(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0118668
(43) 공개일자 2024년08월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C22B 3/18 (2017.01) *C12N 15/79* (2006.01)
C12N 15/87 (2006.01) *C12N 9/88* (2006.01)
C12Q 1/6897 (2018.01) *C12R 1/89* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C22B 3/18 (2013.01)
C12N 15/79 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2024-0010132
(22) 출원일자 2024년01월23일
심사청구일자 2024년01월23일
(30) 우선권주장
1020230009737 2023년01월25일 대한민국(KR)

(71) 출원인
그린미네랄 주식회사
서울특별시 강남구 역삼로 168, 6층 (역삼동)
서강대학교산학협력단
서울특별시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교)
(72) 발명자
정광환
경기도 성남시 분당구 양현로 192, 1021동 102호
심진곤
서울특별시 마포구 월드컵로30나길 7, 301호
이호석션
서울특별시 종로구 종로 347, 인동 1302호
(74) 대리인
특허법인 에스제이파트너스

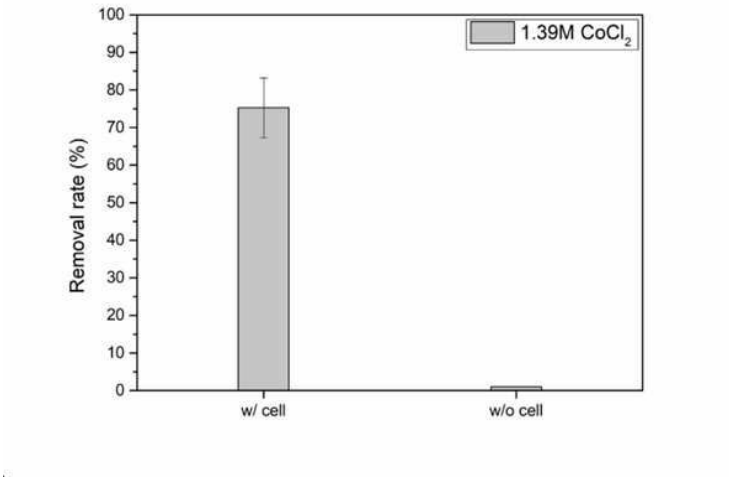
전체 청구항 수 : 총 29 항

(54) 발명의 명칭 **클로렐라 불가리스 균주를 이용한 코발트 침출용 조성물 및 코발트 침출 방법**

(57) 요 약

본 발명은 클로렐라 불가리스 (Chlorella vulgaris) 균주를 이용한 코발트 침출용 조성물 및 코발트 침출 방법에 관한 것이다.

대 표 도 - 도18



(52) CPC특허분류
C12N 15/87 (2013.01)
C12N 9/88 (2013.01)
C12Q 1/6897 (2018.05)
C12Y 113/12007 (2013.01)
C12Y 302/01031 (2013.01)
C12Y 402/01001 (2013.01)
C12R 2001/89 (2021.05)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1425166267
과제번호	S3276150
부처명	중소벤처기업부
과제관리(전문)기관명	중소기업기술정보진흥원
연구사업명	창업성장기술개발
연구과제명	유전자 조작 미세조류의 생광물화 기술 기반 친환경 잔류리튬 재활용 기술
과제수행기관명	그린미네랄
연구기간	2022.04.01 ~ 2023.03.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

클로렐라 불가리스 (*Chlorella vulgaris*) 균주, 상기 균주의 배양물, 상기 배양물의 농축물 및 상기 배양물의 건조물로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는, 코발트 침출용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 균주는 다음을 포함하는 벡터로 형질전환된 것인, 코발트 침출용 조성물:

Coccomyxa C-169 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RuBisCo) small subunit 2 (rbcS2) 유전자의 프로모터;

Coccomyxa subellipsoidea C-169의 beta-type carbonic anhydrase-코딩 뉴클레오타이드 서열; 및

Coccomyxa C-169 rbcS2 유전자의 터미네이터 서열.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 프로모터는 서열번호 2의 염기서열을 포함하는 것인, 코발트 침출용 조성물.

청구항 4

제2항에 있어서, 상기 Coccomyxa subellipsoidea C-169의 beta-type carbonic anhydrase-코딩 뉴클레오타이드 서열은 프로모터에 작동적으로 결합되어 (operatively linked) 있는 것인, 코발트 침출용 조성물.

청구항 5

제2항에 있어서, 상기 터미네이터 서열은 서열번호 3의 염기서열을 포함하는 것인, 코발트 침출용 조성물.

청구항 6

제2항에 있어서, 상기 벡터는 선택 표지로 항생제 내성 유전자를 추가로 포함하는 것인, 코발트 침출용 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 항생제는 스펙티노마이신, 파로모마이신, 앰피실린, 제오신 및 블레오마이신으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것인, 코발트 침출용 조성물.

청구항 8

제2항에 있어서, 상기 벡터는 리포터 분자를 코딩하는 유전자를 추가로 포함하는 것인, 코발트 침출용 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 리포터 분자는 성장 촉진 단백질, 형광 단백질 및 가수 분해 효소로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것인, 코발트 침출용 조성물.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 형광 단백질은 루시퍼라아제인 것인, 코발트 침출용 조성물.

청구항 11

제9항에 있어서, 상기 가수 분해 효소는 β-글루쿠로니다아제인 것인, 코발트 침출용 조성물.

청구항 12

제2항에 있어서, 상기 벡터는 금 입자 충격법 (gold particles bombardment)을 이용한 미세조류 형질전환용인 것인, 코발트 침출용 조성물.

청구항 13

클로렐라 불가리스 (*Chlorella vulgaris*) 균주, 상기 균주의 배양물, 상기 배양물의 농축물 및 상기 배양물의 건조물로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 코발트를 포함하는 물질과 혼합하는 혼합 단계, 및

소정 시간 동안 코발트를 침출하는 침출 단계를 포함하는, 바이오리칭을 통한 코발트 침출 방법.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 코발트 침출 방법은 상기 혼합 단계 전에 다음의 형질전환 단계를 포함하며, 상기 혼합 단계의 클로렐라 불가리스 균주는 형질전환된 클로렐라 불가리스 균주인 것인, 코발트 침출 방법:

Coccomyxa C-169 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RuBisCo) small subunit 2 (rbcS2) 유전자의 프로모터, Coccomyxa subellipsoidea C-169의 beta-type carbonic anhydrase-코딩 뉴클레오타이드 서열, 및 *Coccomyxa* C-169 rbcS2 유전자의 터미네이터 서열을 포함하는 벡터를 클로렐라 불가리스에 도입하는 형질전환 단계.

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 프로모터는 서열번호 2의 염기서열을 포함하는 것인, 코발트 침출 방법.

청구항 16

제14항에 있어서, 상기 Coccomyxa subellipsoidea C-169의 beta-type carbonic anhydrase-코딩 뉴클레오타이드 서열은 프로모터에 작동적으로 결합되어 (operatively linked) 있는 것인, 코발트 침출 방법.

청구항 17

제14항에 있어서, 상기 터미네이터 서열은 서열번호 3의 염기서열을 포함하는 것인, 코발트 침출 방법.

청구항 18

제14항에 있어서, 상기 벡터는 선택 표지로 항생제 내성 유전자를 추가로 포함하는 것인, 코발트 침출 방법.

청구항 19

제18항에 있어서, 상기 항생제는 스펙티노마이신, 파로모마이신, 앰피실린, 제오신 및 블레오마이신으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것인, 코발트 침출 방법.

청구항 20

제14항에 있어서, 상기 벡터는 리포터 분자를 코딩하는 유전자를 추가로 포함하는 것인, 코발트 침출 방법.

청구항 21

제20항에 있어서, 상기 리포터 분자는 성장 촉진 단백질, 형광 단백질 및 가수 분해 효소로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것인, 코발트 침출 방법.

청구항 22

제21항에 있어서, 상기 형광 단백질은 루시퍼라아제인 것인, 코발트 침출 방법.

청구항 23

제21항에 있어서, 상기 가수 분해 효소는 β-글루쿠로니다아제인 것인, 코발트 침출 방법.

청구항 24

제14항에 있어서, 상기 벡터는 금 입자 충격법 (gold particles bombardment)을 이용한 미세조류 형질전환용인

것인, 코발트 침출 방법.

청구항 25

제14항에 있어서, 상기 형질전환 단계는 금 입자 충격법 (gold particles bombardment)을 이용하여 수행하는 것인, 코발트 침출 방법.

청구항 26

제14항에 있어서, 상기 형질전환 단계의 셀 스테이지는 로그 페이즈인 것인, 코발트 침출 방법.

청구항 27

제26항에 있어서, 상기 로그 페이즈는 OD686 값이 0.4 내지 0.6인 것인, 코발트 침출 방법.

청구항 28

제14항에 있어서, 상기 형질전환 단계의 세포 밀도는 $5.0*10^{6}$ 내지 $8.0*10^{7}$ per 60mm Diameter인 것인, 코발트 침출 방법.

청구항 29

제14항에 있어서, 상기 형질전환 단계의 배큠은 27.0 내지 29.0 inchs Hg인 것인, 코발트 침출 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 클로렐라 불가리스 (*Chlorella vulgaris*) 균주를 이용한 코발트 침출용 조성물 및 코발트 침출 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 클로렐라 불가리스 (*Chlorella vulgaris*)는 녹조식물문 (Chlorophyta phylum)에 속하는 단세포 미세조류이다. 클로렐라 불가리스는 광합성 기구를 가지고 있어 광합성을 하면서 빛, 이산화탄소, 물 및 소량의 미네랄만으로도 빠르게 생장하기 때문에, 유용물질 대량생산 (photobioreactor) 연구에 많이 이용되고 있다.

[0003] 또한, 바이오매스 (biomass) 당 지질 함량이 약 42% 정도로 높은 편이어서, 바이오디젤 대용으로 쓸 수 있는 바이오연료 개발 연구에도 많이 이용된다. 최근에는 클로렐라 불가리스를 이용하여 방사성 동위원소인 ^{90}Sr을 제거할 수 있다는 연구가 발표된 바 있다.

[0004] 선택 표지로 하이그로마이신 B 내성 유전자 (hygromycin B resistance gene), 제오신 저항성 유전자 (zeocin resistance gene), 클로람페니콜아세틸전달효소 유전자 (chloramphenicol acetyltransferase gene; CAT gene) 등을 이용하여 전기천공 (electroporation)한 결과, 염색체 DNA에 삽입 (integration)되긴 하였으나, 일시적으로 형질전환체가 만들어져서 이내 저항성 (resistance)를 잃어버렸다.

[0005] 형질전환 방법으로는 유리 비드 (glass beads), 전기천공 및 아그로박테리움-매개 (agrobacterium-mediated) 형질전환 방법 등이 이용되고 있으나, 효율적인 선택 표지 (selectable marker) 및 형질전환 시스템 (transformation system)의 부재로 인하여, 클로렐라 불가리스의 이용이 제한적인 실정이다.

[0006] 기술이 발전함에 따라 전력의 사용량은 급증하고, 에너지 소비와 생산의 효율성은 증가하고 있다. 전력의 사용량이 급증하고 그에 따른 생산의 효율성을 위하여 원전을 이용한 전력의 생산에 세상은 주목하고 있다. 그 생산의 효율성과 함께 항상 대두되는 문제는 바로 원전 사고 및 오염수에 방사능 오염 및 금속이온에 따른 오염을 통한 위험은 사라지지 않는 문제점이다.

[0007] 또한, 산업 현장에서 활용되는 희귀 금속인 Sr, Cs, Li, Ni, Co 등은 해외 수입에 의존하고 있는 국가적 문제에 직면하고 있고, 이차전지의 시장이 증가함에 따라 이러한 문제는 도드라지고 재활용에 대한 문제는 큰 산업적, 국가적 문제로 대두되고 있다.

[0008] 원광석 (ore)이나 2차 자원 (폐촉매 또는 폐전자제품)으로부터 금속을 회수하기 위해서는 주로 습식야금이나 건

식야금 방법이 사용된다. 하지만 산 및 알칼리 침출법에 의한 습식 야금은 금속 침출 시, 강산 및 강알칼리 용매의 사용으로 환경오염이 매우 심각하고, 건식 야금의 경우에는 황화가스가 대량으로 발생하여 설비운영에 있어서 많은 문제점이 있다. 따라서 보다 친환경적인 침출 방법인 바이오리칭 (bioleaching)에 대한 관심이 높아지고 있다.

[0009] 바이오리칭이란, 금속을 침출할 수 있는 미세균을 이용하여 유가금속을 회수하는 습식제련법의 일종이다. 그러나, 친환경적이라 알려진 바이오리칭은 금속 침출의 효율이 낮다는 단점이 있다. 이에, 금속 침출의 효율이 높으면서도 친환경적인 바이오리칭 기술의 개발이 절실히 필요한 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 이에 본 발명자들은 클로렐라 불가리스 (*Chlorella vulgaris*) 균주를 이용하여, 코발트를 포함하는 물질로부터 우수한 효율로 코발트를 침출할 수 있음을 확인하였고, 특히 본 발명의 벡터로 형질전환된 클로렐라 불가리스 균주는 더욱 우수한 코발트 침출 효율을 나타냄을 확인하여, 본 발명을 완성하게 되었다.

