

키토산 마이크로캡셀 및 비드의 제조와 응용에 관한 연구

하 병 조, 이 옥 섭, 이 충 남, 이 윤 식*
((주)태평양 기술연구원, 서울대학교*)

A Study on the Preparation and Application of Chitosan Microcapsule and Bead.

Byung-Jo Ha, Ok-Sub Lee, Choong-Nam Lee, Yoon-Sik Lee*
(Pacific R&D Center, Seoul Nat'l Univ*)

요 약

Glutaraldehyde를 사용하여 화학적인 가교반응에 의해 empty cross-linked chitosan microcapsule을 제조하였다. 또한 chitosan bead는 sodium hydroxide 용액을 이용한 coacervation에 의해 제조하였다. 이들의 제조를 위해 수상/유화제/유기상으로 이루어진 w/o emulsion을 형성시킨 후 에멀전의 안정성에 영향을 미치는 요소들에 대해 조사하였다. 보조계면활성제로 n-hexanol을 첨가한 결과 유화안정성이 상승적으로 증가하는 경향을 보였다. Chitosan microcapsule은 광택이 나는 형태로 내부가 투명한 반면 chitosan bead는 백탁으로 내부가 불투명하며 매우 porous한 구조를 하고 있었다. Chitosan bead의 유리 아미노기의 분석은 picric acid titration으로 수행하였으며, 아미노산 반응의 종결여부는 ninhydrin color test에 의해 판정하였다. 또한 fluoroscamine에 의한 형광분석으로 chitosan bead의 표면에 많은 반응성 아미노기가 존재하고 있음을 정성적으로 확인할 수 있었으며, 이를 생리활성 펩티드의 커플링 반응에 이용할 수 있었다. 모델 펩티드로서 콜라겐의 receptor 부분에 해당하는 생체내 growth factor로 알려진 Gly-His-Lys (GHK)를 각 아미노산 유도체를 차례로 커플링하여 chitosan bead 위에서 합성할 수 있으며, 세포 성장인자와 같은 여러가지 생리활성 펩티드의 운반체로서 chitosan bead가 쉽게 이용될 수 있는 가능성을 보여 주었다.

1. 서 론

키틴을 알칼리로 탈아세틸화하면 C-2 위치의 치환기는 유리 아미노기 (-NH₂)로 바뀌어 glucosamine의 pyranose 단위체가 β-(1-4) 결합된 키토산이 된다. 자연계에서 키틴질은 게, 새우, 가재 등의 갑각류, 오징어 등의 연체동물, 버섯 등의 외피를 이루는 물질로 자연산 고분자물질로는 섬유질 다음으로 풍부한 것으로 알려져 있다. (1-6) 키틴은 대개 다른 유기물질, 단백질, CaCO₃ 등과 밀접하게 결합된 결합조직의 다당체로서 히알루론산, 케라틴 설페이트, 헤파린 등과 비슷한 구조를 하고 있다. 키틴은 1811년 프랑스의 Braconnot에 의해 진균에서 처음 발견되었고, 키토산은 1859년 독일의 Rouget에 의해 제조되었다. 그러나 키틴에 대한 연구가 활발하게 진행된 것은 1950년경 부터이고 키틴, 키토산이 공업적으로 생산되기 시작한 것은 1970년경 부터이다. 키토산의 구성과 구조는 셀룰로오스와 유사하나 C-2 위치에 일차 아민기가 있다는 점이 다른 차이점이다. 따라서 키토산은 화학적 변형에 의해 보다 다양한 기능화가 가능한 장점이 있다. 키토산의 글루코사민 반복단위의 존재는 여러가지 유도체의 합성을 용이하게 한다. 왜냐하면 이 일차아민기는 C-6와 C-3의 수산기에 비해 높은 반응성을 나타내기 때문이다. 최근 키토산과 그 유도체들이 항균활성, 면역증강능, 상처치유효과와 같은 여러가지 생리활성이 알려지면서 주목을 끌고 있다. 이외에 키토산의 생분해성, 무독성, 생체친화성의 측면에서 의약, 화장품, 식품분야 등에서 다양한 응용연구가 진행되고 있다. 특히 키토산은 lysozyme, chitosanase 등의 효소에 의해 선택적으로 가수분해되며 biocompatibility가 우수하여 마이크로스피어, 비드, 멤브레인 등의 형태로 약물전달체로의 연구도 활발하다. 본 연구에서는 키토산 마이크로캡셀 및 비드의 제조방법에 대해 간략하게 살펴보고, 콜라겐의 receptor 부분에 해당하는 생체내 growth factor로 알려진 Gly-His-Lys(GHK)의 커플링을 키토산 비드를 이용하여 시도하였다. GHK는 생체내 Cu(II)와 complex를 형성함으로써 superoxide dismutase (SOD)-like activity, angiogenesis, 세포의 chemoattraction과 같은 여러가지 생리적인 과정에서 중요한 역할을 하며 피부의 상처치유와 조직 손상의 회복에도 관여한다고 알려져 있다. (7) 따라서 생리활성 펩티드의 합성 및 운반체로서의 키토산 비드의 이용 가능성에 대해 살펴보고자 한다.

