



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0117724
(43) 공개일자 2016년10월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12M 1/33 (2006.01) C01B 13/11 (2006.01)
C12M 1/42 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12M 1/33 (2013.01)
C01B 13/11 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0044601
(22) 출원일자 2015년03월30일
심사청구일자 2015년03월30일

(71) 출원인
이화여자대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
손아정
서울특별시 서대문구 대현동 65-53호
이은희
서울특별시 구로구 구일로2길 60 201동 703호 (구로동, 구일우성아파트)
채필리
서울특별시 용산구 새창로 70 113동 1103호 (도원동, 삼성래미안아파트)
(74) 대리인
손민

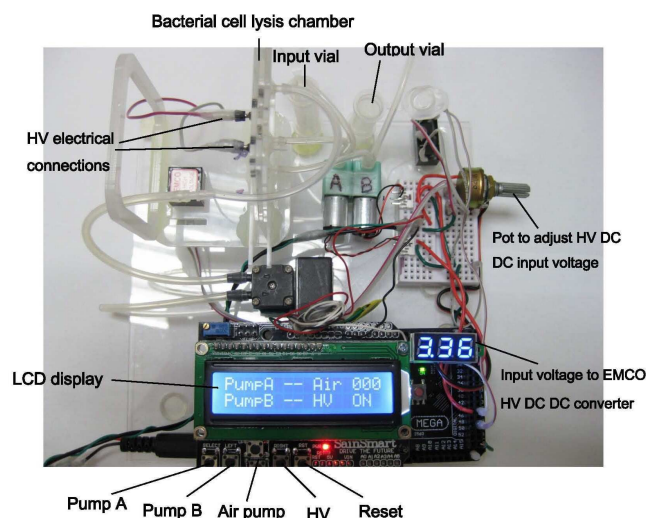
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 휴대용 세포파쇄장치

(57) 요약

본 발명은 세포파쇄부, 펌프부 및 동력제어부로 구성된 휴대용 세포파쇄장치, 상기 휴대용 세포파쇄장치를 사용하여 균체를 파쇄하는 방법 및 균체로부터 DNA를 획득하는 방법에 관한 것이다. 본 발명에서 제공하는 휴대용 세포파쇄장치를 사용하면 낮은 수준의 사용전압을 사용하여도 두터운 세포벽을 포함하는 그람 양성 세균과 같은 세균으로부터 DNA를 추출하고 이를 검사할 수 있으므로, 현장에서 보다 효과적으로 세균을 검출 및 분석하는데 활용될 수 있을 것이다.

대표도 - 도10a



(52) CPC특허분류

C12M 1/42 (2013.01)

C12N 15/1003 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

(a) 코로나 방전에 의하여 오존을 생성하는 음극(anode) 및 양극(cathod), 상기 음극과 양극사이에 공기를 공급하기 위한 공기 유입구(air inlet), 생성된 오존을 배출하기 위한 공기 배출구(air vent), 상기 양극과 음극에서 생성된 오존과 균체시료를 혼합하여 균체를 파쇄하는 세포파쇄 용기(Lysis chamber), 상기 세포파쇄 용기로 균체시료를 공급하기 위한 시료 유입구(sample inlet) 및 상기 세포파쇄 용기에서 파쇄된 균체를 배출하기 위한 시료 배출구(sample outlet)가 구비된 세포파쇄부(Bacterial cell lysis chamber);

(b) 상기 공기 유입구를 통하여 공기를 음극과 양극사이에 공급하는 공기펌프 및 상기 시료 유입구를 통하여 세포파쇄 용기에 균체시료를 공급하는 균체공급펌프가 구비된 펌프부; 및

(c) 상기 펌프부에 전원을 제공하는 전원공급장치 및 제어판넬이 구비된 동력제어부를 포함하는 휴대용 세포파쇄장치.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 양극은 핀 형상이고, 상기 음극은 편평한 판 형상인 것인 휴대용 세포파쇄장치.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 세포파쇄 용기는 계면활성제 공급구를 추가로 포함하는 것인 휴대용 세포파쇄장치.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 동력제어부는 컨버터를 추가로 포함하는 것인 휴대용 세포파쇄장치.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 제어판넬은 LCD 디스플레이를 추가로 포함하는 것인 휴대용 세포파쇄장치.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 시료 유입구와 연결된 용기 및 상기 시료 배출구와 연결된 용기를 추가로 포함하는 것인 휴대용 세포파쇄장치.

청구항 7

제1항에 있어서,

사용전압, 오존의 유속 및 오존 처리시간을 조절하여, 오존으로 균체를 파쇄하는 것인 휴대용 세포파쇄장치.

청구항 8

- (a) 제1항 내지 제7항 중 어느 한 항의 휴대용 세포파쇄장치의 음극과 양극에서 코로나 방전을 수행함으로써 오존을 생성시키는 단계;
- (b) 상기 휴대용 세포파쇄장치의 공기펌프를 사용하여 상기 생성된 오존을 세포파쇄 용기로 공급하는 단계;
- (c) 상기 휴대용 세포파쇄장치의 균체공급펌프를 사용하여 균체시료를 세포파쇄 용기로 공급하는 단계;
- (d) 상기 세포파쇄 용기에서 오존과 균체시료를 접촉시켜서, 균체시료에 포함된 균체를 파쇄하는 단계; 및
- (e) 파쇄된 균체를 포함하는 균체시료를 시료 배출구를 통해 휴대용 세포파쇄장치의 외부로 배출하는 단계를 포함하는, 균체의 파쇄방법.

청구항 9

제8항에 있어서,

- (a) 단계에서, 코로나 방전시 사용전압은 3.5 내지 5.0V인 것인 방법.

청구항 10

제8항에 있어서,

- (b) 단계에서, 오존의 공급시 유속은 120 내지 160ml/분인 것인 방법.

청구항 11

제8항에 있어서,

- (d) 단계에서, 오존과 균체시료의 접촉시 오존의 처리시간은 1 내지 10분인 것인 방법.

청구항 12

- (a) 제1항 내지 제7항 중 어느 한 항의 휴대용 세포파쇄장치의 음극과 양극에서 코로나 방전을 수행함으로써 오존을 생성시키는 단계;
- (b) 상기 휴대용 세포파쇄장치의 공기펌프를 사용하여 상기 생성된 오존을 세포파쇄 용기로 공급하는 단계;
- (c) 상기 휴대용 세포파쇄장치의 균체공급펌프를 사용하여 균체시료를 세포파쇄 용기로 공급하는 단계;
- (d) 상기 세포파쇄 용기에서 오존과 균체시료를 접촉시켜서, 균체시료에 포함된 균체를 파쇄하는 단계;
- (e) 파쇄된 균체를 포함하는 균체시료를 시료 배출구를 통해 휴대용 세포파쇄장치의 외부로 배출하는 단계; 및
- (f) 상기 배출된 파쇄된 균체를 포함하는 균체시료로부터 DNA를 수득하는 단계를 포함하는, 균체로부터 DNA를 수득하는 방법.

청구항 13

제12항에 있어서,

(f) 단계에서, 균체시료를 원심분리하여 DNA 분획을 수득하는 것인 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 휴대용 세포파쇄장치에 관한 것으로, 보다 구체적으로 본 발명은 세포파쇄부, 펌프부 및 동력제어부로 구성된 휴대용 세포파쇄장치, 상기 휴대용 세포파쇄장치를 사용하여 균체를 파쇄하는 방법 및 균체로부터 DNA를 수득하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 생물학적으로, 세포에 의하여 생성되는 대부분의 물질은 세포막 내부에 존재하며, 세포 내 물질의 이용 또는 분석을 위해서는 세포 파쇄 과정이 반드시 요구된다. 상기 세포 파쇄를 위한 다양한 방법들이 알려져 있는데, 이들은 대체로 물리적 방법, 화학적 방법 및 생물학적 방법으로 크게 나누어진다.

[0003] 먼저, 물리적 방법은, 후렌치 프레스(french press), 볼 밀(ball mill) 등과 같이, 압력 변화를 주거나 작은 구슬 등과 충돌시킴으로써 세포를 파쇄하는 방식 및 미생물 세포를 포함하는 용액 내에 초음파 발진기를 삽입하고 높은 주파수의 음파를 가함으로써 세포를 파쇄하는 방식 등을 의미하는데, 세포 파쇄를 위한 용액의 회수 및 이송을 위한 별도의 장비 및 공정을 필요로 하는 관계로, 초기 설비 비용이 많이 소요되고, 오염의 가능성이 높다는 단점이 있는 반면, 초기 설비장치를 사용하여 대량으로 세포를 파쇄할 수 있다는 장점이 있다.

[0004] 다음으로, 생물학적 방법은, 라이소자임(lysozyme)과 같은 효소를 이용하여 세포막을 용해시키는 방식을 의미하는데, 고가인 세포막 용해성 효소를 사용해야 하는 관계로, 처리 비용이 많이 소요되고, 효소 반응에 적합한 온도, pH 등의 조건을 제대로 유지해 주어야 하는 단점이 있는 반면, 생물학적 환경과 유사한 환경을 조성할 수 있어, 천연상태와 유사한 상태의 추출물을 수득할 수 있다는 장점이 있다.

[0005] 끝으로, 화학적 방법은, 미생물의 세포막에 계면활성제를 가함으로써 화학 반응에 의한 세포막 분해를 유도하는 방식을 의미하는데, 세포 배양액에 계면활성제를 단순히 첨가하는 방식이라 상기 물리적 방법에서와 같은 별도 공정이 불필요함은 물론, 상기 생물학적 방법에서와 같은 고가의 효소를 사용하지 않는 관계로, 다른 두 가지 방법에 비하여 전체적 처리 비용이 적게 소요되는 장점이 있으나, 계면활성제로 인하여 추출된 성분이 변성될 수 있어, 천연상태와 유사한 상태의 추출물을 수득하기는 어렵다는 단점이 있다.

[0006] 최근에 들어, 생물공학이 발전함에 따라, 다양한 미생물로부터 DNA, 단백질 등의 생체고분자를 추출하는 방법이 현저하게 발달되었는데, 이같은 생체고분자를 추출하기 위하여 기본적으로 수행되어야 하는 세포를 파쇄하는 방법은 크게 변화되지 않고, 주로 세포막 분해 활성이 우수한 효소 또는 계면활성제를 사용하는 방법이 개발되고 있다. 예를 들어, 한국공개특허 제1997-0070197호에는 스트렙토코커스 뮤탄스의 세포벽을 용해하는 용해효소가 개시되어 있고, 한국공개특허 제2006-0059130호에는 알파 올레핀 설포네이트와 라이소자임 성분을 포함하는 세포 파쇄용 용액 조성물이 개시되어 있다. 그러나, 이러한 방법은 세포를 파쇄할 수 있는 효소와 상기 효소의 반응이 수행될 수 있는 장비가 갖추어진 실험실 수준에서 수행될 수 있을 뿐, 미생물을 채취하는 현장에서는 사용할 수 없다는 단점이 있다. 예를 들어, 전염병과 같이 생물학적 오염이 유발된 지역에서, 오염의 원인균을 규명하기 위해서는, 상기 생물학적 오염이 유발된 지역에서 시료를 채취한 다음, 상기 시료를 실험실로 운반한 후에야 비로소 오염의 원인균을 분석할 수 있다. 만일, 오염현장에서 신속하게 오염원인균을 파쇄하여 DNA를 추출할 수 있다면, 상기 오염원인균을 보다 신속하게 규명하여 이에 대비할 수 있을 것으로 기대되고 있으나, 이처럼 현장에서 오염원인균으로부터 DNA를 추출하기 위하여 상기 오염원인균을 파쇄하는 방법은 지금까지 개발되지 않고 있는 실정이다.

