

공동캡슐화를 이용한 Capsule 내외부의 분자량 분포

이 기 선 · *임 현 수

여수대학교 생물공학과

(접수 : 2001. 5. 11., 게재승인 : 2001. 8. 2.)

Molecular Weight Distribution Inside and Outside Capsules Using Coencapsulating Technology

Ki-Sun Lee and Hyun-Soo Lim*

Department of Biotechnology, Yosu National University, Yosu 550-749, Korea

(Received : 2001. 5. 11., Accepted : 2001. 8. 2.)

The change of molecular weight inside and outside a capsule produced using coencapsulating technology was investigated. Chitosan and chitosanase were enveloped in this membrane and product released was a loaded the medium by the principle of size exclusion. The leakage of substrate corresponding to the agitation speed was controlled by adjusting the alginate and CaCO₃ concentrations. The optimal condition of alginate concentration and agitation speed were 0.5% and 40rpm, respectively. Membrane thickness and capsules diameter were 10 μ m and approx. 3.0 - 1.5 mm, respectively. Molecular weight difference by concentration and alginate viscosity were of little significance. In accordance with the molecular weight distribution versus enzyme concentration relationship, low concentration of enzyme produced high molecular weight oligosaccharides. At a 1.5 mm capsule size the product diffusion rate to outer surface highest. The molecular weight distribution of the released oligosaccharides was ranged from 1000 to 6000 Da. More than 80% of the initial activity of encapsulated enzyme retained after 8hrs of reaction.

Key Words : capsule size, chitosan oligosaccharide, coencapsulation, molecular weight distribution, size exclusion, residual enzyme activity

서 론

캡슐화란 효모, 세포, 생리활성물질을 gel bead 혹은 hollow 캡슐 속에 포집하여 고정화시키는 방법이다. 캡슐 생성 혹은 합성재료로 인공고분자, 생물고분자 등을 사용하여 식품(1), 화장품(2), 약물전달체(3) 및 최근 동물세포배양(4)과 인공 장기(5)에까지 응용하고 있는 실정이다. 캡슐 제조법의 발전과 아울러 약학 및 의학·생물분야에 응용하려는 시도가 행해졌다. 생물분야에서의 연구는 semipermeable membrane을 이용한 artificial cell의 개념이 도입되면서 많은 연구가 이루어지기 시작했다(6). 생물 고분자 막을 이용한 encapsulation은 다가의 양이온 고분자와 반대의 전하를 가진 고분자 사이의 이온성 상호반응에 의해 형성될 수 있고, 고분자 용액이 반대의 전하를 갖는 고분자 용액에 떨어졌을 때 이온 반응에 의해 고분자막을 형성하여 캡슐을 제조할 수 있다. 위와 같

은 막의 특성을 이용하여 기질과 효소가 공존하는 캡슐을 제조하여 이 캡슐의 장점인 membrane의 pore size를 조절하면 올리고당을 분자량별로 유출시키는 것이 가능해짐으로 기질과 효소의 유출을 조절하여 생리활성이 높은 올리고당을 얻을 수 있다. 그리고 효소에 의한 올리고당 제조 방법도 가수분해 후 반응액과 올리고당의 분리에 있어 여러 과정을 거쳐야 하며, 반응에 사용된 잔류 효소에 있어서의 분리 또한 여러 단계의 과정이 요구된다. 본 연구는 alginate capsule 안에 키토산과 분해효소를 고정화 시켜 분해 산물을 alginate 막을 통해 유출시켜 기질과 효소 및 산물을 쉽게 분리하고, 또한 키토산 올리고당의 생산에 있어서의 효율성을 높이고자 하였다. 면역 증진 작용(7,8), 항균·항암성(9,10) 등 높은 생리 활성을 가진 것으로 알려진 키토산 올리고당을 생산하기 위해 이전에 보고한 방법(11,12)으로 본 연구에서는 Coencapsulating technology로 캡슐의 제조 조건을 확립하고, 그리고, 기질의 종류와 농도, Alginate의 점도와 농도, capsule size의 차이, 효소의 농도에 따른 분해 반응에서 capsule의 내부와 외부의 분자량 변화를 조사하였다. 효소의 재 이용을 위하여 capsule 내부의 효소활성도 측정하였다.

