

생체재료로서의 고순도 수용성 키토산 올리고당의 제조와 특성

박준규[#] · 최창용[#] · 남정표 · 박성철 · 박영훈 · 장미경[†] · 나재운[†]

순천대학교 공과대학 고분자공학과

(2013년 9월 4일 접수, 2013년 10월 9일 수정, 2013년 10월 11일 채택)

Preparation and Characterization of Highly Pured Water-soluble Chitosan Oligosaccharides as Biomaterials

Jun-Kyu Park[#], Changyong Choi[#], Joung-Pyo Nam, Seong-Cheol Park, YungHoon Park, Mi-Kyeong Jang[†], and Jae-Woon Nah[†]

Department of Polymer Science and Engineering, Sunchon National University, Jeonnam 540-742, Korea

(Received September 4, 2013; Revised October 9, 2013; Accepted October 11, 2013)

초록: 본 연구에서는 유전자 전달체로 응용하기 위하여 다양한 분자량의 고순도 수용성 키토산 올리고당을 한외여과막을 이용하여 분급화 하였다. 분급화한 고순도 수용성 키토산 올리고당의 평균분자량과 분포를 측정하였고, 매우 좁은 분포를 갖는 것을 확인하였다. 고순도 수용성 키토산 올리고당의 분자량은 한외여과막에 따라 1에서 10 kDa의 범위를 가진다는 것을 젤크로마토그래피 측정을 통하여 확인하였다. 분급화된 키토산의 구조는 ¹H NMR과 FTIR을 통하여 구조를 확인하였고, UV를 통하여 탈아세틸화도를 측정할 결과 90% 이상의 높은 탈아세틸화도를 갖는다. 본 연구를 통하여 제조된 고순도 키토산 올리고당은 세포독성이 없고 아주 좁은 분자량 분포와 높은 순도를 갖고 있음을 확인하였다.

Abstract: To develop water-soluble chitosan as an efficient gene delivery carrier, chitosan oligosaccharides (COSs) with various molecular weights (MW) were studied for gene transfection agents. MWs of COSs fractionated by ultrafiltration techniques were identified as narrow MW distributions with the average MW ranging from 1 to 10 kDa through gel permeation chromatography (GPC) measurement depending on the applied ultrafiltration membranes. Their structural characterizations were analyzed by FTIR spectrophotometer and ¹H NMR. The degree of deacetylation was determined by UV spectroscopy showing the degree of deacetylation above 90%. The relative cell viabilities were maintained over 100% (10 mg/mL), independent of the MW of the fractionated COSs. The fractionated COSs of 10 mg/mL concentration with narrow MW distributions showed non-cytotoxicity in Caco-2 cells.

Keywords: chitosan oligosaccharide, gene delivery, ultrafiltration, transfection, molecular weights.

서 론

키틴, 키토산은 자연에서 셀룰로오스 다음으로 많이 존재하여 다양한 분야에서 이용되고 있다. 키토산은 게나 새우 등의 갑각류의 외피에 존재하는 키틴을 탈아세틸화시켜 얻어지는 물질로 단량체인 글루코사민이 β-1,4 결합으로 이루어진 천연고분자이다. 키토산은 생체적합성, 생분해성, 중금속 흡착 및 항균 활성을 갖는 성질 때문에 제약산업, 생명공학, 폐수처리, 화장품 및 식품 공업 등의 다양한 분야에서 응용이 활발히 진행되고 있다.¹⁻⁷

키토산은 게나 새우 등과 같은 갑각류의 외피에 존재하는 키틴의 탈아세틸화 과정에 의해 얻어지는 다당류로,⁸ 이러한 키토산의 특성은 혈중 콜레스테롤 감소 및 지방 흡수 저해 효과, 항암효과, 면역력 강화 효과, 항 당뇨 효과, 상처치료 효과, 그리고 항균 활성 등의 다양한 생리활성을 갖고 있다.⁹⁻¹¹ 특히 구강, 비강, 그리고 장강 등의 점액질 층에 결합하여 약물의 흡수를 촉진시키는 효과를 나타내기 때문에 단백질 약물이나 난흡수성 약물의 경구 및 여러 제형에 있어서 흡수 촉진제로의 응용이 활발하게 연구되고 있다.^{12,13}

또한 생체의료용 재료로서의 응용성을 가지고 있는 키토산은 수용액 하에서 양이온성을 띠기 때문에 음이온성을 띠는 유전자 물질과 복합체를 형성할 수 있고, 이를 이용하는 키토산 또는 키토산 유도체의 유전자 전달체로의 연구가 활발히 진행되고 있다.¹⁴ 키토산은 비바이러스성 유전자 전달체로

[#]These authors contributed equally to this work.

[†]To whom correspondence should be addressed.

E-mail: jmk8856@sunchon.ac.kr; jwnah@sunchon.ac.kr

서 비록 바이러스성 유전자 전달체에 비하여 효율성은 떨어지지만 면역반응이나 유전자의 크기에 제한을 받지 않는 등의 장점을 가지고 있다.¹⁴⁻¹⁶

키토산 외에도 유전자와 같은 생리활성물질을 체내에 안전하게 전달할 수 있는 다가의 양이온성 고분자에 대한 많은 연구가 이루어지고 있다. 특히 polyethylene imine(PEI)이나 poly(L-lysine)(PLL) 그리고 덴드리머 등의 양이온성 고분자들은 다가의 음이온 전하를 띠는 DNA와 효율적으로 복합체를 형성함으로써 높은 전이효율을 나타낸다는 보고가 이미 기록되어 있다.¹⁷⁻¹⁹ PEI의 경우 세포내에서 proton sponge effect를 나타내며 이로 인해 빠른 endosomal escape에 의해 전이효율이 매우 높다는 장점을 가지고 있어 유전자 전달체로 많은 응용이 이루어지고 있으나,²⁰ 높은 전이효율에 비해 세포 내 독성이 매우 높다는 단점을 가지고 있어 이러한 문제점을 개선할 수 있다면 매우 효율적인 유전자 전달체를 제조할 수 있을 것으로 사료된다.

이러한 문제점을 개선할 수 있는 방법으로는 독성을 나타내지 않는 양이온성 천연고분자인 키토산과 컨쥬게이션함으로써 세포 내 독성은 낮추고 유전자 전달 효율은 최대로 증가시킬 수 있는 방법을 디자인하는 것이다.

