

글루코사민-글루타르알데히드 가교결합체의 항균 효과

Effect of Antimicrobial Activity of the Glutaraldehyde Cross-linked Glucosamine

이춘근¹, 황유진², 박제권^{2*}

Choon Geun Lee¹, You Jin Hwang², Jae Kweon Park^{2*}

¹가천대학교 바이오나노학과 의생명과학전공, 인천, 406-799, 대한민국

²가천대학교 바이오나노대학 생명과학과, 인천, 406-799, 대한민국

¹Department of Biomedical Science, College of Bio-nano, Gachon University, InCheon 406-799, Republic of Korea

²Department of Life Science, College of Bio-nano, Gachon University, InCheon 406-799, Republic of Korea

(Received 5 December 2014, Revised 15 December 2014, Accepted 15 December 2014)

Abstract This study was investigated the antimicrobial activity of glutaraldehyde cross-linked glucosamine. Glutaraldehyde was used as a cross-linker which specifically combines an amine-group of molecules. To optimize the mixing ratio of glutaraldehyde and glucosamine, mixing ratio was set up 1:1, 2:1, 3:1 and 0.5:1 in molarity, respectively. The optimum mixing ratio of glucosamine and glutaraldehyde was found to be 3:1 using thin layer chromatography based on the production of complex. Glucosamine-glutaraldehyde cross-linked complex (Ggcc) revealed significant antimicrobial activity toward PWG than F1, both microbial strains were isolated from porcine semen as antibiotics resistance bacteria (ARB). These results clearly demonstrate that Ggcc has potential bactericidal activity toward ARB in porcine semen.

Keywords : *Glucosamine, Glutaraldehyde, Cross-linked, Antimicrobial activity, Porcine semen*

서 론

현대 과학기술의 급격한 발전은 인간의 삶을 윤택하게 만들었고 이에 따라 평균 수명이 길어지게 되면서 사람들의 관심은 웰빙(Well-being) 즉, 오랫동안 아름다운 모습으로 늙어가는 것에 대해 집중하고 있다. 이러한 이유로 기능성 천연 소재를 이용한 화장품의 소비가 증가하고 있으며, 특히 천연물을 소재로 한 기능성 제품에 관한 연구 개발이 급속도로

이루어지고 있다.

천연 유래 물질을 이용한 화장품은 인체 내 독성이 적을 뿐만 아니라 부작용을 최소화할 수 있는 우리 인체에 무해한 물질로 남녀노소 누구나 사용할 수 있다는 장점이 존재한다 [8]. 그 중에서도 글루코사민은 천연에서 유래한 아미노당(amino sugar) 중 하나로 혈액, 점액 속 단백질과 결합된 형태로 다량 함유되어있으며, 게, 새우와 같은 갑각류의 껍질을 구성하는 다당류인 키틴으로부터 산 가수분해하여

* Corresponding author
Phone: 032-820-4782
E-mail: jkpark@gachon.ac.kr

This is an open-access journal distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/bync/3.0>)

키토산을 얻고 이를 통해 얻을 수 있다 [9]. 또한, 체내에서 섬유나 수분과 결합하여 관절 및 연골 부위에 탄성과 강도를 제공하며, 적혈구의 세포막에서는 당지질의 형태로 존재한다 [4, 10]. 특히, 글루코사민은 뮤코다당류 (e.g. 히알루론산 등)의 전구체로서, 관절 및 연골의 보호 및 강화에 탁월한 효능을 보인다. 이러한 이유로 글루코사민은 과거부터 관절 및 연골 건강에 도움이 된다는 보고가 있으며, 이에 관절염 치료제로 오랫동안 사용되고 있다 [1, 11]. 이처럼 이미 검증된 천연 소재 의약품으로 인체 내 무해한 성분이므로 식용뿐만 아니라 최근에는 화장품의 구성 성분으로도 각광받고 있다 [2]. 인간의 피부는 항상 공기 중에 노출되어있어 눈에 보이지 않는 균에 의한 공격을 받기 쉽다. 때문에 여드름, 부스럼, 습진 등 여러 피부 질환으로 인한 고통을 받고 있다. 이와 같은 문제를 해소하기 위해서 천연물로부터 유래한 화장품 소재 중에서도 항균 활성을 가진 제품이 가장 주목받고 있다.

글루타르알데히드는 주로 조직 고정제 또는 소독제로 사용하는 물질로 세포가 가지는 단백질에 빠르게 가교 결합하여 세포를 사멸시키는 특징을 갖고 있다 [7]. 또한, 이들은 아민기(-NH₂)에 특이적으로 결합하는 특성을 이용하여, 최근에는 생화학 및 고분자화학 분야에서 가교제로써 사용이 증가하고 있다 [3, 13]. 최근의 연구에서는 키토산을 가교결합하여 마이크로 단위의 약물전달체를 제조하고, 효과적으로 약물을 전달할 수 있다는 연구결과가 보고되고 있다 [5]. 이와 같은 연구 결과를 바탕으로 글루코사민에 존재하는 아민기에 글루타르알데히드의 알데히드기가 결합하여 분자량을 증가시켜 글루코사민과 글루타르알데히드의 반응을 통해 새로운 생성물을 얻어내고 컬럼 크로마토그래피 기법을 이용하여 잔여 글루타르알데히드를 효과적으로 제거하고, 합성물만을 분리하였으며, 이들의 항균활성에 대한 연구를 수행하고자 하였다. 현재, 글루코사민의 생물 의·약학적 연구는 주로 관절염 및 연골 치료를 위한 약물로 사용하기 위한 연구가 대부분이라는 점과 글루타르알데히드의 가교결합 유도 능력을 응용한 약물전달용 담체에 관한 연구가 주를 이루고 있다는 점에서, 본 연구에서는 글루코사민을 글루타르알데히드 가교결합을 통해 새로운 생성물을 확인하고자 하였다. Fig. 1은 글루코사민과 글루타르알데히

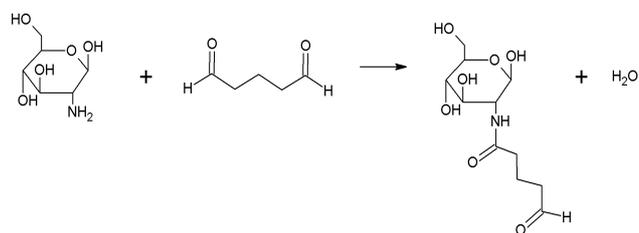


Figure 1. Reaction scheme of glucosamine and glutaraldehyde cross-linked polymer.

