

Biosurfactant를 생산하는 *P. aeruginosa*. KK-7의 분리 및 Biosurfactant의 생산

강상모* · 김대원 · 김혜자¹

건국대학교 미생물공학과, ¹한양대학교 식품영양학과

Isolation of Biosurfactant-Producing *P. aeruginosa* KK-7 and the Biosurfactant Production

Kang, Sang-Mo*, Dae-Weon Kim and Hye-Ja Kim¹

Department of Microbiological Engineering, Konkuk University,
Seoul 133-701, Korea

¹Department of Food and Nutrition, Hanyang University,
Seoul 133-791, Korea

Abstract — The bacteria which secrete surface-active agent and decrease the surface tension of culture broth were isolated from soil samples. Among them, biosurfactant producing strain KK-7 was selected and emulsification was also detected. The KK-7 produced biosurfactant not only lipid but also glucose by using carbon source. Taxonomical characterization tests have demonstrated the strain KK-7 to be *Pseudomonas aeruginosa*. The media composition of the *P. aeruginosa* KK-7 for the biosurfactant production was 1% glucose, 0.5% tryptone, 0.2% yeast extract, 0.15% potassium phosphate mono-dibasic, 0.05% MgSO₄, initial pH 8.5, at 30°C for 2 days. In this condition, the concentration of biosurfactant was reached CMC 5 in the culture broth. Surface active material was produced maximum at stationary phase, but emulsification power was higher at log phase than stationary phase. It was considered that *P. aeruginosa* KK-7 produced biosurfactant more than one type having different properties and each maximum production time was different. The minimum surface tension of biosurfactant in 50 mM Tris buffer (pH 8.0) was 28 dyn/cm, and CMC was 1 g/L.

계면활성제는 물에 녹아 표면에 있는 물분자의 결합을 약화시켜 그 농도가 증가함에 따라 물의 표면장력이 급격히 감소하며 일정한 표면장력에 이르면 micell을 형성한다. Critical micell concentration (CMC)는 micell이 형성되는 시점의 계면활성제의 농도를 말한다(1). 물과 기름의 혼합상태 일 경우 계면활성제에 의하여 표면장력이 저하되면 각 분자간의 인력이 작아져 계면의 확산이 용이해지고 유화(emulsion)상태가 형성된다. 이 상태는 분자내에 친수성과 소수성 부위를 같이 갖는 특징에서 기인하며, 구조의 특성에 따라 다양한 성질을 가진다(2).

현재 많은 종류의 합성계면활성제가 제조되어 각종 공업에 폭 넓게 사용되고 있으며 사용량의 증가에 따라 물질자체의 독성과 난분해성에 의해 하천 및

바다의 오염에 크게 영향을 미치고 있어 생물 유래 계면활성제(biosurfactant)의 개발이 요구되고 있다. Biosurfactant는 종래의 합성계면활성제와는 달리 생물체에서 생산되는 물질이므로 생분해도가 우수하며 독성이 적고, 분자구조의 다양함에 의해 특이적인 목적에 활용될 수 있다는 장점을 가진다(3). 그 중에서 미생물에서 생산되는 biosurfactant는 구조적으로 glycolipid, peptidolipid와 polysaccharide 등으로 분류될 수 있으며, 그 분자구조 또한 생산균주에 따라 다양하여 각기 독특한 물성을 가진다. 그러므로 환경오염이 날로 심각해져 가는 현 상황에서 합성계면활성제와 대치될 수 있는 biosurfactant의 필요성은 중대하다 할 수 있다. 이러한 biosurfactant에 관한 연구 중 biosurfactant 생산균주를 분리하고 그 물질 생산에 미치는 영양인자의 효과에 대한 조사를 하여 보고하는 바이다.

Key words: Biosurfactant, *Pseudomonas aeruginosa*
*Corresponding author

재료 및 방법

Biosurfactant 생산균주의 분리 및 선별

본 연구를 위한 균주는 여러 지역의 토양을 채취하여 분리하였다. 토양시료를 일반적인 희석방법을 이용하여 원유를 도말한 Table 1의 media 1에 접종하고, 30°C 에서 2~4일간 배양하였다. 이들 중 oil 도말배지에서 clear zone이 나타난 colony를 다시 액체배지에서 진탕배양하여 표면장력이 저하된 균주를 선택하였다. 이중 표면장력이 저하된 균주 중 가장 좋은 활성을 나타내는 KK-7 균주를 분리하였다.

균주의 동정 및 생리적 특성실험

선별된 균주를 Bergey's manual of systematic bacteriology(4)와 Biochemical tests for identification of medical bacteria(5)에 준하여 동정실험을 하였다.

배양방법

100 ml 삼각 flask에 액체배지 20 ml을 분주하여 멸균 후 1일 배양한 전배양액을 2.0%의 농도로 접종하고 30°C 에서 2~3일간 왕복진탕배양하였다. Biosurfactant 생산에 미치는 영양인자 조사는 NaNO₃ 2 g, KH₂PO₄ 0.5 g, K₂HPO₄ 1.0 g, MgSO₄ 0.5 g, CaCl₂ 0.01 g, MnSO₄ 0.01 g, FeSO₄ 0.01 g, ZnSO₄ 0.01 g을 기준배지로 하고 각 조건에 따라 배양하였으며, 배양이 끝난 후 균체량, pH, 표면장력, 유화도를 측정하고 활성이 좋은 조건을 선택하여 배양조건을 선정하였다. 각 조건의 검토 후 그 조건을 기준으로하여 다음 영양인자의 조건을 조사 하였다. CMC 농도 이상의 시료는 50 mM Tris buffer(pH 8.0)으로 3~5 배로 시료액을 희석하여 상대적인 활성을 측정하였다.

