

소포로리피드(미생물계면활성제)의 생산과 응용

조 귀 준 · 김 영 범 · †김 은 기
인하대학교 생물공학과 생물환경소재실
(접수 : 1999. 12. 2., 게재승인 : 1999. 12. 17.)

Production and Application of Sophorolipid, A Microbial Surfactant

Kwi Joon Cho, Young Bum Kim, and Eun-Ki Kim†
Department of Biological Engineering, Inha University, Inchon 402-751, Korea
(Received : 1999. 12. 2., Accepted : 1999. 12. 17.)

Microbial surfactants are more effective and environmentally friendly than many synthetic surfactants. Sophorolipid, a glycolipid type microbial surfactant, is produced from *C. bombiocola*. Cultivation techniques to increase the productivity have been developed using various carbon sources and reactor setup, reaching its concentration upto 100-300 g/L. Due to its high productivity and non-toxicity, sophorolipid became one of the most promising alternative to synthetic surfactants. Fermentative production of sophorolipid depends primarily on the carbon sources, such as glucose and vegetable oils, and nitrogen sources. Chemical modification of the sophorolipid produces various derivative with different physical properties including hydrophilic-liphophilic balance(HLB), emulsion formation, surface tension and dispersing ability. Commercial potentials of sophorolipid in the cosmetic, health care and environmental clean-up industries have been discussed.

Key Words : sophorolipid, biosurfactant, surfactant

서 론

미생물계면활성제(BIOSURFACTANTS)

소포로리피드는 효모(*Candida bombiocola*)에서 생산되는 대표적인 미생물계면활성제(microbiol surfactant, biosurfactant)이다. 미생물계면활성제란 효모, 곰팡이, 박테리아 등 미생물에 의해 생산되는 생분해성 계면활성제를 의미하며 균주에 따라 세포외 또는 세포내에 생성이 된다. 미생물계면활성제가 화학합성계면활성제에 대해 가지는 장점은 첫째, 무독성이며 생분해가 용이하고 따라서 이를 사용시 이차오염원이 안된다는 것이다. 둘째, 기존의 방법으로는 합성하기 어려운 복잡한 화학구조로 인해서 특수한 목적으로 사용될 수 있다는 점이다. 셋째, 표면장력 저하능력, 온도, pH에 대한 안정성 등 계면활성제의 물리·화학적 성능면에서 기존의 화학합성 계면활성제와 거의 대등한 결과를 보인다는 점이다(Table 1). 전세계 계면활성제 시장은 1988년에 20억불, 1994년 약 94억불로 불과 6년 사이 400% 이상의 성장률을 기록했으며 그 수요는 해마다 증가하는 추세에 있다. 그러나 이들 대부분이 자체적으로 생분해가 안되어 환경오염의 원인이 되고 있는 화학합성계면활성제로 보고되고 있다. 따라서 이러

Table 1. Comparison of biosurfactants with synthetic surfactants..

Surfactant	Surface tension (mN/m)	Critical micelle Concentration (mg/L)	Cost ^a (\$/kg)
Biosurfactants (organism)			
<i>R. erythropolis</i>	37	15	18.8
<i>P. aeruginosa</i>	29	15	9.1
<i>T. bombiocola</i>	37	82	4.3 ^b
<i>B. subtilis</i>	27	11(0.01 mM)	31.3
Anionic surfactants			
Detergent alkylate dodecylbenzene(LABS)	47	590(1.2 mM)	1.6
Sodium lauryl sulfate (SLS or SDS)	37	2023-2890 (7-10 mM)	1.5(30%) 40(98%)
Span 60		80	7

^a 1999 US dollars, based on raw material costs as 80% of total cost and assuming glucose, yeast extract or soy bean oil as substrates.(Ref. 1)

^b Based on oil from industrial byproduct.

한 문제점을 무독성이며 생분해가 용이한 환경친화적 미생물계면활성제로 대체함으로써 환경오염을 감소시킬 수 있고, 더 나아가 미생물계면활성제는 화장품, 의약품, 식품, 세제, 펄프 및 제지, 원유의 2차 회수, 환경정화 등 각 분야에서 광범위하게 응용될 수 있다.

미생물계면활성제의 종류와 특성

미생물계면활성제의 소수성부분은 대개 선형 포화 탄화수소로

† Corresponding Author : Department of Biological Engineering,
Inha University, Inchon 402-751, Korea
Tel : 032-860-7514, Fax : 032-875-0827
E-mail : ekkim@inha.ac.kr