[0007] 이러한 배경하에서, 본 발명자들은 현장에서 오염원인균으로부터 DNA를 용이하게 추출할 수 있도록, 현장에서 채취된 시료로부터 세균시료의 유전자를 신속하게 분석할 수 있는 방법을 개발하고자 예의 연구노력한 결과, 마이크로 코로나 방전에 의해 생성되는 오존을 이용하여 세균시료에 포함된 균체를 파쇄할 수 있는 휴대용 세포파쇄장치를 사용할 경우, 현장에서 채취된 시료에 포함된 세균시료를 파쇄하여 신속하게 유전자를 분리 및 분석할

수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 하나의 목적은 휴대용 세포파쇄장치를 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은 상기 휴대용 세포파쇄장치를 사용하여 균체를 파쇄하는 방법을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 다른 목적은 상기 휴대용 세포파쇄장치를 사용하여 균체로부터 DNA를 수득하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 본 발명자들은 현장에서 채취된 시료로부터 세균시료의 유전자를 신속하게 분석할 수 있는 방법을 개발하고자, 세균시료에 포함된 균체를 효과적으로 파쇄하는 방법을 개발하기 위하여 다양한 연구를 수행하던 중, 오존에 주목하게 되었다. 상기 오존을 사용할 경우, 특별한 물리적인 처리 또는 화학적 처리 없이도, 세균의 세포벽을 파쇄하여 세균으로부터 DNA를 추출하고 이를 검사시료로 사용할 수 있으므로, 상기 오존을 발생시킬 수 있는 마이크로 코로나 방전장치에 이에 공기를 공급할 수 있는 소형 공기펌프를 포함하는 세포파쇄장치를 제작하였다. 상기 제작된 세포파쇄장치를 사용하면, 상기 장치에 구비된 마이크로 코로나 방전장치에서 생성된 오존을 이용하여 그람 음성균의 일종인 *Pseudomonas putida* DMS 8368 균주를 파쇄할 수 있고, 균체시료에 포함된 50% 이상의 균주를 파쇄하여 세균으로부터 DNA를 추출하고 이를 검사하기 위하여는, 30초 이상의 오존처리시간, 38ml/분 이상의 오존유속 및 2000V 이상의 사용전압 조건이 필요함을 확인하였다.

[0012] 그러나, 2000V 이상의 사용전압을 공급할 수 있는 전원공급장치를 포함하는 장비는 휴대용으로 사용하기에 부적합하였으므로, 사용전압의 수준을 대폭적으로 저하시킬 수 있는 새로운 세포파쇄장치를 고안하고자 다양한 연구를 수행하던 중, 세균시료의 파쇄방식에 주목하게 되었다. 즉, 앞서 개발한 세포파쇄장치는 균체시료를 한꺼번에 파쇄하게 되므로, 이를 위하여 대량의 오존을 생성하기 위하여 높은 수준의 사용전압이 필요함을 인식하고, 상기 균체시료를 조금씩 파쇄할 경우에는 소량의 오존만으로 충분하므로, 상술한 바와 같이 대량의 오존을 생성하기 위한 높은 수준의 사용전압이 불필요할 것으로 가정하였다. 이에, 별도의 세포파쇄 용기(Lysis chamber)를 구비하고, 상기 용기에 마이크로 코로나 방전 장치로부터 생성된 오존과 균체시료를 각각 연속적으로 유입시켜서, 균체를 파쇄한 후에, 파쇄된 균체를 배출하는 방식으로 균체를 파쇄할 수 있는 휴대용 세포파쇄장치를 제작하였다. 상기 제작된 휴대용 세포파쇄장치를 사용하여 그람 양성균주의 일종인 *B. subtilis* 균주(ATCC 6051)를 파쇄하고, 이의 효율을 최적화 할 수 있는 조건을 확립한 결과, 균체시료에 포함된 50% 이상의 균주를 파쇄하여 세균으로부터 DNA를 추출하고 이를 검사하기 위하여는, 1분 이상의 오존처리시간, 120ml/분 이상의 오존유속 및 3.5V 이상의 사용전압 조건 만으로도 충분함을 확인하였다.

[0013] 따라서, 본 발명에서 제공하는 휴대용 세포파쇄장치는 전원공급장치를 최소화하여 낮은 수준의 사용전압을 사용하여도 충분히 세균으로부터 DNA를 추출하고 이를 검사하는데 사용될 수 있음을 알 수 있었다.

[0014] 상술한 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 하나의 양태로서 (a) 코로나 방전에 의하여 오존을 생성하는 음극(anode) 및 양극(cathode), 상기 음극과 양극사이에 공기를 공급하기 위한 공기 유입구(air inlet), 생성된 오존을 배출하기 위한 공기 배출구(air vent), 상기 양극과 음극에서 생성된 오존과 균체시료를 혼합하여 균체를 파쇄하는 세포파쇄 용기(Lysis chamber), 상기 세포파쇄 용기로 균체시료를 공급하기 위한 시료 유입구(sample inlet) 및 상기 세포파쇄 용기에서 파쇄된 균체를 배출하기 위한 시료 배출구(sample outlet)가 구비된 세포파쇄부(Bacterial cell lysis chamber); (b) 상기 공기 유입구를 통하여 공기를 음극과 양극사이에 공급하는 공기 펌프 및 상기 시료 유입구를 통하여 세포파쇄 용기에 균체시료를 공급하는 균체공급펌프가 구비된 펌프부; 및 (c) 상기 펌프부에 전원을 제공하는 전원공급장치 및 제어판넬이 구비된 동력제어부를 포함하는 휴대용 세포파쇄장치를 제공한다.

- [0015] 첫 제, 상기 세포파쇄부의 구성 및 역할을 구체적으로 설명하면 다음과 같다.
- [0016] 먼저, 상기 세포파쇄부는 코로나 방전을 수행하여 공기로부터 오존을 생성할 수 있는 음극과 양극을 포함하는데, 코로나 방전을 용이하게 수행할 수 있도록 양극은 핀 형상으로 구성되고, 음극은 편평한 판(플레이트) 형상으로 구성될 수 있다. 상기 코로나 방전을 수행할 수 있는 음극과 양극의 재질은 전도체의 특성을 갖는 모든 종류의 금속이 될 수 있는데, 일례로서, 구리, 금, 알루미늄, 스틸 등의 금속, 주기율표 그룹 IV에 해당하는 원소(실리콘, 탄소 등), 전도성이 있는 유리 및 고분자 등이 될 수 있고, 다른 예로서, 양극은 스테인레스 스틸 재질이 될 수 있고, 음극은 구리재질이 될 수 있다.
- [0017] 다음으로, 상기 세포파쇄부에 포함된 공기 유입구는 상기 음극과 양극사이에 공기를 지속적으로 제공하여 공기로부터 오존의 생성을 보조하는 역할을 수행할 수 있다.
- [0018] 또한, 상기 세포파쇄부에 포함된 공기 배출구는 균체시료와 접촉하여 균체를 파쇄한 잉여오존을 세포파쇄부의 외부로 배출하는 역할을 수행할 수 있다.
- [0019] 아울러, 상기 세포파쇄부에 포함된 세포파쇄 용기는 오존과 균체시료가 접촉하여, 오존 버블이 형성됨과 동시에 오존을 사용하여 균체시료에 포함된 균주를 파쇄하는 역할을 수행할 수 있다.
- [0020] 끝으로, 상기 세포파쇄부에 포함된 시료 유입구는 상기 세포파쇄 용기에 균체시료를 공급하는 역할을 수행할 수 있고, 시료 배출구는 세포파쇄 용기에서 오존에 의하여 파쇄된 균체를 세포파쇄부의 외부로 배출하는 역할을 수행할 수 있다.
- [0021] 둘 제, 상기 펌프부의 구성 및 역할을 구체적으로 설명하면 다음과 같다.
- [0022] 먼저, 상기 펌프부에 포함된 공기펌프는 상기 공기 유입구를 통하여 상기 음극과 양극사이에 형성된 코로나 방전영역에 공기를 제공하고, 상기 코로나 방전영역에서 공기로부터 생성된 오존을 세포파쇄 용기에 공급하며, 상기 세포파쇄 용기에서 균체시료를 파쇄하고 남은 잉여오존을 상기 공기 배출구를 통하여 세포파쇄부의 외부로 배출하는 역할을 수행할 수 있다.
- [0023] 다음으로, 상기 펌프부에 포함된 균체공급펌프는 시료공급펌프라고도 하는데, 상기 시료 유입구를 통하여 세포파쇄 용기에 균체시료를 공급하고, 상기 세포파쇄 용기에서 오존에 의하여 파쇄된 균체시료를 상기 시료 배출구를 통하여 세포파쇄부의 외부로 배출하기 위한 구동장치가 될 수 있다.
- [0024] 셋 제, 상기 동력제어부의 구성 및 역할을 구체적으로 설명하면 다음과 같다.
- [0025] 먼저, 상기 동력제어부에 포함된 전원공급장치는 상기 세포파쇄부에 포함된 음극과 양극에 전원을 공급하여, 코로나 방전을 유발시킬 수 있고, 상기 펌프부에 포함된 공기펌프와 균체공급펌프에 전원을 공급하여, 상기 펌프부가 그의 작용을 수행할 수 있게 할 뿐만 아니라, 상기 제어판넬에도 전원을 공급하여, 제어판넬이 그의 작용을 수행할 수 있게 한다. 필요에 따라서는 외부에서 공급된 전원을 각 펌프 및 제어판넬에서 요구하는 수준으로 전환시킬 수 있는 컨버터를 추가로 포함할 수 있다.
- [0026] 다음으로, 상기 동력부에 포함된 제어판넬은 상기 펌프에 공급하는 전원의 수준을 조절하여, 휴대용 세포파쇄장치의 작동 수준을 조절할 수 있다. 일례로서, 상기 제어판넬을 통하여 음극과 양극에 공급되는 사용전압의 수준을 조절하면, 코로나 방전의 수준을 조절하여 오존의 생성량을 조절할 수 있다. 다른 예로서, 상기 제어판넬을 통하여 공기펌프의 작동수준을 조절하면, 오존의 생성량, 오존의 유속 등을 조절할 수 있다. 또 다른 예로서, 상기 제어판넬을 통하여 균체공급펌프의 작동수준을 조절하면, 오존의 처리시간을 조절할 수 있다.
- [0027] 한편, 본 발명에서 제공하는 휴대용 세포파쇄장치는 상술한 세포파쇄부, 펌프부 및 동력부에 더하여 다양한 구성요소를 추가로 포함함으로써, 균체의 파쇄효율을 증진시킬 수 있다.
- [0028] 일례로서, 상기 휴대용 세포파쇄장치는 상기 세포파쇄 용기에 계면활성제 공급구를 추가로 포함할 수 있다. 즉, 다양한 세균에 대한 파쇄효과를 증진시킬 수 있다고 알려진 다양한 계면활성제를 세포파쇄 용기에 공급할

수 있는 계면활성제 공급구를 추가함으로써, 균체의 파쇄효율을 증진시킬 수 있다.

[0029] 다른 예로서, 상기 휴대용 세포파쇄장치는 상기 제어판넬에 LCD 디스플레이를 추가로 포함할 수 있다. 즉, 기본적으로는 세포파쇄부의 음극과 양극; 펌프부의 공기펌프와 균체공급펌프; 및 동력제어부의 제어판넬에 공급되는 전원의 수준을 조절하는 제어판넬에 상기 전원수준의 조절을 통해 최종적으로 얻어지는 다양한 수치(예를 들어, 사용전압, 오존의 생성량, 오존의 처리시간, 오존의 유속 등)를 표시하는 LCD 디스플레이를 추가함으로써, 보다 직관적으로 휴대용 세포파쇄장치의 작동을 조절할 수 있다.

[0030] 또 다른 예로서, 상기 휴대용 세포파쇄장치는 상기 시료 유입구와 연결된 용기(input vial) 및 상기 시료 배출구와 연결된 용기(output vial)를 추가로 포함할 수 있다. 즉, 상기 시료 유입구와 연결된 용기를 추가로 포함하여 균체시료를 보다 용이하게 파쇄할 수 있고, 상기 시료 배출구와 연결된 용기를 추가로 포함하여 파쇄된 균체시료를 용이하게 수집할 수 있다.

[0031] 본 발명의 일 실시예에 의하면, 본 발명자들은 핀 형상의 방전 양극과 플레이트의 형상의 음극을 포함하고, 코로나 방전에 의하여 오존을 생성할 수 있는 마이크로 코로나 방전장치를 제작하고(도 1), 상기 마이크로 코로나 방전장치와 소형 공기펌프가 구비된 세포파쇄장치를 제작하였다(도 2). 또한, 낮은 수준의 사용전압으로 균체를 파쇄할 수 있는 휴대용 세포파쇄장치를 제작하였다(도 10a 내지 10c).

