

## 양식 넙치의 세균성 질병에 대한 키토산 및 키토올리고당의 항균효과

양병규<sup>1</sup> · 이제희<sup>1</sup> · 김수현<sup>2</sup> · 전유진<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>제주대학교 해양생산과학부

<sup>2</sup>제주대학교 식품공학과

### Antimicrobial Effect of Chitosan and Chitoooligosaccharides against Bacterial Diseases of Cultured Flounder

Byung-Gyoo Yang<sup>1</sup>, Jehhee Lee<sup>1</sup>, Soo-Hyun Kim<sup>2</sup> and You-Jin Jeon<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Applied Marine Science, Cheju National University, Jeju 690-756, Korea

<sup>2</sup>Dept. of Food Science and Technology, Cheju National University, Jeju 690-756, Korea

#### Abstract

Antimicrobial effect of chitosan and its oligosaccharides was examined on *Vibrios* sp., *Edwardsiella tarda* and *Streptococcus* sp., which are major pathogenic bacteria inducing bacterial diseases of aquacultured flounder. Chitosan oligosaccharides (COS) were produced by enzymatic hydrolysis of chitosan in an ultrafiltration membrane bioreactor system which was established with three membranes with different molecular weight cut-off (MWCO) 1,000, 5,000 and 10,000, and fractionated into three kinds of COS, based on their molecular weight sizes. The three kinds of COS were as follows: relatively high molecular weight COS [HMW-COS, molecular weight distribution of 7,000 to 24,000 Da], medium molecular weight COS [MMW-COS, 1,500 to 6,000 Da], and low molecular weight COS [LMW-COS, 1,000 to 1,500 Da]. Chitosan and HMW-COS effectively inhibited the growths of *Vibrio* sp. and *Streptococcus* sp. and their antimicrobial activities were superior to the others with smaller molecular weights. This result suggested that antimicrobial effect of chitosan preparations extremely depend on their molecular weight sizes. Antimicrobial effect of chitosan and HMW-COS on *E. tarda* was improved by longer inoculation times. Scanning electron microscopy in morphological change of *E. tarda* treated with chitosan preparations showed that chitosan and HMW-COS bound to the cells and suppressed the growth of the cells. This observation appears to prove the fact that positive charged amines of chitosan electrostatically bind to negative charged compounds of cell walls.

**Key words:** chitosan, oligosaccharides, antimicrobial activity, *Vibrio* sp., *Edwardsiella tarda*, *Streptococcus* sp.

#### 서 론

어류 양식산업의 급격한 성장에도 불구하고 해마다 증가하는 어류 질병은 양식산업의 발전을 크게 저해하고 있는 결정적인 요인으로 작용하고 있으며, 이에 따르는 어민들의 피해도 전 세계적으로 계속 증가되고 있는 추세이다. 어류 질병은 최근의 고밀도 육상수조 양식이나 어류 질병에 감염된 저품질의 습사료(moisture pillet, MP)의 급이로 인하여 증가되고 있는데, 이를 극복하기 위하여 사용되고 있는 항생제나 백신은 몇 가지 문제점을 안고 있다. 즉 항생제 투여는 항생제 내성이나 어류 체내의 항생물질 잔존 가능성으로, 백신요법은 모든 어류 질병에 대하여 적용하기가 어렵다는 것이다(1).

따라서 천연물로부터 어류의 세균성 질병을 예방하기 위한 천연 항균성 물질을 탐색하는 연구가 요구되고 있으며,

이러한 천연 항균물질은 식품 보존제나 병원성 미생물 살균제로서 기존의 합성제품을 대체할 수 있을 것이다.

키토산은 갑각류의 껍질이나 곤충의 세포벽에 존재하는  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-2-acetamino-D-glucose와  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-2-amino-D-glucose 구조의 반복단위로 구성되어 있으며, 전자의 구조가 70% 이상을 포함하고 있는 천연 biopolymer이며, 키토산은 키토산을 강알칼리 조건하에서 deacetylation하여 얻어진 것으로서  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-2-amino-D-glucose의 구성단위가 80% 이상 함유되어 있는 천연 biopolymer이다(2). 최근의 키토산에 관한 연구는 면역증강활성(3-9) 및 항암활성(10-15) 뿐만 아니라 항균활성(16-23)에 관해서도 많은 연구가 꾸준히 이루어지고 있다.

키토산은 지구상에 존재하는 많은 biopolymer들 중에서도 매우 드물게 poly cationic amine을 가지고 있다. 이것은 세균의 세포벽에 존재하는 음이온 거대분자와 이온 결합을 형

\*Corresponding author. E-mail: youjinj@cheju.ac.kr  
Phone: 82-64-754-3475, Fax: 82-64-756-3493

성함으로써 세균의 증식을 억제하는 것으로 보고되어 있다(24,25). 이러한 사실은 키토산의 항균활성은 그것의 탈아세틸화도에 따라 크게 의존하고 있다는 사실에 의해서 잘 증명되었다. 또한 키토산의 분자량도 항균활성에 매우 큰 영향을 미치고 있는 요인이다(20,26). 대개 중합도(degree of polymerization)가 6 이상(분자량 기준으로 약 1,200 Da)에서 항균활성이 발현되는 것으로 보고되어 있다.

저자는 이전의 연구에서 한외여과막 생물반응기에서 키토산의 효소적 가수분해를 통하여 분자량이 서로 다른 여러 가지 획분들의 키토산올리고당을 제조하여 항암활성(10), 면역증강활성(27) 및 항균활성(20,21) 등을 검토한 바 있다. 본 연구에서는 한외여과막 생물반응기에서 제조된 분자량이 서로 다른 3종류의 키토산올리고당을 제조하여 양식넙치의 세균성 질병의 주요 원인균, 즉 *Vibrio* sp., *Edwardsiella tarda*, *Streptococcus* sp. 등에 대한 *in vitro* 항균활성을 조사하여, 양식사료의 품질개선 및 식중독의 예방을 위한 천연 항균제로서의 키토산 및 키토산올리고당의 이용 가능성을 검토하였다.