[0011] 본 발명자들은 *Coccomyxa* C-169 (이하, C-169; 이전에는 클로렐라 불가리스로 알려져 있었으나 재명명됨)의 프로모터 (Promotor) 및 터미네이터 (terminator) 부위를 예측하여 서열을 얻어내고, *Sh ble* 유전자와 융합 (fusion)하여 합성하였다. *Streptomyces verticillus* bleomycin (*Sh ble*) 유전자의 중간에 어떤 인트론도 삽입하지 않았고, 합성된 DNA 조각 (fragment)은 SwaI/KpnI 제한효소 처리하여 pSP124S 벡터에 클로닝하였고 이를 pKA650으로 명명하였다.

[0012] 또한, pKa650 벡터에 *Streptomyces verticillus* bleomycin (*Sh ble*) gene의 중간에 목적 유전자인 beta-type carbonic anhydrase cloning 하였고 이를 pJG002으로 명명하였다.

[0013] 그 다음, 금 입자 충격법 (gold particle bombardment)으로 형질전환 한 후, 제오신이 포함된 배지에서 배양하여 선택적으로 선별하였다. 선별을 통한 배양으로 콜로니를 얻음으로써 형질전환체를 제조하였다.

[0014] 그리고 클로렐라 불가리스 또는 이의 형질전환체를 이용하여 코발트를 포함하는 물질로부터 우수한 효율로 코발트를 침출할 수 있음을 확인하였다.

[0015] 따라서, 본 발명의 목적은 클로렐라 불가리스 균주, 상기 균주의 배양물, 상기 배양물의 농축물 및 상기 배양물의 건조물로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는, 코발트 침출용 조성물을 제공하는 것이다.

[0016] 본 발명의 다른 목적은 클로렐라 불가리스 균주, 상기 균주의 배양물, 상기 배양물의 농축물 및 상기 배양물의 건조물로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 코발트를 포함하는 물질과 혼합하는 혼합 단계, 및 소정 시간 동안 코발트를 침출하는 침출 단계를 포함하는, 바이오리칭을 통한 코발트 침출 방법을 제공하는 것이다.

[0017] 본 발명의 또 다른 목적은 클로렐라 불가리스 균주의 코발트 침출 용도를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0018] 본 발명은 클로렐라 불가리스 (*Chlorella vulgaris*) 균주를 이용한 코발트 침출용 조성물 및 코발트 침출 방법에 관한 것이다.

[0019] 이하 본 발명을 더욱 자세히 설명하고자 한다.

[0020] 본 발명의 일 양태는 클로렐라 불가리스 (*Chlorella vulgaris*) 균주, 상기 균주의 배양물, 상기 배양물의 농축물 및 상기 배양물의 건조물로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는, 코발트 침출용 조성물에 관한 것이다.

[0021] 본 발명에 있어서, 클로렐라 불가리스 균주는 생광물화 (biomineralization)를 통해 코발트를 포함하는 물질에서 코발트를 결정화시켜 코발트를 침출할 수 있다.

[0022] 본 명세서 상의 용어 “침출”은 목적 성분의 분리를 의미하며, “분리”, “추출” 또는 “용출”과 상호 교환적으로 사용 가능하다.

[0023] 본 명세서 상의 용어 “침출용 조성물”은 목적 성분의 분리를 목적으로 하는 조성물을 의미하며, “생광물화용 조성물” 또는 “바이오리칭용 조성물”과 상호 교환적으로 사용 가능하다.

[0024] 본 발명에 있어서, 균주는 다음을 포함하는 벡터로 형질전환된 것일 수 있다:

[0025] *Coccomyxa* C-169 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RuBisCo) small subunit 2 (rbcS2) 유전자의 프로모터;

[0026] Coccomyxa subellipsoidea C-169의 beta-type carbonic anhydrase-코딩 뉴클레오타이드 서열; 및

[0027] *Coccomyxa* C-169 rbcS2 유전자의 터미네이터 서열.

[0028] 본 발명에 있어서 프로모터는 서열번호 2의 염기서열을 포함하는 것일 수 있으며, 또는 상기 서열번호 2의 염기서열에 대하여 실질적 동일성을 갖는 염기서열을 포함하는 것일 수 있고, 예를 들어, 서열번호 2의 염기서열로 이루어진 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0029] 본 발명의 일 예에 있어서 서열번호 2의 염기서열을 포함하는 프로모터는 서열번호 1에 포함된 서열번호 2의 서열의 3'말단에 1 내지 50 bp의 염기를 추가로 포함하는 서열인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0030] 본 발명에 있어서 터미네이터 서열은 서열번호 3의 염기서열을 포함하는 것일 수 있으며, 또는 상기 서열번호 3의 염기서열에 대하여 실질적 동일성을 갖는 염기서열을 포함하는 것일 수 있고, 예를 들어, 서열번호 3의 염기서열로 이루어진 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0031] 본 발명에 있어서 목적 단백질-코딩 뉴클레오타이드 서열은 프로모터에 작동적으로 결합되어 (operatively linked) 있는 것일 수 있다.

[0032] 본 발명에 있어서 용어 “작동적으로 결합된 (operatively linked)”은 핵산 발현 조절 서열 (예를 들어, 프로모터 서열, 시그널 서열 또는 전사조절인자 결합 위치의 어레이)과 다른 핵산 서열 사이의 기능적인 결합을 의미하며, 이에 의해 상기 조절 서열은 상기 다른 핵산 서열의 전사 및/또는 번역을 조절하게 된다.

[0033] 본 발명에 있어서 목적 단백질-코딩 뉴클레오타이드 서열은 터미네이터 서열의 3'말단에 연결된 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0034] 본 발명에 있어서 벡터는 선택 표지를 추가로 포함하는 것일 수 있다.

[0035] 본 발명에 있어서 선택 표지는 항생제 내성 유전자인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0036] 본 발명에 있어서 항생제는 스펙티노마이신, 파로모마이신, 앰피실린, 제오신 및 블레오마이신으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0037] 본 발명에 있어서 선택 표지는 기존의 사용하고자 하는 항생제에 대한 다양한 선택 표지 유전자를 선택할 수 있다. 그 예로는 카나마이신 항생제 내성을 갖게 하는 아미노글라이코사이드 포스포트랜스퍼레이즈, 클로람페니콜 항생제 내성에 관여하는 클로람페니콜 아세틸트렌스퍼레이즈 등이 있다.

[0038] 본 발명에 있어서 선택 표지가 블레오마이신인 경우, 선택 표지는 서열번호 4의 염기서열을 포함하는 것일 수 있으며, 또는 상기 서열번호 4의 염기서열에 대하여 실질적 동일성을 갖는 염기서열을 포함하는 것일 수 있고, 예를 들어, 서열번호 4의 염기서열로 이루어진 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0039] 본 발명에 있어서 선택 표지가 도입된 형질 전환된 클로렐라 불가리스를 선별하는 방법은 선택 표지에 의해 발현되는 표현형을 이용하여, 당업계에 널리 알려진 방법에 따라 용이하게 실시할 수 있다. 예를 들어, 상기 선택 표지가 특정 항생제 내성 유전자인 경우에는, 상기 항생제가 함유된 배지에서 형질전환체를 배양함으로써 형질전환체를 용이하게 선별할 수 있다.

[0040] 본 발명에 있어서 벡터는 리포터 분자를 코딩하는 유전자를 추가로 포함하는 것일 수 있다.

[0041] 본 발명에 있어서 리포터 분자는 성장 촉진 단백질, 형광 단백질 및 가수 분해 효소로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0042] 본 발명에 있어서 형광 단백질은 루시퍼라아제인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0043] 본 발명에 있어서 가수 분해 효소는 β-글루쿠로니다아제인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0044] 본 발명에 있어서 벡터는 서열번호 1의 염기서열을 포함하는 것일 수 있으며, 또는 상기 서열번호 1의 염기서열에 대하여 실질적 동일성을 갖는 염기서열을 포함하는 것일 수 있고, 예를 들어, 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0045] 본 발명에 있어서 벡터는 금 입자 충격법 (gold particles bombardment)을 이용한 클로렐라 불가리스 형질전환용인 것일 수 있다.

[0046] 본 발명에 있어서 "벡터(vector)"는 숙주 세포에서 목적 유전자를 발현시키기 위한 수단을 의미한다. 예를 들어, 플라스미드 벡터, 코즈미드 벡터 및 박테리오파아지 벡터, 아데노바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터 및 아데노연관 바이러스 벡터와 같은 바이러스 벡터를 포함한다.

[0047] 본 발명에 있어서 재조합 벡터로 사용될 수 있는 벡터는 당업계에서 종종 사용되는 플라스미드 (예를 들면, pSC101, pGV1106, pACYC177, ColE1, pKT230, pME290, pBR322, pUC8/9, pUC6, pBD9, pHC79, pIJ61, pLAFR1, pHV14, pGEX 시리즈, pET 시리즈 및 pUC19 등), 파지 (예를 들면, λgt4λB, λ-Charon, λΔz1 및 M13 등) 또는 바이러스 (예를 들면, SV40 등)를 조작하여 제작될 수 있으며, 예를 들어, pSP124S 벡터 골격인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0048] 본 발명에 있어서 벡터는 전형적으로 클로닝을 위한 벡터 또는 발현을 위한 벡터로서 구축될 수 있다.

[0049] 본 발명에 있어서 발현을 위한 벡터는 당업계에서 식물, 동물 또는 미생물에서 목적 단백질을 발현하는 데 사용되는 통상의 것을 사용할 수 있다.

[0050] 본 발명에 있어서 벡터는 당업계에 공지된 다양한 방법을 통해 구축될 수 있다.

[0051] 본 발명에 있어서 용어 “실질적인 동일성”은 각각의 염기서열과 임의의 다른 염기서열을 최대한 대응되도록 정렬하고, 그 서열을 분석하여, 상기 임의의 다른 염기서열이 각각의 염기서열과 70% 이상, 90% 이상, 또는 98% 이상의 서열 상동성을 갖는 것을 의미한다.

[0052] 본 발명의 다른 양태는 클로렐라 불가리스 (*Chlorella vulgaris*) 균주, 상기 균주의 배양물, 상기 배양물의 농축물 및 상기 배양물의 건조물로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 코발트를 포함하는 물질과 혼합하는 혼합 단계, 및 소정 시간 동안 코발트를 침출하는 침출 단계를 포함하는, 바이오리칭을 통한 코발트 침출 방법에 관한 것이다.

[0053] 본 발명에 있어서 코발트 침출 방법은 혼합 단계 전에 다음의 형질전환 단계를 포함하며, 혼합 단계의 클로렐라 불가리스 균주는 형질전환된 클로렐라 불가리스 균주인 것일 수 있다:

[0054] *Coccomyxa* C-169 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RuBisCo) small subunit 2 (rbcS2) 유전자의 프로모터, 목적 단백질-코딩 뉴클레오타이드 서열, 및 *Coccomyxa* C-169 rbcS2 유전자의 터미네이터 서열을 포함하는 벡터를 클로렐라 불가리스에 도입하는 형질전환 단계.

[0055] 본 발명에 있어서 프로모터는 서열번호 2의 염기서열을 포함하는 것일 수 있으며, 또는 상기 서열번호 2의 염기서열에 대하여 실질적 동일성을 갖는 염기서열을 포함하는 것일 수 있고, 예를 들어, 서열번호 2의 염기서열로 이루어진 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0056] 본 발명의 일 예에 있어서 서열번호 2의 염기서열을 포함하는 프로모터는 서열번호 1에 포함된 서열번호 2의 서열의 3'말단에 1 내지 50 bp의 염기를 추가로 포함하는 서열인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0057] 본 발명의 일 예에 있어서 서열번호 2의 염기서열을 포함하는 프로모터는 서열번호 7에 포함된 서열번호 2의 서열의 3'말단에 1 내지 50 bp의 염기를 추가로 포함하는 서열인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0058] 본 발명에 있어서 터미네이터 서열은 서열번호 3의 염기서열을 포함하는 것일 수 있으며, 또는 상기 서열번호 3의 염기서열에 대하여 실질적 동일성을 갖는 염기서열을 포함하는 것일 수 있고, 예를 들어, 서열번호 3의 염기서열로 이루어진 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0059] 본 발명에 있어서 목적 단백질-코딩 뉴클레오타이드 서열은 프로모터에 작동적으로 결합되어 (operatively linked) 있는 것일 수 있다.

[0060] 본 발명에 있어서 목적 단백질-코딩 뉴클레오타이드 서열은 터미네이터 서열의 3'말단에 연결된 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0061] 본 발명에 있어서 벡터는 선택 표지를 추가로 포함하는 것일 수 있다.

