

포도상구균에 대한 키토산의 항균성 측정을 위한 실험조건의 적정화

Optimization of Experimental Conditions for the Chitosan Antibacterial Activity Test against *Staphylococcus aureus*

신성여자고등학교, 제주
교사 한영숙

Shinsung Girls' Highschool, Cheju
Teacher : Youngsook Han

◀ 목 차 ▶

I. 서론
II. 실험
III. 결과 및 고찰

IV. 결론
참고문헌

<Abstract>

Experimental conditions for evaluating chitosan antibacterial activities were established. The chitosan antibacterial activities were measured against the *Staphylococcus aureus* and evaluated for their application to antibacterial textile finishing. The strain of *Staphylococcus aureus* used in this experiments was KCTC 1916. The chitosan antibacterial activities were estimated from the bacterial densities or %reduction of bacteria in chitosan solutions and bacterial culture mixtures after incubation under specific conditions.

Six parameters as follows were evaluated to optimize the experimental conditions for measuring antibacterial activities. The different combinations of mixtures according to the different ratios of chitosan solutions to the bacterial cultures showed different antibacterial activities. However, the chitosan antibacterial activities could be evaluated by comparing the data obtained from the same combinations of mixtures. The solvent influence on the chitosan solution antibacterial activities could be eliminated using control solution containing the same concentration of acetic acid. The initial pH of the chitosan -bacterial mixtures also affected the chitosan antibacterial activity; at a higher pH, higher activity in terms of %reduction of bacteria was observed. In case of the bacterial solution without either the acetic acid or chitosan, the initial pH of the solution did not significantly affect bacterial growth. The % reduction of bacteria increased when contact times

Corresponding Author: Youngsook Han, Shinsung Girls' Highschool, Cheju, Korea

Tel: 064-724-7313 Fax: 064-724-7360 E-mail: hys1957@hanmir.com

of bacteria with chitosan in the chitosan -bacterial mixture were expended upto 24 hours. However, the chitosan antibacterial activities could be successfully evaluated at contact time 0 where the chitosan-bacterial mixture was plated immediately after mixing and incubated to measure the bacterial number to 24 hours. Evaluating %reduction of bacteria in the test mixtures after incubation were not changed when the inoculated bacterial concentrations were 2.3×10^0 /ml to 2.3×10^6 /ml. The optimal range of incubation time of the petri-dish after plating the chitosan-bacterial mixture was 24 to 72 hours depending on the antibacterial activities of the test solutions.

주제어(Key Words): 키토산(chitosan), 항균성 측정(antibacterial activity test), 최적화(optimization)

I. 서론

미생물은 섬유에 서식하면서 취화와 변색 등 섬유의 물리화학적 성질을 변화시키고 질병과 악취의 원인이 된다(皆川 基 외, 1972). 생활수준의 향상과 더불어 소비자들의 위생관념이 고조됨에 따라 최근 이를 방지하기 위해 섬유의 항균가공에 대한 연구가 증가하고 있다(Suzuki, 1993). 섬유 가공용 항균제의 개발에 대해서도 그동안 많은 연구가 이루어져 항생물질, 무기 및 유기 금속염 등이 개발되었으나(Vigo, 1983) 섬유가공에 이용할 경우 이러한 항균제들의 대부분은 인체에 직접 악영향을 주거나 환경오염의 원인이 되어 실용화하는 데에는 한계가 있었다(Tokura, 1995). 키토산은 셀룰로오스와 유사한 화학구조를 가진 일종의 다당류로서 키틴 즉 β -(1 \rightarrow 4)2-acetamido-2-deoxy-D-glucose의 C₂에 위치한 아세트아미드가 50% 이상 N-탈아세틸화된 물질을 말한다(Muzzarelli, 1985). 기존에 검토된 다른 항균제와는 달리 키토산은 세균, 진균류 생육을 억제하는 광범위한 항미생물활성을 가지고 있을 뿐 만 아니라(Stanford, 1988), 인체에 대한 독성이 없고 다른 물질에 비해 섬유의 물성을 손상시키지 않으며 환경오염문제를 야기시키지 않는 원료가 풍부한 항균가공제로서의 많은 장점을 지녀 우수한 항균가공제로 평가되고 있다. 따라서 식품, 의료, 농업, 섬유 등 여러 분야에서 다양한 방식과 형태로 활용되고 있으며(小林 丘, 1991; Brine 외 1974; Seo, 외 1984) 특히 키토산은 키틴에 비해 비결정 영역이 많아 약

산에 용해되는 특성 때문에 섬유에 응용이 비교적 용이하여 방사 원액에 첨가하거나 가공단계에서 이용되고 있다(김종준 외, 1995). 아울러 키토산의 항균가공제로서의 활용을 증진시키려면 항균성에 대한 정확한 평가가 수반되어야 하며 이를 위한 항균성의 측정은 항균제의 종류와 상태, 대상 미생물의 종류 등에 따라 적절히 선택되어야 한다. 더욱이 미생물의 성장 증식은 영양, 온도, 습도(수분, 건조상태), 산소, pH, 삼투압, 광선(방사선), 화학약품(혹은 항미생물제), 영양원 등 여러 가지 요인이 영향을 받기 때문에 이러한 요인들은 항균 활성 측정에 영향을 줄 수 있다. 따라서 어떤 물질의 항균활성을 정확하게 평가하기 위해서는 항균성 측정에 영향을 줄 가능성이 있는 요인들이 먼저 검토되어야 한다.

본 연구는 직물의 항균가공에 응용되고 있는 키토산 용액의 항균 활성 측정을 위한 선행연구로서 인체의 피부나 직물에 흔히 서식하는 화농균의 일종인 포도상구균(*Staphylococcus aureus*)에 대한 키토산의 항균성 시험 조건을 확립하고자 실시하였다. 키토산용액과 배양균액을 혼합하여 일정시간 접촉시킨 다음 혼합액의 균수를 측정하여 균감소율을 측정하고 항균활성을 평가하였다. 항균성을 측정하는 과정에서 다음 6가지 조건 즉 키토산용액과 시험균액의 혼합비율, 키토산 용매, 키토산-균 혼합액의 pH, 혼합액에서 키토산과 시험균의 접촉시간, 혼합액의 초기 균농도, 평판 배양시간 등이 균의 생육에 미치는 영향 등을 조사하여 적절한 측정조건을 모색하였다.

<Table 1> Physicochemical properties of chitosan samples

Chitosan types	Solubility	Viscosity(cps)	Molecular weight(dalton)	Degree of deacetylation(%)
#1	Water-insoluble	4	-	86
#2	Water-soluble	-	3,000	-

II. 실험

1. 시료 및 시약

(1) 키토산

키토산 시료는 게 껍질을 NaOH 및 HCl로 처리하여 calcium carbonate와 protein을 제거한 다음 분리된 키토산을 NaOH 수용액으로 탈아세틸화하여 정제하여 사용하였다. $\text{NaBO}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 로 저분자화된 키토산을 CH_3COOH , H_2O_2 , H_2SO_4 의 혼합용액으로 용해시키고 NaOH 수용액으로 투석 동결 건조시켜 수용성키토산을 제조하였고(최정임 외, 2003) 특성은 <Table 1>과 같다.

(2) 균주

항균성 시험에 사용한 세균은 포도상구균(*Staphylococcus aureus*)으로 한국 유전공학 연구소 보유 균주를 분양받아 사용했다 <Table 2>. 균의 단기 보존은 온도 5°C의 냉장고에서, 장기 보관은 -20~-60°C를 유지하면서 사용하였다.

