한국생물공학회지 제22권 제3호
Korean J. Biotechnol. Bioeng.
Vol. 22, No. 3, 146-150(2007)

Poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) 미립구의 제조 및 특성화

강 혜 수 · †김 범 수
충북대학교 공과대학 화학공학부
(접수 : 2006. 12. 26., 게재승인 : 2007. 6. 14.)

Preparation and Characterization of Poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) Microsphere

Hye-Su Kang and Beom Soo Kim†
Department of Chemical Engineering, College of Engineering, Chungbuk National University,
Cheongju, Chungbuk 361-763, Korea
(Received : 2006. 12. 26., Accepted : 2007. 6. 14.)

Poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) [P(3HB-co-4HB)] microspheres were prepared using solvent evaporation technique. P(3HB-co-4HB) with 3.9 mol% 4HB was synthesized by fed-batch culture of *Ralstonia eutropha*. The effects of concentration and type of surfactant (Tween 80, sodium dodecylsulfate, and polyvinyl alcohol), addition of dispersion stabilizer (Acacia), concentration of polymer and model drug (bovine serum albumin) on particle size of the microspheres and their in vitro drug release characteristics were investigated. The average particle size of the microspheres decreased with the addition of dispersion stabilizer and increased with the concentration of surfactant, drug and polymer. Amount of drug release increased with decreasing particle size of the microspheres.

Key Words : Poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate), P(3HB-co-4HB), microsphere, solvent evaporation technique, biodegradable polymer

서 론

많은 박테리아들이 불균형적 영양조건하에서 균체 내에 축적하는 polyhydroxyalkanoates (PHA)는 합성고분자를 대체하기 위한 생분해성 고분자로서 학문적, 상업적인 관심의 초점이 되어왔다(1). PHA 중 poly(3-hdroxybutyrate-co-4-hdroxybutyrate) [P(3HB-co-4HB)]는 1988년 *Ralstonia eutropha*에서 처음 발견되었다(2). P(3HB-co-4HB)는 4HB의 함량에 따라 딱딱한 결정성 플라스틱에서 탄성이 큰 고무에 이르기까지 다양한 물성을 나타내며(3), 다른 PHA에 비해 생체 내 가수분해 속도도 크고 4HB 함량에 따라 조절 가능한 것으로 알려져 있다(4). 따라서 P(3HB-co-4HB)는 의약 분야에 다양하게 활용될 수 있을 것으로 보이며(5), 한 예로 양 모델에서 심장 판막의 조직공학에 성공적으로 적용된 바 있다(4).

최근, 생분해성 고분자를 이용한 약물 전달 시스템에 펩타이드나 단백질의 약물을 응용하는 연구가 만족할만한 효율에 다다르게 되었으며, 이중 생분해성이고 경구 또는 주사로 약을 투여할 수 있는 미립구가 특별히 이상적인 방출형태로 제안되고 있다. 구형입자 제조 방법은 in-situ 중합법, 상분리법, 스프레이법으로 제조하는 microcapsule 형과 유화중합법, 침전중합법, 분산중합법 및 용매증발법을 이용한 microsphere 형으로 크게 나눌 수 있다. 불순물이 포함되어 있지 않고 약물의 함량을 높일 수 있으며, 입자크기를 조절할 수 있는 방법 중의 하나가 용매증발법이다. Hora 등(6)은 약물을 효과적으로 방출시키기 위해 O/W 형태의 용매증발법으로 미립구를 제조하였으나, 수용성 약물을 담지하는데 있어서 효율이 떨어지는 문제점이 관찰되었다. 이러한 단점을 개선하기 위하여 Ruiz 등(7)은 유기 상분리 또는 W/O/W 형태의 2차 에멀젼을 만들어 용매증발법으로 미립구를 제조하여 약물의 담지 효율을 증가시켰다.

P(3HB-co-4HB)의 의약 분야 활용에 대한 장점에도 불구하고 P(3HB-co-4HB) 미립구의 제조에 대해서는 아직까지

† Corresponding Author : Department of Chemical Engineering, College of Engineering, Chungbuk National University, Cheongju, Chungbuk 361-763, Korea
Tel : +82-43-261-2372, Fax : +82-43-269-2370
E-mail : bskim@chungbuk.ac.kr

