박테리아 3D 프린팅에 대한 최근 연구동향

한국화학연구원 송재광

바이오가공기술(Biofabrication)의 하나로서 박테리아의 3D 프린팅 기술은 미개척 차세대 연구 분야이다. 3D 프린팅을 이용하여 기능성 복합 재료를 생산하기 위하여, 최근 다양한 바이오 잉크와 박테리아를 혼합하는 연구가 이루어지고 있다. 현재 각광받고 있는 3D 바이오 프린팅 기술은 인공 조직 또는 장기 재생 등 조직공학 분야로서 바이오 잉크는 세포와 생물분자를 포함하는 3차원 재료의 가공을 위한 물리적, 생물학적 환경을 제공하게 된다[1].

박테리아 3D 프린팅 시스템은 생물학적 정화(bioremediation), 독성 화학물질을 검출할 수 있는 생물센서, 기름 유출 필터, 상처 치료용 드레싱과 같은 응용 분야에서 큰 잠재력이 있으며, 특히 3차원으로 인쇄될 수 있는 소형 바이오공장(mini-biofactory)의 제조는 생물공학은 패러다임 변화를 가져올 수 있는 잠재력이 있다고 평가되고 있다.

박테리아는 약 40억년 전에 나타난 생명체로 본질적으로 매우 적응력이 뛰어나며 다양성이 높고, 생명공학 분야에서 다재다능한 응용이 가능하다. 그 하나의 예로서 정교한 자가 조립을 통하여 복잡한 유기, 무기성 입체 구조물을 생성할 수 있다. 이러한 박테리아 구조물은 지속적으로 다기능을 발휘하고 더욱 향상된 응용을 가능하게 할 수 있다는 점에서 그 잠재력이 있다. 조절가능한 입체적 나노 또는 마이크로 구조와 대사활성을 나타내는 맞춤형 박테리아 재료를 만들어 내는 것은 여전히 도전적인 과제이지만, 최근 3D 프린팅 기술을 이용한 재료 제조에 박테리아를 적용하는 흥미로운 연구가 이루어지고 있다 [2,3].

3D 프린팅된 페놀 분해능 박테리아(*Pseudomonas putida*)

다기능 박테리아는 배양 배지에서 생체 적합성 hyaluronic acid (HA),

k-carrageenan, fumed silica로 구성된 바이오잉크에 내장될 수 있다. 3D 프린팅된 생체재료에서 이러한 박테리아가 고유한 대사활동을 다양하게 구현할 수 있는 것은 필라멘트 형태로 압출될 수 있는 하이드로 겔에 박테리아를 로딩함과 동시에 박테리아 세포의 생존과 기능적인 활동성을 유지시킬 수 있는 환경을 제공하기 때문이다. 이와 같이 기능적으로 살아있는 바이오잉크는 비생명 물질로 제조되는 재료로는 얻어내기 어려운 특정한 기능성을 가진 재료로 3D 프린팅이 될 수 있다(그림 1).

