

전자빔을 조사한 미더덕 유래 셀룰로오스 유도막의 특성

김성민 · 우경미^{*,†} · 송나래 · 어미영 · 조혜진^{**} · 박지현^{***} · 이병철^{***} · 이석근^{****}

서울대학교 치의학대학원 치학연구소, 구강악안면외과학교실, *치과약리학교실,
^{**}한국기초과학지원연구원 전자현미경실험부, ^{***}한국원자력연구원 양자과학기술개발부,
^{****}강릉원주대학교 치과대학 구강병리학교실

(2015년 6월 29일 접수, 2015년 8월 5일 수정, 2015년 8월 31일 채택)

Electron Beam Irradiation to the *Styela Clava* Derived Cellulose Membrane

Soung Min Kim, Kyung Mi Woo^{*,†}, Na Rae Song, Mi Young Eo, Hye Jin Cho^{**},
Ji Hyun Park^{***}, Byung Cheol Lee^{***}, and Suk Keun Lee^{****}

Department of Oral and Maxillofacial Surgery,

^{*}Dental Pharmacology & Dental Therapeutics, Dental Research Institute,

School of Dentistry, Seoul National University, Daehak-ro, Jongno-gu, Seoul 110-768, Korea

^{**}Division of Electron Microscopic Research, Korea Basic Science Institute, Gwahak-ro, Yuseong-gu, Daejeon 305-806, Korea

^{***}Quantum Optics Laboratory, Korea Atomic Energy Research Institute, Daedeok-daro, Yuseong-gu, Daejeon 305-353, Korea

^{****}Department of Oral Pathology, College of Dentistry, Kangnung-Wonju National University,
Jukheon-gil, Gangneung-si, Gangwon-do 210-702, Korea

(Received June 29, 2015; Revised August 5, 2015; Accepted August 31, 2015)

초록: 셀룰로오스는 탄소와 수소 성분으로 이루어진 탄수화물 복합체로서 β -글루코오스 성분으로 이루어진 식물 세포벽의 주된 구성성분이다. 미더덕의 피부 각질에서 개발한 동물성 셀룰로오스 유도막에 1-2 MeV 에너지의 전자빔을 조사하여 C-C 결합보다 C-O 결합이 보다 증가함을 확인하였고, 여러 관련된 결과를 바탕으로 전자빔 조사에 의해 미세소관을 구성하는 셀룰로오스 미세원섬유들의 탈중합 과정을 일으킬 수 있었다. 셀룰로오스 합성복합체가 이 동함으로써 셀룰로오스 섬유소들을 균일하고 미세하게 변형시킴으로써 골유도재생술을 위한 얇은 μm 단위의 의료용 유도막으로 활용이 가능할 것으로 사료된다.

Abstract: Cellulose is the carbohydrate polymer composed of carbon, hydrogen and β -glucose, and the main composition of plant cell walls. The aim of this study is to evaluate the effect and potential of 1-2 MeV electron beam (E-beam) irradiation to the sea squirt derived cellulose membrane (CM) from *Styela clava*, called non-native tunicate. C-O bonding was increased than C-C bonding, and several related results showed depolymerization of cellulose microfibrils composed of microtubules. Cross-linking cellulose protein (CCP) was lost after E-beam irradiation, and so thin and delicate cellulose fibrils were detached each other by moving cellulose synthase complex. The potential of this cellulose polymer as a thin μm thickness medical membrane for the guided bone regeneration can be suggested.

Keywords: cellulose crosslinking protein (CCP), cellulose membrane (CM), depolymerization, electron beam (E-beam) irradiation, guided bone regeneration (GBR).

서론

골유도재생술(guide bone regeneration)은 골 표면에 밀착된 차단막으로 골결손부를 피복하여서 결손부를 골세포가 아닌 상피세포나 섬유아세포(fibroblast)로부터 격리하여서 골면과

차단막 사이에 골을 재생하기 위한 공간을 확보하는 골재생을 도모하는 술식이다. 이 때 사용되는 차단막을 차폐막(barrier membrane), 멤브레인 또는 유도막이라 부른다.¹ 의학 및 치의학 분야의 골유도재생술은 자연치아의 치주조직인 백악질, 치주인대, 치조골 및 치은 조직을 재생시키기 위한 조직유도재생술(guided tissue regeneration)의 원리를 이용하여 개발된 것으로 유도막을 적용하여 주변조직의 침투를 차단하여 배제시키고 혈병을 안정화하여 골재생을 유도하는 방법을 총칭한다.^{2,3}

[†]To whom correspondence should be addressed.

E-mail: kmwoo@snu.ac.kr

©2015 The Polymer Society of Korea. All rights reserved.

기존 상품화된 고비용의 생체유래 멤브레인을 대체하기 위해 미더덕의 피부 각질에서 순도가 높은 셀룰로오스막의 제조공정⁴⁵ 개발하였고, 기본적인 성분 검사 및 구조적인 분석을 통해 미더덕 유래 셀룰로오스막이 창상치유 효과를 가지면서 골막의 재생 및 여러 체내 골재생에 필요한 유도막의 기능을 지니고 있음을 보고한 바 있었다.⁶ 식물 세포벽의 주된 구성성분인 셀룰로오스와 유사하게 미더덕 유래 셀룰로오스도 셀룰로오스 분자의 약 80개의 선형사슬이 모여서 기능적 단위체인 셀룰로오스 미세섬유(cellulose microfibril)를 형성하는 고분자인데, 셀룰로오스 미세섬유는 세포벽의 견고함과 구조적인 성향을 부여하는 경직된 폴리머 구조로 섬유 내 인접한 글루칸의 비공유결합으로 안정적이면서 체내에서 분해되지 않는다. 사람에서는 셀룰로오스를 분해할 수 있는 능력이 없기 때문에 미더덕 유래 셀룰로오스 유도막의 경우 체내에서 흡수되지 않는 비흡수성 유도막으로서 대부분 이차수술에 의해 제거해야 하는 단점이 있어 왔다.

방사선 조사는 의료용 소재개발에 있어서 매우 유용함에도 불구하고 일반 대중에게는 위험한 행위로 인식되어 왔다. 전자빔 조사(electron beam irradiation)는 비록 방사선 조사에 국한될 수 있으나 시설장비의 안전한 구축을 통해 현재 국내에서도 3-5 곳의 국가지정 또는 사설 운용되는 곳이 소개될 정도로 최근에 많은 관심을 받고 있는 방사선 관련 기술사업이다. 전자빔은 톰슨의 음극선 실험에서부터 알려져 있는데, 진공관속 음극의 필라멘트에 고전압을 걸면 전자가 가속화된 상태로 양극으로 향하게 되는데 이 가속화된 전자들을 전자빔이라 일컫는다.^{7,8} 의학용보다는 이공학 및 물리학적으로 보다 알려진 전자빔은 적외선 및 자외선 등의 전자파 에너지와 달리 공학용 전자빔 가속기인 경우 10-100 MeV의 높은 에너지를 이용하여 물체에 투과되는 성질을 지닌다. 높은 에너지로 가속된 전자빔은 다른 가시광선 등과 달리 중합이나 경화 반응에 필요한 광개시제(photo initiator) 또는 광증감제(photo sensitizer)가 불필요하고, 투과 깊이도 대상 물체의 평면 밀도와 연계되어 있어 공학용 이외에도 의료소재의 소독용으로 활용되어 왔다.^{8,9}

본 연구에서는 높은 투과에너지를 지니는 전자빔 조사를 통하여 기존에 개발된 셀룰로오스 유도막의 변화된 성상에 대한 분석을 진행하여 체내 친화성을 지니는 유도막의 가능성을 평가하고자 하였다.

