
미세유체소자와 디지털 홀로그래피 기술을 이용한 미생물의 3D 이미징과 세그먼테이션

신동학* · 이준재**

3D sensing and segmentation of microorganism using microfluidic device
and digital holography

Donghak Shin* · Joon-Jae Lee**

이 논문은 2012년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의
지원을 받아 수행된 기초연구사업임(No. 2012001153)

요 약

미세유체소자(microfluidic device)는 미생물과 관련된 다양한 작업들에 대해서 정확한 제어를 제공할 수 있다. 본 논문에서는 미세유체 소자와 디지털 홀로그래피 마이크로스코피 기술로 구성된 시스템을 구성하고 미생물의 3D 이미징과 세그먼테이션을 설명한다. 각각의 미생물은 미세유체 채널을 통하여 흘러가며 홀로그래피 마이크로스코피가 홀로그래프를 기록한다. 기록된 홀로그래프는 Fresnel 변환을 통하여 컴퓨터적으로 복원되며, 복원된 영상의 위상 성분을 이용하여 미생물의 위치 정보를 찾기 위한 세그먼테이션을 수행한다. 제안하는 방법의 유용함을 설명하기 위하여 광학 실험을 수행하고 그 결과를 나타내었다.

ABSTRACT

Microfluidic devices can offer precise control for a verity of tasks involving biological specimen. In this paper, we propose an integrated system consisting of a microfluidic device along with a digital holographic microscope and present three-dimensional (3D) sensing and segmentation of biological microorganisms. When the individual microorganisms are inputted into the microfluidic channel, the holographic microscope records their holograms. The holograms are computationally reconstructed in 3D using Fresnel transform and the reconstructed phase images are used to search the position of microorganisms. Optical experiments are carried out and experimental results are presented to illustrate the usefulness of the proposed system.

키워드

미세유체소자, 디지털 홀로그래피, 미생물, 세그먼테이션

Key word

Microfluidic device, digital holography, microorganism, segmentation

* 정회원 : 동서대학교 |AI연구소 책임연구원

접수일자 : 2012. 09. 18

** 정회원 : 계명대학교 계명모바일콘텐츠학과 (교신저자: joonlee@kmu.ac.kr)

심사완료일자 : 2012. 10. 25

Open Access <http://dx.doi.org/10.6109/jkiice.2013.17.2.447>

©This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License(<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.
Copyright © The Korea Institute of Information and Communication Engineering.

I. 서론

최근 3D 마이크로스코피 기술은 바이오 분야의 새로운 연구 주제로 활발히 시도되고 있다. 기존의 2차원 마이크로스코피를 한 차원 발전시킴으로써 다양한 응용 분야에 적용되고 있다. 3D 마이크로스코프는 3D 영상을 생성하는데 크게 2가지 방법이 있다. 첫 번째 방법은 광섹셔닝(optical sectioning)로 불리는 기술로써 서로 다른 각도에서 3D 물체의 사영(projection)을 기록하기 위해 작은 depth of field (DOF)를 가지는 광학장치를 사용하여 연속적인 깊이 영상을 얻는다 [1,5]. 다른 방법은 홀로그래피와 같은 3D imaging 기술을 이용하여 물체의 3D 정보를 추출하는 기술이다 [6-14].

이 홀로그래피(holography)나 3D passive imaging 기술을 이용하는 3D 마이크로스코피 기술은 스캐닝을 사용하지 않기 때문에 one-shot으로 고속의 3D 영상을 복원할 수 있는 장점을 가지고 있기 때문에 최근 활발히 연구되고 있다. 일반적으로 홀로그래피 기술을 사용할 경우 레이저 빔을 사용하여 물체에서 나오는 빔과 평면빔을 간섭하여 영상 센서에 기록을 한다. 이 방법의 경우 스펙트럼 영상을 만드는 문제점을 가지고 있다. 이를 해결하기 위해 integral imaging 기술과 같은 3D passive imaging 기술은 3D 영상의 다양한 시점 영상을 획득하고 이를 이용하여 고속 3D 영상을 복원하는 기술로써 최근 새로이 시도되고 있다 [13,14]. 한편, 바이오 연구 분야에서 미세유체소자(microfluidic device)를 이용하는 새로운 연구의 시도가 최근에 많은 관심을 받고 있다 [15-17]. 미세유체소자는 바이오 셀들의 정확한 제어 및 높은 신뢰도를 제공하여 줄 있다. 이 집적 시스템은 셀의 이동 및 저장 등을 위한 마이크로 채널로 구성되어 있으며, 바이오 셀의 단위의 작은 공간으로 디자인되어 제작될 수 있다. 심지어는 개인 셀 단위의 채널 제작이 가능하다. 이러한 미세유체소자 장치의 장점을 기반으로 3D 마이크로스코피 기술을 접목하여 3D 환경하에서 셀의 감시, 분류 및 인식이 가능할 것이다.

