

키토산-알긴산-Fe(II) 복합체의 항균활성

전영현¹ · 김광윤² · 오석중² · 임선영¹ · 전순배¹ · 배 석^{1*}

¹전남대학교 생명과학부, ²(주) 이코 바이오

Antimicrobial Activity of Chitosan-alginate-Fe(II) Complex. Chun, Young-Hyun¹, Kwang-Yoon Kim², Suk-Jung Oh², Suhn Young Im¹, Soon-Bai Chun¹, and Suk Bai^{1*}. ¹Department of Biological Science, College of Science, Chonnam National University, 300 Youngbong-Dong, Puk-Gu, Gwangju, South Korea, ²EcoBio Inc., TBI center, Chonnam National University, Gwangju, South Korea – The antibacterial activity of chitosan-alginate-Fe(II) complex (CAFC) against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, and an opportunistic pathogen, *Candida albicans*, was investigated. A concentration of 1 mg/l was needed to inhibit the growth of *S. aureus* and *E. coli*, while 100 mg/liter was sufficient for the growth inhibition of *Candida albicans*. The ion leakage of potassium and phosphate from *E. coli* cell and the penetration of ethidium bromide dye into it indicate that CAFC might be able to increase the cell permeability and consequently cellular leakage, thus leading to cell plasmolysis. Scanning electronmicroscope showed that *E. coli* cells treated with CAFC became irregular, swelling and expanded. In a field trial, control piglets showed average mortality of up to 60% within 3 days after the onset of diarrhea. In contrast, CAFC-treated groups without mortality was decreased to average 56% on the 1st day after the treatment, and average 7% on the 3rd day. After then, piglets with diarrhea was not found.

Key words : Chitosan-alginate-Fe(II) complex, antimicrobial activity

키토산은 N-acetyl-β-D-glucosamine이 직쇄형으로 결합된 염기성 다당류로 갑각류와 곤충의 골격을 그리고 곰팡이의 세포벽을 이루고 있으며, 이를 알칼리로 탈아세틸화 시키면 키토산이 된다. 키토산은 자돈설사유발균에 항균효과가 있다고 알려져 있고[9], 또 항균력은 키토산의 중합도와 이의 유도체에 따라 차이가 있다고 보고된 바 있다[6, 7, 14, 15, 17]. 한편 알긴산은 β-D-mannuronate 와 이의 C-epimer인 α-L-guluronate와 비분지된 1 → 4 결합으로된 중합체로 갈조류의 세포성 구성분이다. 알긴산은 점도가 있기 때문에 식품, 의약품, 화장품의 제조에 이용되고 있다. 또한 알긴산은 대식세포의 활성을 증진시켜 항암효과가 있는 것으로 보고되고 있고[13], 의약품 및 단백질 운반체[3, 4, 5, 12, 18]로 효소 고정화[11]와 상처 드레싱[10, 16]에 사용되는 키토산-알긴산중합체 비드의 제조에 이용되고 있다. 그러나 키토산-알긴산 복합체의 액상 금속착화합물의 항균효과에 대해서는 보고된 바 없다. 이에 본 연구에서는 chitosan-alginate-Fe(II) 복합체(CAFC)의 돼지설사유발균인 *Escherichia coli*와 *Staphylococcus aureus* 그리고 기회성 병원균인 *Candida albicans*에 대한 항균효과를 알아보고, *E. coli* 세포로부터의 이온유출 및 ethidium bromide에 의한 세포 핵염색 정도를

조사한 다음 자돈설사 치유에 대한 CAFC의 효과를 알아보았다.

