Journal of Radiation Industry 6 (2) : 159~164 (2012)

감마선을 이용한 조직공학용 젤라틴이 개질된 미생물 셀룰로오스 지지체의 제작 및 특성

최종배 · 정성린 · 권희정 · 박종석 · 노영창 · 최영훈[1]
박경진[1] · 박만용[2] · 신흥수[3] · 임윤묵*

한국원자력연구원 첨단방사선연구소 공업환경연구부, [1]국립원예특작과학원 감귤시험장,
[2]주식회사 자담, [3]한양대학교 대학원 생명공학과

Preparation and Characterization of Gelatin-immobilized Bacterial Cellulose Scaffold for Tissue Engineering Using Gamma-ray Irradiation

Jong-Bae Choi, Sung In Jeong, Hui-Jeong Gwon, Jong-Seok Park,
Young-Chang Nho, Young-Hun Choi[1], Kyung Jin Park[1], Man Yong Park[2],
Heungsoo Shin[3] and Youn-Mook Lim*

Research Division for Industry & Environment, Korea Atomic Energy Research Institute, Jeongeup, Korea
[1]*Citrus Research Station, National Instituite of Horticultural and Herbal Science, Rural Development Administration, Jeju, Korea*
[2]*Jadam Co, Jeju, Korea*
[3]*Department of Bioengineering, Division of Applied Chemical and Bio Engineering, Hanyang University, Seoul, Korea*

Abstract - Bacterial cellulose (BC) is generated from citrus gel by *Gluconacetobacter hansenii* TL-2C. BC has good properties such as high-burst pressure, high-water contact and the ultrafine highly nanofibrous structure of mimic natural extracellular matrix (ECM) for tissue engineering. In this study, acrylic acid (AAc) was grafted onto BC surfaces under aqueous conditions using gamma-ray irradiation, and then immobilized gelatin onto AAc-g-BC. The characterization of scaffolds was performed by scanning electron microscopy (SEM), attenuated total reflectance-Fourier transform infrared spectroscopy (ATR-FTIR), toluidine blue O (TBO) assay. Morphology of gelatin and AAc incorporation onto BC nanofibers did not changed. Our study suggests that gelatin-immobilized BC nanofibers scaffold has a potentiality to fabricate 3D nanofibrous scaffolds for tissue engineering.

Key words : Bacterial cellulose, Acrylic acid, Gelatin, Gamma ray, Tissue engineering

* Corresponding author: Youn-Mook Lim, Tel. +82-63-570-3061,
Fax. +82-63-570-3079, E-mail. ymlim71@kaeri.re.kr

서 론

미생물 셀룰로오스(bacterial cellulose, BC)는 β-1.4 glucan을 일자구조로 3차원적인 망상구조를 이루고 있으며, 식물성 셀룰로오스와 달리 리그닌이나 헤미셀룰로오스가 전혀 없는 순수한 셀룰로오스 상태로 생산되어 산업적으로 다양한 용도로 개발되고 있다(Embuscado *et al*. 1994; Vandamme *et al*. 1998). 이러한 구조 때문에 습윤성, 흡수성 및 고강도, 고탄력 등의 특성을 가지고 있어서 화장품, 의료제품, 식이섬유, 공업용 등의 다양한 산업에 응용되어 개발되고 있다(Fontana *et al*. 1990; Chung *et al*. 1998; Sutherlan 1998; Cho *et al*. 2002). 또한 조직공학에 있어서 미생물 셀룰로오스는 생체적합성이 우수하고 세포독성이 낮아 인공피부, 창상 피복제, 인공 연골, 인공근육, 인공혈관 등의 많은 조직의 재생 연구에 사용되고 있다(Klemm *et al*. 2001; Bäckdahl *et al*. 2006).

