

토양으로부터 분리한 유화성 생체계면활성 균주의 배양 특성

임 윤 택* · 윤 용 수

*국립기술품질원, 단국대학교 화학공학과

Characteristics of Culture for Emulsive Biosurfactant-Strain from the Soil

Yoon-Teak Lim* · Yong-Soo Yoon

*National Institute of Technology & Quality,
Department of Chemical Engineering, Dankook University

Abstract

The result of isolated and selected to the strain having the emulsifying activity from soil's strain, the strain was indentified as Candida genus. The strain was investigated with culture condition at pH, culture temperature, flow rate of air, string rate etc., and physicochemical properties of the biosurfactant were examined.

The optimum composition of medium for a strain cultivation were obtained as follow : glucose ; 100g/L, yeast extract ; 10g/L, urea ; 1.0g/L, KH_2PO_4 ; 50mg/L, MgSO_4 ; 500mg/L, and the op condition of cultivation was as follow : pH ; 3.0, temperature ; 24°C, string rate ; 40rpm.

The maximum yield of biosurfactant was obtained by pH ; 3.0~3.5, and temperature ; 25°C. The degree of emulsification of syntesized biosurfactant was increased clearly by increasing concentration of biosurfactant, and it's stability was maintained for a long time. The surface tension of biosurfactant was varied with pH, especially it was showed that the surface tension was high at acidic pH.

I. 서 론

계면활성제는 친수성 부분과 소수성 부분을 가지는 화학구조적 특성을 가지고 있어 계면에 선택적으로 배향·흡착하여 표면장력을 감소시키는 역할을 하는 물질을 말한다.^{1,2)} 그 물성으로는 분산성(dispersion), 유화성(emulsification), 침투성(penetration), 습윤성(wettability), 기포형성(foaming), 기포방지(defoaming) 등이 있다. 이러한 특성으로 인하여 의료품, 화장품, 농약, 세제 등 산업분야 뿐만 아니라 가정의 생활품에 이르기까지 다양하게 응용되고 있다. 최근에는 그 영역이 확장되어서 microelectronics, 자기 기록 매체, 고급 전지, 최신 분리 기술, 배기가스 중 탄화수소의 제어, 전자 인쇄용 액체 인화제 등의 개발과 연구에도 활용되고 있다.³⁾ 계면활성제의 사용량은 1980년대에 300 %가 성장하였으며, 1989년 한 해에는 14 %의 성장율을 기록, 총 매출액이 36억 5천만 달러에 이르렀고 전 세계적으로는 76억 파운드가 생산되었다.⁴⁾

그러나 합성계면활성제의 과소비와 독성, 그리고 난분해성때문에 오늘날에 와서는 심각한 환경오염을 유발하고 있다. 1980년대에 선진국에서는 이미 합성계면활성제의 문제점들이 제기 되면서 ABS(alkyl benzene sulfonate) 등의 품목에 대해서는 사용 및 생산을 금지시키고 있으며, 그 외의 현재 사용중인 계면활성제에 대해서도 환경오염의 논란이 끊이지 않고 있다.⁵⁾

이에 반해 생물체가 생산하는 계면활성제는 이제까지 합성계면활성제가 사용된 대부분의 분야에 응용 가능하며, 독성이 없고 생분해력이 우수하여 사용가치가 높다.^{6,7)} 이러한 특성으로 인해 식품, 음료, 화장품 등에 이용되고 있으며, 최근 기름 유출시 해양사고에 의한 유류 오염 정화의 한 방법으로 미생물을 응용한 신기술의 개발이 시도되고 있다. 또한 에너지 활용 방안의 하나로, 기존 방법으로는 채취할 수 없었던 지구 전체 매장량의 2/3에 해당하는 양의 원유를 회수하는 EOR(Enhance Oil Recovery), MEOR(Microbial Enhanced Oil Recovery)산업부분에 미국, 캐나다 등에서 많은 연구를 행하고 있다. 송유관을 통한 원유의 이송시에 emulsion을 이용하여 에너지를 절약하는 작업은 이미 진행중이다.⁸⁾ 금후에는 폐수처리에도 응용될 것으로 보이며 토양의 재활성화에도 응용될 것으로 전망된다. 현재 선진국에서는

