미생물 발효 셀룰로오스와 젤라틴을 함유한 조직공학적 세포지지체의 제조 및 특성

임윤묵* · 김미영[1] · 권희정 · 박종석 · 노영창 · 이병헌 · 이종대[1]
송성기[1] · 김성호[2] · 최영훈[3] · 이선이[3]

한국원자력연구원 정읍방사선과학연구소, [1](주)큐젠바이오텍,
[2]경북대학교 바이오 식품과, [3]농촌진흥청 국립원예특작과학원 감귤시험장

Preparation and Characterization of Gelatin Scaffold Containing Microorganism Fermented Cellulose

Youn-Mook Lim*, Mi-Yeong Kim[1], Hui-Jeong Gwon, Jong-Seok Park, Young-Chang Nho, Byeon-Heon Lee, Jong-Dae Lee[1], Sung-Gi Song[1], Sung-Ho Kim[2], Young-Hun Choi[3] and Sun-Yi Lee[3]

Advanced Radiation Technology Institute, Korea Atomic Energy Research Institute, Jeongeup 580-185, Korea
[1]Quegenbiotech, Co., Ltd, Incheon 429-931, Korea
[2]Department of Bio-Food, Kyungpook National University, Gyeongbuk 702-201, Korea
[3]Citrus Research Station, National Institute of Horticultural and Herbal Science, Rural Development Administration, Seogwipo 699-943, Korea

Abstract - Cellulose, chitin, chitosan and hyaluronic acid are well known as polysaccharides. These polysaccharides have many effects on cell growth and differentiation. Cell activation increases with increasing the polysaccharides concentration. In this study, gelatin scaffold containing microorganism fermented cellulose, citrus gel were prepared by using irradiation technique. Physical properties of the scaffolds were investigated as a function of the concentrations of gelatin and citrus gel and the cell attachment, cell morphology and inflammation of the scaffolds also were characterized for regeneration of skin tissue.

Key words : Irradiation crosslinking, Scaffold, Gelation, Citrus gel

서 론

생체에 적합하고, 생체기능성을 갖는 생체재료로 이루어진 지지체에 세포를 배양하여 체내에 이식하여 손상되거나 기능을 상실한 조직, 장기를 가능한 정상적 기능을 할 수 있도록 하는 것이 생체조직공학이다(Khang *et al*. 2002; Kim *et al*. 2006). 현재 많은 관심을 일으키고 있는 생체조직공학은 생명과학, 의학, 공학과 서로 연계하여 정상조직 및 비정상조직의 구조와 기능을 이해하여,

* Corresponding author: Youn-Mook Lim, Tel. +82-63-570-3065, Fax. +82-63-570-3079, E-mail. ymlim71@kaeri.re.kr

손상되거나 죽은 조직, 장기 등 신체의 일부를 복구하거나 대체할 수 있는 생물학적 대응물의 개발을 목적으로 한다(Bernhard 2003). 생체조직공학에서의 생체재료 지지체는 체내이식 초기에 파종된 세포가 사멸하지 않고 본래의 기능을 유지하는 기반을 제공하여야 하며, 여러 가지 필수적인 특성을 만족시켜 이상적인 조직 재생을 이루어야 한다. 생분해성 및 비독성, 넓은 표면적을 갖는 상호 연결된 내부 다공성 구조, 구조적 안정성, 세포 흡착 기질의 제공, 낮은 면역 반응성, 혈전 형성억제, 친수성, 생체 기능성 등을 대표적인 특성으로 들 수 있다(Mikos and Temenoff 2000).

