

은 이온과의 비교를 통한 나노 은 입자의 항균 특성 연구

김지연 · 김성은 · 김재은 · 이종찬 · 윤제용[†]

서울대학교 화학생명공학부

(2005년 6월 7일 접수, 2005년 7월 20일 채택)

The Biocidal Activity of Nano-sized Silver Particles Comparing with Silver Ion

Jee Yeon Kim · Sungeun Kim · Jaeeun Kim · Jongchan Lee · Jeyong Yoon[†]

School of Chemical and Biological Engineering, Seoul National University

ABSTRACT : In recent days, there is much interest in the biocidal activity of silver since silver is known to be safe and effective as disinfectant and biocidal material against coliforms and viruses. In particular, nano sized silver particles which can be used as effective biocidal material received more attention. Accordingly, it is important to investigate antimicrobial activity and mechanism of nano sized silver particles prepared in a cost-effective manner. In this study, nano sized silver particles were prepared via photoreduction of a silver salt (AgNO₃) in the bulk phase of PEO₂₀-PPO₇₀-PEO₂₀ (Pluronic 123) block copolymer. The antimicrobial efficacy of silver nano particles against *E. coli* was investigated and compared with that of silver ion as the concentration of silver nano particles, pH (5.6~8.2), temperature (4°C~35°C) varied in aqueous system. Scanning electron microscopy (SEM) and transmission electron microscopy (TEM) was used to examine the nature of damaged microorganism with nano sized silver particles and silver ion. This study showed that antimicrobial efficacy of silver nano particles was approximately one twentieth than that of silver ion. It was more biocidal at higher pH in contrast with silver ion. In addition, nano silver particles was demonstrated to disrupt the outer membrane of *E. coli*, subsequently causing their aggregation. On the other hand, silver ion diffused into the cell damaging the cytoplasmic membrane without disrupting the outer membrane of *E. coli*.

Key Words : Nano Silver Particle, Biocide, Silver Ion, Inactivation

요약 : 최근 항균 성능이 뛰어나면서도 인체에 유해하지 않은 나노 사이즈 은 입자를 이용한 항균 제품 개발 및 연구가 활발히 이루어지고 있음에 따라, 나노 사이즈의 은 입자를 보다 쉬운 방법으로 균일하게 제조하고, 그 특성을 평가하는데 많은 관심이 집중되고 있다. 본 연구에서는 은 이온의 광환원을 통해 나노 은 입자를 15~20 nm 크기로 균일하게 제조한 뒤, 나노 은 입자의 농도, pH, 온도가 변화함에 따른 항균 특성을 살펴보고 이를 정량적으로 평가, 은 이온의 항균 특성과 비교하였다. 또한 주사 전자 현미경과 투과 전자 현미경을 통하여 나노 은 입자의 미생물 불활성화 특성을 은 이온의 미생물 불활성화 특성과 비교하였다. 주요 결과는 나노 은 입자의 항균 효과는 동일한 은 농도를 기준으로 하였을 때 은 이온의 항균 효과에 비하여 약 20배 정도 적은 것을 알 수 있었다. 또한 나노 은 입자의 농도, 온도가 높을수록 항균 성능은 향상됨을 알 수 있었으며 이는 은 이온의 실험 결과와 일치한다. 그러나 나노 은 입자의 항균 성능은 높은 pH에서 향상된 반면, 은 이온의 경우 pH 변화에 따른 항균 성능 변화가 관찰되지 않았다. 나노 은 입자와 은 이온에 의해 불활성화된 미생물을 주사 전자 현미경과 투과 전자 현미경으로 관찰한 결과, 나노 은 입자는 미생물 세포막을 크게 손상시키는 반면, 은 이온은 그렇지 않았다. 은 이온의 경우는 은 이온이 미생물 안으로 흡수되어 세포 질막을 손상시켜 미생물을 불활성화 시키는 것으로 알 수 있었다.

