



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

碩士學位論文

The Study on Antibacterial Effect of Aqueous
Chitosan as a Therapeutic Agent of Fish Diseases

濟州大學校大學院

海洋生命科學科

崔辰泳

2012年 7月

어병예방제 사용가능성을 위한 수용성키토산의 항균성 연구

指導教授 李 濟 熙

崔 辰 泳

이 論文을 理學 碩士學位 論文으로 提出함

2012 年 8 月

崔辰泳의 理學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長

委 員

委 員

김 기 영

정 준 범

이 제 희



濟州大學校 大學院

2012年 8月

THE STUDY ON ANTIBACTERIAL EFFECT
OF AQUAOUS CHITOSAN AS A
THERAPEUTIC AGENT OF FISH DISEASES

Jin Young Choi
(Supervised by professor Jehee Lee)

A thesis submitted in partial fulfillment
of the requirement for the degree of
Master of Science

Department of Marine life science
GRADUATE SCHOOL
JEJU NATIONAL UNIVERSITY

July, 2012

목 차

I. 서 론	
1. 동기 및 목적	1
2. 연구내용	2
II. 재료 및 방법	
1. 수용성 고분자 키토산 제조(1.0%(w/v)).....	5
2. 실험군의 농도 결정	5
3. <i>In vitro</i> test	6
가. 균주배양	6
나. Paper Disc test	6
다. 96-well microplate을 이용한 항생효과 테스트	7
4. <i>In vivo</i> test	8
가. 제브라피쉬의 키토산 농도에 따른 생존 시간 비교.....	8
나. 제브라피쉬의 박테리아 감염 조건 탐색	9
III. 결 과	
1. <i>In vitro</i> test	10
가. 균주 배양	10
나. Paper Disc test	10
다. 96-홈판 (microplate)을 이용한 항생효과 테스트	13
2. <i>In vivo</i> test	20
가. 제브라피쉬의 키토산 농도에 따른 생존 시간 비교	20
나. 제브라피쉬의 박테리아 감염 조건 탐색	21
다. 감염된 제브라피쉬 치료 효과 관찰	22
라. 꼬리지느러미를 자른 제브라피쉬를 이용한 감염실험.....	23
마. 꼬리지느러미를 자른 제브라피쉬를 이용한 어병균 감염예방 효과	24
바. <i>Aeromonas hydrophila</i> 에 대한 키토산의 항균효과 분석	26
사. <i>Aeromonas hydrophila</i> 에 대한 키토산의 감염 예방효과 실험.....	28
3. <i>In vitro</i> 와 <i>In vivo</i> test의 연계분석.....	30
IV. 고 찰	
1. 질병치료의 측면	32
2. 질병예방 및 수질개선 측면	32
V. 참고문헌	34

Abstract

Previous studies have confirmed that positively charged chitosan can bind to negatively charged bacterial cell wall. In this regards both low and high-molecule types of chitosan has shown antibiotic effect against various pathogenes. In our study, we have made a high-molecule weight chitosan solution and investigated the antibacterial effects by *in vitro* tests. It was revealed that chitosan solution can reduce the fish disease bacteria population release in water tank.

In vitro test, using microplate method showed that chitosan has a distinguish mark on depopulation of bacteria. But it is difficult to apply to all bacteria such as *Vivrio ichyventery*. The exact reason for this is not yet revealed and there is no relation either the bacteria is Gram positive or negative.

In vivo study we have determined the appropriate infection condition of bacteria into zebrafish. Comparing induced chitosan solution (treatment group) with no induced control group showed that new way of prevent to fish disease just one dose treatment to the tanks. However, present data suggest that application of chitosan in fish disease treatment is not suitable for healing the wounds. Therefore, we suggest that antibacterial activity of water-soluble chitosan as effective treatment for fish disease. We certificate antibacterial activity on fish disease strains through *in vitro* test. And if we use chitosan solution with predetermined concentration that the macro-molecule soluble chitosan can use a preophylactic natural medicine. This research provides insights into a novel approach of fish disease control with less labor and lower cost. Therefore, addition of chitosan into fish culturing tanks would be an excellent method to control the disease as well as to maintain the higher water quality of aquarium

요 약 문

양이온잔기가 많이 분포된 키토산은 음전하로 하전된 물질을 흡착하는 성질을 갖고 있어 박테리아 및 중금속을 억제하는데 탁월한 효과가 있다. 분자량과 항균성은 상관관계가 없다는 선행연구를 토대로 제작비용이 저렴하고 간편한 수용성 고분자 키토산을 제조하여 손쉽게 수족관 관리를 할 수 있는 새로운 어병예방제로의 활용 가능성을 확인하였다.

본 연구에서는 2%의 아세트산에 키토산분말(Showa co. Japan)을 녹인 후 중화반응을 거쳐 pH6.0의 수용성 고분자 키토산을 제작하였고, 이를 토대로 어병 관련 박테리아(*Aeromonas*, *Salmonella*, *Vivrio*, *Edwardsiella* 속) 9가지를 대상으로 *in vitro* test를 통해 항균성효과를 조사하였다. *in vitro* test는 Paper disc method 및 microplate을 이용한 항균성을 테스트, CFU 측정의 방법으로 진행하였다. *in vitro* test에서 의미 있는 효과가 있는 균주를 대상으로 *in vivo* test를 진행하였다. 제브라피쉬를 대상으로 키토산 농도별 생존조건, 어류질병박테리아 감염 조건, 감염된 제브라피쉬에 대한 질병 예방효과를 실험하였다. Microplate에서 O.D 0.05, 200 μ l의 배양 균주에 각 농도의 키토산 20 μ l를 투여하여 3일간 흡광도를 측정한 성장억제 테스트 결과 키토산 농도 0.1~0.01%에서 4종의 박테리아 균주(*Aeromonas hydrophila*, *Edwardsiella tarda*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteric*)에 대해 성장억제효과가 있었다. 항균성 효과가 있었던 4가지 균주를 대상으로 *in vivo* test 중 감염조건을 조사한 결과 200ml의 미디어병에 O.D_{600nm}= 1.0의 *Aeromonas hydrophila*를 10ml 접종한 실험군에서 제브라피쉬가 2일이내에 사망하여 대략적인 감염 기준으로 설정하였다. 감염조건 설정 이후 20분간 균주를 키토산에 노출시켜 CFU를 통해 0.0001%와 0.0005%에서 약90% 이상의 균주의 성장을 억제하는 키토산의 강력한 항균성을 재확인하였다. 제브라피쉬를 이용한 14일간의 감염예방효과실험을 통해 *Aeromonas hydrophila* 2 O.D, 0.00005% 농도의 키토산처리 실험군에서 제브라피쉬가 대조군에 비해 14일 중 2일 이상 더 생존한 것으로 미루어 감염예방효과가 있음을 확인할 수 있었다.

평상시 어항관리에 키토산을 적용한다면 물고기 생존에 적합한 농도인 0.00001%를 정기적으로 투여하는 방식으로 관리를 하고, 물의 오염정도가 높은 경우 0.00005%를 투여해준다면 키토산이 박테리아의 성장을 억제하여 낮아진 박테리아의 개체수에 대해서는 물고기가 자체면역으로 질병을 극복하고 건강하게 살 수 있을 것이라 예측할 수 있다. 뿐만아니라 키토산은 중금속 및 불소를 흡착하여 물고기 생존에 적합한 수질개선효과도 더불어 볼 수 있을 것이다.

I. 서론

1. 동기 및 목적

요즘 가정이나 관공서 마다 공간에 활력을 불어넣기 위해 관상어를 키우는 곳이 늘고 있다.¹⁾ 하지만 인테리어 측면의 이득에 비하면 관상어를 관리하기가 여간 까다로운 것이 아니다. 좁은 공간에서 키우는 것이기에 필터링을 거친다고 해도 한순간의 환경변화나 물의 오염으로 솔방울병, 내장괴사, 지느러미썩음병, 안구상실과 같은 질병을 불러일으킬 수 있다. 어류 질병은 치명적인 경우 한 물고기만 발생해도 전 수조의 물고기가 전멸할 수 있기에 한번 발병하면 긴장을 놓을 수 없다. 그렇기에 관상어를 키운다는 것은 노하우가 필요하며, 노하우를 얻는데 많은 물고기들을 희생시키게 된다.

수족관에 질병이 발생했을 때 일반적으로 대처하는 방법은 3~5회의 환수, 소금욕, 일광욕, 마이신계열의 항생제(개인적인 방법)를 처리 하는 것 이다.²⁾ 하지만 모든 치료법은 처리시 따로 격리를 시켜야 하는 번거로움이 있고, 효과가 좋은 항생제의 경우 자주 사용시 질병원인균의 내항성을 증가시켜 항생제 효과가 저하된다. 물론 질병치료용 기성제품들이 있지만 물고기의 병명에 맞추어 적당한 것을 사용하지 못하면 효과를 보지 못하는 단점이 있다.

관상어의 질병을 종합적으로 관리할 수 있으면서 동시에 간편하고 저렴한 방법은 없을까?

비항생 물질이면서 무독성이고, 물고기는 안전하면서 질병 발병균주에만 효과를 발휘하며, 생산비용이 낮은 새로운 치료제로서, 본 연구에서는 수용성 고분자 키토산을 제안하고자 한다.

2. 연구내용

키토산은 지구상에 셀룰로오스 다음으로 풍부한 갑각류 껍질의 재료인 키틴에서 탈아세틸화과정을 거쳐 만들어진 물질로 글루코사민 결합으로 되어 있는 무독성의 물질이다.³⁾ 아세트산, 젖산, 포름산 등의 유기산 및 염산, 질산 등의 무기산에 용해되는 특성이 있다. 수용화된 분자의 크기에 따라 고분자와 저분자로 구분하는 키토산은⁴⁾ 아민기 활성부위가 있어 동물성 식이섬유 중 유일하게 (+)이온을 띄고 있으며 콜레스테롤, 세균, 박테리아, 원자량이 큰 중금속, 암세포, 농약, 다이옥신 등 (-)이온을 가진 유해물질을 흡착하는 특징이 있다.⁵⁾

1960년대 중반 이탈리아의 Muzzarelli에 의해 시작된 키토산에 관한 연구는 1980년대 중반 이론적으로 확립되었다. 1980년대 초 키틴·키토산연구의 중심이 일본으로 이동하였으며, 생체기능성물질의 개발 재료로 사용되었다. 이러한 키토산은 물처리용 금속흡착제, 이온교환체, 효소고정화 담체 및 의료용 재료 등 많은 분야에서 응용되고 있다. 최근에는 키토산 올리고당이 항종양, 면역 증강 및 부활작용, 항균 및 항곰팡이 활성, 콜레스테롤 개선 및 고혈압 억제작용 등 여러 가지 생리활성을 발현하는 것으로 알려짐으로써 생리기능성 신소재로서 연구개발이 수행되어 왔다.

