

구조개질 Apatite의 항균효과

강 전 택 · 정 기 호
부산대학교 화학과

(2000년 10월 20일 접수; 2001년 11월 23일 채택)

The Antimicrobial Effect of Structure Modified Apatite

Jeon-Taek Kang and Gi-Ho Jeong

Dept. of Chemistry, Pusan National University, Busan 609-735, Korea
(Manuscript received 20 October, 2000; accepted 23 November, 2001)

The hydroxyapatite(HAp) as a carrier the for ion exchange agent of Ag^+ ions was prepared in semiconductor fabrication, The Ca/P molar ratio of the HAp was 1.65. The HAp is molded in shape of the antimicrobial ball and then sintered at 1000°C. Ag-containing HAp(HAp-Ag) was prepared by incorporating Ag^+ ions in HAp crystals through an ion-exchange reaction in solutions containing 0.01M $AgNO_3$. The antimicrobial effect of HAp-Ag for bacteria such as *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* has been investigated. The concentrations of silver in the antimicrobial ball was determined by inductively coupled plasma and the amount of Ag^+ ion was 9.0 μ g/g. The HAp-Ag exhibited excellent antimicrobial effect for bacteria such as *E. coli* and *S. aureus*. The bactericidal activity was considered to be caused by direct contact of bacteria with Ag^+ ions in the HAp crystals. The HAp would likely to be possible as a carrier of antimicrobial metal ions such as Ag, Cu, and Zn by recycling of waste sludge in the semiconductor fabrication process.

Key words : hydroxyapatite, ion exchange, Ag^+ ions, antimicrobial effect, bacteria.

1. 서 론

산업이 발달함에 따라 우리의 생활은 보다 편리하고 윤택해진 반면에 자연환경은 여러 가지 공해물질로 인하여 점점 오염되어 가고 있다. 각종 공장에서 나오는 폐수와 생활오수는 물론 산업폐기물 및 음식물 쓰레기를 지하에 매립함으로써 토양의 변질을 초래하고 침출수로 인한 2차 수질오염을 유발하여 우리의 식수원인 하천과 호소뿐만 아니라 지하수의 오염마저 우려되고 있는 실정이다. 요즘에는 환경문제에 대한 높은 관심으로 가정에 공급되고 있는 수도물에 대하여 상당수의 시민들이 불신을 갖고 있다. 또한 그 동안 믿고 식수로 사용해 오던 유명 약수터도 세균이 기준치 이상으로 검출되어 폐쇄하는 곳도 발생하고 있다.

물의 살균은 음용수 및 생활용수를 얻기 위한 가장

중요한 기술중의 하나로 식품이나 의약품의 제조에서 전자제품의 제조에 이르기까지 광범위한 공업분야에 고도로 살균된 물을 필요로 하고 있다.

살균 방법으로서 생활용수의 확보에는 음용수의 염소살균과 같이 화학적 살균법이 대부분이며 공업분야에서는 가열이나 자외선 조사에 의한 물리적 살균법을 이용하고 있다.

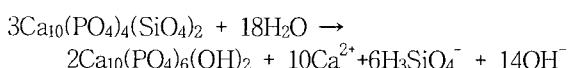
화학적 살균법이 음용수나 생활용수의 살균방법으로서 적용된 이유는 살균처리의 기본조작이 약제의 혼합만이며, 또한 비용도 낮으므로 대량 살균에 적합하기 때문이다.

