(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0009512
(43) 공개일자 2019년01월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 7/06 (2006.01) *C01D 15/00* (2006.01)
C02F 3/34 (2017.01) *C07K 14/705* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 7/06 (2013.01)
C01D 15/00 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0091333
(22) 출원일자 2017년07월19일
심사청구일자 2017년07월19일
기술이전 희망 : 기술양도

(71) 출원인
울산대학교 산학협력단
울산광역시 남구 대학로 93(무거동)
(72) 발명자
홍순호
울산광역시 남구 굴화4길 20, 112동 601호(무거동, 굴화주공1차아파트)
(74) 대리인
위병갑

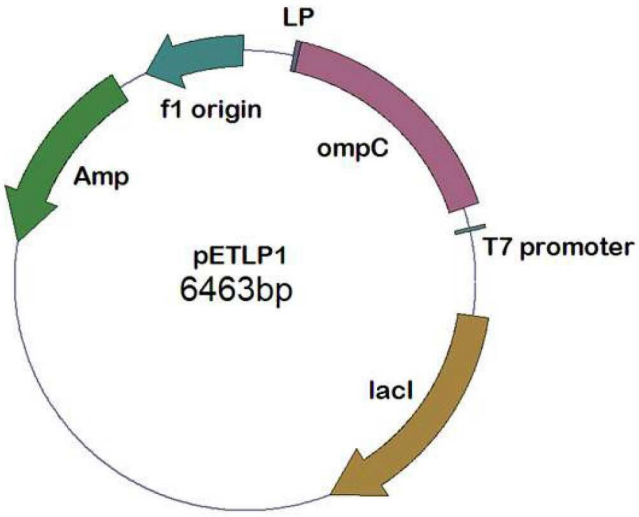
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 **리튬 결합 펩티드의 표면 발현 벡터 및 이에 의해 형질전환된 미생물**

(57) 요 약

본 발명은 세포 표면 발현 시스템을 이용하여 리튬 흡착 미생물을 제조하는 방법 및 이를 이용하여 폐수 또는 해수로부터 리튬을 회수하는 방법에 대한 것이다.

대 표 도 - 도1a



(52) CPC특허분류
C02F 3/34 (2013.01)
C07K 14/705 (2013.01)
C07K 2319/00 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 PJ01111601
부처명 농촌진흥청
연구관리전문기관 농촌진흥청
연구사업명 차세대바이오그린21
연구과제명 효소집적화 전략을 통한 신규 감마아미노부틸산 대사회로 합성
기 여 율 1/1
주관기관 울산대학교 산학협력단
연구기간 2015.01.15 ~ 2017.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

서열번호 1 내지 3 중 어느 하나로 표시되는 염기 서열로 이루어진 OmpC(outer membrane protein C)를 코딩하는 유전자 및 서열번호 4 또는 9로 표시되는 염기 서열로 이루어진 리튬 결합 펩티드를 코딩하는 유전자가 융합된 뉴클레오티드 서열.

청구항 2

서열번호 1 내지 3 중 어느 하나로 표시되는 염기 서열로 이루어진 OmpC(outer membrane protein C)를 코딩하는 유전자 및 서열번호 4 또는 9로 표시되는 염기 서열로 이루어진 리튬 결합 펩티드를 코딩하는 유전자를 포함하는 세포 표면 발현용 재조합 벡터.

청구항 3

제 2 항에 있어서, 상기 리튬 결합 펩티드는 (GPGAP)n 또는 (GPGNP)n의 아미노산 서열로 이루어지며, 여기에서 n은 1 또는 2인 것인 세포 표면 발현용 재조합 벡터.

청구항 4

제 2 항에 있어서, 상기 세포 표면 발현용 재조합 벡터는 T7 프로모터를 포함하는 것인 세포 표면 발현용 재조합 벡터.

청구항 5

제 2 항 내지 제 4 항 중 어느 한 항에 따른 세포 표면 발현용 재조합 벡터로 형질전환된 미생물.

청구항 6

제 5 항에 있어서, 상기 미생물은 대장균, 살모넬라 타이피, 살모넬라 타이피뮤리움, 비브리오 콜레라, 마이코박테리움 보비스, 시겔라, 바실러스, 유산균, 스테필로코커스, 코리네 박테리아, 리스테리아 모노싸이토제네스 및 스트랩코커스로 이루어지는 군으로부터 선택된 것인 미생물.

청구항 7

제 5 항에 따른 형질전환된 미생물을 배양하여 리튬 결합 펩티드를 세포 표면에 발현하는 단계; 및

상기 리튬 결합 펩티드가 표면에 발현된 미생물을 회수하는 단계

를 포함하는 리튬 결합 펩티드의 세포 표면 발현 방법.

청구항 8

제 7 항에 있어서, 상기 발현하는 단계에서 0.1 내지 0.3 mM의 IPTG(isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside)를 추가하는 것인 방법.

청구항 9

제 5 항에 따른 형질전환된 미생물 또는 제 7 항의 방법에 따라 리튬 결합 펩티드가 세포 표면 발현된 미생물을 포함하는 리튬 회수용 조성물.

청구항 10

제 5 항에 따른 형질전환된 미생물 또는 제 7 항의 방법에 따라 리튬 결합 펩티드가 세포 표면 발현된 미생물을 이용하여 폐수 또는 해수로부터 리튬을 회수하는 방법.

청구항 11

제 10 항에 있어서, 상기 회수된 리튬은 나노입자의 형태인 것인 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 리튬 결합 펩티드를 세포 표면 발현 시스템에 도입하여 리튬을 흡착하는 미생물, 이의 제조 방법 및 이를 이용하여 리튬을 흡착하는 방법에 대한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 리튬은 모바일폰, 랩탑, 디지털 카메라, 전기 자동차 및 다수의 전자 기기에서의 충전가능한 배터리로서 널리 사용된다. 리튬 배터리의 수요는 매해 25%까지 성장하며 국제적 소비는 2020년까지 연간 300,000 메트릭 톤까지 증가할 것으로 예상되고 있다. 따라서, 국제적 소비의 증가에 따라 환경에서 리튬 폐기가 증가될 수 있어, 리튬 오염의 독성이 심각한 건강 문제 및 환경적 위험을 야기할 수 있다.

[0003] 이에 따라, 오염된 폐수 또는 해수로부터 리튬을 효과적으로 제거하거나 회수하는 환경 친화적 시스템 기술 창출에 대한 관심이 증가하고 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0004] (특허문헌 0001) 한국등록특허 10-0690948호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 상기와 같은 문제를 해소하기 위해, 본 발명은 리튬 결합 펩티드를 세포 표면 발현 시스템에 도입하여 리튬을 흡착하는 미생물을 제조함으로써, 리튬이 오염된 환경, 예를 들어, 폐수 또는 해수로부터 리튬을 효과적으로 제거 또는 회수하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0006] 상기의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1 내지 3 중 어느 하나로 표시되는 염기 서열로 이루어진 OmpC(outer membrane protein C)를 코딩하는 유전자 및 서열번호 4 또는 9로 표시되는 염기 서열로 이루어진 리튬 결합 펩티드를 코딩하는 유전자가 융합된 뉴클레오티드 서열을 제공한다.

[0007] 또한, 본 발명은 서열번호 1 내지 3 중 어느 하나로 표시되는 염기 서열로 이루어진 OmpC(outer membrane protein C)를 코딩하는 유전자 및 서열번호 4 또는 9로 표시되는 염기 서열로 이루어진 리튬 결합 펩티드를 코딩하는 유전자를 포함하는 세포 표면 발현용 재조합 벡터를 제공한다.

[0008] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 리튬 결합 펩티드는 (GPGAP)n 또는 (GPGNP)n의 아미노산 서열로 이루어지며, 여기에서 n은 1 또는 2일 수 있다.

[0009] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 세포 표면 발현용 재조합 벡터는 T7 프로모터를 포함할 수 있다.

[0010] 또한, 본 발명은 상기 본 발명의 세포 표면 발현용 재조합 벡터로 형질전환된 미생물을 제공한다.

[0011] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 미생물은 대장균, 살모넬라 타이피, 살모넬라 타이피뮤리움, 비브리오 콜레라, 마이코박테리움 보비스, 시겔라, 바실러스, 유산균, 스테필로코커스, 코리네 박테리아, 리스테리아 모노싸이토제네스 및 스트랩코커스로 이루어지는 군으로부터 선택된 것일 수 있다.

[0012] 또한, 본 발명은 상기 본 발명에 따른 형질전환된 미생물을 배양하여 리튬 결합 펩티드를 세포 표면에 발현하는 단계; 및 상기 리튬 결합 펩티드가 표면에 발현된 미생물을 회수하는 단계를 포함하는 리튬 결합 펩티드의 세포

표면 발현 방법을 제공한다.

[0013] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 발현하는 단계에서 0.1 내지 0.3 mM의 IPTG(isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside)를 추가할 수 있다.

[0014] 또한, 본 발명은 상기 본 발명에 따른 형질전환된 미생물 또는 상기 본 발명에 따른 세포 표면 발현 방법에 따라 리튬 결합 펩티드가 세포 표면 발현된 미생물을 포함하는 리튬 회수용 조성물을 제공한다.

[0015] 또한, 본 발명은 상기 본 발명에 따른 형질전환된 미생물 또는 상기 본 발명에 따른 세포 표면 발현 방법에 따라 리튬 결합 펩티드가 세포 표면 발현된 미생물을 이용하여 폐수 또는 해수로부터 리튬을 회수하는 방법을 제공한다.

[0016] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 회수된 리튬은 나노입자 형태일 수 있다.

발명의 효과

[0017] 본 발명은 리튬 결합 펩티드를 세포 표면 발현 시스템에 도입하여 리튬을 흡착하는 미생물을 제조함으로써 오염된 환경으로부터 환경 친화적으로 리튬을 제거 또는 회수할 수 있는 기술을 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0018] 도 1a 및 1b는 각각 본 발명의 일 실시예에 따른 리튬 결합 펩티드 (a) LBP3 (단량체) 및 (b) LP1(단량체)을 가지며 T7 프로모터에 의해 조절되는 (a) pETLBP3 및 (b) pETLP1 플라스미드의 구조를 나타낸 개열지도이다.

도 2a 및 2b는 본 발명의 일 실시예에 있어서 OmpC과 결합된 (a) LBP3 및 (b) LP1 리튬 결합 펩티드의 발현을 나타내는 SDS-PAGE 분석 결과이다. A: 단량체, B: 이량체 (M-protein marker, IPTG concentration in mM).

도 3은 본 발명의 일 실시예에 있어서 IPTG 농도에 따른 pETLP1을 보유한 *E. coli* 균주에 의한 리튬 흡착을 평가한 결과이다.

도 4a는 본 발명의 일 실시예에 있어서 pETLBP3을 포함하는 재조합 E. coli에 의한 리튬의 생물-흡착의 평가 결과를 나타낸 것이다.

도 4b는 본 발명의 일 실시예에 있어서 pETLP1을 포함하는 재조합 E. coli에 의한 시간에 따른 리튬의 생물-흡착의 평가 결과를 나타낸 것이다.

도 4a는 본 발명의 일 실시예에 있어서 pETLP1을 포함하는 재조합 E. coli에 의한 리튬의 생물-흡착의 평가 결과를 나타낸 것이다.

도 5a 및 5b는 본 발명의 일 실시예에 있어서 인공 폐수에서의 (a) LBP3 및 (b) LP1 리튬 결합 펩티드의 리튬의 생물-흡착 결과를 나타낸 것이다.

