(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0113893
(43) 공개일자 2020년10월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
*C12Q 1/02* (2017.01) *G01N 21/65* (2006.01)
(52) CPC특허분류
*C12Q 1/02* (2013.01)
*G01N 21/658* (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-0034744
(22) 출원일자 2019년03월27일
심사청구일자 2019년03월27일

(71) 출원인
**서강대학교산학협력단**
서울특별시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교)
(72) 발명자
**강태욱**
서울특별시 양천구 목동중앙로 143, 101동 406호
**정광영**
경기도 안양시 만안구 양화로135번길 80, 101동 2105호
*(뒷면에 계속)*
(74) 대리인
**최우성**

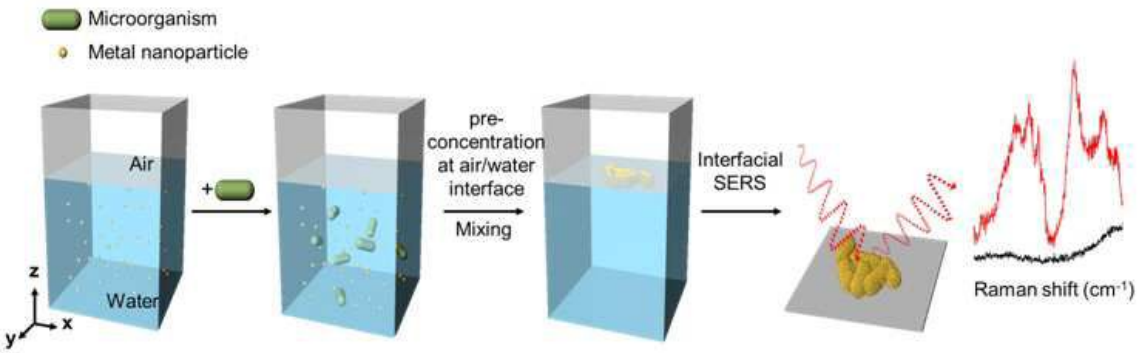
전체 청구항 수 : 총 19 항

(54) 발명의 명칭 **금속 나노 구조체를 부착한 미생물의 공기/물 계면에서의 응집을 활용한 미생물 검출 방법**

## (57) 요 약

본원에는 금속 나노 구조체를 부착한 미생물의 공기와 물 계면에서의 응집을 활용한 미생물 검출 방법이 개시된다. 상기 방법은 금속 나노 구조체 용액과 검출 대상 시료를 혼합하여 혼합 용액을 제조하는 단계; 및 상기 혼합 용액의 액상과 기상 사이의 계면에 부유물 형성 여부를 확인하는 단계를 포함한다.

*대 표 도* - 도1



(72) 발명자

**김유연**

서울특별시 마포구 서강로9길 44

**장지한**

서울특별시 마포구 독막로 221-11, 201호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

| | |
|---|---|
| 과제고유번호 | 2016R1A2B3014157 |
| 부처명 | 과학기술정보통신부 |
| 과제관리(전문)기관명 | 재단법인 한국연구재단 |
| 연구사업명 | 이공분야기초연구사업 |
| 연구과제명 | 프로그래밍 기법을 이용한 자기조립체 기반 차세대 플라스모닉 복합 나노구조체 개발 및 응용 |
| 기 여 율 | 1/3 |
| 과제수행기관명 | 서강대학교 산학협력단 |
| 연구기간 | 2019.03.01 ~ 2019.05.31 |

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 | 1/3 |
| 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 | 1/3 |
| 과제수행기관명 | 서강대학교 산학협력단 |
| 연구기간 | 2019.01.01 ~ 2019.12.31 |

# *명 세 서*

## *청구범위*

### 청구항 1

금속 나노 구조체 용액과 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 단계를 포함하는 미생물 검출 방법.

### 청구항 2

제 1항에 있어서,

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

### 청구항 3

제 1항에 있어서,

상기 금속 나노 구조체는 양전하를 띠도록 표면 처리된 것인, 미생물 검출 방법.

### 청구항 4

제 1항에 있어서,

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

### 청구항 5

제 1항에 있어서,

상기 미생물은 대장균 (*E. coli*), 코리네박테리움 글루타미쿰 (*Corynebacterium glutamicum*) 및 효모 (*Saccharomyces cerevisiae*)로 이루어진 군에서 선택되는 1 이상인 것인, 미생물 검출 방법.

### 청구항 6

제 1항에 있어서,

상기 방법은 혼합 용액을 교반하는 단계를 더 포함하는 것인, 미생물 검출 방법.

### 청구항 7

제 6항에 있어서,

상기 교반은 100 내지 450 rpm의 속도에서 실시하는 것인, 미생물 검출 방법.

**청구항 8**

제 6항에 있어서,

상기 교반은 20 내지 48 ℃의 온도에서 실시하는 것인, 미생물 검출 방법.

**청구항 9**

제 1항에 있어서,

상기 미생물을 검출하는 단계는 부유물을 육안으로 확인하여 미생물 존재 여부를 확인하는 것인, 미생물 검출 방법.

**청구항 10**

제 1항에 있어서,

상기 미생물을 검출하는 단계는 계면에 형성된 부유물에 직접 레이저를 조사하여 표면증강라만산란법으로 미생물을 검출하는 것인, 미생물 검출 방법.

