

전자선 조사에 의한 온도응답성 나노섬유 표면의 제조 및 특성분석

전현애 · 오환희 · 김영진 · 고재역 · 정호운* · 강인규** · 김원일*** · 권오형†

금오공과대학교 고분자공학과, *경북대학교병원 성형외과학교실,

경북대학교 고분자공학과, * (주)원바이오젠

(2008년 2월 29일 접수, 2008년 5월 5일 수정, 2008년 5월 7일 채택)

Fabrication and Characterization of Thermo-responsive Nanofibrous Surfaces Using Electron Beam Irradiation

Hyeon Ae Jeon, Hwan Hee Oh, Young-Jin Kim, Jae Eok Ko,
Ho Yun Chung*, Inn-Kyu Kang**, Won Il Kim***, and Oh Hyeong Kwon†

Department of Polymer Science and Engineering,

Kumoh National Institute of Technology, Gumi 730-701, Korea

*Department of Plastic and Reconstructive Surgery,

Kyungpook National University Hospital, Deagu 700-721, Korea

**Department of Polymer Science and Engineering,

Kyungpook National University, Deagu 702-701, Korea

***Research and Development Center, WONBIOGEN Co., Gumi 730-701, Korea

(Received February 29, 2008; Revised May 5, 2008; Accepted May 7, 2008)

초록 : 전기방사법에 의해 미생물 유래의 나노섬유 부직포를 제조하였고, 전자선조사에 의해 나노섬유상에 poly (*N*-isopropylacrylamide) (PIPAAm)을 그래프트함으로써 온도응답성 나노섬유표면을 제조하였다. 얻어진 나노섬유는 랜덤하게 배열되었으며 평균직경이 400 nm이었다. ATR-FTIR 및 ESCA 분석에 의해서 PIPAAm이 나노섬유 표면에 성공적으로 그래프트되었음을 확인하였다. PIPAAm을 그래프트 하지 않은 표면에서는 물접촉각의 변화가 없었으나, PIPAAm이 그래프트된 나노섬유 표면에서는 온도가 37 °C에서 20 °C로 바뀔 때 물접촉각이 감소하였다. 이러한 결과는 PIPAAm이 그래프트된 표면에서 높은 온도에서는 소수성의 특성을 가지다가, 낮은 온도에서는 PIPAAm 사슬이 수화되면서 친수성으로 바뀌었기 때문이다. 제조한 온도응답성 나노섬유는 조직적합성이 우수하였으며, 저온처리에 의해 배양세포가 원활히 탈착·회수됨을 알 수 있었다.

Abstract : We have fabricated a novel thermo-responsive nanofibrous surfaces by grafting PIPAAm by electron beam irradiation onto poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV) nanofibrous mats. The electrospun PHBV nanofiber structures revealed randomly aligned fibers with average diameter of 400 nm. Increased atomic percent of nitrogen was observed on the PIPAAm-grafted PHBV mats after electron beam irradiation determined by ESCA. The amounts of PIPAAm-grafted onto PHBV films were 6.49 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ determined by ATR-FTIR. The PIPAAm-grafted surfaces exhibited decreasing contact angles by lowering the temperature from 37 to 20 °C, while ungrafted PHBV surfaces had negligible contact angle change. This result indicates that PIPAAm surfaces, which are hydrophobic at the higher temperature, became markedly more hydrophilic in response to a temperature reduction due to spontaneous hydration of the surface-grafted PIPAAm. Thermo-responsive nanofibers showed good tissue compatibility. Cultured cells were well detached and recovered from the surfaces by changing culture temperature from 37 to 20 °C.

Keywords : electrospinning, nanofiber, thermo-responsive property, electron beam irradiation, surface modification.

서 론

최근 생체조직공학이라는 새로운 학문이 급속도로 발전하고 있다.

생체조직공학이란 “공학과 생명공학의 협력에 의해서 생명기능의 회복, 유지, 개선 등을 가능하게 하는 장기 또는 생체조직의 대용품을 개발하는 것을 목적으로 하는 경계학문”이라고 할 수 있으며, 생체밖에서 생체조직을 배양하여 생체에 이식하는 것을 목적으로 하는 연구 분야이다.¹⁻⁴ 최근의 생체조직공학 및 재생의료분야에서는 생분해성

†To whom correspondence should be addressed.
E-mail: ohkwon@kumoh.ac.kr

고분자를 지지체로 사용하여 3차원적인 생체조직을 구축함에 있어서 줄기세포를 활용함으로써 보다 생체에 가까운 조직을 재생하려는 연구가 주를 이루고 있다.⁵⁻⁸

한편, 세포원으로 사용되는 줄기세포는 계대배양을 거쳐 그 개체수를 늘이면서 사용되고 있다. 일반적으로 줄기세포의 계대배양을 위한 회수법으로는 트립신과 같은 단백질분해 효소나 2가의 양이온킬레이트를 사용하고 있다. 그러나 이러한 방법에서는 세포표면에 존재하는 많은 종류의 막단백질이 분해되기 때문에 세포에 큰 손상을 주게 되며 세포장애를 불러올 수 있으며, 따라서 몇 대에 걸쳐 세포를 배양함으로써 세포분화 기능의 소실을 우려하지 않을 수 없다. 실제로 골수유래 간엽줄기 세포는 10회 이상의 계대배양에서 증식능력이 급격하게 감소하고, 분화능력의 저하, 형질변화 및 노화현상 등이 일어나며 이는 트립신과 같은 단백질분해 효소의 사용이 주원인으로 추측되고 있다.^{9,10} 따라서 조직공학 및 재생의료 분야에서 줄기세포가 널리 응용되기 위해서는 반드시 극복해야 할 과제로 대두되고 있다. 특히, 줄기세포는 단백질 분해효소처리에 대해 지극히 높은 감수성을 가지므로 비침략적인 방법으로 세포를 회수하는 것이 중요하다고 할 수 있다.