2. 재료 및 실험방법

2.1 시약 및 기기

키토산은 일본 동경화성의 시약급을 사용하였다. 사용된 키토산의 점도평균 분

자량은 8.2×10^5 , 탈아세틸화도 78%, $[\alpha]_D^{22} = -4.8$ (c 1.0, 1% AcOH) 이었다. Sorbitan mono-oleate (Span 80, HLB 4.3), sorbitan sesquioleate (Span 83, HLB 3.7) 및 sorbitan trioleate (Span 85, HLB 1.8)는 ICI사의 것을 사용하였다. Glutaraldehyde(25% solution)는 Junsei사의 일급시약을 사용하였다. N,N-Dimethylformamide (DMF)는 동양화학의 일급시약을 ninhydrin 존재하에서 감압 증류하여 4A molecular sieve에 보관하여 사용하였다. Triethylamine (Aldrich)는 사용직전에 정제하여 사용하였다. 커플링제인 BOP, benzotriazol-1-yl-oxy-tris-(dimethylamino) phosphonium hexa- fluorophosphate, 은 Richelieu Biotechnologies에서 구입하였으며 N- ϵ -Boc- N- α -Fmoc-L-Lysine, N- α -Fmoc-N-im-Trityl-L-His, N-Fmoc-Glycine은 Bachem Inc.에서 구입하였다. 이외 시약들은 모두 시약급을 사용하였으며, 일반적인 방법을 따라 정제하였다. (8) 자외흡수스펙트럼은 SLM-AMINCO사의 spectrofluorometer SPF-550 CTM을 사용하였다. FT-IR spectra는 Bio-Rad Laboratories의 FTS-40 system을 사용하였고, specific rotation은 JASCO사의 Digital Polarimeter DIP-360을 사용하였다. 키토산 비드의 내부의 표면의 관찰을 위해 Nikon Optiphot Episcopic Fluorescence Microscope를 사용하였고, 아미노산 조성분석을 위한 HPLC는 Waters 712 WISP autoinjector와 Waters 990 photodiode array detector가 결합된 Waters Model 510 HPLC Pump를 사용하였다. 전자현미경은 JEOL JSM-35 Scanning Microscope를 사용하였다.

2.2 고 탈아세틸화도 키토산의 제조

고 탈아세틸화도 키토산은 Miya 등의 방법에 따라 제조하였다. (9) 탈아세틸화도 78%인 키토산 20g을 4구 플라스크에 담고 47% 수산화나트륨 400 밀리리터를 가한 후 질소 분위기 하에서 1 시간동안 110°C 에서 가수분해를 진행하였다. 반응후 용액을 냉각하고 여과후 증류수로 수회 세척하였다. 얻어진 키토산을 1% 초산에 녹인후 불용성 물질을 여과하여 제거한 다음, 여액을 4% 수산화나트륨에 가하여 침전시키고 증류수로 여액의 액성이 중성이 될때 까지 수회 세척하고 잘게 마쇄한 후 다시 47% 수산화나트륨 400 밀리리터를 가한 후 질소분위기 하에서 1 시간 동안 가수분해를 진행시켰다. 반응후 냉각하고 여액의 액성이 중성이 될때까지 수회 세척하고, 에탄올, 메탄올, 아세톤으로 차례로 세척 후 진공 건조하였다.

2.3 유화안정도 시험

HLB 범위가 1.8-4.3인 세종류의 유화제의 농도를 각각 0.2%에서 3.5% 까지 변화시키면서 50ml의 유기상에 녹이고, 여기에 수상을 가해 전체가 100ml 되도록 하였다. 이를 30분 동안 실온에서 격렬하게 흔든후 25°C 항온조에서 1시간 동안 정치하고, 상분리의 정도로 부터 유화안정도를 간접적으로 측정하였다.

2.4 Empty cross-linked chitosan microcapsule의 제조

Sorbitan mono-oleate 0.3g, n-hexanol 0.1g을 함유하고 있는 톨루엔 용액 60g을 400 rpm으로 교반하면서 키토산 용액(1%, in 1% acetic acid) 40g을 가해 전량이 100g 되게 하였다. 30분 동안 교반시킨 후 생성된 w/o 에멀전에 glutaraldehyde (25%) 3ml를 서서히 첨가하고 다시 3 시간 동안 400 rpm으로 교반하였다. 이상에서 제조된 키토산 microcapsule은 90% ethanol, methanol, acetone의 순으로 세척하였다. 세척이 끝난 키토산 microcapsule은 35°C oven에서 24 시간 동안 건조시켰다.