주제어 : 나노 은, 항균성, 은 이온, 미생물 불활성화

1. 서론

최근 수많은 종류의 세균이나 바이러스에 의한 피해가 우리의 생활 환경에서 빈번하게 발생하고 있다. 섬유, 종이, 가전 제품, 생활 기기 등 인간이 직접적으로 접촉하는 주위 환경에서 수많은 세균이나 바이러스가 발견되는가 하면 이러한 미생물에 의한 질병 및 피해가 심각하다는 사실이

보고되기 시작하면서 이들의 효율적인 제어 방안에 대한 관심이 증가하고 있다. 또한 과거 미생물에 의해 오염된 환경을 제어하고자 염소와 같은 유해 화학 소독제에만 의존해 왔던 인간의 미생물 감염 예방은 인체에 무해하고 따로 소독을 하지 않아도 미생물 감염으로부터 인간을 보호할 수 있는 지속 가능한 항균 위생 물질 개발로 점차 확산되고 있다.

항균 물질에는 매우 다양한 종류가 있으나 인체에 무해하고 휘발 또는 분해가 일어나지 않는 등 안정성이 뛰어나 광범위하게 응용될 수 있다는 장점을 지닌 무기계 항균 물질이 최근 각광을 받고 있으며, 그 중에서도 은(silver)에

[†] Corresponding author
E-mail: jeyong@snu.ac.kr
Tel: 02-880-8927

Fax: 02-876-8911

대한 관심과 연구가 급증하고 있다.^{1~3)} 은(silver)은 예로부터 식기나 수저 등의 생활용품에 사용되는 등 인체에 유해한 다른 금속과는 달리 인체에 무해하고 항균성이 매우 뛰어난 것으로 알려져 있다. 은 이온 (Ag^+)을 사용한 소독의 경우 수십 년 전부터 연구가 되어 왔으며^{4,5)} 은 이온에 의한 미생물 불활성화 메커니즘은 효소(enzyme)의 -SH기와 은 이온이 반응함에 따라 S-Ag가 생성되어 미생물 불활성화가 일어나거나, 은 이온이 미생물의 세포질막 (cytoplasmic membrane)에 있는 K^+ 이온을 방출시킴으로써 미생물을 불활성화시킨다고 일반적으로 알려져 있으며, 미생물의 DNA에 존재하는 염기와 반응함으로써 미생물의 세포분열을 방해한다는 메커니즘 역시 제시되고 있다.^{6,7)} 은 이온에 관한 연구는 이러한 메커니즘뿐만 아니라 과산화수소(H_2O_2)나 구리 이온과 같은 다른 항균 물질과의 시너지 효과 연구^{8~10)} 또한 진행되고 있다. 그러나 용액 상태에서만 존재할 수 있는 은 이온은 응용하는데 많은 제한이 있어, 최근에는 고체 상태로 사용이 가능한 나노(nano)사이즈 은 입자(Ag^0)를 이용한 제품 개발 및 항균성 연구가 활발하다.

이온 상태가 아닌 고체 은(Ag^0)의 경우 산소와 미생물의 -SH기가 반응하는 데에 촉매 역할을 하여 산소에 의한 미생물의 불활성화를 촉진시킬 수 있다고 알려져 있지만, 은 이온의 항균 메커니즘에 비하여 확실한 메커니즘이 밝혀지지 않은 상태이다.¹¹⁾

Sondi 그룹은 2004년 나노 은 입자의 항균 성능을 정성적으로 분석하고 전자 현미경 관찰을 통해 항균 메커니즘에 대하여 살펴보았다. 이 그룹은 전자 현미경 관찰 결과로 나노 은 입자가 미생물 주위를 둘러싼 뒤 미생물 세포막의 구성물과 반응함으로써 세포막을 손상시켜 미생물을 불활성화시키는 것으로 추정하였으나 명확한 메커니즘을 제시하지는 못하였다.¹²⁾ 이 외에도 나노 은 입자를 이용한 다양한 항균 물질에 대한 연구가 진행되고 일부는 상업화되어 다양한 제품들에 응용되고 있지만 나노 은 입자의 항균 성능 및 특성에 대한 정량적인 연구와 정확한 메커니즘 연구는 아직 이루어지지 않고 있다.

따라서 본 연구에서는 광환원 반응을 통해 나노 사이즈의 은 입자를 제조하고, 이러한 나노 은 입자가 미생물에 미치는 영향 및 특성을 은 이온과 정량적으로 비교하여 보았다. 또한 주사 전자 현미경, 투과 전자 현미경을 사용하여 나노 은 입자와 은 이온의 미생물 불활성화 결과를 비교, 분석하여 보았다.