한편, 비침략적인 배양세포의 회수를 위해 온도응답성 고분자인 PIPAAm을 사용하는 연구가 보고되고 있다. PIPAAm은 수용액에서 32 °C를 경계로 그 이하에서는 친수성, 그 이상에서는 소수성으로 바뀌는 온도응답성 고분자이다. 이러한 고분자를 세포배양표면에 그래프트함으로써 37 °C의 소수성 환경에서 세포를 배양하고 32 °C 보다 낮은 온도에서 세포배양 표면을 친수성으로 만들어 세포를 손상없이 회수할 수 있다. 동경의자와과대학의 Okano 등은 기존의 polystyrene dish 위에 전자빔 조사에 의해 온도응답성 고분자인 PIPAAm을 그래프트하여 20 °C로 세포의 배양온도를 낮추어 줌으로써 2차원적인 세포시트의 회수에 성공하고 있다.¹¹⁻¹⁶ 그러나, 그래프트된 PIPAAm의 수화에 필요한 물분자가 세포시트의 주위에서 서서히 공급되기 때문에 세포시트가 천천히 탈착되어 많은 시간을 필요로 하는 단점도 가지고 있다.

본 연구에서는 세포배양 표면으로서 전기방사에 의해 제조된 다공성의 나노섬유 부직포를 사용하였다. 섬유는 높은 비표면적과 유연성을 가지며 직경을 나노단위로 만들면 그 장점이 극대화되어 고기능성의 섬유로 응용이 가능하다. 초극세사에 해당되는 나노섬유의 연구와 개발이 주목받고 있는 이유는 나노섬유가 가지는 유연성, 단위부피당 큰 표면적, 단위면적당 존재하는 많은 섬유의 수, 섬유간 발생하는 미세공간 등 많은 장점들과 함께 나노섬유가 기존 소재의 한계성을 극복하고, 새로운 적용 분야에 크게 기여할 것으로 기대하고 있기 때문이다.¹⁷ 나노섬유는 전기방사법을 통하여 간단하게 제조가 가능하며 대표적으로 고기능성 필터 및 상처수복제(wound dressing), 복합재료의 강화섬유, 전극용 재료, 조직공학용 지지체 등의 다양한 응용이 가능하다.^{18,19} 나노섬유와 같이 직경이 가는 극세섬유를 제조하는 방사기술로는 복합방사, 펄트블로우 방사, 플래시 방사, 전기방사 등이 알려져 있으나 적용고분자의 다양성, 제조공정의 단순성, 상용화의 가능성, 다양한 기술로의 응용성을 고려할 때 전기방사가 가장 우수한 나노섬유 제조기술로 인정되고 있다.²⁰⁻²²

본 연구에서는 전기방사법으로 PHBV 나노섬유를 제조하고 전자선조사에 의해 온도응답성 고분자를 그래프트 중합하여, 이들의 특성

평가를 수행하였다. 아울러 피부 유래의 섬유아세포에 대한 세포의 접착 및 탈착거동을 조사함으로써 줄기세포의 배양 및 탈착, 회수에 대한 가능성을 확인하였다.

실 험

시약 및 재료. 본 연구에 사용된 미생물폴리에스터 PHBV는 중량 평균분자량이 약 680000 g/mol이며 3-hydroxyvalerate(3HV)가 5%로 조성된 것으로 Sigma-Aldrich사에서 구입하였다. 전기방사에 사용된 용매인 2,2,2-trifluoroethanol(TFE), 1,1,2,2-tetrachloroethane, chloroform은 Tokyo Kasei사에서 구입하여 그대로 사용하였다. 단량체인 IPAAm(Kasei, Tokyo, Japan)은 *m*-hexane을 이용하여 재결정법으로 정제한 후 사용하였다. 단량체 용액을 제조하기 위한 용매인 2-propanol과 PHBV필름 제조를 위해 사용된 chloroform은 Junsei사에서 구입하여 그대로 사용하였다.

PHBV 나노섬유 제조. 전기방사에 이용되는 PHBV의 용액제조를 위해 다양한 용매 하에서 PHBV 용해성을 조사하였다. 그 결과 2,2,2-trifluoroethanol(TFE)과 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol(HFIP), 1,1,2,2-tetrachloroethane, chloroform에 15 wt% 이상의 좋은 용해성을 보였다. 용액 제조에는 PHBV의 높은 용해성을 갖고 전기방사에 유리한 조건을 가진 TFE를 선택하였고, 용액은 상온에서 12시간 이상 교반하여 균일하게 용해시킨 후 전기방사에 이용하였다.

PHBV 필름은 chloroform을 이용하여 8 wt%의 PHBV 용액을 제조한 후 유리판(15×15 cm)위에 용액 캐스팅하여 제조하였다. 실온에서 2시간 동안 용매를 서서히 증발시킨 후 핀셋으로 필름을 유리판으로부터 분리하여 다시 상온에서 24시간 진공 건조하여 용매를 완전히 제거하였다.

본 연구에서 사용한 전기방사장치의 모식도를 Figure 1에 나타내었다. 장치 구성은 0-40 kV의 전압공급이 가능한 고전압공급장치(high voltage DC power supply unit, 청파 EMT), 평판형태(200×200 mm, stainless steel)의 집전판(collector), 고분자용액의 일정량을 일정한 유체속도(flow rate)로 제어하는 주사기펌프(syringe pump, KDS220), 주사기(gastight and luel lock type 10 mL,

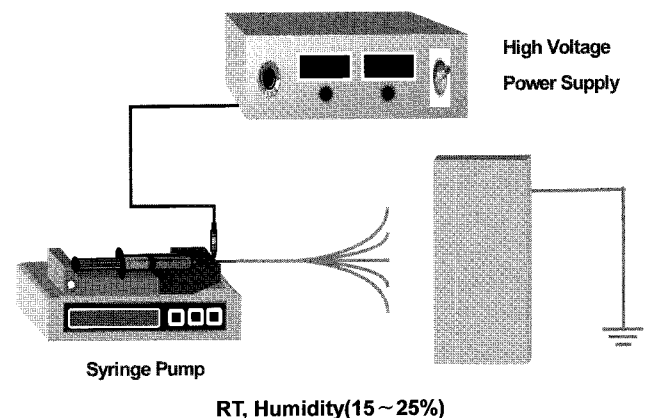


Figure 1. Schematic illustration describing electrospinning process.

