한국정밀공학회지 제 40 권 제 4 호 pp. 269-274
J. Korean Soc. Precis. Eng., Vol. 40, No. 4, pp. 269-274
April 2023 / 269
http://doi.org/10.7736/JKSPE.022.137
ISSN 1225-9071 (Print) / 2287-8769 (Online)

Check for updates

레이저를 이용해 증착된 세라믹 표면에서의 세균 배양에 대한 영향

Effect on Bacterial Culture on Ceramic Surfaces Deposited Using a Laser

윤상우[1], 김주한[2,#]
Sangwoo Yoon[1] and Joohan Kim[2,#]

1 서울과학기술대학교 미래기계기술연구소 (Future Mechanical Technology Research Center, Seoul National University of Science & Technology)
2 서울과학기술대학교 기계·자동차공학과 (Department of Mechanical and Automotive Engineering, Seoul National University of Science & Technology)
Corresponding Author / E-mail: joohankim@seoultech.ac.kr, TEL: +82-2-970-6303
ORCID: 0000-0001-9412-3914

KEYWORDS: Laser induced backward transfer (레이저 후방산란 증착), Cell culture (세포 배양), Mass transfer (물질 전달)

The hydrophilicity of the cell culture substrate was controlled by depositing it on the alumina surface through the laser-induced backward transfer (LIBT) method. Alumina particles were sized using laser energy density and deposited on the soda lime glass surface. The particle size and hydrophilicity of the alumina deposition surface were evaluated by measuring the surface roughness, contact angle, and light diffusivity. As the particle size increased, the effect of alumina became stronger, and the deposited surface had relatively higher roughness, stronger hydrophilicity, and higher light diffusivity. The stronger the alumina effect, the lower the growth of Staphylococcus aureus on the deposited surface. In this study, it was confirmed that selective bacterial growth and culture could be controlled by adjusting the strength of the alumina coating using the LIBT process.

Manuscript received: December 1, 2022 / Revised: January 5, 2023 / Accepted: January 13, 2023

NOMENCLATURE

E_d	=	Laser Power Density
P_{eff}	=	Laser Output Power
v_s	=	Pattern Scanning Speed
h	=	Hatch Distance
d	=	Total Thickness
θ	=	Contact Angle
r	=	Roughness Factor
F	=	View Factor
A	=	Surface Area
f	=	Contact Area Ratio
θ	=	Normal Angle of Incident Light
Φ	=	Normal Angle of Reflected Light

1. 서론

세라믹을 적용한 배양 배지 재료는 우수한 내 화학성, 다공성, 높은 가공성 및 생체 적합성을 가지고 있다. 또한, 세라믹 재료의 표면 개질은 세포 배양에 대해 세포의 운동, 접착 및 성장을 제어하는데 중요한 것으로 여겨지고 있다[1-5]. 예를 들어 세라믹 배양지에서 C-ZrO2 복합 기저는 자외선 레이저 조사에 의해 탄소 함량을 감소시켜 단백질 활성과 접착력을 증가시키는 것으로 Roy et al.에 의해 연구결과가 보고되었다[4]. 알루미나 복합 기저는 그에 반해 단백질 부착을 방해하여 세포 배양을 막는 경향을 보인다고 Feng et al.에 의해 보고되었다[5]. 세라믹 재료는 일반적으로 소결을 통해 만들어지나 세라믹 미세 형상 제조에는 다양한 방법이 존재한다. 레이저는 고품질의 광 에너지를 정밀히 조절할 수 있는 특징을 갖고 있기에 세라믹 형상 제조에 적용될 수 있다. 세라믹 표면에서의 세포배양의 경우 표면의 여러 특성이 배양결과에 영향을 줄 수 있다. 특히

Copyright © The Korean Society for Precision Engineering
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.

