(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0123131
(43) 공개일자 2014년10월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/722 (2006.01) *A61P 31/04* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-0039380
(22) 출원일자 2013년04월10일
심사청구일자 2013년04월10일

(71) 출원인
순천대학교 산학협력단
전라남도 순천시 매곡동 315
(72) 발명자
나재운
전남 순천시 왕지3길 36, 101동 1106호 (왕지동, 롯데캐슬아파트)
장미경
전남 순천시 봉화로 47, 101동 501호 (조곡동, 정원넥스빌아파트)
박성철
광주 북구 삼정로 50, 302동 1103호 (두암동, 두암주공3단지아파트)
(74) 대리인
이원희

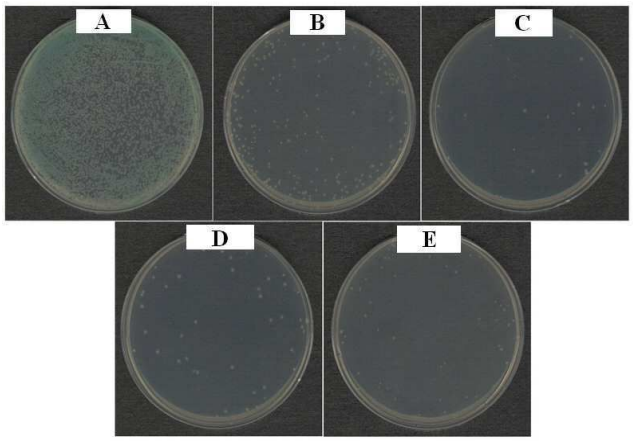
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 **저분자 수용성 β-키토산 또는 이의 유도체를 유효성분으로 함유하는 항균용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 저분자 수용성 β-키토산 또는 이의 유도체를 유효성분으로 함유하는 항균용 조성물에 관한 것으로, 본 발명에 따른 항균용 조성물은 천연물로부터 유래된 500 내지 20000 달톤의 저분자 수용성 β-키토산 또는 이의 유도체를 유효성분으로 함유하여 체내 흡수가 빠르고, 항체 형성이 이루어지지 않으며, 세포독성이 현저히 낮아 인체에 안전하다. 또한, 다양한 병원성 박테리아에 대하여 우수한 항균 효과가 있으므로 식품첨가제, 살균제, 소독제, 세제, 탈취제, 건강기능성 식품 등 항균 효과가 요구되는 다양한 분야에 사용되는 항균용 조성물로 유용하게 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도8



이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2012R1A2A2A01014898
부처명 교육과학기술부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 중견연구자지원사업
연구과제명 해양자원을 이용한 자연친화적 항적제조 개발
기 여 율 1/1
주관기관 순천대학교 산학협력단
연구기간 2012.05.01 ~ 2015.04.30

특허청구의 범위

청구항 1

500 내지 20000 달톤의 저분자 수용성 β-키토산 또는 이의 유도체를 유효성분으로 함유하는 항균용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 β-키토산은 5000 내지 10000 달톤인 것을 특징으로 하는 항균용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 유도체는 글루코스의 2번 탄소 아미노기(-NH_2) 또는 6번 탄소 알코올(-OH)기가 카복시메틸, 하이드록시메틸, 하이드록시프로필 또는 하이드록시프로필에테르로 치환되는 것을 특징으로 하는 항균용 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 조성물은 리스테리아 모노사이토제네스(*Listeria monocytogenes*, ATCC 19115), 스태필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*, ATCC 25923), 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*, KTCT 1918) 및 스트렙토코커스 에피더미디스(*Streptococcus epidermidis*, KCTC 3096)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 그람 양성균; 또는 대장균(*Escherichia coli*, ATCC 25922), 대장균 O-157(*Escherichia coli O-157*, ATCC 43895), 비브리오 블리피커스(*Vivrio vulnificus*, ATCC 29307), 슈도모나스 에루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*, KCTC 1637) 및 살모넬라 티피뮤리움(*Salmonella typhimurium*, KCTC 1926)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 그람 음성균에 대하여 항균 효과를 가지는 것을 특징으로 하는 항균용 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 항균용 조성물은 식품첨가제, 살균제, 소독제, 세제 또는 탈취제 용도로 사용되는 것을 특징으로 하는 항균용 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 세제는 주방세제, 세탁세제, 야채·과일세척제 및 손 세정제로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종인 것을 특징으로 하는 항균용 조성물.

청구항 7

제1항의 저분자 수용성 β-키토산 또는 이의 유도체를 유효성분으로 함유하는 세균에 의하여 발병되는 감염성 질환의 예방 또는 개선용 건강기능성 식품 조성물.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 저분자 수용성 β-키토산 또는 이의 유도체를 유효성분으로 함유하는 항균용 조성물에 관한 것으로, 구체적으로 500 달톤 내지 20000 달톤의 저분자 수용성 β-키토산 또는 이의 유도체는 박테리아에 대하여 우수한 항균 활성을 나타내고, 저분자 형태이므로 흡수가 유리하며, 체내에서 항체를 형성하지 않을 뿐만 아니라, 세포독성으로부터 안전하므로 인체에 안전한 항균용 조성물로 유용하게 사용될 수 있다.

배 경 기 술

[0002] 항균제란 통상적으로 항미생물제를 총칭하는 것으로, 특히 세균에 대한 항균작용을 하는 물질, 상세하게는 세균이 세포벽이나 단백질 등을 합성하는 시스템을 저해시킴으로써 뛰어난 항균작용을 하는 물질 또는 이러한 물질로부터 제조된 것을 의미한다. 항균제의 성분은 주로 곰팡이로부터 추출된 것이 주를 이루었으며, 오늘날 세균 감염에 의한 질병 등을 치료하기 위해 많이 사용되고 있다. 가장 대표적인 항균제로는 영국인 의사 알렉산더 플레밍이 1928년에 제조한 페니실린이다. 페니실린은 인류가 세균에 본격적으로 대응하기 위해 제조한 최초의 항균제였다. 페니실린 이후에 개발된 대표적인 항균제로는 페니실린보다 효과가 탁월한 것으로 인정되는 메티실린(methicillin)이 있다. 메티실린은 페니실린의 화학구조를 일부 변경하여 제조한 것이다.

[0003] 항균제 내성세균이란 특정 항균제에 내성을 보여 약효가 듣지 않는 세균을 말한다. 예를 들어, 상기한 페니실린의 약효가 전혀 듣지 않는 페니실린 내성 황색포도상구균이 이에 해당된다. 이 외에도, 1961년 최초로 학계에 보고되었으며, 그 후로 전 세계적으로 주요 병원성 감염균이 되고 있는 메티실린 내성 황색포도상구균(Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus, MRSA)이 있다.

[0004] 이와 같은 기존 화학물질 유래 항균제에 대한 내성을 가진 병원성 미생물로 인한 감염이 증가될 뿐만 아니라, 최근에는 기존 화학물질 유래 항균제의 경우 부작용과 내성이 문제되어, 천연물 유래 항균 물질에 대한 개발의 요구가 증대되면서, 천연물을 이용한 여러 약품 또는 항균제를 개발하려는 시도가 활발하게 진행되고 있다.

[0005] 한편, 키틴은 게, 새우 등의 갑각류, 크릴의 피각, 투구풍뎅이, 메뚜기 등 곤충류의 갑피, 오징어의 뼈, 세균의 세포벽 등에 존재하며, 셀룰로오스 다음으로 풍부한 생체 고분자 화합물이다. 키틴과 키토산은 결정구조에 따라 α-키틴, β-키틴 및 γ-키틴으로 분류되는데, α-키틴은 게, 새우, 가재 등의 갑각류의 껍질에서 흔히 발견되고 키틴 분자쇄가 서로 역방향이 되어 분자와 분자 간 수소결합이 이루어지므로 결정 구조가 교차구조로 안정한 반면, β-키틴은 오징어 연골 등에서 발견되고 α-키틴에 비해 그 존재량이 매우 적으며, 인접하는 분자쇄 간 서로 평행한 상태를 유지하고 있다(비특허문헌 1 및 비특허문헌 2). 구조의 키틴은 오징어 연골 등에서 발견되고 알파 구조에 비해 그 존재량이 매우 적으며, 인접하는 분자쇄간 서로 평행한 상태를 유지하고 있다(비특허문헌 1 및 비특허문헌 2). γ-구조의 키틴은 곤충의 갑각에 주로 존재하며, 그 구조가 완전히 규명되지는 않았으나 1 개의 교차 및 2 개의 평행이 혼재되어 존재하는 구조로 구성되어 있다(비특허문헌 3).

[0006] 상기 키틴을 탈아세틸화하여 제조되는 키토산은 큰 분자량, 키토산 분자 내에 존재하는 양전하, 필름 형성력, 생체적합성, 생분해성, 중금속 흡착, 겔화 성질 등의 특성을 가지는 것이 알려지면서 생명공학, 제약, 폐수처리, 화장품, 식품공업 등의 다양한 분야에서 키틴 및 키토산의 응용에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다(비특허문헌 4 내지 비특허문헌 7).

[0007] β-키틴 및 β-키토산은 자연계에서 생성되는 키틴 및 키토산의 대부분이 α-키틴 및 α-키토산이므로 상대적으로 그 양은 현저히 적다. 이는 β-키틴 및 β-키토산 분자 내의 분자 간 상호작용이 약하여 α-키틴에 비하여 느슨한 결합 구조를 갖는데, 이러한 구조적 이유로 β-키틴 및 탈아세틸화된 β-키토산은 특별한 공정이 수행되

지 않을 시 구조의 변화가 심하여 α-키틴으로 변형되기 때문이다. 이러한 자연계로부터의 낮은 존재량 및 구조적 불안정성으로 인하여 현재까지 주로 α-키틴 및 키토산에 대한 연구가 집중되었으나, β-키틴 및 키토산이 α-키틴 및 키토산에 비하여 우수한 생리활성을 갖는 것이 알려지면서, 이에 대한 연구도 활발히 진행되고 있다.

[0008] 먼저, β-키틴 및 β-키토산의 추출 및 이들의 탈아세틸화와 관련된 특성에 대한 연구가 발표된 바 있다(비특허문헌 8). 또한, 오징어로부터 추출된 저분자량 β-키토산이 갖는 환원력, 항산화력, 포집력 등의 물성에 대한 연구 및 흰오징어 및 대만 오징어로부터 유래된 β-키토산의 열적 스트레스에 대한 안정성, 탈아세틸화된 생성물의 점도-평균 분자량(viscosity-average molecular weight), 광학활성 관측 평가 등과 관련된 물성에 대한 연구가 발표된 바 있다(비특허문헌 9 및 비특허문헌 10).

[0009] 이에, 본 발명자들은 천연물 유래 항균 물질을 연구하던 중, 500 달톤 내지 20000 달톤의 저분자 수용성 β-키토산에서 병원성 박테리아에 대한 항균 활성이 나타나고, 독성이 없음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0010] (비특허문헌 0001) R. Minke, J. Blackwell., Journal of Molecular Biology (1978) 120, 167-181;

(비특허문헌 0002) K. H. Gardner, J. Blackwell., Biopolymers (1975) 14, 1581-1595;

(비특허문헌 0003) K. M. Rudall., Advances in Insect Physiology (1963) 1, 257-313;

(비특허문헌 0004) L. Illum., Pharmaceutical Research (1998) 15, 1326;

(비특허문헌 0005) Y. C. Chung, H. L. Wang, Y. M. Chen, S. L. Li., Bioresource Technology, (2003) 88, 179-184;

(비특허문헌 0006) F. Devlieghere, A. Vermeulen, J. Debevere., Food Microbiology, (2004) 21, 703-714;

(비특허문헌 0007) E. S. Abdou, K. S. A. Nagy, M. Z. Elsabee., Bioresource Technology (2008) 99, 1359-1367;

(비특허문헌 0008) J. Huang, D. Zhao, S. Hu, J. Mao, L. Mei., Carbohydrate Polymers (2012) 87, 2231-2236;

(비특허문헌 0009) A. Chandumpai, N. Singhpibulporn, D. Faroongsarng, P. Sornprasit., Carbohydrate Polymers (2004) 58, 467-474.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 본 발명의 목적은 저분자 수용성 β-키토산 또는 이의 유도체를 유효성분으로 함유하는 항균용 조성물을 제공하는데 있다.

[0012] 본 발명의 다른 목적은 저분자 수용성 β-키토산 또는 이의 유도체를 유효성분으로 함유하는 항균용 조성물을 포함하는 세균에 의하여 발병되는 감염성 질환의 예방 또는 개선용 건강기능성 식품 조성물을 제공한다.

과제의 해결 수단

[0013] 상기 목적을 달성하기 위하여,

[0014] 본 발명은 저분자 수용성 β-키토산 또는 이의 유도체를 유효성분으로 함유하는 항균용 조성물을 제공한다.

