



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0151766
(43) 공개일자 2023년11월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 15/62 (2006.01) C07K 7/06 (2006.01)
C07K 7/08 (2006.01) C12N 15/70 (2006.01)
C12N 15/74 (2006.01) C12P 3/00 (2006.01)
B82Y 5/00 (2017.01)

(52) CPC특허분류

C12N 15/62 (2013.01)
C07K 7/06 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2022-0051513

(22) 출원일자 2022년04월26일

심사청구일자 2022년04월26일

(71) 출원인

울산대학교 산학협력단

울산광역시 남구 대학로 93(무거동)

(72) 발명자

홍순호

부산광역시 기장군 정관읍 정관5로 75 108-102

(74) 대리인

특허법인비엘티

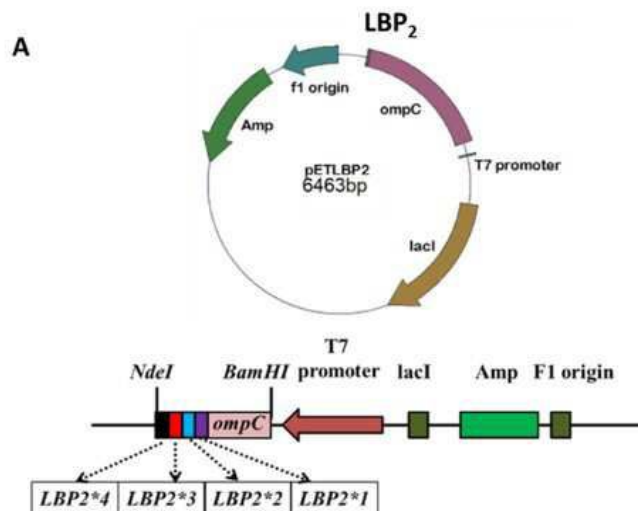
전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 발명의 명칭 리튬 결합 펩타이드의 세포 표면 발현을 통한 리튬 나노입자 제조방법 및 이에 의해 제조된 리튬 나노입자

(57) 요약

본 발명은 리튬 결합 펩타이드를 미생물의 표면에 발현시켜 리튬 나노입자를 생산하는 신규 공정 기술에 관한 것이다. 본 발명에 따르면, 세포 표면에 리튬 결합 펩타이드를 발현하는 재조합 미생물을 이용하여 리튬 나노입자를 제조하는 방법을 제공함으로써 친환경적이고 경제적으로 리튬 나노입자의 합성이 가능하게 하였다. 또한 오염된 폐수 또는 해수로부터 리튬을 효과적으로 제거하거나 나노입자의 형태로 회수할 수 있게 하였다.

대표도 - 도2a



(52) CPC특허분류

C07K 7/08 (2013.01)
C12N 15/70 (2013.01)
C12N 15/74 (2013.01)
C12P 3/00 (2013.01)
B82Y 5/00 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1415177400
과제번호	P0017547
부처명	산업통상자원부
과제관리(전문)기관명	한국산업기술진흥원
연구사업명	지역대표중견기업육성(R&D)
연구과제명	중대형 페리튬이차전지로부터 고용량 배터리 소재화를 위한 습식 유가금속 회수 공정개발
기 여 율	1/2
과제수행기관명	코스모화학주식회사
연구기간	2021.04.01 ~ 2021.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711157984
과제번호	2020R1A2C1008840
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)(R&D)
연구과제명	선택적 리튬흡착 켈타이드 기반의 폐배터리 및 폐수 중 리튬 회수시스템 개발
기 여 율	1/2
과제수행기관명	울산대학교
연구기간	2022.03.01 ~ 2023.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

리튬 결합 펩타이드를 코딩하는 유전자; 및 외막 단백질 (outer membrane protein, Omp)C를 코딩하는 유전자가 융합된 핵산.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 리튬 결합 펩타이드는 서열번호 13으로 표시되는 것인 핵산.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 리튬 결합 펩타이드를 코딩하는 유전자는 서열번호 1로 표시되고, 상기 OmpC를 코딩하는 유전자는 서열번호 10 내지 12 중 어느 하나로 표시되는 것인 핵산.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 핵산은 리튬 결합 펩타이드를 코딩하는 유전자가 8번 루프에서 절단된 OmpC 유전자(서열번호 12)의 C-말단에 결합되어 형성된 것인 핵산.

청구항 5

리튬 결합 펩타이드를 코딩하는 유전자; 및 OmpC를 코딩하는 유전자를 포함하는 세포 표면 발현용 재조합 벡터.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 리튬 결합 펩타이드를 코딩하는 유전자는 서열번호 1로 표시되고, 상기 OmpC를 코딩하는 유전자는 서열번호 10 내지 12 중 어느 하나로 표시되는 것인 세포 표면 발현용 재조합 벡터.

청구항 7

제5항에 있어서,

상기 리튬 결합 펩타이드는 (GPGDP)_n의 아미노산 서열로 이루어지며,
여기에서 n은 1 내지 4 중 어느 하나인 것인 세포 표면 발현용 재조합 벡터.

청구항 8

제5항에 있어서,

상기 세포 표면 발현용 재조합 벡터는 T7 프로모터를 포함하는 것인 세포 표면 발현용 재조합 벡터.

청구항 9

제5항 내지 제8항 중 어느 한 항의 세포 표면 발현용 재조합 벡터로 형질전환된 재조합 미생물.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 재조합 미생물은 대장균, 살모넬라 타이피, 살모넬라 타이피뮤리움, 비브리오 콜레라, 마이코 박테리움 보비스, 시겔라, 바실러스, 유산균, 스테필로코커스, 코리네 박테리아, 리스테리아 모노사이토제네스 및 스트렙토코커스로 이루어지는 군으로부터 선택된 것인 재조합 미생물.

청구항 11

- 1) 제9항의 재조합 미생물을 배양하여 리튬 결합 펩타이드를 세포 표면에 발현시키는 단계; 및
- 2) 상기 리튬 결합 펩타이드가 표면에 발현된 재조합 미생물을 회수하는 단계;를 포함하는 리튬 결합 펩타이드의 세포 표면 발현 방법.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 리튬 결합 펩타이드를 세포 표면에 발현하는 단계에서 0.1 내지 0.3 mM의 IPTG(isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside)를 추가하는 것인 방법.

청구항 13

- 1) 제9항의 재조합 미생물을 배양하는 단계;
- 2) 리튬 이온을 함유하는 물질에 상기 미생물을 첨가한 다음, 미생물을 배양하여 리튬 나노입자를 생성시키는 단계; 및
- 3) 상기 생성된 리튬 나노입자를 회수하는 단계;를 포함하는 리튬 나노입자의 제조방법.

청구항 14

제13항에 있어서,

상기 리튬 나노입자는 결정질인 것인 리튬 나노입자의 제조방법.

청구항 15

제13항 또는 제14항의 방법에 의해 제조된 결정질 리튬 나노입자.

청구항 16

제9항의 제조합 미생물을 포함하는 리튬 나노입자 제조용 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 리튬 결합 펩타이드를 미생물의 표면에 발현시켜 리튬 나노입자를 생산하는 신규 공정 기술에 관한 것으로, 세포 표면에 리튬 결합 펩타이드를 발현하는 제조합 미생물 및 이를 이용한 리튬 나노입자 합성 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 나노기술 (Nanotechnology)은 나노미터 크기의 물질을 조작하는 기술로, 원자, 분자, 및 초분자 물질을 합성하고, 조립, 제어하며 혹은 그 성질을 측정, 규명하는 기술을 말한다.

[0004] 나노입자의 특성은 그 크기에 따라 크게 달라지며, 이러한 특성에 따른 여러 응용 가능성으로 인해 많은 관심을 받고 있다. 특히 금속 나노입자는 금속의 다양한 특성들로 인해 여러 분야에 적용되고 있으며, 연료전지, 광학 장치, 생물의학, 농업, 환경 등 그 응용 분야가 점점 다양해지고 있다.