표면에서의 친/소수성은 배양결과에 중요할 수 있다. 레이저 가공을 통한 다양한 재료의 친/소수성 표면처리법에 대한 다수의 연구가 진행되었다[6-10]. 이러한 공정은 대부분 특별한 표면 재료에 한정되어 있으며 레이저에 의한 직접 표면 가공공정이다. 재료 표면의 다른 개질의 방법으로는 증착 공정을 고려할 수 있다. 레이저 유도 플라즈마에 의한 후방 산란 증착(Laser Induced Backward Transfer, LIBT)은 투명한 모재 뒤 공여체에 레이저 빔을 조사하여 조사 반대 방향으로 물질을 전달하여 모재 뒤편에 타깃물질을 증착하는 방법이다. 이러한 방법을 이용하면 직접 표면 가공이 아닌 마이크로/나노 입자의 레이저 증착을 통해 바이오 필름과 같은 세포 배양에 조절에 필요한 3차원 마이크로/나노 표면 형상을 국지적으로 형성할 수 있다[11]. 펨토초부터 나노초에 이르는 레이저 펄스의 적용은 재료 내에서의 비열 특성으로 인해 높은 피크 출력과 비선형 흡수 특성을 이용하는 것이 가능하다[12,13]. 따라서 생명공학에서 주로 사용하는 세라믹과 같이 단단하고 취성이 높은 생체 재료 가공 및 증착에 대해 높은 신뢰성과 고품질의 결과물을 기대할 수 있다. 또한, 세포배양 바이오 필름에 대한 레이저 패터닝 증착 처리는 정밀하게 가공된 세포 배양 재료 표면 구조의 형성이 가능하므로 효율적인 세포 배양 컨트롤이 가능하다.

본 연구에서는 모재인 소다 라임 글라스에 알루미나를 공여체로 사용하여 알루미나 입자를 LIBT 방법으로 증착했다. 알루미나는 레이저 패턴을 따라 증착 표면과 소결 표면을 형성하였으며 각각의 경우에서 배양배지의 세균 배양 효율의 증감을 확인하였다. 실험을 통해 만들어진 표면의 평가방법으로 거칠기 측정, 접촉각 측정, 스펙트로미터를 통한 광 확산성 측정을 진행하였다. 이러한 결과를 통해 레이저 알루미나 후방 산란 증착이 세균 증식에 미치는 영향을 확인하였다.

2. 실험 방법

LIBT 공정의 개략도가 Fig. 1에 나타나 있다. 조사된 레이저 빔은 알루미나 표면에서 어블레이션 현상을 야기시킨다. 이 때 표면에서 발생한 플라즈마에 의해 알루미나는 표면에서부터 글라스 표면으로 전달되어 미세입자 형태로 증착 된다. 증착된 알루미나 입자는 사용된 레이저 패턴과 동일한 표면패턴을 따른다. 모재의 두께는 1 mm이며, 변수로 설정된 레이저의 영향을 충분히 무시할 수 있는 두께이다. 실험에서 사용된 레이저 매개변수는 Table 1에 나타나 있다. 사용된 타깃 재료는 알루미나(Al_2O_3, 97.50%)이다. 증착하고자 하는 패턴의 레이저 스캐닝 속도 조절을 통해 시간당 레이저 에너지밀도 변수를 설정하였으며 그 수치는 20-120 mm/s 이다. 사용된 스캐닝 패턴은 10 × 10 mm^2의 선형 패턴이며, 패턴 간 오버랩 비율은 0, 50%의 2가지 경우를 사용한다. 적층에 사용된 레이저 에너지 밀도는 다음과 같은 식이 적용되었다[14].

$$E_d = \frac{P_{eff}}{v_s \cdot h \cdot d} \quad (1)$$

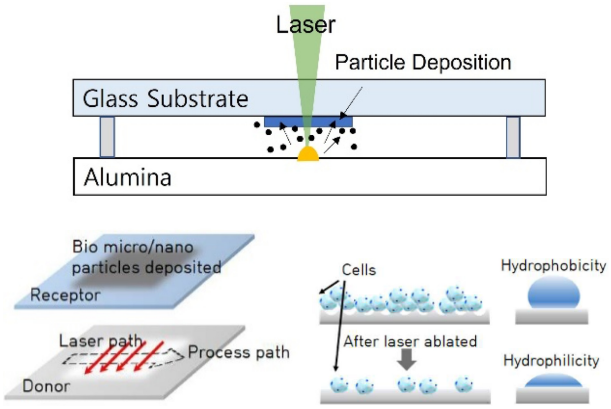


Fig. 1 Schematic of LIBT process

Table 1 Laser parameter and material setup

Wavelength [nm]	1,064
Energy density [J/mm^3]	16.7-100
Pulse duration [ns]	4
Beam spot size [μm]	50
Substrate	Soda lime glass
Target	Alumina (Al_2O_3)

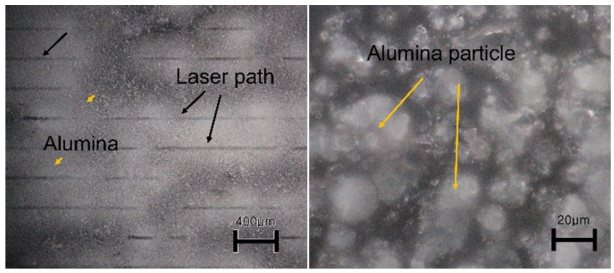


Fig. 2 OM image of Al_2O_3 particle deposition using LIBT

여기서, E_d는 3차원 레이저 에너지밀도, P_{eff}는 출력, v_s는 스캐닝속도, h는 해치거리, d는 층 두께이다. 이 식을 이용하여 실험에서 사용된 단위공간 영역에서 레이저 에너지밀도를 환산하면 16.7-100 J/mm^3이다.