조직공학의 중요한 3가지 구성요소 중에 하나가 다공성 지지체이다. 조직구성 및 조직 안으로 혈관신생이 잘 이루어지도록 적절한 크기의 공극이 서로 연결되어 있는 구조를 가져 마지막에는 지지체가 조직에 흡수되어야 하기 때문에 생분해성과 생체 흡수성이 제어될 수 있어야 한다. 다공성 지지체는 상처치유, 화상치유, 약물전달 및 손상조직 재생을 위한 지지체로서 널리 응용되고 있다(Lee *et al*. 2003). 특히 손상된 조직의 재생을 위한 지지체는 소량의 조직 편으로부터 추출, 분리한 세포를 충분한 양으로 배양하는데, 적합한 구조와 안정성이 요구되며, 체내이식후 부작용이 나타나지 않는 생체 적합성과 생분해성을 가지고 있어야 한다(Pierre *et al*. 2004). 따라서 세포의 재생과 성장을 효과적으로 실현하기 위한 생분해성 지지체는 조직세포가 지지체의 표면에 점착하여 3차원 구조의 조직을 형성할 수 있는 다공성 구조를 가져야 하며 이상적인 다공성 지지체는 100~200 μm 크기의 공극이 서로 연결된 구조를 형성함으로써 수분과 세포성장인자 등의 이동이 용이하고, 세포와 부착과 성장에 적합하여야 한다(Shin *et al*. 2004). 생체 적합성, 생분해성, 그리고 기계적 물성이 우수한 다공성 지지체는 조직의 재생과 복원에 필수적이다(Jeon *et al*. 2001; Pierre *et al*. 2004). 다공성 지지체의 제조에 사용되는 천연고분자 소재들은 생체친화성이 높고 체내 이식 시에 체내 대사물로 분해되어 체외로 방출되거나 체내 독성을 갖고 있지 않아 다공성 지지체 소재뿐만 아니라 의료용 고분자 소재로 널리 이용되고 있다.

천연고분자는 천연물질, 동물, 인체에서 유래한 고분자로서 매우 우수한 생체 적합성을 갖고 있다. 따라서 천연고분자로 제작된 지지체는 생체에 이식 후 염증반응이 적을 뿐만 아니라, 뛰어난 생체 기능성과 생분해성 등을 제공할 수 있어 이상적인 조직공학용 지지체의 재료로 평가 받고 있다. 지지체를 제작하는데 사용되는 천연고분자는 젤라틴(gelatine), 콜라겐(collagen), 피브린(fibrin), 엘라스틴(elastin) 등의 단백질과 알긴산(alginate), 하알루론산(hyaluronic acid) 등의 다당류 계열의 천연고분자가 많이 사용되고 있다(Cui *et al*. 2003; Cheng and Teoh 2004; Zisch *et al*. 2004; Segura *et al*. 2005; Augst *et al*. 2006; Daamen *et al*. 2007).

젤라틴은 콜라겐의 부분적인 가수분해에 의해 얻어지는 수용성 단백질이다. 젤라틴은 온도에 따라 졸-겔 상태가 변화하는 생분해성 고분자로 약물전달체계, 상처 치료용 드레싱 등에 응용되고 생체조직재생에 인공 메트릭스로도 응용되고 있다(Aso *et al*. 1999).

고등식물의 세포벽의 주성분이며, 다당류인 셀룰로오스(cellulose)는 자연에서 널리 존재한다. Pectin, hemicellulose, lignin 등의 다른 다당류와 혼합하여 heteropolysaccharide로 이루어져 있는 식물 셀룰로오스는 결정화도가 낮고 기계적 강도와 흡착성이 떨어지지만, pectin, hemicellulose, lignin 등의 다당류를 함유하지 않은 순수한 셀룰로오스 집합체이며 약 0.1 μm의 두께를 가진 microfibril이 수소결합으로 3차원적 망상구조를 이루고 있는 세균을 생산하는 셀룰로오스는 결정화도가 높고, 기계적 강도와 흡착성이 높다(Benziman *et al*. 1980; Embuscado *et al*. 1994; Chung and Shyu 1999). 또한 세균을 생산하는 셀룰로오스는 보수성, 현탁 안정성, 결착성의 우수한 물리적 성질을 가져 화장품, 식품, 의약품에 널리 이용되고 있으며, 특히 독일은 인공 혈관, 화상 환자용 인공 피부 등에 개발되고 있다(Fontana *et al*. 1990; Chung *et al*. 1998; Sutherlan *et al*. 1998; Vandamme *et al*. 1998; Chung and Shyu 1999; Klemm *et al*. 2001; Cho *et al*. 2002; Backdahl *et al*. 2006).

우리나라 과일 품목 중에서 감귤이 최대 생산 품목이며, 생과로 주로 이용되고 있다. 생과로 주로 이용됨에 따라 가공품에 대한 소비가 적어, 가공품 개발이 요구되고 있다(Chung *et al*. 2000). 감귤은 L-ascorbic acid, β-carotene, 식이성섬유소, 항고혈압, 항산화, 항노화성, flavonoid 화합물인 고혈압을 예방하는 hesperidin, LDL-cholesterol 함량을 줄이는 작용을 하는 naringin을 다량 함유하고 있다(Son *et al*. 1992; 1995; Kana *et al*. 1995; Lee *et al*. 1995; Marie *et al*. 1995; Bok *et al*. 1999). 다양한 생리적 기능에 도움을 주는 항암, 항알러지, 항바이러스, 항염증 효과가 있는 것으로 알려지고 있다(Carrol *et al*. 1999). 이처럼 다양한 기능을 가진 감귤의 과즙을 이용하여 감귤 내성의 *Gluconacetobacter hansenii* TL-2C를 선별한 감귤 발효겔이 개발되었다(Choi *et al*. 2004a, b). 본 연구에서는 개발된 고기능성 감귤 발효겔을 이용하여 지지체 제조에 이용하였다.

