

혼합비율에 따른 키토산/젤라틴 혼합용액의 항균활성에 관한 연구

김병호 · 박장우^{1,*} · 홍지향²

(주)오투기, ¹국립한경대학교 식품생물공학과 및 식품생물산업연구소,
²서울대학교 농업생명과학연구원

Study on the Effect of Blending Ratios on the Antibacterial Activities of Chitosan/Gelatin Blend Solutions

Byung-Ho Kim, Jang-Woo Park^{1,*}, and Ji-Hyang Hong²

Ottogi Co., Ltd.

¹Department of Food and Biotechnology, and Food and Bio-industrial Research Center,
Hankyong National University

²Research Institute for Agriculture and Life Sciences, Seoul National University

Chitosan, second largest biomass after cellulose on earth, has potential for use as functional food package due to its antibacterial activity. However, due to high melting temperature of chitosan, chitosan films have been made by casting method. Because gelatin has relatively low melting temperature depending upon amount of plasticizer added, it was added to chitosan to produce commercially feasible film. The objective of the current study was to determine optimum blend ratio and amount of chitosan/gelatin blend solutions against antibacterial activities for extruder resin. Gram-positive bacteria (*Bacillus cereus* ATCC 14579 and *Listeria monocytogenes* ATCC 15313) and -negative bacteria (*Escherichia coli* ATCC 25922 and *Salmonella enteritidis* IFO 3313) were used. Paper (8 mm) diffusion and optical density methods were used to evaluate effect of different blending ratio solutions on the inhibition of bacterial growth. Measured clear zone size ranged from 8 mm to 18.07 mm in paper diffusion test. For *B. cereus*, *E. coli*, and *S. enteritidis*, addition of 50 μ L blend solution (chitosan/gelatin = 2/8; 0.3 mg) resulted in clear zone on paper disc. In *L. monocytogenes*, inhibition effect was observed with 0.6 mg chitosan (chitosan/gelatin=4/6). Minimum inhibitory concentration (MIC) values of *B. cereus*, *L. monocytogenes*, *E. coli*, and *S. enteritidis* with addition of chitosan were 0.1461, 0.2419, 0.0980, and 0.0490 mg/mL, respectively. These results indicate possibility of producing commercially feasible film with addition of optimum chitosan/gelatin amount.

Key words: biopolymer, chitosan, gelatin, blending ratios, antibacterial activity

서 론

키토산은 키틴(2-acetamino-deoxy- β -D-glucopyranosyl)의 탈아세틸화에 의해 유도되는 탄수화물로서 2-amino-2-deoxy- β -D-glucan으로 불리여지는 잔기가 5,000개 이상 β -1,4 탄소결합을 하고 있고, 분자 구조는 cellulose와 매우 유사한 천연 다당류이다(1). 또한 피라노오스(pyranose)환의 C₂ 위치에 키틴은 N-아세틸기(N-acetyl group, -NHCOCH₃), 키토산은 아미노기(acetoamide group, -NH₂), 셀룰로오스는 수산기(hydroxyl group, -OH)로써 서로 다를 뿐 나머지 부분은 동일하다(2). 키토산은 유리 아민기

및 고도의 결정구조를 가지고 있어 물속에서 일부의 아미노기가 양성화되어 팽윤되지만 대부분의 분자 사슬간 수소결합을 하고 있다. 그래서 일반적인 유기용매와 알칼리 용액에는 녹지 않지만, formic acid, lactic acid, acetic acid, ascorbic acid 등 유기산 수용액이나 묽은 염산과 같은 무기산내에서는 키토산의 아미노기가 산분자간에 용매화가 일어나 용해되어 점도가 높은 용액을 형성하기 때문에 여러 가지 용도로 사용되고 있다(3,4). 이것은 glucosamine pyranose환 1개당 1개의 아미노기와 2개의 히드록시기가 존재하고 있어 주용도는 폐수 처리시 천연 응집제, 탈수제 역할 및 증금속 흡착제로 사용되고(5), 부분적으로 건강식품, 사료산업, 화장품 및 의약품 등의 산업전반에 아주 미비하게 사용되고 있다. 또한 양전하를 띤 선형의 polyelectrolyte 구조를 이루고 있는 키토산은 물리화학적 특성에 의하여 항종양활성, 항암작용, 항콜레스테롤 작용, 항고혈압 작용, 항균활성 등 매우 다양한 생리활성을 나타내는 것으로 보고 되었는데(6-8), 그 중에서 특히 식물병원성의 곰팡이에 대

*Corresponding author: Jang-Woo Park, Department of Food and Biotechnology, Hankyong National University 67, Sukjung-dong, Ansung-si, Kyonggi-do 456-749, Korea
Tel: 82-31-670-5157
Fax:
E-mail: jangwoo_park@hotmail.com

한 생육억제효과를 나타낸다는 사실이 1979년 Allan과 Hadwiger(9)에 의해서 처음으로 보고 된 이후 1984년 Kendra와 Hadwiger(3)에 의해 더욱 명확하게 밝혀지면서 키토산의 항균 효과 및 그 잠재적인 역할에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있다(10,11). Jo(12)는 대장균에 대한 키토산의 항균실험에서 분자량 280만의 고분자 키토산 보다는 분자량 10,000-40,000 범위의 저분자 키토산이 약 20배의 항균효과를 나타내었다고 보고하였다. 또한 키토산은 *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Lactobacillus* sp. 등의 세균과 *Fusarium solani*, *F. oxysporum*, *Verticillium* sp. *Botryosphaeria dothidea* 등의 진균의 증식을 억제하는 것으로 알려졌다(13). Shahidi 등(14)은 키토산의 이러한 항균활성을 실제로 식품에 적용하여 저장성을 연장하였다고 보고하였다. 최근에는 키토산과 methylcellulose, nisin, poly(vinyl alcohol) 등과 혼합시켜 그의 항균활성을 검색하였고(15,16), Chung 등(17)은 수인성 병원균인 *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*에 대한 키토산의 항균작용에 미치는 여러 가지 요인들에 대해 보고하였다.

