

키토산을 함유한 알긴산 칼슘 마이크로캡셀의 항균효과

양재현[†] · 임종필

우석대학교 약학대학

(1998년 7월 6일 접수)

Antibacterial Effect of Calcium Alginate Microcapsule Containing Chitosan

Jae-Heon Yang[†] and Jong-Pil Lim

College of pharmacy, Woosuk University, Chonju 565-800, Korea

(Received July 6, 1998)

The inhibition rate of bacteria growth per molecular weight was higher according as the molecular weight increased, the rate was the highest at the molecular weight 200,000. Microcapsule of ionized calcium was able to be produced by molecular weight 15,000, 30,000, 50,000 and 200,000 of chitosan which was dried for 48 hours after melting it in 2% of acetic acid, adding ionized calcium and controlling pH 1.2. The size of ionized calcium microcapsule was between 200 and 300 μm , the solvency, concentration and the content showed big difference by the molecular weight of chitosan. The inhibition rate of bacteria growth of microcapsule designated high in Gram positive, which was high in *S. aureus*, *S. epidermidis* and *Bacillus subtilis*, low in *S. mutans*, high in *C. albicans* in fungi, low in *A. niger*. The inhibition rate of bacteria growth of chitosan was comparatively high in Gram positive, low in *S. mutans* and it showed high numerical value in *C. albicans* of fungi. The rate recorded good result at molecular weight 200,000 relatively, there was no difference according to the molecular weight. The inhibition rate of bacteria growth according to the concentration of the microcapsule increased differently between 1,000~10,000 $\mu\text{g/ml}$, it showed antibacterial activity close to the inhibition rate of growth of chitosan rather than ionized calcium. The minimum inhibitory concentration marked the highest in the mixture of chitosan and ionized calcium for all kind of bacteria generally, there was a little difference between yeast and fungi.

Keywords—Chitosan, Alginate microcapsule, Antibacterial, Inhibition rate

최근 산업계에서는 기능성 식품에 대한 관심이 고조되고 있고, 이에 관련된 분야로서 식품을 소재로 한 의약품 개발이 활발히 진행되고 있다.

키토산은 천연에 존재하는 다당류로서 최근에 특히 주목을 받고 있는 신 기능성 소재이다. 자연계내 유일하게 분포하는 염기성 폴리머인 키토산은 갑각류의 외골격을 이루는 주요 구성물질로서 N-Acetyl-D-glucosamine이 β -1, 4로 결합한 무코다당의 일종이며, 키토산은 키토산에 존재하는 아세틸기가 제거된 구조식을 갖고 있다.

이 고분자 물질의 중합도는 적어도 분자량 1,000이상이며 기질의 출처나 추출방법에 따라 상당한 차이를

나타낸다. 지금까지 키토산의 연구 및 이용은 대부분 폐수처리 및 오염물질의 제거 등에 관한 고분자 소재로서의 이용이 압도적으로 많았다.¹⁾ 그러나 최근 키토산이 항균활성,²⁾ 항종양 활성,³⁾ 콜레스테롤 저하작용⁴⁾ 및 고혈압 억제작용⁵⁾ 등 여러 가지 생리활성을 발현한다는 사실이 주목되고 있어 이에 대한 관심은 점차적으로 증가하고 있다.

키토산의 재원은 주로 게, 새우, 가재 등 갑각류 등에서 얻어지고 키토산의 acetyl group이 deacetylation된 화합물이며, 항균작용 및 곰팡이에 대한 억제작용이 보고되어 있어 식품의 부패방지 및 보존성 향상에 기여할 수 있으나 키토산의 분자량에 따라 물리적인 성질이 달라지며 항균효과 및 보존성에 큰 차이를 보여준다.

키토산은 매우 다양한 기능성을 나타내고 있지만 응

[†]본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로

용에 있어서는 많은 문제점들이 있다. 먼저, 키토산이 높은 항균활성을 가지고는 있지만 키토산의 체내 흡수율이 극히 미흡한 점을 고려해 볼 때 단지 식품보존제로서의 이용에 제한될 수밖에 없어 의약품 소재로서의 응용을 위해서는 체내 흡수가 용이한 올리고당에 의한 기능발현을 검토해 볼 필요성이 제시되고 있다.