발표되지 않았다. PHA의 의약분야 활용을 위한 연구는 현재 상업적으로 이용 가능한 poly(3-hydroxybutyrate), poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) 및 일부 연구자들이 합성해서 사용하는 medium chain length PHA 등을 이용한 소수의 연구에 불과한 실정이다(8-10). 본 연구에서는 P(3HB-co-4HB)의 의약분야 활용 가능성을 검토하기 위해서 *Ralstonia eutropha*로부터 생합성된 3.9 mol% 4HB 조성의 P(3HB-co-4HB)를 이용하여 유화 용매 증발법으로 미립구를 제조하였다. 계면활성제의 종류 및 농도, 분산 안정제의 첨가, 고분자 및 모델약물의 농도가 미립구 형성에 미치는 효과를 조사하였으며, 모델약물의 in vitro 방출 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

시약 및 재료

P(3HB-co-4HB) 시료 제조를 위해 *Ralstonia eutropha* (ATCC 17699)를 유가식 배양하여 균체를 얻은 후 chloroform으로 추출, 정제하였다(11, 12). 미립구 제조를 위해 모델 약물은 Sigma사의 bovine serum albumin (BSA)을 사용하였으며, P(3HB-co-4HB)를 용해시키기 위해 dichloromethane (Junsei)을 사용하였다. 계면활성제로는 Tween 80 (polyoxyethylene sorbitan monooleate, 덕산화학), sodium dodecyl sulfate (SDS, Fluka), polyvinyl alcohol (PVA, Aldrich) 세 종류를 사용하였다. 2차 에멀젼 형성시 계면활성제의 분산력을 안정시키기 위해 Aldrich사의 Acacia (gum arabic)를 사용하였다.

P(3HB-co-4HB) 미립구 제조

W/O/W 형태의 다중 에멀젼 방식의 유화 용매 증발법으로 미립구를 제조하였다. 오일상을 제조하기 위해 P(3HB-co-4HB)와 BSA를 dichloromethane과 증류수에 각각 5 wt%, 1.5 wt% 되도록 용해시켰다. P(3HB-co-4HB) 용액 10 ml와 BSA 용액 2 ml를 섞어 40 W, 1 min 동안 ultrasonication시켜 W/O 형태의 1차 에멀젼을 형성시켰다. 다중 에멀젼을 제조하기 위해 증류수에 용해된 계면활성제 100 ml에 형성된 1차 에멀젼을 syringe를 이용하여 1 ml/min의 속도로 가한 후, 580 rpm에서 5시간 동안 교반하여 dichloromethane을 증발시켜 W/O/W 형태의 2차 에멀젼을 형성시켰다. 2차 에멀젼 형성시 응집된 입자를 제거하기 위하여 filter paper를 사용하였다. 용매가 증발하여 고형화된 입자는 원심분리기를 이용해 분리하고, 증류수로 3회 세척한 후 건조하여 미립구를 얻었다.

분석

미립구의 입자 크기 및 분포를 측정하기 위해 전기 영동 광산란 광도계 (Otsuka, ELS-8000)를 사용하였다. 입자의 표면 형태를 관찰하기 위해 주사 전자현미경 (SEM, Hitachi S570)을 사용하였다. BSA가 담지된 미립구의 방출거동을 조사하기 위하여 pH 7.4인 인산염 완충용액 (PBS) 20 ml에 약물이 담지된 미립구 0.005 g을 넣고 37℃에서 일정시간 간격으로 시료를 채취하여 spectrophotometer를 사용, 562 nm에서 BCA method로 방출된 단백질량을 측정하였다.

결과 및 고찰

계면활성제 농도 및 종류의 영향

미립구를 제조함에 있어 2차 에멀젼 형성시 입자의 크기와 용매 증발시 입자의 유화력을 유지하기 위해서는 계면활성제의 역할이 중요하다. 이러한 영향인자를 조사하기 위해 계면활성제인 Tween 80, SDS, PVA를 사용하여 제조된 입자의 크기를 측정하였다. 계면활성제의 농도에 따른 입자의 크기 측정결과는 Fig. 1(SDS)과 Fig. 2(Tween 80)에 나타내었다. 계면활성제의 농도가 증가할수록 입자의 크기가 증가하였다. Kim 등(13)은 비이온 계면활성제 Tween 80과 Span 60을 이용하여 W/O 에멀젼 법으로 속이 빈 실리카 미립구 제조시 계면활성제의 농도가 증가할수록 입자크기가 증가함을 보고하여 본 연구결과와 같은 경향을 보였다. 비이온계 계면활성제 NP-5를 이용한 경우에는 물과 계면활성제의 비 (R)가 증가할수록 입자크기가 감소된다고 보고되었으며(14), 반대로 양이온 계면활성제인 AOT를 이용한 경우에는 R 값이 증가할수록 입자크기가 증가한다고 보고되었다(15). 이러한 계면활성제의 종류 및 양에 대한 입자크기의 변화는 R 값과 이온 강도의 변화에 따른 용매와 마이셀 경계면에서의 동역학으로 설명되고 있으며, 계면활성제의 종류 및 농도에 크게 의존하는 것으로 생각된다. Fig. 3은 계면활성제의 종류에 따른 입자크기 측정결과이다. PVA, Tween 80, SDS 순으로 입자크기가 증가하였다.