## 재료 및 방법

### 실험재료

키토산올리고당의 생산을 위해 사용된 키토산 기질은 (주)키토라이프에서 제공받은 것으로서 탈아세틸화도가 89%이며, 점도는 20 cps였다. 키토산의 효소적 가수분해를 위해 사용된 키토산 분해효소는 *Bacillus pumilus* BN-262종에서 분리한 것으로서 분자량은 약 30,000 Da, 최적pH 5.5~6.5, 최적온도 30~50°C의 특성을 가지고 있으며, 일본의 Wako Pure Chemical Co.으로부터 구입하였다. 키토산올리고당의 효소적 가수분해에 의한 생산을 위해 사용한 한외여과막 생물반응기에서의 한외여과막은 Millipore Co.(Billerica, USA)로부터 각각의 서로 다른 한계분자량 범위를 가진 멤브레인들(molecular weight cut off(MWCO): 1,000; 5,000; 10,000)을 구입하여 사용하였다. 본 연구에서 사용된 모든 시약들은 분석용 특급시약들을 구입하여 사용하였다. 본 연구의 항균활성 검색에 사용된 균주는 *Vibrio* sp., *Edwardsiella tarda* 및 *Streptococcus* sp.이며, 제주도 양식장의 양식넙치(*Paralichthys olivaceus*)로부터 각각 분리, 동정한 후 사용하였다.

### 키토산올리고당의 제조

키토산올리고당은 전보의 방법(28)에 따라 한외여과막 생물반응기에서 키토산 가수분해효소를 이용한 효소적 가수분해 방법으로 제조되었다. 생산된 키토산올리고당은 MWCO가 서로 다른 한외여과막의 한계범위에 따라 3종류의 획분으로 분리되어져 얻어졌으며, 상대적으로 고분자량의 키토산올리고당(high molecular weight chitosan oligosaccharides: HMW-COS), 중간 분자량의 키토산올리고당(medium molecular weight chitosan oligosaccharides: MMW-COS),

저분자량의 키토산올리고당(low weight chitosan oligosaccharides: LMW-COS)이다. 전보에서의 방법(28)에 따라 Bio-Gel P-30/P-4 gel 및 TSKgel NH<sub>2</sub>-60 column 등을 사용하여 각각의 키토산올리고당의 분자량 분포를 분석한 결과 HMW-COS는 7,000~24,000 Da, MMW-COS는 1,500~6,000 Da, 그리고 LMW-COS는 1,000~1,500 Da이었다.

### 항균활성의 검색

키토산 및 키토산올리고당의 항균활성 측정은 전보에서의 방법(20)에 따라 콜로니 계수법(colony count method)으로 수행하였다. 즉 위의 제주산 양식넙치로부터 분리된 3종의 세균들을 영양액배지(nutrient broth; NB)에서 배양한 균액 0.5 mL( $2 \times 10^2 \sim 10^3$  colony/mL), 여러 가지 농도의 키토산올리고당 0.5 mL 및 0.05 M 초산완충액(pH 5.5) 4.0 mL를 각각 혼합하여 37°C에서 1시간동안 진탕 배양하였다. 이때 대조구로서는 키토산올리고당 용액 대신 0.05 M 초산완충액 0.5 mL를 첨가하였다. 이 배양액으로부터 1 mL를 취하여 10배 희석한 후, 그 중 1 mL를 tryptic soy 한천평판배지에 접종한 후 37°C에서 24시간 동안 배양하였다. 배양 24시간 후에 한천평판 배지위에 형성된 colony들의 수를 측정하고 후 대조구의 colony 수와 비교하여 세균에 대한 항균활성을 살균률(bactericidal activity, %)로 나타내었다. 키토산 시료의 세균성장의 억제활성에 대한 최소저해농도(minimum inhibitory concentration: MIC)는 키토산올리고당의 10,000 ppm 용액을 2배 희석함으로써 하여 만든 용액으로부터 1 mL를 취하고 여기에 5 mL의 배지와 0.05 mL의 균배양액( $10^5 \sim 10^6$  colony/mL)를 각각 첨가하여 37°C에서 24시간 배양한 후 육안으로 관찰하여 균의 콜로니가 전혀 형성되지 않는 100% 항균활성을 나타내는 시료의 농도를 MIC로 결정하였다. 한편, 3종의 병원성 세균에 대한 키토산올리고당의 처리 후 배양 시간을 1일~7일까지 수행하였을 때의 세균의 성장곡선을 관찰하였으며, 또한 세균에 대한 키토산올리고당의 처리시간(혹은 점종시간)에 따른 항균활성을 검토하기 위하여, 각각의 처리 혹은 점종시간을 0~180분까지 한 후 24시간 배양하여 콜로니 계수법(colony count method)으로 항균활성을 측정하였다. 본 연구에서는 여러 가지 분자량 크기에 따라 분획된 키토산올리고당의 항균활성을 키토산과 함께 비교하면서 실험을 진행하였다.

### 키토산 및 키토산올리고당의 항균기작에 대한 주사형 전자현미경 관찰

본 연구에서의 항균활성에 사용된 3종의 양식넙치 유래 병원성 세균들 중 *E. tarda*에 대한 키토산올리고당의 항균기작을 확인하기 위하여, 각각의 키토산올리고당 용액을 1,000 ppm 농도로 제조하여 *E. tarda*에 첨가한 후 상온에서 3시간 동안 배양하여 병원균의 형태적 변화를 주사형 전자현미경(scanning electron microscopy: SEM)을 통하여 관찰하였다. 즉, 키토산올리고당으로 처리한 *E. tarda* 배양균주를 원

심분리(8,000 g, 5분)하여 pellet을 모은 후 인산완충액(PBS, pH 7.2)으로 15분간 2회 세척하였다. 모아진 cell은 2.5% glutaraldehyde로 2시간동안 처리하여 전고정한 후 PBS로 15분간 2회 세척하였다. 이것을 다시 후고정을 위해 1시간동안 1% osmium tetroxide( $OsO_4$ )로 처리한 후 PBS로 다시 세척하였다. 세척된 세균들은 50~100%의 농도로 조절된 에탄올에 침적하여 순차적으로 탈수한 후 다시 60~100%의 농도로 조절된 isoamyl acetate를 이용하여 치환시키고 임계점 건조기(critical point dryer; HITACHI, HCP-2, Japan)를 이용하여  $CO_2$ 로 건조한 후 골드코팅(HITACHI, E-1010, Japan)하여 SEM으로 관찰하였다. 키토산으로 처리한 *E. tarda*에 대해서도 SEM으로 관찰하여 키토산올리고당으로 처리된 세균과 비교하였다.

