

4차 암모늄기를 가진 키토산 유도체의 항균성

김 천 호 · 최 영 선 · 최 규 석

한양대학교 공과대학 공업화학과
(1996년 6월 14일 접수, 1996년 7월 22일 채택)

Antibacterial Activity by Chitosan Derivatives with Quaternary Ammonium Salt

C. H. Kim, Y. S. Choi, and K. S. Choi

Dept. of Industrial Chemistry, College of Engineering, Hanyang University, Seoul 133-791, Korea
(Received June 14, 1996, Accepted July 22, 1996)

요 약 : 천연고분자인 chitin의 탈아세틸화물인 chitosan의 유리아미노기에 알킬 길이가 다른 알데히드를 이용하여 *N*-alkyl chitosan 유도체를 각각 합성한 다음, 이들을 methyl iodide로 4차화시킴으로써 4차 암모늄기가 도입된 새로운 수용성 chitosan 유도체를 합성하여, 도입된 알킬기의 길이에 따른 항균성을 그람양성균인 *S. aureus*(ATCC 6538P)와 그람 음성균인 *E. coli*(ATCC 14339)에 대해서 shake flask법을 이용하여 검토하였다. 그 결과 소수성이 증대될수록 항균력은 증가하였고, 특히 그람음성균인 *E. coli*에 비해 그람양성균인 *S. aureus*에 대한 항균력이 더욱 증대됨을 확인할 수 있었다. 이는 cytoplasmic membrane의 구조상의 차이에서 기인한 것으로 생각된다.

Abstract: Chitosan is the deacetylation product of chitin. Chitosan was converted to *N*-alkyl chitosan derivatives using proper aldehyde having different alkyl chains, then chitosan derivatives with quaternary ammonium salt were produced by quaternization with methyl iodide. Their antibacterial activities against *S. aureus*(ATCC 6538P) and *E. coli*(ATCC 14339), gram-positive bacteria and gram-negative bacteria, respectively, as introduced alkyl length were evaluated by shake flask method using colony count. The antibacterial activity was found to be increased as alkyl chains, hydrophobic groups. These antibacterial agents were more active against *S. aureus* than *E. coli*. It may be due to the different of structure of cytoplasmic membrane.

1. 서 론

Chitin은 게, 새우 등의 갑각류의 외골격과 조류나 균류와 같은 식물의 세포벽에 함유되어 있는 천연고분자로서 셀룰로오스와 유사한 구조를 가지고 있으며 자연계에 풍부하게 존재하고 있다. 그러나, chitin은 용해성이 좋지 않아서 셀룰로오스만큼 이용되지 못하였지만, 1970년 이후 chitin 뿐만 아니라 탈아세틸화 화합물인 chitosan이 chitin과 유사한 무해·무독성, 생분해성 등의 특성을 지니고 있고, 특히 희석산 용

매 등에 용해되기 때문에 펄프, 분리막, 섬유 등으로의 응용이 활발히 연구되고 있으며 현재도 새로운 기능이 계속 보고되고 있다. Chitin의 여러 금속이온들에 대한 우수한 킬레이트 형성능과 상처 치유효과 등과, chitosan의 유리 일차 아미노기가 가지는 중금속 이온에 대한 우수한 선택적 흡착능으로 중금속 흡착제[1], 폐수 처리제[2], 해수 중의 우라늄 등의 유용 금속 포집제[3, 4], 그리고, 이온교환체, 화장품, 의약품, 의료용 재료, 기능성 식품, 토지개량제 등[5]에 관한 연구가 발표되고 있으며, 이러한 특성들을

향상시키기 위하여 chitin과 chitosan의 고기능성 유도체들에 관한 연구도 활발하다.

