

## 수용성 키토산의 항균효과

정 병 옥<sup>†</sup> · 이 영 무 · 김 재 진\* · 최 영 주\*\* · 정 경 자\*\* · 김 제 중\*\* · 정 석 진\*\*

한양대학교 공업화학과, \*한국과학기술연구원 고분자부 생체재료연구센터, \*\*서울산업대학교 식품공학과  
(1998년 10월 1일 접수, 1999년 6월 14일 채택)

### The Antimicrobial Effect of Water Soluble Chitosan

Byung-Ok Jung<sup>†</sup>, Young-Moo Lee, Jae-Jin Kim\*, Young-Ju Choi\*\*, Kyung-Ja Jung\*\*, Je-Jung Kim\*\*, and Suk-Jin Chung\*\*

Department of Industrial Chemistry, Hanyang University, Seoul 133-791, Korea

\*Biomaterial Research Center, Division of Polymer Science, KIST, Seoul 130-650, Korea

\*\*Department of Food Science and Technology, Seoul National University of Technology, Seoul 139-743, Korea

(Received October 1, 1998; accepted June 14, 1999)

요약: 수용성 키토산을 제조하여 적외선 분광광도계를 이용, 구조확인을 하였으며, X-선 회절분석기로 결정성을, 열분석기로 열안정성을 확인을 하였으며, 고유점도법에 의한 점도평균분자량을 측정한 결과  $3.0 \times 10^4$ 와  $4.5 \times 10^4$ 이었다. 점도평균분자량이  $3.0 \times 10^4$ 인 수용성 키토산의 첨가량 따른 일반미생물과 구강미생물에 대한 shaker flask method로 항균효과를 측정한 결과 0.2%의 첨가량에서 *Staphylococcus aureus*와 *Bacillus subtilis*는 81.7%와 80.6%의 항균효과를 *Escherichia coli*는 42.4%의 저해율로 제일 낮은 항균효과를 나타냈으며, 구강미생물인 *Streptococcus mutans*와 *Streptococcus sanguis*는 100%의 항균효과를 *Streptococcus mitis*는 73.8%의 항균효과를 나타냄으로서 일반미생물 보다 구강미생물이 더 우수한 항균력을 나타내었다. 점도평균분자량이  $4.5 \times 10^4$ 인 수용성 키토산은 점도평균분자량이  $3.0 \times 10^4$ 인 수용성 키토산의 1/2 정도의 항균효과를 나타내므로서 점도평균분자량이 작은 수용성 키토산의 항균효과가 월등히 좋았다. 구강미생물의 산도저하 억제효과는 대조군의 경우 배양 후 8분 이내에 pH 7.0에서 4.9로 급격한 pH의 저하를 보인 반면 그 이상에서는 평형을 유지하였으며, 수용성 키토산은 16분 정도까지는 대조군에 비해 현격히 완만한 산도저하 억제효과를 나타내다가 그 이상에서는 평형을 유지하는 것으로 보아 pH 변화에 대한 완충효과가 있음을 알 수 있었다.

**Abstract:** Structure of water soluble chitosan (WSC) was confirmed by Fourier transform infrared spectrometer (FT-IR), X-ray diffractometer and thermal analyser. The viscosity average molecular weight of WSC ranged from  $3.0 \times 10^4$  to  $4.5 \times 10^4$ . Using the WSC having viscosity average molecular weight of  $3.0 \times 10^4$ , the antimicrobial effects against microorganism and oral microorganism showed 81.7% and 80.6% for *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis*, respectively, while the antimicrobial effect exhibited 100% and 73.8% against *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguis*, respectively. Therefore it is concluded that WSC is more effective against oral microorganism than microorganism in terms of antimicrobial effects. WSC sample with the viscosity average molecular weight of  $4.5 \times 10^4$  exhibited a half of the antimicrobial effect of the low MW sample, indicating that the WSC with low MW was better than that with high MW. Chitin and chitosan showed a drastic decrease of acidity from pH 7.0 to 4.9 after 8 minute incubation time and reached an equilibrium after that. WSC, however, restrained pH of the sample from lowering up to about 16 minutes of incubation and reached an equilibrium after that. WSC obviously showed a buffering effect against pH change.

**Keywords:** Chitin, Chitosan, Water soluble chitosan, Antimicrobial

## 1. 서 론

최근 신소재로 각광을 받고 있는 키틴은 새우, 게 등의 갑각류의 외골격과 조류나 균류와 같은 식물의 세포벽에 함유되어 자연계에 널리 분포되어 있는 엽기성 다당류로서 셀룰로오스와 유사한 구조를 가지고 있는 천연고분자 재료로서 생분해성, 생체적합성 및 무해, 무독성 뿐 아니라 여러 약리활성 등으로 의학, 의료분야에 응용가능성이 매우 크다. 그러나, 키틴은 유기용매에 대한 용해성이 좋지 않아서 셀룰로오스만큼 이용되지 못하였지만, 1970년 키틴의 용매 개발과 함께 키틴의 탈아세틸화물인 키토산도 키틴과 유사한 무해·무독성, 생분해성 등의 특성을 지니고 있으며, 회색산 용매 등에 쉽게 용해되는 특징을 이용하여 키틴의 성질을 충분히 활용

