

## 변형 키토산의 항균효과

정병옥 · 강성태 · 정석진\*  
서울산업대학교 식품공학과

**The Anti-Microbial Activity of Modified Chitosan.** Jung, Byung Ok, Sung Tae Kang, and Suk Jin Chung. Department of Food Science and Technology, Seoul National University of Technology, Seoul 139-743, Korea - New type of chitosan derivatives, chitosan-g-MAP, were synthesized by graft copolymerization of mono (2-methacryloyl oxyethyl) acid phosphate (MAP) into chitosan, in order to solubilize chitosan in water. Ceric ammonium nitrate was used as an initiator for graft copolymerization. The optimal conditions for graft copolymerization were determined on the basis of reaction temperature, time, and the concentration of initiator and monomer. The reaction conditions for the highest percentage of grafting were as follows: an initiator concentration,  $3.5 \times 10^{-3}$  M; monomer concentration, 0.19 M; and reaction temperature, 40°C. The reaction rate reached the maximum value after 4 hrs of reaction. Antifungal activity was tested against *Candida albicans*, *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton violaceum* by using chitosan-g-MAP and two other chitosan samples which have degree of deacetylation of 70% (DA-7) and 90% (DA-90). Their antifungal activities were investigated in weak acidic range. Maximum antifungal activity of them was observed at pH 5.75. Chitosan-g-MAP inhibited thoroughly the growth of *Candida albicans* and *Trichophyton violaceum*. However, DA-70 and DA-90 showed higher antifungal activities on *Trichophyton rubrum* than that of chitosan-g-MAP.

**Key words:** chitosan, chitosan-g-mono(2-methacryloyl oxyethyl)acid phosphate, antimicrobial activity

근래에 와서 자원, 에너지, 환경 등의 문제로 천연고분자의 중요성이 다시 주목되고 있다. 그 중에서도 chitin 및 chitosan을 식품, 의약, 화학공업 등의 넓은 분야에 기능성 다당으로서 이용하기 위한 많은 연구내용이 발표되고 있다.

Chitin은 게, 새우 등의 갑각류, 크릴의 피각, 투구풍뎅이, 메뚜기 등 곤충류의 갑피, 대합, 굴 등의 조개류, 오징어의 뼈, 세균의 세포벽 등에 존재하며, 셀룰로오스 다음으로 다량 생합성되는 것으로 추정되고 있다[15, 18]. Chitin은 종래에는 폐기되었으나, 최근에 와서 생체고분자로서 크게 각광을 받는 귀중한 자원으로 급성장하고 있다. 이 chitin의 탈아세틸화물인 chitosan, poly[ $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-2-amino-2-deoxy-D-glucose]는 생체적합성과 효소에 의한 생분해성이 뛰어나고 그 자체가 제산작용, 콜레스테롤 저하작용 및 종양 억제작용 등의 약리작용을 나타내기 때문에 약물전달체, 혈액응고 방지제, 인공피부 등의 의료용 재료로서 연구되고 있으며[2, 3, 7, 12, 16, 17], 식품첨가제로서의 연구도 활발히 진행되고 있는 무해무독한 물질이다. 이러한 chitin 및 chitosan에 새로운 기능을 부여하기 위해 최근 인산계를 비롯한 여러 가지의 단량체를 그래프트 중합시키려는 연구[6, 13]가 활발하다. Chitosan

의 그래프트 중합에 개시제로는  $Fe^{+2}-H_2O_2$ , pyridine, ceric ammonium nitrate(CAN) 등이 있으나 이 중 CAN은 그 자신이 강한 산화제로서 수산기, 아민기 등의 환원성기가 있는 유기물과 용이하게 착물을 형성하여, 매우 쉽게 그래프트중합을 개시하는 것으로 알려져 있다[13]. 비교적 저온중합이 가능하고 그래프트효율이 극히 높기 때문에 셀룰로오스계에 적용성이 좋으며 중합조작이 용이하여 redox 중합계에서의 개시제로 많이 사용되고 있다.

