(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2023 년 7 월 13 일 (13.07.2023)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2023/132528 A1

(51) 국제특허분류:
G01N 21/78 (2006.01) *C08L 49/00* (2006.01)
G01N 33/544 (2006.01) *C08L 101/00* (2006.01)
G01N 33/569 (2006.01) *C08J 3/075* (2006.01)
C12Q 1/02 (2006.01) *C08K 9/10* (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2022/020936

(22) 국제출원일: 2022 년 12 월 21 일 (21.12.2022)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2022-0002636 2022 년 1 월 7 일 (07.01.2022) KR

(71) 출원인: 인하대학교 산학협력단 (**INHA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION**) [KR/KR]; 22212 인천광역시 미추홀구 인하로 100, Incheon (KR).

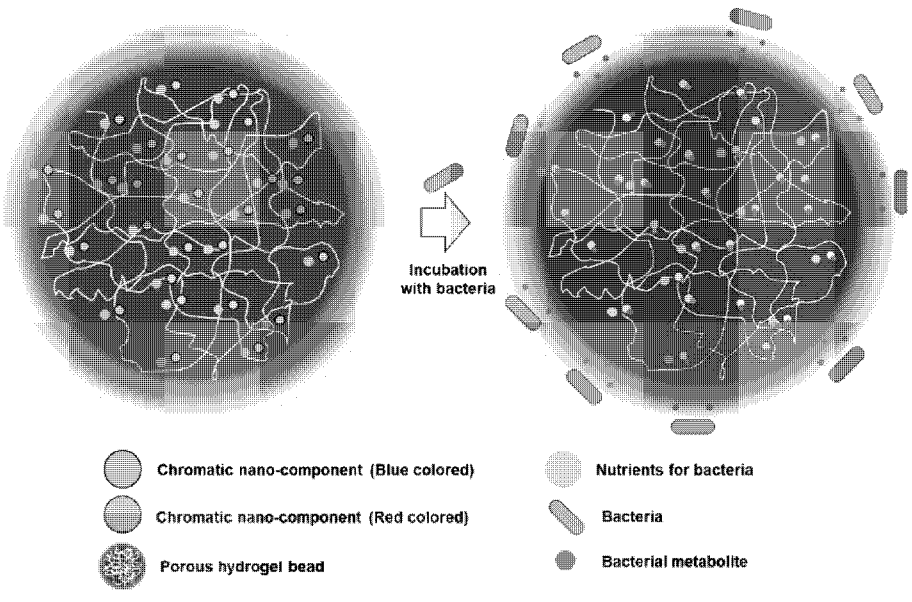
(72) 발명자: 전태준 (**JEON, Tae Joon**); 16509 경기도 수원시 영통구 도청로 65, 5409-204, Gyeonggi-do (KR). 김선민 (**KIM, Sun Min**); 04075 서울특별시 마포구 독막로18길 5, 104-1804, Seoul (KR). 장희수 (**JANG, Hui Soo**); 21650 인천광역시 남동구 논현로 81, 402-1203, Incheon (KR). 정우진 (**JEONG, Woo Jin**); 10507 경기도 고양시 덕양구 지도로103번길 48, 104-201, Gyeonggi-do (KR). 송서윤 (**SONG, Seo Yoon**); 02020 서울특별시 중랑구 공릉로18길 59, 105-1205, Seoul (KR).

(74) 대리인: 특허법인 정진 (**JUNGJIN IP LAW FIRM**); 08381 서울특별시 구로구 디지털로 29길 38, 505, Seoul (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, CV, 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, 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,

(54) **Title:** CHROMATIC BIOSENSOR, METHOD FOR MANUFACTURING SAME, AND ANTIBIOTIC SUSCEPTIBILITY TESTING METHOD USING SAME

(54) **발명의 명칭:** 비색형 바이오센서, 이의 제조방법 및 이를 이용한 항생제 감수성 검사방법



(57) **Abstract:** The present invention relates to a chromatic biosensor, a method for manufacturing same, and an antibiotic susceptibility testing method using same. More particularly, in the present invention, a chromatic biosensor can be manufactured, the chromatic biosensor comprising: a porous hydrogel structure including polydiacetylene and hydrogel polymers (alginate, PEG-DA, etc.); and a microbial nutrient source, and the chromatic biosensor can be applied to a chromatic biosensor for detecting a microorganism or a method for testing the antibiotic susceptibility of a microorganism, which can perform real-time measurement and exhibit excellent sensitivity.

(57) **요약서:** 본 발명은 비색형 바이오센서, 이의 제조방법 및 이를 이용한 항생제 감수성 검사방법에 관한 것으로, 보다 구체적으로, 본 발명에서는 폴리디아세틸렌 및 하이드로겔 고분자(알지네이트, PEG-DA, etc.)를 포함하는 다공성 하이드로겔 구조체; 및 미생물 영양원을 포함하는 비색형 바이오센서를 제조할 수 있고, 이를 이용하여 실시간 측정이 가능하고, 우수한 감도(sensitivity)를 나타낼 수 있는 미생물 검출용 비색형 바이오센서 또는 미생물의 항생제 감수성 검사방법에 응용할 수 있다.

WO 2023/132528 A1

[다음 쪽 계속]

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, CV, 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, ME, 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))

명세서

발명의 명칭: 비색형 바이오센서, 이의 제조방법 및 이를 이용한 항생제 감수성 검사방법

기술분야

[1] 본 발명은 비색형 바이오센서, 이의 제조방법 및 이를 이용한 항생제 감수성 검사방법에 관한 것이다.

배경기술

[2] 비색형 바이오센서는 세포 수준(cellular level)이나 생체 내 수준(*in vivo* level)에서 비색변화 또는 형광을 띠는 나노물질의 특성을 이용하여 신호를 검출함으로써 데이터를 분석하는데 보다 쉽고 유용한 정보를 제공해 줄 수 있는 물질 또는 장치이다.

[3] 이러한 바이오센서의 센서물질로서 폴리디아세틸렌(polydiacetylene, PDA)은 수용액 상에서 합성이 쉬운 장점을 지니며, DNA, 단백질, 탄수화물, 및 이온 등과 같은 생물학적으로 중요한 표적물질은 대부분 친수성을 띠기 때문에 센서물질로서 유리하다. 또한 폴리디아세틸렌은 부가적인 촉매 또는 개시제의 사용이 요구되지 않고 UV 자극에 의해 청색으로 색전이가 일어나며 외부의 물리적, 화학적, 생물학적 자극에 의해 적색으로 색 전이가 일어나는 것으로 알려져 있다.

[4] 한편, 미생물의 성장을 억제할 수 있는 항생제를 선별하는 검사를 항생제 감수성 검사라고 하는데, 이는 미생물에 사용할 항생제의 종류를 선택할 수 있게 해주는 직접적이고, 중요한 검사이다. 또한, 환자에 대하여 적절한 항생제를 처방할 때 처방방법과 횟수, 비용, 부작용을 고려하여 맞춤 처방이 가능하게 해준다. 감수성 결과를 이용한다면 항생제를 경험적 처방을 하였을 때 생길 수 있는 치료 비용 증가와 보호자의 실망감을 줄여줄 수 있으며 세균의 내성 획득과 합병증의 감소 그리고 환자의 회복기간을 줄일 수 있는 기회를 제공한다.

[5] 가장 보편적인 항생제 감수성 검사는 디스크 확산법(disk diffusion technique)과 액체 배지 희석법(broth dilution technique)이 존재한다. 그러나 이러한 방법들은 박테리아를 수일 동안 배양한 후, 세균을 동정한 후, 탁도를 측정하는 과정이 필요한데, 이러한 과정에 시간이 오래 걸리고, 많은 노동력이 필요한 단점이 있다.

[6] 따라서, 실시간 측정이 가능하며, 시간 및 노동력을 단축시켜, 종래 항생제 감수성 검사법의 문제점을 극복하기 위한 방법의 개발이 필요하다.

[7] 이에, 본 발명의 발명자들은 폴리디아세틸렌 및 하이드로겔 고분자 (알지네이트, PEG-DA, etc.)를 포함하는 다공성 하이드로겔 구조체; 및 미생물 영양원을 포함하는 비색형 바이오센서를 제조하였고, 이를 이용하여 실시간 측정이 가능하고, 우수한 감도(sensitivity)를 나타낼 수 있는 미생물 검출용

비색형 바이오센서 또는 미생물의 항생제 감수성 검사방법에 응용할 수 있음에 착안하여 본 발명을 완성하기에 이르렀다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[8] 본 발명은 상기와 같은 문제점을 고려하여 안출된 것으로, 본 발명의 목적은 폴리디아세틸렌 및 하이드로겔 고분자 (알지네이트, PEG-DA, etc.)를 포함하는 다공성 하이드로겔 구조체; 및 미생물 영양원을 포함하는 비색형 바이오센서를 제조하고, 이를 이용하여 실시간 측정이 가능하고, 우수한 감도(sensitivity)를 나타낼 수 있는 미생물의 항생제 감수성 검사방법에 응용하는 것이다.