이루어지며 친수성부분은 당 또는 아미노산으로 구성된다. 미생물계면활성제의 구분은 생산균주에 의해 ① bacterial surfactants, ② yeast surfactants, ③ fungal surfactants로 크게 구분할 수 있으며 계면활성제 형태에 따라 ① glycolipids, ② lipopeptides, lipoproteins, ③ fatty acids, neutral lipids, phospholipids, ④ polymeric surfactants, ⑤ particulate surfactants로 나눌 수 있다(2-7). 미생물계면활성제는 표면장력이 25-35 dyne/cm 범위에 있고, 마이셀 형성농도(CMC; Critical Micelle Concentration)는 0.1-150 mg/L의 광범위한 특성을 보이고 있다. Table 1에서 보는 바와 같이 화학합성계면 활성제와 비교했을 경우, 물리화학적 특성이 같은 범주에 있고, 오히려 낮은 표면 장력, 낮은 CMC 등의 특성을 보이는 우수한 계면활성제도 보고되고 있다(Table 2). 소포로리피드는 효모에서 생산되는 당지질계열의 계면활성제로서 보고된 미생물계면활성제 중 가장 높은 생산량을 보이고 있다. 소포로리피드의 경우, 생산단가는 SDS, LAS의 약 2배에 해당하지만, 최근 산업용부산물을 사용하여 생산률을 낮추는 연구가 진행되고 있고, 환경정화에 사용시 정제가 필요없는 단계라면, 가격 면에서도 화학계면활성제와 경쟁력이 있다고 볼 수 있다(2, 8).

미생물계면활성제의 생산과 응용

어떤 미생물들은 물에 잘 녹지않는 알칸 등에서 성장할 때 소

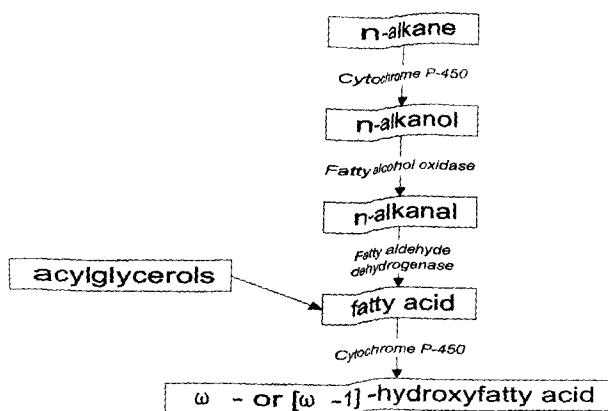


Figure 1. Proposed scheme of the microsomal oxidation reactions of long-chain alkanes like n-hexadecane toward hydroxypalmitic acid in *C. apicola* IMET 43747.

포로리피드를 생산한다(9-10). 미생물들이 소포로리피드와 같은 미생물계면활성제를 생산하는 것은 여러 가지 이유가 있겠지만 주로 탄화수소, 원유 등의 소수성물질을 영양원으로 섭취하는데 미생물계면활성제를 분비하는 경우를 종종 발견하게 된다. 즉, 포도당만이 있는 배지에서도 생산되는 rhamnolipid의 경우는 유

Table 2. Microbial source and properties of important types of microbial surfactants.

Biosurfactants	Microorganisms	C-source	Surface tension (mN/m)	CMC	Interfacial tension (mN/m)	Yield
Glycolipids						
Rhamnolipids	<i>P. aeruginosa</i>	glucose	29		0.25	2.5 g/L
	<i>Pseudomonas</i> sp.		250-30	0.1-10 mg/L	1	
Trehalolipids	<i>R. erythropolis</i>		32-36	4 mg/L	14-17	
	<i>N. erythropolis</i>		30	20 mg/L	3.5	
Sophorolipids	<i>Mycobacterium</i> sp.		38	0.3 mg/L	1.5	
	<i>T. bombicola</i>	glucose/oieic acid	33	82 mg/L	1.8	38-77 g/L
	<i>T. apicola</i>	alkane/carbohydrate	30		0.9	4.1 × CMC
	<i>T. petrophilum</i>					
Cellobiolipids	<i>U. zeae</i> , <i>U. maydis</i>		30	20 mg/L	>1.0	
Lipopeptides and lipoproteins						
Peptide-lipid	<i>B. licheniformis</i>	glucose	27	12-20 mg/L	0.1-0.3	
Serrawettin	<i>S. marcescens</i>	glycerol	28-33			
Viscosin	<i>P. fluorescens</i>	glycerol	26.5	150 mg/L		
Surfactin	<i>B. subtilis</i>	glucose	27-32	23-160 mg/L	1	60-240 × CMC
Subtilisin	<i>B. subtilis</i>					
Gramicidins	<i>B. brevis</i>					
Polymyxins	<i>B. polymyxa</i>					
Fatty acids, neutral lipids, and phospholipids						
Fatty acids	<i>C. lepus</i>	kerosene/alkanes	30	150 mg/L	2	150 mg/L
Neutral lipids	<i>N. erythropolis</i>		32		3	
Phospholipids	<i>T. thiooxidans</i>					
Polymeric surfactants						
Emulsan	<i>A. calcoaceticus</i>					
Biodispersan	<i>A. calcoaceticus</i>					
Mannan-lipid-protein	<i>C. tropicalis</i>					
Liposan	<i>C. lipolytica</i>					
Carbohydrate-protein-lipid	<i>P. fluorescens</i>					
	<i>D. polymorphis</i>					
Protein PA	<i>P. aeruginosa</i>					
Particulate biosurfactants						
Vesicles and fimbriae	<i>A. calcoaceticus</i>					
Whole cells	Variety of bacteria					

Table 3. Composition of culture medium.

