[UCI]I804:24011-200000236260

2008年 2月
碩士學位論文

전기방사을 이용한 항균 나노 섬유제조에 관한 연구

朝 鮮 大 學 校 大 學 院

環 境 工 學 科

韓 成 佑

전기방사을 이용한 항균 나노 섬유제조에 관한 연구

A study on the antimicrobial effect cellulose nanofiber using electrospinning process.

2007年 11月 日

朝 鮮 大 學 校 大 學 院

環 境 工 學 科

韓 成 佑

전기방사을 이용한 항균 나노 섬유제조에 관한 연구

指導敎授　李　仁　化

이 論文을 工學碩士 學位申請 論文으로 提出함.

2007年 11月　日

朝 鮮 大 學 校　大 學 院

環 境 工 學 科

韓　成　佑

韓成佑의 碩士學位論文을 認准함

委員長　朝鮮大學校 敎授　金 時 郁　印

委　員　朝鮮大學校 敎授　李 仁 化　印

委　員　朝鮮大學校 敎授　田 榮 男　印

2007年 11月　日

朝鮮大學校 大學院

목 차

List of tables ····· iii

List of figures ····· iv

ABSTRACT ····· viii

Ⅰ. 서 론 ····· 1

Ⅱ. 이론적 고찰 ····· 4

1. 전기방사 ····· 4

2. 항균물질 ····· 8

2. 1 은행나무 ····· 8

2. 2 프로폴리스 ····· 8

2. 3 Ag ····· 9

Ⅲ. 실험장치 및 방법 ····· 11

1. 시료 및 재료 ····· 11

2. 방사용액 제조 ····· 12

3. 방사용액의 물성 측정 ····· 15

4. 실험 장치 ····· 16

5. 항균활성 측정 ····· 18

5. 1 항균활성 검색용 균주 및 배지 ····· 18

5. 2 항균활성 측정 방법 ····· 20

1) Disc diffusion test ····· 20

2) Optical density test ····· 21

3) Bacteria reduction ····· 21

4) Colony counting test ····· 22
5) Soluble solid 함량측정 ····· 22
Ⅳ. 결과 및 고찰 ····· 23

1. 전기방사 섬유의 형태 ····· 23
1. 1 은행잎 추출물을 첨가한 섬유 ····· 23
1. 2 프로폴리스를 첨가한 섬유 ····· 26
1. 3 Ag를 첨가한 섬유 ····· 29
1. 4 streptomycin을 첨가한 섬유 ····· 32
2. 항균활성 측정 ····· 35
2. 1 은행잎 추출물을 첨가한 섬유 ····· 35
1) Disc diffusion test ····· 35
2) Optical density test ····· 41
2. 2 프로폴리스를 첨가한 섬유 ····· 48
1) Disc diffusion test ····· 41
2. 3 Ag를 첨가한 섬유 ····· 53
1) Disc diffusion test ····· 53
2) Optical density test ····· 56
2. 4 Streptomycin를 첨가한 섬유 ····· 61
1) Disc diffusion test ····· 61
2) Optical density test ····· 63
3. 첨가물질의 S. aureus 에 대한 항균활성 비교 ····· 68
4. Colony counting test ····· 70

Ⅴ. 결 론 ····· 73

REFERENCES ····· 75

List of tables

Table 1 Composition of phosphate buffer. ····· 18
Table 2 Composition of LB medium. ····· 19
Table 3 Composition of trypicase soy agar. ····· 19
Table 4 Yield of dried weight from Ginkgo biloba extract and propolis ····· 22
Table 5 Properties of cellulose acetate in Ginkgo biloba leaves contained solution for various concentration. ····· 24
Table 6 Properties of cellulose acetate in propolis contained solution for various concentration ····· 27
Table 7 Properties of cellulose acetate in silver contained solution for various concentration. ····· 30
Table 8 Properties of cellulose acetate in streptomycin contained solution for various concentration. ····· 33

List of figures

Fig. 1. Schematic diagram of the electrospinning process. ····· 7
Fig. 2. Procedure for antimicrobial effect of electrospun fiber. ····· 14
Fig. 3. Schematic and photo of electrospinning apparatus. ····· 17
Fig. 4. SEM photographs of ginkgo-cellulose fibers electrospun. ····· 25
Fig. 5. SEM photographs of propolis-cellulose fibers electrospun. ····· 28
Fig. 6. SEM photographs of silver-cellulose fibers electrospun ····· 31
Fig. 7. SEM photographs of streptomycin-cellulose fibers electrospun. ····· 34
Fig. 8. Antimicrobial effect of bilobalide and ginkgolide A, B from Ginkgo biloba leaves extract on S. aureus by disc diffusion test. ····· 37
Fig. 9. Antimicrobial effect of Gingko biloba leaves contained solution for various concentration on S. aureus by disc diffusion test. ····· 38
Fig. 10. Blank test with cellulose acetate fiber, for E. coli and S. aureus ····· 39
Fig. 11. Antimicrobial effect of electrospun ginkgo-cellulose fibers in Ginkgo biloba leaves contained solution for various concentration on S. aureus by disc diffusion test. ····· 40
Fig. 12. Antimicrobial effect of Ginkgo biloba leaves contained solution for various concentration on S. aureus by optical density test as a function of culture time. ····· 42
Fig. 13. Antimicrobial effect of electrospun ginkgo-cellulose fiber in Ginkgo biloba extract contained solution for various concentration on S. aureus by optical density test as a function of culture time. ····· 43
Fig. 14. Bacteria reduction of bulk in Ginkgo biloba leaves contained solution for various concentration on S. aureus by optical density test as a function of culture time. ····· 44

Fig. 15. Bacteria reduction of electrospun ginkgo-cellulose fiber in Ginkgo biloba extract contained solution for various concentration on S. aureus by optical density test as a function of culture time. ····· 45
Fig. 16. Antimicrobial effect of electrospun ginkgo-cellulose fiber in Ginkgo biloba extract contained solution for various concentration on S. aureus and E. coli by optical density test as a function of culture time. ····· 46
Fig. 17. Bacteria reduction of electrospun ginkgo-cellulose fiber in Ginkgo biloba extract contained solution for various concentration on S. aureus and E. coli by optical density test as a function of culture time. ····· 47
Fig. 18. Antimicrobial effect of propolis contained solution for various concentration on S. aureus by optical density test as a function of culture time. ····· 49
Fig. 19. Antimicrobial effect of electrospun propolis-cellulose fiber in propolis contained solution for various concentration on S. aureus by optical density test as a function of culture time. ····· 50
Fig. 20. Bacteria reduction of bulk in propolis contained solution for various concentration on S. aureus by optical density test as a function of culture time. ····· 51
Fig. 21. Bacteria reduction of electrospun propolis-cellulose fiber in propolis contained solution for various concentration on S. aureus by optical density test as a function of culture time. ····· 52
Fig. 22. Antimicrobial effect of Silver-cellulose fibers in silver(Ag) various contented on S. aureus by disc diffusion test. ····· 54
Fig. 23. Antimicrobial effect of electrospun silver-cellulose fibers in silver various contented on E. coli by disc diffusion test ····· 55
Fig. 24. Antimicrobial effect of silver contained solution for various concentration on S. aureus by optical density test as a function

of culture time. ····· 57
Fig. 25. Antimicrobial effect of electrospun silver-cellulose fiber in silver contained solution for various concentration on S. aureus by optical density test as a function of culture time. ····· 58
Fig. 26. Bacteria reduction of silver in silver contained solution for various concentration on S. aureus by optical density test as a function of culture time.····· 59
Fig. 27. Bacteria reduction of electrospun silver-cellulose fiber in silver contained solution for various concentration on S. aureus by optical density test as a function of culture time. ····· 60
Fig. 28. Antimicrobial effect of electrospun streptomycin-cellulose fibers in streptomycin contained solution for various concentration on S. aureus by disc diffusion test. ····· 62
Fig. 29. Antimicrobial effect of streptomycin contained solution for various concentration on S. aureus by optical density test as a function of culture time. ····· 64
Fig. 30. Antimicrobial effect of electrospun streptomycin-cellulose fiber in streptomycin contained solution for various concentration on S. aureus by optical density test as a function of culture time. ····· 65
Fig. 31. Bacteria reduction of streptomycin in streotomycin contained solution for various concentration on S. aureus by optical density test as a function of culture time. ····· 66
Fig. 32. Bacteria reduction of electrospun strptomycin-cellulose fiber in streptomycin contained solution for various concentration on S. aureus by optical density test as a function of culture time. ····· 67
Fig. 33. Bacteria reduction of electrospun 30wt% ginkgo-cellulose fiber, 20wt% propolis-cellulose fiber, 0.5wt% Ag-cellulose fiber, 0.5wt%

streptomycin-cellulose fiber on S. aureus by optical density test as a function of culture time. ····· 69
Fig. 34. Numbers of S. aureus colonies of an additive as a function of culture time. ····· 71
Fig. 35. Numbers of S. aureus colonies of fibers as a function of culture time. ····· 72

ABSTRACT

A study on the antimicrobial effect for electrospun cellulose acetate fiber cantaining antibiotic.

Han Sung Woo
Advisor : Prof. In Hwa Lee Ph.D.
Department of Environmental Engineering,
Graduate School of Chosun University

The electrospinning technique has been actively explored recently for potential applications because that offers ultrafine fiber, high specific surface area and possibility of various modification in spite of simple process.

We made fiber out of the polymer solution which added *Ginkgo biloba* extraction, propolis, silver, streptomycin to cellulose acetate/acetone solution through the electrospinning. Electrospinning conditions was as follows; 100㎕/min of flow rate, and 10cm of tip-to-collector distance(TCD), applied voltage was 12kV. After electrospinning process, fiber morphology was observed from Scanning Electron Microscope (SEM). SEM photographs showed that average diameter of fibers by prepared via electrospun was approximately 800nm, 600nm, 600nm, 200nm in cellulose acetate fibers, Ginkgo-cellulose fibers, streptomycin-cellulose fibers, silver-cellulose fibers.

Antimicrobial activities of cellulose acetate fiber from added *Ginkgo biloba* extraction, propolis, silver, streptomycin was investigated by disc diffusion test and optical density test against *S. aureus* and *E. coli*. In case of disc diffusion test of *S. aureus*, the clean zone diameter was increase according to

content of antimicrobial additive. Also, optical density test showed that it appeared to same results.

Bacteria reduction of ginkgo-cellulose fibers, streptomycin-cellulose fibers, silver-cellulose fibers, propolis-cellulose fiber was 0.5wt% silver-cellulose fibers > 0.5wt% streptomycin-cellulose fibers > 20% propolis-cellulose fiber > 30wt% ginkgo-cellulose fibers for *S. aureus* by optical density test during 24 hours. However, bacteria reduction was 20% propolis-cellulose fiber > 0.5wt% silver-cellulose fibers > 30wt% ginkgo-cellulose fibers > 0.5wt% streptomycin -cellulose fibers after 24 hours. Streptomycin-cellulose fiber was 98% of bacteria reduction during 24 hours. But, antimicrobial effect of streptomycin rapidly decrease after 24 hours.

Ⅰ. 서론

Cellulose는 자연에서 풍부하며, 값도 비교적 저렴하고, 열적 기계적 성질이 우수하여 섬유용 재로로 많이 사용되며, 재생성과 생분해능이 우수하기 때문에 종이, 식품가공, 건축자제, 의학, 섬유 등 여러 분야에 다양하게 적용되고 있다. 그러나 천연에 존재하는 셀룰로오스는 이용하기 어려운 측면을 갖고 있다. 다시 말하면 셀룰로오스는 단독으로 존재하지 않고 대부분은 다른 화합물과 혼재되어 존재하고 있다. 이러한 상태로부터 셀룰로오스를 분지 정제하기 위해서는 많은 노력과 에너지가 필요하다. 더욱이 셀룰로오스는 분자 간, 분자 내의 응집력이 강해, 그것을 분자 상으로 용해할 수 있는 용매가 매우 적다. 최근 cellulose 유도체에 관한 연구가 집중되고 있으며, 이 중 cellulose acetate는 최근 들어 생분해성 고분자 소재로 많은 연구들이 진행 중이다.[1-2)]

섬유의 생산하는데 방사 방법으로는 두 가지가 있다. 하나는 용액 방사이고, 이것은 건식, 습식방사를 포함한다. 그리고 다른 방사법은 용융방사이다. 일반적으로 용융된 고분자나 고분자 용액을 압출기를 사용하여 노즐을 통하는 등의 기계적인 힘에 의하여 섬유를 제조 하는 방법이다. 이 전형적인 방사 방법들로 생산되는 섬유의 직경은 대부분 10㎛로 이상이다. 전형적인 방사 방법으로 생산되는 섬유의 직경보다 가는 극세 섬유를 제조하는 방법으로 전기방사(electrospinning)이라는 새로운 방사 방법이 대두 되고 있다.

1934년 Formhals에 의해서 전기방사 공정을 통해 저점도 고분자 용액을 이용하여 고분자 섬유를 생산 한 이후, 많은 연구가들에 의해 고점도 용액을 이용한 섬유제조 가능성이 확인되면서 많은 관심의 대상이 되었다.[3)] 1971년 Baumgarte에 의해 아크릴계 고분자를 이 방법을 통해서 생산이 가능해졌고, 제조된 섬유의 직경은 500 ~ 1,100 nm 정도였다. 또 1981년 Larrondo 와 Manely에 의해서 고분자 용융체(polyethylene and polypropylene)를 이용해서 섬유를 생산했다. 1970년대 이후 세계적으로 봄을 형성하기 시작한 컴퓨터 사업과 근래의 비약적인 정보통신의 발달은 소재산업의 단위를 “micro”에서 “nano”로 바꾸는 기폭제로 작용하게 되었다. 그리하여 최근 나노섬유에 관한 연구가 급속도로 진행되고 있다. 전기방사는 고분자 용액이나 용융된 고분자에 고전압을 걸어주어, 모세관 팁과 웹을 받아주는 컬렉터 사이에 전기장을 형성시켜 섬유를 제조하는 방법이다. 이러한 전기방사를 이용하여 얻은 섬유는 수 나노에서 수백 나노의 직경을 가진 섬유를 얻을

수 있다. 전기방사에 의해 제조된 섬유는 단위부피당 큰 표면적을 가지고, 매우 작은 기공을 가지고 있기 때문에 필터소재, 강화섬유, 생체조직 배양을 위한 담체(scaffold) 그리고 상처 보호 치유소재, 인공혈관, 약물전달 시스템과 같은 의료용 소재 등 많은 분야에 응용이 가능하다는 장점을 가지고 있다.[4-5] 또한 전기방사에 의한 나노 섬유는 특이한 기능으로 전기 · 전자 및 환경, 생명 등 미래 첨단 산업의 필수 소재로 각광받기 시작했으며, 현재 2차전지, 고효율 필터(HEPA급) 및 의료용 등의 소재로 상용화가 진행되고 있다.

많은 장점을 가지고 있는 전기방사에 관한 연구는 주로 고분자 물질 및 용매에 의한 섬유의 형태학적 변화에 미치는 영향과 공정 매개 변수를 조절할 때에 실험적으로 관찰되는 섬유의 특성이나 형성(morphology)에 관한 연구가 진행되고 있다. Haiqing 는 셀룰로오스 아세테이트(cellulose acetate)를 acetone, acetic acid, dimethylacetamide (DMAc)등의 용매를 이용하여 용해시킨 후 전기방사를 실시하여 용매의 비율별 방사 섬유의 형태를 확인하였다. 또한 Lee 등은 셀룰로오스 아세테이트를 아세톤에 용해시켜 인가전압, TCD(tip - to - collector Distance), 점도의 변화에 의한 전기방사 섬유의 평균직경 및 형태의 변화를 확인 하였다.

전기방사의 특징 중 하나인 타 소재와의 혼입성이 우수하다는 특성을 이용하여 전기방사 용액에 Ag 및 TiO_2등의 금속물질을 첨가하여 전기방사 섬유에 기능성을 부여하는 연구 연구도 수행되어져 왔다. Son 등의 연구에서는 셀룰로오스 아세테이트에 대표적인 항균물질로 알려져 있는 은(Ag)을 첨가하여 항균 섬유를 제조하여, 섬유에 은 입자의 분포에 관한 연구를 수행하였다.[6] 그러나 전기방사용액에 타 소재의 첨가하여 향균성 섬유의 제조에 관한 연구는 대부분이 금속물질이 보유하고 있는 항균성을 이용하여 섬유의 제조가 이루어 졌으며, 첨가물질에 의한 섬유의 형태학적 변화 및 첨가물질의 분포에 관한 연구만을 수행하였다. 즉, 항균물질을 첨가한 섬유가 가지는 항균성에 관한 연구는 이루어 지지 않았다. 본 실험에서는 전기방사의 장점 중 하나인 타 소재와의 혼입성이 우수하다는 특성을 활용하여, 고분자 물질로 재생성과 생분해능이 우수한 셀룰로오스 아세테이트를 사용하였으며, 용매로는 인체에 미치는 영향이 적고, 잔류성이 없는 아세톤(acetone)을 이용하여 전기방사 용액을 제조 하였다.[7] 제조된 셀룰로오스 아세테이트 용액에 첨가물질에 대표적인 항균 물질로 알려져 있는 은과 천연 추출물인 은행잎 추출물(*ginkgo biloba* extract)과 프로폴리스(propolis), 합성항성제인 streptomycin을 첨가하여 전기방사에 의해 제조된 섬유를 제조하고, 제조된 섬유의 물성 변화 및

특성을 확인하고자 한다. 또한 전기방사에 의해 제조된 섬유의 항균 효과 와 항균 지속력에 대하여 관찰하고자 한다.

Ⅱ. 이론적 고찰

1. 전기방사

역사적으로 전기방사는 1900년대 초에 봉납에 전기를 통하게 하면 고체 섬유가 분출하는 것이 알려진 후, Formhals는 1934년에 정전기적 힘을 사용한 고분자 섬유의 생산에 대한 장치를 개발하고 특허를 내었고, 이 방법에 의해 섬유를 방사하는 공정을 전기방사라고 하였다. 그와 연관된 연구로는 1945년에 Bose는 연무질 분사에 성공하였고, Lord Rayleigh는 droplet의 표면장력을 극복하는 전하의 최대량을 계산하였으며, Taylor는 전기장에 의해 형성화하는 droplet의 조건을 분석하였다. Bailey는 용액의 정전기적 원자화에 대한 제반 검토를 하였고, Roth와 Kelly는 전하의 분열에 대한 연구를 하였다. 1971년에는 Baumgarten는 아크릴의 정전기적 방사를 하였고, Larrondo와 Manlay는 공기 중에서 polypropylene, polyethylene의 전기방사를 연구하였으며, Chum은 진공상태에서 polyester, polyethylene 의 전기방사를 연구하였다. 전기장에 의해 만들어지는 액체 젯(liquid jet), 전기장에서 액체 droplet의 뒤틀림, 액체 젯의 droplet으로의 붕괴 등의 현상에 대해서도 현재 많은 연구가 행하여지고 있다.

전기방사에 대한 관심의 급증에도 불구하고 공정 자체에 대한 이론적 해석과 모사에 대한 연구는 아직 불충분하다. 섬유의 점도와 고분자 농도 같은 선택된 유체 변수나 방사유량, 인가전압, 주변 분위기에 따른 다양한 결과에 대해 몇몇 연구가 보고되고 있다. 그러나 전기방사 과정은 전기역학적으로 매우 복잡하면서도 유체역학과 상호작용하는 시스템으로 매우 난해하여 아직까지 그 상세한 메커니즘을 완전히 파악하지 못하고 있는 실정이다. 지금까지 알려진 이론에 의하면 전기방사 과정에서 고전압에 연결된 고분자 용액은 초기에 표면장력에 의해 모세관의 끝에서 droplet을 형성하고 전압이 증가함에 따라 전하의 유체표면에 유도되고 droplet은 흐트러진다. 액체의 표면장력을 넘어서는 임계전압 이상에서 단일 분출물이 테일러 콘의 원추형 메니스커스의 최고점으로부터 분사된다.[8] 모세관 튜브의 끝에서 원추형을 일시적으로 넘어서면 분출물은 가늘어지며 이 분출되는 형태는 전기역학적 콘-분출이라고 알려져 있다. 계속적인 유체 불안정성에 의한 유체분출

물의 가속화된 고체화와 포집판상으로의 고체 침적 및 하전(charged)된 섬유의 응집 등의 현상이 발생하며 최종적으로 포집판상에 부직포가 형성되게 된다. 이때 유체 불안정성은 방사상 전하의 반발력 때문에 단일 분출상에서 다중 필라멘트 상으로 된다.[9-12)]

전기방사에 영향을 미치는 공정인자로는 고분자의 분자량, 용액의 농도, 점도, 표면장력, 유전율, 전기전도도, 사용되는 용매와 같은 고분자 용액의 성질과 전기장의 세기, 팁과 컬렉터 사이의 거리(TCD), 방사유속(flow rate)등의 공정변수와 온도와 습도 등과 같은 방사환경 등으로 구별되어 진다.[13-15)]

고분자 용액의 성질 중 점도는 고분자간 인력(attraction)과 반발력(repulsion)에 의존한다. 고분자 농도가 같더라도 사용된 용매의 종류에 따라 다른 점도를 갖는다. 이러한 고분자 용액의 점도는 전기방사에 있어서 중요한 공정인자로서 작용한다. 일반적으로 점도가 일정 임계점도 보다 낮은 점도에서는 용액 상에서 고분자 엉킴(entanglement)이 적고, 충분한 표면장력을 갖지 못한다. 이로 인해 고분자 용액은 임계전압에 도달하기 전에 분사되어 제트가 충분한 신장과 굽힘을 받지 못하므로 섬유의 형태를 형성할 수 없어 미세 방울(bead) 형태로 수집기에 집속된다. 이렇게 분사된 구분자 용액의 용매는 모세관 팁과 수집기 사이에서 완전히 휘발되지 못하므로, 그대로 수집기에 전달되어 일부 고화된 섬유들을 다시 용해시키기도 한다. 점도가 충분한 용액의 경우, 제트는 모세관 팁과 수집기 사이에서 충분히 용매가 휘발되어 수집기 위에 섬유 형태로 쌓이게 된다. 그러나 점도가 너무 높을 경우, 방사용액 자체의 높은 엉킴 현상으로 유동성이 작아서 모세관 끝에 Taylor cone을 형성하기 어렵고, 형성된 전기장 내에서도 분산되지 못한다.[16-17)]

인가전압의 영향은 고전압을 인가할수록 섬유의 평균직경은 작아진다. 전압이 낮을 때에는 전기방사가 일어나지 못하고 용액 상으로 흐르나 전압이 증가하면서 전기장은 점점 세어지다가 전압이 과도하게 되면 분사각 θ가 커져서 섬유가 한 곳에 잘 포집되지 못하고 공기 중으로 분산되는 것을 보인 것이다.