*Corresponding Author : Department of Biotechnology, Yosu National University, Yosu, 550-749, Korea
Tel : +82-61-659-3306, Fax : +82-61-659-3306
E-mail : bplab@yosu.ac.kr

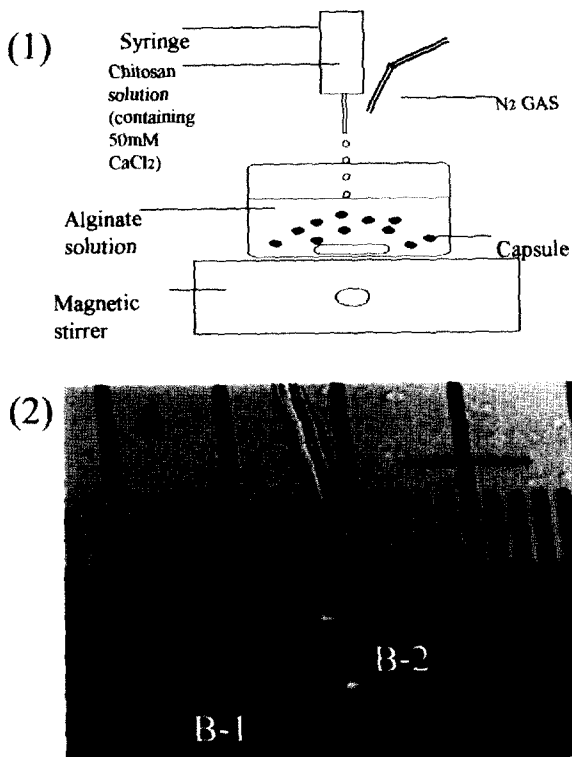


Figure 1. (1) Preparation of capsule. (2) The size of membrane thickness(A, Bar; 50 μ m) and diameter of the capsules(B-1; 3.0 mm, B-2; 1.5 mm, Bar; 1 cm).

재료 및 방법

Capsule의 제조

50 mM CaCl_2 가 포함된 chitosan solution(pH 5.0)를 제조하여 24, 3/4(0.48 mm)gauge needle를 사용하여 4 $^{\circ}$ C에서 교반중인 sodium alginate solution(pH 5.0) 100 mL에 떨어뜨렸다(Figure 1). 그런 다음 10 min 동안 단단하게 한 다음 증류수로 세척한 후, 2% acetic acid solution에 CaCO_3 를 첨가하여 pH를 5.0으로 조절된 용액에 옮겨 사용하였다. 또한 작은 size의 capsule을 만들기 위해 syringe 옆에 nozzle를 부착하여 N_2 gas의 유량을 0.5 kgf/cm^2 로 조절하여 혼합액이 alginate 용액에 떨어지도록 하였다.

Coencapsulating Technology

본 실험에 사용된 chitosan은 (주)세화, Wako(Japan)의 Chitosan 10과 Chitosan 100 (DAC=80%, cps=50-150), Sigma(USA) C3646(DAC=85%)를 2.0-4.0%(W/V)의 키토산 용액(pH 5.0)을 제조하였다. 그리고 각각의 키토산 용액에 50 mM CaCl_2 이 되도록 첨가하였다. Sodium alginate는 Sigma(USA)의 A7128 (approx.=14,000 cps), A2033 (approx.=3,500 cps), A2158 (approx.=250 cps)를 구입하여 증류수에 용해시킨 후 2% acetic acid를 첨가하여 pH를 5.0으로 맞춘 다음 이용하였다.

50 mM CaCl_2 이 포함된 2.0 - 4.0%(W/V)의 키토산 용액(pH 5.0) 10 mL을 4 $^{\circ}$ C에서 20 unit/mL의 효소액 0.1 mL과 혼합하였다. 혼합물은 4 $^{\circ}$ C에서 교반중인 0.4 - 0.8% sodium

alginate solution(pH 5.0) 100 mL에 떨어뜨렸다. Extruding instrument는 24, 3/4(0.48 mm)gauge needle로 15 mL의 주사기를 이용하였다. Capsule은 10분 동안 단단하게 하였다. 그런 다음 증류수로 세척 한 다음, 2% acetic acid solution(pH 5.0)에 옮겼다. 그리고 반응을 incubator에서 40 rpm과 40 $^{\circ}$ C에서 진행하였다.