Microorganism	Component(%)	Culture conditions	Reference(s)
<i>C. bombicola</i> ATCC 22214	Glucose 10 2-alkanol 24 Yeast extract 0.1 KH_2PO_4 0.1 $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0.016 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.07 NaCl 0.05 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.027 $\text{NaNO}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0.5 NH_4Cl 0.15	Cultivation time : 168~210 hr Temparature : 25~30°C Aeration rate : 0.6~1 vvm Agitation speed : 500~550 rpm pH : 5.6(initial) Batch or Fed-batch	9, 26, 27, 30 41-44
<i>C. apicola</i> IMET 43747	Glucose Hexadecane Yeast extract 0.1 KH_2PO_4 0.1 $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0.016 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.07 NaCl 0.05 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.04 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.1	Cultivation time : 450 hr Temparature : 25°C Aeration rate : 1 vvm Agitation speed : 500 rpm pH : not adjusted Batch or Fed-batch	32, 45, 46
<i>C. petrophilum</i> ATCC 20225	Glucose 10 Corn oil 9.5 Yeast extract 0.5 KH_2PO_4 0.1 MgSO_4 0.02 CaCl_2 0.0002 FeSO_4 0.0001 Na_2EDTA 0.0002 NH_4NO_3 0.2	Batch	47

Table 4. Composition of the optimized medium for *C. bombicola* growth.

Compound	Concentration(kgm^{-3})
NaCl	0.1
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.35
$\text{Zn}(\text{AcO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.16
H_3BO_3	0.06
CaCl_2	0.1
Yeast extract	1
$\text{MgCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.2
D-(+)-Glucose	12
NH_4Cl	1.9
KH_2PO_4	7.4
HCl is added to adjust pH at 5.6	

류접취의 목적보다는 다른 목적, 예를 들면 다른 균의 항생효과 또는 중금속침전등이 보고되기도 한다(3, 12, 13, 14). 미생물계면활성제의 생합성경로 또한 매우 복잡하고 다양하다(10, 15-22). 특히, 소수성부분을 이루는 지방산과 지질의 경우는 그 합성경로에 대한 정확한 기작을 규명하기 위해 연구 중에 있다. Figure 1은 미생물(*C. apicola* IMET 43747)에 의해 n-alkane이 지방산으로 산화·합성되는 경로를 보여주고 있다(23). 소포로리피드는 가장 널리 알려진 glycolipid 계열의 미생물계면활성제로서 HLB 값이 8~10정도이고 세제 및 유류분산제등의 용도에 적합하다. 소포로리피드의 생산균주는 대수성장기 후반 또는 정지기에서 탄소, 질소원 결핍시 다량의 소포로리피드를 생산한다고 알려졌다(24, 25). 또한 이 시기에 다른 형태의 기질(hydrocarbon, oil 등)을 첨가하면 생산성이 한층 증가되는 것을 볼 수 있다. 미생물계면활성제가 산업적으로 이용되기 위해서는 화학합성계면활

성제와의 가격경쟁에서 우세해야 한다. 가격경쟁에서 우세하려면 생산가격이 낮아야 하는데 이러한 측면에서 볼 때 소포로리피드 생산균주는 값싼 원료와 분리비용, 비교적 높은 소포로리피드 생산수율을 갖추고 있어 대량생산에 적합하다고 할 수 있다(Table 2).

소포로리피드의 생산 및 조건

소포로리피드 생산균주로는 *Candida* 속 yeast들로서 *Candida (Torulopsis) bombicola*, *C. apicola*, *C. petrophilum*, *C. bogoriensis*, *T. magnoliae*, *T. gropengiesseri* 등이 이에 속한다. Shigeo 등에 의하면 *C. bombicola*는 glucose, yeast extract, urea가 들어있는 수성영양배지에서 glycolipid의 일종인 소포로리피드를 생산할 수 있다고 하였고(9), Asmer 등은 *C. bombicola*는 탄소원으로 oleic acid을 첨가하여 배양하면 많은 양의 소포로리피드를 얻을 수 있다고 하였다(27). 소포로리피드를 생산하기 위한 배양절차는 일반적으로 다음과 같다. 먼저, 4°C YM 사면배지 형태로 보관된 균주를 YM배지(yeast extract, 3 g; malt extract, 3 g; peptone, 5 g; glucose, 10 g; in 1L)에 접종하여 이를동안 배양하고, 생산배지가 들어있는 fermentor를 고압멸균하여 fermentor 온도를 30°C로 설정한 다음 종균을 접종시키고 일주일정도 배양한다. 생산균주별 배지조성과 생산조건을 Table 3에 제시하였고 더 많은 양의 소포로리피드를 얻기 위해 *C. bombicola*의 생장속도에 대한 몇가지 영양원(glucose, nitrogen, phosphorus, magnesium)들의 영향을 조사함으로써 최적의 성장배지를 개발하였는데 이것을 Table 4에 나타내었다. 소포로리피드의 조성은 배양배지에 사용하는 원료에 따라 달라질 수 있고 배양기간에 따라서도 달

Table 5. Sophorolipid production with various C-sources.

