

주사기 바늘 기반의 미세유체 장치를 이용한 단분산성 PEGDA 입자의 제조

진시형 · 김태완 · 오동석 · 강경구 · 이창수[†]

충남대학교 공과대학 바이오응용화학과
34134 대전광역시 유성구 대학로 99
(2018년 11월 5일 접수, 2018년 11월 17일 수정본 접수, 2018년 11월 20일 채택)

Preparation of Monodisperse PEGDA Microparticles Using a Dispensing Needle Based Microfluidic Device

Si Hyung Jin, Taewan Kim, Dongseok Oh, Kyoung-Ku Kang and Chang-Soo Lee[†]

Department of Chemical Engineering and Applied Chemistry, Chungnam National University, 99, Daehak-ro, Yuseong-gu, Daejeon, 34134, Korea

(Received 5 November 2018; Received in revised form 17 November 2018; accepted 20 November 2018)

요 약

본 연구는 주사기 바늘 기반의 미세유체 장치에서 균일한 polyethylene glycol diacrylate (PEGDA) 입자를 제조하는 새로운 방법을 소개한다. 미세유체 장치는 다양한 규격의 기성품들을 별도의 장비없이 조립하여 제작된다. 이 미세유체 장치에서 광개시제를 포함한 PEGDA 분산상과 오일의 연속상의 부피유속을 제어하여 단분산성 PEGDA 액적을 형성한다. PEGDA 액적은 장치의 말단에서 자외선 조사에 의해 입자로 중합된다. 입자의 크기는 부피유속과 미세유체 장치의 규격을 조절하여 손쉽게 제어되며 입자의 단분산도는 변동계수(coefficient of variation)값이 2.57%로 계산된다. PEGDA 입자의 생물학적 응용을 증명하기 위해서 세포를 함입시키고 증식과 생존을 관찰한다.

Abstract – This study presents a novel method for preparing monodisperse polyethylene glycol diacrylate (PEGDA) microparticles in a dispensing needle based microfluidic device. The microfluidic devices are manufactured by manually assembling various off-the-shelf products without using additional equipment. In this microfluidic device, the volumetric flow rates of the dispersed phase of PEGDA solution and the continuous phase of oil are controlled to generate monodisperse PEGDA droplets. The PEGDA droplet contains photo-initiator thus it is crosslinked to microparticle by photopolymerization at the ends of the device. The particle size is easily controlled by adjusting the volume flow rate and the size of the microfluidic device. The monodispersity of the particles is calculated by a coefficient of variation of 2.57%. To demonstrate the biological applications of PEGDA particles, cells are encapsulated and observed for proliferation and viability.

Key words: PEGDA, Microparticle, Microfluidics, Dispensing needle, Monodisperse

1. 서 론

미세규모(microscale)의 polyethylene glycol diacrylate (PEGDA) 입자는 생체 조직(tissue)과 유사한 물리적 특성과 입자 내 물질의 확산이 용이하여 약물 및 조직공학의 커뮤니티에서 중요성이 증대되고 있다[1-3]. 또한 PEGDA의 acrylate는 화학적인 다재성으로 작용기를 도입시키기 용이하여 항체(antibody)나 올리고핵산염(oligonucleotide)와 같은 생체분자의 고정화가 용이하다[4,5]. 일반

적으로 PEGDA 입자는 오일과 수용액으로 이루어진 2상의 현탁액(suspension)을 초음파파쇄(sonification), 와류파쇄(vortexing), 균질화(homogenization) 등의 방법으로 유화(emulsifying)시키고 중합하여 제조한다[6, 7] 상기 방법들은 쉽고 간편하게 PEGDA 입자를 생성할 수 있으나 입자의 크기를 제어하기 어렵고 입자가 다분산성의 특성을 갖는 한계점이 있다[8]. PEGDA 입자의 약물전달체나 세포 캡슐화 등의 생의학적 분야로의 응용을 위해서는 입자의 크기가 균일하여 함입되는 약물이나 세포의 양을 정교하게 제어할 수 있어야 한다[8]. 이런 요구를 만족시키기 위해서 미세유체 시스템이 도입되고 있다.

미세유체 시스템의 내부를 흐르는 유체는 낮은 레이놀드 수를 갖으며 층류형태로 흐르기 때문에 비혼화성 유체들의 정교한 제어가 가능하다[9-11]. 대표적인 미세유체 시스템은 실리콘 계열의 고분

[†]To whom correspondence should be addressed.

E-mail: rhadum@cnu.ac.kr

[‡]이 논문은 충남대학교 이용택 교수의 정년을 기념하여 투고되었습니다. 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.

자인 polydimethylsiloxane (PDMS), 유리 모세관(glass capillary) 기반의 장치들이 제작되어 사용된다[12-15]. PDMS기반 미세유체 시스템의 경우 반도체 제작공정(photo-lithography)과 고분자 복제 몰딩 공정(soft-lithography) 를 통해 장치를 제작한다[16-20]. 이 장치제작공정은 복잡하고 비싼 장비와 시약들이 사용되기 때문에 주로 학계(academia)의 범주 안에서만 사용된다. 유리 모세관 기반 미세유체 시스템의 경우 상대적으로 장치제작공정에 소요되는 비용이 저렴하나 여전히 제작공정이 복잡하여 사용자의 높은 숙련도를 요구한다[21-24]. 근래 이러한 문제를 극복하기 위해서 3D 프린팅, 커피 교반 막대 (stirring bar), 슬라이드 글라스와 같은 기성품(off-the-shelf)을 이용한 다양한 형태의 미세유체 시스템들이 개발되고 있다[25-27]. 하지만 이런 장치의 경우 다양한 크기의 입자를 제조하기에는 미세유체 장치의 가변성에 문제가 제기되고 있다. 따라서 보다 간단하고, 저렴하며, 쉽게 미세유체의 구조를 변경할 수 있는 특성을 가진 주사기 바늘(dispensing needle) 기반의 미세유체 시스템이 새롭게 각광받고 있다[28-30]. 주사기 바늘 기반의 미세유체 시스템은 다양한 규격을 갖는 의료용 주사 바늘, 튜브, 튜브 연결관 등의 다양한 규격을 갖는 기성품들의 조립으로 미세유체 장치를 형성시키는 시스템으로 정의된다[28-30]. 정해진 규격의 기성품들을 조립함으로써 전문적인 제작기술이나 별도의 장비나 공정이 필요하지 않아 사용자의 접근성이 우수하다. 각 기성품들의 구성을 다양하게 조합함으로써 제조되는 입자의 크기, 형상, 조성 등을 정교하게 제어할 수 있다[28-30]. 뿐만 아니라 주사기 바늘 내경의 0.08 부터 4 mm에 이르는 폭넓은 범위로 인하여 미세유체 장치의 규격을 쉽고 유연하게 변경할 수 있다.

