

Shake Flask Method와 개량 Shake Flask Method에 의한 키토산의 MRSA 항균성 평가

최정임 · 전동원

이화여자대학교 의류직물학과

A Study on the Antibacterial Activity of Chitosan on the MRSA by the Shake Flask Method and Modified Shake Flask Method

Jeong Im Choi and Dong Won Jeon

Dept. of Clothing and Textile, Ewha Womans University, Seoul, Korea

Abstract : Water-insoluble chitosan with molecular weight of 2,000,000, 500,000, 80,000, and 40,000 and more than 90% of degree of deacetylation were prepared to test antibacterial activity of chitosan against a pathogenic bacteria, methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). As experimental method, the Shake Flask Method (SFM) and Modified Shake Flask Method (MSFM) were applied. The anti-microbial activity of chitosan/acetic acid aqueous solution is consistent irrespective of Mw of chitosan. MIC value of SFM measurement was 0.2 ppm, and MIC value of modified SFM measurement was 25 ppm. But MIC value of chitosan/acetic acid solution and chitosan treated cotton filter paper was equally 5 ppm. The antibacterial activities of chitosan were different in different test measurements employed. The antibacterial activities of chitosan/acetic acid solution and chitosan treated cotton filter paper were also different. Therefore, it needs to be pointed out that the test measurements of anti-microbial activity have some problems.

Key words : MRSA, shake flask method, modified shake flask method, antibacterial activity, bacteriocidal activity, anti-bacterial agent.

1. 서 론

1990년대 초 일본에서 *Staphylococcus aureus*와 Methicillin Resistant *Staphylococcus Aureus*(MRSA)에 의한 원내감염이 보고되면서부터 'MRSA에 의한 원내감염'은 의료업계의 중대한 문제로 떠오르고 있다.

MRSA는 *Staphylococcus aureus*의 변종균으로서 1961년 영국에서 최초로 보고된 이후 전 세계에 만연되어 있으며 항생물질 Methicillin의 β -락탐(β -lactam)구조를 파괴하는 β -ラタマ제 효소를 생산할 수 있도록 변이한 황색포도상구균이다. 뿐만 아니라 대부분의 항생물질에 대해서 내성을 보이고 있기 때문에 현재 전 세계적으로 대책이 요구되는 병원성 감염균이다(吉川, 1997; 青山, 1994).

병원성 미생물 자체를 쉽게 살상할 수 있는 살균제의 종류는 무수히 많다. 그러나 섬유제품의 경우 인체와 24시간 접촉하는 제2의 피부라는 점을 감안할 때 항균가공에 사용되는 항균제의 특성이 고려되지 않을 수 없다. 살균력이 우수한 유기계 항균제들 보다 살균력이 다소 낮을지라도 인체에 유해성이 낮은 항

균제를 사용하는 것이 바람직하다.

안전성이 우수한 항균제들을 사용하게 됨에 따라서 가식성 천연고분자화합물의 사용이 촉진되고 있는 실정이다. 이들의 사용은 항균력뿐만 아니라 섬유자체에 제 3의 기능성을 부여한다는 장점도 지적되고 있다.

키토산은 대표적인 천연고분자 화합물로서 이에 대한 항균력이 오래 전부터 연구되어 왔다. 뿐만 아니라 키토산은 셀룰로오스와 거의 유사한 화학구조를 지니면서 반응성이 높은 -NH₂기를 분자구조 내에 함유하고 있기 때문에 면 섬유를 비롯한 다수의 섬유재료에 대하여 항균가공이 용이하게 이루어질 수 있다.

본 연구는 병원성 균인 MRSA에 대한 키토산의 분자량 변화에 따른 키토산/초산 산수용액의 항균력 변화와 키토산/초산 산수용액으로 처리된 면 필터의 항균성을 평가하기 위하여 Shake Flask Method(SFM)와 개량 Shake Flask Method를 적용하여 실험하였다.

더불어 두 실험방법간에 발생하고 있는 상이한 결과들을 체계적으로 분석하여 세계적으로 통용되고 있는 항균성 시험방법들의 문제점을 실증하였다.

