

백색광 주사간섭계의 생물학적 응용

김 기 우*

경북대학교 생태환경시스템학부

Biological Applications of White Light Scanning Interferometry

Ki Woo Kim*

School of Ecology and Environmental System, Kyungpook National University, Sangju 742-711, Korea
(Received December 14, 2011; Revised December 20, 2011; Accepted December 21, 2011)

ABSTRACT

White light scanning interferometry has been employed to analyze surface features of diverse specimens. Long established in the field of materials engineering, the technique provides quantitative three-dimensional data as well as qualitative morphological images. It uses white light that is split and reflected from a reference mirror and an object. Merged together, the light generates interference patterns representing topographical contours of the object surface. The amplitude of the z-axis data is differentiated by gray scale. The technique allows the rapid, noncontact, and wide-field measurements for morphometry of biological specimens including chondrocytes, tooth enamel, and plant leaves. Quantification of the dimension of surface structures such as width, length, and elevation angle could be achievable by white light scanning interferometry. The light reflection from plant leaves has been assumed to be sufficient for the technique. Without special specimen preparations like conductive metal coating, the technique can be increasingly used for quantitative three-dimensional surface measurements of biological specimens.

Keywords : Interferometry, Roughness, Surface parameter, White light

서 론

실세계에 존재하는 사물의 표면은 주변부와의 경계를 형성하며 해당 사물을 대표하는 고유한 외형적 특성을 나타낸다. 특히 표면적, 부피, 거칠기(roughness) 등의 표면 특성은 수학적으로 계산이 가능하여 다른 시료와 정량적으로 비교할 수 있는 표면의 수치정보로서 활용되고 있다. 이와 같이 정성적인 결과 이외에도 정량적인 표면 정보를 제공할 수 있는 표면분석장비들이 해당 전문 영역에서 활발히 이용되

고 있다.

생물 시료의 표면 형상을 관찰할 때 주로 실체현미경, 광학현미경, 공초점레이저주사현미경(confocal laser scanning microscope, CLSM), 주사전자현미경(scanning electron microscope, SEM), 원자현미경(atomic force microscope, AFM)을 활용한다. 특히 광학현미경 중에서 미분간섭현미경(differential interference contrast microscope)은 가시광선의 위상차와 간섭현상에 기반한 장비로서 시료의 준삼차원적인 상을 제공하지만 z축 방향으로의 정량적인 정보는 획득할 수 없다. CLSM은 레이저를 구동하여 z축 방향으로의 일정 부분 정

* Correspondence should be addressed to Prof. Ki Woo Kim, School of Ecology and Environmental System, Kyungpook National University, 2559 Gyeongsang-daero, Sangju 742-711, Korea. Ph.: (054) 530-1246, Fax: (054) 530-1248, E-mail: kiwoo@knu.ac.kr

보를 획득할 수 있으나, 수직분해능이 대물렌즈의 개구수 (numerical aperture)에 의존하므로 저배율에서는 수직분해 능이 저하되는 단점이 있다(Kang & Kim, 1999). SEM은 전 자빔을 활용하므로 우수한 공간분해능을 확보하며 정성적 결과를 얻을 수 있지만 특별한 소프트웨어 등의 부가장치가 없을 경우에는 z축 방향으로의 표면의 정량적인 정보를 획득할 수 없다. AFM에서는 미세한 탐침이 시료 표면을 주사 하여 z축 방향으로의 정량적인 정보를 획득할 수 있지만 수십 마이크로미터(μm)의 단차가 큰 시료는 측정이 불가하고 측정 시간이 비교적 긴 단점이 있다.