[0005] 나노입자 생산 방법은 스퍼터링, 화염가열법 등의 물리적 합성 방법과 졸-겔법, CVD (Chemical Vapor Deposition)법 등 화학적 합성 방법이 있는데, 물리적 방법은 나노입자의 크기를 정밀하게 제어하기 어렵고, 화학적 방법은 반응 시간이 길고, 고온 환경에서 많은 양의 화학물질을 사용하고 있어 환경오염 등의 문제를 야기한다.

[0006] 이러한 문제점의 해결을 위한 친환경적인 나노입자 생산 방법으로, 바이오 나노기술이 관심을 받고 있다. 바이오 나노기술은 생물학의 원리와 물리적 및 화학적 방법을 통합하여 나노입자를 합성하는, 녹색 화학 기술로, 매우 간단하고, 저렴하며 친환경적이라는 장점이 있다.

[0007] 나노입자의 전통적인 생합성 방법 중 하나로, 미생물을 식물 추출물과 함께 배양하는 방법이 있다. 바이오 나노입자의 생산을 위해 박테리아, 효모, 균류와 같은 미생물이 사용되며, 나노입자의 특성은 pH, 온도, 시간 및 혼합 비율과 같은 매개 변수의 조절로 제어된다. 미생물은 많은 환원효소를 함유하고 있어 금속염을 금속 나노입자로 환원시키는 나노 공장이라고 할 수 있다. 금속 내성 유전자 외에도 DNA, 단백질, 펩타이드 및 효소는 나노입자의 생합성에서 환원제로 사용된다.

[0008] 리튬 (Lithium)은 화학 에너지를 전기 에너지로 변환하는 능력을 가진 가장 가벼운 금속 중 하나이다. 리튬은 전자제품에서 많이 사용되는 리튬 이온 배터리의 핵심 구성요소이다. GlobalData 보고서에 따르면 리튬에 대한 전 세계 수요는 2020년 47,300톤에서 2024년 117,400톤으로 증가할 것으로 예상된다. 최근 전기 및 전기화학적 특성을 향상시키기 위해 리튬과 나노물질의 상호작용에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다.

[0009] 이에, 본 발명자들은 폐수 또는 해수로부터 리튬을 회수하여 재활용하면서도 친환경적인 방법으로 리튬 나노입자를 합성하는 방법을 개발하기 위하여 노력한 결과, 리튬 결합 펩타이드의 세포 표면 발현을 통해 미생물이 세포 표면의 금속 이온을 킬레이트화할 수 있으며 낮은 농도에서도 전자 오염수에서 금속을 분리하고 합성하는 데 효율적으로 사용될 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

[0010] 등록특허공보 제10-1905026호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 본 발명의 목적은 리튬 결합 펩타이드를 코딩하는 유전자 및 외막단백질을 코딩하는 유전자가 융합된 핵산을 제공하는 것이다.

- [0012] 본 발명의 다른 목적은 리튬 결합 펩타이드를 코딩하는 유전자를 포함하는 세포 표면 발현용 재조합 벡터를 제공하는 것이다.
- [0013] 본 발명의 다른 목적은 상기 재조합 벡터로 형질전환된 미생물을 제공하는 것이다.
- [0014] 본 발명의 다른 목적은 상기 형질전환된 미생물을 배양하여 리튬 결합 펩타이드를 세포 표면에 발현시키는 방법을 제공하는 것이다.
- [0015] 본 발명의 다른 목적은 상기 형질전환된 미생물을 이용하여 리튬 나노입자를 제조하는 방법을 제공하는 것이다.
- [0016] 본 발명의 다른 목적은 상기 제조방법에 의해 제조된 리튬 나노입자를 제공하는 것이다.
- [0017] 본 발명의 다른 목적은 상기 미생물을 포함하는 리튬 나노입자 제조용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0018] 본 발명의 다른 목적 및 기술적 특징은 이하의 발명의 상세한 설명, 청구의 범위 및 도면에 의해 보다 구체적으로 제시된다.

과제의 해결 수단

- [0020] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 리튬 결합 펩타이드를 코딩하는 유전자 및 외막 단백질 (outer membrane protein, Omp) C를 코딩하는 유전자가 융합된 핵산을 제공한다.
- [0021] 또한, 본 발명은 리튬 결합 펩타이드를 코딩하는 유전자 및 OmpC를 코딩하는 유전자를 포함하는 세포 표면 발현용 재조합 벡터를 제공한다.
- [0022] 또한, 본 발명은 재조합 벡터로 형질전환된 재조합 미생물을 제공한다.
- [0023] 또한, 본 발명은 상기 형질전환된 미생물을 배양하여 리튬 결합 펩타이드를 세포 표면에 발현시키는 방법을 제공한다.
- [0024] 또한, 본 발명은 상기 형질전환된 미생물을 이용하여 리튬 나노입자를 제조하는 방법을 제공한다.
- [0025] 또한, 본 발명은 상기 제조방법에 의해 제조된 리튬 나노입자를 제공한다.
- [0026] 또한, 본 발명은 상기 형질전환된 미생물을 포함하는 리튬 나노입자 제조용 조성물을 제공한다.

발명의 효과

- [0028] 본 발명의 세포 표면에 리튬 결합 펩타이드를 발현하는 재조합 미생물을 이용하여 리튬 나노입자를 제조하는 방법을 이용하면 친환경적이고 경제적으로 리튬 나노입자의 합성이 가능하고, 나아가 오염된 폐수 또는 해수로부터 리튬을 효과적으로 제거하거나 나노입자의 형태로 회수할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0030] 도 1은 리튬 결합 펩타이드를 세포 표면에 발현하는 재조합 대장균을 이용하여 균주의 표면에 리튬 나노입자를 합성하는 방법을 나타낸 개략도이다.
- 도 2a는 리튬 결합 펩타이드 LBP2를 가지며 T7 프로모터에 의해 조절되는 pETLBP2 플라스미드의 구조를 나타낸 개략도이다.
- 도 2b는 OmpC-LBP2 시리즈 (단량체, 이량체, 삼량체 및 사량체)의 리튬 농도에 따른 리튬 흡착을 평가한 결과이다.
- 도 2c는 코발트, 크롬, 구리 및 리튬을 포함하는 합성 폐수에서 OmpC-LBP2 시리즈의 금속 종류에 따른 흡착을 평가한 결과이다.
- 도 3a는 리튬 결합 펩타이드 LBP1를 가지며 T7 프로모터에 의해 조절되는 pETLBP1 플라스미드의 구조를 나타낸 개략도이다.

도 3b는 OmpC-LBP1 시리즈 (단량체, 이량체, 삼량체 및 사량체)의 리튬 농도에 따른 리튬 흡착을 평가한 결과이다.

도 3c는 코발트, 크롬, 구리 및 리튬을 포함하는 합성 폐수에서 OmpC-LBP1 시리즈의 금속 종류에 따른 흡착을 평가한 결과이다.

도 4a는 리튬 결합 펩타이드 LBP3를 가지며 T7 프로모터에 의해 조절되는 pETLBP3 플라스미드의 구조를 나타낸 개열지도이다.

도 4b는 OmpC-LBP3 시리즈 (단량체, 이량체, 삼량체 및 사량체)의 리튬 농도에 따른 리튬 흡착을 평가한 결과이다.

도 4c는 코발트, 크롬, 구리 및 리튬을 포함하는 합성 폐수에서 OmpC-LBP3 시리즈의 금속 종류에 따른 흡착을 평가한 결과이다.

도 5a는 리튬 흡착 후, 야생형 대장균의 FE-SEM 현미경 이미지를 나타낸 것이다.

도 5b는 리튬 흡착 후, LBP2를 발현하는 대장균의 FE-SEM 현미경 이미지를 나타낸 것이다.