2. 실험방법

2.1. 카토산의 제조

MRSA의 항균성 측정에 사용한 카토산은 흥제(*Chionoecetes opilio*) 건조 갑각에서 추출되었다. 갑각을 HCl 용액으로 처리하여 석회질 성분을 제거한 다음 다시 NaOH 수용액으로 가열하여 단백질 성분을 제거하고 키틴을 얻었다. 키틴을 다시 고농도의 NaOH 수용액으로 가열하여 탈아세틸화시켜 카토산을 얻었다(전동원, 1997, 2001).

키틴의 제조과정에서 제반 반응조건(HCl의 농도, 처리시간, 처리온도)을 변화시킴으로서 분자량 200만에 달하는 초거대 분자량의 카토산과 분자량 50만에 달하는 2종류의 카토산을 얻었다.

상기 분자량 50만인 카토산을 NaBO₃로 분자쇄를 절단하여 분자량이 15만, 8만, 4만으로 조절된 저분자화 카토산을 얻었다(전동원, 1998a, 1998b).

저분자화 카토산의 제조조건을 Table 1에 제시하였고, Table 2에는 5종류의 수불용성 카토산의 제반특성을 제시하였다.

카토산/초산 수용액의 제조 : 용매로 초산을 사용하고, 초산의 농도는 카토산 농도와 동일하게 적용하되 0.1%~0.05%범위로 조절하여 상온에서 24시간 동안 교반시켜 불용분이 없는 카토산/초산 수용액을 얻었다. 제조된 카토산/초산 수용액은 초산의 작용으로 카토산 분자쇄가 절단되어 분자량 저하가 일어날 가능성을 최소화하기 위하여 용해가 완결된 후 24시간 이내에 사용하였다.

카토산/초산 수용액의 농도는 MRSA에 대한 Tube Dilution Technique(TDT: 시험관 회석법)에 의한 예비실험으로부터 최소 저지농도(MIC)가 0.05%임을 확인하였기 때문에 0.025%, 0.05%, 0.075%, 0.1%로 조절하였다.

Cotton filter paper의 카토산/초산 수용액처리 : Cotton filter paper(지름 110 mm)는 마이크로 피펫을 이용하여 0.05~0.5%

Table 1. Preparation condition of low molecular weight chitosan by NaBO₃.

Molecular weight of used chitosan	Amount of used chitosan (g)	Concentration of NaBO ₃ · 4H ₂ O (g/l)	Reaction time (hr)	Reaction temperature (°C)
150,000	20	9.4	2	35
80,000	20	9.4	3	50
40,000	20	32	6	50

Table 2. Characteristics of water insoluble chitosan with controlled molecular weight.

Chitosan type	Solubility	Molecular weight	Degree of deacetylation (%)
A		2,000,000	98.9
B		500,000	97.1
C	water	150,000	90.4
D	insoluble	80,000	89.2
E		40,000	87.3

농도의 카토산/초산 수용액을 wet pick-up율이 100%가 되도록 처리하였으며, 처리 완료 후 3일간 상온에서 자연 건조시켰다.

2.2. 균주 및 배지

균주로 MRSA ATCC 33592를 사용하였고 세균의 배양 배지로 Difco 제품인 Bacto Nutrient Broth(NB), Nutrient Agar (NA)를 사용하였다. 균의 계대 배양용 사면배지와 생균 측정을 위한 평판배지는 NA배지를, 10배 계열 회석용과 Tube Dilution Technique를 이용한 최소발육저지농도시험배지와 최소 살균시험배지는 NB배지를 사용하였다.

2.3. 배양방법

MRSA는 통성호기성균이기 때문에(E. Dengrmont and M. Membre, 1995) 단기보관은 NA사면배지에 이식하여 37°C, 24시간 배양한 후 5°C 이하에서 냉장보관 하면서 사용하였고, 6개월 주기의 장기보존은 액체육즙배지에서 배양한 균액을 30% 글리세롤에 넣어 -20°C 이하에서 보관하였다.

박테리아의 pure culture를 위해 보존 균주 1 loop를 취하여 NB 육즙배지에 이식하여 37°C shaking incubator에서 20 hr 동안 배양하고, 다시 이 배양액 1 loop를 새로운 NB 배지 10 ml에 이식하여 18시간 동안 배양하였다.

