

미생물 고정화를 위한 광경화성 하이드로겔의 합성과 특성

김 조 응 · 이 정 복[†] · 김 두 현 · 황 정 민* · 조 종 수** · 최 영 훈*** · 정 대 원***

기술표준원, *동성화학 중앙연구소, **서울대학교 생물자원공학부, ***수원대학교 고분자공학과
(1999년 3월 8일 접수, 1999년 8월 6일 채택)

Synthesis and Characteristics of Photo-crosslinkable Hydrogel for Microbial Immobilization

Cho Woong Kim, Jung Bock Lee[†], Du Hyun Kim, Jung Min Hwang*, Chong Su Cho**,
Young Hoon Choi***, and Dae-Won Chung***

Agency for Technology and Standards, Kwacheon 427-010, Korea

*Dongsung Chemical Co. Ltd., Pusan 604-030, Korea

**Division Biological Resources and Materials Engineering, Seoul National University, Suwon 441-744, Korea

***Department of Polymer Engineering, The University of Suwon, Suwon 440-600, Korea

(Received March 8, 1999; accepted August 6, 1999)

요 약: 산업폐수중의 질소·인 제거에 유용한 미생물을 고정화할 수 있는 담체의 제조를 목적으로 하여, 양 말단이 methacryl기로 치환된 poly(ethylene glycol)(PEG) 및 Poly(tetramethylene glycol)(PTMG)을 합성하였다. 합성된 프레폴리머와 UV조사하에서 가교한 하이드로겔의 구조는 ¹H-NMR, FT-IR 분광기로 확인하였다. 프레폴리머 사슬의 길이(M.W. 1,000~8,000) 또는 PEG/PTMG의 혼합비를 달리하면서 광경화된 하이드로겔을 제조하였다. 광경화물의 친수성, 흡수율, 기계적 강도 등과 같은 광경화 특성 및 pore size 등을 조사한 결과, 분자량 1000인 PEG 및 PEG(MW1000)와 PTMG (MW2900)를 7:3의 비율로 제조한 하이드로겔에서 최적의 결과를 나타내었다.

Abstract: The objective of this study was to prepare hydrogel beads which were useful microbial immobilization to remove nitrogen and phosphorous in the industrial wastewater. Two different polyols(PEG, PTMG) terminated with photo-crosslinkable methacrylate groups were synthesized. Structures of the prepolymers and the UV cured hydrogels were characterized by using ¹H-NMR and FT-IR spectroscopy. Water content, mechanical strength and pore sizes of the hydrogels having different MW of polyols and different ratios of PEG/PTMG were investigated. Hydrogels prepared from PEG(MW1000) only or the mixture of PEG(MW1000) and PTMG(MW2900) with 7:3 by weight were considered as potential candidates for the matrix for the immobilization of microorganism.

Keywords: immobilization, UV cured hydrogels, polyols, microorganism

1. 서 론

수팽윤성 고분자는 높은 흡수성과 강한 보수력을 갖는 고흡수성 고분자로서 종래의 흡수재료로서 사용되던 펄프, 면, 우레탄스폰지나 해면 등과는 비교할 수 없는 고흡수능을 갖는다. 즉 자체무게의 수백 혹은 수천 배의 물을 흡수, 팽윤, 겔화하며 일단 팽윤된 겔은 스펀지나 펄프와는 달리 다소의 압력을 받아도 물을 보유할 수 있는 강한 보수력을 갖는다[1]. 이러한 수팽윤성 고분자중 하이드로겔은 화학, 이온, 수소, 또는 물리적 결합을 통해서 가교되어진 고분자로서 수성의 매질에 용해됨이 없이 많은 양의 매질을 흡수 보유할 수 있는 성질을 가지고 있다. 이러한 능력은 주사술에 부착된 친수기의 양에 의해 결정되고 용해에 대한 저항성은 사슬의 가교에 의해 결정된다[2-5]. 하이드로겔의 친수성은 팽윤된 하이드로겔의 부드러움과 고무상의 성질로 인해 주위의 세포나 조직과의 계면 마찰을 최소화하게 하여 그들 대부분을 생체 적합하게 하고 또

한 선택적 투과성, 물리화학적 안정성 등의 특성으로 인해 세포 고정화의 분야에서 연구되어지고 있다. 성공적인 세포 고정화를 위해서 하이드로겔은 산소, 영양분, 대사산물이 하이드로겔 망상구조를 통해 충분히 확산·이동할 수 있는 적절한 투과성과 생체적합성을 지녀야 하며, 무독성이고 불활성이어야 한다[6,7].