합성고분자를 사용하여 제조한 다공성 지지체에 비해 천연고분자를 사용한 다공성 지지체는 생체 적합성이 우

수한 점이 있는 반면, 약한 기계적 물성과 수분이나 체액에 의하여 고분자 자체가 쉽게 용해되는 문제점을 수반한다(Li *et al*. 2005). 따라서 대부분의 천연고분자 소재를 사용한 지지체는 가교제와 같은 화학적 처리를 통해 지지체의 기계적 물성을 향상시키는 것이 일반적이다(Choi *et al*. 1999; Jeon *et al*. 2001; Yilmaz *et al*. 2001; Park *et al*. 2002; Mao *et al*. 2003; Shin *et al*. 2004; Smitha *et al*. 2005).

본 연구에서는 가교제나 화학적 처리 대신 방사선을 이용하여 젤라틴과 미생물 발효에 의한 셀룰로오스 감귤 발효겔으로 지지체를 제조하여, 조직 공학적 이용 가능성을 검토하였다.

재료 및 방법

1. 시약 및 재료

제주도 농촌진흥청에서 증여받은 감귤과즙으로부터 감귤 내성의 *Gluconacetobacter hansenii* TL-2C를 선별한 감귤 발효겔을 사용하였고(Kim *et al*. 2007), gelatin은 Sinho사(Osaka, Japan)에서 구입하여 사용하였다.

2. Citrus gel을 이용한 scaffold 제조

제주도에서 가져온 citrus gel을 믹서기로 곱게 갈아 2번 증류수로 세척하였다. Gelatin(G)과 곱게 간 citrus gel(C)을 10:1, 9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5, 1:9의 wt% 조성비율로 섞은 후, 1시간 동안 75°C의 물에 중탕하여 제조하였다. 제조된 혼합액을 petri dish(3.5 cm × 3.5 cm)에 3 mm 정도의 높이로 담았다. 25 kGy의 조사선량으로 조사하였다. −78°C, 24시간 보관 후, 동결건조(−55°C, 7일)하여 scaffold를 제조하였다.

3. 기계적 물성

INSTRON series IX (Instron Co, Universal Tesring System Model 5569, USA)를 이용하여 겔의 인장강도를 측정하였다. 인장강도를 측정하기 위해 지지체 시편의 폭은 10 mm, 길이는 30 mm이었다. 인장강도 측정 시 cross head speed는 0.1 mm · min^{-1}, 하중은 5 kN으로 하였다.

4. 감귤 발효겔을 함유한 지지체의 세포실험

1) 세포실험의 시약 및 재료

Cell counting kit-8 (CCK-8)은 Dojindo사(Kumamoto, Japan)에서 구입하였으며, Dulbecco's Modified Eagle Medium-High Glucose (DMEM), Dulbecco's phosphate Bufferd saline (DPBS), Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM), Pen Strep-Penicillin Streptomycin, Fetal Bovine Serum (FBS)은 GIBCO BRL (Grand Island, NY, USA)에서 구입하였다. 흰쥐의 섬유아세포(Mouse Fibroblast, L929)와 각질형성세포주(Human Keratinocytes, HaCaT)를 한국세포주은행(KTSS, Seoul, Korea)으로부터 구입하여 사용하였다.

2) 세포 배양

세포 배양액은 L929와 HaCaT의 경우 DMEM에 10% heat-inactivated FBS, 1%의 penicillin과 1%의 streptomycin을 첨가하여 사용하였으며, 한국세포주은행(Seoul, Korea)으로부터 구입한 흰쥐의 섬유아세포(L929), 각질형성세포주(HaCaT)를 사용하였다. 비만세포(HMC-1)인 HMC-1의 경우 IMDM에 10% FBS, 1%의 penicillin과 1%의 streptomycin을 첨가한 것을 사용하였다. 배양은 배양기를 이용하여 37°C, 5% CO_2 상태를 유지하였다.

