

피브로인 미립구 및 중공미립구의 제조

박철완 · 이신영 · 허 원[†]

강원대학교 공과대학 생물공학과

(2010년 1월 19일 접수, 2010년 2월 8일 수정, 2010년 2월 15일 채택)

Fabrication of Fibroin Microspheres and Hollow Spheres

Cheol-Wan Park, Shin-Young Lee, and Won Hur[†]

Department of Bioengineering and Technology, Kangwon National University,

192-1 Hyoja-dong, Chuncheon, Kangwon 200-701, Korea

(Received January 19, 2010; Revised February 8, 2010; Accepted February 15, 2010)

초록: 피브로인은 실크섬유에서 대량으로 얻어지는 생물고분자이며 수술 봉합사로 장기간 사용되어 생체적합성이 확인되었다. 따라서, 본 연구에서는 생체재료로 사용할 수 있는 피브로인 미립구를 제조하였다. 데칸과 혼합유화제로 이루어진 연속상에 재생 피브로인 액적을 분산시킨 후 건조시켜 형성된 미립구를 회수하여 에탄올 등으로 세척 건조 후 수득하였다. 안정한 유중수형(W/O) 에멀션을 600 rpm으로 교반하는 조건하에서 구형의 피브로인 미립구를 얻을 수 있었다. 주사전자현미경 사진을 통하여 상압 및 감압하에서 건조된 미립구의 수평균 직경은 각각 21.6 및 8.5 μm 로 확인되었다. 토모그래피로 미립구는 내부구조가 채워져 있으나 크기에 따라 중공미립구임을 확인하였고 중탄산나트륨을 도입하여 중공미립구도 제조하였다.

Abstract: Fibroin is a biopolymer available in large quantity from silk fiber and has a long history of use as a suture proving biocompatibility. In this report, fibroin microspheres has been fabricated for biomaterial applications. W/O emulsion of regenerated fibroin droplets in a continuous phase of decane with mixed surfactants was dried to facilitate fibroin gelation and the condensed fibroin microspheres were harvested. The ratio of mixed surfactants and their proportions to decane were determined to prepare a stable W/O emulsion. A spherical form of fibroin gels was obtained from the W/O emulsion agitated at 600 rpm. Scanning electron microscopy revealed that number average sizes of the fibroin microspheres were 21.6 and 8.5 μm when dried under ambient conditions or under vacuum, respectively. Tomography of the spheres revealed that their internal structures are packed or hollowed. Hollow and hemispherical forms of microspheres were also prepared by using porogen.

Keywords: fibroin, W/O emulsion, microsphere, hollow sphere, hemisphere.

서 론

피브로인은 누에고치에서 생산되는 실크섬유의 중심가닥을 구성하는 단백질 고분자이며 분자량은 391 kDa이다.¹ 피브로인은 오랫동안 수술용 봉합사로 사용되어 생체적합성이 확인되어 있으며 최근에는 캡슐 및 방출 제어 소재로 개발되고 있다.^{3,4} 물에 녹지 않는 피브로인 분자는 고온의 고농도의 염용액에 용해된 후 투석, 탈염의 과정을 거친 후 일시적으로 수용액 상태로 존재하게 된다. 이 용액을 재생 피브로인이라고 부르며 분무 건조를 통하여 2 μm 내외의 캡슐을 제조할 수 있고,⁵ 한 방울씩 액체질소에 주입하여 얼린 후 메탄올 등으로 처리하여 100~440 μm 의 크기의 하이드로겔 캡슐을 제조할 수 있다.⁴ 이 용액에 에탄올을 첨가하고 동결 용해시켜 0.2~1.5 μm 의 미세입자

도 제조할 수 있다고 보고되었다.⁶

피브로인은 다른 단백질과 달리 단량체에 해당하는 20 종류의 아미노산 중 글리신(glycine), 알라닌(alanine) 및 세린(serine)의 조성 비율이 약 86%로 매우 높다.² 세 종류의 단량체가(glycine-alanine-glycine-alanine-serine-glycine)_n-의 반복단위로 존재하는 11개의 결정성 영역이 피브로인 분자사슬을 구성하고 있다.⁷ 용해된 재생 피브로인 분자에서도 아미노산 단량체의 반복배열은 nematic 액정배열을 형성하고 있으며⁸ 시간의 경과에 따라 재생 피브로인은 액상상태의 random coil 구조의 비율이 줄고 서로 다른 분자사슬의 결정성영역 사이에 수소결합의 비율이 증가하여 불용성 생물 고분자에서 관찰되는 β -sheet 구조를 형성하여 젤이 된다.^{9,10} 최근에는 β -sheet를 형성하여 젤이 만들어지는 hydrogelation 속도가 불특정 정도, 온도 및 피브로인의 농도 등으로 조절됨이 보고되었다.¹¹