한편, chitosan 및 그 염산염에 의한 분해물이 식물병원성의 곰팡이에 대한 생육억제효과를 나타내는 것은 Allan을 필두로 Kendra, Uchida 등에 의해 밝혀지면서 이들의 항균능에 대한 연구가 급속히 진행되었다[1, 9, 20, 21]. 이와 같이, chitosan 및 그들의 유도체에서 나타나는 항균성은 이들 물질이 가지고 있는 polycation성 및 단백질과의 affinity로 부터 유래된다고 생각할 수 있으며, 그 결과 세균 및 곰팡이에 대한 선택적인 항균능이 나타남을 알 수 있다. 최근 chitin에 아민기를 도입시킴으로서, 아민기와 그 치환된 작용기에 따라 chitin에서는 발현되지 않는 항균성이 나타나며, 그 항균능은 분자량과 도입된 작용성기에 크게 영향을 받는다는 것이 밝혀졌으며, 한편 chitosan에 알킬 길이가 다른 4차 암모늄기를 도입했을 때 알킬기의 길이에 따라 즉, 소수성이 증가함에 따라 항균능도 비례하여 증가되는 것으로 보고되고 있다[10, 11]. 따라서, 지금까지 발표되고 있는 chitosan

\*Corresponding author  
Tel. 82-2-970-6258, Fax. 82-2-976-6460  
E-mail: sukjin@duck.snpu.ac.kr



량을 측정하였다(Fig. 1). 그래프트율과 단량체의 그래프트 효율 그리고 단량체의 총 전환율은 다음 식으로 계산하였다[6].

$$\text{그래프트율}(\%) = \frac{W_{gm}}{W_c} \times 100$$

$$\text{그래프트 효율}(\%) = \frac{W_{gm}}{W_{gm} + W_{hm}} \times 100$$

$$\text{총 전환율}(\%) = \frac{W_{gm} + W_{hm}}{W_m} \times 100$$

여기서,  $W_{gm}$ , 그래프트된 단량체의 무게;  $W_{hm}$ , homopolymer의 무게;  $W_c$ , chitosan의 무게;  $W_m$ , 단량체의 무게.

**분석**

반응의 확인은 적외선분광분석기(FT-IR, Nicolet Model 5-DX)를 이용하여 KBr법으로 합성된 고분자들의 구조를 확인하였으며, 표면구조는 전자현미경(SEM, Joel Model JSM-35CF)을 이용하여 확인하였다. 또한 X-선 회절분석기(Rigaku Denky Model RAD-C)는 측정조건 50 kV, 180 mA에서 Ni 필터,  $CuK\alpha$ 를 사용하여  $2\theta=5-30^\circ$ 의 범위에서 chitosan 및 그래프트 공중합물 간의 결정성 정도를 비교하였다.

**항균효과 시험**

시험균으로는 각종 감염증의 원인균인 *Candida albicans*(ATCC 10231), *Trichophyton rubrum*(ATCC 44766) 및 *Trichophyton violaceum*(ATCC 8376)을 국립보건원으로부터 분양 받아 사용하였으며, 항균시험은 적정 pH의 PDA배지(acetate buffer solution:0.2M acetic acid-0.2M sodium acetate)에 DA-70, DA-90과 chitosan과 chitosan-g-MAP을 각각 0.5 wt%로 용해한 시료액 0.5 ml와 시험균 0.2 ml를 분주하여 *C. albicans*는 25℃에서 48시간, *T. rubrum* 및 *T. violaceum*은 28℃에서 72시간 각각 배양한 후 colony 수를 측정하여 다음 식

[5]으로 항균력을 비교하였다.

$$\text{항균력} = \frac{\text{Blank의 CFU} - \text{Sample의 CFU}}{\text{Blank의 CFU}} \times 100$$