본 연구는 주사기 바늘 기반의 미세유체 시스템에서 단분산성 PEGDA 입자를 제조하였다. 주사기 바늘과 십자형 연결관(cross-connector)와 타이콘 튜브(tygon tube)의 기성품을 조립하여 흐름집속(flow-focusing) 형태의 미세유체 장치를 제작하였다[30]. 분산상으로는 광개시제(photoinitiator)를 포함하는 PEGDA 용액이 사용되었고 연속상으로는 계면활성제를 포함한 미네랄오일이 사용되었다. 분산상과 연속상의 부피유속 제어를 통해 PEGDA 액적을 형성시키고 자외선 조사를 통해 광중합시켜 PEGDA 입자를 제조하였다. 부피유속의 조절과 주사기 바늘의 규격을 변경시켜서 입자의 크기를 정교하고 쉽게 제어할 수 있음을 증명하였다. PEGDA 입자의 생물학적 응용성을 증명하기 위해서 세포를 함유한 입자를 제조하였고 세포의 증식과 생존을 관찰하였다.

2. 실험

2-1. 재료

주사기 바늘 기반의 미세유체 장치는 규격이 정해진 기성품으로 제작된다. 모든 규격의 주사기 바늘은 Engineering Support Technology (EST, Republic of Korea) 에서 구매하였다. polypropylene 재질의 루어어댑터(luer adapter)와 십자형 연결관(cross connector)는 Tommyheco (Republic of Korea)에서 구매하였다. 주사기 바늘의 금속 핀의 표면개질을 위한 octadecyltrichlorosilane (OTS)는 Sigma-Aldrich (MO, USA) 에서 구매하였다. 투명한 poly ethylene 재질의 타이콘 튜브는 Saint-Gobain (OH, USA)에서 구매하였다. 입자 제조를 위한 polyethylene glycol diacrylate (PEGDA, Mw = 700), mineral oil, sorbitan monooleate (Span 80), 2-hydroxy-2-methyl-1-phenyl-

propa-1-one (darocur1173)는 Sigma-Aldrich (MO, USA)에서 구매하였다. *Yarrowia lipolytica* 세포의 배양을 위해서 YPD 배지와 질소 성분 결핍배지(nitrogen source deficient media)가 사용되었다. yeast extract, peptone, dextrose는 Becton Dickinson (NJ, USA)에서 구매하였다. amino acids와 ammonium sulfate가 결여된 yeast nitrogen base, glucose, ammonium sulfate는 Sigma-Aldrich (MO, USA)에서 구매하였다.

2-2. 주사기 바늘 기반의 미세유체 장치 제작

주사기 바늘 기반의 미세유체 장치를 구성하는 모든 부품들은 시장에서 손쉽게 구매할 수 있는 기성품들로 구성된다. 소수성의 연속상을 사용하기 위해서 주사기 바늘의 스테인레스 금속 핀만 분리하여 OTS 에 담가 1시간동안 표면개질 시킨다. 친수성의 분산상이 유입되는 주사기 바늘의 경우에는 표면개질 없이 바로 사용한다.

십자형 연결관은 PEGDA 액적을 형성시키기 위한 흐름집속점(flow-focusing)을 형성시키기 위한 연결수단이다(Fig. 1). 십자형 연결관의 수평방향으로는 분산상이 유입되고 수직방향으로는 연속상이 양쪽으로 유입된다. 분산상이 유입되는 주사기 바늘의 좌측 플라스틱 부분에는 루어 어댑터와 타이콘 튜브, 주사기가 연결된다. 주사기 바늘의 우측 핀 부분은 1.6 mm 십자형 연결관(내경 1 mm)와 수평방향으로 연결되고 소수성으로 표면개질한 바늘 핀이 연결된다. 각 연결부는 내경 1.6 mm의 타이콘 튜브 조각으로 감싸 누수를 방지한다. 주사기 바늘의 끝에는 내경 0.762 mm의 내경을 갖는 50 cm 길이의 긴 타이콘 튜브를 연결한다. 이 긴 타이콘 튜브는 배출유로로 사용된다. 십자형 연결관의 수직 방향으로는 내경 1.6 mm의 타이콘 튜브가 양쪽으로 연결된다. 십자형 연결관의 수직방향에는 1.6 mm의 타이콘 튜브가 연결되며 각 튜브의 끝에는 연속상이 채워진 주사기가 연결된다.

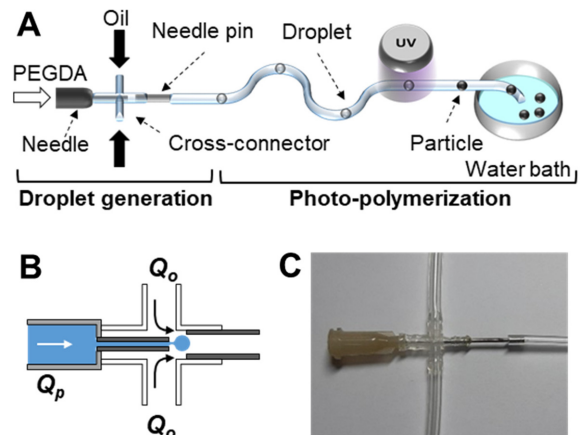


Fig. 1. The dispensing needle based microfluidic device for generation of monodisperse PEGDA particle. (A) Schematic diagram of the experimental setup. Black and white arrows represent the flow of oil and PEGDA prepolymer, respectively. (B) Schematic diagram depicting the process of generation of PEGDA droplet in a cross-connector. The needle placed horizontally serves as an orifice through which the dispersed phase is injected. Oil is injected on both vertical sides to form a coflow against PEGDA prepolymer. Q_p and Q_o represent the volumetric flow rate of PEGDA prepolymer and oil, respectively. (C) Photograph of the dispensing needle based microfluidic device.

