

# 듀얼헤드 적층 기술을 이용한 나노섬유로 결합된 3D 인공지지체 제작

사민우\*, 이창희\*\*, 김종영\*\*,#

\*SJ TOOLS 기업부설연구소, \*\*안동대학교 기계공학과

## Fabrication of Nanofiber-Combined 3D Scaffolds using Dual-Head Deposition Technology

Min-Woo Sa\*, Chang-Hee Lee\*\*, and Jong Young Kim\*\*,#

\*Research Institute, SJ TOOLS

\*\*Department of Mechanical Engineering, Andong National University

(Received 7 December 2017; received in revised form 19 January 2018; accepted 29 January 2018)

### ABSTRACT

In bone tissue engineering, polycaprolactone (PCL) is one of the most widely used biomaterials to manufacture scaffolds as a synthetic polymer with biodegradability and biocompatibility. The polymer deposition system (PDS) with four axis heads, which can dispense bio-polymers, has been used in scaffold fabrication for tissue engineering applications. A dual-head deposition technology of PDS is an effective technique to fabricate 3D scaffolds. The electrospinning technology has been widely used to fabricate porous and highly interconnected polymer fibers. Thus, PDS can fabricate nanofiber-combined hybrid scaffolds using fused deposition modeling (FDM) and electrospinning methods. This study aims to fabricate nanofiber-combined scaffolds with uniform nanofibers using PDS. The PCL nanofibers were fabricated and evaluated according to the fabrication process parameters. PCL nanofibers were successfully fabricated when the applied voltage, tip-to-collector distance, flow rate, and solution concentration were 5 kV, 1 cm, 0.1 ml/h, and 8 wt%, respectively. The cell proliferation was evaluated according to the electrospinning time. Scanning electron microscopy was used to acquire images of the cross-sectioned hybrid scaffolds. The cell proliferation test of the PCL and nanofiber-combined hybrid scaffolds was performed using a CCK-8 assay according to the electrospinning time. The result of in-vitro cell proliferation using osteosarcoma MG-63 cells shows that the hybrid scaffold has good potential for bone regeneration.

**Key Words :** Polymer Deposition System(폴리머 적층 시스템), Electrospinning(전기방사), Scaffold(인공지지체), Nanofiber(나노 섬유), Polycaprolactone(폴리카프로락톤)

## 1. 서 론

조직공학에서는 공학적 재료 및 생화학적 요인

의 지식과 기술을 결합하여 인공 장기와 조직을 만들며, 손상된 조직을 재생하는 다 학제 간 분야로 알려져 있다<sup>[1]</sup>. 우리 몸은 매우 복잡한 조직 구조를 가지고 있기 때문에 재생 능력 자체가 매우 제한적이다. 따라서, 조직공학을 이용한 많은 연구

