

***Pseudomonas* sp. EL-G527에 의한 환경친화성 생물계면활성제의 생산최적조건**

차미선, 임은경, 이근희, 조순자, 손충주*, 이상준
부산대학교 미생물학과, *밀양대학교 생물공학과
(2001년 2월 18일 접수; 2002년 3월 15일 채택)

Optimal Culture Conditions for Production of Environment-Friendly Biosurfactant by *Pseudomonas* sp. EL-G527

Mi-Sun Cha, Eun-Gyoung Lim, Keun-Hee Lee, Sun-Ja Cho,
Hong-Joo Son* and Sang Joon Lee

Department of Microbiology, Pusan National University, Busan 609-735, Korea

*Department of Biotechnology, Miryang National University, Miryang 627-702, Korea

(Manuscript received 18 February 2001; accepted 15 March 2002)

A biosurfactant-producing microorganism was isolated from activated sludge by enrichment culture when grown on a minimal salt medium containing *n*-hexadecane as a sole carbon source. This microorganism was identified as *Pseudomonas* sp. and it was named *Pseudomonas* sp. EL-G527. Its optimal culture condition is 2% *n*-hexadecane, 0.2% NH_4NO_3 , 0.3% KH_2PO_4 , 0.3% K_2HPO_4 , 0.02% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.0025% $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.0015% $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ in 1 l distilled water and initial pH 7.0. Cultivation was initiated with a 2% inoculum obtained from starter cultures grown in 30 ml of the same medium in 250 ml flask. They were cultivated at 30 °C in reciprocal shaking incubator and the highest biosurfactant production was observed after 4 days.

Key word : *Pseudomonas* sp. EL-G527, biosurfactant, activated sludge, *n*-hexadecane

1. 서 론

계면활성제란 분자 내에 친수기와 소수기를 함께 갖는 양친매성 물질로서, 계면의 성질을 변화시켜 표면장력과 계면장력을 감소시킨다¹⁻⁶⁾.

현재 사용되고 있는 계면활성제의 대부분은 석유 화학공업을 이용하거나 일부는 동·식물의 지질을 이용하여 화학적 합성으로 생산되어 왔다⁷⁾. 1917년에 독일에서 처음으로 생산의 공업화가 이루어진 합성계면활성제는 제2차 세계대전 이후로 지금까지 전 세계적으로 그 생산량과 소비량이 계속 증대되고 있다. 그러나 이러한 화학합성 계면활성제는 제조과정이 복잡하고 생분해도도 극히 낮으며 자연 생태계에 미치는 독성이 매우 강할 뿐만 아니라, 난

분해성으로 인하여 심각한 환경문제가 되고 있다^{8,9)}. 최근 계면활성제의 영역이 확장되어 소비량이 늘어남에 따라 환경오염의 문제가 야기되고 있으며, 선진국에서는 1980년대 이미 합성계면활성제의 문제점이 제기되어 ABS(alkylbenzene sulfonate) 등의 품목에 대해서는 사용 및 생산을 금지시키고 있으며, 그 외의 현재 사용중인 계면활성제에 대해서도 환경오염의 논란이 끊이지 않고 있다. 따라서 이러한 문제점을 해결할 수 있는 대체 계면활성제, 환경과 조화를 이루는 계면활성제, 특히 미생물 유래의 생물계면활성제의 개발이 필요하게 되었다.

그 예로써 식품산업에서 유화제로 GMS(glycerol monostearate)와 CMC(carboxymethylcellulose)의 화학합성물을 사용하던 것이 식물로부터 추출한 lecithin과 arabic gum 등으로 일부 대체되었는데¹⁰⁾, 이들 역시 가공 공정상의 문제 또는 대량생산의 어려움 등으로 인하여 xanthan gum, gellan gum 등

Corresponding Author : Sang-Joon Lee, Department of Microbiology, Pusan National University, Busan 609-735, Korea
Phone : +82-51-510-2268
E-mail : sangjoon@pusan.ac.kr

의 미생물 유래 유화제로 대체되고 있다¹¹⁾.

생물계면활성제는 농업, 건축·토목, 식품, 피혁, 제지, 금속, 직물, 화장품, 의약, 정유 및 석유화학 산업 등 산업 전반에 걸쳐 사용될 수 있으며, 또한 폐수처리, 유류 유출에 의한 해양오염문제,¹²⁾ oil-recovery¹³⁻¹⁵⁾ 등의 영역에서도 그 응용성이 크게 기대되고 있다.

