



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0038974
(43) 공개일자 2017년04월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12M 1/33 (2006.01) C12N 15/10 (2017.01)
(52) CPC특허분류
C12M 1/33 (2013.01)
C12N 15/1003 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0137477
(22) 출원일자 2015년09월30일
심사청구일자 2015년09월30일

(71) 출원인
이화여자대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)
(72) 발명자
손아정
서울특별시 용산구 새창로 70 113동 1103호 (도원동, 삼성래미안아파트)
이은희
서울특별시 구로구 구일로2길 60 201동 703호 (구로동, 구일우성아파트)
임현정
서울특별시 서대문구 성산로 547 (대신동) 305호 120-160
(74) 대리인
손민

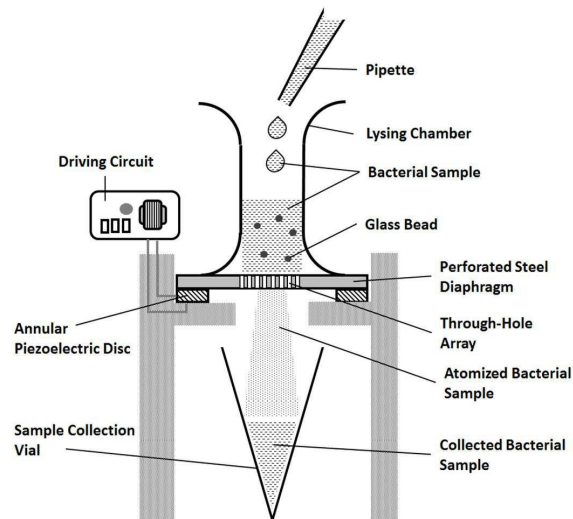
전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 발명의 명칭 **피에조 결합체를 포함하는 휴대용 세포파쇄장치**

(57) 요약

본 발명은 (a) 파쇄챔버, (b) 비드 및 (c) 투과성 금속제 격막과 고리형 압전소자 디스크로 구성된 피에조 결합체를 포함하는 휴대용 세포파쇄장치, 상기 휴대용 세포파쇄장치를 사용하여 세균을 파쇄하는 방법 및 세균으로부터 DNA를 추출하는 방법에 관한 것이다. 본 발명에서 제공하는 휴대용 세포파쇄장치를 사용하면, 인화성 기체가 존재하는 현장에서도 사용될 수 있고, 크기가 작으며 사용이 간단할 뿐만 아니라, 에너지 효율이 우수하여 적은 전력을 사용하므로, 현장에서 두터운 세포벽을 포함하는 그람 양성 세균과 같은 세균으로부터 DNA를 추출하고 이를 검사함으로써, 보다 효과적으로 세균을 검출 및 분석하는데 활용될 수 있을 것이다.

대표도 - 도1e



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2014R1A1A1003129

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 기초과학사업(학술진흥) - 일반연구자지원사업 - 신진연구

연구과제명 나노 및 자성소자를 이용한 휴대용 In-situ 미생물 모니터링 시스템 개발

기 여 율 1/1

주관기관 이화여자대학교 산학협력단

연구기간 2014.05.01 ~ 2017.04.30

명세서

청구범위

청구항 1

- (a) 수직형 파쇄챔버;
- (b) 상기 파쇄챔버 내에 구비된 비드; 및
- (c) 상기 파쇄챔버의 하단에 구비되고, 투과성 금속제 격막(perforated steel diaphragm)과 고리형 압전소자 디스크(annular piezoelectric disc)로 구성된 피에조 결합체(piezo-assembly)를 포함하는 휴대용 세포파쇄장치.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 투과성 금속제 격막은 상기 고리형 압전소자 디스크의 상단에 위치하고, 중앙 영역에 상기 격막을 관통하는 다수의 구멍이 구비되어 있으며, 상기 구멍이 구비된 영역에 오목한 부위가 포함되도록 구성되는 것인 장치.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 비드의 재질은 열경화성 수지 또는 강화 글래스인 것인 장치.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 비드의 직경은 0.1 내지 2mm이고, 0.1 내지 1g의 총중량이 되도록 하나 이상의 갯수가 사용되는 것인 장치.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 피에조 결합체의 하부에 구비되어 파쇄된 시료를 회수할 수 있는 수집용 챔버 및 상기 피에조 결합체에 전력을 공급하는데 사용되는 전원공급장치로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 구성요소를 추가로 포함하는 것인 장치.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 전원공급장치는 전원, 전원공급장치를 작동하는데 사용되는 제어판넬 및 상기 제어판넬의 작동수준을 표시할 수 있는 LCD 디스플레이를 포함하는 것인 장치.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 휴대용 세포파쇄장치는 시료에 포함된 세균의 DNA를 추출하기 위하여, 상기 세균을 파쇄하는 수단으로 사용되는 것인 장치.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 시료는 세균의 파쇄효율을 향상시킬 수 있는 계면활성제를 추가로 포함하는 것인 장치

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 계면활성제의 농도는 0.1 내지 1.0%(w/v)인 것인 장치.

청구항 10

제8항에 있어서,

상기 계면활성제는 SDS(sodium dodecylsulfate)인 것인 장치.

청구항 11

제7항에 있어서,

상기 세균은 그람음성 세균인 것인 장치.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 그람음성 세균은 펩티도글리칸층이 포함된 세포벽을 갖는 것인 장치.

청구항 13

(a) 제1항 내지 제12항 중 어느 한 항의 휴대용 세포파쇄장치의 수직형 파쇄챔버에 세균을 포함하는 시료를 공급하는 단계; 및

(b) 상기 휴대용 세포파쇄장치를 구동하여 상기 시료에 포함된 세균을 파쇄하고, 파쇄된 세균을 회수하는 단계를 포함하는, 세균의 파쇄방법.

청구항 14

제13항에 있어서,

상기 휴대용 세포파쇄장치를 구동시에 소요되는 전력은 1 내지 3W인 것인 방법.

청구항 15

- (a) 제1항 내지 제12항 중 어느 한 항의 휴대용 세포파쇄장치의 수직형 파쇄챔버에 세균을 포함하는 시료를 공급하는 단계;
- (b) 상기 휴대용 세포파쇄장치를 구동하여 상기 시료에 포함된 세균을 파쇄하고, 파쇄된 세균을 회수하는 단계; 및
- (c) 상기 파쇄된 세균으로부터 DNA를 수득하는 단계를 포함하는, 세균으로부터 DNA를 수득하는 방법.

청구항 16

제15항에 있어서,

- (c) 단계에서, DNA의 수득은 상기 파쇄된 세균을 원심분리하여 상층액을 수득함으로써 수행되는 것인 방법.

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 본 발명은 피에조 결합체를 포함하는 휴대용 세포파쇄장치에 관한 것으로, 보다 구체적으로 본 발명은 (a) 파쇄 챔버, (b) 비드 및 (c) 투과성 금속제 격막과 고리형 압전소자 디스크로 구성된 피에조 결합체를 포함하는 휴대용 세포파쇄장치, 상기 휴대용 세포파쇄장치를 사용하여 세균을 파쇄하는 방법 및 세균으로부터 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 단순 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, 별도의 물리화화학적 공정이 추가되어야 하고, 나중에 계면활성제를 제거하는 추가공정이 필요하며, 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 후에

야 비로소 오염의 원인균을 분석할 수 있다.

[0007] 만일, 오염현장에서 신속하게 오염원인균을 파쇄하여 DNA를 추출할 수 있다면, 상기 오염원인균을 보다 신속하게 규명하여 이에 대비할 수 있을 것으로 기대되고 있다. 그러나, 오염현장에서 오염원인균으로부터 DNA를 추출하기 위하여 상기 오염원인균을 파쇄하는 방법은 지금까지 개발되지 않고 있는 실정이다.

[0008] 이러한 배경하에서, 본 발명자들은 현장에서 오염원인균으로부터 DNA를 용이하게 추출할 수 있도록, 현장에서 채취된 시료에 포함된 세균의 DNA를 신속하게 분석할 수 있는 방법을 개발하고자 예의 연구노력한 결과, 투과성 금속제 격막과 고리형 압전소자 디스크를 포함하는 피에조 결합체를 포함하고, 초음파처리 및 미립자화를 수행하면서 동시에 비드비팅에 의한 기계적 파쇄를 수행하여 시료에 포함된 세균을 파쇄할 수 있는 세포파쇄장치를 사용할 경우, 휴대가 간편할 뿐만 아니라 소모되는 전력을 절감할 수 있어, 현장에서 채취된 시료에 포함된 세균으로부터 효과적이면서도 경제적으로 DNA를 분리 및 분석할 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명의 하나의 목적은 투과성 금속제 격막과 고리형 압전소자 디스크를 포함하는 피에조 결합체를 포함하는 휴대용 세포파쇄장치를 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 다른 목적은 상기 세포파쇄장치를 사용하여 세균을 파쇄하는 방법을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 다른 목적은 상기 세포파쇄장치를 사용하여 세균으로부터 DNA를 수득하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0012] 본 발명자들은 현장에서 채취된 시료에 포함된 세균의 DNA를 신속하게 분석할 수 있는 방법을 개발하고자, 오존을 이용할 경우 세균을 신속하게 파쇄할 수 있다는 점에 착안하여, 오존을 발생시킬 수 있는 마이크로 코로나 방전장치와 이에 공기를 공급할 수 있는 소형 공기펌프를 포함하는 휴대용 세포파쇄장치를 개발한 바 있다. 그러나, 상기 휴대용 세포파쇄장치는 마이크로 코로나 방전장치를 사용하기 때문에 인화성 기체가 존재하는 현장에서는 사용할 수 없다는 문제점이 제기되었다. 뿐만 아니라, 오존을 지속적으로 공급하기 위하여는 마이크로 코로나 방전장치를 지속적으로 구동시켜야 하는데, 이때 전력의 소모량이 많아서 배터리를 사용할 경우, 소량의 시료만을 분석할 수 있다는 문제점이 있었다.