키토산은 항균활성이 매우 높은 천연 다당류로서 알려져 있지만, 그 자체는 수용액 상태에서 녹지 않고 또한 대단히 고분자 물질이므로 섭취하더라도 인체 내에서 분해할 수 있는 효소가 없어 거의 대부분이 흡수되지 못하기 때문에 생체 내에서의 이용에 제약을 받았다. 그러나 키토산이 올리고당으로 가수분해되면 수용액에 대단히 잘 녹으며, 또한 체내흡수율도 그만큼 높아지게 되므로 올리고당으로서의 항균활성의 검토가 요구된다.

칼슘이온은 인체 필수원소의 하나로 인체에서 뼈, 치아의 생성, 세포막 투과성 조절, 세포분열, 전기적 흥분 등에 관여하고 부족시 대표적인 증상은 골다공증 등을 유발한다.

이온 칼슘은 천연의 굴 껍질을 통전처리한 후 분쇄하여 미분말상태로 만든 제품으로써 황색포도상구균, 대장균, 장염균, 장티푸스균 등에 대한 항균작용이 보고⁶⁾되어 있고, *Saccharomyces*속을 위시킨 효모 및 *Aspergillus*속을 위시킨 곰팡이 등에 대한 증식 억제 작용이 알려져 있어서 각종 식품의 보존제로 첨가될 뿐 아니라 체내 칼슘보존제로서도 그 이용 가능성이 높아지고 있다.

알긴산은 2가 양이온에 의해서 투명한 구형의 겔을 형성한다. 알긴산 나트륨의 용액에 칼슘 이온을 넣었을 때, 2개의 나트륨이온과 1개의 칼슘 이온의 양이온 결합에 의해 교차결합을 형성한다. 이때 겔을 유도하는 2가 금속에는 칼슘 외에도 마그네슘, 바륨, 카드뮴, 동, 아연, 코발트, 니켈 등이 있다. 건조되어 수축된 알긴산 마이크로캡셀은 pH 7.0의 인산염 완충액에서 원래의 크기 이상으로 재팽윤하며, 증류수나 pH 1.6의 염산 용액에서는 재팽윤이 일어나지 않으므로 건조된 겔 마이크로캡셀은 위에서는 그 형태를 유지하다가 소장으로 옮겨져 재팽윤이 일어나며, 함유된 약물의 방출을 조절할 수 있다. 알긴산 마이크로캡셀의 장점은 1) 제조법이 간단하다. 2) 제조조건이 순해서 polypeptide drug나 enzyme 등과 같이 불안정한 약물이 제조과정에서 파괴될 위험이 적다. 3) 고분자 약물에 도 적용할 수 있다. 4) alginate 기체 자체는 인체에

무해하고 저렴하므로 경제적이다. 5) 약물의 방출을 지속적으로 제어할 수 있으며, 산성에서는 매우 안정하여 거의 수화되지 않는 반면 알칼리성에서는 쉽게 수화되어 용해되므로 산에 불안정한 약물에 적용하기가 적합하다. 6) 적당한 크기로 조절하여 방출된 약물이 한 곳에 편중되는 것을 막는다. 7) 경구용으로 무해하다. 등의 특성이 있다.

따라서 본 연구실에서는 이온칼슘과 알긴산염을 사용하여 키토산을 함유한 마이크로 캡셀을 제조한 후 이들의 그람양성 및 음성균에 대한 항균력, 효모 및 곰팡이에 대한 억제작용을 키토산의 각 분자량별로 비교 검토하여 보고하고자 한다.

실험방법

재료

실험에 사용한 chitosan은 분자량 15,000, 30,000, 50,000, 200,000으로 한국키토산에서 분양 받았으며, Ion-calcium은 하이세이-S(カイボウ株式会社, Japan)를 사용하였고 Sodium alginate는 國産化學株式會社(동경, Japan)를 사용하였으며, 그 외 시약은 특급 또는 일급시약을 사용하였다.

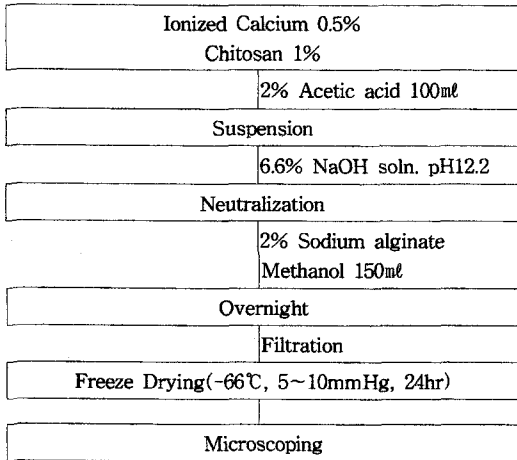
균주

본 실험에 사용한 균주는 한국중균협회로부터 분양 받은 후 실험에 사용하기전 3회 계대하여 사용하였다. 배양 특성 실험에 사용한 배지는 nutrient broth (DIFCO, USA)를 사용하였다.

