

Acinetobacter sp. BE-254에 의한 유화제의 생산

김순한 · 임이종 · 최경숙 · 정영기¹ · 장경립 · 이태호*

부산대학교 미생물학과, ¹동의대학교 미생물학과

Emulsifying Agent Production by *Acinetobacter* sp. BE-254. Soon-Han Kim, Ee-Jong Lim, Kyung-Sook Choi, Yong-Keel Jeong¹, Kyung-Lib Jang and Tae-Ho Lee*. Department of Microbiology, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea, ¹Department of Microbiology, Dong-Eui University, Pusan 614-714, Korea — The strain producing bioemulsifier was isolated from soil samples. The isolated strain was identified as the genus *Acinetobacter* through its morphological, cultural and physiological characteristics. The highest emulsification activity and stability by *Acinetobacter* sp. BE-254 was observed after 5 days of cultivation in the culture medium containing n-hexadecane 4%, NaNO₃ 0.2%, KH₂PO₄ 0.01%, MgSO₄·7H₂O 0.01%, CaCl₂ 0.01%, and yeast extract 0.01%. The optimum pH and temperature for bioemulsifier production were pH 7.0 and 30°C, respectively. Furthermore the most of bioemulsifier was produced during the exponential growth phase, and this suggested that the bioemulsifier production was growth-associated. The bioemulsifier showed good emulsification activity on various emulsifying substrates such as hydrocarbons, edible oils, and petroleum fractions.

계면활성제(Surfactant, Emulsifier)는 소수성부분과 친수성부분을 함께 가지는 화학구조적 특징이 있어 보통 물-공기(액체-기체), 기름-물(액체-액체), 물-고체(Wetting 과정) 상에서 계면의 표면장력을 낮추는 능력을 소유하고 있는 물질을 말한다(1, 2). 계면활성제는 이러한 성질때문에 각 계면에서의 물질의 반응과 이동을 촉진시킬 수 있는 성질이 있어, 의약품, 식·음료, 화장품, 농약, 세제 등의 산업분야에서 뿐만 아니라 일반 생활품에 이르기까지 그 용도는 실로 다양하다(3).

그러나 기존의 계면활성제는 석유계 계면활성제가 주종을 이루고 있고, 특히 이들의 제조시 부산물로 아황산, 일산화탄소, 이산화탄소, 아미노옥사이드, 다이옥산, 니트로졸아민 등이 배출되어, 환경오염 및 인체안전성에 문제를 야기시키고 있다(4, 5). 따라서 환경 및 인체안전성 측면에서 고려해 볼 때 미생물유래 계면활성제는 여러가지 장점을 가지고 있기 때문에 상당한 관심의 대상이 되고 있다. 즉, 미생물에 의해서도 대량생산이 가능하며, 독성이 적다는 점, 생분해가 잘 되고, 화학구조에 따른 다양한 특이성을 가지고 있어 적용범위가 넓다는 점 등이 미생물유래 계면활성제의 유리한 점이라 할 수 있다(6-8). 그러나 이러한 미생물유래 계면활성제가 산업화되기 위해서는 특수용도에 사용될 수 있는 특이 성질을 가지거나 또는 여러가지 용도 개발과 아울러 기존의 화학합성 계면활성제에 비하여 낮은 가격으로 생산될 수 있어야 한다(9, 10).

현재 알려져 있는 대부분의 미생물 계면활성제는 exolipid로서 이들의 분비는 세포의 대사주기에 의존하며 생육기간중 특정시기(대수증식기 말기나 정지기)

에 이루어 진다고 알려져 있다(11). n-Alkane을 탄소원으로 하여 생육하는 미생물(12-17)의 경우 이들에 의해 생산된 계면활성제는 배지중의 n-alkane 화합물을 미세한 기름입자로 유화시켜 세포와 기질과의 접촉면을 넓힘으로서 보다 쉽게 분해할 수 있도록 하며, 이러한 사실은 유류 유출에 의한 해양오염의 경우에도 응용될 수 있음을 시사한다(18, 19). 따라서 계면활성제 중 그 응용성이 가장 큰 이러한 bioemulsifier는 현재까지 문제시 되어 온 합성제품의 대체물질로서 그 사용이 앞으로 확대될 것으로 생각되며, 또한 폐수처리, 토양의 재활성화, 유류 유출에 의한 해양의 오염문제, 잔류유류회수(12, 20, 21)등에도 그 응용성이 크게 기대된다고 할 수 있다.

미생물유래 계면활성제중 상품화가 되어 있는 대표적인 것으로는 미국의 Petroleum사에서 생산하는 Emulsan으로서 기름에 오염된 탱커의 처리, 전자기관의 3차 세척용 등으로 사용되고 있다. 그 외에 다양한 미생물 계면활성제가 특허화 되어 현재 상품개발의 수준까지 와 있으나, 산업체 사이의 경쟁 및 보안관계로 극히 일부만이 보고되고 있는 실정이다(9).

본 연구는 이러한 많은 장점을 지닌 미생물유래의 계면활성제를 개발하기 위한 목적으로 계획되어 현재 유화활성을 나타내는 균주를 토양에서 순수 분리하여, 그 중 유화활성과 유화안정성이 가장 우수한 균주, *Acinetobacter* sp. BE-194을 선발한 후 그 균주의 동정 및 최적생산조건을 검토한 결과에 대해 보고하고자 한다.