젤라틴은 동물의 연골, 뼈, 가죽 등 결합조직의 주요 단백질 성분인 콜라겐(collagen)을 부분적으로 가수분해 시켜 얻어지는 유도단백질로서 수용성 단백질이며, 무독성으로 자연계에서 광범위하게 분포하고 있다(18). 젤라틴은 tryptophan과 cystine을 제외한 필수아미노산을 모두 함유하고 있어 영양학적 가치가 높으며, 겔화제 이외에도 최근에는 건강식품으로까지 그 이용이 확대되고 있다. 또한 젤라틴은 비교적 낮은 온도와 농도에서도 점성을 부여하며, 냉각될 때 젤라틴 용액은 선명하고 탄력성 있는 열가역적 겔(thermoreversible gel)을 형성하기 시작한다(19). 대부분의 단백질과는 달리 온도가 증가됨에 따라 겔(gel) 상태로 변화되는 생고분자 물질로 겔화(gelation) 과정을 살펴보면, 가열 용액 내에서 불규칙한 coil 형태로 용해되어 있는 젤라틴은 냉각됨에 따라 3중 나선구조(triple helix structure)로 되돌아 가려는 3개의 polypeptide 사슬로부터 형성된 작은 영역들이 가교결합(cross-linking)을 통해 접합지역(cross-linking site)을 형성하므로, 최종적으로 3차원의 네트워크를 형성하게 되는 것이다(20,21). 일반적으로 젤라틴의 겔화는 온도, pH, 회분함량, 제조방법 및 농도에 따라서 크게 영향을 받는 것으로 알려졌다(22). Bigi 등(23)은 젤라틴과 hydroxyapatite 혼합필름의 구조와 기계적인 특성에 대하여 연구하였다. 또한 Bigi 등(24)은 glutaraldehyde로 가교 결합시켜 젤라틴 필름의 기계적인 특성을 향상시키고, 그 필름의 열적 성질을 연구하였다. Sobral 등(25)은 sorbitol의 작용에 따라 bovine hide와 pigskin 젤라틴 가식성 필름에 있어 수분 투과도, 기계적 및 열적 특성에 관하여 연구하였다.

현재까지 키토산의 여러 기능들을 이용한 단일 또는 혼합용액 및 필름제조는 실험실적인 방법(casting method)을 탈피하지 못하고 있다. 그 이유는 키토산으로 대량생산(mass production)

시 단독으로는 사용이 불가능하다는 열성형 단점을 지니고 있기 때문이다. 하지만, 생고분자 원료로 사용할 수 있는 물질들 중 투명하고 비교적 낮은 용융점을 지닌 젤라틴은 첨가되는 가소제의 종류 및 농도에 따라 용융점(melting point, Tm)의 변화가 많은 것으로 보고되었다. 그래서 키토산과 젤라틴을 중합반응 시키면 젤라틴이 열에 녹는 물질로 작용하여 키토산의 열적단점을 보완하므로 대량생산 할 수 있는 가능성이 많을 것으로 판단된다. 키토산과 젤라틴을 이용하여 기능성 혼합필름을 제조하기 위한 혼합비율에 따른 혼합용액의 항균활성에 관한 연구는 아직까지 미흡한 상태이다. 따라서 본 연구에서는 키토산과 젤라틴을 이용하여 혼합비율에 따라 혼합용액을 제조하여 paper diffusion method를 통해 항균활성 여부 및 최대 적정 혼합비율을 측정하였고, optical density method로 항균활성을 나타내는 키토산의 최소저해농도를 측정하였다. 또한 향후 대량생산을 위해 resin으로 제조한 다음, 이 resin을 이용하여 압출 성형기(extruder)로 항균활성을 지니는 생고분자 필름 개발 및 대량생산 시스템 공정 확립에 그 기초 자료로 활용하고자 한다.

재료 및 방법

재료

본 실험에 사용한 키토산(average molecular weight 40 KDa, degree of deacetylation 90%)은 목포시에 소재한 Bio-Tech. Co.(Korea)로부터 구입하였고, 젤리강도(jelly strength)가 240-260 bloom인 젤라틴은 UNIGEL Co.(Korea)에서 구입하였다. 또한 키토산 용매인 acetic acid, 필름의 가소제로 사용한 glycerol 및 NaCl은 각각 Showa Chemical Co.(Japan), Samchun Pure Chemical Co.(Korea)에서 구입하였고, 물은 증류수(distilled water)를 사용하였다.

사용균주 및 배지

항균활성 실험에서 사용된 미생물은 일반적인 식품부패 및 병원성 세균으로 4가지 균주들을 사용하였다. 그람양성(*Bacillus cereus* ATCC 14579, *Listeria monocytogenes* ATCC 15313) 및 그람음성(*Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella enteritidis* IFO 3313) 세균들은 (사)한국중균협회 부설 한국미생물보존센터(Korean Culture Center of Microorganisms, KCCM)에서 분양 받았다. 그리고 분양 받은 균주들은 3회 이상 계대배양 시켜 균을 활성화 시킨 후 사용하였다. 즉, 공시 균주의 slant media 상에 배양된 균주를 무균실내에서 1 백금이를 취하여, 멸균된 nutrient broth(NB), brain heart infusion(BHI) 액체배지에 각각 접종하고, 37°C에서 24시간 동안 왕복식 진탕배양기(SSI 603 Shinsaeing, Korea)에서 120 rpm으로 배양하여 Table 1과 같이 활성화 시켰다.

Table 1. List of strains, cultivation conditions and colony forming unit (CFU/mL) used for screening of antimicrobial activity test

Strains	Cultivation conditions	CFU/mL
Gram(+) bacteria		
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	NA, 37°C	1.0×10 ⁸
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 15313	BHIA, 37°C	3.6×10 ⁹
Gram(-) bacteria		
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	NA, 37°C	1.4×10 ⁹
<i>Salmonella enteritidis</i> IFO 3313	NA, 37°C	3.3×10 ⁸

Table 2. Blending ratios of chitosan/gelatin blend solutions

Sample No.	3% (w/w) Chitosan solution concentration (%)	3% (w/w) Gelatin solution concentration (%)
0	0	100
1	10	90
2	20	80
3	30	70
4	40	60
5	50	50
6	60	40
7	70	30
8	80	20
9	90	10
10	100	0

혼합용액 제조

키토산은 젤라틴과 달리 증류수에서 용해성이 좋지 않기 때문에 2%(v/v) acetic acid를 용매로 사용하였다. 먼저 키토산 및 젤라틴의 최종농도가 각각 3%(w/w)가 되도록 용질 3g을 칭량하고, 가소제인 glycerol 0.9g을 가한 뒤, 준비된 묽은 2%(v/v) acetic acid 용액 및 80-90°C로 가열된 증류수 1000 mL를 채웠다. 이 키토산 및 젤라틴 용액을 hot plate stirrer에서 80-90°C로 가열교반 시켜 각각의 3%(w/w) 키토산 용액과 젤라틴 용액을 제조하였다. 또한 제조된 각각의 3%(w/w) 키토산 및 젤라틴 용액을 Table 2와 같은 혼합비율에 따라 혼합용액을 조제하였다. 즉, 혼합비율별로 조절된 각각의 혼합용액들은 균질기를 이용하여 6,000 rpm에서 2분간 중합반응 시킨 후 hot plate stirrer에서 80-90°C로 재가열교반 시켜 혼합용액을 제조하였다 (Fig. 1).