팁과 콜렉터 사이의 거리가 너무 짧은 경우 미처 방사용액이 용매의 증발이 용이 하지 못하여 미쳐 다 신장되지 못하고 수집기에 집속하여 고화된 형태의 섬유를 얻을 수가 없다. 이에 반하여 팁과 컬렉터 사이의 거리가 매우 길면 팁과 컬렉터 사이에 형성되는 전기장의 세기가 약해지기 때문에 수집기에 집적되는 양이 감소하고, 수집기에 집적되지 못하고 비산될 수도 있다. 또한 TCD가 증가할수록 전압에 관계없이 섬유는 원형을 이루며 그 원형의 직경이 증가한다.[18-20)]

방사용액의 유속이 증가할수록 섬유의 평균직경의 크기도 증가하는 경향을 보인다. 이는 방사유속이 증가함에 따라 정전밀도가 감소하여 섬유형성 단위가 커져 평균직경의 크기가 증가한다. 이에 반하여 방사용액의 유속이 너무 낮으면, 단섬유는 간헐적으로 끊어지는 현상을 보이고 있다. 이는 방사유속이 감소함에 따라 정전밀도가 증가하고 이로 인해 방사 용액의 점도가 표면장력보다 상대적으로 낮기 때문이다. 또한 휘발성이 높은 용매를 사용하였을 경우 모세관 팁 끝에서 고화가 이루어져 자주 제거해 주어야 한다.

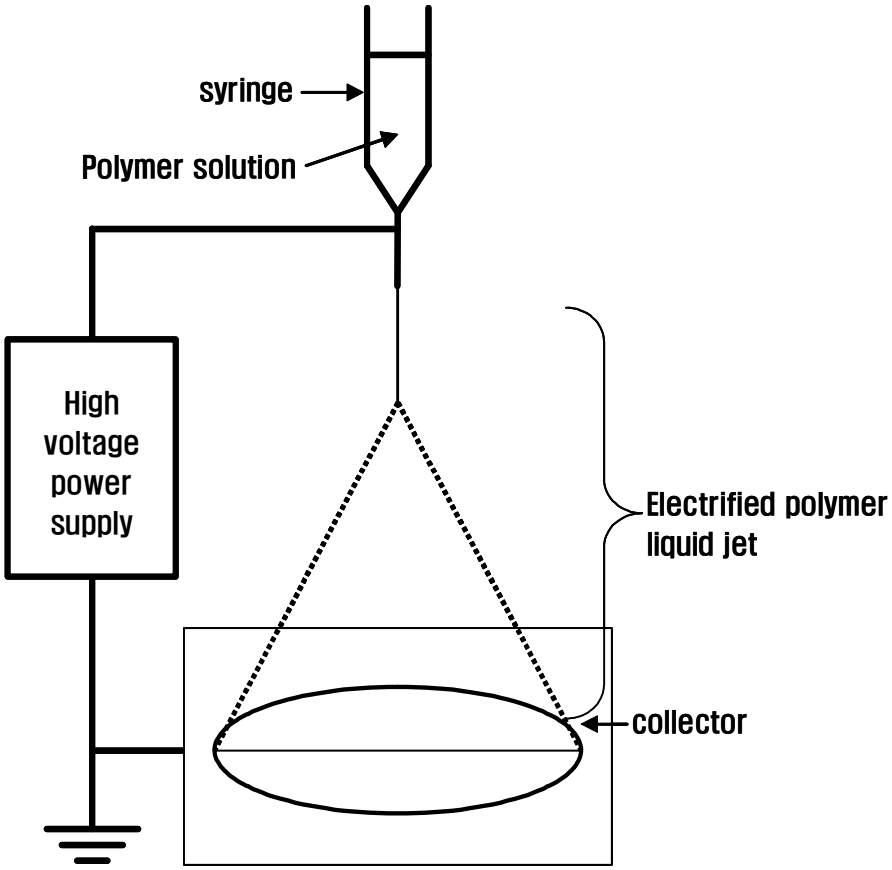


Fig. 1. Schematic diagram of the electrospinning process.

2. 항균물질

2.1 은행잎추출물

은행잎에 대한 성분은 flavonol계와 ginkgo acid, poltphenol류로 대별되며 은행잎으로부터 성분을 추출하는 방법에 따라 조성물이 크게 달라진다.[21] 일반적으로 제약 성분으로 이용되는 것은 징코산 및 플라보놀이며, 폴리페놀은 정제과정에서 배제된다.[22] 은행잎 추출물은 항균제로 이용하기 위해서는 은행잎으로부터 활성 물질을 추출하고 이들 물질을 사용목적에 알맞게 최적화하는 것이 매우 중요한 과정이다.[23] 은행잎의 살충 · 항균 성분에 대한 연구는 주로 외국에서 기초적인 연구로 진행되어 왔다. 은행잎의 메탄올 추출물이 Enterococcus faecalis, Salmonella typhi, Candida albicans, Candida Krusei에 대하여 항균효과가 있는 것으로 밝혀졌다. 은행잎 추출물의 주 유효성분인 ginkgo flavone glycosides의 각 성분에 대한 분리 및 함량 분석연구와 은행잎 추출물에도 함유되어 있으며, 최근 들어 약리적으로 크게 각광을 받고 있는 Ginkgolide 및 Bilobalide에 대한 분리 및 특성에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.[24-25] 은행잎에 함유된 물질은 수십 종이 알려져 있으며 테르펜류인 징코리드, 빌로발리드 등이 신경계질병을 치료하는데 일부 이용되고 있으며 flavoneglycoside인 Zincomine 이 혈액청정제로 최근 상품화되었다. 유럽지역에서는 현제 은행잎 엑기스제제(정제, 액제, 주사제 등)의 단미제 및 복합제로 연간 5억불 이상의 매출고를 기록하고 있으며, 이에 대한 화학적, 약리학적, 임상학적인 연구가 전 세계적으로 활발히 진행되고 있다.

2. 2 프로폴리스

러시안페니실린, 천연페니실린이라고도 한다. 꿀벌은 벌집의 틈이 난 곳에 프로폴리스를 발라 병균이나 바이러스로부터 스스로를 보호하고, 말벌이나 쥐와 같은 적의 침입을 막는다. 이로써 산란과 성장, 꿀의 숙성과 보관 등에 알맞은 서식처를 유지한다. 특히 여왕벌이 산란할 때에는 일벌이 산란장소를 소독할 때 사용해 청결하게 한다. 이러한 프로폴리스는 기원전 약 300년 이집트에서 사용했다는 기록이 있을 정도로 오래 전부터 인류가 화농방지제로서 사용해왔다. 최근에는 1965

년 프랑스의 의사 레미 쇼방이 꿀벌의 몸에 박테리아가 없음을 연구하던 중 프로폴리스가 천연항생물질임을 알아냈다. 성분으로는 유기물과 미네랄(무기염류)이 가장 많으며 이와 함께 104종 정도의 성분이 들어 있다. 많은 성분 중에서 미네랄·비타민·아미노산·지방·유기산·플라보노이드 등은 세포대사에 중요한 역할을 하며, 테르펜류 등은 항암 작용을 한다.[26] 특히 100종류가 넘는 플라보노이드가 들어 있어 건강 증진에 큰 도움을 준다. 주요한 효능으로는 항염·항산화·면역증강 등이 있다. 항염 효과를 내는 것은 사람의 몸에 염증을 일으키는 프로스타그란딘을 만들어내는 효소를 절반까지 줄이기 때문이다. 또 주요 성분인 플라보노이드가 활성산소를 없애기 때문에 항산화 효과가 있다. 항암 효과를 나타내는 케르세틴 등이 있어 암세포의 유전자가 복제되기 전에 차단하는 일을 한다. propolis의 항균 작용 기작은 propolis의 성분들이 박테리아의 RNA polymerase를 저해하기 때문인 것으로 추정되고 있으며, 최근 Takaisi 와 Schilcher 는 *Streptococcus agalactiae*에 대한 propolis의 항균작용의 기작을 전자현미경을 이용하여 밝혀내는 성과를 올렸다. 그 결과 propolis는 세포분열을 방해하여 세균의 성장을 저해함으로써 pseudo-multicellular streptococci를 형성하며 세포질, 세포막과 세포벽을 파괴하여 부분적으로 bacteriolysis를 야기함으로써 단백질 합성을 방해하는 것으로 밝혀졌다.[27]

Propolis는 특히 gram-positive bacteria에 효과적이며 개별 flavonoid 는 항균활성을 감소된다고 한다.

2.3 은 (Silver,Ag)

은(Ag)은 항균, 살균, 방취, 전자파 차단 기능이 우수하고 650가지 이상의 세균에 대하여 항균력을 발휘하는 것으로 알려져 있다. 또한 나노사이즈로 분사된 은은 자외선 차단기능과 단열기능도 있으며 높은 전기 전도성으로 정전기 방지에도 탁월한 효과가 있다. 특히 은을 나노사이즈로 제오 한다면 위의 기능 중 항균작용은 더욱 극대화되고 염소계열의 살균제보다 수십배 강력하고 인체에는 전혀 무해한 특성을 나타내기 때문에 안전하며 특히 은나노를 대량으로 생산이 가능하고 극소량만 첨가하여도 은 입자가 나노사이즈로 분산되어 그 효과는 훨씬 뛰어나기 때문에 은나노 기술의 효용성은 매우 크다고 할 수 있다. 은의 항균메카니즘을 보면 세균의 -SH, -COOH, -OH등과 강하게 결합해 세균의 세포막을 파괴함으로 살균하여

인체에는 무해하며 세균을 사멸시키는데 소요되는 시간도 아주 짧을 뿐 아니라 99%의 살균력을 보이고 돌연변이 같은 내성을 지닌 세균이 생길 수 있는 시간적인 여유을 주지 않는 장점을 가지고 있다.[29)]

Ⅲ. 실험재료 및 방법

1. 시약 및 재료

본 실험에 전기방사 용액 제조에 사용된 고분자인 셀룰로오스 아세테이트(cellulose acetate)는 Aldrich에서 구입한 평균분자량이 30,000을 사용하여, 용매로는 아세톤(CH_3COCH_3, Juncei. co. Japan)을 사용하였다. 은행잎은 조선대학교 근처 가로수에서 2006년 8월과 2007년 7월 중순에 채취하여 2주일 이상 음건 후 300㎛ 이하로 분말화하여 시료로 사용하였다. 프로폴리스(propolis)는 New Direction(Batch# 1006010, Australian)사에서 구입하였으며, streptomycin은 sigma-aldrich에서 구입하여 사용하였다.

2. 방사용액 제조

전기방사 용액 제조는 셀룰로오스 아세테이트(cellulose acetate) 12.5g에 용매로 아세톤(CH_3COCH_3, Juncei. co. Japan)을 87.5g 을 사용하여 12.5wt%의 함량으로 상온에서 완전히 용해될 때까지 충분한 교반하여 용액을 제조하였다. 전기방사 용액의 제조 조건은 Lee 등의 셀룰로오스 아세테이트 전기방사 조건을 기초로 하여 섬유를 제조 하였다.[7)]

첨가물질로서 은행잎은 조선대학교 근처 가로수에서 2006년 8월과 2007년 7월 중순에 채취하여 2주일 이상 음건 후 300 ㎛ 이하로 분말 화하여 사용하였다. 첨가물질로서 충분히 건조된 은행잎 분말 100g에 에탄올(ethanol) 60% 를 가하여 회전 증발 농축기(rotary evaporator, R-114, Buchi co.)로 80℃에서 4시간 현탁한 후 membrane filter(0.45㎛, Whatman co.)로 여과하여 추출물을 얻었다. 이 추출물을 감압회전증발농축기(rotary vacuum evaporator, R-114, Buchi co.)에서 60℃에서 감압하여 16배율로 농축하여 사용하였다. 16 배율로 농축한 은행잎 추출물을 충분한 교반이 이루어진 셀룰로오스 아세테이트 (12.5wt%)용액에 셀룰로오스 아세테이트 기준으로 0.1, 0.5, 1.0, 5.0, 10, 20, 30wt% 을 첨가하여 충분한 교반을 실시하여 방사용액을 제조 하였다. 30wt% 이상으로 은행잎 추출물질을 첨가하였을 때에는 전기방사에 의한 형성되는 물질의 형태가 섬유의 형태를 이루지 못하고 작은 방울형태인 비드(bead)가 형성되었다. 그리하여 본 실험에서는 30wt% 이상의 은행잎 추출물은 실험에서 배제 시켰다.

프로폴리스(propolis)을 첨가한 cellulose acetate 용액의 제조는 New Direction사에서 구입한 프로폴리스 원액을 0.1, 0.5, 1.0, 5.0, 10, 20wt%을 충분히 교반이 이루어진 셀룰로오스 아세테이트 용액에 첨하가여 충분한 교반을 실시하여 방사용액을 제조하였다. 프로폴리스에서도 20wt%의 이상에서는 섬유의 형태가 아닌 비드의 형태로 나타났다. Ag을 첨가한 셀룰로오스 아세테이트 용액의 제조는 0.5M의 질신은($AgNO_3$)을 이용하여 Ag의 기준으로 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5wt% 을 첨가하여 교반을 실시하였다. 이때, Ag는 대기 중에 방치하면 산화가 이루어지는 것을 방지하기 위하여 방사용액주위를 은박호일로 감싸주어 방사용액을 제조하였다. Streptomycin을 첨가한 셀룰로오스 아세테이트 용액의 제조는 셀룰로오스 아세테이트 기준으로 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5wt%을 증류수 1㎖에 녹인 후 첨가하여 충분한 교반을 실시하여 방사용액을 제조 하였다. Ag와 streptomycin

은 0.5wt%이상의 함량으로 첨가하였을 때, 48시간동안의 균 성장이 이루어 지지 않아 본 실험에서는 배제 하였다.

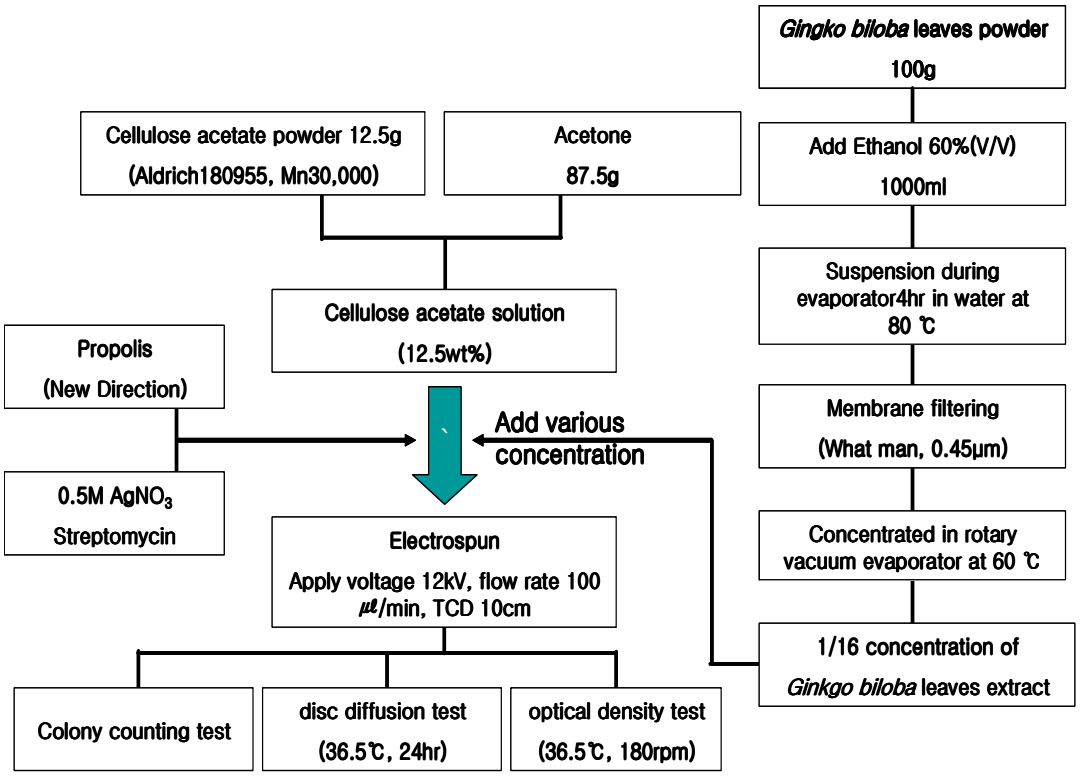


Fig. 2. Procedure for antimicrobial effect of electrospun fiber.

3. 방사용액의 물성 측정

첨가물질을 첨가한 셀룰로오스 아세테이트 용액은 첨가 물질의 물성에 의해서 전기전도도, 점도, 표면장력은 변화하게 된다. 이러한 첨가물질에 의한 방사용액의 물성 변화는 전기방사 시 매우 중요한 요소로 작용하여 섬유의 형태 및 지름에 영향을 미치게 된다. 이러한 영향을 확인하기 위해 전기전도도(electric conductivity meter, CM-11P, TOA Electronic Ltd, Japan), 점도계(Model LVDV II+, USA, 50rpm, S.64), 표면장력계(Kruss K11, Korea)를 사용하여 방사용액의 농도에 따른 물성의 변화를 측정하였다.

4. 실험 장치

본 연구에서 사용된 실험 장치는 Fig. 3에 나타낸 바와 같이 방사용액을 주사기(Syringe)에 주입하여 Syringe pump(200 series, KD Scienrific Inc., U.S.A)를 이용하여 일정한 유량으로 방사시켰다. 이때 5~45kV 범위의 고전압을 발생할 수 있는 DC power supply (PS/ER50R06-DM22, Glassman high voltage Inc., U.S.A)를 이용하여 방전용 (+)전극을 0.8mm의 직경을 갖는 모세관 팁(capillary tip)에 연결하고, collector는 접지하여 (-)전극으로 하였다. 이 방법은 기초연구의 간편한 수단으로 널리 이용되고 있는 장치로 손쉽게 원하는 공정변화의 조작이 가능하다는 장점을 가지고 있다.

각각의 첨가물질을 첨가한 전기방사 섬유를 만들기 위한 조건으로 전압공급장치인 High voltage DC generator에서 인가전압(apply voltage)을 12kV, 전기방사용액의 공급장치인 syringe pump에서 유체공급유량(flow rate)을 100㎕/min, 모세관 팁(capillary tip)과 수집기(collector)사이의 거리인 TCD (Tip-to- Collector Distance)는 10㎝로 동일한 조건에 의해서 전기방사를 실시하였다. 전기방사시 아세톤의 휘발성이 좋아 주사기 팁(tip)에서 고화가 되어 방사에 지장을 줄 수 있으므로 주기적으로 고화된 부분을 제거한 후 실험을 진행하였다.

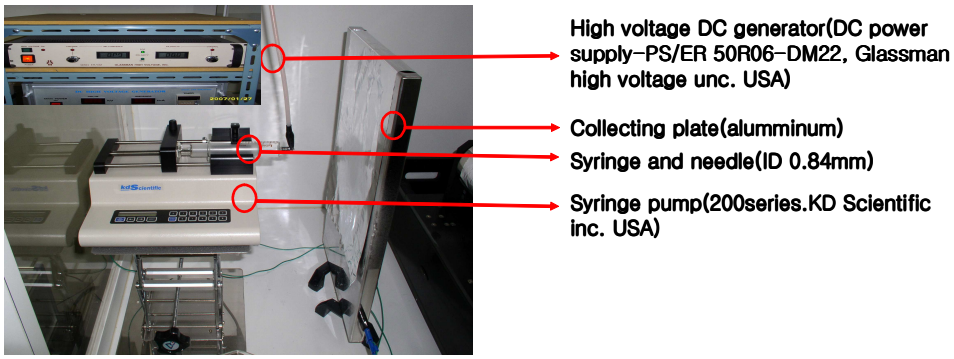


Fig. 3. Schematic and photo of electrospinning apparatus.

5. 항균활성 측정

5.1 균주 항균활성 검색용 균주 및 배지

본 실험에 사용한 균주는 세균 *Escherichia coli* (KCCM 11234), *Staphylococcus aureus* (KCCM 12214)를 한국종균협회로부터 분양받아 사용하였다. 균 생육배지는 luria-bertani medium (LB, pH7.0, 37℃) 배지와 trypicase soy agar(TSA, pH7.2 37℃)에서 24시간 진탕 배양하여 사용하였다. 희석액으로는 phosphate buffer를 사용하였고, 균주의 성장에 이용되는 배지의 조성은 Table 1.~ Table 3.에서 나타내었다.

Table 1. Composition of phosphate buffer

Components	
K2HPO4	6g
KH2PO4	2g
Distilled water	1.0L

Table 2. Composition of LB medium.

Components	
Trypton	10g
Yest extract	5g
NaCl	10g
Agar	15g
Distilled water	1.0L

Table 3. Composition of trypicase soy agar.

Components	
Pancreatic digest of casein	17g
Pancreatic digest of soybean meal	3.0g
NaCl	5.0g
K_2HPO_4	2.5g
Agar	15g
Distilled water	1.0L

5. 2 항균활성 측정방법

1) 디스크확산법 (Disc diffusion test)

세균을 최적생육조건(36℃, 180rpm)에서 1~2일 배양한 후 이 균 액을 배지 1㎖당 1×10^6 cell이 포함되도록 접종하여 현탁하였다. 이 균체를 도말한 soft agar를 충분히 건조시킨 후 paper disc를 무균 조작 (Autoclave 121℃, 15min)에 의해 안착시켰고, 그 위에 각각의 첨가물 용액을 100㎕씩 주입하여 도말한 균체의 최적 생육온도에서 24시간 배양한 후 증식저지환 (clean zone)의 유무로 그 활성을 검색하였다.

