

유류오염의 미생물학적 제어

이상준 · 차미선 · 이근희
(부산대학교 미생물학과)

Bioremediation of petroleum pollution

Sang-Joon Lee · Mi-Sun Cha · Keun-Hee Lee
(Department of Microbiology, College of Natural Sciences,
Pusan National University, Pusan 609-735, Korea)

Abstract

As basic study for purpose bioremediation in oil-contaminated environment, Primarily, we isolated biosurfactant producer- strains utilized of oil-agar plate, and measured surface tension and emulsifying activity. We investigated in oil-contaminated soil and sea water. In this laboratory, *Pseudomonas* sp. EL-012S strain isolated from oil-contaminated soil was able to product novel biosurfactant under the optimal culture condition. Its condition was *n*-hexadecane 2.0%, NH_4NO_3 0.4%, Na_2HPO_4 0.6%, KH_2PO_4 0.4%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02%, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.001%, $\text{FeSO} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.001%, initial pH 7.0 and aeration at 30°C, respectively. This biosurfactant was produced in both late-exponential and early-stationary phase. The biosurfactant from *Pseudomonas* sp. EL-012S was composed of carbohydrate, lipid and protein. The purified-biosurfactant was examined two (biosurfactant type I, II) with the silica gel G60 column chromatography and the purified biosurfactant confirmed thin layer chromatography, high performed liquid chromatography and gas chromatography. The biosurfactant type I

involved in carbohydrate-lipid-protein characteristics lowered surface tension of water to 27dyne/cm and interfacial tension 4.5dyne/cm against to n-hexadecane and the biosurfactant type II involved in carbohydrate lipid characteristics lowered surface tension of water to 30dyne/cm and interfacial tension 8dyne/cm against to n-hexadecane. Specially type I had the properties such as strong emulsifying activity, emulsion stability, pH-stability, thermo-stability, high cleaing activity and forming ability.

서 론

유류는 주요 에너지원으로 가장 널리 사용되고 있으며 다량의 수요에 따른 생산, 운반, 저장 및 사용과정 중 유출되어 대기, 토양 및 해양의 심각한 오염물질로 대두되고 있다. 이러한 유류 유출사고는 정유회사를 비롯한 관련기관 뿐만 아니라 국민들의 관심도 지대하다. 그러나 현행의 유류오염에 대한 방제기법은 2차오염물질의 생성 등 문제점이 많이 발생하고 있다. 이러한 유류오염에 있어 가장 이상적인 방법은 미생물을 이용한 유류의 생물학적 분해로, 많은 연구가 진행되어 왔다. 따라서 본 연구에서는 만성적 유류오염지역인 부산해안 일대와 인근 토양 및 주유소 일대의 토양을 시료로 선정하여 환경조사와 더불어 석유 탄화수소에 대한 분해능을 가지는 세균을 분리한 후 석유탄화수소의 구조적 특성에 따른 조성 성분 각각에 대한 분해활성을 검토하였다. 그리고 유류분해를 위한 최적조건 및 분해특성을 조사함으로써 그 유용가치가 높은 석유탄화수소 분해 세균의 분리를 통해 미생물 유전자원을 확보하고자 하였다. 또한 연구를 통해 분리된 유류분해 미생물들의 유류분해 유전자를 검색하여 그 특성을 규명하고 유전공학적인 기법을 이용하여 분해활성이 증대된 균주를 개발코자 한다. 더 나아가 석유류 분해균주가 생산하는 생물계면활성제(biosurfactant)의 개발을 시도하고자 한다. 생물계면활성제는 소수성부분과 친수성 부분을 동시에 가지고 있어 계면의 표면장력을 낮추는 능력이 있는 물질이다. 계면활성제의 용도는 의약품, 식음료, 화장품, 농약, 세제 등 산업분야와 일상생활의 생필품에 이르기까지 다양하게 사용되고 있다. 최근 국내의 계면활성제 시장은 1.4조원의 규모이며 그 중 약 50%를 수입하고 있다. 이러한 합성 계면활성제는 그 자체가 난분해성 혹은 독성을 가지거나 생물학적 분해가 가능한 물질이라도 대사 중간 산물이 더욱 독성을 야기하고, 대개의 폐수 처리공정이나 상수처리과정에서 제거가 되지 않는 실정이어서 수생생태계에 유출되어 심각한 환경오염문제를

야기하고 있다. 본 연구에서는 유류 분해 미생물이 생산하는 생물계면활성제를 분리, 정제하고 물리화학적 특성을 규명하므로서 새로운 생물유화제의 개발을 시도하고자 한다.

