

Phenanthrene 분해균주로부터 미생물 계면활성제의 생산

한 창 성·윤 현 식·¹서 형 준·*김 은 기
인하대학교 공과대학 생물공학과·¹환경공학과
(접수 : 1999. 12. 2., 게재승인 : 1999. 12. 18.)

Biosurfactant Production from Phenanthrene Degrading Bacteria

Chang-Sung Han, Hyun Shik Yun, Hyung Joon Seo¹, and Eun-Ki Kim*
Department of Biological Engineering, ¹Environmental Engineering, Inha University, Inchon 402-751, Korea
(Received : 1999. 12. 2., Accepted : 1999. 12. 18.)

Phenanthrene degrading bacteria were isolated from the petroleum contaminated soil near an oil tank. Four of 15 strains decreased surface tension of culture broth of phenanthrene-containing minimal media. H6, one of the isolated bacteria decreased surface tension of culture broth below 33 dyne/cm during growth on glucose. H6 was identified as *Bacillus subtilis* and biosurfactant produced by H6 was lipopeptide. The biosurfactant was produced at 0.13 g/L in the mineral medium containing 2% glucose. Critical micelle concentration(CMC) of the biosurfactant was 52 mg/L. Foaming power was similar to Tween 80 and dispersing power was superior to Tween 80, SDS and Brij30. High thermal stability and emulsion index were also observed.

Key Words : phenanthrene, biodegradation, biosurfactant

서 론

PAH(Polycyclic Aromatic Hydrocarbon)는 벤젠고리가 여러 개 있는 물질로서 원유 등에 소량씩 포함되어 있고 산업부산물로서 생성되기도 하는 대표적인 환경 유해물질이다. PAH는 고리의 수가 증가할수록 소수성의 증가와 함께 물에 대한 용해도가 감소하여서 PAH의 일종인 phenanthrene의 경우는 1.2 ppm의 낮은 용해도를 보이고 있다(1). Phenanthrene은 다른 PAH와 함께 대표적인 발암물질로 알려져 있으며 토양에 쉽게 흡착되고 오염된 토양으로부터 물에의 낮은 용해도 때문에 천천히 지하수에 용해되면서 상당기간 동안 지하수를 오염시켜 지하수의 식수 사용을 못하게 만들거나 food chain 등을 통해서 인체 섭취시 많은 위험을 야기한다. 또한 PAH에 오염된 토양을 생물학적 방법을 이용하여 처리할 경우 토양에 흡착된 PAH는 탈착속도가 상당히 느려서 토양 미생물에 의해 분해가 늦어지게 되고 낮은 탈착속도가 낮은 분해속도의 주원인이 되고 있다(2).

흡착된 PAH를 탈착시켜서 물에 대한 용해도를 증가시키는 방법의 하나는 계면활성제를 사용하는 방법이다. 계면활성제는 친수성부분(머리)과 소수성부분(꼬리)이 한 분자 내에 있는 양극성 물질로서 수용액 내에서는 일정농도 이상에서 소수성꼬리끼리

모이고 친수성부분이 물과 접하는 구 형태의 마이셀을 형성한다. 이때의 농도를 임계마이셀농도(Critical Micelle Concentration: CMC)라고 부른다(3). 구의 내부는 소수성공간으로 이 내부로 소수성 오염물질인 PAH가 포집되어서 결국은 수용액내의 PAH 용해도가 증가하게 된다(4,5). 수용액 내로 용해된 PAH는 미생물에 의해 분해되고 결국은 계면활성제에 의해 미생물의 분해속도가 증가하는 결과가 된다. 또한 흡과 소수성 오염물질사이의 계면장력(interfacial tension)을 감소시켜 이동성이 증가하게 되고 흡의 다공(pore)내에 있던 소수성물질이 수용액 내로 쉽게 이동하는 역할을 하여 이 또한 미생물의 PAH 분해속도를 증진시킨다. 그러나 일부 문헌에는 첨가한 화학합성계면활성제가 CMC이상 혹은 이하에서 PAH 분해속도를 증진, 혹은 저해하는 것으로 보고하고 있다(6). 화학합성계면활성제는 일부 보도된 저해작용 이외에도 토양세척 등의 적용 후에도 토양에 흡착되어있어 토양 오염된 물질을 세척 후, 흡착된 계면활성제를 다시 많은 양의 물로 씻어내야 하는 문제가 있다.

