

잣나무 부산물이 첨가된 창상피복재용 Poly(vinyl alcohol)/Pectin 항균 하이드로젤의 평가

김 진 · 이기영*[†]

전남대학교 신화학소재공학과, *전남대학교 응용화학공학부 & 식품공학 연구소
(2014년 10월 29일 접수, 2014년 12월 18일 수정, 2015년 1월 12일 채택)

Evaluation of *Korean Pine* Byproduct Loaded Poly(vinyl alcohol)/Pectin Hydrogel for Wound Healing

Jin Kim and Ki-Young Lee*[†]

Department of Advanced Chemicals and Engineering, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

*Faculty of Applied Chemical Engineering and Functional Food Research Center,
Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

(Received October 29, 2014; Revised December 18, 2014; Accepted January 12, 2015)

초록: 이 연구에서는 잣나무 부산물이 첨가된 창상피복재용 poly(vinyl alcohol)-pectin(PVA:PET) 조성의 하이드로젤을 제조하였다. 잣나무 부산물인 phytoncide(Phy)는 식물에서 유래되고 항균성을 지닌 휘발성 유기 화합물이다. 또한 Phy는 다양한 생리학적 특성을 가지고 있으며 항균, 살충 및 항염증 활성을 가지고 있다. Phy를 젤에 혼합시키기 위해 chitosan/maltodextrin(CH/MD) 조성의 벽물질로 Phy가 함유된 나노미립구를 제조하였다. Phy가 함유된 PVA:PET 하이드로젤을 개발하여 창상피복재로 응용 가능성을 평가하였다. 세포독성 결과 Phy-PVA:PET 하이드로젤은 무독성임을 알 수 있었고 항균실험결과 Phy가 함유된 하이드로젤의 항균활성은 Phy가 함유되지 않은 젤과 비교했을 때 뚜렷한 저해능을 관찰할 수 있었다. 더군다나, *in vivo* 동물 실험결과 Phy가 함유된 PVA:PET 하이드로젤 처치 그룹에서 빠른 재상피화를 관찰할 수 있었다. 이 결과 잣나무 부산물인 Phy는 상처치유와 항균활성에 효과가 있음을 알 수 있었다. 이 식물의 상처치료를 위한 의학 분야에 사용 가능성을 확인할 수 있었다.

Abstract: In this study, we prepared the poly(vinyl alcohol)-pectin(PVA:PET) hydrogel containing the byproducts of *Korean Pine* nanoparticles for their use as a wound healing membrane. Phytoncide (Phy) which comes from *Korean Pine* byproducts is an antimicrobial volatile organic compound derived from plants. Phy has multiple biological properties, such as antifungal, insecticidal, and anti-inflammatory properties. The Phy nanoparticles were prepared by incorporating Phy into the chitosan/maltodextrin (CH/MD) wall materials. PVA:PET hydrogel including Phy nanoparticle were developed, furthermore its applicability in the healing of wound was evaluated. *In vitro* cytotoxicity tests showed that the developed Phy-PVA:PET hydrogel was non-cytotoxic. Antibacterial activity tests revealed that the antibacterial activity of Phy in the hydrogel did show a significant difference compared with that of the control hydrogel. Furthermore, *in vivo* wound healing tests showed that the rate of wound healing was greatly elevated with the rapid re-epithelialization in the Phy-PVA:PET hydrogel group. The results obtained showed that Phy in *Korean Pine* byproduct has good wound healing and antibacterial properties. These findings validate the use of this plant in the medical field for the treatment of wounds.

Keywords: *Korean pine* byproduct, antibacterial, poly(vinyl alcohol), pectin, hydrogel, wound healing.

서 론

최근에 식물성 정유로 알려진 phytoncide(Phy)의 생리활성이 연구되면서 잣나무의 부산물에 함유된 Phy의 항균, 방충,

소취 등 다양한 기능이 연구되었다.¹ 또한 휘발성 성분으로 수십 종에서 200여 종에 달하는 phenolics, terpenoid, alkaloid, acetogenin, steroid 등의 화합물로 구성되어 있다.^{2,3} 하지만, Phy가 다양한 생리활성을 갖고 있음에도 불구하고 많이 활용되지 못한 가장 큰 문제점은 오일성분으로 휘발성이 강하며 빠른 발향에 있다. 이러한 점을 극복하여 식품, 의약품, 화장품 등과 같은 산업에 응용하기 위해 poly(caprolactone)와 PVA

[†]To whom correspondence should be addressed.

E-mail: kilee@chonnam.ac.kr

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

등의 고분자를 활용하여 Phy를 캡슐화하는 연구들이 많이 진행되고 있다.⁴

Phy의 뛰어난 항균성능은 의식주에 다양하게 활용되고 있다. 아토피 치료 패치, 구강용 세제, 건축자재, 식품포장재 등에 활용되어 천연항균제로 알려져 있으며 기능성이 추가된 제품으로 포장되어 비싼 값에 판매가 되고 있다. 이러한 Phy는 측백나무, 소나무, 잣나무 등 침엽수에서 많이 발산되며 Phy 정유를 얻기 위한 나무와 가지의 벌목으로 산림훼손의 문제를 가지고 있다. 그러나 잣나무에서 잣을 얻고 버려지는 부산물인 잣나무 솔방울과 잣껍질에서 Phy의 주요 성분인 α -pinen, limonene, sabinene 등의 성분이 확인되면서 다양한 활용 가능성을 확인하였다.

