

방사선 이용 미생물 발효 셀룰로오스 다공성 폼 제조 및 특성

권희정[†] · 신영민[†] · 최종배 · 임종영 · 정진오 · 정성린 · 박종석
김진규 · 임윤목* · 최영훈¹ · 김상숙¹

한국원자력연구원 첨단방사선연구소, ¹농촌진흥청 국립원예특작과학원

Characterization of Microbial Fermented Cellulose Porous Foam Prepared by Radiation Treatment

Hui-Jeong Gwon[†], Young Min Shin[†], Jong-Bae Choi, Jong-Young Lim, Jin-Oh Jeong,
Sung In Jeong, Jong-Seok Park, Jin Kyu Kim, Youn-Mook Lim*,
Young-Hun Choi¹ and Sang-Suk Kim¹

Advanced Radiation Technology Institute, Korea Atomic Energy Research Institute,
Jeongeup 580-185, Korea

¹Citrus Research Station, National institute of Horticultural and Herbal Science,
Rural Development Administration, Seogwipo 699-943, Korea

Abstract - Microbial fermented cellulose gel, citrus gel (CG), was successfully fabricated to porous foam by radiation treatment and freeze drying. The chemically induced radiation was used to create highly porous foam and further freeze drying of the CG produced tough foams with interconnected open pores for use in tissue engineering. The microstructure of the CG foam was controlled by varying the irradiation dose and quenching temperature with pore size ranging from several microns to a few hundred microns. Tensile strength and Gurley value of the CG foam were influenced by irradiation dose. These radiation induced CG foams are promising scaffolds for tissue engineering.

Key words : microbial fermented cellulose, porous foam, radiation, tissue engineering

서 론

셀룰로오스(Cellulose)는 자연계에 널리 존재하는 고등식물의 세포벽의 주성분으로서 베타-1,4-글루코오스(β -1,4-glucose)로 구성된 다당류이다. 식물 셀룰로오스는 펙틴(pectin), 헤미셀룰로오스(hemicelluloses), 리그닌(lignin) 등의 다른 다당류와 혼합하여 헤테로폴리-사카

라이드(heteropoly-saccharide)로 이루어져 있어 결정화도가 낮고 기계적 강도와 흡착성이 떨어진다. 반면 세균이 생산하는 셀룰로오스는 식물성 셀룰로오스와 달리 펙틴(pectin), 헤미셀룰로오스(hemicelluloses), 리그닌(lignin) 등의 다당류를 함유하지 않은 순수한 셀룰로오스 집합체이며, 약 0.1 μ m의 두께를 지닌 마이크로피브릴(micro-fibril)이 수소결합으로 3차원적 망상구조를 이루고 있다. 따라서 결정화도가 높고 기계적강도와 흡착성, 보수성, 현탁 안정성, 결착성 등의 물리적인 성질이 우수하여 식품, 화장품 및 의약품 산업의 신소재로써 널리 사용되고 있다. 독일의 경우 인조 혈관 및 화상 환자용 인조피부

[†] These authors contributed equally to this works.

* Corresponding author: Youn-Mook Lim, Tel. 063-570-3065,
Fax. 063-570-3079, E-mail. ymlim71@kaeri.re.kr

등의 의료용품으로 개발되고 있다(Benziman *et al.* 1980; Fontana *et al.* 1990; Embuscado *et al.* 1994; Chung *et al.* 1998; Sutherland *et al.* 1998; Vandamme *et al.* 1998; Chung and Shyu 1999; Klemm *et al.* 2001; Cho *et al.* 2002; Backdahl *et al.* 2006).