[0015] 또한, 본 발명은 저분자 수용성 β-키토산 또는 이의 유도체를 유효성분으로 함유하는 항균용 조성물을 포함하는, 세균에 의하여 발병되는 감염성 질환의 예방 또는 개선용 건강기능성 식품 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0016] 본 발명에 따른 항균용 조성물은 천연물로부터 유래된 500 내지 20000 달톤의 저분자 수용성 β-키토산 또는 이의 유도체를 유효성분으로 함유하여 체내 흡수가 빠르고, 항체 형성이 이루어지지 않으며, 세포독성이 현저히 낮아 인체에 안전하다. 또한, 다양한 병원성 박테리아에 대하여 우수한 항균 효과가 있으므로 식품첨가제, 살균제, 소독제, 세제, 탈취제, 건강기능성 식품 등 항균 효과가 요구되는 다양한 분야에 사용되는 항균용 조성물로 유용하게 사용될 수 있다.

[0017]

도면의 간단한 설명

[0018] 도 1은 본 발명에 따른 실시예 2 및 비교예 6에서 제조된 저분자 수용성 아민 키토산의 대장균 O-157(*E.coli O-157*)에 대한 처리시간별 세균사멸 동력학을 도시한 그래프이다.

도 2는 본 발명에 따른 저분자 수용성 아민 β-키토산의 인간 적혈구 세포(hRBC)에 대한 용혈작용률을 나타낸 그래프이다; A: 키토산의 처리 농도에 따른 용혈률을 나타낸 것, B: 키토산의 처리 농도에 따른 인간 적혈구 세포(hRBC)의 생존률을 나타낸 것이다.

도 3은 본 발명에 따른 실시예 2 및 비교예 2에서 제조된 저분자 수용성 아민 키토산의 pH에 따른 인공 세포막의 변형정도를 형광강도 변화를 기준으로 도시한 그래프이다.

도 4는 본 발명의 저분자 수용성 아민 β-키토산에 의한 대장균(*E. Coli*) 세포막의 변형을 주사전자현미경으로 관찰한 사진이다; A: 저분자 수용성 β-키토산이 처리되지 않은 대장균(*E. Coli*), B: 저분자 수용성 β-키토산이 처리된 대장균(*E. Coli*)이다.

도 5는 본 발명의 저분자 수용성 아민 β-키토산에 의한 슈도모나스 에루기노사(*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853)의 전형성된 생물막(preform biofilm) 저해활성을 농도별로 595 nm에서 광흡수도를 측정하여 도시한 그래프이다.

도 6은 본 발명의 저분자 수용성 아민 β-키토산에 의한 슈도모나스 에루기노사(*Pseudomonas aeruginosa* BMP-Pa001)의 전형성된 생물막(preform biofilm) 저해활성을 농도별로 595 nm에서 광흡수도를 측정하여 도시한 그래프이다.

도 7은 본 발명의 실험예 7에 따른 스태필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*, CCARM 3087)에 감염된 누드 마우스의 실시예 2의 저분자 수용성 아민 β-키토산 처리 후 시간경과에 따른 변화관찰 사진(A) 및 누드 마우스 피부 조직에 존재하는, 일차 항체 항-TNF-α(B) 및 항-IL-1β(C)를 형광분석한 사진이다; Ⅰ: 무처리군, Ⅱ: 실시예 2의 저분자 수용성 아민 β-키토산(1 mg/mL) 투여군, Ⅲ: 스태필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*, CCARM 3087) 접종군, Ⅳ: 스태필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*, CCARM 3087) 접종 및 실시예 2의 저분자 수용성 아민 β-키토산(0.5 mg/mL) 투여군, Ⅴ: 스태필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*, CCARM 3087) 접종 및 실시예 2의 저분자 수용성 아민 β-키토산(1.0 mg/mL) 투여군이고; 1: 해마톡시린 및 에오신 염색(haematoxylin & eosin staining)된 피부세포 및 2: FITC-라벨 2차 항체처리된 피부 세포이다.

도 8은 본 발명의 실험예 7에 따른 슈도모나스 에루기노사(*Pseudomonas aeruginosa* BMP-Pa001)에 감염된 ICR 마우스의 폐 조직을 균질화하여 얻은 균질화물에 포함된 세균의 콜로니 형성 정도를 관찰한 사진이다.

도 9는 본 발명의 실험예 7에 따른 스태필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*, ATCC 25923)에 감염된 ICR 마우스의 피부 조직 세포를 관찰한 사진이다; A: 무처리군, B: 슈도모나스 에루기노사(*Pseudomonas aeruginosa* BMP-Pa001) 접종군, Ⅳ: 슈도모나스 에루기노사(*Pseudomonas aeruginosa* BMP-Pa001) 접종 및 실시예 2의 저분자 수용성 아민 β-키토산(0.3 mg/mL) 투여군, Ⅴ: 슈도모나스 에루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*

BMP-Pa001) 접종 및 실시예 2의 저분자 수용성 아민 β-키토산(0.6 mg/mL) 투여군이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0019] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0020] 본 발명은 500 내지 20000 달톤인 저분자 수용성 β-키토산 또는 이의 유도체를 유효성분으로 함유하는 항균용 조성물을 제공한다.

[0021] 본 발명에 따른 저분자 수용성 β-키토산 또는 이의 유도체는 자연계에서 얻어지는 β-키토산을 불용성에서 수용성 형태로 치환됨으로써 미생물의 세포막에 결합시 결합력을 향상시키고, 세포독성이 전혀 없게 하여 항생 효과를 증진시킬 수 있는 것을 특징으로 한다.

[0022] 본 발명에 따른 상기 저분자 수용성 β-키토산은 500 내지 20000 달톤인 것을 사용할 수 있으며, 바람직하게는 5000 내지 10000 달톤인 것을 사용할 수 있다.

[0023] 본 발명에 따른 500 내지 20000 달톤의 저분자 수용성 β-키토산은 천연물에서 유래된 고분자에서 저분자 형태로 전환됨에 따라 흡수면에서 유리(free)하고 체내에서 항체 형성의 이루어지지 않는다는 장점이 있다. 특히, 본 발명에 따른 5000 내지 10000 달톤의 저분자 수용성 β-키토산은 세포독성이 없으므로 동물의 생체 또는 인체에서의 부작용 유발 가능성이 현저히 낮아 안전하게 사용될 수 있다.

[0024] 또한, 본 발명에 따른 상기 저분자 수용성 β-키토산 유도체는 글루코스의 2번 탄소 아미노기($-NH_2$) 또는 6번 탄소 알코올(-OH)기가 카복시메틸, 하이드록시메틸, 하이드록시프로필 또는 하이드록시프로필에테르로 치환될 수 있다.

[0025] 상기 β-키토산 유도체는 키토산 구조의 글루코스 2번 위치의 탄소에 유리 아미노기($-NH_2$) 또는 글루코스 6번 탄소 알코올(-OH)기에 새로운 화학적 치환기를 도입시켜도 분자량의 저하, 용해성, 항균 활성 등의 β-키토산 또는 β-키토산 유도체의 고유 성질이 변하지 않는다.

[0026] 나아가 본 발명에 따른 상기 항균용 조성물은 리스테리아 모노사이토제네스(*Listeria monocytogenes*, ATCC 19115), 스태필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*, ATCC 25923), 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*, KTCT 1918) 및 스트렙토코커스 에피더미디스(*Streptococcus epidermidis*, KCTC 3096)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 그람 양성균; 또는 대장균(*Escherichia coli*, ATCC 25922), 대장균 O-157(*Escherichia coli O-157*, ATCC 43895), 비브리오 블리피커스(*Vivrio vulnificus*, ATCC 29307), 슈도모나스 에루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*, KCTC 1637) 및 살모넬라 티피뮤리움(*Salmonella typhimurium*, KCTC 1926)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 그람 음성균에 대하여 항생효과를 가진다.

[0027] 본 발명에 따른 저분자 수용성 β-키토산의 상기 병원성 세균에 대한 항균 활성을 실험한 결과, 본 발명에 따른 저분자 수용성 아민 β-키토산은 pH에 상관없이 병원성 세균에 대하여 약 9 μg/mL의 MIC 값으로 높은 항균 활성을 나타냈으며, 약물내성을 갖는 슈도모나스 에루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*) 및 스태필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*)에 대한 항균 활성 또한 우수한 것을 알 수 있다(실험예 1 및 실험예 2 참조). 또한, 저분자 수용성 β-키토산은 세포독성이 없어 인간 적혈구(hRBC)의 용혈작용을 초래하지 않으며(실험예 3 참조), 세균의 세포막을 변형시켜 세균의 사멸을 초래하는 효과가 우수하다(실험예 4 내지 실험예 6 참조). 나아가, 생체 내(*in vivo*)에서도 병원성 세균에 대한 항균 효과가 뛰어나다(실험예 7 참조).

[0028] 따라서, 본 발명에 따른 저분자 수용성 β-키토산 또는 이의 유도체를 유효성분으로 함유하는 항균용 조성물은 식품첨가제, 살균제, 소독제, 세제 또는 탈취제 등 항균 효과가 요구되는 다양한 분야에 사용되는 항균용 조성물로 유용하게 사용될 수 있다.

[0029] 본 발명에 따른 상기 저분자 수용성 β-키토산은 오징어 연골로부터 하기의 제조방법에 의하여 제조될 수 있다:

[0030] 오징어 연골에 1 M 염산(HCl) 수용액으로 산처리하여 무기질을 제거된 고형물을 제조하는 단계(단계 1);

[0031] 상기 단계 1에서 제조된 고형물에 2 M 수산화나트륨(NaOH) 수용액을 처리하여 단백질이 제거된 고형물을 제조하는 단계(단계 2);

[0032] 상기 단계 2에서 제조된 고형물을 탈아세틸화하여 불용성 β-키토산을 제조하는 단계(단계 3);

[0033] 상기 단계 3에서 제조된 불용성 β-키토산에 유기산 및 무기산을 이용하여 염의 형성한 후, 효소분해하여 키토산 다당류를 제조하는 단계(단계 4);

[0034] 상기 단계 4에서 제조된 키토산 다당류의 유기산 또는 무기산 염의 용액을 염기인 트라이알킬아민으로 처리하는 단계(단계 5);

[0035] 상기 단계 5의 혼합 용액에 유기용매를 첨가하여 키토산 다당류에 결합되어 있는 유기산 또는 무기산을 트라이알킬아민 염과의 형태로 제거된 키토산 다당류를 제조하는 단계(단계 6); 및

[0036] 단계 6에서 제조된 산이 제거된 키토산 다당류 용액을 무기산 처리 후, 활성화된 탄소/이온교환수지(activated carbon/ion exchange resin) 컬럼으로 정제하여 저분자 수용성 β-키토산을 제조하는 단계(단계 7).

[0037] 이하, 상기 저분자 수용성 β-키토산의 제조방법을 보다 상세히 설명한다.

[0038] 먼저, 본 발명에 따른 상기 단계 1은 1 M 염산(HCl) 수용액에 오징어 연골을 투입시키고, 상온에서 24시간 동안 교반하여 무기질을 제거한 후, 잔류된 고형물을 증류수로 세척하고, 세척된 고형물을 1 M 염산(HCl) 수용액에 다시 투입시킨 다음, 8시간 동안 40℃에 교반하여 고형물에 남은 무기질을 완전히 제거하여, 무기질이 제거된 고형물을 제조하는 단계이다.

[0039] 다음으로, 본 발명에 따른 상기 단계 2는 상기 단계 1에서 제조된 무기질이 제거된 고형물을 2 M 수산화나트륨(NaOH) 수용액에 투입시키고, 상온에서 24시간 동안 교반하여 단백질을 제거한 후 잔류된 고형물을 증류수로 세척하고, 세척된 고형물을 2 M 수산화나트륨(NaOH) 수용액에 다시 투입시킨 다음, 5시간반 동안 승온하고 교반하여 고형물에 남은 단백질을 완전히 제거하여, 단백질이 제거된 고형물을 제조하는 단계이다.

[0040] 다음으로, 본 발명에 따른 상기 단계 3은 상기 단계 2에서 제조된 단백질이 제거된 고형물을 40% 수산화나트륨(NaOH) 수용액을 처리하여 탈아세틸화를 수행하는 단계이다.

[0041] 본 발명에 따른 상기 단계 4는 키틴으로부터 추출한 불용성 키토산을 젖산, 초산, 프로피온산, 포름산, 아스코르브산, 및 주석산을 포함하는 유기산과 염산, 질산 및 황산을 포함하는 무기산을 이용하여 염의 형태로 만들어 용해시킨다. 상기의 키토산 용액을 효소 분해하여 키토산 다당류을 얻을 수 있다.

[0042] 이때, 상기 키토산 다당류의 산 용액은 젖산, 초산, 프로피온산, 포름산, 아스코르브산, 및 주석산을 포함하는 유기산 염과 염산, 질산 및 황산을 포함하는 무기산 염의 용액을 제조하기 위하여 사용된 용매는 PBS(Phosphate buffered saline) 7.0, 7.2 또는 7.4를 사용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0043] 본 발명에 따른 상기 단계 5에서 트라이알킬아민을 상기 키토산 다당류에 포함되어 있는 유기산 또는 무기산 염의 형태를 효과적으로 제거하기 위하여, 키토산 다당류의 아민기 1 당량에 대해 2 내지 3 당량의 비율로 첨가할 수 있으며, 바람직하게는 2 당량을 첨가할 수 있다. 일단, 트라이알킬아민이 첨가되면, 강한 산성을 띠고 있는 키토산 다당류의 아민기에서 H^+를 트라이알킬아민이 끌어당기고, $CH_3CHOHCOO^-$ 또는 CH_3COO^-, Cl^- 와 트라이알킬아

민 간의 정전기적인 상호작용에 의해 결합하여 제거됨으로써 글루코스 2번 탄소의 아민을 유리 아민 형태로 얻을 수 있다.