표 1. 키틴·키토산의 용도 및 응용 정리

순	기능	용도 및 응용
1	중점	식품첨가물 냉동제품 비스킷 사료
2	항균 항곰팡이	항균 항곰팡이제 보존제 식물방역
3	항콜레스테롤	의약품 특정보건용식품
4	면역부활	항암제 면역부활제
5	창상치유	창상피복보호재 수술용 봉합사
6	담체	서방성 약제
7	보습 유향	샴푸 기초화장품 목욕용품
8	생장촉진	생장촉진제 종자코팅제
9	응집	배수처리용 응집제 청징제 단백질 비타민 회수
10	다공성	마이크로비드 효소 고정화담체 크로마토그래피
11	분리	물 알코올 분리막 이온 수송막
12	흡습	스포츠웨어 의류

키토산의 항균성은 0.02% 정도의 저분자키토산(키토산올리고당)을 첨가하여

도 대장균의 증식을 거의 완벽하게 억제시킬 수 있을 정도로 강력하여 무독성 천연 식품 보존제로 응용되고 있다. 키토산은 육류보존제로도 이용되는데 키토산 농도 0.01%의 액체배양에서 부패균주인 *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fragi* 등의 성장을 억제하고, 조금 높은 농도인 0.1~1.0%에서 육류가 부패하는 초기에 나타나는 균주인 *Lactobacillus(Leuconostoc) plantanreum*, *Pediococcus pentosaceus*, *Micrococcus varians* 등의 성장을 방지하고 저장동안 육류의 적색을 잘 유지시키는 효과를 갖는다는 연구가 있다.⁶⁾

키토산은 수용화된 분자의 크기에 따라 고분자와 저분자키토산으로 구분한다. 고분자 키토산은 고분자 물질로 분자량은 학자마다 약간씩 견해가 다르나 대개 수 만에서 수 백 만 달톤까지를 말하고, 저분자 키토산은 키토올리고당이라고도 부르며 초 저탄당(5-10탄당 이하)으로 분자량이 매우 낮은 것을 말한다.

키토산의 항균성을 알아보기 위해 저분자(분자량 10,000)와 고분자 그룹(분자량 26,000)으로 나누어 테스트한 선행 연구에 따르면 수용성 키토산의 항균성은 분자량에 상관없이 우수하다는 결과를 얻었다.⁷⁾ 초기 키토산연구에서는 저분자상태에서 항균성이 매우 좋다는 가설을 주장하였다. 하지만 분자량 10,000과 분자량 26,000등 저분자와 고분자 그룹으로 나누어 *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Bacillus*, *E. coli*, *Pichia* 속에 해당하는 균주들을 대상으로 항균성 테스트(pH5.6~6.0범위)를 진행한 결과, 분자량에 상관없이 수용성키토산의 농도가 20~25ppm일 때 우수한 항균성을 보여주었음이 밝혀졌다. 수용성 키토산이 분자량과 상관없이 항균성을 띄는 이유는 수용성키토산에 존재하는 수많은 양전하 잔기가 미생물의 음전하를 띄고 있는 세포 외부와 결합하여 세포벽을 파괴하거나 응집시키기 때문이다.⁸⁾

어류에 발생하는 질병 원인 박테리아는 다음과 같다.⁹⁾

표 2. 어병 원인 박테리아의 전반적 특성과 분포

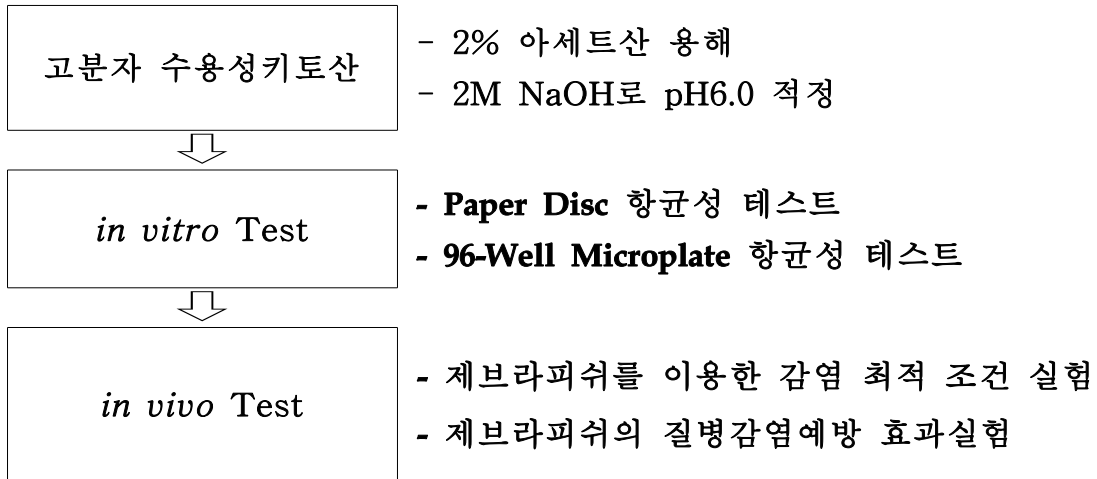
병원체 종류	질 병	숙주생물	분포
<i>Aeromonas</i>	출혈성패혈증 솔방울병	다양한 담수어류	전세계
<i>Vibrio</i>	내장괴사	가자미	일본
<i>Staphylococcus</i>	안구질환	잉어	인디아
<i>Edwardsiella</i>	에드워드감염증	다양한 담수어류	일본, 미국

키토산의 항균성을 다양한 종류의 어병 원인균에 적용하면 박테리아의 생장을 억제시켜 물고기의 질병 치료가 가능할 것이라 예측할 수 있다.

고형 가루상태의 키토산을 수용액으로 만드는 방식은 미생물에서 추출한 효소를 이용하여 분해하는 방법과 산으로 용해시키는 방법으로 나눌 수 있다. 체내흡수를 위하여 저분자 상태의 올리고키토산으로 분해하여 식품 및 건강보조제로 사용하기위에 효소나 막여과법을 사용하지만 이 방법은 생산단가가 높다는 단점이 있다.¹⁰⁾ 반면 산에 녹이는 방식은 생산단가가 저렴한 반면 분자의 크기가 불규칙하기 때문에 음용제로 사용하기에는 부적절하다. 그렇지만 항균성은 동일하면서 생산단가가 낮다는 점은 어병치료제로 키토산을 활용하기에 매력적인 부분이라 할 수 있다.

본 연구는 분자량과 항균성과의 상관관계가 약하다는 선행연구결과를 전제로 제작비용이 저렴하고 간편한 아세트산으로 수용성 고분자 키토산을 제조하여 생체신화적인 신개념의 어항관리제로의 활용 가능성을 확인하고자 한다.

II. 재료 및 방법



1. 수용성 고분자 키토산 제조(1.0%(w/v))

2% acetic acid에 chitosan(Showa co. Japan) 4g을 녹인다. Acetic acid 5.6 ml, 분말키토산 4g, 증류수 294.4ml을 혼합하여 magnetic stir로 24시간 용해 후 2M의 NaOH로 pH6.0이 되도록 적정한다. 증류수를 부어 최종 부피가 400ml이 되도록 맞추어 1.0%의 수용성 고분자 키토산용액을 제조한다.

2. 실험군의 농도 결정

제브라피쉬로 진행한 예비실험에서 1.0%와 0.1%의 고분자 수용성 키토산에 서는 5~10분 이내에 대상 물고기가 사망했다. 사망할때까지의 물고기의 행동을 관찰한 결과 고분자 키토산이 아가미에 흡착되어 호흡곤란을 유발한 것이라 추측할 수 있었다. 따라서 농도는 0.1%에서 10배씩 희석하여 최종 0.00001%까지 5단계의 실험군으로 나누었다. (0.1×10^0 %, 0.1×10^{-1} %, 0.1×10^{-2} %, 0.1×10^{-3} %, 0.1×10^{-4} %)

0.1×10⁻⁴ %)



그림1. 0.1% 키토산에 5분 동안 노출된 제브라피쉬

3. *in vitro* Test

가. 균주 배양

어류의 질병을 일으키는 균주를 학교 실험실에서 배양했다. 4ml의 적정 액체배지에 동결건조된 균주를 접종, 배양한 뒤 고체배지에 도말하였다.

표3. 확보된 어류 질병 유발 균주의 종류 및 배양상태

순	균 주	배지	분양장소
1	<i>Vibrio ichthyventery</i>	Marine ager	충남대
2	<i>Vivrio fluvialis</i>	Marine ager	충남대
3	<i>Edwardsiella tarda</i>	Nutrient agar	KCTC
4	<i>Staphylococcus aureus</i>	Nutrient agar	KCTC
5	<i>Listonella anguillarum</i>	Nutrient agar	KCTC
6	<i>Salmonella enteric subsp. enterica</i>	Nutrient agar	KCTC
7	<i>Aeromonas bivalvium</i>	TSA	KCTC
8	<i>Aeromonas Hydrophila</i>	Nutrient agar	KCTC
9	<i>Trichoderma reesei</i>	Nutrient agar	KCTC

나. Paper Disc Test

[표3]의 7가지 균주를 대상으로 paper disc 항균성 테스트를 진행하였다. 대조군으로 증류수와 Ampicilin(1mg/ml), Ampicilin(100µg/ml)을 사용하였다.

각 균주를 해당 액체배지 4ml에 접종, 16시간 배양한 후 (30℃, 200rpm), 접

중한 균을 각각 10배로 희석한 200 μ l의 배양액(균 배양원액 20 μ l에 적합한 broth 180 μ l 혼합)을 plate에 도말하였다. 시료 20 μ l를 흡수시켜 건조시킨 Paper Disc를 박테리아 접종이 끝난 agar plate에 얹어놓았다. Paper Disc(8mm, 3M)는 총7개 균으로 다음과 같이 처리하였다.

표4. Paper Disc 테스트 조건

그룹	대조군			실험군				
	D. W	Amp1	Amp0.1	A	B	C	D	E
내용	증류수	엠펜실린 (1mg/ml)	엠펜실린 (100 μ g/ml)	키토산 (0.1 \times 10 ⁰ %)	키토산 (0.1 \times 10 ⁻¹ %)	키토산 (0.1 \times 10 ⁻² %)	키토산 (0.1 \times 10 ⁻³ %)	키토산 (0.1 \times 10 ⁻⁴ %)

다. 96-well Microplate 을 이용한 항생효과 테스트

96-well microplate을 활용하여 7종류의 균주에 대한 수용성 키토산의 항균성 테스트를 진행하였다. 각 균주를 해당 액체배지 4ml에 접종하여 30 $^{\circ}$ C, 200rpm으로 16시간 배양한 후 200 μ l를 채취하여 스펙트로포토미터로 OD값을 측정하였다. OD를 통해 균의 성장도를 파악한 후 액체배지를 기준(blank)으로, OD값의 범위 0.1~0.05에 들도록 액체배지로 희석시켜 모든 균들의 개체수가 약 10^{5/6} cells/ml가 되도록 하였다.

각 균주별 대조군은 두 가지로 희석균주 200 μ l 만 접종한 것과 희석균주 200 μ l에 엠펜실린 20 μ l을 추가한 것으로 설정하였다. 실험군은 희석균주 200 μ l에 각 농도별 키토산 20 μ l를 추가한 것으로 설정하였다. 대조군과 실험군은 96홈판(96-well)에 접종하였으며, 각 균주별로 3회 반복 실험을 하였다. 접종 후 30 $^{\circ}$ C 인큐베이터에서 배양하며 3일에 걸쳐 17:00에 측정하였다. 측정은 대전바이오벤처타운의 Elisa reader를 이용하였다.

7종류의 박테리아에 대하여 3회 반복실험을 수행하고 박테리아의 성장에 키토산이 미치는 영향여부를 파악하였다. 각 well에는 200 μ l의 희석한 균을 모두 주입

하고, 대조군에는 이미 항생성이 증명된 엠피실린(5 mg/ml, 1 mg/ml 100 µg/ml)을 20µl 씩 추가 투입한 그룹과 희석된 균 상태에 어떤 것도 처리하지 않은 그룹으로 나누었다. 실험군은 0.1%~0.00001%의 키토산을 해당 열의 Well에 20µl 추가 투입하였다.