본 실험에 사용한 CAFC은 키토산(Mw 2000-3000, Tahoan Chemicals, Korea)과 알긴산(Mw 1500-2000, EcoBio Inc, Korea)를 2:1 무게 비율로 혼합하고 여기에 Fe₂SO₄를 3%되게 첨가하여 90°C에서 2시간 공중합하여 제조하였다. 제조된 CAFC는 수용성이었으며 분자량이 2000-5000 달톤이었고 탈아세틸화는 95% 이었다. 한편 실험에 사용된 세균은 *Escherichia coli*-0157:H7(ATCC 43894)와 *Staphylococcus aureus*(ATCC 6438p)이었으며 냉동보관하면서 실험전 육즙 고체배지에 도말하여 집락의 성상을 확인한 후 단독집락을 골라 50 ml 육즙배지를 함유한 250 ml 플라스크에 접종하여 37°C에서 18시간 진탕배양하였다. 배양액의 OD가 0.7(10⁷ CFU/ml)이 되도록 조정한다음 CAFC를 농도별(0.1, 0.01, 0.001, 0.0001%)로 첨가한 4개의 처리군과 CAFC를 첨가하지 않은 대조군을 두었다. CAFC의 항균력은 이를 첨가한 후 2시간 후에 각 처리군별로 100 μl씩 채취하여 900 μl의 인산완충용액을 넣은 캡 시험관에서 잘 섞은 다음 이중 50 μl씩을 채취하여 혈액 한천배지에 도말한 후 24시간 배양하여 나타난 집락수(CFU)를 계측하였다. 한편 CAFC에 의한 *Candida albicans*의 성장억제측정은 Sabouraud dextrose (SD, Difco) 액체배지에서 대수증식기까지 전배양한 세포를 본배양에서 OD값이 0.6이 되었을때(4×10⁶ CFU/ml) 균액 100 μl를 새로운 배지 800 μl에 접종하고 여기에 CAFC 수

*Corresponding author

Tel. 062-530-3412, Fax: 062-530-3409

E-mail: sukbai@chonnam.ac.kr

용액 100 μ l를 넣어 2시간 배양한 후 단계별 희석하여 배양 균액 50 μ l를 SD 고체배지에 도말하고 이때 형성된 집락수를 세어 균 감소율을 조사하였다. 대조군으로는 CAFC대신에 인산완충용액(0.1 M, pH 6.5) 100 μ l를 사용하였다.

칼륨이온과 인산염 이온의 세포밖으로의 유출을 알아보기 위하여 *E. coli*를 OD값이 1.2 이상(3×10^9 CFU/ml) 되게 배양한 후 원심분리로 수확한 다음 이를 탈이온수로 2회 세척하였다. 세척된 세포는 CAFC(0.001%)으로 처리하여 대조군과 함께 세포밖의 칼륨이온과 인산염 이온의 농도를 ICP로 측정하였고, 0.01% CAFC으로 처리한 *E. coli* 세포의 EB(Ethidium bromide)에 의한 핵염색상은 confocal scanning laser microscope으로 관찰하였다.

CAFC가 대장균성 설사증 치료효과가 있는지를 알아보기 위하여 전남소재 40-50두 규모의 전업양돈장 중 대장균성 설사증이 발생한 3개 농장을 선정하여 1-4 산차의 모돈에서

Table 1. Effect of CAFC on microbial growth

CAFC con.(%) Microorganisms	Number of viable cells (log ₁₀ CFU/ml)					
	0	1	0.1	0.01	0.001	0.0001
<i>E. coli</i>	7.38	N.D	0	0	2.35	5.28
<i>Staphylococcus aureus</i>	5.21	N.D	0	0	2.50	5.45
<i>Candida albicans</i>	7.38	0	2.32	6.28	N.D	N.D

N.D: not determined. The values are the mean from three experiments with standard deviation from 0.12 to 0.38

출생한 7일령 이내의 설사증이 나타난 5복의 자돈을 사용하였고, 대조군은 분만후 1-2일령의 조발성 설사증을 보이는 1복의 동복 자돈을 대상으로 하였다. 실험군으로 대조군과 마찬가지로 동일 모돈에서 출생한 동일 일령의 설사 유발 자돈을 사용하였다. 실험군은 5% CAFC를 3 ml씩 3일간(2회/1일) 경구투여한 군과 대장균과 설사증이 발생한 복은 CAFC 처리없이 대조군으로 사용하였다.