(3) 시약 및 기구

배지는 glystate peptone(BBL®), beef extract powder(BBL®), agar(Junsei Chemical Co., LTD)를 사용했고 중화용액 및 용매는 NaCl(Junsei Chemical Co., LTD 시약 1급)과 acetic acid(Junsei Chemical Co., LTD 시약 1급)를 사용했다. 세균배양용향온기(JHONSAM Corp.JS/IN/180), 진탕배양기(JHONSAM Corp. JS- SKI -1000), Clean Bench(Vision Scientific Co., LTD, VS-1400LS 모델), 고압 멸균기(Wisconsin Aluminum Foundry Co., INC, Electric Steroclave 25X 모델), 균주보존용 냉동고(Forma Scientific Bio-Freezer®)등을 사용했으며 균 농도 측정은 UV-Visible Spectrophotometer(Kotron

<Table 2> Bacterial strain

Bacterial species	Strain
<i>Staphylococcus aureus</i>	KCTC 1916

Unicon 860®)를 이용하였다.

2. 키토산의 분자량 및 탈아세틸화도 측정

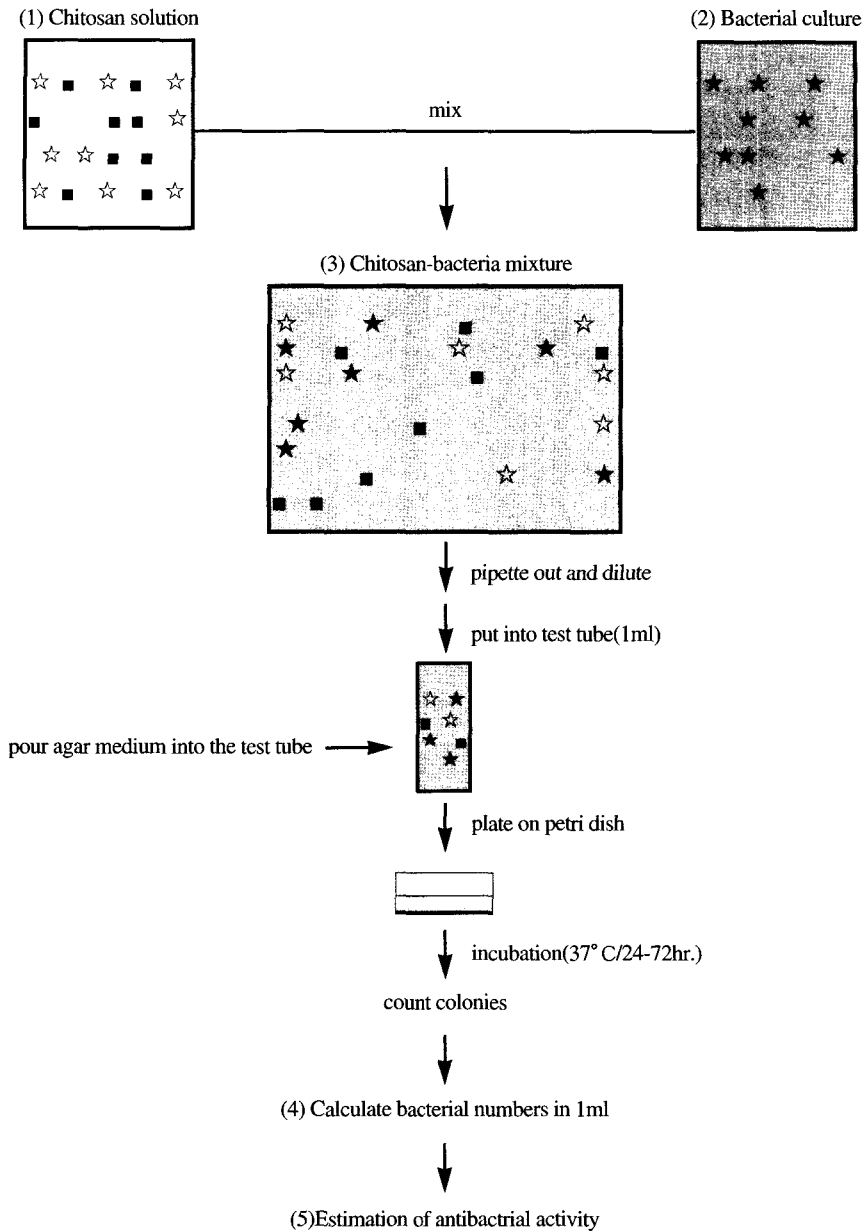
본 실험에서는 키토산의 점도는 키토산을 1% 아세트산 수용액에 용해하여 회전식 점도 측정기(HAAKE RV20 system)로 30°C에서 전단 속도 100D(1/s)를 유지하면서 측정하여 상대적인 분자량으로 간주하였다. 탈아세틸화도는 키토산을 염산 수용액에 녹여 메탄올과 탈아민수로 반복 세척한 후 페놀프탈레인 지시약으로 NaOH 수용액으로 중화적정하여 계산하였다.(김중준 외, 1995)

3. 키토산 용액의 항균성 측정

키토산의 항균성은 대상 물질과 미생물을 일정 조건에서 접촉시키면서 배양한 후 배양액 중 균수의 증감 혹은 미생물의 성장 상태를 조사하여 평가하는 균수 측정법(한국미생물학회 編, 1987)을 기초로 하여 평가하였다. 본 실험에서는 <Fig. 1>에 도식화된 것처럼 (1)키토산용액제조 (2)시험균액제조 (3)키토산과 시험균의 혼합 접촉 (4)균수측정 (5)항균성 평가의 5 단계를 거쳐 실시하였다.

(1) 키토산용액 제조

섭유가공용 항균제는 일반적으로 용액 상태에서 처리하는 것이 편리할 뿐만 아니라 균과 섭유의 접촉을 균일하게 할 수 있는 장점이 있기 때문에 본 실험에서는 키토산용액(chitosan solution)으로 만들어



<Fig. 1> Procedure for antibacterial activity test of chitosan (□ water ■ broth medium ☆chitosan ★bacteria ■ acetic acid)

항균성을 측정하였다. 키토산은 pH 6.5 이상에서는 불용이며 약산에 용해되는 것으로 알려져 있어 초산을 용매로 사용했고 수용성키토산은 물을 용매로

사용했다. 고압 살균한 키토산에 용매를 첨가고반시켜 고농도의 키토산 용액을 만들고 저농도는 동일 농도의 용매를 첨가하여 희석하였으며 키토산용액

<Table 3> Characteristics of chitosan solution

Type of chitosan	Solvent	Chitosan concentration (% w/w)	pH
#1	0.5% Acetic acid	2.0	4.9
		1.0	4.4
		0.5	3.9
		0.1	3.5
		0	3.0
#2	Deionized water	1.0	5.0
		0.5	5.9
		0	5.9

의 특성은 <Table 3>과 같다.

(2) 시험균액 준비

분양 받은 균주는 -20°C 이하에서 냉동 보존하였고 육즙고체배지에 도말하여 보존하며 1개월에 1회 계대 배양하여 사용하였다. 보존 균주는 육즙에 이식하고 항온 진탕 배양기에서 온도 37°C에서 12-24 시간 배양한 후 시험균액(bacterial culture media)으로 사용하였으며, 실험 조건에 따라 육안 판별에 적절한 농도로 희석하였고 균수는 분광광도계로 측정하였다. 육즙액체배지(Broth Medium)와 육즙고체배지(Agar Medium)를 KS K 0693에 준하여 <Table 4>와 같이 제조하였다.