재료 및 방법

1. 유류분해 미생물의 분리

부산시내의 주유소 일대와 영도, 광안리, 해운대 부근의 항만수역 등 만성적인 유류오염지역으로 보이는 200여곳의 토양 및 해수를 시료로하여 유류 분해 미생물을 분리하였다. 분리에 사용한 배지는 인공해수배지 및 토양 미생물 분리용 배지였으며, 고체배지는 액체배지에 agar 1.5%와 소량의 silica gel을 첨가하여 oil-agar plate를 만들어 사용하였다. 탄소원 및 에너지원으로 0.2~2.0 %의 crude oil을 첨가하였다.

2. 생육도 측정

생육도의 측정은 실험여건에 맞추어 생균수 측정법(cell count assay) 및 균체량(biomass) 측정법, spectrophotometer에 의한 흡광도(O.D. 660nm) 측정법을 병행하여 사용하였다

3. 표면장력 측정 및 계면장력 측정

표면장력 및 계면장력의 측정은 tensiometer(Fisher Scientific surface tensiomat[®] 21, U.S.A)를 이용하여 백금 고리법으로 측정하였다.

4. 유화활성 측정

배양액을 20 mM citrate-phosphate buffer로 휘석하여 10 ml로 맞추고, 유화기질을 0.1 ml 첨가하여 Shaking water bath에서 25℃, 50-60 rpm으로 10분간 섞은 후 150 rpm에서 1시간 동안 왕복 진탕한다. 불안정한 유화기름에 의한 오차를 최소화하기 위해 10분 방치 후 540nm에서 O.D.를 측정한다.

5. 생물계면활성제의 농도 측정

생물계면활성제의 농도측정은 생물계면활성제의 상대적인 생산량을 나타내는 Critical micelle dilution factor(Fcmc) 방법에 의하여 측정하였다.

6. 생물계면활성제 생산 최적조건의 검토

유류분해를 극대화하기 위한 최적배지 조건의 검색을 위해 C:N비 및 기타 무기 염의 영향, pH의 영향 등에 대해서 조사한다.

7. 생물계면활성제의 분리

배양액을 4℃에서 12000rpm으로 30분간 2회 원심분리 한 후 filter paper로 걸러 균체를 완전히 제거한다. 이 배양 상등액을 대상으로 산 침전, 유기용매 추출, Ultrafiltration을 거쳐 column chromatography 등을 통해 생물계면활성제를 분리 해낸다.

8. 생물계면활성제의 구조분석

분리 정제된 생물계면활성제는 TLC, HPLC를 통하여 순도 검정을 거친 후 FT-IR spectrometry analysis, NMR 등을 통해 구조 분석을 하고 기존의 계면활성제와의 비교를 통해 상품화 가능성을 조사한다.

9. 생물계면활성제의 물리·화학적 성질 검토

정제된 생물계면활성제의 유화안정성, 기포력, 분산력 등의 물리화학적 성질을 기존의 합성계면활성제와 비교한다.

10. 토양 유류오염에 대한 생물계면활성제의 첨가 효과

생물계면활성제의 효능을 직접적으로 알아보기 위하여 임의적으로 토양 시료를 채취하여, 인위적으로 오염시키고, 시간의 경과에 따른 변화 양상을 조사하였다. 시료의 채취는 2주일 간격으로 실행하였으며, 분석을 위한 전처리 과정은 다음과 같다. crude oil의 회수는 일단 토양을 잘 섞은 후 5g의 토양을 10ml의 chloroform으로 추출하여 먼저 작성한 표준곡선에 따라 흡광도를 측정하여 그 감소율로 분해능을 관찰하였다. 즉, 배양한 토양의 시료를 잘 섞어서 5g 정도 분해칼대기로 옮긴 후 표준물질로 stearyl alcohol을 첨가하여 동량의 chloroform으로 3회 반복추출한 후, 무수황산 나트륨 2g과 copper 5mg을 올린 여과지(Whatman filter paper No. 4)에 걸러 수분과 황성분을 제거하였다. 추출된 잔류유류의 chloroform 성분은

evaporator로 농축한 후, chloroform : hexane(1:1(v/v)) 20ml를 넣고 분핵깔대기로 옮긴 후 추출하였다. Aliphatic hydrocarbon의 분석은 gas chromatography에서 분석하였고, 세균에 의한 유류분해 여부의 확인에 사용되는 C17/Pristane과 C18/Phytane ratio를 분석지표로 삼았다. Aromatic hydrocarbon의 분석은 일정량의 추출 유류를 spectrophotometer로 overlayscanning을 실시한 후에 standard curve로부터 분해된 aromatic hydrocarbon의 양을 측정하였다.