표5. 96-well micro plate에 주입한 용액의 구성

내 용	96-well plate 각 well 당 주입양(단위:µl)			
	희석 균	엠피실린	키토산	총
A 박테리아 + 엠피실린 5 mg/ml	200	20	0	220
B 박테리아 + 엠피실린 1mg/ml	200	20	0	220
C 박테리아 + 엠피실린 100 µg/ml	200	20	0	220
D 박테리아 + 0.1% 키토산	200	0	20	220
E 박테리아 + 0.01% 키토산	200	0	20	220
F 박테리아 + 0.001% 키토산	200	0	20	220
G 박테리아 + 0.0001% 키토산	200	0	20	220
H 박테리아 + 0.00001% 키토산	200	0	20	220
I 박테리아	200	0	20	220

4. *in vivo* Test

가. 제브라피쉬의 키토산 농도에 따른 생존 시간 비교

in vivo 실험에 들어가기 앞서 수용성 고분자 키토산이 물고기의 생존에 미치는 영향을 알아보기 위하여, 제브라피쉬를 이용하여 수온 20℃에서 키토산 농도 별 24시간 생존테스트를 하였다. 제브라피쉬 생존테스트 그룹은 아무처리도 하지 않은 대조군과 수용성 키토산을 처리한 실험군 (0.5%~0.00001%)으로 설정하였고, 물의 총 부피는 1000ml 였다. 각 실험군당 두 마리의 제브라피쉬를 투입하고 7일간 두고 결과를 관찰하였다.

나. 제브라피쉬의 박테리아 감염 조건 탐색

1) 감염을 일으키는 균의 적정투여량

피부질환을 일으키는 *Aeromonas* 를 중심으로 진행하였다. 그 이유는 감염 여부를 육안으로 관찰가능하기 때문이다. 반복실험을 위해 1개의 대조군에 3개의 실험군으로 나누어 7일간 사육하였다.

2) 기타 질병유발 균 감염실험

현재 보유중인 *in vitro* test에서 사용했던 7가지 균주를 이용하여 감염실험을 진행하였다.

3) 감염된 제브라피쉬의 키토산 처리테스트

이미 질병에 감염된 물고기를 수족관마다 돌아다니며 구입하여 키토산 처리를 하였다.

4) 상처를 낸 제브라피쉬의 감염실험

옆구리를 살짝 긁은 후 균주를 투여한 수조에 담는 방법과 꼬리지느러미를 자른 후 담는 방법을 이용하였다. O.D._{600nm}의 흡광도 값을 1.0과 비슷하여 맞춘 후 균주투여량을 조절하여 균주수를 균일하게 조절하였다.

5) 질병예방실험

감염되는 조건에 키토산농도를 달리하여 동시 투여한 후 정상물고기와 꼬리지느러미를 자른 물고기를 넣어 키토산이 감염을 예방할 수 있는지 여부와 예방을 위해 사용할 수 있는 최적의 키토산 농도를 알아내고자 하였다.

6) 질병치료실험

최적 감염조건에서 1일부터 4일까지 시간을 다르게 노출한 물고기를 적정 키토산 용액에 담가 치료여부를 파악하고자 한다.

Ⅲ. 결 과

1. *in vitro* test

가. 균주배양

어류 질병유발 박테리아 7종을 배양하기 위해 각 균주의 생장에 최적화된 Marine, NB, TSB 등의 배지를 이용하였다. KCTC로부터 분양받은 9개의 균주를 배양한 결과 9가지 중 7가지 균주만 배양에 성공하였다.

표6. 확보된 어류 질병 유발 균주의 종류 및 배양상태

순	균 주	그 략	배 양
1	<i>Vibrio ichthyventery</i>	Marine ager	○
2	<i>Vivrio furnissi</i>	Marine ager	○
3	<i>Edwardsiella tarda</i>	Nutrient agar	○
4	<i>Staphylococcus aureus</i>	Nutrient agar	○
5	<i>Listonella anguillarum</i>	Nutrient agar	×
6	<i>Salmonella enteric subsp. enterica</i>	Nutrient agar	○
7	<i>Aeromonas bivalvium</i>	TSA	○
8	<i>Aeromonas Hydrophila</i>	Nutrient agar	○
9	<i>Trichoderma reesei</i>	Nutrient agar	×

나. Paper Disc test

예비실험으로 비브리오균주에 대한 항생성테스트를 진행하였다. 항생성은 나타나지 않았고, 엠펙실린의 clear zone이 지나치게 큰 것으로 보아 50 mg/ml의 농도가 너무 높다는 것을 알 수 있다.

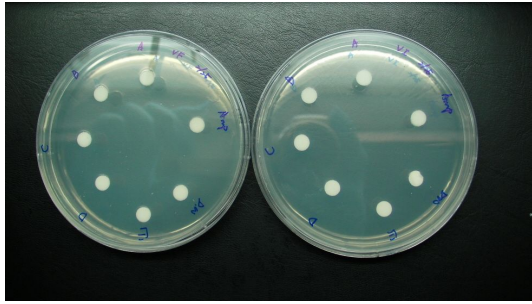


그림 2 Paper Disc 처리 직후
 * 좌 : *Vivrio furnissi*
 우 : *Vibrio ichthyventery*

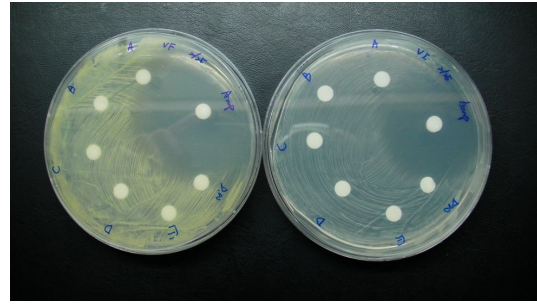


그림 3 처리 후 36시간 배양
 * 좌 : *Vivrio furnissi*
 우 : *Vibrio ichthyventery*

위 결과에 따라 이후 실험에서 엠피실린의 희석배율은 5 mg/ml, 1 mg/ml, 100 μ g/ml의 농도로 대조군에 사용하였다.

하지만 7개 균주를 대상으로 Paper disc를 이용한 항균성테스트에서는 다음과 같이 항균활성을 확인하기 어려웠다.

