

키토산 섬유를 담체로 이용한 라이소자임 효소의 고정화

Immobilization of Lysozyme from Hen Egg by Crosslinking Method onto Chitosan Non-woven

*Corresponding author

So Hee Lee

(sohee.lee@gnu.ac.kr)

이소희*

경상대학교 의류학과/기초과학연구소

So Hee Lee*

Department of Clothing and Textiles/Research Institute of Natural Science, Gyeongsang National University, Jinju, Korea

Received_November 27, 2018

Revised_December 07, 2018

Accepted_December 11, 2018

Abstract Immobilization of lysozyme on chitosan non-woven using glutaraldehyde(GA) was investigated. For this, 100 % chitosan non-woven was prepared as novel support for the enzyme immobilization. In addition, free lysozyme activity was examined depending on various pH and temperature by measuring time. Moreover, the optimum immobilization conditions depending on various pH, temperature, immobilization time and lysozyme concentration was evaluated. In addition, thermal stability and storage stability of immobilized lysozyme were measured. The characteristics of immobilized lysozyme was examined by FT-IR, surface morphology, and MTT assay. The results are follows: the optimal immobilization of lysozyme were pH 7.0, 25 °C, lysozyme concentration 1.5 mg/ml, immobilization time 240 min. The immobilized lysozyme showed higher thermal stability than the free trypsin. The immobilized lysozyme activity was retained 80 % of its initial activity at 4 °C over 30 days of storage. The lysozyme was immobilized effectively on chitosan non-woven by observation of surface morphology.

Textile Coloration and Finishing

TCF 30-4/2018-12/264-274

©2018 The Korean Society of

Dyers and Finishers

Keywords immobilization, chitosan, non-woven, lysozyme, glutaraldehyde

1. 서 론

효소 고정화는 효소를 담체에 흡착, 가교, 포괄시킴으로써 적용의 편리성, 이용성, 안정성 및 재사용성 등을 향상시키는 방법으로 효소를 고정화하면 효소 활성의 pH와 온도 안정성 및 저장 안정성을 증가시킬 뿐 아니라 수용액 상에서 효소를 용이하게 분리할 수 있어 재사용이 가능하므로 편리하고 경제적이다^{1,2)}. 이에 효소 고정화 기술에 대한 연구는 효소의 한계점을 극복할 수 있는 방안으로서 꾸준히 연구되고 있다³⁻⁸⁾. 효소 고정화 방법은 크게 담체 결합법과 포괄법으로 분류된다.

포괄법은 겔의 미세한 격자 혹은 고분자 피막 안에 효소를 집어넣어 효소를 고정화하는 방법으로, 한정된 공

간 내에서 효소의 접힘이나 변성이 제한되어 안정성이 증가할 수 있으나, 제한적인 공간 내에서 효소의 활성이 영향을 받는다^{9,10)}.

담체 결합법 중 물리적 흡착에 의해 효소를 고정화하는 방법은 효소가 담체에 흡착되어 고정화 되지만 효소와 담체간의 결합이 약하여 온도, pH, 염 농도 등의 외부 요인에 의해 흡착된 효소가 쉽게 분리된다^{9,10)}. 담체 결합법 중 공유결합에 의해 효소를 고정화 하는 방법은 효소의 활성에 직접 관여하지 않은 아미노산 잔기와 담체 표면에 유도된 기능기 사이의 공유결합에 의해 효소를 고정화하는 방법으로 가장 널리 쓰이고 있는 방법이다^{9,10)}. 공유결합에 의한 고정화는 담체와 효소의 결합이 강해 효소가 반응 중에 쉽게 분리되지 않고, 기질과

접촉이 용이하며 효소의 열 안정성이 증가되는 장점을 가진다⁹⁻¹¹. 공유결합에 의한 효소 고정화 시, 가교제로 주로 사용되는 글루타알데하이드는 효소와 담체 사이의 아미노기와 공유결합을 형성하며, 글루타알데하이드에 의한 공유결합은 온도 변화에 대한 효소 단백질의 변성을 방지한다¹²⁻¹⁵.

고정화 담체는 고정화된 효소의 활성 및 안정성 등과 같은 고정화 효소의 성질에 영향을 미치기 때문에 적절한 고정화 담체의 선택이 중요하다¹⁵. 고정화 담체로 사용되기 위해서는 높은 기계적 강도, 단백질 친화성, 물리/화학적 안정성 및 성형의 용이성 등이 요구된다^{10,16,17}. 키토산은 β-1,4-글리코시드 결합의 선형 다당류로 효소와의 생체 적합성이 우수하고, 항박테리아 성질, 무독성, 친수성, 높은 기계적 강도, 단백질 친화력 및 생분해성 등의 특성뿐만 아니라 글루타알데하이드와 결합할 수 있는 주 아민기와 같은 관능기가 풍부하여 효소 고정화 담체로 널리 사용되고 있다¹⁸⁻²³. 고정화 담체 중, 부직포 직물 등과 같은 고체담체는 고정화 시, 넓은 비표면적으로 반응할 뿐 아니라, 다공성 구조로 인하여 높은 친화력이 있기 때문에 우수한 적용성을 부여한다²⁴⁻²⁶. 특히, 키토산 100%로 제조된 부직포 담체의 경우 반응할 수 있는 비표면적이 크고, 기계적 강도, 화학적 안정성, 효소 고정화 담체로서의 durability가 우수하다^{27,28}. 또한 경량성, 가공 및 성형에 용이하여 섬유산업에서 각광받고 있다^{20,22}. 또한, 키토산 부직포의 경우 높은 생체적합성, 우수한 통기성, 흡수성이 우수할 뿐 아니라, 유연성 및 비항원성에 기인한 피부 적합성 등으로 각광받고 있는 재료이다.

라이소자임(EC 3.2.1.17)은 N-아세틸뮤라민산과 N-아세틸글루코사민의 1,4-β-결합을 가수분해하는 효소로, 뮤라미다제라고도 한다. 라이소자임은 박테리아에 대한 용해성이 있어 세포벽의 펩티도글리칸의 용해에 주로 사용되며, 특히 그람 양성균에 대한 항미생물성질이 뛰어나다.

일반적으로 라이소자임은 난백에서 추출하며, 세균의 세포벽에 들어있는 다당류를 가수분해함으로써 세

균의 감염을 막는 역할을 한다. 알칼리성 단백질로, 55℃에서도 열변성 없이 우수한 활성을 보이기 때문에 라이소자임을 사용하여 다양한 담체에 고정화를 시도한 연구가 다수 보고되었다²⁹⁻³¹. 그러나 외부 조건에 의해 효소의 고정화 효율 및 활성이 저하될 수 있기 때문에 라이소자임을 고정화 효소로 이용할 경우, 최적의 고정화 조건 설정이 필요하다.