[9] 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 이상에서 언급한 과제(들)로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제(들)는 이하의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제 해결 수단

[10] 상기한 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 하이드로겔 고분자 및 폴리디아세틸렌으로 형성된 다공성 하이드로겔 구조체; 및 미생물 영양원(nutrient source)을 포함하는 비색형 바이오센서를 제공한다.

[11] 상기 미생물 영양원은 상기 다공성 하이드로겔 구조체의 내부에 캡슐화된 것일 수 있다.

[12] 상기 미생물 영양원은 상기 다공성 하이드로겔 구조체의 표면을 감싸는 쉘 형태로 형성된 것일 수 있다.

[13] 상기 하이드로겔 고분자는 알지네이트, 아가로스, 키토산, 폴리(에틸렌글리콜)디아크릴레이트 (PEG-DA), 히드록시에틸렌메타크릴레이트 (HEMA), 폴리비닐알코올 (PVA) 및 폴리아크릴라마이드 (PAM)로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상일 수 있다.

[14] 상기 미생물 영양원은 LB(Luria-Berani broth) 브로쓰 혹은 LB 아가(agar) 배지, 트립틱 소이 브로쓰(Tryptic Soy Broth; TSB) 배지, Lactobacilli MRS 배지, R2A 배지(MB-R2230), M-H(Mueller Hinton) 배지 및 카제인가수분해물(casamino acid) 포함 배지로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상일 수 있다.

[15] 상기 비색형 바이오센서는 색변화를 통하여 미생물을 검출하는 것일 수 있다.

[16] 상기 미생물은 박테리아(bacterium), 곰팡이(fungus), 해조(alga), 원생동물(protozoan), 및 후생동물(metazoan)의 분리된 세포로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상일 수 있다.

[17] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 비색형 바이오센서 및 항생제의 존재 하에 미생물을 배양하는 단계를 포함하는 항생제 감수성 검사방법을 제공한다.

[18] 상기 비색형 바이오센서의 비색변화가 없는 경우에 상기 미생물이 상기 항생제에 대한 감수성을 갖는 것으로 판단하고, 상기 비색형 바이오센서의 비색변화가 존재하는 경우에 상기 미생물이 상기 항생제에 대한 저항성을 갖는

것으로 판단하는 것일 수 있다.

[19] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 비색형 바이오센서 및 항생제를 포함하는 항생제 감수성 검사용 키트를 제공한다.

[20] 또한, 본 발명은 (a) 폴리디아세틸렌 용액, 하이드로겔 고분자 및 미생물 영양원을 포함하는 하이드로겔 전구용액을 수득하는 단계; (b) 염화칼슘 용액에 상기 하이드로겔 전구용액을 적하하여, 하이드로겔 구조체를 수득하는 단계; 및 (c) 상기 하이드로겔 구조체에 200 내지 300 nm 파장의 자외선을 조사하는 단계를 포함하는 비색형 바이오센서의 제조방법을 제공한다.

[21] 상기 하이드로겔 전구용액 내 상기 하이드로겔 고분자의 농도는 1.0 내지 15.0 %(w/v)일 수 있다.

[22] 상기 폴리디아세틸렌 용액의 농도는 0.5 내지 5 mM일 수 있다.

[23] 상기 염화칼슘 용액의 농도는 0.5 내지 20.0 %(w/v)일 수 있다.

[24] 상기 비색형 바이오센서는 상기 하이드로겔 고분자 및 폴리디아세틸렌으로 형성되는 다공성 하이드로겔 구조체 및 상기 미생물 영양원을 포함하고, 상기 미생물 영양원이 상기 다공성 하이드로겔 구조체의 내부에 캡슐화되거나, 또는 상기 미생물 영양원이 상기 다공성 하이드로겔 구조체의 표면을 감싸는 쉘 형태로 형성되는 것일 수 있다.

발명의 효과

[25] 본 발명에 따르면, 폴리디아세틸렌 및 하이드로겔 고분자를 포함하는 다공성 하이드로겔 구조체; 및 미생물 영양원을 포함하는 비색형 바이오센서를 제조할 수 있고, 이를 이용하여 실시간 측정이 가능하고, 우수한 감도(sensitivity)를 나타낼 수 있는 미생물의 항생제 감수성 검사방법에 응용할 수 있다.

[26] 본 발명의 효과는 상기한 효과로 한정되는 것은 아니며, 본 발명의 상세한 설명 또는 청구범위에 기재된 발명의 구성으로부터 추론 가능한 모든 효과를 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

도면의 간단한 설명

[27] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 비색형 바이오센서를 통한 미생물 검출과정을 나타낸 이미지이다[비색형 바이오센서: 미생물 배양(Incubation with bacteria) 전 청색 -> 미생물 배양 후 적색].

[28] 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따라 (a) 레이어드 형태(Layered form) 및 (b) 캡슐화 형태(Encapsulated form)의 비색형 바이오센서를 제조하는 과정을 나타낸 이미지이다[PDA-Alginate Beads: 청색, LB: 노란색, PDA-Alginate-LB Beads: 청색].

[29] 도 3은 본 발명의 일 실시예에 따라 제조된 (a) 레이어드 형태(Layered form) 및 (b) 캡슐화 형태(Encapsulated form)의 비색형 바이오센서를 나타낸 이미지이다.

[30] 도 4는 LB 브로쓰(broth) 배지가 캡슐화 형태의 비색형 바이오센서의 (a) 외부 및 (b) 내부에 위치했을 경우의 감도 차이를 나타내는 실험결과에 대한

이미지이다[T1: 0 h, T2: 6h, T3: 12h, T4; 18h 및 T5; 24h] .

[31] 도 5는 캡슐화 형태(Encapsulated form)의 비색형 바이오센서를 이용한 항생제 감수성 실험결과에 대한 이미지이다.

발명의 실시를 위한 형태

[32] 이하, 본 발명의 실 예를 첨부된 도면들을 참조하여 더욱 상세하게 설명한다. 본 발명의 실시예는 여러 가지 형태로 변형할 수 있으며, 본 발명의 범위가 아래의 실시예들로 한정되는 것으로 해석되어서는 안 된다. 본 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 더욱 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다. 따라서 도면에서의 요소의 형상은 보다 명확한 설명을 강조하기 위해 과장되었다.

[33]

[34] 종래, 보편적으로 수행되는 항생제 감수성 검사는 디스크 확산법(disk diffusion technique)과 액체 배지 희석법(broth dilution technique)이 존재하였다. 그러나 이러한 방법들은 박테리아를 수일 동안 배양한 후, 세균을 동정한 후, 탁도를 측정하는 과정이 필요한데, 이러한 과정에 시간이 오래 걸리고, 많은 노동력이 필요한 단점이 존재하였다.

[35] 따라서, 실시간 측정이 가능하며, 시간 및 노동력을 단축시켜, 종래 항생제 감수성 검사법의 문제점을 극복하기 위한 방법의 개발이 필요한 실정이다.

[36] 상기한 문제점을 해결하기 위하여, 본 발명에서는 폴리디아세틸렌 및 하이드로겔 고분자를 포함하는 다공성 하이드로겔 구조체; 및 미생물 영양원을 포함하는 비색형 바이오센서를 제조하고, 이를 이용하여 실시간 측정이 가능하고, 우수한 감도(sensitivity)를 나타낼 수 있는 미생물의 항생제 감수성 검사방법에 응용하고자 한다.

[37]

[38] <u>비색형 바이오센서</u>

[39] 본 발명은 하이드로겔 고분자 및 폴리디아세틸렌(PDA)으로 형성된 다공성 하이드로겔 구조체; 및 미생물 영양원(nutrient source)을 포함하는 비색형 바이오센서를 제공한다.

[40] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 비색형 바이오센서는 색변화를 통하여 미생물을 검출하는 것일 수 있다. 구체적으로, 상기 비색형 바이오센서를 미생물과 함께 배양할 경우, 센서(내부)에 포함된 미생물 영양원이 외부로 확산하고, 미생물이 이를 성장원으로 활용하여 증식이 이루어진다. 이러한 미생물의 증식에 따라 생산되는 대사산물인 생체분자(biomolecule)는 다공성 하이드로겔 구조체의 기공을 통하여 하이드로겔 내부로 침투하여 PDA를 자극하면서, 비색형 바이오센서의 색변화를 유도할 수 있다. 도 1을 참조하면, 상기 비색형 바이오센서는 미생물 배양(Incubation with bacteria) 전에는 청색을 띠고 있다가, 미생물 배양이 진행된 후에는 전술한 색변화 메커니즘에 의해서

적색으로 색변화가 일어남을 확인할 수 있다.

[41] 보다 구체적으로, 상기 미생물, 특히 박테리아는 주변환경의 성장원을 인식하여 성장하는 특성을 갖는다. 즉, 박테리아는 성장원이 있는 방향으로 모여들며 성장할 수 있다. 본 발명에서는 이러한 특성을 이용하여, 박테리아가 센서물질인 PDA와 최대한 가까운 곳에서 성장할 수 있도록 성장원으로 작용가능한 영양원과 PDA를 하이드로겔에 포함시켰다.