표면장력의 측정

표면장력의 측정은 한국공업규격의 합성세제 시험방법(6)에 명시되어 있는 비표면장력계산법을 이용하였다. 비표면장력계에 일정량(6 ml)의 시료액을 넣고, 아래쪽의 모세관에서 이 액이 적하되는 방울수를 측정한 후 증류수의 방울수와 비교하여 상대적인 표면장력을 계산하였다. 계산방법은 아래와 같다.

$$\alpha = \frac{N_0}{N} \times \alpha_0$$

- α : 측정온도에 있어서의 시험액의 표면장력 (dyn/cm)
- α₀ : 측정온도에 있어서의 물의 표면장력(dyn/cm)
- N : 시험액의 방울수

Table 1. Composition of used media

Composition (g/L)	Media 1 ¹⁾	Media 2 ²⁾
Glucose	5	10.0
Yeast extract	1.0	2.0
Tryptone		5 0
NaNO ₃	2.0	
KH ₂ PO ₄	0.5	0.5
K ₂ HPO ₄	1.0	1.0
CaCl ₂	0.01	0.01
MgSO ₄	0.5	0.2
MnSO ₄ ·5H ₂ O	0.01	0.01
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.01	0.01
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.01	0.01

¹⁾ Screening media.

²⁾ Optimal media for biosurfactant production.

N₀ : 증류수의 방울수

유화도의 측정

유화도의 측정은 Zuckerberg 등(12)의 방법으로 다음과 같이 측정하였다. Hexadecane과 2-methyl naphthalene 동량 혼합물 0.1 ml에 시험액 2.5 ml을 첨가하고, 50 mM Tris-HCl buffer 7.4 ml로 pH를 8.0으로 조절하였다. 이 반응액을 150 rpm, 25°C, 1시간의 왕복진탕 운동으로 반응시킨 후, 10분간 정지한 다음 620 nm에서 흡광도를 측정하고 유화도로 환산하였다. O.D.값 0.1을 유화제 활성단위 1로 정하고 이를 기준으로 비교하였다.

Biosurfactant의 농도 측정

용액상태의 biosurfactant의 농도 측정은 Santos 등(7), Parra 등(8), Reiling 등(9)의 방법으로 하였다. 활성물질의 농도에 따라서 표면활성이 달라지는 점에 기초를 둔 방법으로, CMC 이하의 농도에서는 계면활성제는 표면활성을 상실하며, 이로 인하여 표면장력의 증가가 생긴다. 배양액을 표면장력이 증가할 때까지 희석하고, 표면장력이 증가하는 시점의 농도를 dilution factor(F_{cmc})로 정하였다. 이 F_{cmc}의 증가치로 활성물질농도의 증가를 알 수 있었다.

결과 및 고찰

Biosurfactant 생산균주의 분리 및 동정

앞의 방법과 같이 토양에서 분리한 142균주 중 oil 도말 배지 및 액체배양에서 가장 활성이 좋은 균주 KK-7 균주를 분리하였다. 분리균주 KK-7을 Bergey's

manual of systematic bacteriology와 Biochemical tests of medical bacteria에 따라 동정실험을 행한 결과는 Table 2와 같다. Cetrinide agar와 *Pseudomonas* isolation medium에서 증식하였고, 6.5% NaCl이 첨가된 배지와 41°C 이상의 온도에서 증식하지 않았다. 전자현미경으로 관찰한 결과 간균으로 편모를 가지고 있었고 크기는 1.5~2×0.4~0.8 μm이었다(data not shown).

Agar 평판배지에서 형광색소를 생산하였고, 운동성이 있으며, spore를 형성하지 않았다. Glucose, D-mannose, trehalose를 제외한 당당류 이상의 탄수화물은 이용하지 못하였다. Catalase, oxidase test에 양성이었으며 nitrate reduction은 음성이었다. Nitrate reduction 결과가 *Pseudomonas aeruginosa*와 동일하지 않았으나 *Pseudomonas* 속의 다른 균주나 타속의 균주들의 특성과 비교하여 볼 때 상이한 점이 매우 많았다. 본 균주의 형태학적, 생리학적 특성을 종합하여 볼 때 *Pseudomonas aeruginosa*의 근연종으로 판단되어 본 균주를 *Pseudomonas aeruginosa*로 동정하였다.

분리균주의 배양상의 특성

일반적으로 미생물에 의한 biosurfactant의 생산은 친수성의 세포표면과 소수성 영양원의 접촉을 높이는 일종의 자화를 위한 수단으로 생각되어 왔고 또한 이와 관련된 연구가 진행되어 왔다(10-16). 그러나 이와는 다르게 탄화수소를 탄소원으로 이용한 biosurfactant의 생산은(7-9) 이 물질이 미생물의 영양원 전이수단이 아닌 다른 목적의 대사산물일 것이라는 추측을 하게 되었다. 이 *P. aeruginosa*의 두 부류에서 생산되는 biosurfactant의 구조에 있어서는 서로 유사성을 나타낸다. 본 연구에서는 glucose를 탄소원을 이용하여 배양시에 표면장력을 낮추고 유화능을 가지는 분리균주 KK-7의 각 생산인자의 영향을 검토하기 위하여 flask에서 진탕배양하며 각 영양원에 대한 균주의 증식과 표면장력의 저하 및 유화능을 조사하였다.

탄소원 및 질소원의 영향: 기본배지에 각 탄소원을 2% 첨가하여 균주의 활성을 조사한 결과는 Table 3과 같다. n-Alkane의 자화능은 보이지 않았으나 olive oil, oleic acid와 glucose에서 높은 활성을 나타냈다. *P. aeruginosa*를 이용시에, Santos 등(7), Parra 등(8), Reiling 등(9)은 glucose를 이용하여 glycolipid biosurfactant를 생산하였는데 이때 유화능은 보고하지 않았으며, Hisatsuka 등(17)이 alkane 및 소수성 기질을 이용하며 표면활성과 유화력을 가진 물질을 보고한

Table 2. Taxonomical characteristics of the isolated strain KK-7

Characteristics	KK-7	<i>P. aeruginosa</i>
Morphological characteristics		
Cell form	Rods	Rods
Size (μm)	0.4~0.8	0.5~1
Length (μm)	1.5~2.0	1.5~5.0
Motility	+	+
Gram staining	-	-
Spore	-	-
Colony color	Yellow white	
Aerobe	+	+
Culture characteristics		
Growth on Cetrinide agar	+	+
Growth on medium for <i>Pseudomonas</i> isolation	+	+
Growth on 6.5% NaCl	-	-
Growth on 4°C	-	-
Physiological characteristics		
Fluorescent pigment	+	+
Catalase	+	+
Oxidase	+	+
Voges-proskauer test	-	-
O/F glucose	O	O
Alkaline phosphatase	+	+
Hydrolysis of		
gelatine	+	+
starch	-	-
Utilization of		
citrate	+	+
urea	+	+
D-xylose	-	-
L-arabinose	-	-
D-mannose	+	+
D-galactose	-	-
sucrose	-	-
trehalose	+	+
L-rhamnose	-	-
maltose	-	-
adonitol	-	-
sorbitol	-	-
inositol	-	-
L-alanine	+	+
Nitrate reduced to nitrite	+	-
Formation of		
indole	-	-
H ₂ S	-	-
Arginine dehydrogenase	+	+

+ : 90~100% positive, - : 0~10% positive, V: 11~89% positive, O: oxidation, G: growth, NG: none growth.

