ISSN(Print) 1229-0033
ISSN(Online) 2234-036X
http://dx.doi.org/10.5764/TCF.2014.27.1.70
Textile Coloration and Finishing Vol.27,No.1

〈연구논문(학술)〉

흡수성이 우수한 창상치료용 미더덕껍질 셀룰로오스필름의 제조 및 특성 분석

성금용 · 고은경 · 이승현 · 곽문화 · 손홍주[1] · 이희섭[2] · 황대연 · 정영진†

부산대학교 바이오소재과학과/생명융합연구원, [1]부산대학교 생명환경화학과
[2]부산대학교 식품영양학과

Preparation and Characterization of High Absorptive Cellulose Film Derived from *Styela Clava* Tunic for Wound Dressing

Keum-Yong Seong, Eun-Kyoung Koh, Seunghyun Lee, Moon Hwa Kwak, Hong Joo Son[1], Hee Seob Lee[2], Dae Youn Hwang and Young Jin Jung†

Department of Biomaterials Science and Life and Industry Convergence Research Institute, Pusan National University, Miryang, Korea
[1]Department of Life Science and Environment Biochemistry, Pusan National University, Miryang, Korea
[2]Department of Food Science and Nutrition, Pusan National University, Busan, Korea

(Received: January 2, 2015 / Revised: February 5, 2015 / Accepted: March 20, 2015)

Abstract: To establish the optimal conditions for the manufacture of high absortive cellulose film(CF) originated from *Styela clava* tunic(SCT), the physicochemical properties included absorption was measured in CFs prepared under the various conditions. The highest absorption was observed for SCT-CF20 prepared from the cellulose solution dissolved at 80°C for 20 min, although the filtration treatment did not induce any significance alteration. Also, the absorption was higher in SCT-CF20-F prepared by the freeze drying than SCT-CF20-N (ambient air drying) and SCT-CF20-H (heat drying). The addition of porogen ($NaHCO_3$) induced an increase of absorption in SCT-CF20-PF relative to SCT-CF20-F, while the number of interconnected porous structures was enhanced in SCT-CF20-PF. Furthermore, a high level of SK-MEL-2 cells viability was observed in SCT-CF20-PN and SCT-CF20-PF cultured group. These results show that SCT-CF may have high absorption and biocompatibility when prepared from SCT cellulose solution dissolved at 80°C for 20 min after addition of porogen and then subjected to freeze drying.

Keywords: *Styela clava tunic, cellulose film, absorption, freeze-drying, wound dressing*

1. 서 론

창상치료제란 상처 표면을 덮어 치료를 촉진시키고 우수한 치유조건을 제공하는 것으로[1], 이상적인 창상치료제는 생체적합성이 우수해야 하고, 염증이 생겼을 때 혈액에서 조직이나 체강 속으로 스며나오는 세포와 액체 성분인 삼출물의 흡수성이 뛰어나야 하며, 습윤 환경의 제공 및 유지를 통하여 상처부위가 건조되거나 2차 감염 되는 것을 막아 괴사하는 것을 방지해야 한다[2].

†Corresponding author: Young Jin Jung (hlb@pusan.ac.kr)
Tel.: +82-51-350-5387 Fax.: +82-51-350-5389
ⓒ2015 KSDF 1229-0033/2015-3/70-79

최근까지 창상치료제의 삼출물 흡수 및 습윤환경 제공 등의 기능을 증진시키기 위해 반투과성필름, 하이드로콜로이드(hydrocolloid), 하이드로겔(hydrogel), 폼(foam) 형태 등이 개발되고 있다[3]. 특히, 창상치료제에서 흡수성은 삼출물의 흡수정도를 나타내는 척도로서 흡수성이 높아질수록 삼출물 흡수량이 증가하고, 창상치료제 내부에 삼출물을 저장할 수 있는 능력이 높아진다[3]. 이러한 이유 때문에 많은 연구는 창상치료제의 흡수성 증진을 위한 다양한 기법을 개발하기 위해 집중되고 있다.

현재까지 창상치료제에서 흡수성을 증가시키기 위해 기공을 형성시키는 방법으로는 동결건조법[4], NaCl과 같은 염을 고분자용액과 희석한 후 막을

www.kci.go.kr

제조하여 증류수에서 염을 침출하는 방법[5], 고분자 용액에 가스를 생성하는 염을 혼합하고 일정 압력을 가한 후 수용액에서 가스를 생성하는 가스발포법[6], 전기방사법[7] 등이 적용되고 있다. 이렇게 형성된 기공들은 적당한 크기로 서로 연결되어 개방된 통로를 형성했을 때, 모세관 현상이 일어나 높은 수분 흡수율을 나타낸다[8].

미더덕(*Styela clava*)은 척색동물문 미색동물아문에 속하는 해양생물로서[9] 한국, 일본, 중국의 상해, 호주, 북아메리카, 유럽의 해안에서 주로 서식한다[10-12].

미더덕의 껍질은 주로 proteoglycan으로 구성되어 있고, chondroitin sulfate, glycosaminoglycan 등의 생리활성물질을 포함하고 있다[13]. 특히 미더덕껍질(*Styela clava* tunic; SCT)에서 정제 후 얻어진 셀룰로오스는 목재펄프(WP) 셀룰로오스와 동일한 β-1,4 glucoside 구조를 갖고 있으며[14,15], 높은 α-cellulose의 수율(94%)를 나타낸다[16]. 또한 N-methylmorpholine N-oxide(NMMO)를 용매로 하여 제조된 SCT 셀룰로오스필름은 WP 셀룰로오스필름보다 약 3.5배의 수분 흡수율을 나타내었다[16].

최근까지 SCT의 활용성과 기능성 개발을 위한 연구는 일부 분야에서 제한적으로 수행되었다. 특히 정제 및 표백처리한 SCT는 평균 25nm 크기로 나노화한 후 dupant와 polypyrrole의 template으로 사용하여 10-3 s/cm의 고전도성 필름으로 제조되었으며[17], SCT는 두개골 손상부위에서 골 재생을 촉진시키는 효능을 나타내었다[18].