종래의 셀룰로오스를 생산하는 균주로는 *Acetobacter* sp., *Agrobacterium* sp., *Rhizobium* sp., *Pseudomonas* sp. 및 *Sarcina* sp. 속이 있으며, 특히 *Acetobacter* sp. 중에 *A. xylium*, *A. pasteurianus* 및 *A. hansenii*가 많이 알려져 있는데 (Cowan and Steel 1974), 최근 국내산 감귤과즙으로부터 감귤 내성의 *Gluconacetobacter hansenii* TL-2C를 선별한 후 미생물 발효 셀룰로오스인 감귤 발효겔을 대량 생산할 수 있는 방법이 개발되었으며, 개발된 감귤 기반 미생물 발효 셀룰로오스는 코코넛 셀룰로오스보다 물리적인 강도가 높으며, 구조적으로 매우 치밀하고 순수한 3차원 망상구조의 미세한 마이크로 피브릴로 구성되어 인장강도가 우수한 특징을 가지고 있는 것으로 보고되었다(Choi *et al.* 2004a, b).

감귤은 제주도에서 연간 50~60만 톤이 생산되는 국내 최대 생산 과일 품목으로 대부분 생과로 이용되고 있으나, 일부 감귤주스를 가공하기 위한 전 단계에서 감귤 농축액 상태로 저장되고 있을 뿐 가공품 개발에 의한 소비가 적고 대부분 한정된 계절에 생산되어 보존 가공에 많은 애로점이 있다(Chung *et al.* 2000). 또한 감귤박 및 부산물의 처리에도 막대한 비용이 소비되고 있어 감귤박을 이용한 신소재 개발의 필요성이 대두되고 있다. 현재 바이오 부산물의 처리에 있어 막대한 경제적 비용과 손실이 발생되고 있으며, 특히 감귤박의 경우 매년 6만 톤 이상이 발생되고 있으며 처리비용도 6만원/톤이며 발생량의 50%는 해양으로 투기되고 있는 실정이다.

본 연구에서는 바이오 폐기물로서 재생가능성이 높은 감귤박으로부터 개발된 감귤 발효겔을 이용하여 조직공학용 다공성 폼을 개발하고자 하였다. 특히 다른 고분자 및 화학재료의 첨가없이 감귤 발효겔만을 원료로 하여

동결건조 및 방사선 가교를 통해 다공성 폼을 제조하였고, 제조된 폼의 물리화학적 및 형태학적 특성 분석을 통해 조직공학용 소재로서의 활용가능성을 제시해 보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 시약 및 재료

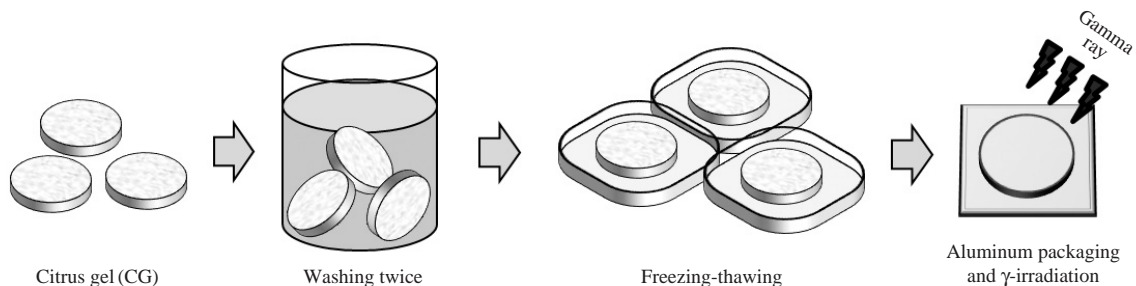
실험에 사용된 미생물 발효 셀룰로오스(MFC)는 농촌진흥청 제주 감귤시험장으로부터 제공받은 감귤 발효겔(citrus gel, CG)로서, CG는 제주산 감귤 껍질을 발효하여 *Gluconacetobacter hansenii* TL-2C 균의 대사산물로 제조된 것이다(Kim *et al.* 2007). 모든 실험에서 물은 3차 증류수를 사용하였다.

