



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

농학석사 학위논문

포도당으로 개시되는
연속 효소 반응에 의한
실크 피브로인의 젤화

Gelation of silk fibroin

via tandem enzyme reaction triggered by glucose

2020 년 08 월

서울대학교 대학원

바이오시스템 · 소재학부

바이오소재공학전공

전 경 화

초 록

최근 실크 피브로인 하이드로젤을 제작함에 있어 horseradish peroxidase(HRP)와 과산화수소에 의한 효소 가교 방법이 주목 받고 있다. HRP에 의한 가교로 하이드로젤을 제작하면 탄성이 있으며 투명한 하이드로젤을 제작할 수 있으나, 과량의 과산화수소가 존재하면 HRP의 비활성화가 일어난다. 따라서 본 연구에서는 직접적인 과산화수소의 부가를 피하기 위해 연속 효소 반응을 적용하여 포도당과 glucose oxidase(GOx)에 의해 실크 피브로인의 젤화를 개시하였다. 연속 효소 반응에서는 먼저 GOx가 포도당과 산소를 각각 글루코노-델타-락톤과 과산화수소로 전환시키고, 이 반응에서 생성된 과산화수소를 기질로 하여 HRP가 실크 피브로인 내의 타이로신 잔기를 산화하여 다이-타이로신 반응을 촉진한다.

연속 효소 가교 하이드로젤(SF/GOx/HRP)의 특성 분석은 크게 두 가지로 나누어, 초기 젤화 거동과 제작한 하이드로젤의 역학적 성질에 대해 살펴보았다. SF/GOx/HRP의 젤화 시간은 SF/HRP에 비해 약 2.7 배 단축되었는데, 이에 대한 자세한 분석을 위해 반응계 내에 존재하는 화합물들의 영향을 자세히 알아보았다. 그 결과, 과산화수소의 간접적인 공급으로 기존에 제기되었던 HRP의 비활성화 문제를 피할 수 있었던 것으로 생각된다. 한편, SF/GOx/HRP의 역학적 성질을 측정하였을 때 초반에는 탄성률이 낮았으나 시간이 경과함에 따라 베타 시트 구조가 발달하며 탄성률이 증가하였다. 하지만 최종적인 탄성률은 SF/HRP에 비해 낮았으며 이는 내부 구조가 비교적 조밀하게 형성되지 않았기 때문이었다. SF/GOx/HRP는 포도당이 존재할 경우에 GOx에 의해 과산화수소가 방출되는 특징을 가지고 있어 항균성이 나타났다. 이에

따라 향후 지혈제로서 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

주요어: 실크 피브로인 하이드로젤, 연속 효소 반응, horseradish peroxidase, glucose oxidase, 포도당, 항균성 하이드로젤

학 번: 2018-28213

목 차

초 록	i
목 차	iii
List of Tables	vi
List of Figures	vii
제 1 장 서론	1
제 2 장 문헌 연구	4
2.1. 실크 피브로인 하이드로젤	4
2.1.1. 물리적 가교법	4
2.1.2. 화학적 가교법	5
2.1.3. 물리·화학적 가교법	9
2.2. Horseradish peroxidase에 의한 효소 가교	10
2.2.1. Horseradish peroxidase 가교 기작	10
2.2.2. Horseradish peroxidase 가교 실크 피브로인 하이드로젤	13
2.2.3. 기질의 다변화-연속 효소 반응	14

제 3 장 재료 및 방법.....	16
3.1. 재료	16
3.2. 실크 피브로인 용액의 제조.....	16
3.3. 효소 가교 실크 피브로인 하이드로젤 및 동결건조 스펀지의 제작	17
3.4. 초기 젤화 거동.....	19
3.5. 효소 반응속도론적 분석.....	22
3.6. 역학적 특성.....	23
3.7. 물 함유량 측정	24
3.8. 감쇠 전반사 푸리에 변환 적외선 분광 분석	25
3.9. X-선 회절 분석.....	27
3.10. 전계 방사형 주사 전자 현미경.....	27
3.11. 과산화수소 방출 분석.....	28
3.12. 항균성 평가.....	28

제 4 장 결과 및 고찰.....	30
4.1. 효소 가교 실크 피브로인 하이드로젤의 제작.....	31
4.2. 효소 가교 실크 피브로인 하이드로젤의 초기 젤화 거동	32
4.2.1. 젤화 시간 및 가교 속도.....	32
4.2.2. 실험 조건 내 인자의 젤화 시간에의 영향	37
4.2.3. 실크 피브로인의 효소 활성화에의 영향-model study.....	41
4.2.4. 기질 농도 조건 변화.....	44
4.2.5. 효소 농도 조건 변화.....	48
4.3. 효소 가교 실크 피브로인 하이드로젤의 역학적 특성 분석.....	51
4.3.1. 점탄성 및 역학적 특성	53
4.3.2. 물 함유량	58
4.3.3. 이차 구조 전이.....	60
4.3.4. 형태학적 특성	64
4.4. 효소 가교 실크 피브로인 하이드로젤의 항균 특성 분석	66
4.4.1. 과산화수소 방출 거동	66
4.4.2. 항균성 시험.....	68
4.5. 효소 가교 실크 피브로인 하이드로젤의 응용분야 제언.....	71
제 5 장 결론	73
참고문헌	75

List of Tables

[Table 1] Methods for preparation of silk fibroin hydrogels.....	8
[Table 2] Concentrations of each experimental group.....	21
[Table 3] Conformation assignments of the secondary structure of silk fibroin in amide I.....	26
[Table 4] Crosslinking density for SF/HRP and SF/GOx/HRP stabilized hydrogel at 0 hr and 24 hr time points.	55

List of Figures

[Figure 1] Mechanism of HRP–catalyzed crosslinking process. (a) Formation of two phenoxy radicals by HRP, which is oxidized by H ₂ O ₂ , in one catalytic cycle. (b) Radical coupling reaction generated by HRP/H ₂ O ₂ system.	12
[Figure 2] Schematic representation of enzymatic crosslinked silk fibroin hydrogel preparation.....	18
[Figure 3] Preparation of enzymatic crosslinked hydrogels via single and tandem enzyme reaction. After the reaction was completed, the hydrogel was sufficiently swelled by immersing in PBS (pH 7.4) at 37°C for 24 hours. This time point was regarded as a fully stabilized hydrogel and was determined as the 0 hr time point.	31
[Figure 4] Gelation kinetics of SF/HRP and SF/GOx/HRP hydrogel. (a) Gelation time assessed by vial tilting method. (n=4) (b) Intrinsic fluorescence of di–tyrosine linkage emission spectrum after excited at 315 nm. (n=4) (c) Crosslinking kinetics investigated by intrinsic fluorescence of di–tyrosine linkage emitted at 405 nm after excited at 315 nm. (n=4)	34
[Figure 5] Blue fluorescence emission images of enzymatically crosslinked silk fibroin hydrogel (left) and precursor solution (right) when irradiated with DAPI filter. (a) Transmittance image and (b) blue fluorescence image. (scale bar = 500 μm)	35
[Figure 6] Blue fluorescence emission changes of enzymatically crosslinked silk fibroin hydrogels over time. (a) Blue fluorescence	

emission images of SF solution, SF/HRP hydrogel and SF/GOx/HRP hydrogel after adding each substrate when irradiated with DAPI filter. (scale bar = 500 μm) (b) Blue color intensity extracted from images.36

[Figure 7] Gelation time of hydrogels with different enzyme/substrate conditions, assessed by vial tilting method. (n=4).....40

[Figure 8] Representative double–reciprocal (Lineweaver–Burk) plot of each enzyme reaction with or without silk fibroin(conc. = 0.0006 wt%).....43

[Figure 9] Gelation kinetics of SF/HRP and SF/GOx/HRP hydrogels with different substrate concentrations. (a) Gelation time assessed by vial tilting method(n=4), (b–c) Crosslinking kinetics of (b) SF/HRP and (c) SF/GOx/HRP hydrogels with different substrate concentrations. Intrinsic fluorescence was emitted at 405 nm after excited at 315 nm(n=4).47

[Figure 10] Gelation kinetics of SF/HRP and SF/GOx/HRP hydrogels with different enzyme concentration. (a) Gelation time assessed by vial tilting method, (b) Crosslinking kinetics of SF/HRP and SF/GOx/HRP hydrogels with different enzyme concentration. Intrinsic fluorescence was emitted at 405 nm after excited at 315 nm. (n=4)50

[Figure 11] Representative rheological properties of (a) SF/HRP and (b) SF/GOx/HRP stabilized hydrogel over time, by strain sweep oscillatory mode. (c) Storage moduli (G') in the linear viscoelastic region(LVR).(n=3)

After the crosslinking reaction was completed, the hydrogel was sufficiently swelled by immersing in PBS (pH 7.4) at 37°C for 24 hours. This time point was regarded as a fully stabilized hydrogel and was determined as the 0 hr time point.....54

[Figure 12] Representative rheological properties of (a) SF/HRP and (b) SF/GOx/HRP stabilized hydrogels over time, with the shear stress (τ) plotted on the x-axis.

After the crosslinking reaction was completed, the hydrogel was sufficiently swelled by immersing in PBS (pH 7.4) at 37°C for 24 hours. This time point was regarded as a fully stabilized hydrogel and was determined as the 0 hr time point.....56

[Figure 13] Representative compressive stress-strain curves of (a) SF/HRP and (b) SF/GOx/HRP stabilized hydrogels over time and (c) mean compressive modulus at ~10% strain. (n=4)

After the crosslinking reaction was completed, the hydrogel was sufficiently swelled by immersing in PBS (pH 7.4) at 37°C for 24 hours. This time point was regarded as a fully stabilized hydrogel and was determined as the 0 hr time point.....57

[Figure 14] Swelling ratio of SF/HRP and SF/GOx/HRP stabilized hydrogels over time, measured by gravimetric method. (n=6)

After the crosslinking reaction was completed, the hydrogel was sufficiently swelled by immersing in PBS (pH 7.4) at 37°C for 24 hours. This time point was regarded as a fully stabilized hydrogel and was determined as the 0 hr time point.....59

[Figure 15] The transition of protein secondary structure. Representative ATR-FTIR spectra of (a) SF/HRP and (b)

SF/GOx/HRP stabilized hydrogels over time. (c–d) Relative proportions (%) of each secondary structure over time, calculated by multi–peak deconvolution. (n=3)

After the crosslinking reaction was completed, the hydrogel was sufficiently swelled by immersing in PBS (pH 7.4) at 37°C for 24 hours. This time point was regarded as a fully stabilized hydrogel and was determined as the 0 hr time point.....62

[Figure 16] The transition of XRD diffraction intensity of (a) SF/HRP and (b) SF/GOx/HRP stabilized hydrogels over time.

After the crosslinking reaction was completed, the hydrogel was sufficiently swelled by immersing in PBS (pH 7.4) at 37°C for 24 hours. This time point was regarded as a fully stabilized hydrogel and was determined as the 0 hr time point.....63

[Figure 17] Inner pore structure changes of (a) SF/HRP and (b) SF/GOx/HRP stabilized hydrogels over time, investigated by FE–SEM. (scale bar = 5 μm)

After the crosslinking reaction was completed, the hydrogel was sufficiently swelled by immersing in PBS (pH 7.4) at 37°C for 24 hours. This time point was regarded as a fully stabilized hydrogel and was determined as the 0 hr time point.....65

[Figure 18] Quantitative H₂O₂ assay of SF/HRP and SF/GOx/HRP as–prepared hydrogel. (n=4)67

[Figure 19] Representative antibacterial activity of SF(a), SF/HRP(b), SF/GOx/HRP(c) hydrogels showed by zone of inhibition. (A) *Escherichia coli*, (B) *Escherichia coli* with glucose in growth medium, (C) *Staphylococcus aureus*. (n=3)

After the crosslinking reaction was completed, the hydrogel was sufficiently swelled by immersing in PBS (pH 7.4) for 24 hours....70

[Figure 20] Gelation of SF, SF/HRP, SF/GOx/HRP lyophilized sponge against glucose solution (conc. = 5.5 mM)72

제 1 장 서 론

실크 단백질은 *Bombyx mori*로부터 얻어지는 섬유상의 단백질로, 구조 유지를 담당하는 피브로인 두 가닥과 이를 접착해주는 세리신으로 이루어져 있다[1]. 이 중 피브로인은 베타 시트 구조로 인한 우수한 역학적 성질과 생체 적합성을 갖기 때문에 다양한 분야에 활용하고자 하는 노력이 이어지고 있다[2]. 따라서 각 분야에 적용될 수 있도록 섬유상의 피브로인 단백질을 하이드로젤[3], 필름[4], 스펀지[5], 전기방사 매트[6] 등의 다양한 형태로 가공하고자 하는 연구가 활발히 진행되고 있다.

이 중 하이드로젤을 제작하는 기존의 방법은 물리적인 방법으로 랜덤 코일 구조의 수용액 상의 실크 피브로인을 베타 시트 구조로 유도하는 방식이다. 예를 들면 실크 피브로인 수용액에 열을 가하거나[7], 이온 농도를 조절하거나[8], 초음파를 처리하는 방법[9] 등으로 실크 피브로인 사슬 간 거리가 가까워지도록 하여 물리적 가교를 유도한다. 이 방법은 간단하며 별도의 가교제가 필요 없다는 장점이 있지만, 약하고 잘 깨지는 성질의 하이드로젤이 형성된다는 단점이 있다[10].

이러한 문제점을 개선하기 위해 화학적 가교를 통해 실크 피브로인 하이드로젤을 제작하는 여러 가지 방법이 제시되었으며[11, 12], 이 경우 탄성이 있는 하이드로젤을 형성할 수 있는 장점이 있다. 그 중 최근에는 실크 피브로인 내의 타이로신 잔기를 대상으로 화학적 가교하는 연구가 활발히 진행되고 있다[13]. 그 방법에는 horseradish peroxidase(HRP)를 활용한 효소 가교법[14-16], 리보플라빈(riboflavin)을 활용한 광가교법[17, 18], 펜톤 반응(Fenton reaction)을 활용한 가교법[19] 등이 있다. 이 연구들의 장점은 개질

과정을 거치지 않은 실크 피브로인 용액을 바로 하이드로젤의 제작에 사용할 수 있으며, 사용한 화학 반응의 독성이 비교적 낮다는 것이다.

그 중 효소 가교는 효소의 기질의 특이성으로 인해 부반응 없이 반응을 진행할 수 있으며, 반응이 온화하며 생리적인 조건 하에서 진행된다는 장점이 있어 다양한 고분자의 가교 및 하이드로젤 제작에 활용되었다[20]. 실크 피브로인을 제작하는 데에 적용되는 효소 가교법은 HRP 와 그 기질인 과산화수소의 산화·환원 반응으로, 실크 피브로인 내 타이로신 잔기의 페놀기에 라디칼이 형성되면 라디칼 간 반응이 일어나는 것을 이용해 화학적 가교를 유도한다. 특히 실크 피브로인에는 타이로신 잔기가 약 5 mol% 존재하기 때문에 반응이 충분히 일어날 수 있다[21]. 효소 가교 실크 피브로인 하이드로젤은 탄성이 있어 기존 물리적 가교 실크 피브로인 하이드로젤의 깨지기 쉬운 성질을 극복하였고, 효소 및 기질의 농도를 바꾸어 역학적 성질을 쉽게 조절할 수 있다[13].

한편, HRP 와 과산화수소의 반응에서 가장 큰 단점은 기질로 사용되는 과산화수소가 과량으로 존재하게 될 때 오히려 효소 활성을 낮추어 반응을 저해한다는 것이다[22]. 하지만 효소의 기질의 특이성 때문에 그 기질의 선택에는 제한이 존재하여 과산화수소를 사용할 수밖에 없다. 이에 대해 기질의 범위를 넓히기 위해 연속 효소 반응을 적용하는 연구가 다수 보고되었다. 반응의 생성물로 과산화수소를 형성하는 다른 효소와 함께 반응을 진행하면, 과산화수소의 직접적인 부가 없이 HRP 의 반응을 간접적으로 개시할 수 있기 때문이다. 예를 들어, 글루코스 산화효소(glucose oxidase) [23], L-아미노산 산화효소(L-amino acid oxidase), 갈락토스 산화효소(galactose oxidase) [24] 등을 사용하면 각각의 기질인 포도당, L-아미노산, 갈락토스로부터 반응을 유도할 수 있다.

HRP 와의 연속 효소 반응에 가장 흔히 사용되는 효소는 글루코스 산화효소(glucose oxidase, GOx)로, PVA[25], 알지네이트[26], 젤라틴[27] 등의 하이드로젤 제작에 사용된 사례가 있다. GOx 는 산소와 포도당을 각각 과산화수소와 글루코노-델타-락톤(Glucono- δ -lactone, GDL)으로 전환하는 반응을 촉매한다. GOx 의 기질인 포도당은 독성이 낮고 혈액이나 체액에도 일정 농도로 존재하기 때문에 이로부터 젤화가 가능하다는 장점이 있다. 따라서 산소의 존재 하에 포도당을 첨가하여 반응을 개시하면 과산화수소를 간접적으로 공급하여 HRP 의 가교 반응을 유도할 수 있다. 하지만 아직까지 실크 피브로인의 효소 가교에 GOx/HRP 연속 효소 반응을 활용한 사례는 보고된 바 없다.

본 연구에서는 GOx 와 HRP 의 연속 효소 반응을 적용하여 실크 피브로인의 젤화를 유도하였다. 기존 HRP 단독 효소 반응과의 젤화 거동의 차이점을 규명하고자 하였으며 이를 위해 젤화 시간, 반응 생성물의 영향, 기질 및 효소의 농도 영향 등이 젤화 시간 단축에 미친 영향에 대해 고찰하였다. 또한 이전의 연구에서 시도되지 않은 시간에 따른 효소 가교 하이드로젤의 역학적 특성이 변화하는 이유에 대해 고찰하고자 하였다. 이를 위해 시간에 따른 이차 구조의 변화와 결정화도의 차이 및 내부 공극의 변화 등을 분석하였다. 최종적으로 제조된 SF/GOx/HRP 의 항균 소재로서의 활용 가능성을 검토하기 위하여 그람 양성, 그람 음성균에 대한 항균성을 검토하였다.

제 2 장 문헌 연구

2.1. 실크 피브로인 하이드로젤

2.1.1. 물리적 가교법

실크 피브로인 하이드로젤을 제작하는 가장 전통적인 방법은 베타 시트의 형성으로 실크 피브로인 고분자 사슬을 물리적으로 가교하는 것이다. 이는 다양한 방법으로 실크 피브로인 용액에 에너지를 가하여 실크 피브로인이 열역학적으로 안정한 베타 시트를 형성하도록 하는 방법이다[10]. 실크 피브로인에는 소수성의 아미노산이 반복되는 구간(GAGAGS 또는 GAGAGY)이 우세하게 나타나기 때문에[28], 에너지를 가하여 사슬의 운동성을 증가시키거나 용액의 탈수화를 일으키는 방식으로 이들 간의 소수성 상호작용을 촉진한다. 이로 인해 고분자 사슬 간 거리가 가까워지게 되어 광범위한 소수 결합을 하면 베타 시트 구조가 형성되어 별도의 가교제가 필요 없이 하이드로젤이 형성된다는 장점이 있다[29].

Kim et al. [8]은 온도 및 Ca^{2+} , K^{+} 이온 농도에 따라 하이드로젤을 제작하여 실크 피브로인이 랜덤 코일에서 베타 시트 구조로 전이하는 것을 확인하였다. 온도가 높을수록 실크 피브로인 사슬 간 상호작용이 증가하여 비교적 빠르게 구조 전이가 일어났으며, K^{+} 와 달리 Ca^{2+} 이온은 첨가하였을 때 실크 피브로인 사슬의 음이온과 다가 양이온의 상호작용으로 인해 비교적 빠른 젤화가 일어나는 것으로 보고하였다. 반면 이러한 방식으로 하이드로젤을 제작하면 짧게는 하루에서 길게는 일주일 이상의 시간이 걸리는 단점이 있었다.

Chen et al. [30]은 실크 피브로인 용액에 에탄올을 처리하였을 때의 구조 전이를 관찰하였다. 알코올을 실크 피브로인 용액에 부가하면 실크

피브로인 고분자를 수화하고 있던 물 분자가 알코올에 의해 탈수화되어 실크 피브로인 사슬 간 베타 시트의 확산이 일어나는 것으로 설명하고 있다.

이 외에도 pH의 저하[31], 초음파 및 볼텍싱을 통한 전단력 부가[9, 32], 계면활성제의 사용[33], 전기장 노출[34] 등의 방법으로 물리적 가교를 통한 실크 피브로인 하이드로젤을 제작할 수 있다.

