

친환경 무기항균제 개발 및 효능 연구

김한울¹, 김소형², 박선영², 이미영^{1*}

Development of environmentally benign inorganic bactericide and studies of its efficacy

Han-Wool Kim¹, So-Hyung Kim², Sun-Young Park² and Mi-Young Lee^{1*}

Abstract The environmentally benign inorganic bactericide was developed by using waste shell as a matrix and its efficacies against various bacteria were examined in this investigation. The inorganic bactericide inhibited strongly the growths of various bacteria such as *S.aureus* and *E.coli*. The inorganic bactericide also showed strong killing effect on the growth of *P.acnes* which causes the acne on human face. Moreover, this bactericide inhibited the activity of lipoxxygenase prominently, indicating notable anti-inflammatory activity of the bactericide .

Key Words : Development, bactericide, antibacterial activity, anti-inflammatory activity

1. 서론

산업이 고도화되고 생활이 윤택해지면서 항균제품에 대한 수요가 크게 증가하고 있으며, 특히 인체와 환경에 무해한 환경 친화적 항균소재개발이 절실히 요청되고 있다. 천연추출물 뿐만 아니라 염소계 항균제, 무기계 항균제, 유기계 항균제 등의 다양한 항균소재가 개발되어 왔다. 그 중에서도 수백 종의 다양한 세균에 대해 항균효능이 있다고 알려진 은을 사용한 항균소재도 주목을 받고 있다. 유기항균제는 무기항균제보다 항균력이 뛰어나지만 피부 자극원의 하나이므로 점차 사용범위가 제한되고 있다. 무기 항균제는 제올라이트, 인산칼슘 등의 세라믹스에 각종 이온들을 결합 혹은 탐침 등의 방법으로 결합시켜서 만들고 있다[1]. Ag^+ , Zn^{2+} , Cu^{2+} 등의 항균활성을 가지는 이온을 담지시킨 항균 세라믹스는 장기간에 걸친 항균력과 내성을 발생시키지 않는 특성을 나타내고 있다 [2]. 무기계 항균제의 항균기작을 살펴보면 무기담체로부터 미량 해리된 항균금속이온이 확산에 의해 세포막에

도달하고, 세포막 등의 단백질에 흡착되어 cystein의 -SH기에 결합하여 세포의 에너지대사를 저해하거나 황화물로 전환시킨다. 특히 Ag^+ 은 매우 낮은 농도에서도 다양한 세균에 대한 강한 항균력을 가지고 있다고 알려져 있다[3-5]. 뿐만 아니라 무기담체와 결합하고 있는 산소 혹은 물속의 용존 산소가 항균 금속의 촉매 작용에 의해 부분적으로 활성산소로 전환되어 강력한 살균 작용을 하게 된다[6].

여드름은 모피지선의 염증성 질환으로 모공 근처에 여드름 균이 침입하여 성장하면서 염증을 일으키는 피부질환이다. 여드름의 주요 원인으로는 과도한 피지 분비, 모공입구의 각질층이 두꺼워지는 모낭의 과각화로 인한 모낭 내 피지의 정체 및 *Propionibacterium acnes*와 같은 혐기성 화농세균의 증식 등이 있다. 이 중 *P. acnes* 등의 세균은 피지를 분해하여 Free fatty acid 등의 화학물질을 방출시키고 주변 피부에 침투하게 하여 피부 염증을 일으킨다[8, 9]. 여드름의 치료 방법으로는 피지 과잉분비 억제, 모낭 폐쇄 제거, 세균 증식 억제 등의 방법이 있다. 여드름 치료시 항안드로젠 제제등의 호르몬제와 소염제 및 항생제로 인한 부작용과 피부의 안정성이 문제가 되고 있다[10-13].