본 논문에서는 미세유체 소자와 디지털 홀로그래피 마이크로스코피 기술로 구성된 시스템을 구성하고 미생물의 3D 이미징과 세그멘테이션에 대해서 설명한다. 각각의 미생물은 미세유체 채널을 통하여 흘러가며 홀로그래피 마이크로스코피 기술로 미생물에 대한 홀로그래피를 기록한다. 기록된 홀로그래피는 Fresnel 변환을 통

하여 컴퓨터적으로 복원된다. 복원거리를 달리하면서 3차원적 영상을 획득할 수 있다. 복원된 영상들의 위상 영상을 이용하여 미생물의 위치 정보를 찾기 위한 세그멘테이션을 수행할 수 있다. 미세유체소자를 실제 제작하고 제작된 미세유체 채널로 여러 미생물을 통과시켜 홀로그래피 영상을 획득하는 실험을 수행하였다. 기록된 홀로그래피에 대해서 3D 영상 복원 실험을 수행하고, 위상 영상을 이용하여 3D 물체를 세그멘테이션을 수행한다.

II. 미세유체 소자와 디지털 홀로그래피 기술을 이용한 3D 이미징 시스템

2.1. 시스템 구조

미세유체 소자와 디지털 홀로그래피를 사용하는 시스템의 구조를 그림 1에 나타내었다. 633 nm 파장을 가지는 레이저를 홀로그래피 이미징을 위해 사용한다. 레이저빔은 공간 필터링된 후 두 개의 평행빔으로 빔분할기(BS1)을 통하여 분리된다. 두 개로 분리된 평행빔은 마흐젠더(Mach Zehnder) 간섭계가 구성되도록 서로 만나게 된다. 간섭계의 물체빔쪽에 미세유체 소자를 위치시킨다. 미세유체 소자를 통하여 미생물을 주입하고, 미세유체 채널을 통하여 흘러가는 미생물에 대해서 대물렌즈 MO1에 의해서 물체빔이 확대된다. 이 미생물의 확대된 회절 빔이 빔검출기에 도달한다.

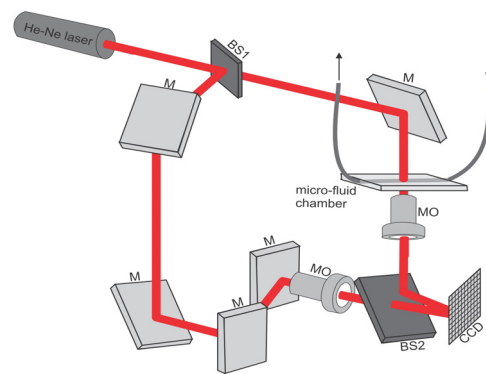


그림 1. 미세유체소자와 디지털 홀로그래피 기술을 사용한 3D 이미징 시스템의 개략도
Fig. 1 3D imaging system using microfluidic device and digital holography

그리고 MO2에 의해 확대된 기준빔의 회절빔도 두 번째 빔분할기 (BS2)를 통하여 빔 검출기에 도달한다. 이때 빔검출기는 MO1의 영상면에 위치한다. 빔검출기에 도착한 기준빔과 물체빔의 간섭으로 홀로그램이 기록되며, 디지털 데이터로 컴퓨터에 저장된다.

