멤브레인(Membrane Journal)
Vol. 25 No. 1 February, 2015, 48-59

Print ISSN: 1226-0088
Online ISSN: 2288-7253
DOI: http://dx.doi.org/10.14579/MEMBRANE_JOURNAL.2015.25.1.48

순수용매와 혼합용매를 이용한 상전이를 통한 Poly(L-lactide) 스캐폴드 막의 제조

김 영 경 · 조 유 송 · 구 자 경†

한국기술교육대학교 에너지신소재화학공학부
(2015년 2월 8일 접수, 2015년 2월 17일 수정, 2015년 2월 17일 채택)

Fabrication of Poly(L-lactide) Scaffold Membranes through Phase Inversion with Pure and Mixed Solvents

Young Kyoung Kim, Yu Song Cho, and Ja-Kyung Koo†

School of Energy · Materials and Chemical Engineering, Korea University of Technology and Education, 1600 Chungjeolno, Byungchonmyun, Chonan, Chungnam 330-708, Korea
(Received February 8, 2015, Revised February 17, 2015, Accepted February 17, 2015)

요 약: 순수용매와 혼합용매를 사용한 상전이를 통하여 poly(L-lactic acid) (PLLA) 스캐폴드 막을 제조하였다. 순수용매로서 chloroform과 1,4-dioxane을 사용하였으며, 이들 순수용매를 혼합하여 혼합용매를 제조하였다. 스캐폴드 막의 모폴로지, 기계적 특성 그리고, 물질전달 특성을 각각 SEM, 인장강도실험 및 당 확산실험을 통하여 측정, 평가하였다. 순수 chloroform 용매를 사용한 용액으로부터는 격벽-공극 구조(solid-wall pore structure)의 스캐폴드 막이 제조되었다. 반면, 순수 1,4-dioxane 용매를 사용한 용액으로부터는 나노섬유 구조의 스캐폴드 막이 제조되었다. 혼합용매의 경우 용매 내의 조성이 변화하면서 다양한 구조의 스캐폴드 막이 제조되었다. 혼합용매 내 1,4-dioxane 함량이 20% 이하인 경우에는 격벽-공극 구조의 스캐폴드 막이 제조되었으며, 1,4-dioxane 함량이 20%인 경우에는 최대직경 100 μm의 거대공극을 갖는 구조를 보였다. 1,4-dioxane 함량이 25% 이상인 구간에서는 나노섬유 구조의 스캐폴드 막이 제조되었다. 이 구간에서는 혼합용매 내 1,4 dioxane 함량이 변화함에 따라 나노섬유의 직경이 함께 변화하였다. 나노섬유의 최소직경은 15 nm 가량이었으며, 혼합용매 내의 1,4-dioxane 함량이 80 wt%일 때에 얻어졌다. 이상의 결과를 통하여 용매의 조성은 스캐폴드 막의 구조를 결정짓는 중요한 요소가 된다는 결론을 얻을 수 있었다.

Abstract: This paper reports a fabrication of poly(L-lactic acid) (PLLA) scaffold membranes through phase separation process using pure and mixed solvents. Chloroform and 1,4-dioxane were used as pure solvents and mixed solvents were obtained by mixing the pure solvents together. Morphologies, mechanical properties and mass transfer characteristics of the scaffold membranes were investigated through SEM, stress-strain test and glucose diffusion test. Scaffold membranes from the solution with pure chloroform showed solid-wall pore structure. In contrast, nano-fibrous membranes were fabricated from the solution with pure 1,4-dioxane. In case of mixed solvents, the scaffold membranes showed various structures with changing composition of the solvents. When 1,4-dioxane content was lower than 20 wt% in the solvent, scaffold membrane showed solid-wall pore structure. When the content was 20 wt%, scaffold membranes with macropores with the maximum size of 100 μm was obtained. In the concentration range of 1,4-dioxane over 25 wt%, the scaffold membranes showed nano-fibrous structures. In this range, the fibers showed different diameters with changing composition of the solvent. The minimum fiber diameter was about 15 μm, when 1,4-dioxane composition was 80 wt%. These results indicate that the composition of the solvent showed a significant effect on the structure of scaffold membrane.

***Keywords**: phase inversion, poly(L-lactic acid), scaffold membrane, tissue engineering, morphology*

1. 서 론

조직공학이란 피부 혹은 연골 등의 신체 조직이 손상된 경우의 치료 과정에서 손상된 조직 기능의 일부를 일시적으로 수행하는 대체물질을 마련하는 것을 목적으로 한다. 이러한 조직공학은 원래 기증자로부터의 조직을 직접 이식하는 것으로 시작되었다. 그러나, 이와

†Corresponding author(e-mail: jay@koreatech.ac.kr)

같이 타인 조직을 환자에게 직접 이식하는 많은 경우는 적지 않은 문제점을 보게 된다. 대부분의 경우 기증자의 조직과 환자의 기존 조직은 상호 면역 불일치를 보이고, 조직이식을 통하여 병원체 전염의 위험성도 상존하며, 가장 큰 문제로 기증자의 조직은 그 수요에 비하여 항상 과부족 상태라는 것이다. 이러한 이유로 조직의 기능을 임시로 수행할 수 있는 물질을 개발하는 것이 새로운 선택이 될 수 있으며, 최근에는 이러한 조직 대체물질의 개발 분야에 많은 노력이 기울여지고 있기도 하다.

조직공학 분야에서 가장 많은 관심이 기울여지는 주제는 스캐폴드 막(scaffold membrane) 제조에 관한 것이다. 스캐폴드 막이란 손상된 조직을 치유하는 동안 환부 주변을 감싸고 보호하며, 그 구조 내부에서 세포가 증식하여 새로이 조직을 형성하도록 하는 등 세포외기질(extra cellular matrix, ECM)의 기능을 임시로 수행하며, 치유가 진행되는 동안 스캐폴드 막 자체는 점차 분해되고 치유가 완료되는 시점에서 스캐폴드 막 자체는 완전 소멸된다. 이러한 이유로 스캐폴드 막의 재질은 생체에 대한 독성이 전혀 없고, 충분한 기계적 강도를 지닌, 생분해성 물질이어야 한다. 이러한 물질로는 poly(L-lactic acid) (PLLA)와 poly(glycolic acid) (PGA) 혹은 이들 두 고분자의 공중합체인 poly(lactic acid-do-glycolic acid) (PLGA) 등의 생분해성 고분자가 알려져 있다. 이들 고분자물질은 FDA 승인을 획득하여 그 안전성이 입증되었으므로 국내외에서 연구되는 스캐폴드 막 재료의 주종을 이루고 있다. 스캐폴드 막은 또한 그 구조 내부에 세포의 부착, 분화 및 성장이 원활하게 이루어질 수 있는 구조를 갖추어야 한다. 이를 위하여 스캐폴드 막 내부에는 세포가 부착 성장할 수 있는 공간으로서의 충분한 공극률(porosity)과 이들 공극 내의 세포에 필요한 영양소와 산소를 공급하고, 세포작용의 부산물을 이송하는 과정이 이루어질 수 있는 통로로서의 공극 간 연결성(pore connectivity)이 충분히 높아야 한다. 이러한 구조로는 대표적으로 격벽과 공극으로 이루어진 격벽-공극 구조(solid-wall pore structure)가 널리 알려져 있으며, 최근에 와서는 나노섬유 구조(nanofibrous structure)가 제시되고 있다[1-4]. 격벽-공극으로 구조의 스캐폴드 막은 피부, 연골 및 치주 등 사용되는 부위별로 공극 내에서 세포가 부착, 분화 및 성장할 수 있는 적합한 공극의 크기를 보이며, 그 구조를 통하여 원활한 물질이동이 이루어질 수 있도록 높은 공극간 연결성을 보일 수 있도록 그 구조가 조절되어야 한다. 나노섬유 구조의 경우는 그 구조 자체가 세포외기질과 매우 유사하므로 세포의 부착 및 분화를 통하여 조직을 형성하는 이상적인 구조로 알려져 있다[1-4]. 그러나, PLLA, PGA 및 PLGA 등의 생분해성 고분자 재질이 나노섬유 구조로 제조된 경우 매우 낮은 강도를 보이는 단점이 있다.