실험결과는 광학현미경(BX51M, Olympus/Japan)을 통해 표면 형상을 확인하였고, 공초점 현미경(LSM 800 BIO, Carl Zeiss/Germany)의 표면 형상 측정과 접촉각 측정(CAM-200, KSV/Finland)의 결과를 통해 표면 거칠기 등의 미세 형상을 확인하였다. 미세 적층 된 표면 위에 황색포도상구균을 배양한 후 셀 카운트 결과를 통해 표면성질이 세균 증식에 미치는 영향을 확인하였다.

3. 실험 결과

3.1 미세 표면 형상 분석

Fig. 2는 LIBT로 증착된 알루미나 패턴의 증착 형상이다.

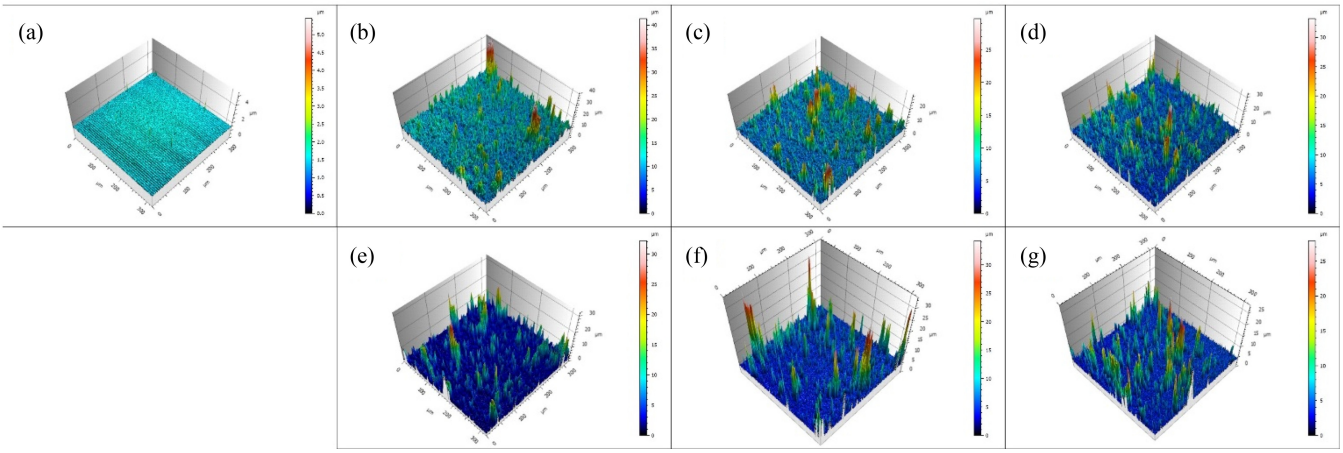


Fig. 3 (a) Soda lime glass surface. Alumina deposited surface using laser influence of (b) 16.7, (c) 20, (d) 33.3, (e) 35, (f) 50, (g) 100 J/mm^3