2.2. 미세유체소자 제작

미세유체(Microfluidics) 기술은 매우 작은 유체의 관측, 제어 등을 다루는 기술이다 [15,16]. 따라서 이 기술은 작은 부피, 작은 크기, 저전력 소모, 마이크로 단위의 효과 등을 기대할 수 있다. 현재 공학, 물리학, 화학, 바이오생체학 등과 같이 많은 분야에서 응용되고 있고 응용 분야에 맞추어 제작 방법 또한 다양하게 연구되고 있다.

최근 바이오 분야에서는 생물학적 세포 또는 미세입자의 수 측정, 크기 측정 및 분류 검출을 목적으로 미세유체소자를 이용하려는 연구가 시도되고 있어 왔다. 이 미세유체소자를 제작하는 가장 널리 알려진 방법은 PDMS 기술을 이용하여 제작하는 것이다. PDMS는 유연한 폴리머로 광학 특성이 좋고, 가격이 저렴하다. 또한 물딩이 용이하고 표면처리가 쉽다는 장점을 가지고 있다. PDMS 기술을 이용한 미세유체소자 제작의 순서도는 그림 2와 같다 [17]. 미세유체소자의 마스터 몰드를 250 마이크로 두께의 실리콘기판에 원하는 채널 마스크를 사용하여 소프트 포토리소그래피를 통해 제작한다. 그리고 PDMS를 마스터 몰드에 주입함으로써 원하는 채널을 만들 수 있다. 제작된 몰드는 클린 공정을 통하여 깨끗이 처리되고, 채널과 연결을 위한 홀을 제작하고 튜브를 삽입하는 과정을 거쳐서 완성하게 된다.

그림 3은 본 논문에서 제작한 미세유체소자를 보여주고 있다. 미생물의 홀로그램 기록을 위하여 미세유체 채널을 그림 3(a)와 같이 디자인하였다. 정밀한 관측을 위하여 채널의 가운데부분을 약 0.2mm의 폭과 0.2mm의 두께로 제작하였다. 그림 2의 제작과정을 통하여 완성한 미세유체소자는 그림 3(b)와 같다. 2개의 튜브가 있으며, 미생물 통로의 입구와 출구로 사용되었다.

2.3. 디지털 홀로그램의 복원

미세유체소자를 통하여 흘러가는 미생물에 대해서 그림 1의 홀로그래피 마이크로스코피 시스템을 이용하여 디지털 홀로그램을 기록한다. 이렇게 기록된 홀로그램은 컴퓨터적으로 복원이 가능하다.

이를 위하여 본 논문에서는 각스펙트럼 전파 (angular spectrum propagation) 접근 방법을 사용하였다.

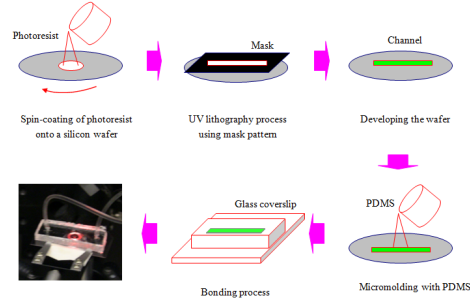


그림 2. 미세유체소자의 제작과정
Fig. 2 Fabrication process of microfluidic device

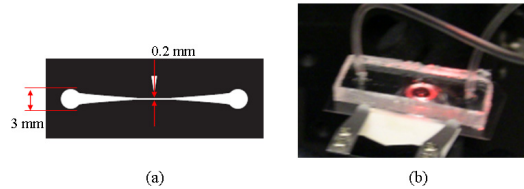


그림 3. (a) 채널 모양 (b) 제작된 미세유체소자
Fig. 3 (a) Channel design (b) Fabricated microfluidic device.

이를 통하여 회절빔들을 주파수 면에서 공간적으로 분리하여 바이오물체에 대한 영상을 분리할 수 있다. 이 방법에서 재생은 홀로그램을 공간적으로 필터링함으로써 영상을 복원한다. 이 과정을 수식적으로 나타내면 다음과 같다.

$$U(x, y, d) = F^{-1} \left\{ \text{filt} \left[F \{ U(x, y, 0) \} \right] e^{ik \sqrt{1 - \lambda^2 f_x^2 - \lambda^2 f_y^2}} \right\} \quad (1)$$

