

항염증성 상처 치유를 위한 다기능 풀빅산 함유 나노섬유의 개발

권미나^{ID} · 김기수^{†ID}

부산대학교 응용화학공학부

(2026년 5월 6일 접수, 2026년 5월 18일 수정, 2026년 5월 19일 채택)

Development of Multifunctional Fulvic Acid-Embedded Nanofibers for Anti-Inflammatory Wound Healing

Mina Kwon^{ID} and Ki Su Kim^{†ID}

School of Chemical Engineering, Pusan National University, 2 Busandaehak-ro 63Beon-gil,
Geumjeong-gu, Busan 46241, Korea

(Received May 6, 2026; Revised May 18, 2026; Accepted May 19, 2026)

초록: 풀빅산(fulvic acid, FA)은 항균, 항염 및 항산화 특성을 지닌 천연 유래 생리활성 물질로, 감염과 염증이 동시에 수반되는 조직 손상 치료에 유망한 소재이다. 본 연구에서는 구내염과 같은 구강 점막 질환 치료를 위해 FA를 함유한 전기방사 기반 나노섬유(nanofiber, NF) 패치를 개발하였다. 조직 접착력을 향상하기 위해 젤라틴-도파민(Gel-DA) 복합체를 기질로 사용하였고 항균 활성 평가 결과, 그람양성균과 그람음성균 모두에서 세균 성장 억제 효과를 나타냈다. 개발된 NF는 우수한 세포적합성을 보였으며, 24시간 동안 지속적인 약물 방출과 적절한 생분해성을 나타냈다. 이러한 결과는 FA 함유 NF가 구강 점막 손상 부위에서 항염 및 항균 효과를 제공하는 국소 치료 플랫폼으로 활용될 가능성을 시사한다.

Abstract: Fulvic acid (FA) is a natural bioactive compound with antibacterial, anti-inflammatory, and antioxidant properties, making it a promising material for treating tissue damage accompanied by infection and inflammation. In this study, an electrospun nanofiber patch containing FA was developed for the treatment of oral mucosal diseases such as oral ulcers. To enhance tissue adhesion, a gelatin-dopamine (Gel-DA) complex was used as the matrix. Antibacterial evaluation demonstrated effective inhibition of both Gram-positive and Gram-negative bacteria. The fabricated nanofibers exhibited excellent cytocompatibility, along with sustained drug release over 24 hours and appropriate biodegradability. These results suggest that FA-loaded nanofibers have strong potential as a localized therapeutic platform for providing both antibacterial and anti-inflammatory effects at oral mucosal injury sites.

Keywords: fulvic acid, electrospun nanofibers, antibacterial activity, mucoadhesive patch, oral ulcer treatment.

서론

풀빅산(fulvic acid, FA)은 부식질(humic substances)의 주요 구성 성분으로, 천연 유기물의 분해 과정에서 생성되는 저분자 생리활성 물질이다. FA는 다수의 카복실기와 페놀성 작용기를 포함한 구조적 특성으로 인해 우수한 항균, 항염 및 항산화 활성을 나타내며, 최근 다양한 생의학적 응용을 위한 기능성 소재로 주목받고 있다.¹

특히 FA는 그람양성균과 그람음성균 모두에 대해 광범위한 항균 활성을 나타내는 것으로 보고되어 있으며, 이는 세

균 세포막의 투과성 증가, 금속 이온 킬레이션, 그리고 활성 산소종(reactive oxygen species, ROS) 생성 조절을 통한 세포 손상 유도와 관련이 있다.² 동시에 FA는 염증성 사이토카인(TNF- α , IL-6, IL-1 β 등)의 발현을 억제하고 항염 신호전달 경로를 조절함으로써 염증 반응을 완화하는 효과를 나타낸다. 이러한 다기능적 특성은 감염과 염증이 복합적으로 작용하는 조직 손상 환경에서 치료 효율을 극대화할 수 있는 잠재력을 제공한다.³ 또한 FA는 비교적 낮은 세포독성과 우수한 생체 적합성을 가지는 것으로 보고되어, 국소 약물 전달 시스템에 적용하기에 적합한 소재로 평가된다.

구내염(oral ulcer)은 구강 점막에 발생하는 대표적인 염증성 질환으로, 통증, 발적, 부종 및 점막 손상을 동반하며 환자의 식사 및 일상생활에 상당한 불편을 초래한다. 구강 내 환경은 지속적인 타액 분비, 기계적 자극, 그리고 다양한 미생물 군

[†]To whom correspondence should be addressed.
kisukim@pusan.ac.kr, ORCID[®]0000-0002-6289-9467
©2026 The Polymer Society of Korea. All rights reserved.

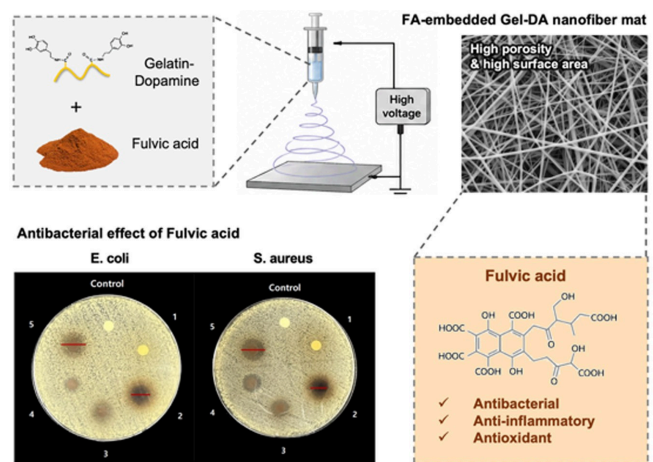
집에 의해 영향을 받는 복잡한 생리적 환경으로, 상처 치유가 지연되기 쉬운 특징을 가진다. 특히 세균 감염과 과도한 염증 반응이 동시에 발생하는 경우, 조직 재생이 저해되고 질환의 만성화 또는 재발 가능성이 증가한다. 따라서 구내염 치료에 있어 감염 억제와 염증 완화를 동시에 유도할 수 있는 치료 전략이 필수적이다.^{4,5}

현재 임상에서 사용되는 연고, 구강 세정제(gargle), 스프레이 등의 치료제는 적용 부위에서의 체류 시간이 짧고, 타액에 의해 쉽게 희석되거나 제거되는 한계를 가진다. 이러한 특성은 약물의 국소 농도를 충분히 유지하기 어렵게 하여 치료 효과의 지속성을 저하시킨다. 따라서 구강 점막에 안정적으로 부착되며 약물을 지속적으로 전달할 수 있는 국소 전달 시스템의 개발이 중요한 연구 과제로 대두되고 있다.⁶