[0032] 본 발명은 다른 양태로서, 상기 휴대용 세포파쇄장치를 사용하여 균체를 파쇄하는 방법을 제공한다. 구체적으로, 본 발명에서 제공하는 균체의 파쇄방법은 (a) 휴대용 세포파쇄장치의 음극과 양극에서 코로나 방전을 수행함으로써 오존을 생성시키는 단계; (b) 휴대용 세포파쇄장치의 공기펌프를 사용하여 상기 생성된 오존을 세포파쇄 용기로 공급하는 단계; (c) 휴대용 세포파쇄장치의 균체공급펌프를 사용하여 균체시료를 세포파쇄 용기로 공급하는 단계; (d) 상기 세포파쇄 용기에서 오존과 균체시료를 접촉시켜서, 균체시료에 포함된 균체를 파쇄하는 단계; 및 (e) 파쇄된 균체를 포함하는 균체시료를 시료 배출구를 통해 휴대용 세포파쇄장치의 외부로 배출하는 단계를 포함한다.

[0033] 이하에서는, 본 발명에서 제공하는 휴대용 세포파쇄장치를 사용하여 균체를 파쇄하는 방법을 각 단계별로 구체적으로 설명한다.

[0034] (a) 오존생성 단계

[0035] 휴대용 세포파쇄장치의 동력제어부에 포함된 전원공급장치와 제어판넬을 사용하여 세포파쇄부에 포함된 음극과 양극에 사용전압을 공급함으로써, 상기 음극과 양극에서 코로나 방전을 유도하고, 상기 유도된 코로나 방전영역에서 오존이 생성시켜서, 오존의 생성량을 조절할 수 있다. 이때, 사용전압은 코로나 방전에 의하여 오존을 생성시킬 수 있는 한 특별히 이에 제한되지 않으나, 일례로서 3.5 내지 5.0V가 될 수 있고, 다른 예로서, 3.5 내지 4.5V가 될 수 있으며, 또 다른 예로서 3.5V가 될 수 있다.

[0036] (b) 오존공급 단계

[0037] 상기 생성된 오존을 펌프부에 포함된 공기펌프를 이용하여 세포파쇄 용기로 공급한다. 상기 공기펌프를 이용하여 상기 코로나 방전영역에 외부로부터 공기를 공급함으로써, 오존의 유속을 조절할 수 있다. 이때, 오존의 유속은 오존을 이용하여 균체를 파쇄할 수 있는 한 특별히 이에 제한되지 않으나, 일례로서 120 내지 160ml/분이 될 수 있고, 다른 예로서 120 내지 140ml/분이 될 수 있으며, 또 다른 예로서, 120ml/분이 될 수 있다.

[0038] (c) 균체시료공급 단계

[0039] 휴대용 세포파쇄장치의 펌프부에 포함된 균체공급펌프를 이용하여 균체시료를 세포파쇄 용기로 공급한다. 상기 균체공급펌프를 이용하여 상기 세포파쇄 용기로 균체시료를 공급할 수 있다. 이때, 상기 공급되는 균체는 특별히 이에 제한되지 않으나, 일례로서 세균시료가 될 수 있고, 다른 예로서 그람음성 세균시료 또는 그람양성 세균시료가 될 수 있으며, 또 다른 예로서, *Pseudomonas* 속 세균 또는 *Bacillus* 속 세균이 될 수 있다.

[0040] (d) 균체파쇄 단계

[0041] 상기 단계에 의하여 세포파쇄 용기로 공급된 오존과 균체시료가 상기 세포파쇄 용기 내에서 혼합되어, 오존에 의하여 균체가 파쇄된다. 이때, 상기 균체에 오존을 처리하는 시간은 오존을 이용하여 균체를 파쇄할 수 있는 한 특별히 이에 제한되지 않으나, 일례로서 1 내지 10분이 될 수 있고, 다른 예로서 3 내지 5분이 될 수 있으며, 또 다른 예로서 3분이 될 수 있다.

[0042] (e) 파쇄된 균체배출 단계

[0043] 상기 세포파쇄 용기 내에서 오존에 의하여 파쇄된 균체는 상기 세포파쇄 용기에 구비된 시료 배출구를 통하여 외부로 배출되어 수집될 수 있고, 상기 세포파쇄 용기 내에서 균체를 파쇄한 후 남겨진 잉여오존은 상기 세포파쇄 용기에 구비된 공기 배출구를 통하여 외부로 배출된다. 상기 파쇄된 균체 시료의 수집을 용이하게 하기 위하여, 상기 시료 배출구는 상기 세포파쇄 용기의 하단에 구비될 수 있고, 상기 잉여오존의 배출을 용이하게 하기 위하여, 상기 공기 배출구는 상기 세포파쇄 용기의 상단에 구비될 수 있다.

[0044] 한편, 본 발명에서 제공하는 균체를 파쇄하는 방법에 있어서, 상기 (c) 단계와 (d) 단계를 통합하여 다른 방식으로 수행할 수도 있다. 구체적으로, 상기 세포파쇄 용기의 내에 균체를 채운 다음, 계속적으로 시료 유입구를 통하여 균체를 공급하고, 상기 세포파쇄 용기 내의 균체의 일부를 시료 배출구를 통하여 방출하면서, 상기 세포파쇄 용기에 오존을 공급하면, 상기 세포파쇄 용기내에서 균체를 연속적으로 파쇄할 수 있다. 이 같은 방법을 사용하면, 현장에서 수집한 시료를 농축등의 방법으로 부피를 조절하지 않고서도 다량의 시료에 포함된 균체를 비교적 신속하게 파쇄할 수 있다. 이때, 상기 균체의 공급속도에 따라, 오존의 처리시간이 결정될 수 있는데, 예를 들어, 균체시료의 공급속도를 증가시키면, 균체시료와 오존의 접촉시간이 감소되어 결과적으로는 오존의 처리시간이 감소하는 반면, 균체시료의 공급속도를 감소시키면, 균체시료와 오존의 접촉시간이 증가되어 결과적으로는 오존의 처리시간이 증가하게 되므로, 상기 균체 공급속도를 조절하여 오존의 처리시간을 조절할 수 있다.

[0045] 본 발명의 일 실시예에 의하면, 본 발명자들이 제작한 세포파쇄장치(도 2)를 사용하여 그람 음성균의 일종인 *Pseudomonas putida* DMS 8368 균주를 파쇄하고(도 4 및 도 5), 이의 세포파쇄물에 미치는 조건을 확립한 결과, 균체시료에 포함된 50% 이상의 균주를 파쇄하여 세균으로부터 DNA를 추출하고 이를 검사하기 위하여는, 30초 이상의 오존처리시간(도 6), 38ml/분 이상의 오존유속(도 7) 및 2000V 이상의 사용전압(도 8) 조건이 필요함을 확인하였다.

[0046] 또한, 본 발명자들이 제작한 휴대용 세포파쇄장치(도 10a 내지 10c)를 사용하여 그람 양성균주의 일종인 *B. subtilis* 균주(ATCC 6051)를 파쇄할 수 있는 최적화 조건을 확립한 결과, 1분 이상의 오존처리시간(도 11), 120ml/분 이상의 오존유속(도 12) 및 3.5V 이상의 사용전압(도 13) 조건 만으로도 충분함을 확인하였다.

[0047] 따라서, 본 발명에서 제공하는 휴대용 세포파쇄장치는 전원공급장치를 최소화하여 낮은 수준의 사용전압을 사용하여도 충분히 세균으로부터 DNA를 추출하고 이를 검사하는데 사용될 수 있음을 알 수 있었다.

[0048] 본 발명은 또 다른 양태로서, 상기 휴대용 세포파쇄장치를 사용하여 균체로부터 DNA를 수득하는 방법을 제공한다. 구체적으로, 본 발명에서 제공하는 균체로부터 DNA를 수득하는 방법은 (a) 휴대용 세포파쇄장치의 음극과 양극에서 코로나 방전을 수행함으로써 오존을 생성시키는 단계; (b) 휴대용 세포파쇄장치의 공기펌프를 사용하여 상기 생성된 오존을 세포파쇄 용기로 공급하는 단계; (c) 휴대용 세포파쇄장치의 균체공급펌프를 사용하여 균체시료를 세포파쇄 용기로 공급하는 단계; (d) 상기 세포파쇄 용기에서 오존과 균체시료를 접촉시켜서, 균체시료에 포함된 균체를 파쇄하는 단계; (e) 파쇄된 균체를 포함하는 균체시료를 시료 배출구를 통해 휴대용 세포파쇄장치의 외부로 배출하는 단계; 및 (f) 상기 배출된 파쇄된 균체를 포함하는 균체시료로부터 DNA를 수득하는 단계를 포함한다. 이때, 상기 (a) 내지 (e) 단계는 상술한 바와 동일하다.

[0049] 상기 (f) 단계에 있어서, 균체시료로부터 DNA를 수득하는 방법은 특별히 이에 제한되지 않으나, 일례로서 균체시료를 원심분리하여 DNA를 포함하는 상층액을 수득하는 방법을 사용할 수 있는데, 이때 원심분리 조건은 균체시료로부터 DNA 분획을 분리할 수 있는 한 특별히 제한되지 않고, 본 발명의 범주에서 당업자에게 공개된 모든 조건을 사용할 수 있다.

[0050] 또한, 상기 수득한 DNA를 포함하는 분획으로부터 DNA를 순수분리하는 단계를 추가로 포함할 수 있는데, 이때 사용되는 방법 역시 특별히 제한되지 않고, 본 발명의 범주에서 당업자에게 공개된 모든 방법을 사용할 수 있다.

발명의 효과

[0051] 본 발명에서 제공하는 휴대용 세포파쇄장치를 사용하면 낮은 수준의 사용전압을 사용하여도 두터운 세포벽을 포함하는 그람 양성 세균과 같은 세균으로부터 DNA를 추출하고 이를 검사할 수 있으므로, 현장에서 보다 효과적으로 세균을 검출 및 분석하는데 활용될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

[0052] 도 1은 마이크로 코로나 방전장치의 구성을 나타내는 사진이다.

도 2는 마이크로 코로나 방전장치에 소형 공기펌프 및 시료튜브가 연결된 세포파쇄장치의 구성을 나타내는 개략도이다.

도 3은 *Pseudomonas putida* DMS 8368 균주의 농도대비 이로부터 얻어진 DNA의 농도를 나타내는 표준곡선이다.

도 4는 오존의 처리에 따른 *Pseudomonas putida* DMS 8368 균주의 외형을 분석한 전자현미경사진으로서, (a)는 아무것도 처리하지 않은 균주를 나타내고, (b)는 공기를 처리한 균주를 나타내며, (c)는 오존을 처리한 균주를 나타내고, 화살표는 상기 균주의 세포벽이 손상된 부분을 나타낸다.

도 5는 아무것도 처리하지 않은 *Pseudomonas putida* DMS 8368 균주 배양물, 공기를 처리한 *Pseudomonas putida* DMS 8368 균주 배양물 및 오존을 처리한 *Pseudomonas putida* DMS 8368 균주 배양물로부터 산출한 정규화된 파쇄율(Normalized % lysis)을 비교한 그래프이다. 도 6은 본 발명에서 제공하는 세포파쇄장치를 사용하여 *Pseudomonas putida* DMS 8368 균주를 파쇄함에 있어서, 오존의 처리시간에 따른 정규화된 파쇄율의 변화를 비교한 그래프이다.

도 7은 본 발명에서 제공하는 세포파쇄장치를 사용하여 *Pseudomonas putida* DMS 8368 균주를 파쇄함에 있어서, 오존의 유속에 따른 정규화된 파쇄율의 변화를 비교한 그래프로서 (a)는 각 유속별로 측정된 정규화된 파쇄율을 나타내고, (b)는 상기 유속별로 측정된 정규화된 파쇄율을 통계적으로 분석하여 산출된 표준곡선($y = 2.12x - 27.6$, $R_2 = 0.97$)을 나타낸다.

도 8은 본 발명에서 제공하는 세포파쇄장치를 사용하여 *Pseudomonas putida* DMS 8368 균주를 파쇄함에 있어서, 사용전압에 따른 정규화된 파쇄율의 변화를 비교한 그래프로서 (a)는 각 사용전압별로 측정된 정규화된 파쇄율을 나타내고, (b)는 상기 사용전압별로 측정된 정규화된 파쇄율을 통계적으로 분석하여 산출된 표준곡선($y =$

0.11 χ - 178.8, $R_2 = 0.96$)을 나타낸다.

