

<응용논문>

DOI:10.3795/KSME-B.2010.34.1.89

잉크젯 프린터를 이용한 박테리아의 이차원 패터닝[§]

윤성희* · 이슬기* · 조명옥** · 김중경*

* 국민대학교 기계자동차공학부, ** 국민대학교 웰빙환경기술연구소

Two-Dimensional Patterning of Bacteria by Inkjet Printer

Seonghee Yoon*, Seul-Gi Lee*, Myoung-Ock Cho** and Jung Kyung Kim*

* School of Mechanical and Automotive Engineering, Kookmin University

** Research Institute for Well-Being Environmental Technology, Kookmin University

(Received September 16, 2009 ; Revised November 23, 2009 ; Accepted November 24, 2009)

Key Words: Inkjet Printing(잉크젯 프린팅), Direct Writing(직접 쓰기), Bacteria(세균), Patterning (패터닝), Colony(콜로니)

초록: 박테리아나 세포를 표면에 패터닝하는 기술은 세포생물학, 항균제 스크리닝, 항균 모니터링, 조직 공학 등 다양한 분야에 적용될 수 있는 잠재력을 지니고 있다. 본 연구에서는 부분적으로 개조된 열방식의 잉크젯 프린터를 이용하여 박테리아를 평판 한천배지에 2차원 배열로 패터닝할 수 있는 기법을 개발하였다. 박테리아 용액의 농도는 잉크젯 노즐에서 분출되는 용액 한 방울에 한개의 콜로니가 형성 되도록 최적화 하였고, 박테리아 농도와 한천배지 농도가 패터닝 성능에 미치는 영향을 정량적으로 측정하였다. 상용 잉크젯 프린터를 이용한 박테리아 패터닝은 기존 방법에 비해 비용과 재료의 소모가 적다는 장점이 있다.

Abstract: Patterning bacteria and cells on substrates has potential applications in molecular biology, antimicrobial drug screening, environmental monitoring and tissue engineering. We developed a technique to deposit two-dimensional array of bacterial cells onto an agar plate by modifying commercially available thermal inkjet printers. The concentration of the bacterial solution in the cartridge was carefully determined to ensure a single cell suspension in a droplet ejected from a nozzle. We measured quantitatively the effects of the bacterial concentration and the agar concentration on patterning performance. Bacterial patterning by inkjet printer is a low-cost and versatile technique which may replace the existing sophisticated methods.

- 기호설명 -

OD : 광학밀도(Optical Density)

1. 서 론

최근 다양한 학문 분야에서 연구가 활발히 진행되고 있는 잉크젯 프린팅 기술은 간편하며 높은 공간분해능력을 요구하는 응용 분야에 적합하다. 이미 유기전자소자 제조공정이나 디스플레이 분야에서 잉크젯 프린팅의 응용기술은 저가격화,

대형화 추세에 맞물려 그 활용도가 증가하고 있다. 이러한 잉크젯 프린팅 기술은 기존의 포토리소그래피(photolithography)나 스크린 프린팅(screen printing) 등의 기법보다 공정이 간단하고 빠르며 저렴하고 재료의 소모가 적다는 장점이 있다. 또한, 비접촉 방식이므로 기관 오염을 줄일 수 있다. 이러한 장점들을 이용해 최근에는 바이오 분야에 활발하게 응용되고 있는데, 펩타이드나⁽¹⁾ 생체고분자 또는 DNA 등을 재료로 대량의 샘플 배열(array)이 필요한 DNA chip이나 protein chip 제작, 유전적 질환의 선별검사, 단백질간의 상호작용 연구와 신약 개발 등에 기여할 수 있다. 이와 더불어 현재 잉크젯 프린팅 기술은 조직공학이나 미생물 분야에서도 그 활용에 대한 기대가 커지고 있다. 특히 많은 균주로부터 특정한 미생물의 존재를 검출해야하는 균주

§ 이 논문은 2009년도 바이오공학부문 춘계학술대회 (2009. 5. 21-22, BEXCO) 발표논문임

† Corresponding Author, jkkim@kookmin.ac.kr

선별검사(screening), 또는 항생제에 대한 미생물의 감수성 검사(MIC)의 경우 자동화된 기기의 필요성이 증대되고 있는데, 대량의 박테리아 콜로니를 정확한 위치에 빠르게 배열할 수 있는 기술이 저비용으로 개발이 된다면 이러한 의학적인 요구뿐 아니라 미생물을 이용한 환경 친화적인 하수처리 기법⁽²⁾ 등을 연구하는데도 도움이 될 것이다.