도 6a 및 6b은 본 발명의 일 실시예에 있어서 리튬 배터리 오염 폐수에서의 (a) LBP3 및 (b) LP1 리튬 결합 펩티드의 리튬의 생물-흡착 결과를 나타낸 것이다.

도 7은 본 발명의 일 실시예에 있어서 OmpC-LBP3 펩티드의 분자 모델링 구조를 나타낸 것이다. 빨간색 구는 가능한 리튬 결합 부위이다.

도 8a는 본 발명의 일 실시예에 있어서 생물-흡착된 리튬의 현미경 이미지를 나타낸 것이다. A: BL21의 FE-SEM 이미지, B: LBP3을 발현하는 E. coli의 FE-SEM 이미지, C: BL21의 TEM 이미지, D: LBP3을 발현하는 E. coli의 TEM 이미지 (화살표는 나노입자의 위치를 나타냄)

도 8b는 본 발명의 일 실시예에 있어서 생물-흡착된 리튬의 FE-SEM 현미경 이미지를 나타낸 것이다.

도 8c는 본 발명의 일 실시예에 있어서 생물-흡착된 리튬의 TEM 현미경 이미지를 나타낸 것이다.

도 9는 본 발명의 일 실시예에 있어서 LBP3을 발현하는 E. coli의 라만 스펙트럼 결과이다.

도 10은 본 발명의 일 실시예에 있어서 (a) 리튬, 납 및 구리를 함유하는 합성 폐수 및 (b) 코발트, 크롬, 은 및 리튬을 함유하는 합성 폐수에서 야생형 균주 및 본 발명의 재조합 균주의 리튬 흡착을 비교한 그래프이다.

도 11은 본 발명의 일 실시예에 있어서 리튬을 함유하는 인공 해수에서 대조 균주 및 본 발명의 재조합 재조합 균주의 리튬 흡착을 비교한 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0019] 본 발명에서 사용되는 용어에 대한 정의는 이하와 같다.

[0020] 본 발명의 명세서 전체에서 용어 "유전자"는 유전적 기능이 관련되어 있는 핵산 분자(염색체, 플라스미드 등)의 뉴클레오티드 서열을 의미한다. 유전자는, 예를 들어, 유기체의 게놈 내의 특정 물리적 위치("유전자좌")를 차지하는 폴리뉴클레오티드 서열(예를 들어, 포유동물의 DNA 서열)을 포함하는, 유기체의 유전 단위이다. 유전자는 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드와 같은 발현 생산물을 코딩할 수 있다. 일반적으로, 유전자는 폴리펩티드 코딩 서열과 같은 코딩 서열 및 프로모터 서열, 폴리아데닐화 서열, 전사 조절 서열(예를 들어, 인핸서 서열)과 같은 비코딩 서열을 포함한다. 다수의 진핵생물 유전자가 "인트론"(비코딩 서열)이 개재되어 있는 "엑손"(코딩 서열)을 갖는다.

[0021] 본 발명의 명세서 전체에서 용어 "형질전환 또는 트랜스펙션"은 세포외부 DNA가, 수반물질이 있고 없는 상태로 숙주 세포로 들어가는 과정을 의미한다. "트랜스펙션된 세포"란 세포 외부 DNA가 세포 내로 도입되어 세포 외부 DNA를 가지고 있는 세포를 가리킨다. DNA는 세포로 도입되어 핵산이 염색체에 삽입되거나 혹은 염색체 외 물질로 복제될 수 있다.

[0022] 본 발명의 명세서 전체에서 용어 "벡터" 또는 "플라스미드"는 삽입된 핵산 분자를 숙주 세포 내 및/또는 사이로 전달하는 핵산 분자, 바람직하게 는 자가-복제성 핵산 분자를 의미한다. 이 용어는 1차적으로 DNA 또는 RNA의 세포 내로의 삽입을 위해 기능하는 벡터, 1차적으로 DNA 또는 RNA의 복제를 위해 기능하는 벡터의 복제물, 및 DNA 또는 RNA의 전사 및/또는 번역을 위해 기능하는 발현 벡터를 포함한다. 또한, 하나 초과의 상기 기능을 제공하는 벡터도 포함된다. "발현 벡터"는 적절한 숙주 세포 내로 도입될 때 폴리펩티드(들)로 전사 및 번역될 수 있는 폴리뉴클레오티드이다. "발현 시스템"은 대체로 요구되는 발현 생산물을 생산하도록 기능할 수 있는 발현 벡터를 포함하는 적합한 숙주 세포를 의미한다.

[0023] 본 발명의 명세서 전체에서 용어 "~로부터 얻은" 또는 "~유래의" 이란 예를 들어, 소정 유기체, 전형적으로 미생물과 같은 특정 공급원으로부터 단리되거나, 이로부터 유도된 폴리뉴클레오티드 추출물 또는 폴리펩티드 추출물 등과 같은 샘플을 의미한다. 또한 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드 서열이 특정 유기체 또는 미생물로부터 단리 되거나, 이로부터 유도된 상황도 의미할 수 있다.

[0024] 본 발명의 명세서 전체에서 용어 "재조합" 미생물은 전형적으로, 예컨대 플라스미드 또는 벡터에 하나 이상의 외래 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0025] 본 명세서를 통해, 문맥에서 달리 필요하지 않으면, "포함하다" 및 "포함하는"이란 말은 제시된 단계 또는 원소, 또는 단계 또는 원소들의 군을 포함하나, 임의의 다른 단계 또는 원소, 또는 단계 또는 원소들의 군이 배제되지는 않음을 내포하는 것으로 이해하여야 한다.

[0026] 본 발명에서 사용되는 모든 기술용어는, 달리 정의되지 않는 이상, 본 발명의 관련 분야에서 통상의 당업자가 일반적으로 이해하는 바와 같은 의미로 사용된다. 또한, 본 명세서에는 바람직한 방법이나 시료가 기재되나, 이와 유사하거나 동등한 것들도 본 발명의 범주에 포함된다. 본 명세서에 참고문헌으로 기재되는 모든 간행물의 내용은 본 발명에 도입된다.

[0028] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0029] 본 발명은 세포 외막 단백질을 코딩하는 유전자와 및 리튬 결합 펩티드를 코딩하는 유전자가 융합된 뉴클레오티드 서열, 이를 포함하는 세포 표면 발현용 재조합 벡터, 이 벡터로 형질전환된 미생물, 이 미생물을 포함하는 리튬 회수용 조성물, 리튬 결합 펩티드의 세포 표면 발현 방법 및 리튬 회수 방법에 관한 것이다.

[0030] 구체적으로, 서열번호 1 내지 3 중 어느 하나로 표시되는 염기 서열로 이루어진 OmpC(outer membrane protein C)를 코딩하는 유전자 및 서열번호 4 또는 9로 표시되는 염기 서열로 이루어진 리튬 결합 펩티드를 코딩하는 유전자가 융합된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 세포 표면 발현용 재조합 벡터를 제조하고, 이를 미생물에 형질전환시킨 후 리튬 결합 펩티드를 세포 표면에 발현시켜 리튬을 흡착할 수 있는 재조합 미생물을 제공한다.

[0031] 상기 OmpC는 N 말단으로부터 2번째(서열번호 1), 6번째(서열번호 2) 또는 8번째(서열번호 3) 루프에서 절단된 OmpC를 포함하는 것일 수 있다.

[0032] 상기 뉴클레오티드 서열은 GGCCCGGGCGCGCCG(서열번호 4) 또는 GGCCCGGGCAACCCG(서열번호 9)의 염기서열을 포함하는 리튬 결합 펩티드 유전자가 8번 루프(993 bp)에서 절단된 *ompC* 유전자의 C-말단에 결합되어 형성된 것일 수 있다. 상기 리튬 결합 펩티드가 이량체일 경우 GGCCCGGGCGCGCCG(서열번호 2) 또는 GGCCCGGGCAACCCG(서열번호 7)가 2회 반복된 염기 서열을 포함하는 리튬 결합 펩티드 유전자가 8번 루프(993 bp)에서 절단된 *ompC* 유전자의 C-말단에 결합되어 형성된 것일 수 있다.

[0033] 상기 리튬 결합 펩티드는 (GPGAP)n 또는 (GPGNP)n(여기에서 n은 1 또는 2임)의 아미노산 서열을 포함할 수 있으며, 예를 들어, GPGAP 또는 의 아미노산 서열을 갖는 단량체 형태의 리튬 결합 펩티드이거나 $(GPGAP)_2$ 또는 $(GPGNP)_2$의 아미노산 서열을 갖는 이량체 형태의 리튬 결합 펩티드일 수 있다.

[0034] 본 발명은 당해 분야에 통상의 기술을 가진 자에게 공지된 표준 클로닝 기술 및 통상적인 방법을 이용하여, 세포 외막 단백질을 코딩하는 유전자와 및 리튬 결합 펩티드를 코딩하는 유전자가 융합된 뉴클레오티드 서열을 기본 벡터에 삽입하여 형질전환시킨 재조합 미생물을 배양함으로써 구현할 수 있다.

[0035] 본 발명에서 사용되는 벡터는 적합한 미생물 내에서 상기 유전자들의 DNA를 발현시킬 수 있는 적합한 조절 서열에 작동가능하게 연결된 DNA 서열을 함유하는 DNA 제조물을 의미한다. 상기 벡터는 플라스미드, 파지 입자, 또는 간단하게 잠재적 게놈 삽입물일 수 있으며, 일 예로서 pETL 또는 pET21a 플라스미드일 수 있다. 적당한 숙주 미생물로 형질전환되면 벡터는 숙주 게놈과 무관하게 복제하고 기능할 수 있거나, 또는 일부 경우에 게놈 그 자체에 통합될 수 있다. 플라스미드가 현재 벡터의 가장 통상적으로 사용되는 형태이므로 본 발명에서 플라스미드(plasmid)와 벡터(vector)는 때로 상호 교환적으로 사용된다.

[0036] 당업계에 주지된 바와 같이, 숙주세포에서 도입된 유전자의 발현 수준을 높이기 위해서는 해당 유전자가 선택된 발현 숙주 내에서 기능을 발휘하는 전사 및 해독 발현 조절 서열에 작동가능하도록 연결되어야만 한다. 바람직하게는 발현 조절서열 및 해당 유전자는 세균 선택 마커 및 복제 개시점(replication origin)을 같이 포함하고 있는 하나의 발현 벡터 내에 포함되게 된다. 발현 숙주가 진핵세포인 경우에는 발현 벡터는 진핵 발현 숙주 내에서 유용한 발현 마커를 더 포함하여야만 한다.

[0037] 본 발명의 명세서 전체에서 "작동 가능하게 연결된"이란 언급된 구성요소들이 그 일반적 기능을 수행하도록 구성되어 있는 요소들의 배열을 의미한다. 따라서, 코딩 서열(예를 들어, 관심있는 펩티드를 코딩하는 서열)에 작동 가능하게 연결된 특정 프로모터는 조절 단백질 및 적절한 효소가 존재할 경우 코딩 서열의 발현을 가능하게 할 수 있다. 일부 경우, 특정 조절 요소가 이들이 코딩 서열의 발현을 지시하는 기능을 할 수 있는 한 코딩 서열에 인접할 필요는 없다.

