

Antimicrobial activity of sophorolipid

Gabjung Kim, Youngbum Kim, Eunki Kim
 Dept. Biol. Eng., Inha University, Incheon, Korea
 TEL (032) 860-7514, FAX (032) 875-0827

Abstract

Antimicrobial activity of sophorolipid produced by *Candida bombicola* ATCC 22214 was investigated, Minimum inhibitory concentration of sophorolipid to *Propionibacterium acne* and *Bacillus subtilis* were 0.5 ppm and 4 ppm, respectively. However no antimicrobial activity to *E. coli* was detected. Indicating the antimicrobial activity of sophorolipid only toward gram positive bacteria. Antifungal activity of sophorolipid was also detected in the hyphae growth assay for *Botrytis cinerea*. Malate dehydrogenase, a cytoplasmic enzyme, of *B. subtilis* was remarkably increased with the sophorolipid treatment, indicating the leakage of membrane by sophorolipid. This result shows the potentials of sophorolipid as mild, non-toxic antimicrobial agent.

Introduction

효모, 곰팡이, 박테리아 등 미생물이 생산하는 계면활성제는 생분해도가 높고 독성이 적어 기존의 화학 합성 계면활성제의 사용 시 야기되었던 환경오염 문제를 해결할 것으로 기대되고 있다. 또한 미생물 계면활성제는 친유성과 친수성을 이루는 성분들이 많은 화합물을 포괄하고 있으므로 이들의 배합으로 다양한 구조를 이룰 수 있고 성능면에 있어서도 온도, pH에 대한 안정성이 뛰어나며 표면장력 저하능도 우수하여 여러 산업 분야에서 그 응용가능성이 크다고 하겠다.

그 중에서 *Candida*가 생산하는 sophorolipid는 가장 널리 알려진 glycolipid 계열의 미생물 계면활성제로서 저가의 원료와 분리 비용으로 비교적 높은 생산수율을 얻을 수 있어 대량생산에 적합하므로 의약, 식품, 화장품, 세제 등 여러 분야에서 관심이 고조되고 있다. 특히, sophorolipid를 비롯한 glycolipid 계열의 계면활성제는 피부의 샘(sebaceous gland)에 존재하는 세균을 공격하여 호흡활동을 방해함으로써 항균작용을 나타내기도 한다.

이에 본 연구에서는 sophorolipid 의 이 같은 특성을 이용하여 관련 분야에 적용하고자 항균특성을 조사하였다.

Material & Methods

1. sophorolipid 생산

Canola oil을 기질로 하여 2.5 L jar fermentor에서 유가식으로 *Candida bombicola* ATCC 22214를 7일간 배양하였다. 배양액으로부터 생성된 sophorolipid는 ethyl acetate, hexane, 그리고 chloroform을 이용하여 추출, 정제하였다.

2. 사용균주

항균실험에 사용된 균주는 *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Propionibacterium acne* DSM 18997, 그리고 *Botrytis cinerea* KCTC 6973이다.

3. 항세균 특성 조사

sophorolipid가 농도별로 첨가된 영양평판배지를 제조하여 전 배양된 각각의 균을 serial dilution 하여 접종한 후 30℃, 48hr 배양하여 생성된 집락을 계수하여 최소저해농도(minimal inhibitory concentration)를 결정하였다.

4. 항진균 특성 조사

Botrytis cinerea KCTC 6973을 potato sucrose agar에서 20℃, 5일간 배양한 후 균사를 직경 5 mm가 되도록 잘라 각각 다른 농도의 sophorolipid가 첨가된 평판배지에 놓고 3일간 배양하여 집락의 직경을 측정하여 억제율을 결정하였다. 균사 성장 억제율은 다음과 같이 계산하였다.

$$* \text{억제율}(\%) = \frac{\text{무처리균의 면적} - \text{처리균의 면적}}{\text{무처리균의 면적}} \times 100$$

5. Malate dehydrogenase 활성조사

sophorolipid가 균에 미치는 영향을 조사하고자 *E. coli*, *B. subtilis* 배양액에 sophorolipid를 처리하여 malate dehydrogenase 활성을 조사하였다. 효소활성은 0.05 ml 효소액을 0.2 mM NADH, 0.33mM oxaloacetate, 94 mM potassium phosphate가 함유된 시험관에 첨가하였고 분광광도계를 이용하여 NADH 산화를 340 nm에서 측정하였으며, 1umol의 NADH가 NAD로 전환되는데 작용한 효소의 양을 1 unit로 환산하였다.