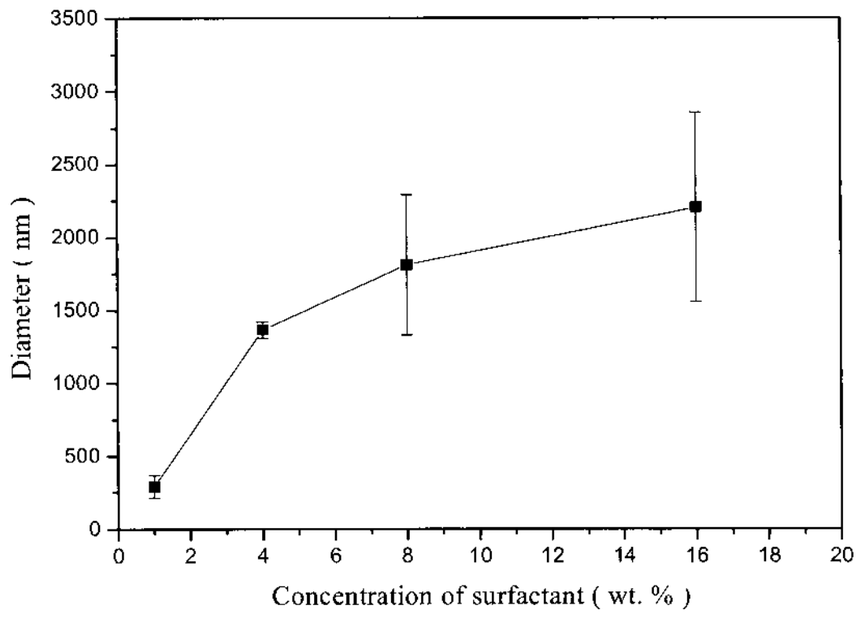

Figure 1. Effect of SDS concentration on the size of the microspheres (5 wt% P(3HB-co-4HB), 1.5 wt% BSA).

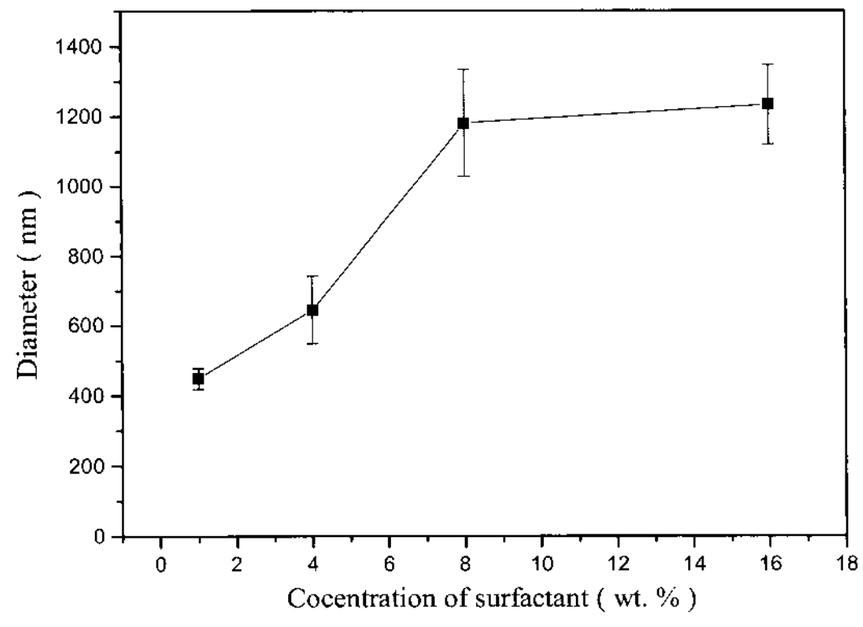

Figure 2. Effect of Tween 80 concentration on the size of the microspheres (5 wt% P(3HB-co-4HB), 1.5 wt% BSA).

