

# 포도상구균(*Staphylococcus aureus*)에 대한 키토산의 항균성 -키토산의 수용성, 탈아세틸화도 및 분자량이 항균성에 미치는 효과-

한영숙 · 전동원

이화여자대학교 의류직물학과

## Antibacterial Activity of Chitosan against *Staphylococcus aureus* -The Effect of Watersolubility, Degree of Deacetylation and Molecular Weight of Chitosan on Antibacterial Activity-

Youngsook Han · Dongwon Jeon

Dept. of Clothing & Textiles, Ewha womans University  
(2003. 11. 17. 접수)

### Abstract

The antibacterial activities of several types of chitosan were measured against *Staphylococcus aureus* and evaluated for their application to antibacterial textile finishing. The % reduction of bacteria of the chitosans prepared in our laboratory were between 72 and 87%. The two water-soluble chitosans with molecular weights 1,000 and 3,000 did not show antibacterial activities. The deacetylation of chitosan was appeared to increase antibacterial activity. The % reduction in bacterial density of the 86%-deacetylated chitosan solution was 56% where that of the 76%-deacetylated chitosan solution was only 17% at 0.1% chitosan concentration. Molecular weights of the chitosans seemed not to affect antibacterial activities of chitosans. The antibacterial activity of the acid-soluble, 86%-deacetylated chitosan with 4 cps showed 98% of the % reduction at the level of 0.2% chitosan. The % reduction of bacteria of this chitosan was higher at the higher concentration of acetic acid in the chitosan-bacterial mixture. The antibacterial activity was increased with the pH change over the range of 4.0 to 6.5. The 100% of the % reduction of bacteria was achieved within 4 hour incubation of the chitosan-bacterial mixture. According to the data obtained from the above experiments, the four chitosans among the six prepared in our laboratory were proved to be valuable for antibacterial textile finishing.

**Key words:** Chitosan, Antibacterial activity, Degree of deacetylation, Molecular weight, Solubility; 키토산, 항균성, 탈아세틸화도, 분자량, 용해성

### I. 서 론

미생물은 질병과 악취를 발생시킬 뿐 아니라 섬유 등에도 서식하면서 섬유의 물리화학적 성질을 변화시켜 취화와 변색 등의 원인이 되기도 한다(남윤자, 1995; Osamoo Yugae, 1992; 弓消 治, 1989). 섬유 향균가공은 미생물의 살균 또는 증식억제를 위한 섬유의 처리나 가공을 의미하는 것으로서 2차 대전 중 군

복에 4차 암모늄염 처리 및 1955년 미국의 「새니타이즈가공」 이후 가공 기술과 방법, 향균제 및 향균 작용 메카니즘에 대해서 다각적으로 연구 보고되고 있다(Vigo, 1983; Suzuki, 1993). 최근 소비자들의 위생 관념이 고조되면서 섬유의 향균 가공에 대한 관심이 더욱 증가함에 따라 이에 관련한 연구도 활발히 진행되어왔으나(우지형, 1984) 섬유 가공에 이용되는 대부분의 향균제는 인체에 직접 악영향을 주거나 환경

오염의 원인이 되어 실용화하는 데에는 한계가 있었고(鶴谷 勝正, 1990; 김종준 외, 1995; Tokura, 1995) 인체와 환경에 친화적인 항균제의 개발이 필요한 시점이다.

키틴과 키토산은 셀룰로오스와 유사한 화학구조를 가진 N-acetyl-D-glucosamine의 (1→4)결합 천연 다당류로서 특히 glucose단위의 C<sub>2</sub>에 위치한 아세트아미드가 50% 이상 N-탈아세틸화된 물질을 키토산(chitosan)이라 지칭한다(Muzzarelli, R. A. A., 1977). 구조상 셀룰로오스와 마찬가지로 글루코오스 잔기 C6 위치의 -CH<sub>2</sub>OH와 C<sub>3</sub> 위치의 -OH를 가지고 있을 뿐 만 아니라 글루코오스 단위 C<sub>2</sub> 위치에 -N이 치환되어 있어서 셀룰로오스보다 다양한 유도체의 제조가 가능하여(Stanford, P. A., 1988) 현재 기능성 유도체의 개발과 이들의 의료, 식품, 농업, 공업, 화장품에의 응용에 관한 관심이 모아지고 있다(Muzzarelli, R. A. A., 1982). 섬유 분야에 응용하고자 하는 시도는 20세기 초 키틴 섬유(Seo, H., 1993) 제조이후 계속되고 있으며 키토산은 키틴에 비해 비결정 영역이 많아서 약산에 쉽게 용해되고 섬유 응용이 비교적 용이하여 방사 원액에 첨가하거나 가공단계에서 이용될 수 있다. 키토산을 이용한 방오, 방축, 염색성 향상, 직물의 태 변화와 관련한 연구가 이루어지고 있고(김종준 외, 1995; 신윤숙, 이연흠, 1994; 大石光一 & 乾拓雄, 1989) 특히 항균성 증진과 관련하여 많은 연구와 상품이 개발되고있다(항균방취섬유개발, 1991; 이은영, 이해자, 1995; Muzzarelli, 1990; Katsumasa & Takao, 1994; 田中 廣司 & 江崎 孝二, 1993; JP 93 05, 273; Seo & Tanibe, 1992).

키토산은 광범위한 항미생물활성을 소유하면서도 타 항균 가공제에 비해 우수한 생분해성과 환경친화

성을 지니는 풍부한 천연 고분자 물질로서 인체 무독, 섬유 성능 저하를 초래하지 않는 장점을 지니기 때문에 항균가공제로 섬유분야에의 적극적인 이용이 바람직하다(Muzzarelli, 1985). 따라서 본 연구에서는 키토산을 직물의 항균 가공에 응용하기 위한 기초 연구로서 인체의 피부나 직물에 흔히 서식하는 화농균의 일종인 포도상구균(*Staphylococcus aureus*)에 대한 몇가지 키토산들의 항균 활성을 조사하였다. 용해성, 탈아세틸화도, 분자량 등 키토산의 특성에 따른 항균성을 측정하였고 이들 키토산 용액이 균과의 접촉 상태에서 키토산의 농도, 접촉시간, 용매, pH, 균농도 등의 변화에 따른 항균성을 측정하여 이들이 항균성에 미치는 영향을 알아보았다.

## II. 실험

### 1. 시료

#### 1) 키토산

키토산 시료는 게 껍질을 NaOH 및 HCl로 처리하여 calcium carbonate와 protein을 제거한 다음 분리된 키틴을 탈아세틸화하여 분리 정제한 것 6종류와 시중에서 구입한 것 1종류(#5) 등 모두 7가지였으며 이들의 물리화학적 특성은 <Table 1>과 같다.

#### 2) 균주

항균성 시험에 사용한 세균은 포도상구균(*Staphylococcus aureus*)으로 한국 유전공학 연구소 보유균주(Strain: KCTC 1916)를 분양받아 사용했다. 단기보존은 온도 5°C로, 장기 보관은 냉동고(Forma Scientific Bio-Freezer<sup>®</sup>)에서 -20~-60°C를 유지하면서 사용하였다.

