

## Methyleugenol 반응시킨 키토산의 세포안정성 및 돌연변이원성

박상순 · 김제중\*  
서울산업대학교 식품공학과

### Cell Stability and Mutagenicity of Chitosan with Methyleugenol

Sang-Soon Park and Je-Jung Kim\*

Department of Food Science and Technology, SNUT

#### Abstract

In order to increase the solubility of chitosan, methyleugenol-g-chitosan (MEC) was prepared by grafting methyleugenol. For the purpose of identify the property of MEC formed, the structure analyses, cell stability, and mutagenicity were also investigated by FT-IR spectrometry, human dermal fibroblast (HDF), and Ames test. The typical eugenol peak structure of MEC, which is engraft eugenol on a chitosan, was identified by the vinyl peak of IR spectra. In the experiment of a given concentration, that is 0.1 - 0.01%, of MEC in HDF, the cell toxicity for MEC is not observed. The mutation result of MEC formed was mutagenicity-negative on Ames test. In the result of inductively coupled plasma method, there wasn't a single heavy metal to be seen.

**Keywords:** chitosan, methyleugenol-g-chitosan, cell stability, Ames test

#### 서 론

키토산은 자연계에서 유일한 염기성 폴리머로 사상균, 효모, 오징어, 동물플랑크톤, 게, 새우 및 곤충 등의 균류 및 갑각류에 분포되어 있다. 키토산은 외골격의 주요구성성분인 *N*-acetyl-D-glucosamine이  $\beta$ -1,4로 결합한 점액다당류의 일종으로 이를 탈아세틸화하면, 키토산이 된다. 키토산은 D-glucosamine과 *N*-acetyl-D-glucosamine이  $\beta$ -1,4 글루코사이드 결합으로 연결되어 있다(Yao et al., 1994).

최근 국내에서의 건강지향성 식품 및 자연식품에 대한 관심이 높아지고 있다. 이러한 상황에서 특히 고순도의 키토산 관련제품의 안정성등이 확보되면 국민건강 및 식품산업발전에도 기여할 수 있다. 한편 키토산은 이미 식품첨가제 및 건강식품원료로도 승인되어 현재까지 키토산·키토산 및 이들 유도체의 각종 유효 기능성에 대한 연구가 많이 보고되어왔다. Carboxymethyl-g-chitosan(CMC)이 W/O형에서 유화안정이 우수하다는 보고가 있으며(Kim et al., 2002), 3 kDa, 50 kDa의 저분자 키토산의 항균효과를 측정 한 결과 *E. coli* 와 *S. aureus* 대한 항균 효과가 있다(Myoung et al., 2002).

또한 키토산·키토산 및 그 유도체들은 면역보조제등으로서 항균, 항산화, 항종양활성등의 성질을 나타내며, 또한 많은 연구자들은 세포독성 T-림프구(cytotoxic T-lymphocyte), 대식세포(macrophage), 내추럴킬러세포 (natural killer cell) 등과 같은 발암성 면역세포(tumoricidal immunocytes)를 활성화시킨다고 발표한 바 있다 (Suzki et al., 1986; Tokoro et al., 1989; Suzki et al., 1984). 그럼에도 불구하고 아직 까지 국내에서는 키토산을 이용한 연구가 침강제나 항산화제, 항균제등으로 사용되고 있으며 고부가가치제품으로서의 인식할 수 있는 약품 등으로는 아직까지 미미한 수준이다.

따라서 본 연구에서는 키토산이 약산과 특수한 용매에만 용해되어 사용에 많은 제약이 있다고 판단되어, 키토산과 methyleugenol을 ceric ammonium nitrate (CAN) 개시제를 사용하여 수용성이 증대된 methyleugenol-g-chitosan(MEC), 즉 수용성 키토산 유도체를 제조하였으며, 제조된 MEC의 구조분석, 세포독성실험, 돌연변이원성, 그리고 유해성 금속등을 확인하여 식품, 의약품과 화장품 원료로서의 활용 가능성을 살펴보고자 하였다.

