

키토산의 *Candida albicans*와 *Trichophyton rubrum*에 대한 항진균 작용과 Apoptosis 유도작용

지 희 윤*

건양대학교 의과대학 세포생물학교실

Antifungal Activity of Chitosans on *Candida albicans* and *Trichophyton rubrum* and its Induction of Apoptosis

Hee Youn Chee*

Dept of Cell Biology, Konyang Medical College, TaeJeon, Korea

(Received October 23, 2006)

The antifungal activity of chitosan (M.W. 400,000~500,000) and chitooligosaccharide (M.W. 3,500~5,000) was investigated against *Candida albicans* and *Trichophyton rubrum*. Chitosan showed antifungal activity against *C. albicans* and *T. rubrum* at 50 and 100 ng/ml, respectively while chitooligosaccharide did not suppress the growth of fungus. The mode of antifungal activity of chitosan was found to be fungicidal activity. In order to investigate the induction of apoptosis by chitosan, exposure of phosphatidylserine on the surface of the cytoplasmic membrane was observed by the FITC-annexin V reaction. The results showed that chitosan induced apoptosis on *C. albicans*.

KEYWORDS: Antifungal activity, Apoptosis, Chitooligosaccharide, Chitosan

키토산은 게, 새우 등의 갑각류의 외골격에 존재하는 키틴을 탈아세틸화(deacetylation)시켜서 제조하는 천연 생체 고분자 물질로서 poly-B-1,4-N-acetyl-D-glucosamine의 화학구조를 가지고 있다. 키토산은 약산 용액에 용해되어 고분자 다량이온성 용액(polycationic solution)을 형성하여 항암, 항균, 면역증진 작용등의 생리활성 물질로서의 기능을 나타내는 것으로 알려져 있다(Allan *et al.*, 1984; Kurita, 1997). 키토산은 수용성이 낮고 산과 염을 형성하여 물에 용해되며, 키토산 염의 수용액은 고분자 전해질로서, 염용액의 이온화로 인하여 고점도를 나타내며 그 흡수효과에 대한 문제점으로 인하여 흡수력이 좋고 저 점도를 나타내는 저분자형 키토 올리고당 형태로 제조하여 이용하기도 한다. 키토산의 의학적 작용에는 항균물질로서의 연구에 대한 보고가 이루어졌는데 지금까지는 주로 세균에 대한 항균작용에 관한 연구가 이루어져 왔다. Jung(2002) 등은 *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*와 *Salmonella cholera* 등에 대한 키토올리고당과 수용성 키토산의 항균 효과를 보고하였고, Jeon(2005) 등은 키토산올리고당의 어류 감염균인 *Vibrio*에 대한 효과를 보여 주었다. Hwang(1999) 등은 충치원인균인 *Streptococcus mutants*에 대한 항균 효과를 연구하였으며 키토산에 의한

세포파괴로 인하여 단백질, 핵산 등 세포물질의 유출로 인한 항균 효과 기작을 보고하였다. 키토산의 항균 효과는 크게 두 가지 기작을 제안하는데 키토산이 균세포에 침입하여 DNA에 흡착되어 DNA를 전사하는 과정을 방해하는 기작과 키토산이 균세포 표면에 흡착하여 세포분열을 방해하고 세포막을 통한 물질이동을 저해한다는 기작이 보고되어 있다(Nishimura *et al.*, 1984; Oh *et al.*, 2000). 이와 같이 키토산의 항균작용에 대한 연구는 세균에 관하여 많이 이루어졌으며 진균에 대한 연구는 부족한 실정이다. 본 연구에서는 키토산과 키토산올리고당에 대하여 효모균인 *Candida albicans*와 균사 형성 균인 *Trichophyton rubrum*에 대한 항진균 효과를 비교하고 키토산의 진균세포에 대한 apoptosis(세포사멸) 유도에 대한 현상에 관한 연구를 수행하였다.

