

유기합금의 열처리조건에 따른 구성상의 제어와 최적 항균특성 측정방법의 선정

박규하* · 황대연* · 손홍주** · 최지웅*** · 김혜성***,†

*부산대학교 바이오소재과학과, **생명환경화학과, ***나노메카트로닉스공학과

The Selection of Optimum Measurement Method of Antimicrobial Activity and Constituent Phase of Yuggi Alloy according to Heat Treatment Condition

Kyu-Ha Park*, Dae Youn Hwang*, Hong-Joo Son**, Ji Woong Choi***, Hye Sung Kim***,†

*Department of Biomaterials Science (BK21 FOUR Program), College of Natural Resources and Life Science/Life and Industry Convergence Research Institute, Pusan National University, Miryang 50463, Korea

**Department of Life Science and Environmental Biochemistry/Life and Industry Convergence Research Institute, Pusan National University, Miryang 50463, Korea

***Department of Nanomechatronics Engineering, College of Nanoscience & Nanotechnology, Pusan National University, Miryang 50463, Korea

Abstract The mechanical, anti-tarnishing, and corrosion characteristics of Yuggi (Cu-22wt%Sn) alloy are greatly affected by fraction of constituent phases according to heat treatment method. The Yuggi heat-treated at 750°C has a $\beta 1'$ phase of 98% or more, which is a high-temperature disordered beta phase, on the other hand, cast Yuggi that Sn is solid-solutioned into Cu consists with α -phase over 60v/o. This difference of constituent phases of Yuggi may cause a difference in dissolution of Cu under antimicrobial test condition. Nonetheless, few studies have been conducted on the effect of fraction of constituent phases and constituent phases in antimicrobial activity. In addition, few studies have also been conducted on the suitable method measuring the antimicrobial activity of Yuggi. Hence, the purpose of this study is to provide an optimum measurement method of antimicrobial activity, and to evaluate quantitatively the effect of constituent phases on antimicrobial activity.

(Received September 2, 2021; Revised September 10, 2021; Accepted September 17, 2021)

Key words : Yuggi, Constituent phase, Antimicrobial test, $\beta 1'$ phase

1. 서 론

최근 슈퍼 박테리아의 문제가 세계적 이슈가 되면서 구리의 항균효과에 관심이 고조되고 있다. Cu-22wt%Sn 조성의 유기 합금은 구리 함량이 60% 이상인 청동합금으로서 인플루엔자 A, 노로바이러스, 사스, 메르스, 인간 코로나바이러스 (229E), 대장균, 비보리오균, O-157 균 등에 대한 살균 효과가 증명되면서 현대의 웰빙 산업과 부합되고, 다양하고 자유로운 표현이 가능한 미적인 측면이 우수하므로 광범위한 분야에서 사용되고 있다[1-11].

유기소재의 항균 메커니즘은 산화된 구리 이온이

세균에 침입하여 다른 물질을 산화·환원·전이시켜 대사를 저해함으로써 최종적으로 균을 사멸시킨다고 알려져 있다[12-15]. 구성상에 따른 항균특성의 조사는 항균특성이 용출된 구리 이온을 기반으로 하며, 구성상에 따라 구리이온 용출특성이 다를 수 있기 때문에 항균특성에 영향을 미칠 수 있음에도 불구하고, Cu-Sn 합금 계에서 항균성 특성 연구는 주로 α 용체에 국한되어 수행되었다. 본 연구에서와 같이 구성상 및 그의 분율을 제어한 후 구성상 차이 따른 항균 활성을 비교·평가한 연구결과는 거의 수행된 바 없다. 따라서 본 연구에서는 열처리 방법에 따라 구성상의 현저한 차이가 나는 Yuggi의 항균활성 측정

†Corresponding author. E-mail : hsk@pusan.ac.kr

방법에 대하여 고찰해 보고자 하였다.