그러나 고분자량 키토산은 유전자와 결합하여 입자를 크게 형성시키고, 낮은 용해도와 유전자 복합체를 형성한 후 강한 charge interaction으로 인해 DNA가 풀리지 않아서 유전자 발현 효율이 낮다는 문제점을 가지고 있다.^{14,21} 또한 고분자량 키토산은 일반적으로 넓은 분자량 분포를 갖고 있기 때문에 생리활성 및 응용에 있어서 효과 및 효능의 재현성을 얻기가 매우 어렵다는 단점을 갖고 있다. 이러한 유전자 전달체로서 키토산의 활용 가능성 및 그 효과가 점차 밝혀지고 있으나, 보다 성공적인 유전자전달을 위해서는 키토산이 가지고 있는 여러 가지 단점들을 보완할 수 있는 다양한 방법에 대한 지속적인 연구가 절실히 요구되고 있다. 아울러 생체 및 의약 재료로서의 성공적인 사용을 위해서는 키토산 고유의 특성은 그대로 유지하며 낮은 독성수준, 고순도, 그리고 높은 용해도 등의 특성을 갖고 있어야 한다.

따라서 이러한 단점을 보완하기 위해서는 먼저 고분자량의 키토산을 효과적으로 저분자량의 수용성 키토산으로 분해하여 사용하는 것이다. 일반적으로 고분자량을 분해하기 위해서는 산분해 방법을 사용하게 되는데 이러한 방법으로 분해된 저분자량의 키토산은 평균 10000 Da 정도의 수용성 키토산 올리고당으로 제조되고 분자량 분포에 있어서는 다양한 분자량을 포함하고 있어서 정확한 구조 및 물성에 대한 분석이 어렵게 된다.

따라서 본 연구에서는 고분자량 키토산을 산분해 과정을 이용하여 제조된 수용성 키토산 올리고당을 한외여과법을 이용하여 다양한 분자량 및 좁은 분자량 분포를 갖는 고순도 수용성 키토산 올리고당 얻고자 하였으며, 분자량에 따른 키

토산 올리고당의 물리화학적 분석을 분광학적 분석 및 다양한 분석법을 이용하여 확인하였다. 다양한 분자량과 좁은 분자량 분포를 갖는 키토산을 이용한 키토산의 분자량에 따른 생리활성 및 그 작용기작에 대한 보다 근본적이고 구체적인 연구의 기초를 제공하고자 한다. 따라서 본 연구에서 얻은 키토산 올리고당은 유전자 전달체와 같은 생체의료용 고분자로 기존의 고분자량 키토산이 가지고 있는 문제점을 해결할 수 있으며 또한 PEI나 PLL과 같은 다양한 다른 양이온성 고분자와 컨쥬게이션함으로써 효율적인 유전자 전달체뿐만 아니라 다른 생리활성 물질을 안전하게 체내에 전달할 수 있는 장치로 응용될 수 있을 것으로 기대한다.

실 험

시약 및 재료. 쫂산염키토산(COSKL225)은 키토라이프(Kittolife Co. Korea)에서 구입하였다. 세포실험에 사용된 HEK 293T 세포는 American Type Culture Collection(ATCC)에서 분양받은 후 10%의 fetal bovine serum(FBS)을 함유한 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM)을 이용하여 배양하였다. Ethylenediamine tetraacetic acid(EDTA), lauryl sulfate sodium salt(SDS), 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT), and DMEM은 Sigma(USA)사에서 구입하여 사용하였다. pEGFP-N1 plasmid DNA, encoding green fluorescence protein(GFP)는 BD Biosciences Clontech(PaloAlto,CA)사에서 구입하여 사용하였다. 기타 시약들은 일급 시약을 구입하여 정제하지 않고 사용하였다.

분급화된 고순도 저분자량 키토산 올리고당의 제조. 분자량 분포가 좁고 다양한 분자량을 갖는 키토산 올리고당을 얻기 위하여 한외여과법(ultrafiltration method)을 통하여 분리하였다.¹⁵ 키토산 올리고당을 증류수(5 w/v%)에 녹인 후 0.45 μm 기공을 갖는 멤브레인 필터로 필터한다. 그 후 한외여과셀(Amicon 8400, Millipore, USA) 장치에 디스크형 멤브레인을 이용하여 분자량에 따라 서로 다른 분리능을 갖는 한외여과막(ultrafiltration membranes, MWCO 1, 3, 10, 30 kDa)을 사용하여 분자량에 따라 키토산 올리고당을 분리한다. 다양한 분자량 및 좁은 분자량 분포를 갖는 고순도 수용성 키토산 올리고당을 제조하기 위하여 위에서 고분자량 수용성 키토산 올리고당을 75 g/L가 되도록 용해를 시켜 4 °C 이하에서 보관하였다. 이 용액을 한외여과막을 통과시킴으로써 고순도 수용성 키토산 올리고당을 단계적으로 제조하였다. 자세한 방법은 다음과 같다. 먼저 30 KDa 한외여과막을 이용하여 고분자량 키토산 올리고당을 분리하고, 30 KDa 한외여과막을 통과한 키토산 올리고당 용액을 10 KDa의 한외여과막을 이용하여 분자량 크기에 따라 분리하였다. 이 과정을 통하여 COS10(30 KDa 막은 통과하나 10 KDa를 통과하지 못하는 키토산 올리고당)을 얻었다. 계속해서 3, 1 KDa의 한외여과막

을 이용하여 COS6(10 KDa 막은 통과하나 3 KDa를 통과하지 못하는 키토산 올리고당), COS3(3 KDa 막은 통과하나 1 KDa를 통과하지 못하는 키토산 올리고당), COS1.5(1 KDa 막은 통과하는 키토산 올리고당)를 얻었다. 위의 모든 단계에서 한외여과는 한외여과장치(Amicon 8400, USA)에 한외여과막을 장치한 후 키토산 올리고당 용액 350 mL을 넣고 한외여과장치에 질소를 토출(토출 압력: 3.5 kg-f/cm²)시켜 초기 양의 1/7이 되도록 농축시킨 후 다시 정제수를 넣어 350 mL이 되도록 하여 다시 동일한 과정으로 농축시켰으며, 이 과정을 3회 반복한 후 한외여과장치 내의 최종 고순도 키토산 올리고당 용액을 얻었다. 이 용액은 다시 0.8 μm의 filter를 이용하여 분리과정에서 발생한 먼지 등의 불순물을 제거하고 -40 °C에서 24시간 동안 동결건조를 통하여 얻었다. 그리고 동결건조를 통하여 얻어진 키토산 올리고당을 다시 증류수에 용해시킨 후 아세톤/에테르 혼합용매(50/50, V/V)에 침전을 시켜 분말형태의 키토산 올리고당을 제조하고 48시간 동안 진공건조(압력: 10⁻³ torr)를 통하여 최종 고순도 수용성 키토산 올리고당 분말을 얻었다.

