



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년08월31일

(11) 등록번호 10-2150025

(24) 등록일자 2020년08월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/569 (2017.01) G01N 27/02 (2006.01)
G01N 33/18 (2006.01)

(52) CPC특허분류
G01N 33/569 (2013.01)
G01N 27/02 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2018-0139263

(22) 출원일자 2018년11월13일

심사청구일자 2018년11월13일

(65) 공개번호 10-2019-0091187

(43) 공개일자 2019년08월05일

(30) 우선권주장
1020180009910 2018년01월26일 대한민국(KR)

(56) 선행기술조사문헌

JP2003098174 A*

(뒷면에 계속)

(73) 특허권자

연세대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

(72) 발명자

박준홍

서울특별시 강남구 선릉로 221, 304동 1002호(도곡동, 도곡렉슬아파트)

전성찬

서울특별시 서대문구 연세로 50 연세대학교 제1공학관 587호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

오위환, 나성곤, 정기택

전체 청구항 수 : 총 7 항

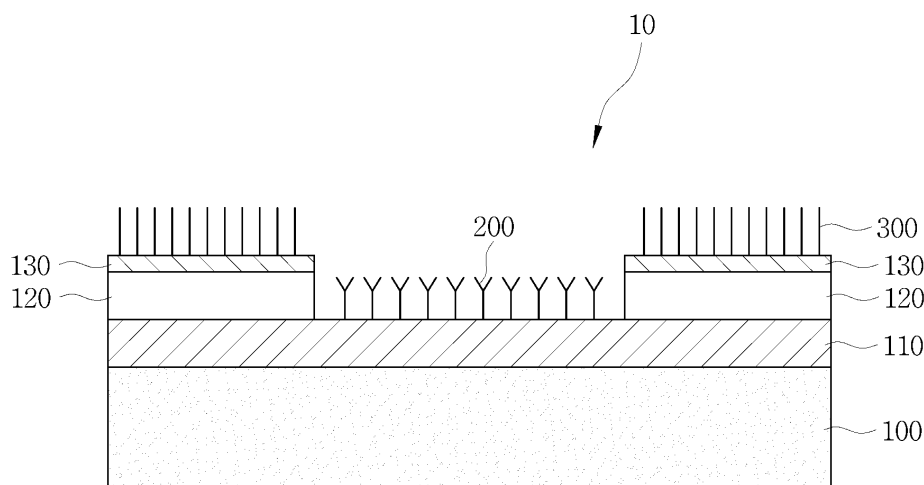
심사관 : 이수진

(54) 발명의 명칭 수돗물 내 목표 미생물 실시간 검출 센서 장치

(57) 요약

본 발명은 수돗물 내 목표 미생물 실시간 검출 센서 장치에 관한 것으로, 보다 상세하게는 임피던스 분광법을 기반으로 수돗물 또는 세정수에서 목표 미생물을 실시간으로 측정 또는 검출할 수 있는 장치에 관한 것이다. 본 발명에 따른 미생물 검출 장치를 이용하여, 수돗물 내 기준치 이하 또는 검출이 되지 않더라도 활성이 있는 세균 또는 미생물을 실시간으로 검지, 검출할 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

G01N 33/18 (2019.01)

(72) 발명자

김지현

경기도 성남시 분당구 내정로 55, 321동 202호(정자동, 상록마을우성아파트)

정영모

서울특별시 서대문구 연세로 50 연세대학교 제4공학관 613호

(56) 선행기술조사문헌

KR1020090085913 A*

KR1020100107087 A

KR1020090033166 A

KR1020170123788 A

신맹근 저, 수돗물 내 실시간 미생물 모니터링 장치 개발을 위한 바이오센서 민감도 평가 연구, 대한토목학회 정기학술대회 (2007.10.), pp 946-947.

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 201600213005

부처명 환경부

연구관리전문기관 한국환경산업기술원

연구사업명 글로벌담환경기술개발 사업

연구과제명 [위탁] 상수도관 수돗물 내 실시간 미생물 유해성 진단 모니터링 장치 개발(2/3)

기 여 율 1/1

주관기관 (주)서용엔지니어링

연구기간 2016.08.10 ~ 2021.04.30

명세서

청구범위

청구항 1

기관부; 및

목표 미생물을 검출하는 미생물 검출부;를 포함하되,

상기 미생물 검출부 상에 미생물 안착부 및 신호 인식부가 구비되고,

상기 신호 인식부 상에는 수열합성부 및 신호 교란 차단부가 구비되어,

상기 미생물 안착부에서 발생하는 전기화학적 반응을 임피던스 신호 값으로 검지하여 목표 미생물을 측정 또는 검출하고,

상기 수열합성부는 그래핀으로 구성되고, 상기 그래핀이 수열합성되어 복수개의 금속 나노와이어를 형성하며, 상기 나노와이어가 신호 교란 차단부를 구성하고,