[42] 또한, PDA는 표면에서 일어나는 다양한 자극(온도, pH, 전기적/물리적 자극 등)에 의해 내부의 구조변화가 일어나고 이에 따라 청색에서 적색으로의 색변화가 일어나는 특징이 있다. 이에 따라, 박테리아가 생성하는 대사산물 중 일부가 PDA 표면과 상호작용함에 따라 자극을 주어 색변화를 일으킬 수 있다.

[43] 이와 같은 색변화는 육안으로도 확인이 가능하며 이미지처리 장치를 통해서 수치적으로도 분석할 수 있다. 따라서, 색변화를 통해 미생물의 유무 및 증식속도를 측정할 수 있다.

[44] 보다 구체적으로, 상기 비색형 바이오센서는 청색에서 적색으로의 색전이 현상을 통하여 미생물의 유무 및 증식속도를 측정할 수 있다. 상기 비색형 바이오센서는 청색을 띨 수 있고, 전술한 바와 같이, 미생물과의 배양 과정을 통하여 미생물로부터 생산된 생체분자에 의해 적색으로 색전이 현상을 나타낼 수 있다.

[45] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 하이드로겔 고분자는 알지네이트, 아가로스, 키토산, 폴리(에틸렌글리콜)디아크릴레이트 (PEG-DA), 히드록시에틸렌메타크릴레이트 (HEMA), 폴리비닐알코올 (PVA) 및 폴리아크릴라마이드 (PAM)로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 구체적으로, 상기 하이드로겔 고분자는 알지네이트일 수 있으며, 이 경우 보다 우수한 색변화 감도를 나타낼 수 있다.

[46] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 다공성 하이드로겔 구조체는 구형일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 구체적으로 비드 형태일 수 있다.

[47] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 미생물 영양원은 상기 다공성 하이드로겔 구조체의 표면을 감싸는 쉘 형태로 형성된 것일 수 있다(도 3a 참조). 이 경우, 미생물이 미생물 영양원으로 접근하는 것이 보다 용이하여 미생물에 대한 감도를 향상시키는 효과가 있다.

[48] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 미생물 영양원은 상기 다공성 하드로겔 구조체의 내부에 캡슐화된 것일 수 있다(도 3b 참조). 이 경우, 특이하게도, 미생물 영양원이 상기 구조체의 표면을 감싸는 경우에 비하여 미생물에 대한 감도가 보다 향상됨을 확인하였다.

[49] 상기 미생물 영양원은 LB(Luria-Berani broth) 브로쓰 혹은 LB 아가(agar) 배지, 트립틱 소이 브로쓰(Tryptic Soy Broth; TSB) 배지, Lactobacilli MRS 배지, R2A 배지(MB-R2230), M-H(Mueller Hinton) 배지 및 카제인가수분해물(casamino acid) 포함 배지로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상일 수 있다. 구체적으로,

상기 미생물 영양원은 LB 배지일 수 있다. 보다 구체적으로, 상기 미생물 영양원은 트립톤, 효모 추출물 및 NaCl로 조성되는 LB 브로쓰 배지 이거나 트립톤, 효모 추출물 및 NaCl 과 아가(Agar) 가 혼합된 LB 아가(Agar) 배지 일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 미생물 영양원은 상기한 종류에만 한정되는 것은 아니며, 검출하고자 하는 타겟 미생물의 성장원으로 활용할 수 있는 것이라면 어느 것을 사용하여도 무방하다.

[50] 상기 미생물은 박테리아(bacterium), 곰팡이(fungus), 해조(alga), 원생동물(protozoan), 및 후생동물(metazoan)의 분리된 세포로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 구체적으로, 상기 미생물은 박테리아일 수 있다. 보다 구체적으로, 상기 미생물은 대표적인 그람음성균(Gram-negative bacteria)인 대장균(*Escherichia*)속, 슈도모나스(*Pseudomonas*)속의 박테리아일 수 있으며, 대표적인 그람양성균(Gram-positive bacteria)인 스타필로코쿠스(*Staphylococcus*)속 또는 엔테로코쿠스(*Enterococcus*)속(genus)의 박테리아일 수 있다.

[51] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 본 발명에 따른 배양은 멸균수에서 수행될 수 있다. 미생물의 배양시에 필요한 배지성분은 본 발명에 따른 영양원에 함유되어, 상기 다공성 하이드로겔 구조체 내부 또는 외부에 존재하기 때문에, 미생물의 배양을 위하여 또 다른 배지가 불필요하며, 멸균수에서 배양이 수행될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[52] 상기 배양은 검출되어야 할 미생물의 증식 (Proliferation)을 얻기 위해 수행된다. 미생물 배양을 위한 기술 및 조건은 특히 각각의 미생물에 대하여, 본 발명에 따른 미생물의 증식을 위한 적절한 영양 배지, 최적의 성장 온도, 예를 들어 포유동물에 병원성인 많은 박테리아의 경우 37℃, 및 요구되는 조건에 대해서 알고 있는 당업자에게 잘 알려져 있다. 배양시간은 성장 속도 및 세대 시간(generation time), 즉, 미생물이 2 개의 자손 미생물로 분열되는 데 요구되는 시간에 따라 각각의 미생물에 대하여 달라질 것이다. 일반적으로, 상기 배양 시간은 72 시간, 48 시간 또는 24 시간 미만일 것이다. 또한, 상기 배양은 찾고 있는 정보, 즉 검출, 정량, 또는 항생제에 대한 감수성을 얻을 수 있게 되자마자 중단될 것이다.

[53]

[54] <u>비색형 바이오센서의 용도</u>

[55] 본 발명은 본 발명에 따른 비색형 바이오센서 및 항생제의 존재 하에 미생물을 배양하는 단계를 포함하는 항생제 감수성 검사방법을 제공한다.

[56] 상기 항생제 감수성(antibiotic susceptibility)은 항생제 민감성이라고도 하며, 해당 미생물(균주 등)이 특정 항생제에 의하여 생육 억제 등의 영향을 받는 것으로, 종래의 항생제 감수성 검사법에 의하면 항생제를 처리하는 경우 항생제를 처리한 부분 주위로 균이 자라지 못하는 경우 감수성을 갖는다고 한다. 항생제 감수성 검사 결과는 일 예로, 감수성, 중간감수성(중간내성) 및

저항성(내성)으로 나누어질 수 있다. 미생물에 의한 감염증을 치료하기 위해서는 감수성이 있는 항생제를 사용해야 하는 데, 상기 감수성(susceptible) 판독된 균주의 감염은 그 균종, 그 부위의 감염에 권고되는 용량의 항균제로 치료될 수 있음을 의미하고, 중간 감수성(또는 중간내성, intermediate susceptible)은 시험 균주에 대한 항균제의 최소저지 농도가 혈중이나 조직농도와 비슷함을 뜻하며, 따라서 치료효과가 감수성인 균주에 대한 경우보다 낮음을 뜻하며 소변 등 항균제가 농축되는 부위에 감염이 되었을 때나 다량을 투여할 수 있는 약제를 최대량 투여했을 때 치료효과가 있음을 의미하며, 저항성(또는 내성, resistant)은 보통 용량을 투여했을 때의 혈중 농도로는 치료되지 않음을 뜻한다.

[57] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 비색형 바이오센서의 비색변화가 없는 경우에 상기 미생물이 상기 항생제에 대한 감수성을 갖는 것으로 판단하고, 상기 비색형 바이오센서의 비색변화가 존재하는 경우에는 상기 미생물이 상기 항생제에 대한저항성을 갖는 것으로 판단하는 것일 수 있다.

[58] 구체적으로, 전술한 바와 같이, 상기 비색형 바이오센서를 미생물과 함께 배양할 경우, 센서(내부)에 포함된 미생물 영양원이 외부로 이동하고, 미생물이 이를 성장원으로 활용하여 증식이 이루어진다. 이러한 미생물의 증식에 따라 생산되는 대사산물인 생체분자(biomolecule)는 다공성 하이드로겔 구조체의 기공을 통하여 하이드로겔 내부로 침투하여 PDA를 자극하면서, 비색형 바이오센서의 색변화를 유도할 수 있다.

[59] 이 때, 상기 바이오센서 주변부에 항생제가 존재할 경우 상기 항생제에 대한 감수성을 보이는 미생물은 증식이 중단되어 대사산물인 생체분자를 생성하지 않게 되고, 이 결과 상기 비색형 바이오센서의 비색변화를 관찰할 수 없게 된다. 반면, 상기 항생제에 대한 저항성(내성)을 보이는 미생물은 증식이 진행되어 대사산물인 생체분자를 생성하고, 이 결과 상기 비색형 바이오센서의 비색변화를 관찰할 수 있다.

[60] 이와 같이, 본 발명에 따른 비색형 바이오센서를 이용하여 실시간 측정이 가능하고, 우수한 감도(sensitivity)를 나타낼 수 있는 미생물의 항생제 감수성 검사방법을 제공할 수 있다.

[61] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 항생제는 페니실린계 항생제, 글리코펩타이드(glycopeptide)계 항생제, 퀴놀론계 항생제, 세팔로스포린계 항생제, 테트라사이클린계 항생제, 설폰아마이드계 항생제, 폴리에테르계 항생제 및 펩타이드계 항생제로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 구체적으로 상기 항생제는 페니실린계 및 글리코펩타이드(glycopeptide)계 항생제일 수 있다.