드의 반응 모식도를 나타냈다. 글루코사민의 아민기 (-NH₂)와 글루타르알데히드의 알데히드기(-CHO)가 아미이드 결합을 이루고 한 분자의 물이 형성된다. 따라서, 생성된 글루코사민-글루타르알데히드 복합체의 항균효과를 검증하여 천연 화장품 제재로의 사용가능성에 관한 연구를 수행하였으며, 이에 대한 효율성 등을 기술하고자 한다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에서 사용한 Glucosamine·HCl은 Sigma aldrich사로 부터 구입하여 사용하였으며, 25% 글루타르알데히드는 Junsei Chemical Co. Ltd.로부터 구입하여 사용하였다. 아민기 정량법을 위한 2, 4, 6-trinitrobenzene sulfonic acid는 Sigma aldrich사로부터 구입하여 사용하였으며, Sodium bicarbonate는 Junsei Chemical Co. Ltd.로부터 구입하였다. Thin layer chromatography (TLC)를 위한 plate는 TLC Silica gel 60 F₂₅₄ 25 Aluminium sheets 20 * 20 cm을 Merck KGaA사로부터 구입하여 사용하였다. 디스크 확산법을 이용한 항균 활성 실험을 위한 재료로 사용된 potato dextrose, bacto agar는 Becton Dickinson and Company사로부터 구입하여 사용하였으며, 6 mm paper disc는 Advantec사로부터 구입하여 사용하였다.

최적 혼합 비율 탐색

글루코사민과 글루타르알데히드의 최적 혼합 비율 탐색을 위해 몰비율 0.5:1, 1:1, 2:1, 3:1로 혼합한 혼합물을 제조하였으며, 충분히 vortex 한 후에 TLC plate에 2 uL를 loading 하였다. 전개용매로는 n-propanol : 25% ammonia : dH₂O = 70 : 15 : 15 비율로 혼합하여 사용하였다. 이동상의 전개가 종료됨과 동시에 TLC plate를 충분히 건조시키고 254 또는 365

nm 파장의 UV를 조사하여 혼합물 spot을 탐색하였다. 이 후, phosphoric acid : copper(II) acetate monohydrate = 80 : 20 비율로 제조한 발색시약에 담갔다 꺼내어 완전히 건조시켰다. 건조된 TLC plate를 23 °C hot-plate에서 20분간 구워 나타난 spot을 통해 시료 내 당 성분을 검색하였다.

잔여 글루타르알데히드의 정량분석

상기 실험을 통해 글루타르알데히드가 254 nm의 특정 파장에서 특이적인 흡광도를 나타낸다는 결과를 바탕으로 시료 내 잔여 aldehyde group의 정량분석을 실시하였다. Spectrophotometer (MQX200, BIO-TEK, U.S.A)를 이용하여 254 nm에서 대조군인 글루타르알데히드의 흡광도를 측정하여 표준 곡선을 얻고, 이를 바탕으로 혼합물 내 잔존하는 aldehyde group의 양을 정량적으로 계산하였다.

잔여 글루코사민의 정량분석

시료의 잔여 amine group의 정량 분석을 위해 이용한 amine group assay를 실시하였다. Amine group assay는 100 ul의 시료와 200 ul의 2% 2, 4, 6-trinitrobenzene sulfonic acid를 5% (w/v) sodium bicarbonate에 녹여 37 °C heating-block에서 1.5 시간 반응시킨 후, 반응 용액 부피의 1.5배의 acetone을 첨가하여 침전을 유발시킨다. 이 후, 원심분리를 실시하여 상층액을 제거하고 다시 acetone을 넣어 세척하는 과정을 3회 반복 실시하였다. 얻어진 침전물을 증류수를 이용해 완전 용해시킨 후 spectrophotometer를 이용하여 335 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 이 때, 대조군으로는 glucosamine hydrochloride를 사용하였으며 측정된 흡광도를 바탕으로 표준 곡선을 작성하였다.

반응 잔여물 제거를 위한 컬럼 크로마토그래피

글루코사민과 글루타르알데히드가 반응하고 남은 잔여물의 제거를 위해서 컬럼 크로마토그래피를 실시하였다. 컬럼은 10 mL pipet에 silica gel 10 mL을 채우고 20 mL의 증류수를 흘려주어 충분히 세척하였다. 글루코사민-글루타르알데히드 혼합 용액을 3 mL loading 한 후, 총 16 mL의 증류수를 지속적으로 공급하여 반응 잔여물 제거를 실시하였다. 반응 잔여물 제거 여부를 확인하기 위해서 TLC plate에 시료 2 uL를 loading 하여 thin layer chromatography를 실시

하였다. 전개용매로는 n-propanol : 25% ammonia : dH₂O = 70 : 15 : 15 비율로 혼합하여 사용하였다. 이동상의 전개가 종료됨과 동시에 TLC plate를 충분히 건조시키고 254, 365 nm 파장의 UV를 조사하여 혼합물 spot을 탐색하였다. 이 후, phosphoric acid : copper(II) acetate monohydrate = 80 : 20 비율로 제조한 발색시약에 담갔다 꺼내어 완전히 건조시켰다. 건조된 TLC plate를 230 °C hot-plate에서 20분간 구워 나타난 spot을 통해 시료 내 당 성분을 검색하였다.