재료 및 방법

Bioemulsifier 생산균주의 분리

Bioemulsifier를 생산하는 균주를 분리하기 위해 부

*Corresponding author.

Key words: Bioemulsifier, emulsifying agent, biosurfactant, *Acinetobacter* sp., microbial surfactant

산근교 및 경남일대등에서 채취한 토양시료 약 1g을 멸균수 10 ml에 현탁시켜 20분간 방치한 후 그 상등액을 회석평판법으로 도말, 배양하여 생성 colony를 순수분리하였다. 순수분리된 균주들을 대상으로 bioemulsifier 생산배지(*n*-hexadecane 4%, NaNO₃ 0.2%, KH₂PO₄ 0.01%, MgSO₄·7H₂O 0.01%, CaCl₂ 0.01%, yeast extract 0.01%, pH 7.0) 10 ml에 1주간 진탕배양하여 그 배양상등액을 대상으로 유화활성을 측정하였으며, 이중 우수한 유화활성을 보이는 BE-254 균주를 분리하여 본 실험의 공시균주로 사용하였다.

균주의 동정

공시균주의 분류학적 위치를 검토하기 위하여 형태학적, 생화학적, 생리학적 제특성을 조사하였으며, 이에 따른 공시균의 분류와 동정은 ‘Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology’(22)와 ‘Biochemical tests for identification of medical bacteria’(23)에 준하여 실시하였다.

유화활성 측정

유화활성의 측정은 E. Rosenberg등의 방법(24-26)을 변형하여 사용하였다. 즉 0.01M MgSO₄·7H₂O를 함유하고 있는 0.05M Tris-HCl buffer(pH 8.0) 7.5 ml에 유화기질인 *n*-hexadecane과 2-methylnaphthalene의 1 : 1(v/v) 혼합액 0.1 ml를 섞은 후, 배양상등액 0.2 ml를 넣고 1분간 vortexing 하여 유화시킨 다음 10분간 정치시킨 뒤, 유화액의 밑부분에서 1 ml를 뽑아내어 540 nm에서 흡광도를 측정하여 탁도로서 유화활성을 나타내었다. Blank로는 유화기질을 넣지 않은 것(blank-1; 배양상등액 자체의 탁도를 제거하기 위한 것)과 배양상등액 대신 bioemulsifier 생산배지를 넣은 것(blank-2; 배지자체의 유화활성치를 제거하기 위한 것)을 사용하여 sample의 탁도에서 blank의 탁도를 뺀 값을 유화활성값으로 정하였다.

생육도 측정

순수분리된 bioemulsifier 생산균을 100 ml의 배지를 넣은 500 ml shaking flask에 접종하여 30°C에서 진탕배양(Vision Co. LTD, 220 rpm)을 행하면서 일정한 시간별로 생육도를 측정하였다. 이때 사용한 방법은 배양액을 10,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액은 버리고 남은 균체를 증류수와 세척액(chloroform : methanol=2 : 1, v/v %)을 사용하여 세척한 후, 남은 pellet을 105°C에서 5시간 건조하여 균체량을 측정하였다.

Bioemulsifier의 생산조건

공시균의 bioemulsifier 최적 생성조건을 설정하기 위해, 탄소원, 질소원, 무기염, 통기량 및 배양 온도등의

영향을 30°C에서 5일간 배양한 후 그 때의 유화활성 및 건조균체량을 측정하여, 서로 비교검토하였다. 접종균체량은 bioemulsifier의 생산배지에서 3일간 전배양한 배양액 1%씩을 100 ml의 배지에 일정하게 접종하였다.

결과 및 고찰

균주의 동정

공시균주 BE-254를 Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology Vol.2(22)와 Biochemical tests for identification of medical bacteria(23)에 따라 동정실험을 행한 결과는 Table 1과 같다. 운동성이 없는 Gram 음성의 단간균으로, 조사된 탄수화물들에 대하여 발효능을 보이지 않았고 호기적으로만 생육하는 절대 호기성 균주로서, oxidative test 음성, catalase test 양성 등의 여러 특성들로 부터 분리균주는 *Acinetobacter*속으로 판단되었다.

Table 1. Taxonomical characteristics of the isolated strain BE-254

1. Morphological characteristics	
Shape of cell	Short rod and round end
Cell size (µm)	0.4~0.6 by 0.8~1.0
Gram stain	Negative
Motility	Nonmotile
2. Cultural characteristics	
Colony on meat extract agar (30°C, 2~3 days)	
Colonies	Circular, convex, undulate, wetted
Surface	Smooth
Color	White
Opacity	Opaque
Growth in MacConkey medium	Negative
3. Physiological characteristics	
Catalase	Positive
Cytochrome oxidase	Negative
Voges-proskauer test	Negative
Simmons citrate test	Negative
Nitrate reduction test	Negative
Lysine decarboxylase	Negative
Ornithine decarboxylase	Negative
Arginine dehydrolase	Negative
Urease	Positive
β-Galactosidase	Negative
Tryptophane deaminase	Negative
Hydrolysis of gelatin	Negative
Formation of indole	Negative
H ₂ S	Negative
O/F glucose	Oxidation
Growth factor requirements	Negative