그러나, 최근 상수의 살균에 사용되는 염소가 humic 물질을 포함하는 유기물질들과 반응하여 발암성물질인 THM(Trihalomethane)류 생성을 조장하고 있는 것이 밝혀지게 됨으로써¹⁾ 이러한 약제를 이용하는 살균방법은 역학적 안전성이 우려되고 있다. 우리나라의 음용수 관리기준²⁾에서 대장균군의 허용치는 50ml에서 검출되지 않아야 되며, 일반세균의 허용치는 1ml중 100CPU 이하로 이들 세균은 균

Corresponding Author, Jeon-Taek Kang, Dept. of Chem.,
Pusan Nat'l Univ., Busan 609-735, Korea
Phone : +82-51-897-9701
E-mail : jtkang@kiflt.re.kr

류(곰팡이), 조류, 원생동물(아메바)과 함께 4대 미생물로 분류되고 있다.³⁾

본 연구에서는 반도체 재료로 사용되는 silicone wafer 제조시 습식 etching 공정에서 발생하는 폐산을 수산화칼슘으로 중화시킨 폐슬러지를 이용하여 hydroxyapatite(이하 HAp로 표기함)를 합성 하고 유기항균제로서의 기능을 조사하였다. 세균과 관련한 HAp의 연구로 Clark 등⁴⁾은 *Streptococcus mutans* 외에 5종의 세균에 대하여 Langmuir 흡착 등온식을 근거로 흡착 모델을 이용하여 HAp 표면에 대한 세균의 흡착세기와 흡착 지점의 수를 비교하여 평가하였다. Shir Khanzadeh 등⁵⁾은 이온교환 메카니즘에 의하여 항균성 Ag⁺ 이온이 흡착 및 고정화된 마이크로 다공성 HAp로부터 인간의 혈장(blood plasma)에 가깝게 화학조성을 가지는 모조 혈액에 서서히 방출되는 Ag⁺ 이온을 시험관 시험에 의하여 확인하였다. 또한 Suzuki 등⁶⁾은 일반적으로 HAp는 세균에 친화성이 있고 살균성이 있다고는 생각하기 어려운 물질이지만 HAp의 PO₄³⁻기를 SiO₄⁴⁻기로 일부 치환한 실리카 함유 HAp [Ca₁₀(PO₄)₄(SiO₄)₂, SiAp로 표기]를 수열조건하에서 CaO, Na₂HPO₄, SiO₂를 출발원료로 하여 150℃의 포화 수증기압 하에서 4시간 동안 합성하여 수증에서 서서히 HAp로 변화하는 수증전환반응⁷⁾을 이용하여 수증의 세균, 특히 오염의 표준이 되는 *E. coli*에 대한 살균 효과를 연구하였다. 살균 메카니즘은 다음 반응식과 같이 SiAp의 주위에 모인 *E. coli*에 대하여 수증전환반응에 의하여 생성된 OH⁻이온이 공격하여 표피층(세포벽, 세포막)을 약화시키고 SiAp의 입자 표면에 생긴 농후한 OH⁻층이 직접 대장균과 접촉함으로써 살균작용을 하는 것으로 추정하였다.



대부분의 유기항균제는 내열성이 약해서 가공온도가 높은 고분자 소재에 첨가하여 가공할 경우 분해되기 쉬우며 일정량 이상 사용할 경우 인체에 대한 안전성이 문제가 되고 있다. 무기계 항균제는 무기질 소재에 항균력이 뛰어난 금속이온을 치환시킨 것으로 3차원의 골격구조를 가지고 있기 때문에 비표면적이 크고 내열성이 우수하며 현재까지는 인체에 무해한 것으로 알려져 있다.⁸⁾ 모든 중금속은 어느 정도의 항균력은 가지고 있지만 대부분 약하다. 그러나 수은과 은의 염류 및 그 유기화합물 등은 항균력이 강하다. 중금속의 항균작용은 금속 본래의 독성이나 항균성에 의한 것은 아니며, 이들의 표면 산화나 금속을 함유하는 용액 중에 해리된 금속 이온에 기인 된다고 한다. 이들 금속 이온의 항균 작용은 Hg > Ag > Cu > Zn > Sn > Bi의 순이라고 하지

만 실제로는 이들의 금속염의 용해성, 해리도 등에 좌우 된다고 한다.³⁾ 따라서, 본 연구에서는 무기계 항균제 제조시 다수의 세균 및 곰팡이에 대하여 우수한 항균효과를 나타내며 인체에 무해한 것으로 알려진 Ag⁺ 이온을 항균작용 금속 이온으로 선택하였다. 그리고 결정성 HAp를 담체로 하여 이온교환시킨 다음 다공성 항균볼을 제조하였으며, 음용수 관리기준에 규제하고 있는 세균에 대한 항균력을 평가함으로써 수처리 공정에 응용하고자 한다.

