글루타알데하이드에 의한 키토산 부직포에 트립신 고정화

김정수 · 이소희* · 송화순†

숙명여자대학교 의류학과, *숙명여자대학교 건강 · 생활과학연구소

Immobilization of Trypsin on Chitosan Nonwoven Using Glutaraldehyde

Jung Soo Kim · So Hee Lee* · Wha Soon Song†

Dept. of Clothing & Textiles, Sookmyung Women's University

*Research Institute of Health and Living Science, Sookmyung Women's University

접수일(2013년 2월 13일), 수정일(2013년 3월 20일), 게재확정일(2013년 3월 23일)

Abstract

We investigate the immobilization of trypsin on chitosan nonwoven using glutaraldehyde (GA). The conditions for trypsin on chitosan nonwoven and GA cross-linking were optimized depending on different conditions. The order of GA cross-linking was determined by the activity of immobilized trypsin. The characteristics of chitosan nonwoven were examined by Fourier-transform infrared (FT-IR) and surface morphology analyses (SEM). Results showed that the optimal treatment conditions for trypsin on chitosan nonwoven were as follows: pH 8.5; temperature 37°C; trypsin concentration 15% (o.w.f); and treatment time 60 min. Those for GA cross-linking were: pH 10.0; GA concentration 3% (v/v); and treatment time 120 min. FT-IR analysis showed that GA was cross-linked on chitosan nonwoven. The SEM analysis also showed that trypsin was immobilized on chitosan nonwoven.

Key words: Enzyme, Immobilization, Chitosan, Trypsin, Glutaraldehyde; 효소, 고정화, 키토산, 트립신, 글루타알데하이드

I. 서 론

섬유산업에서 효소는 처리 조건이 온화하고 우수한 생분해성으로 인한 폐수 발생을 감소시키는 등 친환경적 특성 뿐 아니라, 특정 기질에만 반응하는 기질 특이성으로 인하여 각광받고 있다(Min, 2010). 그러나 효소는 효소의 최적 조건 이외의 반응 조건에서 급격한 활성 저하가 나타나며, 반응 후 회수 및 재사용이 어렵고, 효소의 생산단가가 높아 실제 산업에 적용하는데 한계가 있다(Kang et al., 2011; Min, 2010). 효소 고정화는 효소를

일정한 곳에 물리적으로 구속하여 계속 · 반복적으로 촉매 활성을 나타낼 수 있도록 하는 방법으로 효소의 이용성과 안정성을 증가시키기 때문에 위와 같은 효소의 한계점을 극복할 수 있는 대안으로 각광받고 있다(Ann, 1993). 섬유산업에서 효소 고정화에 대한 연구는 락카아제, 아밀라아제, 셀룰라아제 등을 고정화하여 바이오표백, 염료 탈색 및 분해, 산업 폐수 처리, 세탁용 세제의 오염 제거 효과 향상 등의 적용 가능성에 대하여 보고되었다(Kwon et al., 2002; Pazarlioglu et al., 2005; Silva et al., 2007; Soleimani et al., 2012).

효소 고정화 방법은 크게 담체 결합법, 가교법, 포괄법, 복합법으로 분류되며, 담체 결합법 중 담체와 가교제의 공유 결합에 의한 효소 고정화 방법이 가장 널리 쓰인다(Min, 2010). 효소와 담체 간 공유 결합에 의한 고정화

†Corresponding author

E-mail: doccubi@sm.ac.kr

본 논문은 2011년 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임(No.2011-0012986).

는 담체 표면에 유도된 기능기와 효소 표면의 아미노산 잔기 사이를 공유 결합하여 고정화하는 방법으로, 담체와 효소 간의 강한 결합으로 인해 효소가 반응 중에 분리되는 일이 적고, 기질과 접촉이 쉬우며 효소의 열 안정성이 증가되는 장점을 가진다(Ann, 1993; Joung, 2008). 효소 고정화 시 대표적으로 사용되는 가교제는 글루타알데하이드(이하 GA)로 효소의 아미노기와 반응하여 강한 가교 결합을 형성함으로써 효소를 안정시킬 뿐 아니라 항균 및 항바이러스 효과 등도 부여할 수 있다(Walt & Agayn, 1994). Chang et al.(2010)은 키토산 비드에 가교제인 GA를 이용해 가교 조건을 변화시켜 β -글루코시다아제를 고정화하였으며, Manrich et al.(2008)은 글리시돌과 GA로 키토산 겔을 활성화시킨 후 트립신을 고정화하였다. Silva et al.(2012)는 글리시돌, GA, EDA를 이용해 다양한 방법으로 담체를 활성화시켰다. Peng et al.(2012)은 마이크로스페어에 GA, 헥사메틸렌다이아민과 같은 가교제를 이용해 다양한 담체 표면을 만들어 트립신을 고정화하였다.

담체를 이용한 효소 고정화 시 효소와 담체 간의 강한 결합으로 인해 효소의 고차 구조가 변하여 고정화 효소의 활성이 저하될 수 있기 때문에 단백질과 높은 친화력, 물리·화학적 안정성, 우수한 기계적 강도 및 충분한 반응기를 가지고 있는 담체가 요구된다. 키토산은 인체에 대한 안전성이 뛰어난 뿐만 아니라, 항균성, 방취성, 흡착성, 보습성 등이 우수하며 부가가치가 높고, 생체 적합성 및 생분해성으로 인해 의료, 섬유, 식품산업 및 농업 등의 다양한 분야에서 고정화 담체로서 주목받고 있다(Chang et al., 2010; Lee et al., 2003). 고정화 담체로서 키토산은 값이 저렴하고 우수한 친수성 및 상처 치유 촉진성, 높은 다공성, 효소에 대한 낮은 입체 장애(steric hinderance)를 가진다. 또한 키토산은 폴리글루코사민 사슬에 수산기(-OH)와 유리 아미노기(-NH₂)를 가지고 있어 효소와 결합시키거나 화학적으로 변형시키기가 쉽다(Kildeeva et al., 2009; Xi et al., 2005). 효소 고정화 시 키토산은 키토산 파우더, 키토산 비드, 키토산 층으로 코팅하거나 혼합시킨 겔과 비드, 멤브레인 등 다양한 형태의 고정화 담체로 연구되었다(Dinçer et al., 2012; Krajewska, 2004; Mohamed et al., 2008; Orrego et al., 2010; Xi et al., 2005).