도 5c는 리튬 흡착 후, 야생형 및 LBP2를 발현하는 대장균의 라만 스펙트럼 결과이다.

도 5d는 리튬 흡착 후, 야생형 및 LBP2를 발현하는 대장균의 FT-IR 스펙트럼 결과이다.

도 6a는 리튬 흡착 후, 소성된 LBP2를 발현하는 대장균의 이미지를 나타낸 것이다.

도 6b는 소성된 LBP2를 발현하는 대장균의 X선 회절 패턴을 나타낸 것이다.

도 6c는 소성된 LBP2를 발현하는 대장균의 TEM 이미지를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0031] 본 발명의 이점 및 특징, 그리고 그것들을 달성하는 방법은 첨부되는 도면과 함께 상세하게 후술되어 있는 실시예들을 참조하면 명확해질 것이다. 그러나, 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예들에 제한되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 수 있으며, 단지 본 실시예들은 본 발명의 개시가 완전하도록 하고, 본 발명이 속하는 기술 분야의 통상의 기술자에게 본 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이며, 본 발명은 청구항의 범주에 의해 정의될 뿐이다.
- [0032] 본 명세서에서 사용된 용어는 실시예들을 설명하기 위한 것이며 본 발명을 제한하고자 하는 것은 아니다. 본 명세서에서, 단수형은 문구에서 특별히 언급하지 않는 한 복수형도 포함한다. 명세서에서 사용되는 "포함한다(comprises)" 및/또는 "포함하는(comprising)"은 언급된 구성요소 외에 하나 이상의 다른 구성요소의 존재 또는 추가를 배제하지 않는다. 명세서 전체에 걸쳐 동일한 도면 부호는 동일한 구성 요소를 지칭하며, "및/또는"은 언급된 구성요소들의 각각 및 하나 이상의 모든 조합을 포함한다. 비록 "제1", "제2" 등이 다양한 구성요소들을 서술하기 위해서 사용되나, 이들 구성요소들은 이들 용어에 의해 제한되지 않음은 물론이다. 이들 용어들은 단지 하나의 구성요소를 다른 구성요소와 구별하기 위하여 사용하는 것이다. 따라서, 이하에서 언급되는 제1 구성요소는 본 발명의 기술적 사상 내에서 제2 구성요소일 수도 있음은 물론이다.
- [0033] 다른 정의가 없다면, 본 명세서에서 사용되는 모든 용어(기술 및 과학적 용어를 포함)는 본 발명이 속하는 기술 분야의 통상의 기술자에게 공통적으로 이해될 수 있는 의미로 사용될 수 있을 것이다. 또한, 일반적으로 사용되는 사전에 정의되어 있는 용어들은 명백하게 특별히 정의되어 있지 않는 한 이상적으로 또는 과도하게 해석되지 않는다.
- [0035] 본 발명은 리튬 결합 펩타이드를 코딩하는 유전자 및 외막 단백질 (outer membrane protein, Omp) C를 코딩하는 유전자가 결합된 뉴클레오타이드 서열을 제공한다.
- [0036] 또한, 본 발명은 리튬 결합 펩타이드를 코딩하는 유전자 및 OmpC를 코딩하는 유전자를 포함하는 세포 표면 발현용 제조용 벡터를 제공한다.
- [0037] 본 발명에서 용어 "유전자"는 유전적 기능이 관련되어 있는 핵산 분자 (염색체, 플라스미드 등)의 뉴클레오타이드 서열을 의미한다. 유전자는 폴리펩타이드 또는 폴리뉴클레오타이드와 같은 발현 생산물을 코딩할 수 있다. 일반적

으로, 유전자는 폴리펩타이드 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.

[0038] 상기 OmpC는 N 말단으로부터 2번째(서열번호 10), 6번째(서열번호 11) 또는 8번째(서열번호 12) 루프에서 절단된 OmpC를 포함할 수 있다.

[0039] 상기 뉴클레오타이드 서열은 GGCCCGGGCGATCCG (서열번호 1)의 염기서열을 포함하는 리튬 결합 펩타이드를 코딩하는 유전자가 8번 루프 (993bp)에서 절단된 OmpC 유전자의 C-말단에 결합되어 형성된 것일 수 있다. 상기 리튬 결합 펩타이드가 이량체일 경우, GGCCCGGGCGATCCG (서열번호 1)가 2회 반복된 염기 서열을 포함하는 리튬 결합 펩타이드 유전자가 8번 루프 (993bp)에서 절단된 OmpC 유전자의 C-말단에 결합되어 형성된 것일 수 있다. 상기 리튬 결합 펩타이드가 삼량체일 경우, GGCCCGGGCGATCCG (서열번호 1)가 3회 반복된 염기 서열을 포함하는 리튬 결합 펩타이드 유전자가 8번 루프 (993bp)에서 절단된 OmpC 유전자의 C-말단에 결합되어 형성된 것일 수 있다. 상기 리튬 결합 펩타이드가 사량체일 경우, GGCCCGGGCGATCCG (서열번호 1)가 4회 반복된 염기 서열을 포함하는 리튬 결합 펩타이드 유전자가 8번 루프 (993bp)에서 절단된 OmpC 유전자의 C-말단에 결합되어 형성된 것일 수 있다.

[0040] 본 발명에서 상기 리튬 결합 펩타이드는 (GPGDP)_n의 아미노산 서열로 이루어지며, 여기에서 n은 1 내지 4 중 어느 하나일 수 있다. 예를 들어, GPGDP의 아미노산 서열을 갖는 단량체 형태의 리튬 결합 펩타이드이거나, GPGDP₂의 아미노산 서열을 갖는 이량체 형태의 리튬 결합 펩타이드이거나, GPGDP₃의 아미노산 서열을 갖는 삼량체 형태의 리튬 결합 펩타이드이거나, GPGDP₄의 아미노산 서열을 갖는 사량체 형태의 리튬 결합 펩타이드일 수 있다.

[0041] 본 발명에서 용어 "세포 표면 발현" 또는 "세포 표면 디스플레이 (cell surface display)"는 외래 단백질을 미생물 표면에 존재하는 표면 단백질의 표면 발현 모체 (surface anchoring motif)로 사용하여 미생물 표면에 발현시키는 것을 의미한다. 외래 단백질의 표면 발현에 사용되는 표면 단백질로는 외막 단백질 (outer membrane protein), 지질 단백질 (lipoprotein), 분비 단백질 (secretory protein) 등이 있다.

[0042] 본 발명에서 용어 "벡터"는 삽입된 핵산 분자를 숙주 세포 내 및/또는 사이로 전달하는 핵산 분자를 의미한다. 이 용어는 DNA 또는 RNA의 세포 내 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 이상의 상기 기능을 제공하는 벡터도 포함된다.

[0043] 상기 벡터는 플라스미드, 파지입자 또는 간단하게 잠재적 게놈 삽입물일 수 있으며, 예를 들어, pETL 또는 pET21a 플라스미드일 수 있다. 적당한 숙주 미생물로 형질전환되면 벡터는 숙주 게놈과 무관하게 복제하고 기능할 수 있거나, 또는 일부 경우에 게놈 그 자체로 통합될 수 있다. 본 발명에서 "플라스미드"와 "벡터"는 상호 교환적으로 사용된다.

[0044] 본 발명에서 사용되는 상기 세포 표면 발현용 재조합 벡터는 도 2에 도시된 바와 같은 개열지도를 가진 것일 수 있으며, OmpC-리튬 결합 단백질의 발현을 조절하기 위해 T7 프로모터를 포함할 수 있다.

[0046] 또한, 본 발명은 재조합 벡터로 형질전환된 재조합 미생물을 제공한다.