Table 3. Effects of carbon sources on the biosurfactant production

Carbon sources ¹⁾	Final pH	Cell growth (O.D. ₆₆₀)	Surface tension (dyn/cm)	Emulsification (unit)
None ²⁾	7.3	0.01	73	0.2
Glucose	6.2	2.17	39	7.9
Glycerol	7.3	0.04	79	0.8
Paraffin	7.4	0.01	73	1.5
Olive oil	8.8	2.12	43	4.9
Oleic acid	8.2	1.81	34	7.7
Decane	7.4	0.01	72	0.5
Hexadecane	7.4	0.02	73	0.7
Tetradecane	7.4	0.03	73	0.6

¹⁾Carbon sources are 2% content with basal medium.

²⁾NaNO₃ 2 g, KH₂PO₄ 0.5 g, K₂HPO₄ 1.0 g, MgSO₄ 0.5 g, CaCl₂ 0.01 g, MnSO₄ 0.01 g, FeSO₄ 0.01 g, ZnSO₄ 0.01 g.

Table 4. Effects of nitrogen sources on the biosurfactant production

Nitrogen sources ¹⁾	Final pH	Cell growth (O.D. ₆₆₀)	Surface tension (dyn/cm)	Emulsification (unit)
None	7.2	0.03	72	0.2
(NH ₄) ₂ SO ₄	6.7	0.45	71	0.6
NH ₄ NO ₃	7.0	0.30	72	0.5
Ammonium citrate	6.3	2.30	65	4.0
NaNO ₃	6.4	2.15	35	7.6
Yeast extract	7.4	1.76	37	9.6
Beef extract	7.1	0.39	71	0.2
Malt extract	7.1	0.04	72	0.2
Tryptone	7.6	1.52	44	5.2
NaNO ₃ +Y (1:1)	8.6	1.62	32	20.0
NaNO ₃ +Y+T (1:1:2)	8.7	1.66	30	19.8
Y+T (1:2)	8.5	1.90	30	19.0

Y: Yeast extract. T: tryptone.

¹⁾Nitrogen sources are 1% content with basal medium plus glucose 2%.

바 있다. 본 균주는 glucose를 이용하며 표면활성과 유화능을 나타내므로 보고된 *P. aeruginosa*와는 다른 특성을 지니는 biosurfactant를 생산하는 것으로 생각된다.

Glucose를 2%를 함유한 기본배지에 질소원들을 1% 첨가한 후 영향을 검토한 결과는 Table 4와 같다. 단일 질소원으로 yeast extract, sodium nitrate, tryptone에서 유화도와 표면활성을 나타냈고 이들을 혼합하여 첨가시에 높은 활성을 나타냈다. 특히 tryptone과 yeast extract의 복합첨가시에 고농도의 biosurfactant의 생산을 보였다.

Glucose와 olive oil의 여러 농도에서 biosurfactant 생산은 Fig. 1과 같다. 1%의 농도에서 양쪽 모두 가장 좋은 활성을 보였으며 농도가 증가함에 따라 활성, pH가 급격히 감소하였다. Glucose 1%에서는 배양액을 1/4로 희석하여도 표면장력의 변화가 없어 olive

oil보다 훨씬 높은 농도를 나타냈으나 유화도에서는 olive oil이 오히려 약간 높은 활성을 나타냈다. 이것은 표면활성이 없는 유화물질이 소수성 기질에 의하여 유도되었고, 또한 기질의 분해에 의해 유리된 지방산의 영향이라 생각된다. 복합 질소원의 농도에 따른 영향은 Fig. 2와 같다. 0.7%~1.5% 사이에서 높은 활성을 나타냈으며 0.7% 이하의 농도에서는 표면활성과 유화도 모두 미약하여 질소원의 제한에 의한 생산증가는 나타나지 않았다. 또한 sodium nitrate의 존재는 biosurfactant의 활성에 크게 영향을 끼치지 않았다. 탄소원과 질소원의 농도는 biosurfactant 생산에 큰 영향을 끼치는 인자로 상대적으로 질소원의 결핍시에 지방산 합성대사의 증가를 유도하여 지질함유 biosurfactant의 생산증가를 나타낸다고 알려져 왔다(1, 7, 18). 그러나 본 균주는 이와는 달리 복합 질소원 0.7% 이상의 농도에서 물질 생산량이 높았다. 따라서 탄