[0013] 이에, 본 발명자들은 인화성 기체가 존재하는 현장에서도 사용할 수 있을 뿐만 아니라, 전력의 소모량을 절감시킬 수 있는 세포파쇄장치를 개발하고자 다양한 연구를 수행하던 중, 압전소자 디스크(piezoelectric disc)에 주목하게 되었다. 상기 압전소자 디스크에 전력을 공급하면, 압전소자 디스크로부터 물리적인 진동이 유발되고, 상기 진동으로 인하여 초음파가 발생할 뿐만 아니라, 상기 압전소자 디스크가 액체와 접촉되어 있는 경우에는, 상기 액체의 미립자화(atomization)를 유도한다고 알려져 있는데, 이러한 압전소자 디스크는 가정용 가습기로부터 하수처리장치에 이르기까지 다양한 분야에서 사용되고 있다. 본 발명자들은 상기 압전소자 디스크와 상기 디스크로부터 유래된 진동을 증폭시킬 수 있는 투과성 금속제 격막으로 구성된 피에조 결합체(piezo-assembly)를 사용할 경우, 상기 피에조 결합체로부터 유발되는 진동으로부터 유래된 초음파 및 미립자화에 의하여 시료에 포함된 세균을 파쇄할 수 있을 뿐만 아니라, 상기 진동을 이용하여 비드비팅을 함께 수행할 경우, 상기 세균의 파쇄효율을 증진시킬 수 있음을 확인하였다.

[0014] 이에, 본 발명자들은 원통형의 수직형 파쇄챔버, 상기 파쇄챔버 내에 구비된 비드 및 상기 투과성 금속제 격막과 고리형의 압전소자 디스크로 구성된 피에조 결합체를 포함하는 휴대용 세포파쇄장치를 제작하였다. 상기 투과성 금속제 격막은 기본적으로 압전소자 디스크로부터 발생된 진동을 증폭시키는 역할을 수행하는데, 상기 격막의 중앙에는 상기 격막을 관통하는 구멍이 구비되어 있어, 상기 구멍을 통해 상기 시료를 방출함과 동시에, 상기 시료가 방출되는 동안 이에 포함된 세균을 파쇄하는 역할을 수행한다. 이때, 파쇄챔버에 구비된 비드는 상기 구멍보다 큰 직경을 갖고 있어, 상기 구멍을 통해 방출되지 않고, 파쇄챔버 내에 잔류하게 된다. 상기 제작된 세포파쇄장치의 상부를 통해 파쇄챔버내로 세균을 포함하는 시료를 가하면, 비드비팅을 통해 시료에 포함된 세균이 기계적으로 파쇄되고, 비드비팅을 통과한 시료는 투과성 금속제 격막의 구멍을 통해 아래로 방출되면서 초음파처리 및 미립자화에 의해 이에 포함된 세균이 추가로 파쇄된다.

[0015] 상기 제작된 장치를 사용하여 시료에 포함된 세균을 파쇄할 때의 파쇄효율을 분석한 결과, 종래의 많은 전력을 소모하는 초음파 처리장치를 사용한 경우의 파쇄효율과 비교하여 별다른 차이를 나타내지 않음을 확인하였다.

뿐만 아니라, 동일한 수준의 파쇄효율로 시료에 포함된 세균을 파쇄할 때, 소모되는 전력을 측정하여 파쇄에너지 효율을 분석한 결과, 4.5배 이상의 에너지 효율을 나타냄을 확인하였다. 뿐만 아니라 장치를 구성함에 있어, 종래의 구성요소보다 경제적인 구성요소를 사용할 수 있으므로, 제작비의 측면에서 약 50% 이하로 소요되는 비용을 절약할 수 있음을 확인하였다.

[0016] 따라서, 본 발명에서 제공하는 휴대용 세균파쇄장치를 사용하면, 종래의 장치를 사용한 경우와 동등한 수준의 세포파쇄효율을 나타내면서도, 전력소모량을 현저하게 절감시킬 수 있음을 확인하였으므로, 인화성 기체가 존재하는 현장에서도 소량의 전력을 소모하여 시료에 포함된 세균으로부터 보다 효과적으로 DNA를 추출하고 이를 검사하는데 사용될 수 있음을 알 수 있었다.

[0017] 상술한 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 하나의 양태로서 (a) 수직형 파쇄챔버; (b) 상기 파쇄챔버 내에 구비된 비드; 및 (c) 상기 파쇄챔버의 하단에 구비되고, 투과성 금속제 격막(perforated steel diaphragm)과 고리형 압전소자 디스크(annular piezoelectric disc)로 구성된 피에조 결합체(piezo-assembly)를 포함하는 휴대용 세포파쇄장치를 제공한다.

[0018] 상기 휴대용 세포파쇄장치에 구비된 각 구성요소에 대하여 구체적으로 설명하면 다음과 같다:

[0019] 먼저, 수직형 파쇄챔버는 상부에 개구부를 형성하고, 하부에 투과성 금속제 격막이 구비된 형태의 원통형의 챔버로서, 세균을 포함하는 시료가 최초 투입되는 구성요소를 의미하는데, 여기서 시료에 포함된 세균을 대상으로 비드비팅을 수행할 뿐만 아니라, 피에조 결합체로 전달되기 전까지 시료에 포함된 세균을 잔류시키는 공간으로서의 역할을 수행할 수 있다. 상기 파쇄챔버는 내부에서 수행되는 비드비팅에 의한 충격을 견딜수 있는 한, 이를 구성하는 재질이 특별히 제한되지 않으나, 일 예로서, 내부에 담겨진 시료수준 및 비드비팅의 상태를 외부에서 관찰할 수 있도록 투명성을 제공할 수 있는 재질을 사용할 수 있고, 다른 예로서, 상기 투명성을 제공하면서도, 파쇄된 세포로부터 유래된 유전자와 세포내 물질이 지나치게 흡착되지 않는 플라스틱 재질, 아크릴 재질, 유리재질 등을 사용할 수 있다.

[0020] 상기 파쇄챔버에는 현장에서 수득한 세균이 포함된 것으로 예상되는 액상시료가 가하여 질 수 있는데, 상기 액상시료에 포함된 세균은 본 발명의 휴대용 세포파쇄장치에 의하여 파쇄되어 DNA를 방출할 수 있는 한, 특별히 이에 제한되지 않으나, 일 예로서, 세균성 포자, 진균류, 그람양성 세균류 등이 될 수 있고, 다른 예로서 펩티도글리칸층이 포함된 세포벽을 갖고 있어 세포벽의 파쇄가 용이하지 않은 그람양성 세균이 될 수 있으며, 또 다른 예로서, 두터운 펩티도글리칸층이 포함된 세포벽을 갖는 호기성 그람양성 세균이 될 수 있고, 이보다 상대적으로 얇은 세포벽을 갖는 호기성 그람음성 세균도 포함할 수 있다. 예를 들어, 본 발명에서는 두터운 펩티도글리칸층이 포함된 세포벽을 갖는 호기성 그람양성 세균인 바실러스 서브틸리스 균주를 예시적으로 사용하였다.

[0021] 아울러, 상기 시료에 포함된 세균의 파쇄효율을 향상시키기 위하여, 상기 시료에 계면활성제를 추가할 수 있다. 상기 계면활성제는 본 발명의 휴대용 세포파쇄장치를 사용하여 시료에 포함된 세균의 파쇄효율을 향상시킬 수 있는 한 특별히 이에 제한되지 않으나, 일 예로서, 양이온성 계면활성제, 음이온성 계면활성제 또는 비이온성 계면활성제를 사용할 수 있고, 다른 예로서, SDS(sodium dodecylsulfate), CTAB(Cetyl trimethylammonium bromide), DTAB(dodesyltrimethylammonium bromide), Triton X-100, CHAPS((3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propane- sulphonate)) 등을 사용할 수 있으며, 또 다른 예로서, 음이온성 계면활성제인 SDS, CTAB, DTAB 등을 사용할 수 있다.

[0022] 또한, 상기 계면활성제의 처리량 역시 특별히 이에 제한되지 않으나, 일 예로서, 0.1 내지 1.0%(w/v)가 되도록 시료에 첨가될 수 있고, 다른 예로서, 0.25 내지 내지 1.0%(w/v)가 되도록 시료에 첨가될 수 있으며, 또 다른 예로서 0.5%(w/v)가 되도록 시료에 첨가될 수 있다. 이때, 상기 계면활성제의 처리량이 1.0%(w/v) 이상인 경우, 계면활성제로 인하여 발생된 과다한 거품으로 인하여 세균의 파쇄효율이 오히려 감소할 수 있다.