CAFC에 의한 항균력을 조사한 결과 *E. coli*와 *Staphylococcus aureus*는 0.01% CAFC에서 그리고 *Candida albicans*는 1.0% CAFC에서 각각 2시간 처리하였을 때 균증식이 완전히 억제되었고(Table 1), Table 1에서 본바와 같이 0.001% CAFC에서 *E. coli*의 대수 감소값이 약 5 정도였으나 *Staphylococcus aureus*에서는 약 2이었다. 한편 *Candida albicans*는 0.1% CAFC에서 대수 감소가가 약 5이었다. Jummaa 등[8]은 *Staphylococcus aureus*를 0.07% 키토산(Mw, 87000)에서 24시간 처리시 대수 감소가가 5이었으나 *Candida albicans*는 1.5% CAFC 수용액에서 균의 감소가 없었다고 보고한 바 있고, Choi 등[1]은 0.1% 키토산(Mw, 2000-3000)에서 2시간 처리시 *Actinobacillus actinomycetomcomitans*의 대수 감소가가 약 5이었다고 보고 한 바 있다. 따라서 CAFC는 짧은 시간에 그리고 낮은 농도에서 항균효과가 있음을 알수 있었다.

CAFC의 항세균기작을 알아보기 위하여 CAFC로 시간별 처리한 *E. coli*를 주사현미경으로 관찰하였다. Fig. 1에서 보

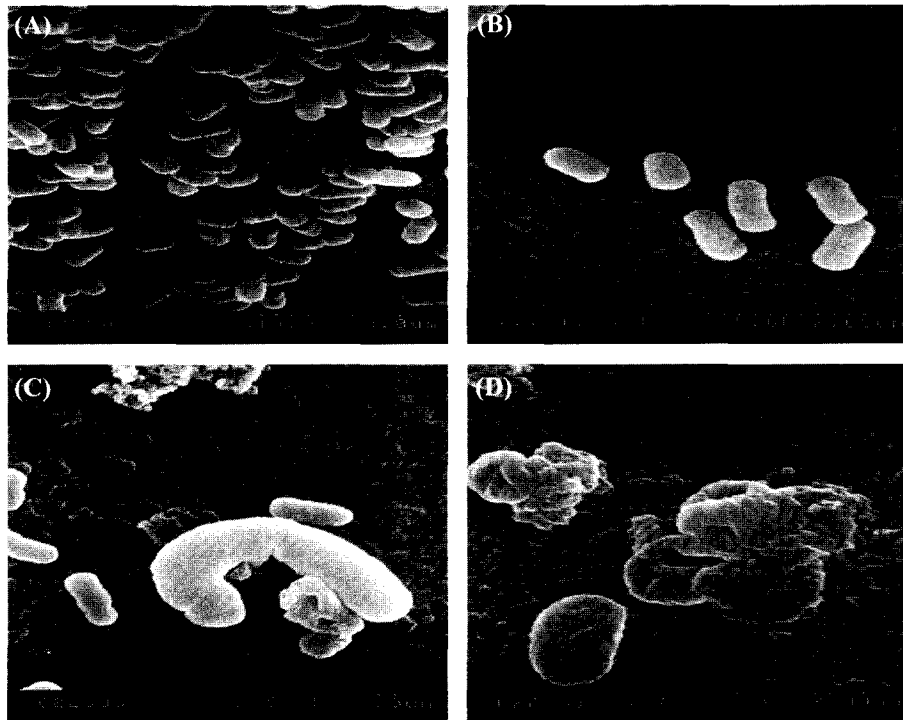


Fig. 1. Effect of CAFC on the morphology of *E. coli* as demonstrated by Scanning electron microscope. A: Bacterial cells not treated with CAFC. Following cells were treated with 0.01% CAFC for given time(minute). B: 1(bacterial cell exhibit a little swelling),C: 3(cell is expanded) D: 5(cells were irregular, swelling and agglutinated).

