

4급 아민 키토산의 제조 및 항균특성

조석형¹, 김영준², 조재철³, 모상현⁴

¹해전대학교 소방안전관리과, ²청운대학교 화장품과학과,

³해전대학교 호텔조리외식계열, ⁴BIO-FD&C(주)

Preparation and Antibacterial Properties of Quaternary Amine Chitosan

Suk-Hyung Cho¹, Young-Jun Kim², Jae-Chul Cho³, Sang Hyun Moh⁴

¹Dept. of Fire Safty Management, Hyejeon College

²Dept. of Cosmetics Science, Chungwoon University

³Dept. of Hotel Culinary Arts & Food Service, Hyejeon College

⁴BIO-FD&C Co. Ltd., 451-7, Nonhyundong, Namdonggu, Incheon 405-849, Republic of Korea

요 약

물/유기용매의 혼합용액에 키토산을 분산시키고 이 현탁액에 글리시딜 트리알킬 암모늄염, 글리시딜 아릴염 등의 에테르 시약을 상온에서 현탁상태로 반응시켜 4급화 키토산을 제조하는 새로운 방법을 개발하였다. 이 방법으로 합성한 결과 수득율이 90%이상이었으며 후처리과정이 필요없었다. 4급화 키토산의 균에 대한 최소저지농도(MIC)를 조사한 결과 *E. coli* O157:H7 균주의 MIC는 0.007%-0.01%(70-100ppm)로 추정되었고 *V. vulnificus* 균주의 MIC는 0.005%(50ppm)정도이고 *V. vulnificus* 균주의 MIC는 0.007%(70ppm)이었다. 작물에 대한 항균성을 알아보기 위하여 4N-키토산의 항균 활성만이 검정되었는데, 4N-키토산은 고추 역병균인 *P. capsici*에 대하여 가장 높은 항균 활성을 보여 4,000 ppm에서부터 키토산 무첨가 대조구에 비하여 항균활성을 보였으며 *P. capsici*보다는 약하지만 잣빛곰팡이병균 *B. cinerea*에 대하여도 약간의 항균 활성을 보이고 있어, 16,000 ppm에서는 항균 서이 뚜렷이 나타났으나 고추 탄저병균인 *C. gloeosporioides*에 대해서는 16,000 ppm 이라는 높은 농도에서도 항균 활성을 전혀 보이고 있지 않았다

1. 서 론

게(蟹) 껍질을 원료로 하여 제조되는 키토산은 생물소재 (biomaterial)로 여러 가지 생리 활성 작용을 지녀 인체에 유효함이 널리 알려져 있다. 인간의 식생활에 없어서는 안되는 야채는 비타민, 미네랄, 섬유질 등이 풍부한 주요 식품인데 야채의 신선도 및 청정도가 식품의 질을 가름하는 가장 중요한 지표이다. 야채는 재배 또는 유통기간 중병·해충에 매우 약하고 부패하기 쉬워 농약 또는 방부제를 사용하지 않고서는 소비자가 원하는 고품질의 것을 대량 공급하는 것이 쉽지 않다. 그러나 식품에 있는 잔여 농약 또는 부패 방지 물질이 인체 건강을 위협하고 있다. 특히 우리 나라 사람들이 즐겨 찾는 콩나물, 느타리 버섯, 양송이, 고추 등은 재배기간, 보관, 유통 기간 중에 미생물에 의한 부패병이 발생하여 생산성 및

품질이 저하가 발생하며 따라서 경제적 손실이 막대하기에 농약 사용의 유혹이 벗어나기 어렵다. 그럼으로 인체에 무해하면서도 식품의 저장병을 막을 수 있는 물질의 개발이 절실히 요구되고 있다. 이러한 물질을 개발되어 실용화된다면 무공해 청정한 야채를 다량 생산 공급할 수 있을 것으로 사료되며 따라서 국민 식생활 및 건강을 증진시킬 수 있으리라 본다.

키토산의 항균효과는 분자량과 잔기구조에 따라 다른 것이 보고되었다. 따라서 식물병 및 저장병 억제제로 사용할 수 있는 저분자 키토산 (15,000)을 제조하고 그의 4차 암모늄기를 갖는 수용성 유도체를 합성하여 항세균·항곰팡이성을 평가함으로써 식품 저장병을 방지하고 식품 보존성을 향상시킬 수 있는 인체에 유익한 키토산계 항균·항곰팡이제를 개발하였다.