이와 같은 연구와 함께 chitosan이 항균성 및 항곰팡이성을 가지고 있다는 것도 매우 흥미있게 발표되고 있다. 한편, chitin, chitosan이 식물병원진균(植物病原真菌), 목재부후균(木材腐朽菌), 근립균(根粒菌) 등의 증식에 대한 영향이나 상호작용에 대한 연구는 많으나, 일반 세균의 증식에 미치는 영향에 관한 연구는 적다. 그렇지만 최근 chitosan 농도가 *E. coli*의 증식에 미치는 영향을 조사한 연구가 발표되었으며, 이때 chitosan 0.01%를 첨가하여 대조군과 비교하면 2일간 증식이 억제되고, 0.02% 이상의 농도에서는 *E. coli*의 생육이 완전히 억제되었다는 것이 밝혀졌다 [6]. 또한 chitosan을 0.02% 함유한 pH 6.0의 배지(培地)를 이용하여 *P. aeruginosa*, *B. subtilis*, *S. aureus*를 배양한 경우에도 배양 후 어떠한 균주(菌株)도 생육하지 않았다는 것도 발표되고 chitosan의 농도에 따른 *F. solani*의 증식에 미치는 영향을 조사한 경우 [7]에 있어서는 농도의 증가와 함께 곰팡이의 증식이 억제되며, 0.1%의 chitosan을 첨가했을 경우 생육이 완전히 제어 되고 *F. oxysporum*과 *F. oxysporum cepae*에 대해서도 동일한 영향을 보이고

있다고 밝혀지고 있다. 그러나, 국내에서는 기초 실험단계에 머물고 있을 뿐만 아니라 chitosan의 기본 원료가 되고 있는 수산자원들이 거의 폐기되고 있는 실정이다.

양전하를 띤 일반적인 항균제에 있어서 항균성의 메카니즘 [8]을 살펴보면, “① 박테리아 세포 표면에 흡착 → ② 세포벽을 통한 확산 → ③ 세포질 막과의 결합 → ④ 세포질 막의 파괴 → ⑤ K^+ 이온, DNA 그리고 RNA 같은 세포질 구성물의 방출 → ⑥ 세포사망”과 같은 과정을 거치게 된다. 이 메카니즘 중에서 박테리아 세포 표면은 항상 음이온으로 대전되어 있고, 음전하인 세포 표면에 양이온의 흡착은 고분자 양이온이 양이온 단량체보다 전하밀도가 높기 때문에 흡착이 많이 일어날 수 있다고 예측할 수 있으며, 또한 세포질 막과의 결합에서 막 자체에 음으로 대전된 각 성분들이 있기 때문에 양이온성을 띤 단량체보다 고분자 양이온이 막과의 결합을 훨씬 촉진시킬 수 있을 것으로 추정된다.

따라서, 본 연구실에서는 chitin에서는 나타나지 않는 chitosan의 항균성이 유리 amino기에 의해서 나타나지만 분자내의 견고한 수소결합 등으로 인해 산성영역에서만 용해되는 등 용해성이 매우 제한적이기

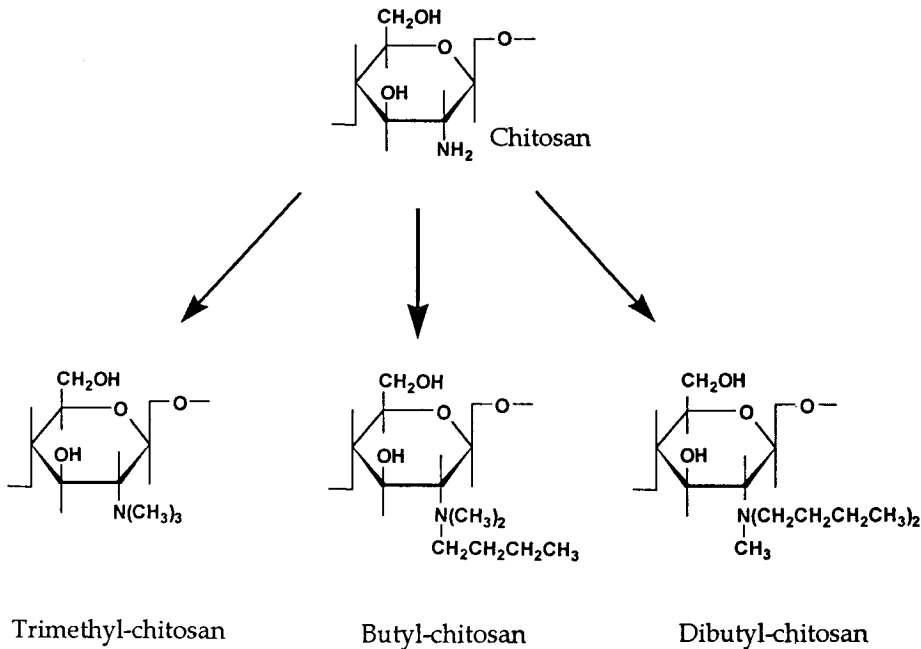


Fig. 1. Schematic structure of chitosan and its derivatives.