**청구항 11**

제 1항에 있어서,

상기 미생물을 검출하는 단계는 계면에 형성된 부유물에 수평 방향으로 기판을 접촉시켜 부유물을 기판에 전사시킨 다음 상기 기판에 레이저를 조사하여 표면증강라만산란법으로 미생물을 검출하는 것인, 미생물 검출 방법.

**청구항 12**

제 10항 또는 제 11항에 있어서,

상기 레이저는 5 내지 250 mW로 633 내지 785 nm 파장으로 조사하는 것인, 미생물 검출 방법.

**청구항 13**

금속 나노 구조체 용액과 검출 대상 시료를 혼합하는 혼합부; 및

상기 혼합부 상단에서 미생물을 검출하는 검출부를 포함하고,

상기 혼합부는 혼합 용액의 액상 (liquid phase)과 만나 계면을 형성할 수 있는 기상 (gas phase) 공간을 포함하고,

상기 계면에 형성된 부유물로부터 미생물을 검출하는 것인, 미생물 검출 장치.

**청구항 14**

제 13항에 있어서,

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

**청구항 15**

제 13항에 있어서,

상기 금속 나노 구조체는 양전하를 띠도록 표면 처리된 것인, 미생물 검출 장치.

**청구항 16**

제 13항에 있어서,

상기 검출부는 계면에 형성된 부유물 형성 여부를 육안으로 확인하여 미생물 존재 여부를 확인하는 것인, 미생물 검출 장치.

**청구항 17**

제 13항에 있어서,

상기 검출부는 계면에 형성된 부유물에 직접 레이저를 조사하여 표면증강라만산란법으로 미생물을 검출하는 것인, 미생물 검출 장치.

**청구항 18**

제 13항에 있어서,

상기 검출부는 계면에 형성된 부유물에 수평 방향으로 기판을 접촉시켜 부유물을 기판에 전사시킨 다음 상기 기판에 레이저를 조사하여 표면증강라만산란법으로 미생물을 검출하는 것인, 미생물 검출 장치.

**청구항 19**

제 13항에 있어서,

상기 장치는 혼합 용액을 교반하는 교반 시스템이 구비된 것인, 미생물 검출 장치.

## *발명의 설명*

### *기 술 분 야*

[0001] 본 명세서에는 금속 나노 구조체를 부착한 미생물의 공기와 물 계면에서의 응집을 활용한 미생물 검출 방법이 개시된다.

### *배 경 기 술*

[0002] 식수 내부에 존재하는 수인성 미생물을 검출하기 위한 방법으로 다음의 기술들이 사용되고 있다.

[0003] 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 낮아지고, 또한 현미경으로 관측한 미생물의 정확한 종을 진단하기 어려운 문제점이 있다.

[0004] 보편적으로 사용되는 또 다른 방법으로, 배지 내부에 미생물을 배양하여 생성된 군락 (colony)의 수를 세는 방법인 평판배지법 (plate culture method)이 있다. 그러나, 배지 분석을 위하여 멸균 상태의 실험 장소가 필요하고, 배지 분석을 통해 최종적인 미생물 검출 여부를 얻기까지 3-5일의 긴 시간이 필요하다는 한계점이 있다.

[0005] 그 밖에도, 미생물이 포함된 시료를 중합효소 연쇄 반응 (Polymerase chain reaction) 기기를 사용하여 미생물 내부의 특정 DNA를 검출하는 방법이 있다. 그러나, 중합효소 연쇄 반응을 위해서는 시료의 전처리 과정이 반드

시 필요하고, 해당 작업을 수행할 수 있는 전문적인 인력이 필요하며, 시료가 오염되기 쉬워 오진을 할 가능성이 높은 한계점이 있다.

## 선행기술문헌

### 특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) KR 10-2002-0069573 A

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0007] 일 측면에서, 본 명세서는 특별한 고가의 장비나 장소에 제약이 없이 짧은 시간 내에 검출 대상 시료 내의 미생물을 농축하여 미생물의 존재 여부를 신속하게 확인할 수 있는 미생물 검출 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0008] 다른 측면에서, 본 명세서는 표면증강라만산란법을 이용하여 액상 시료 내에 존재하는 미생물을 높은 감도로 정성적으로 검출할 수 있는 미생물 검출 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

### 과제의 해결 수단

[0009] 일 측면에서, 본 명세서에 개시된 기술은 금속 나노 구조체 용액과 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 단계를 포함하는 미생물 검출 방법을 제공한다.

[0010] 예시적인 일 구현예에서, 상기 금속 나노 구조체의 조성은 Au, Ag, Pd, Pt, Al, Cu, Co, Cr, Mn, Ni 및 Fe로 이루어진 군에서 선택되는 1 이상의 금속 또는 2 이상의 금속의 합금인 것일 수 있다.

[0011] 예시적인 일 구현예에서, 상기 금속 나노 구조체는 양전하를 띠도록 표면 처리된 것일 수 있다.

[0012] 예시적인 일 구현예에서, 상기 혼합은 검출 대상 시료에 포함된 미생물의 표면에 금속 나노 구조체를 부착하는 것일 수 있다.