섬유로 만들어진 담체는 저렴한 가격, 높은 비표면적, 우수한 기계적 성질 등의 이점으로 인해 최근 효소 고정화 담체로서 주목받고 있다. 다양한 섬유재료들이 고정화 담체로 연구되었다(Albayrak & Yang, 2002; Chen et

al., 2012; Feng et al., 2013; Li et al., 2007; Mohamed et al., 2008; Monier & El-Sokkary, 2012; Silva et al., 2007). 특히, 부직포 형태의 고정화 담체는 높은 비표면적, 우수한 기계적 강도, 화학적 안정성, 기질과 생성물의 낮은 확산 저항성 등의 이점을 가진다(Li et al., 2011; Mohamed et al., 2008). 또한 부직포는 자체의 내구성, 경량성, 취급의 용이성, 저렴한 가격으로 인해 섬유산업에서 주목받고 있으며, 특히 통기성 및 흡수성으로 인해 의료용 섬유소재로도 주목받고 있다(Kim, 2010).

단백질 분해 효소인 트립신은 의료 및 의약품 분야, 식품 분야, 생물 분야 등에서 널리 사용되고 있는 효소로, 가장 확연한 기질 특이성을 가지고 있다(Nikolic et al., 2010; Peng et al., 2012). 트립신은 단백질의 소화(Purcena et al., 2009) 외에도 소염효소로서 몸의 표면 및 내부의 염증 치료에 쓰인다(Monteiro et al., 2007).

따라서 본 연구의 목적은 섬유소재에 적합한 효소 고정화 기술을 도입하기 위하여 고정화 담체로 지금까지 연구된 바 없는 키토산 부직포를, 가교제는 GA를 이용하여 트립신을 고정화하는 것이다. 또한 본 연구를 통해 연구 및 개발이 활발히 진행되고 있는 창상피복재 분야에 효소 고정화를 이용한 창상피복재의 개발 가능성을 확인함으로써 기초 연구자료를 제시하고자 한다. 이를 위하여, 첫째, 키토산 부직포와 트립신 반응 시 최적 조건은 pH, 온도, 트립신 농도, 처리 시간 등의 반응 조건에 따라 트립신의 활성을 평가하여 설정하였다. 둘째, 키토산 부직포에 GA로 가교 시 최적 조건은 pH, GA 농도, 가교 시간에 따른 가교 정도 및 고정화된 트립신의 활성을 평가하여 설정하였다. 셋째, 최적의 고정화 방법은 앞에서 설정한 최적 조건에서 선가교 및 후가교 방법으로 트립신을 고정화한 후, 고정화된 트립신의 활성 평가를 바탕으로 GA 가교 순서를 정하여 설정하였다. 넷째, 분광학적 분석과 표면 관찰을 통해서 키토산 부직포에 GA 가교 및 트립신 고정화의 여부를 확인하였다. 본 연구를 바탕으로 창상피복재로 주목받고 있는 키토산 부직포 담체에 트립신을 고정화함으로써 앞으로 용도가 확대될 기능성 섬유소재의 개발 가능성을 확인하였다.

II. 실험

1. 시료 및 시약

본 연구에서 사용한 키토산 부직포의 시료 특성은 <Table 1>과 같으며, 트립신 효소의 특성은 <Table 2>와

Table 1. Characteristics of chitosan nonwoven

Composition (%)	Thickness (mm)	Weight (g/m ²)	Manufacturing Method
Chitosan 100	0.378	88.5	Needle punching

Table 2. Properties of enzyme

Enzyme	Source	Activity	Form	Manufacturer
Trypsin (EC 3.4. 21.4)	Porcine pancreas	1000-2000 BAEU units/mg solid	Lyophilized powder	Sigma Chemicals Co.

같다.

효소 및 글루타알데하이드 처리 시 pH를 일정하게 유지하기 위하여 버퍼용액을 제조해서 사용하였으며, 버퍼로 Trizma base(Sigma Chemicals Co., USA)와 Trizma HCl(Sigma Chemicals Co., USA), 인산수소나트륨(sodium phosphate monobasic, Sigma Chemicals Co., USA)과 인산일수소나트륨(sodium phosphate dibasic, Sigma Chemicals Co., USA), 탄산나트륨(sodium carbonate, Duxsan Pure Chemicals Co., Korea)과 탄산수소나트륨(sodium bicarbonate, Duxsan Pure Chemicals Co., Korea)을 사용하였다. 트립신과 키토산 부직포의 활성 측정을 위해 브래드포드 시약(Sigma Chemicals Co., USA)을, 가교제로 25% 글루타알데하이드(이하 GA, Glutaraldehyde, Junsei Chemical Co., Japan)를 사용하였다. GA 가교한 키토산 부직포의 가교 정도를 평가하기 위해 반응성 염료 Sunfix Scarlet S2G 150%(C.I. Reactive Red 222, Oh Young Industrial Co., Korea)를 사용하였다. 트립신 활성 측정을 위해 트립신의 기질인 N_α-Benzoyl-L-arginine 4-nitroanilide hydrochloride(이하 L-BAPA, Sigma Chemicals Co., USA), 디메틸설폭시화물(이하 DMSO, dimethyl sulfoxide, Sigma Chemicals Co., USA), 염화칼슘(calcium chloride, Kanto Chemical Co., Japan)을 사용하였다.

2. 실험방법

1) 트립신과 키토산 부직포의 활성

트립신과 키토산 부직포의 활성은 0.5g의 키토산 부직포를 액비 1:50, 25mM의 버퍼용액에 넣고, pH(7.0~9.0), 온도(30~60°C), 트립신 농도(1~100%, o.w.f), 반응 시간(10~240분)을 변화시켜 110rpm으로 항온진탕수조(Shaking water bath, BS-31, JEIO TECH Co., Korea)에서 처리하였다. 트립신과 키토산 부직포의 활성 정도는 브래드포드 법에 의해 반응한 상층액을 UV-Vis Spectro-

photometer(M-3100, SCINCO CO., Korea)를 사용하여 595nm에서 흡광도를 측정하였다.