때문에, 새로운 수용성 chitosan 유도체를 제조하여 이들의 물성 및 항균성을 조사해 보았다. 즉, 먼저 chitosan의 유리아민기를 알데히드를 이용하여 schiff's base를 형성시키고, 이를 다시 환원시키는 방법으로 *N*-alkyl chitosan을 제조한 후 이를 다시 과잉의 alkyl halide를 이용하여 chitosan의 4차화 유도체를 제조(Fig. 1)하였다. 또한, 이들 수용성 chitosan에 도입된 알킬기의 길이에 따른 항균효과를 조사하여 의료용 항균제 및 항균·방취 소재로서의 가능성을 검토해 보았다.

2. 실험

2.1. 시약

Chitosan은 Tokyo Kasei사 제품을 사용하였으며, chitosan에 Schiff's base를 형성하는데 사용된 formaldehyde와 *n*-butyraldehyde는 Kokusan Chemical사 제품을 각각 감압증류하여 사용하였다. NaBH_4 는 Wako Pure Chem.사의 시약 1급을 사용하였고, CH_3I , NaI , alkyl halide 등은 Janssen Chemical의 시약 1급을 그대로 사용하였다. *N*-Methyl-2-pyrrolidone (NMP)은 Aldrich사의 1급 시약을 감압증류한 후 Molecular Sieve (4Å)에 넣어 보관하여 사용하였고, 그 외 시약은 특급시약을 그대로 사용하였으며 유기용매는 감압증류하여 사용하였다.

2.2. 활성화된 chitosan의 제조

탈아세틸화도가 76%인 chitosan의 탈아세틸화율을 높이기 위해, Mima의 방법[9]으로 전고[10]와 같이 처리하여 탈아세틸화도가 96%인 chitosan을 얻었으며, 산, 알칼리처리를 통해 활성화시켜 이를 출발물질로 하였다.

2.3. *N,N,N*-Trimethyl chitosan iodide의 제조

활성화된 chitosan을 1% acetic acid 수용액에 녹여 1wt.%의 chitosan 용액을 제조하고 실온에서 formaldehyde를 chitosan의 amine에 대해서 2mol비로 가하여 30분 후, 1N NaOH로 pH를 4.5로 조절하였다. 10% NaBH_4 수용액을 chitosan의 amine에 대해서 1.5mol비로 1시간 동안 천천히 적가하여 1시간이 경과하면 NaOH 수용액을 가하여 결정을 석출시킨 후, 증류수로 여액이 중성이 될때까지 충분히 세척하고 석출물을 ethanol과 diethyl ether로 4일간

충분히 Soxhlet 처리하여 미반응 aldehyde와 NaBH_4 를 제거한 다음 40°C에서 진공건조하여 *N*-methyl chitosan을 제조하였다. 제조한 *N*-methyl chitosan 1g을 NMP 50ml에 12시간 팽윤시킨 다음 NaOH를 가하고 36°C에서 질소기류 하에 과잉의 methyl iodide를 15mol비로 가한 다음, NaI 가 0.2M이 되도록 부가하여 6시간 반응시킨 후 acetone으로 석출시켰다. 여액이 중성이 될때까지 acetone으로 충분히 세척하고 40°C에서 진공건조하여 *N,N,N*-trimethyl chitosan iodide(이하 Trimethyl chitosan)를 제조하였다.