[0013] 예시적인 일 구현예에서, 상기 미생물은 대장균 (*E. coli*), 코리네박테리움 글루타미쿰 (*Corynebacterium glutamicum*) 및 효모 (*Saccharomyces cerevisiae*)로 이루어진 군에서 선택되는 1 이상인 것일 수 있다.

[0014] 예시적인 일 구현예에서, 상기 방법은 혼합 용액을 교반하는 단계를 더 포함하는 것일 수 있다.

[0015] 예시적인 일 구현예에서, 상기 교반은 100 내지 450 rpm의 속도에서 실시하는 것일 수 있다.

[0016] 예시적인 일 구현예에서, 상기 교반은 20 내지 48 ℃의 온도에서 실시하는 것일 수 있다.

[0017] 예시적인 일 구현예에서, 상기 미생물을 검출하는 단계는 부유물을 육안으로 확인하여 미생물 존재 여부를 확인하는 것일 수 있다.

[0018] 예시적인 일 구현예에서, 상기 미생물을 검출하는 단계는 계면에 형성된 부유물에 직접 레이저를 조사하여 표면증강라만산란법으로 미생물을 검출하는 것일 수 있다.

[0019] 예시적인 일 구현예에서, 상기 미생물을 검출하는 단계는 계면에 형성된 부유물에 수평 방향으로 기판을 접촉시켜 부유물을 기판에 전사시킨 다음 상기 기판에 레이저를 조사하여 표면증강라만산란법으로 미생물을 검출하는 것일 수 있다.

[0020] 예시적인 일 구현예에서, 상기 레이저는 5 내지 250 mW로 633 내지 785 nm 파장으로 조사하는 것일 수 있다.

[0021] 다른 측면에서, 본 명세서에 개시된 기술은 금속 나노 구조체 용액과 검출 대상 시료를 혼합하는 혼합부; 및 상기 혼합부 상단에서 미생물을 검출하는 검출부를 포함하고, 상기 혼합부는 혼합 용액의 액상 (liquid phase)과 만나 계면을 형성할 수 있는 기상 (gas phase) 공간을 포함하고, 상기 계면에 형성된 부유물로부터 미생물을 검출하는 것인, 미생물 검출 장치를 제공한다.

[0022] 예시적인 일 구현예에서, 상기 금속 나노 구조체의 조성은 Au, Ag, Pd, Pt, Al, Cu, Co, Cr, Mn, Ni 및 Fe로 이루어진 군에서 선택되는 1 이상의 금속 또는 2 이상의 금속의 합금인 것일 수 있다.

[0023] 예시적인 일 구현예에서, 상기 금속 나노 구조체는 양전하를 띠도록 표면 처리된 것일 수 있다.

[0024] 예시적인 일 구현예에서, 상기 검출부는 계면에 형성된 부유물 형성 여부를 육안으로 확인하여 미생물 존재 여부를 확인하는 것일 수 있다.

[0025] 예시적인 일 구현예에서, 상기 검출부는 계면에 형성된 부유물에 직접 레이저를 조사하여 표면증강라만산란법으로 미생물을 검출하는 것일 수 있다.

[0026] 예시적인 일 구현예에서, 상기 검출부는 계면에 형성된 부유물에 수평 방향으로 기판을 접촉시켜 부유물을 기판에 전사시킨 다음 상기 기판에 레이저를 조사하여 표면증강라만산란법으로 미생물을 검출하는 것일 수 있다.

[0027] 예시적인 일 구현예에서, 상기 장치는 혼합 용액을 교반하는 교반 시스템이 구비된 것일 수 있다.

[0028] 예시적인 일 구현예에서, 상기 교반 시스템은 혼합부에 구비된 것일 수 있다.

## *발명의 효과*

[0029] 일 측면에서, 본 명세서에 개시된 기술은 특별한 고가의 장비나 장소에 제약이 없이 짧은 시간 내에 검출 대상 시료 내의 미생물을 농축하여 미생물의 존재 여부를 신속하게 확인할 수 있는 미생물 검출 방법을 제공하는 효과가 있다.

[0030] 다른 측면에서, 본 명세서에 개시된 기술은 표면증강라만산란법을 이용하여 액상 시료 내에 존재하는 미생물을 높은 감도로 정성적으로 검출할 수 있는 효과가 있다.

## *도면의 간단한 설명*

[0031] 도 1은 본 명세서의 일 실시예에 있어서, 금속 나노 구조체를 부착한 미생물의 공기/물 계면 상으로의 응집을 활용한 미생물 검출 방법을 나타내는 개략도이다.

도 2는 본 명세서의 일 실시예에 있어서, 금속 나노 구조체를 포함한 콜로이드 용액과 미생물이 포함된 시료를 혼합하였을 때, 혼합된 시료의 공기/물 계면 상에 금속 나노 구조체가 부착된 미생물이 응집되어 있는 현상을 가시적으로 보여주는 사진이다.

도 3은 본 명세서의 일 실시예에 있어서, 금속 나노 구조체가 부착되기 전의 미생물과 공기/물 계면 상에 응집되어 있는 금속 나노 구조체가 부착된 미생물을 주사전자현미경 (scanning electron microscopy)로 분석한 결과이다.