(3) 키토산과 시험균 혼합액 제조

키토산용액을 피펫으로 취하여 멸균 건조 튜브에 주입하고 배양 희석한 시험균액을 첨가한 뒤 키토산과 균이 고르게 접촉되도록 교반하여 키토산-균 혼합액(chitosan-bacteria mixture)을 제조하였다. 접촉

<Table 4> Composition of bacterial culture media

(A) Broth medium : peptone (10g), beef extract(5g), NaCl(5g), deionized water(1,000 ml)
(B) Agar medium bottom agar : broth medium + 1.5% agar top agar : broth medium + 0.7~0.8% agar
(C) pH : 약 7.0~7.2

후 일정량의 키토산-균 혼합액과 육즙천배지(top agar)를 혼합한 뒤 미리 준비해 둔 평판배양기에 부어 평판을 작성하였다. 희석이 필요한 경우는 0.85% 식염수를 이용하였고 희석 비율을 기록하여 실제 1ml당 균수의 환산에 이용하였다. 키토산과 균액이 접촉되면 균은 키토산에 의해 성장에 영향을 받고 그 영향 정도를 평가하여 항균성을 측정할 수 있다. 본 실험에서는 혼합액 내에서 키토산과 균의 접촉 조건이 항균성에 미치는 영향에 미치는 파악하고자 했으므로 혼합비, 용매, pH, 균접촉시간, 균농도, 평판 배양시간 등 6 조건을 변화시켰다. 즉 키토산용액 : 시험균액의 부피조성비를 1 : 9, 5 : 5, 9 : 1의 3가지 유형으로 조정하였다. 또한 키토산 용매는 초산과 물을 이용하고 초산용매의 경우 0.05%와 0.1% 두가지로 농도로 변화를 주었고, 혼합액의 pH는 각각 4, 5, 6 세 조건에서 실험을 실시하였다. 혼합액의 키토산-균 접촉시간은 접촉 직 후(이하 접촉시간 0으로 표기), 4, 24, 48시간까지 증가시켰고 접촉시 균 농도를 배양액의 10⁰에서부터 10⁸의 5단계로 희석하였다. 전 과정에 나타난 키토산 농도(%), 초산 농도(%), 균의 농도는 혼합 용액 중의 농도로 환산 표시했으며 pH와 조성비도 키토산-균 혼합액 상태에서 측정되었다. 대조구로서 육즙액체배지와 용매로 사용된 초산과 탈이온수를 준비하였다.

(4) 균수 측정 및 항균성 평가

감균률 계산 및 항균성 평가는 일반 미생물 실험(한국미생물학회, 1987)에서와 같이 박테리아수의 증감률을 이용하였다. 배양이 끝난 키토산-균 혼합액을 도말하여 작성한 평판을 항온 배양기에서 온도 37°C에서 24시간 이상 배양한 뒤 생성된 콜로니를 계수하고 희석 배율을 곱하여 시료 1ml 당 살아있는 균수를 계산하였다. 계산된 균수를 대조구의 균수와 직접 비교하거나 감균률을 다음의 식에 따라 계산하여 항균성을 평가하였다. 감균률 계산 방식은 다음과 같고 이 때의 대조구는 용매인 초산 혹은 탈이온수로 하였다.

<Table 5> Types of chitosan solution- bacterial culture mixtures (Chitosan #1 was dissolved in 0.5% acetic acid).

Component	Type of mixture(ml)		
	A	B	C
Chitosan #1 solution	0.1	0.5	0.9
Bacterial culture	0.9	0.5	0.1

$$\text{감균률 (\% reduction of bacteria)} = \frac{A-B}{A} \times 100$$

- A : 대조구(초산용액)의 균수
- B : 처리구(키토산용액)의 균수

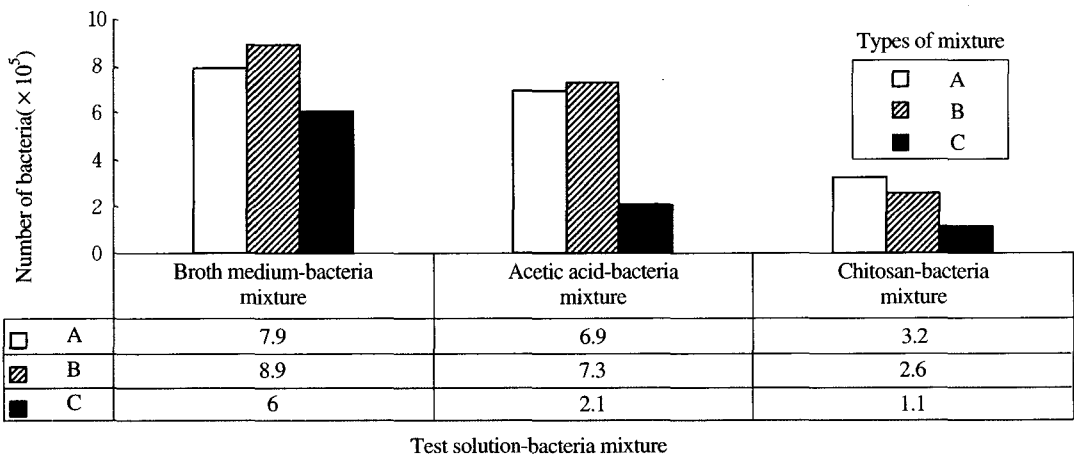
III. 실험결과 및 고찰

1. 키토산용액과 시험균액의 혼합비율

본 실험에서 키토산의 항균활성은 키토산용액에 시험균 배양액을 첨가하여 키토산-균 혼합액을 만들고 일정 시간 배양한 후 혼합액 중의 균의 밀도를 측정하여 평가하였다. 키토산은 용매인 초산에 대한 용해도가 낮고 탈아세틸화도, 분자량 등 키토산의 유형에 따라 용해도가 다르므로 키토산 stock solution의 농도가 다양하게 제조된다. 따라서 일정 농도의 키토산-균 혼합액을 제조하기 위해 첨가되

는 키토산용액과 시험균배양액의 부피는 달라질 수 있고 키토산용액과 시험균배양액의 혼합비율이 달라지면 초산 및 영양분 농도를 비롯한 혼합액의 조성이 달라져 박테리아의 생육에 영향을 줄 수 있으며 항균성 평가에 변수가 된다. 그러므로 키토산-균 혼합액의 구성비율이 균의 생육에 미치는 영향을 조사하여 키토산의 항균성을 평가하는데 영향을 주지 않는 조건을 검토하였다.

본 실험에서 키토산 #1(탈아세틸화도 86%, 점도 4cps)을 0.5% 초산에 녹이고 혼합액의 pH는 4.0, 최종 키토산농도는 0.1%로 모두 동일하게 하였으며 균농도도 동일하게 조정하였다. 키토산-균 혼합액은 <Table 5>의 혼합비가 다른 A, B, C의 3가지 유형이었다. 혼합 후 각 유형의 균농도가 동일하도록 시험균액을 조정한 뒤 <Table 5>에 준하여 키토산용액, 육즙액체배지 그리고 초산용액과 각각 혼합한 후 접촉시간 0에서 평판을 작성하였으며 이로부터 배



<Fig. 2> Effects of the composition of chitosan-bacterial solution mixture on the growth of *Staphylococcus aureus* (Experimental conditions were as follows: Initial bacterial density 1x10⁶, Contact time 0, Incubation 37°C/24 hrs. Conc. of acetic acid 0.5%. Final conc. of chitosan#1 0.1% , pH 4)

양된 콜로니수를 측정하여 계산하고 유형별 ml당 균수를 <Fig. 2>에 나타냈다.