하지만, 미생물 셀룰로오스에는 조직을 효과적으로 재생하는데 필요한 세포부착 리간드가 없어 세포의 접착성 및 증식 효율이 낮은 단점을 가지고 있다. 미생물 셀룰로오스의 세포 접착성을 증가시키기 위해 본 연구에서는 방사선을 이용한 방법을 이용하고자 한다. 방사선을 이용한 기술의 원리는 방사선 조사에 의해 단량체에 라디칼이 생성되어 중합되어 폴리머가 되거나, 고분자 사슬의 라디칼에 의해 고분자 사슬간에 가교 또는 단량체의 결합이 일어난다(Choi *et al*. 2007). 이러한 방사선 기술은 화학적 방법에 비해 인체에 유해한 가교제나 개시제를 사용하지 않기 때문에 반응 후 정제할 필요가 없으며 의료분야에 이용될 경우 필수인 멸균과정 또한 방사선 조사와 동시에 일어난다(Rosiak *et al*. 1999; Jabbari *et al*. 2000).

본 연구실에서는 이전에 방사선을 이용하여 전기방사를 통해 제조한 나노섬유에 acrylic acid (AAc)를 결합하여 카르복실 그룹을 생성하고, 이렇게 생성된 카르복실 그룹을 응용하는 연구를 하였다. 연구 결과 방사선을 이용하여 카르복실기를 생성하였으며 조직 공학적 응용의 가능성을 확인하였다(Shin *et al*. 2011). 그리고 여러 실험실에서 나노섬유에 생성된 카르복실 그룹을 이용하여 조직공학으로 응용하기 위하여 gelatin, collagen, laminin, fibronetin 등 세포 외 기질 단백질을 도입하는 연구들이 많이 진행되고 있다(He *et al*. 2005; Ma *et al*. 2005; He *et al*. 2006; Baek *et al*. 2008; Koh *et al*. 2008). 나노섬유 구조를 하고 있는 미생물 셀룰로오스도 방사선을 통한 AAc 결합과 EDC/NHS반응을 이용하여 gelatin 도입 연구를 하고자 한다.

본 연구에서는 감마선을 이용하여 acrylic acid (AAc)와 gelatin이 결합된 미생물 셀룰로오스를 제조하고 특성을 알아보았다. 그리고 특성 분석을 통해 개질된 미생물 셀룰로오스의 조직 공학적 응용의 가능성도 관찰하였다.

재료 및 방법

1. 재료

Acrylic acid (AAc), *N*-(3-dimethylamionipropyl)-*N*′-ethyl-carbodiimide hydrochloride (EDC), 4-morphilinoethanesulfonic acid (MES), toluidine blue O (TBO), fluorescamine, sodium bicarbonate, gelatin은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) 제품을 사용하였으며, N-hydroxysuccinimide (NHS)는 Aldrich (Milwaukee, WI)에서 구매하여 사용하였다. 본 연구에 사용된 bacterial cellulose nanofabrics (Jadam Co, Jeju, South Korea)는 제주산 감귤 껍질을 발효하여 *Gluconacetobacter hansenii* TL-2C 균의 대사산물로 제조된 셀룰로오스를 사용하였으며, 모든 시약과 용매는 다른 정제 과정 없이 사용하였다.

2. Gelatin-AAc-g-bacterial cellulose nanofabrics 제조

Gluconacetobacter hansenii TL-2C에 의해 제조된 BC 나노섬유에 감마선을 이용하여 AAc를 결합 하였다. 직경 8 mm의 크기로 자른 BC 나노섬유를 0.01 M Mohr's salt의 5% AAc solution에 담근 후, ^{60}Co 선원의 감마선 (ACEL type C-1882, Korea Atomic Energy Institute)을 선량률 10 kGy hr^{-1}로 25 kGy 조사하였다. 조사 후, 미 반응된 AAc를 제거하기 위해서 3차 증류수를 이용하여 72시간 동안 세척하였다. AAc-g-BC 나노섬유에 EDC/NHS 반응을 이용하여 Gelatin을 도입시키기 위해서 0.1 M MES buffer solution (pH 5.07, 5 mg ml^{-1})에 EDC와 NHS를 녹인 용액에 AAc-g-BC 나노섬유를 1시간 동안 담근 후 꺼내어 gelatin solution (2 mg ml^{-1})에 넣고 12시간 동안 교반하였다. 미 반응 gelatin을 제거하기 위해서 MES와 PBS로 24시간 동안 세척 한 후, 동결건조기를 이용하여 3일 동안 동결건조 하였다.

