

키토산 表面處理가 종이의 抗菌性에 미치는 影響^{*1}

최 찬 호^{*2} · 전 양^{*3} · 서 영 범^{*3}

Effect of Chitosan Surface Treatment on the Antibacterial Properties of Paper^{*1}

Chan-Ho Choi,^{*2} Yang Jeon,^{*3} and Yung-Bum Seo^{*3}

ABSTRACT

This study was to investigate the effect of chitosan molecular weight, its charge density, and its surface coating treatment on the antibacterial properties of paper. For this study, E.coli was used for antibacterial experiment.

Results obtained were as follows:

1. The antibacterial properties of chitosan was significant on the surface-treated sheet.
2. Antibacterial property surface treatment was appeared to be effective when film was formed on the paper surface.
3. The antibacterial properties of chitosan-treated paper was dependent on the amount and the molecular weight of chitosan used. The lower the molecular weight of the chitosan down to 30,000 the better the antibacterial properties in this experiment.
4. Determination of the degree of chitosan-deacetylation by colloidal titration method was consistent with the more complicated and conventional FT-IR method.

1. 서론

최근 전세계적으로 경제발전 에 따른 소득의 증대와 더불어 생활여건이 향상되면서 소비자가 원하는 식생활패턴도 크게 변하고 있으며, 신선하고 안전한 무공해 건강식품의 요구가 크게 대두되고 있는 실정이다. 농축산물의 유통은 수확하는 그 순간부터 변질이 일어나고 어느 단계가 지나면 먹을 수 없는 상태에 이른다. 식품의 변질이나 부패

는 일반적으로 물리화학적 변화와 미생물학적 변화로 크게 나눌 수 있으며, 식품의 구성성분이나 조건에 따라 조금의 차이는 있겠지만 물리화학적 작용에 의한 변질보다는 미생물작용에 의한 변질이 그 대부분을 차지하는 것으로 알려져 있다. 유통 또는 소비과정에서 적절치 못하게 관리된다면 미생물의 증식에 의하여 부패 혹은 식중독발생 우려가 있으며, 이와 같은 위해를 막기 위하여 미생물 증식을 억제할 수 있는 포장방법의 도입이 절실하다.^{1,2)}

*1 본 연구는 1996년도 농림부 첨단기술 개발사업비 (296043-3)로 수행되었음.

*2 충남대학교 대학원 임산공학과 (Dept of Forest Product Technology, Graduate School, Chung Nam National University, Taejon 305-764, Korea).

*3 충남대학교 농과대학 임산공학과 (Dept of Forest Product Technology, College of Agriculture, Chung Nam National University, Taejon 305-764, Korea).

식품의 신선도를 유지하기 위해 사용되어 오던 선도유지흡착제 및 원적외선 방출의 무기재료를 종이포장에 사용할 때 리사이클시 섬유유 강도저하가 예상되는데 비해서 본 연구에서 사용하려는 키토산은 특별히 리사이클시 섬유유 강도를 저하시키지 않으며 오히려 강도증진효과가 있다. 또한 키토산은 아민계의 강한 양이온성 기능을 가지고 있어서 균성장을 억제하는 기능을 가지고 있는 것으로 알려져 있다. 따라서 키토산이 포함된 코팅매체는 백상지, 라이너지, 골심지, 식품포장지, 과일포장지, 크라프트지 및 위생용지등의 표면에 사이즈프레스나 코팅기에서 얇은 필름형태로 도포하여 사용되면 균성장을 억제하고, 건조강도 및 습윤강도의 향상 및 종이의 재활용에 도움을 주므로 고부가가치의 고기능성물질로서 이용가능성이 크다고 볼 수 있다.³⁾

본 연구에서는 식품의 저장기간을 증대시키기 위한 방안으로 포장에서 부여할 수 있는 기능성으로서, 항균기능을 주기 위해 키토산을 지류포장재에 적용시키는 연구를 실시하였다. 특별히 본 연구에서는 키토산의 분자량 및 전하밀도를 변화시키고, 그 물리화학적 특성을 연구하였고, 지류포장재에 적용하기 위해 식품부패균에 대한 항균성에 대하여 연구하였다.

2. 재료 및 방법

2.1 공시재료

2.1.1 공시 Sheet

공시재료로서 사용한 sheet는 filter paper No.42와 시중 문방구에서 2종류의 판지를 구입하여 공시하였다. 공시용 종이는 평량 84.3g/m²의

filter paper No.42, 134g/m²의 PB-A, 116.3g/m²의 PB-B 등 3종류를 사용하였으며, 물리적 성질은 Table 1과 같다.

2.1.1 처리약품

처리약품으로서 키토산 시료는 Sigma사 제품(탈아세틸화도 70%)을 정제하여 사용하였고, 표면처리시 사용된 cationic starch는 (주)선일포도당에서 생산한 선캐스터 6011을 사용하였다

2.2 실험방법

2.2.1 키토산의 준비

키토산의 정제⁴⁾에 있어서는 키토산을 5% 아세트산 수용액에 2%(w/w)농도로 하여 하루 밤 동안 교반하면서 용해시킨 다음, 불순물이나 불용성 겔상의 성분을 여과하고 4% 수산화나트륨 수용액을 가하여 중화시키면서 침전을 형성하여 침전물을 거르고 증류수 → 메탄올 → 에테르순으로 세정한후 60℃에서 4hr동안 건조하여 chitosan A를 제조하였다.