Type A, B, C 즉 키토산-균 혼합액에서 총 부피 중 키토산용액의 비율이 10%, 50%, 90%로 많아질수록 배양된 균수는 3.2×10^5 , 2.6×10^5 , 1.1×10^5 로 감소하여 키토산용액의 첨가량이 많아지면 균의 생육이 저해됨을 알 수 있었다. 즉 키토산-균 혼합액 중 키토산의 농도가 동일하더라도 초기 첨가된 키토산용액의 부피에 따라 키토산의 항균성 측정치가 달라지는 것으로 나타났다. 이러한 결과로 보면 키토산-균 혼합액에 첨가하는 키토산의 부피가 다를 때 균수를 기준으로 항균성을 직접 비교하여 평가하는 경우 부정확한 항균성을 나타낼 수 있다고 생각되었다.

키토산용액 대신 육즙액체배지를 배양균액에 혼합한 육즙-균 혼합액의 경우에는 7.9×10^5 , 8.9×10^5 , 6.0×10^5 로 키토산-균 혼합액의 경우와 달리 Type A, B, C 간 균수의 차이가 상대적으로 적었다. 육즙-균 혼합액의 조성은 육즙액체배지와 시험균 만으로 이루어졌고 균의 농도는 동일하게 조정된 상태였으므로 A, B, C 간의 육즙의 조성의 차이를 초래하지 않았기 때문으로 고찰된다.

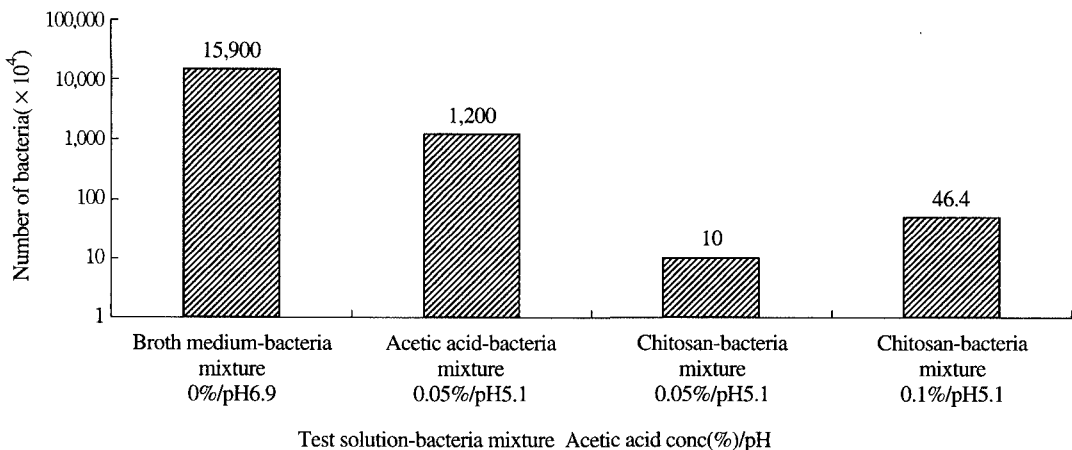
한편 키토산 용액 대신 초산용액을 사용한 초산-

균 혼합액에서는 Type A, B, C의 균수는 각각 6.9×10^5 , 7.3×10^5 , 2.1×10^5 로 용매인 초산 첨가량이 많을수록 적었다. 이 경우 혼합액의 pH와 최종 초산농도 및 균농도는 동일하게 조정된 것이어서 Type A, B, C 간의 차이는 결국 혼합액의 육즙배지 함량의 차이로서 혼합액 중의 육즙배지의 함량이 증가함에 따라 균의 생육 정도가 달라진 것으로 나타났다.

비록 각 혼합액에서 조성이 다른 Type A, B, C 간에 균수가 달랐지만 동일한 Type들끼리 비교할 때 키토산-균 혼합액에서의 배양된 균수는 육즙-균 혼합액, 초산-균 혼합액에 비해서도 뚜렷하게 적어 키토산의 항균활성이 나타났다.

2. 키토산 용매

<Fig. 2>에서 Type A, B, C 간에 균수차이가 나타나는 것은 혼합액의 구성의 차이에 기인하는 것으로 키토산, 배지 외에 용매가 영향을 줄 수 있다는 가능성을 시사한다. 혼합액 중 용매인 초산이 항균성 측정에 미치는 영향을 검토하기 위하여 초산 농도를 달리하여 키토산용액을 제조하고 균의 생육을 조사하였다. <Fig. 3>는 키토산-균 혼합액 상태에서 초산의 농도가 각각 0.05%와 0.1%가 되도록 키토산



<Fig. 3> Effects of acetic acid concentrations of chitosan-bacterial mixtures on the growth of *Staphylococcus aureus* (Experimental conditions were as follows : Initial bacterial density 2×10^8 , Chitosan -bacterial mixture type A, Contact time 0, Incubation 37° C/24 hours. Conc. of acetic acid 0.05% or 0.1% . Final conc. of chitosan #1 0.1%)

용액을 조정한 뒤 시험균액과 접촉 배양시킨 후 혼합액의 균수를 조사한 결과이다.

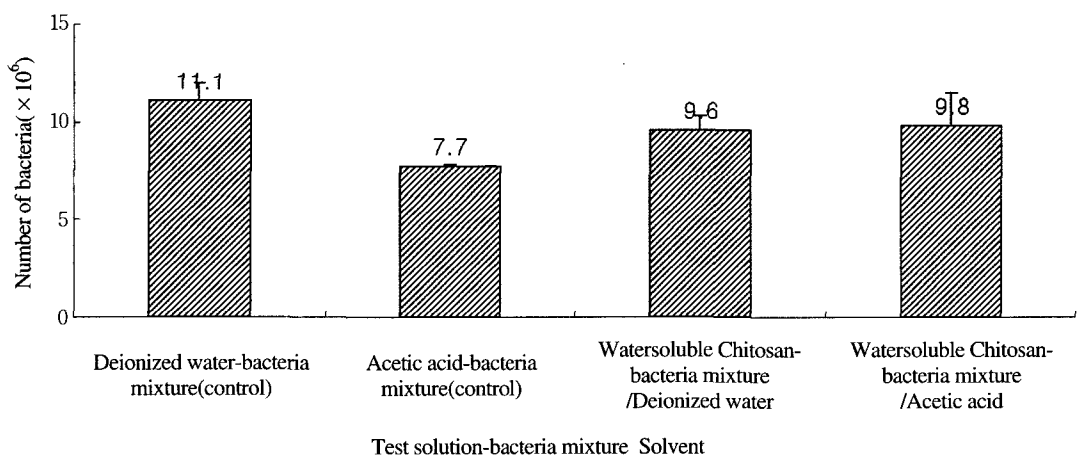
〈Fig. 3〉에서 육즙-균 혼합액의 균수는 1.6×10^8 였던 반면 초산-균 혼합액의 경우 초산농도 0.05%에서 균수는 1.2×10^7 으로 1/10 이하로 감소하여 초산 0.05% 수준에서도 균의 생육이 저해되는 것으로 나타났다. 키토산-균 혼합액의 경우 초산농도를 0.05%로 했을 때 균수는 1.0×10^5 으로 육즙-균 혼합액과 비교하면 1/1500이며 초산-균 혼합액에 비해도 1/100이상 감소하였다. 초산에 의한 균생육 억제 효과를 감안하더라도 키토산에 의한 억제 작용이 현저하다는 것을 알 수 있었다.