본 연구에서는 해양의 폐기 폐각을 사용하여 수산화아파타이트를 담체로 하는 은계 무기 항균제를 개발하였다. 원료의 반응조건이나 항균금속(은)의 함량조절을 통해서

이 논문은 2005년 중소기업청 산학연공동기술개발사업에 의하여 연구되었음

¹순천향대학교 유전공학과

²(주) 코드바이오

*교신저자: 이미영(miyoung@sch.ac.kr)

수율 및 효능을 증대시켰다. 일반세균에 대한 항균력 뿐만 아니라 피부화농성 세균인 여드름 유발 혐기성 세균에 대한 살균력을 평가함으로써 무기항균제의 응용다변화를 모색하였다.

2. 실험 방법

1) 친환경 무기 항균제의 제조

정제된 천연 패각은 (주) 드림 라인에서 제공받아 사용하였다. 패각을 열수 처리하여 잔류 염분을 제거한 후에 분쇄하여 건조 처리하였다. 패각의 입도는 10-50 mm 사이의 크기를 사용하였다. 은 분말은 순도 99%의 것을 사용하였다.

친환경성 무기항균제 제조를 위하여 인산염 용액에서 적정 pH를 유지시켜 주면서 패각을 용해시켰다. 또한 항균성 금속인 은 분말이 잘 혼합되도록 교반시켰다. 최적 은 농도를 결정하기 위하여 각각 0.01, 0.05, 0.1%의 은 분말을 패각의 증량비 대비로 첨가하여 열수 처리하였다. 또한 패각이 수산화 아파타이트로 완전히 전환되도록 최적의 온도와 압력을 설정하였다. 온도는 150-300℃로 하고 시간은 30 시간 미만으로 조절하였다. 기압은 온도에 의존하는데 20-36 kg/cm² 범위 내에서 설정하여 무기 항균제 시제품을 제조하였다.

2) 주사전자현미경 이미지

무기항균제 시료를 metal stubs에 마운팅(mounting)을 실시한 후 금으로 코팅(gold coating)하였다. 무기항균제를 주사전자현미경 (TOPCON, Japan, SM300)을 사용하여 형태를 접경하였다.

3) 무기항균제의 안전성

급성 경구 독성 시험은 미국 FDA Testing Agency {(Consumer Product Testing Co., Inc. (2247982/NWK))}에서 ASTM 1163-98에 의거하여 실시하였다. 피부 자극 시험은 급성 경구 독성 시험과 같은 실험실에서 ASTM의 방법에 의해서 실시하였다. 돌연변이원성 시험은 Micro test Laboratories, Inc.에서 *Salmonella typhimurium* TA97A, TA98, TA100, TA102, TA1535를 이용하여 실시하였다.

4) 그람 양성세균과 그람 음성세균에 대한 항균력

그람 양성균인 *S.aureus*와 그람 음성균인 *E.coli*를 각

각 tryptic soy agar 고체배지와 LB agar 고체배지에 도말하여 37℃ 호기성 조건에서 12시간 배양하였다. *S.aureus*와 *E.coli* 단일 콜로니를 취하여 각각 3 ml의 tryptic soy broth 배양액과 LB broth 배양액에 접종하여 37℃에서 12시간 동안 진탕 배양하였다. 실험군으로 무기항균제가 2%가 포함된 배지에 적절히 희석한 균을 첨가하였고, 대조군으로는 무기항균제가 포함되지 않은 배지를 사용하였으며, 37℃에서 90분간 진탕 배양하였다. *S.aureus*와 *E.coli* 실험군과 대조군 반응액 50 µl을 각각 tryptic soy agar 고체배지와 LB agar 고체배지에 도말하여 37℃에서 배양한 후 생성된 콜로니 수를 세었다. 동일한 조건에서 3회 반복실험 한 후 평균값을 사용하였다.