2.5 Chitosan bead의 제조

Sorbitan mono-oleate 3g, n-hexanol 1g을 톨루엔 460g에 가해 용해시키고, 여기에 키토산 용액 (1%, in 1% acetic acid) 을 가해 전량을 1000g이 되도록 하였다. 400 rpm 으로 균일하게 교반하여 w/o 에멀전을 만들고, 이를 2.4 리터의 12% 수산화 나트륨 용액에 가한 후 3시간 동안 교반시켜 bead를 생성시켰다. 여기에 에탄올 2 리터를 가한후 다시 1 시간 동안 교반하였다. 생성된 bead를 여과하고 여액의 액성이 중성이 될때까지 증류수로 세척하였다. 에탄올, 메탄올, 아세톤, 에테르로 차례로 세척하고 최후에 G4 glass filter로 여과하였다. 여과후 얻어진 chitosan bead는 40°C 에서 24시간 동안 진공건조 하였다.

2.6 입자크기 측정

입자의 크기는 U.S. standard sieves를 사용하여 측정하였다. 즉, 100 mesh, 140 mesh, 170 mesh, 230 mesh, 270 mesh, 400 mesh의 sieve를 사용하여 정확하게 칭량한 전 시료를 상단체에 넣은 후 30분간 두드려서 흔든 다음 각 sieve 위에 함유된 잔류량을 칭량한 후 평균을 구하였다.

2.7 팽윤성 시험

Sintered glass filter가 있는 직경 0.9 cm, 길이 40 cm 의 유리컬럼에 1 그램의 bead를 채우고 10배량의 용매를 가했다. 컬럼을 상하로 흔들어 주면서 30분 동안 팽윤시킨 다음 정치하여 컬럼의 눈금으로 부터 팽윤도를 측정하였다.

2.8 요오드 염색시험

Lugol's iodine solution (iodine / potassium iodide / water: 1 / 2 / 300,

w/w/v} 을 30 분 동안 bead에 가하고 나타나는 색상의 변화를 현미경으로 관찰하였다.

2.9 형광 염색시험

Chitosan bead 약 10mg 을 DMF, methylene chloride, chloroform으로 세척하고 여기에 10% triethylamine로 다시 세척하였다. 10 mg의 fluore- camine 을 소량의 chloroform에 녹인후 가하고 40'C에서 10분동안 반응을 진행시켰다. Chloroform, methanol로 세척후 진공 건조하였다. Fluores- camine이 염색된 시료 10 mg을 JB-4[Ⓢ] Embedding Kit (Polysciences, Inc., USA) 에 담고 JB-4[Ⓢ] solution 을 2 일간 실온에서 처리하여 고분자화 반응을 완료하였다. 약 3 μ m의 두께로 얇게 자른후 시료를 제조하였다. 380- 425nm의 excitation과 450 nm에서의 emission wavelength에서 형광현미경으로 bead의 표면과 내부를 관찰하였다.

2.10 Picric acid titration (10, 11)

Glass filter (용량 약 3ml)에 아미노산이 결합된 비드 약 20mg을 넣고 methylene chloride로 2분간 3회 잘 팽윤시키고, 5% Triethylamine/ methylene chloride로 3분간 2회 처리하였다. 다시 methylene chloride로 2분간 3회 세척하고 0.1M picric acid / in methylene chloride 로 15분간 2회 처리하였다. Methylene chloride로 2분간 3회 세척하고 picrate salt가 형성되도록 하였다. 이것을 5% Triethylamine / methylene chloride 로 3분간 5회 처리한 다음 methylene chloride 로 2분간 3회 처리하고, 최종적으로 소량의 95% ethanol로 처리하여 triethylamine-picrate salt 용액을 얻었다. 이를 95% ethanol로 희석하고, 이를 358nm ($\epsilon=14500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)의 UV spectrum 으로 부터 정량하여 유리아미노기의 농도를 측정하였다.

2.11 Ninhydrin color test (12)

비드에 커플링 반응을 하지않고 남아있는 유리 아미노기의 존재를 확인하기 위해 (1) 500mg의 ninhydrin을 10ml의 에탄올에 녹인 용액 (2) 80g의 phenol을 20ml의 에탄올에 녹인 용액 (3) 2ml의 0.01M KCN을 10ml의 pyridine으로 희석한 용액을 각각 준비하였다. 10 내지 20mg의 비드를 담은 시험관에 위의 각용액들을 한 두 방울씩 떨어뜨려 물중탕으로 5분동안 100'C로 가열하여 비드의 색이 변하지 않거나 노란 색이면 99.4% 이상이 커플링 된것으로 판단하였다.

2.12 비드에 결합된 아미노산의 정량 (13)

Eppendorff tube에 4.2mg의 Fmoc- ϵ -ACA-chitosan을 넣고, 0.5ml의 piperidine/DMF (3:7)을 가한 후 30분 동안 shaking 하였다. 6.5ml의 methanol로 희석하고 생성된 fulvene-piperidine adduct를 모은뒤, 이를 301 nm ($\epsilon=7800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)의 UV spectrum 으로 부터 정량하여 아미노산의 치환율을 구하였다.

