

Ag-Hydroxyl Apatite를 담지한 기능성 플라스틱의 항균성능 평가

†임 윤 택 · 최 형 기 · ¹안 용 현
기술표준원 생물환경과, ¹단국대학교 화학과
(접수 : 2001. 3. 27., 게재승인 : 2001. 4. 25.)

Antimicrobial Activity Assessment of Functional Plastics which Contained Ag-Hydroxyl Apatite Agent

Yoon-Taek Lim†, Hyung-Ki Choi, and Yong-Hyun Ahn¹
Biotechnology & Environmental Eng. Div. Agency for Technology and Standards
¹Department of Chemistry, Dankook University, Seoul 140-714, Korea
(Received : 2001. 3. 27., Accepted : 2001. 4. 25.)

For testing antimicrobial activity of functional plastics containing antimicrobial agent. We have used *Escherichia. coli* (ATCC 25922) and *Staphylococcus. aureus* (ATCC 6538P) with plastics which contained a Ag-hydroxyl apatite agent. In this paper, effect of antimicrobial test on plastics containing silver complex agent which accomplished by using test condition that Trypticase Soy Broth (TSB solution have diluted 500 times with 0.1 M phosphate buffer), pH7.2, Temp. 37±1°C and 120 rpm for 24 hr. the condition give the opportunity to better perform the antimicrobial active effect of individual functional plastics. As result. the test conditions were best effect of antimicrobial by using plastic contained minimum 0.5% with Ag-hydroxyl apatite agent.

Key Words : antimicrobial activity, silver complex agent, functional plastic

서 론

항균성 기능을 가진 항균상품은 인간이 건강하고 쾌적한 생활을 영위하는데 도움을 주며 안전한 특성을 가지고 효과를 신뢰하는 제품이어야 한다.

소비제품으로서 생활용품이 점차적으로 청결과 안전성에 대한 의식이 고조됨에 따라 세균오염에 대한 불안감과 예방책으로 항균 가공처리 한 기능성 제품들을 개발하게 되었다. 종래에는 항균제로서 유기 합성된 항균제가 많이 사용되어 왔으나, 최근에는 지속성과 내열성 및 안전성을 고려하여 제올라이트, 칼슘실리케이트 등의 무기 담체를 이용하여 Ag⁺, Zn²⁺ 등의 금속이온을 담지한 무기 항균제가 범용적으로 사용되고 있다 특히 이들을 사용한 기능성 플라스틱제품으로 음료용기, 주방용 도마, 완구류 등 인기상품으로 시판되고 있다. 그러나 이들 상품에 대한 항균기능의 효력을 평가할 수 있는 시험평가 방법이 정립되어 있지 않아 수요자의 품질신뢰에 혼란을 초래할 뿐만 아니라 새로운 제품의 품질관리를

위해서도 평가에 필요한 균주의 처리방법, 기능성 평가조건 등의 시험방법에 대한 기준의 정립이 필요한 실정이다. 현재 항균제품을 평가할 수 있는 국내·외의 시험방법으로는 섬유 제품에 적용하는 항균성 시험방법(2,5)과 직물의 할로 테스트 (1) 시험방법이 있으며, 플라스틱 경우는 ISO(8), ASTM (3,9,10)에 고풍이 저항성 시험방법이 있으나 세균에 대한 항균력을 시험하는 정량적인 평가방법이 아니고 제품의 물성변화를 측정하는 국한된 방법이다. 한편 섬유제품 전자제 등에 사용되는 시험방법 방법으로는 접촉법(4), Shake flask법(6,7) 이 시험연구소 등에서 활용되어지고 있으나 시험균 용액의 농도, 배지의 적합성, 시험결과와 정밀성 등 아직까지 공인된 평가방법으로 규격화하기에는 미흡한 점이 많다.

본 연구의 목적은 무기 항균제를 사용하여 가공되는 항균 기능 플라스틱 제품들에 대한 항균성능 효과를 시험 및 평가할 수 있는 기준을 정립하고자 함에 있다. 특히 세균에 의한 정량적인 항균효과를 평가할 수 있는 시험기준 설정을 위해 Ag-hydroxyl apatite를 항균 실험재료로 선정하여 기준 시험편에 적용하였으며 공시 균주에 대한 적절한 처리방법, 시험 조건 등을 비교하여 항균효과를 측정할 수 있는 최적 조건을 제시하고 재현성 있는 평가방법의 적용 가능성을 검토하였다.