[0047] 본 발명에서 용어 "형질전환"은 세포외부 DNA가, 수반물질이 있거나 없는 상태로 숙주 세포로 도입되는 과정을 의미한다. "형질전환된 세포"는 세포 외부 DNA가 세포 내로 도입된 세포를 의미한다. DNA는 세포로 도입되어 핵산이 염색체에 삽입되거나 혹은 염색체 외 물질로 복제될 수 있다.

[0048] 본 발명에서 용어 "재조합 미생물"은 유전자 재조합 기술을 이용하여 어떤 생물체의 유용한 유전자를 다른 미생물에 도입하거나 숙주 미생물의 유전자 일부를 결실시키거나 발현양을 조절하는 등 특정한 목적에 맞도록 유전자 일부를 변형시켜 만든 미생물을 말한다. 상기 용어는, "유전자 변형 미생물", "재조합 균주" 등의 용어로 대체하여 사용할 수 있다.

[0049] 본 발명에서 재조합 미생물은 대장균, 살모넬라 타이피, 살모넬라 타이피뮤리움, 비브리오 콜레라, 마이코 박테리움 보비스, 시겔라, 바실러스, 유산균, 스테필로코커스, 코리네 박테리아, 리스테리아 모노사이토제네스 또는 스트렙토코커스로 이루어지는 균으로부터 선택된 것일 수 있다.

- [0050] 본 발명의 리튬 결합 펩타이드의 세포 표면 발현 방법은 형질전환된 미생물을 배양하여 리튬 결합 펩타이드를 세포 표면에 발현하는 단계; 및 상기 리튬 결합 펩타이드가 표면에 발현된 미생물을 회수하는 단계; 를 포함할 수 있다.
- [0051] 상기 리튬 결합 펩타이드를 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 IPTG를 추가할 수 있으며, 0.1mM 미만으로 처리하거나, 0.3mM을 초과하여 처리할 경우 리튬 결합 펩타이드의 발현이 감소할 수 있다.
- [0052] 본 발명은 상기 형질전환된 미생물 또는 상기 리튬 결합 펩타이드가 세포 표면에 발현된 미생물을 이용하여 리튬 나노입자를 제조하는 방법을 제공한다.
- [0053] 구체적으로, 상기 형질전환된 미생물을 리튬 이온을 함유하는 물질에 첨가하고, 배양하여 리튬 나노입자를 생성시키고, 생성된 리튬 나노입자를 회수할 수 있다.
- [0054] 상기 리튬 이온을 함유하는 물질은 리튬 오염된 폐수 또는 해수일 수 있다.
- [0055] 본 발명은 상기 방법에 의해 제조된 리튬 나노입자를 제공한다. 이때, 제조된 리튬 나노입자는 결정질일 수 있다.
- [0056] 본 발명에서 용어 "나노입자"는 나노 단위의 직경을 가지는 입자를 의미한다.
- [0057] 본 발명에서 용어 "결정질(crystalline)"은 어떤 고체가 반복적 원자배열 상태인 결정을 이루고 있는 상태를 의미하며, "비결정질(amorphous)"은 어떤 고체가 반복적 원자배열 상태인 결정을 이루지 않고 있는 상태, 즉 비정질 상태를 의미한다. 본 발명 실시예에서 리튬 나노입자의 XRD 값은 약 23.1° , 33.8° 및 36.4° 의 2θ 값에서 X선 분말 회절(XRD) 분석의 회절 패턴을 갖는 것을 확인하였다.
- [0059] 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.

[0061] [실시예]

[0062] <1-1> 박테리아 균주 및 배지

- [0063] 사용된 박테리아 균주는 표 1에 나타냈다. 균주는 100 mg/L 암피실린이 첨가된 LB 배지(10 g/L bactotryptone, 5 g/L bacto-yeast extract 및 5 g/L NaCl)에서 250 rpm으로 진탕하면서 37°C 에서 배양하였다.

표 1

Strain/Plasmid	Relevant genotype/ property	Source
<i>Escherichia coli</i> 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) ϕ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 nupG recA1 araD139 Δ (ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(Str ^R) endA1 λ^-	Stratagene
Plasmids		
pET-21a	Ap ^R	NEB ^a
pETLBP21	pET-21a 유전자 포함 ompC-lbp2 gene	본 발명
pETLBP22	pET-21a 유전자 포함 ompC-lbp2x2 gene	본 발명
pETLBP23	pET-21a 유전자 포함 ompC-lbp2x3 gene	본 발명
pETLBP24	pET-21a 유전자 포함 ompC-lbp3x4 gene	본 발명

<1-2> 플라스미드 구성

제조합 플라스미드 구축을 위해 pET21a 발현 벡터가 사용되었다. 앵커링 모티프(anchoring motif)로서 OmpC를 사용하여 세포막의 표면에 리튬 결합 펩타이드를 발현시켜 리튬을 흡착하도록 E coli를 조작하였다. 제조합 대장균은 세포 표면에 LBP2가 발현되어 표면의 리튬을 흡수하고 세포외 리튬 나노입자를 합성한다. 나노입자의 세포내 및 세포외 합성 모두 사용될 수 있지만, 세포외 생산 나노입자는 다운스트림 처리가 덜 복잡하다는 장점이 있다.

구체적인 실험 방법은 다음과 같다.

리튬 결합 펩타이드 LBP2를 코딩하는 유전자를 8번 루프(993 bp)에서 절단된 OmpC 유전자(서열번호 12)의 C-말단에 결합시키고 N-Taq 중합효소 (enzymatics)를 사용하여 T100™ thermal cycler (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)로 PCR(polymerase chain reaction)을 수행하여 증폭시켰다. 사용된 리튬 결합 펩타이드의 뉴클레오타이드 서열은 LBP2 리튬 결합 펩타이드 GGCCCGGGCGATCCG (서열번호 1)이며, 사용된 프라이머는 표 2에 기재하였다.

표 2

Name	Sequence (5' to 3')	서열번호
LBP2-F	CATATGAGGAGAAATATAATGAAAGTTAAAGTACTGTCCCTCCTGGTC	2
LBP2-R	GGATCCCGGATCGCCCGGGCCCATGTTTTTGTGTAAGTAGTAGGTAGCACCAACATCAACA	3
LBP2di-F	CATATGAGGAGAAATATAATGAAAGTTAAAGTACTGTCCCTCCTGGTC	4
LBP2di-R	GGATCCGCCCGGGCCCGCTTTCGCCGCGCTTCCGCGGATCGCCCGGGCCCATGTTTTTGTGAAGTA	5
LBP2tri-F	CATATGAGGAGAAATATAATGAAAGTTAAAGTACTGTCCCTCCTGGTC	6
LBP2tri-R	GGATCCTTATTACGGATCGCCCGGGCCCGC	7
LBP2tet-F	CATATGAGGAGAAATATAATGAAAGTTAAAGTACTGTCCCTCCTGGTC	8
LBP2tet-R	GGATCCGGATCCTTATTACGGATCGCCCGGGCCCGCTTTCGCCGCGCTTCCGCGGATCGCCCGGCC	9

PCR 산물 (OmpC-lbp2)을 NdeI 및 BamHI 제한 효소를 사용하여 pET21a 플라스미드 내로 클로닝해 pETLBP2를 구성하였다. 펩타이드 LBP2의 이량체 (pETLBP2x2), 삼량체 (pETLBP2x3) 및 사량체 (pETLBP2x4)반복을 갖는 플라스미드도 같은 방식으로 구성하였다. 제조합 단백질 OmpC-lbp2 시리즈의 발현을 위해 상기 플라스미드를 E coli BL21(DE3) 균주에 형질전환시켰다. 제조합 단백질 OmpC-lbp2 시리즈의 발현을 T7 프로모터에 의해 조절되는 IPTG(isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside)를 추가하여 유도하였다.

이와 같이 구축된 리튬 결합 펩타이드 플라스미드는 T7 프로모터에 의해 조절되는 pETLBP2이다 (도 2a).