2.13 키토산 비드에 생리활성 펩티드의 결합

펩티드 합성용기에 유리아민기의 함량이 0.5 mmol/g 인 chitosan bead 370mg을 가한 후 methylene chloride, DMF로 세척하였다. Fmoc- ϵ -amino- caproic acid 228mg(0.648 mmol) 와 287 mg (0.648mmol)의 BOP 및 68.7 μ l (0.567mmol)의 TEA를 가해 1 시간 동안 반응을 진행시켰다. 여과후 methylene chloride, DMF로 세척하고 다시 같은 조작을 반복하였다. 최종 비드는 DMF 2회, methylene chloride 2회, *iso*-PrOH 1회, acetone 1회, 무수 에테르 1회 각각 세척후 진공건조하여 spacer arm 이 결합된 비드 391 mg을 얻었다. 이를 20% piperidine/DMF 로 3분간 1회, 17분간 1회 각각 세척하였다. DMF로 세척하고 Fmoc-Lys(Boc) 388mg (0.83 mmol)을 가하고 3 분간 흔든후 BOP 366mg (0.83 mmol)과 triethylamine 19.2 μ l를 차려로 가하고 3시간 동안 흔들어 주었다. DMF, methylene chloride, DMF로 세척후 아미노산 커플링을 같은 방법으로 2번 반복하여 Fmoc-Lys(Boc)- ϵ -chitosan 비드를 얻었다. 상기의 방법 과 동일하게 Fmoc-His(Trt)을 반응시켜 Fmoc- His(Trt)-Lys(Boc)- ϵ -ACA-chitosan 비드를 얻었다. 같은 조작으로 Fmoc- Gly를 결합하여 생리활성 펩티드가 결합된 키토산 비드를 제조하였다.

2.14. 펩티드가 결합된 키토산 비드의 형태와 표면관찰

제조한 Fmoc-His(Trt)-Lys(Boc)- ϵ -ACA-chitosan 비드의 형태와 표면은 Scanning Electron Microscope (SEM)으로 관찰하였다. SEM 촬영용 시료는 금 증착기에 넣고 진공도 0.2 torr, 1.0 KV, 5 mA의 조건에서 입자 표면을 순금으로 진공증착하여 사용하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1 키토산 microcapsule, bead의 제조 및 특성

키토산의 탈아세틸화도를 높이기 위해 47% 수산화나트륨 용액을 사용하였으며, 탈아세틸화 반응이 진행됨에 따라 1590 cm^{-1} 의 N-H band의 peak intensity가 점점 증

가하였으며, 반대로 아세틸기에 의한 1665 cm^{-1} 의 amide I 및 1550 cm^{-1} 의 amide II band의 peak intensity는 점점 감소하였다. 탈아세틸화도는 Sannan 등이 제시한 방법에 따라 base line 법을 바탕으로 2878 cm^{-1} 의 흡광도에 대한 1550 cm^{-1} 의 흡광도의 비율에 의해 계산하였다. (14) Domszy의 방법은 3450 cm^{-1} 의 흡광도 값에 1655 cm^{-1} 의 흡광도 비를 계산한 것으로 이는 소량의 수분에 의해 약간의 오차를 나타내었다. (15) 한편 키토산 마이크로캡셀 및 비드를 얻기 위한 방법으로 w/o 에멀전 상분리법을 이용하였으며, 먼저 유기상, 유화제, 보조계면활성제의 종류 및 함량에 따라 유화안정성을 측정해 보았다. 실험에 사용된 유화제는 sorbitan mono-oleate, sorbitan sesquioleate, sorbitan trioleate 였다. 이들은 HLB 값이 1.8 내지 4.3으로 유기상이 헥산일 경우는 sorbitan trioleate에서 높은 유화안정성을 보였으며, 유기상이 톨루엔일 경우는 HLB값이 높은 sorbitan mono-oleate가 좋은 유화안정성을 보였다. 이는 헥산 보다 극성이 높은 톨루엔의 경우 HLB가 높은 sorbitan mono-oleate에 의해 쉽게 안정화됨을 의미한다. 또한 톨루엔의 경우 비중이 헥산에 비해 비교적 물에 가까운 값을 나타낸다. 따라서 비중 역시 유화의 안정화에 영향을 미친다고 생각된다. 보조계면활성제로 n-hexanol의 첨가실험을 실시한 결과 sorbitan mono-oleate와 n-hexanol을 혼용사용 했을때 synergy effect가 생기는 것으로 관찰되었다. 이는 n-hexanol이 sorbitan mono-oleate의 분자사슬 사이에 끼여 들어 에멀전막을 더욱 조밀하게 하고 이 결과 유화안정도가 증가된 것으로 보인다. 키토산 마이크로캡셀과 비드는 Scheme I, II에 따라 제조하였다. 제조된 마이크로캡셀과 비드의 입자분포는 가우스분포에 따랐으며 입자의 크기는 계면활성제의 증가에 따라 감소하는 경향을 나타내었다. 이는 계면활성제의 농도증가에 따른 에멀전 입자 크기의 감소에 기인한다. 현미경사진 분석결과 glutar-aldehyde를 사용하여 제조한 마이크로캡셀은 광택이 나는 형태로 내부가 투명한 반면, 알칼리용액에 의해 제조한 bead의 경우 백탁으로 내부가 불투명하며 bead의 내부와 표면에 다수의 pore를 가지고 있었다. (Fig. 1, Fig. 2, Fig. 4-a) Sorbitan monooleate 0.3%, n-hexanol 0.1%를 사용한 경우 약 $70\mu\text{m}$ 의 평균 입자지름을 갖는 비드가 얻어졌다. 각종 유기용매에 대한 팽윤 실험결과 극성 용매일수록 팽윤도가 증가하였으며, 특히 물을 사용했을때 큰 팽윤성을 나타내었다. 한편 Lugol's iodine 용액으로 비드를 염색한 결과 dark-red color를 나타내었으며 이는 수용액상에서 iodine으로 부터 생성된 cylinder 형태의 tri-iodide가 아미노기를 갖고 있는 키토산 고분자 사슬사이에 흡착되어 intercalation되어 일종의 polyiodide를 형성함으로써 기인된 것으로 여겨진다. 특히 fluorescamine으로 처리시 비드가 강한 청색의 형광을 나타내는 것이 관찰되었으며, 이는 비드 표면에 많은 반응성 아미노기가 존재한다는 것을 의미한다. 또한 비드의 내부를 관찰하기 위해 비드를 고분자 수지에 고착시킨후 얇게 잘라 관찰한 결과 비교적 porous한 내부 구조를 갖고 있음을 알 수 있었다.