도 9는 본 발명에서 제공하는 세포파쇄장치를 사용하여 *Pseudomonas putida* DMS 8368 균주를 파쇄함에 있어서, 오존을 지속적으로 처리하거나 또는 간헐적으로 처리함에 따른 정규화된 파쇄율의 변화를 비교한 그래프이다.

도 10a는 휴대용 세포파쇄장치의 구성을 나타내는 사진이다.

도 10b는 휴대용 세포파쇄장치에 포함된 핵심구성요소인 세포파쇄부의 구성을 나타내는 확대사진이다.

도 10c는 상기 세포파쇄부에 공기 공급관, 오존 배출관, 시료 주입관 및 시료 배출관이 구비된 상태를 보여주는 사진이다.

도 11은 본 발명에서 제공하는 휴대용 세포파쇄장치를 사용하여 *B. subtilis* 균주(ATCC 6051)를 파쇄함에 있어서, 오존의 처리시간에 따른 정규화된 파쇄율의 변화를 비교한 그래프이다.

도 12는 본 발명에서 제공하는 휴대용 세포파쇄장치를 사용하여 *B. subtilis* 균주(ATCC 6051)를 파쇄함에 있어서, 오존의 유속에 따른 정규화된 파쇄율의 변화를 비교한 그래프이다.

도 13은 본 발명에서 제공하는 휴대용 세포파쇄장치를 사용하여 *B. subtilis* 균주(ATCC 6051)를 파쇄함에 있어서, 사용전압에 따른 정규화된 파쇄율의 변화를 비교한 그래프이다.

도 14는 본 발명에서 제공하는 휴대용 세포파쇄장치를 사용하여 *B. subtilis* 균주(ATCC 6051)를 파쇄함에 있어서, 균체시료의 pH 변화에 따른 정규화된 파쇄율의 변화를 비교한 그래프이다.

도 15는 본 발명에서 제공하는 휴대용 세포파쇄장치를 사용하여 *B. subtilis* 균주(ATCC 6051)를 파쇄함에 있어서, 균체시료의 이온강도 변화에 따른 정규화된 파쇄율의 변화를 비교한 그래프이다.

도 16은 본 발명에서 제공하는 휴대용 세포파쇄장치를 사용하여 *B. subtilis* 균주(ATCC 6051)를 파쇄함에 있어서, 균체시료에 처리된 계면활성제인 SDS의 농도 변화에 따른 정규화된 파쇄율의 변화를 비교한 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0053] 이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0054] 실시예 1: 마이크로 코로나 방전장치를 포함하는 세포파쇄장치의 제작

[0055] 핀 형상의 방전 양극과 플레이트의 형상의 음극을 포함하는 마이크로 코로나 방전장치를 제작하였다. 이때, 상기 방전 양극으로는 50 μ m 직경의 스테인레스 스틸제 철사를 사용하고, 음극으로는 50 μ m 두께의 구리포일을 사용하였으며, 상기 방전 양극과 음극을 유리 채널에 구비시킨 후, 에폭시 수지를 사용하여 밀봉하였다. 이어, 상기 채널의 양끝에 알루미늄 튜브를 연결하고, 상기 알루미늄 튜브는 공기튜브(HelixMark 60-825-37, ID = 1.5 mm, OD = 2.5 mm)와 연결시켰다(도 1). 아울러, 상기 마이크로 코로나 방전장치의 사양은 표 1에 기재하였다.

[0056] 도 1은 마이크로 코로나 방전장치의 구성을 나타내는 사진이다.

표 1

[0057]

마이크로 코로나 방전 장치의 사양

구성요소	사양
방전 양극과 음극사이의 거리	1 mm
채널 너비	3 mm
채널 높이	2 mm
음극 너비	5 mm
음극 높이	2 mm
철사의 직경	50 μ m
음극에 사용된 구리포일의 두께	50 μ m
효과적인 채널 길이	7.8 mm
전체 크기	25 mm $\times$ 20 mm $\times$ 5 mm

[0058]

가변성 고전압 전원공급장치(Stanford Research Systems Model PS350)를 사용하여, 상기 제작된 마이크로 코로나 방전장치의 방전 양극과 음극사이에 고전압을 가하여 코로나 방전을 형성하고, 이로부터 오존을 생성하였다. 이때, 사용된 전압은 1900V 내지 2200V이고, 생성된 오존의 농도는 0.14 ppm 이었다.

[0059]

상기 생성된 오존을 이용하여 세균시료를 파쇄하기 위하여, 상기 제작된 마이크로 코로나 방전장치에 구비된 공기튜브의 한쪽 말단에 소형 공기펌프(KNF NF5 RTDCB-4)를 연결하고, 다른 쪽 말단은 세균시료가 담겨진 튜브에 설치하였다(도 2). 이때, 상기 소형 공기펌프는 별도의 전원공급장치(Mastech HY1803D)를 사용하여 구동시켰다.

[0060]

도 2는 마이크로 코로나 방전장치에 소형 공기펌프 및 시료튜브가 연결된 세포파쇄장치의 구성을 나타내는 개략도이다.

[0061]

실시예 2: 세포파쇄장치를 이용한 세균의 파쇄

[0062]

그램 음성균의 일종인 *Pseudomonas putida* DMS 8368 균주를 대상으로 초음파 처리에 의하여 분쇄한 다음, 이로부터 균체량과 DNA 양의 상관관계를 나타내는 표준곡선을 작성하고, 상기 작성된 표준곡선을 이용하여 상기 실시예 1에서 제작된 세포파쇄장치의 세균파쇄 효율을 측정하였다.

[0063]

실시예 2-1: 세균의 균체량과 DNA 양의 표준곡선 작성

[0064]

먼저, 상기 *Pseudomonas putida* DMS 8368 균주를 100mL TSB(tryptic soy broth) 배지에 접종하고, 160 rpm 및 실온의 조건에서 진탕배양하였다.

[0065]

다음으로, 대조군으로서 초음파 처리를 수행하여 상기 균주를 파쇄하였다. 구체적으로, 상기 진탕배양된 세균시료를 얼음환경에서 냉각시킨 상태에서, 초음파 처리장치(XL-2000 ultrasonic dismembrator with a P-3 microprobe)에 적용하고, 10 W로 1분 동안 초음파 처리하여 상기 세균시료를 파쇄하고, 파쇄된 세균중량 대비 파쇄후 세균중량의 비율을 상기 세균 파쇄효율로 간주하였다. 이때, 세균중량으로는 세균의 건조중량을 사용하였는데, 상기 건조중량은 초음파 처리전 또는 처리후 세균시료를 80℃에서 하룻밤 동안 건조한 다음, 이를 측정하여 수득하였다.

[0066]

[0067]

아울러, 상기 균주의 농도와 상기 균주를 파쇄하여 수득한 DNA의 농도간의 상관관계를 규명하기 위하여, 각각 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 1.0, 또는 2.0g/L의 농도의 상기 균주를 초음파 처리에 의하여 파쇄하고 이로부터 얻어진 DNA의 농도를 측정하였다(도 3). 이때, 대조군으로는 파쇄되지 않은 균주로부터 측정된 DNA 농도를 사용하고, DNA 농도는 균주 파쇄물의 상층액을 분광광도계(NanoDrop™ 1000 spectrophotometer)에 적용하여 측정하였다.

[0068] 도 3은 *Pseudomonas putida* DMS 8368 균주의 농도대비 이로부터 얻어진 DNA의 농도를 나타내는 표준곡선이다. 도 3에서 보듯이, *Pseudomonas putida* DMS 8368 균주의 농도와 이로부터 얻어진 DNA의 농도는 비례함을 확인하였다.

[0069] **실시예 2-2: 세포파쇄장치를 이용한 세균의 파쇄**

[0070] 상기 실시예 1에서 제작된 세포파쇄장치를 사용하여 상기 균주를 파쇄하였다. 즉, 상기 세포파쇄장치에 사용전압은 18 μ A 및 2000 V로 설정하고, 공기의 유속은 38ml/분으로 설정하여 오존을 생성시킨 다음, 상기 오존을 *Pseudomonas putida* DMS 8368 균주 배양물에 가하여 상기 균주를 파쇄하고, 이를 전자현미경의 일종인 전계방사형 주사전자현미경(FE-SEM, JEOL-6701F, JEOL Ltd., Tokyo, Japan)으로 관찰하여 균주의 형태변화를 분석하였다(도 4). 이때, 대조군으로는 아무것도 처리하지 않은 균주 배양물을 사용하고, 비교군으로는 오존이 아닌 일반공기를 동일한 유속으로 *Pseudomonas putida* DMS 8368 균주 배양물에 가한 것을 사용하였다.

[0071] 도 4는 오존의 처리에 따른 *Pseudomonas putida* DMS 8368 균주의 외형을 분석한 전자현미경사진으로서, (a)는 아무것도 처리하지 않은 균주를 나타내고, (b)는 공기를 처리한 균주를 나타내며, (c)는 오존을 처리한 균주를 나타내고, 화살표는 상기 균주의 세포벽이 손상된 부분을 나타낸다. 도 4에서 보듯이, 본 발명에서 제공하는 세포파쇄장치를 사용하여 *Pseudomonas putida* DMS 8368 균주에 오존을 처리하면 상기 균주의 세포벽이 손상되었으나, 동일한 장치를 사용하여도 오존이 아닌 공기를 사용하면, 상기 균주를 손상시킬 수 없음을 확인하였다.

[0072] 그런 다음, 파쇄가 종료된 후, 상기 균주의 파쇄물을 원심분리(10,000 rpm 및 1분) 하여 상층액을 수득한 다음, 이로부터 DNA 농도를 측정하고, 이를 상기 표준곡선 및 하기 식에 적용하여, 정규화된 파쇄율(Normalized % lysis)을 산출하고, 이를 비교하였다(도 5).

[0073] 정규화된 파쇄율(Normalized % lysis) = $\frac{\{\text{오존처리 파쇄물의 DNA 농도}(\text{ng}/\mu\text{l})\}}{\{\text{조음과 처리 파쇄물의 DNA 농도}(\text{ng}/\mu\text{l})\}} \times 100$

[0074] 도 5는 아무것도 처리하지 않은 *Pseudomonas putida* DMS 8368 균주 배양물, 공기를 처리한 *Pseudomonas putida* DMS 8368 균주 배양물 및 오존을 처리한 *Pseudomonas putida* DMS 8368 균주 배양물로부터 산출한 정규화된 파쇄율(Normalized % lysis)을 비교한 그래프이다. 도 5에서 보듯이, 오존을 처리한 경우에 거의 모든 균주가 파쇄됨을 확인하였다.

[0075] **실시예 3: 세균 파쇄조건의 확립**

[0076] 상기 실시예 2의 결과로부터 본 발명에서 제공하는 세포파쇄장치를 사용하여 *Pseudomonas putida* DMS 8368 균주에 오존을 처리한 경우에 거의 모든 균주가 파쇄됨을 확인하였으므로, 상기 균주의 최대 파쇄효율을 나타낼 수 있는 오존처리시간, 유속, 사용전압 및 처리조건을 확립하고자 하였다.

[0077] **실시예 3-1: 오존의 처리시간**

[0078] 500 μ l의 *Pseudomonas putida* 배양물에 2000V의 사용전압으로 생성된 오존을 38ml/분의 유속으로 30초 내지 25분동안 처리하는 것을 제외하고는, 상기 실시예 2의 방법을 사용하여, *Pseudomonas putida* DMS 8368 균주를 파쇄하고 이로부터 산출된 정규화된 파쇄율을 비교하였다(도 6).

[0079] 도 6은 본 발명에서 제공하는 세포파쇄장치를 사용하여 *Pseudomonas putida* DMS 8368 균주를 파쇄함에 있어서,

오존의 처리시간에 따른 정규화된 파쇄율의 변화를 비교한 그래프이다. 도 6에서 보듯이, 전체적으로 오존의 처리시간이 증가할 수록 정규화된 파쇄율이 증가하는데, 30초의 처리만으로도 $52.2 \pm 1.6\%$ 의 파쇄율을 나타내고, 10분의 처리시에는 $98.5 \pm 0.2\%$ 의 파쇄율을 나타내며, 이로부터 15분 동안 추가로 처리시에는 $103.2 \pm 1.0\%$ 의 파쇄율을 나타냄을 확인하였다.