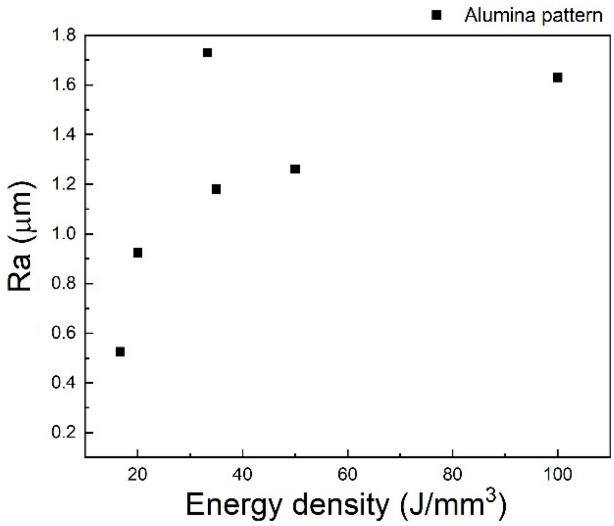


Fig. 4 Ra number of alumina surface samples

16.7 J/μm^3 에너지 밀도로 증착한 시편에서 알루미나 입자의 크기는 평균 직경이 약 500 nm, 100 J/mm^{3}의 조건에서는 평균 약 10 μm의 직경을 갖는 것으로 측정되었다.

Fig. 3는 시편에서 표면들에 대한 공초점 현미경 측정 결과이다. 각 시편의 알루미나 패턴 표면 형상에 대한 3차원 이미지가 획득되었다. 이 데이터를 기반으로 각 패턴 경우의 표면 거칠기를 Ra 값을 통해 계산이 가능하였다. 레이저 에너지 밀도에 대한 알루미나 패턴의 표면 거칠기에 대한 그래프 결과가 Fig. 4와 같이 얻어졌다. 표면 거칠기 Ra 값은 16.7 J/mm^{3}의 에너지밀도에서 0.57 μm, 20 J/mm^{3}에서 0.96 μm, 33.33 J/mm^{3}에서 1.77 μm, 35 J/mm^{3}에서 1.21 μm, 50 J/mm^{3}에서 1.29 μm, 100 J/mm^{3}에서 1.65 μm의 표면 거칠기로 측정되었다. 이는 에너지 밀도가 높을수록 상대적으로 큰 입자가 만들어져 거친 표면이 되고, 영역에 가해지는 레이저 빔의 에너지 밀도가 낮을수록 생성되는 입자의 크기가 작아져 상대적으로 매끈한 표면을 형성하는 것으로 볼 수 있다.

3.2 표면 접촉각 분석

표면 성질인 친/소수성을 구분하는 방법으로 액체의 접촉각 이론을 적용하였다. 접촉각 이론은 크게 표면을 완전히 적시는 경우의 Wenzel Model과 완전히 적시지 못하는 경우 접촉하는 면적의 비율을 설명하는 Cassie-Baxter Model이 있다[15,16]. 각각의 이론에서 설명하는 접촉각은 식(2)와 식(3)을 통해 나타낼 수 있다.

$$\cos\theta_w = r\cos\theta_s \tag{2}$$

$$\cos\theta_{CB} = f\cos\theta_s + (1-f)\cos\theta_{air} \tag{3}$$

식(2)는 Wenzel의 Model, 식(3)은 Cassie-Baxter Model에 적용되는 관계를 나타낸다. 식(2)에서 r은 거칠기 계수이며 고체와 액체간 접촉면적을 투영면적으로 나눈 값이다. θ_s는 매끄러운 고체표면에서의 접촉각이다. θ_w는 액체의 접촉각을 나타낸다. θ_s 값이 90° 이하인 경우 친수성 표면을 나타내며 r이 증가할 때 θ_w가 감소한다. θ_s가 90° 이상인 경우 소수성 표면이며 r이 증가할 때 θ_w가 증가한다. 식(3)에서 f는 접촉면적을 전체면적으로 나눈 값이다. 접촉면적비가 f인 표면에서 공기의 접촉면적비는 $(1-f)$로 정의한다. θ_{air}는 공기 접촉각이며, 이것은 180°이다.

Fig. 5는 레이저 에너지밀도 16.7-100.0 J/mm^{3}에서 각각의 경우에 대한 접촉각 측정 결과이다. 코팅을 한 기저에 알루미나 입자가 증착되었다. 기준이 되는 유리 기저 표면의 접촉각은 101.4°이다. 에너지밀도 100 J/mm^{3}로 증착된 알루미나 표면의 접촉각은 45.7°이며 이는 친수성 표면으로 판별되었다. 50 J/mm^{3}의 경우 접촉각은 73.2°이므로 역시 친수성 표면으로 확인되었다. 에너지밀도가 35 J/mm^3 이하의 경우에는 알루미나 계면이 기저의 표면특성에 영향을 끼치지 못하는 것으로 나타났다. 이를 종합해 볼 때, 낮은 스캐닝 속도에서 레이저 에너지밀도가 50-100 J/mm^{3}으로 충분한 경우 표면 특성은 알루미나에 의해 접촉각이 73° 이하가 되어 친수성 표면이 되는 것을 확인하였다.

