(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0027581
(43) 공개일자 2021년03월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/06 (2006.01) *G01N 33/543* (2006.01)
G01N 33/569 (2017.01) *G06T 7/62* (2017.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/06 (2013.01)
G01N 33/54346 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-0105950
(22) 출원일자 2019년08월28일
심사청구일자 2019년08월28일

(71) 출원인
서강대학교산학협력단
서울특별시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교)
(72) 발명자
강태욱
서울특별시 양천구 목동중앙로 143, 101동 406호
리 루우크 피.
미국, 캘리포니아 94720, 버클리, 캘리포니아 대학교, 버클리 스탠리홀 408
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
최우성

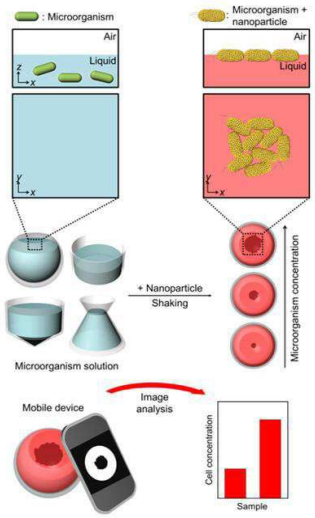
전체 청구항 수 : 총 21 항

(54) 발명의 명칭 **양전하를 가지는 소수성 나노 구조체를 활용한 미생물의 정량적 검출 방법 및 장치**

(57) 요 약

본 명세서는 양전하를 가지는 소수성 나노 구조체를 활용한 미생물의 정량적 검출 방법 및 장치가 개시된다. 즉, 양전하를 가지는 소수성 나노 구조체가 고밀도로 부착된 미생물을 액상과 기상의 계면 상에 응집 또는 농축시키고, 계면 부유물의 면적을 휴대용 이미징 장치로 촬영 및 분석하여 미생물의 존재 여부와 나아가 미생물의 농도를 빠르게 검출할 수 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
G01N 33/569 (2013.01)
G06T 7/62 (2017.01)
(72) 발명자
정광영
경기도 안양시 만안구 양화로135번길 80, 101동 2105호
김유연
서울특별시 마포구 서강로9길 44
장지한
서울특별시 마포구 독막로 221-11, 201호
황금래
서울특별시 강서구 강서로20길 25, 403호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2018M3D3A1A01055759
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 재단법인 한국연구재단
연구사업명 원천기술개발사업
연구과제명 표면증강라만분광법을 이용한 비평형 용존 C1 가스 및 대사산물 실시간 모니터링 기술 개발
기 여 율 1/2
과제수행기관명 서강대학교 산학협력단
연구기간 2019.01.01 ~ 2019.12.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2016R1A6A1A03012845
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 재단법인 한국연구재단
연구사업명 이공분야기초연구사업
연구과제명 뇌질환 약물 평가 기능 나노바이오칩 개발
기 여 율 1/2
과제수행기관명 서강대학교 산학협력단
연구기간 2019.01.01 ~ 2019.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

양전하를 가지는 소수성 나노 구조체 용액과 미생물을 포함하는 검출 대상 시료를 혼합하여 혼합 용액을 제조하는 단계;

상기 혼합 용액의 액상 (liquid phase)과 기상 (gas phase) 사이의 계면에 부유물 형성 여부를 확인하는 단계; 및

상기 부유물로부터 미생물을 검출하는 단계;를 포함하고,

상기 미생물을 검출하는 단계는 상기 계면의 부유물의 이미지를 얻는 단계; 및 얻어진 이미지 중 부유물이 차지하는 면적을 계산함으로써 미생물의 양을 정량화하는 단계;를 포함하는, 미생물의 정량적 검출 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 방법은, 미생물의 농도 변화에 따른 미생물 농도와 면적 간 상관 관계식에 계산된 면적을 대입하여 농도를 계산하는 농도 검출 단계;를 더 포함하는, 방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 이미지는 휴대용 이미징 장치로 얻어진 것인, 방법.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 휴대용 이미징 장치는 스마트폰의 카메라, 태블릿 PC의 카메라, 휴대용 디지털 카메라 중 하나 이상인, 방법.

청구항 5

제3항에 있어서,

상기 휴대용 이미징 장치는 계산된 면적을 미리 설정된 농도와 면적 간의 상관 관계식에 대입하여 농도를 계산하는 처리부를 더 포함하는 것인, 방법.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 면적 계산은 상용 이미지 소프트 웨어를 사용하여 수행하는 것인, 방법.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 상용 이미지 소프트 웨어는 면적을 계산하기 위해 명암 차를 이용하는 이미지 소프트웨어인 것인, 방법.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 혼합은 검출 대상 시료에 포함된 미생물의 표면에 상기 나노 구조체를 부착하는 것인, 방법.

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 나노 구조체는 금속 나노 구조체, 실리콘 나노 구조체 및 고분자 나노 구조체로 이루어지는 그룹에서 선택되는 하나 이상인, 방법.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 금속 나노 구조체의 금속은 Au, Ag, Pd, Pt, Al, Cu, Co, Cr, Mn, Ni 및 Fe로 이루어진 군에서 선택되는 1 이상의 금속 또는 2 이상의 금속의 합금인 것인, 방법.

청구항 11

제1항에 있어서,

상기 미생물은 대장균 (*Escherichia coli*), 슈도모나스 푸티다 (*Pseudomonas putida*), 코리네박테리움 글루타미쿰 (*Corynebacterium glutamicum*) 및 효모 (*Saccharomyces cerevisiae*)로 이루어진 군에서 선택되는 1 이상인 것인, 방법.

청구항 12

제1항에 있어서,

상기 방법은 혼합 용액을 교반하는 단계를 더 포함하는, 방법.

청구항 13

양전하를 가지는 소수성 나노 구조체 용액과 미생물을 포함하는 검출 대상 시료의 혼합액을 제조하는 혼합 장치; 및

상기 혼합 장치의 일측에 위치하고, 상기 혼합 장치의 미생물을 정량적으로 검출하는 검출 장치;를 포함하고,

상기 혼합 장치는 혼합 용액의 액상 (liquid phase) 공간 및 기상 (gas phase) 공간을 포함하는 용기를 포함하고, 여기서 상기 액상 및 기상은 계면을 형성하며,

상기 검출 장치는 상기 계면의 부유물에 대해 획득된 이미지에서 부유물이 차지하는 면적을 계산함으로써 미생물의 양을 정량화하는 프로세서를 포함하는 것인, 미생물의 정량적 검출 장치.