†Corresponding Author : Biotechnology & Environmental Eng. Div. Agency for Technology and Standards Korea
Tel : +82-2-509-7250, Fax : +82-2-507-1922
E-mail : yoontaek@ats.go.kr

재료 및 방법

시험편의 제작

결정성 무기 항균제 원료는 (주) 바이오세라에서 제조한 ceramics 담체에 항균 금속이온인 은(Ag+)이 치환된 입도 3~4 μm의 hydroxyl apatite을 사용하였다. 시험편으로 사용한 은을 담지한 기능성 플라스틱은 다음과 같은 조건으로 제조되었다. 첫째 시험편 플라스틱 제조시 항균제를 고르게 분산시키기 위하여 플라스틱 시험편 제조 전에 가공 수지별(LDPE, HDPE, PP, PS, ABS)로 항균제가 10%(w/w)씩 함유된 master batch를 가공하였다. 둘째 항균제 첨가 플라스틱의 가공은 미리 제조된 각각의 수지별 master batch를 사용하여 항균제 0%, 0.5%, 1.5%, 3.0%(w/w)을 포함한 기능성 플라스틱을 50×80×3 mm의 크기로 (주) 남일공업에 의뢰하여 molding 제작한 시험재료를 사용하였다. 셋째 항균성능 평가에 사용되는 기준 시험편은 molding제작된 시험재료를 10×10×3 mm(가공오차;±0.02 mm)의 크기로 정밀 제작하여 사용하였다. 대조편으로는 항균가공 되지 않은 각각의 플라스틱을 시험편과 동일조건으로 제작하였다.

공시균주 및 배지조제

실험에 사용한 균주는 *Escherichia coli* ATCC 25922 및 *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P를 한국 중균 협회에서 분양 받아 공시 균주로 사용하였다.

액체배지는 Trypticase Soy Broth (Pancreat Digest of Casein 17.0 g, Papaic Didest Soybean Meal 3.0 g, Sodium Chloride 5.0 g, Dipotassium Phosphate 2.5 g, Dextrose 2.5 g)를 정제수 1000 mL에 용해한 후 121℃에서 15분간 가압 멸균하여 사용하였으며 균수의 확인에 사용되는 배지는 Trypticase Soy Agar(TSB배지에 1.5% Agar 첨가)를 사용하였다.

시험기기

시험편 제작시 용융수지의 압출 조건에는 Melt Flow Index (MI tester, Model 993)을 사용하였고, 균주의 생육 상태는 현미경(ENAMED-2, Germany)를 사용하였다. 총 균수의 확인은 콜로니 카운터(American Optical Co. AO-3327)을 사용하였다. 사용 배지 및 기구의 멸균은 가압 멸균기(SANYO : MLS-3000)와 및 건열 멸균기(성창 산업사)를 사용하였고, 균 배양과 항균성능 시험으로 CO₂ 항온 배양기(Forma Science 3033)과 항온 진탕 배양기(Precision shaking incubator) 및 Bio hazard safety cabinet(Class II, VS-1400LSN)를 사용하였다.

공시균의 배양

미리 멸균한 300 mL의 플라스크에 TSB 배양액 100 mL를 준비하고 백금이를 사용하여 보존된 공시균을 무균적으로 이식하고 37±1℃ 항온 배양기에 24시간 배양하였다.

접종균용액 준비

시료의 접종원으로 사용할 균의 농도를 공시균을 사용하여 배양된 세균의 수가 4~6×10⁷CFU/mL 범위내로 되도록 멸균된 생리식염수(0.85% NaCl)를 이용하여 알맞게 희석한 후 1.0 mL씩을 균용액으로 사용하였다.

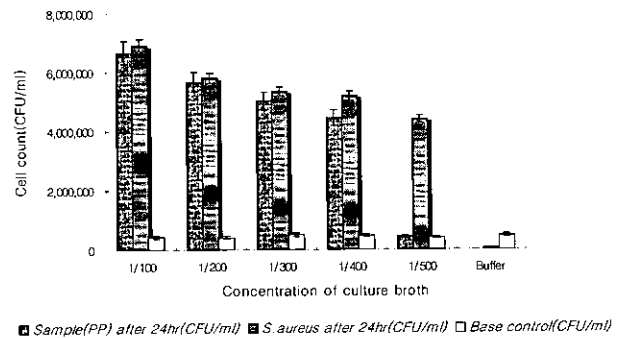


Figure 1. Effect of antibacterial colony(CFU/mL) on the individual concentration culture broth.