[62] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 비색형 바이오센서 및 항생제를 포함하는 항생제 감수성 검사용 키트를 제공한다. 구체적으로, 상기 비색형 바이오센서는 타겟물질(미생물 등)의 특정 항생제에 대한 감수성 또는 저항성을 확인할 수 있는 통상의 키트로 제공될 수 있다.

[63] 구체적인 일 예로, 상기 항생제 감수성 검사용 키트는 상기 비색형 바이오센서가 투입 또는 처리된 웰 플레이트 및 항생제를 각각 따로 포함하는 것이거나, 또는 상기 비색형 바이오센서 및 항생제가 함께 투입 또는 처리된 웰 플레이트일 수 있다. 이 경우, 상기 항생제는 키트를 이루는 각 웰에 서로 다른 농도로 포함시키는데, 예를 들어, 각종 검사대상 항생제를 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32 ㎍/mL 등으로 달리하여 포함된 배지를 상기 키트를 구성하는 각 웰에 넣는다. 상기 배지의 양은 멀티-웰 플레이트를 구성하는 개별 웰의 용적에 따라서 달라지나 일반적으로 각 웰에 평균 200 ㎕ 씩 넣을 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[64] 상기 키트를 구성하는 각 웰에는 멸균수를 더욱 포함할 수 있다. 전술한 바와 같이, 미생물의 배양시에 필요한 배지성분은 본 발명에 따른 영양원에 함유되어, 상기 다공성 하이드로겔 구조체 내부 또는 외부에 존재하기 때문에, 미생물의 배양을 위하여 또 다른 배지가 불필요하며, 멸균수에서 배양이 수행될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[65]

[66] **비색형 바이오센서의 제조방법**

[67] 본 발명은 (a) 폴리디아세틸렌(PDA) 용액, 하이드로겔 고분자 및 미생물 영양원을 포함하는 하이드로겔 전구용액을 수득하는 단계; (b) 염화칼슘 용액에 상기 하이드로겔 전구용액을 적하하여, 하이드로겔 구조체를 수득하는 단계; 및 (c) 상기 하이드로겔 구조체에 200 내지 300 nm 파장의 자외선을 조사하는 단계를 포함하는 비색형 바이오센서의 제조방법을 제공한다.

[68] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 (a) 단계는 하이드로겔 구조체를 형성하기 위한 하이드로겔 전구용액을 준비하는 단계로서, PDA 용액, 하이드로겔 고분자 및 미생물 영양원을 혼합하여 수행될 수 있다.

[69] 상기 하이드로겔 전구용액 내 상기 하이드로겔 고분자의 농도는 1.0 내지 15.0 %(w/v), 5.0 내지 13.0 % (w/v) 또는 8.0 내지 10.0 %(w/v) 일 수 있다. 상기 하이드로겔 고분자의 농도가 1.0%(w/v) 이상인 경우에는 겔의 형성능이 우수하고, 15.0%(w/v) 이하인 경우에는 구형의 다공성 하이드로겔 구조체에 대한 형태 보존능이 우수하며, 점도가 적절하여 다루기 용이한 효과가 존재한다. 특이하게도, 상기 하이드로겔 고분자의 농도 범위를 유지하는 경우 PDA 용액 및 미생물 영양원의 혼합비율이 다양하게 조절되더라도 상기한 임계적 효과는 유지될 수 있다.

[70] 상기 PDA 용액의 농도는 0.5 내지 5 mM, 0.5 내지 4 mM 또는 1.0 내지 3 mM일 수 있다. 상기 PDA 용액의 농도는 상기 (b) 단계의 하이드로겔 구조체를 수득하는 과정에 영향을 미칠 수 있고, 상기한 PDA 용액의 농도 범위에서는 하이드로겔 구조체의 형성이 용이한 효과가 있다.

[71] 상기 염화칼슘 용액의 농도는 0.5 내지 20.0%(w/v), 0.5 내지 10.0%(w/v), 0.5 내지 5.0%(w/v) 또는 0.5 내지 1.5%(w/v)일 수 있다. 상기 염화칼슘 용액의 농도

범위에서는 생성되는 비색형 바이오센서의 감도가 보다 향상되는 효과가 존재한다.

[72] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 (b) 단계는 상기 하이드로겔 전구용액이 상기 염화칼슘과의 반응을 통하여 겔화된 하이드로겔 구조체를 수득하는 단계로서, 적하된 액적이 뭉치지 않도록 마그네틱 바를 이용하여 상기 염화칼슘 용액을 교반하는 과정을 동시에 수행할 수 있다.

[73] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 (b) 단계 이후에, 상기 겔화가 완결된 하이드로겔 구조체를 증류수로 세척하는 과정을 더욱 수행할 수 있다.

[74] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 (c) 단계는 상기 하이드로겔 구조체에 200 내지 300 nm, 230 내지 280 nm, 240 내지 270 nm 또는 250 내지 260 nm 파장의 자외선을 조사함으로써, 청색을 띠는 비색형 바이오센서를 수득하는 단계일 수 있다. 상기 파장 범위의 자외선을 조사할 경우 청색으로의 색전이가 용이하게 수행될 수 있다.

[75]

[76] 상기 비색형 바이오센서는 상기 하이드로겔 고분자 및 폴리디아세틸렌으로 형성되는 다공성 하이드로겔 구조체 및 상기 미생물 영양원을 포함하고, 상기 미생물 영양원이 상기 다공성 하이드로겔 구조체의 내부에 캡슐화되거나, 또는 상기 미생물 영양원이 상기 다공성 하이드로겔 구조체의 표면을 감싸는 쉘 형태로 형성되는 것일 수 있으나, 그 형태가 이에 한정되는 것은 아니다.

[77]

[78] 본 발명의 비색형 바이오센서, 이의 용도 및 이의 제조방법에서 언급된 사항은 서로 모순되지 않는 한 동일하게 적용된다.

[79]

[80] 이상의 설명은 본 발명의 기술 사상을 일 구현예를 이용하여 설명한 것으로서, 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 갖는 자라면 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 다양한 수정 및 변형이 가능할 것이다. 따라서, 본 발명에서 설명된 실시예는 본 발명의 기술 사상을 한정하기 위한 것이 아니라 설명하기 위한 것이고, 이런 실시예에 의하여 본 발명의 기술 사상의 범위가 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 보호범위는 청구범위에 의하여 해석되어야 하며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 기술 사상은 본 발명의 권리범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

[81] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다.

[82]

[83] **<실시예>**

[84] **실시예 1. 캡슐화 형태의 비색형 바이오센서(Encapsulated form)의 제조**

[85] 3 mM의 PDA(Polydiacetylene) 용액, 알지네이트(하이드로겔 전구용액 대비 9%(w/v)) 및 LB 브로쓰(broth) 배지를 혼합하여 하이드로겔 전구용액을 준비하였다. 상기 하이드로겔 전구용액을 실린지 니들을 통해 1%(w/v)

염화칼슘($CaCl_2$) 용액이 채워진 비커에 적하(dripping)하였다. 상기 적하된 액적이 뭉치지 않도록 마그네틱 바를 이용해 염화칼슘 용액을 지속적으로 저어줌으로써 하이드로겔 전구용액을 염화칼슘과 반응시켜 겔(gel) 형태로 겔화(gelation)시켰다. 겔화가 완료된 하이드로겔 구조체를 염화칼슘 용액에서 꺼내어 증류수로 세척한 후, 254 nm 파장의 UV를 조사하여 상기 하이드로겔 구조체 내부의 PDA의 색을 파란색으로 변환하여, 캡슐화 형태의 비색형 바이오센서를 제조하였다(도 2b 및 3b 참조).

[86]

[87] **실시예 2. 레이어드 형태의 비색형 바이오센서(Layered form)의 제조**

[88] 3 mM의 PDA(Polydiacetylene) 용액 및 알지네이트(하이드로겔 전구용액 대비 9%(w/v))를 혼합하여 하이드로겔 전구용액을 준비하였다. 상기 하이드로겔 전구용액을 실린지 니들을 통해 1%(w/v) 염화칼슘($CaCl_2$) 용액이 채워진 비커에 적하하였다. 상기 적하된 액적이 뭉치지 않도록 마그네틱 바를 이용해 염화칼슘 용액을 지속적으로 저어줌으로써 하이드로겔 전구용액을 염화칼슘과 반응시켜 겔(gel) 형태로 겔화(gelation)시켰다. 겔화가 완료된 하이드로겔 구조체를 염화칼슘 용액에서 꺼내어 증류수로 세척한 후, 254 nm 파장의 UV를 조사하여 상기 하이드로겔 구조체 내부의 PDA의 색을 파란색으로 변환하였다. 이후, 겔화 완료된 하이드로겔 구조체를 소수성 액상의 LB 아가(agar) 배지를 파이펫을 이용하여 떨어뜨려 얇은 막형태로 덮이도록 하였다. 코팅된 LB 아가(agar) 배지는 낮은 온도로 인해 곧바로 굳어지면서 최종적으로 박테리아 성장원을 layered 형태로 갖는 비색형 바이오센서를 제조하였다(도 2a 및 도 3a 참조).