이상에서와 같이 생물계면활성제는 그 응용분야가 매우 넓고, 앞으로의 전망 또한 매우 밝은 분야이다. 따라서 이러한 미생물 유래 계면활성제에 관한 연구가 전세계적으로 활발하게 이루어지고 있으며 국내에서도 많은 연구가 진행되고 있다¹⁶⁻¹⁹⁾. 생물계면활성제에 대한 관심은 기본적으로 환경에 대한 우려와 더불어 기존의 합성 계면활성제를 대체코자함이나 합성계면활성제에 비해 상대적으로 비싼 생산단가 및 생물을 다루어야 함으로 인한 어려움 등으로 인해 아직까지 산업적으로 많이 생산되지 못하고 있다. 따라서 이의 해결을 위해 생산성이 높은 균주의 확보, 효과적인 생산법 및 분리법을 개발할 필요성이 있으며, 생물 유래 물질의 장점을 살려 의약 등 고부가가치 상품 개발에도 도움이 될 고기능 생물계면활성제의 개발이 요구된다.

본 연구에서는, 생물계면활성제를 생산하는 미생물 균주를 분리 및 동정하고, 생산을 위한 최적 조건을 확립하여 효과적인 생물계면활성제의 생산법 및 분리법의 개발을 위한 기초 자료를 제공하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 균주의 분리, 동정 및 배양조건

생물계면활성제 생산균을 분리하기 위하여 유류로 오염된 부산 근해의 해수, 주유소 일대의 토양 및 하수처리장의 슬러지 등을 분리원으로 하였다.

각 시료 일정량을 무기염 배지에 접종하여 30°C, 200 rpm으로 1주일간 회전진탕배양한 후, 배양액을 다시 새로운 무기염배지에 취하여 1주일간 배양하였다. 이 중, 표면장력 감소능을 보이는 배양액을 육즙찬천 평판배지에 도말하여 순수분리를 행하였고, 순수분리된 집락은 액체배지에 다시 배양하면서 생물계면활성제 생산능을 재확인하였다. 그 중 표면장력 감소능이 가장 뛰어난 균주를 공시균으로 선정하였다. 이때 사용한 분리용 무기염배지의 조성은 *n*-hexadecane 2%, NH₄NO₃ 0.4%, Na₂HPO₄ · 12H₂O 1.5%, KH₂PO₄ 0.4%, MgSO₄ · 7H₂O 0.02%, CaCl₂ · 2H₂O 0.01%, FeSO₄ · 7H₂O 0.001% (pH 7.0)이었다.

2.2. 생물계면활성제 생산조건 검토

공시균의 생물계면활성제 생산최적조건을 검토하기 위하여 무기염배지를 기본배지로 하여 200 rpm에서 2일간 회전진탕배양하면서 배양온도, 초기 pH, 탄소원, 질소원 및 인산염의 종류 및 농도, MgSO₄ · 7H₂O 및 기타 무기염의 농도 등에 따른 균체 생육도, 표면장력 감소능 및 Fcmc값을 측정하였다.

또한 배양시 통기량이 생물계면활성제 생산에 미치는 영향을 알아보기 위하여 상기에서 결정된 배지 및 배양조건에서, 250ml 삼각 플라스크에 배지의 양을 각각 30~150ml로 달리하여, 30°C에서 200rpm으로 회전진탕배양한 후 균체 생육도와 표면장력 감소능 및 Fcmc값을 측정하였다. 전배양은 30°C, 200 rpm에서 2일간 회전진탕배양하였으며, 전배양액을 12,000 rpm, 20분 동안 원심분리하여 회수한 균을 0.85% NaCl로 두 번 세척하여, 동일 용액에 A₆₆₀=1.0이 되도록 현탁하여 본배양액에 접종(2%, v/v)하였다.