이에 본 연구에서는 생체재료용 텍스타일 분야의 창상치료제로 사용하기 위한 목적으로 글루타알데하이드를 이용한 공유결합을 통해 키토산섬유를 담체로 하여 라이소자임을 고정화하는 방법을 연구하고자 한다. 이를 위하여 난백에서 추출한 라이소자임을 사용하였다.

연구내용으로 첫째, 다양한 온도 및 시간의 조건에서 자유 라이소자임의 활성을 측정하였다. 둘째, 고정화 시, pH, 고정화 온도, 라이소자임의 농도 및 시간 조건 변화에 따라 라이소자임의 활성을 측정하여 최적 고정화 조건을 평가하였다. 셋째, 고정화된 라이소자임의 온도안정성, 저장안정성을 평가하였다. 넷째, 라이소자임이 고정화된 키토산 부직포의 분광학적 특성 변화, 표면 변화 및 세포독성 등의 변화를 측정하였다. 이를 통해, 라이소자임이 고정화된 창상치료용 부직포를 개발하고자 한다.

2. 실험

2.1 시료 및 시약

본 연구에서 (주)텍산메드테크에서 제공받아 사용한 키토산 부직포 시료의 특성은 Table 1과 같으며, 라이소자임의 특성은 Table 2와 같다.

가교 및 효소 처리 시, pH를 일정하게 유지하기 위하여 버퍼용액을 제조해서 사용하였으며, 버퍼로 인산수소칼륨(potassium phosphate monobasic, Sigma Chemicals Co., USA)과 인산일수소칼륨(potassium phosphate dibasic, Sigma Chemicals Co., USA), 탄산나트륨(sodium carbonate, Duksan Pure Chemicals Co., Korea)과 탄산수소나트륨

Table 1. Characteristics of chitosan non-woven

| Composition(%) | Thickness(mm) | Weight(g/m ²) | Manufacturing method | Type |
|----------------|---------------|---------------------------|----------------------|-----------|
| Chitosan 100 | 0.35 | 88.5 | Needle punching | Spun-lace |

Table 2. Properties of enzyme

| Enzyme | Source | Activity | Form | Manufacturer |
|---------------------------|----------------------|-------------|-------------------------|---------------------|
| Lysozyme (EC 3.2.1.17) | Chicken egg white | 70,000 U/mg | Powder (crystalline) | Sigma Chemicals Co. |

(sodium bicarbonate, Duksan Pure Chemicals Co., Korea)을 사용하였다. 가교제로 25% 글루타알데하이드(Glutaraldehyde, Junsei Chemical Co., Japan)를 사용하였으며, 라이소자임의 활성 측정을 위한 기질로 *Micrococcus lysodeikticus*(ATCC 4986, Sigma Chemicals Co., Korea)를 사용하였다. 이상의 시약은 모두 1등급을 사용하였다.

2.2 글루타알데하이드에 의한 가교

키토산 부직포의 가교는 5×5cm 크기의 250mg의 키토산 부직포를 액비 1:50, 25mM, pH 10의 버퍼용액에 넣고, 3%(v/v)의 글루타알데하이드 용액으로 25℃, 110rpm으로 항온진탕수조(BS-31, Jeio Tech., Korea)에서 처리하였다. 글루타알데하이드 가교한 키토산 부직포는 해당 버퍼로 2회 수세 후, 증류수로 3회 수세하여 잔여 가교용액을 제거한 후, 상온에서 건조하였다³²⁾.

2.3 라이소자임의 활성 분석

라이소자임의 활성분석은 *M. lysodeikticus* 9mg을 0.1M, pH 7.0의 인산버퍼 30ml에 용해시킨 후, 용해된 기질 용액 2.9ml에 라이소자임 용액 0.1ml를 첨가한 후, 상온에서 5분간 인큐베이션하여 측정하였다^{33,34)}.

라이소자임의 활성은 UV-Vis spectrophotometer(M-3100, Scinco. Ltd., Korea)를 사용하여 450nm에서 기질의 흡광도 변화량 측정을 통해 계산하였다.

2.4 자유 라이소자임의 pH 및 온도의 영향

자유 라이소자임의 pH 및 온도에 따른 영향은 라이소자임 1.0mg/ml를 pH 4.0~10.0, 온도 25~60℃로 조건을 변화시켜 60분 동안 측정하였다.

2.5 라이소자임 고정화

글루타알데하이드가 가교된 키토산 부직포에 라이소

자임을 고정화하였다. 라이소자임의 고정화는 글루타알데하이드 가교된 키토산 부직포를 액비 1:50, 25mM의 버퍼용액에 넣고, pH 4.0~10.0, 고정화 온도 25~65℃, 라이소자임 농도 0.1~5.0mg/ml, 고정화 시간 10~1440분으로 변화시켜 항온진탕수조에서 110rpm으로 처리하였다. 라이소자임 고정화된 키토산 부직포의 활성은 증류수로 잔여효소가 검출되지 않을 때까지 여러 번 수세한 후, *M. lysodeikticus*를 기질로 하여 450nm에서의 초기흡광도 값으로 계산하였다.

2.6 고정화된 라이소자임의 안정성 평가

자유 및 고정화된 라이소자임의 온도안정성은 30~60℃의 범위 내에서 자유 라이소자임 0.5mg/ml, 혹은 라이소자임 0.5mg/ml이 고정화된 키토산 부직포 0.15g을 온도에 따라 처리 시, 시간에 따른 활성 변화로 평가하였다. 저장 안정성은 라이소자임이 고정화된 키토산 부직포를 4℃에서 30일간 보관한 후, 5일 간격으로 고정화된 라이소자임의 활성 변화를 통해 평가하였다.

2.7 세포독성 평가

RPMI 1640 배지에서 배양된 세포를 세포농도가 5×10⁴ cells/well이 되게 24-well plate에 seeding 하였다. Seeding 후 16-18시간이 지나 80% confluent 하게 자라면 배지를 제거한 후, 준비된 시료를 각각 0.5ml 씩 처리하였다. 그 후 인큐베이터(37±1℃, 5±1% CO₂)에서 48시간 배양하였고, 세포의 상태를 현미경으로 관찰하였다. 현미경 관찰 후 MTT assay를 위해 5mg/ml이 되게 MTT reagent를 증류수에 녹여 0.2µm syringe filter로 filtering 한 후 각 well에 0.5mg/ml이 되게 처리하였다. 처리한 5시간 후 배지를 모두 제거하고 DMSO 500µl로 crystal을 녹인 후 96-well plate에 100µl씩 옮겨 담아 490nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정한 후 용매 대조군의 세포생존율을 100%로 하여 각 시료의 상대적 인 세포생존율을 구하였다.

