

전기분사법에 의한 다공성 실크 피브로인 미세입자의 제조

김무곤 · 이기훈^{***†}

서울대학교 농업생명과학대학 바이오시스템 · 소재학부,
*서울대학교 식품바이오융합연구소, **서울대학교 농업생명과학대학 연구원
(2013년 9월 13일 접수, 2013년 9월 24일 수정, 2013년 9월 25일 채택)

Fabrication of Porous Silk Fibroin Microparticles by Electrohydrodynamic Spraying

Moo Kon Kim and Ki Hoon Lee^{***†}

Department of Biosystems & Biomaterials Science and Engineering, Seoul National University, Seoul 151-921, Korea

*Center for Food and Bioconvergence, Seoul National University, Seoul 151-921, Korea

**Research Institute for Agriculture and Life Sciences, Seoul National University, Seoul 151-921, Korea

(Received September 13, 2013; Revised September 24, 2013; Accepted September 25, 2013)

초록: 실크 피브로인은 뛰어난 생체적합성 및 생분해성으로 인해 의료용 천연고분자소재로 각광받고 있으며 다양한 형태로 제조되어 이용되고 있다. 전기분사법은 고분자 용액에 고전압을 적용하여 미세입자를 제조하는 방법으로 진행과정이 간단하고 첨가제를 필요로 하지 않는다는 장점을 지닌다. 본 연구에서는 실크 피브로인 다공성 미세입자를 제조하기 위하여 폴리(에틸렌 글리콜)(PEG)을 첨가한 후 전기분사를 실시하였다. PEG를 첨가함으로써 분사원액의 전도도는 감소하였고 점도는 증가하였다. 제조된 미세입자의 크기는 PEG 첨가에 따라 감소하였는데 이는 분사원액의 전도도 및 점도보다는 피브로인과 PEG간의 상분리에 의한 효과인 것으로 보인다. 제조된 실크 피브로인 미세입자를 물에 침지한 결과 PEG가 제거되었으며 최종적으로 실크 피브로인 다공성 입자를 제조할 수 있었다. 제조된 다공성 실크 피브로인 미세입자는 약물전달체 및 조직공학용 세포전달체로 이용가능성이 높을 것으로 기대된다.

Abstract: Nowadays, silk fibroin receives a lot of attention as novel natural biomaterials due to its excellent biocompatibility and biodegradability. Electrohydrodynamic spraying (EHDS) is one of the method for the preparation of micro or nanoparticles by applying high voltage to the polymer solution. In this research, we fabricated silk fibroin porous microparticles by electrohydrodynamic spraying. Poly(ethylene glycol) (PEG) was added to the fibroin solution to give pores to silk fibroin microparticles. By the addition of PEG, the microparticle size was decreased despite of the decrease in conductivity and the increase of viscosity of the spraying solution. It seems that the immiscibility of silk fibroin and PEG affected much more to the microparticle size than the conductivity and viscosity. Immersing the as-sprayed microparticles into the water removed the phase-separated PEG, and finally, porous silk fibroin microparticles were prepared. The porous silk fibroin microparticles are expected to be applied as drug carriers in drug delivery or cell carriers in tissue engineering.

Keywords: silk fibroin, PEG, electrohydrodynamic spraying, porous microparticle.

서 론

자연계에 존재하는 수많은 다당류 또는 단백질과 같은 천연고분자들은 합성고분자에 비해 고가이고 가공성이 떨어지는 단점을 지니지만 생체적합성과 생분해성이 합성고분자보다 우수하여 의료용 소재로 이용하기 위한 연구들이 지속되고 있다.

