

## Antimicrobial activity of sophorolipid biosurfactant

윤달수, 김갑정, 김영범, 김은기\*

인하대학교 생물공학과 생물환경소제실

전화 (032) 860-7514, FAX (032) 875-0827

### Abstract

Sophorolipid, a biosurfactant produced from *Candida bombicola* ATCC 22214, showed antimicrobial activity against *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus xylosus*, *Streptococcus mutans*, and *Propionibacterium acne* at 4, 1, 1, 0.5 ppm as MIC(minimum inhibitory concentration). Also 100ppm of sophorolipid inhibited 50% of cell growth of plant pathogenic fungus, *Botrytis cinerea*. However, sophorolipid showed no effect on the *Escherichia coli*, indicating its selective antimicrobial activity depending on the cell wall structure. Treatment of *B. subtilis* with sophorolipid increased the leakage of intracellular enzyme, malate dehydrogenase, indicating the possible interaction of sophorolipid with cellular membrane. Between lactone-type and acid-type sophorolipid, the former showed higher antimicrobial activity.

### 1. Introduction

미생물이 생산하는 계면활성제는 같은 분자 내에 친수성 그룹과 소수성 그룹이 함께 존재하는 형태의 물질로서 계면활성제의 특징을 가지고 있고 당지질, 단백질 및 생체 고분자 등의 종류가 있다. 미생물 계면활성제는 생물학적 친화성이 있어서 생태계에 영향을 주지 않으며 생분해도가 높고 독성이 적어 환경과 조화를 이룰 뿐만 아니라 다양한 구조 때문에 여러 특성을 가지고 있어 식품, 의약품, 섬유, 고분자, 금속, 도료, 화장품 등 산업 전반의 많은 분야에서 그 응용성에 대한 연구가 진행되고 있다.

항균제의 분야에 있어서는 기존 합성 항균제의 낮은 생산경비와 우수한 효과 때문에 biosurfactant에 대한 연구결과가 많지 않으나, 최근 합성 항균제에 의한 저항성 균주들의 출현과 같은 부작용이 나타나 학계와 산업계에서 천연물 및 미생물과 같은 생체를 이용한 신물질 개발에 관심이 고조되고 있다.

그 중에서 *Candida*가 생산하는 sophorolipid는 가장 알려진 glycolipid 계열의 미생물 계면활성제로서 흡습성과 친수성이 뛰어나고 저가의 원료와 낮은 분리 비용으로 비교적 높은 생산수율을 얻을 수 있어 대량생산에 적합하므로 화장품을 비롯하여 치약, 화장비누, 보습제 등으로서 이용되고 있으며, 일반 합성 계면활성제와는 달리 사용 시 인체에 대한 부작용이 거의 없는 것으로 나타나 인체에 적용 가능한 항균제로의 개발이 시도되고 있다.

본 연구에서는 미생물 유래의 sophorolipid를 생산하여 여드름 유발세균인 *P. acne*를 비롯한 다양한 균주들에 대한 항균효과를 조사하고, 추후 이를 산업에 이용 가능성을 알아보기 위해 피부 독성 반응 실험과 다른 계면활성제 첨가 시에 일어나는 항균력 차이를 알아보았다.

## 2. Materials & Methods

### 2.1 사용균주

Sophorolipid 생산을 위해 사용된 균주는 *Candida bombicola* ATCC 22214이고, 항균실험에 사용된 균주는 *Escherichia coli* KCTC 1039, *Bacillus subtilis* KCTC 1028, *Propionibacterium acne* ATCC 6919, *Staphylococcus xylosus* ATCC 35663, *Streptococcus mutans* ATCC 35668 등의 균주를 사용하였다.

### 2.2 Sophorolipid 생산 및 분리

Canola oil을 기질로 하여 2.5L jar fermentor에서 *Candida bombicola* ATCC 22214를 7일간 유가식 배양을 하였다. 배양액으로부터 생성된 sophorolipid는 ethyl acetate, hexane, 그리고 chloroform을 이용하여 추출·정제하였으며, silica gel column과 TLC-FID, 그리고 TLC-IR로 분리·분석하였다.

