(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2023 년 7 월 20 일 (20.07.2023)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2023/136402 A1

(51) 국제특허분류:
C07K 14/435 (2006.01) *C12N 15/70* (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2022/007499

(22) 국제출원일: 2022 년 5 월 26 일 (26.05.2022)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2022-0004732 2022 년 1 월 12 일 (12.01.2022) KR

(71) 출원인: 전북대학교산학협력단 (**INDUSTRIAL CO-OPERATION FOUNDATION JEONBUK NATIONAL UNIVERSITY**) [KR/KR]; 54896 전라북도 전주시 덕진구 백제대로 567, Jeollabuk-do (KR).

(72) 발명자: 이승재 (**LEE, Seung Jae**); 54865 전라북도 전주시 덕진구 출판로 69, 606-803, Jeollabuk-do (KR). 윤청운 (**YOON, Chung Woon**); 41437 대구광역시 북구 구암로21길 38, 102-1003, Daegu (KR). 이채민 (**LEE, Chae Min**); 55108 전라북도 전주시 완산구 견훤로 100, 103-307, Jeollabuk-do (KR). 황윤하 (**HWANG, Yun Ha**); 54824 전라북도 전주시 덕진구 천마산로 100, 106-104, Jeollabuk-do (KR).

(74) 대리인: 특허법인 지담 (**JIDAM IP LAW FIRM**); 13494 경기도 성남시 분당구 대왕판교로 670, 유스페이스2 A-201, Gyeonggi-do (KR).

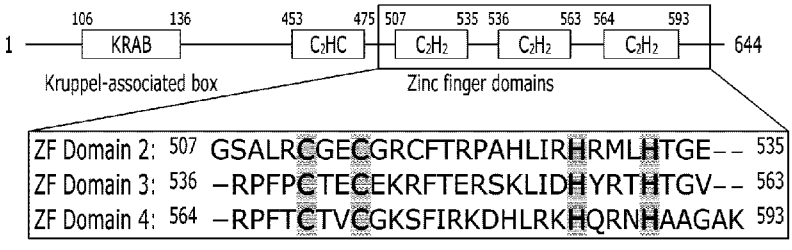
(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:
— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(54) **Title:** ZINC FINGER DOMAIN, AND METHOD FOR RECOVERING COBALT IONS BY USING SAME

(54) **발명의 명칭:** 징크핑거 도메인 및 이를 이용하여 코발트 이온을 회수하는 방법



(57) **Abstract:** The present invention provides a method for using a zinc finger protein in the selective recovery of metal ions included in various types of industrial waste, and provides: a PARIS zinc finger domain having an amino acid sequence of SEQ ID NO: 1; a composition for adsorbing and recovering cobalt ions, comprising the PARIS zinc finger domain as an active ingredient; and a method for recovering cobalt ions, comprising a step of culturing, in a material comprising waste cobalt, E. coli into which the PARIS zinc finger domain has been introduced.

(57) **요약서:** 본 발명은 각종 산업 폐기물에 포함된 금속 이온을 선택적으로 회수하는데 징크핑거 단백질을 이용하는 방법을 제시하는 것으로, 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 PARIS 징크핑거 도메인, 상기 PARIS 징크핑거 도메인을 유효성분으로 포함하는 코발트 이온 흡착 및 회수용 조성물, 상기 PARIS 징크핑거 도메인이 도입된 대장균을 폐코발트를 포함하는 물질 내에서 배양하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는, 코발트 이온의 회수 방법을 제공한다.

WO 2023/136402 A1

명세서

발명의 명칭: 징크핑거 도메인 및 이를 이용하여 코발트 이온을 회수하는 방법

기술분야

[1] 본 발명은 각종 산업 폐기물에 포함된 금속 이온을 선택적으로 회수하는데 있어서 징크핑거 도메인을 이용하여 금속 이온, 특히 코발트 이온을 회수하는 방법에 관한 것이다.

[2]

배경기술

[3] 전기자동차(배터리) 개발 등 4차 산업의 발전에 따른 금속 회수 기술의 필요성이 대두되고 있는 가운데 금속 이온의 독성 및 희소성을 고려할 때, 특정 금속 이온과 결합하는 펩타이드의 능력은 환경 보호 및 금속 이온의 회수를 위한 중요한 수단이 될 수 있다. 특히, 코발트는 지구상에서 약 0.0025%만 존재하는 희소성 물질이며, 스마트폰 및 전기자동차 배터리 등 4차 산업혁명의 주요 산업 분야에 필수적으로 사용되는 소재이다. 그러므로 이의 재생 및 회수에 대한 요구가 계속되고 있다.

[4] 생물적 시스템 내 3분의 1의 단백질은 자연에서 그들의 구조적, 기능적 역할을 수행하기 위해 특정 금속 이온과 결합하여 그들의 생물학적 기능의 활성화를 달성한다. 따라서 오염된 물 또는 토양 속에서 희귀한 금속 이온을 제거 및 회수하는데 이들을 이용할 수 있다.

[5] 징크핑거(Zinc finger, ZF) 단백질은 진핵 및 원핵 생물에서 전사 및 번역 조절자로, 금속 이온과의 배위결합을 통하여 삼차 구조를 형성하는 생체 내 금속단백질(metalloprotein) 중 하나이다. 징크핑거 단백질은 아연 이온의 존재하에서 국지적 징크핑거 도메인 내의 특정 이차적 폴딩이 생성되어 금속 단백질로서의 뚜렷한 형상을 갖는다.

[6] 징크핑거 도메인은 결합하는 리간드에 따라 고전적(classical) 또는 비고전적(non-classical) 징크핑거 도메인으로 구분된다. 고전적 징크핑거 도메인의 경우 Cys_2His_2의 리간드가 아연 이온과 결합하고 있으며, 비고전적 징크핑거 도메인의 경우 $Cys_2His_1Cys_1$ 등과 같은 리간드가 아연 이온과 결합한다. 일반적인 경우에 시스테인(Cysteine, Cys) 및 히스티딘(Histidine, His)과 아연 이온이 결합하여 징크핑거 단백질의 기하학적 구조를 형성하고 단백질의 기능을 활성화한다.

[7] 기존의 미생물 이용 금속 리사이클(recycle) 연구의 경우 미생물 연료전지 또는 외부에 펩티드와 같은 물질이 결합된 미생물을 중심으로 연구가 진행되었다.

