한국기계가공학회지, 제21권, 제5호, pp. 105~109(2022.05) ISSN 1598-6721(Print)
Journal of the Korean Society of Manufacturing Process Engineers, Vol. 21, No. 5 pp. 105~109(2022.05) ISSN 2288-0771(Online)

https://doi.org/10.14775/ksmpe.2022.21.05.105

항균 특성을 위한 나노구조 유연 필름의 제작 및 평가

박현하*,#

*원광대학교 기계공학과

Fabrication and Assessment of Flexible Nanostructured Film for Antibacterial Properties

Hyun-Ha Park*,#

*Department of Mechanical Engineering, College of Engineering, Wonkwang University

(Received 04 May 2022; received in revised form 07 May 2022; accepted 11 May 2022)

ABSTRACT

In the field of medical and marine industries, antibacterial surfaces have been emerged as one of the most important issues. Recently, many researchers have been studying antibacterial surfaces to kill bacteria or prevent the adhesion of bacteria. In their researches, various materials and structures are suggested to inhibit the adhesion of bacteria or kill the attached bacteria. However, chemical materials such as antibiotics or metal could be toxic. Moreover, frequent use of antibiotics causes super bacteria having resistance to antibiotics. In this study, nano-pillar structured surface was fabricated using polyurethane acrylate (PUA) and the mechanically induced antibacterial function was confirmed based on the fabricated nanostructures. Nanostructures can damage the bacterial membrane of Gram-negative bacteria through stretching of bacterial membrane via interaction with the nanostructures and the bacterial membrane. Consequently, the proposed transparent, flexible and nanostructured PUA films can be one of promising candidates for antifouling and antibacterial surfaces which can be applied in various industries.

Keywords : Nanostructure(나노구조), Bacteria(박테리아), Antibacterial(항균), Flexible Film(유연필름)

1. 서 론

바이오파울링은 공중 보건에서 박테리아 필름으로 인해 반복적으로 발생하는 문제이며, 지금까지 많은 연구자들이 바이오필름 형성 및 박테리아 부착을 효과적으로 억제할 수 있는 항균 및 방오재료를 제안했다. 산화질소, 항생제, 은 등의 살균성 물질을 이용한 효과적인 항균 활성의 대표적인 예가 있으나 낮은 생체 적합성 및 독성은 생체 적합성이 중요한 생체 의학 응용 분야에 높은 장벽이 될 수 있다[1-3]. 최근 항균 특성을 가진 나노구조 기반 항균 표면이 생물막 내성에 대한 전략으로 제안되었습니다[4]. 끝이 뾰족한 나노구조는 세포막을 파열시켜 효과적으로 세균을 죽일 수 있으며, 이는 화학물질 없이 표면 구조만 사용하여 세균 집락을 능동적으로 방지할 수 있다. 그러나 나노구조를 이용한 항균에 대한 초기 연구는 흑색실리콘, 산화티타늄과 같은 단단한 무기물을 사용하였으나 외부 충격에

Corresponding Author : plmn130@wku.ac.kr
Tel: +82-63-850-6684, Fax: +82-63-850-6691

Copyright © The Korean Society of Manufacturing Process Engineers. This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Noncommercial 3.0 License (CC BY-NC 3.0 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.

의해 쉽게 부서지고 살균력을 상실할 수 있으며, 곡면에 적용할 수 없다[5-8].

본 연구에서는 취성 재료를 사용할 경우 발생할 수 있는 기계적 견고성의 약점을 극복하기 위한 유연하고 투명하며 생체적합재료기반 항균필름 개발을 제안했다. 광경화 재료 PUA를 이용하여 나노기둥 구조를 제작하였고, 제작된 기둥 구조는 기계적 강건성을 가진다. PUA로 제작된 기둥 모양의 나노 구조는 박테리아의 상호작용으로 항균성능을 확인하였고 이는 항균 표면에 대한 유망한 후보임을 보여주었다.