청구항 14

제13항에 있어서,

상기 프로세서는 면적 계산을 위하여 상용 이미지 소프트 웨어를 사용하는, 장치.

청구항 15

제14항에 있어서,

상기 상용 이미지 소프트 웨어는 부유물이 차지하는 면적을 계산하기 위해 명암 차를 이용하는 이미지 소프트웨어인 것인, 장치.

청구항 16

제13항에 있어서,

상기 검출 장치는 외부 이미징 장치로부터 얻어진 부유물에 대한 이미지를 전송 받는 수신 모듈; 및 상기 수신 모듈에 전자적으로 연결되고, 상기 전송된 이미지에서 부유물이 차지하는 면적을 계산하는 프로세서;를 포함하는, 장치.

청구항 17

제13항에 있어서,

상기 검출 장치는 상기 부유물의 이미지를 획득하기 위한 내부 이미징 장치; 및 상기 내부 이미징 장치로부터 이미지를 수신하여 상기 수신된 이미지에서 부유물이 차지하는 면적을 계산하는 프로세서;를 포함하는, 장치.

청구항 18

제13항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 프로세서는 계산된 면적을 미리 설정된 농도와 면적 간의 상관 관계식에 대입하여 농도를 계산하는 농도 계산을 더 수행하는, 장치.

청구항 19

제16항에 따른 미생물 검출 장치; 및

휴대용 이미징 장치;를 포함하고,

상기 휴대용 이미징 장치는 상기 검출 장치의 외부 이미징 장치인, 미생물 검출 키트.

청구항 20

제19항에 있어서,

상기 휴대용 이미징 장치는 스마트폰의 카메라, 태블릿 PC의 카메라, 휴대용 디지털 카메라 중 하나 이상인, 키트.

청구항 21

제19항에 있어서,

상기 휴대용 이미징 장치는 계산된 면적을 미리 설정된 농도와 면적 간의 상관 관계식에 대입하여 농도를 계산하는 처리부를 더 포함하는 것인, 키트.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 명세서는 양전하를 가지는 소수성 나노 구조체를 활용한 미생물의 정량적 검출 방법 및 장치에 관한 것으로서, 상세하게는 양전하를 가지는 소수성 나노 구조체 예컨대 금속 나노 구조체 등을 활용하여 수용액 내 미생물을 직접적이고 정량적으로 검출할 수 있는 방법 및 장치에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 최근 수인성 병원균에 의한 식수 오염에 대한 사회적 불안감이 급속도로 증대됨에 따라 빠르고 정확한 병원균 검출 기술에 대한 수요가 증가하고 있다.

[0004] 보편적으로 사용되는 기술인 현미경 측정법의 경우, 시료를 채취한 뒤 현미경을 이용하여 일정 단위 부피 내부에 존재하는 박테리아의 수를 측정하는 방법이다. 그러나 시료 내부에 단백질 등의 미생물로 오인될 수 있는 이물질이 존재할 경우 검출 신뢰도가 낮아지는 문제점이 있다.

[0005] 보편적으로 사용되는 다른 방법인 배양법의 경우, 미생물이 포함된 샘플을 채취하여 배지에서 배양하고, 생성되는 군락(colony)을 계수함으로써 미생물을 검출 및 정량화한다. 그러나 배지 분석을 위하여 멸균 상태의 실험 장소가 필요하고, 고도의 전문성이 요구될 뿐만 아니라, 배지 분석을 통해 최종 미생물 검출 결과를 얻기까지 3-5일의 긴 시간이 걸린다는 한계가 있다.

[0006] 또 다른 검출 방법으로는, 중합효소 연쇄 반응(PCR, Polymerase chain reaction)을 사용하여 미생물 내부의 특정 DNA를 증폭함으로써 미생물을 검출하는 방법이 있다. 그러나 이 방법 역시 복잡한 기기와 함께 고도의 전문성이 필요하다.

[0007] 이 외에도 효소면역 분석법(ELISA, enzyme linked immunosorbent assay)이 미생물 검출을 위해 사용되고 있다. 효소면역 분석법이란 항체나 항원에 효소를 표지하여 미생물 내 효소의 활성을 탐지하는 방법이다. 그러나 이 방법 역시 검출에 하루 이상의 긴 시간이 걸릴 뿐만 아니라, 전문 인력이 요구된다는 단점이 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0009] (특허문헌 0001) 한국 특허 제408784호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 일 측면에서, 본 명세서는 복잡한 기기나 장소적 제약, 검출과 분석을 위한 고도의 전문성 내지 전문 인력이 없이도, 반응 용기 내에 양전하를 가지는 소수성 나노 구조체 함유 용액과 미생물을 혼합하여 짧은 시간 내에 검출 대상 시료 내의 미생물을 액상/기상 계면에 농축하고 해당 계면 부유물의 이미지를 촬영하는 단순한 과정만으로, 미생물의 종류에 구애 받지 않고, 미생물을 높은 신뢰도 및 민감도로 정량적으로 손쉽게 검출할 수 있는 방법 및 장치를 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0012] 본 발명의 예시적인 구현예들에서는, 양전하를 가지는 소수성 나노 구조체 용액과 미생물을 포함하는 검출 대상 시료를 혼합하여 혼합 용액을 제조하는 단계; 상기 혼합 용액의 액상 (liquid phase)과 기상 (gas phase) 사이의 계면에 부유물 형성 여부를 확인하는 단계; 및 상기 부유물로부터 미생물을 검출하는 단계;를 포함하고, 상기 미생물을 검출하는 단계는 상기 계면의 부유물의 이미지를 얻는 단계; 및 얻어진 이미지 중 부유물이 차지하는 면적을 계산함으로써 미생물의 양을 정량화하는 단계;를 포함하는 미생물의 정량적 검출 방법을 제공한다.

[0013] 본 발명의 예시적인 구현예들에서는, 또한, 양전하를 가지는 소수성 나노 구조체 용액과 미생물을 포함하는 검출 대상 시료의 혼합액을 제조하는 혼합 장치; 및 상기 혼합 장치의 일측에 위치하고, 상기 혼합 장치의 미생물을 정량적으로 검출하는 검출 장치;를 포함하고, 상기 혼합 장치는 혼합 용액의 액상 (liquid phase) 공간 및 기상 (gas phase) 공간을 포함하는 용기를 포함하고, 여기서 상기 액상 및 기상은 계면을 형성하며, 상기 검출 장치는 상기 계면의 부유물에 대해 획득된 이미지에서 부유물이 차지하는 면적을 계산함으로써 미생물의 양을 정량화하는 프로세서를 포함하는 것인, 미생물의 정량적 검출 장치를 제공한다.