2.1.2. 화학적 가교법

물리적 가교를 통해 실크 피브로인 하이드로젤을 제작하게 되면 가장 큰 단점으로 잘 깨지는 성질(brittle)의 하이드로젤이 만들어진다[8]. 이러한 성질의 젤은 다루기가 쉽지 않으므로 이를 극복하기 위해 물리적 가교가 아닌 공유 결합을 통한 화학적 가교로 하이드로젤을 제작하는 연구가 활발하게 이루어지고 있다. 이러한 방식으로 하이드로젤을 제작하면 대부분 탄성이 있는(elastic) 하이드로젤을 만들 수 있는 것이 장점이다.

먼저, 일반적으로 고분자의 가교에 사용하는 에피클로로하이드린(epichlorohydrin)[35], 글루타르알데하이드(glutaraldehyde)[36] 등과 같은 화학적 가교제를 사용하여 실크 피브로인 하이드로젤을 제작하는 사례가 보고되었다. 이 방법은 단백질 고분자인 실크 피브로인에 풍부하게 존재하는 수산화기 혹은 아민기를 대상으로 가교를 유도하여 간단하게 젤화를 일으키는 장점이 있다. 하지만 사용한 가교제에 따라 독성 문제가 존재하기 때문에 응용 분야에 제한이 있다.

이에 따라 최근에는 독성이 적은 방법으로 실크 피브로인을 가교하여 하이드로젤을 제작하고자 하고 있다. 한 가지 주요 흐름으로, 실크 피브로인에 광중합이 가능한 작용기를 도입하여 광가교 하이드로젤을 제작하는 연구들이 있다. 이 연구들은 메타크릴레이트기(methacrylate)

[12] 또는 글리시딜 메타크릴레이트기(glycidyl methacrylate) [37]를 아미노기가 있는 리신(Lysine)에 도입하여 실크 피브로인이 광개시제의 존재 하에 광가교 되도록 한다. 이 방법으로 하이드로젤을 제작하면 화학적 가교제를 사용하는 것에 비해 독성이 적으나, 실크 피브로인의 개질 과정을 한 번 더 거쳐야 하기 때문에 그 제작이 비교적 복잡하고 어렵다.

따라서 개질 과정을 거치지 않고 독성이 적은 가교제를 사용하여 화학적으로 가교한 실크 피브로인 하이드로젤을 제작하는 연구 사례가 다수 보고되고 있다. 이 경우 실크 피브로인에 약 5 mol% 있다고 알려진 타이로신 잔기[21]를 대상으로 하여 페놀기 간 결합을 유도해 공유 결합을 형성한다.

실크 피브로인의 효소가교는 Partlow et al. [13]에 의해 제안된 이후로 많은 사례의 연구가 보고되고 있다. 효소 가교는 horseradish peroxidase(HRP) 와 과산화수소에 의해 반응이 진행되며, 효소에 의해 실크 피브로인 내의 페놀기에 라디칼이 형성되면 라디칼 간 반응으로 공유 결합을 이루며 가교된다. HRP 는 현재까지 독성이 있다고 밝히고 있는 연구는 없으며, 일반적인 연구에 비해 매우 높은 농도의 HRP 로 하이드로젤을 만들더라도 세포 독성을 보이지 않았다[38].

Kuang et al.[18]은 리보플라빈을 이용한 광가교 방법으로 하이드로젤을 제작하였다. 리보플라빈은 가시광선의 빛을 흡수한 후 HRP 와 마찬가지로 타이로신 잔기에 라디칼을 형성한다. 라디칼 간 공유 결합이 일어나 다이-타이로신 결합을 이루며 가교되어 실크 피브로인 하이드로젤을 제작할 수 있다. 광가교 하이드로젤의 장점을 이용해 해상도가 높은 패턴을 갖는 하이드로젤을 제작할 수 있었다.

Choi et al.[19]은 펜톤 반응(Fenton reaction) 을 이용한 하이드로젤의 제작 가능성을 확인하였다. 과산화수소와 Fe^{2+} 이온이

함께 존재하면 산화·환원 반응이 일어나면서 타이로신 잔기에 라디칼을 형성하고 다이-타이로신 결합을 유도할 수 있음을 밝혔다. 또한 아스코르브산(Ascorbic acid) 및 철환제(iron chelator) 을 사용하고 pH 를 조절하는 등의 방법으로 철 이온의 반응을 조절하여 실크 피브로인 하이드로젤의 성질을 조절하였다. 이렇게 제작한 하이드로젤은 세포 독성을 보이지 않았으며 TCP 대조군과 비슷한 수준으로 세포가 자랐다.

Table 1. Methods for preparation of silk fibroin hydrogels.

Crosslinking	Method	Reference	
Physical crosslinking	Temperature changes	[7, 10]	
	pH changes	[31]	
	Shearing	Sonication	[9]
		Voltexing	[32]
	Electrogel	[34]	
	Surfactant	[33, 39]	
Chemical crosslinking	hydroxyl/ amine group	Glutaraldehyde	[11, 36]
		Epichlorohydrin	[35]
		Genipin	[40]
	Lysine	Methacrylate	[12]
		Glycidyl methacrylate	[37]
	Tyrosine	Horseradish peroxidase	[13, 14, 41]
		Ruthenium	[42, 43]
		Riboflavin	[17, 18]
		Fenton reaction	[19]

2.1.3. 물리·화학적 가교법

실크 피브로인을 화학적으로만 가교하여 하이드로젤을 제작하면 탄성이 있는 하이드로젤을 얻을 수 있으나 실크 피브로인 자체의 베타 시트 구조로 인한 강직하고(rigid) 질긴(tough) 성질은 얻을 수 없다. 이러한 하이드로젤은 높은 강도가 요구되는 곳에 응용할 수 없다는 한계점을 가지기 때문에, 화학적 가교에 추가적으로 물리적 가교를 하여 높은 강도를 갖는 이중 가교 실크 피브로인 하이드로젤을 제작하기도 한다[44, 45]. 이중 가교 하이드로젤은 외력의 존재 하에 두 종류의 가교 결합 중 더 약한 결합이 먼저 파괴되며 에너지를 분산시켜 높은 강도를 보이는 것으로 밝혀져 있다[46]. 이중 가교 실크 피브로인 하이드로젤은 일반적으로 공유 결합보다는 베타 시트 구조 내의 물리적 결합인 수소 결합이 먼저 끊어진다.

Su et al. [44]는 실크 피브로인을 HRP 로 가교한 뒤 하이드로젤을 에탄올에 침지하여 이중 가교 하이드로젤을 제작하였다. 제작한 하이드로젤은 단순히 물리적으로만 가교한 하이드로젤과 달리 다이-타이로신 결합이 형성되어 있는 채로 이차 구조가 전이되었기 때문에 공유 결합에 의해 베타 시트의 발달이 제한되어 작은 크기의 베타 시트 영역이 형성되었다. 이로 인해 기존의 물리적 가교 하이드로젤이 잘 깨지는 성질을 갖고 있던 것과 달리 탄성을 유지하며 강도를 높인 젤을 제작할 수 있었다. 이는 힘이 가해졌을 때 작은 크기의 베타 시트 영역이 희생 결합 (sacrificial bond) 으로 작용하였기 때문이다.

Kim et al. [45]은 루테늄(Ruthenium)을 기반으로 한 광가교 방법으로 실크 피브로인 하이드로젤을 제작한 뒤 메탄올에 침지하여 베타 시트 구조를 유도하였다. 이렇게 형성된 하이드로젤은 마찬가지로 탄성을 유지하며 높은 강도를 보였다. 또한 반복 압축 강도 시험(Cyclic compression test)을 진행하여 실제로 히스테리시스를 통해 에너지가

분산되는 정도를 계산하였을 때 20번의 반복 시험 동안 하이드로젤은 파괴되지 않고 5번 이내에 에너지 분산 정도가 정상 상태에 도달하였다. 즉, 화학적 가교 후에 물리적 가교를 하여 높은 인성(toughness)를 보이는 이중 가교 실크 피브로인 하이드로젤을 제작하였다.

2.2. Horseradish peroxidase 에 의한 효소 가교

2.2.1. Horseradish peroxidase 가교 기작

HRP 는 산화·환원 효소의 일종으로 내부에 헴 그룹이 있어 반응에 직접적으로 관여한다. HRP 의 촉매 반응은 순환적으로 일어나며, 헴 그룹의 산화·환원에 각 기질이 참여함으로써 HRP 는 원래의 상태로 돌아오고 반응에 관여한 기질은 산화 또는 환원된다. 이 반응에서 과산화수소는 산화제로, 페놀기는 환원제로 참여한다[47]. 먼저, 과산화수소의 존재 하에 과산화수소는 물로 환원되고 HRP 의 헴 그룹이 Fe(III)에서 Fe(IV)로 산화되면, compound I 이 형성된다. 산화된 HRP 는 환원제인 페놀기로부터 전자를 받아 compound II 를 형성하며 또 다른 페놀기로부터 전자를 한 번 더 받아 원래의 상태로 되돌아간다 [48]. 즉, HRP 와 과산화수소의 촉매 반응에 의해 두 개의 페놀기에 라디칼이 형성된다. 페놀기에 형성된 라디칼은 라디칼 간의 반응을 하여 다이머(dimer), 트라이머(trimer) 혹은 올리고머(oligomer)까지 형성할 수 있다.

실크 피브로인에는 약 5 mol%의 타이로신 잔기가 존재하는 것으로 알려져 있다. 타이로신은 페놀기를 포함한 아미노산으로, HRP 와 과산화수소의 반응에 의한 라디칼 생성 및 가교 반응이 활발하게 일어나는 것으로 보고되고 있다[49, 50]. 실크 피브로인과 같이 고분자 내에 페놀기가 존재하지 않더라도, 티라민(Tyramine),

타이로신(Tyrosine), 3-하이드록시프로피온산(3-hydroxypropionic acid) 등과 같이 페놀성 화합물을 고분자 사슬에 도입하여 HRP 와 과산화수소에 의한 축매 반응을 통한 효소 가교 하이드로젤을 제작하는 연구도 다수 존재한다[51-53].

한편, 다수의 연구에서 과량의 과산화수소에 의해 HRP 의 효소 활성이 저해되는 것이 확인되었다. 효소의 비활성화 속도는 HRP 및 과산화수소의 농도에 따라 달라지며, 과산화수소가 과량 존재하면 HRP 는 compound III를 형성하여 비활성화된다[54]. 이와 같은 효소 비활성화 과정에 대해 반응속도론적 분석을 한 결과, compound II가 과산화수소에 의해 산화되어 카탈레이스(catalase)와 같은 역할을 하며 비활성 화합물인 compound III를 형성하는 것으로 분석되었다 [55]. 이는 효소 가교 하이드로젤을 제작할 때도 꾸준히 제기되어 온 문제로, PEG [22], PPO-PEO [56], 젤라틴 [57], 히알루론산 [58], 알지네이트 [59] 기반 하이드로젤을 제작할 때 역시 이와 같은 단점이 나타났다. 과산화수소에 의한 HRP 비활성화의 영향으로 젤화 속도의 감소가 나타났다고 보고하고 있다.

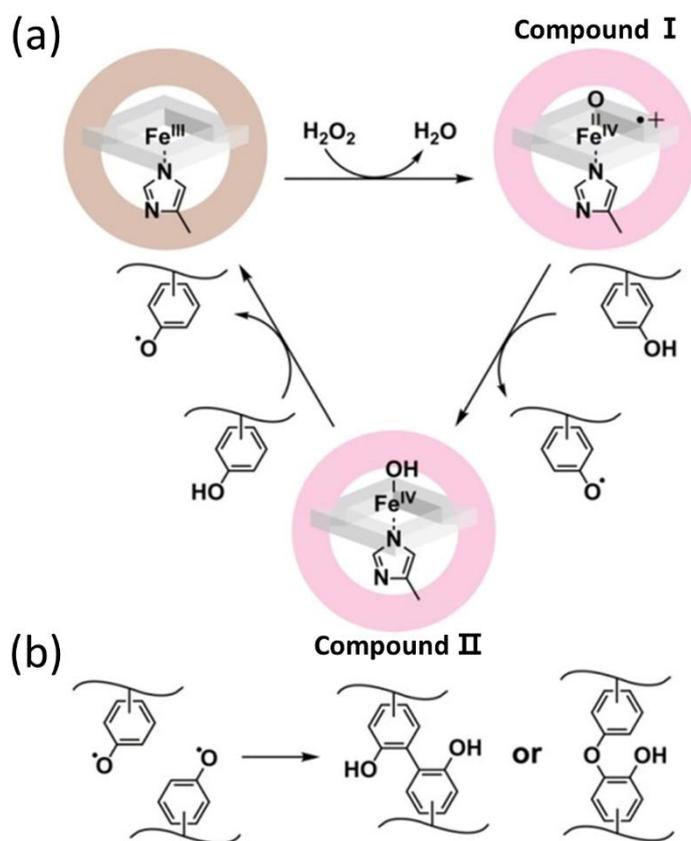


Figure 1. Mechanism of HRP-catalyzed crosslinking process. (a) Formation of two phenoxy radicals by HRP, which is oxidized by H_2O_2 , in one catalytic cycle. (b) Radical coupling reaction generated by HRP/ H_2O_2 system. Adapted from reference [50].

2.2.2. Horseradish peroxidase 가교 실크 피브로인 하이드로젤

HRP 가교 실크 피브로인 하이드로젤은 앞서 설명한 것과 같이 별도의 추가 개질 과정 없이 고분자 사슬 내에 존재하는 타이로신 잔기의 라디칼 반응으로 가교하여 제작한다. 효소 가교 실크 피브로인 하이드로젤은 투명하고 탄성이 있으며 효소 및 실크의 농도를 조절하여 제작한 하이드로젤의 특성을 쉽게 조절할 수 있다는 특징이 있다[13]. 이에 따라 다양한 응용 분야에 적용할 수 있는 효소 가교 실크 피브로인 하이드로젤에 대한 연구가 활발하게 이루어지고 있다[60-62]. 따라서 하이드로젤 자체의 특성을 분석하여 이해를 도울 필요가 있다.

Tabatabai et al. [63]은 효소 가교 실크 피브로인의 초기 젤화 과정에 주목하여, 가교점인 다이-타이로신의 형성과 유변학적 거동의 변화를 실시간으로 관찰하였다. 실크 피브로인은 다른 연구에서 알려진 바와 같이 형광으로 다이-타이로신이 형성되는 것을 관찰할 수 있다는 장점이 있어[13] 초기 젤화 거동을 분석할 수 있었다. 초기에는 형광값은 증가하지만 유변학적 거동을 살펴보았을 때 여전히 액체 상인 것으로 보아, 다이-타이로신 결합의 형성이 분자 내에 먼저 형성되는 것으로 유추하였다. 이후 분자 간 다이-타이로신 결합이 형성되며 저장 탄성률 값이 증가하는데, 값이 급격하게 증가하는 구간은 실크 피브로인 단백질 분자 간 확산하는 네트워크(system-spanning network)가 형성되는 것으로 확인되었다. 반면 이후 완만하게 저장 탄성률 값이 증가하는 구간에서는 형광값의 증가는 나타나지 않았으므로 다이-타이로신 보다 고차의 결합인 트라이- 혹은 테트라-타이로신 결합의 형성에 의한 것으로 가능성을 제시하였다.

Mcgill et al. [64]은 실크 피브로인의 농도와 과산화수소의 농도를 달리하여 하이드로젤을 제작하고, 제작한 하이드로젤의 미소 규모와 거시적 규모에서의 분석을 진행하였다. 미소 규모의 분석으로는 LC-

MS 를 활용하여 하이드로젤에 형성된 가교점인 다이-타이로신(Di-tyrosine), 트라이-타이로신(Tri-tyrosine), 테트라-타이로신(Tetra-tyrosine)의 함량을 분석하였으며, 거시적 규모의 분석으로는 점탄성 특성을 분석하였다. 두 분석에서 유사한 경향으로 실크 및 과산화수소의 농도가 특정 구간일 때 가교점의 함량이 높았으며 저장 탄성률의 값도 큰 것을 확인했다. 이로부터 낮은 농도의 과산화수소에서는 라디칼이 잘 생기지 않고, 높은 농도의 과산화수소에서는 효소의 저해가 일어나기 때문에 가교가 잘 일어나지 않는 것으로 기술하였다. 또한 낮은 농도의 실크 용액은 역학적 성질이 낮고, 높은 농도의 실크 용액은 고분자 사슬의 운동성이 저해되어 가교 밀도가 낮아 저장 탄성률이 낮은 것으로 해석하였다.

2.2.3. 기질의 다변화 - 연속 효소 반응

효소 가교 하이드로젤은 다양한 장점이 있음에도 불구하고, 앞서 언급한 것과 같이 과량의 과산화수소가 존재하면 효소의 비활성화가 일어나는 것이 확인되었다. 하지만 효소의 기질 특이성으로 인해 HRP 의 효소 반응에는 그 기질로 과산화수소가 필수적으로 필요하다. 따라서 이를 극복하기 위한 한 방안으로서, 효소 가교 하이드로젤의 제작에 연속 효소 반응을 적용한 연구가 다수 발표되었다[26, 27, 65]. 즉, 과산화수소를 HRP 의 반응계에 직접적으로 부가하지 않고 반응의 생산물로 과산화수소를 내놓는 다른 효소와 함께 HRP 를 사용하여 간접적으로 과산화수소를 공급하는 방식으로 HRP 의 활성 저해를 줄이고자 하는 것이다 [23].

Nakahata et al. [24]는 과산화수소를 내놓는 다양한 효소를 활용하여 과산화수소의 직접적인 부가 없이 하이드로젤을 제작할 수 있음을

보고하였다. 이 연구에서는 L-아미노산 산화효소(L-amino acid oxidase), 콜린 산화효소(Choline oxidase), 갈락토스 산화효소(Galactose oxidase)를 활용하여 그 기질의 범위를 넓혔으며, 세 가지 효소 모두 기질의 농도를 증가시켰을 때 젤화 시간이 짧아지는 것을 알 수 있었다. 이는 HRP 가교 하이드로젤을 제작하였을 때 과산화수소의 농도를 증가시키면 젤화 시간이 길어지는 것과 상이한 것으로, 연속 효소 반응을 적용하면 과산화수소에 의해 HRP 가 비활성화되지 않음을 확인하였다.

HRP 연속 효소 반응을 활용하여 하이드로젤을 제작할 때 가장 활발하게 연구가 이뤄지고 있는 효소는 포도당 산화효소(glucose oxidase, GOx)로, 알지네이트[26], PVA[25], 히알루론산[66], 젤라틴[27] 등의 고분자를 활용하여 하이드로젤을 제작한 연구가 있다. GOx/HRP 연속 효소 반응을 하이드로젤의 가교에 적용하면 포도당으로 젤화 반응이 개시되며 다른 효소를 사용하였을 때와 유사하게 포도당의 농도를 높일수록 젤화 시간이 감소하였다. 특히, 혈액이나 체액 등에 포도당이 함유되어 있기 때문에 이로부터 젤화가 개시될 수 있다는 장점이 있었다.

제 3 장 재료 및 방법

3.1. 재료

실크 피브로인은 국립농업과학기술원으로부터 제공받은 누에고치(*Bombyx mori*)에서 추출하였다. 누에고치의 정련에 사용된 탄산 나트륨(sodium carbonate)과 마르세유 비누(sodium oleate)는 JUNSEI(Japan)에서 구매하였으며, 실크 피브로인의 용해에 사용된 리튬 브로마이드(lithium bromide, LiBr)는 Alfa Aesar(UK)에서 구매하였다. 가교에 사용된 HRP (Peroxidase from horseradish, Type VI), GOx (Glucose from *Aspergillus niger*, Type VII), H₂O₂ (30% (w/w) in H₂O)는 Sigma-Aldrich(USA)에서, 포도당(glucose)은 덕산과학(한국)에서 구매하였다. 이외의 시약은 모두 Sigma-Aldrich(USA)에서 구매하여 사용하였다.

3.2. 실크 피브로인 용액의 제조

누에고치로부터 세리신을 제거하고 피브로인을 얻기 위해 비누 정련 과정을 거쳤다. 탄산 나트륨 0.2% (w/v), 마르세유 비누 0.3% (w/v) 용액에 4등분 한 누에고치를 1:25의 욱비로 담고, 100℃에서 60분간 가열하였다. 이를 수차례 수세하여 세리신을 완전히 제거하고 건조하여 정련사를 얻었다. 정련사는 9.3 M LiBr 수용액에 10% (w/v)으로 60℃에서 4시간 동안 용해한 후, 증류수에 대해 셀룰로오스 투석막(6-8 kDa)에서 3일 간 투석하였다. 얻어진 실크 피브로인 용액은 4℃에서 보관하였으며, 용액 내의 실크 피브로인 농도는 수분 측정기(MB45, OHAUS, USA)를 이용하여 측정하였다. 그 결과 3.0 - 3.3 wt%의 실크

피브로인 용액을 얻을 수 있었다.