2.4. *N*-Butyl-*N,N*-dimethyl chitosan iodide 제조

Chitosan을 1% acetic acid에 녹여 1wt.%의 chitosan 용액을 제조한 다음, 실온에서 *n*-butyraldehyde를 chitosan의 유리 amine에 대해서 2배 mol비로 가하고 이하 *N*-methyl chitosan 합성과 같은 방법으로 *N*-butyl chitosan을 제조하였다.

제조한 *N*-butyl chitosan 1.5g을 NMP 100ml에 실온에서 18시간 팽윤시킨 다음 NaOH를 가하고 36°C에서 질소기류 하에, CH_3I 와 NaI 를 각각 10배 및 2배 mol비로 가한 다음 NaI 가 0.2M이 되게 첨가하여 35°C에서 12시간 교반하고, acetone으로 석출시키고, 40°C에서 진공으로 건조하여 *N*-butyl-*N,N*-dimethyl chitosan iodide(이하 Butyl chitosan)를 제조하였다.

2.5. *N,N*-Dibutyl-*N*-methyl chitosan iodide 제조

Chitosan의 유리 amine기에 대해서 11배 mol비로 제조한 35% *n*-butyraldehyde 수용액을 격렬히 교반하면서 acetic acid에 대해 1%로 미리 제조한 chitosan 용액을 가하고 8시간 후, 1N NaOH 수용액으로 pH를 4.0으로 상승시킨 다음, 상온에서 10% NaBH_4 수용액을 chitosan의 유리 amine기에 대해 1.2배 mol비로 8시간동안 천천히 적가한다. 완전히 적가하여 1시간 후, pH가 5.5에 이르면 NaOH로 pH를 약 9로 조정하여 결정을 석출시킨 다음, 이하 *N*-methyl chitosan 합성과 같은 방법으로 *N,N*-dibutyl chitosan을 제조하였다. 이를 *N*-butyl dimethyl chitosan iodide와 같은 방법으로 *N,N*-dibutyl-*N*-methyl chitosan iodide(이하 Dibutyl chitosan)를 제조하였다.

2.6. 항균시험

시험균으로는 그람음성지정균인 *Escherichia coli*

Table 1. Elemental Analysis of Chitosan Derivatives

Samples	C(%)	H(%)	N(%)	Degree of substitution	
				N-alkyl	Q-alkyl ³⁾
Chitosan	42.05	7.47	8.15	0.98 ¹⁾	0.63 ⁴⁾
N-butyl chitosan	48.00	8.15	6.90	0.71 ²⁾	0.58
N,N-dibutyl chitosan	44.67	7.68	7.50	0.41 ²⁾	0.28

- 1) The degree of deacetylation : From $(C_8H_{13}NO_5)_{0.02} (C_6H_{11}NO_4)_{0.98} \cdot 0.57 H_2O$
- 2) The degree of N-alkylation (The ratio of N/C)
- 3) The degree of quaternization by methyl iodide (silver nitrate titration)
- 4) The degree of quaternization of N,N,N-trimethyl chitosan.

ATCC 14339(경기도 보건환경연구원)와 그람양성지정균인 *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P(국립보건원)을 이용하여 shake flask 법으로 시험하였고, 이때 균체의 농도는 원균액을 희석하여 agar 평판배지에 24시간, 37°C에서 배양한 후 colony 수를 세고 원균액의 균체 농도를 혈구계수기로 계산하였다(약 10^6 cell/ml).

항균시험은 shake flask법으로 sample과 blank를 각각 소정시간 배양한 후 다시 희석하여 적정 pH의 agar 평판배지에 (pH 6.0(acetate buffer), pH 7.1(phosphate buffer)) 37°C에서 24시간 배양한 후 colony 수를 세고 sample과 blank의 균체 농도를 계산하여 비교하였다.