[0044] 이때, 상기에서 첨가되는 트라이알킬아민의 정량비의 조절은 키토산 다당류의 한 단위체에서 글루코스 2번 탄소의 아민기에 있는 유기산 또는 무기산이 트라이알킬아민 염의 형태로 제거되고, 글루코스 6번 탄소의 $-CH_2OH$기를 보호하는 역할을 위해 필요하다.

[0045] 또한, 상기 트라이알킬아민로는 트라이-C_{1-4} 알킬아민을 사용할 수 있고, 바람직하게는 트라이메틸아민, 트라이에틸아민, 트라이프로필아민, 트라이이소프로필에틸아민 또는 트라이부틸아민을 사용할 수 있다. 보다 바람직하게는 트라이에아민을 사용할 수 있다.

[0046] 본 발명에 따른 상기 단계 6은 유기용매가 첨가되어 생성되는 혼합반응물을 상온에서 2시간 정도 반응시키고 아세톤, 메탄올, 클로로포름 및 디클로로메탄으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 유기용매를 첨가하여 교반한 다음, 원심분리하여 유기산 또는 무기산이 제거된 키토산 다당류를 제조하는 단계이다. 상기 과정을 거친 후, 트라이알킬아민에 의해 보호받은 글루코스 6번 탄소의 $-CH_2OH$기는 0.0005-0.010 N 무기산 처리하여 제거되는데, 이때 제거되는 염은 $(C_2H_5)_3NH^+ \cdot Cl^-$염의 형태로 제거될 수 있다.

[0047] 이때, 상기 무기산으로는 염산, 질산 또는 황산을 사용할 수 있다. 바람직하게는 0.001 N의 염산을 사용할 수 있다.

[0048] 본 발명에 따른 상기 단계 7은 유기산 또는 무기산이 제거된 키토산 다당류의 용액을 활성화된 탄소/이온 교환 수지 칼럼으로 정제하여 순수한 저분자 수용성 β-키토산을 제조하는 단계이다.

[0049] 또한, 본 발명에 따른 저분자 수용성 β-키토산 또는 이의 유도체를 유효성분으로 함유하는 항균용 조성물은 식품 첨가제, 살균제, 소독제, 세제 또는 탈취제 용도로 사용될 수 있다.

[0050] 이때, 상기 세제는 일반적으로 가정에서 사용되고 항균 활성이 요구되는 주방세제, 세탁세제, 야채·과일세척제, 손 세정제 등을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0051] 본 발명의 세제는 하나 이상의 계면활성제를 포함할 수 있다. 상기 계면활성제는 음이온성, 비-이온성, 양이온성, 양쪽성 또는 양이온성형태(zwitter ionic type), 또는 이것들의 혼합물일 수 있다. 음이온성 계면활성제의 대표적인 예로는 선형 알킬벤젠술폰산염(LAS), 알킬황산염(AS), 알파올레핀술폰산염(AOS), 알코올에톡시황산염(AES) 또는 천연지방산의 알칼리금속염을 들 수 있다. 비-이온성 계면활성제의 예로는 알킬폴리에틸렌글리콜에테르, 노닐페놀 폴리에틸렌글리콜 에테르, 수크로스와 글루코스의 지방산에스테르, 또는 폴리에톡실화 알킬글루코시드의 에스테르를 들 수 있다.

[0052] 또한, 본 발명의 세제는 용도에 맞추어 연마제, 표백제, 표면활성제, 부식방지제, 금속봉쇄제, 얼룩-재침착 방지제, 향수, 효소 및 표백제의 안정화제, 제형 보조제, 광증백제, 거품부스터, 킬레이트화제, 충전제, 직물연화제 등과 같은 당업계에서 공지된 다른 세제 성분들을 추가로 포함할 수 있다. 본 발명의 세제는 분제, 액제 등의 임의의 편리한 형태로 제형화될 수 있다.

[0053] 나아가, 본 발명은 저분자 수용성 β-키토산 또는 이의 유도체를 유효성분으로 함유하는 항균용 조성물을 포함하는, 세균에 의하여 발병되는 감염성 질환의 예방 또는 개선용 건강기능성 식품 조성물을 제공한다.

[0054] 본 발명에 따른 건강기능성 식품 조성물은 병원성 세균에 의하여 발병하는 질환의 예방 또는 개선을 목적으로 상기 저분자 수용성 β-키토산 또는 이의 유도체를 식품, 음료 등의 건강기능성 식품에 첨가할 수 있다.

[0055] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 물질을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 드링크제, 육류,

소시지, 빵, 비스킷, 떡, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 알코올 음료 및 비타민 복합제, 유제품 및 유가공 제품 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강기능성 식품을 모두 포함한다.

[0056] 본 발명의 저분자 수용성 β-키토산 또는 이의 유도체를 유효성분으로 함유하는 건강기능성 식품 조성물은 식품에 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효성분의 혼합량은 그의 사용 목적(예방 또는 개선용)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 건강기능성 식품 중의 상기 조성물의 양은 전체 식품 중량의 0.1 내지 90 중량부로 가할 수 있다. 그러나 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.

[0057] 본 발명의 건강 기능성 음료 조성물은 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 화합물을 함유하는 외에는 다른 성분에는 특별한 제한이 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 덱스트린, 시클로덱스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트라이톨 등의 당알코올이다. 상술한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 당 일반적으로 약 1 내지 20 g, 바람직하게는 약 5 내지 12 g이다.

[0058] 상기 외에 본 발명의 저분자 수용성 β-키토산 또는 이의 유도체를 유효성분으로 함유하는 건강기능성 식품 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 중진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 건강기능성 식품 조성물은 천연 과일쥬스 및 과일쥬스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다.

[0059] 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 그렇게 중요하진 않지만 본 발명의 저분자 수용성 β-키토산 또는 이의 유도체를 유효성분으로 함유하는 항균용 조성물 100 중량부 당 0.1 내지 약 20 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

[0060] 이하, 본 발명을 실시예 및 실험예에 의하여 상세히 설명한다.

[0061] 단, 하기 실시예 및 실험예는 본 발명을 구체적으로 예시하는 것이며, 본 발명의 내용이 실시예 및 실험예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0062] **<실시예 1> 천연물로부터의 저분자 수용성 아민 β-키토산의 제조 1**

[0063] 젖산을 용매로 하여 각각 5 % 키토산 용액을 제조한다. 상기 100 ml의 5 % 키토산 용액(pH 5.0 내지 5.5)에 5 유니트(unit)의 바실러스 푸밀러스(*Bacillus pumilus*) BN-262에서 유래된 키토사네이즈(chitosanase) 효소를 혼합하여 40℃에서 36시간 동안 반응시켰다. 반응종료 후, 1 ㎛ 프리필터(prefilter)를 사용하여 예비 여과한 후, 분자량 20,000인 중공사 여과지(hollow filter)로 재여과하였다. 상기 단계에서 얻은 여과액은 나노 여과 시스템(nano filter system)을 이용하여 농축되고, 살균과정을 거쳐 공기 분무 건조기(spray dryer)로 건조됨으로써 키토산 다당류이 제조되었다. 상기에서 얻어진 키토산 다당류을 1 ℓ의 PBS 7.0에 용해한 후 0.52 ℓ의 트라이에틸 아민을 천천히 떨어뜨렸다. 이때, 키토산 다당류의 아민기 1 당량에 대해 트라이에틸 아민 2 당량으로 반응시킨다. 상기의 반응물은 상온에서 2시간 정도 반응시킨 후, 아세톤을 첨가하여 교반하고 원심분리하였다. 상기 과정을 2 내지 3 회 반복한 후 공기 건조 및 동결 건조하였다. 이때, 원심분리는 Supra 30 K를 이용하여 15,000 rpm으로 4℃에서 20 분 동안 실시하였다. 상기 과정에서 얻어진 생성물에 30-50 ml의 0.001 N HCl을 첨가한 후 2 시간 정도 반응시키고, 상기 반응물에 아세톤을 첨가하여 교반하고 상기 동일한 조건으로 원심분리하였다. 이 과정을 2 내지 3 회 반복 후 공기 건조 및 동결 건조시켰다. 상기에서 건조된 생성물을 2차 증류수에 녹인 후, 활성화된 탄소/이온교환 수지 컬럼으로 정제하고 얻어진 수용액을 동결 건조하여 백색의 5000 달톤의

저분자 수용성 아민 β-키토산을 얻었다.

[0064] **<실시예 2> 천연물로부터의 저분자 수용성 아민 β-키토산의 제조 2**

[0065] 상기 실시예 1에서 5000 달톤의 저분자 수용성 아민 β-키토산을 정제하는 것을 제외하고, 상기 실시예 1과 동일한 방법으로 수행하여 10000 달톤의 저분자 수용성 아민 β-키토산을 얻었다.

[0066] **<비교예 1> 천연물로부터의 저분자 수용성 아민 β-키토산의 제조 3**

[0067] 상기 실시예 1에서 50000 달톤의 저분자 수용성 아민 β-키토산을 정제하는 것을 제외하고, 상기 실시예 1과 동일한 방법으로 수행하여 1000 달톤의 저분자 수용성 아민 β-키토산을 얻었다.

[0068] **<비교예 2> 천연물로부터의 수용성 아민 β-키토산의 제조 1**

[0069] 상기 실시예 1에서 15000 달톤의 수용성 아민 β-키토산을 정제하는 것을 제외하고, 상기 실시예 1과 동일한 방법으로 수행하여 15000 달톤의 저분자 수용성 아민 β-키토산을 얻었다.

[0070] **<비교예 3> 천연물로부터의 수용성 아민 β-키토산의 제조 2**

[0071] 상기 실시예 1에서 20000 달톤의 수용성 아민 β-키토산을 정제하는 것을 제외하고, 상기 실시예 1과 동일한 방법으로 수행하여 20000 달톤의 저분자 수용성 아민 β-키토산을 얻었다.

[0072] **<비교예 4> 천연물로부터의 저분자 수용성 아민 α-키토산의 제조 1**

[0073] 상기 실시예 1에서 1000 달톤의 저분자 수용성 아민 α-키토산을 정제하는 것을 제외하고, 상기 실시예 1과 동일한 방법으로 수행하여 1000 달톤의 저분자 수용성 아민 α-키토산을 얻었다.

[0074] **<비교예 5> 천연물로부터의 저분자 수용성 아민 α-키토산의 제조 2**

[0075] 상기 실시예 1에서 5000 달톤의 저분자 수용성 아민 α-키토산을 정제하는 것을 제외하고, 상기 실시예 1과 동일한 방법으로 수행하여 5000 달톤의 저분자 수용성 아민 α-키토산을 얻었다.

[0076] **<비교예 6> 천연물로부터의 저분자 수용성 아민 α-키토산의 제조 3**

[0077] 상기 실시예 1에서 10000 달톤의 저분자 수용성 아민 α-키토산을 정제하는 것을 제외하고, 상기 실시예 1과 동일한 방법으로 수행하여 10000 달톤의 저분자 수용성 아민 α-키토산을 얻었다.

[0078] **<실험예 1> 저분자 수용성 아민 β-키토산의 항균활성 및 약물내성 평가 1**

[0079] 본 발명에 따른 저분자 수용성 아민 β-키토산의 병원성 세균에 대한 항균활성 및 약물내성을 평가하기 위하여 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[0080] 상기 실시예 1 내지 실시예 2, 및 비교예 1 내지 비교예 6에서 제조된 저분자 수용성 키토산의 생육 최소저해농도(MIC) 값을 측정하였다.

[0081] 우선, 항균 활성 측정을 위하여 그람 양성균인 리스테리아 모노사이토제네스(*Listeria monocytogenes*, ATCC 19115), 스태필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*, ATCC 25923), 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*, KTCT 1918), 스트렙토코커스 에피더미디스(*Streptococcus epidermidis*, KCTC 3096) 및 그람 음성균

인 대장균(*Escherichia coli*, ATCC 25922), 대장균 O-157(*Escherichia coli O-157*, ATCC 43895), 비브리오 블리피커스(*Vivrio vulnificus*, ATCC 29307), 슈도모나스 에루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*, KCTC 1637) 및 살모넬라 티피뮤리움(*Salmonella typhimurium*, KCTC 1926)을 생명공학연구소 유전자은행으로부터 분양받아 각 균주를 LB 배지(10 g/L의 박토 트립톤, 5 g/L의 이스트 추출물, 10 g/L의 염화나트륨, pH 7.0)에서 중간-로그 상(mid-log phase, OD_{600}= 0.2-0.5)까지 배양한 다음, 10%(v/v) 성장 배지가 포함된 10 mM 소듐 포스페이트(SP) 완충용액(pH 5.4 또는 7.4)에 5×10^5 세포(CFU)/1 mL의 균체 농도로 희석하여 마이크로 타이트레이트 플레이트(Nunc)에 접종하였다. 본 발명에 따른 상기 실시예 및 비교예에서 제조된 저분자 수용성 아민 키토산들을 각각 5000, 2500, 1250, 625, 312.5, 156.3, 78.1, 39.1, 19.5, 9.5 및 4.9 μg/mL의 농도로 희석하여 플레이트에 첨가한 후 37℃에서 18시간 동안 배양하였고, 620 nm의 파장에서 마이크로 타이트레이트 플레이트 판독기(Merck Elisa reader)로 흡광도를 측정하여 각 균주의 MIC 값을 결정하였으며, 그 결과를 하기 표 1 내지 표 3에 나타내었다.