2. 재료 및 방법

2.1 연구재료

나노구조가 있는 실리콘마스터의 이형제로 사용하기 위해 Trichloro(1H,1H,2H,2H-perfluorooctyl)silane를 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA)에서 구매하였고, 광경화성 재료인 Polyurethane acrylate(PUA)를 Minuta Tech (311 RM; Minuta Tech, Korea)에서 구매하였다.

2.2 나노구조 제작

나노필러형태가 있는 음각형 실리콘마스터는 이형이 용이하도록 불소화 자기조립 단층 용액(trichloro(1H,1H,2H,2H-perfluorooctyl)silane)으로 표면을 처리하였다. 광경화성 재료인 PUA 용액을 실리콘마스터에 떨어뜨린 후 폴리에틸렌 테레프탈레이트(PET) 필름으로 덮고 진공 챔버에서 가스를 제거한다. 가스제거 공정 후, 실리콘마스터를 자외선(UV) 광(λ = 365nm, dose = 200mJ/cm^2)에 노출시켜 광중합하고 경화된 PUA 필름을 실리콘마스터에서 제거하였다. 제작된 나노기둥이 있는 PUA 필름은 투명하고 유연하며, PUA 필름은 10시간 동안 UV 광에 노출시키고 탈이온수로 3회 세척하여 남아있는 광개시제를 제거하였다. 생물학적 실험에 사용하기 전에 PUA필름을 70% 에탄올과 추가 UV 노출로 멸균하고, 제작된 샘플을 1cm*1cm의 크기로 잘라 실험 및 분석을 준비하였다.

2.3 전자현미경 촬영

정확한 나노구조 형상을 관찰하기 위하여 PUA 필름을 금속 스퍼터링(G20, GSEM, Korea)으로 5nm 두께의 백금(Pt)을 코팅한 후 주사전자현미경(SU8200, Hitachi, Japan)을 사용하여 관찰하였다.

2.4 물 접촉각(water contact angle) 측정

PUA 샘플 표면의 WCA(water contact angle) 값은 상온(상대습도 50%, 25℃)에서 접촉각 분석기(SMA RTDROP_PLUS_HS, FEMTOFAB, Korea)를 사용하여 측정하였으며, 평균 WCA 값을 얻기 위해 임의의 위치에서 측정을 5회 반복했다.

2.4 항균성능 분석

항균 특성을 평가하기 위해 *Escherichia coli* (*E. coli*, ATCC25404)를 사용하였고, 600nm의 광학 밀도(OD600)가 0.5에 도달할 때까지 박테리아를 37℃ 및 Luria broth(LB Broth Miller, BD Difco, Franklin Lakes, NJ, USA)에서 박테리아를 배양한 후, OD600 값을 0.1로 희석하였다. 희석된 박테리아 용액을 멸균된 PUA 샘플을 37℃에서 18시간 동안 배양하였다. 박테리아 생존력 분석을 위해 형광성 표지(BacLight™, L7012; Molecular Probes, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)로 염색하고, 암실에서 15분 동안 배양한 다음, 인산완충식염수(PBS)로 샘플을 씻어냈다. 다광자 공초점 현미경(LSM 980; Carl Zeiss, Germany)을 사용하여 염색된 샘플의 형광 이미지를 얻었다. 얻은 이미지의 박테리아 표면 범위 값은 ImageJ 소프트웨어(NIH, Bethesda, MD, USA)를 사용하여 분석되었다. 정량 분석을 위해 콜로니 형성 단위(Colony-forming unit, CFU)를 수행하였으며, 2ml 현탁액(OD600 = 0.1)의 박테리아는 제작된 샘플 위에서 37℃ 및 18시간 동안 배양되었다. 인큐베이션 후, 샘플을 PBS로 3회 헹구고 1ml PBS와 배양된 샘플을 원츄형 튜브에 넣었다. 표면에 부착된 박테리아를 제거하기 위해 샘플을 볼텍스에서 5분 동안 와동시킨 후, 용액을 희석하고 LB 한천 플레이트에 퍼뜨렸다. 한천 플레이트를 37℃에서 18시간 동안 배양하고 박테리아 콜로니 갯수를 확인하고 이를 정량화하였다.

