

Pseudomonas aeruginosa YPJ-80에 의한 생물계면활성제 생산에 미치는 pH 및 온도의 영향과 생물계면활성제의 분리

†박창호·손창규·김성훈·안도균
경희대학교 화학공학과 및 환경연구소
(접수 : 1998. 4. 27., 게재승인 : 1998. 9. 30.)

Effect of pH and Temperature on the Production of Biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa* YPJ-80 and Its Separation

Chang-Ho Park†, Chang Kyu Son, Sung Hoon Kim, and Doh Gyeuhn Ahn
Dept. of Chem. Eng and Institute for Environmental Science, Kyung Hee University, Yongin 449-701, Korea
(Received : 1998. 4. 27., Accepted : 1998. 9. 30.)

Temperature and pH conditions were studied for an effective biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* YPJ-80. Efficient methods of biosurfactant separation were also investigated pH-uncontrolled experiments at 35°C and an initial pH of 8 resulted in the best cell growth (3.6 g/L) and biosurfactant production (0.073 g biosurfactant/g cell). Biosurfactant separation was most efficient using solvent extraction with chloroform/methanol (2:1 vol%) followed by acidification using 1N HCl.

Key Words : pH, Temperature, Biosurfactant, *Pseudomonas aeruginosa* YPJ-80, Rhamnolipid

서론

계면활성제는 용매에 대해서 강한 친화력을 가진 lyophilic group과 용매에 대해 친화력이 거의 없는 lyophobic group을 분자 구조 내에 동시에 가진 물질이다. 계면활성을 가진 물질 또는 계면활성제가 용매(물 또는 유기용매)에 녹게 되면 lyophobic group은 용매와의 강한 반발력으로 인하여 아주 구부러진 형태를 지니게 된다. 예를 들어 계면활성제가 물에 녹았을 경우 소수성기는 심하게 구부러진 모양이 되어 계의 entropy를 감소시키는 결과를 가져온다. 따라서 계면활성제들은 이러한 상태에서 다른 계면에 흡착되거나 소수성기들이 안쪽으로 서로 모여서 계의 에너지를 감소시키게 된다. 계면활성제의 이러한 성질은 계면에너지의 저하와 micelle의 형성이라는 두 가지의 큰 특징을 가져오게 된다.

계면활성제 중에서 화학적으로 합성된 계면활성제는 1917년 독일에서 처음으로 공업화된 이래 현재 그 종류가 1,900여종에 이를 정도로 그 응용범위가 대단히 넓다. 그러나 환경적으로 난분해성, 유독성을 가져 이차적인 정제를 위한 처리비용이 추가로 소요되는 문제점 때문에 미생물이 만드는 생물계면활성제에 관한 연구를 할 필요성이 대두되었다. 생물계면활성제는 살아있는 미생물에 의하여 생산된 계면활성물질이다. 기본생산원리는

비수용성인 탄화수소를 탄소원으로 이용하기 위해 미생물이 체외로 생물계면활성제를 분비하도록 유도하는 방법과, glucose와 같은 일차대사산물에 대해서 미생물의 이화작용을 억제하도록 하여 보다 복잡한 구조인 생물계면활성제를 지속적으로 다량 생산하도록 유전자 조작을 하는 방법 등이 있다(1-4).

생물계면활성제를 생산하는 *Pseudomonas aeruginosa*는 수십 종류에 이르며 이러한 미생물들은 예외 없이 음이온성 계면활성제인 rhamnolipid를 생산한다고 보고되어 있다(5) *Pseudomonas aeruginosa*가 기질을 이용하여 rhamnolipid를 생합성하는 경로로는 glucose와 같은 탄수화물을 이용하는 경로와 hexadecane과 같은 탄화수소를 이용하는 경로로 나뉘게 된다. Glucose에서 지질을 생산하는 경로는 질소제한 상태에서의 생합성 경로로 예측될 수 있다. 즉, 질소제한 상태에서 미생물은 당을 이용하여 체내 구성물질을 생산하게 되는데 여기에는 phosphofructokinase, pyruvate kinase, isocitrate dehydrogenase, citrate lyase, pyruvate dehydrogenase 등의 효소가 작용한다. 이 효소들은 다당(rhamnose, sophorose, trehalose, mannose 등)을 생합성하고 TCA회로 과정을 지나서 acetyl-coA를 거쳐 지방산을 합성할 뿐만 아니라 지질인 rhamnolipid를 생산하게 된다. Hexadecane에서 지질을 생산하는 경로는 전자와는 달리 hexadecane에서 acetyl-coA를 거쳐 지질을 생산하게 되며 에너지를 당으로 저장하기 위하여 전자 경로의 역순으로 생합성이 진행된다. 그러나 이 반응은 비가역 반응으로 알려져있으며 작용하는 효소(isocitrate lyase, malate synthase, phosphoenolpyruvate carboxykinase, fructose-1,6-bisphosphatase 등)도 다르므로 이미 생성된 다당류에서 지질을 생산하기 위해서 전자의 지질 생산경로를 다시 거쳐 지질

† Corresponding Author · Dept. of Chem. Eng., Kyung Hee University, Yongin 449-701, Korea

e-mail : rks@kmucc.keimyung.ac.kr

인 rhamnolipid를 형성하게 된다.

