

오징어 연골  $\beta$ -Chitosan의 항균활성최근표<sup>1</sup> · 김상무\* · 신일식강릉대학교 해양생명공학부, <sup>1</sup>강원전문대학 식품생명과학과Antimicrobial Activity of Squid Pen  $\beta$ -ChitosanGeun-Pyo Choi<sup>1</sup>, Sang-Moo Kim\* and Il-Shik ShinFaculty of Marine Bioscience and Technology, Kangnung National University, Gangneung 200-702, Korea  
<sup>1</sup>Department of Food and Life Science, Gangwon Provincial University, Gangneung 210-800, Korea

## ABSTRACT

Antimicrobial activity of  $\beta$ -chitosan manufactured from domestic squid (*Todarodes pacificus*) pen was analyzed on various bacteria, yeasts, and molds. Antibacterial activity against gram negative bacteria increased as the molecular weight of  $\beta$ -chitosan decreased regardless of deacetylation degree, but  $\beta$ -chitosan concentration did not affect greatly. Antibacterial activity of  $\beta$ -chitosan with 90% deacetylation degree and 200-220 kDa molecular weight against gram positive bacteria was the highest.  $\beta$ -chitosan had the antifungal activity on *Saccharomyces diastaticus*, but no on *Hansenula anomala*, while no activity on molds, *Aspergillus parasiticus* and *Penicillium funiculosum*, producing chitosanase. The growth of these molds was possible on 5,000 ppm of  $\beta$ -chitosan.

**Keywords:** antimicrobial activity, squid pen,  $\beta$ -chitosan, ultrasonic degradation, low molecular weight

## 서 론

키티(chitin)는 5,000개 이상의 N-acetylglucosamine 잔기가 중합된 분자량이 100만 이상인 탄수화물 유도체의 고분자이며, 게, 새우, 곤충 등의 갑피를 이루는 물질로 탄산칼슘(CaCO<sub>3</sub>) 성분과 서로 콘크리트화 하여 이들 생물들의 보호 조직을 이룬다. 또한 박테리아의 세포벽, 포자의 구조막, 균 사체, 원생동물의 포낭과 껍질 성분으로 존재하며 질죽류, 복족류, 두족류, 부족류, 곤충류 등의 동물 외에 녹조류 등의 식물계에도 널리 분포되어 있으나, 불용성이어서 그의 이용성이 크게 부각되지 못하였다. 그러나 1970년대 chitin을 진한 알카리용액 중에서 탈아세틸화한 키토산(chitosan)은 유리아민기를 가지고 있어 약산 수용액에 용해되기 때문에 최근 산업분야에 여러 가지 용도로 응용되고 있다(1-2).

Chitin과 chitosan은 구조적으로 셀룰로오스(cellulose)와 유사한 점이 많은 다당류로, 피라노오스환의 C<sub>2</sub> 위치에 셀룰로오스는 수산기, chitin은 N-아세틸기, chitosan은 아미노기로 서로 다르고 나머지는 같다. chitin의 결정구조는 채취되는 생물체의 종류와 부위에 따라 3종이 발견되었다.  $\alpha$ -Chitin은 게, 새우 등의 갑각류에서 흔히 발견되며, chitin 분자쇄가 서로 역방향성이 되어 분자내와 분자간 수소결합이 이루어지므로 결정 구조가 안정하다. 반면  $\beta$ -chitin은  $\alpha$ -chitin에 비해 그

존재량은 매우 적고 오징어 연골 등에서 발견되고 있는데, 인접하는 분자쇄끼리 서로 평행한 상태를 유지하고 있다.  $\gamma$ -Chitin의 구조는 서로 확실하게 밝혀져 있지 않다(3).

Chitin 및 chitosan은 과거에는 천연물로부터 추출 또는 분리가 용이하지 않아 어패류 가공에서 폐기물로 버려졌으나 이제는 식품을 비롯하여 이온교환체, 효소고정제, 화장품, 의약품, 토양개량제 등 다방면으로 이용되고 있다(4-7). 그 중 식품분야와 관련된 기능으로는 고분자 물질의 흡착능, 색소 흡착능, 지질 및 콜레스테롤 흡착능, 항균성, 항돌연변이성, 항산화성 등이 알려져 있으며(8-12), 또한 식품에 적용할 수 있는 chitosan의 안정성 범위는 5% 첨가수준에서 유효증상이 없다고 보고 되어 있다(13). 특히 chitosan은 자체가 갖는 아미노기 양전하의 특성으로 천연물 그 자체로서 항균력을 갖게 된다. 이를 이용한 항균성 연구로는 Allan 등(14)이 1.0 mg/ml의 chitosan이 대부분의 곰팡이의 생육을 억제하는 것을 발견하였고, Uchida(15)는 chitosan이 대장균의 증식을 상당히 억제하는 것을 보고 하였다. 조 등(16)은 식중독 병원성 세균 *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium* LT2 strain (ATCC 19585), *Listeria monocytogenes* (ATCC 10403)에 대한 증식억제 효과를 검토한 결과 고분자 및 중분자 chitosan은 증식을 억제하였으나, 저분자 chitosan은 증식억제가 미미 하였다고 하였다. 또한 김 등(17)은 항균효과가 있는 생약 제제인 세신(*Arstolchoaceae*)과 정향나무(*Engenia caryophyllata* Thunberg)에서 추출한 Safrol과 Engenol을 chitosan과 그래프트 공중합하여 chitosan 유도체에 대한 항

