



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0162725
(43) 공개일자 2024년11월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C08B 37/08 (2006.01) A61K 31/722 (2006.01)
A61K 35/612 (2015.01) A61P 35/00 (2006.01)
C08B 37/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C08B 37/003 (2013.01)
A61K 31/722 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2023-0059679

(22) 출원일자 2023년05월09일

심사청구일자 2023년05월09일

(71) 출원인

국립부경대학교 산학협력단

부산광역시 남구 용소로 45, 부경대학교내 (대연동)

(72) 발명자

전병수

부산 해운대구 반여로 67

박진석

부산 사하구 사하로 183

(74) 대리인

김종석

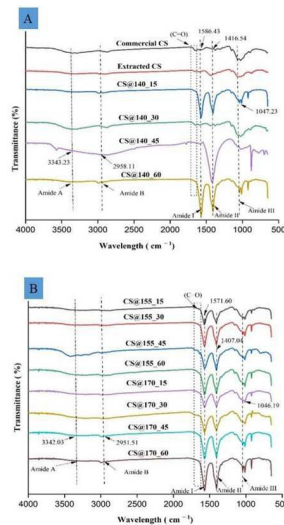
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 아임계 수 가수분해를 이용한 갑각류 유래 올리고키토산의 제조방법, 이를 이용하여 제조된 올리고키토산 및 올리고키토산을 포함하는 약학적 조성물

(57) 요약

본 발명은 아임계 수 가수분해를 이용한 갑각류 유래 올리고키토산의 제조방법, 이를 이용하여 제조된 올리고키토산 및 이를 이용한 암 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따라 제조된 올리고키토산은 아임계 수 처리를 통해 화학 물질을 사용하지 않고 키토산으로 개질하여 수용성인 것을 특징으로 한다. 또한 본 발명의 올리고키토산은 항암 효과를 가져서 암 치료용 약학적 조성물로 활용될 수 있다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

A61K 35/612 (2013.01)

A61P 35/00 (2018.01)

C08B 37/0003 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1525013845
과제번호	201803932
부처명	해양수산부
과제관리(전문)기관명	해양수산과학기술진흥원
연구사업명	수산전문인력양성
연구과제명	미래수산식품 연구센터
기 여 율	1/1
과제수행기관명	부경대학교산학협력단
연구기간	2023.01.01 ~ 2023.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

갑각류의 껍질을 분말화하는 단계;

상기 갑각류 껍질의 분말을 이용하여 키틴 분말을 제조하는 단계;

상기 키틴 분말에서 키토산을 추출하여 키토산 분말을 제조하는 단계;

상기 키토산 분말을 증류수와 혼합하는 단계; 및

상기 혼합물을 아임계 수를 처리하여 가수분해하는 단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는 아임계 수 가수분해를 이용한 올리고키토산의 제조방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 가수분해하는 단계는

40 내지 60 bar 압력에서 130 내지 180℃의 온도로 5 내지 70분 동안 아임계 수를 처리하여 가수분해하는 것을 특징으로 하는 아임계 수 가수분해를 이용한 올리고키토산의 제조방법.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 따른 방법으로 제조된 올리고키토산.

청구항 4

올리고키토산을 유효성분으로 포함하는 암 치료용 약학적 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 올리고키토산은

갑각류 껍질을 이용하여 제조된 것을 특징으로 하는 암 치료용 약학적 조성물.

청구항 6

제4항에 있어서,

상기 올리고키토산은

40 내지 60 bar 압력에서 130 내지 180℃의 온도로 5 내지 70분 동안 아임계 수를 처리하여 가수분해하는 것을 특징으로 하는 암 치료용 약학적 조성물.

청구항 7

제4항에 있어서,

상기 올리고키토산은

XRD 피크가 $2\theta = 8.0^\circ$ 내지 9.5° 에서 관찰되는 것을 특징으로 하는 암 치료용 약학적 조성물.

청구항 8

제4항에 있어서,

상기 올리고키토산은

분자량이 7,500 내지 45,000 Da/g.mol⁻¹인 것을 특징으로 하는 암 치료용 약학적 조성물.

청구항 9

제4항에 있어서,

상기 암은

췌장암인 것을 특징으로 하는 암 치료용 약학적 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 아임계 수 가수분해를 이용한 갑각류 유래 올리고키토산의 제조방법, 이를 이용하여 제조된 올리고키토산 및 올리고키토산을 포함하는 암 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 해산물 산업은 매년 약 10^6 톤의 폐기물을 발생시키며, 대부분은 가축 사료 및 거름과 같은 폐기물로 가공되거나 외부에 버려진다. 그러나 조개 껍질에는 다양한 식품 산업에 사용될 수 있는 다당류가 있다. 그 중 키틴과 키토산은 일반적으로 새우 껍질과 같은 어패류 부산물로부터 추출되는데, 이러한 키틴은 1,4-poly-N-acetyl-D-glucosamine으로 구성된 바이오매스이다. 키틴의 생산량은 매년 1,000억 톤이 넘는 것으로 추정되며, 2019년 전 세계적으로 생산되는 키틴의 양은 약 68억 달러로 폭 넓은 활용 가능성을 보여준다. 이는 2027년까지 키토산으로부터 얻는 수익이 약 24.7% 증가할 것으로 다양한 산업분야에 이용될 것으로 예상된다.

[0004] 키토산(poly-β-1,4-2-amino-2-deoksi-β-D-glukopiranoz)은 D-글루코사민과 N-아세틸글루코사민으로 이루어진 선형 다당류로, 키틴을 탈아세틸화함으로써 만들어진다. 키토산은 생분해성, 생체적합성, 무독성, 상처치유능력 및 지혈작용 등으로 인해 다양한 응용이 가능하면서 재사용이 가능한 바이오폴리머로 여겨져 왔고, 주로 식품, 의약품 제조, 치료 및 의약품을 위한 하이드로겔, 필름, 섬유 및 포장재 등에 사용되어 왔다.

[0005] 하지만 키토산은 수용성이 아니기 때문에 바이오폴리머로서 응용하기 어려운 단점이 있다. 상기 키토산을 수용성으로 만들기 위해 다양한 방법의 키토산 개질 방법이 개발되었다.

[0006] 그 중 무기산, 오존(O₃), 아질산나트륨(NaNO₂) 또는 과산화수소(H₂O₂)로 처리하여 화학적으로 키토산을 개질하는 방법이 있지만, 이러한 화학적 방식은 반응에 대한 제어력 상실, 당 함량 침입 가능성, 말단이 감소하는 불순물 및 변색과 같은 단점이 있으며, 높은 온도와 압력이 필요하므로 공정에 에너지와 시간이 많이 소요된다.

[0007] 따라서 키토산을 개질하는 방법에 있어서, 화학 물질을 최소로 사용하는 것이 중요하다.

선행기술문헌**특허문헌**

[0009] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허공보 제10-2477438호

발명의 내용**해결하려는 과제**

- [0010] 본 발명의 목적은 아임계 수 처리를 통해 화학 물질을 사용하지 않고 키토산을 수용성으로 개질할 수 있는 올리고키토산의 제조방법을 제공하는 것이다.
- [0011] 본 발명의 목적은 아임계 수 처리를 통해 화학 물질을 사용하지 않고 키토산을 수용성으로 개질한 올리고키토산을 제공하는 것이다.
- [0012] 본 발명의 다른 목적은 올리고키토산을 유효성분으로 포함하는 암 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [0013] 발명이 이루고자 하는 기술적 과제들은 이상에서 언급한 기술적 과제들로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 기술적 과제들은 본 발명의 기재로부터 당해 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있다.

과제의 해결 수단

- [0015] 본 발명은 갑각류의 껍질을 분말화하는 단계; 상기 갑각류 껍질의 분말을 이용하여 키틴 분말을 제조하는 단계; 상기 키틴 분말에서 키토산을 추출하여 키토산 분말을 제조하는 단계; 상기 키토산 분말을 증류수와 혼합하는 단계; 및 상기 혼합물을 아임계 수를 처리하여 가수분해하는 단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는 아임계 수 가수분해를 이용한 올리고키토산의 제조방법을 제공한다.
- [0016] 본 발명에 있어서, 상기 가수분해하는 단계는 40 내지 60 bar 압력에서 130 내지 180℃의 온도로 5 내지 70분 동안 아임계 수를 처리하여 가수분해하는 것을 특징으로 한다.
- [0017] 본 발명은 본 발명에 따른 방법으로 제조된 올리고키토산을 제공한다.
- [0018] 본 발명은 올리고키토산을 유효성분으로 포함하는 암 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0019] 본 발명에 있어서, 상기 올리고키토산은 갑각류 껍질을 이용하여 제조된 것을 특징으로 한다.
- [0020] 본 발명에 있어서, 상기 올리고키토산은 40 내지 60 bar 압력에서 130 내지 180℃의 온도로 5 내지 70분 동안 아임계 수를 처리하여 가수분해하는 것을 특징으로 한다.
- [0021] 본 발명에 있어서, 상기 올리고키토산은 XRD 피크가 $2\theta = 8.0^\circ$ 내지 9.5° 에서 관찰되는 것을 특징으로 한다.
- [0022] 본 발명에 있어서, 상기 올리고키토산은 분자량이 7,500 내지 45,000 Da/g.mol⁻¹인 것을 특징으로 한다.
- [0023] 본 발명에 있어서, 상기 암은 췌장암인 것을 특징으로 한다.