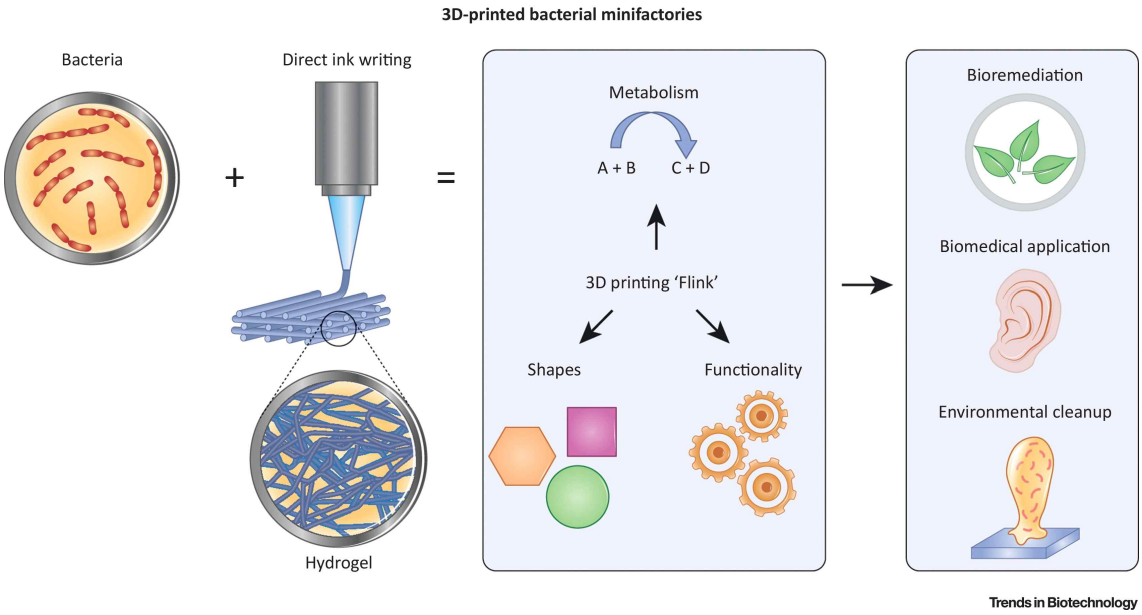

그림 1. 3D 프린팅된 박테리아를 이용한 기능성 재료의 제조

그 첫 번째 사례로서 페놀 분해능이 있는 *Pseudomonas putida*[4]를 3D 프린팅된 격자구조에 고정함으로써 생물학적 환경정화에 응용하는 것이다. 페놀 분해자로 이미 알려진 *P. putida* 균주가 로딩된 glycidyl methacrylate HA 바이오 잉크를 이용하고, 박테리아 세포와 액체 매질 사이의 접촉을 최대화하기 위하여 높은 표면적의 그리드(grid) 구조로 인쇄하였다[5]. 광 가교 결합된 안정적인 박테리아-그리드 3D 박테리아 인쇄물을 유일 탄소원으로 페놀이 포함된 배지에서 배양하였다. 시간의 경과에 따른 페놀 농도와 그리드에서 방출된 박테리아의 농도를 추적한 결과, 페놀이 분해되고 있으며 액체 배지에서 박테리아가 증식하고 있었다(그림 2A). 대조군으로서 *P. putida* 현탁액을 이용한 실험을 통하여 초기 투입한 페놀의 분해는 3D 인쇄된 구조체에서 방출되어 증식한 박테리아 뿐만 아니라, 3D 구조체에 고정된 박테리아에서 일어나고 있다는 것을 확인하였다(그림 2B). 3D 박테리아 구조체로 두 번의 처리를 해야만 동일한 농도의 박테리아 현탁액이 나타내는 페놀 분해 동력학 수준에 도달할 수 있었지만, 박테리아가 함유된 3D 그리드는 생체활성이 고정된 시스템이 갖는 본질적

인 장점과 3D 프린팅으로 가능한 기하학적 설계의 자유로움의 장점을 결합할 수 있는 것이다. 더 나아가 박테리아 DNA 염색실험을 통하여 3D 겔 내부에서 박테리아 증식이 일어나고 있으며(그림 2C), 결국 박테리아의 페놀 분해 대사활동과 증식을 설계된 3D 구조체에 고정할 수 있다는 것을 입증하였다.