5) 여드름 유발균 *P.acnes*에 대한 항균력

GAM agar 고체배지에 *P.acnes*을 도말하여 37℃ 혐기성 조건에서 72시간 배양하였다. 단일 콜로니를 취하여 3 ml의 GAM broth 배양액에 접종하여 37℃ 혐기성조건에서 72시간 재 배양하였다. 5, 10, 20, 50 mg의 무기항균제를 포함한 배지에 적절히 희석된 *P.acnes* 배양액을 넣어 무기항균제를 넣지 않은 대조군과 함께 37℃ 혐기성조건으로 90분간 반응시켰다. 50 µl 반응액을 GAM agar 고체배지에 도말하여 37℃ 혐기성조건에서 72시간 배양한 후 생성된 콜로니 수를 측정하였다. 동일한 조건에서 3회 반복실험 한 후 평균값을 사용하였다.

6) 사람의 피부 여드름에 대한 항균력

GAM agar 고체배지에 사람 피부에서 멸균 면봉으로 채취한 여드름을 도말하여 37℃ 혐기성 조건에서 48시간 배양하였다. 단일 콜로니를 취하여 3 ml의 GAM broth 배양액에 접종하여 37℃ 혐기성 조건에서 48시간 재 배양하였다. 5, 10, 20, 50 mg의 무기항균제를 포함한 배지에 적절히 희석된 여드름 액을 넣어 무기항균제를 넣지 않은 대조군과 함께 37℃ 혐기성조건으로 90분간 반응시켰다. 50 µl 반응액을 GAM agar 고체배지에 도말하여 37℃ 혐기성조건에서 48 시간 배양한 후 생성된 콜로니 수를 측정하였다. 동일한 조건에서 3회 반복실험 한 후 평균값을 사용하였다.

7) 염증 억제 효능

염증반응 효소인 lipoxygenase 활성에 대한 무기항균제의 억제효능을 측정하였다. 무기항균제 (150 mg/ml)를 증류수에 균일하게 섞은 후 100 µl를 lipoxygenase 110 units가 포함된 0.1 M borate 완충액 (pH 9.0)에 첨가하였다. 30℃에서 10 분간 잘 혼합한 후 500 µM linoleic acid

를 첨가하고 234 nm에서 흡광도 변화를 측정하였다. 무기항균제에 의한 lipoxygenase 활성 억제정도를 무기항균제를 넣지 않은 대조군의 효소활성에 대한 백분율로 나타내었다.

3. 결과 및 고찰

1) 친환경 무기항균제 제조 및 전자현미경 이미지

은의 농도와 반응온도 및 압력을 다양하게 변화시키면서 무기항균제 시제품을 제조하였다. 제조한 시제품에 대하여 각각 항균효능을 평가하여 최대의 항균 효능을 가진 무기항균제가 생산되도록 생산 공정을 구축하였다.

최적은 농도는 패각의 중량 대비 0.01% -0.1%로 설정되었다. 최적 반응온도는 150 -300 °C 범위에서 설정되었고, 반응시간은 30 시간 내외, 기압은 20-36 kg/cm² 범위에서 설정되었다.

제조된 무기항균제의 주사전자현미경 이미지가 그림 1에 제시되어 있다.

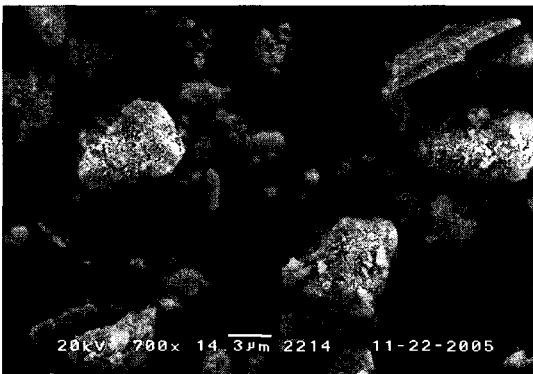


그림 1. 무기항균제의 주사전자현미경 이미지

2) 친환경 무기항균제의 안전성

항균력 평가결과 항균력이 탁월한 무기항균제 시제품을 선정해 미국 FDA Testing Agency{(Consumer Product Testing Co., Inc. (2247982/NWK))에서 ASTM 1163-98에 의거하여 급성 경구독성 시험을 실시하였으며 그 결과 Albino female rat가 사망하는 사례는 발견되지 않았고 LD50은 9g/kg 이상으로 판명되었다. 또한 Albino rabbits의 피부 접촉 시험 결과 48시간 접촉시에도 홍반 현상이 나타나지 않았다. 돌연변이원성 시험에서도 돌연변이가 발생하지 않았다. 따라서 본 무기항균제는 안전한 소재임

을 확인할 수 있었다.