발명의 효과

- [0025] 본 발명에 따른 올리고키토산의 제조방법은 아임계 수 처리를 통해 화학 물질을 사용하지 않고 키토산을 수용성으로 개질할 수 있다.
- [0026] 본 발명은 본 발명에 따른 방법으로 제조된 올리고키토산을 제공할 수 있다.
- [0027] 본 발명은 올리고키토산을 유효성분으로 포함하는 암 치료용 약학적 조성물을 제공할 수 있다.
- [0028] 본 발명의 효과들은 이상에서 언급한 효과들로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 효과들은 청구범위의

기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0030] 도 1은 본 발명에서 사용한 아임계 수 처리 기계의 모식도이다.
- 도 2는 다양한 조건으로 아임계 수 추출한 올리고키토산의 FT-IR spectra를 나타낸 그래프이다.
- 도 3은 다양한 조건으로 아임계 수 추출한 올리고키토산의 XRD spectra를 나타낸 그래프이다.
- 도 4는 다양한 조건으로 아임계 수 추출한 올리고키토산의 항산화능을 나타낸 DPPH assay 결과 그래프이다.
- 도 5는 다양한 조건으로 아임계 수 추출한 올리고키토산의 항산화능을 나타낸 ABTS assay 결과 그래프이다.
- 도 6은 다양한 조건으로 아임계 수 추출한 올리고키토산의 세포독성 결과를 체장암 세포주에서 확인한 결과이다.
- 도 7은 다양한 조건으로 아임계 수 추출한 올리고키토산의 체장암 세포주 막 분해 효과를 나타낸 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0031] 본 명세서에서 사용되는 용어는 본 발명에서의 기능을 고려하면서 가능한 현재 널리 사용되는 일반적인 용어들을 선택하였으나, 이는 당 분야에 종사하는 기술자의 의도 또는 판례, 새로운 기술의 출현 등에 따라 달라질 수 있다. 또한, 특정한 경우는 출원인이 임의로 선정한 용어도 있으며, 이 경우 해당되는 발명의 설명 부분에서 상세히 그 의미를 기재할 것이다. 따라서 본 발명에서 사용되는 용어는 단순한 용어의 명칭이 아닌, 그 용어가 가지는 의미와 본 발명의 전반에 걸친 내용을 토대로 정의되어야 한다.
- [0032] 다르게 정의되지 않는 한, 기술적이거나 과학적인 용어를 포함해서 여기서 사용되는 모든 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가지고 있다. 일반적으로 사용되는 사전에 정의되어 있는 것과 같은 용어들은 관련 기술의 문맥상 가지는 의미와 일치하는 의미를 가지는 것으로 해석되어야 하며, 본 출원에서 명백하게 정의하지 않는 한, 이상적이거나 과도하게 형식적인 의미로 해석되지 않는다.
- [0033] 수치 범위는 상기 범위에 정의된 수치를 포함한다. 본 명세서에 걸쳐 주어진 모든 최대의 수치 제한은 낮은 수치 제한이 명확히 쓰여져 있는 것처럼 모든 더 낮은 수치 제한을 포함한다. 본 명세서에 걸쳐 주어진 모든 최소의 수치 제한은 더 높은 수치 제한이 명확히 쓰여져 있는 것처럼 모든 더 높은 수치 제한을 포함한다. 본 명세서에 걸쳐 주어진 모든 수치 제한은 더 좁은 수치 제한이 명확히 쓰여져 있는 것처럼, 더 넓은 수치 범위 내의 더 좋은 모든 수치 범위를 포함할 것이다.
- [0035] 이하, 본 발명에 대해 상세히 설명한다.

[0037] 아임계 수 가수분해를 이용한 올리고키토산의 제조방법

- [0038] 본 발명은 아임계 수 가수분해를 이용한 올리고키토산의 제조방법을 제공한다.
- [0039] 상기 아임계 수 가수분해를 이용한 올리고키토산의 제조방법은 갑각류의 껍질을 분말화하는 단계; 상기 갑각류 껍질의 분말을 이용하여 키틴 분말을 제조하는 단계; 상기 키틴 분말에서 키토산을 추출하여 키토산 분말을 제조하는 단계; 상기 키토산 분말을 증류수와 혼합하는 단계; 및 상기 혼합물을 아임계 수를 처리하여 가수분해하는 단계;를 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0040] 상기 갑각류의 껍질을 분말화하는 단계;는 갑각류의 껍질을 분말화하여 갑각류 껍질 분말을 제조하는 단계로, 갑각류의 껍질을 사용할 수 있으며, 바람직하게는 새우 껍질을 사용할 수 있고, 더욱 바람직하게는 홍다리얼룩새우(Penaeus monodon)의 껍질을 사용할 수 있다. 보다 구체적으로는 갑각류, 새우 또는 홍다리얼룩새우의 껍질을 증류수로 세척하고 열풍 오븐으로 40 내지 80℃에서 건조한 뒤, 상기 건조한 껍질을 분쇄하여 710 μm 이하로 체질하여 갑각류, 새우 또는 홍다리얼룩새우의 껍질 분말을 제조할 수 있다.

- [0041] 상기 갑각류 껍질의 분말을 이용하여 키틴 분말을 제조하는 단계;는 상기 갑각류, 새우 또는 홍다리얼룩새우 껍질의 분말을 이용하여 키틴 분말을 제조하는 단계로, 상기에서 기술한 바와 같이 제조한 갑각류, 새우 또는 홍다리얼룩새우의 껍질 분말을 탈염하기 위해 4 내지 8 %(w/v) HCl와 혼합하고 40 내지 80℃에서 교반할 수 있다. 상기 교반물을 원심분리하고, 상기 원심분리하여 얻은 상층액의 pH가 중성이 될 때 까지 증류수로 세척할 수 있으며, 상기 세척한 상층액을 5 내지 15%(w/v) NaOH와 혼합하고 80 내지 100℃에서 3시간 동안 방치하여 단백질을 제거하고, pH가 중성이 될 때까지 증류수로 반복하여 세척할 수 있다. 상기 세척물을 열풍 오븐에서 25 내지 45℃로 건조하여 키틴 분말을 제조할 수 있다.
- [0042] 상기 키틴 분말에서 키토산을 추출하여 키토산 분말을 제조하는 단계;는 상기에서 기술한 바와 같이 제조한 키틴 분말에서 키토산을 추출하여 키토산 분말을 제조하는 단계로, 보다 구체적으로는 상기 키틴 분말을 50 내지 70%(w/v) NaOH와 혼합하고, 80 내지 100℃에서 50 내지 70분 동안 교반할 수 있으며, 상기 교반물의 pH가 중성이 될 때까지 증류수로 세척하고, 열풍 오븐에서 25 내지 45℃로 건조하여 키토산 분말을 제조할 수 있다.
- [0043] 상기 키토산 분말을 증류수와 혼합하는 단계;는 상기 키토산에 아임계 수를 처리하기 위해 증류수에 혼합하는 단계로, 보다 구체적으로는 상기 키토산 분말을 증류수에 60 내지 70 %(w/v)로 혼합할 수 있다.
- [0044] 상기 혼합물을 아임계 수를 처리하여 가수분해하는 단계;는 상기 키토산 분말을 증류수에 혼합한 혼합물을 아임계 수 처리하여 올리고키토산을 제조하는 단계이다. 보다 구체적으로 상기 아임계 수를 처리하여 가수분해하는 방법은 40 내지 60 bar 압력에서 130 내지 180℃의 온도로 5 내지 70분 동안 아임계 수를 처리하여 가수분해할 수 있으며, 바람직하게는 150 내지 180℃의 온도로 5 내지 30분 동안 아임계 수를 처리하여 가수분해할 수 있고, 더욱 바람직하게는 160 내지 180℃의 온도로 10 내지 20분 동안 아임계 수를 처리하여 가수분해할 수 있다.
- [0045] 또한, 상기 아임계 수 처리가 끝난 가수분해물은 순환 냉수로 급속 냉각할 수 있다.
- [0047] **아임계 수 가수분해를 이용하여 제조된 올리고키토산**
- [0048] 본 발명은 아임계 수 가수분해를 이용하여 제조된 올리고키토산을 제공한다.
- [0049] 상기 올리고키토산은 상기에서 기술한 아임계 수 가수분해를 이용한 올리고키토산의 제조방법에 따라 제조될 수 있다.
- [0050] 상기 아임계 수 가수분해는 40 내지 60 bar 압력에서 130 내지 180℃의 온도로 5 내지 70분 동안 아임계 수를 처리하여 가수분해할 수 있으며, 바람직하게는 150 내지 180℃의 온도로 5 내지 30분 동안 아임계 수를 처리하여 가수분해할 수 있고, 더욱 바람직하게는 160 내지 180℃의 온도로 10 내지 20분 동안 아임계 수를 처리하여 가수분해할 수 있다.
- [0051] 상기 아임계 수 가수분해를 이용하여 제조된 올리고키토산은 XRD 피크가 $2\theta = 8.0^\circ$ 내지 9.5° 에서 관찰되는 것을 특징으로 할 수 있으며, 바람직하게는 XRD 피크가 $2\theta = 8.5^\circ$ 내지 9.0° 에서 관찰되는 것을 특징으로 할 수 있고, 더욱 바람직하게는 XRD 피크가 $2\theta = 8.76^\circ$ 에서 관찰되는 것을 특징으로 할 수 있다. 상기 올리고키토산은 분자량이 6,000 내지 2,000,000 Da/g.mol⁻¹인 것을 특징으로 할 수 있으며, 바람직하게는 분자량이 7,500 내지 45,000 Da/g.mol⁻¹인 것을 특징으로 할 수 있고, 더욱 바람직하게는 10,000 내지 40,000 Da/g.mol⁻¹인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0052] 상기 올리고키토산은 환원당이 1.0 내지 2.0 g/L만큼 포함하는 것을 특징으로 할 수 있으며, 바람직하게는 1.2 내지 1.6 g/L만큼 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0053] 상기 올리고키토산은 탈아세틸화가 60 내지 100%인 것을 특징으로 할 수 있으며, 바람직하게는 80 내지 95%인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0054] 상기 올리고키토산은 냉수에 대한 용해도(Cold water solubility, CWS)가 15 내지 70%인 것을 특징으로 할 수 있으며, 바람직하게는 40 내지 70%인 것을 특징으로 할 수 있고, 더욱 바람직하게는 55 내지 70%인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0055] 상기 올리고키토산은 보수력(Water retention capacity, WRC)가 10 내지 40%인 것을 특징으로 할 수 있으며, 바람직하게는 22 내지 40%인 것을 특징으로 할 수 있고, 더욱 바람직하게는 25 내지 35%인 것을 특징으로 할 수