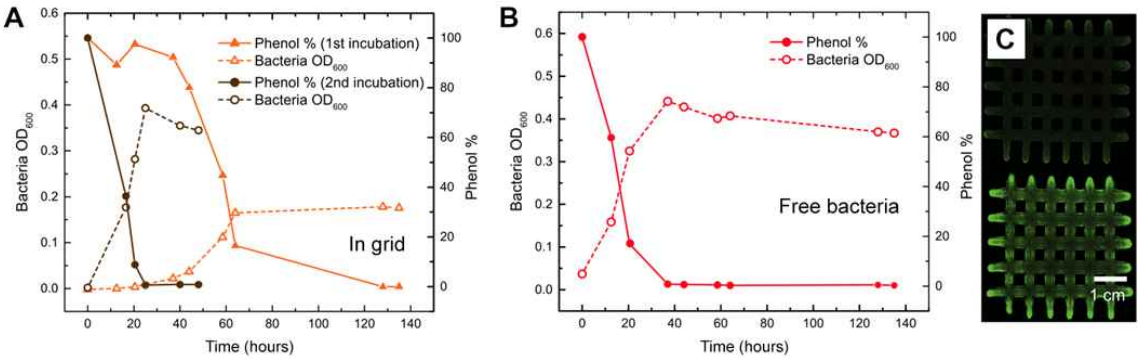

그림 2. 3D 프린팅된 *P. putida*의 페놀 분해능

3D 프린팅된 셀룰로오스 생성 박테리아(*Acetobacter xylinum*)

박테리아 적용을 통하여 기능성이 추가되는 또 다른 예는 산소가 충분한 환경에서 셀룰로오스를 생산할 수 있는 *Acetobacter xylinum* 균주가 장착된 바이오잉크를 3D 프린팅하는 것이다. *Gluconacetobacter xylinus*로도 불리는 *A. xylinum*은 식물성 셀룰로오스와 차별되는 기계적, 화학적 특성을 지닌 나노 스케일의 BC 하이드로 겔을 형성하는 박테리아이며 특히 BC는 의료용 소재로서 유용하게 이용되고 있다. 바이오메디컬 응용분야에 활용되고 있는 bacterial cellulose(BC)를 생성하는 박테리아 *A. xylinum* 균주를 3D 프린팅된 복잡한 모양의 구조체 재료에서 성장시킬 수 있었다.

Hyaluronic acid (HA), k-carrageenan, fumed silica가 포함된 하이드로 겔에 A. xylinum을 삽입하고 며칠 동안 인쇄된 3D 구조물을 방치함으로써, *A. xylinum*에 의한 in situ 셀룰로오스 형성이 이루어지고 잠재적인 생체의학 응용성을 가진 기계적으로 견고하고 복잡한 모양의 3차원 인쇄물을 얻어낼 수 있었다 (그림 3D, 3E). 세균 생물막 형성과 박테리아 셀룰로오스 형성을 촉진하기 위하여 바이오 잉크의 가교결합은 생략하였고, 대부분의 잉크 구성 성분을 씻어내어 나노 스케일의 섬유형으로 조직화된 박테리아 셀룰로오스 네트워크 구조만 남게 되었다. 또한 박테리아 자체도 일반적인 방법을 이용하여 제거 가능하였다. 박테리아 성장과 셀룰로오스 생성은 산소 가용도에 따라 3D 구조물 내부로는 박테리아 성장이 어렵다. 다양한 조건 실험을 통하여 0.5-2.0 mm 두께서만 박테리아 성장이 가능함이 확인되어 3D 구조물에서 표면 필름 또는 코팅의 형태로 박테리아 셀룰로오스 네트워크를 제조할 수 있었다. 또한 산소를 발생하는 시아노박테리아를 *A. xylinum*과 조합하여 사용하는 최적 방법을 개

발한다면 손쉽게 많은 3D 구조물을 양산할 수도 있을 것이라 예상된다[6]. 이렇게 박테리아 셀룰로오스를 코팅할 수 있다는 것은 예를 들어, 박테리아 셀룰로오스로 코팅된 임플란트가 조직과 장기의 거부반응을 줄이는데 매우 효과적이었으므로 3D 프린팅된 박테리아 셀룰로오스 구조물의 응용성이 밝다고 할 수 있다[7,8]. 또한 복잡한 형상을 지닌 얼굴 모양의 3D 구조물을 박테리아를 적용하여 제조할 수 있고 코팅된 셀룰로오스 네트워크를 확인함으로써(그림 3G), 팔꿈치, 무릎, 상처 부위 등 복잡한 모양의 관심 부위에 들어맞게 인쇄 후 분리하여 적용할 수 있을 것이다.