<1-3> 발현 조건 최적화

LBP2 발현 제조합 대장균의 리튬 흡착 능력을 다음과 같이 최적화하였다. 리튬 결합 펩타이드를 발현하는 제조합 E coli를 37℃에서 LB 배지에 밤새 배양하였고, 600nm에서 광학 밀도(OD600)가 0.5에 도달한 후, IPTG를 0 내지 1 mM의 농도로 배양액에 첨가하고 30℃에서 5시간 동안 추가로 배양하였다. 13,000rpm에서 10분 동안 원심 분리하여 제조합 균주를 수확하고 B-7M 요소 버퍼와 함께 실온에서 30분 동안 교반하면서 인큐베이션하였다. 균주를 8000 rpm에서 원심분리하여 잔해를 제거하였다. 10 mM Tris-HCl (pH 7.5)를 첨가하여 펠렛으로부터 외막 분획을 분리하고 현탁된 균주를 4℃에서 밤새 유지시켜 용액으로 막 분획을 상승시키고 12% (w/v) SDS-PAGE로 분석하였다. 분획된 단백질을 Coomassie brilliant blue R-250 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)으로 염색하였다.

배양 온도와 흡착 시간을 최적화한 결과, 배양 온도 25℃, 흡착 시간 30분에서 최대 리튬 흡착을 보였고, LBP2를 발현하지 않는 대조군 균주는 미미한 리튬 흡착을 보였다.

- [0078] 일반적으로 대장균에서 이중 단백질의 발현은 대사 부재(metabolic liability)를 야기하여 재조합 플라스미드에서 단백질 발현, 세포 성장 및 안정성을 감소시킨다. 다양한 농도의 IPTG (0 내지 1.0 mM)를 배지에 첨가하여 재조합 단백질의 발현 및 리튬 흡착을 최적화한 결과, 리튬 흡착을 위한 최적의 IPTG 농도는 0.3mM인 것으로 확인되었다.
- [0080] <비교예 1>
- [0081] LBP1 (GPGNP) 리튬 결합 펩타이드 GGCCCGGGCAACCCG를 사용한 것을 제외하고, 실시예 1과 동일한 방식으로 구성하였다 (도 3a).
- [0083] <비교예 2>
- [0084] LBP3 (GPGAP) 리튬 결합 펩타이드 GGCCCGGGCGCGCCG를 사용한 것을 제외하고, 실시예 1과 동일한 방식으로 구성하였다 (도 4a).
- [0086] <실험예 1>
- [0087] <1-1> 리튬 흡착 평가
- [0088] 재조합 단백질 발현 균주를 0.85% (w/v) NaCl로 2회 세척한 후, 다양한 농도 (0 내지 20mM)의 염화 리튬 용액을 첨가한 LB 배지에서 배양하여 리튬을 흡착하고 나노입자를 합성하였다. 흡착된 리튬은 균주를 1mM EDTA를 함유한 얼음으로 30분 동안 인큐베이션하여 용출시켰다. 용출된 리튬량을 atomic absorption spectrophotometer (AA-7000, Shimadzu, kyoto, Japan) (CHOI 2005)를 사용하여 분석하였다.
- [0089] 리튬 농도의 영향을 평가하기 위하여 다양한 농도의 리튬을 배지에 첨가하였다. 재조합 균주에 의해 흡착된 리튬의 양은 리튬 농도가 0.1mM에서 20mM로 증가함에 따라 계속 증가하였다. 그러나 20mM 보다 높은 농도에서는 흡착이 감소하는 것으로 나타났다. 이는 대장균에 대한 리튬의 독성 효과 때문일 수 있다.
- [0090] 단량체, 이량체, 삼량체 및 사량체 LBP2 펩타이드를 IPTG로 5시간 동안 과발현시킨 후, 리튬 흡착 테스트를 하였다. 그 결과, 리튬 농도에 관계없이 펩타이드 반복이 증가함에 따라 리튬 흡착이 증가하였다. 특히, LBP2의 삼량체를 발현하는 대장균 균주는 20mM 리튬에서 3240.187 μ mol/g의 최대 흡착을 보였다. 반면, 사량체는 삼량체에 비해 리튬 흡착이 감소하였다 (도 2b). 이는 긴 펩타이드 사슬로 인한 구조적 장애 때문일 수 있다.
- [0092] <1-2> 리튬 특이성 평가
- [0093] 펩타이드의 리튬 특이성을 다음과 같이 확인하였다.
- [0094] 단량체, 이량체, 삼량체 및 사량체 펩타이드를 포함하는 대장균을 IPTG로 5시간 동안 과발현시킨 후, 염화리튬 (LiCl), 염화구리 (CuCl₂), 염화코발트 (CoCl₂) 및 염화크롬 (CrCl₃)을 각각 1mM 포함하는 인공 폐수 (AWW)에서 25°C에서 30분 동안 교반하였다. 흡착 후, 균주를 원심분리하고 0.85% (w/v) NaCl로 2회 세척하고 결합되지 않은 리튬을 제거하였다. 흡착된 리튬량을 atomic absorption spectrophotometer (AA-7000, Shimadzu, kyoto, Japan) (CHOI 2005)를 사용하여 분석하였다.
- [0095] 그 결과, LBP2 펩타이드를 발현하는 모든 균주는 리튬에 대해 더 높은 특이성을 보였고, 리튬 > 구리 > 코발트 > 크롬의 순서대로 친화도를 보였다. LBP2 삼량체에서 최대 흡착을 보였으며, LBP2 삼량체에 흡착된 리튬의 양은 코발트, 코발트, 크롬 및 구리보다 각각 8.4배, 14배 및 3.9배 높았다 (도 2c). 이는 LBP2 펩타이드의 높은 리튬 특이성을 보여주는 결과이다.
- [0097] <1-3> 비교예 1 및 2의 리튬 흡착 및 특이성 평가
- [0098] 비교예 1 (LBP1) 및 비교예 2 (LBP3)의 리튬 흡착을 실험예 <1-1> 및 <1-2>와 동일한 방법으로 흡착 및 특이성을 평가하였다.

