

Tube Dilution Technique과 Agar Plate Smear Method에 의한 키토산의 MRSA 항미생물성

최정임 · 전동원

이화여자대학교 의류직물학과

A Study on the Antimicrobial Activity of Chitosan on the MRSA by Tube Dilution Technique and Agar Plate Smear Method

Jeong Im Choi and Dong Won Jeon

Dep. of Clothing and Textile, Ewha Womans University, Seoul, Korea

Abstract : Three different types of chitosan were prepared from red crab shells to study anti-microbial activity of chitosan on pathogenic bacteria, MRSA(Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*). Water-insoluble chitosan, whose degree of deacetylation is kept over 90% and molecular weights are 20,000, 500,000, 150,000, 80,000, and 40,000, respectively. Water-soluble chitosan, whose degree of deacetylation is about 48% and molecular weights are 200,000 and 80,000. Water-soluble chitosan, whose degree of deacetylation is 82% and molecular weight is 3,900. The anti-microbial activities of three types of chitosan were investigated by Tube Dilution Technique(TDT) and Agar Plate Smear Method(APSM). And the following conclusions are made ; Chitosan having 5 different types of M.W. chitosan (over 90% deacetylation) showed similar anti-microbial activities at over 0.05% concentration. Especially, chitosan having M.W. 40,000 150,000 showed the excellent anti-microbial activity. The anti-microbial activity of chitosan was enhanced when the chitosan/acetic acid solution was aged for 7days. The anti-microbial activity of chitosan was only shown at chitosan/acetic acid solution. The anti-microbial activity was not detected in chitosan solution dissolved in neutral pH water. Therefore, it can be concluded that the anti-microbial activity was due to NH₃⁺ cationic ion of chitosan in acidic aqueous solution.

Key words : antimicrobial activity, MRSA, molecular weights, degree of deacetylation, tube dilution technique(TDT), agar plate smear method(APSM).

1. 서 론

최근 물질적 풍요로움에 수반하여 질적 풍요로움에 대한 욕구도 확산되고 있다. 주변환경을 더욱 쾌적하게 만들고 생활을 보다 윤택하게 하려면 지금까지 간과하고 있었던 주변 미생물을 효과적으로 제어해야 한다는 인식이다. 특히 현재 전 세계적으로 심각한 병원 내 감염이 감지됨에 따라 이에 대한 효과적인 방어조치를 취해야 할 상황이 되었고, 특히 생활주변의 미생물에 대한 구체적인 방어수단을 연구하도록 요구하고 있다.

1990년대 초 일본에서 *Staphylococcus aureus*와 *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus*(MRSA)에 의한 원내감염이 보고되면서부터 'EMRSA에 의한 원내감염'은 의료업계의 중대한 문제로 떠오르고 있으며, 1997년 개최된 제12회 일본환경감염학회에서 MRSA 감염을 예방하기 위한 많은 연구결과가

발표되었다(吉川, 1997. 青山, 1994). 또한 일본의 후생성이 1994년도에 실행한 항생물질 감수성 상황조사에서는 시설물의 MRSA 검출율이 전국평균 61%에 이른다고 보고되었다(吉川, 1997. 青山, 1994).

MRSA는 *Staphylococcus aureus*의 변종 균으로서 1961년 영국에서 최초로 보고된 이후 전 세계에 만연되고 있으며 항생물질 methicillin의 β-락탐(β-lactam)구조를 파괴하는 β-락타마제 효소를 생산할 수 있도록 변이한 황색포도상구균이다. 뿐만 아니라 대부분의 항생물질에 대해서 내성을 보이고 있기 때문에 현재 전 세계적으로 대책이 필요한 병원성 감염균이다(吉川, 1997. 青山, 1994).

병원 내 감염은 의료종사자의 직접적인 접촉에 의하여 유발될 수 있으며 환자복이나 시트 등과 같은 섬유제품에 의해서도 흔히 감염되고 있다(吉川, 1997. 青山, 1994)는 사실이 밝혀지면서 포도상구균이나 MRSA에 대한 1차적인 대응이 섬유제품을 통하여 이루어져야 한다는 개념이 확산되고 있다.