#### 재료 및 방법

##### 실험재료

실험에 사용된 키토산은 탈아세틸화도 98%이상의 제품으로 미래바이오텍 (포천, 경기도)에서 구입하여 사용하였

Corresponding author: Je-Jung Kim, Department of Food Science and Technology, SNUT, 172 Kongneug-dong, Nowon-gu, Seoul 139-743, Korea.  
Tel: 82-2-970-6732; Fax: 82-2-976-6460  
E-mail: jejung@snut.ac.kr

으며, methyleugenol, (Tokyo Chemical, Japan), ceric ammonium nitrate (CAN, Sigma, USA), acetic acid, nitric acid, methanol, ethanol, acetone, 질소가스 등은 99.0%이상의 순도를 갖는 제품을 사용하였다.

### MEC 제조

Fig. 1에서와 같이 키토산을 1.5 N-acetic acid 용액에 녹여 반응플라스크에 넣고 N<sub>2</sub>가스 및 저온순환장치(Eyela, CA-1110, Japan)를 통한 4°C의 냉각수 기류하에 40°C의 항온순환장치(Eyela, NTT, Japan)에서 methyleugenol (0.8 mL, 1.0 mL, 1.3 mL)을 가하여 60분간 반응 후 CAN 촉매를 넣고 180분간 반응시켜 아세톤으로 석출 후 진공 건조기(대산, DS-350, 대한민국)로 건조하고, Soxhlet추출장치에 메탄올을 사용하여 미반응물을 제거하여 최종산물인 수용성이 증대된 키토산인 MEC를 얻었다(Jung et al., 1999).

### 적외선분광법에 의한 MEC 구조분석

키토산과 키토산 유도체인 MEC의 구조 및 합성유무를 확인하기 위하여 적외선분광기(FT-IR, Nicolet Model Magna IR 550, Madison, WI)를 사용하였으며, 각 시료는 KBr과 혼합하여 펠렛으로 제조하여 상온에서 cell mount에 고정시킨 후 측정하였다.

### 용융점도법에 의한 분자량 결정

점도평균분자량측정을 위하여 0.2 M 초산, 0.1 M 염화

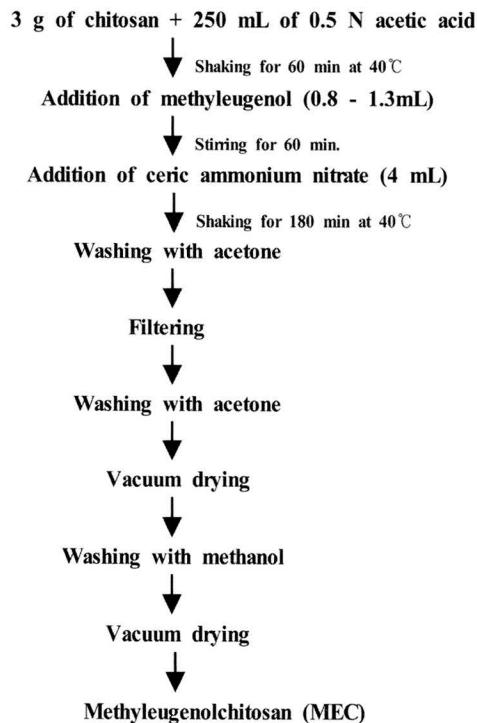


Fig. 1. Schematic procedures for the preparation of methyleugenolchitosan.

나트륨, 4 M 우레아용액을 각각 1 : 1 : 1(v/v/v)로 혼합하여 키토산 유도체 (MEC)를 일정 농도로 용해시킨 후 희석하여 4°C의 냉암소에 3일간 방치하였으며, 25°C로 온도가 일정하게 유지되는 항온조에서 점도측정장치(Schott, ML1130, Germany)에 Ubbelohde 점도계를 사용하여 점도를 측정하였으며, 측정용액이 모세관을 통과하는 시간을 5회 반복 측정하였으며 통과시간의 평균값을 이용하여 점도 평균분자량(Cho et. al., 1999; Wang et al., 1991)을 (1)식에 의하여 계산하였다.

$$\overline{M}_v = \left( \frac{[\eta]}{K} \right)^{\frac{1}{a}} \quad (1)$$

여기서,  $\eta$ : 극한점도(intrinsic viscosity)

$\overline{M}_v$ : 점도평균분자량

K: 상수(= 8.93x10<sup>-4</sup>)

a: 상수(= 0.71)

### Inductively Coupled Plasma (ICP)법에 의한 원소분석

ICP법은 아르곤 가스에 고주파를 유도결합방법으로 걸어 방전되어 얻어진 아르프라마에 시험용액을 주입하여 목적 원소의 원자선 및 이온선의 발광광도를 측정하여 시험용액 중의 목적원소의 농도를 구하는 방법으로 대부분의 금속의 측정에 쓰인다.