- [0099] 비교예 1의 경우, 리튬 농도 10mM에서 가장 높은 리튬 흡착을 보였고, LBP1의 삼량체를 발현하는 균주는 20mM 리튬에서 1794.3 $\mu\text{mol/g}$ 의 흡착을, 10mM 리튬에서 1976.2 $\mu\text{mol/g}$ 의 최대 흡착을 보였다 (도 3b). LBP1 펩타이드를 발현하는 모든 균주는 리튬에 대해 높은 특이성을 보였고, 특히 LBP1 삼량체에 흡착된 리튬의 양은 코발트, 크롬 및 구리보다 각각 18배, 8.5배 및 2.7배 높았다 (도 3c).
- [0100] 비교예 2는 리튬 농도 20mM에서 가장 높은 리튬 흡착을 보였고, LBP3의 삼량체를 발현하는 균주는 10mM 리튬에서 2088.7 $\mu\text{mol/g}$ 의 흡착을, 20mM 리튬에서 2578.8 $\mu\text{mol/g}$ 의 최대 흡착을 보였다 (도 4b). LBP3 펩타이드를 발현하는 모든 균주는 리튬에 대해 높은 특이성을 보였고, 특히 LBP3 삼량체에 흡착된 리튬의 양은 코발트, 코발트, 크롬 및 구리보다 각각 15.9배, 7.0배 및 2.6배 높았다 (도 4c).
- [0101] 실시예 1의 경우, LBP2의 삼량체를 발현하는 대장균 균주는 20mM 리튬에서 3240.187 $\mu\text{mol/g}$ 의 최대 흡착을 보였고, LBP2 삼량체에 흡착된 리튬의 양은 코발트, 코발트, 크롬 및 구리보다 각각 8.4배, 14배 및 3.9배 높았다.
- [0102] 상기와 같이, LBP1 및 LBP3 펩타이드에 비하여 LBP2 펩타이드가 더 높은 리튬 흡착 및 리튬 특이성을 가지는 것을 확인하였다. 이는 LBP2의 네번째 아미노산 변이에 의한 것이다.
- [0104] <실험예 2>
- [0105] <2-1> FE-SEM 분석
- [0106] 리튬 흡착 균주를 FE-SEM (JEOL JSM-6500F)을 사용하여 시각화하였다. 흡착 후 재조합 균주를 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 electron microscopy)으로 시각화하였다.
- [0107] 그 결과, 리튬 흡착 후, LBP2를 발현하는 대장균의 표면에서는 리튬 나노입자가 관찰되었지만 (도 5a), 야생형 대장균의 표면에서는 나노입자가 관찰되지 않았다 (도 5b). 이는 리튬 결합 펩타이드를 통해 재조합 대장균의 표면에 리튬이온이 흡착되었음을 의미한다.
- [0109] <2-2> 라만 분광법 및 FT-IR 분석
- [0110] 재조합 대장균에 의해 흡착된 리튬의 특성을 라만 분광법 (Thermo-scientific, DXR Raman microscope)으로 분석하였다. 280 cm^{-1} 주위에서 밴드가 발견되었다 (도 5c). 표면 발현된 LBP2에서만 형성되었는지 확인하기 위해, 야생형 대장균을 라만 분광법으로 분석하였으며, 280 cm^{-1} 주위에서 밴드가 없음을 확인하였다. 이는 나노입자의 형성이 표면 발현된 펩타이드에 의해서만 발생하기 때문이다.
- [0111] 재조합 대장균의 세포 표면의 변화를 분석하기 위해 FT-IR을 수행하였다. 염화리튬을 대조군으로 하여 테스트하였다. 그 결과, 리튬 흡착 후 재조합 대장균은 염화리튬과 유사한 FT-IR 스펙트럼을 보인 반면, 야생형 대장균은 거의 직선 스펙트럼을 보였다 (도 5d). 이는 리튬 나노입자의 형성이 표면 발현된 LBP2 펩타이드에 의한 것임을 의미한다.
- [0112] 상기와 같이, 라만 분광법 및 FT-IR 분석을 통해 세포 표면에 리튬 나노입자가 형성됨을 확인하였다.
- [0114] <2-3> XRD 및 HR-TEM 분석
- [0115] XRD 및 HR-TEM 분석을 위해 재조합 균주는 리튬 흡착 후 소성하였다. 리튬 흡착 균주를 수확하고 EYELA FDU-2200 동결건조기를 사용하여 동결건조하였다. 소성을 위하여 온도를 30분 내에 10℃로 높이고, 1시간 동안 유지한 다음, 온도를 500℃까지 5시간 동안 높였다. X선 회절(XRD) 패턴은 20-80° 범위에서 Cu K α radiation (V = 40 kV, I = 40 mA)으로 ULTIMA 4 (Rigaku, Japan)를 사용하여 수행되었다. HR-TEM 분석은 JEM-2100F(JEOL, Japan)를 이용하여 수행하였다.
- [0116] 그 결과, 다양한 리튬 산화물 피크가 관찰되었으며, 이는 생성물의 다결정질 특성을 나타낸다. 산화 리튬 나노입자에 대한 브래그 반사는 각각 (002), (111) 및 (110) 평면을 나타내는 23.1°, 33.8° 및 36.4° 의 2-theta 값에서 관찰되었다 (도 6b). TEM 이미지는 소성된 리튬 나노입자의 결정 구조를 보여주었다. 표면 중 하나의 표

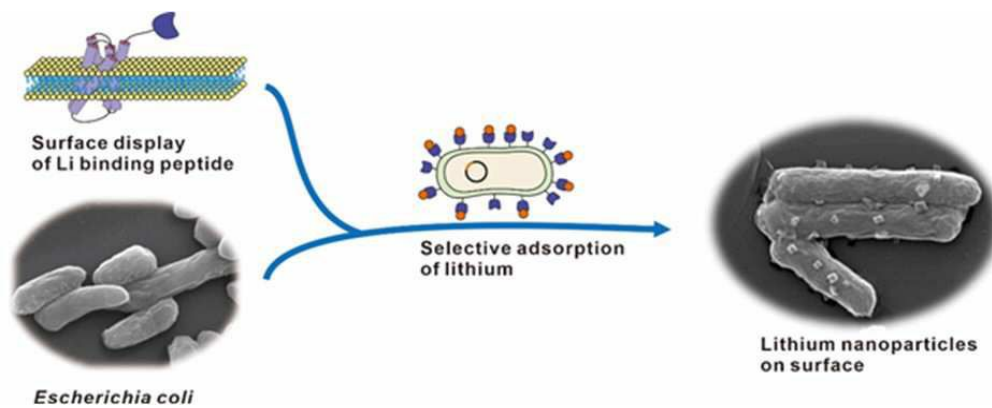
면 간 거리는 $0.264 \text{ \AA}$ 이며, 이는 XRD 분석에서 결정질 금속 리튬 표면 (111)로 지정된다 (도 6c). 이는 세포 표면에 결정질의 리튬 나노입자가 합성되었음을 의미한다.

[0117] 상기 실시예 및 실험예에서, 리튬 결합 펩타이드를 세포 표면에 발현시켜 리튬 나노입자를 합성할 수 있음을 확인하였다. 본 발명의 리튬 나노입자 합성 방법은 새로운 리튬 나노입자 합성 및 리튬 회수 공정에 적용될 수 있다.

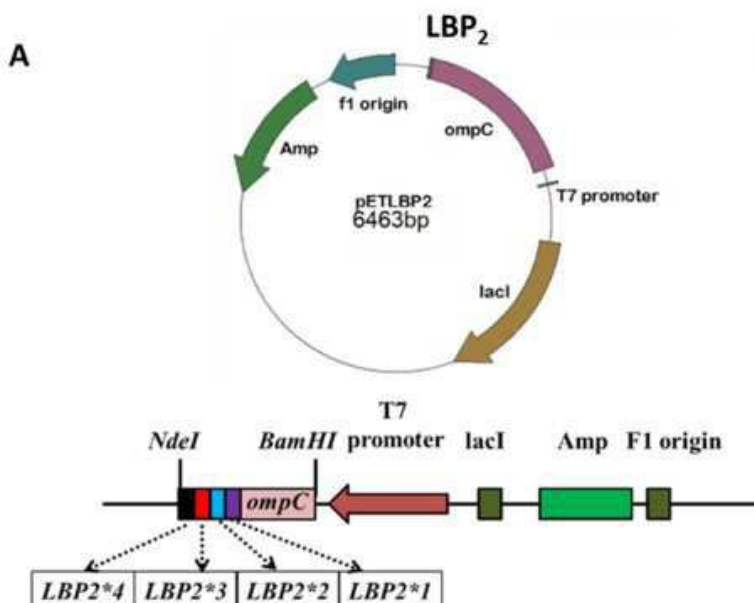
[0119] 이상, 첨부된 도면을 참조로 하여 본 발명의 실시예를 설명하였지만, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 기술자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며, 제한적이지 않은 것으로 이해해야만 한다.