표 1

[0082]

	pH	그람 양성균					그람 음성균				
		B.subtilis	B.cereus	B.megaterium	S.aureus	S.epidermidis	E.coli	E.coli O-157	P.aeruginosa	S.typhimurium	L.monocytogens
실시예 1	7.4	0.018	0.009	0.009	0.018	0.018	0.018	0.009	0.009	0.018	0.009
	5.4	0.009	0.009	0.009	0.009	0.009	0.009	0.009	0.009	0.009	0.009
실시예 2	7.4	0.009	0.009	0.009	0.009	0.018	0.009	0.009	0.009	0.009	0.009
	5.4	0.009	0.009	0.009	0.009	0.0045	0.009	0.009	0.009	0.009	0.009
비교예1	7.4	1.25	0.625	0.625	0.3125	0.3125	0.625	0.625	0.625	0.3125	0.3125
	5.4	2.5	0.625	1.25	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	1.25	>10
비교예 2	7.4	0.009	0.009	0.009	0.009	0.018	0.009	0.009	0.018	0.009	0.018
	5.4	0.009	0.009	0.009	0.009	0.0045	0.009	0.009	0.009	0.009	0.009
비교예 3	7.4	0.018	0.018	0.018	0.009	0.018	0.009	0.009	0.018	0.018	0.018
	5.4	0.009	0.009	0.009	0.009	0.0045	0.009	0.009	0.009	0.009	0.009
비교예 4	7.4	>10	>10	2.5	>10	5	>10	>10	>10	>10	>10
	5.4	0.039	0.018	0.018	0.039	0.009	0.156	0.009	0.156	0.0045	0.3125
비교예 5	7.4	>10	>10	2.5	>10	5	>10	>10	>10	>10	>10
	5.4	0.018	0.018	0.018	0.018	0.0045	0.0039	0.009	0.078	0.009	0.156
비교예 6	7.4	0.009	0.0045	0.009	0.009	0.018	0.0045	0.009	0.009	0.0045	0.009
	5.4	0.009	0.009	0.009	0.009	0.0045	0.009	0.009	0.009	0.0045	0.009

표 2

[0083]

	pH	슈도모나스 에루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*)					
		ATCC 27853	BMP-Pa001	BMP-Pa002	BMP-Pa003	BMP-Pa004	BMP-Pa005
실시예 1	7.4	0.009	<0.0045	<0.0045	<0.0045	<0.0045	<0.0045
	5.4	0.009	0.009	0.009	0.009	0.009	0.009
실시예 2	7.4	0.009	<0.0045	<0.0045	<0.0045	<0.0045	<0.0045
	5.4	0.009	0.009	0.009	0.009	0.009	0.009
비교예 1	7.4	0.625	0.625	0.625	1.25	1.25	1.25
	5.4	2.5	5	5	5	5	5
비교예 2	7.4	0.009	0.018	0.009	0.018	0.009	0.018
	5.4	0.009	0.009	0.018	0.009	0.018	0.009
비교예 3	7.4	0.018	0.009	0.018	0.009	0.018	0.009
	5.4	0.018	0.018	0.018	0.018	0.018	0.018
비교예 4	7.4	>10	10	>10	10	10	5
	5.4	0.156	0.078	0.039	0.078	0.078	0.039
비교예 5	7.4	>10	10	10	10	10	5
	5.4	0.078	0.039	0.039	0.039	0.018	0.018
비교예 6	7.4	0.009	<0.0045	<0.0045	<0.0045	<0.0045	0.009
	5.4	0.009	0.009	0.009	0.009	0.009	0.009

표 3

[0084]

	pH	스태필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*)					
		ATCC 25923	BMP-Sa001	BMP-Sa002	BMP-Sa003	BMP-Sa004	BMP-Sa005
실시예 1	7.4	0.18	<0.0045	0.039	0.039	0.018	0.039
	5.4	0.009	0.009	0.0156	0.3125	0.039	0.078
실시예 2	7.4	0.009	<0.0045	0.018	0.018	0.009	0.009
	5.4	0.009	0.009	0.078	0.078	0.039	0.078
비교예 1	7.4	1.25	2.5	1.25	1.25	1.25	2.5
	5.4	2.5	2.5	2.5	2.5	1.25	1.25
비교예 2	7.4	0.009	0.0045	0.018	0.018	0.018	0.009
	5.4	0.018	0.009	0.078	0.078	0.009	0.078
비교예 3	7.4	0.009	0.0045	0.018	0.018	0.018	0.009
	5.4	0.039	0.018	0.078	0.078	0.039	0.078
비교예 4	7.4	>10	>10	>10	>10	>10	>10
	5.4	0.039	>10	>10	>10	>10	>10
비교예 5	7.4	>10	>10	>10	>10	>10	>10
	5.4	0.018	>10	>10	>10	>10	>10
비교예 6	7.4	0.009	<0.0045	0.018	0.018	0.018	0.018
	5.4	0.009	0.009	0.078	0.078	0.018	0.078

[0085] 상기 표 1에 나타난 바와 같이, 본 발명에 따른 저분자 수용성 아민 β-키토산은 pH에 상관없이 병원성 세균에 대하여 우수한 항균효과가 있는 것이 확인되었다. 보다 구체적으로, 본 발명에 따른 저분자 수용성 아민 β-키토산 대부분이 pH 5.4 및 7.4에서 9 μg/mL의 MIC 값을 나타냈다. 반면, 저분자 수용성 아민 α-키토산은 pH가 5.4이고 분자량이 큰 경우에만 MIC 값이 낮게 나타났다. 이로부터, 본 발명에 따른 저분자 수용성 아민 β-키토산은 pH에 영향을 받지 않으며, 저분자 수용성 아민 α-키토산에 비하여 병원성 세균에 대한 우수한 항균효과가 있는 것을 알 수 있다.

[0086] 또한, 표 2 및 표 3에 나타난 바와 같이, 본 발명에 따른 저분자 수용성 아민 β-키토산은 약물내성을 갖는 병원성 세균인 그람음성 세균인 슈도모나스 에루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*) 및 그람양성 세균인 스태필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*)에 대한 항균 활성이 우수한 것으로 확인되었다. 보다 구체적으로, 본 발명에 따른 저분자 수용성 아민 β-키토산은 pH에 상관없이 항균 활성이 우수하며, 특히 약물내성을 갖는 슈도모나스 에루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*)의 경우 실시예 1 및 실시예 2의 저분자 수용성 아민 β-키토산은 pH에 영향을 받지 않고 높은 항균활성을 갖는 것으로 확인되었다. 또한, 스태필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*)에 대한 항균활성은 pH가 중성인 경우에 우수한 것으로 확인되었다. 반면, 저분자 수용성 아민 α-키토산의 경우, 슈도모나스 에루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*) 및 스태필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*)에 대한 항균 활성은 10,000 달톤의 큰 분자량을 갖는 α-키토산에 한하여 β-키토산과 유사하게 나타났으며, 분자량이 낮아질수록 항균 효과가 현저히 감소하는 것으로 확인되었다.

[0087] 이로부터, 본 발명에 따른 저분자 수용성 아민 β-키토산은 저분자 수용성 아민 α-키토산에 비하여 약물내성을 갖는 병원성 세균에 대하여 항균 활성이 우수한 것을 알 수 있다.

[0088] 따라서, 본 발명에 따른 저분자 수용성 β-키토산 또는 이의 유도체는 저분자 수용성 α-키토산과 대비하여 약물내성을 갖는 병원성 세균에 대한 항균 활성이 우수하므로, 이를 유효성분으로 함유하는 항균용 조성물은 식품 첨가제, 살균제, 소독제, 세제, 탈취제, 건강기능성 식품 등 항균 효과가 요구되는 다양한 분야에 사용되는 항균용 조성물로 유용하게 사용될 수 있다.

[0089] **<실험예 2> 저분자 수용성 아민 β-키토산의 항균활성 평가 2**

[0090] 본 발명에 따른 저분자 수용성 아민 β-키토산의 병원성 세균에 대한 항균활성을 평가하기 위하여 하기와 같은

실험을 수행하였다.

[0091] 본 발명에 따른 저분자 수용성 아민 β-키토산의 세균사멸 동력학은 대장균 O-157(*E.coli O-157*)을 이용하여 측정하였다. 로그-상 세균(2×10^6 CFR/mL) 및 10α%(v/v) 성장 배지를 포함하는 SP 완충용액(pH 5.4 또는 7.4)에 실시예 2 및 비교예 6에서 제조된 분자량 10000 달톤의 키토산을 1X 생육 최소저해농도(MIC) 및 2X 생육 최소저해농도(MIC)로 각각 처리하여 0, 2, 4, 6, 8, 10, 20, 30, 40, 60, 및 120분이 경과된 후에 고체상 생장배지에 도말하고, 37℃에서 16시간 동안 배양하면서 콜로리 형성 단위를 측정하였다. 이때, 부분 표본은 고정된 시간 간격, 용해된 정도, 한천 플레이트에 고정된 정도 등은 고려하지 않았다. 상기의 결과를 도 1에 나타내었다.

[0092] 도 1에 나타난 바와 같이, 본 발명에 따른 저분자 수용성 아민 β-키토산은 병원성 세균에 대한 세균사멸 동력학이 우수한 것을 알 수 있다. 보다 구체적으로, 본 발명에 따른 저분자 수용성 아민 β-키토산은 1X 생육 최소저해농도(MIC)로 배양된 대장균 O-157(*E.coli O-157*)에 처리하였을 경우, 처리 후 약 5분 이내로 세균을 50% 사멸시키는 것을 알 수 있으며, 2X 생육 최소저해농도(MIC)로 배양된 대장균 O-157(*E.coli O-157*)에 처리하였을 경우에는 처리 후 약 1시간이 경과되면 세균을 모두 사멸시키는 것을 알 수 있다. 한편, 비교예 6에서 제조된 저분자 수용성 아민 α-키토산은 본 발명에 따른 실시예 2에서 제조된 저분자 수용성 아민 β-키토산과 동일하게 세균을 모두 사멸시키는 것으로 확인되었으며, 세균의 세포막에 작용하여 사멸을 초래하는 효과를 가지나 그 작용기작은 본 발명에 따른 저분자 수용성 아민 β-키토산과 상이함을 알 수 있다.

[0093] 이로부터, 본 발명에 따른 저분자 수용성 아민 β-키토산은 병원성 세균에 대하여 처리경과시간 대비 세균을 사멸시키는 세균사멸 동력학이 우수한 것을 알 수 있다.

[0094] 따라서, 본 발명에 따른 저분자 수용성 β-키토산 또는 이의 유도체는 병원성 세균에 대한 우수한 세포사멸 동력학을 나타내며, 항균 활성이 우수하므로, 이를 유효성분으로 함유하는 항균용 조성물은 식품첨가제, 살균제, 소독제, 세제, 탈취제, 건강기능성 식품 등 항균 효과가 요구되는 다양한 분야에 사용되는 항균용 조성물로 유용하게 사용될 수 있다.

[0095] **<실험예 3> 저분자 수용성 아민 β-키토산의 세포독성 평가**

[0096] 본 발명에 따른 저분자 수용성 아민 β-키토산의 세포독성을 평가하기 위하여 인간 적혈구 세포(hRBC)의 용혈작용 분석을 하기와 같은 방법으로 수행하였다.

[0097] 건강한 기증자로부터 제공되어 항응고제인 헤파린을 사용한 인간 적혈구 세포(hRBC)를 사용하여 용혈작용을 시험하였다. 건강한 인간 적혈구 세포(hRBC)를 인산 완충용액(PBS)으로 10분 동안 원심분리하여(800 rpm) 헹궈준 후, 다시 현탁시켰다. 인산 완충용액(PBS)에 현탁된 실시예 1 내지 실시예 2, 비교예 1 및 비교예 4 내지 비교예 6에서 제조된 키토산에 인산 완충용액(PBS)에 인간 적혈구 세포(hRBC)가 용해된 표준용액 100 μL를 첨가하였다. 이때, 인간 적혈구 세포(hRBC)가 용해된 표준용액이 첨가된 시료의 키토산 농도는 5, 10, 15 및 20 mg/mL이고, 인간 적혈구 세포(hRBC) 농도는 8% v/v가 되도록 조절하였다. 각 시료를 37℃에서 1시간 동안 배양한 후, 10분 동안 원심분리(800 rpm)하였다. 원심분리된 상등액을 414 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 각각의 1% 트라이톤 X-100이 첨가된 인산완충 용액(PBS)에 현탁된 인간 적혈구 세포(hRBC)에 키토산을 처리하지 않은 무처리군 및 100% 용혈된 시료군에 대해서도 함께 흡광도를 측정하여 인간 적혈구 세포(hRBC)가 용혈되어 세포막이 붕괴된 정도 및 세포막이 유지되어 적혈구가 보존된 정도를 확인하였다. 모든 시료는 3회 반복실험을 수행하여 흡광도를 측정하였으며, 그 결과를 도 2의 A에 나타내었다.