\*To whom all correspondence should be addressed  
Tel.: 033-640-2346; E-mail: smkim@kangnung.ac.kr

균활성 결과 유도체의 점성도 평균 분자량이 클수록 우수한 항균 활성을 나타내었으며, 투입농도는 0.5%일 때 가장 좋은 항균활성효과를 나타내었다고 하였다. 이외에도 각종 세균과 진균 등의 증식에 관한 보고도 다수 있다(18-20).

그러나 종래의 chitosan은 게나 새우에서 추출하여 만든 chitosan ( $\alpha$ -chitosan)은 수백만 내지 수십만 dalton의 전해성 고분자 물질로, 물속에서 아미노기가 양성화되어 실제로 막 전위가 발생되어 팽윤되어 아주 높은 점도를 나타내어 고농도 용액을 제조하는데 어려움이 있다. 또한 pH 6 이상이 되면 수소결합이 끊어지지 않기 때문에 colloid 상태가 되어, 용해되지 않는 단점도 가지고 있으며, pH 상승함에 따라 저분자에 비하여 항균력도 저하된다(21). 미생물 증식 억제효과는 chitosan의 농도, 점도, 분자량, 탈아세틸화도 등에 따라 영향을 받는 것으로 보고되고 있다(1). 따라서 고분자 chitosan을 화학적인 방법이나, 효소적인 방법 및 물리적인에 의하여 저분자 chitosan을 만들어 사용하고 있다(22).

따라서 본 연구에서는 오징어 연골을 화학처리 하여  $\beta$ -chitin을 제조하고, 이것을 탈아세틸화하여  $\beta$ -chitosan을 제조하였다(23). 하지만 고분자 chitosan은 분자내의 견고한 수소결합 등으로 인해 산성영역에서만 용해되는 단점을 가지고 있어, chitosan을 이용하는데 어려움이 있어, 이를 보완하기 위하여 초음파 분해로 점성도 평균분자량이 다른 6종류의 chitosan을 만들어 식품의 변패 원인 및 식중독과 관련된 세균으로 그람양성균인 *Bacillus subtilis*와 *Staphylococcus aureus*, 그람음성균인 *Escherichia coli* 및 *Vibrio parahaemolyticus*, 효모인 *Saccharomyces diastaticus* 및 *Hansenula anomala*, 곰팡이인 *Aspergillus parasiticus*와 *Penicillium funiculosom* 균들의 성장억제효과를 검토하여 식품의 보존기간 연장을 할 수 있는 식품첨가제로 활용 가능성을 타진하였다.

## 재료 및 방법

### 원료

$\beta$ -Chitosan의 제조를 위한 오징어 연골은 강릉시 주문진읍 소재 (주)독도수산의 오징어 가공 폐기물인 오징어 연골을 수세하여 40°C에서 열풍 건조하였다. 이를 50 mesh 정도로 분쇄한 후 PE 용기에 넣어 -18°C에서 보관하면서 실험재료로 사용하였다.

### $\beta$ -Chitosan의 제조

$\beta$ -Chitosan의 제조는 전보(23)의 방법에 따라 제조하였다. 한편 탈아세틸화도 측정은 Sanan 등(24)의 방법으로 하였으며, 고유점도 및 분자량 측정은 Ubbelohde형 모세관 점도계를 사용하여 상대점도를 측정한 후 고유점도를 구하고(25), 고유점도와 분자량과의 관계를 Mark-Houwink 식으로 구하였다(26). 즉, 분쇄한 오징어 연골 시료에 1 N NaOH 용액을 시료중량의 15배를 가하고, 실온에서 4시간 동안 교반하여 탈탄백하

**Table 1.** Squid pen  $\beta$ -chitosans with different molecular weight and deacetylation degree

Chitosan	Deacetylation degree (%)	Ultrasonic degradation (hr)	Concentration (%)	Molecular weight
1(A <sub>80</sub> U <sub>0</sub> Cs)	80	0	0.5	1,139,000
2(A <sub>80</sub> U <sub>1</sub> Cs)	80	1	1.0	228,000
3(A <sub>80</sub> U <sub>2</sub> Cs)	80	2	1.0	205,000
4(A <sub>90</sub> U <sub>0</sub> Cs)	90	0	0.5	1,075,000
5(A <sub>90</sub> U <sub>1</sub> Cs)	90	1	1.0	215,000
6(A <sub>90</sub> U <sub>2</sub> Cs)	90	2	1.0	194,000