[0023] 다음으로, 비드는 상기 파쇄챔버 내에 잔류하여 피에조 결합체의 진동에 의하여 불규칙적으로 이동함으로써 시료에 포함된 세균을 기계적으로 파쇄하는 비드비팅을 수행할 수 있는 직접적인 수단으로 사용되는데, 비드비팅의 효율을 향상시키기 위하여 다수의 비드가 사용될 수 있다.

[0024] 상기 비드는 대체로 구형의 입자형태를 갖는 것이 될 수 있는데, 상기 비드의 직경은 피에조 결합체로부터 유발된 진동에 의하여 쉽게 이동할 수 있는 한 특별히 이에 제한되지 않으나, 일 예로서, 상기 비드의 직경은 0.1 내지 2mm가 될 수 있고, 다른 예로서, 상기 비드의 직경은 1mm가 될 수 있다.

[0025] 상기 비드의 개별적인 중량은 피에조 결합체로부터 유발된 진동에 의하여 쉽게 이동할 수 있는 한 특별히 이에 제한되지 않으나, 일 예로서, 상기 비드의 개별적인 중량은 1 내지 10mg이 될 수 있고, 다른 예로서, 상기 비드

의 중량은 5 내지 6mg이 될 수 있다.

- [0026] 상기 비드의 사용갯수 역시 피에조 결합체로부터 유발된 진동에 의하여 쉽게 이동할 수 있는 한 특별히 이에 제한되지 않으나, 일 예로서, 15 내지 100개의 비드를 사용할 수 있고, 다른 예로서, 20 내지 80개의 비드를 사용할 수 있으며, 또 다른 예로서, 50개의 비드를 사용할 수 있다.
- [0027] 아울러, 사용되는 비드의 총 중량 역시 피에조 결합체로부터 유발된 진동에 의하여 쉽게 이동할 수 있는 한 특별히 이에 제한되지 않으나, 일 예로서, 0.1 내지 1g이 될 수 있고, 다른 예로서 0.1 내지 0.5g이 될 수 있으며, 또 다른 예로서 0.5g이 될 수 있다.
- [0028] 또한, 상기 비드의 재질은 비드비팅에 의해 유발되는 충격에 의하여 손상되지 않는 수준의 경도를 나타낼 수 있으며, 시료에 포함된 세균 또는 파쇄된 세균으로부터 유래된 성분과 결합하지 않거나 또는 비특이적으로 결합하여 세척이 용이한 재질로 구성될 수 있다. 일 예로서, 상기 비드는 페놀수지, 요소수지, 멜라민수지, 에폭시수지, 폴리에스터수지 등의 다양한 열경화성 수지 또는 강화 글래스 등의 재질로 제작된 것을 사용할 수 있다.
- [0029] 예를 들어, 본 발명에서는 1mm의 직경을 갖는 글래스 비드를 0.5g의 총중량으로 사용하였다.
- [0030] 다음으로, 상기 피에조 결합체는 투과성 금속제 격막과 고리형 압전소자 디스크로 구성되며, 상기 투과성 금속제 격막이 고리형 압전소자 디스크의 상단에 결합된 형태로 구성되어, 상기 수직형 파쇄챔버가 투과성 금속제 격막에 위치하여 결합되도록 구성될 수 있다. 상기 피에조 결합체는 고리형 압전소자 디스크로부터 발생된 진동을 증폭시켜서 상기 증폭된 진동에 의하여 유발된 초음파를 시료내에 포함된 세균에 처리할 뿐만 아니라, 상기 진동을 이용하여 세균을 포함하는 시료를 미립자화시켜서 세균을 파쇄시키는 역할을 수행한다. 아울러, 피에조 결합체를 통해 증폭된 진동은 비드비팅을 수행하는 원인이 되기도 한다. 특히, 통상적으로 알려진 초음파 가습기와 같이, 피에조 결합체를 사용하여 액상성분이 미립자화되는 현상은 공지되어 있는데, 상기 미립자화에는 부피의 급격한 팽창이 수반되고, 이러한 팽창으로 인한 압력이 시료에 포함된 세균에 가하여져서, 상기 압력으로 인하여 세균이 파쇄될 수 있다.
- [0031] 상기 피에조 결합체를 형성하는 주요 구성요소인 투과성 금속제 격막과 고리형 압전소자 디스크를 보다 구체적으로 설명하면 다음과 같다.
- [0032] 상기 피에조 결합체를 구성하는 투과성 금속제 격막은 상기 파쇄챔버와 고리형 압전소자 디스크의 가운데 위치하고, 중앙 영역에 상기 격막을 관통하는 다수의 구멍이 구비되어 있으며, 상기 구멍이 구비된 영역에 오목한 부위가 포함되도록 구성될 수 있다. 상기 투과성 금속제 격막은 고리형 압전소자 디스크로부터 발생된 진동을 증폭시켜서 이에 의하여 유발되는 초음파처리 및 미립자화의 효율을 증가시키는 역할을 수행한다. 특히, 상기 구멍은 파쇄챔버에 잔류하는 시료를 아래쪽으로 방출함과 동시에 상기 증폭된 진동을 시료에 포함된 세균에 직접적으로 전달하여, 초음파처리 및 미립자화를 통한 세균의 파쇄효율을 더욱 증가시킬 수 있다. 뿐만 아니라, 상기 구멍의 직경은 상기 시료가 상기 구멍을 통하여 흐르듯이 통과하지 않고, 표면장력에 의하여 물방울 형태로 맺혀서 통과할 수 있는 크기를 갖을 수 있다. 즉, 상기 구멍은 세균을 포함하는 시료의 방출속도를 최적화할 수 있는데, 상기 구멍의 직경이 너무 크면, 시료가 너무 빨리 방출되어 이에 포함된 세균의 파쇄효율이 저하되고, 상기 구멍의 직경이 너무 작으면 시료의 방출이 지체되어, 세균의 파쇄에 소요되는 시간이 과도하게 증가된다. 이에 따라, 적절한 방출속도를 유지할 수 있는 구멍의 직경은 특별히 이에 제한되지 않으나, 일 예로서, 5 내지 50 μ m가 될 수 있고, 다른 예로서 20 μ m가 될 수 있다.
- [0033] 또한, 상기 오목한 부위는 고리형 압전소자 디스크로부터 발생된 단방향성 진동을 복합진동으로 전환시키는 역할을 수행한다. 즉, 고리형 압전소자 디스크로부터 발생된 진동은 단방향성 진동이므로, 단순한 막 형태의 투과성 금속제 격막을 통해 상기 진동이 증폭된다 하여도 단방향성 진동이라는 속성이 변화되지는 않는다. 그러나, 상기 투과성 금속제 격막은 단순한 막 형태가 아니라 중앙부에 오목한 부위가 포함되어 있어, 상기 오목한 부위의 표면을 따라 진동이 증폭되는 경우에는 단방향성 진동이 다양한 방향성을 나타내는 복합진동으로 전환되며, 이러한 복합진동은 초음파 처리와 미립자화의 효율을 증진시킬 수 있을 뿐만 아니라, 상기 비드를 이용한 비드비팅의 효율을 증진시킬 수 있다. 특히, 다양한 방향성을 나타내는 진동에 의하여 비드의 운동방향이 다양하게 변화될 수 있으므로, 이에 의하여 비드비팅의 효율을 증진시킬 수 있다.
- [0034] 아울러, 상기 투과성 금속제 격막은 상기 특성을 갖는 구멍이 구비될 수 있으면서도 비드비팅으로 인한 충격을 견딜 수 있는 금속재질로 구성될 수 있다.
- [0035] 끝으로, 상기 피에조 결합체를 구성하는 고리형 압전소자 디스크는 전력의 공급에 의하여 진동을 발생시키고, 상기 발생된 진동은 투과성 금속제 격막을 통해 증폭되어 초음파처리 및 미립자화를 유발시켜서 시료에 포함된

세균을 파쇄하는 직접적인 수단으로 사용된다. 상술한 바와 같이, 진동으로 인하여 유발되는 초음파는 시료에 포함된 세균에 가하여져서, 세균을 파쇄할 수 있고, 진동에 의해 시료를 미립자화하여 부피의 팽창에 의한 압력으로 세균을 파쇄할 수 있다.