기존의 의약품용 혹은 미용전용 하이드로젤은 합성 보존료인 sodium azide, methyl paraben 등의 첨가로 피부의 문제점을 야기시켜 염증, 민감성 피부, 짓무름 등을 유발시키는 보고가 있다.^{5,6} 이런 점을 보완하여 천연 보존료 연구가 활발히 이루어지고 있으며 천연 보존료로 알려진 황금 추출물, 목단피 추출물, 자몽 종자씨 추출물 등이 사용되고 있으나 값이 비싸며 응용분야에 한계를 가지고 있다.⁷⁻¹⁰

천연항균제 역할이 가능한 잣나무의 Phy 성분을 캡슐화하여 생체내 저독성이며 저자극인 특성을 이용하여 다양하게 활용할 수 있는 하이드로젤에 첨가하여 특히, 상처가 난 피부에 적용시켰을 때 2차적인 감염방어제로 활용이 가능하다.

이에 본 연구에서는 휘발성이 강한 Phy를 캡슐 형태로 제형화하여 분산성 및 응용성을 향상시켜 하이드로젤에 응용하였다. 드래싱 재료에 활용하기 위해 천연고분자인 PET와 합성 고분자 PVA을 하이브리드화시켜 하이드로젤을 제조하였다.

Phy 함유 하이드로젤은 의생체 분야 중 특히 창상분야에서 피부 결손 부위에 물리적인 막을 형성시키고 동시에 피부를 외부의 감염에서 보호하여 상처받은 피부를 복구시키는데 도움을 주는 효과를 기대할 수 있다. 또한 하이드로젤에 포함된 Phy의 항균성을 관찰하고 창상피복재 내 치료용 조성물로서의 이용 가능성을 살펴 보았다.

실 험

재료. Poly(vinyl alcohol) (PVA, M_w 70000~100000), pectin (PET, galacturonic acid 74%), chitosan(CH, M_w 190000~310000), maltodextrin(MD)은 Sigma Aldrich Co., Ltd.(St. Louis, USA)에서 구입하여 사용하였다. 천연항균제로 사용한 잣나무 부산물 정유 phytoncide(Phy, α , β -pinen 41%, L, D-limonene 40%)는 (주)피러스에서 제공받아 사용하였다.

잣나무 부산물의 성분 분석. 공급받은 Phy의 성분 분석을 위하여 gas chromatography/mass spectroscopy(GC-2010, Shimadzu Co., Kyoto, Japan)기기를 통해 관찰하였다. Phy을

hexane에 충분히 교반한 후, 원심분리기를 이용하여 부유물을 제거하고 마이크로 필터(0.45 μ m)로 여과하여 준비하였다. 성분 분석은 다음과 같은 조건으로 진행하였다. 컬럼은 BD-5(60 mm×0.25 mm×0.25 mm), carrier gas로는 He(1 mL/min), injection 온도는 250 °C, oven 온도는 50~300 °C/3 °C 승온, injection volume은 1 μ L, injection mode는 split ratio 10:1 조건에서 성분분석을 하였으며, MSD(mass selective detector)에서 mass range 28~550, acquisition mode는 scan mode 조건으로 성분들을 정량하였다.

Phy 미세입자 제조 및 구조분석. Wanwimol 등 방법을 변형하여 Phy 캡슐화를 진행하였다.¹¹ CH 1 g을 초산 0.1% 농도에 완전히 용해시키고 난 후, MD 10 g을 첨가하여 용액을 제조한다. CH/MD가 혼합된 용액에 Phy을 20 g을 첨가하고 Tween 80을 1.5 g을 첨가하여 호모게나이저(Ika, T25 basic homogenizer)로 7500 rpm에서 20분 동안 에멀전화시켰다. 에멀전화된 용액을 0.1 M NaOH 용액(1 mL/100 mL)에 분산시켜 CH를 고체화시켰다. 고체화된 입자는 원심분리, 필터링, 증류수로 세척한 후 24~48시간 동안 냉동 건조하여 분말화하여 실험에 사용하였다. 하이드로젤 첨가 시 Phy 캡슐을 각각 1% 농도로 첨가하여 실험을 진행하였다. 상기의 방법으로 제조된 Phy 캡슐의 형태 및 입자크기를 주사전자현미경(SEM, S-4100, Hitachi, Japan)과 입자분포도(ELS-8000, Osaka Electronics Co., Osaka, Japan)를 통하여 관찰하였다. 또한 ¹H NMR spectroscopy에 의하여 구조 특성을 관찰하였다. 또한 잣나무 성분 분석시 사용된 GC/MS기기를 통해 일 정량의 캡슐을 hexane에 첨가하고 probe tip sonicators를 이용하여 캡슐 내에 Phy를 방출시켜 함량을 산출하였다.

PVA/PET 하이드로젤의 제조. PVA:PET 하이드로젤을 얻기 위해 냉동과 해동(freezing-thawing)을 3번 반복하여 제조하였다. PVA와 PET을 5:5 비율로 100 mL 증류수에 넣고 호모게나이저(12500 rpm)로 10분간 혼합시킨 후, 오토클레이브(121 °C, 20분)를 이용하여 용해시켰다. 용해된 PVA:PET 조성에서 기포를 제거하기 위해 메스실린더에 넣어 기포를 제거하였다. 기포가 빠진 PVA:PET 용액에 Phy 캡슐을 첨가하지 않은 대조군과 Phy 캡슐을 첨가한 실험군으로 각각의 petri dish에 15 g씩 넣고 -80 °C에서 4시간 방치한 후, 상온에서 8시간 동안 해동시키는 과정을 총 3회 진행하여 하이드로젤을 형성시켰다.