2. 재료 및 실험 방법

2.1. 나노 은 입자의 제조

본 연구에서 사용한 모든 시약은 초순수를 사용하여 제조하였으며, 나노 사이즈 은 입자는 은 이온의 광환원 반응을 통해 제조하였다. 제조 방법은 먼저 은을 나노 사이즈로 형성할 수 있도록 모형(template) 역할을 하는 poly(ethylene

oxide) - poly(propylene oxide) - poly(ethylene oxide) (PEO₂₀-PPO₇₀-PEO₂₀, Pluronic P123, BASF Co., Germany)¹³⁾ 0.2 mmol을 초순수 7 mL에 넣고 완전히 용해시킨 후 은 이온 용액인 $AgNO_3$ (Aldrich Co., USA) 0.1 mmol을 첨가한다. 제조된 은 이온 용액에 15°C 미만의 온도에서 72시간 동안 자외선 램프(>350 nm, Black Ray longwave ultraviolet lamp B100 AP, UVP Inc.)를 조사하여 은 입자로 광환원하였다. 환원되지 않은 은 이온과 Pluronic P123은 원심분리를 통하여 정제한 뒤 진공오븐에서 증발시켜 제거하였다. 제조된 나노 은 입자의 크기는 나노 은 입자를 관찰한 투과 전자 현미경 (Transmission electron microscope, TEM) 사진을 확대하여 50개 입자의 사이즈를 계산함으로써 확인하였다.

2.2. 미생물의 배양 및 분석

나노 은 입자의 항균력을 테스트하기 위하여 지표 미생물로 그람음성균인 *E. coli* (ATCC 8739) strain을 사용하였다. *E. coli*는 50 mL Tryptic Soy broth에 접종하여 37°C에서 하룻밤 배양한 후에 원심분리를 통해 정제한 뒤 사용하였으며 *E. coli*의 항균성 평가는 spread plate method를 통해 분석되었다.

2.3. 나노 은 입자의 항균 특성

항균 실험은 60 mL pyrex 반응기에 50 mL 반응용액을 사용하여 이루어졌으며 지표미생물인 *E. coli*의 초기 농도는 2×10^5 CFU/mL가 되게 하였다. 항균성 평가는 응집된 나노 은 입자를 sonication하여 분리시킨 뒤 사용하였고, 초순수에 넣은 나노 은 입자의 무게를 조절하여 농도를 변화시켰으며, pH는 0.5 M 인산완충용액을 사용하여 5.6, 7.1, 8.2로 조절하였다. 또한 항온수조의 온도를 4°C, 25°C, 35°C로 조절함으로써 항균 성능 실험을 실행하였다. 나노 은 입자의 항균 특성과 은 이온의 항균 특성을 비교하기 위한 은 이온 용액은 $AgNO_3$ 를 초순수에 용해시켜 나노 은 입자와 동일한 은 농도를 기준으로 조절한 뒤 위와 같은 과정을 통해 실험하였다.

항균성 실험 과정에서 채취된 샘플들은 25 μ L의 14.6% sodium thiosulfate와 10% sodium thioglycolate 용액으로 quenching시킨 뒤¹⁴⁾ 적절하게 희석하여 nutrient 평판배지에 도말하였다. 항균성 정도는 실험 시간동안 살아남은 미생물의 비율을 \log_{10} 감소로 표현하였다.

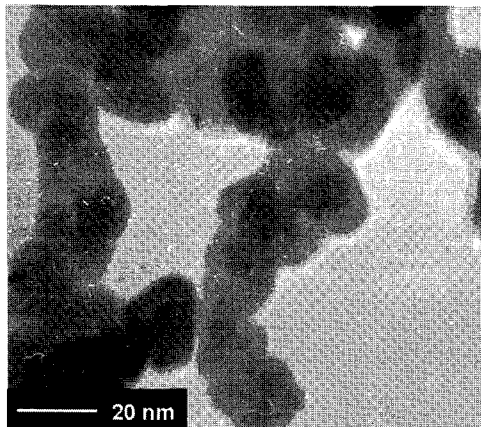
2.4. 전자 현미경에 의한 미생물 불활성화 비교

나노 은 입자와 은 이온의 항균 메커니즘 비교는 나노 은 입자, 은 이온과 접촉하여 불활성화된 미생물의 주사 전자현미경 (Scanning electron microscope, SEM), 투과 전자현미경 (Transmission electron microscope, TEM) 사진 결과를 통하여 추정해보았다.