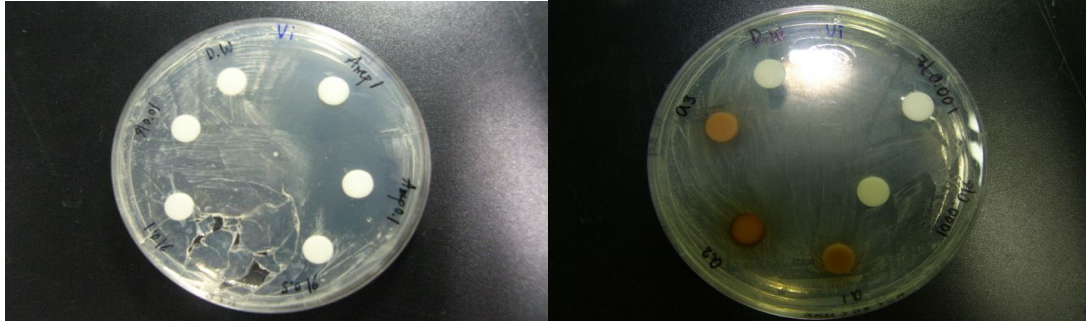


그림 4 Paper Disc, *Vibrio ichthyventery*

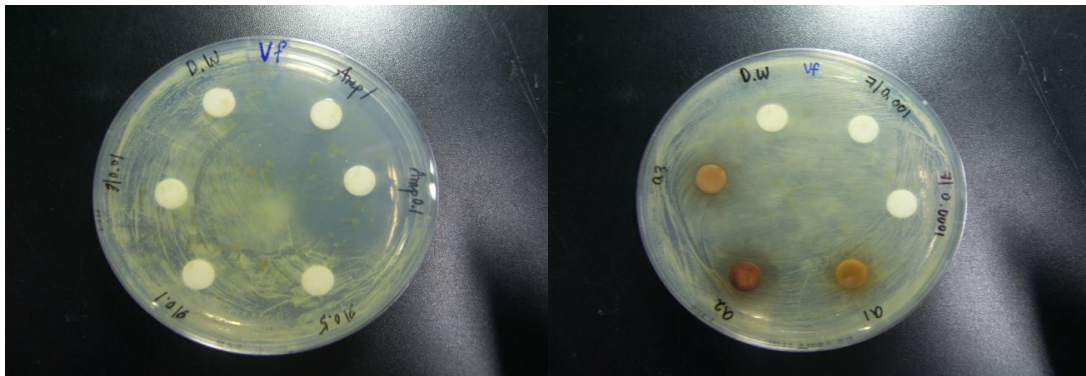


그림 5 Paper Disc, *Vivrio furnissi*

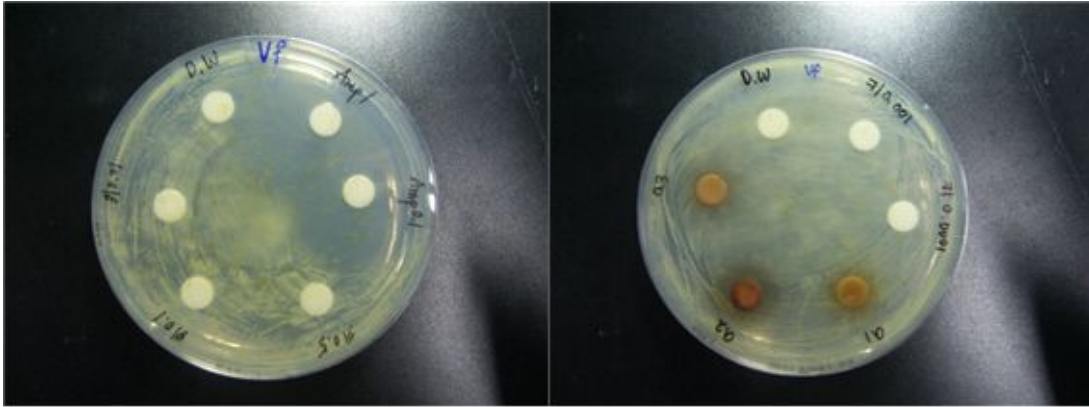


그림 6 Paper Disc, *Aeromonas bivalvium*

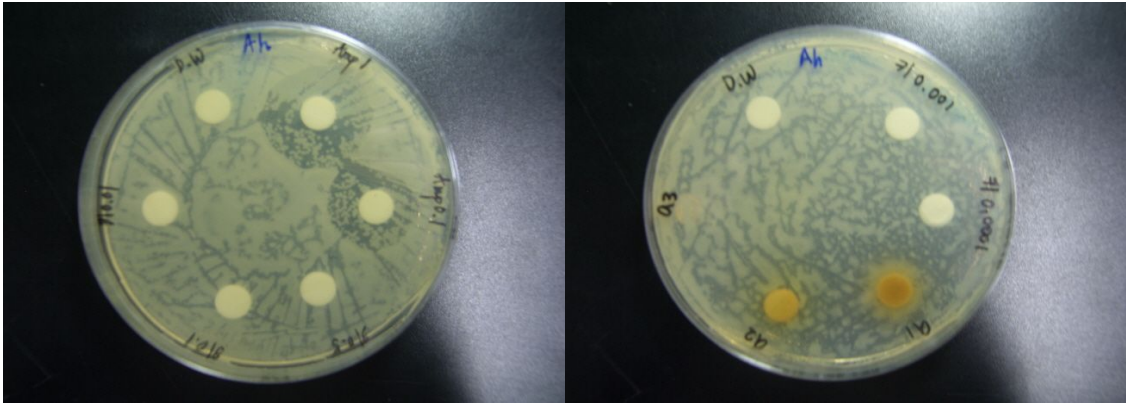


그림 7 Paper Disc, *Aeromonas hydrophila*

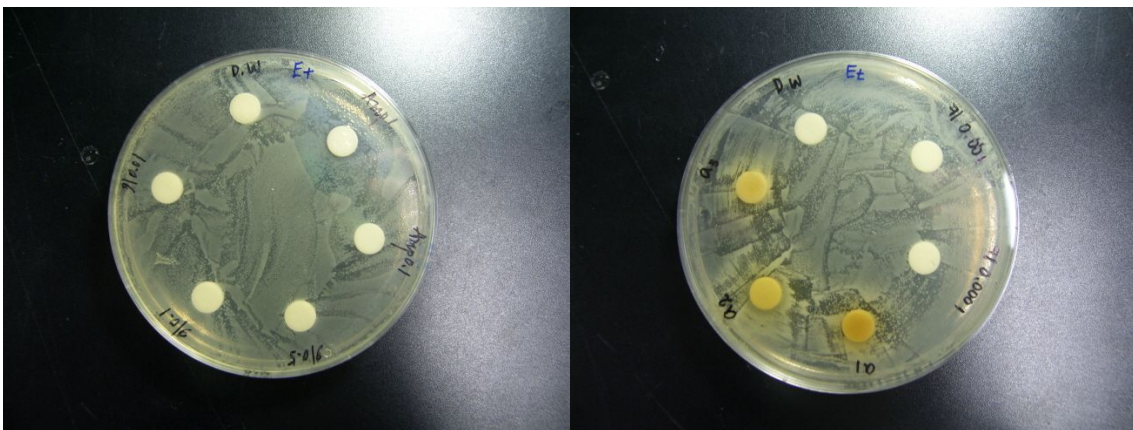


그림 8 Paper Disc, *Edwardsiella tarda*

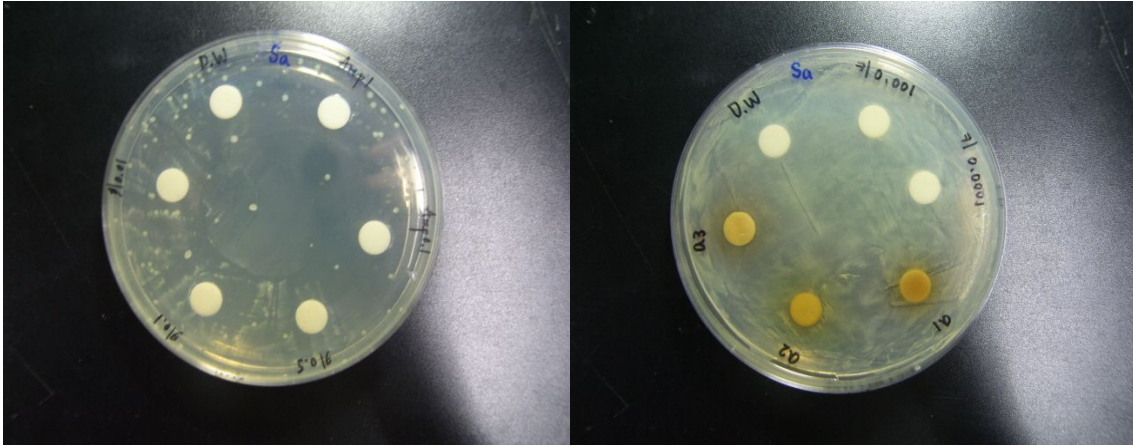


그림 9 Paper Disc, *Staphylococcus aureus*

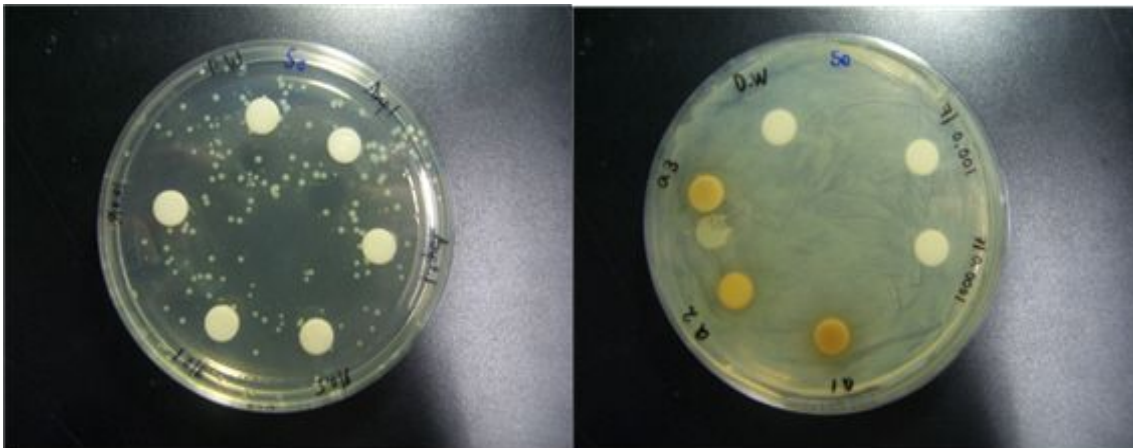


그림 10 Paper Disc, *Salmonella enteric*

다. 96-홈판(microplate)을 이용한 항생효과 테스트

96-well microplate에 균주 배양 후 Elisa reader를 이용하여 O.D값을 측정
한 후 3회 반복실험 평균값을 산출하여 [표8]의 결과를 얻었다.

박테리아의 생장이 왕성하면 개체수의 증가로 흡광도(O.D값)가 증가하고,

생장이 억제되면 흡광도가 감소하였다. 측정결과는 흡광도 데이터를 그래프로 표현한 흡수형(G1·3·5·7·9·11·13)그래프와 대조군을 생장률 100%로 지정하여 개체수의 생존률을 %로 표현한 생존률 그래프는 짝수형(G 2·4·6·8·10·12·14)으로 표시하였다.

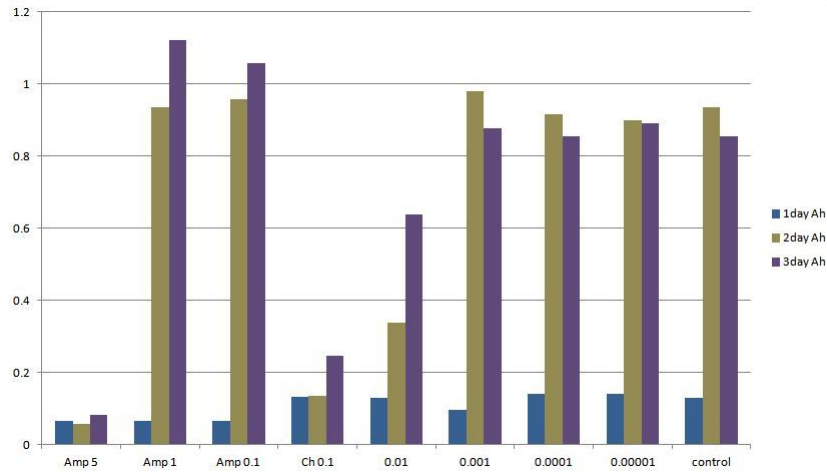
생존률 그래프를 바탕으로 정리해보면 *Aeromonas hydrophila* (그래프1,2), *Edwardsiella tarda* (그래프3,4), *Staphylococcus aureus* (그래프5,6), *Salmonella enteric* (그래프7,8) 4종의 박테리아는 첫 번째 측정에서 엠펜실린에 비해 균주의 생장률이 훨씬 좋았으나, 2일째 이후에는 대조군 최고 농도인 5mg/ml 엠펜실린 보다도 균주의 생장억제효과가 뛰어났다. 하지만 0.001%이하의 농도에서는 항박테리아효과가 급격히 떨어졌다. 반면 키토산이 *Aeromonas bivalvium* (그래프9,10), *Vibrio fluvialis* (그래프11,12), *Vibrio ichthyventery* (그래프13,14) 3종류의 박테리아에서는 항균효과가 나타나지 않았다.

표8. 박테리아의 개체 수 값의 변화측정

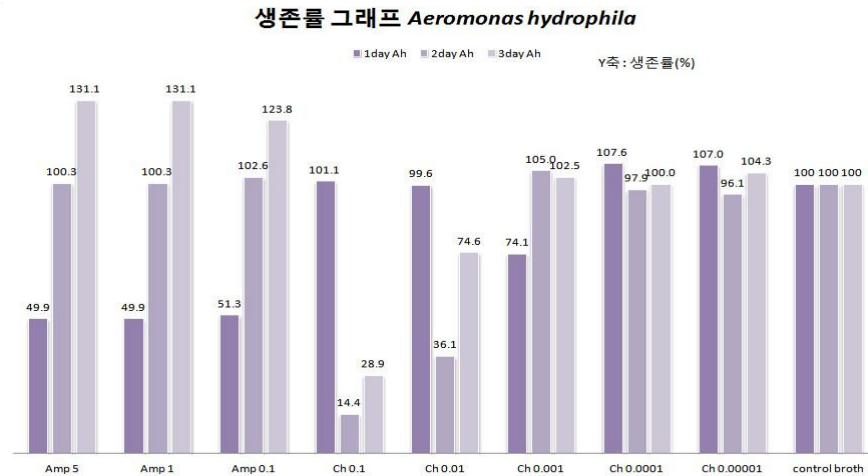
(단위 : OD 기준파장 : 600nm)

일수	종류	Amp 5	Amp 1	Amp 0.1	Ch 0.1	Ch 0.01	Ch 0.001	Ch 0.0001	Ch0.00001	broth
1day	Ab	0.121	0.121	0.125	0.173	0.175	0.258	0.289	0.282	0.264
2day	Ab	0.245	1.362	1.237	1.299	1.297	1.321	1.351	1.357	1.394
3day	Ab	0.929	1.639	1.479	1.496	1.510	1.548	1.577	1.506	1.461
1day	Ah	0.066	0.065	0.067	0.132	0.130	0.096	0.140	0.139	0.130
2day	Ah	0.058	0.937	0.959	0.135	0.337	0.981	0.915	0.898	0.934
3day	Ah	0.083	1.121	1.059	0.248	0.638	0.877	0.855	0.892	0.855
1day	Et	0.065	0.077	0.081	0.157	0.139	0.097	0.132	0.134	0.132
2day	Et	0.058	0.944	0.947	0.160	0.131	0.952	0.961	0.932	0.872
3day	Et	0.087	0.877	0.836	0.172	0.175	0.824	0.845	0.813	0.830
1day	Sa	0.125	0.130	0.136	0.177	0.198	0.151	0.156	0.193	0.192
2day	Sa	0.059	0.551	0.624	0.121	0.161	0.624	0.603	0.597	0.702
3day	Sa	0.058	0.421	0.777	0.174	0.189	0.783	0.799	0.778	0.741
1day	Se	0.081	0.087	0.081	0.161	0.181	0.145	0.147	0.151	0.157
2day	Se	0.064	0.431	0.624	0.141	0.149	0.584	0.565	0.563	0.547
3day	Se	0.061	0.523	0.700	0.208	0.145	0.839	0.826	0.765	0.817
1day	Vf	0.140	0.120	0.120	0.145	0.110	0.128	0.123	0.140	0.168
2day	Vf	0.118	0.103	0.108	0.331	0.299	0.290	0.277	0.417	0.438
3day	Vf	0.116	0.101	0.106	0.455	0.425	0.513	0.347	0.473	0.571
1day	Vi	0.102	0.097	0.113	0.151	0.150	0.148	0.114	0.109	0.154
2day	Vi	0.104	0.107	0.124	0.497	0.436	0.418	0.287	0.270	0.446
3day	Vi	0.104	0.107	0.142	0.612	0.536	0.508	0.376	0.363	0.596
1day	Y	0.188	0.189	0.197	0.645	0.460	0.245	0.191	0.147	0.173
2day	Y	0.924	0.894	0.828	1.357	1.292	1.253	1.055	1.057	1.077
3day	Y	1.039	1.052	0.894	1.351	1.292	1.324	1.316	1.116	1.219