**결과 및 고찰**

**그래프트 중합체의 확인**

Chitosan과 MAP의 그래프트중합은 적외선 스펙트럼, 전자현미경, X-선 회절분석기를 이용하여 확인하였다. 우선, 적외선 스펙트럼을 나타낸 Fig. 2에서 chitosan과 MAP의 호모폴리머 그리고 중합체인 Chitosan-g-MAP의 적외선스펙트럼을 비교해 볼 때 chitosan에서는 관측되지 않는  $1,730\text{ cm}^{-1}$  부근에서 MAP에 있는 카보닐기에 기인한 흡수가 중합체에서 관측되고  $1,100\text{ cm}^{-1}$  부근에

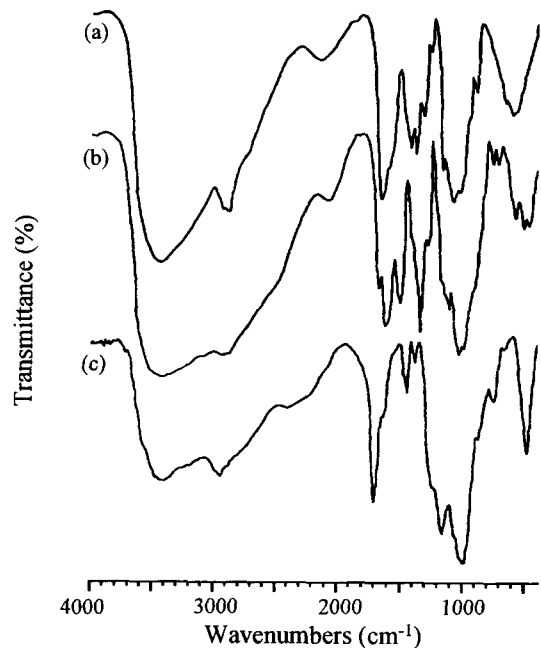


Fig. 2. FT-IR spectra of (a) chitosan, (b) chitosan-g-MAP and (c) poly(MAP).

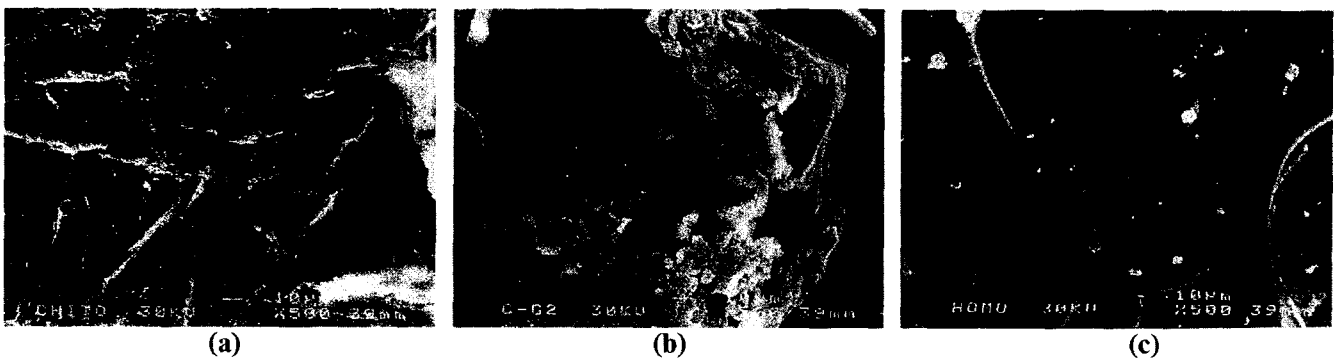


Fig. 3. Scanning electron microscopic photos of (a) chitosan, (b) chitosan-g-MAP and (c) poly(MAP).

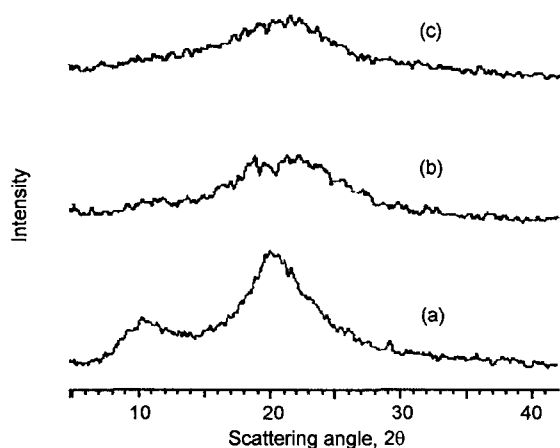


Fig. 4. X-ray diffraction patterns of (a) chitosan, (b) chitosan-g-MAP and (c) poly(MAP).