C. albicans(KCTC7965)와 *T. rubrum*(KCTC 6345)은 한국생명공학연구원 유전자 은행으로부터 구입하여 사용하였다. 균주는 SDA(Sabouraud dextrose agar) 배지에서 *C. albicans*과 *T. rubrum*을 각각 37°C와 26°C에서 계대 배양하여 유지시켰다. 키토산(M.W. 400,000~500,000)과 키토산 올리고당(M.W. 3,500~5,000)은 (주) 키토라이프(경기도, Korea)에서 공급받아서 사용하였다. 키토산은 0.1% 아세트산 용액에 용해시켰으며 키토산올리고당은 증류수에 용해시킨 후 용해시킨 시료액을 0.45 µm 주사

*Corresponding author <E-mail: hychee@konyang.ac.kr>

기 필터로 여과하여 사용하였다. 키토산 및 키토산 올리고당의 항진균 효과를 측정하기 위하여 Microbroth culture assay를 수행하였다. *T. rubrum*의 포자를 얻기 위해서 배양한지 10일된 *T. rubrum*의 균사체 절편에 멸균 증류수를 수차례 피펫으로 가하여 포자를 회수하고 $1 \times 10^7/ml$ 의 포자농도가 되도록 희석하였다. *C. albicans*도 동일농도로 세포수를 조절하였다. Malt extract broth를 100 μl 씩 96 well plate각 well에 첨가하고 준비된 균주액을 10 μl 씩 각 well에 접종한 후 키토산 및 키토산 올리고당 용액을 적정농도 첨가한 후 26°C에서 3일간 배양하여 포자에서의 균사체 형성과 세포성장 유무를 관찰하였다. 대조군에는 키토산 시료액 대신 동일량의 0.1% 아세트산과 증류수를 첨가하였다. 항진균 작용에서의 최소억제농도, 즉 MIC(minimum inhibitory concentration)값은 세포성장이 관찰되지 않는 키토산 시료액의 최소농도로 정의하였다. 항진균 효과를 나타내는 키토산 시료액이 정진균(fungistatic)효과인지 살진균(fungicidal)효과인지를 관찰하기 위해서 시료 액 첨가에 해서 성장이 억제된 나타낸 well에서 세포들을 원심 분리하여 회수하여 malt extract broth로 수세하고 새로운 SDA 배지에 도말하여 26°C에서 5일간 배양하여 세포성장의 유무를 관찰하였다. 항진균 효과를 나타내는 키토산 시료의 진균세포에 대한 apoptosis유도효과를 관찰하기 위하여 Annexin V 염색법을 이용하였다. 적당량의 *C. albicans*를 1.5 ml 튜브에 넣어 증류수로 현탁 하여 세포액을 준비하였다. 96 well에 malt extract broth를 100 μl 를 넣고, 준비한 *C. albicans* 현탁액을 30 μl 첨가하였다. 대조군과 실험군으로 나누어 대조군에는 0.1% 아세트산을 첨가하고 실험군에는 0.1% 아세트산에 용해시킨 키토산을 100 ng/ml 첨가하고 26°C에 1시간과 3시간 반응시킨 후 각각의 반응시킨 대조군과 실험군에 각각 pH 6.8의 sorbitol buffer(1.2 M D-sorbitol, 0.5 mM $MgCl_2$, 35 mM potassium phosphate, Sigma사)를 500 μl 를 넣어 1분 정도 충분히 혼합시켰다. 각각의 대조군과 실험군에서 50 μl 를 tube에 취한 후 20 μl lyticase buffer를 넣고 28°C에서 2시간 동안 반응을 시켜준 후 1000 rpm에서 1분 정도 원심분리한 후 상층액은 버리고 binding buffer(ANNEXIN V-FITC Apoptosis Detection Kit, Sigma사) + 1.2 M sorbitol buffer 200 μl 를 첨가하여 혼합시켜 주었다. 실험액 38 μl 를 1.5 ml 튜브에 취한 후 annexin-FITC(ANNEXIN V-FITC Apoptosis Detection Kit, Sigma사) 2 μl 와 propidium iodide(ANNEXIN V-FITC Apoptosis Detection Kit, Sigma사) 2 μl 를 첨가한 후 20 분 동안 실온에 방치 후 형광 현미경을 통해 관찰하였다. 본 실험의 결과 키토산 올리고당은 *C. albicans* 과 *T. rubrum* 모두에 대하여 항균 작용을 나타내지 않았으나 키토산 경우에는 두 균주 모두에 대하여 높은 항진균 효과를 나타내었다. 키토산 용액의 두 균주에 대한 최소억제농도는 *C. albicans*과 *T. rubrum*에 대하여 각각 50과