은행잎 추출물, 프로폴리스, Ag, streptomycin을 첨가한 셀룰로오스 아세테이트 용액을 방사용액으로 하여 전기방사 섬유를 제조 하였다. 섬유의 항균작용을 확인하기 위하여 paper disc법을 응용하여 전기방사에 의해 제조된 섬유를 펀칭(punching machine)을 이용하여 섬유의 직경을 6㎜로 일정한 크기와 50㎎으로 자른 후 디스크확산법 (disc diffusion test)을 실시하였다. 100㎕의 균주로 도말되어있는 배지위에 직경이 6㎜인 시편을 안착시킨 후 도말한 균체의 최적 생육온도에서 24시간동안 배양한 후 증식저지환의 유무를 비디오 현미경(camsoope, sometech Ine, Korea)을 통하여 증식저지환의 지름을 측정하였다.

2) 광화학탁도측정법 (Optical density test)

광화학탁도측정법은 *Escherichia coli*와 *Staphylococcus aureus* 균의 생육 배지인 LB medium과 trypticase soy broth 100㎖에 균주 1㎖을 접종시킨다. 접종된 broth에 각각의 첨가물질을 함유한 전기방사 섬유의 중량을 기준으로 용액 상태로 환산하여 첨가한 후 진탕배양기에서 최적 생육조건(36℃, 180rpm)으로 배양시킴과 동시에 접종 시간부터 4시간 간격으로 UV-2401PC spectrophotometer(SHIMADZU. Japan)로 640nm에서 측정하였다. 또한 추출물을 넣은 broth를 blank로 사용하여 추출물의 탁도에 의한 광화학탁도 측정법의 결과에 영향을 미치는 것을 방지하였다.

각각의 첨가물질을 함유한 전기방사 섬유의 광화학탁도 측정법은 각각의 broth 100㎖에 균주 1㎖을 접종 후 전기방사 섬유 0.5g 을 첨가하여 진탕배양기에서 최적 생육조건(36℃, 180rpm)으로 배양시킴과 동시에 접종 시간부터 4시간 간격으로 UV-2401PC spectrophotometer(SHIMADZU. Japan)로 640nm에서 측정하였다.

3) 세균증식억제율 (Bacteria reduction)

세균증식억제율(Bacteria reduction)은 광화학탁도측정의 결과 값을 이용하여 균주의 증식억제율을 백분율 값으로 나타낸 것이다. 첨가물질을 넣지 않는 무처리 균주(control sample)에 대한 첨가물질을 넣은 처리균주(test sample)의 균의 증식제거율을 나타낸다.

$$\text{Bacateria Reduction(\%)} = \frac{\text{(absorbance of control sample)} - \text{(absorbance of test sample)}}{\text{(absorbance of control sample)}} \times 100$$

4) Colony counting test

포도상구균 *S. aureus*에 대한 각각의 섬유의 항균작용을 colony counting법을 이용하여 측정하였다. 충분한 성장이 이루어진 S. aureus 균주를 희석액인 phosphate buffer를 이용하여 연속희석법으로 10^4 배로 희석하였다. 희석된 균주 1 ㎖을 phosphate buffer용액 100㎖에 첨가하여 10^6배로 희석하였다. 10^6배로 희석된 용액 100㎖에 각각의 첨가물을 첨가하여 전기방사에 의해 제조된 섬유 0.5g 을 첨가하여 4hr, 8hr, 16hr 간격으로 colony counting을 실시하여 균체 수를 확인하였다.

5) Soluble solid 함량측정

은행잎 추출물 및 프로폴리스의 경우 많은 양의 수분을 함유하고 있다. 이러한 수분을 제거하여 은행잎 추출물 및 프로폴리스의 건조중량을 측정하였다. 은행잎 추출물 및 프로폴리스 10g 을 110℃에서 완전히 건조될 때 까지 건조시킨 후 증발잔사의 무게를 측정하여 고형물 함량(%)을 측정하였다.

Table 4. Yield of dried weight from *Ginkgo biloba* extract and propolis

	Dried weight(g)	Yield(%)
Ginkgo biloba extract	0.5578	5.3783
propolis	0.5776	5.7065

Ⅳ. 결과 및 고찰

1. 전기방사 섬유의 형태

1.1 은행잎 추출물을 첨가한 섬유

충분히 교반이 이루어진 셀룰로오스 아세테이트 용액에 은행잎 추출물 0.1wt ~ 30wt%를 첨가하여 충분한 교반을 실시하였다. 첨가물을 함유한 셀룰로오스 아세테이트 용액은 첨가물의 물성에 의해서 전기전도도, 점도, 표면장력은 변화하게 된다. 이러한 첨가물에 의한 방사용액의 물성 변화는 전기방사 시 매우 중요한 요소로 작용하여 섬유의 형태 및 지름에 영향을 미치게 된다. Table 5. 은 은행잎 추출물의 첨가량에 따른 셀룰로오스 아세테이트 용액의 점도(viscosity, cP), 전기전도도(conductivity, ㎲/㎝), 표면장력(surface tension, mN/m)을 측정한 결과이다. 은행잎 추출물의 첨가량이 증가할수록 용액의 점도는 감소하고, 전기전도도는 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 이와 같이 전기전도도의 증가는 은행잎 추출물 중의 수분의 함량에 의하여 전기전도도가 증가하는 것으로 사료된다.

은행잎 추출물의 첨가한 셀룰로오스 아세테이트 용액을 인가전압 12kV, 방사유량 100㎕/min, TCD 10㎝ 로 하여 전기방사를 실시하였다. Fig. 4. 는 전기방사에 의하여 얻어지는 섬유를 주사전자현미경을 통하여 섬유의 형태를 관찰한 사진이다. Table. 3의 결과에서 은행잎 추출물의 함량이 증가할수록 방사용액의 점도가 감소하는 것 알 수 있었는데, 이러한 점도의 감소로 인하여 은행잎 추출물 섬유의 평균 직경이 셀룰로오스 아세테이트 섬유에 비하여 보다 가늘어 지는 것으로 사료된다. 그러나 은행잎 추출물의 함량을 20wt%, 30wt% 로 첨가하였을 때의 전기방사 섬유에서는 비드(bead)가 발견되었다. 비드가 생성되는 원인으로는 고분자 용액의 방사성이 부족 즉, 방사용액의 점도가 일정 임계점도보다 낮게 되어 고분자의 엉킴이 적고 충분한 표면장력을 갖지 못하게 되어 섬유형성이 안되고 비드 형태로 방출되게 된다.

Table 5. Properties of cellulose acetate in *Ginkgo biloba* leaves contained solution for various concentration.

Solution contents			Solution properties		
cellulose acetate	acetone	*Ginkgo biloba* extract	viscosity (cP)	conductivity (㎲/cm)	surface tension (mN/m)
12.5g	87.5g	0wt %	192	10.07	26.4
		0.1wt% (0.0125g)	199	7.12	26.3
		0.5wt% (0.0625g)	191	7.50	26.9
		1.0wt% (0.1250g)	187	9.15	27.1
		5.0wt% (0.6250g)	171	12.91	27.4
		10wt% (1.2500g)	164	19.48	26.9
		20wt% (2.5000g)	159	24.14	26.4
		30wt% (3.7500g)	154	29.15	26.8

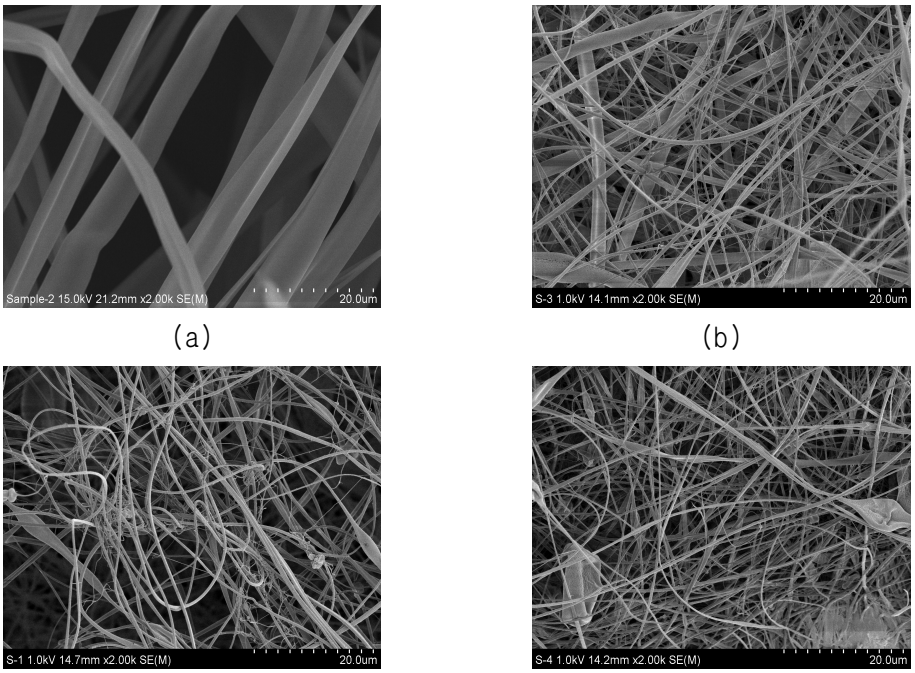


Fig. 4. SEM photographs of ginkgo-cellulose fibers electrospun. (a) cellulose acetate fibers, (b) 1.0wt%, (c) 20wt%, (d) 30wt% ginkgo- cellulose fibers.

1.2 프로폴리스를 첨가한 섬유

충분히 교반이 이루어진 셀룰로오스 아세테이트 용액에 프로폴리스 0.1wt ~ 20wt%를 첨가하여 충분한 교반을 실시하였다. 프로폴리스를 첨가한 셀룰로오스 아세테이트 용액은 프로폴리스의 첨가량에 의해서 전기전도도, 점도, 표면장력은 변화하게 된다. Table 5. 는 프로폴리스의 첨가 농도에 따른 셀룰로오스 아세테이트 용액의 점도 (viscosity, cP), 전기전도도 (conductivity, ㎲/cm), 표면장력 (surface tension, mN/m) 을 측정한 결과이다. 프로폴리스의 첨가량이 증가할 수 록 용액의 점도는 감소하고, 전기전도도는 증가하는 것 을 확인할 수 있었다.

Fig. 5. 는 프로폴리스를 첨가한 셀룰로오스 아세테이트 용액을 전기방사를 실시하여 얻어진 섬유를 주사전자현미경을 통하여 섬유의 형태를 관찰한 사진이다. 프로폴리스의 함량이 증가할 수 록 섬유의 직경은 가늘어 지는 것을 확인 할 수 있었다.

Table 6. Properties of cellulose acetate in propolis contained solution for various concentration.

Solution contents			Solution properties		
cellulose acetate	acetone	propolis	viscosity (cP)	conductivity (㎲/㎝)	surface tension (mN/m)
12.5g	87.5g	0wt %(0g)	192	10.07	26.4
		0.1wt% (0.0125g)	180	9.07	26.3
		0.5wt% (0.0625g)	168	9.15	27.1
		1.0wt% (0.1250g)	168	12.12	26.8
		5.0wt% (0.6250g)	156	17.81	27.2
		10wt% (1.2500g)	132	27.20	26.7
		20wt% (2.5000g)	120	28.30	26.8

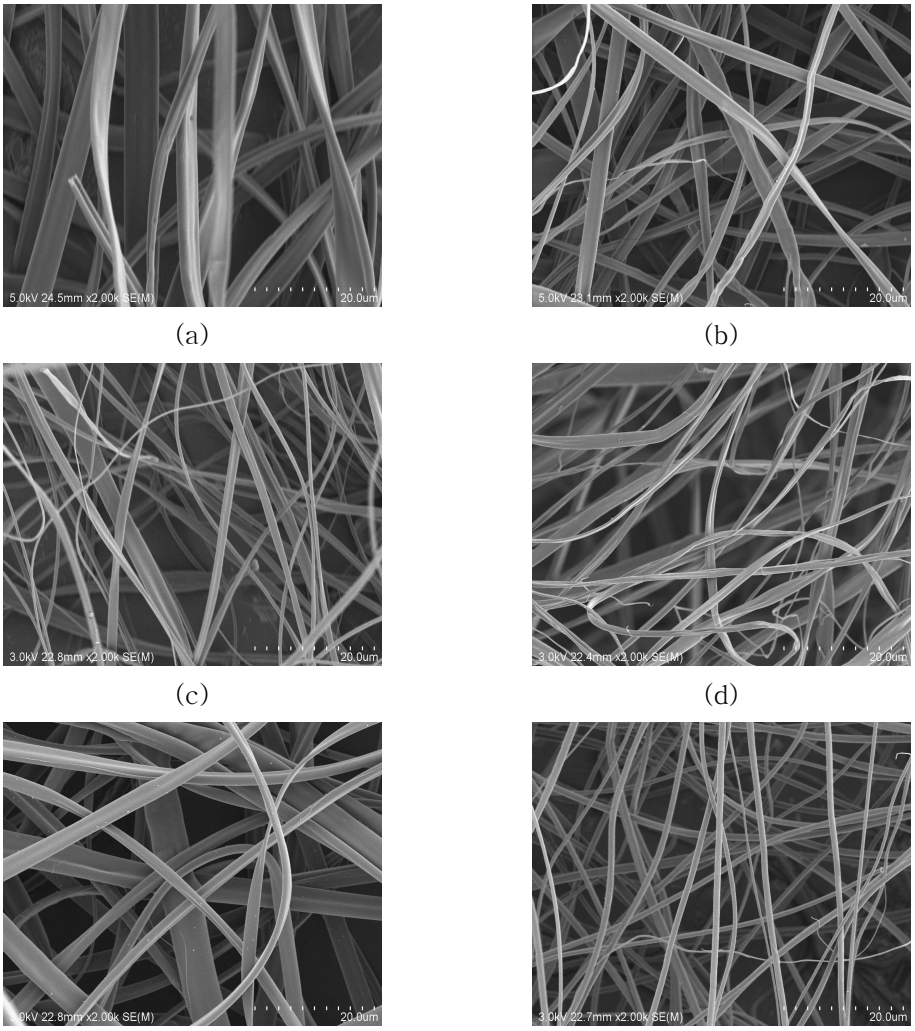


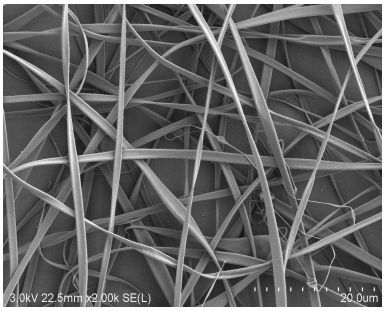
Fig. 5. SEM photographs of propolis-cellulose fibers electrospun. (a) 0.1wt%, (b) 0.5wt%, (c) 1.0wt%, (d) 5.0wt%, (e) 10wt%, (f) 20wt% propolis-cellulose fibers.

1.3 Ag를 첨가한 섬유

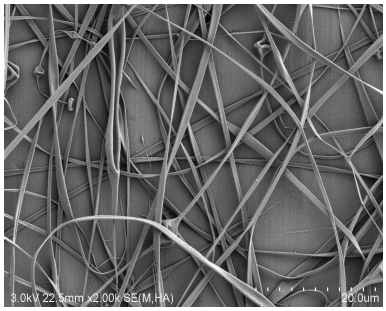
충분히 교반이 이루어진 셀룰로오스 아세테이트 용액에 Ag 0.1wt ~ 0.5wt%를 첨가하여 충분한 교반을 실시하였다. Table. 7 는 Ag를 첨가한 셀룰로오스 아세테이트 용액은 Ag의 첨가량의 변화에 따른 전기전도도, 점도, 표면장력은 변화의 변하를 타나낸 결과이다. 전기전도도가 높은 Ag의 첨가량이 증가할수록 Ag를 첨가한 섬유의 전기전도도도 증가하는 것을 알 수 있었다. Fig. 6. 는 Ag를 첨가한 셀룰로오스 아세테이트 용액을 전기방사하여 제조된 섬유를 주사전자현미경을 통하여 섬유의 형태를 관찰하였다. Ag의 함량이 증가할수록 섬유의 직경이 가늘어 지는 것을 확인 할 수 있었다. 이와 같이 섬유의 직경이 가늘어 지는 것은 Ag의 함량의 증가로 인한 용액의 전기전도도의 증가로 인한 전기방사용액의 전압손실을 최소화하여, 전체 전하밀도를 증가시켜 섬유의 직경이 가늘어 지는 것을 알 수 있었다.

Table 7. Properties of cellulose acetate in silver contained solution for various concentration.

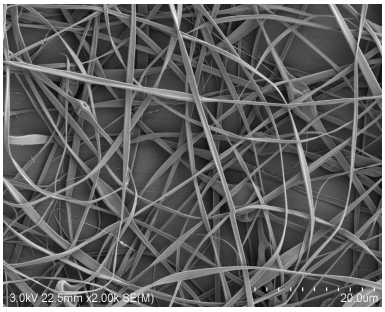
Solution contents			Solution properties		
cellulose acetate	acetone	silver ($AgNO_3$)	viscosity (cP)	conductivity (μs/㎝)	surface tension (mN/m)
12.5g	87.5g	0.1wt%(0.118㎖)	168	40.6	27.2
		0.2wt%(0.235㎖)	144	57.2	27.8
		0.3wt%(0.354㎖)	144	75.6	26.9
		0.4wt%(0.472㎖)	144	95.2	27.3
		0.5wt%(0.590㎖)	144	135.7	27.4



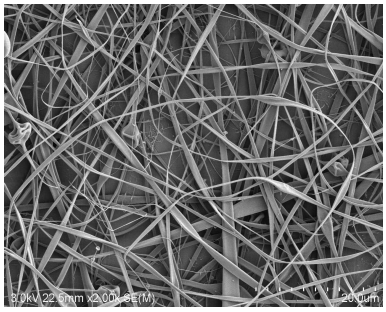
(a)



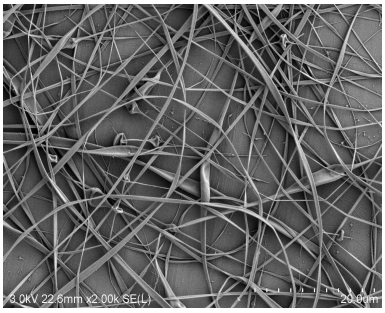
(b)



(c)



(d)



(e)

Fig. 6. SEM photographs of silver-cellulose fibers electrospun. (a) 0.1wt%, (b) 0.2wt%, (c) 0.3wt%, (d) 0.4wt%, (e) 0.5wt% silver-cellulose fibers.

1.4 Streptomycin을 첨가한 섬유

충분히 교반이 이루어진 셀룰로오스 아세테이트 용액에 streptomycin 0.1wt ~ 0.5wt%를 첨가하여 충분한 교반을 실시하였다. 셀룰로오스 아세테이트 용액에 streptomycin을 첨가하였을 경우 용액의 색이 무색에서 불투명한 색으로 변화하는 것을 알 수 있었다. Table. 8 은 streptomycin을 첨가한 셀룰로오스 아세테이트 용액의 strpetomycin의 첨가량의 변화에 따른 전기전도도, 점도, 표면장력은 변화의 변하를 타나낸 결과이다. Fig. 7은 streptomycin을 첨가한 셀룰로오스 아세테이트 용액을 전기방하사여 제조된 섬유를 주사전자현미경을 통하여 섬유의 형태를 관찰하였다. streptomycin의 함량이 증가할 수 록 섬유상에 비드가 증가하는 것을 알 수 있었다.

Table 8. Properties of cellulose acetate in streptomycin contained solution for various concentration.

Solution contents			Solution properties		
cellulose acetate	acetone	streptomycin	viscosity (cP)	conductivity (㎲/㎝)	surface tension (mN/m)
12.5g	87.5g	0.1wt%(0.0125g)	144	10.25	26.3
		0.2wt%(0.0250g)	132	12.22	27.2
		0.3wt%(0.0375g)	132	12.52	26.8
		0.4wt%(0.0500g)	120	11.63	26.2
		0.5wt%(0.0625g)	120	12.78	27.3

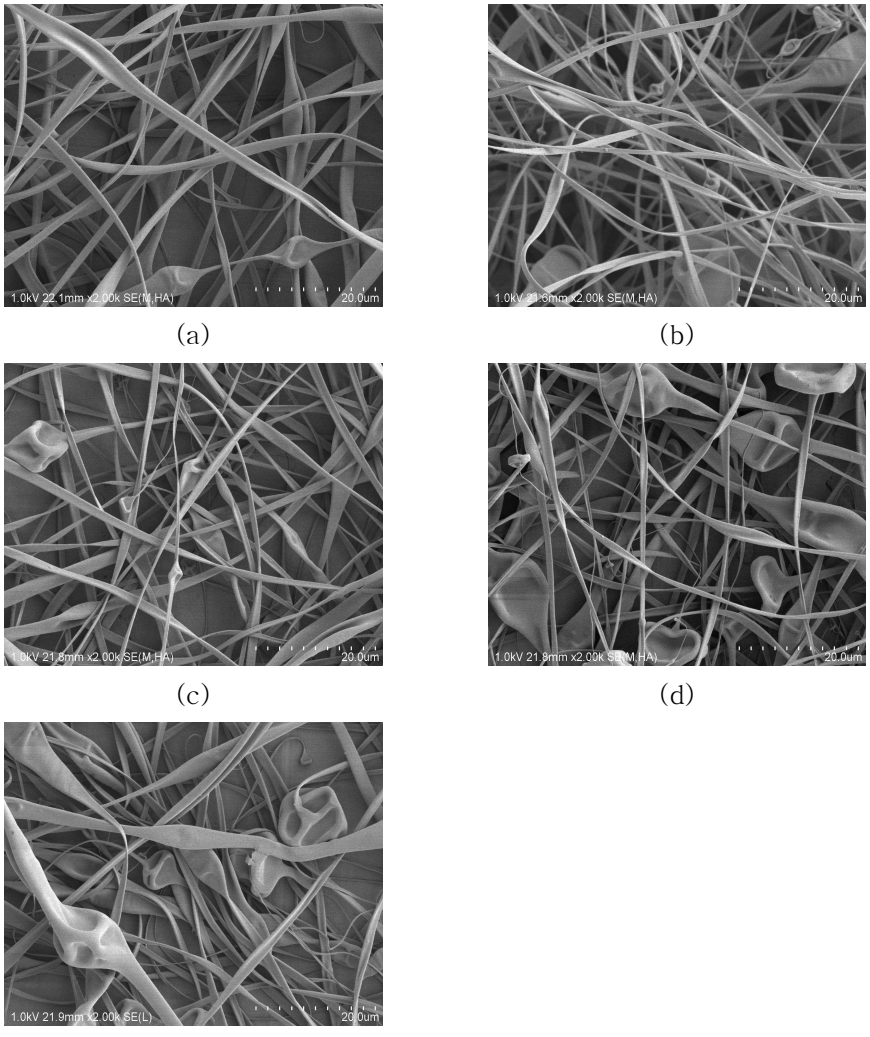


Fig. 6. SEM photographs of streptomycin-cellulose fibers electrospun. (a) 0.1wt% (b) 0.2wt%, (c) 0.3wt% , (d) 0.4wt%, (e) 0.5wt% streptomycin-cellulose fiber (×2,000).