3.2 생리활성 펩티드의 결합

생리활성 펩티드의 모델화합물로서 화장품, 의약품 등의 원료로 이용될 수 있는 Gly-His-Lys (GHK)를 택하였다. 이는 콜라겐의 receptor에 해당하는 부분의 아미노산 서열로서 생체내에서 콜라겐의 성장 및 세포성장인자로서의 역할을 하는 것으로 보고되고 있다. 본 연구에서는 이러한 생리활성 펩티드의 운반체로 키토산을 사용하였으며, 또한 비드에 직접 펩티드를 합성하였다. 이때 사용한 키토산 비드는 약 0.5 mmol/g의 유리 아미노기를 가지고 있었다. 실험에 사용한 Gly, His, Lys은 모두 N 말단이 Fmoc 으로 보호된 것이 었으며 일반적인 고체상 펩티드의 커플링 방법에 따라 반응을 수행하였다. 키토산 비드와 생리활성펩티드 사이의 spacer로서 ϵ -aminocaproic acid 를 사용하였다. 아미노산의 조성분석을 위해 최종 합성된 펩티드가 결합된 키토산 비드를 12N-HCl로서 24시간 가수분해후 아미노산 분석을 실시한 결과 Gly, His, Lys이 1.02: 1.13: 0.96 의 비율로 존재하고 있음을 알 수 있었다. (Fig. 3) 또한 전자현미경 분석결과 펩티드가 결합된 비드는 키토산 비드에 비해 덜 porous 하였고 보다 매끈한 표면구조를 보였다. (Fig. 4)

4. 결 론

W/O 에멀전 상분리법을 이용하여 키토산 마이크로캡셀과 비드를 얻을 수 있었다. 유화제, 보조계면활성제, 유기상의 종류 및 함량변화에 따른 유화안정도를 관찰한 결과 유화제의 함량이 증가될수록 에멀전의 안정도는 대체로 증가하였다. 또한 보조계면활성제로 n-hexanol을 첨가했을때 상승효과가 나타나는 것이 관찰되었다. 톨루엔을 유기상으로 사용하고 sorbitan mono- oleate 0.3%, n-hexanol 0.1%를 사용하여 제조된 비드의 경우 평균 입자크기는 약 70 μ m 정도였다. 모델 펩티드로서 GHK를 생체 친화성이 우수한 chitosan bead 위에 합성할 수 있음을 알 수 있었다. 이와같이 chitosan bead가 세포 성장인자와 같은 여러가지 생리활성 펩티드의 운반체로서 적당한 biopolymer가 될 수 있으며, 또한 펩티드 커플링에 있어서 좋은 고체상 지지체일 뿐만 아니라 생리활성 펩티드의 운반체로 작용할 수 있음이 밝혀졌다.