할 수 있는 필름, 분리막, 섬유 등으로의 제조에 많은 연구가 진행되게 되었다. 이러한 키틴, 키토산은 그 자체가 제산작용, 콜레스테롤 저하작용 및 중앙 억제작용 등의 약리작용을 나타내기 때문에 약물전달체[1], 혈액응고방지제[2], 인공피부[3], 선별적이기는 하지만 산업폐수 처리용 응집제 및 중금속 흡착제[4,5], 식품첨가제[6] 등의 연구가 진행되고 있는 기능성 재료로서의 가능성이 매우 크다.

이후 키토산 및 그 염산염에 의한 분해물이 식물병원성의 곰팡이에 대한 생육억제효과를 나타내는 것이 밝혀지면서 이들의 항균효과에 대한 연구가 급속히 진행되었다[7-9]. 이와 같이, 키토산 및 그들의 유도체에서 나타나는 항균성은 이들 물질이 가지고 있는 폴리양이온성 및 단백질과의 친화성으로부터 유래된다고 생각할 수 있으며, 그 결과 세균 및 곰팡이에 대한 선택적인 항균성이 나타남을 알 수 있다. 또한 키틴에 아민기를 도입시킴으로써, 아민기와 그 치환된 작용기에 따라 키틴에서는 발현되지 않는 항균성이 나타나며, 그 항균능은 분자량과 도입된 작용성기에 크게 영향을

† 주 저자 (e-mail: bojung@duck.snut.ac.kr)

받는다라는 것이 밝혀졌으며, 키토산에 알킬 길이가 다른 4차 암모늄기를 도입했을 때 알킬기의 길이에 따라 즉, 소수성의 증가에 따라 항균능은 비례하여 증가된다는 것이 보고되고 있다[10,11]. 따라서, 지금까지 발표되고 있는 키토산의 항균성 메카니즘을 종합해보면 키토산은 아민기를 가진 높은 양이온성 고분자이고, 미생물의 세포벽을 구성하는 sialic acid와 인지질 등의 음이온성과 정전기적으로 결합되기 때문에 미생물의 자유도가 구속되어 성장을 억제된다고 한다[12]와 키토산이 저분자화되어 미생물의 세포내로 침투함으로써 유전자 DNA에서 RNA로의 전사를 방해하여 성장을 억제한다[13]는 두 가지로 크게 요약되고 있다.

또한 구강미생물인 *Streptococcus*속들을 억제한다는 보고가 있으며 ion-sensitive field effect transistor(ISFET) electrode를 이용하여 구강내의 pH 저하 억제력을 측정[14], 저분자 키토산을 chewing gum에 첨가했을 때의 pH에 대한 변화[15] 등의 *in vivo* 실험들이 보고되고 있다.

본 연구에서는 키토산의 N-acetyl기의 강한 미셀구조로 인하여 다수의 용매에 용해되지 않는다는 점과 키토산의 탈아세틸화물인 키토산 역시 산에만 용해되어, 우수한 장점을 지니고 있음에도 불구하고 활용 측면에서 제한을 받는데 착안하여 유기용매나 산을 사용하지 않고 물에 잘 용해되는 점도평균분자량이 다른 수용성 키토산을 제조하여 일반미생물과 구강미생물을 선택하여 키토산의 유리 아민기에 의해서 나타나는 것으로 추측되는 항균효과를 점도평균분자량, 첨가량에 의해 항균효과에 어떤 영향을 미치는지를 측정하고 구강미생물의 현탁액을 pH 7로 조정하여 시간이 지남에 따라 어느 정도의 완충작용을 하여 산도저하 억제효과가 있는지를 실험하여 활용가능성을 검토하였다.

## 2. 실험

### 2.1. 시료 및 시약

시료인 키토산은 (주)자광 R. N. C. 테크에서 구입하여 사용하였으며, 구입한 키토산의 탈아세틸화도를 높이기 위하여 Mima[16]의 방법을 사용하였다. 키토산의 탈아세틸화도는 potassium polyvinyl sulfate(PVSK)를 이용한 colloidal 침전법으로 측정하였으며, 이렇게 제조한 키토산을 저자들의 미국 특허[17]에 의하여 점도평균분자량이 다른 수용성 키토산(WSC)을 각각 제조하여 항균효과와 산도저하 억제효과 측정용 시료로 사용하였다.

PVSK, HCl, NaOH는 Wako사제 1급 시약을 toluidine blue는 Certistain사제를 사용하였으며, 기타 시약은 Wako 및 Sigma회사 제품을 그대로 사용하였다.

### 2.2. 분석 및 측정

2.1에서 제조한 시료인 WSC의 구조 분석은 적외선분광도계(FT-IR, Jasco, FT/IR-620)를 이용하여 KBr법으로 확인하였고, 결정성은 X-선 회절분석기(Rikagu Denky, Model RAD-C)를 사용하여 확인하였으며, 열적 성질은 열분석기(Shimadzu Co., Model TGA-50H)를 사용하여 확인하였다.