# Corresponding Author : jykim@anu.ac.kr

Tel: +82-54-820-5669, Fax: +82-54-820-6127

자들은 손상된 조직과 기관을 재생하기 위해 활발히 연구를 수행하고 있다<sup>[2-4]</sup>. 조직 재생을 위한 3차원 인공지지체는 세포 및 성장인자와 관련된 중요한 세 가지 요소 중 하나이다. 또한 인공지지체는 세포의 원활한 증착과 성장을 유도하는데 필수적이다<sup>[5-10]</sup>. 자연 세포 외 기질을 모방하기 위한 3차원 다공성 인공지지체도 개발되고 있다<sup>[11-15]</sup>. 따라서, 인공지지체의 공극 크기는 골 세포의 경우 100~350  $\mu\text{m}$ 가 적당하며, 인공지지체 내부로 영양분과 폐기물의 교환이 원활히 이루어 질 수 있도록 상호 연결된 공극을 가져야 한다<sup>[16,17]</sup>. 골 조직 재생을 위한 생체적합성 및 생분해성 재료를 이용한 3차원 인공지지체 및 나노 섬유가 제작되고 있다<sup>[18-19]</sup>. 인공지지체 제작에 사용되는 고분자 재료는 천연 고분자와 합성 고분자로 분류된다. 인체에서 추출한 천연 소재, 동물 및 천연 고분자 소재는 다른 소재와 비교하여 우수한 생체 적합성을 가지며 무독성의 이점이 있다. 천연 고분자 재료에는 젤라틴, 콜라겐, 피브린, 엘라스틴 및 알긴산 등이 있다. 합성 고분자 재료는 천연 고분자 보다 비교적 값이 저렴하며 기계적 성질이 우수하다. 합성 고분자 재료에는 폴리카프로락톤 (Polycaprolactone, PCL), 폴리락틱-코-글라이콜라이드 (Poly (lactide-co-glycolide), PLGA), 폴리락틱산 (Poly (lactic acid), PLA) 등이 있다. 최근에 3차원 인공지지체 및 나노 섬유는 다양한 고분자 재료를 이용하여 열 용해 적층 법 (Fused deposition modeling, FDM) 및 전기방사 (Electrospinning) 방법으로 제조되고 있다. 또한, 자유 형상 제작 기술에 의해 제조된 3차원 인공지지체와 전기방사에 의해 제조된 나노 섬유가 조직공학에서 개별적으로 이용되고 있다<sup>[20-22]</sup>. 전기방사 기술은 조직 재생을 위한 인공지지체 기능을 할 수 있는 상호 연결된 다공성의 고분자 섬유를 제작하는데 널리 사용되고 있으며, 전기방사로 만들어진 나노섬유는 세포 상호작용 효과에 유리한 특성을 가지고 있다<sup>[23,24]</sup>. 전기방사는 나노 스케일에서 마이크로 스케일 이상까지 다양한 직경을 갖는 고분자 나노섬유 기술이다<sup>[25,26]</sup>. 용액의 유속, 실내온도 및 습도, 노즐 팁과 컬렉터 사이의 거리 (Tip to collector distance, TCD), 인가전압 및 컬렉터 설계는 방사

성 및 섬유 형태에 영향을 주는 공정 변수이다<sup>[27,28]</sup>. 국내에서는 일정한 선 두께를 가지도록 제어 가능한 나노섬유 기반 하이브리드 인공지지체의 제작을 수행하였으나, 아직까지 나노섬유의 일정한 방향성을 가지는 제어기술이 부족한 상황이다.

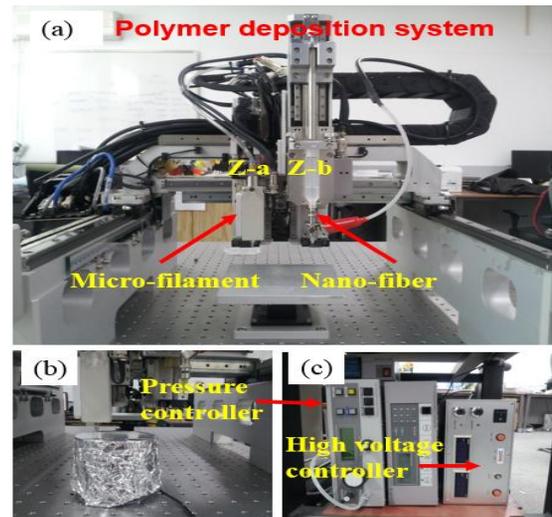


Fig. 1 Actual images of polymer deposition system: (a) electrospinning parts, (b) deposition heads, and (c) pressure and high voltage controllers.

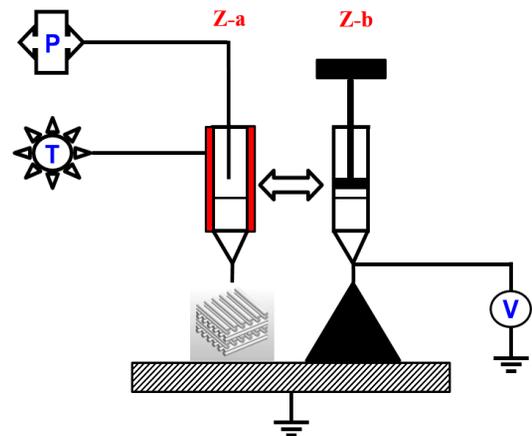


Fig. 2 Schematic diagram of polymer deposition system; (P: Pressure, T: Temperature, and V: Voltage)