2. 재료 및 방법

2.1. 항균볼 제조

본 연구에서 사용한 재료는 반도체 제조시 etching 공정에서 발생한 폐슬러지를 이용 하였다. 이 슬러지를 120℃의 건조기에서 1차 건조한 후 70℃의 전기로에서 30분간 소성한 다음 300g을 채취하여 500ml의 증류수에 넣고 온도를 70℃로 유지하면서 1% H₃PO₄ 용액으로 pH가 중성이 되도록 반응시켰다. 탈수 후 다시 120℃의 건조기에서 건조한 다음 900℃에서 소성하고 0.01M AgNO₃ 용액 500ml를 가하여 불밀에서 12시간 동안 이온교환 반응시켰다. 이온교환 반응 후 남아있는 AgNO₃는 일부 채취한 용액에 염산을 첨가하여 염화은 침전이 생기지 않을 때까지 확인하면서 증류수로 세척하였다.

건조한 후 Ag⁺이온으로 이온교환 반응한 HAp(HAp-Ag) 80g에 성형성 및 다공성을 부여하기 위하여 백자토 20g과 20% PVA용액 25g을 혼합한 다음 볼을 성형하여 1000℃에서 소성하였다. 900℃에서 2차 소성한 HAp의 화학적 조성분석과 HAp-Ag 볼 중의 Ag 함량을 분석하기 위하여 inductively coupled plasma emission spectrometer(GBC, Integra XMP)를 사용하였다. 또한 비정질 HAp와 소성한 HAp의 결정성 및 입자 크기를 비교관찰하기 위하여 X-ray diffractometer(Ligaku, D/MAX 3B)와 scanning electron microscope(Jeol, JSM-6100)를 사용하였다.

2.2 항균시험

시료는 HAp만으로 제조한 볼과 HAp-Ag로 제조한 볼 2종을 *Escherichia coli* ATCC 25922와 *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 시험균주에 대하여 항균력을 시험하였다.

희석수는 0.85% 멸균 생리 식염수를 사용하였으며, 세균용 배지는 1% nutrient broth(NB)와 nutrient agar(NA)를 사용하였다. 1% nutrient broth 배지를 플라스크에 각각 100ml씩 넣고 멸균하였다. 멸균된 배지 100ml당 2종의 시료를 각각 10g씩 첨가 한 후 nutrient broth 배지에서 24시간 배양한 세균액(*E. coli*, *S. aureus*)을 10⁵CFU/ml이 되도록 멸균 생리

식염수로 희석하여 접종하였다. 접종한 후 즉시 생균수를 측정하여 초기 생균수로 정하였다.

35°C의 진탕배양기에서 24시간 배양하여 샤렛 전체를 배지 1plate로 구분하고 4분획하여 각 생리 식염수 희석액을 25 μ l씩 1분획에 1희석배율을 떨어뜨려 접종하는 Miles & Misra method⁹⁾ (생균수 계수방법 : 생균수 평균값 \times 40 \times 희석배율CFU/ml)와 생리 식염수로 희석하여 각 희석 농도별로 0.1ml를 채취하여 배지에 접종한 후 삼각병으로 고르게 분산시켜 배양하는 spreading method(생균수 계수방법 : 생균수 측정값 \times 희석배율CFU/ml)로 생균수를 측정하였다.