그러나 SCT 셀룰로오스필름을 이용하여 창상치료에 적합한 삼출물의 흡수성이 우수한 필름을 개발하기 위한 기술이나 조건 확립에 대한 새로운 연구개발 시도는 거의 없었다.

따라서 본 연구에서는 흡수성과 생체적합성이 우수한 창상치료제를 개발하기 위해 SCT를 이용하여 셀룰로오스 필름을 제조하기 위한 최적조건을 확립하고자 하였고, 이를 통해 제조된 필름의 물성과 생체적합성을 분석하였다.

2. 실 험

2.1 SCT분말의 제조 및 입도분석

실험에 사용된 SCT는 경상남도 고성으로부터 자연건조한 상태의 껍질을 수집하여 사용하였다. SCT에 결합된 불순물은 10% NaOH 수용액을 1:30의 비율로 첨가하여 120℃에서 3시간 동안 가열하면서 제거하였으며, 이후 5% H_2SO_4 수용액을 1:30의 비율로 첨가하여 120℃에서 3시간 동안 가열하면서 중화하였다. 알칼리·산 처리된 SCT는 10% H_2O_2 수용액과 1:30의 비율로 100℃에서 1시간동안 가열하여 표백처리 하였다. 표백 후 건조된 SCT는 Pin milling M/C(Daehaw, Korea)으로 분쇄하여 분말형태로 제조하였다. 대조군으로 사용된 WP(Dp 1160)는 ㈜효성에서 제공받았다. SCT분말의 크기는 증류수에서 분말을 분산시킨 후 입도분석기(ELS-Z, Photal Otsuka Electronics, Japan)을 이용하여 분석하였다.

2.2 1-Allyl-3-methylimidazolium chloride ([Amim]Cl) 이온성액체의 합성

[Amim]Cl의 합성은 Zhang 등에 의해서 보고된 방법에 따라 제조하였다[19]. 교반기, 온도센서, condenser 등이 설치된 4구 반응조(500ml 용)에 1-methylimidazole : 3-chloro-1-propene = 1 : 1.20 몰비율로 각각 172.45g, 192.83g을 넣고, 질소를 퍼징하면서 55℃에서 8시간 동안 반응하였다. 반응 종료 후 황색의 [Amim]Cl에 포함된 미반응 3-chloro-1-propene과 수증기 등의 불순물을 제거하기 위해 80℃에서 2~3시간가량 기포가 올라오지 않을 때까지 감압하면서 정제하였다.

2.3 필름 제조

SCT분말의 용해시간과 필터처리가 셀룰로오스필름의 흡수율에 미치는 영향을 분석하기 위하여 용해시간과 필터처리를 다르게 한 6종류의 SCT 셀룰로오스필름(SCT-CF)을 제조하였다(Table 1A). 이를 위해 premixing한 [Amim]Cl(80g)과 SCT분말(2.4g, 3wt%) 용액을 200ml 4구 반응조에 넣고 80℃에서 3가지 서로 다른 시간 동안(10, 20, 40분) 용해하였다. 용해된 셀룰로오스용액은 각각 0.2mm의 syringe 필터를 이용하여 필터 처리그룹과 필터 미처리그룹으로 나누어 준비한 후 자동필름코팅기(DAO-CO 02, Dao Technology, Korea)를 사용하여 일정한 두께로 유리판 위에 casting 한 뒤 메탄올에서 12시간 침지시킨 후 증류수로 수세하여 상온에서 24시간동안 자연건조 하였다.

WP 셀룰로오스필름(WP-CF)도 위와 동일한 방법으로 제조하여 대조군으로 실험에 사용하였다. 또

www.kci.go.kr

한 발포제와 건조방법이 SCT-CF의 흡수율에 미치는 영향을 분석하기 위해 발포제 첨가와 건조방법을 다르게 처리한 6가지의 필름을 제조하였다(Table 1B). 위의 방법과 동일하게 제조된 혼합용액에 발포제($NaHCO_3$, 0.8g, 1wt%)첨가그룹과 미첨가그룹으로 분리하여 80℃에서 20분간 용해하여 준비하고, 자동필름코팅기를 사용하여 일정한 두께로 유리판 위에 casting 한 뒤 메탄올에서 12시간 침지시킨 후 증류수로 수세하였다. 이들을 각각 3가지 다른 건조법(상온에서 24시간동안 자연건조한 그룹, 50℃에서 12시간 동안 열풍건조한 그룹, -40℃에서 급속 냉각 후 24시간동안 동결건조한 그룹)으로 처리하여 준비하였다.

2.4 화학적 구조 분석

FT-IR 분석은 IR Affinity-1 Fourier transform infrared spectrophotometer (Shimadzu Corp., Japan)을 사용하여 transmittance mode로 4000~500 cm^{-1}의 범위에서 측정하였다. XRD 분석은 Rigaku Ⅲ diffractometer (Rigaku Corp., Japan)를 사용하여 CuK α-1 radiation에서 가속전압 40kV, 전류 30mA로 하여 반사법으로 측정하였다. Diffraction pattern은 Bragg's angle 2θ = 5°- 40° 사이에서 2°/min의 속도로 측정하였다.