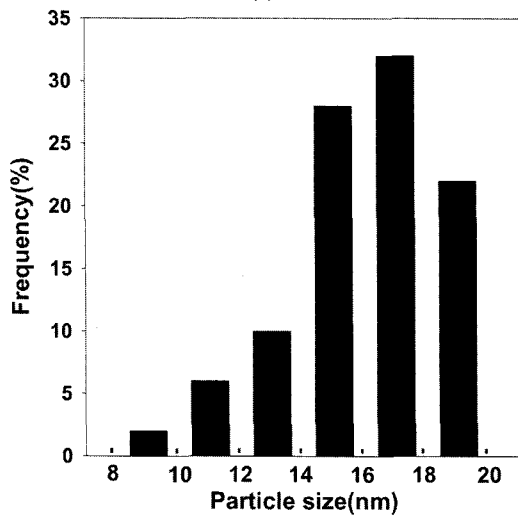
주사 전자현미경 촬영을 위한 샘플 전처리 과정은 다음과 같다. 먼저 항균 성능 실험을 통해 1 log 정도 불활성화

시킨 미생물을 4°C 상태에서 0.05 M sodium cacodylate buffer (pH 7.2)에 포함된 2% glutaraldehyde로 2~4시간 고정하고 세척액 (0.05 M sodium cacodylate buffer)으로 씻은 후 1% osmium tetroxide액에서 2시간 다시 고정하였다. 고정이 끝난 미생물은 다양한 농도의 에탄올로 탈수시킨 후 isoamyl acetate로 치환시키고, 임계점 건조기 (Critical point dry)로 건조하였다. 마지막으로 샘플의 표면을 금으로 코팅한 후 주사 전자현미경 (JSM-5410LV, JEOL, Japan)으로 미생물 구조를 관찰하였다.

투과 전자현미경의 경우 위와 같은 방법으로 전고정, 후 고정 처리를 한 후 0.5% uranyl acetate로 *En bloc* staining 과정을 거쳐 다양한 농도의 에탄올로 탈수시키고 100% propylene oxide로 치환시킨다. 그 다음 다양한 비율의 propylene oxide와 Spurr's resin 혼합물을 침입 (infiltration)시킨 뒤 Ultramicrotome (MT-X, RMC, USA)를 통하여 절편을 만들고 절편은 2% uranyl acetate과 Reynold's lead citrate로 염색을 시켜 투과 전자현미경(JEM-1010, JEOL, Japan)으로 관찰하였다.



(a)



(b)

Fig. 1. (a) TEM image of prepared nano sized silver particles and (b) Size distribution diagram of prepared nano sized silver particles.

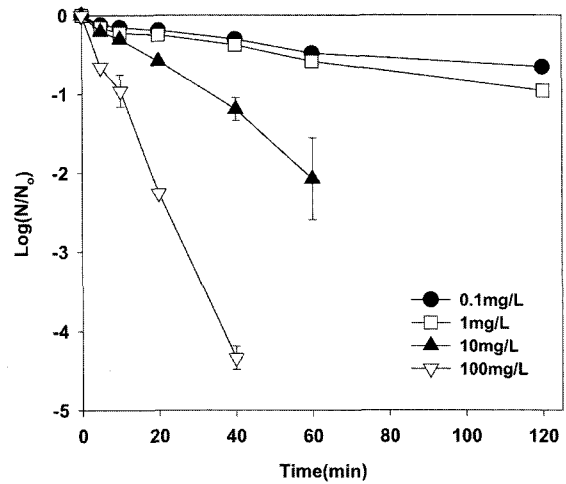
3. 결과 및 고찰

3.1. 나노 은 입자의 제조

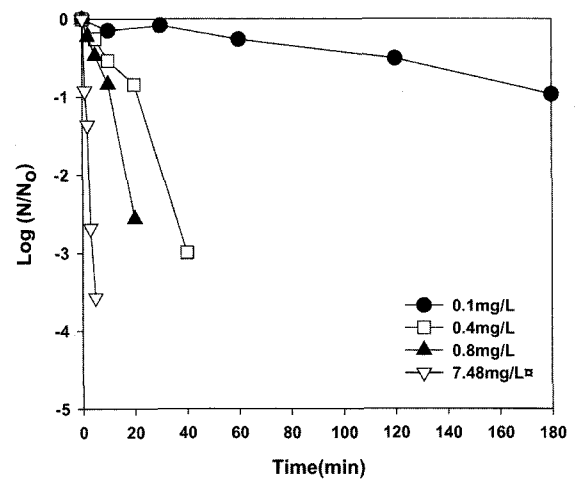
Fig. 1(a), (b)는 제조된 나노 은 입자의 TEM 사진 및 사이즈 분포도를 나타낸 것이다. 제조된 나노 은 입자는 디스크 모양을 띠었으며 전체적으로 진한 회색을 나타내었다. 또한 TEM 사진을 통하여 15~20 nm 사이즈의 나노 은 입자가 균일하게 제조된 것을 확인할 수 있었다.