발명의 효과

[0015] 본 발명의 예시적인 구현예들에 의하면, 양전하를 가지는 소수성 나노 구조체 용액과 검출하고자 하는 미생물 시료를 단순히 혼합함으로써 직접적인 미생물 검출이 가능하므로 복잡한 기기나 검출을 위한 고도의 전문성 내지 전문 인력이 필요하지 않다는 장점이 있다.

[0016] 또한 대용량의 미생물 시료를 활용할 수 있어 검출 신뢰도가 높고 검출이 용이하다는 장점이 있으며, 용액 내 극미량의 미생물을 좁은 액체/기체 계면에 농축시키므로, 검출 민감도가 높다는 장점이 있다. 특히, 모든 미생물을 표면이 음전하를 띠므로, 양전하를 띠는 금속 나노 구조체를 활용하는 경우 미생물의 종류에 구애받지 않는 검출이 가능하다.

[0017] 더욱이, 계면 부유물의 이미지 획득과 부유물 면적 계산의 간단한 과정을 통해 검출 미생물의 검출과 동시에 정량화가 가능하게 된다.

도면의 간단한 설명

[0019] 도 1은 본 명세서의 일 실시예에 있어서, 양전하를 가지는 소수성 나노 구조체(금속 나노 입자)를 부착한 미생물의 공기/물 계면 상으로의 농축(응집) 및 휴대폰 카메라를 활용한 시료 내 미생물 정량화 방법을 나타내는 개략도이다.

도 2는 본 명세서의 일 실시예에 있어서, 양전하를 가지는 소수성 나노 구조체(금속 나노 입자)를 포함한 콜로이드 용액과 미생물이 포함된 시료를 혼합 후 교반해 주었을 때, 시료의 공기/물 계면 상에 상기 나노 구조체가 부착된 미생물이 농축(응집)되는 현상을 가시적으로 보여주는 사진이다.

도 3은 본 명세서의 일 실시예에 있어서, 공기/물 계면 상에 농축(응집)되어 있는 양전하를 가지는 소수성 나노 구조체(금속 나노 입자)가 부착된 미생물을 주사전자현미경 (scanning electron microscopy)로 분석한 결과이다.

도 4는 본 명세서의 일 실시예에 있어서, 상용 이미지 소프트웨어를 통해 공기/물 계면 상에 농축(응집)되어 있는 양전하를 가지는 소수성 나노 구조체(금속 나노 입자)가 부착된 미생물 즉, 부유물의 사진으로부터 계면에 농축(응집)되어 있는 면적을 정량화하는 과정을 보여주는 사진이다.

도 5는 본 명세서의 일 실시예에 있어서, 교반 속도가 증가함에 따른 양전하를 가지는 소수성 나노 구조체(금속 나노 입자)가 부착된 미생물이 공기/물 계면 상에 농축(응집)되는 양의 차이를 가시적으로 보여주는 사진과 그래프이다.

도 6은 본 명세서의 일 실시예에 있어서, 양전하를 가지는 소수성 나노 구조체(금속 나노 입자)가 부착된 미생물의 공기/물 계면 상으로의 농축(응집) 면적을 통해 미생물의 농도를 정량화할 수 있음을 보여주는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0020] 이하, 본 발명의 예시적인 구현예들을 상세히 설명한다.

[0021] 본 명세서에서, 나노란 1000 nm 이하를 의미한다.

[0022] 본 명세서에서, 부유물은 검출 대상 시료에 포함된 미생물 표면에 양전하를 가지는 소수성 나노 구조체가 부착된 복합체를 말한다.

[0023] 본 명세서에서 양전하를 가지는 소수성 나노 구조체는 구조체 표면이 소수성을 가지는 것이며 이에 따라 미생물의 계면 농축을 유도할 수 있는 것으로서, 구조체 표면이 양전하를 나타내는 것이다.

[0024] 본 명세서에서 액상과 기상의 계면은 혼합 용액의 액체상과 기체상이 만나는 계면을 의미하며, 예컨대 상기 액체상은 물이고 기체상은 공기인 것일 수 있다.

[0025] 본 명세서에서 “부”, “모듈”, “장치”, “시스템” 등의 용어는 하드웨어뿐만 아니라 해당 하드웨어에 의하여 구동되는 소프트웨어의 조합을 지칭할 수 있다. 예컨대, 하드웨어는 CPU 또는 다른 프로세서(processor)를 포함하는 데이터 처리 기기일 수 있다. 또한, 하드웨어에 의해 구동되는 소프트웨어는 실행중인 프로세스, 객체(object), 실행파일(executable), 실행 스레드(thread of execution), 계산 프로그램(program) 등의 프로그램일 수 있다.

[0026] 본 명세서에서 2차원이란 구조체의 가로 크기와 세로 크기 사이에는 1오더(order) 이상의 차이(at least one order of magnitude difference)가 나지 않지만, 가로 크기와 두께 및 세로 크기와 두께 사이에 1오더(order) 이상의 차이(at least one order of magnitude difference)가 나는 것을 의미한다. 즉, 가로 크기와 세로 크기는 1오더 이상 차이가 나지 않을 정도로 유사한 크기 범위 내에 있지만, 두께는 가로 크기 및 세로 크기와 1오더 이상 차이가 나는 작은 크기를 가지는 것을 2차원(예컨대 판형이라고 부를 수 있다)이라고 한다

[0027] 일 측면에서, 본 명세서에 개시된 기술은, 양전하를 가지는 소수성 나노 구조체 (예컨대, 금속 나노 구조체) 용액과 미생물을 포함하는 검출 대상 시료를 혼합하여 혼합 용액을 제조하는 단계; 상기 혼합 용액의 액상(liquid phase)과 기상 (gas phase) 사이의 계면에 부유물 형성 여부를 확인하는 단계; 및 상기 부유물로부터 미생물을 검출하는 단계;를 포함하며, 여기서 상기 미생물을 검출하는 단계는 상기 계면의 부유물의 이미지를 얻는 단계; 및 얻어진 이미지 중 부유물이 차지하는 면적을 계산함으로써 미생물의 양을 정량화하는 단계;를 포함하는 미생물의 정량적 검출 방법을 제공한다.