2. 항균활성 측정

2.1 은행잎 추출물을 첨가한 섬유

1) 디스크확산법 (Disc diffusion test)

수십 종의 물질이 은행잎 추출물에 함유되어 잇는데 이 중 대표적인 항균 물질로 알려진 bilobalide, ginkgolides A, ginkgolides B 등이 있다. 이러한 항균활성 물질의 항균활성을 측정하기 위하여 bilobalide, ginkgolide A, B 10㎎에 ethanol 50㎖을 첨가하여 녹인 후 이 용액의 100㎕을 취하여 disc diffusion test 실시하였다. Fig. 8. 는 bilobalide, ginkgolide A, B에 대한 disc diffusion test 결과로, 증식저지환의 크기가 각각 bilobalide는 11.4㎜, ginkgolide A는 9.5㎜, ginkgolide B는 에 10.8㎜으로 bilobalide의 항균활성이 가장 좋은 결과를 보였다. Bilobalide, ginkgolide A, B을 함유하고 있는 은행잎 추출물을 disc diffusion test 이용하여 항균 작용을 확인하였다. Fig. 9.는 은행잎 추출물을 이용한 *S. aureus* 의 disc diffusion test 결과이며 0.1, 0.5wt% 은행잎 농축액에서는 증식저지환 발생하지 않았으며 1.0wt% 은행잎 농축액은 8.7㎜, 10wt% 은행잎 농축액은 9.8㎜, 30wt% 은행잎 농축액은 12.6㎜의 증식저지환이 형성하는 것을 보아 은행잎 추출물에는 항균물질이 있는 것을 확인할 수 있었다.

Fig. 10.는 셀룰로오스 아세테이트를 전기방사하여 얻어진 섬유에 대한 *S. aureus* 와 *E. coli*의 균주에 대한 공실험(blank test)를 실시한 결과이다. 공실험을 실시한 결과 셀룰로오스 아세테이트 섬유 주변에 증식저지환이 형성되지 않는 것을 보아 cellulose acetate 섬유는 균의 성장에 영향을 주지 않는 것을 알 수 있었다.

0.1, 0.5, 1.0, 5.0, 10, 20, 30wt%의 은행잎 추출물을 함유한 cellulose acetate 용액을 전기방사를 실시하였다. 방사된 섬유를 수집기 판에서 섬유를 수집하여 펀칭을 이용하여 은행잎 추출물을 함유한 섬유를 지름을 6 ㎜ 로 일정한 크기와 50㎎ 로 자른 후 100 ㎕ 의 *S. aureus* 가 도말된 배지 위에 안착시켜 디스크확산법을 실시하였다. Fig. 11. 는 *S. aureus*에 대한 다양한 함량별 은행잎 추출물 함유한 셀룰로오스 아세테이트 섬유에 대한 디스크확산법 결과로, 은행잎 추출물의 함량이 증가할수록 증식저지환의 크기가 증가하는 것을 알 수 있었다.

1.0wt% 이하의 은행잎추출물 함유 셀룰로오스 섬유에서는 증식저지환이 생성되지 않았으며, 10wt% 은행잎추출물 함유 셀룰로오스 섬유는 7.6㎜, 20wt% 은행잎추출물 함유 셀룰로오스 섬유는 8.1㎜, 30wt% 은행잎추출물 함유 셀룰로오스 섬유는 8.6㎜의 지름의 증식저지환을 형성하였다.

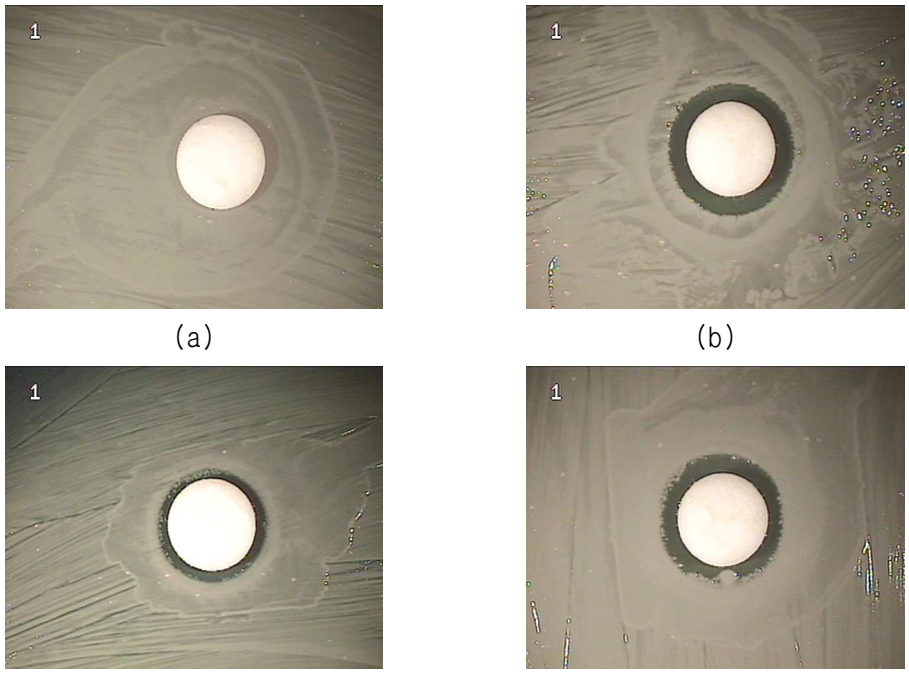
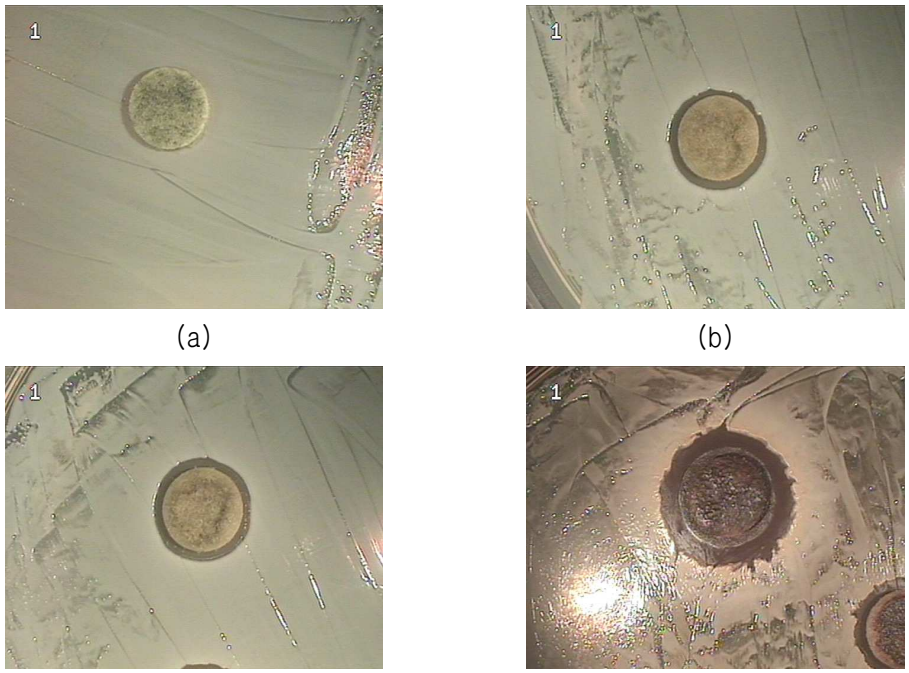


Fig. 8. Antimicrobial effect of bilobalide and ginkgolide A, B from *Ginkgo biloba* leaves extract on *S. aureus* by disc diffusion test. (a) control(ethanol), (b) bilobalide 11.4mm, (c) ginkgolide A 9.5mm, (d) ginkgolide B 10.8mm.



(a) (b)

(c) (d)

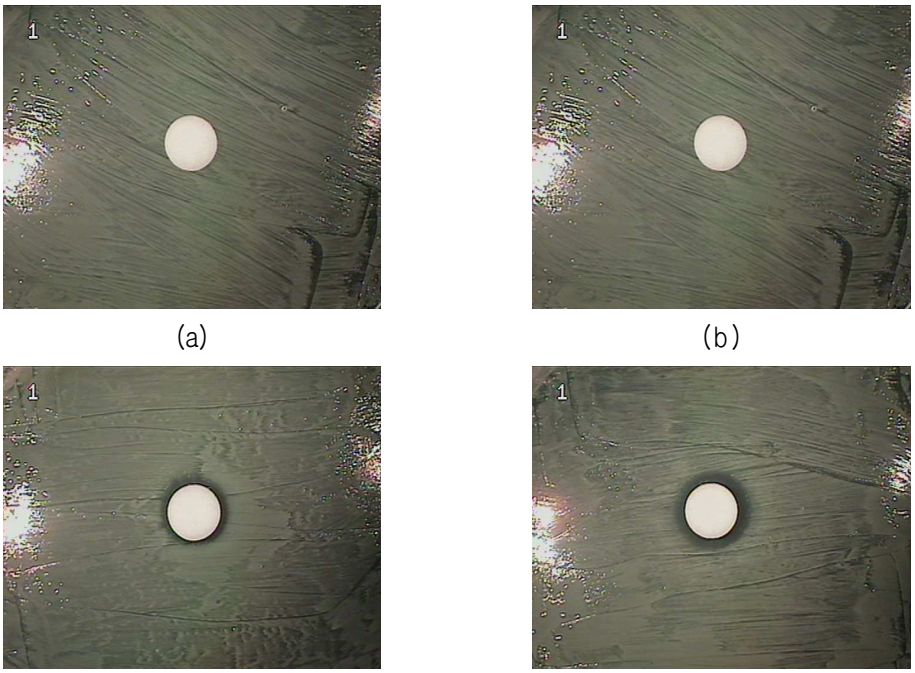
Ginkgo biloba leaves contented (dried weight, mg)	Control (0wt%)	0.1wt% (0.00265)	0.5wt% (0.01325)	1.0wt% (0.0265)	5.0wt% (0.1325)	10wt% (0.2650)	20wt% (0.5300)	30wt% (0.73500)
Diameter(mm)	8	8	8	8.7	9.2	9.8	10.1	12.6

Fig. 9. Antimicrobial effect of *Gingko biloba* leaves contained solution for various concentration on *S. aureus* by disc diffusion test. (a) 0.1wt%, (b) 1.0wt%, (c) 10wt%, (d) 30wt% *Gingko biloba* leaves.

(a)

(b)

Fig. 10. Blank test with cellulose acetate fiber, for *E. coli* and *S. aureus*. (a) Blank test *E. coli*, (b) Blank test *S. aureus*.



Ginkgo biloba leaves in Ginkgo-cellulose fiber (dried weight, mg)	Control (0wt%)	0.1wt% (0.00265)	0.5wt% (0.01325)	1.0wt% (0.0265)	5.0wt% (0.1325)	10wt% (0.2650)	20wt% (0.5300)	30wt% (0.7500)
Diameter(mm)	6	6	6	6	6.7	7.4	8.1	8.6

Fig. 11. Antimicrobial effect of electrospun ginkgo-cellulose fibers in *Ginkgo biloba* leaves contained solution for various concentration on *S. aureus* by disc diffusion test. (a) 0.1wt%, (b) 1.0wt%, (c) 10wt%, (d) 30wt% ginkgo-cellulose fibers.

2) 광화학탁도측정법 (Optical density test)

디스크확산법의 결과를 통하여 은행잎 추출물 및 은행잎 추출물을 함유한 셀룰로오스 섬유의 항균 능력을 확인 할 수 있었다. Fig. 12. 와 Fig 13은 디스크확산법 결과에서 확인한 항균능력을 구체적인 항균능력과 지속 시간을 확인하기 위하여 은행잎 추출물 및 은행잎 추출물을 첨가한 전기방사 섬유에 대한 광화학탁도측정법을 실시한 결과이다. Fig. 14.와 Fig. 15. 는 광화학탁도측정법의 결과를 이용하여 균 성장억제율(bacteria reduction)을 나타낸 값이다. Fig.15의 결과에서 균 접종 후 4시간에서 8시간 사이에 전반적으로 균의 증식억제율이 증가하게 됩니다. 이와 같은 이유는 섬유 내에 존재하고 있는 은행잎 추출물이 액체배지로 방출되면서 균의 증식억제율이 증가하게 됩니다. 8시간이 경과한 후에는 은행잎 추출물의 균의 증식억제율보다 균의 성장률이 더 크게되어 균의 증식억제율이 감소하게 된다. 30wt% 은행잎추출물 함유 셀룰로오스 아세테이트 섬유에서 보면 균 접종 후, 12시간동안에는 90%의 성장억제율을 보이다. 균 접종 후 12시간이 경과한 후에는 지속적으로 균의 증식억제율은 감소다 36시간 이후에는 57%의 일정한 균 증식억제율을 보이고 있다. 또한 30wt%의 은행잎 추출물과 은행잎 추출물을 함유한 섬유의 균 성장억제율을 비교해 보면, 40시간이 경과한 후 용액상태의 은행잎 추출물이 섬유상태의 은행잎 추출물에 비하여 약 21% 정도의 균 증식억제율이 더 높은 것으로 보아 용액 상태의 은행잎 추출물이 섬유상태 보다 항균활성이 비교적 더 높은 것을 알 수 있다. Fig. 16.은행잎 추출물을 함유한 셀룰로오스 아세테이트 섬유를 그람 양성균인 *S. aureus* 와 그람 음성균인 *E. coli*에 대한 항균활성을 비교하였다. Fig. 17.는 *S. aureus* 와 *E. coli*에 대한 광화학탁도측정법의 결과를 이용하여 균증식억제율 (bacteria reduction) 을 통하여 비교하였다. 30wt% 은행잎추출물 함유 셀룰로오스 아세테이트 섬유에서는 대하여 12시간이 경과 후 그람 음성균인 *E. coli*은 75.4%, 그람 양성균인 *S. aureus*는 92.0%, 24시간이 경과 후에는 각각 63.4%와 74.4%로 은행잎 추출물을 함유한 셀룰로오스 아세테이트 섬유는 그람 음성균인 *E. coli*보다 그람 양성균인 *S. aureus* 에 대한 항균작용이 우수하였다. 그러나 36시간이 경과한 후에는 *E. coli* 와 *S. aureus* 에 대한 균 성장억제율은 비슷한 결과를 얻을 수 있었다.

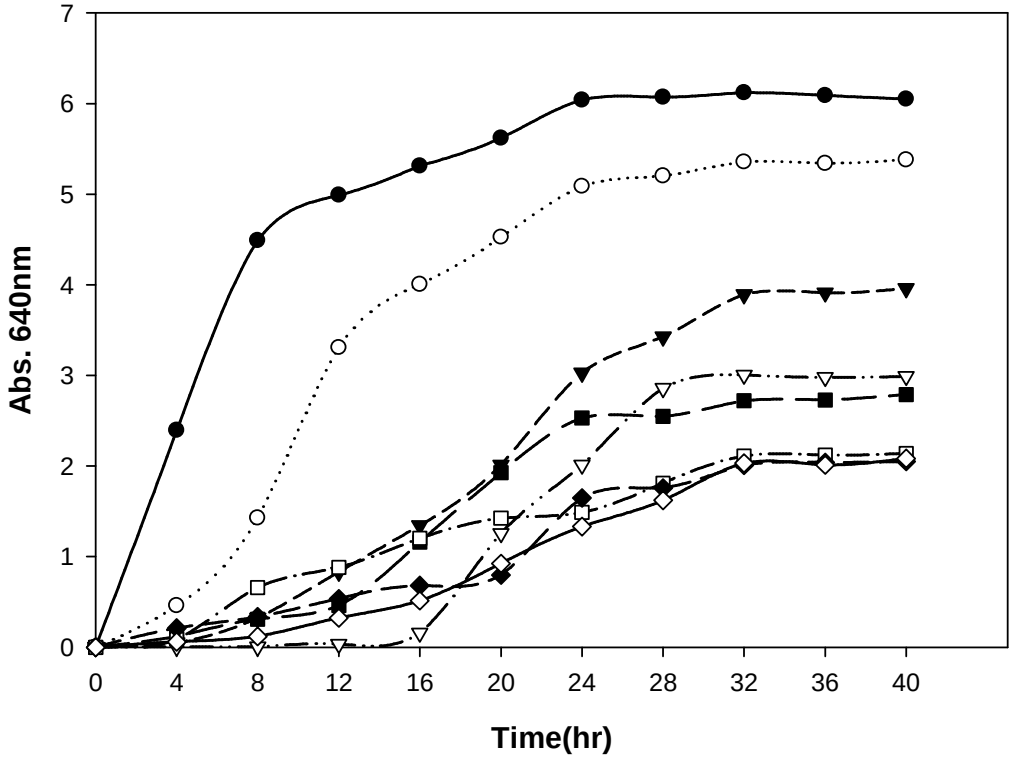


Fig. 12. Antimicrobial effect of *Ginkgo biloba* leaves contained solution for various concentration on *S. aureus* by optical density test as a function of culture time.(broth 100㎖, bacteria 1㎖)

(●) growth curve of S. aureus (○) 0.1wt%(0.0265㎎/100㎖)

(▼) 0.5wt%(0.1325㎎/100㎖) (▽) 1.0wt%(0.2650㎎/100㎖) (■) 5.0wt%(1.3250㎎/100㎖)

(□) 10wt% (2.6500㎎/100㎖) (◆) 20wt% (5.3000㎎/100㎖) (◇) 30wt% (7.9500㎎/100㎖)

∴ wt% (Dried weight/broth)

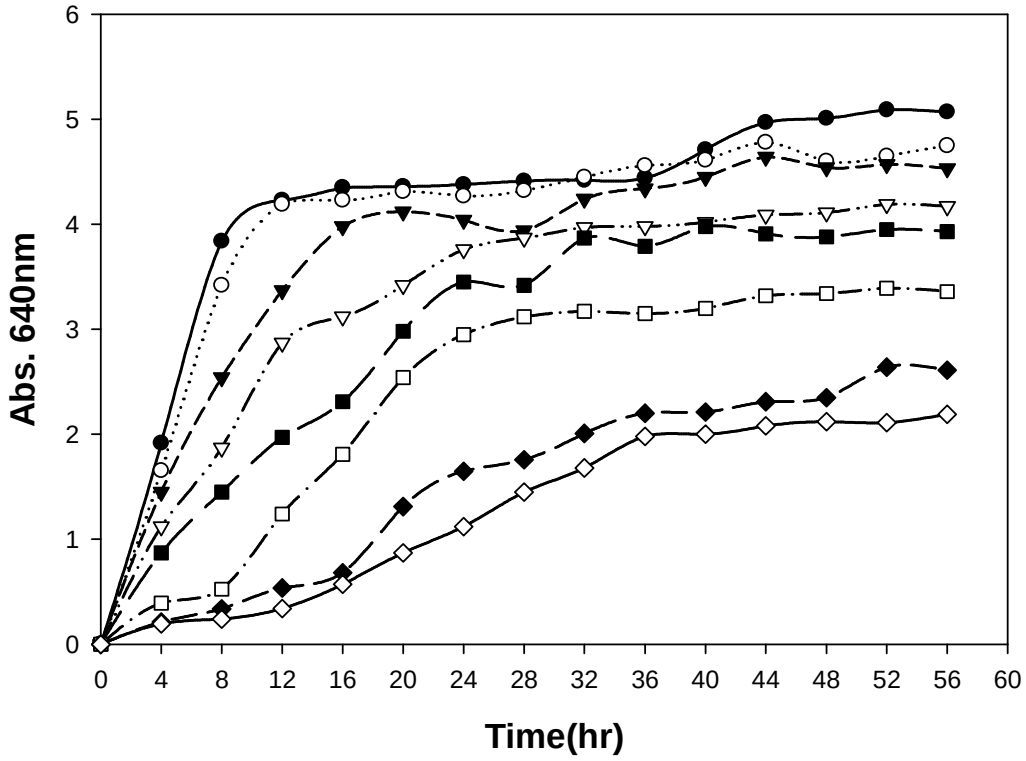


Fig. 13. Antimicrobial effect of electrospun ginkgo-cellulose fiber in *Ginkgo biloba* extract contained solution for various concentration on *S. aureus* by optical density test as a function of culture time. (broth 100㎖, bacteria 1㎖, fiber 0.5g)

(●) growth curve of S. aureus (○) 0.1wt%(0.0265㎎/100㎖)
(▼) 0.5wt%(0.1325㎎/100㎖) (▽) 1.0wt%(0.2650㎎/100㎖) (■) 5.0wt%(1.3250㎎/100㎖)
(□) 10wt% (2.6500㎎/100㎖) (◆) 20wt% (5.3000㎎/100㎖) (◇) 30wt% (7.9500㎎/100㎖)

∴ wt% (Dried weight/broth)