이러한 미생물 유래의 계면활성제는 생분해성, 무독성, 생체적합성 등의 유용한 특성을 가지므로 화장품의 보습제, 석유회수제, 제지산업에서의 오염유류제거, 식품첨가제, 의용재료 등의 중요 소재로 사용할 수 있으나 생산비용이 매우 높기 때문에 그 상업적 이용이 부진한 실정이다.

일반적으로 생물계면활성제를 생산하는데 영향을 미치는 주요 인자로는 탄소원의 종류(6), 영양원의 제한, 탄소원과 질소원의 비(7) 및 질소원의 종류, pH, 용존산소의 양, 온도, 교반속도, 다가이온의 공급(8), 성장시기(9), 생산물에 의한 저해작용(10) 등이 있으며, 표면장력의 감소능이나 유화능 등을 시험하여 그 영향 정도를 알 수 있다.

본 연구에서는 선별된 균주인 *Pseudomonas aeruginosa* YPJ-80에 의한 생물계면활성제의 생산에 미치는 pH 및 온도의 영향을 조사하여 생산성 향상을 위한 조건을 찾아내고, 생산된 계면활성제의 효과적인 분리기술을 개발하여 생물계면활성제의 상업적 가치를 증대시키고자 하였다.

재료 및 방법

실험균주

탄화수소와 탄수화물을 탄소원으로 사용하는 균주 중에서 한국과학기술원(이상엽 박사 팀)에 의해 glucose 액체 배지에서 생물계면활성제를 가장 많이 생산하는 미생물로 선별된 *Pseudomonas aeruginosa* YPJ-80을 실험에 사용하였으며, 이 미생물에 의하여 생산된 계면활성제는 rhamnolipid 계통임이 확인되었다(11)

사용배지

탄소원으로 glucose, 무기질소원으로 ammonium nitrate를 사용하였고 여기에 유기질소원으로 yeast extract를 첨가하였다 Table 1과 같은 조성으로 세 부분으로 각각 가압멸균후, 상온에서 혼합하였으며 1N NaOH로 pH를 조절하였다.

Table 1. Medium composition for the production of biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa* YPJ-80

Stock solution	Chemicals	Concentration (g/L)
I	Glucose	20.00
	MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.50
II	NH ₄ NO ₃	1.00
	K ₂ HPO ₄	1.00
	KH ₂ PO ₄	0.50
	Yeast extract	1.00
III	NaCl	0.10
	CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.01
	MnSO ₄ · 5H ₂ O	0.01
	FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.01

배양방법

액체배지 50ml가 들어있는 250ml 삼각플라스크에 균주 2 colony를 접종한 후 8시간 동안 배양한 전(前)배양액을 660nm에서 optical density(이하 O.D.) 1.0 기준으로 플라스크 배지와

발효조 배지에 각각 2 vol% 접종하였다

플라스크 배양은 250ml 삼각플라스크에서 50ml를 조업부피로 하여 교반속도 300rpm으로 54시간동안 회전식 진탕기(VS-8480-SR, Vision Scientific, Korea)에서 진탕배양하였고, 발효조 배양은 7L 발효조(Korea Fermentor Co., Korea)에서 2L 조업부피로 하여 교반속도 300rpm, 통기량 0.18vvm을 유지하며 54시간동안 배양하였다.

균체량 측정

배양액으로부터 샘플을 취하여 Spectrophotometer(Spectronic 20D, Spectronic Instruments, USA)를 이용하여 파장 660nm에서 흡광도를 측정하여 균체량과 O.D.와의 검교정곡선으로 균체량을 분석하였다 실험을 통하여 얻어진 O.D.와 균체량의 관계는 O.D. 1.0 = 0.5 g dry cell 였다. 발효가 끝났을 때 발효도중 발생하여 발효조 밖으로 나온 foam중에 포함된 균체량도 측정하였다.

유화능(emulsifying activity, 이하 E.A.)측정 및 계면활성제의 정량분석

배양액을 20mM citrate-phosphate buffer(pH 5.3)로 60배 희석하여 99ml를 취한 후 2-methylnaphthalen과 n-hexadecane의 농도 혼합물 0.1ml를 첨가하여 25°C, 150rpm에서 1시간동안 왕복 진탕하고 10분간 정지한 후에 620nm에서의 흡광도를 측정하였다(12-14).

