



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0140608
(43) 공개일자 2024년09월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12Q 1/04 (2017.01)

(52) CPC특허분류

C12Q 1/04 (2013.01)

C12Q 2304/22 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2023-0035202

(22) 출원일자 2023년03월17일

심사청구일자 2023년12월20일

(71) 출원인

울산과학기술원

울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50

한국해양과학기술원

부산광역시 영도구 해양로 385(동삼동)

(72) 발명자

로버트 제임스 미첼

울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50

최성열

울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

리엔특허법인

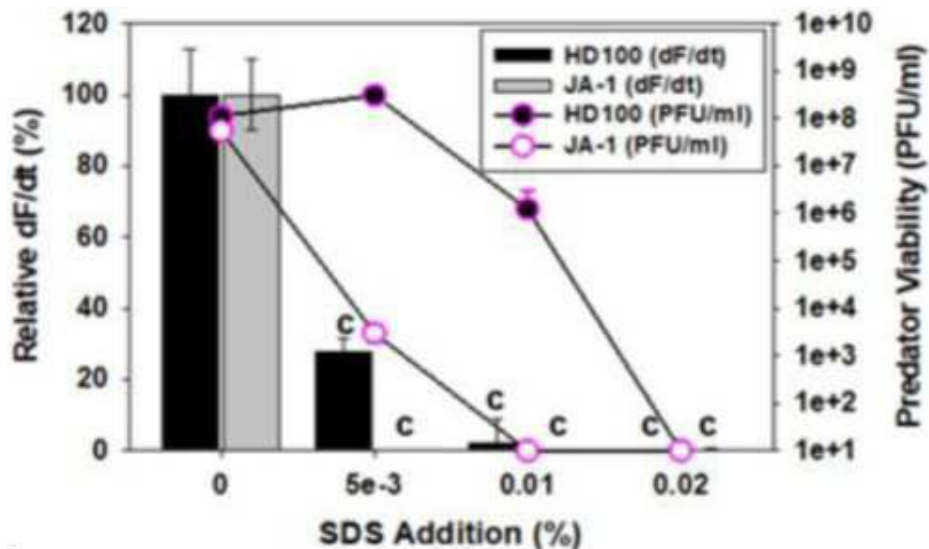
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 포식균의 생활성 및 이의 비율 신속 측정 방법

(57) 요약

본 발명은 혼합 배양물 내 포식균 대 먹이균의 비율을 측정하는 방법 및 혼합 배양물 내 포식균 또는 먹이균의 생활성을 측정하는 방법에 관한 것으로, 상기 방법은 포식균 및 먹이균의 혼합 배양물에 계면활성제를 첨가한 후 시간에 따른 형광 변화량 값을 측정함으로써 $10^7 \sim 10^9$ PFU/mL 농도 범위의 포식균 및 $10^7 \sim 10^9$ CFU/mL 농도 범위의 먹이균의 비율 및 생활성을 높은 신뢰도로 약 15분 내에 신속하게 측정할 수 있다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류
C12Q 2304/24 (2013.01)

장효찬
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50

(72) 발명자
문원식
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711164857
과제번호	2020R1A2C2012158
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)
연구과제명	포식미생물을 이용한 CRE 병원균의 제거와 항생제 내성 DNA, 단백질 분해
기 여 율	25/100
과제수행기관명	울산과학기술원
연구기간	2022.03.01 ~ 2023.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345341301
과제번호	2021R1A6A3A01087091
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	이공학학술연구기반구축(R&D)
연구과제명	VRSA-VRE의 대답: 통합유전체분석을 통한 Violacin과 Prodigiosin의 작용기전 규명
기 여 율	25/100
과제수행기관명	울산과학기술원
연구기간	2021.09.01 ~ 2022.08.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1525011793
과제번호	202104112
부처명	해양수산부
과제관리(전문)기관명	해양수산과학기술진흥원
연구사업명	해양바이오전략소재개발및상용화지원(R&D)
연구과제명	패혈증의 치료에 해양 포식 박테리아의 응용
기 여 율	25/100
과제수행기관명	울산과학기술원
연구기간	2021.04.01 ~ 2022.03.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1525013570
과제번호	PE22900
부처명	해양수산부
과제관리(전문)기관명	극지연구소
연구사업명	극지연구소운영지원(주요사업비)
연구과제명	2022년도 국내 학·연 극지연구 진흥프로그램(PAP사업)
기 여 율	25/100
과제수행기관명	극지연구소
연구기간	2022.01.01 ~ 2022.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

혼합 배양물 내 포식균 대 먹이균의 비율을 측정하는 방법으로서,

- 포식균 및 먹이균을 혼합배양하여 혼합 배양물을 얻는 단계;
- 상기 혼합 배양물에 형광 지시제를 첨가한 후, 제1 형광 변화량 값을 측정하는 단계;
- 상기 a) 단계를 통해 얻은 별도의 혼합 배양물에 형광 지시제 및 계면활성제를 첨가한 후, 제2 형광 변화량 값을 측정하는 단계; 및
- 상기 제2 형광 변화량 값을 먹이균 단독의 형광 변화량 값으로 결정하고, 상기 제1 형광 변화량에서 제2 형광 변화량을 뺀 값을 포식균 단독의 형광 변화량 값으로 결정하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 포식균은 BALO(*Bdellovibrio* And Like Organisms) 이고, 상기 먹이균은 아시네토박터 바우마니(*Acinetobacter baumannii*), 대장균(*Escherichia coli*), 폐렴간균(*Klebsiella pneumoniae*), 녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*) 또는 슈도모나스 푸티다(*Pseudomonas putida*)인, 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 BALO는 델로비브리오(*Bdellovibrio*) 속 또는 박테리오보락스(*Bacteriovorax*) 속 미생물인, 방법.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 델로비브리오 속 미생물은 델로비브리오 박테리오보루스(*Bdellovibrio bacteriovorus*) HD100 또는 109J이고, 상기 박테리오보락스 속 미생물은 할로박테리오보락스(*Halobacteriovorax*) JA-1 또는 JA-3인, 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 a) 단계에서 혼합배양하는 포식균의 농도는 10^7 내지 10^9 PFU/mL이고, 상기 먹이균의 농도는 10^7 내지 10^9 CFU/mL인, 방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 형광 지시제는 레자주린(resazurin), 테트라졸리움 염 또는 메틸렌 블루인, 방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 계면활성제는 SDS(Sodium dodecyl sulfate)인, 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 SDS의 농도는 0.01 내지 0.1%(w/v)인, 방법.

청구항 9

혼합 배양물 내 포식균 또는 먹이균의 생활성(viability)을 측정하는 방법으로서,

- 농도를 알고 있는 포식균 또는 먹이균 단독 배양물에 각각 형광 지시제를 첨가한 후, 포식균 또는 먹이균의 농도 별 형광 변화량 값(dF/dt)을 측정하여 표준곡선을 도출하는 단계; 및
- 혼합비율을 알 수 없는 혼합 배양물에 대해, 청구항 1의 방법에 의해 얻어진 포식균 또는 먹이균 단독의 형

광 변화량 값을 상기 a)단계에서 도출된 표준곡선에 대입하여 포식균 또는 먹이균 각각의 농도를 결정하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 b)단계의 혼합 배양물 내 포식균의 농도는 10^7 내지 10^9 PFU/mL이고, 먹이균의 농도는 10^7 내지 10^9 CFU/mL인, 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 혼합 배양물 내 포식균 대 먹이균의 비율을 측정하는 방법 및 혼합 배양물 내 포식균 또는 먹이균의 생활성을 측정하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 포식균은 자연계에 널리 존재하며 다른 미생물(먹이균)을 포식하여 에너지를 얻고 성장한다. 이러한 포식균 중 특히 델로비브리오 기타 유사한 개체(Bdellovibrio-and-like-organisms, BALOs)는 병원성 박테리아를 내부에서부터 공격하는 '델로 비브리오' 및 그와 유사한 박테리아를 의미하는 것으로, 이는 인체에 무해할 뿐 아니라, 항생제에 내성을 가지는 슈퍼 박테리아를 비롯한 다른 미생물을 포식하고 소멸시키는 바, 차세대 감염병 치료제로서 주목받고 있다.