합성 유기항균제들은 정확한 분자량 크기와 동일한 특성이

합성시에 정확하게 보장될 수 있지만 천연고분자인 키토산은 갑각의 종류 또는 추출방법에 따라서 품위가 다른 제품이 얻어질 수 있다. 키토산이라는 천연 고분자화합물은 현재까지 표준화 되어있지 않으며 그 결과 키토산이라는 물질에 대한 표준품도 존재하지 않고 있다.

한편, 현재까지 발표된 다수의 키토산에 의한 섬유의 항균작용은 키토산의 분자량 차이, 탈아세틸화도 등이 연구자마다 일치하지 않고 있으며 키토산 자체의 항균력도 분명하게 밝혀지지 않고 있는 실정이다.

따라서 본 연구에서는 키토산용액의 최저항균활성농도를 측정하기 위하여 분자량이 서로 다른 여러 종류의 키토산/초산 수용액을 제조하고 Tube Dilution Technique(TDT)과 Agar Plate Smear Method(APSM)에 의해 분자량별 최저항균활성농도(Minimum Inhibition Concentration : MIC)를 측정하였다.

아울러 키토산/초산 수용액을 제조한 후 24시간 이내에 사용하였을 때와 일주일간 방치한 후 사용하였을 때의 항균성과 MIC를 비교·검토하여 후가공에 필요한 최적농도를 찾아내었다.

2. 재료 및 방법

2.1 키토산의 제조

MRSA에 대한 항균성측정에 사용된 키토산은 홍게(*Chionoecetes opilio*)전조 갑각으로부터 추출하였다. 갑각을 2N 농도의 HCl로 처리하여 석회질성분을 제거한 다음 다시 5% 농도의 NaOH 수용액으로 가열하여 단백질성분을 제거하여 키틴(chitin)을 얻었다. 키틴을 NaOH 수용액으로 가열하여 탈아세틸화시켜 줌으로써 키토산을 얻었다(전동원, 1997, 2001).

키틴을 제조할 때 제반 반응조건(HCl의 농도, 처리시간, 처리온도)을 변화시켜 분자량 200만에 달하는 초거대분자량의 키토산과 분자량 50만에 달하는 키토산 2종류를 제조하였다.

상기의 분자량 50만인 키토산을 NaBO₃로 분자쇄를 절단시켜서 분자량이 15만, 8만, 4만인 저분자량 키토산들을 제조하였다(전동원, 1998a, 1998b). 저분자량 키토산을 수득해 하는 저분자화 반응조건을 Table 1에 제시하였다.

수용성 키토산의 구체적인 제조방법은 다음과 같다.

분자량 10만인 키토산 10 g을 초산 100 ml, H₂O₂ 400 ml, H₂SO₄ 2 ml 혼합용액에 침지하고 상온에서 2시간 교반시킨 후 온도를 50°C로 상승시키고 다시 2시간이 경과되면 완전히 용해된 투명액이 형성된다. 이후 다시 반응온도를 10°C 상승시켜

Table 1. Preparation conditions of low-molecular weight chitosan by NaBO₃

MW of chitosan	Amount of used chitosan(g)	Concentration of NaBO ₃ · 4H ₂ O(g/l)	Reaction time(hr)	Reaction temperature(°C)
150,000	20	9.4	2	35
80,000	20	9.4	3	50
40,000	20	32	6	50

Table 2. Characteristics of different molecular weight chitosans.