2. 실험

2.1 재료 및 기구

사용된 키토산은 인도네시아의 PT. 노블바이오텍에서 구입하여 사용하였고 4급화에 필요한 3-chloro-2-hydroxy propyl trimethyl ammonium salt(60%)는 덕산이화학제를 그대로 사용하였다. 기타 염산, 아세톤, 에탄올, 초산 등의 시약은 1급 시약을 그대로 사용하였다.

2.2 4급 암모늄 키토산의 합성

키토산 50g을 물 300ml에 분산시켜 30분간 30 내지 40℃에서 패운시킨 후 60% 글리시딜 트리메틸 암모늄 크로라이드 78.5g을 서서히 가한 후 가성소다를 약간 첨가하여 60℃에서 6시간 반응시켰다. 이 반응물을 여과하고 80% 아세톤 수용액으로 3회 세척 후 풍건하여 건조하였다. 얻어진 4차 암모늄기가 N-치환된 키토산 유도체는 치환도가 98%, 수율이 98%이었으며, 0.5 중량%로 용해시켰을 때 불용분이 0.1%이었다.

2.3 항균 실험

1) 최소성장억제 농도 (Minimal inhibitory concentration-MIC) 측정

LB 액체배지에 키토산 유도체 모액 (pH 5.9-6.0)을 최종 농도가 다르게끔 첨가한 후 일정량의 피검균 (예 : 10^4 - 10^5 CFU/ml)을 접종하고 균의 최적 성장 조건에서 1-5일간 진탕 배양한 후 배양액의 광학밀도 (OD₆₀₀)를 측정하여 균의 생육 곡선을 작성하고 균의 광학밀도가 증가되지 않는 항생제의 농도를 MIC값으로 정했다. 광학 밀도 측정이 용이하지 않을 때는 균 배양액을 생리식염수(0.85% NaCl)로 희석하여 LB 한천 평판배지에 고르게 편 다음, 37℃에서 24 시간 배양하고 한천 영양배지 위에 형성된 집락수(colony forming units-CFU)를 집계하여 시험균의 접종시 균수와 배양한 후의 균수에 변함이 없는 저분자 키토산 유도체의 최소농도를 MIC값으로 했다.

2) 균의 감소율 또는 생존율측정

액체배지에 농도를 다르게 키토산 유도체를 첨가한 후 피검균 액을 일정량 접종하고 각 균들의 최적 성장 조건에서 배양하였다. 일정한 배양 시간 후에 균액을 생리 식염수로 희석하여 영양 한천 배지에 골고루 편 후 성장 최적 환경에서 배양, 48 시간 후에 생

성된 균락의 수를 집계함으로 키토산 유도체에 의한 균 감소율을 측정했다.

3) 항곰팡이활성 실험

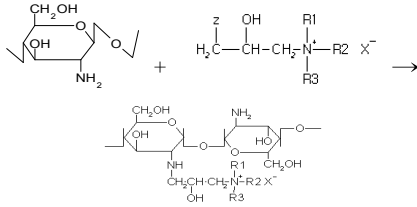
키토산 유도체의 항곰팡이 활성을 검정할 대상 곰팡이로서 작물 재배 또는 저장 중에 식물조직을 감염하여 품질을 떨어뜨리는 고추 탄저병균 (*Colletotrichum gloeosporioides*), 고추 역병균 (*Phytophthora capsici*), 토마토 잿빛곰팡이병균 (*Botrytis cinerea*), 그리고 배추 무름병균 (*Rhizoctonia solani*) 등 4종을 선발하였다. *C. gloeosporioides*는 탄저병에 걸린 고추 열매로부터, *C. capsici*는 역병에 걸린 고추 줄기로부터, 그리고 *R. solani*는 무름병징을 보이는 배추 잎 아래 부분에서 생긴 균핵으로부터 본 실험실에서 분리한 균들이었다. *B. cinerea*는 토마토에서 분리하여 한국화학연구소 농약스크리닝연구부에서 분양 받아 사용하였다. 시험에 사용하는 균주들은 세대수를 동일하게 유지하기 위하여 살균수에 보관균주를 만들어 상온에 보관하였으며, 필요할 때마다 꺼내어 증식시켜 사용하였다. 본 시험 균들의 배양용배지 및 키토산 효과 검정배지로 감자한천배지(PDA: potato dextrose agar)를 사용하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1 4급 키토산의 제조

