

Production and Characterization of Antimicrobial Sophorolipids

Young-Bum Kim, Gab-Jung Kim, Eun-Ki Kim*

Dept. of Biological Engineering, Inha University

Tel (032)872-2978, Fax (032)875-0827

Abstract

Sophorolipid, a glycolipid type biosurfactant produced from *Candida Bombicola*, inhibited the growth of bacteria and fungi.

Between two types of sophorolipid, acid and lactone form, the latter had more strong antimicrobial activity.

Culturing parameters including oil substrate, initial glucose concentration, aeration, culture mode, affected the ratio of two forms.

The fatty acid moiety varied depending on the oil having different fatty acid chains. Minimum inhibitory concentration of lactonic sophorolipid toward *Propionibacterium acne* was below 0.5ppm.

This result indicated the potentials of sophorolipid as antimicrobial agent in various area including cosmetics.

Introduction

미생물계면활성제란 yeast, fungi, bacteria 등 미생물에 의해 생산되는 생분해성 계면활성제를 의미하며 균주에 따라 세포외 또는 세포내에 생성이 된다.

그 중에서 *Candida*가 생산하는 sophorolipid는 가장 널리 알려진 glycolipid 계열의 미생물계면활성제로서 저가의 원료와 분리 비용으로 비교적 높은 생산수율을 얻을 수 있어 대량생산에 적합하므로 의약, 식품, 화장품, 세제 등 여러 분야에서 관심이 고조되고 있다.

Sophorolipid는 항온, 항압에서 크게 lactone 또는 acid 형태로 존재하고 lipidic chain 조금씩 차이를 알 수 있다. 각각의 형태의 sophorolipid는 lipidic chain 말단의 카르보닐기에 당의 4"탄소와 결합되어있으면 lactone 형태라고 말하고 닫힌 구조로 되어있으며 결합이 없이 열린 형태로 되어있는 것은 lipidic chain 말단에 카르복실 산이 있는 acid 형태로 되어있다. 이것에 의해 각각이 갖는 여러 계면활성제로서의 특성이 다르고 또한 항균효과 또한 다른 것을 보여주고 있다.

sophorolipid 생산시 초기 glucose의 양과 2차기질, 그리고 미세 원소 등에 의해 형태가 조금씩 달라지는데 그에 따른 항균효과도 다르게 나타난다. 배양하는 방법에 의해 생성되는 sophorolipid의 형태가 달라지는데 sophorolipid는 배양기간중에 시간에 따라 생성되는 sophorolipid의 형태가 달라지므로 그것을 이용한 배양방법에 의해 생성되는 sophorolipid의 lactone acid ratio 또한 달라짐을 보여주고 있다.

본 연구에서는 sophorolipid 의 이 같은 특성을 이용하여 관련 분야에 적용하고자 기질이 다

른 sophorolipid 항균특성 및 lactone과 acid 형태의 sophorolipid 각각의 항균력을 조사하였고, 여기에서 나타난 항균효과가 높은 부분의 생산을 유도하고자 하였다.

Materials & Methods

1. sophorolipid 생산

본 실험에서 사용된 균주는 효모인 *Candida bombicola* ATCC 22214 이고, YM 사면배지 형태로 4℃에 저장, 한달을 주기로 계대 배양된 균주를 사용하였다. 2차기질은 soybean dark oil, corn oil, soybean oil, canola oil을 10%(wt/vol)씩을 사용하였다. 48시간 전 배양한 종균을 고압 멸균한 2.5L jar fermenter(Korea Fermenter Co., Korea)에 접종하여 유가식 배양으로 7일간 working volume, 1L; 온도 30℃; pH, 3.5; tip speed, 550rpm; aeration rate, 1vvm 상태로 운전하였다.

배양기간 동안 배지내 sophorolipid 생산량, 균체량과 잔존 glucose 농도를 측정하였다.