따라서 본 연구의 목적은 자유 형상 제작 기반의 폴리머 적층 시스템 (Polymer deposition system, PDS)의 듀얼 헤드 적층 기술을 이용하여 3차원으로 제작된 PCL 인공지지체와 전기방사된 PCL 나노섬유를 결합하여 일정한 선 두께 및 방향성을 가지는 하이브리드 인공지지체를 제작하는 것이다. 게다가 인공지지체의 마이크로 필라멘트의 공극 사이에 나노 방사 시간에 따른 세포 증식 평가를 수행하여 초기 세포의 부착을 향상시키고, 세포 증식을 향상시킬 수 있도록 하기 위함이다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1 재료

마이크로 크기의 인공지지체와 나노섬유를 제조 하는데 Poly( $\epsilon$ -caprolactone)이 사용 되었다. 마이크로 크기 인공지지체의 경우, PCL (Mn 45,000, Sigma-Aldrich co., USA)을 사용하였다. Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)에서 PCL (Mn 45,000)을 구입하였고, 삼진화학에서 클로로포름 (CHCL, 99.5%)을 구매하였다. Table 1 은 PCL의 특성을 보여주고 있다. PCL은 전기 방사를 이용한 나노 섬유 제조에 우수한 전기 전도체이다. 전기방사를 위한 PCL용액을 준비하기 위해 PCL을 클로로포름에 용해시켜 실온에서 4시간 동안 투명한 용액을 만들었다. 일정한 선두께를 가지는 나노섬유 제작을 위해 PCL은 클로로포름에 용해시켜 8, 10 및 12 %(w/w)의 농도로 제조되었다.

### 2.2 폴리머 적층 시스템

골 조직 공학을 위한 다양한 3차원 인공지지체를 제작하기 위해 PDS가 사용되었다. Fig. 1 은 PDS의 실제 이미지를 보여준다. 전기방사 공정은 PDS의 뒷면에서 준비하여 수행된다. 전기방사 공정을 위해 Z-b축을 설정 하고 3차원 인공지지체 제작을 위한 축은 Z-a로 설정하였다. 주사기 펌프용 초소형 용량 디스펜서 (NANO MASTER<sup>®</sup>SMP-3-H, Musashi, Japan)를 Z-a축에 장착하여 PCL 용액을 제어하였다. 최대 전압 60 kV 까지 출력 전압을 제어하기 위해 고전압 전원 공급 장치 (ESN-HV60, Nano NC, Korea)를 사용하였다.

Table 1 Properties of PCL material

	PCL
Form	pellets
Melt index	1.8g/10min (80°C, 44psi)
Mol wt	M <sub>n</sub> 45,000
	M <sub>w</sub> 48,000-90,000
Mp	56-64°C

Fig. 2는 3차원으로 제작된 인공지지체와 전기방사 나노섬유의 전체 공정에 대한 개략도를 보여준다. 전기장은 팁과 컬렉터 사이에 높은 전압을 가함으로써 생성되었다.

### 2.3 나노 섬유의 제조 과정

본 연구에서는 PCL 고분자 재료를 클로로포름 혼합물에 용해시켜 8, 10 및 12% (w/w) 의 PCL 용액 농도를 준비하였다. PCL 용액을 32G의 플라스틱 노즐이 결합된 10 ml 플라스틱 주사기에 주입하여 사용하였다. 일정한 선두께 및 방향성을 가지는 나노섬유 제작을 위해 인가전압과 유량을 따라 반복실험을 수행하여 최적의 조건을 탐색하였다. 실험을 위해 설정된 공정조건은 다음과 같다. 인가전압은 5, 10, 15 kV이고, 용액의 TCD는 1 cm이며, 용액의 유량은 0.1 ml/h이다. 모든 실험은 실온에서 수행되었다.