상기 신호 교란 차단부는 상기 미생물 안착부에 접촉하지 못한 미생물을 파괴하여 상기 미생물 검출부에서 인식하는 신호가 교란되는 것을 차단하기 위한 것을 특징으로 하는 수돗물 내 목표 미생물 실시간 검출 센서 장치.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 미생물은 *Pseudomonas putida*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae* 및 *Enterobacter aerogenes*으로 구성된 군으로부터 선택된 1종 이상인 것을 특징으로 하는 수돗물 내 목표 미생물 실시간 검출 센서 장치.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 미생물 검출부는 이산화규소 웨이퍼로 구성되며, 상기 미생물 검출부의 중앙부에 미생물 안착부가 형성되고, 미생물 안착부의 둘레를 따라 신호 인식부가 형성되는 것을 특징으로 하는 수돗물 내 목표 미생물 실시간 검출 센서 장치.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 미생물 안착부는 미생물과 결합하여 반응을 야기하는 항체(antibody)를 포함하는 것을 특징으로 하는 수돗물 내 목표 미생물 실시간 검출 센서 장치.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 항체가 미생물과 결합할 때, 결합부위에서 발생하는 유전 특성의 변화나 전기 이중층의 특성변화를 통해 목표 미생물을 검출하는 것을 특징으로 하는 수돗물 내 목표 미생물 실시간 검출 센서 장치.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 신호 인식부는 단일 검지부가 병렬로 배치된 인터디지테이트드(interdigitated) 어레이 형태의 금속 센서로 구성되는 것을 특징으로 하는 수돗물 내 목표 미생물 실시간 검출 센서 장치.

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 센서 장치, 통신부, 데이터 저장부 및 판단부를 포함하는 수돗물 내 목표 미생물 실시간 검출 시스템.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 수돗물 내 목표 미생물 실시간 검출 센서 장치에 관한 것으로, 보다 상세하게는 임피던스 분광법을 기반으로 수돗물 또는 세정수에서 목표 미생물을 실시간으로 측정 또는 검출할 수 있는 장치에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 환경부의 먹는물 수질기준 (2015)에 따르면 수돗물, 먹는물공동시설과 음용지하수의 일반세균은 평판집락법으로 측정시 100 CFU/ml 이하이어야 하고, 총대장균군, 분원성대장균군, 그리고 대장균 기준은 시험관법, 막여과법 혹은 효소기질이용법으로 미검출이어야 한다.

[0003] 상기 공정시험 방법은 배양 기반의 방법이므로 기준치 이하 또는 검측이 되지 않더라도 활성이 있는 세균들이 수돗물에 존재함을 알아내는 것이 중요하다.

[0004] 배양 기반의 방법은 시료의 환경적 특성에 따라서 검출의 일관성이 낮으므로, 신규 방법의 검증은 분자생물학적인 방법인 정량적 PCR로 진행하는 것이 일반적이다.

[0005] 또한, 세척수 내 세균 검출 분석을 통해서 옥내 급수관 세척의 완성도와 잔류 미생물에 의한 위해도 등에 관한 진단이 가능하므로, 이러한 용도들에 적합한 바이오 센서의 개발을 위해서는 검출한계 설정이 필요하다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 한국 공개특허 제2004-0012854호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 수돗물 내 목표 미생물 실시간 검측 센서 장치에 있어서 상기한 문제점을 해결하고자 예의 연구 검토한 결과,

[0008] 수돗물 내 기준치 이하 또는 검측이 되지 않더라도 활성이 있는 세균 또는 미생물을 실시간으로 측정 또는 검출할 수 있는 장치를 발견하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

[0009] 따라서, 본 발명의 목적은 수돗물 및 세정수에서 목표 미생물을 실시간으로 측정 또는 검출할 수 있는 장치를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0010] 한편으로, 본 발명은

[0011] 수돗물 또는 세정수에서 목표 미생물을 측정 또는 검출하기 위한 센서 장치로서,

[0012] 목표 미생물을 대상으로 항원항체 반응을 야기하는 검지부; 및

[0013] 항원항체 반응을 통해 발생하는 전기화학적 반응을 임피던스 값으로 치환하여 모니터링하는 신호추출부;로 구성되고,

[0014] 상기 센서는 단일 검지부가 병렬로 배치된 어레이 형태를 지니며,

[0015] 이를 통하여 각각의 검지부에 서로 다른 항체를 접합함으로써 목표 미생물을 검지하는 것을 특징으로 하는 수돗물 또는 세정수에서 목표 미생물을 측정 또는 검출하기 위한 센서 장치를 제공한다.