- 1) *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538)
- 2) *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228)
- 3) *Streptococcus mutans* (ATCC JC-2)
- 4) *Bacillus subtilis* (ATCC 6633)
- 5) *Escherichia coli* (ATCC 10536)
- 6) *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 10490)
- 7) *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 10031)
- 8) *Candida albicans* (ATCC 36801)
- 9) *Aspergillus niger* (ATCC 32656)

Microcapsule의 제조

키토산을 함유한 alginate microcapsule의 제조는 Ion-calcium 0.5g와 키토산 1g를 2% 초산 100 ml에 녹인 현탁액을 6.6% 수산화나트륨용액(pH 12.2)에 중화시킨 혼합용액에 메탄올을 첨가한 후 calcium alginate capsule이 형성될 때까지 하룻밤 방치하고 여과한 다음 48시간 동안 동결건조(Ishin FD5508, Korea)하였다



Scheme I—Preparation of chitosan microcapsules loaded ionized calcium and sodium alginate.

(Scheme D. Microscopy(ZEISS AXIOVERT-25CFL, West Germany)로 microcapsule의 단면을 관찰하였다.

세균성장억제를 측정

이온 칼슘과 키토산의 분자량별 항균력 측정 및 키토산을 함유한 microcapsule의 항균력 측정은 nutrient broth를 test tube에 취하고, 동결건조된 키토산을 함유한 alginate microcapsule을 농도별로 각각 첨가한 후 시험균을 4%(v/v)되게 접종한 후 37°C의 CO₂ 항온기에서 48시간동안 배양하면서 경시 적인

균의 생육을 Spectrophotometer(SMART 190DUV, Korea)를 이용하여 620 nm에서 optical density로 측정해서 다음 식에 의해 세균의 성장억제율⁷⁾을 산출하였다. 시료를 넣지 않고 배지에 균만 배양시킨 것을 공시험으로 하였으며, ionized calcium, microcapsule, sodium benzoate를 대조군으로 하였다(Scheme II).

Inhibition rate of growth (%)

$$= \frac{(S - C)}{(100 - C)} \times 100$$

C: Transmittance of control

S: Transmittance of sample

최소발육저지농도 측정

각 시료에 대한 최소 발육 저지 농도 측정은 고체배지 희석법(Agar serial dilution method)⁸⁾으로 하였다. 시험용 균을 사면 Nutrient agar에 37°C에서 18시간 동안 3회 계대배양한 후 0.9% NaCl용액으로 적당히 희석시켜 배양액의 탁도가 표준탁도기준(turbidity standard, 투과율 35%)과 같도록 조절하여 각각의 균액으로 하였다.

Petri dish에 membrane filter(0.2 μm)를 통과시킨 각각의 시료를 키토산을 함유한 alginate microcapsule을 기준으로 하여 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25 μg/ml가 되도록 2배씩 단계적으로 희석하여 2 ml씩 넣고 멸균한 Mueller Hinton Agar를 18 ml씩 가해 잘 섞어 균한 후 위의 균액을 5 μl씩 자동분주기로 접종하였다. 그리고 37°C에서 18시간 배양시켜 균주의 증식을 억제한 최소농도를 육안으로 관찰하였다.

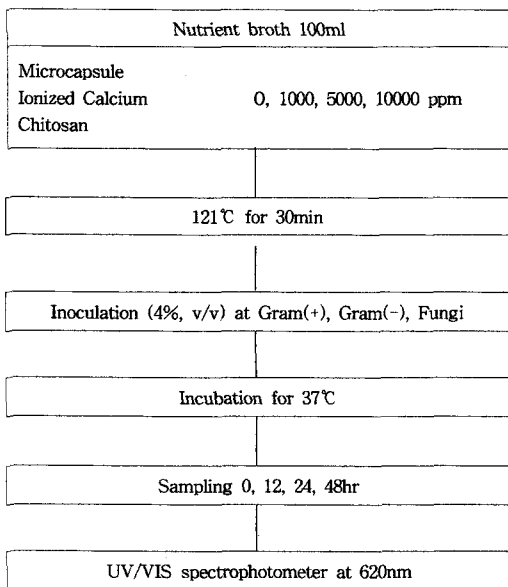
결과 및 고찰

Microcapsule의 현미경 관찰

제조한 직후 키토산을 함유한 alginate microcapsule의 표면을 현미경 관찰한 결과는 Figure 1과 같다. Microcapsule의 크기는 직경 3,000~3,500 μm였고 중량은 15.5~17.4 mg였으며, 이것을 -66°C 10~15 mmHg에서 24시간동안 동결건조한 후의 microcapsule의 크기는 직경 2,000~2,500 μm였고 중량은 2.4~3.9 mg였다(Figure 1).