2. 실험방법

2.1 구성상 제어를 위한 유기 소재의 열처리

99.99% 이상의 고순도 Cu, Sn 소재를 아르곤 가스 분위기 하에서 고주파 유도 용해법을 이용하여 용해한 후 너비 20 mm × 20 mm 두께 3 mm의 크기로 유기 소재(Cu-22wt%Sn) 모 합금을 제조하였다. 미세 구성상을 제어하기 위해 각각 560°C, 650°C, 750°C에서 10시간 동안 유지 후 퀴칭(담금질) 처리하여 미세 구성상을 제어하였다. 주조한 시료는 $\alpha+\delta$ 미세조직을 가졌으며, 560°C, 650°C, 750°C에서 담금질 처리한 시료는 각각 $\gamma+\alpha$, $\beta_1'+\alpha$, β_1' (98% 이상의 β_1')상 조직을 가졌다. 주조 및 열처리 조건에 따른 합금 분류를 이후 본문에서 각각 AC 및 HT560, HT650, HT750으로 명명하고자 한다. 광학현미경과 I-solution 프로그램을 이용하여 미세조직에 따른 구성상을 분석하였다. 유기 소재와 합금 활성 비교군으로 18wt%Cr-8wt%Ni-Fe 조성의 스테인레스 스틸 (stainless steel, SS)을 사용하였다 (Table 1 참조).

2.2 세균의 배양

본 실험에 사용된 세균은 식중독을 유발하는 그람 양성균인 *Staphylococcus aureus* ATCC6538과 그람 음성균인 *Salmonella choleraesuis* ATCC 6994이며, American Type Culture Collection(Washington, USA)으로부터 구매하여 사용하였다. 먼저, 영양한천배지 (nutrient broth 0.8%, agar 1.5%)에서 생육한 집락 (Colony, 세균이 분열을 통하여 형성한 동일세포의 집단) 하나를 면봉으로 떼어내어 영양 배지(Nutrient broth 0.8%)에 접종하여 30°C에서 18시간 동안 배

양한 배양액을 항균실험에 사용하였다.

2.3 디스크 확산 응용법(Disk diffusion application test)

디스크 확산 응용법은 이전에 일반적으로 사용되는 디스크 확산법을 기반으로 하여 디스크를 금속판으로 교체하여 수행하였다[16-17]. 먼저, 균주의 배양액 200 μ L를 영양한천배지에 도말(Spreading, 멸균된 면봉으로 세균 집락의 일부를 문힌 후 영양한천배지 표면에 문지르는 것) 하고, 그 위에 Metal plate를 올린 후, 30°C에서 18시간 동안 배양하였다. 이후 금속판(metal plate) 주위에 생성된 투명대(Clear zone, 시료 주변에 세균이 자라지 못하는 부분)의 크기를 측정하여 항균력을 평가하였다(Fig. 1(a)참조). 위 실험은 3회 반복하여 실시하였다.

2.4 표면노출 생존율 측정법(Survival rate detection method using surface exposure, SRDM)

먼저, 세균 배양액(20 μ L)을 금속 시편 표면 세 곳에 무작위로 적하하고, 시편을 30°C에서 18시간 동안 배양하였다. 이후, 배양액이 적하(Dropping, 세균 배양액을 표면 위에 일정량 떨어뜨리는 것) 된 각 부위를 50 μ L 증류수로 20회씩 세척하여 세균을 회수하였다. 확보된 세척액은 영양한천 배지에 도말하고, 다시 30°C에서 18시간 동안 배양한 후, 형성된 집락 수(Colony number)를 측정하였다(Fig. 1(b) 참조). 또한, 실험 그룹 간에 집락수를 정량적으로 비교 평가하기 위하여, 세균 배양액을 증류수(dH₂O)로 1/10배, 1/5배로 희석하여 유기시편 표면에 무작위로 세 곳에 20 μ L씩 적하하고 위와 동일한 방법으로 영양한천배지에서 집락 수를 계산하였다. 위 실험은 3회 반복하여 실시하였으며, 평균 값은 SD(Standard

Table 1. The samples for antimicrobial activity

Sample	Size (cm)	Alloy composition
SS (stainless steel)	7 × 7 × 0.2	18wt%Cr-8wt%Ni-Fe
HT 560 Cu-20wt%-Sn	4 × 7 × 0.2	Cu-22wt%Sn
HT 650 Cu-20wt%-Sn	7 × 7 × 0.2	Cu-22wt%Sn
HT 750 Cu-20wt%-Sn	4 × 7 × 0.2	Cu-22wt%Sn
Pure Cu	7 × 7 × 0.2	99% Pure Cu