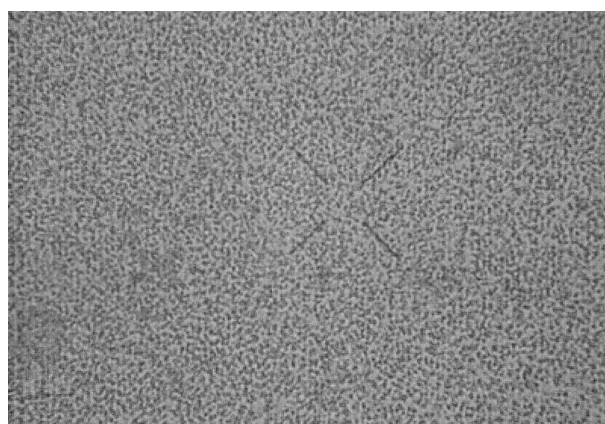


Fig. 1. Abnormal morphology of *Candida albicans* cells treated with chitosan (M.W. 400,000~500,000) (100 $\times$).

100 ng/ml로 나타났다. 항진균 효과를 보인 키토산 용액을 처리한 세포들을 재회수하여 새로운 SDA 배지에서 배양한 결과 두 균주 모두에서 재성장이 관찰되지 않았으므로 키토산은 *C. albicans*과 *T. rubrum*에 대하여 성장억제작용 보다는 키토산 용액이 세포를 죽이는 살진균제적 작용을 나타내는 것으로 해석되었다(Entsar *et al.*, 2005). 광학 현미경을 관찰한 결과도 키토산 시료를 처리한 세포의 형태가 비정상적으로 수축되어있는 모습을 보였다(Fig. 1). 키토산시료액의 진균 세포에 대한 apoptosis작용의 유도를 관찰하기 위하여 phosphatidylserine의 세포막 외부로의 노출을 감지하는 방법을 이용하여 관찰하였다. Phosphatidylserine은 포유동물세포막 인지질이중층에서 비대칭적 분포를 나타내며 apoptosis유도과정 초기에 세포막 표면으로 노출되는 특성을 나타내는 세포막 지질성분이다(Carbon and Calderon, 1991; Martin *et al.*, 1995) FITC-Annexin은 세포막 표면에 노출된 phosphatidylserine에 대하여 높은 친화력을 가지므로 apoptosis를 나타내는 세포는 그린색 형광을 나타내나 apoptosis가 일어나지 않는 세포에서는 형광을 나타내지 않는다. 본 실험에서 키토산을 처리하지 않은 대조군에서는 형광을 나타내는 세포수가 거의 없었으나 1시간 동안 키토산을 처리한 세포에서는 형광을 나타내는 세포들이 관찰되었다(Fig 2). 이러한 결과는 키토산 처리의 시간경과에 따라 세포의 apoptosis 유도되는 현상을 보여주었다. Propidium iodide는 정상세포에 대하여는 세포막 투과성이 없으므로 DNA와 같은 세포내의 핵산과 결합하지 못하지만 세포괴사(necrosis)가 일어나는 세포에서는 세포막을 통과하여 DNA에 결합하여 적색의 형광을 나타낸다. 본실험에서 키토산 처리 3시간 후에는 propidium iodide가 세포막을 통과하여 DNA에 결합하므로 적색의 형광을 나타내는 결과를 통하여 키토산은 세포의 괴사현상을 일으킨다는 사실을 보여주었다(Fig. 3). 이상의 실험결과를 보면 키토산은 처음에는 *C. albicans*에 대하여 apoptosis를 유도하는



Fig. 2. Annexin V-PI staining of *C. albicans* cells exposed to 100 ng/ml chitosan (M.W.) 400,000~500,000 for 1 hr. Cell is stained only in green by annexin V, and not in red, indicating that it is in a stage of apoptosis.

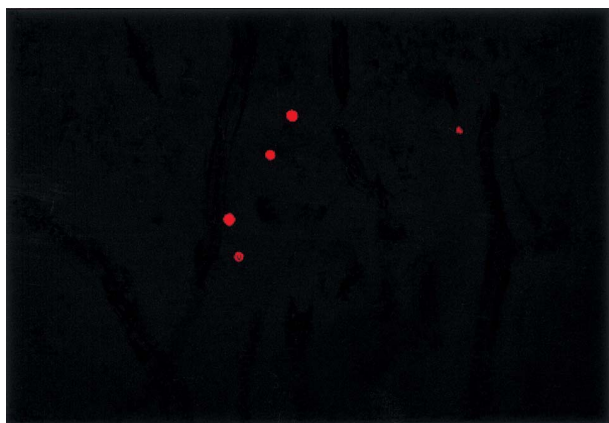


Fig. 3. Annexin V-PI staining of *C. albicans* cells exposed to 100 ng/ml chitosan (M.W.) 400,000~500,000 for 3 hr. The cell is stained only in red, indicating that it is in necrosis.