있다.

[0056] 또한 상기 암 치료용 약학적 조성물에 포함되는 “올리고키토산”은 *Escherichia coli* [ATCC 25922] 및 *Salmonella enterica* [ATCC 19585]를 포함하는 그람 음성 박테리아에 대해 항균 활성을 가지는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0058] **올리고키토산을 포함하는 암 치료용 약학적 조성물**

[0059] 본 발명은 올리고키토산을 유효성분으로 포함하는 암 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0060] 상기 암 치료용 약학적 조성물에 포함되는 “올리고키토산”은 40 내지 60 bar 압력에서 130 내지 180℃의 온도로 5 내지 70분 동안 아임계 수를 처리하여 가수분해하여 제조될 수 있으며, 바람직하게는 40 내지 60 bar 압력에서 150 내지 180℃의 온도로 5 내지 30분 동안 아임계 수를 처리하여 가수분해하여 제조될 수 있고, 더욱 바람직하게는 40 내지 60 bar 압력에서 160 내지 180℃의 온도로 10 내지 20분 동안 아임계 수를 처리하여 가수분해하여 제조될 수 있다.

[0061] 상기 암 치료용 약학적 조성물에 포함되는 “올리고키토산”은 XRD 피크가 $2\theta = 8.0^\circ$ 내지 9.5° 에서 관찰되는 것을 특징으로 할 수 있으며, 바람직하게는 XRD 피크가 $2\theta = 8.5^\circ$ 내지 9.0° 에서 관찰되는 것을 특징으로 할 수 있고, 더욱 바람직하게는 XRD 피크가 $2\theta = 8.76^\circ$ 에서 관찰되는 것을 특징으로 할 수 있다. 상기 올리고키토산은 분자량이 6,000 내지 2,000,000 Da/g.mol⁻¹인 것을 특징으로 할 수 있으며, 바람직하게는 분자량이 7,500 내지 45,000 Da/g.mol⁻¹인 것을 특징으로 할 수 있고, 더욱 바람직하게는 10,000 내지 40,000 Da/g.mol⁻¹인 것을 특징으로 할 수 있다.

[0062] 상기 올리고키토산은 환원당이 1.0 내지 2.0 g/L만큼 포함하는 것을 특징으로 할 수 있으며, 바람직하게는 1.2 내지 1.6 g/L만큼 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0063] 상기 올리고키토산은 탈아세틸화가 60 내지 100%인 것을 특징으로 할 수 있으며, 바람직하게는 80 내지 95%인 것을 특징으로 할 수 있다.

[0064] 상기 올리고키토산은 냉수에 대한 용해도(Cold water solubility, CWS)가 15 내지 70%인 것을 특징으로 할 수 있으며, 바람직하게는 40 내지 70%인 것을 특징으로 할 수 있고, 더욱 바람직하게는 55 내지 70%인 것을 특징으로 할 수 있다.

[0065] 상기 올리고키토산은 보수력(Water retention capacity, WRC)가 10 내지 40%인 것을 특징으로 할 수 있으며, 바람직하게는 22 내지 40%인 것을 특징으로 할 수 있고, 더욱 바람직하게는 25 내지 35%인 것을 특징으로 할 수 있다.

[0066] 또한 상기 암 치료용 약학적 조성물에 포함되는 “올리고키토산”은 *Escherichia coli* [ATCC 25922] 및 *Salmonella enterica* [ATCC 19585]를 포함하는 그람 음성 박테리아에 대해 항균 활성을 가지는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0068] 상기 암 치료용 약학적 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체를 더 포함할 수 있으며, 상기 약학적으로 허용 가능한 담체란 생물체를 자극하지 않으면서, 주입되는 화합물의 생물학적 활성 및 특성을 저해하지 않는 담체 또는 희석제를 의미할 수 있다. 본 발명에 사용 가능한 상기 담체의 종류는 특별히 제한되지 아니하며 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용되고 약학적으로 허용되는 담체라면 어느 것이든 사용할 수 있다.

[0069] 상기 담체의 비제한적인 예로는, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사 용액, 텍스트로즈 용액, 말토 텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 등을 들 수 있다. 이들은 단독으로 사용되거나 2종 이상을 혼합하여 사용될 수 있다. 상기 담체는 비자연적 담체(non-naturally occurring carrier)를 포함할 수 있다. 또한, 필요한 경우 향산화제, 완충액 및/또는 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가하여 사용할 수 있으며, 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제, 윤활제 등을 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제 등으로 제제화하여 사용할 수 있다.

[0070] 상기 암 치료용 약학적 조성물에 있어서, 상기 “암”은 암의 종류에 제한없이 포함되나, 상기 암의 비제한적인

예시로는 식도암, 위암, 대장암, 직장암, 구강암, 인두암, 후두암, 폐암, 결장암, 유방암, 자궁경부암, 자궁내막암, 난소암, 전립선암, 고환암, 방광암, 신장암, 간암, 췌장암, 골암, 결합 조직암, 피부암, 뇌암, 갑상선암 등이 있을 수 있으며, 바람직하게는 췌장암일 수 있다.

[0072] 이하, 본 발명의 실시예를 상세히 기술하나, 하기 실시예에 의해 본 발명이 한정되지 아니함은 자명하다.

[0074] 실시예 1. 아임계 수 가수분해를 이용한 올리고키토산의 제조

[0076] 1-1. 새우 껍질 준비

[0077] 새우는 홍다리얼룩새우(Penaeus monodon)을 사용하였으며, 상기 새우 껍질은 M.U. Sea Foods Ltd(Jashore, Bangladesh)에서 얻었다. 상기 새우 껍질을 증류수로 세척하고 열풍 오븐(PFC-PO-91, 대한민국)으로 60℃에서 건조시켰다. 상기 건조한 새우 껍질은 전기 혼합기를 사용하여 분쇄하고 710 μm 이하로 체질하였다.