실 험

미더덕 유래 셀룰로오스 유도막은 모두 16단계의 과정을 거쳐 준비하였다.^{5,6} 평균 11일 과정으로 크기에 맞추어 자르고 비이커에 보관한 후에 0.1 M KOH(450~500 mL) 처리를 2~4일간 stirrer에서 시행하고, 증류수 세척과 증류수 100 mL + 1 M HCl 10 mL로 하루 이상 처리하였다. 다시 증류수 세척

후 하루 더 처리한 후에 증류수 100 mL + 10 mL NaOCl 용액에서 stirring 없이 하루 보관하고, 다시 증류수 세척하여 증류수 100 mL 및 1 M HCl 10 mL 혼합용액에 하루 이상 보관하고 증류수 세척후 1 N NaOH 100 mL에 6시간 처리하였다. 이후 역시 증류수 100 mL + 1 M HCl 10 mL에서 하루 이상 보관한 이후 증류수 세척과 PBS buffer 100 mL에 2시간 반응하였고, 이후 펩신 2 스푼과 PBS buffer 100 mL에 반응하여 1시간 동안 ultrasonic 45 °C 처리하였다. 이 후 Trypsin 처리를 1시간하고, 1 N HCl 200 mL에 stirring하여 1일 처리한 후에 증류수로 5회 이상 세척하고 얇은 포일 위에서 하루 이상 건조시킨 후에 ethylene oxide 소독 과정을 거쳐 포장하였다.^{5,6}

한국원자력연구원에서 서로 다른 16가지 조건으로 전자빔 조사를 시행하였다. 전자빔 에너지는 1, 2 MeV의 두 조건으로 하고 전류량은 0.12 및 0.24 mA의 두 조건으로 나누었으며, 조사량의 에너지는 1, 10, 30 및 120 kGy 등과 같이 네 가지 다른 조건으로 하여 서로 다른 scan speed(mm/Rev)로 시행하였다(Figure 1, Table 1).⁸ 전자빔 조사된 유도막은 각각 원소, 아미노산, 투과도 및 표면화학 검사를 시행하였으며 주사전자현미경 분석과 일반물성 검사를 시행하였다. 각 시편은 각각 3회 이상 시행하였으며, 조사전 시편과 비교하여 각각의 평균값과 표준편차를 확인하여 통계분석은 student's t-test를 수행하고 결과 값이 $p < 0.05$ 일 때 유의성 있음으로 기준하였다.

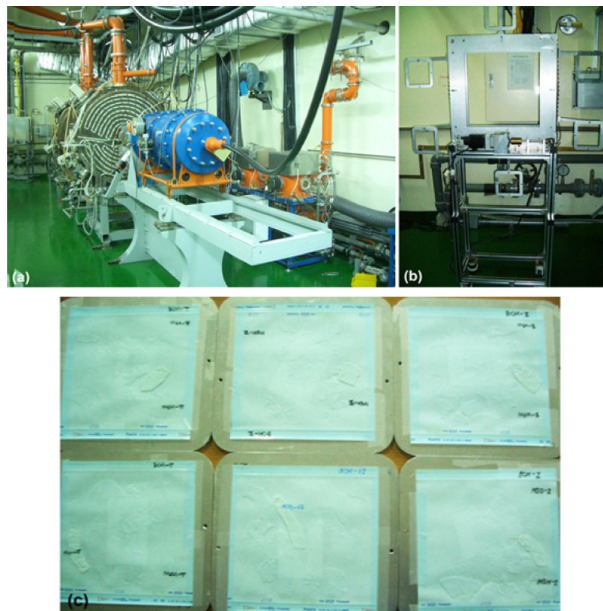


Figure 1. Basic units of electron beam accelerator (a); target specimen holder including six units (b); prepared cellulose membrane appearance after compressive packing with ethylene oxide gas sterilization (c).

Table 1. Actual Dose of Electron Beam Irradiation Study

	Dose	1 kGy	10 kGy	30 kGy	120 kGy
1 MeV	0.12 mA	8.8	15.2	27.3	OR ^a
	0.24 mA	8.8	14.9	27.5	64.4
	mean	8.8	15.1	27.4	OR
2 MeV	0.12 mA	3.2	12.4	23.7	55.2
	0.24 mA	3.1	12.7	23.3	54.4
	mean	3.2	12.6	23.5	54.8

^aOR: Over range.

원소 분석. 원소 분석기와 전계방출 주사전자현미경(FE-SEM, field emission scanning electron microscope)을 이용하여 전자빔 조사후의 원소 분석을 시행하였다. 원소 분석기(EA 1110[®], CE instruments Co.)의 분석 조건은 0.01-100%의 measuring range, maximum working temperature는 1100 °C, oven temperature는 50-190 °C이고, TCD detector를 사용하였다. FE-SEM(S-4200[®], Hitachi Co.)은 유도막 표면의 미세한 구조를 정성 및 정량적으로 분석하였다.

아미노산 분석. 셀룰로오스 유도막의 순도 파악을 위해 아미노산 분석기(L-8800 High speed amino acid analyzer[®], Hitachi Co.)를 사용하여 각각의 유도막 1g을 잘게 파쇄하여 20 mL의 물에 넣고 10기압, 120 °C에서 30분간 끓여서 얻은 각각의 수용액을 원심분리하여 상층액을 이용하였다. 분석기에서는 단백질을 산 가수분해한 후 컬럼을 통과시켜 아미노산들을 분리하고, 고온의 reaction coil에서 유도체화합물과 반응시켜 유도체 아미노산을 만든 후, 검출기에서 흡광도를 측정하여 유지시간에 따른 흡광도의 차이를 분석하였다.

감쇠전반사 적외선분광기를 이용한 화학적 관능기 검사. 한국화학연구원의 Nicolet 5700FTIR[®] 장비를 사용하였으며 45° Dia crystal에 의한 단일산란 감쇠전반사(single bounce ATR)로 측정 범위는 400~4000 cm⁻¹였다. 참조하여 비교할 각 관능기의 파장 범위(group frequencies)로는 기존의 여러 실험과 참조문헌 등을⁹⁻¹¹ 기준하여 alkane C-H stretch(sp³) 2850~3000 cm⁻¹, alkene C-H stretch(sp²) 3050~3150 cm⁻¹ 및 alkyne C-H stretch(sp) 3300~3320 cm⁻¹ 등으로 정하였고, alkanes -CH bending으로는 HCH scissoring 1440~1470 cm⁻¹, CH₃ rocking 1370~1380 cm⁻¹ 및 CH₃ rocking 720~725 cm⁻¹의 내용을 참조하여 비교하였다.