Cell counting은 시간이 많이 걸리지만 대단히 예민한 방법인 생균 측정용 plate count(colony count)를 이용했으며, 이때 접착이 형성된 평판배양은 통계학적으로 가장 믿을 수 있는 30~300 colony가 되도록 10배 계열로 회석하여 사용하였다.

2.4. MRSA균에 대한 항균성 측정

지금까지 알려진 항균성 시험방법에는 정성적 시험법인 Halo Test Method(AATCC Test Method 90, KS K 0693), Parallel Streak Test Method(AATCC Test Method 147, KS K 0890)와 정량적 시험법인 Bioassay Test(AATCC Test Method 100, KS K 0693), 개량 AATCC Test Method 100, Shake Flask Method, 개량 Shake Flask Method, 균수 측정법(JIS L 1902) 등이 있다.

이중 SFM은 카토산 물질과 같은 비 용출형에 적합한 방법으로 고안되었고, 또 타 연구자들에 의해 많이 이용되고 있으며, 개량 SFM은 용출형과 비 용출형 모두 적용할 수 있도록 고안한 시험방법이어서 이를 두 방법을 이용하여 카토산/초산 용액과 카토산으로 처리한 cotton filter paper시험 모두에 적용하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 카토산/초산 수용액의 항균력 측정

SFM에 의한 카토산/초산 수용액의 항균성 : 상기 Table 3에서 SFM로 실험하는 경우 MRSA의 성장이 90% 이상 저지되는 경우를 MIC로 설정하였다. 카토산 분자량의 크기에 관계없

이 MRSA에 대한 MIC가 0.2 ppm(초산수용액의 농도는 0.002%, 즉 20 ppm에 해당되나 SFM에서 회석율을 감안하면 MIC는 0.2 ppm이 된다) 정도로서 아주 낮은 농도에서도 항균력이 발현되고 있음을 볼 수 있다.

이는 키토산의 극히 우수한 MRSA에 대한 항균력을 보여주는 실례로서 해석될 수도 있겠으나 분명 실험방법상의 문제점이 내재되어 있는 것으로 예상될 수 있다. 합성항균제들의 MIC가 대략 20 ppm 정도인 점을 감안할 때 0.2 ppm에 해당하는 MIC 값은 상식적으로 너무 낮은 농도로 평가된다.

SFM에서는 배양액과 접종균액 내에 영양원이 전혀 존재치 않는다는 점과 배양온도가 실제 MRSA의 배양온도 37°C보다 훨씬 낮은 25±5°C로 유지시키고 있다는 점이 MIC의 측정에서 신뢰성이 결여되는 근본적인 원인인 듯 하다.

개량 SFM에 의한 키토산/초산 수용액의 항균성: Table 4에는 개량 SFM에 의한 키토산/초산 수용액의 항균력을 제시하였다. 앞의 SFM에 의거한 실험결과와 서로 비교해 볼 때 개량 SFM에서는 항균력이 발현되기 위해서 키토산/초산 수용액의 농도가 0.002%에서 0.25%까지 상승되고 있음을 볼 수 있다.

SFM과 개량 SFM간에 키토산의 MRSA에 대한 MIC가 0.2 ppm과 25 ppm이라는 현저한 차이를 보여주고 있는 것으로 해석된다.

개량 SFM가 SFM가 내재하고 있는 제반 문제점을 보완한 방법(접종균액을 인산완충용액에서 생리식염수와 육즙배지로 조정했고, 배양시간을 1시간에서 12시간으로 연장하였고, 접종 균수의 조정)이라는 측면을 감안할 때 상기의 2가지 방법 전부, 또는 개개의 테스트 방법 자체에 신뢰도가 부여될 수 없다는 단면을 보여주고 있는 것으로 평가될 수 있다.

키토산/초산 수용액의 MIC: Table 5에 MRSA의 종식을 저지시키는 키토산/초산 수용액 자체의 최소농도를 제시하였고 이로부터 키토산의 MRSA에 대한 MIC가 도출되었다. SFM과 개량 SFM에서 키토산의 MIC가 각각 0.2 ppm, 25 ppm으로 나타나고 있다.

