

Streptococcus mutans에 대한 키토산의 항균효과

황재관 · 김현진* · 심재석* · 변유량
연세대학교 생물산업소재연구센터
*연세대학교 생물소재공학협동과정

Bactericidal Activity of Chitosan on *Streptococcus mutans*

Jae-Kwan Hwang, Hyun-Jin Kim*, Jae-Seok Shim and Yu-Ryang Pyun
Bioproducts Research Center, Yonsei University
*Department of Biomaterials Science and Engineering
Yonsei University

Abstract

Bactericidal effects of chitosans with varying molecular weight (10,000~170,000) were investigated for *Streptococcus mutans*, a primary causative bacterium of dental caries. The molecular weight of chitosan was a significant contributor to the bactericidal effect, and a chitosan having approximately 30,000 of molecular weight exhibited the highest bactericidal effects on *S. mutans*. Treatment of chitosan resulted in leaking intracellular protein and nucleic acid out of *S. mutans* cells. In addition, the divalent cations such as Ca^{2+} and Mg^{2+} were also significantly released out of the cell. Visible damage of chitosan treated cells was observed by transmission electron microscopy (TEM), in which the cell wall was notably distorted and cytoplasmic membrane was separated from the cell wall. The results suggested that the bactericidal effect of chitosan on *S. mutans* was attributable to both leakage of intracellular materials and structural disintegration of cell wall.

Key words: chitosan, bactericidal effect, *Streptococcus mutans*

서 론

충치(Dental caries)는 전세계적으로 가장 널리 만연된 구강내 질병중의 하나로 당섭취의 증가와 함께 그 이환율이 높아지고 있다. *Streptococcus mutans*는 충치 발생에 가장 중요한 원인균으로 알려져 있으며^(1,2), 구강내 치아 표면에 부착하여 당의 발효에 의해 산을 발생시켜 충치를 유발한다⁽³⁾. *S. mutans*는 치면의 피막에 부착 후 glucosyl transferase를 생산하여 sucrose로부터 불용성 glucan을 형성한다⁽⁴⁾. 이러한 glucan은 구강내 미생물들이 치면에 더욱 강하게 부착하게 하며, 치균 세균막을 형성하여 dental plaque를 생성하는 역할을 한다. 결과적으로 구강내 미생물들이 당질 대사를 통하여 고농도의 산으로 enamel질을 탈회시키므로써 충치를 유발하는 것으로 알려져 있다^(5,6). 따라서 충치 예방의 가장 기본적인 방법으로는 이러한 충치유발

세균을 지표면으로부터 제거하는 것이다^(7,8). 충치유발 세균을 화학적으로 제거하는 방법은 구강내의 환경이 매우 민감하기 때문에 안전성의 문제로 적용하는데 많은 어려움이 발생한다.

키토산은 갑각류, 곤충류, 균류 등에 널리 분포하고 있는 키틴을 탈아세틸화 하여 생산하는 생고분자(biopolymer)로서 항종양활성, 면역부활작용, 항암활성, 항콜레스테롤작용, 항고혈압활성, 항균활성, phytoalexin 촉진기능 등 다양한 생물활성을 갖고있다⁽⁹⁻¹⁴⁾. 특히 키토산은 광범위한 균류에 항균활성을 나타낼 뿐만 아니라 인체에 무해한 것으로 알려져 있어 키토산을 항미생물제제로서 이용하는 노력이 확대되고 있다⁽¹⁵⁾. 키토산의 항균활성에 대한 기작은 명확하게 밝혀지지 않는지만 양이온성을 띠는 키토산의 아민기가 음전하를 띠는 미생물의 표면에 부착하여 미생물의 정상적인 생리작용을 억제하므로써 항균활성을 나타낸다고 알려져 있다⁽¹⁶⁾.

본 실험에서는 충치유발균인 *S. mutans*에 대해 키토산의 분자량과 항균활성간의 상관성을 연구하였으며,

Corresponding author: Jae-Kwan Hwang, Bioproducts Research Center, Yonsei University, College of Engineering B521, Seoul 120-749, Korea

아울러 키토산처리에 의한 세포내 물질의 유출 및 세포 형태의 변화를 관찰하였다.

재료 및 방법

재료

본 연구에서 생산된 키토산의 분자량은 황 등⁽¹⁷⁾의 방법에 따라 계꺾질의 산 및 알칼리 세척공정과 후속적인 탈아세틸화 공정의 변화에 의해 조절하였다. 키토산의 탈아세틸화도는 potassium polyvinyl sulfate method⁽¹⁸⁾에 의하여 측정하였다.