미생물계면활성제는 박테리아, 효모와 곰팡이 등에서 생산되는 계면활성제로서 이러한 화학계면활성제가 가지는 단점을 극복할 수 있고 환경친화적이라는 장점과 토양미생물에 의해 토양 내에서 직접 생산할 수 있다는 장점 등으로 최근 많은 연구가 진행되고 있다(7-9). 미생물계면활성제는 소수성 물질을 사용하여 자라는 미생물에 의해 생산되는 것으로 알려져 있다(10). 즉, 소수성물질을 사용하기 위하여 미생물은 세포외부로 유화제인 미생물계면활성제를 생산하여 소수성물질을 마이셀의 내부로 용해시키고 미생물 내로 끌어들이며 분해시킨다. 이때 생산되는 미

*Corresponding Author : Department of Biological Engineering,
Inha University, Inchon 402-751, Korea
Tel : 032-860-7514, Fax : 032-875-0827
E-mail : ekkim@inha.ac.kr

생물계면활성제의 종류는 소수성 기질에 따라 다르고 분해방법도 다른 것으로 보고되어 있다(11). 이러한 미생물계면활성제에 의한 소수성물질의 분해이외에도 소수성물질은 직접 세포벽에 흡착되어 분해되거나, 소량씩이나마 물에 용해되어서 분해된다.

대부분의 미생물계면활성제 생산연구는 직쇄형 탄화수소를 탄소원으로 하여 생산한 경우였다. PAH의 경우에는 직쇄형 탄화수소와 같은 방법으로 계면활성제가 생산되어 PAH의 분해를 촉진하는지에 대한 연구결과가 별로 많지 않다(12). PAH가 어떤 방법으로 주로 분해되는가, 또는 생산되는 계면활성제의 물리적 특성을 조사하는 것은 PAH로 오염된 토양을 효과적으로 정화하기 위한 중요한 정보를 제공한다.

본 논문에서는 PAH를 분해하는 미생물을 분리하고, 이 미생물이 계면활성제를 생산하는지를 조사하고 생산된 계면활성제가 어떤 특성을 가지고 있는지를 조사하는 것이다. 이 연구의 한 방법으로 본 논문에서는 분리된 PAH 분해균주 H6의 계면활성제 생산특성에 대한 결과를 소개한다.

재료 및 방법

Phenanthrene 분해 균주의 분리 및 배양

Phenanthrene 분해 균주의 분리를 위해 학교근처 정유공장의 유류 저장소 부근의 오염토양을 채취하였다. 0.2% phenanthrene이 첨가된 mineral salt medium(MS배지; L당 KH_2PO_4 0.5 g, K_2HPO_4 1 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g, NaNO_3 2 g, CaCl_2 0.01 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g, KCl 0.01 g, pH 7.0±0.2) 10 mL에 1 g 토양을 첨가 후 250 mL flask에서 30°C, 200 rpm으로 2일씩 5차례 계대배양 하였다. 배양 후 MS배지와 같은 조성으로 만들어진 agar plate에 균주를 도말하고 100 mL 아세톤에 phenanthrene 2 g이 녹아 있는 용액을 분무기를 이용하여 2회 분무시키고, 30°C에서 10일간 배양시켰다. 형성된 콜로니 근처의 phenanthrene이 분해되면서 투명해지는 원이 형성된 것을 확인하였다. 분해균의 동정은 인하대학교 생물학부에 동정을 의뢰하여 실시되었으며, 동정방법은 chromosome의 16s rRNA gene 부위를 polymerase chain reaction 기법으로 증폭시킨 후 sequencing하였다. 얻어진 DNA sequence를 기존에 있는 DNA sequencing database와 비교하여 분리된 미생물을 동정하였다. Phenanthrene, Tween 80 등은 모두 시약급을 사용하였다.