도 4는 본 명세서의 일 실시예에 있어서, 혼합 시간이 증가함에 따른 금속 나노 구조체가 부착된 미생물이 공기/물 계면 상에 응집되는 현상의 차이를 가시적으로 보여주는 사진이다.

도 5는 본 명세서의 일 실시예에 있어서, 다양한 크기와 형태의 금속 나노 구조체를 미생물과 혼합하였을 때 미생물의 표면에 금속 나노 구조체가 부착되어 공기/물 계면 상에 응집하는 현상을 가시적으로 보여주는 사진과, 이를 주사전자현미경으로 분석한 결과이다.

도 6은 본 명세서의 일 실시예에 있어서, 미생물의 농도에 따른 금속 나노 구조체가 부착된 미생물의 공기/물 계면 상으로의 응집 현상을 가시적으로 보여주는 사진이다.

도 7은 본 명세서의 일 실시예에 있어서, 공기/물 계면 상에 떠오른 금속 나노 구조체가 부착된 미생물을 표면증강라만산란법 (surface enhanced Raman spectroscopy)으로 분석한 결과이다.

## *발명을 실시하기 위한 구체적인 내용*

[0032] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0033] 본 명세서에서 나노란 1000 nm 이하를 의미한다.

[0034] 일 측면에서, 본 명세서에 개시된 기술은 금속 나노 구조체 용액과 검출 대상 시료를 혼합하여 혼합 용액을 제조하는 단계; 및 상기 혼합 용액의 액상 (liquid phase)과 기상 (gas phase) 사이의 계면에 부유물 형성 여부를

확인하는 단계를 포함하는 미생물 검출 방법을 제공한다.

[0035] 상기 금속 나노 구조체 용액은 금속 나노 구조체를 포함하는 콜로이드 상의 용액을 의미하는 것으로, 예컨대, 상기 금속 나노 구조체 용액은 금속 나노 구조체를 포함하는 수용액인 것일 수 있다.

[0036] 예시적인 일 구현예에서, 상기 금속 나노 구조체의 조성은 Au, Ag, Pd, Pt, Al, Cu, Co, Cr, Mn, Ni 및 Fe로 이루어진 군에서 선택되는 1 이상의 금속 또는 2 이상의 금속의 합금인 것일 수 있다.

[0037] 예시적인 일 구현예에서, 상기 금속 나노 구조체의 형상은, 이에 제한하는 것은 아니나 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.

[0038] 예시적인 일 구현예에서, 상기 금속 나노 구조체의 크기는 200 nm 이하, 150 nm 이하, 100 nm 이하, 3 내지 200 nm, 또는 3 내지 100 nm인 것일 수 있다.

[0039] 상기 크기는 직경을 의미하는 것일 수 있다. 또는 상기 크기는 구조체 내 최장 길이를 의미하는 것일 수 있다.

[0040] 예시적인 일 구현예에서, 상기 금속 나노 구조체는 양전하를 띠도록 표면 처리된 것일 수 있다.

[0041] 예시적인 일 구현예에서, 상기 금속 나노 구조체의 표면 리간드는 하이드록실아민 하이드로클로라이드 또는 헥사데시트리메틸암모늄 브로마이드를 포함하여 금속 나노 구조체의 미생물 표면으로의 부착을 도울 수 있다.

[0042] 예시적인 일 구현예에서, 상기 검출 대상 시료는 액상인 것일 수 있다.

[0043] 예시적인 일 구현예에서, 상기 혼합은 검출 대상 시료에 포함된 미생물의 표면에 금속 나노 구조체를 부착하는 것일 수 있다.

[0044] 다른 예시적인 일 구현예에서, 상기 혼합은 검출 대상 시료에 포함된 미생물의 표면을 금속 나노 구조체로 코팅하는 것일 수 있다.

[0045] 예시적인 일 구현예에서, 상기 미생물은 박테리아 또는 균류인 것일 수 있다. 본원에서 미생물은 그람 양성 세균, 그람 음성 세균 모두를 포함하는 것을 의미한다.

[0046] 예시적인 일 구현예에서, 상기 미생물은 대장균 (*E. coli*), 코리네박테리움 글루타미쿰 (*Corynebacterium glutamicum*), 슈도모나스 푸티다 (*Pseudomonas putida*) 및 효모 (*Saccharomyces cerevisiae*)로 이루어진 군에서 선택되는 1 이상인 것일 수 있다.

[0047] 예시적인 일 구현예에서, 상기 부유물은 검출 대상 시료에 포함된 미생물의 표면에 금속 나노 구조체가 부착된 복합체인 것일 수 있다.

[0048] 본 명세서에 따른 미생물 검출 방법은 금속 나노 구조체가 고밀도로 부착된 미생물을 액상과 기상의 계면 상에 응집 또는 농축시켜 미생물 존재 여부를 육안을 통해 사전적으로 검출할 수 있다. 또한, 응집하여 떠오른 미생물은 표면증강라만산란법으로 신속하게 정성적 검출이 가능하다.

[0049] 본 명세서에서 액상과 기상의 계면은 혼합 용액의 액체상과 기체상이 만나는 계면을 의미하며, 예컨대 상기 액체상은 물이고 기체상은 공기인 것일 수 있다.