키토산의 항균활성을 실험하기 위하여 그람 양성균인 *S. mutans* (ATCC 25175)가 사용되었다. *S. mutans*의 생육 배지는 brain heart infusion broth와 brain heart infusion agar를 사용하였다.

키토산의 분자량 측정

키토산의 분자량은 HPLC (Waters LC Module I/M 410 RI detector/Millennium 2010)로 분석하였다. 0.2% (w/w) 키토산 시료를 0.45 µm filter로 여과한 후 여과액 100 µL를 Waters Ultrahydrogel 120과 250 column에 주입하여 분석하였다. 이동상은 0.1 M NaNO₃로 흐름속도는 0.8 mL/min이었고, 표준물질로는 pullulan을 사용하였다.

항균력 측정

*S. mutans*를 24시간 동안 배양하여 측정한 colony 수가 5×10⁶ 정도 되도록 농도를 조절한 배양액 1 mL와 pH 5.5의 초산 완충액에 녹아 있는 0.001% 키토산 4 mL를 혼합하여 37°C에서 진탕시켰다. 이 때 대조구로는 키토산 용액 대신 초산완충액(pH 5.5) 4 mL를 첨가하였다. 생균수의 측정은 pour-plate method⁽¹⁹⁾에 의해 반응액을 10배씩 희석해 가면서 그 중 1 mL를 배지와 혼합하여 37°C에서 24~48시간 동안 배양한 후 colony를 계측하여 각 시료에 대한 항균력을 측정하였다.

단백질과 핵산의 유출량 측정

S. mutans 배양액 1 mL와 0.001% 키토산 용액 1 mL를 혼합한 후 37°C에서 진탕시켰다. 일정시간이 지난 후 원심분리(15,000×g, 5분)하여 키토산에 의해 세포 내부로부터 유출(efflux)된 물질을 포함한 상등액을 얻었으며, 단백질과 핵산의 흡광도를 각각 280 nm와 260 nm에서 측정하였다. 280 nm에서 측정된 단백질의 흡광도는 bovine serum albumin 표준용액을 이용하여 단백질의 농도로 환산하였다.

Ca²⁺와 Mg²⁺의 측정

S. mutans 배양액 15 mL와 0.001% 키토산 용액 15 mL를 혼합한 후 37°C에서 진탕시켰다. 일정시간이 지난 후 원심분리(15,000×g, 5분)에 의해 세포 내부에서 유출된 물질을 포함한 상등액을 0.45 µm membrane filter를 이용하여 여과하였다. 무기원소의 표준용액은 Junsei Chemical Co. Ltd. (Tokyo, Japan)의 1000 ppm 표준용액을 단계적으로 희석하여 사용하였다. 키토산에 의해 세포벽으로부터 유리(release)된 Ca²⁺와 Mg²⁺는 Jobin Yvon ICP-AES (inductively coupled plasma emission spectrometry: Model JY38S, France)을 이용하여 각각 393.366 nm와 279.553 nm에서 측정하였다.

세포형태변화의 관찰

S. mutans 배양액 5 mL를 원심분리하여 균체를 회수한 후 초산완충액(pH 5.5)에 현탁시켰다. 초산완충액에 현탁된 균체와 0.001% 키토산 용액을 37°C에서 1시간 동안 진탕시킨 후 원심분리(15,000×g, 5분)에 의해 균체만을 회수하였다. 회수된 균체를 2% paraformaldehyde, 2.5% glutaraldehyde, 0.05 M cacodylate 완충액(pH 7.2)을 이용하여 1차 고정시킨 후 1% OsO₄, 0.05 M cacodylate 완충액에서 2차 고정시켰다. 고정된 균체를 알코올로 탈수시킨 후 초박절편을 만들어 투과전자현미경(transmission electron microscopy; JEOL, JEM 1200EX II, Japan)으로 관찰하였다.

결과 및 고찰

키토산의 특성

실험에 사용된 키토산의 수평균 분자량과 탈아세틸화도를 Table 1에 요약하였다. 표에 나타난 바와 같이 준비된 4가지의 키토산은 약 10,000~170,000의 분자량 분포를 보였다. 한편, 키토산의 항균활성에 영향을 미치는 중요한 요인으로 알려진 탈아세틸화도⁽²⁰⁾는 그 값에 큰 차이를 보이지 않았다. 따라서 본 연구에서

Table 1. Characterization of chitosan samples

Samples	Mn ¹⁾	PD ²⁾	DDA ³⁾
CTS-1	174,700	3.3	94.04
CTS-2	102,200	3.8	93.06
CTS-3	29,800	4.4	93.25
CTS-4	9,800	4.1	95.90

¹⁾Number average molecular weight.