미생물계면활성제의 정량

2% 포도당과 0.2% phenanthrene이 각각 포함된 MS배지를 사용하였다. 포도당 포함 배지를 30°C, 200 rpm으로 72시간 배양해 400 rpm으로 20분간 원심분리한 후 상등액을 Surface Tensionmat 21(Fisher Scientific, USA)을 이용하여 표면장력을 측정하였고, phenanthrene 포함배지는 10일간 배양하여 같은 방법으로 측정하였다.

계면활성제의 양을 측정하기 위해서 CMC를 측정하였다. 즉 미생물계면활성제를 증류수에 일정량 녹이고 1 M NaOH로 pH 7.0으로 맞춘 후, 계면활성제의 희석을 통해 농도를 변화시키면서 표면장력을 측정하여 일정 값을 유지하다가 상승하는 지점을 CMC로 결정하였다. 배지내의 계면활성제를 정량하기 위해서는 배양액을 4000 rpm, 20분 원심분리 후 상등액을 증류수로 희석하면서 그 농도가 몇 배의 CMC에 해당하는가를 측정하여 CMD

(Critical Micelle Dilution)로 표시하였다.

미생물계면활성제의 분리 및 성분 분석

2% 포도당이 포함된 MS배지 50 mL에 tryptic soy medium에서 1일 배양한 균주 0.2 mL를 접종하여 30°C, 200 rpm에 48시간 배양하였다. 배양액을 4000 rpm에서 20분간 원심분리 시킨 후, 6 M HCl을 이용하여, pH 2로 낮추었다. 4°C에서 8시간 정치시키고, 12000 rpm으로 20분간 원심분리하고 상등액을 분리한 후 pH 2인 증류수에 녹인 후, 12000 rpm으로 원심 분리하였고, 50°C에서 건조시켜 미생물계면활성제를 얻었다. 얻어진 미생물계면활성제를 증류수에 녹인 후, 1 M NaOH를 사용하여 pH 6.8로 조정하였다. TLC aluminium sheets Silica gel 60 F₂₅₄(Merck, USA)를 사용하여 CHCl_3 ; CH_3OH ; H_2O (65; 15; 1, v; v; v)를 사용하여 전개시킨 후 50% 황산을 분무한 후 110°C로 가열하여 발색시켰다. 아미노기는 아세톤에 녹인 0.2% ninhydrin을 이용하여 120°C로 가열하여 발색시켰다.

Surfactant의 기포력, 분산력, 온도안정도, 유화안정도 측정

기포력 : 500ppm 미생물계면활성제 용액을 시험관에 5 mL를 채운 후, 15 cm 높이에 피펫을 설치하고 10 mL의 미생물계면활성제 용액을 10 mL 높이에서 낙하시켰다. 이때 형성된 거품의 높이를 측정하였다.

분산력 : 500 ppm 미생물계면활성제 용액 10 mL에 0.05 g의 Fe_2O_3 를 시험관(1 cm 직경×12 cm)에 넣고 30초간 강하게 교반시켰다. 2시간 동안 상온에서 정치시키고 시험관 내의 용액을 표면 3 cm 아래의 샘플을 취하여 O.D 600 nm에서 흡광도를 측정하였다.

온도안정도 : 500~200 ppm 미생물계면활성제 용액을 121°C에서 10, 30, 60분 동안 유지시킨 후 용액의 표면장력의 변화를 측정하였다.

유화안정도 : Emulsion stability는 시험관에 hexadecane 10 mL, 증류수 10 mL와 일정량의 surfactant를 첨가한 후 1분간 교반하였다. 2시간 동안 상온에서 정치시키며 유화층의 분리여부를 관찰하였고, emulsion index($\epsilon = \text{Emulsion Volume} / \text{Total volume}$)를 사용하여 상대적 값을 나타내었다.