세균성장억제를

이온 칼슘과 키토산의 분자량별, 키토산(M.W. 200, 000)을 함유한 alginate microcapsule이 Gram(+), Gram(-), Fungi의 생육에 미치는 억제효과를 평가하



Scheme II—Experiment of inhibition rate of microbial growth.

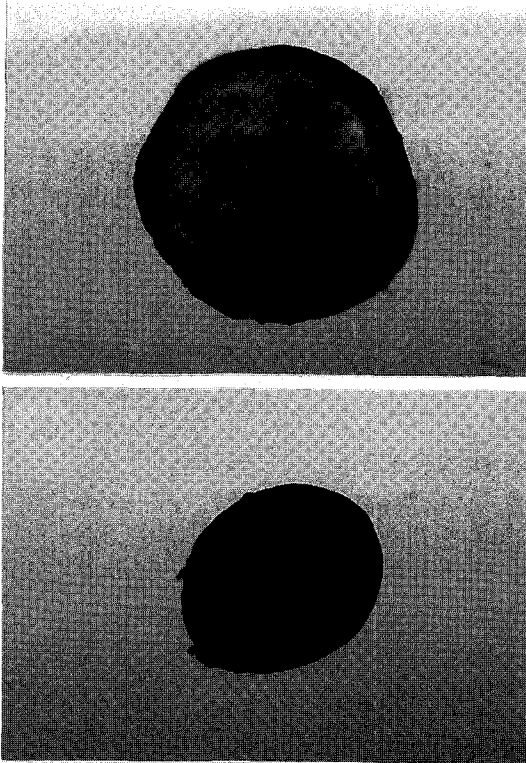


Figure 1—Photomicrographs of microcapsules: before and after freeze drying($\times 200$).

기 위해 nutrient broth에 alginate microcapsule을 0, 1,000, 5,000, 10,000 ppm되게 첨가하고 경시 적으로 측정된 Gram(+), Gram(-), Fungi의 생육정도는 Table I~III과 같다.

키토산 분자량별로 실험한 결과는 Table I과 같다. 키토산 분자량별로 시험한 9종의 균에 대해 분자량 200,000에서 높은 세균 성장 억제율을 보였으나, *Staphylococcus aureus*와 *Streptococcus mutans*에서는 낮은 세균 성장 억제율을 보였다. 세균 성장 억제율은 그람양성균에서 비교적 높게 나타났으며, 그람음성균은 대부분 병원성 균으로서 키토산에 의해서 매우 효과적으로 생육이 저해된다는 전 등의 보고⁹⁾와는 상반되었다(Table I).

이상의 항균활성에 대한 검토에서 키토산은 지금까지 알려진 보고와 마찬가지로 모든 균류에 대하여 높은 항균활성을 보였다.

키토산의 항균작용메커니즘은 양전하를 가진 키토산의 아미노기가 세균 세포벽의 음전하와 이온결합을 형성하여 세포분열을 저해함으로써 세균의 성장을 억제하는 것으로 추정된다. 이에 대한 간접적인 증거로서

Table I—Inhibition Rate(%) of Bacteria and Fungi as a Function of Molecular Weight of Chitosans(1000 $\mu\text{g/ml}$)

Microorganism (ATCC No.)	Chitosan M.W.			
	15,000	30,000	50,000	200,000
<i>Staphylococcus aureus</i> (6538)	24.0	23.6	33.8	39.3
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (12228)	19.1	34.8	70.0	80.6
<i>Streptococcus mutans</i> (JC-2)	11.6	10.8	15.8	40.6
<i>Bacillus subtilis</i> (6633)	50.2	57.4	68.0	83.1
<i>Escherichia coli</i> (10536)	12.6	12.7	33.2	62.6
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (10490)	20.7	23.3	28.4	60.7
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (10031)	13.3	21.1	45.8	90.4
<i>Candida albicans</i> (36801)	62.1	71.6	72.5	85.5
<i>Aspergillus niger</i> (32656)	8.4	11.9	23.3	74.9

키토산의 탈아세틸화도에 따른 항균활성의 검토이다.