2.8 분광학적 특성 평가

미처리, 가교처리 및 고정화된 키토산 부직포 표면의 분광학적 분석은 적외선 분광광도계(FT-IR, FT-IR 670, Jasco Inc., USA)를 이용하여 비교·관찰하였다.

2.9 표면특성 평가

미처리, 가교처리 및 고정화된 키토산 부직포의 표면 형태는 주사 전자 현미경(JSM-7600F, JEOL KOREA LTD., Japan)을 사용하여 비교, 관찰하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1 자유 라이소자임의 pH 및 온도에 따른 활성 변화

Figure 1은 25℃에서 pH별 시간에 따른 자유 라이소자임의 활성 결과이다. Figure 1에 나타난 바와 같이 pH가 4.0에서 증가함에 따라 자유 라이소자임의 활성은 증가하였으며, pH 6.0~9.0 영역에 걸쳐 pH의 활성은 우수하게 나타났다. 특히, pH 6.0에서 효소의 활성이 가장 우수하였고, pH 6.0 이상에서는 점차적으로 효소의 활성이 감소하였다. 이는 선행연구의 결과³⁵⁾와 일치한다. 그러나 전반적으로 pH에 따른 활성 시, 처리 시간이 증가함에 따른 효소 활성의 차이는 크게 나타나지 않았다.

Figure 2는 pH 6에서 온도에 따른 자유 라이소자임의 활성 결과이다. 자유 라이소자임의 활성은 25℃에서 온도가 증가함에 따라 증가하다가 30℃에서 최대 활성을 나타낸 후, 다시 온도가 증가함에 따라 감소하는 경향을 나타냈다. 특히, 25~35℃ 사이에서는 시간이 지남에 따라 활성이 증가하다가 일정 시간 이상이 되면

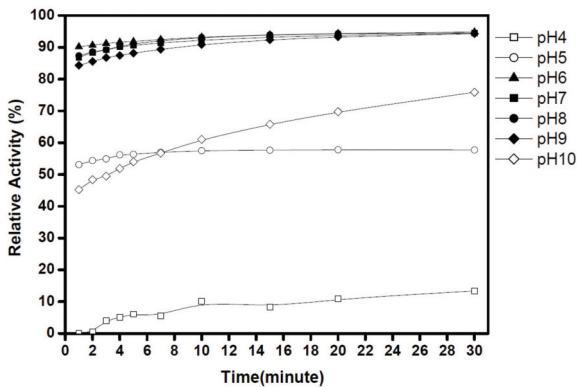


Figure 1. The effects of pH on the free lysozyme activity depending on time.

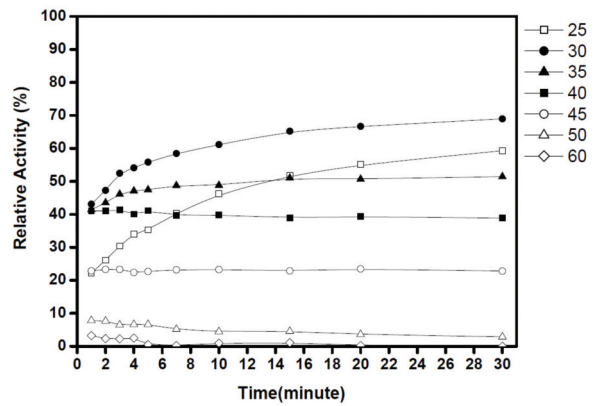


Figure 2. The effect of temperature on the free lysozyme activity depending on time.

증가속도가 둔화되었다. 그러나 40℃ 이상의 온도에서는 활성 정도의 차이만 관찰될 뿐, 시간에 따른 활성 변화는 크게 나타나지 않았다.

3.2 pH, 온도, 라이소자임 농도 및 고정화 시간에 따른 라이소자임 고정화

고정화 용액의 pH는 담체와 공유결합 하는 효소의 구조 및 담체 표면의 관능기의 작용에 영향을 미칠 수 있기 때문에 고정화 시, 적절한 용액의 pH 선택은 중요하다¹⁵⁾.

Figure 3은 키토산 담체에 글루타알데하이드에 의해 가교 후, 라이소자임을 고정화 할 때, 라이소자임 농도 2.5mg/ml, 25℃, 4시간의 조건에서 고정화 용액의 pH(4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0) 변화에 따른 라이소자임의 효소 활성 결과이다. 고정화 시, 용액의 pH 조건을 변수로 하여 각 pH 별로 고정화를 완료하였으며, 최적의 고정화 용액의 pH는 고정화가 완료된 후에 라이소자임이 고정화된 키토산 담체를 회수한 후, 잔여용액에 라이소자임의 기질을 삽입하여 흡광도를 측정하였다. Figure 3에 나타난 바와 같이, 라이소자임의 활성은 pH 7.0 이하에서는 비슷하게 나타났으며, 알칼리 조건으로 pH 조건이 이동할수록 활성이 급격히 감소하였다. 이는 효소의 최적 pH 조건 이외의 pH에서는 고정화된 효소의 활성이 급격히 감소하였다는 선행연구 결과¹⁶⁾와 일치한다. 라이소자임의 고정화 시, 산성조건인 pH 4.0~5.0에서 고정화를 한 담체의 경우, 고정화 후, 표면이 항변 되는 것으로 나타나 산성 조건하에서는 라이소자임이 활성하지 못함을 알 수

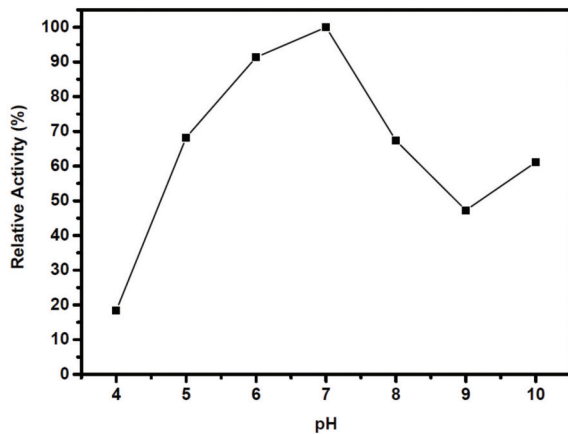


Figure 3. The effects of pH on the immobilized lysozyme activity.