본 연구에서는 데칸 및 혼합유화제와 재생 피브로인 수용액으로부터

[†]To whom correspondence should be addressed.
E-mail: wonhur@kangwon.ac.kr

터 W/O 에멀션을 형성시키고 수적상태로 분산되어 존재하고 스스로 젤화하는 재생 피브로인의 특성을 이용하여 미립구(microsphere)를 제조하였다. 특히, 물보다 비등점이 높은 데칸을 사용하여 연속상의 데칸이 건조되는 용매건조법이 아닌 분산된 수적에서 수분을 제거하는 방법을 통하여 피브로인의 젤화를 촉진시키고 캡슐의 크기를 줄일 수 있었으며 제조된 피브로인 마이크로입자의 특성을 조사하였다.

실 험

시약 및 재료. 본 실험에 사용된 동결건조된 재생 피브로인은 고농도의 염용액에 가용화시키는 방법을¹² 일부 변형하여 제조하였다. 즉, 시중에서 구입한 실크섬유를 탄산나트륨 수용액 0.3%(w/v)에 침지 후 가열하여 표면의 세리신 및 불순물을 제거하고 회수하여 건조시킨다. 이후 105 °C로 가열된 CaCl₂ · H₂O 수용액 50%(w/v)에 투입하여 가용화시키고 식힌 후 molecular weight cut-off(MWCO)가 10 kDa인 투석막에 넣어 밀봉하고 수조에 넣어 전기전도도가 200 μS/cm 이하가 될 때까지 증류수를 교환하여 CaCl₂를 제거하여 제조되었다. 투석이 끝난 피브로인 수용액은 -20 °C에서 냉동하여 동결건조기를 사용하여 건조된 분말로 제조하여 보관하고 실험 직전에 녹여서 사용하였다.

미립구 제조. 피브로인 미립구를 제조하기 위하여 먼저 40 mL의 데칸(n-decane)에 계면 활성제인 Span 80과 Tween 80을 1:1의 비율로 혼합한 용액을 10 mL 넣고 40 °C에서 교반하여 녹인다. 여기에, 2%(w/v) 재생 피브로인 수용액을 첨가한 후 자력교반기를 이용하여 에멀션을 제조한다. 유백색 에멀션 시료 20 μL을 취하여 광학현미경(CX40RF200, Olympus, Japan)을 이용하여 400X 배율로 에멀션 형성을 관찰하였다.

에멀션 용액은 상압 상온에서 24시간 동안 지속적으로 교반하거나 rotary vacuum evaporator(JP/N 1000S-W, Eyela, Japan)를 이용하여 40 °C에서 감압하여 30분 동안 강제적으로 수분을 제거시켰다. 이 용액을 필터페이퍼(Whatmann No.1, Whatmann, USA)로 걸러 얻어진 여과 잔류물을 에탄올로 여분의 데칸과 계면활성제를 제거하고 건조시켜 피브로인 마이크로캡슐을 수득하였다(Figure 1).

전자현미경 관찰. 제조한 시료 및 분말의 형태와 입자 크기를 관찰하기 위해 전계방사형 주사전자현미경(field emission scanning electron microscope, S-4300, Hitachi, Japan)을 이용하였다. 시료를

stub 표면에 부착하고 Sputter(E-1010, Hitachi, Japan)를 이용하여 10 mA에서 70초간 백금으로 코팅시킨 후 15 kV로 관찰하였다.