항균활성 측정

항균활성 측정은 paper diffusion method(26)에 따라 측정하였다. 즉, 멸균된 petri dish에 nutrient agar(NA)와 brain heart infusion agar(BHIA) 배지를 약 20 mL씩 분주하여 응고시키고, 그 위에 0.85%(w/v) 멸균생리식염수로 100배 희석된 시험균액 1 mL과 이미 제조된 soft agar(Difco 214010, USA) 9 mL를 잘 혼합시켜 분주 후 응고시켰다. 그리고 멸균된 filter paper disc(8 mm in diameter, Toyo, Japan)를 화염멸균 된 핀셋을 이용하여 시험용 평판 배지 위에 올려놓고, paper disc의 가운데 부분을 가볍게 눌러 밀착시킨 후 혼합비율별로 제조된 혼합용액 50 µL, 75 µL를 각각 흡수시켰다. 그런 다음 신속히 1-2분 이내에 멸균수 25 µL를 각각 분주하여 4°C에서 1시간 방치한 후 37°C에서 뒤집어서 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 paper disc 주변에 저해환이 형성되면 항균활성이 있는 것으로 판단하였고, 그 저해환의 직경크기를 vernier caliper(Mitutoyo Co., Japan)로 측정하였다.

최소저해농도 측정

최소저해농도 측정은 NB 및 BHI 배지 용액을 제조하여 삼각플라스크에 60 mL씩 분주한 다음, 121°C에서 15분간 고압멸균(MLS-3020, SANYO Co., Japan) 시켰다. 멸균된 NB 및 BHI 배지에 활성 시킨 균액을 각각 1 mL를 접종하고, *B. cereus*, *E. coli* 및 *S. enteritidis* 균들에는 혼합비율별로 혼합용액을 각각 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 mL씩 첨가하였고, *L. monocytogenes*는 여러 번의 예비실험을 통해 혼합용액을 각각 0, 1.0,

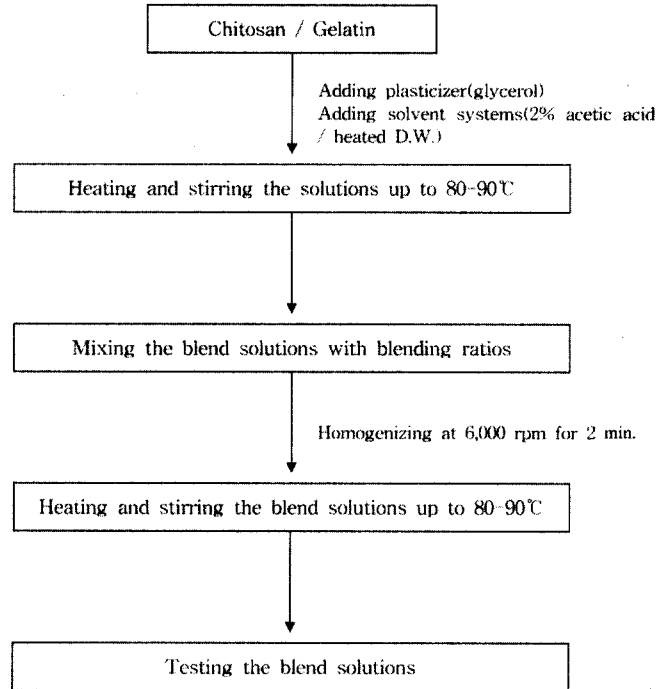


Fig. 1. Flow chart for the preparation of chitosan/gelatin blend solutions.

1.2, 1.4, 1.6 mL씩 첨가시켰다. 또한 균액과 시료가 첨가된 NB 및 BHI 배지를 37°C에서 72시간 동안 진탕배양 시키면서, 1일 동안은 4시간 간격, 2-3일은 8시간 간격으로 미생물의 생육정도를 UV-VIS Spectrophotometer(OPRON-3000, HANSON Tech. Co., Korea)를 이용하여 620 nm에서 흡광도를 측정하였다. 혼합용액 0 mL 첨가한 것을 공시균(control)으로 하였고, 공시균 보다 흡광도가 낮은 것을 저해활성이 있는 것으로 판단하였다. 또한 대조균으로 묽은 2%(v/v) acetic acid(초산)의 항균활성을 관찰하기 위하여 균액이 접종된 NB 및 BHI 배지에 2% acetic acid를 0.4 mL씩 첨가하여 상기와 같은 방법으로 최소저해농도를 측정하였다.

통계적 분석

혼합비율에 따른 혼합용액의 항균활성에 따른 저해환의 크기 및 최소저해농도의 값들은 평균값과 표준편차로 나타내었고, 각 실험 평균값의 유의적인 차이 검정은 SAS(Statistical Analysis System)통계 package(27)를 이용하여, Duncan's Multiple Range Test로 검증하였다.