- [0036] 상기 고리형 압전소자 디스크는 피에조 결합체를 구성하여 상술한 피에조 결합체의 기능을 수행하게 할 수 있는 한 특별히 이에 제한되지 않으나, 일 예로서 공지된 납, 지르콘 및 티타늄으로 구성된 합금인 PZT(lead zirconia titanate)를 이용하여 제작된 것을 사용할 수 있는데, 상기 투과성 금속제 격막의 구멍이 형성된 부위에 상응하는 부위에 빈 공간이 형성된 고리형태로 제작된 것을 사용할 수 있다.
- [0037] 따라서, 상기 투과성 금속제 격막과 고리형 압전소자 디스크로 구성된 피에조 결합체는 시료에 포함된 세균을 파쇄하는 주된 수단을 제공하므로, 본 발명에서 제공하는 휴대용 세포파쇄장치의 핵심적인 역할을 수행하는 구성요소가 될 수 있다.
- [0038] 한편, 본 발명에서 제공하는 휴대용 세포파쇄장치는 상기 구성요소 이외에, 세균파쇄를 보다 효율적으로 수행하는데 사용될 수 있는 추가적인 구성요소를 포함할 수 있는데, 상기 추가적인 구성요소는 상기 고리형 압전소자 디스크의 하부에 구비되어 파쇄된 시료를 회수할 수 있는 수집용 챔버, 상기 고리형 압전소자 디스크에 전력을 공급하는데 사용되는 전원공급장치 등이 될 수 있다. 특히, 전원공급장치는 특별히 이에 제한되지 않으나, 전원, 전원공급장치를 작동하는데 사용되는 제어판넬, 상기 제어판넬의 작동수준을 표시할 수 있는 LCD 디스플레이 등으로 구성될 수 있다.
- [0039] 본 발명의 일 실시예에 의하면, 수직형 파쇄챔버의 하부에, 투과성 금속제 격막과 이의 하부에 고리형 압전소자 디스크가 결합된 형태의 피에조 결합체를 결합시켜서, 세포파쇄장치를 제작하였다(도 1a 내지 1e).
- [0040] 상술한 세포파쇄장치는 이에 포함된 고리형 압전소자 디스크의 자체적인 진동에 의해 구동되기 때문에, 종래의 세포파쇄장치에 비하여 상대적으로 단순한 구조를 갖는다. 따라서, 상기 세포파쇄장치에 포함된 파쇄챔버와 피에조 결합체의 크기를 자유롭게 확대시키거나 축소시켜서, 다양한 크기를 갖도록 제작될 수 있다. 특히, 상기 세포파쇄장치를 축소시킬 경우, 사람의 손바닥 위에 올라갈 수 있는 크기(가로 10cm, 세로 10cm, 높이 1.2cm)를 갖는 세포파쇄장치를 제작할 수 있을 뿐만 아니라, 이의 구동시에 소요되는 전력도 1회 당 약 2W에 불과하여, 휴대폰 배터리 크기의 소규모의 전원을 사용하여도 충분히 전력을 공급할 수 있으므로, 이의 휴대성을 현저히 향상시킬 수 있다.
- [0041] 따라서, 본 발명의 세포파쇄장치는 현장에서 수집된 세균을 포함하는 시료를 그 자리에서 직접파쇄하는데 사용할 수 있는 휴대용 세포파쇄장치로서 사용될 수 있다는 장점을 나타낸다.
- [0042] 본 발명은 다른 양태로서, 상기 휴대용 세포파쇄장치를 사용하여 세균을 파쇄하는 방법을 제공한다. 구체적으로, 본 발명에서 제공하는 세균의 파쇄방법은 (a) 상기 휴대용 세포파쇄장치의 수직형 파쇄챔버에 세균을 포함하는 시료를 공급하는 단계; 및 (b) 상기 휴대용 세포파쇄장치를 구동하여 상기 시료에 포함된 세균을 파쇄하고, 파쇄된 세균을 회수하는 단계를 포함한다.
- [0043] 상기 방법에 있어서, (a) 단계에서 사용되는 시료는 현장에서 수집된 시료를 그대로 사용하거나 또는 상기 수집된 시료에 SDS와 같은 계면활성제를 처리한 것을 사용할 수도 있다. 상기 계면활성제를 처리한 시료를 사용하면, 시료에 포함된 세균의 파쇄효율을 향상시킬 수 있다.
- [0044] 또한, (b) 단계에서 휴대용 세포파쇄장치의 구동은 상기 피에조 결합체의 구동에 의해 수행되는데, 상기 피에조 결합체에서 발생된 진동에 의하여 비드비팅, 초음파처리 및 미립자화가 동시에 수행되어, 시료에 포함된 세균을 파쇄하게 된다. 상기 휴대용 세포파쇄장치에 공급된 시료는 다양한 수단에 의해 이에 포함된 세균이 파쇄된 후, 중력에 의하여 상기 피에조 결합체의 하부로 방출되는데, 상기 피에조 결합체의 하부에 구비되는 수집용 챔버를 사용하면, 파쇄된 세균을 용이하게 회수할 수 있다. 이때, 소요되는 전력은 특별히 이에 제한되지 않으나 일 예로서 1 내지 3W가 될 수 있고, 다른 예로서 2W가 될 수 있다.
- [0045] 본 발명의 일 실시예에 의하면, 상기 세포파쇄장치를 단독으로 사용하거나, 글래스 비드를 가하여 비드비팅과 함께 사용하거나 또는 SDS가 처리된 시료를 이용하여 세포파쇄장치를 사용함으로써, 두터운 펩티도글리칸 층을 포함하는 바실러스 서브틸리스 균주를 각각 파쇄한 결과, 세포파쇄장치를 단독으로 사용한 경우에 얻어진 세포파쇄율은 순수한 비드비팅 방법 및 초음파처리 방법을 통해 얻어진 세포파쇄율의 중간값을 나타내었고(도 2), 글래스 비드를 가하여 비드비팅과 함께 사용한 경우에 얻어진 세포파쇄율은 비드의 직경(도 3a) 또는 부가수준(도 3b)이 증가할 수록 증가하며, SDS가 처리된 시료를 이용하면 SDS의 농도에 비례하여 세포파쇄율이 증가하는

양상을 나타냄을 확인하였다(도 4).

- [0046] 아울러, 상기 파쇄시에 소요된 에너지효율을 비교하면, 상기 세포파쇄장치를 단독으로 사용한 경우에는 초음파 처리를 수행한 것에 비하여 에너지 효율이 약 1.7배 증가하였고, 상기 세포파쇄장치에 글래스 비드를 부가하여 비드비팅을 추가로 수행하거나 또는 SDS를 처리한 경우에는 대조군 대비 파쇄에너지 효율이 각각 약 4.8배 또는 약 5.0배 증가함을 알 수 있었다. 특히, 상기 세포파쇄장치에 글래스 비드를 부가하거나 SDS를 처리한 경우에는 세포파쇄율의 측면에서 대조군과 동등한 수준을 나타내면서도, 파쇄에너지 효율이 현저하게 증가됨을 알 수 있었다(표 1).
- [0047] 상술한 바와 같이, 휴대용 세포파쇄장치를 사용하여 시료에 포함된 세균을 파쇄하면, 공지된 초음파처리 장치를 사용하여 세균을 파쇄할 경우보다고, 소모되는 전력대비 세포파쇄효율이 현저히 증가됨을 알 수 있다.
- [0048] 예를 들어, 통상적으로 사용되는 휴대폰의 배터리(3.8 V 11.78 Wh 3100 mAh)를 전원으로 사용할 경우를 상정하면, 이로부터 산출되는 전력에너지의 약 50%를 사용할 수 있다고 가정할 때, 실제로 사용가능한 전기에너지는 약 21204 J이다. 상기 약 21204 J의 전기에너지를 사용하여 1회 구동시에 10W의 전력이 소모되는 초음파 처리 장치를 구동시키면 92번 동안 반복구동할 수 있는 반면, 1회 구동시에 2W의 전력이 소모되는 본 발명의 휴대용 세포파쇄장치를 구동시키면 460번 동안 반복구동할 수 있다. 즉, 본 발명에서 제공하는 휴대용 세포파쇄장치는 소모전력이 20%에 불과하므로, 사용회수가 5배 증가되기 때문에, 보다 많은 양의 시료에 포함된 세균을 파쇄하는데 사용될 수 있다.
- [0049] 이처럼, 본 발명에서 제공하는 휴대용 세포파쇄장치를 사용하면 적은 양의 전력을 사용하여 보다 많은 양의 세균을 파쇄할 수 있으므로, 휴대용으로 사용할 수 있을 뿐만 아니라 절전형 세포파쇄장치로서도 사용될 수 있다는 장점을 나타낸다.
- [0050] 본 발명은 또 다른 양태로서, 상기 휴대용 세포파쇄장치를 사용하여 세균으로부터 DNA를 획득하는 방법을 제공한다. 구체적으로, 본 발명에서 제공하는 세균으로부터 DNA를 획득하는 방법은 (a) 상기 휴대용 세포파쇄장치의 수직형 파쇄챔버에 세균을 포함하는 시료를 공급하는 단계; (b) 상기 휴대용 세포파쇄장치를 구동하여 상기 시료에 포함된 세균을 파쇄하고, 파쇄된 세균을 회수하는 단계; 및 (c) 상기 파쇄된 세균으로부터 DNA를 획득하는 단계를 포함한다. 이때, 상기 (a) 및 (b) 단계는 상술한 바와 동일하다.
- [0051] 상기 (c) 단계에 있어서, 시료로부터 DNA를 획득하는 방법은 특별히 이에 제한되지 않으나, 일례로서 파쇄된 세균을 포함하는 시료를 원심분리하여 DNA를 포함하는 상층액을 획득하는 방법을 사용할 수 있는데, 이때 원심 분리 조건은 파쇄된 세균으로부터 DNA 분획을 분리할 수 있는 한 특별히 제한되지 않고, 본 발명의 범주에서 당업자에게 공개된 모든 조건을 사용할 수 있다.
- [0052] 또한, 상기 획득한 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