[0038] 전형적인 플라스미드 벡터는 (a) 숙주세포당 수백 개의 플라스미드 벡터를 포함하도록 복제가 효율적으로 이루어지도록 하는 복제 개시점, (b) 플라스미드 벡터로 형질 전환된 숙주세포가 선발될 수 있도록 하는 항생제 내성 유전자 및 (c) 외래 DNA 절편이 삽입될 수 있는 제한효소 절단부위를 포함하는 구조를 지니고 있다. 적절한 제한효소 절단부위가 존재하지 않을지라도 통상의 방법에 따른 합성 올리고뉴클레오타이드 어댑터(oligonucleotide adaptor) 또는 링커(linker)를 사용하면 벡터와 외래 DNA를 용이하게 라이게이션(ligation)할 수 있다.

[0039] 통상적으로, 하나 이상의 제한 효소로 DNA 서열 및 벡터를 절단하고 단편들을 함께 결찰하여 최종적으로 발현될 DNA 서열을 벡터에 결합시킨다. 제한 효소 소화처리 및 결찰은 당업자들에게 익히 알려졌다.

[0040] 본 발명에서 사용되는 상기 세포 표면 발현용 재조합 벡터는 도 1에 도시된 바와 같은 개열지도를 가진 것일 수 있으며, OmpC-리튬 결합 단백질의 발현을 조절하기 위해 T7 프로모터를 포함할 수 있다.

[0041] 본 발명의 재조합 미생물은 대장균, 살모넬라 타이피, 살모넬라 타이피뮤리움, 비브리오 콜레라, 마이코박테리움 보비스, 시겔라, 바실러스, 유산균, 스테필로코커스, 코리네 박테리아, 리스테리아 모노싸이토제네스 및 스트랩코커스로 이루어지는 군으로부터 선택된 것일 수 있으며, 본 발명의 일 실시예에서는 대장균을 재조합 미생물로서 사용하였다.

[0042] 박테리아 게놈으로부터 원하는 유전자를 얻는 방법은 분자 생물학 분야에서 일반적이며 잘 알려져 있다. 예를 들어, 당해 유전자의 서열이 공지되어 있는 경우, 적합한 게놈 라이브러리가 제한 엔도뉴클레아제 절단에 의해 생성될 수 있으며, 원하는 유전자 서열에 상보적인 프로브를 이용하여 스크리닝될 수 있다. 일단 당해 서열이 단리되면, 그 DNA는 표준 프라이머-유도 증폭 방법, 예를 들어 폴리머라아제 연쇄 반응을 이용하여 증폭되어 적절한 벡터를 이용한 형질전환에 적합한 양의 DNA가 얻어질 수 있다. 이종 숙주에서의 발현을 위한 코돈 최적화

도구는 쉽게 이용가능하다. 코돈 최적화를 위한 일부 도구는 숙주 유기체의 GC 함량을 기반으로 하여 이용가능하다. 일단 관련 경로 유전자가 동정되어 단리되면, 이 유전자는 당업계에 잘 알려진 수단에 의해 적합한 발현 숙주를 형질전환시킬 수 있다. 형질전환(transformation), 형질도입(transduction), 또는 형질감염(transfection))은 전기천공(electroporation), 극미 주입(microinjection), 유전자총(biolistics)(또는 입자 폭격 매개된 전달), 또는 아그로박테리움 매개된 형질전환 등을 비롯한 다수의 수단 중에서 하나에 의해 달성될 수 있다

[0043] 본 발명의 명세서 전체에서 "재조합 미생물" 및 "재조합 균주"라는 용어는 본 명세서에서 동의어로 사용되며, 본 발명의 특정 효소를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 발현하거나 과다 발현하기 위하여 유전적으로 변형된 미생물을 지칭한다.

[0044] 본 발명의 리튬 결합 펩티드의 세포 표면 발현 방법은 형질전환된 미생물을 배양하여 리튬 결합 펩티드를 세포 표면에 발현하는 단계; 및 상기 리튬 결합 펩티드가 표면에 발현된 미생물을 회수하는 단계를 포함할 수 있으며, 리튬 결합 펩티드를 세포 표면에 발현하는 단계에서 발현을 최적화하기 위해 IPTG(isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside)를 미생물에 처리할 수 있다. 예를 들어, 0.1 내지 0.3 mM의 IPTG(isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside)를 추가할 수 있으며, 0.1 mM 미만으로 처리하거나 0.3 mM를 초과하여 처리할 경우 리튬 결합 펩티드의 발현이 감소할 수 있다.

[0045] 본 발명에 따른 리튬을 회수하는 방법은 해수 또는 폐수에 본 발명에 따른 형질전환된 미생물 또는 본 발명에 따른 방법에 의해 리튬 결합 펩티드가 세포 표면 발현된 미생물을 처리하는 것을 포함할 수 있으며, 이때, 회수된 리튬은 나노입자의 형태일 수 있다. 나노입자 형태의 리튬은 예를 들어 10 내지 100 nm의 직경을 가질 수 있다.

[0047] 본 발명의 이점 및 특징, 그리고 그것들을 달성하는 방법은 상세하게 후술되어 있는 실시예들을 참조하면 명확해질 것이다. 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명하기로 한다. 그러나 이들 실시예들은 본 발명을 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0049] **[실시예]**

[0051] **<실시예 1>**

[0052] **박테리아 균주 및 배지**

[0053] 사용된 박테리아 균주는 표 1에 나타냈다. 균주는 100 mg/L 암피실린이 첨가된 LB 배지(10 g/L bacto-tryptone, 5 g/L bacto-yeast extract 및 5 g/L NaCl)에서 250 rpm으로 진탕하면서 37℃에서 배양하였다.

표 1

Strain/Plasmid	Relevant genotype/ property	Source
***Escherichia coli* strains**		
BL21 (DE3)	*F⁻ ompT gal dcm lon hsdS$_B$(r_B^- m_B^-) λ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])*	Novagen
TOP10	*F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 nupG recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(Str^R) endA1 λ⁻*	Stratagene
Plasmids		
pET-21a	Ap^R	NEB[a]
pETLBP3	*ompC-LBP3* 유전자 포함 pET-21a	본 발명
pETLBP3x2	*ompC-LBP3*(x2) 유전자 포함 pET-21a	본 발명
pETLP1	*ompC-LP1* 포함 pET-21a	본 발명
pETLP1x2	*ompC-LP1*(x2) 유전자 포함 pET-21a	본 발명

[a]**New England Biolabs, Beverly, MA, U.S.A.**

[0054]

[0055] **플라스미드 구성**

[0056] 리튬 결합 펩티드의 유전자를 8번 루프(993 bp)에서 절단된 *ompC* 유전자(서열번호 3)의 C-말단에 결합시키고 Expand High Fidelity PCR system (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany)을 사용하는 MJ Mini Personal Thermal Cycler(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)로 PCR(polymerase chain reaction)을 수행하여 증폭시켰다. 사용된 리튬 결합 펩티드의 뉴클레오티드 서열은 LBP3 리튬 결합 펩티드 GGCCCGGGCGCGCCG (서열번호 4) 및 LP1 리튬 결합 펩티드 GGCCCGGGCAACCCG (서열번호 9)이며 코돈 사용빈도(codon usage)를 고려하여 설계하였다. 사용된 프라이머는 표 2(LBP3) 및 표 3(LP1)에 기재된 바와 같다. PCR 산물을 NdeI 및 BamHI 제한 효소를 사용하여 pET21a 플라스미드 내로 클로닝해 pETLBP3 및 pETLP1을 각각 구성하였다. 펩티드 LBP3 및 LP1의 이량체 반복을 갖는 플라스미드도 같은 방식으로 구성하였다. OmpC-LBP3 및 OmpC-LP1의 발현을 T7 프로모터에 의해 조절되는 IPTG(isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside)를 추가하여 유도하였다. 제조된 플라스미드들을 추가 연구를 위해 *E. coli* BL21(DE3) 균주에 형질전환시켰다.

표 2

Name	Sequence (5' to 3')
LBP3_Frw	**CATATG**ATGAAAGTTAAAGT (서열번호 5)
LBP3_Rev	**GGATCC**TTATTACGGCGCGCCCGGGCCCATGTTTTTGTTGAAGTAGTA (서열번호 6)
LBP3dim1_Frw	**CATATG**ATGAAAGTTAAAGT (서열번호 7)
LBP3dim1_Rev	**GGATCC**TTATTACGGCGCGCCCGGGCCCGCTTTCGCCGCCGCTTCCGCCGGCGCGCCCGGGCC (서열번호 8)

[0057]

표 3

Name	Sequence (5' to 3')
LP1_Frw	**CATATG**ATGAAAGTTAAAGT (서열번호 10)
LP1_Rev	**GGATCC**TTATTACGGGTTGCCCGGGCCCATGTTTTTGTTGAAG TAGTA (서열번호 11)
LP1dim1_Frw	**CATATG**ATGAAAGTTAAAGT (서열번호 12)
LP1dim1_Rev	**GGATCC**TTATTACGGGTTGCCCGGGCCCGCTTTCGCCGCCGC TTCCGCCGGGTTGCCCGGGCC (서열번호 13)

[0058]

[0059] **<실험예 1>**

[0060] **SDS PAGE 분석**

[0061] 리튬 결합 펩티드를 발현하는 재조합 *E. coli*를 37℃에서 LB 배지에 밤새 배양한 후 LB 배지로 100배 희석하였다. 600nm에서 광학 밀도(OD600)가 0.5에 도달한 후, IPTG를 0 내지 1 mM의 농도로 배지 브로스에 첨가하고 30℃에서 5시간 동안 배양하였다. 13,000rpm에서 10분 동안 원심분리하여 재조합 균주를 수확하고 iced sonicator를 사용하여 초음파 처리하였다(30 sec ON, 30 sec OFF, 12 cycles). 세포를 8000rpm에서 원심분리하여 세포 잔해를 제거하였다. 10 mM Tris-HCl (pH 7.5)를 첨가하여 펠렛으로부터 외막 분획을 분리하고 현탁된 세포를 4℃에서 밤새 유지시켜 용액으로 막 분획을 상승시키고 12% (w/v) SDS-PAGE로 분석하였다. 분획된 단백질 샘플을 Coomassie brilliant blue R-250 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)으로 염색하였다.

[0063] **리튬 생물-흡착의 분석**

[0064] 재조합 *E. coli* 균주를 37℃에서 100 mg/L 암피실린이 보충된 LB 배지에서 밤새 배양하였다. 밤새 배양한 배양물을 신선한 LB 배지로 100배 희석하고 OD600가 0.5가 될 때까지 배양하였다. 세포를 IPTG로 유도하고, 균주를 30℃에서 5시간 동안 추가 배양하였다. 균주를 0.85% (w/v) NaCl로 2회 세척한 후 세포를 염화 리튬 함유 LB 배지, 인공 폐수 및 리튬 배터리 오염 폐수 샘플에서 배양하였다. 다양한 농도의 염화 리튬(LBP3: 0 ~ 10 mM, LP1: 0 ~ 20 mM) 이 LB 배지에 첨가되었다. 사용된 인공 폐수는 각각 1 mM의 리튬, 구리, 코발트 및 크롬을 포함하였다. 리튬 배터리 오염 폐수는 1g의 리튬 이온 배터리를 물 속에 밤새 두어 제조하였다. 균주를 0.85% (w/v) NaCl로 2회 세척한 후, 결합된 리튬을 1mM EDTA를 함유한 얼음으로 30분 동안 인큐베이션하여 용출시켰다. 흡착된 리튬량을 atomic absorption spectrophotometer (AA-7000, Shimadzu, kyoto, Japan) (CHOI 2005)를 사용하여 분석하였다.