하이드로겔을 합성하는데 있어서 여러 방법 중 반응성이 있는 프레폴리머구조를 폴리머화시키는 효과적인 수단으로 알려져 있는 자외선 조사 방법이 있는데, 이 기술은 대부분의 형성물이 100% 반응성이 있는 프레폴리머와 희석제이기 때문에 높은 생산성, 낮은 에너지 사용도, 그리고 단순히 용매를 사용하는 경우보다 낮은 용매 발산 등의 이점을 안고 있다[8-12].

포괄고정화미생물의 적용범위로 식품·의약품의 제조, 분석기술의 개발, 생활폐수·산업폐수의 효율적 처리를 들 수 있는데[13], 최근 Ichimura 등[14]의 연구보고에 따르면 광경화성 stilbazole기를 갖는 PVA 흡수겔을 합성하여 질화균의 고정화에 사용한 바 있고, Kansai Paint사가 개발한 광경화성 수지인 ENT3800에 균을 고정화하여 알콜발효를 파이롯트 플랜트규모로 운전한 실적이 있으며, 폐수처리에도 유망시되고 있다[15].

[†] 주 저자 (e-mail: jblee@ats.go.kr)

본 연구에서는 폐수처리 등의 용도로 활용가능한 균을 고정화할 수 있는 하이드로겔의 제조방법 확립을 목적으로 하여, 친수성, 무독성, 비항원성, 그리고 생체적합성이 있다고 알려져 있는 poly(ethylene glycol)(PEG) 및 팽윤성 조절을 위해 도입하는 소수성 물질인 Poly(tetramethylene glycol) (PTMG)의 양 말단에 아크릴기를 도입한 프레폴리머를 합성하여, UV 조사하에서 하이드로겔을 제조하였다. 각각의 성분의 분자량 및 두 성분의 함량비의 변화에 따른 하이드로겔의 겔함량, 팽윤도 및 물성변화를 조사하였으며, SEM 사진을 통하여 하이드로겔의 pore size 및 분포를 관찰하였다.

2. 실험

2.1. 실험재료

합성에 사용한 MW 1000, 8000의 PEG는 Aldrich사의 제품을 사용하였고, MW 4000의 PEG와 MW 2900 PTMG는 Polyscience사의 제품을 사용하였으며, MW 1000의 PTMG는 동성화학의 제품을 50 °C에서 진공 건조하여 잔류수분을 제거하고 사용하였다. 광중합개시제인 α, α -dimethoxy- α -phenyl-acetophenone은 Fluka사 제품을 사용하였으며, 또한, bead제조시 사용되었던 sodium alginate, calcium chloride는 일본의 Kanto사 제품을 사용하였다. 시약내에 포함되어 있는 중합금지제를 제거할 목적으로 methacryloyl chloride는 Aldrich사의 제품을 진공 증류법에 의해서 정제하여 사용하였다[16]. 그 외 시약들은 특급시약을 정제하지 않고 그대로 사용하였다.

2.2. 기기 분석

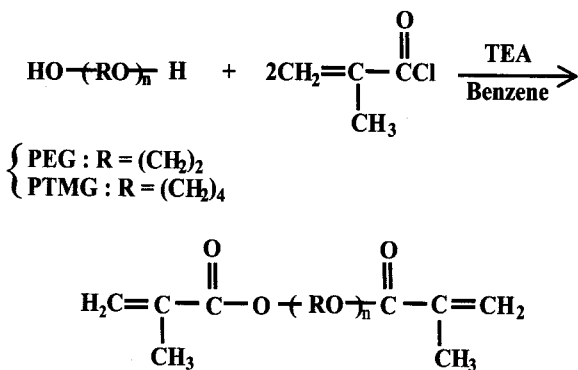
프레폴리머의 합성 여부를 확인하기 위하여 UNITY plus 300 system NMR spectrometer(300 MHz)를 이용하여 spectrum을 측정하였고, 가교 여부를 조사하기 위한 IR spectrum은 Nicolet사의 800 FT-IR spectrometer에 의해 측정하여 얻었다.