[0028] 상기 소수성 나노 구조체 용액은 소수성 나노 구조체를 포함하는 콜로이드 상의 용액을 의미하는 것으로, 예컨대, 상기 소수성 나노 구조체 용액은 금속 나노 구조체를 포함하는 수용액인 것일 수 있다.

[0029] 도 1은 본 명세서의 일 실시예에 있어서, 양전하를 가지는 소수성 나노 구조체(양전하를 띄는 금속 나노 입자)를 부착한 미생물의 공기/물 계면 상으로의 농축(응집) 및 휴대폰 카메라를 활용한 시료 내 미생물의 정량화 방법을 나타내는 개략도이다.

[0030] 도 1에 도시된 바와 같이, 콜로이드 상의 금속 나노 입자 용액에 미생물이 포함된 시료를 혼합한다.

[0031] 혼합된 용액 내부에서 상기 금속 나노 입자는 미생물 표면에 고밀도로 부착하여 공기/물 계면 상으로 상기 금속 나노 입자가 부착된 미생물을 응집시킬 수 있다. 여기서, 혼합된 용액 내부에서 미생물의 농도가 높을수록 공기/물 계면 상으로 응집되는 미생물의 면적이 증가한다.

[0032] 또한, 예컨대 스마트폰 등과 같은 휴대용 이미징 장치로 촬영된 혼합된 용액의 사진 이미지 및 이를 분석할 수 있는 상용 소프트웨어를 통해 공기/물 계면 상으로 응집되는 미생물의 면적을 손쉽게 측정할 수 있고, 이에 따라 미생물의 농도를 계산할 수 있다.

[0033] 구체적으로, 상기 나노 구조체가 부착된 미생물의 면적의 계산은 촬영된 사진 내에서 특정 명도 이하의 영역을 분리해 낸 뒤, 상용 소프트웨어를 통해 영역의 면적을 구함으로써 이루어진다.

[0034] 예시적인 일 구현예에서, 상기 방법은, 미생물의 농도 변화에 따른 미생물 농도와 면적 간 상관 관계식에 계산된 면적을 대입하여 농도를 계산하는 농도 검출 단계;를 더 포함할 수 있다.

[0035] 비제한적인 예시에서, 상기 방법은, 미생물의 농도 변화에 따른 미생물 농도와 면적 간 상관 관계식을 도출하는 단계; 및 상기 상관 관계식에 면적을 대입하여 농도를 계산하는 농도 검출 단계;를 더 포함할 수 있다.

[0036] 즉, 미생물의 농도를 변화시켜 농도에 따른 면적 변화를 파악하여, 농도와 면적 간 상관 관계식을 구해 놓은 후, 측정된 면적을 전술한 농도와 면적 간의 상관관계식(calibration curve)에 대입함으로써 농도를 얻을 수 있

는 것이다.

[0037] 따라서 미생물의 검출과 동시에 부유물의 면적을 통한 미생물의 정량화와 농도 검출이 가능하게 된다.

[0038] 예시적인 일 구현예에서, 상기 이미지는 휴대용 이미징 장치로 얻어진 것이 바람직하다. 상기 휴대용 이미징 장치는 스마트폰의 카메라, 태블릿 PC의 카메라, 휴대용 디지털 카메라 중 하나 이상일 수 있다.

[0039] 예시적인 일 구현예에서, 상기 정량화는 상용 이미지 소프트 웨어를 사용하여 수행하는 것일 수 있다. 여기서, 상기 상용 이미지 소프트 웨어는 면적을 계산하기 위해 명암 차를 이용하는 이미지 소프트웨어인 것이 바람직하다. 이러한 예로서 예컨대 이미지제이(ImageJ), 어도비 포토샵(Adobe Photoshop) 등을 들 수 있지만, 이에 제한되는 것이 아니다.

[0040] 예시적인 일 구현예에서, 이러한 상용 이미지 소프트웨어는 애플리케이션 형태로 제작되어 스마트 폰 등의 휴대용 이미징 장치에 내장되어 사용될 수 있다.

[0041] 예컨대, 상기 휴대용 이미징 장치는 계산된 면적을 미리 설정된 농도와 면적 간의 상관 관계식에 대입하여 농도를 계산하는 처리부를 더 포함할 수 있다.

[0042] 예시적인 일 구현예에서, 상기 혼합은 검출 대상 시료에 포함된 미생물의 표면에 양전하를 가지는 소수성 나노 구조체를 부착 또는 코팅하는 것일 수 있다.

[0043] 예시적인 일 구현예에서, 상기 방법은 혼합 용액을 교반하는 단계를 더 포함할 수 있다. 교반은 용액 내에서 미생물의 이동 속도를 증가시켜 물/공기와 같인 액상/기상 계면에 미생물이 접촉할 수 있는 확률을 증가시킨다는 측면에서 바람직하다.

[0044] 예시적인 일 구현예에서, 교반은 100 내지 450 rpm의 속도 및 20 내지 48 ℃의 온도에서 실시하는 것일 수 있다. 상기와 같은 조건으로 혼합 용액을 교반함으로써 미생물의 물리적 손상을 야기하여 검출 신뢰도가 떨어질 수 있는 문제를 예방하고 미생물을 혼합 용액의 액상과 기상 계면 상에 응집시켜 미생물의 존재 여부를 육안을 통해 사전적으로 용이하게 검출할 수 있는 효과가 있다.

[0045] 이러한 측면에서, 교반은 100 rpm 이상, 150 rpm 이상, 200 rpm 이상, 250 rpm 이상 또는 300 rpm 이상이고 450 rpm 이하, 400 rpm 이하 또는 300 rpm 이하인 속도로 실시하는 것이 바람직할 수 있다. 또한, 교반은 20 ℃ 이상, 25 ℃ 이상, 30 ℃ 이상 또는 35 ℃ 이상이고 48 ℃ 이하, 45 ℃ 이하, 40 ℃ 이하 또는 35 ℃ 이하인 온도에서 실시하는 것이 바람직할 수 있다.

[0046] 예시적인 일 구현예에서, 상기 금속 나노 구조체의 금속은 Au, Ag, Pd, Pt, Al, Cu, Co, Cr, Mn, Ni 및 Fe로 이루어진 군에서 선택되는 1 이상의 금속 또는 2 이상의 금속의 합금일 수 있다.

[0047] 예시적인 일 구현예에서, 상기 양전하를 가지는 소수성 나노 구조체는 전술한 바와 같이, 입자 표면이 소수성을 가지는 것이며 이에 따라 미생물의 계면 농축을 유도할 수 있는 것으로서 표면이 양전하를 나타내는 것이면 된다.