결과 및 고찰

1. 유류분해 미생물의 분리 및 공시균의 선정

해수시료에서 분리된 균주들은 균의 생육도 및 유화활성이 높은 반면, 표면장력은 낮았으며, 토양시료에서 분리된 균주들은 균의 생육도 및 표면장력 감소능은 우수한 반면, 유화활성은 해수시료에서 분리된 균주들 보다 비교적 낮은 분포를 나타내었다(table 1). 이들 중 EL-012S 균주가 배양 4일 후 표면장력이 35dyne/cm로 현저히 감소하였고, 유화활성도 타 균주에 비해서 월등히 높아 공시균주로 선정하고 동정한 결과 *Pseudomonas* sp.로 판정되어 *Pseudomonas* sp. EL-012S로 명명하였다.

2. 생산최적조건에 있어서 생육시간별 생물계면활성제 생산

Pseudomonas sp. EL-012S의 생물계면활성제(biosurfactant) 최적 생산배지 조건은 Table 2와 같이 결정되었으며, 생물계면활성제 최적생산조건에 맞추어, 시간에 따른 생물계면활성제의 생성을 조사한 결과는 Fig. 1에서와 같다.

유화활성도는 균체생육과 비례하여 증감되는 것으로 나타났으며, 표면장력 및 dilution factor(F_{cmc})는 정지기 초기에 최대로 다타났다. 따라서, *Pseudomonas* sp. EL-012S는 정지기 초기에 최대의 생물계면활성제 생산능을 나타내고 있음을 알수 있다. 또한, 배양시간에 따른 pH의 변화와 표면장력 감소능과 유화활성과의 관계(Fig. 1)에서 보는 바와 같이 생물계면활성제 생산능 배양 말기에 가서는 pH가 4.0 ± 1.0 로 낮아졌다. 이것은 *Pseudomonas* sp. EL-012S의 생물계면활성제 생산으로 인하여 pH가 저하되는 것으로 사료되며, 연속배양시 pH를 조절해줌으로서 대량생산이 가능할 것으로 사료된다.

Table 1. Cell growth, emulsifying activity and surface tension of primarily screened strains in oil-contaminated sites

Sampling site & *Isolated strain numbers	Cell Growth (CFU/ml)	Emulsifying activity (O.D. at 540nm)	Surface tension (dyne/cm)
^a EL-008Soil	1.2×10^6	1.231	42
^a EL-012Soil	3.2×10^9	2.452	35
^a EL-032Soil	2.1×10^9	0.682	38
^a EL-051Soil	1.8×10^6	0.826	42
^a EL-057Soil	2.4×10^6	0.973	48
^a EL-079Soil	3.2×10^6	0.574	45
^a EL-082Soil	3.6×10^9	0.735	40
^a EL-093Soil	2.4×10^6	1.224	48
^a EL-098Soil	2.0×10^6	0.883	50
^a EL-104Soil	1.7×10^6	0.998	42
^a EL-145Soil	1.9×10^6	1.023	46
^a EL-002Ocean	3.0×10^6	2.532	52
^a EL-024Ocean	2.2×10^6	2.423	54
^a EL-028Ocean	1.8×10^6	2.387	48
^a EL-038Ocean	1.9×10^6	1.243	50
^a EL-042Ocean	2.5×10^6	2.784	54
^a EL-063Ocean	2.4×10^6	2.448	48
^a EL-077Ocean	1.9×10^6	2.453	45
^a EL-079Ocean	2.2×10^6	2.445	40
^a EL-089Ocean	2.6×10^9	1.094	38
^a EL-101Ocean	2.8×10^6	2.394	42
^a EL-112Ocean	2.2×10^6	2.452	52
^b EL-055Non-sea	3.26×10^9	0.234	68
^b EL-076Non-sea	0.62×10^9	0.543	62
^b EL-014Non-Ocean	2.23×10^9	0.432	70
^b EL-014Non-Ocean	2.71×10^9	0.378	68

* ; In case of biosurfactant producer strains cut off higher surface tension 50dyne/cm.

a : formed pale-halo circle(biosurfactant producer strains)

b ; not formed pale-halo circle(non-biosurfactant producer strains).

Table 2. The optimum culture condition for the biosurfactant production

Medium	n-Hexadecane	2.0%
	NH ₄ NO ₃	0.40%
	Na ₂ HPO ₄	0.60%
	K ₂ HPO ₄	0.02%
	KH ₂ PO ₄	0.03%
	MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.04%
	mineral salts :CaCl ₂ · 6H ₂ O, FeCl ₃ · 6H ₂ O, MnSO ₄ · 5H ₂ O, ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.001%
pH	7.0	
Other conditions	Temperature	30°C
	Agitation	200rpm (20Rev. × 6cm strock)
	Culture time	4 days