효소의 농도에 의한 분자량 변화를 측정하기 위해 1U, 5U, 10U, 20U / 100 mL를 첨가하였으며, 기질은 Wako(Japan)의 Chitosan 10(DAC=80%, cps=5-20)을 2.0%의 키토산 용액(pH 5.0)으로 제조하여 사용하였다. alginate는 Sigma(USA)의 A2033 (approx.=3,500 cps)를 0.5% alginate 용액(pH 5.0)으로 제조하여 capsule을 만들었다. 그리고, 교반속도는 40 rpm으로 하였다.

잔류 효소 활성 측정

50 mM CaCl_2 이 포함된 1.0%(W/V)의 키토산 용액(pH 5.0) 10 mL을 4 $^{\circ}$ C에서 20 unit/mL의 효소액 0.1 mL과 혼합하였다. 혼합물은 4 $^{\circ}$ C에서 교반중인 0.5% sodium alginate solution(pH 5.0) 100 mL에 떨어뜨렸다. Extruding instrument는 24, 3/4(0.48 mm)gauge needle로 15 mL의 주사기를 이용하였다. Capsule를 10분 동안 단단하게 하였다. 그런 다음 증류수로 세척 한 다음, 40 $^{\circ}$ C에서 2% acetic acid solution(pH 5.0)에 옮겼다. 매 1시간 간격으로 40 $^{\circ}$ C에서 교반 상태에 있는 capsule를 회수한 다음 모두 깨뜨려서 내부의 혼합물 1 mL과 100 mM sodium acetate buffer(pH5.0)에 녹인 1% Chitosan 용액 1 mL를 첨가하여 50 $^{\circ}$ C에서 10분간 반응 후 반응을 정지시키기 위해 10N NaOH 66 μ L첨가하여 교반시킨 다음 3,000 \times g로 20분간 원심 분리하여 잔여 기질과 반응 상등액을 분리하였다. 그런 다음 잔류 효소의 활성을 DNS 방법(13)으로 측정하였다.

Gel Permeation Chromatography(GPC) Analysis

키토산 분해물의 평균 분자량을 측정하기 위하여 GPC system (Shimadzu class-LC10A, Shimadzu inc., Japan)을 이용하였다. 분석에 사용된 이동상은 5% acetic acid (pH 4.0), 그리고 flow rate는 0.6 mL/min 이었으며, 검출기는 RI detector를 사용하였으며, column은 Ultrahydrogel 250(Waters inc., USA)을 이용하였다. Standards 는 dextran series(MW 180, 1500, 6000, 11300, 71000, Fluka inc., USA)을 사용하였다.

결과 및 고찰

Capsule의 반응 조건 및 제조

실험에 사용된 효소의 최적 pH와 온도는 각각 5.0, 70 $^{\circ}$ C이며, pH 3.0 - 10.0 범위와 40 $^{\circ}$ C에서 비교적 안정하고, 81.9% 탈아세틸화 기질에 대해서 높은 활성이 보인다고 보고되었다(14). Lee(15) 등의 실험에 의하면 키토산과 alginate의 Capsule로부터 guafenesin의 유출이 가장 적은 pH가 4.8이었다. 본 실험에서는 alginate로 만들어진 capsule로부터 기질과 효소의 leakage를 최소화하기 위해 alginate 용액, 키토산 용액, 효소액, 반응용액의 pH를 5.0으로 조절하여 사용하였으며, 반응 온도는 40 $^{\circ}$ C에서 행하였다.