Table 1. Manufacture condition of cellulose film derived from SCT

	Name	Time (min)	Filtration	$NaHCO_3$ (g)	Drying method
A	SCT-CF10(Ft)	10	○	-	N
	SCT-CF10	10	-	-	N
	SCT-CF20(Ft)	20	○	-	N
	SCT-CF20	20	-	-	N
	SCT-CF40(Ft)	40	○	-	N
	SCT-CF40	40	-	-	N
B	SCT-CF20-N	20	-	-	N
	SCT-CF20-H	20	-	-	H
	SCT-CF20-F	20	-	-	F
	SCT-CF20-PN	20	-	0.8	N
	SCT-CF20-PH	20	-	0.8	H
	SCT-CF20-PF	20	-	0.8	F

*SCT films were prepared with three different drying methods; N, Natural drying at room temperature for 24h; H, Heat drying at 50℃ for 12h; F, Freeze drying for 24h after rapid cooling at -40℃

2.5 흡수율 측정

흡수율은 제조된 각각의 필름을 상온에서 증류수에 침지한 후 한계 팽윤에 도달할 때까지 일정한 시간 간격마다 필름표면의 과도한 물기를 제거한 후 중량을 측정하여 아래의 식(1)을 이용하여 산출하였다.

$$\text{Water absorption (\%)} = [(W_s - W_d) / W_d] \times 100 \cdots\cdots\cdots (1)$$

where W_d is the weight of a dried film

W_s is the weight of a swollen film

흡수율은 각각 총 3회씩 반복하여 실험한 후 평균을 산출하였다.

2.6 SCT분말의 용해정도 관찰 및 CF의 형태학적 분석

용해 시간에 따른 SCT분말의 용해정도는 용액이 고정된 슬라이드글라스를 Optical Microscopy(BX50, Olympus, Japan)을 이용하여 200x의 배율로 관찰하여 확인하였다.

SCT-CF의 표면 및 단면의 형태학적 분석을 위해 먼저 건조된 필름의 표면을 아르곤대기 상황에서 Sputter coater(Jeol JXA-840A, London UK)를 이용하여 120초 동안 백금으로 코팅한 후 Field Emission Scanning Electron Microscopy (FE-SEM; S-4700, Hitachi, Japan)을 이용하여 5kV의 전압에서 1,000x의 배율로 관찰하였다. 또한 SCT-CF의 절단면은 필름을 액체질소에 급속냉각한 후 순간적으로 부러뜨려 만들어 실험에 사용하였다.

2.7 세포 배양

SCT-CF의 세포부착능 및 세포생존율에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 사용된 SK-MEL-2 세포주는 한국세포주은행(KCLB, Seoul, Korea)에서 구입하여 사용하였다.

SK-MEL-2 세포주는 10% fetal bovine serum(FBS,

www.kci.go.kr

Gibco, Carlsbad, CA, USA), L-glutamine, penicillin 및 streptomycin(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 함유한 Minimun essential Eagle midium(MEM, Gibco)를 이용하여 37℃, 5% CO_2 조건의 배양기에서 배양하였다.

2.8 MTT 분석 및 세포부착능 평가

MTT(3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide, Sigma chemical Co.)는 살아있는 세포 내 미토콘드리아 내막에 존재하는 oxido-reductase의 효소작용에 의해 환원되어 보라색의 formazan을 형성하며, 이들의 발색정도를 흡광도로 측정함으로써 세포 생존률을 측정하는 실험방법이다[20].

두 종류의 SCT-CF의 양면을 각각 10분간 UV 조사하고 멸균된 1 x PBS에 세척하여 오염물을 제거하였다. UV 조사한 필름을 24 well plate에 넣고 MEM 배지를 첨가하여 37℃, 5% CO_2 조건의 배양기에서 30분간 사전배양 하였다. 배양 후 배지를 제거하고 필름을 넣지 않은 positive control을 포함하여 각 well에 유리링(glass ring)을 이용하여 두 종류의 CF을 고정시켰다. 각 well에 SK-MEL-2 세포를 2×10^5(세포/well)로 분주하여 24시간 동안 배양하였다. 배지를 제거하고, MTT 용액을 125㎕를 첨가하여 4시간 동안 추가 배양하였다. 세포 내에 보라색 결정이 생성되면 dimethly sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) 용액을 300㎕씩 첨가하여 formazan을 용해시킨 후 각 well에 나타난 색깔의 변화는 ELISA-reader(VERSA max, micro-reader, MDS, Co., USA)를 이용하여 570㎚에서 측정하였다. 살아있는 세포의 부착능을 확인하기 위해 FDA(Fluorescein diacetate, F7378, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 염색을 실시하였다. Fluorescein diacetate(3' 6'-diacetyl-fluorescein)는 백색의 무형광 물질로서 살아 있는 세포의 세포막을 통과하여 세포질 내에서 가수분해 되어 형광을 발색한다[21].

두 종류의 SCT-CF양면을 각각 10분간 UV 조사하고 1 x PBS에 세척하여 담근 후 UV를 10분간 조사하였다. UV 조사한 필름을 24 well plate에 넣고 MEM 배지를 첨가하여 37℃, 5% CO_2조건의 Incubator에서 30 분간 배양하였다. 배양 후 배지를 제거하고 각 well에 유리관을 넣어 필름을 고정시켰다. 그 위에 SK-MEL-2 세포를 2×10^5(세포/well)로 분주하여 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 배지를 제거한 뒤 1 x PBS로 두 번 세척하고 아세톤에 용해시킨 FDA용액을 0.5μg/ml의 농도로 처리하였다. 처리된 세포는 Incubator에서 15분간 염색 시킨 뒤 형광현미경(NIKON ECLIPSE TS100, Nikon Instruments, Melville, NY, USA)을 이용하여 관찰하였다.

2.9 통계처리

집단 간의 통계적인 유의성은 One-way ANOVA (SPSS for Windows, Release 10.10, Standard Version, Chicago, IL)를 이용하여 분석하였으며, 모든 값은 평균 ± SD로 제시하였다.

P값이 < 0.05인 경우 유의성이 있는 것으로 간주하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1 SCT분말의 입도분포

CF의 제조에 사용된 SCT분말의 입자크기를 확인하기 위하여 제조된 분말을 입도분석기를 이용하여 입자크기를 분석하였다. 그 결과 대부분의 SCT 분말 입자는 50-300㎛ 크기에 분포하고 있으며, 가장 많은 입자는 100-200㎛ 크기에 분포하고 있었다 (Figure 1A).