결과 및 고찰

혼합용액의 항균활성

키토산과 젤라틴의 혼합비율에 따른 혼합용액의 항균활성을 paper diffusion method로 측정한 결과, Fig. 2(A, B)에서와 같이 혼합용액을 50 µL, 75 µL로 흡수시켰을 때 저해환의 크기는 8-18.07 mm로 측정되었다. 먼저 paper disc에 혼합비율별로 각각 50 µL를 분주한 경우(A)를 살펴보면, 키토산의 농도가 0%에서 10%(*B. cereus*, *E. coli*, *S. enteritidis*), 20%(*L. monocytogenes*)까지는 전혀 항균활성을 나타내지 않았지만, 그 농도가 20%(*B. cereus*, *E. coli*, *S. enteritidis*), 30%(*L. monocytogenes*) 이상으로 높아질수록 항균활성이 서서히 증가하는 경향을 보였다. *L.*

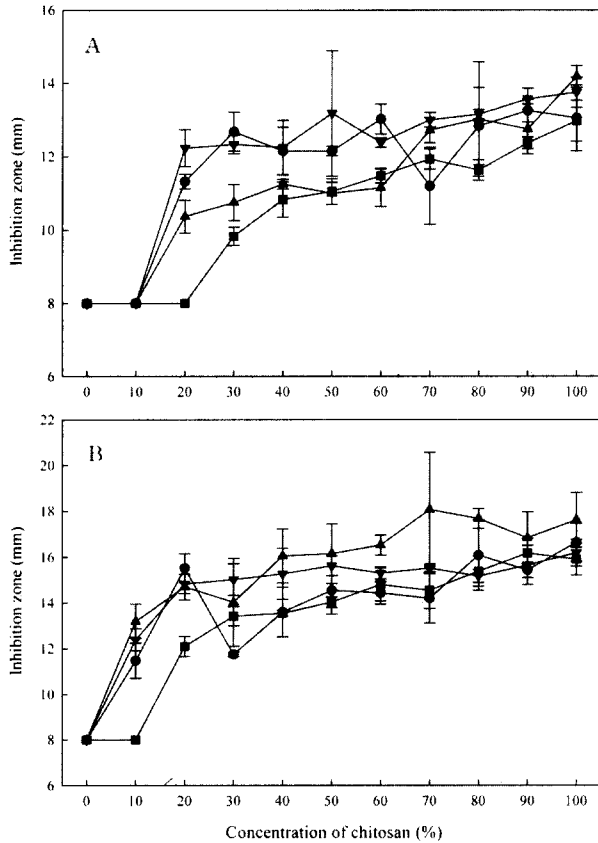


Fig. 2. Antibacterial activities of chitosan concentration (A: 50 µL/disc, B: 75 µL/disc) on the growth of gram positive and gram negative bacterial.

●: *Bacillus cereus* ATCC 14579, ■: *Listeria monocytogenes* ATCC 15313, ▲: *Escherichia coli* ATCC 25922, ▼: *Salmonella enteritidis* IFO 3313.

*monocytogenes*는 키토산의 농도가 30%에서 항균활성을 나타내었지만, 그 저해환의 크기가 뚜렷하지 않았다. 따라서 *B. cereus*, *E. coli* 및 *S. enteritidis* 균주들에 대하여 항균활성을 나타내는 혼합용액의 혼합비율은 chitosan/gelatin = 2/8이었고, 그때 항균활성을 나타내는 키토산의 절대량은 0.3 mg으로 측정되었다. 또한 *L. monocytogenes*에 대해서는 혼합비율이 chitosan/gelatin = 4/6이었고, 항균활성을 나타내는 키토산의 절대량은 0.6 mg이었다.

Paper disc에 혼합비율별로 각각 75 µL를 분주한 경우(B)는 키토산의 함량이 10%(*B. cereus*, *E. coli*, *S. enteritidis*), 20%(*L. monocytogenes*) 이상으로 증가함에 따라 50 µL를 분주했을 때와 마찬가지로 항균활성이 서서히 증가하는 경향을 나타내었고, 키토산/젤라틴 혼합용액의 혼합비율이 chitosan/gelatin = 7/3에서 *E. coli*에 대하여 저해환의 크기가 18.07 mm로 가장 큰 항균활성을 나타내었다. *L. monocytogenes*와 *E. coli*의 경우 저해환의 크기가 각각 12.10 mm(chitosan/gelatin = 2/8, 키토산의 절대량 0.450 mg), 13.20 mm (chitosan/gelatin = 1/9, 키토산의 절대량 0.225 mg)로 50 µL의 혼합용액(chitosan/gelatin = 8/2)보다 키토산 농도를 기준으로 4-8배 정도 높은 항균활성을 나타내었다. 이것은 *L. monocytogenes*와 *E. coli*에 50 µL보다 많은 75 µL를 분주함으로써 항균활성을 지니고 있는 키토산의 확산속도가 빨라져 이와 같은 결과가 측정된 것으로 사료된다.

이렇게 키토산이 항균효과를 나타내는 것은 키토산을 초산 수용액에 용해시킴으로써 아미노기가 초산과 조염 결합하여 암

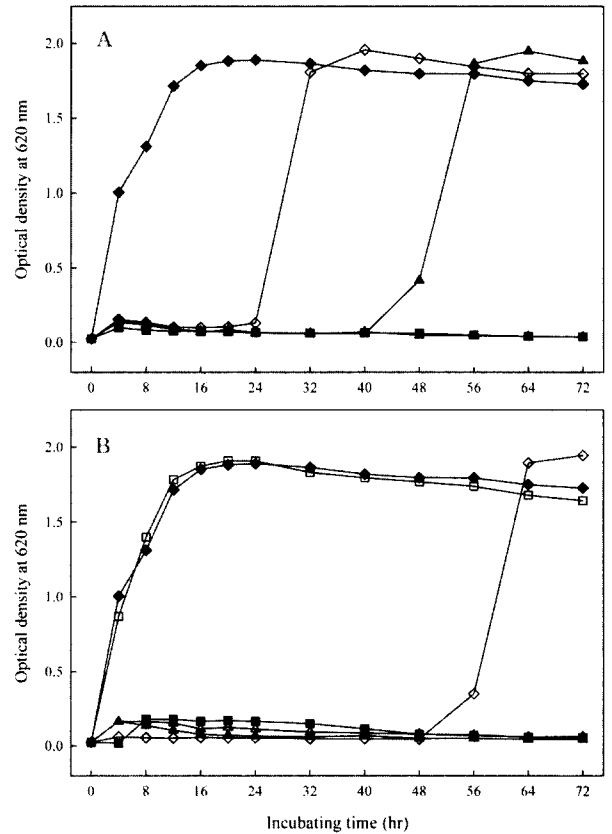


Fig. 3. The minimum inhibitory concentration of blended solution (A: chitosan/gelatin = 50/50, B: chitosan/gelatin = 100/0) on the growth of *Bacillus cereus*.