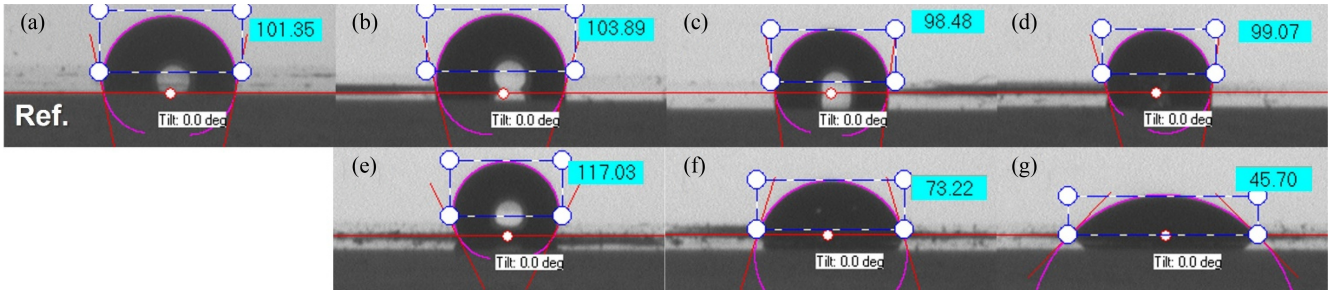


Fig. 5 (a) Hydrophobic coated soda lime surface. Alumina deposited surface using laser power (b) 16.7, (c) 20, (d) 33.3, (e) 35, (f) 50, (g) 100 J/mm^3

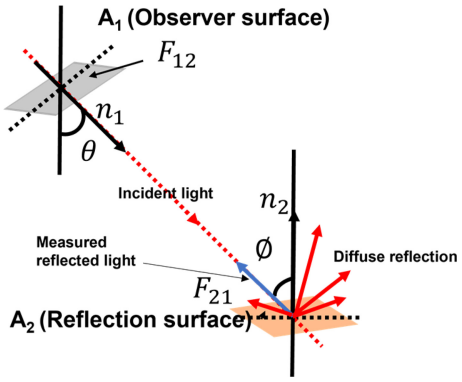


Fig. 6 Schematic of view factor theory

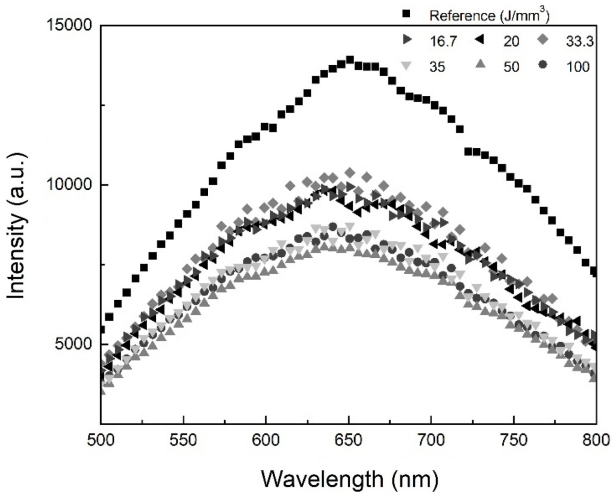


Fig. 7 Spectrometer intensity of alumina surface about laser influence

3.3 광 확산성 분석

표면 분석에 있어서 광 확산성 측정법은 표면의 난반사광 휘도를 측정하여 표면의 미세 형상의 균일도를 확인하는 방법이다. 사용된 스펙트로미터 장비(HR4000, Ocean Insight/USA)의 측정방법에 대한 개략도가 Fig. 6에 있으며 일반적인 스펙트로미터 측정방법에서 기준광의 반사도를 확산면을 기준으로 사용한다. 두 물체 사이의 형상계수(View Factor)를 F_{12}라 정의하며 다음과 같은 식(4)로 나타낼 수 있다[17].