Hamilton), 금속주사기바늘(22 G, Hamilton) 등으로 구성하였다. 집전판에는 알루미늄 호일을 덧씌움으로써 포집된 섬유를 쉽게 분리해 내었다. 전기방사는 나무 챔버 안에서 가능한 습도(30%)와 온도(20 °C)를 일정하게 유지하며 사용하였다. 중력의 영향을 배제하기 위해 방사 방향은 수평으로 하였다.

먼저 사용 용매는 앞에서 설명한 바와 같이 PHBV에 좋은 용해성을 보이며 유전율이 높은 TFE를 선택하였고, 농도는 4 wt%로 제조하여 전기방사하여 최적조건을 선택하였다. 이 때 다른 공정인자들은 전압 15 kV, 방사거리 18 cm, 유체속도 1 mL/h의 조건으로 고정하고 4 wt% 용액 6 mL를 방사함으로써 나노섬유부직포를 얻었다. 전기방사에 의해 얻어진 섬유는 주사전자현미경(SEM, JSM-6380, JEOL)을 이용하여 섬유 형태 및 구조를 관찰하였다. 제조된 섬유의 직경을 관찰하기 위해 영상분석기(TDISE V3.1.73, TECHSAN Co., Ltd.)를 이용하였다. 먼저 SEM을 통해 얻어진 나노섬유의 사진 이미지를 영상분석 프로그램을 이용하여 평균직경, 표준편차, 직경분포 등을 계산하였다.

전자선 조사에 의한 온도응답성 표면 제조. 온도응답성 고분자인 PIPAAm을 전기방사에 의해 제조된 PHBV 나노섬유 표면에 그래프트하기 위하여 전자선 조사방법을 이용하였다. 본 연구에서 사용한 전자선 조사장치는 Curetron BBC-200-AA2(Nisshin High Voltage, Kyoto, Japan)으로서, 장치 구성은 크게 고주파 전원과 전압공급이 가능한 직류 고압전원, 전자선 주사관, 반입구, 반출구, conveyer controller로 구성되어 있다. 전자선 조사는 산소의 영향을 최소화하기 위해 질소 분위기에서 진행하였다. 본 기기는 전압 150~200 kV, 전류 3~12 mA, 조사폭 15 cm 그리고 conveyer 속도 4~10 m/min로 각각의 변수를 이용하여 다양한 조사량으로 조사가 가능하다.

먼저 정제된 단량체인 IPAAm을 2-propanol에 55 wt%로 녹인 다음 40 μ L의 용액을 직경 22 mm로 자른 원형의 PHBV 나노섬유 상에 균일하게 가한다. 다양한 선량의 전자선을 조사하면 전자선에 의해 라디칼이 형성되어 중합 및 가교가 이루어진다. 중합한 표면은 미반응 단량체와 그래프트되지 않은 PIPAAm을 제거하기 위해서 차가운 증류수로 충분히 세척하고 진공건조하였다.

표면특성 분석.

전자선 조사량에 따른 섬유의 형태 관찰: 본 연구에서는 앞서 언급한 전자선 조사 기기의 조사량을 결정하는 전압(150~200 kV), 전류(3~12 mA), conveyer 속도(분당 4~10 m)의 인자들을 이용하여 다양한 조사량으로 PHBV mat 표면에 PIPAAm을 그래프트시켰다. PIPAAm이 그래프트된 PHBV 나노섬유는 SEM을 이용하여 전자선 조사전과 조사량에 따른 섬유 형태 및 구조를 관찰하였다.

ATR-FTIR에 의한 표면 분석: 온도응답성 고분자인 PIPAAm이 PHBV 나노섬유 표면에 그래프트되었는지 확인하기 위해서 attenuated total reflection FT-IR(ATR-FTIR 300E, Jasco)을 이용하였다. ATR(MIRacle™, single reflection HATR)은 프리즘을 통해 입사된 적외선이 프리즘의 표면에서 반사가 일어남에 따라 프리즘에 밀착되어 있는 재료 표면의 화학결합양식을 확인하는데 유용하며, 본 연구에서는 MIRacle Ge crystal(cat. no. 025-2050, MIRacle)을 사용하였다.

표면에 그래프트된 PIPAAm을 정량하기 위해 미리 중합한

PIPAAm을 2-propanol에 녹인 다음 PHBV 필름에 40 μ L를 균일하게 마이크로피펫으로 전개한 후 건조하여 ATR-FTIR로 측정하였다. PHBV는 구조식에서 알 수 있는 바와 같이 ester 결합을 가지고 있으며 그 특성 피크는 1720 cm^{-1} 에서 나타난다. PHBV에 그래프트된 PIPAAm은 1650 cm^{-1} 에서 amide I 결합의 특성 피크가 나타난다. 따라서 peak intensity ratio(I_{1650}/I_{1720})를 이용하여 보정 곡선을 작성하고 PHBV 필름과 나노섬유 표면에 그래프트된 PIPAAm을 정량하였다.

ESCA에 의한 표면 분석: ESCA는 시료 표면으로부터 방출된 광전자의 수를 정량적으로 측정된 spectra이며, 시료 분석 시 표면에 아무런 손상을 주지 않고 표면으로부터 100 Å까지의 극표면의 화학조성이나 표면의 원소들의 화학적 결합방식에 대한 정보를 준다. 미처리된 PHBV 나노섬유 표면과 PIPAAm이 그래프트된 PHBV 나노섬유 표면을 ESCA(MT 500/1, VG Microtech)를 이용하여 각각 survey scan한 다음 각 표면의 원소조성을 정량화하였다.