3.2. 나노 은 입자의 항균 특성

나노 은 입자와 은 이온의 농도에 따른 미생물 불활성화 결과를 Fig. 2(a), (b)에 각각 나타내었다. Fig. 2(a)에 의하면, 나노 은 입자는 미생물을 효과적으로 불활성화 시킴을 알 수 있으며, 농도가 높을수록 항균 성능이 증가함을 알 수 있다. Fig. 2(b)에서는 은 이온 농도에 따른 미생물 불활성화 변화를 살펴보았다. 은 이온 농도는 AgNO₃의 농도



(a)



(b)

Fig. 2. The effect of concentration on biocidal activity (a) nano silver particles and (b) silver (Ag⁺) ion (T = 25°C, pH = 7.1).

를 0.1 mg/L부터 7.48 mg/L로 변화시키면서 실험하였으며, 나노 은 입자와 마찬가지로 은 이온 농도가 높을수록 항균 성능이 증가함을 알 수 있다. 또한 Fig. 2(a)와 (b)의 비교를 통해 나노 은 입자의 항균 효과가 은 이온의 항균 효과에 비해 동일한 은 농도를 기준으로 하였을 때 약 20배 가량 적은 것을 알 수 있었다.

Fig. 3(a), (b)는 각각 나노 은 입자 용액과 은 이온을 포함한 용액 pH를 5.6에서 8.2로 변화시킨 후 미생물의 불활성화를 살펴본 결과이다. Fig. 3(a)는 10 mg/L 나노 은 입자를 포함한 용액 pH를 5.6에서 8.2로 변화시킨 후 미생물의 불활성화 결과를 살펴본 결과이며 나노 은 입자 용액 pH가 5.6, 7.1, 8.2로 증가할수록 항균 성능 또한 증가하는 것을 알 수 있었다. Fig. 3(b)에서는 은 이온 농도가 1 mg/L 일 경우 pH에 따른 미생물의 불활성화 특성 변화를 알아보았다. 결과에서 볼 수 있듯이 은 이온의 경우 pH의 차이에 의한 항균 특성 변화는 관찰되지 않았다.

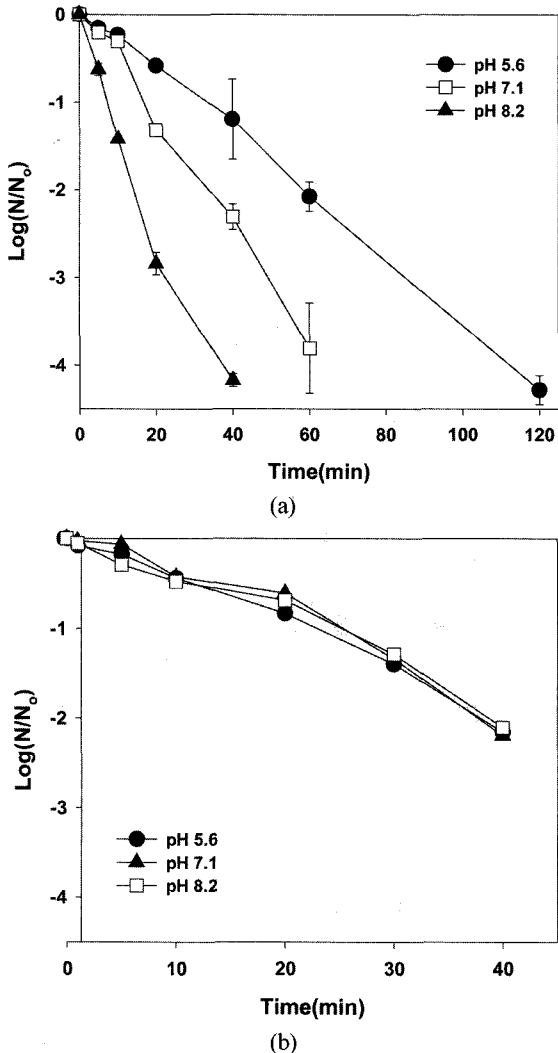


Fig. 3. The effect of pH on biocidal activity (T = 25°C) (a) nano silver solution (10 mg/L) and (b) silver (Ag⁺) ion (1 mg/L).