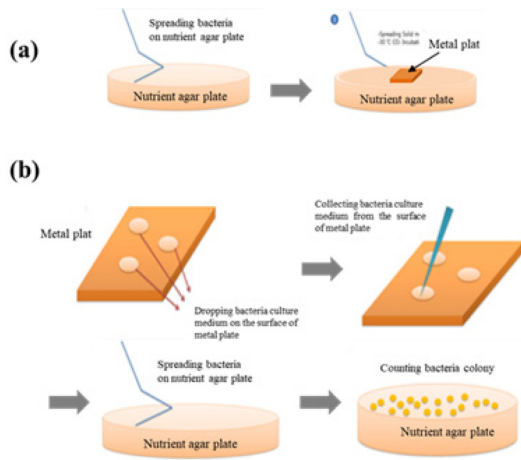


Fig. 1. Schematic diagram for disk diffusion test and SRDM. (A) Inhibition zone of disk diffusion test was observed on the surface of nutrient agar plate. (B) In SRDM, the bacteria culture media was dropped on the metal surface and incubated at 37°C for 18 h. These medium spread on the surface of nutrient agar plate and colony forming unit counted.

deviation)으로 표시하였고, 통계분석은 One-Way ANOVA(SPSS, Inc., Chicago, IL, USA)로 실시하였다.

3. 결 과

3.1 유기 소재의 열처리에 따른 구성상 및 구성상의 분율 제어

유기 합금(Cu-22wt%Sn)을 주조한 후 열처리 온도에 따라 담금질 후 구성상을 조사하면 Table 2에서 보는 바와 같이 주조 시에는 $\alpha+\delta$ 상이 존재하며, 상 분율은 α 가 57%, δ 상이 43.6%로 구성된 미세조직을 보인다(Table 2 참조). 이 주조합금을 560°C에서

열처리 후 담금질처리 하면 $\gamma'+\alpha$ 상으로 구성되고, 이때, α 상의 분율이 44% 수준으로 감소하며, 650°C에서 열처리 후 수냉 처리 후 38%의 α 상과 62%의 $\beta 1'$ 상으로 구성상 및 구성상의 분율 변화가 뚜렷하였다[18]. 특히, 750°C에서 열처리 후 담금질 처리한 경우에는 α 상이 거의 제거되고 $\beta 1'$ 상의 분율이 98%이었다(Table 2 & Fig. 2 참조). Fig. 2의 (a)는 위의 구성상과 그의 분율 차이를 보이는 유기 합금들을 3.5wt% NaCl용액에 노출 시 노출 시간에 따른 변색특성을 보여주는 것으로 α 상의 분율이 높을 때 부식에 의한 변색특성은 3.5wt%NaCl의 가혹한 부식 분위기에서 부식에 의한 변색이 3배가량 차이가 난다. 변색의 주원인은 적갈색 및 청록색 계열의 Cu_2O 산화물 형성에 기인한다. 즉 Cl^- 이온 수용액에서 $CuCl_2$ 가 형성된 후 물 (H_2O)과의 반응을 통해 Cu_2O 가 형성되는데 위 반응이 α 에서 빠르게 활성적으로 일어난다(아래의 반응식 참조). γ' 나 $\beta 1'$ 상에서는 매우 느리게 일어남을 알 수 있다. 이는 Fig. 2의 (c)에서 확연하게 확인할 수 있다. Fig. 2의 (c)는 NaCl 용액에서 1시간 노출 후 α 상의 분율 증가에 따른 변색도(ΔE) 그래프로써 구성상의 분율(volume fraction)이 증가함에 따라 변색도 (ΔE)는 선형적으로 증가하는 것을 확인할 수 있다. 즉, $\beta 1'$ 상으로 상 제어된 경우 Cu의 이온화 및 산화 반응이 크게 저하되어 변색이 거의 일어나지 않음을 확인할 수 있다. 위의 결과는 열처리에 따른 구성상 제어를 통해 변색/부식 반응을 억제할 수 있음을 보여준다.