AFM에 의한 표면 Topography의 관찰: 주사탐침현미경(AFM, Nanoscope IIIa, CA)으로 각 표면의 topography를 관찰하였다. AFM은 재료표면의 3차원적인 영상을 얻을 수 있게 된다. 온도응답성 고분자인 PIPAAm이 그래프트된 PHBV 나노섬유 표면의 topography 변화에 의해 그래프트 여부를 확인하고자 하였다.

물접촉각의 측정: 재료표면에 그래프트된 PIPAAm의 친수/소수 전환특성을 확인하기 위해서 물접촉각(SEP contact angle analyzer, Phoenix 3000)을 측정하였다. PIPAAm은 LCST인 32 °C를 기준으로 배양온도인 37 °C에서는 소수성을 띠고 저온인 20 °C에서는 친수성을 띠는 특성을 가지므로 온도에 따른 접촉각을 측정하여 온도응답성 고분자의 그래프트 여부를 확인하였다.

본 실험은 PIPAAm이 그래프트된 실험군과 그래프트되지 않은 대조군으로 나누어 진행되었다. Sessile drop method에 의한 방법으로 작은 물방울을 재료 표면에 떨어뜨린 후 각 3개의 시료의 표면마다 3번 이상 위치를 바꾸어서 측정하였다.

세포의 정착 및 탈착. 세포배양실험은 normal human epidermal fibroblasts를 계대 배양하여 사용하였다. PIPAAm이 그래프트된 PHBV 나노섬유(PHBV-g-PIPAAm)를 에탄올로 멸균처리하여 35 mm 페트리접시(petri dish)에 놓고 섬유아세포를 10^5 cells/ish의 농도로 파종하였다. 세포 파종은 PIPAAm이 그래프트된 표면에만 파종을 유도하기 위해 유리로 제작된 링을 샘플 위에 올리고 링 안쪽으로 파종하였다. 사용한 배지로는 Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM, Gibco)을 기본으로 10% fetal bovine serum(FBS)과 1% 항생제 penicillin G-streptomycin을 포함하였다.

본 연구에서는 PIPAAm에 의한 세포 탈착을 확인하기 위해 PHBV-g-PIPAAm 시료와 그래프트되지 않은 시료에 섬유아세포 10^5 cells/dish를 파종하고 37 °C, 5% CO₂의 분위기의 인큐베이터 내에서 8시간 동안 배양한 후 20 °C에서 저온 처리함으로써 배양세포의 탈착을 유도하였다. 동일한 조건으로 배양된 섬유아세포는 20 °C, 5% CO₂로 세팅된 인큐베이터에 10, 30, 50, 70, 90분으로 저온처리를 하였고 탈착된 정도를 확인하기 위해 8시간 배양 후 저온처리를 하지 않은 시료도 제작하였다. 저온처리 후 SEM 측정을 통해 탈착정도를 평가하였다.

결과 및 토론

나노섬유 제조. 본 연구에서 PHBV 나노섬유를 제조하기 위해 공정 변수들을 다양하게 조절하여 방사하였다. 최종적으로 PHBV는 4 wt%의 용액으로부터 제조하였고 전압 15 kV, 방사거리 18 cm, 유체속도 1 mL/h로 고정하고 방사하였다. 이 조건에서 재현성 높고 상대적으로 균일한 나노섬유가 얻어졌다. 얻어진 나노섬유는 Figure 2에서 알 수 있는 바와 같이 비교적 균일하였으며 방사와 동시에 부직포 형태로 얻을 수 있었다. 나노섬유 부직포는 3차원 망상구조를 이루며 다양한 크기의 기공(pore)을 형성하는 것이 관찰되었다.

검토된 최적의 방사조건으로 PHBV-TFE 용액 6 mL를 방사하여 부직포를 제조하였다. 집전판에 평판형에 알루미늄 호일을 사용하였고, 호일에서의 회수 후 진공 건조하여 잔류 용매의 제거하였다.

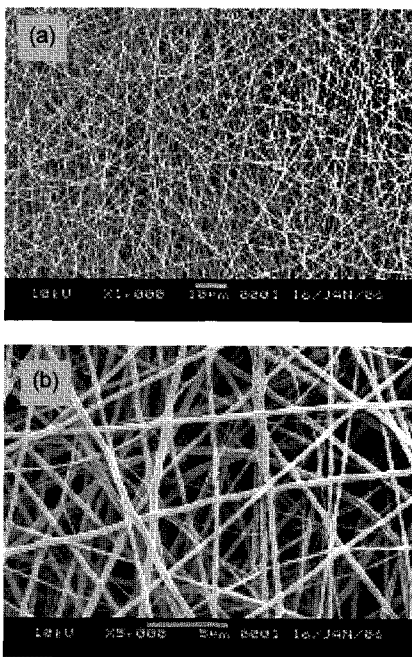


Figure 2. SEM micrographs of the electrospun PHBV nanofibrous mat with different magnifications of (a) X 1000 and (b) X 5000.

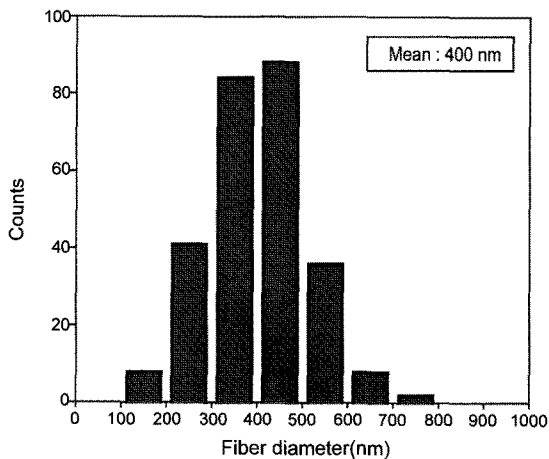


Figure 3. Fiber diameter distribution of the PHBV nanofibers.