[89]

[90] **실험예 1. 감수성 감도 비교실험**

[91] LB 브로쓰(Broth) 배지가 캡슐화 형태의 비색형 바이오센서 (a) 외부 및 (b) 내부 위치했을 경우 센서의 감수성 감도 비교실험을 수행하여 도 4에 나타내었다.

[92] 구체적으로, 상기 실시예 1로부터 캡슐화 형태의 비색형 바이오센서를 제조할 때 LB 브로쓰(broth) 배지가 포함되지 않거나 LB 브로쓰(broth) 배지가 포함된 형태로 준비했다. LB 배지가 포함되지 않은 바이오센서가 담긴 웰에는 10^8 CFU/mL의 대장균과 LB 배지를 함께 채웠다(도 4a). LB 배지가 포함된 바이오센서가 담긴 웰에는 10^8 CFU/mL의 대장균만 채웠다(도 4b). 실험의 조건을 동일하게 구성하기 위해 LB 브로쓰(broth) 배지의 농도를 동일하게 준비했다. 대장균의 성장 및 이에 따른 바이오센서의 색변화를 유도하기 위해 37 ℃ 조건으로 배양하고 각 웰플레이트 사진을 0, 6, 12, 18 그리고 24시간 마다 촬영하여 색변화를 비교하였다.

[93] 도 4를 참조하면, LB 브로쓰(broth) 배지가 바이오센서 내부에 포함된 경우(도 4b)가 그렇지 않은 경우(도 4a)와 비교하여 PDA의 색변화가 더 빠르게 일어남을 확인할 수 있다. 구체적으로 도 4b를 참조하면 LB 브로쓰(broth) 배지가 비색형 바이오센서 내부에 위치해 있을 경우 6시간(T2) 뒤부터 색변화(청색->적색)를

나타냈지만, 도 4a를 참조하면 LB 브로쓰(broth) 배지가 비색형 바이오센서 외부에 위치했을 경우 18시간(T4) 뒤부터 색변화(청색->적색)가 나타났다. 따라서 대장균이 바이오센서 내부의 LB 브로쓰(broth) 배지를 인지하여 바이오센서 표면에서 성장하고 이에 따라 방출되는 생체분자(biomolecule)가 바이오센서 내부로 더욱 용이하게 이동하여 PDA 색변화를 더욱 빠르게 유도함을 판단할 수 있다.

[94]

[95] **실험예 2. 항생제 감수성 검사 시험**

[96] 상기 실시예 1로부터 제조된 캡슐화 형태의 비색형 바이오센서의 항생제 감수성 검사실험을 수행하여, 그 결과를 도 5에 나타내었다.

[97] 구체적으로, 상기 실시예 1로부터 캡슐화 형태의 비색형 바이오센서를 제조하여 ampicillin 항생제 2, 4 μg/mL를 포함하고 있는 웰(도 5B, 도 5C)과 vancomycin 항생제 0.25, 2, 4 μg/mL 포함하고 있는 웰(도 5D, 도 5E, 도 5F)에 투입하였다. 또한 항생제 감수성 시험을 위해 ampicillin에 대해서는 저항성을 가지고 있고, vancomycin 에는 감수성을 가지고 있는 Methicillin Resistant *Staphylococcus Aureus* (MRSA) 박테리아를 각 웰에 10^6 CFU/mL 만큼 투입했다. 비교실험을 위해 비색형 바이오센서와 박테리아만 담겨있는 웰(도 5A)과 오직 비색형 바이오센서만 담겨있는 웰(도 5G)도 준비했다. MRSA의 성장 및 이에 따른 바이오센서의 색변화를 유도하기 위해 37 ℃ 조건으로 배양하고 각 웰플레이트 사진을 0, 5, 6, 7, 9, 12, 13 그리고 15시간 마다 촬영하여 색변화를 비교했다.

[98] 도 5를 참조하면, 비색형 바이오센서와 MRSA만 배양한 경우 7시간(t=7) 뒤부터 색변화(청색->적색)가 나타났다(도 5A). 반면 항생제와 박테리아 모두 없는 경우 15시간(t=15)이 지나도 색변화가 나타나지 않았다(도 5G). MRSA와 비색형 바이오센서가 투입된 웰에 2 μg/mL ampicillin을 함께 배양했을 경우 9시간(t=9) 뒤부터 색변화(청색->적색)가 나타났으며(도 5B), 4 μg/mL ampicillin을 함께 배양했을 경우 13시간(t=13) 뒤부터 색변화(청색->적색)가 나타났다(도 5C). MRSA의 경우 ampicillin 항생제에 대한 저항성을 가지고 있으므로 함께 배양했을 경우 비색형 바이오센서의 색변화를 일으켰다는 것을 판단할 수 있다. 다음으로 MRSA 와 비색형 바이오센서가 투입된 웰에 0.25 μg/mL vancomycin을 함께 배양했을 경우 9시간(t=9) 뒤부터 색변화(청색->적색)가 나타났지만(도 5D), 2, 4 μg/mL vancomycin을 함께 배양했을 경우 색변화가 나타나지 않았다(도 5E, 도 5F). MRSA의 경우 vancomycin 항생제를 함께 배양했을 때 2 μg/mL 부터 색변화를 일으키지 않았으므로 vancomycin 항생제에 대해 2 μg/mL농도부터 감수성을 가지고 있음을 판단할 수 있다.

[99]

[100] 따라서, 본 발명에 따른 비색형 바이오센서는, 실시간 측정이 가능하고, 우수한

감도(sensitivity)를 나타낼 수 있는 미생물 검출용 비색형 바이오센서 또는 미생물의 항생제 감수성 검사방법에 응용할 수 있음을 확인하였다.

[101] 이상의 상세한 설명은 본 발명을 예시하는 것이다. 또한 전술한 내용은 본 발명의 바람직한 실시 형태를 나타내어 설명하는 것이며, 본 발명은 다양한 다른 조합, 변경 및 환경에서 사용할 수 있다. 즉 본 명세서에 개시된 발명의 개념의 범위, 저술한 개시 내용과 균등한 범위 및/또는 당업계의 기술 또는 지식의 범위 내에서 변경 또는 수정이 가능하다. 저술한 실시예는 본 발명의 기술적 사상을 구현하기 위한 최선의 상태를 설명하는 것이며, 본 발명의 구체적인 적용 분야 및 용도에서 요구되는 다양한 변경도 가능하다. 따라서 이상의 발명의 상세한 설명은 개시된 실시 상태로 본 발명을 제한하려는 의도가 아니다. 또한 첨부된 청구 범위는 다른 실시 상태도 포함하는 것으로 해석되어야 한다.

청구범위

[청구항 1] 하이드로겔 고분자 및 폴리디아세틸렌으로 형성된 다공성 하이드로겔 구조체; 및
미생물 영양원(nutrient source)을 포함하는 비색형 바이오센서.

[청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 미생물 영양원은 상기 다공성 하이드로겔 구조체의 내부에 캡슐화된 것인 비색형 바이오센서.

[청구항 3] 제1항에 있어서,
상기 미생물 영양원은 상기 다공성 하이드로겔 구조체의 표면을 감싸는 쉘 형태로 형성된 것인 비색형 바이오센서.

[청구항 4] 제1항에 있어서,
상기 하이드로겔 고분자는 알지네이트, 아가로스, 키토산, 폴리(에틸렌글리콜)디아크릴레이트 (PEG-DA), 히드록시에틸렌메타크릴레이트 (HEMA), 폴리비닐알코올 (PVA) 및 폴리아크릴라마이드 (PAM)로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 비색형 바이오센서.

[청구항 5] 제1항에 있어서,
상기 미생물 영양원은 LB(Luria-Berani broth) 브로쓰, LB 아가(agar) 배지, 트립틱 소이 브로쓰(Tryptic Soy Broth; TSB) 배지, Lactobacilli MRS 배지, R2A 배지(MB-R2230), M-H(Mueller Hinton) 배지 및 카제인가수분해물(casamino acid) 포함 배지로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 비색형 바이오센서.

[청구항 6] 제1항에 있어서,
상기 비색형 바이오센서는 색변화를 통하여 미생물을 검출하는 것인, 비색형 바이오센서.

[청구항 7] 제1항에 있어서,
상기 미생물은 박테리아(bacterium), 곰팡이(fungus), 해조(alga), 원생동물(protozoan) 및 후생동물(metazoan)의 분리된 세포로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 비색형 바이오센서.

[청구항 8] 제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 따른 비색형 바이오센서 및 항생제의 존재 하에 미생물을 배양하는 단계를 포함하는 항생제 감수성 검사방법.

[청구항 9] 제8항에 있어서,
상기 비색형 바이오센서의 비색변화가 없는 경우에 상기 미생물이 상기 항생제에 대한 감수성을 갖는 것으로 판단하고,
상기 비색형 바이오센서의 비색변화가 존재하는 경우에 상기 미생물이 상기 항생제에 대한 저항성을 갖는 것으로 판단하는 것인, 항생제 감수성 검사방법.

[청구항 10] 제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 따른 비색형 바이오센서 및 항생제를 포함하는 항생제 감수성 검사용 키트.