아울러 유기소재의 항균 메커니즘이 산화된 구리 이온이 세균에 침입하여 다른 물질을 산화·환원 전이시켜 대사를 저해함으로써 균을 사멸시키므로 구성상과 그의 분율에 따른 항균특성에도 영향을 미칠 것

Table 2. Heat treatment condition and constituent phases of Cu-Sn alloy

Sample	Heat treatment condition	Constituent phases	Volume fraction of constituent phase
22Casting	As-received	$\alpha+\delta$	Primary $\alpha+\delta= 56.4 : 43.6$
22HT560	After casting, heat treated at 560°C for 10 hours followed by water quenching	$\gamma'+\alpha$	Primary $\alpha+\gamma'= 43.6 : 56.4$
22HT650	After casting, heat treated at 650°C for 10 hours followed by water quenching	$\beta 1'+\alpha$	Primary $\alpha+\beta 1'= 37.9 : 62.1$
22HT750	After casting, heat treated at 750°C for 10 hours followed by water quenching	$\beta 1'+\alpha$	Primary $\alpha+\beta 1'= 2.1 : 97.9$

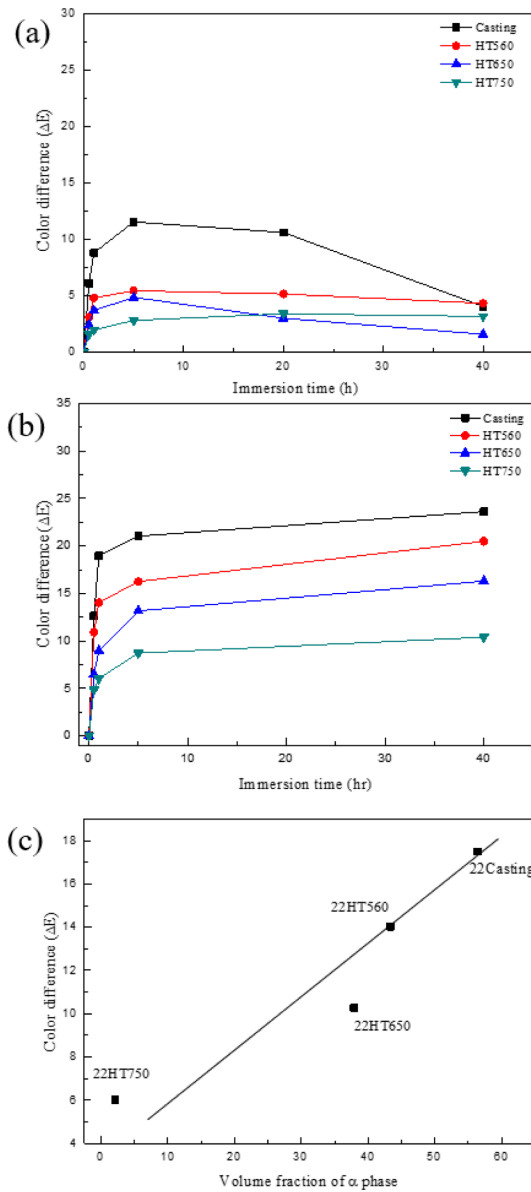


Fig. 2. Color difference of Cu-22wt%Sn alloys with different heat treatment condition in (a) 3.5wt%NaCl solution, (b) tap water and (c) color difference according to volume fraction of α -phase after immersion for 1 hr in 3.5wt%NaCl solution.

으로 사료된다.

다음 절에서 유기 소재에 가장 적합한 항균특성 측정방법을 선정하고 열처리 방법에 따른 구성상과 그의 분율 차이에 따른 항균특성을 비교해 보고자 하였다[19-20].

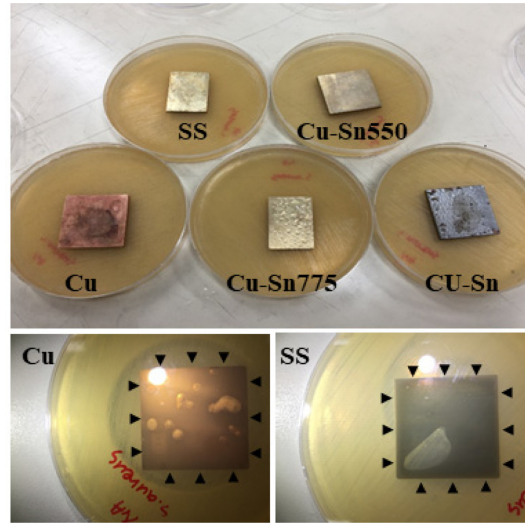
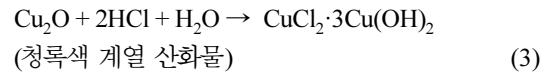
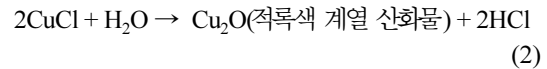


Fig. 3. Antibacterial activity of metal plate using disk diffusion application test. After incubation for 18 h, actual images of bacteria plates were taken with digital camera.