높은 점도를 가지고 있는 시료를 전처리하기 위해 시료 10 g에 3N-HNO<sub>3</sub> 10 mL을 넣어 서서히 가열하여 액량이 15 mL 될 때까지 증발농축하고 방냉시켰다. 3N-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 mL와 3N-HNO<sub>3</sub> 5 mL 넣고 가열하여 백색연기가 발생하면 반응이 종료된 것으로 보고 가열을 중지한다. 분해가 끝나면 방냉하여 증류수 50 mL을 넣고 끓기 직전까지 가열하여 침전된 용해성 염을 녹인다. 방냉 후 여과하여 증류수로 정확히 100 mL로 하여 시험용액으로 사용하였다. 전처리한 시료는 ICP(Thermo, USA)를 이용하여 납(Pb), 구리(Cu), 수은(Hg), 비소(As), 주석(Sn) 항목을 분석하였다. 표준용액은 Kanto Chemical (Japan)사의 Pb, Cu, Hg, As, Sn를 표준원액(1000 mg/L)을 사용하였다. 시료 및 공시험용액은 희석한 다음 ICP에 주입하여 흡광도를 구하고 따로 표준용액 및 공시험용액에 대해서도 각각 시료와 같은 조작을 해서 검량선을 작성하였다.

### Human Dermal Fibroblast에 의한 MEC의 세포독성시험

(주)엠씨티티 (대한민국)에서 제공받은 human dermal fibroblast (HDF, p=2)를 이용하여 MEC (a), (b), (c)에 대한 세포독성실험을 수행하였다. 세포는 10% fetal bovine serum (FBS), 1% penicillin/streptomycin을 포함한 DMEM-F12(GIBCO사) 배지에 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 배양하였으며, HDF를 96-well plate에 well당 3x10<sup>3</sup>cell로 분주하고

12시간동안 배양한 후 0.1~0.01% 농도의 MEC를 well에 첨가하여 24시간 경과 후 MTT assay 법을 이용하여 세포 성장률을 측정하였다.

### 돌연변이원성 실험

Ames 시험방법에 따라 MEC의 돌연변이원성 유무를 확인하였다 (Ames and Maron et al., 1983). 이때 돌연변원성 양성대조구로서 2-nitrofluorene을 20 mg/mL의 농도로 메탄올에 녹인 용액을 사용하였으며, MEC-a, MEC-b, MEC-c를 증류수에 100 mg/mL 농도로 녹여 준비하였으며, 돌연변이균주로는 *Samonella typhimurium* TA98 혹은 *Samonella typhimurium* TA100을 각각 고압증기멸균기 (Eyala, MAC-501, Japan)에 멸균한 nutrient broth에 접종하여 37°C 배양기(Eyala, MIR-262, Japan)에서 ( $1.5\sim3.0\times 10^2$  cfu/mL)하여 0.1mL를 멸균된 screw cap tube에 넣고 가볍게 흔든 후 45°C로 냉각된 top agar 2 mL 및 멸균된 biotin-histidine용액 0.2 mL를 모두 혼합하여 미리 제조된 hard agar에 각 시료는 20  $\mu$ L을 분주한 후 top agar를 그 위에 분주하여 37°C에서 양성대조구 (2-nitrofluorene)와 음성대조구 (methanol)에 골고루 분주하였다. 24시간배양 후 생성된 colony를 양성대조구 및 음성대조구와 비교하여 돌연변이원성을 측정하였다.

## 결과 및 고찰

### 키토산 유도체의 제조

Ubbelohde 점도계를 사용하여 점도평균분자량을 측정한 결과, 키토산  $1.2\times 10^5$  Da이었고, 키토산 유도체는 MEC (a)  $4.3\times 10^5$  Da, MEC (b)  $5.6\times 10^5$  Da MEC (c)  $6.5\times 10^5$  Da인 것으로 확인되었다. MEC의 경우, 키토산보다 예상보다 3~4배 정도 큰 점도평균분자량을 갖는 것으로 나타났는데, 이는 키토산에 methyleugenol이 합성된 MEC의 자체점도가 증가하는 것에서 기인한 것이라 볼 수 있다.