있다. 자유 라이소자임의 경우, pH 6.0~9.0 사이의 조건 중, pH 6.0에서 최대 활성을 보인 반면, 고정화된 라이소자임의 경우, pH 7.0부터 고정화가 잘 된 것으로 보아, 고정화 시, 라이소자임의 최적 활성 pH가 시프트 됨을 확인하였다. 이는 pH 약 5.5에서 자유 라이소자임의 최대 활성이 나타난 후, 고정화 한 경우, pH 6.0으로 최대 활성 조건이 시프트된 선행연구 결과³³⁾와도 일치한다. 즉, 고정화된 효소에서 pH-활성 프로파일은 알칼리성 조건으로 이동하였는데, 이는 키토산 담체 위에 고정화된 라이소자임의 경우, 효소 용액의 pH가 보다 낮은 이온농도로 구성되어 있기 때문에 알칼리성의 pH조건으로 최대 활성이 이동된 것으로 보인다³³⁾.

고정화 시, 용액의 온도는 효소적 활성에 영향을 미치는 중요한 요인³⁶⁾으로 일반적으로 37°C의 온도 범위에서 효소적 활성이 우수하며, 온도가 일정 온도이상으로 증가함에 따라 효소의 사활로 인하여 효소 활성은 정지된다. 고정화 시, 용액의 온도변화에 따라 고정화를 실시하였으며, 고정화가 완료된 후에 고정화된 담체를 회수한 다음, 잔여용액 내 존재하는 효소와 기질의 반응을 통해 최적의 온도 조건을 평가하였다.

Figure 4는 키토산 담체에 글루타알데하이드에 의해 가교 후, 라이소자임을 고정화 할 때, pH 7.0, 라이소자임 농도 2.5mg/ml, 25°C의 조건에서 고정화 용액의 온도(30, 35, 40, 45, 50, 60°C) 변화에 따른 라이소자임의 활성 결과이다. Figure 4에 나타난 바와 같이 고정화된 라이소자임의 경우 온도가 증가함에 따라 점차 증가하다가 35°C에서 최대 활성을 보인 후, 그

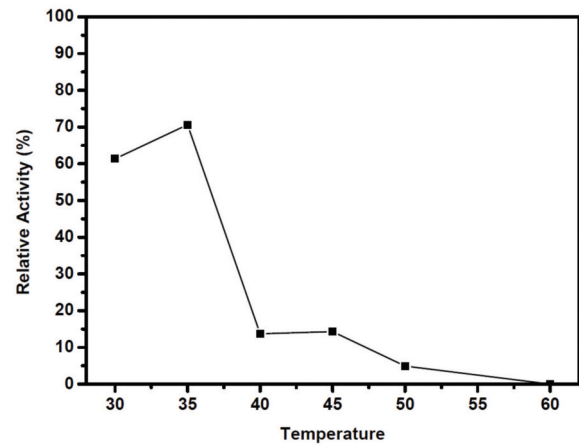


Figure 4. The effects of temperature on the immobilized lysozyme activity.

이상의 온도로 처리 시, 더 이상의 활성이 나타나지 않았다. Figure 2에서와 같이 자유효소의 경우, 30°C에서 최대 활성을 보인 후, 점차 감소하였으나, 고정화된 라이소자임의 경우, 35°C에서 최대 활성이 나타나, 고정화에 의해 온도가 증가해도 효소의 활성이 유지된 것으로 판단된다. 이는 키토산과 라이소자임의 다지점 공유결합의 형성에 의해 효소 분자가 높은 온도에서도 활성이 유지되기 때문으로, 더 높아진 온도에서도 훨씬 안정적으로 반응한 것으로 보인다³³⁾.

최적의 고정화 시간은 고정화 시, 고정화 시간변화에 따라 고정화를 실시하였으며, 일정 시간동안 고정화를 한 후, 고정화 용액 내 라이소자임이 고정화된 담체를 회수한 다음, 잔여용액에 기질을 삽입하여 기질의 활성 정도를 평가하였다. Figure 5는 키토산 담체에 글루타알데하이드에 의해 가교 후, 라이소자임을 고정화 할 때, pH 10.0, 라이소자임 농도 2.5mg/ml, 40°C의 조건에서 고정화 시간(10, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 240, 1440분) 변화에 따른 라이소자임의 활성 결과이다. Figure 5에 나타난 바와 같이 고정화 시간이 증가함에 따라 효소의 활성은 점차적으로 증가하다가 240분 동안 고정화 시, 라이소자임은 키토산 담체 표면에 거의 고정화 되었으며, 이에 따라 잔여용액 내 기질과 반응할 수 있는 효소가 잔존하지 않아 기질과의 반응하지 않았다. 또한 240분 이상의 시간으로 고정화를 해도 더 이상의 효소는 라이소자임의 표면에 결합되지 않았다. 이를 통해, 라이소자임을 키토산 담체에 고정화 시, 최적 고정화 시간은 240분이며, 그 이상의 시간으로 고정화하는 것은 무의미하다.

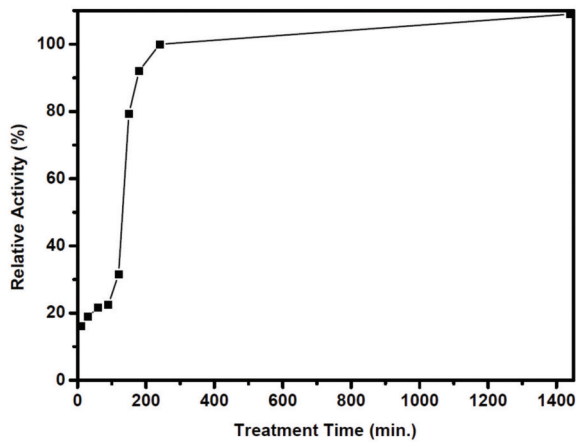


Figure 5. The effects of immobilization time on the immobilized lysozyme activity.