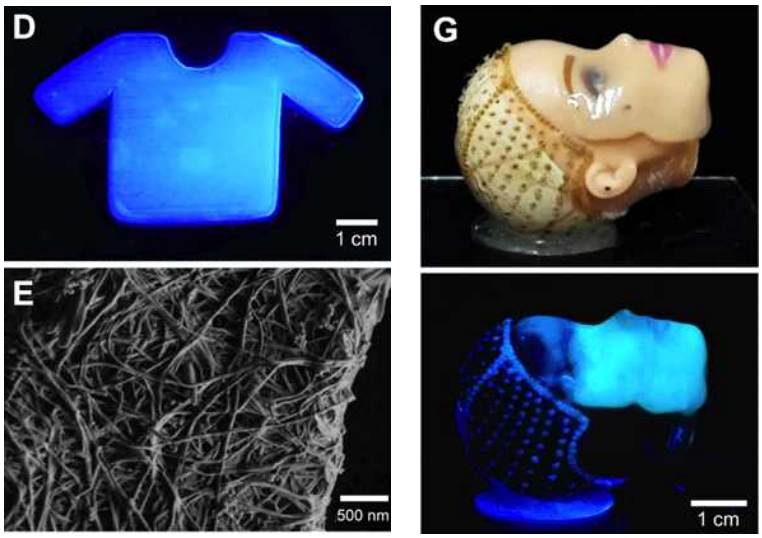

그림 3. 3D 프린팅된 셀룰로오스 생성 박테리아 A. xylinum. (D) A. xylinum에 의한 셀룰로오스의 in situ 형성이 T셔츠 형태의 3D 프린팅된 스캐폴드를 제조하는 데에 사용되었다 (셀룰로오스는 형광염료로 처리되었음). (E) 스캐닝전자현미경으로 관찰된 3D 구조물의 박테리아 셀룰로오스 나노 섬유 네트워크. (G) 사람의 얼굴을 스캔하고 맞춤형 3D 프린터를 이용하여 A. xylinum이 들어있는 바이오잉크를 인쇄하였다. 박테리아 셀룰로오스 네트워크의 in situ 형성은 모든 생물학적 잔여물을 제거한 후 피부 이식용으로 사용할 수 있는 셀룰로오스 강화 하이드로 겔의 제조를 용이하게 하였다.

결론 및 전망

박테리아의 농도가 조절되고 통제된 위치에 적용할 수 있는 박테리아-하이드로 겔의 복잡한 3D 구조물을 제조할 수 있는 3D 프린팅 플랫폼에 관한 연구가 수행되고 있다. 이러한 박테리아 고유의 다양한 대사 활동에 의해 제공되는 자유로운 모양의 3D 프린팅 기술은 기존에 없던 기능성을 만들어 낼 수 있다. 생물공학적 응용이 가능한 페놀 분해능 박테리아와 생체 의학적 응용이 가능한 생체 적합성을 지닌 셀룰로오스 생성 박테리아의 고정밀 3D 프린팅 연구에서 그 가능성을 볼 수 있다(그림 4). 앞으로 박테리아가 만들어 낼 수 있는 기능성 물질을 응용하는 새로운 차원의 플랫폼을 3D 프린팅과 연계된 기술에서 찾아갈 수 있을 것이라 예상한다. 마지막으로 박테리아 3D 프린팅 분야의 최근 연구 성과와 엄청난 잠재력에도 불구하고, 박테리아 3D 구조물의 재사용성과 재현성, 박테리아 적용의 확장성, 인쇄시간의 단축과 대량 제작, 박

테리아 프린팅의 환경적 영향 인자에 관한 연구과제에 초점을 맞춘 후속 연구가 필요할 것으로 보인다.