Abstract

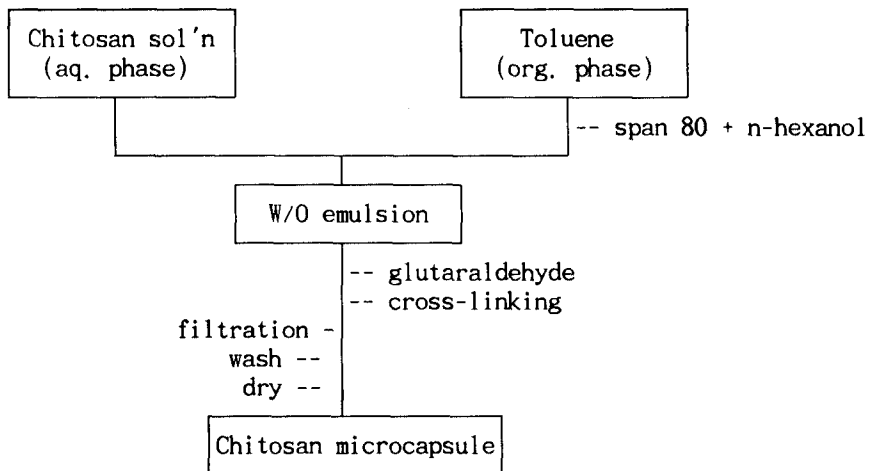
Empty cross-linked chitosan microcapsule was prepared by chemical cross-linking reaction using glutaraldehyde (GA). Chitosan bead was also prepared by coacervation method using sodium hydroxide. The technique

involves the formation of a chitosan solution in the discontinuous phase of W/O emulsion. The factors influencing the emulsion stability have been examined to establish optimum conditions.

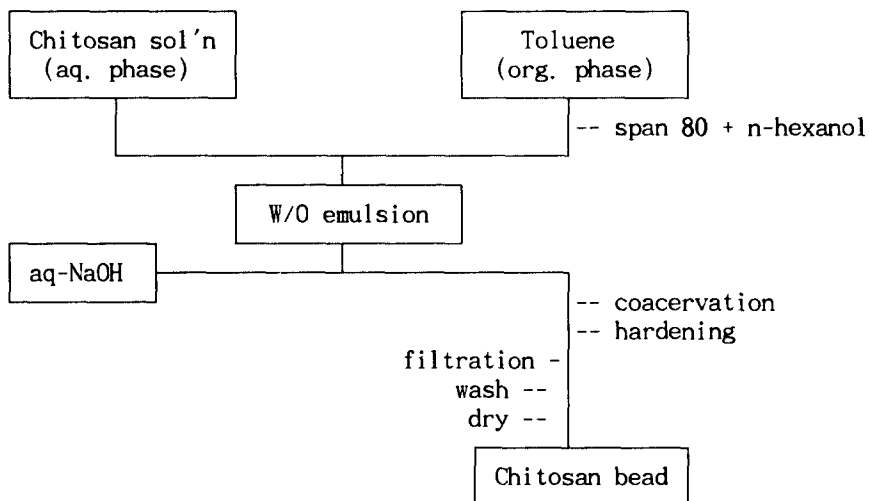
Chitosan microcapsules were useful for encapsulation of biological materials, and chitosan bead was useful to prepare the biologically active peptide-bound polysaccharide. As a model compound Gly-His-Lys, cell growth factor, was successfully coupled to chitosan bead.

참 고 문 헌

- 1) S.B. Gudmund, A. Thorleif, and S. Paul, "Chitin and Chitosan", Elsevier Science Publishers, New York, 1989.
- 2) R.A.A. Muzzarelli, "Chitin", Pergamon Press, Oxford, 1977.
- 3) R.A.A. Muzzarelli, "Natural Chelating Polymer", Pergamon Press, Oxford, 1977.
- 4) W.A. Wood and S.T. Kellogg, "Methods in Enzymology", Vol 161, Academic Press, New York, 1988.
- 5) R.L. Whistler and M.L. Wolfrom, "Methods in Carbohydrate Chemistry", Vol 1, Academic Press, New York, 1962.
- 6) S. Aiba, *Makromol. Chem.*, **194**, pp 65-75 (1993).
- 7) A. Dalpozzo, K. Kanai, G. Kereszturi, and G. Calabrese, *Int. J. Peptide Protein Res.*, **41**, pp 561-566 (1993).
- 8) D. D. Perin, *et al.*, "Purification of Laboratory Chemicals", 2nd edition, Pergamon Press, Oxford (1980).
- 9) S. Mima, M. Miya, R. Iwamoto, and S. Yosikawa, *J. Appl. Polym. Sci.*, **28**, pp 1909-1917 (1983).
- 10) W.A. Neugebauer, *Carbohydrate Research*, **189**, pp 363-367 (1989).
- 11) B.F. Gisin, *Anal. Chim. Acta*, **58**, pp 248-249 (1972).
- 12) E.T. Kaiser, R.L. Colecott, C.D. Bossinger, and P.I. Cook, *Anal. Biochem.*, **34**, pp 595-5980 (1970).
- 13) E. Atherton, and R.C. Sheppard, "Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach", IRL Press, New York, pp 134-140 (1989).
- 14) T. Sannan, K. Kutita, K. Ogawa, and Y. Iwakura, *Polymer*, **19**, pp 458-459 (1979).
- 15) J.G. Domszy and G.A.F. Roberts, *Makromol. Chem.*, **186**, pp 1671 (1985).