[0003] BALO의 이러한 특성으로 인해 실험 상 배양의 과정에서 반드시 먹이균과 혼합하여 배양한다. 이에 포식균의 생장은 자연히 먹이균의 감소로 이어지며, 따라서 그 생활성 및 혼합 배양물에서의 정확한 비율을 측정하기 어렵다. 이러한 이유로 포식균의 생활성 및 혼합 배양물에서 비율을 측정하는 방법으로 종래의 일반적인 세포 수 측정 방법인 OD(optical density)를 활용하여 확인할 수 없다. 또한, BALO는 기존의 박테리아보다 크기가 작기 때문에 필터 처리를 하더라도 OD를 활용하는 것이 불가능하다.

[0004] 한편, 포식균의 생활성을 측정하는 방법으로 플라크 형성 단위(Plaque forming unit, PFU)를 이용하는데, PFU의 확인을 위해서는 먹이균과 한천 배지의 준비, 배양기의 활용 등 많은 시간적, 자원적 소요가 필수적이다. 그러나 기존에 포식균의 생활성을 측정하기 위한 다른 대안이 전무했기 때문에, 포식균의 PFU를 확인하기 위해서는 반드시 3일에서 5일 이상의 배양을 요구하게 되고, 실험 상에서 포식균 생활성의 즉각적이지 못한 확인은 실험의 소요시간을 늘리고 변화에 적극적으로 대처하지 못하는 등 실험 탄력성을 낮추는 문제점이 있었다. 따라서, 포식균의 생활성 및 비율을 신속하게 측정할 수 있도록 하는 기술의 개발이 요구되는 실정이다.

[0005] 이러한 배경 하에, 본 발명자들은 계면활성제에 대한 포식균과 먹이균의 민감성 차이 및 형광 지시제 첨가에 따른 형광값의 변화량을 이용하여, 혼합 배양물 내 포식균 대 먹이균의 비율을 측정하는 방법 등을 개발하였다. 이러한 방법은 높은 신뢰도 및 15분 내의 짧은 소요 시간으로 인해 실험적으로도 활용도가 높으며, 나아가 BALO는 차세대 항생제로 활용될 수 있는 바, 인체에 안전하면서도 효과적인 항생제 및 치료방법 등의 개발에 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 일 양상은 혼합 배양물 내 포식균 대 먹이균의 비율을 측정하는 방법을 제공한다.

[0007] 다른 양상은 혼합 배양물 내 포식균 또는 먹이균의 생활성을 측정하는 방법을 제공한다.

과제의 해결 수단

[0008] 일 양상은 혼합 배양물 내 포식균 대 먹이균의 비율을 측정하는 방법을 제공하는 것이다.

[0009] 구체적으로, 일 양상은

[0010] a) 포식균 및 먹이균을 혼합배양하여 혼합 배양물을 얻는 단계;

- [0011] b) 상기 혼합 배양물에 형광 지시제를 첨가한 후, 제1 형광 변화량 값을 측정하는 단계;
- [0012] c) 상기 a) 단계를 통해 얻은 별도의 혼합 배양물에 형광 지시제 및 계면활성제를 첨가한 후, 제2 형광 변화량 값을 측정하는 단계; 및
- [0013] d) 상기 제2 형광 변화량 값을 먹이균 단독의 형광 변화량 값으로 결정하고, 상기 제1 형광 변화량에서 제2 형광 변화량을 뺀 값을 포식균 단독의 형광 변화량 값으로 결정하는 단계를 포함하는, 포식균 대 먹이균의 비율을 측정하는 방법을 제공하는 것이다.
- [0014] 또한, 상기 방법은 e) 먹이균 또는 포식균 단독의 형광 변화량 값을 비교하여 포식균 대 먹이균의 비율을 측정하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [0015] 본 명세서에서 용어 '포식균'이란 다른 박테리아 내에 침입 후 포식하여 소멸시키거나, 다른 박테리아에 기생하는 박테리아의 일종을 말한다. 이들 포식균은 일반적으로 먹이균의 표면에 부착, 침입, 분열, 방출의 4단계를 통해 생활사를 이루어 나가며 한번의 생활사를 겪는데 약 4시간이 소요된다(도 7). 구체적으로, 상기 포식균은 델로비브리오 기타 유사한 개체(*Bdellovibrio*-and-like-organisms, BALOs)일 수 있고, 이는 델로비브리오 박테리오포루스(*Bdellovibrio bacteriovorus*), 페레디박터 스타리(*Peredibacter starrii*) 또는 마이카비브리오 에루기노사보루스(*Micavibrio aeruginosavorus*)와 같은 다양한 종을 포함할 수 있다.
- [0016] 보다 구체적으로, 상기 BALO는 델로비브리오(*Bdellovibrio*) 속 또는 박테리오포락스(*Bacteriovorax*) 속 미생물일 수 있으며, 일 실시예에서 상기 델로비브리오 박테리오포루스는 *Bdellovibrio bacteriovorus* HD100(NCBI Genbank 등록번호 BX842601.2, 기탁번호: ATCC 15356) 또는 *Bdellovibrio bacteriovorus* 109J(기탁번호: ATCC 15143)이고, 상기 박테리오포락스 속 미생물은 할로박테리오포락스(*Halobacteriovorax*) JA-1 또는 JA-3일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0017] 예를 들어, 상기 BALO 중 델로비브리오는 먹이균의 외막과 펩티도글리칸 층에 자신을 부착하여 그람 음성균을 공격한 후 외막에 작은 구멍을 만들고 먹이균의 세포질 내부로 들어간다. 세포질 내부에 들어가면 델로비브리오가 막 구멍을 밀봉하고 숙주 세포(먹이균)를 구형 형태로 전환한다. 이 때 형성된 2개의 균 복합체를 델로플라스트(*bdelloplast*)라고 한다. 숙주 세포의 영양소가 고갈되면 자손을 형성하여 먹이균을 용해(*lysis*)하고 밖으로 방출된다. 이러한 전체 포식 주기에는 3~4시간이 소요된다(도 7).
- [0018] 본 명세서에서 용어 '먹이균'이란 포식균의 침입에 의해 포식되는 균으로, 예를 들어 살모넬라 속(*Salmonella* sp.), 아시네박터 속(*Acinebacter* sp.), 에세리키아 속(*Escherichia* sp.), 슈도모나스 속(*Pseudomonas* sp.) 또는 크렙시엘라 속(*Klebsiella* sp.) 균주를 포함할 수 있으며, 구체적으로는 대장균(*Escherichia coli*, 기탁번호: ATCC 47076) 또는 폐렴간균(*Klebsiella pneumonia*, 기탁번호: NCCP 15782)일 수 있으나, 이에 특별히 제한되는 것은 아니다.
- [0019] 본 명세서에서 용어 '혼합배양'은 동일한 배지에 2종류 이상의 균류를 같이 배양하는 것으로, 구체적으로는 상기 포식균 및 먹이균을 혼합배양하는 것일 수 있다. 혼합배양하는 포식균의 농도는 10^7 내지 10^9 PFU/mL이고, 먹이균의 농도는 10^7 내지 10^9 CFU/mL일 수 있으며, 상기 농도 범위 내에서 높은 신뢰도로 포식균과 먹이균의 비율을 측정할 수 있다. 일 실시예에서, 레자주린 첨가 이후 측정된 dF/dt 값을 *B. bacteriovorus* HD100 생활성(PFU/ml)에 대해 플롯팅 했을 때, 포식균 밀도 10^7 내지 10^9 PFU/ml에서 용량-의존(dose-dependent) 관계가 확인되었고, *B. bacteriovorus* 109J, *Halobacteriovorax* JA-1 및 JA-3에 대해서도 유사한 결과가 확인되었다(도 2a 및 도 2b). 본 명세서에서 상기 용어 '농도'는 '밀도'와 혼용될 수 있다.
- [0020] 본 명세서에서 용어 '배양물'이란 상기 포식균 또는 먹이균을 공지의 액체 배지 또는 고체 배지 등에서 배양시켜 수득한 것으로, 포식균 또는 먹이균의 전체 배양물, 배양상등액, 과쇄물 또는 이들의 분획물을 포함할 수 있으며, 이는 본 명세서에서 용어 '배양액'과 혼용될 수 있다. 상기 배양물을 얻기 위해 사용되는 배지 및 배양방법은 특별히 제한되지 않으며, 본 발명의 목적을 달성하기 위한 것이라면 당업자에 의해 적절히 선택될 수 있다.
- [0021] 본 명세서에서 용어 '형광 지시제'란 산화 환원 반응에 의해 색상이 변화되는 산화 환원 지시약을 말한다. 상기 산화 환원 지시약은 NAD(P)H를 전자 공여체로 하는 산화 환원 반응에 의해 색상이 변화하는 지시약이면 특별하게 제한되지 않는다. NAD(P)H는 균의 대사에 의해 생성되므로, 산화 환원 지시약의 환원에 의한 색상의 변화는 생균수(생활성)를 반영한다. 구체적으로, 상기 형광 지시제는 레자주린, 테트라졸리움 염 또는 메틸렌 블루일