[0079] 1-2. 키틴 추출

[0080] 상기 실시예 1-1에서 준비한 새우 껍질 분말을 탈염하기 위해 6%(w/v) HCl와 혼합하고 60℃에서 60분 동안 300rpm에서 교반하였다. 상기 교반물을 4000 rpm으로 원심분리하고, 상층액의 pH가 중성이 될 때 까지 증류수로 세척하였다. 상기 세척한 상층액을 10%(w/v) NaOH와 혼합하고 90℃에서 3시간 동안 방치하여 단백질을 제거하고, pH가 중성이 될 때까지 증류수로 반복하여 세척하였다. 상기 세척물을 열풍 오븐에서 35℃로 건조하여 키틴 분말을 얻었다.

[0082] 1-3. 키토산 추출

[0083] 상기 실시예 1-2에서 제조한 키틴 분말을 이용하여 키토산을 추출하였다. 상기 실시예 1-2에서 제조한 키틴을 60%(w/v) NaOH와 혼합하고, 90℃에서 300rpm으로 60분 동안 교반하였다. 상기 교반물의 pH가 중성이 될 때까지 증류수로 세척하고, 열풍 오븐에서 35℃로 건조하여 키토산 분말을 얻었다.

[0085] 1-4. 아임계 수 가수분해를 이용한 올리고키토산의 제조

[0086] 상기 실시예 1-3에서 제조한 키토산에 아임계 수를 처리하여 가수분해한 올리고키토산을 제조하기 위해 실시예 1-4를 실시하였다. 상기 실시예 1-3에서 제조한 키토산 1g에 증류수 150 mL를 혼합하고, 상기 혼합물을 반응기에 로딩하였다. 상기 반응기의 반응 온도는 140℃, 155℃ 또는 170℃로 설정하였으며, 반응 시간은 15, 30, 45 또는 60분으로 설정하였다. 상기 반응기 온도가 설정한 온도에 도달하면 반응 시간을 카운트하였다. 상기 반응기의 내부 압력은 50 bar로 유지하였으며, 온도와 압력은 각각 온도계와 압력계를 이용하여 연속적으로 측정하였다. 상기 반응기에서 설정한 시간이 끝나면 추가 열화를 방지하기 위해 반응물을 순환 냉수로 급속 냉각시켰다. 이와 같은 방법으로 아임계 수 가수분해를 이용하여 올리고키토산을 제조하였다. 상기 실시예 1-4에서 상기 반응기는 온도 조절기가 장착된 Hastelloy 반응기를 사용하였으며, 상기 반응기를 나타낸 모식도를 도 1에 나타내었다.

[0088] 실험예 1. 올리고키토산의 FTIR 분석

[0089] 상기 실시예 1에서 제조한 올리고키토산의 유효한 구조 변경과 작용기의 이동을 검증하기 위해 FTIR analysis를 실시하였다. 상기 실험예 1에서는 상업용 키토산(Sigma Aldrich), 상기 실시예 1-3에서 추출한 키토산 및 상기 실시예 1-4에서 제조한 올리고키토산의 FTIR을 비교하였다. 상기 FTIR 분석은 DTGS 검출기(Perkin Elmer, USA)와 KBr 펠릿을 사용하여 수행하였으며 파장은 400 내지 4000 cm^{-1} 범위에서 수행하였다.

[0090] 본 실험예 1에서 871, 1060, 1571 및 3433 cm^{-1} 의 주요 피크는 각각 피라노스 고리(pyranose ring), 글루코사이드

드(glucoside), 아미노 그룹 및 수산기인 주요 기능 그룹을 의미한다. 따라서 상기 주요 기능 그룹은 아임계 수 처리를 통한 가수분해 이후에도 남아 있었고 1차 다당류 사슬 구조는 아임계 수 가수분해동안 그대로 유지되었다. 또한 카르보닐 그룹은 아마이드 I 밴드가 1586.43 cm^{-1} 에서 1571.60 cm^{-1} 의 파장인 더 낮은 파장으로 이동했기 때문에 더 강한 수소 결합을 형성할 가능성이 더 크다. 그러나 1337 cm^{-1} 내지 1485 cm^{-1} 영역에서 다른 밴드도 나타났다, 이에 상응하는 대칭 및 비대칭 굽힘 진동은 1415 cm^{-1} 에서 역으로 보고되었다.

[0091] 본 실험예 1의 결과, 상기 실시예 1-4에서 제조한 올리고키토산은 상업용 키토산(Sigma Aldrich)과 상기 실시예 1-3에서 추출한 키토산에 비해 FTIR 스펙트럼이 극적으로 변하지 않았음을 확인하였다(도 2). 이는 아임계 수 처리를 통한 가수분해는 키토산의 화학 구조를 변화시키지 않음을 의미한다.

[0093] 실험예 2. 올리고키토산의 결정화도 비교

[0094] 상기 실시예 1-3에서 추출한 키토산, 상기 실시예 1-4와 동일한 방법으로 155°C 에서 45분 또는 60분 동안 아임계 수 가수분해한 올리고키토산 및 170°C 에서 15분 또는 30분 동안 아임계 수 가수분해한 올리고키토산의 결정화도를 비교하기 위해 XRD analysis를 실시하였다.

[0095] 상기 실험예 2에서 XRD analysis는 Bruker D8-Advance diffractometer(Bruker, Germany)를 사용하여 측정하였다. 상기 실험예 2의 XRD analysis는 샘플을 600°C 까지 $10^{\circ}/\text{분}$ 으로 연속 가열하면서 건조하였으며, XRD는 0.25° 의 단계 크기 및 5초/단계로 5° - 55° 의 각도 2θ 스캔 범위에서 기록되었다.

[0096] 본 실험예 2의 결과, 상기 실시예 1-3에서 추출한 키토산의 XRD 패턴은 $2\theta=10.4^{\circ}$ 및 19.8° 에서 특징적인 피크를 나타냈으며, 이는 이전에 알려진 키토산의 패턴과 일치한다(Li et al., 2005). 상기 실시예 1-3에서 추출한 키토산과 비교하여 155°C 에서 45분과 60분, 170°C 에서 15분 동안 아임계 수 처리한 올리고키토산은 $2\theta = 8.76^{\circ}$, 11.05° 및 22.24° 에서 뚜렷한 피크를 보였다(도 3).

[0098] 실험예 3. 올리고키토산의 항산화능

[0100] 3-1. DPPH assay

[0101] 상기 실시예 1-4에서 제조한 올리고키토산의 항산화능을 평가하기 위해 실험예 3-1에서 DPPH assay를 실시하였다. 0.1 mM DPPH 용액을 HPLC 등급 메탄올로 희석하고, 상기 희석한 용액 2.9 mL 를 5 mg/mL 용액에서 얻은 $100\text{ }\mu\text{L}$ 의 CH와 혼합하였다. 상기 혼합물을 어두운 조건에서 30분 동안 방치하였고, 대조군(메탄올과 혼합된 아스코르브산 $300\text{ }\mu\text{g/mL}$) 및 블랭크에 대해 517 nm 에서 흡광도를 측정하였다. 상기 측정한 흡광도를 하기 식 1로 계산하여 DPPH 라디칼 소거능을 측정하였다.

[0103] [식 1]

$$\text{DPPH radical scavenging activity (\%)} = \left[1 - \left(\frac{As - Ab}{Ac} \right) \right] \times 100$$

[0104]

[0105] (여기서 As는 시료의 흡광도를 나타내며, Ac는 대조군의 흡광도를 나타내고, Ab는 메탄올과 혼합된 올리고키토산의 흡광도를 나타낸다.)

[0107] 본 실험예 3-1의 결과, 상기 실시예 1-3에서 추출한 키토산과 비교하여 온도와 시간이 각각 증가함에 따라 DPPH 소거능 활성이 크게 증가했음을 확인하였다(도 4). 하지만 DPPH 소거능 활성은 170°C 에 도달하고 45분 후에 감소했는데 이는 열분해 때문에 감소한 것이다. 정리하자면, 상기 키토산은 가장 낮은 DPPH 소거능을 보인 반면, 아임계 수 처리를 통해 제조한 올리고키토산은 아임계 수 처리 온도 및 시간이 증가함에 따라 DPPH 소거능도 증가하였다.

[0109] **3-2. ABTS assay**

[0110] 상기 실시예 1-4에서 제조한 올리고키토산의 항산화능을 평가하기 위해 실험예 3-1에서 ABTS assay를 실시하였다. 7 mM/L의 ABTS 원액을 증류수에 준비하였고, 2.45 mM/L의 과황산칼륨을 동량의 스톡 용액에 준비하고 적절히 혼합하였다. 상기 혼합물을 실온에서 16시간 동안 어두운 조건에 둔 다음, ABTS 스톡 용액을 HPLC 등급 에탄올로 희석하여 734 nm에서 0.70 ± 0.02 의 흡광도를 얻었다. 다음으로, 100 μ L의 올리고키토산에 상기 희석된 ABTS 용액 2.9 mL을 첨가하고 어두운 조건에서 실온에서 30분 동안 보관하였다. 모든 용액의 흡광도는 734 nm에서 측정하였으며, Trolox를 300 μ g/mL 농도의 표준물질로 사용하였다. 상기 측정된 흡광도를 하기 식 2로 계산하여 ABTS 라디칼 소거능을 측정하였다.