키토산의 탈아세틸화⁵⁾는 정제된 chitosan A를 47%(W/V) NaOH 용액으로 60℃에서 30min(chitosan B), 1hr(chitosan C), 2hr(chitosan D) 처리하여 탈아세틸화(deacetylation)한 후 충분히 수세 및 여과하여 여과액이 중성이 될때까지 반복하였다. 이어서 60℃에서 4hr 동안 건조하여 제조하였으며 실온에서 보관한 후 사용하였다.

키토산의 저분자화^{6,7)}는 5% 아세트산 수용액에 정제된 키토산을 녹인후 4% 수산화나트륨 용액으로 중화하면서 pH를 10-11로 맞추고 액량비를

Table 1. Physical properties of sheet

Sample	Basis weight (g/m ²)	Density (g/cm ³)	Burst index (kPa · m ² /g)	Compressive index(N)		Tensile index (mN · m ² /g)		Cobb test (g/m ²)
				MD	CD	MD	CD	
Filter paper								
No.42	84.3	0.38	0.71	22.43		12.08		121.21
PB-A	134	0.66	3.94	174.72	107.36	35.08	28.14	21.58
PB-B	116.3	0.68	4.79	106.40	91.84	71.35	44.78	25.94

1:100으로 조절하여 이용액에 과산화수소를 키토산 1g에 대하여 각각 1g(chitosan E), 2g(chitosan F)으로 달리하여 간헐적으로 적하하면서 70℃에서 1 hr 동안 저분자화 반응을 실시하고 반응종료후 키토산 용액을 실온으로 급냉시킨후 증류수 → 메탄올 → 에테르순으로 세정한후 60℃에서 4 hr 동안 건조하여 chitosan E, F를 제조하였다.

2.2.2 탈아세틸화도의 측정

탈아세틸화도의 측정은 Kienzle-Sterzer 등의 방법에 준하여 1%초산용액에 각각의 키토산을 0.8%로 용해하여 실온에서 24hr 동안 방치한후 여과하여 petri dish에 부어 60℃에서 24 hr 동안 건조하였다. 여기에 1N NaOH을 가하여 20분 동안 처리하여 중화한 후 증류수로 충분히 수세하여 실온에서 건조시켜 키토산필름(chitosan film)을 제조하여 FT-IR spectroscope (model Perkin-Elmer 1750. Fourier Transform Infrared Spectrometer)로 스펙트럼을 얻은 후 아래의 공식에 의거하여 탈아세틸화도(% degree of deacetylation)를 계산하였다.

$$\% \text{ Deacetylation} = \left[1 - \frac{A_{1655}}{A_{3450}} \times \frac{1}{1.33} \right] \times 100$$

A₁₆₅₅ : A₁₆₅₅cm⁻¹에서 흡수비

A₃₄₅₀ : A₃₄₅₀cm⁻¹에서 흡수비

2.2.3 분자량 측정

분자량 측정은 극한점도법으로 측정하였다. 키토산의 극한점도수는 키토산을 0.2M acetic acid+0.1M NaCl+4.0M Urea용액에 용해시킨 후 Ostwald形 점도계를 이용하여 25℃수온상에서 상대점도를 구한다음 산출된 극한점도수와 Lee의 정수를 통용한 아래의 변형된 Staudinger식으로 부터 분자량을 계산하였다.¹⁰⁻¹²⁾

$$[\eta] = K \cdot Mw^\alpha$$

[η]=극한점도 (dl/g)

K=8.93×10⁻⁴ (cm³·mol/g²)

Mw=분자량

α=0.71

2.2.4 전하측정(Colloidal titration)

전하측정은 (주)날코에서 생산한 PVSK(S5432), DADMAC(S5430), Test Reagents는 SO 5431을 이용하여 각 키토산의 전위 변화를 측정하였다.

2.2.5 표면처리

상법과 같이 제조된 키토산(A, D, E)을 1% acetic acid solution에 용해시킨 후 전하상실의 우려 때문에 양성전분을 사용하여 종이표면에 도포하였는데, 먼저 호화된 6% cationic starch에 대하여 제조된 각각의 키토산 용액을 1%, 5%, 10%로 혼입한 것과 6% cationic starch에 대하여 제조된 각각의 키토산 용액을 1%, 5%, 10%, 20%로 혼입하여 호화한 것 두가지 방법으로 공시 sheet인 filter paper No.42는 평량 5g/m², PB-A 와 PB-B는 평량 8g/m²으로 표면처리 하였다. 내침처리가 아닌 표면처리를 실시한 이유는 내침시 상당히 많은 양의 키토산이 사용되어야 항균효과를 나타내며 키토산 자체의 가격도 상대적으로 비싸기 때문이었다. 각 농도별로 처리된 시트는 직경 3cm로 자른 후 살균(UV)하고 균사생장반응을 위한 시료로 사용하였다.

