라 속 HJ23 균주의 N_2O 환원 활성을 평가하기 위해, HJ23 균주를 200mL의 영양 배지에 접종한 후, 호기성 조건 하에서 30℃에서 120 rpm 조건으로 48시간 동안 배양하였다. 전배양액을 증류수로

세척하고, 획득된 세포 펠렛을 PBS (pH 7.0)로 부유시켜 OD600 값이 1.0이 되도록 조정하였다. 흡광도값은 분광광도계 Biochrom Libra S22, Cambridge, UK)를 사용하여 600 nm에서 측정하였다. 상기와 같은 방법으로 탈질 활성을 보유하고 있지 않은 *Bacillus* sp. 42(실시예 2의 균주 분리 과정에서 수득)를 사용하여 세포 부유액(cell suspension)을 제조하고, 상기 세포 부유액 200 μL의 최종 OD_{600} 값이 0.07이 되도록 120 mL 혈청 병에서 20 mL의 새로운 합성폐수와 혼합하였다. 동일한 방법으로, 아조스피라 속 HJ23 균주(*Azospira* sp. HJ23) 및 탈질 활성을 보유하고 있지 않은 균주를 동일 부피비로 혼합한 실험군(1:1, v/v) 및 대조군(합성폐수)의 N_2O 환원 활성도 평가하였다. N_2O 240 ppm을 각 병에 주입하고, 헤드스페이스의 N_2O 농도를 모니터링하였다. 모든 실험은 3회 반복으로 진행하였다. 그 결과를 도 2에 나타내었다.

[0053] 도 2에 나타낸 바와 같이, N_2O는 250분 내에 본 발명의 아조스피라 속 HJ23 균주에 의해 완전히 소비됨을 확인하였다. 반면, 대조군과 탈질 활성을 보유하고 있지 않은 균주인 *Bacillus* sp. 42의 경우 실험 시작 5시간 후에도 N_2O 소비가 관찰되지 않았다. 상기 결과를 통해, 본 발명의 아조스피라 속 HJ23 균주는 아산화질소를 효과적으로 환원 시킬 수 있는 미생물임을 확인하였다. 한편, 아조스피라 속 HJ23 균주 및 탈질 활성을 보유하고 있지 않은 바실러스 속 균주를 혼합한 경우, 아조스피라 속 HJ23 단독 실험군과 비교하여 HJ23 균주가 절반밖에 포함되지 않았음에도 200분 내에 모든 N_2O가 소비됨을 확인하였다. 상기 결과를 통해, 아조스피라 속 HJ23 균주 및 탈질 활성을 보유하고 있지 않은 균주는 N_2O 환원에 있어서 단독 처리 시보다 N_2O 환원을 향상시키는 시너지 효과를 나타낼 수 있음을 확인하였다.

[0055] **실시예 4. 탈질에 관여하는 기능성 유전자의 정량적 분석**

[0056] 본 발명의 아조스피라 속 HJ23 균주의 농화 배양액으로부터 NucleoSpin® Soil Kit (Macherey-Nagel GmbH, Duren, ermany)를 사용하여 설명서에 따라 DNA를 추출하였다. 추출된 DNA를 박테리아 16S rRNA 유전자 및 다음과 같은 탈질 기능성 유전자의 정량 분석에 사용하였다: narG(질산염 환원, nitrate reductase gene), nirK(아질산염 환원, nitrite reductase gene), norB(일산화질소 환원, nitric oxide reductase gene), nosZ(아산화질소 환원, nitrous oxide reductase gene). 실시간 PCR을 CFX96™ Real-Time System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)을 사용하여 수행하였으며, 각 유전자를 증폭하기 위해 사용한 모든 프라이머를 하기 표 2에 나타내었다.