### 2.4 In vitro 세포 실험

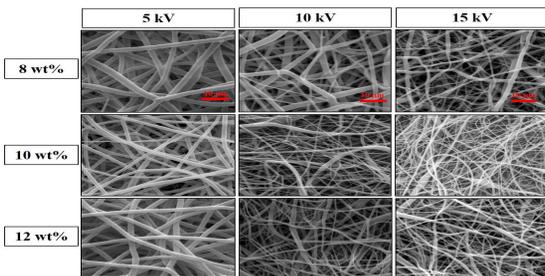
#### 2.4.1 세포 배양 및 파종

제작된 인공지지체의 세포 증식 실험을 수행하기 위해 Osteosarcoma MG-63 세포를 이용하였다. 세포 배양액은 D-minimum essential medium (DMEM, Hyclone, Logan, UT, USA)에 10% 우태혈청 (Fetal bovin serum, Gibco, Rockville, MD, USA), 1% 항생제 (Penicillin streptomycin, Sigma, St. Louis, MO, USA)를 첨가하여 준비되었다. 세포는 37°C, 5% 이산화탄소 환경의 인큐베이터에서 4일간 충분히 배양되었다. 그리고 pH를 조절하기 위해 실험기간 동안 매일 배지를 교체하였다. 배양된 세포는 0.25% 트립신 (Trypsin-EDTA, Gibco, Rockville, MD, USA)을 사용하여 떼어졌다. 세포를 떼어내고 원심분리기에서 세포를 상층액과 분리시킨 후에 세포의 수를 계산

하기 위해 0.4% 트립판블루 (Trypan blue, Gibco, Rockville, MD, USA)로 염색한 후 Hemacrometer를 사용하여 계산하였다. 24-well plate 에 위치한 각각의 인공지지체에  $1 \times 10^5$  세포를 파종하였다.

### 2.4.2 CCK - 8 분석

세포가 파종된 인공지지체의 세포 증식을 평가하기 위해 Cell Counting Kit-8 (CCK-8, Dojindo, Kumamoto, Japan)을 사용하였다. 흡광도 (Optical density, OD) 값은 마이크로 플레이트 판독기 (UVM 340, Biochrom, Cambridge, UK)에 의해 450 nm에서 측정되었다. OD값은 살아있는 세포의 수와 비례하는 관계를 가지기 때문에 3차원 인공지지체의 세포 증식 효과를 1, 4, 7일에 각각 측정하여 결과를 얻었다.



**Fig. 3 SEM observation of nanofibers according to solution concentration and voltage (at TCD of 1 cm). Scale bars of all images are 10  $\mu$  m equally**

**Table 2 Process conditions of hybrid scaffolds using Polymer deposition system**

	3D printed PCL struts	Electrospun nanofibers
Nozzle size ( $\mu$ m)	250 (precision nozzle)	100 (plastic nozzle)
Pressure (kPa)	Avg. 600	-
Temperature ( $^{\circ}$ C)	100	-
Feed rate (mm/min)	150	Fixed Z-axis
Voltage (kV)	-	5
TCD (cm)	-	1
Flow rate (ml/h)	-	0.1
Solution concentration (wt%)	-	8

## 3. 실험결과 및 고찰

### 3.1 나노 섬유 분석

전기 방사 공정을 위해 설정된 실내 온도는  $22 \pm 2^{\circ}$ C였으며, 습도는  $42 \pm 3\%$  로 실험을 수행하였다. TCD는 반복실험을 통해 인공지지체 제작에 가장 효과적인 1 cm로 고정되었다. Fig. 3은 공정 조건에 따른 제조된 나노 섬유의 사진이다. Table 3 에서 인가전압과 농도에 따른 나노섬유의 평균 직경을 나타내고 있다. 전기방사의 공정이 8 wt%의 농도일 때, 5 kV의 전압과 1 cm의 TCD에서 전기 방사된 나노섬유의 평균 직경은  $1599 \pm 402$  nm였다. 10 kV의 전압일 때의 평균 직경은  $686 \pm 382$  nm였고 15 kV의 전압일 때는  $678 \pm 360$  nm였다. 10 kV일 때 섬유의 크기가 크게 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 그리고 전기방사의 공정이 10 wt%의 농도에서 5 kV의 전압일 때의 평균 직경은  $1708 \pm 364$  nm였다. 그러나 10 kV일 때는 많이 감소된 값으로  $1181 \pm 658$  nm였다. 그리고 15 kV의 전압일 때 평균 직경은  $1089 \pm 759$  nm였다. 12 wt%의 농도에서 5 kV의 전압일 때의 평균 직경은  $2221 \pm 415$  nm였다. 그러나 10 kV의 전압일 때의 평균 직경은 2배 가까이 감소된 것으로  $1105 \pm 786$  nm였다. 그리고 15 kV의 전압일 때의 평균 직경은  $1091 \pm 767$  nm였다. 용액의 농도가 증가할수록 전기방사된 나노섬유의 평균 직경이 증가함을 알 수 있었다. 그러나 전압이 증가할 때에는 나노 섬유의 직경이 감소되는 특성을 확인할 수 있었다. 따라서 제조된 나노섬유가 일정한 크기를 유지하는 것은 5 kV일 때가 가장 좋은 것으로 판단되었다. 이 결과를 토대로 하이브리드 인공지지체의 제작에 가장 최적의 공정 조건은 8 wt%의 용액 농도와 5 kV의 전압일 때이며, 이 조건으로 나노 섬유를 방사했을 때 가장 균일한 나노 섬유의 선풍으로 제작이 되었다.