스캐폴드 막을 제조하기 위하여 사용되는 방법으로는 발포법[5,6], 염침출법[7,8], 용매교환을 통한 상전이법[9-11], 열유도상전이법[12,13] 등이 보고된 바 있으며 더 한층 발달된 방법으로 리소그패피법[14]을 이용하여 격벽-공극구조의 스캐폴드 막을 제조하거나 나노방사법[1,15-17]을 통하여 나노섬유 구조의 스캐폴드 막을 제조한 결과가 발표되고 있기도 하다. 본 연구에서는 생분해성 고분자인 PLLA를 재질로 하고, 상전이법 중 용매교환법을 통한 상전이법을 이용하여 스캐폴드 막을 제조하였다. 용매교환에 의한 상전이법은 다공성 고분자를 제조하는 데에 있어서 가장 단순하고 저렴한 방법이며, 막을 대량생산하기 위하여 가장 적합한 방법이므로 정밀여과막 및 한외여과막 등의 분리막을 사용하는 목적으로 널리 사용되고 있다[10,11]. 그러나, 용매교환에 의한 상전이법을 통하여서는 공극의 직경을 조절하기가 어려우며, 제조된 다공성 막의 공극직경이 수 μm 대의 낮은 범위에 국한된다는 단점이 존재한다[18]. 반면, 일전에 발표된 바에 의하면 용매교환에 의한 상전이법에 사용되는 고분자 재질과 용매 및 비용매의 선택과 용매교환시의 온도조절 등의 방법에 의해 공극의 크기를 10 μm 이상으로 높일 수 있으며[18], 고분자 재질의 분자량과 용매 및 비용매의 선택에 따라서는 나노섬유 구조의 스캐폴드 막을 제조할 수도 있다고 알려진 바 있다[19]. 본 연구진도 용매와 비용매의 선택과 용매교환 조건의 조절을 통하여 스캐폴드 막의 구조를 통하여 격벽-공극 구조와 나노섬유 구조로 선택하여 제조할 수 있음을 보였다[20]. 그 결과에 의하면 비교적 높은 분자량(Mn = 116,300 g/mol, Mw = 270,000 g/mol)의 PLLA에 대하여 용매교환에 의한 상전이법을 사용할 때에 chloroform을 용매로 사용하는 경우 격벽-공극 구조의 스캐폴드 막이 제조되는 반면, 1,4-dioxane을 용매로 사용하는 경우 나노섬유 구조의 스캐폴드 막이 제조되는 것을 확인하였다. 그러나, 격벽-공극 구조의 스캐폴드 막의 경우 그 공극의 직경이 최대 10 μm 이하에 한정되며, 나노섬유 구조의 스캐폴드 막의 경우 인장강

Table 1. Cholroform-1,4-Dixoxne Weight Ratio in Mixed Solution

Solvent No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
wt%, Chloroform	95	90	85	80	75	30	25	20	15	10	5
wt%, 1,4-Dioxane	5	10	15	20	25	70	75	80	85	90	95

도가 최대 470 kPa 이하로 국한되는 등 상전이법으로 제조된 격벽-공극 구조와 나노섬유 구조 스캐폴드 막의 일반적인 단점을 보여주었다. 이 결과를 통해서 용매교환에 의한 상전이법에서 chloroform과 1,4-dioxane이 일정 분율로 혼합된 혼합물을 용매로 사용할 경우 격벽-공극 구조와 나노섬유 구조의 중간 구조를 보이면서 양쪽 구조들의 장단점을 절충할 수 있는 구조의 스캐폴드 막이 제조될 수도 있다는 가정이 가능하였다. 이에 본 연구에서는 chloroform과 1,4dioxane 간의 혼합물로서 혼합용매를 제조하고, 혼합용매 내의 두 성분 간의 질량비를 조절하여 가며 용매교환에 의한 상전이법을 통하여 스캐폴드 막을 제조하였으며, 이들 혼합용매 내에서의 두 성분 간 조성비의 변화가 스캐폴드 막의 성질에 미치는 영향을 관찰하였다.

2. 실 험

2.1. 시약

스캐폴드 막 제조의 원료로는 고분자는 poly(L-lactic acid) (PLLA, Natureworks, USA, Mw = 116,300 g/mol, Mw = 270,000 g/mol)를 사용하였고, 용매로는 chloroform (Samchun, 99.8%), 1,4-dioxane (Samchun, 99.8%) 및 이들의 혼합물을 사용하였으며, 혼합용매로는 이들 두 용매를 일정분율 혼합하여 사용하였다. 비용매로는 ethanol (Duksan, 99.9%)을 사용하였다. PLLA는 50°C, 진공으로 12시간 이상 건조하여 수분을 충분히 제거한 후 사용하였으며, 용매와 비용매는 전처리 없이 사용하였다.

2.2. 스캐폴드 막의 제조

용매교환을 통한 상전이법의 용매는 순수한 chloroform과 1,4-dioxane 그리고, 이들 두 용매를 일정분율 혼합한 혼합용매를 사용하였다. 혼합용매 내 1,4-dioxane의 함량은 5 wt% (95 wt% chloroform), 10 wt% (90 wt% chloroform) 순으로 5 wt% 간격으로 95 wt% (5 wt% chloroform)까지 설정하였으며, 이러한 혼합용매들 중 PLLA의 용해도가 충분히 높은 조성 범위의 용매를 이용하여 스캐폴드 막을 제조하였다. Table 1은 본 연구에서 사용한 용매의 조성을 나타낸다. Table 1에서 solvent No. 5와 solvent No. 6 사이, chloroform 함량 75 wt%~30 wt% 구간 함량의 혼합용매에서는 PLLA에 대한 용해도가 매우 낮아져서 용액을 제조할 수 없었다.

이러한 순수용매와 혼합용매에 PLLA를 혼합, 용해하여 캐스팅 용액을 제조하였으며 용액 내의 PLLA 함량은 3 wt%로 조절하였다. 캐스팅 용액을 유리 기판 위에 doctor blade를 사용하여 500 μm의 두께로 캐스팅한 후 즉시 20°C로 온도 조절된 항온조에 침지하여 용매교환을 유도하고 막을 형성시켰다. 용매교환이 이루어져 형성된 막은 18시간 동안 비용매를 교체하며 비용매 항온조에 담근 상태를 유지하여 캐스팅 용액과 주변의 비용매 간 완전한 용매교환이 이루어지도록 하였으며, 이후, 추가로 증류수로 채워진 20°C의 항온조 내에 8시간 동안 담가서 잔류용매 성분을 제거하였다. 이후 제조한 막은 상온, 진공에서 12시간 이상 건조하여 스캐폴드 막을 제조하였다.