고정화 시 사용되는 효소는 양이 증가할수록 활성은 증가하며, 일정 이상의 농도가 고정화에 사용이 되어도, 담체와 결합할 수 있는 효소는 한정적이므로, 최적의 고정화 농도를 설정하는 것은 경제성 측면에서 중요한 문제이다. 키토산 담체에 고정화 시, 최적의 라이소자임 필요 농도는 pH 10.0, 40°C의 240분 동안 고정화 시, 사용되는 라이소자임의 농도(0.1, 0.5, 0.7, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 5.0mg/ml) 변화에 따라 측정하였다. Figure 6은 농도별로 고정화 된 라이소자임의 활성 결과이다. Figure 6에 나타난 바와 같이 낮은 농도 조건에서는 고정화에 사용되는 효소량이 너무 적어 담체 표면에 모두 고정화가 되었기에 잔여 용액에는 기질과 반응할 수 있는 라이소자임이 잔존하지 않음을 알 수 있다. 그러나 라이소자임의 농도가 증가함에

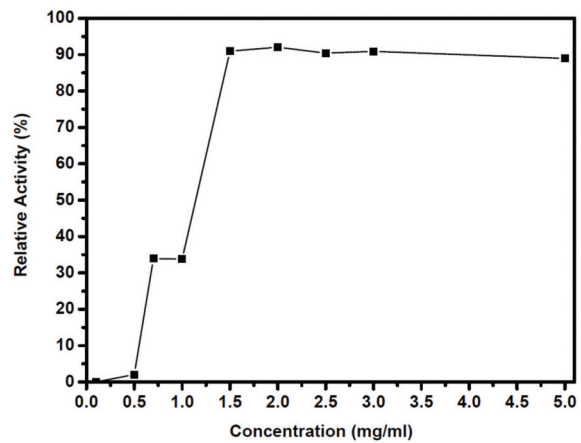


Figure 6. The effects of lysozyme concentration on the immobilized lysozyme activity.

따라 용액 내 잔존 효소가 점차 늘어나 기질과 반응할 수 있는 효소가 검출되기 시작하였다. 농도가 증가함에 따라 활성은 점차 증가하였으며, 1.5mg/ml 이상의 농도에서는 더 이상의 활성 증가가 나타나지 않았다.

3.3 고정화된 라이소자임의 안정성

Figure 7은 라이소자임이 고정화 된 키토산 부직포의 온도에 따른 안정성 결과이다. 온도에 따른 안정성은 고정화 된 키토산 부직포를 일정한 온도에서 처리 시, 시간에 따른 활성 감소변화를 통해 측정하였다. Figure 7에 나타난 바와 같이, 고정화가 잘 되는 30-50°C의 온도에서는 시간이 경과하여도 뚜렷한 활성 감소는 관찰되지 않았다. 그러나 60°C 이상의 온도에서는 해당 온도에서 처리 시간이 증가할수록 활성은 급감

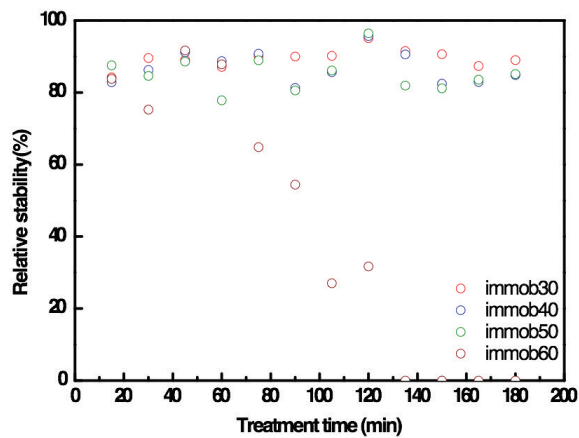


Figure 7. The thermal stabilities of immobilized lysozyme.

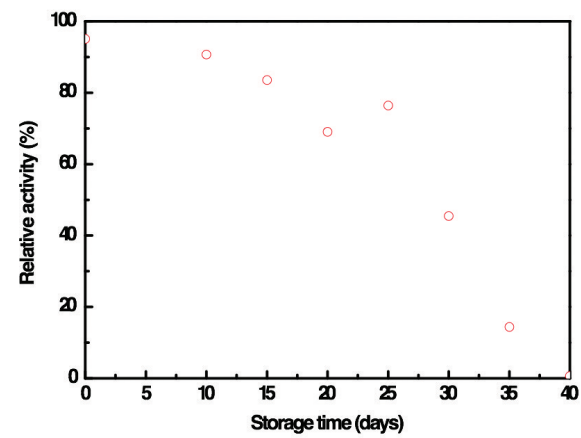


Figure 8. Storage stabilities of immobilized lysozyme.

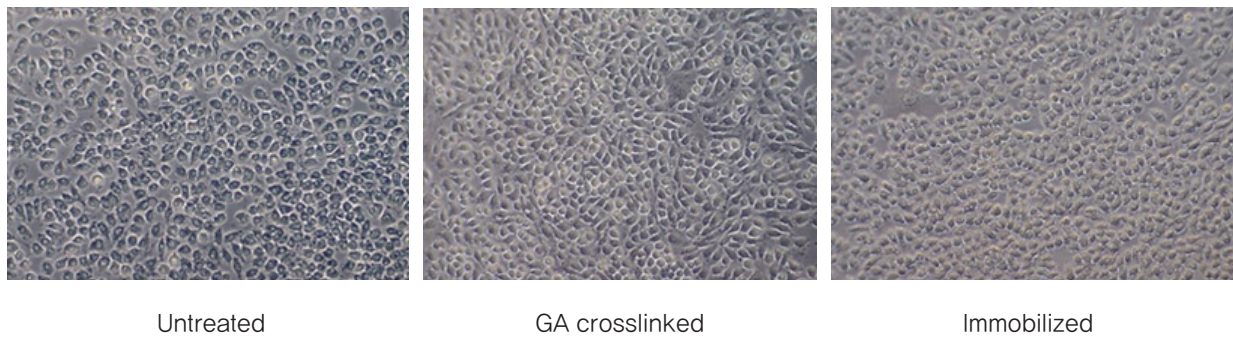


Figure 9. Antimicrobial effects of the lysozyme immobilized chitosan non-woven.

하여, 약 135분 경과 시, 고정화 된 효소는 완전히 활성을 정지함을 알 수 있다. 이를 통해, 자유효소의 경우, 30℃에서 반응하고, 효소 고정화는 35℃의 온도에서 진행하였으나, 실제 고정화된 효소의 경우, 고온에서도 활성이 유지됨을 확인하였다. 즉, 열 안정성은 키토산 부직포에 라이소자임을 고정화시킴으로써 증가하였다. 이는 고정화로 인해 라이소자임이 높은 온도에서 고차 구조 변화 및 실활이 제한되고, 라이소자임의 구조적 강성이 증가되었기 때문이다¹⁵⁾. 효소 고정화 방법 중, 공유결합에 의해 고정화된 효소는 자유 효소에 비해 열에 의한 변성 및 실활에 강하며¹⁵⁾, 특히, 라이소자임과 키토산 부직포간의 강한 결합이 라이소자임을 열에 의한 구조적 변성으로부터 보호하여 열에 대한 높은 안정성을 부여한 것으로 판단된다^{2,37,38)}.