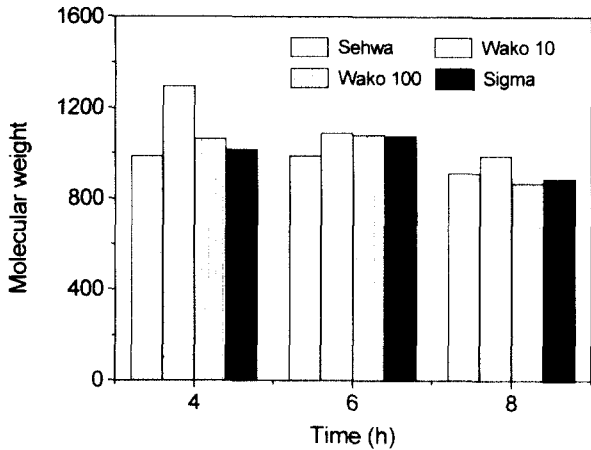


Figure 2. Molecular weight difference of outside with various chitosan enzyme conc. : 20U, alginate conc.: 0.5%, substrate conc. : 0.2%.

Encapsulation은 polymeric anion과 polymeric cation의 전기적인 상호작용에 의해 이루어지는데, alginate networks는 calcium, barium과 같은 2가 이온에 의해 형성할 수 있다. 그래서 기질에 50 mM CaCl₂를 첨가하여 membrane를 형성하게 하였으며, 기질인 키토산 또한 생체 고분자로는 드물게 양전하를 띠고 있고, 이 양전하와 alginate의 음전하간에 정전기적 반응으로 membrane 형성하게 하였다. 기질과 효소액을 혼합하여 4℃에서 이 혼합액을 syringe를 이용하여 alginate 용액에 떨어뜨려 제조하였다. 또한 작은 size의 capsule을 만들기 위해 syringe 옆에 nozzle를 부착하여 N₂ gas의 유량을 0.5 kgf/cm²로 조절하여 혼합액이 alginate 용액에 떨어지도록 하였다. 제조된 capsule의 막 두께와 직경은 Olympus IX50 microscope를 이용하여 측정된 결과 막의 두께는 10 μm이었으며(Figure 1 A), capsule의 크기는 대략 3.0 mm(Figure 1. B-1), N₂ gas를 이용한 capsule은 대략 1.5 mm(Figure 1. B-2)였다.

기질의 종류에 따른 분해 반응

기질의 종류에 따른 분해 반응에 있어서 (주)세화, Wako(Japan)의 Chitosan 10과 Chitosan 100, Sigma(USA) C3646의 키토산을 2.0% 용액으로 제조하여 사용하였다. Sodium alginate는 Sigma(USA)의A2033 (approx.= 3,500 cps)을 0.5% alginate의 용액, 효소의 첨가량은 20U/100 mL, 교반속도는 40 rpm으로 하였다. GPC 측정 결과 (주)세화 키토산은 분자량이 약 20,000, Wako(Japan)의 Chitosan 10은 분자량이 약 250,000, Chitosan 100은 약 750,000, Sigma(USA) 키토산은 분자량이 약 250,000이었다. (주)세화, Wako(Japan)의 Chitosan 10과 Chitosan 100, Sigma(USA) C3646의 기질 용액을 2.0%의 키토산 용액을 제조하여 사용하였다.

Figure 2에 각각의 기질로 제조된 capsule로부터 생산된 올리고당의 평균 분자량을 측정하여 나타내었다. Capsule 밖으로 유출된 올리고당의 분자량은 4가지 기질 모두 비슷하게 나타났다. (주)세화의 키토산은 분자량이 20,000이기 때문에 다른 기질에 비교해 반응 시간에 있어서 분해 속도가 빠르기 때문에 낮은 분자량의 올리고당을 생성할 수 있는 가능성이 높고, Wako의 Chitosan 100과 Sigma(USA) 키토산은 점도가

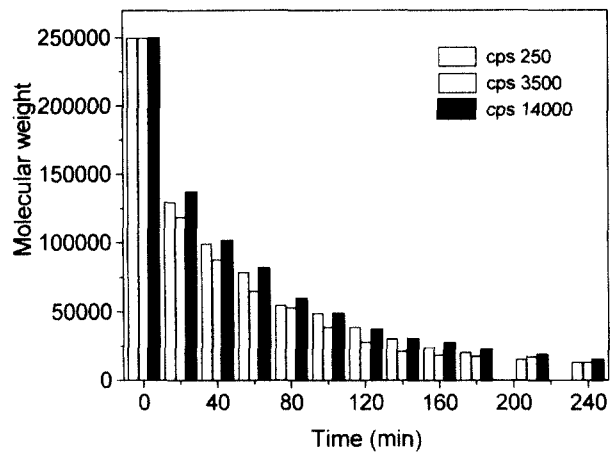


Figure 3. The change of molecular weight according to cps of alginate. enzyme conc. : 20U, alginate conc. : 0.5%, substrate(wako 10) conc.: 0.2%.