도면

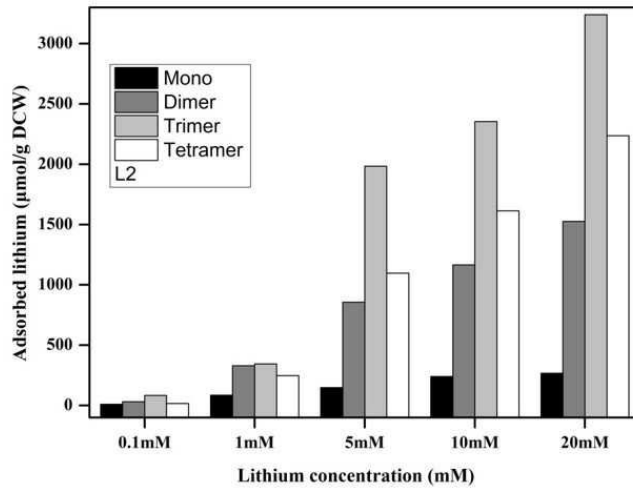
도면1



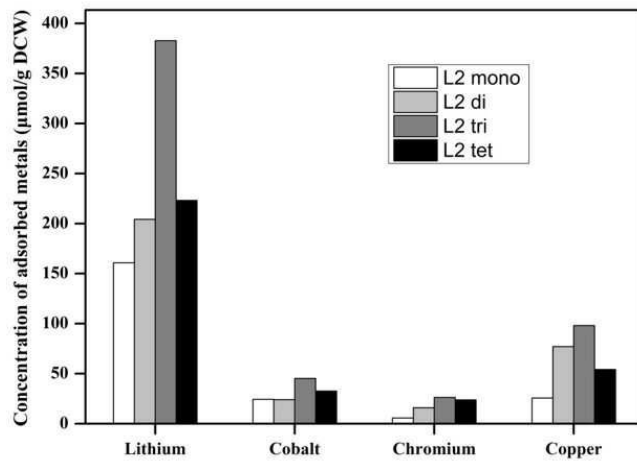
도면2a



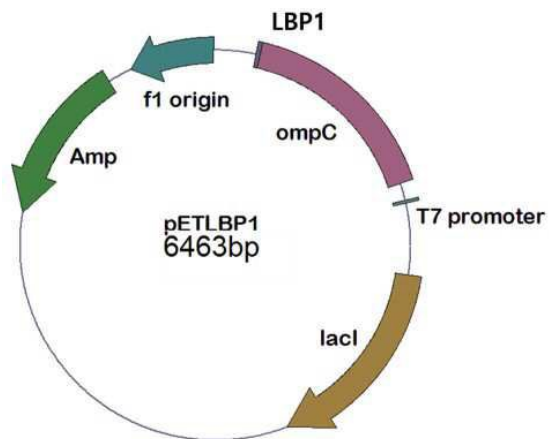
도면2b



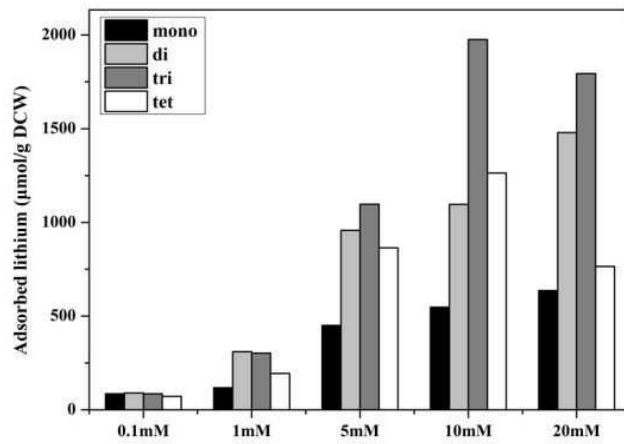
도면2c



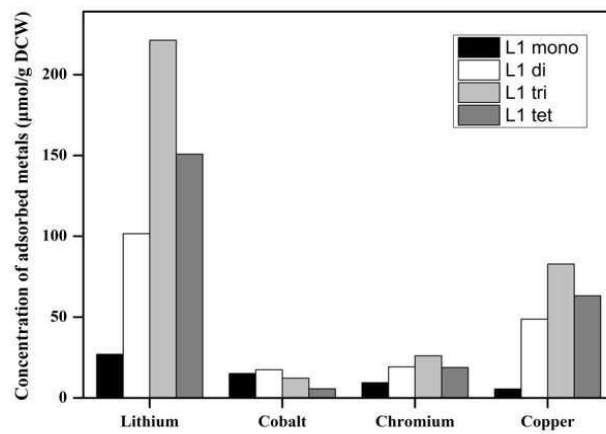
도면3a



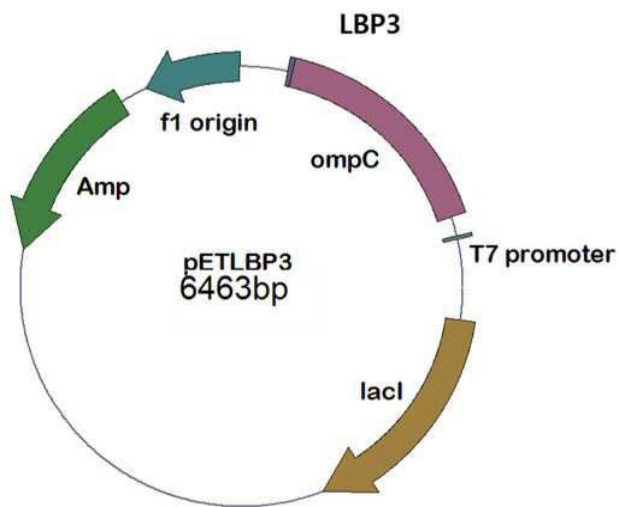
도면3b



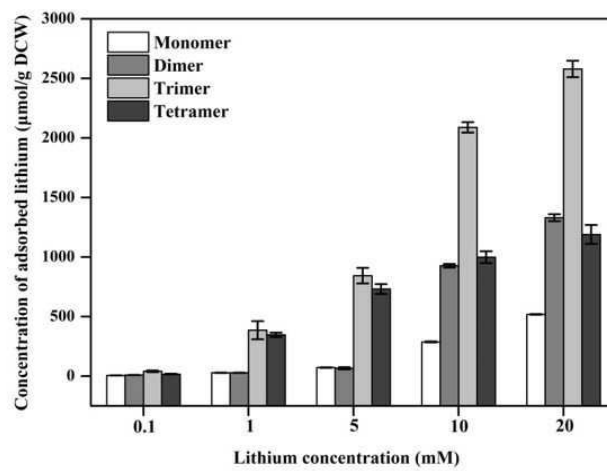
도면3c



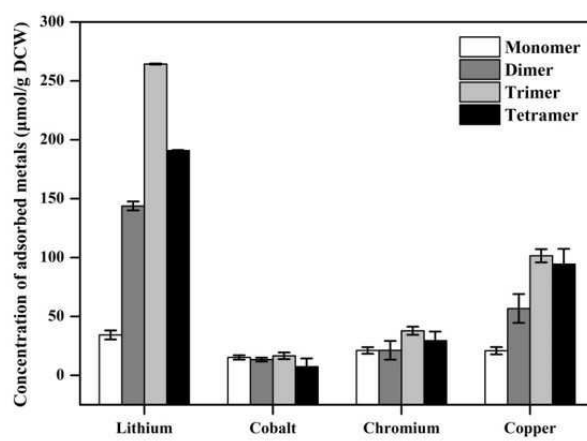
도면4a



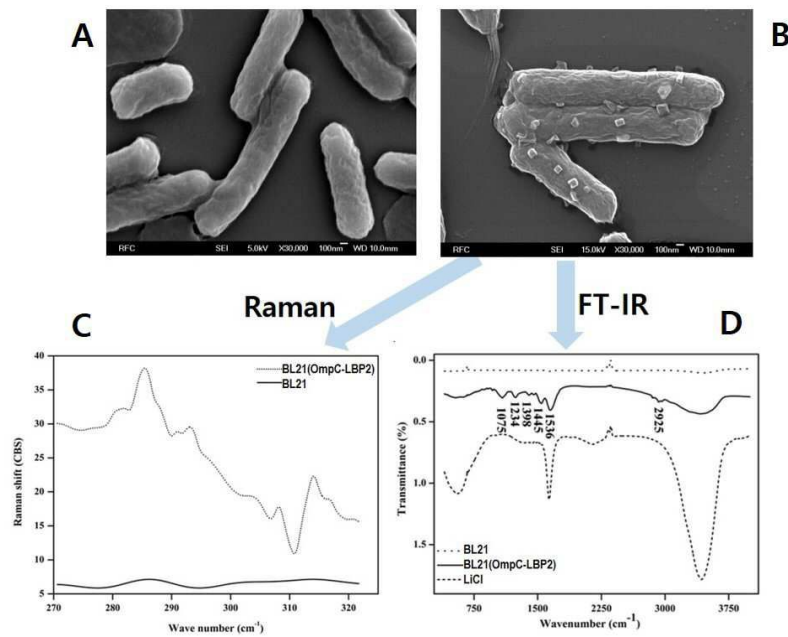
도면4b



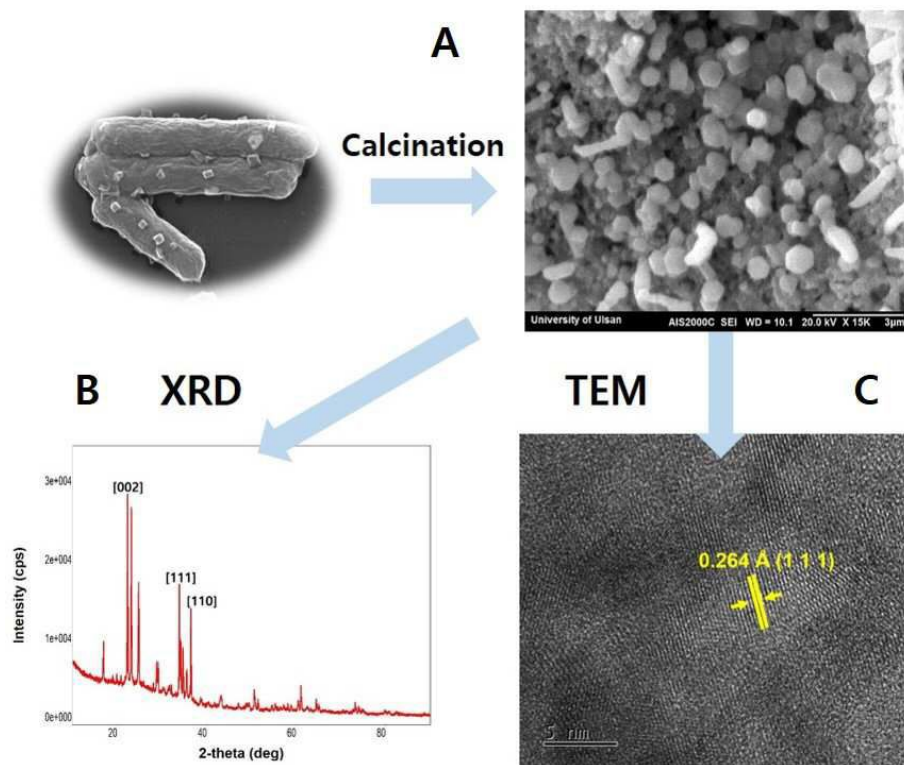
도면4c



도면5



도면6



서열 목록

- <110> University of Ulsan Foundation For Industry Cooperation
- <120> Method for preparing lithium nanoparticles through cell surface display of lithium-binding peptides and lithium nanoparticles prepared thereby

<130> APP2022-0051KR
 <160> 13
 <170> KoPatent In 3.0
 <210> 1
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> LBP2
 <400> 1
 ggccccgggcg atccg 15
 <210> 2
 <211>
 48
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> LBP2 Forward primer
 <400> 2
 catatgagga gaaatataat gaaagttaa gtactgtccc tcctgggc 48
 <210> 3
 <211> 61
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> LBP2 Reverse primer
 <400> 3
 ggatccccga tcgccccggc ccatgtttt gttgaagtag taggtagcac caacatcaac 60
 a 61
 <210> 4
 <211> 48
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> LBP2 dimer Forward primer
 <400> 4
 catatgagga gaaatataat gaaagttaa gtactgtccc tcctgggc 48
 <210> 5

<211> 69

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> LBP2 dimer Reverse primer

<400> 5

ggatccgccgccc gggccccgctt tcgccgccgc ttccgccgga tcgcccgggc ccatgttttt 60

gttgaagta 69

<210> 6

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> LBP2 trimer Forward primer

<400> 6

catatgagga gaaatataat gaaagttaa gtactgtccc tcttggtc 48

<210> 7

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> LBP2 trimer Reverse primer

<400> 7

ggatccttat tacggatcgc ccgggccccgc 30

<210> 8

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> LBP2 tetramer Forward primer

<400> 8

catatgagga gaaatataat gaaagttaa gtactgtccc tcttggtc 48

<210>

> 9

<211> 69

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> LBP2 tetramer Reverse primer