항균력 실험

TSB희석배지(1/500)를 100 mL씩 넣은 300 mL 삼각플라스크를 121℃에서 15분간 멸균하여 냉각하고 항균제 처리 시험편과 무처리 시험편을 대조군으로 하여 일정 수량씩(5~30편) 표시하여 넣는다. 각각의 플라스크에 미리 조정하여 둔 균 접종액 1.0 mL씩 분주한 후 즉시 1분 동안 심하게 흔들어 혼합하여 둔다. 먼저 1) 시험편과 대조군에서 초기 균수 확인을 위하여 각각 진탕 용액에서 1.0 mL씩 채취한다. 다음 2) 채취 후 남아있는 시험편과 대조군을 담고 있는 플라스크를 37℃에서 24시간 동안 120 rpm(왕복회전)에서 진탕 배양한다. 배양한 각각의 시험군 용액과 대조군 용액에서 균수 확인을 위하여 각각 1.0 mL씩 채취한다.

(1)과(2)에서 채취된 용액은 단계별 멸균 생리식염수로 희석시켜 0.1 mL씩 채취하여 TSA배지에 도말 하여 37℃에서 24~48시간 동안 배양하고 mL당 균의 집락수를 확인한다.

각각의 균주 별로 항균력을 비교하였고 항균 시험편 수량과 시험편 종류에 따른 항균력을 확인하여 항균효과는 대조 시험과 평가시험재료 간의 생균의 감소율로 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{감소율(\%)} = \frac{(\text{대조군의 24시간 후의 균수} - \text{시험군의 24후의 균수})}{\text{대조군의 24시간 후의 균수}} \times 100$$

결과 및 고찰

배지 및 균 용액의 농도 최적화

사용한 시험군 용액에 대한 항균효과와 최적배지농도를 결정하기 위해 첨가배지 용액의 농도별 배지첨가량에 따른 세균의 최소저해농도를 시험하였다. 진탕 배양에 의한 항균력을 실험 할 때 0.1 M 인산완충용액만으로 사용할 경우 첨가 배지내의 영양결핍으로 인해 균의 생육이 처리시간 동안 견딜 수 없어 항균력 시험용액으로는 적합하지 않았다. 따라서 미량의 영양성분만으로 균 증식을 도울 수 있는 배지의 적절한 농도의 선정이 중요하여 균 배양에 적합한 TSB배지를 첨가하여 최소배지로서 적합한 범위를 선정하였다. 100배에서 500배까지 단계별 희석한 배지를 첨가 실험한 결과 본 실험에서 사용된 접종 균 농도의 경우는 첨가 배지농도가 높을수록 균의 활성은 높아지지만 대수 성장기에서 균체 증가량이 너무 높으면 기준시험 편의 처리량에 따른 항균 활성이 상대적으로 미약하게 되어 성능평가 범위 결정이 어려웠다. 따라

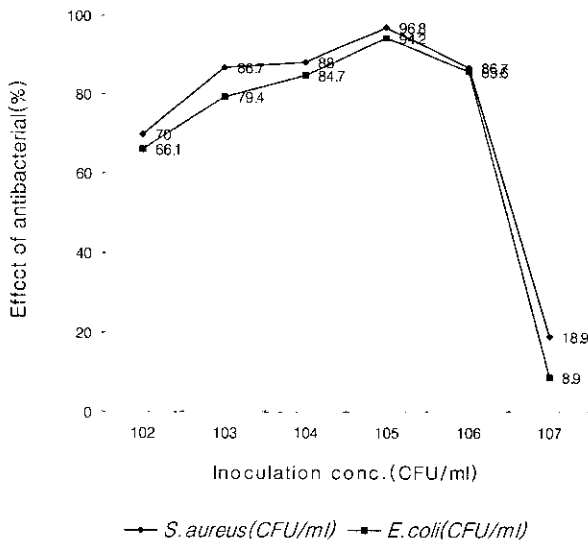


Figure 2. The correlation between the antibacterial (*S. aureus* and *E. coli*) efficiency curves obtained by several culture concentrations.

서 배지에 대한 균의 활성도와 항균 시험 편에 대한 영향을 비교해 본 결과 배지첨가량으로 500배로 희석한 TSB배지를 사용할 때가 최소배지로 가장 안정적인 항균효과를 얻을 수 있었다.