항균효과 측정을 위하여 생균수는 Artek Counter(Dynatech. Laboratory Ins. Model 880)로 측정하였다.

### 2.3. 점도평균분자량 측정

0.2 M 아세트산, 0.1 M 염화나트륨, 4 M 요소 용액을 각각 용량비(v/v)로 1:1:1로 잘 섞은 후 항량시킨 WSC를 용해하여 각각 0.4%, 0.2%, 0.1%, 0.05%(w/v)가 되도록 희석하여 냉암소 3일간 방치한 후 온도가 25 °C로 일정하게 유지되는 항온조에서 Ubbelohde형 점도계를 사용하여 측정용액이 모세관을 통과하는 시

Table 1. Composition of Nutrient Agar and Brain Heart Infusion Agar

Ingredients	Nutrient Agar	Ingredients	BHI Agar
Agar	15 g	Agar	15 g
Bacto-peptone	10 g	Calf brains	20 g
Beef extract	3 g	Beef heart	25 g
NaCl	5 g	Proteose peptone	2 g
D.W	1000 mL	Disodium phosphate	2.5 g
pH	7.0	NaCl	5 g
		D. W.	1000 mL
		pH	7.4

간을 5회 이상 반복 측정하여 평균을 낸 후, 고유점도[ $\eta$ ]를 계산하고 다음식 (1)에 의하여 분자량을 측정하였다[18].

$$[\eta] = 8.93 \times 10^{-4} M_w^{0.71} \quad (1)$$

### 2.4. 항균효과 시험

시험균으로는 그람 양성균인 *Staphylococcus aureus*(ATCC 65389), *Bacillus subtilis*(ATCC 6633)와 그람 음성균인 *Escherichia coli*(ATCC 8739)와 구강미생물인 *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), *Streptococcus mitis*(ATCC 9811), *Streptococcus sanguis* (ATCC 10556)을 국립보건원과 롯데그룹 중앙연구소로부터 분양받아 사용하였으며, 배지는 nutrient agar(NA)와 brain heart infusion(BHI) agar를 제조하여 사용하였다(Table 1). 시험균주 중 *S. sanguis*는 37 °C에서 48시간 배양하였으며, 다른 시험균들은 37 °C에서 24시간 배양하여 3회 이상 계대배양한 것을 사용하였다. 한천 배지에 WSC를 농도별(0.01~0.30%) 첨가하여 균현 다음 균액을 0.1 mL씩 주입한 후 shake flask법으로 37 °C에서 24시간 및 48시간 배양하여 생균수를 측정하였다.

### 2.5. 산도저하 억제효과 측정

구강미생물인 *S. mutans*, *S. mitis*는 BHI broth 배지에서 37 °C, 24시간, *S. sanguis*는 37 °C, 48시간 액체배양하여 20분 동안 10000×G에서 원심분리한 후 균체를 10 mM 인산완충용액으로 2회 수세하고 생리식염수로 희석하여 660 nm에서 흡광도를 측정하여 일정한 균수가 되도록 하여 균 현탁액 2 mL와 0.05% MgCl<sub>2</sub> 1 mL을 섞어 0.01 N-NaOH로 pH 7로 조정하여 37 °C에서 예비 배양하고 생리식염수로 만든 5% glucose 용액을 2 mL 첨가한 후 진탕배양 하면서 37 °C에서 2분 간격으로 20분간 pH의 변화를 측정하여 대조군으로 하였으며, 실험군은 같은 방법으로 5%의 glucose와 점도평균분자량이 다른 WSC를 2% 첨가하여 산도저하 억제효과를 측정하였다.

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1. WSC의 구조확인 및 점도평균분자량 측정

2.1에서 제조한 시료인 WSC의 구조확인 및 물성측정은 적외선 스펙트럼, X-선 회절분석기, 열중량분석기를 이용하여 확인하였다. 키토산과 키토산의 적외선 스펙트럼을 Figure 1에 나타내었다. Figure 1에서 보면 키토산(a)의 경우는 3447 cm<sup>-1</sup>에서 broad한 -OH stretching, 3264 cm<sup>-1</sup>에서 -NH stretching, 1650, 1550, 1310 cm<sup>-1</sup>에서 아마이드 I, II, III 흡수띠가 나타난 것으로 미루어 키토산이 제조되었음을 확인할 수 있었으며, 이 키토산을 탈아세틸화하여 얻은 키토산의 경우는 키토산에서 나타나는 아마이드의 특성 피크가 거의