3. 결과 및 고찰

본 연구에서는 화학합성 HAp를 합성하기 위하여 페슬러지를 건조한 후 먼저 700°C에서 소성한 다음 반응용액의 온도를 70°C로 유지하면서 1% H₃PO₄으로 반응시키고 900°C에서 다시 소성하였다. ICP 분석결과 Ca/P의 몰비는 1.65였으며, HAp를 담체로 Ag⁺이온을 이온교환시켜 성형한 HAp-Ag 불 중의 Ag 함량은 9.0ppm이었다.

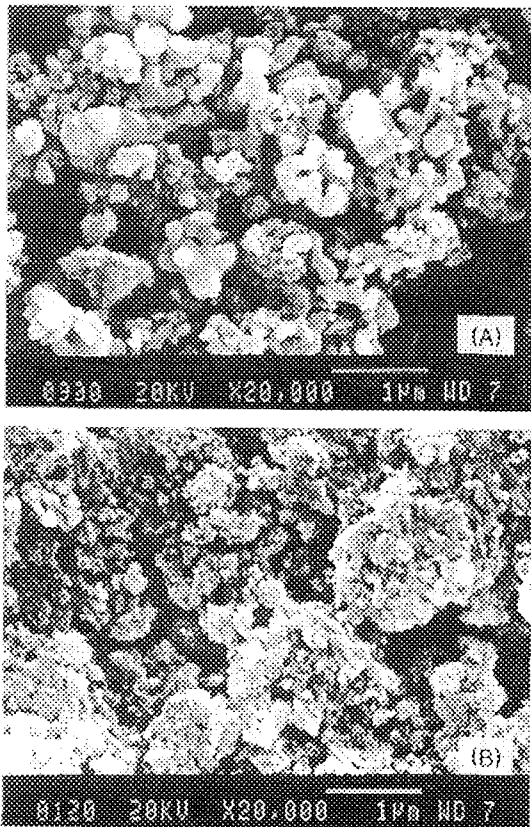


Fig. 1. Scanning electron micrograph of (A) crystallization HAp after ion exchange with 0.01M-AgNO₃ and (B) amorphous HAp before sintering.

Fig. 1과 2는 0.01M AgNO₃ 용액으로 이온교환한 결정성 HAp-Ag와 소성전의 비정질 HAp의 SEM 사진과 XRD 스펙트럼을 나타낸 것으로 소성에 의하여 결정화가 일어남으로써 HAp의 입자가 성장한 것을 알 수 있었으며 Ag⁺ 이온에 의한 실질적인 구조변화는 없는 것으로 나타났다.

Lin 등¹⁰⁾은 Ca(OH)₂, NaOH와 H₃PO₄의 반응에 의한 인공치아용 바이오세라믹 [Ca_{9.65}Na_{0.35}(PO₄)₆(OH)_{1.65}] 합성에서 분해온도(1250°C이상) 이하에서는 반응온도가 높고 반응시간이 길수록 기공이 없는 마이크로 구조를 나타내고 입자 크기가 현저하게 증가한다고 하였다.

미생물은 channel 단백질을 통해 영양물을 세포 내에 전달하고 대사물질 및 불필요한 물질을 배설하는 세포막 기능, 산소를 취하고 CO₂를 배설하는 호기적 호흡 기능, 세포막 등을 구성하는 아미노산 합성 및 지질합성으로 미생물의 조직이나 구성물질을 합성하는 기능 등이 있는데 항균 메커니즘은 이 세 가지 기능 중 한 가지만 저해시켜도 미생물의 생육은 정지되고 사멸된다.