**Table 3 Fabrication of nanofibers**

	5 kV	10 kV	15 kV
8 wt%	$1599 \pm 402$ nm	$686 \pm 382$ nm	$678 \pm 360$ nm
10 wt%	$1708 \pm 364$ nm	$1181 \pm 658$ nm	$1089 \pm 759$ nm
12 wt%	$2221 \pm 415$ nm	$1105 \pm 786$ nm	$1091 \pm 767$ nm

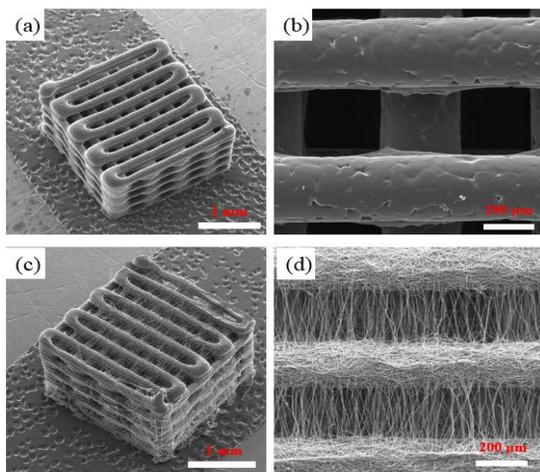


Fig. 4 SEM images of (a, b) PCL scaffold (normal) and (c, d) Nanofiber-combined PCL scaffold (hybrid)

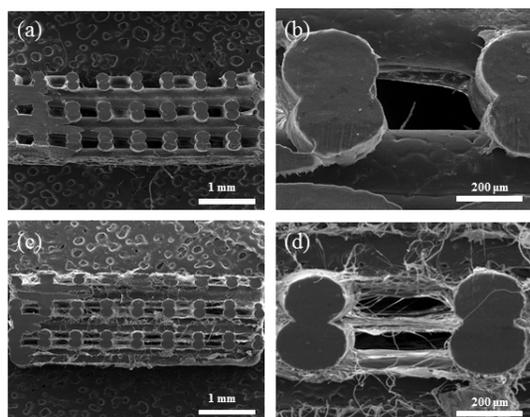


Fig. 5 SEM images of cross-sectioned scaffolds fabricated at optimal conditions (a and b : PCL scaffold, c and d : nanofiber-combined PCL scaffold)

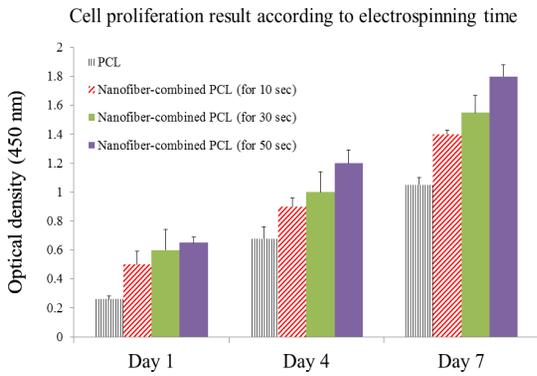
### 3.2 하이브리드 인공지지체 평가

하이브리드 인공지지체의 필라멘트는 PDS장비를 이용하여 250  $\mu\text{m}$ 의 노즐, 100°C의 온도, 600 kPa의 평균 압력 및 150 mm/min의 이송속도로 최적의 공정조건으로 제작되었다. 하이브리드 인공지지체의 크기는  $5 \times 5 \times 2.5 \text{ mm}^3$ 이며, 필라멘트 공극의 크기는  $280 \pm 20 \mu\text{m}$ 로 제작되었다. 전기방사 헤드는 고정된 상태로 전기 방사되었다. Table 2 는 하이브리드 인공지지체의 공정조건을