본 연구에서는 분산상의 주사기 바늘은 내경 0.23 mm (27 G) 혹은 내경 0.34 mm (25 G) 규격이 사용되었으며 소수성으로 표면개질된 바늘 핀의 내경은 0.79 mm (19 G)로 고정하여 사용하였다.

2-3. PEGDA 액적 생성 및 *In situ* 입자 합성

주사기 바늘 기반의 미세유체 장치를 이용한 PEGDA 입자의 제조 방법은 Fig. 1을 통하여 간략하게 보여준다. 미세알 오일의 연속상과 PEGDA 용액의 분산상은 서로 섞이지 않으며 주사기 펌프(syringe pump, PHD-Ultra, Harvard Apparatus, MA, USA)를 통해 주입된다. 연속상에는 계면활성제인 Span 80이 포함되어 PEGDA 용액과의 계면장력을 제어한다. 분산상에는 PEGDA 용액의 광중합을 위해서 광개시제가 5% 포함된다. 주사기 바늘 기반의 미세유체 장치는 CCD 카메라(Coolsnap cf2, Roper Science, USA)가 장착된 역상 형광 현미경(TE 2000U, Nikon, Japan)에서 이미지 촬영을 통해 분석된다.

PEGDA 액적은 십자형 연결관에서 분산상이 연속상에 의해 끊어짐으로써 형성되며 장치의 말단에서 $5,000 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$ 의 자외선에 노출된다. 자외선에 노출된 PEGDA 액적은 광개시제의 분해로 인한 라디칼 형성으로 중합이 급속하게 진행되며 주사기 바늘 기반의 미세유체 장치 내부에서 *In situ*로 PEGDA 입자가 제조된다.

2-4. *Yarrowia Lipolytica* 세포의 배양

Yarrowia Lipolytica 세포는 YPD 배지(1 wt% yeast extract, 2 wt% peptone, 2% dextrose)에 접종한다. 섭씨 30도의 인큐베이터에서 24시간 배양한 뒤 4 mL의 새 YPD 배지에 $\text{OD}_{600} = 0.05$ 의 농도로 계대배양을 수행한다. 세포의 농도가 $\text{OD}_{600} = 1$ 에 도달할 때까지 섭씨 30도의 인큐베이터에서 배양을 수행한다. 세포를 주사기 바늘 기반의 미세유체 장치에 주입하기 위해서 세포 현탁액에서 세포를 원심분리하여 20% 질소 성분 결핍 배지(0.17 wt% yeast nitrogen base, 0.1 wt% ammonium sulfate, 2 wt% glucose)와 80% PEGDA 용액의 혼합액에 $\text{OD}_{600} = 0.1$ 의 농도로 재 현탁 시킨다.

세포가 캡슐화된 PEGDA 입자는 질소 성분 결핍배지에 받아지고 섭씨 30도의 인큐베이터에서 배양된다. 세포 생존율을 분석하기 위해서 propidium iodide (Sigma-Aldrich, MO, USA)가 $3 \mu\text{M}$ 의 농도로 추가되고 사멸세포 염색에 의한 형광 신호를 관찰한다.

3. 결과 및 토의

PEGDA 입자를 제조하기 위해서 주사기 바늘 기반의 미세유체 장치를 활용하였다. 이 미세유체 장치는 역상 형광 현미경에 놓여져 이미지 분석을 통해서 PEGDA 입자가 제조되는 과정을 실시간으로 모니터링 할 수 있다(Fig. 1(A)). PEGDA 액적이 형성되는 십자형 연결관 부분은 불투명한 금속 재질의 바늘 핀들이 위치하고 있어 직접적으로 관찰할 수 없다. 따라서 장치의 하단부에 연결된 투명한 타이콘 튜브 재질의 배출유로에서 관찰을 하게 된다. 십자형 연결관은 PEGDA 액적을 형성하는 흐름집합점(flow-focusing junction)으로 활용된다(Fig. 1(B), (C)). 수평방향으로는 분산상인 PEGDA 용액이 주입되며 수직 상하방향에서 연속상인 오일이 주입되어 싸개흐름(sheath flow)을 형성한다. 십자형 연결관의 집합점에서 두 용액은 서로 만나 동축류(coflow)를 형성하고 레일리 테일러 불안정성원리(Rayleigh-Taylor instability)에 의해서 분산상인

PEGDA 용액이 액적 형태로 형성된다. PEGDA 액적은 배출유로로 흘러나가며 말단의 자외선 조사 영역에서 광중합(photo-polymerization)이 일어난다. PEGDA 액적은 PEGDA 단량체와 광개시제로 구성되며 전형적인 라디칼 반응으로 중합된다. 광개시제인 darocure 1173은 벤조인에테르(benzoin ether) 유도체로써 자외선 조사에 의해서 균일절단되어 활성 라디칼을 형성한다. 이는 PEGDA의 탄소 이중결합을 끊어 선형 고분자의 형성 및 3차원 그물형태의 구조를 형성함으로써 PEGDA 액적이 입자로 중합된다[2,3]. 배출유로의 끝은 증류수가 담긴 수조(water bath)에 담겨져 형성된 PEGDA 입자를 회수한다. 연속상으로 사용되는 미세알 오일의 경우 밀도가 0.8 g mL^{-1} 이고 PEGDA 입자의 밀도는 1.12 g mL^{-1} 이다. 수조에서 입자는 바닥면으로 가라앉고 오일은 위쪽 공기계면을 향하여 부유하는 자발적인 상분리가 발생하여 PEGDA 입자를 손쉽게 회수할 수 있다.