전기방사(electrospinning) 기술은 고전압 전기장을 이용하여 나노에서 마이크로 스케일의 연속적인 섬유를 제조하는 공정으로, 높은 비표면적과 다공성 구조를 갖는 나노섬유(nanofiber, NF)를 형성할 수 있다. 이러한 NF는 세포외기질(extracellular matrix, ECM)과 유사한 3차원 구조를 제공함으로써 세포 부착, 이동 및 증식을 촉진할 수 있으며, 동시에 약물의 균일한 담지와 제어된 방출이 가능하다. 이러한 특성으로 인해 전기방사 기반 NF는 상처 치유, 조직공학 및 국소 약물 전달 분야에서 매우 유망한 플랫폼으로 평가된다.^{7,8}

한편, 젤라틴(gelatin)은 콜라겐 유래의 천연 고분자로서 우수한 생체적합성과 생분해성을 가지며, 세포 친화적인 미세환경을 제공할 수 있는 소재이다.^{9,10} 그러나 젤라틴 단독으로는 기계적 안정성과 수분 환경에서의 구조 유지 능력이 제한적일 수 있다. 이를 보완하기 위해 도파민(dopamine)을 도입할 경우, 카테콜기(catechol group)에 의해 다양한 기질과의 강한 접착성을 부여할 수 있으며, 특히 습윤한 환경에서도 안정적인 점막 부착이 가능하다.¹¹⁻¹³ 도파민 기반 접착 메커니즘은 홍합 접착 단백질(mussel-inspired adhesion)에서 유래한 것으로, 생체 조직과의 강한 상호작용을 가능하게 한다. 따라서 젤라틴-도파민(gelatin-dopamine, Gel-DA) 복합체는 구강 점막과 같은 특수 환경에 적합한 점막 부착형 패치 소재로서 높은 잠재력을 가진다.^{14,15}

이러한 배경을 바탕으로, 본 연구에서는 항균 및 항염 기능을 동시에 수행할 수 있는 구내염 치료용 점막 부착형 NF 패치를 개발하고자 하였다(Scheme 1). 이를 위해 FA의 항균 활성 및 세포적합성을 체계적으로 평가하고, Gel-DA 복합체를 기반으로 다양한 농도의 FA를 담지한 전기방사 NF를 제조하였다. 또한 제조된 NF의 형태학적 특성, 섬유 직경 분포, 약물 방출 거동, 생체적합성 및 생분해성을 종합적으로 분석하였다. 이를 통해 본 시스템이 구강 점막 손상 부위에서 감염 억제, 염증 완화 및 조직 재생을 동시에 유도할 수 있는 다기능성 국소 치료 플랫폼으로서의 가능성을 규명하고자 하였다.



Scheme 1. Schematic illustration of multifunctional fulvic acid-embedded nanofibers.

실 험

재료. FA는 선행연구에 명시된 방법을 통해 추출되었다.¹ 젤라틴(gelatin, type A from porcine skin)과 도파민 염산염(dopamine hydrochloride, $\geq 98\%$)은 Sigma-Aldrich(USA)에서 구매하였다. Gel-DA 복합체 합성을 위한 1-ethyl-3-(3-dimethylamino propyl)carbodiimide hydrochloride(EDC, $\geq 98\%$) 및 *N*-hydroxysuccinimide(NHS, $\geq 98\%$)는 Sigma-Aldrich(USA)에서 구매하여 사용하였다.

전기방사를 위한 고분자 용액 제조에 사용된 용매로는 hexafluoroisopropanol(HFIP, $\geq 99\%$)를 TCI(Japan)에서 구매하여 사용하였다. 또한 FA 용해를 위해 dimethyl sulfoxide (DMSO, $\geq 99\%$)를 Sigma-Aldrich(USA)에서 구매하여 사용하였다.

세포 실험을 위해 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), fetal bovine serum(FBS), penicillin-streptomycin(P/S)은 Thermo Fisher Scientific(USA)에서 구매하여 사용하였다. 세포 생존율 분석을 위한 CCK-8 assay kit와 세포 염색을 위한 Alexa Fluor 488 phalloidin, Alexa Fluor 594 phalloidin 및 4',6-diamidino-2-phenylindole(DAPI)은 Thermo Fisher Scientific(USA)에서 구매하였다.

항균 실험에 사용된 그람양성균 *Staphylococcus aureus*(*S. aureus*)와 그람음성균 *Escherichia coli*(*E. coli*)는 American Type Culture Collection(ATCC, USA)로부터 분양받아 사용하였다. 항균 활성 평가를 위한 Mueller-Hinton agar(MHA) plate는 MCell(Korea)에서 구매하여 사용하였다.

약물 방출 및 생분해성 분석을 위해 phosphate-buffered saline(PBS, pH 7.4)을 사용하였다. Dialysis membrane(molecular weight cut-off, MWCO 80 kDa)은 Thermo Fisher Scientific(USA)사에서 구매하여 사용하였다. 또한 효소적 분해 실험을 위해 collagenase를 Sigma-Aldrich(USA)에서 구매하여 사용

하였다. 모든 시약은 별도의 정제 과정 없이 사용하였다.

기기 및 분석 화학적 구조 분석을 위해 UV-visible spectrophotometer(UV-vis, Optizen 2120UV model)와 ^1H nuclear magnetic resonance(^1H NMR, Bruker Avance 500 MHz spectrometer)를 사용하였다. 세포 이미징 분석을 위해 confocal laser scanning microscopy(CLSM, ZEISS LSM 900 model)를 사용하였으며, NF의 형태학적 특성 분석을 위해 scanning electron microscopy(SEM, SUPRA 25 model)를 사용하였다.

FA의 항균 활성 평가는 그람양성균 *Staphylococcus aureus*와 그람음성균 *Escherichia coli*를 대상으로 수행하였다. 세균 현탁액을 FA 100 mg과 혼합한 후 Mueller-Hinton agar(MHA) plate에 도말하여 37 °C에서 24시간 동안 배양하였다. 이후 colony 형성 정도를 관찰하여 항균 효과를 평가하였으며, 필요 시 colony forming unit(CFU) 분석을 통해 정량적으로 비교하였다.