[0080] 대체로, 시료의 50% 이상의 균주를 파쇄할 경우, 이로부터 DNA를 추출할 수 있으므로, 세균으로부터 DNA를 추출하고 이를 검사하기 위하여는, 본 발명에서 제공하는 세포파쇄장치를 사용하여 30초동안 오존을 처리하는 것만으로도 충분함을 알 수 있었다.

[0081] **실시예 3-2: 오존의 유속**

[0082] $500\mu\text{l}$ 의 *Pseudomonas putida* 배양물에 2000V의 사용전압으로 생성된 오존을 24 내지 60ml/분의 유속으로 3분동안 처리하는 것을 제외하고는, 상기 실시예 2의 방법을 사용하여, *Pseudomonas putida* DMS 8368 균주를 파쇄하고 이로부터 산출된 정규화된 파쇄율을 비교하였다(도 7).

[0083] 도 7은 본 발명에서 제공하는 세포파쇄장치를 사용하여 *Pseudomonas putida* DMS 8368 균주를 파쇄함에 있어서, 오존의 유속에 따른 정규화된 파쇄율의 변화를 비교한 그래프로써 (a)는 각 유속별로 측정된 정규화된 파쇄율을 나타내고, (b)는 상기 유속별로 측정된 정규화된 파쇄율을 통계적으로 분석하여 산출된 표준곡선($y = 2.12x - 27.6$, $R_2 = 0.97$)을 나타낸다. 도 7에서 보듯이, 전체적으로 오존의 유속이 증가할 수록 정규화된 파쇄율이 증가하는데, 오존의 유속이 24ml/분에서 60ml/분으로 증가할 경우, 정규화된 세포파쇄율은 $27.0 \pm 2.2\%$ 에서 $109.3 \pm 0.6\%$ 로 증가함을 확인하였다.

[0084] 또한, 38ml/분의 유속으로 오존을 공급할 경우, 50% 이상의 균주를 파쇄할 수 있으므로, 세균으로부터 DNA를 추출하고 이를 검사하기 위하여는, 본 발명에서 제공하는 세포파쇄장치를 사용하여 38ml/분 이상의 유속으로 오존을 처리하는 것만으로도 충분함을 알 수 있었다.

[0085] **실시예 3-3: 사용전압**

[0086] $500\mu\text{l}$ 의 *Pseudomonas putida* 배양물에 1900 내지 2200V의 사용전압으로 생성된 오존을 38ml/분의 유속으로 3분동안 처리하는 것을 제외하고는, 상기 실시예 2의 방법을 사용하여, *Pseudomonas putida* DMS 8368 균주를 파쇄하고 이로부터 산출된 정규화된 파쇄율을 비교하였다(도 8).

[0087] 도 8은 본 발명에서 제공하는 세포파쇄장치를 사용하여 *Pseudomonas putida* DMS 8368 균주를 파쇄함에 있어서, 사용전압에 따른 정규화된 파쇄율의 변화를 비교한 그래프로써 (a)는 각 사용전압별로 측정된 정규화된 파쇄율을 나타내고, (b)는 상기 사용전압별로 측정된 정규화된 파쇄율을 통계적으로 분석하여 산출된 표준곡선($y = 0.11x - 178.8$, $R_2 = 0.96$)을 나타낸다. 도 8에서 보듯이, 전체적으로 사용전압이 증가할 수록 정규화된 파쇄율이 증가하는데, 사용전압이 1900 V에서 2200 V로 증가할 경우, 정규화된 세포파쇄율은 $39.2 \pm 3.4\%$ 에서 $72.6 \pm 3.4\%$ 로 증가함을 확인하였다.

[0088] 또한, 2000V의 사용전압으로 오존을 공급할 경우, 50% 이상의 균주를 파쇄할 수 있으므로, 세균으로부터 DNA를 추출하고 이를 검사하기 위하여는, 본 발명에서 제공하는 세포파쇄장치를 사용하여 2000V 이상의 사용전압으로 오존을 처리하는 것만으로도 충분함을 알 수 있었다.

[0089] **실시예 3-4: 오존의 처리방법**

[0090] 오존의 처리방식에 따라 파쇄율의 변화되는지를 확인하기 위하여, $500\mu\text{l}$ 의 *Pseudomonas putida* 배양물에 1900 내지 2200V의 사용전압으로 생성된 오존을 38ml/분의 유속으로 3분 동안 지속적으로 처리하거나, 30초의 간격으로 총 3분동안 간헐적으로 처리하거나 또는 1분 간격으로 총 3분 동안 간헐적으로 처리하는 것을 제외하고는,

상기 실시예 2의 방법을 사용하여, *Pseudomonas putida* DMS 8368 균주를 파쇄하고 이로부터 산출된 정규화된 파쇄율을 비교하였다(도 9).

[0091] 도 9는 본 발명에서 제공하는 세포파쇄장치를 사용하여 *Pseudomonas putida* DMS 8368 균주를 파쇄함에 있어서, 오존을 지속적으로 처리하거나 또는 간헐적으로 처리함에 따른 정규화된 파쇄율의 변화를 비교한 그래프이다. 도 9에서 보듯이, 오존을 지속적으로 처리하거나 또는 간헐적으로 처리하여도 전체적인 파쇄율은 변화되지 않음을 확인하였다.

[0092] 따라서, 오존의 처리시간이 파쇄율에 영향을 미치지만, 총 처리시간이 동일하다면, 이를 지속적으로 처리하거나 또는 간헐적으로 처리하여도 동일한 결과를 나타냄을 알 수 있었다.

[0093] 상기 실시예 3-1 내지 3-4의 결과를 종합하면, 본 발명에서 제공하는 세포파쇄장치를 사용하면, 30초 이상의 오존처리시간, 38ml/분 이상의 오존유속 및 2000V 이상의 사용전압 조건 만으로도, 세균으로부터 DNA를 추출하고 이를 검사할 수 있음을 확인하였다.

[0094] 실시예 4: 휴대용 세포파쇄장치의 제작

[0095] 상기 실시예 1 내지 3의 결과를 통해, 마이크로 코로나 방전장치와 소형 공기펌프를 포함하는 세포파쇄장치를 제작하고, 이를 사용하여 세균을 파쇄하여 DNA를 수득할 수 있음을 확인하였는 바, 상기 세포파쇄장치의 구성을 포함하면서도 최적화시켜서, 휴대용 세포파쇄장치를 제작하고자 하였다.

[0096] 상기 실시예 1에서 제작된 세포파쇄장치는 마이크로 코로나 방전장치를 사용하여 생성시킨 오존을 공기펌프를 이용하여 균체시료가 담겨진 용기에서 균체를 한꺼번에 파쇄하도록 구성하였으나, 이처럼 균체를 한꺼번에 파쇄하기 위하여는 대량의 오존이 균체시료에 투입되어야 하고, 이같은 대량의 오존을 생성하기 위하여는 1900V 이상의 고전압이 사용되어야 하는데, 이처럼 1900V 이상의 고전압을 사용하기 위하여는 비교적 대형의 전원공급장치가 필요하므로, 이들 장치를 소형화시켜서 휴대용으로 제작하기가 어렵다는 단점이 있었다.

[0097] 이러한 단점을 극복하기 위하여, 균체시료를 한꺼번에 파쇄하지 않고, 소량으로 나누어 파쇄하면, 균체의 파쇄에 소요되는 오존의 사용량을 감소시킬 수 있고, 이로 인하여 사용전압을 저하시켜서 전원공급장치를 소형화시켜서, 결과적으로는 휴대용 세포파쇄장치를 제작할 수 있을 것으로 예상하였다.

[0098] 이를 위하여, 별도의 세포파쇄 용기(Lysis chamber)를 구비하고, 상기 용기에 마이크로 코로나 방전 장치로부터 생성된 오존과 균체시료를 각각 연속적으로 유입시켜서, 균체를 파쇄한 후에, 파쇄된 균체를 배출하는 방식으로 균체를 파쇄할 수 있는 휴대용 세포파쇄장치를 제작하였다(도 10a 내지 10c).

[0099] 도 10a는 휴대용 세포파쇄장치의 구성을 나타내는 사진이다. 도 10a에서 보듯이, 상기 휴대용 세포파쇄장치는 세포파쇄부(Bacterial cell lysis chamber)를 중심으로, 균체를 공급하는 input vial, 파쇄된 균체를 수집하는 output vial, 상기 세포파쇄부에 포함된 코로나 방전장치에 전원을 공급하기 위한 HV electrical connection, 휴대용 세포파쇄장치에 전체 전력을 공급하기 위한 포트(pot), 공급된 전력을 전환시키는 컨버터 및 제어판을 포함하도록 구성하였다.

[0100] 도 10b는 휴대용 세포파쇄장치에 포함된 핵심구성요소인 세포파쇄부의 구성을 나타내는 확대사진이다. 도 10b에서 보듯이, 상기 세포파쇄부는 코로나 방전을 유발시키는 음극(anode) 및 양극(cathode), 상기 음극과 양극 사이에 공기를 공급하기 위한 공기 유입구(air inlet), 생성된 오존을 배출하기 위한 공기 배출구(air vent), 상기 양극과 음극에서 생성된 오존과 균체시료를 혼합하여 균체를 파쇄하는 세포파쇄 용기(Lysis chamber), 상기 세포파쇄 용기로 균체시료를 공급하기 위한 시료 유입구(sample inlet) 및 상기 세포파쇄 용기에서 파쇄된 균체를 배출하기 위한 시료 배출구(sample outlet)를 포함하도록 구성하였다.

[0101] 도 10c는 상기 세포파쇄부에 공기 공급관, 오존 배출관, 시료 주입관 및 시료 배출관이 구비된 상태를 보여주는 사진이다. 도 10c에서 보듯이, 코로나 방전은 상기 세포파쇄부에 포함된 음극과 양극 사이에서 형성되고, 이로

부터 생성된 오존은 시료 주입관이 연결된 시료 주입구부분에서 균체시료와 접촉하여 버블을 형성하면서 균체를 파쇄함을 확인하였다.

[0102] **실시예 5: 휴대용 세포파쇄장치를 이용한 세균 파쇄조건의 확립**

[0103] 상기 실시예 3에서와 유사하게, 상기 실시예 4에서 제작한 휴대용 파쇄장치를 사용하여 균체를 파쇄함에 있어서, 최대 파쇄효율을 나타낼 수 있는 다양한 조건을 확립하고자 하였다.

[0104] **실시예 5-1: 균체의 배양**

[0105] 그람 양성 세균의 일종인 *B. subtilis* 균주(ATCC 6051)를 50 ml Luria-Bertani 배지에 접종하고, 150 rpm으로 진탕하면서 26℃에서 배양하였다. 배양된 균체의 농도는 분광광도계를 사용하여 600 nm에서 흡광도를 측정하여 확인하였다.

[0106] 한편, 실시예 2와 유사하게 상기 배양된 *B. subtilis* 균주(ATCC 6051)에 초음파를 처리하고 파쇄한 다음, 이로부터 수득한 DNA의 농도를 측정하여 표준곡선을 작성하고, 이에 근거하여 실시예 4에서 제작한 휴대용 파쇄장치를 사용하여 파쇄된 균체의 정규화된 파쇄율(Normalized % lysis)을 하기식을 사용하여 산출하였다.

[0107] 정규화된 파쇄율(Normalized % lysis) = $\frac{[\{\text{오존처리 파쇄물의 DNA 농도}(\text{ng}/\mu\text{l})\}]}{[\{\text{초음파 처리 파쇄물의 DNA 농도}(\text{ng}/\mu\text{l})\}]} \times 100$

[0108] **실시예 5-2: 오존의 처리시간**

[0109] 200 μl 의 *B. subtilis* 균주(ATCC 6051) 배양물을 130ml/분의 유속으로 세포파쇄 용기(Lysis chamber)에 공급하면서, 이에 4V의 사용전압으로 생성된 오존을 130ml/분의 유속으로 30초 내지 10분동안 처리하여, 상기 공급된 배양물에 포함된 균체를 파쇄하고, 이로부터 얻어진 파쇄물을 원심분리(10,000 rpm 및 1분)하여, 상층액을 수득하였으며, 이로부터 산출된 정규화된 파쇄율을 비교하였다(도 11). 이때 대조군으로는 상기 균주에 공기를 처리하여 산출한 정규화된 파쇄율을 사용하였고, 배양물의 pH는 7.2로 설정하였으며, 이온강도는 0.244M로 설정하였다.