배양이 끝났을 때 발효조내의 배양액과 발효도중 발생하여 발효조밖으로 나온 foam을 섞은후 crude한 rhamnolipid를 취하여 건조시킨 후 농도에 따른 O.D.를 620nm에서 측정하여 rhamnolipid 농도와 O.D.와의 검교정곡선으로 정량분석을 하였다. 실험을 통하여 얻어진 O.D.와 rhamnolipid 농도의 관계는 O.D. 0.5 = 73 mg rhamnolipid 였다

표면장력의 측정

표면장력은 윤환법(백금고리법)을 이용한 표면장력기(吉田社, 일본)를 사용하여 측정하였다(15). 배양액을 10ml씩 취하여 알루미늄 집시에 넣고 표면장력을 두 번씩 측정하여 평균한 값으로 취하였다.

계면활성제의 분리

계면활성제의 효과적인 분리방법을 모색하기 위하여 배양액에서 균체를 제거한 상등액으로부터 여러 가지 추출법과 침전법으로 계면활성제를 분리시켜서 각각의 유화능을 비교하였다. 또한 그 유화능의 성능을 검증하기 위하여 상업용으로 시판되는 Anti-foam A(Sigma)와 Tween 80(Aldrich)의 유화능과 비교하였다.

결과 및 고찰

온도의 영향

사용 균주의 활성 및 계면활성제 생산에 미치는 배양온도의 영향을 조사하기 위하여 초기 pH, 교반속도, 통기량을 각각 8, 300rpm 및 0.18vvm으로 고정하고 발효조의 배양 온도를 25°C, 30°C, 35°C로 각각 유지하며 54시간 배양하였다.

균체생장은 35°C에서 O.D.로서 최대 7.21(3.6 g/L)로 25°C에 비해 2.9배, 30°C에 비해 2.3배만큼 더 높았다(Figure 1) 유화능

은 35°C에서 최대 1.40으로서 25°C에 비해 무려 38.9배, 30°C에 비해 15배나 더 높았다(Figure 2). 계면활성제의 생산여부를 간접적으로 알 수 있는 표면장력의 감소 추이는 25, 30°C에서 각각 58, 36 dyne/cm이었던 것에 비하여 35°C에서는 33 dyne/cm 이하를 나타냄으로써 35°C에서 더 많은 계면활성제가 생산되었음을 확인할 수 있었다(Figure 3).

이상의 결과는 상대적으로 높은 온도(35°C)에서 균체생장이 촉진되는 정도보다 계면활성제 생산이 증가되는 정도가 훨씬 두드러짐을 나타내었다

40°C에서 배양하였을 때는 최대 균체농도가 0.9 g/L로서 25°C(1.0 g/L), 30°C(1.4 g/L), 35°C(3.6 g/L)에서 배양한 경우에 비하여 비교적 낮기 때문에 이후 그림상의 비교에서 제외하였다. 사용된 균주의 성장가능 최대온도가 42°C로 40°C가 균주생장의 상한온도에 가깝기 때문에 낮은 성장을 나타낸 것으로 판단된다(16).

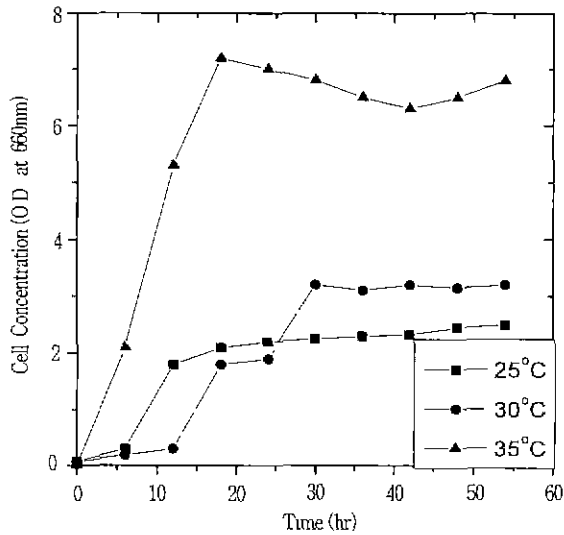


Figure 1. Effect of temperature on cell growth in fermentor experiments.

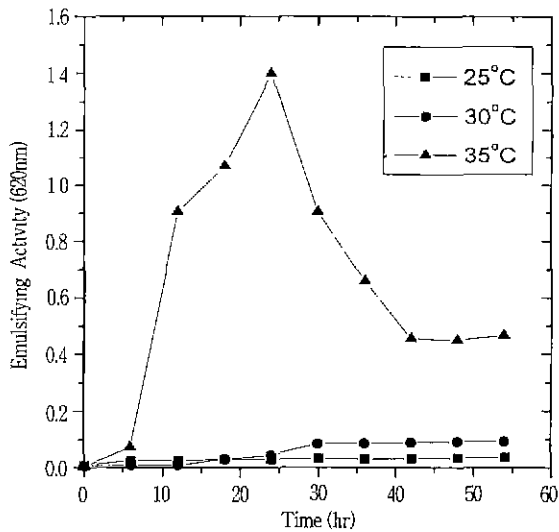


Figure 2. Effect of temperature on emulsifying activity in fermentor experiments.