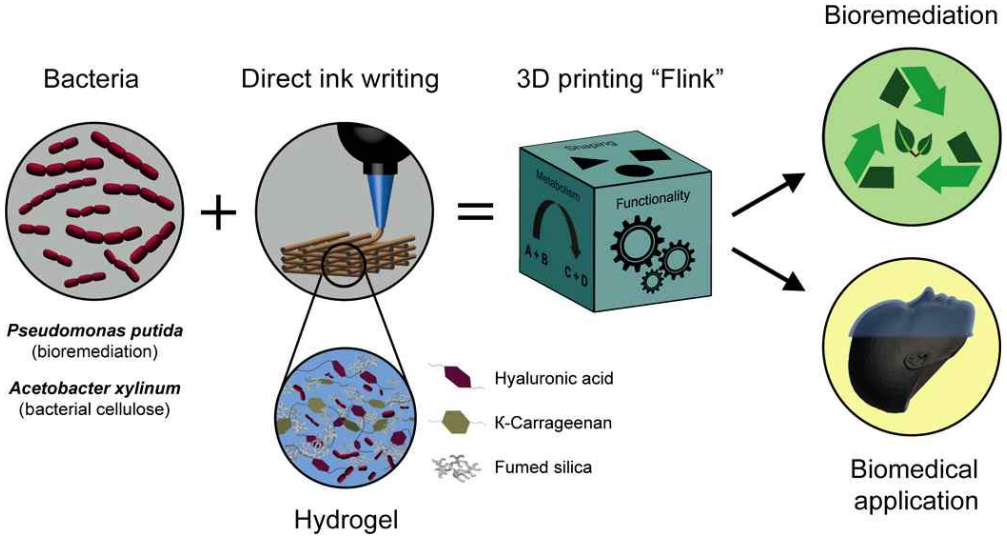

그림 4. 화합물 전환능 및 셀룰로오스 생성능을 지닌 박테리아 균주들이 제공할 수 있는 기능성 3D 재료 제작을 위한 3D 박테리아-프린팅 플랫폼

참고문헌

[1] 강현욱 (2016) 3D 바이오 프린팅 기술을 위한 바이오 잉크. KSMCB webzine

[2] Kyle S (2018) 3D printing of bactyeria: the next frontier in biofabrication. Trends in Biotechbology 36, 340-341.

[3] Lehner B, Schmieden DT, Meyer AS (2017) A straightforward approach for 3D bacterial printing. ACS Synth Biol 6, 1124-1130.

[4] Hasan SA, Jabeen S (2015) Degradation kinetics and pathway of phenol by Pseudomonas and Bacillus species. Biotechnol. Biotechnol. Equip. 29, 45-53.

[5] MSchaffner M, Ruhs PA, Coulter F, Kilcher S, Studart AR (2017) 3D printing of bacteria into functional complex materials. Science Advances 3, 6804

[6] Das AAK, Bovill J, Ayesh M, Stoyanov SD, Paunov VN (2016) Fabrication of living soft matter by symbiotic growth of unicellular microorganisms. J Mater Chem B 4, 3685-3694.

[7] Bottan S, Robotti F, Jayathissa P, Hegglin A, Bahamonde N, Heredia-Guerrero JA, Bayer IS, Scarpellini A, Merker H, Lindenblatt N, Poulikakos D, Ferrari A (2015) Surface-structured bacterial cellulose with guided assembly-based biolithography (GAB). ACS Nano 9, 206-219.

[8] Nguyen D, Hagg DA, Forsman A, Ekholm J, Nimkingratana P, Brantsing C, Kalogeropoulos T, Zaunz S, Concaro S, Brittberg M (2017) Cartilage tissue engineering by the 3D bioprinting of iPS cells in a nanocellulose/alginate bioink. Sci Rep 7, 658.