디스크 확산법을 통한 반응 생성물의 항균 활성 측정

시료의 항균 활성 측정을 위해서 디스크 확산법 (Disc diffusion)에 의한 항균 실험을 실시하였다. 항균 실험에 사용된 균은 porcine semen으로부터 분리한 항생제 내성을 갖는 PWG와 F1 두 종이며, 강원대학교 박춘근 교수로부터 제공받아 실험에 사용하였다. PD 배지에서 전배양한 PWG와 F1 (0.2 mL)에 신선한 PD 배지를 20 mL 공급하여 실험에 사용하였다. PWG와 F1 균 80 uL를 미리 제조해둔 PDA(2.4% PD, 1.5% bacto agar) 배지에 접종한 후, 디스크 디스펜서에 시료를 20 uL loading 하였다. Loading이 완료된 디스크를 PDA에 올리고 중앙을 가볍게 눌러 agar 표면에 완전히 부착시켰다. 이 때, 디스크 간의 간격은 중심으로부터 2.5 cm로 하였으며, 평판 가장 자리로부터 1.5 cm 떨어지게 디스크를 고정하였다. 이 후, 37 °C incubator에서 약 3일간 배양하며, 균체의 발육 억제대 (clear zone) 크기를 관찰하여 항균 활성을 평가하였다.

액체 배양을 통한 반응 생성물의 항균 활성 측정

디스크 확산법을 통해 반응 생성물의 항균 활성 측정 결과를 뒷받침하기 위해서 액체 배양을 통한 반응 생성물의 항균 효과 검정을 실시하였다. PD 배지에서 전배양한 PWG와 F1 (0.2 mL)에 신선한 PD 배지를 20 mL을 넣어 24시간동안 37 °C incubator에서 전배양 하였다. 전배양이 완료된 배양액 5 mL을 취해 글루코사민, 글루타르알데히드, 1%, 2.8% 반응 생성물과 분획을 거친 2.8% 반응 생성물을 200 uL 첨가하였다. 이 후, 24시간 동안 37 °C incubator에서 배양하면서 일정한 시간 간격으로 시료를 취해 600 nm 파장에서 흡광도를 측정하여 생육 곡선을 작성하여 항균 활성을 확인하였다.

결과 및 고찰

글루코사민과 글루타르알데히드의 최적 혼합 비율 탐색

글루코사민과 글루타르알데히드의 최적 혼합 비율을 탐색하기 위해서 각각의 몰 비율을 0.5:1, 1:1, 2:1, 3:1로 혼합한 용액을 제조하고 15분간 반응시킨 뒤 thin layer chromatography (TLC)를 실시하였다.

Fig. 2(a)는 TLC plate를 발색 시약을 도포한 후 고온에서 굽는 과정을 거쳐 얻어진 그림이다. Fig. 2의 (a)에서 볼 수 있듯이 글루코사민(GlcN)과 글루타르알데히드(GA) 표준물질 spot이 나타나는 위치 이외의 위치에서 새로운 spot이 나타나는 점으로 미루어 보아 글루코사민과 글루타르알데히드가 결합하여 새로운 생성물이 형성됨을 확인하였다. 또한, 혼합 비율에 따라서 혼합 용액 내 잔존하는 글루코사민과 글루타르알데히드의 농도가 다르게 나타나는데 특히, 3:1의 몰비율로 혼합한 용액에서 잔여 글루타르알데히드의 농도가 매우 낮게 나타났다. Fig. 2의 (b)는 254 nm의 파장의 UV를 가해 쬐었을 경우 나타난 spot을 나타내었다. 이 파장 영역에서는 글루코사민 spot이 나타나지 않는 것이 특징이며, 반응 생성물의 spot이 나타나기는 하나 TLC plate를 굽기 이전에 비해 비교적 spot의 선명도가 낮아진 결과를 보였다. 또한, 글루타르알데히드 spot은 이 파장에서 높은 감도로 검출이 되는 것을 확인할 수 있었다. 365 nm의 파장의 UV를 가하여 얻어진 Fig. 2(c)는 정확히 글루타르알데히드만을 감지하는 것으로 판단된다. Fig. 2의 (a)나 (b)에 있는 그림에서와 달리 반응 생성물 spot이 감지되지 않는 것이 그 이유이다.

상기 서술한 결과는 글루타르알데히드의 알데히드기(-CHO)가 아미노기(-NH₂)에 특이적으로 결합하는 성질을 바탕으로 글루코사민-글루타르알데히드 복합체를 형성하였으며, 이로 인해 혼합 용액 내 글루코사민과 글루타르알데히드의 양이 농도 비례적으로 감소하고 새로운 반응 생성물의 spot이 나타나는 경향을 TLC를 통해 확인하였다. 이러한 이유는 알데히드기가 아미노기(-NH₂)와의 결합하려고 하는 특성 때문으로 사료된다 [12]. 또, Fig. 2(a)에서 보이는 바와 같이 대조군으로 사용한 글루코사민의 spot의 크기와 비교할 때, 0.5:1, 1:1, 2:1, 3:1의 몰 비율로 혼합한 용액 내 잔여 글루코사민 spot의 크기가