### 결과 및 고찰

키토산은 천연 바이오 폴리머로서 그 생리기능성과 안전성 측면에서 매우 우수한 것으로 많이 보고되어 있어, 기능성 식품소재나 의약품 소재 등의 다양한 분야에서 응용하려는 움직임을 보이고 있다. 특히 키토산이 가지고 있는 poly cationic biopolymer로서의 기능성은 여러 가지 다양한 세균들에 대하여 높은 항균효과를 보여 왔으며, 특히 병원성 세균에 대하여도 우수한 항균활성을 나타내었다. 양식장에서 해마다 병원성 세균의 감염에 의한 다량의 양식어 폐사는 어민들에게 많은 피해를 입혀 왔으며, 희생을 즐기고 있는 소비자들에게도 늘 위협한 요소로서 자리를 잡고 있다. 이러한 문제를 해결하고자 키토산을 효소적 가수분해 방법으로 제조한 여러 가지 분자량획분의 키토산올리고당에 대하여 제주산 양식넙치로부터 분리한 *Vibrio* sp., *E. tarda* 그리고 *Streptococcus* sp.의 항균효과를 검토하였다. Fig. 1에서 나타난 것처럼 키토산은 측정된 모든 농도범위(100~1,000 ppm)에서 *Vibrio* sp.의 성장을 거의 100% 저해하였다. 키토산올리고당 중 비교적 분자량이 큰 HMW-COS는 시료의 농도가 500 ppm에서 약 80% 정도의 항균활성을 보였으며 1,000 ppm까지 농도를 증가시켜도 항균활성의 뚜렷한 증가는 보이지 않았다. 한편 MMW-COS와 LMW-COS는 모두 측정된 농도범위에서 항균활성이 60%를 넘지 못하였다. 그리고 이들 두 키토산올리고당의 MIC값도 모두 10,000 ppm을 나타내어 항균활성이 미약한 것으로 확인되었다. HMW-COS의 MIC값은 5,000 ppm으로서 키토산의 MIC값 1,250 ppm 보다는 높게 나타났지만, *Vibrio* sp.에 대하여 항균활성을 명확하게 증명하였다. 키토산올리고당이 *E. tarda*에 대한 항균활성은 Fig. 2에 나타내었다. 키토산을 제외한 3종류의 키토산올리고당을 1,000 ppm까지 첨가하였을 때 50% 정도의 항균활성을 보였으며, 키토산올리고당들 사이에는 유의성은 없었다. 키토산은 500 ppm의 농도에서 약 75%의 항균활성을 보였으며, 1,000 ppm의 농도에서도 약 80%의 매우

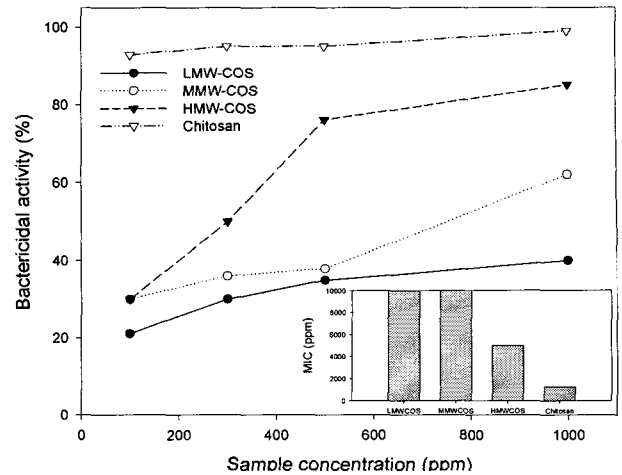


Fig. 1. Antimicrobial effect of chitosan and its oligosaccharides (COS) against a pathogenic bacterium, *Vibrio* sp., which was isolated from aquacultured flounder infected with vibriosis.

The small figure is MIC values of chitosan and COS against the bacterium. The antimicrobial effect was indicated as bactericidal activity evaluated by counting the number of colony of cells grown on tryptic soy agar plate for 24 h of incubation time.

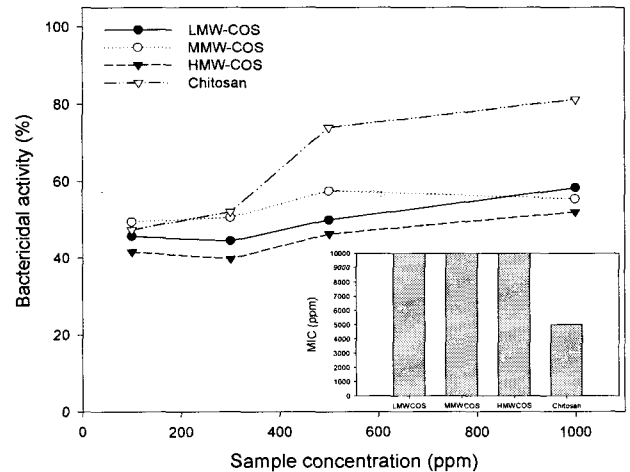


Fig. 2. Antimicrobial effect of chitosan and its oligosaccharides (COS) against a pathogenic bacterium, *Edwardsiella tarda*, which was isolated from aquacultured flounder infected with edwardsiellosis disease.

The small figure is MIC values of chitosan and COS against the bacterium.