공초점 현미경 관찰. 피브로인 미립구의 내부구조를 관찰하기 위하여 1 mg의 시료를 인산 완충용액(KH₂PO₄ 20 mM, pH 7.4)에 현탁시키고 여기에 25 μL의 fluorescein isothiocyanate(FITC, 0.5 mg/mL ethanol)을 첨가하여 암실에서 2시간 동안 반응시켰다. 이후에 13000 rpm에서 10초간 원심 분리하여 상등액을 제거하였다. 인산완충용액을 1 mL 첨가하여 재현탁한 후 원심분리하고 다시 상등액을 제거하는 방법을 5회 반복하여 남아 있는 FITC를 제거하였다. 이후 인산완충용액을 첨가하여 재현탁한 후 20 μL를 취하여 슬라이드 글라스 위에 떨어뜨리고 커버 글라스를 덮어 가장자리를 매니큐어로 밀봉하였다. 레이저 공초점 현미경(confocal laser microscope FLUOVIEW-FV300, Olympus, Japan)을 이용하여 1200배에서 FITC로 염색된 피브로인 미세구 시료를 초점면(focal plane)을 달리하여 촬영하고 토모그래피(tomography)를 구성하였다.

결과 및 토론

에멀션의 제조. 피브로인 미립구를 제조하기 위한 안정한 W/O 에멀션 용액을 형성할 수 있는 조건을 찾기 위하여 유화제 Span 80 과 Tween 80의 혼합비를 2:8, 5:5, 8:2 및 10:0으로 변화시키고 혼합유화제를 데칸에 10%(v/v) 첨가하고 여기에 2%의 재생 피브로인 수용액을 10%(v/v) 첨가하여 교반하여 얻어진 유화액을 광학현미경으로 관찰하였다. 유화제의 혼합비가 2:8에서는 유화액 전체가 젤화되었고 나머지 혼합비에서는 유백색의 유화액이 얻어졌으며 광학현미경으로 분산된 액적을 관찰할 수 있었다. 두 유화제의 혼합비가 1:1인 경우 hydrophilic-lipophilic balance(HLB)는 9.6으로서 일반적으로 알려진 W/O 에멀션을 형성한다고 알려진 HLB 6-8 사이의 값보다는 크지만 에멀션의 안정성이 높았다. 따라서, 유화제의 혼합비를 1:1로 혼합한 혼합유화제를 데칸에 5, 10, 20, 30% (v/v)의 다른 비율로 첨가하여 에멀션을 제조하였다. 이중 10% 이상의 혼합유화제를 포함한 용액에서 피브로인 수용액을 첨가하여도 안정적인 유화상태를 유지하였다. 따라서 여유를 두어 유화제 혼합액을 20% 사용하고 피브로인의 농도를 달리하여 에멀션을 제조하였다. 피브로인의 농도가 4% 이상에서는 수적이 서로 엉겨어 덩어리를 형성하는 현상이 관찰되었다. 따라서 2%의 피브로인 용액을 사용하여 W/O 에멀션을 제조하여 상온에서 교반시키고 원심분리하여 회수한 후 건조시켜 피브로인 미립구를 얻었다.

에멀션 상태의 수적에 녹아있는 피브로인 분자는 서로 응집하여 구형의 젤을 형성하는데 교반속도의 영향을 보기 위하여 600, 700 및 800 rpm으로 교반속도를 달리하여 얻어진 미립구의 전자현미경 사진과 크기를 Figure 2에 나타내었다. 대체적으로 표면이 매끈한 구형에 가까운 미립구가 형성되었으나 교반속도가 높아지면 약 10 μm 이하의 작은 미립구의 수가 많아지며 동시에 납작한 형태의 큰 미립구들이 빈번하게 관찰되었다. 교반속도의 증가와 함께 피브로인 미립구의 수평균 직경은 25.9, 21.4 및 16.5 μm로 점차적으로 감소하는 경향을 보였다.

따라서 에멀션을 600 rpm으로 교반시키며 상온 상압하에서 건조시키면 구형의 피브로인 미립구가 형성이 됨을 알 수 있었다. 그러나 700 rpm 이상으로 교반하면 크기가 작은 미립구의 비율이 증가하는 동시

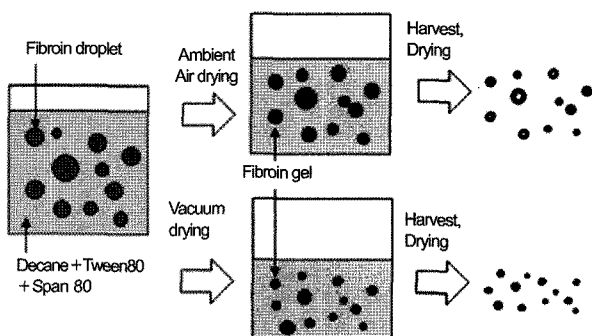


Figure 1. A schematic diagram of W/O emulsion of fibroin in decane and mixed surfactant and formation of fibroin microcapsules.