[0050] 예시적인 일 구현예에서, 상기 방법은 혼합 용액을 교반하는 단계를 더 포함하여 금속 나노 구조체가 부착된 미생물을 효과적으로 액상과 기상의 계면 상에 응집시킬 수 있다.

[0051] 예시적인 일 구현예에서, 상기 교반은 100 내지 450 rpm의 속도 및 20 내지 48 ℃의 온도에서 실시하는 것일 수 있다. 상기와 같은 조건로 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.

[0052] 다른 예시적인 일 구현예에서, 상기 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. 다른 예시적인 일 구현예에서, 상기 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.

[0053] 예시적인 일 구현예에서, 상기 방법은 계면에 레이저를 조사하여 표면증강라만산란법으로 미생물을 검출하는 단계를 더 포함하는 것일 수 있다. 본 명세서에 따른 미생물 검출 방법은 별도의 기판에 부유물을 전사하지 않고

도 라만 신호를 얻을 수 있으므로 매우 용이하게 미생물 검출이 가능한 이점이 있다.

[0054] 예시적인 일 구현예에서, 상기 방법은 계면에 수평 방향으로 기판을 접촉시켜 부유물을 기판에 전사시킨 다음 상기 기판에 레이저를 조사하여 표면증강라만산란법으로 미생물을 검출하는 단계를 더 포함하는 것일 수 있다.

[0055] 표면증강라만산란 (Surface Enhanced Raman Scattering, SERS)은 높은 민감도 (sensitivity)로 인해 화학물질을 탐지하고 생화학적으로 분석하는 방법 중 하나로 각광받고 있다. 라만산란은 입자의 진동과 회전 에너지로 인해 에너지를 잃거나 얻으면서 산란되는 과정을 말하고, 화학물질에 따라 고유의 스펙트럼을 방출하게 된다. 표면증강법은 금속 나노 입자에서 발생하는 플라즈모닉 현상을 이용하여 금속 나노 입자 표면 주위에서 라만 산란을 증강시키는 것을 말한다.

[0056] 예시적인 일 구현예에서, 상기 레이저는 5 내지 250 mW로 633 내지 785 nm 파장으로 0.5초 내지 10초 동안 조사하는 것이 바람직할 수 있다. 상기와 같은 조건로 레이저를 조사함으로써 미생물의 물리적 손상을 야기하여 검출 신뢰도가 떨어질 수 있는 문제를 예방하고 별도의 기판에 부유물을 전사하지 않고도 라만 신호를 얻어 매우 용이하게 미생물 검출이 가능한 효과가 있다.

[0057] 예시적인 일 구현예에서, 상기 기판은 실리콘, 고분자, 유리 및 ITO로 이루어진 군에서 선택되는 1 이상의 재질로 이루어진 것일 수 있다.

[0058] 예시적인 일 구현예에서, 상기 고분자는 폴리디메틸실록산 (polydimethylsiloxane, PDMS), 폴리메틸 메타크릴레이트 (polymethyl methacrylate, PMMA) 및 히드로겔 (hydrogel)로 이루어진 군에서 선택되는 1 이상인 것일 수 있다.

[0059] 예시적인 일 구현예에서, 상기 방법은 도 1에 도시된 바와 같이, 콜로이드 상의 금속 나노 구조체 용액에 미생물이 포함된 시료를 혼합한다. 이때, 혼합된 용액 내부에서 금속 나노 구조체는 미생물 표면에 고밀도로 부착된다. 이어서, 금속 나노 구조체가 미생물의 표면을 개질하여 공기/물 계면 상으로 금속 나노 구조체가 부착된 미생물을 응집하도록 한다. 응집된 미생물은 미생물의 표면에 부착된 금속 나노 구조체 간의 좁은 간격으로 인해 생성되는 핫 스팟을 이용하여 표면증강라만산란법을 통해 그 특이적인 신호가 검출된다.

[0060] 상기와 같이 본 명세서의 예시적인 구현예들에 의하면, 시료에서부터 결과를 검출하기까지 소요되는 시간을 수 시간 내로 단축하여 미생물의 존재 여부 또는 미생물의 종류를 빠르게 진단할 수 있고 높은 신뢰성을 갖는 효과가 있다.

[0061] 또한, 본 명세서에 따른 미생물 검출 방법은 표면증강라만산란법을 통해 미생물의 세포막에 존재하는 각 분자의 화학 결합으로부터 기인하는 분자 고유의 라만 신호를 활용하여 미생물의 특이적인 신호를 얻을 수 있기 때문에 미생물의 종 파악 등에 폭넓게 이용되고 미생물을 특이적으로 검출할 수 있는 효과가 있다.

[0062] 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 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0063] **실시예 .**

[0064] (1) 금속 나노 구조체 용액과 검출 대상 시료를 혼합하여 혼합 용액을 제조하는 단계

[0065] 약 2.69 nM, 0.0604 nM의 하이드록실아민 하이드로클로라이드 (hydroxylamine hydrochloride)로 표면 개질된 지름이 약 30 nm인 구형 금 나노 구조체 수용액을 준비하였다.