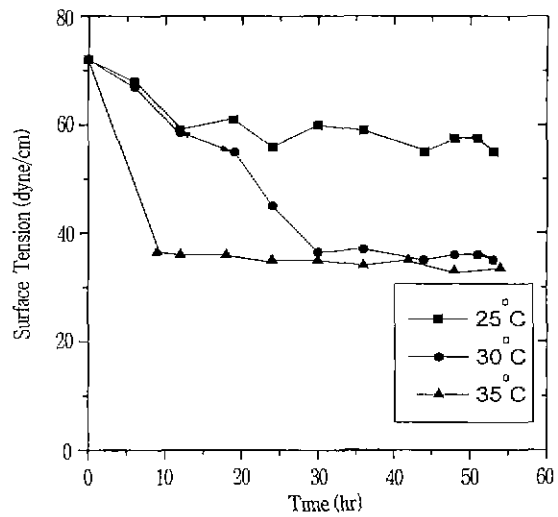


Figure 3. Effect of temperature on surface tension in fermentor experiments (initial pH 8).

초기 pH의 영향

플라스크와 발효조에서 배양온도와 교반속도를 각각 35°C 와 300rpm로 고정하고 배양 초기 pH를 각각 pH 6, 7, 8로 하여 균주의 활성 및 계면활성제 생산에 미치는 초기 pH의 영향을 조사하였다. 플라스크 배양시 균체생장은 초기 pH 8에서 최대 3.91로서 pH 7에 비해 17.4%, pH 9에 비해 14.1% 더 높은 값을 나타내었다(Figure 4). 유화능 또한 초기 pH 8에서 최대 0.40을 나타내었으며 이는 pH 7에 비해 2.6배, pH 9에 비해 1.3 배 더 높았다(Figure 5).

발효조를 이용하여 35°C, 300rpm에서 같은 실험을 수행한 결과도 역시 동일한 추이를 보임을 알 수 있었다. 균체생장은 초기 pH 8에서 O.D로 최대 7.21로서, pH 7에 비해 7.4배, pH 9에 비해 2.1배 더 큰 높은 값을 나타내었다(Figure 6). 유화능의 경우도 초기 pH 8에서 최대 1.40으로서, pH 8에서의 유화능은 pH 7에 비해 2.0배, pH 9에 비해 1.9배 더 큰 값을 나타내었

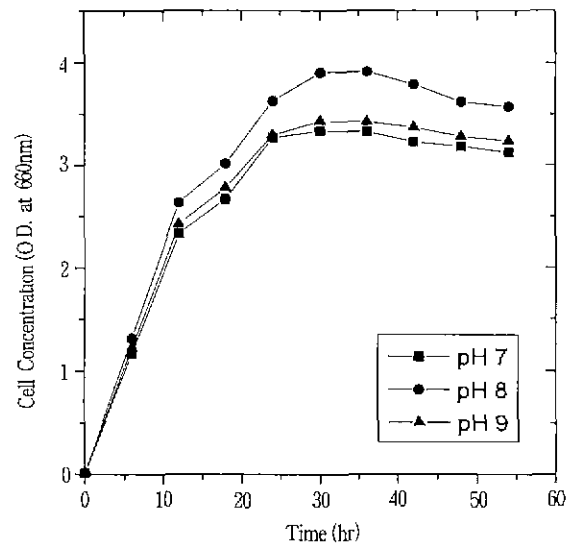


Figure 4. Effect of initial pH on cell growth in flask experiments.

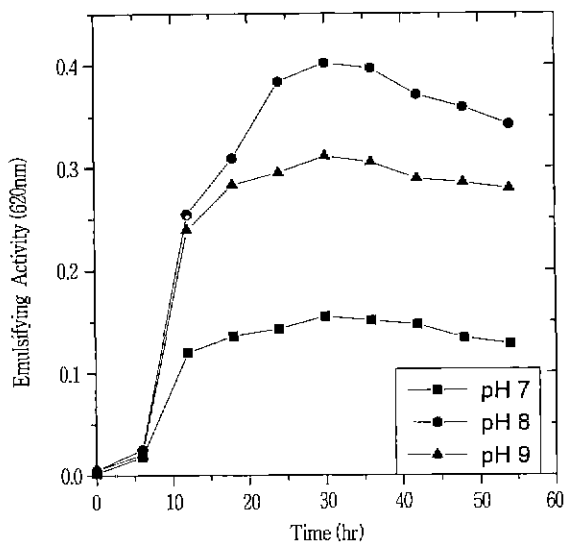


Figure 5. Effect of initial pH on emulsifying activity in flask experiments.