특히 누에고치로부터 얻어지는 천연단백질인 실크 단백질

은 대표적인 천연고분자로 중심부에 두 가닥으로 존재하는 피브로인과 그 주변을 감싸고 있는 세리신으로 구성되어 있다. 이 중 친수성이며 점착성을 갖는 단백질인 세리신은 정련과정을 거쳐 제거되며, 의료용 소재로는 일반적으로 피브로인만 이용한다. 실크 피브로인(SF)은 강도, 광택, 촉감이 우수하여 예전부터 최고의 의류용 소재로 이용되어 왔다. 그러나 이에 못지않게 생체적합성과 생분해성도 매우 뛰어나다는 장점을 지닌다.^{1,2} 이 때문에 고대부터 수술용 봉합사로 이용되어 왔으며, 최근에는 실크 피브로인을 용해하여 섬유뿐만 아니라 필름, 스펀지, 나노섬유, 미세입자 등의 다양한 형태로 제조할 수 있는 가공기술들이 개발되면서 의료용

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

천연고분자소재로서 그 가능성을 인정받고 있다.³⁻⁷

미세입자는 그 크기에 따라 경구투여, 주사 등의 적용경로 및 부위가 매우 광범위하다는 장점을 지닌다. 약물전달시스템에서는 약물, 펩티드, 유전자, 성장인자 등 다양한 물질들을 운반하는 담체로 이용될 수 있으며, 조직공학에서는 미세입자에 치료용 세포를 부착하여 결손된 부위에 주입할 수 있는 세포 운반체로 이용될 수 있다.

일반적으로 실크 피브로인 미세입자를 제조하는 방법으로는 유화법, 분무건조법, 자가조립 등이 많이 쓰인다.⁸⁻¹⁰ 이러한 방법들은 수십 마이크로미터 이하 크기의 미세입자를 제조하기에 유리하지만 분산제나 유화제, 가교제, 유기용매 등 독성 물질들을 첨가하거나 고온 또는 저압 등 극한 조건을 요구하는 단점을 지닌다. 또한 이러한 조건들은 담지한 약물에 변성을 유도하는 등 추가적인 문제점을 일으킬 수 있는 가능성을 가지기도 한다. 한편, 전기분사법은 나노섬유를 제조하는 전기방사법과 그 과정이 매우 유사한 방법으로 전기방사법에 비해 높은 전압을 공급하여 분사구 끝에 맺힌 고분자용액에 불안정성을 유도하여 고분자용액이 나노섬유가 아닌 방울형태로 튀어 날라가도록 하는 방법이다.^{11,12} 이 방법은 장치가 간단하고 가교제나 유화제 등 다른 첨가제가 필요하지 않으며 고분자 용액의 농도나 적용전압, 분사속도를 조절하여 미세입자의 형태 및 크기 제어가 가능하다는 장점을 지닌다.

본 연구에서는 전기분사법을 이용하여 실크 피브로인 미세입자를 제조하였다. 특히 약물전달체 또는 세포전달체로 응용할 경우 더 넓은 표면적을 제공하여 효율성을 극대화하기 위하여 다공성 실크 피브로인 미세입자를 제조하고자 하였다. 이전의 연구결과에서 폴리(에틸렌 글리콜)(PEG)를 이용하여 실크 피브로인에 공극을 도입하는 방법으로 다공성 필름을 제조하거나 나노 섬유 지지체의 기공크기 조절에서 쓰인 사례가 있다.^{5,13,14} 본 연구에서도 PEG를 첨가하여 미세입자를 제조한 후 PEG를 물에 녹여내어 제거하는 침출법을 이용하여 다공성 실크 피브로인 미세입자를 제조하였다.

실 험

재료 및 시약. 실크 피브로인 추출에 쓰인 누에고치는 흥진(한국)에서 구입하였다. 정련과정에서 이용된 올레산 나트륨, 탄산나트륨과 피브로인 재용해에 쓰인 염화칼슘, 에탄올 및 미세입자 제조과정에 쓰인 염화리튬(LiCl), 디메틸 술폭사이드(DMSO), 폴리(에틸렌 글리콜)(PEG 6000)은 시그마 알드리치(미국)에서 구입하였다. 응고욕으로 쓰인 메탄올은 삼전(한국)에서 구입하였다.