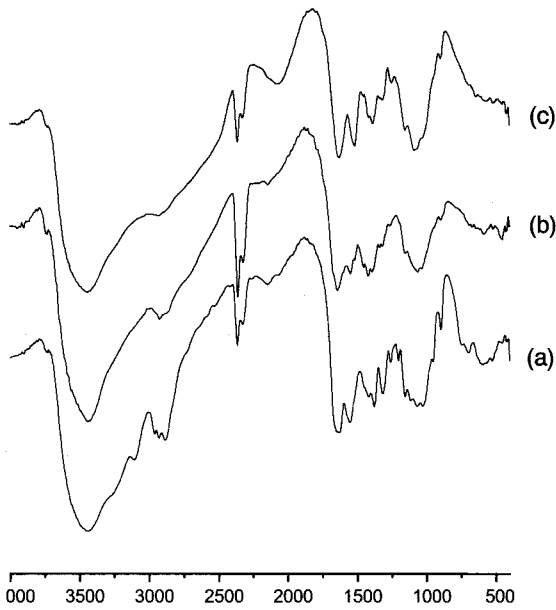


Figure 1. FT-IR spectra of (a) chitin, (b) chitosan, and (c) WSC.

없어지고 1590  $\text{cm}^{-1}$  부근에서  $-\text{NH}_2$ 의 흡수띠가 나타난 것으로 미루어 키토산이 제조되었음을 확인할 수 있었다. 점도평균분자량이 다른 2종류의 WSC의 탈아세틸화도를 측정된 결과 모두 95% 이상이였으며, 고유점도법에 의해 측정된 점도평균분자량은 각각  $3.0 \times 10^4$ 과  $4.5 \times 10^4$ 이었다.

키틴, 키토산, WSC의 X-선 회절분석기로 결정성을 분석한 결과를 Figure 2에 나타내었다. Figure 2에서  $\alpha$ -키틴의 회절에 의한 결정성 피이크 (a)를 나타낸 것으로  $2\theta = 9.8^\circ$ 에서 (020),  $18^\circ$  부근에서 (110),  $20.5^\circ$ 에서 (101),  $25^\circ$ 에서 (130),  $27^\circ$ 에서 (013) 결정면으로 나타났으며, 이중  $9.8^\circ$ 와  $18^\circ$ 의 강한 특성 피이크가 나타났다.  $\alpha$ -키틴을 탈아세틸화하여 얻은 키토산의 특성 피이크인 (b)의 결정구조를 살펴보면  $2\theta = 9.8^\circ$ 의 피이크와  $18.5^\circ$  부근의 결정성 피이크만 나타나고 그외의 결정성 피이크는 결정의 파괴로 인하여 소멸이 된 것으로 생각되며, WSC인 (c)는 키틴과 키토산에서 강하게 나타났던  $2\theta = 9.8^\circ$ 와  $18.5^\circ$  부근의 결정성 피이크가 없어지므로써 결정이 완전히 파괴되었음을 관찰할 수 있었다. 키토산이 수용성으로 되는 과정에서 점도평균분자량이 작아지면서 키토산 자체의 분자간 및 분자내의 강한 수소결합의 파괴에 의한 결정성이 감소되는 것으로 생각된다[19].

키틴과 키토산 및 WSC의 열중량 분석(thermal gravimetric analysis, TGA)을 통해서 열적성질을 비교한 결과를 Figure 3에 나타내었다. Figure 3에서 보면 모든 측정 시료가  $100^\circ\text{C}$  부근에서부터 물분자의 이탈로 인한 무게 감소 현상이 나타나기 시작하다가 키틴(a)의 경우는  $350^\circ\text{C}$  부근에서 급격히 무게 감소를 수반하는 초기 분해온도가 나타났으며, 탈아세틸화시켜 제조한 키토산(b)은 분해온도가  $290^\circ\text{C}$  로 낮아졌으며, WSC(c)의 분해온도가  $210^\circ\text{C}$  로 키틴과 비교하면 분해온도가 현저히 낮아지면서 낮은 열안정성을 나타냈다. 이러한 경향은 고분자 분자내 수소결합력의 감소로 인해 분해온도가 감소되는 것으로 사료된다[19]. WSC으로 되는 과정에서 저분화되면서 고분자 사슬사이의 상호인력이 감소되어 열적 안정성이 감소되는 것으로 추측되며, 이와 같은 결과는 X-선회절분석 결과에서 나타난 분자내 수소결합의 변화에 따른 결정성이 파괴되는 경향과 일치하므로써 WSC가 제조되었음을 확인하였다.

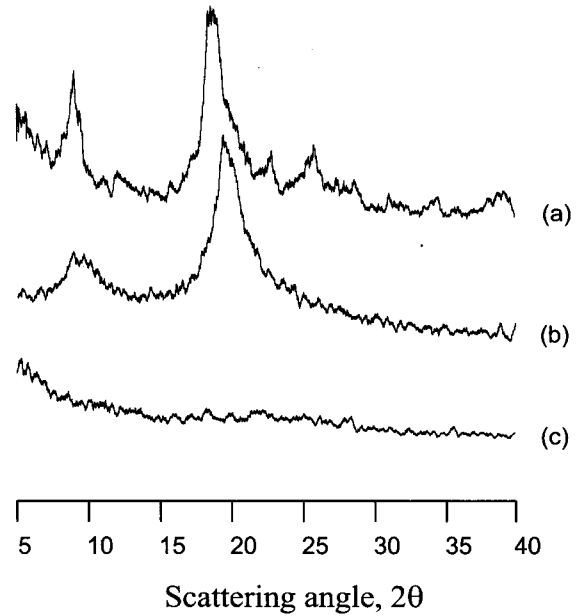


Figure 2. X-ray diffraction patterns of (a) chitin, (b) chitosan, and (c) WSC.