즉, 화학적 약제가 미생물에 접촉, 세포 표피층에 흡착하여 세포벽이나 세포막의 물리적 변화(변성)나 생리기능 저해를 일으켜 단기간에 세포 표피층 구조가 파괴되어 미생물은 재생능력(생육능력)을 소멸하게 된다. 따라서 각종 살균법의 작용 메커니즘은 아직 완전히 규명되지 않은 것도 있지만 미생물의 생존, 증식에 관한 기능을 저해하는 작용을 한다. 은계 무기항균제의 항균 메커니즘에 대해서도 아직 완전히 규명되지는 않았으나 미량의 은 이온이 균체 내부에 흡입되고 미생물 세포의 호흡계, 전자전달계 등을 방해 하기도 하며, 효소저해를 일으키기도 한다는 가설이 있다. 또한 이온의 축적작용에 의해 은 이온이 효소 혹은 수중의 용존 산소를 활성산소로 변화시키고 이 활성산소가 항균성을 발휘한다는 설이 있다.¹²⁾

Table 1에 나타낸 바와 같이 *E. coli*의 경우 초기 생균수는 2.0 \times 10⁹인데 비하여 24시간 배양한 후의 생균수는 1.0 \times 10⁸으로 대조군과 HAp가 비슷하였으나 HAp-Ag에 대해서는 완전히 사멸하여 우수한 항균효과를 나타내었다. 또한 *S. aureus*의 경우 초기 생균수는 3.2 \times 10⁹인데 비하여 배양 후의 생균수는 1.0 \times 10⁷으로 *E. coli*와 같은 경향으로 대조군과 HAp는 거의 비슷하였으며 HAp-Ag에 대해서는 100% 사멸하였다. Fig. 4와 5는 *E. coli* 및 *S. aureus*에 대한 항균 효과를 Miles & Misra method에 의하여 시험한 결과를 나타낸 것이다. 대조군과 HAp는 세균액을 10⁻²~10⁻⁵배로 희석하였으며 HAp-Ag는 원액을 10⁻³배 까지 희석하여 접종하였으나 HAp-Ag 배지에는 세균의 성장을 인지할 수 없었

다. 그리고 2종의 균주에 대하여 두 가지 생균수 계수방법에 의한 실험은 동일한 결과를 나타내었다.

Table 1. Antimicrobial effect for *E. coli* and *S. aureus*

Item	<i>E. coli</i>			<i>S. aureus</i>		
	Control	HAp	HAp-Ag	Control	HAp	HAp-Ag
0 hr	2.0×10^9			3.2×10^9		
24 hr	1.7×10^8	1.4×10^8	0	7.6×10^7	6.4×10^7	0

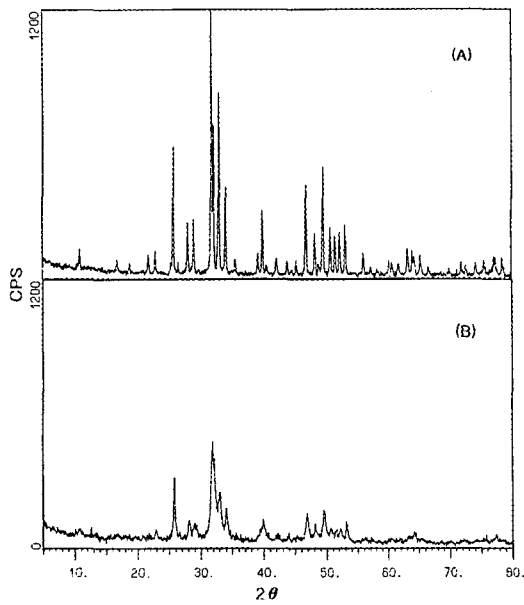


Fig. 2. XRD spectrum of (A) crystallization HAp after ion exchange with 0.01M AgNO_3 and (B) amorphous HAp before sintering.