발명의 효과

[0016] 본 발명에 따른 미생물 검출 장치를 이용하여, 수돗물 내 기준치 이하 또는 검측이 되지 않더라도 활성이 있는 세균 또는 미생물을 실시간으로 검지, 검출할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0017] 도 1은 본 발명에 따른 수돗물 또는 세정수에서 목표 미생물을 측정 또는 검출하기 위한 센서 장치의 단면도이다.

도 2는 본 발명에 따른 센서 장치에 목표 미생물이 검출 또는 파괴되는 것을 나타낸 도면이다.

도 3은 본 발명에 따른 센서 장치를 포함하는 시스템의 구성을 나타낸 블록도이다.

도 4는 본 발명에 따른 바이오 센서의 세균 수에 따른 반응 (임피던스 변화율) 특성 곡선그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0018] 이하, 본 발명을 보다 상세히 설명한다.

[0020] 본 발명의 일 실시형태는

[0021] 기관부(100); 및

[0022] 목표 미생물을 검출하는 미생물 검출부(110);를 포함하되,

[0023] 상기 미생물 검출부(110) 상에 미생물 안착부(200) 및 신호 인식부(120)가 구비되고,

[0024] 상기 신호 인식부(120) 상에는 수열합성부(130) 및 신호 교란 차단부(300)가 구비되어,

[0025] 상기 미생물 안착부(200)에서 발생하는 전기화학적 반응을 임피던스 신호 값으로 검지하여 목표 미생물을 측정 또는 검출하는 것을 특징으로 하는 수돗물 내 목표 미생물 실시간 검출 센서 장치(10)에 관한 것이다(도 1 참조).

[0027] 본 발명의 일 실시형태에서, 상기 미생물은 박테리아, 대장균 등을 포함하며, 이에 제한되지 않는다.

[0029] 본 발명의 일 실시형태에서, 상기 기관(100) 상에 구비되는 상기 미생물 검출부(110)는 이산화규소 웨이퍼(SiO_2 Wafer)로 구성되며, 상기 미생물 검출부(110)의 중앙부에 미생물 안착부(200)가 형성되고, 미생물 안착부의 둘레를 따라 신호 인식부(120)가 형성된다.

[0030] 상기 기관(100)은 실리콘(si)으로 구성될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0031] 상기 미생물 검출부(110)는 항체 기반의 바이오 센서로서, 상부에 미생물과 결합하여 반응을 야기하는 항체 (antibody)를 포함 미생물 안착부(200)를 포함한다. 상기 미생물 안착부(200)의 항체에 목표 미생물(400)이 부착되어 선별적인 반응을 나타내며, 이와 같은 반응을 통해 목표 미생물을 검출할 수 있다(도 2 참조).

[0032] 상기 목표 미생물(400)이 항체와 선택적으로 결합할 때, 결합부위에서 발생한 유전 특성의 변화나 전기 이중층의 특성변화를 전기적으로 측정한다.

[0033] 상기 목표 미생물(400)은 생물학적으로 조직(tissue) 구조를 지니며, 이로 인하여 주파수에 따라 변화하는 전기적 임피던스를 나타낸다. 조직은 복잡한 전기 임피던스를 야기하는 저항성 및 용량성 특성을 모두 포함하는데, 임피던스의 크기와 주파수 의존성은 조직 구조에 따라 다르게 나타난다. 주파수 범위에서 목표 미생물의 임피던스를 측정하면 생물학적 조직의 특징인 스펙트럼이 생성되며, 따라서 임피던스 스펙트럼의 변화는 조직의 기본 특성 변화와 직접적인 연관이 있다.

[0034] 종래 임피던스 측정 센서는 신호 인식부에서 목표 미생물 접촉에 의한 신호 교란이 일어나 고분해능 측정이 어려운 측면이 있었으나, 본 발명에서는 신호 교란 차단부(300)가 목표 미생물 구조를 파괴함으로써 신호 교란을 최소화하여 결과적으로 미생물 검출부에만 선별적으로 목표 미생물이 항체와 결합하게 한다.

[0036] 본 발명의 일 실시형태에서, 상기 신호 인식부(120)는 단일 검지부가 병렬로 배치된 인터디지테이트드 (interdigitated) 어레이 형태의 금속 센서 전극으로 구성된다.