고, 증류수로 수세액이 중성으로 될 때까지 수세한 후 이를 40°C에서 열풍건조하여  $\beta$ -chitin을 제조하였다.  $\beta$ -chitin 120 g에 대하여 40% NaOH 용액 2 l를 가하고 120°C에서 90 분간 탈아세틸화 처리한 다음 증류수로 수세하고 동결건조하여 고분자  $\beta$ -chitosan을 제조하였다. 이렇게 만들어진 고분자  $\beta$ -chitosan을 저분자화 하기 위하여,  $\beta$ -chitosan을 3% 초산용액에 1% 농도로 녹인 다음, 초음파발생기(Branson Co., VCX400, USA)를 이용하여 조사시간을 변화시켜 저분자  $\beta$ -chitosan을 제조하였으며 그 특성은 Table 1에 나타내었다.

### 공시균주

항균력 실험에 사용된 균주로는 세균, 곰팡이 및 효모를 사용하였으며 Table 2에 나타내었다.

### 항균력 측정

초음파로 저분자화한 오징어 연골  $\beta$ -chitosan을 3% 초산용액에 1% 농도로 녹인 다음 2 N NaOH로 pH 6.0으로 조정한다. 다음 agar well method로 항균력을 검사하였다. 즉, 항균 측정 대상균을 Brain Heart Infusion (BHI) 배지 (Difco Co., USA)에 10 ml를 접종하여 37°C에서 하룻밤 진탕 (150 rpm) 배양한 다음, 전 배양액을 다시 10 ml의 BHI 배지에 접종하여 18시간 배양하여 균 현탁액을 얻었다. 이 균 현탁액을 soft agar 5 ml에 1% 되게 희석하여 종균으로 사용하였다.

증식억제 능력을 측정하기 위하여 2~3일간 건조시킨 Muller Hinton agar plate에, 종균을 soft agar에 1% 되게 넣어 shaking 한 후 Muller Hinton agar plate에 중충한 후 20~30

**Table 2.** The kinds of microorganisms used for determining antimicrobial activity

Microorganism	Strain
Bacteria	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922
	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 10149
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923
Yeast	<i>Saccharomyces diastaticus</i> NCYC 361
	<i>Hansenula anomala</i> CBS 2872
Mold	<i>Aspergillus parasiticus</i> ATCC 20235
	<i>Penicillium funiculosom</i> ATCC 9644

분 가량 건조하였다. 한편 yeast 와 mold의 경우에는 Dextrose agar를 사용하였다. 그리고 건조된 평판에 멸균한 pasteur pipette의 뒷부분 ( $\psi$ 7 mm)으로 agar well을 만들어 항균력을 검사하고자 하는 각 농도의  $\beta$ -chitosan 시료 75  $\mu$ l를 agar well에 loading 하였다. 시료가 완전히 스며든 다음 뒤집어서 37°C에서 24시간 배양하였다. 시료의 항균력은 증식 저해환의 직경으로 나타내었다.

## 결과 및 고찰

### $\beta$ -chitosan의 분자량에 따른 항균력

초음파 처리로 저분자화 한  $\beta$ -chitosan을 3% 초산용액에 1%의 농도로 녹인 다음, 2 N NaOH로 pH 6.0으로 보정한 후 분자량에 따른 농도별 항균력을 측정된 결과를 Table 3, 4, 5, 6, 7, 8에 각각 나타내었다.

### Chitosan 1 ( $A_{80}U_0C_s$ )의 항균활성

Chitosan 1은 탈아세틸화도 80%이며 초음파 처리를 하지 않은 분자량 1,139 kDa의  $\beta$ -chitosan으로 미생물에 대한 항균활성을 Table 3에 나타내었다. Gram positive bacteria인 *Bacillus subtilis* ATCC 10149는  $\beta$ -chitosan의 투입농도 1,000 ppm에서 6 mm, 5,000 ppm에서 8.0 mm의 항균활성을 나타내었다. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923에서는 투입농도 1,000 ppm에서 5.5 mm, 5,000 ppm에서 7.0 mm의 항균활성을 나타내었다. 한편 효모인 *Saccharomyces diastaticus* NCYC 361에서는 1,000 ppm에서 6.0 mm, 5,000 ppm에서는 7.5 mm의 항균활성을 나타내었으나, *Hansenula anomala*

CBS 2872에서는 항균활성을 나타내지 않았다. 또한 gram negative bacteria인 *Escherichia coli* ATCC 25922와 *Vibrio parahaemolyticus*, 곰팡이인 *Aspergillus parasiticus* ATCC 20235와 *Penicillium funiculosum* ATCC 9644에는 항균활성이 없었다.