3. 실험결과 및 고찰

3.1 나노구조 제작

Fig. 1은 PUA를 사용한 나노기둥 어레이의 제작 절차를 보여준다. 먼저, 자외선(UV) 레플리카 몰딩 공정을 이용하여 PUA 기반 나노기둥을 제작하였다. PET

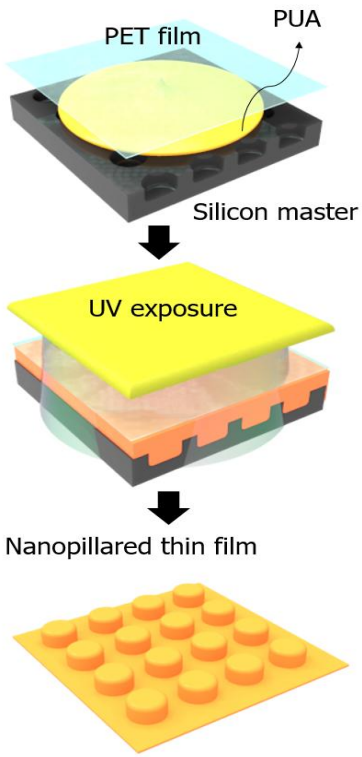

Fig. 1 Fabrication process schematics for PUA-based nanopillar

필름으로 덮인 PUA 용액은 UV 노출에 의해 빠르게 경화하였다. 경화 과정 후 필름은 음각형 실리콘마스터에서 조심스럽게 분리하여 최종적으로 나노구조가 있는 항균 필름을 제작하였다[9].

3.2 나노표면 분석

PUA 기반 나노기둥은 넓은 면적에 균일하게 형성되었고, 규칙적인 배열을 가진다. 최종 제작된 표면은 나노기둥이 있는 투명하고 유연한 필름으로, PET 필름의 두께 조절이 가능하기 때문에 표면 거칠기와 곡률이 있는 다양한 표면에 나노구조 필름을 적용할 수 있다(Fig. 2a). Fig. 2b의 전자현미경 이미지에서 볼 수 있듯이, 각각의 나노기둥은 직경 500nm, 높이 500nm, 간격 500 nm를 가진다. 제작된 나노기둥은 음각형 실리콘마스터에서 정확한 사이즈로 높은 수율을 가진다[10].

그림 3는 Bare PUA와 PUA nanopillars의 물 접촉각을 보여준다. Bare PUA의 샘플은 약 78°의 접촉각 값을 가졌으며, 나노기둥이 있는 PUA nanopillars샘플은 표면 거칠기로 인해 110°로 접촉각이 향상되었다.

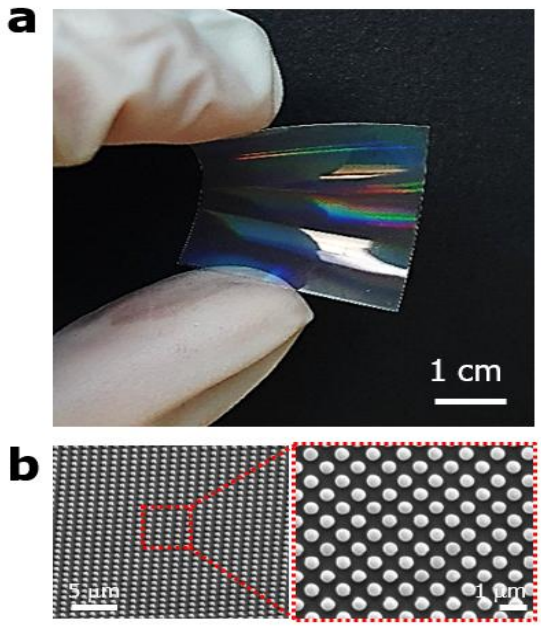

Fig. 2 (a) Photograph of the fabricated PUA-based nanopillar film with flexibility, (b) SEM images of the PUA-based nanopillar arrays