실크 피브로인 추출. 누에고치 40 g을 0.2%(w/v) 탄산나트륨과 0.3%(w/v) 올레산 나트륨을 용해한 1 L 용액으로 100 °C에서 30분씩 두 번 끓였다. 이 후 증류수로 수세하여 세리신을 제거한 피브로인 섬유를 얻었다. 실크 피브로인 재용해는

Table 1. Electrohydrodynamic Jetting Solutions

Sample	SF ^a concn.	PEG ^b concn.	Total concn.
SF7	7	0	7
SF8	8	0	8
SF9	9	0	9
SF10	10	0	10
SFG73	7	3	10
SFG82	8	2	10
SFG91	9	1	10

^aSF = Silk fibroin. ^bPEG = Poly(ethylene glycol).

정련한 피브로인 섬유를 염화칼슘, 에탄올, 증류수를 1:2:8(몰비)로 용해한 용액에 옥비 1:25로 80 °C에서 용해하였다. 용해시간에 따라 분자량이 급격하게 감소하므로 분자량 감소를 최소화하기 위하여 5분간 용해하였다. 이 후 3일간 증류수에서 투석막(Spectra/Por®, 분획분자량 6000-8000, 미국)으로 투석하여 염을 제거한 후 동결건조하여 파우더 형태의 실크 피브로인을 제조하였다.

실크 피브로인 분사용액 제조. 실크 피브로인 파우더와 PEG를 비율별로 섞어 최종 농도 10%(w/v)로 1 M LiCl을 포함하는 DMSO 용액에 40 °C에서 60분 용해하였다. 구체적인 조건은 Table 1에 나타내었다.

다공성 실크 피브로인 미세입자 제조. 미세입자를 제조하기 전에 PEG를 실크 피브로인 용액에 첨가하였을 때 미치는 영향을 분석하기 위해 분사원액의 전도도와 전단점도 그리고 용액 내 고분자의 크기를 측정하였다.

분사원액의 전도도는 실크 피브로인 용액에 전도계(Orion 115, Thermo Electron Co., 미국)를 넣고 1분 후에 측정하였다. 분사원액의 전단점도(shear viscosity)는 유변물성측정기(advanced rheometric expansion system, Rheometric Scientific, 영국)를 이용하여 cone and plate geometry에서 1.0-700 s⁻¹로 측정하였다. 측정에는 직경 50 mm, 0.04 rad cone을 사용하였다. 용액 내 나노입자의 크기는 동적광산란(dynamic light scattering) 광도계(ELSZ-1000, Otsuka Electronics, 일본)를 이용하여 측정하였다.

실크 피브로인 미세입자는 제조된 분사용액을 22G 바늘이 장착된 주사기에 넣은 후 주사기펌프(KD scientific, KDS100, 한국)로 분사원액을 공급하였다. 분사속도는 0.4 mL/hr이었으며 적용전압은 22 kV(high voltage DC power supply unit, 청파 EMT, 한국)로 고정한 후 제조하였다. 분사된 용액은 곧바로 메탄올 응고액에 받았으며 분사가 종료된 후 추가로 1시간 동안 응고시켰다(Figure 1). 미세입자에 존재하는 PEG는 증류수에서 12시간 침지하여 제거하였다. 제조된 미세입자의 형태 및 표면은 전계방사형 주사현미경(FE-SEM)(JSM-7600F, JEOL, 일본)을 이용하여 관찰하였다. 미세입자의 크기는 FE-