결과 및 고찰

Phenanthrene 분해균주의 분리

저유소 유류저장탱크 오염토양으로부터 phenanthrene 분해균주 15개를 분리하였다. 분리균주를 각각 2% 포도당 혹은 0.2% phenanthrene이 함유된 MS배지에서 3일 및 10일 배양 후 표면장력을 측정한 결과 대부분의 균주는 표면장력이 별로 저하되지 않았다(Table 1). Phenanthrene배지의 경우는 H6, H12 2개 분리균주만이 표면장력이 저하되었고 미생물계면활성제가 phenanthrene 분해시 생산됨을 알 수 있었고 나머지 균주는 다른 기작, 예를 들면 세포벽의 소수성 특성에 의해서 phenanthrene이 흡착되어서 직접 분해되는 것으로 추측되었다. 포도당을 배지로 사용한 경우 역시 H6와 H12균이 낮은 표면장력을 보여서 계면활성제의 생산이 반드시 phenanthrene의 분해에만 생산되는 것이 아님을 알 수 있었다. 각 분리균주의 phenanthrene 분해능과 세포벽의 소수성은 상관성이 있음을 보여주고 있다(Table 2). 즉, phenanthrene

Table 1. Biosurfactant production by isolated strains.

isolate	Surface tension (dyne/cm)	
	2% Glucose (3day)	0.2% phenanthrene (10 day)
Control	71.9	72.0
H1	65.7	72.0
H2	71.6	73.7
H3	61.6	71.0
H4	67.9	73.2
H5	72.5	74
H6	33.3	32.4
H7	63.5	61.5
H8	66.3	75.0
H9	69.5	72.6
H10	68.9	71.0
H11	65.3	76.4
H12	70.2	57.2
H13	52.0	67.0
H14	62.5	69.4
H15	62.2	68.7

* Cells were cultured in MS medium, 30°C, 200 rpm.

배지에서 표면장력이 낮아지지 않는, 즉 계면활성제를 생산하지 않은 H13, H14, H15균은 계면활성제를 생산하는 H6보다도 높은 phenanthrene 분해능을 보여주었으며 또한 이들 균주의 세포벽의 소수성을 조사해 본 결과 H13, H14, H15는 소수성이 강하고 상대적으로 H6는 친수성인 것으로 나타났다. 즉 phenanthrene 분해력이 높은 균주는 소수성이 높았고 계면활성제를 생산하지 않음을 알 수 있었고 상대적으로 미생물계면활성제를 생산하는 균은 친수성이 강하고 phenanthrene 분해력도 떨어짐을 알 수 있다. 이는 미생물이 직쇄형 탄화수소를 분해할 경우에는 미생물 계면활성제가 대부분 생산되나 PAH 등 방향족 탄화수소 분해시에는 별로 많이 생산되지 않는 것으로 여겨진다(4,5)

미생물계면활성제 생산

분리한 phenanthrene 분해균주 중 낮은 표면장력을 보이는 H6 균을 동정하였다. 16S rRNA의 DNA Sequencing 결과 *Bacillus subtilis*로 확인되었다. 생산되는 계면활성제의 특성을 조사하기 위해서 H6를 포도당 함유 배지에서 배양하였다. Figure 1에서 보는 바와 같이 균의 성장과 함께 표면장력이 저하하여서 계면활성제 생산이 균의 성장과 비례하여 생산됨을 알 수 있었다. 이러한 현상은 PAH 분해균주인 *Pseudomonas*에서 포도당을 배지로 사용하여 계면활성제를 생산할 경우와 같은 경향을 보였다 (1). 계면활성제가 생산됨에 따라 많은 거품이 발생되었고, 플라스크 배양의 경우보다 배양기(1 Liter)에서 강한 교반과 공기의 공급으로 많은 거품이 발생되었으며 기계적 거품제거기는 큰 효과가 없었다. 거품의 발생에 따라 세포가 유출되면서 배양기내의 농도가 낮아지는 현상으로 배양이 중단되는 등의 문제점이 발생되었다. 소포체의 첨가는 계면활성제의 분리를 어렵게 할뿐만 아니라 많은 양이 소요되는 점등의 문제점이 있었다. 이러한 문제를 해결하기 위해 현재 oxygen vector로 사용되는 식물성 기름을 사용하는 연구 중에 있다.