여준바와 같이 처리 3분 부터 대조군과 비교했을 때 세포의 팽화 및 외형의 불규칙화를 볼수 있었고 처리 5분 후에는 일그러진 세포의 응집현상을 볼 수 있었다. 또한 칼륨 및 인산염 이온의 세포로부터 유출과 EB에 의한 핵 염색상으로 세포막의 투과성의 변화를 알아보았다. Fig. 2에서 보여준바와 같이 0.05% CAFC로 처리한 실험구에서 대조구에 비해 칼륨이온 및 인산염이온의 유출량이 증가함을 볼수 있었고, Fig. 3에서 보여준바와 같이 CAFC를 처리한 실험구에서는 처리 시간이 경과됨에 따라 대조구에 비하여 현광 반점이 증가하였다. 이같은 결과들은 세균의 세포막 투과성의 변화를 보여준 것이다.

Tasi 등[19]은 키토산의 아미노기의 양이온이 세균 세포벽의 음이온과의 결합으로 세포막의 삼투압의 변화를 초래 할 수 있다고 보고한 바 있고, Cohen 등[2]은 알긴산이 인지질 이중층에 삽입하여 세포막의 삼투압의 변화를 일으킬 수 있다고 보고한 바 있다. CAFC의 항균작용은 CAFC 분자내에 유리상태로 남아 있는 키토산의 양이온과 알긴산 분자의 지질층으로의 침투로 세포막 투과성의 변화에 기인 된 것 같다. 앞으로 이에 관한 보다 자세한 연구가 필요하리라 본다.

CAFC의 대장균성 자돈설사에 대한 치료효과를 알아보기 위하여 설사증이 발생한 포유자돈에 대하여 CAFC를 구두 투여하여 실험을 실시하였다(Table 2). CAFC를 처리하지 않은 대조군에서는 분만 후 7일 이내에 설사가 나타나 설사후

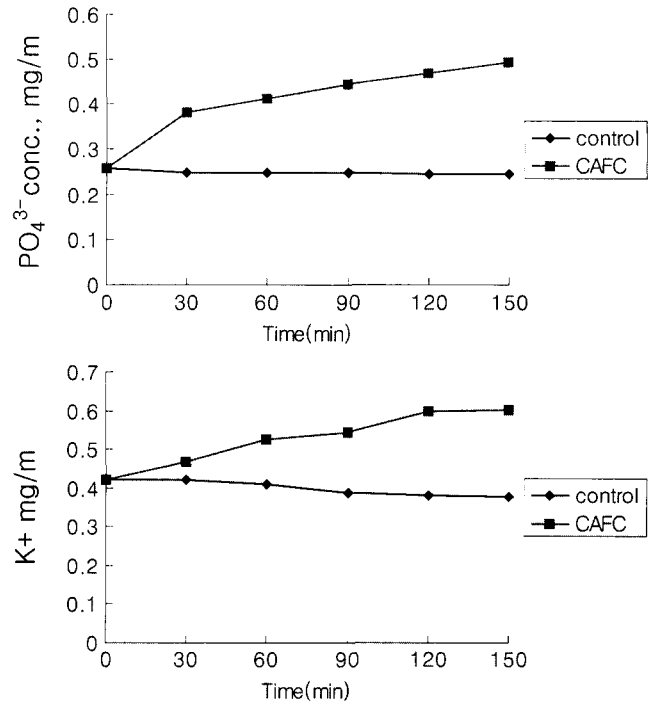


Fig. 2. Extracellular concentration of potassium and phosphate ions in aliquotes of *E. coli* without and with 0.01% CAFC. Data-points represent results from three independent experiments (coefficient of variation <5%).