표면화학 분석. 유도막 표면의 원소 구성과 각 원소의 화학적 결합상태를 파악하기 위해 한국화학연구원의 mono-chromatic Al-K α 선을 광원으로 하는 X-ray photoelectron spectroscopy(XPS) 광전자분광기인 AXIS NOVA[®] 장비를 이용하여 분석하였다.^{9,12,13} 표면화학 분석은 산소 및 탄소의 1s 전자의 결합에너지가 각각 531, 284 eV임을 이용하여 산소와

탄소의 내각 전자들의 결합에너지가 다르고 이들 각각의 특징적인 결합에너지를 측정함으로써 전자빔 조사에 의한 표면 성상의 변화를 비교 분석하였다.

주사전자현미경 분석. 주사전자현미경(Hitachi Co., Japan) 검사에서는 각 유도막의 외면과 내면을 구분하여 $\times 5.0$, $\times 20.0$ 및 $\times 50.0$ k의 배율로 관찰하였다. 주로 미세섬유소(micro fibrils)의 분포 상태를 기준으로 촬영하였으며 불순물들이 남아있거나 또는 표면이 중첩되어 그리드가 만들어진 부분은 제외하였고, 3회 이상 촬영하여 대표적인 촬영만을 비교할 수 있도록 배치하였다.

평균 두께, 인장강도 및 신장률 등의 물성 검사. 전자빔 조사 전후의 물성 검사를 위해 모든 시편을 Instron 4482[®] 장비를 사용하여 속도 5 mm/min, 그리프 간격은 20 mm, 그리고 1 kgf의 full scale load range와 같은 측정 조건으로 각각 3회씩 측정하여 평균치를 구하였다. 전자빔 조사 전후의 물성의 정확한 평가를 위해서 유도막 시편은 3.5 cm 직경으로 같은 습도와 보존 조건으로 유지하여 진행하였다.^{5,6}

결과 및 토론

원소 분석. 전자빔 조사된 셀룰로오스 유도막은 대부분 탄소와 수소 성분으로 이루어진 탄수화물 복합체로서 거의 대부분 β -글루코오스 성분으로 이루어진 물질로 확인되었다. 조사전의 탄소와 산소의 질량 비율이 53.7457%였음에^{5,6} 비해 조사후에도 50%를 전후한 비율이 관찰되어 이번 전자빔조사 에너지 및 다른 조사량에 대해서도 질량 비율은 변화를 보이지 않았다. 원자별 분포에 있어서도 탄소가 52-59%의 비율을 일관되게 보이고 산소가 나머지 41-48%의 비율을 보였는데, 이는 조사전의 평균 50.21%의 탄소, 49.61%의 산소 비율을 보임과^{5,6} 비교하여 전자빔 조사전후의 차이 또는 조사 에너지 및 조사량과 관련하여 차이점은 발견되지 않았다. 또한 다른 특이한 중금속 성분도 관찰되지 않았다. 드물게 황 성분이나 칼륨 성분이 극소량인 질량 0.19% 미만, 원자별 0.08% 미만으로 관찰되었으나 이는 전자빔 조사전의 미량으로 발견되었던 결과와^{5,6} 차이점을 보이지 않았다(Figure 2).

아미노산 분석. 시편이 컬럼을 통과하면서 아미노산이 분리되도록 유기용매를 사용하여 4회 이상 분리하여 흡광도를 측정하였는데, 유지시간에 따라 Asp, Thr, Ser, Glu, Gly, Ala, Val, Ile, Leu, Phe, Lys, 및 NH₃ 등의 유리 아미노산이 차례대로 검출되었다. 전자빔 조사 전후 및 조사된 에너지와 조사량에 따라 유의성 있는 차이점은 관찰되지 않았고, 1 MeV-1 kGy의 조사량과 2 MeV-120 kGy의 조사량에서도 검출되는 높이와 면적, 그리고 농도에 있어서도 유의성 있는 차이점은 관찰되지 않았다(Figure 3). 이는 전자빔 조사를 통해 셀룰로오스 유도막의 아미노산 함량의 변화는 관찰되지 않았으며 기존에 확인된^{4,6} 셀룰로오스 유도막의 골재생 능력을 지속적

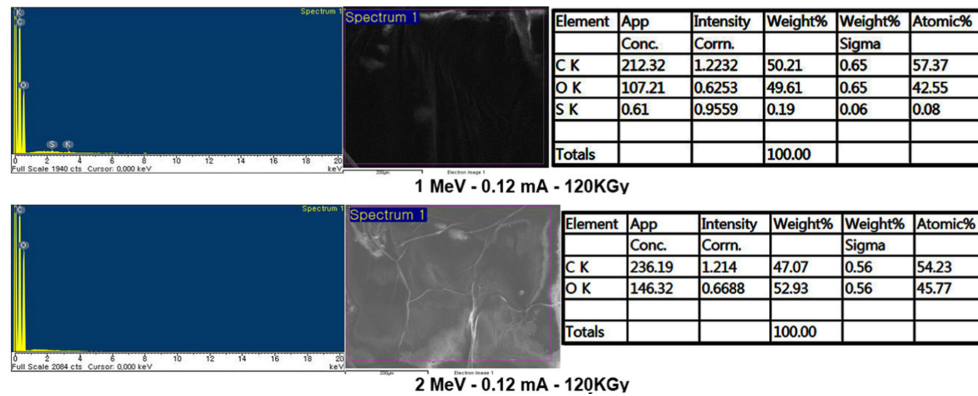


Figure 2. Elementary analysis of cellulose membrane after 1 MeV-0.12 mA-120 kGy (above) and 2 MeV-0.12 mA-120 kGy (below) electron beam irradiation.

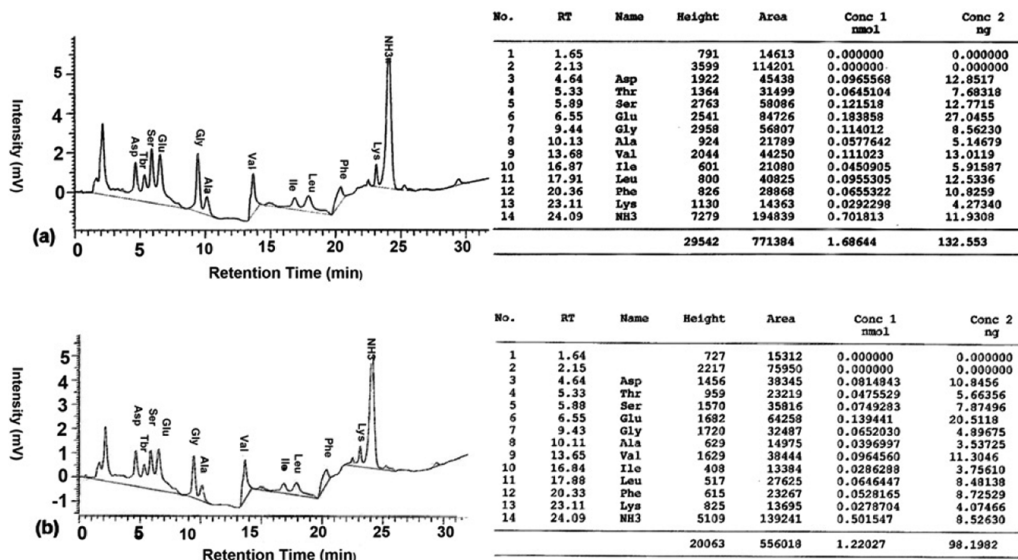


Figure 3. Amino acid analysis of cellulose membrane under the 1 MeV-0.12 mA-1 kGy (a); 2 MeV-0.12 mA-120 kGy (b) electron beam irradiation, showing the detection intensity of Asp, Thr, Ser, Glu, Gly, Ala, Val, Ile, Leu, Phe, Lys, and NH₃ according to the retention time.