3.3. 효소 가교 실크 피브로인 하이드로젤 및 동결건조 스펀지의 제작

하이드로젤은 실크 피브로인 내 타이로신 잔기의 페놀기가 가교되는 반응을 통해 형성되었다. 대조군으로는 HRP만을 사용한 단독 효소 가교 방법을, 실험군으로는 GOx와 HRP를 사용한 연속 효소 가교 방법을 사용하였다. 가교에 사용되는 효소인 HRP 및 GOx 용액은 최종 농도의 100배인 500, 1000, 2000 U/ml로 제작하였고, H₂O₂와 포도당 용액은 50, 100, 200, 400, 800 mM로 제작하였다. 하이드로젤의 제조는 먼저 실크 용액 1 ml 당 각 효소 용액을 10 μ l씩 첨가하여 균일하게 섞어준 후 특정 농도의 과산화수소 또는 포도당 용액을 10 μ l 첨가하여 반응을 개시하였다. 하이드로젤은 37°C에서 2시간 동안 충분히 젤화를 진행하였다.

포도당 용액에 의해 실험군을 동결건조한 스펀지의 젤화 여부를 확인하기 위해 실크 피브로인 용액, 실크 피브로인과 HRP 혼합 용액, 실크 피브로인과 GOX, HRP 혼합 용액을 제작하여 동결 건조하였다. 적당한 크기로 제작하기 위해 24 well plate에 1 ml씩 분주하여 넣어 스펀지를 제작하였다. 동결 건조가 완료된 후에는 냉장 보관을 하여 효소의 활성이 유지될 수 있도록 하였다.

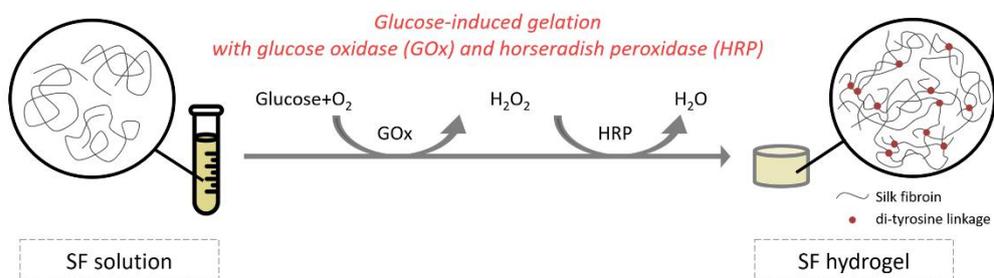


Figure 2. Schematic representation of enzymatic crosslinked silk fibroin hydrogel preparation.

3.4. 초기 젤화 거동

젤화 시간은 바이알 기울기 시험을 통해 측정하였다. 실크 피브로인 용액에 효소를 첨가하여 균일하게 섞어준 후, 과산화수소 또는 포도당을 첨가하여 반응을 개시하고 30초 간격으로 바이알을 뒤집어 더 이상 흐르지 않는 시점을 젤화 시간으로 결정하였다. 5 ml 바이알에 반응이 개시된 용액을 250 μl 씩 분주하여 담고, 37°C에서 보관하며 젤화를 관찰하였다.

다이-타이로신 형성에 따른 형광을 분석하기 위해 마이크로플레이트 리더기(Synergy H1, BioTeck, USA)를 사용하였다. 반응이 개시된 실크 피브로인 용액을 96 well 검정색 마이크로 플레이트에 200 μl 씩 분주하여 담고 37°C에서 형광 방출 거동을 측정하였다. 먼저 하이드로젤의 최대 형광 방출 파장을 측정하기 위해 200 μl 씩 분주하여 담은 용액을 2시간 동안 완전히 반응시키고 315 nm에서 여기(excitation)시킨 후 350-500 nm에서의 형광값을 확인하였다[13]. 그 결과 405 nm에서 최대로 형광을 방출하는 것을 확인하였으며 이후 용액의 형광 속도 분석을 위한 실험에서는 405 nm에서의 형광 방출을 1시간 동안 측정하였다. 초기 가교 속도를 반영하는 형광 스펙트럼의 초기 기울기는 원점에서 첫 관측값까지의 기울기로 생각하였다.

또한 젤의 형광 이미지는 형광 현미경(Celena S, logos Biosystems, South Korea)의 DAPI 필터를 사용하여 얻었다[67]. 실크 피브로인 용액에 효소를 첨가하여 균일하게 섞어준 후, 과산화수소 또는 포도당을 첨가하여 반응을 개시하고 5분 간격으로 이미지를 촬영하였다. 얻은 이미지의 정량적인 비교 분석을 위해 파이썬 소프트웨어를 이용해 이미지 내 모든 픽셀의 RGB 중 B 값을 추출하고 평균 내어 계산하였다.

실험 조건 내의 인자들이 젤화 시간에 미치는 영향을 확인하기 위해

6 가지의 실험군을 설계하였다. 각 실험군을 제작할 때에는 효소 및 기질의 농도는 하이드로젤을 제작할 때와 동일한 농도로 첨가하였다. 즉 효소인 HRP와 GOx는 10 U/ml로, 기질인 과산화수소와 포도당(Glc)은 2 mM로 첨가하였으며, GDL은 첨가한 포도당이 모두 산화하였을 때를 가정하여 2 mM을 첨가하였다. 각 실험군의 상세한 조성은 실크 피브로인 용액을 기반으로 Table 2와 같으며, 최종 농도를 기준으로 작성하였다.

Table 2. Concentrations of each experimental group.

	HRP	GOx	H ₂ O ₂	Glc	GDL
HRP/H ₂ O ₂	10		2		
HRP/GOx/Glc	10	10		2	
HRP/H ₂ O ₂ /GDL	10		2		2
HRP/H ₂ O ₂ /Glc	10		2	2	
HRP/GOx/H ₂ O ₂	10	10	2		
HRP/GOx/ H ₂ O ₂ /Glc	10	10	2	2	

* Units for HRP and GOx: U/ml

* Units for H₂O₂, Glc and GDL: mM

3.5. 효소 반응속도론적 분석

모든 효소의 농도는 UV-Vis 분광 광도계(UV-Vis spectrometer, Optizen POP Bio, Mecasys, Korea)를 통해 정량하였다. GOx의 결정 계수는 280 nm에서 $2.67 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 이고, HRP의 결정 계수는 403 nm에서 $1.0 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 이다[68]. 시간에 따른 효소 활성은 UV-Vis 분광 광도계(UV-Vis spectrometer, Optizen 2120UV plus, Mecasys, Korea)를 이용하여 측정하였다. 최종 생성물인 ABTS 라디칼 양이온의 결정 계수는 415 nm에서 $3.6 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 이다[69].

HRP의 활성 검정을 위해서 최종적으로 1 nM의 HRP, 2 mM의 ABTS와 6.25-200 μM 의 H_2O_2 를 1차 증류수에 용해하여 수용액을 제작하였다. GOx의 활성 검정을 위해서는 최종적으로 1 nM의 GOx, 20 nM의 HRP, 2 mM의 ABTS와 0.78125 - 200 mM의 포도당을 1차 증류수에 용해하여 수용액을 제작하였다. 실크 피브로인의 저해 작용을 확인하기 위해서 하이드로젤 제작 시 사용하는 실크 피브로인 용액(~3 wt%)을 최종적으로 HRP와 동일한 배수로 희석하여 사용하였다.

UV-Vis 분광 광도계 내부의 온도는 37°C로 유지하였고 415 nm에서의 흡광도를 4초 간격으로 15분 간 측정한 후, 효소의 초기 속도는 형성 농도-시간 그래프의 초기 100초 간의 기울기로 계산하였다. 얻어진 효소의 초기 속도를 바탕으로 매트랩 소프트웨어의 Enzkin을 사용하여 Michaelis-Menten plotting 및 Lineweaver-Burk plotting을 진행하였다[70]. 이로부터 효소 속도 상수 및 실크 피브로인의 저해제 작용 여부를 확인하였다.

3.6. 역학적 특성

제작한 하이드로젤의 점탄성을 회전형 레오미터(HAKKE MARSIII, Thermo Scientific, USA)을 이용하여 측정하였다. 반응이 끝난 하이드로젤은 24시간 동안 37°C에서 PBS(pH 7.4)에 침지하여 충분히 팽윤하였고, 이 시점을 완전히 안정화 된 하이드로젤으로 보고 0 hr 시점으로 결정하였다. 점탄성은 안정화 후 0 hr, 24 hr 시점의 하이드로젤에 대해 측정하였다.

하이드로젤은 각 시점마다 8 mm 생검 펀치(biopsy punch)를 이용하여 직경 8 mm, 높이 1-2 mm로 제작하였다. 습윤 상태의 하이드로젤의 G' 및 G'' 을 진동 모드(oscillatory mode) 중 strain sweep 모드로 변형률 0.1-100%, 진동수 1 Hz, 온도 25°C 조건으로 측정하였다. 측정 시에는 parallel plate geometry를 사용하였으며, 전단 저장 탄성률은 선형 점탄성 영역(linear viscoelastic region, LVR)에서의 평균값으로 계산하였다. 또한, 이렇게 얻은 전단 저장 탄성률로부터 하이드로젤의 가교 밀도(ν)를 다음의 식(1)에 의해 구하였다 [71]. 이 때 G' 은 전단 저장 탄성률, R 은 기체 상수(8.314 J · mol⁻¹ · K⁻¹), T 는 절대 온도(K)이다.

$$G' = \nu RT \quad \text{식 (1)}$$

제작한 하이드로젤의 압축 강도를 만능 재료 시험기(Lloyd instruments, Chichester, UK)를 사용하여 측정하였다. 반응이 끝난 하이드로젤은 24시간 동안 37°C에서 PBS(pH 7.4)에 침지하여 충분히 팽윤하였고, 이 시점을 완전히 안정화 된 하이드로젤으로 보고 0 hr 시점으로 결정하였다. 압축 강도는 안정화 후 0 hr부터 120 hr 시점의 하이드로젤에 대해 24시간 간격으로 측정하였다.

하이드로젤은 각 시점마다 8 mm 생검 펀치(biopsy punch)를

이용하여 직경 8 mm, 높이 1-2 mm로 제작하였다. 0, 24 hr 하이드로젤은 10 N 로드 셀을 사용하여, 48 hr 이후의 하이드로젤은 500 N 로드 셀을 사용하여 5 mm/min 의 압축 속도로 하이드로젤에 대한 압축 응력-변형률 그래프를 얻었다. 압축 탄성률은 초기 10%까지의 기울기로 계산하였다.

3.7. 물 함유량 측정

제작한 하이드로젤의 물 함유량을 중량 측정 및 계산을 통해 구하였다. 반응이 끝난 하이드로젤은 24시간 동안 37°C에서 PBS(pH 7.4)에 침지하여 충분히 팽윤하였고, 이 시점을 완전히 안정화 된 하이드로젤으로 보고 0 hr 시점으로 결정하였다. 물 함유량은 안정화 후 0 hr부터 120 hr 시점의 하이드로젤에 대해 24시간 간격으로 측정하였다.

하이드로젤은 각 시점마다 8 mm 생검 펀치(biopsy punch)를 이용하여 직경 8 mm, 높이 1-2 mm로 제작하였다. 하이드로젤의 습윤 무게(W_s)을 측정한 뒤, PBS 염을 제거하기 위해 증류수로 수세하였다. 이 후 충분한 시간 동안 하이드로젤을 건조한 뒤 건조 무게(W_d)를 측정하고, 다음 식(2)에 따라 물 함유량을 계산하였다.

$$\text{Water content}(\text{g/g}) = \frac{W_s - W_d}{W_s} \quad \text{식 (2)}$$

3.8. 감쇠 전반사 푸리에 변환 적외선 분광 분석

하이드로젤의 시간 경과에 따른 이차 구조 분석을 위해 감쇠 전반사 푸리에 변환 적외선 분광분석기(attenuated total reflectance-fourier transform infrared spectroscopy, ATR-FTIR, Nicolet 6700, Thermo Scientific, USA)를 사용하였다. 반응이 끝난 하이드로젤은 24시간 동안 37°C에서 PBS(pH 7.4)에 침지하여 충분히 팽윤하였고, 이 시점을 완전히 안정화 된 하이드로젤으로 보고 0 hr 시점으로 결정하였다. 적외선 분광분석을 위해서 안정화 후 0 hr부터 72 hr 시점의 하이드로젤에 대해 24시간 간격으로 동결 건조하여 시료를 준비하였다.

amide I 스펙트럼($1705 - 1595 \text{ cm}^{-1}$)은 해상도 8 cm^{-1} , 스캔 수 32 회로 측정하여 얻었다. 이 후 하이드로젤의 이차 구조 조성의 정량 분석을 위하여 푸리에 셀프 디컨볼루션(Fourier self deconvolution, FSD) 후 가우시안 커브 피팅(Gaussian curve fitting)을 진행하였다. FSD는 OMNIC 소프트웨어에서 스펙트럼의 베이스 라인을 맞춘 후 25 cm^{-1} 의 반차폭, 2.7의 Enhancement로 수행하였다. FSD를 진행한 곡선에 대해 가우시안 커브 피팅을 진행하기 위해 파이썬 소프트웨어의 LMFIT(non-linear least-squares minimization and curve-fitting for python) 패키지를 사용하였다[72]. 이 후 문헌에 따라 11개의 이차 구조 피크를 설정하여 커브 피팅하였다(Table 3).

Table 3. Conformation assignments of the secondary structures of silk fibroin in amide I [73].

Wavenumber (cm ⁻¹)	Conformation assignment
1697–1703	Intermolecular β –sheet
1686–1696	Turns
1671–1685	Turns
1663–1670	Turns
1656–1662	α –helices
1647–1655	Random coils
1638–1646	Random coils
1628–1637	Intramolecular β –sheets
1622–1627	Intermolecular β –sheets
1616–1621	Intermolecular β –sheets
1605–1615	Aggregated strands

3.9. X-선 회절 분석

또한 시간 경과에 따른 이차 구조 및 결정화도 분석을 위해 X-선 회절 분석기(XRD, D8 Advance with Davinci, Bruker, Germany)를 사용하였다. 반응이 끝난 하이드로젤은 24시간 동안 37°C에서 PBS(pH 7.4)에 침지하여 충분히 팽윤하였고, 이 시점을 완전히 안정화 된 하이드로젤으로 보고 0 hr 시점으로 결정하였다. X-선 회절분석을 위해서 안정화 후 0 hr부터 48 hr 시점의 하이드로젤에 대해 24시간 간격으로 동결 건조한 후 동결 파쇄하여 가루 형태로 만들어 시료를 준비하였다. 측정 시 스캔 속도는 0.5 sec/step로 하였으며 $2\theta = 5-40^\circ$ 범위에서 측정되었다. 기존 문헌에 따르면, silk I 결정 구조는 12.2° , 19.7° , 24.7° , 28.2° 에서 회절 피크가 나타나고, silk II 결정 구조는 9.1° , 18.9° and 20.7° 에서 피크가 나타난다 [74, 75]. 결정화도(X_c)는 스펙트럼에 디컨볼루션을 시행하여 무정형의 피크와 결정형의 피크를 구한 후 전체 밀넓이 대비 결정형 피크의 밀넓이로 구하였으며, 그 식은 다음과 같다[76].

$$X_c(\%) = \frac{A_c}{A_c + A_a} \times 100 \quad \text{식 (3)}$$

3.10. 전계 방사형 주사 전자 현미경

시간 경과에 따른 하이드로젤 내부 미세 공극 구조의 관찰을 위해 전계 방사형 주사 전자 현미경(Field-emission scanning electronic microscopy, FE-SEM, Auriga, Carl Zeiss, Germany)을 사용하였다. 반응이 끝난 하이드로젤은 24시간 동안 37°C에서 PBS(pH 7.4)에 침지하여 충분히 팽윤하였고, 이 시점을 완전히 안정화 된 하이드로젤으로 보고 0 hr 시점으로 결정하였다. 주사 전자 현미경을

통한 관찰을 위해 안정화 후 0 hr부터 72 hr 시점의 하이드로젤을 24시간 간격으로 동결 건조한 후 단면을 관찰할 수 있도록 시료를 준비하였다.

3.11. 과산화수소 방출 분석

효소 가교 하이드로젤로부터 방출되는 과산화수소의 거동을 분석하기 위해 과산화수소 정량 검정 키트(Pierce™ Quantitative Peroxide Assay Kit, Thermo Scientific, USA)를 사용하였다. 이 키트는 과산화수소가 Fe^{2+} 를 Fe^{3+} 로 산화시키는 반응을 통해 과산화수소를 정량한다.

하이드로젤의 과산화수소 방출 거동을 위해, 24 well 마이크로 플레이트에 1 ml씩 실크 피브로인과 효소가 균일하게 섞인 용액을 분주한 후 과산화수소 및 포도당을 첨가하여 반응을 개시한다. 30분간 젤화를 시키면 젤이 형태를 유지하고 PBS(pH 7.4)를 첨가하였을 때 정확히 상이 분리되었으므로 PBS 버퍼를 각 well에 1 ml씩 첨가하였다. 이후 시점별로 20 μ l의 버퍼를 채취하여 96 well 마이크로 플레이트에 담아 검정 키트의 용액을 200 μ l씩 첨가하였다. 상온에서 15분간 반응한 후 마이크로플레이트 리더기(Synergy H1, BioTeck, USA)를 사용해 595 nm에서 흡광도를 측정하였다. 과산화수소의 농도를 알고 있는 용액으로 검정 곡선을 그려 농도를 계산하였다.

3.12. 항균성 평가

항균성 평가를 위하여 하이드로젤을 제작하기에 앞서, 실크 피브로인 용액 및 효소·기질 용액을 0.2 μ m 필터에 투과시켜 멸균 과정을 거쳤다[77].

항균성 시험은 (주)제노젠에 위탁하여 진행하였다. 효소 가교 하이드로젤의 *E. coli*(*Escherichia coli*, ATCC 8739) 및 *S. aureus*(*Staphylococcus aureus*, ATCC 6538) 균주에 대한 항균 활성 효능을 확인하기 위해 paper disk agar diffusion assay를 수행하였다. 동결 보관한 각 균주를 해동하여 배지에 접종하고 진탕배양 (37℃, 130 rpm)한 후, 각 균주의 660 nm에서의 흡광도를 측정하여 1 이상이 되는 배양액을 시험에 사용하였다. 전배양 종료 후, 균 배양액을 한천배지에 분주한 후 균히고 직경 8 mm의 하이드로젤을 올려 37℃에서 24시간 동안 배양하였다. 배양이 완료된 후에 하이드로젤 주위의 투명환(clear zone)의 직경을 측정하였다.

평판 배지는 *E. coli*는 Nutrient medium을 사용하였고, 조성은 beef extract 3 g/L, peptone 5 g/L이었다. SF/GOx/HRP의 항균성을 확인하기 위해서 추가적으로 glucose 2.5 g/L를 첨가한 평판 배지에서도 항균성 시험을 진행하였다. *S. aureus*는 Trypticase soy medium을 사용하였으며 그 조성은 pancreatic digest of casein 17 g/L, pancreatic digest of soybean meal 3 g/L, NaCl 5 g/L, K₂HPO₄ 2.5 g/L, glucose 2.5 g/L 이다.

제 4 장 결과 및 고찰

4.1. 효소 가교 실크 피브로인 하이드로젤의 제작

본 연구에서는 효소 가교 실크 피브로인 하이드로젤의 제작에 있어 과산화수소의 HRP 비활성화 문제를 해결하기 위해 그 기질의 범위를 넓히고자 HRP와 GOx를 함께 사용하여 포도당에 의해 젤화되는 하이드로젤을 제작하고 그 특성을 분석하였다. 따라서 연속 효소 가교 실크 피브로인 하이드로젤(SF/GOx/HRP)을 제작하고, 대조군으로서 과산화수소에 의해 젤화가 시작되는 단독 효소 가교 실크 피브로인 하이드로젤(SF/HRP)을 제작하였다. Figure 3과 같이 하이드로젤을 제작하였으며, 두 하이드로젤 모두 37℃에서 2시간 동안 충분한 젤화가 일어날 수 있도록 하였다. 완전히 젤화가 일어난 후에는 PBS(pH=7.4)에 수세 후 침지하여 37℃에서 24시간 동안 안정화하였다. 제작한 SF/GOx/HRP는 SF/HRP와 유사하게 투명하고 탄성이 있었다.