Table 2. Effect of carbon sources on the production of bioemulsifier

Carbon source (4%)	Growth (g/l)	Emulsification activity
Glucose	6.12	0.02
Fructose	6.64	0.06
Sucrose	6.96	0.07
<i>n</i> -Pentane	0.04	0.03
<i>n</i> -Hexane	0.42	0.03
<i>n</i> -Heptane	0.32	0.01
<i>n</i> -Octane	0.63	0.04
<i>n</i> -Nonane	0.62	0.05
<i>n</i> -Decane	0.72	0.07
<i>n</i> -Undecane	0.54	0.12
<i>n</i> -Dodecane	2.56	2.64
<i>n</i> -Tetradecane	3.52	2.68
<i>n</i> -Hexadecane	3.40	2.70
Cyclohexane	0.10	0.02
Benzene	0.05	0.02
Toluene	0.16	0.03
Paraffin	8.08	0.02
Olive oil	12.28	0.72
Soybean oil	10.12	0.41
Corn oil	11.0	0.50
Peanut oil	13.12	0.45
Caster oil	14.08	0.31
Stearic acid	1.66	0.03
Oleic acid	5.18	1.01

Each carbon source was added to the basal medium containing NaNO₃ 0.2%, KH₂PO₄ 0.01%, MgSO₄·7H₂O 0.01%, CaCl₂ 0.01%, and yeast extract 0.01% (pH 7.0). Seed culture (1 ml) was inoculated into a 500 ml shaking flask containing 100 ml of medium and cultivated at 30°C, for 5 days on a reciprocal shaker.

Bioemulsifier의 생산조건

탄소원 Bioemulsifier 생산배지의 *n*-hexadecane 대신 각종 탄소원을 4%씩 첨가하여 30°C에서 4일간 진탕배양한 후, 전술한 측정법에 따라 건조 균체량과 유화활성을 측정하였다. Table 2에 나타난 것과 같이 탄소원으로 *n*-dodecane, *n*-tetradecane, *n*-hexadecane과 같은 탄소수가 12개 이상인 aliphatic hydrocarbon들을 사용했을 경우에 우수한 유화활성을 보였으며, 이외에 식용성 oil들과 oleic acid의 경우도 비교적 높은 활성을 나타내었다. 따라서 그중 활성이 가장 높은 *n*-hexadecane을 탄소원으로 선택하였다.

통상 탄소원으로서 많이 사용되는 glucose, fructose 및 sucrose의 경우 균체의 생육은 양호하였으나 유화활성은 극히 저조하였으며 본 공시균주인 *Acinetobacter* sp. BE-254주는 alkane 화합물을 기질로 이용할 경우에만 bioemulsifier를 생산하는 미생물로 판단되었다.

이와 더불어 *n*-hexadecane의 농도에 따른 균의 생

Table 3. Effect of *n*-hexadecane concentration on the production of bioemulsifier

Carbon source (%)	Growth (g/l)	Emulsification activity
None	—	0.01
1.0	2.80	1.61
2.0	2.96	1.85
3.0	2.83	2.08
4.0	3.14	2.34
5.0	2.67	1.87
6.0	2.40	1.32
7.0	2.53	1.30
8.0	2.49	1.41
9.0	2.34	1.45
10.0	2.13	0.72

n-Hexadecane as carbon source was added to the basal medium containing NaNO₃ 0.2%, KH₂PO₄ 0.01%, MgSO₄·7H₂O 0.01%, CaCl₂ 0.01%, and yeast extract 0.01% (pH 7.0). The culture conditions are the same as Table 2.

Table 4. Effect of nitrogen sources on the production of bioemulsifier

Nitrogen source (0.2%)	Growth (g/l)	Emulsification activity
NH ₄ Cl	0.17	0.07
NH ₄ NO ₃	0.60	0.12
NaNO ₂	3.06	2.32
NaNO ₃	3.44	2.37
KNO ₃	3.05	2.35
CH ₃ COONH ₄	2.51	0.08
Urea	2.30	0.12
Casamino acid	3.49	1.73
Bactopeptone	2.76	0.86
Polypeptone	3.24	2.30
Proteus peptone	2.46	2.27
Beef extract	1.87	0.84
Malt extract	1.92	0.72
Yeast extract	2.01	0.97
Tryptone	2.26	0.82

Each nitrogen source was added to the basal medium containing *n*-hexadecane, KH₂PO₄ 0.01%, MgSO₄·7H₂O 0.01%, CaCl₂ 0.01%, and yeast extract 0.01% (pH 7.0). The culture conditions are the same as Table 2.

육과 유화활성을 조사한 결과, Table 3에 나타난 것과 같이 *n*-hexadecane 농도가 4%일 경우 유화활성이 가장 우수하였다.