분산 안정제 농도의 영향

유화 용매증발법으로 미립구를 제조할 경우 용매의 증발에 따라 입자간의 안정성이 떨어져 입자간의 응집현상이 발생하여 입자의 크기가 크게 형성되는 경향이 있다. 이러한 문제점을 해결하기 위하여 분산 안정제로 Acacia를 사용하였다. Acacia는 분산력과 안정성을 보유한 물질로서 분산 안정제가 미립구의 입자크기에 미치는 영향을 조사하였다. 2차 에멀젼 형성시 사용되는 분산 안정제의 농도를 0 - 2 wt%로 변화시켜 가며 미립구의 입자 형태 및 크기를 주사전자현미경으로 관찰하여 Fig. 4와 5에 나타내었다. 분산 안정제를 첨가했을 경우, 첨가하지 않은 것보다 약 1/2로 입자의 크기가 감소하여, 평균 입자직경이 수백 nm인 미립구를 얻을 수 있었다.

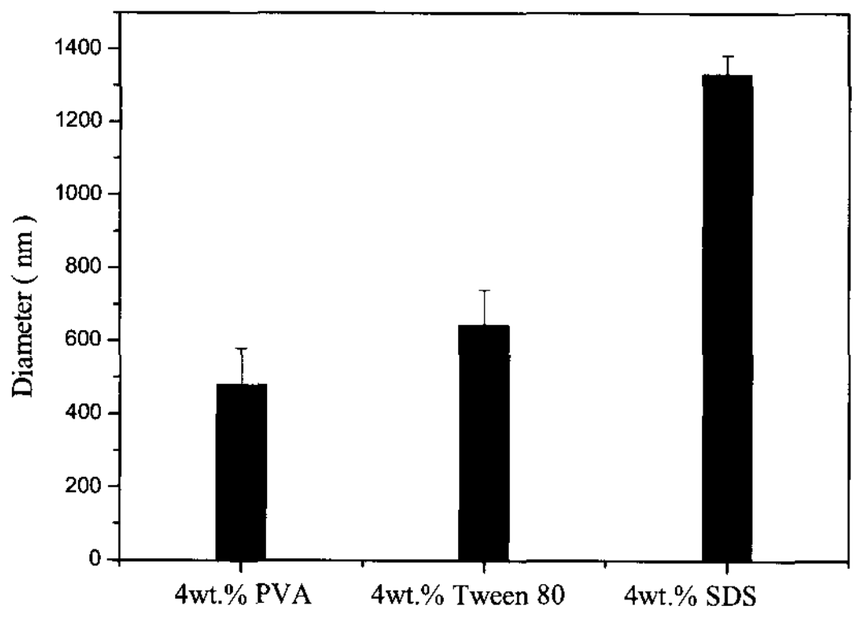

Figure 3. Effect of surfactant type on the size of P(3HB-co-4HB) microspheres (5 wt% P(3HB-co-4HB), 1.5 wt% BSA).

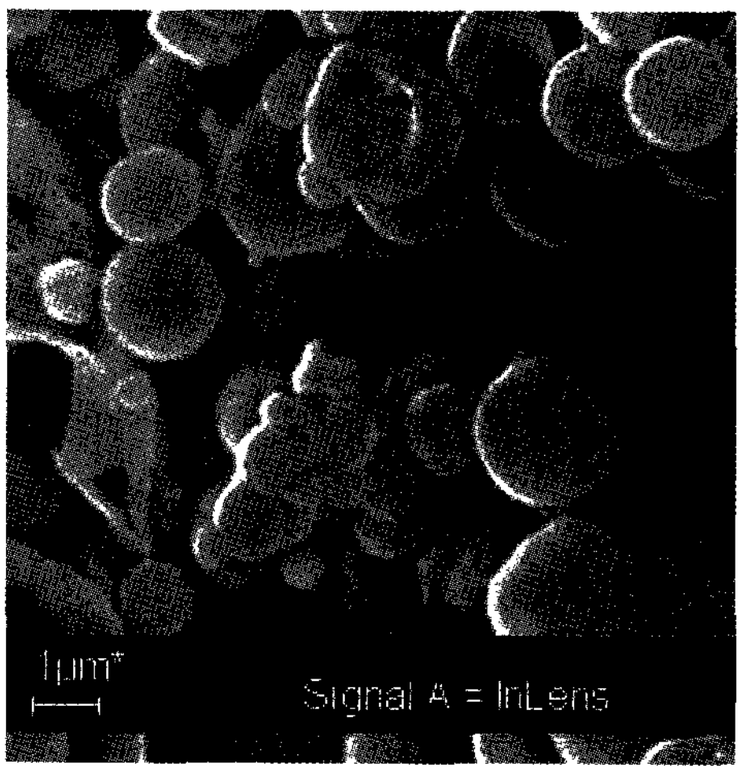

Figure 4. Scanning electron micrographs of the microspheres prepared with 1% dispersion stabilizer (5 wt% P(3HB-co-4HB), 4 wt% SDS, 1.5 wt% BSA).