²⁾Polydispersity.

³⁾Degree of deacetylation (%).

관찰된 키토산의 항균활성의 차이는 탈아세틸화도에 의한 영향은 배제되며, 분자량의 차이에만 기인하는 것으로 해석하였다.

키토산의 항균성

키토산의 분자량이 *S. mutans*에 대한 항균성에 미치는 영향을 Fig. 1에 나타내었다. 분자량에 따라 항균활성에 상당한 차이를 보였으며, 분자량 약 30,000의 CTS-3이 가장 높은 항균활성을 나타내었다. 10 ppm의 CTS-3을 10분간 처리하였을 때 *S. mutans*의 생존수가 약 10^{-3} 만큼 감소하였으며, 분자량을 적절하게 조절할 경우 키토산이 *S. mutans*에 대해 매우 강력한 항균활성을 발휘하는 것을 알 수 있었다. 이러한 결과는 오징어 뼈 키토산의 분자량에 따라 *S. mutans*에 대한 항균활성에 차이가 난다는 Shimojoh 등⁽²¹⁾의 결과와 일치하였다.

Fig. 1에서 전체적으로 키토산의 항균활성이 반응초기에 뚜렷이 나타난 후 반응시간에 따라 점차 감소하는 것을 관찰할 수 있으며, 이러한 결과는 미생물에 대한 생물학적 항균물질에서 공통적으로 발견되는 현상이다⁽²²⁾. 이것은 키토산의 항균활성을 나타내는 요인으로 알려진 양이온성의 아민기가 반응시간이 길어질수록 *S. mutans*의 세포벽과 결합하므로써 가용한 분자수가 줄어들기 때문으로 추정된다.

본 연구에서 사용한 키토산은 Table 1에 나타난 바

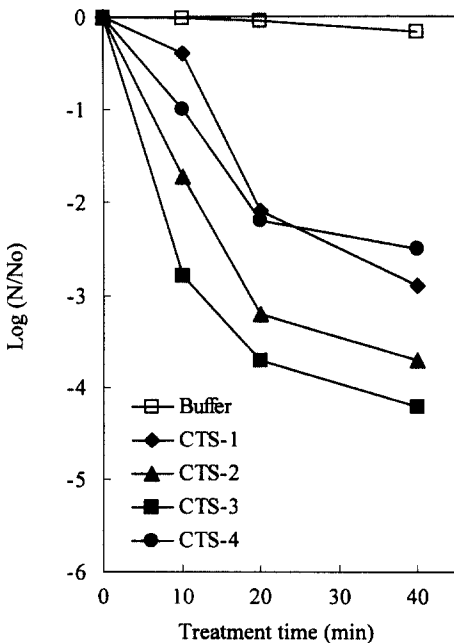


Fig. 1. Effect of molecular weight on bactericidal activity of chitosans.

와 같이 분자량 분포도를 나타내는 polydispersity (PD)가 3.3~4.4인 시료를 사용하였다. 일반적으로 생고분자의 식품 및 생물활성은 분자량 분포도에 의해 많은 영향을 받는다. 따라서 앞으로 키토산의 분자량 분포도와 항균활성의 상관성에 대한 보다 세부적인 연구를 필요로 한다.

단백질과 핵산의 유출

Fig. 2는 키토산 처리시간에 따른 단백질과 260 nm에서의 흡광물질의 유출을 나타낸 것으로, 처리시간이 길어질수록 단백질과 핵산으로 추정되는 260 nm 흡광물질이 증가하였다. 이 때, 키토산처리에 의해 단백질과 260 nm 흡광물질이 증가되는 경향이 거의 일치하였다. 키토산에 의한 세포내 물질의 유출은 강한 양이온성을 가진 키토산이 *S. mutans*의 세포벽과 강하게 결합하므로써 세포벽을 약화시키기 때문으로 생각된다. 이는 키토산처리에 의해 곰팡이 세포내부로부터 단백질계 물질의 유출이 있었다는 보고와 일치하였다⁽²³⁾. 또한, 양이온성을 가진 항균물질처리에 의해 단백질 등과 같은 세포내 물질이 유출되는 현상은 항균성 단백질인 protamine에서도 관찰된 바 있다⁽²⁴⁾.