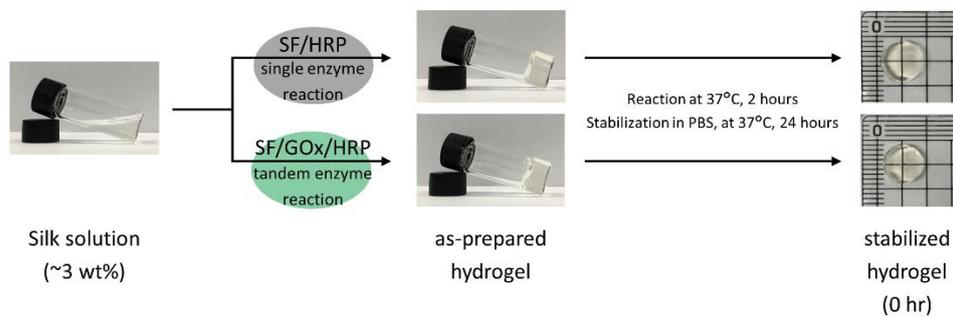


Figure 3 . Preparation of enzymatic crosslinked hydrogels via single and tandem enzyme reaction. After the reaction was completed, the hydrogel was sufficiently swelled by immersing in PBS (pH 7.4) at 37°C for 24 hours. This time point was regarded as a fully stabilized hydrogel and was determined as the 0 hr time point.

4.2. 효소 가교 실크 피브로인 하이드로젤의 초기 젤화 거동

4.2.1. 젤화 시간 및 가교 속도

각 반응계에서 하이드로젤이 잘 형성되는 것을 확인하여, 먼저 SF/HRP와 SF/GO_x/HRP가 초기 젤화 거동에서 어떠한 차이를 보이는지 확인해 보고자 하였다. 초기 젤화 거동은 하이드로젤의 젤화 시간과 형광으로 분석하였다.

먼저 바이알 기울기 시험을 통해 37°C에서의 젤화 시간을 측정하였을 때(Figure 4(a)), SF/GO_x/HRP가 SF/HRP 보다 약 2.7 배 빠르게 젤화가 일어나는 것을 확인하였다(SF/HRP: 5.4 ± 0.2 min, SF/GO_x/HRP: 2.0 ± 0.1 min). 이에 대한 명확한 분석을 위해 다음과 같이 형광 분석을 실시하였다.

하이드로젤은 용액 상태와 다르게 거시적으로 3차원 구조체를 유지할 수 있는 미시적인 물리적·화학적 네트워크 구조가 존재해야 한다[78]. 효소 가교 실크 피브로인은 다이-타이로신 결합의 형성으로 네트워크 구조를 이루어 젤화가 일어난다. 실크 피브로인의 다이-타이로신 형성은 형광 분석을 함으로서 실시간으로 관찰할 수 있기 때문에, 두 가교 반응계의 초기 젤화 거동을 비교하기 위해 형광 분석을 진행하였다(Figure 4(b-c)).

Figure 4(b)에서는 완전히 젤화가 이루어진 두 하이드로젤에 대하여 315 nm에서 여기(excitation)시켰을 때의 형광 방출 스펙트럼을 얻었다. 이는 실시간으로 다이-타이로신의 형성을 관찰하기에 적합하도록 가장 높은 강도로 형광을 방출하는 파장대를 확인하기 위함이었으며, 두 반응계 모두 405 nm에서 최고 강도를 보였다. 따라서 Figure 4(c)는 315 nm 여기(excitation), 405 nm 방출(emission) 형광을 감지하여 두 하

이드로젤에서의 다이-타이로신의 초기 형성 거동에 대해 살펴보았다. SF/GOx/HRP는 초기에 빠르게 형광 세기가 증가하였으나 약 5분 후에 강도가 더 이상 증가하지 않고 정체되었다. 반면 SF/HRP는 비교적 느리게 형광 세기가 증가하고 약 30분 간 그 강도가 증가한 후 정체되었다. 또한 최종적으로 도달한 형광 세기는 SF/GOx/HRP가 SF/HRP에 비해 약 2배 더 낮았다. 이 때 Figure 4(a)의 바이알 기울기 시험을 통해 관찰한 젤화 지점을 Figure 4(c)에 빨간 선으로 표시하였다.

분광 분석법과 더불어서, 형광 현미경을 통해 하이드로젤이 형광을 나타내는 것을 DAPI 필터로 관찰하여 실시간으로 이미지화 하였다. 먼저 Figure 5와 같이 완전히 젤화가 된 하이드로젤을 관찰하였을 때, 실크 피브로인 용액이 형광을 전혀 보이지 않는 것과 달리 효소 가교 하이드로젤은 강한 형광을 나타내었다. 따라서 하이드로젤의 젤화가 진행될 때 형광 세기의 변화를 Figure 6과 같이 형광현미경으로 확인하였다. 얻은 이미지를 정량적으로 분석하기 위해 각 이미지의 RGB 중 Blue 값을 추출하여 비교하면 Figure 4(c)와 유사한 양상을 보였다. SF/GOx/HRP는 초기에는 SF/HRP에 비해 높은 형광을 보이다 어느 정도 수준의 형광 세기에 도달하면 더 이상 증가하지 않고 정체되었고, SF/HRP는 초기에는 형광을 보이지 않다가 형광 세기가 크게 증가하는 양상을 보였다.

초기 젤화 거동을 바이알 기울기 시험 및 형광으로 살펴보았을 때, SF/GOx/HRP는 연속 효소 반응으로 반응 단계가 하나 더 추가되었음에도 불구하고 초기 젤화가 더 빠르게 일어났다. 또한 빠른 가교와 달리 SF/HRP에 비해 최종 가교 밀도는 낮았다. 이에 대해 먼저 빠른 젤화 속도에 대한 이해를 위해 다양한 조건에서의 초기 젤화 시간을 확인하여 그 원인을 알아보려고 하였다.

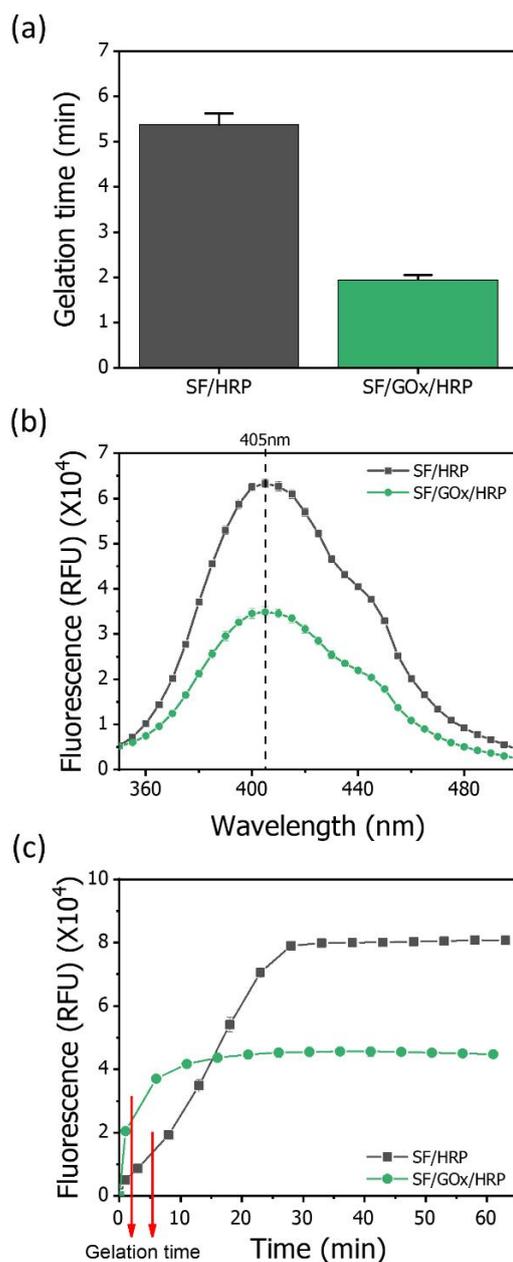


Figure 4. Gelation kinetics of SF/HRP and SF/GOx/HRP hydrogel. (a) Gelation time assessed by vial tilting method. (n=4) (b) Intrinsic fluorescence of di-tyrosine linkage emission spectrum after excited at 315 nm. (n=4) (c) Crosslinking kinetics investigated by intrinsic fluorescence of di-tyrosine linkage emitted at 405 nm after excited at 315 nm. (n=4)

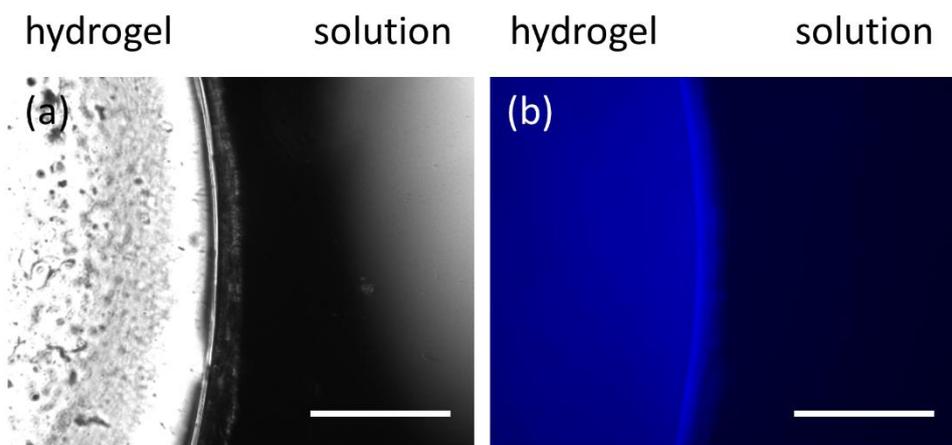


Figure 5. Blue fluorescence emission images of enzymatically crosslinked silk fibroin hydrogel (left) and precursor solution (right) when irradiated with DAPI filter. (a) Transmittance image and (b) blue fluorescence image. (scale bar = 500 μm)

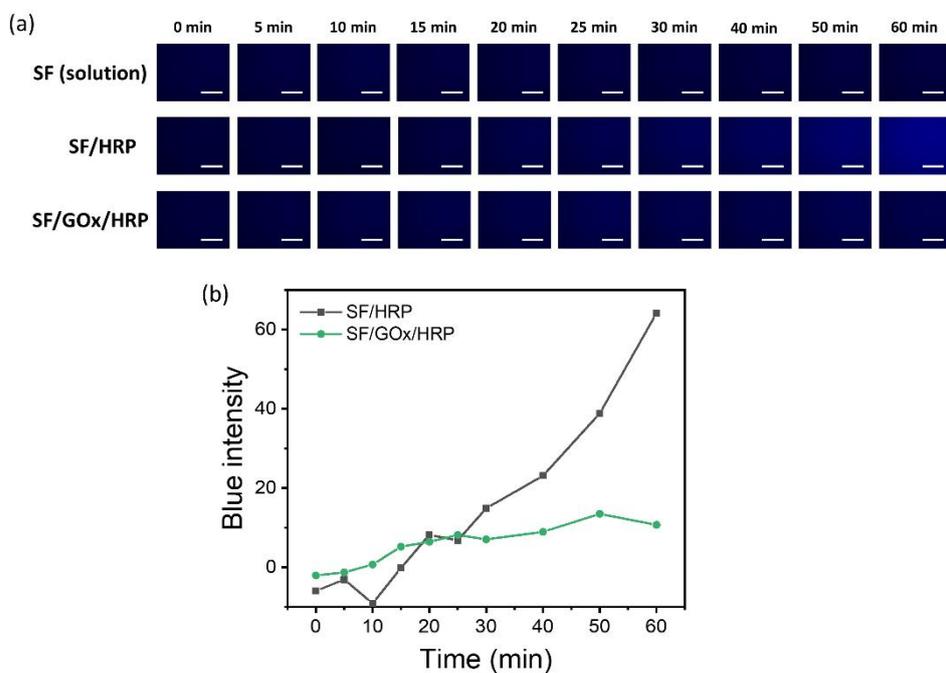


Figure 6. Blue fluorescence emission changes of enzymatically crosslinked silk fibroin hydrogels over time. (a) Blue fluorescence emission images of SF solution, SF/HRP hydrogel and SF/GOx/HRP hydrogel after adding each substrate when irradiated with DAPI filter. (scale bar = 500 μm) (b) Blue color intensity extracted from images.

4.2.2. 젤화 시간에 영향을 미치는 인자에 대한 고찰

SF/GOx/HRP가 SF/HRP보다 빠르게 젤화가 나타나는데, 그렇다면 SF/GOx/HRP의 젤화를 빠르게 하는 인자가 무엇인가를 살펴보고자 반응에 관여하는 화합물의 영향을 확인하였다. 반응에는 효소인 GOx와 HRP, 그리고 각각의 기질인 포도당(Glucose, Glc)과 과산화수소(H₂O₂)가 존재하며, GOx와 포도당의 반응으로 물과 글루코노-델타-락톤(Glucono- δ -lactone, GDL)이 생성된다. 따라서 반응계에 존재하는 모든 인자들의 영향을 독립적으로 확인할 수 있는 실험군을 설정하고 각 경우 젤화 시간이 어떻게 바뀌는지를 확인하여 각 인자의 영향을 살펴보고자 하였다. 실크 피브로인 용액을 기본으로 하여, 다음과 같은 6 가지 조합의 실험군을 설계하였다.

1. HRP/ H₂O₂: 단독 효소 가교 반응 조건
2. HRP/GOx/Glc: 연속 효소 가교 반응 조건
3. HRP/H₂O₂/GDL: GDL의 영향 확인
4. HRP/H₂O₂/Glc: 포도당의 영향 확인
5. HRP/GOx/H₂O₂: GOx의 영향 확인
6. HRP/GOx/H₂O₂/Glc: 각 효소의 기질을 모두 부가한 조건

이와 같이 실험을 설계하였을 때, Figure 7에서 확인할 수 있듯이 조건 2를 제외하고는 조건 1과 유사한 젤화 시간을 보였다. 조건 3에서는 SF/GOx/HRP 반응 시에 부가적으로 생성되는 GDL의 영향을 알아보았다. GDL은 수용액 상에서 글루콘산(gluconic acid)으로 가수분해가 일어나 수소 이온을 생성하는데, 기존의 연구에서 GDL의 첨가에 따라 실크 피브로인의 젤화가 단축되는 것을 확인한 바 있다[79]. 본 연구에서는 포도당이 GOx에 의하여 100% GDL로 전환된다는 가정 하에 2mM의 GDL을 첨가하였으나 Figure 7에서 보듯 젤화 시간의 단축은 관찰되지

않았다. 이는 기존의 연구에서 사용된 30mM의 GDL에 비하여 매우 적은 양이 부가되었기 때문에 그 영향이 미비한 것으로 생각된다. 조건 4에서는 SF/GOx/HRP 반응 시에 기질로 첨가되는 포도당의 영향을 알아보았다. 포도당은 HRP 내의 시스테인 잔기의 산화·환원 반응에 관여하며, 이 반응의 결과로 HRP의 활성 부위와 무관하게 직접 과산화수소를 발생한다고 알려져 있다[38]. 하지만 이러한 결과는 고농도의 HRP(~300 U/ml)와 고농도의 포도당(~250 mM) 조건에서 발생하는 것이므로 본 실험의 조건(HRP(~10 U/ml), 포도당(~2 mM))에서는 젤화 시간의 단축을 촉진할 정도의 영향을 주지는 않는 것으로 보인다. 조건 5에서는 GOx가 HRP의 효소 활성을 증가시키거나 HRP와 과산화수소의 반응을 촉진하는지를 알아보려고 하였다. 일부 연구에서는 GOx와 HRP가 근접해 있는 경우 효소의 활성이 증가한다는 보고가 있다[80]. 하지만 이 실험 조건에서는 GOx는 오히려 과량의 과산화수소 하에서 비활성화 될 가능성이 있고[81], 최근의 연구에 의하면 두 효소가 자유롭게 존재하면 HRP와 GOx 간의 효소 활성 영향은 없는 것으로 보고되었다[68]. 따라서 GOx 자체가 HRP와 과산화수소의 반응을 증대시키지는 않는 것으로 생각된다. 조건 6에서는 각 효소의 기질을 모두 부가하였음에도 불구하고 젤화 시간을 단축하지 못하였다.

이로부터 SF/GOx/HRP에서 특정 화합물의 생성 또는 존재로 인하여 젤화가 촉진되는 것이 아님을 확인할 수 있다. 젤화 시간이 지연된 조건 1, 3-6을 살펴보면 모두 과산화수소가 직접적으로 부가된 조건이었다. 이는 기존 문헌에서 확인할 수 있듯이 과산화수소로 인하여 HRP가 비활성화되어 효소 활성이 저해되기 때문에[22, 56-59] 젤화 속도가 지연된 것으로 보인다. 반면 SF/GOx/HRP는 SF/HRP와 달리 과산화수소가 간접적으로 적은 양이 꾸준히 공급된다. 따라서 반응의 단계가 더 추가되었음에도 불구하고 HRP의 비활성화를 최소화하며 반응이 진행되어

빠르게 젤화가 일어나는 것으로 생각된다.

이와 같이 다양한 조건의 젤화 시간을 측정하여 과산화수소가 HRP의 활성에 있어 일종의 저해제로 작용하는 것을 확인하였다. 하지만 설계한 6개의 실험군에는 실크 피브로인이 포함되어 있기 때문에 실크 피브로인이 효소 반응속도에 미치는 영향은 확인할 수 없었다. 따라서 실크 피브로인의 첨가에 따라 각 효소의 활성이 달라지는지를 확인해 볼 필요가 있다.

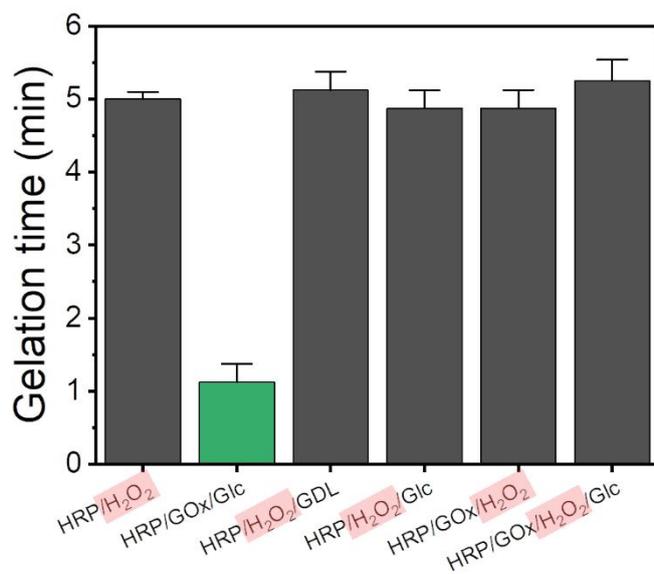


Figure 7. Gelation time of hydrogels with different enzyme/substrate conditions, assessed by vial tilting method. (n=4)

4.2.3. 실크 피브로인의 효소 활성에의 영향- model study

실크 피브로인은 과거 GOx의 고정화 지지체로 사용이 되었으며 GOx의 활성을 오랜 기간 유지하는 데 도움을 준다고 알려져 있다[82]. 따라서 본 연구에서도 실크 피브로인이 GOx의 활성에 영향을 미쳐 SF/GOx/HRP의 젤화 시간 단축에 일조할 수 있다. 이에 따라 실크 피브로인의 존재 유무에 따른 효소의 반응속도론적 분석을 진행하였다.

반응속도론적 분석을 위해서는 ABTS assay를 진행하고 라인위버-버크(Lineweaver-Burk) 근사를 하였다. ABTS assay는 실제 하이드로젤을 제작할 때와 동일한 효소 농도로 진행할 수 없기 때문에 선행 연구 [68]와 비슷한 수준의 농도에서 실험을 진행하였다. 실크 피브로인의 농도도 동일한 배수로 희석하여 실제 젤화 조건과 유사한 환경을 만들고자 하였다. 라인위버-버크 근사는 특정 물질이 효소의 활성에 미치는 영향을 보다 정확히 알 수 있다는 장점이 있어[83], 이를 본 실험에 적용하여 실크 피브로인의 존재 유무에 따라서 효소 활성이 바뀌는지를 알아보았다.

Figure 8은 각 효소의 활성에 실크 피브로인이 미치는 영향을 살펴본 것이다. 검은 선은 효소 단독이며, 붉은 선은 실크 피브로인 존재 하에서의 라인위버-버크 근사선이다. 실크 피브로인이 첨가된 경우 각 효소의 활성이 저해되는 것처럼 보이나 통계적 유의성은 없었다. 따라서 실크 피브로인의 존재가 HRP와 GOx의 활성을 촉진하거나 저해하는 영향을 준다고 볼 수 없다. GOx를 실크 피브로인에 고정화한 경우 효소의 활성이 오랜 기간 유지되는 것은 실제 효소의 활성이 증가되었다는 것을 의미하지는 않는다. 따라서 실크 피브로인이 GOx의 고정화 지지체로서 효소 활성의 유지에 도움을 줄 수는 있으나 자유 상태로 존재할 때 GOx의 활성 증가에 영향을 미치지 않는 것으로 보인다.