화장품에서부터 항생제 연구 및 oil-recovery 연구에까지 확대되어 있다. 그 밖에도 약 20여종의 생체계면활성제가 특허화되어서 상품 개발의 수준까지 도달에 있으나, 산업체 사이의 경쟁 및 보완관계로 극히 일부분만이 보고되고 있다.⁹⁾

이와 같이 생체계면활성제는 미생물의 종류에 따라서 다양한 구조의 물질로 생산이 가능하고 여러가지 용도로의 이용가능성이 높다. 이들의 화학구조나 분자 형태는 합성계면활성제와는 현저히 상이하며, 친수성 부분은 주로 알코올, 인산염, 당 등으로, 소수성 부분은 포화, 불포화, 수산화물 지방산등으로 이루어 졌으며, 에스터 결합이나 아마이드 결합, 글리코사이드 결합 등으로 연결되어 있다.

현재 진행중인 생체계면활성제의 공업적인 생산은 주로 미생물 기술에 의존하고 있는데 그 이유는 다른 동·식물 세포에 비해 다루기 쉽고 미생물 중에 따라 다양한 종류의 계면활성물질을 얻을 수 있으며 성장속도도 다른 생물체에 비해 훨씬 빨라 단 시일내에 비교적 간단한 장치를 이용하여 다량의 생체계면활성제를 생산해 낼 수 있기 때문이다.

본 연구에서는 토양에 존재하는 미생물로부터 계면활성제를 생산하는 활성 균주를 분리·동정하고, 그 중 유화능이 우수한 균주를 본 실험의 공시 균주로 선정한다. 다음 최적 생산 조건을 규명하고, 생분해성이 우수한 생체계면활성제를 제조 및 정제하는데 그 목적이 있다. 또한 식품, 화장품 등에 사용되는 유화제 및 보습제로의 용도 개발에 필요한 기초자료로 활용하고자 하였다.

II. 실험 방법

1. 생체계면활성제 생산균주의 분리 및 배지조성

본 연구를 위해 전국의 여러지역, 즉 산림, 밭, 논, 도로변, 주유소 등에서 균주분리용 토양을 채취하였다. 각각의 토양으로부터 일반적 회석방법에 따라 10^{3-4} 배로 회석한 다음, Table 1의 Lard 함유 평판배지에 접종한 뒤, 30 °C의 항온 및 CO₂ 0.5 %, 습도 90 %의 배양기(Forma scientific, inc. Steri-cult.200)에서 유화활성을 나타내는 균종을 반복 계대배양하여 순수분리 하였으며 동시에 clear zone test로 유화활성 정도를 확인하였다.

Table 1. Composition of used Lard agar media

성분	g/l
Solution A	See blow
Yest Ext.	2.5g
Glucose	5.0g
Agar	7.5%
Lard	0.5g

2. 공시균의 선정

라드(Lard)함유 agar 생산배지에서 유화활성을 나타내는 여러 균주를 대상으로 Clear zone 실험에서 활성이 가장 강한 균주를 본 실험의 공시 균주로 선정하였으며 분류와 동정은 "Bergy's Manual Vol. 2"에 준하여 실시하였다.^{10,11)}

3. 생체계면활성제의 최적 생산조건 검토

공시균 생체계면활성제의 최적 생산조건을 알아보기 위하여 다음과 같이 실험하였다. 탄소원, 질소원, 무기염 및 통기량에 따른 영향을 25 °C에서 3~5일간 배양시켜 각각의 균체량과 표면장력을 비교 하였다.

1) 탄소원의 영향

생체계면활성제 생산에 관한 탄소원의 효과를 관찰하기위해서 생산 배지에 각종 탄소원을 3 %씩 첨가하여 균체량과 표면장력을 실험하였다.

2) 질소원의 영향

탄소원의 영향 실험으로 결정된 최적 탄소원을 넣고 질소원을 제외한 생체계면활성제 생산배지에 각종 질소원을 0.3 %씩 첨가하여 질소원 농도에 따른 균체량과 표

Table 2. Composition of Solution A

Solution A ;	(기준: l 당)
Mineral solution	50.0ml
Trace element solution	1.0ml
Vitamin solution	5.0ml
KH ₂ PO ₄	0.5g
Na ₂ SO ₄	2.8g

면장력을 실험하였다.