질소원 0.2% NaNO₃와 0.01% yeast extract 대신 여러가지 다른 무·유기 질소원을 0.2% 첨가하여 유화활성과 건조균체량을 측정하였다. 그 결과 Table 4에 나타난 것과 같이 NaNO₃, KNO₃, NaNO₂와 사용한 모든 유기질소원에서 균 성장과 유화활성치에서 비교적 양

호한 결과를 나타내었다. 이 중에서도 유화활성이 비교적 높은 NaNO₃의 농도에 따른 균의 생육과 유화활성은 Table 5에 나타내었다. NaNO₃의 농도가 0.2%일 때 가장 우수한 유화활성을 나타내었다. 따라서 bioemulsifier 생산을 위한 액체배지의 질소원으로서는 가장 높은 활성을 보인 NaNO₃ 0.2%을 선택하였으나, 이 배지에 yeast extract를 소량(0.01%) 첨가하여 배양하면 유화활성이 다소 증가한다는 사실이 발견되어 물질생산을 위한 본 배양에서는 이 성분을 첨가하여 배양하였다.

무기염 Bioemulsifier 생산배지에 첨가되는 KH₂PO₄와 MgSO₄·7H₂O 그리고 CaCl₂의 농도를 0.001~0.100%까지 단계별로 조절하여 생육도 및 유화활성을 측정하였다. 결과 KH₂PO₄의 경우 0.05%, CaCl₂의 경우 0.01%, 그리고 MgSO₄·7H₂O의 경우 0.05%에서 bioemulsifier의

생산이 양호한 것으로 나타났다(data not shown).

배양온도 Bioemulsifier 생산배지에서 배양온도를 20~40°C 범위의 온도별로 배양하여 균의 생육 및 유화활성을 측정하였다. 결과 Fig. 1에서 나타난 바와 같이 30°C에서 균의 생육은 물론 유화활성도 가장 높게 나타나 이 온도를 bioemulsifier 생성을 위한 최적 배양온도로 결정하였다.

통기량의 변화

공시균주의 생육과 유화활성에 적합한 통기량을 찾기 위해 500 ml shaking flask에 배지를 50 ml에서 300 ml까지 첨가하여 건조균체량과 유화활성을 측정하였으며, Table 6에서 보는 바와 같이 배양 배지를 50 ml 첨가하였을 때 유화활성이 가장 높게 나타남에 따라 본 공시균은 호기적인 조건에서 bioemulsifier를 보다 효율적으로 생산하는 것으로 나타났다.

이상의 배양조건을 검토한 결과, bioemulsifier의 최적생성조건을 Table 7과 같이 설정하였다.

배양시간에 따른 균의 증식 및 유화활성 Table 7에 표시된 최적배지 100 ml를 첨가한 500 ml shaking

Table 5. Effect of NaNO₃ concentration on the production of bioemulsifier

NaNO ₃ conc. (%)	Growth (g/l)	Emulsification activity
None	0.5	0.64
0.05	1.27	1.11
0.10	1.73	1.63
0.20	2.93	2.42
0.30	2.64	2.37
0.40	2.17	2.13
0.50	1.86	1.83

NaNO₃ as nitrogen source was added to the basal medium containing *n*-hexadecane 4%, KH₂PO₄ 0.01%, MgSO₄·7H₂O 0.01%, CaCl₂ 0.01%, and yeast extract 0.01% (pH 7.0). The culture conditions are the same as Table 2.

Table 6. Effect of aeration on the production of bioemulsifier

Volume of medium (ml)	Growth (g/l)	Emulsification activity
50	3.25	2.39
100	3.62	2.11
150	3.12	1.86
200	2.85	1.92
250	2.64	1.59
300	2.92	0.78

The culture medium are the same as Table 7. The volume of medium was adjusted to each volume as indicated.

Table 7. Optimum culture condition for the bioemulsifier production

	<i>n</i> -Hexadecane	40 ml
	NaNO ₃	2
	KH ₂ PO ₄	0.5
Medium (g/l)	CaCl ₂	0.1
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5
	Yeast extract	0.1
	pH	6.8~7.0
	Temperature	30°C
Other conditions	Culture time	4 days
	Agitation	120 Rev.× 6 cm stroke
	100 ml of medium per 500 ml flask	