2.3. 공극률 측정

스캐폴드 막의 공극률은 막의 전체 부피에 대한 공극 부피의 비로 정의하였다. 이때에 공극의 부피는 막의 전체 부피와 스캐폴드 막의 질량으로부터 산출하였다. 막의 전체 부피, V_S는 막의 면적(A)과 두께(δ)를 이용하여 $A \times \delta$로 계산하며 스캐폴드 막 내에서 고분자(PLLA)가 점유하는 부피, V_P는 스캐폴드 막의 무게(W_S)와 고분자(PLLA)의 밀도(ρ_S)를 이용하여 W_S/ρ_S로 계산하여 구할 수 있다. 이러한 방법으로 구한 전체 부피와 고분자가 점유하는 부피를 이용하여 아래의 식을 통하여 공극률을 구할 수 있다.

$$Porosity(\%) = \frac{V_S - V_P}{V_S} \times 100$$

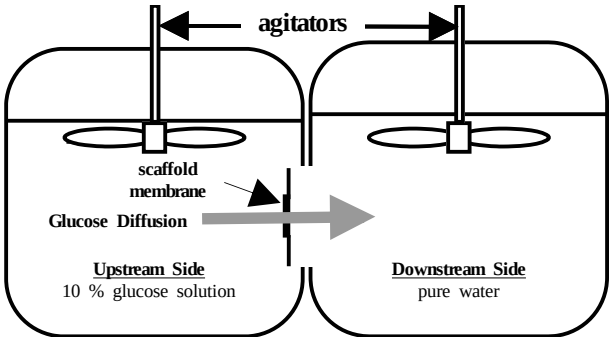

Fig. 1. Schematic representation of glucose diffusion device.

이 방법에서 PLLA의 밀도는 pycnometer를 사용하여 측정하였으며 그 결과 값은 1.27 g/cm^{3}이다.

2.4. SEM

상전이법을 통하여 제조한 스캐폴드 막의 표면공극과 단면의 모폴로지는 scanning electron microscopy (SEM, CX-200TA)를 통하여 관찰하였다. SEM 촬영을 위하여 샘플은 액체질소를 이용하여 극저온 처리 후 절단하였으며, 촬영 이전에 샘플의 표면에 금 코팅하여 촬영하였다.

2.5. 스캐폴드 막의 기계적 특성

스캐폴드 막은 체내에서 세포의 증식, 분화 및 성장을 보조하여 조직의 회복을 보조하는 역할 이외에도 조직을 보호하는 장벽으로서의 지지체 역할도 수행한다. 그러므로 스캐폴드 막은 입체적 특성 뿐만 아니라 인장강도와 같은 기계적 특성 역시 중요한 요소로 작용하게 된다. 이러한 기계적 특성을 평가하기 위하여 본 연구에서는 상온에서 인장강도 측정기(H5KT, Tinius Olsen)를 통해 스캐폴드 막의 인장강도를 측정하였다.

2.6. 스캐폴드 막의 물질전달 특성

스캐폴드 막에서의 영양분 전달 특성을 평가하기 위하여 포도당 확산실험을 수행하였다. 포도당은 신체 조직의 주 영양성분 중의 하나로서 포도당의 확산계수는 스캐폴드 막 내에서의 영양분 전달특성에 대한 지표로 삼을 수 있다. 확산실험은 Papenburg에 가 수행한 방법[18]과 동일하게 진행되었으며, 확산실험을 위한 포도당은 Sigma로부터 구입한 Ultra D-(+)-glucose를 사용하였다. 확산실험의 포도당 농도는 혈중 농도의 1/10 (10g/L)로 조절하여 사용하였다. Fig. 1은 확산실험 장치를 나타낸다. 장치는 2 L의 plexiglass 용기로 이루어져 있으며, 이 용기는 칸막이에 의해 1 L씩으로 반분되고, 각각 막 상류부 및 막 하류부로 나누어져 있다. 칸막이에는 40 × 40 mm의 통로가 뚫려 있으며, 이 통로 부위에 스캐폴드 막을 설치하였다. 스캐폴드 막은 알루미늄 포일 테이프를 사용하여 칸막이의 통로 부위에 부착, 설치하였으며, 스캐폴드 막의 확산면적은 알루미늄 포일 테이프에 뚫린 구멍의 면적(2.25 cm^2)을 통하여 조절하였다. 막 상류부에는 포도당 용액으로 채우고, 막 하류부에는 증류수로 채운 후 확산실험을 수행하였다. 확산실험 동안 장치는 37°C로 체온과 동일한 온도가 유지되는 오븐 내에 설치하였으며, 막의 상류부와 하류부를 각각 교반하여 그 농도를 가각 균일하게 유지하였다. 막 상류부와 하류부 간의 농도차이로 인하여 상류부 용액 내의 포도당은 하류부로 확산되며, 확산실험동안 상류부와 하류부로부터 매 시간 시료를 채취하였다. 채취한 시료는 Sigma에서 구입한 효소(PGO enzyme)를 이용한 효소정량법을 통하여 측정하였다. 시료 중의 포도당은 효소와 반응하여 주황색으로 변색되며, 변색된 시료 내 포도당의 농도는 UV 측정 장치를 이용, λ = 450 nm의 자외선에 대한 흡광도를 측정하여 평가하였다.

확산도 계수는 Fick's first law에서 유래하며, 확산과정이 정상상태에 도달한 경우 Fick's first law는 아래의 식 (1)로 표현될 수 있다.

$$J = D\frac{\Delta C}{L} \tag{1}$$

위의 식 (1)에서 J는 포도당의 확산 플럭스, D는 포도당의 확산도 계수, △C는 막 상류부와 하류부 간의 포도당 농도차 그리고, L은 확산이 이루어지는 스캐폴드 막의 두께를 각각 의미한다. 확산플럭스와 확산도 계수는 확산실험을 통하여, 그리고 아래의 식 (1) 및 식 (2)를 통하여 각각 측정 평가하였다.

$$J = \frac{V(C_{t2} - C_{t1})}{A(t_2 - t_1)} \tag{2}$$

$$D = \frac{J}{\Delta C / L} \tag{3}$$

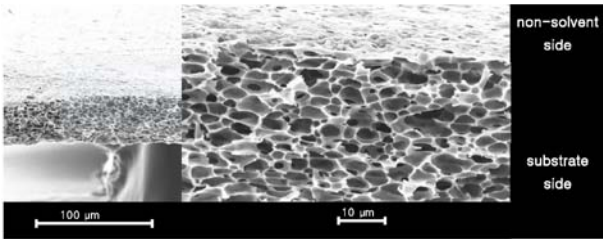

Fig. 2. SEM images of the scaffold membrane obtained from casting solutions with chloroform pure solvent (3 wt% PLLA).

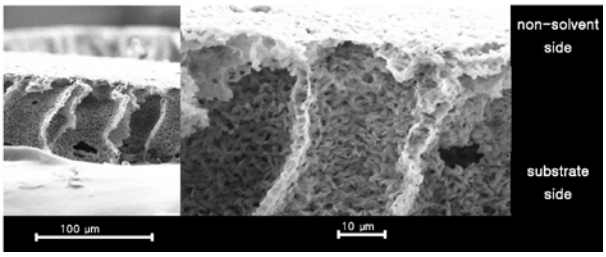

Fig. 3. SEM images of the scaffold membrane obtained from casting solution with 1,4-dioxane pure solution (3 wt% PLLA).

위의 식에서 V는 막 하류부의 부피, C_{t1} 및 C_{t2}는 각각 확산실험 중의 시점 t_1 및 t_2에서 측정한 포도당의 농도 그리고, A는 실험 중 확산이 이루어진 면적을 각각 의미한다.