2.3. 분석방법

공시균의 생육도는 건조균체량으로 나타내었다. 즉, 배양액을 일정량 취하여 원심분리(12,000 rpm, 4°C, 20 min)하여 회수한 pellet을 0.85% NaCl 용액과 세척액(chloroform : methanol = 2 : 1, v/v)을 사용하여 세척한 후 다시 원심분리하여 105°C에서 항량이 될 때까지 건조하였다. 표면장력의 측정에는 Fisher scientific surface tensiometer를 이용한 ring method로 측정하였다^{20,21)}. 공시균의 생물계면활성제 생산능은 배양액의 표면장력 감소능과 그 농도로 측정하였다. 생물계면활성제의 상대적인 농도는 배양액을 희석하여 표면장력이 증가하는 시점의 희석배수를 나타내는 Fcmc값²²⁾으로 나타내었다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 생물계면활성제 생산균의 분리 및 동정

생물계면활성제 생산균을 분리하기 위하여 유류오염 지역으로 보이는 부산 근해의 해수를 비롯하여 주유소일대의 토양과 하수처리장의 슬러지 등을 시료로 채취하여 표면장력 감소능을 보이는 균주를 선별하였고, 그 중에서 표면장력 감소능이 가장 우수한 균주를 공시균으로 선정하여 형태학적, 배양적 및 생화학적 특성을 조사하였다. 이 특성들을 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol. I²³⁾과 Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 제 9판²⁴⁾과 비교, 검토한 결과(미제시) 본 공시균은 *Pseudomonas* sp.으로 동정되었으며, 편의상 *Pseudomonas* sp. EL-G527로 명명하였다.

3.2. 생물계면활성제 생산조건

분리용 배지의 배양온도를 20~40°C까지 단계별로 배양하여 균체 생육도, 표면장력 및 Fcmc를 측정 한 결과는 Table 1에서 보는 바와 같이 30°C에서 균체 생육도, 표면장력 감소능 및 Fcmc 값이 가장 높았다. 35°C와 37°C에서도 비교적 비슷한 생육도와 생물계면활성제 생성능을 나타내었으며 40°C에서도 어느 정도 생육과 생물계면활성제 생산이 나타났다. 분리용 배지의 pH를 1N HCl과 1N NaOH를 이용하여 초기 pH를 4.0~10.0까지 단계별로 조절하여 공시균을 배양한 결과, pH 5 이하에서 생육이 거의 이루어지지 않았고, pH 7.0~9.0의 약알칼리성에서 높은 생육도와 표면장력 감소능, Fcmc 값을 보였다(Table 2). 가장 우수한 생육도와 Fcmc 값을 나타낸 pH 7.0을 최적 초기 pH로 결정하였다.

Table 1. Effect of temperature on the production of biosurfactant

Temperature (°C)	Growth (g/l)	Minimum surface tension(dyne/cm)	Dilution factor (Fcmc)
20	0.02	49.6	1.0
25	2.85	36.2	2.1
30	3.95	30.1	4.3
35	3.18	30.3	3.9
37	3.08	30.4	3.8
40	1.46	43.1	1.7

Table 2. Effect of pH on the production of biosurfactant

pH	Growth (g/l)	Minimum surface tension(dyne/cm)	Dilution factor (Fcmc)
4.0	0.02	72.0	1.0
5.0	0.05	72.0	1.0
6.0	0.13	59.0	1.1
7.0	3.52	30.3	3.9
8.0	2.52	33.4	3.0
9.0	2.33	33.1	2.7
10.0	0.02	72.0	1.0

배양온도 30°C, 초기 pH 7.0의 배지에 *n*-hexadecane 대신 각종 탄소원을 2%의 농도로 첨가하여 공시균을 배양한 결과는 Table 3에서 보는 바와 같다. 지방족 탄화수소(aliphatic hydrocarbons)의 경우, 탄소수 12개 미만에서는 거의 생육이 일어나지 않았으며, 탄소수 14~18개에서 높은 생육도와 생물계면활성제 생산능을 보였다. 특히 *n*-tetradecane과 *n*-hexadecane에서는 생육도와 Fcmc 값이 우수하였다. Glucose나 fructose와 같은 단당류에서는 생육도 및 표면장력 감소능을 보였으나 이당류인