물성분석. 제조된 하이드로젤을 물에 48시간 침지한 후에 꺼내어 젤 표면에 물을 닦은 후 진공 오븐에 넣어 60 °C에서 48시간 건조시킨 후 무게를 잰다. 무게의 변화가 없을 때까지 건조시킨 젤의 무게가 건조된 젤의 무게(W_d)이다. 처음 사용한 고분자 무게(W_i)와 건조된 젤의 무게(W_d)로부터 젤화율을 계산하였다.

$$\text{젤화율(\%)} = \frac{W_d}{W_i} \times 100 \quad (1)$$

팽윤도는 함수율로 나타낼 수 있다. 제조된 하이드로젤을 물에 48시간 침지한 후 꺼내어 젤 표면에 물을 닦은 후 무게를 잰다. 무게의 변화가 없을 때까지 팽윤시킨 젤의 무게가 팽윤된 젤의 무게(W_s)이다. 팽윤된 젤의 무게(W_s)와 건조된 젤의 무게(W_d)로부터 팽윤도를 계산하였다.

$$\text{팽윤도}(\%) = \frac{W_s - W_d}{W_d} \times 100 \quad (2)$$

제조된 하이드로젤의 젤강도를 측정하여 기계적 물성을 예측하였다. Phy 캡슐의 첨가에 따른 하이드로젤의 물성의 변화를 관찰하였다. 젤의 압축강도는 만능물성시험기(Compac-100, Sun Scientific Co., Ltd, Tokyo, Japan)를 이용하여 상온에서 평가하였다. 하이드로젤의 시편 두께는 3 ± 0.5 mm이고 지름은 10 mm로 준비하였고 압축강도 측정 시 크로스 헤드(cross head) 속도는 120 mm/min, 시편이 50% 이상 변형이 이루어질 때의 값을 측정하였다.

항균성 평가. Phy 캡슐이 함유된 PVA:PET 하이드로젤의 항균성을 측정하기 위하여 UV light하에서 5분 건조시킨 하이드로젤을 10 mm 두께로 고정하여 항균시험에 이용하였다. 시험균주는 *staphylococcus aureus*와 *staphylococcus epidermidis*를 사용하였다. 먼저 균주를 nutrient broth(Difco Co., USA)에 접종하여 37 °C에서 24시간 동안 배양한 후, 배양된 균을 1 mL 취하여 액체 배지 99 mL에 혼합한 후, 멸균된 하이드로젤을 10 g씩 첨가시킨 후 shaking incubator에서 24시간 동안 배양하였다. 대조군에는 순수 균주만 배양한 그룹과 실험군으로 Phy가 함유되지 않은 벽물질로만 구성된 하이드로젤군과 Phy 나노미립기가 혼합된 하이드로젤, 그리고 미립기가 첨가되지 않은 하이드로젤만 첨가한 그룹으로 나누어 실험을 진행하였다. 일정시간을 정해두고 배양액을 얻어 UV-spectrophotometer기기를 이용하여 700 nm 파장에서 탁도를 측정하였다.

세포독성. 하이드로젤의 세포독성을 측정하기 위해 ISO 10993 근거하여 멸균된 하이드로젤을 세포배양액(DMEM, Dulbecco's modified eagle's medium, Gibco)에 넣어 37 °C에서 24시간 이상 배양하여 용출액을 제조하였다. 96 well tissue culture plate에 1×10^5 cells/mL로 각 well 당 100 μ L씩 분주하여, 24시간 동안 배양한 RAW 264.7 세포에 하이드로젤 용출액(100 μ L)을 처리하였다. 24시간 후 약물이 포함되어 있는 배지에 MTT 용액(Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO)을 처리하여 37 °C에서 4시간 동안 반응시킨 후 570 nm에서 ELISA reader(ELX808, Biotek Instruments, Vermont, USA)을 이용하여 측정하였다.

창상실험. 실험대상 SD rat을 마취 전 24시간 동안 절식시켰고, 물은 공급하였다. 모든 실험군에서 창상유발 한 시간 전에, 졸레틸50과 림퐁을 1:2 비율로 혼합하여 30 μ L 사용하여 근육 주사로 마취시킨 후, 전기제모기로 백서의 등 부위

털을 제거하였다. 등 부위에 10% povidine-iodine과 70% ethanol을 각각 도포하여 소독한 뒤, 등 부위에 소독된 수술용 가위를 이용하여 직경 2 cm×2 cm의 크기로 진피층을 포함한 전층 결손 창상을 유발하였다. 총 세 그룹으로 나누어 실험을 진행하였다. 이 젤을 처리하지 않고 생리식염수만 처리한 군, Phy 캡슐이 첨가되지 않은 하이드로젤군 그리고 Phy 캡슐이 첨가된 하이드로젤을 처리한 그룹으로 나누어 창상 치유 효과를 측정하였다. 각각의 처치군은 4마리씩 실험에 사용하였다. 이후 각 처치군의 동일한 환경을 제공하고자 멸균된 거즈(Tegaderm; 3M Health Care, USA)를 덮고, 그 위에 탄력밴드(Coban; 3M Health Care, USA)로 움직임에 지장이 없도록 감아주었다. 동물실험은 전남대학교 용봉캠퍼스 동물실험 윤리 위원회에 적합함을 승인받고(CNU IACUC-YB-2012-36) 실험하였다.