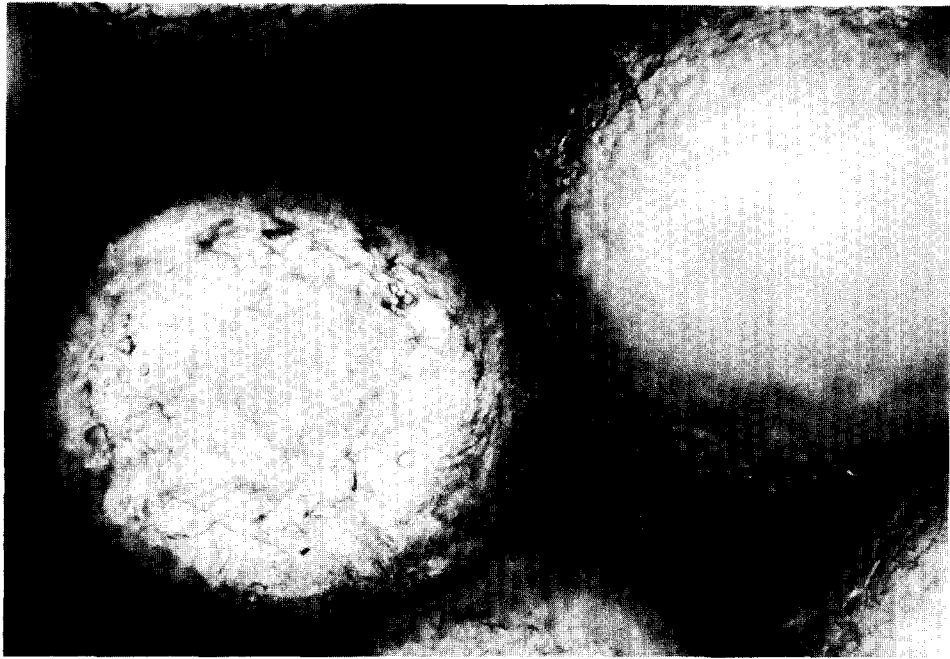
Scheme I. Preparation of chitosan microcapsule using glutaraldehyde.



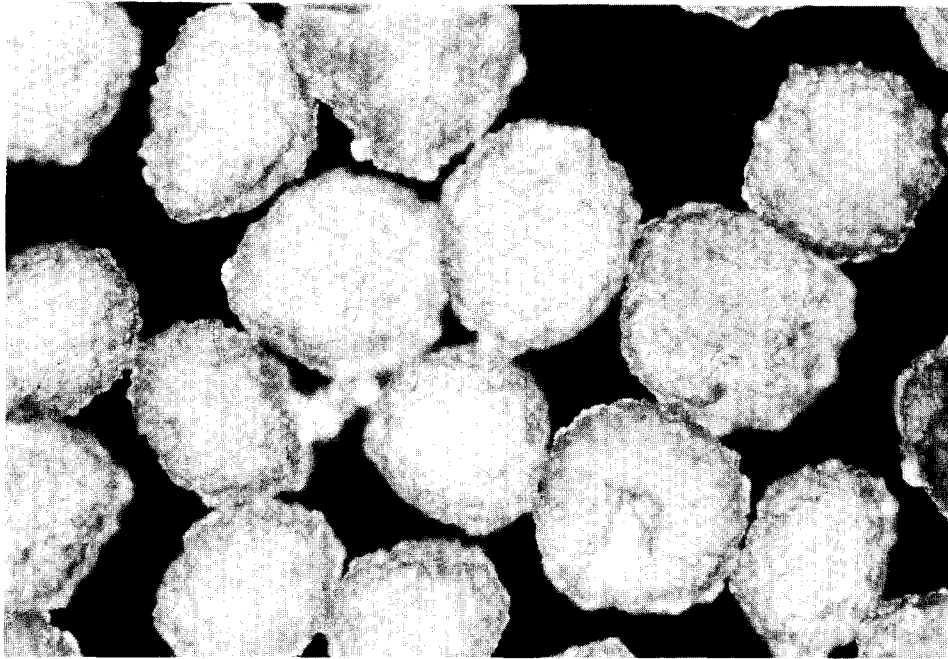
Scheme II. Preparation of chitosan bead using sodium hydroxide solution.