3) 세포 부착율

흰쥐의 섬유아세포(L929)를 지지체에 1×10^4 cells · $well^{-1}$의 농도로 파종한 후 3, 7, 14일째에 CCK-8 10 μl씩 첨가하였고, 5% CO_2가 포함된 37°C 인큐베이터에서 2시간 동안 배양하였다. 주황색을 띄면 지지체를 취하여 새로운 96-well culture plate에 옮긴 후, 100 μl씩 분주한 후, ELISA microplate reader (Bio-Tak instruments, Winooski, VT, USA)로 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

4) 세포지지체의 형태학적 분석

제조된 다공성 감귤 발효겔을 함유한 지지체의 표면형태를 SEM (Scanning electron microscopy, Model JSM-6390, Jeol Co, Tokyo, Japan)을 사용하여 관찰하였다. 액체 질소 속에 flake 형태의 blends 시료 5 g을 5분간 냉동시킨 후 꺼내어 절단시켜 진공오븐 속에서 24시간 건조 후 파단면을 금으로 균일하게 도금시킨 다음, SEM을 사용하여 샘플의 파단면을 관찰하였다.

5. 감귤 발효겔을 함유한 지지체의 동물실험

1) 동물실험 재료

실험용 쥐로는 체중 200～250 g의 Sprague-Dawley 계인 7～8주령인 수컷 흰쥐를 ORIENT (Korea)에서 구입하였다. 사육환경은 온도 23±1°C, 습도 50±10%의 항온 항습 사육실에서 자유 급수 하에서 고형 사료로 사육하였다. 마취제로 사용된 diethyl ether와 ketamine은 Aldrich사(WI, USA)와 유한양행(Seoul, Korea)에서 구입하였다. 살균 · 소독제로 사용된 과산화수소, 포비돈 국소도포 용액을 성광제약(Buchon, Korea)에서 구입하였다. 치료 효과

비교를 위해 사용된 바셀린 거즈는 Tegaderm을 3M (USA)에서 구입하였다. 봉합사는 Ethicon사(Edinburgh, England) 제품을 사용하였다.

2) 지지체의 생체 삽입에 의한 혈액 염증 반응

털이 제거된 쥐의 등에 직경 생후 4주된 쥐의 등 쪽 부분에 1～1.5 cm 절개하여 표피를 제거하여 지지체를 생체에 삽입하였다. 이때 지지체의 크기는 1 cm로 하여 동물 전처리를 하였다. 쥐를 통해서 지지체가 생체 내에 삽입 됐을 때의 염증반응을 알아보았다. In vivo 환경에서 감귤 발효겔을 함유한 지지체에서의 조직 공학적 혈액 염증 반응을 관찰하기 위하여 면역결핍 쥐의 피하에 감귤 발효겔을 함유한 지지체를 이식하여 분석하였다. 3, 7, 14일 간격으로 혈액 채혈한 후, Hemavet 850 (USA)으로 분석하였다.

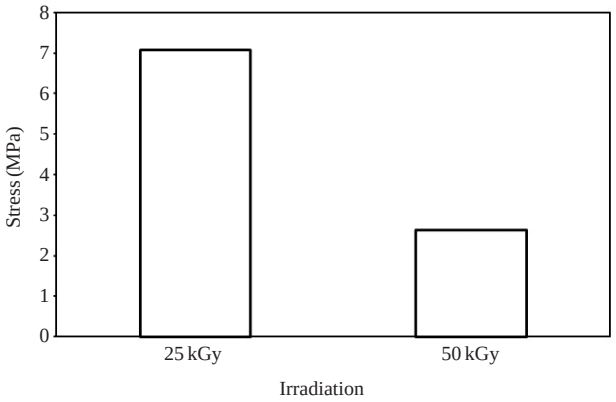

Fig. 1. Tensile strength of the gelatin/citrus cel scaffolds (gelatin : citrus gel=1 : 9, irradiation dose; 25 kGy and 50 kGy).