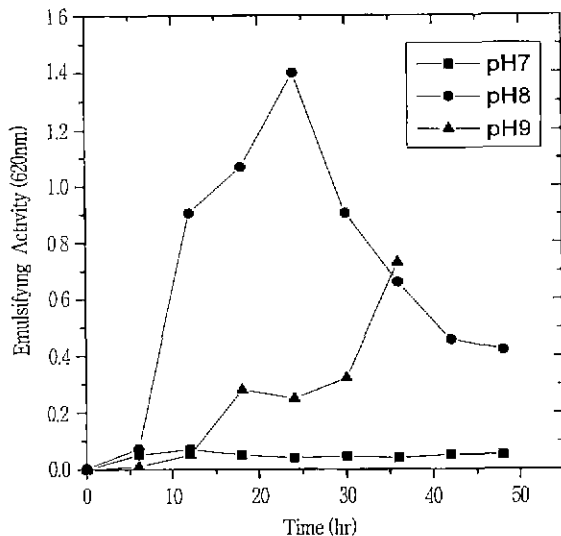


Figure 7. Effect of initial pH on emulsifying activity in fermentor experiments.

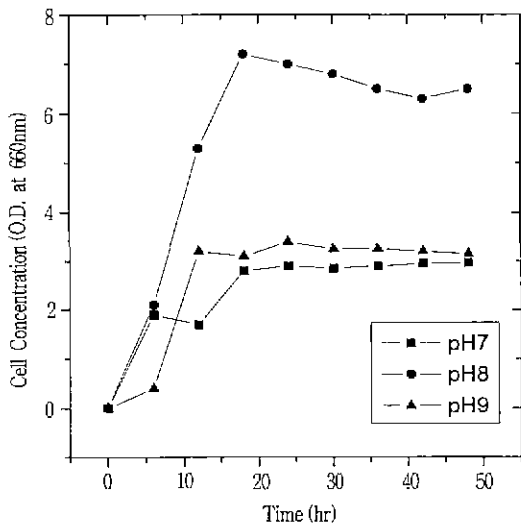


Figure 6. Effect of initial pH on cell growth in fermentor experiments.

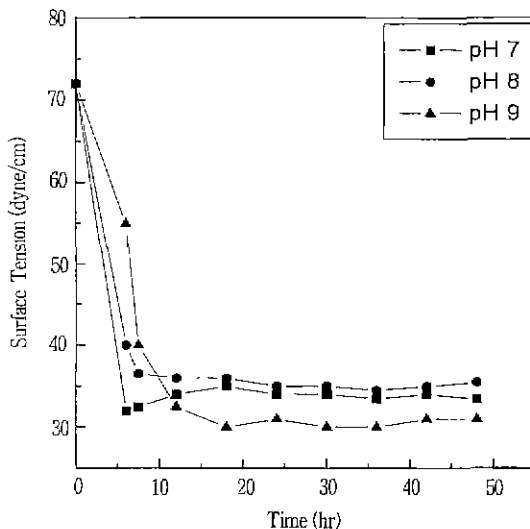


Figure 8. Effect of initial pH on surface tension in fermentor experiments.

다(Figure 7). 반면 각 초기 pH에 따른 세포성장 및 유화능 차이의 정도가 플라스크에서 보다 발효조에서 실험하였을 때 더 컸다. 표면장력은 초기 pH 7, 8, 9일 때 30~32 dyne/cm로써 비슷한 수치를 보였다(Figure 8).

이상의 플라스크 실험과 발효조 실험 결과를 토대로 본 균주는 초기 pH 8에서 배양할 때 균주의 활성이 가장 높고, 계면활성제 생산도 우수하였다.

pH 제어의 영향

pH 제어가 본 균주의 활성 및 계면활성제 생산에 미치는 영향을 조사하기 위하여, 발효조에서 pH를 7, 8, 9로 일정하게 제어하며 배양 온도를 35°C, 교반속도 300rpm, 통기량 0.18vvm으로 54시간 배양하였다. pH의 제어는 발효조에서 1N HCl과 1N NaOH로 pH 조절기능을 이용하여 제어하였다. 그 결과 균체생장에 있어서 매우 불규칙한 수치를 나타내었는데, pH가 7로 제

어된 경우 OD가 배양 후 6.5시간 후에 최고 1.64까지 상승하다가 그후 0.60경도로 감소한 후 다시 35시간에서 1.16으로 증가하여 정지기로 안정화되었다. pH가 8로 제어된 경우 30시간 후에 최고 1.46까지 상승하다가 정지기로 이어지는 형태를 보였고, pH가 9로 제어된 경우 배양 12시간 후에 2.85까지 상승하다가 42시간 후에 3.34로 증가한후 정지기로 안정화되는 등 대체적으로 고르지 못한 추이를 보였다(Figure 9). 유화능은 pH 7, 8, 9일 때 각각 최고 0.061, 0.048, 0.037을 나타내는 등 매우 낮은 값을 나타내었다(Figure 10). 표면장력에 대해서도 pH 7, 8, 9일 때 최저값이 각각 40, 46, 39 dyne/cm이었으며(Figure 11) 이는 pH를 제어하지 않은 실험결과보다 평균 33.2%나 높아서 pH제어가 효율적인 발효방법이 아님을 확인하였다.