표 2

[0057]

이름	서열(5'-3')	서열번호
narG(정방향)	5'-TCGCCSATYCCGGCSATGTC-3'	4
narG(역방향)	5'-GAGTTGTACCAGTCRGCSGAYTCSG-3'	5
nirK(정방향)	5'-ATYGGCGGVCAYGGCGA-3'	6
nirK(역방향)	5'-GCCTCGATCAGRTTRTGGTT-3'	7
norB(정방향)	5'-CGNGARTTYCTSGARCARCC-3'	8
norB(역방향)	5'-TGCAKSAR RCCCCABACBCC-3'	9
nosZ(정방향)	5'-CGCTACGGCAASAAGGTSMSSGT-3'	10
nosZ(역방향)	5'-CAKRTGCAKSGCRTGGCAGAA-3'	11

[0058]

[0059] 도 3에 나타낸 바와 같이, 호기성 조건 하에서 본 발명의 아조스피라 속 HJ23 균주는 아질산염에서 일산화질소를 거쳐 아산화질소로 환원시키는 과정에 관여하는 nirK 및 norB 유전자에 대하여 상대적으로 높은 발현량을 나타냄을 확인하였다. 또한, narG 및 nosZ 유전자의 발현이 확인되어 본 발명의 아조스피라 속 HJ23 균주의 질산염 및 아산화질소에 대한 환원 활성을 확인하였다.

[0061] **실시예 5. 본 발명의 아조스피라 속 HJ23 균주의 N_2O 환원의 최적 조건 탐색**

[0062] 본 발명의 아조스피라 속 HJ23 균주의 N_2O 환원 활성에 대한 폐수의 C/N 비율, pH, 온도 및 N_2O 농도의 영향을

평가하였다. OD600 값이 1.0인 세포 부유액 200 μL를 20 mL 합성폐수를 포함하는 120 mL 혈청 병에 접종하고, 질소(N_2) 가스로 퍼지(purge)한 후 혐기성 조건을 유지하기 위해 부틸고무마개로 밀봉하였다. 이를 30℃에서 120 rpm으로 2-7일 동안 진탕배양하였다. N_2O 환원 속도는 헤드스페이스의 N_2O 농도가 약 100 ppmv가 된 시점에서 N_2O 주입 시점으로부터 소요된 시간에 대한 건조 세포 무게(Dry Cell Weight, DCW) 감소량으로 계산하였다. 모든 실험은 3회 반복으로 진행하였고, 통계적 유의성은 REGWQ(Ryan-Einot-Gabriel-Welsch Q) 다중 범위 검정을 통해 분석하였다(Microsoft Excel 2016; Microsoft Co., Redmond, WA, USA).

[0064] **5-1. C/N 비율의 영향**

[0065] C/N 비율에 따른 영향을 알아보기 위해 C/N 비율을 각각 15, 31, 62, 125 및 188 (mol-C · mol N^{-1})로 하여 N_2O 환원 활성을 조사하였다. 탄소원으로는 아세테이트(acetate)/글루코스(glucose)의 혼합물(COD 비율 1:1), 아세테이트, 글루코스, 에탄올 및 메탄올을 사용하였다. 대조군은 C/N 비율을 62로 하였다.

[0066] 그 결과, 도 4에 나타낸 바와 같이, N_2O는 C/N 비율과 무관하게 300분 이내에 모두 소비됨을 확인하였으며, 특히, C/N 비율 62에서는 N_2O 농도가 지연기(lag phase) 없이 감소하고 200 분이 지난 시점에서 모든 N_2O가 소비되어 N_2O가 가장 빠르게 환원되는 최적 조건임을 확인하였다. 각 C/N 비율에서의 N_2O 환원 속도를 하기 표 3 및 도 5의 (a)에 나타내었다.

표 3

[0067]

C/N 비율 (mol · mol^{-1})	N_2O 환원 속도 (μg-N · g-dry cell $weight^{-1}$ · h^{-1})
15	7263.8 ± 1250.09
31	9341.57 ± 1296.41
62	12575.74 ± 534.47
125	4253.86 ± 881.62
188	1222.75 ± 1626.35

[0069] **5-2. pH의 영향**

[0070] pH에 따른 영향을 알아보기 위해 pH를 5, 6, 7, 8 및 9로 하여 N_2O 환원 활성을 조사하였다. 대조군은 pH 7로 하였다.

[0071] 그 결과, 도 5의 (b)에 나타낸 바와 같이, pH 5 내지 7의 범위에서 안정적인 N_2O 환원 속도(1, 1.28)를 나타냄을 확인하였다.

[0073] **5-3. 온도의 영향**

[0074] 온도에 따른 영향을 알아보기 위해 온도를 4, 10, 20, 30, 37 및 40℃로 하여 N_2O 환원 활성을 조사하였다. 대조군은 30℃로 하였다.