일반적으로 세균의 생육은 중성일 때 최적이므로 (정동효, 1986) 초산의 농도가 증가하면 pH가 감소하여 균생육 억제 효과를 유도할 수 있을 것으로 예상되었다. 그러나 본 실험에서 키토산-균 혼합액의 초산농도를 0.1%로 조정된 상태에서 배양된 균수는 0.05% 보다 증가하였다. 키토산-균 혼합액에 사용된 초산농도가 증가했음에도 균의 배양이 오히려 증가한 정확한 이유를 본 실험 만으로 검증할 수 없었으나, 적어도 혼합액의 초산농도 0.05% - 0.1% 범위 내에서 키토산은 초산농도와 관계없이

항균활성을 나타낼 수 있으며 키토산의 항균성이 초산에 의해서 결정되지는 않는다는 점은 확인 할 수 있었다.

수용성 키토산은 산과 물 모두에 가용성이므로 두 종류의 용매에 각각 용해시킨 뒤 동일 조건에서 항균성 측정 실험을 하여 용매 종류가 미치는 영향을 파악하고자 하였다. 〈Fig. 4〉는 수용성 키토산 #2를 초산수용액과 탈이온수에 각각 용해하여 동일한 조건에서 배양된 균수를 나타낸 결과이다. 용매가 물과 초산으로 달라져도 키토산-균 혼합액의 균수의 차이가 적었으며 초산-균 혼합액에서 배양된 균수보다 증가하였다. 이 결과를 기초로 용매 종류가 키토산의 항균 활성에 영향을 주지 않는다고 단정할 수는 없었으며 오히려 수용성 키토산이 항균 활성이 나타내지 않아 키토산의 항균 활성에 미치는 초산의 영향을 평가할 수 없는 것으로 판단되었다.

〈Fig. 3〉와 〈Fig. 4〉의 결과를 종합적으로 고찰하면 용매인 초산에 의한 균의 생육 억제 작용을 배제할 수 없으며 항균성을 비교 평가할 때는 키토산-균 혼합액 중의 초산 농도를 고려하여야 함을 알 수 있었다. 또한 〈Fig. 2〉에서 키토산-균 혼합액



〈Fig. 4〉 Effects of solvents used for dissolving chitosan on the growth of *Staphylococcus aureus* (Experimental conditions were as follows: Initial bacterial density 1.0×10^7 , Test solution-bacteria mixture type A. Contact time 0, Incubation $37^\circ\text{C}/24$ hrs. Conc. of acetic acid 0.05%. Conc of chitosan #2 0.1%)

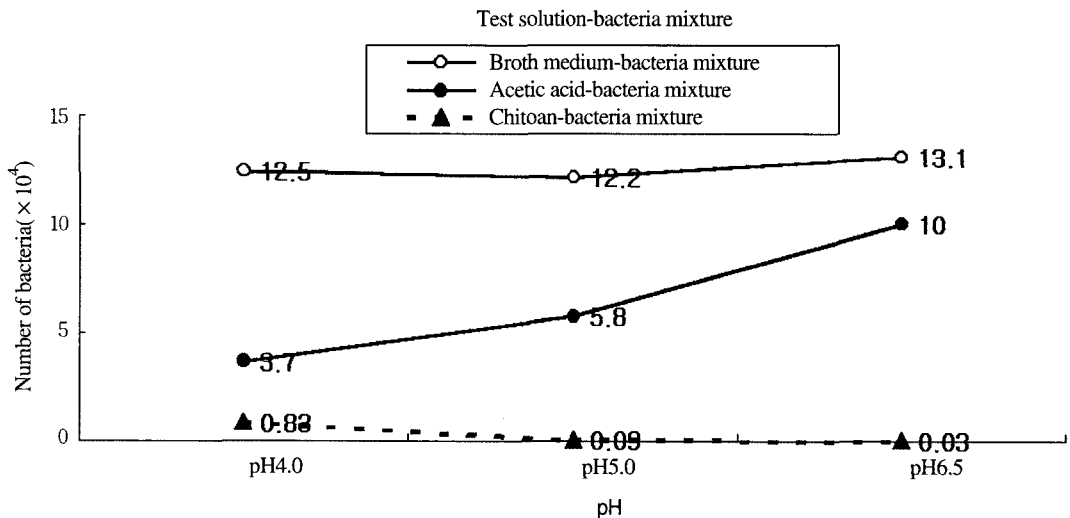
에 사용된 혼합비를 A, B, C로 달리했을 때 배양된 균수는 3.2×10^5 , 2.6×10^5 , 1.1×10^5 의 차이를 나타냈으나 초산용매를 대조구로 하여 계산된 세 유형의 감균율은 53.6, 64.4, 47.6%로 상대적으로 유사한 값을 나타냈다. 그러므로 초산 농도를 0.05% - 0.1% 범위 내에서 감균율을 검토하면 초산의 영향을 배제할 수 있으며 키토산 만의 항균성을 평가할 수 있는 것으로 판단되었다.

3. 키토산-균 혼합액의 pH

키토산-균 혼합액의 조성비가 변화되면 육즙과 용매인 초산량이 변화되므로 pH가 변화될 수 있다. pH는 미생물의 생육에 영향(R.Y.Stanier 외 2인, 1976)을 주는 것으로 알려져 있어 혼합액의 초기 pH가 배양 후 혼합액의 박테리아 생육에 미치는 영향을 조사하였다.

<Fig. 5>은 키토산용액, 육즙, 초산용액 pH를 4.0, 5.0, 6.5의 3가지로 조절한 뒤 pH 변화를 극소화시키기 위해 <Table 5>의 C type에 준하여 시험용액: 배

양균액이 9 : 1의 혼합비를 유지하도록 혼합하고 즉시 일정량을 채취 도말하여 평판을 작성한 뒤 배양된 ml당 균수를 측정된 결과이다. 육즙-균 혼합액의 경우에 pH가 달라도 균수는 거의 변화가 없었던 반면 초산-균 혼합액의 경우 pH가 4.0, 5.0, 6.5로 증가할 때 균수는 3.7×10^4 , 5.8×10^4 , 10.0×10^4 으로 증가하였다. 그런데 키토산-균 혼합액에서는 pH가 4.0, 5.0, 6.5로 증가할 때에도 초산-균 혼합액에서와는 반대로 균수가 0.83×10^4 , 0.09×10^4 , 0.03×10^4 으로 pH의 증가에 따라 균수가 감소하였다. 키토산-균 혼합액의 배양된 균수를 초산-균 혼합액의 배양 균수에 비교하면 pH 4.0인 경우 1/45, pH 5.0인 경우 약 1/64배, pH 6.5인 경우 약 1/333로 감소하여 pH가 높을수록 키토산의 균생육 억제 효과는 초산에 비해 뚜렷하였다. 이처럼 키토산-균 혼합액에서 pH 증가에 따른 균수 감소 현상 즉 키토산의 항균성 증가는 양전하를 가진 키토산의 $-NH_2$ 의 비율이 클수록 항균성이 증가한다는 다른 보고(H. Seo, 1993)와 상반되는 것처럼 보인다. 왜냐하면 용액의 pH가 높을수록 양전하를 띠는 $-NH_2$ 의 비율이 감소하여