이상의 결과를 통하여 pH를 일정하게 제어하는 방법은 pH를 제어하지 않는 방법보다 효과적이지 못함을 알 수 있었다.

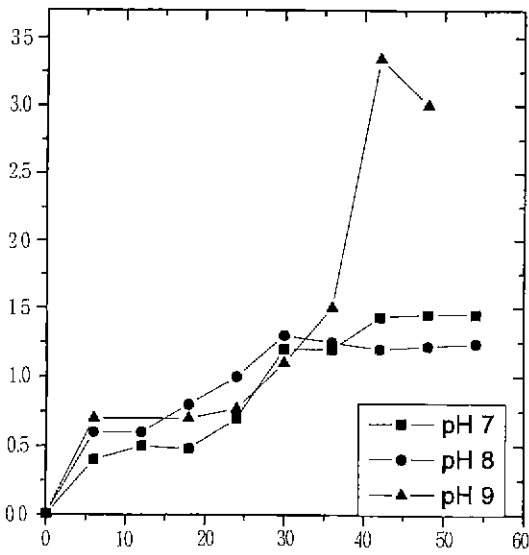


Figure 9. Effect of controlled pH on cell growth in fermentor experiments

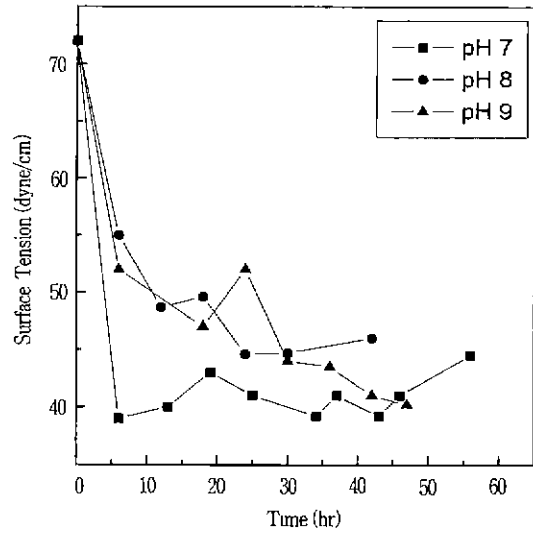


Figure 11. Effect of controlled-pH on surface tension in fermentor experiments.

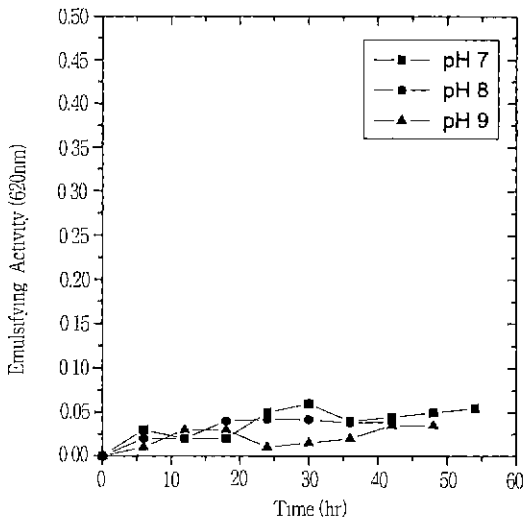


Figure 10. Effect of controlled-pH on emulsifying activity in fermentor experiments.

계면활성제의 정량분석에 의한 pH 및 온도의 영향 비교

온도, 초기 pH 및 pH제어가 균주의 활성과 계면활성제 생산에 미치는 영향을 계면활성제의 정량분석을 통하여 검증하였다. 앞서 설명한 각 실험조건에서의 배양을 54시간 수행한 후 발효조내의 배양액과 발효조 밖으로 나온 foam을 섞은 후 배양액에서 얻은 crude한 rhamnolipid를 일정하게 희석하여 농도와 OD와의 관계로써 균체량과 계면활성제 생산량을 분석하였다. (Table 2.)

먼저 온도의 영향 실험 결과, 35°C에서의 총 균체 생산량은 4.26g, 총 계면활성제 생산량은 0.31g으로 단위 균체당 생산된 계면활성제의 비율을 계산하면 7.3wt% (g 계면활성제/ g 균체)이며, 이는 25°C의 0.73wt%보다 10배, 30°C의 1.56wt%보다 4.7배나 높았다(Table 2-1).