본 연구진은 박테리아를 이용하여 잉크젯 프린팅 기술에 기반한 패터닝 기법을 개발하고자 한다. 타 연구진의 선행연구⁽³⁾에서는 박테리아용액의 점도가 패터닝에 영향을 미치는 중요한 요소였으나 본 연구에서는 점도의 영향을 배제하고 박테리아의 생균수에 중점을 두어 부분적으로 개조된 열방식 잉크젯 프린터를 이용하여 박테리아를 아가(agar) 평판배지에 일정한 간격으로 패터닝하였다. 박테리아를 고밀도로 패터닝하여 분사 지점에 단일 콜로니를 형성시키기 위해서는 잉크젯 노즐에서 분출되는 용액 한 방울에 박테리아 한 개체만 포함되도록 잉크 카트리지에 주입하는 박테리아 용액의 농도를 최적화시킬 필요가 있다. 이를 위해 광학밀도(optical density; OD) 측정장치를 통해 박테리아 용액의 최적 농도를 도출하였고 박테리아 농도와 아가배지 농도에 따른 패터닝 성능을 측정하였다. 또한, 이번 연구를 통해 박테리아의 2차원 배열을 성공적으로 수행하였으며 600dpi 해상도에서 패터닝이 가능한 최소 간격을 측정하였다.

2. 실험 장치 및 방법

2.1 박테리아 배양

3차 증류수 1L당 Tryptic Soy Broth(TSB) 30g을 녹여 120°C에서 15분 동안 멸균한다. E.coli(ATCC25922) glycerol stock을 녹여 멸균된 액체배지 20mL당 20μL씩 넣어 37°C에서 180rpm으로 18시간 배양한다. 고체배지는 TSB에 1.5%, 2.5% 아가를 각각 첨가하여 2종류를 만들고, 멸균 후 배양접시에 40mL씩 분주하여 균한다.

2.2 박테리아 용액 제조

18시간 배양된 균을 PBS(phosphate buffered solution)로 희석하여 광학밀도 측정기로 측정한 OD값이 0.04, 0.08, 0.1, 0.2, 0.3이 되도록 현탁액을 10mL씩 만든다. 5개의 빈 카트리지에 75% 에탄올 6mL를 넣어 내부를 소독한 후 멸균된 증류

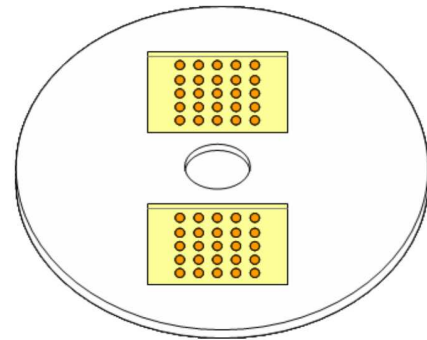


Fig. 1 Schematic of two-dimensional dot arrays on the agar-filled chambers located in the aluminum disk

수를 각 카트리지에 6mL씩 넣어 5회 세척하여 내부에 이물질이 남지 않도록 했다. 만약 잔여 물질이 있으면 카트리지 내 박테리아 용액 농도를 변화시켜 정확한 결과를 얻지 못할 뿐 아니라 E.coli의 생존에 영향을 준다.