[8] 대한민국 특허출원 제10-2011-0042226호는 미생물 연료전지를 이용한 중금속 제거 또는 귀금속 회수 방법에 관한 것으로, 중금속 또는 귀금속 함유

폐수로부터 미생물 연료전지(MFC)를 사용하여 Hg^{2+}를 금속 Hg나 Hg_2Cl_2의 고형 침전물이나 침적물 등으로 제거하며, 부수적으로 전력을 생산하고 부산물의 발생 없이 장기적 경제 운전이 가능함을 확인하였다.

[9] 대한민국 특허출원 제10-2011-0145668호는 미생물 연료전지를 이용한 폐수로부터 은 금속의 회수 및 전력 생산에 관한 것으로, 은 이온 폐수를 전자 수용체로 이용하고, 유기물을 전자 공여체로 사용한 고성능의 미생물 연료전지를 이용하여 은 금속을 회수하는 방법으로서, 효율적인 비용으로 은 금속 회수와 동시에 전력을 생산할 수 있다는 이점을 포함한다.

[10] 대한민국 특허출원 제10-2018-0004636호는 미생물 흡착제 및 이를 이용한 리튬의 연속 회수 방법에 관한 것으로, 지지체 및 리튬 결합 펩티드가 표면에 발현된 미생물을 이용하여 리튬 회수에 사용하며, 폐수 또는 해수로부터 리튬 이온의 연속적인 회수가 가능함을 확인하였다.

[11] 또한, 실크 가공 과정에서 발생하는 폐액 중의 실크 단백질이 금속 이온과 반응해 착화합물(complex compound)을 형성하는 것을 이용하여 금속 제련 공정에서 발생되는 중금속을 분리·회수할 수 있는 방법을 규명한 바 있다(한국실크연구원, 2015). 여기서는 실크 단백질과 금속의 높은 용융점을 이용하여 착화합물을 일정 온도 이상으로 가열할 경우 순수한 금속의 회수가 가능한 원리를 이용하였다.

[12]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[13] 본 발명은 징크핑거 도메인의 금속 이온에 대한 특이적 흡착을 이용하여 유한한 자원인 금속 이온, 특히 코발트 이온의 회수 문제를 해결할 방법을 제시하는 것을 목적으로 한다.

[14]

과제 해결 수단

[15] 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 PARIS 징크핑거 도메인, 이를 암호화하는 유전자, 상기 유전자를 포함하는 재조합 발현 벡터, 상기 재조합 발현 벡터가 숙주세포에 도입된 형질전환체를 제공한다.

[16] 또한, 본 발명은 상기 형질전환체를 배양하는 단계 및 상기 형질전환체의 배양물로부터 PARIS 징크핑거 도메인을 분리하는 단계를 포함하는 PARIS 징크핑거 도메인의 제조 방법을 제공한다.

[17] 또한, 본 발명은 상기 PARIS 징크핑거 도메인을 유효성분으로 포함하는 코발트 이온 흡착 및 회수용 조성물을 제공한다.

[18] 또한, 본 발명은 상기 PARIS 징크핑거 도메인이 도입된 대장균을 폐코발트를 포함하는 물질 내에서 배양하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는, 코발트 이온의 회수 방법을 제공한다.

[19]

발명의 효과

[20] 본 발명에 의하면, 징크핑거 도메인은 구조 유지를 위하여 금속 이온과의 결합이 필수적이면서, 금속 결합 특이성이 높은 징크핑거 도메인을 금속 이온의 선택적 회수도구로 이용하는 것이 가능하다. 특히, 코발트 이온의 존재 하에서 단백질 내 금속 이온의 흡착을 확인함으로써, 코발트 이온의 효율적인 회수를 달성할 수 있다.

[21]

도면의 간단한 설명

[22] 도 1은 PARIS 내 징크핑거 도메인의 아미노산 서열을 나타낸 것이다.

[23] 도 2는 (a) apo-PARIS_ZF2-4 및 (b) Co^{2+}-PARIS_ZF2-4의 흡광도를 측정하여 Co^{2+} 이온의 특이적 흡착을 확인한 그래프이다.

[24] 도 3은 PARIS_ZF2-4의 과발현에 따른 대장균 내의 금속 이온 측정 결과이다.

[25] 도 4는 배양액 내 Co, Cu 및 Fe 이온의 농도를 달리하여 투입하였을 때 세포내 PARIS_ZF2-4의 Zn 이온의 농도를 측정한 것이다.

[26] 도 5는 배양액 내 Co, Cu 및 Fe 이온의 농도를 달리하여 투입하였을 때 세포내 PARIS_ZF2-4 내 금속 이온의 농도를 측정한 것이다.

[27]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[28] 본 발명은 징크핑거 도메인과 배위결합을 형성하는 아연 이외의 금속(Co, Cu, Fe)을 이용하여 대장균 내 금속 이온의 흡수를 확인하고, 코발트(Co)의 경우에서 아연을 대신하여 상기 징크핑거 도메인의 구조를 형성하고 단백질의 아연수송 과정에 관여하고 있음을 확인하며, 이에 따라 금속 이온을 선택적 제거 및 회수하는데 징크핑거 도메인을 사용하는 방법을 제공한다.

[29] 본 발명에서는 금속 이온의 특이적 흡착을 확인하기 위하여 징크핑거 도메인을 선택적으로 발현하여 정제하고, 대장균 내 징크핑거 도메인을 이용하여 금속 이온을 특이적으로 흡착하는 방법을 제공한다. 상기 금속 이온은 이종 금속 이온, 구체적으로 코발트 이온일 수 있다.

[30] 구체적으로, 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 PARIS 징크핑거 도메인을 제공한다. 아울러 본 발명은 상기 PARIS 징크핑거 도메인을 암호화하는 유전자, 상기 유전자를 포함하는 재조합 발현 벡터, 상기 재조합 발현 벡터가 숙주세포에 도입된 형질전환체를 제공한다.

[31] 상기 PARIS 징크핑거 도메인은 Parkin-interacting substrates(PARIS)의 C-말단에 존재하는 세 개의 징크핑거 도메인(PARIS_ZF2-4)으로써, 고전적 징크핑거 도메인이다.