초기 pH의 영향 실험 결과 초기 pH 8에서의 총 균체 생산량은 4.26g, 총 계면활성제 생산량은 0.31g으로 단위 균체당 생산

Table 2-1. Effect of temperature on total rhamnolipid and cell mass production at pH 8.

Product	Temperature	25°C	30°C	35°C
Rhamnolipid (g)		0.019	0.047	0.311
Cell (g)		2.600	3.000	4.260
RL/cell mass × 100 (w/w%)		0.73	1.56	7.3

* RL : rhamnolipid

Table 2-2. Effect of initial pH at 35°C on total rhamnolipid and cell mass production.

Product	Initial pH	pH 7	pH 8	pH 9
Rhamnolipid(g)		0.027	0.311	0.202
Cell(g)		2.772	4.260	3.216
RL/cell mass × 100 (w/w%)		0.97	7.3	6.28

* RL : rhamnolipid

Table 2-3. Effect of pH controlled at 35°C on total rhamnolipid and cell mass production.

Product	Controlled pH	pH 7	pH 8	pH 9
Rhamnolipid (g)		0.032	0.077	0.017
Cell (g)		6.609	17.611	0.914
RL/cell mass × 100 (w/w%)		0.48	0.44	1.86

* RL : rhamnolipid

된 계면활성제의 비율을 계산하면 7.3wt%이며, 이는 초기 pH 7 일 때의 0.97wt%보다 7.5배, 초기 pH 9일 때의 6.28wt%보다 16.2%가 높았다(Table 2-2)

pH를 제어한 실험에서는 pH 9에서의 단위 균체당 생산된 계면활성제의 비율이 1.86wt%로 가장 높았으니 그 절대량에 있어서는 pH를 제어하지 않은 실험결과에 비해 훨씬 적었다(Table 2-3).

이상의 결과를 종합할 때, 배양온도 35°C, 초기 pH 8로 배양을 시작한 후 pH제어를 하지 않는 방법이 본 균주의 균체 활성과 계면활성제 생산에 있어서 가장 효과적이었다.

계면활성제의 분리

여러 가지 추출법과 침전법을 사용하여 균체를 제거한 배양액의 유화능을 비교하여 효과적인 계면활성제 분리방법을 확인하였다

침전법은 두 가지로서 acetone을 배양액의 3배 부피비로 가하여 침전시키는 acetone 침전법과 ethanol을 배양액의 3배 부피비로 가하여 침전시키는 ethanol 침전법을 사용하였다. 추출법은 세 가지로서 원심분리기로 균체를 제거한 상등액을 ethylacetate 용매로 1:1 부피비로 사용하여 3회 추출하는 ethylacetate 추출법과 chloroform/ methanol(2:1 vol%) 용매로 3회 추출하는 추출법, 그리고 1N HCl로 pH를 2.0으로 낮추어 산성화한 후 chloroform/methanol(2:1 vol%) 용매로 3회 추출하여 상등액에서 건조시키는 추출법 등으로 수행하였다.

사용한 용매로 인한 유화능에 미치는 영향은 없는 것으로 확인되었으며 모든 분리실험 후 각각의 경우에 대한 유화능을 비교한 결과, 균체를 포함한 배양액의 유화능이 0.430, 균체를 제거한 상등액의 유화능이 0.869이었으나, acetone 침전법 후의 유화능은 0.739, ethanol 침전법 후의 유화능은 0.329로 두 가지 침전법 사용할 때의 유화능이 균체가 제거된 상등액의 유화능에도 미치지 못함을 알 수 있었다(Table 3)

Table 3. Comparison of emulsifying activity for different separation methods

Sample and separation methods		Emulsifying activity (λ=620nm, 60 fold dilution)
Cultured sample		0.430
Supernatant		0.869
Precipitation	Ethanol	0.329
	Acetone	0.739
Acidification		0.555
Extraction	Ethylacetate	0.150
	Chloroform/methanol (2:1 vol%)	0.955
	Chloroform/methanol (2:1 vol%) after acidification	0.997
Commercial emulsifier	Antifoam A	0.389
	Tween 80	0.378

상등액을 1N HCl로 pH 2.0으로 낮추는 산성화만을 수행한 후 측정된 유화능은 0.555였으며, ethylacetate 추출법 후의 유화능은 0.150이었다. 그러나 chloroform/ methanol(2:1 vol%) 용매로 추출하는 추출법 후의 유화능은 0.955, 그리고 1N HCl로 pH를 2.0으로 낮추는 산성화 후 chloroform/methanol(2:1 vol%) 용매로 추출하는 방법 후의 유화능은 0.997로 다른 분리방법에 비해 매우 높은 유화활성을 나타내었다. 이는 acidification 후 chloroform/methanol(2:1 vol%) 용매로 추출하는 방법이 본 균주가 생산한 계면활성물질을 분리하는데 가장 효율적임을 알 수 있게 한다.