최소배지로 항균성능 시험에 앞서 공시 균에 대한 초기 접종용액의 최적농도 결정은 항균효과에 미치는 총 균수의 수치에 중요한 영향을 미치게 되므로 초기 농도의 결정이 매우 중요하게 된다. 균주별 초기 접종농도를 Figure 2.에서와 같이 10² ~ 10⁷ CFU/mL의 범위에서 농도별 진탕 방법으로 항균효과를 비교실험 한 결과 균 용액의 농도를 10² ~ 10⁴ CFU/mL의 초기 균수 범위로 집중하여 실험하였을 때 대조군에 대한 균 수의 증가량이 떨어지는 효과를 보였고, 10⁶ ~ 10⁷ CFU/mL의 범위에서는 대수가 상태에서 균수의 증가 속도가 너무 빨라져 생 균수의 증가량이 시험편에 적용된 항균의 작용이 상대적으로 급격히 감소되는 극소현상을 나타내었다. 따라서 항균효과는 접종 균의 초기 농도에 균 수에 따라 항균효과에 대한 영향이 큰 차이가 있음을 알 수 있었다. 비교 시험결과 접종 균의 초기접종 용액의 농도로서 4 ~ 6 × 10⁵ CFU/mL의 범위가 항균효과 유효시험에 가장 적절함을 알 수 있었다.

항균제 함량별 항균효과

항균제가 첨가된 농도별 각각의 기준 시험균에 대해서 공시균주 *E. coli* 및 *S. aureus*를 이용하여 항균제 함유량에 따른 항균력을 비교하기 위해 각각의 시험편과 대조편에 항균제 함량별(7종)로 첨가한 항균력을 실험을 하였다.

함량별 시료 0, 0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 0.9, 1.5%(w/w) 각 시험편을 동일 수량씩 적용하여 항균성능을 실험을 해 본 결과 Figure 3.에서와 같이 0.3%이하의 시험균에서는 균 감소 효과가 5.0% 미만으로 항균효과의 평가기준 설정에 미흡한 결과를 보였으며, 0.5% 이상의 시료균에 대해서는 항균효과가 점차적으로 높아지는 경향을 나타내어 항균효과 시험범위 선정이 가능하였다.

두 공시균주에 대한 항균제 함유량에 따른 항균력을 비교

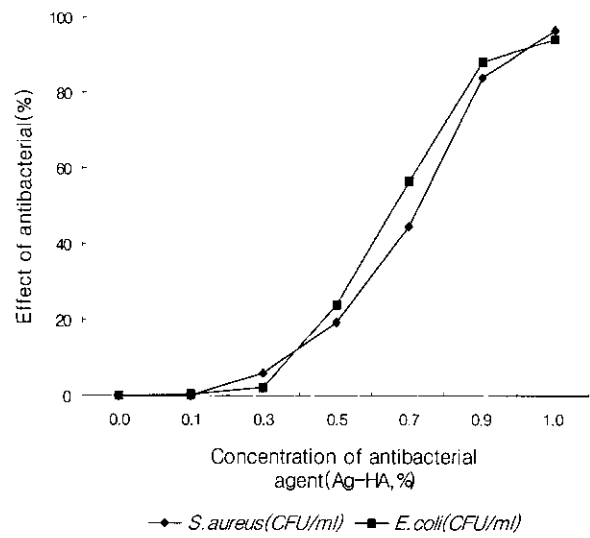


Figure 3. The relation between the concentration of antibacterial agent in the plastic samples and antibacterial efficiency of microbiology.

하여 본 결과 *E. coli*는 *S. aureus*에 비하여 항균제 함유량이 적을수록 낮은 민감도를 보이다가 항균제 함유량이 높은 시료에 대해서는 더욱 큰 민감도를 보였다. 한편 항균제 함량 0.5%(w/w) 이하를 함유한 시험편의 경우는 공시균에 대한 항균력이 낮아 항균효과가 불안정한 경향을 나타내었고 항균제 0.5% 이상을 함유한 시험편의 경우는 점차적으로 최소저해농도 범위 이상으로 항균력이 지속되는 효과를 나타내었다. 결과적으로 본 시험에서는 0.5% 이상의 항균제를 함유한 시험편을 사용하는 것이 시험 평가에 적절함을 알 수 있었다.

항균시험편 수량에 따른 효과

시험편의 종류 및 항균제 첨가량에 따른 항균효과를 적용 범위를 알아보기 위하여 항균제 1.0%(w/w)를 함유한 각각의 시험편을 시험균으로하여 대조군과 비교하며 시험편 수량에 따른 시간별 항균효과를 실험하였다.