Result & Discussion

Canola oil에서 생산된 sophorolipid에 대한 항균력 시험결과 여드름을 야기시키는 *P. acne*에서는 0.5 ppm, *B. subtilis*에서는 4 ppm으로 나타나 그람 양성세균에 대해서는 저농도의 sophorolipid도 균의 생육에 영향을 주는 것으로 나타났다. 반면, *E. coli*에서는 항균력이 없는 것으로 나타나 그람양성 세균과 그람 음성세균 사이의 세포벽 상의 구조적 차이로 인해 그람음성세균보다 양성세균에 더욱 효과적인 것으로 확인되었다.

사과, 딸기, 토마토 등의 농작물에 해를 주는 잣빛 곰팡이로 알려진 *Botrytis cinerea*에 대한 균사 생육 억제 실험에서는 100 ppm의 sophorolipid에서 약 50 %의 억제율을 보여 농작물에 해를 주는 곰팡이의 처리에 이용할 수 있는 가능성을 제시하였다. 일반적으로 미생물의 생육에 영향을 주는 많은 물질들의 다양한 억제 기작들이 제시되고 있는 가운데 본 연구실에서 분리, 정제된 sophorolipid의 항균 기작에 대한 연구로 malate dehydrogenase 활성변화를 관찰하였다. MDH는 TCA cycle의 주요 효소 중 하나로 sophorolipid 처리 전과 후의 활성을 각각 조사한 결과 sophorolipid 처리 후 그람 양성균에서 약 5배의 활성증가가 나타난 것으로 보아 sophorolipid로 인해 세포가 영향을 받은 것으로 사료되며 MIC 결과에서도 제시된 바와 같이 그람 음성 세균인 *E. coli*에서는 처리후에 효소활성이 큰 변화가 없는 것으로 나타나 sophorolipid가 그람 양성 세균에만 특이적으로 작용하는 항균물질로 확인되었다.

본 연구에 이어 여러 종류의 sophorolipid를 대상으로 항균력을 조사하고, 정확한 항균기작을 규명하기 위해 연구중에 있다.

Reference

1. Cooper, D. G., and D. A. Paddock.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **46**, 1426(1983)
2. Stuver, O., R. Hommel, D. Haferburg, and H. P. Kleber.: *J. Biotechnol.*, **6**, 259(1987)
3. Davila, A. M., Marchal, and J. P. Vandecasteele.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **47**, 496(1997)
4. Lang, S., E. Katsiwela, and F. Wagner.: *Fat Sci. Technol.*, **91**, 363(1989)
5. Nikolaos, E. L., and Y. D. Clonis.: *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **337**, 103(1997)

Table 1. Antimicrobial activity of the sophorolipid

Microorganism	MIC ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
<i>Bacillus subtilis</i>	4
<i>Escherichia coli</i>	NI
<i>Propionibacterium acne</i>	0.5

NI, No Inhibition.

Table 2. Antifungal activity of sophorolipid against the growth of *Botrytis cinerea* assessed by the hyphal-extension inhibition assay

Concentration(ppm)	Diameter of colony	Inhibition rate (%)
0	4.90	0
10	4.75	6.05
50	3.95	35.01
100	3.50	48.97
300	3.20	57.35

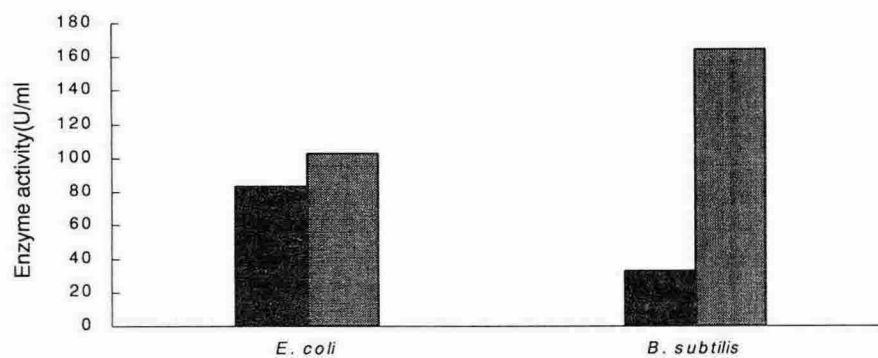


Fig. 1. Comparison of malate dehydrogenase activity in bacterial culture broth treated with sophorolipid (300 ppm). □, non treated; ■, treated.