### 2.3 항세균 활성 측정

항균력의 측정은 액체배지에 각각의 균주를 전배양하고 이 배양액을 취해 Sophorolipid가 여러 농도로 첨가된 평판배지에 접종하고 *P. acne*는 37°C의 CO<sub>2</sub> incubator에서 6~7일간, 나머지 균주들은 37°C에서 1~2일간 배양하여 생성된 콜로니의 수를 측정하고, 이를 sophorolipid가 첨가되지 않는 대조구의 집락수와 비교하여 최초로 colony가 감소되는 농도를 최소저해농도(MIC, minimum inhibitory concentration)로 결정하였다.

### 2.4 항진균 활성 측정

Potato sucrose agar plate에서 20°C, 3일간 배양한 *Botrytis cinerea* KCTC 6973의 균사를 직경 5mm의 구형균사로 잘라 sophorolipid가 다르게 첨가된 평판 배지 위에 놓고 20°C에서 3일간 배양하여 colony의 직경을 재어 억제 효과를 관찰하였다.

억제율은 ((무처리균의 면적 - 처리균의 면적) / 무처리균의 면적 X 100)으로 계산하였다

### 2.5 효소 활성 측정

Sophorolipid가 균에 미치는 영향을 조사하고자 *E. coli*와 *B. subtilis* 배양액에 sophorolipid를 처리하여 malate dehydrogenase 활성을 조사하였다. 효소활성은 0.05 ml 효소액을 0.2 mM NADH, 0.33 mM oxaloacetate, 94 mM potassium phosphate가 함유된 시험관에 첨가하였고 분광광도계를 이용하여 NADH 산화를 340 nm에서 측정하였다.

### 2.6 피부 독성 시험

백색 토끼를 대상으로 털을 제거하고 건강한 피부 표면에 sophorolipid를 개방 또는 폐쇄 침포하여 투여 후 24, 48, 72 시간 경과 시 투여 부위의 상태를 관찰하였다.

### 2.7 안구 독성 시험

백색 토끼를 대상으로 한쪽 눈의 하안검을 안구로부터 당겨서 결막낭 내에 sophorolipid를 투여하고 다른 쪽 눈은 무처리 그대로 두어 무처리 대조구로 한다. 투여 후 1, 2, 3, 4, 7일째 각각의 혼탁 및 혼탁된 범위, 홍채의 반응, 결막의 발적, 부종 및 배출물의 유무 등 변화를 육안으로 관찰하여 sophorolipid의 영향을 평가하였다.

피부·안구 독성 시험은 결과에 넣지 않았다.

### 2.8 계면활성제 첨가시 sophorolipid의 항균력 비교

액체배지에 각각의 균주를 전배양하고 이 배양액을 취해 Sophorolipid와 계면활성제가 비율별로 첨

가된 평판배지에 접종하고 *P. acne*는 37°C의 CO<sub>2</sub> incubator에서 6~7일간, *B. subtilis*는 30°C에서 1~2일간 배양하여 생성된 콜로니의 수를 측정하여 항균력을 비교하였다.

### 3. Results & 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 그람 양성세균과 그람 음성세균 사이의 세포벽 상의 구조적 차이로 인해 그람 음성세균보다 양성세균에 더욱 효과적인 것으로 확인되었다.

사과, 딸기, 토마토 등의 농작물에 해를 주는 잿빛 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 malate dehydrogenase 활성변화를 sophorolipid의 항균 기작에 대한 연구로 관찰하였다. MDH는 TCA cycle의 주요 효소 중 하나로 sophorolipid 처리 전과 후의 활성을 각각 조사한 결과 sophorolipid 처리 후 그람 양성세균에 약 5배의 활성증가가 나타난 것으로 보아 sophorolipid로 인해 세포가 영향을 받은 것으로 사료되며 MIC 결과에서도 제시된 바와 같이 그람 음성세균인 *E. coli*에서는 처리 후에 효소활성이 큰 변화가 없는 것으로 나타나 sophorolipid가 그람 양성세균에만 특이적으로 작용하는 항균물질로 확인되었다.