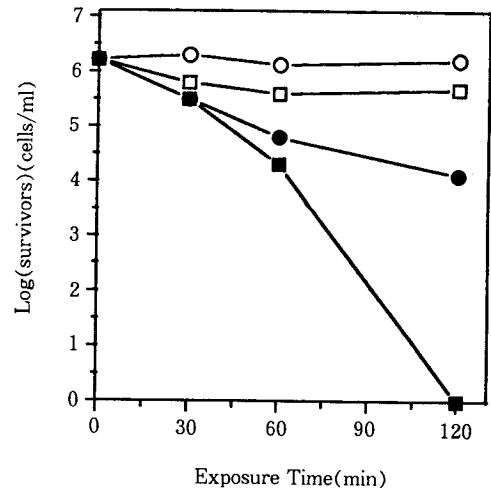
3. 결과 및 고찰

3.1. Chitosan유도체의 합성분석

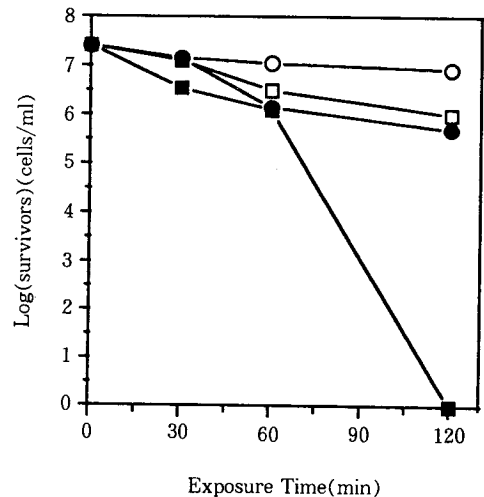
합성한 N-alkyl chitosan유도체는 활성화 시킨 chitosan과 비교하여 이들의 각 유도체인 Trimethyl chitosan, N-alkyl chitosan 및 이들의 4차화 유도체에 대한 치환도 및 치환위치를 FT-IR과 ¹³C-NMR로 확인하여 전고[10]에 나타냈으며, 이들의 원소분석 결과는 Table 1에 chitosan과 N-alkyl chitosan 유도체의 원소분석 결과치와 이들의 4차화 유도체에 대한 4차화도를 각각 나타냈다.

3.2. 항균성

일반적인 4차화 항균제의 mechanism[8] 중에서



(a)



(b)

Fig. 2. Plots of log(survivors) versus exposure time for Trimethyl chitosan against (a) *S. aureus* (b) *E. coli*. Concentrations: (○) blank; (□) 100ppm; (●) 200ppm; (■) 500ppm.

박테리아 세포 표면은 항상 음이온으로 하전되어 있기 때문에, polycationic biocide에서는 높은 전하 밀도로 인해 기대되는 것으로 1단계가 촉진되지만 2단계인 확산은 기대하기 어렵다. 따라서 산성영역에서 chitosan은 전하밀도가 높은 polycationic biocide으로서 1단계인 세포 표면의 흡착과, 또한 cytoplasmic

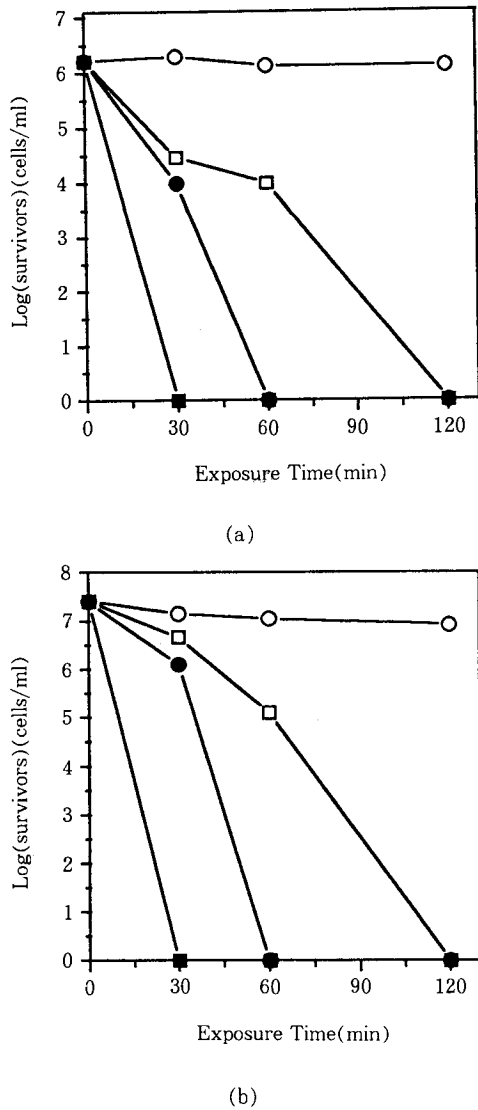


Fig. 3. Plots of log(survivors) versus exposure time for Dibutyl chitosan against (a) *S. aureus* (b) *E. coli*. Concentrations: (○) blank; (□) 100ppm; (●) 200ppm; (■) 500ppm.