한편 반도체 디스플레이 부품, 자동차 부품, 정밀기계, 제지 분야에서도 표면 형상을 측정하기 위하여 다양한 방법을 이용한다. 축척식 측정기(stylus profiler) 등의 접촉식 측정방식은 표면의 구조적인 특성 즉 표면의 유연성 등에 의하여 분석 결과가 쉽게 영향을 받으며, 측정 후 접촉침에 의하여 표면에 결함이 발생하는 문제점이 있다. 이를 극복하기 위하여 접촉침 대신에 광학적 원리를 사용하여 표면에 결함을 주지 않는 비접촉식 방법을 활용한다(Kim et al., 2002; Sung et al., 2004). 그 예로서 위상전이 간섭계(phase shifting interferometry), 백색광 주사간섭계(white light scanning interferometry, WSI) 등의 방법이 있다. 최근 관련 알고리즘의 개발 등으로 WSI는 나노미터(nm) 수준의 수직분해능을 가지면서 수십 μm 의 단차를 비파괴적으로 측정할 수 있다. 또한 WSI는 비교적 대영역을 신속하게 분석할 수 있으므로 다양한 시료의 품질검사에 이용되고 있다. 본 논문에서는 WSI의 기본 원리 및 생물학 분야에서의 응용에 관하여 소개하고자 한다.

백색광 주사간섭계의 구성

최근 수십 년간 보급되어 활용되고 있는 WSI는 개인용 컴퓨터, 컨트롤러, 본체로 구성되어 운영된다. 명칭에서 알 수 있듯이 WSI는 광원으로서 텅스텐 할로겐등을 이용하여 조명계를 구성한다. 시료를 대기 중에 장착하고 측정할 수 있으므로 SEM과 같은 진공 조건이 필요 없다. 본체는 방진 테이블 상단에 위치하여 지면에서 유입되는 진동의 영향을 최소화하여야 한다. 방진테이블이 오작동을 할 경우에는 측정결과를 획득할 수 없으므로 방진 환경 유지에 주의를 기울여야 한다.

WSI는 제조업체에 따라서 다른 명칭으로 통용되기도 하며 일반적으로 광학 포로파일러(optical profiler)라는 명칭으로 지칭되기도 한다. 현재 국외는 물론이고 국내 업체에서도 WSI를 제조하여 보급하고 있다. 최근 장비의 수직해상도는 0.1 nm 이하이고, 수평해상도는 대물렌즈에 따라서 0.2~4 μm 수준이다. 그리고 z축 방향으로 약 270 μm 수준까지 스캐닝이 가능하다(특정 사양에 따라서 장비 사양은

변동될 수 있음).

백색광 주사간섭계의 원리

WSI는 기본적으로 빛의 파동성이 유발하는 간섭현상(interference)을 이용한다(Sung et al., 2004). 핵심적인 원리의 이해를 위하여 한 측정점에서의 간섭 신호(interferogram)에 대해서만 고려하기로 한다(Fig. 1) (Kim & Kim, 1999). 동일한 광원에서 출발한 조명광은 광분할기 (beam splitter)를 통과하여 기준광과 측정광으로 분할되고, 기준광은 완벽한 평면으로 정의되는 기준면(reference mirror)에 입사되며, 측정광은 측정하고자 하는 시료면에 조사된다. 이와 같이 각각의 광은 다른 광경로(optical path)를 진행한 후 다시 광분할기에 의해서 합쳐지면 각각의 광이 진행한 거리차에 따라서 간섭신호를 발생하게 된다(Kang & Kim, 1999). 이 신호는 밝고 어두운 명암으로 구분되어 연속적으로 나타나며 기준면에 대한 상대적인 높이를 의미한다. 만약에 구형의 구조물이 표면에 돌출되어 있을 경우, 구면에는 일련의 간섭 무늬가 동심원 형태로 나타나고(Fig. 2A), 이를 둘러싼 평면에서는 선형의 간섭무늬가 나타난다(Fig. 2B). 따라서 지도에서 등고선과 같은 의미로서 기준면에 대한 동일한 높이의 지점을 연결한 물리적 현상으로 이해할 수 있다.

측정 결과의 획득을 위하여 압전 구동기(piezoelectric actuator)를 이용하여 시료의 단차에 해당하는 높이를 설정하고 대물렌즈인 간섭렌즈(interferometric lens)를 조금씩 변화시킨다. 이후 전하결합소자(charge-coupled device, CCD)로 검출되는 광강도를 저장함으로써 해당 측정점에서의 간