키토산 유도체인 SaCs(safrol-g-chitosan)와 EuCs(eugenol-g-chitosan)의 점도평균분자량을 측정한 결과 각각  $7.5\times 10^5$  Da,  $7.8\times 10^5$  Da인 것을 확인할 수 있었다.(Kim et al., 2003)

키토산 구조에 methyleugenol의 고리구조가 첨가되어 고리구조의 함량이 증가하며 이러한 구조가 그물구조형성에 기여함으로써 MEC의 자체점도가 증가하게 되며 이에 따라 점도 평균분자량이 예상보다 더 크게 보이는 것으로 추측된다. 또한, 점도평균분자량이 감소하지 않는 결과로 볼 때, 형성된 MEC는 원래 키토산의  $\beta$ -1,4 결합 및 고리구조를 절단하지 않는다고 볼 수 있다.

### 키토산, MEC과 Methyleugenol의 FT-IR을 통한 구조분석

Fig. 2는 Methyleugenol 과 키토산의 구조를 나타낸 것이다. Methyleugenol의 경우 3300-3000  $\text{cm}^{-1}$ 에서 방향족고

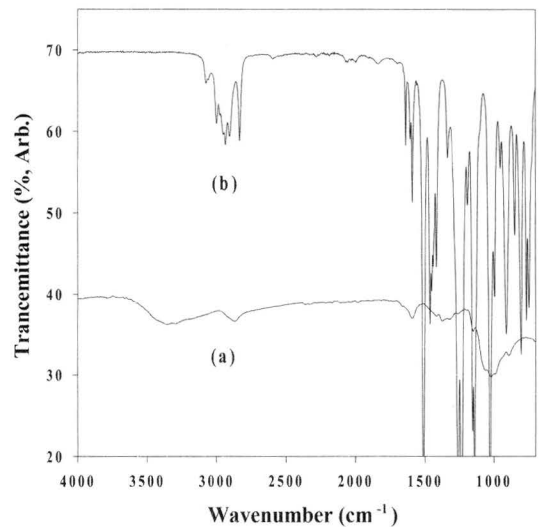


Fig. 2. IR spectra of chitosan (a) and Methyleugenol (b).

리 (Ar-H) -CH의 stretch에 기인한 흡수띠, 3000-2700  $\text{cm}^{-1}$ 에서 지방족 -CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>-의 -CH stretch에서 기인한 흡수띠, 1675-1625  $\text{cm}^{-1}$ 에서 >C=C< stretch에서 기인한 흡수띠, 1475-1300  $\text{cm}^{-1}$ 에서 >C-H bending, 1000-650  $\text{cm}^{-1}$ 에서 Ar-H bending (our-of-plane), >C=C< bending에서 기인한 흡수띠가 나타남을 보여준다. Chitosan의 FT-IR 스펙트럼의 경우 3750-3000  $\text{cm}^{-1}$ 에서 -OH, -NH stretching의 흡수띠, 3000-2700  $\text{cm}^{-1}$ 에서 -CH stretch에 기인하는 흡수띠, 1653과 1595  $\text{cm}^{-1}$ 에서 카르보닐기의 stretching vibration (amide I)과 1차 아민의 N-H bending vibration (amide II) 흡수 파장을 각각 발현하고 있다.

Fig. 3은 키토산에 methyleugenol을 함량별 (0.8, 1.0, 1.3)로 그래프트시킨 MEC 공중합체의 FT-IR 스펙트라를 나타냈다. Methyleugenol이 그래프트된 MEC 공중합체의 경우,

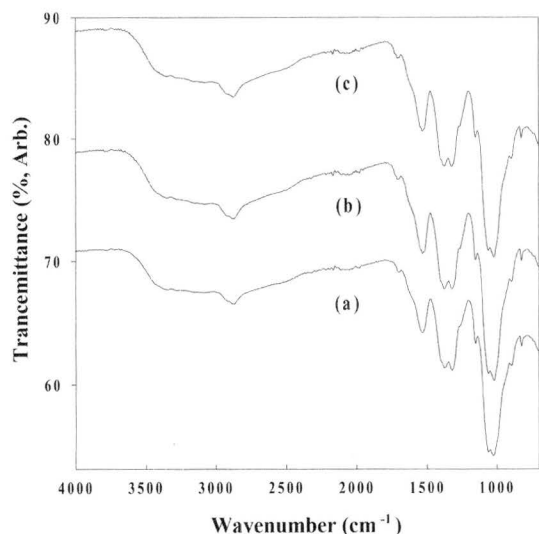


Fig. 3. IR spectra of MEC-a (a), MEC-b (b) and MEC-c (c).