[32] 상기 PARIS는 뇌에서 유비퀴논의 가수분해를 조절하는 것으로 644개의 아미노산으로 이루어져 있으며, 도 1 및 서열번호 1에 도시된 바와 같이

아미노산 서열의 C-말단부에 1개의 비고전적 $Cys_2His_1Cys_1$ 징크핑거 도메인과 3개의 고전적 Cys_2His_2 징크핑거 도메인을 갖는다. 본 발명에서는 상기 Cys_2His_2 도메인, 즉 세 개의 고전적 징크핑거 도메인을 대장균 내에 적용하여 금속 이온과의 결합을 확인한다. 상기 세 개의 징크핑거 도메인은 총 네 개의 PARIS의 징크핑거 도메인에서 두 번째부터 순차적으로 위치하고 있으므로 PARIS_ZF2-4라 한다(도 1 참고).

[33] 상기 PARIS_ZF2-4는 기본적으로 금속 이온과의 배위결합을 형성할 수 있다. 따라서 상기 PARIS_ZF2-4는 아연 이온을 포함한 이종 금속 이온으로 치환될 수 있고, 상기 이종 금속 이온은 Co^{2+}, Cu^{2+} 및 Fe^{3+}의 금속 이온일 수 있다. 상기 이종 금속 이온의 치환은 UV/Vis spectrophotometer를 이용하여 금속 치환 시 특이적으로 발생하는 ligand-to-metal charge-transfer (LMCT) 또는 d-d transition band에 의한 peak를 통해 확인할 수 있다(도 2 참고).

[34] 상기 PARIS_ZF2-4은 대장균 내에서 성공적으로 발현되어 아연 이온과 결합하고 있으며, 구체적으로 단백질 발현 시 세포 내 아연 이온의 농도가 증가하는 것이 확인된다(도 3 참고).

[35] 상기 PARIS_ZF2-4을 포함하는 대장균을 대상으로 이종 금속 이온 농도가 상이한 배양액 조건에서 배양하고, ICP-OES (Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectrometry)를 이용하여 세포 내 아연 이온의 농도를 확인하면, 상기 이종 금속 이온 중 1개의 금속 이온(Co^{2+})에서 단백질 발현 시 세포 내 아연 이온의 농도가 특이적으로 감소하는 것이 확인된다(도 4 참고).

[36] 추가적으로 상기 PARIS_ZF2-4을 포함하는 대장균을 대상으로 이종 금속 이온 농도가 상이한 배양액 조건에서 배양하고, ICP-OES (Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectrometry)를 이용하여 세포 내 이종 금속 이온의 농도를 확인하면, 상기 이종 금속 이온 중 1개의 금속 이온(Co^{2+})에서 금속 이온 농도 증가에 따라, 세포 내 아연 이온의 농도가 특이적으로 감소하고 반면 대장균 내 코발트 이온의 농도가 증가하는 것이 확인된다. 즉, 대장균 내 아연 이온과의 배위결합이 코발트 이온과의 배위결합으로 치환되는 것이다(도 5 참고).

[37] 따라서, 본 발명은 상기 PARIS 징크핑거 도메인을 포함하는 형질전환체를 배양하는 단계 및 상기 형질전환체의 배양물로부터 PARIS 징크핑거 도메인을 분리하는 단계를 포함하는 PARIS 징크핑거 도메인의 제조 방법을 제공한다.

[38] 또한, 본 발명은 상기 PARIS 징크핑거 도메인을 유효성분으로 포함하는 코발트 이온 흡착 및 회수용 조성물을 제공한다. 상기 징크핑거 도메인은 고전적 또는 비고전적 징크핑거 도메인일 수 있다. 바람직하게, PARIS 징크핑거 도메인은 고전적 징크핑거 도메인이다. 추가적으로, 바람직하게 상기 PARIS 징크핑거 도메인은 아연이 배제된 것으로서, PARIS_ZF2-4에서 Zn^{2+}가 제거된 상태인 apo-PARIS_ZF2-4일 수 있다.

[39] 또한, 본 발명은 상기 PARIS 징크핑거 도메인이 도입된 대장균을 폐코발트를

포함하는 물질 내에서 배양하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 코발트 이온의 회수 방법을 제공한다. 바람직하게, 상기 페코발트를 포함하는 물질에는 코발트 이온이 100 μM 이상의 농도로 존재한다. 상기 대장균 내에 도입된 PARIS 징크핑거 도메인은 대장균 내에서 발현 중 또는 발현된 상태에서 코발트 이온의 회수를 달성할 수 있다.

[40]

[41] 이하, 본 발명의 실시예에 의하여 상세히 설명한다.

[42] 단, 하기 실시예는 본 발명을 구체적으로 예시하는 것이며, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 의해 한정되지 아니한다.

[43]

발명의 실시를 위한 형태

[44] **실시예 [1-1] : PARIS_ZF2-4-pET15b의 클로닝 및 형질전환**

[45] 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 징크핑거 도메인을 발현 및 정제하기 위하여 서열번호 2의 염기 서열을 포함하는 PCR 산물이 삽입된 재조합 발현 벡터를 제작하였다. 상기와 같이 제작된 재조합 발현 벡터를 대상으로 염기 서열분석(sequencing)을 수행한 결과, 상기 서열번호 2의 염기 서열이 제대로 삽입되었음을 확인하였으며, 이를 대장균에 형질전환 하였다.

[46] 상기와 같이 얻어진 형질전환체는 10 mL의 LA 고체 배지(LB 배지+50 μg/mL 암피실린)에 선접종하고 37°C에서 12시간 이상 배양하였다. 고체 배지에 나타나는 하나의 콜로니를 단집락 분리 과정으로 5 mL의 LB 배지와 50 μg/mL 암피실린이 포함된 시험관(test tube)에 접종하고 37°C의 진탕 배양기로 12시간 이상 종균 배양을 실시하였다. 상기와 같이 얻어진 형질전환체는 이용하기 전에 15% 글리세린 용액을 첨가하여 냉동 보관하였다.

[47]

[48] **실시예 [1-2] : PARIS_ZF2-4-pET15b의 과발현 및 정제**

[49] 상기 실시예 [1-1]에서 냉동 보관된 형질전환체를 200 mL의 LB 배지와 50 μg/mL 암피실린이 포함된 시험관(test tube)에 접종하고 37°C의 진탕 배양기로 12시간 이상 종균 배양을 실시하였다. 그 후, 상기 종균 배양된 배양액 5 mL를 500 mL의 LK 배지가 포함된 2,000 mL 플라스크에 첨가하여 총 2 L의 본 배양을 실시하였고, 600 nm에서의 흡광도가 0.6이 될 때 최종 농도 0.5 mM이 되도록 IPTG(isopropyl-1-thio-β-D-galactopyranoside)를 첨가하여 상기 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 단백질의 과발현을 유도하였다. 상기와 같이 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 단백질을 유도하는 과정에서, 교반 속도는 200 rpm이, 배양 온도는 37°C가 유지되도록 조정하였고, IPTG 첨가 후에는 교반 속도를 200 rpm으로, 배양 온도를 25°C로 조정하여 6시간 동안 배양하였다.