나타낸다. Fig. 4 는 PCL 인공지지체와 Table 2 의 공정조건을 이용하여 제작 된 하이브리드 인공지지체의 SEM 사진을 보여준다. Fig. 4 (a, b)는 PCL 인공지지체의 모습을 보여준다. Fig. 4 (c, d)에서 필라멘트 각 층마다 50초 동안 전기 방사된 하이브리드 인공지지체의 모습을 보여준다. 하이브리드 인공지지체의 표면 및 필라멘트 각 층에 전기방사에 의해 만들어진 나노섬유가 고르게 분포되어 있다. Fig. 5 는 PCL 인공지지체와 전기방사로 결합된 하이브리드 인공지지체의 단면 SEM 사진을 보여준다. Fig. 5 (a, b)는 PCL 인공지지체의 단면을 보여준다. Fig. 5 (c, d)에서 필라멘트 각 층마다 50초 동안 전기 방사된 하이브리드 인공지지체의 단면 모습을 보여준다. 하이브리드 인공지지체의 층과 층 사이를 확인해본 결과, 전기 방사된 나노섬유들이 각 층마다 고르게 분포되어 있다. 인공지지체의 표면과 각 층마다 고르게 분포된 나노섬유에 의하여 높은 다공성을 지닌 하이브리드 인공지지체가 제작되었다. 따라서, PCL 인공지지체에 나노섬유를 8 wt%의 용액 농도와 5 kV의 전압일 때의 공정조건으로 제작 된 하이브리드 인공지지체가 더 높은 다공성을 보였다.

### 3.3 세포 증식 평가

세포 증식 평가는 PCL인공지지체와 필라멘트 각 층마다 10초, 30초 및 50초 동안 전기방사 된 하이브리드 인공지지체로 수행되었다. 하이브리드 인공지지체의 세포 증식 평가를 위하여 70% 에탄올을 이용하여 클린벤치에서 4시간 자외선 살균을 하였고, PBS를 이용하여 하이브리드 인공지지체 표면을 씻어준 후 배지에 2시간 동안 넣어 세포들이 잘 증착 할 수 있는 조건이 되도록 하였다. 준비된 하이브리드 인공지지체에 MG-63 세포를 파종하고 7일 동안 세포 증식 평가를 수행하였다. 세포 증식 평가는 Microreader (UVM 340, Elisa, USA)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. Fig. 6은 PCL 인공지지체와 전기 방사 시간에 따른 하이브리드 인공지지체의 세포 증식 결과를 보여준다. 세포 증식 실험의 기간이 1, 4, 7일차로 진행될수록 세포 증식은 더욱 향상되었다. 전기 방사된 시간이 증가할수록 OD 값은 PCL인공지지체와 필라멘트 각 층



**Fig. 6 Cell proliferation result of nanofiber-combined PCL scaffolds according to electrospinning time**

마다 10초, 30초 및 50초 동안 전기방사 된 하이브리드 인공지지체 각각 480%, 280%, 260%, 그리고 280% 증가되었고, 7일차 OD 값은 50초동안 전기방사 된 하이브리드 인공지지체가 가장 높게 나타났다. 따라서 나노섬유가 결합된 하이브리드 인공지지체가 PCL 인공지지체보다 뛰어난 세포증식을 보여줬으며, 전기방사 시간이 길수록 세포 증식이 좋은 것을 확인할 수 있었다. 추후 나노 섬유의 방향성을 제어함에 따라 세포 증식이 어떻게 되는지 평가하고 더 나아가 골 조직 재생 능력을 검증할 계획이다.