현상을 나타내다가 시간이 경과함에 따라 괴사를 유도하게 된다는 결과를 보여주었다. Paula *et al.*(2001)은 효모 균인 *Saccharomyces cerevisiae*가 고농도의 acetic acid에 의하여 포유류 진핵세포와 유사한 apoptosis 현상이 유도된다는 연구를 발표하였다. 본 실험의 결과도 키토산에 의하여 *C. albicans*의 apoptosis 유도를 보여주었다. 키토산은 부작용이 없는 천연 화합물로서 키토산의 항진균 효과는 미래에 새로운 항진균제 개발에 기여할 수 있는 물질로서 더 많은 연구가 수행되어야 한다고 사려된다.

적 요

키토산 및 올리고키토산의 *C. albicans*과 *T. rubrum*에

대한 항 진균작용에 대하여 조사하였다. 키토산은 *C. albicans*과 *T. rubrum*에 대하여 항 진균 효과를 나타내었으나 올리고키토산은 두 균주에 대한 성장억제를 나타내지 않았다. 키토산의 항 진균 양상은 살 진균 적 활성을 나타내었다. 키토산의 apoptosis 유도에 대한 조사를 위하여 phosphatidylserine의 세포막 외부로의 노출을 FITC-Annexin 반응을 이용하여 관찰하였다. 실험결과 키토산은 *C. albicans*의 세포에 대하여 apoptosis를 유도하는 것을 보여주었다.

참고문헌

- Allan, G. G., Altman, L. C., Bensinger, R. E., Ghosh, D. K., Hirabayashi, Y., Neogi, A. N. and Neogi, S. 1984. Biomedical applications of chitin and chitosan. Pp 19-133. In: Zikakis, J. P. Ed. Chitin, Chitosan and Related Enzymes. Academic press.
- Cerbon, J. and Calderon, V. 1991. Changes of the compositional asymmetry of phospholipids associated to the increment in the membrane surface potential. *Biochim. Biophys. Acta* **1067**: 139-144.
- Entsar I Rabea, Mohamed EL Badawy, Tina M Rogge, Christian V Stevens, Monica Hofte, Walter Steubaut and Guy Smagghe. 2005. Insecticidal and fungicidal activity of new synthesized chitosan derivatives. *Pest Manag Sci.* **61**: 951-960.
- Hwang, J. K., Kim, H. J., Shim, J. S. and Pyun, Y.R. 1999. Bacteriocidal activity of chitosan on *Streptococcus mutans*. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **31**: 522-526.
- Jung, B. O., Chung, S. J. and Lee, G. W. 2002. Effect of molecular weight of chitosan on its antimicrobial activity. *J. Chitin Chitosan.* **7**: 231-236.
- Jeon, Y. J., Kim, S. K., Heo, M. S., Park, P. J. and Ahn, C. B. 2005. Antimicrobial affect of chitosan of chitosan and its oligosaccharides against growth of vibrio species causing fish diseases. *J. Chitin Chitosan.* **10**: 82-88.
- Kurita, K. 1997. Chemistry and application of chitin and chitosan. *Polymer Degrad. Stabil.* **59**: 117-120.
- Martin, S. J., Reutelingersperger, C. P. M., McGahon, A. J., Rader, J. A., van Schie, R. C. A. A., LaFace, D. M. and Green, D. R. 1995. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and AbI. *J. Exp. Med.* **182**: 1545-1556.
- Nishimura, K., Nishimura, S., Nishi, N., Saiki, I., Tokura, S. and Azuma, I. 1984. Immunological activity of chitin and its derivatives. *Vaccine.* **2**: 129-135.
- Oh, S. W., Hong, S. P., Kim, H. J. and Choi, Y. J. 2000. Antimicrobial effects of chitosans on *Escherichia coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **32**: 218-224.
- Paulo, L., Maria, J. S., Manuel, T. S., Cecilia, L. and Manuela, C-R. 2001. *Saccharomyces cerevisiae* commits to a programmed cell death process in response to acetic acid. *Microbiol.* **147**: 2409-2415.