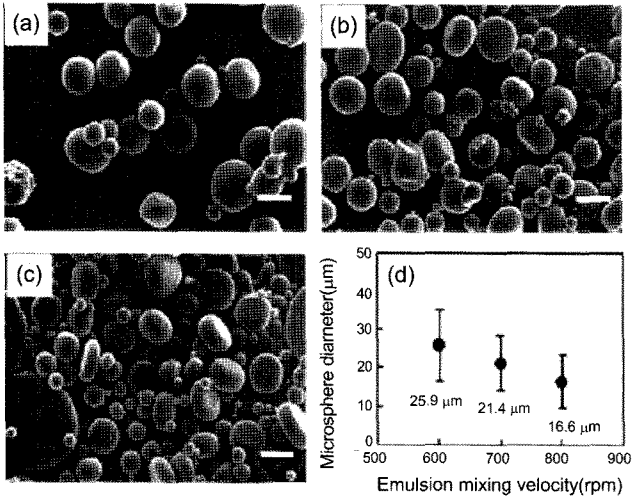


Figure 2. Scanning electron microscopic images of fibroin microspheres prepared from emulsions mixed at varying velocities of (a) 600; (b) 700; (c) 800 rpm (scale bar = 30 μm); (d) effect of agitation speed on the diameters of the microspheres.

에 직경이 30 μm 이상이며 원반형으로 변형된 피브로인 미립구가 생성되는 것이 관찰되었다. 이것은 W/O 에멀션에서 표면장력으로 구형을 이루는 수적의 교반으로 인한 전단흐름에서 변형되고 피브로인이 변형된 수적의 모양대로 젤화되어 형성된 것으로 생각된다. 전단이 큰 상태에서 형성되는 이러한 원반형 모양은 혈액 속의 적혈구와 매우 유사하다. 원반형 모양의 변형은 유체의 전단력과 관련이 있는 것으로 추정되며 결론적으로 교반속도를 증가시켜 수적의 크기를 감소시켜 균일도를 유지하는 작은 미립구를 만들 수 없었다. 교반속도는 에멀션 혼합액의 물리화학적 특성과 같이 작용하여 액적의 크기를 결정하고¹³ 교반속도가 증가하면 전단이 큰 상태의 액적이 타원형으로 변하는 것은 잘 알려져 있다.¹⁴ 특히, 액적의 변형은 사진으로 2차원적으로 관찰할 수 밖에 없어 수학적 모델이 많이 이용되지만¹⁵ 본 연구에서는 변형된 액적의 모양을 유지하는 입자를 얻을 수 있어 액적의 변형을 연구하는 수단이 될 수 있다.

건조방법. 피브로인 에멀션에서 유중수형의 피브로인의 자발적인 젤화를 이용하여 피브로인 미립구를 제조할 수 있으나 감압건조를 통하여 에멀션의 수분을 신속하게 제거하면 젤화 및 응집에 영향을 미칠 수 있으므로 감압회전증발기를 이용하여 피브로인 미립구를 제조하였다. 에멀션의 400X 광학현미경 사진 및 상온상압에서 600 rpm으로 24시간 교반하며 건조하여 얻은 미립구와 30분 동안 감압 건조하여 얻은 미립구의 주사전자현미경 사진과 미립구의 크기 분포를 Figure 3에 나타내었다.

감압건조를 통하여 단시간에 미립구를 제조할 경우 그 직경의 분포는 대부분 20 μm 이하로 감소하였고 10 μm 이하 크기의 미립구가 대부분을 차지하였다. 상온상압에서 건조된 미립구의 수평균 직경은 21.6 ± 11.3 μm인 반면 감압건조된 미립구는 8.5 ± 4.9 μm로 감소하였다. W/O 에멀션에서 수적은 2%의 재생 피브로인으로 구성되어 있는데 감압건조시 수분이 많이 제거되어 미립구의 크기가 감소한 것이다. 이후 에탄올 세척과정을 통하여 수분 및 데칸과 유화제가 제거되고 열중량분석을 통하여 7~8%의 수분만 포함하는 것으로 관찰되었다.