SFM에서는 키토산과 접촉되는 MRSA의 접종배양액 내에 영양원이 전혀 존재하고 있지 않을 뿐만 아니라 접종배양액의 온도가 너무 낮다는 사실에 기인하여 MRSA의 자동사멸이 촉진되고 있는 것으로 가정할 수 있다. 이로부터 SFM에 의한 키토산 자체의 항균력 측정에서는 신뢰감이 부여될 수 없다는 사실이 증명되고 있다.

Table 5로부터 밝혀지고 있는 또 하나의 사실은 키토산 분자량 크기가 MRSA의 종식저지에 절대적인 영향을 미치지 않는다는 사실이다.

키토산과 MRSA의 접종배양에서 키토산이 산수용액에 완전히 용해되어 첨가되었기 때문에 접종배양액 속에서 역시 키토산이 완전히 용해된 상태로서 MRSA와 접촉된다고 가정할 때

Table 5. MIC Value of chitosan/acetic acid solution by antimicrobial activity test method of two types.

Molecular weight of chitosan	Shake Flask Method	Modified Shake Flask Method
2,000,000		
500,000	0.002%*	0.25%
150,000	(0.2ppm)**	(25ppm)
80,000		
40,000		

* % represent concentration of chitosan/acetic acid solution for MRSA

** () represent MIC of chitosan/acetic acid solution

Table 3. Antibacterial activity of chitosan/acetic acid solution by SFM.

Test condition	Test solution	Mean colony number (CFU/ml)	Decrease number of bacteria colony (%)	Remarks
chitosan solution	0.002%	inoculum size	1~2×10 ⁵	
		2,000,000	0.5×10 ⁴	95
		500,000	0.17×10 ⁴	98
		150,000	0.03×10 ⁴	99
		80,000	0.09×10 ⁴	99
		40,000	0.26×10 ⁴	99

Table 4. Antibacterial activity of chitosan/acetic acid solution by modified SFM.

Test condition	Test Solution	Mean colony number (CFU/ml)	Decrease number of bacteria colony (%)	Remarks
chitosan solution	0.25%	inoculum size	3~4×10 ⁴	
		2,000,000	0	0.5% concentration of chitosan solution : 99% decrease number of bacteria colony
		500,000	0	
		150,000	0	
		80,000	0	
		40,000	0	

키토산 분자량의 크기가 MRSA의 증식저지에 큰 영향을 미치지 않고 있음을 증명되고 있다.

키토산이 도포된 항균섬유에 대한 항균력이 조사된 여러 실험결과(성하수 등, 1998. 성하수 등, 1997. 이재원 등, 1999. 이재원 등, 1998)에서는 키토산 분자량의 크기가 MRSA에 대한 항균력에 영향을 미치는 것으로 예측되어 왔는데 이는 가공포의 표면에 고화, 부착된 키토산의 상태와 키토산 자체의 항균력이 서로 달라질 수 있음을 보여주고 있는 것으로 해석될 수 있다.

섬유표면에 도포된 키토산들은 가공조건의 변화에 따라서 키토산 자체의 변성, 섬유표면에 부착된 키토산과 MRSA와의 접촉용이성 등이 변화될 수 있기 때문에 실험자마다 항균결과가 달라질 수 있는데 이로 인하여 키토산 분자량의 크기가 다소나마 MRSA에 대한 항균력에 영향을 미치게 되는 것으로 인식되고 있는 듯하다.

3.2. 키토산 처리 포의 항균성 측정

SFM과 개량 SFM에 의한 키토산 처리 cotton filter paper의 항균성 : 개량 SFM를 적용한 반복된 시험결과로부터 미루어 볼 때 항균력에서 일관성이 결여되고 있음을 발견하였다. 예를 들면 Table 7에서 보듯이 키토산/초산 수용액 농도 0.05%에서 항균성이 발현되는 반면 오히려 0.075% 농도에서는 항균성이 발현되지 않는 경우도 다수 발견되고 있다. 또한 동일한 키토산/초산 수용액의 농도에서도 항균력의 차이가 심하게 나타나고 있음을 발견되었는데 개량 SFM에서 이러한 실험오차의 발현은 반복된 실험으로부터 이끌어낸 결과이다.

