

합성보존제(benzalkoniumchloride)와 천연보존제(키토산)의 세포독성 및 항균활성에 관한 연구

박현주, 이기영

전남대학교 생물화학공학과

전화 (062) 530-0327, FAX (062) 530-1824

Abstract

Cytotoxicity and antibacterial activity of preservatives were examined. Fibroblast cell L929 was used for cytotoxicity experiment and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Trichoderma reesei* ATCC6967 were used for antibacteria and antifungi. Benzalkoniumchloride(BAK) as synthetic preservative and chitosan as natural preservative were used. Minimum inhibitory concentration(MIC) of BAK was 0.1% for *P. aeruginosa* and 0.001% for *S. aureus* and 0.1% for *T. reesei*. MIC of chitosan was 2% for *P. aeruginosa* and 1% for *S. aureus*.

서론

보존제는 항균성을 필요로 하는 모든 제품에 광범위하게 사용되는데 눈에 점안하는 약제에도 일반적으로 benzalkoniumchloride(BAK)와 같은 보존제가 사용되며 사용농도 범위는 0.01~0.001%이다. BAK는 보통 점안약에 0.01% 농도로 쓰이는데 미국의 경우, US pharmacopoeia (USP)나 Federal Food Drug Administration (FDA)에서 보존제(Preservatives)가 접촉하는 조직에는 독성효과를 유발하지 않아야 한다고 규정하고 있다.¹⁾ 각막은 외부로 노출되어 있기 때문에 장기간 동안 콘택트렌즈와 관리 용액과 접촉이 계속되어 각막에 심각한 부작용을 줄 수 있다. 보존제는 장기간 사용시에 눈에 독성을 일으키는 것으로 알려져 있으므로 독성을 일으키지 않으면서 항균성이 있는 보존제의 필요성이 증가되고 있다.²⁾ 키토산은 천연 항균제로 알려져 있는데 다른 약리작용도 뛰어나 건강식품, 증점제, 보습제 등의 용도로 사용되고 있으며 각 분야에서 연구가 활발하게 이루어지고 있다. 이에 본 연구는 식품의약품 안전청의 세포독성 검사 방법과 유사하지만 더 민감한 방법을 이용하여, 보존제의 세포증식 저해 및 안정성에 대한 기초자료를 조사하기 위해 섬유모세포를 배양하여 세포증식 저해정도를 비색반응 검사로 검정하여 비교하고자 시행하였다. 키토산의 점안약 보존제로서의 연구는 아직 없으므로 향후 이 분야의 응용에 기초자료로 사용될 수 있다.

재료 및 방법

세포독성 검정에 사용된 세포주는 생쥐섬유모세포(L929 Cell)이며 배양액은 α -MEM (Minimum Essential Medium Alpha Medium(GIBCO))이고, 10%의 Fetal Bovine Serum (FBS)와 Fungizone($30\mu\text{l}/\text{ml}$), Antibiotics($10\mu\text{l}/\text{ml}$)로 구성되어, 세포는 3일마다 계대하였다. 세포의 배양은 37°C , 5% CO_2 로 조정된 CO_2 항온기 (Forma Co. USA)에서 24hr 배양하였으며, 배양한 세포를 0.25% trypsin-EDTA (ethylenedia-minetetraacetate)를 처리하여 세포를 부유시킨 다음 혈구계산기로 세포수를 계수한 후 4×10^3 cell/ml 세포를 96well-plate(NUNC)에 $200\mu\text{l}/\text{well}$ 분주해 세포가 60-70%정도 채워졌을 때 실험에 사용하였다.

세포독성검정은 Mosmann(1983)의 방법으로 세포소기관인 mitochondria의 활성을 조사해 세포활성을 측정하는데, 96 Well plate에 세포주를 24시간 전배양 후 benzalkoniumchloride와 키토산이 농도별로 포함된 medium을 처리 하여 시간별로 24hr, 48hr, 72hr 후 MTT가 포함된 배양액으로 배양한 다음 20분 경과 후 Dimethylsulfoxide(DMSO)로 formazan을 용해시켜 ELISA Reader로 570 nm에서 흡광도를 측정하여 대조군과 비교하여 30%이상 세포증식저해가 있을 때를 독성이 있는 것으로 하였다.

항균성검정에 사용된 균주는 *P. aeruginosa*, *S. aureus*였으며, Muller-Hinton Broth(MERCK, 21 g/L)를 배지로 사용하였다. *T. reesei*를 항진균 검정에 사용하였고, Potato Dextrose Broth(DIFCO, 24g/L)를 배지로 사용하였다. 한천 1.5% 용액을 만들어 이것에 보존제를 농도별로 처리한 후 멸균되어진 petri dish(87×15 mm)에 분주하여 응고시킨 다음, 여기에 각각의 실험 균주를 도말하였다. 배양조건은 37°C , 24hr, 48hr, 72hr에서 배양하여 균의 증식이 억제된 정도를 대조군과 비교하여 최소억제농도(MIC)를 구하였다.