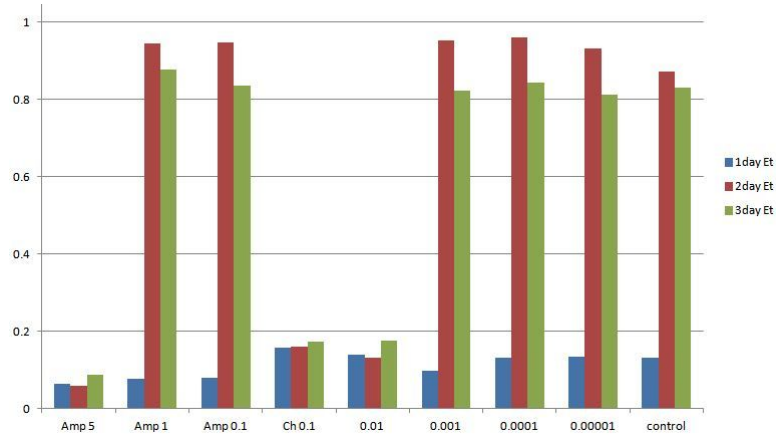
그래프1. *Aeromonas hydrophila* 개체수변화 (단위: O.D. 600nm)



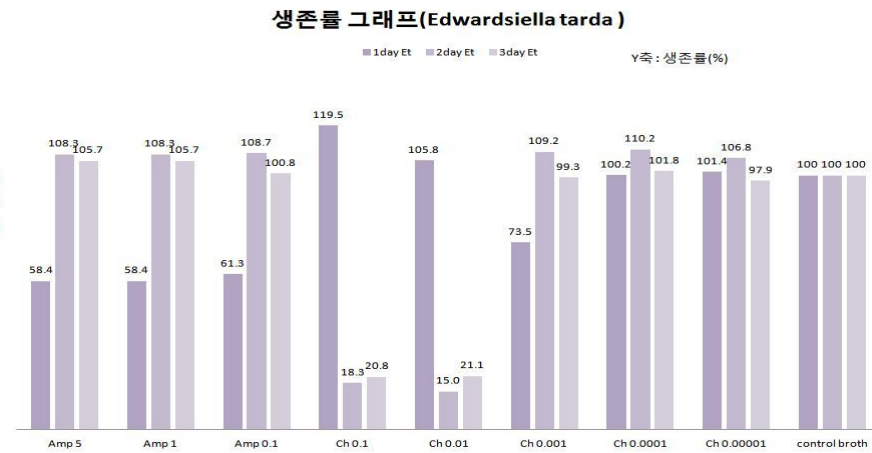
그래프2. *Aeromonas hydrophila* 생존률 변화 (단위: %)



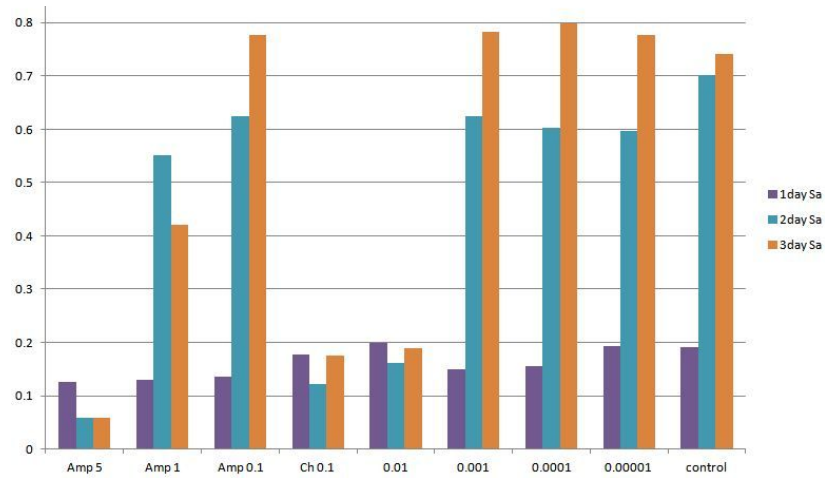
그래프3. *Edwardsiella tarda* 개체수변화 (단위: O.D. 600nm)



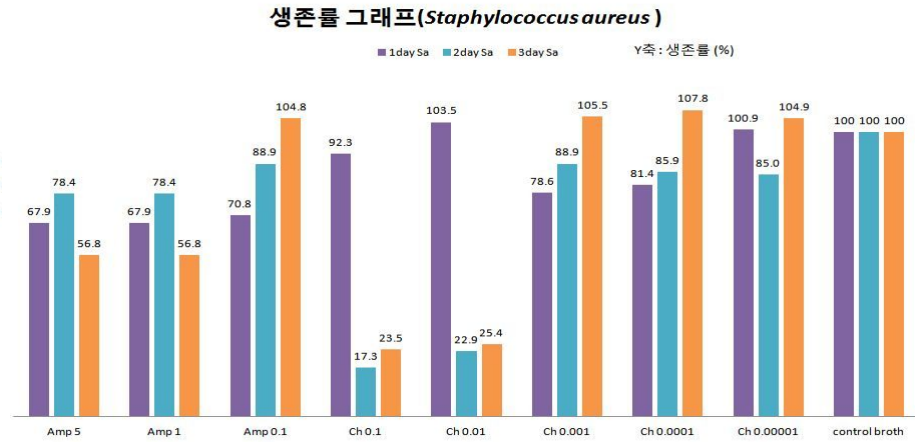
그래프4. *Edwardsiella tarda* 생존률 변화 (단위: %)



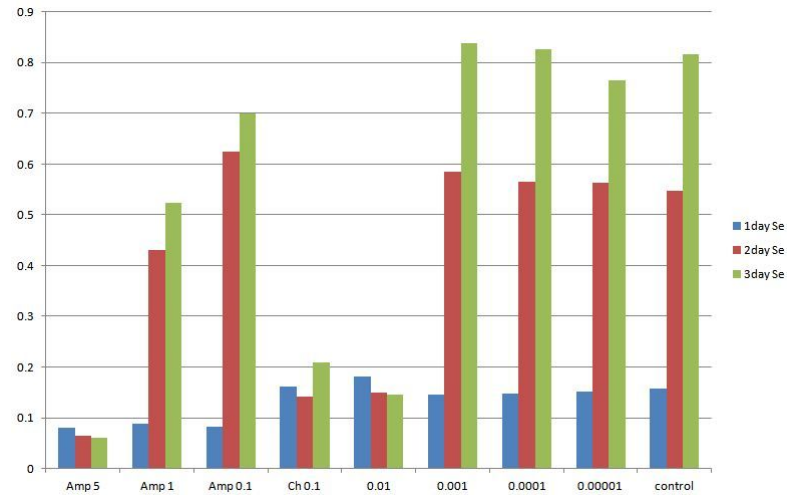
그래프5 *Staphylococcus aureus* 개체수 변화(단위 : O.D, 600nm)



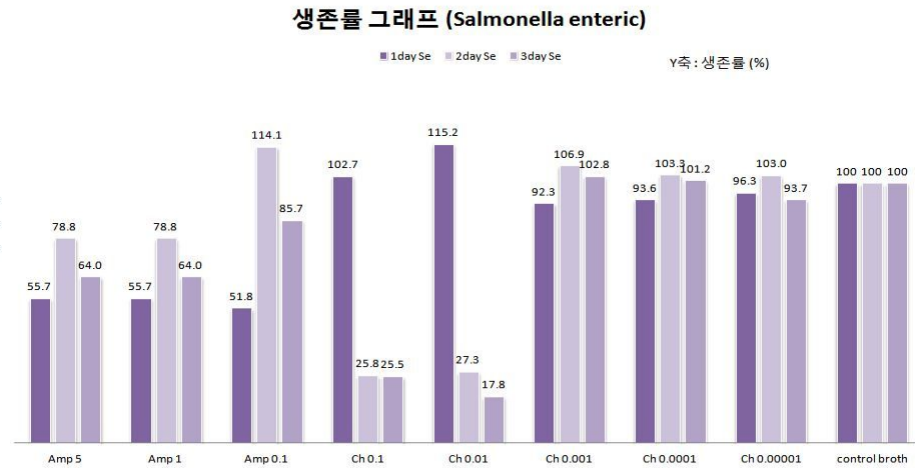
그래프6. *Staphylococcus aureus* 생존률 변화 (단위: %)



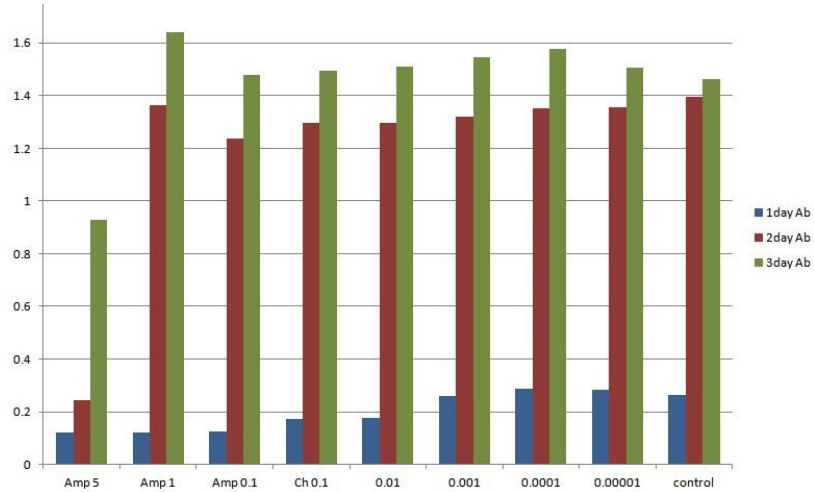
그래프7. *Salmonella enteric* 개체수 변화 (단위: O.D, 600nm)



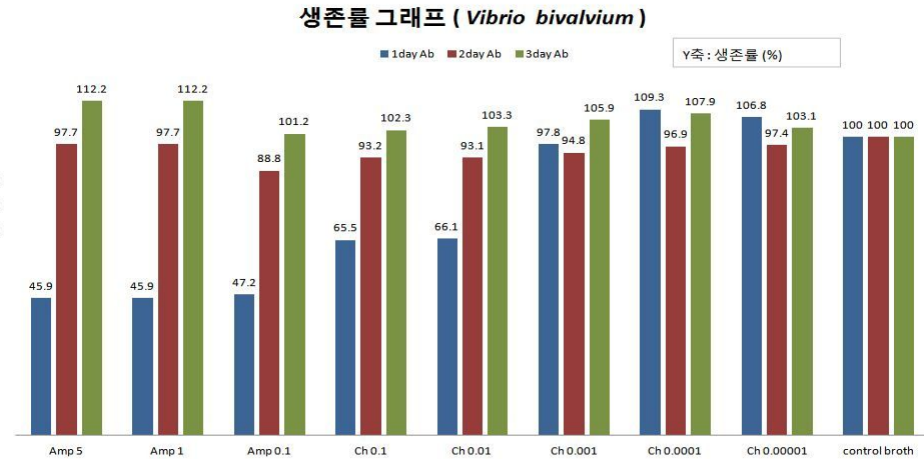
그래프8. *Salmonella enteric* 생존률 변화 (단위: %)



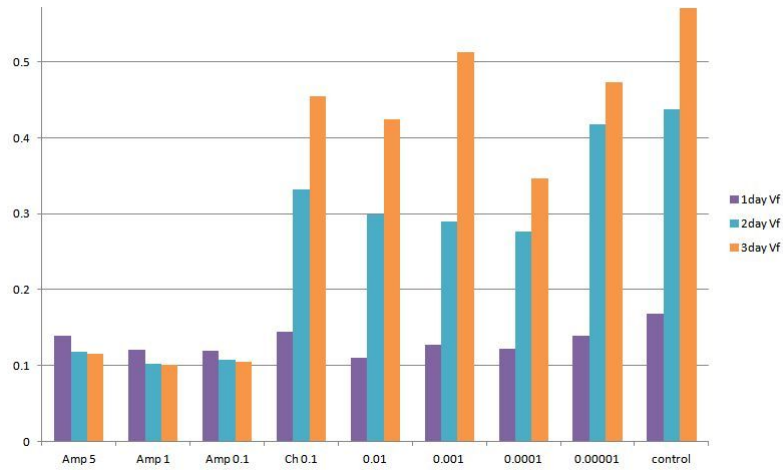
그래프9. *Aeromonas bivalvium* 개체수변화 (단위: O.D, 600nm)