주사기 바늘 기반의 미세유체장치에서 단분산성(monodisperse) PEGDA 입자를 제조하기 위해서 PEGDA 용액의 유동패턴(flow pattern)을 정교하고 재현성 있게 제어할 수 있어야 한다. PEGDA 용액은 위성액적(satellite droplet), 액적(droplet), 전이(transition), 늘어난 유동(elongation)의 대표적인 4가지 유동패턴을 보인다(Fig. 2(A)). PEGDA 용액의 유동패턴은 연속상인 오일의 부피유속(volumetric flow

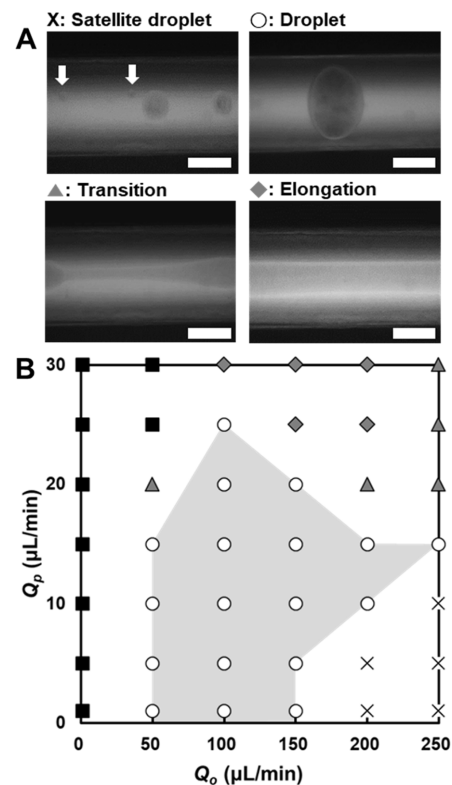


Fig. 2. The flow patterns of PEGDA prepolymer in a dispensing needle based microfluidic device. (A) Microscopic images of four typical flow patterns of PEGDA prepolymer. White arrows represent the satellite droplets. All scale bars indicate $100 \mu\text{m}$. (B) Phase diagram as a function of volumetric flow rates of PEGDA prepolymer (Q_p) and oil (Q_o). Symbols of square, triangle, rhombus, circle, and X represent flow patterns of counter flow, transition, elongation, droplet, satellite droplet, respectively. The gray shaded area represents the range in which monodisperse PEGDA droplets are generated.

rate of oil, Q_o)와 분산상인 PEGDA 용액의 부피유속(volumetric flowrate of PEGDA, Q_p)으로 제어된다. 용액의 부피유속에 따른 PEGDA 용액의 유동패턴을 상도표로 작성하였다(Fig. 2(B)). PEGDA 용액의 굴절률(refractive index)은 1.47 이고 미네랄 오일은 1.467 로서 차이가 미미하기 때문에 유동패턴을 가시화 하기 어렵다. 따라서 PEGDA 용액에 검정색의 염료를 1% 섞어 가시화 하여 분석 하였다. 오일의 부피유속에 비해서 PEGDA 용액의 부피유속이 낮을 때 다수의 작은 위성액적들이 불균일한 크기로 형성된다(Fig. 2(A), (B)의 X). 이는 연속상의 부피유속에 따른 선속도(U)와 모세관 수($Ca = \mu U \gamma^{-1}$)의 증가로 인하여 오일과 PEGDA 액적 사이의 계면(γ)이 안정하게 유지되기 어렵기 때문이다. 반면 오일의 낮은 부피유속과 PEGDA 용액의 높은 부피유속에서는 부피유속에 따른 영향보다 점성(μ)과 계면장력의 영향을 지배적으로 받기 때문에 PEGDA 용액은 불안정한 유동으로 전이되다가 점차 안정한 늘어진 유동을 형성한다. PEGDA 용액의 부피유속이 오일의 부피유속보다 높을 경우에는 십자형 연결관의 오일 유로쪽으로 PEGDA 용액의 역류가 발생된다. PEGDA 액적이 안정적으로 형성되는 조건은 연속상의 부피유속이 100 에서 150 $\mu\text{L min}^{-1}$, PEGDA 용액이 1에서 20 $\mu\text{L min}^{-1}$ 이다. 이 특정 조건에서는 넓은 영역에서 단분산성 액적이 형

성됨을 확인할 수 있으며 유속제어에 따른 액적의 크기제어까지 가능하다.

주사기 바늘 기반의 미세유체장치는 PEGDA 입자의 크기를 부피유속과 오리피스스의 규격을 통해 제어할 수 있다. 기존의 미세유체 장치들과 달리 주사기 바늘 기반의 미세유체 장치는 타이콘 튜브의 굴곡진 면에 의해서 빛이 굴절됨으로써 PEGDA 입자 형상이 왜곡되어 보이기 때문에 *In situ* 로 분석할 수 없다. 따라서 PEGDA 입자는 바닥면이 평평하고 투명한 수조로 옮겨져 이미지 분석을 통해 관찰된다(Fig. 3(A)). 앞선 PEGDA 용액의 유동패턴의 상도표에서 가장 넓은 영역에서 액적이 형성되는 연속상의 부피유속이 100 $\mu\text{L min}^{-1}$ 인 조건에서 PEGDA 용액의 부피유속을 5 에서 20 $\mu\text{L min}^{-1}$ 까지 제어하여 입자를 형성하였다(Fig. 3(B), (C), (D)). PEGDA 용액의 부피유속이 증가함에 따라서 PEGDA 입자의 크기가 선형적으로 증가되며 모든 유속 조건에서 PEGDA 입자의 변계계수(coefficient of variance, CV) 값이 2.57% 이하로 계산된다 (Fig. 3(C), (D)) 이는 미국 국립표준기술연구소(National institute of standard and technology)에서 정의하는 단분산도의 기준 변계계수 값인 5% 이하의 조건을 충족함으로써 제조된 PEGDA 입자가 매우 균일함을 증명한다[2, 31]. 부피유속의 제어를 통해서 PEGDA 입자의 크기를 제어할 수