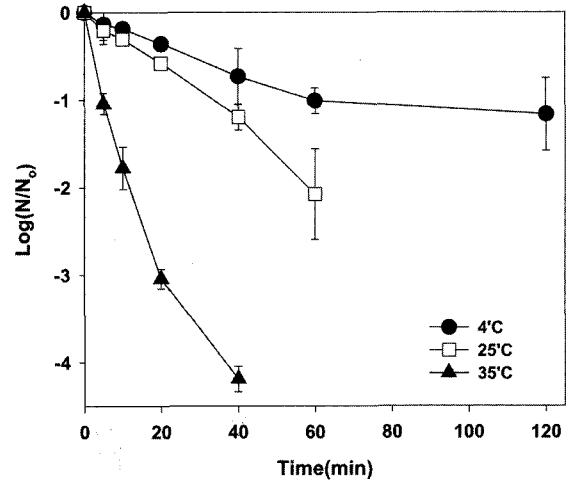


Fig. 4. The effect of temperature of nano silver solution on biocidal activity ([nano silver]₀ = 10 mg/L, pH = 7.1).

Fig. 4는 나노 은 입자 용액의 온도가 항균 성능에 미치는 영향을 알아보기 위한 실험 결과이다. 용액의 온도가 증가함에 따라 항균 성능 역시 향상되는 것을 알 수 있었다. 일반적으로 염소나 오존 등을 사용할 경우 온도가 높을수록 소독능이 증가하는 경향을 나타내며¹⁵⁾ 은 이온 역시 온도가 높을수록 미생물 불활성화 속도가 빨라지는 것으로 보고되었는데,⁵⁾ 이는 미생물과 소독제의 화학 반응 속도가 온도가 증가함에 따라 증가하기 때문이다.

3.3. 전자 현미경에 의한 미생물 불활성화 비교

Fig. 5는 나노 은 입자와 은 이온에 의해 불활성화된 미생물 특성을 비교하기 위하여 은 이온과 나노 은 입자에 의해 1 log 불활성화된 미생물을 주사 전자현미경으로 관찰한 결과이다. Fig. 5(a)는 처리하지 않은 *E. coli*를 나타내며, (b)는 나노 은 입자, (c)는 은 이온으로 처리한 뒤의 미생물 관찰 결과이다. 처리하지 않은 대조군과 비교하였을 때 나노 은 입자로 처리한 미생물의 경우 표면이 크게 손상된 반면 은 이온으로 처리한 미생물은 표면이 크게 손상되지 않은 것을 관찰할 수 있었다.

나노 은 입자와 은 이온에 의해 불활성화된 미생물의 표면뿐만 아니라 내부 모습을 살펴보기 위한 투과 전자현미경 관찰 결과는 Fig. 6과 같다. 마찬가지로 (a)는 처리하지 않은 *E. coli*를 나타내며 (b)는 나노 은 입자로 1 log 불활성화 시킨 뒤, (c)는 은 이온으로 1 log 불활성화시킨 *E. coli*의 관찰 결과이다. 투과 전자현미경 결과 은 이온은 미생물의 표면을 크게 손상시키지 않은 상태에서 세포막의 안쪽인 세포질막 (cytoplasmic membrane) 부분을 손상시킨 것을 알 수 있었으며 이는 은 이온이 세포질막의 K⁺ 이온을 방출함으로써 미생물을 불활성화 시킨다는 기존의 연구와 일치한다.⁷⁾ 반면 나노 은 입자의 경우 미생물의 세포막을 크게 손상시킨 것을 관찰할 수 있었다.