2.3 실험장치 및 박테리아 용액 인쇄 과정

프린터로는 SAMSUNG SCX-1455 잉크젯 복합기를 사용했다. 선행 연구에서 열방식 잉크젯 프린터의 순간적인 온도증가는 박테리아의 생존을 저해하지 않는다는 사실이 확인되었다⁽⁴⁾. 아가 평판배지를 포함하는 배양접시가 고정될 공간을 확보하고자 잉크젯 복합기의 불필요한 부분을 제거하였다. 잉크젯 프린터로 분사되는 패턴을 설정하기 위해 마이크로소프트사 파워포인트 프로그램을 사용하여 배양접시 가장자리 6개 구역에 점을 일렬로 7개씩 인쇄하도록 설정하였다. 각 구역별 점 간격은 1.2, 1, 0.8, 0.6, 0.4, 0.2cm로 변화시켰다. 따라서 이상적인 분사 조건에서는 한 개의 배양접시에서 총 42개의 박테리아 콜로니가 형성된다.

2.4 박테리아 2차원 배열을 위한 응용 실험

2차원 배열 응용실험을 위해 CD표면에 인쇄가 가능한 열방식의 HP Photosmart D5360 프린터를 사용하였다. 기존 실험과 같은 방법으로 박테리아를 배양 후 OD 측정값이 0.03, 0.05, 0.1이 되도록 균 현탁액을 만들어 카트리지에 들어갈 박테리아 용액을 준비하였다. CD가 지나가는 동선에서 프린터의 불필요한 부분을 제거하였다.

기존에 사용하던 배양접시 대신 Fig. 1과 같이

프린터에서 인쇄가 가능한 최대 두께를 고려하여 알루미늄 CD를 2mm 두께로 자체 제작하였고, 가운데 지점을 기준으로 양쪽에 45mm×35mm, 깊이 1.7mm의 고체배지가 위치할 직사각형 챔버를 만들었다. 1.5% 아가 농도의 TSA 배지를 만들어 알루미늄 CD 위의 챔버에 분주하여 굳혀서 고체 배지를 만들었다. 2차원 배열 패터닝을 위해 Fig. 1과 같이 알루미늄 CD의 양쪽에 각각 점 25개가 5mm 간격의 격자 형태로 인쇄되도록 설정하였다. 따라서 이상적인 분사 조건에서는 한 개의 CD에서 총 50개의 박테리아 콜로니가 형성된다. E.coli 용액을 10개의 CD에 분사한 후 37°C에서 20시간 동안 배양하였다.

2.5 인쇄설정을 위한 최적화 실험

마이크로소프트사 파워포인트 프로그램을 이용하여 점들의 배열을 설정하고 간격을 조정하여 실험에 사용된 프린터에서 인쇄할 수 있는 최소 간격을 정량적으로 측정하였다. 프로그램 화면에서 일정한 너비의 텍스트 상자 안에 점들을 배열하고 인쇄된 점들의 수로 너비를 나누어 간격을 계산하였다. 또한, 인쇄하고자 하는 점들의 수와 실제 인쇄된 점들의 수를 비교하여 600dpi의 해상도에서 인쇄 목표점들이 누락되지 않는 한도에서 최적화된 최소간격을 도출하였다.

3. 결과 및 토의

3.1 OD값에 따른 생균수 변화

박테리아를 배양할 때 일반적으로 고체배지나 액체배지를 이용하여 성장에 필요한 영양분을 공급하여 증식을 유도하게 된다. 액체배지에서 증식한 박테리아는 OD 측정기를 통해 박테리아 농도를 정량적으로 측정할 수 있다. OD값과 생균수의 관계를 파악한 뒤에는 원하는 박테리아 농도를 OD값 측정을 통해 쉽게 제조할 수 있으므로, 카트리지에 주입하는 샘플 준비 시간을 효과적으로 단축할 수 있다.