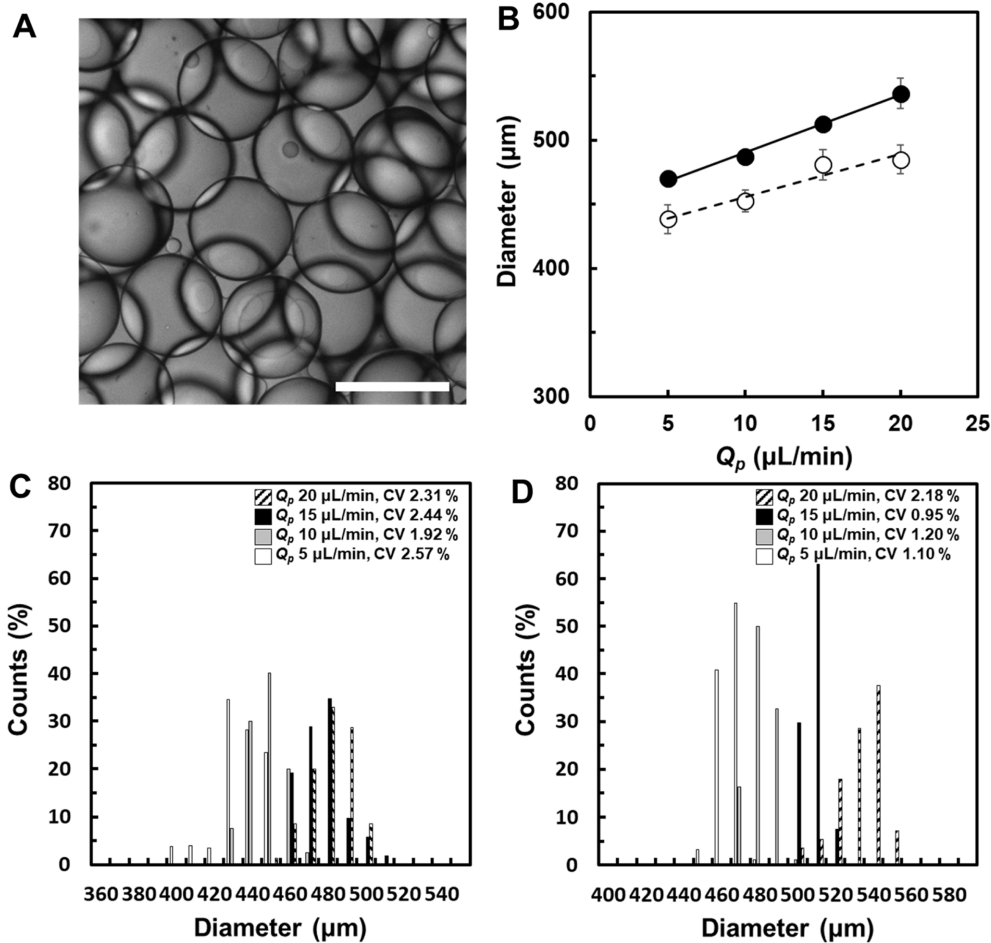


Fig. 3. The size control of monodisperse PEGDA microparticles. (A) Microscopic image of the monodisperse PEGDA microparticles suspended in distilled water. Scale bars indicates 500 μm . (B) Control of the diameter of PEGDA microparticles by volumetric flowrate of PEGDA prepolymer and orifice size of dispensing needle based microfluidic device. The closed and opened circles represent the 0.23 and 0.34 mm of inner diameter of the orifice, respectively. The size distribution of the PEGDA microparticles obtained from 0.23 (C) and 0.34 mm (D) of the inner diameter of the orifice. CV indicates the coefficient of variation.

있지만 그 범위가 입자의 직경의 $60\ \mu\text{m}$ 이내 수준에 머문다. 입자의 직경을 더 넓은 폭으로 제어하기 위해서 분산상인 PEGDA 용액이 유입되는 오리피스 내경을 조절하였다. 오리피스 내경은 다른 규격의 주사기 바늘을 사용함으로써 손쉽게 조절한다. 주사기 바늘은 0.08에서 4.39 mm 까지 다양한 규격으로 구성된다. 본 연구에서는 오리피스 내경을 0.23 또는 0.34 mm로 사용하였다. 또한 배출유로와 연결되는 바늘 핀의 내경은 0.79 mm (외경 0.99 mm), 타이콘 튜브의 내경은 1 mm로 동일하게 사용하였다. 오리피스 내경의 직경을 두 단계 올림으로써 PEGDA 입자의 직경범위를 $120\ \mu\text{m}$ 로 약 2배 이상 증가시켰다. 기존의 PDMS 기반 미세유체 장치도 오리피스 내경을 통한 액적 크기를 제어한 바가 있다[9]. 하지만 기존의 미세유체 장치를 제작하기 위해 사용되는 감광재(photoresist)의 비용, 점도, 공정의 복잡성 등을 고려할 때 오리피스 내경을 큰 폭으로 증가시키기 어렵다. 주사기 바늘은 게이지에 따른 비용의 차이도 크지 않을 뿐 아니라 누구나 손쉽게 조립할 수 있기 때문에 다양한 크기의 입자를 제조하는데 더 유리하다.

PEGDA의 경우 생체적합성이 우수하다고 보고된 합성 고분자 물질로써 입자, 섬유, 패드 등의 형태로 제조되어 사용된다. 본 연구에서는 PEGDA 입자가 생체물질의 운반체로의 응용 가능성을 증명하기 위해서 *Yarrowia Lipolytica* 세포가 고정된 PEGDA 입자를 제조하였다(Fig. 4(A), (B)). 세포는 20% 질소 성분 결핍배지가 포함된 PEGDA 용액에 현탁되어 분산상으로 주입된다. 연속상은 이