생산되는 계면활성제를 분리하기 위해서 먼저 배양 상등액의 pH를 변화시켜서 침전정도를 측정하였다. Figure 2에서와 같이

Table 2. Phenanthrene biodegradation and hydrophobicity of isolated strains.

Isolated strain	Phenanthrene biodegradation (%) [*]	Hydrophobicity of cells (%) ^{**}
H6	40 ± 2	9 ± 1
H13	89 ± 5	52 ± 9
H14	88 ± 7	58 ± 5
H15	87 ± 8	95 ± 4
Control (No cells)	10 ± 3	-

* Cells were cultured in MS medium (500 ppm phenanthrene), 30°C, 200 rpm, 10 days

** High value indicates more hydrophobic cells

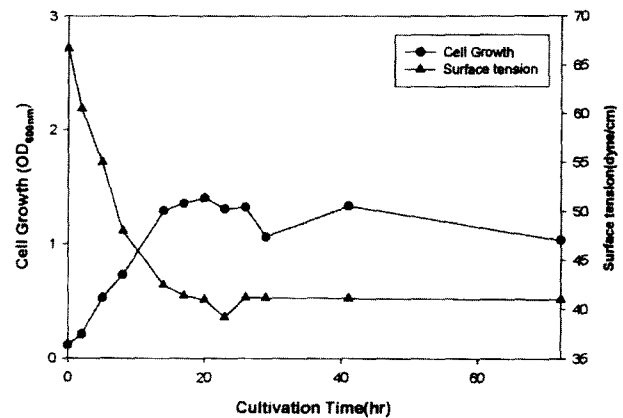


Figure 1. Production of biosurfactant by H6 isolate.

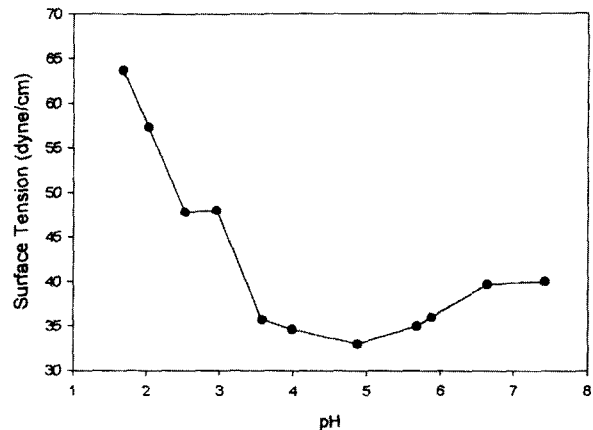


Figure 2. Precipitation of the biosurfactant by 6N HCl.

낮은 pH, 즉 pH 2 이하에서 대부분의 계면활성제가 침전되어 상등액에는 계면활성제의 양이 급격히 감소하여 표면장력이 증가함을 알 수 있다. 생성된 계면활성제를 회수하기 위해서 배양액을 6M HCl로 pH 2로 저하시킨 결과 백색의 침전물이 형성되었다. 원심분리 후 1M NaOH로 pH 7로 조정한 결과, 물에 쉽게 용해되었다. 플라스크 배양 후, 70시간 후에 H6에 의해서 생성된 계면활성제의 양은 130 mg/L이었다. 분리한 계면활성제의 임계마이셀농도(CMC)는 52ppm이었고 표면장력은 30 dyne/cm까지 낮아졌다(Figure 3).

미생물계면활성제의 특성

H6에 의해 생산된 미생물계면활성제의 구성성분을 분석하기

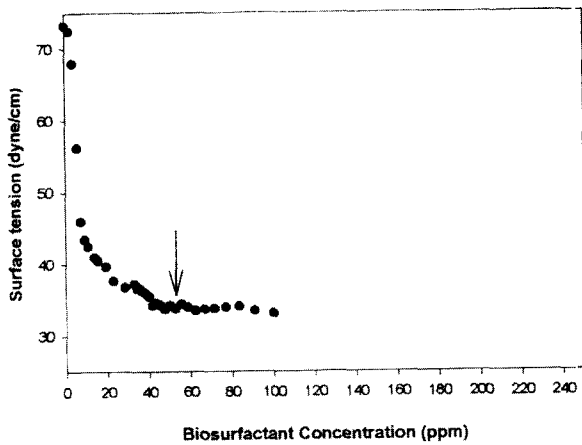


Figure 3. Critical micelle concentration (↓) of the biosurfactant produced by H6 strain.