OD값의 변화에 따른 생균수를 측정하기 위해 박테리아 용액 1mL당 고체배지에 형성된 콜로니 개수를 측정하여 OD값과 생균수와의 관계 그래프를 Fig. 2에 나타내었다.⁽⁵⁾ 이전에 타 연구진이 수행한 박테리아의 잉크젯 패터닝 연구에서는 생균수를 측정하기 어려운 점이 있었다.⁽⁶⁾ 그러나

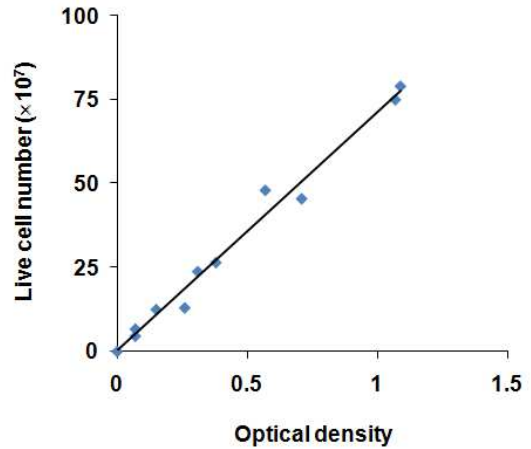


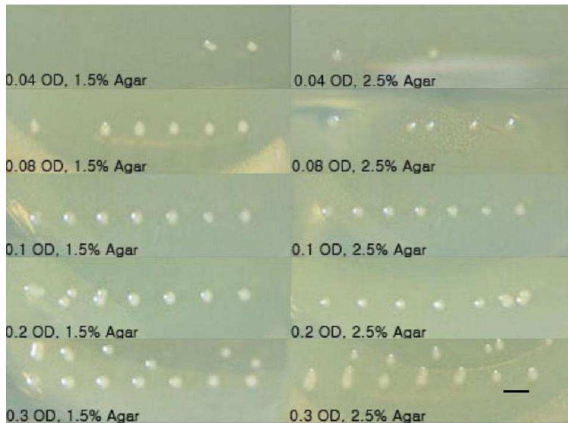
Fig. 2 Variation in live cell number with the concentration of bacterial solution

OD값과 생균수 측정값을 그림과 같이 그래프로 나타내면, 다른 OD값에서의 생균수를 예측해 낼 수 있고, 원하는 농도를 갖는 박테리아 용액을 쉽게 제조할 수 있다. 패터닝 종류에 따라 별도의 실험을 통해 OD값의 최적치를 알아내면 다양한 실험에 응용할 수 있을 것이다.

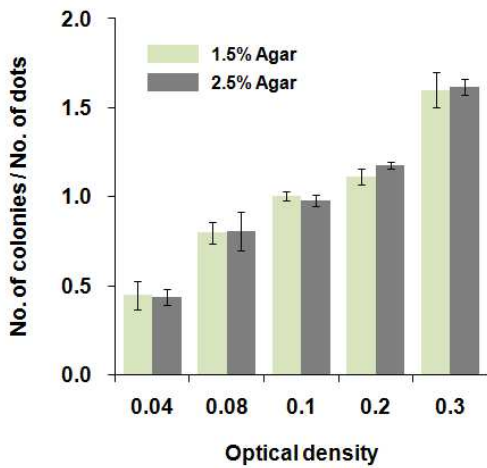
3.2 OD값에 따른 박테리아 콜로니 패턴

OD값 변화에 따라 SAMSUNG SCX-1455프린터로 패터닝한 박테리아가 성장하여 형성한 콜로니 사진을 Fig. 3(a)에 나타내었다. 공간해상도는 300dpi이며 점 간격이 좁은 구역에서도 다른 구역과 비슷한 결과가 관찰되었다. OD값이 0.2와 0.3인 경우에 분사 목표 지점 주변에 약 1~2cm 간격으로 콜로니가 불규칙적으로 생성되었는데, 이는 아가 평판배지의 탄성으로 인해 프린터 노즐에서 고속으로 분사된 균액이 주변으로 튀어 발생한 것으로 추측된다. 박테리아 용액 농도가 높을수록 이러한 현상이 두드러지게 나타났다.