으로 지닐 수 있을 것으로 해석되었다.

감식전반사 적외선분광기를 이용한 화학적 관능기 검사. ATR-IR 분석에서는 셀룰로오스 유도막을 구성하는 특징적인 탄소와 산소의 결합 양식을 그대로 보여주었는데, 유기물 및 무기 합성물에 대해 C-O-C, C=O, -NO₂, -OH와 -CH₃ 결합 등의 관능기 구성이 특징적인 스펙트럼 유형으로 확인되었다 (Figure 4). 전자빔 조사 후 조사량 증가에 따라 조사전에 비해 투과도가 점차 증가하였으나 조사 에너지 및 전류량에 따른 차이점은 관찰되지 않았다. 스펙트럼은 대조군인 조사전의 적외선분광 스펙트럼 결과와 거의 유사한 파형과 스펙트럼을 보였는데, -OH vibration인 3366.8 cm⁻¹와 -CH₃ vibration인 1368.8 cm⁻¹에서 각각 -OH와 -CH₃ 기의 특징적인 흡수밴드(absorption bands)가 관찰되었다. 또한 C-O-C bridge의 anti-symmetric stretching에 의한 1157.4 cm⁻¹의 피크와 C-O

stretching에 의한 1059.6와 1024.6 cm⁻¹의 피크 등을 보이는 일관적인 형태는 셀룰로오스 유도막이 전자빔 조사 후에도 기본적인 당(saccharide) 성분 폴리머의 스펙트럼 구조가^{14,15} 그대로 유지되었다.

표면화학 검사. ESCA survey 분석 스펙트럼에서는 주성분인 탄소와 산소의 구성이 관찰되어 C1s와 O1s 각각의 특징적인 피크가¹⁴⁻¹⁶ 모든 셀룰로오스막의 내면과 외면에서 관찰되었다(Figure 5). C1s 고분해능 분석에서 hydroxyl carbon 결합인 C-OH 결합, ether carbon인 -C-O-C 결합, carbonyl carbon인 -C=O 결합 및 ester carbon인 O-C=O 결합 및 hydrocarbon 결합인 -C-C-, -C-H 결합에서는 조사전과 비교하여 조사후에는 전반적으로 피크 값이 낮아졌으며 284.9 eV 피크의 hydrocarbon 결합만이 상대적으로 피크 값이 높아진 모습을 보였다.

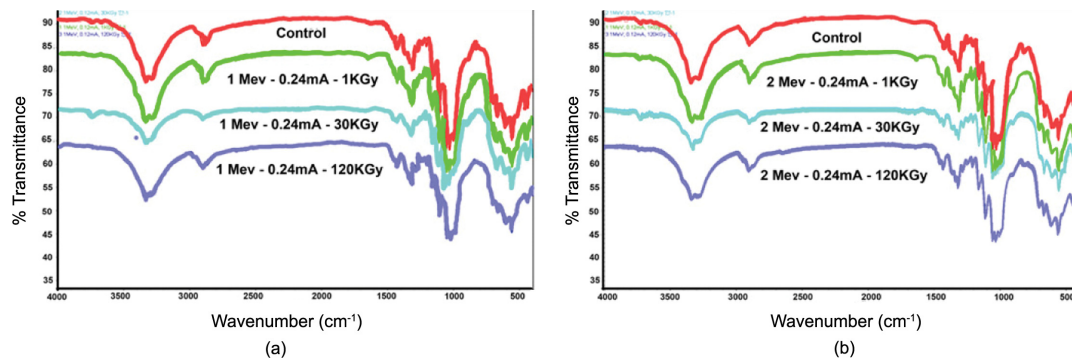


Figure 4. ATR-IR spectra of cellulose membrane (upper, red); electron beam irradiated cellulose membrane, from middle to bottom (green, blue and violet).

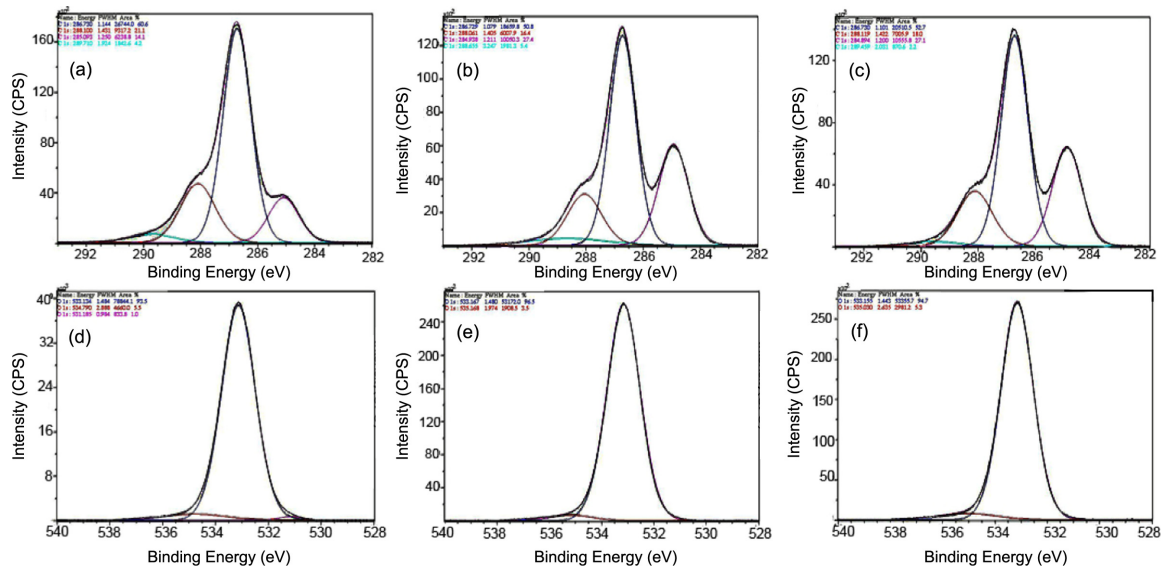


Figure 5. High-resolution C1s ESCA spectrum, showing hydrocarbon (C-C, C-H) bonding of 284.9 eV peak, hydroxyl carbon (C-O-H) bonding of 286.7 eV peak, ether carbon (O-C-O) bonding of 288.4 eV peak and ester carbon (O-C=O) bondings of 289.6 eV peak. No E-beam (a); inner (b); outer (c) surface of 2 MeV-0.24 mA-120 kGy irradiated cellulose membrane. High-resolution O1s ESCA spectrum, showing hydroxyl oxygen (-C-O-H), ether oxygens (-C-O-C-) and ester oxygen (-COO-). No E-beam (d); inner (e); outer (f) surface of 2 MeV-0.24 mA-120 kGy irradiated cellulose membrane.