◆: control, ◇: 0.2 mL, ▲: 0.4 mL, △: 0.6 mL, ■: 0.8 mL, □: 2% acetic acid 0.4 mL.

모늄(-NH₃⁺)의 형태로 되기 때문에 항균활성을 갖는다. 즉, 용해되지 않은 키토산은 항균효과가 발휘되지 못하며 유기 또는 무기산에 의해 용해되어야만 항균효과가 나타날 수 있다는 것을 알 수 있다. 또한 키토산은 지구상에 존재하는 많은 biopolymer들 중에서도 매우 드물게 polycationic amine을 가지고 있기 때문에 세균의 세포벽에 존재하는 음이온 거대분자와 이온결합을 형성하여 세균의 증식을 억제할 수 있다. 키토산의 항균성에 대한 관심이 고조됨에 따라서 키토산의 항균 메커니즘을 밝혀려는 연구가 많이 이루어지고 있다. Tokura 등(28)은 형광 현미경 사진관찰 결과를 통해서 키토산의 항균작용 기작이 세포벽에 결합된 키토산이 영양성분의 전달을 막기 때문이라고 추측하였으며, Liu 등(29)은 *E. coli*에 대한 키토산과 carboxymethylated chitosan의 항균작용 실험을 통해서 키토산 올리고머의 항균활성은 세포내에 키토산이 침투하여 DNA의 전사(transcription)를 방해하기 때문이라고 주장하였다. 또한 Hwang 등(30)은 키토산을 처리한 세포로부터 단백질, 핵산, 2가 양이온 등이 상당량 세포 밖으로 유출되는 것을 관찰하고 세포내 물질의 유출정도가 키토산의 항균효과와 밀접한 상관성을 나타낸다고 하였다. 이 세포내 물질의 유출은 양이온성을 가지는 키토산이 세포벽에 강하게 결합함으로써 세포벽의 기본 구조가 붕괴되어 물질 투과성(permeability)이 증가되었기 때문이라고 보고하였다. 이렇듯 항균 메커니즘은 크게 세 가지로 나누어 볼 수 있다. 보통 세균의 세포벽을 구성하고 있는 시알산이나 인지질 등의 음이온성으로 인하여 세균의 최외층은 음전하

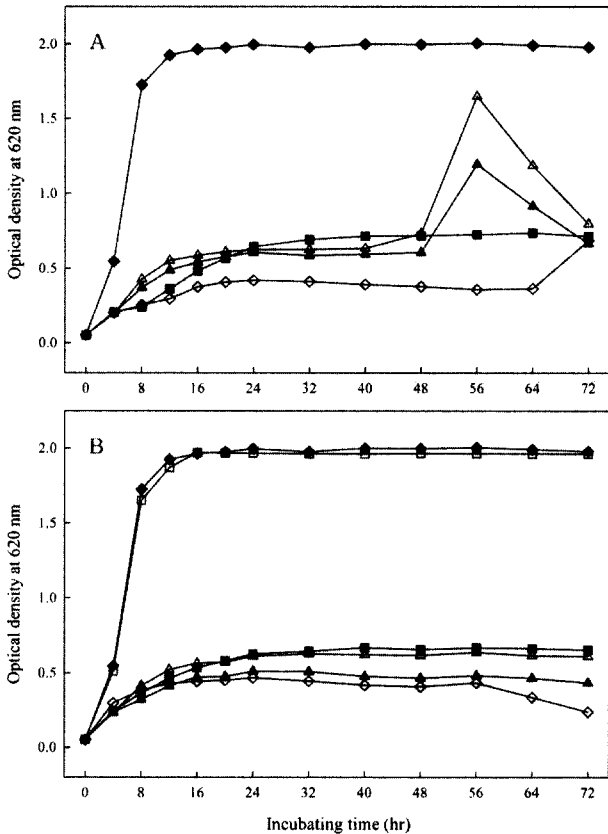


Fig. 4. The minimum inhibitory concentration of blended solution (A: chitosan/gelatin = 50/50, B: chitosan/gelatin = 100/0) on the growth of *Listeria monocytogenes*. ◆: control, ◇: 1.0 mL, ▲: 1.2 mL, △: 1.4 mL, ■: 1.6 mL, □: 2% acetic acid 0.4 mL.

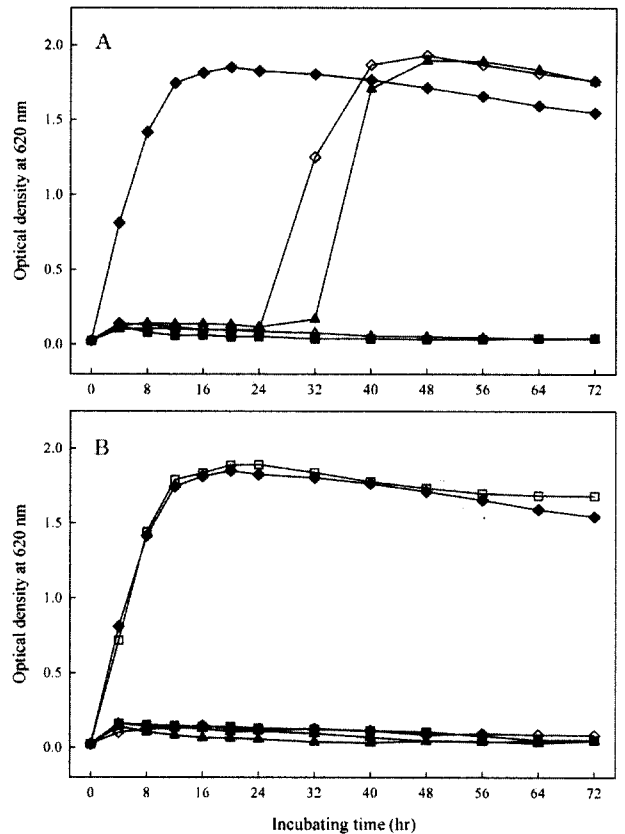


Fig. 5. The minimum inhibitory concentration of blended solution (A: chitosan/gelatin = 50/50, B: chitosan/gelatin = 100/0) on the growth of *Escherichia coli*. ◆: control, ◇: 0.2 mL, ▲: 0.4 mL, △: 0.6 mL, ■: 0.8 mL, □: 2% acetic acid 0.4 mL.