결과 및 논의

1. 기계적 물성

감귤 발효겔의 방사선 조사량에 따른 지지체의 인장

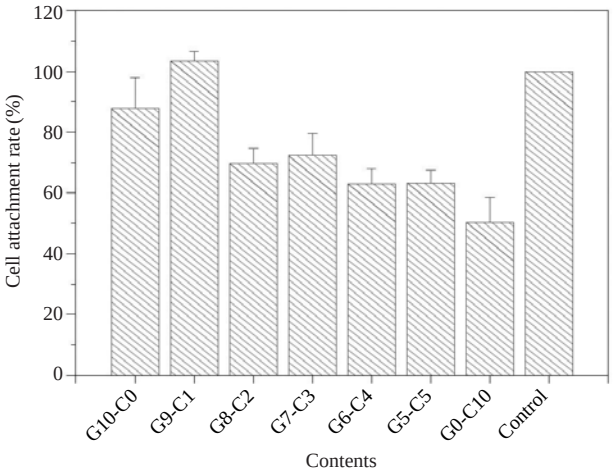

Fig. 2. Cell attachment rate of gelatin/citrus cel scaffolds (gelatin (G) : citrus gel (C)=10 : 0, 9 : 1, 8 : 2, 7 : 3, 6 : 4, 5 : 5, 0 : 10).

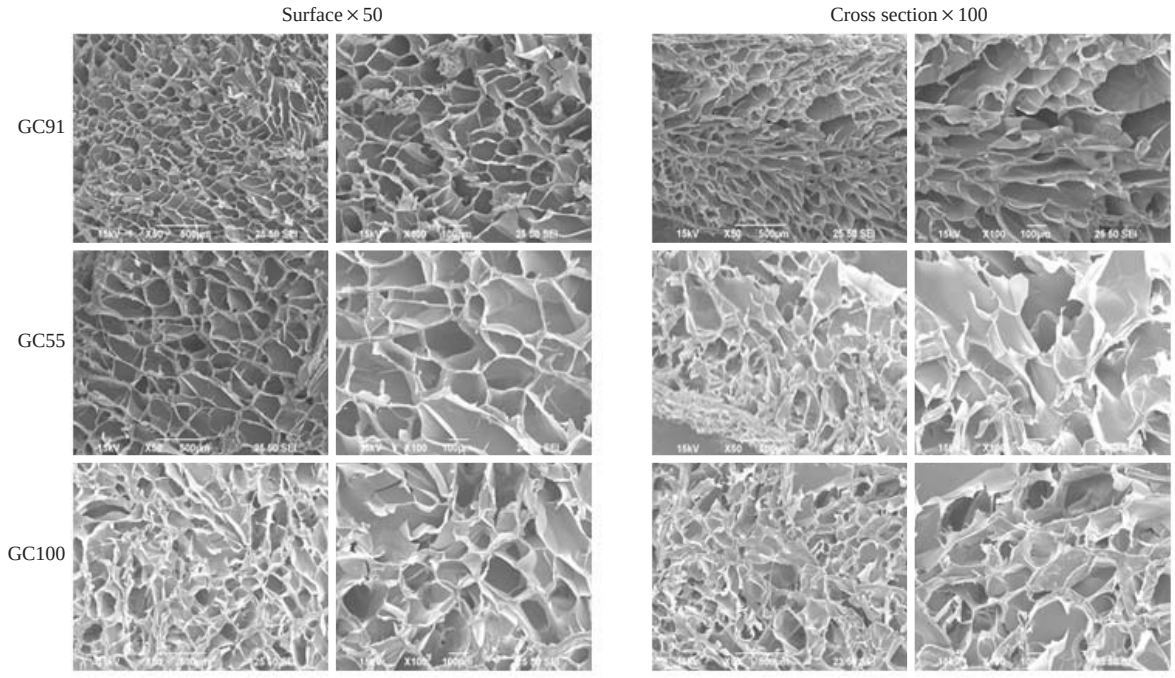

Fig. 3. SEM pictures of the gelatin/citrus gel scaffolds; gelatin (G) : citrus gel (C)=9 : 1, 5 : 5, 10 : 0.

강도를 보여준다(Fig. 1). 지지체의 방사선 조사량은 25 kGy, 50 kGy 였다. 인장강도는 7 MPa, 2.7 MPa의 값을 보였다. 제조된 지지체는 낮은 조사량이었을 때 가교가 잘 되어 인장강도가 높았다는 것보다 높은 조사량에서 가교보다는 분해가 더 많이 일어나서 인장강도가 낮아진 것으로 보인다.