여기서 $U(x, y, d)$ 는 영상면에서 물체 파형의 복소 크기이며, 홀로그램면에서 d 거리에 위치되어 있다. 그리고 $\text{filt}[F\{U(x, y, 0)\}]$ 는 홀로그램의 필터링된 스펙트럼을 의미한다. 그리고 exponential 항은 자유공간 빔의 전파 함수이다. 식 (1)로부터 물체 파형의 세기 및 위상 정보를 컴퓨터적으로 복원할 수 있다. 그림 4는 디지털 홀로그램으로부터 복원 거리에 따른 재생 영상의 예를 보여준다. 홀로그램 면과 영상면 사이의 거리를 달리하면서 미생물의 3차원 영상들이 서로 다르게 얻어진다. 미생물의

실제 위치가 복원면의 거리와 일치할 때에는 재생 영상에서 선명한 영상을 얻을 수 있으며, 이와 반대로 일치하지 않을 때에는 흐린 (blurred) 영상이 얻어지게 된다.

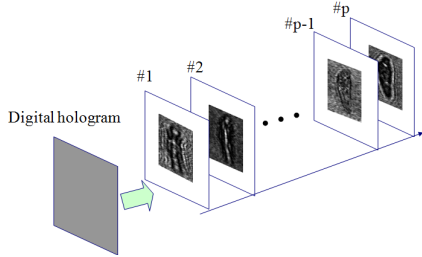


그림 4. 기록된 홀로그램의 디지털 복원 과정
Fig. 4 Digital reconstruction from the recorded hologram

2.4. 복원영상에서 미생물의 세그먼테이션 과정

미생물의 인식이나 식별을 위해서는 세그먼테이션 과정이 필요하다. 본 논문에서는 디지털 홀로그램으로부터 복원되는 평면영상들을 이용하여 쉽게 미생물의 영역을 추출하는 방법을 설명한다. 본 논문에서 사용하는 복원 평면 영상은 홀로그램으로부터 재생되는 위상 영상들이다. 이 과정을 그림 5에 나타내었다. 홀로그램으로부터 복원되는 위상 영상들은 세기 영상에 비해서 더 명확한 영상 분리를 가능하게 할 수 있다. 그림 5에서 보여 지듯이 거리에 따른 위상 영상들을 재생시키고 이들을 평균 영상을 구한다. 그리고 적절한 역치화 과정을 거쳐서 최종 미생물의 영역을 추출한다. 세그먼테이션된 영상들을 이용하여 미생물의 인식이나 식별이 가능하다.

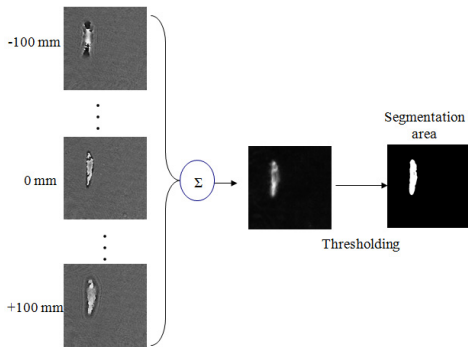


그림 5. 위상영상을 이용한 세그먼테이션 과정
Fig. 5 Segmentation process using phase images

III. 실험 및 분석

본 논문에서는 서로 다른 2 종류의 미생물에 대한 실험을 수행하였다. 그림 6은 실제 실험한 시스템의 구성을 보여준다. 그림 6(b)에 보여 지듯이 미생물은 미세유체소자에 각각 통과시키며 디지털 홀로그램으로 기록되었다. 실험에 사용한 미생물은 'Euglena Acus', 'Chilomanas'이다. 이들 미생물의 사이즈는 약 20-40 μm 정도였다. 실험에 사용한 CCD 카메라는 Prosilica 8-bit 4.4 μm의 화소 크기를 가진다. 그림 7(a)와 (b)에 실제 기록된 홀로그램의 예들을 보여준다. 그리고 이 두 홀로그램을 이용하여 세기 영상과 위상 영상을 컴퓨터적으로 복원하였다. 복원된 영상들을 그림 7(c)와 (d)에 각각 나타내었다. 이 결과에서 보여 지듯이 위상 영상이 세기 영상에 비해 더 선명하게 복원됨을 알 수 있다. 따라서 본 논문에서는 이들 위상 영상을 이용하여 미생물의 세그먼테이션을 수행한다.