BSA 농도의 영향

모델 약물인 BSA의 농도가 미립구의 입자 형성과정에 미치는 영향을 조사하기 위해 BSA의 농도를 10, 20, 30 wt%로 증가시키면서 제조하였다(Fig. 6). 농도가 높아짐에 따라 입자크기는 증가하는 경향을 보여주고 있다. 이는 1차 에멀젼 형성시 수용액상에 용해되어 있는 BSA의 농도가 높아짐에 따라 점도가 증가하여 분산력이 감소함으로써 1차 에멀젼의 크기가 증가하여 2차 에멀젼 형성시 영향을 줌으로써 크기가 증가하는 것으로 판단된다(15).

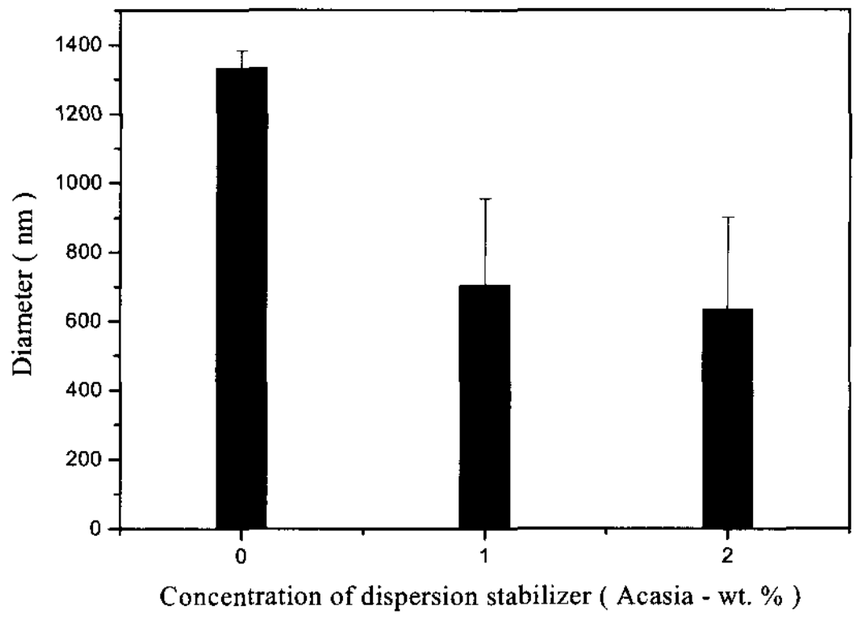

Figure 5. Effect of dispersion stabilizer concentration on the size of P(3HB-co-4HB) microspheres (5 wt% P(3HB-co-4HB), 4 wt% SDS, 1.5 wt% BSA).

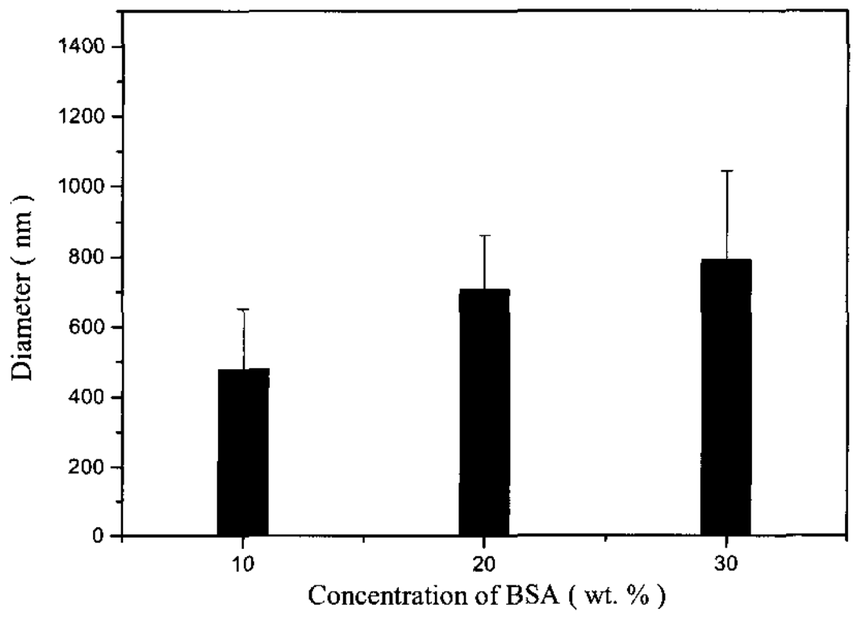

Figure 6. Effect of BSA concentration on the size of P(3HB-co-4HB) microspheres (5 wt% P(3HB-co-4HB), 4 wt% SDS).