[0062] 본 발명에 있어서 선택 표지는 항생제 내성 유전자인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0063] 본 발명에 있어서 항생제는 스펙티노마이신, 파로모마이신, 앰피실린, 제오신 및 블레오마이신으로 이루어진 군

에서 선택된 1종 이상인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0064] 본 발명에 있어서 선택 표지는 기존의 사용하고자 하는 항생제에 대한 다양한 선택 표지 유전자를 선택할 수 있다. 그 예로는 카나마이신 항생제 내성을 갖게 하는 아미노글라이코사이드 포스포트랜스퍼레이즈, 클로람페니콜 항생제 내성에 관여하는 클로람페니콜 아세틸트렌스퍼레이즈 등이 있다.

[0065] 본 발명에 있어서 선택 표지가 블레오마이신인 경우, 선택 표지는 서열번호 4의 염기서열을 포함하는 것일 수 있으며, 또는 상기 서열번호 4의 염기서열에 대하여 실질적 동일성을 갖는 염기서열을 포함하는 것일 수 있고, 예를 들어, 서열번호 4의 염기서열로 이루어진 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0066] 본 발명에 있어서 선택 표지가 도입된 형질 전환된 클로렐라 불가리스를 선별하는 방법은 선택 표지에 의해 발현되는 표현형을 이용하여, 당업계에 널리 알려진 방법에 따라 용이하게 실시할 수 있다. 예를 들어, 상기 선택 표지가 특정 항생제 내성 유전자인 경우에는, 상기 항생제가 함유된 배지에서 형질전환체를 배양함으로써 형질전환체를 용이하게 선별할 수 있다.

[0067] 본 발명에 있어서 벡터는 리포터 분자를 코딩하는 유전자를 추가로 포함하는 것일 수 있다.

[0068] 본 발명에 있어서 리포터 분자는 성장 촉진 단백질, 형광 단백질 및 가수 분해 효소로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0069] 본 발명에 있어서 형광 단백질은 루시퍼라아제인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0070] 본 발명에 있어서 가수 분해 효소는 β-글루쿠로니다아제인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0071] 본 발명에 있어서 벡터는 서열번호 1의 염기서열을 포함하는 것일 수 있으며, 또는 상기 서열번호 1의 염기서열에 대하여 실질적 동일성을 갖는 염기서열을 포함하는 것일 수 있고, 예를 들어, 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0072] 본 발명에 있어서 벡터는 서열번호 7의 염기서열을 포함하는 것일 수 있으며, 또는 상기 서열번호 7의 염기서열에 대하여 실질적 동일성을 갖는 염기서열을 포함하는 것일 수 있고, 예를 들어, 서열번호 7의 염기서열로 이루어진 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0073] 본 발명에 있어서 벡터는 금 입자 충격법 (gold particles bombardment)을 이용한 클로렐라 불가리스 형질전환용인 것일 수 있다.

[0074] 본 발명에 있어서 재조합 벡터로 사용될 수 있는 벡터는 당업계에서 종종 사용되는 플라스미드 (예를 들면, pSC101, pGV1106, pACYC177, ColE1, pKT230, pME290, pBR322, pUC8/9, pUC6, pBD9, pHC79, pIJ61, pLAFR1, pHV14, pGEX 시리즈, pET 시리즈 및 pUC19 등), 파지 (예를 들면, λgt4λB, λ-Charon, λΔz1 및 M13 등) 또는 바이러스 (예를 들면, SV40 등)를 조작하여 제작될 수 있으며, 예를 들어, pSP124S 벡터 골격인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0075] 본 발명에 있어서 벡터는 전형적으로 클로닝을 위한 벡터 또는 발현을 위한 벡터로서 구축될 수 있다.

[0076] 본 발명에 있어서 발현을 위한 벡터는 당업계에서 식물, 동물 또는 미생물에서 목적 단백질을 발현하는 데 사용되는 통상의 것을 사용할 수 있다.

[0077] 본 발명에 있어서 벡터는 당업계에 공지된 다양한 방법을 통해 구축될 수 있다.

[0078] 본 발명에 있어서 형질전환 단계는 금 입자 충격법 (gold particles bombardment)을 이용하여 수행하는 것일 수 있다.

[0079] 본 발명에 있어서 형질전환 단계의 셀 스테이지는 로그 페이즈인 것일 수 있다. 로그 페이즈일 때가 가장 효율이 높다.

[0080] 본 발명에 있어서 로그 페이즈는 OD686 값이 0.4 내지 0.6, 0.45 내지 0.6, 0.5 내지 0.6, 0.55 내지 0.6, 예를 들어, 0.6인 것일 수 있다.

[0081] 본 발명에 있어서 형질전환 단계의 세포 밀도는 $5.0*10^6$ 내지 $8.0*10^7$ per 60mm Diameter, $1.0*10^7$ 내지 $8.0*10^7$ per 60mm Diameter, $2.0*10^7$ 내지 $8.0*10^7$ per 60mm Diameter, $3.0*10^7$ 내지 $8.0*10^7$ per 60mm Diameter, $4.0*10^7$ 내지 $8.0*10^7$ per 60mm Diameter, $1.0*10^7$ 내지 $7.0*10^7$ per 60mm Diameter, $2.0*10^7$ 내지 $7.0*10^7$ per

60mm Diameter, $3.0*10^7$ 내지 $7.0*10^7$ per 60mm Diameter, $4.0*10^7$ 내지 $7.0*10^7$ per 60mm Diameter, $1.0*10^7$ 내지 $6.0*10^7$ per 60mm Diameter, $2.0*10^7$ 내지 $6.0*10^7$ per 60mm Diameter, $3.0*10^7$ 내지 $6.0*10^7$ per 60mm Diameter, $4.0*10^7$ 내지 $6.0*10^7$ per 60mm Diameter, $1.0*10^7$ 내지 $5.0*10^7$ per 60mm Diameter, $2.0*10^7$ 내지 $5.0*10^7$ per 60mm Diameter, $3.0*10^7$ 내지 $5.0*10^7$ per 60mm Diameter, $4.0*10^7$ 내지 $5.0*10^7$ per 60mm Diameter, 예를 들어, $4.8*10^7$ per 60mm Diameter인 것일 수 있다.

[0082] 본 발명에 있어서 형질전환 단계의 배큠은 27.0 내지 29.0 inchs Hg, 배큠은 27.5 내지 29.0 inchs Hg, 28.0 내지 29.0 inchs Hg, 28.5 내지 29.0 inchs Hg, 예를 들어, 29.0 inchs Hg 인 것일 수 있다.

[0083] 본 발명에 있어서 형질전환 단계의 타겟 거리는 3 내지 9인 것일 수 있으며, 예를 들어, 3, 6 또는 9인 것일 수 있다.

[0084] 본 발명에 있어서 형질전환 단계의 압력은 1200 내지 1300 psi, 1210 내지 1300 psi, 1220 내지 1300 psi, 1230 내지 1300 psi, 1240 내지 1300 psi, 1250 내지 1300 psi, 1260 내지 1300 psi, 1270 내지 1300 psi, 1280 내지 1300 psi, 1290 내지 1300 psi, 예를 들어, 1300 psi인 것일 수 있다.

[0085] 본 발명에 있어서 코발트를 포함하는 물질은 $CoCl_2$ 용액, $CoSO_4$ 용액, 코발트를 포함하는 배터리, 폐배터리, 폐수 및 염호로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

발명의 효과

[0086] 본 발명은 클로렐라 불가리스 (*Chlorella vulgaris*) 균주를 이용한 코발트 침출용 조성물 및 코발트 침출 방법에 관한 것이다.

도면의 간단한 설명

[0087] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 pKA650 벡터지도이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따라 유리 비드 방법을 이용한 형질전환 시 효율성이 떨어지며 형질전환이 잘 이루어 지지 않았음을 확인한 결과를 보여주는 사진이다.

도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 벡터 시스템으로 저항유전자를 도입하고 이에 대한 형질전환으로 인해 항생제 내성을 갖는 돌연변이체들을 확보한 결과를 보여주는 사진이다.

도 4는 본 발명의 일 실시예에 따라 확보된 돌연변이체의 유전적 정보를 확인한 결과를 보여주는 사진이다.

도 5는 본 발명의 일 실시예에 따라 돌연변이체 유지 확인을 위해 계대 배양한 결과를 보여주는 사진다.

도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른 pJG002 벡터지도이다.

도 7은 본 발명의 일 실시예에 따라 실시예 2와 같은 생체탄도학적으로 형질전환을 실시하였고, 이에 대한 계대 배양 후 항생제 내성이 유지하는 것을 농도별로 확인한 결과이다.

도 8은 본 발명의 일 실시예에 따라 형질전환체의 유전자, 단백질적 발현을 확인하기 위하여, Whole protein SDS-PAGE를 통하여 목적 단백질인 beta-type carbonic anhydrase의 약 43kDa의 밴드사이즈를 확인한 결과 사진이다.

도 9는 본 발명의 일 실시예에 따라 목적단백질의 밴드의 확인을 위하여 MALDI-TOF를 실시한 결과이다.

도 10은 본 발명의 일 실시예에 따라 유전자적 확인을 위하여 southern blot을 통해 목적 유전자의 유무를 확인한 결과를 보여주는 사진이다.

도 11은 본 발명의 일 실시예에 따라 야생형과 형질전환체의 Sr 생광물화를 비교한 결과를 보여주는 사진이다.

도 12는 본 발명의 일 실시예에 따라 야생형과 형질전환체의 Sr 생광물화의 정량적인 비교를 위하여 ICP-MS를 통하여 분석 결과이다.

도 13 및 도 14는 본 발명의 일 실시예에 따라 단일 $CoCl_2$ 농도에 따른 제거율을 확인한 결과 그래프이다.

도 15 및 도 16은 본 발명의 일 실시예에 따라 Sodium 및 Sulfate에 대한 영향 결과 (농도별: 300, 600,

900mM)를 측정한 결과 그래프이다.

도 17은 본 발명의 일 실시예에 따른 코발트 배터리 용액 조성을 나타낸 그래프이다.

도 18은 본 발명의 일 실시예에 따라 코발트 배터리 용액에서의 Co 결정화 결과를 나타낸 그래프이다.

도 19 및 도 20은 본 발명의 일 실시예에 따라 코발트 배터리 용액에서의 Na, S에 따른 결정화 (각 300,600,900 mM) 결과를 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0088] 이하, 본 발명을 하기의 실시예에 의하여 더욱 상세히 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐이며, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의하여 한정되는 것은 아니다.

[0090] **제조예 1. 플라스미드 구축 및 클로닝**

[0091] 방선균 (*Streptomyces verticillus*)의 지노믹 DNA로부터 블레오마이신 (bleomycin) 내성 유전자 (*Sh ble*)의 서열을 얻었다. 블레오마이신 내성 유전자의 5' 부분에는 *Coccomyxa* C-169 *rbcS2* 유전자의 프로모터 서열을, 3' 부분에는 *Coccomyxa* C-169 *rbcS2* 유전자의 터미네이터 서열을 접합시켜 얻은 전체 서열인 *Sh-ble*를 합성하였다 (GenScript, 미국). 합성한 유전자를 Swa I 및 Kpn I로 제한효소 처리하여 pSP124S 벡터에 삽입하였다. 수득한 플라스미드를 pKA650이라고 명명하고 백터지도를 도 1에 나타내었다.

[0092] 도 1에서 확인할 수 있듯이, 벡터지도의 OriV는 복제 기원 (replication origin), *Sh ble*는 *Streptomyces verticillus* bleomycin의 프로모터 및 터미네이터가 결합된 *Sh ble* 유전자, AmpR은 앰피실린 내성 유전자), C-169-ble는 *Coccomyxa* C-169 *rbcS2* 유전자의 프로모터 서열을, 3' 부분에는 *Coccomyxa* C-169 *rbcS2* 유전자의 터미네이터 부분이다.

[0094] **제조예 2. 클로렐라 불가리스에 형질전환**

[0095] **2-1. 유리 비드 방법을 이용한 형질전환**

[0096] Glass bead를 통한 A Simple and Rapid Glass Bead Transformation Method를 사용하였다. 이 방법은 Glass bead를 넣고 물리적 힘을 가하면 세포와의 물리적인 마찰을 통해 세포의 세포막에 구멍을 만들어 원하는 플라스미드를 도입하는 방법이다.

[0097] 표 1에 기재된 조건에 따라 실험을 진행하였다. 구체적으로, 세포를 상온 (25℃)에서 유리 비드를 통해 볼텍싱을 진행하여 세포의 일부분을 파쇄하였다. 그 다음, 중력으로 비드와 상층액을 분리하여 상층액에 DNA를 첨가하였다. 그 다음, 37℃에서 천천히 회전시키며 회복을 진행시켰다. 항생제가 포함된 고체 배지에 분주한 후, 형질전환체를 확인하였다. 그 결과를 도 2에 나타내었다.