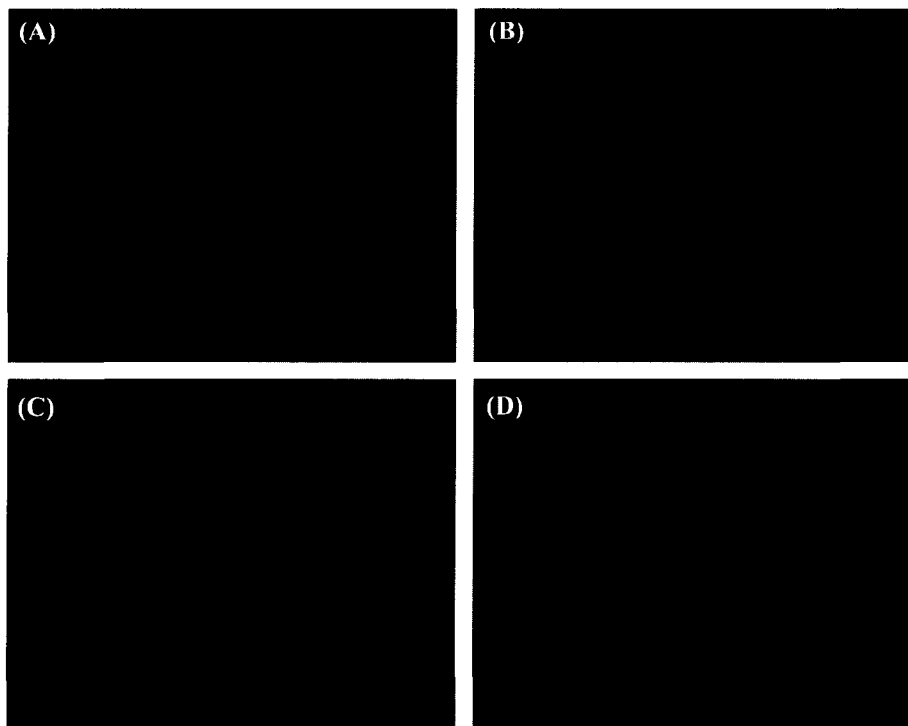


Fig. 3. Results illustrating the effect of exposure to 0.01% CAFC on the permeability of the membrane of individual cells of *E. coli* in nutrient broth (pH 6.5) by confocal scanning laser microscope by influx of the fluorescent nuclear stain ethidium bromide (10 µg/ml). The captured images are representative of typical results A: control B: treatment with CAFC for 30 min C: treatment with CAFC for 60 min D: treatment with CAFC for 90 min.

Table 2. Therapeutic effect of orally treated chitosan-alginate-Fe(II) complex derivative in piglets with diarrhea.

Group	No. of diarrheal piglets	Day(s) after CAFC treatment				
		1	2	3	4	5
Control	10	6 ^b	4	4	4	4
	8	8	7	4	4	4
	10	7	5	5	3	3
	8	6	5	1	1	1
	36	27/36 (75%)	21/36 (58%)	14/36 (39%)	12/36 (33%)	12/36 (33%)
CAFC treated	8	8 ^c	2	0	0	0
	9	5	2	1	0	0
	8	3	1	1	0	0
	7	4	2	0	0	0
	9	3	2	1	0	0
	41	23/41 (56%)	9/42 (22%)	3/4 (7%)	0/41 (0%)	0/41 (0%)

CAFC was administered 5 ml per day from the day of onset of diarrhea. ^b: No of survivals, ^c: No of diarrhea.

1일이 경과시 생존률이 75%, 2일 경과시 58%, 3일 경과시 는 약 40%으로 3일 이내에 60% 이상이 폐사하였다. 그러나 CAFC를 투여한 실험군에서는 설사자돈수가 1일 후에 56%으로 감소하였으며 2일 이후에는 22%으로 3일 후에는 7%으로 감소하였고, 4일 후에는 설사자돈이 나타나지 않아 대조군과 비교하였을 때 설사 치료 및 생존 효과가 있었다 (P<0.01).