SAMSUNG SCX-1455프린터로 패터닝된 콜로니 사진을 분석하여 각 OD값에 따라 아가 평판배지에 미리 설정한 분사 목표 지점의 개수(이 경우 총 42개)와 실제로 형성된 박테리아 콜로니 개수의 비를 패터닝 성능지표로 정의하여 Fig. 3(b)에 나타내었다. 예상한대로 OD값이 증가함에 따라 이 비율도 함께 증가하는데, 1에 가까울수록 이상적인 분사 조건이라고 볼 수 있다. 본 실험에 사용한 5가지 박테리아 용액 농도 중에서는 OD 값 0.1인 경우에 패터닝 성능지표가 1에 가장 근



(a)



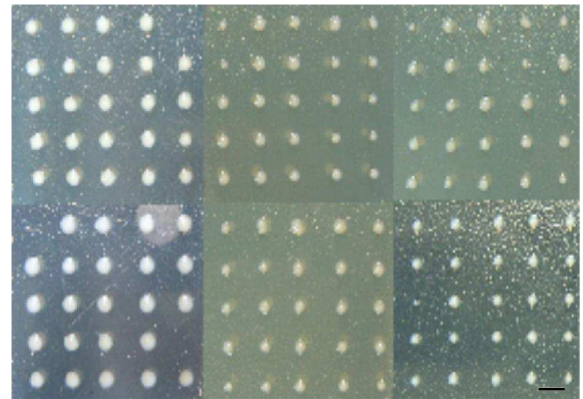
(b)

Fig. 3 (a) One-dimensional dot arrays generated by SAMSUNG SCX-1455 inkjet printer and (b) Index of patterning efficiency with various concentrations of bacterial solution. (bar = 5 mm)

접합을 알 수 있다. 추가로 OD값 0.1의 박테리아 용액을 이용하여 168개의 점을 패터닝한 결과 164개의 점이 분사되어 98%에 가까운 재현성이 있음을 확인하였고, 1.5%와 2.5% 아가배지에 대한 결과에서는 아가 농도차이가 패터닝 성능에 미치는 영향은 무시할 수 있으나, Fig. 3(a)의 왼쪽 열과 오른쪽 열의 비교를 통해 알 수 있듯이 형성된 콜로니의 크기 차이는 존재한다. 결과적으로 박테리아 용액 농도가 패터닝 성능에 가장 큰 영향을 주는 요소임을 알 수 있다.

3.3 박테리아 2차원 배열 응용실험

응용실험으로 2차원 배열이 가능한 HP Photosmart D5360을 이용하였고, OD값 0.03, 0.05,

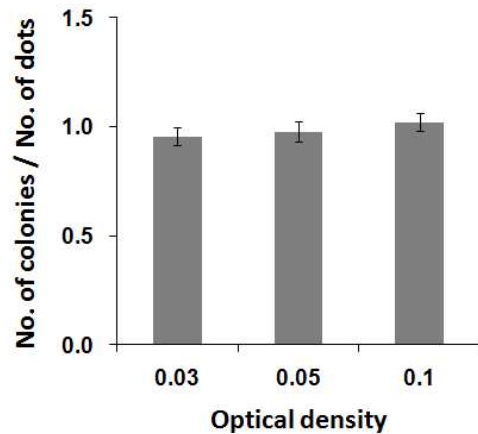


0.03 OD

0.05 OD

0.1 OD

(a)



(b)

Fig. 4 (a) Two-dimensional dot arrays generated by HP Photosmart D5360 inkjet printer and (b) Index of patterning efficiency with various concentrations of bacterial solution. (bar = 5 mm)

0.1에 대한 패터닝 결과 사진을 Fig. 4(a)에 나타내었다. 패터닝 실험에 사용된 공간해상도는 600dpi이고 2.5% 농도를 갖는 아가배지에 인쇄하였다. 이전 실험에서 생성된 콜로니 개수가 OD 값에 확연히 비례하는 것과는 다르게 넓은 범위의 OD값에서 일정한 성능을 나타내는 것을 확인할 수 있다. Fig. 4(b)에서 알 수 있듯이 0.03부터 0.1까지 오차범위 5% 이내로 일정한 성능을 보여준다. 이는 프린터의 성능뿐 아니라 해상도의 차이에 의한 중첩효과로 박테리아 용액의 최적 농도값의 범위 크기에 차이가 있음을 보여준다.

