

## 커들란을 이용한 protein 방출속도조절

이미희, 이중헌  
조선대학교 화학공학과

## Protein release rate control with curdlan particle

Mi-Hee Lee, Jung-Heon Lee  
Department of Chemical Engineering Chosun University

**서론**

최근 화학공업이 여러 분야로 발전되면서 약물전달시스템(drug delivery system; DDS)에 관한 연구가 국내외에서 많이 진행되고 있다. 약물전달시스템은 약물이나 다른 생리활성물질을 원하는 기간동안 원하는 농도로 일정하게 투여하는 것을 의미한다. 약물전달시스템은 의약품 뿐만 아니라 화장품, 농약 및, 가정용품에도 다양하게 응용되고 있다.

약물 수송체의 개발에 있어 생분해성 천연 고분자 물질은 생분해성 합성 고분자 물질과 함께 활발한 연구대상이 되고 있다. 이 중 특히 천연 고분자 물질은 독성이 적어서 생체 적합성이 우수하고, 생분해가 가능하며, 합성 고분자 물질에 비해 경제성이 있는 장점을 가진다.

생분해성 고분자를 이용한 방출조절 시스템은 고분자 matrix 내에 가수분해나 효소분해를 받기 쉬운 결합을 가지고 있으며 약물이 particle 내에 균일하게 분포되어 있는 형태이다. 생분해성 고분자 particle은 체내에서 가수분해나 효소분해가 일어나게 되면 약물이 particle로부터 체내로 방출되어 약효를 나타내게 된다. 생분해성 고분자를 이용한 약물방출조절 시스템의 장점은 약물이 particle로부터 모두 방출되어도 체내로부터 제거하지 않아도 된다는 점이다. 또한 생분해성 고분자는 체내에서 분해되더라도 독성물질을 방출하지 않는 고분자를 선택해야 한다. 출하지 않는 고분자를 선택해야 한다.

커들란은  $\beta$ -1,3 glucan으로 연결된 단일 고분자로 *Agrobacterium* sp.에 의해 생산된다. 1962년 Harada와 그의 동료들에 의해 처음 발견된 이래로 커들란의 특이한 물성, 특히 액상에서는 가열에 의해 탄력성이 있는 비가역적인 gel을 형성하는 특징이 있기에 식품분야와 비식품 분야에서 많은 관심을 기울여 왔다. 커들란은 20종에 미치는 독성실험 결과 독성이 매우 낮고 안정성이 높은 것으로 확인되었다.

본 연구에서는 커들란의 이러한 성질을 이용하여 protein 수송체로서의 가능성을 실험하였다. 녹말 가수분해 효소인  $\alpha$ -amylase를 새로운 수송체인 커들란에 함유시키고, 효소활성을 분석하였으며 유량에 따른 고정화 효소의 활성변화를 수학적으로 분석함으로써 커들란의 방출거동을 살펴보았다.

**본론**

## 시약

본 실험에서는 효소로  $\alpha$ -amylase(E.C. 3.2.1.1 Sigma Chem. Co., USA), starch는 soluble starch(Junsei chem. co., Japan)를 사용하였으며, matrix를 제조하기 위하여 curdlan(Takeda chem. Japan)을 사용하였고 그 밖의 모든 시약들은 1급시약 등급을 사용하였다.

## $\alpha$ -Amylase의 함유(loading)

커들란 matrix는 커들란 5 %(w/v)용액을 제조한 후 공극을 크게 하기 위해 pH 10 으로 조절하여 커들란을 녹인 후 용액을 중화하여 121°C에서 10분간 가열하였다. 그 후 gel을 0.3 cm 정도로 자르고 중화반응으로 생긴 염은 증류수로 여러번 세척하고 1시간정도 보관한 후 동결건조기(SFDSM06 Samwon)를 사용하여 동결건조하였다. 효소의 loading 양은 particle g당 2 g/L의 효소액 1 ml를 흡수시켜 4°C에서 24hr동안 보관하였다.

## $\alpha$ -Amylase의 활성 측정

방출 효소의 활성은 starch-iodine method (Yoo, Hong & Hatch, 1987)에 의해 측정하였다. 기질인 수용성 녹말은 요오드 용액으로 발색시켜 UV(Shimazu UV M: UV-1201 Shimazu. Co. Japan)를 사용하여 파장 600nm에서의 흡광도 변화로부터 반응 기질량을 계산하였다.