Figure 8은 최적 조건에서 라이소자임이 고정화 된 키토산 부직포의 저장 안정성 결과이다. 안정성은 효소 고정화의 응용분야에서 가장 중요한 요건 중 하나이다. 저장 안정성의 경우 4℃에서 약 40일간 평가하였다. Figure 8에 나타난 바와 같이, 저장 안정성의 경우, 저장일수가 증가함에 따라 효소의 안정성은 점차 감소하였지만, 15일 이내에 초기 활성의 약 80% 이상이 잔존하는 것으로 나타났다. 즉, 담체와 효소간의 다지점결합에 의해 효소에 높은 구조적인 안정성이 부여되어³³⁾ 자유효소에 비해 활성 손실이 적은 것으로 판단된다. 그러나 저장 15일 이후로는 뚜렷한 활성 감소가 나타났으며, 저장 30일 이후에는 활성의 50%가 감소하였고, 저장 40일 이후에는 효소가 전혀 활성하지 않았다. 이는 효소와 담체간의 강한 공유결합에도 불구하고 아미노기와 알데하이드기 사이의 반응 및 위 반응으로 형성된 Schiff's 염기가 가역적이므로 보관 기간이 일정 기간 이상 길어짐에 따라 고정화 트립신의 활성 저하가

일어난 것으로 판단된다³⁾. 위 결과를 통해 글루타알데하이드 가교한 키토산 부직포에 공유결합으로 고정화된 라이소자임의 저장성은 4℃에서 30일 보관 후에도 약 50%의 활성을 유지함을 알 수 있다.

3.4 라이소자임 고정화된 키토산 부직포의 물성

Figure 9는 라이소자임이 고정화 된 키토산 부직포의 세포독성 테스트 결과이다. Figure 9에 나타난 바와 같이, 형태적 변화에 따른 큰 차이는 나타나지 않았다.

Figure 10은 라이소자임이 고정화 된 키토산 부직포에서의 세포 생존율 결과로, Figure 10에 나타난 바와 같이, 미처리된 키토산에 비해 라이소자임이 고정화된 키토산 부직포에서의 세포 생존율은 1%로 미미한 증가를 보였다. 그러나 라이소자임 고정화에 의해 세포 생존이 크게 증가했다고 보기에는 다소 어려움이 있으며, 세포 생존율을 올릴 수 있는 추가적인 방법에 대한 연구가 필요하다.

Figure 11은 키토산 부직포의 적외선 분광 분석 결

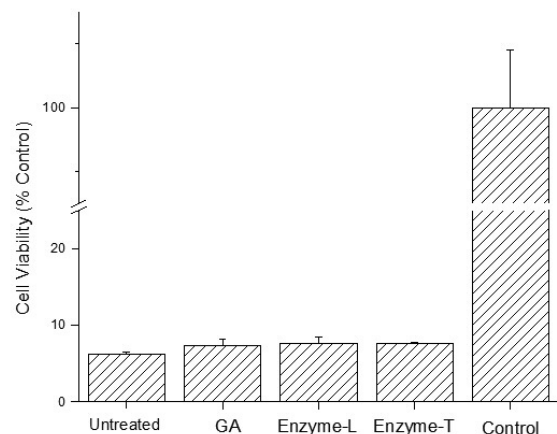


Figure 10. Cell viability of the chitosan non-woven.

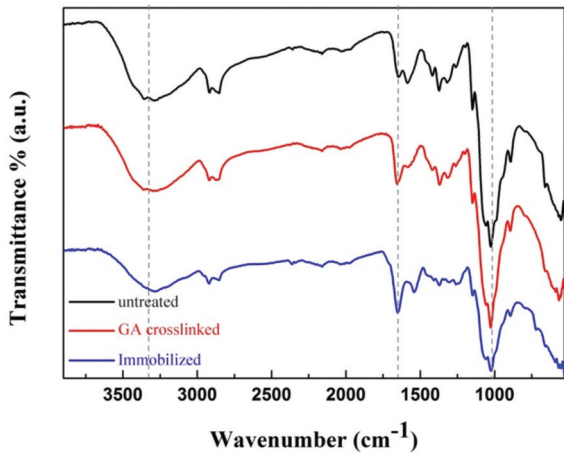


Figure 11. FT-IR spectrometer of chitosan non-woven.

과이다. 미처리 키토산 부직포, 글루타알데하이드를 이용한 가교 후, 라이소자임 고정화 후의 표면 변화를 측정하였으며, 그 결과 가교 및 효소 고정화에 의해 1660~1680cm⁻¹ 범위에서 피크의 변화가 관찰되고, 피크의 세기가 커짐을 알 수 있다. 이는 글루타알데하이드의 알데하이드기와 키토산 부직포섬유의 아미노기가 결합한 후, 라이소자임의 고정화에 의해 효소내 아미노기와 글루타알데하이드의 알데하이드기가 결합하게 됨에 따라 공유결합 내 C=N 결합이 생기기 때문이다³⁹⁾. 따라서 키토산 부직포에 글루타알데하이드 가교 및 라이소자임의 고정화가 효과적으로 이루어짐을 확인하였다.

Figure 12는 키토산 부직포의 표면관찰 결과로, 미처리 키토산 부직포, 글루타알데하이드를 이용한 가교 후, 라이소자임 고정화 후의 표면 변화를 측정하였다. Figure 12에 나타난 바와 같이, 미처리 키토산 부직포는 표면이 매끄러운데 반해, 라이소자임의 고정화에 의

해 표면에 작은 알갱이들이 흡착된 형태로 변함을 알 수 있다. 표면 거칠기의 증가는 글루타알데하이드 가교한 부직포 표면의 트립신 고정화에 의한 것으로 판단되며^{40,41)}, 작은 알갱이들이 흡착된 표면은 트립신 단백질 결정의 재결정화에 의한 것으로 보인다^{17,39,42)}. 이를 통해 글루타알데하이드를 이용한 라이소자임의 고정화가 잘 이루어짐을 확인하였다.

4. 결 론

본 연구는 생체재료용 텍스타일 분야의 창상치료제로 사용하기 위한 목적으로 글루타알데하이드를 이용한 공유결합을 통해 키토산 섬유를 담체로 하여 라이소자임을 고정화하였다. 이를 위하여 난백에서 추출한 라이소자임을 사용하여 다양한 온도 및 시간의 조건에서 자유 라이소자임의 활성을 측정하였다. 또한 라이소자임의 고정화 시, pH, 고정화 온도, 라이소자임의 농도 및 시간 조건 변화에 따른 최적 고정화 조건을 설정하였다. 고정화된 라이소자임의 온도안정성, 저장안정성을 평가하고, 라이소자임이 고정화된 키토산 부직포의 분광학적 특성 변화, 표면 변화 및 세포독성 등의 변화를 측정하였다.