육안적 상처 변화의 관찰. 상처치료의 진행 과정을 관찰하기 위해 창상 유발 시작 점부터 5일 간격으로 digital camera (CAMEDIATM, Olympus Co., Tokyo, Japan)를 이용하여 각 군별로 일정 거리에서 촬영하여 상처의 변화를 육안적으로 관찰하였다. 또한 객관적인 지표로 나타내기 위하여 digital calliper(Mitutoyo Co., Kawasaki, Japan)로 창상의 면적을 측정하였다. 창상 치유율은 창상부의 면적변화를 선행연구에서¹² 제시한 방법으로 계산하였다.

$$\text{창상 치유율}(\%) = 100 \times \frac{W_0 - U_i}{W_0} \quad (3)$$

W_0 : 창상 유발 직후 창상부 면적

U_i : 측정일 창상부 면적

조직학적 검사. 창상유발 후 20일 경과한 후 실험동물은 보건복지부고시 제88-9호의 실험동물 관리 지침서 등에 관한 기준에 명시된 항정신성 약의 과잉투여에 의한 방법에 따라 ethyl ether를 이용하여 조직 검사용 실험동물을 안락사 시켰다. 원형 창상 전체가 포함된 조직을 채취하고, 10% 중성 formalin 용액에 24시간 고정한 후, 창상 중양을 통과하는 절편을 취하여 탈수시킨 후 paraffin 블록에 포매하였다. 조직을 조직 절편기를 이용하여 절단한 다음 polylysin으로 코팅된 slide에 붙여 paraffin 제거 및 함수과정을 거친 후 H & E (haematoxylin and eosin Y) 염색을 실시했다.

통계처리. 모든 실험 결과는 평균값(mean)과 표준편차(standard deviation, SD)로 표시하였다. 대조군과 실험군 사이의 통계학적 유의성 검정은 Student's t-test로 비교하였으며 p 가 0.05 이하인 것과 0.01 이하인 것만 유의한 것으로 하였다.

결과 및 토론

잣나무 부산물 성분분석. 제공받은 잣나무 부산물 오일의

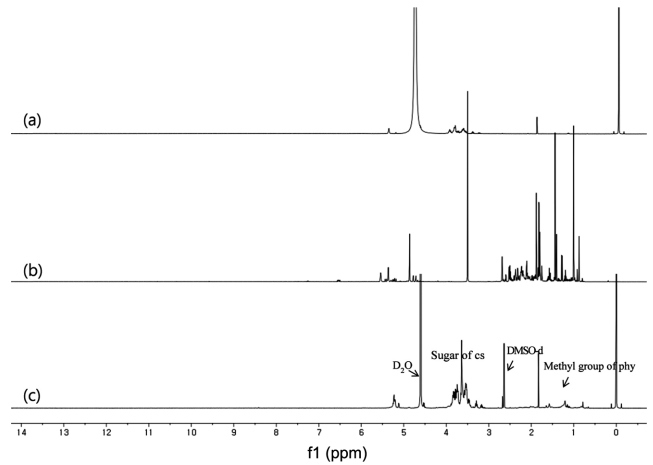
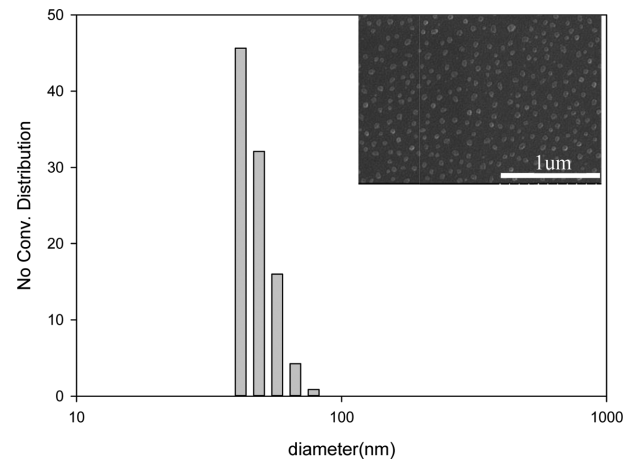
Table 1. Main Chemical Composition of Korean Pine Byproduct

Compound	RT	%	Molecular formula
α -Pinene	22.989	27	C ₁₀ H ₁₆
β -Pinene	25.984	14	C ₁₀ H ₁₆
β -Myrcene	27.088	9.3	C ₁₀ H ₁₆
3-Carene	28.273	5.6	C ₁₀ H ₁₆
L-Limonene	29.595	26	C ₁₀ H ₁₆
D-Limonene	30.006	14	C ₁₀ H ₁₆
α -Terpinolene	33.057	0.7	C ₁₀ H ₁₆
Thymol	43.600	5.1	C ₁₀ H ₁₄ O
α -Longipinene	46.580	0.5	C ₁₅ H ₂₄
Junipene	49.124	2.7	C ₁₅ H ₂₄

주요 화합물을 GC/Mass를 이용하여 분석한 결과 Table 1에 서와 같이 monoterpene계열의 화합물이 다량 검출되었고 α -pinene(27%), L-limonene(26%), β -pinene(14%), D-limonene(14%), β -myrcene(9.3%), 3-carene(5.6%), thymol(5.1%), junipene(2.7%), α -terpinolene(0.7%), α -longipinene(0.5%)의 순으로 높은 함량을 나타내었다. α -Pinene은 대표적으로 소나무, 잣나무, 편백나무 등의 침엽수에서 함유되어 있는 정유의 주성분으로 woody 계열, 소나무향으로 평가된다. 이러한 terpene계열의 유기화합물은 Phy의 주요 구성 물질로 알려져 있다.² Phy의 성분은 편백이 가장 높게 나타났으며 잣나무, 소나무 순으로 스트레스 완화효과가 있다고 보고되었다.¹³ 또한 진정효과, 항균효과 및 혈중 콜레스테롤 감소 효과 등 매우 다양한 분야의 생리활성 효능이 있다고 보고된 바 있으며 이를 활용한 방향제 및 구취제 등의 상품화와 심신안정 치료의 재료로 사용되고 있다.¹⁴