3. Scanning electron microscopy (SEM)

BC 나노섬유의 표면에 AAc와 gelatin이 미치는 영향을 알아보기 위해 전자현미경 (SEM, JSM-6300, JEOL, Japan)을 이용하여 10 kv, 10～12 mm distance 조건에서 확인하였다. 샘플은 Sputter coater를 이용하여 70초 동안

골드 코팅하여 측정하였다.

4. Toluidine blue O (TBO) 염색 및 정량

BC 나노섬유 표면에 결합된 AAc의 카르복실 그룹을 확인하기 위해 TBO를 사용하여 염색과 정량을 하였다. 24 well plate에 TBO solution (0.01 M HCl, 60 mg NaCl, and 12 mg toluidine blue O chloride) 500 µl와 BC 나노섬유를 넣고 6시간 이상 교반 후, 증류수를 이용하여 TBO가 더 이상 녹아 나오지 않을 때까지 세척을 한다. 세척이 끝난 샘플을 0.1 M NaOH와 ethanol blend solution (1 : 4 v/v)에 녹인 후 UV-vis spectrometer (PowerWave XS, Biotek, USA)를 이용하여 630 nm에서 측정한다.

5. Fluorescamine 염색

AAc-BC와 gelatin-AAc-BC 나노섬유의 표면에 있는 gelatin을 확인하기 위해 Fluorescamine을 이용하였다. BC 나노섬유에 0.2 M borate buffer (pH 9) 350 µl와 Fluorescamine solution (1 mg ml^{-1} in acetone) 150 µl를 함께 넣고 voltex를 이용하여 빠르게 1분 동안 교반 후, 형광현미경 (Leica Microsystems GmBh, DM1400B, Germany)을 이용하여 확인하였다.

6. Attenuated total reflectance-fourier transform infrared spectroscopy (ATR-FTIR)

BC 나노섬유 표면의 화학 특성을 확인하기 위하여 attenuated total reflectance-Fourier transform infrared spectroscopy (ATR-FTIR) (Bruker TEMSOR 37, Bruker AXS. Inc., Germany)를 사용하였다. Spectra는 1,200～2,000 cm^{-1}의 범위를 4 cm^{-1} 해상도와 64 scans 조건에서 측정하였다.

결과 및 논의

Gluconacetobacter hansenii TL-2C에 의해 30°C에서 14일간 배양되어 제조된 BC 나노섬유를 동결 건조하여 표면을 전자현미경으로 관찰하였다. Fig. 1의 (a)에서 보는 바와 같이 3차원적인 구조체를 이루고 있는 것을 육안으로 확인이 가능하며, BC 나노섬유의 윗면 (Fig. 1(b))은 나노섬유가 그물망의 형태를 하고 있는 다공성 시트 형태이고, 횡단면 (Fig. 1(c))은 다공성 나노시트가 층을 이루며 나노섬유에 의해 서로 연결된 3차원 입체 구조를 이루고 있는 것을 확인할 수 있다. 이러한 구조는 ECM과 유사한 구조로써 세포의 기능과 증식을 지속시켜 주고 세포의 부착을 충분히 도와주며 세포로부터 방출되는 산소와 영양분의 확산을 촉진시켜 줄 수 있기 때문에 조직공학적 적용을 위한 이상적인 지지체라고 할 수 있다 (Oh *et al*. 2008).