[0112] [식 2]

[0113]
$$\text{ABTS}^+ \text{ radical scavenging activity \%} = \left[1 - \left(\frac{A_s - A_b}{A_c} \right) \right] \times 100$$

[0114] (여기서 A_s 는 시료의 흡광도를 나타내며, A_c 는 대조군의 흡광도를 나타내고, A_b 는 메탄올과 혼합된 키토산의 흡광도를 나타낸다.)

[0116] 본 실험예 3-2의 결과, 상기 실시예 1-3에서 추출한 키토산과 비교하여 온도와 시간이 각각 증가함에 따라 ABTS 소거능 활성이 크게 증가했음을 확인하였다(도 5). 하지만 ABTS 소거능 활성은 170℃에 도달하고 45분 후에 감소했는데 이는 열분해 때문에 감소한 것이다. 정리하자면, 상기 키토산은 가장 낮은 ABTS 소거능을 보인 반면, 아임계 수 처리를 통해 제조한 올리고키토산은 아임계 수 처리 온도 및 시간이 증가함에 따라 ABTS 소거능도 증가하였다.

[0118] **실시예 2. 올리고키토산의 항암 효과**

[0120] **2-1. MTT assay**

[0121] 상기 실시예 1-4에서 제조한 올리고키토산의 항암 효과를 확인하기 위해 MTT assay를 통한 in vitro 세포 독성을 분석하였다. 상기 올리고키토산은 아임계 수 반응 온도 155 또는 170℃에서 15, 30 또는 60분 동안 반응시킨 올리고키토산을 사용하였으며, 상기 췌장암 세포는 Panc 1을 사용하였다. 상기 Panc 1 세포주는 포도당이 보충된 DMEM 배지에서 계대배양되었고, 5% CO₂에서 37℃에서 48시간 동안 배양하였다. 상기 배양한 세포를 24-well cell culture plate에 12,500 cells/well의 수로 시딩하고 5% CO₂ 인큐베이터에서 37℃에서 48시간 동안 인큐베이션하였다. 상기 인큐베이션한 세포의 컨플루언트 세포층에서 상기 155 또는 170℃에서 15, 30 또는 60분 동안 반응시킨 올리고키토산(OC) 및 상업용 저분자량 키토산(CC)을 첨가하고 5% CO₂ 인큐베이터에서 37℃에서 24시간 동안 인큐베이션하였다. 상기 배양한 세포의 배지에 10 %(v/v)의 MTT 용액을 첨가하고 5% CO₂, 37℃의 어두운 곳에서 3시간 동안 배양한 후 배지 내용물을 천천히 흡인하였다. 이후 200 μ L의 DMSO를 각 well에 첨가하고 어두운 조건에서 20분 동안 37℃에서 배양한 후 플레이트를 517 nm에서 마이크로플레이트 판독기(Biotek Synergy HTX, USA)를 사용하여 판독하였으며, 상기 단계를 3번 반복하여 수행하였고, 상기 판독한 결과를 하기 식 3으로 계산하여 세포 독성을 평가하였다. 상기 실시예 2-1에서 양성 대조군으로 3%의 빙초산(glacial acetic acid, GAA)를 사용하였다. 다른 대조군으로 상업용 실험 저분자량 키토산(CC)을 사용하였다.

[0123] [식 3]

$$\text{Cell toxicity (\%)} = \frac{\text{Average OD}_{517} \text{ of samples}}{\text{Average OD}_{517} \text{ of control}} \times 100$$

[0124]

[0126] 본 실시예 2-1의 결과, 아임계 수를 170℃에서 15분 동안 처리된 올리고키토산이 500 μg/mL의 농도에서 80.545%±0.808%의 최대 세포 독성 값으로 Panc 1에 상당한 세포 독성 효과를 나타냄을 입증하였다(도 6).

[0128] **2-2. Syto 9/PI fluorescent staining**

[0129] 상기 실시예 1-4에서 제조한 올리고키토산의 항암 효과를 확인하기 위해 Syto 9/PI fluorescent staining을 통해 세포 사멸을 관찰하였다. 상기 세포 사멸의 육안 관찰은 LIVE/DEAD® BacLight™ 염색 키트(BioProbes Inc., Eugene, OR, USA)를 사용하여 수행되었다.

[0130] 상기 실시예 2-2에서 사용한 세포는 Panc 1의 인간 췌장암 세포를 사용하였으며, 상기 Panc 1을 48시간 동안 배양한 뒤 각 well에 세포를 분주하고, 각 well에 3 μL의 Syto 9/PI(1:1) 염색제를 첨가하고 암실에서 15분 동안 실온에서 배양하였다. 상기 플레이트를 형광 필터(CKX53, Olympus, Inc., Tokyo, Japan)가 있는 도립 현미경으로 관찰하였다. 올리고키토산에 의한 세포 사멸은 Syto 9/PI 염색에 의해 방출된 형광 신호를 통해 평가되었다(도 7).

[0131] 본 실시예 2-2의 결과는 도 7에 그림으로 나타내었으며, 도 7A는 아무 것도 처리하지 않은 Panc 1 세포의 사진이며, 도 7B는 상기 실시예 1-4에서 제조한 155℃에서 60분 동안 처리된 올리고키토산(OC 155/60)을 처리한 Panc 1 세포의 사진이고, 도 7C는 상기 실시예 1-4에서 제조한 170℃에서 15분 동안 처리된 올리고키토산(OC 155/60)을 처리한 Panc 1 세포의 사진이고, 도 7D는 상기 실시예 1-4에서 제조한 170℃에서 30분 동안 처리된 올리고키토산(OC 155/60)을 처리한 Panc 1 세포의 사진이다.

[0132] 상기 실시예 2-2에서 일반적으로 세포 내 핵산을 염색하는 PI를 세포막 붕괴의 표준지표로 사용하였으며, 이를 강렬한 적색 형광으로 관찰할 수 있었다. 진핵 및 원핵 세포로 돌출할 수 있는 녹색 형광 염료인 Syto 9는 살아 있는 세포와 죽은 세포를 염색하는 반면 PI는 원형질막을 통해 죽은 세포를 염색할 수 있다. 상기 PI는 DNA에 대해 높은 친화력을 보이고 더 많은 양이 있을 때 Syto 9를 압도하는 경향이 있으며, 더 많은 적색 형광을 방출하고 녹색 형광을 감소시키는 경향이 있는데, 이는 세포 사멸의 독특한 현상으로 판별된다.

[0133] 도 7을 참조하면, 상기 실시예 2-2의 결과는 상기 실시예 1-4에서 제조한 170℃에서 15분 동안 처리된 올리고키토산(OC 155/60)로 처리했을 때 최대 세포 분해를 나타냈다. 반면에 상기 실시예 1-4에서 제조한 155℃에서 60분 동안 처리된 올리고키토산(OC 155/60)로 처리된 세포의 형광은 대조군에 가까웠는데, 이는 낮은 온도는 변형을 거의 유발하지 못해서 덜 변형된 올리고키토산을 제조하고, 이는 효율적인 세포 용해로 이어지지 않았다.

[0135] **실험예 4. 올리고키토산의 항균 활성**

[0136] 상기 실시예 1에서 제조한 올리고키토산의 항균 활성을 확인하기 위해 실험예 4를 실시하였다. 상기 실험예 4에서는 2개의 그람 음성 박테리아를 사용하였으며, 상기 그람 음성 박테리아는 Escherichia coli [ATCC 25922] 및 Salmonella enterica [ATCC 19585]를 사용하였다. 상기 그람 음성은 대한민국 한국모식문화원에서 입수하여 영양액에 계대배양하고 37℃에서 24시간 동안 배양하여 실험에 사용하였다.

[0137] 상기 실시예 1에서 140℃, 155℃ 또는 170℃의 온도로 15, 30, 45 또는 60분 동안 아임계 수를 처리하여 제조한 올리고키토산을 0.005% 아세트산에서 진탕하면서 준비하였다. 상기 박테리아 2종을 계대배양하여 각각 10⁶ CFU/mL를 준비하고 Muller-Hinton 한천 배지 플레이트에 분산시켰다. 그 후 멸균 팁을 사용하여 기공(깊이 2mm, 직경 4mm)을 수집하고 120 μL의 샘플에 로딩하였다. 마지막으로, 플레이트를 4℃에서 30분 동안 유지하고 37℃에서 24시간 동안 인큐베이터에서 배양하였다. 상기 배양한 플레이트에서 상기 실시예 1에서 제조한 올리고키토산의 항균 효과를 평가하기 위해 성장 억제 영역의 직경을 mm 단위로 측정하였다. 상기 실험예 4의 결과는 표 1에 나타내었다.