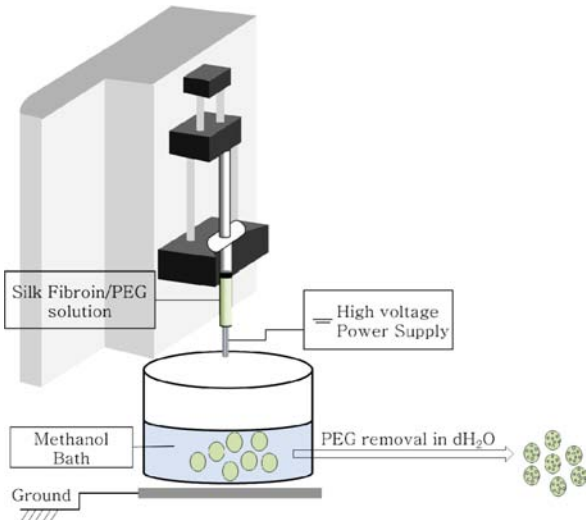


Figure 1. Scheme of fabrication of porous silk fibroin microparticles by electrohydrodynamic spraying.

SEM 사진으로 이미지 분석 소프트웨어(Leopard2009, 주토스, 한국)를 이용하여 측정하였다.

결과 및 토론

실크 피브로인 및 실크 피브로인/PEG 용액의 특성분석. 일반적으로 실크 피브로인 전기방사에는 포름산이나 헥사플루오로이소프로판올(HFIP)을 용매로 사용하지만 본 연구에서는 LiCl/DMSO를 용매로 사용하였다. 이 용매는 이전에 세리신의 용해에 사용한 적이 있다.¹⁵ LiCl/DMSO는 포름산과 달리 실크 피브로인의 분자량을 저하시키지 않으며, HFIP에 비해서는 저가의 용매라는 점에서 장점을 갖는다.

PEG가 실크 피브로인 분사용액에 미치는 영향을 확인하기 위하여 전도도와 전단점도를 측정하였다. 전기 전도도는 실크 피브로인의 농도가 증가할수록 감소하였고 PEG가 첨가되면 더 감소하였다(Figure 2). 실크 피브로인은 글라이신이나 알라닌과 같은 소수성 아미노산이 70% 이상을 구성하는 고분자이나 이온성 아미노산도 존재한다.¹² 따라서 본 연구에서 쓰인 LiCl이 피브로인의 이온성 아미노산 결사슬과 결합하며, 이에 따라 실제 유리상태의 이온 농도를 감소시켜 전기전도도를 감소시키는 것으로 생각된다. 그리고 PEG는 본 연구에서 쓰인 용매인 DMSO 내에 존재하는 LiCl과 같은 전해질과 함께 있거나 또는 실크 피브로인과 같은 거대분자와 함께 존재하게 되면 소구체를 형성한다고 알려져 있으며,^{16,17} 결과적으로 PEG들이 응집되어 전도도를 감소시키는 작용을 한 것으로 보인다. 이러한 실크 피브로인과 PEG의 첨가에 따른 전도도의 변화는 Jin 등의 연구결과에서도 동일한 경향을 보인다.¹⁸

실크 피브로인 용액과 PEG의 비율 및 농도에 따른 전단점도도 확인하였다(Figure 3). 우선 실크 피브로인을 단독으로

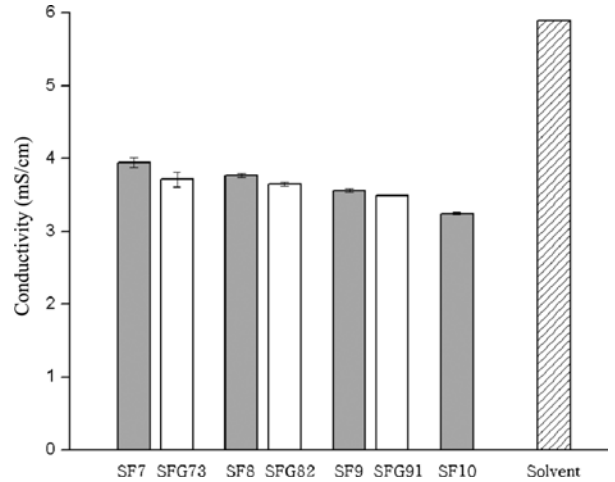


Figure 2. Conductivity of SF and SFG solutions. Solvent is 1 M LiCl/DMSO.