2. 감귤 발효겔(CG)을 이용한 다공성 폼 제조

CG를 증류수로 2회 세척한 후, petri dish(10cm×10cm)에 넣어 deep freezer에서 -76°C 에서 -80°C 의 온도 사이로 3분간 냉동한 후 다시 상온으로 용해하여 1차적으로 물리적 가교 구조를 형성하게 하였다. 물리적 가교를 이룬 CG를 알루미늄 박으로 포장하여 25 및 50kGy 조사선량을 10kGy h^{-1} 의 조사선량율로 감마선(^{60}Co)을 조사하여 물리화학적 가교 및 방사선 멸균된 CG 다공성 폼을 제조하였다. 또한, 동결온도에 따른 기공변화를 측정하기 위해 CG를 실온(a), -20°C (b), $-76^{\circ}\text{C}\sim-80^{\circ}\text{C}$ (c), -192°C (d)로 각각의 온도 조건에서 동결 및 건조하였다. CG 다공성 폼의 제조에 관한 전체적인 모식도를 Scheme 1에 나타내었다.

3. 가교율 측정

제조된 CG 다공성 폼의 가교율을 측정하기 위해 진공



Scheme 1. Preparation of CG porous foam.

오븐에 65°C, 48 hr 동안 CG 다공성 폼을 건조한 후 무게를 측정하였다. 이 무게가 초기 무게 (W_i)이다. 가교에 참여하지 않은 부분을 제거하기 위해 건조된 CG 다공성 폼을 3차 증류수에 48 hr 침지시키고, 다시 진공 오븐에 65°C, 48 hr 동안 건조시켰다. 건조된 이 무게는 나중 무게 (W_d)이다. 가교율은 W_d 와 W_i 의 백분율 비 ($(W_d/W_i) \times 100$)로 측정하였다.

4. 기계적 물성

제조된 CG는 조직공학용 소재로서 이용하기에 적합한 강도를 갖는지 판단하기 위해 기계적 물성을 조사하였다. 대표적인 기계적 물성 중 인장강도를 Universal testing machine (Instron Model-5960, USA)을 이용하여 측정하였다. 측정 샘플은 길이 30 mm, 너비 10 mm로 제작하였으며, 측정 속도는 10 mm min⁻¹, 하중은 5 kN으로 하였다.

5. 형태학적 분석

제조된 CG 다공성 폼의 표면형태를 SEM (Scanning electron microscopy, Model JSM-6390, JEOL, Japan)을 사용하여 관찰하였다. 시료는 약 5 × 5 mm 크기로 고정했으며, 60초간 백금코팅한 후, 10 kV에서 시료의 표면을 관찰하였다.

6. 통기도 측정

다양한 조건으로 제조된 CG 다공성 폼을 Gurley type densometer (Toyoseiki, Japan)를 사용하여 통기도를 측정하여 기공크기의 변화를 비교하고 평가하였다.

결과 및 고찰

1. 가교율 측정

Fig. 1에 제조된 CG 다공성 폼의 가교율을 나타내었다. 동결건조를 통한 물리적 가교에 의한 CG의 가교율은 약 56%였고, 방사선 조사를 통한 화학적 가교가 더해져 25

kGy에서 약 67%로 향상된 가교율을 나타내었다. 그러나 더 높은 50 kGy의 조사선량에서는 일부 방사선 분해반응에 의해 58%로 감소된 가교율을 나타내었다.

2. 기계적 물성

Table 1에 CG 다공성 폼의 제조 조건에 따른 인장강도 측정결과를 나타내었다. 동결건조된 CG 다공성 폼의 tensile stress는 약 14 MPa이었고, 방사선 조사된 CG 다공성 폼은 25와 50 kGy에서 각각 약 10과 8 MPa로서 감소하는 경향을 나타내었다. 본 연구팀은 방사선을 이용한 조직공학용 고분자 소재의 표면 개질에 관련된 연구를 보고하였는데, 생분해성 합성고분자 소재의 경우 방사선 조사선량이 증가할수록 고분자 분자량의 감소와 함께 기계적 강도에도 영향을 주는 것을 확인하였다 (shin *et al.* 2007). 실제로 방사선 조사시 가교 및 분해반응은 동시에 발생하며, 소재 및 조사량의 증가에 따라 분해반응이 더 우월하게 진행하기도 한다 (Wang *et al.* 2000; Zhang