완만한 활성증가만을 보여 주었다. *E. tarda*에 대한 MIC값에 대하여도 키토산이 5,000 ppm을 나타내었을 뿐, 3종류의 키토산올리고당은 모두 10,000 ppm을 나타내었다. *Streptococcus* sp.에 대한 키토산올리고당의 항균활성을 측정한 결과, Fig. 3에서 보는 것과 같이 키토산 뿐만 아니라 비교적 고분자의 키토산올리고당인 HMW-COS의 모든 농도범위에서 100%의 항균활성을 보였다. 하지만 MMW-COS와 LMW-COS는 모든 농도범위에서 20% 이하의 매우 낮은 항균활성을 보였다. 키토산 및 HMW-COS의 MIC값에서도 모두 625 ppm으로 매우 낮게 나타났기 때문에, *Streptococcus*

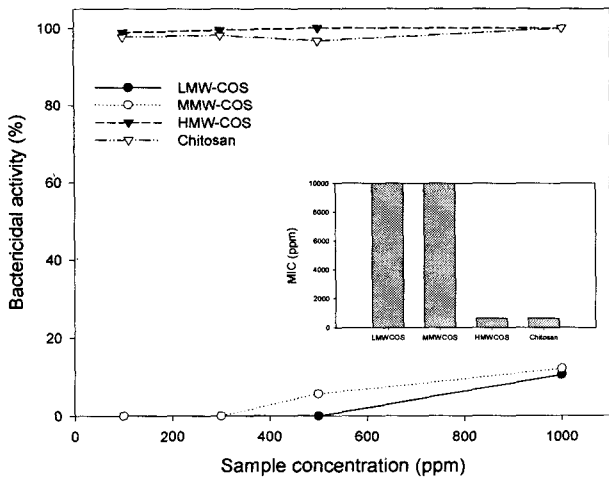


Fig. 3. Antimicrobial effect of chitosan and its oligosaccharides (COS) against a pathogenic bacterium, *Streptococcus* sp., which was isolated from aquacultured flounder infected with streptococcosis. The small figure is MIC values of chitosan and COS against the bacterium.

sp.에 대한 키토산과 HMW-COS의 높은 항균활성을 보여 주었다. 본 연구의 결과를 볼 때, 키토산과 비교적 고분자의 키토산올리고당인 HMW-COS는 *Vibrio* sp.와 *Streptococcus* sp.의 성장을 매우 효과적으로 억제하고 있음을 알 수 있었다.

양식넙치로부터 분리한 3종의 병원성 세균에 대하여 키토산올리고당을 처리한 후 배양시간의 경과에 따른 세균의 성장곡선을 측정하여, Fig. 4에서 보는 것과 같이 모든 세균들은 배양 3~5일까지는 성장이 증가하였으나 그 이후로는 감소하였다. *Vibrio* sp.와 *Streptococcus* sp.을 키토산 및 HMW-COS로 처리한 경우에는 배양기간 5일까지도 매우 낮은 성장을 보였으며, 배양 6일째부터는 성장이 억제되기 시작하여 7일째에는 거의 사멸하였다. *E. tarda*에 키토산 및 키토산올리고당을 처리하였을 경우에는 *E. tarda*의 성장이

키토산 무처리군에 비해서는 낮은 성장을 보였지만, 어떠한 시료의 처리도 배양 7일동안 완전히 사멸되는 현상은 보여 주지 못하였다.

3종의 세균에 대하여 키토산올리고당 및 키토산을 각각 0~180분까지 처리시간(혹은 점종시간)을 달리하였을 때의 항균활성을 측정하여, Fig. 5에서 보는 것과 같이 시료의 처리시간이 길어질수록 세균의 성장은 억제되었다. *Vibrio* sp.와 *Streptococcus* sp.는 키토산 및 HMW-COS의 처리시간이 1시간 이후에는 큰 변화가 없었던 것과 달리 *E. tarda*는 1시간 처리에서는 약 60%의 항균활성을 보이던 것이 2시간의 처리에서는 약 80%의 항균활성을 보여 시료의 처리시간의 증가에 따라 항균활성이 증가함을 보였다. 처리시간이 3시간으로 길어졌을 때에는 키토산 처리시 항균활성이 약간 더 증가하였으나, HMW-COS 처리에서는 항균활성이 거의 증가하지는 않았다. 본 실험에서 알 수 있듯이, 세균에 대하여 키토산 및 키토산올리고당의 처리시간(혹은 점종시간)이 길어질 경우 세균의 성장을 효율적으로 억제할 수 있음을 알 수 있었다.

키토산올리고당 및 키토산을 *E. tarda*에 3시간동안 배양한 후 키토산의 항균기작을 살펴보기 위해 SEM을 통하여 세균의 형태학적 관찰을 실시하였다. Fig. 6에 보는 것과 같이, 키토산 무처리 세균에서는 모든 균들이 정상적으로 성장하고 있다는 사실이 쉽게 관찰되었다. 하지만 키토산올리고당의 처리에 의해서 세균은 서로 응집되기 시작하였으며, 비교적 분자량이 큰 키토산올리고당인 HMW-COS 처리 세균에서는 많은 부분들이 그들의 형태가 서로 엉켜져 있음을 알 수 있었다. 앞의 실험결과에서 밝혀진 것처럼, *E. tarda*의 성장에 대하여 가장 항균활성이 높은 것으로 나타난 키토산으로 처리하였을 경우, 대부분의 세균들이 정상적으로 성장하고 있지 않음을 관찰할 수 있었다. 이러한 현상은 키토산 혹은 키토산올리고당의 분자구조에서 양이온 전하를 띠고 있는

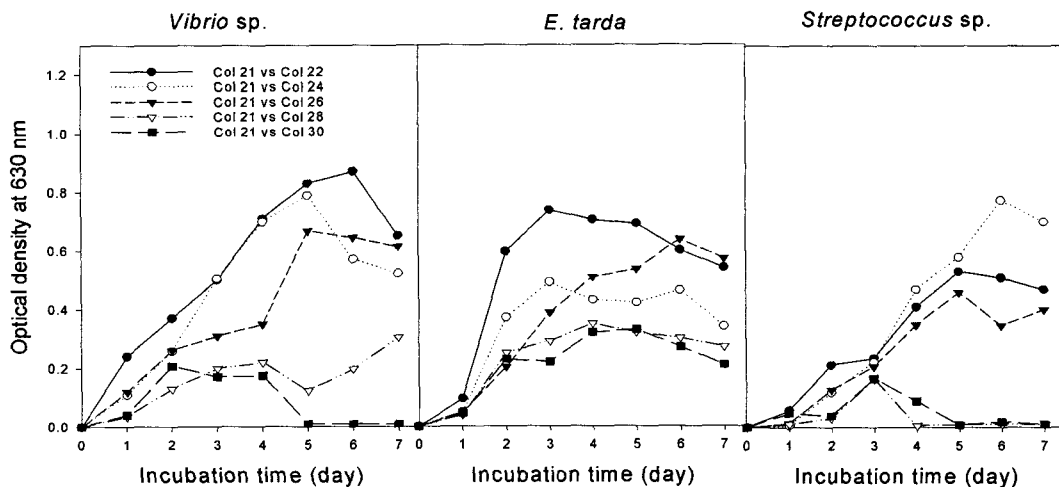


Fig. 4. Antimicrobial effect of chitosan and COS against the three pathogenic bacteria depending on the incubation times. Growth rate of the bacteria cells incubated was evaluated by measurement of optical density at 630 nm.

