

공동캡슐화를 이용한 키토산 분해반응에서 alginate 막의 특성 및 크기에
따른 올리고당의 분자량 내외 분포

이기선, 최명락, 송상호, 임현수

여수대학교 생물공학과

전화(061) 659-3306, FAX (061) 659-3306

Abstract

To separate chitosan oligosaccharides easily by size exclusion, an coencapsulating technology of substrate and enzyme was developed. Chitosan and chitosanase were enveloped in this membrane and the product released to medium by size exclusion. The lower limit of the alginate concentration and the agitation speed were 0.5% and 40 rpm, respectively. Membrane thickness and capsules diameter were 10 μ m and approx. 3.0mm, 1.5mm, respectively. The molecular weight difference by concentration and cps of alginate were of little significance. And also, the molecular weight of distribution according to enzyme concentration was low concentration of enzyme produced high molecular weight of oligosaccharides. At 1.5mm size of capsule, product diffusion rate to outer part was higher than other capsules. The molecular weight distribution of the released oligosaccharides ranged from 1000 to 6000 Da.

서론

많은 biological polymer는 biotechnology, biochemistry, medicine field에서 많은 잇점을 가지고 있기 때문에 동물세포배양과 효소의 고정화에 이용되고 있다^{1,2,3}. Encapsulation은 polymeric anion 과 polymeric cation의 전기적인 상호작용에 의해 이루어진다. Alginate networks는 calcium, barium과 같은 2가 이온에 의해 형성할 수 있다⁴. biopolymer membrane의 중요한 기능 중의 하나는 membrane의 pore size 즉 molecular cut-off size를 조절할 수 있다는 장점이 있다⁵. 본 연구에서는 alginate capsule 안에 키토산과 분해효소를 고정화 시켜 분해 산물을 alginate 막을 통해 유출시키는 것이다. 이는 기질과 효소 및 산물을 쉽게 분리 하고자 하기 위함이며, 또한 키토산 올리고당의 생산에 있어서의 효율성을 높이고자 하였다. Alginate의 점도와 농도, capsule size의 차이, 효소의 농도에 따른 올리고당의 생산량과 capsule의 안과 밖의 분자량 등을 조사하였다.

재료 및 방법

본 실험에 사용한 chitosan은 Wako(Japan)의 Chitosan 10(DAC=80%, cps=5-20)를

구입하여 사용하였다. Chitosan은 2% acetic acid에 용해시킨 다음 CaCO_3 를 첨가하여 pH를 5.0으로 조절한 다음 이용하였다. Sodium alginate는 Sigma(USA)의 A7128 (approx.= 14,000cps), A2033 (approx.= 3,500cps), A2158 (approx.= 250cps)를 구입하였다. Alginate는 DW에 용해시킨 후 2% acetic acid를 첨가하여 pH를 5.0으로 맞춘 다음 이용하였다. 효소는 *Bacillus* sp. GM44 유래의 chitosanase를 사용하였다. Chitosanase의 활성 단위(U)는 주어진 조건에서 분당 $1\mu\text{mole}$ 의 glucosamine를 생산하는 효소의 양으로 정의하였다.

Coencapsulating Technology

50mM CaCl_2 이 포함된 키토산 용액(pH 5.0) 10ml를 4°C 에서 20unit/ml의 enzyme solution 0.1ml을 혼합하였다. 혼합물은 4°C 에서 교반 중인 sodium alginate solution(pH 5.0) 100ml에 떨어뜨렸다. Extruding instrument는 24, 3/4(0.48mm)gauge needle로 15ml의 주사기를 이용하였다. Capsule은 10분 동안 단단하게 하였다. 그런 다음 DW로 세척 한 다음, 2% acetic acid solution(pH 5.0)에 옮겼다. 그리고, 작은 size의 capsule을 만들기 위하여 N_2 gas를 분사하여 chitosan solution이 떨어지도록 하여 제조하였다. Capsule의 막 두께와 직경은 Olympus IX50 microscope로 측정하였다. 효소 반응은 40rpm과 40°C 에서 진행하였다. 키토산 올리고당의 생산량은 DNS방법⁶⁾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 4.00), 그리고 flow rate는 0.6ml/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