인장강도는 Instron사의 만능재료 시험기를 사용하여 10 mm/min의 인장속도로 인장하였고, 하이드로겔을 24시간 동결건조하고 다시 40 °C에서 진공 건조한 후 단면형상을 SEM(Hitachi, S-2700)으로 조사하였다.

2.3. 실험방법

2.3.1. 담체용 프레폴리머의 합성

광경화성 프레폴리머는 Scheme 1에 나타낸 것과 같이, PEG와 PTMG의 양 말단의 하이드록시기를 acrylation하여 합성하였다. 이 중에서 PEG의 합성 예를 들면, MW 4,000인 PEG 6 g(3.4



Scheme 1.

mmol)을 500 mL의 삼구 플라스크에 넣고 30 mL benzene을 첨가한 다음, 60 °C의 온도로 유지된 oil bath에서 교반하면서 용해시켰다. 그리고 methacryloyl chloride 0.68 mL(7 mmol)를 넣은 후 triethylamine 1 mL(7.2 mmol)를 첨가하여 3시간 동안 반응시켰다. 이 반응은 질소기류하에서 수행하였다.

반응이 끝난 후 반응물을 실온으로 냉각시킨 다음, 반응물 중의 침전된 염인 triethylamine hydrochloride를 여과분리하여 제거한 후, 여액을 과량의 n-hexane에 한 방울씩 적하하여 침전시키므로써 poly(ethylene glycol) dimethacrylate를 얻을 수 있었다. 여기서 얻은 프레폴리머는 40 °C에서 진공 건조하였다. 분자량이 다른 PEG 및 PTMG의 프레폴리머도 동일한 방법에 의해서 합성하였다.

2.3.2. UV-cured film의 제조

상기와 같이 합성한 프레폴리머를 1 wt %의 광개시제와 함께 1 g/mL의 농도가 되도록 CH₂Cl₂에 용해시켰다. 이를 applicator를 사용하여 1 mm의 두께로 유리판에 도포한 후 실온에서 longwave mercury spot lamp(100 W, UVP Inc.)로 10분간 조사하였다. Film은 40 °C의 vacuum oven에서 건조하였다.

2.3.3. Gel content 측정

경화된 film을 에탄올로 24시간 동안 추출한 후, 40 °C의 진공 oven에서 하루동안 건조시켰다. Film의 gel content는 추출전의 sample 무게와 추출후의 sample무게를 측정하여 아래의 식에 의해 얻었다. W₀와 W는 추출전과 후의 무게를 각각 나타낸다.

$$\text{gel content (wt.-%)} = W / W_0 \times 100$$

2.3.4. 함수율 측정

UV-cured film을 충분히 건조시킨 후 실온에서 증류수에 침적하여 일정한 시간 간격으로 sample 표면의 물을 신속히 filter paper로 제거한 후 무게를 측정하였다. 무게의 변화가 없을 때까지 반복하여 다음과 같은 식에 의해 함수율을 측정하였다.

$$\frac{(W_s - W_d)}{W_s} \times 100$$

W_s : wet weight W_d : dry weight

2.3.5. 인장강도 측정

UV-cured film을 한국 산업규격(KS M 3054)에 따라서 4호형의 인장시험편 틀칼로 따내어 시험편을 만들었다. 측정기의 인장속도는 10 mm/min의 속도로 인장하였고, 측정된 인장강도는 아래 식과 같이 계산된다.

$$T_B = F_B / A$$

T_B : 인장강도 [kgf/cm² (MPa)]
F_B : 최대하중 [kgf (N)]
A : 시험편의 단면적 [cm² (m²)]

2.3.6. 고정화 담체 성형

에탄올에 프레폴리머 45 wt %, CaCl₂ 2 wt %를 녹이고 프레폴리머 무게에 대하여 1 wt %의 광개시제를 함께 녹인 용액에 폐수처리시설에서 채취한 농축 황성슬러지를 프레폴리머와 1:1 (W:W)의 비로 혼합하였다. 그리고 준비된 혼합액을 0.005 g/mL의 농도로 균일하게 녹인 sodium alginate 수용액에 주사기(Φ2 mm)로 dropping하였다. 형성된 bead는 실온에서 longwave mercury spot lamp(100 W, UVP Inc.)로 10분간 조사한 후 증류수에 세척하였다.