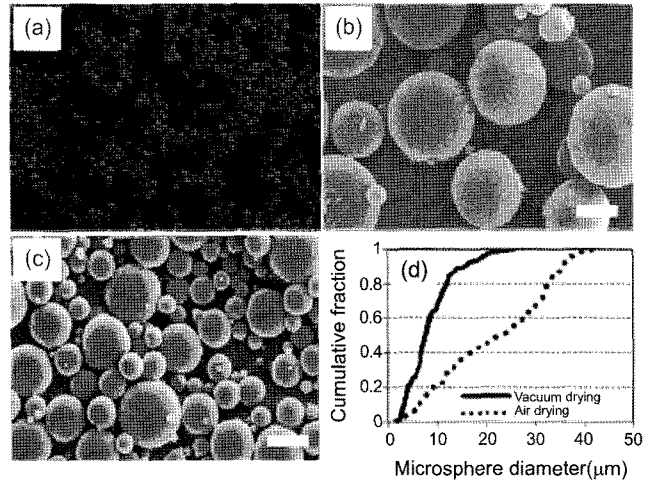


Figure 3. (a) A microscopic image of W/O emulsion and scanning microscopic images (scale bar = 50 μm) of microspheres by; (b) prepared under vacuum drying; (c) air drying under ambient conditions; (d) comparison of the diameters.

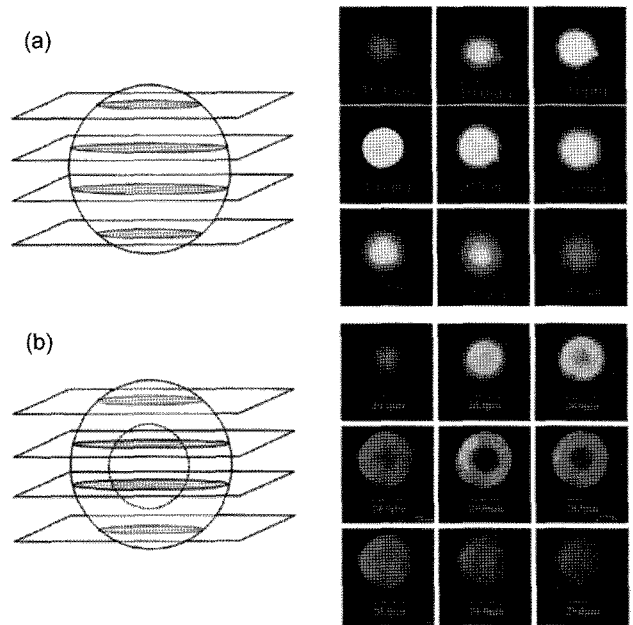


Figure 4. Schematics and tomographies of FITC-stained fibroin microspheres by confocal laser microscopy for (a) a microsphere prepared under vacuum drying; (b) a microsphere prepared by air drying under ambient conditions.

Chen 등은¹⁶ 피브로인 필름을 에탄올을 처리하는 과정에서 random coil이 β-sheet로 바뀌면서 amide I의 피크가 낮은 wavenumber로 이동하는 것을 관찰하였다. 제조된 미립구의 FTIR 흡광 스펙트럼에서는 피브로인과 유사하게 1512 cm⁻¹의 amide II 피크와 1236 cm⁻¹의 amide III 피크가 관찰되었고 피브로인의 amide I 피크는 1643 cm⁻¹에서 1623 cm⁻¹로 이동한 것을 관찰할 수 있었다. 따라서 피브로인 미립구에는 주로 피브로인으로 구성되어 있음을 알 수 있고 제조과정에서 에탄올 처리로 인해 amide I의 random coil이 β-sheet로 바뀌었음을 확인할 수 있다.