#### 4. 결 론

본 연구에서는 폴리머 적층 시스템의 듀얼 헤드 적층 기술을 이용하여 하이브리드 인공지지체를 제작하였다. PCL 용액의 농도와 인가전압을 공정 변수로 하여 나노섬유를 제작하였다. PCL 나노섬유는 1 cm의 TCD와 0.1 ml/h의 유량인 경우 8 wt%의 농도 및 5 kV의 인가전압에서 가장 일정한 선 두께를 가지는 공정조건임을 확인할 수 있었다. 그 결과, 용액의 농도가 증가하면 전기 방사된 나노섬유의 평균 직경이 증가하고, 인가전압이 증가하면 전기 방사된 나노섬유의 평균직경이 감소하는 결론을 얻었다. 자유 형상 제작 기반의 폴리머 적층 시스템의 듀얼 헤드 적층 기술을 이용하여 PCL 나노섬유가

일정한 선 두께 및 방향성을 가지는 하이브리드 인공지지체 제작 공정을 자체적으로 확립하였으며 근거리에서의 전기방사 공정을 통한 하이브리드 인공지지체 제작의 공정조건을 확인하였다. 전기방사 시간에 따른 하이브리드 인공지지체가 제작 되었고 이러한 하이브리드 인공지지체를 이용한 세포증식 평가를 통하여 7일간의 데이터를 분석하였다. 그 결과, 전기방사 시간이 증가할수록 세포증식이 증가하는 결과를 얻을 수 있었다. 향후 단일 PCL 인공지지체보다 나노 섬유가 결합된 PCL 하이브리드 인공지지체가 골 조직 재생으로의 적용 가능성이 뛰어날 것으로 기대된다.

#### 후 기

“이 논문은 2017년도 안동대학교 기본연구지원사업에 의하여 연구되었음”

#### REFERENCES

1. Zhao, X., Courtney, J. M., & Qian, H., “Bioactive materials in medicine : Design and applications”, Woodhead publishing in materials, 2011.
2. Mohanty, S., Larsen, L. B., Trifol, J., Szabo, P., Burri, H. V. R., Canali, C., ... & Wolff, A. “Fabrication of scalable and structured tissue engineering scaffolds using water dissolvable sacrificial 3D printed moulds.” *Materials science and engineering : C*, Vol. 55, pp. 569~578, 2015.
3. Qazi, T. H., Rai, R., & Boccaccini, A. R. “Tissue engineering of electrically responsive tissue using polyaniline based polymers : A review,” *Biomaterials*, Vol. 35, No. 33, pp. 9068~9086, 2014.
4. Yoshida, A., Chitcholtan, K., Evans, J. J., Nock, V., & Beasley, S. W. “In vitro tissue engineering of smooth muscle sheets with peristalsis using a murine induced pluripotent stem cell line,” *Journal of pediatric surgery*, Vol. 47, No. 2, pp. 329~335, 2012.
5. Wongwitwichot, P., Kaewsrichan, J., Chua, K. H., & Ruzzymah, B. H. I. “Comparison of TCP and TCP/HA hybrid scaffolds for osteoconductive