Table 1. Physicochemical properties of chitosan samples

Chitosan Types	Solubility	Viscosity (cps)	Molecular Weight (dalton)	Degree of Deacetylation(%)
#1	Water-insoluble	930	1,380,000	92
#2		50	60,000	92
#3		8	8,000	92
#4		4	4,000	86
#5		-	230,000	76
#6	Water-soluble	-	1,000	-
#7		-	3,000	-

2. 실험방법

1) 키토산의 분자량 및 탈아세틸화도 측정

키토산의 점도는 1% 아세트산 수용액에 용해하여 회전식 점도 측정기(HAAKE RV20 system)로 30°C에서 전단 속도 100D(1/s)를 유지하면서 측정하여 상대적인 분자량으로 간주하였고 분자량은 Mark-Houwink식( $[\eta]=K \times Ma$ )에 고유점성도를 대입하여 산출하였다. 탈아세틸화도는 키토산을 염산수용액에 녹여 메탄올과 탈이온수로 반복 세척하고 페놀프탈레인을 지시약으로 사용하여 NaOH 수용액으로 중화 적정하여 산출하였다(김종준 외, 1995).

2) 항균성 측정

본 실험에서는 균수 측정법(한국미생물학회, 1987)을 기초로 항균성을 평가하였다. 보존 중인 균주를 육즙에 이식하고 37°C에서 약 24시간 진탕배양(JHONSAM Corp. JS-SKI-1000)한 뒤 시험균용액을 제조하고 UV-Visible Spectro-photometer(Kotron Unicon 860<sup>®</sup>)로 균수를 측정했다. 초산수용액과 물을 용매로 키토산 용액을 제조한 뒤 키토산용액과 시험균현탁액을 혼합하여 키토산-균 혼합액(chitosan-bacterial mixture)을 제조하였다. 혼합시의 조건이 항균성에 미치는 효과는 키토산 농도, 용액조성, 용매, pH, 접촉시간에 변화를 주어 측정하였다. 배양이 끝난 키토산-균 혼합액 중 일정 분량을 채취하고 top agar를 첨가한 후 미리 준비해 둔 bottom agar위에 부어 평판을 작성하였다. 사용된 육즙액배지(Broth Medium)와 육즙고체배지를 KS K 0693에 준하여 <Table 2>와 같이 조제하였다. 작성된 평판은 항온배양기(JHONSAM Corp. JS/IN/180)에서 37°C로 24-72시간 배양한 뒤 생성된 콜로니를 계수하고 회석배울을 곱하여 시료 1ml 당 생균수를 구하였다. 균감소율 계산 방식은 다음과 같고 이 때의 대조구는 용매인 초산 혹은 탈이온수로 하였다.

$$\text{균감소율}(\% \text{ reduction of bacteria}) = \frac{A-B}{A} \times 100$$

A : 대조구(초산용액)의 균수

B : 처리구(키토산용액)의 균수

III. 결과 및 고찰

1. 수용성 키토산의 항균성

키토산은 formic acid와 acetic acid 등 특정 용매를 제외한 대부분의 용제에 불용성(Muzzarelli et al, 1987)이므로 용해도가 높은 유도체의 개발(변희국 외, 1992; Muzzarelli, 1988)등 용해성을 증가시키려는 많은 노력이 있었다. 반면 수용성 키토산은 저렴하고 물을 용매로 사용할 수 있어 응용성이 높으나 항균제로서 이용되기 위해서는 항균성도 높아야 한다. 여기서는 본 실험실에서 제조한 수용성 키토산의 항균활성을 확인하고자 분자량이 1,000과 3,000인 두 종류의 수용성키토산 #6, #7과 산가용성인 키토산 #4의 항균성을 비교하였다. 키토산의 농도는 0.1%로 하였고 접촉 직 후(이하 접촉시간 0라 칭함)에서 *Staphylococcus aureus*에 대한 항균성을 측정하고 <Table 3>에 나타냈다.

#4 키토산-균 혼합액의 균수는  $1.8 \times 10^2$ 으로 대조구인 초산용액의  $4.1 \times 10^2$ 의 1/2.3로 상대적으로 적었으며 초산용액을 대조구로 계산한 감균율은 55.5%로서 상당한 항균성을 나타냈다. #6, #7 수용성 키토산-균 혼합액의 경우 균수가 각각  $5.2 \times 10^2$ 와  $4.7 \times 10^2$ 으로서 대조구인 초산용액 보다 오히려 높아 균 생육 억제 효과가 나타나지 않았다. 감균율은 분자량 1,000은 -30.5%과 3,000은 -16.0%로 오히려 균의 생육을 촉진하는 것으로 나타났다. 이러한 결과가 수용성 키토산 #6과 #7의 균주 *Staphylococcus aureus*에 대한 특이한 반응일 수도 있어서 본 실험만으로 다른 균에 대해서도 항균성이 없다고 단정할 수는 없었으나 수용

Table 2 . Composition of bacterial culture media

(A) Broth Medium	
Glystate peptone(BBL <sup>®</sup> ) : 10 g	Beef extract powder(BBL <sup>®</sup> ) : 5 g
Deionized water: 1,000 ml	pH: 6.8
(B) Agar Medium	
bottom agar: broth medium+1.5% agar(Junsei Chemical Co., LTD.)	pH 7.0-7.2
Top agar : broth medium+agar (0.7~0.8%)	pH 7.0-7.2

**Table 3. Comparison of antibacterial activity between water-insoluble and water-soluble chitosan(Experimental conditions were as follows:Initial bacterial density  $1 \times 10^3$ , Contact time 0, Incubation  $37^\circ\text{C}/48\text{hrs}$ . Conc. of acetic acid was 0.5%. Conc of chitosan was 0.1% )**

Test solution	Solubility	Viscosity or Mw	Chitosan type	Number of bacteria( $\times 10^3$ )	% Reduction of bacteria
				Mean SD	Mean SD
Broth medium	-	-	-	5.8 $\pm$ 0.1	-
Acetic acid	-	-	-	4.1 $\pm$ 1.1	0
Chitosan	Water-insoluble	4cps	#4	1.8 $\pm$ 0.2	55.5 $\pm$ 5.5
	Water-soluble	1,000	#6	5.2 $\pm$ 1.0	-30.5 $\pm$ 9.5
		3,000	#7	4.7 $\pm$ 1.2	-16.0 $\pm$ 4.0

**Table 4. Effects of effects of deacetylation on antibacterial activity of chitosan against staphylococcus aureus (Experimental conditions were the same as Table 3.)**

Test solution	Degree of deacetylation (%)	Chitosan type	Number of bacteria( $\times 10^3$ )	% Reduction of bacteria
			Mean $\pm$ SD	Mean $\pm$ SD
Broth Medium	-	-	5.8 $\pm$ 0.1	-
Acetic Acid	-	-	4.1 $\pm$ 1.1	0
Chitosan	86	#4	1.8 $\pm$ 0.2	55.5 $\pm$ 5.5
	76	#5	3.2 $\pm$ 0.3	17.4 $\pm$ 14.1

성 키토산의 경우 어느 정도 균에 대한 생육 촉진 효과가 있음이 나타나 수용성 키토산에서 항균성을 기대하기는 어려울 것으로 사료된다. 수용성 키토산은 물의 사용이 가능하여 응용성이 넓다는 이점이 있으나 항균성이 없는 것으로 보여 새로운 타입의 수용성 키토산 개발이 필요한 것으로 보인다.