sucrose에서는 거의 생육하지 못하였다. Crude oil 및 bunker oil에서도 어느 정도 생육을 보였으며, 시간이 지날수록 서서히 생육도가 증가하였다. Edible oils에서는 다른 탄소원에 비해 상대적으로 높은 생육도를 보였으나 탄소수 14~18개의 지방족 탄화수소에 비해서 낮은 Fcmc 값을 보였다. 따라서 가장 높은 생육도와 Fcmc 값을 보인 *n*-hexadecane을 최적 탄소원으로 선정하여 최적농도를 조사한 결과, 2%를 첨가했을 때 가장 높은 생육도와 생물계면활성제 생산을 보였다(미제시). 일반적으로 미생물에 있어 생물계면활성제의 가장 큰 기능이 물에 불용성인 기질을 유화시켜 이용하기 쉽도록 하기 위함이므로 탄화수소류(hydrocarbons)가 생물계면활성제의 생산에 가장 많이 이용되고 있으나 탄수화물류(carbohydrate)를 이용하는 것도 보고되어 있다²⁵⁾.

Table 3. Effect of carbon source on the production of biosurfactant

Carbon source	Growth (g/l)	Minimum surface tension(dyne/cm)	Dilution factor (Fcmc)
Glucose	1.04	47.0	1.0
Fructose	1.55	33.0	1.4
Sucrose	0.01	69.0	1.0
<i>n</i> -Pentane	-	72.0	1.0
<i>n</i> -Hexane	-	72.0	1.0
<i>n</i> -Isooctane	-	72.0	1.0
<i>n</i> -Octane	-	72.0	1.0
<i>n</i> -Nonane	-	72.0	1.0
<i>n</i> -Decane	-	72.0	1.0
<i>n</i> -Undecane	0.03	56.0	1.0
<i>n</i> -Dodecane	1.04	40.0	1.0
<i>n</i> -Tetradecane	2.30	30.1	3.4
<i>n</i> -Hexadecane	2.86	30.2	3.8
<i>n</i> -Octadecane	1.72	34.0	1.2
Cyclohexane	-	72.0	1.0
Benzene	-	72.0	1.0
Ethylacetate	0.09	55.0	1.0
Toluene	-	72.0	1.0
Crude Oil	0.22	52.0	1.1
Bunker A	0.36	47.0	1.2
Bunker B	0.05	56.0	1.0
Bunker C	0.15	59.0	1.0
Olive Oil	2.56	32.5	1.4
Soybean Oil	2.90	32.2	1.5
Corn Oil	3.64	32.0	1.2
Peanut Oil	1.93	35.0	1.1
Caster Oil	2.44	33.3	1.0
Oleic acid	2.44	35.0	1.2

최적 탄소원으로 결정된 *n*-hexadecane을 배지에 2%로 접종하고 각종 질소원을 0.2%씩 각각 첨가한 후 30°C, 200rpm으로 배양한 결과는 Table 4에서 보는 바와 같다. 대부분의 무기질소원은 유기질소원보다 훨씬 우수한 생육도와 표면장력 감소능을 보였는데, 질산염의 형태로 첨가된 KNO₃, NH₄NO₃, NaNO₃에서 높은 생육도를 보였으며, 암모늄 형태로 첨가된 NH₄Cl과 (NH₄)₂SO₄에서는 생물계면활성제의 생산능이 좋았다. 그러나 암모늄과 질산염을 동시에 가지는 NH₄NO₃가 생육도와 Fcmc 값이 모두 우수하였으므로 이를 최적 질소원으로 선정하여 최적농도를 조사한 결과, 0.2%를 첨가했을 때 가장 높은 생물계면활성제 생산을 보였다(미제시). Yeast extract의 존재시 생물계면활성제의 생산량이 감소되며, 질소원의 경우 nitrate가 ammonium보다 생물계면활성제 생산량이 월등하다는 보고²²⁾가 있으며, 질소원의 결핍이 rhamnolipid의 생산을 증가시킨다는 보고²⁶⁾도 있으나 본 연구에서는 질소원이 결핍되었을 경우 생육과 생물계면활성제의 생산이 일어나지 않았다.