2. 지지체의 조직학적 분석

1) 세포 부착율

감귤 발효겔을 함유한 지지체에서 초기 세포부착 및 성장률이 우월함을 확인할 수 있었다(Fig. 2). 이는 지지체의 다공형태에 따른 표면의 물리적 상태가 세포의 증식을 위한 영양분의 공급에 영향을 미친 것으로 예상된다. 그 결과 감귤 발효겔을 함유한 지지체에서의 규칙적인 다공형태 및 열린 셀 구조가 세포가 부착하고 성장함을 확인할 수 있었다.

2) 세포 지지체의 형태학적 분석

젤라틴과 감귤 발효겔의 함량이 9 : 1, 5 : 5, 10 : 0 wt% 인 지지체를 SEM 분석하였다. Surface ×50와 cross section ×100을 보았다. 기공도와 기공의 크기도 매우 균일하게 유지되는 것이 확인된다. 이러한 기공은 내부로 자유롭게 세포들이 왕래할 수 있는 역할을 하여 지지체 전체에 고르게 세포가 퍼져 자랄 수 있게 해 준다.

3) 지지체의 생체 삽입 내 혈액 염증반응

젤라틴과 감귤 발효겔의 함량이 control, 10 : 0, 9 : 1, 7 : 3, 5 : 5 wt%인 지지체를 삽입한 혈액의 염증반응을 3, 7, 14일 간격으로 알아보았다. 지지체를 삽입하지 않았을 때를 control로 두었다. 호중성 백혈구 수가 증가할수록 염증이 증가한다는 것을 알 수 있다. 호중구와 백혈구 수의 변화가 없는 control과 비교하여 보면, 감귤 발효겔의 함량이 많아질수록 호중구가 증가하였으며, 또한 백혈구의 수도 증가한 것을 볼 수 있다(Figs. 4, 5). 이는 감귤 발효겔의 함량이 많아질수록 염증이 증가한다는 것을 알 수 있었다. 염색을 통해 세포의 핵과 섬유를 많이 관찰할 수 있었다. 이는 세포의 활성이 우수하다는 것을 확인할 수 있다.

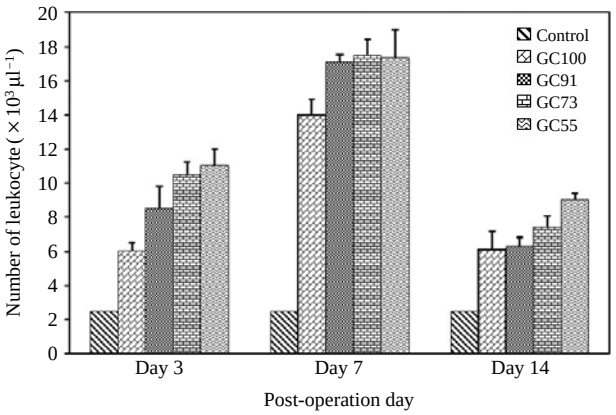

Fig. 4. Number of leukocyte of gelatin (G)/citrus gel (C) scaffolds.

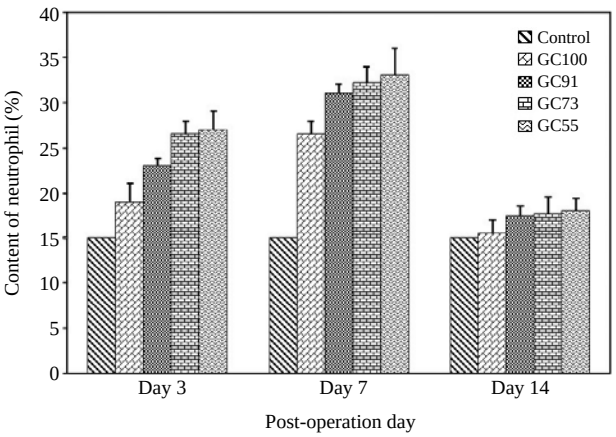

Fig. 5. Content of neutrophil of gelatin (G)/citrus gel (C) scaffolds.