3.2 SCT-CF의 화학적 성분 및 결정구조

SCT-CF의 화학구조를 분석하기 위해 [Amim]Cl를 이용하여 80℃에서 20분간 용해시킨 후 자연건조하여 제조한 0.03mm 두께의 SCT-CF20을 FT-IR로 분석하였다. 그 결과 SCT-CF20은 WP-CF와 매우 유사한 스펙트럼 형태를 나타내었다(Figure 1B). 특히 899cm^{-1}에 비결정영역의 C-O 신축진동이 나타나고, C_6에서 O에 연결된 수소결합이 파괴되어 1,426cm^{-1}에 CH_2굽힘 진동이 약하게 나타나는데, 이것은 천연 셀룰로오스에서는 보이지 않고, 재생 셀룰로오스에서만 보이는 특징들이다[24-26]. 이러한 결과는 FT-IR 스펙트럼에서 특정피크의 모양과 강도가 거의 모든 파장에서 일치하므로 SCT-CF20과 WP-CF가 동일한 화학적 성분으로 조성되어 있음을 확인할 수 있고, SCT-CF20은 용해된 재생셀룰로오스 형태임을 제시하고 있다. 일반적으로 천연 셀룰로오스의 경우 1,250-1,450cm^{-1}영역에서 5개의 피크 분리가 나타나고, 1,000-1,200cm^{-1}영역에서 4개

www.kci.go.kr

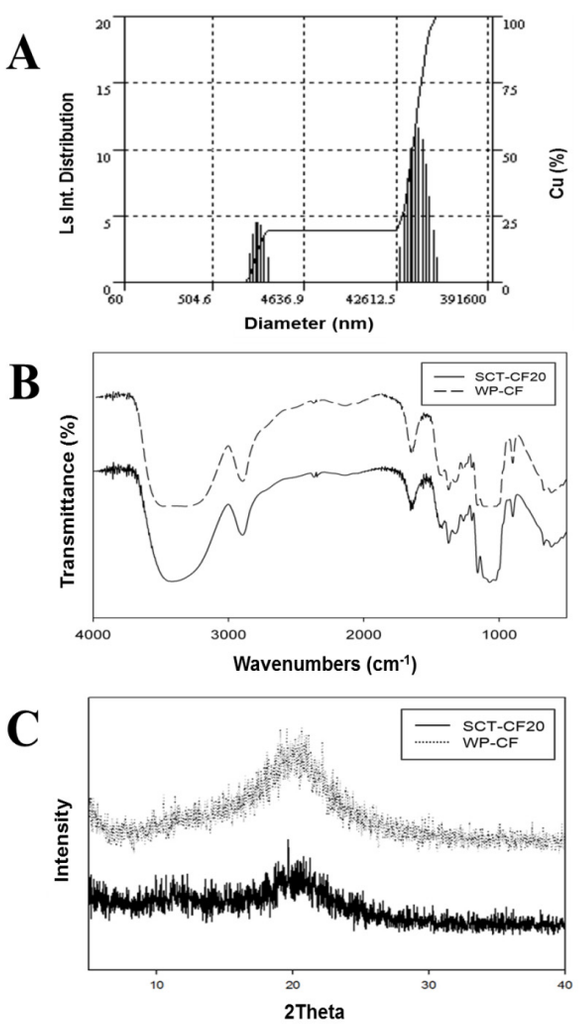

Figure 1. Properties of powder and cellulose film derived from SCT.

의 피크로 분리된다.

WP 셀룰로오스는 cell Ⅰ의 결정구조를 나타내며, 893cm^{-1}에 CH의 변형에 의한 진동, 1,432cm^{-1}에 CH_2 대칭성 굽힘 진동, 2,900cm^{-1}에 CH 신축진동, 3,000-3,500cm^{-1}에 OH 신축 진동 등의 대표적인 적외선 흡수 스펙트럼을 나타낸다[22,23].

SCT-CF과 WP-CF의 결정구조를 분석하기 위해 [Amim]Cl를 이용하여 80℃에서 20분간 용해시킨 후 자연건조하여 제조한 SCT-CF20를 XRD로 분석하였다(Figure 1C). 그 결과 SCT-CF20과 WP-CF은 XRD 그래프 상에 피크강도에 차이가 있으나 재생 셀룰로오스로써 전형적인 cell Ⅱ의 미세구조를 나타내었다. 일반적으로 용해되지 않은 천연 셀룰로오스의 X선 회절 피크는 2θ = 14.8°, 16.3°, 22.6°에서 피크가 생성되는데, 이는 전형적인 cell Ⅰ의 구조를 나타낸다[27]. 용해되어 메탄올 또는 물에서 응고된 후 건조된 재생 셀룰로오스 필름은 2θ = 20.3°에서 회절 피크가 나타나는 전형적인 cell Ⅱ의 구조를 가진다. 회절 피크 강도 또한 재생 셀룰로오스 피크가 천연 셀룰로오스 피크 강도보다 낮은데, 이것은 cell Ⅰ에서 cell Ⅱ의 구조로 바뀌었다는 것을 의미하고, 분자 간 및 분자 내 수소결합이 파괴되어 결정화도가 낮아졌음을 의미한다[27-29].

3.3 SCT분말의 용해시간과 필터조건이 SCT-CF의 흡수성에 미치는 영향

SCT분말의 용해시간과 필터조건이 SCT-CF의 흡수성에 미치는 영향을 알아보기 위해 6가지 다른 조건에서 제조된 SCT-CF의 흡수성을 측정하였다.

각각 다른 건조 방법을 통해 제조된 SCT-CF는 마이크로미터를 사용하여 두께를 측정한 결과 자연건조 및 열풍건조를 통해 제조된 SCT-CF의 두께는 0.03mm, 동결건조를 통해 제조된 SCT-CF의 두께는 0.9mm로 측정되었다.