2) GA에 의한 키토산 부직포 가교

키토산 부직포의 가교는 0.15g의 키토산 부직포를 액비 1:50, 25mM의 버퍼용액에 넣고, pH(7.0~11.0), GA 농도(0.1~15%, v/v), 반응 시간(10~900분)을 변화시켜 110rpm으로 항온진탕수조에서 처리하였다. GA 가교한 키토산 부직포는 해당 버퍼로 10분간 1회, 증류수로 10분간 2회 수세하여 잔여 GA를 제거한 후, 상온에서 건조하였다(Betancor et al., 2007).

3) GA 가교한 키토산 부직포의 활성 측정

(1) 반응성 염료에 의한 활성 측정

반응 조건에 따라 GA 가교한 키토산 부직포의 GA 가교 정도는 키토산 부직포를 반응성 염료 RR222로 염색하여 측정하였다. 조건별로 GA 가교한 키토산 부직포를 0.05%(w/v) 반응성 염료 표준용액으로 제조한 액비 1:1000의 염료용액에 넣고, 30°C에서 130rpm으로 항온진탕수조에서 3일간 반응시켰다(Juang et al., 2002). 잔여 용액의 흡광도는 506nm에서 UV-Vis Spectrophotometer로 측정한 후, 흡진율로 환산하여 GA 가교 정도를 평가하였다.

$$\text{Exhaustion}(\%) = \frac{C_0 - C_1}{C_0} \times 100$$

Where C_0 is the dye absorbance in the dye bath before dyeing, C_1 is that after dyeing.

(2) 트립신 기질에 의한 활성 측정

반응 조건에 따라 GA 가교한 키토산 부직포를 액비 1:50, pH 8.5, 25mM의 버퍼용액에 넣고, 10%(o.w.f)의 트립신과 25°C에서 24시간 동안 110rpm으로 항온진탕수조에서 반응시켰다. 트립신 고정화한 키토산 부직포는 증류수로 여러 번 수세하여 고정화되지 않은 잔여 트립신을 제거한 후, 효소의 변성이 적은 4°C에서(Nikolic et al., 2010) 1시간 보관 후 고정화된 트립신의 활성을 측정하였다(Manrich et al., 2008). 트립신 고정화된 키토산 부직포를 pH 8.5, 10mM 염화칼슘이 포함된(Dartiguenave et al., 2010) 50mM Tris 버퍼 10ml에 넣고, DMSO에 녹인 50mM L-BAPA 35μl를 넣은 후, 25°C에서 60분간 110rpm으로 항온진탕수조에서 반응시켰다. 반응한 상층액은 UV-Vis Spectrophotometer를 사용해서 410nm에서 흡광도를 측정하였다(Xi et al., 2005).

4) 키토산 부직포에 GA 가교 순서에 따른 트립신 고정화

(1) 키토산 부직포에 GA 가교 후 트립신 고정화

GA와 키토산 부직포의 최적 가교 조건에서 GA와 키토산 부직포를 반응시킨 후, GA 가교한 키토산 부직포를 트립신과 키토산 부직포의 최적 반응 조건으로 트립신을 고정화시켰다. 반응하지 않은 잔여 GA를 제거하기 위해 GA 가교한 해당 버퍼로 10분간 1회 수세하고, 고정화되지 않은 트립신이 검출되지 않을 때까지 증류수로 여러 번 수세한 후, 4°C에서 1시간 보관한 다음 위와 동일한 조건의 기질과 10분간 반응시켜 고정화된 트립신의 활성을 측정하였다.

(2) 키토산 부직포에 트립신 흡착 후 GA 가교

트립신과 키토산 부직포의 최적 반응 조건에서 트립신과 키토산 부직포를 반응시킨 후, 트립신 흡착된 키토산 부직포를 GA와 키토산 부직포의 최적 가교 조건으로 GA로 가교시켰다. 반응하지 않은 잔여 GA를 제거하기 위해 버퍼로 10분간 1회 수세하고, 고정화되지 않은 트립신이 검출되지 않을 때까지 증류수로 여러 번 수세한 후, 4°C에서 1시간 보관한 다음 위와 동일한 방법으로 고정화된 트립신의 활성을 측정하였다.

5) 분광학적 분석

표면의 분광학적 분석은 적외선 분광광도계(FT/IR-670Plus, Jasco Inc., USA)를 사용하여 비교, 관찰하였다.

6) 표면 형태

표면 형태는 주사 전자 현미경(JSM-7600F, JEOL KO-REA LTD., Japan)를 사용하여 비교, 관찰하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 트립신과 키토산 부직포의 활성

<Fig. 1>~<Fig. 3>은 트립신과 키토산 부직포의 최적 반응 조건을 설정하기 위하여, 반응 용액의 pH 및 온도, 트립신 농도, 처리 시간을 변화시켜 처리한 결과이다. 트립신의 최적 반응 조건은 효소 처리 후 잔여 용액을 브래드포드 시약과 반응시킨 후 595nm에서 흡광도를 측정하여 평가하였다.

<Fig. 1>은 키토산 부직포와 트립신 반응 시 트립신 농도 10%(o.w.f)로 60분간 처리 시 pH(7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0)와 온도(30, 37, 40, 45, 50, 60°C) 변화에 따른 트립

신의 활성 측정 결과이다. <Fig. 1>에 나타난 바와 같이 트립신의 활성은 pH 8.5, 37°C 조건에서 최대 흡광도 값을 나타냈고, 45°C 이하의 온도에서는 pH에 의한 흡광도 차이가 크고 그 이상의 온도에서는 pH에 의한 흡광도 차이가 작았다. 즉, 트립신은 키토산 부직포와 반응 시 45°C 이하의 온도에서는 pH의 영향을 많이 받고, 그 이상의 온도에서는 pH보다는 온도에 의해 영향을 많이 받음을 확인하였다. 브래드포드 시약은 단백질의 양전하를 띤 염기성 아미노산인 아르기닌, 리신, 히스티딘 잔기와 결합하여 푸른색을 띠며 595nm로 스펙트럼 이동을 보이는데(Bradford, 1976), 45°C 이상의 온도에서 온도가 높아짐에 따라 흡광도 값이 매우 작아지는 결과를 통해 위 온도에서 트립신은 그 구조가 변성되거나 부분적으로 사멸되어 키토산 부직포 및 브래드포드 시약과 반응하지 못한 것으로 판단된다. 또한 대부분의 효소는 강한 산성과 염기성 조건에서 변성으로 인해 안정성이 낮아진다. 본 실험에서는 트립신의 최적 pH인 pH 8.0 부근(pH 7.0~9.0)에서 트립신의 활성을 평가하였다. <Fig. 1>에 나타난 바와 같이, 트립신의 활성은 pH 8.5에서 가장 우수하였으며, 이는 선행연구와도 일치하는 결과이다(Monteiro et al., 2007). 따라서 트립신과 키토산 부직포의 반응 시 최적 pH와 온도는 pH 8.5, 37°C이다.