[청구항 11] (a) 폴리디아세틸렌 용액, 하이드로겔 고분자 및 미생물 영양원을 포함하는 하이드로겔 전구용액을 수득하는 단계;
(b) 염화칼슘 용액에 상기 하이드로겔 전구용액을 적하하여, 하이드로겔 구조체를 수득하는 단계; 및
(c) 상기 하이드로겔 구조체에 200 내지 300 nm 파장의 자외선을 조사하는 단계를 포함하는 비색형 바이오센서의 제조방법.

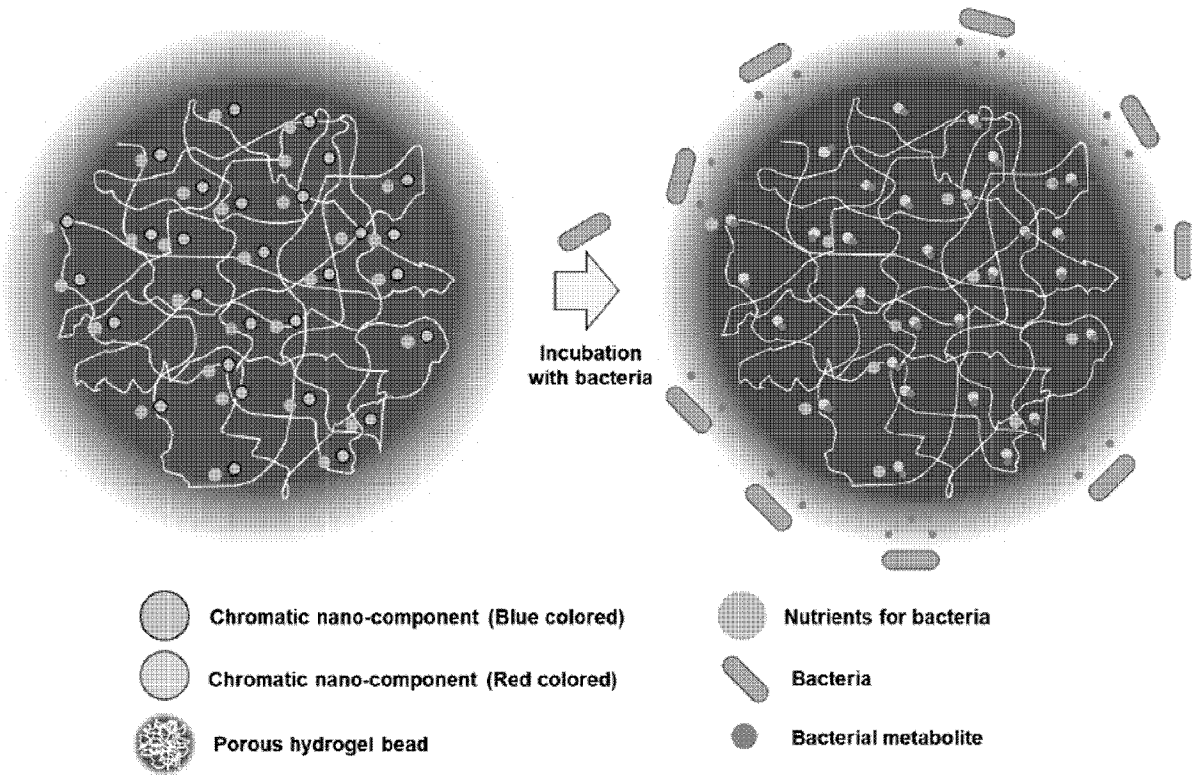
[청구항 12] 제11항에 있어서,
상기 하이드로겔 전구용액 내 상기 하이드로겔 고분자의 농도는 1.0 내지 15.0 %(w/v)인 비색형 바이오센서의 제조방법.

[청구항 13] 제11항에 있어서,
상기 폴리디아세틸렌 용액의 농도는 0.5 내지 5 mM인 비색형 바이오센서의 제조방법.

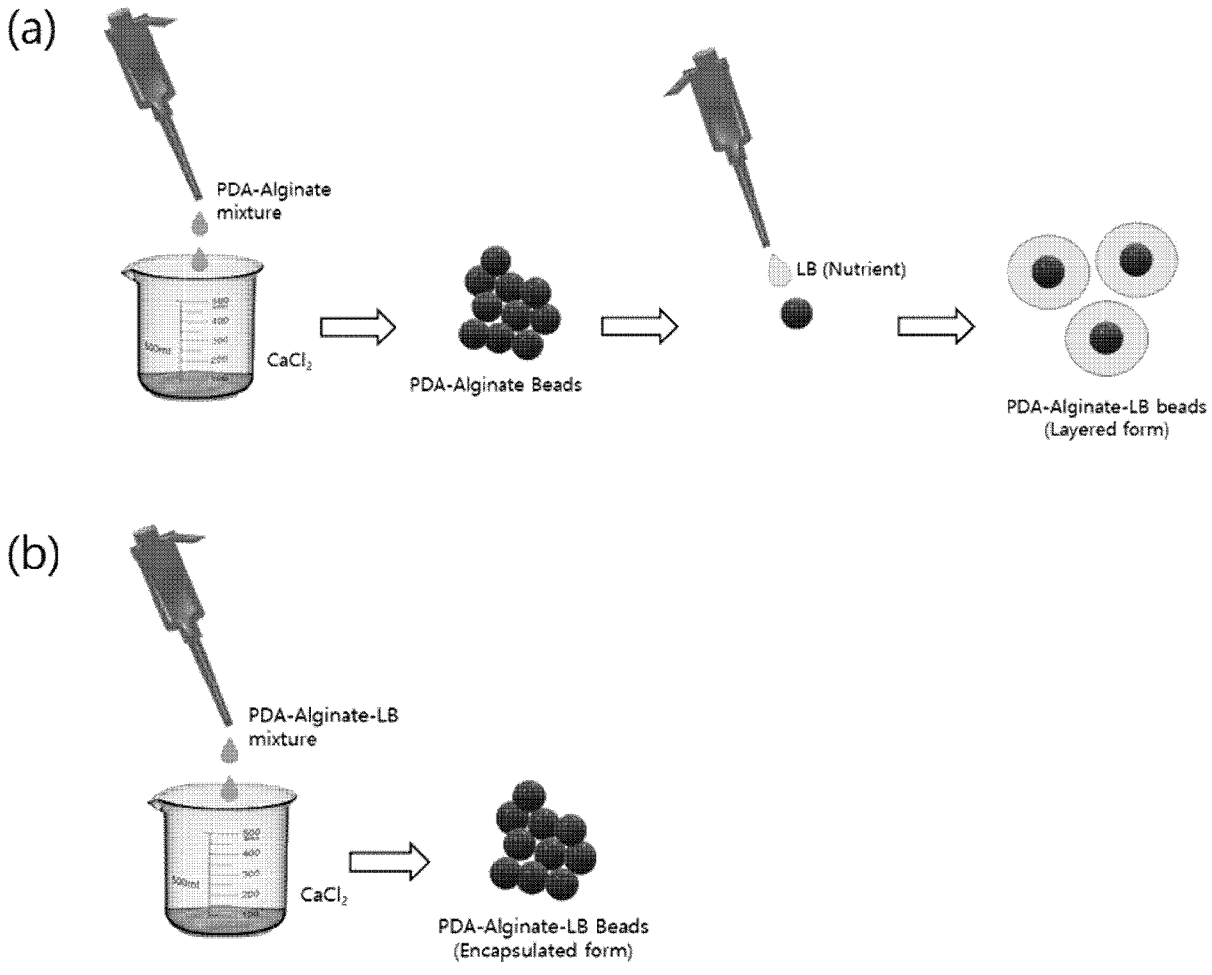
[청구항 14] 제11항에 있어서,
상기 염화칼슘 용액의 농도는 0.5 내지 20.0 %(w/v)인 비색형 바이오센서의 제조방법.

[청구항 15] 제11항에 있어서,
상기 비색형 바이오센서는 상기 하이드로겔 고분자 및 폴리디아세틸렌으로 형성되는 다공성 하이드로겔 구조체; 및 상기 미생물 영양원을 포함하고,
상기 미생물 영양원이 상기 다공성 하이드로겔 구조체의 내부에 캡슐화되거나, 또는 상기 미생물 영양원이 상기 다공성 하이드로겔 구조체의 표면을 감싸는 쉘 형태로 형성되는 것인 비색형 바이오센서의 제조방법.