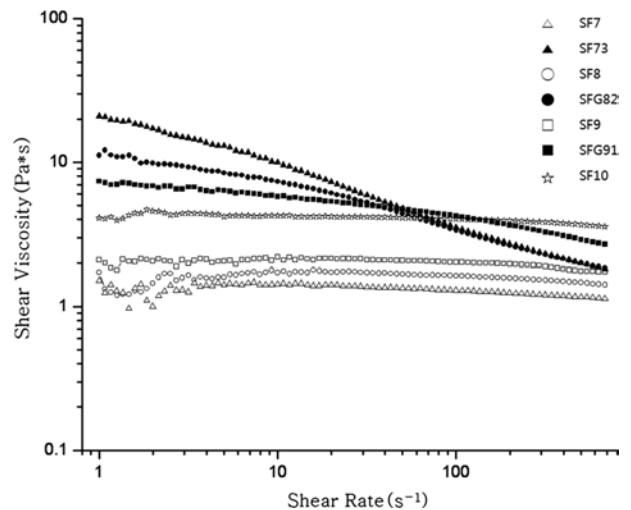


Figure 3. Shear viscosity of SF and SFG solutions.

녹인 분사용액의 경우 농도가 증가할수록 점도가 증가하였으며 전단속도가 증가함에 따라 뉴턴 용액 거동을 보였다. 이러한 거동은 실크 피브로인 사슬들이 용매 내에서 잘 용해된 상태로 유지되기 때문인 것으로 보인다. 이전의 연구결과에서 용매의 종류에 따른 실크 피브로인의 점단거동을 살펴본 결과, 피브로인의 용해도가 우수한 용매의 경우 전단 유동화 거동 없이 뉴턴 용액 거동을 보인다고 설명하였다.¹⁹ 따라서 실크 피브로인이 1 M LiCl/DMSO에서 매우 안정하게 용해됨을 확인할 수 있었다.

그러나 PEG를 첨가했을 경우에는 전단점도의 거동에서 큰 차이점을 보인다. PEG의 비율이 증가할수록 비뉴턴 거동 중 전단 유동화 거동(shear thinning)이 뚜렷해진다. 이러한 거동은 전도도 측정결과에서 언급되었듯이 PEG가 1 M LiCl/DMSO 용매 내에서 응집하기 때문인 것으로 생각된다.^{16,17}

실제로 1 M LiCl/DMSO 용매하에서 실크 피브로인과 PEG 혼합용액 내에서 입자의 크기를 동적광산란 광도계로 측정된 결과, 실크 피브로인이 단독으로 존재할 때에는 약 10 nm 크기의 분자들로 존재하지만, PEG가 첨가될수록 실크 피브로인 분자들과 PEG들이 얽히면서 응집되어 크기가 커지는 것을 확인할 수 있었다(Figure 4). 따라서 실크 피브로인과 PEG의 혼합용액에서 전단 유동화 거동이 발생하는 것은 응집된 실크 피브로인과 PEG가 전단속도가 증가함에 따라 풀리면서 나타나는 현상으로 해석할 수 있다.

한편, 실험에서 적용한 분사속도에서의 전단점도는 PEG 비율이 증가할수록 크게 증가하였다. 우선 분사속도를 전단속도로 바꾸는 식은 다음과 같다.