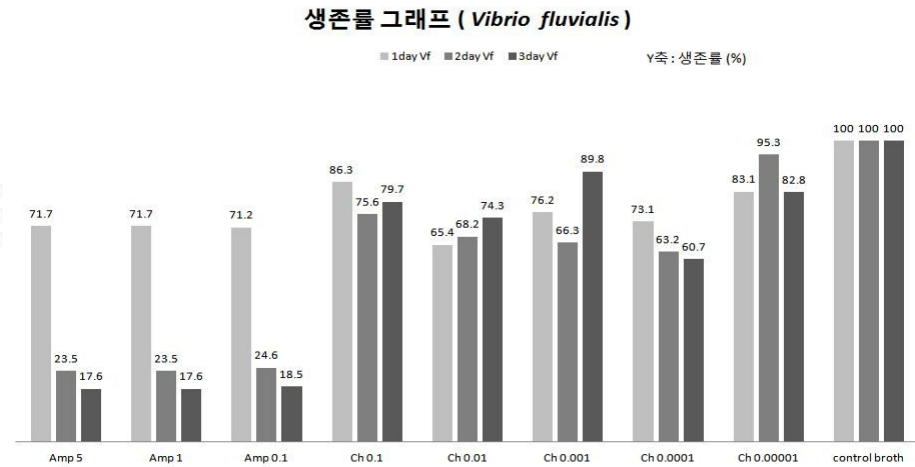
그래프10. *Aeromonas bivalvium* 생존률 변화 (단위: %)



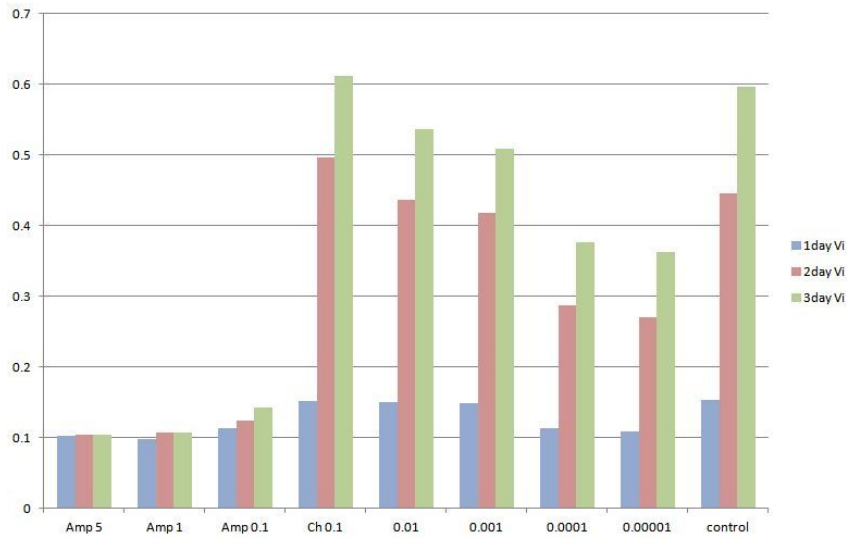
그래프11. *Vibrio fluvialis* 개체수변화 (단위: O.D, 600nm)



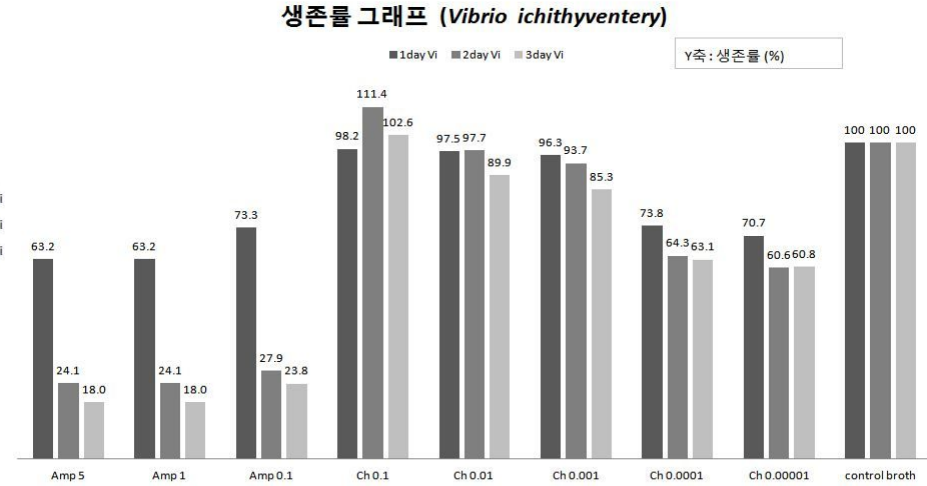
그래프12. *Vibrio fluvialis* 생존률 변화 (단위: %)



그래프13. *Vibrio ichthyventery* 개체수변화 (단위: O.D, 600nm)



그래프14. *Vibrio ichthyventery* 생존률 변화 (단위: %)



2. *in vivo* test

가. 제브라피쉬의 키토산 농도에 따른 생존 시간 비교

in vivo 실험에 들어가기 앞서 수용성 고분자 키토산이 물고기의 생존에 미치는 영향을 알아보기 위하여, 제브라피쉬를 이용하여 수온 20℃에서 키토산 농도 별 24시간 생존테스트를 하였다. 제브라피쉬 생존테스트 그룹은 아무처리도 하지 않은 대조군과 수용성 키토산을 처리한 실험군 (0.5%~0.00001%)으로 설정하였고, 물의 총 부피는 1000ml 였다. 0.5%의 경우 고농도인 관계로 100ml를 메디아병에 담아 제브라피쉬 한 마리만 테스트하였다. 그 결과 0.1%과 0.01%에서는 5분 이내에 호흡곤란 및 사망하였다. 0.001%에서는 10분 이내에 배를 보인 후 호흡이 멎었다. 0.0001%에서는 4시간에 배를 뒤집었고 7시간 후 숨이 멎었다. 그 외 나머지 물고기 들은 대조군과 다름없이 건강한 상태와 호흡이 유지되었다. 고농도 키토산에서 제브라피쉬가 보인 공통적인 반응은 호흡이 거칠어진 후 배를 보였고, 호흡을 하려 애써도 숨을 쉴 수 없는 것 처럼 보였다. 뒤집혀 숨을 쉬지 못하는 물고기를 수조로 다시 옮겨도 곧 숨이 멎었다. 하지만 호흡곤란 증세가 약하게 시작된 한 개체를 곧바로 꺼내 수조로 옮기자 일주일 동안은 뒤집어 지내는 현상을 보이다가 다시 건강해졌다. 이를 통해 고분자 키토산은 아가미에 부착되어 호흡을 방해하고, 한번 부착된 키토산은 쉽게 분리하기 어려운 것은 아닐까하고 예상하였다.

표9. 제브라피쉬의 최소 생존 키토산 농도

처리농도 (기준:1000ml)		실험군					대조군
		0.1× 10 ⁰ %	0.1× 10 ⁻¹ %	0.1× 10 ⁻² %	0.1× 10 ⁻³ %	0.1× 10 ⁻⁴ %	무처리
투입량	0.1% 수용성 키토산	150ml	100ml	10ml	1ml	0.1ml	0ml
	물	0ml	900ml	990ml	999ml	999.9ml	1000ml
생존 시간	1st	5분	5분	10분	7시간	생존	생존

나. 제브라피쉬의 박테리아 감염 조건 탐색

지층실험용 분별관에 200ml의 증류수를 담고 솔방울병의 원인균으로 알려진 *Aeromonas hydrophila* 균주를 4ml의 배지에 30℃, 16시간 Shaking incubator에서 180rpm으로 키운 후, 200μl를 접종하였다. 대조군은 박테리아가 없는 증류수이다. 캠코더를 설치하고 5일간 감염여부를 지켜보았다. 감염의 여부는 균의 특성에 따라 비늘이 하얗게 일어나거나, 개체가 죽는 경우를 감염 기준으로 삼았다. 하지만 감염이 일어나지 않았다. 3회 실험을 하였으나, 감염 시키는 것에 실패하였다. 이후 O.D값 1.0 전후로 키운 박테리아를 1ml 접종한 후 5일 경과하였으나 역시 감염여부를 확인할 수 없었다.



그림 11 제브라피쉬의 *Aeromonas hydrophila* 감염 실험

-
- 감염 확인 방법 : 박테리아를 투입한 물에 제브라피쉬 투입 후 변화 육안식별
 - 접종조건 : 200ml 증류수 + O.D 1.0 $200\mu\text{l}$ or 1ml / 5일
 - 감염여부 : 감염실험 실패
-

다. 감염된 제브라피쉬 치료효과 관찰

여러 차례의 감염실험으로도 감염되지 않아 수족관에 수소분하여 질병에 걸린 제브라피쉬 및 관상어를 구하여 치료 효과 실험을 진행하였다. 미디어병에 200ml의 증류수를 담고 0.0001%의 수용성 키토산을 주입하며 솔방울병, 백점병에 걸린 물고기를 처치하였다. 0.0001%의 경우 7시간 이내에 모두 사망하였다. 운이 좋아야 한 마리씩 단발적으로 구할 수 있다 보니 병걸린 물고기의 대조군을 둘 수가 없었다. 또한 수족관사장님들은 한결같이 병에 걸린 물고기는 몇 시간 뒤에 죽을 것이라는 조언을 꼭 붙여주었기에 키토산에 의한 사망인지 질병에 의한 사망인지 본 과정에서는 확인할 길은 없었다. 치료의 가능성을 확인하는 예비실험의 개념이 었으나, 병걸린 상태에서 온 물고기들은 얼마 지나지 않아 모두 죽었다. 치료실험에 사용된 물고기는 개별적으로 총 7마리였다.



그림 12. 슬방울병에 걸린 제브라피쉬



그림 13. 0.001% 키토산 처리 후 7시간 내 사망

라. 꼬리지느러미를 자른 제브라피쉬를 이용한 감염실험

메디아병에 200ml의 증류수를 담고 대조군은 아무 것도 처리하지 않았으며, 실험군은 박테리아를 10ml씩 투여하였다. 제브라피쉬는 꼬리지느러미를 자른 후 각 병에 한 마리씩 넣었다.¹¹⁾ 박테리아는 *in vitro*에서 키토산으로부터 성장저해가 있었던 4가지 균주를 선정 한 후 액체배지에 배양 하고 아래 표와 같이 메디아 병에 투입하였다.

표10. 메디아병 접종 균주의 O.D값

순	균주명	OD ₆₀₀	라벨표기	투입량	
1	<i>Salmonella enteric</i>	1.429	Se	2ml	10ml
2	<i>Aeromonas hydrophila</i>	0.925	Ah	2ml	10ml
3	<i>Edwardsiella tarda</i>	1.137	Et	2ml	10ml
4	<i>Staphylococcus aureus</i>	0.896	Sa	2ml	10ml

감염실험 4일째, 10ml의 균주를 투여한 실험군 중 Ah와 Et에서 제브라피쉬가 죽었다. O.D값을 1.0으로 정확히 맞추지 않고 진행했으므로 정확한 균주투입량을 알기 위해 O.D값을 1.0으로 통일하여 알아보고자 추가 실험을 계획하였다.