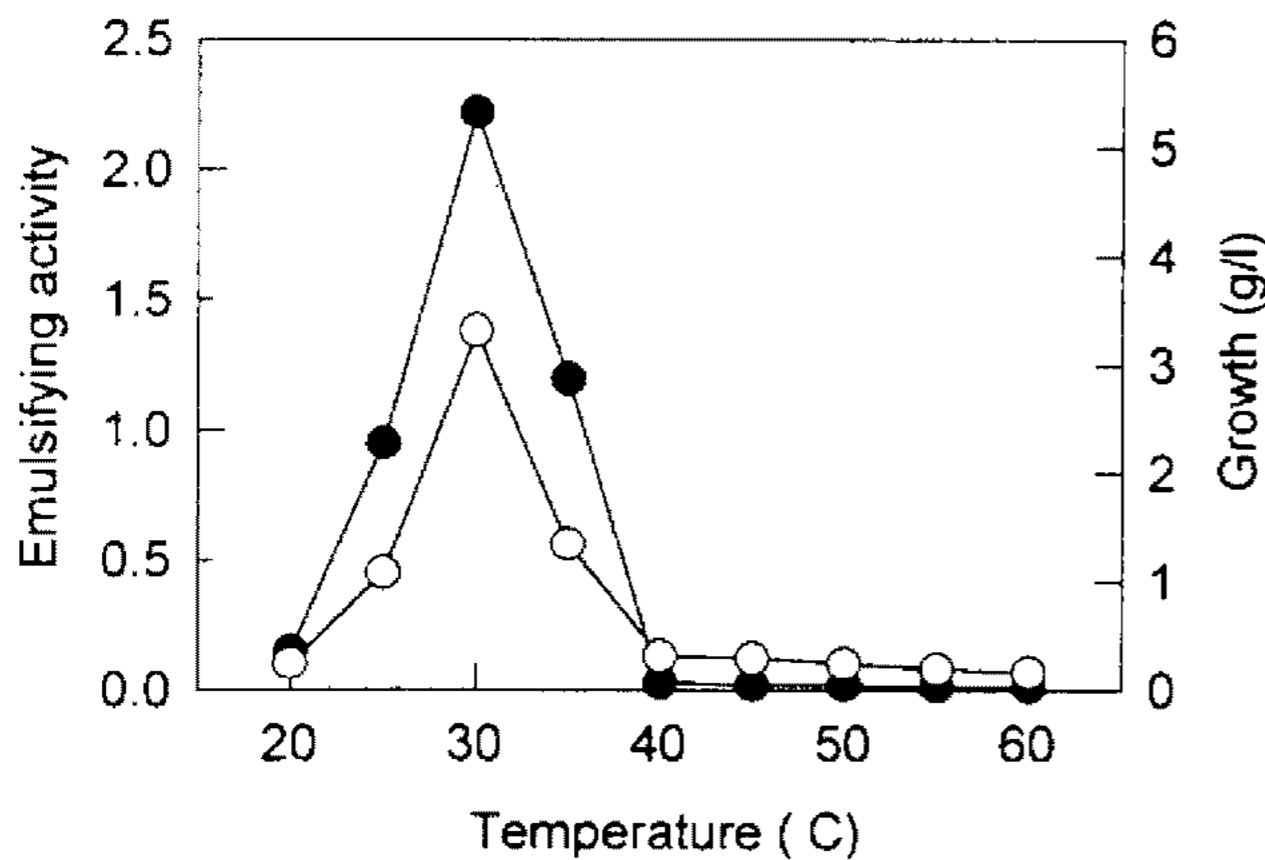


Fig. 1. Effect of cultivation temperature on the production of bioemulsifier.

The culture medium contained *n*-hexadecane 4%, NaNO₃ 0.2%, KH₂PO₄ 0.05%, MgSO₄·7H₂O 0.05%, CaCl₂ 0.02%, and yeast extract 0.01% (pH 7.0). Culture temperature was adjusted to each temperature as indicated.