Chitosan type	Solubility	Molecular weight	Degree of deacetylation (%)
A+		2,000,000	98.9
A		500,000	97.1
B	water insoluble	150,000	90.4
C		80,000	89.2
D		40,000	87.3
E		82,500	48.0
F	water soluble	200,000	48.8
G		3,900	82.4

서 60°C에 도달하면 2시간 동안 반응을 진행시킨다. 반응이 완료되면 10% 농도의 NaOH 수용액으로 pH를 7로 조절한 후 cut off 1000의 투석막으로 투석하여 동결건조시키면 저분자 수용성 키토산이 얻어진다.

수용성 키틴은 분자량의 크기가 대략 8만과 20만으로서 분자량 8만과 20만에 해당하는 키토산을 무수초산으로 아세틸화시켜서 얻었다.

본 연구에서 제조된 5종의 수용성 키토산과 수용성 키틴, 저분자 수용성 키토산에 대한 제반특성을 Table 2에 제시하였다.

키토산/초산 수용액의 제조 : 키토산/초산 수용액을 제조할 때 초산의 농도는 키토산의 농도와 동일하게 하되 최고 0.1%에서 0.05%까지 혼합하고 상온에서 24시간 동안 교반시켜 불용분이 없는 용액을 얻었다. 제조한 키토산/초산 수용액은 초산의 작용으로 인해서 분자쇄가 절단되어 분자량이 감소될 가능성을 최소화하기 위해 용해가 완결된 후 24시간 이내에 사용하거나 7일간 실온에 방치한 후 사용하였다.

MRSA에 대한 TDT(시험관 회석법)의 반복시험결과 MIC가 0.05% 농도(TDT 시험법에 의한 회석율을 감안하면 5 ppm)임을 확인했기 때문에 0.025%, 0.05%, 0.075%, 0.1%로 조절하여 사용하였다.

2.2 균주 및 배지

세균은 MRSA ATCC 33592를 사용했고, 세균의 배양 배지는 Difco 제품인 Bacto Nutrient Broth(BNB)와 Nutrient Agar(NA)를 사용했다.

균의 계대 배양용 사면배지와 생균을 측정하기 위한 평판배지는 NA를, 10배 계열 회석용과 Tube Dilution Technique(TDT)법을 이용한 최소발육저지농도 시험배지와 최소살균 시험배지는 Nutrient-Broth(NB)를 사용하였다.

2.3 배양방법

MRSA는 호기성 균이기 때문에(E. Dengrmont and M. Membre, 1995) 단기보관은 NA사면배지에 이식하여 37°C, 24시간 배양한 후 5°C이하에서 냉장보관하면서 사용하였고, 6개월 주기의 장기보존을 위해 액체육즙배지에서 배양한 균액을 30% 글리세롤에 넣어 -20°C 이하에서 보관하였다.

바테리아의 pure culture를 위해 보존 균주 1 loop를 취하여 NB육즙배지에 이식하여 37°C의 shaking incubator 속에서 20시간 동안 배양하고, 다시 이 배양액 1 loop를 새로운 NB배지 10ml에 이식하여 18시간 동안 배양하였다.

Cell counting은 예민한 측정방법인 생균 측정용 plate count(colony count)을 이용했으며, 이때 접락이 형성된 평판배양은 통계학적으로 가장 신뢰할 수 있는 30~300 colony가 되도록 10배 계열로 회석하여 사용하였다.

2.4 MRSA균에 대한 항균성 측정

카토산/초산 용액의 항 미생물제에 대한 역기를 측정하기 위해 액체배지를 이용한 MIC 역가측정방법인 TDT(Madigan, 1997)와 함께 한천배지를 이용하여 보다 쉽고 정확하게 MIC를 평가할 수 있는 시험방법 APSTM(최정임, 2001)을 수행하였다.

Tube Dilution Technique : 액체배지를 시험관에 9 ml씩 준비한다. 항균약제 1,000 ppm을 조제하고, 이 용액을 물에 단계적으로 배화석하여 500 ppm, 250 ppm, 125 ppm...2 ppm 용액이 되도록 조제하여 준비한 액체배지 시험관에 주입한다. 준비된 시험관에 미생물이 일정량이 되도록 접종하여 37°C에서 24시간, 36시간, 48시간, 60시간, 72시간동안 진탕배양한 후 증식, 정균, 살균 여부를 판정한다.