높아 2.0% 용액 이상의 농도를 제조하기가 쉽지 않기 때문에 고분자이면서 점도가 낮은 Wako(Japan)의 Chitosan 10을 다음 실험에서 계속 사용하였다.

Alginate에 따른 분자량 변화

점도에 따른 기질의 molecular weight distribution에 있어서 alginate는 Sigma(USA)의 A7128 (approx.=14,000 cps), A2033 (approx.=3,500 cps), A2158 (approx.=250 cps)를 0.5% alginate 용액으로 제조하여 capsule을 만들었다. 기질은 Wako (Japan)의 Chitosan 10을 사용하였다. Figure 3에 각각의 다른 alginate로 제조된 capsule 내부의 기질의 변화를 나타내었다. 점도 250, 3500, 14000을 비교하였을 경우 효소와의 반응시간에 따른 기질 변화에 있어 차이는 없었으나, 점도 3500에서 반응시간에 따라 분자량의 변화에 있어 약간 빨랐다. 막을 이루는 alginate의 점도에 따른 capsule 내부의 분자량 변화를 측정된 결과 반응 시간에 따라서 분해되어지는 chitosan의 분자량은 큰 차이는 없었다. 그리고 점도 3500인 alginate를 사용하여 0.4%, 0.5%의 alginate 용액으로 capsule을 제조하여 capsule의 내부와 밖의 분자량 변화를 Figure 4에 나타내었다. 여기에서 alginate의 농도에 대한 차이는 나타나지 않았다.

효소의 농도에 의한 분자량 변화

효소의 농도에 의한 분자량 변화는 효소의 첨가량은 1U, 5U, 10U, 20U이었으며, 기질은 Wako(Japan)의 Chitosan 10, alginate는 Sigma(USA)의 A2033 (approx.= 3,500 cps)를 0.5% alginate 용액으로 제조하여 capsule을 만들었다. 효소의 농도에 의한 capsule의 내부와 밖의 분자량 변화를 Figure 5에 나타내었다. 효소의 첨가량에 따른 capsule 내부의 분자량 변화에 있어서는 20U이 첨가된 capsule에서 시간에 따라 10U이 첨가된 capsule 보다 더 작았다. 밖으로 유출된 올리고당의 분자량에 있어 10U이 더 분해가 늦음으로 해서 시간에 따른 20U과 10U의 분자량 비교에서는 10U를 첨가한 capsule에서의 분자량이 더 높았다. 20U를 첨가한 capsule에서는 주로 1,000 정도의 분자량을 가지고 있었으며, 10U를 첨가한 capsule

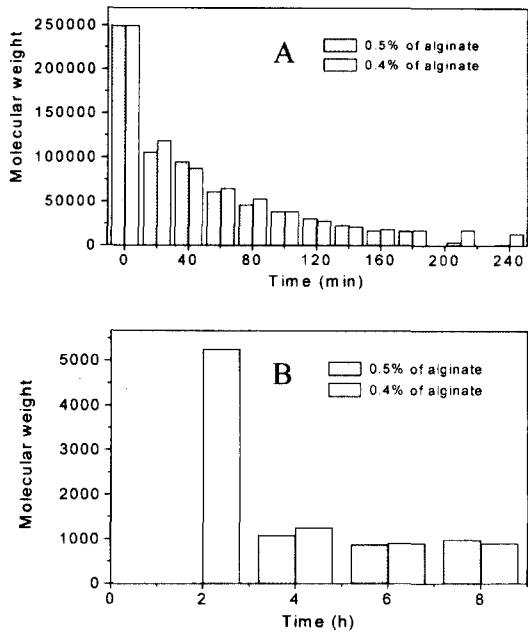


Figure 4. The molecular weight difference inside(A) and outside(B) by alginate concentration. enzyme conc. : 20U, substrate(wako 10) conc. : 0.2%, alginate : 3,500 cps.