전 실험들과 동일하게 2 wt% Span80 계면활성제를 포함하는 미네랄 오일을 사용하였다. 세포를 포함하는 PEGDA 입자를 회수하는 증류수 대신 질소 성분 결핍배지를 채웠다. 이것은 PEGDA 입자 속 세포에게 지속적으로 영양분을 공급하고 세포가 증식하면서 분비하는 노폐물들을 희석시키는 역할을 한다. PEGDA 입자에서 세포의 생존율을 분석하기 위해서 수조의 배지에는 $3\ \mu\text{M}$ 의 농도로 propidium iodide (PI)를 섞었다. PI는 세포의 생존율을 형광으로 분석하는 대표적인 시약으로써 사멸세포를 선택적으로 염색할 수 있다. 세포가 생존해 있을 경우에는 세포막이 온전히 유지되기 때문에 외부의 PI는 체내로 유입될 수 없다. 하지만 세포가 사멸될 경우 세포막이 손상되어 외부의 PI가 체내로 유입되고 DNA (deoxyribonucleic acid)의 염기쌍 사이에 삽입(intercalating) 되어 형광이 발현된다. 직경 $500\ \mu\text{m}$ 인 PEGDA 입자에는 세포가 약 50마리가 포함되도록 초기 세포농도를 제어하였다(Fig. 4(A), 검정 화살표). PEGDA 입자 제조 직후에 세포의 사멸에 의한 형광이 관찰되지 않았다. 이는 PEGDA 용액의 세포독성이 미미할 뿐만 아니라 광중합을 위한 자외선의 조사에 대한 영향이 미미함을 간접적으로 보여준다. 세포를 포함하는 PEGDA 입자를 섭씨 30도의 인큐베이터에 수조 채 넣어 세포 증식을 유도하였다. PEGDA 입자 내에서 단일세포 혹은 출아 전의 세포 형태로 고정되었던 세포들이 6에서 10 마리 수준으로 증식했으나 PI 형광신호는 관찰되지 않았다(Fig. 4(B), 검정 화살표). 이는 세포가 PEGDA 입자에서 12시간 동안 생존하기 위한 영양분,

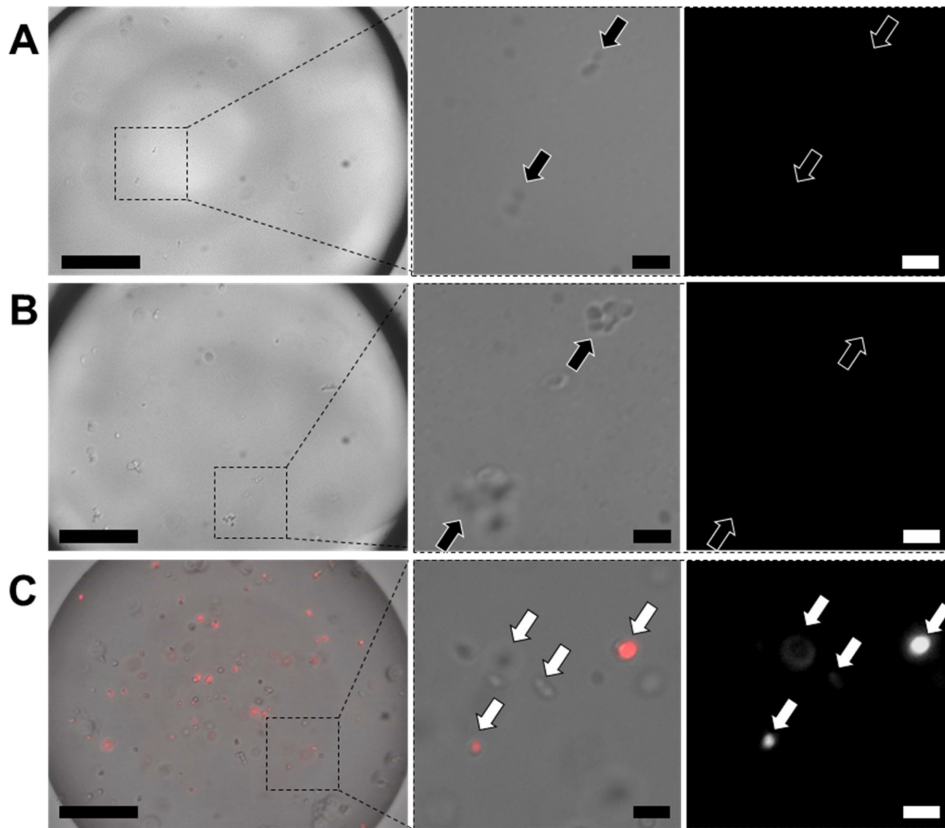


Fig. 4. Encapsulation of *Yarrowia Lipolytica* cells in PEGDA and agarose microparticles. The particles are incubated in nitrogen source deficient medium containing $3\ \mu\text{M}$ propidium iodide. Overlay and fluorescence images of PEGDA microparticles containing the cells at 0 hr (A) and 12 hrs (B). Fluorescence signal of propidium iodide was not observed in culture until 12 hrs. Black arrows indicate the location of cells. (C) Overlay and fluorescence images of agarose microparticle containing the cells. White arrows indicate the cells stained with propidium iodide. The scale bars of the large images and the inset images represent 100 and $10\ \mu\text{m}$, respectively.

산소의 공급이 원활하게 되었음을 의미한다. 대조 실험으로 본 미세유체 장치에서 아가로스(agarose) 젤 입자에 *Yarrowia Lipolytica* 세포를 합입시켰다. 세포는 1% 아가로스, 99% 질소 성분 결핍배지가 포함된 수용액에 현탁되어 분산상으로 주입되었다. 연속상은 PEGDA 입자를 제조하는 실험 조건과 동일하게 설정하였다. 본 대조실험에서 사용한 아가로스는 젤화온도가 섭씨 30도를 갖기 때문에 세포를 포함하는 용액은 이보다 높은 37도로 유지시켰다. 세포를 포함하는 아가로스 용액은 주사기 바늘 기반 미세유체장치에서 동일한 원리로 액적으로 형성된다. 생성된 액적은 미세알 오일이 담긴 수조에 받아지고 섭씨 4도의 냉장고에서 30분동안 냉각시켰다. 냉각을 통해서 아가로스 액적은 젤화되어 입자 형태로 제조된다. 아가로스 젤 입자는 3 μM 의 PI를 포함하는 질소 성분 결핍배지에 옮겨져 세포의 생존을 확인하였다(Fig. 4(C)). 아가로스 젤 입자 속의 세포는 입자제조 직후에도 사멸된 세포의 수가 많아 PI의 형광 신호가 다수 관찰되었다(Fig 4(C), 하얀 화살표). 이것은 아가로스 젤 입자에 세포를 합입시키기 위하여 37도부터 4도까지 급격한 온도 변화에 의해 세포가 손상을 입은 영향일 것으로 예상된다. 대조실험과 달리 PEGDA 입자의 결과에서는 입자제조 직후부터 12시간이 지난시점까지 PI 신호가 식별되지 않았다. 이것은 본 연구에서 제안하는 PEGDA 입자의 제조 방법이 세포의 합입 및 증식에 더 적합하다는 것을 의미한다. *Yarrowia Lipolytica* 세포는 질소가 결핍된 환경에서 지질을 축적하는 균주이다. 질소 성분 결핍 배지에서 PEGDA 입자 속 세포가 증식 및 생존할 수 있다는 결과는 본 시스템이 바이오매스 미생물의 연구에 활용될 수 있음을 시사한다.