수 있으며, 보다 구체적으로는 레자주린일 수 있다.

- [0022] 본 명세서에서 용어 '레자주린(resazurin)'이란 세포 내 NAD(P)H 풀(pool)과 반응하여 안정한 형광성 화합물인 레조루핀(resorufin)으로 환원되는 막 투과성 화합물이다. 레자주린은 통상 산화형의 청색 색소인 레자주린(극대 흡수 파장 605nm)으로서 존재하지만, NAD(P)H에 의해 환원되어 적자색 색소(극대 흡수 파장 573nm)인 레조루핀으로 변환된다. 배양물에 첨가되는 레자주린의 농도는 0.05% 내지 0.2%일 수 있으며, 일 실시예에서는 0.05% 농도로 레자주린을 첨가하였으나, 배양물에서 포식균 또는 먹이균의 레자주린에 대한 환원능을 측정 가능한 농도라면 이에 특별히 제한되지 않는다.
- [0023] 본 명세서에서 용어 '형광 변화량'이란 상기 형광 지시제의 역동학적 변화(fluorescence kinetic change)를 색 측정 장치로 측정한 시간 당 변화량(dF/dt)을 의미한다. 본 명세서에 있어서 용어 '형광 변화'는 '색상 변화' 또는 '(형광) 역동학적 변화'와 혼용될 수 있고, ' dF/dt '는 '시간에 따른 형광 변화량 값'과 혼용될 수 있다. 일 실시예에서는, 포식균 또는 먹이균의 대사에 의해 레자주린이 레조루핀으로 환원됨에 따라 가장 큰 형광 변화가 최초 10분 동안 나타났기 때문에, 이를 혼합 배양물 내 포식균과 먹이균의 비율 및 생활성 측정에 사용하였다.
- [0024] 본 명세서에서 '계면활성제'란 SDS(sodium dodecyl sulfate), CTAB(cetyltrimethylammonium bromide), DODAB(n-dodecyl trimethylammonium bromide), HTAB(n-hexadecyl trimethylammonium bromide), DTAB(dodecyltrimethylammonium bromide), CPC(cetylpyridinium chloride), LAS(linear alkylbenzene sulfonate), AOS(α -olefin sulfonate), AS(alkyl sulfate), AES(alkyl ether sulfate), SAS(secondary alkyl sulfonate) 또는 MES(ethyl ester sulfonate)일 수 있으며, 포식균 및/또는 먹이균에 처리시 포식균에 대해서만 그 대사를 억제시키거나 세포 사멸을 유도하는 등 서로 다른 민감성을 나타내게 하는 물질이면 특별히 제한되지 않으나, 구체적으로는 SDS일 수 있다.
- [0025] 혼합 배양물 내 포식균과 먹이균의 비율 및 생활성 측정을 위해 처리되는 SDS의 농도는 0.01 내지 0.1%(w/v), 바람직하게는 0.02 내지 0.1%(w/v)이고, 포식균에 대해서만 대사를 억제하거나 세포 사멸을 유도하여 dF/dt 를 감소시킬 수 있는 농도 범위라면 특별히 제한되지 않는다. 일 실시예에서, *B. bacteriovorus* HD100, *Halobacteriovorax* str. JA-1 및 *E. coli*의 SDS에 대한 민감성을 확인하기 위해 단독 배양물 각각에 SDS를 처리한 뒤 dF/dt 를 확인한 결과, SDS의 농도가 0.02%(w/v)일 때, 두 포식균 모두 대사가 억제되거나 세포 사멸이 유도되어 dF/dt 값이 거의 나타나지 않은 반면(도 3), 먹이균 *E. coli*의 경우 dF/dt 변화가 크지 않은 것으로 나타났다(도 4). 이에 따라, 계면활성제에 대한 포식균 및 먹이균의 상이한 민감성을 이용하여 혼합 배양물 내 포식균 및 먹이균 비율을 측정하고자 하였으며, 일 실시예에서는 혼합 배양물 내 SDS의 최종농도가 0.02%(w/v)가 되도록 첨가하였다.
- [0026] 일 실시예에서, BALO 및 *E. coli* 혼합 배양물에 레자주린 첨가시 시간에 따른 레조루핀 형광 변화량 값(제1 형광 변화량 값), BALO 및 *E. coli* 혼합 배양물에 SDS를 처리한 경우 시간에 따른 레조루핀 형광 변화량 값(제2 형광 변화량 값)을 측정하였다. 여기서 제2 형광 변화량 값은 *E. coli* 단독 배양물에서의 레조루핀 형광 변화량 값과 동일하므로, 제1 형광 변화량 - 제2 형광 변화량 값은 BALO 단독 배양물에서의 레조루핀 형광 변화량 값에 해당하고, 이는 실제로 BALO 단독 배양물에 레자주린 첨가시 시간에 따른 레조루핀 형광 변화량 값과 일치함을 확인하였는 바(도 12), 이를 혼합 배양물에서 포식균 대 먹이균의 비율 측정에 사용하였다.
- [0027] 다른 양상은 혼합 배양물 내 포식균 또는 먹이균의 생활성을 측정하는 방법을 제공한다.
- [0028] 구체적으로, 다른 양상은
- [0029] a) 농도를 알고 있는 포식균 또는 먹이균 단독 배양물에 각각 형광 지시제를 첨가한 후, 포식균 또는 먹이균의 농도 별 형광 변화량 값(dF/dt)을 측정하여 표준곡선을 도출하는 단계;
- [0030] b) 혼합비율을 알 수 없는 혼합 배양물에 대해, 청구항 1의 방법에 의해 얻어진 포식균 또는 먹이균 단독의 형광 변화량 값을 상기 a)단계에서 도출된 표준곡선에 대입하여 포식균 또는 먹이균 각각의 농도를 결정하는 단계를 포함하는, 포식균 또는 먹이균의 생활성을 측정하는 방법을 제공하는 것이다.
- [0031] 상기에서 설명한 내용과 동일한 부분은 상기 생활성 측정 방법에도 공히 적용된다.
- [0032] 구체적으로, 상기 a)단계에서 청구항 1의 방법에 의해 포식균 또는 먹이균 단독의 형광 변화량 값을 얻는 과정은, 혼합비율을 알 수 없는 혼합 배양물에 대해 형광 지시제를 첨가한 후 제1 형광 변화량 값을 측정하는 단계; 혼합비율을 알 수 없는 별도의 동일한 혼합 배양물에 형광 지시제 및 계면활성제를 첨가한 후 제2 형광 변화량