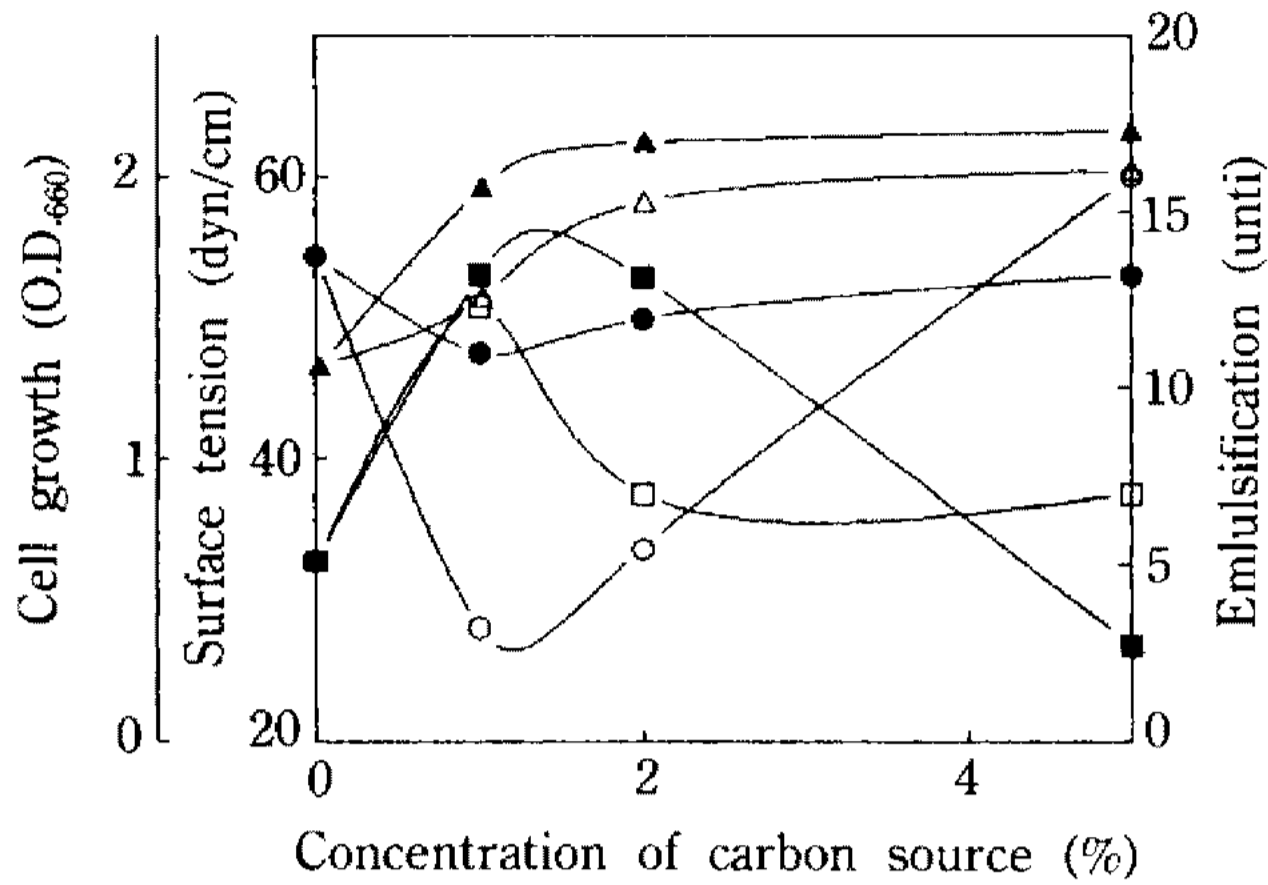


Fig. 1. Effects of glucose and olive oil on the biosurfactant production. Open symbols indicated glucose and filled symbols were olive oil. (○-●) surface tension, (□-■) emulsification, (△-▲) cell growth.

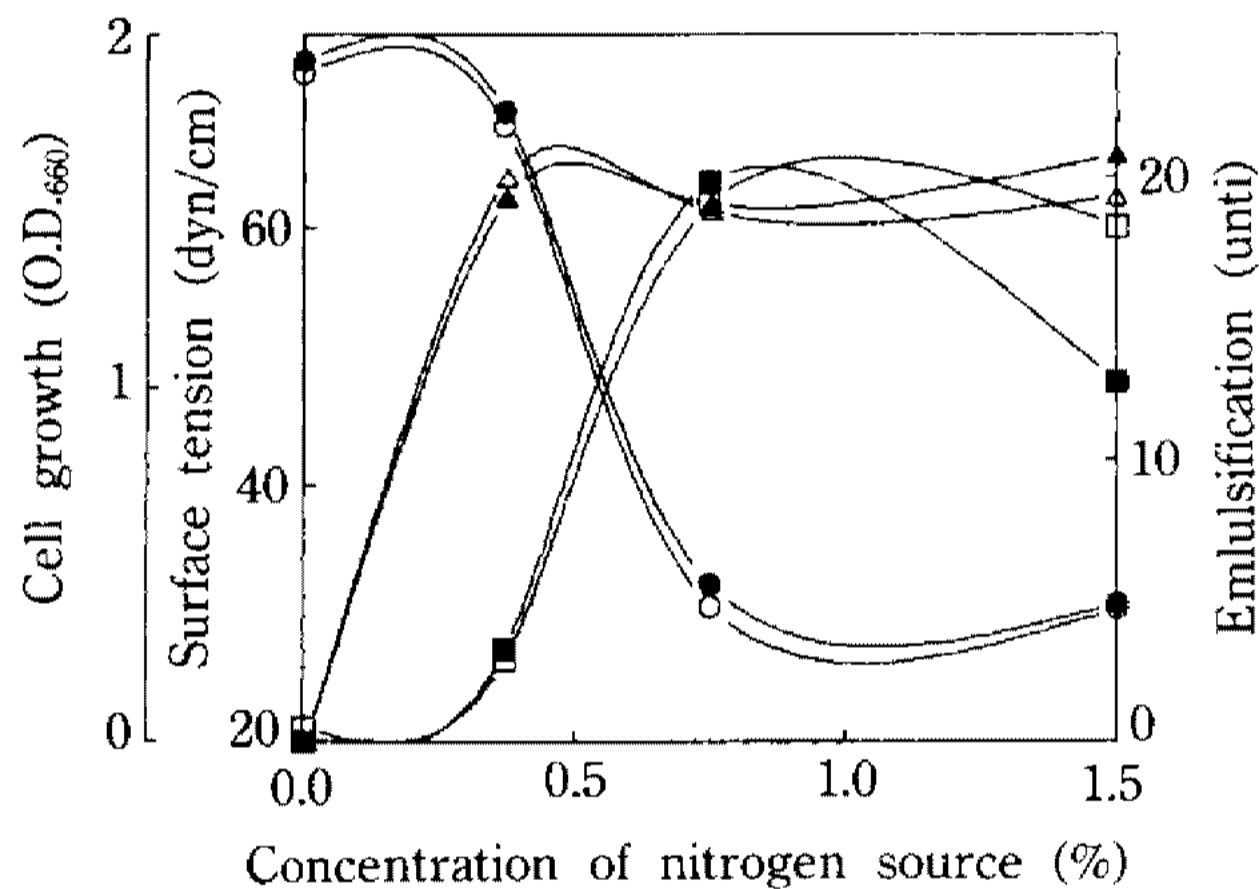


Fig. 2. Effects of nitrogen concentration on the biosurfactant production. Open symbols indicated tryptone and yeast ext. (2:1) and filled symbols were NaNO₃, tryptone and yeast ext. (1:2:1). (○-●) surface tension, (□-■) emulsification, (△-▲) cell growth.