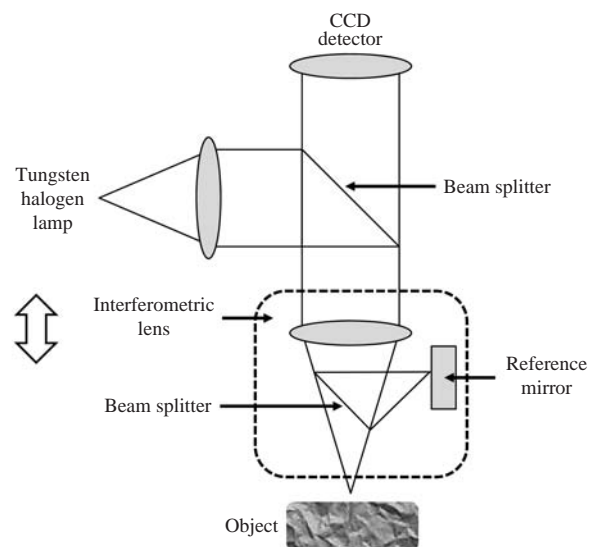


Fig. 1. Schematic diagram of white light scanning interferometry. The system is based on the Michelson interferometer.

섭신호를 획득한다(Kim & Kim, 1999). 대물렌즈의 배율에 따라서 작업거리(working distance)에 차이가 있으므로 내부에 존재하는 기준면의 구성을 변화시킨다. 따라서 저배율(1배~5배)에서는 마이켈슨(Michelson) 간섭계, 중배율(10배~50배)에서는 미라우(Mirau) 간섭계, 고배율(100배 이상)에서는 리닉(Linnik) 간섭계를 사용한다(Kim & Kim, 2004). 결론적으로 간섭렌즈 내부에서 빛의 분할, 반사, 통합을 통하여 간섭현상을 발생시킨다.

백색광 주사간섭계 실험을 위한 고려 사항

일반적으로 WSI는 금속 및 재료 분야에서 활용되므로 생물 시료에 적용한 사례는 많지 않다. 실제로 생물 시료를 대상으로 WSI 실험을 수행할 때 다음과 같은 사항을 고려

할 필요가 있다.

1. 시료 장착

시료를 측정할 때 본체가 상하 운동을 하며 간섭신호를 획득하므로 시료는 동일한 위치에 고정되어야 한다. 특히 대기 상태에 시료가 노출되므로 실온 조절이나 환기 등 기류에 의한 시료의 미동을 최소화해야 한다. 이를 위하여 SEM용 시료를 시료대(stub)에 부착하듯이 적당한 기질(슬라이드 글래스, 페트리 디쉬 등)에 양면테이프 등을 이용하여 고착시킨다.

2. 시료의 반사성

WSI를 이용하기 위해서는 시료의 반사도가 확보되어야 한다(Recum et al., 1996). 입사광이 일정 수준 이상으로 반사되도록 하기 위하여 필요에 따라서는 시료면을 금 또는 백