## 2. 탈아세틸화도에 따른 키토산의 항균성

키토산은 키토신의 C<sub>2</sub>에 위치한 아세트아미드의 아세틸기를 50%이상 제거한 것으로 키토산 제조 과정에서 탈아세틸화를 조절할 수 있다(Moore & Robert, 1980; Mima et al, 1982). 탈아세틸화도는 키토산의 용해도와 같은 물리 화학적 성질에도 영향을 줄 뿐만 아니라 최근에는 항균성에도 영향을 미친다고 보고되고 있다(신윤숙, 민경혜, 1996). 키토산의 항균성 메카니즘에 대한 현재의 견해로는 키토산 아민기의 양이온화 메카니즘이론이 지배적이다. 양이온화 메카니즘은 키토산의 구조 단위인 글루코사민의 -C<sub>2</sub> 위치의 -NH<sub>2</sub>가 -NH<sub>3</sub><sup>+</sup>화되면 이 양이온이 세균 등의 세포벽에 작용되어 미생물의 자유도를 저하시키고 생육을 저지하여 항균성을 발휘한다는 이론이다. 이에 근거한다면 탈아세틸화도가 높아진다는 것은 C<sub>2</sub>

의 아민기 증가와 양이온화 증가를 의미하는 것이므로 탈아세틸화 정도는 항균성에 긍정적 영향을 줄 것으로 생각되었다. 그러나 탈아세틸화도를 높이기 위한 공정은 또한 경제적 효율성을 저해하는 요인으로 작용될 수 있어 항균제로서의 이용을 높이기 위해서는 항균성과 경제성이라는 두 조건을 공히 만족시킬 수 있는 탈아세틸화 키토산이 필요하다. 따라서 본 실험에서는 아세틸화도가 86%와 76%인 #4, #5 두 종류의 키토산 0.1% 용액을 *Staphylococcus aureus*와 접촉한 뒤 즉시 채취하여 항균성을 측정하였고 탈아세틸화도가 키토산의 항균성에 미치는 영향을 고찰하였다(Table 4).

76%와 86%의 두 탈아세틸 키토산에서 배양된 균수 모두 대조구인 육즙액배지나 초산시료에 비해 적어 항균력이 확인되었다. 탈아세틸화도 86%에서 균수는 약 180으로 탈아세틸화도 76%의 균수 320보다 적었다. 감균률은 86% 탈아세틸키토산이 56%으로 동일 조건의 76%의 탈아세틸화 키토산의 약 17%보다 높았다. 본 실험 결과 탈아세틸화도가 높으면, 즉 -NH<sub>2</sub>가 약 10% 증가하면 감균률이 약 40% 상승하는 것으로 나타나 탈아세틸화도가 높을수록 항균성이 증가한다는 기존의 다른 보고(田中廣司 & 江崎孝二, 1993)와 유사한 결과를 얻었으며 탈아세틸화도

가 키토산의 항균성에 영향을 줄 수 있다는 사실을 확인할 수 있었다. 76%와 86%의 비교적 높은 수준의 탈아세틸 키토산의 항균성에 차이가 나타났으므로 이를 토대로 추후 좀더 다양한 범위에서 항균성의 비교가 필요한 것으로 생각된다.

### 3. 분자량에 따른 키토산의 항균성

키토산 분자량에 따라 항균성이 다르다고 보고된 바 있어(Tokura, 1995). 키토산의 분자량이 항균성에 미치는 영향을 검토하였다. 상대적 분자량은 점도에 비례하므로 키토산의 점도가 4cps, 8cps, 930cps인 다른 3가지의 항균성을 비교 평가하여 분자량에 따른 항균성을 평가하였다. 탈아세틸화율은 86~92% 범위였고 농도 0.1%, pH 4, 접촉 시간 0에서 *Staphylococcus aureus*에 대한 항균성 측정 실험을 실시하였다(Table 5).

<Table 5>에 나타난 결과를 보면 분자량의 크기에 관계없이 감균율은 평균 약 74~87% 범위의 우수한 항균성을 나타냈다. 점도가 4→8→930cps의 순으로 커질수록 감균율이 증가했으나 봄 실험의 경우 분자량의 변화에 비례하여 감균율이 증가하지는 않았다. 특히 점도가 4→8cps로 상대적으로 적게 상승한 경우 감균율이 급격히 증가했다. 이 때 탈아세틸화도도 증가했으므로 분자량 단독의 원인으로 보기는 어려우며 탈아세틸화도의 영향도 큰 것으로 고찰된다. 본 실험에 사용된 키토산은 광범위한 분자량의 영역에서 항균성을 발휘하였으며 탈아세틸화도를 높이면 항균성을 더욱 증가시킬 수 있을 것으로 예상된다. 고분자 물질의 경우 흔히 용액 상태에서 점도가 높아 균과의 접촉 확률에 영향을 미쳐 항균력이 다르게 나타날 수 있지만 본 실험에서와 같이 고분자 키토산일

지라도 소량 사용하는 경우 균과 혼합시 용액의 점도가 낮아 균과의 접촉이 원활하게 유지될 수 있었으며 항균성을 저하시키지 않은 것으로 보여 긍정적인 결과였다.

### 4. 키토산-균액 접촉 조건에 따른 항균성

전술한 바와 같이 86~92% 범위의 키토산은 항균성이 우수하여 섬유의 항균제로 사용이 기대되므로 점도 4cps인 86% 탈아세틸화 #4 키토산을 중심으로 키토산농도, 용매, pH, 접촉시간, 균농도 등의 다양한 조건에 따른 *Staphylococcus aureus*에 대한 항균성을 비교 검토하였다.

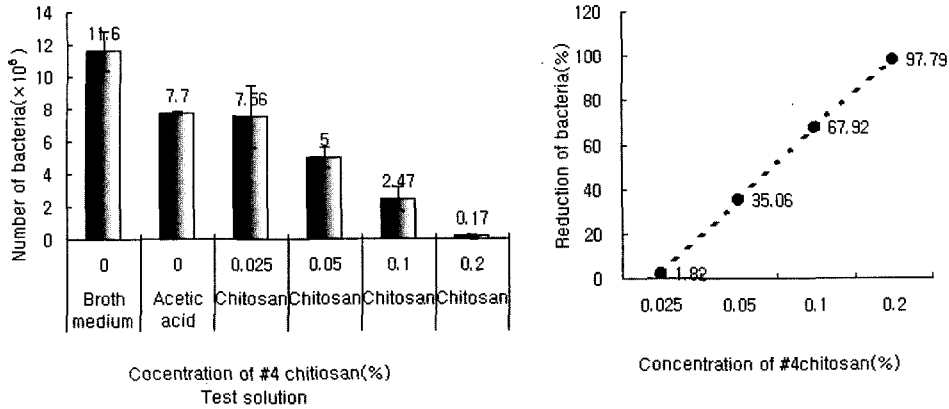
#### 1) 키토산의 농도에 따른 항균성

MIC값(최소 균 억제 농도)으로 항균성이 평가되므로 균감소를 평가방식에서 키토산 농도가 낮은 수준에서 항균력이 나타난다면 상대적으로 우수하면서 경제적인 항균제로 평가될 수 있을 것이다. 키토산의 경우 *Staphylococcus aureus*에 대해 최소 20ppm에서 균 억제력을 나타내고(Seo et al, 1992) *E. coli*에 대해서는 0.02%에서 균 억제 작용이 있다고(Hirano, 1989) 보고되어 우수한 항균성이 입증되었다. 탈아세틸화도 86%인 #4 키토산 농도를 0.025%에서 0.2%까지 변화시켜 키토산 농도가 항균성에 미치는 영향을 파악하였다(Fig. 1). 또한 상대적으로 탈아세틸화도가 낮은 #5 키토산(탈아세틸화도 76%)의 농도를 0.1에서 0.5%로 변화시켜 접촉시간 0과 3시간에서 항균성을 측정했고 그 결과는 <Fig. 2>와 같다.