Gel-DA 합성 Gel-DA 복합체는 젤라틴의 카복실기와 도파민의 아민기 간의 carbodiimide 반응을 통해 합성하였다. 먼저 젤라틴 1 g을 71 mL의 MES buffer(pH 4.5, 50 mM)에 용해시킨 후 40 °C에서 교반하여 균일한 용액을 제조하였다.

이후 젤라틴의 카복실기를 활성화하기 위해 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride(EDC) 500 mg과 N-hydroxysuccinimide(NHS) 427.1 mg을 첨가하고, 실온에서 30분 동안 반응시켰다. 이어서 dopamine hydrochloride 150 mg을 첨가하여 첨가한 후, 용액 내 용존 산소에 의한 도파민의 산화를 방지하기 위해 질소 가스를 퍼징하였다. 이후 암조건에서 12시간 동안 교반 반응을 진행하였다.

반응 종료 후, 생성된 Gel-DA 용액은 dialysis membrane(MWCO 80 kDa)에 담가 증류수에 대해 3일 동안 투석을 진행하여 미반응 물질과 부산물을 제거하였다. 이때 투석액은 6시간 간격으로 교체하였다. 이후 정제된 용액을 동결건조하여 Gel-DA 분말을 얻었으며, 사용 전까지 -20 °C에서 보관하였다.

합성된 Gel-DA는 UV-visible spectroscopy 및 ^1H NMR 분석(D₂O 용매 사용)을 통해 도파민의 성공적인 도입을 확인하였다.

FA NF의 합성 Gel-DA 기반 전기방사 용액은 hexafluoroisopropanol(HFIP)을 용매로 사용하여 제조하였다. 먼저 Gel-DA(15 wt%)를 HFIP에 첨가한 후, 상온에서 6시간 동안 교반하여 균일한 고분자 용액을 얻었다.

한편, FA는 HFIP에 대한 용해도가 제한적이므로, 사전에 dimethyl sulfoxide(DMSO)에 용해하여 stock solution을 준비하였다. 이후 FA 용액을 Gel-DA/HFIP 용액에 다양한 질량 비율(Gel-DA:FA = 20:1, 40:1, 80:1)로 첨가하고, 완전히 균일해질 때까지 3시간 동안 추가 교반을 수행하였다. 혼합 용액은 기포 제거를 위해 정지 상태에서 탈기 과정을 거친 후, 암조건에서 보관하였다.

준비된 용액은 전기방사 장치를 이용하여 NF로 제조하였

다. 전기방사는 22-gauge 스테인리스 스틸 니들이 장착된 시린지를 사용하여 수행되었으며, 용액은 시린지 펌프를 통해 공급되었다. 전기방사 조건은 인가 전압 15 kV, 니들과 콜렉터 간 거리 15 cm, 유속 1 mL/h로 설정하였다.

생성된 NF는 실리콘 코팅된 종이(silicone-coated paper)가 부착된 콜렉터 위에 수집되었으며, 이후 잔존 용매를 제거하기 위해 하루 동안 건조한 후 후속 실험에 사용하였다.

FA NF의 특성분석 제조된 Gel-DA/FA NF의 형태학적 특성은 SEM을 이용하여 분석하였다. 시료는 분석 전 표면 전도성을 확보하기 위해 5 nm 두께의 백금 코팅을 수행한 후 관찰하였다. SEM 이미지를 기반으로 섬유 직경은 ImageJ 소프트웨어를 이용하여 최소 200개 이상의 섬유를 측정하여 평균값과 분포를 산출하였다.

Gel-DA 복합체의 합성 여부는 UV-vis ^1H NMR을 이용하여 확인하였다. UV-vis 분석을 통해 도파민의 특성 흡수 피크 변화를 관찰하였으며, ^1H NMR 분석을 통해 젤라틴에 도파민이 성공적으로 결합되었음을 확인하였다.

NF 내 FA의 방출 거동은 dialysis membrane을 이용하여 평가하였다. 일정량의 NF를 PBS에 담가 일정 시간 간격으로 방출 용액을 채취하였으며, 동일 부피의 신선한 PBS로 교체하였다. 방출된 FA의 농도는 UV-vis 분석을 통해 정량하였고, 이를 바탕으로 누적 방출량을 계산하였다.

NF의 생분해성 평가는 PBS 조건에서 수행하였다. 일정 질량의 NF를 PBS에 침지한 후, 일정 시간 간격으로 시료를 회수하여 건조한 뒤 잔존 질량을 측정하였다. 이를 통해 시간에 따른 질량 감소율을 계산하여 분해 거동을 분석하였다.

세포 부착 및 형태학적 특성은 CLSM을 이용하여 분석하였다. L929 세포를 NF 표면에 배양한 후, Alexa Fluor 488 phalloidin 또는 Alexa Fluor 594 phalloidin으로 F-actin을 염색하고 DAPI로 세포핵을 염색하였다. 이후 CLSM을 통해 세포 부착, spreading 및 세포 형태를 관찰하였다.

결과 및 토론

FA의 항균 활성을 평가하기 위해 그람음성균 *E. coli*와 그람양성균 *S. aureus*를 대상으로 세균 생존율 분석을 수행하였다(Figure 1). 본 연구에서 사용된 FA1-FA5는 선행연구에서 서로 다른 이온용액 조건을 이용해 추출된 폴빅산 시료이다.¹ 본 연구에서는 각 FA 시료의 추출 조건 자체보다는 생물학적 활성 차이를 비교하는 데 초점을 두었다.

정량적 분석 결과(Figure 1(a)), 대조군(Control)에서는 두 군 모두 약 100%의 생존율을 나타낸 반면, FA 처리군에서는 전반적으로 세균 생존율이 감소하는 경향을 보였다. 특히 FA2는 *E. coli*에 대해 가장 우수한 항균 활성을 나타내며 생존율을 크게 감소시켰고, FA3 및 FA4에서도 유의한 수준의 항균 효과가 확인되었다.