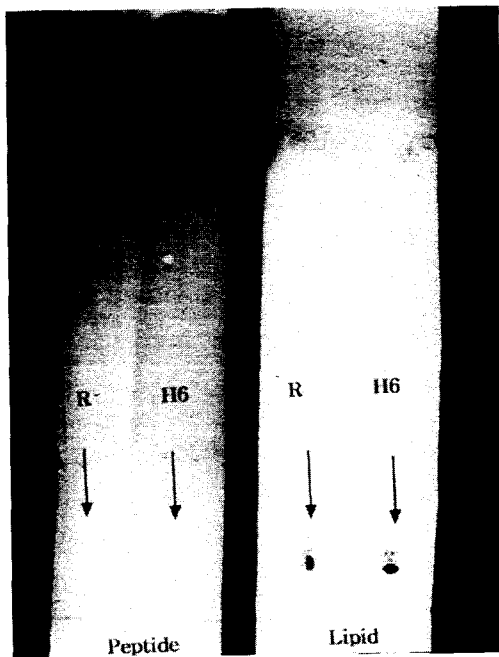


Figure 4. TLC analysis of biosurfactant produced by H6 strain R: Lipopeptide produced from *B.subtilis* (ATCC 21332), H6: Biosurfactant produced from H6 isolated bacteria. Presence of peptide and lipid was confirmed by color development (↓) with ninhydrin (left) and sulfuric acid (right), respectively.

위해서 Thin Layer Chromatography(TLC)를 이용, 분리한 후 발색시켰다. Lipid와 peptide의 존재여부를 각각 조사한 결과, 황산을 사용하여 lipid 부분을 발색시킨 경우와 ninhydrin을 이용한 amino group의 발색지점이 각각 존재하는 것을 알 수 있었다 (Figure 4) 즉, H6에서 생산된 미생물계면활성제는 lipid와 amino group의 공존하는 lipopeptide 계열임이 확인되었다. *B. subtilis*에서 생산되는 lipopeptide는 통상 surfactin이라고 불리며, cyclic lipopeptide의 구조로서 구조가 다른 형태가 많이 보고되고 있다 (13-15). Phenanthrene을 분해하는 많은 균이 분리되어 보고되었지만 *Bacillus*에 의한 phenanthrene 분해는 별로 많지 않다. 현재 생산된 lipopeptide의 구조와 아미노산 순서를 확인 중에 있다.

생산된 미생물계면활성제의 물리적 특성은 계면활성제의 산업

Table 3. Foaming power of surfactant.

Surfactant*	Tween 80	Brij 30	SDS	H6 Biosurfactant
Foam Height (mm)	23 ± 2	12 ± 2	34 ± 3	20 ± 2

* concentration: 1 g/L

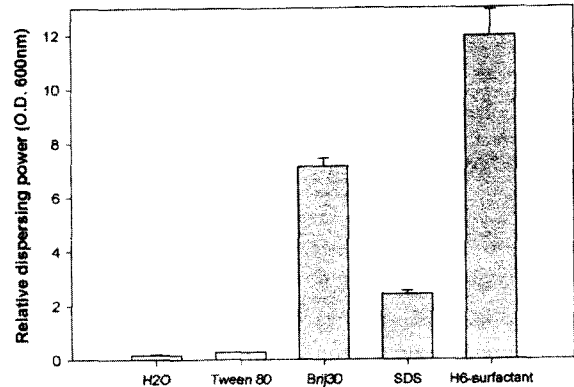


Figure 5. Relative dispersing power of surfactants.