	Second C-sources	Process	Production(g/L)	Yield(g/g)	Reference(s)
Oils(vegetable and animal)	Corn oil	Batch	20		26
	Soybean oil	"	18		26
	Palm oil	Fed-batch	82	0.39	29
	Sunflower oil	"	172	0.43	29
	Safflower oil	Resting cell	120	0.6	48
	Rapeseed oil		120-130		43
	Olive oil	Fed-batch	225	0.53	29
	Canola oil	"	42.5	0.28	
	Fish oil	Batch	160	0.76	31
		Fed-batch	51	0.21	29
Esters	Stearic acid methyl ester	Fed-batch	32		27
	Linoleic acid methyl ester	Continuous		0.8-0.9	29
	Rapeseed ester	Fed-batch	340	0.65	31
	Sunflower ester	"	235	0.52	29
	Palm ester	"	240	0.67	29
	Linseed ester	"	122	0.25	29
Fatty acids	Palmitic acid	Fed-batch	13.3	0.1	
	Stearic acid	"	20		27
	Oleic acid	"	38		27
		Extended Fed-batch	180	0.87	31
n-Alkanols	2-Dodecanol	Fed-batch	16	0.13	30
	2-Tetradecanol	"	23	0.18	30
	2-Hexadecanol	"	24	0.19	30
n-Alkanes	Tridecane	Fed-batch	.	.	32
	Pentadecane	"	traces		32
	Heptadecane	"	21.8	0.18	32
	Octadecane	"	24.9	0.21	32
	Eicosane	"	8.2	0.07	32
	Hexadecane	"	20.8	0.17	32

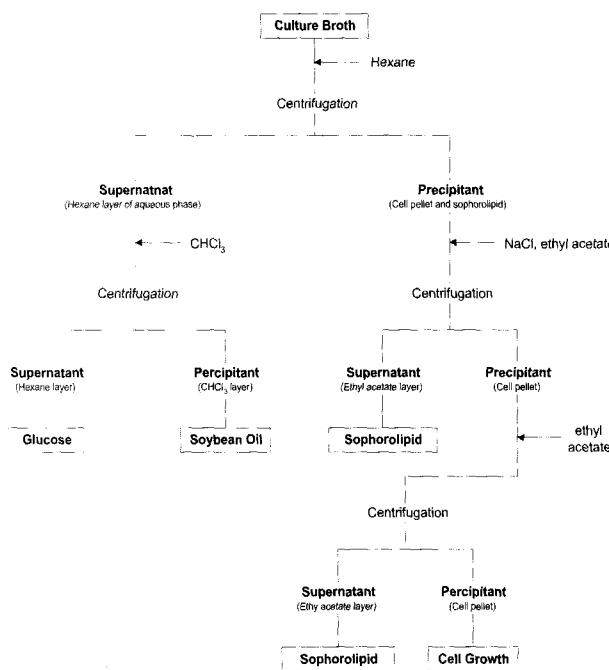


Figure 2. A diagram of the isolation procedure for analysis of glucose, soybean oil, sophorolipid and cell(49).

라질 수 있다(26). 또한 사용하는 기질의 형태에 따라 수율도 다양해진다(9, 27-38)(Table 5).

일주일 정도 배양후 배양액으로부터 생성된 소포로리피드는 에틸아세테이트로 추출하고 추출에 사용된 용매는 감압증류로 제거하여 미정제 소포로리피드를 얻는다. 미정제 소포로리피드에 다시 1배 이상의 물을 첨가하여 잔류오일을 제거하고 클로로폼으로 용액중의 소포로리피드를 추출한 후 $MgSO_4$ 로 미량의 수분을 제거시키고 감압증류하면 정제된 소포로리피드를 얻을 수 있다. 대략적인 소포로리피드 추출과정은 Figure 2에 나타내었다 (39-42).