membrane 내에 있는 산성 인지질과 일부 단백질이 음으로 대전되어 있기 때문에 3의 과정을 기대할 수 있다. 그러나, chitosan에 대한 정확한 항균 메커니즘은 아직까지 규명되지 못한 상태이다.

항균시험에서의 pH를 6.0으로 조절한 것은 chitosan 초산용액의 pH가 5.6 근처이고 pH가 6.5 이

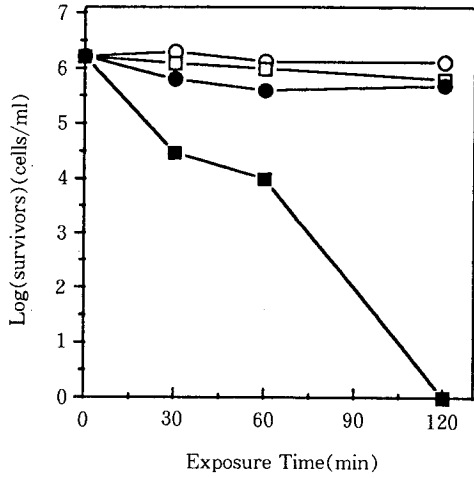
상이 되면, 콜로이드상태가 되어 pH의 상승과 함께 항균력은 저하되기 때문에 pH를 6.0으로하여 먼저 chitosan과 비교를 하기 위함이었다고 할 수 있는 pH 7.1로 phosphate buffer를 사용하여 배지의 pH를 조정하여 비교 실험하였다.

먼저 acetate buffer를 이용하여 배지의 pH를 6.0으로 한 agar 평판배지에 접종하여 24시간 배양한 다음, 배양된 colony의 수를 대조군과 비교하여 실험한 결과를 Fig. 2~5에 나타내었다.

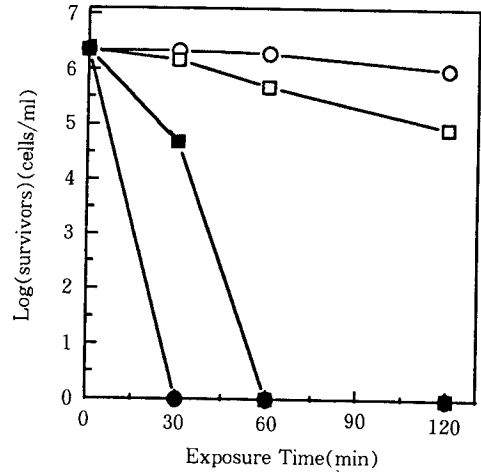
Fig. 2는 그람음성균인 *E. coli*와 그람양성균인 *S. aureus*에 대한 Trimethyl chitosan의 항균능을 농도별로 각각 검토한 것으로 농도 500ppm에서 항균시험에 사용된 두균에 대한 항균력은 모두 접촉시간이 120분만에 모두 사멸되었고, *S. aureus*의 경우 100ppm만으로도 접촉시간 30분만에 98% 이상으로 현저히 감소하였다.