그림 14 꼬리지느러미 자르기



그림 15. 꼬리지느러미를 자른 지브라 피쉬 투입

표11. 제브라피쉬 감염실험 조건 및 결과

구분	대조군	실험군					
		Se		Ah		Et	
균주명	×						
증류수	20ml	20ml	20ml	20ml	20ml	20ml	20ml
접종량	×	10ml	2ml	10ml	2ml	10ml	2ml
생존여부	생존○	생존○	생존○	사망×	생존○	사망×	생존○
결과							

마. 꼬리지느러미를 자른 제브라피쉬를 이용한 어병균 감염 예방 효과 실험

*Aeromonas hydrophila*를 한차례의 계대배양을 통해 30ml을 키운 후 O.D값을 1.0으로 희석하여 맞추었다. 미디어병에 200ml의 증류수를 담고 대조군은 아무 것도 처리하지 않은 그룹과 Ah를 10ml투입한 그룹으로 나누었다. 실험군은 박테리아를 10ml씩 투여 한 후 키토산 0.01%, 0.0001% 투입한 그룹으로 나누었다. 각 병에는 TMS(Tricaine methanesulfonate)을 이용하여 마취한 제브라피쉬의 꼬리지느러미를 자른 한 마리와 자르지 않은 건강한 물고기 한 마리 하여 총 두 마리를 투

입하였다. 비교를 위하여 균주 2ml를 넣은 그룹을 추가하였다. 4일간 키운 결과는 다음과 같다.



그림 16 TMS처리 후 꼬리지느러미 절단

표12. 제브라피쉬 *Aeromonas hydrophila* 감염실험 및 질병예방효과

구분	대조군			실험군	
그룹명	A	B	C	D	E
증류수 (ml)	2000	200	200	200	200
Ah접종 O.D600 1.0 (ml)	2	×	10	10	10
키토산	×	×	×	0.01%	0.0001%
예상	○(생존)	○(생존)	×(사망)	×(사망)	○(생존)
결과					
물고기 생존시간	생존	생존	5시간/2일	3분/10분	6시간/1일

만일 위 표의 예상과 같은 결과가 나온다면 다음과 같이 이유를 예측할 수 있다. C그룹은 4일내에 사망하였으나, E그룹은 생존하게 된다고 가정하면 *in vitro* test에서 0.0001%는 항균성이 거의 없었던 것으로 보였지만 실제 처리를 하였을 때 질병을 예방할 수 있는 A그룹이 생존한 것에서 찾을 수 있을 것이다. A그룹은 낮은 균주농도로 물고기의 면역체계가 충분히 극복할 수 있는 수준이다. 이를 통해 저농도의 키토산처리군인 E그룹에서 키토산이 고농도의 균주는 저농도로 바꾸어 물고기가 생존할 수 있는 계기를 만들었을 것이므로 수용성 고분자 키토산의 예방 효과가 있다고 볼 수 있을 것이다.

실험결과 의미 있는 정보는 10 O.D가 접종되면 균주감염으로 반드시 물고기가 죽고, 20.O.D는 물고기가 자체 면역으로 생존할 수 있는 균주 농도라는 사실을 알 수 있었다. D그룹의 결과를 통해 키토산의 농도가 높으면 질병보다 키토산에 의해 죽게되고 E그룹의 0.0001%도 농도가 너무 높아 더 낮은 농도의 키토산 처리가 필요하다는 것을 알 수 있었다. 감염예방실험은 실패하였으나 이후 실험의 조건을 설정할 수 있었다.

바. *Aeromonas hydrophila* 에 대한 키토산의 항균효과 분석(CFU)

증류수 1.5L가 든 4개의 수조에 키토산처리(0.0001%, 0.0005%, 0.0025%)와 비처리군으로 나눈 후 *Aeromonas hydrophila*를 1.5ml (O.D. 1.0)를 넣었다. 균주투입 후 20분 뒤의 수조 속 용액을 1ml 추출하여 식염수로 3회에 걸쳐 10배씩 희석농도를 증가시켜 최종 1배, 10배, 100배, 1000배의 희석배수의 용액을 100 μ l 고체배지에 접종한 후 24 $^{\circ}$ C에서 3일간 배양하였다. 배양 후 생긴 콜로니의 개수를 세어 키토산의 항균효과를 파악하였다.

표13. *Aeromonas hydrophila* 에 대한 키토산의 항균효과 분석

이름	증류수 (L)	균주 A.h (ml)	키토산 (%)	콜로니 개수				CFU/ml (Colony-Forming Unit)
				① 회석 (1배)	② 회석 (10배)	③ 회석 (100배)	④ 회석 (1000배)	
1	1.5	1.5	0	많음	많음	370	30	$(370 \times 1000 \times 100 \times 5) 1.85 \times 10^8$
2	1.5	1.5	0.0001	많음	66	3	1	$(66 \times 1000 \times 10 \times 5) 3.3 \times 10^6$
3	1.5	1.5	0.0005	많음	51	5	0	$(51 \times 1000 \times 10 \times 5) 2.6 \times 10^6$
4	1.5	1.5	0.0025	11	4	1	1	$(4 \times 1000 \times 10 \times 5) 2.0 \times 10^5$

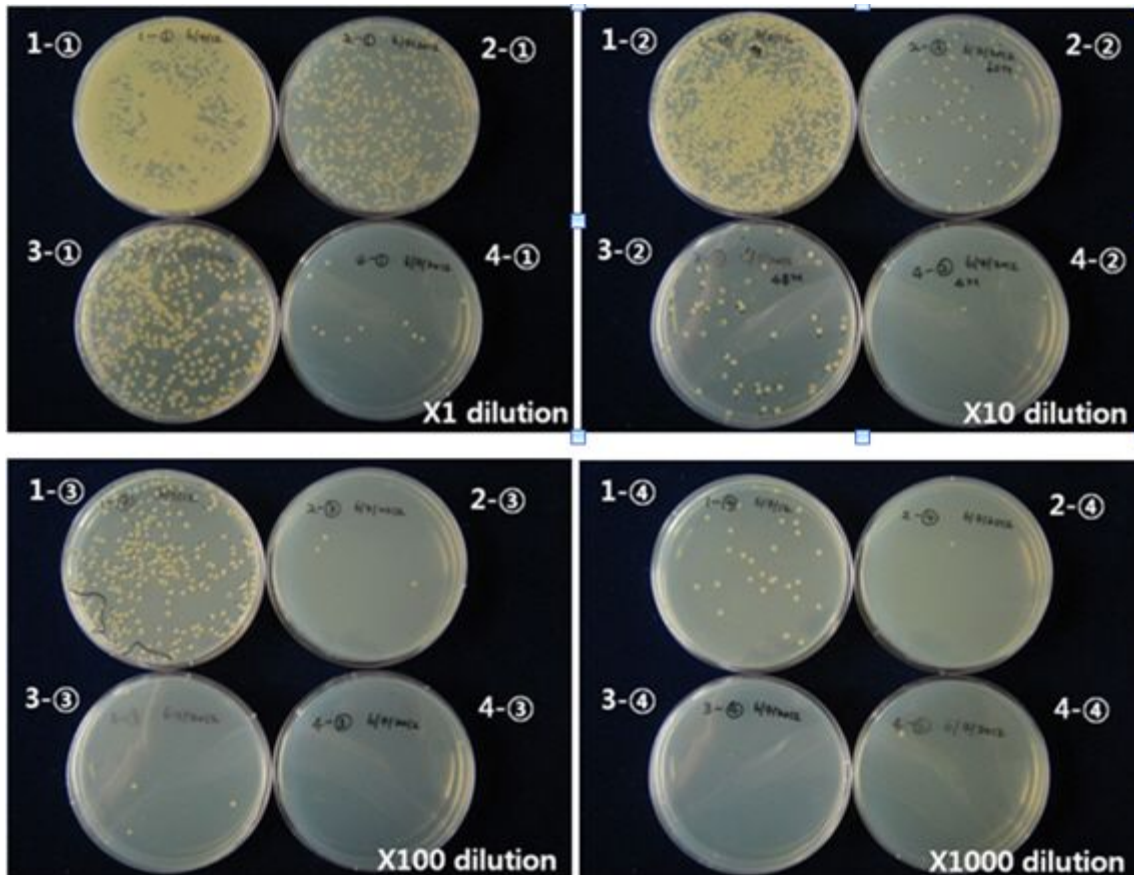


그림 17 고체배지에 접종한 후 24°C에서 3일간 배양

육안으로도 키토산 처리시 20분만에도 비처리군(1)에 비해 모든 키토산농도에서 확연히 항균효과가 있음을 살필 수 있었다. 이 결과는 MIC검사를 통해 0.005%~0.1%농도의 키토산용액에서 항생효과가 있음을 밝혔던 선행연구와 비교하여 10배 더 희석한 상태의 고분자키토산에서도 항균성이 있으며, 여전히 뛰어나다는 것을 보여주고 있다.¹²⁾

사. *Aeromonas hydrophila*에 대한 키토산의 감염 예방효과 실험

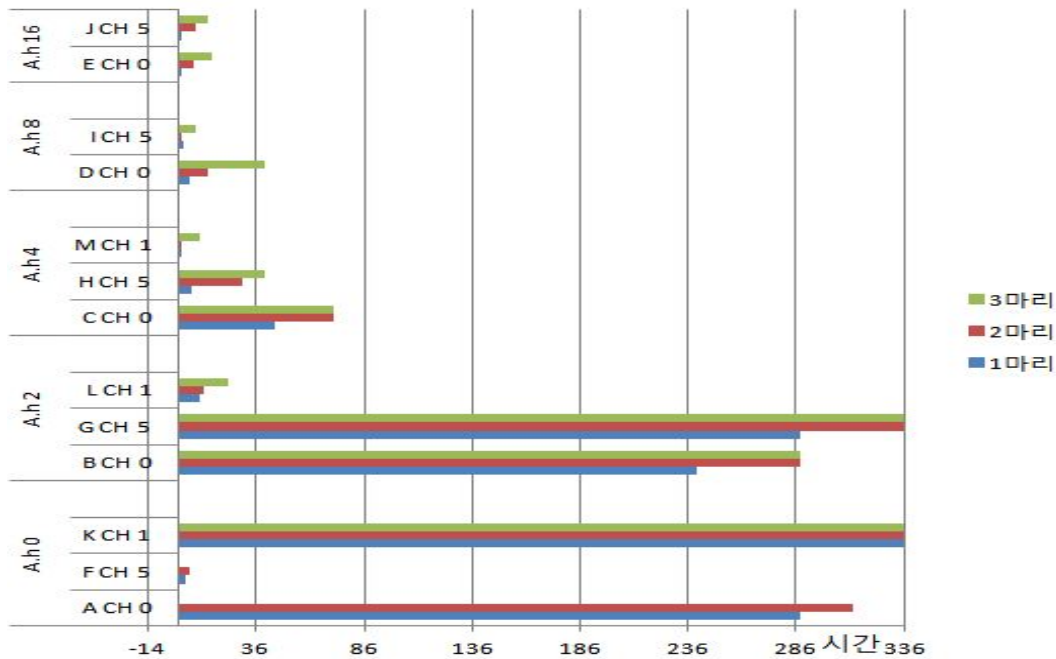
증류수 200ml가 들어있는 메디아병에 키토산 비처리군, 키토산 처리군(0.00005%, 0.00001%)로 나눈 후 O.D값 1.0으로 맞춘 *Aeromonas hydrophila* 배양액을 0, 2, 4, 8, 16(혹은 14)ml 투여하였다. 제브라피쉬 3마리씩 투입하여 장기간(14일)동안 물고기의 생존결과를 통해 예방효과를 알아보았다.