[0066] **분자 모델링 연구**

[0067] 리튬 결합 펩티드(GPGAP)의 상동성 모델링(homology modeling)을 Modeller를 사용하여 실시하였다. 디폴트 파라미터(default parameters)(Altschul et al., 1990)를 갖는 protein databank (PDB)에 대해 Blastp tool을 사용하여 잠재적인 주형 탐색을 실시하였다. Modeller의 align2D tool의 도움으로, PDB로부터 입수된 주형 서열을 갖는 query를 정렬하였다. 서열 정렬 및 주형 단백질 구조에 근거하여, 디폴트 파라미터를 갖는 상동성 모델을 구축하였다.

[0069] **FE-SEM 및 TEM 분석**

[0070] 리튬 흡착 균주를 FE-SEM을 사용하여 시각화하였다. 흡착 후 재조합 *E. coli* 세포를 0.85% NaCl (pH 5.8)로 세척하여 세포 표면에 결합되지 않은 리튬을 제거하였다. 그런 다음, 세포를 2.5% 글루타르알데히드를 사용하여 14시간 동안 4℃에서 고정시키고 배양하였다. 고정된 세포를 PBS로 세척한 후 세포를 ultra-flat silicon wafers 위에 올리고 건조시켜 FE-SEM(field emission scanning election microscopy)으로 시각화하였다. TEM으로 시각화하기 위해, Li를 흡착한 재조합 *E. coli*를 상기 공정에 따라 고정시키고 구리 격자(copper grids)로

코팅하였다.

[0072] **라만 분광법**

[0073] pETLBP3을 보유한 재조합 *E. coli*에 의해 흡착된 리튬의 특성을 라만 분광법(Thermo- scientific, DXR Raman microscope 532nm full range)으로 평가하였다.

[0075] **결과**

[0076] **리튬 결합 시스템**

[0077] 앵커링 모티프(anchoring motif)로서 OmpC를 사용하여 세포막의 표면에 리튬 결합 펩티드를 발현시켜 리튬을 흡착하도록 *E. coli*를 조작하였다. 이를 인식하기 위해 리튬 결합 펩티드를 루프 8에서 절단된 *ompC* 유전자에 결합시켰다. 이와 같이 구축된 리튬 결합 펩티드 플라스미드는 T7 프로모터에 의해 조절되는 pET21LBP3 및 pETLP1이다(도 1a 및 1b). *E. coli*에서 이종 단백질의 발현은 일반적으로 대사 부재(metabolic liability)를 야기하여 재조합 플라스미드에서 단백질 발현, 세포 성장 및 안정성을 감소시킨다. 리튬의 효율적인 흡착은 성장 및 발현 조건을 최적화하여 달성되었다.

[0079] **발현 조건의 최적화**

[0080] LBP3 GPGAP 및 LP1 GPGNP를 각각 OmpC의 절단된 8번째 루프에 결합시켜 재조합 플라스미드를 구성하였다. 플라스미드는 T7 프로모터를 포함하며 IPTG의 첨가에 의해 유도되었다. IPTG의 농도(0.0 1.0 mM)를 다양화하여 OmpC-LBP3 펩티드 및 OmpC-LP1 펩티드의 발현을 최적화하였다. 재조합 펩티드의 발현을 SDS PAGE로 분석한 결과, IPTG의 농도가 증가할수록 펩티드의 발현이 증가함을 확인하였다(도 2a 및 2b). 또한, pETLBP3 및 pETLP1을 보유한 *E. coli* 균주에 의한 리튬 흡착이 0.3mM IPTG에서 높고, 더 높은 농도에서는 감소하기 시작함이 관찰되었다(도 3).

[0082] **흡착 연구**

[0083] 단량체 및 이량체 LBP3 펩티드에 의한 리튬의 흡착을 암피실린이 보충된 LB 배지에 재조합 *E. coli*를 배양하여 평가하였다. OmpC-LBP3 펩티드 및 OmpC-LP1 펩티드를 IPTG를 추가하여 과발현시킨 후 30℃에서 5시간 동안 추가 인큐베이션하였다. LBP3 또는 LP1 없이 OmpC를 포함하는 플라스미드를 대조로서 사용하였다.

[0084] 단량체 및 이량체 LBP3 펩티드의 과발현 후에, 다양한 농도의 리튬을 배지에 첨가하였다(0-10mM)(도 4a). LBP3 단량체 펩티드는 3mM의 리튬에서 50.107 μmol/g의 최대 흡착을 보이고, LBP3 이량체 펩티드를 포함하는 재조합 *E. coli*는 증가된 리튬 흡착을 보였다(도 4a). 이는 펩티드 LBP3의 이량체 반복에 기인한 것일 수 있다. 5mM의 리튬에서 229.6589 μmol/g로 흡착이 최대였으며, 흡착은 더 증가하면서 안정 상태를 유지했다. 대조 균주(일반 *E. coli*)는 LBP3을 갖는 재조합 *E. coli*에서보다 더 낮은 94.711 μmol/g의 매우 낮은 리튬 흡착을 보였다. 따라서, *E. coli*에 의한 리튬의 생물-흡착은 LBP3를 표면 발현에 의한 것이다.

[0085] 단량체 및 이량체 LP1 펩티드의 과발현 후에, 다양한 농도의 리튬을 배지에 첨가하였다(0-20mM) (도 4b 및 4c). 최대 흡착이 10mM의 리튬에서 관찰되었으며, 리튬의 농도가 더 증가할 경우 단계적으로 리튬 흡착이 감소하기 시작하였다(도 4c). 단량체 및 이량체 LP1 펩티드의 비교 실험에서 이량체 균주가 더 높은 리튬 흡착을 나타냈다(4b 및 4c). 시간에 따른 프로필은 도 4b에 도시하였으며, 15분에 최대 흡착을 보이고 그 이후부터는 단계적으로 감소하기 시작했다.

[0087] 리튬에 대한 LBP3의 특이성을 리튬(Li), 구리(Cu), 코발트(Co) 및 크롬(Cr)과 같은 금속을 갖는 인공 폐수(AWW)에 *E. coli*를 노출시켜 평가하였다. 1000ppm의 각 금속을 증류수에 용해시켜 AWW를 제조하였다. 단량체 및 이량체 펩티드를 포함하는 *E. coli*를 IPTG로 5시간 동안 과발현시키고, 추가 흡착 실험을 실시하였다.

[0088] LBP3는 리튬에 대해 더 높은 특이성을 보였다. 그러나, 다른 금속 흡착량은 무시할만한 정도였으며, 이는 비-특

이적 물리적 흡착에 기인한 것일 수 있다 (도 5a). LP1 단량체 펩티드는 리튬, 구리, 코발트 및 크롬에 대해 104.57 μM/g, 25.622 μM/g, 24.37 μM/g 및 5.704 μM/g의 최대 흡착량을 보였으며, LP1 이량체 펩티드는 199.30399 μM/g, 29.058 μM/g, 23.554 μM/g 및 13.0029 μM/g의 최대 흡착량을 보이고 있어, LP1 단량체 역시 리튬에 대해 더 높은 특이성을 보임을 확인하였다(도 5b).

[0089] LBP3 및 LP1의 실제 적용을 평가하기 위해, 리튬 배터리 오염 폐수에서의 실험을 실시하였다(도 6a 및 6b). LBP3 이량체 펩티드를 보유한 E. coli에 의한 리튬 흡착이 LBP3단량체에 비해 55% 더 높았다(도 6a). LP1 단량체 및 이량체 펩티드를 각각 보유한 E. coli에 의한 리튬 흡착은 리튬 배터리로부터 559.365 μM/g의 리튬을 함유한 오염 폐수로부터 각각 84.771 및 220.00146 μM/g의 흡착량을 보였다(도 6b).

[0091] **분자 모델링**

[0092] 펩티드 GPGAP 조직화(coordinates)의 구조는 Karle et al.의 문헌(Karle, I.L. 1978. Crystal structure and conformation of cyclo-(glycylprolylglycyl-D-alanylprolyl) containing 4. fwdarw. 1 and 3. fwdarw. 1 intramolecular hydrogen bonds. *Journal of the American Chemical Society*, 100(4), 1286-1289)으로부터 입수하였다. 이러한 펩티드의 사이클릭 형태로부터 제조되었다(도 7). 펩티드의 자유 형태는 글리신과 알라닌 및 글리신과 글리신 사이의 2개의 분자내 H-결합을 갖는다. 이들 두 개 결합은 펩티드 구조를 안정화시킨다. 펩티드 내의 프롤린, 글리신 및 프롤린의 카르보닐 옥시젠(carbonyl oxygen)이 리튬의 결합의 원인이다. 모델링된 펩티드의 구조는 도 7에 나타냈다. 빨간색 구는 선호되는 리튬 결합 부위를 나타낸다.

[0094] **FE-SEM 및 TEM 분석**

[0095] LBP3 및 LP1 펩티드를 보유한 균주의 FE-SEM 및 TEM 이미지는 도 8a 내지 8c에 각각 나타냈다. 도 8a의 D, 8b의 C 및 8c의 C에서 볼 수 있는 바와 같이, 균주가 리튬 나노입자를 흡착함을 확인할 수 있다.

[0097] **라만 분광법**

[0098] 흡착된 리튬의 특성을 라만 분광법으로 분석하였다. 280 Cm^{-1}주위에서 밴드가 발견되었다(도 9). 밴드가 표면 발현된 LBP3에서만 형성되었는지를 확인하기 위해, LBP3가 없는 대조 E. coli를 라만 분광법으로 분석하였으며, 280 Cm^{-1}에서 밴드가 없음을 확인하였다. 이는 나노입자의 형성이 표면 발현된 펩티드에 의해서만 발생하기 때문이다.

[0100] **<실험예 2>**

[0101] **<u>합성 폐수로부터 혼합된 금속의 선별</u>**

[0102] 리튬 이온의 흡착을 합성 폐수의 혼합된 금속으로부터 조사하였다. 실시예 1에서와 같이 제조된 재조합 균주 및 야생형 균주(Novagen) 둘 다에 리튬, 납 및 구리와 같은 금속 이온의 세트를 포함하는 합성 폐수를 2시간 동안 30℃에서 처리하였다. 처리 후, 세포의 표면에 존재하는 금속 이온을 5 mM EDTA로 분리하고 금속의 농도를 측정하였다. 재조합 균주는 129.9 μmol/g DCW의 리튬이 대조 균주에서보다 많이 흡착됨을 보였다(도 10a). 재조합 세포는 리튬 이온의 흡착이 야생형 E. coli 균주보다 4.3배 더 증가했음을 보였다. 납 및 구리의 경우, 흡착은 재조합 균주에서 각각 42.6 μmol/g DCW 및 11.4 μmol/g DCW의 범위였다. 데이터는 pETL 플라스미드를 보유하는 재조합 균주가 납 및 구리보다 리튬에 대해 더 높은 특이성을 가짐을 명확히 보였다.

[0103] 다른 세트의 실험에서, Co, Cr, Ag 및 Li와 같은 혼합된 금속을 포함하는 합성 폐수를 재조합 균주 및 야생형 균주와 함께 인큐베이션하였다. 이전 실험과 마찬가지로, 재조합 세포는 101.2 μmol/g DCW의 리튬 금속에 대한 가장 높은 흡착을 보였다(도 10b). 재조합 균주는 Co, Cr 및 Ag 흡착에 대해 더 적게 특이적임이 관찰되었다. 이는 흡착 특이성에 근거하여, 재조합 E. coli에서 발현되는 펩티드가 폐수에서 리튬 흡착에 대해 더 선택적임을 제안하는 것이다.