NMR 결과. Figure 1은 MD와 CH, Phy 그리고 CH/MD에 적재된 Phy 함유 캡슐의 NMR 결과를 나타낸 것이다. CH의 고유 피크 NHCOCH₃을 (a), (c)의 δ 1.96 ppm에서 관찰할 수 있었고, (b)의 Phy 오일의 지방족화합물(aliphatic) CH, CH₂과 CH₃은 (B)와 (C)의 그래프에서 δ 1.0~2.0 ppm에서 관찰할 수 있었다. MD와 CH 조성의 벽물질 내부에 Phy가 함유된 것을 관찰할 수 있었다.

Phy-캡슐 평가. MD와 CH을 이용하여 제조한 Phy 함유 캡슐은 주사 현미경으로 관찰하였을 때 구(sphere)의 형태였으며 입도분석 결과 100 nm 이하의 크기를 가지고 있음을 확인할 수 있었다(Figure 2). ZETA 전위 측정 결과 31.46 mV를 확인하였다. 캡슐 내 Phy의 담지 효율을 평가한 결과, 처음 첨가량의 48 \pm 3.4%가 담지되었다. 알파-아밀라제 효소를 이용해서 제조된 MD는 구조적인 면에 있어서는 hydroxyl가 외부로 배향되어 있고 겉으로 친수성을 띠고 있으며 다량의

**Figure 1.** ¹H NMR spectra of CH/MD (a); Phy (b); the Phy-CH/MD complex-3(c).**Figure 2.** SEM image and size distribution of the Phy-loaded nanoparticle.

가지 구조를 형성하고 있어 Wanwimol 등의 연구 결과와 같이 CH와 MD에 Phy을 혼합하여 제조한 에멀전의 안정성을 높여 캡슐화에 효과적인 것을 알 수 있었다.¹¹

PVA/PET 하이드로젤의 물성. 제조한 하이드로젤의 물리적 특성 평가는 Table 2에 나타냈다. Phy 캡슐이 함유된 하이드로젤 필름의 강도는 545.3 \pm 35 MPa이었고, Phy 캡슐이 함유되지 않은 하이드로젤 필름의 강도는 892 \pm 41.71 MPa였다. CH/MD로 캡슐화된 Phy에서 존재하는 OH 그룹에 의해 하이드로젤 형성시 수분함량이 증가되면서 하이드로젤 강도에 영향을 주어 압축강도를 감소시키는 역할을 하는 것으로 생각된다.^{13,15}

PVA/PET 하이드로젤의 항균성. Phy 캡슐이 함유된 하이드로젤의 항균 효과를 확인하기 위해 제조된 각각의 젤을 *Staphylococcus aureus*와 *Staphylococcus epidermidis*가 접종된 액체배지에 첨가한 후 균 저해능을 평가하였다. Figure 3

Table 2. Properties of PVA/PET Hydrogels and Phy-PVA/PET Hydrogel

Film formulation	Thickness (mm)	Tensile strength (MPa)	Swelling index (%)	Gel fraction (%)
Hydrogel	1.68±0.19	892±41.71	173.82±2.3	82.64±4.44
Phy-hydrogel	1.57±0.06	545.3±35	149.03±15.13	77.87±5.15

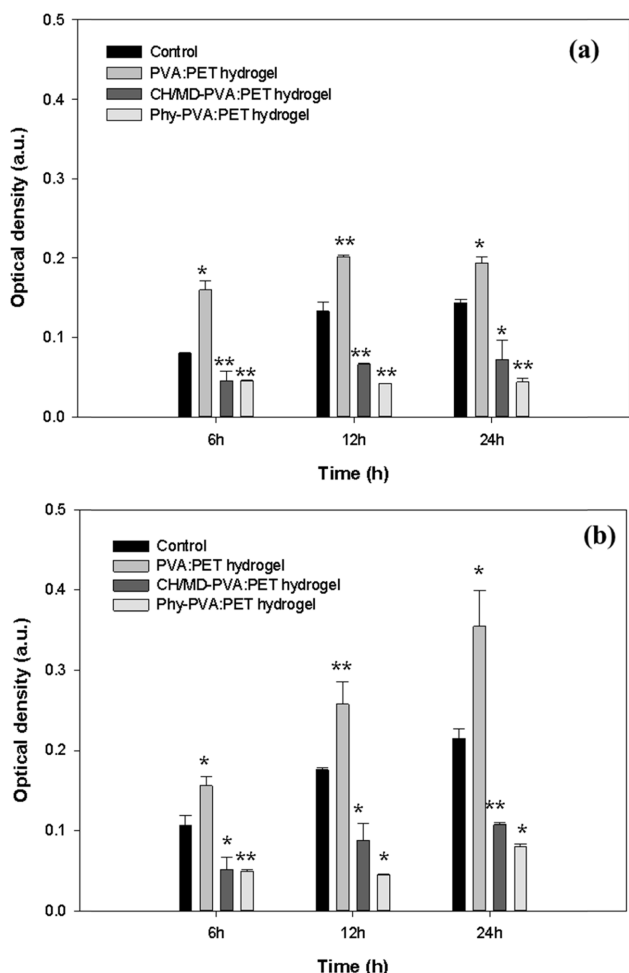


Figure 3. Antimicrobial activity of Phy-PVA:PET hydrogel at different exposure times against (a) *Staphylococcus aureus*; (b) *Staphylococcus epidermidis* (n=4). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ as compared with control and experiment.