O1s 고분해능 분석에서는 셀룰로오스의 C-O 결합만이 관찰되므로 사용된 셀룰로오스가 매우 순수하게 정제되었음을 나타내는데, hydroxyl oxygen(C-OH), ether oxygens(C-O-C) 및 ester oxygen(-COO-) 결합에 대한 피크가 각각 구분되어 관찰되었다. 특징적인 것은 전자빔 조사전의 38 cps(counts per second) 피크 값이 전자빔 조사후 240-250 cps 피크 값으로 매우 크게 증가되었으며, 이는 전자빔 조사에 의한 표면 성상에서 C-O 결합량이 급격히 증가한 것으로 해석되었다.

전자빔 조사에 의한 셀룰로오스막의 표면에서 산화반응이 촉진되어 분자구조가 C-C에서 C-O 결합으로 촉진된 것이 표면화학검사에서 주 결과로서 기존 셀룰로오스막에 있는 C-C 및 C-O 결합에서 전자빔 조사후에 C-O 결합이 많아짐을

확인할 수 있었다. C-O 결합이 증가된 셀룰로오스막은 물과 수화반응을 하면서 C-OH로 되어 친수성이 높아지면 보다 쉽게 생활성 작용 및 수화분해 작용을 할 수 있을 것으로 사료된다. 이는 전자빔을 조사한 셀룰로오스 유도막의 내면에서 보다 큰 친수성을 보이고 동시에 전자빔에 의한 셀룰로오스 섬유소들이 잘려지는 절단화(scissioning) 현상이 C-C 결합에서 많았던 것으로 사료된다.

다양한 여러 전자빔 조사 조건에 따른 셀룰로오스 유도막의 외면과 내면에 대한 ESCA 분석 결과는 차이가 없었는데, ESCA 분석이 광전효과에 의한 분석 원리임을 고려하면 μm 두께를 갖는 셀룰로오스 유도막의 극표면간의 화학적 구성에는 차이가 없는 것으로 사료된다.

주사전자현미경 분석. SEM 분석은 모든 시편에 대해 내면과 외면으로 나누어 진행하였으며, 거칠고 단단하게 뭉쳐진 셀룰로오스 섬유소들의 돌출과 함입 구조가 반복되는 외면과 상대적으로 미세하고 얇은 섬유상 구조를 이루는 내면으로 관찰되었다. 여러 조건의 전자빔 조사와 관련하여 같은 에너지의 전자빔에서 조사량이 증가할수록 유도막의 내면과 외면의 형태가 비슷해지는 양상을 일관되게 보였는데, 셀룰로오스 섬유소들이 희미해지면서 그 기본적인 형태가 희미해지는 소견이 관찰되었다(Figures 6, 7). 1 및 2 MeV 각각의

에너지 조건에서 조사량에 따라서 비례하여 구조가 비슷해지는 양상도 관찰되었는데, 특히 2 MeV-0.24 mA-120 kGy의 조건에서는 외면과 내면이 거의 유사한 모습이었다(Figure 7M-7R).

평균 두께, 인장강도 및 신장률. 물성 검사의 평균치는 Table 2에 기재하였다. 전자빔 조사전의 셀룰로오스 유도막의 두께는 0.0231 ± 0.0012 mm, 평균 인장강도는 1.13 ± 0.069 kgf/mm² 및 신장률(%)은 12.43 ± 0.605 % 임에 비해,⁵ 2 MeV의 에너지로 여러 조사량에 의한 전자빔 조사후에는 두께 0.0046-

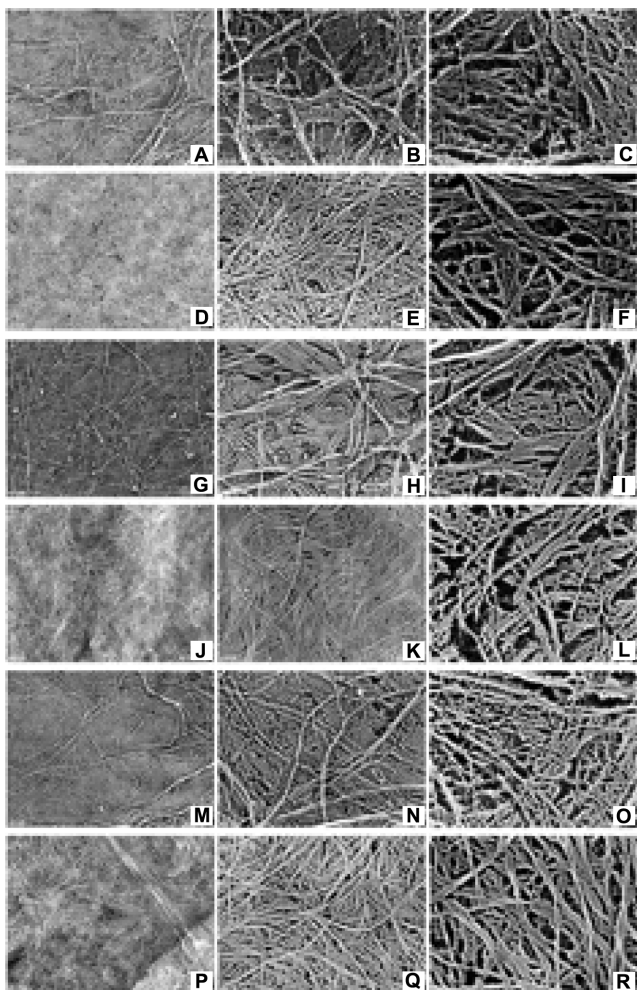


Figure 6. Inner surface of 1 MeV-0.12 mA-1 kGy irradiated cellulose membrane, $\times 5.0$ k (A); $\times 20.0$ k (B); $\times 50.0$ k (C), and outer surface of 1 MeV-0.12 mA-1 kGy irradiated cellulose membrane, $\times 5.0$ k (D); $\times 20.0$ k (E); $\times 50.0$ k (F). Inner surface of 1 MeV-0.12 mA-30 kGy irradiated cellulose membrane, $\times 5.0$ k (G); $\times 20.0$ k (H); $\times 50.0$ k (I), and outer surface of 1 MeV-0.12 mA-30 kGy irradiated cellulose membrane, $\times 5.0$ k (J); $\times 20.0$ k (K); $\times 50.0$ k (L). Inner surface of 1 MeV-0.12 mA-120 kGy irradiated cellulose membrane, $\times 5.0$ k (M); $\times 20.0$ k (N); $\times 50.0$ k (O), and outer surface of 1 MeV-0.12 mA-120 kGy irradiated cellulose membrane, $\times 5.0$ k (P); $\times 20.0$ k (Q); $\times 50.0$ k (R).