—●—; emulsifying activity, —○—; growth

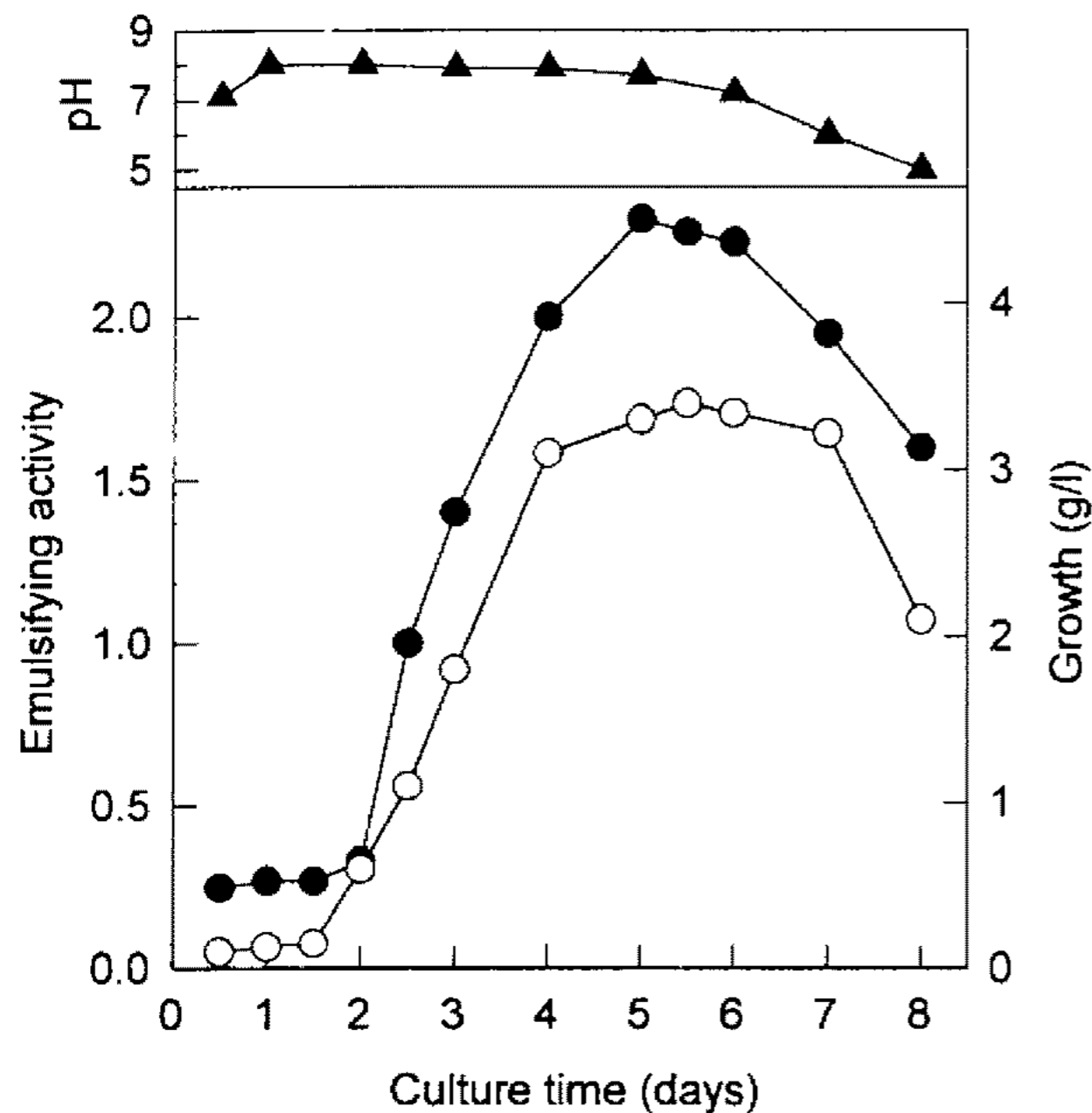


Fig. 2. Time course of growth, pH, and emulsifying activity during the cultivation of *Acinetobacter* sp. BE-254.

The culture medium are the same as Table 8. Seed culture (0.5 ml) was inoculated into a 500 ml shaking flask containing 50 ml of the optimal medium and cultured at 30°C. The pH, emulsifying activity, and cell growth during cultivation were measured with time intervals as indicated. —▲—: pH, —○—: growth, —●—: emulsifying activity

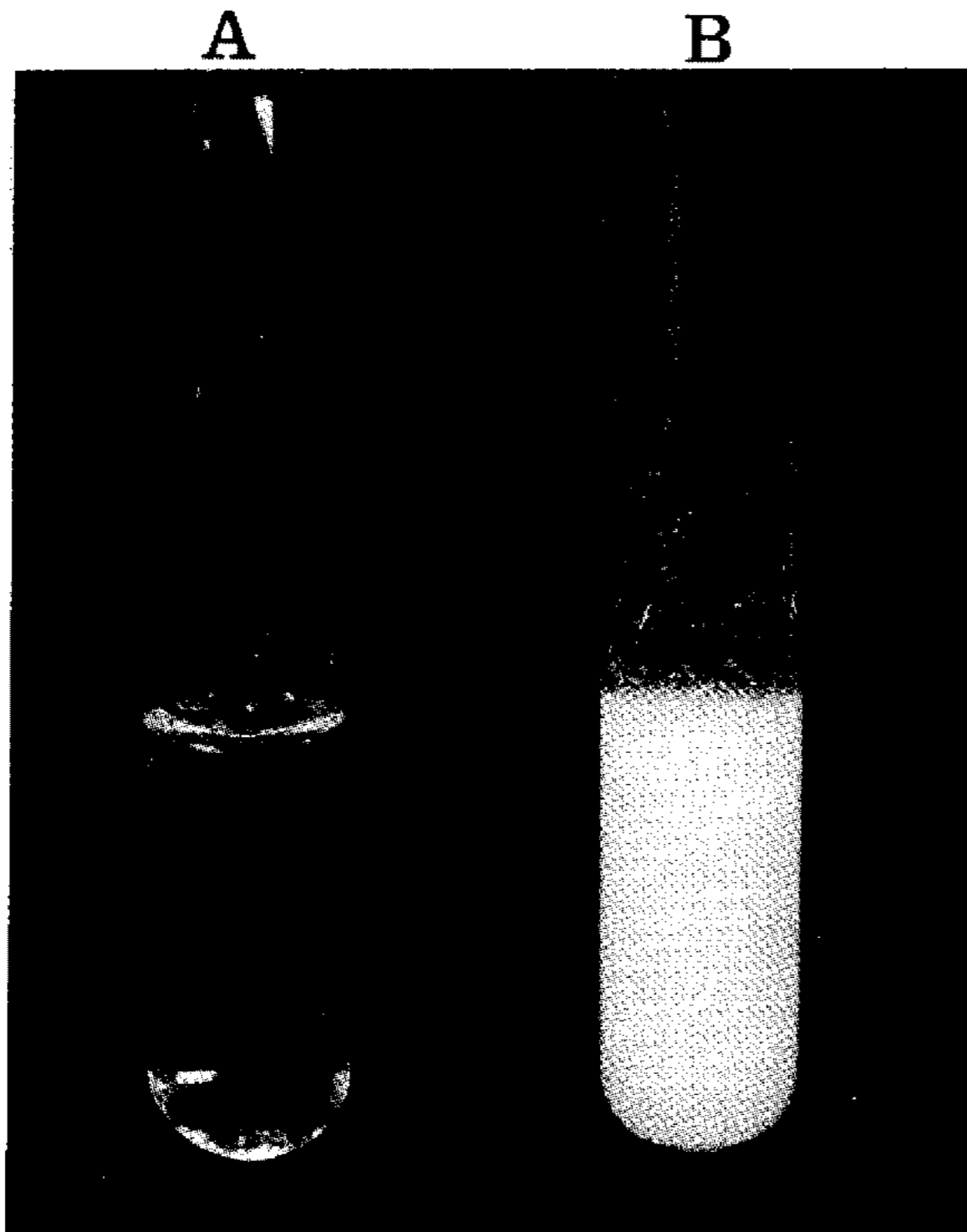


Fig. 3. Photograph of emulsion on *n*-hexadecane:2-methylnaphthalene mixture.