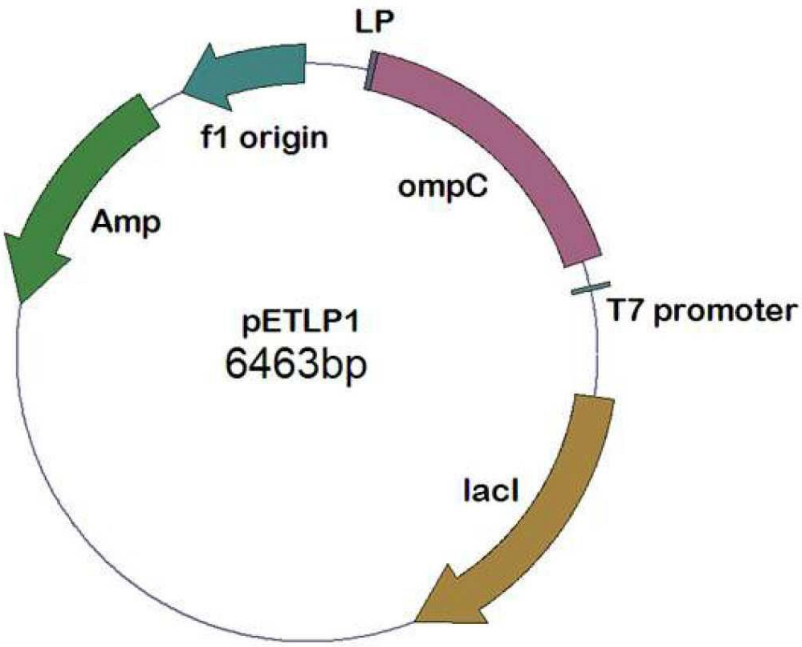
[0105] **해수로부터의 리튬의 추출**

[0106] 해수에서의 리튬 함량은 풍부하며 23억톤 정도로 추정되고 있다. 해수로부터 리튬을 추출하는 가능성을 찾기 위해, 35 g/L의 NaCl 및 0.17 mg/L의 리튬을 함유하는 물을 준비하였다. 재조합 세포를 0.1mM 및 0.3mM의 IPTG와 함께 인큐베이션하였으며 이를 NaCl을 갖는 인공적으로 리튬 오염된 물을 처리하였다. 데이터는 0.1 및 0.3mM의 IPTG로 유도된 재조합 세포가 82.1 μmol/g DCW의 리튬을 흡착함을 보였다. 야생형 균주는 21.89 μmol/g DCW만을 흡착하였으며 이는 재조합 균주보다 3.7배 더 적은 것이다(도 11). 이는 리튬 결합 펩티드를 보유한 재조합 균주가 NaCl을 함유하는 물로부터 리튬 이온과 결합하는데 효율적임을 명확하게 보이는 것으로, 본 발명의 재조합 균주가 해수에서 리튬을 추출하기 위해 잠재적으로 사용될 수 있음을 확인하였다.

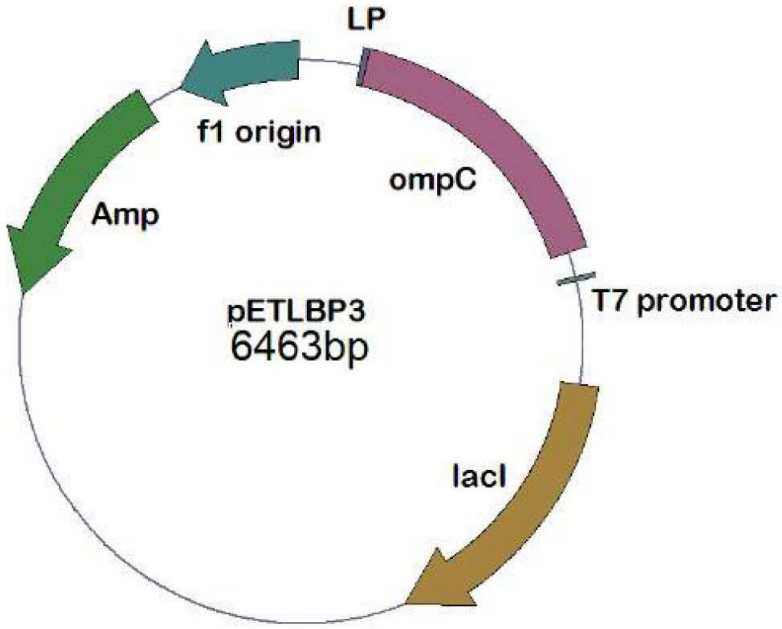
[0108] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

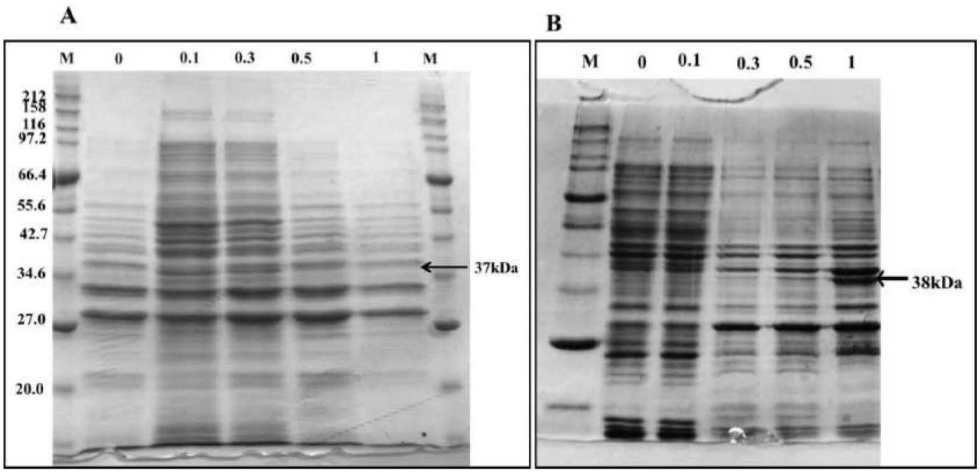
도면1a



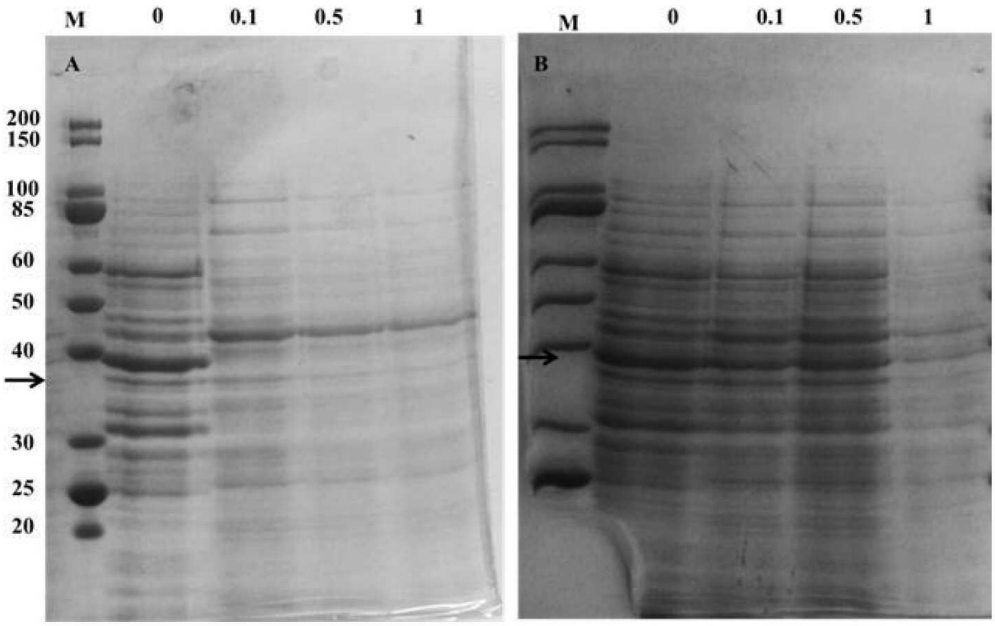
도면1b


LP
f1 origin
ompC
Amp
T7 promoter
pETLBP3
6463bp
lacI

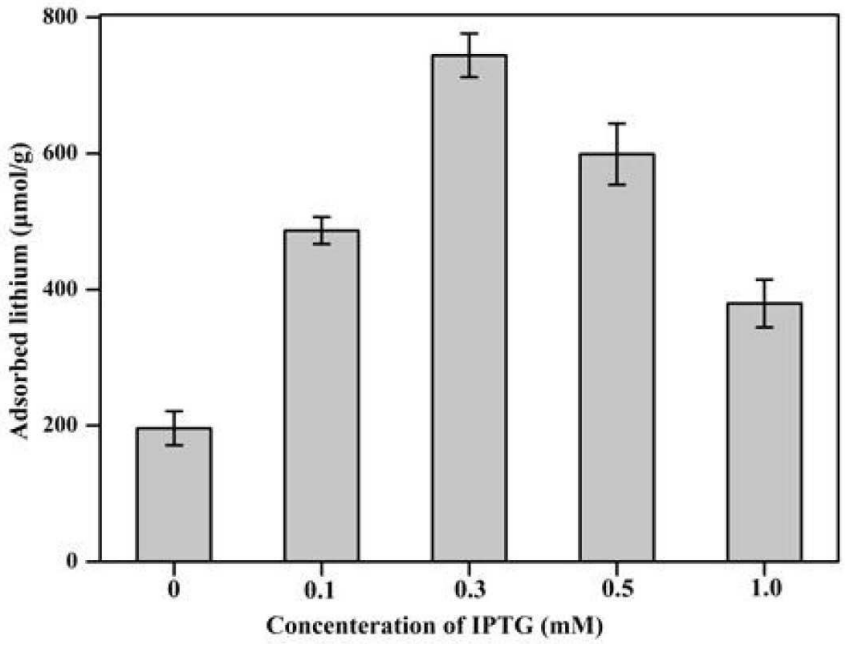
도면2a


A
M
0
0.1
0.3
0.5
1
M
212
158
116
97.2
66.4
55.6
42.7
34.6
27.0
20.0
37kDa
B
M
0
0.1
0.3
0.5
1
38kDa