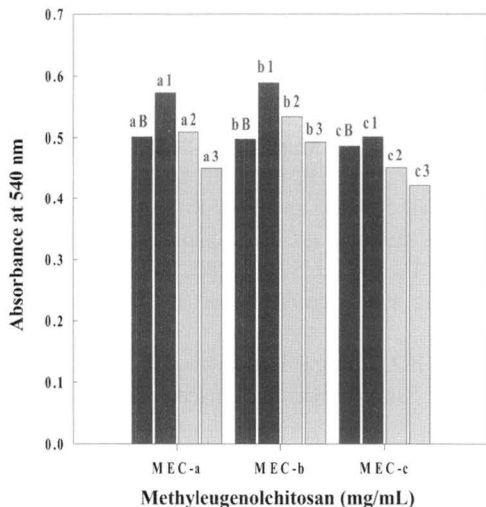
methyleugenol의 공유결합에 의한 키토산 아민기와 반응으로 인하여 순수 키토산 보다 amide II의 흡수띠가 1531  $\text{cm}^{-1}$ 으로 이동함을 알 수 있었다. 이것은 키토산 일차 아민 그룹이 methyleugenol의 이중결합이 반응하여 공유결합을 형성함으로써 흡수띠의 이동현상이 나타났으며, 또한 methyleugenol의 비닐기와 키토산이 반응하면서 1675-1625  $\text{cm}^{-1}$ 에서의  $>\text{C}=\text{C}<$ 의 흡수띠가 사라졌음을 알 수 있었다 (Parshanth et al., 2003; Chen et al., 2003; Zhang., 2003). 이러한 결과를 통해 methyleugenol이 키토산에 그래프트반응이 잘 일어났음을 알 수 있었다.

#### 유해성 금속

건강기능식품의 기능성원료 규격기준(2.0 mg이하/kg)에 명시된 유해성 금속인 Pb의 유무를 확인하기 위함과 동시에 MEC의 안전성 확보차원에서 Cu, Hg, As, Sn 등의 유무를 확인한 결과 유해성 금속이 전혀 검출되지 않아, 식품 및 화장품 그리고 의약품의 원료로서 안정성이 높은 것을 확인할 수 있었다.

#### 세포안정성 실험

키토산 유도체인 MEC에 대한 독성여부를 확인하기 위하여 0.1~0.01%의 농도를 갖는 MEC 시료를 HDF에 각각 처리하여 세포의 성장을 관찰한 결과, Fig 4에서 보는 바와 같이 MEC은 어떠한 농도 범위에서도 세포독성을 나타내지 않음을 확인할 수 있었다. 이는 이전 allylphenol-g-chitosan 제조에 대한 세포독성유무를 확인한 결과 어떠한 농도의 범위에서도 세포독성이 나타나지 않았던 결과와도



**Fig. 4.** Cytotoxic effects of MEC on Human Dermal Fibroblast. aB: MEC-a Blank, a1: MEC-a 0.1%, a2: MEC-a 0.03%, a3: MEC-a 0.01%  
bB: MEC-b Blank, a1: MEC-b 0.1%, a2: MEC-b 0.03%, a3: MEC-b 0.01%  
cB: MEC-c Blank, a1: MEC-c 0.1%, a2: MEC-c 0.03%, a3: MEC-c 0.01%

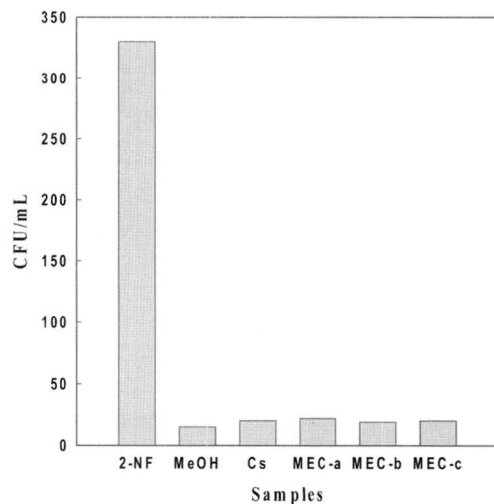
일치하였다(Jung et. al., 2007).