실험결과, 최적의 고정화 조건은 pH 7.0, 35℃, 리소자임 농도 1.5mg/ml, 고정화 시간 240분이다. 고정화된 라이소자임은 자유 라이소자임에 비해 온도 안정성은 매우 우수하였다. 특히, 고정화된 라이소자임은 60℃의 고온에서도 최대 한 시간가량 초기 활성의 약 80%를 유지하는 등, 우수한 활성을 나타내 고정화에 의해 라이소자임의 열 안정성은 향상되었다. 고정화된 라이소자임은 4℃에서 30일 보관 후에도 효소의 활성이 유지되었다. 표면관찰을 통해 글루타알데하이드

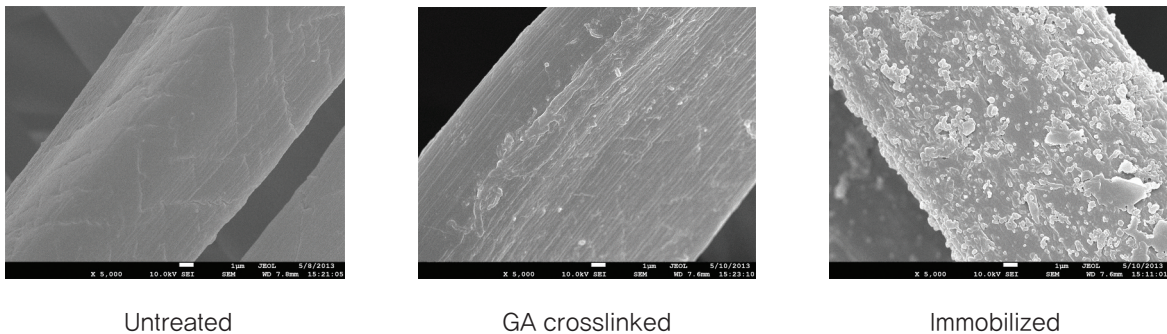


Figure 12. FE-SEM analysis of the chitosan non-woven.

가교한 키토산 부직포에 라이소자임이 고정화되었음을 확인하였다. 표면관찰결과, 최적의 활성 조건에서 표면에 가교결합 되었으며, 고정화 라이소자임에 의해 표면이 원형상의 물질이 생성되는 것을 확인하였다. 이상의 연구를 통해, 글루타알데하이드를 이용해 키토산 부직포가 고정화 담체로서 활성하고 라이소자임이 효과적으로 고정화됨을 확인하였다. 본 연구를 통해 효소 고정화를 이용한 기능성 섬유소재의 개발 가능성을 확인하였으며, 본 연구 결과는 효소 고정화를 이용하여 다기능성 섬유소재 개발 연구에 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 글

이 성과는 2014년도 과학기술정보통신부의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임(No. NRF-2014R1A1A1005314).

References

1. S. Guedidi, Y. Yurekli, A. Deratani, P. Dejardin, C. Innocent, S. A. Altinkaya, S. Roudesli, and A. Yemencioğlu, Effect of Enzyme Location on Activity and Stability of Trypsin and Urease Immobilized on Porous Membranes by using Layer-by-layer Self-assembly of Polyelectrolytes, *J. of Membrane Science*, **365**, 59(2010).
2. R. Wu, B. H. He, G. L. Zhao, L. Y. Qian, and X. F. Li, Immobilization of Pectinase on Oxidized Pulp Fiber and its Application in Whitewater Treatment, *Carbohydrate Polymers*, **97**, 523(2013).
3. R. O. Cristovao, S. C. Silverio, A. P. Tavares, A. I. Briqida, J. M. Loureiro, R. A. Boaventura, E. A. Macedo, and M. A. Coelho, Green Coconut Fiber: a Novel Carrier for the Immobilization of Commercial Laccase by Covalent Attachment for Textile Dyes Decolorization, *World J. of Applied Microbiology and Biotechnology*, **28**, 2827(2012).
4. C. Guerrero, C. Vera, and A. Illanes, Optimisation of Synthesis of Oligosaccharides Derived from Lactulose (fructosyl-galacto-oligosaccharides) with β -Galactosidases of Different Origin, *Food Chemistry*, **138**, 2225(2013).
5. S. Kwon, W. R. Ryu, and M. H. Cho, Continuous Degradation of Azo Dye by Immobilized Laccase, *Korean J. of Biotechnology and Bioprocess Engineering*, **17**, 189 (2002).
6. N. K. Pazarlioglu, M. Sariisik, and A. Telefoncu, Treating Denim Fabrics with Immobilized Commercial Cellulases, *Process Biochemistry*, **40**, 767(2005).
7. M. Soleimani, A. Khani, and K. Najafzadeh, α -Amylase Immobilization on the Silica Nanoparticles for Cleaning Performance towards Starch Soils in Laundry Detergents, *J. of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **74**, 1(2012).
8. Q. Wang, X. Fan, Y. Hu, J. Yua, L. Cui, and P. Wang, Antibacterial Functionalization of Wool Gabric via Immobilizing Lysozymes, *Bioprocess and Biosystems Engineering*, **32**, 633(2009).
9. A. C. Paulo and G. M. Guebitz, "Textile Processing with Enzymes", CRC Press, Cambridge, pp.19-24, 2003.
10. D. H. Joung, "Introduction of Enzymology", Daekwang, Seoul, pp.91-130, 2008.
11. H. R. Kim and H. Y. Seo, Enzymatic Hydrolysis of Polyamide Fabric by using Acylase, *Textile Research J.*, **83**, 1181(2013).
12. J. Chang, I. H. Park, Y. S. Lee, S. Y. Chung, S. J. Fang, M. S. Chandra, and Y. L. Choi, Immobilization of β -Glucosidase from Exiguobacterium sp. DAU5 on Chitosan bead for Improved Enzymatic Properties, *J. of Life Science*, **20**, 1589(2010).
13. A. Mandrich, C. M. A. Galvao, C. D. F. Jesus, R. C. Giordano, and R. L. C. Giordano, Immobilization of Trypsin on Chitosan Gels: Use of Different Activation Protocols and Comparison with Other Supports, *International J. of Biological Macromolecules*, **43**, 54(2008).
14. J. A. Silva, G. P. Macedo, D. S. Rodrigues, R. L. C. Giordano, and L. R. B. Goncalves, Immobilization of Candida antarctica lipase B by Covalent Attachment on Chitosan-based Hydrogels using Different Support Activation Strategies, *Biochemical Engineering J.*, **60**, 16(2012).
15. G. Peng, C. Zhao, B. Liu, F. Ye, and H. Jiang, Immobilized Trypsin onto Chitosan Modified Monodisperse Mi-