2.2.6 균사생장반응

항균력시험에 사용된 배지는 Table 2와 같은 조성의 배지를 사용하였으며, 균주로는 오염의 지표균으로서 취급되며 식품의 품질저하를 야기하는 여러 가지 식품부패균의 생육발생을 대표하기 위하여 공시균주인 *E. coli*를 사용하였다. *E. coli*를 LB media에 이식하여 암상태에서 37℃에서 5일간 배양하고 균총의 가장자리로 부터 균총원판(7mm)을 만들었다. 그런 다음 각 농도별로 표면

Table 2. LB media for the *E. coli*

Medium	g/Liter
Bacto - tryptone	10
Bacto - yeast extract	5
NaCl	10
Agar	15
Temperature, °C	37

Table 3. Molecular weight and degree of deacetylation of chitosan samples used

Sample	Molecular weight(g/mol)	Degree of deacetylation(%)
Chitosan A	2.8×10^5	73.3
Chitosan B	2.2×10^5	77.3
Chitosan C	2.1×10^5	77.9
Chitosan D	1.4×10^5	79.7
Chitosan E	0.3×10^5	73.2
Chitosan F	0.2×10^5	76.8

처리된 시트 직경 3cm를 배지 중앙에 올려놓고 균총원판을 이 시트 중앙에 접종한후 image analyzer로 12 hr, 24 hr, 48 hr, 72 hr, 96 hr 별로 균사성장 면적을 측정하여 균사성장반응속도를 반경으로 환산하여 계산하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1 탈아세틸화도의 측정

제조한 각각의 키토산을 적외선 분광분석하여 조사한 탈아세틸화도는 Table 3에 나타난 바와 같다. Table 3에서 보는 바와 같이 47% NaOH 용액으로 2 hr(chitosan D)처리했을 때 가장 높은 탈아세틸화도를 나타내었다.

3.2 분자량 측정

극한점도법으로 측정한 키토산의 분자량은 Table 3에 나타난 바와 같다.

3.3 전하측정

제조한 각각의 탈아세틸화한 키토산을 colloidal titration method에 의해 전하를 측정하였으며 그 결과를 Table 4과 같이 나타내었다.

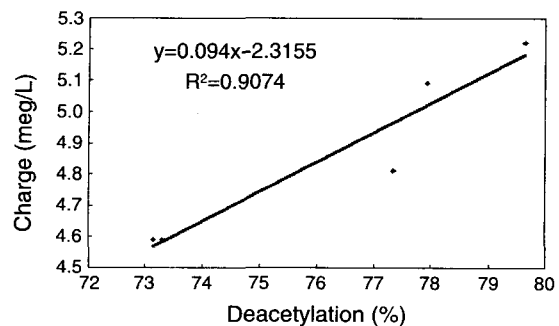
3.4 탈아세틸화도와 전하와의 관계

키토산의 탈아세틸화도의 측정에 있어서 대표적인 방법은 Robert 등의 보고에 기초한 것으로 브롬화 칼륨분말과 함께 키토산 분말을 더욱 잘게

Table 4. Colloidal titration of chitosan samples and cationic starch used

Sample	Charge(meq/L)
Chitosan A	+4.59
Chitosan B	+4.81
Chitosan C	+5.09
Chitosan D	+5.22
Chitosan E	+4.59
Chitosan F	+4.64

부수어 펠리트(pellet)로 성형하거나, 키토산 펠름을 제조하여 IR 스펙트럼의 $1,655\text{cm}^{-1}$ 의 아미드기 신축진동에 의한 밴드와 $3,450\text{cm}^{-1}$ 의 수산기 신축진동에 의한 밴드와의 흡수비로부터 탈아세틸화도를 계산하는 방식이 있으나, Fig. 1에서 보는 바와 같이 탈아세틸화도와 전하와의 밀접한 관계를 가지는데 이는 키토산을 제지공업에 적용할 시에 현재 흔히 제지공업에 사용하고 있는 전하측정방법(colloidal titration method)을 사용하여 탈아세틸화도를 계산한다면 비교적 손쉽게 탈아세틸화도를 구할 수 있다고 생각된다.