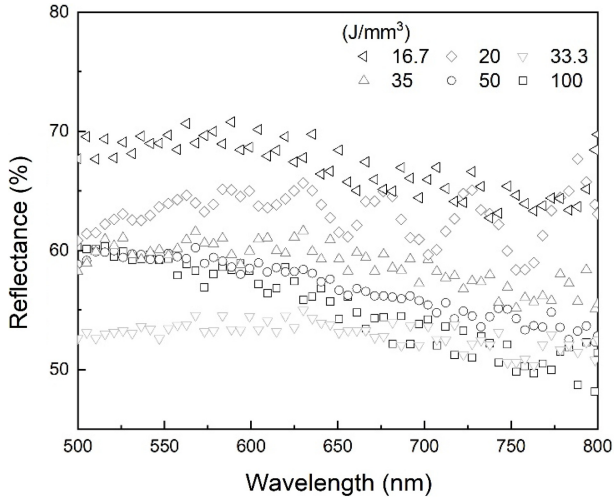


Fig. 8 Reflectance of alumina surface vs. reference of diffuse surface

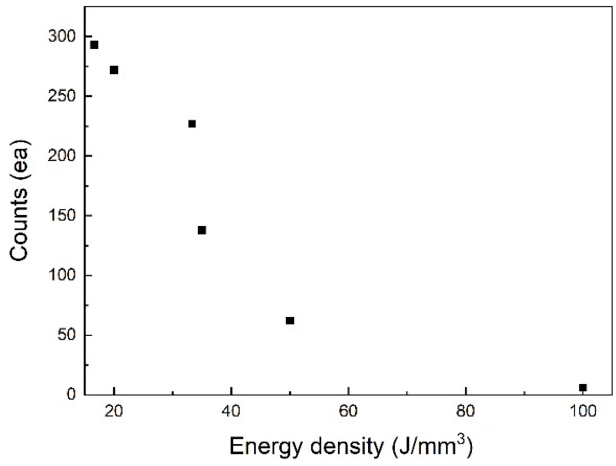


Fig. 9 Cell counts graph of each samples 16.67-100 J/mm^3

$$F_{12} = \frac{1}{A_1}\int_{A_1}\int_{A_2}\frac{\cos\theta\cos\varnothing}{\pi r^2}dA_1 dA_2 \quad (4)$$

A_1에서 A_2로의 입사광은 시편표면에서 난반사에 의해 확산되어 일부만 스펙트로미터로 되돌아온다. 이 때 되돌아온 광의 세기를 기준광과 비교하여 정반사율이 낮을수록 확산성이 높고,

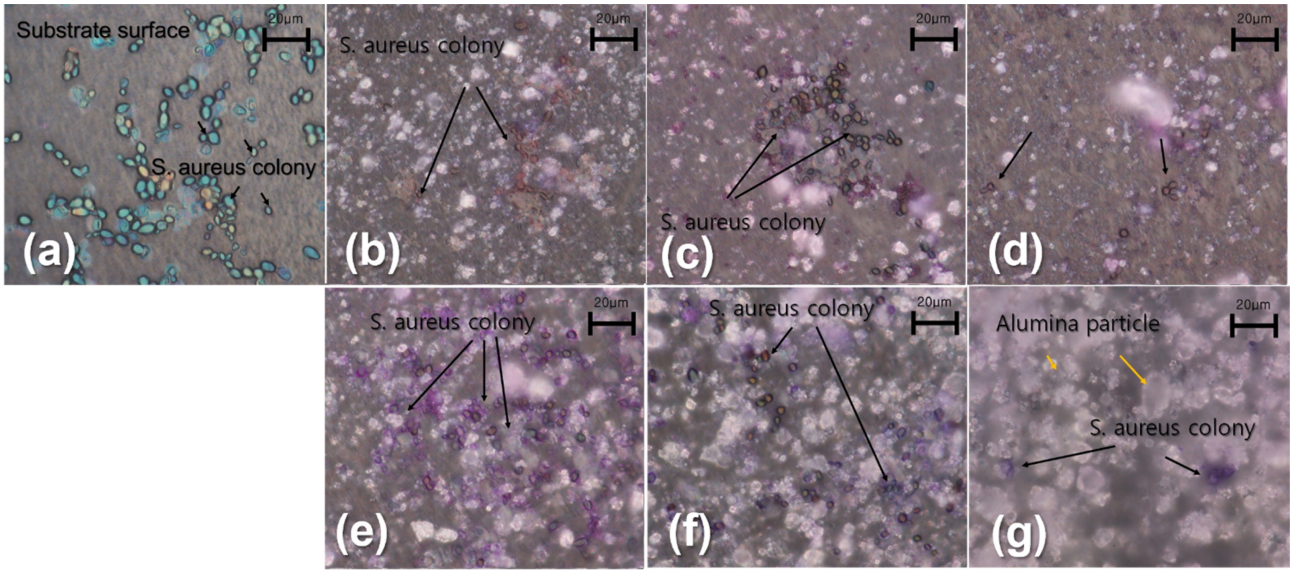


Fig. 10 Bacterial culture results of (a) soda lime surface, (b) 16.7, (c) 20 (d) 33.3 (e) 35 (f) 50 (g) 100 J/mm^3 alumina surface

정반사율이 높을수록 확산성이 낮다고 할 수 있다. Figs. 6과 7은 알루미나 표면의 광 반사율을 통해 간접적으로 광 확산성을 측정한 결과 그래프이다. 16.7 J/mm^{3}의 낮은 에너지밀도로 알루미나를 증착한 표면의 경우 상대적으로 높은 광 반사율을 보이므로 보다 매끈하고 작은 입자로 이루어져 있으며 기저표면의 영향을 받는 특성을 보인다고 할 수 있다. 반면 100 J/mm^{3}의 높은 레이저 에너지밀도의 경우에는 상대적으로 큰 알루미나 입자에 의한 난반사로 인해 높은 광 확산성을 갖는 표면이라고 볼 수 있다. 이러한 표면 성질은 세포 배양에 있어 세포 성장을 컨트롤할 수 있는 요소로 확인하였다. 이러한 원리를 적용하면 레이저 에너지 밀도에 따른 세라믹 적층의 조건에 따라 세포 배양의 효과를 조절할 수 있을 것으로 판단할 수 있다.