개량 SFM는 수용액 속에서 항균실험이 행해지고 있지만 비

용출형의 항균제인 경우 수용액 속으로 항균제의 고른 확산이 이루어지지 않은 결과로 유추된다. 개량 SFM에서 키토산 자체의 MRSA에 대한 MIC가 0.25%(25 ppm)이었으나 Table 7에서 보듯이 키토산으로 처리한 cotton filter paper의 MIC가 0.05%(5 ppm)으로 나타나고 있어 키토산 자체보다도 키토산 처리필터의 항균력이 더욱 크게 나타나고 있음을 볼 수 있다.

키토산 자체의 항균성 실험에서 접종균액에 첨가된 키토산 자체의 첨가량보다는 필터표면에 도포되어 있는 키토산의 양이 극히 적음에도 불구하고 키토산 자체의 MIC 보다 키토산으로 가공된 cotton filter paper의 MIC가 더욱 낮아지고 있다는 사실은 키토산으로 가공된 필터의 항균력측정에서 개량 SFM가 적용되는 경우 상당한 문제가 발생하고 있음을 단적으로 증빙하고 있는 것으로 사료된다.

또 한가지 모순되는 사실로서 키토산 자체의 MIC는 SFM과 개량 SFM에서 각각 0.2 ppm과 25 ppm으로서 상기 2종류의 실험방법 간에 키토산 자체의 MIC에서 100배 정도의 차이를 보여준 바 있으며 SFM보다는 개량 SFM에서 MIC가 높아져야만 한다는 조건도 충족시키고 있다. 그러나 Table 6과 Table 7에서 보듯이 키토산이 섬유에 도포된 경우는 2가지 실험방법에서 MIC가 동일하게 나타나고 있어 논리적으로 이해되기 어렵다.

키토산으로 가공된 cotton filter paper의 항균실험에서 SFM 가 적용되는 경우 접종배양액 내에 영양원이 전혀 공급되지 않기 때문에 MIC가 현저히 낮아질 것이 당연하며 개량 SFM에서는 영양원이 충분히 공급되고 있기 때문에 MIC가 훨씬 상승되어야 마땅하다.

그러나 키토산으로 가공된 cotton filter paper의 항균력 측정 실험에서 SFM과 개량 SFM 간에 MIC가 키토산 산수용액 농

Table 6. Antibacterial activity of the cotton filter treated with chitosan/acetic acid solution by SFM.

Test Method	Test condition	Test solution	Mean colony number (CFU/ml)	Decrease number of bacteria colony (%)	Remarks
Shake Flask Method	coating on the cotton filter paper	inoculum size	2~3×10 ⁴		
		2,000,000	330	98	0.05~0.1% concentration of chitosan/acetic acid solution : 99% Decrease number of bacteria colony
		500,000	180		
		150,000	120		
		80,000	103	99	
		40,000	70		

Table 7. Antibacterial activity of the cotton filter treated with chitosan/acetic acid solution by modified SFM.

Test Method	Test condition	Test solution	Mean colony number (CFU/ml)	Decrease number of bacteria colony (%)	Remarks
Modified Shake Flask Method	coating on the filter paper	inoculum size	0.5~1×10 ⁴		
		2,000,000	0		0.1~0.25% concentration of chitosan/acetic acid solution : 99% Decrease number of bacteria colony
		500,000	1		
		150,000	3		
		80,000	0		
		40,000	14		

도 0.05%로서 서로 동일하게 나타나고 있는 것으로 보아 2가지 실험방법에 의한 항균성 측정결과에 대하여 신뢰도가 의심될 수밖에 없다.

키토산/초산 수용액으로 필터를 가공할 때 MRSA 군에 대한 MIC(부착량 MIC): Table 8에는 wet pick up을 100%로 고정하고 키토산/초산 수용액으로 cotton filter paper를 처리하였을 때 MRSA의 증식을 저지시키는 키토산/초산 수용액의 최소처리농도를 제시하였다.