결과 및 고찰

L929세포의 24hr, 48hr, 72hr에 대해 각각 보존제의 농도에 따른 세포독성검정 결과 세포의 30%이상 성장저해를 일으키는 농도는 BAK의 경우 0.001%였고, 키토산의 경우는 0.6%였으며 이 결과는 시간에 따라 유의성 있는 변화가 없었다. 각각의 균에 대한 BAK의 항균항진균 활성을 나타내는 최소저해농도는 *P. aeruginosa*가 0.1%였고, *S. aureus*가 0.001%였으며 *T. reesei*가 0.1%였다. 키토산은 *P. aeruginosa*의 경우 2%, *S. aureus*가 1%에서 48시간 동안 정균작용을 나타냈으며, 48시간 후에는 균의 성장을 촉진 시켰다. 진균에 대해서는 농도 의존적으로 생육을 촉진시켜서 항진균 기능은 없는 것으로 나타났다. 눈의 정상세균총으로 분류되는 *P. aeruginosa*와 *S. aureus*에 대한 BAK의 항균성은 각각 0.1%와 0.001%로 나타나 BAK가 *P. aeruginosa*에는 약하고, *S. aureus*에는 강한 항균작

용을 나타냄을 보였으며, 항진균성도 떨어짐을 보였다. 점안약에 사용되는 농도 범위가 0.01~0.001%인 것을 고려할 때 각각의 세균과 진균에 대해 활성을 가지려면 더 고농도로 처리되어야 하는데 그로 인해 야기되는 세포독성의 문제가 있다. 천연보존제는 세포활성과 항균성을 가지고 있지만 이 역시 시간이 경과되면서 역가가 떨어지는 문제와 진균에 저항성이 없다는 문제가 있다. 그에 대한 대안으로 천연보존제가 들어 있는 점안약의 유통기한을 줄이거나, 1회용품의 사용 등을 생각해볼 수 있다.

요약

점안약에 광범위하게 사용되는 보존제(preservatives)의 세포독성 및 항균활성 및 항진균 활성을 검정하였다. 세포독성은 L929세포를 사용하였으며, 항균항진균 활성 검정에 사용된 균주는 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, *Staphylococcus aureus* ATCC25923 등 2가지이고, 진균은 *Trichoderma reesei* ATCC6967을 사용하였다. 사용된 시약은 합성보존제인 benzalkoniumchloride(BAK)와 천연보존제인 키토산이며 키토산의 분자량은 60,000, 탈아세틸화도는 95%, 점도는 2cps였다. L929세포에 대해 24hr, 48hr, 72hr에 대해 각각 농도에 따른 세포독성검정 결과 세포의 30%이상 성장저해를 일으키는 농도는 BAK의 경우 0.001%였고, 키토산의 경우는 0.6%였으며 이 결과는 시간에 따라 유의성 있는 변화가 없었다. 각각의 균에 대한 BAK의 항균항진균 활성을 나타내는 최소저해농도는 *P. aeruginosa*에는 0.1%였고, *S. aureus*에는 0.001%였으며 *T. reesei*에는 0.1%였다. 키토산은 *P. aeruginosa*의 경우 2%, *S. aureus*가 1%에서 2일간 징균작용을 나타내었다. 진균에 대해서는 농도 의존적으로 생육을 촉진시켰다. 천연보존제는 합성보존제에 비해 독성을 일으키지 않으며 약리작용이 있는 반면에 항균성이 떨어지므로 이에 대한 연구가 더 필요하다.

참고문헌

1. 시력 보정용 콘택트렌즈 기준 및 시험 방법, 식품의약품안전청 고시 제 1999-18호('99.3.10)
2. 국립보건안전 연구원, LAS-Na 및 ASME의 마우스에 대한 급성경구 독성시험, 피부자극시험, 안 점막 자극시험결과 보고서, 1993
3. York M. and Steiling W. 1998. A critical review of the assessment of eye irritation potential using the Draize rabbit eye test. J. Appl. Toxicol, 1998, 18(4):233-240
4. Keith A. Booman, Betty Kong, Tito M. Cascieri, William C. McCormick III, Janis Demetruilias, Helen North-Root, Arno Driedger, Micheal G. Rozen, John F. Griffith, Richard I. Sedlak, Gregory T. Grochoski, in vivo methods for estimating eye irritancy

- of cleaning products phase I : Preliminary assessment. *J. Toxicol.*, 1988, 7(3):173-185
5. 윤 영, 유근창, 김재민, 나명석, 이종빈, 다목적 콘택트렌즈 용액이 HCE 와 L929 세포에 미치는 저해효과. *대한시과학회지*, 1999, 1(1)81-88
 6. Ishidate, M and Soufuní, T., The in vitro chromosomal aberration test using chinase hamster lung fibroblast cell in culture. *Mut. Res.*, 1988 5:427
 7. Ubles JL, McCartney MD, Lantz WK, Beaird J, Dayalan A, Edelhauser HF : Effects of preservative-free artificial tear solutions on corneal epithelial structure and function. : *Arch Ophthalmol* 1995 MAR; 113(3): 371-8
 8. 이종수. 염부섭 : 가토의 각막실질세포에 미치는 인공누액 및 항염증 점안약의 효과. *대한안과학회지*, 제 39 권 제 1 호 1998
 9. Tripathy BJ, Tripathy RC, Kolli SP : Cytotoxicity of ophthalmic preservatives on human corneal epithelium. : Visual Sciences Center, University of Chicago, IL 60637
 10. 김재민, Cytosine arabinoside와 Vinblastine이 배양 생쥐 섬유모세포에 미치는 세포유전독성에 관한 연구. *전남대학교 대학원 박사학위 논문*.1990
 11. Frank Becquet, Marie Goldschild, Mihnea S. Moldovan, Mohamed Ettaiche, Pierre Gastaud and Christophe Baudouin, Histopathological effects of topical ophthalmic preservatives on rat corneconjunctival surface, *Current Eye Research*, 419-425, 1997.
 12. Skehan P., streng R. and scudiero D.: New colormetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J. of the National cancer institute*. 82(13),1107,1990
 13. Lynn Ferris : BME Test Report, pp. 99-50, 1999