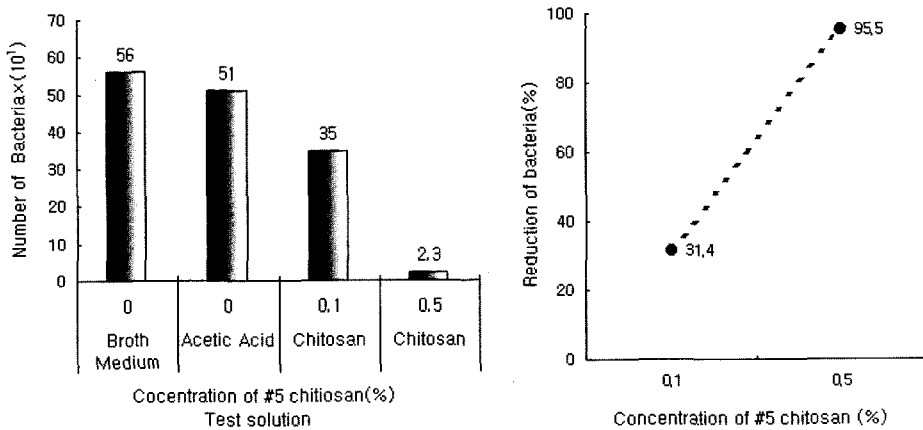
<Fig. 1>에서 대조구인 초산용액의 경우 균수가  $7.7 \times 10^6$  이었고 키토산 농도가 0.025% → 0.05% →

**Table 5. Effects of molecular weights on chitosan antibacterial activity against *Staphylococcus aureus*. (Experimental conditions were as follows: initial bacterial density  $1.0 \times 10^8$ . Contact time: 0. Incubation  $37^\circ\text{C}/48\text{hrs}$ . Conc. of acetic acid : 0.5%. Conc. of chitosan : 0.1%. Relative molecular weights were expressed in terms of viscosity(cps).**

Chitosan Type	Molecular Weight (cps) <sup>a</sup>	Degree of Deacetylation (%)	Number of bacteria ( $\times 10^7$ )		% Reduction of Bacteria	
			Mean	SD	Mean	SD
Broth Medium	-	-	56.5	±1.5		
Acetic Acid	-	-	55.0	±4.0	0	
Chitosan Solution	#1	930	7.0	±0.3	87.3	±1.4
	#3	8	7.3	±4.4	86.1	±9.0
	#4	4	14.0	±4.2	73.7	±12.7



**Fig. 1. Effects of chitosan concentrations on the antibacterial activity of highly deacetylated chitosan against *Staphylococcus aureus*. (Experimental conditions: Initial bacterial density  $1.0 \times 10^7$ , contact time 0, Incubation  $37^\circ\text{C}/24\text{hrs}$ . Conc. of acetic acid 0.05%)**



**Fig. 2. Effects of chitosan concentrations on the antibacterial activity of low deacetylated chitosans against *Staphylococcus aureus* (Experimental conditions were as follows: initial bacterial density  $1.0 \times 10^3$ , Incubation  $37^\circ\text{C}/24\text{hrs}$ , Contact time 0, Conc. of acetic acid 0.5%)**

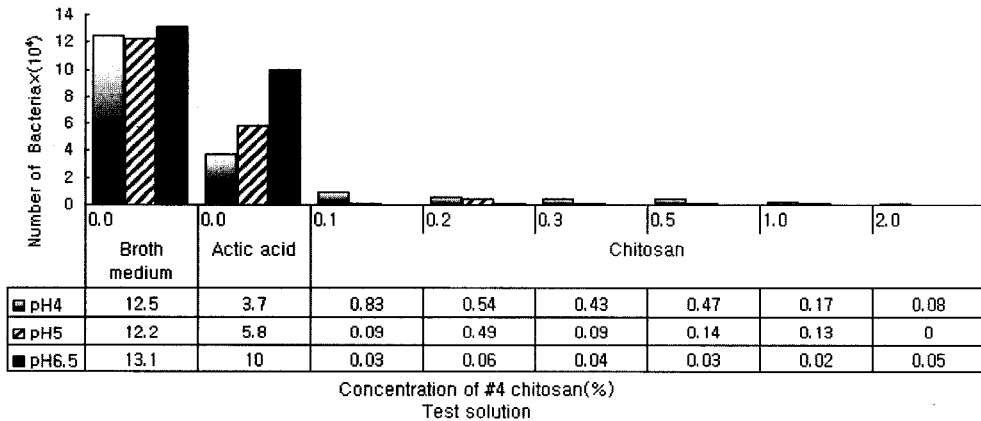
0.1%→0.2%로 증가함에 따라 균수는  $7.6 \times 10^6 \rightarrow 5.0 \times 10^6 \rightarrow 2.5 \times 10^6 \rightarrow 0.17 \times 10^6$ 로 감소하였다. 감균율로 나타내면 약 2%→35%→68%→98%로 점차 증가하고 있다. <Fig. 2>에서는 접촉시간이 0으로 동일 할 때 키토산 농도가 0.1%→0.5%로 증가되면 균수는 350→23으로 감소하여 감균율이 31.4→95.5로 상승되었다. 일반적으로 키토산의 농도가 증가함에 따라 항균성이 증가하는 것으로 나타났으며 특히 고타아세틸 키토산 #4의 경우 0.2%의 저농도에서도 97% 이상의 항균력을 나타내고 있었다. 이러한 결과를 근거로 8, 50, 95cps의 다른 92% 탈아세틸 키토산도 모두 #4 키토산과 같은 경향의 항균력을 나타낼 것으로 생각된다.