키토산의 항균성은 탈아세틸화도 및 분자량 등이 중요한 요인이라고 알려져 있는데, Saito 등¹⁰⁾은 탈아세틸화도를 66%, 79%, 90% 및 99%까지 4가지로 만들어 *Fusarium solini*를 대상으로 최소발육 저지농도를 확인한 결과 0.09%, 90%와 99%일 경우 0.07%의 농도로 항균 효과를 나타내어 탈아세틸화가 높을수록, 즉 아미노기가 많을수록 항균력이 좋다고 보고하였다. 특히 90% 이상의 탈아세틸화 키토산일 경우 가장 좋은 항균효과가 나타났으며, 그 이상의 탈아세틸화도에서는 유의한 차이가 없었다고 하였다.

키토산 및 그 염산 가수분해물이 식물병원성 곰팡이에 대하여 생육저지효과를 나타낸다는 사실이 1979년 Allan and Hadwiger¹¹⁾에 처음으로 보고된 이래로 1984년 Kendra and Hadwiger¹²⁾에 의해 더욱 명확하게 밝혀졌다. 内田⁹⁾은 키토산의 농도변화에 따른 대장균(*Escherichia coli*)의 증식에 미치는 영향을 육즙배지(육즙 1%, 펩톤 1% 및 염화나트륨 0.5%; pH 6.0)에서 검토한 결과 키토산을 0.02% 이상 첨가하였을 때 *E. coli*의 생육을 완전히 저지하였다고 보고하였다.

이상과 같이 키토산의 항균작용에 대한 연구들에서, 키토산은 분자내 양이온의 아미노기를 함유하고 있어 이것이 세균의 세포벽의 성분중 음이온과 특이적으로 결합하여 세균의 증식을 억제할 수 있었으며, 또한 키

토산이 적당한 크기의 분자량을 가지고 있을 때 그 활성은 보다 효과적이라 할 수 있다.

井瓜正人¹³⁾은 키토산 분해물의 *E. coli*에 대한 작용과 식물병원균인 *Fusarium solini* 및 *F. oxysporum* 곰팡이에 대한 작용을 검토한 결과 분자량이 낮은 키토산 분해물에서 항균효과가 더 강하게 나타났으며, 그 활성은 키토산 자체보다 더 우수하였고, 거의 분해되지 않은 키토산 가수분해물은 키토산과 거의 같은 증식억제효과를 보였다고 하였다. 이와 같은 결과는 키토산의 항균성은 그 분자량에 영향을 받는다고 생각할 수 있다. 즉, 키토산이 40~50 mg 환원당/g 키토산 정도로 적당하게 분해되었을 때 가장 강력한 항균력을 나타내었으며, 그 이상 분해가 진행되었을 때는 오히려 항균력이 급격하게 감소된다는 사실을 알 수 있었다.

조¹⁴⁾는 분자량 크기에 따른 키토산의 항균력을 검토한 결과, 분자량 2,800,000의 고분자 키토산은 2,000 ppm의 농도로 대장균의 증식을 억제시킬 수 있었으며, 토양에서 '분리'한 *Aspergillus* CHS와 *Penicillium* CHS2 균주가 생산하는 키토산 분해효소로 가수분해시킨 분자량 40,000~100,000의 키토산 올리고당에서는 약 20배가량 항균력이 증가되었다고 보고하였다.

이온칼슘과 안식향산에 대한 실험결과는 Table II와 같다. 이온화 칼슘의 세균성장억제율은 그람양성균에서 높게 나타났는데, *S. mutans* 및 *B. subtilis*에서 높은 수치를 보여주었고, 진균에서는 *C. albicans*에서 높

은 수치를 나타내었고 안식향산은 *S. mutans*를 제외한 그람양성균에서 그람음성균 보다 높게 나타났으며, 진균에서는 *C. albicans*에서 높은 수치를 나타내었다 (Table II).

이온 칼슘은 천연의 굴 껍질을 통전처리한 후 분쇄하여 미분말상태로 만든 제품으로써 황색 포도상구균, 대장균, 장염균, 장티푸스균 등에 대한 항균작용이 보고¹⁵⁾되어 있고, *Saccharomyces*속을 위시킨 효모 및 *Aspergillus*속을 위시킨 곰팡이 등에 대한 증식억제작용이 알려져 있어서 각종 식품의 보존제로 첨가될 뿐 아니라 체내 칼슘보존제로서도 그 이용 가능성이 높아지고 있다.