카트리지 헤드에서 분사되는 양을 정량화하고자 1in×1in 정사각형 크기에 90,000개의 점을 분사한 후 0.001g 정확도로 질량을 측정하고 리터

당 질량과 비교한 결과, 분사되는 용액 한 방울의 부피가 약 60pL로 추정되었다. Fig. 2에서 각 OD값에 해당하는 1mL당 생균수를 이용하여 균일한 농도분포에서 60pL에 포함되는 생균수를 계산하면 약 1~2개로 추정된다. 이는 Fig. 3과 Fig. 4에서 관찰되는 단일 콜로니가 형성된 이유를 설명할 수 있다.

응용실험을 통한 2차원 배열 패터닝 후 콜로니 사진을 분석하여 각 OD값에 따라 아가 평판 배지에 미리 설정한 분사 목표 지점의 개수(총 50개)와 실제로 형성된 박테리아 콜로니 개수의 비를 성능지표로 정의하여 Fig. 4(b)에 나타내었다. 0.03~0.1 OD값에서 모두 1에 가까운 최적 성능지표가 얻어짐을 확인할 수 있다. 그 중 0.05 OD값에서 최적 성능지표를 가지는데, 이전 실험에서 300dpi 해상도로 패터닝한 경우 0.1 OD값에서 최적 성능지표가 얻어졌음을 고려할 때 합당한 결과이다.

Fig. 5는 여러 가지 기본 도형과 문자를 박테리아로 패터닝한 사진이다. 이와 같이 다양한 형태의 패터닝에 응용이 가능하고, 본 논문에서는 다루지 않았지만 적절한 영양분을 공급할 수만 있다면 아가 고체배지 뿐만 아니라 다른 재질을 갖는 기판 위에 각종 박테리아를 패터닝하는 것도 가능할 것이다. E.coli에 대한 최적 농도가 다른 종류의 박테리아에 대한 최적 농도와는 다를 수 있고 사용한 액체배지의 물성에 따라 분사 성능이 달라질 수 있으므로, 패터닝 성능을 향상시키기 위해 조건을 다양하게 변화시킨 후 추가 연구가 필요하다.

3.4 인쇄 설정의 최적화

패터닝 과정에서 점들의 배열과 간격을 조정할 결과 실험에 사용된 프린터의 최대 공간해상도인 600dpi에서 실험에 최적화할 경우 인쇄된 점들의 최소 간격이 135 μm가 됨을 고배율현미경으로 확인하였다. Fig. 6은 위와 같은 방법으로 조정된 20개의 점들을 차례로 배열하여 인쇄한 것으로 누락 없이 일정한 간격을 형성하고 있다. 그러나 점들의 간격이 이보다 좁아졌을 경우 의도한 점들이 누락되거나 간격이 일정치 않았다. 패터닝의 정밀도와 관련하여 인쇄할 점들의 주형과 실제 인쇄된 콜로니의 이미지를 분석할 필요가 있으며, 이러한 정량적인 분석의 결과 정보는 추후에 고해상도 현미경 이미징 기법과 결합된 고밀



Fig. 5 Various patterns formed by colonies of bacteria deposited on the agar substrate by HP Photosmart D5360 inkjet printer.

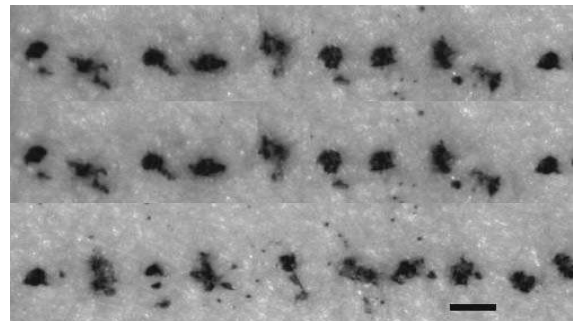


Fig. 6 Dot arrays with the minimum interval. (bar = 100 μm)

도 패터닝 실험 및 살아있는 박테리아 내에서 단일분자 수준의 분자생물학적 연구를 가능하게 할 것이다.