Experiment was performed as described in the text, using 0.1 ml of 1:1 (v/v) hexadecane-2-methylnaphthalene mixture, 7.5 ml of Tris-Mg buffer, and 0.2 ml of culture broth containing bioemulsifier.

A: without culture broth, B: with culture broth

flask에 전배양액을 1% 되게 접종하여 경시적으로 배양한 후, 그때의 균체량 및 유화활성치에서의 변화를 측정하여 Fig. 2에 나타내었다. 그 결과 배양 5일째 균의 증식 및 유화활성이 가장 높게 나타남에 따라 본 bioemulsifier 생산에는 5일 배양이 최적인 것으로 판단되었다. Fig. 3은 본 공시균주의 배양여액 0.2 ml에 대한 *n*-hexadecane-2-methylnaphthalene mixture의 유화정도를 가시적으로 나타낸 사진으로 배양여액을 첨가하지 않은 A는 control로서 유화기질층과 수층이 서로 분리되었으며, 배양여액을 첨가한 B는 층의 분리 없이 완전히 유화된 상태를 유지하였다.

공시균주의 배양시간에 따른 유화활성은 대수증식기에 증식과 더불어 급격히 증가하다가 배양시간이 정지기를 경과하면서 감소하는 경향을 나타내고 있다. 따라서 본 공시균주가 생산하는 bioemulsifier는 균의 생육과 밀접한 관련이 있는 것으로 보여지며, 이러한 bioemulsifier의 대량생산을 위해 유가식 또는 연속배

Table 8. Emulsification activity of various hydrocarbons and oils by bioemulsifier

Hydrocarbons		Emulsification Activity
Aliphatic and cycloparaffins	Cyclohexane	0.65
	Pentane	0.17
	Hexane	0.21
	Heptane	0.38
	Octane	0.40
	Nonane	0.42
	Decane	0.40
	Undecane	0.44
	Dodecane	0.70
	Tetradecane	0.72
	Hexadecane	0.47
	Octadecane	0.41
	Aromatics	Benzene
Toluene		1.07
2-Methylnaphthalene		1.75
Xylene		2.52
Ethylbenzene		2.43
Hexylbenzene		2.40
Edible oils	Olive oil	1.41
	Soybean oil	1.60
	Peanut oil	1.70
	Corn oil	1.78
	Caster oil	1.71
Petroleum oils	Bunker-A	1.94
	Bunker-B	1.18
	OMAN crude oil	1.63
	Diesel oil	0.98

양과 같은 배양방법상의 연구가 필요하다고 생각된다.

각종 유화기질에 따른 유화활성의 평가

배양 최적조건에서 5일동안 배양한 배양여액을 각종 기질에 첨가하여 유화정도를 측정하였다. 이때 *n*-hexadecane과 2-methylnaphthalene의 mixture에 대한 유화활성을 100으로 하여 각종 기질에 대한 유화활성을 측정, 비교하여 Table 8에 나타내었다. 그 결과 cyclic 및 aliphatic hydrocarbon에는 비교적 활성이 낮게 나타났으나 aromatic hydrocarbon과 각종 oil류들에서는 유화활성이 아주 높게 나타나 본 물질이 bioemulsifier로서의 유용성이 입증되었다. 따라서 본 물질의 산업적 응용성을 확인하기 위해 현재 물질 정제를 시도하고 있으며, 이후 정제 물질의 물성 및 제성질들을 검토하고자 한다.

요 약

Bioemulsifer를 생산하는 미생물을 토양으로부터 screening하였다. 그 중에서 유화활성과 유화안정성에서 가장 우수한 BE-254 균주를 순수분리하여 동정한 결과, *Acinetobacter*속으로 판명되었다. Bioemulsifier 생산을 위한 최적배지 조성은 *n*-hexadecane 4%, NaNO₃ 0.2%, KH₂PO₄ 0.05%, MgSO₄·7H₂O 0.05%, CaCl₂ 0.01%, yeast extract 0.01%이였으며, 최적온도와 pH는 각각 30°C와 7.0이였다. 이러한 조건에서 500 ml용 shaking flask에 최적배지 50 ml를 넣어 배양했을 경우 대수증식기 말기인 5일째 균의 증식과 유화활성이 가장 높게 나타남에 따라 *Acinetobacter* sp. BE-254에 의한 bioemulsifier의 생산은 균의 생육과 밀접한 관련이 있는 것으로 판단되었다. 유화기질로서 hydrocarbon류, edible oil류, 그리고 petroleum fraction등에 작용시켰을 경우 이들 물질에 대해서 비교적 높은 활성을 나타내어 유화제로서의 우수성을 시사 하였다.