**2) 항균성에 미치는 용매의 영향**

용매인 초산이 키토산의 항균활성에 미치는 영향을 평가하기 위해 농도 0.1% #4 키토산 용액의 초산 농도를 각각 0.05%와 0.1%가 되도록 조정하였고 접촉시간을 24시간까지 변화시키며 균수의 변화를 측정하였다(Table 6). pH나 키토산의 농도를 동일한 상태로 조정하고 단지 용매인 초산의 농도를 0.05%에서 0.1%로 2배 증가시켜 키토산 용액에서 배양된 균수를 비교해 보았다. 접촉 시간 4시간에서 키토산 용액 중의 초산농도가 증가하여도 균수는 감소되지 않고 오히려 4.6배 증가하였다. *Staphylococcus aureus*에 대한 항균성은 키토산-균 혼합액의 초산농도가 낮을 때 더 크게 나타났는데 이러한 경향은 접촉 시

**Table 6. Effects of acetic acid concentration at different contact times on antibacterial activity of highly deacetylated chitosan. (Experimental conditions: Initial bacterial density  $2.0 \times 10^8$ , Contact time 0, incubation  $37^\circ\text{C}/24\text{hrs}$ . Conc. of #4 chitosan 0.1%. H means number of colonies which are too many to count)**

Test Solution	Concentration of Acetic Acid (%)	pH	Number of Bacteria( $\times 10^5$ ) at Each Contact Time (hr)		
			0	4	24
Broth Medium	0	6.9	H	H	H
Acetic Acid	0.05	5.1	H	120.00	6300.00
Chitosan solution	0.05	5.1	H	1.00	0.00
	0.1	5.1	H	4.64	2.00



**Fig. 3. Effects of pH's on the antibacterial activity of highly deacetylated chitosan. (Experimental conditions were as follow : Initial bacterial density  $1.0 \times 10^5$ , Contact time: 0, Incubation;  $37^\circ\text{C}/24\text{hours}$ . Conc of acetic acid 0.5%)**

간 24시간까지 유지되었다. 키토산의 항균성이 초산에 의존하는 것은 아님을 재확인할 수 있었고 초산을 대조구로 사용하여 감균률로 항균성을 평가하면 정확한 평가가 가능하다고 판단된다.

**3) 항균성에 미치는 pH의 영향**

일반적으로 미생물의 성장과 증식은 pH에 따라 큰 영향을 받기 때문에(하덕모, 1994) 키토산-균 혼합액의 초기 pH가 키토산의 항균성에 미치는 영향을 조사하고자 키토산-균 혼합액의 최종 pH를 4.0, 5.0, 6.5의 3가지로 조정하여 86% 탈아세틸 키토산-균용액의 *Staphylococcus aureus*의 생육정도를 측정하였다(Fig. 3).

혼합용액의 초기 pH가 4.0→5.0→6.5로 증가함에 따라 배양된 균수의 변화는 용액의 종류에 따라 각각 다른 양상을 보였다. 먼저 육즙 배지에서는 pH에 무관하게 균수가 거의 일정하였다. 초산 용액에서는 pH가 증가함에 따라 균수의 증가하였다. 즉 pH 4.0에서  $3.70 \times 10^4$  이었던 균수가 pH 6.5에서는  $10.0 \times 10^4$

으로 2.7배 증가하였다. 키토산 용액에서는 초산용액과 달리 pH가 높을수록 균수가 오히려 감소하였으며 키토산의 농도를 0.1~1.0% 범위 내에서 달리했을 때 감소 경향이 지속되었다. pH가 6.5일 때의 균수는 pH 4.0에 비해 약 1/10 정도로 감소하였다. 이 결과를 고찰하면 키토산은 pH가 높을 때 더 큰 항균력을 나타냈으며 용매인 초산이 키토산의 항균력을 감소시키지 않는다는 결론에 도달하게 된다. 지금까지 제안된 키토산의 항균메카니즘 중 가장 설득력이 있는 것은 키토산의 구조 단위인 글루코사민의 C<sub>2</sub>에 있는 -NH<sub>2</sub>가 -NH<sub>3</sub><sup>+</sup>로 되면 이 양이온이 세균 등의 미생물과 접촉되었을 때 음전하를 띠는 세포벽과 인력이 작용하여 미생물의 자유도를 저하시키고 세포벽을 파괴시켜 생육을 저하시키고 항균력을 발휘한다는 것이다(Katsumasa & Takao, 1994; Hadwiger et al, 1986). 이에 근거한다면 키토산의 항균력은 글루코사민의 C<sub>2</sub> 위치의 -NH<sub>2</sub>가 충분히 존재할 것과 아울러 -NH<sub>2</sub>의 -NH<sub>3</sub><sup>+</sup> 양이온의 형태로의 유도가 용이하게 이루어지고 그 양이온의 상태가 지속적으로 유지될

수 있는 지의 여부에 의해 결정될 수 있다. 본 실험에서 키토산은 초산수용액에 녹였으므로 키토산 분자는 이 용액에서 <Fig. 4>와 같이 C<sub>2</sub> 위치의 -NH<sub>2</sub>가 -NH<sub>3</sub><sup>+</sup>로 양전하를 갖게 될 것으로 예상된다.

용액의 pH가 높을수록 양전하를 띠는 -NH<sub>2</sub>의 비율이 오히려 감소하므로 pH 증가에 따라 키토산의 항균성도 저하될 것으로 예상되기 때문에 키토산용액에서 pH 증가에 따라 오히려 항균성이 증가한 본 실험의 결과는 위에서 언급한 항균메카니즘과 상치되는 것처럼 생각될 수도 있을 것이다. 그러나 본 실험에서 검토한 pH의 범위는 4.0-6.5 로서 -NH<sub>2</sub>의 pKa(>9) 보다 매우 낮다. 이 범위의 어떤 pH에서도 -NH<sub>2</sub>은 이미 -NH<sub>3</sub><sup>+</sup>로 양전하를 띠게 되어 pH가 다르더라도 양전하를 띠는 키토산의 -NH<sub>2</sub> 비율이 변하지 않는다는 점을 고려하면 본 실험의 결과가 전술한 항균메카니즘과 완전히 배치되는 것으로 생각되지는 않는다. 또한 비록 본 실험의 결과가 -NH<sub>2</sub>의 양전하

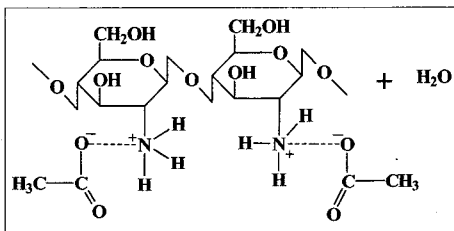


Fig. 4. The dissolved state of chitosan molecule in aqueous acetic acid solution.

화 메카니즘과 상치하는 것이 아니라고 하더라도 반대로 이 메카니즘으로 본 실험의 결과를 충분히 설명하기는 미흡하여 새로운 항균메카니즘으로 설명되어야 할 것으로 생각된다. pH가 낮을 때 키토산의 항균 효과가 더 낮게 나타난 것은 낮은 pH에서 흔히 나타나는 미생물의 방어 기구와 관련이 있을 가능성이 있으나 이에 관하여는 앞으로 더 많은 연구가 있어야 할 것으로 생각된다.