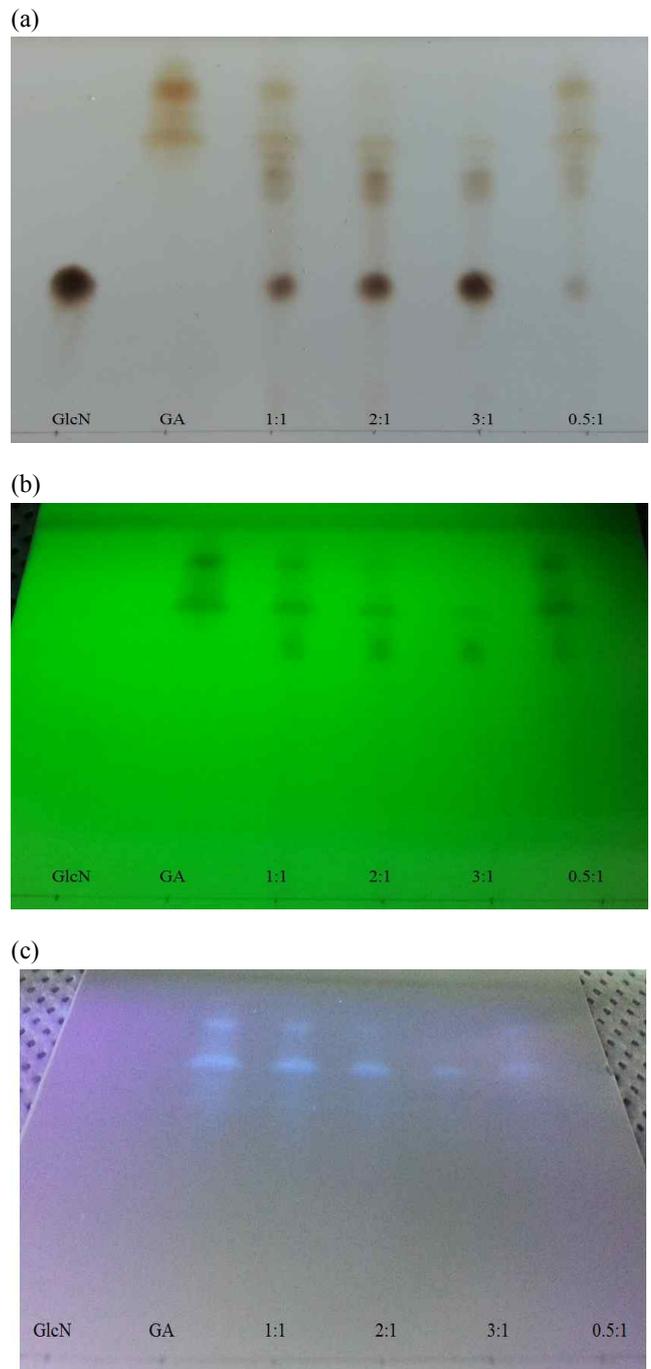


Figure 2. Thin layer chromatography of glucosamine (GlcN), glutaraldehyde (GA) and glucosamine-glutaraldehyde mixture according to mixing molar ratio 1:1, 2:1, 3:1 and 0.5:1. (a) : baking plate, (b) : 254 nm UV light, (c) : 365 nm UV light

작아진 것을 확인할 수 있었다. 이는 글루코사민과 글루타르알데히드가 결합하여 새로운 분자가 형성되었다는 또 다른 증거로 볼 수 있다. 하지만, 반응물

에서 점차적으로 글루코사민 혼합 물 비율이 0.5:1, 1:1, 2:1, 3:1로 점차 증가할수록 잔존하는 글루코사민의 양이 증가하는 경향을 Fig. 2(a)에서 보여주고 있다. 이는 두 가지로 해석할 수 있는데, 하나는 모든 물 비율 조건의 혼합 용액에서, 두 분자간의 결합 정도를 농도에 따라 조절 가능하다는 점과 반응 생성물만을 순수하게 얻어내기 위한 추가적인 공정이 필요한 것으로 해석할 수 있다. 그러나, 서론에서 서술한 바와 같이 글루타르알데히드는 체내에 흡수될 경우 세포독성 [6]을 나타내는 치명적인 단점으로 인해 혼합 용액 내 글루타르알데히드의 농도를 최소화할 수 있는 최적 혼합 비율이 필요하다고 판단되는 바, Fig. 2의 결과를 바탕으로, 3:1 물 비율로 혼합한 조건에서의 글루타르알데히드의 용액 내 잔여 농도가 다른 조건과 비교해볼 때 상대적으로 낮은 것으로 판단되므로 본 실험에서는 최적 혼합 비율로 선택하고 추후 진행되는 실험에서 사용하였다. 또, TLC plate 상에서 글루타르알데히드의 정확한 양을 계산하기 어렵기 때문에 최적 혼합 비율로 선택한 3:1의 혼합 용액 내 잔존하는 글루타르알데히드의 잔여 농도의 확인을 위해서 글루타르알데히드가 365 nm의 특수한 파장을 흡수한다는 사실을 Fig. 2(c)에서 확인한 바, 다음절에서 글루타르알데히드의 흡광도 측정을 통해 혼합 용액 내 잔존 글루타르알데히드의 양을 정량하였다.

글루코사민과 글루타르알데히드의 혼합 용액 내 잔여 농도 확인

혼합 용액 내 글루타르알데히드 잔여 농도의 확인을 위해서 글루타르알데히드가 특정 파장 (365 nm)을 흡수하는 성질을 이용한 알데히드기 검출 실험을 실시한 결과를 Fig. 3에 나타내었다. Fig. 3는 글루타르알데히드의 농도별 흡광도를 측정하여 표준 곡선을 작성한 결과를 나타낸 그림이고, 이 결과를 바탕으로 혼합 용액 내 잔존하는 글루타르알데히드의 양을 정량하였다. 그 결과, 3:1 물비율로 혼합한 용액 내 잔여 글루타르알데히드의 농도는 약 2.64% (v/v)로 나타났다. 이와 같은 결과는 혼합 전 용액 내 글루타르알데히드의 농도가 1% (v/v) 였던 결과와 비교해 1.64% (v/v) 증가한 결과를 보였다. 이와 같은 결과는 글루타르알데히드가 갖는 알데히드기가 글루코사민의 아민기에 결합한다고 가정했던 것 이외에

도 글루코사민 1번 탄소에 결합한 히드록시기(-OH)와 결합하면서 물을 생성하고 분자 내 고리구조가 개환됨에 따라 추가적인 알데히드기의 생성이 이루어진 것으로 판단된다. 결과적으로 반응하지 않은 글루타르알데히드의 알데히드기, 아민기와 결합한 알데히드기 그리고 글루코사민 분자 내 고리구조의 개환으로 인한 알데히드기가 모두 검출되어 초기 글루타르알데히드 농도보다 1.64% (v/v) 증가한 결과를 보이는 것으로 사료된다.