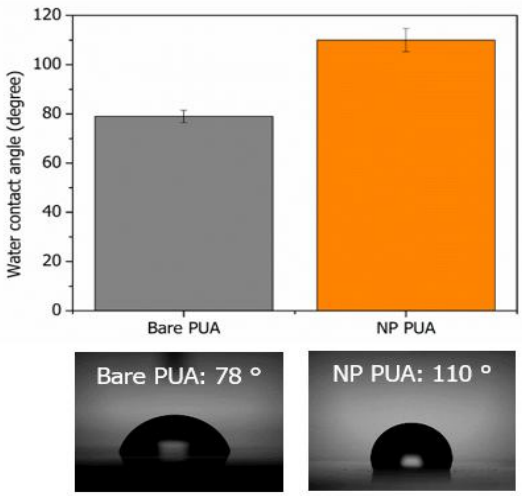

Fig. 3 Water contact angle measurements of the bare and nanopillared PUAsamples; (NP PUA: nanopillared PUA)

3.3 PUA 기반 나노기둥의 항균성능 평가

PUA 기반 나노기둥의 살균 효과를 평가하기 위해, 준비된 Bare PUA와 PUA nanopillars 샘플에 대장균(그람 음성형: *E. coli*) 박테리아를 배양하였다. Fig. 4a에서 볼 수 있듯이 18시간 동안 배양된 박테리아는 제작된 표면에서 *E. coli*의 공초점 현미경 이미지를 확인할 수 있다. 18시간 동안 배양한 후 녹색 형광으로 표시된 살아있는 많은 *E. coli*가 Bare PUA 표면에 부착되었다. 그러나, 부착된 고밀도 대장균은 PUA nanopillars 표면에서 죽은 세포가 관찰되었으며, 이는 적색 형광으로 표시된다. 본 결과는 PUA의 형태를 적절한 나노 규모 구조로 변경하여 강력한 살균 결과를 얻을 수 있음을 의미한다. 단일 박테리아보다 나노 구조가 작기 때문에 PUA로 제작된 나노구조는 박테리아의 세포막에 물리적 손상을 일으키고 용해를 유도한다. 더욱이 대부분의 적색 형광으로 표시된 박테리아는 죽은 것으로 밝혀졌으며, 이러한 결과는 나노구조를 가지는 PUA 표면은 현저한 박테리아의 항균 특성을 가질 수 있음을 보여준다. 또한 Fig. 4b에 도시된 바와 같이 전자현미경을 통해 나노기둥 어레이가 세균 세포막의 물리적 상호작용에 의해 손상되었음을 확인하였다. 박테리아가 나노기둥에 부착되고 박테리아의 멤브레인과 나노기둥은 접촉힘을 가지며, 이동성을 가지는 박테리아는 움직임을 가지다가 멤브레인 손상으로 사멸에 이른다. 또한 박테리아는 나노기둥 의 윗부분이나 기둥 사이에 자리를 잡게 되는데, 기둥 사이에 끼어있는 박테리아는 2차 바이오필름 형성이 어려움을 가진다. 최종적으로 나노기둥 PUA 표면은 부착된 박테리아 막을 손상시키기에 충분한 기계적 강성을 가지며, 나노기둥 어레이가 강력한 살균 효과를 가지고 있음을 보여준다.