<Fig. 2>는 키토산 부직포와 트립신 반응 시 pH 8.5, 온도 37°C에서 60분간 처리 시 트립신 농도(1, 3, 5, 7, 10,

Fig. 1. Effect of different pH and temperature of trypsin activity onto chitosan nonwoven (trypsin conc. 10% (o.w.f), 60 min).

15, 20, 30, 40, 50, 100%, o.w.f) 변화에 따른 트립신의 활성 측정 결과이다. <Fig. 2>에 나타난 바와 같이 트립신의 활성은 트립신 농도 15%까지 트립신 농도가 증가함에 따라 선형적으로 증가하다가 15%에서 20%까지는 거의 일정한 수준을 유지한 후, 20% 이상의 농도에서 다시 증가하였다. 트립신 농도 20% 이상에서 흡광도 값의 꾸준한 증가는 트립신 용액 내 높은 농도의 미반응 트립신과 브래드포드 시약의 반응 결과로 판단된다. 이에 <Fig. 2>의 그래프 기울기에 따라서 기울기가 완만해지기 시작하는 트립신 농도 15%를 최적 농도로 보았다. 따라서 트립신과 키토산 부직포의 반응 시 최적 트립신 농도는 15%(o.w.f)이다.

<Fig. 3>은 키토산 부직포와 트립신 반응 시 pH 8.5, 온도 37°C, 트립신 농도 15%(o.w.f)의 조건에서 처리 시간(10, 30, 60, 90, 120, 180, 240분) 변화에 따른 트립신의 활성 측정 결과이다. <Fig. 3>에 나타난 바와 같이 트립신의 활성은 60분에서 최대 반응을 보인 후, 시간이 지남에 따라 다시 감소하여 일정 수준을 유지하였다. 이는 자유 트립신이 자가분해 혹은 단백질의 변성과 응집에 따른 실패로 인해 60분에서의 최대 흡광도 값이 유지되지 않고 감소한 것으로 판단된다. 따라서 트립신과 키토산 부직포의 반응 시 최적 처리 시간은 60분이다.

이상, 키토산 부직포와 반응시킨 자유 트립신의 안정성을 평가한 결과, 자유 트립신의 최적 pH는 8.5이며,

pH와 관계없이 45°C 이상의 온도에서 점차적으로 활성이 저하되다가 60°C에서는 거의 사멸되었다. 또한 농도는 최적 농도 이상에서 과 농도로 인한 응집으로 트립신 활성의 상대적인 증가율이 감소하였다(Lee & Song, 2010). 시간은 반응 60분이 지나면 트립신의 불안정성으로 자가분해 되어 활성이 감소함을 확인하였다. 따라서 본 연구에서는 키토산 부직포와 트립신 반응 시 pH 8.5, 온도 37°C, 트립신 농도 15%(o.w.f), 처리 시간 60분을 최적 반응 조건으로 설정하였다.

2. GA 가교 조건에 따른 반응성 염료의 흡착 및 고정화된 트립신의 활성 평가

1) pH의 영향

<Fig. 4>는 키토산 부직포에 GA 가교 시 GA 농도 0.3%(v/v), 25°C, 2시간의 조건에서 GA 용액의 pH(7.0, 8.0, 9.0, 10.0, 11.0) 변화에 따른 반응성 염료의 흡진율 <Fig. 4(a)>과 고정화된 트립신의 L-BAPA에 대한 활성 <Fig. 4(b)> 측정 결과이다.

<Fig. 4(a)>에 나타난 바와 같이 미처리 키토산 부직포의 흡진율은 100%이고 다른 pH 조건에서 GA 가교한 키토산 부직포의 흡진율은 각 pH 조건 간에 10% 내의 차이를 가졌으며 pH 8.0에서 가장 낮은 흡진율을 나타내었다. GA 가교한 키토산 부직포를 반응성 염료로

Fig. 2. Effect of different trypsin concentration of trypsin activity onto chitosan nonwoven (pH 8.5, temp. 37°C, 60 min).

Fig. 3. Effect of different treatment time of trypsin activity onto chitosan nonwoven (pH 8.5, temp. 37°C, trypsin conc. 15% (o.w.f)).

Fig. 4. Effect of various pH on GA cross-linking onto chitosan nonwoven (a) Exhaustion of dye RR222, (b) Absorbance of immobilized trypsin (GA cross-linking: GA 0.3% (v/v), 25°C, 2 hours).

염색 시, 반응성 염료는 키토산의 아미노기(-NH₂)와 GA의 알데하이드기(-CHO)에 반응하는데, 이때 키토산의 아미노기와 우선적으로 반응하여 흡착한다(Juang et al., 2002). 즉, 흡진율이 낮게 나올수록 반응성 염료가 키토산의 아미노기와 거의 반응하지 못한 것이므로 GA의 알데하이드기가 키토산 부직포의 아미노기와 반응하여 GA 가교 결합이 잘 된 것으로 판단할 수 있다. 따라서 흡진율 결과에 따른 최적 GA 가교 pH는 8.0이다. <Fig. 4 (b)>에 나타난 바와 같이 고정화된 트립신의 활성은 중성에서 염기성으로 pH가 증가함에 따라 증가하였으며 pH 10.0에서 최대 활성을 보인 후 다시 감소하였다. 이는 염기성 조건 하에서 GA의 분자 구조와 관련이 있다. 염기성 조건에서 GA는 분자 간의 빠른 알돌축합 반응으로 α , β -불포화 다중 결합을 가진 중합된 GA 형태의 분자 구조를 만들며, 이 중합된 GA 분자 내부의 알데하이드기는 C-C 이중 결합으로 연결되어 단백질의 아미노기와 반응해 Schiff 염기를 형성함으로써 단백질과 안정적으로 결합한다(Walt & Agayn, 1994). 염기성 조건 하에서 중합된 형태의 GA는 단백질의 아미노기와 반응하여 환원제 없이도 안정한 공명 구조를 만들기 때문에 GA와 단백질의 가교 반응은 높은 pH가 적절하다(Migneault et al., 2004; Walt & Agayn, 1994). 또한 키토산은 단백질은 아니지만 분자 내부에 아미노기를 가지고 있기 때문에 염기성 조건에서 GA와 더 우수한 가교 반응