공시균에 대한 각각의 시험균에 대하여 시험편의 수량을 5~30개를 단계별로 사용하여 진탕 배양으로 변화량을 비교한 결과 10개 이하의 시험편을 적용하였을 경우에는 균의 증식속도에 따른 두 구간간의 감소율이 너무 낮아 비교범위 대상으로 적절하지 않았으며 15개 이상의 경우는 두 구간간의 생균수의 감소량이 점차적으로 현저한 차이를 보여 공시균의 감소율에 의한 항균성능을 Figure 4. 및 5에서 비교할 수 있다. *E. coli* 및 *S. aureus*간의 시간에 따른 균 감소율은 시간의 경과에 따른 비교결과 6시간 이후부터 점차적으로 대조군과 시험균에 균수의 증감 현상이 나타나기 시작하였으며 12시간 이후부터 대조군에서 두개의 공시 균간의 뚜렷한 속도에 차이를 나타내기 시작하였다. 이는 *E. coli*가 *S. aureus*에 비하여 빠른 약 7배 이상의 generation time이 빠른 현상을 보였으며, 결과적으로 24시간이 이후에는 *E. coli*를 사용한 시험균의 항균효과는 *S. aureus*보다 낮아짐을 알 수 있었다.

공시균주별 균감소효과

공시균주인 *E. coli*와 *S. aureus*간의 항균효과를 Figure, 6,과

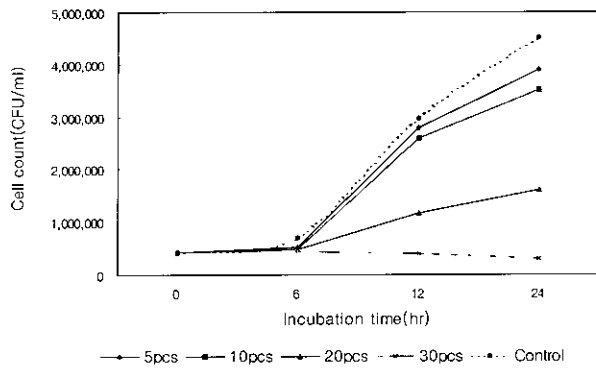


Figure 4. The efficiency of antibacterial(*S. aureus*) between the unfinished samples and the finished plastic samples.

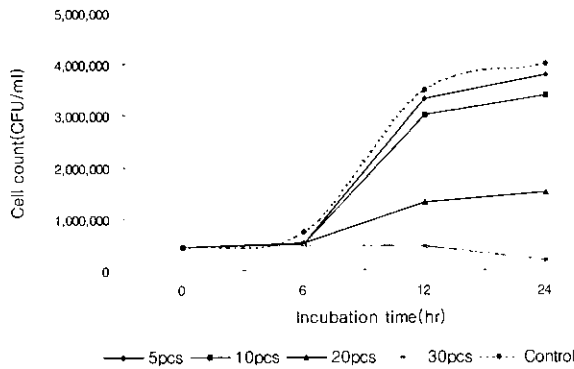


Figure 5. The efficiency of antibacterial(*E. coli*) between the unfinished samples and the finished plastic samples.

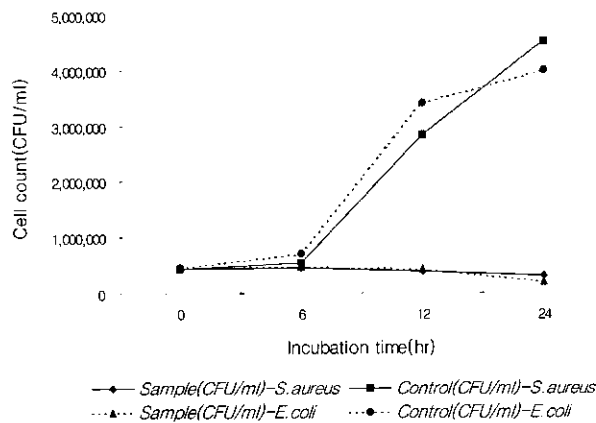


Figure 6. Effect of cell growth with anti bacterial agent in plastics by microbial(*E. coli* and *S. aureus*)

같이 비교해 보았다. 시험군으로는 항균제 함유량이 1.0%(w/w)인 시험편(PP)을 각각 30개 사용하여 24시간 진탕배양 하였다. 배양처리 6시간 이후에 점차적으로 균주의 증식이 이루어짐에 따라 항균효과를 나타내기 시작했으며 12시간을 기점으로 두 균주간의 세대시간에 따른 차로 인해 *E. coli*의 경우는 *S. aureus*에 비하여 빠른 세대시간으로 인해 24시간에서는 무첨가군의 균수증식 속도에 따른 영향으로 항균효과가 오히려 낮아짐을 알 수 있었다.