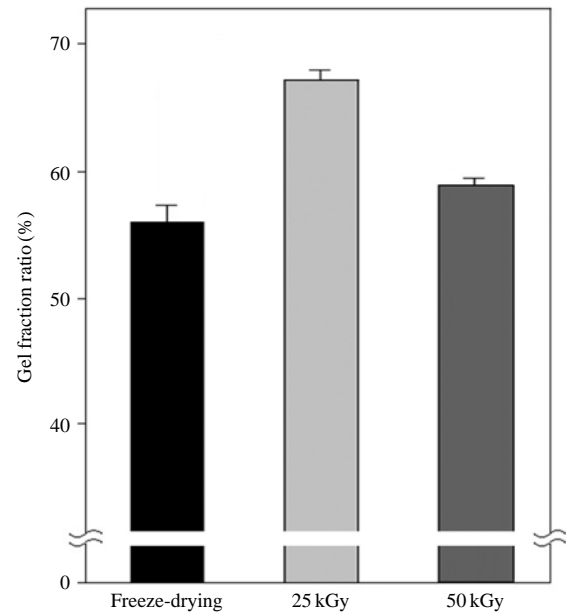


Fig. 1. Gel fraction ratio of CG porous foams; freeze-dried CG and gamma-irradiation added (25 or 50 kGy) CG.

Table 1. Mechanical properties of CG porous foams

	Tensile stress (Mpa)	Tensile strain (%)	Young's modulus (Mpa)
Freeze-dried CG	14.721 ± 1.274	5.517 ± 0.161	445.457 ± 29.287
CG foam* at 25 kGy	10.069 ± 0.489	4.367 ± 0.455	445.813 ± 17.912
CG foam* at 50 kGy	8.607 ± 0.106	3.764 ± 0.365	350.519 ± 5.669

*Gamma irradiated CG after freeze-drying.