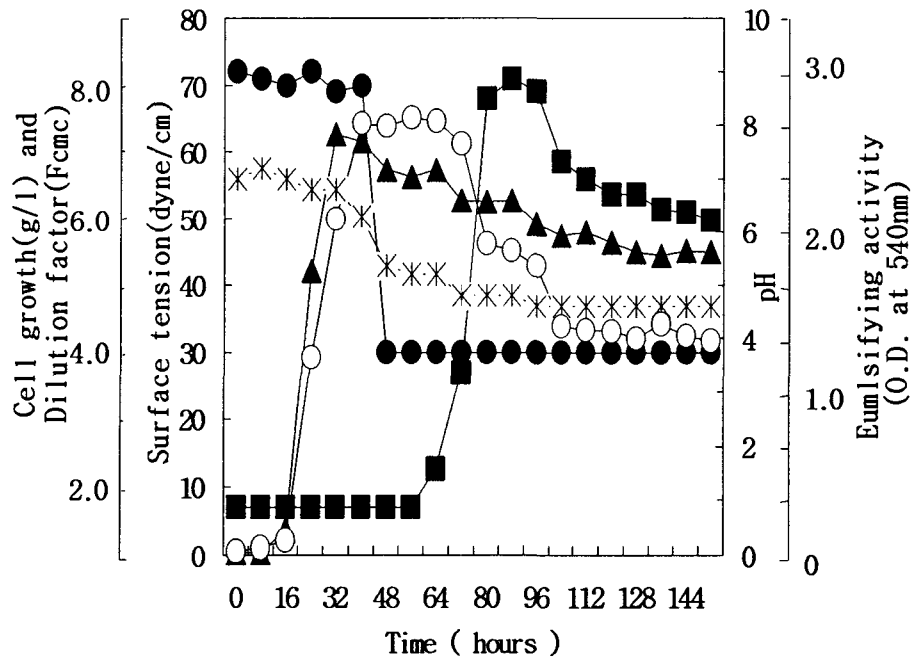


Fig. 1. Cell growth and production of biosurfactant from *Pseudomonas* sp.

EL-012S on the optimal medium at 30°C

- ; surface tension, -■- ; dilution factor(Fcmc), -▲- ; celll growth,
 -*-* ; pH, -○- ; Emulsifying activity

3. 생물계면활성제의 정제 및 구조 분석

Pseudomonas sp. EL-012S가 생산하는 생물계면활성제의 정제를 위해 5 l의 jar fermentor에 *Pseudomonas* sp. EL-012S를 3일간 배양하여, 산 추출법 및 유기용매 추출법으로 crude biosurfactant를 정제한 후에, silica gel column chromatography와 sephadex G-15 gel filtration을 행하였다(Fig. 2). 정제된 생물계면활성제는 TLC와 HPLC로 순도 검정함으로 단일 물질로 정제되었음을 확인하였으며, 그 결과 생물계면활성제 type I과 type II를 얻었다.

정제과정을 통하여 얻어진 crude biosurfactant는 암갈색을 띄고 있었으며, 1 l 배양시 약 4g정도를 회수할 수 있었다. 각 정제 단계에서 생물계면활성제의 활성의 변화를 조사한 결과는 Table 3에 나타내었다. 각각의 정제 단계에서 생물계면활성제의 활성을 나타내는 지표인 유화활성과 표면장력 감소능은 거의 일정하게 유지되고 있었으며, 최종적으로 회수된 crude biosurfactant의 유화활성 및 Dilution factor의 값은 각각 26.4 unit와 36.4unit로 나타났다. 이때의 회수율은 42% 정도였다.

Table 3. Distribution of biosurfactant at each isolation steps.

Isolation steps	Surface tension (dyne/cm)	Dilution factor(Fcmc)	Emulsifying activity (unit/ml)		
			n-hexadecane	Crude oil	Soybean oil
Culture broth	30	7.8	2.741	1.425	2.045
Acid precipitant	30	12.2	5.562	4.864	4.198
Culture broth except acid precipitant	30	4.3	1.263	1.098	1.127
Lower phase (Organic phase)	30	15.4	12.245	3.154	8.015
Upper phase (Water phase)	42	2.0	4.824	1.516	2.268
Extracted powder (Crude biosurfactant)	30	36.4	26.431	6.215	12.981