소포로리피드 생산

소포로리피드를 생산하는 가장 일반적인 방식은 회분식 배양과 유가식 배양이다. 그 외에 이용되는 방식으로는 resting-cell process, SCF(self-cycling fermentation), 연속배양 등을 들 수 있다 (Table 6)(31, 48). 이 중에서 가장 좋은 결과를 나타내는 resting-cell process은 100 g/L 포도당과 100 g/L sunflower oil로부터 120 g/L의 소포로리피드를 생산했다. SCF는 반연속식배양방법으로서 일정기간 배양 후 영양원이 고갈되었을 때 일정량의 배지를 회수하고 다시 새로운 배지를 첨가하여 정지기를 연장시켜 소포로리피드를 생산하는 방식이다. 연속배양에서는 μ 값이 $0.03 h^{-1}$ 일 때 최대 소포로리피드 생산성이 약 $1.8 g/l \cdot h$ 를 얻었다(49). 되도록 많은 양의 소포로리피드를 얻으려면 위의 제시된 방법들 중 하나 혹은 두가지를 결합시켜서 미생물을 배양하는 것이 훨씬 생산적이다. 예를 들어 *C. apicola*의 경우 소포로리피드 생산의 단점은 그것을 생산하는데 많은 시간이 소요되는 것

Table 6. Sophorolipid production modes.

Processes	Characteristics
Batch	growth of yeast in stirred and aerated tank containing a medium with both carbon sources
Fed-batch	similar to the batch process, but continuously introduces one carbon source(usually fatty acid)
Resting-cell	two stages - growth and product formation phase reduction of cost of product recovery
SCF	semi-continuous production of secondary metabolites stable, synchronous cultures, short doubling time.(4.5h)
Continuous culture	investigate the quantitative effect of carbon sources on cell growth and sophorolipid production

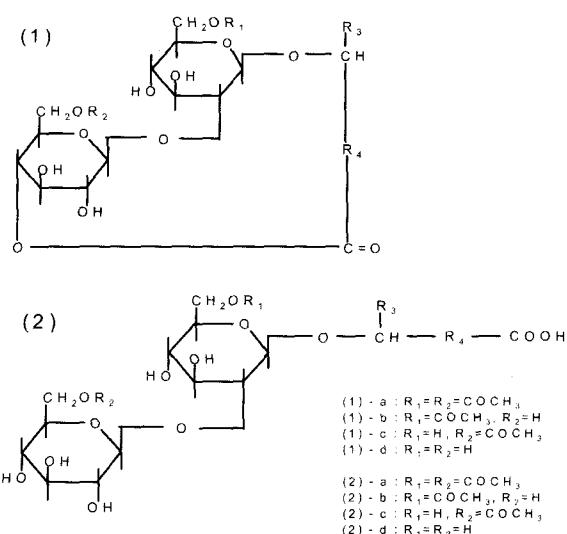


Figure 3. Structures of major components of sophorolipid.

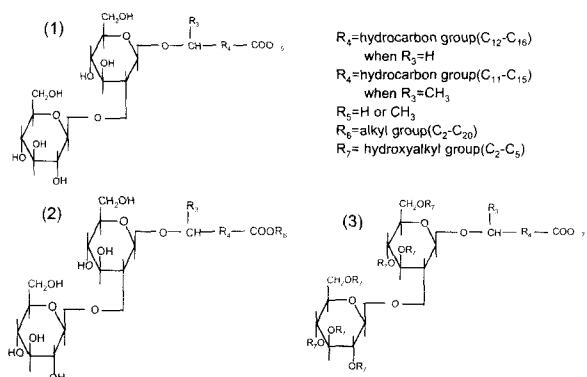


Figure 4. Structures of sophorolipid derivatives.

인테 이것은 연속배양이나 지속적인 산물회수를 겸한 회분식 배양으로 극복될 수 있다(40).

소포로리피드의 구조 및 특성

C. bombicola, *C. apicola*, *C. petrophilum* 유래의 소포로리피드는 배지내에서 여러 구조의 혼합물형태로 존재한다. 혼합물속의

구조들은 HPLC, TLC, NMR등의 분석방법으로 규명되었는데 5', 5" 탄소에 각각 -COCH₃가 에스테르결합을 하고 1, 4" 탄소가 에스테르결합하여 lactone 구조를 갖는 소포로리피드가 가장 많은 부분을 차지한다. Figure 3은 소포로리피드의 일반적인 구조식을 보여주고 있다. Figure 3에서 R₃는 H 혹은 -CH₃이고, R₄는 R₁가 H일 때 탄소수가 12내지 16인 포화 혹은 불포화 탄화수소기이고, R₁가 -CH₃일 때는 탄소수가 11내지 15인 포화 혹은 불포화 탄화수소기이며, R₁, R₂는 H 혹은 -COCH₃이다. 소포로리피드는 최소 6가지 이상의 혼합물이다(8, 50). 그렇기 때문에 Figure 3에서 제시된 것과 다른 형태의 소포로리피드에 대해서도 연구, 분석되었다. 소포로리피드는 구조내의 acetyl 결합과 lactone 결합이 화학적으로 불안정하여, alkaline hydrolysis에 의해 acid form으로 쉽게 전환되며, 최적 pH 3.5에서 4 g/L의 낮은 용해도를 나타낸다. 또한 *C. apicola*로부터 생산되는 소포로리피드는 pH 2에서는 물에 잘 녹지만, pH shifting(2→3)에 의해 결정형의 소포로리피드가 생성된다. 그 밖에 소포로리피드는 우수한 분산능력(dispersal) 능력을 가지며, 특히 그람양성 미생물에 대하여 항생효과를 보인다고 알려졌다(32, 45).