한편, SF/GOx/HRP 반응은 기존 SF/HRP 반응에 GOx의 반응을 추가

한 것이다. 따라서 GOx에서 생성된 과산화수소가 HRP에 도달하는 것을 고려하기 위해 과산화수소의 확산 속도를 계산해보았다. 과산화수소의 용액 상에서의 확산 계수는 $1.83 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ (at 37°C)이며[84] 1 nM HRP, 1 nM GOx가 용액 상에서 자유롭게 존재할 때 GOx와 HRP 간 평균 거리는 1 μm 인 것으로 보고되어 있다[85]. 따라서 이 거리에서는 GOx에서 생산된 과산화수소가 약 0.62 ms 만에 HRP까지 확산되기 때문에 과산화수소의 확산에 걸리는 시간은 무시할 만하다[68].

4.2.2와 4.2.3의 결과, 초기 젤화 거동에 반응계 내에 존재하는 과산화수소 외의 다른 화합물은 영향을 주지 않는 것을 확인하였다. 따라서 SF/GOx/HRP에서 젤화가 빨리 일어나는 원인은 과산화수소를 간접적으로 공급함으로써 과량의 과산화수소로 인한 HRP의 활성 저하가 일어나지 않기 때문인 것으로 생각된다.

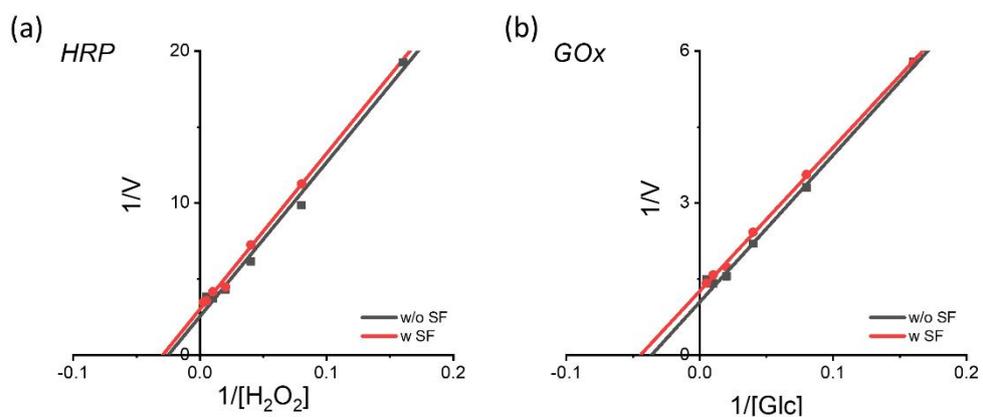


Figure 8. Representative double-reciprocal (Lineweaver-Burk) plot of each enzyme reaction with or without silk fibroin (conc. = 0.0006 wt%).

4.2.4. 기질 농도 조건 변화

앞선 절에서는 HRP 가교 실크 피브로인 하이드로젤을 제작하는 기존의 연구[41, 64]에서와 비슷한 수준의 과산화수소 농도에 대해 대표적으로 실험을 진행하였다. 선행 연구에서는 단독 효소 가교 반응에서 직접적인 과산화수소의 부가에 의해 HRP가 비활성화되고, 과산화수소의 농도가 달라짐에 따라 그 젤화·가교 속도 및 가교 밀도가 달라진다고 하였다[22, 56–58]. 따라서 SF/GOx/HRP에서 포도당의 농도의 변화에 따라 발생하는 젤화 거동의 차이에 대해 알아보려고 하였다. 이에 따라 과산화수소 및 포도당의 농도를 기존의 2 mM을 기준으로 하여 0.5 – 8.0 mM로 다양하게 설정하여 가교 속도 및 밀도를 형광으로 분석하였다.

먼저 Figure 9(a)에서는 바이알 기울기 시험으로 과산화수소와 포도당의 농도에 따른 젤화 시간을 측정하였다. SF/HRP에서는 과산화수소의 농도가 증가함에 따라 젤화시간도 함께 지연되는 것을 확인하였다. 이는 기존 연구[57, 59]에서의 보고와 유사한 결과로, HRP 가교 반응은 과량의 과산화수소의 존재 하에서 효소가 비활성화되기 때문에 오히려 과산화수소의 농도가 증가할수록 젤화 시간은 느려지는 양상을 보였다. 반면에 SF/GOx/HRP에서는 포도당의 농도가 2 mM 이하일 때 젤화 시간이 길어졌으며, 이는 효소 가교에 의한 젤화가 일어날 정도의 충분한 과산화수소가 공급되지 못한 것으로 생각된다. 한편 포도당의 농도가 2 mM 이상에서는 큰 차이 없이 비슷한 수준의 젤화 시간(약 2분 가량)을 나타내었다. 이는 연속 효소 가교 반응에서 GOx의 농도 및 활성은 일정하므로 간접적으로 과산화수소가 공급되는 속도가 일정하기 때문이다.

이러한 경향은 Figure 9(b–c)의 다이-타이로신 형광 분석을 통해서 재확인 가능하다. SF/HRP의 초기 가교 속도를 확인해보면 과산화수소의 농도가 높아질수록 기울기가 완만해지며 다이-타이로신의 형성 속도가

감소하는 것을 확인할 수 있다. 반면에 SF/GOx/HRP에서는 포도당의 농도가 높아질수록 기울기가 비교적 증가하다 포도당의 농도가 2 mM 이상일 때는 초기 기울기가 유사하였다. 이는 앞서 확인한 Figure 9(a)의 결과와 동일한 이유로 설명 가능하다.

여기서 초기 형광 세기가 증가한 이후 더 이상 형광이 증가하지 않는 구간은 다이-타이로신 가교가 더 이상 진행되지 않아 형광 세기가 정체되거나 감소하는 것으로 생각할 수 있다. 따라서 이 구간의 형광 세기는 최종적으로 제작된 하이드로젤의 다이-타이로신 가교 밀도를 반영한다고 볼 수 있다. 따라서 최종 형광 세기를 비교하여 각 하이드로젤의 가교 밀도의 차이를 비교·분석하고자 한다.

첫번째로 SF/GOx/HRP에서는 모든 포도당 농도에서 SF/HRP에서보다 최종 형광 세기가 낮았다. 이는 Figure 4(c)에서 확인된 결과와 마찬가지로이다. SF/GOx/HRP에서 포도당의 농도가 2 mM 이상일 때의 최고 형광 세기는 SF/HRP에서의 과산화수소 농도 0.5 mM 일 때의 최고 형광 세기와 유사한 수준을 보였다. 이로부터 GOx에 의해 과산화수소를 방출하게 될 때 모든 포도당이 반응에 참여하는 것이 아니라는 것을 유추할 수 있다. 이에 따라 실제로 효소에 의한 가교가 개시되고 난 후에 SF/HRP와 SF/GOx/HRP에서 잔존하는 과산화수소의 양을 살펴보았다. 하이드로젤 내부의 과산화수소를 직접적으로 정량하는 데에는 어려움이 있어 하이드로젤이 형성된 직후에 PBS 용액에 침지하여 확산되는 과산화수소를 정량하였다. SF/HRP에서는 과산화수소가 약 68 μM , SF/GOx/HRP에서는 약 0.28 μM 이 확산되었다. 따라서 SF/GOx/HRP에서는 비교적 적은 양의 과산화수소가 존재하기 때문에 HRP의 비활성화를 일으키지 않아 초기 젤화가 빨라질 수 있었던 것으로 보인다. 하지만 전체적으로는 적은 양의 과산화수소가 공급되어 최종 가교 밀도가 낮은 것으로 생각된다.

두번째로 SF/HRP에서는 과산화수소의 농도가 2 mM일 때의 형광 세기가 가장 높았는데 이는 기존 연구[64]와 유사한 결과이다. 즉, 최적 농도 범위보다 낮은 농도의 과산화수소를 부가하면 가교가 적게 일어나고 그보다 높은 농도의 과산화수소를 부가하면 HRP의 비활성화에 의해 가교 밀도가 낮아진 것으로 생각된다.

한편 포도당이 4.0, 8.0 mM 첨가되었을 때 최고 형광 강도가 나타났다가 감소하는 양상을 보였다. 이러한 형광 값의 후기 감소 경향은 선행 연구에서도 보고된 바 있다. 이에 대해 Tabatabai et al.[63]은 다이-타이로신 결합이 트라이-타이로신 결합으로 전환되었을 가능성을 제시하였다. HRP 가교 실크 피브로인 하이드로젤 내에 트라이-타이로신과 테트라-타이로신의 존재가 이미 보고된 바 있기 때문이다[64]. 따라서 오히려 다이-타이로신 결합의 감소가 발생하여 형광 값의 감소가 야기될 수 있다고 보고하였다.

따라서 SF/GOx/HRP에서는 GOx의 반응에 의해 과산화수소가 공급되므로 포도당이 충분히 부가된다면 포도당의 농도는 젤화 시간에 영향을 미치지 않았다. 또한 최종 가교 밀도가 동량의 과산화수소를 부가한 SF/HRP에 비해 낮은 것으로 보아 부가한 포도당이 모두 반응에 참여하지는 않는 것으로 보인다. 이로부터 SF/HRP와 달리 기질인 포도당의 농도가 높아져도 HRP의 비활성화를 일으키지 않는 낮은 농도의 과산화수소를 생성하는 것으로 생각된다.

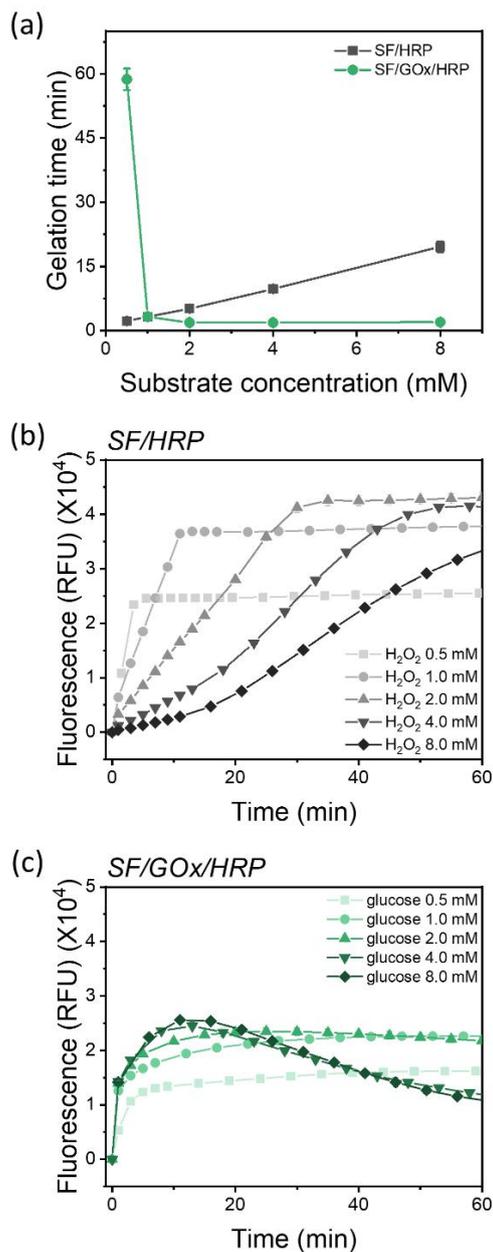


Figure 9. Gelation kinetics of SF/HRP and SF/GOx/HRP hydrogels with different substrate concentrations. (a) Gelation time assessed by vial tilting method (n=4), (b-c) Crosslinking kinetics of (b) SF/HRP and (c) SF/GOx/HRP hydrogels with different substrate concentrations. Intrinsic fluorescence was emitted at 405 nm after excited at 315 nm (n=4).

4.2.5. 효소 농도 조건 변화

앞선 절에서는 효소의 농도를 고정하고 기질인 과산화수소와 포도당의 농도를 변화하여 초기 젤화 거동의 차이에 대해 알아보았다. 이번에는 과산화수소와 포도당의 농도를 2 mM로 고정하고, GOx와 HRP의 효소 농도 비율을 기존의 조건인 1:1을 기준으로 2:1, 1:2로 변화하며 초기 젤화 거동을 살펴보았다. 이 때 GOx의 농도는 10 U/ml로 고정하였으며, HRP의 농도를 5 – 20 U/ml로 조절하였다.

먼저 Figure 10(a)에서 바이알 기울기 시험으로 젤화 시간을 확인해보면 효소의 농도 비율에 관계 없이 SF/GOx/HRP가 SF/HRP에 비해 빠르게 젤화가 일어난 것을 확인할 수 있었다. SF/GOx/HRP 실험군 내에서는 농도 비율이 2:1일 때 젤화 시간이 지연되었다. 반면 HRP의 농도가 기존 실험 조건인 1:1 보다 더 높아져도 젤화 시간의 단축이 나타나지는 않았다. 이는 Figure 10(b)에서 형광을 통해 다이-타이로신 형성 속도를 확인해보았을 때도 마찬가지로의 경향을 확인할 수 있었다. 즉, GOx/HRP 농도 비가 2:1일 때 가교 밀도가 더 천천히 증가하였고 1:1 과 1:2 조건에서의 가교 속도는 유사하였다. 한편, 형광으로 확인한 최종 가교 밀도는 SF/GOx/HRP 실험군 간의 차이가 나타나지 않았다. 이러한 차이는 일원 배치 분산 분석법(One-way ANOVA)과 Bonferroni 사후 검정을 통해 확인하였다.

GOx가 HRP보다 높은 농도일 때는 생성된 과산화수소의 양에 비해 HRP가 적게 존재한다. 따라서 간접적으로 과산화수소가 공급되었지만 HRP의 비활성화가 일어났기 때문에 젤화 시간이 지연된 것으로 생각된다. 반면 GOx가 HRP보다 같거나 낮은 농도일 때는 효소 농도 비가 초기 젤화 및 가교 속도에 큰 영향을 미치지 않았다. Zhang et al.[68]은 GOx의 농도가 더 낮은 경우에는 HRP 보다 항상 반응 속도가 느리며, 이에 따라 GOx가 속도 결정 단계가 되기 때문에 GOx/HRP 전체 반응

속도는 GOx의 반응 속도로 수렴한다고 보고하였다.

따라서 연속 효소 반응으로 HRP의 비활성화를 피해 젤화 시간을 단축할 수는 있으나 그 효소 농도 비에 따라 그 영향이 달라지는 것으로 보인다. GOx의 농도가 HRP보다 높으면 HRP의 비활성화를 야기할 수 있다. 하지만 GOx의 농도가 HRP보다 낮을 때는 결국 GOx의 반응 속도에 수렴하므로 효소 농도 비율에 관계 없이 젤화 시간이 단축되는 것으로 보인다. 하지만 형광 값의 증가가 끝난 후의 최종 형광 세기는 SF/GOx/HRP 실험군 간 차이가 없었으므로 최종 가교 밀도에는 효소 농도 비율의 영향이 적은 것으로 생각된다.

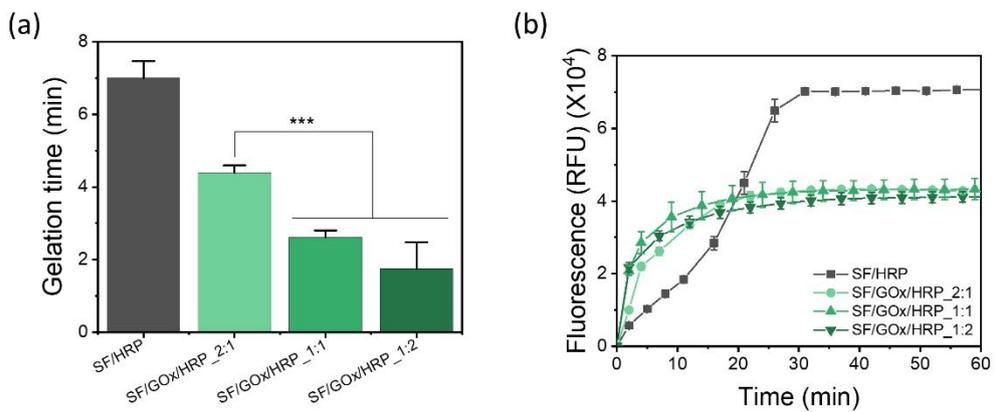


Figure 10. Gelation kinetics of SF/HRP and SF/GOx/HRP hydrogels with different enzyme concentration. (a) Gelation time assessed by vial tilting method (n=4, ***p<0.005), (b) Crosslinking kinetics of SF/HRP and SF/GOx/HRP hydrogels with different enzyme concentration. Intrinsic fluorescence was emitted at 405 nm after excited at 315 nm (n=4).

4.3. 효소 가교 실크 피브로인 하이드로젤의 역학적 특성 분석

4.3.1. 점탄성 및 역학적 특성

SF/GOx/HRP의 초기 젤화 거동을 살펴본 후, 제작한 SF/GOx/HRP의 역학적 특성을 확인하였다. 화학적 가교 실크 피브로인 하이드로젤은 시간이 경과함에 따라 압축 탄성률이 증가한다는 연구가 다수 보고되어 있다[60, 86]. 실크 피브로인은 화학적 가교를 하여도 여전히 열역학적으로 안정한 베타 시트 구조로 자가 조립 하기 때문이다. 베타 시트 구조는 실크 피브로인의 강도를 담당하는 이차 구조이므로 베타 시트가 발달하면 하이드로젤은 점차 탄성을 잃고 강도가 증가한다. 따라서 시간에 따른 역학적 특성의 변화 거동에 대해 살펴보았다.

먼저, 효소 가교로 제작한 하이드로젤의 전단 탄성률을 측정하여 비교하였다. 하이드로젤을 제작한 후 PBS에서 24 시간 동안 안정화 하였으며, 이 시점을 0 hr로 보았다. Figure 11(a-b)와 같이 0 hr, 24 hr 시점의 두 하이드로젤의 각 시점 별 저장 탄성률과 손실 탄성률을 측정하였다. 선형 점탄성 영역(LVR)에서의 저장 탄성률을 Figure 11(c)와 같이 계산하였을 때, SF/GOx/HRP는 시간 경과에 따라 저장 탄성률 값이 약 7.3배 증가하였다. (1.6 ± 0.1 kPa \rightarrow 11.6 ± 1.0 kPa, mean \pm s.d.) 반면 SF/HRP는 저장 탄성률 값이 약 1.7배 증가하였다. (3.7 ± 0.1 kPa \rightarrow 6.5 ± 0.6 kPa, mean \pm s.d.)

측정한 저장 탄성률로부터 식 (1)에 의해 가교 밀도를 구해 Table 4과 같이 나타내었다. SF/GOx/HRP의 0 hr 시점에서의 가교 밀도는 SF/HRP보다 2 배 이상 낮았다. 이는 Figure 4(c)에서 형광으로 확인한 바와 일치하였다. 하지만 이후 24 hr 시점에서는 저장 탄성률이 증가하며 SF/HRP보다 가교 밀도가 높아졌다.

같은 실험군에 대해 x 축을 전단 응력으로 두어 이에 대한 G' 과 G'' 값을 Figure 12와 같이 그래프로 나타내고 G' 과 G'' 의 교차점 (crossover point)을 확인하여 그 때의 응력을 비교하였다. SF/GOx/HRP에서는 0 hr 시점에서 G' 과 G'' 의 교차가 나타나지 않았으나 24 hr 시점에서는 G' 과 G'' 의 교차가 나타났다. 반면 SF/HRP는 0 hr 시점과 24 hr 시점의 응력은 동일하였다. 이로부터 SF/GOx/HRP는 SF/HRP와 달리 시간 경과에 따라 재료의 파괴에 필요한 응력이 감소하는 것으로 보인다[87].

24시간 이후의 샘플은 탄성률이 크게 증가하여 기기 상의 한계로 인해 저장 탄성률을 측정하지 못하였다. 따라서 이후의 샘플은 Figure 13과 같이 압축 탄성률을 측정하였다. 하이드로젤을 제작한 후 PBS에서 24 시간 동안 안정화 하였으며, 이 시점을 0 hr로 보았고 24시간 간격으로 120 hr 시점까지의 하이드로젤 압축 탄성률 변화 양상을 확인하였다. 압축 탄성률은 0 - 10% 변형률에서의 기울기 값으로 구하였다.

24 hr시점까지는 점탄성 분석 결과와 마찬가지로의 경향이 나타났다. SF/GOx/HRP는 0 hr 시점에서 24 hr 시점이 되자 압축 탄성률이 약 6.9 배 증가하였다. (6.4 ± 2.5 kPa \rightarrow 44.0 ± 5.7 kPa, mean \pm s.d.) 반면에 SF/HRP는 동일한 시간 동안 약 1.8 배 증가하였다. (19.4 ± 4.6 kPa \rightarrow 35.1 ± 7.6 kPa, mean \pm s.d.) 따라서 SF/GOx/HRP의 강성의 증가가 먼저 진행되기 시작하는 것을 알 수 있다. 하지만 48 hr 후에는 SF/HRP의 압축 탄성률이 크게 증가하여 SF/GOx/HRP 보다도 더 큰 강성을 보였다. 이 시점 이후에는 두 하이드로젤 모두 압축 탄성률의 큰 변화 없는 안정기가 지속되었다.