3. 결과 및 토의

3.1. SEM 촬영결과 및 분석

Chloroform 순수용매를 사용한 경우 : 사용한 용매의 조성에 따라 스캐폴드 막은 매우 다양한 모폴로지를 보였다. Fig. 2는 순수 chloroform 용매를 사용하여 제조한 스캐폴드 막 단면의 SEM 사진이다. 일전의 선행 연구결과[20]에서 보았듯이 chloroform 용매를 사용하여 제조한 스캐폴드 막은 격벽-공극 구조를 보였다. 공극의 단면 모양은 원형이 아니고 위 아래로 눌린 형태를 보였으며 2~3 μm의 상하 폭과 4~7 μm의 좌우 길이를 지닌 길쭉한 타원 형태를 보였다. 이는 용매교환을 통해 다공성 막이 제조되는 과정에서 캐스팅되었던 당시에 비하여 그 두께가 줄어듦에 따른 압축으로 인한 것으로 판단된다. 타원형태의 공극의 벽에는 작은 구멍들이 몇 개씩 존재하는 것을 볼 수 있으며, 이는 공극간을 연결하는 통로로서 작용하게 될 것으로 판단된다. 이상의 결과로서 단면 SEM 사진만으로 볼 때에

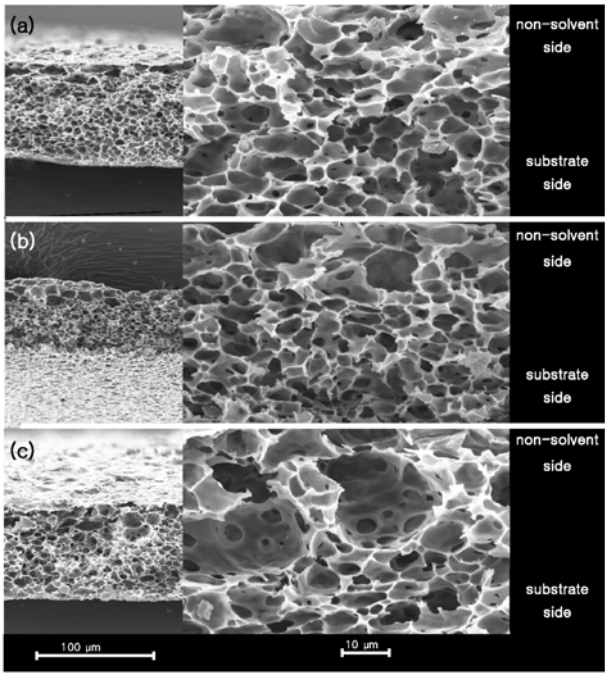

Fig. 4. SEM images of scaffold membranes obtained from solutions with mixture solvents (3 wt% PLLA, chloroform-1,4-dioxane weight ratio : (a) 95 : 5 (b) 90 : 10, (c) 85 : 15.

chloroform 용매를 이용한 캐스팅 용액으로부터의 스캐폴드 막은 충분한 공극률과 공극 간 상호 연결도를 보일 것으로 판단할 수 있다.

1,4-dioxane 순수용매를 사용한 경우 : Fig. 3은 순수 1,4-dioxane 용매를 사용하여 제조한 스캐폴드 막의 단면의 SEM 사진이다. 그림에서 보듯이 순수 1,4-dioxane 용매를 사용하여 제조한 스캐폴드 막은 나노섬유의 구조를 보였다. 나노섬유 가닥의 두께는 800 nm 가량이었으며 이러한 나노섬유 구조를 벽으로 하여 직경이 최대 100 μm인 원통형의 거대공극(macropore)을 갖는 구조를 갖는 것으로 나타났다.

혼합용매를 사용하여 제조한 격벽-공극 구조의 스캐폴드 막 : 이상과 같은 결과에 입각하여 chloroform과 1,4-dioxane 간의 혼합용매를 사용하여 스캐폴드 막을 제조할 경우 격벽-공극 구조와 나노섬유 구조 사이의 중간형태의 스캐폴드 막을 제조할 수 있을 것이라는 기대 하에 혼합용매를 사용한 스캐폴드 막 제조를 시행하였다. Fig. 4는 혼합용매에서 chloroform과 1,4-dioxane의 질량비율이 각각 95 : 5, 90 : 10 및 85 : 15인 용매를 사용하여 제조한 스캐폴드 막의 단면을 나타낸다. 이러한 경우 전체적으로는 순수한 chloroform을 용매로

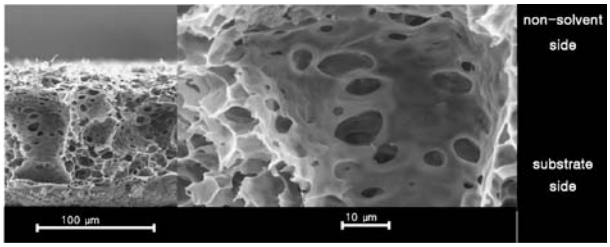

Fig. 5. SEM images of scaffold membrane obtained from solution with mixture solvent (3 wt% PLLA, chloroform-1,4-dioxane weight ratio : 80 : 20).

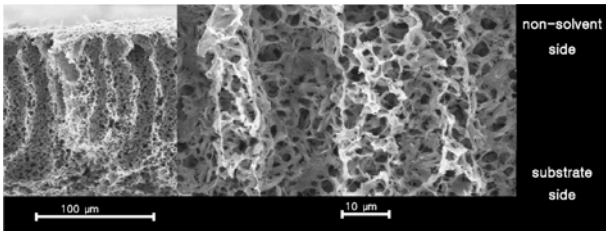

Fig. 6. SEM images of scaffold membrane obtained from solution with mixture solvent (3 wt% PLLA, chloroform-1,4-dioxane weight ratio : 75 : 25).

하여 제조한 스캐폴드 막과 유사한 공극구조를 보였으나, 용매에 1,4-dioxane이 첨가되기 시작하면서 용매 측 표면에 인접한 부위에서는 20 μm 내외의 좌우 길이와 10 μm 내외의 상하 폭을 갖는 비교적 큰 공극이 생성되기 시작함을 볼 수 있다. Fig. 4에서 chloroform과 1,4-dioxane 간의 질량비가 85 : 15인 용매로 제조한 스캐폴드 막의 단면 사진을 통해 이러한 비교적 큰 공극이 좌우 길이 최대 50 μm, 상하폭 최대 20 μm까지 확대됨을 알 수 있었다. Fig. 5는 chloroform과 1,4 dioxane 간의 질량비가 80 : 20인 용매를 사용한 경우의 스캐폴드 막 단면구조를 나타낸다. 혼합용매 내의 1,4-dioxane의 함량이 15 wt% 이하인 용매로 제조한 스캐폴드 막에서는 비교적 큰 공극이 용매측 표면에 국한하였던 반면 혼합용매 내의 1,4-dioxane 함량이 20 wt%로 증가한 경우에는 이러한 공극이 스캐폴드 막의 단면 전 영역으로 확장하여 존재하며, 그 크기도 좌우 길이, 상하 폭 공히 최대 100 μm까지의 거대 공극(macropore)으로 확대된 것을 볼 수 있다. 또한 거대공극의 벽면에는 최대직경 10 μm 내외의 비교적 작은 공극이 다수 존재하는 것으로 관찰되었으며 이들 작은 공극들은 대형공극 간을 연결하는 통로로 작용할 것으로 판단된다. 이와 같은 결과는 용매교환을 이용한 상전이법은 간편하고 단순한 방법이지만 혼합용매를 사용하고 혼합용