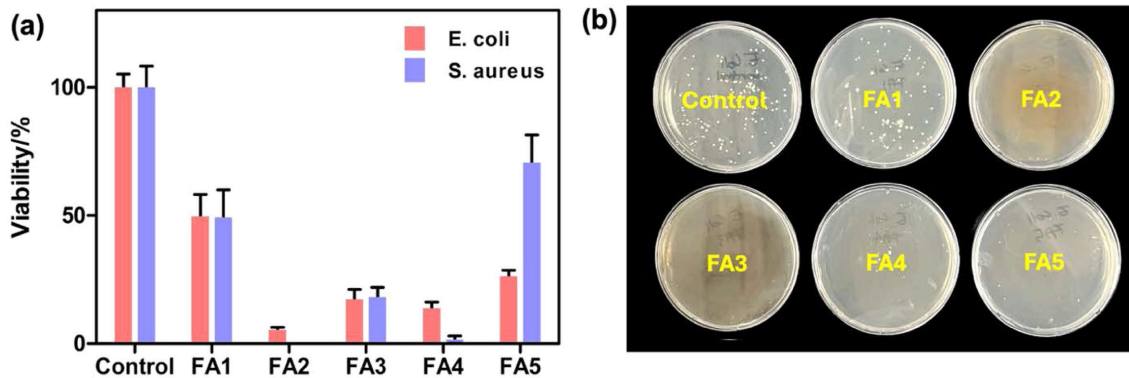


Figure 1. (a) Viability of *E. coli* and *S. aureus* after treatment with different FA samples (FA1-FA5), determined by colony counting; (b) representative images of bacterial colonies on agar plates after FA treatment.

*S. aureus*의 경우 FA4에서 가장 강력한 항균 활성을 보였으며, 전반적으로 *E. coli*보다 더 높은 감수성을 나타냈다. 반면 FA5에서는 상대적으로 낮은 항균 효과가 관찰되었다. 이러한 결과는 동일한 FA라 하더라도 시료 간 구성 성분 차이에 따라 항균 활성이 달라질 수 있음을 시사한다.

또한 Figure 1(b)에 제시된 배양 결과에서도 FA 처리군에서 colony 형성이 감소하는 경향이 관찰되어, 정량적 분석 결과와 일치하는 항균 효과를 확인할 수 있었다.

이러한 항균 효과는 FA의 다기능성 작용에 기인하는 것으로 해석된다. FA는 페놀성 및 카복실기 기반 구조를 통해 세균 세포막의 안정성을 저하시킬 수 있으며, 동시에 산화환원 반응을 통해 세포 내 산화적 스트레스를 유도하여 세균 사멸을 촉진할 수 있다.^{16,17}

종합적으로, FA는 그람양성균(*S. aureus*)과 그람음성균(*E. coli*) 모두에 대해 우수한 항균 활성을 나타내었으며, 특히 특정 농도 범위에서 세균 성장 억제 효과를 보였다. 이는 FA가 감염이 동반된 조직 손상 치료를 위한 효과적인 항균 소재로 활용될 수 있음을 시사한다.

FA의 세포적합성을 평가하기 위해 L929 섬유아세포를 이용한 세포 생존율 분석 및 형광 이미징을 수행하였다(Figure 2).

CCK-8 assay 결과(Figure 2(a)), 0.00125% 농도에서는 모든 FA 처리군에서 세포 생존율은 대조군 대비 유의한 감소 없이 유지되었으며, 전반적으로 80% 이상의 생존율을 나타내어 우수한 생체적합성을 확인할 수 있었다. 특히 일부 조건(FA1 및 FA2)에서는 세포 생존율이 100% 이상으로 나타나는 경향이 관찰되었으며, 이는 FA가 특정 농도 범위에서 세포 활성 또는 증식을 촉진하였음을 시사한다. 이러한 결과는 FA의 항산화 및 생리활성 특성이 세포 내 산화 스트레스를 완화하고 세포 성장에 긍정적인 영향을 미친 것으로 해석된다.

반면, 고농도 조건에서는 일부 감소 경향이 나타났으나, 전체적으로 세포 독성은 크지 않은 것으로 판단된다.

본 연구에서는 *E. coli*에 대해 가장 우수한 항균 활성을 보였으며, *S. aureus*에 대해서도 충분한 억제 효과를 나타낸 FA2를 이후 NF 제조를 위한 최적의 후보 물질로 선정하였다.

또한 FA2는 L929 세포에서 우수한 세포적합성을 보여, 항균성과 생체적합성을 종합적으로 고려했을 때 나노파이버 제조에 가장 적합한 후보로 판단하였다. 세포의 형태 및 부착 특성은 CLSM을 이용하여 분석하였다(Figure 2(b)). L929 섬유아세포는 0.005% 농도의 FA2로 처리하여 24시간 인큐베이션 이후 형광 이미징을 위해 염색되었다. 이미징 결과 세

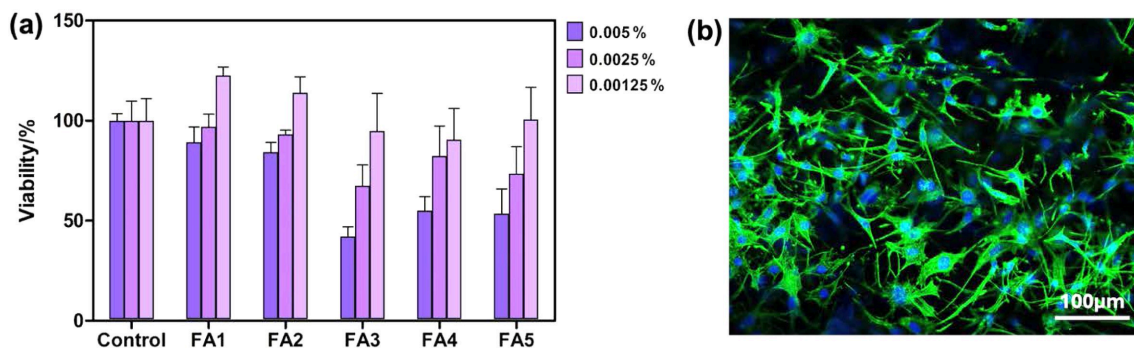


Figure 2. (a) Cell viability of L929 fibroblasts after treatment with different FA samples, evaluated by CCK-8 assay; (b) CLSM images of L929 cells stained with Alexa Fluor 488 (F-actin, green) and DAPI (nuclei, blue).