로 되어 있으며 키토산은 구조내에 포함하고 있는 아미노기로 인하여 쉽게 양이온화하므로 이러한 키토산과 미생물간의 정전기적인 결합으로 인하여 미생물의 자유도가 구속되어 증식이 억제되며, 결과적으로 세균의 생육을 저해한다는 것과 다른 하나는 저분자화된 키토산이 세포내로 침투하여 DNA의 전사를 방해하기 때문에 미생물의 성장을 억제한다는 것이다. 또한 세포벽이 음이온으로 대전되어 있는 미생물이 키토산의 양이온화 된 아미노기에 전기적으로 끌려가게 되고 이때 미생물 세포막 중의 인지질의 극성화로 접촉면과 반대측 세포막의 조직이 파괴되고 원형질의 누설로 인하여 항균활성이 나타난다는 것이지만, 이 3가지 주장 모두 키토산의 양이온성 성질에 의한 물리적인 결합을 그 기반으로 하고 있다.

혼합용액의 최소저해농도

키토산과 젤라틴의 혼합용액에서 키토산의 첨가농도에 따른 *B. cereus*, *L. monocytogenes*, *E. coli* 및 *S. enteritidis*에 대한 항균활성을 나타내는 키토산의 최소저해농도를 optical density method로 측정된 결과를 Fig. 3-6로 나타내었다. Fig. 3(A, B)은 *B. cereus* 증식에 키토산/젤라틴의 혼합비율이 50/50, 100/0인 혼합용액을 각각 0 mL, 0.2 mL, 0.4 mL, 0.6 mL 및 0.8 mL를 첨가한 결과이다. Fig. 3(A)에서 0.2 mL를 첨가한 처리구는 24 시간까지 높은 항균활성을 나타내었지만, 24시간 이후에는 급격하게 항균활성이 낮아졌다. 또한 0.4 mL를 첨가한 처리구는 0.2 mL를 첨가한 경우와 비슷하지만, 40시간까지 항균활성을

나타내다가 그 이후로는 *B. cereus* 균주가 혼합용액을 첨가하지 않은 control 보다 조금 높게 증식하였다. 혼합용액 0.6 mL 및 0.8 mL를 첨가한 처리구에서는 *B. cereus*에 대한 높은 항균활성을 나타내었다. Fig. 3(B)의 경우 0.2 mL를 첨가한 처리구는 48시간까지 다른 처리구들과 비교시 가장 높은 항균활성을 나타내었지만, 48시간 및 56시간 이후로는 *B. cereus* 균주가 급격하게 증식하여 항균활성을 나타내지 못하였다. 따라서 *B. cereus*에 대해 항균활성을 나타내는 키토산의 최소저해농도는 0.1461 mg/mL로 측정되었다.

*L. monocytogenes*의 경우, Fig. 4(A)에서와 같이 키토산/젤라틴의 혼합비율이 50/50인 혼합용액 1.0 mL를 첨가한 처리구는 1.2 mL, 1.4 mL 및 1.6 mL를 첨가한 처리구 보다 키토산의 첨가농도가 낮음에도 불구하고 *L. monocytogenes*에 대하여 항균활성이 가장 높게 측정되었다. 혼합용액 1.2 mL 및 1.4 mL를 첨가한 것은 48시간까지 항균활성을 지속적으로 나타내다가 48시간 이후 *L. monocytogenes*가 증식되었지만 56시간 이후에는 다시 감소되었다. 이는 키토산에 의한 항균활성이기 보다는 균의 지속적인 증식에 따른 배지내 영양성분의 고갈로 증식이 감소되었다고 생각된다. 또한 Fig. 4(B)는 키토산/젤라틴 혼합비율이 100/0인 혼합용액을 농도별로 첨가하여 최소저해농도를 측정된 결과이다. 혼합용액 1.0 mL를 첨가한 경우 4시간까지는 다른 처리구들과 큰 차이를 보이지 않았지만, 그 이후에는 키토산의 농도가 낮음에도 불구하고 *L. monocytogenes*에 대하여 가장 높은 항균활성을 나타내었다. Fig. 4(A, B)의 결과를 정리

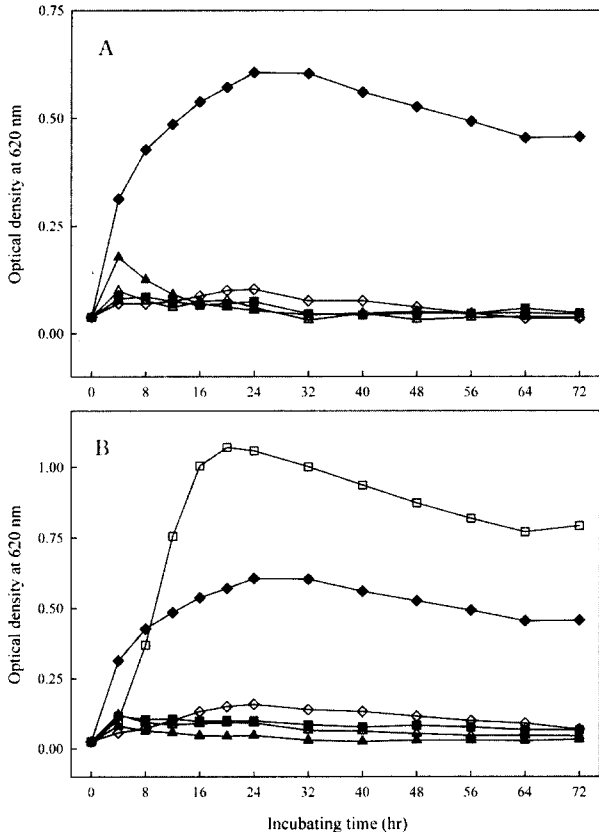


Fig. 6. The minimum inhibitory concentration of blended solution (A: chitosan/gelatin = 50/50, B: chitosan/gelatin = 100/0) on the growth of *Salmonella enteritidis*.

◆: control, ◇: 0.2 mL, ▲: 0.4 mL, △: 0.6 mL, ■: 0.8 mL, □: 2% acetic acid 0.4 mL).

하면 *L. monocytogenes*에 대한 항균활성을 나타내는 키토산의 최소저해농도는 0.2419 mg/mL로 나타났다.