**Fig. 1. Plots for colloidal charge versus degree of deacetylation.**

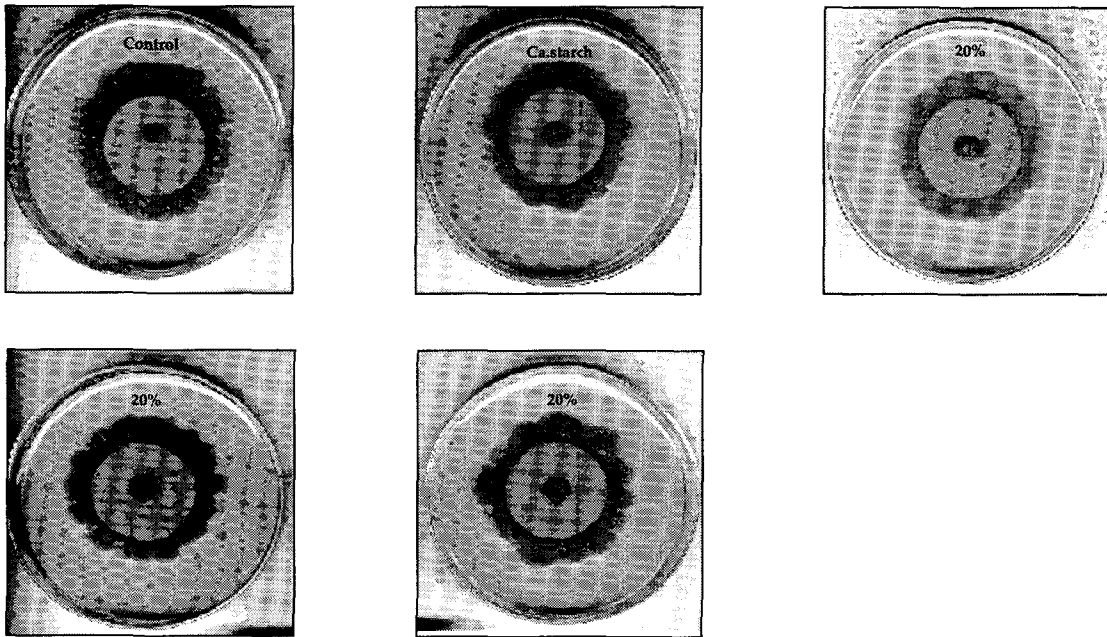


Fig. 2. Typical effect of CS-A,D,E addition level on the growth of *E. coli* in nutrient broth. (A Filter paper No. 42: after 96 hr)

3.5 균사생장반응 측정

식품부패균의 성장속도를 살펴볼수 있는 대표적인 균주인 *E. coli*에 대한 균사생장반응으로 항균성을 알아보았다. 먼저 호화 후에 키토산을 넣은 것과 호화 전에 넣은 것의 효과를 비교 한 결과 차이가 나타나지 않아, 호화 전에 넣는것의 편리성을 이유로 호화 전에 키토산을 넣어 사용하였다. 항균효과를 얻기 위하여 6% 양이온성전분에 대하여 각각의 키토산용액을 1%, 5%, 10%, 20%로 혼합하여 호화한 것으로 표면처리를 실시하였다. 표면처리된 시편들을 3cm 원으로 잘라 nutrient broth 증양에 올려 놓고 균총을 접종하여 12, 24, 48, 72, 96 hr 배양한 후 균사생장 반응을 측정하였는데 그 결과는 Figs. 2~14와 같다. 농도별로 처리된 sheet의 항균효과는 Fig. 2에서 보는 바와 같이 사이징 처리가 안된 filter paper No. 42의 경우에는 96 hr 이 지나도 균 성장이 억제되지 않아 항균력이 발현되지 않았는데 이는 종이표면에 키토산 필름이 형성되지 않고 종이내부에 흡수됨으로써 그 효과가 크게 나타나지 않은 것으로 판단된다.

한편, Figs. 3~5에서 보는 바와 같이 사이징

처리가 된 PB-A의 경우에는 10%이상 표면처리 시에는 그립에서 백색부분처럼 균 성장이 억제되어 항균효과가 발휘되었는데, 이는 종이표면에 키토산 필름이 형성되어 종이표면에 미생물 방어벽(barrier)을 형성하여 그 효과가 나타났기 때문이라 판단되며, PB-B의 경우도 같은 경향을 보였다.

균이 성장한 거리별로 측정시에 있어서는 항균효과는 사이징 처리가 된 PB-A 와 PB-B 의 항균효과는 1%, 5%첨가시 그 차이가 미미하였고, 10%첨가시에는 CS-E > CS-D > CS-A순으로 나타났고, 20%첨가시에는 CS-D > CS-A > CS-E순으로 나타났다. 그리고 균의 균성장속도에 있어서 20%첨가시에는 초기에 빠른 균성장을 보였는데, 24 hr 이후 부터는 사실상 균 성장이 정지되었고, PB-A 과 PB-B가 같은 경향을 보이고 있다. (Figs. 9~14)

균이 성장한 시간별로의 성장억제 측정시에 있어서의 항균효과는 무처리와 cationic starch처리, CS-F(filter paper No.42)는 96 hr이 지나도 계속적인 균성장을 하였지만, 사이징 처리가 된 PB-A 과 PB-B의 경우에는 Table 5에서 보는 바와 같이 CS-A, CS-D는 48 hr이후 성장이 억제되었고, CS-E는 24 hr이후 그 성장이 억제