값을 측정하는 단계; 상기 제2 형광 변화량 값을 먹이균 단독의 형광 변화량 값으로 결정하고, 상기 제1 형광 변화량에서 제2 형광 변화량을 뺀 값을 포식균 단독의 형광 변화량 값으로 결정하는 단계를 통해 수행될 수 있다.

[0033] 또한, 상기 b)단계의 혼합비율을 알 수 없는 혼합 배양물 내 포식균의 농도는 10^7 내지 10^9 PFU/mL이고, 먹이균의 농도는 10^7 내지 10^9 CFU/mL일 수 있으며, 상기 농도 범위 내에서 높은 신뢰도로 포식균과 먹이균의 생활성을 측정할 수 있다.

[0034] 본 명세서에서 용어 '생활성(viability)'이란 포식균 또는 먹이균의 성장 정도를 의미하며, 용어 '생존율(survival rate)'과 혼용될 수 있다. 이는 포식균 또는 먹이균의 세포 수(microbial cell)로서, 각각 PFU/ml 또는 CFU/ml 단위로 정의될 수 있다.

[0035] 일 실시예에서는, 농도를 알고 있는 10^7 내지 10^9 PFU/ml BALO 단독 배양물과 10^7 내지 10^9 CFU/ml *E. coli* 단독 배양물 각각에서 측정된 dF/dt 값을 생활성에 대해 플롯팅(plotting) 하여 표준곡선을 도출하였다.

[0036] 또한 일 실시예에서, 10^7 내지 10^9 PFU/ml BALO 단독 배양물에서 측정된 dF/dt 값을 측정하여 표준곡선을 도출하여 용량-의존(dose-dependent) 관계를 확인하였고(도 2a, 도 2b), 상기 제1 형광 변화량 값 - 제2 형광 변화량 값은 BALO 단독 배양물에서의 레조루핀 형광 변화량 값에 해당하므로, 상기 제1 형광 변화량에서 제2 형광 변화량을 뺀 값을 BALO 단독 배양물로부터 도출한 표준곡선에 대입하여 BALO의 농도를 결정하였다.

발명의 효과

[0037] 본 발명의 방법은 포식균 및 먹이균의 혼합 배양물에 레자주린과 계면활성제를 첨가한 후 시간에 따른 형광 변화량 값을 측정함으로써 혼합 배양물 $10^7 \sim 10^9$ PFU/mL 농도 범위의 포식균 및 $10^7 \sim 10^9$ CFU/mL 농도 범위의 먹이균의 비율 및 생활성을 높은 신뢰도로 약 15분 내에 신속하게 측정할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0038] 도 1은 포식균 *Bdellovibrio bacteriovorus* HD100의 농도 별 시간에 따른 레조루핀 형광값을 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 2a는 *Bdellovibrio bacteriovorus* HD100 및 109J에 대해 레자주린 첨가 후 최초 10분 전후에서의 dF/dt 값과 PFU/ml간의 상관관계를 나타낸 것이다.

도 2b는 *Bacteriovorax* str. JA-1 및 JA-3에 대해 레자주린 첨가 후 최초 10분 전후에서의 dF/dt 값과 PFU/ml간의 상관관계를 나타낸 것이다.

도 3은 포식균에 대해 SDS의 농도 별 첨가에 따른 dF/dt 값 및 PFU/ml의 변화를 나타낸 것이다.

도 4는 SDS 처리 여부 및 시간에 따른 먹이균(*E. coli*)의 dF/dt 값 변화를 나타낸 것이다.

도 5는 서로 다른 삼투압에서 포식균 *Bdellovibrio bacteriovorus* HD100 및 *Bacteriovorax* str. JA-1의 dF/dt 값을 나타낸 것이다.

도 6a는 서로 다른 삼투압에서 포식균 *Bdellovibrio bacteriovorus* HD100을 24시간 관찰한 이후 여과 유무에 따른 생활성을 나타낸 것이다.

도 6b는 서로 다른 삼투압에서 포식균 *Bacteriovorax* str. JA-1을 24시간 관찰한 이후 여과 여부에 따른 생활성을 나타낸 것이다.

도 7은 포식균의 포식 주기(약 4시간) 과정의 개략도이다.

도 8a는 포식균 추가 여부에 따른 먹이균의 시간 별 dF/dt 값 및 생활성을 나타낸 것이다.

도 8b는 SDS가 처리되지 않은 포식균의 시간 별 dF/dt 값 및 생활성을 나타낸 것이다.

도 9a는 포식 테스트(혼합 배양)에 있어서 포식균 및 먹이균에 대한 레조루핀 형광값(per bacterium)을 나타낸 것이다.

도 9b는 SDS 처리 여부에 따른 포식균 및 먹이균 혼합 배양물의 시간 별 dF/dt 값의 변화를 나타낸 것이다.

도 10은 포식균 및 먹이균 혼합 배양물의 농도 별 시간에 따른 dF/dt 값을 측정한 결과를 나타낸 것이다.

도 11은 SDS를 처리한 포식균 및 먹이균 혼합 배양물에서 농도 별 시간에 따른 dF/dt 값(F'_{SDS})을 측정한 결과를 나타낸 것이다.

도 12는 포식균 단독 배양물의 농도 별 시간에 따른 dF/dt 값과, 포식균 및 먹이균 혼합 배양물의 농도 별 시간에 따른 dF/dt 값에서 SDS를 처리한 혼합 배양물에서 농도 별 시간에 따른 dF/dt 값(F'_{SDS})을 뺀 값의 경향을 비교하여 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0039] 이하 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0040] 실시예 1: *Halobacteriovorax* 균주의 분리 및 식별

[0041] 샘플(토양 및 물)을 250rpm, 30℃에서 2시간 동안 진탕(shaking)하면서 인큐베이션 하였다. 이어서 원심분리(500xg, 5분)하여 흙을 제거한 후, 상층액을 여과하여(0.45 μ m 주사기 필터, Millipore, USA) 큰 박테리아 세포를 제거하였다. 여과액에 폐혈증 관련 병원균인 *Klebsiella pneumoniae* NCCP 15782를 OD(600 nm) 1.0으로 첨가하였다. 배양물을 OD(600 nm)가 0.2 미만이 될 때까지 30℃에서 며칠 동안 진탕(250 rpm)하며 성장시켰고, 이후 배양물을 여과하여(0.45 μ m 주사기 필터, Millipore, USA) 남아 있는 먹이균(*Klebsiella pneumoniae*)과 델로플라스트(bdelloplast)를 제거하였다. 여과액을 35% 인공 해수(artificial seawater; ASW)에 희석하여 한천 배지(top agar)에 첨가하고 먹이균을 첨가하였다. 이후 이를 플라크가 형성될 수 있도록 최대 1주일 동안 30℃에서 배양하였다.