Agar Plate Smear Method : 표준한천배지를 준비한다. 항균약제 10,000 ppm을 조제하고, 이 용액을 물에 단계적으로 배화석하여 5000 ppm, 2500 ppm, 1250 ppm...20 ppm 용액이 되도록 조제한다. 표준한천배지위에 일정한 량의 미생물과 조제한 항균약제용액 0.1 ml를 투입하여 도말한다. 정치배양기에서 48시간 배양하여 증식한 colony를 계산한다.

3. 결과 및 고찰

3.1 TDT에 의한 카토산/초산 수용액의 항균성

카토산의 농도, 분자량, 탈아세틸화도, 접종배양시간에 미치는 영향 : Table 3은 TDT에 의해 카토산/초산 수용액을 제조한 후 즉시 사용하여 항균력을 측정한 결과이다.

접종배양시간의 변화가 감균율에 미치는 영향을 상세히 검토하기 위하여 접종배양시간을 24시간에서 60시간까지 변화시켰다. 또한 카토산의 탈아세틸화도가 감균율에 미치는 영향을 상세히 조사하기 위하여 탈아세틸화도가 47.99%(시료 E), 48.8%(시료 F)로 유지되는 수용성 키틴도 사용되었다.

시료 G는 분자량이 약 3800으로 유지되는 분자량이 지극히 낮은 수용성 카토산으로서 탈아세틸화도가 82.4%를 유지하고 있다. 시료 G는 탈아세틸화도가 시료 E와 시료 F에 비해서 현저히 높아서 80%를 상회하고 있는 반면 분자량이 5000 이하로까지 저하되었다는 점에 차안하여 극도로 낮은 분자량의 크기가 항균력에 미치는 영향을 조사하기 위하여 저분자 수용성 카토산인 시료 G도 직접 제조하여 사용하였다.

Table 3에서 나타낸바와 같이 카토산/초산 수용액의 농도

Table 3. Antibacterial activity after preparation of chitosan/acetic acid solution by TDT

Test solution		Activity			
		24 hr	36 hr	48 hr	60 hr
inoculum size					
	control	×	○	○	○
0.05%	2,000,000	×	○	○	○
	500,000	×	○	○	○
	150,000	×	○	○	○
	80,000	×	○	○	○
	40,000	×	○	○	○
inoculum size					
0.075%	control	○	○	○	○
	2,000,000	×	○	○	○
	500,000	×	○	○	○
	150,000	×	×	○	○
	80,000	×	×	○	○
	40,000	×	○	○	○
	E	○	○	○	○
	F	○	○	○	○
inoculum size					
0.1%	control	○	○	○	○
	2,000,000	×	×	×	×
	500,000	×	×	×	×
	150,000	×	×	×	×
	80,000	×	×	×	×
	40,000	×	×	×	×
	E	×	○	○	○
	F	×	○	○	○
G	×	○	○	○	

O : growth × : inhibition

0.05%에서는 분자량의 크기에 관계없이 MRSA의 생육이 24시간까지 저지되고 있음을 볼 수 있다.

APSM에 의해서도(Table 7) 카토산 자체의 MRSA에 대한 생육저지는 카토산/초산 수용액의 농도 0.05% 부근이라는 사실이 확인되고 있다.

카토산/초산 수용액의 농도가 0.075%로 상승되면 분자량 8만과 15만 범위에서는 36시간까지 MRSA의 생육이 저지되고 있음이 확인되는데 이로부터 카토산의 분자량 8만과 15만 범위에서 좀 더 우수한 항균효과가 발현되고 있는 것으로 추정된다.