표 14. *Aeromonas hydrophila*에 대한 키토산의 감염 예방효과 실험 생존 시간

그룹이름	A	B	C	D	E
증류수(ml)	200	200	200	200	200
A.h O.D	0	2	4	8	14
키토산(%)	비처리	비처리	비처리	비처리	비처리
#1 생존시간	12일	10일	45시간	5시간35분	1시간40분
#2 생존시간	13일	12일	72시간	14시간	7시간20분
#3 생존시간		12일	72시간	40시간	15시간

그룹이름	F	G	H	I	J
증류수(ml)	200	200	200	200	200
A.h O.D	0	2	4	8	16
키토산(%)	0.00005	0.00005	0.00005	0.00005	0.00005
#1 생존시간	3시간3분	12일	6시간	1시간46분	1시간23분
#2 생존시간	5시간30분	생존(14일)	30시간	7시간30분	7시간30분
#3 생존시간		생존(14일)	40시간	30시간	14시간

그룹이름	K	L	M
증류수(ml)	200	200	200
A.h O.D	0	2	4
키토산(%)	0.00001	0.00001	0.00001
#1 생존시간	생존(14일)	10시간	37분
#2 생존시간	생존(14일)	12시간	1시간
#3 생존시간	생존(14일)	24시간	10시간



그래프 15. *Aeromonas hydrophila*의 제브라피쉬 감염 지연효과 결과

*Aeromonas hydrophila*에 대한 키토산의 감염 예방효과 실험에서 제브라피쉬는 아무것도 처리하지 않은 대조군에서 생존 시간이 6시간 이내였으나, 키토산 처리 0.00001% 그룹에서는 오히려 비처리군보다 오래 산 것으로 보아 키토산 0.00001%가 제브라피쉬의 생존을 촉진해주는 농도라는 것을 알 수 있다.

A. hydrophila 균주 2 O.D를 투여한 A.h 2 그룹에서 오히려 키토산 0.00005%를 처리한 그룹이 비처리그룹에 비해 오래 생존하였다. 하지만 0.00001%에서는 매

우 빨리 죽었다.

나머지 그룹은 키토산비처리군이 처리군에 비해 근소한 차이로 조금 오래 생존했으나 비교할만한 차이는 아니었다.

3. *in vitro*와 *in vivo* test의 연계분석

키토산은 양전하를 띤 아민기 활성부위가 박테리아 최외각의 음전하를 띤 막과 결합하여 성장을 억제하는 특징이 있다. 1% 아세트산에 24시간 녹인 후 NaOH로 pH6.0으로 맞춘 수용성고분자 키토산을 이용하여 *in vitro* test를 한 결과 Paper disc test 에서는 항생성이 검출되지 않았다. 그 이유는 아세트산의 농도를 70%까지 점진적으로 높이며 나노섬유를 형성하는 과정을 실험한 연구보고서에서 보여주듯, 기본적으로 점성을 갖고 있는 키토산 수용액은 Paper Disc에서 고체평판 배지 내로 확산되지 못했기에 clear zone이 형성되지 않았다고 볼 수 있다¹³⁾

Microplate을 이용한 성장억제 테스트에서는 키토산 농도 0.1~0.01%에서 4종의 박테리아 균주(*Aeromonas hydrophila*, *Edwardsiella tarda*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteric*)를 대상으로 한 실험에서 5mg/ml 엠피실린과도 비교할 수 있을 만큼 성장억제효과가 뛰어났다. 반면 동일조건에서 3종류의 박테리아 (*Aeromonas bivalvium*, *Vibrio fluvialis*, *Vibrio ichthyventery*)에 대한 실험에서는 키토산의 항생특성이 나타나지 않았다. 다양한 그람양성 음성균을 대상으로 한 키토산의 항생성 테스트를 진행했던 선행연구와 같이¹⁴⁾ 항생성을 보였던 4개 균주 중 하나인 *Staphylococcus aureus*를 제외한 모든 박테리아가 그람음성균이었으므로, 그람양성과 음성의 차이가 항생성여부가 결정하는 것은 아니라는 것을 알 수 있었다. Microplate 실험 결과로 부터 일부 어병 유발 박테리아에 대해서는 항균제 사용에 따른 내성 및 치료제 잔여물이 미치는 외부효과에 대해 걱정이 없는 생체친화적인 어병치료제로 수용성 고분자 키토산을 사용할 수 있다는 가능성을 확인할 수 있었다.

실제 질병에 걸린 물고기를 치료하는 실험(*in vivo*)의 경우 물고기 감염이 전제조건이 되어야 하는데, 제브라피쉬를 대상으로 다양한 방식으로 감염실험을 진행하는 과정에서 많은 시간이 소요되었다. 물속에 박테리아를 접종하여 제브라피쉬의 감염여부를 육안으로 관찰하고자 하였으나, 구분이 어려워 실패하였다. 이후 물고기의 죽음을 통해 감염을 확인하고자 하였으나 죽는 조건을 잡기가 어려웠다. 대안으로 수족관을 돌며 감염된 제브라피쉬를 구입하여 치료실험을 진행하고자 하였으나, 면역력이 현저히 떨어진 탓인지 치료 도중 모두 죽었다. 다시 시도한 감염실험은 *in vitro* test에서 생장억제를 보였던 *Aeromonas hydrophila*, *Edwardsiella tarda*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteric* 4종의 박테리아를 대상으로 건강한 제브라피쉬의 꼬리지느러미를 잘라 진행한 결과 *Aeromonas hydrophila*, *Edwardsiella tarda*에서 10ml 접종한 실험군의 물고기가 4일째에 사망함을 관찰할 수 있었다. 위 두 그룹을 제외한 나머지 그룹은 이후 6일간의 계속되는 질병유발균 노출에도 불구하고 생존했다. 이후 *Aeromonas hydrophila*에 대해 집중적인 실험을 수행한 결과 꼬리를 자르지 않아도 감염되는 조건(O.D 1.0, 8ml/200ml)을 설정할 수 있었다.

감염조건 설정 이후 CFU를 통해 키토산의 항균성을 다시한번 확인한 후, 제브라피쉬를 이용한 14일간의 감염예방효과실험을 통해 *Aeromonas hydrophila* 2 O.D에서 0.00005% 농도의 키토산이 감염예방효과가 있음을 확인할 수 있었다. 물론 14일 이후에도 계속 노출을 시킨 결과 1마리를 제외하고 무려 6일 간 더 생존하였다.

IV. 고찰

키토산은 다양한 용도로 각광을 받고 있다. 미국에서는 다이어트 식품으로 인기를 끌고 있으며, 일본에서는 천연 식품첨가물로 등록되어 안전한 식품첨가제로 사용되고 있다. 키토산은 미생물이나 효소에 의해 분해가 가능하고, 기본 단위인 N-아세틸-D-글루코사민, D-글루코사민 역시 체내 친화성이 우수하다.¹⁵⁾

이처럼 현재까지 키토산은 인체에 영향을 미치는 특이한 독성에 관해서는 보고된 바가 없는 안전한 물질로 알려져 있다. 생체 친화적인 물질인 수용성 고분자 키토산을 어병 유발 박테리아의 성장저해제로 도입하였을 때, *in vitro test*에서는 일부 박테리아에 대해 성장억제 기능을 보였다. *in vivo test*에서는 물고기 생존에 적합한 농도인 0.00001%를 사용하거나, 물의 오염정도가 높은 경우 0.00005%를 사용한다면 키토산이 어병원과 반응하여 성장을 억제하므로 박테리아 농도에서 낮아진 상태에서 물고기가 자체면역으로 질병을 이겨낼 수 있음을 확인할 수 있었다. 이러한 특성이 곧 효과적인 어병 예방제로 사용될 수 있음을 실험을 통해 확인할 수 있었다. 현재의 결과를 대규모의 어류대상 실험을 거쳐 예방효과를 검증해 낸다면 다음과 같은 분야에 키토산을 활용할 수 있음을 예견할 수 있다.

1. 질병치료의 측면

in vitro test 결과를 바탕으로 질병에 걸린 물고기를 치료하기 위해서는 0.1~0.01%의 키토산이 필요하다. 하지만 실제 물고기에 적용하면 아가미에 고분자 키토산이 부착되어 질병에 의한 죽음이 아닌 키토산에 의한 호흡곤란으로 사망할 수 있다. CFU측정을 위한 실험에서 20분 동안 키토산(0.0025%)에 노출한 균주가 90%이상 사멸하는 것으로 미루어 외부에 노출되는 피부병 치료제로는 연속적인 사용이 아닌 일정 시간 격리치료를 통해 질병 치료에 사용할 수도 있을 것이다. 다만 기존의 치료방식과 유사하여 물고기를 격리해야하는 번거로움이 있지만 치료제의 성분이 생체친화적인 점이 장점이다.

나. 질병예방 및 수질개선 측면

키토산의 농도를 0.00005% 이하로 낮추어 평상시의 수조 속에 투입했을 때 균주의 농도를 일정수준 이하로 낮추어 물고기가 자체면역으로 질병을 극복할 수

있도록 도와주는 천연 질병 예방제로 사용할 수 있을 것이다. 정기적으로 키토산을 수조에 공급하는 것만으로 질병을 간편하게 예방할 수 있을 뿐만 아니라, 미생물에 의해 자연분해되는 물질이기에 오염문제 및 내성문제에서 자유로울 수 있을 것이다. 뿐만아니라 키토산의 낮은 농도는 고농도만큼 완벽한 항생효과를 보이지 않기 때문에 오히려 수질개선에 도움을 주는 유익한 균주도 계속 생존할 수 있어 수질문제를 걱정하지 않아도 될것으로 예상할 수 있다. 키토산의 음이온 흡착특성은 어병균 뿐만 아니라 수돗물 속에 섞인 중금속에나 불소 까지도 결합하게 되므로 수조의 물관리가 훨씬 손쉬워질 것이다.

V. 참고문헌

- 1) 농식품부, 관상어산업 육성을 위한 정책,
http://epic.kdi.re.kr/epic_attach/2011/R1102370.pdf
- 2) 담뽕뽕의 물생활, <http://www.dampopo.com/>
- 3) Shahidi, F. and Synowiecki, J. (1991). Isolation and characterization of nutrients and value-added products from snow crab (*Chionoecetes opilio*) and shrimp (*Pandalus borealis*) processing discards. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39: 1527-1532.
- 4) Hong Kyoon Na et al. (2002). Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights. *International Journal of food microbiology*, 74: 65-72.
- 5) 김종준 외, (1997). 키틴/키토산의 산업적 응용. *고분자과학과 기술* 제8권 5호
- 6) 고병열 외, (2002). 키토산, 심층정보분석보고서. KISTI, 13쪽
- 7) Ying-Chien Chung et al. (2003). Effect of abiotic factors on the antibacterial activity of chitosan against waterborne pathogens. *Bioresource Technology*, 88: 179-184.
- 8) Helander I.M. et al. (2001). Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of Gram-negative bacteria. *International Journal of Food biology*, 71: 235-244.
- 9) Austin B. and Austin D.A. (1999). Bacterial fish pathogens, disease of farmed and wild fish p11~16
- 10) Chul-Hong Oh (2003). Chitosanase from *Bacillus subtilis* strains; Purification, Characterization, Cloning and Expression of gene, department of marine biology graduate school cheju national university
- 11) Rodriguz I. et al. (2008). Immune response of zebrafish(*Danio rerio*) against a newly isolated bacterial pathogen *Aeromonas hydrophila*. *Fish&shellfish Immunology*, 25: 239-249
- 12) No, K.H. et al. (2002). Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights. *International Journal of Food Microbiology*, 74, 65-72.
- 13) Geng X. et al. (2005). Electrospinning of chitosan dissolved in concentrated acetic acid solution. *Biomaterials*, 26: 5427~5432.
- 14) No H.K. et al. (2002). Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers

with different molecular weights. *Food Microbiology*, 74: 65~72.

15) Ben-Shalom, N. et al. (2003). Controlling gray mould caused by *Botytis cinerea* in cucumber plants by means of chitosan. *Crop Protection*, 22: 285–290.