Table 8로부터 MRSA의 증식을 저지시킬 수 있는 필터가공에 사용되는 키토산/초산 수용액의 최소농도를 근거로 하여 MRSA의 증식을 저지 가능케 하는 필터표면에 고화, 부착되어 있는 키토산 자체의 최소농도도 계산 가능하다.

Table 8에서 항균실험방법에 따라서 MRSA 생육저지가 발현되는 키토산/초산 수용액의 최소농도가 변화되고 있음을 볼 수 있다.

우선 SFM에서는 키토산 자체의 MRSA에 대한 MIC가 0.2

Table 8. MIC of MRSA on the chitosan/acetic acid solution and the filters treated with chitosan/acetic acid solution.

Chitosan type (molecular weight)	Shake Flask Method	Modified Shake Flask Method
2,000,000		
500,000	0.05% (5 ppm)*	0.05% (5 ppm)
150,000	(cotton filter)	(cotton filter)
80,000		
40,000		

* () value is MIC of chitosan/acetic acid solution

ppm이었던 반면 cotton filter paper를 키토산/초산 수용액으로 가공하는 경우는 키토산/초산 수용액의 농도가 0.05% 이상으로 유지되어야만 항균력이 발현되고 있다. 키토산으로 가공된 필터표면에 부착되어 있는 키토산 양의 계산으로부터 부착되어 있는 키토산이 MRSA에 대하여 항균력을 발휘할 수 있는 MIC의 도출이 다음의 계산으로부터 가능해진다.

SFM의 경우 wet pick up이 100%이므로 0.75g의 가공필터에 흡착되는 키토산/초산 수용액의 양은 0.75ml이고 0.05% 농도의 키토산/초산 수용액 0.75 ml 내에 함유되어 있는 키토산의 양(결국 0.75 g의 직물에 고화되어 부착되는 키토산의 양과 일치한다)은 $0.75 \times (0.05/100) = 7.5 \times 5 \times 10^{-5}$ g으로 계산된다.

결국 SFM에 의한 키토산 가공필터의 항균실험에서는 가공필터에 부착된 $7.5 \times 5 \times 10^{-5}$ g의 키토산이 접종균액 75 ml 속에 침지되므로 키토산 자체의 농도는 $7.5 \times 5 \times 10^{-5} \text{ g}/75 \text{ ml} = 5 \times 10^{-6} \text{ g/ml} = 5 \text{ ppm}$ 으로 계산된다.

SFM가 적용될 때 키토산 자체의 MIC가 0.2 ppm이었던 반면 키토산이 가공필터에 고착되는 경우는 항균력이 저하되어 MRSA에 대한 MIC가 25배 상승하여 5 ppm으로 나타나고 있다.

키토산 자체의 항균력 측정에서는 75 ml의 접종균액 내에 0.75 ml에 해당하는 키토산/초산 수용액이 침가되어 완전히 용해되므로 항균력이 클 수밖에 없으나 키토산이 고화, 부착된 가공필터에서는 필터표면에 키토산이 고체상태로 고착되어 존재하므로 용해상태가 유지되고 있는 키토산 자체에 비해서 항균력이 저하되리라는 추측은 매우 당연한 것으로 받아들여진다.

더구나 SFM가 비용출형 가공제에 대하여 적용되는 항균성

Table 9. Strength and weakness of the SFM.