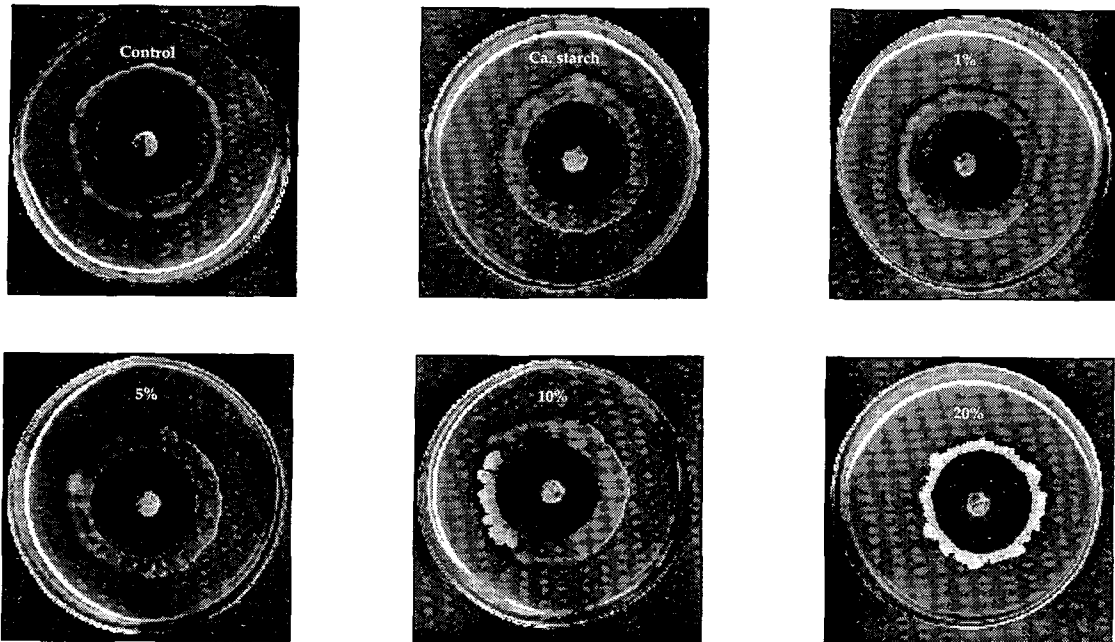


Fig. 3. Typical effect of CS-A addition level on the growth of *E. coli* in nutrient broth.(PB-A : after 96hr)

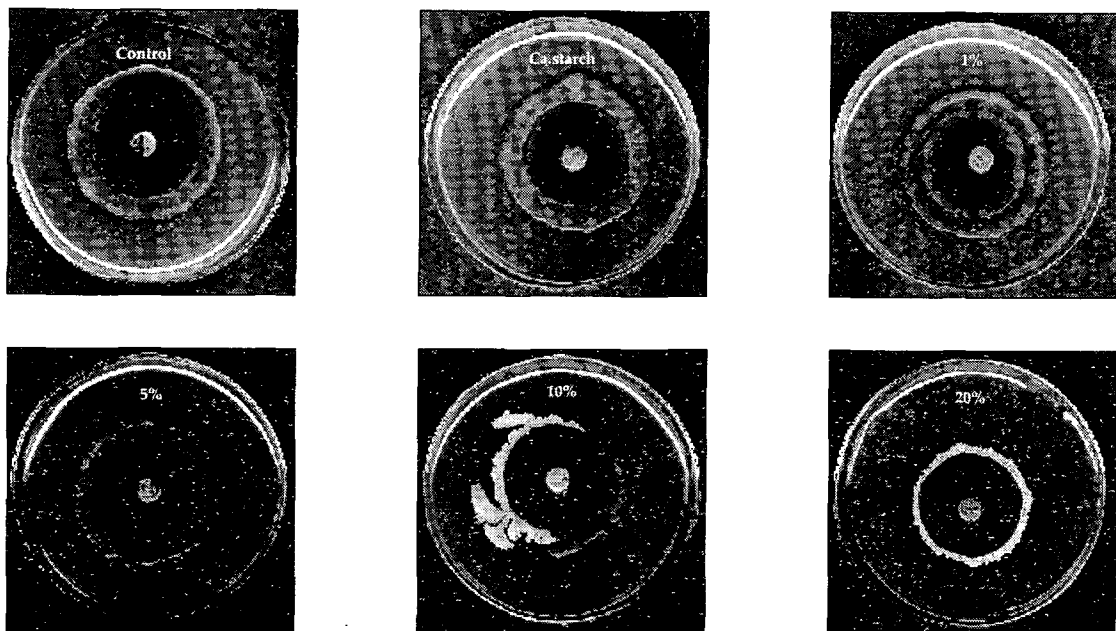


Fig. 4. Typical effect of CS-D addition level on the growth of *E. coli* in nutrient broth.(PB-A : after 96hr)

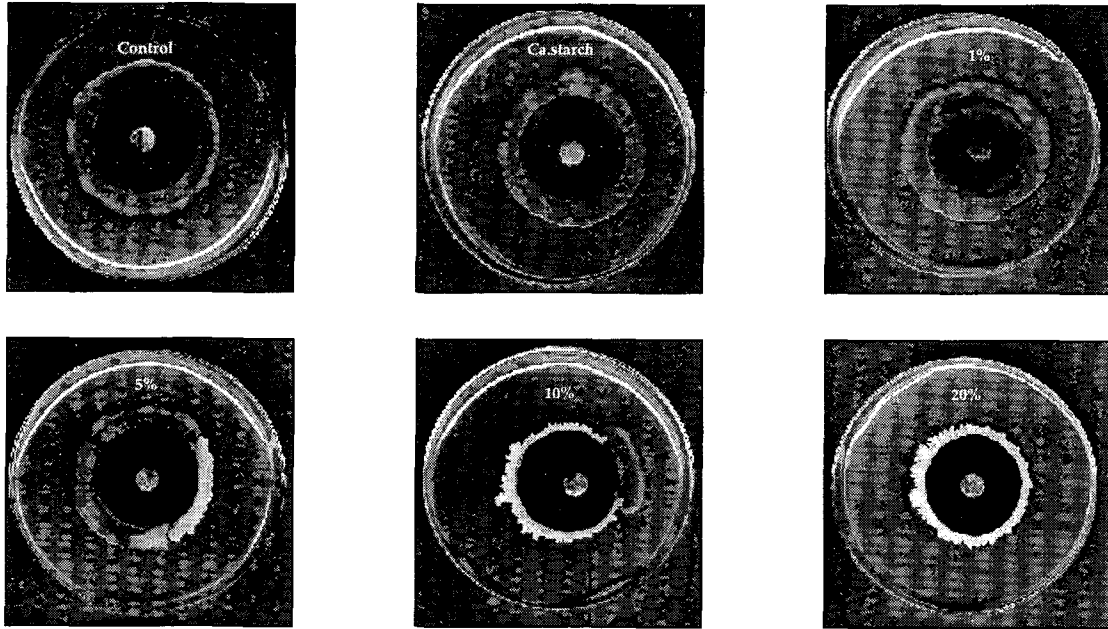


Fig. 5. Typical effect of CS-E addition level on the growth of *E. coli* in nutrient broth.(PB-A: after 96hr)