[0110] 도 11은 본 발명에서 제공하는 휴대용 세포파쇄장치를 사용하여 *B. subtilis* 균주(ATCC 6051)를 파쇄함에 있어서, 오존의 처리시간에 따른 정규화된 파쇄율의 변화를 비교한 그래프이다. 도 11에서 보듯이, 전체적으로 오존의 처리시간이 증가할 수록 정규화된 파쇄율이 증가하는데, 1분의 처리만으로도 51.3 $\pm$ 7.3%의 파쇄율을 나타내고, 5분의 처리시에는 87.8 $\pm$ 8.8%의 세포파쇄율을 나타내었으며, 10분의 처리시에는 101 $\pm$ 11%의 세포파쇄율을 나타냄을 확인하였다.

[0111] 따라서, 세균으로부터 DNA를 추출하고 이를 검사하기 위하여는, 본 발명에서 제공하는 휴대용 세포파쇄장치를 사용하여 1분동안 오존을 처리하는 것만으로도 충분함을 알 수 있었다.

[0112] 아울러, 그람 음성균과는 달리 그람 양성균은 테이코익산(teichoic acid)과 리포테이코익산(lipoteichoic acid)을 포함하는 복잡하게 가교화된 펩티도글리칸을 포함하는 세포벽을 갖기 때문에, 그람 음성균에 비하여 세포벽의 파쇄가 어렵다고 알려져 있으나, 본 발명에서 제공하는 휴대용 세포파쇄장치는 이같은 그람 양성균의 세포벽을 파쇄하여 용이하게 DNA를 추출하는데 사용될 수 있음을 알 수 있었다.

[0113] 실시예 5-3: 오존의 유속

[0114] 4V의 사용전압으로 생성된 오존을 120 내지 160ml/분의 유속으로 5분동안 처리하는 것을 제외하고는, 상기 실시예 5-2와 동일한 방법을 수행하여, 오존의 유속에 따른 정규화된 파쇄율의 변화를 비교하였다(도 12).

[0115] 도 12는 본 발명에서 제공하는 휴대용 세포파쇄장치를 사용하여 *B. subtilis* 균주(ATCC 6051)를 파쇄함에 있어서, 오존의 유속에 따른 정규화된 파쇄율의 변화를 비교한 그래프이다. 도 12에서 보듯이, 전체적으로 오존의 유속이 증가할 수록 정규화된 파쇄율이 증가하는데, 오존의 유속이 120ml/분에서 140ml/분으로 증가할 경우, 정규화된 세포파쇄율은 $73.5 \pm 4.3\%$ 에서 $102.9 \pm 4.3\%$ 로 증가하여, 140ml/분 이상의 유속은 의미가 없음을 확인하였다.

[0116] 따라서, 세균으로부터 DNA를 추출하고 이를 검사하기 위하여는, 본 발명에서 제공하는 휴대용 세포파쇄장치를 사용하여 120ml/분 이상의 유속으로 오존을 처리하는 것만으로도 충분함을 알 수 있었다.

[0117] 실시예 5-4: 사용전압

[0118] 사용전압을 3 내지 5V로 변화시키면서 130ml/분의 유속으로 5분 동안 오존을 처리하는 것을 제외하고는, 상기 실시예 5-2와 동일한 방법을 수행하여, 사용전압에 따른 정규화된 파쇄율의 변화를 비교하였다(도 13).

[0119] 도 13은 본 발명에서 제공하는 휴대용 세포파쇄장치를 사용하여 *B. subtilis* 균주(ATCC 6051)를 파쇄함에 있어서, 사용전압에 따른 정규화된 파쇄율의 변화를 비교한 그래프이다. 도 13에서 보듯이, 전체적으로 사용전압이 증가할 수록 정규화된 파쇄율이 증가하는데, 사용전압이 3V인 경우 약 41%의 정규화된 세포파쇄율을 나타내고, 사용전압이 3.5V인 경우에는 60% 이상의 정규화된 세포파쇄율을 나타내며, 사용전압이 4.5V인 경우 약 100%의 정규화된 세포파쇄율을 나타냄을 확인하였다.

[0120] 따라서, 세균으로부터 DNA를 추출하고 이를 검사하기 위하여는, 본 발명에서 제공하는 휴대용 세포파쇄장치를 사용하여 3.5V 이상의 사용전압으로 오존을 처리하는 것만으로도 충분함을 알 수 있었다.

[0121] 실시예 5-5: 균체시료의 pH

[0122] *B. subtilis* 균주(ATCC 6051) 배양물을 원심분리(10,000 rpm 및 3분)하여 균체를 수득하고, 상기 수득한 균체를 일염기 인산과 이염기 인산의 비율을 조절하여 pH 6 내지 8로 적정한 PBS 용액에 현탁시킨 것을 균체시료로서 사용하고, 4V의 사용전압으로 생성된 오존을 130ml/분의 유속으로 5분 동안 처리하는 것을 제외하고는, 상기 실시예 5-2와 동일한 방법을 수행하여, 균체시료의 pH 변화에 따른 정규화된 파쇄율의 변화를 비교하였다(도 14).

[0123] 도 14는 본 발명에서 제공하는 휴대용 세포파쇄장치를 사용하여 *B. subtilis* 균주(ATCC 6051)를 파쇄함에 있어서, 균체시료의 pH 변화에 따른 정규화된 파쇄율의 변화를 비교한 그래프이다. 도 14에서 보듯이, 균체시료의 pH 변화와 정규화된 파쇄율의 변화의 관련성은 확인되지 않았다. 다만, 균체시료의 pH가 7.0일 때, 가장 높은 수준의 정규화된 파쇄율을 나타냄을 확인하였다.

[0124] 실시예 5-6: 이온강도

[0125] *B. subtilis* 균주(ATCC 6051) 배양물을 원심분리(10,000 rpm 및 3분)하여 균체를 수득하고, 상기 수득한 균체를 0.025 내지 2.434 M의 이온강도에 해당하는 0.1 내지 1M의 범위로 인산농도가 조정된 PBS 용액에 현탁시킨 것을 균체시료로서 사용하고, 4V의 사용전압으로 생성된 오존을 130ml/분의 유속으로 5분 동안 처리하는 것을 제외하고는, 상기 실시예 5-2와 동일한 방법을 수행하여, 균체시료의 이온강도 변화에 따른 정규화된 파쇄율의

변화를 비교하였다(도 15).

[0126] 도 15는 본 발명에서 제공하는 휴대용 세포파쇄장치를 사용하여 *B. subtilis* 균주(ATCC 6051)를 파쇄함에 있어서, 균체시료의 이온강도 변화에 따른 정규화된 파쇄율의 변화를 비교한 그래프이다. 도 15에서 보듯이, 균체시료의 이온강도 변화와 정규화된 파쇄율의 변화의 관련성은 확인되지 않았다.

[0127] **실시예 5-7: 계면활성제의 처리**

[0128] 세균의 세포벽을 파쇄함에 있어서 통상적으로 사용되는 계면활성제가, 본 발명에서 제공하는 휴대용 세포파쇄장치를 사용하여 *B. subtilis* 균주(ATCC 6051)를 파쇄할 때 나타내는 효과를 검증하고자 하였다.

[0129] 구체적으로, *B. subtilis* 균주(ATCC 6051) 배양물을 원심분리(10,000 rpm 및 3분)하여 균체를 수득하고, 상기 수득한 균체를 계면활성제의 일종인 0 내지 1%(w/w) SDS를 포함하는 PBS 용액에 현탁시킨 것을 균체시료로서 사용하고, 4V의 사용전압으로 생성된 오존을 130ml/분의 유속으로 5분 동안 처리하는 것을 제외하고는, 상기 실시예 5-2와 동일한 방법을 수행하여, 균체시료에 포함된 계면활성제의 농도 변화에 따른 정규화된 파쇄율의 변화를 비교하였다(도 16).

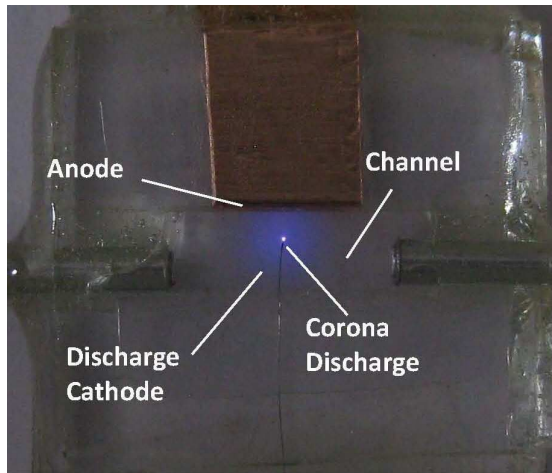
[0130] 도 16은 본 발명에서 제공하는 휴대용 세포파쇄장치를 사용하여 *B. subtilis* 균주(ATCC 6051)를 파쇄함에 있어서, 균체시료에 처리된 계면활성제인 SDS의 농도 변화에 따른 정규화된 파쇄율의 변화를 비교한 그래프이다. 도 16에서 보듯이, 균체시료에 포함된 SDS의 농도가 증가할 수록 정규화된 파쇄율이 증가됨을 확인하였다. 특히, 0.5%(w/w)의 SDS를 처리한 경우에 산출된 정규화된 세포파쇄비율인 $96.1 \pm 5.8\%$ 는, SDS의 처리없이 오존을 단독으로 처리하여 얻어진 값인 $64.0 \pm 3.4\%$ 에 비하여 약 50% 증가된 값을 알 수 있었다.

[0131] 상기 실시예 5-2 내지 5-7의 결과를 종합하면, 본 발명에서 제공하는 휴대용 세포파쇄장치를 사용하면, 1분 이상의 오존처리시간, 120ml/분 이상의 오존유속 및 3.5V 이상의 사용전압 조건 만으로도, 세균으로부터 DNA를 추출하고 이를 검사할 수 있음을 확인하였다. 상기 조건을 상기 실시예 2에서 제작한 세포파쇄장치를 사용하여 동일한 효과를 얻을 수 있는 조건인 30초 이상의 오존처리시간, 38ml/분 이상의 오존유속 및 2000V 이상의 사용전압 조건과 비교하면, 오존처리시간은 2배 증가하고, 오존유속은 약 3배 증가한 반면, 사용전압은 약 570배 이상 감소된 값을 알 수 있었다.

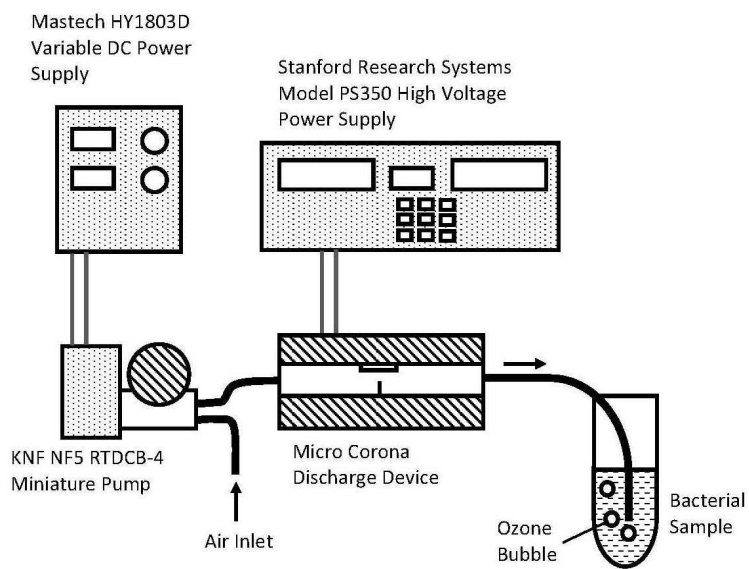
[0132] 이와 같이, 본 발명에서 제공하는 휴대용 세포파쇄장치를 사용하면 전원공급장치를 최소화하여 낮은 수준의 사용전압을 사용하여도 충분히 세균으로부터 DNA를 추출하고 이를 검사할 수 있는 장점을 나타낼 수 있었다.