[0048] 이러한 나노 구조체는 바람직하게는 금속 나노 구조체이지만, 이에 제한되지 않으며 예컨대 실리콘이나 고분자(예컨대, 폴리락틱산(PGA), 폴리락틱코글리콜산(PLGA), 폴리카프로락톤(PCL) 등) 나노 구조체와 같이 입자 표면이 소수성을 가지고 미생물의 계면 농축을 유도할 수 있는 것이면 제한되지 않는다. 따라서, 상기 나노 구조체는 금속 나노 구조체, 실리콘 나노 구조체 및 고분자 나노 구조체로 이루어진 그룹에서 선택되는 하나 이상일 수 있다.

[0049] 또한, 이러한 소수성 나노 구조체는 제조 시 표면이 양전하를 띄도록 제조될 수 있다. 모든 미생물을 표면이 음전하를 띠므로, 양전하를 띠도록 표면 처리함으로써 미생물의 종류에 구애받지 않는 검출이 가능하다.

[0050] 예시적인 일 구현예에서, 상기 나노 구조체는 예컨대 구, 타원체, 막대, 덴드리머, 사면체, 육면체, 팔면체, 2차원 사각형, 2차원 삼각형 및 코어-쉘 구조로 이루어진 군에서 선택되는 1 이상의 형상을 갖는 것일 수 있다.

[0051] 예시적인 일 구현예에서, 상기 나노 구조체는 그 크기가 200 nm 이하, 150 nm 이하, 100 nm 이하, 3 내지 200 nm, 또는 3 내지 100 nm인 것일 수 있다. 여기서, 상기 크기는 2차원 이미지 예컨대 SEM 이미지 등으로 확인할 수 있는 것으로서, 입자 직경을 의미하는 것일 수 있다. 여기서, 직경이란 반드시 구형 또는 실질적 구형에 적용되는 것뿐만 아니라, 구조체를 구 내에 포섭한다고 가정하였을 때에 해당 구의 직경으로 간주될 수 있는 구조체의 최장 길이를 의미하는 것일 수 있다.

[0052] 예시적인 일 구현예에서, 상기 나노 구조체 특히 금속 나노 구조체의 표면 리간드는 하이드록실아민 하이드로클로라이드 또는 헥사데시트리메틸암모늄 브로마이드를 포함하여 나노 구조체의 미생물 표면으로의 부착을 도울 수 있다.

[0053] 한편, 고분자나 실리콘 나노 입자 구조체의 경우도 리간드를 사용해 양전하를 띄도록 할 수 있으며, 이 경우 말단이 아민기($-NH_2$)를 가지는 표면 리간드를 주로 사용할 수 있다.

[0054] 예시적인 일 구현예에서, 상기 미생물은 박테리아 또는 균류인 것일 수 있다. 본원에서 미생물은 그람 양성 세균, 그람 음성 세균 모두를 포함하는 것을 의미한다.

[0055] 예시적인 일 구현예에서, 상기 미생물은 대장균 (*Escherichia coli*), 슈도모나스 푸티다 (*Pseudomonas putida*), 코리네박테리움 글루타미쿰 (*Corynebacterium glutamicum*) 및 효모 (*Saccharomyces cerevisiae*)로 이루어진 군에서 선택되는 1 이상인 것일 수 있다.

[0056] 한편, 다른 일 측면에서, 본 명세서에 개시된 기술은, 양전하를 가지는 소수성 나노 구조체 용액과 미생물을 포함하는 검출 대상 시료의 혼합액을 제조하는 혼합 장치; 및 상기 혼합 장치의 일측에 위치하고, 상기 혼합 장치의 미생물을 정량적으로 검출하는 검출 장치;를 포함하고, 상기 혼합 장치는 혼합 용액의 액상 (liquid phase) 공간 및 기상 (gas phase) 공간을 포함하는 용기를 포함하고, 여기서 상기 액상 및 기상은 계면을 형성하며, 상기 검출 장치는 상기 계면의 부유물에 대해 획득된 이미지에서 부유물이 차지하는 면적을 계산함으로써 미생물의 양을 정량화하는 프로세서를 포함하는 미생물의 정량적 검출 장치를 제공한다.

[0057] 예시적인 일 구현예에서, 상기 프로세서는 정량화를 위하여 상용 이미지 소프트 웨어를 사용하는 것일 수 있다. 전술한 바와 같이, 이러한 상용 이미지 소프트 웨어는 부유물이 차지하는 면적을 계산하기 위해 명암 차를 이용하는 이미지 소프트웨어인 것이 바람직하다.

[0058] 예시적인 일 구현예에서, 상기 검출 장치는 외부 이미징 장치로부터 얻어진 부유물에 대한 이미지를 전송 받는 수신 모듈; 및 상기 수신 모듈에 전자적으로 연결되고, 상기 전송된 이미지에서 부유물이 차지하는 면적을 계산하는 프로세서;를 포함할 수 있다.

[0059] 예시적인 일 구현예에서, 상기 검출 장치는 상기 부유물의 이미지를 획득하기 위한 내부 이미징 장치; 및 상기 내부 이미징 장치로부터 이미지를 수신하여 상기 수신된 이미지에서 부유물이 차지하는 면적을 계산하는 프로세서;를 포함할 수 있다.

[0060] 예시적인 일 구현예에서, 상기 프로세서는 계산된 면적을 미리 설정된 농도와 면적 간의 상관 관계식에 대입하여 농도를 계산하는 농도 계산을 더 수행할 수 있다.

[0061] 예시적인 일 구현예에서, 상기 용기의 형상은, 예컨대 원통형, 원뿔형, 주둥이가 좁은 모래시계형, 구형 및 다각기둥형 구조로 이루어진 군에서 선택되는 1 이상의 형상을 갖는 것일 수 있지만, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0062] 또 다른 일 측면에서, 본 명세서에 개시된 기술은, 전술한 미생물 검출 장치; 및 휴대용 이미징 장치;를 포함하고, 상기 휴대용 이미징 장치는 상기 검출 장치의 외부 이미징 장치인 미생물 검출 키트를 제공한다.

[0063] 전술한 바와 같이, 상기 휴대용 이미징 장치는 스마트폰의 카메라, 태블릿 PC의 카메라, 휴대용 디지털 카메라 중 하나 이상일 수 있으며, 또한 계산된 면적을 미리 설정된 농도와 면적 간의 상관 관계식에 대입하여 농도를 계산하는 처리부를 더 포함할 수 있다.