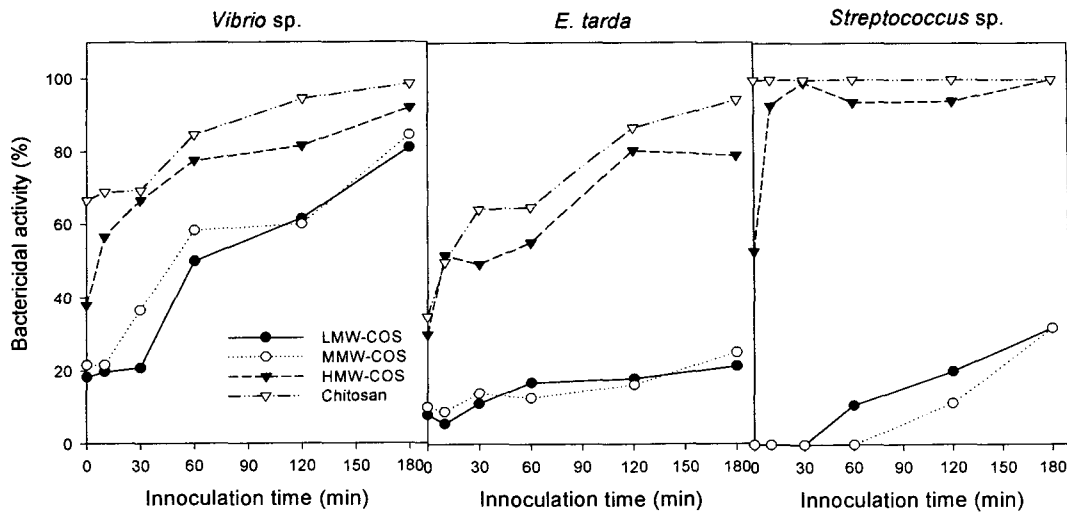


Fig. 5. Antimicrobial effect of chitosan and COS against the three bacteria depending on the inoculation times (treated time of bacteria with the samples). The antimicrobial effect was indicated as bactericidal activity evaluated by counting the number of colony of cells grown on tryptic soy agar plate for 24 h of incubation time.

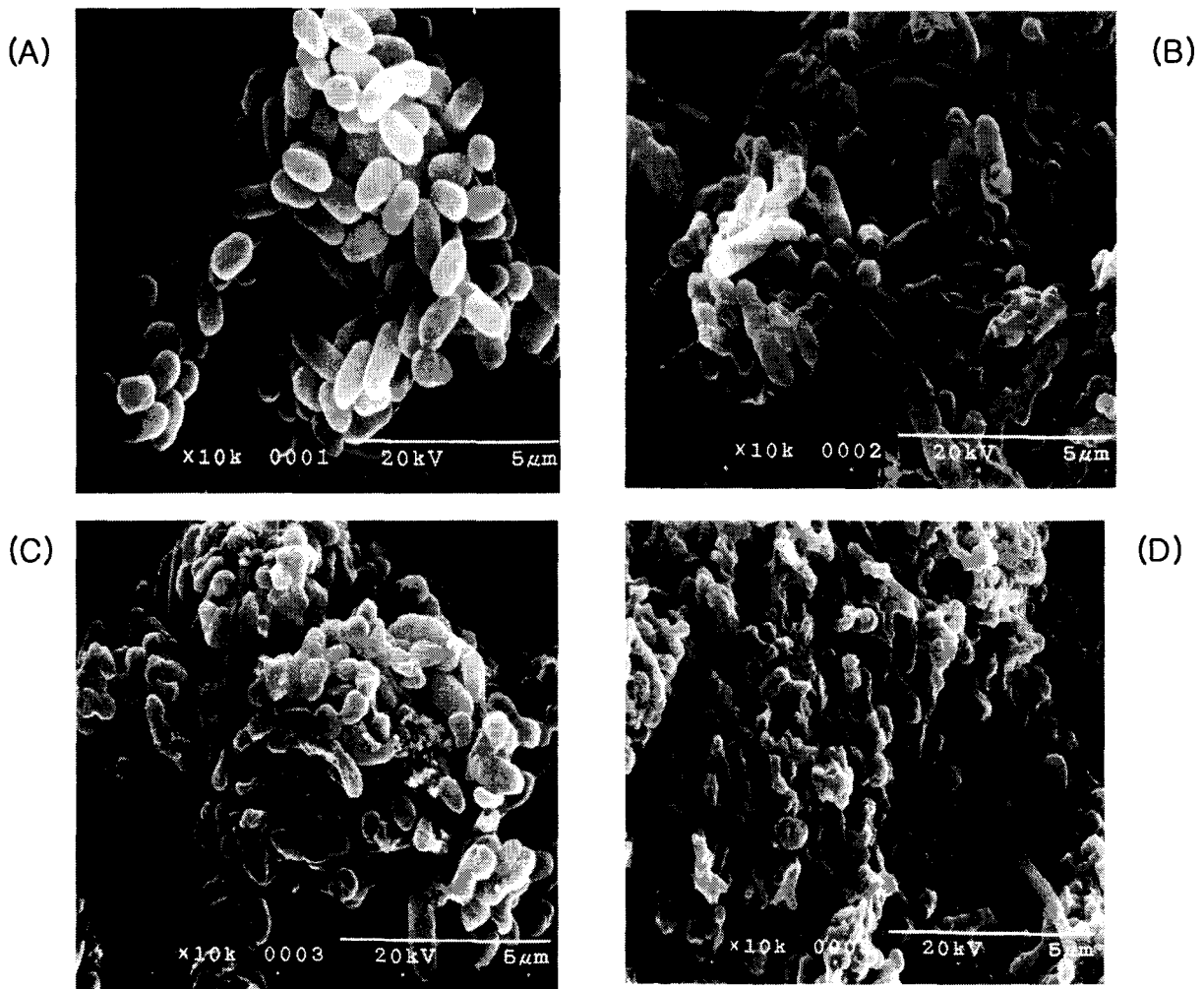


Fig. 6. Scanning electron micrographs of *E. tarda* cells treated with chitosan preparations. Morphology of *E. tarda* cells treated with 1000 ppm of chitosan preparations (B, MMW-COS; C, HMW-COS; D, chitosan) during 3 h was compared to the cells untreated (A).