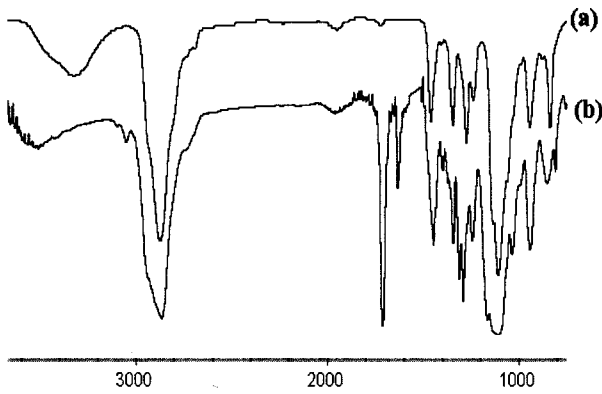


Figure 1. IR spectra of PEG(MW1,000)(a) and its prepolymer(b).

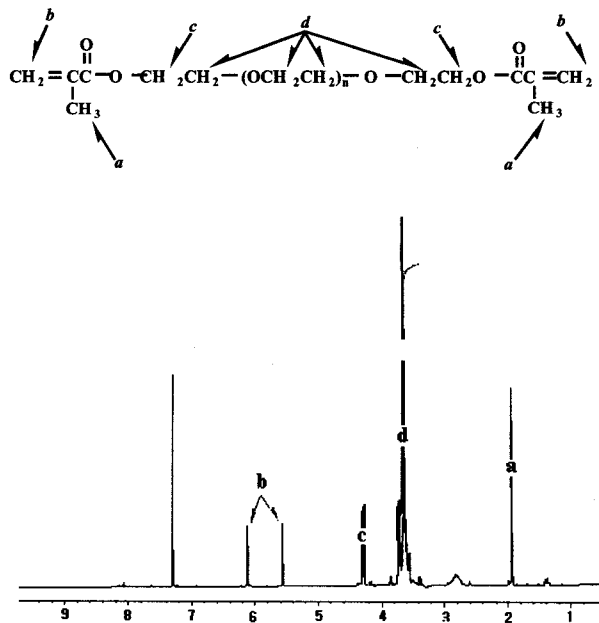


Figure 2. ¹H-NMR spectrum of PEG(MW1,000).

3. 결과 및 고찰

3.1. 합성 및 구조해석

PEG 4,000과 PEG 4,000의 프레폴리머의 FT-IR spectra를 Figure 1에 나타내었다. PEG 프레폴리머의 IR spectrum에서는, 새로 형성되는 에스터기의 carbonyl bond에 의한 흡수대가 1719 cm⁻¹에 강하게 나타나는 것을 알 수 있었다.

PEG (MW1,000) 및 PTMG (MW2,900) 프레폴리머에 대한 ¹H-NMR spectrum을 각각 Figures 2와 3에 나타내었다. Figure 2에서 methacryl기에 의해 나타나는 a, b 피크 및 양 말단이 에스터기로 치환되므로써 새롭게 나타나는 PEG 말단의 -CH₂- 피크(c)에 의해서 원하는 반응이 일어났음을, 또한 PEG 양 말단의 하이드록시가 전부 methacryl기로 치환되었음을 알 수 있었다. 즉, PEG의 양 말단에 ester기가 새롭게 생성되므로써 나타나는 말단의 -CH₂- 피크와 vinyl group의 피크(b)의 적분치가 1:1에 해당한다. 또한 PEG의 평균분자량을 고려한 Figure 2(d)와 2(b)의 적분치로부터 PEG 양말단의 하이드록시가 전부 methacryl기로 치환된 것을 확인하였다.

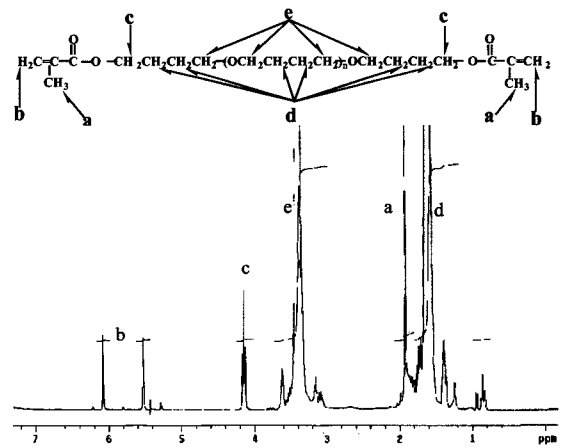


Figure 3. ¹H-NMR spectrum of PTMG(MW2,900).