3) 무기염의 영향

생체계면활성제 생산배지의 무기염류(예를들면 인산염, 마그네슘 등)를 농도별로 첨가하여 균체량과 표면장력을 실험하였다.

4) 통기량의 변화에 따른 영향

공시균주의 성장과 유화활성에 적합한 통기량을 찾기위해 500 ml shaking flask에 배지를 50~300 ml까지 각각 차례로 첨가하여 4일간 배양한 후 균체량과 표면장력을 실험하였다.

5) pH 변화에 따른 영향

공시균주의 유화활성에 최적인 pH를 찾기 위해 각 pH별로 균주를 접종한 뒤, shaking bath에서 4일간 배양한 뒤에 균체량과 표면장력을 실험하였다.

4. 균주 배양

Lard배지에서 계대배양한 생체계면활성제 생산균주의 Clear Zone Test로 유화활성이 우수한 균종을 찾아 계대 배양하여 순수분리한 뒤 공시 균주로 선정하였다. Biosurfactant를 생합성하기 위하여 5 L의 발효기를 사용하여 선별된 균주로 배양시켰다. 이 때 배지의 조성은 KH₂PO₄ 2.5 g, MgSO₄ 12.5 g, CaCl₂ 0.25 g, NaCl 0.25 g, Yeast Extract 25 g, Urea 2.5 g, Glucoses 250 g을 증류수에 녹여 2.5 L로 제조하였으며 한국 발효기의 fermentor를 사용하여 25 °C, 400 rpm 의 조건에서 실험하였다.

5. 균체량 측정

균체량은 일정량 채취한 배양액을 원심분리하여 얻은 균체를 동량의 생리식염수에 현탁하여 UV Spectrophotometer로 660 nm에서 흡광도로 측정하였다.

6. 생체계면활성제의 분리

배양이 끝난 배양액을 150 ml 취하여 5000 rpm에서 10 분동안 원심분리를 한 다음, 상등액을 pH 2.0~3.0로 조

정하여 biosurfactant를 수층에서의 용해도를 감소시켰으며, 클로로포름 : 메탄올 = 2 : 1의 유기용매를 사용하여 3회 반복 추출한 다음, 감압하에서 용매를 제거, crude biosurfactant를 추출하였다.

7. 생체계면활성제의 물리적 성질

1) 분산력

분산력은 용매상에서 주로 고체를 분산, 안정화 시키는 능력으로 섬유, 페인트, 의약품등 산업분야에 쓰이고 있다. 일정량의 생체계면활성제를 함유한 시료와 공시험과의 분산력을 비교하였다. 100 ml 메스실린더에 각각 0.3 g의 산화철(Fe_2O_3)과 0.5 g 생체계면활성제를 넣은 뒤 증류수로 100 ml까지 채우고 산화철(Fe_2O_3)이 골고루 분산 되도록 흔들어 상온에서 방치한 다음 메스실린더내 시료액 윗면에서 20 ml 아래부분에서 5 ml를 취하여 증류수로 희석한 뒤 660 nm에서 투광도를 측정하였다.

2) 유화력

각 시료를 0.01, 0.03, 0.05, 0.1, 0.3, 0.5 %를 제조한 후, 각 시료용액에 5 ml와 올리브기름 10 ml를 혼합한 뒤, 2분간 유화시킨 후, 상온에서 방치한 다음 1시간 뒤 생성된 유화층의 높이를 측정하여 계산하였다.

3) 표면장력

일정온도에서 각 농도별 및 pH변화에 따른 표면장력 시험을 tension meter(Fisher Autotensionmat)를 이용하여 측정하였다.¹²⁾

4) 유화안정도의 측정

유화안정도의 측정은 Cirigliano 등의 방법에 의해서 측정하였다.^{13,14)} 계면활성제 시료용액 1 ml에 9 ml의 oil를 첨가한 후 800 rpm, 25 °C에서 2분간 혼합시킨 후, 10분간 정지한 다음 660 nm에서 흡광도를 측정하고 10분 간격으로 50분간 흡광도를 측정하였다.