Nanopillared PUA 어레이의 항균 거동을 정량적으로 평가하기 위해 Fig. 5a와 같이 표면에 부착된 *E. coli* 박테리아의 live/dead 면적 분석을 수행했다. 그 결과, Bare PUA 표면에 비해 Nanopillared PUA 표면에서 살아있는 *E. coli*의 커버리지 면적은 62.4% 감소하였다. 또한, Fig. 5b의 CFU 정량 결과는 나노구조와 박테리아 멤브레인의 상호작용으로 NP PUA가 강력한 항균성 막 특성을 가질 수 있음을 명확하게 보여준다.

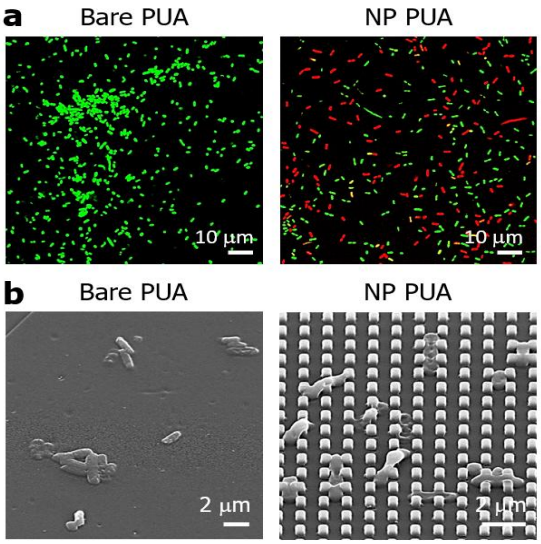

Fig. 4 (a) Confocal microscopy images and (b) SEM images of *E. coli* cultured on the bare and NP PUA(nanopillared PUA) surfaces for 18h

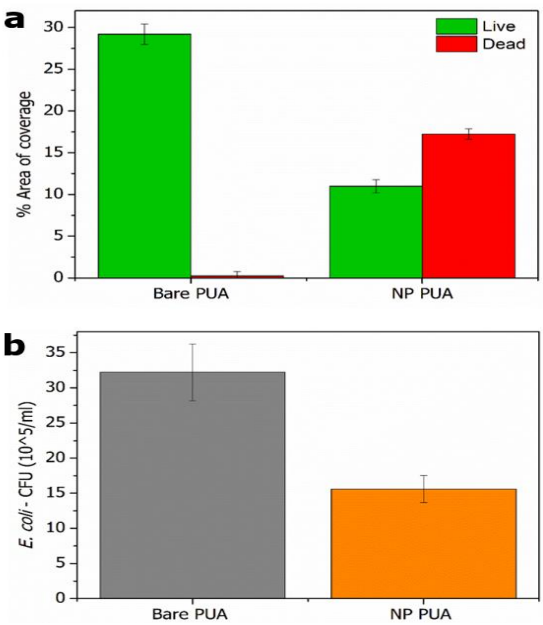

Fig. 5 (a) Quantification of area coverage of the live (green) and dead (red) cells cultured on bare and NP (nanopillared) surfaces (b) CFU of the *E. coli* grown on bare and NP(nanopillared) surfaces after 18 h culture

4. 결 론

본 연구에서는 나노구조를 손쉽게 제작가능하며, 제작된 나노구조표면에서 박테리아와 나노구조와의 상호작용을 통해 항균성을 확보하고자 하였다. 광경화성 재료인 PUA를 이용하여 나노기둥이 있는 음각형 실리콘마스터에서 UV molding 방식으로 나노구조가 있는 투명하고 유연한 필름을 제작하고 그람음성균 *E. coli* 를 배양하여 나노구조 표면에서의 항균성을 평가하였다. 이를 통해 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다.