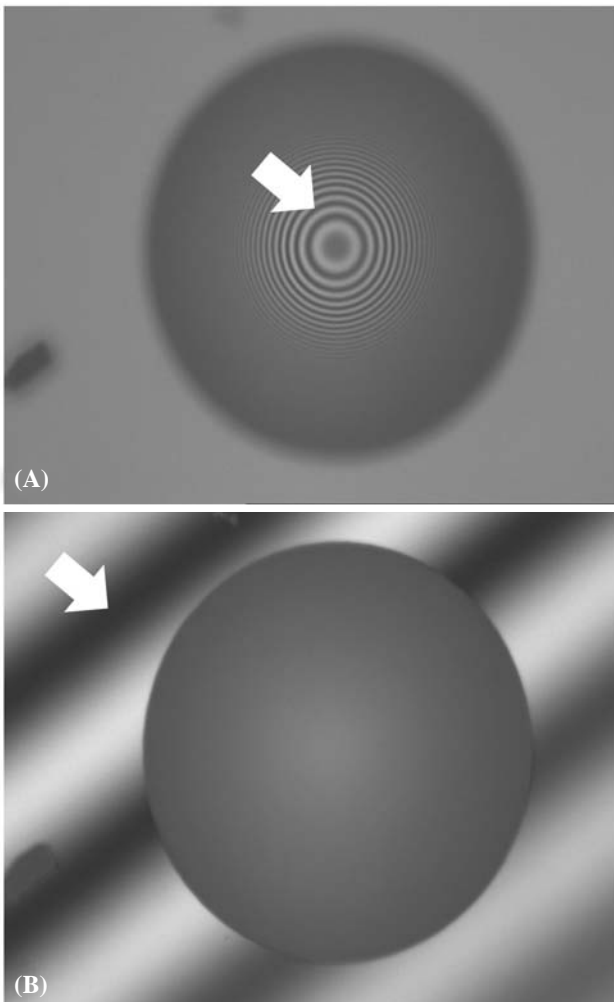


Fig. 2. Two types of interferograms. (A) Circular interferogram. (B) Linear interferogram. Interference lines (arrows) represent the same height positions (Photographs provided by from Nanosystem).

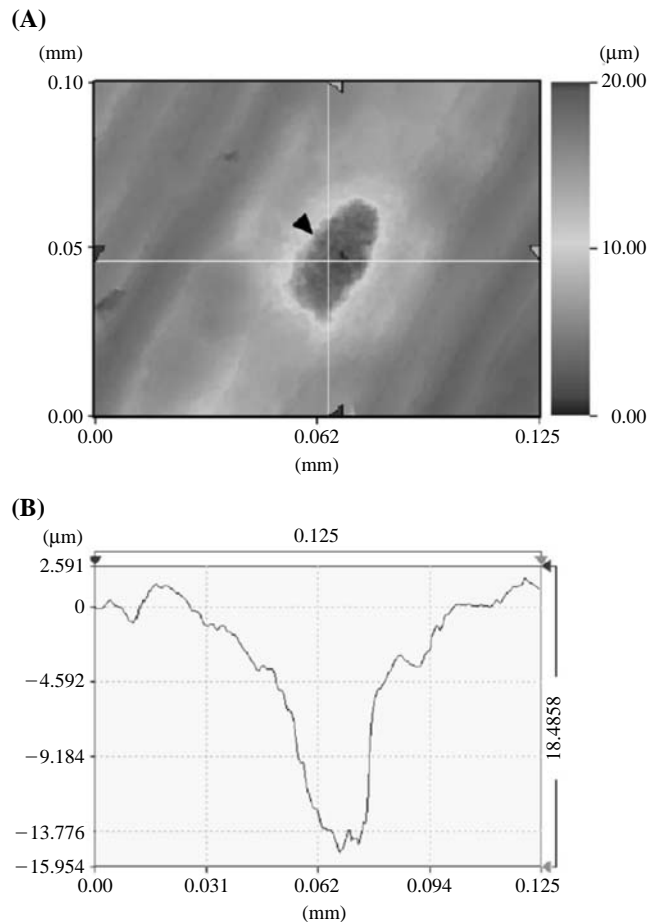


Fig. 3. White light scanning interferometry of the needle stomatal complex of *Pinus rigitaeda*. (A) Two-dimensional surface plot. An arrowhead indicates a stoma. (B) X-direction line profile analysis of the stoma in (A). (Reproduced from Kim et al., 2010 with permission from the publisher).

금으로 코팅해야 한다. 생물 시료의 반사성에 대하여 체계적인 자료로 정리된 바는 거의 없지만, 연구 사례에 의하면 종이, 페트리 디쉬, 식물 잎 표면은 코팅하지 않은 자연 상태에서 모두 WSI로 측정 가능하였다.

3. 시료의 전처리

WSI는 실제 상태에서의 시료를 전처리 없이 측정할 수 있는 것이 가장 큰 장점이다. 따라서 일반적으로 시료의 변

형 또는 왜곡을 배제하며 표면 형상을 측정할 수 있다. 광원으로 사용하는 텅스텐 할로겐 조명에 의하여 측정 중에 약간의 건조는 진행되어도 시료의 외형상 특별한 변화가 없다면 별도의 전처리가 필요 없다. 수분이 표면에 많은 경우에는 반사율에 영향을 주므로 측정편차를 발생시킬 수 있다.