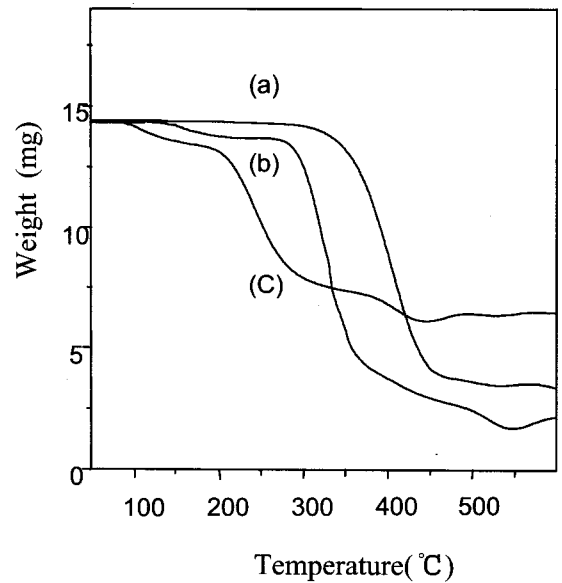


Figure 3. TGA thermogram of (a) chitin, (b) chitosan, and (c) WSC.

3.2. 항균효과 측정

실험에 사용된 일반미생물은 *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli*와 구강미생물인 *S. mutans*, *S. mitis*, *S. sanguis*를 공시균주로 하여 WSC (a)와 (b)의 첨가량 변화에 따른 생균수를 측정된 결과는 Table 2와 3에 나타내었다. Table 2는 점도평균분자량이  $3.0 \times 10^4$ 인 WSC의 첨가 농도를 0.01~0.3%로 변화시키면서 최소저해 농도를 결정하였다. 그람양성균인 *S. aureus*와 *B. subtilis*는 첨가량이 증가할수록 항균효과가 증가하는 경향을 나타내고 있는데 0.3%의 첨가 농도에서 각각 86.4%와 84.2%의 저해효과를 보이는 반면, 그람음성균인 *E. coli*는 첨가량이 0.01%에서는 저해효과가 나타나지 않지만 그 이상의 첨가 농도에서는 첨가 농도가 증가할수록 항균효과는 증가하였으나 그람양성균인 *S. aureus*, *B. subtilis*에 비

**Table 2.** The Antibacterial Effect Evaluated by Shake Flask Method of Water Soluble Chitosan Average Molecular Weight ( $3.0 \times 10^4$ ) Determined by Viscosity

Strains	Inhibition(%)					
	Amount of added(w/v, %)					
	0.01	0.03	0.05	0.10	0.20	0.30
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 65389)	46.6	51.2	65.5	81.7	81.7	86.4
<i>Bacillus subtilis</i> (ATCC 6633)	49.1	57.8	63.6	79.1	80.6	84.2
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 8739)	- <sup>a)</sup>	13.5	18.4	32.9	42.4	42.1
<i>Streptococcus mutans</i> (ATCC 25175)	58.7	64.9	81.6	98.3	100	100
<i>Streptococcus mitis</i> (ATCC 9811)	36.3	41.7	58.4	64.6	73.8	74.1
<i>Streptococcus sanguis</i> (ATCC 10556)	52.1	54.6	86.1	94.2	100	100

<sup>a)</sup> Not detected

$$* \text{ Inhibition rate(\%)} = \frac{\frac{A+C}{2} - B}{\frac{A+C}{2}} \times 100$$

\* A : Microbial number from shaker flask test after incubating for 24 hrs at 37 °C without shaking

\* B : Microbial number from shaker flask test after incubating for 24 hrs at 37 °C with shaking for 1 h

\* C : Microbial number from shaker flask test after incubating for 24 hrs at 37 °C without shaking(controlled no chitosan)

**Table 3.** The Antimicrobial Effect Evaluated by Shake Flask Method of Water Soluble Chitosan Average Molecular Weight ( $4.5 \times 10^4$ ) Determined by Viscosity

Strains	Inhibition(%)					
	Amount of added(w/v, %)					
	0.01	0.03	0.05	0.10	0.20	0.30
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 65389)	- <sup>a)</sup>	-	11.5	29.2	37.3	48.7
<i>Bacillus subtilis</i> (ATCC 6633)	-	-	8.6	23.6	42.6	47.6
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 8739)	-	-	-	12.3	34.1	34.8
<i>Streptococcus mutans</i> (ATCC 25175)	-	14.9	21.5	42.4	54.5	56.3
<i>Streptococcus mitis</i> (ATCC 9811)	-	7.9	18.1	28.5	31.2	34.7
<i>Streptococcus sanguis</i> (ATCC 10556)	-	12.3	19.8	38.2	49.8	53.1