5) 배양시간에 따른 균체량과 pH의 변화

최적 배양조건에서 배양시간에 따른 균체량의 변화와 pH의 변화에 대하여 측정하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 생체계면활성제 생성균주의 동정

탄화수소자화성 미생물로서 탄화수소를 유일한 탄소원으로 이용되는 발효성있는 효모로, *Candida*속의 특성을 가지며 통기교반시 당질의 분해력과 증식속도가 빨라짐을 확인하였고, Potato Dextrose Agar(PDA) 배지상에 White Creamy의 색조를 보이고 Glucose, Maltose를 탄소원으로 한 Culture plate에서 48시간 배양후 성장속도가 빨라짐을 보였다. 유지의 분해성이 좋아 5 % (w/v)의 경화성 옥배유를 선택배양조건에서 56시간내에 유화가 가능하였다.

배양최적 온도는 24~30 °C의 범위에서 성장이 잘되며 글루코스 배지에서 4~7일간의 세대시간을 갖는 특징이 관찰되었으며 기질 탄소소 $C_{15} \sim C_{18}$ 의 n-파라핀류 함유물질에서 유화성이 우수한 것으로 보아 *Torulopsis*속의 특성과 유사한 균주로 동정하였다.

2. 배양조건의 검토

1) 탄소원의 영향

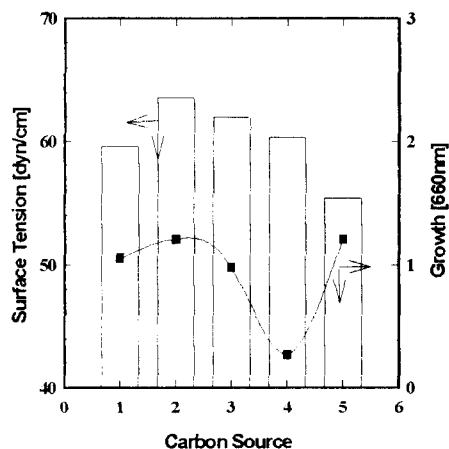


Fig. 1. Effect of carbon source on the biosurfactant production. (1:None, 2:Glucose, 3:Olive oil, 4:Hexadecane, 5:Com oil)

본 균주의 활성에 미치는 탄소원의 영향을 검토하기 위하여 YM broth(DI FCO 0711)을 기본배지로하여 각 탄소원을 3%이 되게 첨가하여 배양시킨 후 탄소원의 종류에 따라 표면장력과 성장속도를 비교한 결과 Fig. 1과 같이 나타났으며 활성과 균주의 증식에 있어서 글루코스와 옥배유가 양호한 것으로 나타났다. 헥사데칸의 경우 균주 자체의 증식이 거의 없는 것으로 보아 이 균주는 헥사데칸을 산화하지 못하는 것임을 확인할 수 있었다.

2) 질소원의 영향

균주의 활성에 미치는 질소원의 영향을 검토하기 위하여 탄소원으로써 글루코스 0.3%를 기준으로하여 각각 질소원을 3%씩 첨가하여 배양시킨 후 표면장력과 균주의 증식을 조사한 결과 Fig 2와 같이 나타났다. 균체의 증가는 Yeast extract에서 잘 이루어졌으나 potassium nitrate, urea, ammonium citrate 등은 오히려 저조하였다. 무기염의 경우 세포증식과 활성이 우수한 반면, 유기 질소원의 경우는 그다지 좋지않음을 알 수 있었다.