4. 시료의 단차

측정하고자 하는 시료의 단차에 대한 개략적인 정보가 있

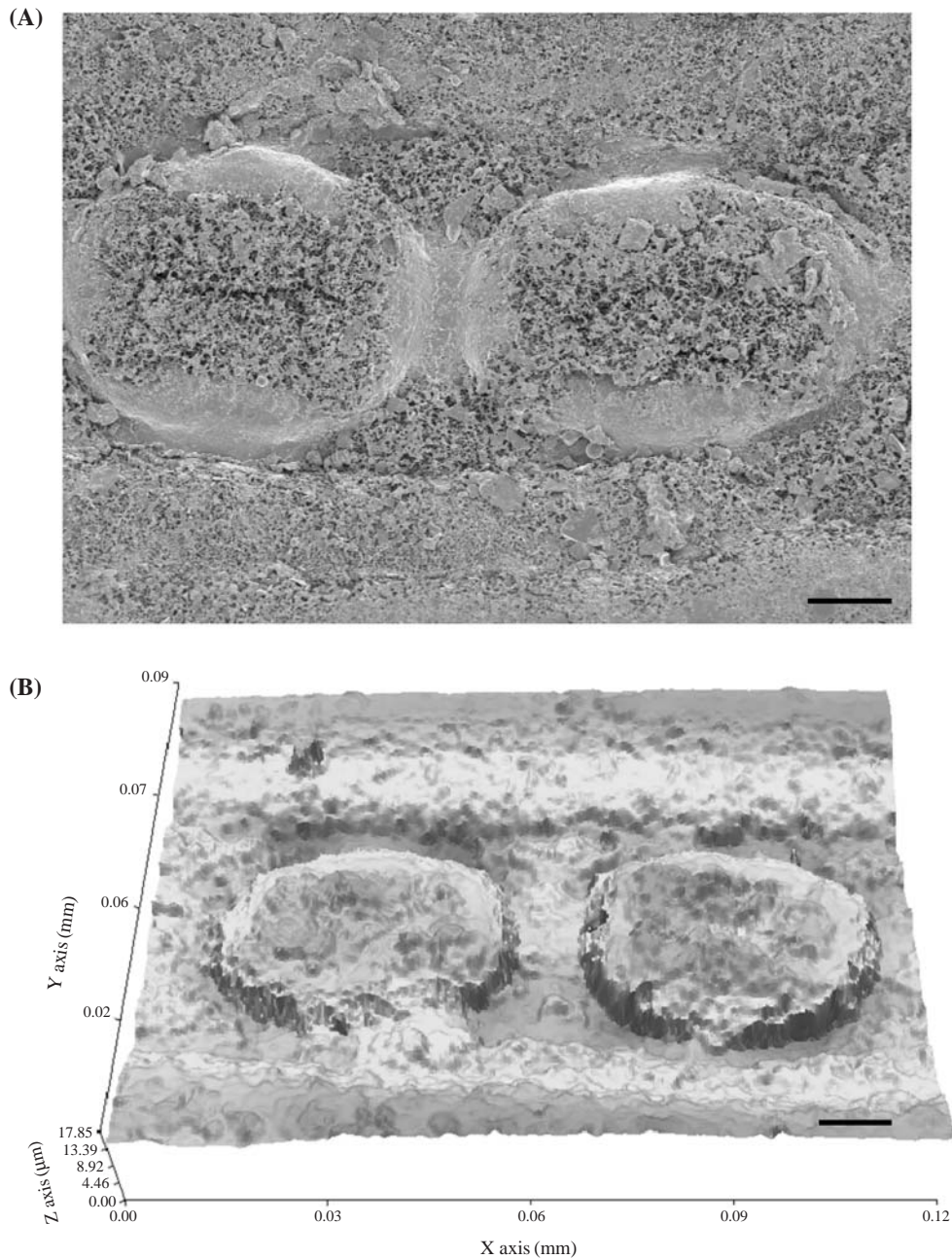


Fig. 4. Needle stomata of *Pinus koraiensis*. (A) Field emission scanning electron micrograph. (B) Three-dimensional surface reconstruction by white light scanning interferometry. Stomata were filled with epicuticular waxes. Bars=10 µm.

다면 시행착오를 최소화할 수 있다. 간섭렌즈를 z축 방향으로 구동하는 범위를 설정할 때, 시료의 전체 단차가 포함될 경우에만 정상적인 간섭신호를 획득할 수 있다. 이 과정에서 해당 장비의 사양이 특정 시료의 분석에 적합한지를 판단할 수 있다.