### Chitosan 2 ( $A_{80}U_1C_s$ )의 항균활성

Chitosan 2는 탈아세틸화도 80%, 초음파를 1시간 처리하여 분자량 228 kDa의  $\beta$ -chitosan으로, gram positive bacteria인 *B. subtilis*에서 농도 500 ppm에서 8.5 mm, 1,000 ppm에서 9.0 mm, 5,000 ppm에서 9.0 mm의 항균활성을 나타내었다(Table 4). *S. aureus*에서도 투입농도 500 및 1,000 ppm에서 9.0 mm, 5,000 ppm에서 9.5 mm의 항균활성을 나타내었다. 특이한 점은 Chitosan 1에서는 낮은 농도인 500 ppm에서 항균활성을 나타내지 않았으나, 초음파를 1시간 처리하여 chitosan 1 보다 더 저분자화 한 chitosan 2에서 높은 항균활성을 나타내었다. 효모인 *S. diastaticus*에서는 1,000 및 5,000 ppm에서 7.0 mm의 높은 항균활성을 나타내었으나, *H. anomala*에서는 chitosan 1과 동일하게 항균활성이 없었다. 하지만 gram negative bacteria인 *E. coli*에서 1,000 ppm에서 7.0 mm, 5,000 ppm에서 9.5 mm의 항균활성을 나타내었으며, *V. parahaemolyticus*에서도 1,000 ppm에서 8.0 mm, 5,000 ppm에서 9.0 mm의 높은 항균활성을 나타내었다. 한편 곰팡이인 *A. parasiticus*와 *P. funiculosum*에서는 항균활성이 없었다.

### Chitosan 3 ( $A_{80}U_2C_s$ )의 항균활성

Chitosan 3은 탈아세틸화도 80%, 초음파를 2시간 처리하

**Table 3.** Antimicrobial activity of  $\beta$ -chitosan with 80% deacetylation degree and 1,139 kDa molecular weight

$\beta$ -Chitosan concentration (ppm)	Inhibition zone (mm)							
	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>B. subtilis</i> ATCC 10149	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>Sacch. diastaticus</i> NCYC 361	<i>Han. anomala</i> CBS 2872	<i>Asp. parasiticus</i> ATCC 20235	<i>Pen. funiculosum</i> ATCC 9644
Control	0	0	0	0	0	0	0	0
5,000	- <sup>a)</sup>	-	8.0	7.0	7.5	-	-	-
1,000	-	-	6.0	5.5	6.0	-	-	-
500	-	-	+ <sup>b)</sup>	+	+	-	-	-

a), Not inhibited; b), Slightly inhibited

**Table 4.** Antimicrobial activity of  $\beta$ -chitosan with 80% deacetylation degree and 228 kDa molecular weight

$\beta$ -Chitosan concentration (ppm)	Inhibition zone (mm)							
	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>B. subtilis</i> ATCC 10149	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>Sacch. diastaticus</i> NCYC 361	<i>Han. anomala</i> CBS 2872	<i>Asp. parasiticus</i> ATCC 20235	<i>Pen. funiculosum</i> ATCC 9644
Control	0	0	0	0	0	0	0	0
5,000	9.5	9.0	9.0	9.5	7.0	- <sup>a)</sup>	-	-
1,000	7.0	8.0	9.0	9.0	7.0	-	-	-
500	+ <sup>b)</sup>	+	8.5	9.0	+	-	-	-

a), Not inhibited; b), Slightly inhibited

**Table 5.** Antimicrobial activity of  $\beta$ -chitosan with 80% deacetylation degree and 205 kDa molecular weight

$\beta$ -Chitosan concentration (ppm)	Inhibition zone (mm)							
	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>B. subtilis</i> ATCC 10149	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>Sacch. diastaticus</i> NCYC 361	<i>Han. anomala</i> CBS 2872	<i>Asp. parasiticus</i> ATCC 20235	<i>Pen. funiculosus</i> ATCC 9644
Control	0	0	0	0	0	0	0	0
5,000	7.5	7.0	7.5	8.0	6.5	- <sup>a)</sup>	-	-
1,000	7.0	7.0	-	+ <sup>b)</sup>	6.5	-	-	-
500	-	+	-	-	-	-	-	-

a), Not inhibited; b), Slightly inhibited

**Table 6.** Antimicrobial activity of  $\beta$ -chitosan with 90% deacetylation degree and 1,075 kDa molecular weight

$\beta$ -Chitosan concentration (ppm)	Inhibition zone (mm)							
	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>B. subtilis</i> ATCC 10149	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>Sacch. diastaticus</i> NCYC 361	<i>Han. anomala</i> CBS 2872	<i>Asp. parasiticus</i> ATCC 20235	<i>Pen. funiculosus</i> ATCC 9644
Control	0	0	0	0	0	0	0	0
5,000	- <sup>a)</sup>	-	8.0	7.5	7.0	-	-	-
1,000	-	-	7.0	6.0	6.0	-	-	-
500	-	-	6.0	+ <sup>b)</sup>	-	-	-	-