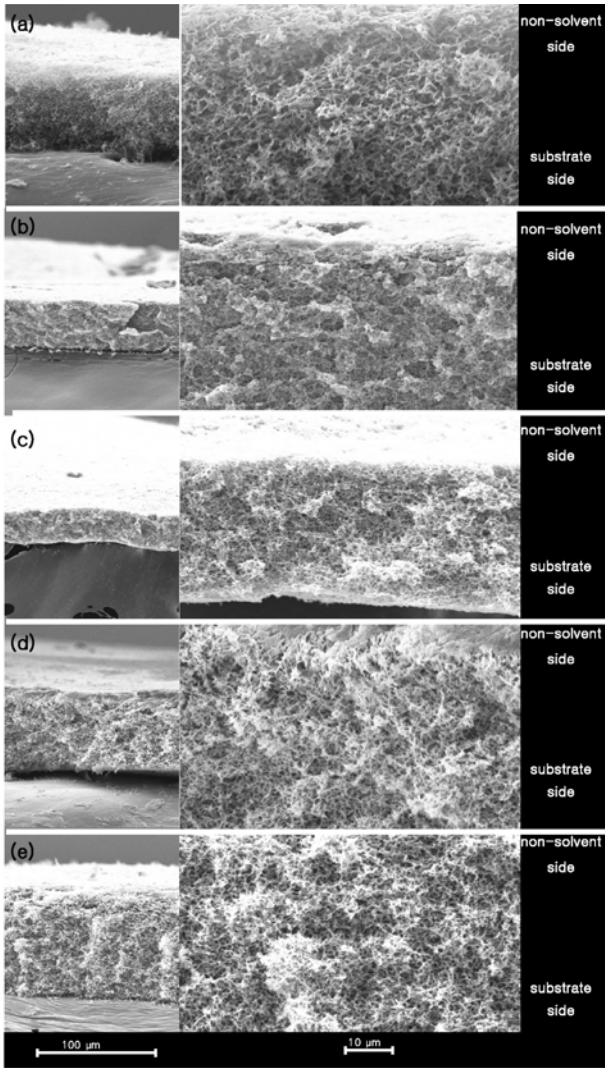

Fig. 7. SEM images of scaffold membranes obtained from solutions with mixture solvents (3 wt% PLLA, chloroform-1,4-dioxane weight ratio : (a) 30 : 70 (b) 25 : 75, (c) 20 : 180, (d) 15 : 85, (e) 10 : 90.

매 내의 조성을 조절함에 따라서는 공극의 직경과 구조를 조절할 수 있다는 것을 보여준다. 또한 용매교환법을 통한 상전이법은 공극의 직경 작은 범위의 스캐폴드 막 만을 제조할 수 있다는 기존의 한계[18]를 넘어선 결과라고 판단된다. 특히, 스캐폴드 막의 용도 중 골세포와 연골세포의 재생을 목적으로 하는 경우에는 직경 100 μm 내외의 거대공극이 다수로 분포하는 구조가 요구되는 것으로 알려져 있으며 본 연구의 결과는 이러한 용도에 매우 요긴하게 사용될 수 있을 것이다.

혼합용매를 사용하여 제조한 나노섬유 구조의 스캐폴드 막 : Fig. 6은 혼합용매 내 1,4-dioxane 함량이 25

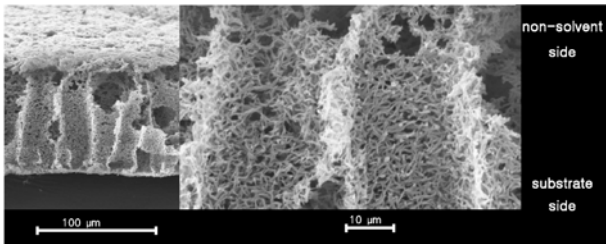

Fig. 8. SEM images of scaffold membrane obtained from solution with mixture solvent (3 wt% PLLA, chloroform-1,4-dioxane weight ratio : 5 : 95).

wt%인 용매를 사용하여 제조한 스캐폴드 막의 단면을 나타낸다. 이 경우 나노섬유의 형태를 갖는 바탕에 원통형의 거대공극이 존재하는 구조를 보였다. 나노섬유 가닥의 굵기는 대략 90 nm 내외였으며, 원통형 거대공극은 최대 30 μm의 직경을 보였다. 나노섬유 형태의 바탕에는 또한 직경 5 μm 내외의 미세공극들이 매우 높은 밀도로 분포하는 것을 볼 수 있었으며, 이들 미세공극은 거대공극 간의 물질이동을 돕는 연결 통로로 작용할 것으로 보인다. 이러한 구조의 스캐폴드 막에서 거대공극은 그 벽면에 세포가 부착하여 분화, 성장하는 공간을 제공하며, 나노섬유구조와 미세공극은 공극 간의 원활한 물질이동을 이루는 이상적인 스캐폴드의 기능을 보일 것으로 판단된다. Fig. 7은 chloroform과 1,4-dioxane 간의 잘량비율이 30 : 70, 25 : 75, 20 : 80, 15 : 85 및 90 : 10 wt%일 때의 스캐폴드 막 단면을 나타낸다. 1,4-dioxane 함량이 30 wt%로 증가하면서 25 wt%일 때에 보였던 거대공극은 관찰되지 않았으며, 전체적으로 균질한 나노섬유 구조를 보였다. 이러한 균질한 나노섬유 구조는 혼합용매 내의 1,4-dioxane 함량이 90 wt%로 증가할 때까지 지속적으로 나타났다. 단지, 혼합용매 내에서 chloroform과 1,4-dioxane 간의 함량비가 변화하면서 나노섬유 구조를 이루는 나노섬유의 굵기가 변화하는 것을 반복적인 확인실험을 통하여 볼 수 있었다. 혼합용매 내의 1,4-dioxane 함량이 70 wt%일 때에 25 nm이었던 섬유 굵기가 1,4-dioxane 함량이 75 wt%로 증가하였을 때에는 2 nm 내외의 섬유 굵기를 보이는 미세한 구조를 보였다. 나노섬유 구조 내의 섬유 굵기는 1,4-dioxane 함량이 80 wt%일 때에 1.5 nm의 최소값을 보였다. Fig. 8은 1,4-dioxane 함량이 95 wt%인 혼합용매를 사용하여 제조한 스캐폴드의 단면이다. 혼합용매 내 1,4-dioxane 함량이 95 wt%로 증가하면서 1,4-dioxane 순수용매를 사용하여 제조한 스캐폴드와 유사하게 나노섬유 구조에 원통형의 거대공극이 존재하는 형태를 보였다. 그러나 섬유 굵기 600 μm 가량의 나노섬유구조에 거대공극은 폭 25 μm 내외의 원통형으로 형성되어 1,4-dioxane 순수용매를 사용한 경우에 비하여 섬유 굵기와 거대공극 직경에서 공히 작은 값을 보였다.