반면 시료 E, F, G에서는 항균력이 전혀 발현되지 않고 있어 탈아세틸화도가 50% 부근까지 낮아지게 되면 항균력도 급격히 저하된다는 사실이 증명되며(시료 E, F) 탈아세틸화도가 80% 이상으로 유지되어도 분자량이 5000 미만으로 저하되면 항균력이 극히 저하되고 있음을 볼 수 있다(시료 G).

카토산/초산 수용액의 농도가 0.1%로 상승되면 분자량의 크기에 관계없이 분자량 4만~200만 범위에서 60시간까지 MRSA의 생육이 저지되고 있어 단순한 정균작용이 아니라 살균작용

이 유발되는 것으로 판단된다.

또한 키토산/초산 수용액의 농도 0.1%에서는 항균력을 전혀 보여주지 못하였던 시료 E, F, G 조차도 24시간까지 MRSA의 생육을 저지하고 있어서 탈아세틸화도가 50% 정도까지 저하된다 할지라도 키토산의 농도가 증가되면 항균력이 발현될 수 있음을 증명되고 있다.

상기 Table 4의 항균 실험결과는 키토산을 산수용액에 용해시킨 다음 즉시 사용하였을 때의 결과이다. 여러 번의 반복된 실험으로부터 키토산을 산수용액에 용해시킨 다음 일정기간 동안 방치하였다가 사용하면 항균력이 팔목할만하게 상승되고 있다는 사실이 발견되었다.

키토산/초산 수용액의 제조후 방치기간이 접종배양시간에 미치는 영향 : Table 4는 0.075% 농도의 키토산 산수용액을 7일간 방치하였다가 사용하였을 때 MRSA에 대한 생육저지 결과를 나타내었다.

Table 3에서는 키토산/초산 수용액의 농도가 0.075% 일때 시료 E, F, G에서 항균력이 전혀 발현되지 않았을 뿐만 아니라 분자량 4만~200만에 해당하는 키토산들도 단순히 MRSA에 대하여 36시간까지 생육저지를 유도하였을 뿐 살균력까지는 보여주지는 못하였으나 Table 4에서는 키토산의 종류에 관계없이 접종배양시간 72시간까지 MRSA의 생장발육이 억제되고 있어 정균작용을 넘어서서 살균력이 발현되고 있는 것으로 결론지을 수 있다.

Table 4의 결과로부터 키토산 자체의 항균력을 일충 상승시키기 위해서는 키토산/초산 수용액을 제조하여 즉시 사용하기보다는 일정기간 동안 방치하였다가 사용하는 것이 바람직한 것으로 사료된다.

키토산을 산수용액에 용해시킨 후 즉시 사용하는 경우와 일정기간 동안 방치하였다가 사용하였을 때의 항균력 차이를 다시 한번 확인하기 위하여 분자량 4만~200만 범위에 해당하는 수불용성 키토산과 수용성 키토산에 해당하는 시료 E, F, G에 대하여 키토산/초산 수용액의 농도를 0.05%로 고정하고 MRSA에 대한 생육저지 효과를 검토하였다.

Table 5에서 보듯이 키토산을 산수용액에 용해시킨 후 즉시

Table 4. Antibacterial activity after preparation of 0.075% chitosan/acetic acid solution by TDT.

Test solution	Activity				
	24 hr	36 hr	48 hr	60 hr	72 hr
control	O	O	O	O	O
2,000,000	x	x	x	x	x
500,000	x	x	x	x	x
150,000	x	x	x	x	x
0.075%	x	x	x	x	x
80,000	x	x	x	x	x
40,000	x	x	x	x	x
82,500	x	x	x	x	x
200,000	x	x	x	x	x
3,900	x	x	x	x	x

O : growth x : inhibition

사용하는 경우는 분자량 4만~200만에 해당하는 수불용성 키토산에서 접종배양 24시간까지 MRSA의 증식이 저지되고 있다. 특히 분자량 8만과 15만에 해당하는 키토산은 접종배양 30시간까지 MRSA의 증식을 저지하고 있음을 볼 수 있다.