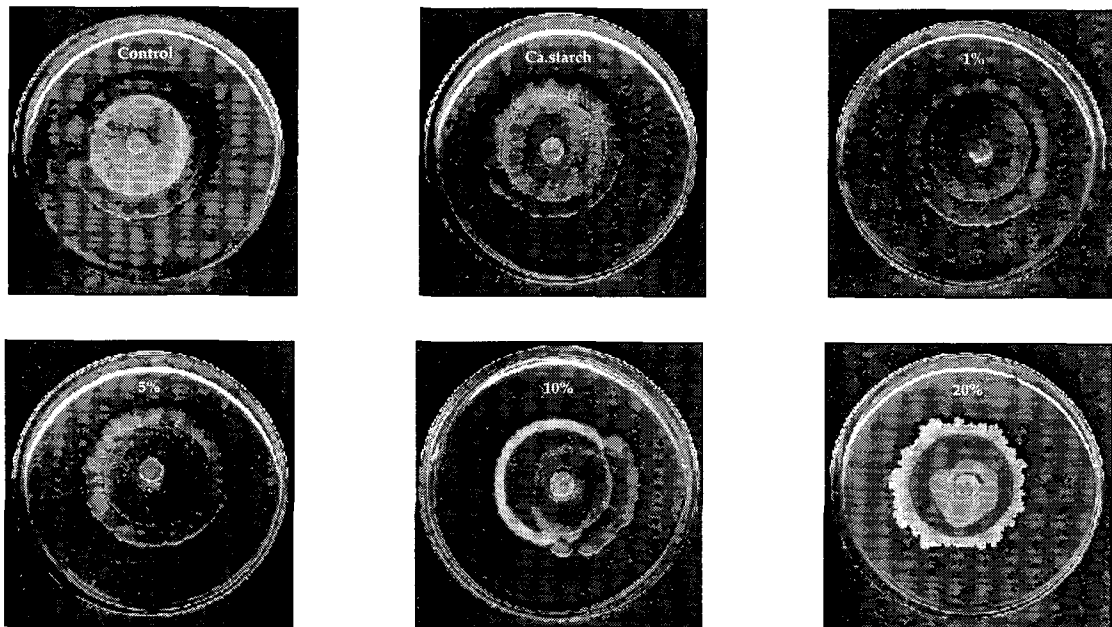


Fig. 6. Effect of CS-A addition level on the growth of *E. coli* in nutrient broth.(PB-B)

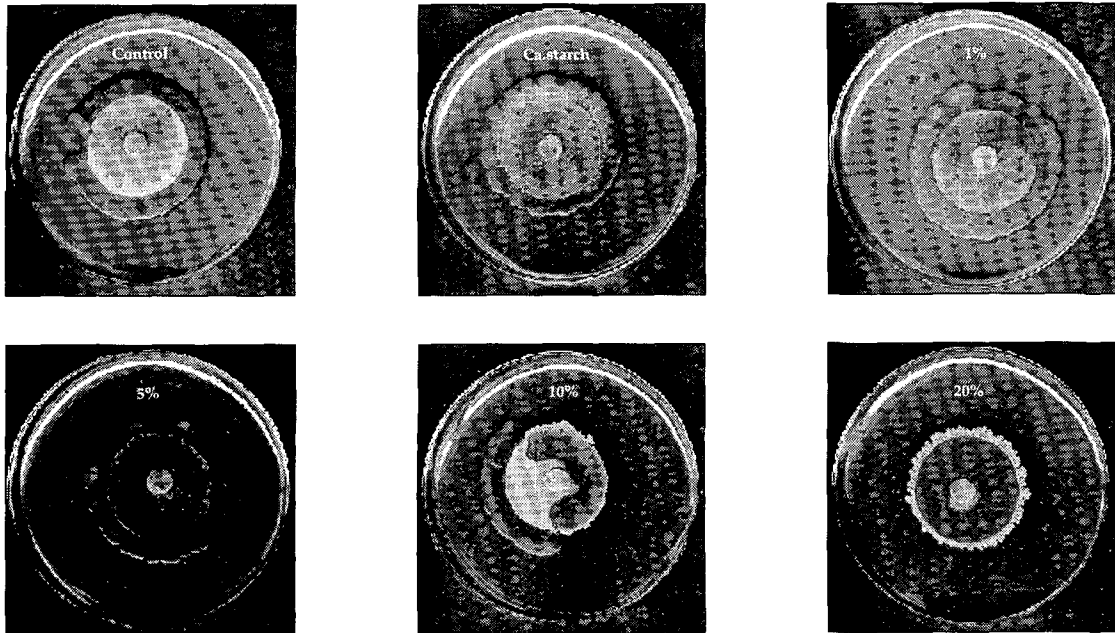


Fig. 7. Effect of CS-D addition level on the growth of *E. coli* in nutrient broth.(PB-B)