<Fig. 5> Effects of the initial pH's of chitosan-bacterial mixtures on the growth of *Staphylococcus aureus* (Experimental conditions were as follows : Initial bacterial density 1.0×10^5 , Chitosan-bacterial mixture type C, Contact time 0, Incubation 37°C/24 hours. Conc. of acetic acid was 0.5%. Conc. of chitosan #1 0.1%)

pH 증가에 따라 키토산의 항균성도 저하될 것으로 예상되었기 때문이다. 그러나 본 실험에서 검토한 pH의 범위는 4.0 - 6.5로서 -NH_2 의 $\text{pKa}(>9)$ 보다 매우 낮다. 이 범위의 어떤 pH에서도 -NH_2 은 이미 -NH_3^+ 로 양전하를 띠게 되어 pH가 다르더라도 양전하를 띠는 키토산의 -NH_2 비율이 변하지 않는다는 점을 고려하면 본 실험의 결과가 기존의 보고들과 배치되는 것으로 생각되지는 않았다. 그러므로 pH가 낮을 때 키토산의 항균효과가 더 낮게 나타난 것은 오히려 낮은 pH에서 흔히 나타나는 미생물의 방어기구와 관련이 있을 가능성이 있으나, 이에 관하여는 앞으로 더 많은 연구가 있어야 할 것으로 생각된다.

4. 키토산-균 접촉시간

어떤 물질의 항균성은 그 물질과 시험 미생물을 접촉시킨 후 균수의 변화를 측정하여 평가할 수 있으며 현재 직물의 항균성도 역시 시료에 균액을 접촉시킨 후 일정시간 경과한 후의 균수의 변화를 통해 측정하고 있다(한국공업표준협회, 1991: A.A.T.C.C, 1988: 本衛生加工協會, 1992: 일본공업기술원, 1990). 균의 생육은 균과 항균제의 접촉 시간에 따라 달라질 수 있을 것으로 가정하고 접촉 시간이 균의 생육에 미치는 영향을 조사하였다. 본 논문에서 접촉 시간은 키토산 용액과 시험균 용액을 혼합시킨 그 순간부터 평판을 작성하기 위해 키토산-균 혼합 용액을 채취한 순간까지의 기간을 의미한다. 접촉 시간 0에서부터 일정 접촉 시간별로 시료

를 중간 채취했으며 접촉하는 동안 37°C 에서 shaking 상태를 유지하였고 접촉 시간을 48시간까지 연장시키며 실험을 실시한 결과는 <Table 6>과 같다.

균액에 육즙 만을 첨가한 경우 접촉시간 0에서도 배양 균수는 이미 계수가 곤란할 정도로 많았다. 초산용액 만을 첨가한 경우는 접촉시간 4시간까지 감소했다가 다시 증가하였다. 키토산용액에서는 배양 시간(접촉시간)이 0일 때 계수가 불가능할 정도로 많았던 것이 4시간일 때 1.0×10^5 으로 감소되었고 24시간일 때 0으로 되어 24시간까지는 키토산과 균의 접촉 시간이 길수록 균의 생육 억제 효과가 컸다. 그러나 접촉 시간을 48시간으로 연장했을 때는 오히려 균수가 접촉 시간 0일 때와 같은 정도로 많아졌다. 균과의 접촉시간에 의해 항균성이 영향을 받고 있었으며 본 적정화 실험 조건에서는 항균활성은 24시간 이내에서 작용하였고 균의 접촉 시간이 4시간일 때 평가가 적당한 것으로 판단되었다. 또한 키토산 용액에서 접촉시간 0~24시간 범위에서 균수가 감소하다가 48시간 이후부터는 다시 증가한 것으로 미루어 볼 때 키토산은 살균 작용에 의해 항균성을 나타내기 보다 정균 작용에 의해 항균성을 나타내는 것으로 생각되었다. 이처럼 키토산 시료와 균의 혼합액에서 균과 키토산이 접촉되는 시간은 항균성 평가에 변수로 작용할 수 있으므로 키토산 시료의 항균 활성의 비교는 동일 접촉시간에서 시행되어야 함은 물론 접촉시간에 따른 경향까지 고려된다면 더욱 정확한 평가가 이루어질 수 있다고 생각된다.

<Table 6> Effects of chitosan-bacterial contact times on the growth of *Staphylococcus aureus*(Experimental conditions were as follows: Initial bacterial density 2.0×10^8 , Chitosan -bacterial mixture type A, Incubation $37^\circ\text{C}/24$ hrs. Conc. of acetic acid 0.05%. Conc. of chitosan #1: 0.1%. H means number of colonies which are too many to count)

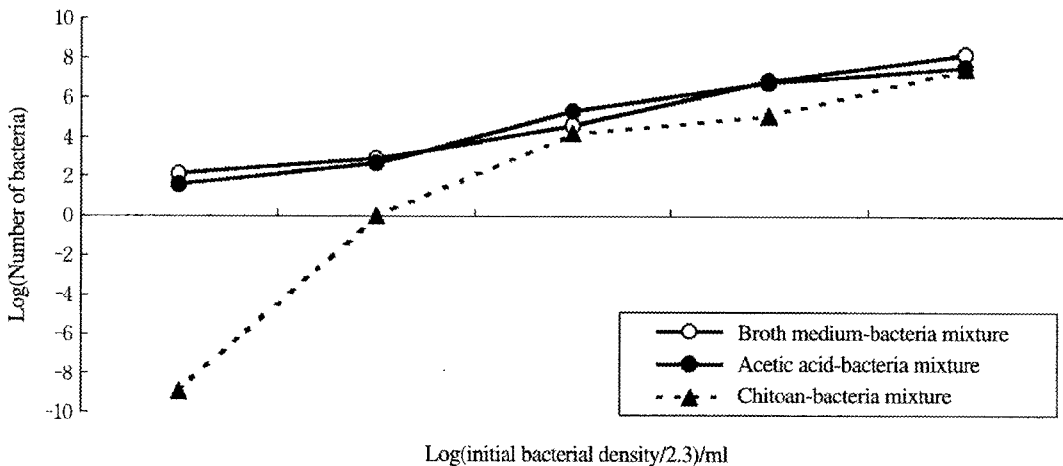
Test solution-bacteria mixture	pH	Number of bacteria ($\times 10^5$)			
		Contact time (hrs)			
		0	4	24	48
Broth medium-bacteria mixture	6.9	H	H	H	H
Acetic acid-bacteria mixture	5.1	H	120.0	6,300.0	H
Chitosan-bacteria mixture	5.1	H	1.0	0.0	H