서는 인산기와 C-O기에 기인한 특성 피크가 나타나는 것으로 chitosan에 MAP이 그래프트중합 되었음을 확인할 수 있었다.

Fig. 3은 chitosan과 chitosan-g-MAP 및 호모폴리머의 표면구조를 전자현미경으로 찍은 사진으로 그래프트된 chitosan-g-MAP의 경우 chitosan의 조밀한 모양의 표면 위에 poly(MAP)의 특징적인 rough 한 표면구조가 관측되어 그래프트가 되었음을 확인할 수 있었다.

Chitosan과 chitosan-g-MAP의 X-선 회절분석 결과를 Fig. 4에 나타내었다. Chitosan인 Fig. 4(a)는 (001)과 (100) 면에 의한  $2\theta=9.8^\circ$ 의 피크와 (101)과 (002) 면의 혼합 결정에 의한  $2\theta=19.5^\circ$ 의 피크가 나타났고, 그래프트중합체인 Fig. 4(b)에서는 그 강도가 감소되는 것으로 보아 그래프트가 진행됨에 따라 chitosan 자체의 분자간 및

분자내의 강인한 수소결합의 파괴에 의한 결정성이 감소되는 것으로 생각된다[8]. 또 그래프트율과 그리프트효율 및 충전환율을 구한 결과 개시제인 CAN의 농도  $3.5 \times 10^{-3}$  M, 단량체인 MAP의 농도 0.19 M, 그리고 온도  $40^\circ\text{C}$ 에서 최고의 그래프트율을 나타내었고 반응시간 4시간이 최적의 조건으로 나타남을 확인할 수 있었다(Table 1).

항균성에 미치는 pH의 영향

*C. albicans*, *T. rubrum* 및 *T. violaceum*에 대해서 chitosan 및 chitosan-g-MAP의 pH에 따른 최적의 항균 조건을 살펴보기 위해 약산성영역에서 항균실험을 한 결과를 Fig. 5에 나타내었다. 먼저 Fig. 5(a)의 경우 *C. albicans*에 대한 항균능을 살펴본 것으로 DA-70과 DA-90인 chitosan의 경우 최적 pH인 5.75에서는 거의 비슷한 경향으로 85% 정도의 항균력을 나타냈으며, DA-90의 경우 6.16 에서는 80% 이하로 감소하는 경향을 나타냈다. 이러한 경향은 탈아세틸화 반응이 진행될수록 chitosan 자체의 pKa 값이 낮아지는 것을 고려하면 항균성에 미치는 유리 아민기의 영향을 예측할 수 있는데 기인한다고 생각된다. 이러한 pH 의존성은 chitosan-g-MAP에서 그 경향은 더욱 크게 나타나는데 pH 5.0 및 5.75에서 95~98%의 항균력을 보이는 반면, pH 6.16에서는 15% 정도의 낮은 항균력을 나타내었다. 이것은 *C. albicans* 등과 같은 효모류는 알칼리 영역으로 갈수록 성장이 촉진되는 것과 같은 맥락으로 생각할 수 있다. 한편 Fig. 5(b)의 경우는 *T. rubrum*에 대한 항균능으로 DA-70과 DA-90인 chitosan은 95%이상의 거의 비슷한 우수한 항균력을 나타냈으며, chitosan-g-MAP은 DA-70과 DA-90인 chitosan보다 오히려 10% 이상의 낮은 항균력을 나타내었다. 그러나, DA-70인 chitosan의 경우 pH에