잔류 용매가 제거된 부직포는 모든 시료의 섬유 표면에 균일한 양의 PIPAAm 그래프트를 위해 지름이 22 mm인 cork borer를 이용하여 절단하였다. 섬유의 직경과 분포를 조사하기 위해 image analyzer를 통해 분석하여 그 결과를 Figure 3에 나타내었다. 평균 직경은 약 400 nm이었고, 전체적으로 비교적 고른 직경을 갖는 나노섬유들이 얻어졌다.

전자선 조사에 의한 표면 개질. 전자선 조사량은 전압, 전류, conveyor 속도를 이용하여 다양하게 조절할 수 있다. 동일한 크기로 제작된 PHBV 나노섬유에 균일한 양의 IPAAm 용액을 가한 후 42, 84, 422 kGy의 전자선을 조사한 후 섬유 표면의 모폴로지를 SEM을 이용하여 조사하였다. Figure 4에서 전자선을 조사하지 않은 PHBV 나노섬유의 섬유형태인 (a)와 서로 다른 전자선 조사량인 (b), (c), (d)의 PHBV 섬유형태를 비교하였을 때 큰 변화가 없는 것을 확인할 수

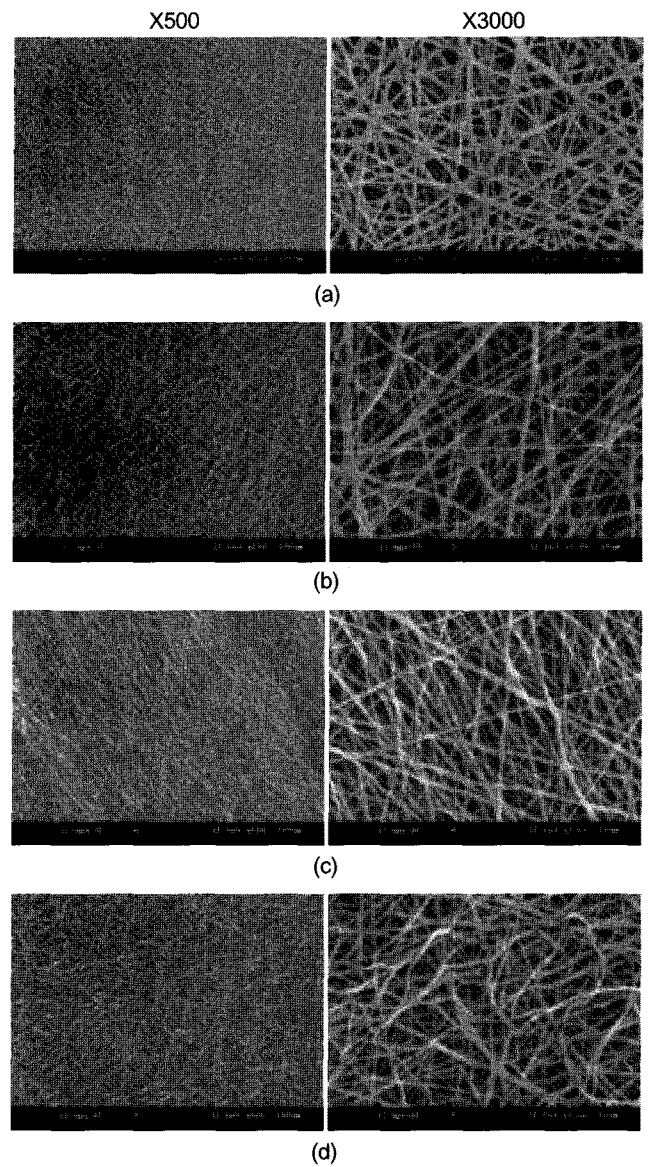


Figure 4. SEM micrographs of the electrospun PHBV nanofibers as a function of radiation dose: (a) before irradiation, (b) 42 kGy, (c) 84 kGy, and (d) 422 kGy.

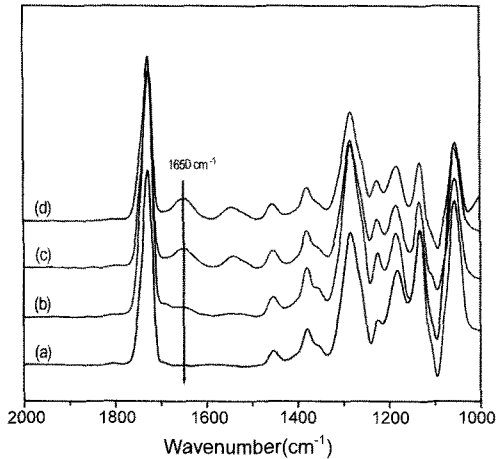


Figure 5. ATR-FTIR spectra of PHBV-g-PIPAAM mats as a function of radiation dose: (a) ungrafted PHBV nanofiber, (b) 42 kGy, (c) 84 kGy, and (d) 422 kGy.

있었고, 이로서 전자선 조사에 의해 나노섬유가 끊어진다거나 심한 분해거동을 보이지 않는 것을 확인할 수 있었다.

온도응답성 나노섬유 표면의 특성 분석.

ATR-FTIR을 이용한 표면 분석: 전자선 조사량을 달리하여 PIPAAm을 그래프트한 PHBV 나노섬유 표면을 ATR-FTIR로 측정하여 그 결과를 Figure 5에 나타내었다. PHBV는 ester 결합을 가지고 있고 이의 carbonyl 특성 피크는 1720 cm⁻¹에서 나타나고, 온도응답성 고분자인 PIPAAm의 amide 결합에 기인하는 특성 피크가 1650 cm⁻¹ 부근에 나타난다.