표 1

[0098]

Date	OD686	Cell number	Concentration	Amount of DNA	Vortexing	Results
160810	0.1	$1*10^6$ cells/ml	$1*10^8$ cells/ml	10 ug linearized	15 sec	NO
160811	0.3	$1*10^6$ cells/ml	$1*10^8$ cells/ml	10 ug linearized	10 sec	NO
160816	0.3	$1*10^7$ cells/ml	$1*10^9$ cells/ml	10 ug non-linearized	20 sec	NO

[0100] 도 2에서 확인할 수 있듯이, 효율성이 떨어지며 형질전환이 잘 이루어 지지 않았음을 확인하였다.

[0102] **2-2. 유전자 총 방법을 이용한 형질전환**

[0103] 식물 형질전환 방법인 유전자 총 (gene gun)을 이용한 금 입자 충격법 (gold particles bombardment)을 사용하

여 형질전환을 하였다. 이 기술은 미세입자 가속 또는 생체탄도학이라고도 부르지만, 유전자 총이라고 부르는 기계의 공식명칭은 미세 입자 충격법 (microparticle bombardment)이다. 미세입자로 플라스미드를 감싸 형질전환 하는 방법이다. 미세 입자는 크기에 비해 아주 무겁기 때문에 세포를 잘 뚫고 들어간다. 미세 입자를 고속으로 세포 방향으로 날려 보내면서 주변을 강철 그물로 감싸서, 입자가 세포로 더 많이 날아가도록 한다. 세포 속으로 들어간 미세입자에 코팅된 DNA가 방출되어 식물의 유전체에 들어갈 수 있다. 이 미세입자로 금을 사용하여 형질전환을 하였다.

[0104] 구체적으로, 하기 표 2과 같이 금 입자 충격법으로 형질 전환을 시키기 위하여 여러 가지 조건을 바꾸어 주며 실험을 진행하였다. 우선 Vacuum과 Helium Pressure는 고정하여, Cell stage와 농도, 금 입자의 분사 범위, Target Distance, 세포의 실험 환경을 고려하여 실험을 진행하였다.

[0105] 조건을 확립하는 과정에서 Gene gun의 금 입자의 분사 범위와 압력을 고려하여 47mm, 50mm, 60mm으로 실험을 하였고, Target Distance의 거리를 변화에 따라 진행하여 적정위치로 Target Distance 3으로 실험을 진행하였다. 또한 Cell stage가 많이 진행이 되면 미세조류의 막이 두꺼워지게 되어 실험이 어렵기 때문에 초기 stage부터 OD값의 변화에 따라 실험을 진행하였다. 또한 세포의 밀도는 diameter에 따라 조절하여 실험을 진행하였다.

표 2

[0106]

Date	OD686	Cell Density	Vacuum (inchs Hg)	Target Distance	Helium Pressure	Results
160603	0.5	4.0*107 per 60mm Diameter	29	3,6,9	1300	NO
160607	0.7	6.0*107 per 50mm Diameter	29	3	1300	NO
160607	0.7	6.0*108 per 50mm Diameter	29	6	1300	NO
160607	0.7	6.0*109 per 50mm Diameter	29	9	1300	NO
160613	0.074	3.6*106 per 50mm Diameter	29	3,6,9	1300	NO
160614	0.1	3.6*106 per 50mm Diameter	29	3.6.9	1300	NO
160615	0.2	3.5*106 per 50mm Diameter	29	3.6.9	1300	NO
160616	0.3	4.0*106 per 50mm Diameter	29	3.6.9	1300	NO
160617	0.6	3.6*106 per 50mm Diameter	29	3.6.9	1300	NO
160629	0.1	4.8*107 per 60mm Diameter	29	3.6.9	1300	NO
160630	0.2	4.8*107 per 60mm Diameter	29	3.6.9	1300	NO
160701	0.3	4.8*107 per 60mm Diameter	29	3.6.9	1300	NO
160704	0.6	4.8*107 per 60mm Diameter	29	3.6.9	1300	YES
160711	0.1	1.0*107 per 47mm Membrane	29	3	1300	NO
160712	0.2	1.0*107 per 47mm Membrane	29	3	1300	NO
160713	0.3	1.0*107 per 47mm Membrane	29	3	1300	NO
160714	0.6	1.0*107 per 47mm Membrane	29	3	1300	NO
160815	0.07	2.0*107 per 47mm Membrane	29	3	1300	-
160816	0.1	2.0*107 per 47mm Membrane	29	3	1300	-
160818	0.3	2.0*107 per 47mm Membrane	29	3	1300	-

[0108] 표 2 및 도 3에서 확인할 수 있듯이, 실패의 경우 항생제가 포함된 고체 배지에서 생장을 하지 못하고, 성공시 콜로니를 형성하게 되는 바, 160704의 조건의 경우에서만 프로모터의 작동 (돌연변이체)를 확인하였다. 그 다음, 동일한 조건을 통해 목적으로 하는 단백질 (Carbonic anhydrase)를 도입하여 돌연변이체를 형성하였다.

[0110] **실험예 1. 유전적 정보 확인**

[0111] 이의 유전적 정보 확인을 위하여 genomic DNA를 확보하여 PCR과 DNA 시퀀싱을 통해 도입 유전자를 확인하였다. 구체적으로, 유전자를 확인하는 PCR을 수행하기 위하여, 하기 표 3의 프라이머 세트를 제작하고, 프라이머 세트로 98도 8분으로 pre denaturation을 하고, 98도 1분, 53.5도 30초, 72도 1분을 30 cycle 72도 7분으로 PCR을 수행하였고, 이를 시퀀싱 분석을 통하여 확인하였다. 이는 표 1에 나타내었다.

[0112] 그리고 본 발명자의 목적으로 하는 블레오마이신 내성 유전자의 5' 부분에는 *Coccomyxa* C-169 *rbcS2* 유전자의 프로모터 서열을, 3' 부분에는 *Coccomyxa* C-169 *rbcS2* 유전자의 터미네이터 서열을 접합시켜 얻은 전체 서열인 *Sh-ble*를 확인하기위하여 M13 primer set으로 PCR을 진행하였다. 98도 8분으로 pre denaturation을 하고, 98도 1분, 54도 40초, 72도 2분 30초을 30 cycle 72도 7분으로 PCR을 수행하였고 PCR를 통해 목적 DNA 밴드를 확인하여, 그 결과를 도 4에 나타내었다.

표 3

[0113]

서열번호	명명	서열목록 (5'-> 3')	비고
5	Forward primer	ATGGCCAAGTTGACCAGT	
6	Reverse primer	TCAGTCCTGCTCCTCGGCCA	

[0115] 도 4에서 확인할 수 있듯이, 타겟 유전자의 총 크기인 약 2kb 정도에서 밴드를 확인하였다. 이를 DNA 유전자 분석을 통해 목적 유전자와 일치하는지를 확인하여, 그 결과를 표 4에 나타내었다.

표 4

[0116]

sh-ble	----------
TF5ble1	CGGCAATGACTGATTACGCCAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTAACGGCCGCCA
sh-ble	----------ATGGCCAAGTTGACCAGTGCCGTTCCGGTGCTCACCGCGC
TF5ble1	GTGTGCTGGAATTCGCCCTTATGGCCAAGTTGACCAGTGCCGTTCCGGTGCTCACCGCGC
	**********
sh-ble	GCGACGTCGCCGGAGCGGTCGAGTTCTGGACCGACCGGCTCGGGTTCTCCCGGGACTTCG
TF5ble1	GCGACGTCGCCGGAGCGGTCGAGTTCTGGACCGACCGGCTCGGGTTCTCCCGGGACTTCG
	**********
sh-ble	TGGAGGACGACTTCGCCGGTGTGGTCCGGGACGACGTGACCCTGTTCATCAGCGCGGTCC
TF5ble1	TGGAGGACGACTTCGCCGGTGTGGTCCGGGACGACGTGACCCTGTTCATCAGCGCGGTCC
	**********
sh-ble	AGGACCAGGTGGTGCCGGACAACACCCTGGCCTGGGTGTGGGTGCGCGGCCTGGACGAGC
TF5ble1	AGGACCAGGTGGTGCCGGACAACACCCTGGCCTGGGTGTGGGTGCGCGGCCTGGACGAGC
	**********
sh-ble	TGTACGCCGAGTGGTCGGAGGTCGTGTCCACGAACTTCCGGGACGCCTCCGGGCCGGCCA
TF5ble1	TGTACGCCGAGTGGTCGGAGGTCGTGTCCACGAACTTCCGGGACGCCTCCGGGCCGGCCA
	**********
sh-ble	TGACCGAGATCGGCGAGCAGCCGTGGGGGCGGGAGTTCGCCCTGCGCGACCCGGCCGGCA
TF5ble1	TGACCGAGATCGGCGAGCAGCCGTGGGGGCGGGAGTTCGCCCTGCGCGACCCGGCCGGCA
	**********

sh-ble	ACTGCGTGCACTTCGTGGCCGAGGAGCAGGACTGA
TF5ble1	ACTGCGTGCACTTCGTGGCCGAGGAGCAGGACTGA
	**********

[0118] 표 4에서 확인할 수 있듯이, CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment 결과 목적 유전자인 Sh-ble의 DNA 염기서열을 확보한 유전자정보와 대조하였을 때 완전 일치함을 확인하였다.

[0120] **실험예 2. 돌연변이체 유지 확인**

[0121] 돌연변이체 유지를 위하여 계대배양을 통하여 돌연변이체 유지를 확인하여, 그 결과를 도 5에 나타내었다. 도 5에서 확인할 수 있듯이, 돌연변이체 유지를 위하여 계대배양을 통하여 돌연변이체 유지를 확인하였다.

[0123] **실험예 3. 생광물화**

[0124] **실시예 1: 플라스미드 구축 및 클로닝**

[0125] pKA650벡터에 기반하여 목적 단백질에 대한 유전자를 삽입하여 제오신에 대한 내성을 갖으며, 목적단백질을 발현하기 위한 플라스미드 구축 및 클로닝이다. *Streptomyces verticillus*(*Sh ble*)의 지노믹 DNA로부터 bleomycin 내성 유전자(*Sh ble*)의 서열을 얻었다. *Coccomyxa* C-169 rbcS2(ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase small subunit) 유전자의 프로모터 및 터미네이터서열을 각각 *Sh ble*의 5' 및 3' 부분에 붙여 만들어진 전체 서열을 합성하였다. 이 서열을 pKA650이라고 명명되었고, 합성된 pKA650에서 상기 전체 서열인 *Sh-ble*의 중간 유전자인 *BleoR*을 C-169 *beta-type carbonic anhydrase* 유전자를 치환하여 합성한 뒤, 제한효소 *Kpn*I, *Apa*I을 사용하여 중복된 프로모터 부분을 삽입하였다. 클로닝 된 플라스미드를 도 6에 나타내었으며, 이를 pJG002라고 명명하였다.

[0127] **실시예 2: 클로렐라 불가리스 형질전환**

[0128] pJG002 벡터를 통한 형질전환 방법은 상기 pKA650 벡터를 통한 형질전환 방법과 동일하다.

[0129] 구체적으로, 감응세포를 만들기 위하여 500m L 플라스크에 300mℓ 멸균 MBM배지(KNO_3 2.5mM, $MgSO_47H_2O$ 0.3mM, K_2HPO_4 0.43mM, KH_2PO_4 1.29mM, NaCl 0.43mM, $CaCl_2*2H_2O$ 0.068mM, $FeSO_4*7H_2O$ 0.1g, A5 metal mix ml/L)를 준비하고 *Chlorella vulgaris*을 접종하여 23℃ 및 100 rpm 조건에서 배양하였다. OD_{686}값이 0.5-0.6에 이르면 *Chlorella vulgaris* 원심분리기로 수득한 후 셀 수를 확인한다.

[0130] 셀 수를 확인 후 셀 밀도를 $4.8*10^7$로 준비한다. 그 후 gold particles bombardment를 위하여 도입할 pKA650을 제한효소 KpnI로 linearized하게 준비한다. 미리 멸균상태로 준비해 놓은 retaining cap, Brass Adjustable Nest, Micro carrier Holder, Stopping screen, Macrocarrier 을 준비하고 Rupture disk는 70% isopropanol로 씻어준다. Rupture disk를 말리고 그 사이 plasmid와 gold particle mixture를 준비한다. 우선 20번의 bombardment를 위하여 gold를 12mg을 Microfuge tube에 넣고, 70% ethanol을 1ml 첨가한다. 5분 동안 최대속도로 vortexing을 해주고 5초 동안 원심분리기를 돌려 상층액을 제거한다.

[0131] gold particle을 증류수 1ml, vortex 1분, 1분 동안 세워두고, 5초 원심분리기를 돌린 후 상층액을 제거하는 순으로 3번 반복하여 씻어준다. 그리고 205ul의 50% 글리세롤을 첨가하고, 5분동안 vortex를 통해 풀어준다. vortexing 속도를 2~3으로 해서 vortexing을 지속하며, 10번의 bombardment를 위하여 100ul의 gold particle을 새로운 microfuge tube에 옮긴 후 vortexing을 하면서 10ul DNA (0.5~20ug/ul), 100ul 2.5M $CaCl_2$, 40ul 0.1M spermidine을 순서대로 첨가하면서 파이펫팅으로 섞어준다. 섞은 후 2분동안 vortexing을 지속하고 1분 동안 세워놓는다. 2초 동안 원심분리기로 다운하고 상층액을 제거한다. 상층액이 제거되면 70% ethanol을 300ul 넣고 1분 기다리고 상층액을 제거한 후 100% ethanol을 300ul 넣고 1분을 기다린다. 다시 제거해주고 100% ethanol 110ul을 첨가하여 지속적인 vortexing으로 pellet을 풀어준다.