Table 4. Effect of inorganic and organic nitrogen on the production of biosurfactant

Nitrogen source	Growth (g/l)	Minimum surface tension(dyne/cm)	Dilution factor (Fcmc)
None	0.02	70.0	1.0
KNO ₃	3.00	31.0	3.6
NaNO ₂	0.02	70.0	1.0
NaNO ₃	3.21	32.0	2.4
NH ₄ NO ₃	3.22	30.2	8.2
NH ₄ Cl	2.81	30.3	7.4
CH ₃ COONH ₄	0.78	37.5	1.4
(NH ₄) ₂ SO ₄	2.88	30.2	6.1
NH ₄ H ₂ PO ₄	1.28	30.5	1.8
(NH ₄) ₂ HPO ₄	1.14	31.5	1.2
Urea	2.67	34.0	2.5
Yeast extract	1.53	32.0	2.1
Malt extract	0.03	62.0	1.0
Beef extract	0.08	38.0	1.0
Tryptone	2.66	31.4	2.6
Bactopeptone	2.12	32.0	2.5
Polypeptone	1.61	33.0	1.6

인산염이 생물계면활성제 생산능에 미치는 영향을 알아보기 위하여 배지에 KH₂PO₄ 및 Na₂HPO₄ · 12H₂O, K₂HPO₄의 농도를 단계적으로 조절하여 30°C, 200 rpm으로 배양하여 균체 생육도와 생물계면활성제 생산능을 검토하였다. KH₂PO₄-Na₂HPO₄ · 12H₂O system보다 KH₂PO₄-K₂HPO₄ system에서

생물계면활성제 생산능이 높았으며, 최적농도는 각각 0.3% 및 0.3%였다(미제시). MgSO₄ · 7H₂O의 최적 농도를 조사한 결과는 Table 5에서 보는 바와 같이 MgSO₄ · 7H₂O를 무첨가시, 균의 생육이 관찰되지 않았으며, 0.02% 첨가시 가장 좋은 생육도와 표면장력 감소능을 보였다. CaCl₂ · 2H₂O는 0.025% 첨가시 가장 높은 생물계면활성제 생산을 나타내었으며(미제시), FeSO₄ · 7H₂O는 첨가 유무에 관계없이 생육도에는 차이가 거의 없었으나 생물계면활성제의 생산에 있어서는 큰 영향을 미치는 것으로 나타났다. 첨가하지 않을 경우에는 생물계면활성제 거의 생산되지 않았으며 0.0015%까지 농도를 높여 가며 첨가할 경우 생산량이 증가하였고, 그 이상의 농도에서는 더 이상 증가하지 않았다. 따라서 FeSO₄ · 7H₂O는 0.0015%를 최적 농도로 정하였다.(Table 6)

Table 5. Effect of MgSO₄ · 7H₂O concentration on the production of biosurfactant

Concentration (%)	Growth (g/l)	Minimum surface tension(dyne/cm)	Dilution factor (Fcmc)
0	0.12	70.4	1.0
0.005	3.32	36.2	1.0
0.01	3.72	30.8	5.3
0.015	4.11	30.8	5.8
0.02	4.48	30.6	8.7
0.025	4.37	30.6	4.9
0.03	4.07	30.1	4.1
0.035	3.74	30.0	3.2
0.04	3.52	30.6	2.4

Table 6. Effect of FeSO₄ · 7H₂O concentration on the production of biosurfactant

Concentration (%)	Growth (g/l)	Minimum surface tension(dyne/cm)	Dilution factor (Fcmc)
0	4.64	33.8	1.6
0.0005	4.50	30.2	4.4
0.001	4.66	30.1	6.8
0.0015	4.52	30.1	7.6
0.002	4.67	30.3	7.1
0.0025	4.22	30.1	6.5
0.003	3.72	30.1	6.1
0.0035	3.54	30.0	5.3
0.004	3.40	30.0	2.6

통기량이 생물계면활성제 생산에 미치는 영향을 Table 7에서 보는 바와 같다. 250ml 용량의 삼각플라스크내 배지량이 적을수록 높은 생육도와 생물계면활성제 생산량을 보였다. 이것은 *Pseudomonas* sp. EL-G527이 호기적으로 *n*-hexadecane을 분해

하여 생물계면활성제를 생산함을 의미한다.

Table 7. The effect of aeration on the production of biosurfactant

Medium volume(ml)*	Growth (g/l)	Minimum surface tension(dyne/cm)	Dilution factor (Fcmc)
30	0.873	30.7	8.6
50	0.921	31.9	8.3
75	0.918	32.2	6.1
100	0.742	32.6	4.2
150	0.4313	39.3	2.1

* Medium volume(ml) in 250ml shaking flask.