[0098] 또한, 정상세포주인 HEK293(인간 태아 신장세포)을 이용하여 세포독성을 측정하였다. 보다 구체적으로, 10% FBS(Fetal Bovine Serum)가 함유된 DMEM 배지에서 배양된 사람의 태아 신장세포(HEK293)를 각 3×10^3 cells/mL으로 96 웰 플레이트에 분주하고 24시간 배양하였다. 그 후, 실시예 1 내지 실시예 2 및 비교예 1 내지 비교예 6을 각각 농도별로 처리하여 24시간 동안 5% CO_2 인큐베이터에서 반응시켰다. 반응이 완료되면 5 mg/ml 농도로

인산 완충액 생리식염수(phosphate buffered saline;PBS)에 녹인 MTT(Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide) 용액(20 ul)을 각 웰에 투입하고 4시간 동안 반응시킨 다음, 상층액을 제거하였다. 상층액이 제거된 잔류물에 200 ul의 다이메틸설폭사이드(DMSO)를 주입하고, 형성된 MTT 크리스탈을 녹여 560 nm에서 결과를 확인하였다. 그 결과를 도 2의 B에 나타내었다.

[0099] 도 2에 나타난 바와 같이, 본 발명에 따른 저분자 수용성 아민 -키토산은 인간 적혈구 세포(hRBC)와 태아 신장세포에 대하여 독성을 나타내지 않는 것으로 나타났다. 보다 구체적으로 도 2의 A에서 5000 달톤 내지 10000 달톤의 분자량을 갖는 실시예 1 및 실시예 2의 저분자 수용성 아민 β-키토산은 인간 적혈구 세포(hRBC)의 용혈작용을 발생시키지 않아 용해된 적혈구 세포(hRBC)의 용혈률이 약 5% 미만인 것으로 확인된 반면, 분자량이 10000 달톤을 초과하는 비교예 2 및 비교예 3의 저분자 수용성 아민 β-키토산은 20 mg/ml 농도로 처리할 경우 각각 20% 및 40%의 용혈률을 나타내는 것으로 확인되었다. 또한, 도 2의 B에서 5000 달톤 내지 10000 달톤의 분자량을 갖는 실시예 1 및 실시예 2의 저분자 수용성 아민 β-키토산이 처리된 인간 태아 신장세포(HEK293)의 경우, 약 97% 이상의 높은 세포 생존율을 나타낸 반면, 분자량이 10000 달톤을 초과하는 비교예 2 및 비교예 3의 저분자 수용성 아민 β-키토산은 10 mg/ml 농도로 처리할 경우 각각 72% 및 50%의 세포 생존율을 나타내는 것으로 확인되었다. 아울러, 저분자 수용성 아민 α-키토산의 경우, 인간 적혈구 세포(hRBC)에 대한 용혈현상은 관찰되지 않았으나, 인간 태아 신장세포(HEK293)의 경우, 분자량 및 처리 농도가 높아짐에 따라 세포 생존율이 약 90%까지 감소하는 것으로 나타났다.

[0100] 이로부터, 본 발명에 따른 저분자 수용성 아민 β-키토산은 저분자 수용성 아민 α-키토산과 대비하여 인간 태아 신장세포에 대한 세포 독성이 현저히 낮아 세포 생존율이 높은 것을 알 수 있으며, 저분자 수용성 아민 β-키토산의 분자량이 10000 달톤을 초과하는 경우에는 세포독성이 현저히 증가하는 반면 5000 달톤 내지 10000 달톤의 분자량을 갖는 저분자 수용성 아민 β-키토산은 세포독성이 없어 동물 생체 또는 인체에 부작용 유발 가능성이 낮으므로 안전한 것을 알 수 있다.

[0101] 따라서, 본 발명에 따른 저분자 수용성 β-키토산 또는 이의 유도체는 일반 병원성 세균 및 약물내성을 갖는 병원성 세균에 대한 항균활성이 현저히 우수할 뿐만 아니라, 인체 내 혈액에 존재하는 인간 적혈구 세포(hRBC)에 대한 용혈작용을 발생시키지 않고, 저분자 수용성 α-키토산과 대비하여 인간 정상세포(HEK293)에 대한 독성을 나타내지 않아 인체에 안전하므로 이를 유효성분으로 함유하는 항균용 조성물은 식품첨가제, 살균제, 소독제, 세제, 탈취제, 건강기능성 식품 등 항균 효과가 요구되는 다양한 분야에 사용되는 항균용 조성물로 유용하게 사용될 수 있다.

[0102] **<실험예 4> 저분자 수용성 아민 β-키토산의 세포막 투과도 평가**

[0103] 본 발명에 따른 저분자 수용성 아민 β-키토산의 세포막 투과도를 평가하기 위하여 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[0104] 먼저, 인공 리포좀(Artificial liposome)을 박테리아의 막 지질 성분인 PE/PG=7/3, w/w)으로 제작하여 각각 실시예 1와 비교예 5에서 제조된 키토산을 pH 7.4와 5.4에서 처리하여 활성 정도 농도별로 탐색하였다. 지질(Lipid, PE/PG)이 용해된 클로로포름 용액(0.1 ml)을 10 ml 바이엘(vial)에 주입하고, 질소 가스 분출(N2 gas blowing)로 클로로포름을 2시간 이상 제거하였다. 유리 벽면에 코팅된 지질 필름에 70 mM 칼세인(calcein)이 함유된 HEPES 완충용액(각 pH 5.4, 7.4)을 1 ml을 주입하고 세게 진탕한 후, 팁 타입 소니케이터(Tip type sonicator)를 이용하여 10초 간격으로 20회 소니케이션(sonication)을 수행하였다. 칼세인이 결합된 리포좀는 유리 칼세인으로부터 세파덱스 G-컬럼(Sephadex G-50 column)을 이용하여 겔 여과 크로마토그래피로 정제하였다. LUVs는 아밴티 미니-압출기(Avanti Mini-Extruder, Avanti Polar Lipids Inc. Alabaster, AL)의 0.2 m 포어 크기를 갖는 폴리카보네이트 여과기를 통하여 압출하였다. 그 후, 20 M의 지질함량을 가지는 칼세인을 함유한 LUVs 현탁액을 pH 5.4 또는 pH 7.4의 10 mM HEPES에 용해된 실시예 1 및 비교예 5의 키토산을 다양한 농도로 처리하고 배양하였다. 그 후, 칼세인이 방출하는 형광을 여기 파장은 480 nm에서, 방출 파장은 520 nm에서 형광분광기(Perkin-Elmer LS55)에서 측정하였다. 염료 방출 완결의 조절은 트라이톤 엑스-100(Triton X-100)으로 결정하였다. 100% 염료 방출은 트라이톤 엑스-100(Triton X-100)를 최종 농도의 0.1%가 되도록 첨가하

여 완료되었다. 모든 실험은 25℃에서 수행되었으며, 상기 방출률은 하기의 식 1에 따라 계산하였다. 그 결과를 도 3에 나타내었다.

수학식 1

[0105] $$\text{방출률}(\%) = \frac{(F - F_0)}{(F_t - F_0)} \times 100$$

[0106] F: 무처리 형광강도;

[0107] F_0: 키토산 처리 후 형광강도;

[0108] F_t: 리포좀의 형광강도.

[0109] 도 3에 나타난 바와 같이, 본 발명에 따른 저분자 수용성 β-키토산은 세균의 인공 세포막인 인공 리포좀에 대하여 높은 파괴력을 나타내는 것으로 확인되었다. 보다 구체적으로 본 발명에 따른 5000 달톤의 저분자 수용성 β-키토산은 pH 5.4 및 pH 7.4 모두에서 높은 형광강도를 나타내어, 칼세인이 결합되어 있는 인공 리포좀에 대하여 높은 투과성을 갖는 것을 확인할 수 있다. 반면, 저분자 수용성 α-키토산은 pH 7.4인 경우, 형광강도가 증가되는 정도가 미미한 것으로 나타났으며, pH 5.4인 경우에도 형광강도가 증가되는 것으로 나타났으나 그 정도는 저분자 수용성 β-키토산을 사용하였을 경우에 비하여 약 20% 낮은 형광증가를 보이는 것으로 나타났다.

[0110] 이로부터, 본 발명에 따른 저분자 수용성 β-키토산은 세포막에 대한 파괴력이 우수한 것을 알 수 있으며, 이는 상기 실험예 2의 결과와 일치하는 것을 알 수 있다. 또한, 저분자 수용성 α-키토산에 비하여 세포막의 파괴력이 현저히 우수한 것을 알 수 있다.

[0111] **<실험예 5> 저분자 수용성 아민 β-키토산의 세포막 형태 변화 평가**

[0112] 본 발명에 따른 저분자 수용성 아민 β-키토산의 세포막 형태 변화를 관찰하기 위하여 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[0113] 먼저, 대장균(*E. coli*)을 1 ml당 10^8개로 준비하고 Na-포스페이트 버퍼(Na-phosphate buffer: pH 7.4)에 이를 현탁시켰다. 그 후 실시예 2에서 제조된 키토산을 생육 최소저해농도(MIC)로 처리하고 1시간 반응시킨 후 2% 글루타르알데히드(glutaraldehyde)를 이용하여 세포를 고정하였다. 그 후, 10, 30, 50, 70 및 100% 에탄올을 순차적으로 처리하고 역순으로 탈수 과정을 수행한다. 탈수된 세균을 임계점 건조를 거친 다음, 골드(gold)로 코팅하고 주사전자현미경(HITHACHI S-2400, Japan)을 사용하여 120 kV에서 세균의 형태를 관찰하였다. 이때, 키토산이 처리되지 않은 대장균(*E. coli*)도 주사전자현미경 관찰을 하였으며, 그 결과를 도 4에 나타내었다.

[0114] 도 4에 나타낸 바와 같이, 본 발명에 따른 저분자 수용성 아민 β-키토산은 세균의 세포막을 변형시키는 것을 알 수 있다. 보다 구체적으로 본 발명에 따른 실시예 2에서 제조된 10,000 달톤의 저분자 수용성 아민 β-키토산을 처리한 대장균(*E.coli*)의 경우, 대장균(*E. coli*)의 세포막이 붕괴되어 있는 것을 알 수 있다. 반면, 키토산이 처리되지 않은 대장균(*E. coli*)은 세포막의 변형이 일어나지 않은 것을 알 수 있다.

[0115] 이로부터, 본 발명에 따른 저분자 수용성 아민 β-키토산은 세균의 세포막을 변형시키는 효과가 우수하며, 이로 인하여 세균의 사멸을 초래하는 것을 알 수 있다.

[0116] 따라서, 본 발명에 따른 저분자 수용성 β-키토산 또는 이의 유도체는 세균의 세포막을 변형시켜 세균을 사멸하

는 효과가 우수하므로, 이를 유효성분으로 함유하는 항균용 조성물은 식품첨가제, 살균제, 소독제, 세제, 탈취제, 건강기능성 식품 등 항균 효과가 요구되는 다양한 분야에 사용되는 항균용 조성물로 유용하게 사용될 수 있다.

[0117] **<실험예 6> 저분자 수용성 아민 β-키토산의 항생물막 평가**

[0118] 본 발명에 따른 저분자 수용성 아민 β-키토산의 항생물막 평가를 하기 위하여 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[0119] 저분자 수용성 아민 β-키토산의 부유성 세균인 슈도모나스 에루기노사(*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 및 BMP-Pa001)에 대한 전형성된 생물막(preformed biofilm) 파괴활성 측정을 측정하였다. 부유성 세균인 슈도모나스 에루기노사(*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 및 BMP-Pa001)를 37℃에서 배양하였다. 96-웰 플레이트에 상기 세균 1×10^{8} CFU/mL을 주입하고, 주입된 배양액을 37℃에서 50 rpm으로 48시간 동안 진탕배양하였다. 그 후 배양액을 피펫을 이용하여 제거하고, 200 μL의 인산완충용액(PBS)으로 3 회 세척하였다. 세척 후, 실시예 1 내지 실시예 2 및 비교예 1 내지 비교예 6에서 제조된 키토산(200 μL)을 18 내지 50 mg/mL 농도로 생물막이 전형성된 96-웰 플레이트에 첨가하였다. 상기 플레이트를 37℃, 24시간 동안 배양하고, 배양된 배양액을 피펫을 이용하여 제거하고, 인산완충용액(PBS)으로 3 회 세척하였다. 세척 후, 생물막을 메탄올로 15분 동안 상온에서 플레이트에 고정시키고, 메탄올이 모두 제거될 때까지 건조시켰다. 건조된 생물막을 정량하기 위하여 200 μL의 0.1%(w/v) 크리스탈 바이올렛(Sigma-Aldrich)을 첨가하고 5 내지 10분 동안 상온에서 염색하였다. 염색 후, 인산완충용액(PBS)로 남은 크리스탈 바이올렛을 제거하기 위하여 3 회 헹궜다. 각 웰의 슈도모나스 에루기노사(*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 및 BMP-Pa001) 생물막을 95% 에탄올 및 인산완충용액(PBS, 200 μL)으로 가용화시키고, 상온에서 30분 동안 배양하였다. 그 후, 전형성된 생물막(preform biofilm)의 파괴활성을 595 nm에서 microplate veresa max ELISA로 광흡수도를 측정하여 평가하였으며, 그 결과를 도 5 및 도 6에 나타내었다.