Table 2. Porosity and Thickness of PLLA Scaffold Membrane

Weight Ratio (Chloroform : 1,4-Dioxane)	Final Thickness (μm)	Porosity (%)
100 : 0	46	77.0
95 : 5	65	79.1
90 : 10	62	80.8
85 : 15	99	85.9
80 : 20	91	86.3.
75 : 25	105	87.0
30 : 70	69	79.6
25 : 75	58	71.4
20 : 80	41	66.8
15 : 85	70	68.3
10 : 90	81	76.5
5 : 95	88	83.1
0 : 100	92	90.6

이상의 결과를 종합하여 볼 때에 용매교환을 이용한 상전이법을 통하여 스캐폴드 막을 제조함에 있어서 용매 선택에 따라 스캐폴드 막의 구조를 격벽-공극 구조와 나노섬유 구조를 선택하여 제조할 수 있으며, 혼합용매를 사용하고 혼합용매 내의 성분별 함량비의 조절함으로서 격벽-공극 구조에서의 공극 크기와 공극 분포 그리고 나노섬유 구조에서의 섬유 굵기와 거대공극의 유무 및 그 크기 등의 특성을 광범위하게 조절할 수 있었다.

3.2. 스캐폴드 막의 두께 및 공극률

Table 2는 본 연구에서 제조한 스캐폴드 막의 두께와 공극률을 나타낸다. 스캐폴드 막을 제조할 때에 기판 위의 캐스팅 용액 두께는 500 μm로 동일하게 조절한 후 비용매조에 침지하였으나 제조된 스캐폴드 막은 원래 용액의 두께인 500 μm에 비해 그 두께가 크게 감소한 것을 알 수 있었다. 그 주된 원인은 용매교환 시 용액 내의 용매가 외부의 비용매 층으로 확산하면서 구조

Table 3. Mechanical Properties of Scaffold Membranes

weight ratio (chloroform : 1,4-dioxane)	modulus of elascity (MPa)	yield strength (MPa)	strain at break (%)
100 : 0	51.62	6.52	49.8
95 : 5	46.71	5.82	56.6
90 : 10	41.62	4.84	48.6
85 : 15	36.73	2.85	31.2
80 : 20	30.61	2.37	23.4
75 : 25	3.40	0.31	1.5
0 : 100	2.84	0.26	4.8

가 압축되는 현상[18,19]을 보이기 때문인 것으로 알려져 있다. 아울러 용액을 캐스팅 하는 과정에서 나타나는 흐름현상[9,10]도 그 이유로 들 수 있다. 본 연구에서 제조한 여러 장의 스캐폴드 막에 대한 면적대비 질량을 비교하여 볼 때에 이러한 두께감소현상의 주된 원인은 용매교환시의 압축현상이지만, 같은 조건에서 제조한 스캐폴드 막 간에 작지 않은 두께 편차를 보이는 것으로 보아서 캐스팅 시의 흐름현상도 무시할 수 없는 요인으로 작용한 것으로 보인다. Table 2를 통해서 혼합용매 내의 1,4-dioxane 함량이 0 wt%-25 wt%의 구간 내에서 1,4-dioxane 함량이 증가하면서 스캐폴드 막의 두께와 공극률이 증가하는 추세를 보임을 알 수 있다. 이는 0~20 wt%의 함량구간에서는 공극의 직경이 증가하는 구간이며 이러한 증가하는 공극직경이 공극률과 두께 증가의 원인인 것으로 보인다. 1,4-dioxane 함량이 25 wt%일 때까지도 두께와 공극률이 증가하는 이유는 이 거대공극이 존재하는 상태에서 스캐폴드 막의 바탕이 낮은 밀도를 갖는 나노섬유 형태의 구조를 보이기 때문인 것으로 판단된다. 1,4-dioxane 함량이 80 wt%까지 증가하면서 스캐폴드 막의 두께와 공극률은 지속적으로 떨어지는 추세를 보이며 함량 80 wt%일 때 최소값을 보였다. 이 구간에서 나노섬유의 굵기가 감소하였으며, 이러한 섬유 굵기의 감소가 스캐폴드 막의 두께 및 공극률 감소와 다소 연관된 것으로 판단된다. 1,4-dioxane 함량이 85 wt%를 지나 90 wt%까지 증가하는 구간에서는 스캐폴드 막의 두께와 공극률이 증가하였으며, 이는 이 구간은 나노섬유의 굵기가 증가하는 구간이기도 하다. 1,4-dioxane의 함량이 95, 100 wt%로 증가하면서 스캐폴드 막의 두께와 공극률을 계속 증가하였다. 이는 함량 95 wt%에서 거대공극이 다시 생성되어 전체적인 밀도가 감소하였으며, 함량 100 wt%에서 거대공극의 직경과 그에 따른 공극 부피가 더욱 크게 증가하였기 때문인 것으로 보인다.

3.3. 스캐폴드 막의 기계적 특성

Table 3은 본 연구에서 제조한 스캐폴드 막의 기계적 특성을 보여준다. 그 인장강도 값은 Chloroform 순수용매를 사용하여 제조한 스캐폴드 막의 경우 Bettahalli[21] 등이 LIPS법을 통해 제조한 중공사막 형태의 스캐폴드 막에 비해 높은 값을 보였다. 이에 비해 chloroform에 1,4-dioxane을 첨가하고 그 첨가량이 20 wt%까지 증가하면서 스캐폴드 막의 인장강도가 감소하는 것을 볼 수 있다. 이는 스캐폴드 막의 구조가 격벽-공극 구조를 갖는 범위에서 1,4-dioxane의 함량이 증가하면서 공극 크기와 공극률이 증가하며 결과적으로 전체적인 밀도가 저하되기 때문인 것으로 보인다. 용매 내에 1,4-dioxane의 함량이 25 wt%로 증가하면서 인장강도는 급격히 감소하는 것을 볼 수 있다. 이는 스캐폴드 막의 구조가 격벽-공극의 구조에서 나노섬유 구조로 변환되기 때문인 것으로 판단된다. 나노섬유 형태의 스캐폴드 막은 격벽-공극구조에 비하여 매우 낮은 강도를 갖는 것이 공통적인 특성으로 알려져 있다. 1,4-dioxane을 더욱 첨가한 30 wt%~95 wt% 구간의 함량의 용매를 통하여 제조한 스캐폴드 막은 그 인장강도가 매우 낮아서 합당하게 재연성 있는 인장강도 값을 얻을 수 없었다. 이 구간 조성의 용매를 통하여 제조한 스캐폴드 막은 나노섬유의 굵기가 매우 작았으며 이러한 얇은 섬유 굵기가 낮은 인장강도의 원인과 어느 정도 관련될 것으로 사료된다. 순수한 1,4-dioxane을 용매로 사용하여 제조한 스캐폴드 막은 나노섬유 형태의 특성대로 격벽-공극 구조를 갖는 스캐폴드 막에 비해 매우 낮은 인장강도 값을 보였다. 나노섬유는 그 구조상으로는 세포의 부착과 증

Table 4. Glucose Diffusion Coefficients Through Scaffold Membranes

chloroform : 1,4-dioxane wt. ratio in solvent	porosity (%)	thickness (μm)	diffusion coefficient (10^{-10} m^2/s)
100 : 0	74.9	48.6	1.01
0 : 100	91.3	88.9	1.93
80 : 20	87.1	93.8	2.36
75 : 25	88.4	103.1	1.52

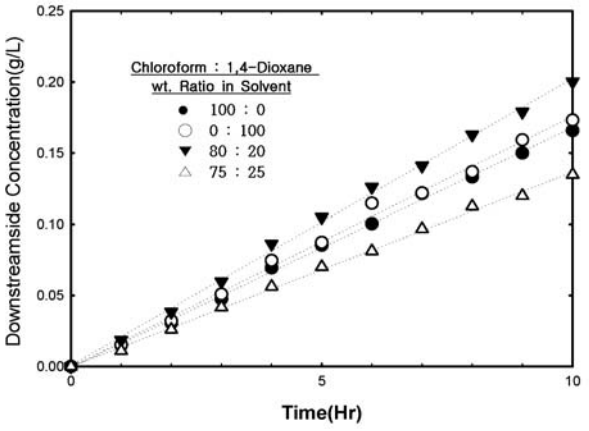

Fig. 9. Graph of glucose diffusion through scaffold membranes toward downstream side.