a), Not inhibited; b), Slightly inhibited

**Table 7.** Antimicrobial activity of  $\beta$ -chitosan with 90% deacetylation degree and 215 kDa molecular weight

$\beta$ -Chitosan concentration (ppm)	Inhibition zone (mm)							
	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>B. subtilis</i> ATCC 10149	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>Sacch. diastaticus</i> NCYC 361	<i>Han. anomala</i> CBS 2872	<i>Asp. parasiticus</i> ATCC 20235	<i>Pen. funiculosus</i> ATCC 9644
Control	0	0	0	0	0	0	0	0
5,000	7.5	8.0	10	9.5	8.5	- <sup>a)</sup>	-	-
1,000	6.0	6.5	8.5	8.0	7.5	-	-	-
500	-	+ <sup>b)</sup>	7.0	7.0	7.0	-	-	-

a), Not inhibited; b), Slightly inhibited

**Table 8.** Antimicrobial activity of  $\beta$ -chitosan with 90% deacetylation degree and 194 kDa molecular weight

$\beta$ -Chitosan concentration (ppm)	Inhibition zone (mm)							
	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>B. subtilis</i> ATCC 10149	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>Sacch. diastaticus</i> NCYC 361	<i>Han. anomala</i> CBS 2872	<i>Asp. parasiticus</i> ATCC 20235	<i>Pen. funiculosus</i> ATCC 9644
Control	0	0	0	0	0	0	0	0
5,000	10.5	10.0	8.0	8.5	8.5	- <sup>a)</sup>	-	-
1,000	8.0	9.0	+ <sup>b)</sup>	7.0	7.0	-	-	-
500	+	+	-	+	7.0	-	-	-

a), Not inhibited; b), Slightly inhibited

여 분자량 205 kDa의  $\beta$ -chitosan으로 탈아세틸화도 80%에서 가장 작은 분자량을 가지고 있는 시료이다. Table 5에서 보면 gram positive bacteria인 *B. subtilis*에서  $\beta$ -chitosan의 투입농도 500 및 1,000 ppm에서는 항균활성이 없었으나, 5,000 ppm에서는 7.5 mm의 다소 낮은 항균활성을 나타내었다. *S.*

*aureus*에서도 투입농도 500 및 1,000 ppm에서는 항균활성이 없었으나, 5,000 ppm에서는 8.0 mm의 낮은 항균활성을 나타내었다. 효모인 *S. diastaticus*에서는 1,000 ppm에서 6.5 mm, 5,000 ppm에서 6.5 mm의 항균활성을 나타내었으나, *H. anomala*에서는 chitosan 시료 1, 2와 동일하게 항균활성이 없

었다. 하지만 gram negative bacteria인 *E. coli*에서는 1,000 ppm에서 7.0 mm, 5,000 ppm에서 7.5 mm의 항균활성을 나타내었으며, *V. parahaemolyticus*에서도 1,000 ppm에서 7.0 mm, 5,000 ppm에서 7.0 mm의 항균활성을 나타내었다. 한편 곰팡이인 *A. parasiticus*와 *P. funiculosum*에서의 항균활성은 chitosan 1 및 2와 동일하게 나타나지 않았다. 일반적으로 chitosan의 항균활성은 고분자에서 저분자로 분해되면서 증가하는 경향을 나타내는데, 너무 작은 분자량의 chitosan의 항균력은 감소하는 경향이 있다. 조 등(16)의 식중독균의 증식에 미치는 chitosan 처리의 영향에서 분자량 200 kDa의 고분자 chitosan보다 40 kDa의 중분자 chitosan이 항균활성이 더욱 우수하였는데, 본 실험에서도 고분자와 중분자의  $\beta$ -chitosan의 항균활성이 더 높아, 이와 유사한 경향을 나타내었다(21). 한편 한 등(22)은 chitosan의 초음파 분해는 피라노오스환이나 아미노기에는 영향을 주지 않아, 탈아세틸화도에는 거의 영향을 미치지 않고 글루코사민 단위체 사이의 1-4 글리코사이드 결합의 절단에 의한 저분자화에만 관여한다고 하였는데, 본 실험에서 초음파를 사용하여 저분자화 하여 항균성의 차이를 실험하였는데, 초음파 사용으로 탈아세틸화에는 영향을 미치지 않고 분자량 변화에만 영향을 주어 항균활성의 차이를 나타낸 것으로 생각된다.