[0120] 도 5 및 도 6에 나타낸 바와 같이, 본 발명에 따른 저분자 수용성 아민 β-키토산은 항생물막 효과가 있는 것으로 확인되었다. 보다 구체적으로 본 발명에 따른 저분자 수용성 아민 β-키토산은 슈도모나스 에루기노사(*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 및 BMP-Pa001) 생물막에 처리였을 경우, 농도 및 분자량 의존적으로 파괴활성이 있는 것으로 나타났으며, 특히 5000 및 10,000 달톤의 저분자 수용성 아민 β-키토산은 3.12 mg/mL에서 50% 이상의 전형성된 생물막 (preformed biofilm) 파괴활성이 있는 것으로 나타났다. 반면, 저분자 수용성 α-키토산은 슈도모나스 에루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*) 세균 중 BMP-Pa001 세균에 대해서는 파괴활성이 현저히 떨어지는 것으로 나타나 균주 종류에 따라 전형성된 생물막(preformed biofilm) 파괴활성이 감소하는 것으로 나타났다.

[0121] 이로부터, 본 발명에 따른 저분자 수용성 아민 β-키토산은 농도 및 분자량 의존적으로 전형성된 생물막(preformed biofilm) 파괴활성이 있는 것으로 알 수 있으며, 균주 종류에 상관없이 전형성된 생물막(preformed biofilm) 파괴활성이 우수한 것을 알 수 있다.

[0122] 따라서, 본 발명에 따른 저분자 수용성 아민 β-키토산 또는 이의 유도체는 균주 종류에 상관없이 전형성된 생물막(preformed biofilm) 파괴활성이 우수하여 생물막 형성을 억제하는 효과가 우수하므로, 이를 유효성분으로 함유하는 항균용 조성물은 식품첨가제, 살균제, 소독제, 세제, 탈취제, 건강기능성 식품 등 항균 효과가 요구되는 다양한 분야에 사용되는 항균용 조성물로 유용하게 사용될 수 있다.

[0123] **<실험예 7> 저분자 수용성 아민 β-키토산의 생체 내(*in vivo*) 항균효과 평가**

[0124] 본 발명에 따른 저분자 수용성 아민 β-키토산의 생체 내(*in vivo*) 항균효과를 평가하기 위하여 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[0125] 약물내성 스태필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*)에 대한 항균효과

[0126] 누드 마우스의 등 표피에 약물내성인 스태필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*, CCARM 3087, 5×10^8 세포/mL)를 접종하고, 1시간 후 본 발명에 따른 실시예 2의 저분자 수용성 아민 β-키토산을 0.5 mg/mL 및 1.0 mg/mL의 농도로 접종하였다. 7일 후, 접종된 누드 마우스의 피부를 채취하고, 인산완충용액(PBS)로 세척하였다. 세척된 누드 마우스의 피부 조직을 4% 파라포름알데하이드(paraformaldehyde)에 옮겨 24시간 동안 처리하고, 2시간 동안 50% 내지 100% 에탄올을 3회 탈수하였다. 그 후, 1시간 동안 자일렌으로 치환하고, 4 μm로 절단된 시료에 파라핀 처리되었다(Microtome, Thermo-scientific). 각각의 시료는 30분 동안 상온에서 일차 항체 항-TNF-α, 항-IL-1β를 포함하는 소혈청알부민(bovine serum albumin, BSA)에 배양하였다. 상기 시료는 TBST 완충용액으로 세척한 다음, FITC-라벨 2차 항체 처리하였으며 해마톡시린 및 에오신 염색(haematoxylin & eosin staining)도 동시에 실시하여 형광분석기(IX71, Olympus, Tokyo, Japan)로 측정하였다. 이때, 대조군으로 키토산을 처리하지 않은 세균에 대해서도 측정하였으며, 그 결과를 도 7에 나타내었다.

[0127] 도 7에 나타난 바와 같이, 본 발명에 따른 저분자 수용성 아민 β-키토산은 생체 내(*in vivo*)에서 우수한 항균효과가 있는 것이 확인되었다. 보다 구체적으로 병원성 세균인 스태필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*, CCARM 3087)가 감염된 누드 마우스의 피부 조직에 존재하는 선-염증성 사이토카인(항-TNF-α 및 항-IL-1β)을 관찰해보면, 키토산이 처리되지 않은 마우스의 경우 선-염증성 사이토카인(TNF-α 및 IL-1β)이 과량 분비되어 강한 형광을 발광하는 것을 확인할 수 있다. 또한, 해마톡시린 및 에오신 염색(haematoxylin & eosin staining)을 통하여 병원성 세균에 감염된 표피 두께가 두꺼워지는 것을 확인할 수 있는데 여기에 본 발명에 따른 저분자 수용성 아민 β-키토산을 추가적으로 투여하면 다시 표피 두께가 정상 두께로 회복되는 것을 알 수 있다. 나아가, 본 발명의 저분자 수용성 아민 β-키토산에 의하여 누드 마우스의 피부 염증이 완화되는 것을 육안으로도 확인할 수 있다.

[0128] 이로부터, 본 발명에 따른 저분자 수용성 아민 β-키토산은 생체 내(*in vivo*)에서도 항균효과가 우수한 것을 알 수 있다.

[0129] 약물내성 슈도모나스 에루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*)에 대한 항균효과

[0130] ICR 마우스의 등 표피에 약물내성인 슈도모나스 에루기노사(*Pseudomonas aeruginosa* BMP-Pa001, 1×10^8 세포/mL)를 접종하고, 실시예 1의 저분자 수용성 아민 β-키토산을 10 mg/mL, 20 mg/mL 및 40 mg/mL의 농도로 접종하였다. 그 후, 7일 동안 접종된 마우스를 관찰하였으며, 관찰이 끝나면 마우스의 폐를 축출하여 균질화하였다. 균질화물은 NB + 0.5% 소듐클로라이드 아가(agar) 플레이트에 주입하여 균질화물의 세균 콜로니 형성 정도를 평가하였다. 그 결과를 도 8에 나타내었다.

[0131] 도 8에 나타난 바와 같이, 본 발명에 따른 저분자 수용성 아민 β-키토산은 생체 내(*in vivo*)에서 우수한 항균효과가 있는 것으로 확인되었다. 보다 구체적으로 슈도모나스 에루기노사(*Pseudomonas aeruginosa* BMP-Pa001)가 접종되었던 ICR 마우스의 폐 조직 세포를 균질화한 균질화물은 본 발명의 저분자 수용성 아민 β-키토산을 처리한 경우 세균 콜로니 형성이 억제되어 그 양이 현저히 감소된 것을 알 수 있다.

[0132] 이로부터, 본 발명에 따른 저분자 수용성 아민 β-키토산은 생체 내(*in vivo*)에서도 항균효과가 우수한 것을 알 수 있다.

[0133] 비약물내성 스태필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*)에 대한 항균효과

[0134] ICR 마우스의 등 표피에 약물내성인 스태필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*, ATCC 25923, 5×10^8 세포/mL)를 접종하고, 4시간 후 본 발명에 따른 실시예 2의 저분자 수용성 아민 β-키토산을 0.3 mg/mL 및 0.6 mg/mL 농도로 접종하였다. 10일 후, 접종된 ICR 마우스의 피부를 축출하고, 인산완충용액(PBS)로 세척하였다. 세척된 누드 마우스의 피부 조직을 4% 파라포름알데하이드(paraformaldehyde)에 옮겨 24시간 동안 처리하고, 2시간 동안 50% 내지 100% 에탄올을 3회 탈수하였다. 그 후, 해마톡시린 및 에오신 염색(haematoxylin & eosin

staining)하여 형광분석기(IX71, Olympus, Tokyo, Japan)로 측정하였다. 이때, 대조군으로 키토산을 처리하지 않은 세균에 대해서도 측정하였으며, 그 결과를 도 9에 나타내었다.

[0135] 도 9에 나타난 바와 같이, 본 발명에 따른 저분자 수용성 아민 β-키토산은 생체 내(*in vivo*)에서 우수한 항균 효과가 있는 것으로 확인되었다. 보다 구체적으로 스태필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*)가 접종된 ICR 마우스의 피부 조직 세포에 본 발명의 저분자 수용성 아민 β-키토산을 0.3 mg/mL 및 0.6 mg/mL의 농도로 처리된 경우, 스태필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*)가 접종되지 않은 무처리군에 가까운 피부 조직 세포가 확인되는 것을 알 수 있다.

[0136] 이로부터, 본 발명에 따른 저분자 수용성 아민 β-키토산은 생체 내(*in vivo*)에서도 항균 활성이 우수한 것을 알 수 있다.

[0137] 따라서, 본 발명에 따른 저분자 수용성 β-키토산 또는 이의 유도체는 생체 내(*in vivo*)에서도 항균 활성이 우수하므로, 이를 유효성분으로 함유하는 항균용 조성물은 식품첨가제, 살균제, 소독제, 세제, 탈취제, 건강기능성 식품 등 항균 효과가 요구되는 다양한 분야에 사용되는 항균용 조성물로 유용하게 사용될 수 있다.

[0138] 한편, 본 발명의 화합물들은 목적에 따라 여러 형태로 건강기능성 식품의 제조가 가능하다. 하기에 본 발명의 조성물을 위한 건강기능성 식품의 제조예를 예시한다.

[0139] **<제조예 1> 유제품(dairy products)의 제조**

[0140] 본 발명의 항균용 조성물 0.01 - 1 중량부를 우유에 첨가하고, 상기 우유를 이용하여 버터 및 아이스크림과 같은 다양한 유제품을 제조하였다.

[0141] **<제조예 2> 선식의 제조**

[0142] 현미, 보리, 찹쌀, 율무를 공지의 방법으로 알파화시켜 건조시킨 것을 배전한 후 분쇄기로 입도 60 메쉬의 분말로 제조하였다. 검정콩, 검정깨, 들깨도 공지의 방법으로 쪄서 건조시킨 것을 배전한 후 분쇄기로 입도 60 메쉬의 분말로 제조하였다. 본 발명의 항균용 조성물을 진공 농축기에서 감압농축하고 건조분말을 얻었다.

[0143] 상기에서 제조한 곡물류, 종실류 및 항균용 조성물의 건조분말을 다음의 비율로 배합하여 제조하였다.

[0144] 곡물류(현미 34 중량부, 율무 19 중량부, 보리 20 중량부),

[0145] 종실류(들깨 7 중량부, 검정콩 8 중량부, 검정깨 7 중량부),

[0146] 항균용 조성물 (2 중량부),

[0147] 영지(1.5 중량부), 및

[0148] 지황(1.5 중량부).

[0149] **<제조예 3> 건강기능성 식품의 제조**

[0150]	항균용 조성물	100 mg
[0151]	비타민 혼합물	적량
[0152]	비타민 A 아세테이트	70 μg
[0153]	비타민 E	1.0 mg

[0154]	비타민 B1	0.13 mg
[0155]	비타민 B2	0.15 mg
[0156]	비타민 B6	0.5 mg
[0157]	비타민 B12	0.2 μg
[0158]	비타민 C	10 mg
[0159]	비오틴	10 μg
[0160]	니코틴산아미드	1.7 mg
[0161]	엽산	50 μg
[0162]	판토텐산 칼슘	0.5 mg
[0163]	무기질 혼합물	적량
[0164]	황산제1철	1.75 mg
[0165]	산화아연	0.82 mg
[0166]	탄산마그네슘	25.3 mg
[0167]	제1인산칼륨	15 mg
[0168]	제2인산칼슘	55 mg
[0169]	구연산칼륨	90 mg
[0170]	탄산칼슘	100 mg
[0171]	염화마그네슘	24.8 mg

[0172] 상기의 비타민 및 미네랄 혼합물의 조성비는 비교적 건강기능성 식품에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만, 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하며, 통상의 건강기능성 식품 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 과립을 제조하고, 통상의 방법에 따라 건강기능성 식품 조성물 제조에 사용할 수 있다.