식 및 성장을 통해 새로운 조직을 형성하고 손상된 조직을 수복하는 데에 이상적인 스캐폴드 막의 형태이지만, 충분한 기계적 강도를 제공하지 못하는 것이 결정적인 단점으로 알려져 있다[16,17]. 다른 여러 방식으로 제조한 스캐폴드 막과 다름없이 본 연구에서 순수용매와 혼합용매를 사용한 상전이법을 통해 제조된 나노섬유의 스캐폴드 막도 충분한 기계적 강도를 보여주지는 못하였고, 섬유의 굵기가 낮은 일부 나노섬유 구조의 스캐폴드 막은 기계적 강도를 측정하는 것조차도 불가능하였다. 이는 용매의 선택에 따라서 나노섬유 구조의 스캐폴드 막을 제조할 수 있으며, 그 구조를 조절할 수도 있으나, 제조한 스캐폴드 막을 사용하는 데에는 작지 않은 한계가 있다는 지적을 할 수가 있다. 그러나, 이러한 낮은 기계적 강도의 스캐폴드 막도 높은 강도를 보이는 스캐폴드 막과의 복합막으로 제조하여서 사용할 수 있는 방안[13]이 제시되기도 하였다.

3.4. 스캐폴드 막의 물질전달 특성

물질전달 실험은 초기에 스캐폴드 막의 양 표면에 각각 고농도의 5 wt% 포도당 용액과(상류부) 0 wt% 증류수(하류부)를 접촉시켜서 수행하였다. 물질전달 실험 중에 상류부 용액 내의 포도당은 스캐폴드 막의 구조를 통하여 확산되며 이러한 과정을 통하여 하류부 증류수 내의 포도당 농도는 점차 증가하게 되고 이러한 농도 증가율을 통하여 스캐폴드 막을 통한 포도당의 확산도 계수를 산출하였다. 스캐폴드 막을 통한 포도당의 확산도 계수는 곧 스캐폴드 막의 영양분 공급능력을 대별하는 척도로 판단될 수 있으며 그 바람직한 범위는 1.0×10^{-10} cm^2/s 이상으로 제시된 바 있다[18]. 본 연구에서 각 스캐폴드 막 별로의 물질전달 실험을 통하여 측정한 하류부 농도증가 추세를 Fig. 9에 나타내었고, 이러한 농도증가 추세를 통하여 산출한 확산계수 값을 Table 4에 정리하였다. Chloroform 순수용매를 사용하여 제조한 스캐폴드 막은 그 확산도 계수에서 일전에 수행한 선행연구의 결과[20]와 유사하게 바람직한 범위인 1.0×10^{-10} cm^2/s 이상의 값을 보였다. 1,4-dioxane 순수용매를 사용하여 제조한 스캐폴드 막에서도 일전의 연구에서 측정한 확산도 계수와 유사한 값을 보였다. Chloroform : 1,4-dioxane 질량비율 80 : 20의 비율을 갖는 혼합용매를 사용하여 제조한 스캐폴드 막 역시 확산도 계수의 바람직한 범위여건은 만족시켰으나, 높은 공극률과 거대공극의 존재에 비하여 기대한 만큼 월등하게 높은 확산도 계수를 보이지는 않았다. 이는 스캐폴드 막을 이루는 대부분의 영역에서의 공극률과 공극직경은 매우 높지만, 스캐폴드 막의 용매측, 기판측 표면의 한정된 부위에 낮은 공극률의 고밀도층이 존재하며, 이러한 고밀도층을 통한 물질전달 저항이 크게 작용하기 때문인 것으로 추정된다. 이러한 고밀도층의 형성과 이를 통한 물질전달 저항은 용매교환을 통한 상전이법으로 스캐폴드 막을 제조하는 데에 있어서 빈번하게 나타나는 문제점으로 이에 대한 해결책이 추후 연구의 중요한 과제일 것으로 보인다. Chloroform : 1,4-dioxane 질량비율 75 : 15의 값을 갖는 혼합용매를 사용하여 제조한 스캐폴드 막에서는 낮은 밀도의 나노섬유

바탕에 거대공극이 존재하는 구조인 만큼 높은 확산도 계수를 기대하였으나, 측정된 확산도 계수 값은 오히려 1,4-dioxane의 순수용매를 사용한 경우에 비하여 더 낮은 값을 보였다. 일전의 선행연구 결과에 의하면 나노섬유 구조의 스캐폴드 막이 예상했던 바에 비하여 낮은 확산도 계수를 보였고, 그 이유는 나노섬유의 미세한 섬유가닥 사이의 작은 틈새를 통한 확산의 저항이 예상보다 컸기 때문인 것으로 결론지었다. 본 연구에서 혼합용매를 사용하여 제조한 나노섬유는 공극률과 거대공극의 직경에 있어서 1,4-dioxane의 순수용매를 사용한 스캐폴드 막에 비하여 낮은 값을 보였으며, 이도 역시 미세한 섬유구조 사이로 확산되는 과정에서의 큰 저항으로 인하여 낮은 확산도 계수를 보인 것으로 볼 수 있다.

4. 결 론

용매교환을 통한 상전이법을 이용하여 다공성 스캐폴드 막을 제조하였다. 용매로는 순수용매로서 chloroform과 1,4-dioxane을 사용하였으며, 혼합용매로서는 두 순수용매 간의 질량비율을 변화하여 가면서 제조한 혼합물을 사용하였다. 비용매로는 ethyl alcohol을 사용하였다. 제조한 스캐폴드 막의 구조, 기계적 특성 및 포도당 확산특성에 대하여 용매의 종류 및 혼합용매의 성분비의 영향을 관찰하였다. 그 결과 아래와 같은 결과를 얻었다.

1) Chloroform 순수용매를 사용하여 제조한 스캐폴드 막은 상하 폭 2~3 μm, 좌우 길이 4~7 μm의 납작한 공극을 지닌 격벽-공극구조를 보였으며 반면, 1,4-dioxane 순수용매를 사용하여 제조한 스캐폴드 막은 섬유 굵기 800 nm 가량인 나노섬유구조에 최대직경이 100 μm에 달하는 원통형 거대공극을 지닌 형태를 보였다.

2) Cholroform과 1,4-dioxane 간의 혼합용매를 사용하여 제조한 스캐폴드 막에 있어서 혼합용매 내의 1,4 dioxane의 질량분율이 20 wt% 이하인 경우에는 격벽-공극 구조의 스캐폴드 막이 제조되었다. 1,4-dioxane의 질량분율이 0으로부터 증가함에 따라 용매측 표면 인접부위의 공극이 좌우 최대 50 μm, 상하 최대 20 μm의 비교적 큰 공극이 형성되었으며, 이러한 비교적 큰 공극은 혼합용매 내의 chloroform과 1,4-dioxane 간의 질량비가 80 : 20일 때에 스캐폴드 막 전 영역으로 퍼지고 그 크기도 직경 및 길이가 최대 100 μm인 거대공극으로 확장되었다.