- [0037] 상기 금속으로는 금(Au) 등을 사용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0039] 본 발명의 일 실시형태에서, 상기 수열합성부(130)는 그래핀(Graphene)으로 구성되고, 상기 그래핀이 수열합성되어 복수개의 금속 나노와이어를 형성하며, 상기 나노와이어가 신호 교란 차단부(300)를 구성한다.
- [0040] 이와 같은 그래핀 및 금속 나노와이어의 결합 구조는 임피던스 신호 안정성 및 반응성 향상에 기여할 수 있다.
- [0042] 또한, 본 발명의 일 실시형태는 상기 센서 장치(10), 통신부(500), 데이터 저장부(600) 및 판단부(700)를 포함하는 수돗물 또는 세정수에서 목표 미생물을 측정 또는 검출 시스템(800)에 관한 것이다(도 3 참조).
- [0044] 이하, 실시예에 의해 본 발명을 보다 구체적으로 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오직 본 발명을 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 국한되지 않는다는 것은 당업자에게 있어서 자명하다.
- [0046] 환경부 먹는물 수질기준에 준하는 세균 16S rRNA copy 수를 본 발명자의 실험결과를 기반으로 도출하였고, 이의 10% 수준까지 검출할 수 있도록 바이오 센서의 검출한계 목표치를 설정하였다(표 1 참조).

표 1

목표 세균 항목	먹는물 수질기준에 준하는 16S rRNA 유전자 수	신규 센서 검출 한계 목표 16S rRNA 유전자 수
일반세균 (총 세균)	1,000 16S copies/ml	> 100 16S copies/ml
대장균 (<i>E. coli</i>)	10 16S copies/100 ml	> 1 16S copies/100 ml

- [0050] 본 발명에서 대상으로 하는 두 번째 시료는 옥내 급수관에서 세척 과정에서 획득된 세척수이다. 세척수 내 세균 검출 분석을 통해서 옥내 급수관 세척의 완성도와 잔류 미생물에 의한 위해도 등에 관한 진단이 가능하므로, 이러한 용도들에 적합한 바이오 센서의 개발을 위해서는 검출한계 목표치 설정이 필요하였다.

- [0052] 이를 위해서 옥내 급수관의 세척수 시료 30 여개를 분석해서 획득된 데이터를 기반으로 세척수 내 측정치 범위를 분석하였고, 아래 표와 같은 측정치 범위를 보이었다 (표 2). 수돗물에 비해서 현격하게 높은 수의 세균들이 검출되었고 그 측정된 값의 범위도 상당히 넓었다. 세척수에서 측정된 값 중에서 최소치의 10%를 신규 센서가 검출할 수 있으면 충분하다고 판단하여, 신규 바이오센서를 세척수 분석에 활용시 검출 한계의 목표치를 아래 표에 설정하였다.

표 2

목표 세균 항목	세척수 내 측정치	신규 센서 검출 한계 목표
일반세균 (총 세균)	$10^4 - 10^6$ CFU/ml $10^7 - 10^{11}$ 16S copies/ml	> 1,000 CFU /ml > 10^6 16S copies/ml
대장균 (<i>E. coli</i>)	$10^2 - 10^4$ CFU/ml $10^3 - 10^5$ 16S copies/ml	> 10 CFU /ml > 100 16S copies/ml

- [0055] 1) 세척수 내 측정된 값들 중 최소치의 10% 수준으로 목표치 설정
- [0056] 2) 먹는물 수질기준의 일반세균 평판집락법으로 측정
- [0057] 3) PMA 전처리한 후 살아있는 총 세균 16S rRNA 유전자 수 측정치
- [0058] 4) 먹는물 수질기준의 대장균 막여과법으로 측정
- [0059] 5) PMA 전처리한 후 살아있는 *E. coli* 16S rRNA 유전자수 측정치

- [0061] 본 발명에서, 특정 타겟 미생물 항체를 설치하지 않은 (1) 일반세균 검출용 바이오 센서 (Bacteria sensor)와 특정 타겟 미생물 (대장균 [*E. coli*]) 항체를 설치한 (2) 대장균 검출용 바이오 센서 (*E. coli* specific sensor)에 대해서 검출한계 평가를 수행하였다.

- [0063] 시료 내 미생물이 센서의 임피던스 반응으로 검출되는지를 아래 절차에 의해서 진행하였다. 수돗물의 시료를 바로 적용하기 보다는 기지의 배지에서 순수배양된 *E. coli* K12를 농도를 다르게 준비해서 미생물 검지 센서에 투여하고 센서에서 발생하는 임피던스를 측정하였다. 이때 공 시료로서 PBS 만의 임피던스 프로파일과 비교해서

임피던스 변화가 통계적으로 95% 수준에서 유의한 ($p\text{-value} < 0.05$) 최저의 미생물 농도를 검출한계로 산정하였다.

[0065] 그 결과 일반세균 검지용 바이오 센서 검출 한계는 평판 집락법의 CFU/ml 단위 기준으로는 10 정도로 밝혀졌다. 기존 미생물 검지 센서 기술의 검출한계 수준이 50-1000 CFU/ml 인 점을 고려한다면 (성균관대학교, 2009; 농촌진흥청, 2014). 본 발명에서 개발된 센서는 그 민감도가 우수하다고 판단된다.