- crosspheres: A Different Way for Improving Carrier's Surface Biocompatibility, *Applied Surface Science*, **258**, 5543(2012).
16. M. Chellapandian and C. A. Sastry, Immobilization of Alkaline Protease on Nylon, *Bioprocess Engineering*, **11**, 17(1994).
 17. I. B. Romdhane, Z. B. Romdhane, A. Gargouri, and H. Belghith, Esterification Activity and Stability of *Talaromces thermophilus* lipase Immobilized onto Chitosan, *J. of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **68**, 230 (2011).
 18. M. N. V. R. Kumar, A Review of Chitin and Chitosan Applications, *Reactive and Functional Polymers*, **46**, 1(2000).
 19. V. R. Sinha, A. K. Singla, S. Wadhawan, R. Kaushik, R. Kumria, K. Bansal, and S. Dhawan, Chitosan Microspheres as a Potential Carrier for Drugs, *International J. of Pharmaceutics*, **274**, 1(2004).
 20. Y. J. Kim, Medical Textile Material Development Trends, *Dyeing and Finishing*, **5**, 1(2010).
 21. S. Sinha, S. R. Dhakate, P. Kumar, R. B. Mathur, P. Tripathi, and S. Chand, Electrospun Polyacrylonitrile Nanofibrous Membranes for Chitosanase Immobilization and its Application in Selective Production of Chitooligosaccharides, *Bioresource Technology*, **115**, 152 (2012).
 22. S. P. Lee, S. W. Kim, E. S. Sohn, and J. S. Kang, Technology Trend Analysis of Chitosan, *J. of Chitin and Chitosan*, **8**, 193(2003).
 23. S. H. Lee, H. R. Kim, B. H. Lee, and W. S. Song, Enzymatic Hydrolysis of Chitosan Fiber using Cellulase and Papain, *Textile Science and Engineering*, **47**, 212(2010).
 24. L. Li and Y. Hsieh, "Lipase Immobilization on Ultrafine Poly(acrylic acid)-poly(vinyl alcohol) Hydrogel Fibers, Polymer Biocatalysis and Biomaterials II", ACS Publications, Washington D. C., pp.129-143, 2008.
 25. N. Bhardwaj and S. C. Kundu, Electrospinning: a Fascinating Fiber Fabrication Technique, *Biotechnology Advances*, **28**, 325(2010).
 26. H. Jia, Enzyme-carrying Electrospun Nanofibers, *Methods in Molecular Biology*, **743**, 205(2011).
 27. W. Li, B. Chen, and T. Tan, Comparative Study of the Properties of Lipase Immobilized on Nonwoven Fabric Membranes by Six Methods, *Process Biochemistry*, **46**, 1358(2011).
 28. S. A. Mohamed, A. S. Aly, T. M. Mohamed, and H. A. Salah, Immobilization of Horseradish Peroxidase on Nonwoven Polyester Fabric Coated with Chitosan, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **144**, 169(2008).
 29. J. V. Edwards, N. Prevost, B. Condon, K. Sethumadhavan, J. Ullah, and A. Bopp, Immobilization of Lysozyme on Cotton Fabrics: Synthesis, Characterization, and Activity, *AATCC Review*, **11**, 73(2011).
 30. B. Krajewska, Application of Chitin-and Chitosan-based Materials for Enzyme Immobilizations: a Review, *Enzyme and Microbial Technology*, **35**, 126(2004).
 31. C. M. Gucbilmez, A. Yemencioğlu, and A. Arslanoglu, Antimicrobial Antioxidant Activity of Edible Zein Films Incorporated with Lysozyme, Albumin Proteins and Disodium EDTA, *Food Research International*, **40**, 80 (2007).
 32. L. Betancor, F. Lopez-Gallego, N. A. Morales, G. Delamora, C. Mateo, R. F. Lafuente, and J. M. Guisan, "Immobilization of Enzymes and Cells", Humana Press Inc., New-Jersey, pp.57-64, 2007.
 33. Z. X. Lian, Z. S. Ma, J. Wei, and H. Liu, Preparation and Characterization of Immobilized Lysozyme and Evaluation of its Application in Edible Coatings, *Process Biochemistry*, **47**, 201(2012).
 34. D. Shugar, The Measurement of Lysozyme Activity and the Ultra-violet Inactivation of Lysozyme, *Biochimica et Biophysica Acta*, **8**, 302(1952).
 35. R. C. Davies, A. Neuberger, and B. M. Wilson, The Dependence of Lysozyme Activity on pH and Ionic Strength, *Biochimica et Biophysica Acta- Enzymology*, **178**, 294(1969).
 36. P. Monsan, Influence of the Conditions of Trypsin Immobilization onto Spherosil on Coupling Efficiency, *European J. of Applied Microbiology and Biotechnology*, **5**, 1(1978).
 37. K. Shin, T. J. Kim, Y. K. Kim, and Y. S. Kim, Immobilization of Cellulase from *Fomitopsis Pinicola* and their

- Changes of Enzymatic Characteristics, *Mokchaekonghak*, **38**, 251(2010).
38. F. Xi, J. Wu, Z. Jia, and X. Lin, Preparation and Characterization of Trypsin Immobilized on Silica Gel Supported Macroporous Chitosan Bead, *Process Biochemistry*, **40**, 2833(2005).
 39. J. S. Kim, S. H. Lee, and W. S. Song, Immobilization of Trypsin on Chitosan Non-woven using Glutaraldehyde, *J. of Korean Society of Clothing and Textiles*, **37**, 852(2013).
 40. F. Y. Li, Y. J. Xing, and X. Ding, Immobilization of Pepsin on Cotton Fabric by Sol-gel Method, *Enzyme and Microbial Technology*, **40**, 1692(2007).
 41. M. Monier and A. M. A. E. Sakkary, Modification and Characterization of Cellulosic Cotton Fibers for Efficient Immobilization of Urease, *International J. of Biological Macromolecules*, **51**, 18(2012).
 42. A. N. Zelenetskii, T. A. Akopova, N. R. Kildeeva, G. A. Vikhoreva, E. S. Obolonkova, and A. A. Zharov, Immobilization of Trypsin on Polysaccharides upon Intense Mechanical Treatment, *Russian Chemical Bulletin*, **52**, 2073(2003).

Authors

이소희 경상대학교 의류학과 교수