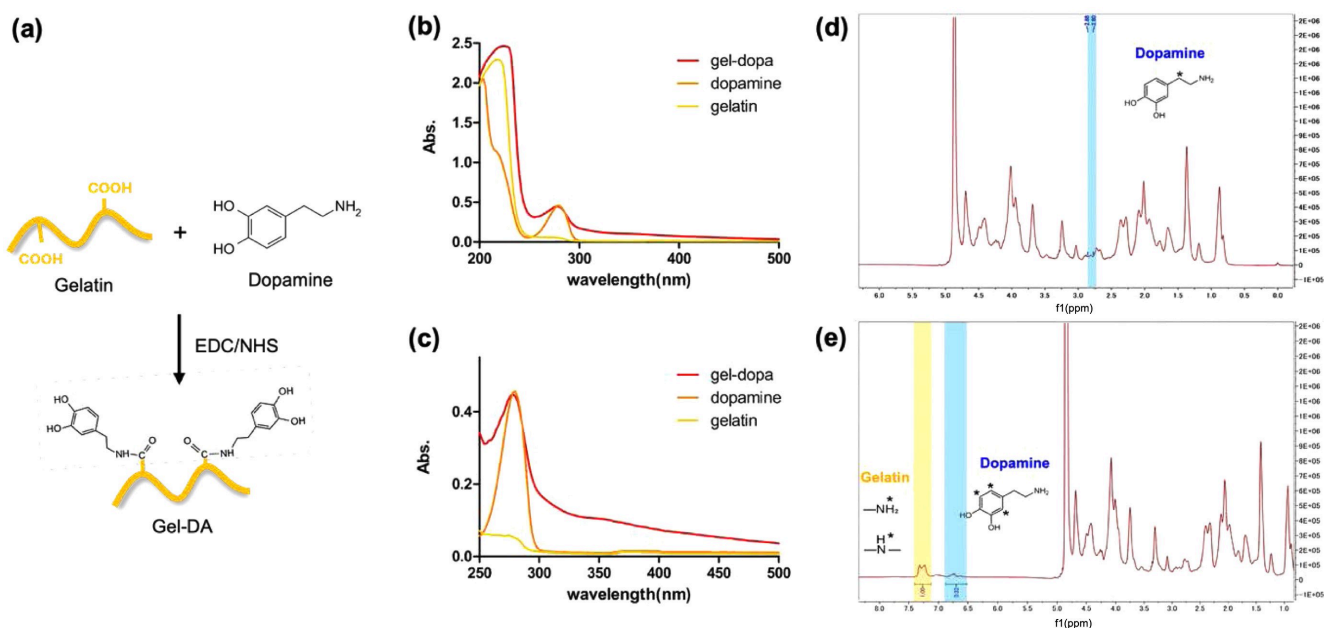


Figure 3. (a) Synthesis of Gel-DA; (b), (c) UV-vis absorption spectra of gelatin, dopamine, and Gel-DA; (d), (e) ¹H NMR spectra of dopamine and Gel-DA in D₂O, confirming successful conjugation.

포질과 세포핵이 균일하게 분포하였고 세포는 전반적으로 spindle-like morphology를 유지하며 넓게 spreading된 형태를 나타내어, 정상적인 세포 부착 및 성장 상태를 보였다.

종합적으로, FA는 다양한 조건에서 우수한 세포적합성을 나타내었으며, 이는 이후 NF 기반 국소 치료 시스템에 적용하기에 적합한 생체 안전성을 가진 소재임을 시사한다.

Gel-DA 복합체의 형성은 EDC/NHS coupling reaction을 통해 이루어졌으며 성공적인 합성을 확인하기 위해 UV-vis 및 ¹H NMR 분석을 수행하였다(Figure 3(a)).

UV-vis 분석 결과(Figure 3(b), (c)), 순수 도파민은 약 280 nm 부근에서 특징적인 흡수 피크를 나타낸 반면, 젤라틴은 해당 영역에서 뚜렷한 흡수 피크를 보이지 않았다. Gel-DA의 경우 도파민의 특성 피크가 유지되면서도 피크가 다소 broaden되고 intensity 변화가 나타났으며, 이는 도파민이 젤라틴 사슬에 결합됨에 따라 전자 환경이 변화한 결과로 해석된다. 또한 Gel-DA는 젤라틴 대비 전반적으로 증가된 흡광 특성을 나타내어 도파민의 도입을 뒷받침한다.¹⁸

¹H NMR 분석 결과(Figure 3(d), (e)), 젤라틴에서 나타나는 신호와 함께 도파민의 방향족 고리에 해당하는 피크가 약 6.5–7.0 ppm 영역에서 새롭게 관찰되었다. 또한 도파민의 aliphatic proton에 해당하는 피크 역시 확인되었으며, 이는 젤라틴 구조 내에 도파민이 성공적으로 도입되었음을 의미한다. 특히 Gel-DA 스펙트럼에서는 젤라틴과 도파민의 특징적인 피크가 동시에 존재하여 두 성분 간 결합이 이루어졌음을 명확히 보여준다.¹⁹

이러한 결과는 도파민이 젤라틴에 성공적으로 결합되어

Gel-DA 복합체가 형성되었음을 입증한다. 도파민의 카테콜 구조 도입은 향후 제조될 NF에 점막 부착성을 부여하여, 습윤한 구강 환경에서도 안정적인 부착 및 국소 약물 전달을 가능하게 할 것으로 기대된다.

제조된 NF는 육안으로 확인 시 균일한 멤브레인 형태를 나타내었으며, 표면이 매끄럽고 결함 없이 형성된 것을 확인할 수 있었다(Figure 4(a)). 이는 전기방사 공정이 안정적으로 이루어졌음을 시사한다.

SEM 분석 결과(Figure 4(b)), NF는 무작위로 얹힌(randomly oriented) 섬유 구조를 나타내었으며, bead가 없는 균일한 형태(bead-free morphology)를 보였다. 이는 용액의 점도 및 전기방사 조건이 적절하게 설정되어 안정적인 Taylor cone이 형성되었음을 의미한다. 또한 섬유 간 연결성이 우수하다.

공성 네트워크 구조가 형성되어, 높은 비표면적을 가지는 나노섬유 매트릭스가 구현되었음을 확인할 수 있었다.

섬유 직경 분포 분석 결과(Figure 4(c)), NF는 약 80–650 nm 범위의 직경을 가지며, 평균 직경은 약 305 nm로 나타났다. 직경 분포는 비교적 좁은 범위 내에서 정규분포 형태를 나타내어 균일한 섬유 형성이 이루어졌음을 보여준다. 이러한 균일한 직경 분포는 약물의 안정적인 담지 및 방출 특성에 긍정적인 영향을 미칠 것으로 기대된다.

따라서, Gel-DA/FA NF는 균일한 구조적 특성과 높은 형태적 안정성을 나타내었으며, 이는 이후 약물 전달 및 조직 재생을 위한 효과적인 지지체로 활용될 수 있음을 시사한다.

Gel-DA NF로부터 FA의 방출 거동을 평가하기 위해 UV-vis를 이용하여 정량 분석을 수행하였다(Figure 5).