- [0053] 본 발명에서 제공하는 휴대용 세포파쇄장치를 사용하면, 인화성 기체가 존재하는 현장에서도 사용될 수 있고, 크기가 작으며 사용이 간단할 뿐만 아니라, 에너지 효율이 우수하여 적은 전력을 사용하므로, 현장에서 두터운 세포벽을 포함하는 그람 양성 세균과 같은 세균으로부터 DNA를 추출하고 이를 검사함으로써, 보다 효과적으로 세균을 검출 및 분석하는데 활용될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0054] 도 1a는 본 발명에서 제공하는 휴대용 세포파쇄장치의 형태를 나타내는 사진이다.
- 도 1b는 본 발명에서 제공하는 휴대용 세포파쇄장치에 포함된 피에조 결합체를 구성하는 투과성 금속제 격막을 나타내는 사진이다.
- 도 1c는 본 발명의 투과성 금속제 격막의 일부를 확대한 사진이다.
- 도 1d는 피에조 결합체를 구성하는 투과성 금속제 격막에 포함된 구멍의 역할을 나타내는 개략도이다.
- 도 1e는 본 발명에서 제공하는 세포파쇄장치를 이용하여 세균을 파쇄하는 방법을 나타내는 개략도이다.
- 도 1f는 본 발명의 세포파쇄장치에 적용되어, 최종적으로 시료 수집용기(sample collection vial)에 회수된 미

립자화된 시료(atomized bacterial sample)를 나타내는 사진이다.

도 2는 본 발명에서 제공하는 세포파쇄장치, 공지된 비드비팅 방법 또는 공지된 초음파처리 방법을 사용하여 파쇄된 세균의 세포파쇄율을 비교한 결과를 나타내는 그래프로서, 점선은 비드비팅 방법으로 파쇄된 세균의 세포파쇄율을 나타내고, 실선은 초음파처리 방법으로 파쇄된 세균의 세포파쇄율을 나타낸다.

도 3a는 본 발명에서 제공하는 세포파쇄장치의 수직형 파쇄챔버에 다양한 직경(0.1, 0.5 및 1.0 mm)의 글래스 비드를 부가하여, 피에조 결합체로부터 유발된 초음파처리와 미립자화 및 비드비팅을 동시에 수행함으로써 얻어진 세포파쇄율을 비교한 결과를 나타내는 그래프로서, 도 2와 마찬가지로 점선은 비드비팅 방법으로 파쇄된 세균의 세포파쇄율을 나타내고, 실선은 초음파처리 방법으로 파쇄된 세균의 세포파쇄율을 나타낸다.

도 3b는 본 발명에서 제공하는 세포파쇄장치의 수직형 파쇄챔버에 1.0 mm의 글래스 비드를 서로 다른 수준(0.1, 0.2 및 0.5 g)으로 부가하여, 피에조 결합체로부터 유발된 초음파처리와 미립자화 및 비드비팅을 동시에 수행함으로써 얻어진 세포파쇄율을 비교한 결과를 나타내는 그래프로서, 도 2와 마찬가지로 점선은 비드비팅 방법으로 파쇄된 세균의 세포파쇄율을 나타내고, 실선은 초음파처리 방법으로 파쇄된 세균의 세포파쇄율을 나타낸다.

도 4는 다양한 농도(0, 0.1, 0.25, 0.5 및 1.0%)의 SDS가 처리된 시료를 본 발명에서 제공하는 세포파쇄장치로 파쇄하여 얻어진 세포파쇄율을 비교한 결과를 나타내는 그래프로서, 도 2와 마찬가지로 점선은 비드비팅 방법으로 파쇄된 세균의 세포파쇄율을 나타내고, 실선은 초음파처리 방법으로 파쇄된 세균의 세포파쇄율을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0055] 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.

[0056] 실시예 1: 피에조 결합체를 포함하는 세포파쇄장치의 제작

[0057] 먼저, 투과성 금속제 격막(perforated steel diaphragm)을 준비하고, 상기 투과성 금속제 격막의 하부에 실리콘 링 봉인을 통해 고리형 압전소자 디스크(annular piezoelectric disc)를 결합시킨 형태의 피에조 결합체(piezo-assembly)를 수득하였다.

[0058] 다음으로, 상기 피에조 결합체를 구성하는 투과성 금속제 격막의 위쪽에 실리콘 링 봉인을 통해 수직형 파쇄챔버(lysing chamber)의 하부를 결합시킨 후, 상기 파쇄챔버에 글래스 비드(glass bead)를 부가하여, 휴대용 세포파쇄장치를 제작하였다(도 1a 내지 1f). 도 1a는 본 발명에서 제공하는 휴대용 세포파쇄장치의 형태를 나타내는 사진이다.

[0059] 또한, 도 1b는 본 발명에서 제공하는 휴대용 세포파쇄장치에 포함된 피에조 결합체를 구성하는 투과성 금속제 격막을 나타내는 사진이다. 도 1b에서 보듯이, 상기 투과성 금속제 격막(두께 약 0.1mm, 직경 약 16mm)은 중앙에 다수의 관통하는 구멍(through-hole)이 구비되어 있는데, 상기 구멍의 직경은 약 20 μ m이고 구멍 사이의 간격은 약 100 μ m가 되도록 설정하였다. 상기 구멍이 구비된 영역은 중앙부의 약 5mm의 직경을 갖는 원형부위로 설정하였는데, 상기 원형부위의 중심에는 약간 오목한 부위가 구비된 약 3mm의 직경을 갖는 원형부위가 포함되도록 하였다. 상기 오목한 부위는 피에조 결합체에 의하여 발생한 진동을 비평면성 진동으로 전환시켜서, 보다 효과적인 미립자화를 수행할 수 있게 한다.

[0060] 도 1c는 본 발명의 투과성 금속제 격막의 일부를 확대한 사진이고, 도 1d는 피에조 결합체를 구성하는 투과성 금속제 격막에 포함된 구멍의 역할을 나타내는 개략도이다. 도 1c 및 1d에서 보듯이, 상기 피에조 결합체를 구성하는 투과성 금속제 격막에 포함된 구멍은 글래스 비드보다 작은 직경을 갖기 때문에, 상기 구멍을 통해 파쇄된 세균을 포함하는 시료를 아래쪽으로 방출될 수 있으나, 글래스 비드는 방출될 수 없도록 구성하였다.

[0061] 또한, 고리형 압전소자 디스크는 PZT(lead zirconia titanate)로 제작된 두께 약 0.65mm, 내측직경 약 8mm 및 외측직경 약 16mm로 구성되고, 가운데 부분이 없는 고리형태의 것을 사용하였다. 상기 고리형 압전소자 디스크에 전력을 공급하면 진동이 유발되는데, 상기 진동은 투과성 금속제 격막으로 전달되어 증폭됨과 동시에 비평면성 진동으로 전환되어, 세균에 대한 초음파처리 및 미립자화를 유발시킨다.

[0062] 도 1e는 본 발명에서 제공하는 세포파쇄장치를 이용하여 시료에 포함된 세균을 파쇄하는 방법을 나타내는 개략도이다. 도 1e에서 보듯이, 피펫(pipette)으로 수직형 파쇄챔버(lysing chamber)에 세균을 포함하는 시료(bacterial sample)를 가하고, 제어판(driving circuit)을 통해 세포파쇄장치를 구동시키면, 피에조 결합체를 구성하는 고리형 압전소자 디스크가 진동한 다음, 상기 진동이 투과성 금속제 격막을 통해 증폭되고 복합진동으로

로 전환되어, 상기 세균을 포함하는 시료에 초음파처리를 수행함과 동시에 시료의 미립자화를 유도하여 상기 시료에 포함된 세균을 파쇄하고, 상기 시료는 상기 피에조 결합체를 구성하는 투과성 금속제 격막에 구비된 관통하는 구멍(through-hole array)을 통해 하부로 이동하여 미립자화된 시료(atomized bacterial sample)를 형성하며, 상기 미립자화된 시료는 시료 수집용기(sample collection vial)에 회수된다(도 1f). 도 1f는 본 발명의 세포파쇄장치에 적용되어, 최종적으로 시료 수집용기(sample collection vial)에 회수된 미립자화된 시료(atomized bacterial sample)를 나타내는 사진이다.

[0063] 한편, 상기 파쇄챔버 내에 글래스 비드(glass bead)를 가하면, 고리형 압전소자 디스크에 의해 발생된 진동으로 인하여 비드비팅(bead beating)이 추가로 수행될 수 있다. 이처럼 초음파 처리, 미립자화 및 비드비팅이 동시에 수행될 경우, 상기 시료가 투과성 금속제 격막을 통해 방출되는 속도는 40 ml/h 이하가 되도록 설계하였다.

[0064] 결과적으로, 세포파쇄장치는 약 10 cm × 10 cm × 12 cm의 크기를 나타내고, Instrustar ISDS205B 오실로스코프가 구비된 전원공급장치를 사용하여 구동될 수 있도록 제작되었다. 상기 오실로스코프를 통하여, 상기 제작된 세포파쇄장치는 약 12 Vpp 및 약 100 KHz에서 약 50%의 사용율을 나타내는 구형파의 형태로 진동을 유발시킴을 확인하였는데, 이때 소모되는 전체적인 전력소비량은 약 2W임을 확인하였다.