<sup>a)</sup> Not detected

$$* \text{ Inhibition rate(\%)} = \frac{\frac{A+C}{2} - B}{\frac{A+C}{2}} \times 100$$

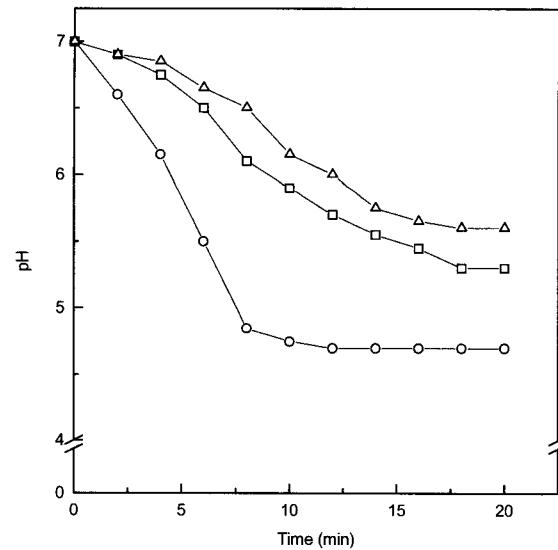
\* A : Microbial number from shaker flask test after incubating for 24 hrs at 37 °C without shaking

\* B : Microbial number from shaker flask test after incubating for 24 hrs at 37 °C with shaking for 1 h

\* C : Microbial number from shaker flask test after incubating for 24 hrs at 37 °C without shaking(controlled no chitosan)

해 50% 정도의 항균효과를 나타냄으로서 그람양성균이 그람음성균보다 우수한 항균효과를 나타냈다. Chen[20]은 본 실험에서 보다 첨가 농도가 적은 키토산 0.01%를 첨가하여 대조군과 비교하면 2일간 증식이 억제되고, 0.02% 이상의 첨가 농도에서는 *E. coli*의 생육이 완전히 억제된다는 보고와는 일치하지 않았는데, 이는 WSC의 점도평균분자량의 차이와 *E. coli*의 strains number가 다른 것에서 오는 현상으로 생각된다.

구강미생물인 *S. mutans*와 *S. sanguis*는 WSC의 첨가 농도가 0.2% 이상에서는 100%의 항균효과를 나타내었으나, *S. mitis*의 경우는 0.2%의 첨가 농도에서 73.8%의 항균효과를 나타냄으로서 구강미생물 중에서 가장 낮은 항균효과를 나타내었다. 그렇지만 그람음성균인 *E. coli* 보다는 훨씬 우수한 항균효과를 나타냈으며, 모든 균주가 WSC의 첨가 농도가 증가함에 따라 항균효과와 차이는



**Figure 4.** pH fall reducing activity of WSC in cell suspension of *Streptococcus mutans*; ○ : control(glucose), △ : WSC( $3.0 \times 10^4$ ), □ : WSC( $4.5 \times 10^4$ ).

있지만 증가하는 것으로 나타났다.

구강미생물들은 그람양성균이 그람음성균보다 우수한 항균효과를 나타내고 있는데 이는 세포질막 구조상의 차이로 그람음성균보다 그람양성균이 빠른 속도로 세포내에 침투될 수 있으며, 그람양성균의 세포 표면은 그람음성균인 *E. coli*보다 훨씬 강한 소수성이기 때문에 그람양성균이 우수한 항균효과를 나타낸 것으로 생각된다[21,22].

Table 3은 점도평균분자량이  $4.5 \times 10^4$ 인 WSC의 첨가 농도에 따른 그람양성균들과 그람음성균의 항균효과를 나타낸 것이다. 구강미생물인 *S. mutans*, *S. mitis*, *S. sanguis*를 제외한 일반미생물들은 WSC의 첨가 농도가 0.03%까지는 항균효과를 나타내지 않았지만 첨가 농도가 증가할수록 항균효과가 증가하고 있다. 그렇지만 점도평균분자량이  $3.0 \times 10^4$ 인 WSC와 비교하면 전반적으로 50% 정도의 항균효과를 나타냄으로서 WSC의 점도평균분자량이 항균효과에 영향을 미치는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 탈아세틸화도가 높을수록, 점도가 낮을수록 우수한 항균효과를 나타낸다는 Saito[23] 등의 연구결과와도 같은 경향을 나타낸다.

### 3.3. 산도저하 억제효과 측정

구강미생물인 *S. mutans*, *S. mitis*, *S. sanguis*를 배양하여 균 현탁액을 pH7로 조제한 후 대조군으로 glucose와 시약액인 WSC를 각각 2% 용액으로 제조하여 37 °C에서 진탕배양하여 2분 간격으로 pH의 변화를 측정된 결과를 Figures 4, 5, 6에 나타내었다.