$$\gamma = 32Q/(\pi D^3)$$

여기에서, γ 는 전단속도, Q 는 분사속도, D 는 분사구의 내경이다. 22 게이지 분사구(= 0.413 mm)에서 0.4 mL/hr로 분사

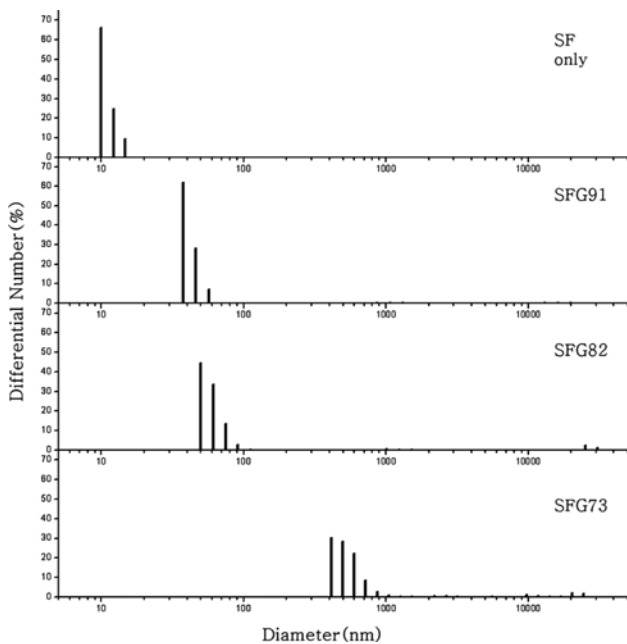


Figure 4. Particle size of molecules in silk fibroin/PEG blended solution.

Table 2. Shear Viscosity of SF and SFG at 16 s⁻¹

Sample	Shear viscosity (Pa*s)
SF7	0.14
SF8	0.18
SF9	0.21
SF10	0.42
SFG91	0.55
SFG82	0.66
SFG73	0.81

하였을 때 가해지는 실제 전단속도는 약 16 s⁻¹가 되며 이 때 전단점도는 Table 2와 같다. Table 2에서 보이듯이 PEG가 첨가되었을 경우 전단점도가 2배 이상 증가하는 것을 확인할 수 있다. 이러한 경향은 실크 피브로인 미세입자 형성에도 영향을 미치는 것으로 보인다.

실크 피브로인 형태 및 표면 분석. 실크 피브로인 단독으로 미세입자를 제조한 경우 농도가 증가할수록 불규칙한 형태에서 구형의 미세입자로 형성되었다(Figure 5). 특히 SF7, SF8 그리고 SF9에서는 크기 측정이 불가능할 정도로 불규칙했다. 이는 실크 피브로인의 농도가 낮을 경우 용액 내에서 존재하는 실크 피브로인 분자들간의 거리가 멀어 고분자간 얽힘이 충분히 발생하지 못하기 때문인 것으로 판단된다. 전기분사에 있어 고분자의 얽힘은 매우 중요하며, 분자간의 얽힘이 충분하지 않은 경우 안정한 형태의 미세입자 형성이 어렵다는 것이 보고된 바 있다.¹¹ 그러나 PEG가 첨가될 경우, 실크 피브로인의 농도가 낮더라도 구형의 미세입자가 형성되는 것을 확인하였다. 동적광산란 측정결과에서 보면 PEG의 첨가에 따라 용액내 입자의 크기가 증가하는 것을 볼 수 있었다. 용액내의 입자크기가 증가하면 고분자가 겹치게 되는