#### 4) 항균성에 미치는 접촉시간의 영향

균과의 접촉 시간이 증가함에 따라 키토산 및 수용성 키토산의 항균성이 증가되는 결과가 나타난 바 있어 키토산에 대해 접촉 시간에 따른 항균 활성의 유무를 확인하기 위한 실험을 실시하였다. 탈 아세틸화도 86%의 #4 키토산을 균 접촉시간 0(순간접촉), 4, 8, 24시간의 4가지로 키토산 농도 0.0125~0.2% 범위 내의 5수준으로 하여 항균성을 측정하였고 <Fig. 5> 탈아세틸화도 76%의 키토산 #5은 접촉시간 0~3시간에서 항균성의 변화를 측정하였으며 <Fig. 6> 수용성 키토산인 #7 키토산(Mw 3,000)을 농도 0.1%에서 0~24시간까지의 항균성을 측정하였다(Fig. 7).

<Fig. 5>에서 #4키토산의 항균성은 접촉시간 증가에 따라 증가하였고 농도가 변화해도 지속적으로 유지되었다. 키토산 농도가 0.025% 이상에서는 접촉시간에 따른 항균성이 현저히 상승되었는데 접촉 24시간 후는 접촉시간 0에 비해 약 70%, 0.05%에서는 약

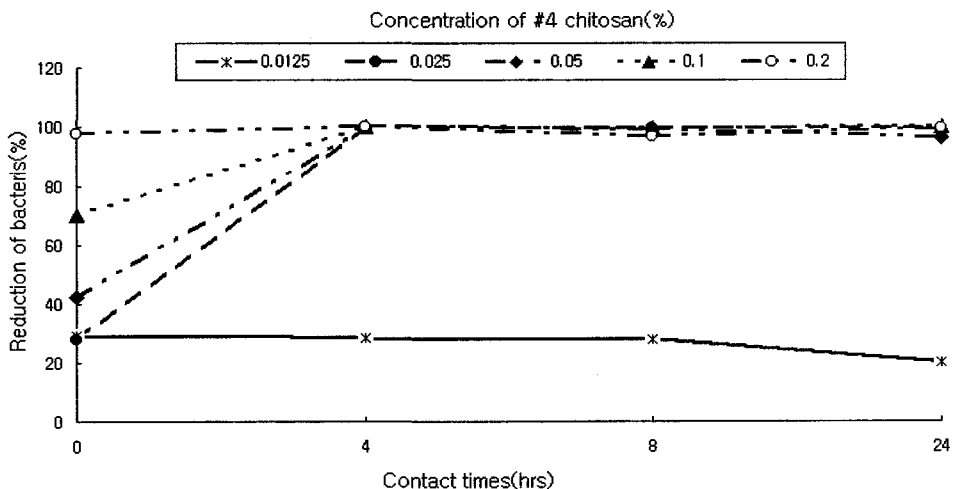


Fig. 5. Effects of contact times on the antibacterial activity of highly deacetylated chitosan at various chitosan concentration. (Experimental conditions were as follows :initial bacterial density  $1.0 \times 10^5$ , Contact time 0, Incubation  $37^\circ\text{C}/24\text{hrs}$ . Conc. of acetic acid 0.05%.)



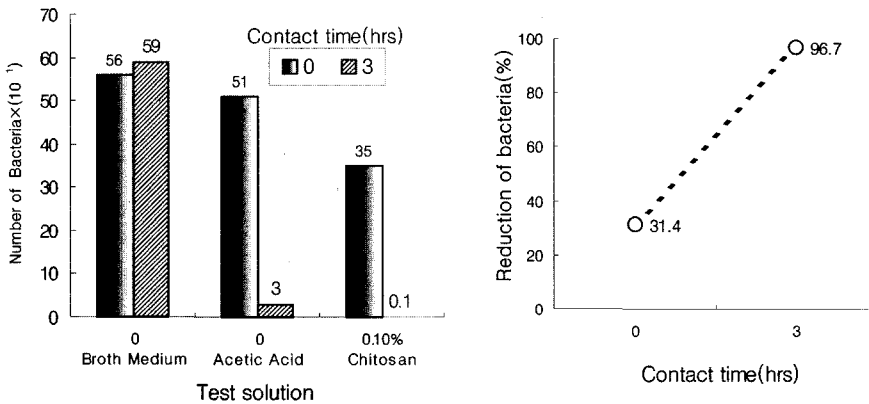


Fig. 6. Effects of contact time on the antibacterial activity of low deacetylated chitosans against *Staphylococcus aureus* (Experimental conditions were as follows : initial bacterial density  $1.0 \times 10^8$ , Conc. of #5 chitosan 0.1%, Conc. of acetic acid 0.5%)

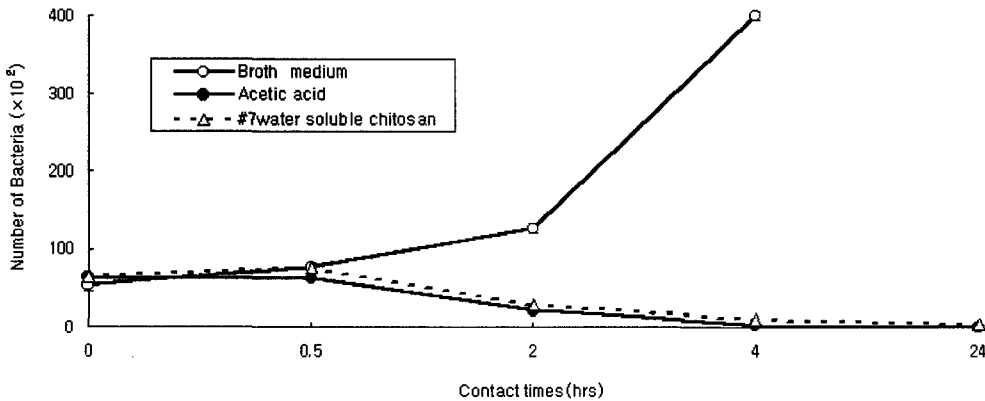


Fig. 7. Effect of contact time on antibacterial activity of watersoluble chitosan against *staphylococcus aureus* (Experimental conditions were as follows : Initial bacterial density  $1.0 \times 10^4$ , Incubation  $37^\circ\text{C}/48$  hrs. Acetic acid 0.5%. Chitosan 0.1%. H means number of colonies which are too many to count.)

50%, 0.1%에서는 약 30% 정도 감균률이 향상되었다. 0.2%에서는 약 2% 만으로 소폭 향상되었으며 이는 초기에 이미 높은 항균성을 발휘했기 때문으로 보인다. 고 탈아세틸 키토산의 접촉시간에 따른 항균성은 키토산 농도가 증가할수록 완만히 증가하였다. 접촉 시간 4시간에서 키토산 0.0125%를 제외한 거의 모든 농도 즉 0.025~0.2%에서 100%의 항균성을 나타냈고, 접촉 시간이 24시간으로 증가되어도 100%에 가까운 항균성이 지속되었다. #4 키토산과 같이 접촉시간 증가에 따라 항균활성이 유지되거나 증가한다면 이는 매우 항균 피복 소재로 바람직한 특성으로 생각된다. <Fig. 6>에서 키토산 #5는 접촉 시간을 0→3시간으로 증가시키면 균수가 350→1로 뚜렷히 감소하였고 감균률이 31.4→96.7%로 65%나 증가하였다. 고 탈아세

틸키토산보다 다소 저조한 항균력을 나타냈던 76% 탈아세틸 키토산은 접촉시간의 증가시켜 항균성이 증가를 유도할 수 있음이 확인되었다. 이러한 현상은 수용성 키토산의 감균률이 -값을 나타내었고 접촉 시간 증가에도 뚜렷한 증가 현상이 나타나지 않았던 <Fig. 7>의 결과와 비교한다면 대조되는 현상이었다. 즉 수용성 키토산이 저분자화되어 항균력을 상실하였던 점과 비교하면 저 탈아세틸화도에 의한 저조한 감균률은 균 접촉 시간의 증가나 농도의 변화를 통해 상승되었으므로 상대적으로 보완 가능한 요인임을 알 수 있었다. 균 접촉시간의 증가로 항균력이 향상될 수 있다는 이러한 사실은 항균 가공체로서의 이용에 고무적인 결과로 기대된다. <Table 5>에서 저분자 수용성 키토산 #6의 항균성은 본 실험에 이용된 #7 키토산 보

다도 더욱 저조했으므로 두 종류의 수용성 키토산 모두 수불용성 키토산과 달리 항균력이 거의 없는 것으로 판단되었다.