#### Chitosan 4 ( $A_{90}U_0C_5$ )의 항균활성

Chitosan 4는 탈아세틸화도 90%, 초음파를 처리하지 않은 분자량 1,075 kDa의  $\beta$ -chitosan이다. Table 6에서 gram positive bacteria인 *B. subtilis*에서  $\beta$ -chitosan의 투입농도 500, 1,000 및 5,000 ppm에서 각각 6.0, 7.0 및 8.0 mm의 항균활성을 나타내었다. *S. aureus*에서는 투입농도 1,000 ppm에서 6.0 mm, 5,000 ppm에서 7.5 mm의 항균활성을 나타내었으며, 효모인 *S. diastaticus*에는 1,000 ppm에서 6.0 mm, 5,000 ppm에서는 7.0 mm의 항균활성을 나타내었으나, *H. anomala*에는 chitosan 시료 1, 2, 3과 동일하게 항균활성을 나타내지 않았다. 또한 gram negative bacteria인 *E. coli* 및 *V. parahaemolyticus*, 곰팡이인 *A. parasiticus* 및 *P. funiculosum*에서는 항균활성이 없었다. 일반적으로 chitosan의 항균활성은 탈아세틸화도가 높을수록 항균활성이 우수한 것으로 평가되고 있는데, chitosan 1의 80% 탈아세틸화한 시료보다 90% 탈아세틸화도의 chitosan 4의 항균활성이 더 우수한 것도 같은 원리가 적용되어 진다고 본다(27).

#### Chitosan 5 ( $A_{90}U_1C_5$ )의 항균활성

Chitosan 5는 탈아세틸화도 90%, 초음파를 1시간 처리하여 분자량 215 kDa의  $\beta$ -chitosan이다. Table 7에서 gram positive bacteria인 *B. subtilis*에서  $\beta$ -chitosan의 투입농도 500 ppm에서 7.0 mm, 1,000 ppm에서 8.5 mm, 5,000 ppm에서 10.0 mm의 항균활성을 나타내었다. *S. aureus*에서도 투입농도 500 ppm에서 7.0 mm, 1,000 ppm에서 8.0 mm, 5,000 ppm에서 9.5 mm의 항균활성을 나타내었다. 효모인 *S. diastaticus*

에서는 500 ppm에서 7.0 mm, 1,000 ppm에서 7.5 mm, 5,000 ppm에서 8.0 mm의 항균력을 나타내었으나, *H. anomala*에서는 chitosan 시료 1, 2, 3, 4와 동일하게 항균활성을 나타내지 않았다. 하지만 gram negative bacteria인 *E. coli*에서는 1,000 ppm에서 6.0 mm, 5,000 ppm에서 7.5 mm의 항균력을 나타내었으며, *V. parahaemolyticus*에서도 1,000 ppm에서 6.5 mm, 5,000 ppm에서는 8.0 mm의 높은 항균활성을 나타내었다. 한편 곰팡이인 *A. parasiticus* 및 *P. funiculosum*에서는 항균활성이 없었다. Chitosan 5는 chitosan 2 보다 탈아세틸화도가 조금 높고 분자량은 약간 작았는데 효모에서는 항균활성이 약간 높았으며, 세균에서는 항균활성이 약간 낮았다. 이러한 결과로 세균에 대한 항균활성은 탈아세틸화도보다 분자량이 더 큰 영향을 미치는 것으로 생각된다.

#### Chitosan 6 ( $A_{90}U_2C_5$ )의 항균활성

Chitosan 6은 탈아세틸화도 90%, 초음파로 2시간 처리하여 분자량 194 kDa로 저분자화 한  $\beta$ -chitosan으로 탈아세틸화도가 가장 높고, 분자량은 가장 작은 시료이다. Table 8에서 gram positive bacteria인 *B. subtilis*에서  $\beta$ -chitosan의 투입농도 500 및 1,000 ppm에서는 항균활성이 없었으나, 5,000 ppm에서는 8.0 mm의 낮은 항균활성을 나타내었다. *S. aureus*에서도 투입농도 500 ppm에서는 항균활성을 나타내지 않았으나, 1,000 ppm에서 7.0 mm, 5,000 ppm에서 8.5 mm의 항균활성을 나타내었다. 효모인 *S. diastaticus*에서는 500 및 1,000 ppm에서 7.0 mm, 5,000 ppm에서는 8.5 mm의 항균활성을 나타내었으나, *H. anomala*에서는 chitosan 시료 1, 2, 3, 4, 5와 동일하게 항균활성이 없었다. 하지만 gram negative bacteria인 *E. coli*에서 1,000 ppm에서 8.0 mm, 5,000 ppm에서 10.5 mm의 항균활성을 나타내었으며, *V. parahaemolyticus*에서도 1,000 ppm에서 9.0 mm, 5,000 ppm에서 10.0 mm의 항균활성을 나타내었다. 한편 곰팡이인 *A. parasiticus*와 *P. funiculosum*에서의 항균활성은 chitosan 시료 1, 2, 3, 4, 5와 동일하게 나타나지 않았으며, chitosan 시료 6의 항균활성이 가장 우수하였다.