소포로리피드의 응용

소포로리피드와 같은 glycolipid surfactant는 추출공정 후, 점도가 매우 높은 반고체성의 물질로 취급이 매우 어렵고 제품으로서의 사용성이 좋지 않은 단점이 있다. 이러한 단점을 해결하고자 여러 문헌에서는 소포로리피드에 polyhydric alcohol을 다양 침가함으로써 소포로리피드 유도체를 합성하였다. 대부분의 특허내용은 소포로리피드에서 수분을 제거하거나(51), 지방산에스터를 만드는 방법(52), 당지질에스터 생산방법(24, 53) 등 생산 이후에 화학적 변화를 통해서 물성을 향상시키는 방법 등이 특허화되어 있다. 형성된 몇 가지 유도체를 Figure 4에 나타내었다. 이러한 소포로리피드 유도체들은 세제 및 유화제로서 흡습성과 친수성이 뛰어나게 좋은 성질을 갖고 있어 화장품을 비롯하여 화장비누, 치약 및 기타 세제제품에 생체계면활성제 또는 보습제로서 이용되고 있으며(13, 54, 55) 일반 화학합성 계면활성제와는 달리 사용할 때 인체에 대한 부작용이 거의 없으며 생분해가 뛰어난 우수한 특성을 지닌 물질이다.

결언

미생물계면활성제는 미생물의 수만큼 양적으로나 질적으로 다양하고 이를 용융할 수 있는 가능성 또한 다양하다(2). 즉, 미생물계면활성제로부터 다양한 용도 개발이 가능하다는 것이다. 소포로리피드의 경우 무독성 및 탁월한 습윤효과, skin compatibility의 이유로써 화장품 중의 고가 skin moisturizer로 상용화되기도 하였다(54-56). 또한 캐나다 및 미국에서 heavy crude oil 수송시 표면장력을 감소시키기 위하여 미생물계면활성제를 사용한 실적이 있으며 유전지대의 oil recovery를 위해서도 공해물질인 화학합성 계면활성제 대신 미생물계면활성제의 사용이 요구되어지고 있다. 이와 같이 환경정화, 식품, 의약품 등 다용도로 상용화 될 수 있는 생분해성 미생물계면활성제 생산기술 개발에 대한 국내 연구는 거의 미약한 수준에 있지만 외국의 경우 지난 10년간 생산단가를 낮추어 화학합성 계면활성제와 비교하여 경쟁력이 있는 미생물계면활성제의 대량생산 기술을 보유하게 되

었다. 고부가가치 정밀화학제품 개발 필요성 및 전세계적인 환경규제 강화 등을 고려하면 국내에서도 시급히 미생물계면활성제 생산기술 개발에 대한 기초연구가 절실하다 하겠다. 이에 본 연구실에서는 생산비용절감 차원에서 *Candida sp.* 유래의 소포로리피드를 식품부산물의 한 형태인 dark oil로부터 생산하고, 추출된 소포로리피드 및 관련 유도체를 합성하고, 이를 포함한 다른 미생물계면활성제를 화장품원료, 정밀화학제품 및 토양정화 등 환경관련 bioremediation에 적용하고자 연구 중에 있다(42, 43, 57-61).

감 사

본 연구는 과학기술부·한국과학재단 지정 인하대학교 서해연안환경연구센터의 지원(과제번호: 99-특-4)에 의한 것입니다.