Table 1. Composition of Hydrogels

Code No.	MW of PEG	MW of PTMG	Weight ratio of prepolymers (PEG : PTMG)
E1	1,000	-	100 : 0
E1T1-7/3	1,000	1,000	70 : 30
E1T1-5/5	1,000	1,000	50 : 50
E1T1-3/7	1,000	1,000	30 : 70
T1	-	1,000	0 : 100
E1T3-7/3	1,000	2,900	70 : 30
E1T3-5/5	1,000	2,900	50 : 50
E1T3-3/7	1,000	2,900	30 : 70
T3	-	2,900	0 : 100
E4	4,000	-	100 : 0
E4T3-7/3	4,000	2,900	70 : 30
E4T3-5/5	4,000	2,900	70 : 30
E4T3-3/7	4,000	2,900	70 : 30
E8	8,000	-	100 : 0
E8T3-7/3	8,000	2,900	70 : 30
E8T3-5/5	8,000	2,900	50 : 50

PTMG의 경우에도 동일한 방법으로 확인하였다.

이와 같이 합성한 PEG 및 PTMG 프레폴리머로부터 제조한 하이드로젤의 종류 및 본 논문에서 사용하는 Code No.를 Table 1에 정리하였다.

3.2. UV-curing

Vinyl group은 1636, 1401, 815 cm⁻¹에서 흡수대를 가진다[12]. PEG(MW1,000) 및 자외선 조사를 전후한 프레폴리머의 FT-IR spectra(Figure 4)를 나타낸 바와 같이, 1636 cm⁻¹부근에서 PEG 자체에 흡수대가 나타나므로 이 피크로써 직접 비교하기는 어려우나, 또 다른 흡수대(1401, 815 cm⁻¹)로 비교시 조사전의 double-bond 피크는 자외선 조사 후의 spectrum에서는 나타나지 않았다. 이것으로 자외선 조사로 인해 double-bond가 소멸되어 거의 전부가

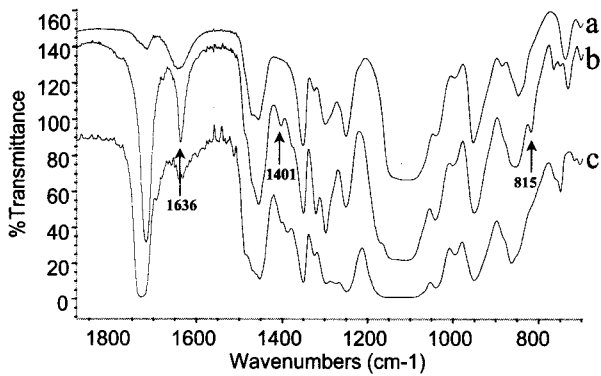


Figure 4. FT-IR spectra of PEG(a), E1 before(b) and after(c) UV irradiation.

crosslinking되었음을 확인할 수 있었다.

3.3. Gel content 측정

Gel content는 자외선 조사에 의해 경화된 고분자의 수득율로도 생각할 수 있는데 Table 2에 나타난 것처럼 E1이 90.1%로 가장 높았다. 그리고 PEG의 분자량이 증가함에 따라 수득율은 감소하는 경향을 보이는데 이는 사슬의 길이가 길어져서 영겨어져 말단의 이중결합이 충분히 가교를 이룰 수 있는 조건을 방해하기 때문으로 생각되어진다. 특히 E8의 경우에는 매우 낮은 gel content를 나타내, 광경화가 거의 일어나지 않는다는 사실을 시사했다.

3.4. 흡수율 측정

PEG의 분자량이 서로 다른 하이드로젤의 흡수율을 Table 2에 나타내었다. PTMG를 골격으로 하는 하이드로젤을 제외한 대부분은 1시간 내에 빠른 속도로 팽윤하여 시간이 경과함에 따라 평형 상태에 이르는 것을 확인 할 수 있었다. 또한 PEG만 사용한 하이드로젤의 경우에는 PEG의 분자량이 클수록 하이드로젤이 흡수율

도 큰 것을 알 수 있었는데, 이는 PEG분자량이 커질수록 골격내의 친수성기가 증가하게 되기 때문으로 사료된다. 그리고, PEG의 weight fraction이 증가함에 따라 흡수율도 증가하는 양상을 보였는데, 이 역시 polymer matrix내의 PEG함량이 증가하면서 친수성이 증가하기 때문으로 생각된다.