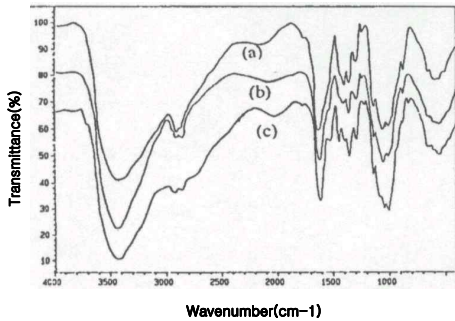
물/유기용매의 혼합용액에 키토산을 분산시키고 이 현탁액에 글리시딜 트리알킬 암모늄염, 글리시딜 아릴염 등의 에테르 시약을 상온에서 첨가한 다음 이를 25 내지 80℃에서 반응시키는 것과 물/유기용매의 혼합용액에 키토산을 분산시키고 4차 할로하이드린과 4차 에폭사이드 등의 에테르시약(4급염)을 현탁상태로 반응시켜 4급화 키토산을 제조하였다. 제조하는데 있어서 에테르시약은 여러 가지를 사용할 수 있으며 이중 3-chloro-2-hydroxy propyl aryl ammonium salt를 사용하였고 이 3-chloro-2-hydroxy propyl aryl ammonium salt(4급염)에 같은 mole수로 NaOH를 첨가하여 에폭시기를 합성하고 키토산 분산액에 투입하여 합성하였다.

합성 과정은 그림 1과 같다.



[그림 1] 급화 키토산의 반응식

그림 4에서 보는 바와 같이 4급염기가 도입됨에 따라 1630, 1470 cm^{-1} 에서 N-H deformation vibration에 의한 흡수화 4급염의 메틸기에 의한 흡수가 관측되는 것으로 보아 반응이 진행되었음을 알 수 있으며 그림의 (c)에서 4급염기가 많이 도입됨에 따라 1470 cm^{-1} 에서의 메틸기에 의한 흡수가 커짐을 알 수 있다.

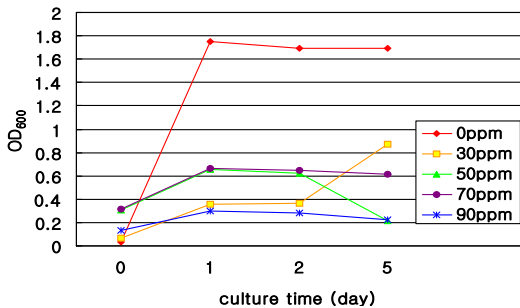


[그림 2] 4급화 키토산의 IR 스펙트라(a:키토산, b:4급키토산(키토산/4급염 =1:1, c : 4급키토산(키토산/4 급염=1:2))

3.2 4급화 키토산에 대한 최소저지농도(MIC)

1) *E. coli* 에 대한 최소저지농도

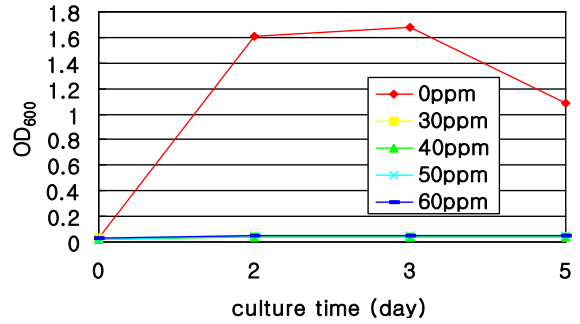
*E. coli*를 각기 다른 농도의 4급화키토산이 함유된 배지에서 배양했을 때 그림 1에서 보는 바와 같이 키토산 농도에 따라 각기 다른 성장저해 효과가 나타났는데 70ppm의 농도에서는 균의 성장이 거의 일어나지 않아 4급화 키토산의 *E. coli* O157:H7 균주의 MIC는 0.007%-0.01% (70-100ppm)로 추정하였다.



[그림 3] 농도가 다른 4급화 키토산의 *E.coli* 에 대한 항균성

2) *V. vulnificus* 에 대한 최소저지농도

*V. vulnificus*를 각기 다른 농도의 4급화키토산이 함유된 배지에서 배양했을 때 그림 2에서 보는 바와 같이 키토산 농도에 따른 각기 다른 성장저해 효과가 나타났는데 0.005 %의 4급화키토산의 농도에서는 거의 균의 성장이 일어나지 않아 4급화키토산의 *V. vulnificus* 균주의 MIC는 0.005%(50ppm)정도로 추정되었다.