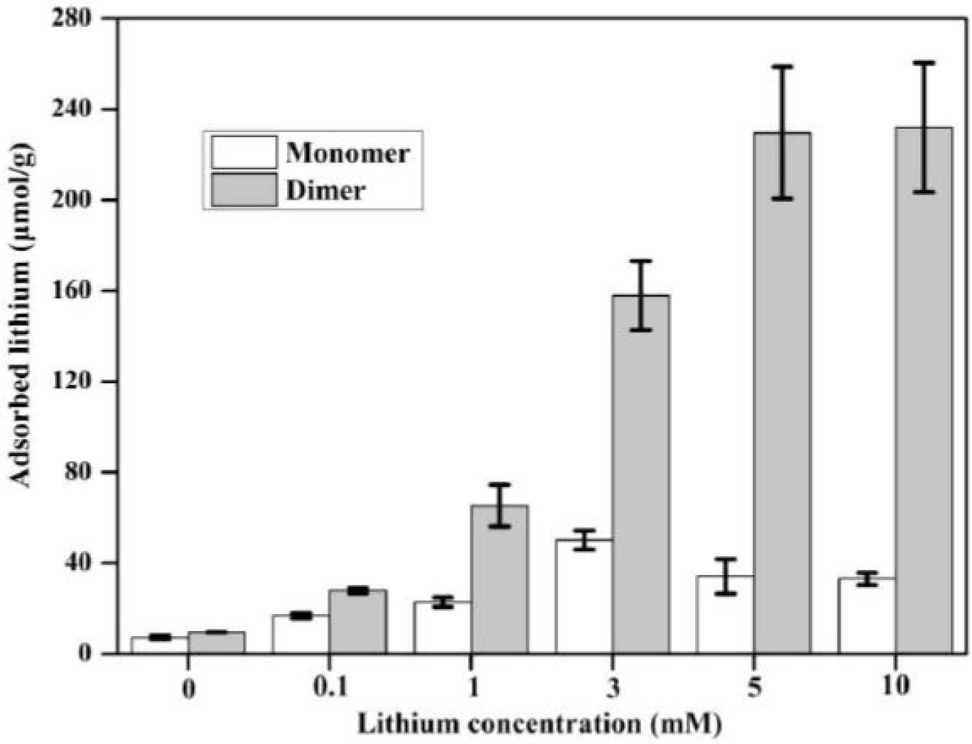
도면2b


M
0
0.1
0.5
1
A
B
200
150
100
85
60
50
40
30
25
20

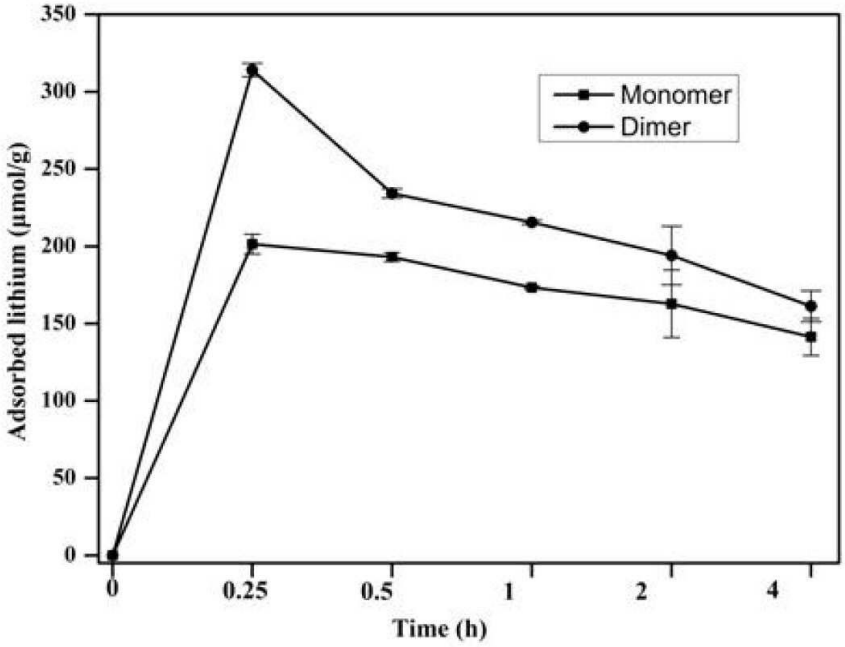
도면3


800
600
400
200
0
Adsorbed lithium (μmol/g)
0
0.1
0.3
0.5
1.0
Concenteration of IPTG (mM)

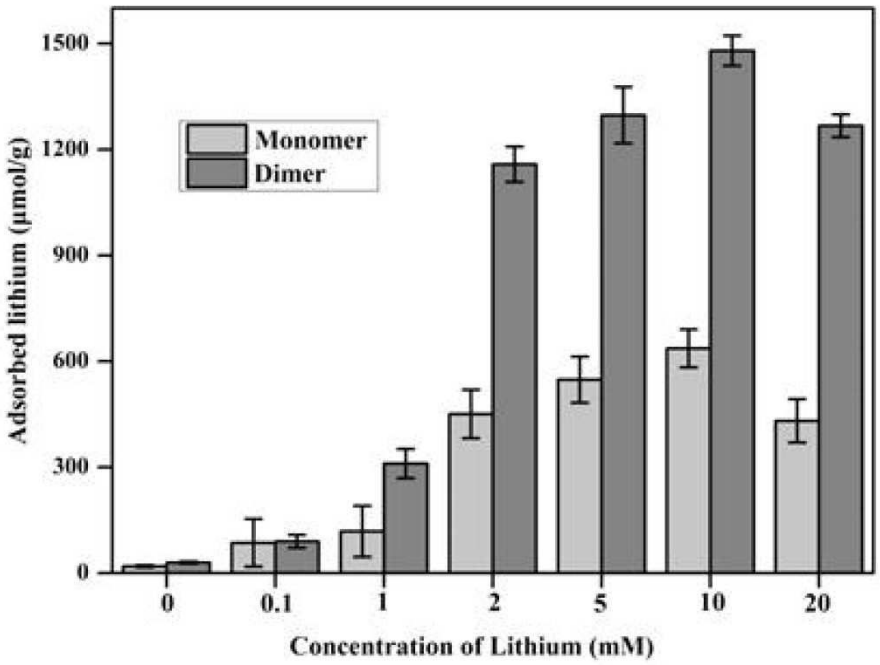
도면4a


Adsorbed lithium (μmol/g)
280
240
200
160
120
80
40
0
Monomer
Dimer
0
0.1
1
3
5
10
Lithium concentration (mM)

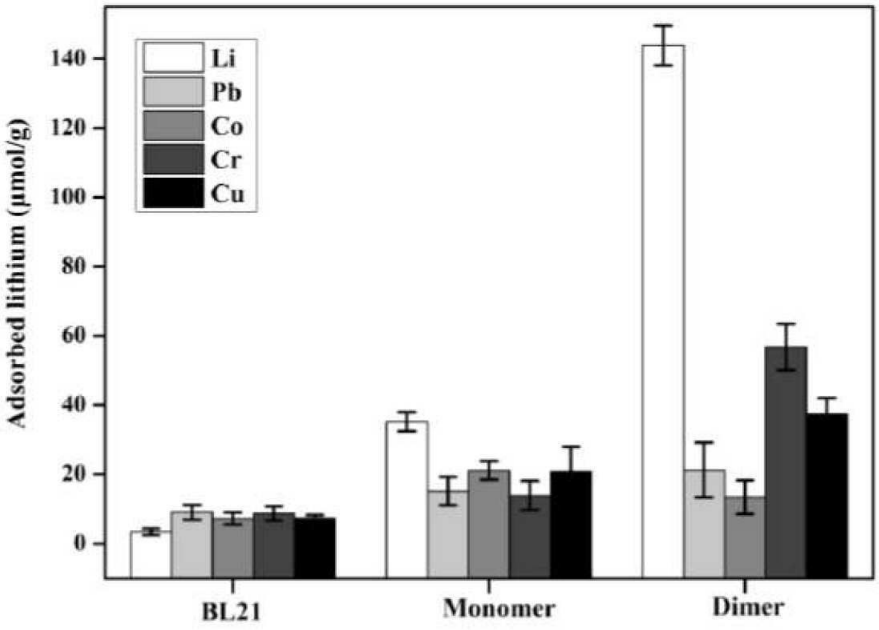
도면4b


Adsorbed lithium (μmol/g)
350
300
250
200
150
100
50
0
Monomer
Dimer
0
0.25
0.5
1
2
4
Time (h)

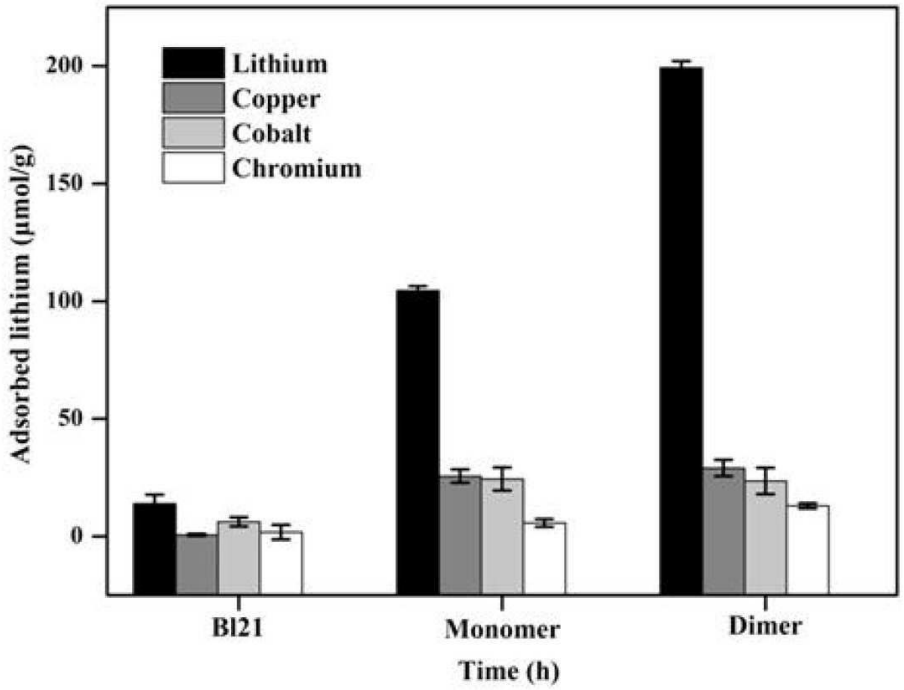
도면4c


Monomer
Dimer
Adsorbed lithium (μmol/g)
1500
1200
900
600
300
0
0
0.1
1
2
5
10
20
Concentration of Lithium (mM)

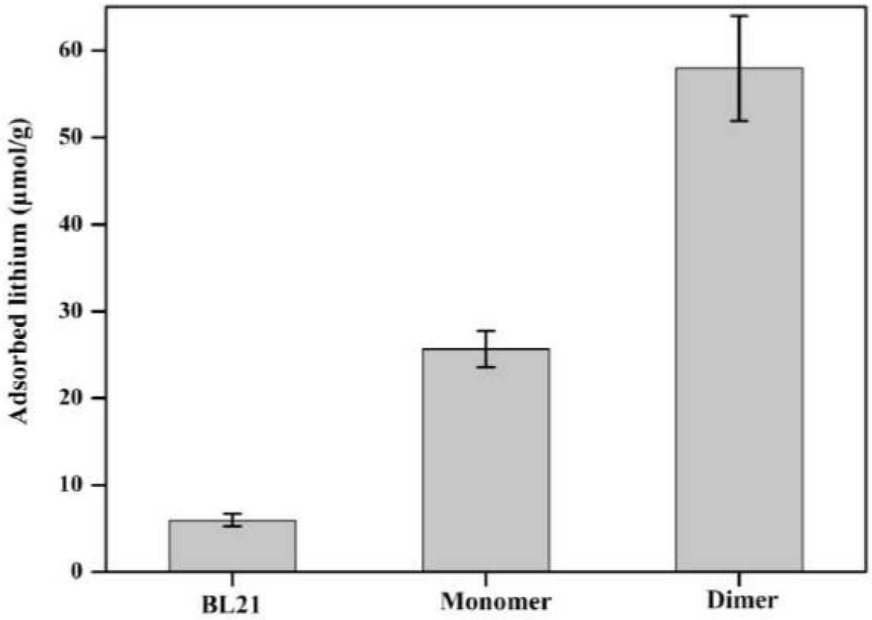
도면5a


Li
Pb
Co
Cr
Cu
Adsorbed lithium (μmol/g)
140
120
100
80
60
40
20
0
BL21
Monomer
Dimer