반면 수용성 키토산인 시료 E, F, G는 항균력을 전혀 보여주지 못하고 있다. 그러나 키토산을 산수용액에 용해시킨 후 일주일 동안 방치하였다가 사용하는 경우는 모든 시료에서 60시간까지 MRSA의 생육이 저지되고 있어 MRSA에 대한 정균의 개념을 넘어서서 살균작용이 발현되고 있음이 확인된다. 수용성 키토산들에 비해서 탈아세틸화도가 낮은 시료인 E, F, G에서 조차 살균작용이 나타나고 있다는 사실은 매우 특이한 현상으로 받아들여지고 있다.

키토산/초산 수용액과 키토산 수용액이 항균성에 미치는 영향 : 수불용성 키토산들은 중성의 물에 용해되지 않기 때문에 중성의 물에 용해시켜서 접종배양이 불가능하지만 시료 E, F, G는 중성의 물에 용해 가능하므로 중성의 물에 용해시켜서 사용할 수도 있고 산수용액에 용해시켜서 사용할 수도 있다.

Table 5와 Table 6에서 보듯이 시료 E, F, G를 중성의 물에 용해시켜서 사용하는 경우는 항균력이 전혀 발현되지 않지만 산수용액에 용해시켜서 사용하는 경우는 항균력이 발현되고 있

Table 5. Antibacterial activity after preparation of 0.05% chitosan/acetic acid solution by TDT.

Test solution	Activity			
	24hr	30hr	48hr	60hr
control	O	O	O	O
2,000,000	x	O	O	O
500,000	x	O	O	O
150,000	x	x	O	O
80,000	x	x	O	O
immediately	40,000	x	O	O
E	w*	O	O	O
	a**	O	O	O
F	w	O	O	O
	a	O	O	O
G	w	O	O	O
	a	O	O	O
control		O	O	O
2,000,000		x	x	x
500,000		x	x	x
150,000		x	x	x
80,000		x	x	x
after 7 days	40,000	x	x	x
E	w	O	O	O
	a	x	x	x
F	w	O	O	O
	a	x	x	x
G	w	O	O	O
	a	x	x	x

W* : dissolved in water O : growth

a** : dissolved in 0.05% acetic acid x : inhibition

Table 6. Antibacterial activity after preparation of 0.025% chitosan/acetic acid solution by TDT.

Test solution	Activity				
	24hr	30hr	48hr	60hr	72hr
immediately	control	O	O	O	O
	2,000,000	O	O	O	O
	500,000	O	O	O	O
	150,000	O	O	O	O
	80,000	X	O	O	O
	40,000	X	O	O	O
	E w	O	O	O	O
	E a	O	O	O	O
	F w	O	O	O	O
	F a	O	O	O	O
after 7 days	G w	O	O	O	O
	G a	O	O	O	O
	control	O	O	O	O
	2,000,000	O	O	O	O
	500,000	O	O	O	O
	150,000	X	O	O	O
	80,000	X	O	O	O
	40,000	O	O	O	O
	E w	O	O	O	O
	E a	X	X	X	X
F	w	O	O	O	O
	a	O	O	O	O
	G w	O	O	O	O
	a	X	X	X	O

W* : dissolved in water O : growth

a** : dissolved in 0.05% acetic acid X : no growth

는 것으로 보아 역시 키토산의 항균작용 기전이 free -NH₂에 기인하는 것이 아니고 -NH₃⁺ 상태가 유지되어야만 항균력이 발현될 수 있다는 사실도 증명되고 있다.

키토산의 농도를 0.025%로 더욱 저하시키고 산수용액으로 용해시킨 후 즉시 사용하였을 때 분자량 4만, 8만에서만 MRSA의 증식이 저지되고 있을 뿐 다른 시료들에서는 항균력이 발현되지 않고 있는 것으로부터 분자량이 4만~15만 범위로 유지될 때 항균력이 가장 우수하다는 사실이 다시 한번 증명되고 있다(Table 3).