4. 결 론

본 연구는 주사기 바늘 기반의 미세유체 장치에서 단분산성 PEGDA 입자를 제조하는 방법을 제안하였다. 기존의 미세유체 장치들과 달리 주사기 바늘, 십자형 연결관, 타이콘 튜브 등의 기성품들을 조립하는 매우 간단한 제작과정을 갖음으로써 공정 복잡성, 공정 비용 등의 문제를 해결하고 사용자의 접근성을 높였다. 연속상인 오일과 분산상인 PEGDA 용액의 부피유속을 마이크로 시린지 펌프를 이용하여 조절하였으며 부피유속에 따른 PEGDA 용액의 유동 특성을 상도표로 정의하였다. 이 기준을 통해서 넓은 직경범위를 갖는 PEGDA 액적을 형성시켰으며 광중합을 통해 단분산성 PEGDA 입자를 제조하였다. PEGDA 입자의 크기는 부피유속을 제어하거나 주사기 바늘의 규격을 통해 오리피스 내경을 제어 하였다. 또한 단일공정으로 PEGDA 입자의 제조와 세포를 고정할 수 있음을 보여주었다. PEGDA 속 세포의 증식과 생존을 통해 본 방법이 생체 적합성이 우수함을 증명하였다. 본 시스템은 기성품의 주사기 바늘의 조합을 변경함으로써 과학이나 산업분야에서 요구하는 다양한 크기의 입자를 제조하는데 적용될 수 있다. 또한 합성 고분자인 PEGDA 뿐만 아니라 키토산, 펙틴, 알지네이트(alginate) 등의 천연 고분자를 이용한 하이드로젤 입자의 제조에도 활용될 수 있다. 분산상의 유동특성을 제어함으로써 입자뿐만 아니라 미세섬유(microfiber)의 제조에도 활용될 수 있을 것이다. 더 나아가, 본 시스템을 기반으로 제조된 PEGDA 입자는 약물전달시스템, 생체 물질의 담지체나 세포배양을 위한 지지체로써 활용될 수 있을 것으로 기대한다.

감 사

이 논문은 충남대학교 학술연구비에 지원을 받아 수행된 연구로 이에 감사드립니다.

Reference

1. Choi, C. H., Lee, J., Yoon, K., Tripathi, A., Stone, H. A., Weitz, D. A. and Lee, C. S., "Surface-Tension-Induced Synthesis of Complex Particles Using Confined Polymeric Fluids," *Angew. Chem. Int. Ed.*, **49**(42), 7748-7752(2010).
2. Choi, C. H., Jung, J. H., Hwang, T. S. and Lee, C. S., "In Situ Microfluidic Synthesis of Monodisperse PEG Microspheres," *Macromol. Res.*, **17**(3), 163-167(2009).
3. Krutkramelis, K., Xia, B. and Oakey, J., "Monodisperse Polyethylene Glycol Diacrylate Hydrogel Microsphere Formation by Oxygen-Controlled Photopolymerization in a Microfluidic Device," *Lab Chip*, **16**(8), 1457-1465(2016).
4. Li, C. Y., Wood, D. K., Hsu, C. M. and Bhatia, S. N., "DNA-Templated Assembly of Droplet-Derived PEG Microtissues," *Lab Chip*, **11**(17), 2967-2975(2011).
5. Lee, A. G., Arena, C. P., Beebe, D. J. and Palecek, S. P., "Development of Macroporous Poly(ethylene glycol) Hydrogel Arrays within Microfluidic Channels," *Biomacromolecules*, **11**(12), 3316-3324(2010).
6. Chen, H. S., Li, J., Zhou, W. Z., Pelan, E. G., Stoyanov, S. D., Arnaudov, L. N. and Stone, H. A., "Sonication-Microfluidics for Fabrication of Nanoparticle-Stabilized Microbubbles," *Langmuir*, **30**(15), 4262-4266(2014).
7. Koh, C. G., Kang, X. H., Xie, Y. B., Fei, Z. Z., Guan, J. J., Yu, B., Zhang, X. L. and Lee, L. J., "Delivery of Polyethylenimine/DNA Complexes Assembled in a Microfluidics Device," *Mol. Pharmaceutics*, **6**(5), 1333-1342(2009).
8. Kim, C., Park, K. S., Kang, S. M., Kim, J., Song, Y. and Lee, C. S., "Comparison of Pectin Hydrogel Collection Methods in Microfluidic Device," *Korean Chem. Eng. Res.*, **53**(6), 740-745(2015).
9. Ward, T., Faivre, M., Abkarian, M. and Stone, H. A., "Microfluidic Flow Focusing: Drop Size and Scaling in Pressure Versus Flow-Rate-Driven Pumping," *Electrophoresis*, **26**(19), 3716-3724(2005).
10. Song, H., Bringer, M. R., Tice, J. D., Gerdts, C. J. and Ismagilov, R. F., "Experimental Test of Scaling of Mixing by Chaotic Advection in Droplets Moving Through Microfluidic Channels," *Appl. Phys. Lett.*, **83**(22), 4664-4666(2003).
11. Choi, C. H., Prasad, N., Lee, N. R. and Lee, C. S., "Investigation of Microchannel Wettability on the Formation of Droplets and Efficient Mixing in Microfluidic Devices," *Biochip J.*, **2**(1), 27-32(2008).
12. Jin, S. H., Jeong, H. H., Lee, B., Lee, S. S. and Lee, C. S., "A Programmable Microfluidic Static Droplet Array for Droplet Generation, Transportation, Fusion, Storage, and Retrieval," *Lab Chip*, **15**(18), 3677-3686(2015).
13. Jin, S. H., Lee, S. S., Lee, B., Jeong, S. G., Peter, M. and Lee, C. S., "Programmable Static Droplet Array for the Analysis of Cell-Cell Communication in a Confined Microenvironment," *Anal. Chem.*, **89**(18), 9722-9729(2017).
14. Nam, J. O., Kim, J., Jin, S. H., Chung, Y. M. and Lee, C. S.,