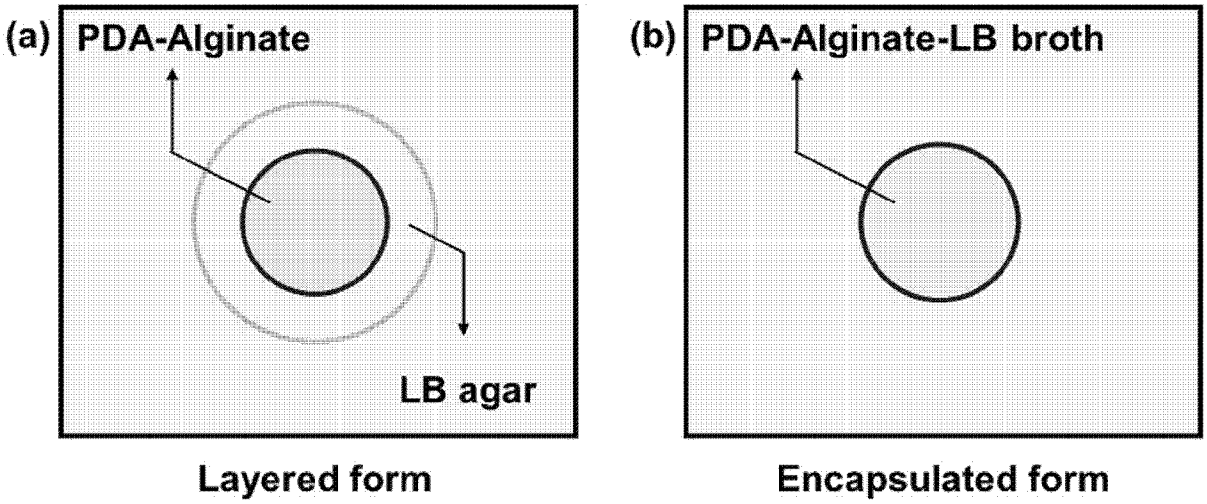
[도1]


Incubation
with bacteria
Chromatic nano-component (Blue colored)
Chromatic nano-component (Red colored)
Porous hydrogel bead
Nutrients for bacteria
Bacteria
Bacterial metabolite

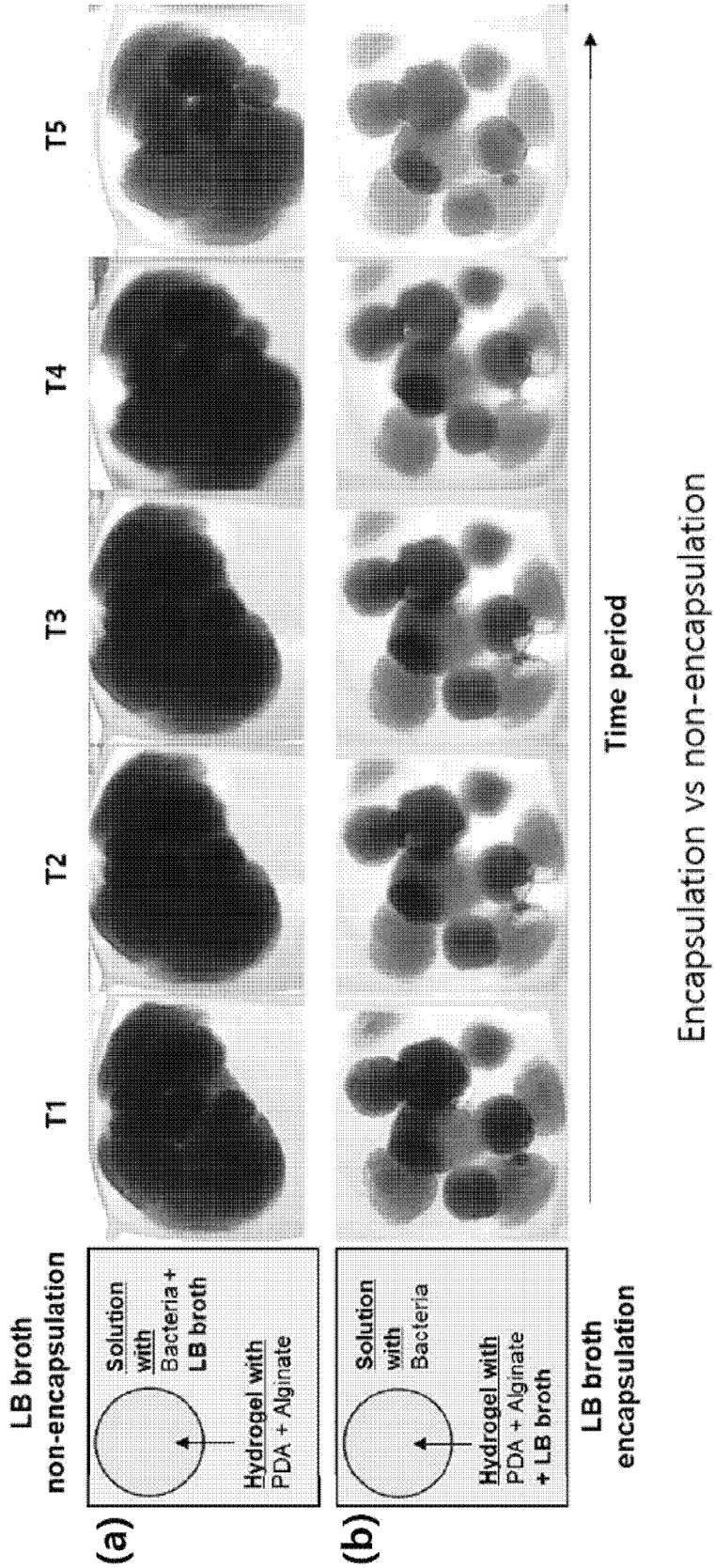
[도2]


(a)
PDA-Alginate
mixture
CaCl2
PDA-Alginate Beads
LB (Nutrient)
PDA-Alginate-LB beads
(Layered form)
(b)
PDA-Alginate-LB
mixture
CaCl2
PDA-Alginate-LB Beads
(Encapsulated form)

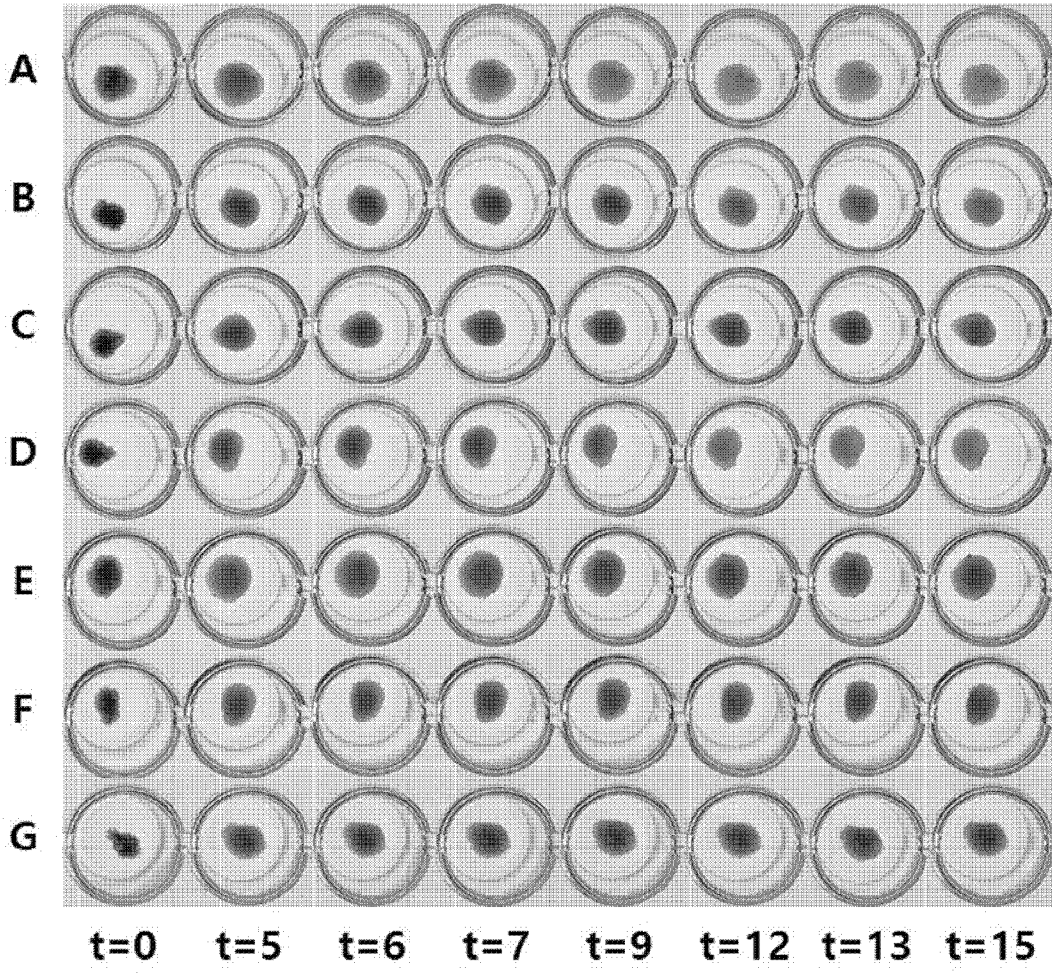
[도3]


(a)
PDA-Alginate
LB agar
Layered form
(b)
PDA-Alginate-LB broth
Encapsulated form

[도4]


LB broth non-encapsulation
T1
T2
T3
T4
T5
(a)
Solution with Bacteria + LB broth
Hydrogel with PDA + Alginate
(b)
Solution with Bacteria
Hydrogel with PDA + Alginate + LB broth
LB broth encapsulation
Time period
Encapsulation vs non-encapsulation