[0042] 개별 플라크를 멸균된 35% ASW(삼투압 농도 300~350mOsm/kg)에 처리하고, 동일한 먹이균을 사용하여 다시 한번 포식을 개시하였다. 배양물 OD가 깨끗해졌을 때 스톡(stock)을 제조하고, 동일한 병원균을 먹이균으로 사용하여 포식균을 20% 글리세롤, -80℃ 조건에서 델로플라스트 제형으로 보관하였으며, 필요에 따라 새로운 플라크를 성장시켰다. 이 분리주의 계대배양은 항상 *K. pneumoniae*를 먹이균으로 하여 30% ASW(350 mOsm/kg)에서 진행하였다. 순수한 배양물을 얻은 후, 새로 분리된 포식균을 프라이머 27F/1492R 세트를 사용한 16S rDNA 시퀀싱 후, MEGAversion 6 소프트웨어를 사용한 계통 발생 분석을 통해 식별하였다. 그 결과, 상기 샘플로부터 분리된 *Halobacteriovorax* 균주는 각각 *Halobacteriovorax* str. JA-1 및 JA-3임을 확인하였다.

[0043]

[0044] 실시예 2. BALO(bdellovibrio-and-like organisms) 균주의 배양

[0045] *B. bacteriovorus* 균주를 배양하는 데 *E. coli* MG1655를 먹이균으로 사용하였고, *Halobacteriovorax* 균주의 배양에는 *K. pneumoniae* NCCP 15782를 먹이균으로 사용하였다. 각 먹이균을 30℃, 250rpm 진탕 배양기를 이용하여 Lysogeny Broth(LB)에서 밤새 배양하였다. 먹이 세포(pre-y cells)를 펠렛화하고(2,200 x g, 10분), $CaCl_2$ 및 $MgCl_2$ (각각 3mM 및 2mM)가 첨가된 HEPES 완충액(25mM, pH 7.4)으로 세척한 후, OD(600 nm) 1.0으로 재현탁하였다. 이들 배양물에 포식균을 첨가하고(1:100 희석) 플라스크 배양물에서 성장시켰다. 24시간 후, OD가 0.2 미만일 때, 0.45 μ m 주사기 필터(Millipore, USA)를 사용하여 배양물(predated culture)을 여과하여 공격 단계(attack-phase)의 포식 세포(predatory cells)로부터 생존한 먹이균 및 델로플라스트를 제거하였다.

[0046] 실시예 3: 포식균의 생활성 측정

[0047] 포식균의 생활성(viability) 측정을 다음과 같은 단계로 수행하였다.

[0048] (1) 10^7 내지 10^9 PFU/ml BALO의 배양물을 준비한다. 이때 먹이균의 양이 충분히 적다면(10^5 CFU/ml 이하인 경우) 0.45 μ m 필터를 처리하지 않은 혼합 배양물을 사용할 수 있다. 구체적으로, 상기 BALO가 *Bdellovibrio bacteriovorus* HD100 또는 109J인 경우 먹이균은 *E. coli* MG1655를 사용하고, 상기 BALO가 *Halobacteriovorax* JA-1 또는 JA-3인 경우 먹이균은 *K. pneumoniae*를 사용한다.

[0049] (2) 형광값 측정을 위한 플레이트(SPL 96 black plate)에 상기 배양물을 추가한다.

[0050] (3) 0.05% 레자주린 20 μ L를 상기 플레이트에 추가로 첨가한다

- [0051] (4) 0분에서의 형광값 F_0 를 Excitation 530nm, Emission 580nm로 측정한다.
- [0052] (5) 10분에서의 형광값 F_{10} 를 Excitation 530nm, Emission 580nm로 측정한다.
- [0053] (6) 분당 평균 dF/dt 값을 $(F_{10}-F_0)/10$ 을 통해 산출한다.
- [0054] (7) PFU/ml와 dF/dt 값 간의 correlation curve를 작성한다.
- [0055] (8) 이후 해당 배양물 조건에서의 BALO의 PFU/ml 값은 dF/dt 값을 측정하여 correlation curve를 이용하여 역산한다.
- [0056] 구체적으로, 레자주린 스톱(0.2%(w/v))은 증류수를 사용하여 준비하고 필터(0.22 μ m 주사기 필터, Millipore, USA)로 멸균하였다. 스톱을 $CaCl_2$ 및 $MgCl_2$ (각각 3mM 및 2mM)가 첨가된 HEPES 완충액(25mM, pH 7.4)에 1:3(v:v)으로 희석하였다. 밤새 성장시킨 후, 포식 배양물을 여과하고(0.45 μ m 주사기 필터, Millipore, USA), 각각 HEPES 완충액(*Bdellovibrio*) 또는 30% ASW(*Halobacteriovorax*)에 희석하였다. 희석액에서 200 μ l 분취량(aliquots)을 검정색 96-웰 플레이트(Greiner, USA)의 웰로 옮기고, 희석된 레자주린 스톱 20 μ l 를 첨가하여 최종 농도 0.005%의 레자주린(w/v)를 제공하였다. 이후 각 웰의 형광을 플레이트 리더(TECAN, USA; Ex 530nm, Em 580nm)를 사용하여 판독하였다. 플레이트 리더가 샘플을 혼합하도록 설정하고, 온도를 30℃로 유지하여 10분마다 각 웰의 형광 신호를 읽도록 설정하였다.
- [0057] 그 결과, 레자주린은 *B. bacteriovorus* HD100에 의해 농도-의존적으로 레조루핀으로 빠르게 환원되었다(도 1). 이 때 가장 큰 형광 역동학적 변화(fluorescence kinetic change, dF/dt)가 최초 10분 동안 나타났기 때문에, 이를 포식균 계수를 위한 레자주린의 잠재적 사용을 평가하기 위해 사용하였다.
- [0058] 또한, 측정된 dF/dt 값을 *B. bacteriovorus* HD100 생활성(PFU/ml)에 대해 플롯팅(plotting)했을 때, 포식균 밀도 10^7 내지 10^9 PFU/ml에서 용량-의존(dose-dependent) 관계가 확인되었으며($R^2 = 0.9908$; 표준편차 = 22.5%, 도 2a), 3개의 다른 포식균, 즉 *B. bacteriovorus* 109J, *Halobacteriovorax* JA-1 및 JA-3에서도 유사한 결과가 나타났다(도 2a 및 2b). 이로부터, 본 발명자들은 레자주린을 사용하여 약 10분 이내의 빠른 시간 안에 포식균의 생활성을 안정적으로 추정할 수 있음을 확인하였다.
- [0059] **실시예 4: 계면활성제(SDS) 테스트**
- [0060] 포식균 *B. bacteriovorus* HD100의 SDS에 대한 민감성을 확인하기 위해, 포식 배양물을 제외하고 상기 실시예 3의 방법과 동일하게 실험을 수행하였다. 0.45 μ m 여과 후 10배 희석 즉, 180 μ l 멸균 배지(HEPES 완충액 단독 또는 SDS가 첨가된 HEPES 완충액)에 여과된 포식 배양물 20 μ l를 첨가하고, 검정색 96-웰 플레이트(SPL, 한국)의 웰 내에서 혼합하였다.
- [0061] *Halobacteriovorax* str. JA-1의 경우, 사용된 배지가 35% ASW 내 25mM HEPES 인 것을 제외하고 동일한 프로토콜을 사용하였다. 플레이트를 TECAN Spark 플레이트 리더에서 진탕하면서 30℃에서 배양하고, 1시간 후 희석된 레자주린 20 μ l 를 각 웰에 첨가하고 상기 실시예 3과 같이 형광을 측정하였다.
- [0062] 그 결과, 두 포식균에 대해 배양물 내 SDS 농도가 각각 0.005%, 0.01%, 0.02%(w/v)가 되도록 처리하였을 때 레조루핀 형광(dF/dt)은 모두 급격하게 감소하였고, 특히 *Halobacteriovorax* str. JA-1에 대해서는 더 빨리 감소하였다. 또한, SDS 농도가 0.02%(w/v)일 때 두 포식균에서 모두 형광값의 변화량이 거의 나타나지 않았다(도 3). 즉, 포식균에 대해 SDS를 처리할 경우 포식균의 대사가 억제되거나 세포 사멸이 유도되어 레자주린의 환원이 발생하지 않음을 확인하였다. 반면, 먹이균 *E. coli* MG1655에 대해 SDS를 처리한 경우에는 레조루핀의 형광 변화(dF/dt)가 크지 않은 것으로 나타났다(도 4).
- [0063] **실시예 5: 높은 삼투압(Osmolality) 테스트**
- [0064] 각 샘플의 삼투압 농도를 조정하기 위해 ASW 용액을 HEPES 제제와 혼합하여 0, 25, 50, 75, 100% ASW를 제공하였다. 포식균에 대한 삼투압 농도의 단기적-영향은 레자주린 시험에 관한 상기 실시예 3과 같이 수행하였다. 구체적으로, 여과 후 포식균을 다른 배지(1:10)로 희석하고, 배양액 200 μ l 를 TECAN Spark 플레이트 리더에서 진탕하면서 30℃의 검정색 96-웰 플레이트(SPL, 한국)에서 배양하였다. 1시간 후, 희석된 레자주린 20 μ l를 각 웰에 첨가하고 실시예 3과 같이 형광을 측정하였다.
- [0065] 24시간 포식에 대한 삼투압 농도의 영향을 확인하기 위해, 먹이균을 상기 실시예 2와 같이 성장시키고, 원심분