3) 친환경 무기항균제의 항균력

원료 패각의 세척 조건과 일정온도에서의 압력 차이 등 다양한 반응공정으로 생산된 무기항균제 시제품을 사용하여 Gram 양성균인 *S.aureus*와 Gram 음성균인 *E.coli*에 대한 항균효능을 측정하였다 (그림 2). 생산된 항균제 시제품은 *S.aureus*와 *E.coli*에 대하여 서로 다른 항균력을 나타내었다. Gram 음성균 *E.coli*에 대해서는 P, O, M, F 등의 무기 항균제가 상대적으로 높은 항균력을 보였다. Gram 양성균 *S.aureus*에서는 M, C, E, S 등의 무기 항균제에서 높은 항균력을 보였다.

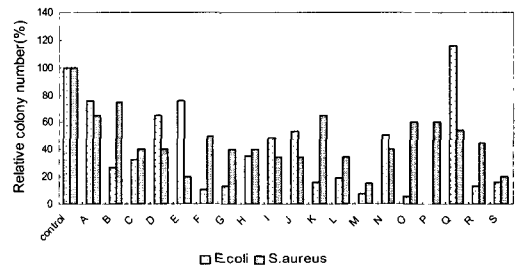


그림 2. 무기항균제에 의한 *S.aureus*와 *E.coli*의 성장 제어

4) 여드름 유발균 *P.acnes*에 대한 항균력

Gram 음성균에 대한 항균력 평가 결과 항균력이 가장 탁월한 무기항균제 'P'를 이용해 혐기성 세균인 *P.acnes* 균에 대한 항균력을 측정하였다. 피부 화농성 세균인 *P.acnes*에 대한 항균력은 무기항균제의 농도가 증가함에 따라 의존적으로 증가하였다 (그림 3). 대조군과 비교하였을 때 0.5% (5 mg/ml) 무기항균제는 약 65%의 항균력을 나타내었으며 5% (50 mg/ml) 무기항균제는 *P.acnes* 균에 대하여 약 95%의 항균력을 나타내었다. 무기항균제의 세포독성을 측정하기 위하여 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyltetrazolium bromide) 염색법을 실시한 결과 5% 무기항균제를 첨가한 후 측정된 세포생존율이 대조군과 거의 유사함을 확인할 수 있었다 (결과 미제시). 무기항균제 시제품을 대상으로 급성 경구 독성시험, 피부자극시험 및 돌연변이원성 시험을 실시한 결과 인체에의 안전성을 확보할 수 있었음을 앞에서 기술하였다. 항균력은 패각에 결합하고 있는 은 이온에 기인할 것으로 추측되며 은 이온은 단백질의 -SH기와 반응하여 미생물의 불활성화를 일으킨다고 한다[15]. 또한 은 이온은 미생물 원형질막에 있는 K⁺이온을 방출시킨다고 알려져 있으며, 미생물 DNA상의 염기와 반응함으로써

미생물의 세포분열을 방해한다는 메커니즘도 제안되고 있다[15].

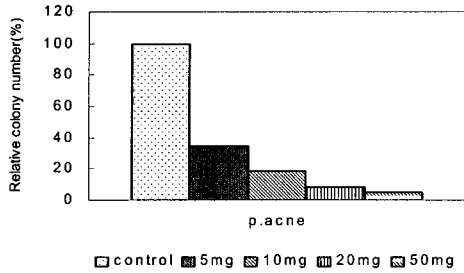


그림 3. 무기항균제에 의한 P.acnes의 성장 제어

5) 사람 피부 여드름에 대한 항균력

무기항균제 'P'의 사람 피부 여드름 액에 대한 항균력을 측정하였다 (그림 4). 사람의 피부에서 채취한 여드름 액에 무기항균제를 처리한 결과 무기항균제의 처리농도가 높아질수록 항균력도 증가하였다. 대조군과 비교하였을 때 5% (50 mg/ml) 무기항균제는 약 97%의 강력한 살균력을 나타내었다. 이러한 결과는 본 무기항균제가 사람 피부에 존재하는 여드름균 복합물을 제어할 수 있음을 보여준다.