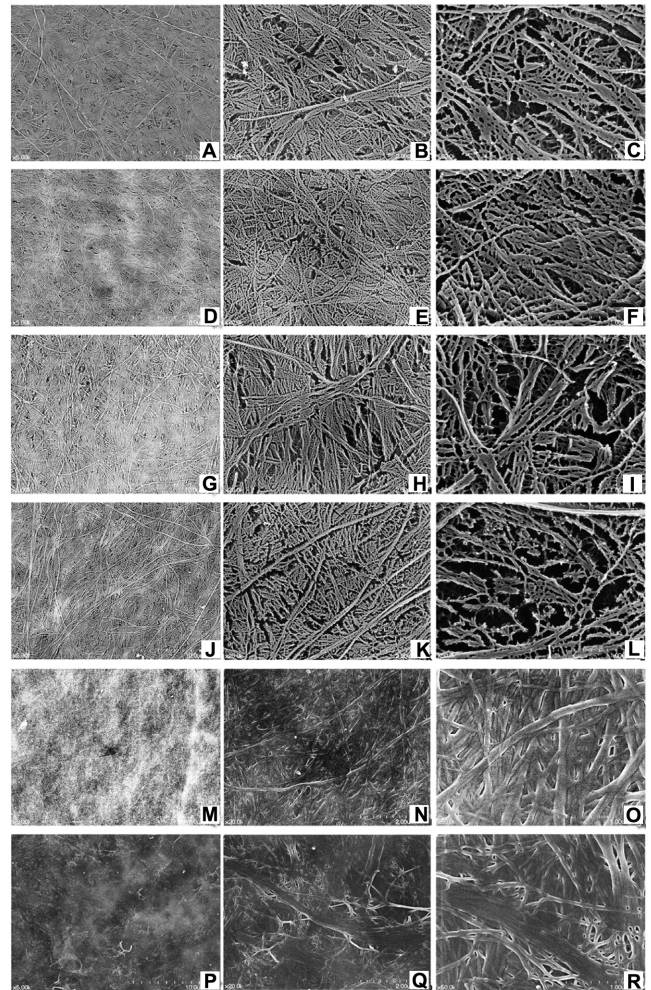


Figure 7. Inner surface of 2 MeV-0.24 mA-1 kGy irradiated cellulose membrane, $\times 5.0$ k (A); $\times 20.0$ k (B); $\times 50.0$ k (C), and outer surface of 2 MeV-0.24 mA-1 kGy irradiated cellulose membrane, $\times 5.0$ k (D); $\times 20.0$ k (E); $\times 50.0$ k (F). Inner surface of 2 MeV-0.24 mA-30 kGy irradiated cellulose membrane, $\times 5.0$ k (G); $\times 20.0$ k (H); $\times 50.0$ k (I), and outer surface of 2 MeV-0.24 mA-30 kGy irradiated cellulose membrane, $\times 5.0$ k (J); $\times 20.0$ k (K); $\times 50.0$ k (L). Inner surface of 2 MeV-0.24 mA-120 kGy irradiated cellulose membrane, $\times 5.0$ k (M); $\times 20.0$ k (N); $\times 50.0$ k (O), and outer surface of 2 MeV-0.24 mA-120 kGy irradiated cellulose membrane, $\times 5.0$ k (P); $\times 20.0$ k (Q); $\times 50.0$ k (R).

Table 2. Mean Thickness, Tensile Strength and Elongation Rate

0.12 mA, kGy	Thickness (mm)	Tensile strength ^a (kgf/mm ²)	Elongation rate ^a (%)
1 MeV	1	0.044±0.012	5.78±1.43
	10	0.025±0.007	3.62±0.09
	30	0.050±0.004	6.66±2.19
	120	0.023±0.011	0.52±0.21
2 MeV	1	0.034±0.018	5.98±0.97
	10	0.035±0.009	6.96±2.41
	30	0.021±0.009	7.55±1.62
	120	0.028±0.016	2.84±0.73

^aASTM D638-03, speed 5 mm/min.

0.044 mm($p<0.05$), 평균 인장강도 0.52-2.84 kgf/mm²($p<0.05$), 신장률은 4.05-19.27%($p>0.05$)의 값을 보였다. 조사전과 비교하여 세 항목 모두 큰 차이점은 발견되지 않았으며 무엇보다 처음 시편을 제작하는 과정에서 일관된 두께의 유도막을 제작하지 못하여 넓은 측정범위를 보인 것으로 생각된다. 특히, 신장률에서는 넓은 측정 범위를 보였으며 이는 비록 통계적 유의성은 없었으나 전자빔 조사후 다당류의 교차결합이 탈중합되면서 셀룰로오스 미세섬유간의 결합력이 적어지면서 신장률이 다양해지거나 증가된 것으로 사료된다.

골유도재생술의 기본 개념과 기술은 여러 동물실험에서 성공적인 것으로 보고되어 왔는데, 일반적인 신생골의 재생은 골막과 골합성 능력을 지니는 골수기원의 세포들에 의해 이루어진다.¹² 골유도재생술의 궁극적인 목표는 일시적인 어떤 기구 및 장치를 이용하여 신체에서 자연스런 치유능력을 발휘하도록 주변 환경을 제공하여 상실된 조직을 재생시키는 것이라 할 수 있으며, 골치유 및 골재건술과 연관된 유도막의 효과는 여러 다양한 기계적, 세포적 및 분자생물학적 기전들의 종합적인 결과로 나타나게 된다. 즉, 유도막의 기능으로 섬유아세포가 골대신 성장하는 것을 막아주며, 세포에서 기원한 용해성 방해인자들을 배제하며, 동시에 성장촉진인자들의 국소적 농도를 유지하는 등의 유도막 자체의 여러 골재생 촉진인자들을 유지하는 것이 중요하다. 골재생 과정의 초기 치유과정인 외상 상태에서는 유도막을 적용함으로써 하버시안(haversian) 및 폴크만관(Volkman's canal) 그리고 골내막(endosteum) 대부분의 세포들로부터 골합성 능력을 가지는 세포들이 보충되는 과정이 촉진되는 것으로 이해된다. 즉, 유도막은 자체의 기능 이외에 내부에서의 골재생이 이루어지는 충분한 기간 동안에 공간을 유지하면서 형태를 유지시켜야 하는 유도막 고유의 기능을 하여야 하고, 기능후에는 최종적으로 제거되거나 또는 골재생 이후의 골막의 기능을 방해하지 않을 정도로 얇게 남아 있어야 한다.