[0132] Gold Particle Mix가 완성이 되면 microcarrier에 11ul를 중앙에 올리고 5~10분 동안 말려준다. 그 사이 준비된 cell을 배지위에 60mm 지름으로 고루 펴준다. 그리고 Brass Adjustable Nest에 Stopping screen을 올리고 다 마른 Microcarrier를 올린다. 그리고 Holder로 고정을 해주고, gene gun instrument를 키고 5분가 예열해 놓는다. 예열이 다 되면 rupture disk를 retaining cap에 넣고 gun부분에 돌려서 끼워준다. 그리고 Microcarrier가 조합된 Brass Adjustable Nest를 끼워넣고 Target distance 3에 cell이 깔려진 배지를 올려놓고 문을 닫는다. 헬륨가스를 열고 vacuum을 눌러준다. vacuum이 29(inchs Hg), Helium Pressure 1300psi가 되면 fire버튼을 누르고 있으면 압력이 올라가 1100psi가 되면 gold particle이 쏘아지게 된다. bombardment 후 배지를 23도 인큐베이션을 통해 회복기를 갖는다.

[0134] **실시예 3: 클로렐라 불가리스 형질전환체 확인**

[0135] 실시예 2와 같은 생체탄도학적으로 형질전환을 실시하였고, 이에 대한 계대 배양 후 항생제 내성이 유지하는 것을 농도별로 확인하여, 도 7에 나타내었다. 총 형질전환체는 42개의 형질전환체를 확보하였다. 이는 실시예 2에서의 배지를 활용하여 빛을 조사하면서 계대를 지속하였다.

[0136] 이러한 형질전환체의 유전자, 단백질적 발현을 확인하기 위하여, Whole protein SDS-PAGE를 통하여 목적 단백질인 beta-type carbonic anhydrase의 약 43kDa의 밴드사이즈를 확인하여, 그 결과를 도 8에 나타내었다.

[0137] 이러한 목적단백질의 밴드의 확인을 위하여 MALDI-TOF를 실시하였고, 그 결과를 도 9에 나타내었다.

[0138] 본 발명은 형질전환체의 단백질적 발현의 확인하였고, 내성에 대한 계대 유지를 확인함으로 발명을 진행하였고, 유전자적 확인을 위하여 southern blot을 통해 목적 유전자의 유무를 확인하여, 그 결과를 도 10에 나타내었다.

[0139] 도 10에서 확인할 수 있듯이, 목적 유전자의 크기와 같은 위치에서 DNA의 밴드를 확인하였고, 이는 PCR을 통한 DNA sequencing으로도 확인하였다.

[0141] **실시예 4: Sr 생광물화**

[0142] 형질전환체의 기능은 Sr 생광물화에 대한 기능 증대를 제공하기 위하여 생광물화 결정을 현미경을 통해 같은 양에서의 결정화 시각화를 통해 확인하였다. 우선 야생형 (WT)인 *Chlorella vulgaris*의 Sr 생광물화 능력을 확인하였다.

[0143] 구체적으로, OD 0.6까지 *Chlorella vulgaris*를 빛조건에서 배양한다. 배양 후 25도 4000rpm 15분 조건으로 멸균을 유지한 조건에서 미세조류를 모아준다. 그리고 3mM NaHCO3로 3번 미세조류를 씻어준다. 이후 셀을 1*10^7으로 맞추어 준비된 3mM NaHCO3에 Sr 200ppm을 첨가한 뒤 준비된 *Chlorella vulgaris*를 혼합하여 4도에서 4시간 이상 배양한다. 그리고 sodium rhodizonate 0.004%로 염색하여 현미경을 통해 관찰하여, 그 결과를 도 11에 나타내었다.

[0144] 도 11에서 확인할 수 있듯이, WT의 결정화는 형질전환체에 비해 낮은 양의 생광물화 결정을 확인하였다. 또한, 정량적인 비교를 위하여 ICP-MS를 통하여 분석하여, 그 결과를 도 12 및 표 5에 나타내었다.

표 5

[0145]

	Remain metal ion rate (%)	RSD(%) : Relative Standard Deviation
Control (200 mM LiCl2)	100	0.56
+ algae	45.27667	0.42

[0147] 도 12 및 표 5에서 확인할 수 있듯이, 형질전환체는 야생형보다 최대 약 160% 증대된 생광물화 결정을 가짐을 확인하였다.

[0149] **실시예 5. 단일 $CoCl_2$ 에서의 Cobalt (Co) 생광물화 결과**

[0150] **5-1. $CoCl_2$ 농도에 따른 제거율**

[0151] 상기 실시예 3에서 형질전환된 클로렐라 불가리스 (세포), $CoCl_2$ (sigma), 멸균 MBM 배지 (KNO_3 2.5mM, $MgSO_47H_2O$ 0.3mM, K_2HPO_4 0.43mM, KH_2PO_4 1.29mM, NaCl 0.43mM, $CaCl_2*2H_2O$ 0.068mM, $FeSO_4*7H_2O$ 0.1g, A5 metal mix ml/L), DIW (deionized water), white light, 교반기, 10ml Cornical tube, 원심분리기, 및 0.2uM syringe filter를 이용하여, 단일 $CoCl_2$ 용액의 코발트 농도에 따른 제거율을 확인하였다. 구체적인 실험 방법은 다음과 같다.

[0152] 클로렐라 불가리스의 Fresh (log phase) cell을 MBM 배지에 6*10^7/ml로 배양하였다. 배지에 모아진 세포를 5ml로 수득한 후에, 10ml의 Cornical tube를 이용하여 5ml의 농도별 (각 300, 600 및 900 mM) $CoCl_2$ 용액과 혼합하여 총 10ml로 혼합하였다. 이를 White light에서 16시간 동안 천천히 교반하여 반응시켰다. 16시간 후 3000rpm에서 3분간 원심분리하였다. 상층액을 수거하여 0.2uM syringe filter를 통해 세포와 결정을 필터링하였고, 모아진 용액을 ICP 분석에 사용하였다. ICP-OES 및 MS기기에 샘플을 로딩하여 측정되는 유도 결합 플라즈마를 이용하여 시료를 이온화 시킨 후, 해당 이온들을 질량 분석기를 이용하여 분리하여 ICP 분석을 수행하였다. 그 결과를 도 13 내지 도 14에 나타내었다.

[0153] 도 13의 결과를 통해 코발트의 농도에 따른 코발트 제거율을 확인하였다. 300 mM에서는 약 50%, 600 mM에서는 약 54%, 및 900 mM에서는 약 30%의 코발트 제거율을 나타냄을 확인하였다.

[0154] 또한, 도 14의 결과를 통해 세포의 유무에 따른 코발트 제거율을 확인하였다. 모든 농도에서 세포가 존재하지 않을 경우 (w/o *C.vulgaris*)에 비하여 세포 존재 시 (w/ *C.vulgaris*)에 훨씬 우수한 코발트 제거율을 나타냄을 확인하였고, 도 14의 구체적인 측정값은 하기 표 6에 나타냈다.

표 6

[0155]

	300 mM		600 mM		900 mM	
	w/ *C.vulgaris*	w/o *C.vulgaris*	w/ *C.vulgaris*	w/o *C.vulgaris*	w/ *C.vulgaris*	w/o *C.vulgaris*
Co (ppm, μg/ml)	5598.14	21531.30	12889.26	35803.51	14853.89	64582.16

[0157] **5-2. Sodium 및 Sulfate에 대한 영향 결과**

[0158] Sodium 및 Sulfate에 대한 영향 결과를 측정하기 위하여, 상기 실시예 5-1과 동일한 방법으로 실험을 수행하되, Cornical tube에 추가로 NaCl 또는 potassium sulfate를 농도별 (300, 600, 900mM)로 첨가하였다. Co의 농도는 600mM으로 고정하였다. 그 결과를 도 15 내지 도 16에 나타내었다.

[0159] 그 결과, 도 15의 결과를 통해 Sodium의 농도에 따른 코발트 제거율을 확인하였다. 300 mM에서는 약 3%, 600 mM에서는 약 0%, 및 900 mM에서는 약 3%의 코발트 제거율을 나타냄을 확인하였다. 즉, Sodium의 농도와 코발트 제거율 간 일정한 상관관계를 나타내지는 않음을 확인하였다.

[0160] 또한, 도 16의 결과를 통해 Sulfate의 농도에 따른 코발트 제거율을 확인하였다. 300 mM에서는 약 5%, 600 mM에서는 약 13%, 및 900 mM에서는 약 4%의 코발트 제거율을 나타냄을 확인하였다. 즉, Sulfate의 농도와 코발트 제거율 간 일정한 상관관계를 나타내지는 않음을 확인하였다.

[0162] **실시예 6. 코발트 배터리 용액 제조**

[0163] $LiCl_2$ (sigma), $NiCl_2$ (sigma), $CoCl_2$ (sigma), MnCl (sigma), $AlCl_3$ (sigma), $CuCl_2$ (sigma), $FeCl_2$ (sigma), ClF (sigma), KH_2PO_4 (sigma)를 DIW (deionized water)에 믹스하여 코발트 배터리 용액을 제조하였다. 제조된 코발트 배터리 용액의 조성을 분석하여 하기 표 7 및 도 17에 나타내었다.

표 7

[0164]

Elements	1L당 g
Al	5
Co	33
Cu	3
Fe	0.3
Li	4
Mn	11
Ni	26
F	4
P	1

[0166] 표 7에서 확인할 수 있듯이, Li 4%(1M), Ni 26%(1.09M), 및 Co 33%(1.39M)임을 확인하였다.

[0168] **실시예 7. 코발트 배터리 용액에서의 Cobalt (Co) 생광물화 결과**

[0169] **7-1. 코발트 배터리 용액에서의 결정화**

[0170] 상기 실시예 3에서 형질전환된 클로렐라 불가리스 (세포), 상기 실시예 6에서 제조된 코발트 배터리 용액, 멸균 MBM 배지 (KNO_3 2.5mM, $MgSO_47H_2O$ 0.3mM, K_2HPO_4 0.43mM, KH_2PO_4 1.29mM, NaCl 0.43mM, $CaCl_2*2H_2O$ 0.068mM, $FeSO_4*7H_2O$ 0.1g, A5 metal mix ml/L), DIW (deionized water), white light, 교반기, 10ml Cornical tube, 원심분리기, 및 0.2uM syringe filter를 이용하여, 코발트 배터리 용액에서의 Co 결정화 결과를 확인하였다. 구체적인 실험 방법은 다음과 같다.

[0171] 클로렐라 불가리스의 Fresh (log phase) cell을 MBM 배지에 6*10^7/ml로 배양하였다. 배지에 모아진 세포를 5ml로 수득한 후에, 10ml의 Cornical tube를 이용하여 2.78M의 $NiCl_2$ 5ml가 포함된 코발트 배터리 용액과 혼합하여, 최종적으로 1.39M의 $CoCl_2$ 용액 10ml을 만들었다. 이를 White light에서 16시간 동안 천천히 교반하여 반응시켰다. 16시간 후 3000rpm에서 3분간 원심분리하였다. 상층액을 수거하여 0.2uM syringe filter를 통해 세포와 결정을 필터링하였다. 모아진 용액을 ICP 분석에 사용하였다. ICP-OES 및 MS기기에 샘플을 로딩하여 측정되는 유도 결합 플라즈마를 이용하여 시료를 이온화 시키고, 해당 이온들을 질량 분석기를 이용하여 분리하여 ICP 분석을 수행하였다. 그 결과를 도 18에 나타내었다.

[0172] 도 18의 결과를 통해 세포의 유무에 따른 코발트 제거율을 확인하였다. 세포가 존재하지 않을 경우 (w/o Cell)에는 코발트가 거의 제거되지 않았으나, 세포가 존재할 경우 (w/ Cell)에는 약 75%의 코발트가 제거됨을 확인하였다.

[0174] **7-2. 코발트 배터리 용액에서의 Na, S에 따른 결정화**

[0175] Sodium 및 Sulfate에 대한 영향 결과를 측정하기 위하여, 상기 실시예 7-1과 동일한 방법으로 실험을 수행하되, Cornical tube에 추가로 NaCl 또는 potassium sulfate를 농도별 (300, 600, 900mM)로 첨가하였다. 그 결과를 도 19 내지 도 20에 나타내었다.