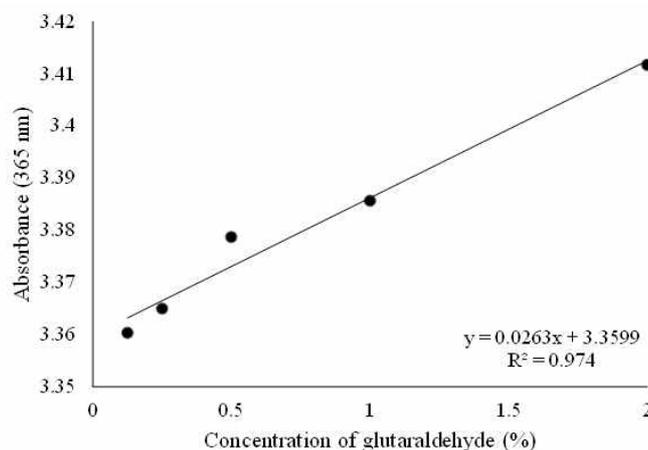


Figure 3. Standard curve of the glutaraldehyde according to concentration. (corresponding residual glutaraldehyde quantification data are shown in Table 1)

두 번째로 글루코사민의 반응 후 잔여 농도를 확인하기 위해서 아민기 정량법을 실시하였으며, 그 결과를 Fig. 5(a)와 (b)에 나타내었다. 글루코사민은 아민기를 갖고 있으므로 아민기 정량법을 통해 잔여 농도를 확인하고자 하였다. 초기 글루코사민 농도는 1% (v/v) 였으며, 글루코사민과 글루타르알데히드의 반응 후 잔여 글루코사민의 농도는 0.24% (v/v)로 나타났다. 이와 같은 결과는 Fig. 2(a)의 TLC 결과를 비교해 보면, 대조군 글루코사민 spot이 3:1의 물 비율로 글루타르알데히드와 반응한 결과 대조군 글루코사민 spot보다 약 3배 정도 크기와 선명도가 감소한 결과를 입증할 수 있었다. 잔여 글루코사민을 제외한 양은 모두 글루타르알데히드와 결합했다고 볼 수 있는데, 그 양이 0.76% (v/v)로 계산할 수 있다. 정량적으로 반응한 글루코사민의 양을 계산해보면, 30.4 ug이 TLC 상에 나타난 반응량이라 볼 수 있으며, 앞서 명확히 판단할 수 없었던 글루타르알데히

Table 1. Concentration of residual glutaraldehyde in the glucosamine and glutaraldehyde cross-linked solution and eluted solution through column chromatography.

	Mixture*	Fraction 1	Fraction 2	Fraction 3	Fraction 4
Absorbance (365 nm)	3.429	3.413	3.421	3.407	3.406
Glutaraldehyde conc. (%)	2.64 ± 0.06	2.04 ± 0.04	2.32 ± 0.05	1.80 ± 0.03	1.77 ± 0.04

*Mixture was not conducted by the column chromatography.

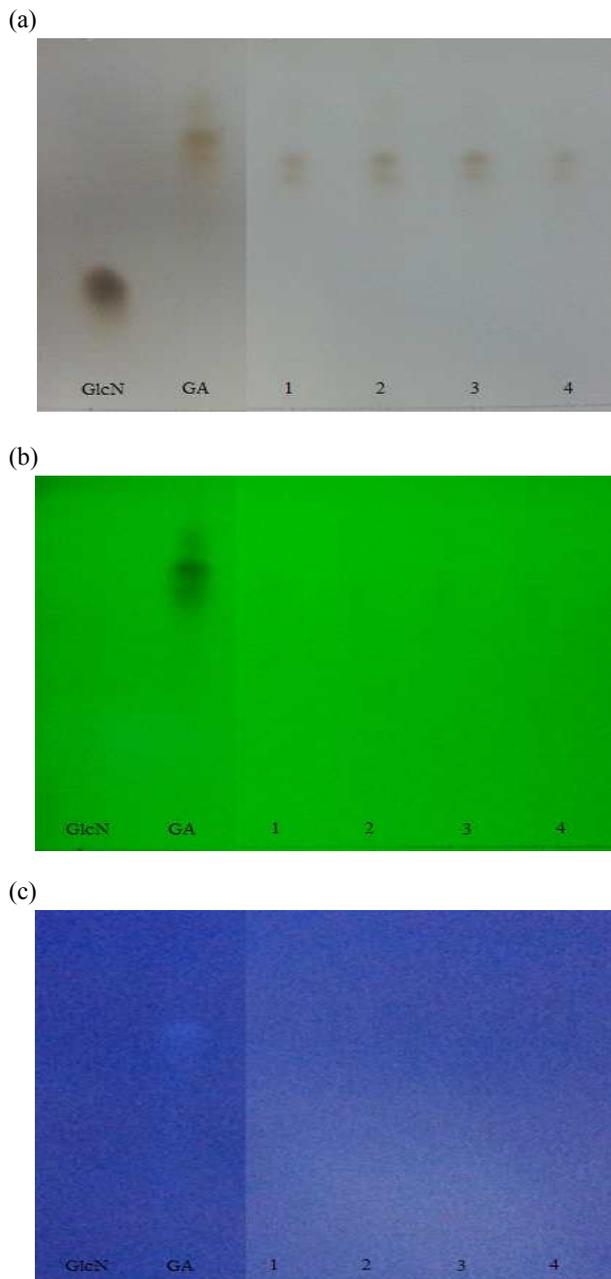


Figure 4. Thin layer chromatography of glucosamine (GlcN), glutaraldehyde (GA) and glucosamine-glutaraldehyde mixture molar ratio 3:1 eluted solution (1 : first eluted, 2 : second eluted, 3 : third eluted, 4 : fourth eluted) through column chromatography. (a) : baking plate, (b) : 254 nm UV light, (c) : 365 nm UV light