[그림 4] 농도가 다른 4급화 키토산의 *V. vulnificus*에 대한 항균성

3.3 4급 키토산의 식물 병원균에 대한 효과

식물병원균의 분리 및 동정

분리한 균들을 PDA 배지에서 증식시켜 균총의 형태와 색깔, 성장 특성, 그리고 현미경관찰을 통한 균사와 포자의 모양을 참조하여 동정한 결과, 각각 고추 탄저병균, 고추 역병균, 토마토 잿빛곰팡이병균, 그리고 배추 무름병균이 맞는 것으로 나타났다.

시험에서는 4N-키토산의 항균 활성이 검정되었는데, 4N-키토산은 고추 역병균인 *P. capsici*에 대하여 가장 높은 항균 활성을 보여 (표 1), 4,000 ppm에서부터 키토산 무첨가 대조구에 비하여 균총의 지름이 뚜렷이 작음을 볼 수 있었고, 4N-키토산의 농도가 증가함에 따라서 균총의 지름도 줄어들고 있었다. 또한, 키토산 무첨가 대조구에서는 균총의 가장자리가 뾰뾰하지 않고 퍼져 나가는 것을 볼 수 있었던데 비하여 4N-키토산을 첨가한 배지에서는 균총의 가장자리가 매우 선명하여, 균사의 길이생장이 큰 폭으로 억제되고 있음을 알 수 있었다. 4N-키토산은 *P. capsici*보다는 약하지만 잿빛곰팡이병균 *B. cinerea*에 대하여도 약간의 항균 활성을 보이고 있어, 16,000 ppm에서의 균총 크기가 다른 농도에서의 균총 크기보다 뚜렷이 작았다(표 3). 그러나 고추 탄저병균인 *C. gloeosporioides*에 대해서는 16,000 ppm 이라는 높은 농도에서도 항균 활성을 전혀 보이고 있지 않았다(표 2). 이상과 같이 4N-키토산은 고추 역병균과 토

마토 잿빛곰팡이병균에 항균 활성을 보이고 있었는데, 고추 역병균의 생육을 저지하기 시작하는 농도는 2,000-4,000 ppm 사이에 있으며, 잿빛곰팡이병균의 생육을 저지하는 농도는 8,000-16,000 ppm에 있을 것으로 예상할 수 있다. 그러나, 잿빛곰팡이병균의 경우 8,000 ppm에서의 균총 크기가 대조구의 크기와 거의 차이가 없음을 볼 때, 생육저지농도시작농도가 10,000 ppm 이상이 될 가능성이 높다. 따라서, 4N-키토산을 현재 상태로 잿빛곰팡이병 방제용으로 사용하는 것은 현실성이 없어 보이지만, 항균 가능성은 가지고 있음이 판명되었으므로 효능을 개선시킨다면 농업현장에의 적용 가능성도 가지고 있다고 할 수 있다. 고추 역병균에 대해서는 현재의 상태로도 비교적 큰 효과를 보이고 있으므로 조금만 더 역가를 높인다면 실용화하는데도 무리가 없을 것으로 생각한다.

[표 3] 4N-키토산이 토마토 잿빛곰팡이병균 *Botrytis cinerea*의 생육에 미치는 영향

농도 (ppm)	균총의 지름 (mm)		
	48 hr	96 hr	144 hr
0	23.3	48.3	78.5
500	23.1	47.8	78.4
1,000	23.1	48.2	78.1
2,000	23.0	47.7	78.0
4,000	23.1	45.2	75.5
8,000	21.9	44.2	73.5
16,000	13.6	30.4	59.3

[표 1] 4N-키토산이 고추 역병균 *Phytophthora capsici*의 생육에 미치는 영향

농도 (ppm)	균총의 지름 (mm)		
	48 hr	96 hr	144 hr
0	25.7	50.2	80.0
500	25.5	49.8	79.8
1,000	26.0	49.9	79.2
2,000	25.1	50.0	79.7
4,000	19.0	35.4	55.5
8,000	14.7	24.8	39.7
16,000	10.9	17.4	31.3

[표 2] 4N-키토산이 고추 탄저병균 *Colletotrichum gloeosporioides*의 생육에 미치는 영향

농도 (ppm)	균총의 지름 (mm)		
	48 hr	96 hr	144 hr
0	17.0	33.1	53.6
500	16.8	33.2	52.4
1,000	16.4	32.9	52.8
2,000	16.8	33.0	53.1
4,000	16.9	33.1	53.0
8,000	16.8	32.9	51.2
16,000	16.3	31.7	50.3