전자빔은 여러 전자파 종류 중 하나로서 전자파는 에너지

(eV) 크기에 따라 0.01-0.1 eV의 적외선, 1.5-3.0 eV의 가시광선, 3.0-12.5 eV의 자외선, -10^4 eV의 X 선, -10^6 eV의 감마선(gamma ray, γ 선) 및 10^5 - 10^7 eV의 전자빔으로 분류된다. 전자빔 가속기가 상용화되기 전에는 감마선에 의한 산업처리물 또는 의학용 소재에 대한 연구가 광범위하게 진행되어 왔는데, 감마선은 불안정한 원자핵에서 나오는 전자파로서 파장이 매우 짧고 높은 에너지를 가지고, 자체는 전리작용을 일으키지 않으나 높은 투과력을 지녀서 간접적인 전리 작용으로 식품의 살균 등에 주로 활용되어 왔다.^{17,18} 또한 감마선은 높은 에너지를 가지므로 투과력이 크고 납과 같이 높은 밀도의 물질로 차폐시킬 수 있는데 이는 고에너지 전자빔과 거의 유사한 반응 기전을 보임으로써 여러 물질을 변환시킬 수 있는 점에서 응용분야가 유사하다. 그러나 전자빔 조사는 상대적으로 흡수선량 속도(dose rate)에 있어서 감마선보다 1000 단위 이상이어서 단시간에 조사할 수 있는 가장 큰 장점을 지닌다.¹⁹

셀룰로오스 소재에 대한 전자빔 조사에 대한 보고는 최근까지도 여러 산업공학 및 자원처리 분야에서 많이 진전되어 왔고 펄프 등을 분해하거나 처리하기 위한 전자빔 효과에 대해서도 다양하게 보고되어 왔다.²⁰⁻²³ 즉, 전 세계적으로 사회 및 경제 개발 이후 펄프 소재의 여러 종이 등의 서류 쓰레기 처분을 위해서 대기 중에 불순물을 남기거나 공기 오염 없이 소각시키기 위한 분야로 진행되어 왔으며, 이 때 사용하는 전자빔의 에너지는 최소 150 kGy 이상으로서 1000-2000 kGy의 조사량이 유용함이 보고되어 왔다. 조사량이 1000 kGy까지 증가할 경우 목재 등의 대부분의 셀룰로오스는 결정체 구조가 감소함으로써 분자량이 감소하고, 상대적으로 표면 면적이 증가하는 추세를 보인다. 이러한 현상은 전자빔의 조사량에 따른 중합 분포 정도가 다른 탈중합(depolymerization) 반응에 의한 것으로서 조사량이 증가할수록 중합 정도가 감소하는 것으로 설명될 수 있다. 즉, 기존 목재에서 기원한 셀룰로오스가 서로 다른 정도로 흡수하는 에너지만큼 분해되는 정도가 다르고, 이중 전자빔의 에너지를 4.5 및 10 MeV로 유지하면서 조사량을 균일하게 할 경우 목재 기원 셀룰로오스의 중합화 분포는 조사에너지가 낮을수록 셀룰로오스에 주는 영향인 위해(damage) 현상이 증가함을 기존 논문에서 설명되어 왔다.^{24,25}

X선 회절분석기 또는 HPLC 등을 이용한 미세섬유소들의 결정체 변화 및 분자량 측정의 차이점은 120 kGy 이하의 조사량에서는 거의 비교되지 않았기에, 여러 분석법 중 최소한의 차이점을 파악하고자 본 연구 방법에서와 같이 ESCA, FE-SEM 및 SEM 분석을 시행하게 되었다.⁴⁶ 따라서 본 연구에서는 120 kGy 이상의 조사량 사용은 배제하였으며 120 kGy에서 미세한 표면 성상의 변화 및 미세섬유소들의 흠어지는 소견을 SEM 등의 여러 분석에서 관찰할 수 있었다. 이미 기존 식물성 셀룰로오스에서 모식화되어 설명되고 있는 셀룰로

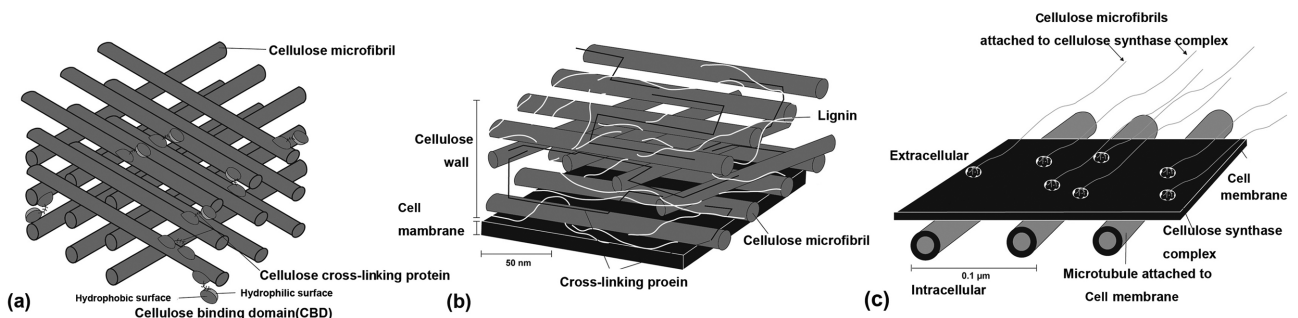


Figure 8. Schematic drawings of cellulose microfibrils showing cellulose cross-linking protein and cellulose binding domain (a); cellulose microfibril with lignin and cross-linking protein (b); extracellular cellulose microfibril attached to the intracellular microtubule (c).

오스 섬유들은 이를 단단히 잡아주는 셀룰로오스 교차결합 단백질이 존재하며, 이러한 단백질은 각각의 친수성 및 소수성의 셀룰로오스 결합공간(cellulose binding domain)을 지니게 된다(Figure 8(a)). 소수성 결합공간은 각각의 셀룰로오스 미세섬유들에 붙게 되고 반대편인 친수성의 결합공간은 이들을 연결하는 셀룰로오스 교차결합 단백질에 의해 서로 연결되어 셀룰로오스 유도막 전체의 구조와 성상을 유지하게 된다.^{26,27} 기존의 교차결합된 고분자는 전자빔 조사에 의해서 서로의 셀룰로오스 결합공간을 놓치고 연결이 끊어짐으로써 셀룰로오스 섬유들을 단단히 잡아주는 역할을 소실하게 된다. 이러한 단백질에 작용하여 서로간 긴밀한 미세섬유들을 흠뜨림으로써 단단한 셀룰로오스 유도막의 성상이 보다 부드러워져서 본 연구결과와 물성 검사와 같이 신장력도 증가된 것으로 사료된다. 그리고 친수성인 셀룰로오스 결합공간이 많아짐으로써 유도막이 보다 주변의 친수성 세포들과 결합하여 주변 조직과의 생체적합성이 더욱 우수해질 수 있을 것으로 사료된다.

셀룰로오스 섬유들은 다른 다당류 및 구조단백질과 서로 얽혀 있는 구조를 지니며 특히 리그닌(lignin) 그물구조가 복잡하게 결합시키는 구조를 형성한다(Figure 8(b)).²⁸ 이렇게 결합시키는 구조가 세포외기질 내에 저장되어 좀더 견고한 성질과 방수성을 부여하는 것으로 알려져 있다. 셀룰로오스는 세포막에 묻혀있는 셀룰로오스 합성복합체(cellulose synthase complex)에 의해 합성되는데, 이러한 방식은 세포의 외부표면에서 합성되는 여러 세포외기질의 거대분자가 합성되는 방식과는 다르게 합성된다.^{26,29} Figure 8(c)와 같이 세포 내에서 만들어져서 세포외로 배출(exocytosis)되지 않고 셀룰로오스 합성복합체는 막을 가로질러 다당류를 운반하여 성장하는 중합체에 첨가시킴으로써 생기는 한 묶음의 중합체 사슬로서 셀룰로오스 미세섬유를 형성하게 된다. 이처럼 셀룰로오스 합성복합체는 세포막으로 이동하여 새로운 중합체를 합성하고 기존에 합성 배열된 셀룰로오스 미세섬유를 이어나감으로써 계속적으로 새로 형성된 세포의 셀룰로오스 미세섬유들이 세포내 미세소관의 배열에 의해 결정되어진다. 즉, 셀룰

로오스 미세섬유들은 서로 다른 다당류 및 구조단백질과 복잡하게 얽혀 있는 구조를 지니며,²⁶ 세포외기질 내에 저장되어 견고한 성상과 방수성을 지니고 있다. 세포막 외부에 인장강도를 유지하는 셀룰로오스 원섬유들이 촘촘히 분포하고, 이러한 셀룰로오스 원섬유를 서로 흰색의 리그닌과 같은 극성이 강한 기능기(functional group)와²⁸ 진한색의 교차결합 단백질은 이들 원섬유들을 붙잡아주면서 이들 사이의 공간을 채워주며 압축에 대한 저항성을 지니게 한다.