실크 피브로인 하이드로젤의 이러한 역학적 성질의 변화는 내부 구조의 변화에 의한 것으로 생각된다. 점탄성 및 역학적 분석 결과를 종합하면 SF/GOx/HRP는 시간 경과에 따라 강성이 증가하였으며 이러한 변화

는 SF/HRP에 비해 단계적으로 나타났다. 반면 SF/HRP는 48 hr 시점에서 급격하게 역학적 성질이 변화하였다. 하이드로젤을 제작하고 난 후에는 과산화수소 및 포도당의 공급이 없었기 때문에 효소로 인한 추가적인 화학적 가교의 가능성은 적다. 따라서 이는 실크 피브로인의 이차 구조 전이에 의한 것으로 추측 가능하다. 이에 대한 보완으로 시간에 따른 가교 밀도의 변화를 간접적으로 추가 분석하였다.

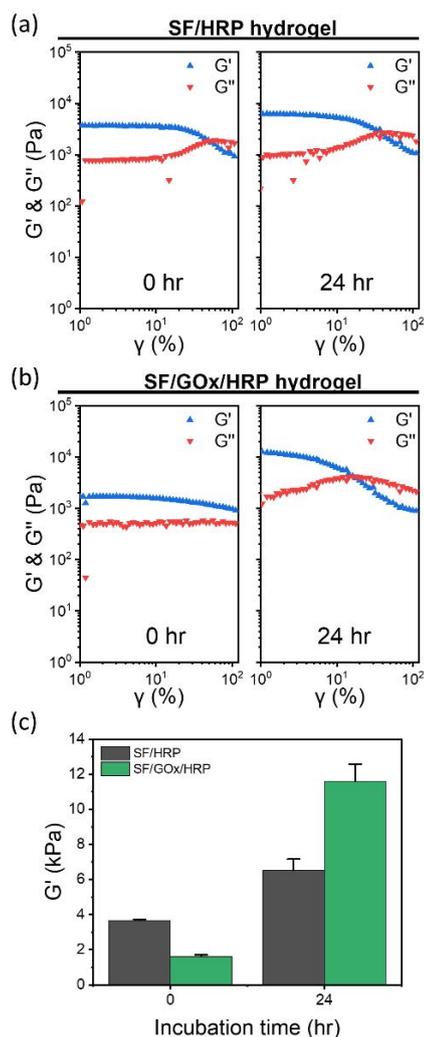


Figure 11. Representative rheological properties of (a) SF/HRP and (b) SF/GOx/HRP stabilized hydrogel over time, by strain sweep oscillatory mode. (c) Storage moduli (G') in the linear viscoelastic region (LVR) ($n=3$).

After the crosslinking reaction was completed, the hydrogel was sufficiently swelled by immersing in PBS (pH 7.4) at 37°C for 24 hours. This time point was regarded as a fully stabilized hydrogel and was determined as the 0 hr time point.

Table 4. Crosslinking density for SF/HRP and SF/GO_x/HRP stabilized hydrogel at 0 hr and 24 hr time points.

	SF/HRP	SF/GO _x /HRP
0 hr	1.479 mM	0.656 mM
24 hr	2.630 mM	4.677 mM

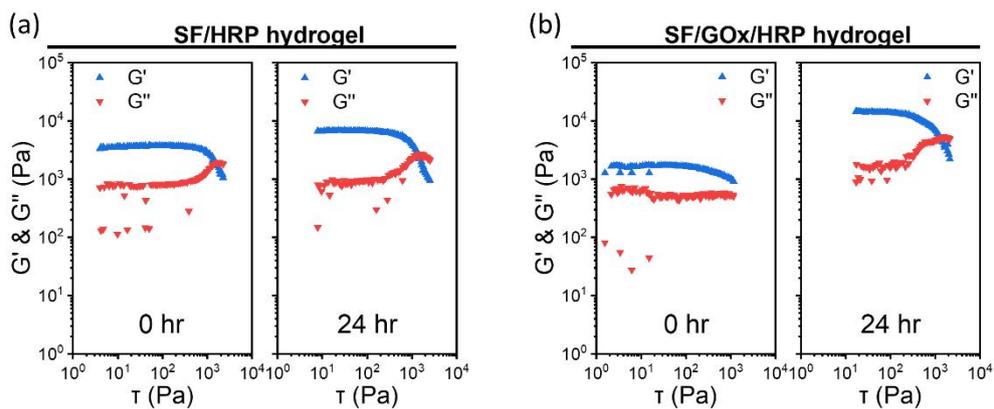


Figure 12. Representative rheological properties of (a) SF/HRP and (b) SF/GOx/HRP stabilized hydrogels over time, with the shear stress (τ) plotted on the x-axis.

After the crosslinking reaction was completed, the hydrogel was sufficiently swelled by immersing in PBS (pH 7.4) at 37°C for 24 hours. This time point was regarded as a fully stabilized hydrogel and was determined as the 0 hr time point.

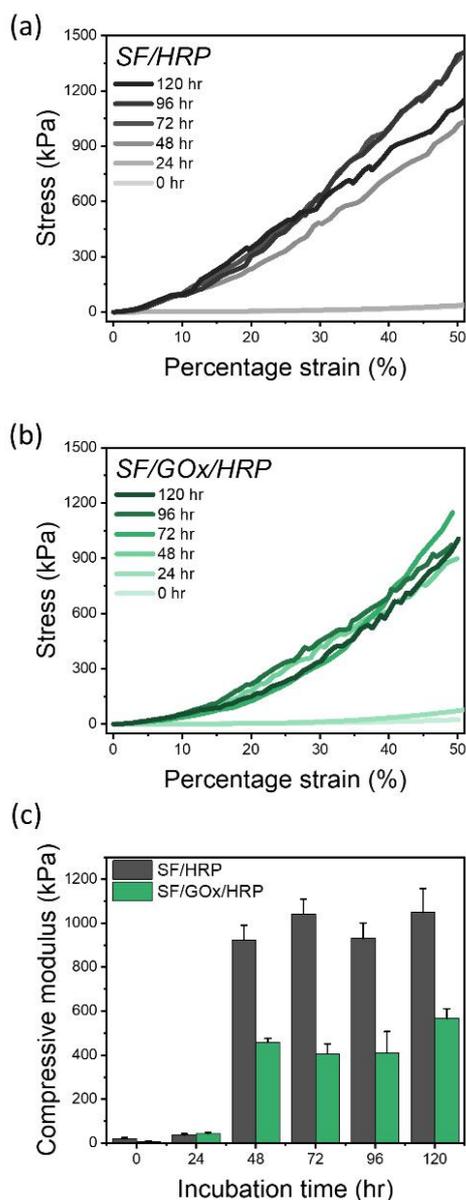


Figure 13. Representative compressive stress–strain curves of (a) SF/HRP and (b) SF/GOx/HRP stabilized hydrogels over time and (c) mean compressive modulus at ~10% strain (n=4).

After the crosslinking reaction was completed, the hydrogel was sufficiently swelled by immersing in PBS (pH 7.4) at 37°C for 24 hours. This time point was regarded as a fully stabilized hydrogel and was determined as the 0 hr time point.

4.3.2. 물 함유량

하이드로젤의 가교 밀도는 전단 저장 탄성률을 측정하여 식 (1)을 통해 구할 수 있기 때문에 Table 4과 같이 초기 0, 24 hr 시점은 가교 밀도를 계산하였다. 하지만 48 hr 시점 이후의 전단 저장 탄성률은 기기 상의 한계로 인해 측정이 어려워 이 시점 이후부터는 하이드로젤의 가교 밀도를 식 (1)에 따라 구할 수 없었다. 따라서 간접적인 방법으로 가교 밀도를 비교하기 위해 식 (2)에 따라 시간에 따른 하이드로젤의 물 함유량 변화를 측정하였다. 일반적으로 가교 밀도가 증가할수록 하이드로젤 내부의 물 함유량은 감소하기 때문에 가교 밀도에 대한 간접적인 평가가 가능하다[41].

Figure 14에서 SF/GOx/HRP는 48 hr 시점까지 꾸준히 물 함유량이 감소하였고 이후에는 변화가 나타나지 않았다. 반면 SF/HRP는 0 hr 시점에서 24 hr 시점이 되었을 때는 물 함유량의 큰 변화가 없었으나 48 hr 시점이 되자 물 함유량이 급격하게 감소하였고 이후에는 변화가 나타나지 않았다. 이는 앞선 압축 탄성률 데이터와 유사한 경향성을 보이는 것으로, 48 hr 이전의 시점까지 하이드로젤 내 구조의 변화가 일어나는 것으로 보인다.

점탄성/역학적 특성 및 물 함유량 변화를 통해 경시적으로 하이드로젤의 변화가 일어나며, 이러한 변화가 추가적인 화학적 가교가 아닌 실크 피브로인의 물리적 상호작용에 기인한다고 생각된다. 따라서 이를 뒷받침하기 위해 실크 피브로인 하이드로젤의 이차 구조를 분석하였다.

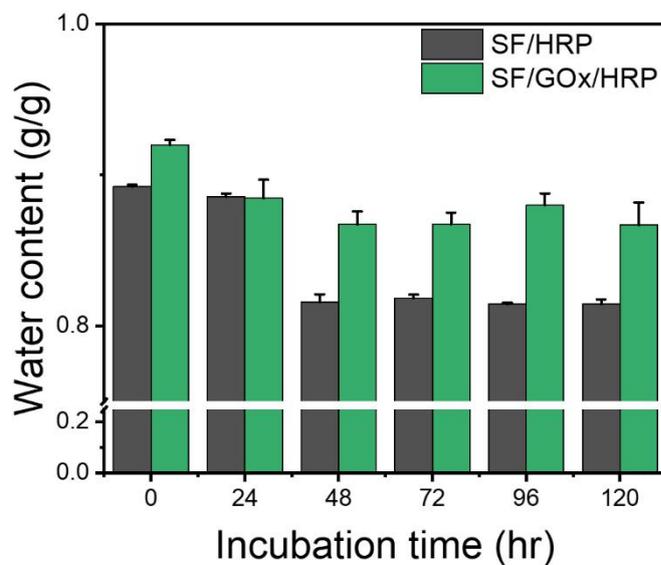


Figure 14. Swelling ratio of SF/HRP and SF/GOx/HRP stabilized hydrogels over time, measured by gravimetric method (n=6).

After the crosslinking reaction was completed, the hydrogel was sufficiently swelled by immersing in PBS (pH 7.4) at 37°C for 24 hours. This time point was regarded as a fully stabilized hydrogel and was determined as the 0 hr time point.

4.3.3. 이차 구조 전이

앞서 나타난 시간 경과에 따른 역학적 성질 및 가교 밀도 변화의 원인 분석을 위해 먼저 두 하이드로젤의 이차 구조 전이를 알아보려고 하였다. 이는 Figure 15(a-b)과 같이 amide I 스펙트럼으로 확인하였다. 이때, 4.3.1-4.3.3 절에서 48 hr 시점 이후에서는 특성 변화가 크지 않았기 때문에 72 hr 시점까지의 이차 구조만 분석하였다. 스펙트럼 상에서 나타난 결과로부터 SF/HRP는 24 hr 시점까지 랜덤 코일 구조를 유지하다가 48 hr 시점 이후 베타 시트 구조가 급격하게 발달하는 것을 확인할 수 있었다. 반면 SF/GOx/HRP는 초기 0 hr 시점에서는 랜덤 코일 구조를 나타내지만 24 hr 시점 이후부터 점차 베타 시트 구조가 발달했다.

이차 구조의 발달에 대해 보다 정확히 비교하기 위해 Table 3과 같이 11개의 피크로 디컨볼루션을 시행하였다. 각 가우시안 곡선의 밑면적을 계산하고 5개의 이차 구조가 전체에서 차지하는 비율을 계산하여 Figure 15(c-d)와 같이 나타내었다. SF/GOx/HRP는 0 hr 시점에서 베타 시트의 함량이 약 16%이었으나, 24 hr 시점에서 베타 시트가 약 29%가 되었다. 이후 48 hr 시점에서 다시 증가하여 베타 시트가 약 37%가 되었으며 72 hr 시점에서 이를 유지하였다. 반면 SF/HRP는 0, 24 hr 시점에서 베타 시트의 함량이 약 16%이었으며 이는 0 hr 시점의 SF/GOx/HRP와 유사한 수준이다. 48 hr 시점에서는 베타 시트 함량이 2 배 가량 급격히 증가하여 약 37%가 되었으며 마찬가지로 72 hr 시점에서 더 이상 증가하지 않았다. amide I 스펙트럼의 분석을 통해 두 하이드로젤 모두 시간이 경과함에 따라 이차 구조의 전이가 일어난 것을 확인했다. SF/GOx/HRP는 비교적 빠르게 베타 시트의 발달이 시작되었기 때문에 Figure 11(c), 13(c)의 전단 탄성률 및 압축 탄성률 결과에서 SF/GOx/HRP의 24 hr 시점의 강성이 더 크게 나타난 것으로 보인다.

반면 48 hr 시점 이후에 SF/HRP 및 SF/GOx/HRP에서 베타 시트의 발달이 일어났기 때문에 두 시료에서 모두 탄성률이 크게 증가하였다. 한편 48 hr 시점의 전체적인 베타 시트의 비율은 두 하이드로젤에서 동일하였는데도 불구하고 SF/GOx/HRP의 탄성률이 더 낮게 나타났다. 즉, 최종적인 역학적 성질의 차이에 베타 시트 구조의 함량이 중요한 요인은 아닌 것을 알 수 있다.

이러한 차이에 대한 하이드로젤의 결정화도 분석을 위해 XRD 분석을 진행하였다. XRD 그래프의 해석에 앞서, 31.6° 에서 나타난 피크는 하이드로젤을 보관한 PBS의 NaCl 염에 의해 나타나는 피크로 보인다[88]. Figure 16(a)에서 나타난 SF/HRP의 이차 구조 전이 거동을 살펴보면, 0, 24 hr에서는 베타 시트 구조를 나타내는 Silk II 피크로 알려져 있는 20.7° 의 피크가 나타나지 않고 완전한 스펙트럼을 나타낸다. 하지만 48 hr에서는 20.7° 의 피크가 뚜렷하게 나타나며 Silk II 구조로 전이된 것을 알 수 있다. 반면 Figure 16(b)로 SF/GOx/HRP의 이차 구조 전이 거동을 확인해보면 24 hr부터 20.9° 의 피크가 나타나며 48 hr에서 20.7° 의 피크가 나타났다. 하지만 최종적으로 나타난 피크에 대해 식(3)과 같이 결정화도(X_c) 분석을 진행해보면 SF/GOx/HRP는 약 17.3%, SF/HRP는 약 18.8%로 두 실험군 간 뚜렷한 차이가 나타나지 않았다. 즉, 하이드로젤의 결정화도 역시 역학적 성질의 차이에 미치는 영향은 적은 것으로 생각된다.

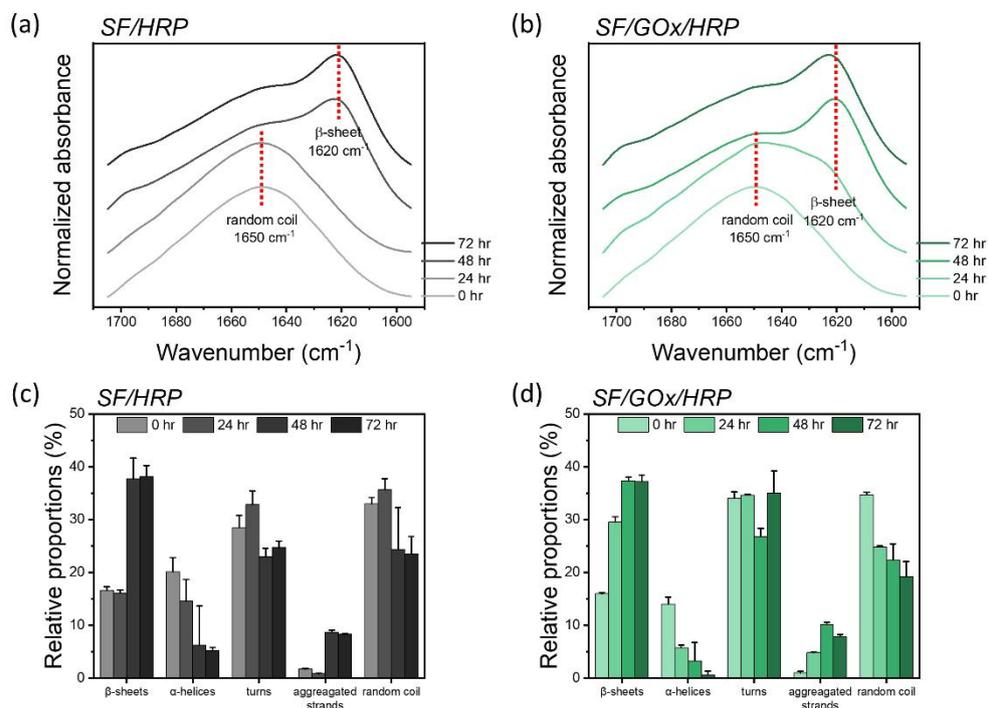


Figure 15. The transition of protein secondary structure. Representative ATR-FTIR spectra of (a) SF/HRP and (b) SF/GOx/HRP stabilized hydrogels over time. (c-d) Relative proportions (%) of each secondary structure over time, calculated by multi-peak deconvolution ($n=3$).

After the crosslinking reaction was completed, the hydrogel was sufficiently swelled by immersing in PBS (pH 7.4) at 37°C for 24 hours. This time point was regarded as a fully stabilized hydrogel and was determined as the 0 hr time point.

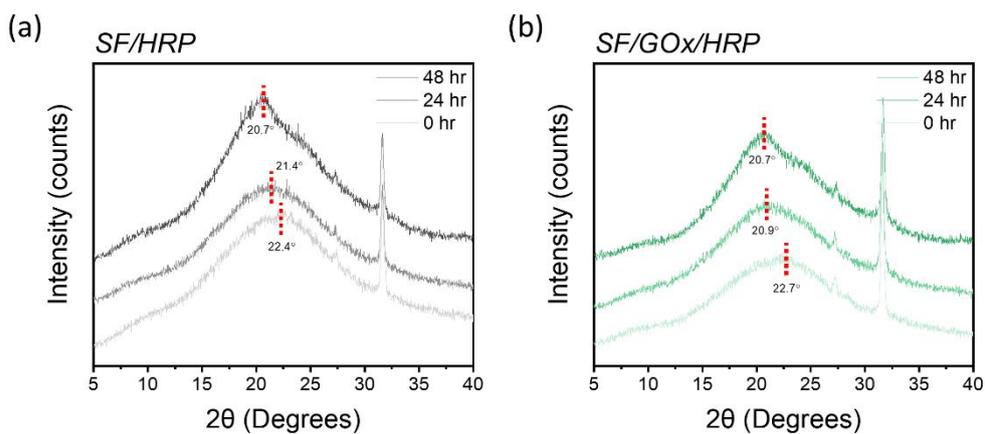


Figure 16. The transition of XRD diffraction intensity of (a) SF/HRP and (b) SF/GOx/HRP stabilized hydrogels over time.

After the crosslinking reaction was completed, the hydrogel was sufficiently swelled by immersing in PBS (pH 7.4) at 37°C for 24 hours. This time point was regarded as a fully stabilized hydrogel and was determined as the 0 hr time point.

4.3.4. 형태학적 특성

앞서 시간에 따른 하이드로젤의 이차 구조 특성 변화를 살펴 보았고, SF/GO_x/HRP의 단계적인 역학적 성질 변화 양상이 베타 시트 구조의 발달 속도에 기인하는 것을 확인하였다. 하지만 최종적으로 나타나는 SF/GO_x/HRP와 SF/HRP의 이차 구조 및 결정화도는 역학적 성질 차이에 거의 영향을 미치지 않는 것으로 생각된다. 이에 따라 추가적으로 하이드로젤 내부의 공극 구조를 살펴보기 위해 주사 전자 현미경을 사용하여 동결 건조한 하이드로젤의 단면을 관찰하였다[89].

먼저 Figure 17에서 시간에 따른 공극 크기의 변화 양상을 살펴보면, 전체적으로 앞선 데이터와 비슷한 경향이 나타났다. 즉, 0 hr 시점에서 SF/GO_x/HRP의 공극 크기는 동일 시점의 SF/HRP에 비해 컸다. 이후 24 hr 시점에서 공극의 크기가 감소하였는데 공극 벽이 나타나며 비연속적으로 작은 공극이 형성되는 것이 아닌 미세 섬유 구조가 형성되는 것이 관찰되었다(화살표). 48 hr 시점에서는 공극 벽이 나타나며 공극의 크기가 크게 감소하였으나 각 공극 내부에는 마찬가지로 미세 섬유 구조가 형성되어 있었다(화살표). SF/GO_x/HRP의 미세 섬유 구조는 실크 피브로인 고분자 사슬 간 물리적 상호작용인 베타 시트 구조가 형성되었을 때 나타나는 것으로 알려져 있다[90, 91].