그램음성 세균인 *E. coli*는 Fig. 5(A)에서 보는 것과 같이 0.2 mL 및 0.4 mL를 첨가한 처리구는 각각 24시간 및 32시간 이후에는 항균활성을 나타내지 못하였다. 반면에 0.6 mL 및 0.8 mL를 첨가한 처리구는 72시간까지 지속적으로 높은 항균활성을 나타내었다. 또한 키토산과 젤라틴의 혼합비율이 100/0인 혼합용액을 농도별로 첨가한 Fig. 5(B)에서는 첨가된 모든 키토산의 농도에서 높은 항균활성을 나타내었다. 따라서 *E. coli*에 대한 항균활성을 나타내는 키토산의 최소저해농도는 0.0980 mg/mL로 나타났다.

Fig. 6(A, B)은 *S. enteritidis*에 대한 키토산의 최소저해농도를 측정된 결과이다. Fig. 6(A)에서 0.4 mL를 첨가한 처리구는 4시간까지 균이 증식하다가 그 이후에는 다른 처리구들과 비슷하게 높은 항균활성을 나타내었다. 또한 Fig. 6(B)에서 보듯이 0.4 mL를 첨가한 처리구에서 가장 높은 항균활성을 나타내었다. 따라서 *S. enteritidis*에 대한 키토산의 최소저해농도는 0.0490 mg/mL로 나타났다. *E. coli*와 *S. enteritidis*는 그램음성 세균으로 lipopolysaccharide층으로 이루어진 외막과 얇은 peptidoglycan으로 이루어진 세포벽을 가지고 있고, DNA homology에서 *E. coli*와 *S. enteritidis*는 50%의 유사성을 지닌 장내질환 세균들이기 때문에 키토산에 대한 항균활성도가 비슷할 것이라 기대했지만, 본 실험결과로 균주 특성에 따라 키토산의 항균력에 차이가 있음을 확인할 수 있었다.

B. cereus, *L. monocytogenes*, *E. coli* 및 *S. enteritidis*에 대하여 항균활성을 나타내는 키토산의 첨가농도가 증가됨에도 불구하고 오히려 항균활성이 감소하는 특성을 나타내었다. Sudarshan 등(31)은 첨가되는 키토산에 의해 균주의 응집이 많이 발생할수록 항균활성이 크게 나타난다고 보고하였는데, 미생물 세포벽과 결합한 키토산의 농도가 증가함에 따라 미생물 사이의 반발력이 발생하여 균주의 응집현상이 방해되었기 때문이다(32). 또한 묽은 초산 자체의 최소저해농도를 측정된 결과, *B. cereus*, *L. monocytogenes*, *E. coli*에 대해서는 control과 비교 시 유의적인 차이가 없는 것으로 항균효과는 나타나지 않았다. 반면에 *S. enteritidis*의 경우는 배양시간 4시간까지는 항균활성을 나타내었지만, 8시간 이후부터는 *S. enteritidis*의 성장이 control 보다 높아져 배양시간 20시간에서는 control 보다 2배 정도로 가장 높게 균주의 성장을 촉진시켰다. 이는 *S. enteritidis*가 장내 세균임을 감안할 때 묽은 초산의 영향으로 영양성분으로 흡수되기보다는 *S. enteritidis*의 성장 조건에 맞는 pH를 제공한 것으로 사료된다.

요 약

본 연구에서는 항균활성을 지니는 기능성 생고분자 필름을 제조하기 위한 전 단계로 키토산과 젤라틴을 이용하여 혼합비율별로 키토산/젤라틴 혼합용액의 항균활성을 측정하였다. 사용된 균주는 그램양성(*Bacillus cereus* ATCC 14579, *Listeria monocytogenes* ATCC 15313) 및 그램음성(*Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella enteritidis* IFO 3313) 세균 4종류이고, paper diffusion method와 optical density method로 항균효과를 나타내는 키토산/젤라틴 혼합용액의 최적 혼합비율 및 키토산의 최소저해농도를 측정하였다. 또한 키토산의 용매로 사용된 2%(v/v) 초산의 항균효과를 측정하였다. 혼합비율별로 제조된 키토산/젤라틴 혼합용액을 이용하여 paper diffusion method로 paper disc(8 mm)에 50 μ L, 75 μ L씩 분주시켜 항균활성을 측정된 결과, 저해환의 크기는 8 mm에서 18.07 mm로 측정되었다. 키토산의 농도가 0%에서 10%(*B. cereus*, *E. coli*, *S. enteritidis*), 20%(*L. monocytogenes*)까지는 전혀 항균활성을 나타내지 않았지만, 그 농도가 20%(*B. cereus*, *E. coli*, *S. enteritidis*), 30%(*L. monocytogenes*) 이상으로 높아질수록 항균활성이 서서히 증가하는 경향을 보였다. *L. monocytogenes*는 키토산의 농도가 30%에서 항균활성을 나타내었지만, 그 저해환의 크기가 뚜렷하지 않았다. 따라서 *B. cereus*, *E. coli* 및 *S. enteritidis* 균주들에 대하여 항균활성을 나타내는 혼합용액의 혼합비율은 chitosan/gelatin = 2/8이었고, 그 때 항균활성을 나타내는 키토산의 절대량은 0.3 mg으로 측정되었다. 또한 *L. monocytogenes*에 대해서는 혼합비율이 chitosan/gelatin = 4/6이었고, 항균활성을 나타내는 키토산의 절대량은 0.6 mg이었다. 혼합비율별로 제조된 키토산/젤라틴 혼합용액을 이용하여 항균활성을 나타내는 키토산의 최소저해농도를 optical density method로 측정하였다. 그 결과, *B. cereus*, *L. monocytogenes*, *E. coli* 및 *S. enteritidis*에 대한 키토산의 최소저해농도는 각각 0.1461 mg/mL, 0.2419 mg/mL, 0.0980 mg/mL 및 0.0490 mg/mL로 측정되었다. 또한 2%(v/v) 초산 자체의 최소저해농도를 측정된 결과, *B. cereus*, *L. monocytogenes*, *E. coli*에 대해서는 control과 비교 시 유의적인 항균효과는 나타나지 않았다. 반면에 *S. enteritidis*의 경우는 배양시간 4시간까지는 항균활성을 나타내었지만, 8시간 이후부터는 *S. enteritidis*의 성장이 control 보다 높아져 배양시간 20시간

에서는 control 보다 약 2배 이상 균주의 성장을 촉진시켰다.