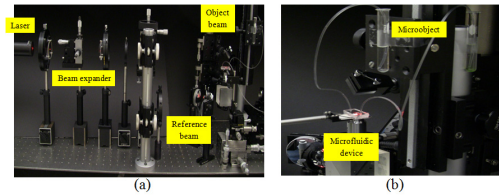


그림 6. 실제 실험 사진
Fig. 6 Real experiment photography

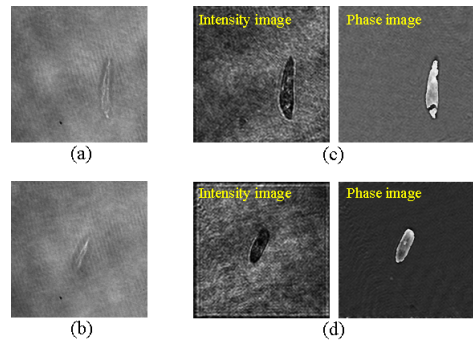


그림 7. (a) 'Euglena Acus' 미생물의 홀로그램과 (b) 세기 및 위상 영상 (c) 'Chilomanas' 미생물의 홀로그램과 (d) 세기 및 위상 영상
Fig. 7 (a) 'Euglena Acus' hologram and (b) its intensity and pahse images (c) 'Chilomanas' hologram and (d) its intensity and phase images

미생물의 세그먼테이션을 위해서는 재생거리 d 를 달리하면서 다양한 위상 영상을 그림 8과 같이 얻었다. d 의 거리를 -100 mm에서 100 mm까지 10 mm 간격으로 총 21개의 복원 영상을 얻었다. 얻어진 영상들에 대해서 그림 5의 세그먼테이션 과정을 거쳐서 최종 미생물의 영역을 추출하였다. 그 추출 영역을 그림 9에 나타내었다. 그림 9의 결과로부터 성공적으로 미생물을 세그먼테이션할 수 있음을 확인할 수 있다. 이렇게 세그먼테이션된 미생물은 쉽게 인식이나 식별이 가능할 것이다.

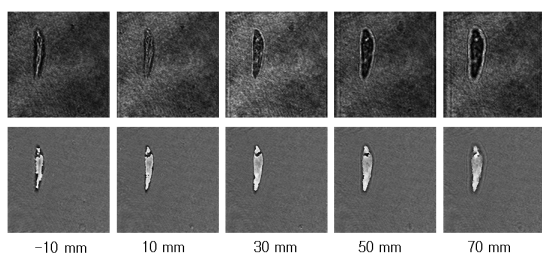


그림 8. 영상 면의 거리에 따른 복원 영상의 예
Fig. 8 Examples of reconstructed images according to the distance of image plane

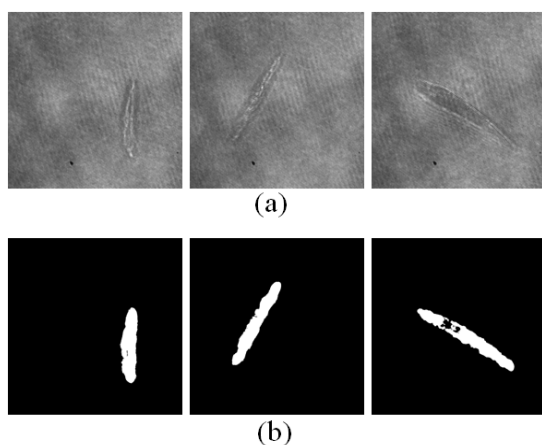


그림 9. (a) 다양하게 회전된 미생물의 예 (b) 세그먼테이션된 실험 결과
Fig. 9 (a) Examples of some rotated micro-objects (b) Their segmentation results

IV. 결론

본 논문에서는 미세유체 소자와 디지털 홀로그래피 마이크로스코피 기술로 구성된 3D 이미징 시스템을 구성하였다. 제안한 시스템을 이용하여 2 종류의 미생물에 대해서 디지털 홀로그램 실험을 수행하였다. 미생물은 미세유체 소자를 통하여 흐르도록 하고 홀로그램으로 기록하였다. 복원된 영상들의 위상 영상을 이용하여 미생물의 위치 정보를 찾기 위한 미생물의 세그먼테이션을 수행할 수 있음을 실험적으로 확인하였다. 본 실험의 결과를 바탕으로 향후 미생물의 인식 및 식별 등의 연구가 가능할 것으로 기대한다.