[0138] 본 실험에 4의 결과, 상기 실시예 1에서 제조한 올리고키토산(CS@140_15, CS@140_30, CS@140_45, CS@140_60, CS@155_15, CS@155_30, CS@155_45, CS@155_60, CS@170_15, CS@170_30, CS@170_45 및 CS@170_60)은 대조군(CS)에 비해 그람음성균(*S. enterica* 및 *E. coli*)에 대한 억제 효과를 가지는 것을 확인하였다. 보다 구체적으로 그람-음성 박테리아에 대한 대조군과 비교하여 상기 올리고키토산의 억제 영역 크기가 유의하게 증가($P < 0.05$)함을 확인하였다(표 1).

[0140] [표 1]

Temperature (°C)	Gram-negative	
	<i>E. coli</i> (mm)	<i>S. enterica</i> (mm)
ExC (Control)	12.88 ± 0.42 ^e	11.30 ± 0.25 ^h
CH 140/15	12.02 ± 0.08 ^f	13.65 ± 0.45 ^f
CH 140/30	14.53 ± 0.40 ^d	13.43 ± 0.50 ^f
CH 140/45	13.1 ± 0.30 ^e	12.36 ± 0.45 ^g
CH 140/60	17.23 ± 0.73 ^c	16.20 ± 0.36 ^e
CH 155/15	13.23 ± 0.35 ^e	16.13 ± 0.20 ^e
CH 155/30	14.26 ± 0.20 ^d	18.56 ± 0.41 ^{cd}
CH 155/45	16.6 ± 0.36 ^c	18.46 ± 0.35 ^{cd}
CH 155/60	18.43 ± 0.35 ^b	20.13 ± 0.30 ^{ab}
CH 170/15	18.2 ± 0.62 ^b	16.93 ± 0.6 ^e
CH 170/30	18.7 ± 0.79 ^{ab}	18.03 ± 0.50 ^d
CH 170/45	17.16 ± 0.70 ^c	19.33 ± 0.45 ^{bc}
CH 170/60	19.46 ± 0.60 ^a	20.76 ± 1.10 ^a

[0141]

[0142] (상기 표 1에서 결과값은 3중의 평균±표준편차로 표시되며, Duncan의 다중 범위 검정에 따라 각 열의 다른 위 첨자 소문자는 유의한 차이($P<0.05$)를 나타낸다.)

[0144] 실험예 5. 올리고키토산의 분자량, 환원당 및 탈아세틸화 정도 분석

[0146] 5-1. 분자량

[0147] 상기 실시예 1에서 제조한 올리고키토산의 분자량을 알아보기 위해 실험예 5-1를 실시하였다. 상기 분자량을 분석하기 위해 Gel permeation chromatography(GPC) 분석을 실시하였고, 상기 GPC에서 상기 올리고키토산 용액의 농도는 1 mg/mL였다. 상기 올리고키토산 용액과 용리액을 Millipore 0.45-μm 필터를 사용하여 여과하고 유속은 0.6 mL/min으로 일정하게 유지하였으며, Pullulans(Mw 5900-708,000 Da)을 표준 샘플로 사용하였다. 상기 실험예 5-1의 결과는 표 2에 기재하였다.

[0148] 본 실험예 5-1의 결과, 대조군으로 사용한 키토산의 초기 평균 분자량은 2,109,056 Da/g.mol⁻¹이었으며, 155℃에서 45분 및 60분 동안 아임계 수를 처리한 올리고키토산에서 각각 289,431 및 46,523 Da/g.mol⁻¹로 감소하였다. 특히 170℃에서 30분 동안 아임계 수를 처리한 올리고키토산의 평균 분자량은 8,951 Da/g.mol⁻¹으로 감소하였다. 상기 올리고키토산의 정확한 평균 분자량(Mw), 수평균분자량(Mn), 다분산도(PD)를 표 3에 나타내었다.

[0150] [표 2]

Temperature (°C)	Molecular weight (Da/g.mol ⁻¹)
ExC (Control)	2,109,056
CH 140/15	1,854,093
CH 140/30	1,709,321
CH 140/45	1,605,438
CH 140/60	1,502,456
CH 155/15	997,623
CH 155/30	592,353
CH 155/45	289,431
CH 155/60	46,523
CH 170/15	31,265
CH 170/30	8,951
CH 170/45	7,289
CH 170/60	6,293

[0151]

[0153] [표 3]

Sample Name	M _n (Da)	M _w (Da)	M _z (Da)	M _{z+1} (Da)	Polydispersity
ExC	1975891	2317667	2650652	2947222	1.17
CH 155/60	1261	4101	10820	16372	3.25
CH 170/15	1179	3060	8061	12911	2.60

[0154]

[0156] 5-2. 환원당(Reducing sugar)

[0157] 상기 실시예 1에서 제조한 올리고키토산의 환원당을 알아보기 위해 실험예 5-2를 실시하였다. 포도당 표준 곡선은 0.6 내지 4.00 μmol/mL 범위의 0.05M 아세트이트 완충액(pH 8)으로 작성하였으며, 0.1 mg/mL의 올리고키토산 용액을 DNS 시약과 함께 바이알에 용해시키고 100 °C의 수조에서 5분 동안 가열했습니다. 상기 가열한 샘플이 실온에 도달하면 분광 광도계를 사용하여 540 nm에서 샘플 흡광도를 측정하였다. 상기 실험예 5-2의 결과는 표 4에 기재하였으며, 상기 표 4에서 TRS 값은 상기 올리고키토산의 글루코사민과 그 올리고머의 함량을 나타내는 값이다.

[0158] 본 실험예 5-2의 결과, 대조군으로 사용한 키토산을 아임계 수 처리하였을 때 아임계 수 처리 온도와 시간이 증가함에 따라 TRS 수준도 증가하였다. 상기 대조군의 TRS 수준은 1.10±0.02였으나, 아임계 수를 155°C에서 45분 및 60분 동안 처리했을 때 각각 1.31±0.15 및 1.38±0.32 g/L로 증가하였다. 또한 아임계 수를 170°C에서 60분 동안 처리하였을 때 TRS가 1.52±0.46 g/L으로 증가하였다.

[0160] [표 4]

Temperature (°C)	Reducing sugar (g/L)
ExC (Control)	1.09 ± 0.02 ^h
CH 140/15	1.11 ± 0.01 ^h
CH 140/30	1.18 ± 0.02 ^g
CH 140/45	1.20 ± 0.01 ^g
CH 140/60	1.25 ± 0.02 ^f
CH 155/15	1.27 ± 0.02 ^f
CH 155/30	1.30 ± 0.01 ^e
CH 155/45	1.33 ± 0.01 ^e
CH 155/60	1.38 ± 0.02 ^d
CH 170/15	1.41 ± 0.01 ^c
CH 170/30	1.43 ± 0.02 ^c
CH 170/45	1.48 ± 0.01 ^b
CH 170/60	1.54 ± 0.02 ^a

[0161]

[0162] (상기 표 4에서 결과값은 3중의 평균±표준편차로 표시되며, Duncan의 다중 범위 검정에 따라 각 열의 다른 위치자 소문자는 유의한 차이(P<0.05)를 나타낸다.)

[0164] 5-3. 탈아세틸화 정도

[0165] 상기 실시예 1에서 제조한 올리고키토산의 탈아세틸화 정도를 확인하기 위해 실험예 5-3을 실시하였다. 상기 탈아세틸화 정도는 Fourier transform infrared(FTIR) spectroscopy를 통해 분석되었다. 상기 탈아세틸화 정도는 하기 식 4를 통해 계산되었다. 상기 실험예 5-3의 결과는 하기 표 5에 기재하였다.

[0167] [식 4]

$$DD = \frac{A_{1655cm-1}}{A_{3450cm-1}} \times \frac{100}{1.33}$$

[0168]

[0169] (여기서, A는 기준 도면에서 계산된 두 파수의 흡광도를 의미한다.)

[0171] 본 실험예 5-3의 결과, 대조군으로 사용한 키토산의 탈아세틸화 정도는 69.4%로 확인되었으며, 아임계 수를 170℃로 45분 및 60분 동안 처리한 올리고키토산의 경우 각각 90.3%와 91.2%로 탈아세틸화 정도가 크게 증가하였다. 뿐만 아니라, 아임계 수 처리 온도와 시간이 증가함에 따라 탈아세틸화 정도도 함께 증가하는 것을 확인하였다(표 5).