결 론

감귤 발효겔의 방사선 조사량에 따른 지지체의 인장강도를 측정한 결과, 조사선량 25 kGy, 50 kGy 일 때 stress는 7 MPa, 2.7 MPa의 값을 보였다. 이는 낮은 조사량이었을 때 가교가 잘 되어 인장강도가 높았다는 것보다 높은 조사량에서 가교보다는 분해가 더 많이 일어나서 인장강도가 낮아진 것으로 보인다. 감귤 발효겔을 함유한 지지체에서의 규칙적인 다공형태 및 열린 셀 구조가 세포가 부착하고 성장함을 확인할 수 있었다. 세포의 형태학적 분석은 기공도와 기공의 크기도 매우 균일하게 유지되는 것이 확인된다. 이러한 기공은 내부로 자유롭게 세포들이 왕래할 수 있는 역할을 하여 지지체 전체에 고르게 세포가 퍼져 자랄 수 있게 해 준다. 지지체를 채내 삽입하여 혈액 염증반응을 본 결과, control을 비교해 보아 감귤 발효겔의 함량이 많아질수록 호중구가 증가하며, 또한 백혈구의 수도 증가하였다. 이는 감귤 발효겔의 함량이 많아질수록 염증이 증가한다는 것을 알 수 있다.

사 사

본 연구는 농촌진흥청 바이오그린 21 사업단(과제번호: PJOO7177)의 연구비 지원으로 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

Aso Y, Yoshioka S, Nakai Y and Kojiuma S. 1999. Thermally controlled protein release from gelatin-dextran hydrogels. *Radiat Phys. Chem*. **55**:179-183.

Augst AD, Kong HJ and Mooney DJ. 2006. Alginate hydrogels as biomaterials. *Macromol. Biosci.* **6**:623-633.

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

Benziman M, Haigler CH, Brown Jr RM, White AR and Cooper KM. 1980. Cellulose biogenesis: polymerization and crystallization are coupled processes in Acetobacter xylinum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**:6678-6682.

Bernhard P. 2003. Tissue engineering. CRC Press. Boca Raton. pp. 392.

Bok SH, Lee SH, Park Yb, Bae KH, Son KH, Jeong TS and Choi MS. 1999. Plasma and hepatic cholesterol and hepatic activities of 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl CoA reductase and acyl CoA: cholesterol transferase are lower in rat fed citrus peel extract or a mixture of citrus bioflavonoids. *J. Nutr*. **129**:1182-1185.

Carrol KK, Kurowska FM and Guthrie N. 1999. Usa of citrus limonoids and flavonoids as well as tochotrienols for the treatment of cancer. International patent. WO 9916167.

Cheng Z and Teoh SH. 2004. Surface modification of ultra thin poly (-caprolactone) films using acrylic acid and collagen. *Biomaterials.* **25**:1991-2001.

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

Choi KH, Jeong JS, Moon CH and Kim ML. 2004a. Optimization of culture condition of *Gluconacetobacter hansenii* TF-2 for cellulose gel fermentation. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr*. **33**:176-181.

Choi KH, Jeong JS, Moon CH and Kim ML. 2004b. Effect of carbon source supplement on the gel production from citrus juice by *Gluconacetobacter hansenii* TL-2C. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr*. **33**:170-175.

Choi YS, Hong SR, Lee YM, Song KW, Park MH and Nam YS. 1999. Studies on gelatin-containing artificial skin: II. Preparation and characterization of cross-linked gelatin-hyaluronate sponge. Int. *J. Biomed. Mater. Res*. **23**:631-639.

Chung BW, Kim CY, Kang SK and Park BN. 1998. Characteristics of Korean traditional paper containing bacterial cellulose. The Research of Industrial Technology Institute, Chonbuk National University **29**:47-51.

Chung SK, Kim SH, Choi YH, Song EY and Kim SH 2000. Status of citus fiuit production and view of utilization in Cheju. *Food Ind. Nutr*. **5**(2):42-52.

Chung Y and Shyu Y. 1999. The effect of pH, salt, heating and freezing on the physical properties of bacterial cellulose-nata. *International J. Food Sci. Technol*. **34**:23-26.

Cui YL, Hou X, Qi AD, Wang XH, Wang H, Cai KY, Yin YJ and Yao KD. 2003. Biomimetic surface modification of poly (L-lactic acid) with gelatin and its effects on articular chondrocytes *in vitro*. *J. Biomed. Mater. Res*. **66**:770-778.

Daamen WF, Veerkamp JH, van Hest JC and van Kuppevelt TH. 2007. Elastin as a biomaterial for tissue engineering. *Biomaterials* **28**:4378-4398.

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

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

Hutmacher DW, Schantz T, Zein I, Ng KW, Teoh SH and Tan KC. 2001. Mechanical properties and cell cultural response of polycaprolactone scaffold designed and fabricated via-fused deposition modeling. *J. Biomed. Meter. Res*. **55**:203-216.