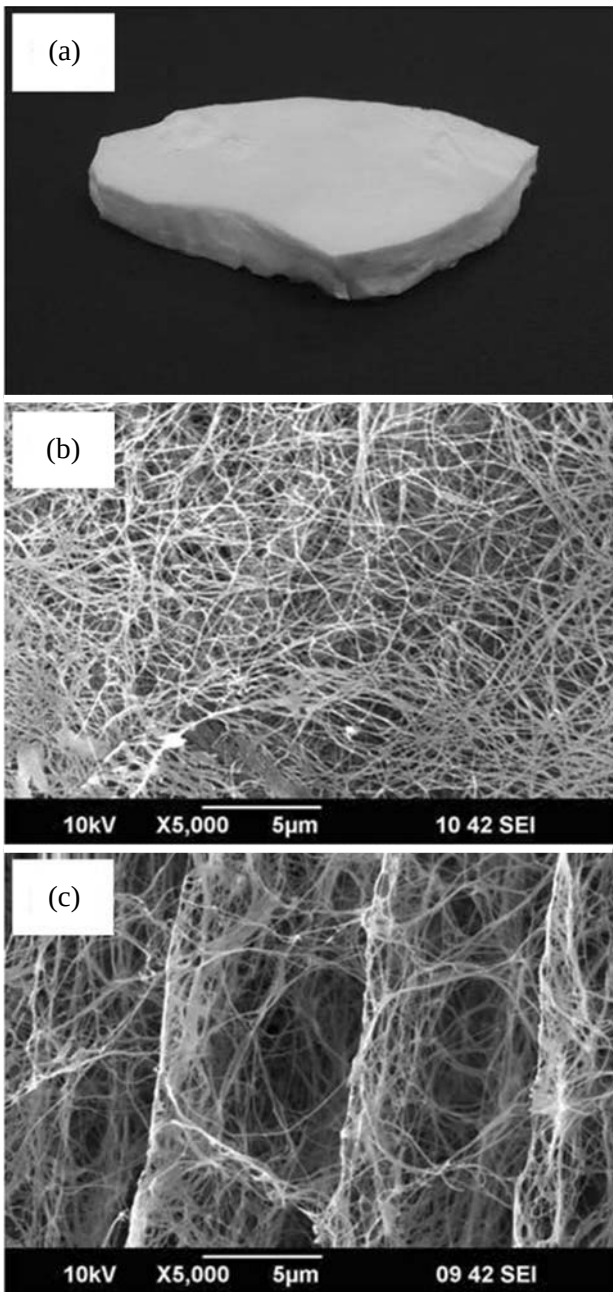

Fig. 1. SEM images of photo image (a) and top surface (b), cross-section (c) of BC nanofibers.

Fig. 2의 전자현미경 사진에서 보이는 바와 같이 감마선을 이용하여 AAc를 결합한 (a) AAc-BC 나노섬유와 EDC/NHS 반응을 이용하여 gelatin을 도입시킨 (b) gelatin-AAc-BC 나노섬유의 표면은 개질 전의 BC 나노섬유

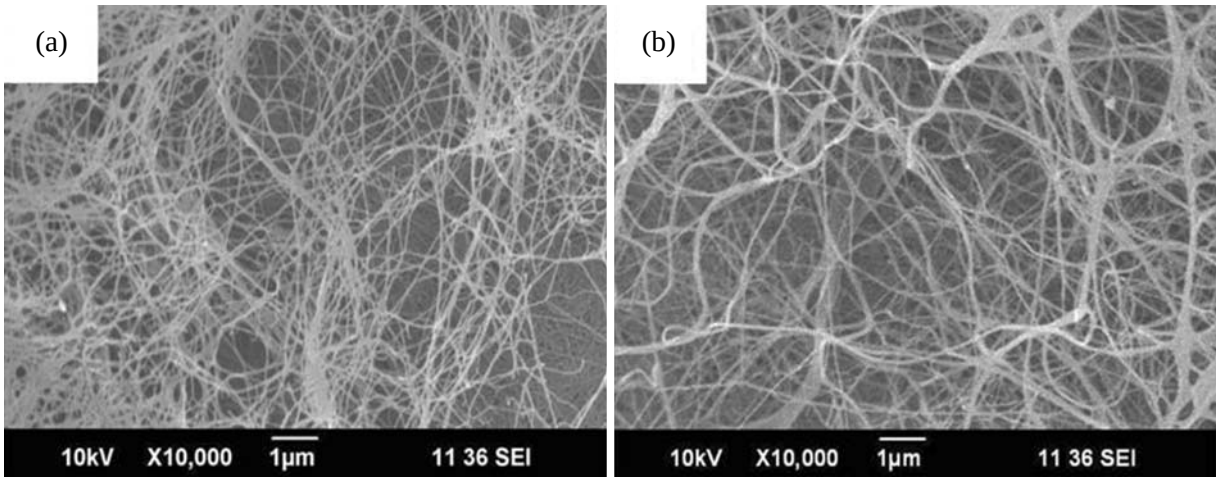

Fig. 2. SEM images of top surface of AAc-BC nanofibers (a) and gelatin-AAc-BC nanofibers (b).