- activity," *The open biomedical engineering journal*, Vol. 4, pp. 279-285, 2010.
6. Sa, M. W., & Kim, J. Y. "Effect of various blending ratios on the cell characteristics of PCL and PLGA scaffolds fabricated by polymer deposition system," *International journal of precision engineering and manufacturing*, Vol. 14, No. 4, pp. 649-655, 2013.
  7. Ghasemi-Mobarakeh, L., Prabhakaran, M. P., Morshed, M., Nasr-Esfahani, M. H., & Ramakrishna, S. "Electrospun poly( $\epsilon$ -caprolactone)/gelatin nanofibrous scaffolds for nerve tissue engineering," *Biomaterials*, Vol. 29, No. 34, pp. 4532-4539, 2008.
  8. Peter, M., Kumar, P. T. S., Binulal, N. S., Nair, S. V., Tamura, H., & Jayakumar, R. "Development of novel  $\alpha$ -chitin/nanobioactive glass ceramic composite scaffolds for tissue engineering applications," *Carbohydrate polymers*, Vol. 78, No. 4, pp. 926-931, 2009.
  9. Martel-Estrada, S. A., Rodríguez-Espinoza, B., Santos-Rodríguez, E., Jiménez-Vega, F., García-Casillas, P. E., Martínez-Pérez, C. A., & Armendáriz, I. O. "Biocompatibility of chitosan/Mimosa tenuiflora scaffolds for tissue engineering," *Journal of alloys and compounds*, Vol. 643, pp. 119-123, 2015.
  10. Hayati, A. N., Hosseinalipour, S. M., Rezaie, H. R., & Shokrgozar, M. A. "Characterization of poly( $\epsilon$ -hydroxybutyrate)/nano-hydroxyapatite composite scaffolds fabricated without the use of organic solvents for bone tissue engineering application," *Materials science and engineering : C*, Vol. 32, No. 3, pp. 416-422, 2012.
  11. Zhao, L., Wu, Y., Chen, S., & Xing, T. "Preparation and characterization of cross-linked carboxymethyl chitin porous membrane scaffold for biomedical applications," *Carbohydrate polymers*, Vol. 126, pp. 150-155, 2015.
  12. Kim, J. Y., Yong, J. J., Park, E. K., Kim, S. Y., & Cho, D. W. "The fabrication of rapid prototype based 3D PCL and PLGA scaffolds using precision deposition system," *Tissue engineering and regenerative medicine*, Vol. 5, No. 3, pp. 506-511, 2008.
  13. Du, Y., Chen, X., Koh, Y. H., & Lei, B. O. "Facilely fabricating PCL nanofibrous scaffold with hierarchical pore structure for tissue engineering," *Materials letters*, Vol. 122, pp. 62-65, 2014.
  14. Ghasemi-Mobarakeh, L., Prabhakaran, M. P., Morshed, M., Nasr-Esfahani, M. H., & Ramakrishna, S. "Bio-functionalized PCL nanofibrous scaffolds for nerve tissue engineering," *Materials science and engineering : C*, Vol. 30, No. 8, pp. 1129-1136, 2010.
  15. Johnson, T., Bahrapourian, R., Patel, A., & Mequanint, K. "Fabrication of highly porous tissue-engineering scaffolds using selective spherical porogens," *Biomedical master engineering*, pp. 107-118, 2010.
  16. Mikos, A. G., & Temenoff, J. S. "Formation of highly porous biodegradable scaffolds for tissue engineering," *Electronic Journal of biotechnology*, Vol. 3, No. 2, pp. 2000.
  17. Goudouri, O. M., Theodosoglou, E., Kontonasaki, E., Will, J., Chrissafis, K., Koidis, P., ... & Boccaccini, A. R. "Development of highly porous scaffolds based on bioactive silicates for dental tissue engineering," *Materials research bulletin*, Vol. 49, pp. 399-404, 2014.
  18. Kim, S. E., Yun, H. S., Hyun, Y. T., Shin, J. W., & Song, J. J. "Nano-hydroxyapatite/poly  $\epsilon$ -caprolactone composite 3D scaffolds for mastoid obliteration," *Journal of Physics : Conference Series*, 2008.
  19. Oryan, A., Alidadi, S., Moshiri, A., & Maffulli, N. "Bone regenerative medicine: classic options, novel strategies, and future directions," *Journal of orthopaedic surgery and research*, 2014.
  20. Dhandayuthapani, B., Yoshida, Y., Maekawa, T., & Kumar, D. S. "Polymeric Scaffolds in Tissue Engineering Application: A Review," *International journal of polymer science*, 2011.

21. Kim, J. Y., Yoon, J. J., Park, E. K., Kim, S. Y., & Cho, D. W. "Fabrication of 3D PCL/PLGA/TCP bio-scaffold using multi-head deposition system and design experiment," Korean society for precision engineering, Vol. 26, No. 1, pp. 146~154, 2008.
22. Vroman, I., & Tighzert, L. "Biodegradable polymers," Materials, 2009.
23. Vasita, R., & Katti, D. S. "Nanofibers and their applications in tissue engineering," International journal of nanomedicine, pp. 15~30, 2006.
24. Yao, J., Bastiaansen, C. W., & Peijs, T. "High strength and high modulus electrospinning nanofibers," fibers, Vol.2, No. 2, pp. 158~186, 2014.
25. Ku, S. H., Lee, S. H., & Park, C. B. "Synergic effects of nanofiber alignment and electroactivity on myoblast differentiation," Biomaterials, Vol. 33, No. 26, pp. 6098~6104, 2012.
26. Chaurey, V., Block, F., Su, Y. H., Chiang, P. C., Botchwey, E., Chou, C. F., & Swami, N. S. "Nanofiber size-dependent sensitivity of fibroblast directionality to the methodology for scaffold alignment." Acta biomaterialia, Vol. 8, No. 11, pp. 3982~3990, 2012.