을 한 것으로 판단된다. 이는 키토산과 GA 가교 시 GA 반응용액의 pH가 증가함에 따라 가교 결합의 수는 증가한다고 보고한 Nikonorov et al.(2006)의 연구와 유사한 결과이다. 본 실험 결과, pH 7.0, 8.0에서 GA 가교한 키토산 부직포는 노란 갈색에 가까운 색 변화를 보였으며, 위 조건에서 GA 가교한 키토산 부직포에 고정화된 트립신의 활성은 매우 낮았다. 이는 담체의 색이 갈색에 가까워질수록 GA 반응이 잘 일어나지 않았기 때문에 담체로 쓸 수 없다는 Betancor et al.(2007)와 일치하는 결과로, GA 반응으로 인한 담체의 색 변화로 GA 반응이 제대로 일어나지 않음을 확인하였다. 이에 키토산 부직포에 GA 가교 시 pH 8.0은 가장 낮은 흡진율을 나타냈지만 담체 표면의 GA 가교 증가와 효소의 활성은 비례 관계가 아니므로(Silva et al., 2012) 최적 GA 가교 시의 pH로 적절치 않다고 판단하였다. 따라서 고정화된 트립신 활성 측정 결과에 따른 최적 GA 가교 pH는 10.0이다.

2) GA 농도의 영향

<Fig. 5>는 키토산 부직포에 GA 가교 시 pH 10.0, 25°C, 2시간의 조건에서 GA 농도(0.1, 0.3, 1, 2, 3, 4, 5, 15%, v/v) 변화에 따른 반응성 염료의 흡진율<Fig. 5(a)>과 고정화된 트립신의 L-BAPA에 대한 활성<Fig. 5(b)> 측정 결과이다. <Fig. 5(a)>에 나타난 바와 같이 반응성 염료에 의한 흡진율은 GA 농도 0.1~3%까지는 선형적

Fig. 5. Effect of various GA concentration on GA cross-linking onto chitosan nonwoven (a) Exhaustion of dye RR 222, (b) Absorbance of immobilized trypsin (GA cross-linking: pH 10, 25°C, 2 hours).

으로 크게 감소하다가 3~15%에서는 약 10% 정도로 완만하게 감소하였다. 이는 GA 농도 3% 이상부터는 중합된 GA 분자들이 키토산 부직포의 아미노기에 포화상태로 결합하였기 때문이다. 이는 GA 농도가 증가할수록 많은 양의 GA 분자들의 알돌축합 반응에 의한 중합화로 그 분자 크기가 커져 키토산 부직포의 아민기와 반응할 반응성 염료의 흡진율을 감소시킨 것으로 판단된다. 따라서 흡진율 결과에 따른 최적 GA 농도는 3%(v/v)이다. <Fig. 5(b)>에 나타난 바와 같이 키토산 부직포에 가교시키는 GA의 농도가 증가함에 따라 고정화된 트립신의 활성은 선형적으로 증가하였으며, GA 농도 3%에서 최대 활성을 나타내고, 그 이상의 농도에서는 약간 감소하여 일정 수준을 유지하였다. GA 농도는 가교 결합 정도에 영향을 주는 중요한 요소로, GA 농도 2% 이하에서 트립신과 GA의 가교 결합이 충분히 이루어지지 않아 고정화된 트립신의 활성이 낮게 나타난 것으로 판단된다 (Migneault et al., 2004). 또한 낮은 농도의 효소와 GA의 결합은 GA의 반응기가 효소의 같은 분자에 반응할 가능성을 높여 원치 않은 효소 분자 내 가교 결합을 유도하기 때문에 (Kildeeva et al., 2009; Migneault et al., 2004; Monsan, 1978) 위와 같은 결과가 나온 것으로 보인다. 고정화된 트립신의 활성은 GA 농도 4% 이상에서 다시 낮아지는 것으로 나타나 높은 GA 농도로 인한 과도한 가교 결합이 트립신 구조에 변성을 주어 촉매 활성에 영향

을 준 것으로 판단된다 (Chang et al., 2010; Silva et al., 2012). 이는 GA 농도가 증가할수록 고정화된 트립신의 활성이 더 낮아진다고 보고한 Monsan(1978)의 결과와 일치한다. 따라서 고정화된 트립신 활성 측정 결과에 따른 최적 GA 농도는 3%(v/v)이다.

3) 시간의 영향

<Fig. 6>은 키토산 부직포에 GA 가교 시 pH 10.0, 25°C, GA 농도 3%(v/v)의 조건에서 가교 시간(0.5, 1, 2, 5, 15시간) 변화에 따른 반응성 염료의 흡진율 <Fig. 6(a)>과 고정화된 트립신의 L-BAPA에 대한 활성 <Fig. 6(b)> 측정 결과이다. <Fig. 6(a)>에 나타난 바와 같이 반응성 염료에 의한 흡진율은 GA 가교 시간이 증가함에 따라 감소하다가 2시간에서 가장 낮은 흡진율을 보이고 다시 증가하여 일정한 수준을 유지하였다. 이는 반응 초기 30분 동안 GA가 담체의 아미노기와 빠르게 반응한다는 Monsan(1978)의 연구결과와 일치하며, 본 연구결과에서도 미처리한 키토산 부직포에 비해 30분 동안 GA를 가교한 키토산 부직포의 흡진율이 100%에서 약 38%로 급격히 감소한 것을 확인하였다. 즉, 같은 양의 GA를 다른 가교 시간 조건에서 처리한 키토산 부직포에 반응성 염료를 흡착시킨 결과는 2시간 동안 GA를 가교한 키토산 부직포가 가장 낮은 흡진율을 보였다. 따라서 최적 GA 가교 시간은 2시간이다. <Fig. 6(b)>에 나타난 바와 같이 고정

Fig. 6. Effect of various cross-linking time on GA cross-linking onto chitosan nonwoven (a) Exhaustion of dye RR 222, (b) Absorbance of immobilized trypsin (GA cross-linking: pH 10, GA 3% (v/v), 25°C).