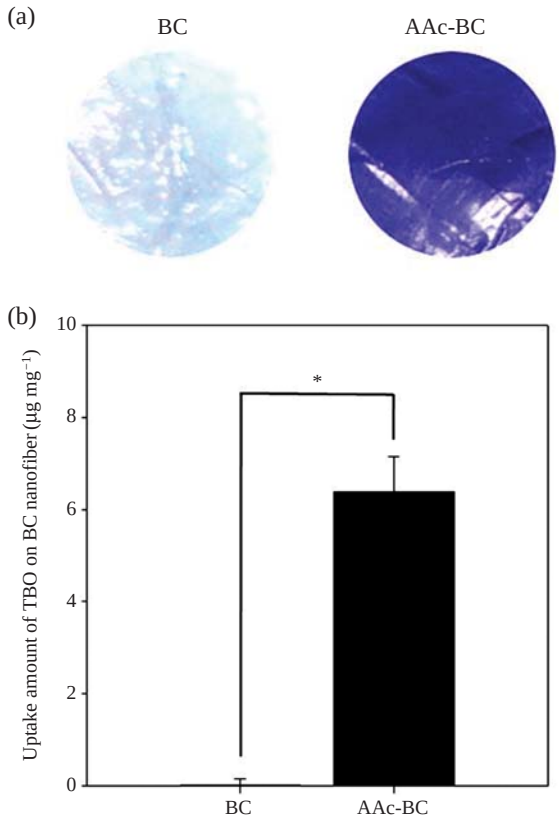

Fig. 3. Quantification of carboxylic acid groups of AAc grafted BC nanofiber. (a) AAc-BC stained with toluidine blue O and (b) Uptake amount of toluidine blue O stained with AAc-BC nanofiber (Significantly different from control (*$p < 0.05$))

와 동일한 다공성 나노시트 형태를 유지하며 약 40 nm의 섬유로 이루어져 있는 것을 확인할 수 있다. 하지만 결합된 AAc와 gelatin은 전체적인 나노섬유의 두께에 영향을 미치지 않았다. 방사선 조사 기술을 이용한 방법에서는 구조적인 변화 없이 아주 얇은 두께의 개질 방법에 우수하다는 것을 확인하였다(Grøndahl *et al*. 2005).

BC 나노섬유에 결합된 AAc와 반응하는 TBO를 UV-visible spectrometer (630 nm)로 확인하였다. Fig. 3(a)에서 보는 바와 같이 BC 나노섬유는 푸른색 염색이 되지 않은 반면, AAc-BC 나노섬유는 TBO염색이 되어 푸른색을 보였다. 또한 (b) BC와 AAc-BC 나노섬유에 염색된 TBO 양은 각각 0.0195±0.1384, 6.3827±0.7710 (μg mg^{-1})으로 측정되었으며, TBO는 카르복실 그룹과 반응하여 염색이 되기 때문에 AAc-BC 나노섬유는 BC 나노섬유에 카르복실 그룹을 가진 AAc가 균일하게 방사선을 이용하여 결합되었다는 것을 확인할 수 있다. 이러한 결과는 이전에 PLCL 나노섬유와 필름에 AAc를 결합한 결과와 같다는 것을 확인할 수 있다(Shin *et al*. 2011).

AAC-BC 나노섬유에 도입된 gelatin은 fluorescamine으로 gelatin에 있는 아민 그룹을 염색하여 광학 현미경으로 확인하였다. Fluorescamine은 아민그룹과 반응하여 녹색형광을 나타낸다. Fig. 4에서 보는 바와 같이 BC와 AAc-BC 나노섬유는 녹색형광이 나타나지 않는 반면 Gelatin-AAc-BC 나노섬유에서 녹색형광이 나타나기 때문에 아민 그룹을 가지고 있는 gelatin이 도입되어 있는 것을 확인할 수 있다(Mobini *et al*. 2008; Jeong *et al*. 2009). Fig. 5는 BC 나노섬유의 표면특성을 분석한 ATR-FTIR 그래프이다. AAc-BC 나노섬유의 카르복실 그룹의 피크(b)는 1,720 cm^{-1}에서 발견되었다. Gelatin을 도입시킨 gelatin-AAc-BC 나노섬유는 1,650 cm^{-1}, 1,550 cm^{-1}에서 새로운 피크가 발견되었다. 이 피크는 gelatin에 있는 amide (I), (II)로 AAc-BC 나노섬유에 gelatin이 도입되었