[0064] 이상과 같이 본 명세서의 예시적인 구현예들서는, 나노 구조체가 고밀도로 부착된 미생물을 액상과 기상의 계면상에 응집 또는 농축시켜 이의 면적을 측정 및 분석한다. 이에 따르면, 시료에서부터 결과를 검출하기까지 소요되는 시간을 수 시간 내로 단축하여 미생물의 존재 여부 및 미생물의 농도를 빠르게 진단할 수 있다.

[0065] 또한, 본 명세서의 예시적인 구현예들에 의하면, 휴대가 용이하고 접근성이 뛰어난 모바일 등의 휴대용 전자기기 또는 광학 기기와 간단한 상용 이미지 소프트웨어를 사용하여 용액 내부의 미생물의 정량화와 농도 검출을 빠르게 수행할 수 있기 때문에, 실제 환경에서 미생물의 정량화와 농도 측정 등에 폭넓게 이용될 수 있다. 또한, 어느 장소에서나 쉽게 검출 결과를 데이터화하고 이를 원격 통신할 수 있다는 장점도 있다.

[0067] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지

식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0069] **실시예**

[0070] **(1) 금속 나노 입자 용액과 미생물 시료를 혼합하여 미생물 표면을 나노 입자로 코팅하는 단계**

[0071] 양전하를 띠는 하이드록실아민 하이드로클로라이드 (hydroxylamine hydrochloride)로 표면 개질된 지름이 약 30 nm인 구형 금 나노 입자 수용액을 준비하였다.

[0072] 상기 금속 나노 입자 수용액 (수용액 중 금속 나노 입자 농도는 약 3×10^{10} 개/ml) 4.5 ml이 담긴 용기를 준비하였다. 용기는 예컨대, 원통 모양의 바이알 (vial), 모래시계 모양의 삼각 플라스크 (flask), 둥근 바닥 플라스크 (flask) 등의 용기를 사용할 수 있으며 공기/물 계면이 용액상에 비해 더 좁은 구조의 경우, 미생물을 더 좁은 계면에 농축시킬 수 있어 응집 효율이 더 높아질 것으로 기대된다. 또한, 예컨대 10 ml, 30 ml, 50 ml 또는 100 ml 크기의 용기를 사용할 수 있으며, 더 큰 사이즈의 용기를 사용하여 처리량을 높여 검출 신뢰도를 증가시킬 수 있다. 상기 준비한 금속 나노 입자 수용액 4.5 ml에 검출하고자 하는 미생물이 포함된 용액 0.5 ml를 혼합하여 혼합 용액을 제조하였다.

[0074] **(2) 혼합 용액을 교반하여 미생물을 물/공기 계면에 위치시키는 단계**

[0075] 구형 금 나노 입자 수용액과 미생물이 혼합된 용액을 약 30 ℃ 하에서 250 rpm으로 2 시간 동안 교반시켰을 때, 혼합 용액의 공기/물 계면에 금속 나노 입자가 부착된 미생물이 농축되는 것을 관찰하였다.

[0077] **(3) 휴대용 광학기기로 계면의 부유물을 촬영하는 단계**

[0078] 도 2는 본 명세서의 일 실시예에서, 하이드록실아민 하이드로클로라이드로 표면 개질된 구형 금 나노 입자 수용액 4.5 ml와 10^7 cells/ml의 농도를 가지는 대장균 용액 0.5 ml를 2 시간 동안 혼합 및 교반하기 전과 후의 사진을 나타낸 것이다.

[0079] 도 2로부터 알 수 있듯이 혼합 및 교반 전의 미생물과 금속 나노 입자 용액의 공기/물 계면에는 부유물이 없지만, 혼합 용액의 계면에는 부유물이 형성됨을 확인하였다.

[0080] 도 3은 본 명세서의 일 실시예에서, 교반된 금 나노 입자와 슈도모나스 푸티다 (*Pseudomonas putida*)의 혼합용액의 공기/물 계면에 존재하는 부유물을 주사전자현미경을 통해 관찰한 것이다.

[0081] 도 3으로부터 알 수 있듯이, 공기/물 계면에 형성된 부유물을 주사전자현미경으로 관측한 결과, 해당 물질은 미생물 표면에 금속 나노 입자가 고밀도로 부착된 구조체의 군집인 것을 확인하였다. 양전하로 표면 개질된 구형 금 나노 입자가 정전기적 인력에 의해 미생물 표면에 고밀도로 부착되어 있으며 금속 나노 입자가 부착된 미생물이 고밀도로 농축되어있음을 확인하였다.

[0083] **(4) 상용 이미지 소프트웨어를 사용하여 미생물의 양을 정량화하는 단계**

[0084] 공기/물 계면 상에 떠오른 금속 나노 입자가 부착된 미생물의 면적을 이미지 분석 소프트웨어 (ImageJ)를 통해 계산했다. 미생물의 농도를 달리하여 계면 상에 응집되는 물질의 면적을 정량화하였다.

[0085] 도 4는 본 명세서의 일 실시예에서, 공기/물 계면 상으로 응집되는 금속 나노 입자가 부착된 미생물의 면적을 계산하기 위하여 처리된 계면의 금속 나노 입자가 부착된 미생물의 사진의 처리 전과 후이다.

[0086] 도 4에서 알 수 있듯이, 이미지 분석 소프트웨어를 통하여 공기/물 계면에서 금속 나노 입자가 부착된 미생물이 응집 되어있는 부분과 응집 되어있지 않은 부분을 분리해낼 수 있다.

[0087] 이와 같이 분리한 후의 면적 계산은 ImageJ를 통해 사진 내 특정 명도 이하의 어두운 영역을 분리해 낸 뒤 미리 면적을 알고 있는 영역과 대비함으로써 수행하였고 얻어진 수치는 201.50 mm^2 (도4의 경우) 이었다.

[0088] 도 5는 본 명세서의 일 실시예에서, 약 30 ℃에서 0, 50, 250 rpm으로 교반 속도를 달리하여 대장균이 포함된

용액과 콜로이드 상의 금속 나노 입자 용액을 3시간 동안 혼합하였을 때, 교반 속도가 증가할수록 계면상에 응집되는 면적이 증가함을 나타낸 그래프이다.

[0089] 도 5에서 알 수 있듯이, 교반 속도를 증가시켜 줌으로써 계면에 응집되는 미생물의 양을 늘려줄 수 있다.