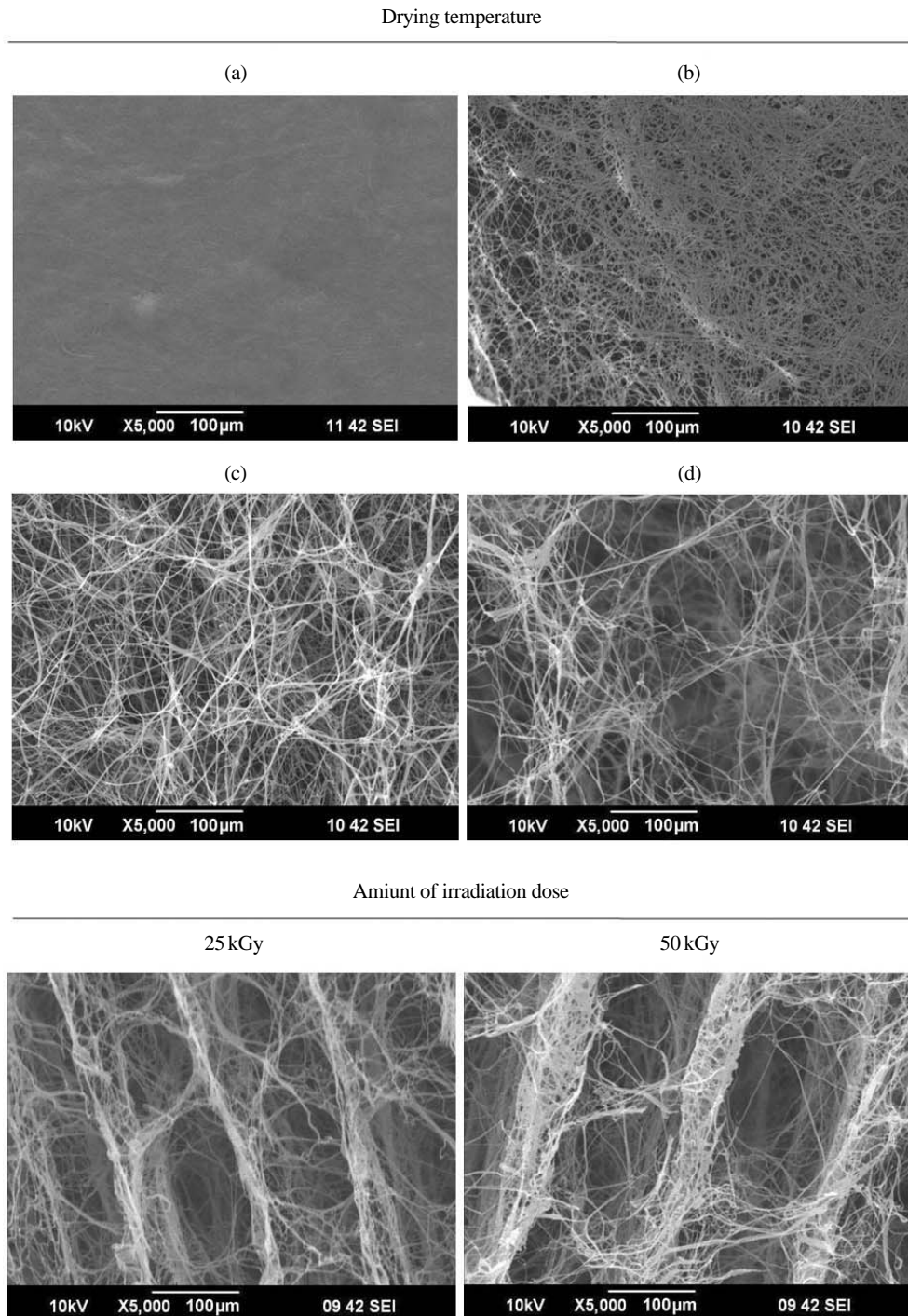


Fig. 2. SEM pictures of room- or freeze-dried CG and gamma-irradiation added (25 or 50 kGy) CG; (a) room temperature, (b) -20°C , (c) -76°C $\sim -80^{\circ}\text{C}$, (d) -192°C .

and Yu 2004). CG 다공성 폼의 1차적인 물리적 가교형성은 방사선 조사를 통해 CG 폼 내부의 약한 셀룰로오스 잔기 및 가교 조직의 분해와 라디칼 가교반응을 통해 보다 감소된 인장강도를 나타낸 것으로 판단되며, 더 높은

조사선량에서는 가교보다는 분해반응에 의해 더 낮은 인장강도를 나타낸 것으로 판단된다. 또한 polysaccharide도 방사선 조사에 의해 분자량이 감소한다는(Chmielewski *et al.* 2007) 결과를 통해 유추해 볼 때, 본 연구에서도

polysaccharide로 구성된 CG 다공성 폼이 방사선 조사에 따른 분자량의 감소 혹은 분해의 영향을 받은 것으로 판단된다. 따라서 CG 다공성 폼이 유지할 수 있는 최대하중을 나타내는 tensile stress의 감소와 tensile strain(변형률)도 감소는 물론, 탄성계수인 Young's modulus도 tensile stress와 같이 감소하는 것으로 나타났다. 특히 다른 천연고분자 기반의 조직공학용 소재의 인장강도가 140 kPa 정도인 것에 비추어 볼 때 (Madhally and Matthew 1999), 본 연구에서 제조된 CG 다공성 폼은 월등한 기계적 강도를 가지고 있어 세포지지체로서 활용하기에 매우 적합한 것을 확인할 수 있다.