키토산은 체내 미네랄의 감소를 일으킬 가능성이 몇몇 보고^{15,16)}에서 제시되었다. 이러한 원인은 키토산이 고분자 물질의 식이 섬유로서의 역할을 수행하기 때문에 일어나는 현상으로 생체흡수율이 좋은 올리고당의 섭취에 의해 이러한 부적절한 효과를 감소시킬 수 있을 것이다.

굴 껍질로 추출한 칼슘화합물을 체내에 효율적으로 흡수시키기 위해서는 키토산 올리고당을 식이량의 1%로 하여 염화칼슘과 함께 섭취시킴으로서 극대화할 수 있다고 보고하였으며,⁹⁾ 본 실험의 결과와도 유사하였다.

안식향산은 미생물에 대하여 살균작용과 발육저지작용을 가지며, 소르빈산에 비하여 적용범위가 크지만 pH에 의한 영향을 많이 받는다. pH 4이하에서는 낮은

Table II—Effect of Ionized Calcium, Sodium Benzoate and Alginate Microcapsules Containing Chitosan on the Inhibition Rate(%) of Bacteria and Fungi

Microorganism (ATCC No.)	Microcapsules (Chitosan M.W. 200,000)			Ionized calcium			Sodium benzoate
	1,000	5,000	10,000	1,000	5,000	10,000	100
<i>Staphylococcus aureus</i> (6538)	21.0	34.2	53.9	25.9	37.0	61.5	65.1
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (12228)	50.4	62.6	65.7	42.0	46.6	64.2	74.6
<i>Streptococcus mutans</i> (JC-2)	15.0	20.7	25.6	80.3	80.4	87.5	19.0
<i>Bacillus subtilis</i> (6633)	31.9	55.5	75.2	63.9	70.6	82.2	70.6
<i>Escherichia coli</i> (10536)	38.7	43.9	67.6	12.6	28.8	49.2	33.4
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (10490)	20.7	31.9	75.0	37.4	54.5	63.0	49.2
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (10031)	28.4	40.3	59.6	17.0	36.1	43.4	46.0
<i>Candida albicans</i> (36801)	70.7	76.5	76.5	70.7	73.1	77.1	77.1
<i>Aspergillus niger</i> (32656)	58.3	68.3	72.8	11.3	37.3	37.7	32.1

농도로서도 각종 부패 미생물의 증식을 억제하지만, pH 5.5이상에서는 그 효과가 격감하여 대부분의 미생물에 대하여 1/500의 농도에서도 효력이 없다고 한다. 따라서 이 보존료도 다른 산형 보존료와 마찬가지로 비해리 분자에 의하여 방부효과를 나타내는 것임을 알 수 있다.

안식향산 나트륨은 안식향산에 비하여 그 효력이 대체로 약한 것으로 알려져 있으나, 물에 잘 녹으므로 사용하기에 편리하다.¹⁷⁾ 작용기구가 안식향산과 같으며, 안식향산을 유리할 수 있는 조건에서 효력을 발휘하므로 산성이 강한 식품일수록 유효하다. 그러나 안식향산에 비하여 그 효력이 대체로 약한 것으로 알려져 있다. 안식향산은 독성이 비교적 낮고, 또 인체 내에 섭취되어도 축적됨이 없이 배설된다.¹⁸⁾

이온칼슘과 키토산 혼합물의 항균효과를 측정하기 위해 이온칼슘, 키토산과 항균력을 비교 시험하였다. 그 결과는 Table III과 같다.

이온칼슘과 키토산의 혼합액의 항균력이 이온칼슘 단독과 키토산(M.W. 200,000)단독의 항균력보다 이온칼슘과 키토산의 혼합한 것에서 모든 균의 항균력이 우수하게 나타났다(Table III).

키토산은 대부분의 세균과 곰팡이의 증식을 억제하는 것으로 알려져 있고, 이온칼슘의 황색 포도상구균, 대장균, 장염균, 장티푸스균 등 여러 가지 균에 대한 항

균작용이 있기 때문에 이러한 작용들이 키토산과 이온칼슘 혼합액의 항균력을 상승시키는 것으로 사료된다.

한편, 키토산은 대부분의 세균과 곰팡이의 증식을 억제하는 것으로 알려져 있어 서로 다른 중합도를 가진 가수분해물의 항균성을 조사함으로써 키토산의 항균성 메커니즘을 추정할 수 있다고 생각된다. 따라서 키토산을 키토산 분해효소로 가수분해하여 그 가수분해물에 의한 세균 및 곰팡이의 증식에 미치는 효과를 검토하는 것은 중요하다.