[0066] 상기 금속 나노 구조체 수용액 (수용액 중 금속 나노 구조체 농도는 약 $10^{10}$ 개/ml) 4.5 ml이 담긴 용기를 준비하였다. 용기는 예컨대, 30 ml 크기의 바이알 (vial)일 수 있다. 또한, 예컨대 5 ml 또는 10 ml 크기의 바이알을 사용할 수 있으며, 더 큰 사이즈의 용기를 사용하여 더 많은 양을 처리할 수도 있다. 상기 준비한 금속 나노 구조체 수용액 4.5 ml에 검출하고자 하는 미생물이 포함된 용액 0.5 ml를 혼합하여 혼합 용액을 제조하였다. 과량의 구형 금 나노 구조체가 자발적으로 미생물의 표면에 부착되었다.

[0067] (2) 상기 혼합 용액의 물과 공기 사이의 계면에 부유물 형성 여부를 확인하는 단계

[0068] 구형 금 나노 구조체 수용액과 미생물이 포함된 용액을 약 30 ℃ 및 320 rpm으로 1시간 동안 교반시켰을 때, 혼합 용액의 공기/물 계면으로 금속 나노 구조체가 부착된 미생물이 응집되는 것을 관찰하였다.

[0069] 도 2는 본 명세서의 일 실시예에서, 하이드록실아민 하이드로클로라이드로 표면 개질된 구형 금 나노 구조체 수

용액 4.5 ml와 $10^8$ cells/ml의 농도를 가지는 대장균 용액 0.5 ml를 1시간 동안 혼합 및 교반하였을 때 혼합 용액의 공기/물 계면에 부유물이 형성되는 현상을 가시적으로 나타낸 것이다.

[0070] 도 3은 본 명세서의 일 실시예에서, 그램-네거티브 종인 대장균 (*E. coli*), 그램-포지티브 종인 코리네박테리움 글루타미쿰 (*Corynebacterium glutamicum*), 그리고 균류인 효모 (*Saccharomyces cerevisiae*)의 표면에 양전하로 표면 개질된 구형 금 나노 구조체가 과량으로 부착된 것을 주사전자현미경을 통해 관찰한 것이다.

[0071] 도 3으로부터 알 수 있듯이, 공기/물 계면에 형성된 부유물을 주사전자현미경으로 관측한 결과, 해당 물질은 금속 나노 구조체가 부착된 미생물인 것을 확인하였다. 금속 나노 구조체가 고밀도로 미생물 표면에 부착되어 있으며 과량의 미생물이 혼합 용액의 공기/물 계면 상에 응집되어 있는 것을 확인하였다.

[0072] 도 4는 본 명세서의 일 실시예에서, 혼합 시간에 따른 공기/물 계면 상으로 응집되는 금속 나노 구조체가 부착된 미생물의 양의 변화를 위에서 촬영한 사진이다.

[0073] 도 4에서 알 수 있듯이, 콜로이드 상의 금속 나노 구조체가 포함된 용액과 대장균이 포함된 용액을 혼합한 지 20분이 경과하였을 때 공기/물 계면 상에 금속 나노 구조체가 결합된 대장균이 육안으로 관찰되었으며, 1시간이 지난 이후에는 금속 나노 구조체가 부착된 대량의 대장균이 공기/물 계면 상에 과량으로 응집되어 미생물의 존재 여부를 육안으로 식별하기가 매우 용이하였다. 금속 나노 구조체가 단일로 있는 경우 (HA-GNP, Hydroxylamine Gold Nanoparticle)나 대장균이 단일로 있는 경우와는 다르게 금속 나노 구조체와 대장균이 혼합된 용액의 계면에서만 응집 현상이 발생하였다.

[0074] 도 5는 본 명세서의 일 실시예에서, 금속 나노 구조체의 형태가 구형이 아닌 막대인 경우 (AuNR, Gold Nanorod)와, 구형 금속 나노 구조체의 크기가 50 nm인 경우에도 마찬가지로 금속 나노 구조체가 미생물의 표면에 부착되어 공기/물 계면 상에 응집되는 것을 가시적인 사진과 주사전자현미경을 통해 나타낸 것이다.

[0075] 도 6은 본 명세서의 일 실시예에서, 대장균의 농도를 달리하여 대장균이 포함된 용액과 콜로이드 상의 금속 나노 구조체 용액을 혼합하였을 때, 대장균의 농도가 줄어들수록 계면 상에 응집되는 물질이 줄어드는 것을 통해 육안으로 확인한 것이다. 이는 본 명세서에 따른 미생물 검출 방법은 미생물의 존재 여부를 육안을 통해 용이하게 사전 검출이 가능한 것을 나타낸다.