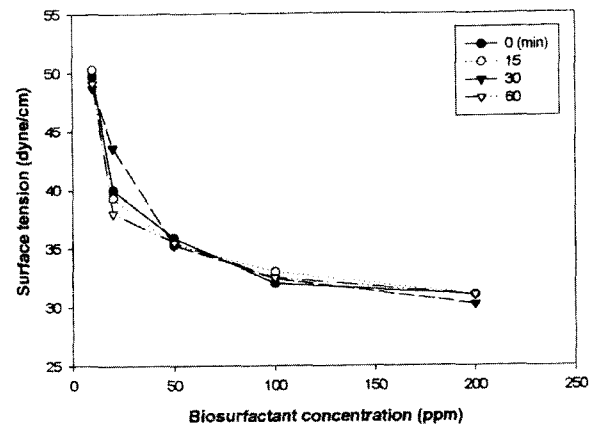


Figure 6. Thermal stability of H6 biosurfactant at 121°C.

적응용에 중요한 정보를 제공한다. 거품생산능력은 표면장력 저하능력 과도 밀접한 관계가 있다. Table 3에는 H6에서 생산된 미생물계면활성제의 거품생산능력이 Brij 30보다 우수하고 Tween 80과는 유사하며 SDS 보다는 낮았다. 분산력은 고체 등을 액체에 분산시키는 능력으로 화장품, 제약 및 농업부문에서 고체분산을 시키는 능력을 의미한다. Figure 5에는 생산된 미생물계면활성제 분산능이 다른 계면활성제보다 월등히 우수함을 알 수 있다. 미생물계면활성제가 인체에 독성이 적은 장점이 있기 때문에 인체와 직접 접촉하는 경우, 즉 화장품, 의약, 식품, 환경분야에서 분산제로서 사용될 수 있다(7,10,16,17). *Bacillus*에서 생산되는 미생물계면활성제가 아미노산이 7~8개로 구성된 cyclic lipopeptide구조로서 열에 약한 구조일 수 있다. 고온에서 열 안정성을 조사하여 산업적인 응용의 고온처리 문제점 여부를 조사하였다. 121°C에서 약 1시간이 경과한 후에도 열처리하기전과 다름없이 표면장력 저하능을 유지하여서 열에는 상당히 안정됨을 알 수 있었다(Figure 6). 에멀전을 형성하는 능력은 같은 농도의 Tween 80보다는 약했으나(Table 4), 미생물계면활성제의 농도를 증가시킨 경우 에멀전 형성능력이 증가하였으며 상온에서 에멀전 형성능이 높았고, 높은 온도에서 감소하는 경향을 보

Table 4. Emulsion index of surfactant.

Surfactant*	sophorolipid	Brij 30	Tween 80	S-acid**	H6 biosurfactant
Emulsion Index (ϵ)	0.1	0.05	0.58	0.05	0.06

* concentration: 1 g/L ** Spiculisporic acid

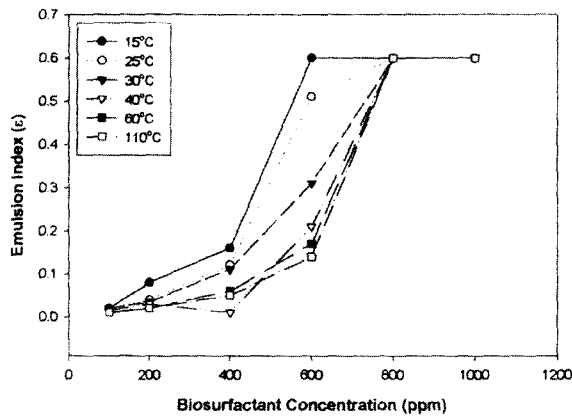


Figure 7. Emulsion index of H6 biosurfactant at various temperature.

였으나 40°C 이상에서는 큰 차이를 보이지 않았다(Figure 7). 또한 시간이 경과하여도 에멀전이 유지되는 안정도를 보여주고 있어서 장기간 에멀전을 유지할 수 있는 특성이 있었다.