4. 결 론

최근 잉크젯 기술을 활용한 바이오 패터닝에 대한 연구가 활발해지고 있으나 실험에 필요한 박테리아 용액의 농도를 조절하는 것이 쉽지 않았다. 본 연구의 결과로 얻어진 E.coli 용액의 OD 최적값 자료를 이용하면 농도를 일정하게 하거나 특정 농도로 제조하여 패터닝에 사용하고, 용액의 농도나 생균수를 알아내어 단시간 내에 다양한 조건에서 용이하게 실험을 수행할 수 있다. 본 연구에서는 추가로 1.5%, 2.5% 아가 평판배지를 이용한 실험을 통해 아가 농도 증가에 따라 콜로니의 크기가 감소한다는 사실을 확인하였다. 또한 응용실험에서 잉크젯 프린터를 이용한 박테리아 패터닝 과정 중 정밀도 및 패턴 배열과 관련된 한계를 극복하고 단시간 내에 다양한 조건에서 실험을 수행하기 위한 2차원 패터닝 기술을 개발하였다. 본 연구에서는 알루미늄 CD를 제작하여 그 위 직사각형의 챔버안에 박테리아 콜로니의 2차원 배열을 형성시킬 수 있었다. 잉크젯

프린터는 간편하고 경제적으로 사용할 수 있고 다양한 분야에 적용될 수 있는 잠재력을 지니고 있으며 본 연구진은 여러 응용 실험을 통해 이를 확인하였다. 피코리터 부피의 액적 분사가 가능한 잉크젯 기술을 이용하여 최적화된 농도의 박테리아를 고밀도로 패터닝 할 수 있는데 이러한 박테리아 콜로니의 2차원 고밀도 패터닝은 항균제 스크리닝, 환경 모니터링을 위한 바이오센서 개발, 박테리아 주화성 연구 등 다양한 분야에 응용될 수 있을 것으로 기대한다.

후 기

본 논문은 2009년도 국민대학교 교내연구비와 지식경제부 21세기 프론티어 기술개발사업인 지능형마이크로시스템개발사업단(<http://www.microsystem.re.kr>)의 지원을 받아 수행된 연구임.

참고문헌

- (1) Breitling, F., Nesterov, A., Stadler, V., Felgenhauer, T. and Bischoff, F. R., 2009, "High-density Peptide Arrays," *Mol. BioSyst.*, Vol. 5, No. 3, pp. 224-234.
- (2) Ryu, K. and Lee, E. K., 2008, "Rapid Screening Method of Peroxidase by Colorimetric Assay and Screening of 2, 4-DCP Degradable Strains," *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.*, Vol. 23, No. 6, pp. 484-488.
- (3) Kim, J.-H., Lee, D.-Y., Hwang, J. and Jung, H.-I., 2009, "Direct Pattern Formation of Bacterial cells Using Micro-droplets Generated by Electrohydrodynamic Forces," *Microfluid. Nanofluid.*, Vol. 7, No. 6, pp. 829-839.
- (4) Xu, T., Jin, J., Gregory, C., Hickman, J. J. and Boland, T., 2005, "Inkjet Printing of Viable Mammalian Cells," *Biomaterials*, Vol. 26, No. 1, pp. 93-99.
- (5) Yoon, S., Lee, S., Cho, M. Y. and Kim, J. K., 2008, "Bacterial Patterning by Inkjet Printer," *Proceedings of the Korean Society of Medical & Biological Engineering*, Vol. 38, pp. 229-231.
- (6) Xu, T., Petridou, S., Lee, E. H., Roth, E. A., Vyavahare, N. R., Hickman, J. J. and Boland, T., 2004, "Construction of High-density Bacterial Colony Arrays and Patterns by the Ink-jet Method," *Biotechnol. Bioeng.*, Vol. 85, No. 1, pp. 29-33.