분급화된 고순도 저분자량 키토산 올리고당의 분석. 고순도 수용성 키토산 올리고당의 구조 분석은 핵자기공명장치 (¹H NMR, 400 MHz, Bruker, Germany)와 FTIR spectroscopy를 이용하여 분석하였다. ¹H NMR은 NMR 용매 D₂O로 7 mg/mL의 농도로 녹여 측정하였다. FTIR은 KBr 법을 사용하여 적외선 분광광도계(FTIR 8700, Shimadzu)를 이용하여 4600 ~400 cm⁻¹의 범위에서 측정하였다. 절대 분자량과 분자량 분포는 0.5 M 암모늄 아세테이트 용액(pH 5.5, 10 mg/mL)에 녹여서 젤투과크로마토그래피(gel permeation chromatography equipped with multi-angle laser light scattering detector, GPC-MALLS, 18 angle detector, Wyatt, USA)를 이용하여 측정하고, Opt-LAB reflectometer(Wyatt, USA)로 굴절 지수(dn/dc)를 측정하였다. 그 결과를 가지고 GPC 결과 그래프를 이용하여 절대 분자량을 계산하였다.

고순도 수용성 키토산 올리고당의 용액점도 및 고유점도는 레오미터(rheometer; Bohlin Instruments, UK)를 이용하여 혼합용매(0.1 M 아세트산과 0.2 M NaCl)에 용해시켜 측정하고 이를 분자량과 상관관계를 계산하였다. 또한 GPC를 이용한 분자량과 고유점도를 이용하여 Mark-Houwink 상수값을 구하였다.

탈아세틸화도는 UV 1차 미분법 등을 이용하여 탈아세틸화도를 측정한다.²² 분급화된 키토산 올리고당을 0.01 M 아세트산 용액에 1 mg/mL이 되도록 용해하였다. 그리고 UV (Shimadzu UV-1601, Japan, 파장 범위: 190-250 nm)을 이용하여 흡수 스펙트럼을 측정한다. Zero crossing point(ZCP)는 superimposing 스펙트럼을 이용하여 측정하였다.

고순도 수용성 키토산 올리고당의 수분 함량과 무기물의 함량은 열중량분석기(thermogravimetric analyzer, TGA:

TGA951, TA Instruments, USA)를 이용하여 측정하였다. 이때 가열속도는 10 °C/min으로 하여 800 °C까지 가열하였으며 공기를 50 mL/min 순환시키면서 실험을 실시하였다.

고순도 저분자량 키토산 올리고당의 세포독성 실험. 분자량에 따른 고순도 수용성 키토산 올리고당의 세포 독성은 MTT assay를 이용하여 실험을 수행하였다. 96 well 세포배양 플레이트의 한 well에 약 1×10⁴개의 Caco-2(대장암 세포주) 세포를 분주한 후 하루 동안 배양하여 세포를 안정하게 배양기에 부착하였다. 24시간 후 플레이트의 세포 배양액을 제거한 후 제조되어진 각각의 고순도 수용성 키토산 올리고당을 10%의 FBS가 포함되어 있는 PBS 7.4 용액을 이용하여 다양한 농도의 고순도 수용성 키토산 올리고당 용액(6.25, 12.5, 25, 50, 100 및 200 μg/mL)을 만들고 이 용액을 투여한 후 2시간 동안 세포 배양기에서 배양하였다. 고순도 수용성 키토산 올리고당 처리 후 키토산 용액을 제거하고 세포를 생리 식염수로 세척한 다음, 신선한 배양액을 넣고 약 4시간 동안 안정화시킨 후 MTT 용액이 들어 있는 세포 배양액(0.5 mg/mL MTT in DMEM)으로 바꾼 후 세포 배양기에서 4시간 동안 배양하였다. MTT 처리 후 세포 배양액을 제거하고 세포 내의 미토콘드리아 활성에 의해 생성된 formazan 결정을 100 mL의 dimethylsulfoxide(DMSO)를 이용하여 녹여내었다. 세포의 상대적 활성도(relative cell viability)는 DMSO로 녹여낸 용액의 570 nm에서의 흡광도를 이용하여 식 (1)로 계산하였다.

$$\text{세포의 상대적 활성도(\%)} = \frac{(OD_{570}(\text{sample}) - OD_{570}(\text{blank}))}{(OD_{570}(\text{control}) - OD_{570}(\text{blank}))} \times 100 \quad (1)$$

위 식에서 OD_{570(sample)}은 분급화된 고순도 수용성 키토산, OD_{570(control)} PBS 완충용액으로 처리된 well로부터 측정된 흡광도 값이다.

결과 및 토론

고순도 수용성 키토산 올리고당의 구조분석. 분리된 고순도 수용성 키토산 올리고당의 구조는 적외선 분광 광도계와 핵자기 공명장치를 이용하여 분석하였다. Figure 1의 ¹H NMR 스펙트럼에서 일반적인 키토산의 특성 피크를 확인할 수 있었다. 아세트아마이드 그룹에서의 메틸기의 수소가 약 2 ppm에서 나타났으며, 1번 탄소 위치의 수소가 5.4 ppm, 그리고 3.0-4.5 ppm 사이에서 2번 탄소 위치에서 6번 탄소 위치에 나타나는 수소의 특성 피크를 모두 확인하였다. 또한 Figure 2의 FTIR 스펙트럼 결과에서는 1500 cm⁻¹ 부근에서 키토산의 특성피크인 아마이드 I, II의 특성 피크가 나타남을 확인하였다. 이러한 분광학적 분석의 결과에서 볼 수 있듯이 키토산의 특성 피크를 모두 확인함으로써 한외여과 과정 및 정제