감사의 말

이 연구는 1995년도 교육부 기초과학육성연구비 지원에 의한 연구(BSRI-95-4410)로 이에 감사 드립니다.

참고문헌

1. Kosaric, N., N.C.C. Gray, and W.L. Cairn. 1983. Microbial emulsifiers and de-emulsifiers. *Biotechnology*, Vol 3, Pp. 575. Verlag Chemie.
2. Layman, P. 1985. Industrial surfactants set for strong growth. *Chem. Eng. News*. **63**: 23-48.

3. Haferburg, D. and R. Hommel. 1986. Extracellular microbial lipids as biosurfactants. *Advan. Biochem. Engineer. Biotechnol.* **33**: 53-93.
4. Magaritis, A., J.E. Zajic, and D.F. Gerson. 1979. Production and surface-active properties of microbial surfactants. *Biotech. Bioeng.* **21**: 1151-1162.
5. Yoon, Y.K. and K.S. Choi. 1994. Studies on physical behavior of alkyl polyglucosides (I) -Interfacial activities and detergency-. *J. Korean Ind. Eng. Chem.* **5**: 451-456.
6. Parkinson, M. 1985. Biosurfactants. *Biotechnol. Adv.* **3**: 65-72.
7. Zajic, J.E. and C.J. Panchal. 1976. Bio-emulsifiers. *CRC Crit. Rev. Microbiol.* Nov., 39-66.
8. Kosaric, N. and W.L. Carins. 1987. Biosurfactant and biotechnology. Marcel Dekker Inc., New York.
9. Kim, W.K. and E.K. Kim. 1992. Effects of culturing parameters on the production of microbial biosurfactant from *Candida bombicola*. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **7**: 102-106.
10. Kim, W.K. and E.K. Kim. 1992. Application of biosurfactant (sophorolipid) produced from *Candida bombicola*. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **7**: 107-111.
11. 김상중. 1988. 미생물과 산업 **14**: 37-40.
12. Kretschmer, A., H. Bock, and F. Wabner. 1982. Chemical and physical characterization of interfacial-active lipids from *Rhodococcus erythropolis* grown on *n*-alkanes. *Appl. Environ. Microbiol.* **44**: 864-870.
13. Pines, O., E.A. Bayer, and D.L. Gutnick. 1983. Localization of emulsan-like polymers associated with the cell surface of *Acinetobacter calcoaceticus*. *J. Bacteriol.* **154**: 893-905.
14. Powalla, M., S. Lang, and V. Wary. 1989. Penta- and disaccharide lipid formation by *Nocardia corynebacteroids* grown on *n*-alkanes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **31**: 473-479.
15. Cirigliano, M.C. and G.M. Carman. 1984. Isolation of a bioemulsifier from *Candida lipolytica*. *Appl. Environ. Microbiol.* **46**: 747-750.
16. Cirigliano, M.C. and G.M. Carman. 1985. Purification and characterization of liposan, a bioemulsifier from *Candida lipolytica*. *Appl. Environ. Microbiol.* **50**: 847-850.
17. Zosim, Z., D. Gutnick, and E. Rosenberg. 1982. Properties of hydrocarbon-in-water emulsions stabilized by *Acinetobacter* RAG-1 Emulsan. *Biotech. Bioeng.* **26**: 281-292.
18. Gutnick, D.L. and E. Rosenberg. 1977. Oil tankers and pollution: a microbiological approach. *Annu. Rev. Microbiol.* **31**: 379-396.
19. Park, J.Y., I.S. Park, K.H. Suh, and Y.K. Hong. 1988. Emulsification of bunker-C oil by a marine bacterium *Achromobacter* sp. M-1220. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **16**: 384-388.
20. Boyle, C.D. and A.E. Reade. 1983. Characterization of two extracellular polysaccharides from marine bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **46**: 392-399.
21. Copper, D.G. and D.A. Paddock. 1984. Production of a biosurfactant from *Tolulopsis bombicola*. *Appl. En-*

- viron. Microbiol.* **47**: 173-176.
22. Sneath, P.H.A., N.S. Mair, M.E. Sharpe and J.G. Holt. 1986. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. The William and Wilkams Co. U.S.A.
 23. Jwan, F.M. 1980. *Biochemical tests for identification of medical bacteria* 2nd ed. The William and Wilkams Co. U.S.A.
 24. Rosenberg, E., A. Zuckerberg, C. Rubinovitz and D.L. Gutnick. 1979. Emulsifier of *Arthrobacter* RAG-1: isolation and emulsifying properties. *Appl. Environ. Microbiol.* **37**: 402-408.
 25. Rosenberg, E., A. Perry, D.T. Gilson, and D.L. Gutnick. 1979. Emulsifier of *Arthrobacter* RAG-1: Specificity of hydrocarbon substrate. *Appl. Environ. Microbiol.* **37**: 409-413.
 26. A. Zuckerberg, A. Diver, Z. Pceri, D.L. Gutnick, and E. Rosenberg. 1979. Emulsifier of *Arthrobacter* RAG-1: Chemical and physical properties. *Appl. Environ. Microbiol.* **37**: 414-420.

(Received 20 December 1995)