소원은 glucose 1%, 질소원은 tryptone과 yeast extract 2 : 1 비율의 0.7%로 고정하였다.

인산염의 영향 : 미생물에 의한 biosurfactant의 생산에 관여하는 인자는 C, N원 외에도 여러 인자가 작용한다. 대표적인 glycolipid에서 lipid 부분의 합성은 세포의 지방산 합성기작에 큰 영향을 받는 것으로 생각되고 있다(3). 이와 관련되어 C/N 비율, P 농도, 금속이온의 농도와 biosurfactant 생산량에 관한 많은 연구가 이루어져 왔다. 인산염 농도의 영향은 potassium phosphate monodibasic의 농도를 0~0.2%까지 변화시키며 배양하여 Fig. 3의 결과를 얻었다. 인산염 농도 0.01%~0.15% 내에서는 표면장력은 CMC 농도를 유지하며 큰 차이가 없었으나 유화도에서는

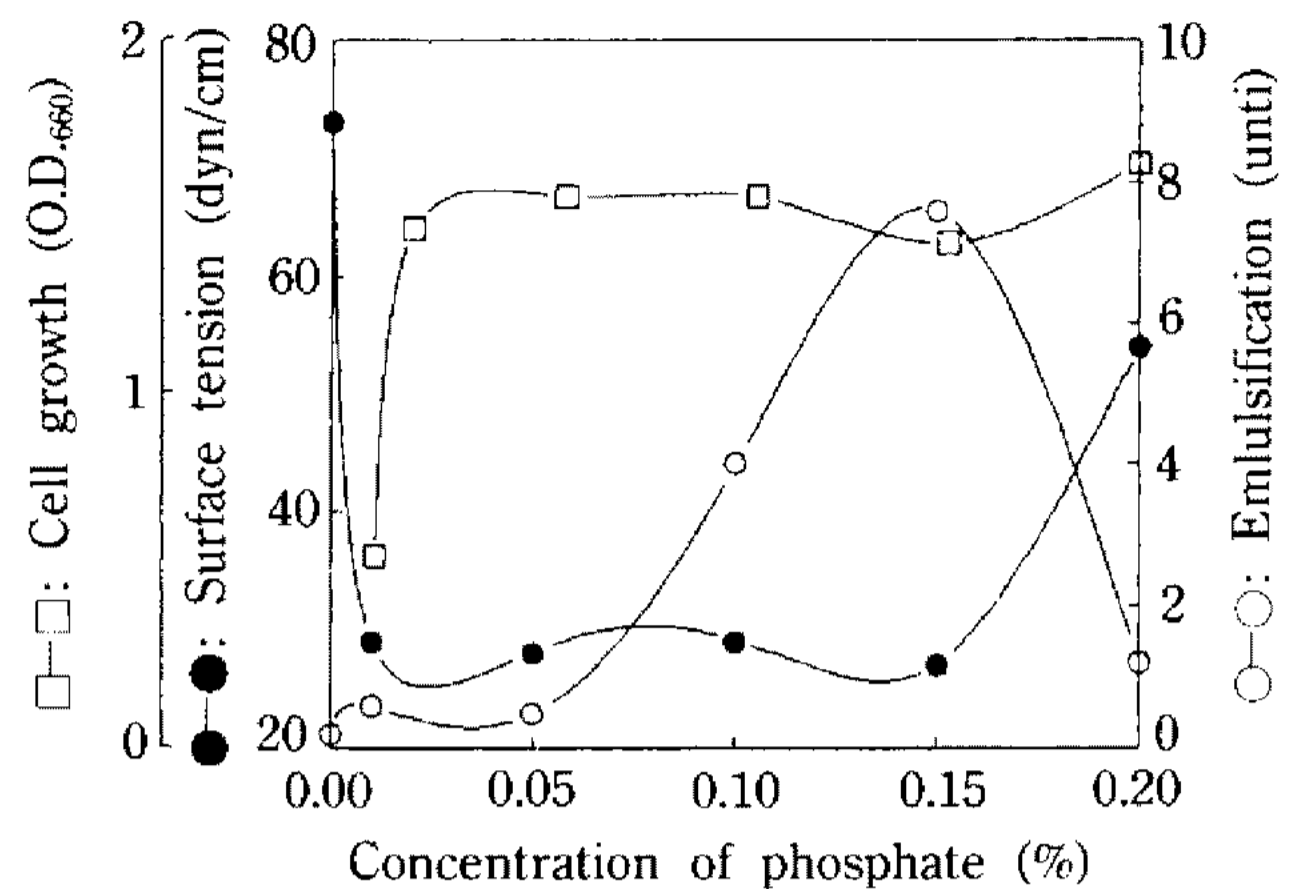


Fig. 3. Effects of phosphate concentration on the biosurfactant production.