[50] 또한, 상기와 같이 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 단백질의 과발현이 유도된 형질전환체의 배양액을 500 mL의 PP 튜브(PP tube)에 분주하고, 4°C에서

8,000 rpm으로 20분 동안 원심분리하여 상층액을 분리해 낸 펠렛에 완충 용액 A(25 mM MOPS, 50 mM NaCl, 5 mM $MgCl_2$, 0.01 μL/mL DNaseI, 0.002 mg/mL, pH 6.5) 50 mL을 첨가하고, 초음파분쇄(sonication) 방법으로 세포를 파쇄함으로써 형질전환체의 세포 용해물(cell lysate)을 수득하였다.

[51] 상기와 같이 수득된 세포 용해물을 4°C에서 12,000 rpm으로 1시간 동안 원심분리하여 상층액을 수득하였고, SP sepharose 이온 교환 컬럼 및 Superdex 75이 장착된 고속 단백질 액체 크로마토그래피(Fast Protein Liquid Chromatography)를 이용하여 상기와 같이 수득된 상층액으로부터 과발현된 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 단백질을 분리하였다.

[52]

[53] **실시예 2 : PARIS_ZF2-4의 금속 이온 흡착 연구**

[54] 금속 이온이 배제된 apo-PARIS_ZF2-4 단백질을 얻기 위해 상기 실시예 [1-2]에서 분리 및 정제한 단백질을 1 M HCl에서 200 rpm, 4°C, 1시간 산처리하였다. 금속 이온 흡착을 위하여 3당량의 코발트(cobalt(II) chloride hexahydrate(Sigma-Aldrich))를 첨가하고, UV/Vis spectrophotometer를 이용하여 용액의 흡광도를 측정하였다. 이에 따른 결과를 도 2에 나타냈다. 징크핑거 도메인에 코발트 이온이 흡착할 경우 나타나는 특징적인 d-d transition band (560 nm 및 644 nm)를 확인하였으며, apo-PARIS_ZF2-4의 UV/Vis spectrum 결과를 대조군으로 삼았다.

[55]

[56] **실시예 3 : 대장균 내의 금속 이온의 농도 측정**

[57] 징크핑거 도메인 발현 시 형성되는 아연 이온과의 배위결합을 확인하기 위하여, 대장균 내 징크핑거 도메인의 발현 전(w/o IPTG)과 발현 후(0.1 mM IPTG)의 금속 이온의 농도를 조사하였다. 배양된 세포를 원심분리하여 세포배양액(LB 배지)과 세포를 분리하고 세포 배양액에 포함된 금속 이온과 대장균 내 금속 이온 농도를 ICP-OES(ThermoFisher Scientific, iCAP 7000)를 이용하여 측정하였다. 이에 따른 결과를 도 3에 나타냈다. 흰색 막대는 세포 파쇄 전 상층액의 농도이고, 빗금 막대는 세포 파쇄 후 상층액의 농도이다.

[58] 여기서, 세포배양액 내 금속 이온과 비교하였을 때 IPTG에 의해 발현된 PARIS_ZF2-4 대장균 내의 아연 금속 이온의 농도가 증가하였다. 구체적으로, PARIS_ZF2-4 내의 세 개의 징크핑거 도메인은 대장균 내의 발현에 의해 아연 이온과 배위결합을 형성함을 확인하였다.

[59]

[60] **실시예 4 : Co, Cu 및 Fe 존재 하에서 PARIS_ZF2-4의 발현**

[61] 상기 PARIS_ZF2-4의 대장균 내 발현 과정에서 이종 금속 이온을 각각 상이한 농도로 첨가하여, 대장균 내 아연 이온의 농도 변화를 측정하였다. 결과를 도 4에 나타냈다. 이를 보면, 상기 이종 금속 이온, 구체적으로 코발트, 구리 및 철의 추가적인 금속 이온의 존재 하에서 아연 이온의 농도를 ICP-OES(ThermoFisher

Scientific, iCAP 7000)를 이용하여 측정하였을 때, 금속 이온의 첨가에 따라 아연 이온의 농도가 감소하였다. 상기 이종 금속 이온 중 1개의 금속 이온(코발트 이온)에서 특이적인 아연 이온 농도의 감소를 보였으며, 코발트 이온이 PARIS_ZF2-4가 발현된 대장균 내에서 아연 이온을 치환하여 배위결합하는 것을 확인하였다.

[62]

[63] **실시예 5 : PARIS_ZF2-4 발현 후 금속 이온의 회수 능력 평가**

[64] 상기 PARIS_ZF2-4의 이종 금속 이온의 회수 능력을 평가하기 위하여 100 내지 500 μM 농도 범위의 상기 이온을 투입하고, 대장균 내 금속 이온을 ICP-OES (ThermoFisher Scientific, iCAP 7000)를 이용하여 측정하였다. PARIS_ZF2-4에 배위결합한 아연 금속 이온의 치환은 대장균 내 첨가한 금속 이온과 감소한 아연 이온의 농도를 비교하여 확인하였다. 결과를 도 5에 나타냈다.

[65] 여기서, 상기 이종 금속 이온 중 1개의 금속 이온, 구체적으로 코발트 이온(100, 300, 500 μM)을 첨가하였을 때 PARIS_ZF2-4가 발현된 대장균 내 코발트 이온의 농도가 증가하고 아연 이온 농도가 감소하는 것을 확인하였다. 아울러, 코발트 이온의 농도가 증가할 수록 대장균 내 PARIS_ZF2-4에 의해 회수되는 코발트 이온의 양이 증가함을 확인하였다. 구체적으로 대장균 내 PARIS_ZF2-4와 배위결합을 형성하는 아연 이온이 고농도의 코발트 이온 조건에서 코발트 이온으로 치환됨을 확인하였다.