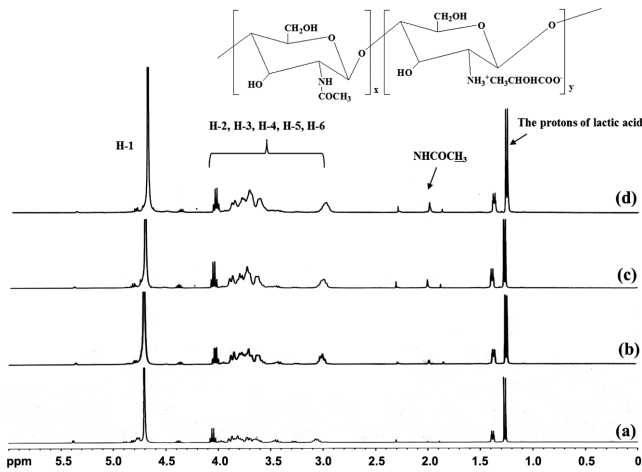


Figure 1. ^1H NMR spectra of COS1.5 (a); COS3 (b); COS7 (c); COS10 (d).

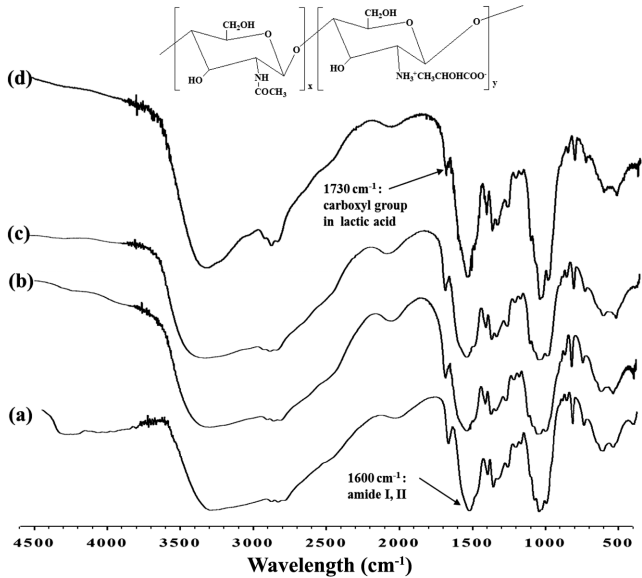


Figure 2. FTIR of COS1.5 (a); COS3 (b); COS7 (c); COS10 (d).

과정에서 키토산의 분해가 일어나지 않고 순수한 키토산을 얻었음을 확인하였다.

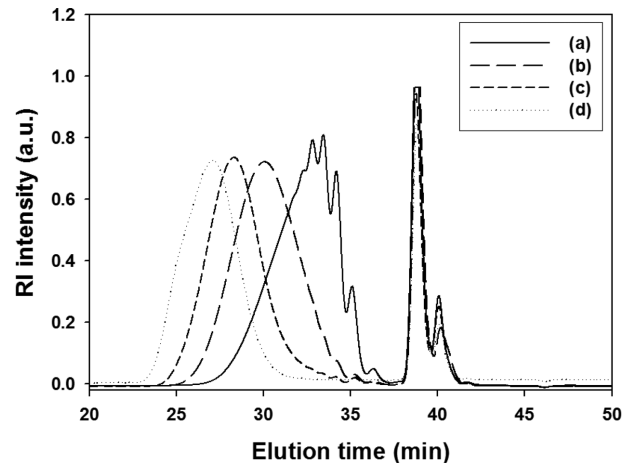


Figure 3. GPC chromatograms of COS1.5 (a); COS3 (b); COS7 (c); COS10 (d).

고순도 수용성 키토산 올리고당 분자량 분석. 고순도 수용성 키토산 올리고당의 분자량은 GPC를 이용하여 절대분자량 및 분자량 분포를 측정하였다. 분자량 별로 분급 분리한 고순도 수용성 키토산 올리고당을 GPC-MALS를 이용하여 실질 분자량을 측정한 결과 한외여과막의 MWCO에 따라 COS1.5, COS3, COS5, COS7 그리고 COS10을 얻을 수 있었으며 정확한 분자량과 PDI 값은 Table 1에 나타내었다. 이러한 결과로부터 한외여과법에 의하여 성공적으로 분자량 별로 분급 분리가 되는 것을 알 수 있었으며(Figure 3), 또한 분급화된 고순도 수용성 키토산 올리고당의 경우 상당히 좁은 분자량 분포를 나타내는 것을 알 수 있었다(Table 1).

고순도 수용성 키토산 올리고당 탈아세틸화도(DDA) 분석. 자외선분광광도계(UV spectrophotometer, Simadazu, UV1601, Japan) 측정을 통한 1차 미분법을 이용하여 고순도 수용성 키토산 올리고당의 탈아세틸화도를 다음의 방법으로 측정하였다. 0.01, 0.02, 0.03 M의 아세트산 용액의 202.5 nm의 흡광도를 이용하여 ZCP를 구하였다.²² 그리고 *N*-acetyl glucosamine의 0.1 M 아세트산에 다양한 농도로 용해시켜 202.5 nm에서 각각의 흡광도와 ZCP를 이용하여 calibration

Table 1. Characterization of High Purity Chitosan Oligosaccharide

Sample	Membranes (MWCO)	M_n^a	PDI ^a	Intrinsic viscosity ^b [η]	DDA ^c (%)	Water content ^d (%)	Residue ^d (%)
COS1.5	~1 K	1260	1.42	0.0250	94.55	2.78	0.96
COS3	1~3 K	2700	1.24	0.0595	92.96	1.07	0.06
COS7	3~10 K	6700	1.17	0.1451	91.32	1.40	0.00
COS10	10~30 K	10500	1.13	0.2280	90.17	2.55	0.00

^aMeasurement by GPC (0.5 M ammonium acetate, pH 5.5, 25 °C). ^bMeasurement by Gemini advanced rheometer (co-solvent (0.1 M acetic acid, 0.2 M NaCl), 25°C). ^cMeasurement by UV first derivative method. ^dMeasurement by TGA (heating rate; 10 °C/min, air).