백색광 주사간섭계의 활용 사례

의과학분야에서 WSI 기법으로 분석한 사례가 보고되었다. 연골세포(chondrocyte)는 표면 기질의 유형에 의하여 외형이 민감하게 반응하는 것으로 알려져 있는데, 이러한 차이를 WSI 기법을 적용하여 분석하였다(Scott et al., 2005). 이로써 다양한 표면 기질에 대한 세포의 생체적합성(biocompatibility), 부착 및 이동에 관한 분석을 보다 쉽게 할 수 있게 되었다. 이외에도 치아 법랑질(enamel)에 세균인 *Streptococcus mutans*에 의하여 형성된 바이오 필름의 두께 및 표면 거칠기를 WSI 기법으로 분석하여 제시된 사례도 있다(Cross et al., 2009).

동물 시료 이외에도 식물학 연구에 있어서도 WSI 기법이 활용되고 있다. 식물과 곤충의 상호작용을 연구할 때 식물 표면의 단차 변화를 WSI로 측정하였다(Gorb & Gorb, 2009). 또한 소나무류 수목의 침엽 기공(stoma)에 대한 일련의 연구가 최근에 보고되었다. 기공 부위를 125 μm \times 95 μm 에 해당하는 면적과 z축 방향으로 20 μm 를 스캔하여 2차원 결과를 획득한다(Fig. 3A). 기공 및 사양에 따라서 차이는 있지만, z축 방향으로의 스캔 속도는 2.4 $\mu\text{m}/\text{sec}$ 수준이고, 1초에 약 30 frame을 획득하여 보통 10초 이내에 결과를 얻을 수 있다. 단차의 차이는 회색 수준(gray scale)으로 표현되며 모조색상(pseudo color)으로 처리하여 제시된다. 이 과정에서 임의의 방향으로 선분석(line analysis)을 수행하여 단차의 변화 양상을 정량적으로 확인할 수도 있다(Fig. 3B) (Kim et al., 2010).

SEM으로 촬영한 결과와 WSI로 측정한 결과를 비교하여 차이점 및 장단점을 확인할 수 있다. SEM 결과에서는 정성적 결과를 신속하고 고해상도로 제시할 수 있다(Fig. 4A). 그러나 z축 방향에 대한 정량적인 정보는 일반적으로 제공되지 않는다. 이에 대한 보완책으로 WSI는 광학 기반에서 가능한 배율에서 z축을 포함한 3차원적인 정량 자료를 제공하므로 표면을 3차원으로 재구성 할 수 있다(Fig. 4B).

표면의 3차원 결과가 확보되므로 거칠기를 계산하여 시료 표면을 정량적으로 비교할 수 있다. 소나무류에서 교잡종(*Pinus rigitaeda*)의 표현형이 각 양친수(parental tree) 표현형의 중간 형태임을 규명하였다(Kim et al., 2010). 또한 참나무 잎 윗면과 아랫면의 표면 거칠기를 산술평균 거칠기(average roughness)와 평방근 자승 거칠기(root mean square

roughness)를 계산하여 비교하므로 차이점을 제시하였다(Kim et al., 2011a).

이외에도 선분석 결과에 기초하여 표면 돌출 구조의 경사각을 측정할 수도 있었다(Kim et al., 2011b). 특히 경사각을 측정할 때 약 30도를 초과할 경우에는 WSI로 측정이 불가능하다. 이 때에는 WSI의 방식과는 차이점이 있는 초점-변이(focus-variation) 기법을 적용하면 80도 수준의 고경사각도 측정할 수 있다(Kim et al., 2011c).

현재까지 국내에서 WSI 방식을 의생명 분야에 활용하는 연구는 초기 단계에 있는 것으로 판단된다. 최근에는 이미 보급되어 있는 장비를 융합연구의 관점에서 나노바이오 연구의 도구로서 활용하려는 시도가 보고되었다(Kim et al., 2009). 따라서 단순한 정성적 결과 이외에도 표면 특성에 대한 수학적 연산을 요구하는 정량현미경기법(quantitative microscopy)이 향후 보편화될 때 WSI 기법이 큰 기여를 할 것으로 기대한다.