3) 혼합용매에서 1,4-dioxane의 질량분율이 25 wt% 이상의 구간에서는 나노섬유 구조의 스캐폴드 막이 제조되었다. 혼합용매 내의 질량분율이 20 wt%에서 25 wt%로 증가하면서 섬유 직경 90 nm의 나노섬유 구조 바탕에 직경 최대 30 μm의 거대공극을 갖는 형태를 보였다. 혼합용매 내 1,4-dioxane 함량이 더욱 증가하여 70 wt%~90 wt% 간의 구간에서는 거대공극이 존재하지 않는 비교적 균일한 상태를 가진 나노섬유 구조의 스캐폴드 막이 제조되었으며 1,4-dioxane 함량 95 wt%에서는 섬유 굵기 600 nm의 나노섬유 구조에 직경 25 μm의 원통형 거대공극이 존재하는 형태를 얻을 수 있었다.

4) Chloroform 순수용매를 사용하여 제조한 스캐폴드 막은 6.52 MPa의 인장강도를 보였으며, 1,4-dioxane 순수 용매를 사용하여 제조한 스캐폴드 막은 0.26 MPa (260 kPa)의 인장강도를 보였다.

5) Chloroform과 1,4-dioxane 간의 혼합용매를 사용하여 제조한 나노섬유 구조의 스캐폴드는 1,4-dioxane 함량 25 wt%의 용매를 사용하여 제조한 스캐폴드 막이 0.31 MPa (310 kPa)의 인장강도 값을 보인 이외에는 모두가 측정이 불가능할 정도의 약한 인장강도 값을 보였다.

6) 본 연구에서 제조한 스캐폴드 막은 당 확산도 계수에 있어서 실용적으로 사용할 수 있는 기준치는 넘어섰지만, 혼합용매를 사용한 격벽-공극 구조의 스캐폴드 막의 경우 높은 공극률과 공극직경에 비하여 기대이하의 낮은 당 확산도 계수를 보였으며, 이는 스캐폴드 양쪽 표면에 형성된 고밀도 층의 영향인 것으로 보인다.

이상의 결과를 통하여 PLLA의 용매교환법에 의한 상전이법을 통하여 스캐폴드 막을 제조하는 경우 순수용매 혹은 혼합용매를 선택, 사용하고 혼합용매 내의 조성을 조절함으로써 다양한 구조의 스캐폴드 막을 다양하게 제조할 수 있다는 결론을 내릴 수 있었다.

감 사

본 연구는 2014학년도 미래창조과학부 과학벨트 기능지구 지원사업에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

감 사

본 연구는 2013학년도 한국기술교육대학교 교육연구진흥비 연구지원 사업의 연구비지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

Reference

1. U. Boudriot, R. Dersch, A. Greiner, and J. H. Wendorff, “Electrospinning Approaches toward Scaffold Engineering-a brief overview”, *Artif. Organs*, **30**, 10, 785 (2006).
2. R. Chen and J. A. Hunt, “Biomimetic materials processing for tissue-engineering processes”, *J. Mater. Chem.*, **17**, 38 3974 (2007).
3. L. Moroni, J. R. De Wijn and C. A. Van Blitterswijk, “Integrating novel technologies to fabricate smart scaffolds”, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, **19**, 5, 543 (2008).
4. M. M. Stevens and J. H. George, “Exploring and engineering the cell surface interface”, *Science*, **310**, 5751 1135 (2005).
5. T. K. Kim, J. J. Yoon, D. S. Lee, and T. G. Park, “Gas foamed open porous biodegradable polymeric microspheres” *Biomaterials*, **27**, 2, 152 (2006).
6. X. Wang, W. Li, and V. A. Kumar, “A method for solvent-free fabrication of porous polymer using solid-state foaming and ultrasound for tissue engineering applications”, *Biomaterials*, **27**, 9, 1294 (2006).
7. K. Katoh, T. Tanabe, and K. Yamauchi, “Novel approach to fabricate keratin sponge scaffolds with controlled pore size and porosity”, *Biomaterials*, **25**, 18, 4255 (2004).
8. P. X. Ma and J.-W. Choi, “Biodegradable polymer scaffolds with well defined interconnected spherical pore network”, *Tissue Eng.*, **7**, 1, 23 (2001).
9. M. J. Kim S. D. Lee, and K. H. Youm, “Effect of Inorganic Salt Additives on Formation of Phase Inversion Polyethersulfone Ultrafiltration Membrane”, *Membr. J.*, **12**, 2, 75 (2002).
10. D. H. Yu, M. A. Jeong, J. W. Rhim, H. S. Byun, C. H. Jeong, Y. M. Lee, M. S. Seo, and S. Y. Nam, “Preparation and Characterization of Microporous PVDF Membrane for Li-ion rechargeable battery”, *Membr, J.*, **17**, 3, 233 (2007).
11. B. G. Park, S.-H. Kong, and S. Y. Nam, “Phase behavior and morphological studies of polysulfone membranes; The effect of alcohols used as a non-solvent coagulant”, *Membr. J.*, **15**, 4, 272 (2005).
12. M. Ebrahimian-Hosseinabadi, F. Ashrafizadeh, M. Etemadifar, and S. S. Venkatraman, “Evaluating and Modeling the Mechanical Properties of the Prepared PLGA/nano-BCP Composite Scaffolds for Bone Tissue Engineering”, *J. Matr. Sci. Technol.*, **27**, 12, 1005 (2011).
13. T. Lou, X. Wang, and G. Song, “Fabrication of nano-fibrous poly(l-lactic acid) scaffold reinforced by surface modified chitosan micro-fiber”, *Int. J. Biomed. Macromol.*, **61**, 353 (2013).
14. G. Vozzi, C. Flim, A. Ahluwalia, and S. Bhatia, “Fabrication of PLGA scaffolds using soft lithography and microsyringe deposition”, *Biomaterials*, **24**, 2533 (2003).
15. B. M. Whited, J. R. Whitney M. C. Hofmann, Y. Xu, and M. N. Rylander, “Pre-osteoblast infiltration and differentiation in highly porous apatite-coated PLLA electrospun scaffolds”, *Biomaterials*, **32**, 9, 2294 (2011).
16. E. P. S. Tan and C. T. Lim, “Mechanical characterization of nanofibers - A review”, *Compos. Sci. Technol.*, **66**, 9, 1102 (2006).
17. S. Liao, R. Murugan, C. K. Chan, and S. Ramakrishna, “Processing nanoengineered scaffolds through electrospinning and mineralization suitable for biomimetic bone tissue engineering”, *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.*, **1**, 3, 252 (2008).
18. B. J. Papenburg, L. Vogelaar, L. Bolhuis-Versteeg, R. Lammertink, D. Stamatialis, and M. Wessling, “One-step fabrication of porous micropatterned scaffolds to control cell behavior”, *Biomaterials*, **28**, 1998 (2007).
19. B. J. Papenburg, L. Bolhuis-Versteeg, D. W.

Grijpma, J. Feijen, M. Wessling, and D. Stamatialis, “A facile method to fabricate poly(L-lactide) nano-fibrous morphologies by phase inversion”, *Acta Biomaterialia*, **6**, 2477 (2010).

20. Y. S. Cho, Y. K. Kim, and J-K. Koo, “Effects of Solvent on the Fabrication of Poly(L-lactice) Scaffold Membranes Through Phase Inversion”, *Membr. J.*, **24**, 2, 113 (2014).
21. N. M. S Bettahalli, H. Steg, M. wessling, and D. Stamatials, “Development of poly(L-lactic acid)hollow fiber membranes gor aritficial vasculature in tissue engineering scaffolds”, *J. Membr. Sci.*, **371**, 117 (2011).