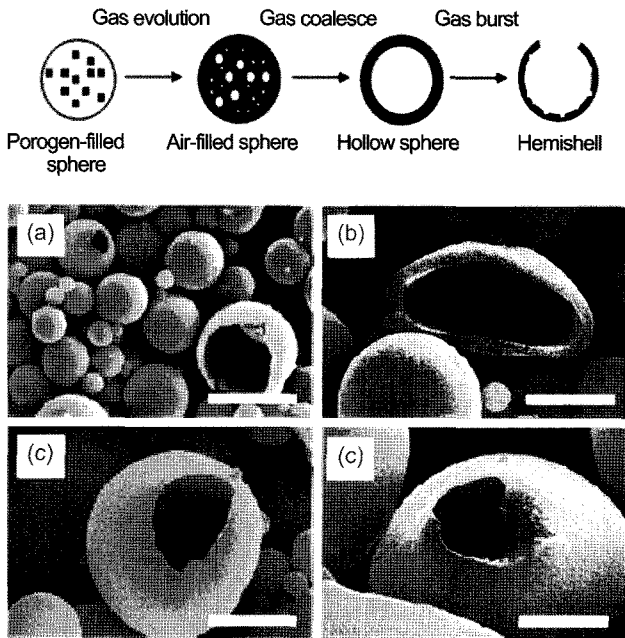


Figure 5. A schematic for hollow sphere formation and scanning electron microscopic images of the spheres with hemishells (scale bar = (a) 20; (b) 10; (c) 5; (d) 5 μm).

미립구의 내부구조. W/O 에멀션의 수적 피브로인이 서로 응집하여 젤을 형성하고 건조과정에서 수분이 제거되어 피브로인 미세구가 만들어지므로 내부가 어떻게 형성되어있는지 관찰해 볼 필요가 있다. 따라서 피브로인 미세구를 형광물질인 FITC로 염색 후 공초점 현미경을 이용하여 수직방향으로 1.5~3 μm 단위로 이동하면서 초점면을 연속적으로 촬영한 토모그래피를 Figure 4에 나타내었다. 미립구의 크기가 10 μm 이하의 경우에는 모든 초점면에서 원형의 형광을 나타내어 단면이 피브로인으로 가득 채워져 있음을 관찰할 수 있었다. 그러나 상온 상압에서 건조된 미립구 중에서 크기가 20 μm 이상인 경우 Figure 4(b)처럼 미세구의 단면의 중심부에서 형광이 발색되지 않은 경우가 관찰되었다. 이것은 피브로인이 미세구를 형성하면서 표면부터 젤화가 시작되고 서서히 건조되면서 내부가 빈 미세구가 형성될 수 있음을 나타내고 있다. 그러나 크기가 10 μm 이하거나 감압건조를 통하여 빠른 시간내 미세구의 수분을 제거한 경우 대부분의 미세구는 Figure 4(a)에서 볼 수 있는 내부가 피브로인으로 꽉 차 있는 구조를 형성하고 있었다.

중공미립구의 제조. 미립구의 내부구조를 관찰하는 과정에서 속이 빈 중공미립구가 일부 관찰되었다. 이를 재현하고 중공미립구를 주로 제조하기 위하여 중탄산나트륨을 사용하여 중공미립구를 제조하였다. 피브로인 수용액에 중탄산나트륨을 1% 첨가하고 전술한 방법으로 에멀션을 제조한 후 1 N HCl을 5% (v/v) 첨가하고 1시간 동안 추가로 교반시킨 후 감압건조하여 피브로인 미립구를 수득하였다. Figure 5에서 속이 빈 미립구의 형성 과정과 주사전자현미경으로 관찰한 제조된 피브로인 미립구 사진을 나타내고 있다. 일부 미립구의 벽면이 파괴되어 중공미립구가 형성되었음을 확인할 수 있다.

중공미립구는 주로 코어-셸 구조의 마이크로캡슐을 합성한 후 코어물질을 팽윤시켜 제조될 수 있다.¹⁷ Porogen은 주로 다공성 구조를

가지도록 사용되지만 다양한 종류의 porogen을 사용하여 다공성 미립구 뿐만 아니라 조건에 따라 중공미립구의 제조에도 상용될 수 있음이 보고되었다.¹⁸ 그러나 porogen을 사용한 미립구는 다공성으로 인하여 내부기체가 빠져나가 함몰된 형태로 생성되는 경우가 많다. 본 연구에서 제조된 중공 미립구는 대부분 구형을 유지하고 있다.

다른 연구자들에 의하여 여러 종류의 미세구 및 마이크로캡슐이 재생 피브로인으로 제조될 수 있음이 보고되었으나 분무 건조를 통하여 얻어지는 2 μm 내외의 캡슐은 표면이 주름지거나 함몰된 형태를 주로 나타내었고,⁵ 액체질소에 주입 후 메탄올 등으로 처리한 하이드로젤 캡슐은 표면이 거칠고 다공성을 나타내었다.⁴ 마찬가지로 동결 용해법으로 제조된 미세입자의 형태에 대하여 자세한 분석은 되어 있지 않으나 전자현미경 사진으로 통하여 표면이 거친 구형으로 보고되고 있다.⁶ 따라서 본 연구에서 제조된 피브로인 미세구는 다른 연구자들이 보고한 제조방법 및 얻어진 미세구의 형태와 다른 새로운 피브로인 미세구라고 할 수 있다. 동시에 피브로인 분자사슬의 자기조합을 이용하여 함몰되지 않는 중공미립구를 제조할 수 있음을 보였다.