도면

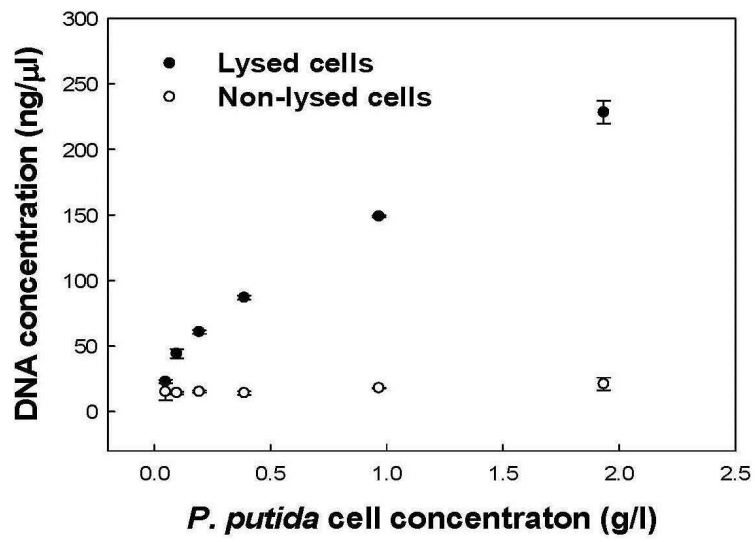
도면1



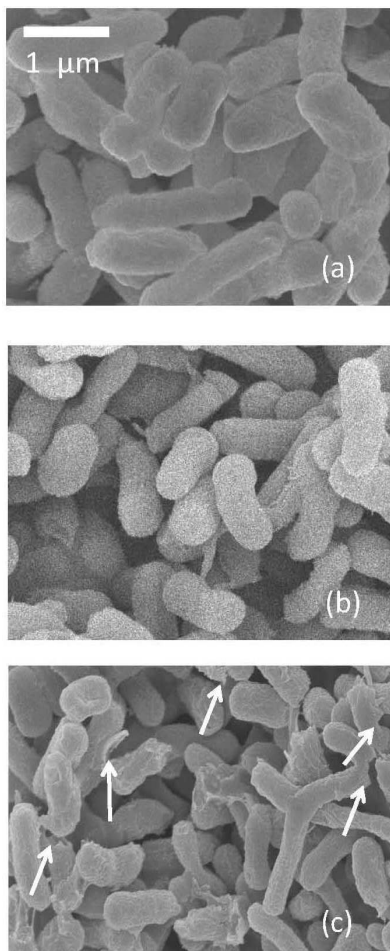
도면2



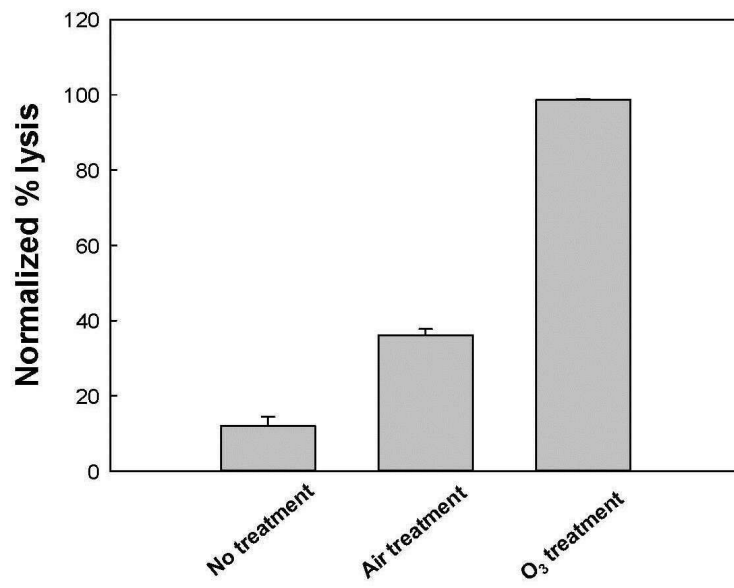
도면3



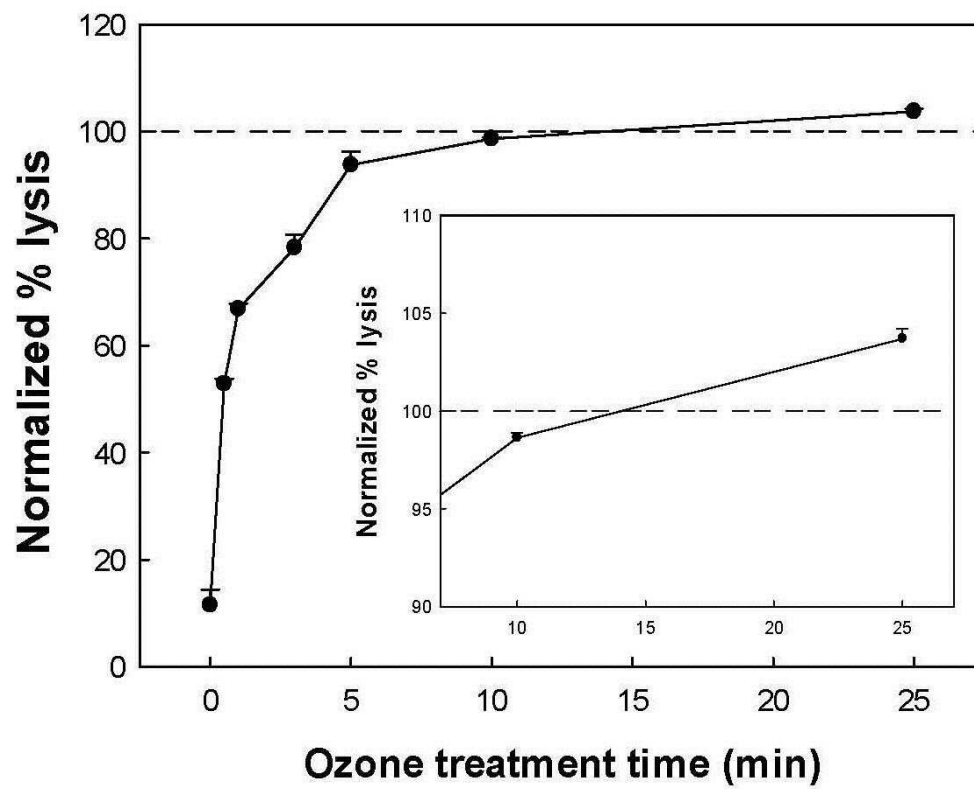
도면4



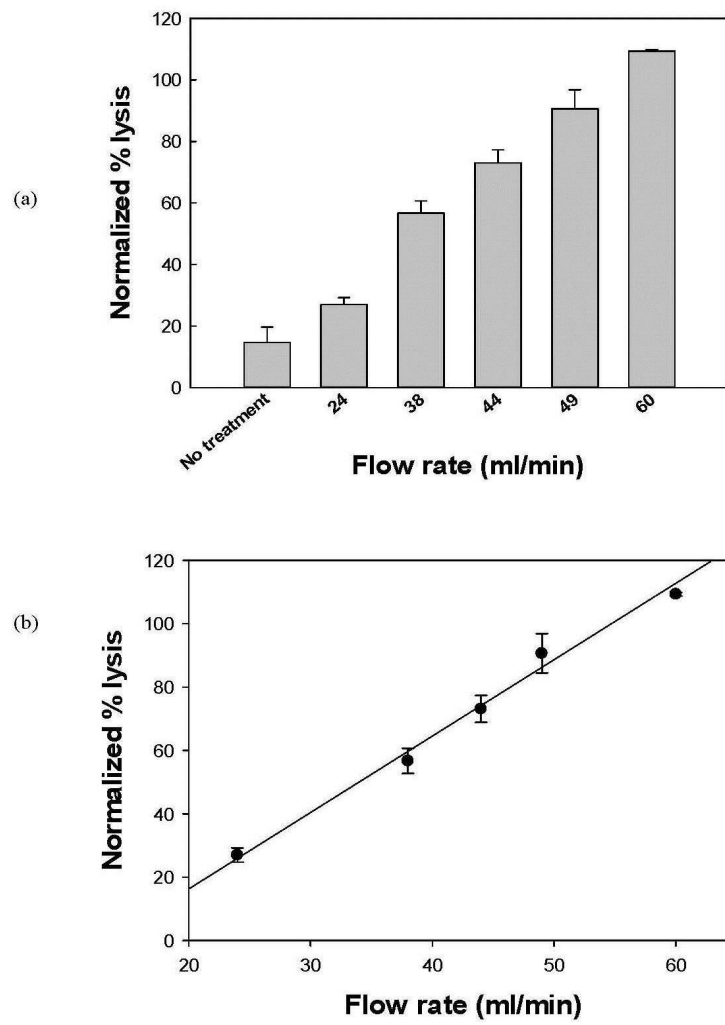
도면5



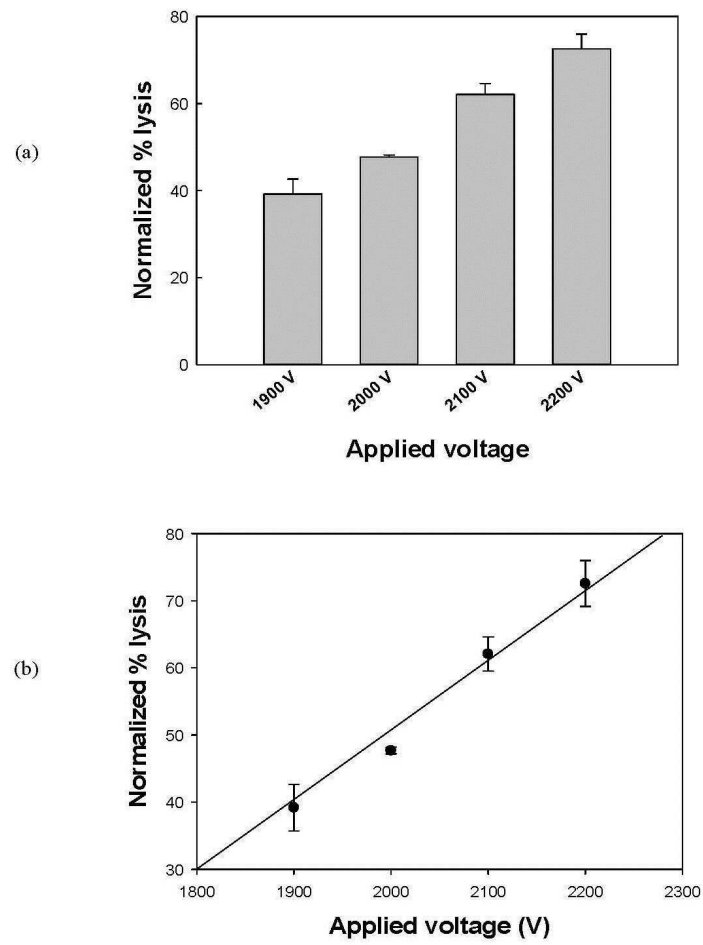
도면6



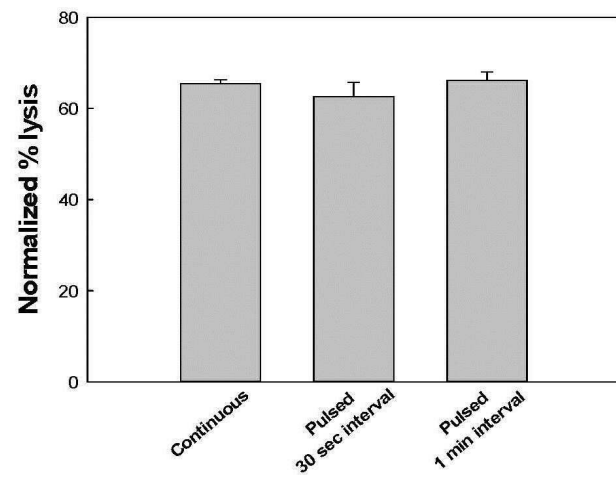
도면7



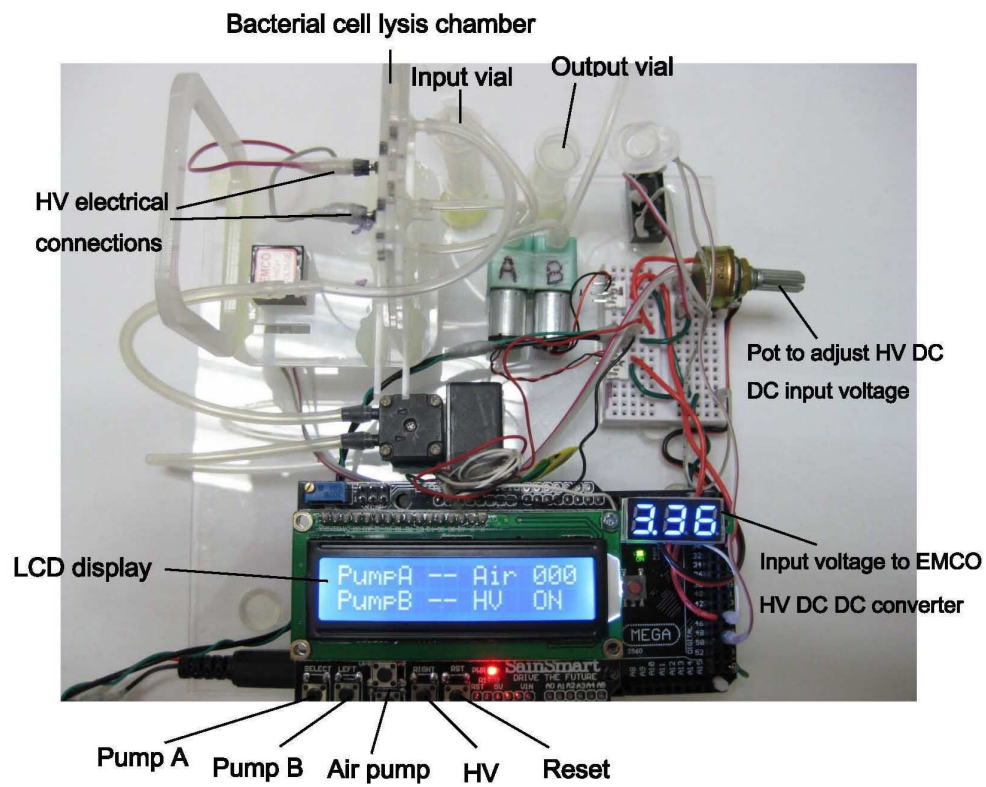