[0173] **<제조예 4> 건강기능 음료의 제조**

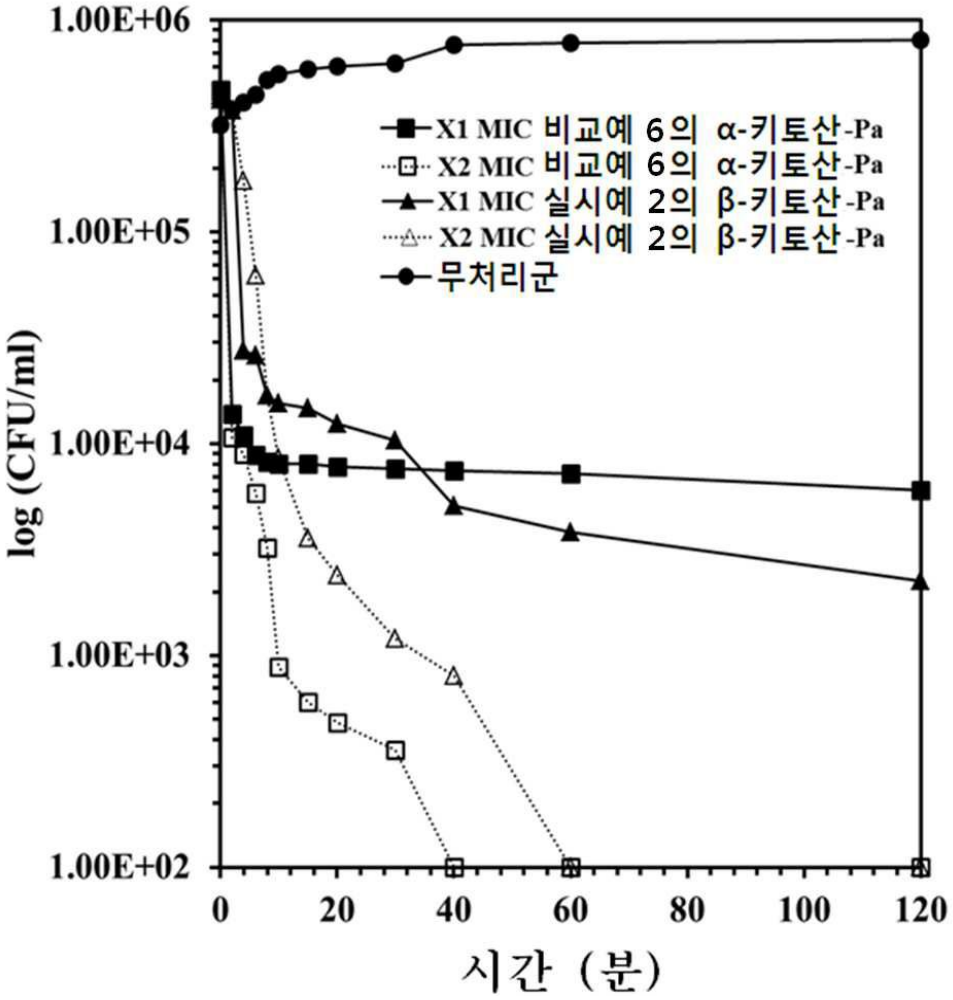
[0174]	항균용 조성물	100 mg
[0175]	구연산	100 mg
[0176]	올리고당	100 mg
[0177]	매실농축액	2 mg
[0178]	타우린	100 mg
[0179]	정제수를 가하여 전체	500 mL

[0180] 통상의 건강음료 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 약 1시간 동안 85℃에서 교반 가열한 후, 만들어진 용액을 여과하여 멸균된 1 용기에 취득하여 밀봉 멸균한 뒤 냉장 보관한 다음 본 발명의 건강음료 조성물 제조에 사용한다.

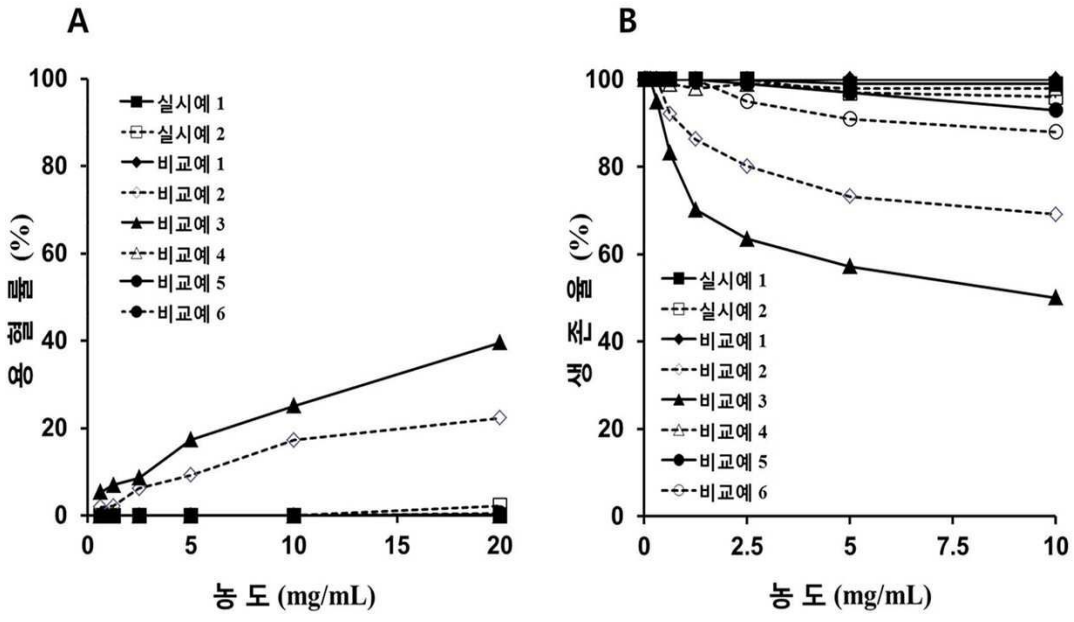
[0181] 상기 조성비는 비교적 기호 음료에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만, 수요계층, 수요국가, 사용 용도 등 지역적, 민족적 기호도에 따라서 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하다.

도면

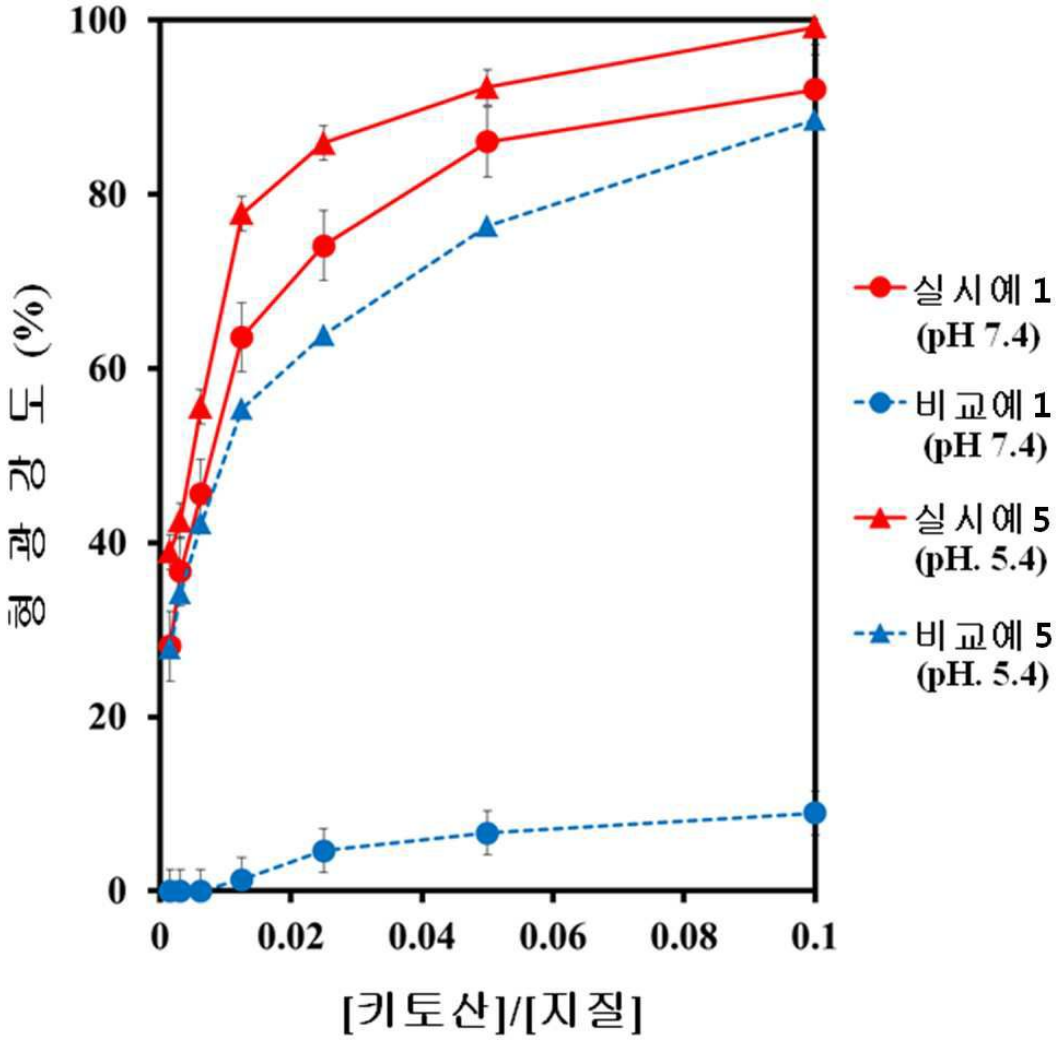
도면1


1.00E+06
1.00E+05
1.00E+04
1.00E+03
1.00E+02
log (CFU/ml)
0
20
40
60
80
100
120
시간 (분)
X1 MIC 비교예 6의 α-키토산-Pa
X2 MIC 비교예 6의 α-키토산-Pa
X1 MIC 실시예 2의 β-키토산-Pa
X2 MIC 실시예 2의 β-키토산-Pa
무처리군

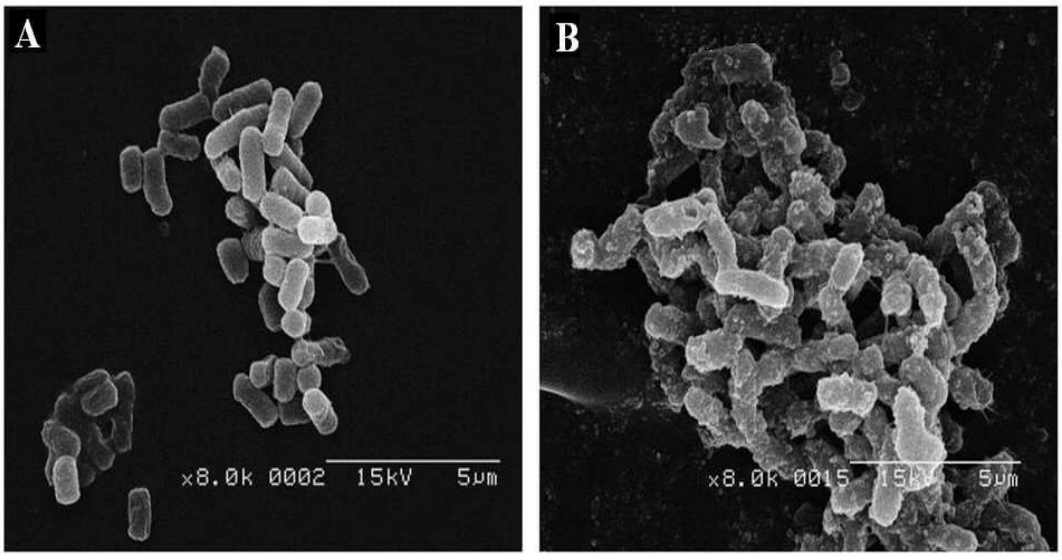
도면2


A
B
용혈율 (%)
농 도 (mg/mL)
실시예 1
실시예 2
비교예 1
비교예 2
비교예 3
비교예 4
비교예 5
비교예 6

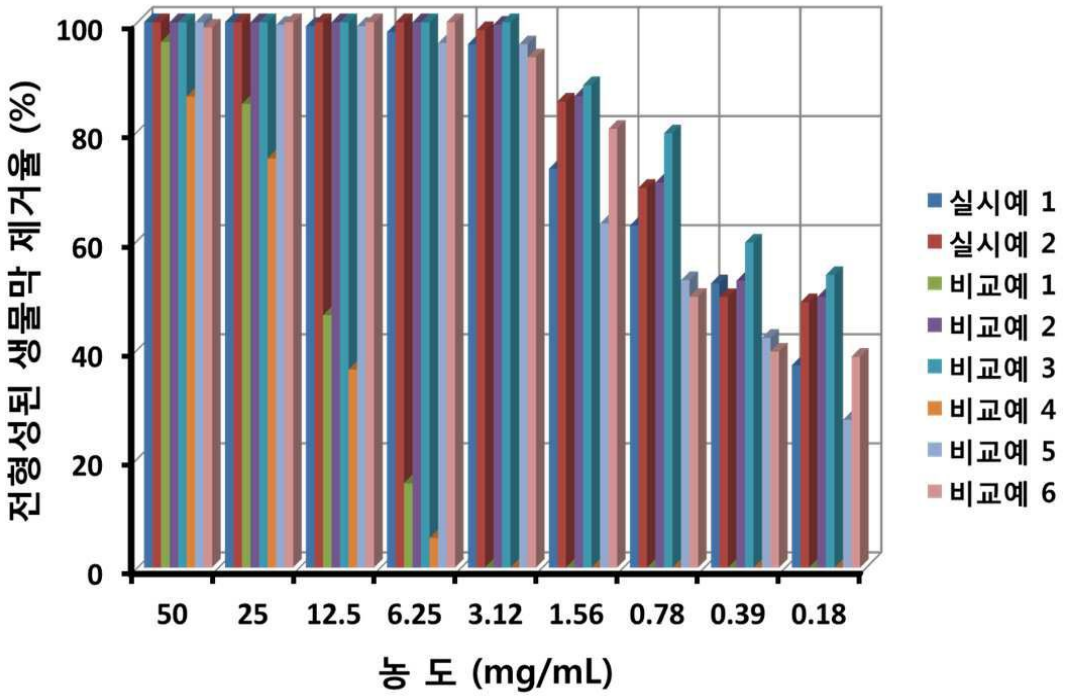
도면3


100
80
60
40
20
0
평 균 방 출 도 (%)
0
0.02
0.04
0.06
0.08
0.1
[키토산]/[지질]
실 시 예 1
(pH 7.4)
비 교 예 1
(pH 7.4)
실 시 예 5
(pH. 5.4)
비 교 예 5
(pH. 5.4)