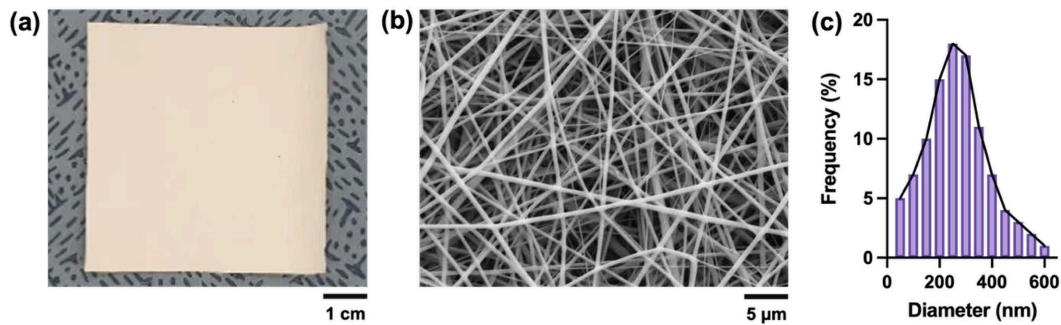


Figure 4. (a) Photograph of electrospun nanofiber mat; (b) SEM image showing uniform and bead-free nanofiber morphology; (c) diameter distribution histogram of nanofibers.

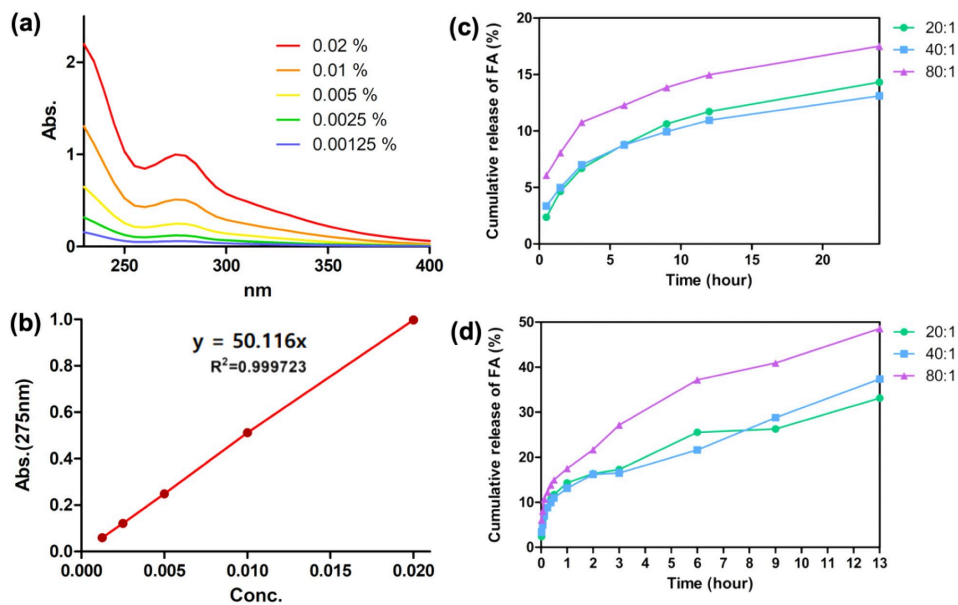


Figure 5. (a) UV-vis absorption spectra of FA at different concentrations; (b) calibration curve of FA showing linear relationship between absorbance and concentration; (c) short-term; (d) long-term cumulative release profiles of FA from nanofibers with different composition ratios (20:1, 40:1, 80:1, w/w).

먼저, FA의 정량 분석을 위해 UV-vis 흡수 스펙트럼을 측정 한 결과(Figure 5(a)), 약 270–280 nm 부근에서 농도 의존적인 흡광 피크가 확인되었다. 이를 바탕으로 표준 검량선을 작성 하였으며(Figure 5(b)), FA 농도와 흡광도 간의 높은 선형성 ($R^2 = 0.9997$)을 나타내어 정량 분석의 신뢰성을 확보하였다.²⁰

Gel-DA/FA NF의 방출 거동은 서로 다른 질량비(20:1, 40:1, 80:1)에 대해 평가하였다(Figure 5(c), (d)). 모든 군에서 초기 수 시간 내에 상대적으로 빠른 방출(initial burst release)이 관찰 되었으며, 이후 점진적인 증가를 보이는 sustained release profile을 나타냈다. 이러한 초기 방출은 NF 표면에 존재하는 FA의 빠른 용출에 기인한 것으로 해석된다.

누적 방출율(%) 기준으로 비교하였을 때, 각 군 간 방출 거 동은 전반적으로 유사한 경향을 나타냈으며, 특정 조성비에 따른 뚜렷한 방출 경향성은 관찰되지 않았다. 이는 FA가 Gel-

DA 매트릭스 내에서 비교적 균일하게 분산되어 유사한 확산 메커니즘을 통해 방출되었음을 시사한다.

또한 장시간 방출 결과에서도 모든 군에서 안정적인 지속 방출이 유지되었으며, 이는 Gel-DA 기반 NF가 FA를 효과적 으로 담지하고 서서히 방출하는 전달 시스템으로 기능함을 보여준다.

종합적으로, Gel-DA/FA NF는 초기 burst release와 이후 지 속 방출 특성을 동시에 나타내었으며, 조성비 변화에도 불구 하고 유사한 방출 프로파일을 유지하였다. 이러한 결과는 본 시스템이 안정적인 약물 전달 플랫폼으로 활용될 수 있음을 시사한다.

Gel-DA/FA NF의 생분해 거동은 collagenase (2 U/mL)를 포함한 PBS 조건에서 평가하였다(Figure 6).²¹

분해 분석 결과, 7일 후 Gel-DA 기준 약 10% 수준의 질량

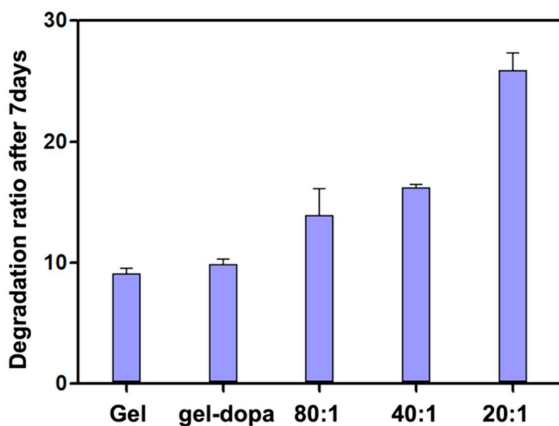


Figure 6. Degradation of nanofibers in PBS containing collagenase (2 U/mL), evaluated by percentage weight loss.