[0065] 실시예 2: 세포파쇄장치를 이용한 세포파쇄의 효율분석

[0066] 실시예 2-1: 세균을 포함하는 시료의 준비

[0067] 두터운 펩티도글리칸 층을 포함하여 기계적인 파쇄가 어렵다고 알려진 바실러스 서브틸리스 균주(ATCC 6051)를 대상으로 상기 세포파쇄장치의 파쇄효율을 평가하였다.

[0068] 상기 균주를 LB 배지(Difco Laboratories, Detroit, MI, USA)에서 접종하고, 160 rpm으로 교반하면서 배양하고, 상기 배양물을 원심분리하여 세균을 수득하였으며, 상기 수득한 세균을 0.1 moles/L PBS로 2회 세척한 다음, 동일한 용액에 현탁시켜서 현탁액을 수득하였다. 상기 현탁액의 흡광도(OD₆₀₀)값을 측정한 결과, 흡광도가 1.4인 경우 세균의 함량이 0.5 g/L임을 확인하고, 이하에서는 상기 현탁액을 세균을 포함하는 시료로서 사용하였다.

[0069] 실시예 2-2: 고리형 압전소자 디스크로부터 유발된 초음파처리와 미립자화를 이용한 세포파쇄의 효율분석

[0070] 상기 세균을 포함하는 시료 250 μl를 세포파쇄장치의 수직형 파쇄챔버에 가하고, 글래스 비드는 가하지 않은 상태로 약 2W의 전력을 가하여 상기 세포파쇄장치를 구동시키고, 파쇄된 세균은 수집용 바이알을 이용하여 회수하였다. 이때, 미립자화 속도를 약 40 ml/h 또는 10.9 μl/s가 되도록 설정하여, 250 μl 시료의 총 잔류시간은 약 23초가 되도록 하였다. 또한, 비교군으로서 동일한 세균을 포함하는 시료를 대상으로 0.1 mm의 글래스 비드 0.5 g을 사용하여 3000 rpm으로 비드비팅을 23초간 수행하여 파쇄된 세균 및 동일한 시료를 초음파 분쇄기(P-1 microprobe가 장착된 ultrasonic dismembrator)에 적용하여 10 W로 23초간 처리하여 파쇄된 세균을 사용하였다.

[0071] 상기 파쇄된 각 세균을 14000 rpm 으로 1분동안 원심분리하여 잔류물이 제거된 상층액을 수득하고, 분광광도계(UV/VIS spectrophotometer ASP-2680)를 사용하여 260 nm에서 흡광도를 측정함으로써 DNA 농도를 측정하였으며, 측정된 DNA 농도를 하기 식에 적용하여, 세포파쇄율을 산출하였다(도 2).

[0072] 세포파쇄율(%) = (파쇄된 세균에서 얻어진 DNA 농도 - 음성대조군에서 얻어진 DNA 농도)/(양성대조군에서 얻어진 DNA 농도) × 100

[0073] 상기 식에서, 음성대조군은 동일한 시료를 14,000 rpm으로 1분동안 원심분리하여 수득한 상층액이고, 양성대조군은 동일한 시료를 초음파 분쇄기에 적용하여 10 W로 1분간 처리한 다음, 이를 원심분리하여 수득한 상층액이다.

[0074] 도 2는 본 발명에서 제공하는 세포파쇄장치, 공지된 비드비팅 방법 또는 공지된 초음파처리 방법을 사용하여 파쇄된 세균의 세포파쇄율을 비교한 결과를 나타내는 그래프로서, 점선은 비드비팅 방법으로 파쇄된 세균의 세포파쇄율을 나타내고, 실선은 초음파처리 방법으로 파쇄된 세균의 세포파쇄율을 나타낸다. 도 2에서 보듯이, 본 발명에서 제공하는 세포파쇄장치를 사용하여 파쇄된 세균의 세포파쇄율은 약 23.14±1.90%이며, 이는 비드비팅 방법을 통해 얻어진 세포파쇄율(9.82±0.38%)과 초음파처리 방법을 통해 얻어진 세포파쇄율(65.58±1.84%)의 중간값임을 확인하였다.

[0075] 실시예 2-3: 고리형 압전소자 디스크로부터 유발된 초음파처리와 미립자화 및 비드비팅을 동시에 수행한 세포파

쇄의 효율분석

- [0076] 상기 세포파쇄장치의 수직형 파쇄챔버에 다양한 직경(0.1, 0.5 및 1.0 mm)의 글래스 비드 2g을 부가하거나 또는 1.0 mm의 글래스 비드를 서로 다른 수준(0.1, 0.2 및 0.5 g)으로 부가하여 비드비팅을 동시에 수행하는 것을 제외하고는, 상기 실시예 2-2와 동일한 방법을 수행하고, 이로부터 얻어진 파쇄된 세균을 사용하여 세포파쇄율을 분석하였다(도 3a 및 3b).
- [0077] 도 3a는 본 발명에서 제공하는 세포파쇄장치의 수직형 파쇄챔버에 다양한 직경(0.1, 0.5 및 1.0 mm)의 글래스 비드를 부가하여, 피에조 결합체로부터 유발된 초음파처리와 미립자화 및 비드비팅을 동시에 수행함으로써 얻어진 세포파쇄율을 비교한 결과를 나타내는 그래프로서, 도 2와 마찬가지로 점선은 비드비팅 방법으로 파쇄된 세균의 세포파쇄율을 나타내고, 실선은 초음파처리 방법으로 파쇄된 세균의 세포파쇄율을 나타낸다. 도 3a에서 보듯이, 세포파쇄장치의 수직형 파쇄챔버에 글래스 비드를 부가하여 비드비팅을 동시에 수행하면, 비드의 크기에 상관없이 비드를 부가하지 않은 경우($23.14 \pm 1.90\%$)보다도 세포파쇄율이 증가함($46.06 \pm 5.25\%$, $56.55 \pm 1.20\%$ 및 $58.74 \pm 3.55\%$)을 확인하였다.
- [0078] 또한, 비드의 직경크기와 세포파쇄율의 상관관계를 분석한 결과, 비드의 직경이 증가할 수록 세포파쇄율이 증가함을 확인하였다. 다만, 비드의 직경을 0.5mm에서 1.0mm로 증가시켰을 때 향상되는 세포파쇄율(약 2.19%)보다도, 0.1mm에서 0.5mm로 증가시켰을 때 향상되는 세포파쇄율(약 10.49%)이 현저하게 높은 값을 나타내었으므로, 비드의 직경이 일정수준에 도달하면, 비드의 직경을 증가시켜도 세포파쇄율이 더 이상 증가되지 않을 것으로 분석되었다.
- [0079] 도 3b는 본 발명에서 제공하는 세포파쇄장치의 수직형 파쇄챔버에 1.0 mm의 글래스 비드를 서로 다른 수준(0.1, 0.2 및 0.5 g)으로 부가하여, 피에조 결합체로부터 유발된 초음파처리와 미립자화 및 비드비팅을 동시에 수행함으로써 얻어진 세포파쇄율을 비교한 결과를 나타내는 그래프로서, 도 2와 마찬가지로 점선은 비드비팅 방법으로 파쇄된 세균의 세포파쇄율을 나타내고, 실선은 초음파처리 방법으로 파쇄된 세균의 세포파쇄율을 나타낸다. 도 3b에서 보듯이, 세포파쇄장치의 수직형 파쇄챔버에 동일한 직경의 글래스 비드를 부가하여 비드비팅을 동시에 수행하면, 비드를 부가하지 않은 경우($23.14 \pm 1.90\%$)보다도 비드의 부가수준이 증가할 수록 세포파쇄율이 증가함($54.08 \pm 0.73\%$, $58.74 \pm 3.55\%$ 및 $63.34 \pm 1.39\%$)을 확인하였다.
- [0080] 또한, 비드의 부가수준과 세포파쇄율의 상관관계를 분석한 결과, 비드의 부가수준을 0.1g에서 0.2g으로 증가시켰을 때 향상되는 세포파쇄율(약 4.66%)과, 0.2g에서 0.5g으로 증가시켰을 때 향상되는 세포파쇄율(약 4.6%)이 유사한 수준을 나타내었으므로, 비드의 부가수준이 일정수준에 도달하면, 비드의 부가수준을 증가시켜도 세포파쇄율이 더 이상 증가되지 않을 것으로 분석되었다.
- [0081] **실시예 2-4: 고리형 압전소자 디스크로부터 유발된 초음파처리와 미립자화 및 계면활성제 처리를 동시에 수행한 세포파쇄의 효율분석**
- [0082] 상기 시료 250 μ l를 원심분리하여 침전된 세균을 수득하고, 상기 수득한 세균을 다양한 농도(0, 0.1, 0.25, 0.5 및 1.0%(w/v))의 SDS 용액(0.1M PBS) 250 μ l에 현탁시킨 것을 시료로서 사용하는 것을 제외하고는, 상기 실시예 2-2와 동일한 방법을 수행하고, 이로부터 얻어진 파쇄된 세균을 사용하여 세포파쇄율을 분석하였다(도 4).
- [0083] 도 4는 다양한 농도(0, 0.1, 0.25, 0.5 및 1.0%)의 SDS가 처리된 시료를 본 발명에서 제공하는 세포파쇄장치로 파쇄하여 얻어진 세포파쇄율을 비교한 결과를 나타내는 그래프로서, 도 2와 마찬가지로 점선은 비드비팅 방법으로 파쇄된 세균의 세포파쇄율을 나타내고, 실선은 초음파처리 방법으로 파쇄된 세균의 세포파쇄율을 나타낸다. 도 4에서 보듯이, SDS 농도를 0에서 0.5%로 증가시키면, 세포파쇄율이 $23.14 \pm 1.90\%$ 에서 $66.13 \pm 10.93\%$ 로 증가되었으므로, SDS의 농도에 비례하여 세포파쇄율이 증가하는 양상을 나타내었으나, 1%의 SDS를 처리한 경우에는 세포파쇄율이 오히려 감소함을 확인하였다. 이는 과다한 SDS의 처리로 인하여 과도한 거품이 형성되고, 상기 형성된 거품에 의하여 세포파쇄가 억제되었기 때문인 것으로 분석되었다.
- [0084] **실시예 3: 세균의 파쇄시에 소요된 에너지효율 분석**
- [0085] 상기 실시예 2-2 내지 2-4에서 수행한 세균 파쇄시 사용된 에너지 효율을 하기 식으로 산출하고 비교하였다(표 1). 이때, 대조군으로는 초음파 처리에 의하여 파쇄된 세균을 사용하였다.
- [0086] 파쇄에너지 효율(%/J) = (세포파쇄율(%))/(잔류시간(s) × 전력소비량(W))