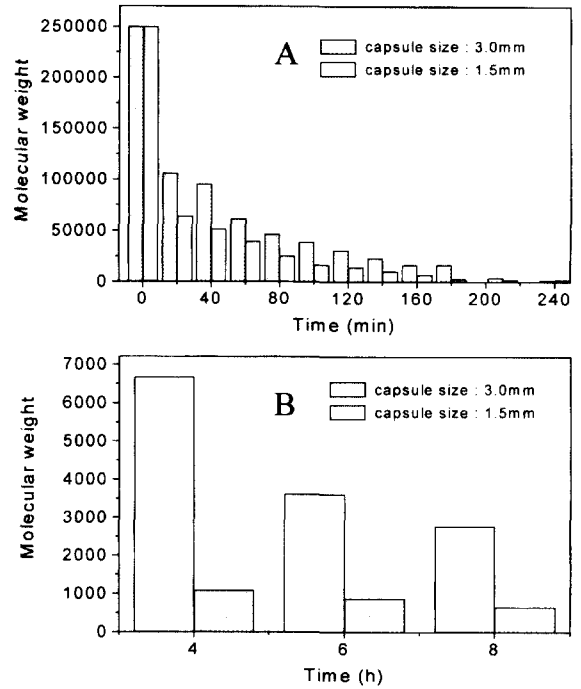


Figure 6. The molecular weight difference inside(A) and outside(B) by capsule size. enzyme conc. : 20U, substrate(Wako 10) conc.: 0.2%, alginate : 3,500 cps, 0.5%.

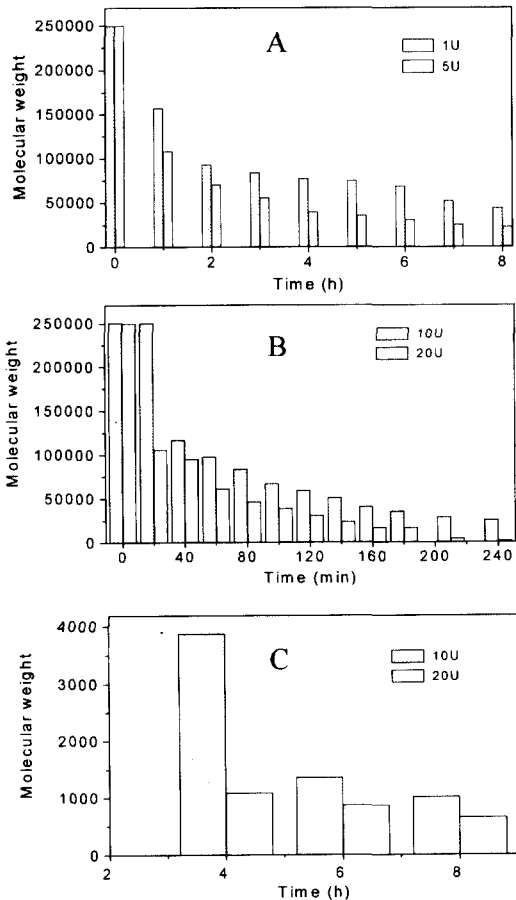


Figure 5. The molecular weight difference inside(A, B) and outside(C) by enzyme concentration. substrate(wako 10) conc. : 0.2%, alginate : 3,500 cps, 0.5%.

에서는 1,500-3,500 정도의 분자량이 확인되었다. 그리고 1U 과 5U를 첨가한 capsule에 있어서 capsule 내부의 분자량 변화만을 나타내었을 뿐 capsule 밖의 올리고당의 분자량은 Figure 5-A에서 보듯 효소의 농도가 낮아 분해 반응 활성이 낮기 때문에 반응 8 hr에도 측정되지 않아 나타나지 않았다.