스펙트리를 분석해보면 PIPAAm을 그래프트하지 않은 PHBV 나노섬유에서는 carbonyl의 특성 피크를 1720 cm⁻¹에서 확인할 수 있고, PIPAAm이 그래프트된 PHBV 나노섬유에서는 amide I의 특성 피크가 1650 cm⁻¹ 부근에서 관찰됨으로써 PIPAAm의 그래프트 여부를 확인할 수 있었다. 조사량에 따라서 amide 결합의 특성 피크 크기가 조금씩 차이를 보이는데, 42 kGy로 조사한 그래프 (b)는 전자선 조사 전인 (a)와 비교하여 아주 약한 amide 피크를 보여 그래프트 양이 아주 작은 것으로 생각된다. (c)와 (d)에서는 유사한 크기의 amide 피크가 측정되었고, 이 결과로 보아 일정 세기 이상의 전자선 조사는 PIPAAm 그래프트량에 큰 영향이 없는 것으로 보여진다. 앞서 살펴본 SEM 결과와 ATR-FTIR 결과로 미루어 보아 84 kGy로 조사한 샘플이 본 실험에 가장 적합할 것으로 생각되어 이후 전자선 조사량을 84 kGy로 고정하여 실험을 진행하였다.

나노섬유 표면에 그래프트된 PIPAAm을 정량하기 위해서 별도로 용액 중합한 PIPAAm을 다양한 농도의 용액으로 만들고 PHBV 필름에 cast하였다. 이 표면을 ATR-FTIR로 측정하고 peak intensity ratio (I_{1650}/I_{1720})를 계산하여 calibration curve를 얻은 후, 이로부터 나노섬유상에 그래프트된 PIPAAm의 농도를 계산하였다. 필름상과 섬유상은 비표면적이 틀리나 전자선에 의해 노출된 표면 부분만 PIPAAm이 그래프트되므로 필름상의 데이터로 얻은 보정곡선으로부터 환산하였다. 그 결과 PHBV 나노섬유 표면에는 $6.52 \pm 1.72 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, PHBV 필름 표면에는 $6.49 \pm 1.64 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 로 각각 나노섬유와 필름 표면에 유사한 양의 PIPAAm이 그래프트되었음을 알 수

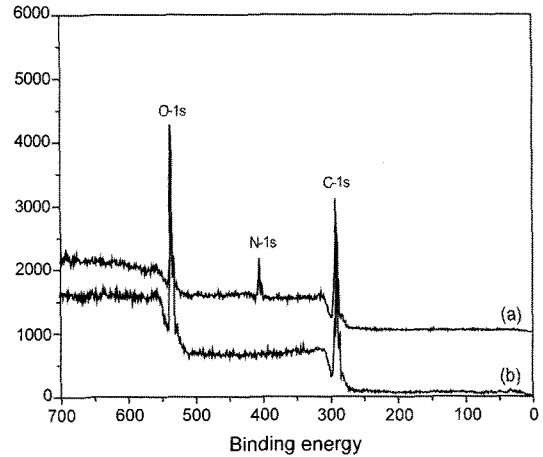


Figure 6. ESCA survey scan spectra of (a) PIPAAm-grafted PHBV and (b) ungrafted PHBV mats.

Table 1. Surface Atomic Compositions of Ungrafted PHBV and PHBV-g-PIPAAM Mats Determined by ESCA

Substrates	Atom (%)		
	C	O	N
Ungrafted PHBV mat	63.4	36.6	-
PIPAAM-grafted PHBV mat	62.5	31.4	6.1

있었다.

Electron Spectroscopy for Chemical Analysis(ESCA)에 의한 표면 분석: PIPAAm이 그래프트된 PHBV 나노섬유에서의 표면원소 조성을 ESCA를 이용하여 조사하였다. Figure 6에서 나타난 survey scan의 결과를 통해 구한 표면원소 분석 결과를 Table 1에 나타내었다. PHBV는 구조에서 알 수 있는 바와 같이 C, H, O의 원소로 구성되어 있고, PIPAAm은 amide 결합을 가지므로 N이 함유되어 있다.

Table 1에서 알 수 있는 바와 같이 PIPAAm이 그래프트되지 않은 PHBV에서 나타나지 않은 질소가 PIPAAm을 그래프트시킨 PHBV 표면에서 그 함량이 증가한 것을 볼 수 있다. 이것은 PIPAAm의 amide bond에 의한 결과라고 할 수 있으며 이는 앞서 ATR-FT-IR 스펙트럼의 결과와도 잘 일치하여 나노섬유상에 온도응답성 고분자인 PIPAAm이 성공적으로 그래프트되었음을 알 수 있다.

AFM에 의한 표면 Topography의 관찰: 재료 표면의 topography를 관찰하기 위하여 AFM을 이용하여 tapping mode로 확인하였다. 측정 시료는 PIPAAm이 그래프트된 PHBV 나노섬유와 필름, 그래프트되지 않은 PHBV 나노섬유와 필름으로 나누어 비교하였다. 모든 시료는 건조 상태에서 측정되었고 scan size는 30 μm , data scale은 10 μm , scan rate는 5 Hz로 고정하였다. 3차원(height)으로 표현하여 Figure 7에 나타내었다.

Figure 7의 결과에서 알 수 있는 바와 같이 PIPAAm이 그래프트되지 않은 나노섬유 (a)와 PIPAAm이 그래프트된 나노섬유 (b)에서 SEM을 통해 관찰한 것과 유사하게 길고 둥근 섬유의 형태를 확인하였다. SEM에서 볼 수 있는 직경보다는 다소 굵게 나타났는데 이는 AFM의 tip이 기울기를 가지면서 섬유의 표면 굴곡을 지나가므로