[0173] [표 5]

Temperature (°C)	Degree of deacetylation (%)
ExC (Control)	69.4
CH 140/15	71.5
CH 140/30	73.1
CH 140/45	73.8
CH 140/60	75.3
CH 155/15	77.3
CH 155/30	79.6
CH 155/45	80.1
CH 155/60	84.5
CH 170/15	87.3
CH 170/30	88.9
CH 170/45	90.3
CH 170/60	91.2

[0174]

[0176] 실험예 6. 올리고키토산의 냉수에 대한 용해도 및 보수력 분석

[0177] 상기 실시예 1에서 제조한 올리고키토산의 냉수에 대한 용해도(Cold water solubility; CWS) 및 보수력(Water holding capacity; WHC)을 분석하였다. 상기 올리고키토산 200 mg을 증류수에 녹이고 수조 온도를 $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ 로 10 분 동안 유지하면서 흔들어서 현탁액을 제조하였다. 상기 현탁액을 2 mL 바이알에 보관하고 12,000 rpm에서 10 분 동안 원심분리하였다. 상기 상등액을 펠트리 접시에 옮기고 열풍 오븐에서 55°C 에서 밤새 건조하였다. 상기 냉수에 대한 용해도(CWS) 및 보수력(WHC)는 하기 식 5 및 식 6을 통해 계산하였으며, 상기 실험예 6의 결과는 표 6에 기재하였다.

[0179] [식 5]

$$\text{CWS (\%)} = \frac{\text{Dry weight of supernatant}}{\text{Initial weight of chitosan hydrolysate}} \times 100$$

[0180]

[0182] [식 6]

$$\text{WRC (\%)} = \frac{\text{Wet weight of sediment paste}}{\text{Dry weight of sediment paste}} \times 100$$

[0183]

[0185] 본 실험예 6의 결과, 대조군으로 사용한 키토산의 냉수에 대한 용해도는 11.39 ± 1.13 이었으며, 보수력은 9.43 ± 1.65 였다. 아임계 수 처리한 올리고키토산은 상기 대조군보다 높은 냉수에 대한 용해도와 보수력을 가지며, 보다 구체적으로 아임계 수 처리 온도 및 시간이 증가함에 따라 크게 증가하였다(표 6).

[0187] [표 6]

Temperature (°C)	Cold water solubility (%)	Water retention capacity (%)
ExC (Control)	11.39 ± 1.13 ^j	9.43 ± 1.65 ^h
CH 140/15	19.40 ± 1.02 ⁱ	10.42 ± 0.70 ^{sh}
CH 140/30	20.41± 0.64 ^{hi}	11.95 ± 1.05 ^s
CH 140/45	22.37 ± 1.28 ^h	15.60 ± 1.15 ^f
CH 140/60	25.96 ± 1.03 ^s	18.03 ± 1.67 ^e
CH 155/15	36.89 ± 1.57 ⁱ	18.37 ± 1.12 ^e
CH 155/30	42.77 ± 1.95 ^e	24.20 ±0.79 ^d
CH 155/45	46.29 ± 0.75 ^d	25.20 ± 1.08 ^d
CH 155/60	54.86 ± 1.61 ^c	28.69 ± 0.46 ^c
CH 170/15	61.52 ± 1.64 ^b	29.44 ± 1.06 ^{bc}
CH 170/30	65.58 ± 1.50 ^a	31.42 ± 1.33 ^b
CH 170/45	65.18 ± 0.95 ^a	34.25 ± 0.84 ^a
CH 170/60	65.22 ± 2.00 ^a	35.18 ± 1.89 ^a

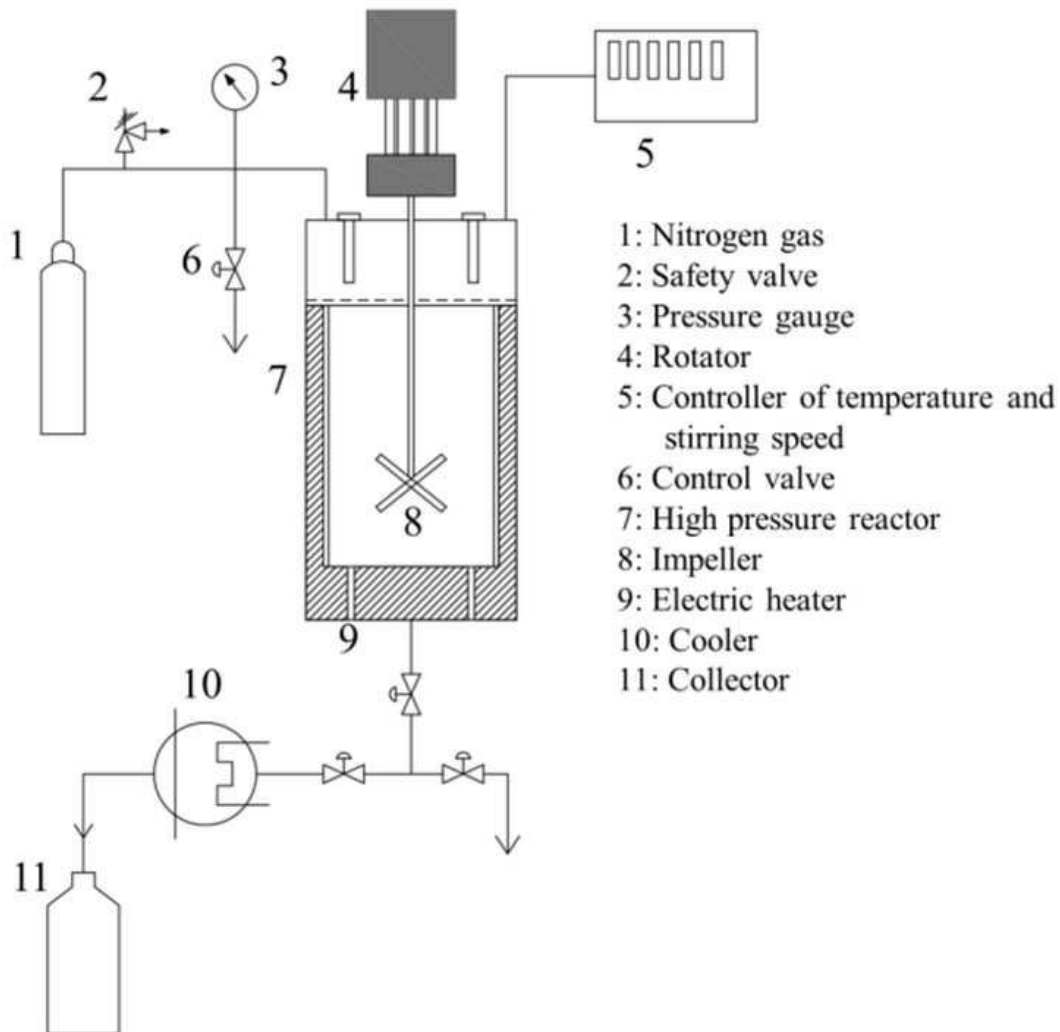
[0188]

[0189] (상기 표 6에서 결과값은 3종의 평균±표준편차로 표시되며, Duncan의 다중 범위 검정에 따라 각 열의 다른 위 첨자 소문자는 유의한 차이(P<0.05)를 나타낸다.)