[66]

산업상 이용가능성

[67] 본 발명은 각종 산업 폐기물에 포함된 금속 이온을 선택적으로 회수하는데 있어서 징크핑거 도메인을 이용하여 금속 이온, 특히 코발트 이온을 회수하는 방법에 관한 것으로, 본 발명에 의하면 징크핑거 도메인은 구조 유지를 위하여 금속 이온과의 결합이 필수적이면서, 금속 결합 특이성이 높은 징크핑거 도메인을 금속 이온의 선택적 회수도구로 이용하는 것이 가능하고, 특히, 코발트 이온의 존재 하에서 단백질 내 금속 이온의 흡착을 확인함으로써, 코발트 이온의 효율적인 회수를 달성할 수 있어 유용하다.

청구범위

[청구항 1] 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 PARIS 징크핑거 도메인.

[청구항 2] 제 1 항의 PARIS 징크핑거 도메인을 암호화하는 유전자.

[청구항 3] 제 2 항의 유전자를 포함하는 재조합 발현 벡터.

[청구항 4] 제 3 항의 재조합 발현 벡터가 숙주세포에 도입된 형질전환체.

[청구항 5] 제 4 항의 형질전환체를 배양하는 단계; 및 상기 형질전환체의 배양물로부터 PARIS 징크핑거 도메인을 분리하는 단계;를 포함하는 PARIS 징크핑거 도메인의 제조 방법.

[청구항 6] 제 1 항의 PARIS 징크핑거 도메인을 유효성분으로 포함하는 코발트 이온 흡착 및 회수용 조성물.

[청구항 7] 제 6 항에서,
상기 PARIS 징크핑거 도메인은 고전적 또는 비고전적 징크핑거 도메인인 것을 특징으로 하는, 코발트 이온 흡착 및 회수용 조성물.

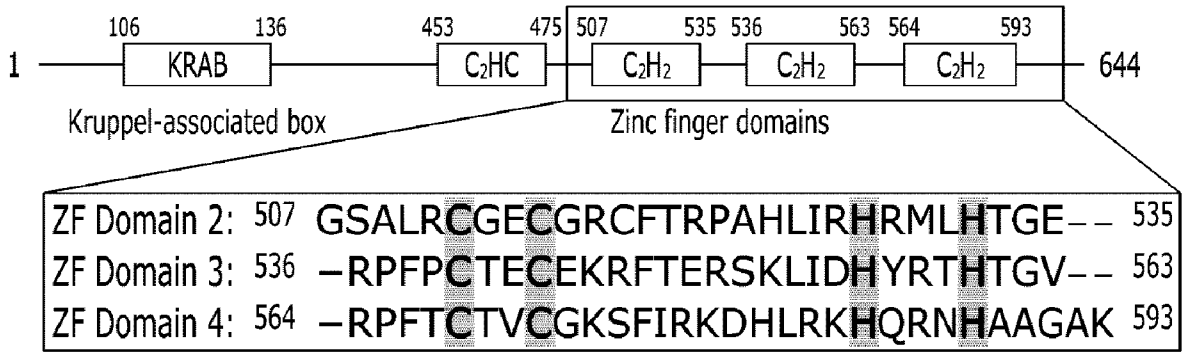
[청구항 8] 제 6 항에서,
상기 PARIS 징크핑거 도메인은 아연이 배제된 것으로서,
PARIS_ZF2-4에서 Zn^{2+}가 제거된 상태인 apo-PARIS_ZF2-4인 것을 특징으로 하는, 코발트 이온 흡착 및 회수용 조성물.

[청구항 9] 제 1 항의 PARIS 징크핑거 도메인이 도입된 대장균을 폐코발트를 포함하는 물질 내에서 배양하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는, 코발트 이온의 회수방법.

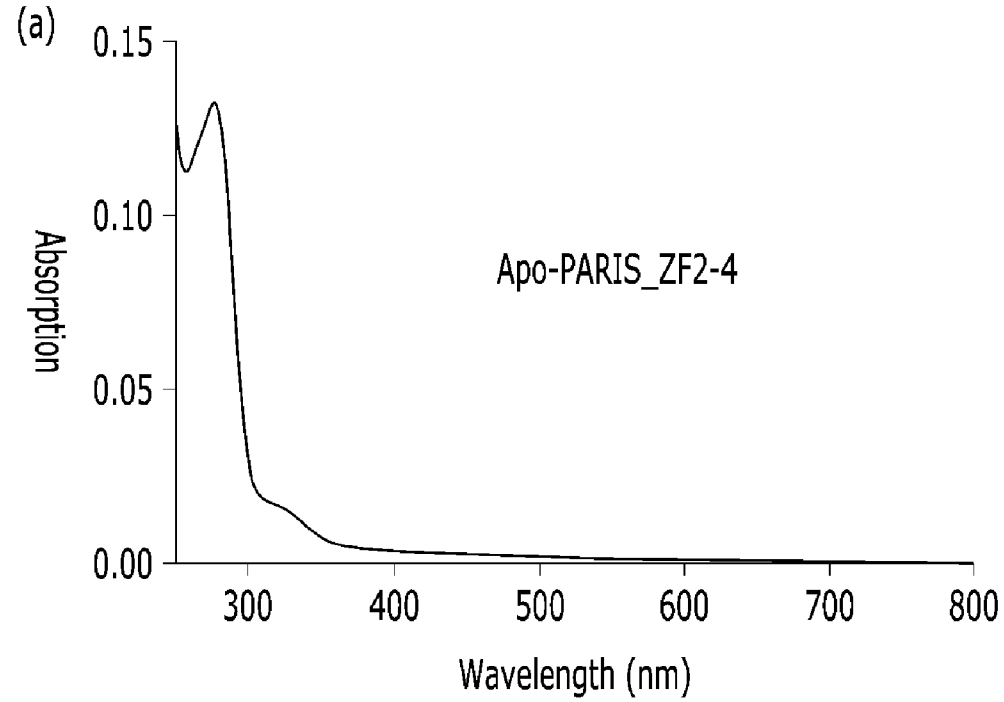
[청구항 10] 제 9 항에서,
상기 폐코발트를 포함하는 물질에는 코발트 이온이 100 μM 이상의 농도로 존재하는 것을 특징으로 하는, 코발트 이온의 회수 방법.