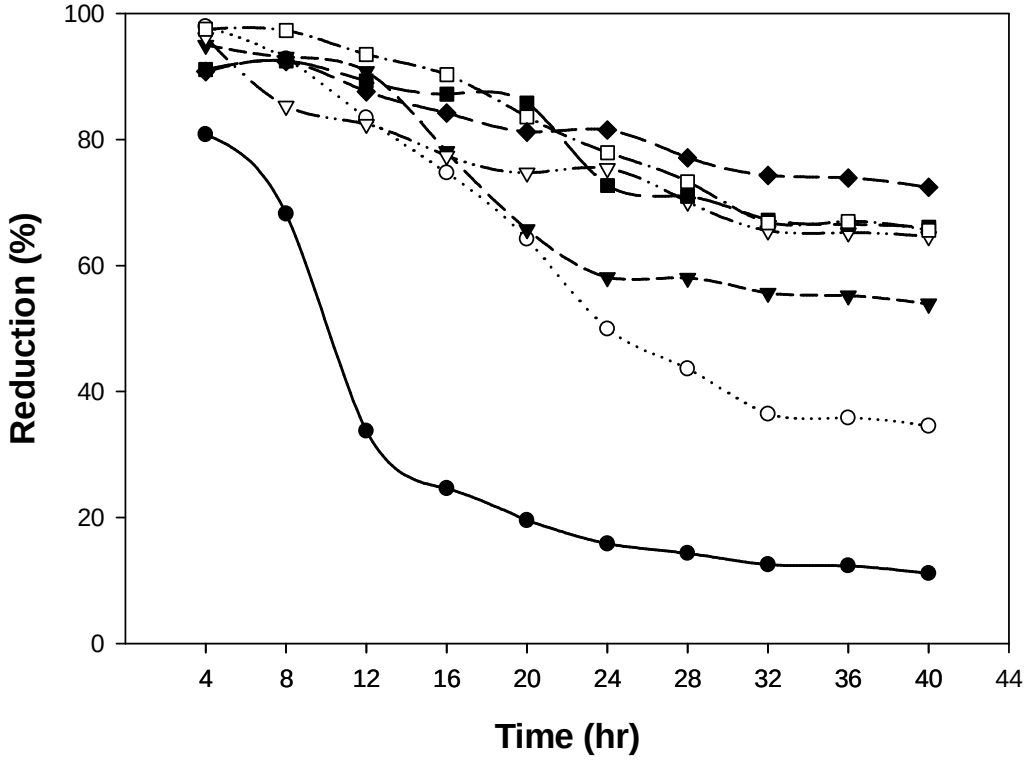


Fig. 14. Bacteria reduction of bulk in *Ginkgo biloba* leaves contained solution for various concentration on *S. aureus* by optical density test as a function of culture time. (broth 100㎖, bacteria 1㎖)

(●) 0.1wt%(0.0265㎎/100㎖) (○) 0.5wt%(0.1325㎎/100㎖) (▼) 1.0wt%(0.2650㎎/100㎖)

(▽) 5.0wt%(1.3250㎎/100㎖) (■) 10wt% (2.6500㎎/100㎖) (□) 20wt% (5.3000㎎/100㎖)

(◆) 30wt% (7.9500㎎/100㎖)

∴ wt% (Dried weight/broth)

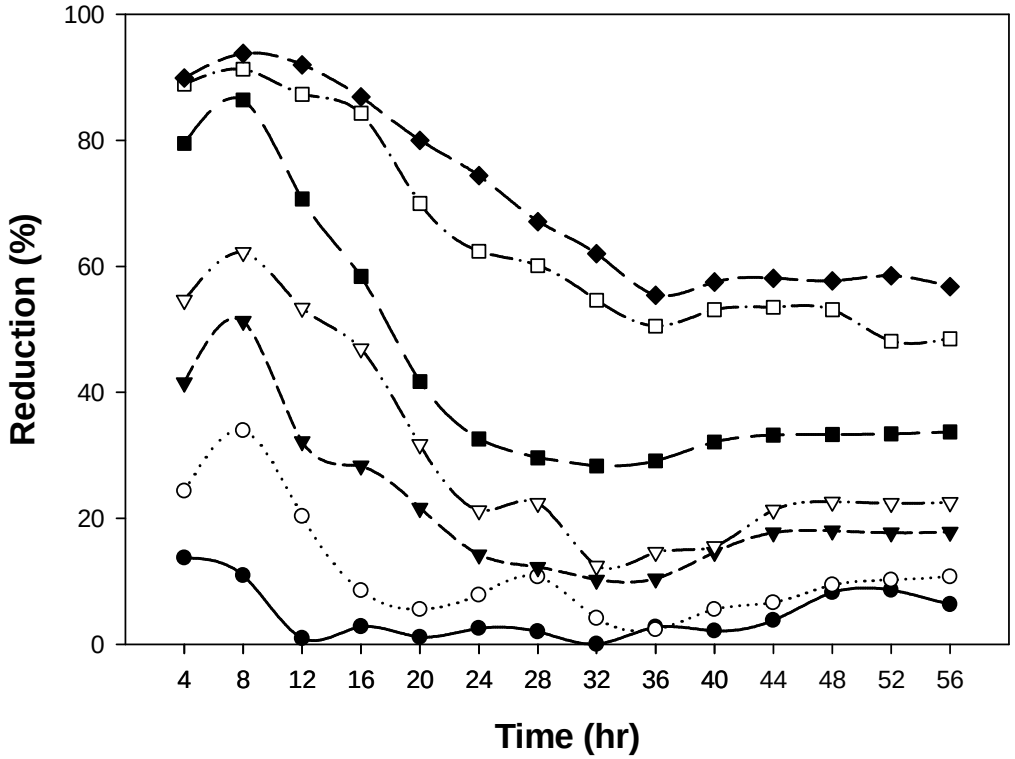


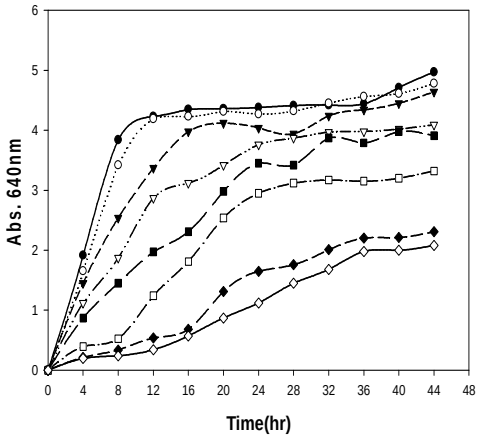
Fig. 15. Bacteria reduction of electrospun ginkgo-cellulose fiber in *Ginkgo biloba* extract contained solution for various concentration on *S. aureus* by optical density test as a function of culture time. (broth 100㎖, bacteria 1 ㎖, fiber 0.5g)

(●) 0.1wt%(0.0265mg/100㎖) (○) 0.5wt%(0.1325mg/100㎖) (▼) 1.0wt%(0.2650mg/100㎖)

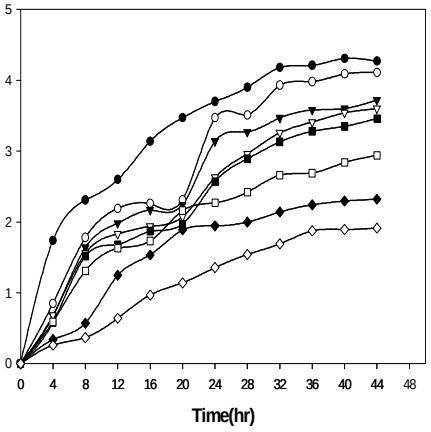
(▽) 5.0wt%(1.3250mg/100㎖) (■) 10wt% (2.6500mg/100㎖) (□) 20wt% (5.3000mg/100㎖)

(◆) 30wt% (7.9500mg/100㎖)

∴ wt% (Dried weight/broth)



(a)ginkgo-cellulose fiber of 0.D test by *S. aureus*

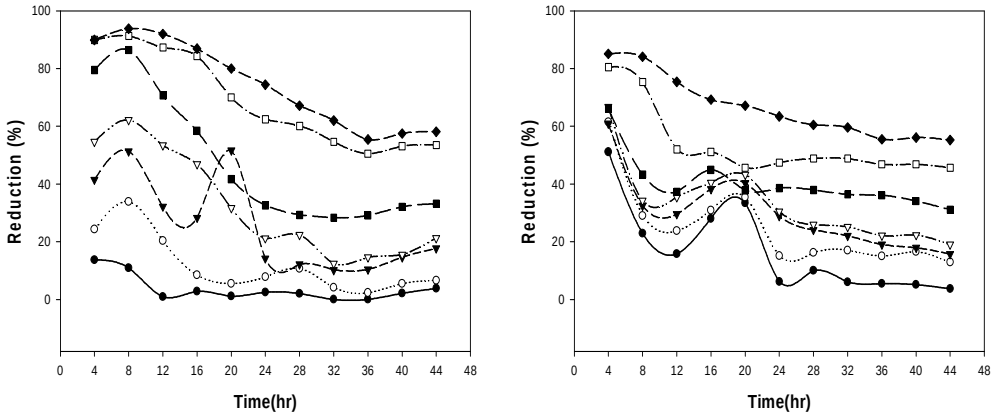


(b)ginkgo-cellulose fiber of 0.D test by *E. coli*

Fig. 16. Antimicrobial effect of electrospun ginkgo-cellulose fiber in *Ginkgo biloba* extract contained solution for various concentration on *S. aureus* and *E. coli* by optical density test as a function of culture time. (broth 100㎖, bacteria 1㎖, fiber 0.5g)

(●) growth curve of S. aureus (○) 0.1wt%(0.0265㎎/100㎖)
(▼) 0.5wt%(0.1325㎎/100㎖) (▽) 1.0wt%(0.2650㎎/100㎖) (■) 5.0wt%(1.3250㎎/100㎖)
(□) 10wt% (2.6500㎎/100㎖) (◆) 20wt% (5.3000㎎/100㎖) (◇) 30wt% (7.9500㎎/100㎖)

∴ wt% (Dried weight/broth)



(a) ginkgo-cellulose fiber bacteria reduction by *S. aureus*

(b) ginkgo-cellulose fiber bacteria reduction by *E. coli*

Fig. 17. Bacteria reduction of electrospun ginkgo-cellulose fiber in *Ginkgo biloba* extract contained solution for various concentration on *S. aureus* and *E. coli* by optical density test as a function of culture time. (broth 100㎖, bacteria 1㎖, fiber 0.5g)

(●) 0.1wt%(0.0265mg/100㎖) (○) 0.5wt%(0.1325mg/100㎖) (▼) 1.0wt%(0.2650mg/100㎖)

(▽) 5.0wt%(1.3250mg/100㎖) (■) 10wt% (2.6500mg/100㎖) (□) 20wt% (5.3000mg/100㎖)

(◆) 30wt% (7.9500mg/100㎖)

∴ wt% (Dried weight/broth)

2.2 프로폴리스를 첨가한 섬유

1) 광화학탁도측정법 (Optical density test)

충분히 교반이 이루어진 셀룰로오스 아세테이트 용액(12.5wt%)에 프로폴리스 0.1, 0.5, 1.0, 5.0, 10, 20wt% 농도로 첨가하여 충분한 교반을 한 후, 전기방사를 실시하여 프로폴리스 함유 셀룰로오스 아세테이트 섬유를 제조하였다. 프로폴리스 함유 셀룰로오스 섬유 0.5g를 정확히 달아 첨가하여 진탕배양기에서 최적 생육조건으로 배양시킴과 동시에 접종 시간부터 4시간 간격으로 spectrophotometer로 640nm에서 측정하였다. 제조된 섬유 0.5g 에 해당하는 프로폴리스 원액의 함량을 bulk 상태로 첨가하여 광화학탁도측정법 (optical density test)을 측정한 결과가 Fig. 18.이다. Fig. 19.는 프로폴리스 함유 셀룰로오스 아세테이트 섬유의 광화학탁도측정 결과이다. 프로폴리스는 bulk 상태가 섬유 상태에 비하여 *S. aureus* 에 대하여 비교적 높은 항균작용을 보이고 있다. Fig 20 .와 Fig. 21 는 프로폴리스의 bulk 상태와 섬유상태에서의 균 증식억제율을 확인 할 수 있었다 . 천연 추출물인 프로폴리스 20wt% 을 함유한 전기방사 섬유는 초기 32시간 동안에 90% 이상의 높은 균 증식억제율을 보유하고 있으며, 32시간이 경과한 이후에는 꾸준히 감소하여 44시간이후에는 72%의 일정한 균의 증식억제율을 보이고 있다.

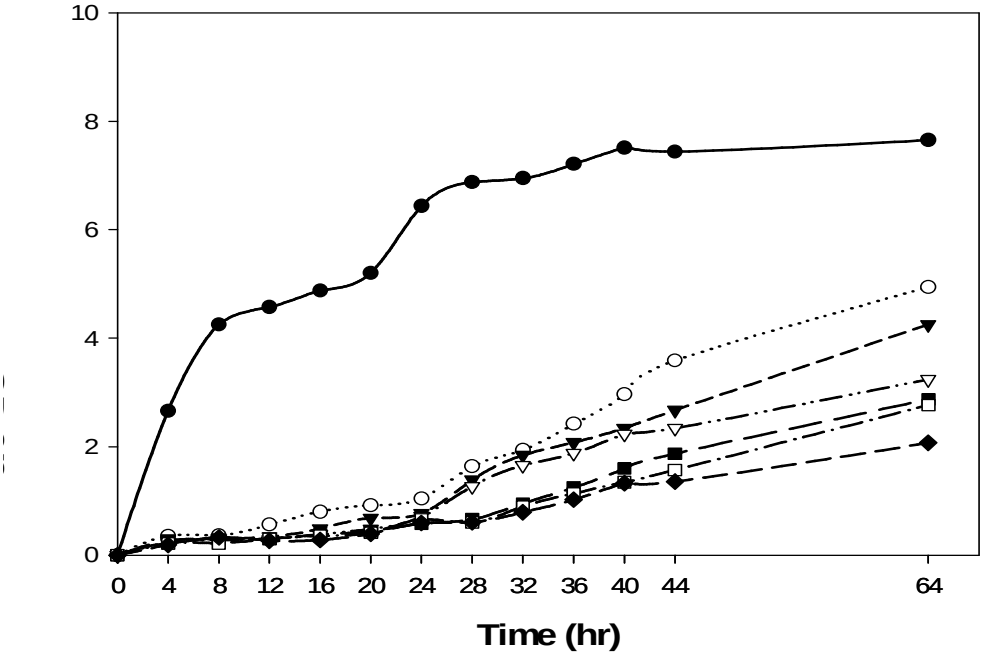


Fig. 18. Antimicrobial effect of propolis contained solution for various concentration on *S. aureus* by optical density test as a function of culture time. (broth 100㎖, bacteria 1㎖)

(●) growth curve of *S. aureus* (○) 0.1wt%(0.0265㎎/100㎖)

(▼) 0.5wt%(0.1325㎎/100㎖) (▽) 1.0wt%(0.2650㎎/100㎖) (■) 5.0wt%(1.3250㎎/100㎖)

(□) 10wt% (2.6500㎎/100㎖) (◆) 20wt% (5.3000㎎/100㎖)

∴ wt% (Dried weight/broth)

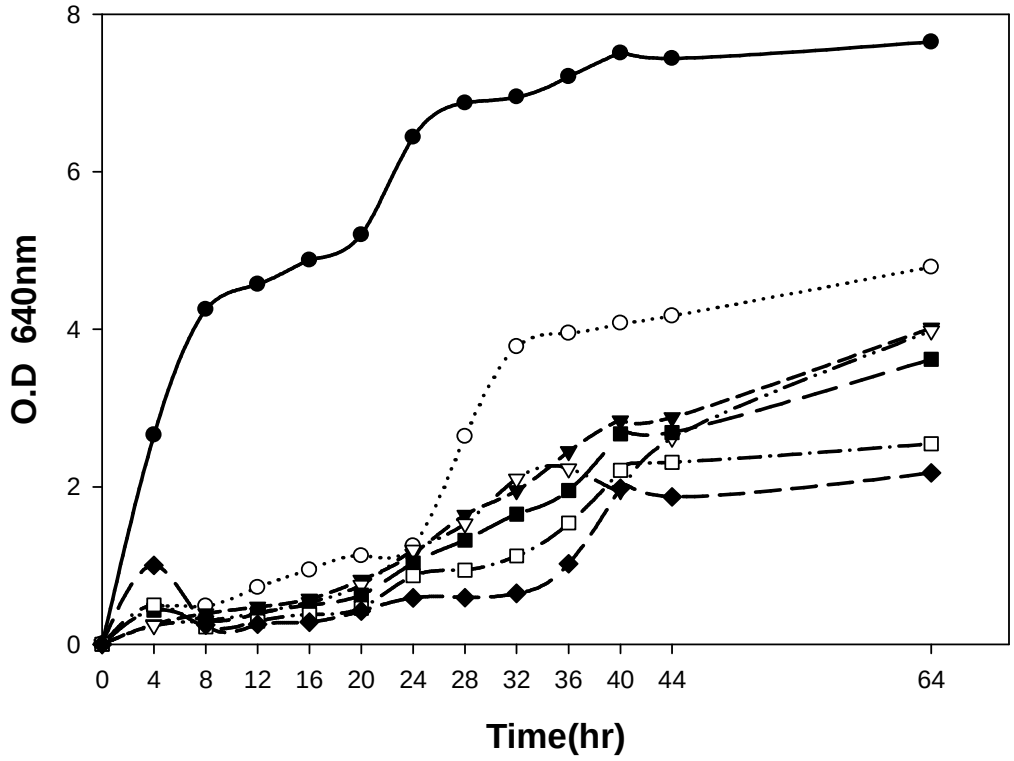
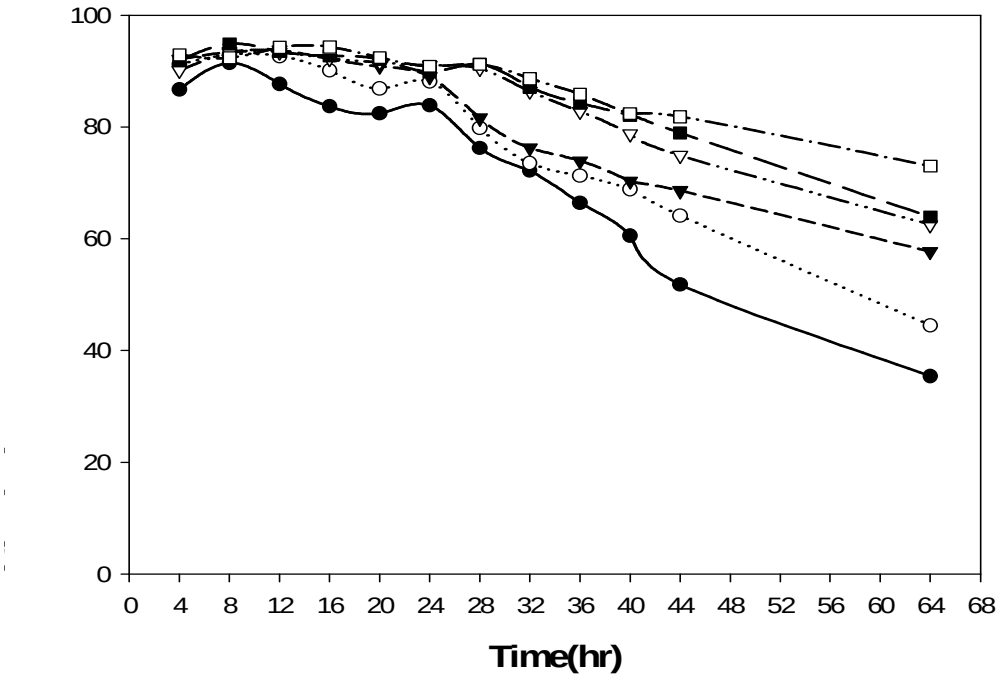


Fig. 19. Antimicrobial effect of electrospun propolis-cellulose fiber in propolis contained solution for various concentration on *S. aureus* by optical density test as a function of culture time. (broth 100㎖, bacteria 1 ㎖, fiber 0.5g)

(●) growth curve of *S. aureus* (○) 0.1wt%(0.0265㎎/100㎖)
(▼) 0.5wt%(0.1325㎎/100㎖) (▽) 1.0wt%(0.2650㎎/100㎖) (■) 5.0wt%(1.3250㎎/100㎖)
(□) 10wt% (2.6500㎎/100㎖) (◆) 20wt% (5.3000㎎/100㎖)

∴ wt% (Dried weight/broth)

Fig. 20.Bacteria reduction of bulk in propolis contained solution for



various concentration on *S. aureus* by optical density test as a function of culture time. (broth 100㎖, bacteria 1㎖)

(●) 0.1wt%(0.0265㎎/100㎖) (○) 0.5wt%(0.1325㎎/100㎖) (▼) 1.0wt%(0.2650㎎/100㎖)

(▽) 5.0wt%(1.3250㎎/100㎖) (■) 10wt% (2.6500㎎/100㎖) (□) 20wt% (5.3000㎎/100㎖)

∴ wt% (Dried weight/broth)

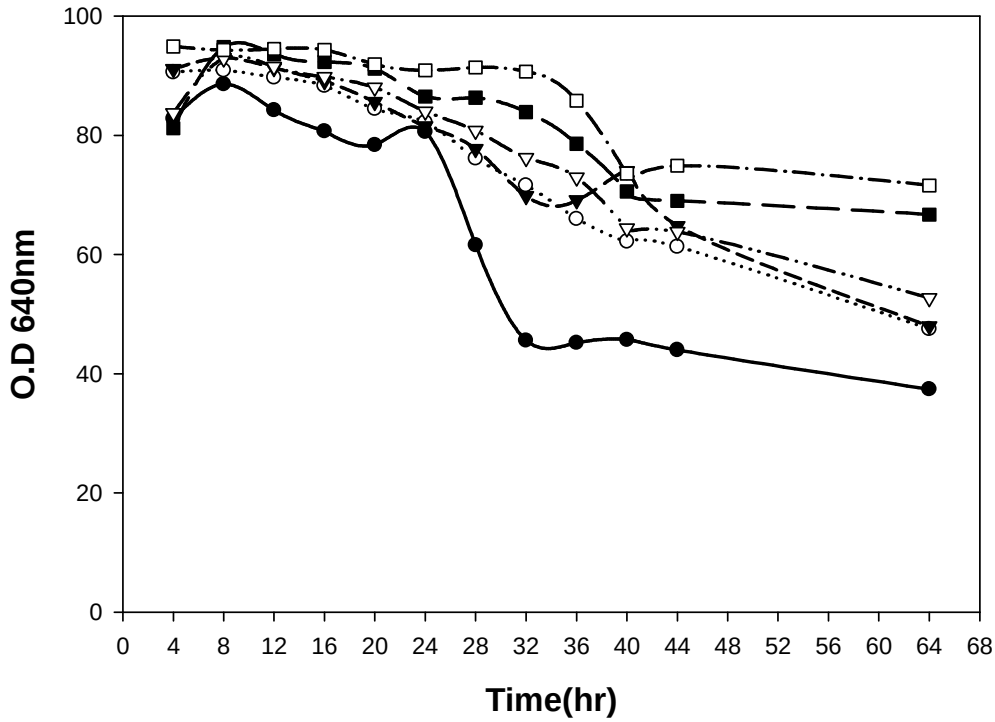


Fig. 21. Bacteria reduction of electrospun propolis-cellulose fiber in propolis contained solution for various concentration on *S. aureus* by optical density test as a function of culture time. (broth 100㎖, bacteria 1 ㎖, fiber 0.5g)