5) 항균성에 미치는 균 농도의 영향

항균성 측정을 위한 적정화 실험에서 키토산-균 혼합액 중 초기 균농도를 저 농도에서 고농도로 변화시키면 배양 균수가 변화되었고 감균률은 저하되었음을 확인한 바 있다. 초기 접촉된 균농도의 변화가 균농도와 접촉시간에 변화를 준 조건에서 고탈아세틸 키토산 #4의 항균성에 미치는 영향을 알아보기 위해 5 종류의 균농도에서 키토산의 농도를 0.1~1.0%로, 접촉시간을 0~24시간까지 변화시키며 항균성 측정 실험을 진행시켰다. 저장 중인 균주 *Staphylococcus aureus*를 37°C에서 배양하여 시험균 배양액을 만들고 육즙으로 희석하여 접촉시 균농도를 조절하였다. 접촉시 균농도의 표시는 시험균 배양액의 균농도를 측정하여 둔 뒤 희석률을 곱하여 표시하였다. 균농도  $2.30 \times 10^8$  되는 시험균 배양액을  $10^0, 10^2, 10^4, 10^6, 10^8$ 의 5종류로 희석 접촉하였으며 그 결과는 <Table 7>과 같다.

접촉 시간 0, 키토산 농도 0.1~1.0%에서 초기 접촉시 균농도  $2.30 \times 10^8$ 일 때 감균률은 약 16~69%의 범위를 나타냈다. 그러나 균 농도가 다소 감소된  $2.30 \times 10^0 \sim 2.30 \times 10^6$ 의 광범위한 영역에서 감균률이 급상승되어 90~100%를 나타냈다. 키토산의 항균력

이 발휘되는 적정 범위의 균 농도가 존재할 수 있음은 물론 키토산의 항균력은 광범위한 균농도에서 작용됨을 알 수 있었는데 본 실험 조건에서는  $2.30 \times 10^2 \sim 2.30 \times 10^8$ 에서 항균력이 작용되었다. 본 항의 실험에서 나타난 접촉시 균농도의 감소에 따른 감균률의 증가 현상은 키토산의 농도의 고저에 관계없이 지속되어 균농도  $2.30 \times 10^8$ 에서  $2.30 \times 10^0$ 으로 감소되었을 때 감균률의 변화를 보면 동일한 접촉시간 0에서 키토산 농도 0.1%에서는 감균률이 16%에서 100%로 약 80%이상 증가하였고, 농도 0.5%에서는 약 41%에서 100%로 약 50%, 농도 1.0%에서는 약 69%에서 100%로 약 30% 등 키토산 농도가 증가함에 따라 증가 정도는 다소 완만해졌으나 감균률의 증가 현상은 지속되었다. 각 접촉 균농도에서 키토산 농도에 따른 감균률은 접촉시 균농도가 높은  $2.30 \times 10^8$ 에서는 키토산 농도 0.1%일 때 16%로 저조했으나 키토산 0.5%로 농도가 증가하면 약 40%로 증가하였고, 1.0% 고농도에서 약 69%로 50%이상 증가되었다. 그러나 균의 농도가 감소된 영역인  $2.30 \times 10^0 \sim 2.30 \times 10^6$ 에서는 키토산의 농도가 0.1%일 때에 이미 92~100%의 범위에서 감균률을 나타냈다.

IV. 결 론

본 연구는 원료가 풍부하고 인체에 독성이 없으면

Table 7. Effects of initial bacterial densities of chitosan-bacterial mixtures on antibacterial activity of highly deacetylated chitosan (Experimental conditions were as follows:Incubation 37°C/24hrs. Acetic acid 0.5%, ND : not detected.)

Contact time (hr.)	#4 Chitosan concentration (%)	% Reduction of bacteria at each initial bacterial density (×2.3)				
		$10^0$	$10^2$	$10^4$	$10^6$	$10^8$
0	0	0	0	0	0	0
	0.1	100	99.8	92.0	97.6	15.6
	0.5	100	100	97.5	90.4	40.6
	1.0	100	100	98.5	99.2	68.8
4	0	0	0	0	0	0
	0.1	91.7	100	99.3	98.4	84.8
	0.5	100	100	98.0	99.2	94.9
	1.0	100	100	96.0	99.2	99.0
24	0	0	0	0	0	0
	0.1	92.8	92.6	0	ND	ND
	0.5	100	100	0	ND	ND
	1.0	100	100	0	ND	ND

서도 다양한 미생물에 대해 항균성을 나타내는 것으로 알려지고 있는 키토산을 직물의 항균가공에 응용하기 위한 기초연구로서 적정화된 시험 조건에서 인체의 피부나 직물에 흔히 서식하는 화농균의 일종인 포도상구균(*Staphylococcus aureus*)에 대한 7종류의 키토산들의 항균 활성을 조사하였고 아래와 같은 결론을 얻었다.

(1) 본 실험에서는 시중에서 구입한 1가지와 본 실험실에서 제조한 6가지 등 모두 7가지 키토산 시료에 대해 항균성을 조사하였는데 수용성 키토산 2가지를 제외한 4가지 키토산 모두 시중에서 구입한 것보다 항균활성이 4배 이상 높게 나타났다. 항균 활성이 있는 이들 4가지 키토산의 경우에 키토산농도 0.1% 수준에서 대조구(초산용액)에 대한 감균율이 72~87% 였다.

수용성키토산과 산에 가용성이지만 물에 불용성인 키토산(불용성 키토산)의 항균활성을 비교한 결과 후자는 항균활성이 있었으나 수용성 키토산은 항균활성이 없었다. 분자량이 1,000과 3,000인 두 종류의 수용성 키토산은 초산을 함유하는 배지에서 오히려 균의 생육을 촉진시키는 것으로 나타났는데, 균 생육 촉진효과는 분자량 1,000인 것이 높았다.

(2) 탈아세틸화 정도에 따라 키토산의 항균력은 다르게 나타났는데 76%-탈아세틸 키토산의 감균률이 17%, 86%-탈아세틸 키토산이 56%로 탈아세틸화도가 큰 키토산의 항균활성이 높았다.