Ca²⁺와 Mg²⁺의 유리

Fig. 3은 키토산과 *S. mutans*의 반응시간에 따라 세

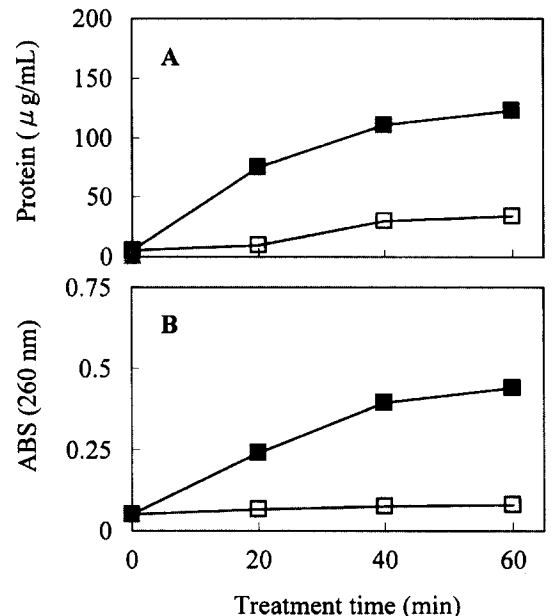


Fig. 2. Chitosan-induced efflux of intracellular materials from *S. mutans*. A: Protein, B: UV absorbing materials at 260 nm, □—□: control, ■—■: CTS-3

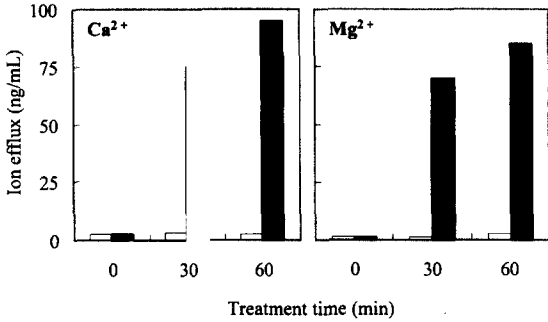


Fig. 3. Chitosan-induced release of Ca²⁺ and Mg²⁺ from *S. mutans*. □: control, ■: CTS-3

포벽으로부터 유리된 Ca²⁺와 Mg²⁺의 양을 나타낸 것으로 반응시간에 따라 점차적으로 증가되는 것을 뚜렷이 나타내고 있다. 그람 양성균인 *S. mutans*의 경우 인산이 포함된 teichoic acid에 의해 세포 표면이 전기적으로 음전하를 띠며, 양이온성을 가진 고분자물질은 세균 세포벽의 음전하와 이온결합을 형성할 수 있다⁽²²⁾. Teichoic acid는 2가 양이온인 Mg²⁺의 흡수를 돕고 세포벽의 안정성을 유지시키는데, 키토산이 teichoic acid와 결합하므로써 세포벽과 Ca²⁺와 Mg²⁺ 사이의 결합력이 약화되어 결과적으로 Ca²⁺와 Mg²⁺이 세포벽으로부터 유리되는 것으로 생각된다.

세포벽으로부터 Ca²⁺와 Mg²⁺가 유리될 경우 세포벽의 안정성이 상당히 감소하게 되는데, 이러한 현상은 강한 chelating 물질인 EDTA를 이용한 실험에서도 보고된 바 있다⁽²⁵⁾. 세포벽의 안정성은 미생물의 성장 및 생명유지와 직접적인 연관이 있으므로 키토산 처리에 따른 Ca²⁺와 Mg²⁺의 유리는 키토산의 항균효과를 결정하는 중요한 요인으로 보인다.

세포형태의 변화

Fig. 4는 투과전자현미경(TEM)을 이용하여 *S. mutans*의 세포형태의 변화를 관찰한 결과를 나타낸 것이다. 키토산 처리에 의해 *S. mutans*의 세포벽이 분리되었으며, 대조구에 비해 세포내 물질의 상당부분이 유출된 것을 알 수 있었다. 키토산처리에 의한 세포형태의 변화는 키토산이 *S. mutans*의 음이온 세포벽에 부착함으로써 발생하며, 이는 Fig. 3에서 관찰된 바와 같이 세포벽의 안정성을 부여하는 2가 양이온들이 키토산에 의해 유리되면서 세포벽의 안정성이 급격히 저하되는 것으로 해석할 수 있다⁽²⁶⁾. 키토산처리에 의한 세포벽 형태의 변화는 Muzzarelli 등⁽²⁷⁾에 의해 *E. coli*에 대해서도 관찰된 바 있는데, 키토산이 미생물 세포벽의 산성물질과 강하게 결합하는 것이 세포벽 형