REFERENCES

- Kosaric, N. (1993), Biosurfactants; Production, Properties, Applications, p366, Marcel Dekker, INC., New York.
- Desai, J. D., and I. M. Banat. (1997), Microbial production of surfactants and their commercial potential[review]. *Microbiol. Mole. Biol. Rev.*, **61**, 47-64.
- Lin, S-C. (1996), Biosurfactant: Recent Advances. *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, **66**, 109-120.
- Georgiou, G., S-C. Lin, and M. M. Sharma (1992), Surface-active compounds from microorganisms(Review). *Bio/technology*, **10**, 60-65.
- Kosaric, N. (1990), Biosurfactants. *Kem. Ind.*, **39**, 557-566.
- Haferburg, D., R. Hommel, R. Claus, and H.-P. Kleber (1986), Extracellular microbial lipids as biosurfactants. *Adv. in Biochem. Eng./ Biotechnol.*, **33**, 53-93.
- Lee, S. J. and K. D. Nam (1993), Properties and application of glycolipid. *J. Korean Ind. Eng. Chem.*, **4**, 26-40.
- Parra, J. L., M. A. Manresa, M. Robert, M. E. Mercade, F. Comelles, and M. P. Bosch (1989), Chemical characterization and physicochemical behavior of biosurfactants. *JAOCs.*, **66**, 141-145.
- Shigeo, I., and S. Ito. (1982), Sophorolipids from *Torulopsis bombicola* as microbial surfactants. *Biotechnol. Lett.*, **4**, 3-8.
- Ken-ichi, H., N. Tadaatsu, S. Noritoshi, and Y. Koichi (1971), Formation of rhamnolipid by *Pseudomonas aeruginosa* and its function in hydrocarbon fermentation. *Agr. Biol. Chem.*, **35**, 686-692.
- Abraham, W.-R., H. Meyer, and M. Yakimov (1998), Novel glycine containing glucolipids from the alkane using bacterium *Alcanivorax borumensis*. *Biochim. et Biophys. Acta* **1393**, 57-62.
- Lang, S. and D. Wullbrandt (1999), Rhamnose lipids - bio-synthesis, microbial production and application potential. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **51**, 22-32.
- U. S. Patent 4,628,030 Process for the production of rhamnolipid (1986).
- Helle, S. S., S. J. B. Duff, and D. G. Cooper (1993), Effect of surfactant on cellulose hydrolysis. *Biotechnol. Bioeng.*, **42**, 611-617.
- Guerra, D. I., O. Kappeli, and A. Flechter (1986), Dependence of *Pseudomonas aeruginosa* continuous culture biosurfactant production on nutritional and environmental factors. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **24**, 443-448.
- Banat, I. M. (1993), The isolation of thermophilic biosurfactant producing *Bacillus sp.* *Biotechnol. Lett.*, **15**, 591-594.
- Hbid, C., P. Jacques, H. Razafindralambo, M. K. Mpoyo, E. Meurice, M. Paquot, and P. Thnart (1996), Influence of the production of two lipopeptides, Iturin A and Surfactin S1 on oxygen transfer during *Bacillus subtilis* fermentation. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **57/58**, 571-579.
- Sim, L., OP. Ward, and Z.-Y. Li (1997), Production and characterisation of a biosurfactant isolated from *Pseudomonas aeruginosa* UW-1. *J. Ind. Microbiol. & Biotechnol.*, **19**, 232-238.
- Matsufuji, M., K. Nakata, and A. Yoshimoto (1997), High production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* growing on ethanol. *Biotechnol. Lett.*, **19**, 1213-1215.
- Ochsner, U. A., J.eiser, A. Fiechter, and B. Witholt (1995), Production of *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipid biosurfactants in heterologous hosts. *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**, 3503-3506.
- Makker, R. S. and S. S. Cameotra (1997), Biosurfactant production by a thermophilic *Bacillus subtilis* strain. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **18**, 37-42.
- U. S. Patent 5,037,758 Enhanced production of biosurfactant through the use of a mutated *B. subtilis* strain (1991).
- Susumu, Ito and S. Inoue. (1982), Sophorolipids from *Torulopsis bombicola*: Possible relation to alkane uptake. *Appl. Environ. Microbiol.*, **43**, 1278-1283.
- U. S. Patent 4,215,213 Process for producing a glycolipid ester (1980).
- Kosaric, N., W. L. Cairns, N. C. C. Gray, D. Stechey, and J. Wood (1984), The role of nitrogen in multiorganism strategies for biosurfactant production. *JAOCs*, **61**, 1735-1743.
- Cooper, D. G., and D. A. Paddock (1984), Production of a biosurfactant from *Torulopsis bombicola*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **47**, 173-176.
- Asmer, H.-J., A. S. Lang, F. Wagner, and V. Wray. (1988), Microbial production, structure elucidation and bioconversion of sophorose lipids. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **65**, 1460-1466.
- Casas, J. A., S. García de Lara, and F. García-Ochoa. (1997), Optimization of a synthetic medium for *Candida bombicola* growth using factorial design of experiments. *Enzyme Microb. Technol.*, **21**, 221-229.
- Davila, A.-M., R. Marchal, and J.-P. Vandecasteele. (1994), Sophorose lipid production from lipidic precursors: predictive evaluation of industrial substrates. *J. Ind. Microbiol.*, **13**, 249-257.
- Brakemeier, A., S. Lang, D. Wulbandt, L. Merschel, A. Benninghoven, N. Buschmann, and F. Wagner. (1995), Novel sophorose lipids from microbial conversion of 2-alkanols. *Biotechnol. Lett.*, **17**, 1183-1188.
- Rau, U., C. Manzke, and F. Wagner. (1996), Influence of substrate supply on the production of sophorose lipids by *Candida bombicola* ATCC 22214. *Biotechnol. Lett.*, **18**, 149-154.
- Stüwer, O., R. Hommel, D. Haferburg, and H.-P. Kleber. (1987), Production of crystalline surface-active glycolipids by a strain of *Torulopsis apicola*. *J. Biotechnol.*, **6**, 259-269.
- Zhou, Q. H., V. Klekner, and N. Kosaric (1992), Production of sophorose lipids by *Torulopsis bombicola* from safflower oil and glucose. *JAOCs* **69**, 81-91.
- Klekner, V., N. Kosaric, and Q. H. Zhou (1991), Sophorose lipids produced from sucrose. *Biotechnol. Lett.*, **13**, 345-348.
- Susumu, I., K. Manzo, and I. Shigeo (1980), Growth of yeasts on n-alkanes: Inhibition by a lactonic sophorolipid