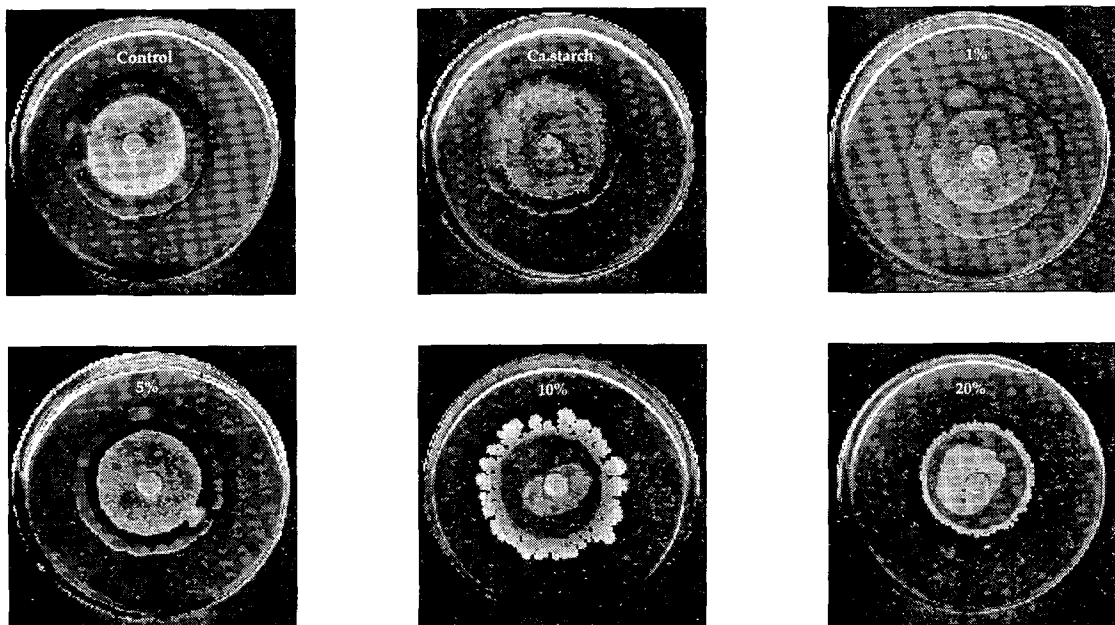


Fig. 8. Effect of CS-E addition level on the growth of *E. coli* in nutrient broth.(PB-B)

Table 5. Antibacterial activity of chitosan samples against *E. coli*

Sample	Culture time(hour)				
	12	24	48	72	96
Ca-starch	G	G	G	G	G
Control	G	G	G	G	G
CS- F	G	G	G	G	G
CS- A	G	G	NG	NG	NG
CS- D	G	G	NG	NG	NG
CS- E	G	NG	NG	NG	NG

**E. coli* was cultured in LA media at 37°C for 96 hr.

(Each chitosan samples addition level 20%)

(CS-F, Ca-starch + Chitosan A, D, E + Filter paper No.42

CS-A, Ca-starch + Chitosan A + PB-A/PB-B:

CS-D, Ca-starch + Chitosan D + PB-A/PB-B:

CS-E, Ca-starch + Chitosan E + PB-A/PB-B)

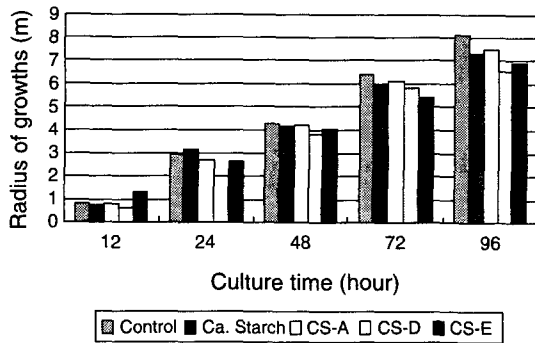


Fig. 9. Effect of chitosan samples addition level(5%) on the growths of *E. coli* in nutrient broth(PB-A).

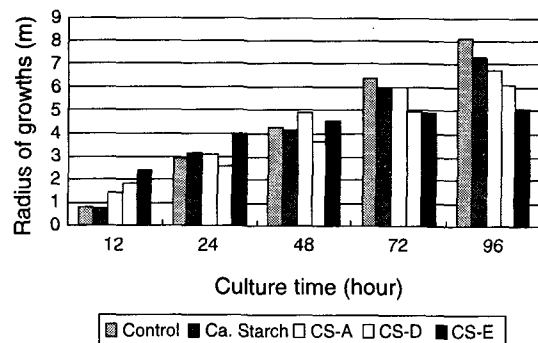


Fig. 10. Effect of chitosan samples addition level(10%) on the growths of *E. coli* in nutrient broth(PB-A).

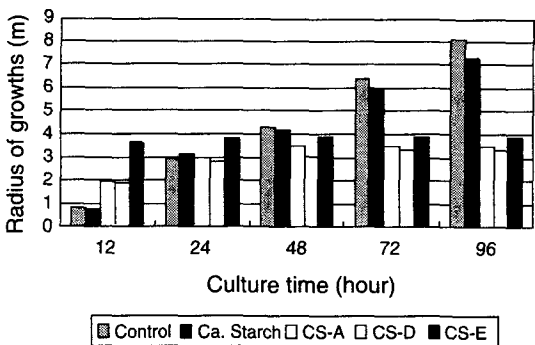


Fig. 11. Effect of chitosan samples addition level(20%) on the growths of *E. coli* in nutrient broth(PB-A).