[0067] 먹는물 수질기준인 100 CFU/ml 보다 측정된 검출한계치가 통계적으로 현격한 ($p\text{-value} < 0.001$) 차이가 있으므로 먹는물 수질기준에 적용이 가능해 보인다. 정량적인 PCR을 이용해서 검증해 본 결과도 마찬가지로 먹는물 수질기준의 일반세균 수에 해당하는 총 세균의 16S rRNA 유전자 수인 1,000 copies/ml에 비해서 통계적으로 현격하게 다른 ($p\text{-value} < 0.01$) 검출 한계치가 측정되었다(표 3). 이로써 개발된 센서는 먹는물 수질기준의 일반세균 검출을 위해서 사용되기 적당한 검출 한계 특성이 있음이 입증되었다.

표 3

세균 정량방법	측정된 검출 한계	검출 한계 목표 (먹는물 수질기준)	검출 한계 목표 (세척수 최소측정치)
막여과법 (CFU/ml)	10 ± 10	- (미검출)	1000 (10,000)
16S Q-PCR (16S copies/ml)	100-1000	10 ¹ (100)	10 ⁶ (10 ⁷)

[0069] ¹⁾ 먹는물 수질기준에 준하는 일반세균 (총 세균) 16S rRNA 유전자 수로 환산치

[0071] 상기 표 3의 결과가 PBS 완충용액을 배경 용액으로 사용한 것이므로 수돗물과는 그 배경 효과 차원에서 센서 반응에 차이가 있을 것으로 추정된다. 본 발명에서 사용되는 센서는 PBS에서 처럼 이온 농도가 높을 수록 임피던스 시스널에 방해 효과가 높다. 하지만 수돗물이나 먹는물처럼 이온농도가 매우 낮은 경우에는 이러한 방해효과가 매우 적다. 이러한 점 때문에 수돗물에서는 검출한계가 표 3 보다 더 낮을 것으로 기대된다. 이에 대한 추가 실험을 진행 중이다 (최종 발표에서 입증 예정). 현재 결과는 센서에 소량 (0.01 -0.05 ml)을 투여해서 얻은 결과이다. 시료를 농축하는 전 처리를 거친다면 같은 시료의 일반 세균을 더 낮은 농도에서도 검출이 가능하다.

[0073] 세척수 내 일반세균 검출에 사용 가능성 평가에 관해서는 세척수의 검출 한계 목표치는 먹는물 검출한계 목표치보다 높으므로 먹는물 검출한계 목표치를 달성한 일반세균 검출 센서는 세척수 검출 한계 목표치를 충분히 달성할 것으로 판단되었다. 하지만 세척수의 경우 수돗물과 달리 부식과 스케일 등에 의해서 형성된 물질들이 다량 포함되었다.

[0075] 본 발명에서는 선정된 목표 미생물의 감지를 위해 낮은 미생물 농도(CFU)에서도 비교적 높은 반응성을 지니며 기존 분석 방법에 비해 경제성을 확보 가능한 임피던스 측정을 이용하는 센서를 설계 및 구현하였다. 센서는 목표 미생물을 대상으로 항원항체 반응을 야기하는 검지부와, 항원항체 반응을 통해 발생하는 전기화학적 반응을 임피던스 값으로 치환하여 모니터링하는 신호추출부로 구성된다. 센서는 단일 검지부가 병렬로 배치된 어레이 형태를 지니며, 이를 통하여 각각의 검지부에 서로 다른 항체를 접합함으로써 목표 미생물을 검지할 수 있는 구조를 선택하였다.

[0077] 센서는 다단계의 광식각(photo-lithography) 공정을 통해 구현한다. 반도체 공정에서 일반적으로 사용되는 SiO₂ 기판 상부에 광식각 공정을 기반으로 검지부 전극 패턴(3~10 μ m 간격, Comb electrode 구조체)을 구현하고, PDMS 구조체를 부착하여 항체 부착면을 제외한 전극 부분을 보호(passivation)하는 공정을 추가하였다. 이를 통하여 목표 미생물 이외의 반응 요소에 대한 신호 교란을 막을 수 있다. 검지부 전극은 금(Au)을 이용하여 구현되며, 검지부 전극 사이의 SiO₂ 표면에 제품화된 항체를 반응에이전트를 활용해 부착한다. 센서 검지부의 Comb electrode 구조체는 목표 미생물에 대한 센서의 민감도 향상을 위해 양 전극의 거리를 조절하여 설계되었다. 센서의 민감도는 전극의 형태 및 타겟 물질에 대한 전기적 반응 정도를 기반으로 결정되므로, 다종의 목표 미생물에 대한 농도 구간, 크기 및 전기적 특성을 고려하여 Comb electrode 구조체를 설계하였다. 또한 검지부는 낮은 미생물 농도를 지니는 샘플에 대한 민감도 향상을 위해 대면적으로 설계되었으며, 이는 낮은 농도에서도 목표 미생물이 검지부 표면의 항체에 선별적으로 반응할 가능성을 증가시킬 수 있다.