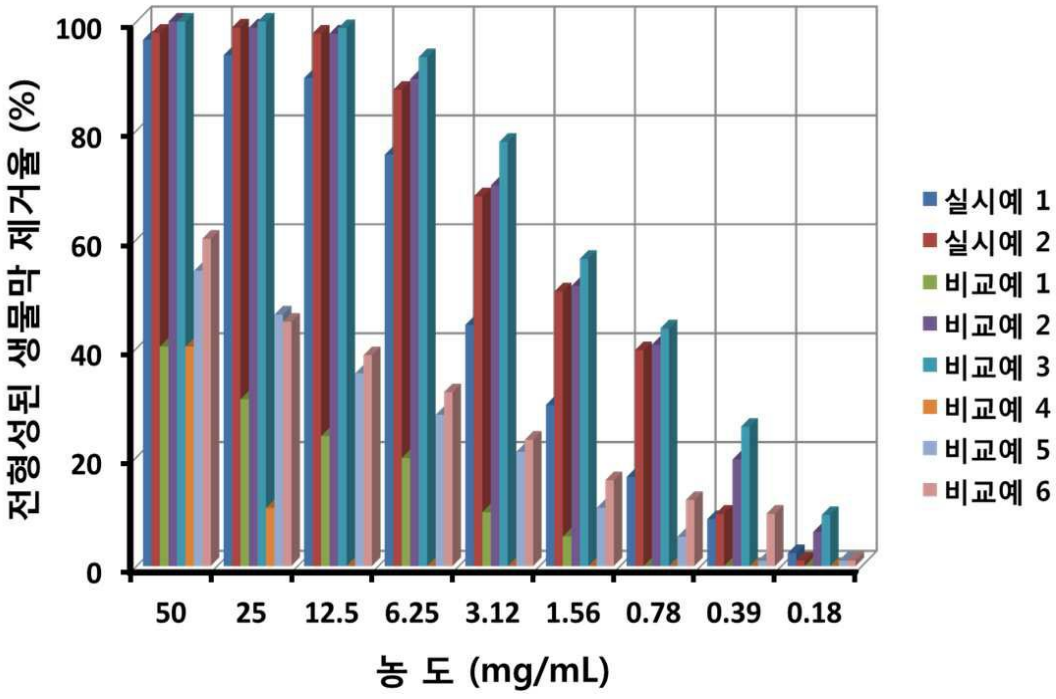
도면4


A
x8.0k 0002 15kV 5μm
B
x8.0k 0015 15kV 5μm

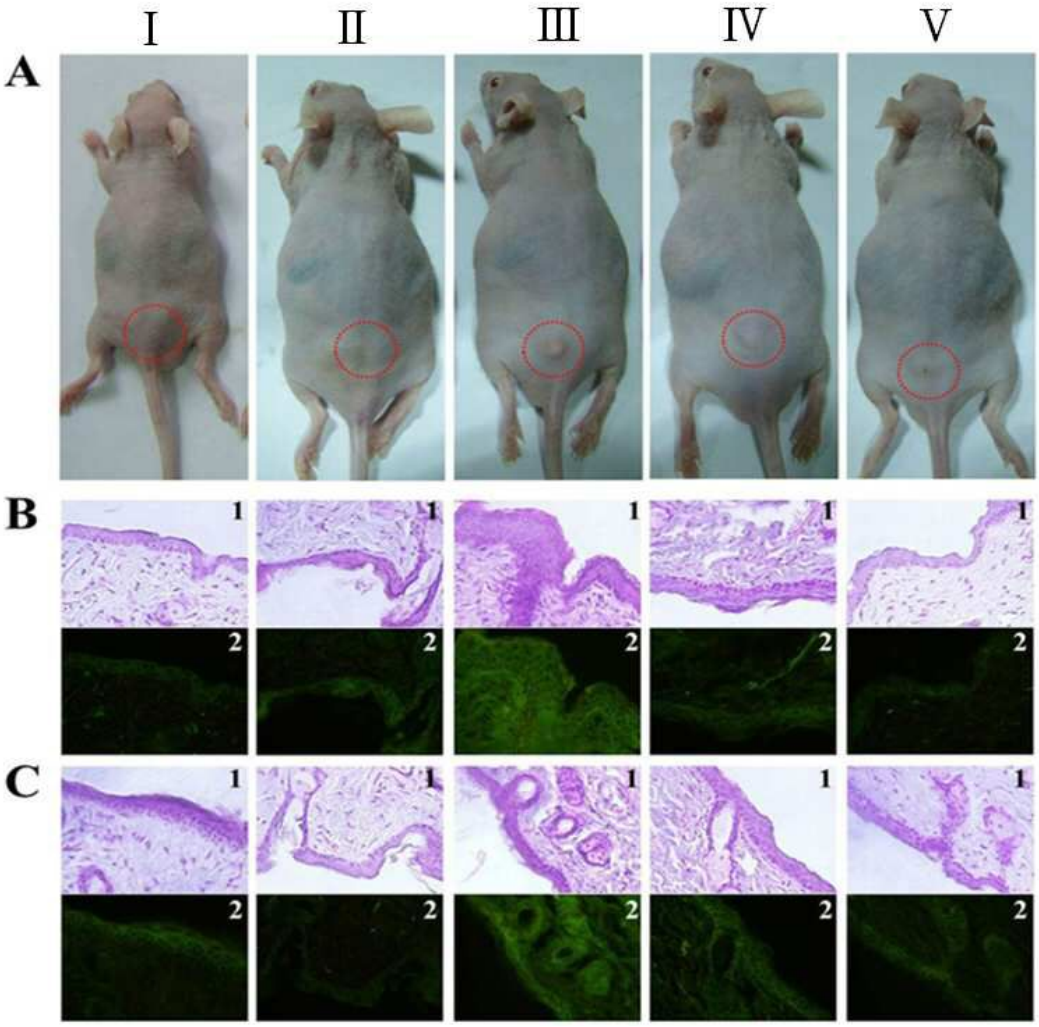
도면5


전형성된 생물막 제거율 (%)
100
80
60
40
20
0
50
25
12.5
6.25
3.12
1.56
0.78
0.39
0.18
농 도 (mg/mL)
실시예 1
실시예 2
비교예 1
비교예 2
비교예 3
비교예 4
비교예 5
비교예 6

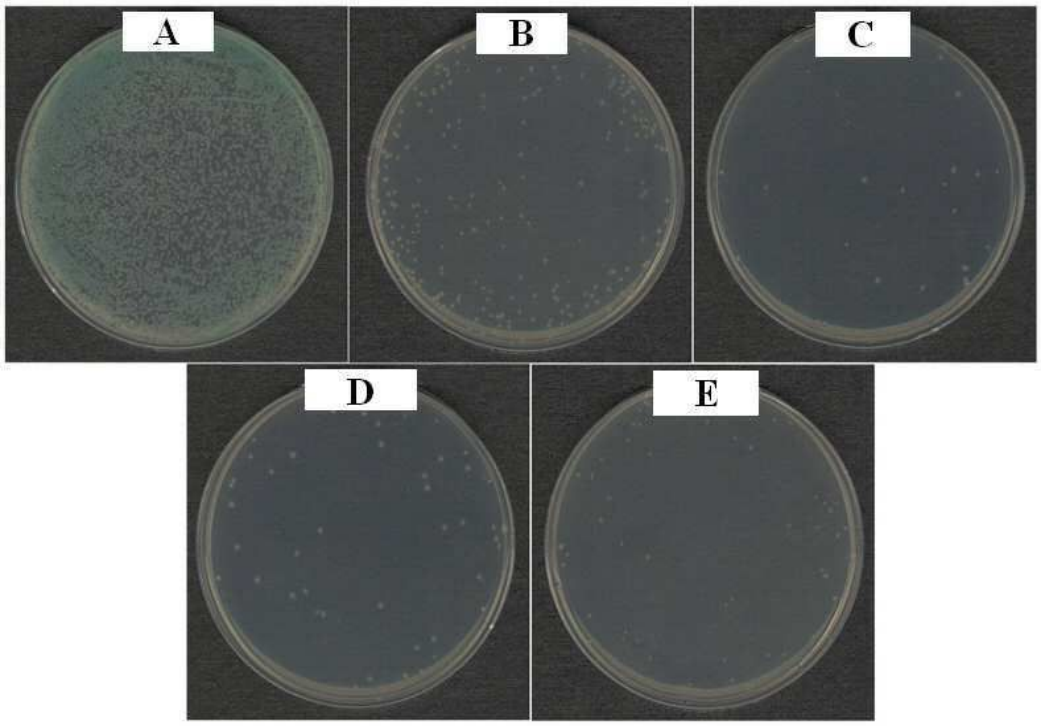
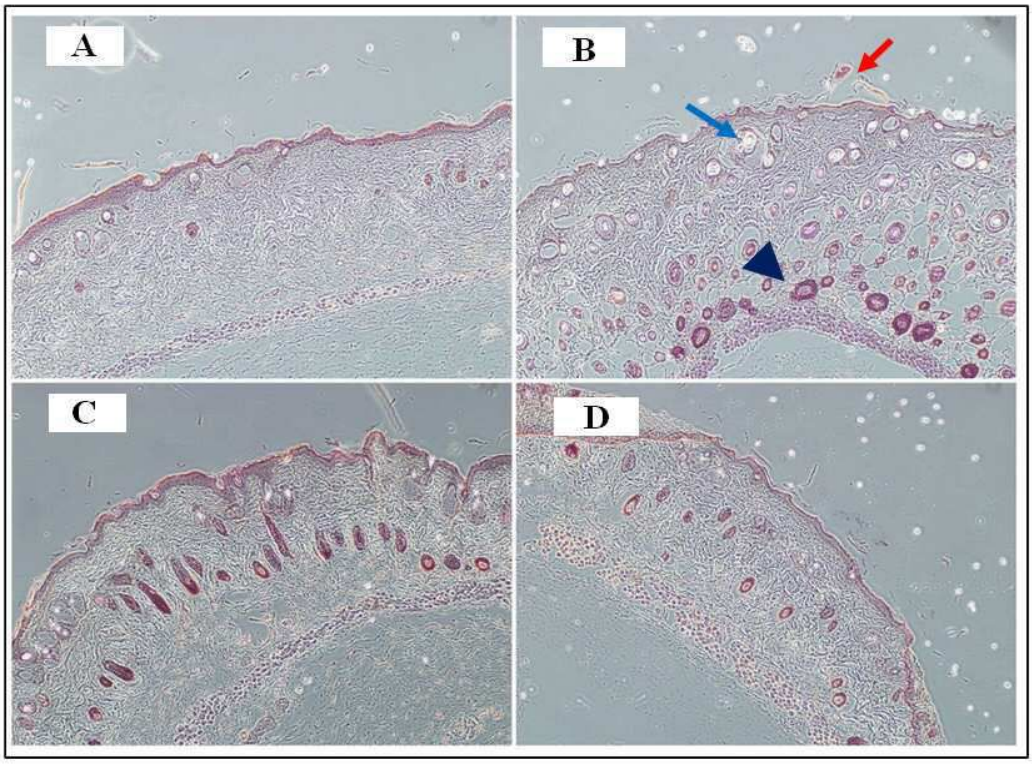
도면6


전형성된 생물막 제거율 (%)
100
80
60
40
20
0
50
25
12.5
6.25
3.12
1.56
0.78
0.39
0.18
농 도 (mg/mL)
실시예 1
실시예 2
비교예 1
비교예 2
비교예 3
비교예 4
비교예 5
비교예 6

도면7



도면8



도면9