최소발육저지농도

각 균주들에 대한 이온칼슘과 키토산(M. W. 200,000) 및 키토산과 이온칼슘혼합액에 대한최소농도를 육안으로 관찰한 결과는 Table IV와 같다.

최소 발육 저지 농도는 항균력에서와 같이 키토산, 이온칼슘 단독시 보다 키토산과 이온칼슘의 혼합액이 최소 발육 저지 농도가 높게 나타났다. 최소 발육 저지 농도는 *Staphylococcus aureus*와 *Staphylococcus epidermidis* 등 그람양성구균에 대해 이온 칼슘과 키토산은 50 µg/ml인 반면 키토산과 이온 칼슘혼합액은 25.0 µg/ml과 1.5 µg/ml로 강한 항균력을 나타내었으며, *Bacillus subtilis* 등 그람양성간균에 대해서는 이온 칼슘과 키토산은 100 µg/ml인 반면 키토산과 이온 칼슘혼합액은 50 µg/ml로 나타났다. *Klebsiella pneumoniae* 등

Table III—Composition of Inhibition Rate(%) of Ionized Calcium, Chitosan and Their Mixtures in Alginate Microcapsules for Bacteria and Fungi

Microorganism (ATCC No.)	Ionized calcium	Chitosan (M.W. 200,000)	Mixture
<i>Staphylococcus aureus</i> (6538)	61.5	39.3	65.1
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (12228)	64.2	80.6	84.3
<i>Streptococcus mutans</i> (JC-2)	87.5	17.0	86.3
<i>Bacillus subtilis</i> (6633)	82.2	83.1	83.6
<i>Escherichia coli</i> (10536)	49.2	62.6	70.4
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (10490)	63.0	60.7	69.2
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (10031)	43.4	90.4	96.0
<i>Candida albicans</i> (36801)	77.1	85.5	87.1
<i>Aspergillus niger</i> (32656)	37.7	74.9	79.1

Table IV—On the Antibacterial Activity Effect of Ionized Calcium, Chitosan and Their Mixtures in Alginate Microcapsule

Microorganism (ATCC No.)	Minimum Inhibitory Concentration(µg/ml)		
	Ionized calcium	Chitosan (M.W. 200,000)	Mixture
<i>Staphylococcus aureus</i> (6538)	50.0	50.0	25.0
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (12228)	50.0	50.0	12.5
<i>Streptococcus mutans</i> (JC-2)	50.0	50.0	25.0
<i>Bacillus subtilis</i> (6633)	100.0	100.0	50.0
<i>Escherichia coli</i> (10536)	>200.0	>200.0	100.0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (10490)	>200.0	>200.0	>200.0
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (10031)	50.0	100.0	50.0
<i>Candida albicans</i> (36801)	>200.0	>200.0	>200.0
<i>Aspergillus niger</i> (32656)	>200.0	>200.0	>200.0

의 그람음성균에 대해서도 키토산과 이온 칼슘은 50 µg/ml인 반면 chitosan은 100 µg/ml로 항균작용을 나타냈었으며, *Escherichia coli*와 *Pseudomonas aeruginosa* 등의 그람음성균과 효모와 곰팡이에 대해서는 키토산, 이온 칼슘 및 키토산과 이온 칼슘혼합액 모두 200 µg/ml 이상으로 항균효과가 낮게 나타났다 (Table IV).

결 론

이온칼슘을 주성분으로 하고 키토산을 각 분자량별로 함유한 마이크로 캡셀을 제조한 후 이들의 그람 양성 및 음성균에 대한 항균력, 효모 및 곰팡이에 대한 억제작용을 이온칼슘 및 키토산과 비교 검토한 결과는 다음과 같다.