Capsule의 크기에 따른 분자량의 변화

Figure 1에서 보듯 capsule의 크기는 대략 3.0 mm(Figure 2. B-1), N₂ gas를 이용한 capsule은 대략 1.5 mm(Figure 1. B-2) 였다. 기질은 Wako(Japan)의 Chitosan 10, alginate는 A2033 (approx.=3,500 cps)을 이용하여 capsule를 만들었다. Capsule 의 크기에 의한 capsule의 내부와 밖의 분자량 변화를 Figure 6에 나타내었다. 3.0 mm와 1.5 mm의 capsule의 크기에 있어서의 분자량의 변화는 작은 크기의 capsule에서 내부의 분자량이 더 빨리 작아졌다. 밖으로 유출된 올리고당의 분자량 비교에서 3.0 mm 크기의 capsule에서는 주로 1,000 정도의 분자량을 갖는 올리고당이 나타났지만, 1.5 mm의 capsule에서 밖으로 유출된 올리고당의 조사에서는 3,000-6,000 사이의 분자량이 확인되었다. 이는 capsule의 크기가 작아졌으므로 효소 반응에 따른 물질의 이동이 더 빨라졌기 때문으로 사료된다.

Capsule 내부의 효소활성 측정

40℃에서 교반 상태에 있는 capsule를 회수한 다음 모두 깨뜨려서 내부의 혼합물 1 mL과 100 mM sodium acetate buffer(pH5.0)에 녹인 1% Chitosan 용액 1 mL를 첨가하여 50℃에서 10분간 반응 후 반응을 정지시키기 위해 10N NaOH 66 μL첨가하여 반응을 중지시켜 capsule의 효소의 활성을 DNS method으로 측정하였다. Figure 7은 반응 시간에

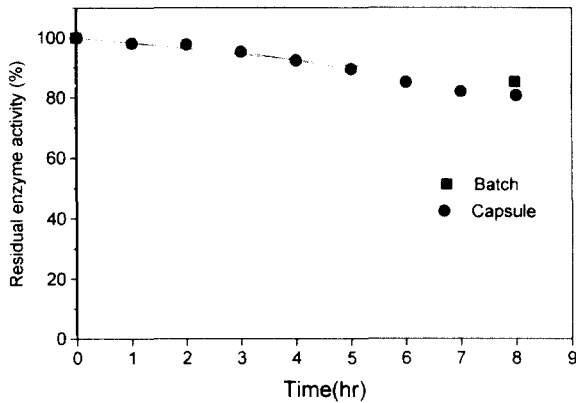


Figure 7. Residual enzyme activity inside capsules. ■ ; batch, ● ; capsule

따른 capsule 내부의 잔류 효소 활성을 나타내준 것으로, 반응 8시간째에도 약 80% 이상의 효소활성을 나타내었다. Batch-type과 비교하여 capsule의 경우에는 반응을 끝낸 후 capsule를 회수하여 효소를 재 사용할 수 있을 것으로 사료된다.

요 약

막의 특성을 이용하여 기질과 효소가 공존하는 캡슐을 제조하여 이 캡슐의 장점인 membrane의 pore size를 조절하면 올리고당을 분자량별로 유출시키는 것이 가능해짐으로 기질과 효소의 유출을 조절하여 생리활성이 높은 올리고당을 얻고, 생산된 올리고당의 단순한 분리·정제를 위하여, 그리고 효소의 재 이용 측면에서 encapsulation technology를 이용하여 올리고당을 생산하는 연구를 하였다. 제조된 capsule의 막 두께와 직경은 Olympus IX50 microscope를 이용하여 측정된 결과 막의 두께는 10 μm이었으며, capsule의 크기는 대략 3.0 mm, N₂ gas를 이용한 capsule은 대략 1.5 mm였다. 본 실험에 사용된 기질의 용액, 효소액, 반응액, alginate 용액을 pH 5.0으로 제조하여 사용하였기 때문에 막이 보다 견고하게 형성할 수 있었으며, 제조된 capsule를 반응 용액 즉 2% acetic acid의 pH를 CaCO₃로 조절한 용액에 넣었기 때문에 막이 단단하게 형성되고 유지되는 것으로 판단된다. 기질의 사용에 있어서 작은 분자량을 갖는 기질은 효소와 분해 반응에 있어서 가수분해가 빨리 일어나기 때문에 보통 capsule 밖으로 유출된 올리고당의 분자량은 평균 M.W. 1,000이었다. 그러나 분자량이 큰 기질을 사용하였을 경우 평균 M.W. 1,000-3,500이었다. 막을 이루는 alginate의 점도에 의한 차이는 없었으며, 교반 속도에 의한 기질과 효소의 유출, 그리고 분해 반응에 따른 가수분해 산물인 올리고당의 유출에 있어 alginate 농도 0.5%, 교반 속도는 40 rpm이 가장 적당하였다 (12). Capsule에서 분해 반응 후 분해 산물인 올리고당의 이동을 빨리 하기 위하여 작은 size의 capsule를 제조하여 실험한 결과 3.0 mm보다 capsule 내부의 분자량 변화가 더 빨랐으며, capsule 밖으로 유출된 올리고당의 분자량 분석 결과 M.W. 3000-6000의 올리고당이 생성되었다. 반응 시간에 따른 capsule 내부의 잔류 효소 활성을 조사한 결과, 반응 8시간째에도 약 80% 이상의 효소활성을 나타내었다. Batch-type