문 헌

1. Berkely RCW, Gooday GW, Ellwood DC. Chitin chitosan and their degradative enzymes. pp. 204-250. In *Microbial Polysaccharides and Polysaccharides*. Berkely RCW (ed). Academic Press, New York, NY, USA (1979)
2. Arai K, Kinumaki T, Fugita T. Toxicity of chitosan. *Bull. Tokai Reg. Fich Res. Lab.* 56: 86-94 (1968)
3. Kendra DF, Hadwiger LA. 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 (1984)
4. Muzzarelli RAA, Barontini G, Rocchetti R. Immobilized enzymes on chitosan columns: α chymotrypsin and acid phosphatase. *Biotechnol. Bioeng.* 18: 1445 (1976)
5. Koyano T, Minoura N, Nagura M, Kobayashi K. Attachment and growth of cultured fibroblast cells on PVA/chitosan blended hydrogels. *Biomed. Mater. Res.* 39:486-490 (1998)
6. Toroko A, Tatewaki N, Suzuki K, Mikami T, Suzuki S, Suzuki M. Growth inhibitory effect of hexa-N-acetylchitohexaose against Meth-A solid tumor. *Chem. Pharm. Bull.* 36: 784-790 (1988)
7. Kim MH, Oh SW, Hong SP, Yoon SK. Antimicrobial characteristics of chitosan and chitosan oligosaccharides on the microorganisms related to kimchi. *Korean J. Food Sci. Technol.* 30: 1439-1447 (1998)
8. Yamaguchi H. Application of chitin/chitosan to food and medicine fields. *Shokuhin to Kaihatsu.* 21: 203 (1986)
9. Allan CR, Hadwiger LA. The fungicidal effects of chitosan on fungi and varying cell wall composition. *Exp. Mycol.* 3: 285-287 (1979)
10. Uchida Y, Izume M, Ohtakara A. Purification and Enzymatic properties of Chitosanase from *Bacillus* sp. *M. Bull. Fac. Agr. Saga Univ.* 66: 105-116 (1989)
11. Li Q, Dunn T, Grandmaison EW, Goosen MFA. Applications and properties of chitosan. pp. 3-30. In: *Applications of chitin and chitosan*, Goosen MFA (ed). Technomic Publishing Co., Lancaster, UK (1997)
12. Jo HL. Antimicrobial activity and food preservative function of a low molecular weight chitosan. Ph. D. thesis. Pusan National Fisheries Univ., Pusan, Korea (1989)
13. Stossel P, Leuba JL. Effect of chitosan, chitin and some amino-sugars on growth of various soilborns phytopathogenic fungi. *Phytopath. W.* 111: 82-90 (1984)
14. Shahidi F, Arachchi JKV, You JJ. Food applications of chitin and chitosan. *Trends Food Sci. Technol.* 10: 37-51 (1999)
15. Cha DS, Cooksey K, Chinnan MS, Park HJ. Release of nisin from various heat-pressed and cast films. *Lebensm.-Wiss. U.-Technol.* 36: 209-213 (2003)
16. Zhao L, Mitomo H, Zhai M, Yoshii F, Nagasawa N, Kume T. Synthesis of antibacterial PVA/CM-chitosan blend hydrogels with electron beam irradiation. *Carbohydr. Polymers*, 53: 439-446 (2003)
17. Chung YC, Wang HL, Chen YM, Li SL. Effect of abiotic factors on the antibacterial activity of chitosan against waterborne pathogens. *Bioresource Technol.* 88: 179-184 (2003)
18. Choi YH, Lim ST, Yoo BS. Dynamic rheological properties of gelatin. *Korean J. Food Sci. Technol.* 34: 830-834 (2002)
19. Normand V, Muller S, Ravey JC, Parker A. Gelation kinetics of gelation: a master curve and network modeling. *Macromolecules.* 33: 1063-1071 (2000)
20. Ross. Murphy SB. Structure and rheology of gelatin gels. *Polymer* 33: 2622-2627 (1992)
21. Gilsenan PM, Ross-Murphy SB. Rheology characterization of gelatins from mammalian and marine sources. *Food Hydrocolloids* 14: 191-195 (2000)
22. Wu J, Chiu SC, R Pearce EM, Kwei TK. Effects of phenolic compounds on gelation behavior of gelatin gels. *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.* 39: 224-231 (2000)
23. Bigi A, Panzavolta S, Roveri N. Hydroxyapatite-gelatin films: a structural and mechanical characterization. *Biomaterials* 19: 739-744 (1998)
24. Bigi A, Bracci B, Cojazzi G, Panzavolta S, Roveri N. Drawn gelatin films with improved mechanical properties. *Biomaterials* 19: 2335-2340 (1998)
25. Sobral PJA, Menegalli FC, Hubinger MD, Roques MA. Mechanical, water vapor barrier and thermal properties of gelatin based edible films. *Food Hydrocolloids* 15: 423-432 (2001)
26. Conner DE, Beuchat LR. Effect of essential oil from plants on growth of food spoilage yeast. *J. Food Sci.* 49: 429-434 (1984)
27. SAS Institute, Inc. SAS User's Guide. Statistical Analysis Systems Institute, Cary, NC, USA (1990)
28. Tokura S, Ueno K, Miyazaki S, Nishi N. Molecular weight dependent antimicrobial activity by chitosan. *Macromolecular Symposia* 120: 1-9 (1997)
29. Liu XF, Guan YL, Yang DZ, Yao KD. Antibacterial action of chitosan and carboxymethylated chitosan. *J. Appl. Polym. Sci.* 79: 1324-1335 (2001)
30. Hwang JK, Kim HJ, Shim JS, Pyun YP. Bacteriocidal activity of chitosan on *Streptococcus mutans*. *Korean J. Food Sci. Technol.* 31: 522-526 (1999)
31. Sudarshan NR, Hoover DG, Knorr D. Antibacterial action of chitosan. *Food Biotechnol.* 6: 257-272 (1992)
32. Oh SW, Hong SP, Kim HJ, Choi YJ. Antimicrobial effects of chitosans on *Escherichia coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*. *Korean J. Food Sci. Technol.* 32: 218-224 (2000)

(2005년 1월 6일 접수; 2005년 4월 11일 채택)