요 약

본 연구에서 분리된 phenanthrene 분해균주의 대부분이 소수성을 나타내었고, 미생물계면활성제를 생산하면서 분해하는 균주보다 phenanthrene 분해능이 높았다. 균주 H6의 경우 phenanthrene 분해시 생산되는 미생물계면활성제는 포도당을 분해할 때도 생산되며 미생물의 성장과 더불어 증가하다가 stationary phase에서 일정하게 유지되었다. H6는 *Bacillus subtilis*로서 분리된 미생물계면활성제는 lipopeptide이었으며 H6에서 추출한 미생물계면활성제는 pH 2 이하에서 거의 회수되었고, 분산력이 Tween 80이나 Brij 30 등 화학계면활성제보다 높았고 열에 강한 특성을 보였다.

감 사

본 연구는 1997년도 교육부 학술연구조성비(97-F-4)에 의하여 연구되었음.

REFERENCES

- Deziel, E., G. Ragnette, R. Villemur, F. Lepine, and J. G. Bisailon (1996), Biosurfactant Production by a Soil *Pseudomonas* strain growing on Polycyclic Aromatic Hydrocarbon, *Appl. Env. Microbiol.* **62**, 1908-1912.
- Venkataraman, C., J. M. Lyons, and S. K. Friedlander (1994), Size Distribution Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Elemental carbon, *Environ. Sci. Technol.*, **28**, 555-562.
- Myers, D. (1988), Surfactant science and technology, VCH Publisher, New York, USA, p. 15-19.
- Zhang, Y. M., W. J. Maier, and R. M. Miller (1997), Effect of rhamnolipid on the dissolution, bioavailability and biodegradation of phenanthrene. *Environ. Sci. Technol.*, **31**, 2211-2217.
- Herman, D. C., R. J. Lenhard, and R. M. Miller (1997), Formation and removal of hydrocarbon residual in porous media-effects of attached bacteria and biosurfactants *Environ. Sci. Technol.* **31**, 1290-1294.
- Volkerling, F., A. M. Breure, J. G. Vanandel, and W. H. Rulkens (1995) Influence of nonionic surfactants on bioavailability and biodegradation of polyaromatic hydrocarbons. *Appl. Environ Microbiol.* **61**, 699-1705.
- Lim, S. C. (1996), Biosurfactant: Recent advances, *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, **66**, 109-120.
- Banat, M. (1995), Characterization of biosurfactants and their use in pollution removal-state of the art, *Acta. Biothechnol.* **15**, 251-267.
- Desai, J. D. and I. M. Banat (1997), Microbial production of surfactants and their commercial potential, *Microbiology & Molecular Biology Reviews*, **61**, 47-64.
- Jitendra, D. D., A. J. Desai, and N. Kosaric (1993), Biosurfactants: production properties application, *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 65-73.
- Cirigliano, M. C. and G. M. Carman(1985), *Appl. Environ. microbiol.* **50**, 846-852.
- Thomas R. N. (1996), Significance of Surface Active compound in interaction of bacteria with interface, *Microbiological Reviews*, **60**, 151-166.
- Sakayama, S., S. Takahashy, M. Hirai, and M. Shoda (1997), Isolation of new variants of surfactin by a recombinant *Bacillus subtilis*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **48**, 80-82.
- Itokawa, H., T. Mishita, H. Morita, K. Takeya, T. Hiraco, and M. Homma (1994) Structural and conformational studies of [Ile7] and [Leu7] surfactins from *Bacillus subtilis nato*. *Chem. Pharm. Bull.* **42**, 604-607.
- Rosenberg, E. and E. Z. Ron (1999), High- and low-molecular-mass microbial surfactants, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **52**, 154-162.
- Peypoux, F., J. M. Bonmatin, and J. Wallach (1999), Recent trends in the biochemistry of surfactin, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **51**, 553-563.
- Kevin, G., R. M. G. Mriganka, S. Zhou, and P. H. Wallane(1995), The impact of biologically-derived surfactant (Rhamnolipid R1) on HOC mineralization, Proceedings of WEFTEC '95, 68th Annual Conference and Exposition, **2**, 569-577.