에서 액체 배지의 optical density(OD) 값은 대조군으로 아무 것도 첨가하지 않은 균만 접종한 그룹, PVA:PET 조성 젤 첨가 그룹, Phy를 캡슐화 하기 위해 벽물질로 사용된 CH/MD 소재가 첨가된 PVA:PET 조성 젤 그룹, Phy 캡슐이 첨가된 PVA:PET 조성 젤 그룹으로 각각 배양 후 저해 값을 비교한 그래프이다.

각각의 균주 그룹에서 Phy 캡슐이 첨가된 군에서 균의 성장을 억제시키는 것을 관찰할 수 있었다. 벽물질 조성이 첨가된 젤그룹에서도 CH의 자체적 항균력으로 균 저해능을 관

찰할 수 있었으나, 시간이 지남에 따라 균 저해능이 높아지는 것은 Phy의 방출에 의한 현상임을 짐작할 수 있었다. 또한 PVA:PET 조성 젤만 처리한 그룹에서는 대조군보다 높은 OD 값을 나타낸 것은 PVA:PET 조성이 균주 성장에 도움이 되는 영양분이 되어 투과도 값이 높아지는 것을 관찰할 수 있었다.

PVA/PET 하이드로젤의 세포독성. MTT assay를 이용하여 관찰한 Phy 캡슐 함유 하이드로젤의 농도별 용출액의 세포독성 평가는 모든 농도에서 95% 이상으로 독성이 없는 것을 관찰하였다. 농도에 따라 Figure 4에 나타내었다. 실험 결과 각 농도별로 처리한 후 세포가 95% 이상의 생존율을 보여 본 실험에 이용된 젤은 세포독성이 없는 생체 소재로 활용이 가능하며, 다양한 생체재료로의 응용도 예측할 수 있다.

창상에 대한 육안적, 조직학적 평가. Figure 5는 창상유발 일에서 창상유발 후 20일 경과시점까지 창상유발군(control, PVA: PET hydrogel, Phy-PVA: PET hydrogel)에서 선택한 동일 개체의 창상부분을 5일 간격으로 촬영하여 상처면적 변화를 나타낸 것이다. 창상유발 당일에서부터 창상유발 후 20일 경과시점까지 창상유발군의 대조군(control group)은 멸균 거즈를 처리한 군으로 10일까지 염증과 삼출액에 형성되는 것을 관찰할 수 있었다. 점차 20일이 경과된 시점에서는 피딱지가 형성되어 있는 표피를 관찰할 수 있었다. 하지만,

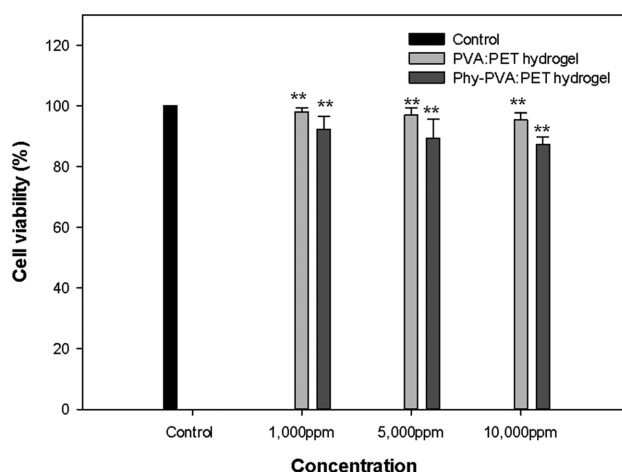


Figure 4. Cell viability of RAW 264.7 cells treated with the extracts of the PVA:PET hydrogel and PVA:PET hydrogel containing Phy nanoparticles. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ as compared with control and experiment.