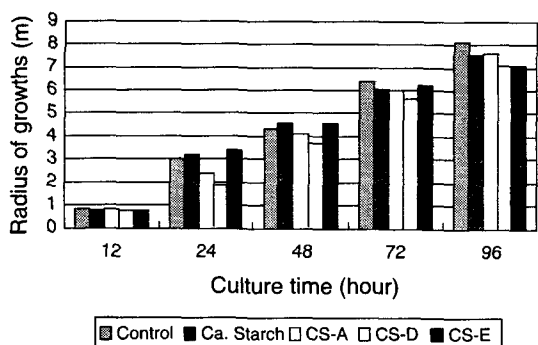


Fig. 12. Effect of chitosan samples addition level(5%) on the growths of *E. coli* in nutrient broth(PB-B).

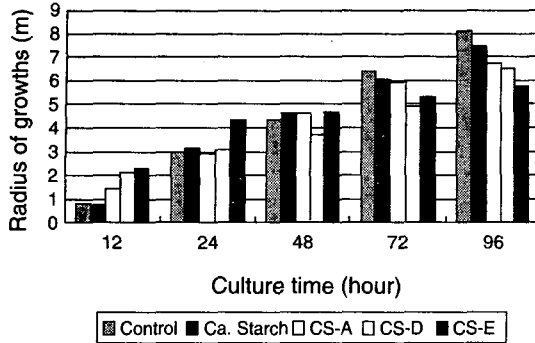


Fig. 13. Effect of chitosan samples addition level(10%) on the growths of *E. coli* in nutrient broth(PB-B).

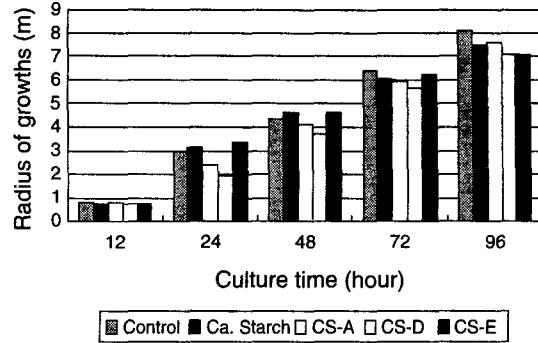


Fig. 14. Effect of chitosan samples addition level(20%) on the growths of *E. coli* in nutrient broth(PB-B).

되었다. 이는 양전하의 키토산이 균들의 성장을 억제시킨 것이라 판단된다.

4. 결론

본 연구에서는 키토산의 분자량 및 전하밀도 변화를 측정하고 종이에 표면처리를 한 후 *E. coli* 균을 사용하여 이들의 항균특성을 비교하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 키토산의 항균력은 종이에 적용시에 효과적으로 나타났다.
2. 키토산의 항균력은 액상에서 발현되는 효과와 같이 종이에 적용 시에도 나타났다.
3. 종이에 표면처리시의 항균력은 표면에 필름이 형성된 것에서 효과적으로 발현되었다.
4. 키토산 표면처리된 종이의 항균력은 키토산의 양과 분자량에 따라 차이가 있었다. 표면처리시 사용된 양성전분에 대해 10% 이상 첨가시 항균효과가 나타났다. 분자량은 작은 순으로 효과가 크게 나타났다.
5. 적외선분광분석으로 측정한 탈아세틸화도는 colloidal titration 분석결과와 밀접한 관계가 있었다.

인용문헌

1. Kornacki, J. and Gabis., Microorganisms and refrigeration temperatures. Dairy Food

Environ. Sanitation, 10:192 (1990).
 2. Scott, V.N., Factors to be considered in establishing good manufacturing practices for the production of refrigerated foods. Dairy Food Sanitation, 8:288 (1988).
 3. 서영범, 고기능성 지류포장재를 이용한 농축산물의 유통 및 저장기간의 증대에 관한 연구, 농림수산기술개발사업 1차년도 보고서 (1996).
 4. Fukuda, H and Y. Kikuchi, Bull. Chem. Soc.
 5. S.Mima, M.Mima.R. Iwamoto, and S. Yoshikawa, J. Appl. Polymer. Sci. 28:1909 (1983).
 6. JP 1 - 185301(1989).
 7. JP 54 - 148890(1979).
 8. Sannan, T., K. Kurita, K. Ogura, and Y. Iwakura, Studies on chitin : IR spectroscopic determination of degree of deacetylation. polymer, 19:458 (1978).
 9. Blair, H.S., J. Guthrie, T.K. Law, and P. Turkington, Chitosan and modified chitosan membranes. I. Preparation and characterization. J. Appl. Polymer Sci. 641 (1987).
 10. 月刊フードケミカル, キチン, 키토산商品一覽, 食品化學新聞社,p.135 (1987).
 11. Flory, P.J, Priciples of polymer chemistry cornell univ.press,thaca, NY., P.87 (1953).
 12. Lee,V, Solution and shear properties of chitin and chitosan. Univ.Microfilms. Ann Arbor, 74(29):446 (1974).