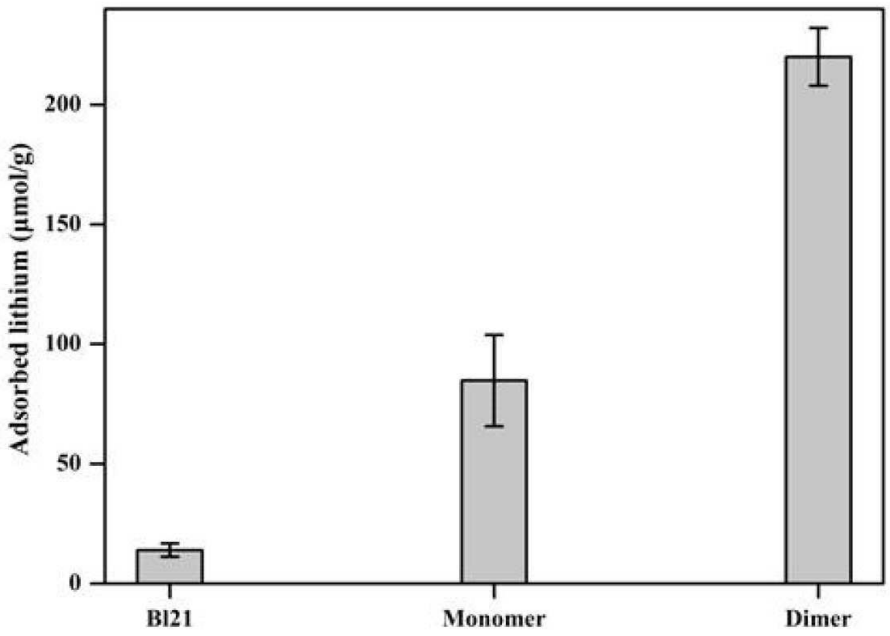
도면5b


Lithium
Copper
Cobalt
Chromium
Adsorbed lithium (μmol/g)
200
150
100
50
0
Bl21
Monomer
Dimer
Time (h)