3) 인산염의 영향

인산염의 농도에 따른 영향을 검토하기 위하여 그 농도를 0.001%~0.04%까지 변화시키면서 균주의 활성과 표면장력을 비교하여 Fig 3과 같이 나타내었다. 그 결과 농

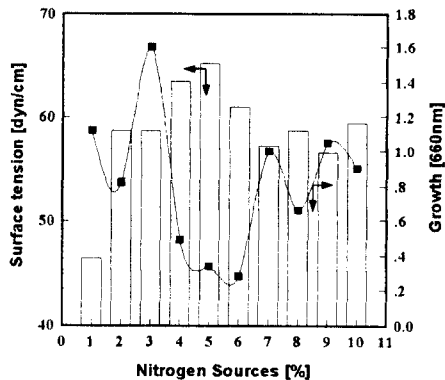


Fig. 2. Effect of nitrogen sources on the biosurfactant production. (1:None, 2:Potassium nitrate, 3:Yeast extract, 4:Urea, 5:Sodium nitrate, 6:Ammonium chloride, 7:Peptone, 8:Ammonium nitrate, 9:Ammonium citrate, 10:Malt extract)

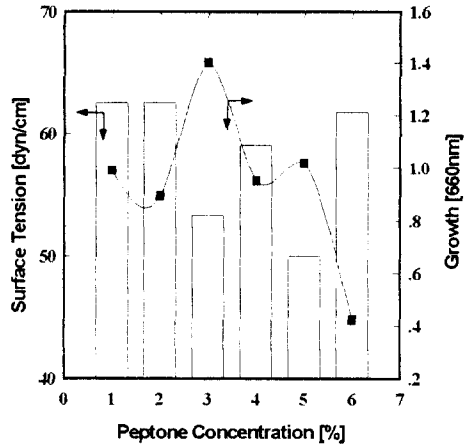


Fig. 3. Effect of concentration of phosphate on the biosurfactant production. (1:None, 2:0.001%, 3:0.005%, 4:0.01%, 5:0.02%, 6:0.04%)

도가 0.005%일 때 가장 좋은 성장을 하였으며, 그 이후의 농도에서 급격히 감소함을 알 수 있었다. 이로서 이 균주의 인산염의 농도로는 0.005%가 적당하다고 사료되었다.

4) 마그네슘이온의 영향

균주의 활성과 성장에 영향을 미치는 마그네슘이온의 영향을 검토하기 위하여 황산마그네슘(MgSO₄)의 농도를 0.05%~0.4%까지 변화시키면서 조사한 결과 Fig 4와 같

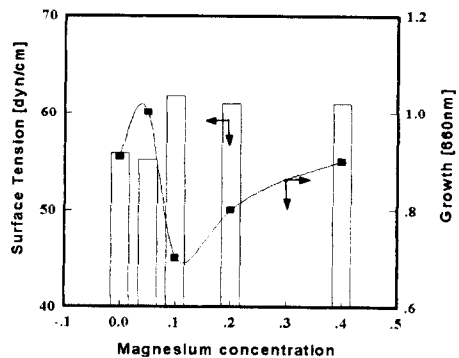


Fig. 4. Effect of magnesium sulfate concentration on the biosurfactant production.

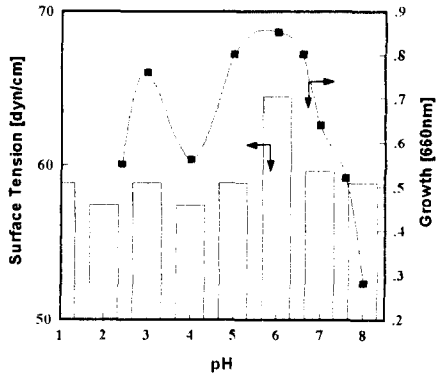


Fig. 5. Effect of pH on the biosurfactant production.

이 나타났으며 황산마그네슘(MgSO₄)의 농도가 0.05 %일 때 가장 좋은 활성을 나타내었다.

5) pH의 영향

균주에 미치는 pH의 영향을 검토하기 위하여 pH를 2~8까지 변화시켜 영향을 조사한 결과 Fig 5와 같이 나타났다. Fig. 5에 나타난 바와 같이 균체의 활성은 그다지 변화가 없었으나, 성장 곡선은 pH에 따라 큰 폭의 변화가 있음을 확인 할 수 있었다. pH 5.0 ~ 6.6까지의 높은 증식은 *pseudomonas aeruginosa*의 경우에 있어서

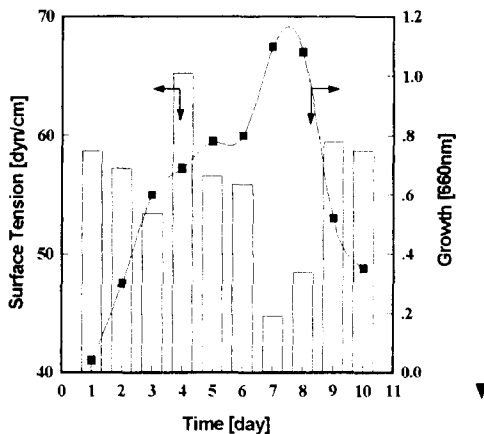


Fig. 6. Effect of time on the biosurfactant production.