1. UV 성형 기술을 기반으로 PUA는 간단하고 재현 가능한 방식으로 직경 500nm의 나노 기둥 어레이를 제작했다.
2. 생체적합성을 가진 PUA를 나노토폴로지에 적용함으로써 그람음성균 대한 우수한 항균력을 보여주었고, 기둥 모양의 나노 구조는 기계적 내구성이 우수하다.
3. 개발된 유연하고 투명한 항균활성이 우수한 필름은 다목적 표면에 적용가능하며 일상, 건강, 산업분야에서 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

후 기

"이 논문은 이 논문은 2021년도 한국연구재단 '이공분야기초연구사업'의 지원을 받아 연구되었음. (NRF-2021R1C1C1008767)".

REFERENCES

1. Li, W., Yang, Y., Ehrhardt, C. J., Lewinski, N., Gascoyne, D.; Lucas, G., Zhao, H., Wang, X., "3D Printing of Antibacterial Polymer Devices Based on Nitric Oxide Release from Embedded S-Nitrosothiol Crystals," ACS Appl. Bio Mater., Vol. 4, No. 10, pp. 7653-7662, 2021.
2. Yang, L., Schoenfisch, M. H., "Nitric Oxide-Releasing Hyperbranched Polyaminoglycosides for Antibacterial Therapy," ACS Appl. Bio Mater., Vol. 1, No. 4, pp. 1066-1073, 2018.
3. Sharma, P. K., Halder, M., Srivastava, U., Singh, Y., "Antibacterial PEG-Chitosan Hydrogels for Controlled Antibiotic/Protein Delivery," ACS Appl. Bio Mater., Vol. 2, No. 12, pp. 5313-5322, 2019.
4. Hawi, S., Goel, S., Kumar, V., Pearce, O., Ayre, W. N., Ivanova, E. P., "Critical Review of Nanopillar-Based Mechanobactericidal Systems," ACS Appl. Nano Mater., Vol. 5, No. 1, pp. 1-17, 2022.
5. Zhao, L., Liu, T., Li, X., Cui, Q., Wu, Q., Wang, X., Song, K., Ge, D., "Low-Temperature Hydrothermal Synthesis of Novel 3D Hybrid Nanostructures on Titanium Surface with Mechano-Bactericidal Performance," ACS Biomater. Sci. Eng., Vol. 7, No. 6, pp. 2268-2278, 2021.
6. Bhadra, C. M., Werner, M., Baulin, V. A., Truong, V. K., Kobaisi, M. Al., Nguyen, S. H., Balcytis, A., Juodkazis, S.; Wang, J. Y., Mainwaring, D. E., Crawford, R. J., Ivanova, E. P., "Subtle Variations in Surface Properties of Black Silicon Surfaces Influence the Degree of Bactericidal Efficiency," Nano-Micro Lett., Vol. 10, No. 2, pp. 1-8, 2018.
7. Fan, Z., Cui, D., Zhang, Z., Zhao, Z., Chen, H., Fan, Y., Li, P., Zhang, Z., Xue, C., Yan, S., "Recent Progress of Black Silicon: From Fabrications to Applications," Nanomaterials, Vol. 11, No. 1, pp. 1-26, 2021.
8. Linklater, D. P., Nguyen, H. K. D., Bhadra, C. M., Juodkazis, S., Ivanova, E. P., "Influence of Nanoscale Topology on Bactericidal Efficiency of Black Silicon Surfaces," Nanotechnology, Vol. 28, No. 24, pp. 245301, 2017.
9. Park, H. H., Sun, K., Seong, M., Kang, M., Park, S., Hong, S., Jung, H., Jang, J., Kim, J., Jeong, H. E., "Lipid-Hydrogel-Nanostructure Hybrids as Robust Biofilm-Resistant Polymeric Materials," ACS Macro Lett., Vol. 8, No. 1, pp. 64-69, 2019.
10. Kim, H. N., Kang, D. H., Kim, M. S., Jiao, A., Kim, D. H., Suh, K. Y., "Patterning Methods for Polymers in Cell and Tissue Engineering," Ann. Biomed. Eng., Vol. 40, No. 6, pp. 1339-1355, 2012.