REFERENCES

- Choi, B. K., K.Y. Kim, Y. J. Yoo, S. K. Oh, J. Choi, and C. Y. Kim. 2000. *In vitro* antimicrobial activity of a chitooligosaccharide mixture against *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Streptococcus mutans*. *Intern. J. Antimicrob. Agents*. **18**: 553-557.
- Cohen, S., M. C. Bano, M. Chow, and R. Langer. 1991. Lipid-alginate interactions render changes in phospholipid bilayer permeability. *Biochim. Biophys. Acta*. **18**: 1063.
- Douxian, S., S. Yan, D. Anlie, M. F. Goosen, and A. M. Sun. 1991. Studies on the degradation of chitosan and preparation of chitosan-alginate microcapsules. *Polymer. Biomaterials*. **3**: 295-300.
- Giunchedi, P., C. Juliano, E. Gavini, M. Cossu, and M. Sorrenti. 2002. Formulation and in vivo evaluation of chlorhexidine buccal tablets prepared using drug-loaded chitosan microspheres. *E. J. Pharmaceutics Biopharmaceutics*. **53**: 233-239.
- Hari, P. R., T. Candy, and C. P. Sharma. 1996. Chitosan/alginate beads for oral delivery of insulin. *J. Appl. Polymer Sci.* **59**: 1795-1801.
- Jeon, Y. J. and S. K. Kim. 2001. Effect of antimicrobial activity by chitosan oligosaccharide N-conjugated with asparagine. *J. Microbiol. Biotechnol.* **11**: 281-286.
- Jia, J., D. Shen, and W. Xu. 2002. Synthesis and antibacterial activities of quaternary ammonium salt of chitosan. *Carbohydrate Res.* **333**: 1-6.
- Jumaa, M., F. H. Furkert, and G. W. Muller. 2002. A new lipid emulsion formulation with high antimicrobial efficacy using chitosan. *E. J. Pharmaceutics Biopharmaceutics*. **53**: 115-123.
- Kim, H. K. 1998. Production of chitosan oligosaccharides and their antibacterial effect to pathogenic *Escherichia coli*. Pukyong University. PhD Thesis. 142-150.
- Kim, K. J., H. C. Lee, B. A. Shin, C. S. Oh, R. D. Park, K. S. Yang, and C. S. Cho. Polyelectrolyte complex composed of chitosan and sodium alginate for wound dressing application. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **10**: 543-556.
- Martinsen, A., I. Storro, and G. Skjak-Braek. 1992. Alginate as immobilization material- III. Diffusional properties. *Biotechnol. Bioeng.* **39**: 186-194.
- Mi, F. L., H. W. Sung, and S. S. Shyu. 2002. Drug release from chitosan-alginate complex beads reinforced by a naturally occurring cross-linking agent. *Carbohydrate Polymer*. **48**: 61-72.
- Michio, F., and N. Terukazu. 1992. The effect of the content of D-mannuronic acid and L-guluronic acid blocks in alginates on antitumor activity. *Carbohydrate Res.* **224**: 343-347.
- No, H. K., N. Y. Park, S. H. Lee, and S. P. Meyers. 2002. Antibacterial activity of chitosan and chitosan oligomers with different molecular weights. *Intern. J. Microbiol.* **74**: 65-72.
- Oh, H. I., Y. J. Chang, and J. Y. Kim. 2001. Antimicrobial characteristics of chitosan against food spoilage microorganisms in liquid media and mayonnaise. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **65**: 2378-2383.
- Quin, Y., and D. K. Gilding. 1996. Alginate fibers and wound dressings. *Med. Device Technol.* **7**: 32-41.
- Sudarshan, N.R., D. G. Hoove, and D. Knorr. 1992. Antibacterial action of chitosan. *Food Biotechnol.* **6**: 257-272.
- Thu B., P. Bruheim, T. Espevik, O. Smidsrod, and G. Skjak-Braek. 1996. Alginate polycation microcapsules - II. Some functional properties. *Biomaterials* **17**: 1069-1079.
- Tsai, G. J. and W. H. Su. 1999. Antibacterial activity of shrimp chitosan against *Escherichia coli*. *J. Food. Prot.* **62**: 239-243.

(Received Feb. 11, 2003/Accepted Mar. 12, 2003)