Santos 등 보고서와 같은 경향이 있음을 볼 수 있었으나 pH 3에서의 또 하나의 높은 활성은 이 균체만의 특징이라 할 수 있다. 실험에 사용된 완충용액으로는 citric acid 와 0.2M NaH₂PO₄의 비로써 조절하였다.

6) 시간별 영향

시간대별로 균체의 증식과 표면장력을 조사한 결과 Fig 6과 같이 나타났다. 균주의 성장은 배양 7일까지는 점진적으로 증가하였으며 그 이후에는 급속히 감소함을 볼 수 있었는데, 그 결과 본 실험에 사용된 균주의 life cycle이 7일임을 확인할 수 있었다.

2. 생체계면활성제의 성질

1) 농도에 따른 표면장력의 변화

Crude 생체계면활성제를 0~0.5 g/L의 농도로 변화시켜가면서 표면장력의 변화를 비교하여 Fig. 7의 결과를 얻었다. 최저 표면장력은 34 dyn/cm으로 생체계면활성제의 농도가 0.1 %일 때 크게 감소하였으며 0.1 %이상의 농도에서는 표면장력이 거의 일정하게 유지됨을 볼 수 있었다. 이러한 경향은 다른 균주의 생체계면활성제와 비교할 때, 그 표면장력은 비슷함을 알 수 있었다.

2) pH 변화에 의한 표면장력의 변화

Crude 생체계면활성제의 0.3 %(W/V)용액의 pH변화에

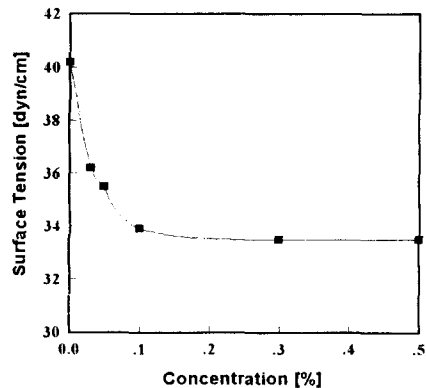


Fig. 7. Effect of concentration on surfacetension.

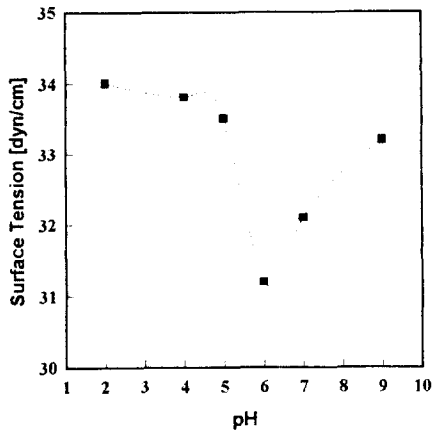


Fig. 8. Effect of pH on surfacetension.

다른 표면장역의 특성을 조사한 결과 Fig. 8과 같이 나타났다. 본 실험에서 생성된 생체계면활성제는 pH가 증가함에 pH 6부근에서 표면장력이 31 dyn/cm까지 감소하였으며, pH 6이후엔 다소 다시 증가하는 경향을 보였다. 이로써 본 실험의 생체계면활성제는 pH에 대해서 안정적인임을 알 수 있었다.

3) 농도에 따른 유화도의 변화

정제된 생체계면활성제를 0.01~0.5 %의 농도로 변화시키면서 유화도의 변화를 측정하여 Fig. 9에 나타내었다.