아민들이 *E. tarda* 세균의 세포벽 구성성분들 중 음이온 전하를 가지고 있는 고분자 화합물과 정전기적으로 이온결합을 형성하여 서로 얽혀있는 것으로 보여진다. 이러한 관찰은 키토산 혹은 키토산올리고당이 세균을 서로 응집시킴으로써 세균의 증식을 방해하고 결국 세균의 성장을 억제한다는 사실을 보여 주는 것이라 판단된다.

*Vibrio* sp.에는 *V. anguillarum*, *V. alginolyticus*, *V. carchariae*, *V. furnissii*, *V. cholerae*, *V. damsela*, *V. ordalii*, *V. parahaemolyticus*, *V. mimicus*, *V. fluvialis*, *V. salmonicida*, *V. harveyi* 그리고 *V. vulnificus* 등이 있으며, 이외에도 많은 세균들이 이에 속하고 있다. 이들 대부분은 사람이나 양식어의 질병에 영향을 미치고 있는 병원성 세균들이다. 특히 *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae*, *V. mimicus*, *V. fluvialis* 등은 일본 후생성에서 대표적인 식중독 원인균으로 지정하였으며(29), *V. anguillarum*이나 *V. alginolyticus* 등은 대표적인 어병 세균에 속한다. 한편 *E. tarda*는 양식어류의 에드워드병을 일으키는 주요 원인균으로서 항상 수중 혹은 환경수나 정상어류의 장내에 상존하고 있으면서 어떤 stress 조건 하에서 발병하게 되는 조건성 병원체로서 알려져 있다(30). 연쇄구균증의 원인균인 *Streptococcus* sp.는 대부분의 어류들을 감염시키고 있으며, 특히 넙치나 뱀장어에 대한 감염율은 매우 높은 편이다(31). 이들의 병원성 세균에 의한 어류의 감염은 어류들 간의 수평적 감염과 오염된 사료에 의해서 발생하는 경우가 많다. 따라서 식중독이나 오염된 사료에 의한 어류질병을 예방하기 위하여 이들 병원성 세균에 대한 항균활성에 관한 연구로서, 항생제를 이용한 항균활성에 관한 연구(31-34), 생약제나 천연물을 이용한 항균활성에 관한 연구(35,36), 면역능을 이용한 항병력효과에 관한 연구(37-39), 방사선조사에 의한 세균의 억제에 관한 연구(40,41), 그리고 probiotic 균주를 이용한 어류의 세균성 질병의 억제에 관한 연구(42,43) 등이 있다. 한편, 키토산의 높은 항균능력을 이용하여 *Vibrio* sp.에 대한 항균활성에 관한 연구가 본 저자를 비롯한 몇몇 연구자들에 의해 수행되었으며, 모두 우수한 연구결과를 도출하였다(44-46). 하지만 넙치 유래 에드워드병과 연쇄구균증의 원인균인 *E. tarda*와 *Streptococcus* sp.에 대한 키토산의 항균활성에 관한 연구는 지금까지 보고된 바가 없다. 본 연구 결과에서 볼 수 있듯이 키토산을 비롯한 고분자의 키토산올리고당은 *Streptococcus* sp.에 대한 항균활성이 매우 높은 것을 알 수가 있다. 특히 다른 두 세균종과는 달리 *Streptococcus* sp.에 키토산 및 HMW-COS의 접촉시간이 10분 이상만 되면 항균활성은 거의 100%에 도달한다는 사실은 매우 놀라운 결과라 할 수 있다. 따라서 키토산 및 키토산올리고당을 이용한 어류 유래 연쇄구균증에 대한 항균활성에 관한 좀 더 구체적인 효과를 다양하게 검색할 필요가 있을 것으로 보인다. 한편, 본 연구에서 사용된 균주 중 키토산 및 키토산올리고당에 가장 내성이 강한 것으로 밝혀진 *E. tarda*의 경우, 처리시간을 3시간으로 증가시킴으로

써 항균활성을 높일 수 있었으며, 이에 대한 결과를 SEM을 통하여 관찰하여 명확하게 세균의 성장이 억제됨을 확인할 수 있었다. 이러한 사실은 키토산 및 HMW-COS이 *E. tarda*에 대한 항균활성에 효과적으로 이용될 수 있음을 시사하는 것이다. Choi et al.(47)도 키토산올리고당이 처리된 *Actinobacillus actinomycetemcomitans*을 SEM을 통하여 형태학적으로 관찰한 결과, 구형 상태의 세균이 분해되어 불규칙한 형태로 되어 있다는 것을 보고하였는데, 이것은 키토산올리고당이 세균을 파괴하여 사멸시킨다는 것을 암시한다. 지금까지 몇몇 연구자들에 의해 밝혀진 키토산의 항균기작은 다량의 양이온 전하를 가지고 있는 키토산이 세균의 세포벽 성분 중 음이온 전하를 띠고 있는 성분들과 이온결합을 형성하여 세균을 성장을 방해한다는 것이다. 이러한 사실은 키토산의 탈아세틸화도를 변화시킴으로써 간접적으로 증명되었다(24,25,48). 따라서 본 연구에서 제시한 키토산의 항균활성에 대한 SEM 관찰에서 보면 지금까지 알려진 항균기작을 뒷받침하는 결과라 판단된다.