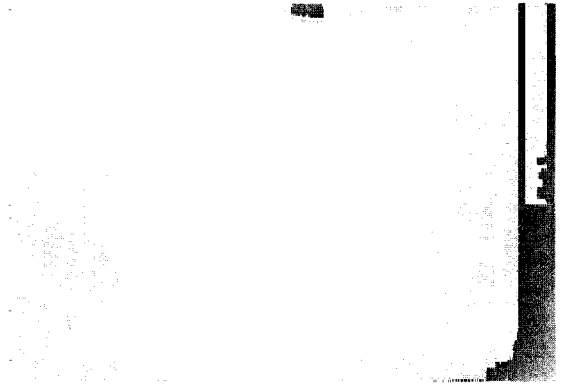


Fig. 4. Transmission electron microscopy of chitosan-treated *S. mutans* (magnification: ×50,000). A: control, B: CTS-3

태변화의 주원인인 것으로 보고되었다. 이같이 키토산에 의해 미생물 세포벽의 기본구조가 상당히 붕괴되며, 이는 결과적으로 세포벽의 물질 투과성(permeability)을 증가시켜 앞에서 관찰된 바와 같은 각종 세포내 물질의 유출을 야기하는 것으로 해석된다.

요 약

*S. mutans*에 대한 키토산의 항균효과는 그 분자량에 따라 뚜렷한 차이를 보였으며, 약 30,000의 분자량을 갖는 키토산이 가장 높은 항균활성을 보였다. 키토산 처리에 의해 세포로부터 단백질, 핵산, 2가 양이온 등이 상당량 유출되는 것이 관찰되었으며, 세포내 물질의 유출정도는 키토산의 항균효과와 밀접한 상관성을 보였다. 이러한 세포내 물질의 유출은 양이온성을 띠는 키토산의 아민기와 세포벽내의 음이온 성분과의 강한 결합에 의해 세포벽의 결합력이 약화되면서 생기는 결과로서 추측되었다. 키토산처리에 의해 *S. mutans*의 세포벽이 원형질로부터 분리되고 세포내 물질이

세포벽 내에서 밖으로 유출되는 현상은 투과전자현미경(TEM)에 의해 확인되었다.

감사의 글

본 연구는 연세대학교 생물산업소재연구센터를 통한 한국과학재단 우수연구센터 지원금(98K3-1508-01-03-5)과 연세대학교 1997년도 학술연구비 지원금에 의한 것입니다.