1. 키토산 분자량별 세균 성장 억제율은 분자량이 증가할수록 높은 세균 성장 억제율을 보였으며, 분자량 200,000에서 가장 높은 세균성장억제를 보였다.
2. 이온화 칼슘의 마이크로 캡셀은 분자량 15,000, 30,000, 50,000 및 200,000의 키토산을 2% 초산에 녹이고 이온화 칼슘을 가하여 pH를 1.2로 조절하고, 여과한 후 48시간 동결건조함으로써 제조할 수 있었다.
3. 이온화 칼슘 마이크로캡셀의 크기는 200~300 µm이었으며, 키토산 분자량에 따라 물에 대한 용해도, 점도 및 함량 등이 큰 차이를 나타내었다.
4. 마이크로캡셀의 세균 성장 억제율은 그람 양성 균에서 높게 나타났는데, *S. aureus*, *S. epidermidis* 및 *B. subtilis*에서 높았고, *S. mutans*에서는 낮게 나타났으며, 진균에서는 *C. albicans*에서 높게 나타났고, *A. niger*에서는 저조하였다.
5. 이온화 칼슘의 세균성장억제율은 그람양성균에서 높게 나타났는데, *S. mutans* 및 *B. subtilis*에서 높은 수치를 보여주었고, 진균에서는 *C. albicans*에서 높은 수치를 나타내었다.
6. 키토산의 세균성장억제율은 그람 양성 균에서 비교적 높게 나타났으나, *S. mutans*에서는 저조하였고, 진균에서는 *C. albicans*에서 높은 수치를 보여주었는데, 분자량 200,000에서 비교적 좋은 성적을 나타내었으나 분자량에 따른 유의성은 없었다.
7. 마이크로캡셀의 농도에 따른 세균성장억제율은 1,000~10,000 µg/ml에서 유의성 있게 증가하였으며, 이온화 칼슘보다는 키토산의 성장억제율과 가까운 항균력을 나타내었다.

8. 최소 발육 저지 농도는 전반적으로 모든 균에 대해서는 키토산과 이온 칼슘의 혼합액이 가장 높았으며, 효모와 곰팡이는 별차이가 나타나지 않았다.

감사의 말씀

이 논문은 1998년도 우석대학교 학술연구 조성비에 의하여 연구되었으며 이에 감사드립니다.

문 헌

- 1) 坂井和男, 別冊 Food Chemical-I, 106
- 2) 内田, 月刊 Food Chemical, No. 2, 22 (1988).
- 3) K. Nishimura, C. Ishihara, S. Ukei, S. Tokura and I. Azuma, Stimulation of cytokine production in mice using deacetylated chitin, *Vaccine*, **4**, 151 (1986).
- 4) M. Sugano, T. Fujikawa, Y. Hiratsuji and Y. Hasegawa, *Nutr. Rept. In.*, **18**, 531 (1978).
- 5) 奥田拓道, 月刊 Food Chemical, No. 2, 33 (1995).
- 6) 농수산식품연구회, 일본농업신문, 3月 24日 (1993).
- 7) A.H. Amin, K.M. Abbasi and T.V. Subbaiah, Berberine Sulfate : Antimicrobial activity, bioassay and mode of action, *Can. J. Microbiol.*, **15**, 1067-1076 (1969).
- 8) 미생물학 분과회, 실험 종합 미생물학, 대학사, 95-99 (1992).
- 9) 전유진, 김세권, 한외여과막 효소반응기에서 제조한 키토산 올리고당의 항암작용, 항균작용 및 칼슘 흡수 촉진작용. 한국 키틴·키토산 연구회지, **2**(3), 60-78 (1997).
- 10) K. Saito, M. Shimojoh and J. Ishibashi, Growth inhibition of chitosan from suid pen against oral streptococci, *Chitin, Chitosan 研究報告*, 77-79 (1994).
- 11) C.R. Allan, and L.A. Hadwiger, The fungicidal effects of chitosan on fungi and varying cell wall composition, *Exp. Mycol.*, **3**, 285-287(1979).
- 12) D.F. Kendra and L.A. Hadwiger, Characterization of the smallest chitosan oligomer that is maximally antifungal to *Fusarium solani* and elicits pisatin formation in *Pisum sativum*, *Exp. Mycol.*, **8**, 276-281 (1984).
- 13) 井瓜正人, Chitin, Chitosan, 307, 技報堂出版 (1995).
- 14) 조학래, 저분자 Chitosan의 항균성 및 식품보존효과에 관한 연구, 부산수산대학 대학원 박사논문 (1989).
- 15) K. Deuchi, O. Kanaubci, M. Shizukuish and E. Kobayashi, Continuous and mass intake of chitosan effect mineal and fat-soluble

- vitamin status in rat fed on a high-fat, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **59**, 1211-1216 (1995).
- 16) D.T. Gordon and C.B. Williford, Chitin and chitosan: influence on element absorption in rat, ACS Symposium Series 214, *Unconventional Source of Dietary Fibers*, 156-184 (1983).
- 17) 문범수, 식품위생학, 386-387, 신광출판사 (1993).
- 18) 장지현, 문범수, 김교창, 식품위생학, 213-215, 수학사 (1982).