[0075] 그 결과, 도 5의 (c)에 나타낸 바와 같이, N_2O는 37℃ 및 40℃에서 가장 빠르게 환원됨을 확인하였다(각각 1.97, 2.01±0.08). 한편, 20℃의 낮은 농도에서는 환원 속도가 0.36으로 현저히 낮음을 확인하였다.

[0077] **5-4. N_2O 농도의 영향**

[0078] N_2O 농도에 따른 영향을 알아보기 위해 N_2O 농도를 50, 100, 200, 500, 1000 및 2000 ppm으로 하여 N_2O 환원 활

성을 조사하였다. 대조군은 호기성 조건 하에서 N_2O 가스 농도 200 ppmv로 하였다.

[0079] 그 결과, 도 5의 (d)에 나타낸 바와 같이, N_2O 환원 속도는 N_2O 농도 50 내지 200 ppm에서 0.77 내지 1 정도로 나타났으나, 500 ppm에서 4.94로 현저히 증가하고, 1000 ppm에서는 9.76까지 증가하여 농도의존적으로 N_2O 환원 속도가 급격하게 증가함을 확인하였다.

[0080] 상기 결과를 통해, 본 발명의 아조스피라 속 HJ23 균주의 아산화질소 환원 속도를 증가시키는 최적 조건은 C/N 비율 62, pH 5 내지 7, 온도 37℃ 내지 40℃, N_2O 농도 500 ppm 이상임을 확인하였다.

[0082] **실시예 6. 본 발명의 아조스피라 속 HJ23 균주의 탈질화**

[0083] 본 발명의 아조스피라 속 HJ23 균주의 아산화질소 환원 활성 외에, 탈질 작용(denitrification)에 대한 활성을 확인하기 위해, 질산염(nitrate, NO_3^-)과 아질산염(nitrite, NO_2^-)을 각각 166 mg/L와 18 mg/L 주입한 조건에서 탈질화 활성을 조사하였다. 본 발명의 아조스피라 속 HJ23 균주의 농화 배양액으로부터 얻은 세포 부유액을 100 mL의 합성폐수를 포함하는 1.2 L 혈청 병에 접종하고, 질소(N_2) 가스로 퍼지(purge)한 후 부틸고무마개로 밀봉하여 30℃에서 120 rpm 조건으로 배양하였다. 이온 크로마토그래피(ion chromatography, IC; 883 Basic IC plus, Metrohm AG, Switzerland)를 통해 질산염 및 아질산염 농도를 측정하였다. 헤드스페이스의 N_2O 농도는 가스 크로마토그래피를 이용하여 측정하였다. 모든 실험은 3회 반복으로 수행하였다.

[0084] 그 결과, 도 6에 나타낸 바와 같이 본 발명의 아조스피라 속 HJ23 균주는 질산염과 아질산염을 환원할 수 있는 탈질세균임을 확인하였다.

[0086] 상기 결과를 통해, 본 발명의 아조스피라 속 HJ23 균주는 아산화질소 환원 활성이 우수하고, 고농도의 아산화질소도 빠른 속도로 환원시킬 수 있어 온실가스 저감 기술에 널리 활용될 수 있음을 확인하였다.

[0088] 이상, 본 발명의 바람직한 실시 예에 대하여 상세히 설명하였으나, 본 발명의 기술적 범위는 전술한 실시 예에 한정되지 않고 특허청구범위에 의하여 해석되어야 할 것이다. 이때, 이 기술분야에서 통상의 지식을 습득한 자라면, 본 발명의 범위에서 벗어나지 않으면서도 많은 수정과 변형이 가능함을 고려해야 할 것이다.

수탁번호

[0090]

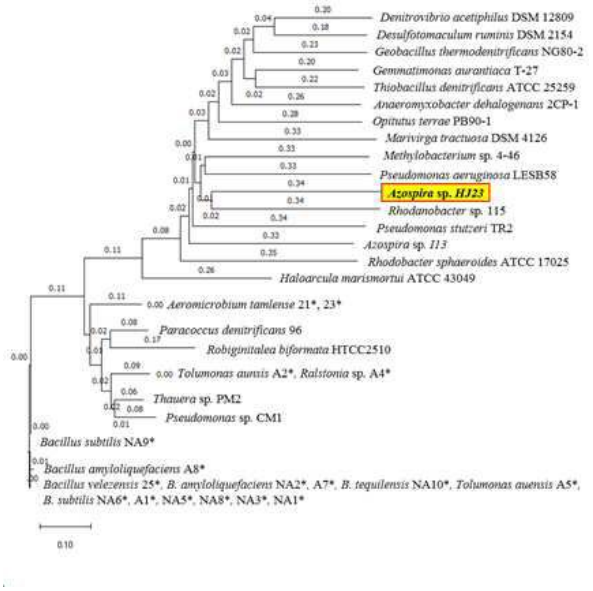
기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC13866BP