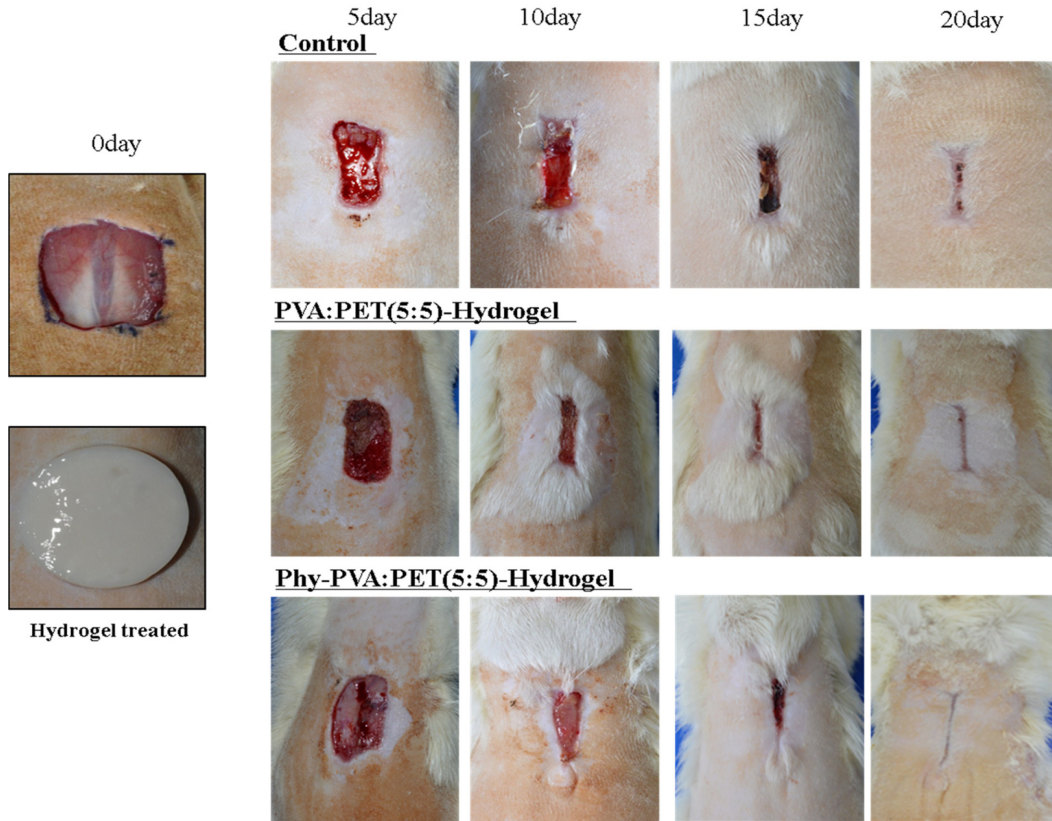


Figure 5. Photographs of the wounds at 0th, 5th, 10th, 15th and 20th day are representative of four rats in each group. Wound reduction of PVA:PET hydrogel and Phy-PVA:PET hydrogel treated SD rats. The data represent the mean±SD of four rats.

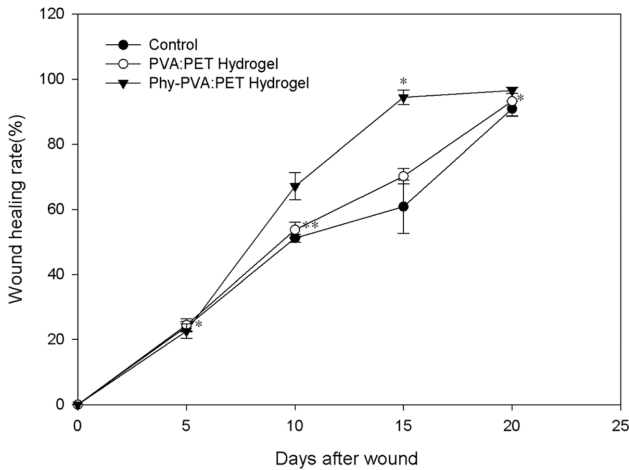


Figure 6. Size reduction of wound treated with sterile gauze, PVA:PET hydrogel, and Phy-PVA:PET hydrogel in rat dorsum. Each value represents the mean±S.D. (n=4). **p*<0.05, ***p*< 0.01 as compared with sterile gauze(control) and hydrogel(experiment).

PVA:PET 하이드로젤을 처리한 그룹에서는 15일 경과시점에서부터 표피화와 수축이 더 빨라진 것을 관찰할 수 있었다. 창상치유율의 변화는 Figure 6과 같이 측정되었다. 창상치유율은 창상 유발 후 5일 대조군은 23.97±1.57, Phy함유 젤군은

은 22.56±2.23, Phy가 함유되지 않은 군에서는 24.48±1.88, 10일째 대조군은 51.11±1.189, Phy 함유 젤군은 67.10±4.20, Phy가 함유되지 않은 군에서는 53.67±2.38, 15일째 대조군은 60.83±8.18, Phy 함유 젤군은 94.42±2.24, Phy가 함유되지 않은 군에서는 70.21±2.34, 20일째 대조군은 90.9±2.35, Phy 함유 젤군은 96.51±0.9, Phy가 함유되지 않은 군에서는 93.18±4.36로 측정되었다.

Figure 7은 SD rat 피부의 H&E 염색 후 대조군과 실험군의 조직을 관찰하였다. 대조군의 조직에서는 혈전생성과 적혈구가 삼출되는 것을 관찰할 수 있었다. Phy가 첨가된 하이드로젤과 첨가되지 않은 하이드로젤을 처치한 조직에서는 Phy가 함유된 군에서 염증 침윤 세포도 감소하고 조직이 치밀하게 형성된 것을 확연히 관찰할 수 있었다. Phy가 함유된 하이드로젤 처치군으로 일차적으로 scar에 습윤 및 항균 상태가 유지되고, monoterpene계열의 화합물인 α -pinene(27%), L-limonene(26%) 성분은 섬유아세포의 증식 및 교원질의 형성을 돕고 염증침윤세포를 저해하여 창상부위의 재생에 효과적인 것을 관찰할 수 있었다.¹⁶ 상처유발 후 상처 초기의 관리와 처치는 상피층에 표피가 형성되면서 scar에 많은 영향을 주는 것을 관찰할 수 있었으며, 잣나무 부산물에서 얻어지는 Phy는 상처치유를 개선할 수 있는 식물성 정유로 사용