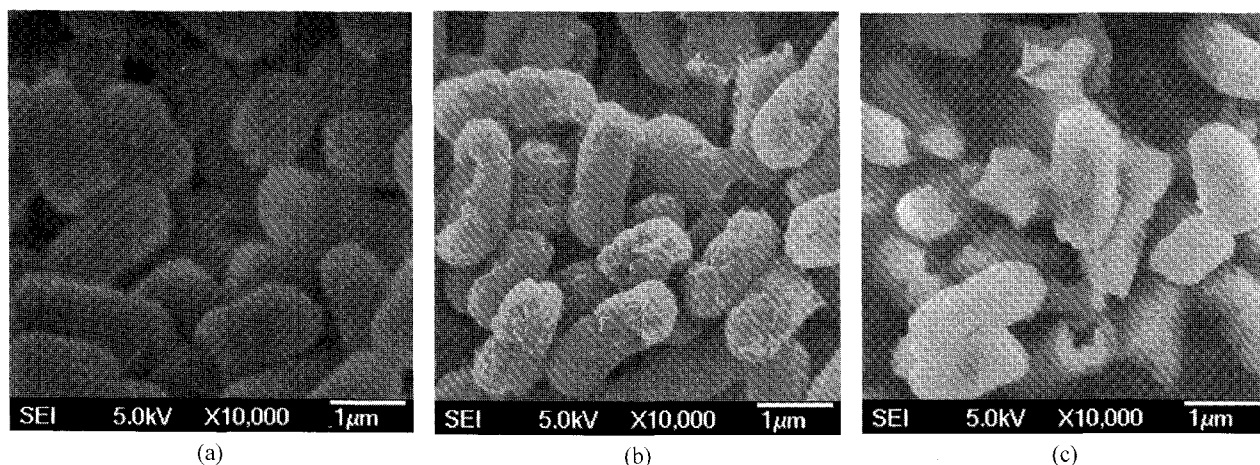


Fig. 5. SEM images of *E. coli* cells (a) untreated, (b) treated with Ag^0 and (c) treated with Ag^+ .

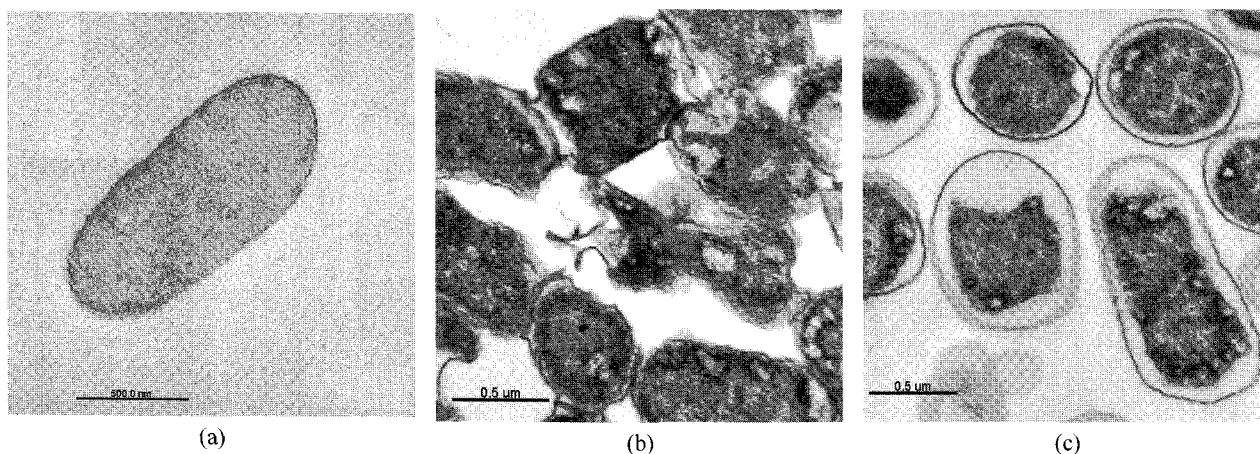


Fig. 6. TEM images of *E. coli* cells (a) untreated, (b) treated with Ag^0 and (c) treated with Ag^+ .

4. 결론

본 연구는 광환원 반응을 통해 제조된 15~20 nm 사이즈 나노 은 입자의 그람 음성균 *E. coli*에 대한 항균 특성을 살펴보고, 은 이온의 항균 특성과 비교하여 보았으며, 주사 전자현미경과 투과 전자현미경의 관찰 결과를 통하여 두 항균 물질에 의해 불활성화된 미생물 특성을 살펴보았다. 연구 결과로 나노 은 입자의 항균 성능은 은 이온 용액의 항균 성능과 비교하여 보았을 때 동일한 은 농도를 기준으로 약 20배 가량 적은 것으로 나타났다. 그리고 나노 은 입자 용액의 경우 pH와 온도가 증가할수록 항균 성능 또한 향상됨을 관찰할 수 있었지만, 은 이온 용액의 경우 pH 변화에 따른 항균 성능 변화가 관찰되지 않았다.