리(13,000 x g, 5분)에 의해 펠렛화하여 ASW 배지에 OD가 1.0이 되도록 재현탁하였다. 여기에 포식균의 여과액을 추가하고(1:100 희석), 이 샘플을 30℃에서 24시간 동안 교반하면서(250rpm) 배양한 후 각 배지에서 먹이균과 포식균의 생활성을 확인하였다.

[0066] 그 결과, *B. bacteriovorus* HD100에 대한 dF/dt 는 삼투압 농도가 증가함에 따라 감소하였고, 특히 75% ASW 또는 780mOsm/kg에서 최저로 나타났다. 반면 *Halobacteriovorax* str. JA-1의 경우, dF/dt 값은 ASW의 농도가 50%와 100%에서 증가함에 따라 약간 감소하는 것으로 나타났으나, 배지의 삼투압 농도는 큰 영향을 미치지 않았다(도 5).

[0067] 한편, *B. bacteriovorus* HD100에 의한 포식은 배양물이 24시간 후 여과되거나 여과되지 않은 경우 모두 ASW 농도 25% 이상일 때 억제되었다. 이 때 여과되지 않은 포식균은 여과된 포식균에 비해 일반적으로 2-log배 더 많은 것으로 나타났는데, 이는 포식 주기는 억제되었으나 삼투압 농도가 매우 높은 경우(1040 mOsm/kg)에도 먹이균에 부착되어 있는 포식균이 있음을 나타낸다(도 6a). *Halobacteriovorax* str. JA-1의 경우 삼투압 농도가 매우 낮거나(40 mOsm/kg) 매우 높을 때(1040 mOsm/kg)를 제외하고 유사한 결과를 확인하였다(도 6b).

[0068] 실시예 6: 포식 테스트(predation test)

[0069] $MgCl_2$ 3mM 및 $CaCl_2$ 2mM 가 첨가된 HEPES 완충액(pH 7.2) 25mM 에서 *E. coli* MG1655를 먹이균으로 하여 *B. bacteriovorus* HD100에 대한 포식 테스트를 수행하였다. 먹이균 OD를 1.0으로 설정하고, 초기 포식균 대 먹이균의 비율이 약 0.3이 되도록 여과된 포식균을 추가하였다. 배양물을 진탕(250rpm)하면서 30℃에서 배양하였고, 매시간 샘플을 채취하여 먹이균 한천 플레이트와 포식균 상면 한천 플레이트(top agar plate)를 사용하여 생활성을 측정하였다. 시간별 분취량을 0.02% SDS 처리 없이 또는 처리 10분 후 레자주린을 사용하여 시험하였다. 즉, 180 μ l의 배양물을 20 μ l HEPES 또는 20 μ l의 SDS가 첨가된 HEPES와 혼합하고, 10분간 인큐베이션한 후 희석된 레자주린 20 μ l를 첨가하고 검정색 96-웰 플레이트(SPL, 한국)에서 상기 기재된 실시예 3과 같이 형광을 측정하였다.

[0070] 그 결과, 포식균이 존재하지 않는 먹이균 단독 배양물의 경우 dF/dt 값이 시간이 지남에도 큰 차이가 없었으나, 포식균이 존재하는 경우에는 첫번째 포식 주기(도 7)가 끝난 직후인 4시간 후, dF/dt 값이 급격히 감소하였다. 또한, 두 경우에서 모두 측정된 형광값과 먹이균의 생활성이 유사한 경향을 나타낸다는 것을 확인하였다(도 8a). 이와 유사하게, SDS를 처리하지 않은 포식균 단독 배양물에서도 dF/dt 값과 생활성의 유사한 경향을 확인하였다(도 8b).

[0071] 또한, SDS를 처리하지 않은 *B. bacteriovorus* HD100의 시간에 따른 레조루핀 형광값(per bacterium)은 *E. coli* 보다 약 7배 많다는 것을 확인하였다(도 9a). 보다 구체적으로, 포식균 및 먹이균의 혼합 배양물에 SDS를 처리하지 않은 경우, 포식균의 첫번째 포식 주기가 완료되어 먹이균으로부터 방출되는 약 3시간 이후부터 dF/dt 값이 급격히 상승하나, SDS를 처리한 경우에는 포식균의 대사가 억제되거나 세포 사멸이 유도되어 시간이 지남에도 dF/dt 값이 증가되지 않음을 확인하였다(도 9b).

[0072] 이로부터, 본 발명자들은 계면활성제(SDS)에 대한 포식균 및 먹이균의 민감성 차이를 이용하여 혼합 배양물의 형광값 측정을 통해 그 비율 및 생존수 측정의 가능성을 확인하였다.

[0073] 실시예 7: 계면활성제를 이용한 포식균 및 먹이균의 비율 측정

[0074] 포식균 및 먹이균의 혼합 배양물에서 각각의 생활성 및 그 비율 측정을 다음과 같은 단계로 수행하였다.

[0075] (1) 10^7 내지 10^9 PFU/ml BALO 및 10^7 내지 10^9 CFU/ml 먹이균의 배양물을 각각 준비한다. 구체적으로, 상기 BALO가 *Bdellovibrio bacteriovorus* HD100 또는 109J인 경우 먹이균은 *E. coli* MG1655를 사용하고, 상기 BALO가 *Halobacteriovorax* JA-1 또는 JA-3인 경우 먹이균은 *K. pneumoniae*를 사용한다.

[0076] (2) 형광값 측정을 위한 플레이트(SPL 96 black plate)에 BALO 및 먹이균의 배양물을 200 μ L 추가한다.

[0077] (3) 0.05% 레자주린 20 μ L를 상기 플레이트에 추가로 첨가한다.