3.1 디스크 확산응용법을 이용한 유기 항균 활성 평가

디스크 확산응용법이 유기 항균 활성평가에 적용 가능한지를 분석하기 위하여, 금속판을 *S. aureus*와 *S. choleraesuis*가 도달된 한천배지의 표면 위에 배양하여 집락 수를 측정하였다. 측정결과 세균의 생장은 금속판과 접촉한 면에서 관찰할 수 없었지만, 투명 대(화살표 부분)는 형성되지 않음이 확인되었다. 또한, 유기 종류에 따른 항균성에도 차이가 없었으며, 2가지 실험군 간에도 항균특성의 차이가 없음이 확인되었다(Fig. 3 참조). 위의 결과는 디스크 확산응용법은 금속판 형태의 항균성을 평가하는 방법으로는 적절하지 않음을 제시하고 있다.

3.2 표면노출 생존율 측정법을 이용한 유기 항균 활성 평가

표면노출 생존율 측정법이 유기 항균력 평가에

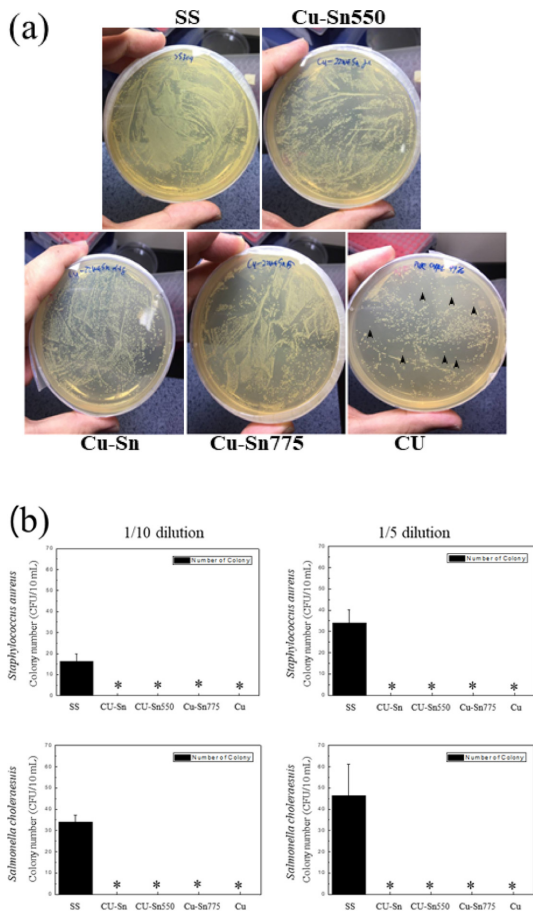


Fig. 4. Antibacterial activity of metal plates using SRDM. (a) Actual image of nutrient agar plate after SRDM. (b) CFU of *Staphylococcus aureus* and *Salmonella choleraesuis* after SRDM. The data represent the means \pm SD of three replicates. *, $P < 0.05$ compared with the SS group.

활용 가능한지 평가하기 위하여, *S. aureus*와 *S. choleraesuis* 배양액을 금속판 표면에 노출한 후 회수하여 한천배지에서 배양하여 집락 수(회살표로 표시)를 측정하였다. 먼저, 세균배양액의 원액을 금속판 표면에 노출하여 배양한 결과에서 집락은 영양한천 배지에서 정상적으로 형성되었으며, pure Cu \approx HT560 Cu-Sn \approx HT650 Cu-Sn \approx HT750Cu-Sn 775 > SS 순서로 관찰되었다. 그러나 전체적으로 생성된 집락 수가 지나치게 많아 측정이 그룹 간의 차이를 통계적으로 명확하게 확인하는 것이 어려웠다 (Fig. 4의 (a) 참조).