#### 돌연변이원성 확인

MEC 와 키토산을 각각 100 mg/mL의 농도로 증류수에 녹여 돌연변이원성을 검색하기 위하여 *Samonella typhimurium* TA98 및 *Samonella typhimurium* TA100을 사용하였다. 키토산, 키토산 유도체인 MEC-a, MEC-b, MEC-c 음성대조구인 MeOH, 양성대조구인 질소계 발암물질인 2-nitrofluorene(2-NF)을 메탄올에 녹여 시료대신 배지에 첨가하여 실험한 결과 Fig. 5와 Fig. 6과 같이 24시간 배양 후 생성된 colony를 측정된 결과 양성대조구인 2-nitrofluorene은 변이를 일으켜 TA 98은 330, TA 100은 340 CFU/mL 균수가 측정되었으며, 키토산 및 키토산 유도체 MEC를 측정된 결과, TA 98, TA 100 19-35 CFU/mL의 균수를 측정하였다. 이는 음성대조구(TA 98 15, TA 100 25 CFU/mL)와 비교하여 돌연변이 음성대임을 확인할 수 있었다. 따라서 본 논문에서 제조한 MEC와 키토산은 돌연변이 음성임을 확인하였다.

*S. typhimurium* TA 98은 히스티딘 탈수소효소(histidine dehydrogenase)를 암호화하는 his D gene에서 돌연변이를 일으킨 것으로 프레임시프트 돌연변이(frameshift mutation)가 일어난 부근에 반복되는 8개의 -GC- 염기들을 가진다. 프레임시프트 돌연변이생성물(frameshift mutagene)들은 핫스팟 (hot spot)이나 반복되는 서열에서 일어나는 염기대합 (base-pairing)을 안정화하므로 이들 돌연변이들에 의한 프레임시프트 돌연변이를 원래의 히스티딘 리딩프레임(histidine reading frame)으로 복귀시킬 수 있다.

따라서 *S. typhimurium* TA 98은 프레임시프트 돌연변이 생성물들을 검출하기 위해 사용된다. *S. typhimurium* TA



**Fig. 5.** Result of Ames test for chitosan and MEC with *S. typhimurium* TA 98; Contents of methyleugenol in chitosan : (MEC-a: 0.8 mL, MEC-b: 1.0 mL, MEC-c: 1.3 mL), Cs (chitosan)

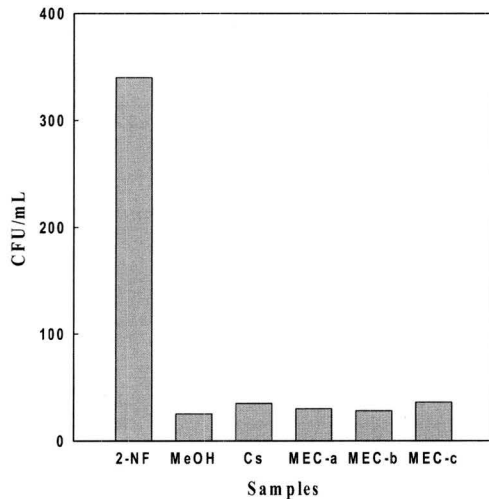


Fig. 6. Result of Ames test for chitosan and MEC with *S. typhimurium* TA 100; Contents of methyleugenol in chitosan : (MEC-a: 0.8 mL, MEC-b: 1.0 mL, MEC-c: 1.3 mL), Cs (chitosan)

100은 TA 98과 달리 염기쌍(base-pair)의 치환을 일으키는 돌연변이 물질을 검출하기 위해 사용하였다(Kim et. al., 2003; Kim et al., 2002).