점도평균분자량이  $3.0 \times 10^4$ 와  $4.5 \times 10^4$ 인 WSC를 *S. mutans*현탁액에 첨가하여 시간이 지남에 따른 pH의 변화를 Figure 4에 나타내었다. Figure 4에서 보면 대조군인 glucose의 경우는 8분 이내에 pH 4.8로 급격히 감소하다가 그 이상에서는 시간에 관계없이 거의 평형을 이루었다. 반면 WSC의 경우는 16분까지는 서서히 pH의 감소를 나타내다가 그 이상에서는 거의 평형을 이루었으나 점도평균분자량이 작은 WSC가 산도저하 억제효과가 좋았다. 이는 키토산이 균의 생육을 억제하기 때문에 산도저하 억제효과를 나타내는 것으로 생각되며 키토산이 *S. mutans*의 생육을 억제한다는 Sano[24]의 연구결과와도 일치한다.

Figure 5는 *S. mitis* 현탁액의 산도저하 억제효과를 나타낸 것으로 대조군은 8분까지는 급격한 산도저하를 나타내다가 그 이상에

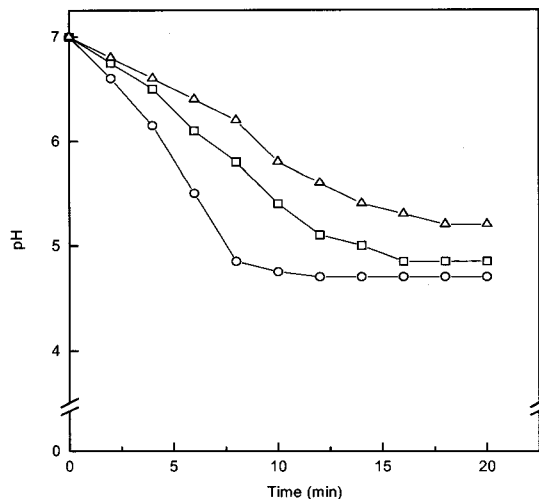


Figure 5. pH fall reducing activity of WSC in cell suspension of *Streptococcus mitis*; ○ : control(glucose), △ : WSC( $3.0 \times 10^4$ ), □ : WSC( $4.5 \times 10^4$ ).

서는 평형을 유지하고 있다. WSC는 16분까지는 서서히 산도저하 억제효과를 나타내다가 16분 이상에서는 대조군과 WSC가 근소한 차이의 산도저하 억제효과를 나타내었다. Figure 6은 *S. sanguis* 현탁액에 대한 산도저하 억제효과를 나타낸 것으로 *S. mutans*의 산도저하 억제효과와 같은 경향을 나타내고 있는 반면, *S. mitis*는 구강미생물중 가장 저조한 산도저하 억제효과를 나타내고 있는데 이는 항균효과 시험과 같은 결과이며 점도평균분자량이 작은 WSC가 점도평균분자량이 큰 WSC보다 다소 높은 산도저하 억제효과를 나타내고 있다. 이는 탈아세틸화도가 높을수록, 저분자 키토산은 치구(dental plaque)에 침투성이 좋을수록 좋다는 것과 치구를 통한 탄수화물의 확산비는 그들의 분자량과 밀접한 관계가 있다고 한 결과[25,26]와 같은 경향을 나타내었다.

4. 결 론

키토산이 특정한 용매나 약산에만 용해하는 단점을 개선하기 위해 수용성 키토산을 제조하여 그람양성균과 그람음성균의 항균효과를 측정하였으며, 그 중에서 구강미생물을 이용하여 산도저하 억제효과를 비교 검토하였다.

1) 제조한 수용성 키토산의 구조확인인 기기분석을 통하여 확인하였으며, 점도평균분자량을 측정된 결과  $3.0 \times 10^4$ 와  $4.5 \times 10^4$ 인이었다.

2) 점도평균분자량이  $3.0 \times 10^4$ 인 수용성 키토산은 일반미생물인 *Staphylococcus aureus*와 *Bacillus subtilis*의 경우 0.2% 첨가량에서 80% 항균효과를 *Escherichia coli*는 42%의 항균효과를 나타낸 반면 구강미생물인 *Streptococcus mutans*와 *Streptococcus sanguis*는 100%의 항균효과를 나타냈으며, *Streptococcus mitis*는 73.8%의 항균효과를 나타냈다. 점도평균분자량이  $4.5 \times 10^4$ 인 수용성 키토산은 점도평균분자량이  $3.0 \times 10^4$ 인 수용성 키토산에 비해 50% 정도의 항균효과를 나타냄으로서 점도평균분자량이 작은 수용성 키토산이 훨씬 우수한 항균효과를 나타냈다.