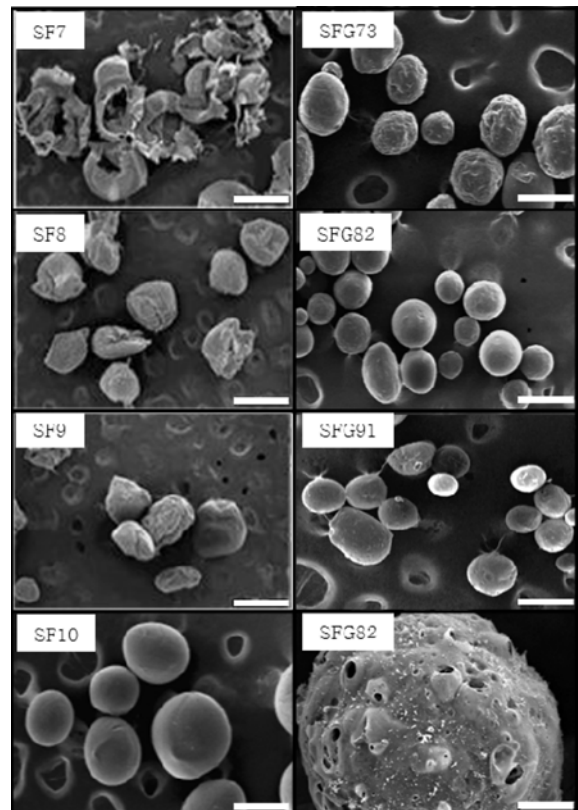


Figure 5. FE-SEM images of SF and SFG microparticles. All SFG microparticles were before removing PEG but the only right lower end was after removing PEG. All scale bars were 500 μm but the right lower end was 50 μm.

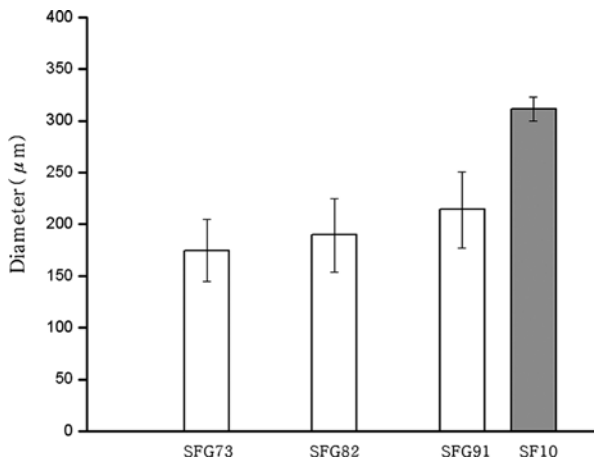


Figure 6. Size distributions of SF and SFG microparticles.

농도가 감소하게 되고, 따라서 보다 낮은 농도에서도 안정적인 형태의 미세입자 제조가 가능하다.¹¹ 또한 PEG의 첨가에 의하여 전단점도가 증가하였는데, 이러한 점도의 증가도 안정적인 형태의 미세입자 형성에 영향을 주었을 것으로 생각된다. 따라서 PEG의 첨가로 인하여 안정적인 형태의 미세입자가 형성된 것은 실크 피브로인과 PEG의 응집에 의한 입자크기의 증가와 전단점도의 증가에 기인한다고 할 수 있다.

미세입자의 크기는 실크 피브로인 단독으로 제조하였을 때 보다 PEG가 첨가될수록 크기가 감소하였다(Figure 6). 이러한 경향은 분사용액 내에서 PEG가 상분리되어 존재하면서 전압이 적용되었을 때 분사용액의 불안정성을 유도하였기 때문으로 보인다. 이전의 보고에서 키토산과 PEG를 블렌드하여 전기방사한 경우 두 고분자 사이의 상용성이 불량하여 섬유유의 직경이 감소한다고 보고된 바 있다.²⁰ 피브로인과 PEG 또는 PEO는 상용성이 떨어져 필름으로 제조할 경우 거시적 상분리가 발생한다.^{13,14} 따라서 본 연구에서 PEG의 첨가에 의해 미세입자의 크기가 감소하는 것은 이러한 이유에 기인한다고 판단된다. 일반적으로 미세입자의 크기는 전도도가 증가하면 감소한다. 앞서 PEG의 첨가로 전도도가 감소한다고 하였으나, 실제 전도도의 변화는 그 차이가 크지 않아 실제 미세입자의 크기변화에는 영향을 주지 않은 것으로 보인다.

제조된 미세입자의 표면을 살펴본 결과 PEG를 첨가하여 제조한 실크 피브로인 미세입자의 경우 표면에 공극들이 성공적으로 생성된 것을 확인하였다(Figure 5). 이는 실크 피브로인 용액 내에서 PEG가 상분리된 후 물에 침지함으로써 성공적으로 제거된 것으로 보인다.