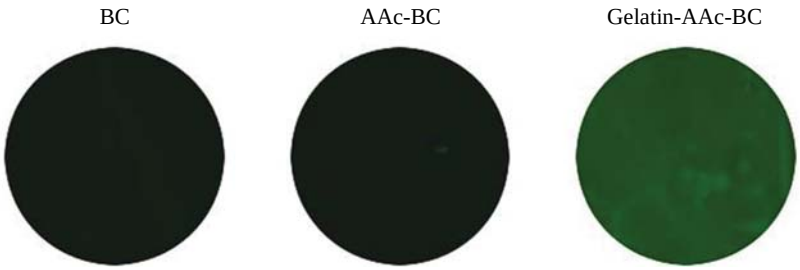

Fig. 4. Quantification of amide groups of gelatin immobilized AAc-BC nanofiber. BC (a) and AAc-BC (b), gelatin-AAc-BC (c) stained with fluorescamine.

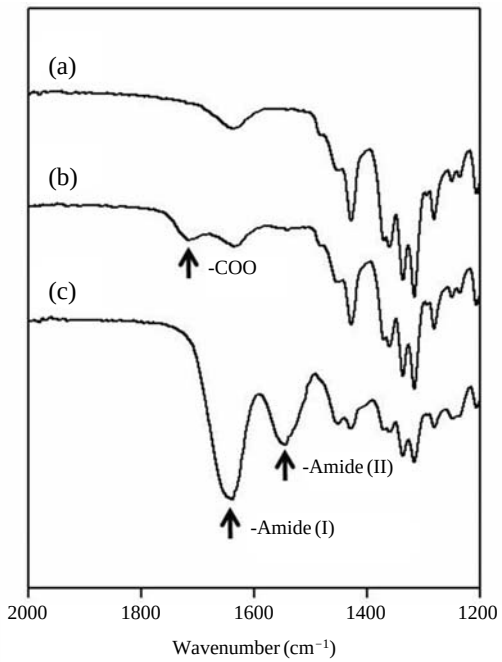

Fig. 5. ATR-FTIR spectra of BC (a), 5% AAc-BC (b), and gelatin-5% AAc-BC (c) nanofibers.

다는 것을 확인할 수 있다(Mobini *et al*. 2008). 이 결과로써, BC 나노섬유에 AAc를 도입을 하였고 EDC/NHS 반응을 이용하여 gelatin을 성공적으로 도입하였다.

결 론

본 연구에서는 감마선을 이용하여 BC 나노섬유에 AAc를 결합하고 gelatin을 도입하는 실험을 수행하였다. TBO 염색 결과 감마선에 의해 BC 나노섬유에 AAc가 결합되어 카르복실 그룹이 생성되는 것을 확인하였으며, Fluorescamine의 형광을 통해 아민기를 확인함으로써 Gelatin의 도입을 확인할 수 있었다. 또한 FT-IR을 통해서도 카르복실과 아마이드 그룹을 확인함으로써 BC 나노섬유에 AAc와 Gelatin이 도입된다는 것을 확인할 수 있다. 그리고 SEM을 이용한 BC 나노섬유의 표면 분석 결과, 나노섬유로 되어 있고 조직공학에 쓰이는 하이드로겔과 같이 3차원적인 구조를 가지고 있으며, AAc 결합이나 gelatin의 도입 이후에도 형태학적인 변화가 없기 때문에 나노섬유의 특성을 그대로 유지한다는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과를 종합해 볼 때 gelatin이 도입된 BC 나노섬유의 조직공학적 응용에 기대된다.

사 사

본 연구는 2012년도 농촌진흥청 차세대 바이오그린 21사업(과제번호: 75580-12)의 연구비 지원에 의한 연구결과의 일부이며, 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

Bäckdahl H, Helenius G, Bodin A, Nannmark U, Johansson BR, Risberg B and Gatenholm P. 2006. Mechanical properties of bacterial cellulose and interacrions with smooth muscle cells. *Biomaterials* **27**:2141-2149.

Baek HS, Park YH, Ki CS, Park JC and Rah DK. 2008. Enhanced chondrogenic responses of articular chondrocytes onto porous silk fibroin scaffolds treated with microwave-induced argon plasma. *Surf. Coat. Technol.* **202**:5794-5797.