문헌

- Muroi, H. and Kubo, I.: Combination effects of antibacterial compounds in green tea flavor against *Streptococcus mutans*. *J. Agric. Food Chem.*, **41**, 1102-1105 (1993)
- Luc, T.: Xylitol: A review of its action on mutans *Streptococci* and dental plaque-its clinical significance. *Int. Dent. J.*, **45**, 77-92 (1995)
- Marsh, P.D.: Microbiological aspects of the chemical control of plaque and gingivitis. *J. Dent. Res.*, **71**, 1431-1438 (1992)
- Ooshima, T., Minami, T., Aono, W., Tamura, Y. and Hamada, S.: Reduction of dental plaque deposition in humans by oolong tea extract. *Caries Res.*, **28**, 146-149 (1994)
- Hamada, S. and Slade, H.D.: Biology, immunology and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Microbiol. Rev.*, **44**, 331-384 (1980)
- Kolenbrander, P.E. and London, J.: Adhere today, here tomorrow: oral bacterial adherence. *J. Bacteriol.*, **175**, 3247-3252 (1993)
- Kubo, I., Muroi, H. and Himejima, M.: Antibacterial activity against *Streptococcus mutans* of mate tea flavor components. *J. Agric. Food Chem.*, **41**, 107-111 (1993)
- Kubo, I., Muroi, H. and Kubo, A.: Antibacterial activity of long-chain alcohols against *Streptococcus mutans*. *J. Agric. Food Chem.*, **41**, 2447-2450 (1993)
- Kendra, D.F., Christian, d. and Hadwiger, L.A.: Chitosan oligomers from *Fusarium solani*/pea interactions, chitinase/ β -glucanase digestion of sprulings and from fungal wall chitin actively inhibit fungal growth and enhance disease resistance. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, **35**, 215-230 (1989)
- Tokoro, A., Tatewaki, N., Suzuki, K., Mikami, T., Suzuki, S. and Suzuki, M.: Growth-inhibitory effect of hexa-N-acetylchitohexaose against Meth-A solid tumor. *Chem. Pharm. Bull.*, **36**, 784-790(1988)
- Nishimura, K., Nishimura, S., Nishi, N., Saiki, I., Tokura, S. and Azuma, I.: Immunological activity of chitin and its derivatives. *Vaccine*, **2**, 93-99 (1984)
- Sugano, N., Yoshida, K., Hashimoto, M., Enomoto, K. and Hirano, S.: Hypocholesterolemic activity of partially hydrolyzed chitosan. In *Advances in chitin and chitosan* Brine, C.J., Sandford, P.A. and Zikakis, J.P. (Ed.), Elsevier Science, p. 472-478 (1992)
- Ghaouth, A.E., Arul, J., Grentier, J. and Asselin, A.: Antifungal activity of chitosan on two postharvest pathogens of strawberry fruits. *Phytopathol.*, **82**, 398-402 (1992)
- Tokoro, A., Kobayashi, M., Tatewaki, N., Suzuki, K., Okawa, Y., Mikami, T., Suzuki, S. and Suzuki, M.: Protective effect of N-acetyl chitohexaose on *Listeria monocytogenes* infection in mice. *Microbiol. Immunol.* **33**, 357-367 (1989)
- Li, Q., Dunn, T., Grandmaison, E.W. and Goosen M.F. A.: Applications and properties of chitosan. In *Applications of chitin and chitosan*, Goosen, M.F.A. (Ed.), Technomic Publishing Co., Lancaster, p. 3-30 (1997)
- Sudarshan, N.R., Hoover, D.G. and Knorr, D.: Antibacterial action of chitosan. *Food Biotech.*, **6**, 257-272 (1992)
- Hwang, J.K., Hong, S.P. and Kim, C.T.: Effect of molecular weight and NaCl concentration on dilute solution properties. *J. Food Sci. Nutr.*, **2**, 1-5 (1997)
- Kina, K., Tamura, K. and Ishibashi, J.: The fungicidal effect of chitosan on fungi of varying cell wall composition. *Japan Analyst*, **23**, 1082-1100 (1974)
- Harrigan, W.F. and Margaret, E.M.: Laboratory methods in food and dairy. In *Microbiology*, Academic Press, p. 25-37 (1976)
- Seikiguchi, S., Miura, Y., Kaneko, H., Nishimuran, S.I., Nishi, N., Iwase, M. and Tokura, S.: Molecular weight dependency of antimicrobial activity by chitosan oligomers. In *Food Hydrocolloids: Structures, Properties and Functions*, Nishinari, K. and Doi, E. (Ed.), Plenum Press, New York, p. 71-76 (1994)
- Shimojoh, M., Masaki, K. and Kurita, K.: Bactericidal effects of chitosan from squid pens on oral *Streptococci*. *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, **70**, 787-792 (1996)
- Sudarshan, N.R., Hoover, D.G. and Knorr, D.: Antibacterial action of chitosan. *Food Biotech.*, **6**, 257-272 (1992)
- Leuaba, S. and St ssel, P.: Chitosan and other polyamines: Antifungal activity and interaction with biological membranes. In *Chitin in nature and technology*, Muzzarelli, R.A.A., Jeuniaux, C. and Goody, C. (Ed.), Plenum Press, New York, p. 215-222 (1986)
- Johansen, C., Verheul, A., Gram, L., Gill, T. and Abee, T.: Protamine induced permeabilization of cell envelopes of gram-positive and gram-negative bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**, 1155-1159 (1997)
- Depamphilis, M.L.: Dissociation and reassembly of *Escherichia coli* outer membrane and lipopolysaccharide, and their reassembly onto flagellar basal bodies. *J. Bacteriol.*, **105**, 1184-1199 (1971)
- Young, D.H., Kohle, H. and Kauss, H.: Effect of chitosan on membrane permeability of suspension-cultured *Glycine max* and *Phaseolus vulgaris* cells. *Plant Physiol.*, **70**, 1449-1454 (1982)
- Muzzarelli, R.A.A., Tarsi, R., Filippini, O., Giovanetti, E., Biagini, G. and Valardo, P.: Antimicrobial properties of N-carboxybutyl chitosan. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **34**, 2019-2023 (1990)