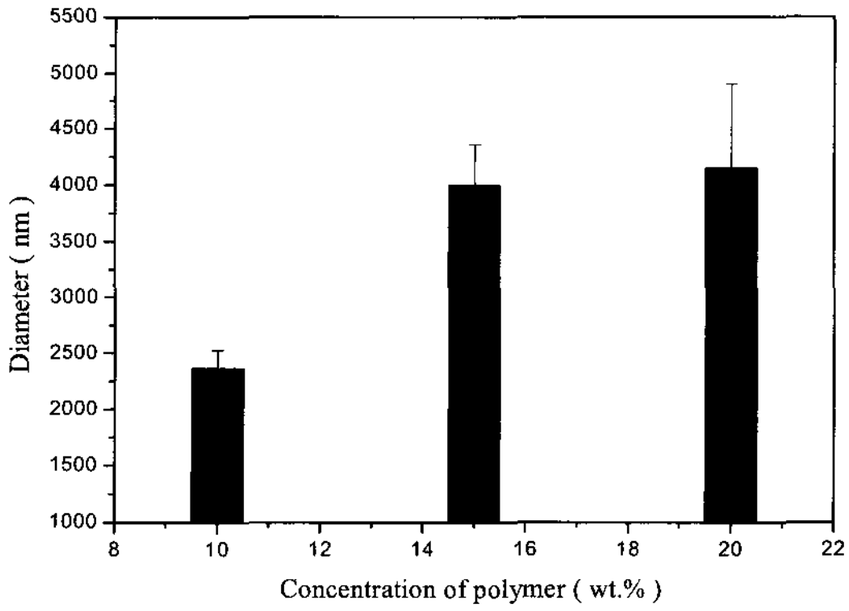

Figure 7. Effect of polymer concentration on the size of P(3HB-co-4HB) microspheres (4 wt% SDS, 20 wt% BSA).

P(3HB-co-4HB) 농도의 영향

P(3HB-co-4HB)이 dichloromethane에 용해된 농도가 미립구의 입자 크기에 미치는 영향을 조사하기 위하여 P(3HB-co-4HB)의 농도를 10, 15, 20 wt%로 증가시키면서 미립구

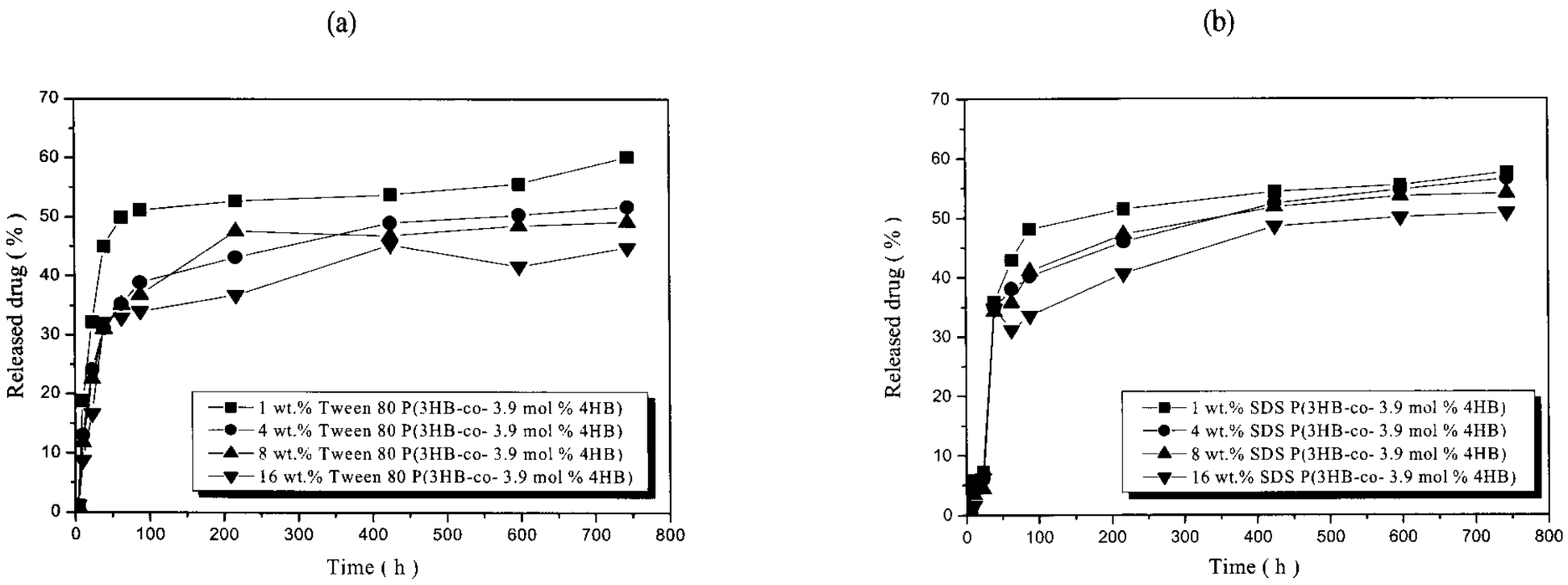

Figure 8. Effect of surfactant concentration on in vitro drug release (1.5 wt% BSA).