Sophorolipid에 대한 토끼의 피부·안구 실험에서는 무해한 것으로 결과가 나와 인체에 대한 유독성은 없는 것으로 추정된다.

계면활성제의 첨가 시 sophorolipid의 항균력에 미치는 영향을 *P. acne*와 *B. subtilis*에 대하여 이온성 계면활성제에 따라 실험되었다. 비이온성 계면활성제의 첨가 시, 두 균 모두 일반적으로 sophorolipid의 항균력을 저해하는 것으로 나왔고 이온성 계면활성제의 경우에는 항균력의 상승효과를 나타내었다.

Table 1. Antimicrobial activity of the sophorolipid

Microorganism	MIC (ppm)
<i>Bacillus subtilis</i> KCTC 1028	4
<i>Staphylococcus xylosus</i> ATCC 35663	1
<i>Streptococcus mutans</i> ATCC 35668	1
<i>Propionibacterium acne</i> ATCC 6919	0.5
<i>Escherichia coli</i> KCTC 1039	NI

NI ; No Inhibition

Table 2. Antifungal activity of sophorolipid against *Botrytis cinerea*

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

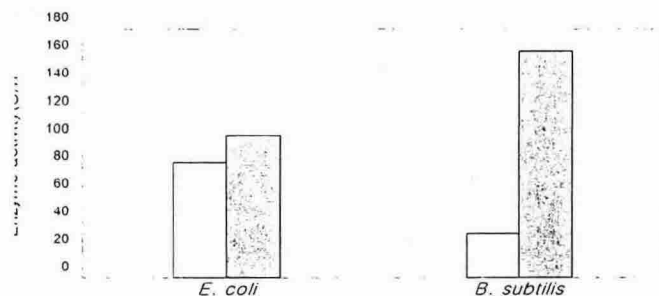


Fig. 1. Comparison of malate dehydrogenase activity in bacterial culture broth treated with sophorolipid(300 ppm). □ ; non treated, ■ ; treated.

Table 3. Effects of surfactant type on the antimicrobial activity of sophorolipid

Type of surfactants	Surfactants	Inhibition(%)			
		<i>Propionibacterium acne</i>		<i>Bacillus subtilis</i>	
		Surfactant (20ppm)	Surfactant(20ppm) + Sophorolipid(20ppm)	Surfactant (20ppm)	Surfactant(20ppm) + Sophorolipid(20ppm)
	No surfactant	0	-	0	-
	Sophorolipid	90	-	37.7	-
Nonionic	Tween 81	0	90.7	5	37
	OA-20	0	43.3	13	17
	Span 80	53.3	95	21	60
	NP-8	73.3	99	-	-
Anionic	AOS-1416	-	-	2	81
Cationic	MPS-814S(EQ)	93.7	99.7	32	50
Zwitterionic	Cocamidopropyl -Betain	0	99.2	18	95.1

Tween 81 ; Polyoxyethylene sorbitan monooleate, OA-20 ; Polyoxyethylene oleylether, Span 80 ; Sorbitan monooleate, NP-8 ; Polyoxyethylene nonylpenylether, AOS-1416 ;  $\alpha$ -olefinsulfornate, MPS-814S ; Esterquart.

## Reference

1. Cooper, A. J., 1998. Systematic review of *Propionibacterium acne* resistance to systemic antibiotics. MJA, 169, 259 ~ 261.
2. Desai J. P., and I. M. Banat, 1997. Microbial production of surfactants and their commercial potential. Microbiol. Mol. Rew., 61, 47 ~ 64.
3. Lang, S., E. Katsiwela, and F. Wagner, 1989. Antimicrobial effects of biosurfactant. Fat Sci. Technol. 91(9), 363 ~ 366.
4. Sullivan, E. R., 1998. Molecular genetics of biosurfactant production. Curr. Opin. Biotechnol., 9, 263 ~ 269.