[0176] 도 19의 결과를 통해 Sodium의 농도에 따른 코발트 제거율을 확인하였다. 300 mM에서는 약 74%, 600 mM에서는 약 64%, 및 900 mM에서는 약 77%의 코발트 제거율을 나타냄을 확인하였다. 즉, Sodium의 농도와 코발트 제거율 간 일정한 상관관계를 나타내지는 않음을 확인하였다.

[0177] 또한, 도 20의 결과를 통해 Sulfate의 농도에 따른 코발트 제거율을 확인하였다. 300 mM에서는 약 13%, 600 mM에서는 약 53%, 및 900 mM에서는 약 62%의 코발트 제거율을 나타냄을 확인하였다. 즉, Sulfate의 농도가 증가함에 따라 코발트 제거율이 증가함을 확인하였다.

[0179] **소결**

[0180] 단일 $CoCl_2$ 용액 및 코발트 배터리 용액에서의 Cobalt (Co) 생광물화 결과 결과를 요약하여 하기 표 8 및 9에 나타냈다.

표 8

[0181]

농도 ($CoCl_2$,mM)	제거율 (%)	Na 농도 (mM)	Δ제거율 (600mM $CoCl_2$, %)	Sulfate 농도 (mM)	Δ제거율 (600mM $CoCl_2$, %)
300	50	300	3	300	5
600	54	600	0	600	13
900	30	900	3	900	4

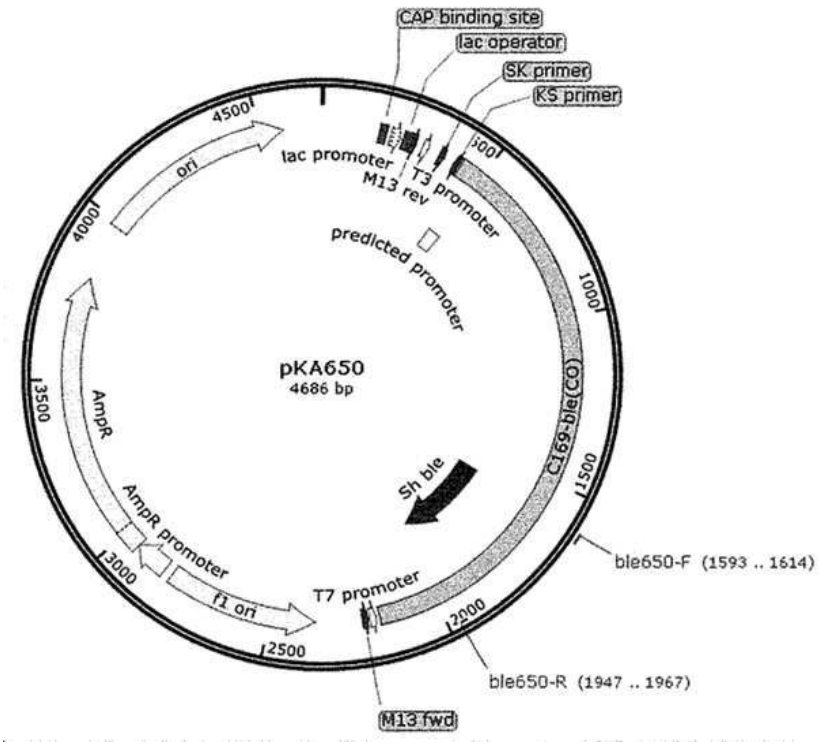
표 9

[0183]

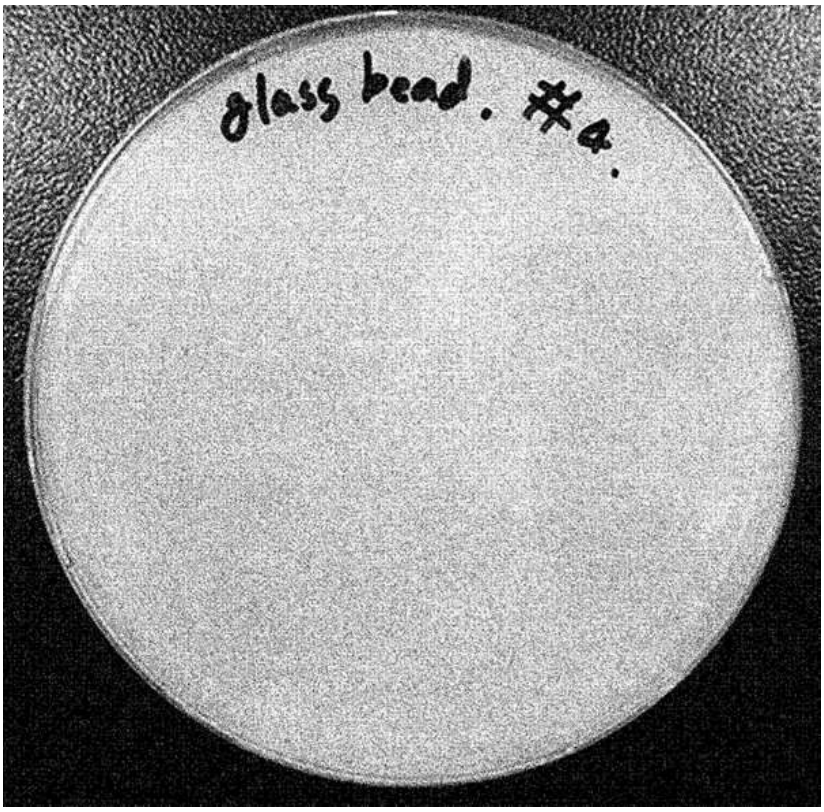
농도 ($CoCl_2$,mM)	제거율 (%)	Na 농도 (mM)	제거율 (1.39M $CoCl_2$, %)	Sulfate 농도 (mM)	제거율 (1.39M $CoCl_2$, %)
300	69	300	74	300	13
600	67	600	64	600	53
900	73	900	77	900	62