## 방출실험 장치 및 조건

효소의 방출 변화를 검토하기 위하여 효소반응기를 사용하였다. 반응기에 효소겔을 충전시키고 기질 용액을 미량펌프로 유입속도를 5, 3, 1.1 ml/min으로 변화시키면서 반응기에 주입하였다. 반응한 물질은 일정량 채취하여 미반응 기질량을 측정하였다. 이때 사용한 반응기의 부피는 약 42 mL 였으며, 커들란 particle을 채운 후의 공극 부피는 약 8 mL 정도 였다.

## Proposed Model

효소 반응기에서의 효소방출 반응은 다음과 같은 반응 수지식에 의해 표시된다.

$$\frac{d[S]}{dt} = F \cdot S_{in} - F \cdot S_{out} - r_s \cdot V \cdot S_{out}$$

정상상태에서 효소 반응 속도식을 해석하면 시간에 따른 출구에서의 기질의 변화량이 0 이므로 residence time( $V/F=\tau$ )을 고려하면 효소 반응 속도에 따른 기질의 농도 변화를 구할 수 있다.

$$\frac{S_{in} - S_{out}}{\tau} = r_s \cdot S_{out}$$

그리고  $r_s = \frac{V_m \cdot S}{K_m + S}$  이고, 여기서 particle의 효소방출을 시간의 함수로 나타내었다.

$$V_m = k_2[E_0] = k_2[E_0]e^{-k_3 t}$$

이므로 대입하면 다음과 같은 식으로 표현된다.

$$\frac{S_{in} - S_{out}}{\tau} = \frac{k_2[E_0]e^{-k_3 t} \cdot S_{out}}{K_m + S_{out}}$$

여기서  $K_2[E_0]$ 를  $V_{m_0}$  로 놓고,  $V_{m_0}e^{-k_3t}$  는 시간의 함수이므로  $V_m(t)$ 라고 놓으면,

$$\frac{S_{in} - S_{out}}{\tau} = \frac{V_m(t)S_{out}}{K_m + S_{out}}$$

역수를 취하면 다음과 같이 표현된다.

$$\frac{\tau \cdot S_{out}}{S_{in} - S_{out}} = \frac{K_m}{V_m(t)} + \frac{S_{out}}{V_m(t)}$$

**결론**

Flow rate에 변화를 주며 방출되지 않은 효소의 양을 측정하였다. Figure 1.은 flow rate은 1.1 ml/min 으로  $\tau$ 는 7.81 min일 때  $\tau$ 에 따른 효소활성의 변화를 나타낸 그래프이다.  $K_m$ 값의 오차를 고려하여 0.01, 0.1 그리고 0.5라 가정하여 계산하였다. 그래프를 보면  $\tau$ 값에 관계없이  $K_m$ 값이 작을수록 효소 방출 속도가 느려짐을 알 수 있다.

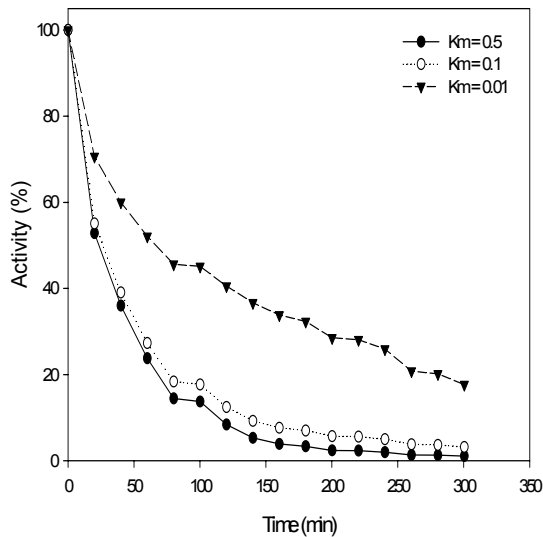


Figure 1. Change of enzyme activity estimated with starch degradation rate when  $\tau = 7.81$ .