Strength	<ul style="list-style-type: none"> ① As antibacterial effects testing time of fiber(shaking time of inoculated bacterial solution and test fabrics is an hour, test can be performed within short time). ② As it is not required of dilution after testing due to no multiplication of bacteria after shaking incubation, testing method is very simple.
Weakness	<ul style="list-style-type: none"> ① It cannot be clearly confident if bacteria included in the inoculated bacterial solution are those that correspond to the logarithmic growth phase in life cycle. ② Number of bacteria included in the inoculated bacterial solution is defined as $1.5 \sim 3 \times 10^8$ unit/ml. But, it cannot be correctly measured and number of early bacteria can be different by inspectors, so possibility that difference in antibacterial performance may occur is high. ③ Under the shaking testing condition that fiber and inoculated bacterial solution are contacted, the inoculated bacterial solution has no nutrition. Therefore, this condition is too different from wearing conditions and bacteria cannot grow due to extreme lack of nutrition. ④ Inoculation and culture time of fiber and inoculated bacterial solution is an hour. It is unsuitable. An hour of contact and culture time never considers induction phase that bacteria can adapt to new environment and is significantly different from the wearing time. ⑤ $25 \pm 5^\circ\text{C}$ is unsuitable for inoculation and culture temperature of test fabrics and inoculated bacterial solution. Considering body temperature is 37°C, $25 \pm 5^\circ\text{C}$ is not suitable for the actual wearing environment and low temperature of $25 \pm 5^\circ\text{C}$ is not recognized to be suitable temperature for multiplication of skin flora. ⑥ Inoculation and culture are performed under completely soaked condition of test fabrics within the inoculated bacterial solution. Antibacterial test of antibacterial processing textile in water is significantly different from the actual wearing condition. ⑦ Antibacterial effect is recognized when reduction of bacteria is over 26%. But, it is recognized that reduction of bacteria should be greatly higher than 26% for validity of antibacterial effects.

Table 10. Strength and weakness of modified SFM.

Strength	① It is suitable for growth conditions of bacteria as nutritious sources are sufficient in the inoculated bacterial solution compared to shake flask method. ② The problem, which the inoculated bacterial solution and test fabrics cannot be contacted evenly, resulted from AATCC Test Method 100, is settled because it is tested in water.
Weakness	Except that some of item ③ and ④ among weaknesses proposed in the shake flask method, most weaknesses proposed in the shake flask method remain as it is.

측정방법이라는 점을 감안할 때 가공필터에 고화, 부착되어 있는 키토산 자체가 5 ppm의 낮은 MIC를 보여준다는 사실은 예상 밖의 결과로 해석될 수 있다.

엄격히 해석한다면 키토산 가공필터 표면에 고착되어 있는 키토산 자체의 MIC가 5 ppm이라는 것은 이론적 수치일 뿐 의미가 없을 수도 있다. 그 이유는 75 ml의 접종균액 내에 0.75 g의 키토산 가공필터가 가해질 때 필터표면에 고착되어 있는 키토산 성분이 접종균액 내부로 골고루 분산되지 않기 때문이다.

키토산 가공필터에 고화, 부착되어 있는 키토산이 보여줄 수 있는 항균능력이 매우 낮다는 점을 고려할 때 SFM에 의거하여 측정되는 항균가공필터에 부여된 MRSA의 종식저지능은 항균제인 키토산의 작용이라기보다는 열악한 환경 하에서 MRSA의 자동사멸로 보는 것이 타당하다. 뿐만 아니라 SFM에서의 최대 문제점은 개량 SFM에서 나타나고 있다. 개량 SFM에서도 MRSA의 생육저지 키토산/초산 수용액의 최소농도가 SFM에서와 같이 0.05%로 나타나고 있음을 볼 수 있다.

SFM에 비해서 접종균액 내에 영양원이 지극히 풍부할 뿐만 아니라 균의 성장온도 측면에서도 절대적으로 유리한 개량 SFM에서 필터가공에 적용되는 키토산/초산 수용액의 MRSA 최소저지농도가 SFM과 동일하다는 사실은 납득되기 어렵다. 이는 SFM과 개량 SFM에 내재되어 있는 근본적인 문제점을 단적으로 보여주고 있는 것으로 해석된다.

앞서 개량 SFM에서 키토산 자체의 MRSA에 대한 MIC가 25 ppm이었다는 점을 감안할 때 필터에 고화, 부착된 키토산 자체의 MIC가 오히려 5 ppm으로 저하되고 있다는 사실은 상식적으로 납득되기 어려운 것으로서 이는 개량 SFM에 내재된 문제점을 객관적으로 노출시키고 있는 것으로 볼 수 있다.

결론적으로 SFM과 개량 SFM의 시험방법에서 발현되는 항균성은 항균가공필터가 MRSA의 생육저지를 유도하는 것이 아니고 균의 생육이 거의 불가능한 접종균액의 열악한 환경특성에 기인하여 MRSA의 자동사멸에 의거한 가시적인 항균력이 발현되는 것으로 사료된다.