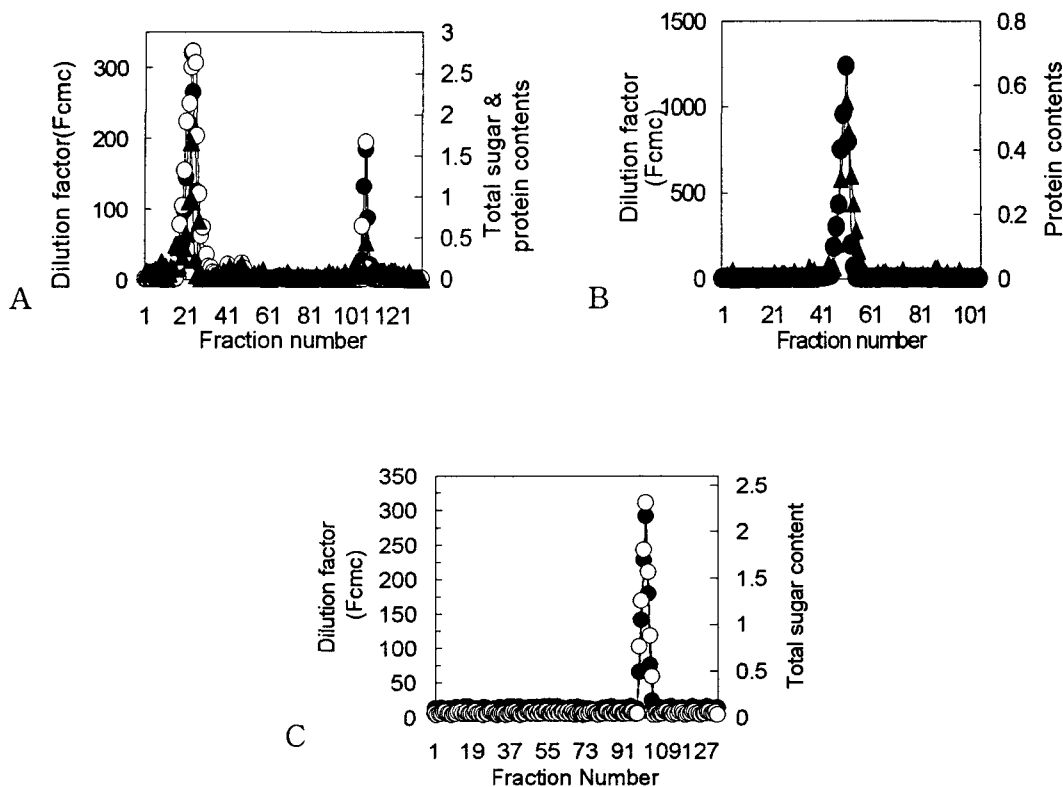


Fig. 2. Elution patterns of column chromatography for purification of biosurfactants.

A ; Elution diagram of first silica gel G60 column chromatography. Concentration biosurfactant solution 3ml was loaded onto a column equilibrated with chloroform/methanol(10:1) and eluted with same solvent. column size ; 2.5×100cm, flow rate ; 30ml/hr, fraction volume : 5ml, B ; Elution diagram of secondary sephadex G-15 gel filtration column chromatography. Fraction solution from first column chromatography fraction 17~29 was evaporated and then dissolved in 20mM Tri-HCl buffer(pH 8.0), This solution filtrated by membrane filter paper(0.2 μ m pore size). This filtered solution was applied onto a column of equilibrated with 20mM Tri-HCl buffer(pH 8.0). column size ; 1.5×80cm, flow rate ; 10ml/hr, fraction volume ; 3ml, C ; Elution diagram of biosurfactant type II from secondary silica gel 60 column chromatography. Fraction solution from first column chromatography fraction 106~110 was evaporated and then dissolved chloroform/methanol/acetic acid (65/25/4). This solution filtrated by membrane filter paper (0.2 μ m pore size). This filtered solution was applied onto a column equilibrated with same solvent. column size ; 1.5× 80cm, flow rate ; 20ml/hr, fraction volume; 3ml

-●- ; Critical micelle dilution factor(Fcmc),
 -○- ; Total sugar content (O.D. at 490nm by phenol-sulfuric acid method)
 -▲- ; Total protein (O.D. at 750nm by Lowry method)

4. 생물계면활성제의 구조분석

정제된 생물계면활성제 type I, II를 각종 발색반응, UV-spectrophotometer analysis, FT-IR spectrometry analysis를 실행한 결과 biosurfactant type I은 당과 lipid 및 protein을 함유하고 있는 polymeric biosurfactant인 것으로 추정되었으며, 생물계면활성제 type II는 당과 lipid가 결합된 rhamnolipid인 것으로 추정되었다. 또한, 생물계면활성제 type I은 SDS-PAGE상에서 단일 band로 확인 되었으며, densitometry scanning 결과 분자량이 11,000정도로 측정되었다. 정제된 생물계면활성제들의 분자량을 확인하기 위하여 sephadex-LH 20으로 gel filtration 한 결과 생물계면활성제 type I은 분자량이 11,000으로, type II는 분자량이 5,000정도 되는 것으로 측정되었다.

정제된 생물계면활성제를 alkali 가수분해하였을 때, 생물계면활성제 type I의 경우 여러개의 lipid가 확인되었으며, 당으로는 rhamnose가 확인 되었다. 생물계면활성제 type II의 경우에는 3개의 lipid가 확인 되었으며, 당으로서 rhamnose가 확인되었다.