Fig. 3에서는 Dibutyl chitosan의 농도에 따른 항균능으로 전반적으로 Trimethyl chitosan 유도체보다 우수한 결과를 얻을 수 있었다. 그림에서 볼 수 있듯이 *E. coli*의 경우 100ppm에서는 120분, 200ppm에서는 60분, 그리고 500ppm에서는 30분의 접촉 시간만으로도 성장이 완전히 억제됨을 확인할 수 있었고, 그람양성균인 *S. aureus*의 경우에는 이러한 경향이 더욱 두드러졌으며, 특히 Dibutyl chitosan에서는 100ppm만으로도 충분한 성장 저지효과를 확인할 수 있었다. 그리고, 그람음성균인 *E. coli*에 비해 그람양성균인 *S. aureus*에 대한 항균능이 더욱 우수함을 알 수 있는데 이는 cytoplasmic membrane의 구조상의 차이에서 기인한 것으로 *S. aureus*는 monolayer 인데 반하여 *E. coli*는 bilayer이기 때문에 polycationic biocide로 사용된 chitosan 유도체가 쉽게 cytoplasmic membrane을 통해 침투될 수 있기 때문으로 생각된다.

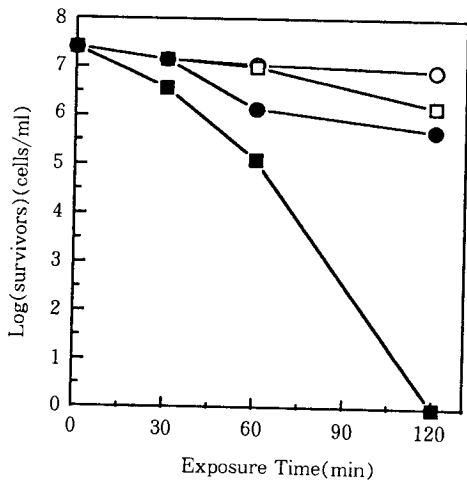
Fig. 4에 제조한 chitosan 및 모든 chitosan 유도체를 농도를 100ppm으로 하여 그람음성균인 *E. coli*와 그람양성균인 *S. aureus*에 대한 항균능을 각각 비교한 결과를 나타내었다. 결과에서 볼 수 있듯이 Trimethyl, Butyl, Dibutyl chitosan의 순으로 항균력이 점차 증가하였고 이는 항균 mechanism[8] 중 3단계에서 유리아민기에 도입된 알킬기가 증가함에 따라 각 제조된 유도체의 소수성이 증가되어 이로서 세포의 cytoplasmic membrane과의 훨씬 active한



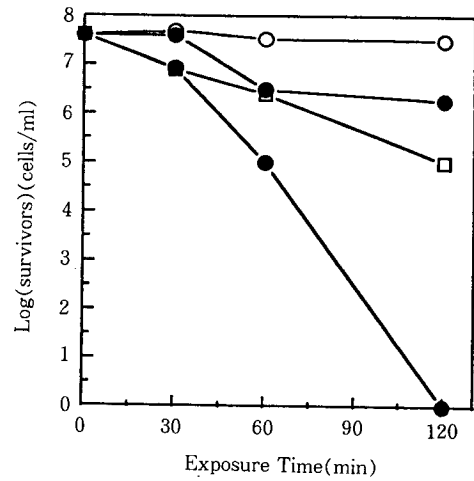
(a)



(a)



(b)



(b)

Fig. 4. Plots of log(survivors) versus exposure time for various chitosan derivatives (Concentration: 100ppm. Buffer: acetate buffer (pH 6.0) against (a) *S. aureus* (b) *E. coli*, (○) blank; (□) chitosan; (●) Trimethyl; (■) Dibutyl chitosan.

상호작용을 일으키기 때문으로 추측할 수 있으며, 특히 *S. aureus*의 경우에 있어서 이러한 경향은 두드러지는데 이것은 *S. aureus*의 세포 표면이 *E. coli*보다 훨씬 더 hydrophobic 하기 때문 [8]으로 생각된다.

Fig. 5. Plots of log(survivors) versus exposure time for various chitosan derivatives (Concentration: 100ppm. Buffer: phosphate buffer (pH 7.1) against (a) *S. aureus* (b) *E. coli*, (○) blank; (□) Trimethyl chitosan; (●) Butyl chitosan; (■) Dibutyl chitosan.

모든 시료에 대해서 그람음성균인 *E. coli*에 비해 그람양성균인 *S. aureus*에 대한 항균능이 더욱 우수함을 알 수 있는데 이는 앞서서도 언급하였듯이 cytoplasmic membrane의 구조상의 차이에서 기인한 것

으로 생각된다.