[0078] (4) 0분에서의 형광값 F_0 를 Excitation 530nm, Emission 580nm로 측정한다.

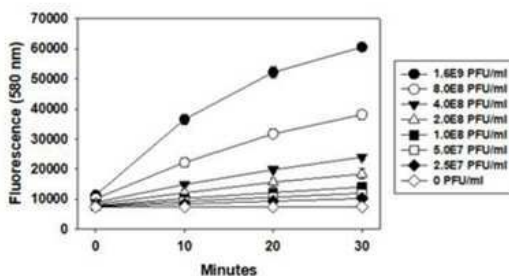
[0079] (5) 10분에서의 형광값 F_{10} 를 Excitation 530nm, Emission 580nm로 측정한다.

[0080] (6) 분당 BALO 및 먹이균의 평균 dF/dt (이하, 각각 F'_{BALO} , F'_{prey})값을 $(F_{10}-F_0)/10$ 을 통해 산출한다.

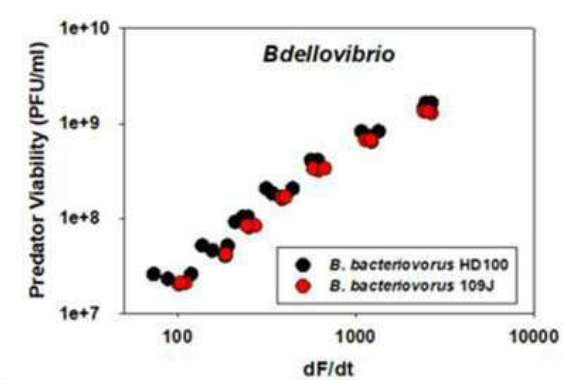
- [0081] (7) PFU/ml 와 F'_{BALO} 값 및 CFU/ml와 F'_{prey} 값 간 correlation curve를 각각 작성한다.
- [0082] (8) BALO 및 먹이균의 비율을 알 수 없는 혼합 배양물의 dF/dt (이하, $F'_{mixture}$)값을 상기 (4) 내지 (6) 단계를 통해 확인한다.
- [0083] (9) (8) 단계와 동시에, 상기 혼합 배양물에 최종농도 0.02%(w/v)가 되도록 SDS를 처리한 뒤, 상기 (4) 내지 (6) 단계를 통해 dF/dt (이하, F'_{SDS}) 값을 확인한다(여기서 F'_{SDS} 값은 F'_{prey} 와 같고, 따라서 $F'_{mixture}-F'_{SDS}$ 의 값은 F'_{BALO} 와 같다).
- [0084] (10) 따라서, $F'_{mixture}$ 와 F'_{SDS} 를 확인하는 것으로부터 상기 혼합 배양물의 F'_{prey} , F'_{BALO} 를 알 수 있으며, 혼합 배양물에서 BALO의 PFU/ml 값은 상기 (7) 단계에서 작성한 correlation curve를 이용하여 역산한다. 마찬가지로 혼합 배양물에서 먹이균의 CFU/ml 값을 계산할 수 있으며, 이를 통해 혼합 배양물 내 먹이균과 포식균의 비율 또한 확인할 수 있다.
- [0085] 상기 실시예 4 및 실시예 6의 결과로부터 알 수 있듯이, 포식균에 대해 SDS를 처리할 경우, 포식균의 대사가 억제되거나 세포 사멸이 유도되어 레조루핀 형광(dF/dt)이 관찰되지 않는 바(도 3 또는 도 9b), 상기 (9) 단계에서 F'_{SDS} 값은 F'_{prey} 와 같고, 따라서 $F'_{mixture}-F'_{SDS}$ 의 값은 F'_{BALO} 와 같다.
- [0086] 구체적으로, BALO 및 *E.coli* 혼합 배양물에 레자주린 첨가시 시간에 따른 레조루핀 형광값(제1 형광 변화량 값), BALO 및 *E.coli* 혼합 배양물에 SDS를 처리한 경우 시간에 따른 레조루핀 형광값(제2 형광 변화량 값)의 그 래프를 각각 도 10과 도 11에 나타내었다. 여기서 제2 형광 변화량 값은 *E.coli* 단독 배양물에서의 레조루핀 형광 변화량 값과 동일하므로, 제1 형광 변화량 값 - 제2 형광 변화량 값은 BALO 단독 배양물에서의 레조루핀 형광 변화량 값에 해당하고, 이는 실제로 BALO 단독 배양물에 레자주린 첨가시 시간에 따른 레조루핀 형광 변화량 값과 일치한다(도 12).
- [0087] 즉, 상기와 같이 계면활성제(SDS)에 대한 포식균 및 먹이균의 민감성 차이를 이용하여 포식균 및 먹이균의 비율을 알 수 없는 혼합 배양물에 대해서도 그 비율 및 생균수를 신속하게 측정할 수 있고, 이는 다양한 포식균에 대해 적용 가능하다.
- [0088] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