도면8



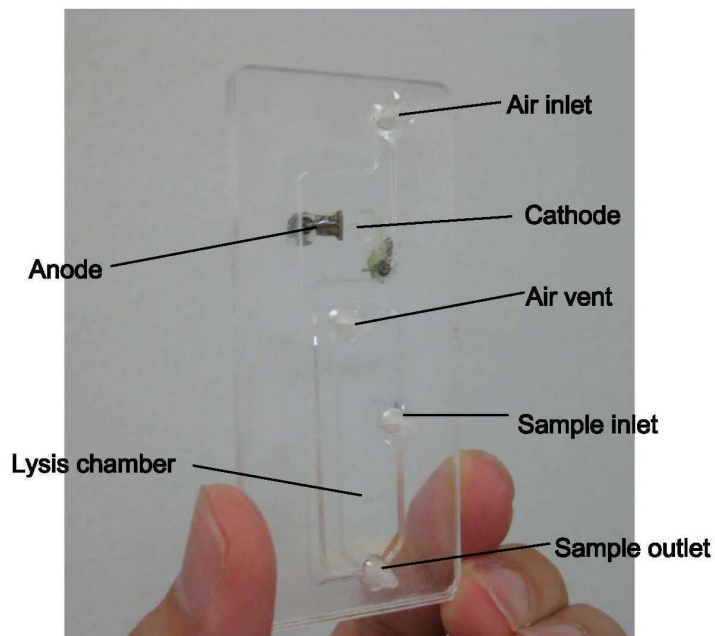
도면9



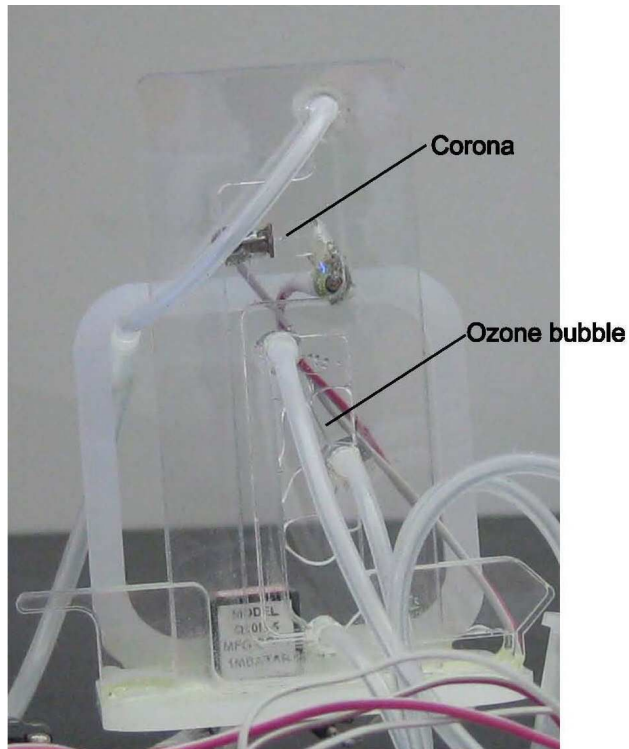
도면10a



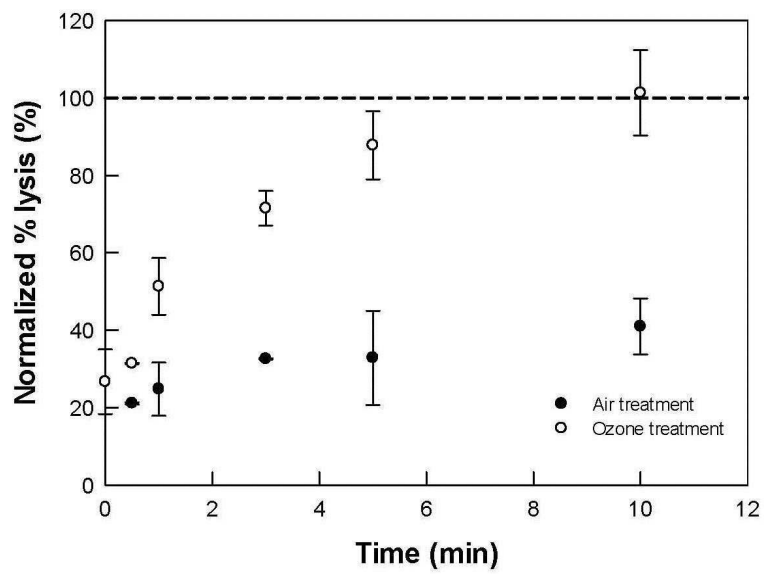
도면10b



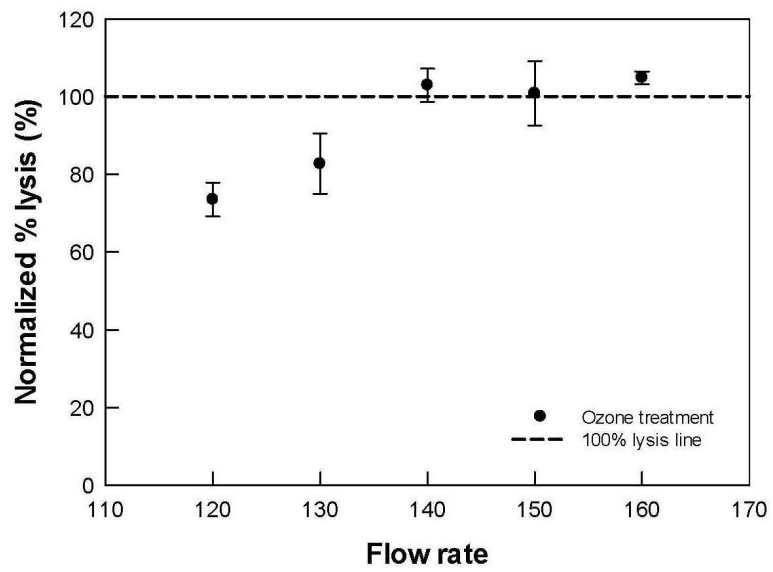
도면10c



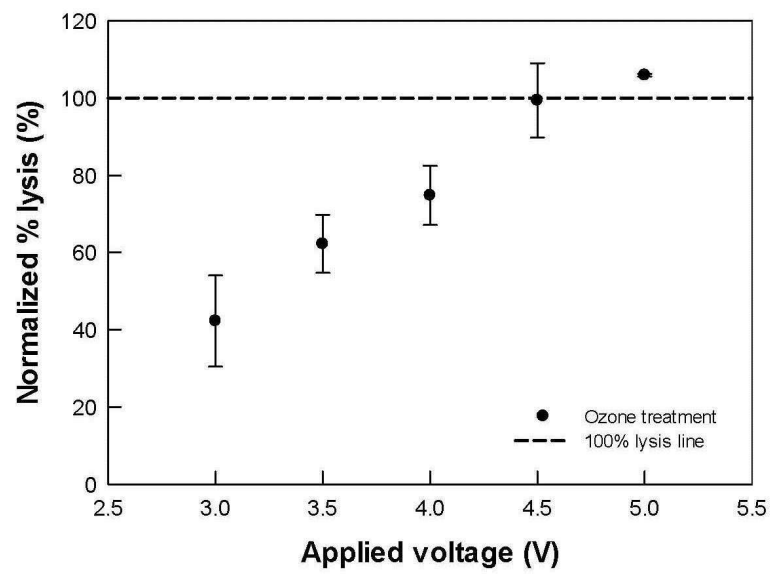
도면11



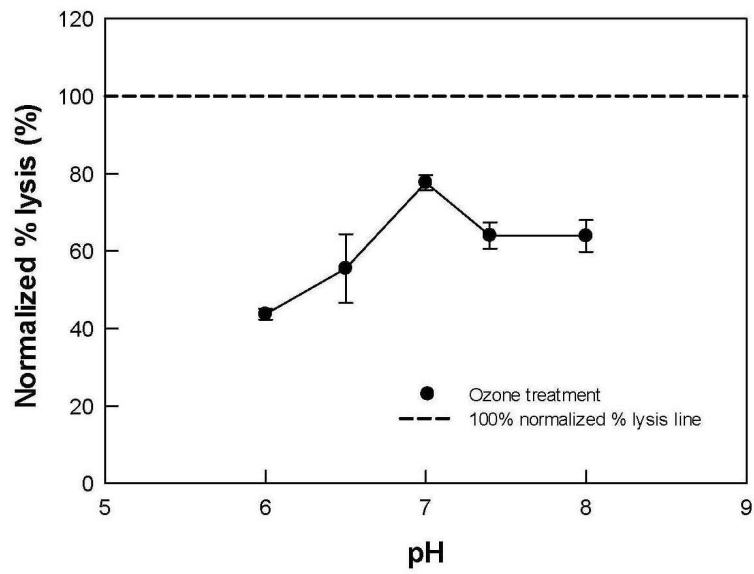
도면12



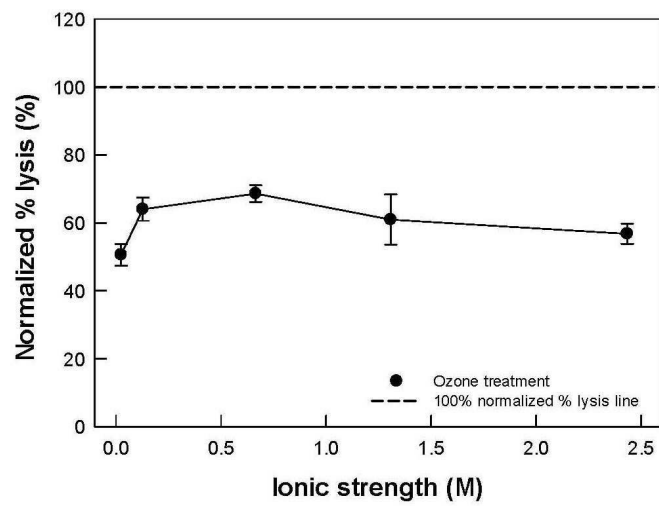
도면13



도면14



도면15



도면16