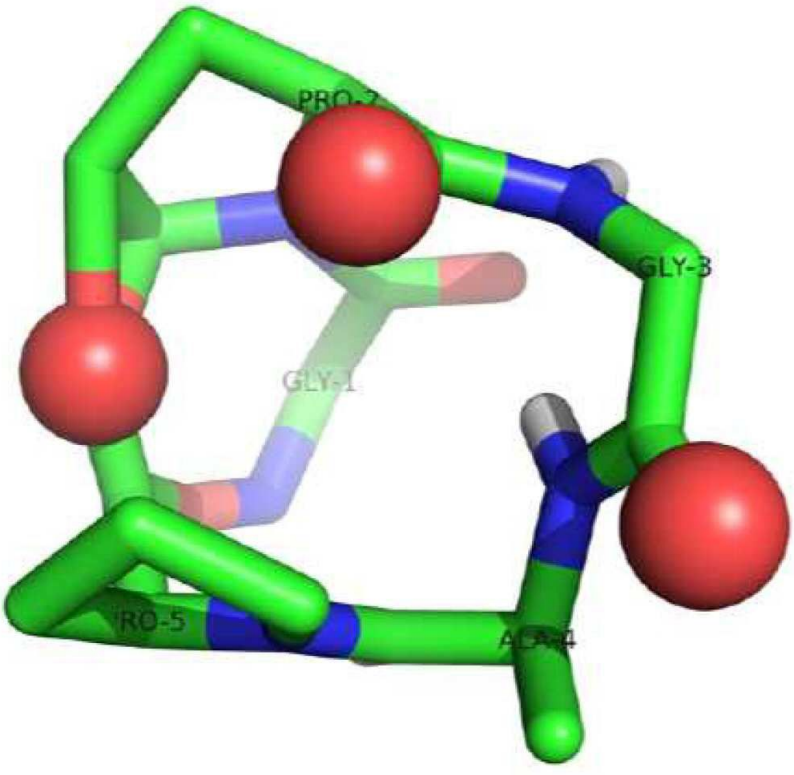
도면6a


Adsorbed lithium (μmol/g)
60
50
40
30
20
10
0
BL21
Monomer
Dimer

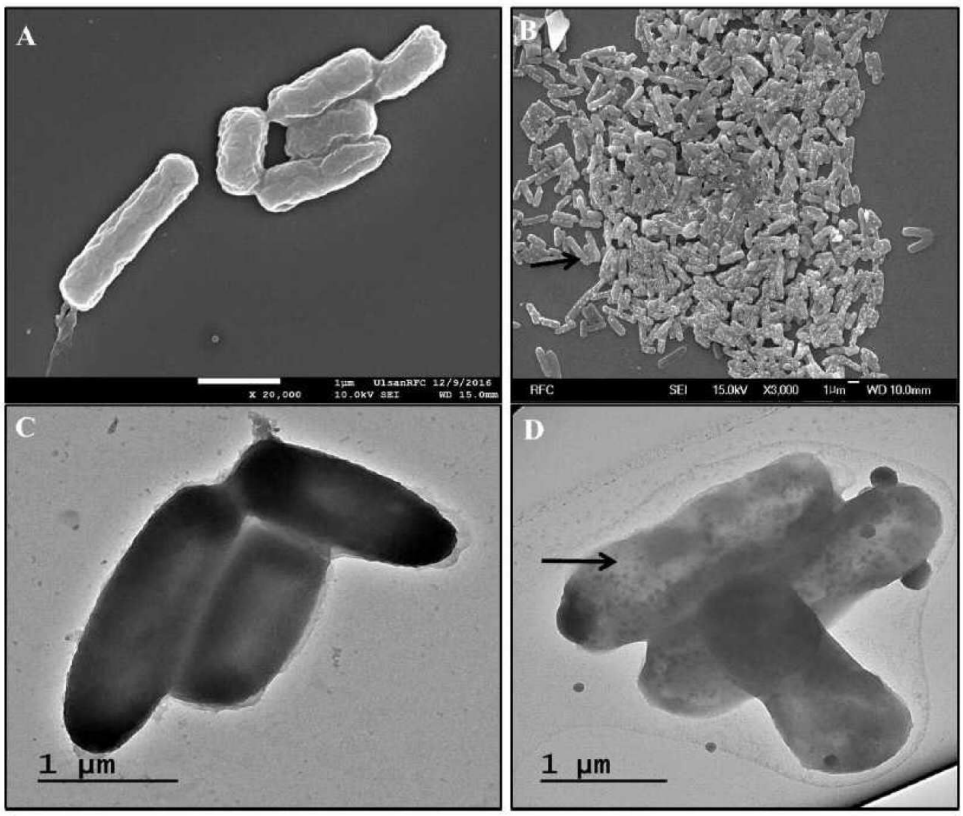
도면6b


Adsorbed lithium (μmol/g)
200
150
100
50
0
Bl21
Monomer
Dimer

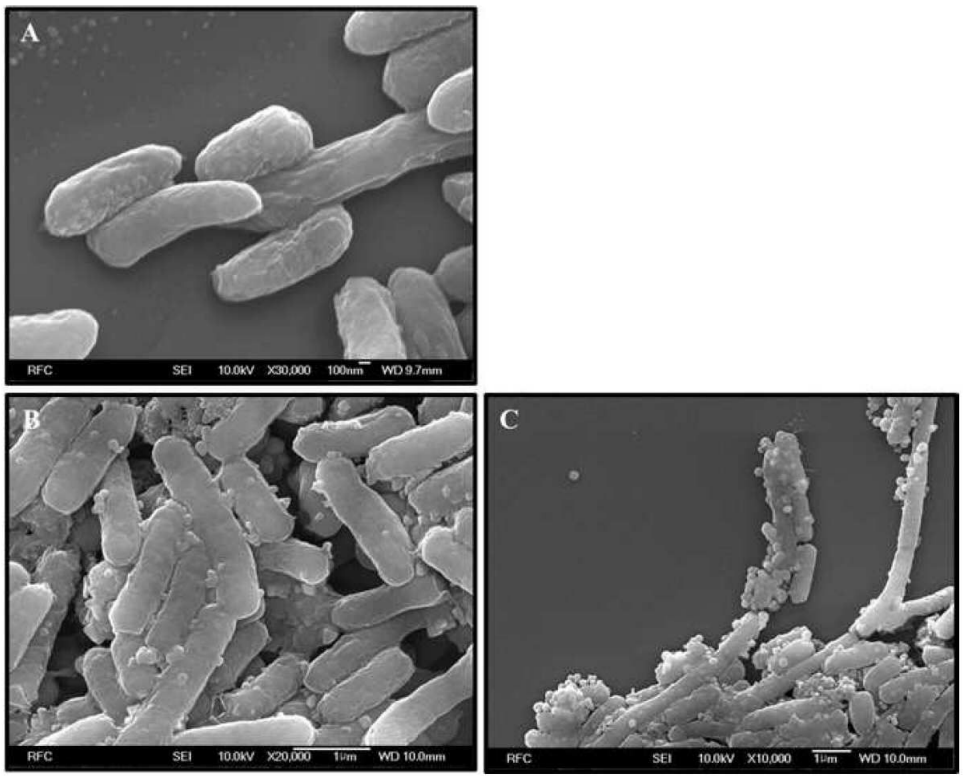
도면7


PRO-2
GLY-3
GLY-1
PRO-5

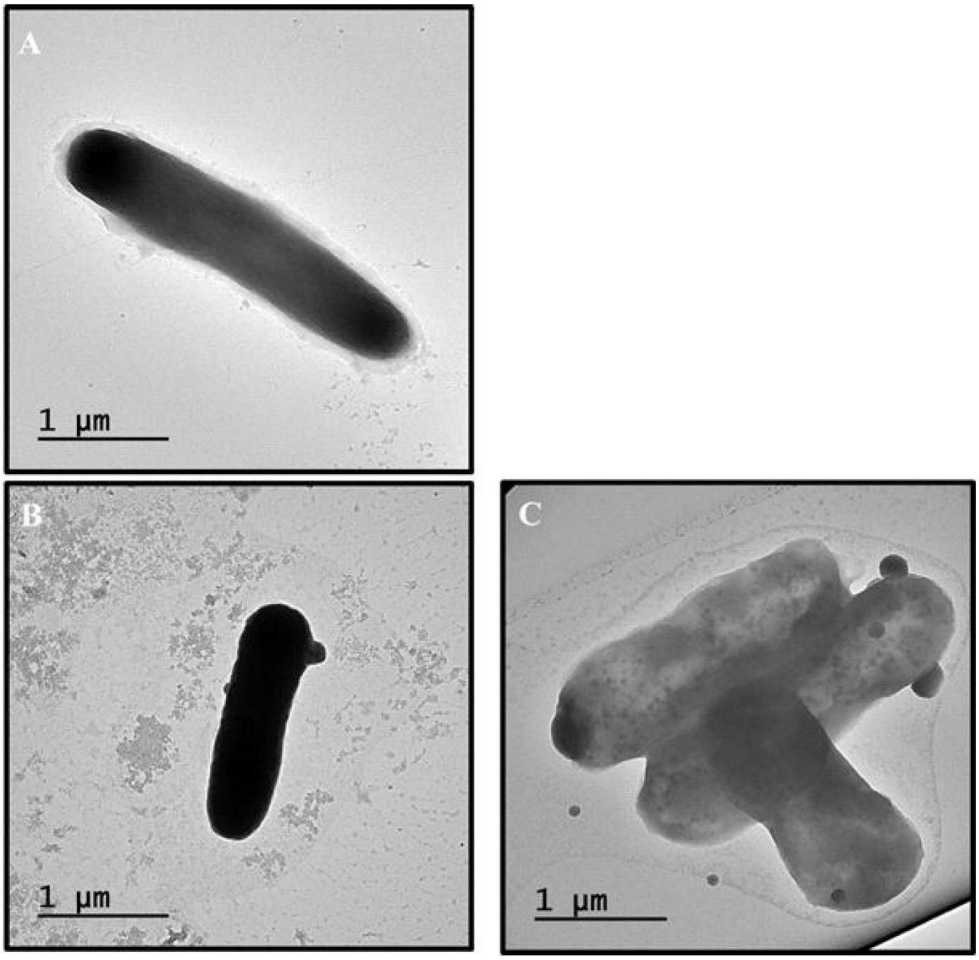
도면8a



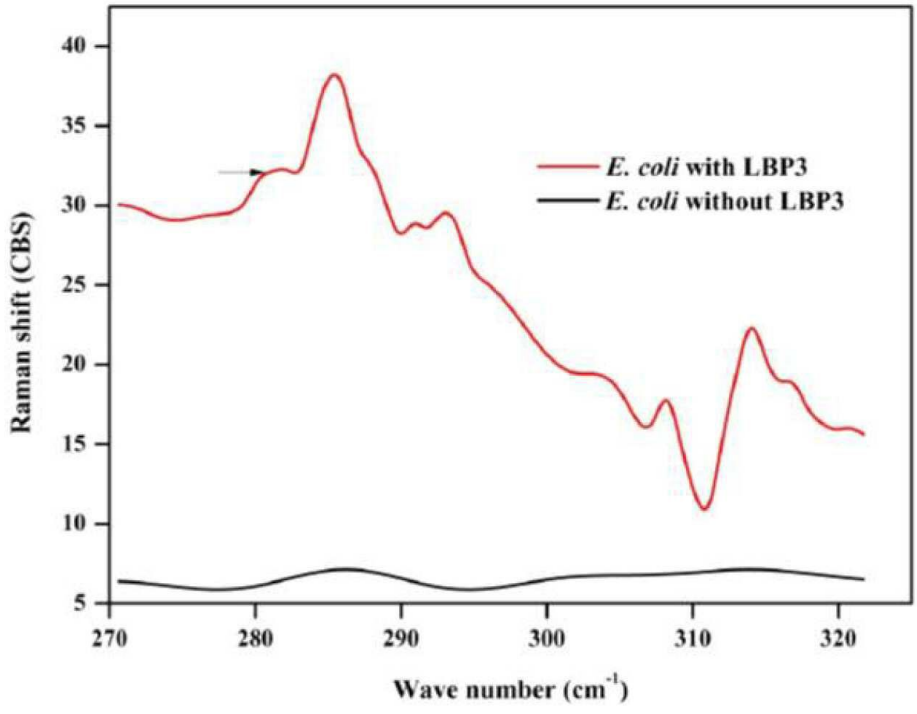
도면8b



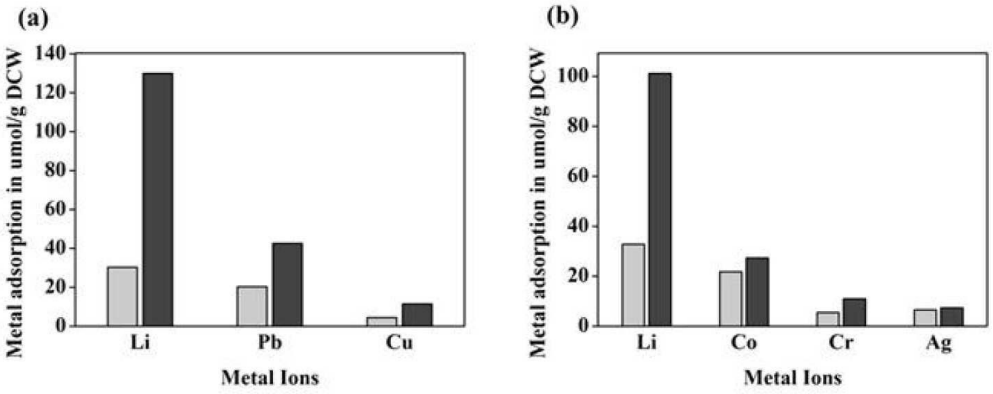
도면8c


A
1 μm
B
1 μm
C
1 μm

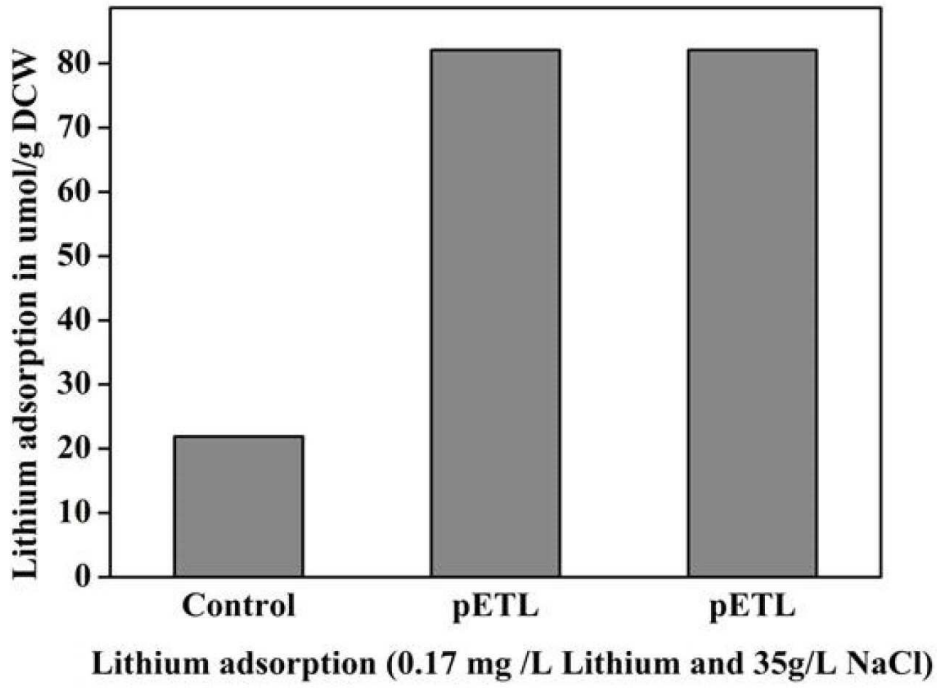
도면9


E. coli with LBP3
E. coli without LBP3
Raman shift (CBS)
Wave number (cm-1)
40
35
30
25
20
15
10
5
270
280
290
300
310
320

도면10



도면11



서 열 목 록

<110> University of Ulsan Foundation For Industry Cooperation

<120> CELL SURFACE EXPRESSION VECTOR FOR LITHIUM BINDING PEPTIDE AND MICROORGANISM TRANSFORMED BY THE SAME

<130> PN1607-275

<160> 13

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 189

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> OmpC

<400> 1

atgaaagtta aagtactgtc cctcctggtc ccagctctgc tggtagcagg cgcagcaaac 60

gctgctgaag tttacaacaa agacggcaac aaattagatc tgtacggtaa agtagacggc 120

ctgcactatt tctctgacaa caaagatgta gatggcgacc agacctacat gcgtcttggc 180

ttcaaaggt 189

<210> 2

<211> 726

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> OmpC

<400> 2

atgaaagtta aagtactgtc cctcctggtc ccagctctgc tggtagcagg cgcagcaaac 60

gctgctgaag tttacaacaa agacggcaac aaattagatc tgtacggtaa agtagacggc 120

ctgcactatt tctctgacaa caaagatgta gatggcgacc agacctacat gcgtcttggc 180

ttcaaaggtg aaactcaggt tactgaccag ctgaccggtt acggccagtg ggaatatcag 240

atccagggca acagcgctga aaacgaaaac aactcctgga cccgtgtggc attcgcaggt 300

ctgaaattcc aggatgtggg ttctttcgac tacggtcgta actacggcgt tgtttatgac 360

gtaacttcct ggaccgacgt actgccagaa ttcggtggtg acacctacgg ttctgacaac 420

ttcatgcagc agcgtggtaa cggcttcgcg acctaccgta acactgactt cttcggtctg 480

gttgacggcc tgaactttgc tgttcagtac cagggtaaaa acggcaaccc atctggtgaa 540

ggctttacta gtggcgtaac taacaacggt cgtgacgcac tgcgtcaaaa cggcgacggc 600

gtcggcggtt ctatcactta tgattacgaa ggtttcggta tcggtggtgc gatctccagc 660

tccaaacgta ctgatgctca gaacaccgct gcttacatcg gtaacggcga ccgtgctgaa 720

acctac 726

<210> 3

<211> 993

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> OmpC

<400> 3

atgaaagtta aagtactgtc cctcctggtc ccagctctgc tggtagcagg cgcagcaaac 60

gctgctgaag tttacaacaa agacggcaac aaattagatc tgtacggtaa agtagacggc 120

ctgcactatt tctctgacaa caaagatgta gatggcgacc agacctacat gcgtcttggc 180

ttcaaaggtg aaactcaggt tactgaccag ctgaccggtt acggccagtg ggaatatcag 240

atccagggca acagcgctga aaacgaaaac aactcctgga cccgtgtggc attcgcaggt 300

ctgaaattcc aggatgtggg ttctttcgac tacggtcgta actacggcgt tgtttatgac 360

gtaacttcct ggaccgacgt actgccagaa ttcggtggtg acacctacgg ttctgacaac 420

ttcatgcagc agcgtggtaa cggcttcgcg acctaccgta acactgactt cttcggtctg 480

gttgacggcc tgaactttgc tgttcagtac cagggtaaaa acggcaaccc atctggtgaa 540

ggctttacta gtggcgtaac taacaacggt cgtgacgcac tgcgtcaaaa cggcgacggc 600

gtcggcggtt ctatcactta tgattacgaa ggtttcggta tcggtggtgc gatctccagc 660

tccaaacgta ctgatgctca gaacaccgct gcttacatcg gtaacggcga ccgtgctgaa 720

acctacactg gtggtctgaa atacgacgct aacaacatct acctggctgc tcagtacacc 780

cagacctaca acgcaactcg cgtaggttcc ctgggttggg cgaacaaagc acagaacttc 840

gaagctgttg ctcagtacca gttcgacttc ggtctgcgtc cgtccctggc ttacctgcag 900

tctaaaggta aaaacctggg tcgtggctac gacgacgaag atatcctgaa atatgttgat 960

gttggtgcta cctactactt caacaaaaac atg 993

<210> 4

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> LBP3

<400> 4

ggcccgggcg cgccg 15

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> LBP3 Forward primer

<400> 5

catatgatga aagttaaagt 20

<210> 6

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> LBP3 Reverse primer

<400> 6

ggatccttat tacggcgcgc ccgggcccat gtttttgttg aagtagta 48

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> LBP3 dimer Forward primer

<400> 7

catatgatga aagttaaagt 20

<210> 8

<211> 63

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> LBP3 dimer Reverse primer

<400> 8

ggatccttat tacggcgcgc ccgggcccgc tttcgccgcc gcttccgccg gcgcgcccgg 60

gcc 63

<210> 9

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> LP1

<400> 9

ggcccgggca acccg 15

<210> 10

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> LP1 Forward primer

<400> 10

catatgatga aagttaaagt 20

<210> 11

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> LP1 Reverse primer

<400> 11

ggatccttat tacgggttgc ccgggcccat gtttttgttg aagtagta 48

<210> 12

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> LP1 dimer forward primer

<400> 12

catatgatga aagttaaagt 20

<210> 13

<211> 63

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> LP1 dimer reverse primer

<400> 13

ggatccttat tacgggttgc ccgggcccgc tttcgccgcc gcttccgccg ggttgcccgg 60

gcc 63