[0076] (3) 응집하여 떠오른 금속 나노 구조체가 부착된 미생물을 표면증강라만산란법을 통해 검출하는 단계

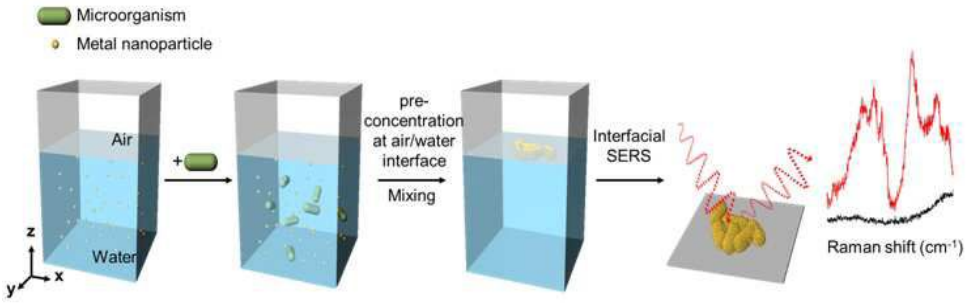
[0077] 한 변의 길이가 1 cm인 실리콘 웨이퍼 기판을 공기/물 계면 상에 떠오른 금속 나노 구조체가 부착된 미생물층에 수평으로 접촉시킨 뒤 떼어냈다. 이후 해당 시료를 250 mW의 레이저 출력으로 785 nm 파장의 레이저를 10초간 노출시켜 라만 신호를 측정하였다. 또한, 공기/물 계면 상에 직접 레이저를 조사하여 표면증강라만산란법으로 미생물 검출이 가능하였다.

[0078] 도 7은 본 명세서의 일 실시예에서, 실리콘 웨이퍼 기판에 전이시킨 미생물의 표면에 존재하는 금속 나노 구조체를 활용하여 표면증강라만산란법을 통해 대장균 (*E. coli*), 코리네박테리움 글루타미쿰 (*Corynebacterium glutamicum*) 및 효모 (*Saccharomyces cerevisiae*)를 검출한 결과를 나타낸 것이다. 각각의 미생물은 라만 신호가 다르게 측정되어 공기/물 계면 상에 응집된 미생물의 구분 및 검출이 가능함을 확인하였다.

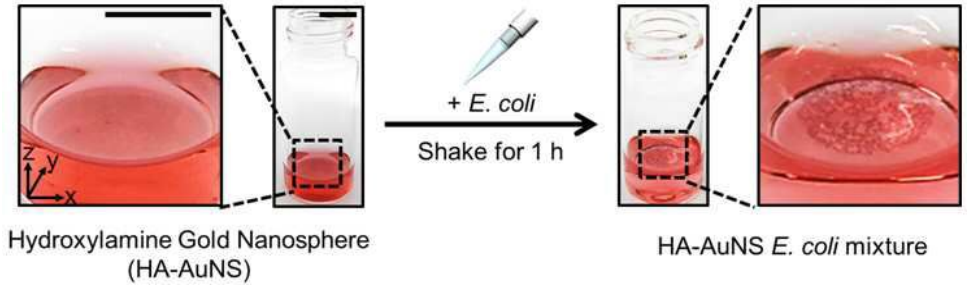
[0079] 이상, 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 실시 태양일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의해 정의된다고 할 것이다.