이러한 문제점을 해결하고, 정량적으로 측정하기

위하여 배양액의 세균수를 1/5과 1/10 희석하여 금속판의 표면에 노출시켜 한천배지에 배양하였다. 그 결과 pure Cu, HT560, HT650, HT750 Cu-Sn 유기그룹에서는 2 가지 세균 군 모두 완전하게 사멸 (death)되었으며, SS 처리 군에서만 집락이 형성되었다 (Fig. 4의 (b) 참조). 항균성 평가 시 대조군으로 사용한 SS(stainless steel)는 앞 절에서 언급한 바와 같이 18wt%Cr-8wt%Ni-Fe 합금으로써 3.5wt%NaCl 수용액 하에서도 유기합금(Cu-22wt%Sn)보다 30배가량의 고 내식 특성을 가진 합금으로 알려져 있으나, 위의 항균 실험조건에서 균주들이 최대 90% 이상 사멸되지 않고 그대로 집락을 이루는 것을 확인할 수 있었다. 위의 실험결과로부터 유기의 항균성 측정은 표면노출 생존율 측정법이 유용하며, 배양 균주의 희석배율 조율을 통하여 정량적인 평가가 가능함을 제시하고 있다.

4. 고 찰

변색 혹은 부식 특성이 우수한 $\beta 1'$ 상은 실험 환경 하에서 Cu 이온의 방출이 α 상보다 용이하지 않음을 앞 절의 Fig. 2에서 확연하게 나타낸다. 775°C에서 열처리 후 담금질처리 한 HT750시료의 미세조직은 α 상이 2% 이하로써, 98% 이상의 $\beta 1'$ 상을 갖는다. 유기조성(Cu-22wt%Sn)에서 급냉 열처리하여도 완전하게 α 상을 제어할 수 없다. 위의 항균특성 결과는 α 상의 변색/부식 특성에서 유추할 수 있다. 즉, α 상 영역에서 방출된 Cu 이온은 노출환경 (변색/부식 및 항균테스트)에서 산소와 반응을 통해 Cu_2O 산화물이 용이하게 형성되며, 초기 $\beta 1'$ 상은 비교적 안정하여 초기 노출환경에서 Cu이온 형성과 더불어 산화 반응이 억제되거나 오랜 노출 (18시간) 시간이 경과함에 따라 α 상이 Cu 이온의 형성 통로로 작용하여 점진적으로 변색·부식·항균특성을 초래하는 것으로 사료된다. $\beta 1'$ 상 $\beta 1'/\beta 1'$ 상간 계면에 Cu-편석 영역이 형성되는데 이를 통해서도 점진적인 항균특성이 발현하는 것으로 사료된다. 추후 이에 대한 추가적인 데이터 확보 및 검증이 요구된다.

아울러, 고찰된 항균특성측정 방법 중 탁도 측정법의 경우 금속 시편의 부식 정도에 따른 반복실험이 불가능하고, 탁도를 측정하기 위한 분광광도계가 필

요하다는 단점이 있어서 금속 판 유기의 항균성 실험방법으로는 적절치 않았다. 본 연구의 디스크 확산법 검증 결과, 고체 배지 위에 금속 시편을 올렸을 때, 금속 시편과 접촉한 균들은 사멸되었지만, 접촉 부위 이외의 균들은 사멸되지 않았다. 이는 금속 시편에서 구리 이온이 방출됨으로써 접촉 부위에서 살균 효과(sterilizing effect)가 나타나며, 방출된 구리 이온이 확산되지 않는 한 시편 주변부에서의 살균 효과는 유도되지 않음을 시사한다. 따라서 디스크 확산법 또한 유기의 항균측정방법으로 적절하지 않음을 확인할 수 있다. 반면 표면노출 생존율 측정을 수행한 결과, 형성된 집락 수의 차이를 통해 대조군과 항균성을 상호 비교할 수 있었다. 집락 수의 비교가 용이하지 않을 경우 증류수로 희석하는 등의 액상 조건을 변화가 가능한 것도 장점이며, 경제적이고, 실험방법이 간단하며 금속 시편의 형상이 판 형태라도 표면 연마를 통해 정확하게 항균특성 측정이 가능하다.