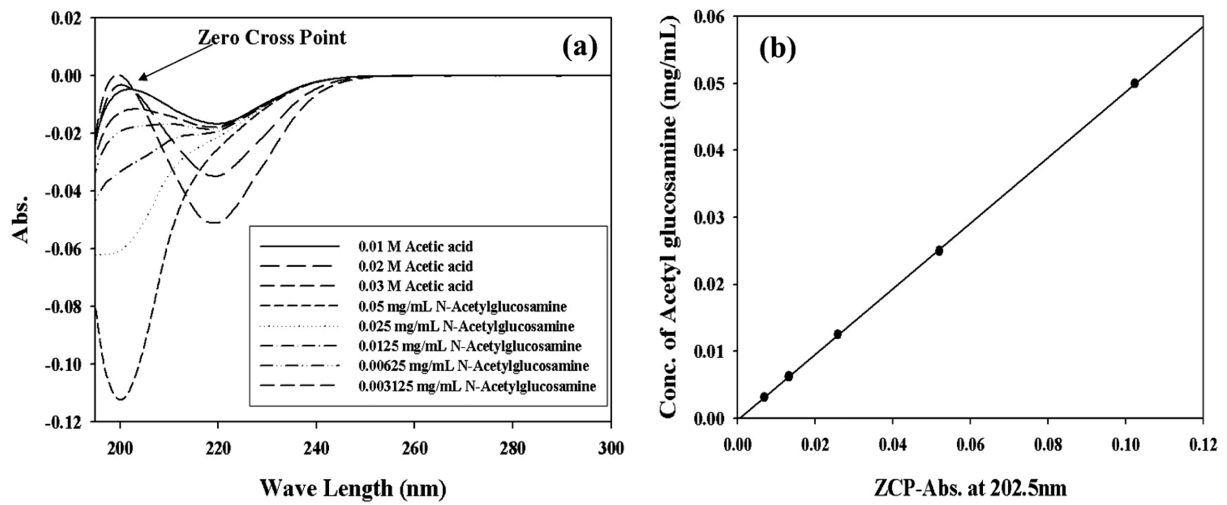


Figure 4. UV spectrum of first derivative curve (a); calibration curve (b).

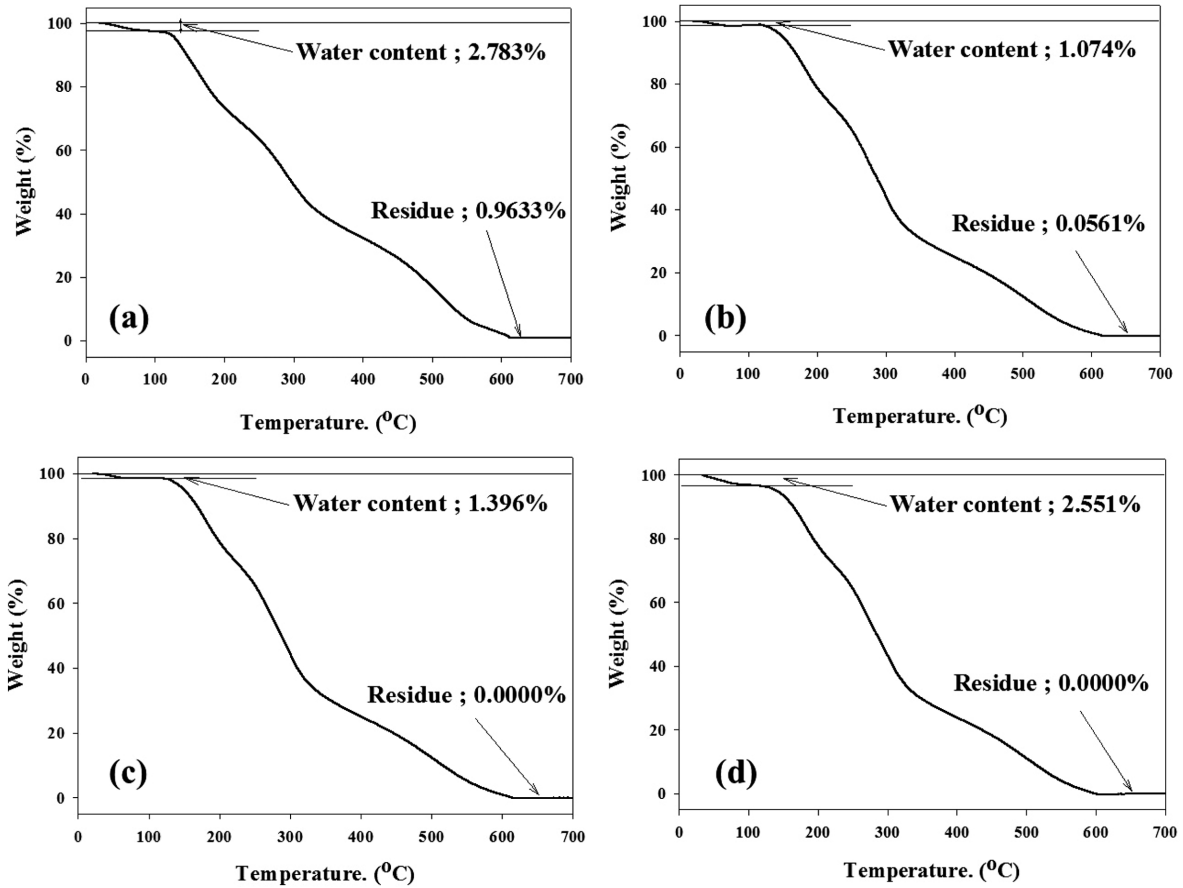


Figure 5. TGA thermograms of COS1.5 (a); COS3 (b); COS7 (c); COS10 (d).

curve를 얻었다. 그리고 고순도 수용성 키토산 올리고당을 0.01 M 아세트산에 0.1 mg/mL로 용해시킨 후 202.5 nm에서의 흡광도를 측정하고 식 (2)로부터 탈아세틸화도를 구하였다.

$$DDA(\%) = 100 - \left[\frac{\frac{A}{204}}{\left(\frac{W-A}{251} + \frac{A}{204}\right)} \right] \times 100 \quad (2)$$

A 는 측정되어진 *N*-acetyl glucosamine의 아민의 양이고, W 는 키토산의 양이다.