- produced by *Torulopsis bombicola*. *Agr. Biol. Chem.*, **44**, 2221-2223.
- 36. Zhou, Q. H. and N. Kosaric (1993), Effect of lactose and olive oil intra- and extracellular lipids of *Torulopsis bombicola*. *Biotechnol. Lett.*, **15**, 477-482.
 - 37. Kor. Patent 94-23921. New sophorolipid derivative and its use. (1994).
 - 38. U. S. Patent 5,656, 747 Process for the quantitative purification of glycolipids. (1997).
 - 39. U. K. Patent 2,002,369 Process for the dehydrating purification of hydrated sophorolipid or a derivative thereof. (1978).
 - 40. U. S. Patent 5,616,479 Method of production of sophorosides by fermentation with fed batch supply of fatty acid esters of oils (1997).
 - 41. Duvnjak, Z., and N. Kosaric. (1987), Deemulsification of petroleum w/o emulsions by selected bacterial and yeast cell. *Biotechnol. Lett.*, **9**, 39-42.
 - 42. Kim, W. K., and E. K. Kim. (1992), Effects of culturing parameters on the production of microbial biosurfactant from *Candida bombicola*. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, **7**, 102-106.
 - 43. Kim, W. K., and E. K. Kim. (1992), Application of biosurfactant(sophorolipid) produced from *Candida bombicola*. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, **7**, 107-111.
 - 44. McCaffrey, W. C., and D. G. Cooper. (1995), Sophorolipids production by *Candida bombicola* using self-cycling fermentation. *J. Ferment. Bioeng.*, **79**, 146-151.
 - 45. Hommel, R., O. Stüwer, W. Stuber, D. Haferburg, and H.-P. Klber. (1987), Production of water-soluble surface-active exolipids by *Torulopsis apicola*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **26**, 199-205.
 - 46. Hommel, R. K., and K. Huse. (1993), Regulation of sophorose lipid production by *Candida (Torulopsis) apicola*. *Biotechnol. Lett.*, **15**, 853-858.
 - 47. Cooper, D. G., and D. A. Paddock. (1983), *Torulopsis petrophilum* and surface activity. *Appl. Environ. Microbiol.*, **46**, 426-1429.
 - 48. Davila, A.-M., R. Marchal, and J.-P. Vandecasteele. (1997). Sophorose lipid fermentation with differentiated substrate supply for growth and production phases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **47**, 496-501.
 - 49. Kim, S. Y., D. K. Oh, K. H. Lee, and J. H. Kim. (1997), Effect of soybean oil and glucose on sophorose lipid fermentation by *Torulopsis bombicola* in continuous culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **48**, 23-26.
 - 50. Brakemeier, A., D. Wullbrandt, and S. Lang, (1998). Microbial alkyl-sophorosides based on 1-dodecanol or 2-, 3- or 4-dodecanones. *Biotechnol. Lett.*, **20**, 215-218.
 - 51. U. S. Patent 4,197,166 Dehydrating purification for a fermentation product (1980)
 - 52. U. S. Patent 4,201,844 Process for producing a hydroxyfatty acid ester (1980)
 - 53. U. S. Patent 4,216,311 Process for producing a glycolipid methyl ester (1980)
 - 54. U. S. Patent 4,297,340 Cosmetic composition for skin and hair treatment (1981)
 - 55. U. S. Patent 4,305,961 Cosmetic composition (1981)
 - 56. Dykes, P. (1998), Surfactants and the skin. *Int. J. Cosmetic Sci.*, **20**, 53-61.
 - 57. Kim, E. K. (1991), Production of Biosurfactant. *Biochem. Engineer.*, **5**, 31-38.
 - 58. Kim, E. K.(1993), Application of Biosurfactant for Environmental Clean-up. *Biochemical Engineering*, **7**, 97-103.
 - 59. Kim, D. H, J. B. Lee, Guhn Been Yim and E. K. Kim (1995), Optimized Production of Microbial Surfactant, S-acid, from *Penicillium spiculisorporum*, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.*, **10**, 113-118
 - 60. Jung, H. K., J. B. Lee, G. B. Yim and E. K. Kim (1995), Properties of Microbial Surfactant, S-acid, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **10**, 71-77
 - 61. Kang, S. H., K. J. Cho, C. S. Han, E. K. Kim (1998), Effects of Microbial surfactants on Bioremediation, Theor Appl. of Chem. Eng., **4(2)**, 2945-2948