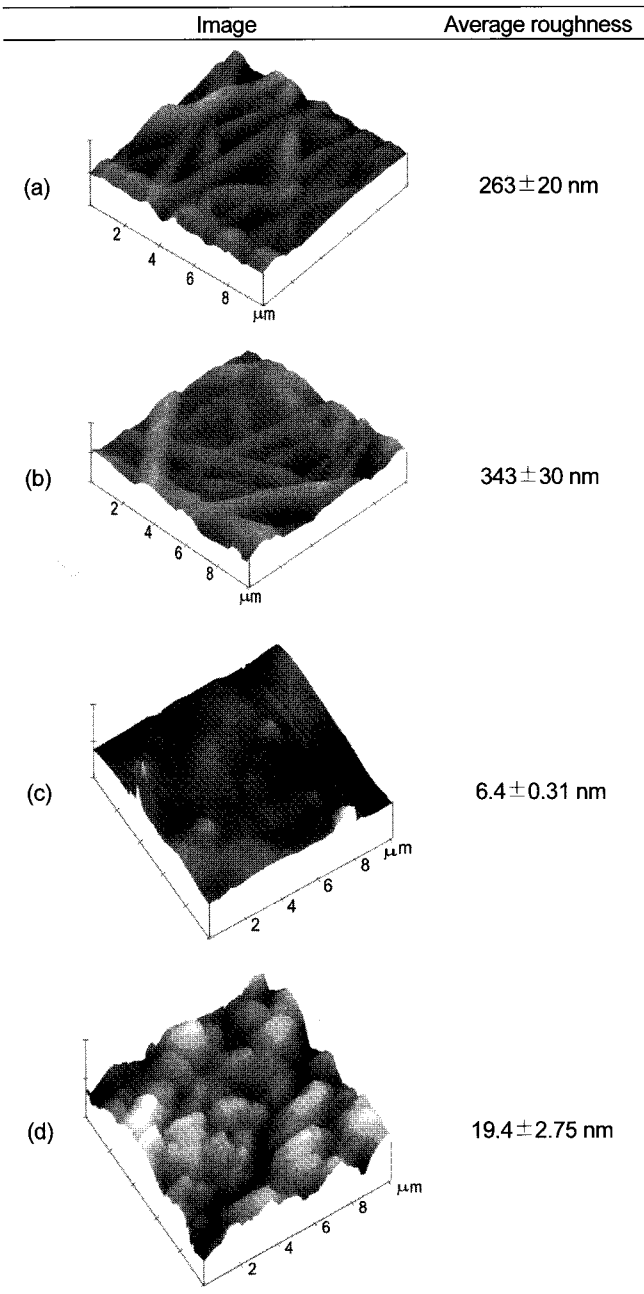


Figure 7. Three-dimensional tapping mode AFM topographical images of (a) ungrafted PHBV mat, (b) PHBV-*g*-PIPAAM mat, (c) ungrafted PHBV film, and (d) PHBV-*g*-PIPAAM film.

기기의 특성상 나타나는 현상으로 간주된다. 표면조도(Roughness)는 각각의 시료를 3개씩 3번 이상 측정하여 평균한 값으로 이를 비교해 보면 각각 (a)보다는 (b)가, (c)에 비해서는 (d)가 높은 값을 가지는데 이는 나노섬유나 필름 표면에 PIPAAm이 전자선에 의해 그래프트됨으로써 표면이 거칠어진 것으로 보인다. 특히 필름표면에서의 변화는 두드러짐을 알 수 있었다(d).

물접촉각의 측정: 수용액상에서 가역적인 온도응답성을 나타내는 PIPAAm을 재료표면에 그래프트하였을 때에도 동일한 특성이

Table 2. Water Contact Angle (°) of Each Surface Measured by Sessile Drop Method (n=10)

Substrates	20 °C	37 °C
Ungrafted PHBV mat	80.0°±1.4	83.5°±1.5
PIPAAm-grafted PHBV mat	39.3°±1.9	74.8°±5.3
Ungrafted PHBV film	63.2°±1.7	65.3°±2.6
PIPAAm-grafted PHBV film	35.4°±3.2	49.7°±4.0

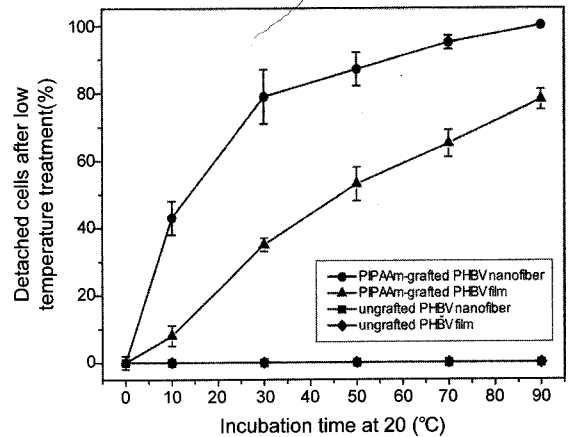


Figure 8. The percentage of the detached fibroblasts from the surface of the ungrafted PHBV and grafted PHBV-*g*-PIPAAM films as a function of incubation time at 20 °C.

나타나는지를 확인하기 위해 물접촉각을 측정하였다. 이때 모든 샘플은 LCST 이하의 온도인 20 °C와 LCST 이상의 온도인 37 °C에서 측정하였으며 각각 10개의 측정 결과를 평균하여 Table 2에 나타내었다. 물접촉각은 표면의 표면조도가 커지면 물의 spreading이 상대적으로 어려워져 높은 값을 가진다.

그 결과, 나노섬유상의 물접촉각이 필름상의 물접촉각보다 훨씬 높게 나온다. PIPAAm을 그래프트하지 않은 PHBV 나노섬유와 필름에서는 온도의 변화에도 접촉각은 각각 80°와 63° 내외로 큰 변화가 없었다. 온도응답성 고분자인 PIPAAm이 그래프트된 나노섬유와 필름에서는 37 °C에서 75°와 50°를 나타내었으나 온도를 LCST 이하의 20 °C에서 측정하였을 때는 40°와 35°로 크게 감소하였다. 이는 소수성에서 친수성으로 표면 특성이 변화되었다는 것을 의미하며 PIPAAm이 재료 표면에 그래프트된 경우에도 온도응답특성이 나타난다는 것을 의미한다.

세포배양 및 탈착거동. 나노섬유상에서 세포배양을 실시한 결과 세포의 초기접착 및 성장거동이 우수하였다. 한편, 8시간 배양후 저온처리에 의해 탈착되는 세포를 측정하여 Figure 8에 나타내었다.