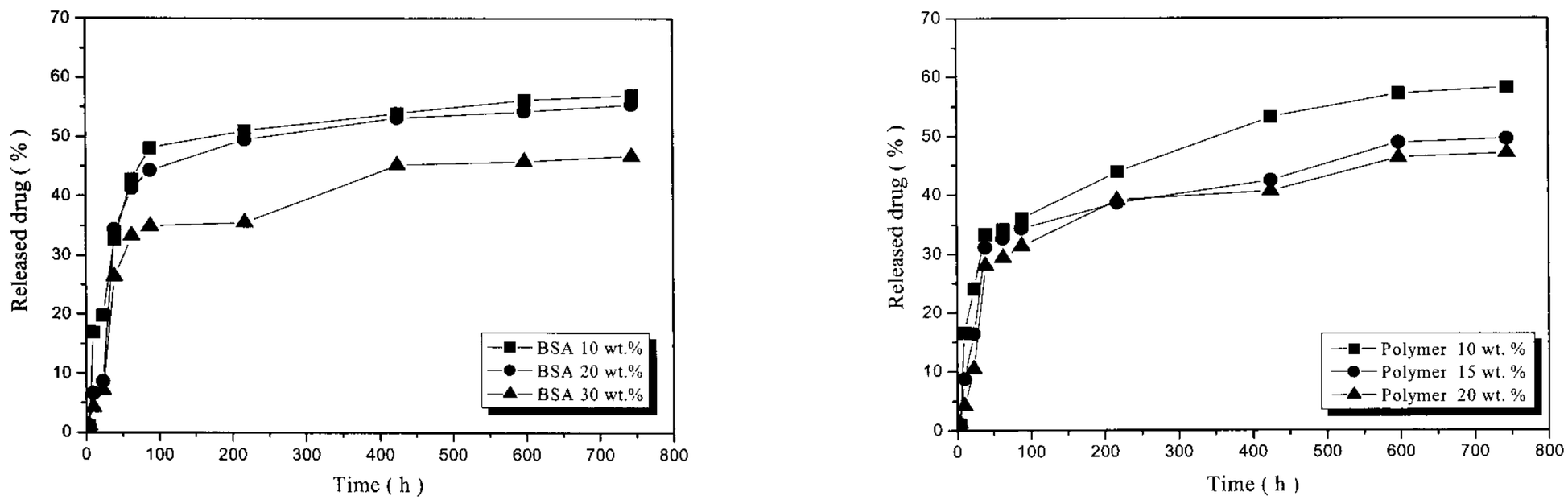

Figure 9. Effect of polymer and drug concentration on in vitro drug release ((a) 5 wt% P(3HB-co-4HB), 4 wt% SDS, (b) 20 wt% BSA, 4 wt% SDS).

를 제조하였다(Fig. 7). P(3HB-co- 4HB)의 농도가 증가함에 따라 미립구의 크기가 증가하는 경향을 나타내고 있다. 이는 BSA 농도 증가의 경우와 마찬가지로 P(3HB-co-4HB)의 농도가 증가함에 따라 점도가 증가하게 되어 SDS의 분산력이 감소하게 됨으로써 2차 에멀젼 형성시 입자의 크기가 증가하는 것으로 판단된다(9).

In vitro 약물 방출

계면활성제의 농도에 따른 P(3HB-co-4HB)에 BSA가 담지된 미립구를 제조하여 약물 방출특성을 Fig. 8에 나타내었다. 약 50 - 100 시간에 30 - 50% 정도 약물 방출이 일어났으며, 그 이후 서서히 증가하여 포화상태에 도달하였다. 미립구의 약물 방출은 계면활성제의 농도가 증가함에 따라 약물 방출량이 작아졌다. Fig. 9는 고분자 및 약물 농도에 따른 BSA 방출 특성을 나타낸다. P(3HB-co-4HB) 및 BSA 농도가 증가할수록 약물 방출량이 많아졌다. 이상의 결과는 입자 크기가 작을수록 약물 방출량이 증가하는 것을 나타낸다. 이상과 같이 P(3HB-co-4HB) 미립구를 제조하고 특성화함으로써 향후 P(3HB-co-4HB)의 의약분야 활용을 기대할 수 있을 것이다.