3.4. 최적조건에서 공시균주의 생육도 및 생물계면활성제의 생산

상기 실험 결과에 의하여 최종적으로 확립된 생물계면활성제 생산 최적조건은 *n*-hexadecane 0.2%, NH₄NO₃ 0.2%, KH₂PO₄ 0.3%, K₂HPO₄ 0.3%, MgSO₄ · 7H₂O 0.02%, CaCl₂ · 2H₂O 0.025%, FeSO₄ · 7H₂O 0.0015%, pH 7.0 및 30°C이었다. 최적 배지 및 배양조건에서 *Pseudomonas* sp. EL-G527의 생육도 및 생물계면활성제 생산능을 조사한 결과는 Fig. 1에서 보는 바와 같다. *Pseudomonas* sp. EL-G527는 배양 18시간째부터 대수증식기에 들어갔으며, 균체의 증식과 함께 배양액의 pH가 저하되었고 배양 40시간째부터 생물계면활성제의 생산이 이루어짐과 동시에 pH도 증가하여 최종적으로는 초기 pH와 유사한 값을 보였다. 생물계면활성제의 생산은 균의 생육과 함께 서서히 이루어지다가 배양 84시간째에 최고가 되었다.

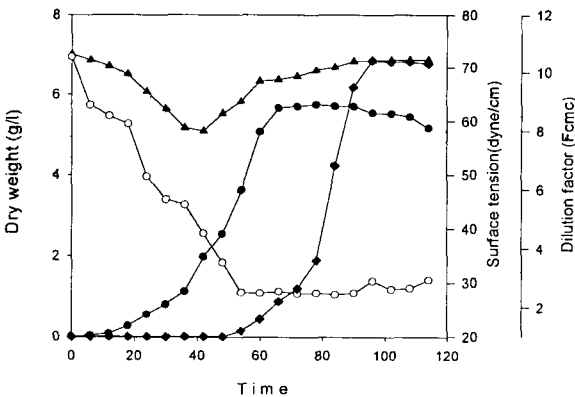


Fig. 1. Cell growth and production of biosurfactant from *Pseudomonas* sp. EL-G527 on the optimal condition.

● - cell growth, ○ - surface tension,
 ▲ - pH, ◆ - dilution factor(Fcmc)

4. 결 론

활성슬러지로부터 생물계면활성제를 생산하는 *Pseudomonas* sp. EL-G527을 분리 및 동정하였다. 생물계면활성제 생산 최적조건은 *n*-hexadecane 0.2%, NH₄NO₃ 0.2%, KH₂PO₄ 0.3%, K₂HPO₄ 0.3%, MgSO₄ · 7H₂O 0.02%, CaCl₂ · 2H₂O 0.025%, FeSO₄ · 7H₂O 0.0015%, pH 7.0 및 30°C이었다. 250 ml 용량의 삼각 플라스크에 배지 30 ml을 첨가했을 때 생물계면활성제 생산량이 가장 높았다. 확립된 최적배지에서 배양 4일째에 생물계면활성제 생산이 가장 높았다.

이후 *Pseudomonas* sp. EL-G527이 생산하는 생물계면활성제를 분리 정제하고, 그 특성을 밝혀 기존의 합성계면활성제와 비교함으로써 그 상업적 가치를 고찰하는 한편, 대량생산 기법을 확립함으로써 합성계면활성제의 대처방안을 모색하고자 한다.

감사의 글

이 논문은 한국과학재단 지정 환경기술·산업개발연구센터(RRC-IETI)의 지원(99-10-05-02-A-3)에 의하여 연구되었으며, 이에 감사드립니다.