3.4 황색포도상구균 배양 분석

Figs. 10(a)는 글라스에 증착 된 알루미나의 표면이며, 10(b)부터 10(g)는 알루미나가 증착된 표면에서 배양된 황색포도상구균의 샘플 사진이다. 높은 에너지밀도로 증착된 알루미나 표면에서는 세균이 잘 자라지 못하게 되는 결과를 얻었다. 앞의 실험에서 상대적으로 큰 입자로 이루어진 알루미나 표면은 큰 친수성을 갖게 되며, 상대적으로 작은 입자로 구성된 알루미나 표면은 보다 작은 친수성을 띄는 것과 관계가 있다고 판단된다. 기저 표면의 표면에너지가 높을수록 또는 친수성 표면에서 세균이나 세포의 부착이 잘 일어난다는 연구결과들이 있다[7-10,18]. 따라서 일반적인 친수성 기저에서의 세균/세포 증식이 소수성 기저에서 보다 더 잘 일어나는 것을 예측할 수 있다. 하지만 알루미나 코팅면에서는 이러한 경향이 반대로 나타난다[1,5] 선행 연구에 따르면 알루미나 코팅은 친수성 형태를 가지지만 분자구조가 단백질과의 결합을 방해하기 때문에 높은 표면에너지에도 불구하고 세포의 분열과 성장을 억제한다고 보고하고 있다[5].

Fig. 10은 레이저 에너지 밀도에 따른 세균 배양 결과이다. 낮은 레이저 에너지 밀도로 적층 된 경우에는 작은 입자의 구조적 특성과 입자로 코팅이 되지 않는 간헐적인 유리기저의 영향으로 세균의 증식이 많이 일어난 것으로 보인다. 반면에 알루미나 입자의 영향은 에너지밀도 30 J/mm^3 이상일 때 평균 약 5 μm 크기의 입자에서 나타나기 시작해서 100 J/mm^{3}의 약 15 μm 크기의 입자환경에서는 균의 성장이 억제되고 있는 것을 확인할 수 있었다. 이는 LIBT를 통해 증착된 알루미나 표면에서 그 입자의 크기에 따라 세균의 증식을 조절 할 수 있는 방법을 갖는다고 볼 수 있다.

4. 결론

LIBT 공정을 통해 알루미나 입자 물질전달 방식의 표면처리를 통해 배양기저의 표면에너지를 변화시키는 실험이 수행되었다. 알루미나 증착 표면의 특성은 표면 거칠기, 접촉각, 광확산성 측정을 통해 평가되었다. LIBT에 적용되는 시간당 레이저 에너지밀도가 높아질수록 큰 직경의 알루미나 입자가 산란 증착 되었다. 입자크기가 커질수록 상대적 거칠기는 커지고 접촉각은 감소하였으며, 광확산성은 증가하였다. 증착 입자의 크기가 클수록 모재 표면의 영향이 줄고 알루미나 증착 표면의 영향이 강해졌다. 이 알루미나 표면에 황색포도상구균을 배양하였을 때 알루미나의 영향이 강해질수록 균의 증식을 억제하게 되었다. 따라서 상대적으로 레이저 적층 공정을 통해 알루미나의 코팅의 강도를 조절할 수 있을 것으로 판단되며 이를 통해 선택적 세균 배양 또는 증식을 조절할 수 있다. 이러한 원리는 세균 배양에 있어 그 목적에 따라 다양한 형태로 적용될 수 있을 것으로 판단한다.

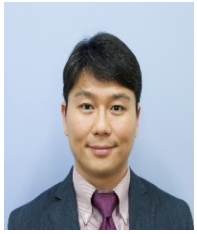
ACKNOWLEDGEMENT

이 연구는 정부(과학기술정보통신부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임(No. NRF-2021R1F1A1045844).