3.3. 항균가공설유에 대한 항균력 측정방법의 장단점

앞서 언급한 바와 같이 항균가공필터의 항균력을 측정했을 때 많은 문제점이 도출되었다. 다음 Table 9과 Table 10에 각 시험법의 장점과 단점을 비교했다.

4. 결 롬

병원성균 MRSA에 대한 키토산의 항균성을 조사하기 위해 홍계의 갑각으로부터 탈아세틸화도가 90% 이상 유지되면서 분자량이 200만, 50만, 15만, 8만, 4만에 해당하는 5종류의 수불용성 키토산을 각각 제조하였다.

Shake Flask Method와 개량 Shake Flask Method를 적용하여 상기의 5종류 키토산으로 제조된 키토산/초산 수용액 자체와 키토산/초산 수용액으로 후가공 처리된 cotton filter paper의 항균력을 측정하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 키토산/초산 수용액의 항균력은 분자량의 크기에 관계 없이 동일하였다. SFM에서는 MIC가 0.2 ppm이었으며 개량 SFM에서는 MIC가 25 ppm으로 측정되었다.

2. 키토산/초산 수용액으로 후가공 처리된 cotton filter paper의 MIC는 SFM과 개량 SFM에서 동일하게 0.05%(5 ppm)으로 측정되었다. 접종균액 내에 충분한 영양원이 공급되고 있는 개량 SFM의 MIC가 SFM의 MIC와 동일하다는 사실은 2가지 실험방법 전부 신뢰성의 의문을 제기한다.

3. SFM은 배양에 필요한 온도와 영양이 갖추어지지 않았고 착의조건과도 거리가 먼 큰 결점이 지적되어 왔다. 개량 SFM 또한 SFM에 비해서 단순히 영양분만 주어지고 배양시간이 1시간에서 12시간으로 연장된 것 외에는 큰 차이점이 없다. 키토산 항균제 자체와 키토산 처리 cotton filter paper와의 항균력간에 큰 차이가 유발되고 있기 때문에 유의성이 성립되지 않고 있다.

따라서 항균제 자체와 항균가공 cotton filter paper의 항균성을 정확하고 간편하게 시험할 수 있는 새로운 항균가공시험법의 개발이 요구되어 진다.

참 고 문 헌

- 성하수·고석원·송경근 (1998) Chito-oligosaccharide를 이용한 면직물의 항미생물 가공(II), 한국섬유공학회지, 35(11), 716-720.
- 성하수·김재필·고석원 (1997) 항균제로서 키토산 울리고당의 제조와 면직물에 대한 영향. 한국섬유공학회 추계세미나, 329-333.
- 이재원·남창우·고석원 (1999) Acrylamidomethyl Chito-oligosaccharide를 이용한 면직물의 항미생물 가공. 한국섬유공학회지, 36(10), 769-775.
- 이재원·남창우·성하수·고석원 (1998) Chito-oligosaccharide를 이용한 면직물의 항미생물 가공(I). 한국섬유공학회지, 35(10), 649-655.

전동원 (1997), 생체 임상의학용 키틴 및 카토산의 제조방법. Kr 122542.

전동원 (2001), 생체 임상의학용 키틴 및 카토산의 제조방법. Kr 0190723.

전동원 (1998a), 생물의학 등급의 저분자량 카토산의 제조방법. Kr 159971.

전동원 (1998b), 생물의학 등급의 저분자량 카토산의 제조방법. Kr 159972.

吉川邦彦 (1997) “抗菌のすべて”. 繊維社, pp.1-394.

青山直充 (1994) “人にやさしい繊維と加工”. 繊維製品衛生加工協議會

, pp. 1-488.

Saito K., Shimojoh M. and Fukushima K. (1994) Growth inhibition of chitosan from suid pen against Oral Streptococci, chitin, chitosan 研究報告, 77-79.

Dengmont E. and Membre M. (1995) *Applied and Environmental Microbiology*, 61(12), 4389-4395.

KS K 0693, 0890.

JIS L 1902.

AATCC Test Method 90, 100, 147.

(2003년 2월 12일 접수)