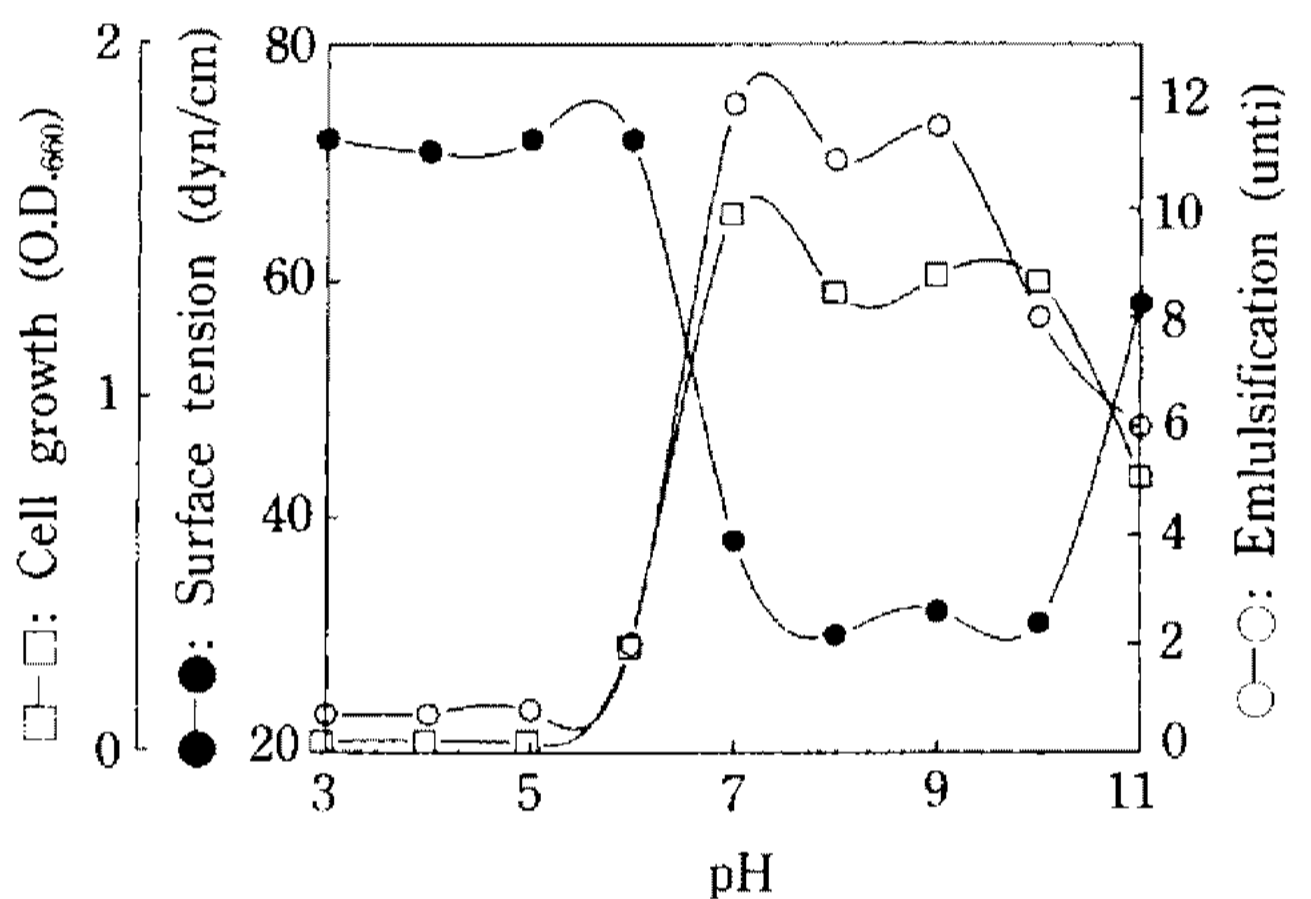


Fig. 4. Effects of initial pH on the biosurfactant production.

0.15%의 농도에서 가장 좋은 활성을 나타냈다. *P. aeruginosa*의 경우 인산염이 0.2 mg/l 이하의 농도로 제한된 배지에서 biosurfactant 생산이 증가하는 결과(19, 20)와는 상이하였다.

초발 pH의 영향 : 배양 후 균주의 증식과 pH의 관계를 볼 때 증식과 활성이 약한 경우는 배양 후의 pH가 5 이하로 매우 낮았는데 이의 조사를 위해 배지의 초발 pH를 3~11까지 변화시켜 그 영향을 조사하였다(Fig. 4). pH 3~6에서는 균주의 증식이 매우 미약하고 그 활성도 전혀 보이지 않았다. pH 7~10 사이에서는 배양 후 pH 8~9 정도가 되었으며 높은 활성을 나타냈다. 보고된 *P. aeruginosa*는 pH 6~7의 중성이하 pH가 biosurfactant 배양 최적 pH인 것(6, 19, 20)과는 다른 양상이었으며 균주의 증식과 활성을 볼 때 분리균주 *P. aeruginosa* KK-7은 배지의 초발 pH는 알칼리성인 pH 8-9가 적당하다고 생각된다. 이상과 같은 배지성분의 영향을 종합한 결과, 분리균주 KK-7의 biosurfactant 생산을 위한 영양인자는 Table 1의 media 2와 같다.