Cho SH, Lee JY, Choi TS and Choi KH. 2002, dietary effects of fiber produced from gluconacetobacter hansenii on digestive tract and lipid metabolism in rats. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr*. **31**:802-807.

Choi JH, Lee YJ, Lim YM, Kang PH, Shin JH and Nho YC. 2007. Radiation processing of polymeric materials. *Polymer Science and Technology* **18**(3):253-258.

Chung BW, Kim CY, Kang SK and Park BN. 1998. Characteristics of Korean traditional paper containing bacterial cellu-

lose. *The Research of Industrial Technology Institute, Chonbuk National University* **29**:47-51.

Embuscado ME, Marks JS and BeMiller JN. 1994. Optimization of cellulose production by acetobacter xylinum through response surface methodology. *Food Hydrocoll* **8**:419-430.

Fontana JD, De Souza AM, Fontana CK and Torriani IL. 1990. Acetobacter cellulose pellicle as a temporary skin substitute. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **24**:253-264.

Grøndahl L, Chandler-Temple A and Trau M. 2005. Polymeric grafting of acrylic acid onto poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate): surface functionalization for tissue engineering applications. *Biomacromolecules* **6**:2197-2203.

He W, Ma ZW, Yong T, Teo WE and Ramakrishna S. 2005. Fabrication of collagen-coated biodegradable polymer nanofiber mesh and its potential for endothelial cells growth. *Biomaterials* **26**:7606-7615.

He W, Yong T, Ma ZW, Inai R, Teo WE and Ramakrishna S. 2006. Biodegradable polymer nanofiber mesh to maintain functions of endothelial cells. *Tissue Eng* **12**:2457-2466.

Jabbari E and Nozari S. 2000. Swelling ratio behavior of acrylic acid hydrogels prepares by γ-radiation crosslinking of poly acrylic acid in aqueous solution. *Eur. Polym. J.* **36**:2685-2692.

Jeong KH, Chung WY and Kye YS. 2009. A Study on the Quantification of PrP 106-126 peptide by fluorescamineand alpha-imager. *J. Korean Ind. Eng. Chem.* **20**(6):628-631.

Klemm D, Schumann D, Udhardt U and Marsch S. 2001. Bacterial synthesized cellulose-artificial blood vessels for microsurgery. *Prog. Polymer Science* **30**:14-21.

Koh HS, Yong T, Chan CK and Ramakrishna S. Enhancement of neurite outgrowth using nano-structured scaffolds coupled with laminin. *Biomaterials* **29**:3574-3582.

Ma ZW, He W, Yong T and Ramakrishna S. 2005. Grafting of gelatin on electrospun poly(caprolactone) nanofibers to improve endothelial cell spreading and proliferation and to control cell orientation. *Tissue Eng*. **11**:1149-1158.

Mobini S, Javadpour J, Hosseinalipour M, Ghazi-Khansari M, Khavandi A and Rezaie HR. 2008, Synthesis and characterisation of gelatin-nano hydroxyl apatite composite scaffolds for bone tissue engineering. *Advances in Applied Ceramics* **107**(1):4-8

Oh AY, Kim SH and Lee SJ. 2008. Preparation and characterization of PLGA scaffold impregnated keratin for tissue engineering application. *Polymer Korea* **32**(5):403-408.

Rosiak JM and Ulański P. 1999. Synthesis of hydrogels by irradiation of polymers in aqueous solution. *Radiation Phys. Chem*. **55**:139-151.

Shin YM, Kim WJ, Park JS, Gwon HJ, Nho YC and Lim YM. 2011. Polydopamine coating behaviors on the acrylic acid grafted-nanofibers. *Journal of Radiation Industry* **5**(4):371-376.

Sutherlan IW. 1998. Novel establish applications of microbial polysaccharides. *Tibtecg.* **16**:41-46.

Vandamme EJ, Baets SD, Vanbaelen A, Joris K and Wulf PD. 1998. Improved production of bacterial cellulose and its application potential. *Polym Degrad Stab*. **59**:93-99.

Manuscript Received: March 31, 2012
Revised: April 17, 2012
Revision Accepted: May 13, 2012