(●) 0.1wt%(0.0265㎎/100㎖) (○) 0.5wt%(0.1325㎎/100㎖) (▼) 1.0wt%(0.2650㎎/100㎖)

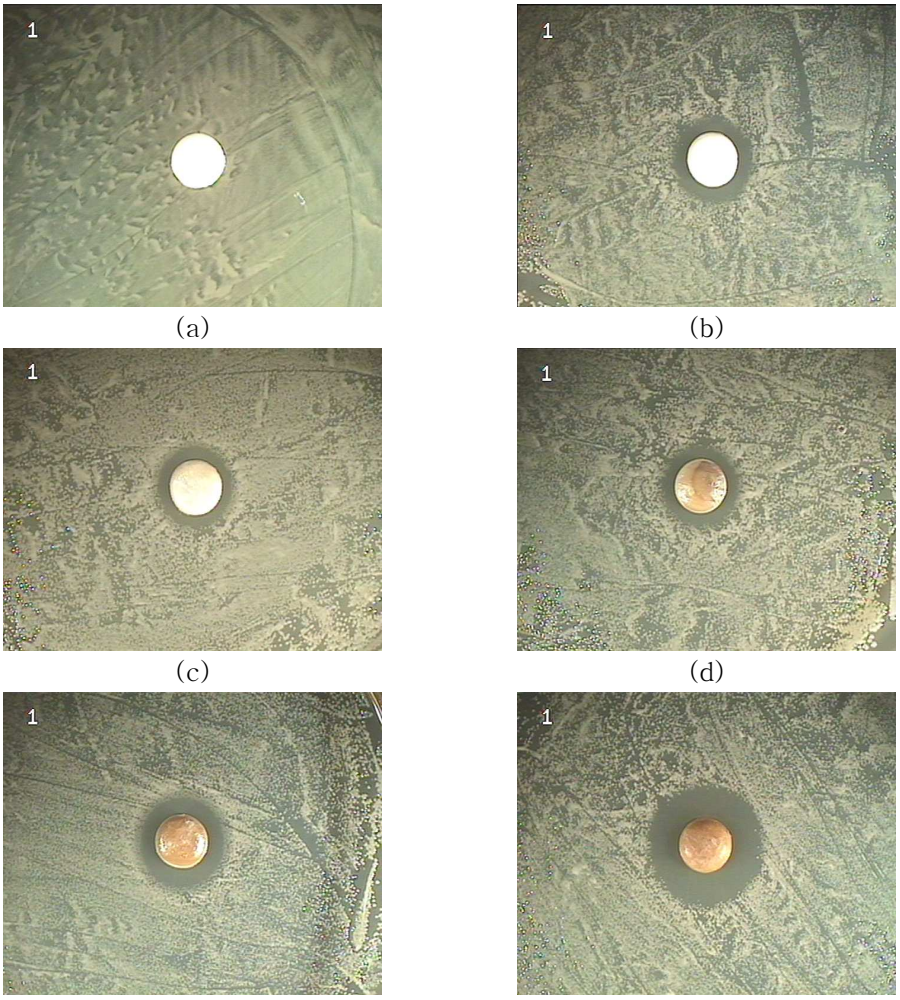
(▽) 5.0wt%(1.3250㎎/100㎖) (■) 10wt% (2.6500㎎/100㎖) (□) 20wt% (5.3000㎎/100㎖)

∴ wt% (Dried weight/broth)

2.3 Ag을 첨가한 섬유

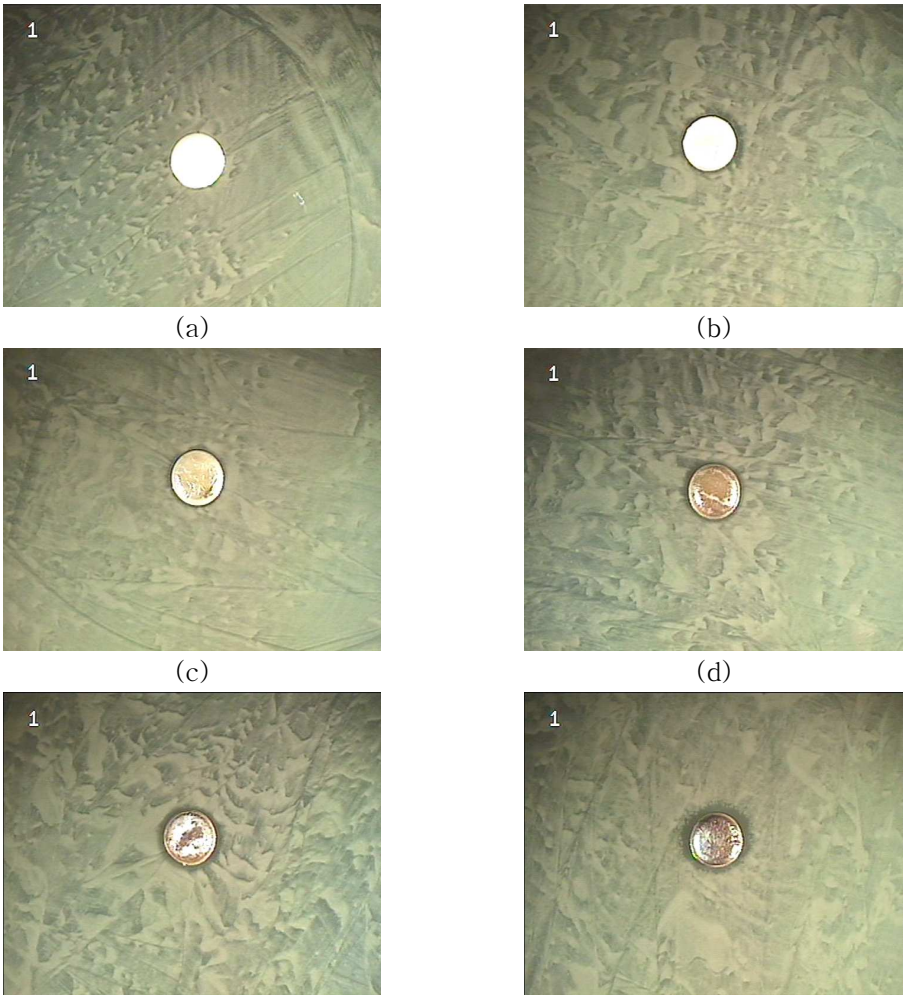
1) 디스크확산법 (disc diffusion test.)

충분한 교반이 이루어진 셀룰로오스 아세테이트용액에 Ag을 셀룰로오스 아세테이트의 중량의 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5wt%로 조절하여 첨가 후 충분한 교반을 실시하여 방사용액을 제조하여 전기방사를 실시하여 Ag 함유 셀룰로오스 섬유를 제조하였다. 전기방사에 의해 제조된 Ag 함유 셀룰로오스 아세테이트 섬유를 6mm 의 일정한 크기(5㎎)로 자른 후 *S. aurues* 가 도말된 배지에 안착시켜 배양기에서 36℃에서 24시간동안 배양 후 비디오 현미경을 통하여 증식저지환의 유무를 확인하였다. Fig. 22 는 Ag을 첨가한 셀룰로오스 아세테이트 섬유의 *S. aureus*에 대한 디스크확산법의 결과이다. 0.1wt% Ag 함유 셀룰로오스 아세테이트 섬유는 8.293mm, 0.3wt% Ag 함유 셀룰로오스 섬유는 9.171mm, 0.5wt% Ag 함유 셀룰로오스 아세테이트 섬유는 12.0mm 로 Ag의 함량이 증가할수록 증식저지환의 크기도 증가하는 것을 알 수 있었다. Fig. 23 은 Ag을 첨가한 셀룰로오스 아세테이트 섬유의 *E. coli*에 대한 디스크 확산법의 결과이다. *S. aureus* 와 비교하여 *E. coli*에 대한 항균 활성이 더 낮은 것을 확인 할 수 있었다. Ag 함유 셀룰로오스 아세테이트 섬유는 대기 중에서 방지하면 자외선등의 영향에 의하여 섬유에 포함되어 있는 Ag의 산화가 발생하게 되어 섬유의 색깔이 백색에서 갈색으로 변화하는 것을 확인할 수 있었다.



Silver-cellulose fiber (weight of Ag, ㎎)	control (0)	0.1wt% (0.025)	0.2wt% (0.05)	0.3wt% (0.075)	0.4wt% (0.100)	0.5wt% (0.0125)
Diameter(mm)	6 (a)	8.29 (b)	8.34 (c)	9.17 (d)	9.56 (e)	12.0 (f)

Fig. 22. Antimicrobial effect of electrospun silver-cellulose fibers in silver various contented on *S. aureus* by disc diffusion test.



Silver-cellulose fiber (weight of Ag, ㎎)	control (0)	0.1wt% (0.025)	0.2wt% (0.05)	0.3wt% (0.075)	0.4wt% (0.100)	0.5wt% (0.0125)
Diameter(mm)	6 (a)	6 (b)	6.35 (c)	7.02 (d)	7.65 (e)	8.96 (f)

Fig. 23. Antimicrobial effect of electrospun silver-cellulose fibers in silver various contented on *E. coli* by disc diffusion test.

2) 광화학탁도측정법 (optical density test.)

0.1wt%, 0.2wt%, 0.3wt%, 0.4wt% 0.5wt% Ag 함유한 셀룰로오스 섬유 0.5g에 해당하는 Ag의 함량을 0.5M의 $AgNO_3$ 로 환산하여 bulk 상태로 하여 첨가하였다. 진탕

배양기에서 최적 생육조건(36℃, 180rpm)으로 배양시킴과 동시에 접종 시간부터 4시간 간격으로 spectrophotometer로 640nm에서 측정한 결과가 Fig. 24.이다. 0.5wt% Ag을 첨가한 용액상태에서는 32시간동안 균의 성장이 거의 이루어 지지 않는 것을 을 확인 할 수 있었다. Fig. 25. 는 Ag 함유 셀룰로오스 섬유에 대한 광화학탁도법의 결과이다. Fig. 26.과 Fig 27.는 용액상태와 Ag을 첨가한 셀룰로오스 섬유의 광화학탁도법을 이용한 균의 증식억제율(bacteria reduction)을 나타낸 결과이다. 초기에는 둘 다 99%의 높은 항균능력을 보이고 있으나, 일정시간이 경과한 후 균감소율이 감소하는 시점에서 균의 증식억제율이 용액상태에 비하여 섬유형태로 존재하는 Ag의 항균작용이 보다 높은 것을 확인 할 수 있었다. 은행잎, propolis, streptomycin 등은 bulk 형태가 섬유형태에 비하여 비교적 높은 결과값을 나타나는데 Ag의 경우에는 섬유형태가 더 높은 항균능력을 나타내고 있다.

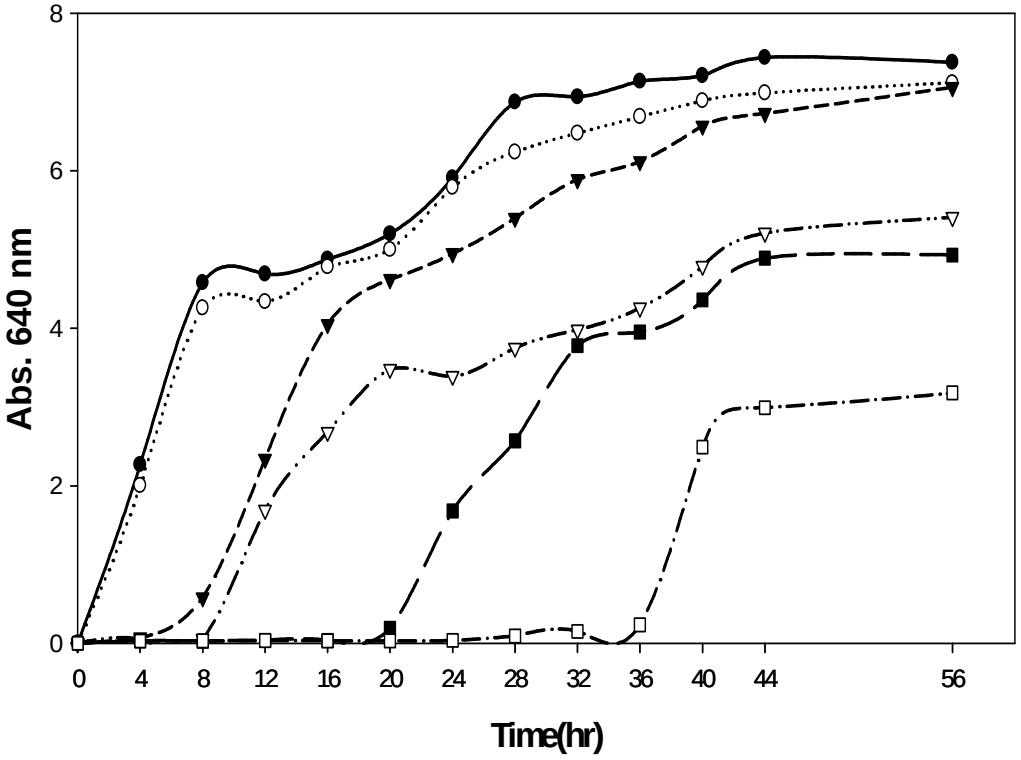


Fig. 24. Antimicrobial effect of silver contained solution for various concentration on *S. aureus* by optical density test as a function of culture time. (broth 100㎖, bacteria 1㎖)

(●) growth curve of *S. aureus*
(○) 0.1wt%(0.025㎎/100㎖)
(▼) 0.2wt%(0.50㎎/100㎖)
(▽) 0.3wt%(0.750㎎/100㎖)
(■) 0.4wt%(1.00㎎/100㎖)
(□) 0.5wt%(1.250㎎/100㎖)

∴ wt% (weight of silver/broth)

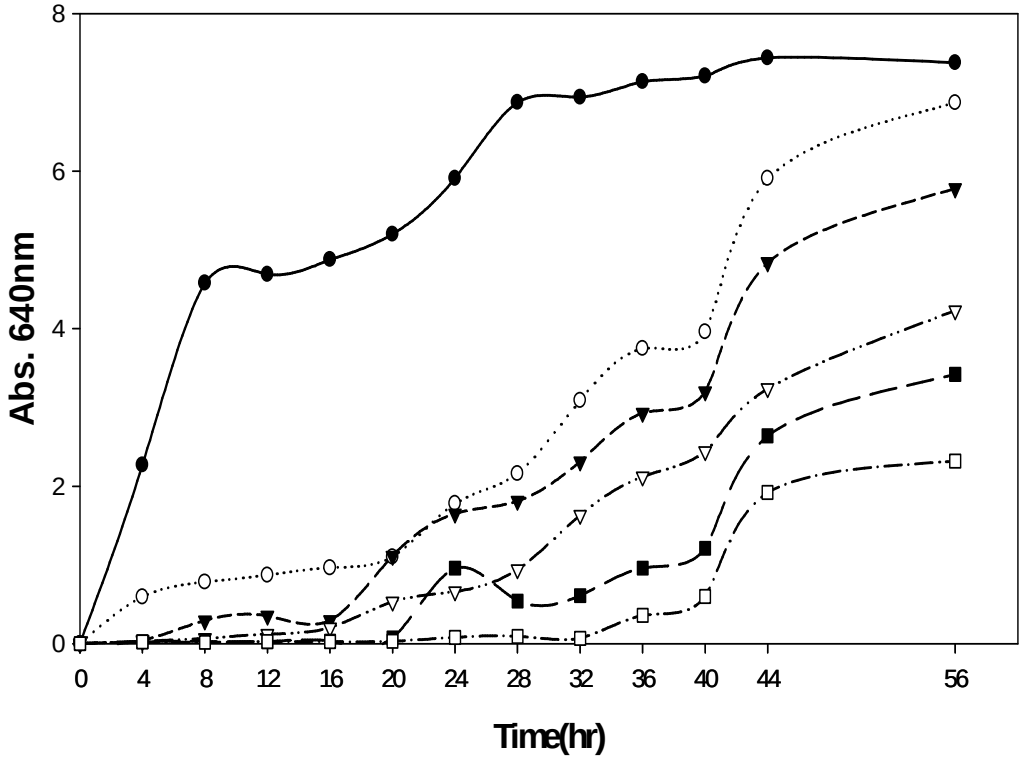


Fig. 25. Antimicrobial effect of electrospun silver-cellulose fiber in silver contained solution for various concentration on *S. aureus* by optical density test as a function of culture time. (broth 100㎖, bacteria 1㎖, fiber 0.5g)

(●) growth curve of *S. aureus*
(○) 0.1wt%(0.025㎎/100㎖)
(▼) 0.2wt%(0.50㎎/100㎖)
(▽) 0.3wt%(0.750㎎/100㎖)
(■) 0.4wt%(1.00㎎/100㎖)
(□) 0.5wt%(1.250㎎/100㎖)

∴ wt% (weight of silver/broth)

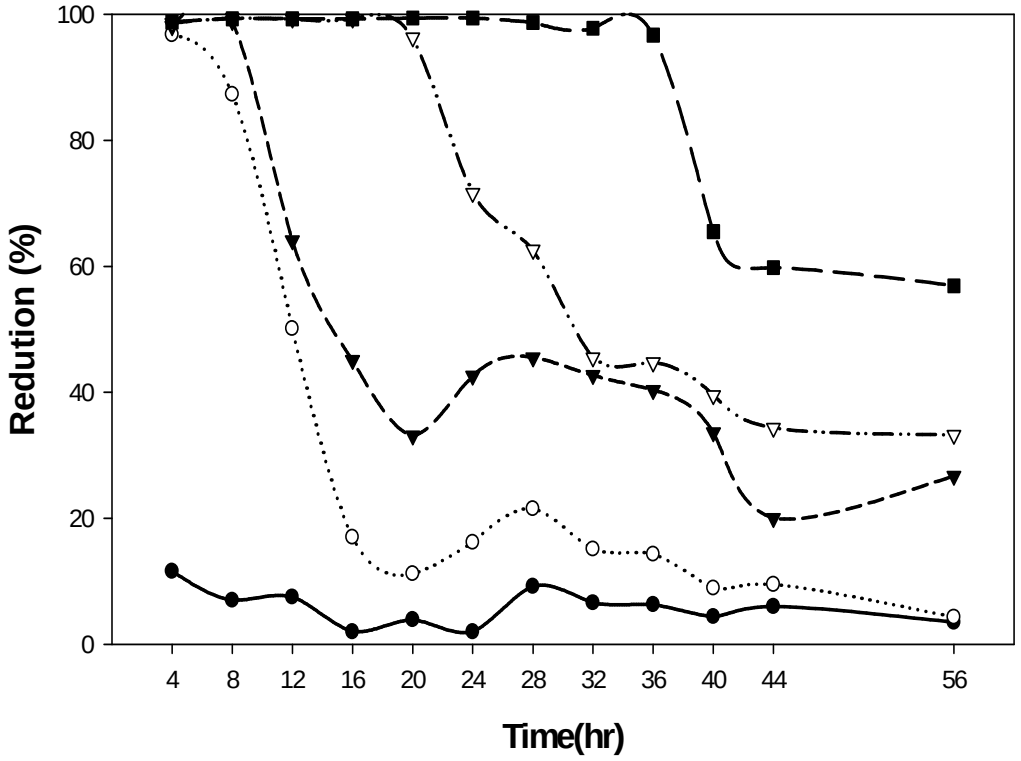


Fig. 26. Bacteria reduction of silver in silver contained solution for various concentration on *S. aureus* by optical density test as a function of culture time. (broth 100㎖, bacteria 1㎖)

(●) 0.1wt%(0.025㎎/100㎖) (○) 0.2wt%(0.50㎎/100㎖) (▼) 0.3wt%(0.75㎎/100㎖)

(▽) 0.4wt%(1.0㎎/100㎖) (■) 0.5wt% (1.25㎎/100㎖)

∴ wt% (weight of silver/broth)