도면

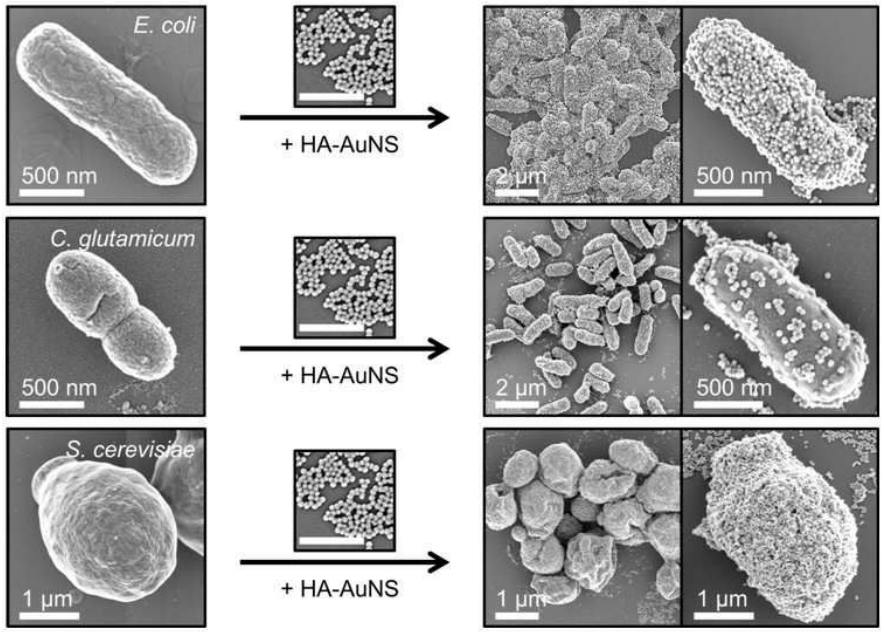
도면1



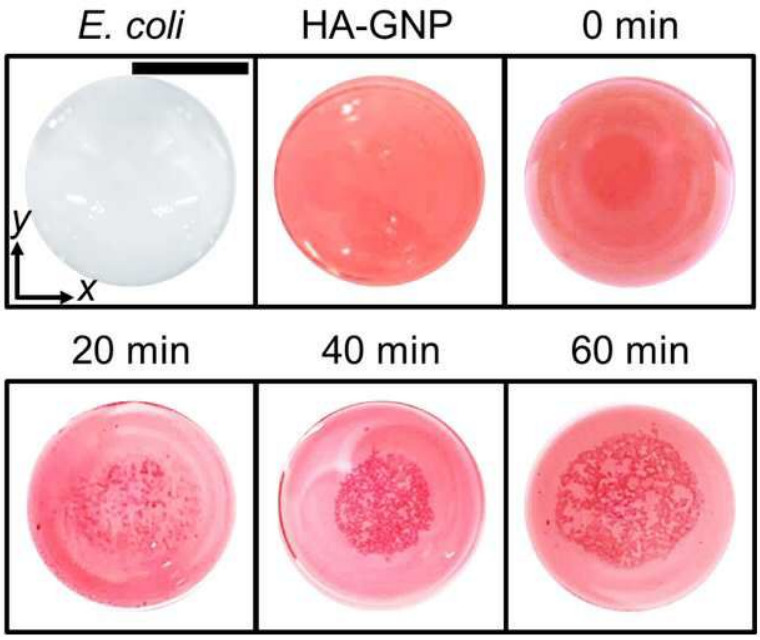

도면2



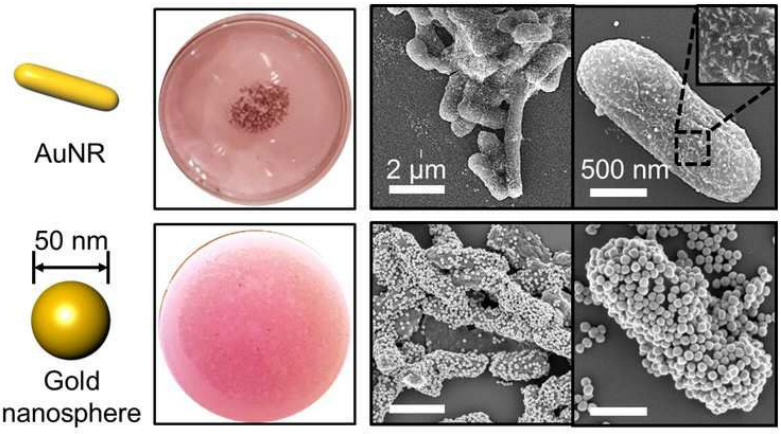

도면3



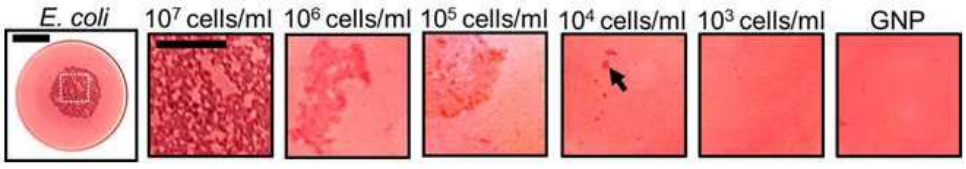
도면4


E. coli
HA-GNP
0 min
y
x
20 min
40 min
60 min

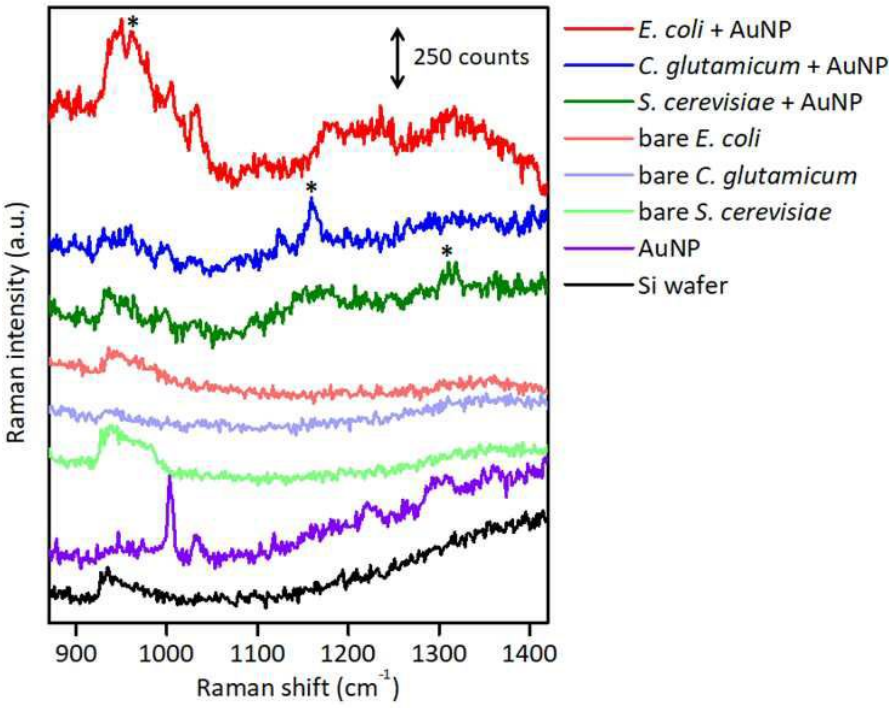
도면5


AuNR
2 μm
500 nm
50 nm
Gold
nanosphere

도면6


E. coli
10⁷ cells/ml
10⁶ cells/ml
10⁵ cells/ml
10⁴ cells/ml
10³ cells/ml
GNP

도면7


250 counts
Raman intensity (a.u.)
900
1000
1100
1200
1300
1400
Raman shift (cm-1)
E. coli + AuNP
C. glutamicum + AuNP
S. cerevisiae + AuNP
bare E. coli
bare C. glutamicum
bare S. cerevisiae
AuNP
Si wafer