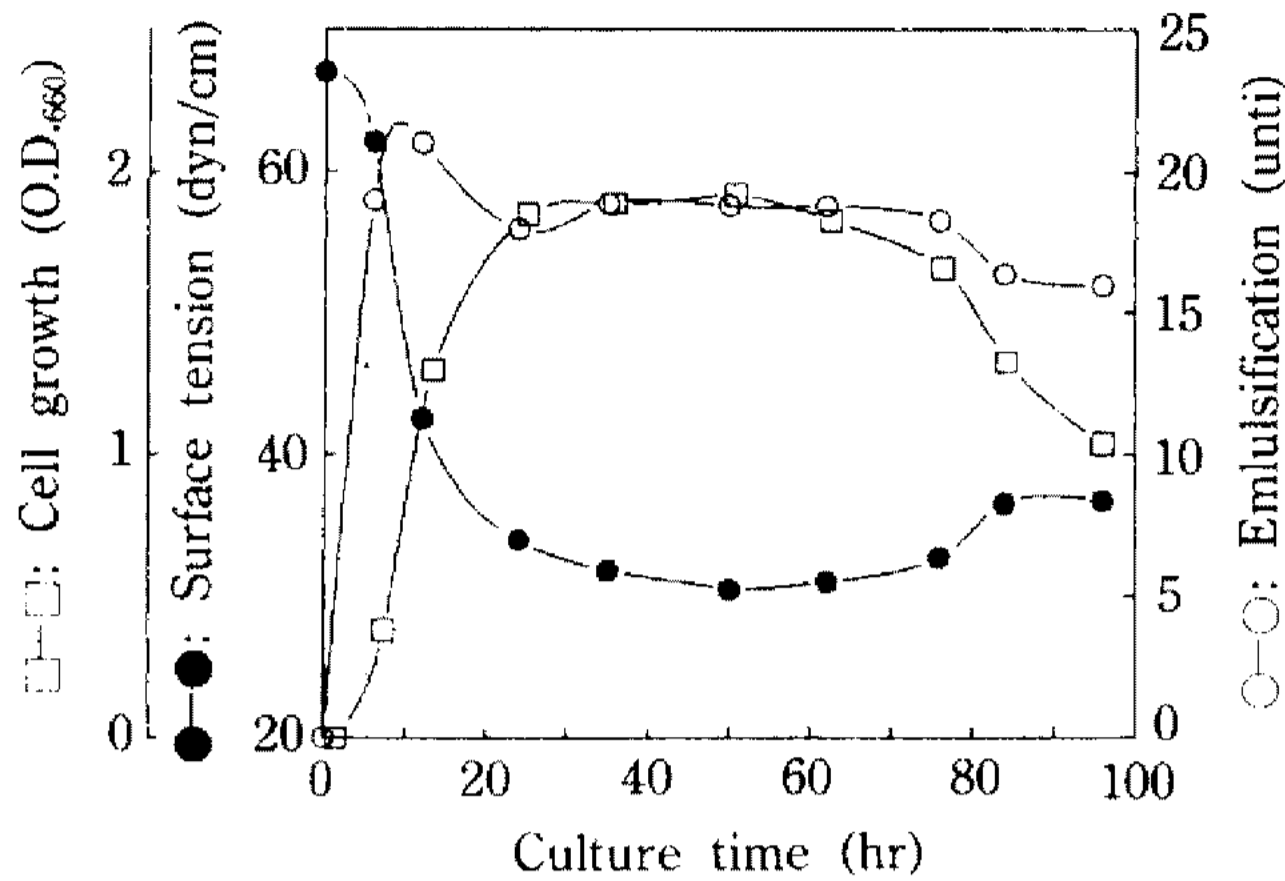


Fig. 5. Effects of culture time on the biosurfactant production.

배양시간의 영향 : 분리균주의 배양시간에 따른 활성의 변화는 Fig.5와 같다. 유화도는 균주의 대수증식기에 증식과 더불어 급격히 증가하다가 시간에 따라 약간 감소하였고 표면활성은 정지기에 많이 증가하였고 50시간에 30 dyn/cm으로 최저 표면장력을 나타내었다. Biosurfactant는 균주의 정지기에 이르러 탄소원이 biosurfactant로 전환되면서 다량 생산되며 (1), Mulligan 등(20, 21)도 *P. aeruginosa*에서 정지기 중에 glycolipid의 생산 보고를 하였으며 본 균주의 특성에도 일치하였다. 표면장력과 유화도 활성의 차이는 분리균주에서 생산되는 활성물질이 하나 이상으로 각기 다른 표면장력과 유화도를 가지며, 이들은 균주증식의 다른 시점에서 생산되어 지기 때문이라 생각된다. 이상과 같이 분리균주 *P. aeruginosa* KK-7은 보고된 다른 *P. aeruginosa*와는 달리 glucose를 이용시에도 유화물질의 생산이 나타나며 복합질소원의 충분한 상태에서 많은 생산을 보이고, 한 종류 이상의 biosurfactant를 생산하는 것으로 보여 독특한 성질을 가진 균주로 생각된다.

원심분리한 배양액에서 ethylacetate와 chloroform-methanol로 추출한 biosurfactant의 농도별 표면장력과 유화도는 Fig. 6과 같다. 추출물을 50 mM Tris buffer(pH 8.0)에 녹여 측정하였으며 CMC는 1 g/L 이상의 농도였으며 이 때 유화도는 크게 증가하였다. 배양시에 최고 biosurfactant 농도는 CMC 5의 농도를 나타냈으며 Fig. 6과 비교시에 본 균주는 5 g/L의 생산량을 나타냈다. 그러나 biosurfactant의 대량생산을 위해서는 좀 더 저가의 질소원을 첨가한 배지로의 배양, 배양 중에 영양원을 첨가해 주는 유가식 또는 연속배양에서의 연구가 필요하다고 생각되며 휴지기 세포의 고농도 배양의 방법도 바람직하다고 생각된다.