공극의 크기 감소가 나타나는 이유는 하이드로젤이 시간에 따라 단단한 구조를 형성하여 동결 과정에서 얼음 결정이 크게 성장하지 못했기 때문이다. 따라서 SF/GO_x/HRP의 공극 크기가 시간에 따라 단계적으로 감소하며 역학적 성질 역시 단계적으로 변화한 것으로 생각된다. 한편 48 hr 시점에서 SF/HRP의 내부 공극이 더 조밀한 구조로 발달이 되며 최종적인 역학적 성질을 SF/HRP가 더 높았던 것으로 생각된다.

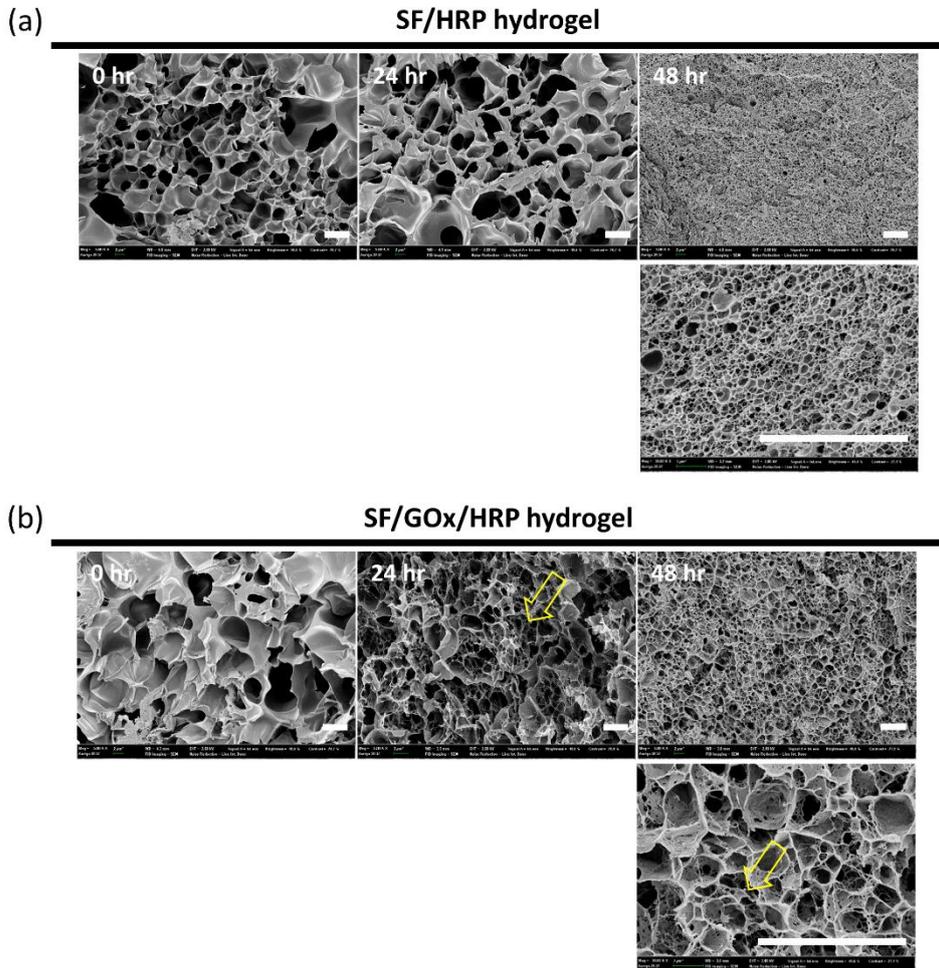


Figure 17. Inner pore structure changes of (a) SF/HRP and (b) SF/GOx/HRP stabilized hydrogels over time, investigated by FE-SEM. (scale bar = 5 μm)

After the crosslinking reaction was completed, the hydrogel was sufficiently swelled by immersing in PBS (pH 7.4) at 37°C for 24 hours. This time point was regarded as a fully stabilized hydrogel and was determined as the 0 hr time point.

4.4. 효소 가교 실크 피브로인 하이드로젤의 항균 특성 분석

4.4.1. 과산화수소 방출 거동

SF/GO_x/HRP는 GO_x가 하이드로젤 내에서 활성을 유지하는 한 포도당의 공급 하에서 과산화수소가 방출되는 것이 보고되었다[23, 27]. 이에 따라 SF/HRP와 SF/GO_x/HRP의 시간에 따른 과산화수소 방출량을 정량하였다. 분석을 위해 하이드로젤이 형성되자마자 그 위로 PBS 완충 용액을 올려 과산화수소의 확산 양상에 대해 확인하였다.

Figure 18에서 나타난 바와 같이, SF/HRP는 초기에 과산화수소가 빠르게 방출이 되고, 그 이후로 방출량이 감소하고 2 시간 만에 과산화수소의 방출이 더 이상 나타나지 않았다. 반면 SF/GO_x/HRP는 초기에는 과산화수소 방출이 확인되지 않았으나 1 시간 이후부터 6 시간 까지 천천히 과산화수소가 방출되었다. SF/HRP는 하이드로젤을 제작할 때 첨가한 과산화수소 중 가교 반응에 참여하지 않은 잉여 과산화수소가 방출된 것으로 생각되며, 그렇게 방출된 과산화수소는 빠르게 분해되어 더 이상 검출되지 않은 것으로 보인다. 하지만 SF/GO_x/HRP는 반응에 참여하지 않은 포도당이 안정적으로 용액 내에 존재할 수 있기 때문에 GO_x와 반응하며 과산화수소를 꾸준히 방출할 수 있었던 것으로 생각된다.

즉, SF/GO_x/HRP는 포도당의 존재 하에 과산화수소를 방출하는 특성이 있으므로 이를 활용하여 항균성 하이드로젤로의 응용 가능성을 탐색해보았다.

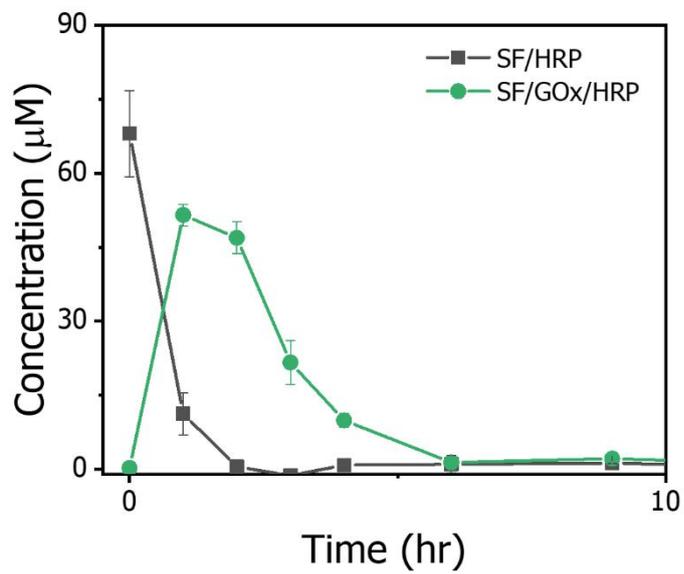


Figure 18. Quantitative H₂O₂ assay of SF/HRP and SF/GO_x/HRP as-prepared hydrogel. (n=4)

4.4.2. 항균성 시험

과산화수소는 라디칼을 형성하여 세포막을 파괴하기 때문에 높은 항균 작용을 보이는 것으로 알려져 있어 [92], 과산화수소를 방출하는 하이드로젤의 항균성을 측정하였다. 항균성은 하이드로젤 내부에 효소가 활성이 남아 있는 상태에서 측정해야 하므로 하이드로젤을 제작하고 PBS 버퍼 상에서 24 시간 동안 안정화 한 후 바로 항균성 시험을 진행하였다. 시험을 통해 항균성을 측정한 시료는 총 세 가지로, 실크 피브로인을 37°C에 보관하여 제작한 하이드로젤(음성 대조군, a)과 SF/HRP(b) 및 SF/GOx/HRP(c)이다.

Figure 19에서, (A)는 *E. coli* 균이 도말된 평판 배지로 배지의 구성에 포도당이 첨가되어 있지 않은 일반 배지를 사용하였다. 이 경우 세 시료에 대해 모두 투명환이 나타나지 않아 항균성이 없는 것으로 파악되었다. 반면 (C)에서 *S. aureus* 균에 대해 항균성을 시험하였는데, SF/GOx/HRP에 대해서는 투명환이 형성되었으며(15.6 ± 0.3 mm) 이러한 결과는 배지에 포도당이 포함되어 있기 때문에 하이드로젤 내의 GOx 효소로부터 과산화수소가 방출되었기 때문으로 보인다. 따라서 (B)와 같이 *E. coli* 균에 대해 기본 배지 구성에 포도당을 첨가하여 항균성을 시험하였으며, (A)와 다르게 SF/GOx/HRP에 대해 투명환이 형성되었다(12.2 ± 0.9 mm).

따라서 SF/GOx/HRP 내 GOx의 존재에 의해 포도당이 존재할 때 과산화수소가 방출되며, 이에 의해 그람 음성균과 양성균 모두에서 항균성이 나타나는 것을 확인하였다. 하지만 이러한 결과는 포도당의 존재 하에서만 나타났으므로, 혈액이나 체액에 노출되는 등의 포도당이 있는 환경에서 항균성을 나타낼 수 있을 것으로 기대된다. 특히 당뇨 환자의 경우 작은 상처에도 궤양이 생기기 때문에 상처의 초기 발견과 적절한 드레싱이 중요하다. 특히 상처 부위의 감염을 막기 위해 항균 작용을 하는

물질을 첨가하여 드레싱을 하는 경우도 존재한다. 따라서 혈당이 높은 당뇨 환자를 대상으로 한 항균 드레싱으로 활용 가능할 것으로 생각된다.

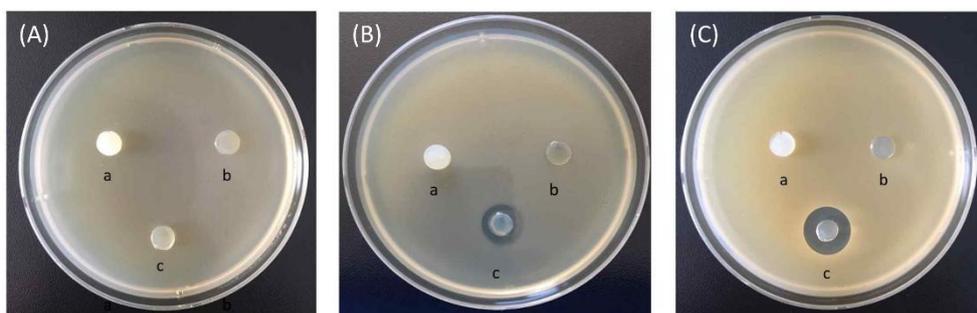


Figure 19. Representative antibacterial activity of SF (a), SF/HRP (b), SF/GOx/HRP (c) hydrogels showed by zone of inhibition. (A) *Escherichia coli*, (B) *Escherichia coli* with glucose in growth medium, (C) *Staphylococcus aureus*. (n=3)

After the crosslinking reaction was completed, the hydrogel was sufficiently swelled by immersing in PBS (pH 7.4) for 24 hours.

4.5. 연속 효소 가교 실크 피브로인 하이드로젤의 응용분야 제언

SF/GOx/HRP는 포도당에 의해 젤화가 개시되며 그 속도가 비교적 빠르다는 장점과 방출되는 과산화수소에 의해 항균성을 나타낸다는 장점이 있다. 이러한 장점을 활용하기 위한 응용 분야로서 혈액에 존재하는 포도당으로부터 젤화가 개시될 수 있다는 점에 착안하여 지혈제로서의 활용 가능성을 제안하고자 한다. WHO 기준에 따르면 공복 혈당이 100 mg/dL(약 5.5 mM) 이하일 때 정상 범위이기 때문에[93] 실크 피브로인과 두 효소의 혼합 용액이 이 농도의 포도당 용액으로부터 젤화가 이뤄지는지 확인하고자 하였다. 5.5 mM 포도당 용액은 실제 혈액을 모사하기 위하여 유사 생체 용액(Simulated body fluid, SBF)에 포도당을 용해하여 제조하였다. 또한 실크 피브로인과 효소를 혼합 용액 상태에서 포도당 용액에 노출시키는 방법은 실제로 응용되었을 때 보관 및 사용에 어려운 점이 있다. 따라서 혼합 용액을 동결건조하여 스펀지 형태로 제조하여 포도당 용액에 노출시켜 실험을 진행하였다.

Figure 20에서 볼 수 있듯이, 실크 피브로인 용액만을 동결 건조한 경우, 실크 피브로인과 HRP의 혼합 용액을 동결 건조한 경우, 실크 피브로인과 GOx, HRP의 혼합 용액을 동결 건조한 경우 모두 스펀지 형태로 제작되었다. 이 스펀지에 5.5 mM 포도당 용액을 첨가하고 2분 후에 형태가 안정하게 유지되며 젤화가 진행되었는지를 살펴보았다. GOx가 존재하지 않는 동결 건조 스펀지는 용액에 적셔지며 녹은 것 같은 형태가 되었지만 실크 피브로인과 GOx, HRP의 혼합 용액을 동결 건조한 스펀지는 2분 내로 젤화가 진행되었으며 최종 사진과 같이 하이드로젤이 형성되었다. 즉 SF/GOx/HRP는 혈액 내의 포도당 성분으로부터 젤화가 진행될 수 있기 때문에 지혈제로서 응용 가능할 것으로 생각된다.

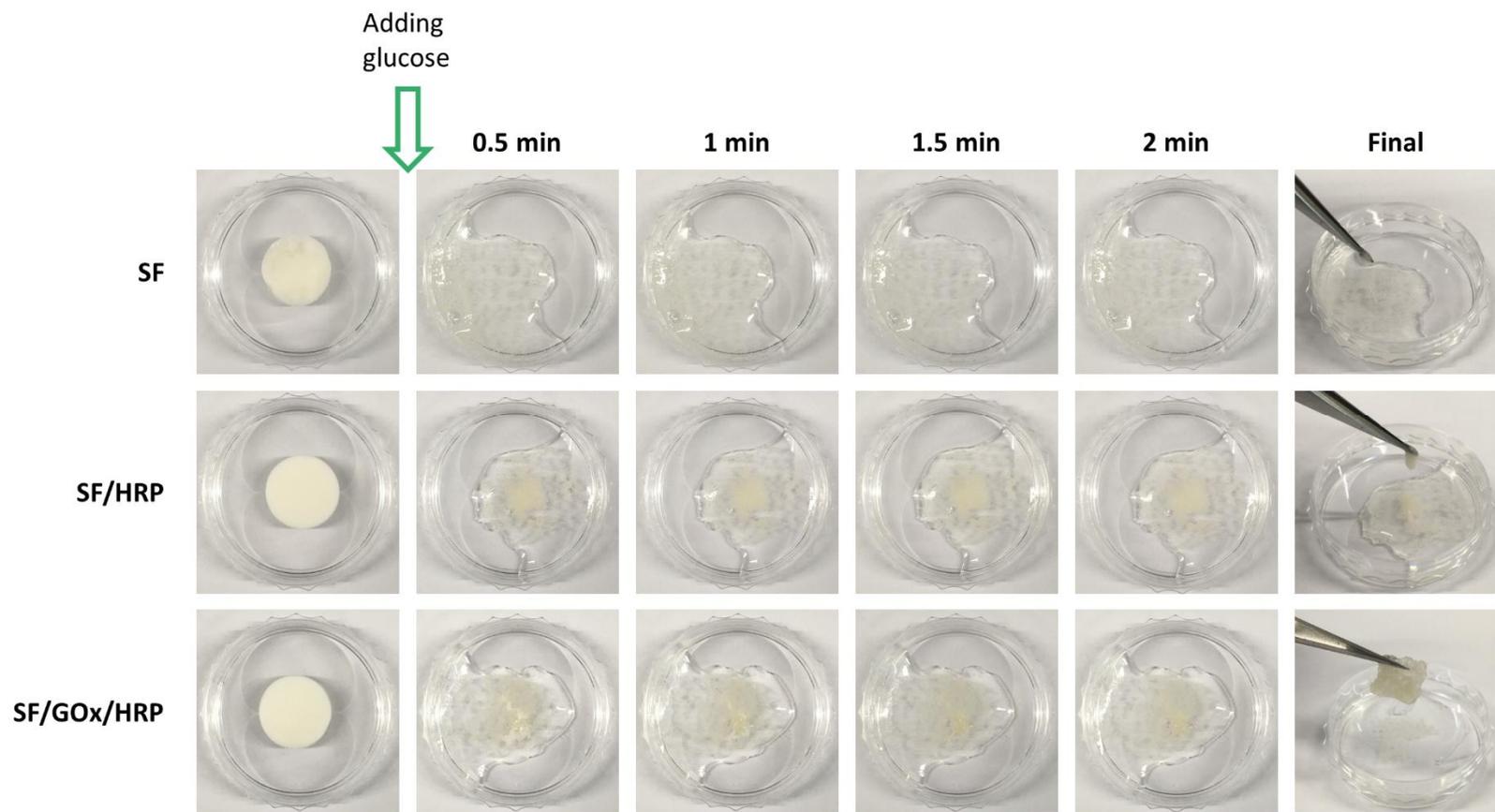


Figure 20. Gelation of SF, SF/HRP, SF/GOx/HRP lyophilized sponge against glucose solution (conc. = 5.5 mM).

제 5 장 결 론

본 연구에서는 HRP에 의한 효소 가교 실크 피브로인 하이드로젤을 제작함에 있어 과산화수소의 직접적인 부가에 의한 HRP의 비활성화 문제를 해결하기 위해 연속 효소 반응을 도입하였다. 연속 효소 반응을 위해 사용한 효소는 GOx로, 포도당에 의해 반응을 개시하고 과산화수소를 간접적으로 공급하여 실크 피브로인 하이드로젤을 제작하였다. 이에 따라 SF/GOx/HRP와 SF/HRP의 특성 분석을 진행하여 두 반응계로부터 제작된 하이드로젤을 비교·분석하였다. 이에 따른 결론은 다음과 같다.

1. SF/GOx/HRP는 SF/HRP에 비해 빠르게 젤화가 진행되었다. 이는 기존의 과산화수소에 의한 HRP의 비활성화 문제를 극복한 것으로 보이며 효소의 활성화에 실크 피브로인은 영향을 미치지 않았다.
2. 한편, SF/GOx/HRP의 다이-타이로신 형성에 따른 초기 가교 밀도는 SF/HRP에 비해 낮았다. 이는 HRP의 비활성화 문제와 별개로 GOx에 의해 공급되는 과산화수소의 양이 적기 때문인 것으로 생각된다.
3. 시간의 경과에 따라 두 하이드로젤의 이차 구조 전이 양상에 차이가 있었다. SF/GOx/HRP는 단계적으로 이차 구조가 전이되어 역학적 성질의 향상이 진행되었다. 이는 가교 밀도가 낮아 다이-타이로신 가교점 간 사슬 자유도 및 유동성이 높기 때문인 것으로 보인다.
4. 하지만 최종적으로 역학적 성질이 정상 상태에 도달하였을 때의 역학적 성질은 SF/HRP가 더 우수하였고 두 하이드로젤 간 베타 시트 구조 함량에는 차이가 없으나 결정화도가 더 높았다. 이는 가

교 밀도가 높아 더 작고 균일한 베타 시트 구조가 형성되었기 때문으로 생각된다.

5. 효소의 활성이 유지되는 경우, SF/GOx/HRP는 과산화수소를 방출하였다. 이에 따른 항균성 시험을 진행하였을 때 배지에 포도당이 첨가되어 있을 때 그람 음성 및 양성균 모두에서 항균성이 나타나는 것을 확인하였다.
6. 또한 포도당에 의해 젤화가 개시되는 점에 착안하여 혈중 포도당 농도와 동일한 포도당 용액에 의해 SF/GOx/HRP 동결건조 스펀지의 젤화가 일어나는 것을 확인하여 지혈제로의 응용 가능성을 확인하였다.