[0090] 도 6은 본 명세서의 일 실시예에서, 미생물 농도를 달리하여 대장균이 포함된 용액과 콜로이드 상의 금속 나노 구조체 용액을 약 30 ℃ 및 250 rpm에서 6시간 동안 혼합하였을 때, 미생물 농도가 증가할수록 계면상에 응집되는 면적이 증가함을 나타낸 그래프이다.

[0091] 참고로, 농도와 면적 간의 상관 관계를 구할 때는 다른 조건은 모두 고정한 채로 농도만 변경하고 이에 따른 면적 변화를 파악하여야 함은 물론이다.

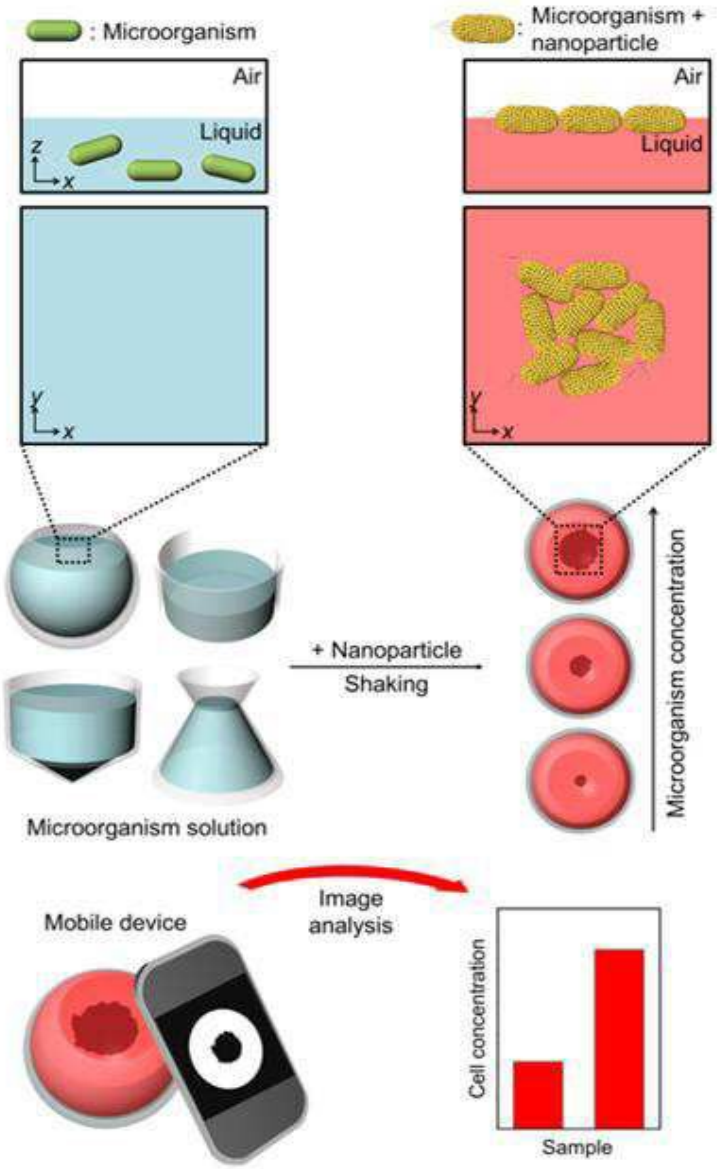
[0092] 도 6에서 알 수 있는 바와 같이, 미생물의 농도와 계면에 응집되는 면적이 선형적인 관계를 보여준다. 따라서 미리 농도를 알고 있는 미생물 수용액을 통해 면적과의 상관관계식을 도출해 낼 수 있으며, 미지의 농도의 미생물 수용액에서 응집된 면적을 이에 대입함으로써 농도를 구해 낼 수 있다.

[0093] 이와 같이 본 명세서에 따른 미생물 정량화 방법은 간단한 이미지 분석 소프트웨어를 통해 얻어진 면적을 통해 농도 역시 용이하게 측정할 수 있다.

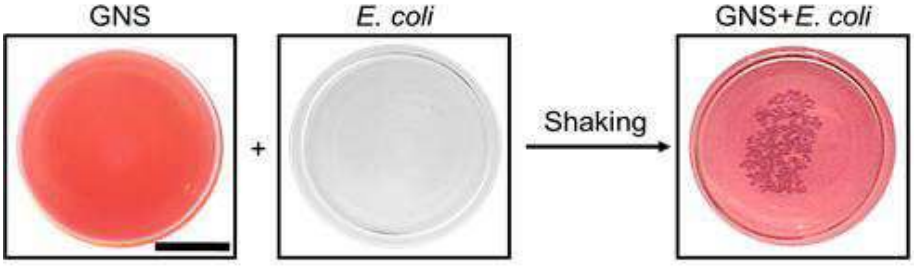
[0094] 이상과 같이 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 실시 태양일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의해 정의된다고 할 것이다.

도면

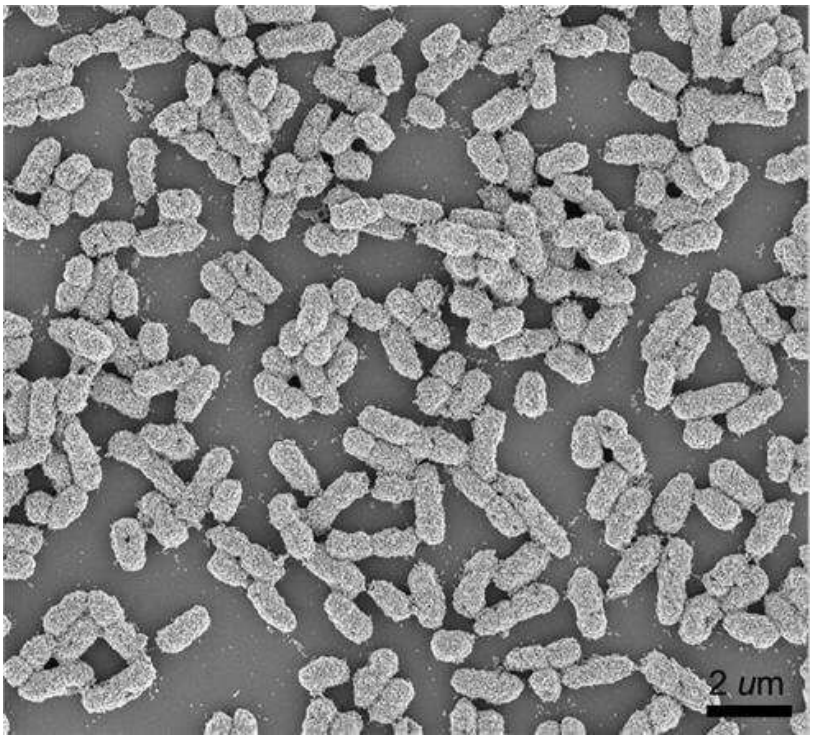
도면1


: Microorganism
: Microorganism + nanoparticle
Air
Liquid
Air
Liquid
+ Nanoparticle
Shaking
Microorganism concentration
Microorganism solution
Mobile device
Image analysis
Cell concentration
Sample