2. 유효 fraction의 분리

항균력이 좋은 canola oil 유래의 sophorolipid를 30cm길이와 부피 100mL의 column에 75g의 silica gel(Merck, grade 9385, 230-400 mesh 60A^o)을 이용하여 1.75mL/min의 속도로 전개용매(chloroform:methanol =4:1)를 이용 분리하였다. 각 fraction은 2분간격으로 받았으며 분석은 TLC/FID(IATRON, Japan))를 이용하였다.

3. 사용균주

항균실험에 사용된 균주는 *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Propionibacterium acne* DSM 18997이다.

4. 항세균 특성 조사

sophorolipid가 농도별로 첨가된 영양평판배지를 제조하여 전 배양된 각각의 균을 serial dilution하여 접종한 후 30℃, 48hr 배양하여 생성된 집락을 계수하여 최소저해농도(minimal inhibitory concentration)를 결정하였다. 여러기질로 생산된 sophorolipid 및 fraction으로 나뉜 canola oil sophorolipid를 실험 대상으로 삼았다.

5. 유효 fraction의 생산

① 1차기질 glucose에 따른 sophorolipid 생산형태

초기 glucose 첨가량을 달리하고 같은 조건으로 배양하여 생산되는 cell과 sophorolipid의 양과 생산된 형태를 비교하였다.

Sophorolipid는 상온 상압에서 lactone form과 acid form이 존재하는데 이 비율을 TLC/FID(Thin Layer Chromatography/Frame Ionization Detector, IATRON Co., Japan) IATRON MK-5와 FT-IR(Frouier Transform Infrared Spectrometer, JASCO Co., Japan)을 사용하여 측정하였다.

먼저 TLC/FID에 의한 분석에서 시료를 5mL의 methanol에 녹인 후 박층 크로마로드 CHROMAROD-SIII에 시료 1 μ l를 점적(spotting)하여 100mm의 높이로 50분간 전개하였다. 전개용매는 chloroform : methanol : water를 40 : 35 : 2의 부피비로 혼합하여 사용하였고, 분석조건으로서 H₂는 160ml/min, Air는 2.0 l/min, scan speed는 30초로 하였다. 결과 처리

는 IATROCODER TC-21(IATRON, Japan)을 사용하였으며 attenuation 64mV/F.S., chart speed 10.0cm/min으로 하였다.

FT-IR 분석에서는 수분을 제거한 sophorolipid, 0.01g을 KBr powder, 1g에 균일하게 혼합, 분쇄 후 적정량을 pellet 성형기에 넣고 7ton 압력하에서 1분간 성형하였다. 이 성형된 pellet 을 4,000-650cm⁻¹ 영역에서 측정하였다.

② 2차기질 oil에 따른 sophorolipid의 생산형태

유가식으로 공급되는 2차기질의 종류에 따른 lipidic chain의 형태를 비교하였다.

Sophorolipid 내에 결합한 지방산과 2차기질 oil의 지방산 조성을 비교하기 위해 1g의 sophorolipid에 0.5N KOH/methanol 15mL를 플라스크에 넣고 혼합 후 sand bath 100°C 이상에서 3시간 반응시켜 에스테르 결합을 파괴하고 다시 BF₃/methanol을 20mL 첨가해 90°C에서 15분간 반응시켜 fatty acid methyl ester를 형성시켰다.

이 용액에 석유에테르를 40mL 첨가한 후 층 분리시키고 상층(석유에테르층)에서 12mL을 취한 후 50mL 메스플라스크에 넣고 hexane으로 나머지를 채운다. 그 후 시료를 취해 SUPELOCOWAX 10(30m×0.53mm×1μm) column을 사용한 GC/FID(HP 5890, Hewlett Parkard)로 분석하였다.

Results and Discussion

Sophorolipid는 기질에 따른 생산량과 그 지방산의 조성 그리고 형태가 다르다는 것을 보였다. 생산량은 2차기질이 corn oil 일 때 가장 높은 수율인 180g/L가 생산되었으며 적게는 soybean oil을 기질로 하였을 때 30g/L정도의 생산량만을 보였다. Sophorolipid에는 크게 그 형태가 열린 형태인 acid form과 닫힌 형태인 lactone form을 가지고 있는데 Table 1.은 TLC/FID와 FT-IR을 이용하여 기질에 따른 생산형태를 보인 것이다. Dark oil과 corn oil은 그 생산형태가 비슷함을 보이며 canola oil을 2차 기질로 하였을 경우 그 생산 형태가 현격히 다른 것을 알 수 있다, 즉 대부분이 acid 형태로 생산되어짐을 보이고, 또한 Table 2에서와 같이 canola oil 유래 sophorolipid의 지방산조성이 다른 oil을 기질로 하였을 때와 매우 다름을 알 수 있다.