본 연구에서는 alginate capsule 안에 키토산과 분해효소를 고정화 시켜 분해 산물을 alginate 막을 통해 유출시키는 것이다. 이는 기질과 효소 및 산물을 쉽게 분리하고자 하기 위함이며, 또한 키토산 올리고당의 생산에 있어서의 효율성을 높이고자 하였다. Alginate의 점도와 농도, capsule size의 차이, 효소의 농도에 따른 올리고당의 생산량과 capsule의 안과 밖의 분자량 등을 조사하였다. 제조된 capsule은 2% acetic acid의 pH를 CaCO_3 로 조절한 용액에 넣은 다음 반응 시켜 조사하였다. 제조된 capsule의 막 두께와 직경은 Olympus IX50 microscope를 이용하여 측정한다.

결과 막의 두께는 10 μ m이었으며, capsule의 크기는 대략 3.0mm, N₂ gas를 이용한 capsule은 대략 1.5mm였다. 막을 이루는 alginate의 점도에 따른 capsule 내부의 분자량 변화를 측정한 결과 반응 시간에 따라서 분해되어지는 chitosan의 분자량은 큰 차이는 없었다. 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 1000정도의 분자량을 가지고 있었으며, 10U를 첨가한 capsule에서는 1500-3500정도의 분자량이 확인되었다. 3.0mm와 1.5mm의 capsule의 크기에 있어서의 분자량의 변화는 작은 크기의 capsule에서 내부의 분자량이 더 빨리 작아졌다. 밖으로 유출된 올리고당의 분자량 비교에서 3.0mm 크기의 capsule에서는 주로 1000정도의 분자량을 갖는 올리고당이 나타났지만, 1.5mm의 capsule에서 밖으로 유출된 올리고당의 조사에서는 3000-6000사이의 분자량이 확인되었다. 이는 capsule의 크기가 작아졌으므로 효소 반응에 따른 물질의 이동이 더 빨라졌기 때문으로 사료된다.

참고문헌

1. Mansfeld, J., M. Foster, A. Schellenberger, and H. Dautzenberg (1991) Immobilization of invertase by encapsulation in polyelectrolyte complexes. *Enzyme Microb. Technol.* 13 : 240-244.
2. Posillico, E. D., M. S. Kallelis, and J. M. George (1987) Large scale production and purification of monoclonal antibodies using cellular microencapsulation. *Cell. Microencapsul.* 2 : 139-157.
3. Lee, G. M. and B. O. Palsson (1990) Simplified method of making alginate-polylysine microcapsules for hybridoma cell culture using RPMI 1640 medium. *Biotechnol. Tech.* 4 : 341-344.
4. Elcin, Y. M. (1995) Encapsulation of urease enzyme in xanthan-alginate spheres. *Biomaterials.* 16 : 1157-1161.
5. Kim S. K. and C. K. Rha (1990) Chitosan for the encapsulation of mammalian cell culture, in Chitin and Chitosan-Sources, Chemistry, Biochemistry, Physical Properties and Application, ed, G. Skjak-Bra^다, T. Anthonsen, and P. Sandford, Elsevier Science Pub. Co, NY, 644-652.
6. Miller G. L. (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31 : 426-428.

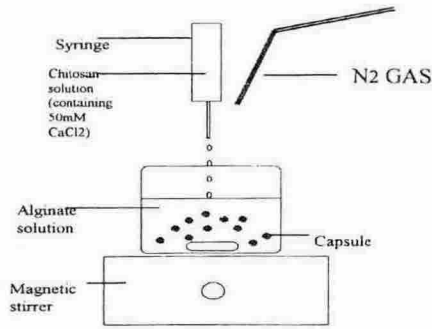


Figure 1. Preparation of capsule.