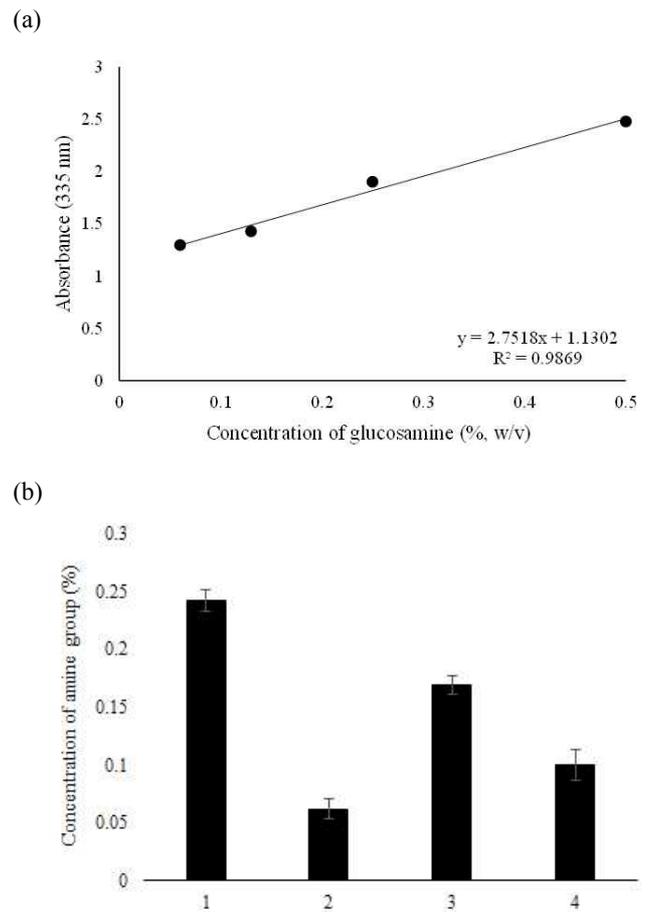


Figure 5. (a) Standard curve of amine group of glucosamine according to the glucosamine concentration by using amine group assay. (b) Concentration of amine group percentage in the 1 : neutralized glucosamine, 2 : glutaraldehyde, 3 : non-neutralized mixture solution and 4 : neutralized mixture solution.

드의 반응량을 몰 비율에 근거하여 역산하였을 경우 약 21.1 ug이 반응에 사용되었다. 이 때, 글루타르알데히드의 반응량을 %로 전환하였을 경우 약 0.5% (w/v)로 나타났다. 간접적인 계산으로 글루타르알데히드와 글루코사민의 결합이 이루어지고 이를 통해 새로운 반응 생성물이 생성됨을 확인할 수 있었던 반면, 반응에 참여하지 않은 반응 잔여물이 혼합 용

액 내 존재하는 것 또한 알 수 있었다. 순수한 반응 생성물만을 얻기 위해서 반응 잔여물을 효과적으로 제거할 수 있는 처리 과정이 추가적으로 필요할 것으로 판단되어 컬럼 크로마토그래피를 진행하고자 하였다.

컬럼 크로마토그래피를 이용한 혼합 용액 내 잔여 글루타르알데히드 및 글루코사민의 제거

혼합 용액 내 잔여 글루코사민과 글루타르알데히드를 제거하고 순수한 반응 생성물만을 얻기 위해서 컬럼 크로마토그래피를 실시하였으며, 잔여 글루코사민과 글루타르알데히드의 제거가 효율적으로 이루어졌는지를 확인하고자 TLC를 진행하였다. Fig. 4은 그 결과를 나타낸 그림으로 Fig. 4(a)는 Fig. 2(a)에서 확인 할 수 있었던 기존 혼합 용액 내 글루타르알데히드와 글루코사민의 spot이 컬럼 크로마토그래피의 실시를 통해 분리된 혼합 용액 1, 2, 3, 4에서 거의 나타나지 않음을 확인하였다. 이러한 결과는 컬럼 크로마토그래피 기법을 통해 새로운 반응 생성물의 분자량이 글루타르알데히드와 글루코사민보다 상대적으로 큰 이유로 먼저 용출되어 반응 생성물만을 우선적으로 얻어낼 수 있는 효과적인 실험 방법임을 알 수 있었다. 또한, 글루타르알데히드와 글루코사민보다 용출이 먼저 이루어지는 현상을 통해서 이 둘 분자가 서로 결합하여 각각이 갖는 분자량보다 높은 분자량을 갖는 새로운 반응 생성물이 생성되었다는 증거가 될 수 있었다. Fig. 4(b)와 (c)는 컬럼 크로마토그래피를 통해 분리된 용액들에 대해 254 nm와 365 nm의 UV 파장에서 조사한 결과를 나타낸 그림이다. 분리된 반응 생성물은 컬럼 크로마토그래피를 실시하지 않았던 Fig. 2의 (b), (c)와 비교했을 때와 달리 두 영역대의 UV 파장을 흡수하지 않는 것으로 나타나는데, 이는 반응 생성물만을 효과적으로 분리해낸 것으로 사료된다.

순수하게 생성물만을 얻어졌는지 재확인을 위해서 글루코사민과 글루타르알데히드의 혼합 용액 내 잔여 농도 확인 실험을 앞선 절에서 기술한 방법과 동일하게 실시하였다. Table. 1에서 볼 수 있듯이 글루타르알데히드의 경우 초기 혼합 용액에서의 농도가 1% (v/v)였으며, 글루타르알데히드와 글루코사민의 반응이 종료된 후 잔여 글루타르알데히드의 혼합액 내 농도는 2.64% (v/v)로 나타났다. 이처럼 초기

농도에 비해 반응 후 알데히드기 농도의 증가는 앞서 설명한 바와 같이 글루타르알데히드가 글루코사민이 갖는 아민기 이외에 환형 구조 내 존재하는 히드록시기(-OH)와 반응하여 환의 구조가 파괴되면서 추가적인 알데히드기의 생성이 야기되는 것으로 판단된다. 또한, 용출된 순수한 반응 생성물 내 글루타르알데히드 농도는 분리 용액에서 각각 2.04, 2.32, 1.80, 1.77% (v/v)로 나타났다. 이와 같은 결과는 컬럼 크로마토그래피를 실시하기 전의 혼합 용액 내 알데히드기의 농도와 비교할 때 전반적으로 감소한 결과를 보이는데 이는 TLC를 통해 글루타르알데히드가 컬럼 크로마토그래피 기법으로 효율적으로 분리가 된다는 점을 입증할 수 있는 수치적 결과로 판단된다.