5. 키토산-균 혼합액의 초기 균농도

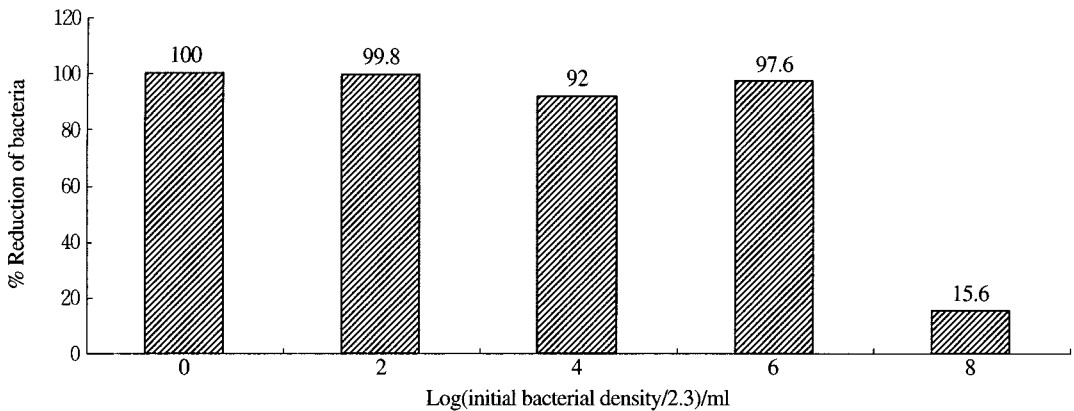
키토산 용액에 접종하는 균의 양 즉 키토산-균 혼합액의 초기 균농도는 키토산과의 접촉 가능성과 관련되어 평판 배양 후 나타나는 콜로니 수에 영향을 줄 수 있다. 키토산 용액의 항균성을 평가하는데 적당한 초기 균농도를 조사하기 위해 균농도가 2.30×10^8 /ml인 초기 배양액을 육즙으로 10^0 , 10^2 , 10^4 , 10^6 , 10^8 의 5종류로 100배 간격으로 희석하여 접촉할 시험균액의 균농도를 조절하였다. 키토산 용액과 혼합하고 배양된 콜로니를 이용하여 균수와 감균율을 계산하였고 <Fig. 6> 및 <Fig. 7>에 나타내었다.

초기 균농도의 변화에 따른 균 혼합액의 균밀도 변화의 양상은 초산 및 키토산 용액 간에 차이를 보였다. 초기 균농도가 23, 2.3×10^2 , 2.3×10^4 , 2.3×10^6 , 2.3×10^8 로 100배씩 증가됨에 따라 초산-균 혼합액의 최종 균밀도는 3.9×10 , 4.7×10^2 , 2.0×10^5 , 5.0×10^6 , 3.2×10^7 으로 약 10배씩 증가하는 경향을 보였다. 키토산-균 혼합액은 0, 1, 1.6×10^4 , 1.2×10^5 , 2.7×10^7 로 초기 균농도 2.3×10^4 까지는 균의 증가가 급격하여 육즙이나 초산용액에서 보다는 변화가 컸음을

알 수 있었다(Fig. 6). <Fig. 7>은 초산용액을 대조군으로 하여 계산한 키토산 용액의 감균율로써 ml 당 $2.3 \sim 2.3 \times 10^6$ 범위 내에서는 초기 균농도에 관계없이 92% 이상이었다. 이상의 결과는 키토산-균 혼합액의 초기균농도 $2.3 \sim 2.3 \times 10^6$ 의 넓은 범위 내에서 접종균량이 키토산의 항균 활성 평가에 영향을 주지 않는다는 것을 나타내며 다른 측면에서는 키토산이 *Staphylococcus aureus*의 광범위한 농도에서도 항균 활성을 나타내는 능력이 있음을 시사해 준다. 그런데 초기 균농도가 2.3×10^8 이 되었을 때는 감균율이 약 16%로 급격히 저하되었던 점을 고려하면 비록 $2.3 \sim 2.3 \times 10^8$ 범위내에서 초기 균농도가 키토산의 항균활성에 영향을 주지 않지만 그 이상의 초기 균농도가 되면 항균 활성을 평가하기 어려운 것으로 나타났다. 이처럼 초기 접종하는 균농도에 따라 키토산의 항균성이 높게 혹은 낮게 평가될 수 있는 있으므로 이러한 점을 고려하여 초기 균농도가 설정되어야 한다. 또한 키토산의 함량이 본 실험에서 보다 높거나 낮은 경우, 항균 활성이 다른 시료의 경우 등에 의해 항균성 평가에 영향을 주지 않는 초기 균농도 범위는 달라질 수 있다.



<Fig. 6> Effects of initial bacterial densities of chitosan-bacterial mixtures on the growth of *Staphylococcus aureus*(Experimental conditions were as follows :Chitosan-bacterial mixture type B. Contact time 0, incubation 37° C/24 hours. Conc. of acetic acid, 0.5%. Conc. of chitosan #1was 0.1%)



<Fig. 7> Effects of initial bacterial densities of chitosan-bacterial mixtures on the % reduction of *Staphylococcus aureus*. (Experimental conditions were the same as Fig. 6.)

6. 평판 배양 시간

항균성 평가를 위한 항균제-시험균액의 평판 작성 과정에서 평판의 배양 시간이 너무 짧으면 콜로니가 자라지 않아 계수가 불가능하고 반면에 배양 시간이 너무 길면 콜로니가 너무 많이 자라 계수가 불가능 하다(한국미생물학회, 1987). 섬유와 직물의 항균력 측정에 흔히 이용되는 KS K 0693 (한국공업표준협회, 1991)과 Shake Flask Method (日本衛生加工協會, 1992)에서는 평판 상의 콜로니는 온도 37°C에서 24-48시간 배양한 뒤 측정하도록 권장하고 있다. 그러나 항균제의 특성에 따라 배양시간별로 나타나는 항균 활성이 변화될 수 있어 키토산의 항균

활성에 적절한 평판 배양 시간을 확인하기 위해 각 시료의 평판 배양 시간을 24시간에서 96시간으로 연장하였을 때 관찰된 콜로니 수를 관찰하고 <Table 7>에 기록하였다.

본 실험에서는 콜로니 수를 정성적으로 평가하면 충분하기 때문에 평판 배양시 각 시료간 희석률을 달리하지 않았고 편의상 육안 측정 불가능할 정도로 colony가 많이 배양된 경우는 H로, H 보다는 수가 다소 적으나 역시 판별 불가능한 경우는 M으로 표시하였다. <Table 7>에서 평판을 24시간 배양한 결과 키토산 용액에서 뿐 만 아니라 초산 용액의 경우에도 콜로니가 관찰되지 않아 이 배양시간에서 콜로니수를 관찰하여 키토산용액의 항균 활성을 평

<Table 7> Changes in the number of colonies appearing on the agar plates during incubation after plating of chitosan-bacterial mixtures (Experimental conditions were as follows :Initial bacterial density 1.0×10^4 , Chitosan-bacterial mixture type A, Contact time 0, Incubation 37°C /24 hours. Conc. of acetic acid : 0.5%. Conc. of chitosan#1 : 0.1%, H means number of colonies which are too many to count. M means the number of colonies which are not so many as 'H', but still uncountable).