흡수성을 측정한 결과 SCT-CF의 흡수율은

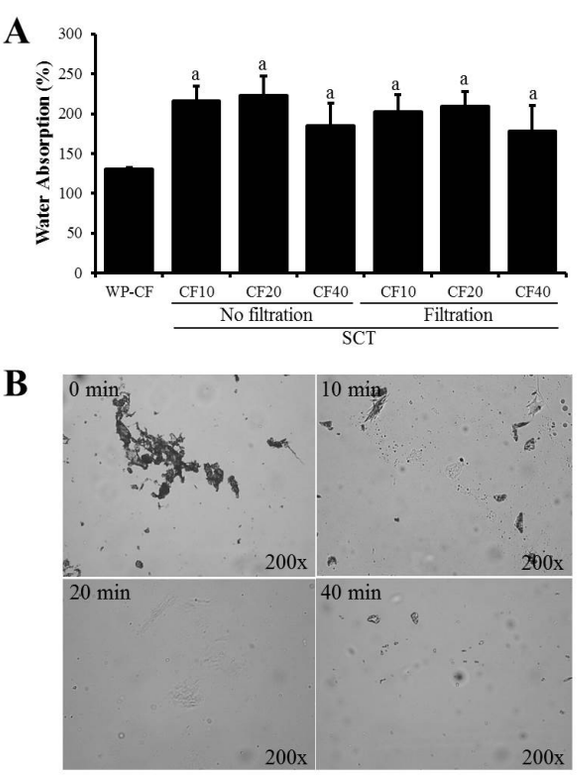

Figure 2. Water absorption of cellulose film and optical microscopy images of SCT powder in [Amim]Cl ionic liquid

www.kci.go.kr

WP-CF의 흡수율보다 높았으며, 비록 유의성은 없었으나 20분 동안 용해한 SCT-CF20과 SCT-CF20-F가 가장 높은 흡수성을 나타내었다. 그러나 40분 동안 용해한 SCT-CF40과 SCT-CF40-F은 다른 필름에 비해 흡수성이 낮았다.

한편 SCT 분말 용액의 필터 처리필름과 필터 미처리필름에서 흡수성의 차이는 없었다(Figure 2A). 이러한 결과는 필터처리를 하지 않아도 필터처리한 필름과 유사한 흡수성을 나타내므로 공정 절차의 축소를 위해 SCT 분말은 20분 동안 용해하고 필터를 하지 않는 조건에서 필름을 제조하는 것이 최적조건임을 제시하고 있다.

용해시간에 따라 흡수율을 비교 했을 때 10분간 용해한 SCT-CF10(216%), SCT-CF10-F(203%)와 20분간 용해한 SCT-CF20(223%), SCT-CF20-F(210%)의 흡수율은 각각 크게 차이를 보이지 않았으나, 40분간 용해한 SCT-CF40, SCT-CF40-F의 흡수율은 각각 185%, 178%로 감소하였다(Figure 2A). 이러한 감소는 용해시간 증가에 따라 분해증가로 입자의 크기가 감소하여 메탄올에서 응고 후 건조 되었을 때, 높은 가교밀도로 인해 수분침투가 줄어들기 때문으로 사료된다[30].

SCT분말의 [Amim]Cl 이온성액체 내에서 용해시간의 경과에 따른 변화를 광학현미경을 이용하여 관찰하였다. 그 결과 20분과 40분 처리그룹에 서는 SCT분말이 완전히 용해되어 입자모양이 관찰되지 않았으나 0분과 10분 처리그룹에서는 SCT분말이 용해되지 않고 남아있음을 관찰하였다(Figure 2B).

또한 본 연구에서 SCT-CF의 흡수율(223%)은 WP-CF의 흡수율(130%)에 비하여 약 1.7배 정도 높게 나타났으나, 이러한 흡수율은 NMMO/H_2O용매를 사용하여 제조한 SCT-CF가 WP-CF보다 3.5배 이상 높은 수분 흡수율을 나타내는 것과 차이가 있다[16]. 이러한 차이는 용매 종류에 따른 용해도의 차이 때문에 발생하는 것으로 사료된다.

3.4 발포제처리와 건조방법이 SCT-CF의 흡수성에 미치는 영향

발포제 처리와 건조방법이 SCT-CF의 흡수성에 미치는 영향을 분석하기 위하여, 발포제의 처리조건과 3가지 건조방법을 조합하여 제조한 6종류의 셀룰로오스필름의 흡수성을 분석하였다.

그 결과 발포제를 처리하지 않은 경우 동결건조법으로 제조된 SCT-CF20-F는 다른 방법으로 제조

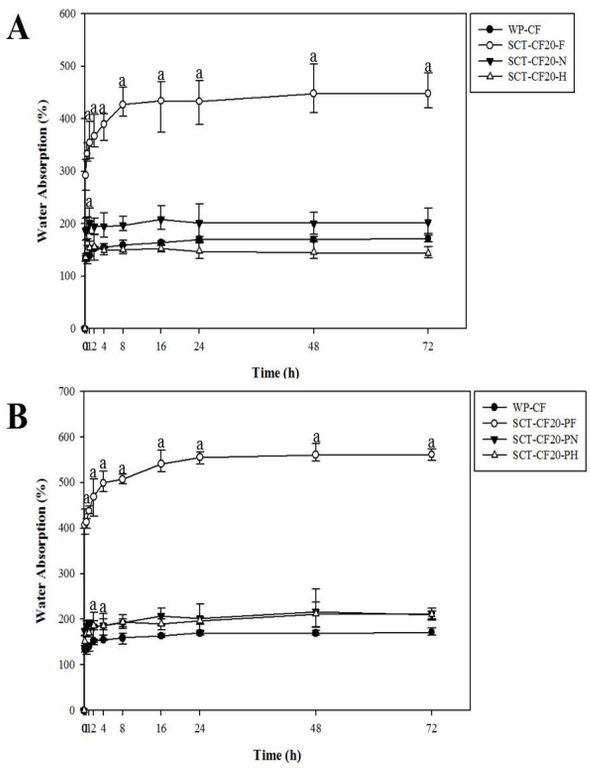

Figure 3. Water absorption of cellulose film treated with vehicle and porogen($NaHCO_3$).