Fig.3은 항균볼의 외부 표면의 SEM 사진($\times 10,000$)을 나타낸 것으로 항균볼 제조 시 가능한 한 항균성 금속이온과 세균의 접촉효과를 향상시키기 위하여 1000°C 에서 소성하는 과정에 연소될 수 있는 PVA 수지를 성형용 바인더로 사용함으로써 항균볼의 내부 및 외부 표면을 다공성으로 비표면적을 크게 하였다. 김동균 등¹¹⁾은 쿨패각 분말을 담체로 항균성 금속이온을 이온교환시켜 수생미생물에 대한 살균특성을 연구하였다. 살균 효과는 금속이온의 미생물 세포벽에 대한 접촉효과 및 항균제 농도에 따른 금속 이온의 활성 효과 등으로 규명할 수 있는 것으로 알려져 있으나 90%의 균사멸 속도를 나타내는 시간과의 관계로부터 살균 메카니즘은 접촉 시간에 의존한다는 사실을 확인하였다.

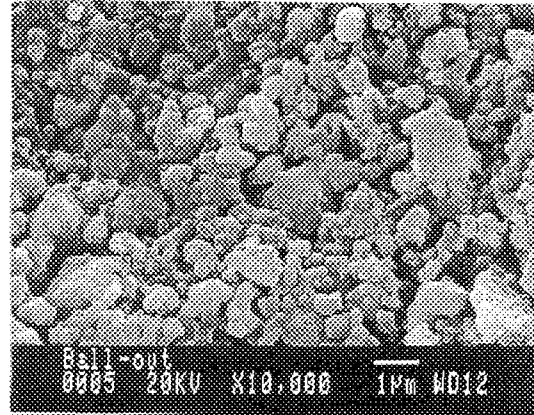


Fig. 3. Scanning electron micrograph of external surface on the antimicrobial ball.

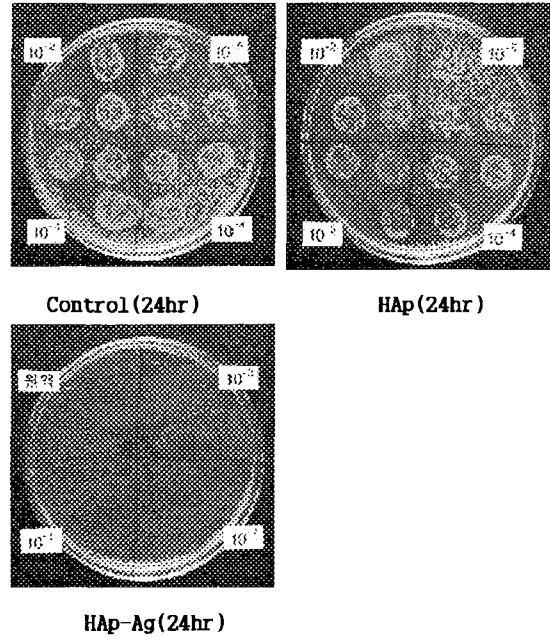
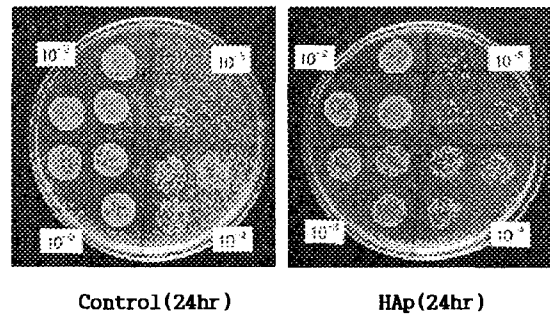
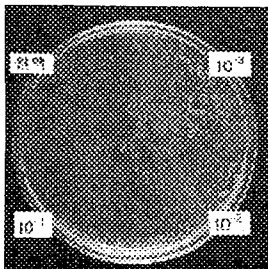


Fig. 4. Antimicrobial effect of modified apatite for *Escherichia coli* by the Miles & Misra method





HAp-Ag(24hr)

Fig. 5. Antimicrobial effect of modified apatite for *Staphylococcus aureus* by the Miles & Misra method

4. 결 론

HAp를 담체로 격자 이온인 칼슘과 Ag^+ 이온의 이온교환에 의하여 제조한 구조개질 Apatite를 기재로한 항균볼의 항균시험 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

24시간 배양후 Ag^+ 이온을 이온교환하지 않은 HAp로 만든 볼과 대조군의 생균수는 *E. coli*에 대해서는 1×10^8 , 그리고 *S. aureus*에 대해서는 1×10^7 정도로 거의 비슷한 측정결과를 나타내었다.