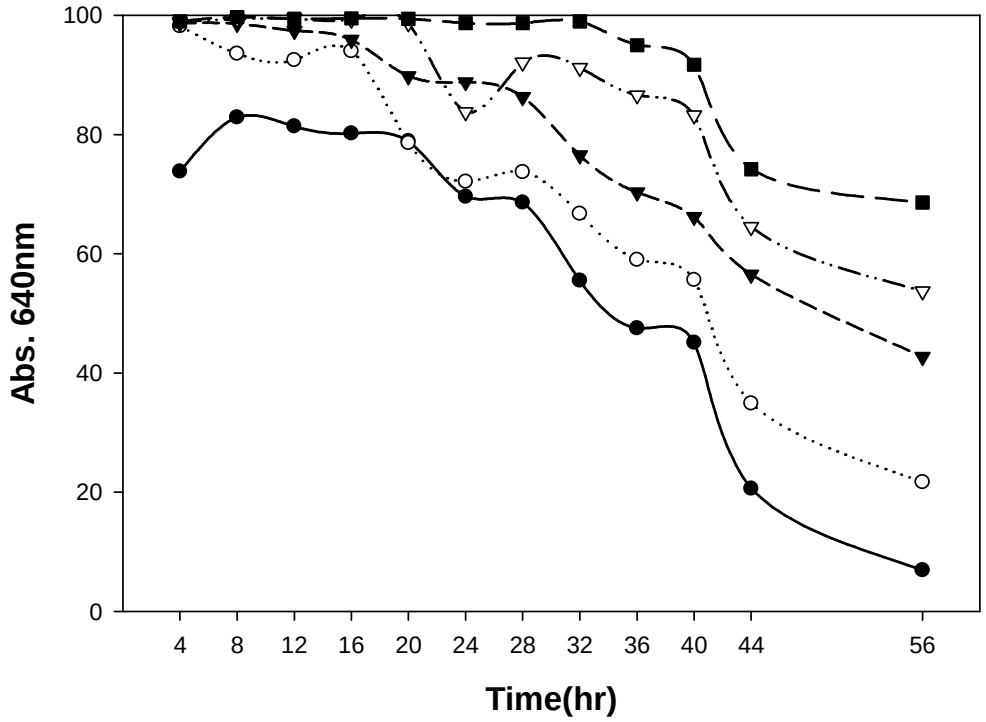


Fig. 27. Bacteria reduction of electrospun silver-cellulose fiber in silver contained solution for various concentration on *S. aureus* by optical density test as a function of culture time. (broth 100㎖, bacteria 1㎖, fiber 0.5g)

(●) 0.1wt%(0.025㎎/100㎖) (○) 0.2wt%(0.50㎎/100㎖) (▼) 0.3wt%(0.75㎎/100㎖)

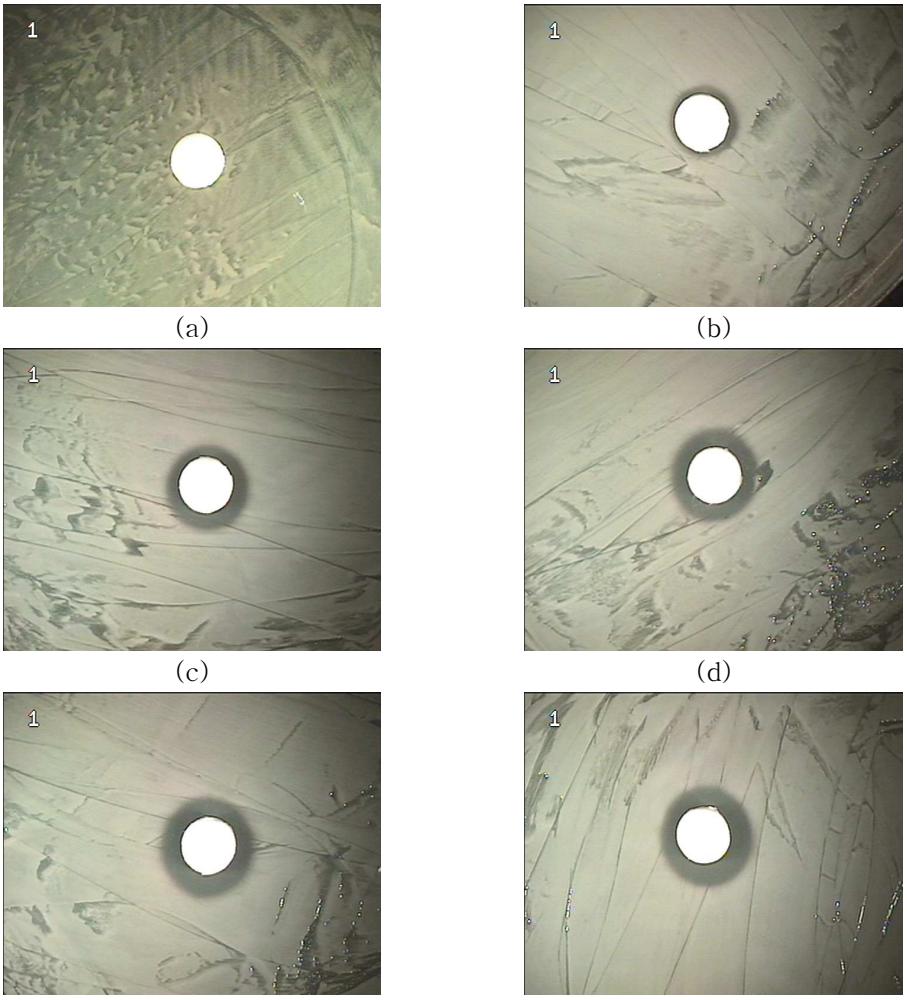
(▽) 0.4wt%(1.0㎎/100㎖) (■) 0.5wt% (1.25㎎/100㎖)

∴ wt% (weight of silver/broth)

2.4 Streptomycin 을 첨가한 섬유

1) 디스크확산법 (disc diffusion test)

충분한 교반이 이루어진 셀룰로오스 아세테이트용액에 streptomycin을 셀룰로오스 아세테이트의 중량의 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5wt%로 조절하여 첨가 후 충분한 교반을 실시하여 방사용액을 제조하여 전기방사를 실시하여 streptomycin을 함유 셀룰로오스 아세테이트 섬유를 제조하였다. 전기방사에 의해 제조된 streptomycin 함유 셀룰로오스 아세테이트 섬유를 6mm 의 일정한 크기(50mg)로 자른 후 *S. aurues* 가 도말된 배지에 안착시켜 배양기에서 36℃에서 24시간동안 배양 후 비디오 현미경을 통하여 증식저지환의 유무를 확인하였다. Fig. 28.는 streptomycin을 첨가한 streptomycin 함유 셀룰로오스 아세테이트 섬유의 *S. aureus*에 대한 디스크확산법의 결과이다. 0.1wt% streptomycin 함유 셀룰로오스 섬유에서는 증식 저지환이 8.2mm, 0.2wt% streptomycin 함유 셀룰로오스 아세테이트 섬유는 9.2mm, 0.3wt% streptomycin 함유 셀룰로오스 아세테이트 섬유는 9.56mm, 0.4wt% streptomycin 함유 셀룰로오스 아세테이트 섬유는 11.12mm, 0.5wt% streptomycin 함유 셀룰로오스 아세테이트 섬유는 11.89mm 로 streptomycin의 함량이 증가할수록 증식저지환의 크기도 증가하는 것을 알 수 있었다.



streptomycin-cellulose fiber (weight of streptomycin, ㎎)	control (0)	0.1wt% (0.5)	0.2wt% (1.0)	0.3wt% (1.5)	0.4wt% (2.0)	0.5wt% (2.5)
Diameter(mm)	6 (a)	8.2 (b)	9.22 (c)	9.56 (d)	11.12 (e)	11.89 (f)

Fig. 28. Antimicrobial effect of electrospun streptomycin-cellulose fibers in streptomycin contained solution for various concentration on *S. aureus* by disc diffusion test.

2) 광화학탁도법 (Optical density test)

0.1wt%, 0.2wt%, 0.3wt%, 0.4wt% 0.5wt% streptomycin 첨가한 셀룰로오스 아세테이트 섬유 0.5g에 해당하는 streptomycin의 함량을 용액상태로 하여 첨가하였다. 진탕배양기에서 최적 생육조건(36℃, 180rpm)으로 배양시킴과 동시에 접종 시간부터 4시간 간격으로 spectrophotometer로 640nm에서 측정한 결과가 Fig. 29.이다. 0.5wt% streptomycin을 첨가한 용액상태에서는 32시간동안 균의 성장이 거의 이루어 지지 않는 것을 을 확인 할 수 있었다. 그러나 32시간이 경과한 후에는 균의 성장이 급격히 증가하는 것을 확인 할 수 있었다. Fig. 30 는 streptomycin 함유 셀룰로오스 아세테이트 섬유에 대한 optical density test 결과이다. 용액상태와 섬유상태 모두 초기 균주에 대하여 97%의 균의 증식억제로 항균활성능력이 매우 우수한 것으로 나타났으나, 일정 시간이 경과 한 후에는 균주의 성장 속도가 급격히 증가하는 것을 확인 할 수 있었다.

Fig. 30.는 streptomycin을 첨가한 셀룰로오스 아세테이트 섬유의 광화학탁도법를 이용한 균감소율 (bacteria reduction)을 나타낸 결과이다. 0.4wt% streptomycin 함유 셀룰로오스 아세테이트 섬유는 균 접종후 24시간 동안에는 균 감소율이 96% 로 매우 높은 균 감소율을 보이고 있으나, 24시간이 경과한 이후 균 감소율이 급격히 감소하여 48시간이 경과한 이후에는 40% 미만의 균 감소율을 나타내고 있다.

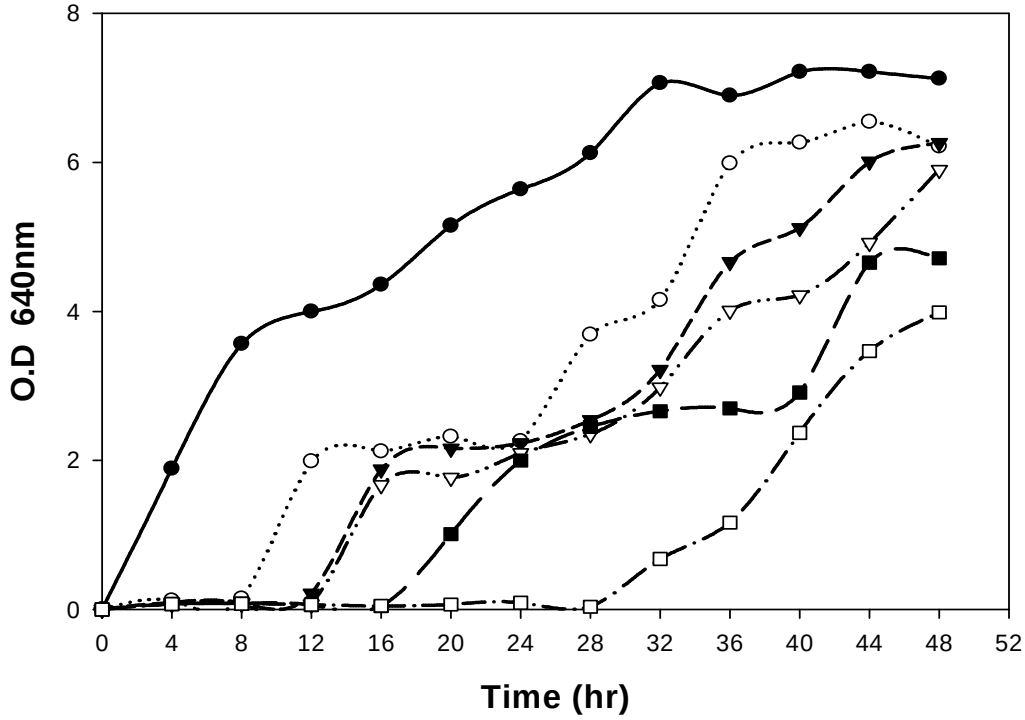


Fig. 29. Antimicrobial effect of streptomycin contained solution for various concentration on *S. aureus* by optical density test as a function of culture time. (broth 100㎖, bacteria 1㎖)

(●) growth curve of *S. aureus* (○) 0.1wt%(5㎎/100㎖)

(▼) 0.2wt%(10㎎/100㎖) (▽) 0.3wt%(15㎎/100㎖)

(■) 0.4wt%(20㎎/100㎖) (□) 0.5wt%(25㎎/100㎖)

∴ wt% (weight of streptomycin/broth)

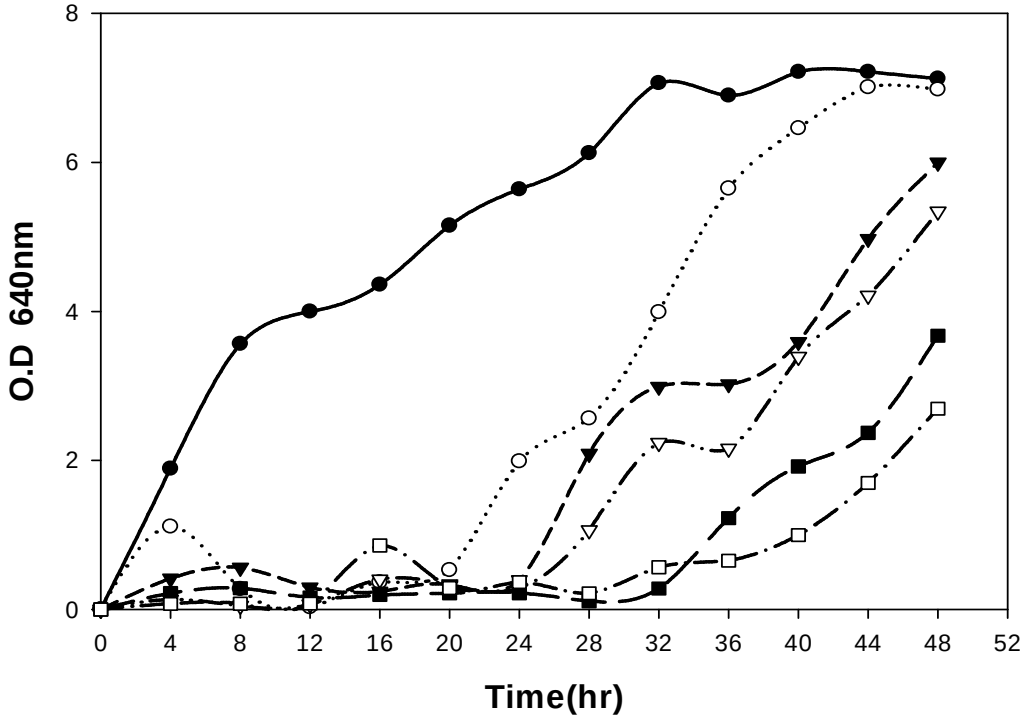


Fig. 29. Antimicrobial effect of electrospun streptomycin-cellulose fiber in streptomycin contained solution for various concentration on *S. aureus* by optical density test as a function of culture time. (broth 100㎖, bacteria 1 ㎖, fiber 0.5g)

(●) growth curve of *S. aureus* (○) 0.1wt%(5㎎/100㎖)

(▼) 0.2wt%(10㎎/100㎖) (▽) 0.3wt%(15㎎/100㎖)

(■) 0.4wt%(20㎎/100㎖) (□) 0.5wt%(25㎎/100㎖)

∴ wt% (weight of streptomycin/broth)

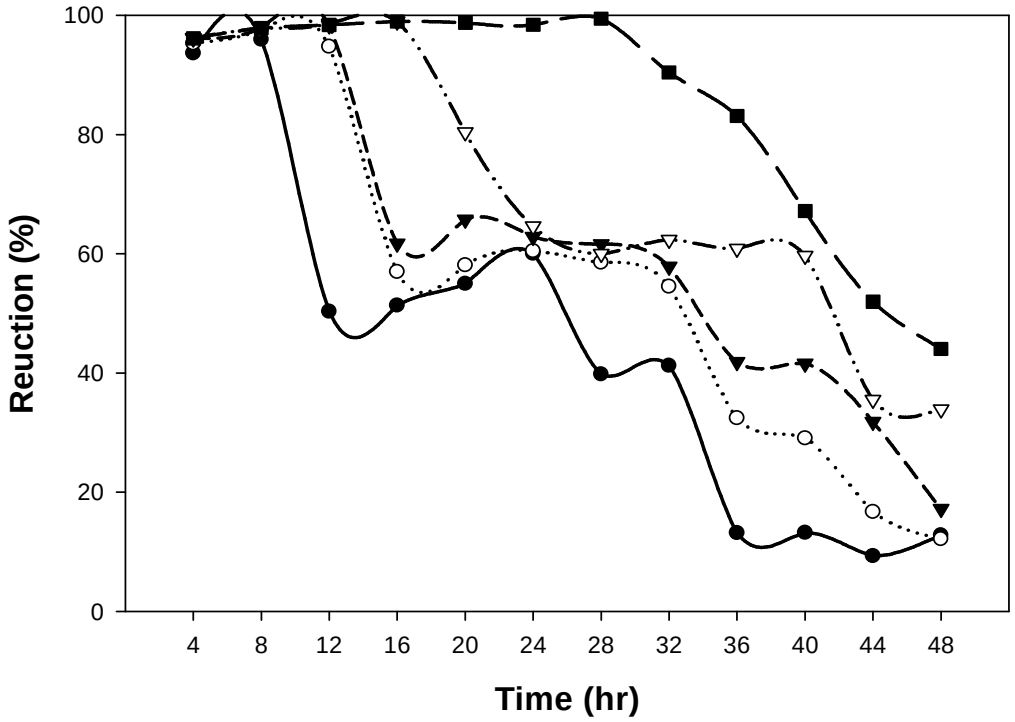


Fig. 30. Bacteria reduction of streptomycin in streptomycin contained solution for various concentration on *S. aureus* by optical density test as a function of culture time. (broth 100㎖, bacteria 1㎖)

(●) 0.1wt%(5㎎/100㎖) (○) 0.2wt%(10㎎/100㎖) (▼) 0.3wt%(15㎎/100㎖)

(▽) 0.4wt%(20㎎/100㎖) (■) 0.5wt% (25㎎/100㎖)

∴ wt% (weight of streptomycin/broth)

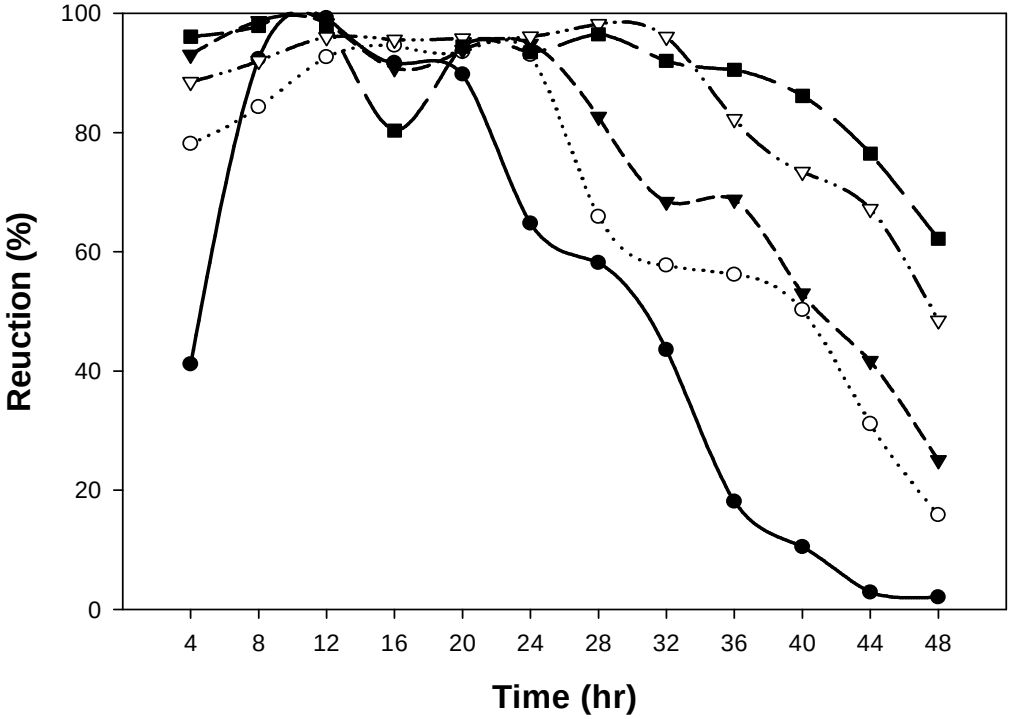


Fig. 30. Bacteria reduction of streptomycin-cellulose fiber in streptomycin contained solution for various concentration on *S. aureus* by optical density test as a function of culture time. (broth 100㎖, bacteria 1㎖, fiber 0.5g)

(●) 0.1wt%(5㎎/100㎖) (○) 0.2wt%(10㎎/100㎖) (▼) 0.3wt%(15㎎/100㎖)

(▽) 0.4wt%(20㎎/100㎖) (■) 0.5wt% (25㎎/100㎖)

∴ wt% (weight of streptomycin/broth)

3.첨가 물질들에 대한 *S. aureus*에 대한 항균활성 비교

Fig. 31.는 은행잎 추출물, 프로폴리스, Ag, streptomycin 을 함유한 셀룰로오스 아세테이트 섬유에 대하여 *S. aureus* 에 대한 bacteria reduction을 통하여 각 물질의 항균활성일 비교하였다. 균 접종 이후 24시간이 경과하였을 때의 각 물질의 항균 효과를 비교하여 보면, 0.5wt% Ag 함유 셀룰로오스 아세테이트 섬유 (98.7%) > 0.5wt% streptomycin 함유 셀룰로오스 아세테이트 섬유 (96.3%) > 20wt% 프로폴리스 함유 셀룰로오스 아세테이트 (90.9%) > 30wt% 은행잎추출물 함유 셀룰로오스 아세테이트 섬유 (74.4%) 순으로 나타났다. 그러나 48시간이 경과하였을 때의 각 물질의 항균 효과를 비교하여 보면, 20wt% 프로폴리스 함유 셀룰로오스 아세테이트 섬유 (72.3%) > 0.5wt% Ag 함유 셀룰로오스 아세테이트 섬유 (68.6%) > 30wt% 은행잎추출물 함유 셀룰로오스 아세테이트 섬유 (56.8%) > 0.5wt% streptomycin 함유 셀룰로오스 아세테이트 섬유 (30.0%) 순으로 나타났다. 각각의 첨가물질을 함유한 섬유에 24시간이 경과한 후 와 48시간이 경과 후의 균 감소율을 비교하여 보면 30wt% ginkgo-cellulose 섬유는 17.6%, 20wt% 프로폴리스 함유 셀룰로오스 아세테이트 섬유는 18.6%, 0.5wt Ag 함유 셀룰로오스 아세테이트 섬유는 30.1%, 0.5wt% 유 셀룰로오스 아세테이트 섬유는 66.3%의 균감소율 차이를 보이고 있다. 천연추출물인 프로폴리스와 은행잎은 20% 미만으로 비교적 낮은 차이를 보이고 있으나 합성항생제인 streptomycin은 66.3%로 많은 차이를 보이고 있다.