3. 형태학적 분석

CG는 수소결합에 의한 물리적 가교를 형성시키기 위해 동결건조를 수행하였는데, 이는 고온과 상온건조시에 CG 내부에 함유되어 있는 수분이 증발되면서 CG의 두께와 내부 공극이 감소되는 문제가 있기 때문이다. 그러나 Fig. 2에서 나타난 것처럼 동결건조를 수행할 경우 저온에서 CG 내부의 수분이 얼음으로 결정화되면서 동시에 압력을 낮추면 수분의 승화작용에 의해 CG의 두께가 어느 정도는 유지되면서 내부의 공극을 유지시킬 수 있다. 특히, 초기 습윤 상태의 CG를 동결 온도에 따라 수분의 결정 크기를 조절할 수 있기 때문에 다양한 기공 크기를 가진 CG 다공성 폼을 제조할 수 있었다. 기공의 크기는 (a) < (b) < (c) < (d) 순으로 증가되는 것을 확인할 수 있는데, 이는 동결 온도를 낮출수록 증가된 얼음 결정의 크기로 인해 기공의 크기가 증가된 것으로 판단되며 (Matsumoto *et al.* 2002), 특히 (c)와 방사선 조사된 폼의 기공크기를 비교해 보면 월등히 증가된 기공을 볼 수 있다. 이는 방사선 조사에 의해 CG 폼 내부의 약한 셀룰로오스 잔기 및 가교 조직의 분해 (Wang *et al.* 2000; Zhang and Yu 2004)로 인해 더욱 증가된 기공을 나타내는 것으로 판단된다. 또한, (a)와 (b)의 경우 매우 조밀하게 형성된 내부구조를 이루고 있어, (c)와 (d)의 조건에서만 방사선 조사를 통해 100 μm 이상의 보다 크고 균일해진 기공을 가진 CG 다공성 폼을 제조할 수 있을 것으로 판단된다.

4. 통기도 측정

조직공학용 소재로서 활용하기 위해서는 서로 연결된 균일한 내부 공극을 가지고 있어야 하는데, 본 연구에서는 제조된 CG 다공성 폼의 통기도를 측정함으로써 내부 공극의 특성을 평가해 보고자 하였다. Table 2에서 나타

Table 2. Gurley values of CG porous foams; freeze-dried CG and gamma-irradiation added (25 or 50 kGy) CG

Gurley value (sec 100 mL ⁻¹)		
Freeze-dried CG	25 kGy	50 kGy
4766	3205	1989

내듯이 방사선 조사선량이 증가할수록 훨씬 줄어든 통기 수치로 인해 낮은 통기도 값을 나타내었다. 이 결과는 앞서 설명된 바와 마찬가지로 방사선량이 증가할수록 CG 다공성 폼 내부에 약한 강도를 가지는 일부 구조물은 분해되거나 가교를 이루면서 보다 더 균일하고 기공이 커진 내부구조를 이루었기 때문으로 판단된다. 따라서 CG 다공성 폼은 방사선에 의해 보다 균일해진 내부구조 및 증가된 기공으로 인해 통기성이 향상되었고, 이는 단위 면적당 통과 시간을 측정하는 통기도 수치의 감소를 통해서 입증할 수 있었다.

결 론

본 연구에서는 폐바이오 부산물인 감귤박을 이용하여 생산된 미생물 발효 셀룰로오스(MFC)인 감귤 발효겔(CG)을 이용하여 동결건조와 방사선 조사를 통해 기공 크기의 조절이 가능한 조직공학용 다공성 폼을 제조하였다. 제조된 CG 다공성 폼은 50% 이상의 가교율과 제조 조건에 따라 5 μm 에서부터 100 μm 이상의 기공 크기 및 8 MPa 이상의 인장강도를 가지고 있어 향후 조직공학용 소재로의 활용가능성을 확인하였고, 특히 화학약품을 사용하지 않으면서 폐부산물의 활용이라는 측면에서 매우 친환경적이고 경제적인 다공성 폼의 제조기술로서 전망될 수 있을 것으로 판단된다.