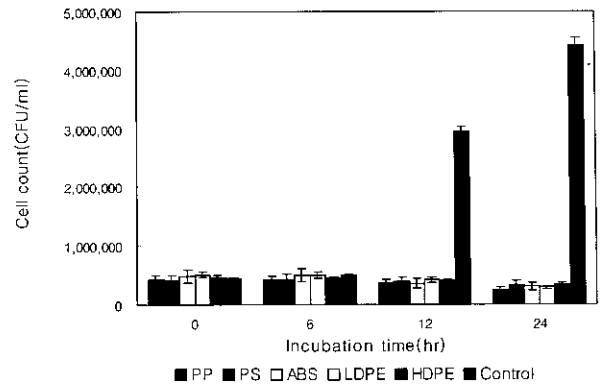


Figure 7. Effect of antimicrobiology with the incubation times on plastic samples.

수지의 종류별 항균효과

기준 시험편의 종류별에 따른 PP, PS, ABS, LDPE, HDPE에 대하여 항균효과의 차이점을 비교시험을 통해 알아보았다. 기준시료는 1,0(w/w,%) 항균제 함유 플라스틱 시험재료 30개를 사용하여 *S. aureus* 균주의 초기접종농도는 $4\sim6\times 10^5$ CFU/mL의 범위에서 실험하였을 때 시험편의 종류별 항균효과는 Figure 7.에서 보는 바와 같이 공시험 균용액의 생균수에 비하여 균의 감소량이 비슷한 변화율을 나타내어 항균효과에는 차이점을 발견할 수 없었다.

요약

항균 기능성 플라스틱에 대한 항균력 시험방법 기준을 설정하기 위하여 *E. coli* 및 *S. aureus*를 공시험균으로 하여 균주별 항균제 Ag-hydroxyl apatite의 첨가량에 따른 플라스틱의 항균력을 비교실험 하였다. 첫번째 평가방법 기준을 설정하기 위해 공시험의 최적 활성농도 범위를 설정하였고, 두 번째 이를 기준으로 한 시험용 플라스틱의 기준 시험편을 제작하여 항균성능 비교를 통한 시험방법을 검토하였다. 실험결과 균 접종용액으로 사용한 균 용액의 농도범위는 Trypticase Soy Broth를 0.1 M 멸균 인산완충용액으로 500배 희석한 첨가배지가 적합하였고, 처리조건으로 $37\pm 1^\circ\text{C}$, 120 rpm, 24시간동안 항온 진탕 시험하여 균 용액의 사용범위를 $4\sim6\times 10^5$ CFU/mL이었을 때가 항균 활성효과 시험에 가장 적합하였다. 그리고 항균제의 첨가량에 따른 플라스틱 종류별 항균성능은 동일한 첨가함량의 경우 비슷한 항균효과를 보였으며 기준시료의 항균제 첨가효과 적용범위는 0.5%(w/w) 이상의 시험편을 적용하는 것이 항균력 평가 결과 균 감소량에 재현성 있는 적용범위 선정이 가능함을 알 수 있었다.

REFERENCES

1. KS K 0693-1990 : Evaluation of antibacterial finishes on fabrics.
2. JIS L 1902-1990 : Testing method for antibacterial of textiles.
3. ASTM D-5590-1994 : Standard test method for determining the resistance of paint film and related coatings to fungi

- defacement by accelerated four-week agar plate assay.
4. Keiichiro Hiyama, A convenient testing method of the efficiency of antibacterial finish plastics, J. antibact. antifung. agents Vol. 22, No. 3, pp.127~131, 1994.
 5. KS K 0890-1995 : Testing method for antibacterial activity assessment of textile materials:Parallel streak method.
 6. FC-TM-19 : Shake flask method.
 7. KICM-FIR-1002 : Shake flask method.
 8. ISO 846-1997 : Plastics-determination of behaviour under the action of fungi and bacteria-evaluation by visual examination or measurement of change in mass or physical properties.
 9. ASTM G-21-1985 : Standard practice for determining of synthetic polymeric materials to fungi.
 10. ASTM G-29-1985 : Standard practice for determining algal resistance of plastic films.