감사의 글

이 논문은 2012년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업임(No. 2012001153)

참고문헌

- [1] C. J. R. Sheppard, D. M. Shotton, "Confocal laser scanning microscopy," BIOS, Oxford, 1997.
- [2] H. Naora, "Microspectrophotometry and cytochemical analysis of nucleic acids," *Science*, vol. 114, pp. 279-280, 1951.
- [3] D. M. Maurice, "A scanning slit optical microscope," *Invest. Ophthalmol.* vol. 13, pp. 1033-1037, 1974.
- [4] C. J. R. Sheppard, X. Mao, "Confocal microscopes with slit apertures," *J. Mod. Opt.* vol. 35, pp. 1169-1185, 1988.
- [5] C. J. R. Sheppard, M. Roy, M. D. Sharma, "Image formation in low-coherence and confocal interference microscopes," *Appl. Opt.* vol. 43, pp. 1493-1502, 2004.
- [6] E. Tajahuerce, O. Matoba, and B. Javidi, "Shift-invariant three-dimensional object recognition by means of digital holography," *Appl. Opt.* vol. 40, pp. 3877-3886, 2001.

- [7] O. Matoba, T. J. Naughton, Y. Frauel, N. Bertaux, B. Javidi, "Real-time three-dimensional object reconstruction by use of a phase-encoded digital Hologram," *Appl. Opt.* vol. 41, pp. 6187-6192, 2002.
- [8] B. Javidi, I. Moon, S. Yeom, and E. Carapezza, "Three-dimensional imaging and recognition of microorganism using single-exposure on-line (SEOL) digital holography," *Opt. Express* vol. 13, pp. 4492-4506, 2005.
- [9] Y. Frauel, T. J. Naughton, O. Matoba, E. Tajahuerce, and B. Javidi, "Three-dimensional imaging and processing using computational holographic imaging," *Proc. IEEE* vol. 94, pp. 636-653, 2006.
- [10] T. Nomura, S. Murata, E. Nitnai, and T. Numata, "Phase-shifting digital holography with a phase difference between orthogonal polarizations," *Appl. Opt.* vol. 45, pp. 4873-4877, 2006.
- [11] B. Javidi, S. Yeom, I. Moon, and M. Daneshpanah, "Real-time automated 3D sensing, detection, and recognition of dynamic biological micro-organic events," *Opt. Express* vol. 14, pp. 3806-3829, 2006.
- [12] S. Yeom, I. Moon, and B. Javidi, "Real-time 3D sensing, visualization and recognition of dynamic biological micro-organisms," *Proc. IEEE* vol. 94, pp. 550-566, 2006.
- [13] J.-S. Jang and B. Javidi, "Three-dimensional integral imaging of micro-objects," *Opt. Lett.* vol. 29, pp. 1230-1232, 2004.
- [14] B. Javidi, I. Moon and S. Yeom, "Three-dimensional identification of biological microorganism using integral imaging," *Opt. Express*, vol. 14, pp. 12096-12108, 2006.
- [15] L. Hood, J. R. Heath, M. E. Phelps, and B. Lin "Systems biology and new technologies enable predictive and preventative medicine," *Science*, vol. 306, pp. 640-643, 2004.
- [16] D. Breslauer, P. Lee, and L. Lee, "Microfluidics-based systems biology," *Mol. Syst. Biol.* vol. 2, pp. 97-112, 2006.
- [17] D. Shin, M. Daneshpanah, A. Anand, and B. Javidi, "Optofluidic system for three-dimensional sensing and

identification of micro-organisms with digital holographic microscopy," *Opt. Lett.* vol. 35, pp. 4066-4068, 2010.

저자소개

신동학(Shin Donghak)

한국정보통신학회 논문지
제16권 제10호 참조

이준재(Lee Joon Jae)

한국정보통신학회 논문지
제16권 제10호 참조