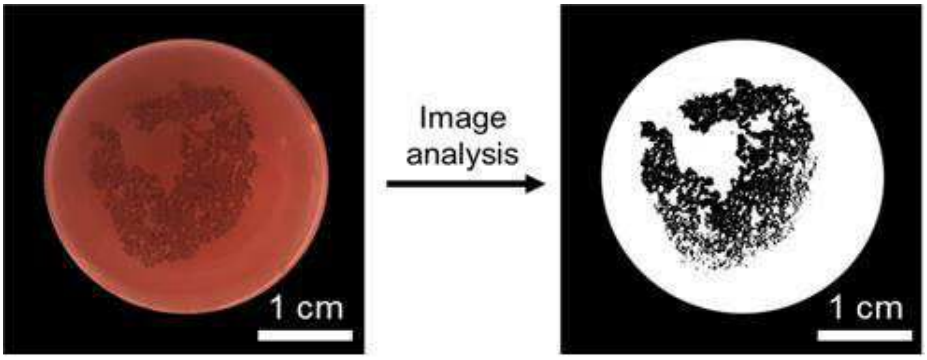
도면2


GNS
E. coli
GNS+E. coli
+
Shaking

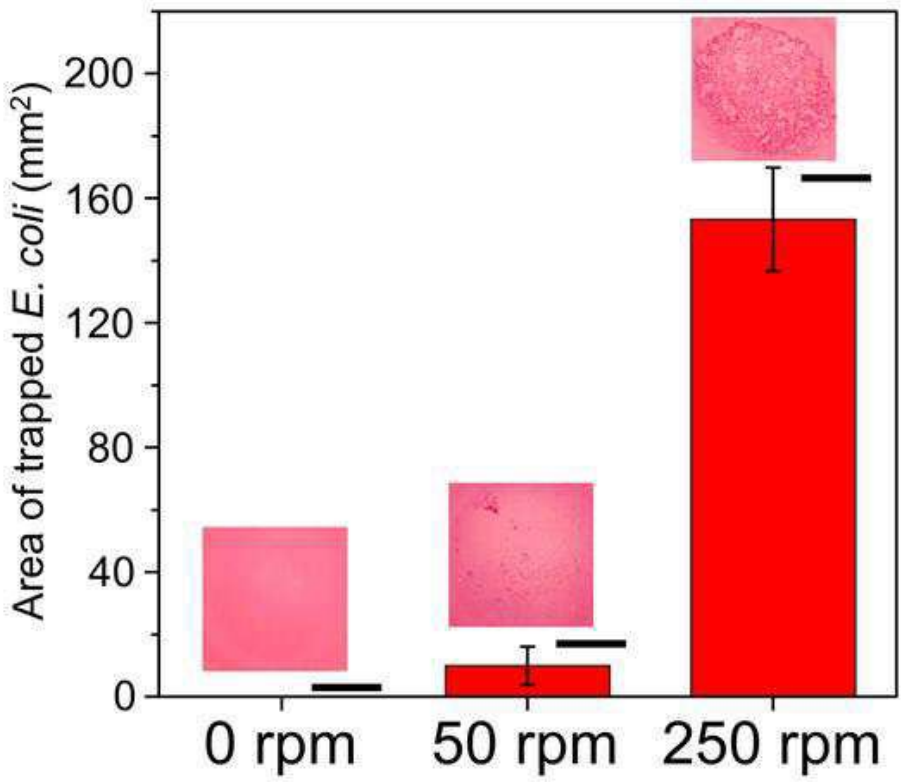
도면3



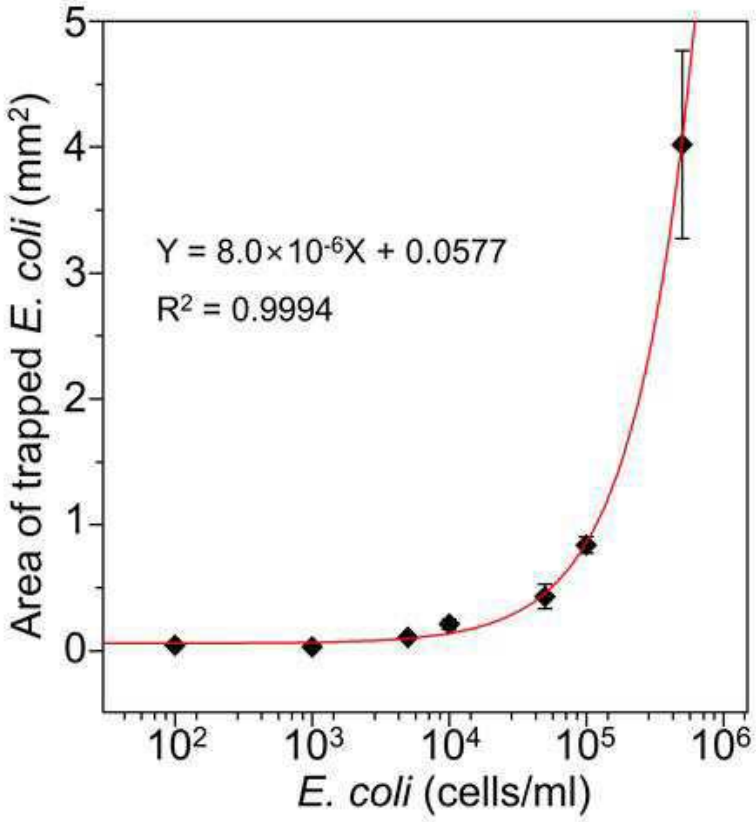
도면4



도면5


Area of trapped E. coli (mm²)
200
160
120
80
40
0
0 rpm
50 rpm
250 rpm

도면6


Area of trapped E. coli (mm²)
E. coli (cells/ml)
Y = 8.0×10⁻⁶X + 0.0577
R² = 0.9994
0
1
2
3
4
5
10²
10³
10⁴
10⁵
10⁶