5. 결 론

본 연구에서는 항균특성의 효율적 평가 방법을 상호 비교·분석하고, 스테인레스(SS, stainless steel)를 대조군으로 유기의 열처리 조건을 달리하여 구성상 및 그의 분율을 제어한 후 각 유기 시료들의 항균특성을 측정, 상호 비교·평가하여 다음과 같은 결과를 도출하였다.

1. 다른 고찰 측정방법과 달리 표면 노출 생존율 측정법은 금속판(metal plate) 형태의 시료 표면에 직접 균을 적하하여 배양한 후 영양 한천배지에 이식하여 집락 수 계산을 통해 비교군 시료들의 항균특성을 정량적으로 계산하는 것이 가능하였다.
2. 표면노출 생존율 측정법에 의해 집락 수 측정결과 SS는 높은 수의 집락을 형성하였으나, 순 구리 및 구성상 및 그의 분율에 차이가 있는 유기소재들은 집락이 형성되지 않고 균주가 완전하게 사멸됨을 확인하였다.
3. 열처리 방법을 달리하여 구성상과 그의 분율을 제어한 유기 시료들의 변색/부식 특성은 α 상의 분율에 선형적으로 의존하는 데 비하여 표면노출 생존율 측정법에 따른 항균특성은 구성상과 그 분율에 따라 차이가 관찰되지 않았으며 100% 사멸하였다.

감사의 글

본 연구는 연구재단의 지원(NRF-2017M3CIB 5018722) 을 받아 수행되었습니다.

References

1. Y. Li, K. He, C. Liao, and C. Pan : Journal of Mater. Res. **27**(1) (2012) 192-196.
2. S. Pattnaik, D. B. Karunakar, and P. K. Jha : Technol., **212**(11) (2012) 2332-2348.
3. K. Lee, S. Blackburn, and S. T. Welch : Ceram. Int., **43**(1) (2017) 268-274.
4. C. M. C. C. K. Chua and C. W. L. C. Feng : Int. J. Adv. Manuf Technol., **25** (2005) 308-320.
5. H. O. U. Jixin, S. U. N. Jianjun, Z. Chengwei, T. Xuelei, and C. Xichen : Mech. Astron., **50**(4) (2007) 414-420.
6. E. T. Zeynep Taslicukur, Gözde S. Altug, Şeyda Polat, Ş. Hakan Atapek : Met. **5** (2012) 23-25.
7. V. Debut and M. Carvalho : E. Figueiredo, J. Antunes, and R. Silva : J. Cult. Herit., **19** (2016) 544-554.
8. M. B. Cortie et. al. : Metall. Trans. **22A** (2011) 421-430.
9. J. S Lee and J. S Park : J. Conser. Serv. **30**(4) (2014) 417-425.
10. J. S Lee, I. H. Jeon, and J. S. Park : J. Conser. Serv., **27**(4) (2011) 421-430.
11. J. H. Shin, J. S. Park, and D. H. Bae : Met. and Mater. Int. **17**(3) (2011) 441-444.
12. C. Dutkiewicz and H. Fallowfield : J. Appl. Microbiol. **85** (1998) 597-602.
13. Y. Pang, J. A. Patterson, and T. J. Applegate : Poult. Sci **88** (2009) 586-592.
14. S. Subhadarshini, R. Singh, D. K. Goswami, A. K. Das, and N. Ch. Das : Langmuir **35**(52) (2019) 17166-17176.
15. M. E. Villanueva, A. M. del Rosario Diez, J. A. González, C. J. Pérez, M. Orrego, L. Piehl, S. Teves, and G. J. Copello : ACS Applied Materials & Interfaces **8** (25) (2016) 16280-16288.
16. I. Wiegand, K. Hilpert, and R. E. W. Hancock : Nature Prot. **3**(2) (2008) 163-175.
17. Y. Chong, H. R. Chung, and S. Y. Lee : J. Korean Sco. Microbial. **24**(3) (1989) 217-224.
18. D. Li, P. Franke, S. Fürtauer, D. Cupid, and H. Flandorfer, **34** (2013) 148-158.
19. T. Notoya : Journal of Materials Science Letter **10** (1991) 389-391.
20. E. Cano, J. L. Polo, A. La Iglesia, and J. M. Bastidas : Corrosion Science **47**(4) (2005) 977-987.