3.5. 인장강도 측정

팽윤을 조절을 위해 도입한 소수성의 PTMG가 경화된 polymer의 기계적 물성에 미치는 영향을 조사하기 위해 인장실험을 하였다. 그 결과를 Table 2에 나타내었는데 흡수율, 인장강도, 연신율 등의 상관관계를 명확하게 구별할 수는 없었으나, T3의 인장강도와 비교하여 상대적으로 큰 수치를 보이는 E4의 경우 소수성인 PTMG의 weight fraction이 증가함에 따라 인장강도가 감소하는 경향을 보였다. 건조상태에서는 E4가 60.16 kgf/cm²로 다른 polymer에 비해 높은 인장강도를 나타내었으나, 팽윤상태에서는 E1 및 E1T3-7/3이 각각 11.9 및 10.2 kgf/cm²로 다른 고분자들에 비해 높은 인장강도를 나타내었다. 그러나 다른 고분자들은 건조상태에서와 비슷하거나 급격한 인장강도의 감소를 보였다. 신장율은 팽윤상태에서 6~35% 범위로 대부분의 고분자들이 건조상태에서와 비교하여 증가하였다. 미생물을 고정화하기 위한 담체로 사용하기 위해서는 연신율보다도 인장강도가 더욱 중요시된다. 즉, 팽윤상태에서의 인장강도가 건조상태보다 저하되지 않을 필요가 있다는 점을 고려하면, 본 연구에서 제조한 하이드로젤 중에서는 E1 또는 E1T3-7/3이 최적의 것으로 판단된다.

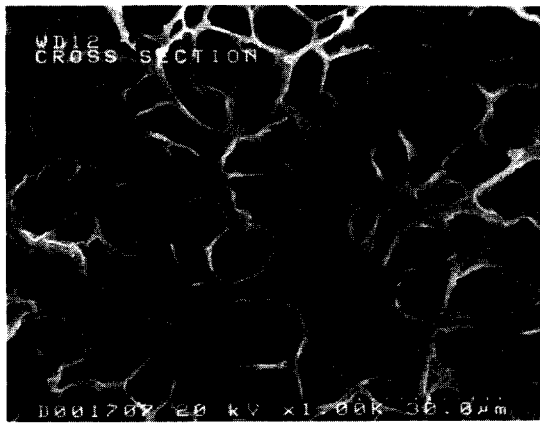
3.6. SEM 분석

하이드로젤의 단면형상을 관찰하기 위해 E1을 SEM으로 조사한 결과(Figure 6 (a)) 약 15~50 μm 정도의 pore가 비교적 균일하게 형성되어 있는 것을 관찰할 수가 있었으며, 성상이 다른 하이드로젤에서도 유사한 결과가 얻어졌다. 이는 미생물이 적절히 flock을 형성하여 대사작용을 원활히 할 수 있는 크기라 판단되어지며[17], Figure 6 (b)는 활성슬러지의 고정화 후 15일간 폐수처리 반응기

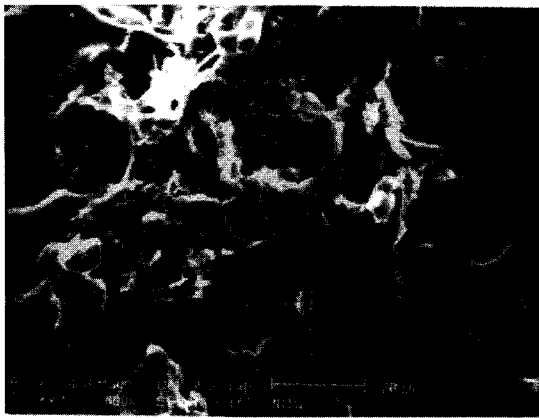
Table 2. Water Contents, Gel Contents and Mechanical Properties of Prepared Hydrogels