결 론

본 연구에서는 실크 피브로인 미세입자에 다공성을 부여하기 위하여 PEG를 첨가하여 미세입자를 제조한 후 상분리된 PEG를 제거하는 침출법을 이용하였다. 실크 피브로인 분사

용액에 PEG가 미치는 영향들을 분석한 결과 제조된 실크 피브로인 미세입자 표면에 공극을 부여할 뿐만 아니라 실크 피브로인이 낮은 농도에서도 미세입자를 형성할 수 있도록 분자 간의 응집에 관여하는 것으로 확인되었다. 실험에 의해 제조된 다공성 실크 피브로인 미세입자는 넓은 표면적을 가짐으로써 더 효과적인 약물전달체 및 세포전달체로 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 글: 이 논문은 2010년도 교육부 한국연구재단 기초연구사업(No. 2010-0025378) 및 2012년도 해양수산부 해양바이오산업신소재 연구단의 지원을 받아 수행된 연구임.

참 고 문 헌

1. Y. Cao and B. Wang, *Int. J. Mol. Sci.*, **10**, 1514 (2009).
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. J. G. Hardy, L. M. Römer, and T. R. Scheibel, *Polymer*, **49**, 4309 (2008).
4. H. L. Kim, H. Yoo, H. J. Park, Y. G. Kim, D. Lee, Y. S. Kang, and G. Khang, *Polymer(Korea)*, **35**, 7 (2011).
5. S. Y. Cho, H. H. Park, and H.-J. Jin, *Polymer(Korea)*, **36**, 651 (2012).
6. B. M. Min, G. Lee, S. H. Kim, Y. S. Nam, T. S. Lee, and W. H. Park, *Biomaterials*, **25**, 1289 (2004).
7. E. Wenk, A. J. Wandrey, H. P. Merkle, and L. Meinel, *J. Control. Release*, **132**, 26 (2008).
8. Y. Srisuwan, P. Srihanam, and Y. Baimark, *J. Macromol. Sci. Part A-Pure Appl. Chem.*, **46**, 521 (2009).
9. J.-H. Yeo, K.-G. Lee, Y.-W. Lee, and S. Y. Kim, *Eur. Polym. J.*, **39**, 1195 (2003).
10. Z. Cao, X. Chen, J. Yao, L. Huang, and Z. Shao, *Soft Matter*, **3**, 910 (2007).
11. N. Bock, T. R. Dargaville, and M. A. Woodruff, *Prog. Polym. Sci.*, **37**, 1510 (2012).
12. S. Chakraborty, I.-C. Liao, A. Adler, and K. W. Leong, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **61**, 1043 (2009).
13. H.-J. Jin, J. Park, R. Valluzzi, P. Cebe, and D. L. Kaplan, *Biomacromolecules*, **5**, 711 (2004).
14. B. D. Lawrence, J. K. Marchant, M. A. Pindrus, F. G. Omenetto, and D. L. Kaplan, *Biomaterials*, **30**, 1299 (2009).
15. H. Oh, J. Y. Lee, A. Kim, C. S. Ki, J. W. Kim, Y. H. Park, and K. H. Lee, *Fiber. Polym.*, **8**, 470 (2007).
16. C. Cuniberti and R. Ferrando, *Polymer*, **13**, 379 (1972).
17. B. Hammouda, D. L. Ho, and S. Kline, *Macromolecules*, **37**, 6932 (2004).
18. H.-J. Jin, S. V. Fridrikh, G. C. Rutledge, and D. L. Kaplan, *Biomacromolecules*, **3**, 1233 (2002).
19. X. Chen, D. P. Knight, Z. Shao, and F. Vollrath, *Polymer*, **42**, 9969 (2001).
20. B. Duan, C. Dong, X. Yuan, and K. Yao, *J. Biomater. Sci.-Polym. Ed.*, **15**, 797 (2004).