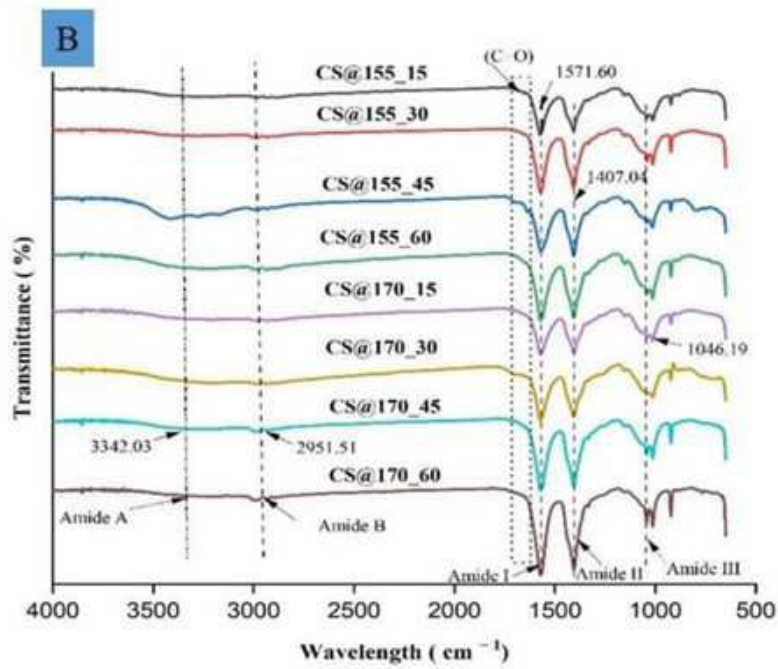
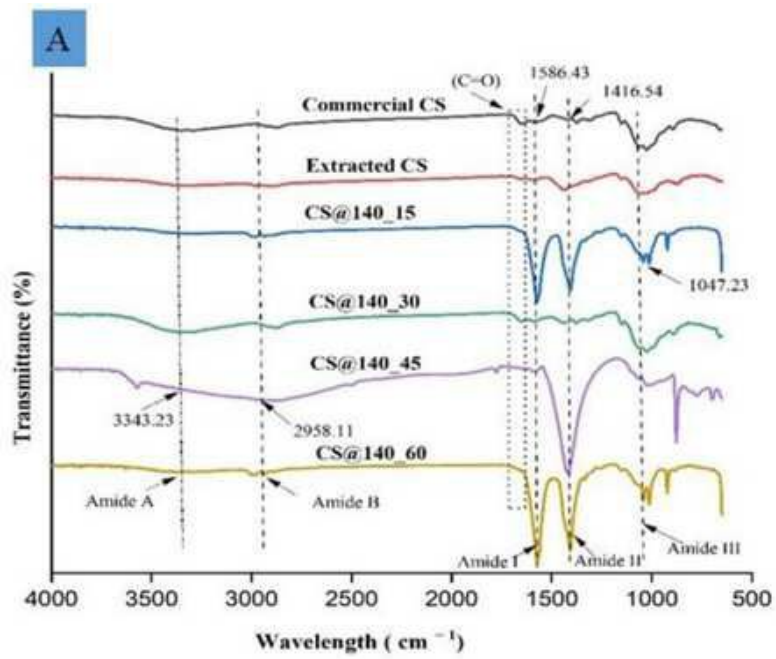
[0191] 이상 설명으로부터, 본 발명에 속하는 기술 분야의 당업자는 본 발명의 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며, 한정적인 것이 아닌 것으로서 이해해야만 한다.

도면

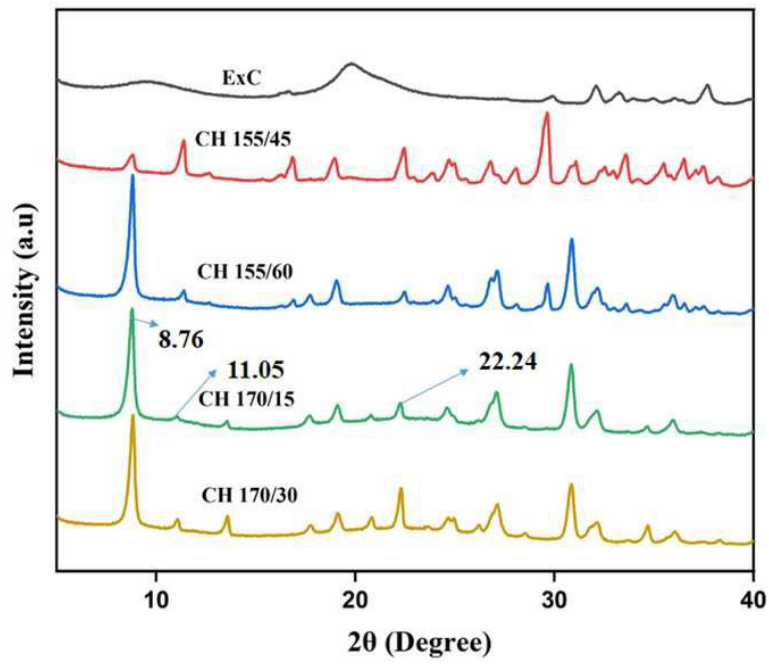
도면1



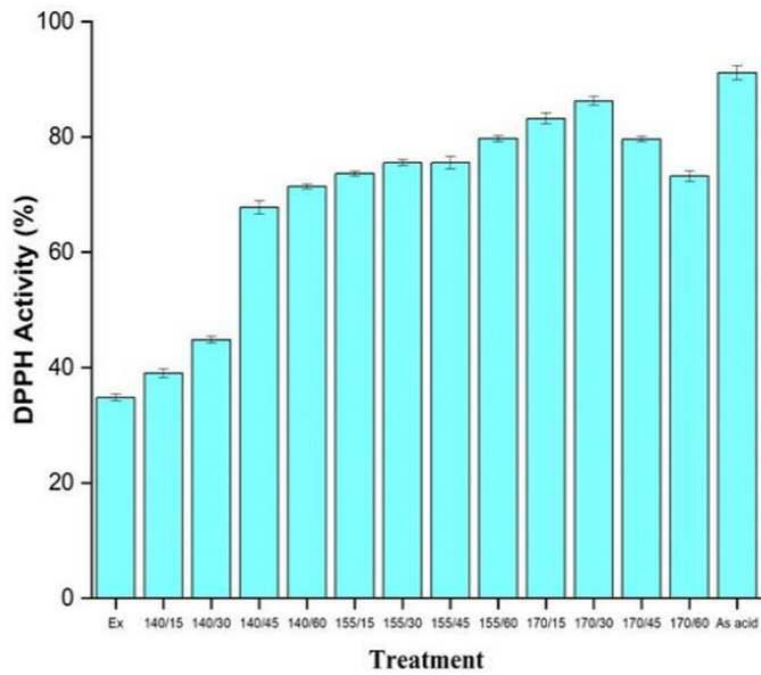
도면2



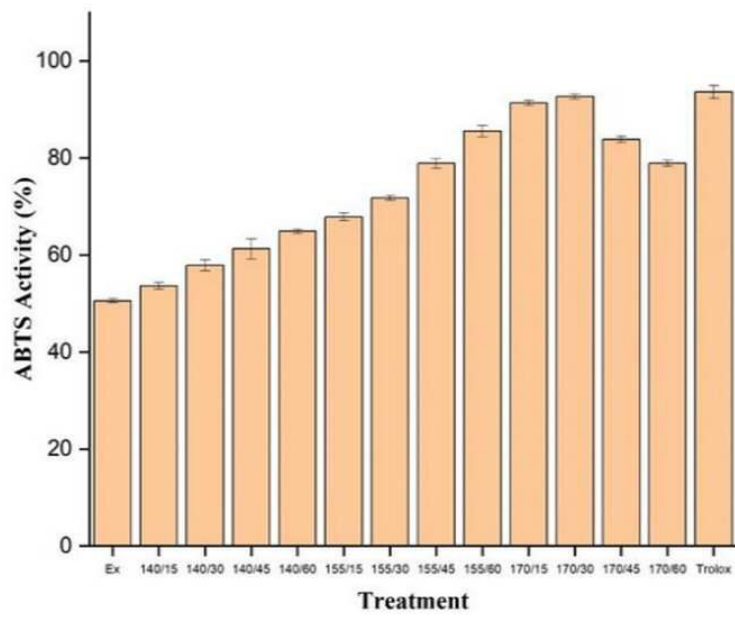
도면3



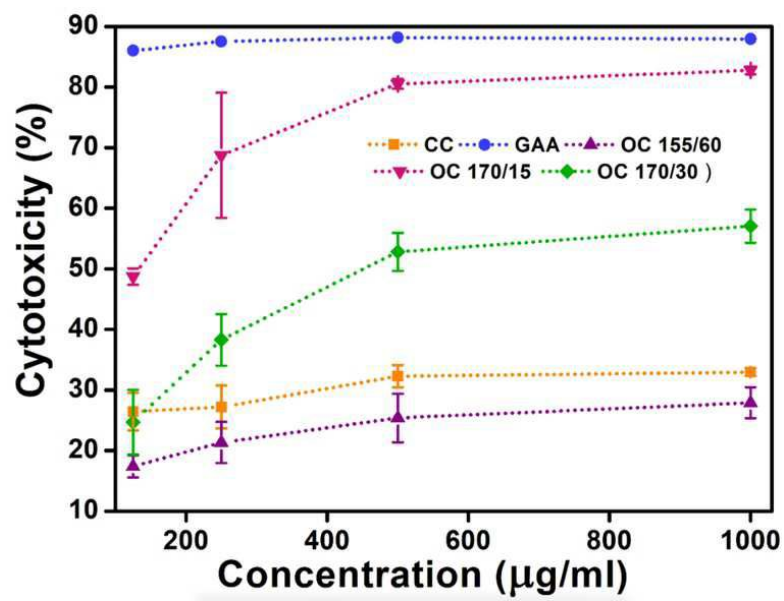
도면4



도면5



도면6



도면7