사 사

본 연구는 미래창조과학부에서 주관하는 원자력연구개발사업과 농촌진흥청 차세대바이오그린21사업(과제번호: PJ009510012013)의 지원에 의해 이루어진 것으로, 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Backdahl H, G Helenius, A Bodin, U Nannmark, BR Johansson, B Risberg and P Gatenholm. 2006. Mechanical properties

- of bacterial cellulose and interactions with smooth muscle cells. *Biomaterials* 27:2141-2149.
- Benziman M, CH Haigler, RM Brown Jr, AR White and KM Cooper. 1980. Cellulose biogenesis: polymerization and crystallization are coupled processes in *Acetobacter xylinum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:6678-6682.
- Chmielewski AG, W Migdal, J Swietoslowski, J Swietoslowski, U Jakubaszek and T Tarnowski. 2007. Chemical-radiation degradation of natural oligoamino-polysaccharides for agricultural application. *Radiat. Phys. Chem.* 76:840-1842.
- Cho SH, JY Lee, YS Choi and KH Choi. 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, JS Jeong, CH Moon and ML Kim. 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, JS Jeong, CH Moon and ML Kim. 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.
- Chung Y and Shyu Y. 1999. The effect of pH, salt, heating and freezing on the physical properties of bacterial cellulose. *International J. Food Sci. Technol.* 34:23-26.
- Cowan ST and KJ Steel. 1974. *Manual for the identification of medical bacteria*, 2nd Ed., Cambridge University Press, UK.
- Embuscado ME, JS Marks and JN BeMiller. 1994. Bacterial cellulose. II. Optimization of cellulose production by *Acetobacterxylinum* through response surface methodology. *Food Hydrocolloid* 8:419-430.
- Fontana JD, AM De Souza, CK Fontana, IL Torriani, JC Moresch and BJ Gallotti. 1990. *Acetobacter* cellulose pellicle as a temporary skin substitute. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 24:253-264.
- Gwon HJ, YM Lim, YC Nho and SH Baik. 2010. Humectants effect on aqueous fluids absorption of γ -irradiated PVA hydrogel followed by freeze thawing. *Radiat. Phys. Chem.* 79:650-653.
- Hassan CM and NA Peppas. 2000. Structure and applications of poly(vinyl alcohol) hydrogels produced by conventional crosslinking or by freezing/thawing methods. *Adv. Polym. Sci.* 153:37-65.
- Madhally S and H Matthew. 1999. Porous chitosan scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials.* 20:1133-1142.
- Matsumoto M, S Saito and I Ohmine, 2002. Molecular dynamics simulation of the ice nucleation and growth process leading to water freezing. *Nature* 416:409-413.
- Shin YM, KS Kim, YM Lim, YC Nho and H Shin. 2008. Modulation of spreading, proliferation, and differentiation of human mesenchymal stem cells on gelatin-immobilized poly(L-lactide-co-E-caprolactone) substrates. *Biomacromolecules* 9:1772-1781.
- Vandamme EJ, SD Baets, A Vanbaelen, K Joris and PD Wulf. 1998. Improved production of bacterial cellulose and its application potential. *Polym. Degrad. Stab.* 59:93-99.
- Wang B, S Mukataka, E Kokufuta and M Kodama. 2000. The influence of polymer concentration on the radiation-chemical yield of intermolecular crosslinking of poly(vinyl alcohol) by gamma-rays in deoxygenated aqueous solution. *Radiat. Phys. Chem.* 59:91-95.
- Zhang SJ and HQ Yu. 2004. Radiation-induced degradation of polyvinyl alcohol in aqueous solutions. *Water Res.* 38:309-316.

Received: 23 October 2013

Revised: 7 November 2013

Revision accepted: 11 November 2013