Table 3.은 sophorolipid에 따른 *P. acne*에 대한 항균효과를 보인 것이고 canola oil 유래 sophorolipid의 항균능력을 나타내는 MIC(Minimum Inhibitory Concentration)이 가장 낮음을 보이고 있다. 하지만 IC₅₀(50% colony inhibitory concentration)은 dark oil이나 corn oil에서 생산된 lactone ratio가 더 높은 sophorolipid에서 더 좋은 효과를 보이고 있다. Fig. 1은 lactone 형태의 sophorolipid가 항균효과가 0.5ppm미만의 MIC를 가짐으로 4ppm 정도의 MIC를 갖는 acid 형태보단 더 좋은 것으로 보인다.

Lactone 형태의 sophorolipid는 초기 glucose량, 2차기질의 형태, 통기량, 그리고 미세원소함유에 의해 ratio가 변함을 보였다. Table 4는 EDTA에 의해 lactone 형태의 sophorolipid의 생산이 유도됨을 보이고 있고, 0.1g/L의 EDTA를 배지에 함유했을 때 가장 좋은 수율과 lactonic fraction만 생산됨을 보여주고 있다.

Reference

1. Cooper, D. G., and D. A. Paddock.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **46**, 1426(1983)
2. Lang, S., E. Katsiwela, and F. Wagner.: *Fat Sci. Technol.*, **91**, 363(1989)

Table 1. Chemical composition of sophorolipid produced by second substrate

	Lactone form	Acid form
Corn oil	14.51	85.49
Canola oil	5.5	94.5
Soy bean dark oil	40.26	59.74
Soy bean oil	3.94	96.06

Table 2. Fatty acids composition of oils and sophorolipids

Oils and sophorolipids	Fatty acid(%)				
	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3
Corn oil	9.75	1.65	24.65	61.95	0.59
Sophorolipid	7.83	0.67	27.41	56.50	2.23
Canola oil	5.87	1.67	51.98	28.95	8.74
Sophorolipid	8.78	2.23	50.70	26.38	3.68
Soybean dark oil	6.50	2.63	16.10	65.41	5.78
Sophorolipid	9.20	4.26	22.13	51.10	4.87
Soybean oil	10.30	2.63	16.10	56.13	6.22
Sophorolipid	8.27	4.26	22.13	60.88	0.51

Table 3. MIC of sophorolipids against acne

Sophorolipids	MIC(mg/L)
Corn oil	1.5
Canola oil	0.5
Soybean oil	16
Soybean dark oil	2

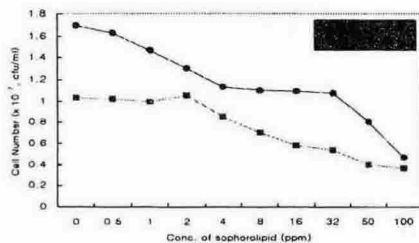


Fig. 2. Effect of sophorolipid concentration on the growth of *Propionibacterium acne*.

Table 4. Lactonic sophorolipid production effect by EDTA

	DCW	잔류 oil	crude sophorolipid	Lactone/ acid ratio
Blank	28	16	106.5	27.65/73.35
ENa	24	49.5	58.5	74.2/25.8
0.05g/L				100/0
ENa	45	17	113.5	100/0
0.1g/L				100/0
ENa	26	53.5	62.5	62.09/37.91
0.15g/L				100/0
ENa	22	69	12	100/0
0.2g/L				100/0
ENa	11	69	11	100/0
0.25g/L				100/0
ENa	1	95	2	0
0.3g/L				0