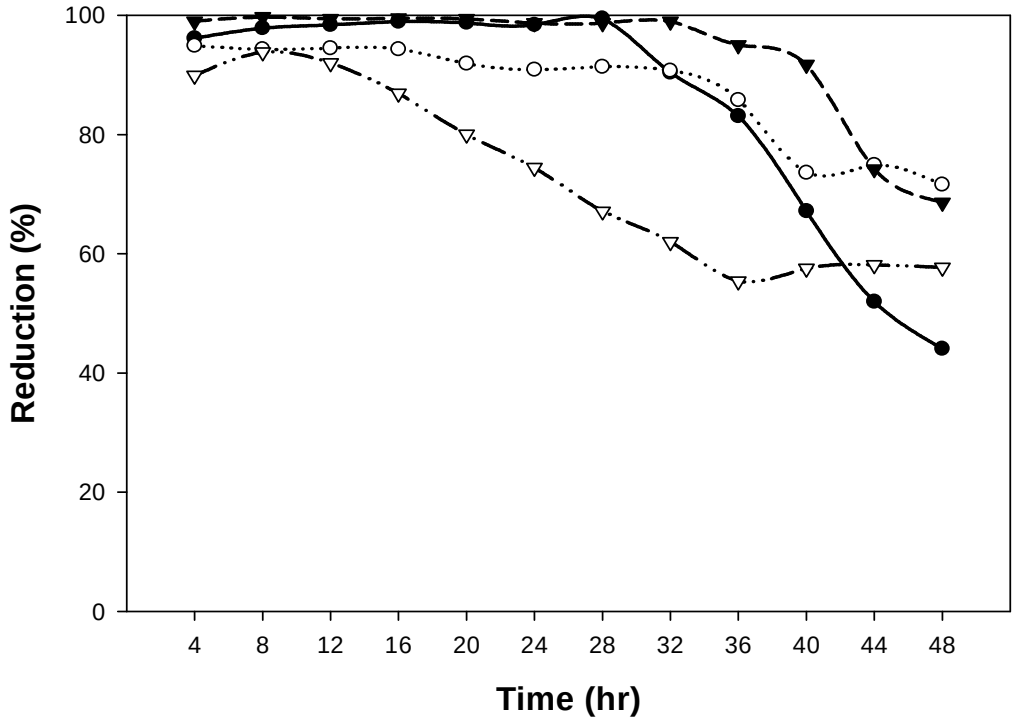


Fig. 31 Bacteria reduction of electrospun 30wt% ginkgo-cellulose fiber, 20wt% propolis-cellulose fiber, 0.5wt% Ag-cellulose fiber, 0.5wt% streptomycin-cellulose fiber on *S. aureus* by optical density test as a function of culture time.(broth 100㎖, bacteria 1㎖, fiber 0.5g)

(●) 0.5wt% streptomycin-cellulose fiber (25㎎/100㎖)
(○) 20wt% propolis-cellulose fiber (5.30㎎/100㎖)
(▼) 0.5wt% silver-cellulose fiber (1.25㎎/100㎖)
(▽) 30wt% ginkgo-cellulose fiber (7.35㎎/100㎖)

4. colony counting test

*S. aureus*에 대한 각각의 섬유의 항균작용을 colony counting법을 이용하여 측정하였다. 충분한 성장이 이루어진 S. aureus 균주를 희석액인 phosphate buffer를 이용하여 연속희석법으로 10^4 배로 희석하였다. 희석된 균주 1㎖을 phosphate buffer용액 100㎖에 첨가하여 10^6배로 희석하였다. 10^6배로 희석된 용액 100㎖에 각각의 첨가물을 첨가하여 전기방사에 의해 제조된 섬유 0.5g 을 첨가하여 4hr, 8hr, 16hr, 24hr간격으로 colony counting을 실시하여 균체 수를 확인하였다. colony counting 결과, 0.5wt% Ag을 함유한 셀룰로오스 아세테이트 섬유와 0.5wt% streptomycin을 함유한 셀룰로오스 아세테이트 섬유에서는 균체의 발견되지 않았으며, 은행잎 추출물과 프로폴리스에서는 4시간이 경과 후 각각 89.6%, 98.4%의 사멸율를 보이고 있다.

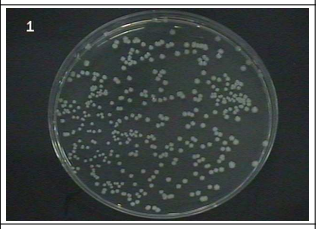
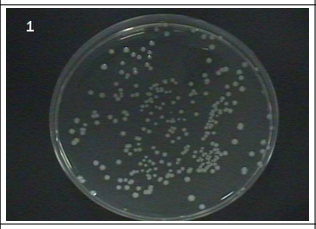
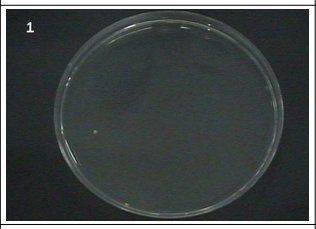
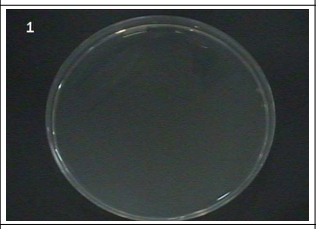
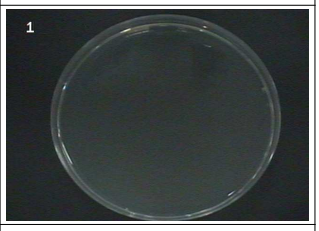
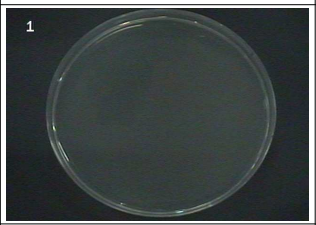
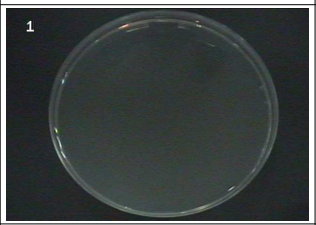
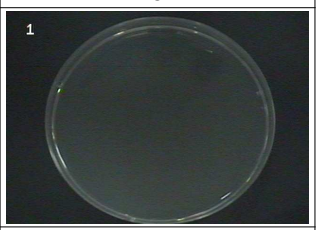
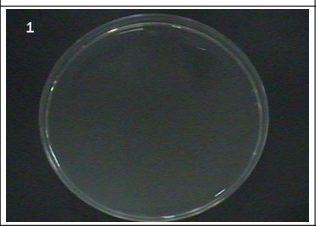
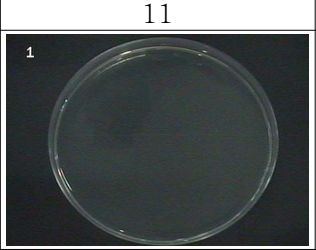
	4hr	8hr	16hr
control			
Number	309	318	321
0.5wt% silver			
Number	0	0	0
30wt% Ginkgo biloba extract			
Number	0	0	0
20wt% propolis			
Number	11	0	0
0.5wt% strepto mycin			
Number	0	0	0

Fig. 34. Numbers of *S. aureus* colonies of an additive as a function of culture time.

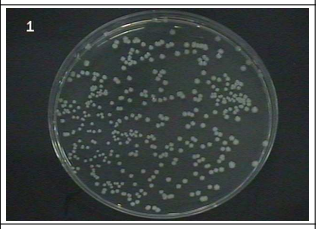
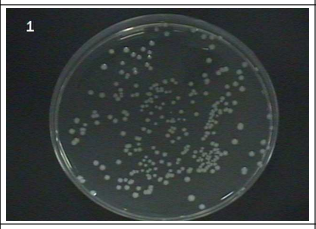
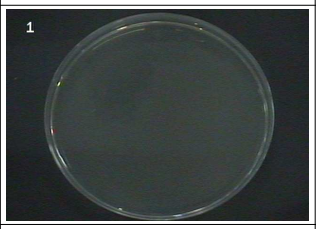
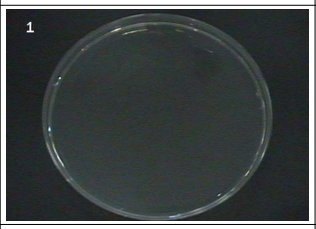
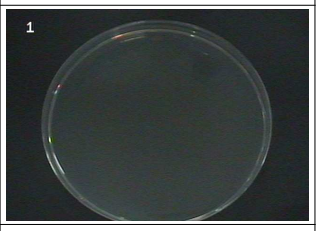
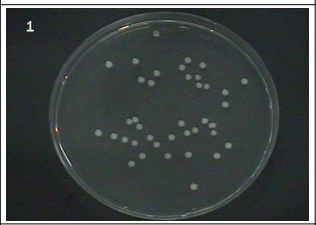
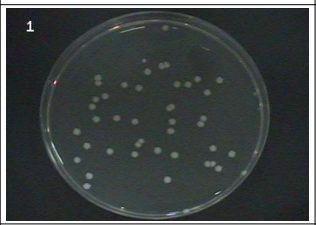
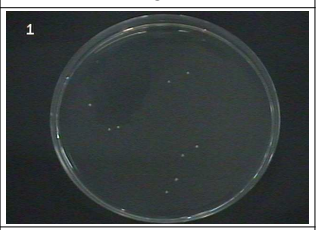
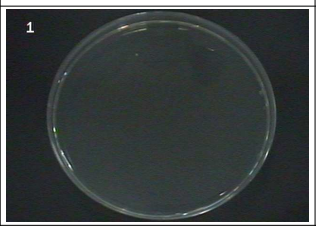
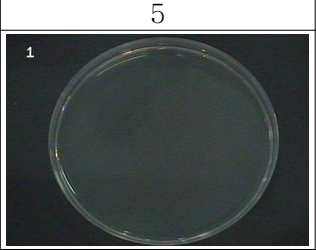
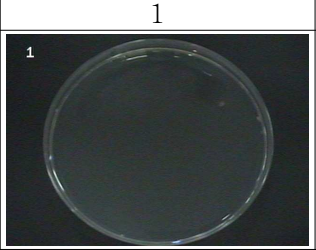
	4hr	8hr	16hr
control			
Number	309	318	321
0.5wt% silver fiber			
	0	0	0
30wt% Ginkgo fiber			
	32	32	11
20wt% propolis fiber			
	5	1	0
0.5wt% strepto mycin fiber			
	0	0	0

Fig. 35. Numbers of *S. aureus* colonies of fibers as a function of culture time.

Ⅴ. 결론

본 연구에서는 은행잎 추출물, Ag, 프로폴리스, streptomycin 등의 항생물질을 첨가한 cellulose acetate의 전기방사법에 의해 제조된 나노섬유의 물성 변화 및 특성을 파악하고, 전기방사 섬유의 항균효과 및 항균지속력에 대하여 관찰하였다. 항생물질을 첨가한 전기방사섬유 디스크확산법(disc diffusion test), 광화학탁도법(optical density test), 균감소율(bacteria reduction), colony counting법을 통하여 항균활성을 검색하였다.

1. 은행잎 추출물을 함유한 cellulose acetate 섬유의 *S. aureus*와 *E. coli*에 대한 항균작용에서 S. aureus에 대하여 24시간 동안의 항균활성이 높은 것을 알 수 있었다. 그러나 32시간이 경과한 후에는 비슷한 항균활성을 보이고 있다.

2. 은행잎 추출물, 프로폴리스, streptomycin 을 함유한 cellulose acetate 섬유는 *S. aureus*에 대한 항균작용에서 bulk 형태가 섬유 형태에 비하여 보다 높은 항균능력보이고 있으나, Ag을 함유한 cellulose 섬유의 경우 bulk 형태보다 섬유 형태가 보다 높은 항균 작용을 보이는 것을 알 수 있었다.

3. 0.5wt% Streptomycin-cellulose 섬유의 optical density test 결과 초기 24시간동안에서는 99%의 균감소율을 우수한 항균작용을 나타내었으나, 32시간 이후에는 항균작용이 급격히 감소하여 항균능력을 잃은 것을 알 수 있었다.

4.균 접종 후 24시간이 경과한 후에 항균 효과는 0.5wt% Ag 함유 셀룰로오스 아세테이트 섬유 (98.7%) > 0.5wt% streptomycin 함유 셀룰로오스 아세테이트 섬유 (96.3%) > 20wt% 프로폴리스 함유 셀룰로오스 아세테이트 (90.9%) > 30wt% 은행잎 추출물 함유 셀룰로오스 아세테이트 섬유 (74.4%) 순으로 나타났다.

5. 균 접종 후 56시간이 경과한 후의 항균 효과는 56시간이 경과하였을 때의 각 물질의 항균 효과를 비교하여 보면, 20wt% 프로폴리스 함유 셀룰로오스 아세테이트 섬유 (72.3%) > 0.5wt% Ag 함유 셀룰로오스 아세테이트 섬유 (68.6%) > 30wt%

은행잎추출물 함유 셀룰로오스 아세테이트 섬유 (56.8%) > 0.5wt% streptomycin 함유 셀룰로오스 아세테이트 섬유 (30.0%) 순으로 나타났다.

6. colony counting 결과 0.5wt% Ag을 함유한 셀룰로오스 아세테이트 섬유와 0.5wt% streptomycin을 함유한 셀룰로오스 아세테이트 섬유에서는 균체의 발견되지 않았으며, 은행잎 추출물과 프로폴리스에서는 4시간이 경과 후 사멸율이 각각 89.6%, 98.4%의 사멸율을 보이고 있다.

참고문헌

1. J. A. Matthews, G. E. Wnek, D. G. Simpson, and G. L. Bowlin, "Electrospinning of Collagen Nanofibers", Biomacromolecules, 3(2), pp.232-238 (2002)
2. G. I. Taylor, "Electrically Driven jets", Proc. R. Soc. Londen Ser. A, 313, pp.453-475 (1969).
3. A. formhals, "Process and Apparatus for Preparing Artificial Threads", *US Patent*, 1,975,540, (1934).
4. P. Gibson, H. Schreuder-Gibson, and D. Rivin, "Transport Proeprties of Porous", Colloids and Surfaces A: Physicochem, 187-188, pp.469-481 (2001)
5. X. Zong, K. Kim, D. Fang, S. Ran, B. S. Hsiao, and B. Chu, "Structure and Process Relationship of Electrospun Bioabsorbable Nanofiber Membranes", Polymer, 43, pp.4403-4412 (2002)
6. W. K. Son, J. H. Youk, W. H. Park, "Antimicrobial cellulose acetate nanofibers containing silver nanoparticles", J. Carbohtdrate Polymers, 65, pp.430-434, (2006)
7. I. H. Lee., M. S. Seol., J. Y. Park, and S. J. Yoon. "Preparation of Ultrafine Fiber Web from Cellulose Acetate by Electrospinning" J. Korean Ind. Eng. Chem, 17(3), 255-259 (2005).
8. G. C. Rutledge, M. Y. Shin, S. B. Warner, A. Buer, M. Grimler, and S. C. Ugbolue, "A Funda,ental Investigation of the Formation and Properties of Electrospun Fibers", NTC annual Report, M98-D01, (1999)
9. S. G. Lee, S. S. Choi, and C. W. Joo, "Nanofiber Formation of Poly(etherimide) under Various Electrospinning Conditions", J. Korean fiber Society, 39(1), (2002).
10. S. Ramakrishna, K. Fujihara, W. E. Teo, T. C. Lim, and Z. Ma, "An Introduction to Electrospinning and Nanofibers" World Scientific Publishing Co. pp17, 96, 123, (2005)
11. Kristian Stromgaard, Koji Nakanishi "Chemistry and bilogy of terpene trilactones from Ginkgo biloba" Natural products chemistry. 43, pp. 1640-1658, 2004.
12. J. M. Deitzel, J. Kleinmeyer, J. K. Hirvonen, and N.C. Beck Tan, "controlled Deposition of Electrospun Ploly(ethylene oxide) Fibers",

Polymer, 42, pp.8163-8170 (2001).
13. Y. M. Shin, M. M. Hohman, M. P. Brenner, and G. C. Rutledge, "Experimental Characterization of electrospinning the Electrically Forced Jet and Instabilities", Polymer, 42, pp.9955-9967 (2001).
14. P. K. Baumgarten, "Electrostatic spinning of Acrylic Microfibers", J. Colloid. Interf. Sci., 36, pp.71-79 (1971).
15. Y. S. Kang, H. Y. Kim, Y. J. Ryu and D. R. Lee, "Manufactering the Cellulose Web by Using Electro-Spinning and In-vitro Behaviour of Oxidized Cellulose Web" J. Korean Fiber Society. 39(1), (2002).
16. J. M. Deitzel, J. Kleinmeyer, D. Harris, and N. C. B. Tan, "The Effect of Processing Variables Nanofibers and a Process for Making the Same", U.S. Patent, 6, 110, 590, (2000).
17. J. Doshi and D. H. Reneker, " Electrospinning Process and Applications of Electrospun Fibers", J. Electrostatic, 35, pp.151-160 (1995).
18. S. C. Lee, H. Y. Kim, D. R. Lee, D. Bin, and S. J. Park, "Morphological Characteristics of Electrospun Poly(vinyl alcohol) Nonwoven. J. Korean Fiber Society. 39(3), (2002).
19. J. M. Deitzel, J. Kleinmeyer, D. Harris, and N. C. B. Tan, "The Effect of Processing Variables on the Morphology of Electrospun Nanofibers and Textiles", Polymer, 42, pp.261-272 (2001).
20. D. R. Chen, D. Y. H. Pui, and S. L. Kaufman, "Electrospraying Liquids for Monodisperse Aerosol Generation in the 4nm to 1.8㎛ Diameter Range" J. Aerosol Sci., 26, pp.963-967 (1996).
21. D. H. Reneker, A. L. Yarin, H. Fong, and S. Koombhongse, "Bending Instability in Electrospinning of Nanofiner", J. Appl. Phys., 89, pp.3018-3029 (2001).
22. I. H. Lee., Y. Shim., S. H. Choi., J. Y. Park., S. W. Han., J. Y. Song, and S. J. Yoon. "A study on the Antimicrobial of Ginkgo biloba leaves extracts according to concentrations of ethanol for staphylococcus aureus" Biotechnol. Bioprocess Eng (2006)
23. Seiichiro Nishida, Hiroyasu Satoh "Comparative vasodilating actions among the terpenoids and flavonoids contained in Ginkgo biloba extract" *Clinica Chimica Acta* **339**, pp. 129-133, 2004

24. Stanislav Jaracz, Shahid Malik, Koji Nakanishi "Isolation of ginkgolides A,B,C,J and bilobalide from G. biloba extract. *Phythchemistry* **65**, pp. 2897-2902, 2004

25. G. Mazzanti, M. T. Mascellino, L. Battinelli, D. Coluccia, M. Manganaro, L. Saso "Antimicrobial investigation of semipurified fraction of Ginkgo biloba leaves" *Journal of Enthnopharmacology.* **71**, pp. 83-88, 2000

26. Kou-Lung Chiu, Ya-Chuan Cheng, Jun-Hao Chen, Chiehming J. Chang, Po-Wen Yang "Supercritical fluids extraction of Ginkgo ginkgolides and flavonoids" *Journal of Supercritical Fluids*. **24**, pp. 77-87

27. S. L. Percivala, P. G. Bowler, D. Russell, "Bacterial resistance to silver in wound care", *J. Hospital Infection*, Vol 60, 1-7 (2005)

28. G. I. Taylr, "Electrically driven jet", *Proc. Roy. Soc. London*, A313, 453 (1969)

29. I. H. Lee., M. S. Seol., J. Y. Park, and S. J. Yoon. "Preparation of Ultrafine Fiber Web from Cellulose Acetate by Electrospinning" J. Korean Ind. Eng. Chem, 17(3), 255-259 (2005).

30. I. H. Lee., Y. Shim., S. H. Choi., J. Y. Park., S. W. Han., J. Y. Song, and S. J. Yoon. "A study on the Antimicrobial of Ginkgo biloba leaves extracts according to concentrations of ethanol for staphylococcus aureus" Biotechnol. Bioprocess Eng(2006).

31. I. H. Lee., Y. Shim., S. H. Choi., J. Y. Park., S. W. Han., J. Y. Song, and S. J. Yoon. "A study on the Antimicrobial of Ginkgo biloba leaves extracts according to concentrations of ethanol for staphylococcus aureus" Biotechnol. Bioprocess Eng(2006).

저작물 이용 허락서

학 과	환경공학과	학 번	20067101	과 정	석사
성 명	한글 : 한 성 우 한문 : 韓 成 佑 영문 : Han Sung Woo				
주 소	광주광역시 남구 서2동 31-8				
연락처	E-MAIL : hansimin@hanmail.net				
논문제목	한글 : 전기방사법을 이용한 항균 나노 섬유제조에 관한 연구 영문 : A study on the antimicrobial effect cellulose nanofiber using electrospinning process.				

본인이 저작한 위의 저작물에 대하여 다음과 같은 조건아래 조선대학교가 저작물을 이용할 수 있도록 허락하고 동의합니다.

- 다 음 -

1. 저작물의 DB구축 및 인터넷을 포함한 정보통신망에의 공개를 위한 저작물의 복제, 기억장치에의 저장, 전송 등을 허락함
2. 위의 목적을 위하여 필요한 범위 내에서의 편집·형식상의 변경을 허락함. 다만, 저작물의 내용변경은 금지함.
3. 배포·전송된 저작물의 영리적 목적을 위한 복제, 저장, 전송 등은 금지함.
4. 저작물에 대한 이용기간은 5년으로 하고, 기간종료 3개월 이내에 별도의 의사표시가 없을 경우에는 저작물의 이용기간을 계속 연장함.
5. 해당 저작물의 저작권을 타인에게 양도하거나 또는 출판을 허락을 하였을 경우에는 1개월 이내에 대학에 이를 통보함.
6. 조선대학교는 저작물의 이용허락 이후 해당 저작물로 인하여 발생하는 타인에 의한 권리 침해에 대하여 일체의 법적 책임을 지지 않음
7. 소속대학의 협정기관에 저작물의 제공 및 인터넷 등 정보통신망을 이용한 저작물의 전송·출력을 허락함.

2008년 02월 일

저작자 : 한 성 우 (서명 또는 인)

조선대학교 총장 귀하