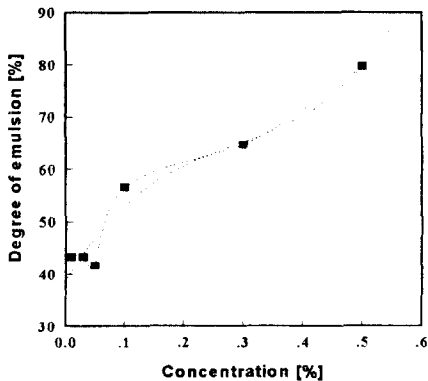


Fig. 9. Effect of concentration on emulsification.

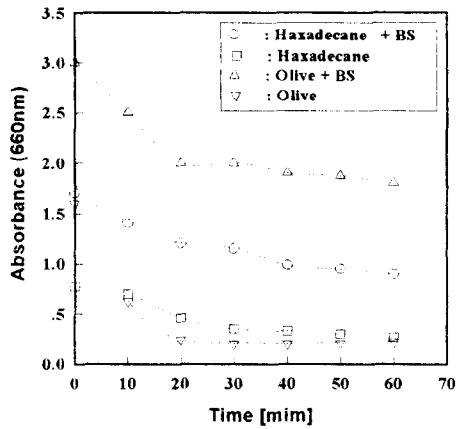


Fig. 10. Stabilization of olive oil and haxadecane emulsion by biosurfactant.

Fig. 9에서 보는 바와 같이 생체계면활성제의 농도가 증가할수록 상대적으로 강한 활성을 나타내었으며 유화도와 생체계면활성제가 밀접한 관계가 있음을 알 수 있었다.

4) 생체계면활성제의 첨가에 따른 유화 안정도의 변화

생체계면활성제가 haxadecane, olive oil의 유화 안정도에 끼치는 영향을 조사한 결과 Fig. 10과 같이 나타났으며 Haxadecane의 경우에 있어서 물과 비교하였을 때 거의 2.5~3 배에 가까운 차이가 있음을 확인하였다. 그러므

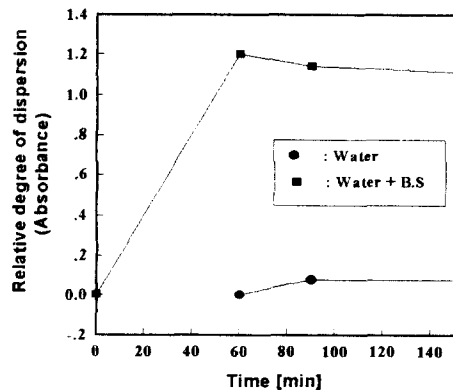


Fig. 11. Dispersion of the biosurfactant.

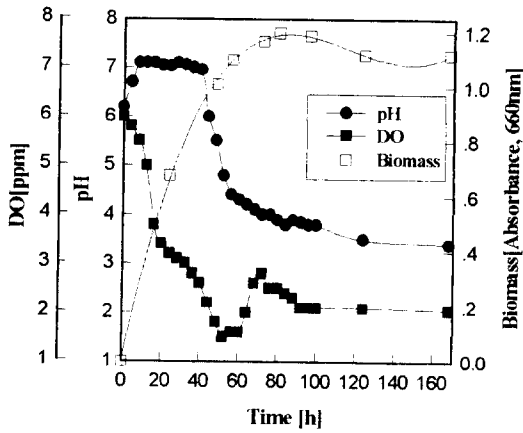


Fig. 12. Variation of biomass, pH and DO on cultivation time.

로 생체계면활성제는 유효안정도를 증가하는 데 매우 중요한 역할을 함을 알 수 있었다.

5) 분산력

분산력은 일반적으로 용매상에서 고체를 분산, 안정화시키는 능력을 말하는데 Fig. 11은 생체계면활성제의 분산력 실험결과를 나타내었다. 일반 증류수에 분산력을 실험하였을 때 빠른 회복력을 보였지만, 생체계면활성제를 함유한 용액에서의 분산력은 매우 높은 것으로 나타났다. 일반적으로 유화제인 Tween#80과 분산력을 비교하지만, 본 실험에서 증류수와의 비교에서 12배의 분산력이 좋은 것으로 나타났다.