화된 트립신의 활성은 2시간까지 가교 시간이 늘어남에 따라 증가하다가 2시간에서 최대 활성을 보인 후 2시간 이상으로 가교 시간이 길어짐에 따라 활성이 점차적으로 감소하였다. 따라서 고정화된 트립신 활성 측정 결과에 따른 최적 GA 처리 시간은 2시간이다.

이상의 결과를 바탕으로 GA 최적 가교 조건은 pH 10.0, GA 농도 3%(v/v), 가교 시간 2시간이다.

3. GA 선가교 및 후가교에 의한 트립신 고정화

<Fig. 7>은 기질과 10분간 반응시킨 자유 트립신과 GA 가교 순서에 따른 고정화된 트립신의 활성 측정 결과이다. GA 선가교는 키토산 부직포에 GA를 가교시킨 후 트립신을 고정화하였고, GA 후가교는 키토산 부직포와 트립신을 반응시킨 후 GA로 가교하여 고정화하였다(Be-tancor et al., 2007; Lopez-Gallego et al., 2005). 이 두 가지 방법 모두 앞 실험에서 설정한 트립신과 키토산 부직포의 최적 반응 조건 및 GA와 키토산 부직포의 최적 가교 조건으로 실험하였다.

<Fig. 7>에 나타난 바와 같이 고정화된 트립신의 활성은 GA 선가교의 방법이 GA 후가교의 방법보다 월등히 높았다. GA 선가교로 고정화한 트립신의 활성이 더 우수한 원인 중 하나는 고정화에 따른 효소의 화학적 변형과 관련이 있다. GA로 먼저 고정화 담체를 활성화시킨 후

Fig. 7. Absorbance of free and immobilized trypsin activity (Free trypsin: 15% (o.w.f), GA cross-linking: pH 10.0, GA 3% (v/v), 2 hours, trypsin immobilization: pH 8.5, trypsin 15% (o.w.f), 1 hour, trypsin activity: 0.05M L-BAPA, 10 min).

효소를 고정화하는 방법은 고정화에 관련된 효소 단백질 일부에만 영향을 끼쳤기 때문에 효소의 화학적 변형

이 적은 반면, 아미노기를 가진 담체에 효소를 흡착시킨 후 GA로 처리하는 방법은 모든 단백질 표면이 변형될 수 있기 때문이다(Lopez-Gallego et al., 2005). 본 연구에서도 GA 후가교로 고정화한 트립신은 거의 활성이 없는 것으로 나타났다. 이는 키토산 부직포와 트립신 간의 이온적 흡착이 잘 일어나지 않아 트립신이 고정화되지 않은 것으로 판단된다. 또한 키토산 부직포 역시 GA의 알데하이드기와 공유 결합하는 아미노기를 가지고 있기 때문에 GA 선가교 방법이 더 안정적이며 반응이 일어나기 쉬운 것으로 판단된다. 따라서 키토산 부직포에 GA를 이용한 트립신 고정화 시 GA 선가교의 방법이 GA 후가교의 방법보다 더 우수함을 확인하였다.

자유 트립신과 고정화 트립신의 활성을 비교해보면, 고정화 트립신의 활성이 자유 트립신 활성의 약 40%를 나타냈다. 이는 효소를 담체에 공유결합으로 고정화할 때 효소의 고차 구조나 활성 중심이 일부 파괴될 수 있고, 물리적 구속에 의해 효소의 원활한 이동이 제한되어 기질과의 반응 속도가 저하되기 때문이다(Ann, 1993; Joung, 2008; Li et al., 2011). 또한 트립신은 트립신의 특정 활성 지점(single point attachment)이 아닌 다지점(multi point attachment)에서 공유 결합으로 고정화됨으로써 안정성을 향상시킬 수는 있지만, 효소의 여러 지점이 고체 표면 위에 직접 고정화되어 본연의 입체 구조가 변화될 수 있고, 무작위로 무배향성으로 고정되기

때문에 활성 지점이 가려져 활성이 감소될 수 있으므로(Jang et al., 2006), 고정화된 트립신이 자유 트립신 활성의 약 40%를 보인 것으로 판단된다.

4. 트립신 고정화된 부직포의 구조분석 및 표면 관찰

<Fig. 8>은 미처리, GA 가교 및 트립신 고정화한 키토산 부직포의 FT-IR 측정 결과이다. <Fig. 8>에 나타난 바와 같이, GA 가교 및 트립신 고정화에 의해 1660~1670 cm^{-1} 범위에서 새로운 피크가 나타났다. 이는 GA 가교 시 키토산 부직포의 아미노기와 GA의 알데하이드기가 결합하고 트립신 고정화 시 트립신의 아미노기와 GA의 알데하이드기가 결합함에 따라 C=N 결합이 생기기 때문이다(Kildeeva et al., 2009). 따라서 C=N 결합을 통해 키토산 부직포에 GA 가교 및 트립신 고정화가 효과적으로 이루어짐을 확인하였다. 또한 GA 가교된 키토산 부직포에 트립신이 고정화되었는지의 여부는 표면 관찰을 통해 확인하였다.

<Fig. 9>는 미처리 및 트립신 고정화한 키토산 부직포의 표면 관찰 결과이다. 미처리 키토산 부직포의 표면이 매끈한 반면 트립신 고정화에 의해 표면은 둥글게 주름진 형태로 표면 거칠기가 증가하였다. 표면 거칠기의 증가는 GA 가교한 부직포 표면의 트립신 고정화에

Fig. 8. FT-IR spectra of untreated, GA cross-linked and trypsin immobilized chitosan nonwoven.

(a) Untreated

(b) Trypsin immobilized

Fig. 9. SEM micrographs ($\times 5,000$) of (a) untreated chitosan nonwoven and (b) trypsin immobilized chitosan nonwoven.

의한 것으로 판단되며(Li et al., 2007; Monier & El-Sokkary, 2012), 굴곡진 주름형태의 표면은 트립신 단백질 결정의 재결정화에 의한 것으로 보인다(Romdhane et al., 2011; Zelenetskii et al., 2003). 따라서 표면 관찰 결과를 통해, 키토산 부직포에 트립신이 고정화됨을 확인하였다.

IV. 결 론

본 연구는 인체 적합성 생체 고분자 소재로 각광 받고 있는 키토산 부직포에 GA로 가교 후, 트립신을 고정화 하였다. 키토산 부직포와 트립신의 최적 반응 조건, 키토산 부직포에 GA 가교 시 최적 가교 조건을 설정하고, GA 가교 순서에 따른 두 가지 방법으로 트립신을 고정화 하였다. 고정화된 트립신의 활성을 자유 트립신의 활성과 비교·평가하였으며, 이상의 실험을 통해 다음과 같은 결론을 얻었다.