(3) 점도 4, 8, 50, 930 cps의 4가지 키토산에 대해 항균활성을 조사 비교한 결과 평균 약 74~87% 범위의 우수한 항균성을 나타냈다. 점도가 4→930cps로 분자량이 증가함에 따라 감균률이 증가했으며 분자량의 변화에 비례하여 감균률이 증가하지는 않았다.

(4) 4cps, 86%-탈아세틸 키토산은 키토산 농도 낮은 농도에서도 활성을 나타내었으며 농도 0.2%에서는 감균율이 98%에 도달했다. 키토산-균 혼합액의 초산농도가 낮을 때 더 높은 항균활성을 나타내 항균활성에 초산이 직접 관여하지 않았음을 확인하였다. 혼합액의 초기 pH 4~6 범위내에서 pH가 높을수록 항균활성이 증가하였다. 키토산 농도 0.025% 이상에서는 균과의 접촉시간 4시간 이내에 100%의 감균율을 나타냈고, 혼합액의 초기 균농도  $2.3 \times 10^6$ /ml 이내에서는 90% 이상의 감균율을 나타냈다. 이러한 결과로 미루어 볼 때 본 실험실에서 제조한 4가지 키토산은 우수한 항균성을 가지고 있어서 직물의 항균가공

제로서 매우 가치가 큰 것으로 판단되었다.

## 참고문헌

- 김종준, 김신희, 전동원. (1995). 키토산으로 처리한 면직물의 태의 변화에 관한 연구. *한국섬유공학회지*, 32(8), 782-789.
- 김종준, 전동원, 홍주석. (1995). 섬유가공 및 관련 분야에서 키토산 응용성에 대한 제안. *한국섬유공학회지*, 32(8), 705-712.
- 남윤자. (1995). *被服衛生學*. 서울: 수화사.
- 변희국, 강옥주, 김세권. (1992). 키틴 및 키토산 유도체의 합성과 그 물리화학적 특성. *한국 농화학회지*, 35(4), 265-271.
- 신윤숙, 민경혜. (1996). 키토산을 이용한 면직물의 항균가공 (I): 탈아세틸화도에 따른 항균효과. *한국섬유공학회지*, 33(6), 487-491.
- 신윤숙, 이인흠. (1994). 카이토산을 이용한 이직커 면직물의 방오성 증진 (I). *한국섬유공학회지*, 31(8), 583-588.
- 우지형. (1984). 섬유제품의 위생가공(항균 방취 가공)의 개요. *섬유의 위생가공세미나*. 대한방직주식회사.
- 이은영, 이해자. (1995). 이불솜의 종류에 대한 유기실리콘 제4급 암모늄염의 항 미생물 성 효과. *대한가정학회지*, 33(3), 243-253.
- 일본 후지방적 천연사 항균 방취 섬유 개발. (1991, 9. 23). *일본섬유신문*.
- 하덕모. (1994). *응용미생물학*. 서울: 개문사.
- 한국미생물학회(編). (1987). *미생물학실험서*. 서울: 도서출판 아카데미서적.
- 항균 방취 가공사 양산. (1994). *과학세계*, 34(3), 240.
- 大石 光一 & 乾拓 雄. (1989). キトサンの染色加工への応用. *纖維加工*, 41(11), 511-514
- 田中 廣司, 江崎 孝二. (1993). JP 93 05, 273.
- 田中 廣司, 江崎 孝二. (1993). JP 93 05, 274.
- 鶴谷 勝正. (1990). 纖維の技能化加工についてキトサンの活用. *纖維加工*, 42(8), 364-371.
- 弓消 治. (1989). *抗菌防臭*. 東京: 纖維社.
- Hadwiger, L. A., Kendra, D. F., Fristensky B. W. & Wag-  
oner, W. (1986). *Chitin in Nature and Technoloy: Pro-  
ceedings from the 3rd international conference on chitin  
and chitosan*, ed. by Muzzarelli, R. A. A., Jeuniaux, C.  
& Gooday, G. W. Plenum Press, Inc.
- Hirano, S. (1989). Production and application of chitin and  
chitosan in Japan. *Chitin and chitosan: Proceedings from  
the 4th international conference on chitin and chitosan*,  
ed. by Gudmund, S. B., Anthonsen, T. & Sandford, P.  
Elsevier Applied Science, New York
- Katsumasa, T., & Takao, H. (1994). Preparation and antibac-  
terial activities of N-Trimethylammonium salts of chito-

- san. *Sen'i Kagaku*, 50(5), 215–220.
- Mima, S., Miya, M., & Iwamoto, R. (1982). Highly deacetylated chitin and Its property. *Chitin and chitosan : Proceedings from the 2nd international conference on chitin and chitosan*, ed. by Hirano, S. and Tokura, S. Sapporo, Japan : The Japanese Society of Chitin and chitossan.
- Moore, G. K. & A. F. Robert(1980). Determination of the degree of N-acetylation of chitosan. *Int. J. Biol. Macromol.*, 2, 115–116.
- Muzzarelli, R. A. A. (1988). Carboxymethylated chitin and chitosan. *Carbohydrate Polymers*, 8, 1–21.
- Muzzarelli, R. A. A. (1990). Antimicrobial properties of N-Carboxybutyl chitosan. *Antimicrob Agents Chemother*, 34, 2019–2023.
- Muzzarelli, R. A. A. (1977). *Chitin*. Pergamon Press Inc. New York.
- Muzzarelli, R. A. A. (1982). Communications from research groups advances in the chemicl modication of chitin and perspectives of applications. *Carbohydrate Polymers*, 2, 288–289.
- Muzzarelli, R. A. A. (1985). Chitin. *The Polysaccharides*, 3, 417–450.
- Muzzarelli, R. A., Jeuniaux, A., C. & Gooday, G. W(eds.). (1987). *Chitin in Nature and Technoloy: Proceedings from the 3rd international conference on chitin and chitosan*. Plenium Press, Inc.
- Osamoo Yugae. (1992). *被服衛生學*. 김병우(譯). 維新文化社.
- Pariser, E. R., & Lombard, D. P. (1989). *Chitin sourcebook : A guide to the research literature*. N.Y.: John Wiley & Sons.
- Seo, H. (1993). Antimicrobial fibre from chitosan. *染色工業*, 41(4), 177–183.
- Seo, H., Mitsuhashi K., & Tanibe H. (1992). Antibacterial and antifungal fibre blanded by chitosan. in *Chitin and chitosan: Proceedings from the 5th international conference on chitin and chitosan*. NJ: Elsevier Applied Science.
- Stanford, P. A. (1988). Chitosan: commercial uses and potential applications. in *Chitin and chitosan: Proceedings from the 4th international conference on chitin and chitosan*, ed. by Gudmund, S. B., Anthonsen, T. & Sandford, P. New York: Elsevier Applied Science.
- Suzuki, K. (1993). Application of antibacterial and antifungal agents to textile goods. *染色工業*, 41(4), 184–194.
- Tokura, S. (1995). キチンあよびキトサン應用の新展開. *高分子*, 44(3), 112–115.
- Vigo, T. L. (1983). *Handbook of fiber science and technolgy. vol. II, partA*, ed. by Lewin, M., Sello, S. B. New York: Marcel Dekker, Inc.