Chitosan의 항균기능은 양이온화된 아미노기와 저분자화된 chitosan에 의해 발휘되는 것으로 알려져 있다. 양이온화된 chitosan의 아미노기와 미생물의 세포벽을 구성하는 sialic acid 및 phospholipid 등의 음전하간에 이온결합이 일어나 세포막 중의 인지질의 극성화로 접촉면 반대측의 세포막 조직이 파괴되고 그로 인해 세포내의 원형질이 누출되어 미생물의 성장을 억제하는 것으로 알려져 있으며(27), chitosan이 저분자로 되어 미생물의 세포내로 들어가 유전자 DNA에서 RNA로 전사를 방해하여 생육저해를 일으키는 것으로 판명되고 있다는 결과(28)와 일치하는 것으로 나타났다. 또한 본 실험에서도 그람양성균에서 그람음성균보다 chitosan의 항균활성이 우수하였는데, 그람양성균이 그람음성균보다 chitosan에 보다 민감한 것은 그람음성균의 세포벽은 그람양성균보다 peptidoglycan 층이 얇고 그 외층에 외막이라 불리는 리포다

당과 인지질로 구성된 층이 있고, 리포단백질로 결합되어 있어 외막은 여러 가지 약품으로부터 세균을 보호하기 때문에 일반적으로 그람음성균이 약제에 대해 감수성이 낮은 것으로 알려져 있는 이론과 일치하는 결과이다(27-29). 최근 chitosan을 섬유산업에 응용하여 “키토폴리(CHTOPOLY)”라는 상품명으로 일본 후지사에서 항균섬유를 만들어 이용하고 있으며(30), baquette의 저장성(31), 육수내 병원균 억제(32) 등에 chitosan이 매우 다양하게 이용되고 있다. 새우나 게껍질에서 추출되는  $\alpha$ -chitin은 결정구조가 치밀하여 유기용제에 대한 용해성이 매우 낮은 반면에, 오징어 등에서 추출되는  $\beta$ -chitin은 결정구조가 비교적 느슨하여 유기용제에 대한 용해성이 비교적 크다(30). 이러한 이유에서 폐기물로 버려지는 오징어 연골에서 추출한  $\beta$ -chitosan의 이용성이 크게 확대될 것을 기대하여 본다.

## 요 약

오징어 연골에서 추출한  $\beta$ -chitosan의 항균활성을 검토하였다. Gram negative bacteria의 경우, 탈아세틸화도에 관계 없이 분자량이 작아짐에 비례하여 항균활성이 증가하였으며 농도에 따른 차이는 거의 없었다. Gram positive bacteria의 경우 gram negative bacteria는 달리 탈아세틸화도가 높은 90%  $\beta$ -chitosan이 항균활성이 가장 높았으며, 분자량은 200~220 kDa의 chitosan이 항균활성이 높았다. Yeast의 경우 *Saccharomyces diastaticus* (NCYC361)에서는 항균활성이 있었으나 *Hansenula anomala* (CBS2872)에서는 항균활성이 없었다. Mold의 경우 *Aspergillus parasiticus* (ATCC20235)와 *Penicillium funiculosum* (ATCC9644) 등 chitosan 분해효소를 생산하는 진균류에는 항균활성이 없었으며, 심지어 5,000 ppm 높은 농도에서도 증식이 가능하였다.

## 감사의 글

본 연구논문은 2001년도 한국과학재단 지역협력연구센터 사업(한림대 실버생활산업기술연구센터(R12-2001-047-03004-0)의 지원에 의해 얻은 결과이므로 이에 감사드립니다.