## 요 약

낮은 수용성의 키토산을 개선시키고자 methyleugenol 시약을 키토산과 그래프트시켜 키토산 유도체인 methyleugenol-g-chitosan (MEC)을 제조하였다. 또한 얻어진 MEC의 성질을 확인하고자, 구조분석, 세포안정성, 그리고 돌연변이원성등을 살펴 다음과 같은 결과를 얻었다. 적외선분광법을 이용한 구조분석 결과, methyleugenol이 그래프트된 키토산 공중합체인 MEC 경우, methyleugenol의 비닐기가 키토산에 그래프트되어 있음을 확인하였다. MEC의 세포독성을 살펴보기 위하여 0.1 - 0.01% 농도를 갖는 MEC 시료를 혈액투석여과 (HDF)에 각각 처리하여 세포성장을 확인한 결과, MEC를 투입한 전체 농도범위에서 세포독성을 나타내지 않았다. 키토산 유도체인 MEC를 Ames 시험법에 의하여 돌연변이원성시험 결과 음성으로 확인되었으며, 또한 ICP 분석법에 의해서도 유해성 금속이 전혀 검출되지 않음을 확인하였다.

## 참고문헌

Suzuki K, Tokoro A, Okawa Y, Suzuki S and Suzuki M. 1986. Effect of N-acetylchito-oligosaccharides on activation of phago-

cytes. *Microbial Immunol.* **30**: 777-787

Kim JJ, Park GD, Hwang YJ, Ryoo HJ, Park SS, Jung BK and Park DK. 2002. Studies on the Stability of Emulsification for Carboxymethylchitosan. *J. Chitin and Chitosan* **7(2)**: 118-124

Myoung SM, Chio MH and Park YH. (2002). Binding of Molecular Weight Chitosan on the bacterial Cells. *J. Chitin and Chitosan* **7(1)**: 18-22

Tokoro A, Kobayashi M, Tatewaki N, Suzuki K, Okawa Y, Mikami T, Suzuki S and Suzuki M. 1989 Protective effect of N-acetyl chitohexanose on *Listeria monocytogenes* infection in mice, *Microbiol Immunol.* **33**: 357-367

Suzuki K, Okawa Y, Hashimoto K, Suzuki S and Suzuki M. 1984. Protecting effect of chitin and chitosan on experimentally induced murine candidiasis, *Microbial Immunol.* **28**: 903-912

Lim DK, Chio U and Shin DW. 1996. Antioxidative activity of Some Solvent Extract from *Caesalpinia sappan* L. *Korea J. Food Sci. Technology.* **28**: 77-82

Jung BO, Kim CH, Choi HK, Lee YM and Kim JJ. 1999. Preparation of amphiphilic and their antimicrobial activities. *J. Polym. Sci.* **72**: 1713-1719

Cho SK, Jung BO, Kim JJ, Chio KS and Lee YM. 1999. Effect of waste-water treatment of partially deacetylated chitosan. *J. Korean Ind. Eng. Chem.* **72**: 1713-1719

Wang W, Bo S and Qin W. 1991. Determination of the Mark Houwink equation for chitosans with degrees of deacetylation, *Int. J. Biol. Macro.* **13**: 899-903

Prashanth KVH and Tharanathan RN. 2003. Studies on graft copolymerization of chitosan with synthetic monomers. *Carbohydrate Polymer.* **54**: 343-351

Kim JJ, Ryoo HJ, Jung BO and Park DK. 2003. antimicrobial activity of safrolchitosan and eugenolchitosan. **8(1)**: 45-51

Chen XG and Park HJ. 2003. O/W emulsification for the self-aggregation and nanoparticle formation of linoleic acid-modified chitosan in the aqueous system. *Carbohydrate Polymers.* **53**: 355-359

Zhang C, Ping Q, Zhang H and Shen J. 2003. Synthesis and characterization of water-soluble O-succinyl-chitosan, *Eur. Polymer J.*, **39**: 1629-1634

Maron DM and Ames BN. 1983. Revised methods for the salmonella mutagenicity test. *Mutant. Res.* **113**, 173-215

Jung BO, Kim JJ, Ryoo HJ, Park DK, Ma JS Park SS and Chung SJ. 2007. Cell Stability and Free Radical Removal Activity of Allylphenol-g-chitosan. *J. Chitin Chitosan* **12(3)**: 133-137

Kim JJ, Ryoo HJ and Park DK. 2003. Antimicrobial Activity of Safrolchitosan and Eugenolchitosan. *J. Chitin and Chitosan* **8**: 45-51

Kim JJ, Jung BO, Chang PS and Park DK. 2002. Antimicrobial Activities of Safrolchitosan and Eugenolchitosan. *Food Sci. Ind.* **35**: 41-47

(접수 2008년 2월 13일, 채택 2008년 4월 21일)