결론

본 연구에서는 미터덕 유래 셀룰로오스 유도막에 1-2 MeV 에너지의 전자빔을 서로 다른 조사량으로 조사함으로써 셀룰로오스 미세원섬유들을 유지하는 교차단백질에 영향을 줄 수 있었다. 셀룰로오스의 베타 1-4 linkages를 분해할 수 있는 방법으로 알려진 셀룰라아제와 같은 분해효소 이외에는 여러 화학적 복합 성분의 제제가 알려져 있다. 본 연구결과와 같이 셀룰로오스 유도막 표면이 성상 변화는 서로 다른 조건의 저에너지의 전자빔 조사를 통해 미세소관을 구성하는 셀룰로오스 미세원섬유들의 탈중합 과정을 일으킨 것으로 사료된다. 즉, 전자빔 조사로 미세소관의 배열도 일부 변화하여 셀룰로오스 미세섬유들과 합성 복합체가 세포막 내에서 서로 움직임으로써 전자빔 조사에 의한 투석 및 여과용으로 셀룰로오스막을 사용하는 것도 가능하리라 사료되며, 이는 전자빔 조사에 의해 C-O 결합이 증가되어 셀룰로오스 유도막의 친수성도 보다 증진된 것으로 사료된다.

이에 보다 미세하면서 신장력이 우수한 셀룰로오스 유도막으로의 변화를 확인하기 위해 기본 성분 검사 및 다양한 구조분석을 진행하였으며, 셀룰로오스 섬유소들을 균일하고 미세하게 배열시킴으로써 얇은 μm 단위의 의료용 유도막으로 활용이 가능할 것으로 사료된다.

감사의 글: 본 연구는 보건복지부 보건의료연구개발사업의 지원에 의해 이루어진 것임(A120822).

참 고 문 헌

1. S. M. Kim, J. H. Lee, P. H. Choung, and S. K. Lee, *Tissue Eng. Regen. Med.*, **5**, 959 (2008).
2. C. Dahlin, A. Linde, J. Gottlow, and S. Nyman, *Plast. Reconstr. Surg.*, **81**, 672 (1988).
3. H. J. Lim, E. J. Oh, J. H. Choi, H. Y. Chung, and H. D. Ghim, *Polym. Korea*, **36**, 401 (2012).
4. S. M. Kim, J. H. Lee, J. A. Jo, S. C. Lee, and S. K. Lee, *J. Kor. Oral. Maxillofac. Surg.*, **31**, 440 (2005).
5. S. M. Kim, M. Y. Eo, J. M. Park, H. Myoung, J. H. Lee, Y. I. Park, D. J. Byun, and S. K. Lee, *Tissue Eng. Regen. Med.*, **7**, 191 (2010).
6. S. M. Kim, J. M. Park, T. Y. Kang, Y. S. Kim, and S. K. Kim, *Cellulose*, **20**, 655 (2013).
7. S. Ponader, E. Vairaktaris, P. Heintz, C. V. Wilmowsky, A. Rottmair, C. Korner, R. F. Singer, S. Holst, K. A. Schlegel, F. W. Neukam, and E. Nkenke, *J. Biomed. Mater. Res. A*, **84**, 1111 (2008).
8. S. M. Kim, M. Y. Eo, J. Y. Kang, H. Myoung, J. H. Lee, H. J. Cho, K. H. Yea, and B. C. Lee, *Tissue Eng. Regen. Med.*, **9**, 24 (2012).
9. M. E. Fray, A. Bartkowiak, P. Prowans, and J. Slonecki, *J. Mat. Sci.*, **11**, 757 (2000).
10. K. T. Rinne, T. Boettger, N. J. Loader, I. Robertson, V. R. Switsur, and J. S. Waterhouse, *Chem. Geol.*, **222**, 75 (2005).
11. J. Yuan, J. Zhang, X. Zang, J. Shen, and S. Lin, *Colloid. Surf., B*, **30**, 147 (2003).
12. D. T. Clark, *Pure Appl. Chem.*, **57**, 941 (1985).
13. L. S. Johansson, J. M. Campbell, K. Koljonen, and P. Strnius, *Appl. Surf. Sci.*, **144**, 92 (1999).
14. D. P. Delmer, *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.*, **50**, 245 (1999).
15. S. Kimura and T. Kondo, *J. Plant. Res.*, **115**, 297 (2002).
16. U. Bora, P. Sharma, K. Kanna, and P. Nahar, *J. Biotechnol.*, **126**, 220 (2006).
17. U. Henniges, S. Okubayashi, T. Rosenau, and A. Potthast, *Biomacromolecules*, **13**, 4171 (2012).
18. I. Edward, K. Aleksandra, S. Halina, and M. Wlodzimierz, *Rad. Phys. Chem.*, **63**, 253 (2002).
19. A. M. Mintier, and D. M. Foley, *J. Food Prot.*, **69**, 570 (2006).
20. D. Mark, S. Arthur, W. Wiliam, C. Kun, M. Mellony, S. Jessica, A. G. Richard, and R. C. Marshall, *Rad. Phys. Chem.*, **78**, 539 (2009).
21. A. A. Iberti, S. Bertini, G. Gastaldi, N. Lannaccone, D. Macciantelli, G. Tom, and E. Vismara, *Eur. Polym. J.*, **41**, 1787 (2005).
22. H. Baek, B. Shin, Y. Nho, Y. Lim, J. Park, J. Park, and K. M. Huh, *Polym. Korea*, **36**, 182 (2012).
23. J. Borsa, T. Toth, E. Takacs, and P. Hargittai, *Eur. Rad. Phys. Chem.*, **67**, 509 (2003).
24. D. Kang, I. Kuk, C. Jung, I. Hwang, J. Choi, Y. Nho, S. Mun, and Y. Lee, *Polym. Korea*, **35**, 157 (2011).
25. J. Bouchard, M. Methot, and B. Jordan, *Cellulose*, **13**, 601 (2006).
26. I. Levy and O. Shoseyov, *Biotechnol. Adv.*, **20**, 191 (2002).
27. M. Linder and T. T. Teeri, *J. Biotechnol.*, **57**, 15 (1997).
28. W. Lee, W. G. Jung, and Y. J. Sung, *J. Korea TAPPI*, **45**, 56 (2013).
29. H. Sun, X. Wang, and L. Zhang, *Polym. Korea*, **38**, 464 (2014).