<400>	9	
ggatccggat ccttattacg gatcgcccgg gcccgctttc gccgccgctt ccgccggatc	60	
gcccgggcc	69	
<210>	10	
<211>	189	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	OmpC	
<400>	10	
atgaaagtta aagtactgtc cctcctggtc ccagctctgc tggtagcagg cgcagcaaac	60	
gctgctgaag ttacaacaa agacggcaac aaattagatc tgtacggtaa agtagacggc	120	
ctgcactatt tctctgacaa caaagatgta gatggcgacc agacctacat gcgtcttggc	180	
ttcaaaggt	189	
<210>	11	
<211>	726	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	OmpC	
<400>	11	
atgaaagtta aagtactgtc cctcctggtc ccagctctgc tggtagcagg cgcagcaaac	60	
gctgctgaag ttacaacaa 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	
gtaacttctt ggaccgacgt actgccagaa ttcggtgggtg acacctacgg tctgacaac	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> 12

<211> 993

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> OmpC

<400> 12

atgaaagtta aagtactgtc cctcctggtc ccagctctgc tggtagcagg cgcagcaaac 60
gctgctgaag ttacaacaa agacggcaac aaattagatc tgtacggtaa agtagacggc 120
ctgcactatt tctctgacaa caaagatgta gatggcgacc agacctacat gcgtcttggc 180
ttcaaagggtg aaactcaggt tactgaccag ctgaccggtt acggccagtg ggaatatcag 240

atccagggca acagcgtga aaacgaaaac aactcctgga cccgtgtggc attcgcaggt 300
ctgaaattcc aggatgtggg ttctttcgac tacggtcgta actacggcgt tgtttatgac 360
gtaacttctt ggaccgacgt actgccagaa ttcgggtgtg acacctacgg ttctgacaac 420
ttcatgcagc agcgtggtaa cggcttcgag acctaccgta aactgactt cttcggctctg 480
gttgacggcc tgaactttgc tgttcagtac cagggtaaaa acggcaaccc atctggtgaa 540
ggctttacta gtggcgtaac taacaacggt cgtgacgcac tgcgtcaaaa cggcgacggc 600
gtcggcggtt ctatcactta tgattacgaa ggtttcggta tcgggtgtgc gatctccagc 660

tccaaacgta ctgatgtca gaacaccgct gcttacatcg gtaacggcga cctgctgaa 720
acctacactg gtggtctgaa atacgacgct aacaacatct acctggctgc tcagtacacc 780
cagacctaca acgcaactcg cgtaggttcc ctgggttggg cgaacaaagc acagaacttc 840
gaagctgttg ctgagtacca gttcgacttc ggtctgcgtc cgtccctggc ttacctgcag 900
tctaaaggta aaaacctggg tcgtggctac gacgacgaag atatcctgaa atatgttgat 960
gttgggtgcta cctactactt caacaaaaac atg 993

<210> 13

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> GPGDP

<400> 13

Gly Pro Gly Asp Pro

1 5