5. 생물계면활성제의 물리 화학적 성질 검토

정제된 생물계면활성제의 물리·화학적 특성을 조사한 결과 생물계면활성제 type I, II 모두 dichloromethane에서 용해도가 가장뛰어났으며, 표면장력 에서는 생물계면활성제 type I은 30mg/l에서 27dyne/cm으로 나타났고, type II는 80mg/l에서 30dyne/cm으로 나타났다. 또한, n-hexadecane에 대한 계면장력을 측정한 결과 type I의 경우에는 12mg/l의 농도에서 4.5dyne/cm으로 나타났으며, type II의 경우 20mg/l의 농도에서 8.0 dyne/cm으로 나타났다. 또한, 열 및 pH NaCl, calcium ion에 대한 영향을 살펴본 결과 생물계면활성제 type I, II 모두 비교적 안정한 값을 나타내었다. 유화활성 및 유화 안정성은 생물계면활성제 type II가 type I 보다 우수하게 나타났으며, 다른 시판되고 있는 합성계면활성제와 비슷한 결과를 나타내었다. 그외, 기포력 및 안정도 측정, 세정력 측정, 분산력 측정, 습윤력(침투력) 측정에서 생물계면활성제 type I은 기포력 및 세정력이 뛰어났으며, type II는 분산력 및 습윤력이 뛰어났다.

6. 유류오염에 대한 생물계면활성제의 첨가 효과

Crude oil로 오염된 토양에 대한 생물계면활성제의 첨가 효과에서는 crude biosurfactant와 생물계면활성제 type I 을 첨가했을 때 모두에서 EL-012S주가 유류를 생분해시키는데 촉진 효과가 있는 것으로 나타났다.

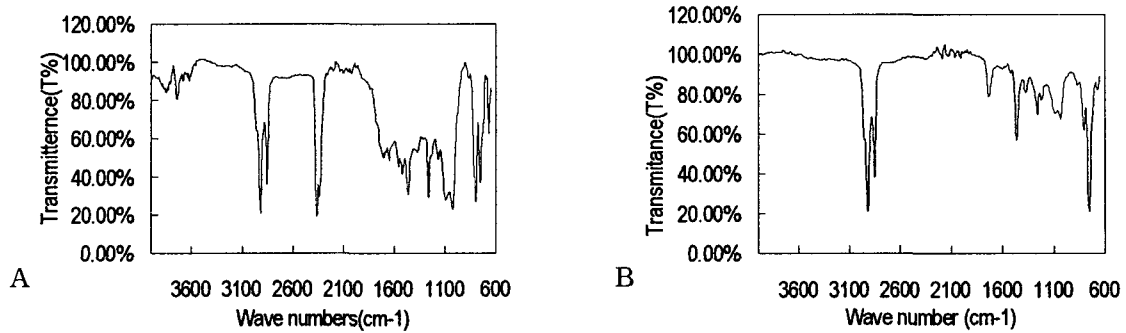


Fig. 3. The infrared spectrum of the biosurfactants.
A : biosurfactant type I , B ; biosurfactant type II

Table 4. Identification of biosurfactant by colorimetric method

Substrate	Detection	Results	
		biosurfactant type I	biosurfactant type II
Carbohydrate	Diphenylamine reagents	-	-
	α -Naphtol-sulfuric acid	-	-
	Phenol-sulfuric acid	+	+
	Anthrone	+	+
	Somogyi-Nelson arsenomolybdate	-	-
	Elson-Morgan reagent	+	-
Esterified fatty acid	Hydroxylamine-ferric chloride reagent	+	+
Lipid	Rhodamine 6G	+	+
Amino acid	Ninhydrine	+	-
Protein	Lowry Method	+	-

Table 5. Identified carbohydrate of biosurfactants after alkaline hydrolysis of biosurfactants

Detection	After alkaline hydrolysis		After acid hydrolysis	
	Biosurfactant		Biosurfactant	
	type I	type II	type I	type II
Diphenylamine reagents	-	-	-	-
α -Naphthol-sulfuric acid	+	-	+	-
Phenol-sulfuric acid	+	+	+	+
Anthrone	+	+	+	+
Somogyi-Nelson arsenomolybdate	+	-	+	-
Elson-Morgan reagent	+	+	+	+