본 실험에서 생산된 생물계면활성제와 상업용으로 시판되는 Antifoam A(Sigma, USA)와 Tween 80(Aldrich, USA)의 유화능을 비교하였다. Antifoam A의 유화능은 0.389, Tween 80의 유화능은 0.378로서 본 연구에서 추출법으로 분리한 계면활성제의 유화능(0.997)이 우수함을 알 수 있었다.

요 약

Pseudomonas aeruginosa YPJ-80을 이용하여 생물계면활성제를 효과적으로 생산하기 위한 pH와 온도의 조건을 조사하였고, 생성된 계면활성제의 효율적 분리방법을 모색하였다. 배양온도 35°C와 초기 pH 8로 배양을 시작하여 이후 변하는 pH를 제어하지 않았을 때가 최대균체량이 36 g/L, 단위균체당 생산된 계면활성제량이 7.3 wt%(g 계면활성제/g 균체)로 균체의 생장과 계면활성제의 생산에 가장 효과적이었다. 생산된 계면활성제의 분리는 1N HCl로 산성화한 후 chloroform/methanol (2:1 vol%)의 용매로 추출하는 방법이 가장 효율적이었다.

감 사

본 연구는 한국과학재단의 목적기초 연구과제(과제번호 : 94-0502-10-02-3)의 연구비 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다. 또한 경희대학교 교비연구비(1994)로 일부 지원을 받았으며 이에 감사드립니다

참 고 문 헌

- 1 Hisatsuka, T., Nakahara, and K. Tamada (1972), Protein like activator for-alkane oxidation by *Pseudomonas aeruginosa* S7B¹, *Agr. Biol. Chem.*, **36**, 1361-1369
- 2 Hisatsuka, K., T. Nakahara, Y. Minoda, and K. Yamada (1977), Formation of protein-like activator for n-alkane oxidation and its properties. *Agr. Biol. Chem.*, **41**, 445-450.
- 3 Yamaguchi, M., A. Sato, and A. Yukuyama (1976), Microbial production of sugar-lipids, *Chem. Ind.*, **17**, 741-742.
- 4 Cirigliano, M. C. and G. M. Carman (1984), Isolation of a bioemulsifier from *Candida lipolytica*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **48**, 747.
- 5 Hisatsuka, K., T. Nakahara, and K. Tamada (1971), Formation of rhamnolipid by *Pseudomonas aeruginosa* and its function in hydrocarbon fermentation, *Agr. Biol. Chem.*,

- 35(5), 686-692.
6. Robert, M., M. E. Mercadé, M. P. Bosch, J. L. Parra, M. J. Espuny, M. A. Manresa, and J. Guinea (1989), Effect of the carbon source on biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* 44T1. *Biotechnol. Lett.*, **11**, 871-874.
 7. Santos, L. G., O. Kappeli, and A. Fiechter (1984), *Pseudomonas aeruginosa* biosurfactant production in continuous culture with glucose as carbon source, *Appl. Environ. Microbiol.*, **48**, 301-305.
 8. Suzuki, T., K. Tanaka, I. Matsuura, and S. Kinoshita (1969), Trehalose lipid and α -branched β -hydroxy fatty acid formed by bacteria grown on n-alkanes, *Agr. Biol. Chem.*, **33**, 1619.
 9. Shabtai, Y., and Daniel I. C. Wang (1990), Production of emulsan in a fermentation process using soybean oil (SBO) in a carbon-nitrogen coordinated feed. *Biotechnol Bioeng.*, **35**, 753.
 10. Cooper, D. G., C. R. Macdonald, S. J. B. Duff, and N. Kosaric (1981), Enhanced production of surfactin from *Bacillus subtilis* by continuous product removal and metal cation additions, *Appl. Environ. Microbiol.*, **42**(3), 408.
 11. 정용린 (1996), "Pseudomonas aeruginosa YPJ-80에 의한 생물유화제의 생산", 한국과학기술원, 석사학위논문, 대전.
 12. 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.
 13. Rosenberg, E., A. Perry, D. T. Gibson, and D. L. Gutnick (1979), Emulsifier of *Arthrobacter* RAG-1: Specificity of hydrocarbon substrate, *Appl. Environ. Microbiol.*, **37**, 409-413.
 14. Zuckerberg, A., A. Diver, Z. Peeri, D. L. Gutnick, and E. Rosenberg (1979), Emulsifier of *Arthrobacter* RAG-1. Chemical and physical properties, *Appl. Environ. Microbiol.*, **37**, 414-420.
 15. 안도균 (1997), "생물계면활성제의 발효 최적화 및 분리공정의 개발", 경희대학교 대학원, 석사학위논문, 용인.
 16. Atkinson, B., F. Mavituna (1991). *Biochemical Engineering and Biotechnology Handbook*, Stocken Press, USA, 221.