키토산 부직포와 트립신의 최적 반응 조건은 pH 8.5, 37°C, 트립신 농도 15%(o.w.f), 60분이며, 키토산 부직포에 GA 가교 시 최적 가교 조건은 pH 10.0, GA 농도 3%(v/v), 2시간이다. 최적 반응 조건에서 GA 가교 순서에 따라 트립신을 고정화한 결과, GA 선가교 방법에 GA 후가교 방법보다 트립신 고정화에 더 효과적이며, GA 선가교 방법으로 고정화된 트립신의 활성은 자유 트립신의 약 40%이다. 분광학적 분석과 표면 관찰을 통해 키토산 부직포에 GA가 가교되었고, 트립신이 고정화되었음을 확인하였다.

본 연구를 통해, 키토산 부직포 담체에 GA를 이용한 트립신의 고정화가 효과적이므로 효소 고정화를 이용한 창상피복재의 개발 가능성을 확인하였다. 또한 후속 연구로 GA 가교한 키토산 부직포의 최적의 트립신 고정화 조건 설정 및 고정화 된 트립신의 안정성 평가 등이 필요한 것으로 판단된다. 이러한 결과는 향후 키토산 부직포에 용균효소, 소염효소 등의 효소를 고정화하여 염증 완화, 지혈, 상처 치유의 다양한 기능을 가진 의료용 섬유소재 개발 연구에 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

References

- Albayrak, N., & Yang, S. T. (2002). Immobilization of *Aspergillus oryzae* β -galactosidase on tosylated cotton cloth. *Enzyme and Microbial Technology*, 31(4), 371–383.
- Ann, Y. G. (1993). *효소화학* [Chemistry of enzyme]. Paju: Cheongmoongak.
- Betancor, L., López-Gallego, F., Alonso-Morales, N., Dellamora, G., Mateo, C., Fernandez-Lafuente, R., & Guisan, J. M. (2007). Glutaraldehyde in protein immobilization. In J. M. Guisan (Ed.), *Immobilization of enzymes and cells* (2nd ed., pp. 57–64). New Jersey: Humana Press Inc.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248–254.
- Chang, J., Park, I. H., Lee, Y. S., Chung, S. Y., Fang, S. J.,

- Chandra, M. S., & Choi, Y. L. (2010). Immobilization of β -glucosidase from *Exiguobacterium* sp. DAU5 on chitosan bead for improved enzymatic properties. *Journal of Life Science*, 20(11), 1589–1594. doi:10.5352/JLS.2010.20.11.1589
- Chen, B., Yin, C., Cheng, Y., Li, W., Cao, Z., & Tan, T. (2012). Using silk woven fabric as support for lipase immobilization: The effect of surface hydrophilicity/hydrophobicity on enzymatic activity and stability. *Biomass and Bioenergy*, 39, 59–66. doi:10.1016/j.biombioe.2010.08.033
- Dartiguenave, C., Hamad, H., & Waldron, K. C. (2010). Immobilization of trypsin onto 1,4-diisothiocyanatobenzene-activated porous glass for microreactor-based peptide mapping by capillary electrophoresis: Effect of calcium ions on the immobilized procedure. *Analytica Chimica Acta*, 663(2), 198–205. doi:10.1016/j.aca.2010.01.042
- Dinçer, A., Becerik, S., & Aydemir, T. (2012). Immobilization of tyrosinase on chitosan-clay composite beads. *International Journal of Biological Macromolecules*, 50(3), 815–820. doi:10.1016/j.ijbiomac.2011.11.020
- Feng, X., Patterson, D. A., Balaban, M., & Emanuelsson, E. A. C. (2013). Enabling the utilization of wool as an enzyme support: Enhancing the activity and stability of lipase immobilized onto woolen cloth. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 102, 526–533. doi:10.1016/j.colsurfb.2012.08.037
- Jang, D. H., Seong, G. H., & Lee, E. K. (2006). Comparison of enzymatic activity and cleavage characteristics of trypsin immobilized by covalent conjugation and affinity interaction. *Korean Journal of Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 21(4), 279–285.
- Joung, D. H. (2008). 효소학개론 [Introduction of enzymology]. Seoul: Daekwang.
- Juang, R. S., Wu, F. C., & Tseng, R. L. (2002). Use of chemically modified chitosan beads for sorption and enzyme immobilization. *Advances in Environmental Research*, 6(2), 171–177.
- Kang, H. K., Lee, D. E., Won, J. W., Park, K. M., Choi, S. J., & Chang, P. S. (2011). Production of bio-effective lipids and emulsifiers using immobilized lipase for CO₂ savings. *Journal of Food Hygiene and Safety*, 6(3), 5–10.
- Kildeeva, N. R., Perminov, P. A., Vladimirov, L. V., Novikov, V. V., & Mikhailov, S. N. (2009). About mechanism of chitosan cross-linking with glutaraldehyde. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 35(3), 360–369. doi:10.1134/S106816200903011X
- Kim, Y. J. (2010). Medical textile material development trends. *Dyeing and Finishing*, 5, 1–10.
- Krajewska, B. (2004). Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: A review. *Enzyme and Microbial Technology*, 35(2-3), 126–139. doi:10.1016/j.enzmtec.2003.12.013
- Kwon, S., Ryu, W. R., & Cho, M. H. (2002). Continuous degradation of azo dye by immobilized laccase. *Korean Journal of Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 17(2), 189–194.
- Lee, S. H., & Song, W. S. (2010). Surface modification of polyester fabrics by enzyme treatment. *Fibers and Polymers*, 11(1), 54–59. doi:10.1007/s12221-010-0054-4
- Lee, S. P., Kim, S. W., Sohn, E. S., & Kang, J. S. (2003). Technology trend analysis of chitosan. *Journal of Chitin and Chitosan*, 8(4), 193–201.
- Li, F. Y., Xing, Y. J., & Ding, X. (2007). Immobilization of papain on cotton fabric by sol-gel method. *Enzyme and Microbial Technology*, 40(7), 1692–1697. doi:10.1016/j.enzmtec.2006.09.007
- Li, W., Chen, B., & Tan, T. (2011). Comparative study of the properties of lipase immobilized on nonwoven fabric membranes by six methods. *Process Biochemistry*, 46(6), 1358–1365. doi:10.1016/j.procbio.2011.03.005
- Lopez-Gallego, F., Betancor, L., Mateo, C., Hidalgo, A., Alonso-Morales, N., Dellamora-Ortiz, G., Fuisan, J. M., & Fernandez-Lafuente, R. (2005). Enzyme stabilization by glutaraldehyde crosslinking of adsorbed proteins on aminated supports. *Journal of Biotechnology*, 119(1), 70–75. doi:10.1016/j.jbiotec.2005.05.021
- Manrich, A., Galvão, C. M. A., Jesus, C. D. F., Giordano, R. C., & Giordano, R. L. C. (2008). Immobilization of trypsin on chitosan gels: Use of different activation protocols and comparison with other supports. *International Journal of Biological Macromolecules*, 43(1), 54–61. doi:10.1016/j.ijbiomac.2007.11.007
- Migneault, I., Dartiguenave, C., Bertrand, M. J., & Waldron, K. C. (2004). Glutaraldehyde: Behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking. *BioTechniques*, 37(5), 790–802.
- Min, K. S. (2010). Enzyme immobilization and its application using carbon-based nanomaterials. *News & Information for Chemical Engineers*, 28(4), 465–469.
- Mohamed, S. A., Aly, A. S., Mohamed, T. M., & Salah, H. A. (2008). Immobilization of horseradish peroxidase on nonwoven polyester fabric coated with chitosan. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 144(2), 169–179. doi:10.1007/s12010-007-8026-x
- Monier, M., & El-Sokkary, A. M. A. (2012). Modification and characterization of cellulosic cotton fibers for efficient immobilization of urease. *International Journal of Biological Macromolecules*, 51(1-2), 18–24. doi:10.1016/j.ijbiomac.2012.01.007