참고 문헌

- 1) Suzuki, T., K. Tanaka, I. Matsubara and S. Kinoshi, 1969, Trehaloses lipid and α -branched- β -hydroxyfatty acid formed by bacteria grown on *n*-alkanes, *Agr. Biol. Chem.*, 11, 1619-1627.
- 2) Zajic, J.E. and K. Seffens, 1984, Biosurfactants, *CRC Crit. Rev. Microbiol.*, 5, 87-107.
- 3) Haferburg, D., R. Hommel, R. Claus and H.P. Kleber, 1986, Extracellular microbial lipids as biosurfactant, *Adv. Bioche. Engin/Biotech.*, 33, 53-53.
- 4) Parkinson, M., 1985, Biosurfactants, *Biotech. Adv.*, 3, 65-68.
- 5) Zajic, J.E., 1976, Bio-emulsifiers, *CRC Crit. Rev. Microbiol.*, Nov., 39-66.
- 6) Thomas R., 1996, Significance of bacterial surface-active compounds interaction of bacteria with interface, *Microbiol. Rev.*, 60, 151-166.
- 7) Kosaric, N., N. C. C. Gray, and W. L. Cairns, 1987, *Biotechnology and surfactant Industry, Biosurfactants and Biotechnology*, N. Kosaric, W. L. Cairns, N. C. C. Gray eds., 1-45.
- 8) Dunvnjak, J. D. G. Cooper and N. Kosaric, 1982, Production of biosurfactant by *Arthrobacter*

- paraffineus* ATCC 19558, *Biotechnol. Bioeng.*, 24, 165-175.
- 9) Poremba, K., W. Gunkel, S. Lang, and F. Wagner, 1991, Marine biosurfactants, III. toxicity testing with marine microorganisms and comparison with synthetic surfactants, *Z. Naturforsch.*, 46c, 21-216 14.
 - 10) Shepherd, R., J. Rockey, I. W. Sutherland, and S. Roller, 1995, Novel Bioemulsifier from Microorganisms for Use in Foods, *J. Biotechnol.*, 40, 207-217.
 - 11) Roller, S. and I. C. M. Dea, 1992, Biotechnology in the Production and Modification of Biopolymers for Foods, *CRC Crit. Rev. Biotechnol.*, 12, 261-277
 - 12) Park, J.Y. and I.S. Park, 1998, Emulsification of bunker-C oil by a marine bacterium *Arthrobacter* sp. M-1220, *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, 16, 384-388.
 - 13) Gutnick, D.L. and E. Rosenberg, 1977, Oil tankers and pollution: a microbiological approach, *Ann Rev. Microbiol.*, 31, 379-396.
 - 14) Aheam, G.P., 1987, Surfactants for oil recovery, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 46, 540-580.
 - 15) Beerstecher, E., 1954, *Petroleum Microbiology*, Elsevier, Houston.
 - 16) Kim, D.W., M.J. Kim and S.M. Kang, 1995, Purification and properties of Biosurfactant from *Pseudomonas aeruginosa*, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 23, 337-345.
 - 17) 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, Chunjo.
 - 18) Lee, K.H., 1993, Carbon mass balance analysis of biosurfactant, sophorose lipid, fermentation by *Torulopsis bombicola*, Ph. D. Thesis, Dept. of Biotechnology, KAIST, Daejon.
 - 19) Lee, J.M., 1993, The studies on biosurfactant production by Microorganism, M. S. Thesis, Dept. of Microbiology, Pusan National Univ., Busan.
 - 20) Chopineau, J., F.D. MacCafferty, M. Therisod, and A.M. Klibanov, 1988, Production of bio-surfactant from sugar alcohol and vegetable oils catalyzed by lipase in a nonaqueous medium, *Biotechnol. Bioeng.*, 31, 208-214.
 - 21) Magaritis, A., K. Kennedy, J.E. Jajic, and D.F. Gerson, 1979, Biosurfactant production by *Nocardia erythropolis*, *Develp. Ind. Microbiol.*, 20, 623-630.
 - 22) Luis, G.S. and K. Othmar, 1984, *Pseudomonas aeruginosa* biosurfactant production in continuous culture with glucose as carbon source, *Appl. Environ. Microbiol.*, 48, 301-305.
 - 23) Krieg, N.R. and J.G. Holt, 1984, *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 1, The William and Wilkins Co., U.S.A.
 - 24) Krieg, N.R. and J.G. Holt. 1974, *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* 9th ed. The William and Wilkins Co., U.S.A., 21.
 - 25) Itoh, S. and T. Suzuki, 1974, Sucrose lipids of *Arthrobacter*, *Corynebacteria*, and *Nocardia* grown on sucrose, *Agri. Biol. Chem.*, 38, 557-563.
 - 26) Hisatsuka, K., 1971, Formation of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* and it's function in hydrocarbon fermentation, *Agri. Biol. Chem.*, 35, 686-692.