Figure 8에서 알 수 있는 바와 같이 저온 처리시간에 따라 탈착된 세포의 수를 그래프로 그려 보면 필름보다 나노섬유 표면에서 세포의 탈착이 빠른 시간에 이루어지는 것을 확인할 수 있었다. 나노섬유에서는 세포가 접착해 있는 아래의 기공 사이로 물의 이동이 쉽고 따라서 PIPAAm이 그래프트된 표면에서 빠른 친수화가 일어나므로 세포의 탈착이 필름보다 빨라지는 것으로 생각된다. 위의 결과로 온도응답성 나노섬유상에서 세포의 배양 및 온도변화에 의해 간단히 배양중인 세포의 탈착이 가능함을 알 수 있었다.

결 론

본 연구에서는 온도응답성 고분자인 PIPAAm을 전기방사방법으로 제조된 PHBV 나노섬유 표면에 그래프트하여 온도응답성을 가지는 나노섬유 표면을 제조하였다. 약 400 nm의 평균직경을 가지는 PHBV 나노섬유의 제조 조건을 확립하고 방사하여 PHBV 부직포를 제조하고 SEM과 영상분석기를 통해 확인하였다. PIPAAm은 전기방사로 얻어진 PHBV 나노섬유 표면에 단량체 용액을 마이크로펄스로 떨어뜨린 후 전자선을 조사함으로써 섬유 표면에 그래프트하였다. 이를 ATR-FTIR과 ESCA를 통해 표면 분석한 결과 PIPAAm이 성공적으로 그래프트되었음을 확인하였다. 또한, 나노섬유 표면에 그래프트된 PIPAAm의 양은 ATR-FTIR을 이용하여 정량한 결과 $6.52 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 정도임을 확인하였다. 그리고 AFM에 의한 표면 분석 결과 PIPAAm이 그래프트됨으로써 섬유 표면의 topography의 변화를 확인할 수 있었다. 물집촉각 측정을 통해 각각의 표면에서의 온도에 따른 표면 특성을 확인한 결과 PIPAAm이 그래프트된 표면에서만 온도응답성을 나타냄을 알 수 있었다. 아울러 소수성의 상태에서 세포를 배양하고 온도변화에 의해 표면을 친수성으로 변화시킴으로써 간단히 배양중인 세포를 회수하여 재배양할 수 있음을 확인하였다. 현재 줄기세포에 대한 적용을 시행중에 있으며, 줄기세포의 배양 및 비침략적인 회수가 가능하다면 조직공학 및 재생의료분야에 있어서 중요한 세포원을 확보할 수 있으므로 큰 기여를 할 것으로 기대된다.

감사의 글: 본 연구는 2007년 한국과학재단의 원자력기반확충사업 핵심기초연구의 지원에 의해 이루어졌으므로 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. R. Langer and J. P. Vacanti, *Science*, **260**, 920 (1993).
2. L. G. Cima, D. E. Ingber, J. P. Vacanti, and R. Langer, *Biotechnol. Bioeng.*, **38**, 145 (1991).
3. A. Atala, D. Mooney, J. P. Vacanti, and R. Langer, *Synthetic Biodegradable Polymer Scaffolds*, Birkhauser, Boston, 1997.
4. J. R. Morgan and M. L. Yarmush, *Tissue Engineering Methods and Protocols*, Humana Press, 1999.
5. A. Nieponice, L. Soletti, J. Guan, B. M. Deasy, J. Huard, W. R. Wagner, and D. A. Vorp, *Biomaterials*, **29**, 825 (2008).
6. L. Cui, B. Liu, G. Liu, W. Zhang, L. Cen, J. Sun, S. Yin, W. Liu, and Y. Cao, *Biomaterials*, **28**, 5477 (2007).
7. G. Marletta, G. Ciapetti, C. Satriano, F. Perut, M. Salerno, and N. Baldini, *Biomaterials*, **28**, 1132 (2007).
8. J. C. Mohr, J. J. de Pablo, and S. P. Palecek, *Biomaterials*, **26**, 6032 (2006).
9. S. Sethe, A. Scutt, and A. Stolzing, *Ageing Res. Rev.*, **5**, 91 (2006).
10. S. Bae, C. W. Park, H. K. Son, C.-J. Jeon, and H. Kim, *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, **4**, 388 (2007).
11. M. Yamato, M. Utsumi, A. Kushida, and T. Okano, *Tissue Engineering*, **7**, 473 (2001).
12. O. H. Kwon, A. Kikuchi, M. Yamato, Y. Sakurai, and T. Okano, *J. Biomed. Mater. Res.*, **50**, 82 (2000).
13. G. Chen, Y. Imanishi, and Y. Ito, *J. Biomed. Mater. Res.*, **42**, 38 (1998).
14. O. H. Kwon, A. Kikuchi, M. Yamato, and T. Okano, *Biomaterials*, **24**, 1223 (2003).
15. M. Yamato, O. H. Kwon, M. Hirose, A. Kikuchi, and T. Okano, *J. Biomed. Mater. Res.*, **55**, 137 (2001).
16. M. Hirose, O. H. Kwon, M. Yamato, A. Kikuchi, and T. Okano, *Biomacromolecules*, **1**, 377 (2000).
17. Y. M. Shin, M. M. Hohman, M. P. Brenner, and G. C. Rutledge, *Polymer*, **42**, 9955 (2001).
18. X. M. Mo, C. Y. Xu, M. Kotaki, and S. Ramacrishna, *Biomaterials*, **25**, 1883 (2004).
19. E. D. Boland, *J. Biomed. Mater. Res.*, **71B**, 144 (2004).
20. H. Fong, I. Chun, and D. H. Reneker, *Polymer*, **40**, 4585 (1999).
21. X. Zong, K. Kim, D. Fang, S. Ran, B. S. Hsiao, and B. Chu, *Polymer*, **43**, 4403 (2002).
22. I. S. Lee, O. H. Kwon, W. Meng, I.-K. Kang, and Y. Ito, *Macromol. Res.*, **12**, 374 (2004).