- “Microfluidic Preparation of a Highly Active and Stable Catalyst by High Performance of Encapsulation of Polyvinylpyrrolidone (PVP)-Pt Nanoparticles in Microcapsules,” *J. Colloid Interface Sci.*, **464**, 246-253(2016).
15. Utada, A. S., Lorenceau, E., Link, D. R., Kaplan, P. D., Stone, H. A. and Weitz, D. A., “Monodisperse Double Emulsions Generated from a Microcapillary Device,” *Science*, **308**(5721), 537-541(2005).
 16. Jin, S. H., Jung, J. H., Jeong, S. G., Kim, J., Park, T. J. and Lee, C. S., “Microfluidic Dual Loops Reactor for Conducting a Multistep Reaction,” *Front. Chem. Sci. Eng.*, **12**(2), 239-246(2018).
 17. Jin, S. H., Jang, S. C., Lee, B., Jeong, H. H., Jeong, S. G., Lee, S. S., Kim, K. P. and Lee, C. S., “Monitoring of Chromosome Dynamics of Single Yeast Cells in a Microfluidic Platform with Aperture Cell Traps,” *Lab Chip*, **16**(8), 1358-1365(2016).
 18. Choi, C. H., Weitz, D. A. and Lee, C. S., “One Step Formation of Controllable Complex Emulsions: From Functional Particles to Simultaneous Encapsulation of Hydrophilic and Hydrophobic Agents into Desired Position,” *Adv. Mater.*, **25**(18), 2536-2541(2013).
 19. Choi, C. H., Jeong, J. M., Kang, S. M., Lee, C. S. and Lee, J., “Synthesis of Monodispersed Microspheres from Laplace Pressure Induced Droplets in Micromolds,” *Adv. Mater.*, **24**(37), 5078-5082(2012).
 20. Choi, C. H., Yi, H., Hwang, S., Weitz, D. A. and Lee, C. S., “Microfluidic Fabrication of Complex-Shaped Microfibers by Liquid Template-Aided Multiphase Microflow,” *Lab Chip*, **11**(8), 1477-1483(2011).
 21. Zhu, P. G., Kong, T. T., Kang, Z. X., Tian, X. W. and Wang, L. Q., “Tip-Multi-Breaking in Capillary Microfluidic Devices,” *Sci. Rep.*, **6**, 11102-1-11102-8(2015).
 22. Nabavi, S. A., Vladisavljevic, G. T., Gu, S. and Ekanem, E. E., “Double Emulsion Production in Glass Capillary Microfluidic Device: Parametric Investigation of Droplet Generation Behaviour,” *Chem. Eng. Sci.*, **130**, 183-196(2015).
 23. Lee, T. Y., Ku, M., Kim, B., Lee, S., Yang, J. and Kim, S. H., “Microfluidic Production of Biodegradable Microcapsules for Sustained Release of Hydrophilic Actives,” *Small*, **24**(29), 1700646-1-1700646-11 (2017).
 24. Kang, J. H., Lee, S. S., Guerrero, J., Fernandez-Nieves, A., Kim, S. H. and Reichmanis, E., “Ultrathin Double-Shell Capsules for High Performance Photon Upconversion,” *Adv. Mater.*, **29**(21), 1606830-1-1606830-6(2017).
 25. Ho, C. M. B., Ng, S. H., Li, K. H. H. and Yoon, Y. J., “3D Printed Microfluidics for Biological Applications,” *Lab Chip*, **15**(18), 3627-3637(2015).
 26. Bardin, D. and Lee, A. P., “Low-Cost Experimentation for the Study of Droplet Microfluidics,” *Lab Chip*, **14**(20), 3978-3986(2014).
 27. Deng, N. N., Meng, Z. J., Xie, R., Ju, X. J., Mou, C. L., Wang, W. and Chu, L. Y., “Simple and Cheap Microfluidic Devices for the Preparation of Monodisperse Emulsions,” *Lab Chip*, **11**(23), 3963-3969(2011).
 28. Hwangbo, K. H., Kim, M. R., Lee, C. S. and Cho, K. Y., “Facile Fabrication of Uniform Golf-Ball-Shaped Microparticles from Various Polymers,” *Soft Matter*, **7**(22), 10874-10878(2011).
 29. Benson, B. R., Stone, H. A. and Prud’homme, R. K., “An “Off-the-Shelf” Capillary Microfluidic Device that Enables Tuning of the Droplet Breakup Regime at Constant Flow Rates,” *Lab Chip*, **13**(23), 4507-4511(2013).
 30. Li, T. B., Zhao, L., Liu, W. M., Xu, J. and Wang, J. Y., “Simple and Reusable Off-the-Shelf Microfluidic Devices for the Versatile Generation of Droplets,” *Lab Chip*, **16**(24), 4718-4724(2016).
 31. Xu, S., Nie, Z., Seo, M., Lewis, P., Kumacheva, E., Stone, H. A., Garstecki, P., Weibel, D. B., Gitlin, I. and Whitesides, G. M., “Generation of Monodisperse Particles by Using Microfluidics: Control over Size, Shape, and Composition,” *Angew. Chem. Int. Ed.*, **44**(5), 724-728(2005).