Table 8. Result of MIC and MBC value test of chitosan/acetic acid solution by APSM and TDT.

Molecular weight of chitosan	Agar Plate Smear Method	Tube dilution technique		
		after preparation of chitosan solution used immediately	after preparation of chitosan solution used that passed for 7 days	
2,000,000				
500,000				
150,000	0.05%(6.49 ppm) Inhibition	0.05%(5 ppm) Inhibition [specially molecular weight 80,000, 40,000 : 0.025%(2.5 ppm)]	0.05%(5 ppm) Bactericide [specially molecular weight 150,000, 80,000 : 0.025%(2.5 ppm)]	
80,000				
40,000				
E	0.1%(12.98 ppm) Inhibition		0.025%(2.5 ppm) inhibition	
F		0.1%(10 ppm) Inhibition	0.05%(5 ppm) inhibition	
G	-		0.025%(2.5 ppm) inhibition	

Table 7. Antibacterial activity of chitosan/acetic acid solution by APSM.

Test condition	Test solution	Reduction in bacteria(%)
	control	
smearing with chitosan solution on the Agar plate	2,000,000 0.05%	500,000 150,000 80,000 40,000
		96
		92

반면 키토산 산수용액을 제조한 후 7일간 방치하였다가 사용하면 Table 6의 0.025%농도에서 시료 E와 G는 48시간까지 증식이 억제되고 있다. 동일한 수용성 키토산인 시료 E와 시료 F에서 항균력의 차이가 발생하는 이유는 아마도 분자량의 크기가 현저히 다르기 때문일 것으로 추정된다.

시료 E는 분자량 82500, 시료 F는 분자량 201400이라는 점을 감안할 때 분자량의 차이가 항균력에 영향을 미치지 않나 의심되고 있다.

앞서 수불용성 키토산들에서는 분자량이 4만~15만 범위로 유지될 때 항균력이 가장 우수하였다는 점을 감안할 때 역시 수용성 키토산인 시료 E와 시료 F에서도 분자량과 관련된 동일한 원칙이 적용되어 분자량이 큰 경우보다는 분자량이 82500으로 낮게 유지되고 있는 시료 E에서 항균력이 크게 발현되는 것으로 추정된다.

상기의 논의로부터 수불용성 키토산의 경우 분자량이 4만~15만 범위로 유지될 때 MRSA의 증식저지능력이 가장 탁월하며 키토산 농도 0.05%로 키토산을 산수용액에 용해시켜 7일간 방치 후 사용하면 정균율 넘어서서 살균능력까지도 발휘될 수 있음이 확인된다. 또한 7일 방치 후 사용하는 경우는 MRSA에 대한 키토산의 MIC를 2.5 ppm까지 저하시킬 수 있다는 사실도 확인되고 있다.

3.2 APSM에 의한 키토산/초산 수용액의 항균성

APSM을 적용하여 키토산/초산 수용액의 항균력을 테스트하여 Table 7에 제시하였다. 키토산/초산 수용액의 농도가 0.05%일 때 감균율이 92~96% 범위에 이르고 있으며 0.07~0.5%의 농도범위에서 감균율이 97% 이상으로 나타났다.

키토산/초산 수용액의 농도가 0.05%일 때 키토산의 분자량 크기와 관계없이 감균율이 거의 동일하게 나타나고 있다. 키토산으로 가공된 섬유의 항균성 측정결과들을 참고할 때 키토산의 분자량 크기가 MRSA의 항균력에 영향을 미치는 것으로 예측하였다(성하수 등 1998. 성하수 등, 1997. 이재원 등, 1999. 이재원 등, 1998).

Table 7의 결과와 기발표된 연구결과간의 항균력 차이는 우선 항균력 시험방법이 다르다는 이유가 제시될 수 있다. 또한 Table 7의 결과는 키토산이 완전히 용해된 상태에서 적용되었던 반면 기 발표된 논문에서는 가공포위에 고화, 부착된 키토산이 항균력을 발휘하고 있다는 차이점도 항균력 차이를 유발시키고 있는 것으로 평가된다.