[0079]

실험예 1:

[0080]

수돗물과 세척수 내 미생물 군집의 구성원들을 모두 분석하는 것이 가장 좋은 방법이나 그 비용과 시간이 너무 소모가 될 것이므로, 미생물 군집내 개체 다양성을 생태적 요인을 측정하는 항목으로 포함하기로 했다. 이를 간단히 측정하는 방법은 16S rRNA 유전자를 PCR로 증폭해서 간단한 효소 digestion를 하는 T-RFLP (terminal-restriction fragment length polymorphism) 방법으로 분석해서 class 수준의 알파 다양성을 Shannon Index로 측정하였다. 그 밖의 생물학적 항목으로는 대장균, 분원성대장균군, 총대장균군, 일반세균을 대표할 수 있는 지표 세균들 4종을 선정해서 이들의 정량적인 수를 quantitative PCR (qPCR)로 측정하였다(표 4 참조).

[0082]

qPCR을 이용한 미생물의 정량적인 검측은 다음과 같이 진행되었다:

[0083]

①타깃 미생물의 적정 qPCR primer 및 PCR cycle을 선정

[0084]

②Primer를 제작

[0085]

③해당 미생물을 이용하여 제작된 primer들을 PCR 증폭으로 DNA product 생성

[0086]

④동시에 copy 수를 알고 있는 시료를 이용해서 같은 PCR 증폭

[0087]

⑤타깃 미생물의 gene copy 수를 산정

표 4

[0088]

미생물	Primers (5'-3')	Gene	참고문헌
<i>Pseudomonas putida</i>	xylE-F: AGCATCCTCATCCACAAC xylE-R: GCCGTGTCTATCTGAAGG	xylE	Chang et al., 2009
<i>Escherichia coli</i>	tir-F: GTGGCGCATTGATTCTTGG tir-R: CCGGCTGATTTTTCGATGA	tir	Higgins et al., 2003
<i>Enterobacter cloacae</i>	HycE-F: TGTTCGCGCGCAGCATGTAG HycE-R: TGACCGGCGACAACCAGAAG	HycE	Norbert Acs et al., 2005
<i>Enterobacter aerogenes</i>	GFP-F: GCCATGCCAGAAGGTTATGTTTC GFP-R: CAAACTTGACTTCAGCTCTGGTCTT	GFP-F	K.Verthe et al., 2004

[0090]

실험예 2: 센서 기저 반응 특성 곡선 분석

[0091]

본 발명에서 개발된 기본적인 센서의 세균 농도 (혹은 수)에 대한 임피던스 변화 반응에 대한 특성을 알아보았다.

[0092]

그 결과, 두 가지가 시사되었다. 첫째, 세균 수가 증가할수록 센서의 반응도 비례적으로 증가하다가 임피던스 변화율이 30% 부근에서 포화되는 경향을 보인다. 즉 40,000 - 60,000 CFU/ml 범위 보다 높은 세균 수에서는 센서의 반응이 포화되는 경향을 보인다. 둘째, 세균의 수가 상대적으로 적은 800 CFU/ml 이하 범위에서는 세균 수와 센서의 임피던스 변화율 간에 선형적인 상관성이 있다(도 4 참조).

[0093]

본 발명에서 대상으로 하는 먹는 물의 세균 수는 낮은 편이므로, 세균 수가 낮은 수준에서 보여 주는 선형적인 상관관계가 본 발명에서 개발된 센서의 정량적 검출 능력에 대한 가능성을 제시하고 있다. 이러한 근거로 아래에서는 1000 CFU/ml 이하의 세균 수에 집중해서 본 발명에서 제작된 센서들의 정량적 검출 능력을 실험적으로 평가하였다.

[0095]

실험예 3: 일반세균 검측용 바이오 센서의 정량적 검출 능력

[0096]

본 발명에서 개발된 일반 세균 검측용 바이오 센서가 시료 내 총 세균 수를 정량적으로 측정할 수 있는지를 실험적으로 평가하였다. PBS 용액에 *E. coli* K-12 만을 포함한 단일 균주 배양 결과물을 이용해서 총 세균 수가 다양한 시료의 기존 방법인 평판집락법 (LB배지)와 본 발명에서 개발한 non-specificity 바이오 센서의 측정치를 비교 분석하였다.