3) 구강미생물의 산도저하 억제효과는 대조군인 glucose는 8분까지는 급격한 pH 감소를 나타내다가 그 이상에서는 평형을 이루는 반면, 수용성 키토산은 16분까지는 서서히 감소하다가 그 이상에서 평형을 이루었다. 또한 *S. mutans*와 *S. sanguis*는 비슷한 산도저하 억제효과를 보인 반면, *S. mitis*는 가장 낮은 산도저하 억제효과를

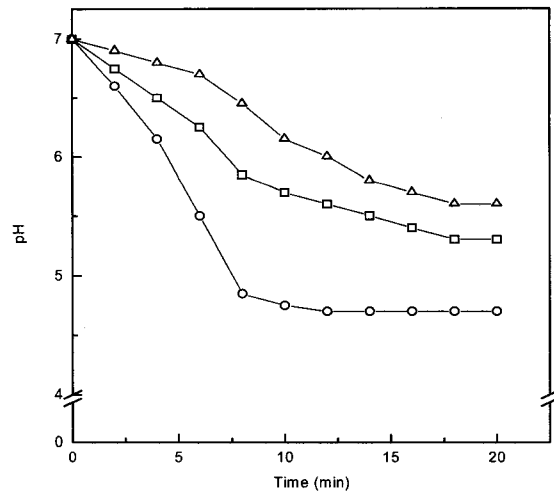


Figure 6. pH fall reducing activity of WSC in cell suspension of *Streptococcus sanguis*; ○ : control(glucose), △ : WSC( $3.0 \times 10^4$ ), □ : WSC( $4.5 \times 10^4$ ).

나타냈으며, 점도평균분자량이 작은 수용성 키토산이 pH변화에 대한 완충작용이 더 효과적으로 나타났다.

참 고 문 헌

1. R. A. A Muzzarelli, Chitin, Pergamon Press, Oxford(1977).
2. S. Hirano and Y. Noisiki, *J. Biomed. Mat. Res.*, **19**, 413 (1985).
3. K. Kojima, M. Yoshikuni, and T. Suzuki, *J. Appl. Polym. Sci.*, **24**, 1587(1979).
4. C. H. Kim, B. O. Jung, K. S. Choi, and J. J. Kim, *J. Korean Ind. Eng. Chem.*, **7**, 118(1996).
5. B. O. Jung and T. S. Chung, *J. Korean Ind. Eng. Chem.*, **9**, 451(1998).
6. M. A. Bough, *Food Product Development*, **11**, 90(1977).
7. C. R. Allan and L. A. Hadwiger, *Exp. Mycol.*, **3**, 285 (1979)..
8. D. F. Kendra and L. A. Hadwiger, *Exp. Mycol.*, **8**, 276 (1984).
9. Y. Uchida, *Food Chemical*, **2**,22(1988).
10. C. H. Kim, S. Y. Kim, and K. S. Choi, *Polym. Adv. Technol.*, **8**, 319(1997).
11. C. H. Kim, J. W. Choi, H. J. Chun, and K. S. Choi, *Polym. Bull.*, **38**, 387(1997).
12. S. W. Fang, C. F. LI, and D. Y. C. Shin, *J. Food Protection*, **57**, 136(1994).
13. M. G. Shepherd et al., in *Microbial Cell Wall Synthesis and Autolysis*, ed. by C. Nombela, p. 73, Elsevier Science Publishers(1984).
14. K. I. Shibasaki, H. Sano, T. Matsukubo, and Y. Takaesu, *Bull. Tokyo dent., Coll.*, **35**, 33(1994).
15. K. I. Shibasaki, H. Sano, T. Matsukubo, and Y. Takaesu, *Bull. Tokyo dent., Coll.*, **35**, 61(1994).
16. S. Mima, M. Miya, R. Iwamoto, and S. Yoshikawa, *J. Appl. Polym. Sci.*, **28**, 1909(1983).
17. S. B. Seo, et al., US Patent 5,730,876(1992).
18. S. K. Cho, S. J. Kim, B. O. Jung, J. J. Kim, K. S. Choi, and

- Y. M. Lee, *J. Korean Ind. Eng. Chem.*, **5**, 899(1994).
19. R. D. Deanin, *Polymer Structure, Properties and Application*, p. 311, Cahners Press, USA(1972).
  20. G. C. Chen and B. R. Johnson, *Appl. Environ. Microbial.*, **46**, 13(1983).
  21. 竹本喜一, 砂本順三, 明石 滿, *高分子と医療*, p. 459, 三田出版會, 東京(1989).
  22. T. J. Franklin, G. A. Black, and V. E. Davision, *Microbiology Principles & Applications*, Chapter 14, p. 337, Prentice Hall, New Jersey(1990).
  23. K. Saito, M. Shimojoh, and K. Fukushima, "Growth inhibition of chitosan from suid pen against oral Streptococci", *Chitin, Chitosan Report*, p. 77(1994).
  24. H. Sano, T. Matsukubo, K. Shibasaki, H. Itoi, and Y. Tadaesu, *Bull. Tokyo Dent. Coll.*, **32**, 9(1991).
  25. K. Shibasaki, H. Sano, T. Matsukubo, and Y. Takaesu, *Bull. Tokyo Dent. Coll.*, **35**, 33(1994).
  26. A. Tatevossian and E. Newbrun, *Archs. Oral Biol.*, **28**, 109 (1983).