Figure 4(a)에서처럼 ZCP를 결정하였으며, ZCP로부터 *N*-acetyl glucosamine의 calibration curve는 Figure 4(b)과 같이 얻을 수 있었다. 이 결과로부터 얻은 calibration curve와 식 (2)로부터 키토산의 탈아세틸화도를 결정하였으며, 그 결과는 Table 1에서 볼 수 있듯이 90~95%로 아주 높은 탈아세틸화도를 갖는 고순도 수용성 키토산 올리고당을 얻을 수 있었다.

고순도 수용성 키토산 올리고당 순도 분석. 열중량 분석기를 통하여 수분과 잔류 회분을 분석한 결과 Table 1과 Figure 5에서 나타낸 바와 같이 1~3% 정도의 수분을 함유하

고 있으며 회분의 경우 극히 미량이나 존재하지 않음을 알 수 있다. 따라서 위의 구조분석이나 탈아세틸화도 분석에서와 동일하게 아주 순수한 키토산 올리고당이 본 연구에서 제조되었음을 확인할 수 있었다.

고순도 수용성 키토산 올리고당 점도 분석. 레오미터를 이용한 점도 측정 결과 고유점도는 Table 2와 Figure 6에서 보인 것처럼 분자량이 증가함에 따라 증가하였다. 이 결과로부터 용액의 고유점도는 고순도 수용성 키토산 올리고당과 아주 밀접한 관계를 갖고 있으며 분자량이 증가하며 고유점도가 증가하는 이론과도 잘 일치하고 있음을 보이고 있다. 또한 농도에 따른 고순도 수용성 키토산의 용액 점도 역시 농

Table 2. Characterization of Molecular Weight and Viscosity

Sample	Membranes (MWCO)	M_n (GPC) ^a	PDI ^a	Viscosity ^b (cP)				
				0.5%	1%	2%	3%	5%
COS1.5	~1 K	1570	1.42	1.056	1.080	1.117	1.177	1.274
COS3	1~3 K	3400	1.24	1.089	1.137	1.230	1.355	1.570
COS7	3~10 K	6050	1.17	1.193	1.302	1.553	1.835	2.600
COS10	10~30 K	8700	1.13	1.337	1.541	2.005	2.720	6.010

^aMeasurement by GPC (0.5 M ammonium acetate, pH 5.5, 25 °C). ^bMeasurement by viscosity Gemini advanced rheometer (fixed single stress of 0.3847 Pa at 25 °C).

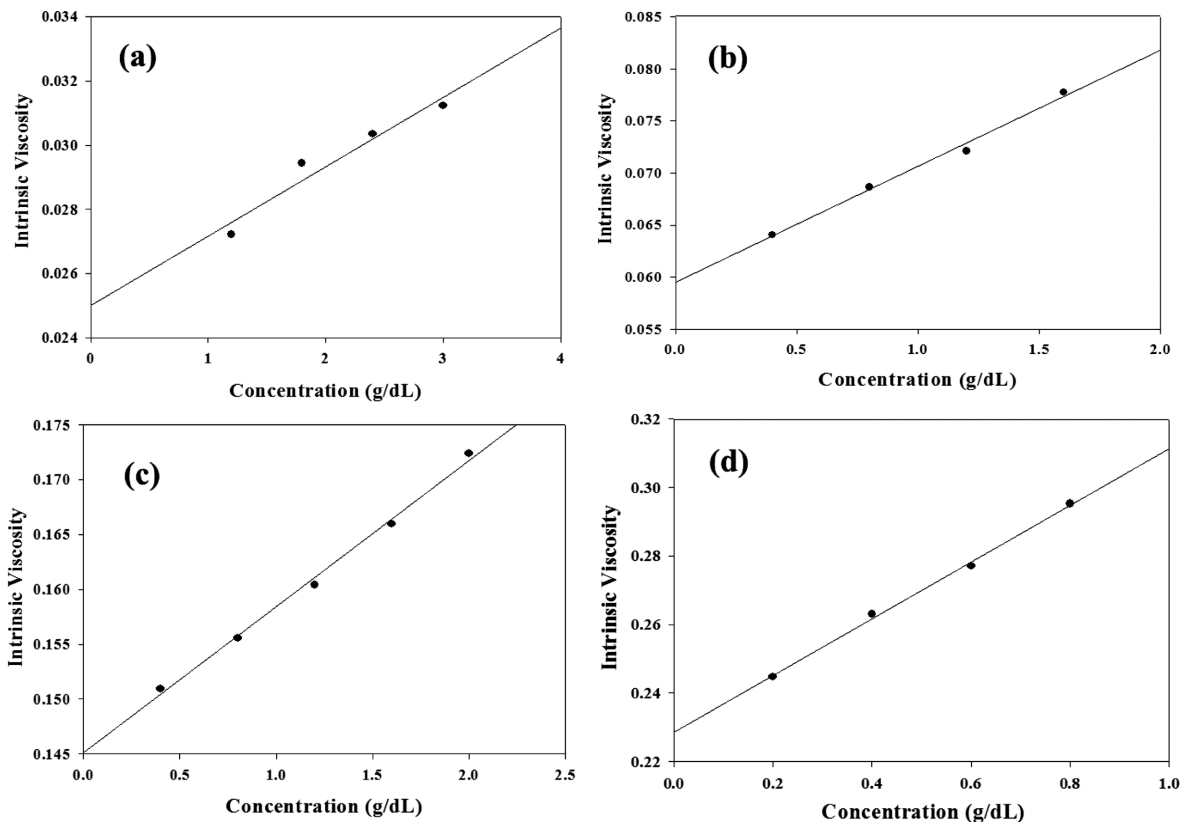


Figure 6. Intrinsic viscosities of COS1.5 (a); COS3 (b); COS7 (c); COS10 (d).