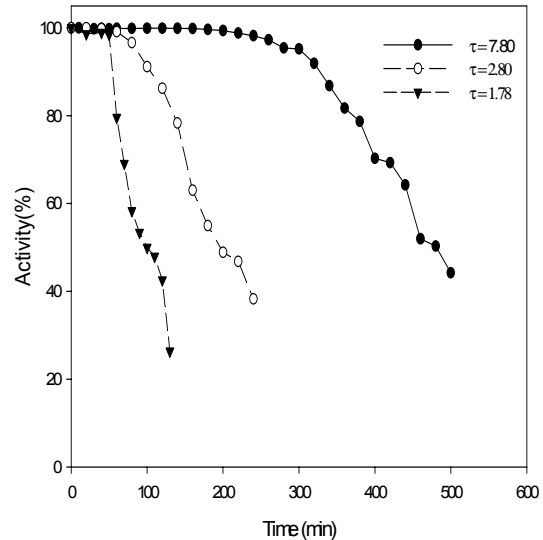


Figure 2. Effect of  $\tau$  on protein activity. With the increase of flow rate, the protein release rate increase.

Figure 2.는  $\tau$ 에 따른 효소의 활성을 나타낸 그래프이다. Flow rate에 따라 효소의 방출속도가 많이 달라짐을 알 수 있다. 고정화 효소의 활성도가 50% 남아있는 시간도 약 1시간에서 8시간까지 다르게 나타났다.

또한  $\tau$ 가 작을수록 효소의 방출 속도가 느려짐을 알 수 있는데 이는 효소의 방출 현상이 기질의 흐름에 의한 외부의 물질 전달 속도의 증가에 의한 것이며 외부의 물질 전달 속도 증가에 의해 입자 내부의 효소의 확산속도가 증가하여 효소가 외부로 방출되는 속도가 증가한다.

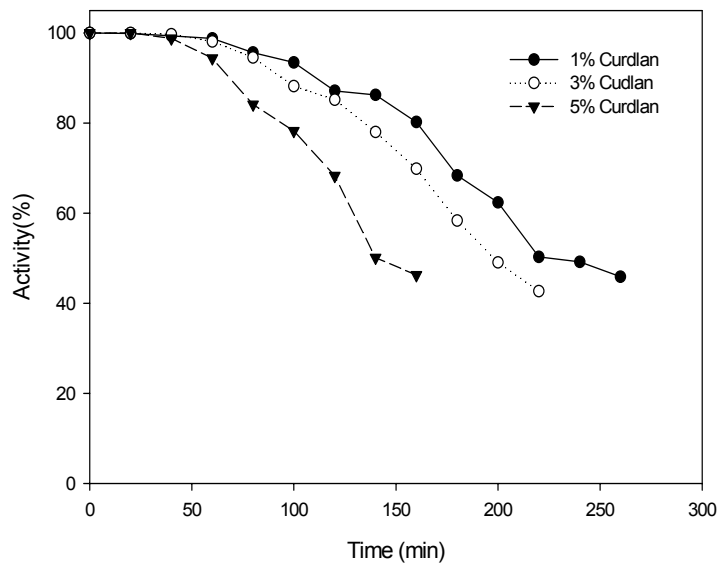


Figure 3. Effect of curdlan concentration on diffusion protein release

Figure 3.는 커들란의 농도에 따른 효소방출 특성을 살펴본 것이다. 이때 flow rate은 3 ml/min 으로  $\tau = 5$  min 이며, 커들란의 농도는 각각 1, 3, 5% 이다. 실험결과 커들란의 농도가 높아질수록 많은 방출량 및 높은 방출속도가 보이고 있다. 이는 커들란 gel이 농도가 높을수록 internal pore가 더 커서 효소의 방출속도가 더 크기 때문이다.

이러한 실험을 통하여 커들란은 생분해의 특성으로 좋은 생체적합성을 가지므로 커들란의 농도를 조절하여 약물방출 속도를 조절하면 생물학적 반감기가 짧은 약물을 투여하는 경우에 이용할 수 있으며, 생체내 약물전달시스템으로의 응용이 가능할 것으로 기대된다.

#### 참고문헌

1. H. Y. Park, J. Y. Yoon, and C. L. Choi, "Drug delivery system using functional microspheres"(1995), *Theories and applications of Chem. Eng.*, 1, 97-100
2. H. Y. Park, C. L. Lim and W. S. Kim, "Drug delivery system using polysaccharide tablet"(1995), *Theories and applications of Chem. Eng.*, 1, 65-68
3. H. Y. Park, B. C. Lee and W. S. Kim, "Drug delivery system using alginate beads"(1997), *J. of the Korean Institute of Chem. Eng.* 35, 264-269
4. S. H. Seo, K. S. Kim and D. H. Kim, "Development of drug delivery system by solid dispersed system of polysaccharides"(1994), *Bull. K. H. Pharma. Sci.*, 22, 1-18