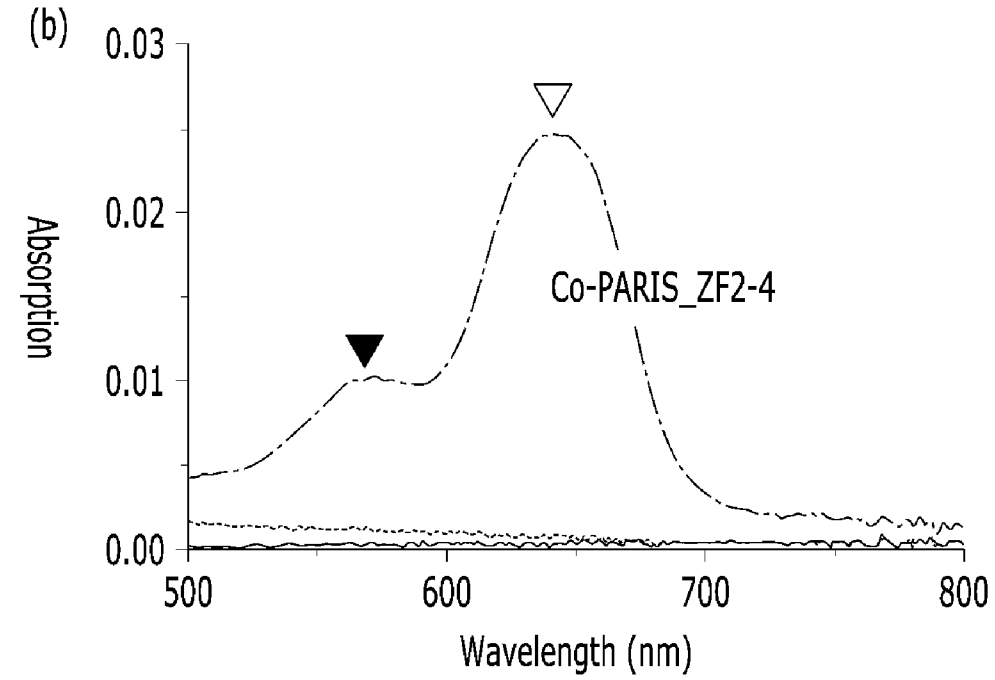
[청구항 11] 제 9 항에서,
상기 대장균 내에 도입된 PARIS 징크핑거 도메인은 대장균 내에서 발현 중 또는 발현된 것을 특징으로 하는, 코발트 이온의 회수 방법.

[도1]

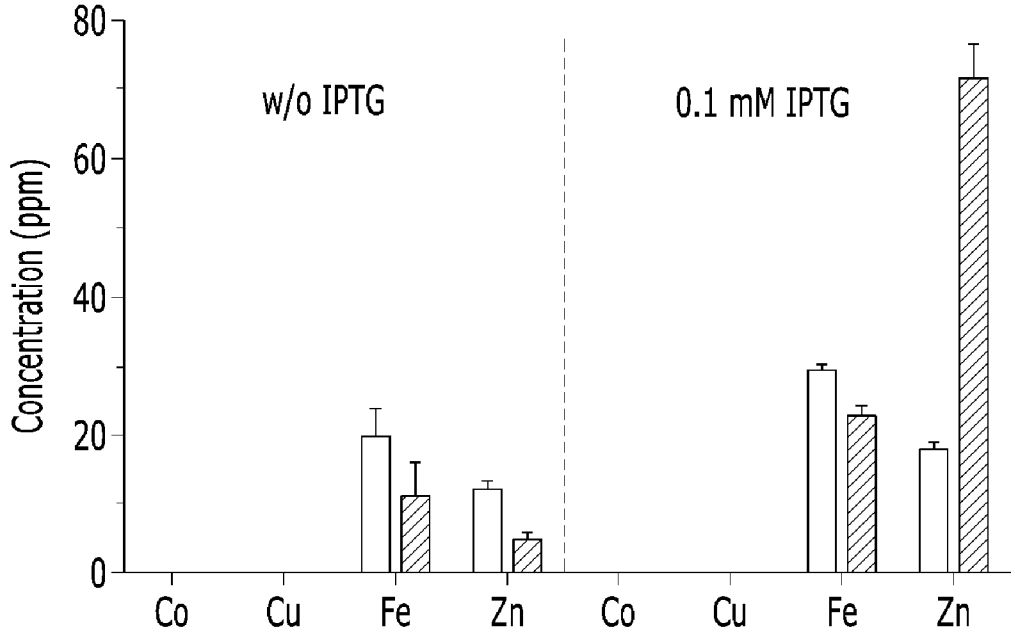

106
136
453
475
507
535
536
563
564
593
1
KRAB
C2HC
C2H2
C2H2
C2H2
644
Kruppel-associated box
Zinc finger domains
ZF Domain 2: 507 GSALRCGECGRCFTRPAHLIRHRMLHTGE-- 535
ZF Domain 3: 536 -RPFPCTECEKRFTERSKLIDHYRTHTGV-- 563
ZF Domain 4: 564 -RPFTCTVCGKSFIRKDHLRKHQRNHAAGAK 593

[도2]