된 필름(SCT-CF20-N, SCT-CF20-H)에 비하여 높은 수분흡수성을 나타내었다. SCT-CF20-F는 침지 후 8시간까지 흡수율이 상승한 후 평형을 이루었으며, 72시간 후에 448%로 최대 흡수율을 나타내었다. 그러나 상온건조법과 열풍건조법으로 제조된 SCT-CF20-N와 SCT-CF20-H는 2시간 이후 평형에 도달하였고, 각각 202%, 143%의 수분 흡수율을 나타내었다(Figure 3A).

발포제를 첨가한 경우 4가지 필름의 흡수율은 발포제를 첨가하지 않은 그룹의 필름과 매우 유사한 양상을 나타내었다. SCT-CF20-PF는 다른 3가지 필름에 비하여 가장 높은 흡수율을 나타내었으며, 24시간이 경과한 평형에 도달하였고, 72시간 후 562%으로 최대 흡수율을 나타내었다. 그러나 상온건조법과 열풍건조법에 의해 제조된 SCT-CF20-PN과 SCT-CF20-PH는 각각 210%, 211%의 흡수율을 나타내었고, 침지한지 1시간에 평형상태에 도달하였다(Figure 3B).

발포제를 첨가한 필름과 미첨가 필름을 비교하면, 상온건조법과 열풍건조법으로 제조된 필름은 흡수율에 큰 차이를 보이지 않았으나 동결건조법으로

www.kci.go.kr

제조된 필름에서는 SCT-CF20-PF(562%)가 SCT-CF20-F (448%)보다 1.25배 정도 높은 흡수율을 나타냈다 (Figure 3).

따라서 이러한 결과는 SCT-CF은 발포제를 첨가하여 동결건조방법으로 제조하였을 때 가장 높은 흡수율을 나타냄을 제시하고 있다.

3.5 발포제처리와 건조방법이 SCT-CF의 형태학적 변화에 미치는 영향

CF의 흡수율과 형태학적 변화의 상관관계를 분석하기 위해, 이들 필름의 표면과 단면에 대한 형태학적 변화를 주사전자현미경을 이용하여 관찰하였다. 필름 표면분석의 경우 상온건조필름의 표면은 열풍건조필름에 비하여 거친 표면을 나타내었으며, 동결건조필름은 기포가 빠져나간 흔적들이 관찰되었다. 발포제 첨가필름과 미첨가필름은 기본적으로 매우 유사한 형태를 나타내었으나 일부 필름에서 거친 표면을 나타내었다(Figure 4A). 또한 필름 단면분석의 경우, 발포제 미첨가그룹에서는 동결건조법으로 제조한 SCT-CF20-F가 가장 많은 다공성구조를 나타내었다. 나머지 2개 필름(SCT-CF20-H 혹은 SCT-CF20-N)은 특별한 다공성구조를 나타내지 못하였다. 발포제 첨가필름 역시 미첨가 필름과 유사한 경향으로 SCT-CF20-PF에서 다공성 구조를 나타내었다(Figure 4B).

동결건조 그룹에서 500x의 배율로 관찰했을 때, SCT-CF20-PF가 SCT-CF20-F와 비해 다공성이 높았다. 이는 SCT를 [Amim]Cl에 용해시킬 때 발포제로 인해 큰 기공이 생겼고, 응고욕인 물에 침지했을 때 큰 기공의 형태 그대로 응고가 되어 큰 기공이 형성되고 응고된 SCT 사이의 물 분자가 승화되면서 작은 크기의 기공이 생성됐기 때문으로 사료된다.

따라서 이러한 결과는 전체적으로 발포제 첨가필름이 미첨가필름에 비하여 우수한 다공성을 나타냄을 제시하고 있다. 발포제로 사용된 $NaHCO_3$의 첨가는 다양한 종류의 필름에서 기공률을 증가시키는 물질로서 알려져 있으며[31], 이러한 효과는 본 실험에서도 동일하게 관찰되었다.

3.6 SCT-CF의 세포생존율 평가

다양한 조건에서 제조된 SCT-CF에 대한 인간 피부세포주인 SK-MEL2의 세포생존율을 평가하기 위해, 6가지 필름을 대상으로 MTT분석을 실시하였다.

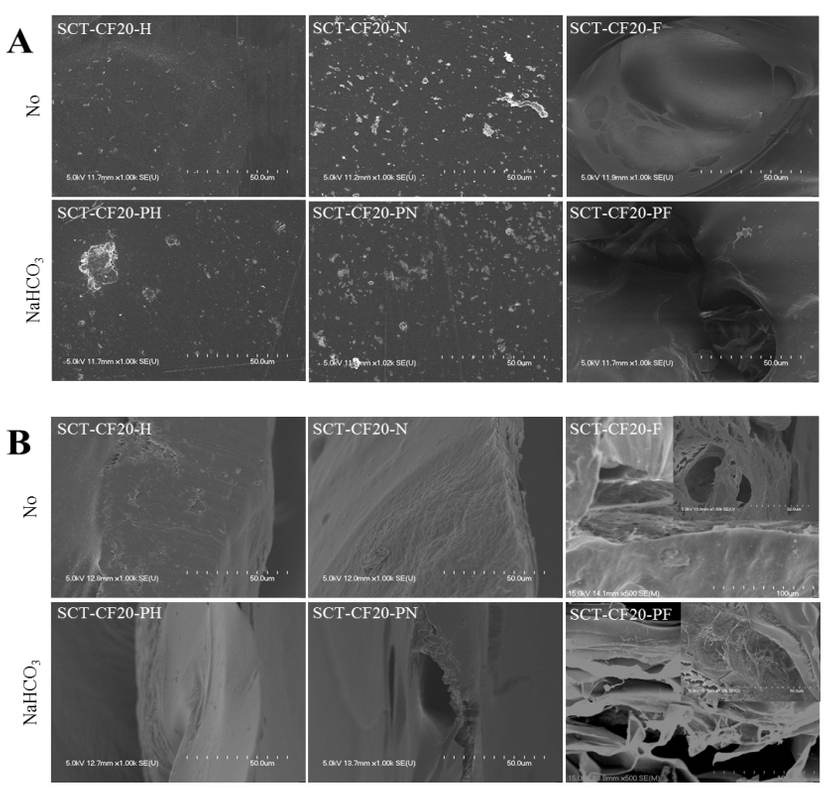

Figure 4. SEM image of cellulose films derived from SCT.