- p>mac.2012.04.019
- Monsan, P. (1978). Optimization of glutaraldehyde activation of a support for enzyme immobilization. *Journal of Molecular Catalysis*, 3(5), 371–384.
- Monteiro, F. M. F., Silva, G. M. M., Silva, J. B. R., Porto, C. S., Carvalho Jr., L. B., Lima Filho, J. L., Anjos Carneiro-Leão, A. M., Graças Carneiro-da-Cunha, M., & Porto, A. L. F. (2007). Immobilization of trypsin on polysaccharide film from *Anacardium occidentale* L. and its application as cutaneous dressing. *Process Biochemistry*, 42(5), 884–888. doi:10.1016/j.procbio.2007.01.006
- Nikolic, T., Kostic, M., Praskalo, J., Pejic, B., Petronijevic, Z., & Skundric, P. (2010). Sodium periodate oxidized cotton yarn as carrier for immobilization of trypsin. *Carbohydrate Polymers*, 82(3), 976–981. doi:10.1016/j.carbpol.2010.06.028
- Nikonorov, V. V., Perminov, P. A., & Kil'deeva, N. R. (2006). Crosslinking in solutions of chitosan in the presence of a crosslinking reagent for production of fibre biocatalysts. *Fibre Chemistry*, 38(2), 95–97.
- Orrego, C. E., Salgado, N., Valencia, J. S., Giraldo, G. I., Giraldo, O. H., & Cardona, C. A. (2010). Novel chitosan membranes as support for lipase immobilization: Characterization aspects. *Carbohydrate Polymers*, 79(1), 9–16. doi:10.1016/j.carbpol.2009.06.015
- Pazarlioglu, N. K., Sariisik, M., & Telefoncu, A. (2005). Treating denim fabrics with immobilized commercial cellulases. *Process Biochemistry*, 40(2), 767–771. doi:10.1016/j.procbio.2004.02.003
- Peng, G., Zhao, C., Liu, B., Ye, F., & Jiang, H. (2012). Immobilized trypsin onto chitosan modified monodisperse microspheres: A different way for improving carrier's surface biocompatibility. *Applied Surface Science*, 258(15), 5543–5552. doi:10.1016/j.apsusc.2012.01.071
- Purcena, L. L. A., Caramori, S. S., Mitidieri, S., & Fernandes, K. F. (2009). The immobilization of trypsin onto polyani-line for protein digestion. *Material Science and Engineering C*, 29(4), 1077–1081. doi:10.1016/j.msec.2008.09.014
- Romdhane, I. B., Romdhane, Z. B., Gargouri, A., & Belghith, H. (2011). Esterification activity and stability of *Talaromces thermophilus* lipase immobilized onto chitosan. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 68(3-4), 230–239. doi:10.1016/j.molcatb.2010.11.010
- Silva, C., Silva, C. J., Zille, A., Guebitz, G. M., & Cavaco-Paulo, A. (2007). Laccase immobilization on enzymatically functionalized polyamide 6,6 fibers. *Enzyme and Microbial Technology*, 41(6-7), 867–875. doi:10.1016/j.enzmictec.2007.07.010
- Silva, J. A., Macedo, G. P., Rodrigues, D. S., Giordano, R. L. C., & Gonçalves, L. R. B. (2012). Immobilization of *Candida antarctica* lipase B by covalent attachment on chitosan-based hydrogels using different support activation strategies. *Biochemical Engineering Journal*, 60(15), 16–24. doi:10.1016/j.bej.2011.09.011
- Soleimani, M., Khani, A., & Najafzadeh, K. (2012). α -Amylase immobilization on the silica nanoparticles for cleaning performance towards starch soils in laundry detergents. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 74(1-2), 1–5. doi:10.1016/j.molcatb.2011.07.011
- Walt, D. R., & Agayn, V. I. (1994). The chemistry of enzyme and protein immobilization with glutaraldehyde. *Trends in Analytical Chemistry*, 13(10), 425–430.
- Xi, F., Wu, J., Jia, Z., & Lin, X. (2005). Preparation and characterization of trypsin immobilized on silica gel supported macroporous chitosan bead. *Process Biochemistry*, 40(8), 2833–2840. doi:10.1016/j.procbio.2004.12.013
- Zelenetskii, A. N., Akopova, T. A., Kildeeva, N. R., Vikhorova, G. A., Obolonkova, E. S., & Zharov, A. A. (2003). Immobilization of trypsin on polysaccharides upon intense mechanical treatment. *Russian Chemical Bulletin*, 52(9), 2073–2077.