Jeon EK, Whang HJ, Kang GG, Lee I, Rhee JM and Lee HB. 2001. Preparation and release profile of NGF-loaded poly-lactide scaffolds for tissue engineered nerve regeneration. *Polymer. Korea* **25**(6):893-901.

Kana I, Tojiro T, Yoko T, Nobuji N and junji T. 1995. antioxidative activity of quercetin and quercetin monoglucosides in solution and phosphlipid bilayers. *Bioch. Biophy. Acta*. **1234**:99-104.

Khang G, Lee SJ and Lee HB. 2002. Polymer-cell inter-tastion. p. 297. *In*: Tissue Engineering: Concepts and Application (Yoo JJ and Lee I *eds*.), Korea Med. Pud. Co., Seoul.

Kim SH, Yun SJ, Jang JW, Kim MS, Khang G and Lee HB. 2006. Effects of SIS/PLGA porous scaffolds and muscle-derived stem cell on the formation of tissue engineered bone. *Polymer. Korea* **30**:14-21.

Klemm D, Schumann D, Udhardt U and Marsch S. 2001. Bacterial synthesized cellulose-artificial blood vessels for microsurgery. *Prog. Polym. Sci*. **26**:1561-1603.

Lee SB, Joen HW, Lee YW, Lee YM, Song KW, Park MH, Nam Y and Ahn HC. 2003. Bio-artificial skin composed of gelatin and (1→3), (1→6)-β-glucan. *Biomaterials* **24**: 2503-2511.

Lee Y, Howard L.R. and villalon B. 1995. Flavonoids and antioxidant activity of fresh peppers (Capsicum annuaum)

cultivars. *Jllalon Sci*. **60**:473-476.

Li Z, Ramay HR, Hauch KD, Xiao D, Zhang M. 2005. Chitosan-alginate hybrid scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* **26**:3919-3928.

Mao JS, Liu HF, Yin YJ and Yao KD. 2003. The properties of chitosan-gelatin membranes and scaffolds modified with hyaluronic acid by different methods. *Biomaterials* **24**:1621-1629.

Marie HS, Jole L, Marie C, Canivenc L, Patrick R and Marc S. 1995. Heterogenous effects of natural flavonoids on monoxygenase activites in human and rat liver microsomes. *Toxicol. Appl. Pharmacol* **130**:73-78.

Mikos AG and Temenoff JS. 2000. Formation of highly porous biodegradable scaffolds for tissue engineering. *Electron. J. Biotechnol.* **3**: 2.

Park SN, Park JC, Kim HO, Sung MJ and Suh H. 2002. Characterization of porous collagen/hyaluronic acid scaffold modified by 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide cross-linking. *Biomaterials* **23**:1205-1212.

Pierre S, Xavier R and Basil DF. 2004. Controlled preparation and properties of porous poly (-lactide) obtained from a co-continuous blend of two biodegradable polymers. *Biomaterials* **25**:5965-5978.

Segura T, Anderson BC, Chung PH, Webber RE, Shull KR and Shea LD. 2005. Crosslinked hyaluronic acid hydrogels: a strategy to functionalize and pattern. *Biomaterials* **26**:359-371.

Shin HW, Kim SH, Jang JW, Kim MS, Cho SH, Lee HB and Khang KS. 2004. Preparation and characterization of sponge using porcine small intestinal submucosa. *Polymer. Korea* **28**:194-200.

Smitha B, Sridhar S and Khan AA. 2005. Chitosan-sodium alginate polyion complexes as fuel cell membranes. *Polym. J.* **41**:1859-1866.

Son HS, Kim HS, Kwon TB and Ju JS. 1992. Isolation purification and hypotensive effects of bioflavoids in citus sinensis. *J. Korean Soc. Food Nutr.* **21**:136-142.

Sutherlan IW. 1998. Novel and established 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.

Yilmaz G, Jongboom ROJ, Feil H and Hennink WE. 2001. Encapsulation of sunflower oil in starch matrices via extrusion: effect of the interfacial properties and processing conditions on the formation of dispersed phase morphologies. *Carbohyd. Polym*. **45**:403-410.

Zisch AH, Zeisberger SM, Ehrbar M, Djonov V, Weber CC, Ziemiecki A, Pasquale EB and Hubbell JA. 2004. Engineered fibrin matrices for functional display of cell membrane-bound growth factor-like activities: Study of angiogenic signaling by ephrin-B2. *Biomaterials* **25**:3245-3257.

Manuscript Received: November 26, 2010
Revision Accepted: November 30, 2010