[0097]

그 결과 센서의 전기적 신호 변화인 임피던스 변화량은 총 세균의 수의 값과 양적인 상관관계가 확인되었다 ($R^2 = 0.9584$). 이는 시료 내 일반세균이 증가할수록 바이오센서의 반응도 비례해서 증가하므로 정량적인 분석이 가능함을 보이고 있다.

[0099] 실험예 4: 미생물 군집 내 타깃 세균의 선별적 검출 성능(specificity) 평가

[0100] 대장균 antibody가 부착된 바이오 센서가 대장균만 선별적으로 검출하고 비 대장균은 검출하지 않는지에 대해서 평가하기 위해서 대장균의 지표 세균으로 *E. coli* K12를 비 대장균이면서 세균인 *Pseudomonas putida*를 지표 세균으로 선정해서 각각의 단일 균주를 다른 비율로 혼합한 mock communities를 아래 표 5와 같이 제작하였다.

표 5

구 분	시료 #1	시료 #2	시료 #3	시료 #4	시료 #5
<i>E.coli</i> K12 농도 (CFU/ml)	4,800	4,800	4,800	4,800	4,800
<i>Pseudomonas putida</i> (CFU/ml)	6,900	3,450	0	690	345

[0103] *E.coli* K12는 4,800 CFU/ml로 고정하고, *Pseudomonas putida*의 농도를 다양하게 변화 했을 때에도, 일관성 있는 측정 결과를 보였다. 이 결과는 개발된 센서가 타깃이 아닌 세균에 의한 영향에 무관하게 타깃 세균인 대장균을 일관성 있게 검출하는 능력이 있음을 입증한 것이다.

[0105] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 본 발명이 속한 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아님은 명백하다. 본 발명이 속한 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 상기 내용을 바탕으로 본 발명의 범주 내에서 다양한 응용 및 변형을 행하는 것이 가능할 것이다.

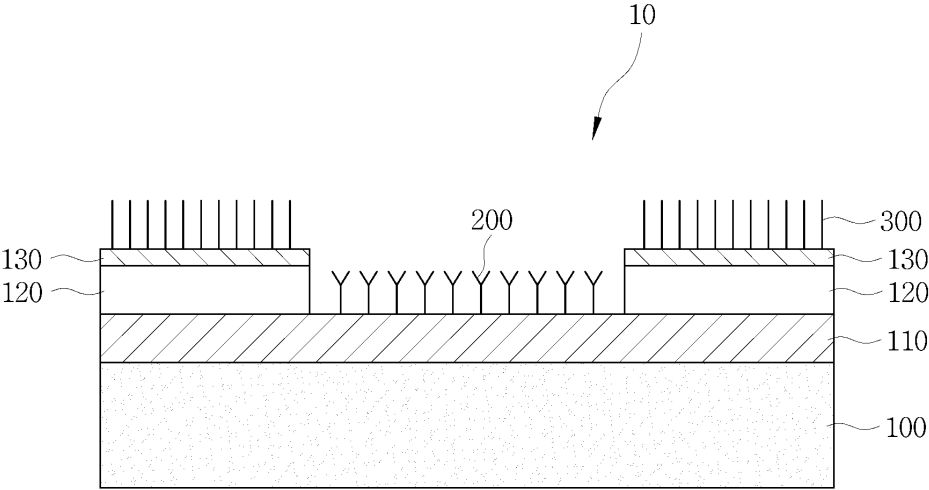
[0106] 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 특허청구범위와 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

부호의 설명

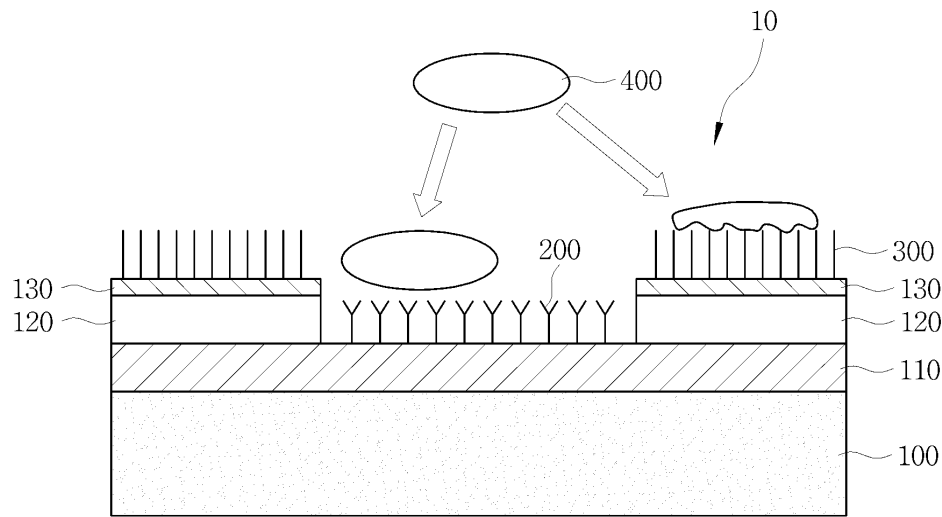
- [0107] 10: 센서장치 100: 기판부 110: 미생물 검출부
- 120: 신호 인식부 130: 수열합성부
- 200: 미생물 부착부 300: 신호 교란 차단부 400: 미생물
- 500: 통신부 600: 데이터 저장부 700: 판단부
- 800: 시스템