본 연구를 통해 연속 효소 반응에 의한 실크 피브로인의 초기 젤화 과정 및 제작한 하이드로젤의 특성에 대해 분석해보았다. SF/GOx/HRP는 포도당에 의해 젤화가 개시되며, 과산화수소의 방출에 의해 항균성을 갖는다는 점에서 향후 포도당 감지 하이드로젤이나 지혈제로서 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

참고 문헌

1. Vepari, C. and D.L. Kaplan, *Silk as a biomaterial*. Progress in Polymer Science, 2007. **32**(8–9): p. 991–1007.
2. Umhuza, D., et al., *Strategies for Tuning the Biodegradation of Silk Fibroin-Based Materials for Tissue Engineering Applications*. Acs Biomaterials Science & Engineering, 2020. **6**(3): p. 1290–1310.
3. Floren, M., C. Migliaresi, and A. Motta, *Processing Techniques and Applications of Silk Hydrogels in Bioengineering*. Journal of Functional Biomaterials, 2016. **7**(3).
4. Kim, D.H., et al., *Dissolvable films of silk fibroin for ultrathin conformal bio-integrated electronics*. Nature Materials, 2010. **9**(6): p. 511–517.
5. Liu, H.F., et al., *The interaction between a combined knitted silk scaffold and microporous silk sponge with human mesenchymal stem cells for ligament tissue engineering*. Biomaterials, 2008. **29**(6): p. 662–674.
6. Schneider, A., et al., *Biofunctionalized electrospun silk mats as a topical bioactive dressing for accelerated wound healing*. Acta Biomaterialia, 2009. **5**(7): p. 2570–2578.
7. Ribeiro, M., et al., *The role of dialysis and freezing on structural conformation, thermal properties and morphology of silk fibroin hydrogels*. Biomatter, 2014. **4**(1): p. e28536.
8. Kim, U.J., et al., *Structure and properties of silk hydrogels*.

- Biomacromolecules, 2004. **5**(3): p. 786–792.
9. Wang, X.Q., et al., *Sonication-induced gelation of silk fibroin for cell encapsulation*. Biomaterials, 2008. **29**(8): p. 1054–1064.
 10. Matsumoto, A., et al., *Mechanisms of silk fibroin sol-gel transitions*. Journal of Physical Chemistry B, 2006. **110**(43): p. 21630–21638.
 11. Srisawasdi, T., et al., *Electromechanical response of silk fibroin hydrogel and conductive polycarbazole/silk fibroin hydrogel composites as actuator material*. Materials Science & Engineering C–Materials for Biological Applications, 2015. **56**: p. 1–8.
 12. Kim, H.H., et al., *Characterization of silk hydrogel formed with hydrolyzed silk fibroin-methacrylate via photopolymerization*. Polymer, 2018. **153**: p. 232–240.
 13. Partlow, B.P., et al., *Highly Tunable Elastomeric Silk Biomaterials*. Advanced Functional Materials, 2014. **24**(29): p. 4615–4624.
 14. Hasturk, O., et al., *Enzymatically crosslinked silk and silk-gelatin hydrogels with tunable gelation kinetics, mechanical properties and bioactivity for cell culture and encapsulation*. Biomaterials, 2020. **232**: p. 19.
 15. McGill, M., J.M. Grant, and D.L. Kaplan, *Enzyme-Mediated Conjugation of Peptides to Silk Fibroin for Facile Hydrogel Functionalization*. Annals of Biomedical Engineering, 2020: p. 11.

16. Goczkowski, M., et al., *Properties of interpenetrating polymer networks associating fibrin and silk fibroin networks obtained by a double enzymatic method*. *Materials Science & Engineering C—Materials for Biological Applications*, 2019. **104**: p. 9.
17. Brif, A., et al., *Dynamic Photo-cross-linking of Native Silk Enables Macroscale Patterning at a Microscale Resolution*. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 2020. **6**(1): p. 705–714.
18. Kuang, D.J., et al., *Highly elastomeric photocurable silk hydrogels*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019. **134**: p. 838–845.
19. Choi, J., et al., *Silk Hydrogels Crosslinked by the Fenton Reaction*. *Advanced Healthcare Materials*, 2019. **8**(17): p. 12.
20. Khanmohammadi, M., et al., *Horseradish peroxidase-catalyzed hydrogelation for biomedical applications*. *Biomaterials Science*, 2018. **6**(6): p. 1286–1298.
21. Murphy, A.R. and D.L. Kaplan, *Biomedical applications of chemically-modified silk fibroin*. *Journal of Materials Chemistry*, 2009. **19**(36): p. 6443–6450.
22. Park, K.M., et al., *In situ cross-linkable gelatin-poly(ethylene glycol)-tyramine hydrogel via enzyme-mediated reaction for tissue regenerative medicine*. *Journal of Materials Chemistry*, 2011. **21**(35): p. 13180–13187.
23. Kim, B.Y., et al., *Dual Enzyme-Triggered In Situ Crosslinkable Gelatin Hydrogels for Artificial Cellular Microenvironments*. *Macromolecular Bioscience*, 2016. **16**(11): p. 1570–1576.

24. Nakahata, M., et al., *Versatility of hydrogelation by dual-enzymatic reactions with oxidases and peroxidase*. Biochemical Engineering Journal, 2018. **131**: p. 1–8.
25. Sakai, S., et al., *Polyvinyl alcohol-based hydrogel dressing gellable on-wound via a co-enzymatic reaction triggered by glucose in the wound exudate*. Journal of Materials Chemistry B, 2013. **1**(38): p. 5067–5075.
26. Sakai, S., K. Komatani, and M. Taya, *Glucose-triggered co-enzymatic hydrogelation of aqueous polymer solutions*. Rsc Advances, 2012. **2**(4): p. 1502–1507.
27. Lee, Y., et al., *Hydrogen Peroxide-Releasing Hydrogels for Enhanced Endothelial Cell Activities and Neovascularization*. Acs Applied Materials & Interfaces, 2018. **10**(21): p. 18372–18379.
28. Omenetto, F.G. and D.L. Kaplan, *New Opportunities for an Ancient Material*. Science, 2010. **329**(5991): p. 528–531.
29. Kapoor, S. and S.C. Kundu, *Silk protein-based hydrogels: Promising advanced materials for biomedical applications*. Acta Biomaterialia, 2016. **31**: p. 17–32.
30. Chen, X., et al., *Conformation transition kinetics of Bombyx mori silk protein*. Proteins–Structure Function and Bioinformatics, 2007. **68**(1): p. 223–231.
31. Foo, C.W.P., et al., *Role of pH and charge on silk protein assembly in insects and spiders*. Applied Physics a–Materials Science & Processing, 2006. **82**(2): p. 223–233.
32. Yucel, T., P. Cebe, and D.L. Kaplan, *Vortex-Induced Injectable*

- Silk Fibroin Hydrogels*. Biophysical Journal, 2009. **97**(7): p. 2044–2050.
33. Li, Z., et al., *Robust Protein Hydrogels from Silkworm Silk*. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2016. **4**(3): p. 1500–1506.
34. Leisk, G.G., et al., *Electrogelation for Protein Adhesives*. *Advanced Materials*, 2010. **22**(6): p. 711–+.
35. Lee, M.S., S.R. Seo, and J.C. Kim, *A beta-cyclodextrin, polyethyleneimine and silk fibroin hydrogel containing Centella asiatica extract and hydrocortisone acetate: releasing properties and in vivo efficacy for healing of pressure sores*. *Clinical and Experimental Dermatology*, 2012. **37**(7): p. 762–771.
36. Yeo, I.S., et al., *Collagen-based biomimetic nanofibrous scaffolds: Preparation and characterization of collagen/silk fibroin bicomponent nanofibrous structures*. *Biomacromolecules*, 2008. **9**(4): p. 1106–1116.
37. Kim, S.H., et al., *Precisely printable and biocompatible silk fibroin bioink for digital light processing 3D printing*. *Nature Communications*, 2018. **9**: p. 14.
38. Gantumur, E., et al., *Horseradish peroxidase-catalyzed hydrogelation consuming enzyme-produced hydrogen peroxide in the presence of reducing sugars*. *Soft Matter*, 2019. **15**(10): p. 2163–2169.
39. Wu, X.L., et al., *Sodium dodecyl sulfate-induced rapid gelation of silk fibroin*. *Acta Biomaterialia*, 2012. **8**(6): p. 2185–2192.

40. Vasconcelos, A., A.C. Gomes, and A. Cavaco–Paulo, *Novel silk fibroin/elastin wound dressings*. *Acta Biomaterialia*, 2012. **8**(8): p. 3049–3060.
41. Raia, N.R., et al., *Enzymatically crosslinked silk–hyaluronic acid hydrogels*. *Biomaterials*, 2017. **131**: p. 58–67.
42. Whittaker, J.L., et al., *Facile and rapid ruthenium mediated photo–crosslinking of Bombyx mori silk fibroin*. *Journal of Materials Chemistry B*, 2014. **2**(37): p. 6259–6270.
43. Cui, X.L., et al., *Rapid Photocrosslinking of Silk Hydrogels with High Cell Density and Enhanced Shape Fidelity*. *Advanced Healthcare Materials*, 2020. **9**(4): p. 15.
44. Su, D.H., et al., *Enhancing Mechanical Properties of Silk Fibroin Hydrogel through Restricting the Growth of beta–Sheet Domains*. *Acs Applied Materials & Interfaces*, 2017. **9**(20): p. 17490–17499.
45. Kim, C.S., et al., *A bioinspired dual–crosslinked tough silk protein hydrogel as a protective biocatalytic matrix for carbon sequestration*. *Npg Asia Materials*, 2017. **9**: p. 10.
46. Sun, J.Y., et al., *Highly stretchable and tough hydrogels*. *Nature*, 2012. **489**(7414): p. 133–136.
47. Kobayashi, S., H. Uyama, and S. Kimura, *Enzymatic polymerization*. *Chemical Reviews*, 2001. **101**(12): p. 3793–3818.
48. Thi, T.T.H., et al., *Engineered horseradish peroxidase–catalyzed hydrogels with high tissue adhesiveness for biomedical applications*. *Journal of Industrial and Engineering*

- Chemistry, 2019. **78**: p. 34–52.
49. Bae, J.W., et al., *Horseradish peroxidase–catalysed in situ–forming hydrogels for tissue–engineering applications*. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 2015. **9**(11): p. 1225–1232.
 50. Sakai, S. and M. Nakahata, *Horseradish Peroxidase Catalyzed Hydrogelation for Biomedical, Biopharmaceutical, and Biofabrication Applications*. *Chemistry–an Asian Journal*, 2017. **12**(24): p. 3098–3109.
 51. Li, T., et al., *Silk fibroin/carboxymethyl chitosan hydrogel with tunable biomechanical properties has application potential as cartilage scaffold*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019. **137**: p. 382–391.
 52. Wang, L.S., et al., *The role of stiffness of gelatin–hydroxyphenylpropionic acid hydrogels formed by enzyme–mediated crosslinking on the differentiation of human mesenchymal stem cell*. *Biomaterials*, 2010. **31**(33): p. 8608–8616.
 53. Lee, F., J.E. Chung, and M. Kurisawa, *An injectable enzymatically crosslinked hyaluronic acid–tyramine hydrogel system with independent tuning of mechanical strength and gelation rate*. *Soft Matter*, 2008. **4**(4): p. 880–887.
 54. Arnao, M.B., et al., *A KINETIC–STUDY ON THE SUICIDE INACTIVATION OF PEROXIDASE BY HYDROGEN–PEROXIDE*. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1990. **1041**(1): p. 43–47.

55. Hernandez–Ruiz, J., et al., *Catalase–like activity of horseradish peroxidase: relationship to enzyme inactivation by H₂O₂*. *Biochemical Journal*, 2001. **354**: p. 107–114.
56. Park, K.M., et al., *In Situ Forming Hydrogels Based on Tyramine Conjugated 4–Arm–PPO–PEO via Enzymatic Oxidative Reaction*. *Biomacromolecules*, 2010. **11**(3): p. 706–712.
57. Sakai, S., et al., *An injectable, in situ enzymatically gellable, gelatin derivative for drug delivery and tissue engineering*. *Biomaterials*, 2009. **30**(20): p. 3371–3377.
58. Kurisawa, M., et al., *Injectable biodegradable hydrogels composed of hyaluronic acid–tyramine conjugates for drug delivery and tissue engineering*. *Chemical Communications*, 2005(34): p. 4312–4314.
59. Sakai, S. and K. Kawakami, *Synthesis and characterization of both ionically and enzymatically cross–linkable alginate*. *Acta Biomaterialia*, 2007. **3**(4): p. 495–501.
60. Stoppel, W.L., et al., *Elastic, silk–cardiac extracellular matrix hydrogels exhibit time–dependent stiffening that modulates cardiac fibroblast response*. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2016. **104**(12): p. 3058–3072.
61. Yan, L.P., et al., *Tumor Growth Suppression Induced by Biomimetic Silk Fibroin Hydrogels*. *Scientific Reports*, 2016. **6**: p. 11.
62. Partlow, B.P., et al., *Tyrosine Templating in the Self–Assembly and Crystallization of Silk Fibroin*.

- Biomacromolecules, 2016. **17**(11): p. 3570–3579.
63. Tabatabai, A.P., et al., *Silk Molecular Weight Influences the Kinetics of Enzymatically Cross-linked Silk Hydrogel Formation*. Langmuir, 2018. **34**(50): p. 15383–15387.
64. McGill, M., et al., *Molecular and macro-scale analysis of enzyme-crosslinked silk hydrogels for rational biomaterial design*. Acta Biomaterialia, 2017. **63**: p. 76–84.
65. Wei, Q.C., et al., *Printable hybrid hydrogel by dual enzymatic polymerization with superactivity*. Chemical Science, 2016. **7**(4): p. 2748–2752.
66. Sakai, S., K. Ueda, and M. Taya, *Peritoneal adhesion prevention by a biodegradable hyaluronic acid-based hydrogel formed in situ through a cascade enzyme reaction initiated by contact with body fluid on tissue surfaces*. Acta Biomaterialia, 2015. **24**: p. 152–158.
67. Huang, W.W., et al., *Design of Multistimuli Responsive Hydrogels Using Integrated Modeling and Genetically Engineered Silk-Elastin-Like Proteins*. Advanced Functional Materials, 2016. **26**(23): p. 4113–4123.
68. Zhang, Y.F., S. Tsitkov, and H. Hess, *Proximity does not contribute to activity enhancement in the glucose oxidase-horseradish peroxidase cascade*. Nature Communications, 2016. **7**: p. 9.
69. Forni, L.G., et al., *NITROGEN-DIOXIDE AND RELATED FREE-RADICALS – ELECTRON-TRANSFER REACTIONS WITH ORGANIC-COMPOUNDS IN SOLUTIONS*

- CONTAINING NITRITE OR NITRATE*. Journal of the Chemical Society–Perkin Transactions 2, 1986(1): p. 1–6.
70. Cardillo, G., *Enzkin: a tool to estimate Michaelis–Menten kinetic parameters* <http://www.mathworks.com/matlabcentral/fileexchange/26653>. 2010.
71. Rubinstein, M. and R.H. Colby, *Polymer physics*. Vol. 23. 2003: Oxford university press New York.
72. Newville, M., et al., *LMFIT: Non–Linear Least–Square Minimization and Curve–Fitting for Python, Version 1.0.0*, <https://dx.doi.org/10.5281/zenodo.11813>. 2014.
73. Hu, X., D. Kaplan, and P. Cebe, *Determining beta–sheet crystallinity in fibrous proteins by thermal analysis and infrared spectroscopy*. *Macromolecules*, 2006. **39**(18): p. 6161–6170.
74. Yan, S.Q., et al., *Directed assembly of robust and biocompatible silk fibroin/hyaluronic acid composite hydrogels*. *Composites Part B–Engineering*, 2019. **176**: p. 9.
75. Wang, X.Q., et al., *Injectable silk–polyethylene glycol hydrogels*. *Acta Biomaterialia*, 2015. **12**: p. 51–61.
76. Dhatarwal, P. and R.J. Sengwa, *Tunable beta–phase crystals, degree of crystallinity, and dielectric properties of three–phase PVDF/PEO/SiO₂ hybrid polymer nanocomposites*. *Materials Research Bulletin*, 2020. **129**: p. 12.
77. Rockwood, D.N., et al., *Materials fabrication from Bombyx mori silk fibroin*. *Nature Protocols*, 2011. **6**(10): p. 1612–

- 1631.
78. Barbucci, R., *Hydrogels: Biological properties and applications*. 2010: Springer Science & Business Media.
79. 이현지, 동적 pH 변화상에서 실크 피브로인의 구조 전이, in *Structural transition of silk fibroin under dynamic pH change*. 2020, 서울대학교 대학원: 서울.
80. Fu, J.L., et al., *Interenzyme Substrate Diffusion for an Enzyme Cascade Organized on Spatially Addressable DNA Nanostructures*. Journal of the American Chemical Society, 2012. **134**(12): p. 5516–5519.
81. Kleppe, K., *EFFECT OF HYDROGEN PEROXIDE ON GLUCOSE OXIDASE FROM ASPERGILLUS NIGER*. Biochemistry, 1966. **5**(1): p. 139–&.
82. Lu, S.Z., et al., *Stabilization of Enzymes in Silk Films*. Biomacromolecules, 2009. **10**(5): p. 1032–1042.
83. Pant, M., et al., *Nonlinear optimization of enzyme kinetic parameters*. J. Biol. Sci, 2008. **8**(8): p. 1322–1327.
84. Vanstroebiezen, S.A.M., et al., *DIFFUSION-COEFFICIENTS OF OXYGEN, HYDROGEN-PEROXIDE AND GLUCOSE IN A HYDROGEL*. Analytica Chimica Acta, 1993. **273**(1–2): p. 553–560.
85. Idan, O. and H. Hess, *Engineering enzymatic cascades on nanoscale scaffolds*. Current Opinion in Biotechnology, 2013. **24**(4): p. 606–611.
86. Ribeiro, V.P., et al., *Rapidly responsive silk fibroin hydrogels as an artificial matrix for the programmed tumor cells death*.

- Plos One, 2018. **13**(4): p. 21.
87. Gami, P., et al., *Chemically crosslinked xylan- β -Cyclodextrin hydrogel for the in vitro delivery of curcumin and 5-Fluorouracil*. International Journal of Biological Macromolecules, 2020.
88. Rodriguez-Navarro, C., et al., *Effects of ferrocyanide ions on NaCl crystallization in porous stone*. Journal of Crystal Growth, 2002. **243**(3-4): p. 503-516.
89. Mandal, B.B. and S.C. Kundu, *Cell proliferation and migration in silk fibroin 3D scaffolds*. Biomaterials, 2009. **30**(15): p. 2956-2965.
90. Kaewprasit, K., T. Kobayashi, and S. Damrongsakkul, *Thai silk fibroin gelation process enhancing by monohydric and polyhydric alcohols*. International Journal of Biological Macromolecules, 2018. **118**: p. 1726-1735.
91. Han, Y.Y., et al., *Silk fibroin-based hydrogels as a protective matrix for stabilization of enzymes against pH denaturation*. Molecular Catalysis, 2018. **457**: p. 24-32.
92. Juven, B.J. and M.D. Pierson, *Antibacterial effects of hydrogen peroxide and methods for its detection and quantitation*. Journal of Food Protection, 1996. **59**(11): p. 1233-1241.
93. "About diabetes"
https://www.who.int/diabetes/action_online/basics/en/index2.html. WHO(World Health Organization), accessed May 17, 2020.

Abstract

Gelation of silk fibroin via tandem enzyme reaction triggered by glucose

Jeon, KyoungHwa

Biomaterials Engineering

The Graduate School

Seoul National University

The enzymatic crosslinking reaction by horseradish peroxidase (HRP) and hydrogen peroxide (H_2O_2) is getting attention for fabricating silk fibroin hydrogel. HRP-mediated crosslinked hydrogel is elastic and optically transparent, yet has the drawback of HRP inactivation by excess H_2O_2 . In this study, the tandem enzyme reaction was applied to avoid the direct addition of H_2O_2 , which triggered the gelation of silk fibroin by glucose and glucose oxidase (GOx). In the tandem enzyme reaction with GOx and HRP, GOx converts glucose and oxygen into glucono- δ -lactone and H_2O_2 , and subsequently, HRP consumes indirectly provided H_2O_2 . In consequence, HRP oxidizes tyrosine residue and induces di-tyrosine linkage of silk fibroin.

The properties of serial enzymatic crosslinked hydrogels(SF/GOx/HRP) were analyzed by dividing them into two parts: initial gelation behavior and time-dependent stiffening. The effects of chemicals in the reaction system were investigated since the gelation time of SF/GOx/HRP was approximately 2.7 times shorter than SF/HRP. To sum up, the indirect supply of H₂O₂ can inhibit HRP deactivation. The elasticity was increased over time despite lower modulus than SF/HRP at 0 hr because of the β -sheet development. However, the final modulus of SF/GOx/HRP was lower than that of SF/HRP because the pore structure was not relatively dense. In addition, SF/GOx/HRP showed antibacterial activity because hydrogel releases H₂O₂ by GOx when glucose was supplied. As a result, it is expected to be used for glucose sensing hydrogel or hemostatic agent.

Keywords: silk fibroin hydrogel, tandem enzyme reaction, horseradish peroxidase, glucose oxidase, glucose, antibacterial hydrogel

Student Number: 2018-28213