www.kci.go.kr

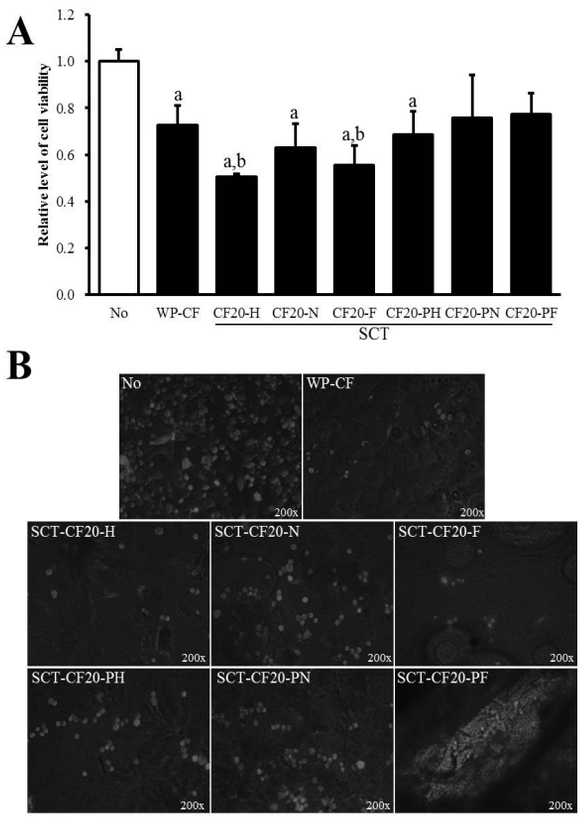

Figure 5. Cell viability and adhesion on the cellulose films derived from SCT.

그 결과 발포제 첨가필름은 발포제 미첨가필름에 비하여 높은 세포생존율을 나타내었으며, WP-CF와 유사한 세포생존율을 나타내었다. 발포제 미첨가필름 중에서는 SCT-CF20-H이 가장 낮은 세포생존율을 나타내었고, SCT-CF20-N이 가장 높은 생존율을 나타내었다. 발포제 첨가필름에서도 SCT-CF20-PH이 가장 낮은 세포생존율을 나타내었고, SCT-CF20-PN과 SCT-CF20-PF은 높은 세포생존율을 나타내었다(Figure 5A). 또한 세포부착성은 세포생존율과 전체적으로 유사한 양상을 나타내었다(Figure 5B).

SCT-CF20-F와 SCT-CF20-PF는 흡수력 증가로 인해 필름의 두께가 지나치게 증가하여 현미경상에 세포형태를 정확하게 관찰하는데 한계가 있었다. 이러한 결과는 발포제를 첨가하여 상온건조법 혹은 동결건조법으로 제조한 CF가 우수한 세포생존율과 세포부착능을 나타냄을 제시하고 있다.

4. 결 론

본 연구에서는 흡수성이 우수한 창상치료용 SCT-CF을 제조하기 위하여 [Amim]Cl 이온성액체에 SCT분말을 용해시간, 발포제 처리조건, 필터처리 조건, 건조 방법에 따라 다양한 필름을 제조하여 수분흡수율, 형태학적 구조, 생체적합성 등을 분석하여 상처치료용 필름으로서의 최적조건을 확립하고자 하였다.

본 연구결과에서는 SCT분말을 이용하여 [Amim]Cl 이온성액체로 80℃에서 20분 동안 용해시킨 후 발포제를 첨가하여 동결건조방법으로 건조한 필름이 가장 높은 수분흡수율과 다공성 구조를 나타내었다. 또한 이러한 조건에서 제조된 필름은 피부세포주에서 높은 생존율과 부착능을 나타내어 향후 생체적합성이 우수할 것으로 예상된다.

따라서 본 연구에서 확립된 최적조건을 이용하여 흡수성과 생체적합성이 우수한 SCT-CF을 개발한다면 상처치료 의료용 소재로서 응용될 가능성이 높을 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 한국해양과학기술진흥원의 지원(과제제목: 미더덕껍질을 이용한 고부가가치 의료용 기능성소재 개발 및 산업화)을 받아 수행되었습니다.

References

1. M. Kokabi, M. Sirousazar, and Z. M. Hassan, PVA-clay Nanocomposite Hydrogels for Wound Dressing, *Eur. Polym. J.,* **43**(3), 773(2007).
2. G. A. Kannon and A. B. Garrett, Moist Wound Healing with Occlusive Dressings, A Clinical Review, *Dermatol. Surg.,* **21**(1), 583(1995).
3. W. I. Kim, C. J. Kim, D. Y. Kim, O. K. Kwon, and O. H. Kwon, Fabrication and Characterization of Polyurethane Foam for Wound Dressing, *Polymer(Korea*), **34**(5), 442(2010).
4. C. J. Doillon, Porous Collagen Sponge Wound Dressing: *in Vivo* and *in Vitro* Studies, *J. Biomater. Appl.,* **2**(4), 562(1988).
5. S. B. Lee, Y. H. Kim, M. S. Chong, S. H. Hong, and Y. M. Lee, Study of Gelatin-containing Artificial Skin Ⅴ: Fabrication of Gelatin Scaffolds using a Salt-leaching Method, *Biomaterials,* **26**(14), 1961(2005).