도면

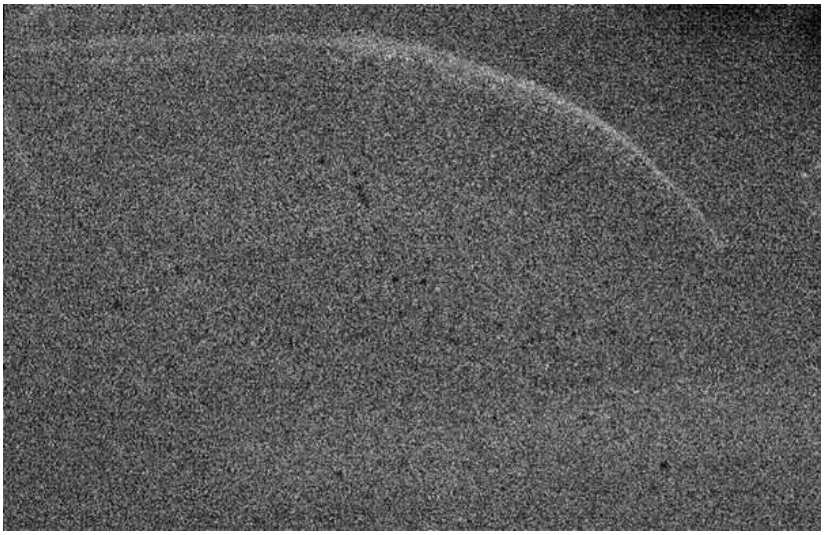
도면1



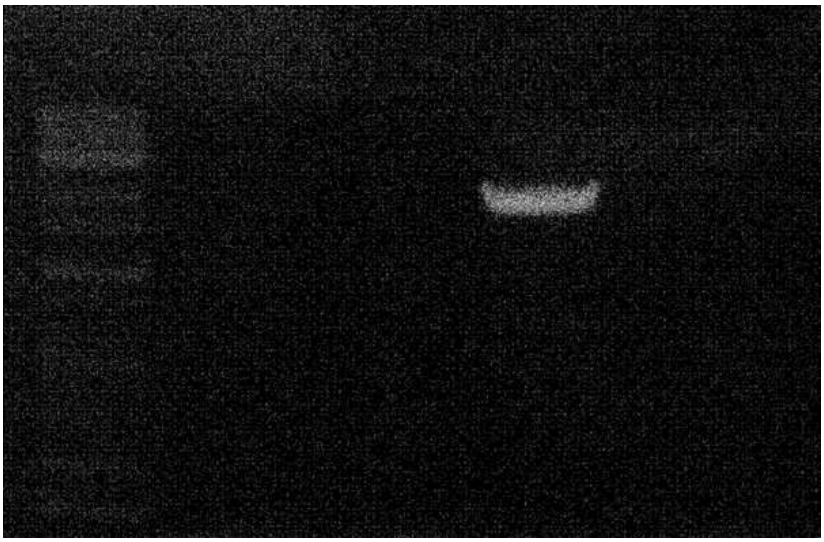
도면2



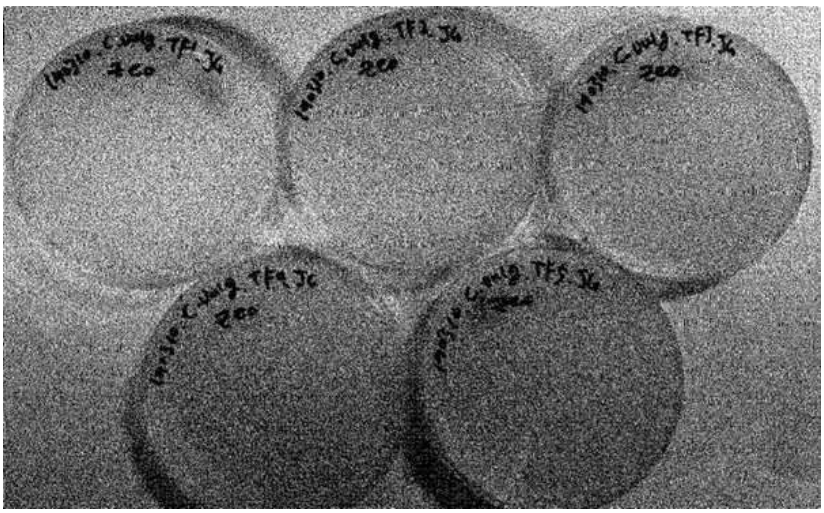
도면3



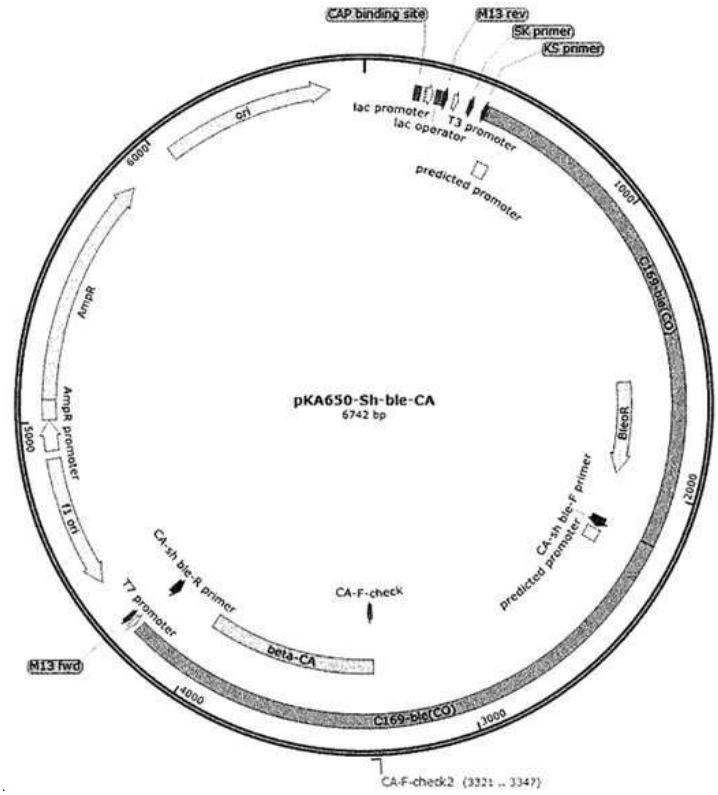
도면4



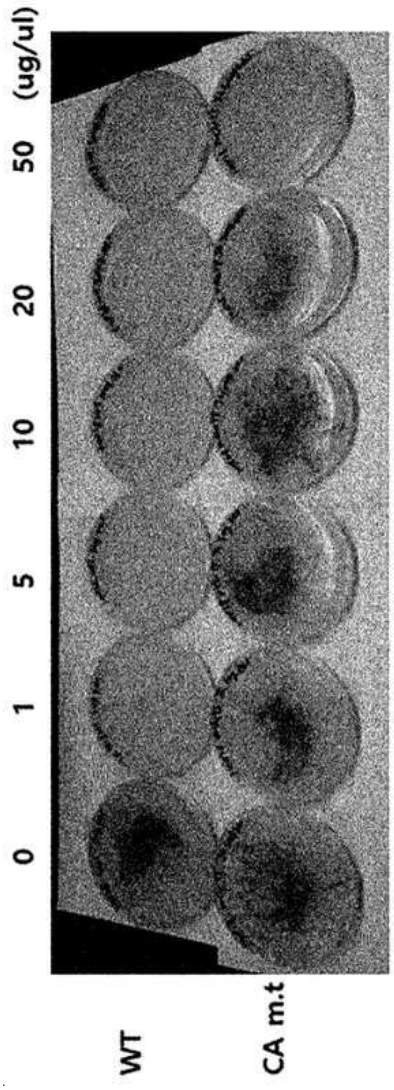
도면5



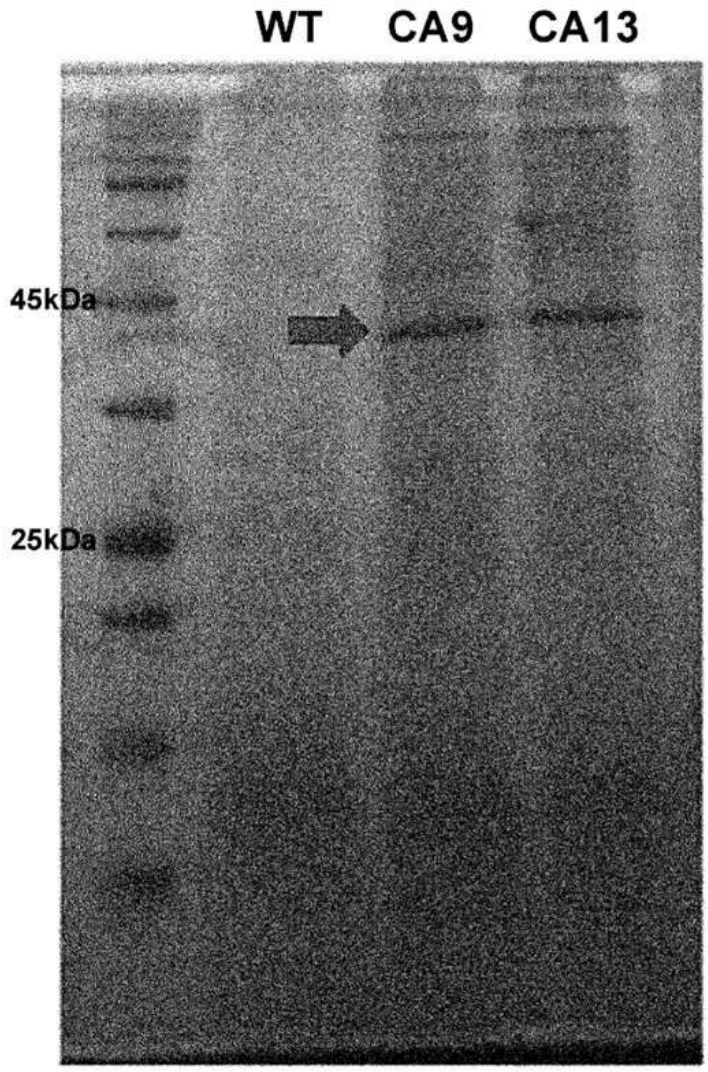
도면6


CAP binding site
M13 rev
SK primer
KS primer
lac promoter
lac operator
T3 promoter
predicted promoter
ori
6000
1000
C169-ble(CO)
AmpR
AmpR promoter
f1 ori
5000
pKA650-Sh-ble-CA
6742 bp
BleoR
2000
CA-sh ble-F primer
predicted promoter
CA-sh ble-R primer
T7 promoter
CA-F-check
beta-CA
M13 fwd
4000
C169-ble(CO)
3000
CA-F-check2 (3321 .. 3347)

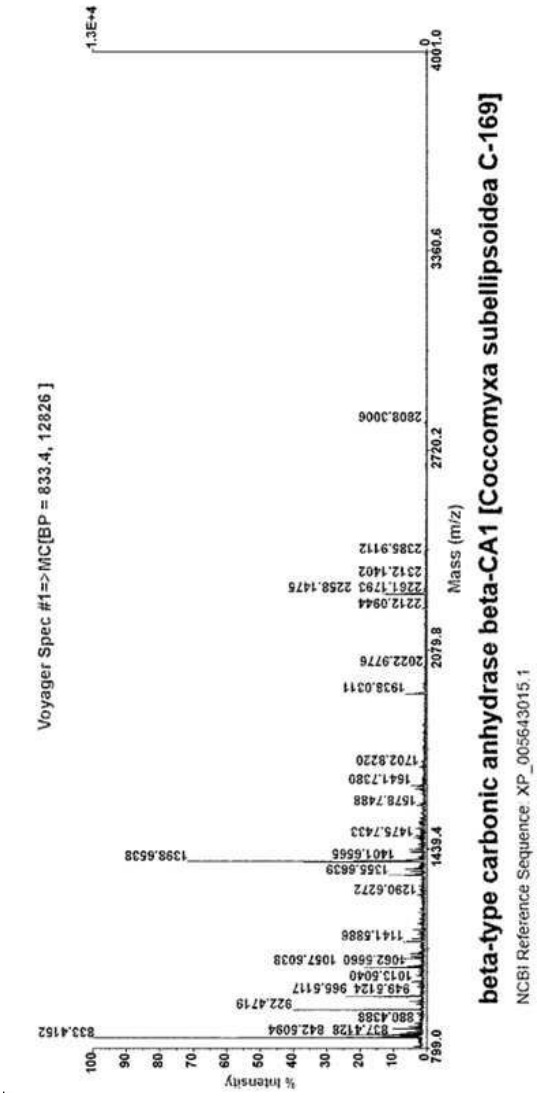
도면7



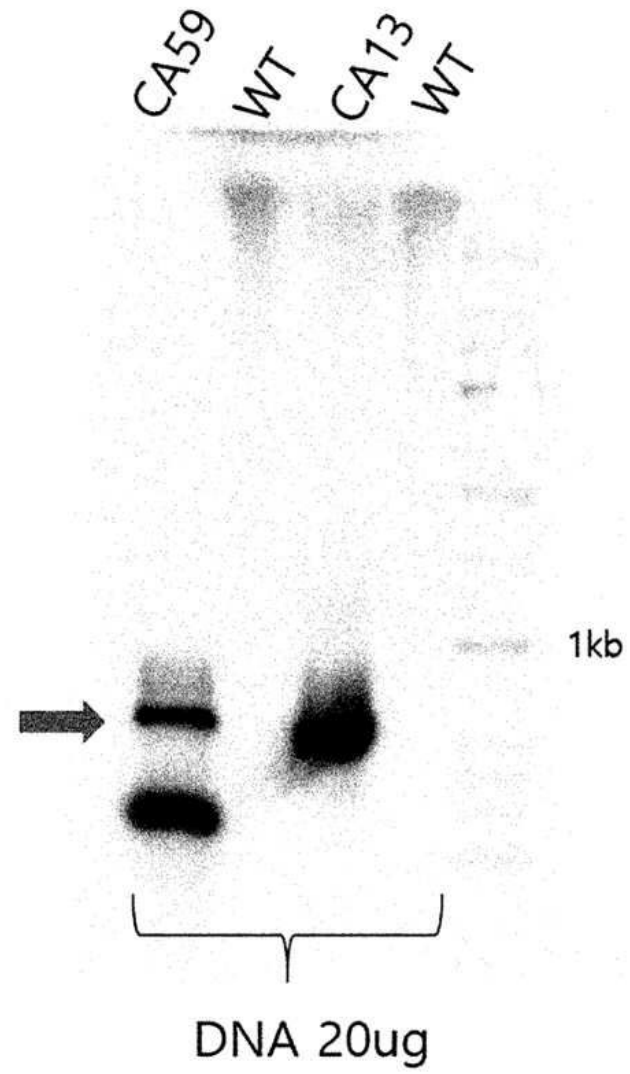
도면8



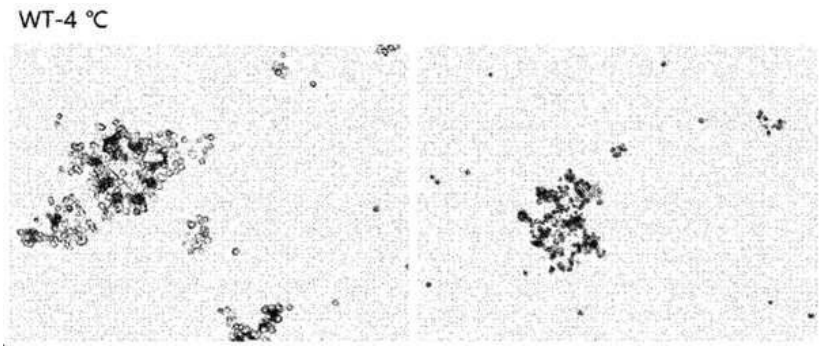
도면9


beta-type carbonic anhydrase beta-CA1 [Coccomyxa subellipsoidea C-169]
NCBI Reference Sequence: XP_005643015.1
Voyager Spec #1=>MC[BP = 833.4, 12826]
% Intensity
Mass (m/z)
833.4162
837.4178 842.5094
880.4388
922.4719
949.5124 966.5117
1013.5040
1062.5660 1057.5038
1141.5888
1290.6272
1355.6639
1401.6566
1398.6538
1475.7433
1578.7488
1641.7380
1702.8220
1938.0311
2022.9776
2212.0944
2261.1793 2258.1475
2312.1402
2385.9112
2808.3006
1.3E+4
0
4001.0
3360.6
2720.2
2079.8
1439.4
799.0