REFERENCES

1. Chen, Z.-C., Chang, T.-L., Liu, C.-C., Hsiao, W.-T., Huang, C.-H., (2020), Picosecond laser surface modification of aluminum oxide with fish-scale structures for cell culture, Ceramics International, 46(11), 17651-17658.
2. Angelaki, D., Kavatzikidou, P., Fotakis, C., Stratakis, E., Ranella, A., (2020), Laser-induced topographies enable the spatial patterning of co-cultured peripheral nervous system cells, Materials Science and Engineering: C, 115, 111144.
3. Moritz, J., Abram, A., Čekada, M., Gabor, U., Garvas, M., Zdovc, I., Dakskobler, A., Cotič, J., Ivičak-Kocjan, K., Kocjan, A., (2019), Nanoroughening of sandblasted 3Y-TZP surface by alumina coating deposition for improved osseointegration and bacteria reduction, Journal of the European Ceramic Society, 39(14), 4347-4357.
4. Roy, M., Pompella, A., Kubacki, J., Piosik, A., Psiuk, B., Klimontko, J., Szade, J., Roy, R. A., Hedzelek, W., (2017), Photofunctionalization of dental zirconia oxide: Surface modification to improve bio-integration preserving crystal stability, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 156, 194-202.
5. Feng, G., Cheng, Y., Wang, S.-Y., Hsu, L. C., Feliz, Y., Borca-Tasciuc, D. A., Worobo, R. W., Moraru, C. I., (2014), Alumina surfaces with nanoscale topography reduce attachment and biofilm formation by Escherichia coli and Listeria spp, Biofouling, 30(10), 1253-1268.
6. Hanada, Y., Sugioka, K., Kawano, H., Tsuchimoto, T., Miyamoto, I., Miyawaki, A., Midorikawa, K., (2009), Selective cell culture on UV transparent polymer by F2 laser surface modification, Applied Surface Science, 255(24), 9885-9888.
7. Tsibouklis, J., Stone, M., Thorpe, A. A., Graham, P., Peters, V., Heerlien, R., Smith, J. R., Green, K. L., Nevell, T. G., (1999), Preventing bacterial adhesion onto surfaces: The low-surface-energy approach, Biomaterials, 20(13), 1229-1235.
8. Lim, J. Y., Shaughnessy, M. C., Zhou, Z., Noh, H., Vogler, E. A., Donahue, H. J., (2008), Surface energy effects on osteoblast spatial growth and mineralization, Biomaterials, 29(12), 1776-1784.
9. Harnett, E. M., Alderman, J., Wood, T., (2007), The surface energy of various biomaterials coated with adhesion molecules used in cell culture, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 55(1), 90-97.
10. Pfleging, W., Bruns, M., Welle, A., Wilson, S., (2007), Laser-assisted modification of polystyrene surfaces for cell culture applications, Applied Surface Science, 253(23), 9177-9184.
11. Kuznetsov, A., Koch, J., Chichkov, B., (2009), Laser-induced backward transfer of gold nanodroplets, Optics Express, 17(21), 18820-18825.
12. Werner, D., Hashimoto, S., (2011), Improved working model for interpreting the excitation wavelength-and fluence-dependent response in pulsed laser-induced size reduction of aqueous gold nanoparticles, The Journal of Physical Chemistry C, 115(12), 5063-5072.
13. Jeon, J.-W., Yoon, S., Choi, H. W., Kim, J., Farson, D., Cho, S.-H., (2018), The effect of laser pulse widths on laser—Ag nanoparticle interaction: Femto-to nanosecond lasers, Applied Sciences, 8(1), 112.
14. Ullah, A., Ur Rehman, A., Salamci, M. U., Pıtır, F., Liu, T., (2022), The influence of laser power and scanning speed on the microstructure and surface morphology of Cu2O parts in SLM, Rapid Prototyping Journal, 28(9), 1796-1807.
15. Uelzen, T., Müller, J., (2003), Wettability enhancement by rough surfaces generated by thin film technology, Thin Solid Films, 434(1-2), 311-315.
16. Ceyhan, U., Tiktaş, A., Özdoğan, M., (2020), Pinning and depinning of Wenzel-state droplets around inclined steps, Colloid and Interface Science Communications, 35, 100238.
17. Sparrow, E., (1963), A new and simpler formulation for radiative angle factors, ASME Journal of Heat and Mass Transfer, 85(2), 81-87.
18. Eosoly, S., Vrana, N. E., Lohfeld, S., Hindie, M., Looney, L., (2012), Interaction of cell culture with composition effects on the mechanical properties of polycaprolactone-hydroxyapatite scaffolds fabricated via selective laser sintering (SLS), Materials Science and Engineering: C, 32(8), 2250-2257.

Sangwoo Yoon
Ph.D. in the Future Mechanical Technology Research Center, Seoul National University of Science & Technology. His research interest is laser processing and analysis.
E-mail: yoonsw@seoultech.ac.kr



Joohan Kim
Professor in the Department of Mechanical Engineering, Seoul National University of Science & Technology. His research interest is laser processing.
E-mail: joohankim@seoultech.ac.kr