지금까지의 논의로부터 Agar Plate Smear Method와 Tube dilution technique에 의한 chitosan/acetic acid solution의 MIC와 MBC(Minimum Bactericidal Concentration)를 Table 8에 정리하였다.

4. 결 론

병원성균 MRSA에 대한 키토산의 항균성을 조사하기 위하여 홍게의 갑각으로부터 탈아세틸화도가 90% 이상이면서 분자량이 200만, 50만, 15만, 8만, 4만인 수불용성 키토산과, 탈아세틸화도 약 48%이고 분자량 20만, 8만, 탈아세틸화도 82%이며 분자량 3,900인 수용성 키틴을 각각 제조하여 TDT와 APSM으로 항균성을 시험하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 탈아세틸화도가 90% 이상으로 유지되면서 분자량이 상이한 5종류의 키토산을 다양한 농도로 산수용액을 제조하여 항균력을 측정한 결과 0.05% 이상의 농도에서는 분자량의 크기에 관계없이 거의 유사한 항균력을 보여주나 특히 분자량이 4만~15만 범위인 경우는 더욱 우수한 항균력이 발현되고 있다.

2. 키토산/초산 수용액 제조 후 즉시 사용할 때보다 저온에서 7일간 보존하였다가 사용했을 때의 항균성이 월등히 우수하였다.

3. 7일간 보존하였다가 사용했을 경우 분자량이 약 8만이면

서 탈아세틸화도가 48%인 키틴은 0.025%의 아주 낮은 농도에서도 우수한 항균성을 나타내었다.

4. 키토산을 초산수용액에 용해시켜서 사용할 때에는 항균력이 우수하나 증성의 물에 용해 시켜서 사용하였을 때는 거의 항균력이 발현되지 않는 것으로 보아 키토산은 -NH_3^+ 기의 양이온 상태가 유지될 때에만 항균력이 발현되는 것으로 사료된다.

참고문헌

- 성하수 · 고석원 · 송경근 (1998) Chito-oligosaccharide를 이용한 면직물의 항미생물가공(II). *한국섬유공학회지*, 35(11), 716-720(1998).
- 성하수 · 김재필 · 고석원 (1997) 항균제로서 키토산 올리고당의 제조와 면직물에 대한 영향. *한국섬유공학회 추계세미나*, 329-333.
- 이재원 · 남창우 · 고석원 (1999) Acrylamidomethyl Chito-oligosaccharide를 이용한 면직물의 항미생물 가공. *한국섬유공학회지*, 36(10), 769-775.
- 이재원 · 남창우 · 성하수 · 고석원 (1998) Chito-oligosaccharide를 이용한 면직물의 항미생물 가공(I). *한국섬유공학회지*, 35(10), 649-655.
- 전동원 (1997), 생체 임상의학용 키틴 및 키토산의 제조방법. Kr 122542
- 전동원 (2001), 생체 임상의학용 키틴 및 키토산의 제조방법. Kr 0190723
- 전동원 (1998a), 생물의학 등급의 저분자량 키토산의 제조방법. Kr 159971
- 전동원 (1998b), 생물의학 등급의 저분자량 키토산의 제조방법. Kr 159972
- 최정임 (2001) Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*에 대한 키토산의 항균성과 항균시험방법에 관한 연구. 이화여자대학교 대학원 박사학위청구논문.
- 吉川邦彦 (1997) ‘抗菌のすべて.’ 繊維社, pp.1-394.
- 青山直充 (1994) “人にやさしい繊維と加工”. 繊維製品衛生加工協議會, pp.1-488.
- Dengrmont E. and Membre M. (1995) *Applied and Environmental Microbiology*, 61(12), 4389-4395.
- Michael T. Madigan (1997) “Biology of Microorganisms,” Brrock, pp.406-408.

(2003년 2월 12일 접수)