도면

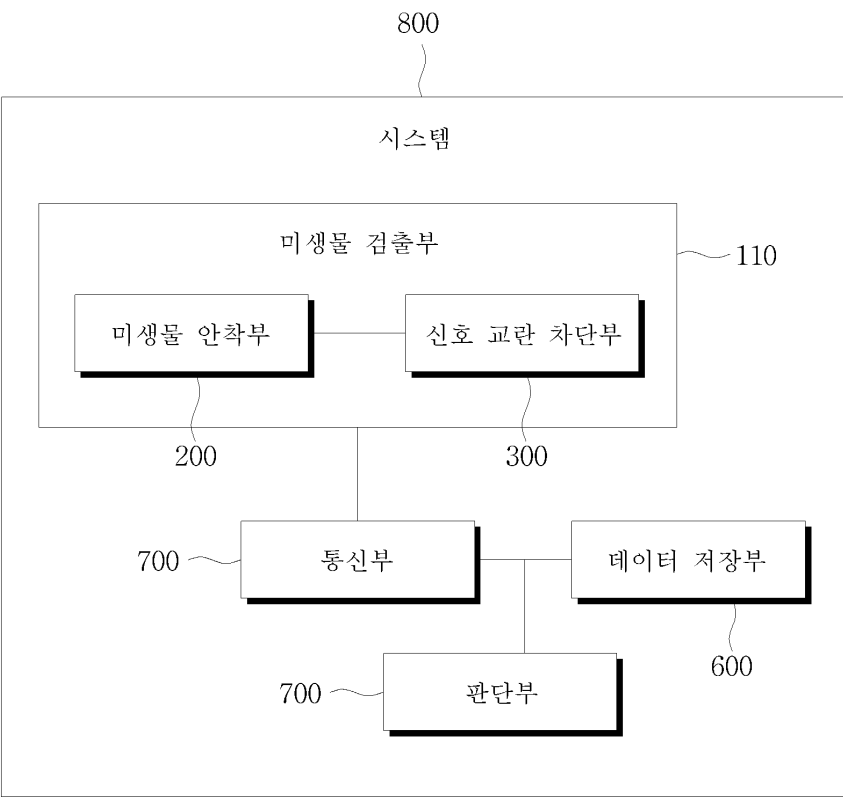
도면1



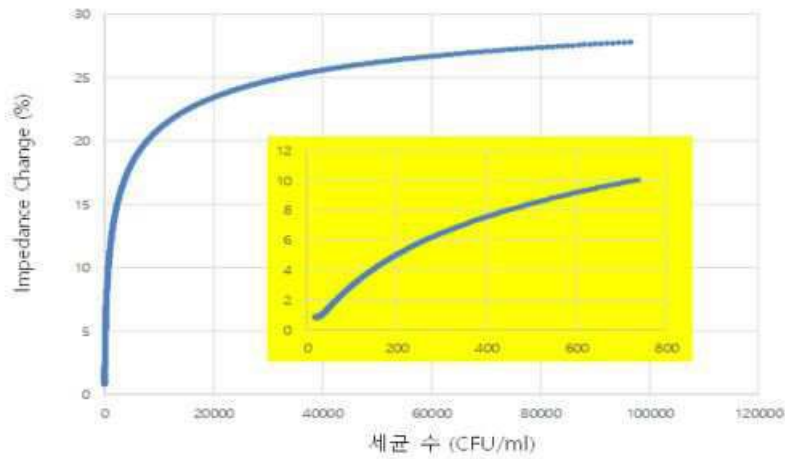
도면2



도면3



도면4



【심사관 직권보정사항】

【직권보정 1】

【보정항목】 청구범위

【보정세부항목】 청구항 9

【변경전】

제1항 내지 제5항, 제8항 중 어느 한 항에 따른 센서 장치, 통신부, 데이터 저장부 및 판단부를 포함하는 수돗물 내 목표 미생물 실시간 검출 시스템.

【변경후】

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 센서 장치, 통신부, 데이터 저장부 및 판단부를 포함하는 수돗물 내 목표 미생물 실시간 검출 시스템.