[0087] 세균의 파쇄시에 소요된 에너지효율

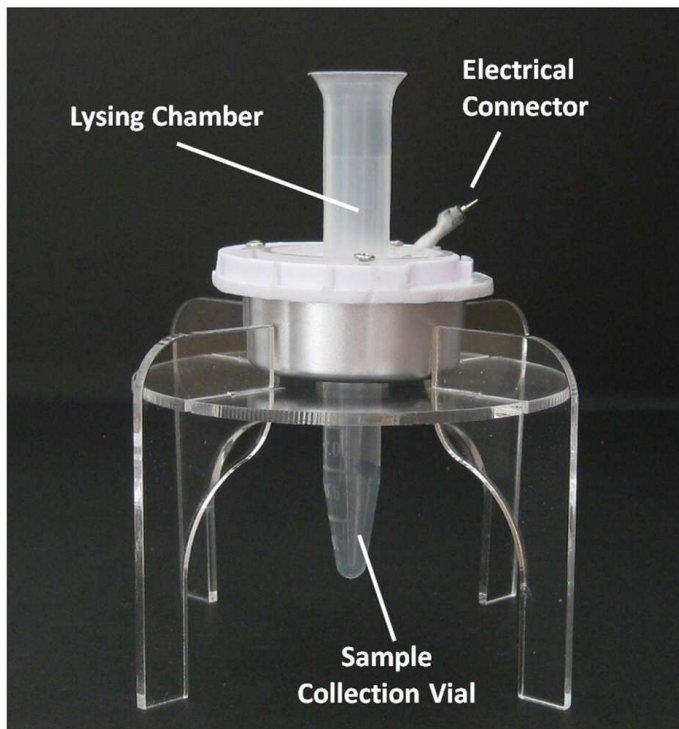
	세포파쇄율(%)	파쇄에너지 효율(%/J)
초음파처리(대조군)	65.58	0.29
세포파쇄장치	23.14	0.50
세포파쇄장치 + 글래스 비드(1mm, 0.5g)	63.34	1.38
세포파쇄장치 + 0.5 % SDS	66.13	1.44

[0088] 상기 표 1에서 보듯이, 대조군에 비하여 본 발명의 세포파쇄장치를 사용할 경우에는 파쇄에너지 효율이 약 1.7배 증가하였고, 상기 세포파쇄장치에 글래스 비드를 부가하여 비드비팅을 추가로 수행하거나 또는 SDS를 처리한 경우에는 대조군 대비 파쇄에너지 효율이 각각 약 4.8배 또는 약 5.0배 증가함을 알 수 있었다. 특히, 상기 세포파쇄장치에 글래스 비드를 부가하거나 SDS를 처리한 경우에는 세포파쇄율의 측면에서 대조군과 동등한 수준을 나타내면서도, 파쇄에너지 효율이 현저하게 증가됨을 알 수 있었다.

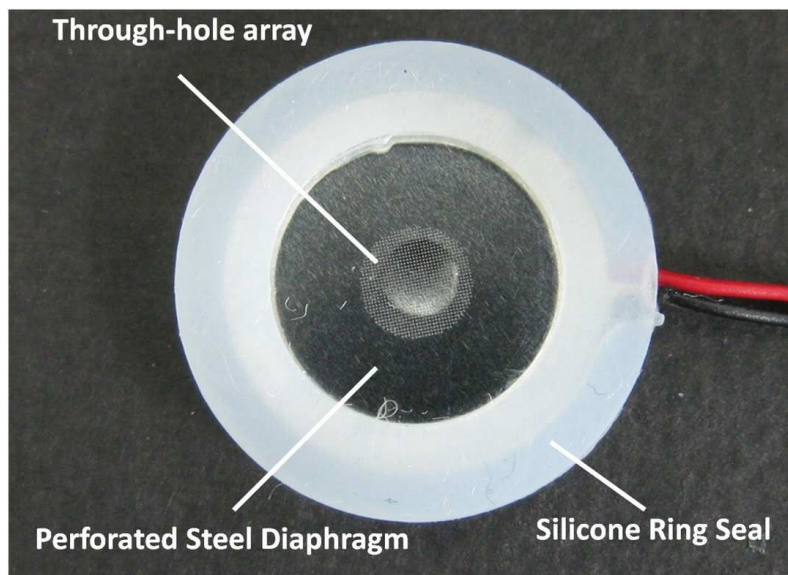
[0089] 따라서, 본 발명의 세포파쇄장치는 단독으로 사용하여도, 종래의 초음파 처리장치보다 우수한 파쇄에너지 효율을 나타낼 뿐만 아니라, 글래스 비드 또는 SDS 처리를 동시에 수행할 경우에는, 동등한 수준의 세포파쇄율을 나타내면서도 종래의 초음파 처리장치보다 파쇄에너지 효율이 현저하게 증가됨을 알 수 있었다.