Table 1. Results on various reaction conditions

Concentration		Temperature (°C)	Reaction Time (hr)	Percentage of Grafting	Efficiency of Grafting(%)	Total Conversion (%)
CAN ( $\times 10^{-3}$ )	MAP ( $\times 10^{-2}$ )					
0.5	19.0	40	4	68.1	75.8	20.1
2.0	19.0	40	4	93.2	81.0	26.0
3.5	2.0	40	4	42.1	79.1	99.1
3.5	12.0	40	4	78.2	84.1	36.9
3.5	19.0	20	4	91.0	81.1	25.0
3.5	19.0	30	4	102.0	84.0	27.0
3.5	19.0	40	1	89.0	82.2	26.0
3.5	19.0	40	2	106.2	84.1	29.3
3.5	19.0	40	3	112.4	84.5	29.5
3.5	19.0	40	4	113.9	85.2	28.2
3.5	19.0	40	5	113.2	85.0	28.1
3.5	19.0	50	4	109.0	85.0	28.0
3.5	32.0	40	4	99.1	82.5	18.0
5.0	19.0	40	4	113.0	85.3	28.3

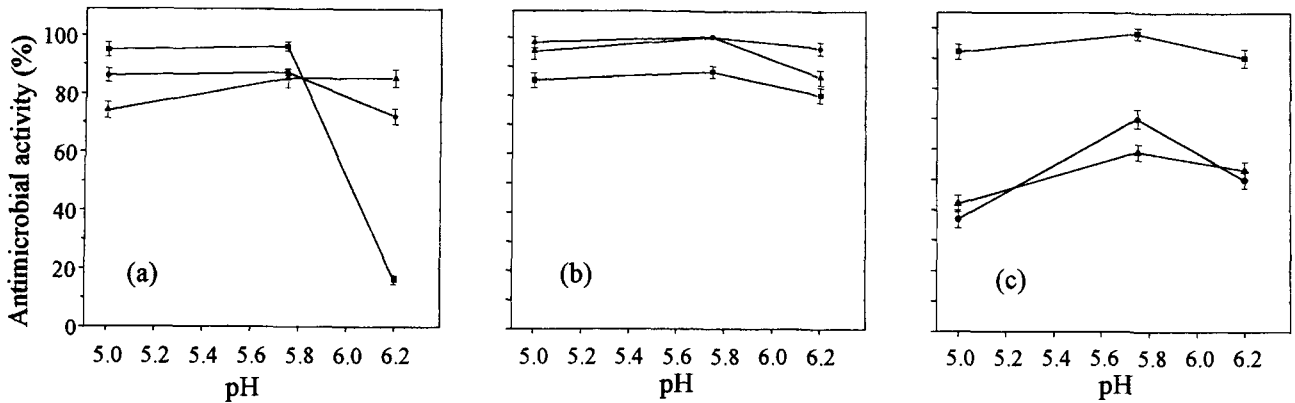


Fig. 5. Effect of pH on the antimicrobial activity of chitosan and chitosan-g-MAP at the dosage of  $6.25 \times 10^{-4}$  g against (a) *Candida albicans*, (b) *Trichophyton rubrum*, and (c) *Trichophyton violaceum*. ■; chitosan-g-MAP, ●; DA-90%, ▲; DA-70%.

영향을 받아 알칼리 영역에 가까울수록 감소되는 경향을 보이지만, pH 5.0과 5.75에서 95% 이상의 높은 항균력을 나타내었다. 특히 chitosan-g-MAP의 경우는 더 큰 폭으로 감소하였지만 전체적으로는 80% 이상의 항균력을 나타냄을 볼 수 있었다. Fig. 5(c)는 *T. violaceum*에 대한 것으로 *T. rubrum*에 대한 항균력과 비교해 볼 때 탈아세틸화도가 다른 DA-70과 DA-90의 chitosan은 음이온성 작용기가 그래프트된 chitosan-g-MAP과 서로 상반되는 항균력을 보이고 있다. 항균력이 40~70%를 나타내는 DA-70과 DA-90인 chitosan 보다 chitosan-g-MAP은 월등히 우수한 95% 이상의 항균력을 나타내었다. 따라서 pH가 5.75에서 가장 우수한 항균능이 발현됨과 곰팡이 균류에 대한 선택성이 나타남을 확인할 수 있었다. 이러한 특이성은 곰팡이류의 세포벽이 chitin과 cellulose 그리고  $\beta$ -glycan 등으로 이루어져 있기 때문에 [19] chitosan 또는 chitosan-g-MAP은 곰팡이의 세포벽

과의 친화력의 차이에서 오는 영향으로 추측하였다.