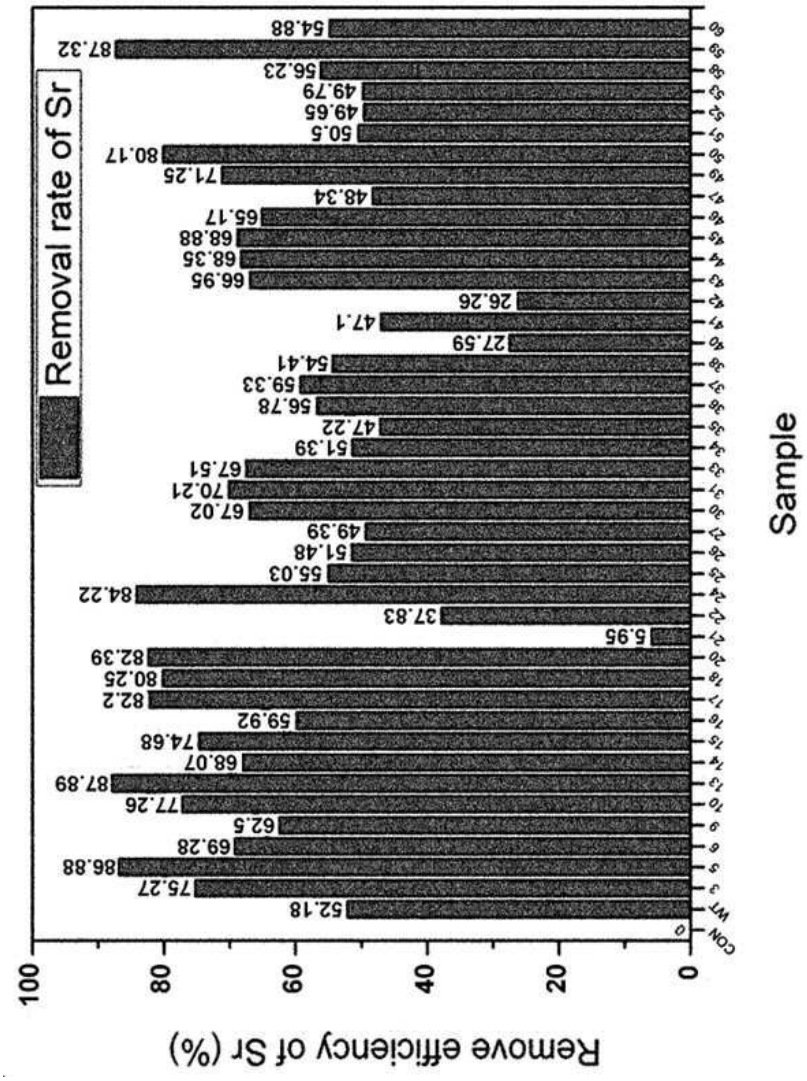
도면10



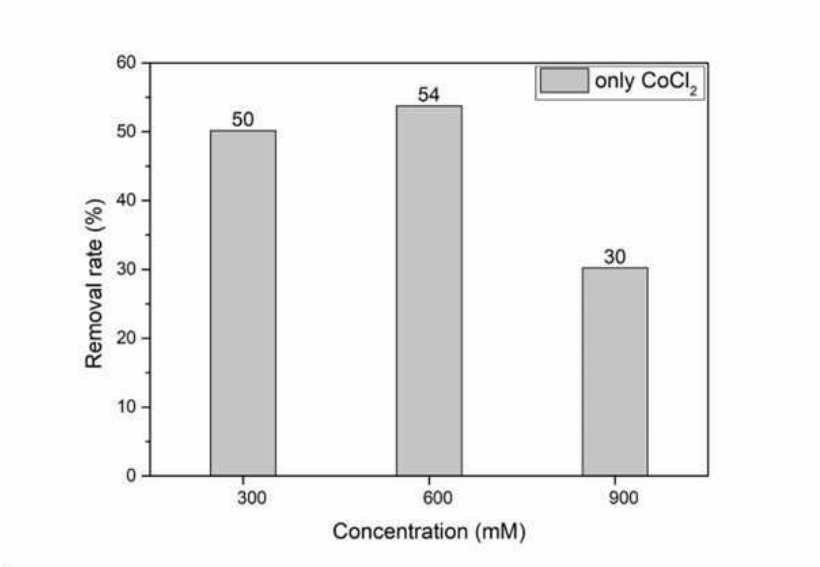
도면11



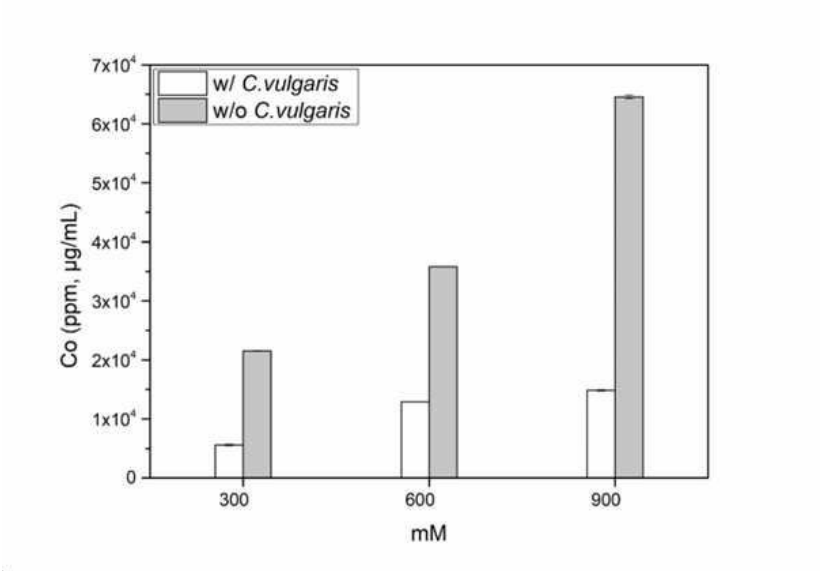
도면12


Removal rate of Sr
Sample
Remove efficiency of Sr (%)
CON
WT
0
100
80
60
40
20
0
52.18
75.27
86.88
69.28
62.5
77.26
87.89
68.07
74.68
59.92
82.2
80.25
82.39
5.95
37.83
84.22
55.03
51.48
49.39
67.02
70.21
67.51
51.39
47.22
56.78
59.33
54.41
27.59
47.1
26.26
66.95
68.35
68.88
65.17
48.34
71.25
80.17
50.5
49.65
49.79
56.23
87.32
54.88

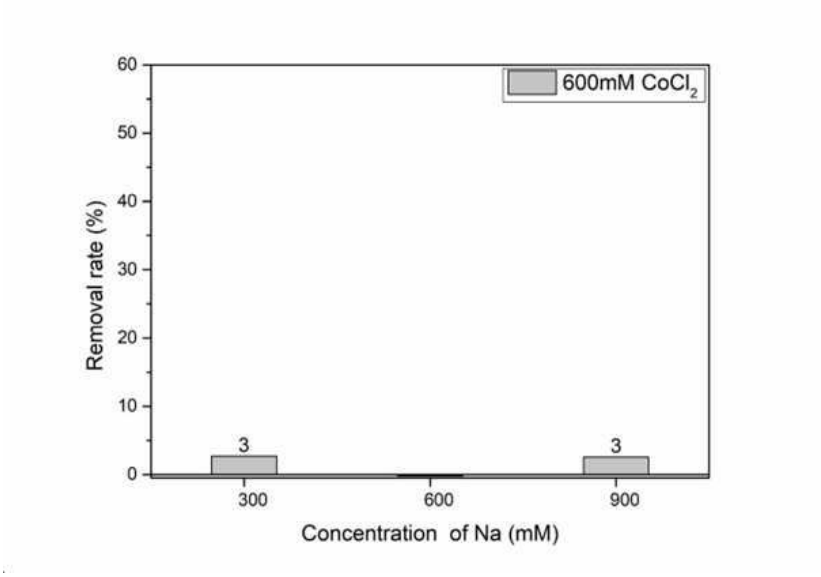
도면13


only $CoCl_2$
Removal rate (%)
Concentration (mM)
0
10
20
30
40
50
60
300
600
900
50
54
30

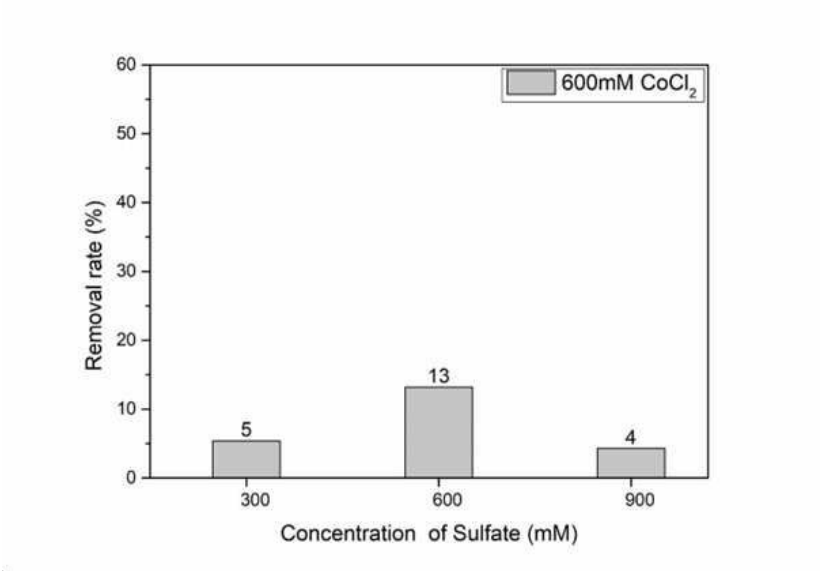
도면14


w/ C.vulgaris
w/o C.vulgaris
Co (ppm, μg/mL)
7x10⁴
6x10⁴
5x10⁴
4x10⁴
3x10⁴
2x10⁴
1x10⁴
0
300
600
900
mM

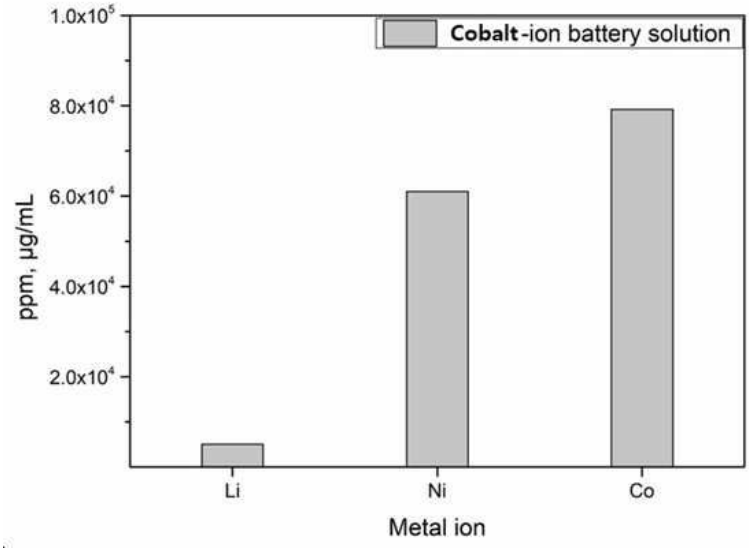
도면15


600mM CoCl2
Removal rate (%)
60
50
40
30
20
10
0
3
3
300
600
900
Concentration of Na (mM)

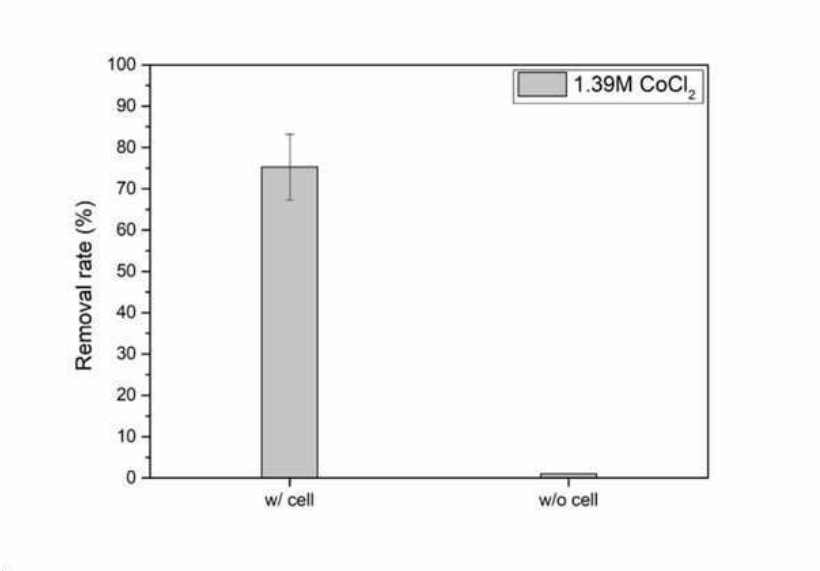
도면16


600mM $CoCl_2$
Removal rate (%)
60
50
40
30
20
10
0
5
13
4
300
600
900
Concentration of Sulfate (mM)

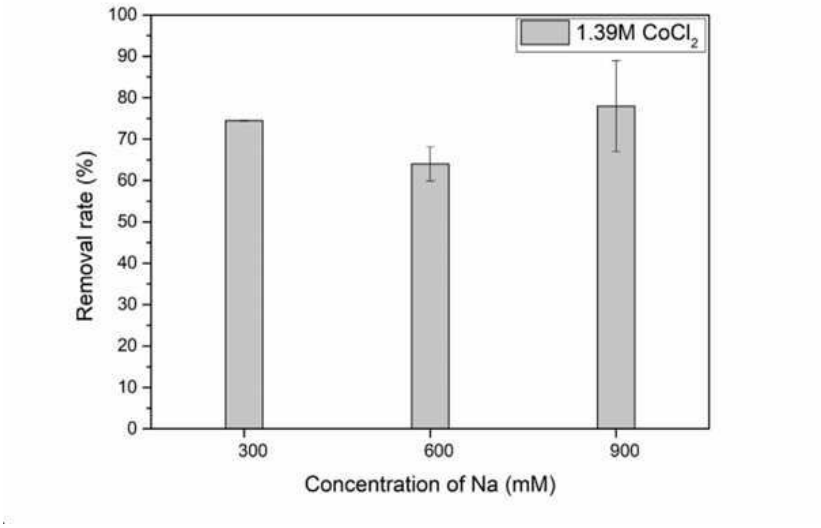
도면17


Cobalt-ion battery solution
ppm, μg/mL
$1.0x10^5$
$8.0x10^4$
$6.0x10^4$
$4.0x10^4$
$2.0x10^4$
Li
Ni
Co
Metal ion

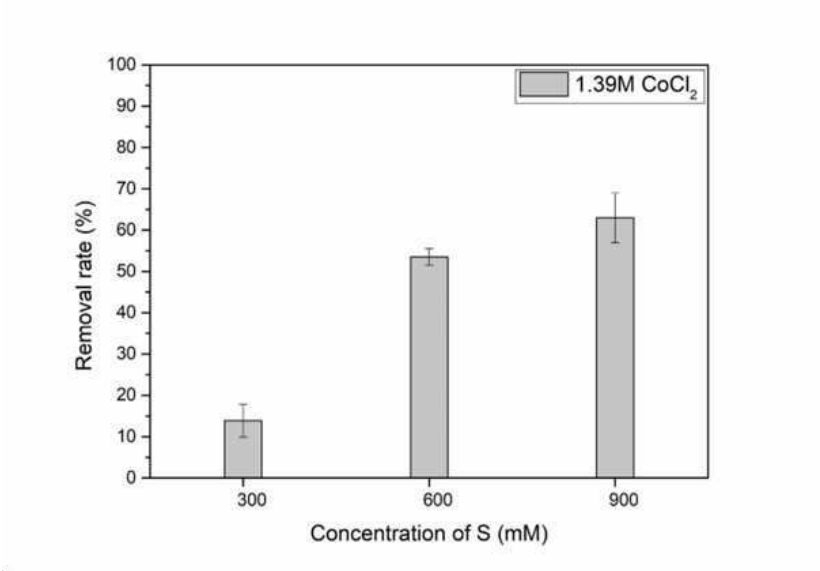
도면18


1.39M CoCl2
Removal rate (%)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
w/ cell
w/o cell

도면19


1.39M CoCl2
Removal rate (%)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
300
600
900
Concentration of Na (mM)

도면20


1.39M $CoCl_2$
Removal rate (%)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
300
600
900
Concentration of S (mM)

서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.