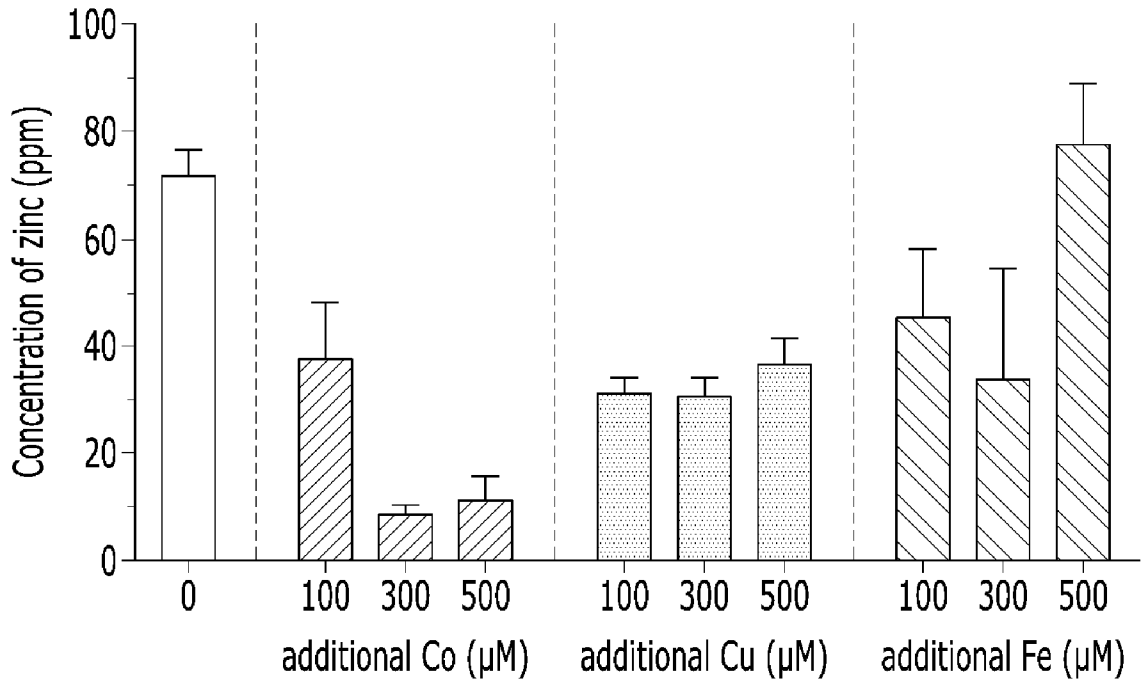

(a)
0.15
0.10
0.05
0.00
Absorption
Apo-PARIS_ZF2-4
300
400
500
600
700
800
Wavelength (nm)


(b)
0.03
0.02
0.01
0.00
Absorption
Co-PARIS_ZF2-4
500
600
700
800
Wavelength (nm)

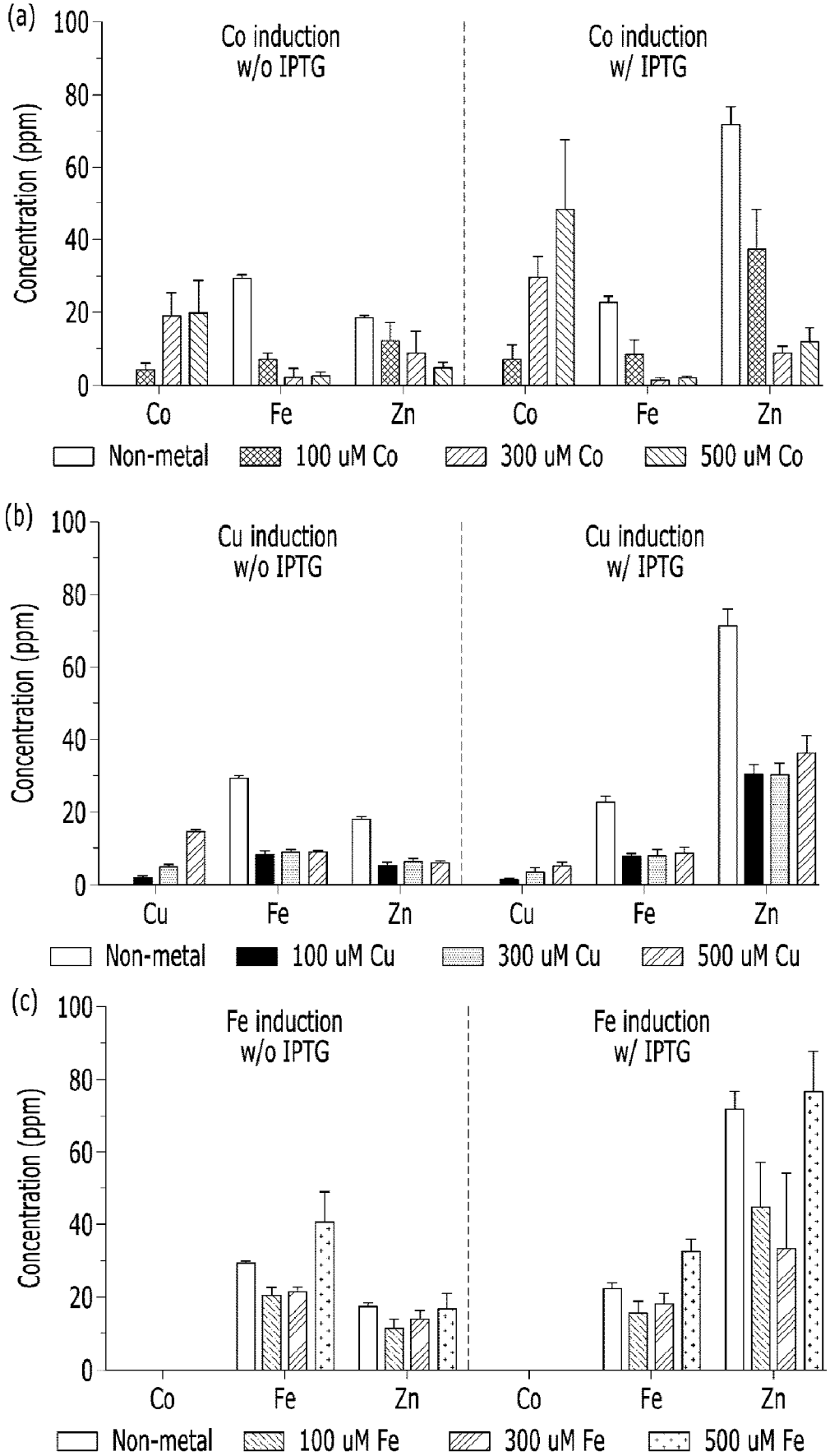
[도3]


w/o IPTG
0.1 mM IPTG
Concentration (ppm)
80
60
40
20
0
Co
Cu
Fe
Zn
Co
Cu
Fe
Zn

[도4]


Concentration of zinc (ppm)
100
80
60
40
20
0
0
100
300
500
100
300
500
100
300
500
additional Co (μM)
additional Cu (μM)
additional Fe (μM)

[도5]


(a)
Co induction w/o IPTG
Co induction w/ IPTG
Concentration (ppm)
Co
Fe
Zn
Non-metal
100 uM Co
300 uM Co
500 uM Co
(b)
Cu induction w/o IPTG
Cu induction w/ IPTG
Concentration (ppm)
Cu
Fe
Zn
Non-metal
100 uM Cu
300 uM Cu
500 uM Cu
(c)
Fe induction w/o IPTG
Fe induction w/ IPTG
Concentration (ppm)
Co
Fe
Zn
Non-metal
100 uM Fe
300 uM Fe
500 uM Fe