생육 곡선을 통한 반응 생성물의 항균 활성 측정

디스크 확산법을 통해서 PWG에 대한 미미한 항균 활성을 보임을 근거로 하여, PWG의 액체배양을 통해 반응 생성물의 생육 억제 효과를 측정하고자 하였다. 디스크 확산법에서 약간의 항균 활성을 보였던 글루코사민은 생육 억제 활성이 오히려 없는 것으로 나타났다 (data not shown). 이는 Fig. 6에서 확인할 수 있듯이, 일반 배양 배지에서 배양한 PWG의 생육 곡선이 배양 기간 내내 흡광도가 높게 나타난다는 점을 통해 알 수 있었다. 또한, Fig. 6에서 알 수 있듯이 컬럼 크로마토그래피를 실시하여 얻은 순수한 반응 생성물을 공급한 배지에서도 또한 일반 배양 배지에서 배양한 PWG보다 생육도가 높게 나타나는 결과를 나타냈다. 균체 생육 억제 효과를 알아보기 위해서 실시한 본 실험에서 순수한 반응 생성물이 균체의 생육을 촉진시켰다는 점을 부정적으로 바라볼 수만은 없다고 사료된다. 왜냐하면, 새로운 반응 생성물이 균체의 생육을 촉진시킬 수 있는 새로운 영양 공급원으로 이용이 가능하다고 해석해 볼 수 있겠다.

상기 서술한 경향과는 달리, 글루타르알데히드를 공급해준 배지에서는 균체의 생육이 억제되는 경향을 보였다. 배양이 종료되는 시점까지 꾸준한 생육이 이루어지나 일반 배양 배지에서의 PWG의 생육과 비교해볼 때, 약 67% 균체 생육이 억제되는 효과를 나타냈다. 물론 글루타르알데히드는 이미 알려진 바와 같이 세포 독성을 야기하는 물질로 분류되고 있기 때문에 당연한 결과라 판단된다. 반면, 컬럼 크

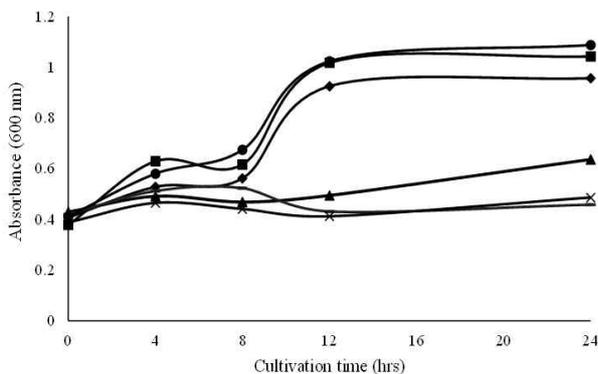


Figure 6. Effect of polymer on the growth of PWG in PD medium at 37 °C in CO₂ incubator for 26 hrs.(● : Fraction mixture, ■ : Glucosamine, ◆ : PWG, ▲ : Glutaraldehyde, × : 1 % mixture, — : 2.8 % mixture).

로마토그래피를 실시하지 않은 1 % 반응 생성물과 2.6 % 반응 생성물은 글루타르알데히드보다 더 강력한 생육 억제 효과를 보였다. 본 실험에서 사용한 글루타르알데히드는 세포 내 단백질과 결합하여 그들을 불활성화 시키는 특성을 갖고 있어 가교제 뿐만 아니라 멸균제로 주로 사용되고 있다 [13]. Fig. 6의 PWG의 액체 배양 결과로부터 알 수 있듯이, 글루코사민은 단분자 그자체로는 특별한 항균 활성을 갖지 않는다. 이러한 이유로 본 실험에서는 글루타르알데히드와 글루코사민의 가교 결합을 통해 균에 대한 상승 효과(synergic effect)를 유도하고자 실험을 실시하였으며, 디스크 확산법을 통해 육안으로 확인할 수 없었던 이들의 항균 효과를 액체 배양을 통한 생육 억제 효과를 확인하였다. 디스크 확산법의 경우 미생물이 생육할 때, 운동성이 극히 제한되어 반응 생성물이 미생물의 세포막과 접촉할 수 있는 확률이 비교적 떨어지므로 항균 활성이 미미했다고 사료된다. 반면, 액체 배양의 경우 수용액 상태의 혼합 용액이 배양기의 지속적인 교반에 의해서 미생물 세포막에 결합해 세포막의 파괴를 더 효과적으로 유도한 것으로 판단된다. 상기 제시한 바와 같이 디스크 확산법과 액체 배양을 통한 균체 생육 억제 활성은 실험법의 차이에 따라 결과가 다르게 나타나는 것으로 생각된다. 두 균주 모두 그램 양성균으로 좀 더 구체적인 기작은 살펴보아야겠지만, 아마도 transpeptidase의 활성저해에 따른 항균성을 나타내는 것으로 사료된다. 이는 그램 양성균 세포벽 합성에 매

우 주요한 역할을 하는 것으로 향후 이에 대한 효소 활성 저해성을 바탕으로 항균 기작을 규명하고자 한다. 그러나, 한 가지 문제되는 점은 컬럼 크로마토그래피를 실시하지 않은 두 반응 생성물에서 생육 억제 효과를 보인다는 사실이다. 이러한 결과는 어쩌면 컬럼 크로마토그래피를 통해 분리되지 않은 글루타르알데히드에 의해 균체 생육 억제가 이루어졌다고 해석할 수 있다.