## 요 약

양식넙치의 세균성 질병의 원인균주인 *Vibrio* sp., *Edwardsiella tarda* 및 *Streptococcus* sp.를 제주산 양식넙치로부터 직접 분리하였으며, 이들 세균에 대하여 키토산 및 분자량 크기에 따라 분류된 3종류의 키토산올리고당(HMW-COS, MMW-COS, LMW-COS)의 항균활성을 검토하였다. 키토산과 HMW-COS는 모든 세균에 대한 항균활성이 우수하였으며, 특히 *Vibrio* sp.과 *Streptococcus* sp.에 대해서 높은 항균활성을 나타내었다. 이들에 대한 결과는 키토산의 항균활성은 분자량에 따라 크게 의존한다는 사실을 보여주었다. *E. tarda*에 대한 키토산 및 HMW-COS의 항균활성은 처리시간을 증가시킴으로써 항균활성이 증가함을 보였으며, 이들의 항균기작을 조사하기 위한 SEM의 관찰에서, 세균들은 키토산에 의해 응집되어 서로 엉켜있는 형태를 보여주고 있었다. 이러한 현상은 키토산 및 HMW-COS가 세균의 증식을 명확하게 억제하고 있음을 보여주는 증거라 할 수 있다. 이것은 지금까지 여러 보고에서 밝혀진 키토산의 항균활성 메카니즘과 일치하는 것이라 판단된다.

## 감사의 글

이 논문은 제주대학교 두뇌한국21사업에 의하여 지원되었으며, 이에 감사를 드립니다. 또한 세포의 주사형전자현미경(SEM) 관찰에 도움을 주신 해양과환경연구소의 강태연 선생님께서도 감사드립니다.

## 문 헌

1. Jia X, Patrzykat A, Devlin RH, Ackerman PA, Iwama GK,

- Hancock REW. 2000. Antimicrobial peptides protect coho salmon from *Vibrio anguillarum* infections. *Appl Environ Microbiol* 66: 1928-1932.
2. Arvanitoyamis IS, Nakayama A, Aiba S. 1998. Chitosan and gelatin based edible films: state diagrams, mechanical and permeation properties. *Carbohydr Polym* 37: 371-382.
  3. Rosales-Cortes M, Peregrina-Sandoval J, Banuelos-Pineda J, Sarabia-Estrada R, Gomez-Rodiles CC, Albarran-Rodriguez E, Zaitseva GP, Pita-Lopez ML. 2003. Immunological study of a chitosan prosthesis in the sciatic nerve regeneration of the axotomized dog. *J Biomater Appl* 18: 15-23.
  4. Risbud MV, Bhonde MR, Bhonde RR. 2001. Effect of chitosan-polyvinyl pyrrolidone hydrogel on proliferation and cytokine expression of endothelial cells: implications in islet immunoisolation. *J Biomed Mater Res* 57: 300-305
  5. van der Lubben IM, Verhoef JC, Borchard G, Junginger HE. 2001. Chitosan and its derivatives in mucosal drug and vaccine delivery. *Eur J Pharm Sci* 14: 201-207.
  6. van der Lubben IM, Verhoef JC, Borchard G, Junginger HE. 2001. Chitosan for mucosal vaccination. *Adv Drug Deliv Rev* 52: 139-144.
  7. Westerink MA, Smithson SL, Srivastava N, Blonder J, Coeshott C, Rosenthal GJ. 2001. ProJuvant (Pluronic F127/chitosan) enhances the immune response to intranasally administered tetanus toxoid. *Vaccine* 20: 711-723.
  8. Kobayashi M, Watanabe T, Suzuki S, Suzuki M. 1990. Effect of N-acetylchitohexaose against *Candida albicans* infection of tumor-bearing mice. *Microbiol Immunol* 34: 413-426.
  9. Tokoro A, Suzuki K, Matsumoto T, Mikami T, Suzuki S, Suzuki M. 1988. Chemostatic response of human neutrophils to N-acetylchitohexaose in vitro. *Microbiol Immunol* 32: 387-395.
  10. Jeon YJ, Kim SK. 2002. Antitumor activity of chitosan oligosaccharides produced in ultrafiltration membrane reactor system. *J Microbiol Biotechnol* 12: 503-507.
  11. Qin C, Du Y, Xiao L, Li Z, Gao X. 2002. Enzymic preparation of water-soluble chitosan and their antitumor activity. *Int J Biol Macromol* 31: 111-117.
  12. Kato Y, Onishi H, Machida Y. 2000. Biological fate of highly-succinylated N-succinyl-chitosan and antitumor characteristics of its water-soluble conjugate with mitomycin C at i.v. and i.p. administration into tumor-bearing mice. *Biol Pharm Bull* 23: 1497-1503.
  13. Sato M, Onishi H, Takahara J, Machida Y, Nagai T. 1996. In vivo drug release and antitumor characteristics of water-soluble conjugates of mitomycin C with glycol-chitosan and N-succinyl-chitosan. *Biol Pharm Bull* 19: 1170-1177.
  14. Tsukada K, Matsumoto T, Aizawa K, Tokoro A, Naruse RS, Suzuki S, Suzuki M. 1990. Antimetastatic and growth-inhibitory effects of N-acetylchitohexaose in mice bearing Lewis lung carcinoma. *Jpn J Cancer Res* 81: 259-265.
  15. Tokoro A, Tatewaki N, Suzuki K, Mikami K, Suzuki S, Suzuki M. 1988. Growth-inhibitory effect of hexa-N-acetylchitohexaose and chitohexaose against Meth-A solid tumor. *Chem Pharm Bull* 36: 784-790.
  16. Kim KW, Thomas RL, Lee C, Park HJ. 2003. Antimicrobial activity of native chitosan, degraded chitosan, and O-carboxymethylated chitosan. *J Food Prot* 66: 1495-1498.
  17. Rabea EI, Badawy ME, Stevens CV, Smagghe G, Steurbaut W. 2003. Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. *Biomacromolecules* 4: 1457-1465.
  18. Savard T, Beaulieu C, Boucher I, Champagne CP. 2002. Antimicrobial action of hydrolyzed chitosan against spoilage yeasts and lactic acid bacteria of fermented vegetables. *J Food Prot* 65: 828-833.
  19. Jeon YJ, Kim SK. 2001. Effect of antimicrobial activity by chitosan oligosaccharides N-conjugated with asparagine. *J Microbiol Biotechnol* 11: 281-286.
  20. Jeon YJ, Park PJ, Kim SK. 2001. Antimicrobial effect of chitooligosaccharides produced by bioreactor. *Carbohydr Polym* 44: 71-76.
  21. Jeon YJ, Kim SK. 2000. Production of chitooligosaccharides using an ultrafiltration membrane reactor and their antibacterial activity. *Carbohydr Polym* 41: 133-141.
  22. Roller S, Covill N. 1999. The antifungal properties of chitosan in laboratory media and apple juice. *Int J Food Microbiol* 47: 67-77.
  23. Hadwiger LA, Ogawa T, Kuyama H. 1994. Chitosan polymer sizes effective in inducing phytoalexin accumulation and fungal suppression are verified with synthesized oligomers. *Mol Plant Microbe Interact* 7: 531-533.
  24. Young DH, Kohle H, Kauss H. 1982. Effect of chitosan on membrane permeability of suspension-cultured *Glycine max* and *Phaseolus vulgaris* cells. *Plant Physiol* 70: 1449-1454.
  25. Hadwiger LA, Beckman JM, Adams MJ. 1981. Localization of fungal components in the pea-*Fusarium* interaction detected immunochemically with anti-chitosan and anti-fungal cell wall antisera. *Plant Physiol* 67: 170-175.
  26. Kendra DF, Hadwiger LA. 1984. Characterization of the smallest chitosan oligomer that is maximally antifungal to *Fusarium solani* and elicits pisatin formation in *Pisum sativum*. *Exp Mycol* 8: 276-281.
  27. Jeon YJ, Kim SK. 2001. Potential immuno-stimulating effect of antitumor fraction of chitosan oligosaccharides. *J Chitin Chitosan* 6: 163-167.
  28. Jeon YJ, Kim SK. 2000. Continuous production of chitooligosaccharides using a dual reactor system. *Process Biochem* 35: 623-632.
  29. Miyoshi S. 1989. Infection of *Vibrio* sp. *J Antibacterial Antifungi* 17: 279-285.
  30. Kim KH, Choi DL, Chung JK, Chun SK. 1992. Experimental infection of *Edwardsiella tarda* in the tilapia. *J Fish Pathol* 5: 61-76.
  31. Heo GJ, Lee YS. 1996. Efficacy of clindamycin for the control of streptococcal infection in cultured fish, flounder fish (*Paralichthys olivaceus*) and eel (*Anguilla japonica*). *Kor J Lab Ani Sci* 12: 25-30.
  32. Jung SH, Kim JW. 2000. In vitro antimicrobial activity in combination of antibacterials against fish-pathogenic bacteria. *J Fish Pathol* 13: 45-51.
  33. Hasan Jama Y, Varadaraj MC. 1999. Antibacterial effect of plantaricin LP84 on foodborne pathogenic bacteria occurring as contaminants during *idli* batter fermentation. *World J Microbiol Biotechnol* 15: 27-32.
  34. Heo GJ, Lee JH. 1994. A study on efficacy and safety of gentamicin to bacterial diseases in cultured fish, *Cryprinus carpio* and *Paralichthys olivaceus*. *Kor J Vet Publ Hlth* 18: 327-331.
  35. Jung SH, Sohn YC, Kim YC. 2001. In vitro effect of water extract of medicinal herbs on antimicrobial activity against fish pathogenic bacteria and superoxide production of kidney phagocytes in olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. *J Fish Pathol* 14: 3-10.
  36. Cho SH, Seo IW, Choi JD, Chun SS, Na TK, Chung SK, Kang DH. 1992. Disinfectant and inhibitory effect of natural antimicrobial agent on *Vibrio vulnificus* in fish. *Kor J Food Hygiene* 7: 99-106.
  37. Jung SH, Lee JS, An HK, Jun CY, Lee HY. 2002. Effect of medicinal herb extract on non-specific immune responses, hematology and disease resistance on olive flounder, *Paralichthys olivaceus* by oral administration. *J Fish Pathol* 15:

- 25-35.
38. Kwon MG, Lee YH, Park SU, Kim BS, Park SI. 2002. The effect of charcoal in diet on the immune responses of flounder, *Paralichthys olivaceus*. *J Fish Pathol* 15: 17-24.
  39. Park SW, Kim YG, Choi DL. 1997. Enhancement of bacterial disease resistance in rockfish (*Sebastes schlegeli*) by  $\beta$ -glucan administration. *J Fish Pathol* 10: 143-152.
  40. Kim SR, Kim SH. 2002. The effect of food treated with gamma radiation after inoculation with pathogenic bacteria in the flounder (*Paralichthys olivaceus*). *J Vet Clin* 19: 7-13.
  41. Liltved H, Landfald B. 2002. Effect of high intensity light on ultraviolet-irradiated and non-irradiated fish pathogenic bacteria. *Wat Res* 34: 481-486.
  42. Yang BG, Jeon YJ, Heo MS. 2003. Screening and characterization of probiotic strains for prevention of bacterial fish diseases. *Kor J Microbiol Biotechnol* 31: 129-134.
  43. Sugita H, Okano R, Suzuki Y, Iwai D, Mizukami M, Akiyama N, Matsuura S. 2002. Antibacterial abilities of intestinal bacteria from larval and juvenile Japanese flounder against fish pathogens. *Fish Sci* 68: 1004-1011.
  44. No HK, Park NY, Lee SH, Meyers SP. 2002. Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights. *Int J Food Microbiol* 74: 65-72.
  45. Kim SK, Jeon YJ, Zan HC. 2000. Antibacterial effect of chitooligosaccharides with different molecular weights prepared using membrane bioreactor. *J Chitin Chitosan* 5: 1-8.
  46. Tsai GJ, Wu ZY, Su WH. 2000. Antibacterial activity of a chitooligosaccharide mixture prepared by cellulase digestion of shrimp chitosan and its application to milk preservation. *J Food Prot* 63: 747-752.
  47. Choi BK, Kim KY, Yoo YJ, Oh SJ, Choi JH, Kim CY. 2001. *In vitro* antimicrobial activity of a chitooligosaccharide mixture against *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Streptococcus mutans*. *Int J Antimicrobiol Agents* 18: 553-557.
  48. Tsai GJ, Su WH, Chen HC, Pan CL. 2002. Antimicrobial activity of shrimp chitin and chitosan from different treatments and applications of fish preservation. *Fish Sci* 68: 170-177.

(2003년 9월 15일 접수; 2003년 12월 27일 채택)