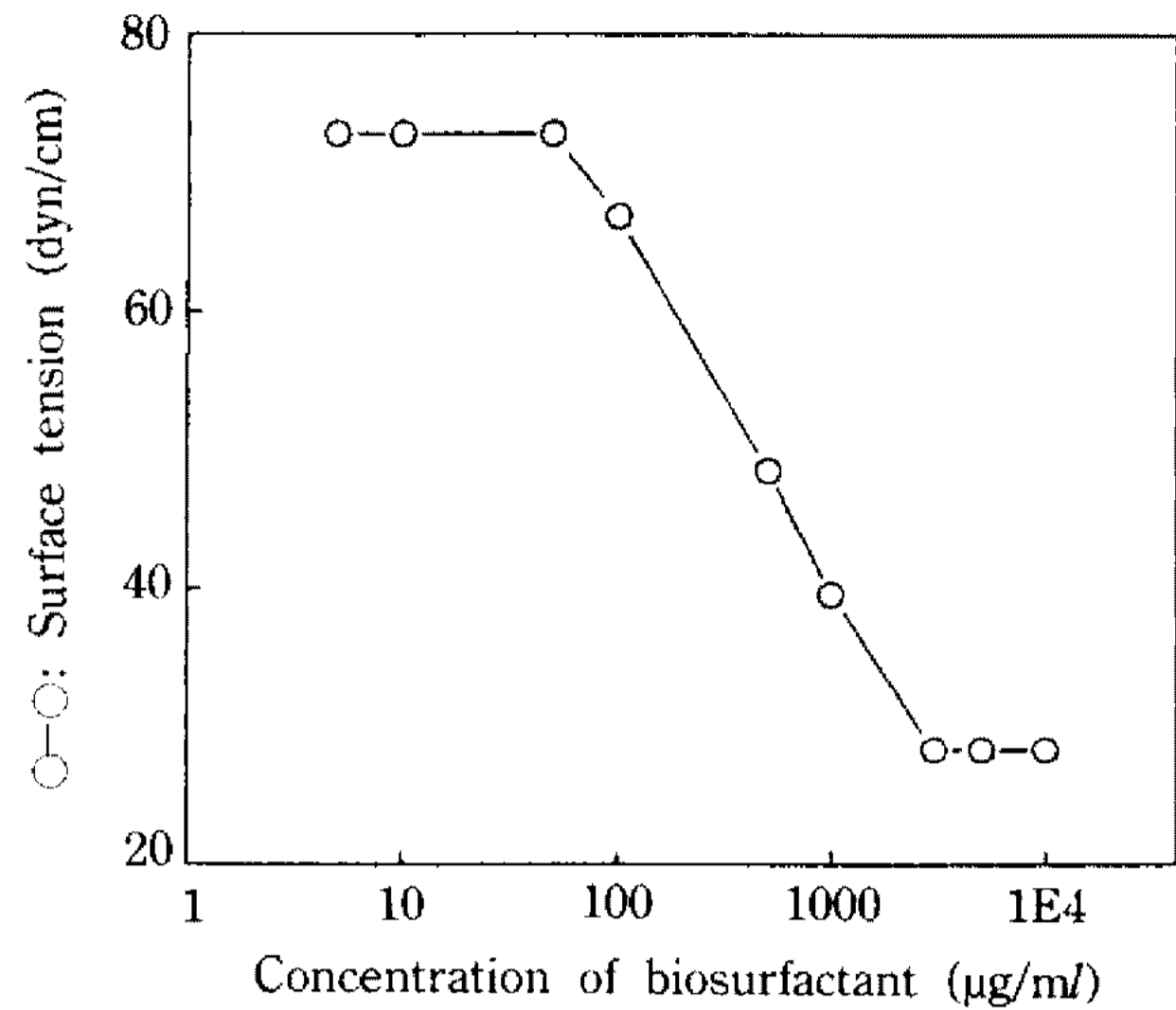


Fig. 6. Surface tension of biosurfactant.

Solvent extract from cell-free broth was solved in 50 mM Tris buffer (pH 8.0) and determined surface tension.

요 약

토양 및 균원시료에서 물의 표면장력을 저하시키는 biosurfactant 생산균주 KK-7을 분리하여 동정한 결과 *Pseudomonas aeruginosa*로 판명되었다. 배지 영양인자의 검토 결과, 일반적으로 소수성 탄소원을 이용하는 biosurfactant 생산균주들의 성질과는 달리 탄소원으로 glucose 1%을 이용한 biosurfactant를 생산능력이 우수하였다. 질소원은 tryptone 0.5%, yeast extract 0.2%의 복합질소원을 이용시에 높은 활성을 나타내었다. 또한 배지의 알칼리성 조건이 생산에 유리하였다. 50시간의 배양시간에서 최대 생산량을 나타내었으며 각기 다른 유화능력과 표면활성을 가지는 biosurfactant를 생산한다고 보인다. Biosurfactant 최대생산량은 CMC 5로 약 5 g/L였다.

감사의 말

본 연구는 1991~1992년도 한국과학재단 목적기초연구비(과제번호 913-0406-023-2) 지원의 일부로 수행되었으며, 지원에 감사드립니다.

참고문헌

1. Gennis, R.B. 1989. *Biomembranes. Molecular Structure and Function*. Springer-Verlag New York Inc.
2. Layman, P. 1985. Industrial surfactants set for strong growth. *Chem. Eng. News*, **63**: 23-48.

3. Kasaric, N. and W.L. Carins. 1987. *Biosurfactant and biotechnology*. Marcel Dekker Inc., New York.
4. Sneath, P.H.A., N.S. Mair, M.E. Sharpe, and J.G. Holt. 1986. *Bergey's manual of synthetic bacteriology*. Vol. 1.
5. Jwan, F.M. 1980. *Biochemical tests for identification of medical bacteria*. 2nd ed.
6. 한국공업규격 합성세제 시험법 KS M 2707, 1991.
7. Santos, L.G., O. Kappeli, and A. Fiechter. 1984. *Pseudomonas aeruginosa* biosurfactant production in continuous cultures with glucose as carbon source. *Appl. Environ. Microbiol.* **48**: 301-305.
8. Parra, J.L. and J. Guinea. 1989. Chemical characterization and physicochemical behavior of biosurfactant. *JAOCs*. **66**: 141-145.
9. Reiling, H.E., U. Thanei-wyss, L.H. Guerra-santos, and O. Käppeli. 1986. Pilot plant production of rhamnolipid biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* **51**: 985-989.
10. Hisatsuka, K. 1971. Formation of rhamnolipid by *Pseudomonas aeruginosa* and its function in hydrocarbon fermentation. *Agri. Biol. Chem.* **35**: 686-692.
11. Iguchi, T. and I. Takeda. 1969. Emulsifying factor of hydrocarbon produced by a hydrocarbon assimilating yeast. *Agri. Biol. Chem.* **33**: 1657-1658.
12. Zucherberg, A., A. Diver, and Z. Peeri. 1979. Emulsifier of *Arthrobacter* RAG-1 : chemical and physical properties. *Appl. Environ. Microbiol.* **37**: 414-420.
13. 박중연. 1988. 해양세균 *Arthrobacter* sp. M-1220 균주에 의한 bunker-C유의 유화. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **16**: 384-388.
14. Cirigliano, M.C. and G.M. Carman. 1985. Purification and characterization of liposan a bioemulsifier from *Candida lipolytica*. *Appl. Environ. Microbiol.* **50**: 846-850.
15. Suzuki, T. and K. Ogawa. 1972. Transient accumulation of fatty alcohol by n-paraffin grown microorganisms. *Agri. Biol. Chem.* **36**: 457-463.
16. Itoh, S., H. Honda, F. Tomita, and T. Suzuki. 1971. Rhamnolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa* grown on n-paraffin. *J. Antibio.* **24**: 855-859.
17. Hisatsuka, K., T. Nagahara, and K. Yamada. 1972. Protein like activator for-alkane oxidation by *Pseudomonas aeruginosa* S₇B¹. *Agri. Biol. Chem.* **36**: 1361-1369.
18. Wagner, F., U. Behrendt, H. Bock, A. Kretschmer, and S. Lang. 1983. *Microbiol Enhanced Oil Recovery*, Pennwell Books, Tulsa, Oklahoma.
19. Santos, L.G., O. Kappeli, and A. Fiechter. 1986. Dependence of *Pseudomonas aeruginosa* continuous culture biosurfactant production on nutritional and environmental factors. *Appl. Microbiol. Biotech.* **24**: 443-448.
20. Mulligan, C.N., G. Mahmoudides, and B.F. Gibbs. 1989. The influence of phosphate metabolism on biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biotech.* **12**: 199-210.
21. Mulligan, C.N., G. Mahmoudides, and B.F. Gibbs. 1989. Biosurfactant production by a chloramphenicol tolerant strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biotech.* **12**: 37-44.

(Received December 2, 1993)