한편 사용된 그람음성균인 *E. coli*와 그람양성균인 *S. aureus*의 최적 배양조건인 pH 7.1로 배지를 제조 (phosphate buffer 사용)하여 그 항균능을 검토한 결과를 Fig. 5에 각각 나타내었는데, 이 역시 pH 6.0으로 제조한 배지에서와 비슷한 경향을 얻을 수 있었다. 따라서 제조된 배지의 pH에도 그다지 큰 영향은 없었고 제조된 각 고분자 항균제인 chitosan 유도체의 *N*-alkyl화에 영향을 받으며, 이러한 경향은 앞서 언급한 바와 같이 *S. aureus*의 세포표면은 *E. coli*보다 훨씬 더 hydrophobic[8]하기 때문에 *N*-trimethyl기에 비해 *N*-butyl기가 더욱 세포벽과의 흡착능이 높아지고, 또한 이로서 cytoplasmic membrane을 통해 훨씬 빠른 속도로 침투될 수 있음으로서 그 항균력이 증가된다고 생각된다.

이상의 결과로서 Uchida 등[6]이 발표한 *E. coli*와 *S. aureus*에 대한 chitosan 자체의 MIC(최소억제농도) 값이 각각 250ppm, 500ppm인 실험 결과와 비교해 볼때, 4차화 유도체를 합성하므로써 더욱 우수한 고분자 항균제로서의 작용이 기대되며, 또한 chitosan이 희석산에만 용해되는 등 용해성이 제한적이라는 점을 고려해 볼 때 합성한 유도체가 더욱 사용범위가 넓은 유용한 소재라고 생각된다.

4. 결 론

합성한 4차 ammonium기가 도입된 chitosan은 모두 chitosan 보다 우수한 항균력을 나타내었으며 alkyl기의 탄소수가 증가함에 따라서 증가되는 경향을 나타내었다. 특히 이 중 dibutyl기가 도입된 chitosan 유도체에서 가장 우수한 결과를 얻을 수 있었다. 즉 100ppm의 농도에서 그람양성균인 *S. aureus*(ATCC 6538P)와 그람음성균인 *E. coli*(ATCC 14339) 모두 접촉시간이 각각 30분, 60분에서 완전히 사멸됨을 확인 할 수 있었다. 또한, 항균실험에서 그람양성균인 *S. aureus*가 더 빠른 속도로 억제되는

것은 cytoplasmic membrane의 구조상의 차이로 *S. aureus*는 monolayer 인데 반하여 *E. coli*는 bilayer 이기 때문에 polycationic biocide로 사용된 chitosan 유도체가 쉽게 cytoplasmic membrane을 통해 침투될 수 있기 때문으로 생각된다.

감 사

본 연구는 1995년 교육부 신소재분야 연구비 지원으로 수행되었기에 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. K. S. Choi and Y. M. Kim, *Polymer (Korea)*, **9**, 435(1985).
2. C. H. Kim and K. S. Choi, et al., *Korean Ind. & Eng. Chemistry*, **6**, 130(1995).
3. K. S. Choi and H. S. An, *Polymer (Korea)*, **12**, 86(1988).
4. K. S. Choi, *Macromol. Chem., Macromol. Symp.*, **33**, 55(1990).
5. R. A. A. Muzzarelli, C. Jeuniaux, and G. W. Gooday (eds.), "Chitin in Nature and Technology", Plenum Press, New York, NY, 1986.
6. Y. Uchida, *Food Chemical*, **2**, 22(1988).
7. 絲井弘志, "キチン,キトサンの開發と應用", 工業技術會, p. 94, 東京, 日本(1988).
8. T. J. Franklin and G. A. Snow, "Biochemistry of Antimicrobial Action", 58, Chapman and Hall, London(1981).
9. S. Mima, M. Miya, R. Iwamoto, and S. Yoshikawa, *J. Appl. Polym. Sci.*, **28**, 1909(1983).
10. C. H. Kim, B. O. Jung, K. S. Choi, and J. J. Kim, *Korean Ind. & Eng. Chemistry*, **7**, 118 (1996).