**Chitosan 및 변형chitosan의 농도가 항균성에 미치는 영향**

Chitosan 및 chitosan-g-MAP의 농도에 따른 *C. albicans*, *T. rubrum* 및 *T. violaceum*에 대한 항균효과를 살펴본 결과를 Fig. 6에 나타내었다. Fig. 6(a)는 최적 pH인 5.75에서 *C. albicans*에 대한 농도 변화에 따른 영향을 살펴본 결과 농도가  $6.25 \times 10^{-4}$  g에서 모든 항균제가 최고의 항균력을 나타내었으며, 그 이상의 농도에서는 항균력의 변화가 거의 없었다. Chitosan은 탈아세틸화도가 높을수록 더 좋은 항균력을 나타냈으며, chitosan-g-MAP은 거의 100%에 가까운 항균력을 보였다. 이러한 결과는 앞서 언급한 바와 같이 효모와 도입된 단량체와의 친화력 및 유리 아민기의 함량에 의한 영향으로 생각되었다. Fig. 6(b)는 *T. rubrum*에 대한 항균력으로 DA-

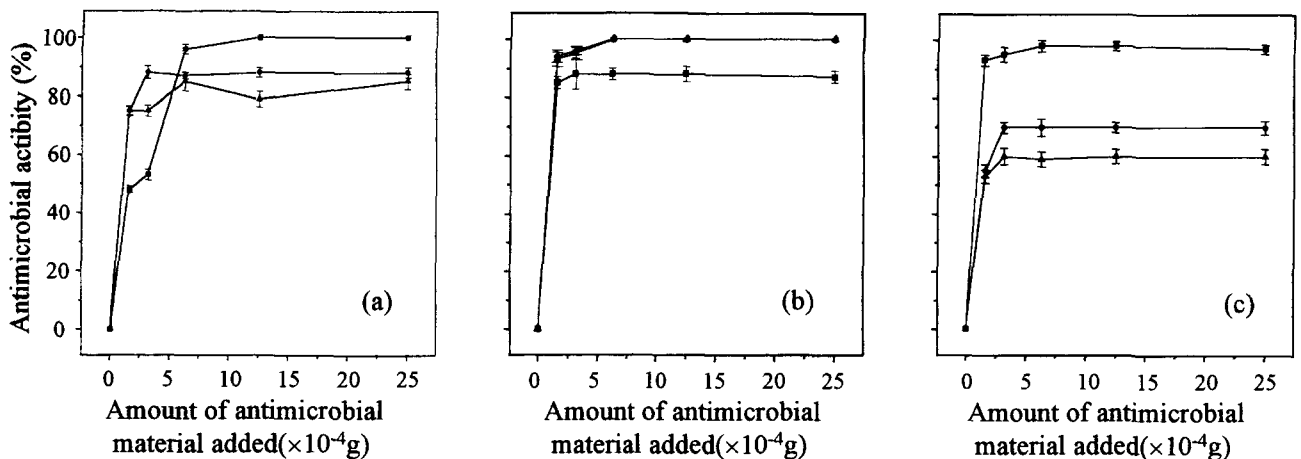


Fig. 6. Effect of the dosage of antimicrobial material on the antimicrobial activity at the pH 5.75 against (a) *Candida albicans*, (b) *Trichophyton rubrum*, and (c) *Trichophyton violaceum*. ■; chitosan-g-MAP, ●; DA-90%, ▲; DA-70%.