www.kci.go.kr

6. E. Petra, Y. Julia, K. L. Rachel, D. S. Lonnie, and J. M. David, Porous Carriers for Biomedial Applications based on Alginate Hydrogels, *Biomaterials,* **21**(19), 1921(2000).
7. M. S. Khil, D. I. Cha, H. Y. Kim, I. S. Kim, and N. Bhattarai, Electrospun Nanofibrous Polyurethane Membrane as Wound Dressing, *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.,* **67**(2), 675(2003).
8. S. K. Bajpai, M. Bajpai, and L. Sharma, Poly(methacrylamide-co-acrylicacid) Hydrogels for Gastrointestinal Delivery of Theophylline I. Swelling Characterization, *J. Macromol. Sci.,* **101**(4), 2995(2006).
9. D. R. Houghton and R. H. Millar, Spread of *Styela mammiculata* Carlisle, *Nature,* **185**, 862(1960).
10. K. A. Hillock and H. J. Costello, Tolerance of the Invasive Tunicate *Styela clava* to Air Exposure, *Biofouling,* **29**(10), 1181(2013).
11. M. J. Wonham and J. T. Carlton, Trends in Marine Biological Invasions at Local and Regional Scales: the Northeast Pacific Ocean as a Model System, *Biol. Invasions.,* **7**, 369(2005).
12. M. H. Davis and M. E. Davis, *Styela clava* (Tunicata: Ascidiacea) - A New Addition to the Fauna of the Portuguese Coast, *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.,* **85**(2), 403(2005).
13. S. H. Ahn, S. H. Jung, S. J. Kang, T. S. Jeong, and B. D. Choi, Extraction Glycosaminoglycans from *Styela clava* Tunic, *Korean J. Biotechonl. Bioeng.,* **18**(3), 180(2003).
14. A. Bodin, L. Gustafsson, and P. Gatenholm, Surface-engineered Bacterial Cellulose as Template for Crystallization of Calcium Phosphate, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.,* **17**(4), 435(2006).
15. S. Shiqeta, O. Suzuki, Y. Aki, S. Kawamoto, and K. Ono, Purification and Characterization of Sea Squirt Alpha-N-acetylgalactosaminidase, *J. Biosci. Bioeng.,* **89**(1), 84(2000).
16. Y. J. Jung, Properties of Regenerated Cellulose Films Prepared from the Tunicate *Styela clava, J. Kor. Fish. Soc.,* **41**(4), 237(2008).
17. D. Zhang, Q. Zhang, X. Gao, and G. Piao, A Nanocellulose Polypyrrole Composite based on Tunicate Cellulose, *Int. J. Polym. Sci.,* **2013**, 1(2013).
18. S. M. Kim, J. H. Lee, J. A. Jo, S. C. Lee, and S. K. Lee, Development of a Bioactive Cellulose Membrane from Sea Squirt Skin for Bone Regeneration a Preliminary Research, *J. Kor. Oral Maxillofac. Surg.,* **31**, 440(2005).
19. H. Zhang, J. Wu, J. Zhang, and J. He, 1-Allyl-3-methylimidazolium Chloride Room Temperature Ionic Liquid: A New and Powerful Nonderivatizing Solvent for Cellulose, *Macromolecules,* **38**(20), 8272(2005).
20. D. Gerlier and N. Thomasset, Use of MTT Colorimetric Assay to Measure Cell Activation, *J. Immunol. Methods.,* **94**(1-2), 57(1986).
21. L. C. F. Stubberfield and P. J. A. Shaw, A Comparison of Tetrazolium Reduction and FDA Hydrolysis with Other Microbial Activity, *J. Microbiol. Methods,* **12**, 151(1990).
22. C. F. Liu, R. C. Sun, A. P. Zhang, J. L. Ren, and Z. C. Geng, Structural and Thermal Characterization of Sugarcane Bagasse Cellulose Succinates Prepared in Ionic Liquid, *Polym. Degrad. Stab.,* **91**, 3040(2006).
23. S. Y. Oh, D. I. Yoo, Y. Shin, H. C. Kim, H. Y. Kim, Y. S. Chung, W. H. Park, and J. H. Crystalline Structure Analysis of Cellulose Treated with Sodium Hydroxide and Carbon Dioxide by Means of X-ray Diffraction and FTIR Spectroscopy, *Carbohydr. Res.,* **340**(15), 2376(2005).
24. H. G. Higgins, C. M. Stewart, and K. J. Harrington, Infrared Spectra of Cellulose and Related Polysaccharides, *J. Polym. Sci.,* **51**(155), 59(1961).
25. S. Zhou, K. Tashiro, T. Hongo, H. Shirataki, C. Yamane, and T. Li, Influence of Water on Structure and Mechanical Properties of Regenerated Cellulose Studied by an Organized Combination of Infrared Spectra, X-ray Diffraction, and Dynamic Viscoelastic Data Measured as Functions of Temperature and

www.kci.go.kr

Humidity, *Macromolecules,* **34**, 1274(2001).
26. Y. Kataoka and T. Kondo, Quantitative Analysis for the Cellulose I Alpha Crystalline Phase in Developing Wood Cell Walls, *Int. J. Biol. Macromol.,* **24**(1), 37(1999).
27. S. Raymond, B. Henrissat, D. T. Qui, A. Kvick, and H. Chanzy, The Crystal Structure of Methyl Beta-cellotrioside Monohydrate 0.25 Ethanolate and its Relationship to Cellulose II, *Macromolecules,* **277**(2), 209(1995).
28. F. J. Kolpak and J. Blackwell, Determination of the Structure of Cellulose II, *Macromolecules,* **9**(2), 273(1976).
29. F. J. Kolpak and J. Blackwell, Communications to the Editor: The Structure of Regenerated Cellulose, *Macromolecules,* **8**(4), 583(1975).
30. P. Sriamornsak and R. A. Kennedy, Swelling and Diffusion Studies of Calcium Polysaccharide Gels Intended for Film Coating, *Int. J. Pharm.,* **358**(1-2), 205(2008).
31. J. H. Jung, J. Kim, and K. Y. Lee, Swelling Behavior of Low Toxic Absorbent Based on Biopolymer, *Polymer(Korea),* **37**, 478(2013).

www.kci.go.kr