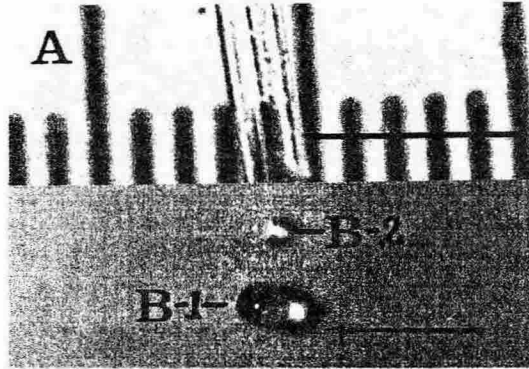


Figure 2. The size of membrane thickness(A, Bar :50 μ m) and diameter of the capsules(B-1:3.0mm, B-2:1.5mm, Bar:1cm).

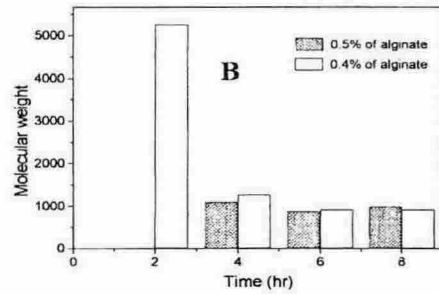
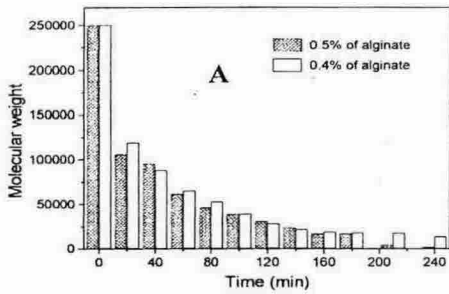


Figure 3. The molecular weight difference by alginate concentration. A:inner, B:outer.

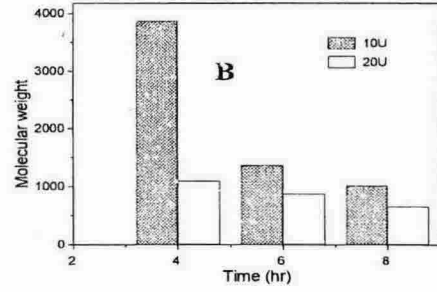
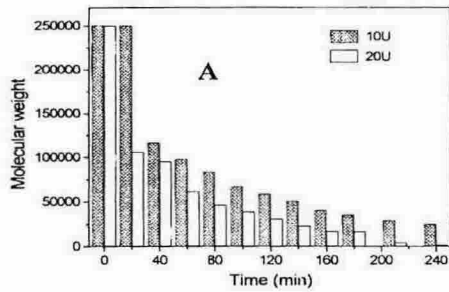


Figure 4. The molecular weight distribution by enzyme concentration. A:inner, B:outer.

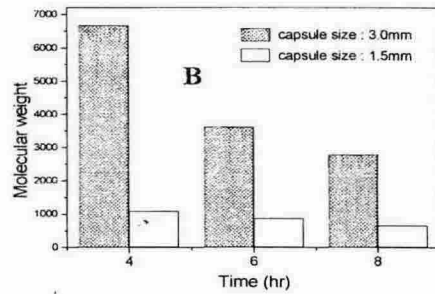
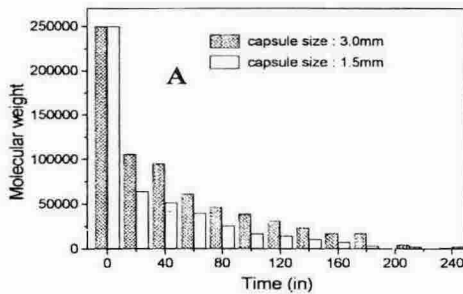


Figure 5. The molecular weight difference by capsule size. A:inner, B:outer.