70과 DA-90인 chitosan의 경우는  $1.56 \times 10^{-4}$  g의 농도로 90% 이상의 항균능을 나타내었으며, 음이온성 작용기가 도입된 chitosan-g-MAP의 경우는 다소 떨어진  $3.12 \times 10^{-4}$  g의 농도에서 85%의 최대 항균력을 나타내었다. DA-70과 DA-90인 chitosan의 경우는  $6.25 \times 10^{-4}$  g 이상의 농도에서 아민기의 함량에 관계없이 동등한 항균력을 보였다. *T. rubrum*에 대한 항곰팡이성은 pH 변화에서도 나타난 바와 같이 아민기의 함량이 항균력에 미치는 영향은 거의 없음을 알 수 있었다. *T. violaceum*에 대한 항균능을 살펴본 Fig. 6(c)의 경우는 Fig. 6(b)와는 달리 아민기의 함량이 증가할수록 항균력은 다소 증가하는 경향을 보였고, chitosan-g-MAP의 경우는 DA-70과 DA-90인 chitosan보다 훨씬 높은 항균력을 확인할 수 있었다. DA-70과 DA-90인 chitosan의 경우  $3.12 \times 10^{-4}$  g 이상의 농도에서 각각 60%와 70%의 항균력을 나타내었다. Chitosan-g-MAP은  $1.56 \times 10^{-4}$  g 농도에서도 90% 이상의 높은 항균력을 나타내었으며,  $6.25 \times 10^{-4}$  g 이상의 농도에서는 100%에 가까운 항균력을 나타내었다. 그래프 트가 진행됨에 따라서 피라노즈 고리의 개환반응으로 유리 아민의 함량이 감소된다[5]. 그러나 항균성에 있어서 활성기라고 할 수 있는 유리 아민기의 감소에도 불구하고 항균력이 증가하는 것은 진균세포막이 이중막으로 인 지질을 함유하고 있기 때문에 이들이 chitosan-g-MAP의 인산염과 친화성에 기인한 영향을 크게 받아 chitosan-g-MAP의 항균능이 증가되는 것으로 추측하였다[4].

## 요 약

게나 새우 등의 갑각류의 껍질에서 주로 얻어지는 생체적합성이 뛰어난 천연고분자인 chitosan에 음이온 수용성의 함인계 단량체인 mono(2-methacryloyl oxyethyl) acid phosphate를 그래프트중합시켜 새로운 유도체인 chitosan-g-MAP을 합성하였다. 그래프트중합에서 개시제로는 ceric ammonium nitrate을 사용하여 개시제의 농도, 단량체의 농도, 반응온도, 반응시간에 따른 그래프 트율, 단량체의 그래프트효율 및 단량체의 충전환율의 변화를 조사하여 최적조건을 규명하였다. 그래프트율은 개시제농도  $3.5 \times 10^{-3}$  M, 단량체농도 0.19 M, 반응온도 40°C에서 가장 높은 값을 나타내었고, 반응시간 4시간이 최적조건 이었다. Chitosan의 유리 아민의 함량과 그래프트된 단량체의 종류에 따른 항균성을 *Candida albicans*, *Trichophyton rubrum* 및 *Trichophyton violaceum*에 대하여 조사한 결과, pH 5.75에서 가장 우수한 항균능이 발현되고, 항균제의 농도에 따른 영향에서는 변형chitosan은 *C. albicans*와 *T. violaceum*에 대하여 100%의 우수한 항균력을 나타낸 반면, 탈아세틸화도가 다른 DA 70과 DA-90인 chitosan은 *T. rubrum* 균에 대해서만 변

형 chitosan 보다 우수한 항균성을 나타내었다.

## 감사의 글

본 연구는 서울산업대학교 교내연구비 지원으로 수행되었기에 이에 감사드립니다.