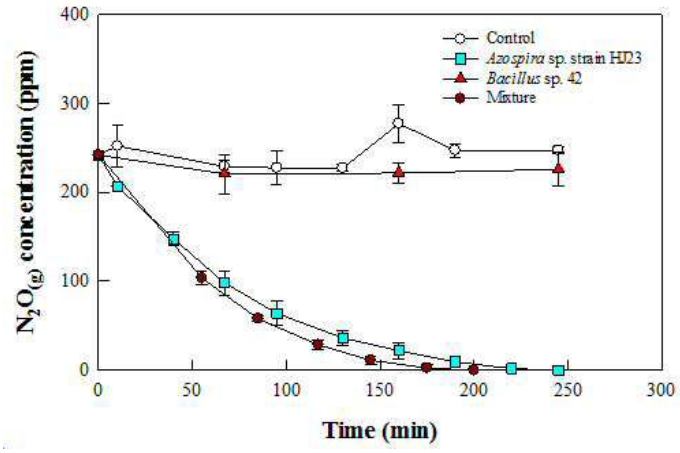
수탁일자 : 20190619

도면

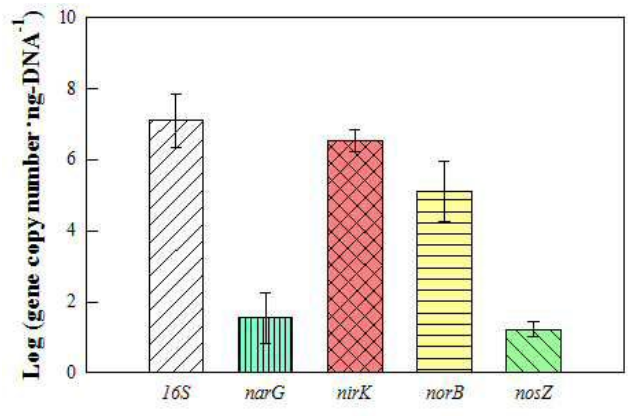
도면1



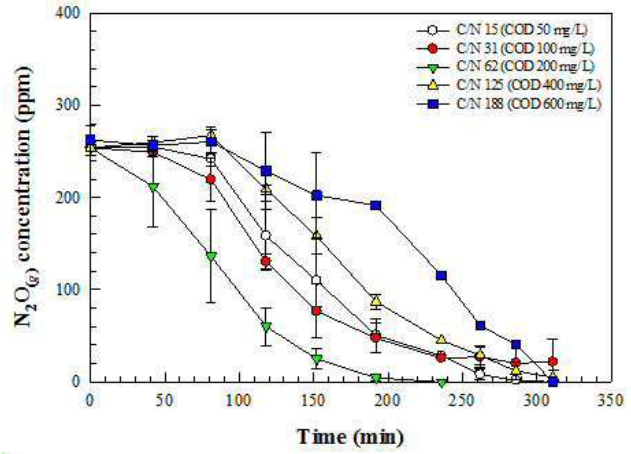
도면2



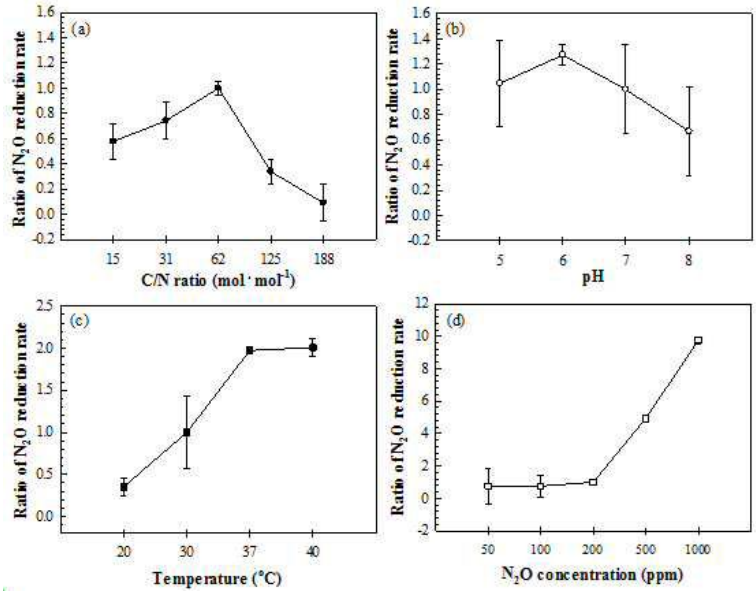
도면3



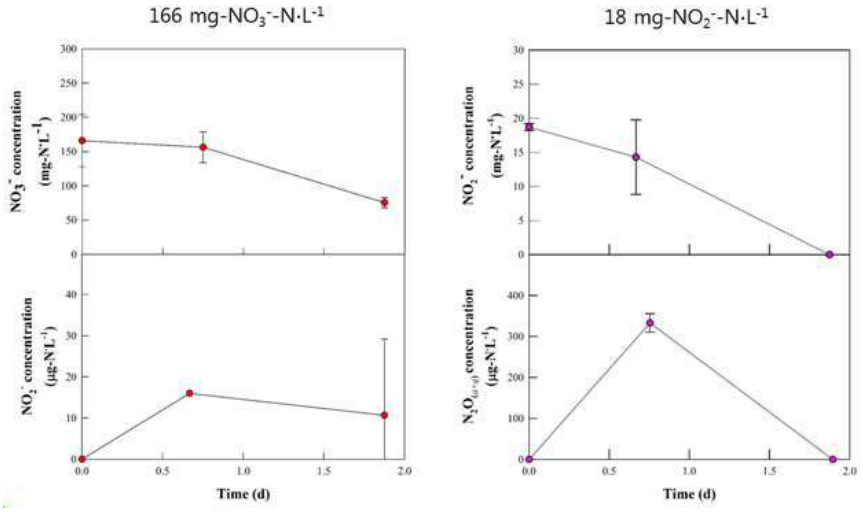
도면4


C/N 15 (COD 50 mg/L)
C/N 31 (COD 100 mg/L)
C/N 62 (COD 200 mg/L)
C/N 125 (COD 400 mg/L)
C/N 188 (COD 600 mg/L)
$N_2O_{(g)}$ concentration (ppm)
Time (min)

도면5


(a)
Ratio of N_2O reduction rate
C/N ratio (mol·mol^{-1})
(b)
pH
(c)
Temperature (°C)
(d)
N_2O concentration (ppm)

도면6



서 열 목 록

<110> Ewha University - Industry Collaboration Foundation

<120> Novel Azospira sp. Bacterium and method for reducing nitrous oxide using the same

<130> EWHA1-62

<160> 11

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 340F

<400> 1

tcctacggga ggcagcag 18

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 805R

<400> 2

gactachvgg gtatctaatc c 21

<210> 3

<211> 409

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> HJ23 16S rDNA

<400> 3

tgagcgtcag tactaaccca gggggctgcc ttcgccatcg gtattcctcc acatctctac 60

gcatttcact gctacacgtg gaattctacc cccctctgcc gtactctagc ctcgcagtca 120

caaacgcagt tcccaggttg agcccgggga tttcacgtct gtcttacgaa accgcctgcg 180

cacgctttac gcccagtaat tccgattaac gctcgcaccc tacgtattac cgcggctgct 240

ggcacgtagt tagccggtgc ttcttatgcg ggtaccgtca tcaacaacgg atattagccg 300

ttgccatttc ttccccgccg aaagagcttt acaacccgaa ggccttcttc actcacgcgg 360

catggctgga tcagggttgc ccccattgtc caaaattcca cactgctgt 409

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> narG F

<400> 4

tcgccsatyc cggcsatgtc 20

<210> 5

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> narG R

<400> 5

gagttgtacc agtcrgcsga ytcsg 25

<210> 6

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nirK F

<400> 6

atyggcggvc ayggcga 17

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nirK R

<400> 7

gcctcgatca grttrtggtt 20

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> norB F

<400> 8

cgngarttyc tsgarcarcc 20

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> norB R

<400> 9

tgcaksarrc cccabacbcc 20

<210> 10

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nosZ F

<400> 10

cgctacggca asaaggtsms sgt 23

<210> 11

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nosZ R

<400> 11

cakrtgcaks gcrtggcaga a 21