참 고 문 헌

- Cross SE, Kretz J, Wali RP, Sullivan R, Shi W, Gimzewski JK: Evaluation of bacteria-induced enamel demineralization using optical profilometry. *Dent Mater* 25 : 1517-1526, 2009.
- Gorb E, Gorb S: Effects of surface topography and chemistry of *Rumex obtusifolius* leaves on the attachment of the beetle *Gastrophysa viridula*. *Entomol Expt Appl* 130 : 222-228, 2009.
- Kang MG, Kim SW: Depth profile measurement of laser engraved marks on silicon wafers by white light scanning interferometry. *Proc Kor Soc Prec Eng* 45-48, 1999.
- Kim GH, Jeon HJ, Yoon H: Electric field-aided formation combined with a nanoimprinting technique for replicating a plant leaf. *Macromol Rapid Commun* 30 : 991-996, 2009.
- Kim GH, Kim SW: Thin film thickness profile measurement using white light scanning interferometry. *J Opt Soc Kor* 10 : 373-378, 1999.
- Kim KW, Cho DH, Kim PG: Morphology of foliar trichomes of the Chinese cork oak *Quercus variabilis* by electron microscopy and three-dimensional surface profiling. *Microsc Microanal* 17 : 461-468, 2011a.
- Kim KW, Kim DH, Han SS, Lee JC, Kim PG: Three-dimensional surface topography of the needle stomatal complexes of *Pinus rigida* and its hybrid species by complementary microscopy. *Micron* 41 : 571-576, 2010.
- Kim KW, Lee IJ, Kim CS, Lee DK, Park EW: Micromorphology of epicuticular waxes and epistomatal chambers of pine species by electron microscopy and white light scanning interferometry. *Microsc Microanal* 17 : 118-124, 2011b.
- Kim KW, Lee ST, Bae SW, Kim PG: 3D surface profiling and high resolution imaging for refining the Florin rings and epicuticular

- wax crystals of *Pinus koraiensis*. *Microsc Res Techniq* 74 : 1166-1173, 2011c.
- Kim SW, Jin JH, Kang MG: Optical probe of white light interferometry for precision coordinate metrology. *Proc Kor Soc Prec Eng* 195-198, 2002.
- Kim YS, Kim SW: Phase change on reflection in a white-light interferometer as polarization changes. *Han Kwang H* 15 : 331-336, 2004.
- Recum AFV, Shannon CE, Cannon CE, Long KJ, Kooten TGV, Meyle J: Surface roughness, porosity, and texture as modifiers of cellular adhesion. *Tissue Eng* 2 : 241-253, 1996.
- Scott CC, Luttge A, Athanasiou KA: Development and validation of vertical scanning interferometry as a novel method for acquiring chondrocyte geometry. *J Biomed Mater Res* 72A : 83-90, 2005.
- Sung YJ, Ryu JY, Song BK: Application of white light interferometry method for the measurement of surface micro-structure of paper products and prints. *J Kor TAPPI* 36 : 33-40, 2004.

< 국문 초록 >

백색광 주사간섭계는 다양한 시료의 표면 특성을 분석하기 위하여 널리 활용되고 있다. 이 기법은 재료공학 분야에서 오래 전부터 이용되었으며 정성적인 형상 이미지 이외에도 정량적인 3차원 결과를 제공한다. 이 기법에서는 백색광을 광원으로 이용하는데, 기준면과 측정면에서의 반사광을 합쳐서 형성되는 간섭신호를 형태 정보로 활용한다. z축 결과인 고도는 회색수준으로 구분되어 제시된다. 이 기법을 통하여 대영역으로 생물 시료를 신속하고 비파괴적으로 형태를 측정할 수 있다. 연골세포, 치아 법랑질, 식물 잎을 대상으로 적용한 사례가 있다. 특히 표면 구조물의 폭, 길이, 경사각과 같은 특성도 이 기법을 통하여 정량화할 수 있다. 이 기법을 적용하기 위하여 일정 수준의 반사도가 필요한데, 식물 잎에서의 반사도는 그 요건을 충족하였다. 전도성 금속의 코팅 등 추가적인 시료 전처리가 필요 없으므로 이 기법을 통한 생물 시료의 정량적 측정이 더욱 증가할 것으로 예상된다.