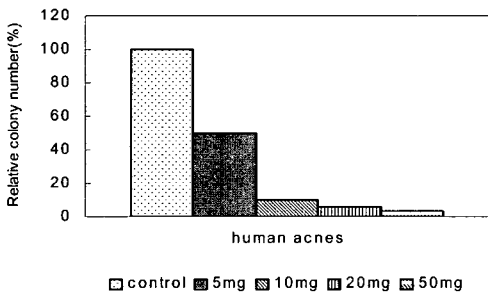


그림 4. 무기항균제가 사람 피부 여드름에 미치는 영향

6) 염증 억제 효능

Lipoxygenase는 아라키돈산으로부터 생체 내 염증반응이나 알러지에 관여하는 다양한 chemical mediator를 만드는 효소이다. 따라서 lipoxygenase 억제 효능은 항염증 효능을 측정할 수 있는 수단이 된다[14]. 그림 5에서는 무기항균제의 lipoxygenase활성 억제 효과를 보여준다.

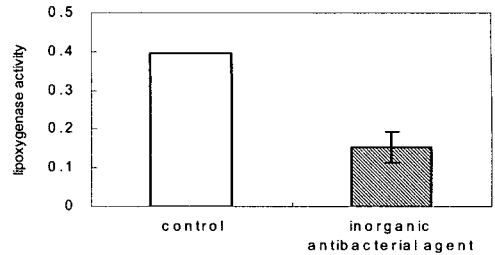


그림 5. 무기항균제에 의한 lipoxygenase 효소활성억제

대조군에 비하여 무기항균제는 약 61%이상의 lipoxygenase 활성을 억제하였으며 이러한 결과는 무기항균제가 항염증 효능을 가지고 있음을 보여준다.

본 연구에서 개발한 무기항균제는 폐기되는 해양 패각을 이용한 친환경 소재로서 다양한 세균에 대한 강력한 항균작용을 나타내었다. 또한 피부에서 채취한 여드름 액에 대해서 강력한 살균항균 효능을 보였을 뿐만 아니라 강력한 항염증효능을 나타내었다. 여드름 환자를 치료하기 위하여 전신적 혹은 국소적으로 항생제가 흔히 사용된다. 항생제 치료는 효과적이지만, 항생제의 장기 사용에 의하여 여드름 발생에 관여하는 세균이나 피부 정상균의 항생제 내성이 많이 보고되고 있다[10-12]. 따라서 본 소재는 장기적 사용에서도 항균효능을 나타내고 인체에 안전하며 세균의 내성을 일으키지 않는 친환경성 무기항균소재로 제품화가 가능할 것이다.

참고문헌

- [1] M. R. Garza, M. T. Olgún, I.G. Sosa, D. Alcántara and G. R. Fuentes, "Silver supported on natural Mexican zeolite as an antibacterial material", *Microporous and Mesoporous Materials*, 39, 431-444, 2000.
- [2] J. H. He, W. S. Ma, S. Z. Tan and J. Q. Zhao, "Study on surface modification of ultrafine inorganic antibacterial particles", *Applied Surface Science*, 241, 279-286, 2005.
- [3] T. B. Karchmer, E. T. Giannetta, C. A. Muto, B. A. Strain and B. M. Farr, "A randomized crossover study of silver-coated urinary catheters in hospitalized patients", *Arch. Intern. Med.* 160, 3294-3298, 2000.
- [4] U. Samuel and J. P. Guggenbichler, "Prevention of catheter-related infections: the potential of a new nano-silver impregnated catheter", *Int. J. Antimicrob. Agents*, 23, 75-78, 2004.