Figure 1. Microphotograph picture of cross-linked chitosan microcapsule using glutaraldehyde (x400)



(a)



(b)

Figure 2. Microphotograph picture of chitosan bead (x400)

(a) wet state (b) dry state

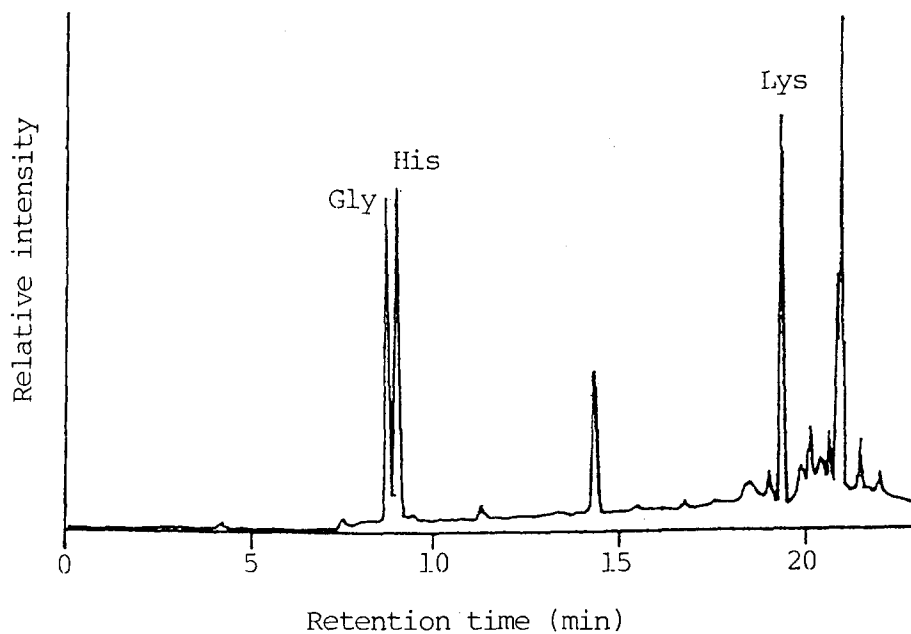
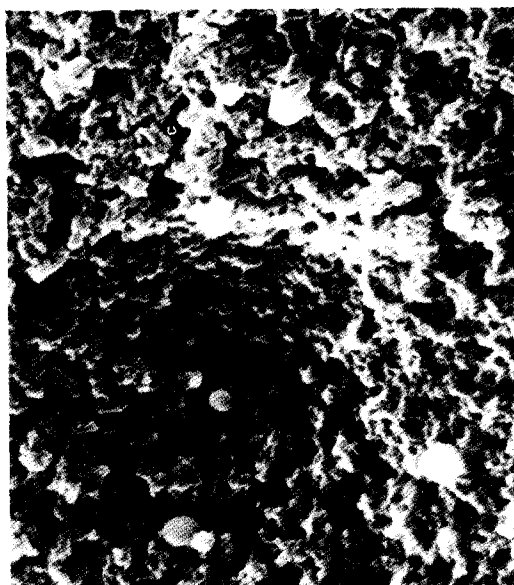


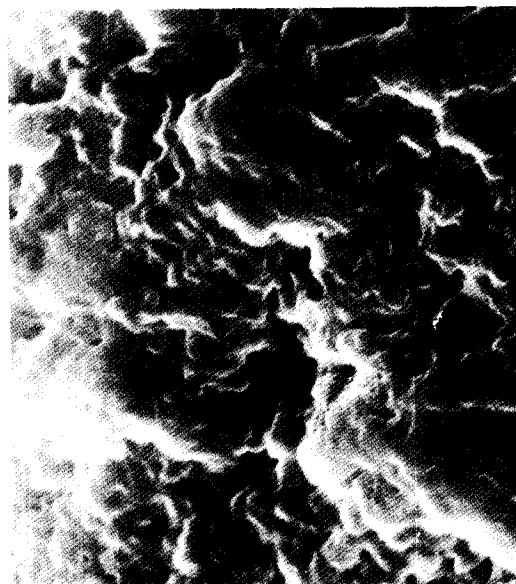
Figure 3. Analytical HPLC profile of Fmoc-G-H(Trt)-K(Boc)- ϵ -ACA-chitosan hydrolyzate. The solvent systems were solvent A (1.4mM NaOAc / 0.1% TFA / 6% CH₃CN) and solvent B (60% CH₃CN). The sample was eluted with linear gradient of solvent B (0-100%) at a flow rate of 1.0 ml/min. The results of amino acid analysis gave Gly_{1.02} His_{1.13} Lys_{0.96}



(a)



(b)



(c)

Figure 4. SEM pictures of the surface of chitosan bead and Fmoc-G-H(Trt)-K(Boc)- ϵ -ACA-chitosan bead [(a), (c) : x7200, (b) : x660]