결론

본 연구에서는 유중수형의 W/O 에멀션을 제조하고 수적을 형성하는 재생 피브로인 수용액에서 수분이 건조되면서 피브로인이 젤화되는 원리를 이용하여 피브로인 미립구를 제조할 수 있음을 보였다. 이 과정에서 교반속도가 높으면 액적의 표면장력보다 전단력이 영향을 주어 납작해진 변형된 구형의 피브로인 미립구의 비율이 증가하였다. 감압상태에서 건조시켜 내부가 모두 채워져 있는 수평균 8.5 \pm 4.9 μm 직경의 피브로인 미립구를 제조할 수 있었다. 상온상압에서 서서히 건조시켜 얻어진 미립구 중에는 속이 빈 중공미립구가 관찰되는 점에 착안하여 중탄산나트륨을 porogen으로 사용하여 중공미립구를 제조하였다.

참고 문헌

1. C. Z. Zhou, F. Confalonieri, M. Jacquet, R. Perasso, Z. G. Li, and J. Janin, *Proteins*, **44**, 119 (2001).
2. G. H. Altman, F. Diaz, C. Jakuba, T. Calabro, R. L. Horan, J. Chen, H. Lu, J. Richmond, and D. L. Kaplan, *Biomaterials*, **24**, 401 (2003).
3. X. Wang, E. Wenk, A. Matsumoto, L. Meinel, C. Li, and D. L. Kaplan, *J. Control. Release*, **117**, 360 (2007).
4. E. Wenk, A. J. Wandrey, H. P. Merkle, and L. Meinel, *J. Control. Release*, **132**, 26 (2008).
5. J. H. Yeo, K. G. Lee, Y. W. Lee, and S. Y. Kim, *Eur. Polym. J.*, **39**, 1195 (2003).
6. Z. Cao, X. Chen, J. Yao, L. Huang, and Z. Shao, *Soft Matter*, **3**, 910 (2007).
7. C. Z. Zhou, F. Confalonieri, N. Medina, Y. Zivanovic, C. Esnault, T. Yang, M. Jacquet, J. Janin, M. Duguet, R. Perasso, and Z. G. Li, *Nucleic Acids Res.*, **28**, 2413 (2000).
8. F. N. Braun and C. Viney, *Int. J. Biol. Macromol.*, **32**, 59 (2003).
9. R. E. Marsh, R. B. Corey, and L. Pauling, *Biochim. Biophys. Acta*, **16**, 1 (1955).

10. H. Wang, Y. Zhang, H. Shao, and X. Hu, *Int. J. Biol. Macromol.*, **36**, 66 (2005).
11. T. Yucel, P. Cebe, and D. L. Kaplan, *Biophys. J.*, **97**, 2044 (2009).
12. R. Sugino, H. Masuda, J. Yao, T. Kameda, K. Enomoto, S. Amiya, A. Suzuki, and T. Asakura, *Polymer Preprints (Japan)*, **49**, 529 (2000).
13. J. L. Salager, M. Perez-Sanchez, and Y. Garcia, *Colloid. Polym. Sci.*, **274**, 81 (1996).
14. W. Yu and M. Bousmina, *J. Rheol.*, **47**, 1011 (2003).
15. D. Megias-Alguacil, K. Feigl, M. Dressler, P. Fischer, and E. J. Windhab, *J. Non-Newtonian Fluid Mech.*, **126**, 153 (2005).
16. X. Chen, Z. Shao, N. S. Marinkovic, L. M. Miller, P. Zhou, and M. R. Chance, *Biophys. Chem.*, **89**, 25 (2001).
17. G.-S. Choi, Y.-S. Kim, H.-S. Jung, S.-W. Jang, and N.-S. Kim, *Polymer (Korea)*, **33**, 463 (2009).
18. H. Zhang, X. J. Ju, R. Xie, C. J. Cheng, P. W. Ren, and L. Y. Chu, *J. Colloid Interface Sci.*, **336**, 235 (2009).