또한 주사 전자현미경과 투과 전자 현미경 관찰 결과, 나노 은 입자는 미생물의 세포막을 크게 손상시킴으로써 항균 효과를 가지는 것으로 나타났으며 은 이온의 경우 세포막을 크게 손상시키지 않고 미생물 내부로 확산(diffusion)되어 세포질막(cytoplasmic membrane)을 손상시키는 것으로 알 수 있었다.

위의 결과를 통해 나노 은 입자와 은 이온의 항균 특성

및 항균 메커니즘은 상이한 것을 알 수 있으며 이는 앞으로 나노 은 입자, 은 이온을 이용한 항균 물질의 개발 및 응용에 유용하게 사용될 수 있을 것이다.

참고문헌

1. 강환열, 정명주, 정영기, "금속 은으로 제조한 Ag^+ 용액의 항균 효과와 안정성," 한국생물공학회지, **15**(5), 521~524(2000).
2. 임윤택, 최형기, 안용현, "Ag-Hydroxyl Apatite를 담지한 기능성 플라스틱의 항균 성능 평가," 한국생물공학회지, **16**(2), 123~127(2001).
3. 조경환, 박수길, "초음파법으로 제조된 은 나노 입자의 항균 특성 연구," 한국공업화학학회지, **15**(8), 952~955(2004).
4. Cecil, W. C., Charles, M. P., and Paul, W. K., "Bactericidal effect of low concentrations of silver," *J. AWWA*, **54**, 208~216(1962).
5. Richard, L. W., "Review of the bactericidal effectiveness of silver," *J. AWWA*, **55**, 881~886(1963).
6. Robert, B. T. and Charles, P. G., "The molecular mecha-

- nisms of copper and silver ion disinfection of bacteria and viruses," *CRC Crit. Rev. Environ. Cont.*, **18**(4), 295~315(1989).
7. Russell, A. D. and Hugo, W. B. "Antimicrobial activity and action of silver," *Prog. Med. Chem.*, **31**, 351~370 (1994).
 8. Lee, K. L., Moyasar, T. Y., and Charles, P. G., "Efficacy of copper and silver ions reduced levels of free chlorine in inactivation of *Legionella pneumophila*," *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**(12), 3045~3050(1989).
 9. Rami Pedahzur, Ovadia Lev, Badri Fattal and Hillel I. Shuval, "The inactivation of silver ions and hydrogen peroxide in the inactivation of *E. coli* : A preliminary evaluation of a new long acting residual drinking water disinfectant," *Water Sci. Technol.*, **31**(5-6), 123~129(1995).
 10. Pedahzur, R., Katzenelson, D., Barnea, N., Lev, O., Shuval, H. I., Fattal, B., and Ulitzur, S., "The efficacy of long-lasting residual drinking water disinfectants based on hydrogen peroxide and silver," *Water Sci. Technol.*, **42**(1-2), 293~298(2000).
 11. Richard, L. D., Samuel, F. E., "The development and functions of silver in water purification and disease control," *Catal. Today*, **36**, 107~114(1997).
 12. Ivan, S. and Branka, S. S., "Silver nanoparticles as antimicrobial agent : A case study on *E. coli* as a model for gram-negative bacteria," *J. Colloid Interf. Sci.*, **275**, 177~182(2004).
 13. Kim, J. U., Cha, S. H., Shin, K. S., Jho, J. Y., and Lee, J. C., "Preparation of gold nanowires and nanosheets in bulk block copolymer phases under mild conditions," *Adv. Mater.*, **16**(5), 459~464(2003).
 14. Richard, C. T. and Bernard, R., "Reversal of the silver inhibition of microorganisms by agar," *Appl. Environ. Microbiol.*, **35**(6), 1116~1120(1978).
 15. John Wiley and Sons, Inc., *Water Treatment Principles and Design*, A Wiley-Interscience Publication, Canada, pp. 264~265(1985).