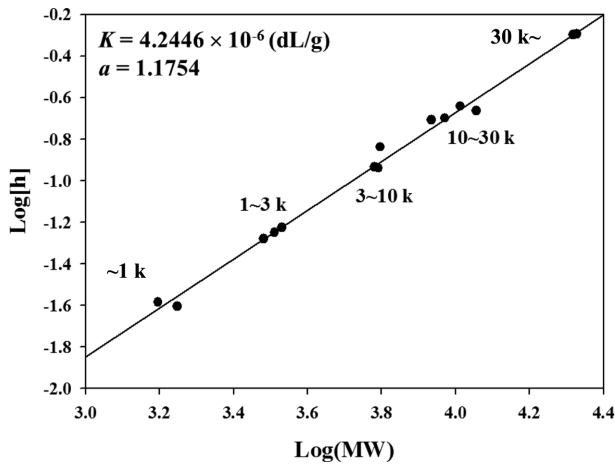


Figure 7. Relationship between intrinsic viscosities and MW of the fractionated COSs. The Mark-Houwink's constants K and a were calculated by linear regression of $\log[\eta]$ vs. $\log(MW)$ plot.

도가 증가함에 따라 증가함을 알 수 있었다. 또한 GPC-MALS 를 이용하여 구한 고순도 수용성 키토산 올리고당 각각의 절대분자량과 고유점도로부터 Mark-Houwink 상수값(K, a)을 구하였다.

$$\text{Mark-Houwink 식: } [\eta] = KM^a \quad (3)$$

$[\eta]$ 는 고유점도, M 은 분자량, K, a 는 고분자의 용액에 대한 상수 값이다. 이 식은 다시 다음으로 표현할 수 있다.

$$\log[\eta] = a \log M + \log K \quad (4)$$

따라서 분자량 값과 고유점도 값을 log-log fitting(Figure 7) 하여 기울기와 절편으로 K, a 값을 구할 수 있다. 이 결과로부터 고순도 수용성 키토산 올리고당의 혼합용매(0.1 M 아세트산과 0.2 M NaCl)에 대한 K, a 값은 각각 4.2446×10^{-6} , 1.1754임을 계산하였다. 이 결과는 고유점도로부터 제조되어진 키토산의 분자량을 구할 수 있는 기본적인 데이터를 제공

할 것이다.

Figure 8은 0.5~2% 범위의 점도의 분자량(x 축)에 따른 경향을 나타낸 그림이다. 2~5% 범위의 점도의 분자량(x 축)에 따른 경향을 나타낸 그림이다. 고유 점도는 여러 번의 점도 측정 및 정밀한 기기가 필요하므로, 이를 확인하기 위하여 수용액 상태에서의 점도 값 또한 측정하였다(Table 2). 점도 또한 분자량이 증가할수록, 그리고 농도가 증가할수록 증가하는 경향을 보였다.

고순도 수용성 키토산 올리고당 세포독성 분석. 일반적으로 키토산은 세포독성이 없는 물질로 알려져 있다. 그러나 키토산의 세포독성은 키토산의 분자량과 농도와 밀접한 관계를 가지고 있다. 고순도 수용성 키토산 올리고당의 세포독성을 분자량과 농도에 따라 측정한 결과는 Figure 9에 나타내었다. 결과에서 알 수 있듯이 COS1.5와 COS3는 농도와 상관없이 세포독성이 전혀 없는 물질임을 알 수 있었으며, COS7과 COS10은 낮은 농도에서는 전혀 세포독성이 없었으나 농도

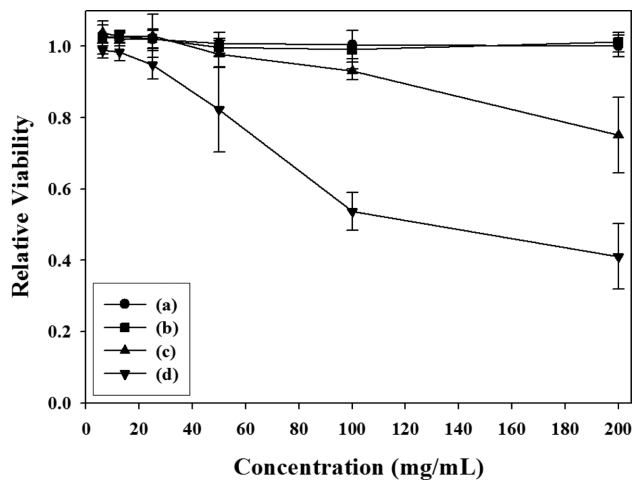


Figure 9. Cytotoxicities of COS1.5 (a); COS3 (b); COS7 (c); COS10 (d) in Caco-2 cells.

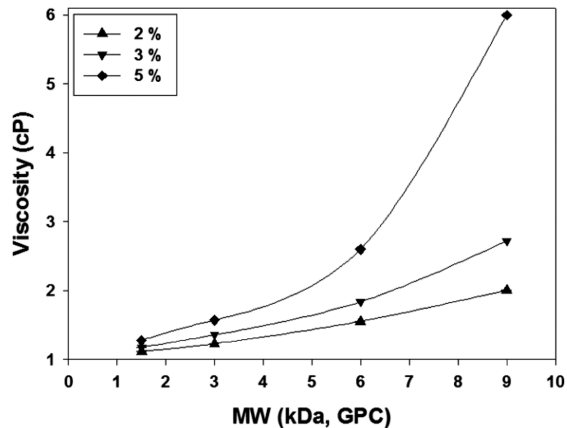
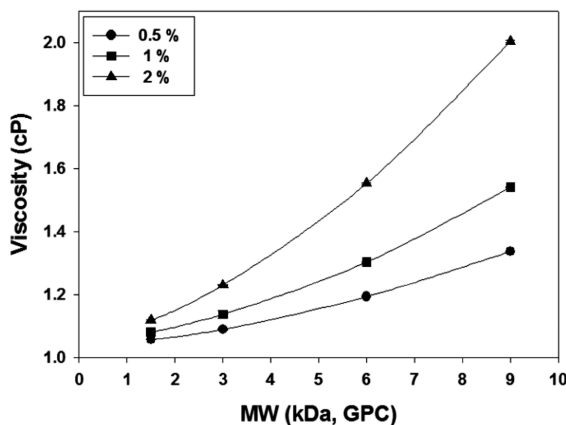


Figure 8. Viscosities of water-soluble chitosan according to the various concentrations of water-soluble chitosan.

가 증가함에 따라 세포생존율이 떨어지고 있으나 COS7에서는 높은 농도에서도 0.75의 세포생존율을 보였으며, COS10K의 경우에는 비교적 높은 농도인 100 µg/mL에서 0.54의 세포생존율을 보였다. 이 결과에서 일반적으로 0.5 이상의 세포생존율(LD₅₀)을 보일 경우 독성을 무시한다는 것과 비교하면 제조되어진 고순도 수용성 키토산 올리고당의 세포독성은 무시할 수 있다.