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2022/007499

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 14/435(2006.01)i; **C12N 15/70**(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K 14/435(2006.01); A61K 48/00(2006.01); C12N 15/11(2006.01); H01M 8/16(2006.01)

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean utility models and applications for utility models: IPC as above
Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & keywords: PARIS 징크핑거 도메인(Parkin-interacting substrate zinc finger domain), 코발트 이온 흡착(cobalt ion adsorbing), 대장균(Escherichia coli)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	YOON, Chungwoon et al. Selective coordination of cobalt ions by zinc fingers in Escherichia coli. Bulletin of the Korean Chemical Society. 21 September 2021, vol. 42, no. 12, pp. 1-9. See pages 2-5 and 7; and figure 1.	1-11
X	US 8603994 B2 (DAWSON, Ted M. et al.) 10 December 2013 (2013-12-10) See paragraphs [0022]-[0024]; and claims 1 and 3.	1-5
A	SIVO, Valeria et al. Co (II) coordination in prokaryotic zinc finger domains as revealed by UV-Vis spectroscopy. Bioinorganic Chemistry and Applications. 2017, vol. 2017, Article ID: 1527247, pp. 1-7. See entire document.	1-11
A	SENEQUE, Olivier et al. Coordination properties of zinc finger peptides revisited: ligand competition studies reveal higher affinities for zinc and cobalt. Journal of the American Chemical Society. 2010, vol. 132, pp. 17760-17774. See entire document.	1-11
A	KR 10-1694576 B1 (INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION, DANKOOK UNIVERSITY) 09 January 2017 (2017-01-09) See entire document.	1-11

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☑ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"D" document cited by the applicant in the international application
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
30 September 2022	**30 September 2022**

Name and mailing address of the ISA/KR	Authorized officer
Korean Intellectual Property Office **Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon 35208**	
Facsimile No. **+82-42-481-8578**	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2022/007499

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
   a. ☑ forming part of the international application as filed:
      ☑ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
      ☐ on paper or in the form of an image file.
   b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
   c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
      ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
      ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2022/007499

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
US 8603994 B2	10 December 2013	US 2012-0122958 A1	17 May 2012
		US 2014-0045921 A1	13 February 2014
		US 2014-0378536 A1	25 December 2014
		US 8921042 B2	30 December 2014
		US 9274128 B2	01 March 2016
		WO 2012-067970 A2	24 May 2012
		WO2012-067970javascriptA3 document.forms[0].task.value='10615226'; doSubmit('gototask_10615226')	06 December 2012
KR 10-1694576 B1	09 January 2017	KR 10-2014-0129853 A	07 November 2017
		WO 2014-178499 A1	06 November 2014

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2022/007499

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C07K 14/435(2006.01)i; **C12N 15/70**(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C07K 14/435(2006.01); A61K 48/00(2006.01); C12N 15/11(2006.01); H01M 8/16(2006.01)

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: PARIS 징크핑거 도메인(Parkin-interacting substrate zinc finger domain), 코발트 이온 흡착(cobalt ion adsorbing), 대장균(Escherichia coli)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	YOON, CHUNGWOON 등, 'Selective coordination of cobalt ions by zinc fingers in Escherichia coli', Bulletin of the Korean Chemical Society, 2021.09.21, 42권, 12호, 페이지 1-9 페이지 2-5, 7; 및 도면 1 참조.	1-11
X	US 8603994 B2 (DAWSON, TED M. 등) 2013.12.10 칼럼 22-24; 및 청구항 1, 3 참조.	1-5
A	SIVO, VALERIA 등, 'Co (II) coordination in prokaryotic zinc finger domains as revealed by UV-Vis spectroscopy', Bioinorganic Chemistry and Applications, 2017, 2017권, Article ID: 1527247, 페이지 1-7 전체 문헌 참조.	1-11
A	SENEQUE, OLIVIER 등, 'Coordination properties of zinc finger peptides revisited: ligand competition studies reveal higher affinities for zinc and cobalt', Journal of the American Chemical Society, 2010, 132권, 페이지 17760-17774 전체 문헌 참조.	1-11
A	KR 10-1694576 B1 (단국대학교 산학협력단) 2017.01.09 전체 문헌 참조.	1-11

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☑ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

"A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

"D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌

"E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

"L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

"O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

"T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

"X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

"Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일
2022년09월30일(30.09.2022)	**2022년09월30일(30.09.2022)**

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 **+82-42-481-8578**

심사관

허주형

전화번호 **+82-42-481-5373**

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2022/007499

제1기재란 핵산염기 및/또는 아미노산 서열(첫 번째 용지의 1.c의 계속)

1. 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열과 관련하여, 국제조사는 다음에 기초하여 수행되었습니다.

   a. ☑ 아래의 형태로 출원시 국제출원의 일부를 구성하는 서열목록
      - ☑ 부록 C/ST.25 텍스트 파일
      - ☐ 서면 혹은 이미지 파일

   b. ☐ PCT 규칙 13의3.1(a)에 따라 국제출원과 함께 국제조사만을 목적으로 부록 C/ST.25 텍스트 파일의 형태로 제출된 서열목록

   c. ☐ 국제조사만을 목적으로 국제출원일 이후에 아래 형태로 제출된 서열목록
      - ☐ 부록 C/ST.25 텍스트 파일 (규칙 13의3.1(a))
      - ☐ 서면 혹은 이미지 파일 (규칙 제13의3.1(b) 및 시행세칙 713).

2. ☐ 추가로 서열목록에 대하여 하나 이상의 버전이나 사본이 제출된 경우, 후속 버전 또는 추가된 사본에 기재되어 있는 정보가 출원시 출원의 일부를 구성하는 정보와 동일하거나 또는 출원시의 개시범위를 벗어나지 않는다는 진술서가 제출되었습니다.

3. 추가 의견:

국 제 조 사 보 고 서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2022/007499

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 8603994 B2	2013/12/10	US 2012-0122958 A1	2012/05/17
		US 2014-0045921 A1	2014/02/13
		US 2014-0378536 A1	2014/12/25
		US 8921042 B2	2014/12/30
		US 9274128 B2	2016/03/01
		WO 2012-067970 A2	2012/05/24
		WO 2012-067970 A3	2012/12/06
KR 10-1694576 B1	2017/01/09	KR 10-2014-0129853 A	2017/11/07
		WO 2014-178499 A1	2014/11/06