Ag^+ 이온을 이온교환한 HAp로 만든 볼은 Ag 의 함량이 9.0ppm 정도임에도 2종의 균주에 대하여 100% 사멸하는 우수한 항균력을 나타내었다.

2종의 균주에 대하여 Miles & Misra method와 spreading method에 의한 생균수 계수방법은 동일한 결과를 나타내었다.

따라서, 생체친화성이 양호한 HAp를 각종 환경 오염으로 인하여 물의 정화에 많은 어려움을 겪고 있는 현시점에서 HAp-Ag를 주성분으로 다공성 성형볼을 제조한다면 수처리 공정에 응용할 수 있을 것으로 판단된다. 또한 최근에는 항균에 대한 높은 관심으로 섬유, 플라스틱, 도료, 제지 등에 항균력을 부여하여 미생물에 의한 품질 저하를 방지하는 추세에 있기 때문에 반도체 제조공정에서 매월 수십톤씩 발생하는 폐슬러지를 재활용하여 담체로 사용한다면 세라믹이나 제올라이트를 담체로한 항균제와 같이 공업적으로 널리 이용될 수 있을 것으로 판단된다.

참 고 문 헌

1) Park, E. J., D. C. Ryou, S. G. Kim, E. W. Bae,

and Y. J. Kim, 1997, The variation of AMWD after each stage in BAC Pilot-plant, The report of Water Quality Research Institute of Pusan, Vol. 3, 92-118.

- 2) 환경부, 1997, 우리나라의 음용수 관리기준, 먹는 물 수질오염공정시험편.
- 3) (株) 東レリサーチセンター, 殺菌・抗菌技術の新发展.
- 4) Clark, W. B., L. L. Bammann and R. J. Gibbons, 1978, Comparative Estimates of Bacterial Affinities and Adsorption Sites on Hydroxyapatite Surfaces, Infection and Immunity, 19 (3), 846-853.
- 5) Shirkhazadeh, M., M. Azadegan and G. Q. Liu, 1995, Bioactive delivery Systems for the slow release of antibiotics : incorporation of Ag^+ ions in to micro-porous hydroxyapatite coatings, Materials Letters, 24, 7-12.
- 6) Suzuki, T. and K. Sugiyama, 1995, Application of Structure Modified Hydroxyapatite to Disinfectant, 資源 と 素材, 111(9), 581~586.
- 7) Sugiyama, K., M. Miyake and T. Suzuki, 1992, Synthesis and Cation-exchange Characteristics of Silicate-containing Hydroxyapatites, Gypsum & Lime, 236, 3~11.
- 8) 기업기술교육 시스템, 1998, 항균·방취 기능의 제품활용기술 세미나집, 95pp.
- 9) Singleton, P., D. Sainsbury, Dictionary of microbiology and Molecular biology, John Wiley & Sons Ltd., 2nd Addition.
- 10) Lin, F. H., T. L. Harn and M. H. Hon, 1989, A Study on Synthesized Hydroxyapatite Bioceramics, Ceramics International, 15, 351-356.
- 11) 김동균, 정숙현, 신춘환, 1996, 굴 패각 분말로부터 제조된 항균성 수처리제의 수생미생물에 대한 살균특성, 한국환경과학회 가을학술발표회 초록집, 44pp.
- 12) 綿貫喆, 實川佐太郎, 榑原欣作, 1981, 「医科器械學叢書1, 滅菌法・消毒法 第1集」, (株)文光堂, 153pp.