## REFERENCES

- Allan, C. R. and L. A. Hadwiger. 1979. The fungicidal effect of chitosan on fungi of varying cell wall composition. *Exp. Mycol.* **3**: 285-287.
- Balasa, L. L. and J. F. Pruden. 1978. Applications of chitin and chitosan in wound-healing acceleration, pp. 296-305. In R. A. A. Muzzarelli and E. R. Pariser(eds), *Proceedings of the First International Conference on Chitin/Chitosan*, Cambridge.
- Brine, C. J., P. A. Sandford, and J. P. Zikakis. 1992. *Advanced Chitin and Chitosan*, Elsevier, New York.
- Creager, J. G., J. G. Black, and V. E. Davison. 1990. *Microbiology Principles and Application*, pp. 75-76. Prentice-Hall, Inc., New Jersey, U.S.A.
- Fang, S. W., C. F. Li, and D. Y. C. Shih. 1994. Antifungal activity of chitosan and its preservative effect on low-sugar Candied Kumquat. *J. Food Protection.* **56**: 136-140.
- Goni, I., M. Gurruchaga, M. Valeru, and G. M. Guzman. 1983. Graft polymerization of acrylic monomers onto starch fractions I: Effect of reaction time on grafting methyl methacrylate onto amylose. *J. Polym. Sci.* **21**: 2573-2580.
- Hirano, S., Y. Tanaka, M. Hasegawa, K. Tobetto, and A. Nishioka. 1985. Effect of sulfated derivatives of chitosan on some blood coagulant factors. *Carbohydr. Res.* **137**: 205-217.
- Ide, H. 1977. *Graft Polymerization and Its Application*, Chater 2, Polymer-publication conference, Kyoto, Japan.
- Kendra, D. F. and L. A. Hadwiger. 1984. Characterization of the smallest chitosan oligomer that is maximally antifungal to *Fusarium solani* and elicits Pisatin formation in *Pisum sativum*. *Exp. Mycol.* **8**: 276-281.
- Kim, C. H., J. W. Choi, H. J. Chun, and K. S. Choi. 1997. Synthesis of chitosan derivatives with quaternary ammonium salt and their antibacterial activity. *Polym. Bull.* **38**: 387-393.
- Kim, C. H., S. Y. Kim, and K. S. Choi. 1997. Synthesis and antibacterial activity of water-soluble chitin derivatives. *Polym. Adv. Technol.* **8**: 319-325.
- Kojima, K., M. Yoshikuni, and T. Suzuki. 1979. Tributylborane-initiated grafting of methyl methacrylate onto chitin. *J. Appl. Polym. Sci.* **24**: 1587-1593.
- Li, W., Z. Li, W. Liao, and X-D. Feng. 1993. Chemical modification of biopolymer-mechanism of model graft co-

- polymerization of chitosan. *J. Biomater. Sci. Polymer Edn.* **4**: 557–566.
14. Mima, S., M. Miya, R. Iwamoto, and S. Yoshikawa. 1983. Highly deacetylated chitosan and its properties. *J. Appl. Polym. Sci.* **28**: 1909–1917.
  15. Muzzarelli, R. A. A. 1977. *Chitin*, Pergamon Press, Oxford.
  16. Nishimura, K., S. Nishihara, N. Nishi, S. Tokura, and I. Azuma. 1984. Immunological activity of chitin and its derivatives. *Vaccine* **2**: 93–99.
  17. Nishimura, K., S. Nishihara, H. Seo, N. Nishi, S. Tokura, and I. Azuma. 1986. Macrophage activation with multiporous beads prepared from partially deacetylated chitin. *J. Biomed. Mat. Res.* **20**: 1359–1372.
  18. Roberts, G. A. F. 1992. *Chitin Chemistry*, Macmillian Press, London.
  19. Shepherd, M. G. *et al.*, 1984. pp. 73–77. In C. Nombela (ed), *Microbial Cell Wall Synthesis and Autolysis*, Elsevier Science Publishers.
  20. Uchida, Y. and A. Ohtakara. 1988. Chitosanase from *Bacillus* species, pp. 501–505. In W. A. Wood and S. T. Kellogg(eds), *Methods in Enzymology*, Academic Press, New York, Vol. 161, Biomass, Part B.
  21. Walker-Simmons, M. and C. A. Ryan. 1984. Proteinase inhibitor synthesis in tomato leaves: Induction by chitosan oligomers and chemically modified chitosan and chitin. *Plant. Physiol.* **76**: 787–790.

(Received April 1, 1998)