결 론

본 연구에서 고순도 수용성 키토산을 다양한 분자량과 좁은 분자량 분포를 갖도록 한외여과법을 통하여 제조하였다. 제조한 고순도 수용성 키토산은 한외여과막 과정에서 분해가 이루어지지 않은 것을 구조 분석을 통하여 확인하였다. 수평균 분자량 측정 결과 COS1.5의 경우는 분자량 1260 Da를 나타내었으며, COS3의 경우는 2700 Da, COS7은 6700 Da, 그리고 COS10의 경우에는 10500 Da의 분자량을 나타내었고, PDI는 1.13~1.42의 좁은 분자량 분포를 갖는 것을 확인하였다. 분급화된 고순도 수용성 키토산은 90~95% 아주 높은 탈아세틸화도를 보였다. 순도는 1~3% 정도의 수분을 함유하고 있으며 회분의 경우 극히 미량이나 존재하지 않다는 것을 알 수 있다.

GPC-MALS를 이용하여 구한 고순도 수용성 키토산 올리고당 각각의 절대분자량과 고유점도로부터 Mark-Houwink 상수값(K, a)을 구하였다. 고순도 수용성 키토산 올리고당의 혼합용매(0.1 M 아세트산과 0.2 M NaCl)에 대한 K, a 값은 각각 4.2446×10^{-6} , 1.1754임을 계산하였다. 이 결과는 고유점도로부터 제조되어진 키토산의 분자량을 구할 수 있는 기본적인 데이터를 제공할 것이다.

고순도 수용성 키토산 올리고당은 COS10은 낮은 농도에서는 전혀 세포독성이 없었으나 농도가 증가함에 따라 세포생존율이 떨어졌으나 LD₅₀의 기준에서는 거의 무시할 만한 독성을 나타냄을 확인할 수 있었다.

본 연구를 통하여 제조되어진 고순도 수용성 키토산 올리고당은 여러 가지 분석으로부터 세포독성이 없으며, 아주 좁은 분자량 분포와 높은 순도를 갖고 있음을 확인하였으며 따라서 다양한 분자량을 가진 저분자량 수용성 키토산 올리고당을 확인할 수 있었다. 그리고 이러한 결과는 고순도 수용성 키토산 올리고당의 생체재료로 유전자 전달체뿐만 아니라 다른 양이온성 고분자와의 키토산-핵산 복합체를 통한 활용성을 높임으로써 다양한 분야로의 응용 가능성을 제시하는 결과로 기대할 수 있다.

감사의 글: 이 논문은 2012년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업임(NRF-2012R1A2A2A01014898).

참 고 문 헌

1. H. Q. Mao, K. Roy, V. L. Troung-Le, K. A. Janes, K. Y. Lin, Y. Wang, J. T. August, and K. W. Leong, *J. Control. Rel.*, **70**, 399 (2001).
2. L. I. Ilum, *Pharm. Res.*, **15**, 1326 (1998).
3. S. P. Ramnani and S. Sabharwal, *React. Funct. Polym.*, **66**, 902 (2006).
4. S. K. Cho, B. O. Jung, J. J. Kim, K. S. Choi, and Y. M. Lee, *J. Korean Ind. Eng. Chem.*, **5**, 899 (1994).
5. M. N. V. R. Kumar, R. A. A. Muzzarelli, C. Muzzarelli, H. Sahiwa, and A. J. Domb, *Chem. Rev.*, **104**, 6017 (2004).
6. P. J. Chien, F. Seu, and F. H. Yang, *J. Food Eng.*, **78**, 225 (2007).
7. F. Shahidi, J. K. V. Arachchi, and Y. J. Jeon, *Sci. Technol.*, **10**, 37 (1999).
8. J. W. Nah and M. K. Jang, *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.*, **40**, 3796 (2002).
9. S. Tokura and I. Azuma, Editors, *Chitin Derivatives in Life Science*, Japan Soc. Chitin, Sapporo, 1992.
10. I. Ikeda, M. Sugano, K. Yoshida, E. Sasaki, Y. Iwamoto, and K. Hatano, *J. Agric. Food Chem.*, **41**, 431 (1993).
11. R. A. A. Muzzarelli, C. Lough, and M. Emanuelli, *Carbohydr. Res.*, **8**, 433 (1987).
12. M. N. V. R. Kumar, *React. Funct. Polym.*, **46**, 1 (2000).
13. M. Koping-Hoggard, K. M. Varum, M. Issa, S. Danielsen, B. E. Christensen, B. T. Stokke, and P. Artursson, *Gene Therapy*, **11**, 1441 (2004).
14. M. Koping-Hoggard, Y. S. Mel'nikova, K. M. Varum, B. Lindman, and P. Artursson, *J. Gene Med.*, **5**, 130 (2003).
15. S. Son, S. Y. Chae, C. Choi, M. Y. Kim, V. G. Ngugen, M. K. Jang, J. K. Kweon, and J. W. Nah, *Macromol. Res.*, **12**, 573 (2004).
16. I. M. Van der Lubben, J. C. Verhoef, G. Borchard, and H. E. Junginger, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **52**, 139 (2001).
17. W. J. Kim, J. W. Yockman, M. Lee, J. H. Jeong, Y. H. Kim, and S. W. Kim, *J. Control. Rel.*, **106**, 224 (2005).
18. G. Y. Wu and C. H. Wu, *Biochem.*, **27**, 887 (1998).
19. G. Y. Wu, J. M. Wilson, F. Shalaby, M. Grossman, D. A. Shafritz, and C. H. Wu, *J. Biol. Chem.*, **266**, 14338 (1991).
20. G. Creusat, A. S. Rinaldi, E. Weiss, R. Elbaghdadi, J. S. Remy, R. Mulherkar, and H. Zuber, *Bioconjug. Chem.*, **21**, 994 (2010).
21. D. V. Schaffer, N. A. Fidelman, N. Dan, and D. A. Lauffenburger, *Biotechnol. Bioeng.*, **67**, 598 (2000).
22. T. A. Khan, K. K. Peh, and H. S. Ch'ng, *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.*, **5**, 205 (2002).