Test solution-bacteria mixture	Chitosan concentration(%)	Incubation Time (hrs.)			
		24	48	72	96
Broth meium	0	H	H	H	H
Acetic acid	0	0	M	M	H
Chitosan solution	0.1	0	M	M	H
	1.0	0	0	0	H

가하기에는 곤란하였다. 평판배양시간이 48시간일 때 초산용액의 평판에서 육안으로 계수하기 곤란할 정도로 많은 콜로니가 관찰되었는데 콜로니의 생육 상태로 판별할 때 육즙배지의 경우 보다는 훨씬 적었다. 키토산 용액의 경우는 평판배양시간 48시간에서 키토산의 농도에 따라 콜로니 수가 다르게 나타났는데 0.1%에서는 육안으로 계수하기 곤란할 정도로 많았으나 1.0% 농도에서는 여전히 콜로니가 관찰되지 않았다. 평판배양 72시간 후에는 콜로니 수가 너무 많아 육안으로 계수하기 불가능할 정도였다. 본 실험조건에서는 키토산 용액의 항균 활성 평가는 평판 배양 시간을 48시간 정도가 적절한 것으로 판단되었다. 이 조건에서 키토산 0.1%에서와 같이 항균활성이 낮은 혼합액의 경우에 콜로니 수가 많아 계수하기가 곤란할 수도 있으므로 혼합액을 적절한 배율로 희석하여 평판을 작성해야하며 만약 항균활성이 충분히 큰 경우에는 평판배양 시간을 24시간으로 단축하고, 항균활성이 낮은 경우에는 이보다 더 연장이 필요하다. 이러한 결과는 평판 배양 시간도 키토산의 항균성을 평가하는데 변수로 작용할 수 있음을 시사한다.

평판 배양 시간을 96시간으로 연장하면 72시간의 배양까지는 나타나지 않았던 고농도 키토산(1%)에서도 육즙 시료에 상당하는 대단히 많은 콜로니가 나타났다. 이것은 본 실험 조건에서는 키토산의 항균성이 살균에 의한다기 보다는 균의 생육억제하는 정균작용(하덕모, 1994)에 의한다는 사실을 뒷바침해 준다. 우리의 일상 생활에 이용되는 섬유류 중에는 장기간 사용되는 침구류와 신발류, 비교적 단기간 사용된 후 세탁해야 되는 일부 겉옷류, 1일 정도 사용 후 세탁을 실시해야 하는 속옷, 양말, 여름 의류, 스포츠 의류, 혹은 기저귀, 냅킨류 처럼 아주 짧은 기간 만 사용한 후 폐기해야 하는 일회용품 등 다양하다(남윤자, 1995). 따라서 키토산이 정균작용을 통해 항균성을 나타낸다고 해도 항균 가공제로서의 가치가 적어지는 것은 아니며 오히려 항균효과를 지속시키기 위한 노력을 통해 키토산의 항균제로서의 이용은 확대될 수 있다고 생각된다.

IV. 결 론

본 연구는 원료가 풍부하고 인체에 독성이 없으면서도 다양한 미생물에 대해 항균성을 나타내는 것으로 알려지고 있는 키토산을 식물의 항균 가공에 응용하기 위한 선행 연구로 실시하였다. 인체의 피부나 식물에 흔히 서식하는 화농균의 일종인 포도상구균(*Staphylococcus aureus*)에 대한 키토산 항균성 평가에서 적절한 시험 조건을 확립하기 위해 균의 생육에 영향을 줄것으로 여겨지는 6가지 요인을 선정하였고 이에 따른 항균성을 평가하였으며 그 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 키토산용액과 배양균의 혼합 비율에 따라 키토산에 의한 감균률이 다른 값을 나타냈지만 혼합비 1:9에서 9:1 범위 내에서 키토산의 항균 활성을 평가하는 데에는 문제가 없었다.
2. 키토산을 녹이는데 사용한 초산은 균의 생육을 억제하는 것으로 나타났다. 그러나 키토산의 항균활성을 초산 대조구에 대한 감균율에 의해 평가함으로써 초산의 영향을 배제할 수 있었다.
3. 키토산-균 혼합액의 초기 pH는 4.0에서 6.5로 높아질수록 키토산의 항균활성도 높게 나타났다.
4. 키토산-균 혼합액에서 키토산과 균의 접촉시간이 24시간까지 길어질수록 감균율도 커졌다. 그러나 접촉시간을 짧게 해도 키토산의 항균성을 평가하는 데는 문제가 없었다.
5. 키토산-균 혼합액의 초기 균농도는 2.3×10^6 /ml 이내에서는 키토산에 의한 감균율에 영향을 주지 않았다.
6. 키토산을 처리한 용액의 균수를 측정하기 위한 평판배양시간은 키토산 용액의 항균활성에 따라 차이가 있으나 24~72시간이 적당하였다.

■ 참고문헌

- 김중준, 전동원, 홍주석(1995). 섬유가공 및 관련 분야에서 키토산 응용성에 대한 제안. 한국섬유 공학회지, 32(8), 705-712.
- 남윤자(1995). 피복위생학. 서울: 수학사.

- 정동호(1986). 식품미생물학. 서울: 선진문화사.
- 최정임, 전동원(2003). Tube Dilution Technique과 Agar Plate Smear에 의한 키토 산의 MRSA 항미생물성. 한국의류산업학회지, 3(1), 71-76.
- 하덕모(1994). 응용미생물학. 서울: 개문사.
- 한국공업표준협회(2001). 한국산업규격. KS K 0692 KS K 0693.
- 한국미생물학회(編)(1987). 미생물학실험서. 서울: 도서출판 아카데미서적.
- 日本衛生加工協會(1992). 衛生加工製品の加工效果 評價試験方法.
- 일본공업기술원(1990). 일본공업규격. JIS L 1902.
- 小林 丘(1991). JP 92 253, 721.
- 皆川 基, 小澤 敦, 森 忠敬(1972). 衣類上の細菌とその洗淨に関する研究(第1報)- 細菌汚れの付着状態について- 繊維消費誌, 13(3), 103-119.
- A.A.T.C.C (1988). *Technical Manual and Year Book*. A.A.T.C.C TEST METHOD -100. 146-147.
- Brine, C. J. & Austin, P. R. (1974). Utilization of chitin, a cellulose derivative from crab and shrimp waste. *Biological and Medical Science*, 75(8), 42.
- Seo, H. (1993). Antimicrobial fibre from chitosan. *染色工業*, 41(4), 177-183.
- Seo, H., Senda, H., Yamamoto, Y. & Watanabe, A. (1984). Several novel attempts for the use of the potential functions of chitin and chitosan. *Chitin, Chitosan and Related Enzymes*, ed. by John P. Zikakis. Academic Press.
- Suzuki, K. (1993). Application of antibacterial and antifungal agents to textile goods. *染色工業*, 41(4), 184-194.
- Muzzarell, R. A. A. (1990). Antimicrobial properties of N-Carboxybuthyl chitosan. *Antimicrob Agents Chemother*, 34, 2019-2023.
- Stanford, P. A. (1988). Chitosan: commercial uses and potential applications, *Chitin and chitosan: Proceedings from the 4th international conference on chitin and chitosan*, ed. by S.B. Gudmund, , T.Anthonsen & P.Sandford, New York Elsevier Applied Science.
- Muzzarelli, R. A. A. (1985). *Chitin. The Polysaccharides*, 3, 417-450.
- Stanier, R.Y., Adelberg, A. A. & Ingraham, J. (1976). *The microbial world*. NJ : Prentice-Hall Inc.
- Vigo, T. L. (1983). *Handbook of fiber science and technology, vol. II, partA*, ed. by M. Lewin, S. B. Sello. New York: Marcel Dekker, Inc.
- Tokura, S. (1995). キチンおよびキトサン應用の新展開, *高分子*, 44(3), 112-115.

(2003년 11월 17일 접수, 2004년 2월 4일 채택)