요 약

Poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) [P(3HB-co-4HB)] 미립구를 용매증발법으로 제조하였다. 3.9 mol% 4HB 조성의 P(3HB-co-4HB)를 *Ralstonia eutropha*의 유가식 배양으로부터 합성하였다. 계면활성제의 농도 및 종류(Tween 80, sodium dodecylsulfate, polyvinyl alcohol), 분산안정제 (Acacia)의 첨가, 고분자 및 모델 약물 (bovine serum albumin)의 농도 등이 미립구 입자 크기에 미치는 효과 및 in vitro 약물 방출 특성을 조사하였다. 평균 입자 크기는 분산 안정제 첨가시 감소하였으며, 계면활성제, 약물 및 고분자의 농도가 증가할수록 증가하였다. 약물 방출량은 입자 크기가 감소할수록 증가하였다.

감 사

본 연구는 2006학년도 충북대학교 학술연구지원사업의 연구비지원에 의하여 연구되었으며, 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Pouton, C. W. and S. Akhta (1996), Biosynthetic polyhydroxyalkanoates and their potential in drug delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **18**, 133-163.
2. Kunioka, M., Y. Nakamura, and Y. Doi (1988), New bacterial copolyesters produced in *Alcaligenes eutrophus* from organic acids, *Polym. Commun.* **29**, 174-176.
3. Saito, Y., S. Nakamura, M. Hiramitsu, and Y. Doi (1996), Microbial synthesis and properties of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate), *Polym. Int.* **39**, 169-174.
4. Martin, D. P. and S. F. Williams (2003), Medical applications of poly-4-hydroxybutyrate: a strong flexible absorbable biomaterial, *Biochem. Eng. J.* **16**, 97-105.
5. Williams, S. F. and D. P. Martin (2002), Applications of PHAs in medicine and pharmacy, In *Biopolymers Polyesters III,* Y. Doi and A. Steinbüchel, Eds, p91, Wiley-VCH, Weinheim.
6. Hora, M. S., R. K. Rana, J. H. Nunberg, T. R. Tice, R. M. Gillery, and M. E. Hudson (1990), In vitro and in vivo characterization of biodegradable enoxacin microsphere, *Pharm. Res.* **49**, 191-194.
7. Ruiz, J. M., J. P. Busnel, and J. P. Benoit (1990), Influence of Average Molecular Weights of Poly(DL-Lactic Acid-Co-Glycolic Acid) Copolymers 50/50 on Phase Separation and *in Vitro* Drug Release from Microspheres, *Pharm. Res.* **7**, 928-934.
8. Kang, H. S., J. S. Kim, D. W. Kim, B. C. Kang, B. H. Lee, and B. S. Kim (2003), Drug Released Characteristics of Biodegradable Polymers for Stent Coating. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **18**, 107-110.
9. Lee, K. C., S. E. Lee, and H. J. Seo (1999), Preparation of poly(3-hydroxy butyrate-co-3-hydroxyvalerate) microspheres by emulsification process, *Polymer(Korea)* **23**, 338-347.
10. Han, J. H., S. S Kim, B. C. Shin, Y. H. Rhee, and S. U. Hong (2003), Preparation and Characterization of unsaturated poly(3-hydroxyalkanoate) nanoparticles. *Polymer(Korea)* **27**, 542-548.
11. Kim, J. S., B. H. Lee, and B. S. Kim (2005), Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) by *Ralstonia eutropha, Biochem. Eng. J.* **23**, 169-174.
12. Song, J. Y. and B. S. Kim (2004), Characteristics of cell growth and poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) synthesis by *Alcaligenes latus* and *Comamonas acidovorans*, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng,* **19**, 358-362.
13. Kim, M. S., S. I. Seok, B. Y. Ahn, T. S. Suh, and S. M. Koo (2002), Preparation of hollow silica microspheres by W/O emulsion processes, *J. Korean Ind. Eng. Chem.* **13**, 151-155.
14. Arriagada, F. J. and K. Osseo-Asare (1995), Synthesis of nanosize silica in aerosol OT. reverse microemulsions, *J. Colloid Interf. Sci.* **170**, 8-17.
15. Osseo-Asare, K. and F. J. Arriagada (1990), Preparation of SiO_2 nanoparticles in a non-ionic reverse micellar system, *Colloid Surf.* **50**, 321-339.
16. Kim, K. S., S. H. Kang, and J. M. Kim (1998), Preparation and biodegradability of microsphere prepared from biodegradable microgel, *J. Korean. Ind. Eng. Chem.* **9**, 591-594.