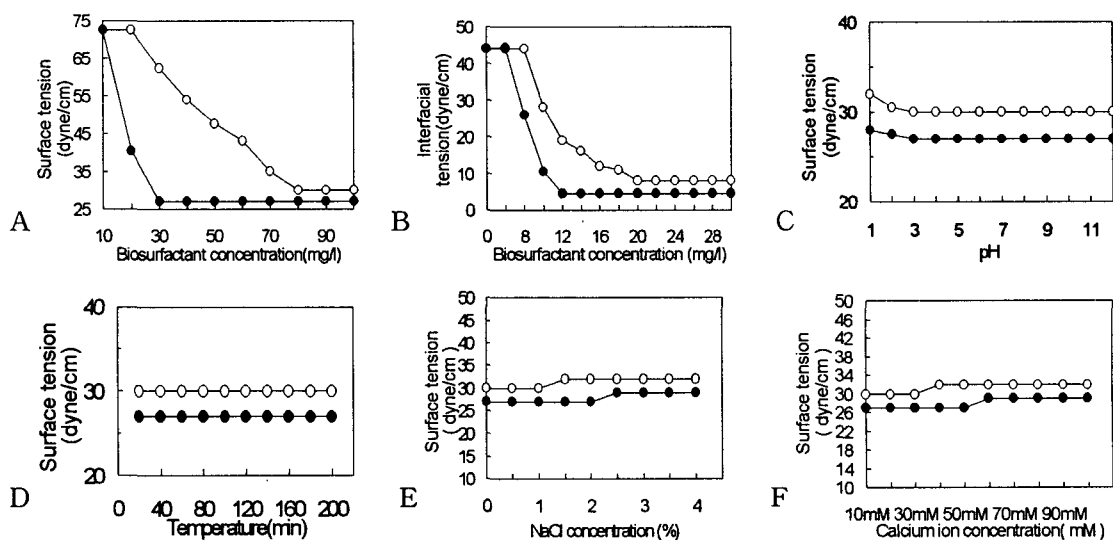


Fig. 4. Surface activity of the purified biosurfactants versus condition.

A ; Surface tension measurements in various concentration of purified biosurfactant added to slightly basic water(pH8.0), B ; Interfacial tension measurements in various concentration of purified biosurfactant added to slightly basic water(pH8.0), C ; Effect of pH on the biosurfactant stability, D ; Effect of temperature on the biosurfactant stability, E ; Effect of NaCl concentration on the biosurfactant stability, F ; Effect of calcium concentration on the biosurfactant stability.

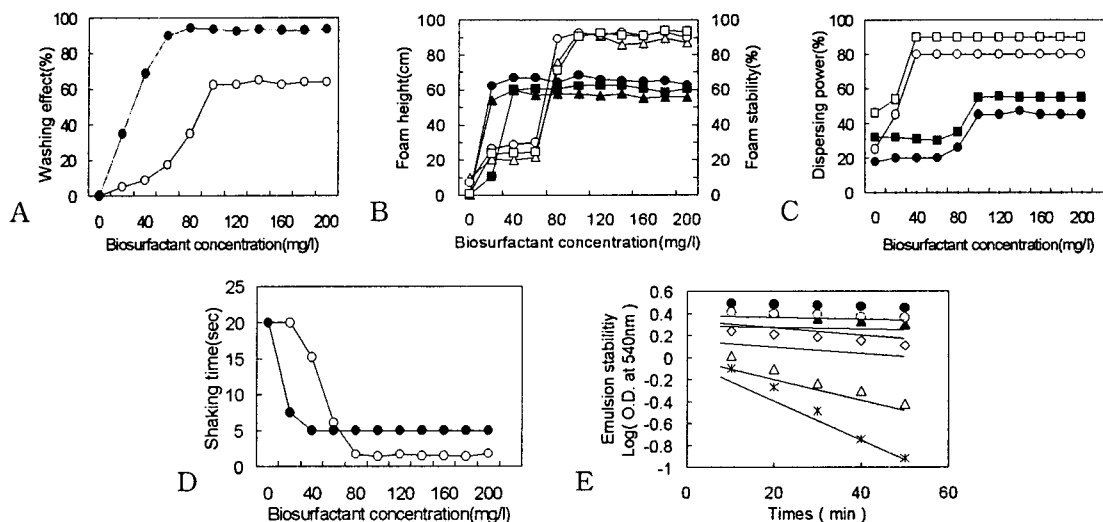


Fig. 5. Physicochemical properties of biosurfactants produced by *Pseudomonas* sp. EL-012S

A ; Rose-Miles foam height and stability after 5 & 10 min (cm) versus concentration of biosurfactants at 25°C, B ; Dispersan power of biosurfactants in carbon black, (-○-) or α -Cu phthalocyanine blue-□-, C ; Washing effects versus concentration of biosurfactants concentration, D ; Wetting ability versus concentration of biosurfactants at 25°C, E ; Washing effects of various surfactants.(A ; AEO, B ; AES, C ; formal cleaner used washing power measurements, Marketing washing solvent((sparkle) D ; Bio solve 6%(hydrocarbon mitigation agents) ; biosurfactant type I, G : biosurfactant type II.), E ; Stabilization of emulsion by purified biosurfactants & synthetic surfactants H ; Emulsifying substrate was n-hexadecane. The absorbance 540nm(A_{540}) of the emulsion was determined at the indicated times. After initial 10min holding period, absorbance readings were taken every 10min.. The log of the absorbance was then plotted versus time, and the slope(decay constant, K_d) of the line was calculated. -●- ; Biosurfactant type I -○- ; Biosurfactant type II, -▲- ; Triton X-100. -◇- ; Tween 60, -△- ; Span 85, -*- ; Sodium dodecyl sulfonate(SDS), in α -Cu phthalocyanine blue. -○-

Table 5. Reduction rate of aliphatic and aromatic hydrocarbons after incubation with the sample A, B, C, D, E.