감소가 확인되었으며, 이는 NF가 효소적 환경에서 일정 기간 구조적 안정성을 유지함과 동시에 점진적으로 분해되는 특성을 나타냄을 의미한다. 이러한 분해 거동은 collagenase에 의한 젤라틴 사슬의 효소적 분해에 기인한 것으로 해석된다. 하지만, 실제 구강 환경은 타액, pH 변화, 기계적 자극 등 더 복잡한 조건을 포함하므로, 향후 연구에서는 artificial saliva 또는 ex vivo oral mucosa model을 이용한 추가 평가가 필요할 것으로 판단된다.

또한 FA가 도입된 Gel-DA NF는 분해 과정에서 내부에 담지된 FA의 방출과 연계될 수 있으며, 이는 조직 재생 과정에서 재료의 점진적 제거와 함께 지속적인 약물 전달을 가능하게 하여 구강 점막과 같은 생체 환경에서 적용 가능한 생분해성 소재로서의 가능성을 시사한다.

Gel-DA/FA NF 상에서의 세포 증식 및 형태학적 특성을 평가하기 위해 L929 세포를 7일간 배양한 후, CLSM을 통해 분석하였다(Figure 7).

모든 실험군에서 세포는 NF 표면에 안정적으로 부착되었으며, 염색된 F-actin 구조는 뚜렷한 세포 골격 형성을 나타냈다. 세포핵 또한 균일하게 분포하였으며, 이를 통해 NF 상에서 세포가 정상적으로 생존하고 있음을 확인할 수 있었다.

7일 배양 후, 모든 조건에서 세포가 파이버 구조체에 고루 분포하고 spreading된 형태를 보였으며, 이는 NF가 세포외기질(ECM)과 유사한 미세환경을 제공하여 NF의 표면 특성과 FA의 생리활성 효과가 세포 성장에 긍정적인 영향을 미친 결과로 해석된다.

또한 FA의 담지 농도 변화에 따른 세포 골격 구조의 손상이나 비정상적인 형태 변화는 관찰되지 않았다. 이는 FA가 포함된 시스템에서도 우수한 세포적합성이 유지됨을 의미한다.

종합적으로, Gel-DA/FA NF는 장기(7일) 세포 배양 조건에서도 우수한 세포 부착 및 증식 능력을 나타내었으며, 조직 재생을 위한 지지체로서 적합한 미세환경을 제공할 수 있음을

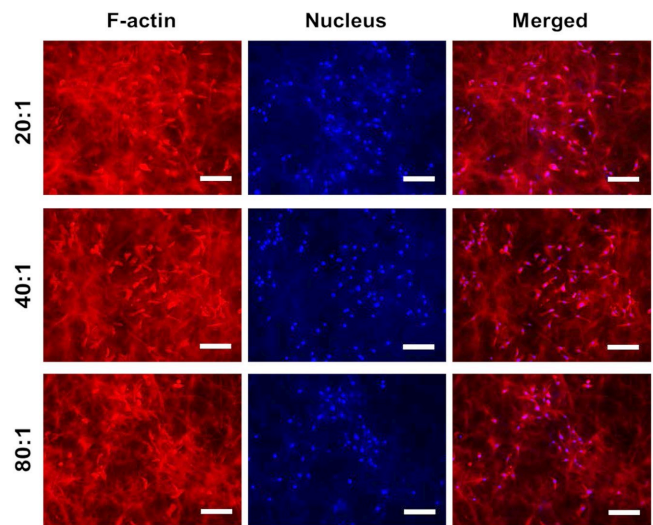


Figure 7. Cell morphology of L929 cells cultured on Gel-DA/FA. CLSM images of L929 cells cultured on nanofibers with different compositions for 7 days. Cells were stained with Alexa Fluor 594 (F-actin, red) and DAPI (nuclei, blue), showing cell attachment and spreading. Scale bar: 200 nm.

확인하였다.

결론

본 연구에서는 항균 및 항염 특성을 지닌 FA를 기반으로, 구강 점막 치료를 위한 Gel-DA NF 패치를 성공적으로 개발하였다. 먼저, 서로 다른 FA 시료의 항균 활성을 비교한 결과, FA2가 *E. coli*와 *S. aureus* 모두에 대해 우수한 항균 효과를 나타내어 최적의 후보로 선정되었다. 또한 FA는 낮은 세포독성과 우수한 세포적합성을 나타내어 생체 적용 가능성을 확인하였다.

Gel-DA 복합체는 UV-vis 및 ¹H NMR 분석을 통해 성공적으로 합성되었으며, 전기방사를 통해 균일하고 bead-free한 NF 구조를 형성하였다. 제조된 NF는 높은 비표면적과 다공성 구조를 가지며, 세포 부착 및 증식에 유리한 환경을 제공하였다.

또한 Gel-DA/FA NF는 초기 burst release와 이후 지속 방출 특성을 동시에 나타내었으며, collagenase(2 U/mL) 조건에서 점진적인 생분해 거동을 보였다. 이러한 특성은 약물 전달과 동시에 재료의 자연스러운 제거를 가능하게 하는 장점으로 작용한다. 실제로 NF 상에서 7일간 배양된 세포는 우수한 부착과 증식을 나타내어 조직 재생을 위한 지지체로서의 가능성을 입증하였다.

종합적으로, 본 연구에서 개발된 Gel-DA/FA NF는 항균 활성, 우수한 세포적합성, 제어된 약물 방출 및 적절한 생분해성을 동시에 갖춘 다기능성 국소 치료 플랫폼으로, 구내염을

포함한 구강 점막 손상 치료에 효과적으로 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 글: 본 연구는 부산대학교 기본연구지원사업(2년)의 지원을 받아 수행되었으며, 이에 깊은 감사를 드립니다.

이해상충: 저자들은 이해상충이 없음을 선언합니다.