도면

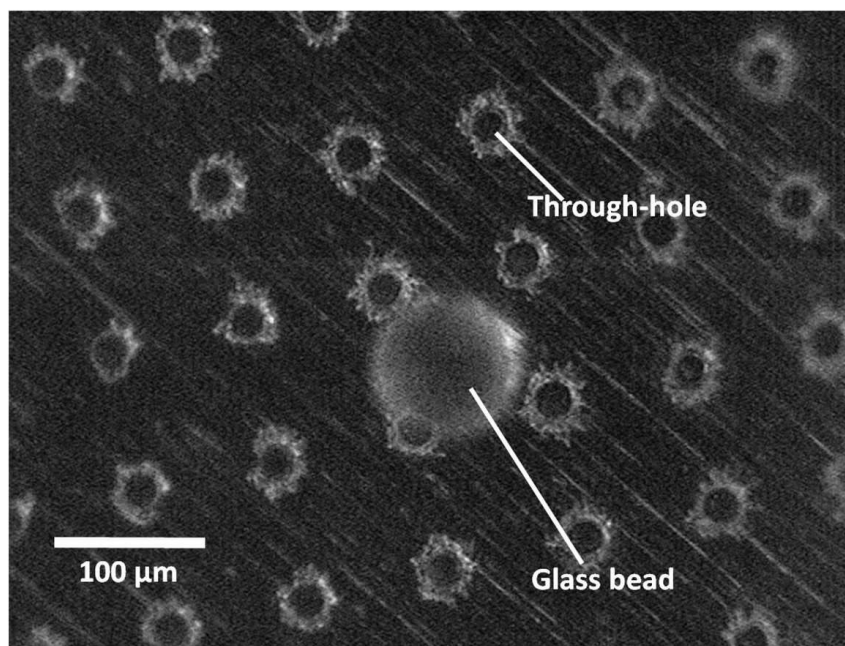
도면1a



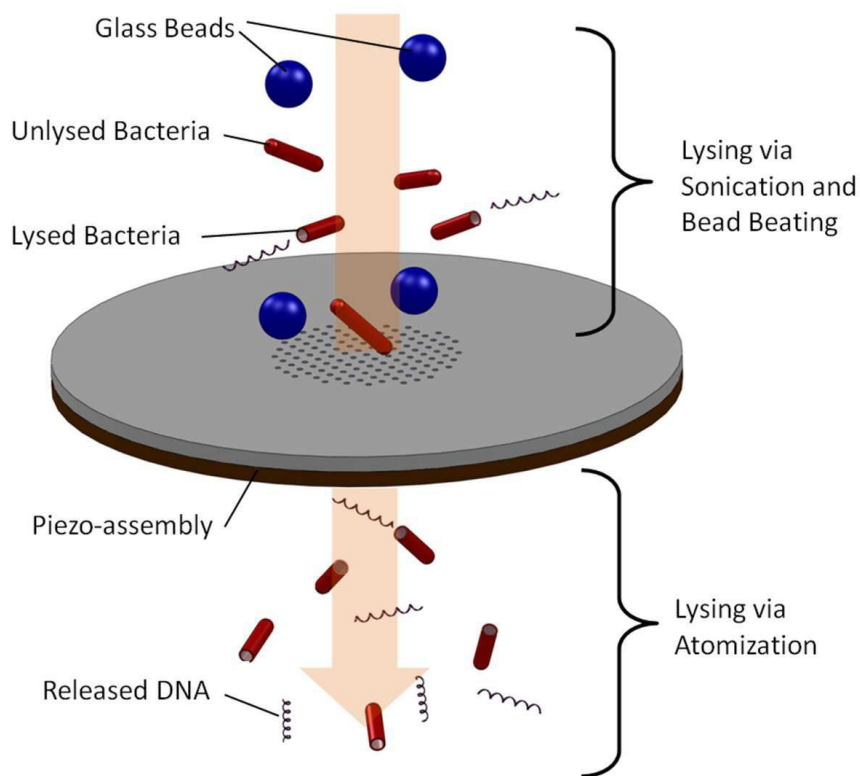
도면1b



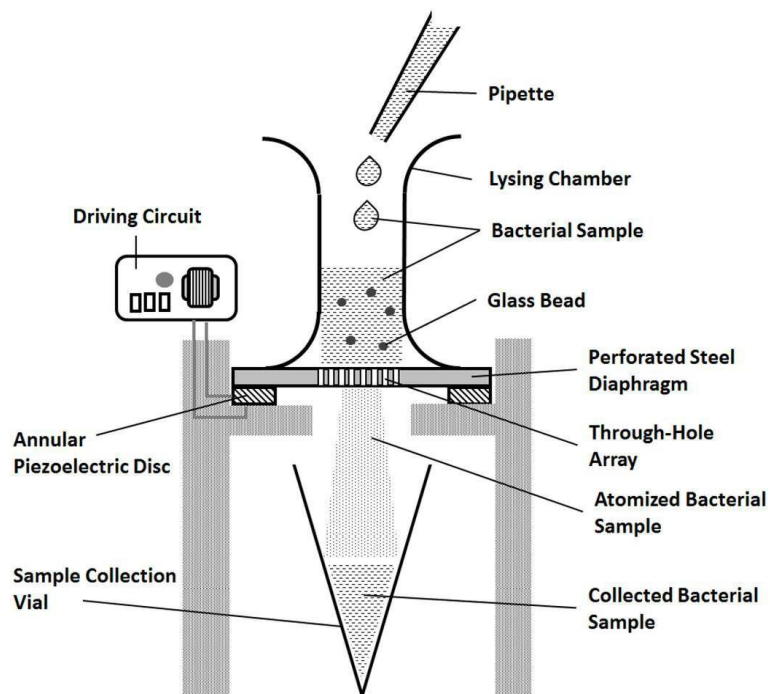
도면1c



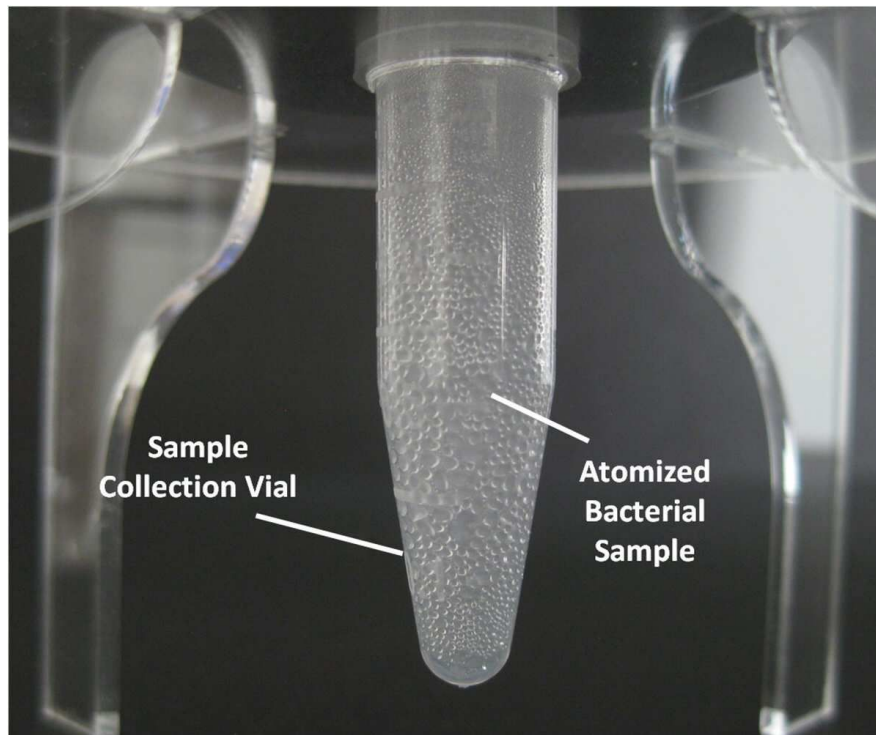
도면1d



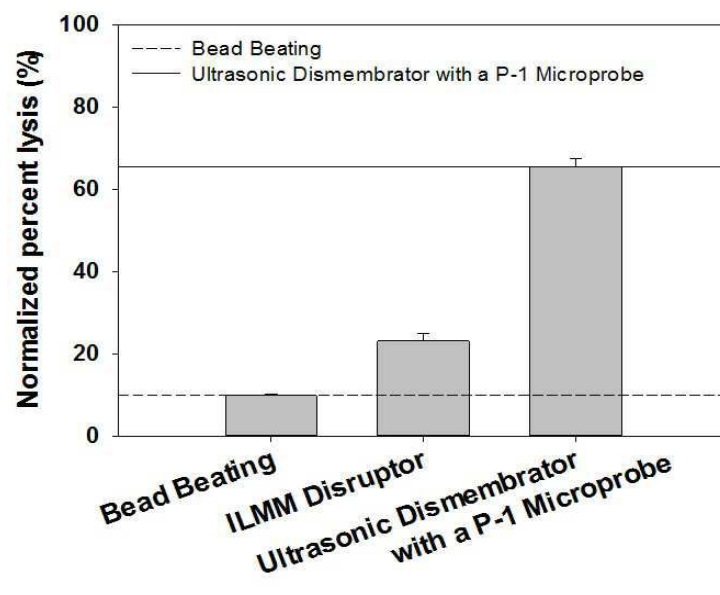
도면1e



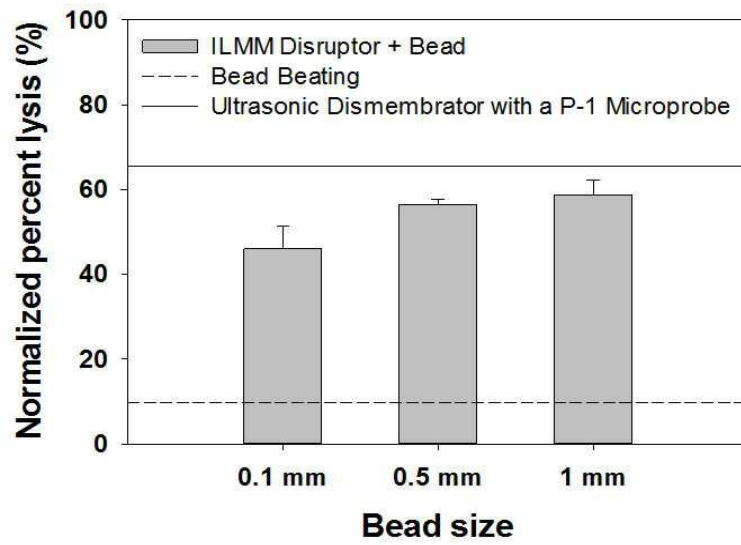
도면1f



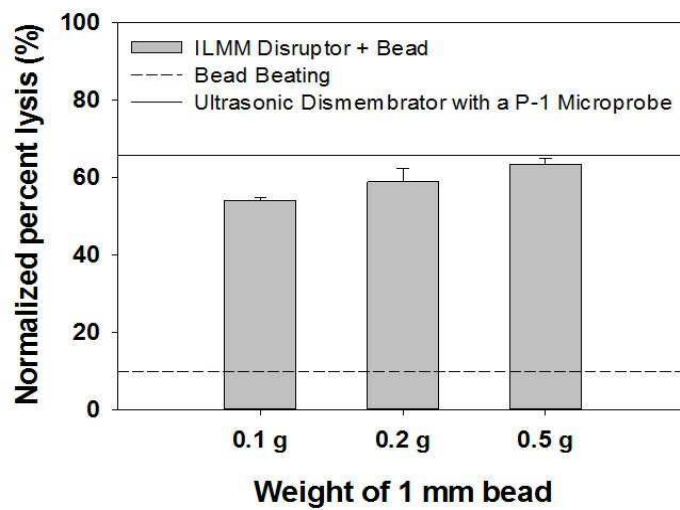
도면2



도면3a



도면3b



도면4