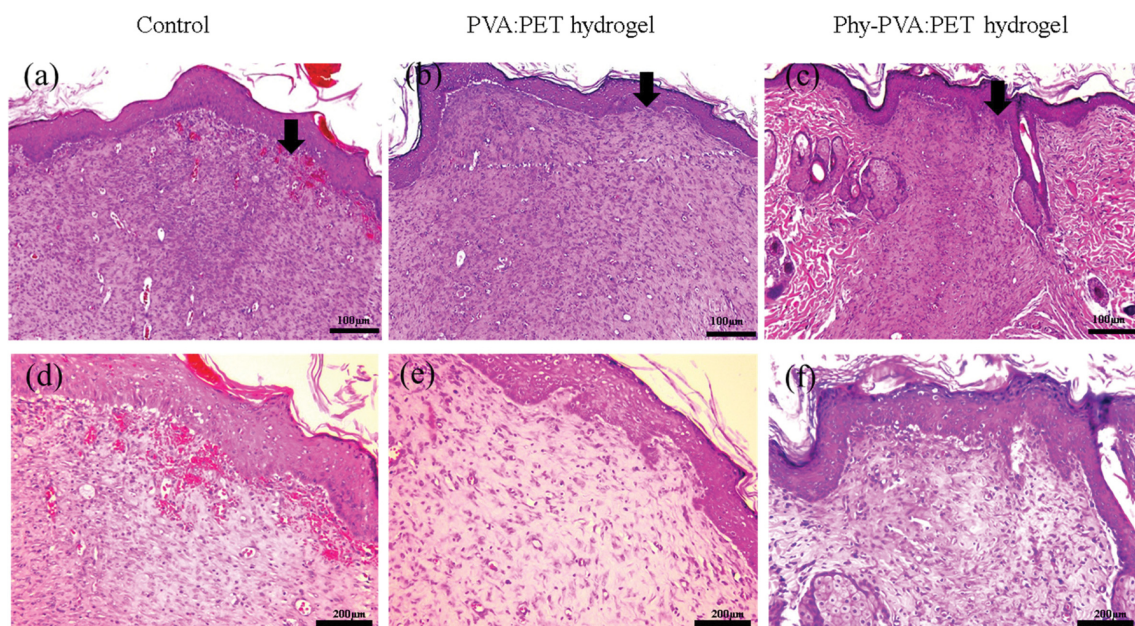


Figure 7. Histopathological studies, photograph 40× magnification (a, b, c) and 200× magnification (d, e, f) were at 20 days after injury. (a, d) sterile gauze treated; (b, e) PVA:PET hydrogel treated; (c, f) Phy-PVA:PET hydrogel treated.

가능성을 관찰할 수 있었다.

결론

본 연구는 잣나무의 부산물에서 얻어지는 Phy를 함유시킨 창상피복재의 개발에 대한 연구이다. 실험에 사용된 Phy는 α -pinene(27%), L-limonene(26%), β -pinene(14%), D-limonene(14%), β -myrcene(9.3%), 3-carene(5.6%), thymol(5.1%), junipene(2.7%), α -terpinolene(0.7%), α -longipinene(0.5%)순의 화합물이 관찰되었다. 특히 창상피복재용 하이드로젤에 Phy를 활용하고자 캡슐화를 진행하였고, 48±3.4%의 Phy가 담지된 것을 관찰하였다. 제조된 하이드로젤의 항균력은 황색포도상구균(*staphylococcus aureus*)과 표피포도상구균(*staphylococcus epidermidis*)이 접종된 배지에서 Phy가 첨가된 젤 그룹에서 확인한 균 저해능을 관찰하였고, 외과적인 창상을 유도한 SD rat에서 창상 치유에 효능을 관찰하였다. 창상치유율 또한 재생피화가 빠른 것을 조직학적 평가를 통해 관찰할 수 있었다.

감사의 글: 이 논문은 2014년도 정부(교육부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구(NRF-2014R1A6A3A01009461)이며 지원에 감사드립니다.

참고 문헌

1. H. O. Lee, S. H. Baek, and D. M. Han, *J. Microbiol. Biotechnol.*,

29, 253 (2001).
 2. H. Y. Kang, I. G. Choi, and S. S. Lee, *J. Korean For. Soc.*, **13**, 71 (1993).
 3. R. H. Whittaker and P. P. Feeny, *Science*, **171**, 757 (1971).
 4. H. I. Kim, C. H. Jeong, and S. M. Park, *Text Coloration Finish.*, **22**, 3 (2010).
 5. Y. S. Kim and I. J. Yoo, *Korean J. Food Sci. An.*, **15**, 127 (1995).
 6. S. U. Kim, J. Y. Shin, Y. M. Park, K. M. Chung, J. H. Lee, and D. H. Kweon, *Korean J. Food Sci. Technol.*, **38**, 241 (2006).
 7. H. S. Choi, J. S. Kim, D. S. Jang, Y. B. Yu, Y. C. Kim, and J. S. Lee, *J. Fish Pathol.*, **18**, 239 (2005).
 8. K. D. Kim, J. H. Min, J. E. Jo, and M. K. Na, *J. Korean Soc. Cosmet.*, **23**, 75 (2006).
 9. U. Y. Park, Y. M. Kim, S. H. Kim, and D. S. Chang, *J. Fd. Hyg. Safety*, **10**, 139 (1995).
 10. J. K. Jang and J. Y. Han, *Korean J. Food Sci. Technol.*, **34**, 524 (2002).
 11. W. Klaypradit and Y. W. Huang, *Food Sci. Technol.*, **41**, 1133 (2008).
 12. J. Kim, E. B. Cho, and K. Y. Lee, *Polym. Korea*, **37**, 462 (2013).
 13. H. Y. Kang, Editor, *Secret of the Phytoncide*, Yeoksanet Publ. Co., Seoul, 2003.
 14. S. Hayashi, K. Yano, and T. Matsuura. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **37**, 680 (1964).
 15. S. Hwang and J. Lee, *Polym. Korea*, **35**, 332 (2011).
 16. F. V. Silva, A. G. Guimarães, E. R. Silva, B. P. Sousa-Neto, F. D. Machado, L. J. Quintans-Júnior, D. D. Arcanjo, F. A. Oliveira, and R. C. Oliveira, *J. Med. Food*, **15**, 984 (2012).