Code No.	Water content(%)	Gel content(%)	Tensile strength(kgf/cm ²)		Elongation at break(%)	
			dry	wet	dry	wet
E1	51.4	90.1	6.3	11.9	8.4	16.1
E1T3-7/3	53.6	82.7	5.2	10.2	12.4	14.1
E1T3-5/5	44.9	62.3	4.8	5.1	22.3	21.4
E1T3-3/7	55.2	53.5	8.6	5.4	26.8	28.6
E1T1-7/3	52.2	87.6	14.8	NM	10.7	NM
E1T1-5/5	51.1	82.2	19.8	NM	9.8	NM
E1T1-3/7	49.9	87.8	5.6	NM	26.5	NM
E4	79.1	90.1	60.2	0.5	13.4	6.6
E4T3-7/3	71.9	67.7	32.5	NM	3.6	NM
E4T3-5/5	64.3	45.4	34.9	1.6	8.9	16.1
E4T3-3/7	56.5	44.7	10.3	5.8	6.3	7.1
E8	91.8	36.1	20.8	0.1	2.7	14.3
E8T3-7/3	87.9	43.6	25.0	NM	3.6	NM
E8T3-5/5	84.4	26.9	5.9	NM	6.3	NM
T1	17.6	83.6	7.2	6.5	27.3	30.6
T3	19.4	26.2	5.6	6.0	20.8	35.7

NM: non-measurable



(a)



(b)

Figure 5. Cross-sectional SEM photographs(X1.00K) of hydrogel beads. (a) before immobilization (b) after immobilization of activated sludge.

에 적용된 하이드로겔 bead의 단면형상으로 활성슬러지가 고정화되어 있음을 확인할 수 있었다. 이로써 향후 미생물을 고정화한 담체로서의 활용에 적합하리라고 사료된다.

4. 결 론

PEG 및 PTMG의 양 말단에 methacryl기를 도입한 프레폴리머를 합성하여, UV조사하에서 가교하므로써 하이드로겔을 제조할 수 있었다. 프레폴리머 사슬의 길이(M.W. 1,000~8,000) 또는 PEG/PTMG의 혼합비를 달리하면서 제조한 하이드로겔의 gel

content, 흡수율 및 인장강도 등과 같은 광경화 특성 및 SEM 사진을 통하여 pore size 등을 조사한 결과, 분자량 1000인 PEG 또는 PEG (MW1000)와 PTMG(MW2900)를 7:3의 비율로 제조한 하이드로겔이 미생물을 고정화할 수 있는 담체로서 최적의 결과를 나타내었다.

감 사

본 연구는 1998년도 산업자원부 공업기반기술 개발과제에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. L. Zeng and E. O. Stejskal, *Appl. Spectrosc.*, **50**, 1402 (1996).
2. A. C. Jen, M. C. Wake, and A. G. Mikos, *Biotechnol. Bioeng.*, **50**, 357 (1996).
3. Y. M. Lee and S. S. Kim, *Polymer*, **38**, 2415 (1997).
4. A. M. Mathur, S. K. Moorjani, and A. B. Scranton, *Macromol. Chem. Phys.*, **C36(2)**, 405 (1996).
5. N. Vyavahare and J. Kohn, *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.*, **32**, 1271 (1994).
6. G. King and M. F. A. Goosen, "Fundamentals of animal cell encapsulation and immobilization", pp. 1-6, CRC press (1993).
7. M. F. A. Goosen, "Fundamentals of animal cell encapsulation and immobilization", pp. 43-54, CRC press (1993).
8. J. P. Fouassier and J. F. Rabek, "Radiation Curing in Polymer Science and Technology", Elsevier Sci., NY (1993).
9. B. K. Kim, K. H. Lee, and H. D. Kim, *J. Appl. Polym. Sci.*, **60**, 799 (1996).
10. H. D. Kim, S. G. Kang, and C. S. Ha, *J. Appl. Polym. Sci.*, **46**, 1339 (1992).
11. B. S. Chiou, R. J. English, and S. A. Khan, *Macromol.* **29**, 5368 (1996).
12. A. Priola, G. Gozzelino, F. Ferrero, and G. Malucelli, *Polymer*, **34**, 3653 (1993).
13. 順藤隆一, "微生物固定化法による排水処理", 産業用水調査會, 日本 (1987).
14. K. Ichimura, K. Mishima, and A. Watanabe, *J. of water and waste*, **29**, 742 (1987).
15. T. Iida, M. Sakamoto, H. Izumida, and T. Akagi, *J. of Fermentation and bioengineering*, **75**, 32 (1993).
16. 大津隆行, 木下雅設, "高分子合成の實驗法", 化學同人, 日本 (1976).
17. Y. G. Du, R. D. Tyagi, and R. Bhamidimarri, *Process Biochem.*, **31**, 753 (1996).