## 참고문헌

- Kendra, D. F. and Hadwiger, L. A.: Characterization of the smallest chitosan oligomer that is maximally antifungal to *Fusarium solani* and elicits pisatin formation in *pisum sativum*, *Exp. Mycol.*, **1984**, 8, 276-281
- Muzzarelli, R. A. A., Barontini, G., and Rocchetti, R.: Immobilized enzyme on chitosan columns:  $\alpha$ -chymotrypsin and acid phosphatase, *Biotechnol. Bioeng.*, **1976**, 18, 1445-1452
- Shin, Y. S. and Min, K. T.: Antimicrobial properties and application of Chitin/Chitosan. *Polymer Science and Technology*, **1997**, 8(5), 591-595
- Bissett, F. and Sternberg, D.: Immobilization of *Aspergillus*  $\beta$ -glucosidase on chitosan. *Appl. Environ. Microbiol.* **1987**, 35(4), 750-755
- 三田康藏: 키토산의性質と化粧品原料としての利用, 別冊 フードケミカル -1, 키토산/키토산의科學, 食品科學新聞社, pp. 70-78 (1987)
- 平野茂博: 키토산, 키토산의科學, 高分子加工, **1986**, 35(9), 28-34
- 外山章夫: Chitinとその誘導体の有効利用研究, 食品加工技術, **1984**, 4(4), 215-222
- Sudarshan, N. R., Hoover, D. G., and Knorr, D.: Antimicrobial action of chitosan. *Food Biotechnology*, **1992**, 6, 257-272
- Suzuki, K., Mikami, T., Okawa, Y., Tokoro, A., Suzuki, S., and Suzuki, M.: Antitumor effect of hexa-N-acetylchitohexaose and chitohexaose. *Carbohydr. Res.*, **1986**, 151, 403-408
- Yamaguchi, H.: Application of chitin-chitosan to food and medicine fields. *Shokuhin to kaihatu*, **1986**, 21, 20-23
- Fang, S. W., Li, C. F., and Shin, Y. C.: Antifungal activity of chitosan and its preservative on low-sugar candies. *Kumauat. J. Food Prot.*, **1994**, 57, 136-140
- Shin, D. H., Kim, M. S., Bae, K. S., and Kho, Y. H.: Identification of putrefactive bacteria related to soybean curd. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **1992**, 24, 29-30
- Landes, D. R. and Bough, W. A.: Effect of chitosan-coagulating agent for food processing wastes in diet of rats on growth and liver and blood consumption. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **1976**, 15, 555-564
- Allan, C. R. and Hadwiger, L. A.: The fungicidal effect of chitosan on fungi of various cell composition. *Exp. Mycol.*, **1979**, 2, 285-287
- Uchida, Y.: Antimicrobial activities of chitin and chitosan. *Food Chemical*, **1988**, 2, 22-29
- Jo, G. H., Jin, Y. L., Chin, K. B., and Park, R. D.: Effect of chitosan on the growth of food-poisoning bacteria. *J. Chitin Chitosan*, **2002**, 7(4), 219-224
- Kim, J. J., Ryoo, H. J., Jung, B. O., and Park, D. K.: Antimicrobial activity of Saffrolechitosan and Eugenolchitosan. *J. Chitin Chitosan*, **2003**, 7(4), 45-51
- Jung, B. O., Chung, S. J., and Lee, G. W.: Effect of molecular weight of chitosan on its antimicrobial activity. *J. Chitin Chitosan*, **2002**, 7(4), 231-236
- Seo, H. and Kinemura, Y.: Preparation and some properties of chitosan porous beads, in *Proceeding from the 4th International Conference on Chitin and Chitosan*, Vol. 4, pp. 585-588, Trondheim, Norway (1988)
- Uchida, Y., Izume, M., and Ohtakara, A.: Purification and enzymatic properties of chitosanase from *Bacillus* sp. No.7-M. *Bull. Fac. Agr. Saga Univ.* **1989**, 66, 105-116
- Yun, Y. S., Kim, K. S., and Lee, Y. N.: Antibacterial and antifungal effect of chitosan. *J. Chitin Chitosan*, **1999**, 4, 8-14
- Han, Y. S., Kim, K. S., Lee, Y. N., and Cho, S. H.: Ultrasonic

- degradation of chitosan. *J. Chitin Chitosan*, **1999**, *4*, 1-7
23. Kim, S. M., Park, S. M., Choi, H. M., and Lee, K. T.: Rheological properties of chitosan manufactured from the pens of domestic and foreign squid. *J. Korean Fish. Soc.*, **1997**, *30*(5), 859-867
  24. Sanan, T., Kurita, K., Ogura, K., and Iwakura, Y.: Studies on chitin: 7. I.R. spectroscopic determination of degree of deacetylation. *Polymer*, **1978**, *19*, 458-459
  25. Rebek, J. P.: Experimental methods in polymer chemistry. A Wiley-Interscience Pub., New York, **1989**, pp 123-141
  26. Roberts, G. A. F. and Domszy, J. G.: Determination of the viscometric constants for chitosan. *Int. J. Bio. Macromol.*, **1982**, *4*, 374-377
  27. Saito, K., Shimojoh, M., and Fukushima, K.: Growth inhibition of chitosan from squid pen against oral *Streptococci*. Chitin, Chitosan report, p. 77-79, Japan (1994)
  28. Uchida, Y. and Ohtakara, A.: Chitosan from *Bacillus* species, p. 161, 501, Academic Press. New York (1998)
  29. Sudharshan, N. R., Hoover, D. G., and Knorr, D.: Antibacterial action of chitosan. *Food Biotechnology*, **1992**, *6*, 257-272
  30. Ko, S. W. and Cho, Y. W.: Chitin or chitosan blends and their applications. *Polymer Sci. and Tech.*, **1997**, *8*(5), 538-545
  31. Park, I. K., Lee, Y. K., Kim, M. J., and Kim, S. D.: Effect of surface treatment with chitosan on shelf-life of baguette. *J. Chitin Chitosan*, **2002**, *7*(4), 208-213
  32. Lee, C. S., Cho, S. H., Kim, K. S., and Lee, Y. N.: Antibacterial activity of low molecular chitosans on enteropathogens in meat broth. *J. Chitin Chitosan*, **2001**, *6*(1), 22-25
- (2003년 8월 1일 접수, 2003년 9월 1일 채택)