6) 배양시간에 따른 균체량과 pH의 변화

pH값의 변화는 배양시간이 진행됨에 따라 pH 6에서 3으로 낮아짐을 Fig. 12에 나타내었다. 초기에 pH값이 상승하는 것은 접종 직후인 미생물의 적응기간(lag time)으로 미생물이 새로운 환경에 적응하는 기간임을 나타낸다. 또한 pH가 급속도로 낮아지는 구간이 지수 성장기로 적응기를 거친 후 미생물들이 탄소원을 소비하면서 빠르게 성장하므로 높은 활성을 띄기 때문인 것으로 사료된다.

이와는 반대로 균체량은 시간에 따라 급속히 증가하다가 일정수준에 있어서 더 이상 균체량의 변화를 볼 수

없는 데, 이는 미생물이 성장을 멈춘 정지기로서 pH의 최저값이 일정하게 나타나는 때와 일치함을 확인 할 수 있었다.

IV. 결 론

생체계면활성제를 합성하는 미생물에 대한 배양조건을 검토하고, 합성된 계면활성제에 대한 물리·화학적 특성을 조사한 결과 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다.

1. 토양미생물을 *C. bombicolar* 배양배지를 사용하여 가장 우수한 유화 활성을 갖는 균주를 선별, 선택하였으며, 균주는 *Candida*속임을 알 수 있었다.
2. 균주의 배양에 있어서 최적 배지조성은 glucose: 100 g/L, yeast extract: 10 g/L, urea: 1.0 g/L, KH_2PO_4 : 50 mg/L, MgSO_4 : 500 mg/L 이고, 최적 배양조건은 pH: 3~7, 배양온도: 24 °C, 교반속도: 400 rpm이었다.
3. 생체계면활성제의 최대 수율은 pH: 3.0~3.5, 배양온도: 24 °C에서 얻을 수 있었다.
4. 합성된 생체계면활성제의 유효력은 생체계면활성제 농도가 증가함에 따라 현저하게 증가하였으며, 안정도는 대단히 오래 지속되는 것으로 나타났다.
5. 표면장력은 pH값에 따라 크게 달라졌으며, 특히 산성 범위에서 높게 나타났다.

향후 연구 추진 사항으로써 선택적 배양조건별 및 생성된 계면활성 물질의 분리정제 방법의 선정과 기기(NMR, GC, HPLC 등)를 이용한 구조적 분석과 활성물질의 이화학적 특성을 규명하고자 한다.

참고문헌

1. J. E. Zajic and C. J. Panchal : *CRC Crit. Rev. Microbiol.*, 5, 39, 1976.
2. D. F. Gerson and J. E. Zajic : *Proc. Biochem.*, 7, 20, 1979.
3. M. J. Milton, Ed : *Surfactants in Emerging*

- Technology*, Surfactant Science Series, Vol. 26, Merrell Dekker, New York, 1987.
4. B. F. Creek : *Chem. Eng. News*, 68, 37, 1990.
 5. A. Margaritis and E. Creese : *In Waste Treatment and Utilization, Theory and Practice of Waste Management*, M. Moo-Young and G. J. Farquhar, Eds. Pergaman, Oxford, 445, 1980.
 6. Moilliet, J. L : *Surface activity*, D. Van Nostrand Co, New Jersey, 1961.
 7. Ishigami, Y, et al : *Chem. Lett*, 763, 1987.
 8. Yoshimura, K : *Fragrance J*, 59, 1990.
 9. N. Kasaric, W. L. Carins : *Biosurfactant and biotechnology*, 1987.
 10. *Bergy's Manual of Systematic Bacteriology* : The William and Wilkams Co., U.S.A, 1984.
 11. *Bergy's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th ed : The William and Wilkams Co., U.S.A 1974.
 12. Klekner, V, Kosaric, N : *Biosurfactant for Cosmetics*, Surfactant Science Series, Vol. 48, Merrell Dekker, New York, 373-386, 1993.
 13. M. C. Cirigliano, G. M. Carman : *Appl. Environ. Microbiol*, 48, 104, 747-750, 1984.
 14. M. C. Cirigliano, G. M. Carman : *Appl. Environ. Microbiol*, 50, 49, 845-850, 1985.