도면

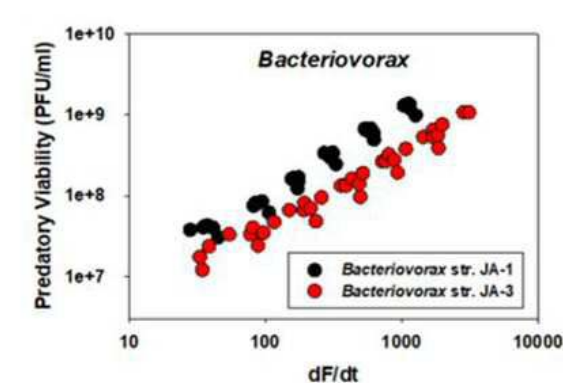
도면1



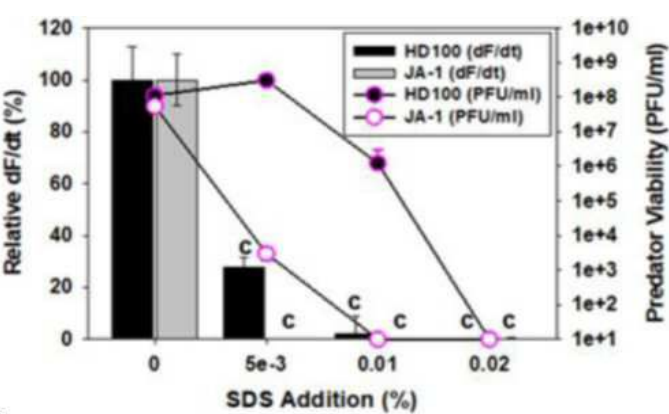
도면2a



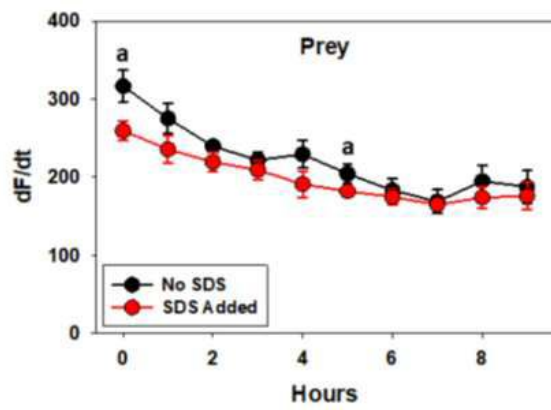
도면2b



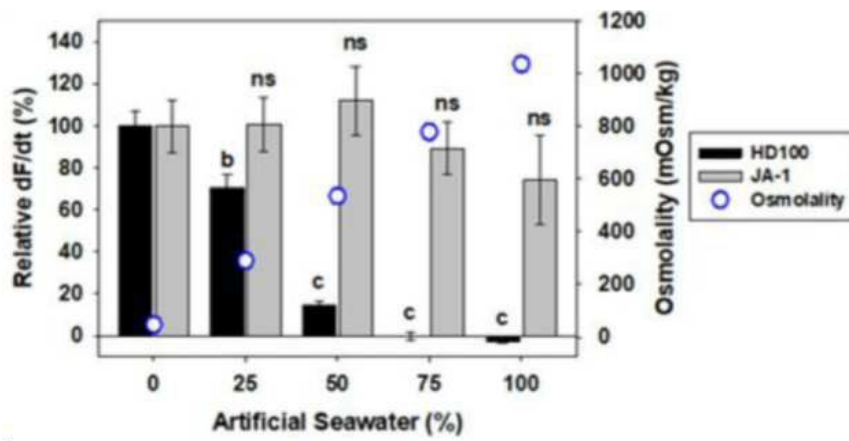
도면3



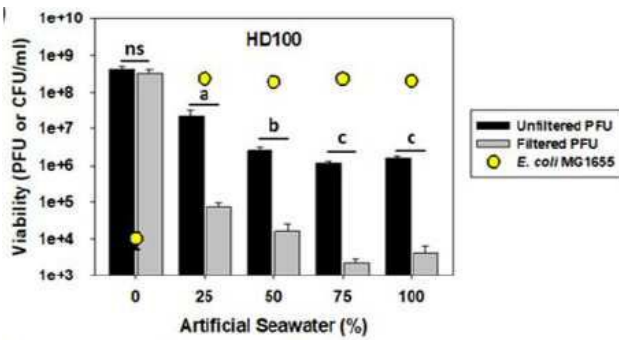
도면4



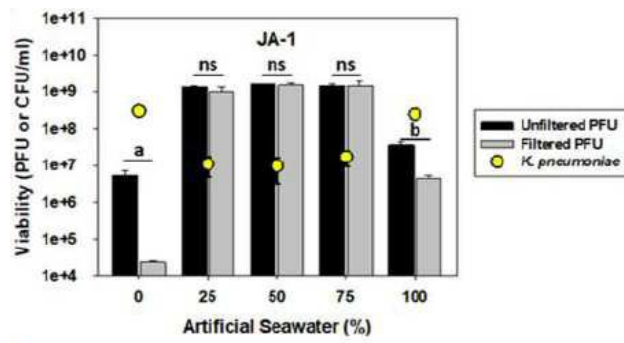
도면5



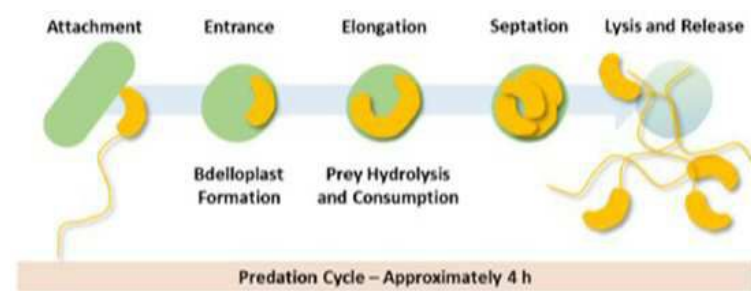
도면6a



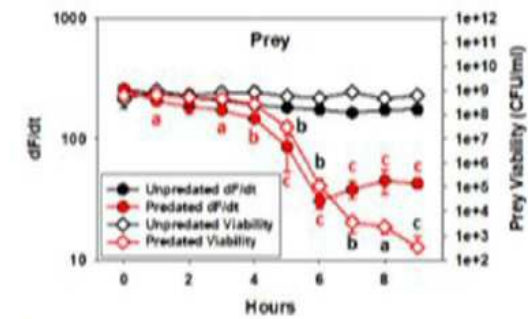
도면6b



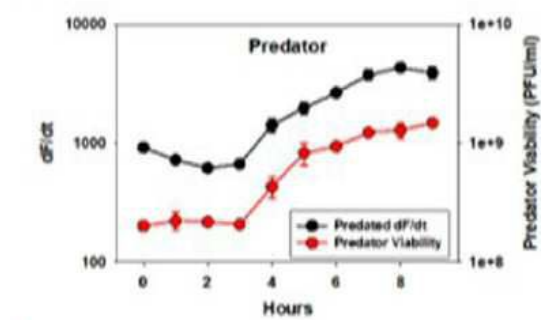
도면7



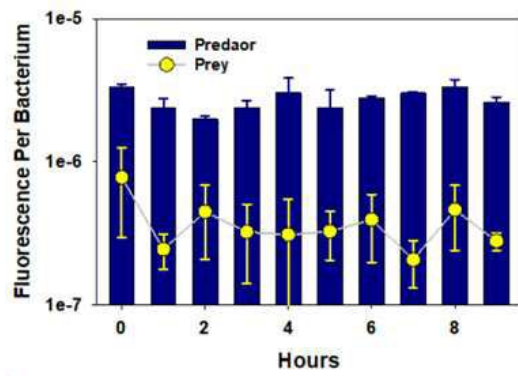
도면8a



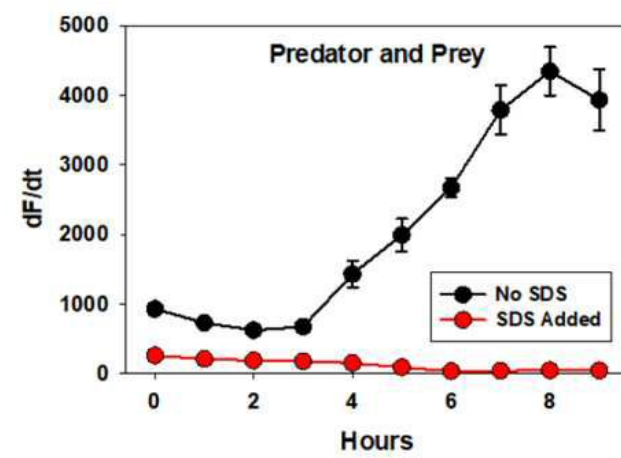
도면8b



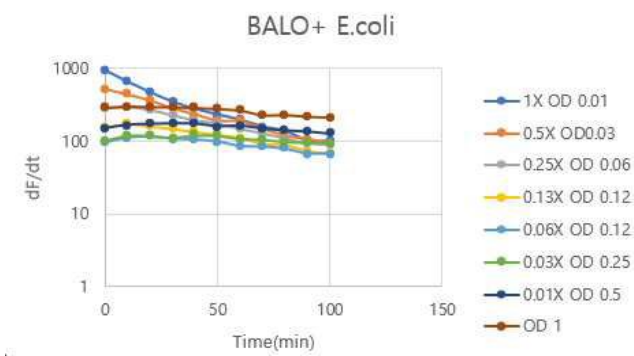
도면9a



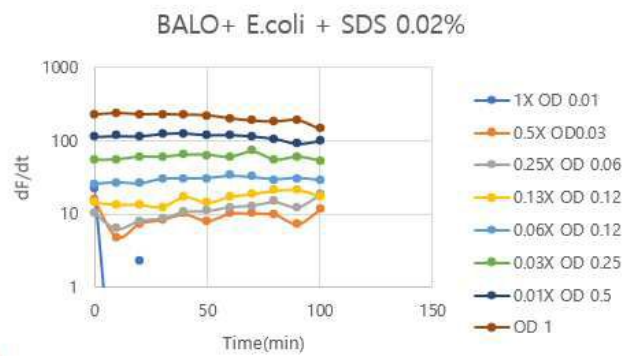
도면9b



도면10



도면11



도면12