	Reduction rate(%) of	
	Aliphatic hydrocarbons	Aromatic hydrocarbons
	(C_{17} /pristane : C_{18} phytane ratios)	
Control	0	0
A	24	7
B	52	43
C	21	15
D	42	31
E	32	13
F	72	54
G	32	17
H	53	48

Reduction rates were calculated as following :

$$\frac{\text{the remaining amounts of aliphatic or aromatic hydrocarbons in A, B, C, D, E samples experiment at intervals of 4 weeks incubation}}{\text{the remaining amounts of aliphatic or aromatic hydrocarbons in the control experiment at intervals of 4 weeks incubation}} \times 100(\%)$$

Control ; added to 4% crude oil, **A** ; added to 4% crude oil + 10% cell suspended solution, **B** ; added to 4% crude oil + 10% cell suspended solution + biosurfactant type I (100mg/kg), **C** ; added to 4% crude oil + 10% cell suspended solution + biosurfactant type II (100mg/kg), **D** ; added to 4% crude oil + 10% cell suspended solution + crude biosurfactant (100mg/kg), **E** ; added to 4% crude oil + 10% cell suspended solution + N · P solution, **F** ; added to 4% crude oil + 10% cell suspended solution + biosurfactant type I, + N · P solution, **G** ; added to 4% crude oil + 10% cell suspended solution + biosurfactant type II, + N · P solution, **H** ; added to 4% crude oil + 10% cell suspended solution + crude biosurfactant + N · P solution.

* N · P solution was composed to NH_4NO_3 0.40%, Na_2HPO_4 0.60%, K_2HPO_4 0.02%, KH_2PO_4 0.03%.

참 고 문 헌

- 이영, 이상엽, 양지원, 박창호, 1996, 생물계면활성제, 생물화공 제10권 제2호, 53-63.
- C. E. Zobell, 1992, "Proc. Joint Conference on Prevention and control of Oil Spills", American Petroleum Institute, New York, 1986, 317-326.
- Kosaric, N., N. C. C. Gray, and W. L. Cairns, 1987, Biotechnology and surfactant Industry, Biosurfactant and Biotechnology, 1-45.
- Armin Fiechter, 1992, Biosurfactants : Moving towards industrial application, Tibtech. Rew., 10, 208-217.
- J. Y. Park, I. S. Park, etc., 1998, Emulsification of bunker-C oil by a marine bacterium *Arthrobacter* sp. M-1220, Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng., 16, 384~388
- Gutnick, D. L., and E. Rosenberg, 1977, Oil tankers and pollution: a microbiological approach, Ann Rev. Microbiol., 31, 379~396
- Aheam, G. P., Surfactants for oil recovery, J. Am. Oil Chem. Soc., 46. 540A-580A
- Kim, D. W., M. J. Kim, and S. M. Kang, 1995, Purification and properties of

- Biosurfactant from *Pseudomonas aeruginosa* . Korean J, Appl. Microbiol. Biotechnol., 23, 337-345
- Beersteacher, E. 1954, Petroleum Microbiology, Elsevier, Houston
- 김상중, 1988, 계면활성제 생산 미생물, 미생물과 산업, 제 14권, 37-40.
- 김은기, 1991, Biosurfactant의 개발, 생물화공, 제 5권 제 3호, 31-38.
- Busscher. H. J., Van der Kuiji Booiij, M., Van der Mei, H. C., 1996, Biosurfactant from thermophilic dairy streptococci and their potential role in the fouling control of heat exchanger plates, J. Ind. Microbiol., 6.
- Lee, S. J. 1993, Characteristics of the Rhamnolipid Biosurfactant Prepared with *Pseudomonas sp.* 13 Ph. D. Thesis. Dept. of Chem. Eng., Chun Buk National Univ, Chunjoo.
- Lee, K. H. 1993 ,Carbon Mass Balance Analysis of Biosurfactant, Sophorose Lipid, Fermentation by *Torulopsis bombicola*. Ph. D. Thesis. Dept. of Biotechnology, KAIST, Daejon.
- Lee, J. M. 1993, The Studies on Biosurfactant Producing by Microorganism. M.S. Thesis, Dept. of Microbiology, Pusan National Univ, Pusan.