과 비교하여 capsule의 경우에는 반응이 끝난 후 capsule를 회수하여 효소를 재 사용할 수 있을 것으로 사료된다.

감 사

본 연구는 여수대학교 2000년도 학술연구지원비에 의한 연구 결과로 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Mutka, J. R. and D. B. Nelson (1988), Preparation of encapsulated flavors with high flavor level, *Food Technology*, **42**, 154-164.
- Bioinformation Associates (1984), Microencapsulation and encapsulated ingredients, *Client study*, 330-358.
- Brodelius, P. and K. Nilsson (1990), Entrapment of plant cells in different matrices, A Comparative Study, *FEBS Letters*, **122**, 312-319.
- Son J. H., S. H. Yu, and S. K. Kim (1998), Animal cell culture and the production of monoclonal antibody(Mab) using biopolymer membrane. *Korean. J. Biotechnol. Bioeng.* **13**, 1, 13-19.
- Hiestand, E. N. G. Jensen, E. Jensen, and P. D. Meister(1970), Encapsulation of lipophilic liquid in hydrophobic liquid emulsions, *US Patent*, 3,549,555.
- Cahng T. (1964), Semipermeable membrane, *Science*, **146**, 524-527.
- Suzuki, S., Y. Okawa, Y. Okura, K. Hashimoto, and M. Suzuk (1982), Immunoadjuvant effect of chitin and chitosan, p. 210-212. In Hirano, S. and Tokukara, S. (eds), Chitian and Chitosan, The Japanese Society of Chitin and Chitosan, Tottori University, Tottori.
- Sujuki, K., A. Tokoro, Y.. Okawa, S. Suzuki, and M. Suzuki (1985), Enhancing effect of N-acetylchitooligosaccharides on the active oxygen-generating and microbicidal activities of peritoneal exudate cells in mice, *Chem. Pharm. Bull.* **36**, 886-888.
- Suzuki, K., Mikami, Y. Okawa, A. Tokoro, S. Suzuki, and M. Suzuki (1986), Antitumor effect of hexa-N-acetylchitohexaose and chitohexaose, *Carbohydr. Res.* **151**, 403-408.
- Suzuki. K., Y. Okawa, K. Hashimoto, S. Suzuki, and M. Suzuki (1984), Protecting effect of chitin and chitosan on experimentally induced murine candidiasis, *Microbiol. Immunol.* **28**, 903-912.
- Lee, K. S., S. M. Kim, and H. S. Lim (1999) Stepwise addition technology for the high yield production of chitosanoligosaccharide, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **14**, 6, 639-642
- Lee, K. S., M. R. Choi, and H. S. Lim (2000) Development of coencapsulating technology for the production of chitosanoligosaccharide, *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **5**, 345-349
- Miller G. L. (1959), Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical chemistry.* **31**, 3, 426-428.
- Choi, Y. J., E. J. Kim, Y. S. Kim, and Y. C. Shin (1997), Development of chitosanase for the Production of Chitosanoligosaccharides, *Korean J. of chitin and chitosan.* **2(3)**, 40-48.

15. Lee, K. Y., W. H. Park, and W. S. Ha (1997), Polyelectrolyte complexes of sodium alginate with chitosan or its derivatives for microcapsules. *J. Appl. Polym. Sci.* **63**, 425-432.