[도5]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2022/020936

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N 21/78(2006.01)i; **G01N 33/544**(2006.01)i; **G01N 33/569**(2006.01)i; **C12Q 1/02**(2006.01)i; **C08L 49/00**(2006.01)i; **C08L 101/00**(2006.01)i; **C08J 3/075**(2006.01)i; **C08K 9/10**(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)

G01N 21/78(2006.01); A61K 31/74(2006.01); C12N 1/14(2006.01); C12N 11/084(2020.01); C12N 5/02(2006.01); C12Q 1/02(2006.01); C12Q 1/04(2006.01); C12Q 1/68(2006.01); G01N 33/50(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: 비색형 바이오 센서(colorimetric biosensor), 하이드로겔(hydrogel), 항생제 감수성(antibiotic susceptibility), 미생물 영양원(nutrient source), 캡슐(capsule), 박테리아(bacteria), 폴리디아세틸렌(polydiacetylene)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KR 10-2071507 B1 (KOOKMIN UNIVERSITY INDUSTRY ACADEMY COOPERATION FOUNDATION) 30 January 2020 (2020-01-30) See paragraphs [0053]-[0058], claim 1 and figures 1-3.	1-8,10
A		9,11-15
Y	WO 2020-223202 A1 (THE TRUSTEES OF PRINCETON UNIVERSITY) 05 November 2020 (2020-11-05) See page 18, line 18 - page 21, line 15 and page 35, line 18 - page 36, line 7, claim 1 and figures 1 and 2.	1-8,10
A	KR 10-2011-0132388 A (3M INNOVATIVE PROPERTIES COMPANY) 07 December 2011 (2011-12-07) See paragraphs [0143]-[0145], claim 1 and figures 7a and 8a.	1-15

☑ 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
23 March 2023	**24 March 2023**

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.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 112111412 A (JIANGXI HUAWEI TECHNOLOGY CO., LTD.) 22 December 2020 (2020-12-22) See claims 1-4 and figure 1.	1-15
A	KR 10-2014-0012072 A (AMYRIS, INC.) 29 January 2014 (2014-01-29) See claims 1-7 and figures 3-5.	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2022/020936

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
KR 10-2071507 B1	30 January 2020	KR 10-2019-0112595 A	07 October 2019
WO 2020-223202 A1	05 November 2020	AU 2021-264968 A1	28 October 2021
		CA 3137912 A1	05 November 2020
		CN 113747905 A	03 December 2021
		EP 3927357 A1	29 December 2021
		JP 2022-530662 A	30 June 2022
		KR 10-2022-0003013 A	07 January 2022
		US 2022-0403364 A1	22 December 2022
KR 10-2011-0132388 A	07 December 2011	BR PI1005946 A2	24 September 2019
		CN 102333884 A	25 January 2012
		CN 102333884 B	23 July 2014
		EP 2401391 A1	04 January 2012
		EP 2401391 B1	29 May 2013
		MX 2011008962 A	27 September 2011
		US 10280446 B2	07 May 2019
		US 2012-0028251 A1	02 February 2012
		US 2015-0050642 A1	19 February 2015
		US 2017-0314059 A1	02 November 2017
		US 8889351 B2	18 November 2014
		US 9738919 B2	22 August 2017
		WO 2010-099068 A1	02 September 2010
CN 112111412 A	22 December 2020	CN 112111412 B	06 July 2021
KR 10-2014-0012072 A	29 January 2014	AU 2012-211052 A1	05 September 2013
		AU 2012-256195 A1	22 November 2012
		BR 112013017884 A2	24 September 2019
		BR 112013027954 A2	17 January 2017
		CA 2824420 A1	02 August 2012
		CA 2834783 A1	22 November 2012
		CN 103459610 A	18 December 2013
		CN 103518136 A	15 January 2014
		DK 2668284 T3	15 December 2014
		EP 2668284 A1	04 December 2013
		EP 2668284 B1	15 October 2014
		EP 2707722 A1	19 March 2014
		HK 1186498 A1	14 March 2014
		JP 2014-508516 A	10 April 2014
		JP 2014-519028 A	07 August 2014
		KR 10-2014-0032438 A	14 March 2014
		MX 2013008062 A	09 August 2013
		MX 2013013065 A	02 December 2013
		SG 192107 A1	30 August 2013
		SG 194785 A1	30 December 2013
		US 2012-0196770 A1	02 August 2012
		US 2014-0057314 A1	27 February 2014
		WO 2012-103516 A1	02 August 2012
		WO 2012-158466 A1	22 November 2012
		ZA 201304895 B	25 September 2014
		ZA 201307917 B	28 January 2015

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2022/020936

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

G01N 21/78(2006.01)i; **G01N 33/544**(2006.01)i; **G01N 33/569**(2006.01)i; **C12Q 1/02**(2006.01)i; **C08L 49/00**(2006.01)i; **C08L 101/00**(2006.01)i; **C08J 3/075**(2006.01)i; **C08K 9/10**(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

G01N 21/78(2006.01); A61K 31/74(2006.01); C12N 1/14(2006.01); C12N 11/084(2020.01); C12N 5/02(2006.01); C12Q 1/02(2006.01); C12Q 1/04(2006.01); C12Q 1/68(2006.01); G01N 33/50(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: 비색형 바이오 센서(colorimetric biosensor), 하이드로겔(hydrogel), 항생제 감수성(antibiotic susceptibility), 미생물 영양원(nutrient source), 캡슐(capsule), 박테리아(bacteria), 폴리디아세틸렌(polydiacetylene)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	KR 10-2071507 B1 (국민대학교산학협력단) 2020.01.30 단락 [0053]-[0058], 청구항 1 및 도면 1-3	1-8,10
A		9,11-15
Y	WO 2020-223202 A1 (THE TRUSTEES OF PRINCETON UNIVERSITY) 2020.11.05 페이지 18, 라인 18 - 페이지 21, 라인 15, 페이지 35, 라인 18 - 페이지 36, 라인 7, 청구항 1 및 도면 1, 2	1-8,10
A	KR 10-2011-0132388 A (쓰리엠 이노베이티브 프로퍼티즈 컴파니) 2011.12.07 단락 [0143]-[0145], 청구항 1 및 도면 7a, 8a	1-15
A	CN 112111412 A (JIANGXI HUAWEI TECHNOLOGY CO., LTD.) 2020.12.22 청구항 1-4 및 도면 1	1-15

☑ 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
2023년03월23일(23.03.2023)	**2023년03월24일(24.03.2023)**

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

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

팩스 번호 **+82-42-481-8578**

심사관

박태욱

전화번호 **+82-42-481-3405**

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2022/020936

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	KR 10-2014-0012072 A (아미리스 인코퍼레이티드) 2014.01.29 청구항 1-7 및 도면 3-5	1-15

국 제 조 사 보 고 서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2022/020936

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2071507 B1	2020/01/30	KR 10-2019-0112595 A	2019/10/07
WO 2020-223202 A1	2020/11/05	AU 2021-264968 A1	2021/10/28
		CA 3137912 A1	2020/11/05
		CN 113747905 A	2021/12/03
		EP 3927357 A1	2021/12/29
		JP 2022-530662 A	2022/06/30
		KR 10-2022-0003013 A	2022/01/07
		US 2022-0403364 A1	2022/12/22
KR 10-2011-0132388 A	2011/12/07	BR PI1005946 A2	2019/09/24
		CN 102333884 A	2012/01/25
		CN 102333884 B	2014/07/23
		EP 2401391 A1	2012/01/04
		EP 2401391 B1	2013/05/29
		MX 2011008962 A	2011/09/27
		US 10280446 B2	2019/05/07
		US 2012-0028251 A1	2012/02/02
		US 2015-0050642 A1	2015/02/19
		US 2017-0314059 A1	2017/11/02
		US 8889351 B2	2014/11/18
		US 9738919 B2	2017/08/22
		WO 2010-099068 A1	2010/09/02
CN 112111412 A	2020/12/22	CN 112111412 B	2021/07/06
KR 10-2014-0012072 A	2014/01/29	AU 2012-211052 A1	2013/09/05
		AU 2012-256195 A1	2012/11/22
		BR 112013017884 A2	2019/09/24
		BR 112013027954 A2	2017/01/17
		CA 2824420 A1	2012/08/02
		CA 2834783 A1	2012/11/22
		CN 103459610 A	2013/12/18
		CN 103518136 A	2014/01/15
		DK 2668284 T3	2014/12/15
		EP 2668284 A1	2013/12/04
		EP 2668284 B1	2014/10/15
		EP 2707722 A1	2014/03/19
		HK 1186498 A1	2014/03/14
		JP 2014-508516 A	2014/04/10
		JP 2014-519028 A	2014/08/07
		KR 10-2014-0032438 A	2014/03/14
		MX 2013008062 A	2013/08/09
		MX 2013013065 A	2013/12/02
		SG 192107 A1	2013/08/30
		SG 194785 A1	2013/12/30
		US 2012-0196770 A1	2012/08/02
		US 2014-0057314 A1	2014/02/27
		WO 2012-103516 A1	2012/08/02
		WO 2012-158466 A1	2012/11/22
		ZA 201304895 B	2014/09/25
		ZA 201307917 B	2015/01/28