결론

글루코사민과 글루타르알데히드의 가교 결합을 통하여 항균 활성을 가지는 새로운 천연 소재를 얻고자 진행한 본 실험을 통해 두 고분자 사이의 결합을 통한 새로운 생성물의 생성을 확인할 수 있었다. 상기 두 고분자의 최적 혼합 비율은 1:3 몰비율로 확인되었다. 이 때, 21.1 ug의 글루타르알데히드가 30.4 ug의 글루코사민과 4 uL 내 반응 생성물 용액 내에서 반응하였음을 정량적으로 계산할 수 있었다. 하지만, 반응 후 용액 중 잔여 글루타르알데히드의 농도가 2.6% (v/v)로 초기 1% (v/v) 글루타르알데히드의 농도보다 높게 나타났다. 이러한 결과는 글루타르알데히드의 알데히드기가 글루코사민의 아민기를 공격하면서 결합이 이루지는 것 이외에도 글루코사민 분자에 존재하는 히드록시기에 글루타르알데히드의 알데히드기가 결합하면서 글루코사민 분자 내 고리구조가 개환됨에 따라 새로운 알데히드기의 형성으로 인해 농도가 높아지는 것으로 판단된다. 반면, 글루코사민의 잔여 농도는 0.24% (v/v)로 초기 공급 농도보다 낮아지는 결과를 나타냄으로써 글루타르알데히드와 가교 결합을 형성했다는 근거로 판단된다. 이 후, 이들 반응 생성물만을 순수하게 얻기 위해서 컬럼 크로마토그래피를 실시하여 순수한 글루코사민-글루타르알데히드 가교 결합 고분자만을 얻을 수 있었으며, 이들의 항균 활성을 탐색하기 위해 디스크 확산법을 진행한 결과 F1균에 대한 활성을 보이지는 않았으며, PWG 균에 대한 미미한 항균 활성을 나타냈다. 이러한 근거를 바탕으로 반응 생성물의 균체 생육 억제 활성을 평가하기 위한 실험에서는 반응 생성물 중 컬럼 크로마토그래피를 실시하지 않은 반응 생성물에서 항균 활성을 보임을 확인하였다. 하지만 컬럼 크로마토그래피를 실시하

여 얻은 순수한 반응 생성물에서는 균체의 생육이 일반 배양 배지에서보다 더 우수하게 나타났다. 균체 생육 억제 활성을 탐색하기 위해 실시한 본 실험에서 얻은 특이적 결과이나, 이는 반응 생성물이 균의 생육에 있어서 영양 공급원으로 이용가능 할 수 있음을 확인할 수 있었다.

결론적으로 본 실험에서 새롭게 형성된 글루코사민-글루타르알데히드 복합체는 생리활성의 하나로 유의적 항균 활성을 나타냈으며, 향후 돼지 정장액 보존제, 피부 질환 치료 및 화장품 제재로 이용이 가능할 것으로 판단된다.

감사의 글

본 연구는 지식경제부가 지원하는 2012년도 지역연고산업육성사업(RIS, No. R0001090)으로 가천대학교 바이오 헬스 솔루션 사업단의 연구수행 중 일부를 밝히며 지원에 감사드립니다.

References

- Anderson, J. W., Nicolosi, R. J. and Borzelleca, J. F. 2005. Glucosamine effects in humans: a review of effects on glucose metabolism, side effects, safety considerations and efficacy. *Food Chem. Toxicol.* **43**, 187-201.
- Bissett, D. L. 2006. Glucosamine: an ingredient with skin and other benefits. *J. Cosmet. Dermatol.* **5(4)**, 309-315.
- Campos, E., Coimbra, P. and Gil, M. H. 2013. An improved method for preparing glutaraldehyde cross-linked chitosan-poly(vinyl alcohol) microparticles. *Polym. Bull.* **70**, 549-561.
- Donzelli, B. G., Ostroff, G. and Harman, G. E. 2003. Enhanced enzymatic hydrolysis of langostino shell chitin with mixtures of enzymes from bacterial and fungal sources. *Carbohydr. Res.* **338**, 1823-1833.
- Elzoghby, A. O., Samy, W. M. and Elgindy, N. A. 2012. Albumin-based nanoparticles as potential controlled release drug delivery systems. *J. Control. Release.* **157**, 168-182.
- Gough, J. E., Scotchford, C. A. and Downes, S. 2002. Cytotoxicity of glutaraldehyde crosslinked collagen/poly(vinyl alcohol) films is by the mechanism of apoptosis. *J. Biomed. Mater. Res.* **61(1)**, 121-130.
- Jayakrishnan, A. and Jameela, S. R. 1996. Glutaraldehyde as a fixative in bioprostheses and drug delivery matrices. *Biomaterials.* **17**, 471-484.
- Lee, Y. H. 2003. Study on multi-functional chitosan in cosmetics. *Kor. J. Aesthet. Cosmetol.* **1(3)**, 119-126.
- Rahman, M. H., Hjeljord, L. G., Aam, B. B., Sørli, M. and Tronsmo A. 2014. Antifungal effect of chito-oligosaccharides with different degrees of polymerization. *Eur. J. Plant. Pathol.* **Published Online.**
- Reginster, J. Y., Deroisy, R., Rovati, L. C., Lee, R. L., Lejeune, E., Bruyere, O., Glacovelli, G., Henrotin, Y., Dacre, J. E. and Gossett, C. 2001. Long-term effects of glucosamine sulphate on osteoarthritis progression: a randomised, placebo-controlled clinical trial. *Lancet.* **357**, 251-256.
- Richy, F. and Henrotin, Y. 2003. Structural and symptomatic efficacy of glucosamine and chondroitin in knee osteoarthritis: a comprehensive meta-analysis. *Arch. Intern. Med.* **163**, 1514-1522.
- Sun, H. W., Feigal, R. J. and Messer H. H. 1990. Cytotoxicity of glutaraldehyde and formaldehyde in relation to time of exposure and concentration. *Pediatr. Dent.* **12(5)**, 303-307.
- Wang, T., Turhan, M. and Gunasekaran, S. 2004. Selected properties of pH-sensitive, biodegradable chitosan-poly(vinyl alcohol) hydrogel. *Polym. Int.* **53**, 911-918.