참 고 문 헌

- Phong, N. T.; Yoon, H. Y.; Kang, M. S.; Kwon, M.; Lee, Y.; Baik, J. M.; Son, E. J.; Jang, K. S.; Han, D. W.; Kim, K. S.; Jeon, J. R. Ionic Liquid-Based Extraction of Fulvic-like Substances from Wood Sawdust: Reproducing Unique Biological Activities of Fulvic Acids Using Renewable Natural Sources. *J. Agric. Food Chem.* **2024**, 72, 20981-20990.
- Shang, E.; Li, Y.; Niu, J.; Zhou, Y.; Wang, T.; Crittenden, J. C. Relative Importance of Humic and Fulvic Acid on ROS Generation, Dissolution, and Toxicity of Sulfide Nanoparticles. *Water Res.* **2017**, 124, 595-604.
- Canellas, L. P.; Olivares, F. L.; Aguiar, N. O.; Jones, D. L.; Nebbioso, A.; Mazzei, P.; Piccolo, A. Humic and Fulvic Acids as Biostimulants in Horticulture. *Sci. Hortic.* **2015**, 196, 15-27.
- Winkler, J.; Ghosh, S. Therapeutic Potential of Fulvic Acid in Chronic Inflammatory Diseases and Diabetes. *J. Diabetes Res.* **2018**, 2018, 5391014.
- Saar, R. A.; Weber, J. H. Fulvic Acid: Modifier of Metal-Ion Chemistry. *Environ. Sci. Technol.* **1982**, 16, 510A-517A.
- Gandy, J. J.; Meeding, J. P.; Snyman, J. R.; van Rensburg, C. E. J. Phase 1 Clinical Study of the Acute and Subacute Safety and Proof-of-Concept Efficacy of Carbohydrate-Derived Fulvic Acid. *Clin. Pharmacol. Adv. Appl.* **2012**, 2012, 7-11.
- Dahlin, R. L.; Kasper, F. K.; Mikos, A. G. Polymeric Nanofibers in Tissue Engineering. *Tissue Eng. Part B Rev.* **2011**, 17, 349-364.
- Vasita, R.; Katti, D. S. Nanofibers and Their Applications in Tissue Engineering. *Int. J. Nanomedicine* **2006**, 1, 15-30.
- Echave, M. C.; Burgo, L. S.; Pedraz, J. L.; Orive, G. Gelatin as Biomaterial for Tissue Engineering. *Curr. Pharm. Des.* **2017**, 23, 3567-3584.
- Lukin, I.; Erezuma, I.; Maeso, L.; Zarate, J.; Desimone, M. F.; Al-Tel, T. H.; Dolatshahi-Pirouz, A.; Orive, G. Progress in Gelatin as Biomaterial for Tissue Engineering. *Pharmaceutics* **2022**, 14, 1177.
- Gowda, A. H.; Bu, Y.; Kudina, O.; Krishna, K. V.; Bohara, R. A.; Eglin, D.; Pandit, A. Design of Tunable Gelatin-Dopamine Based Bioadhesives. *Int. J. Biol. Macromol.* **2020**, 164, 1384-1391.
- Montazerian, H.; Baidya, A.; Haghniaz, R.; Davoodi, E.; Ahadian, S.; Annabi, N.; Khademhosseini, A.; Weiss, P. S. Stretchable and Bioadhesive Gelatin Methacryloyl-Based Hydrogels Enabled by in Situ Dopamine Polymerization. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2021**, 13, 40290-40301.
- Lee, S. Y.; Jeon, S.; Kwon, Y. W.; Kwon, M.; Kang, M. S.; Seong, K. Y.; Park, T. E.; Yang, S. Y.; Han, D. W.; Hong, S. W.; Kim, K. S. Combinatorial Wound Healing Therapy Using Adhesive Nanofibrous Membrane Equipped with Wearable LED Patches for Photobiomodulation. *Sci. Adv.* **2022**, 8, eabn1646.
- Zhou, D.; Li, S.; Pei, M.; Yang, H.; Gu, S.; Tao, Y.; Ye, D.; Zhou, Y.; Xu, W.; Xiao, P. Dopamine-Modified Hyaluronic Acid Hydrogel Adhesives with Fast-Forming and High Tissue Adhesion. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2020**, 12, 18225-18234.
- Han, L.; Lu, X.; Liu, K.; Wang, K.; Fang, L.; Weng, L. T.; Zhang, H.; Tang, Y.; Ren, F.; Zhao, C.; Sun, G. Mussel-Inspired Adhesive and Tough Hydrogel Based on Nanoclay Confined Dopamine Polymerization. *ACS Nano* **2017**, 11, 2561-2574.
- Sherry, L.; Jose, A.; Murray, C.; Williams, C.; Jones, B.; Millington, O.; Bagg, J.; Ramage, G. Carbohydrate-Derived Fulvic Acid: An *In Vitro* Investigation of a Novel Membrane-Active Antiseptic Agent against *Candida albicans* Biofilms. *Front. Microbiol.* **2012**, 3, 116.
- Sherry, L.; Millhouse, E.; Lappin, D. F.; Murray, C.; Culshaw, S.; Nile, C. J.; Ramage, G. Investigating the Biological Properties of Carbohydrate-Derived Fulvic Acid (CHD-FA) as a Potential Novel Therapy for the Management of Oral Biofilm Infections. *BMC Oral Health* **2013**, 13, 47.
- Fan, C.; Fu, J.; Zhu, W.; Wang, D. A. A Mussel-Inspired Double-Crosslinked Tissue Adhesive Intended for Internal Medical Use. *Acta Biomater.* **2016**, 33, 51-63.
- Fu, J.; Quek, K. Y.; Chuah, Y. J.; Lim, C. S.; Fan, C.; Wang, D. A. The Effects of Gelatin-Dopamine Coating on Polydimethylsiloxane Substrates on Pluripotency Maintenance and Myocardial Differentiation of Cultured Mouse Embryonic Stem Cells. *J. Mater. Chem. B* **2016**, 4, 7961-7973.
- Nieweś, D.; Huculak-Mączka, M.; Braun-Giwerska, M.; Marecka, K.; Tyc, A.; Biegun, M.; Hoffmann, K.; Hoffmann, J. Ultrasound-Assisted Extraction of Humic Substances from Peat: Assessment of Process Efficiency and Products' Quality. *Molecules* **2022**, 27, 3413.
- Noh, H. K.; Lee, S. W.; Kim, J. M.; Oh, J. E.; Kim, K. H.; Chung, C. P.; Choi, S. C.; Park, W. H.; Min, B. M. Electrospinning of Chitin Nanofibers: Degradation Behavior and Cellular Response to Normal Human Keratinocytes and Fibroblasts. *Biomaterials* **2006**, 27, 3934-3944.

출판자 공지사항: 한국고분자학회는 게재된 논문 및 기관 소속의 관할권 주장과 관련하여 중립을 유지합니다.