- [5] R. Kumar and H. Münstedt, "Silver ion release from antimicrobial polyamide/silver composites", *Bio-materials*, 26, 2081-2088, 2005.
- [6] A. B. Lansdown, "Silver. I: Its antibacterial properties and mechanism of action", *J. Wound Care*, 11, 125-130, 2002.
- [7] J. C. Gnanou and P. Sanders, "Antibiotic resistance in bacteria of animal origin: methods in use to monitor resistance in EU countries", *Int. J. Antimicrob. Agents*, 15, 311-322, 2000.
- [8] J. C. Harper, "An update on the pathogenesis and management of acne vulgaris", *J. Am. Acad. Dermatol*, 51, 36-38, 2004.
- [9] H. G. Ki, S. J. Yun, J. B. Lee, S. J. Kim, S. C. Lee and Y. H. Won, "Microorganisms isolated from acne and their antibiotic susceptibility", *Korean. J. Dermatol*, 43, 871-875, 2005.
- [10] J. M. Brown and S. M. Poston, "Resistance of propionibacteria to antibiotics used in the treatment of acne", *J. Med. Microbiol*, 16, 271-280, 1983.
- [11] J. J. Leyden, K. J. Mc Ginley, S. Cavalier, G. F. Webster, O. H. Mills and A. M. Kligman, "Propionibacterium acnes resistance to antibiotics in acne patients", *J. Am. Acad. Dermatol*, 8, 41-45, 1983.
- [12] I. Kurokawa, S. Nishijima and Y. Asada, "The antibiotic susceptibility of propionibacterium acnes: a 15-year bacteriological study and retrospective evaluation", *J. Dermatol*, 15, 149-154, 1988.
- [13] I. Schneider and F. Bucar, "Lipoxygenase inhibitors from natural plant sources. Part 2: medicinal plants with inhibitory activity on arachidonate 12-lipoxygenase, 15-lipoxygenase and leukotriene receptor antagonists", *Phytother Res*, 19, 263-272, 2005.
- [14] J. H. Cho, Y. M. Kim, H. T. Yoo and Y. H. Kim, "Studies on various test conditions and application of test method for lipoxygenase-1 in soybean.", *J. Crop Sci*, 42, 739-747, 1997.
- [15] A. D. Russell, F. R. C. Path and W. B. Hugo, "Antimicrobial activity and action of silver", *Prog. Med. Chem*, 31, 351-370, 1994.

이 미 영(Mi-Young Lee)

[정회원]



- 1985년 2월 : 연세대학교 생화학 과(이학사)
- 1987년 2월 : 연세대학교 생화학 과(이학석사)
- 1991년 8월 : 연세대학교 생화학 과(이학박사)
- 1992년 3월~현재 : 순천향대학교 유전공학과 교수

<관심분야>

세포 기능성 평가, 단백질체 및 유전체학

김 한 울(Han-Wool Kim)

[학생회원]



- 2003년 3월 ~ 현재 : 순천향대학교 유전공학과 4학년 재학

<관심분야>

proteomics, 응용 미생물

박 선 영(Sun-Young Park)

[정회원]



- 1987년 2월 : 전북대학교 농과대학 식품공학과 (농학사)
- 1992년 2월 : 전북대학교 농과대학 (농학석사)
- 1997년 2월 : 일본 북해도 대학교 농예화학 (농학박사)
- 2004년 3월 ~ 현재 : (주)코드바이오 대표이사

<관심분야>

Biomaterials(생체재료), 기능성 생물 소재, DDS, 인공피부 등

김 소 형(So-Hyoung Kim)

[정회원]



- 1995년 8월 : 전북대학교 식품공학과 (농학사)
- 1999년 2월 : 전북대학교 식품공학과 (농학석사)
- 2005년 1월~현재 : (주)코드바이오 부설연구소 선임연구원

<관심분야>

생체고분자, 응용미생물, 바이오 센서, 화학 반응 메카니즘 연구 등