

## *Bacillus* sp. LSC11가 생산하는 biosurfactant의 특성

이상철 · 정연주 · 유주순 · 조영수 · 차인호<sup>1</sup> · 최용락 \*

동아대학교 생명자원과학부  
<sup>1</sup>부산시 보건환경연구원

### Characteristics of Biosurfactants produced by *Bacillus* sp. LSC11

Sang-Cheol Lee, Youn-Ju Jung, Ju-Soon Yoo, Young-Su Cho, In-Ho Cha<sup>1</sup> and Yong-Lark Choi\*

Faculty of Natural Resources and Life Science, Dong-A University, Busan 604-714, Korea,  
<sup>1</sup>Institute of Health & Environmental, Busan 614-103, Korea

#### Abstract

Several bacterial strains producing biosurfactants were isolated from polluted marine and soil by oil. One of the strains named LSC11 showed strong production activity of biosurfactants. This strain was identified as a *Bacillus* sp. LSC11 based on the morphological, biochemical, and physiological characteristics. The biosurfactant, produced by the strain, emulsified crude oil, vegetable oil, and hydrocarbons. The surface tension of the culture broth of *Bacillus* sp. LSC11 decreased to 32 mN/m. The crude biosurfactant was obtained from the culture broth by acid precipitation, freeze drying, solvent extraction, and evaporation. The emulsifying activity of the biosurfactant showed better than the chemically synthesized surfactant (SDS, Span40, Span 85). The biosurfactants had strong properties as an emulsifying agent and as an emulsion-stabilizing agent.

**Key words** – *Bacillus* sp. LSC11, biosurfactant, emulsifying activity, emulsifying stability

#### 서 론

Biosurfactant는 효모, 곰팡이, 박테리아 등 미생물에 의해 생산되는 생분해성 계면활성제를 의미하며 균주에 따라 세포 외 또는 세포 내에 생성이 된다. Biosurfactant가 화학합성 계면활성제에 대해 가지는 장점은 첫째, 무독성이며 생분해가 용이하고 따라서 이를 사용 시 이차오염원이 안 된다는 것이다. 둘째, 기존의 방법으로 합성하기 어려운 복잡한 화학구조로 되어있다는 점이다. 셋째, 표면장력 저하

능력, 온도, pH에 대한 안정성 등 계면활성제의 물리·화학적 성능 면에서 기존의 화학합성 계면활성제와 거의 대등한 결과를 보인다는 점이다[14]. 전 세계 계면활성제 시장은 1988년에 20억불, 1994년 약 94억불로 불과 6년 사이 400% 이상의 성장률을 기록했으며 그 수요는 해마다 증가하는 추세에 있다[20]. 그러나 이들 대부분이 자체적으로 생분해가 안되어 환경오염의 원인이 되고 있는 화학합성계면활성제로 보고되고있다. 따라서 이러한 문제점을 무독성이며 생분해가 용이한 환경 친화적 biosurfactant로 대체함으로써 환경오염을 감소시킬 수 있고, 더 나아가 biosurfactant는 화장품, 의약품, 식품, 세제, 펄프 및 제지, 원유의 2차 회수 및 환경정화 등 다양한 분야에서 광범위하

\*To whom all correspondence should be addressed  
Tel : 051-200-7585, Fax : 051-200-6993  
E-mail : ylchoi@mail.donga.ac.kr

게 응용될 수 있다. 최근, 황 등[6,12,22]은 *P. aeruginosa*, *Nocardia* sp. 균에서 생산된 biosurfactant의 계면활성능 측정, 분리 및 구조분석 등의 산업적 이용을 위한 기초연구가 이루어지고 있는 실정이다.

토양 및 해양의 유류 오염 제어를 위한 유처리 방법중의 하나인 생물학적 방법으로는 해양의 유류 오염물질인 cyclo-alkane 계열의 탄화수소원과 원유 (crude oil) 및 경유, 중유 등의 석유제품에 대한 다양한 탄화수소원의 기질을 분해시키는 균주를 분리, 동정하여 실제로 오염현장에 적용되고 있다[8,9,15,22]. 이러한 유류 분해의 해양 미생물로서는 *Aeromonas*, *Arthrobacter*, *Corollospora*, *Dendryphiella*, *Pseudomonas* 등이 대부분을 차지하고 있으며[9,17,22], 또한 이들 균주가 생산하는 유화제 등이 분리·정제되어 실제로 이용되고 있다.

본 연구에서는 해양 원유 분해용 등의 다양한 용도에 사용할 생물유화제 개발을 위한 기초자료를 얻을 목적으로 biosurfactant 생성이 우수한 균주를 분리·동정하여 분류학상의 위치를 확인하고, 원유 분해 균주의 특성, 균체 생육도 및 생성되는 유화제의 특성에 대하여 검토하였다.

## 재료 및 방법

### 미생물의 분리 및 동정

Biosurfactant 생성 미생물을 분리하기 위하여 배지중에 탄소원이 결핍된 C-배지(Carbon-minimal medium)를 사용하였으며[1], 배지의 조성은 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 g/L, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2 g/L, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.2 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 g/L, CaCl<sub>2</sub> 10 mg/L, FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 10 mg/L, NaCl 30 g/L, yeast extract 0.2 g/L 및 trace element 용액 2 mL (MoO<sub>3</sub> 1mg/L, ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 7 mg/L, CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O 0.5 mg/L, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 1 mg/L, CoCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O 6 mg/L, NiSO<sub>4</sub> · 6H<sub>2</sub>O 1 mg/L)를 함유하고 있으며, pH 7.0로 조정하여 사용하였다. 탄소원으로 원유 또는 식용유를 1% 첨가한 C-배지에 채취한 샘플 희석액을 1% 첨가하여 7일간 진탕 배양하여 생육된 균을 새로운 C-배지에 균주 및 원유를 각각 1%로 첨가하여 다시 배양하였다. 이렇게 3회 반복하여 생육한 균주를 LB-고체배지에 도말하여 37°C에서 배양하였다. 선별된 단일 균주를 LB 액체배지에서 각각 전 배양시킨 후, tributyrin이 첨가된 배지에 배양한 후 투명환이 생성된 것을 우수한

균주로 보아 단일 콜로니를 선별하였다.

선별된 균주를 동정하기 위하여 형태학적, 생리학적, 생화학적 특징을 조사한 후 Bergey's manual of systematic bacteriology를 근거로 하여 동정하였다[7].

### 균주의 생육도 측정

선별된 균주의 생육온도를 조사하기 위하여, 500 ml 삼각플라스크에 crude oil 1%를 함유한 C-배지를 200 ml 넣고, LB액체 배지에서 전 배양시킨 균주 1%를 접종하여 25°C, 32°C, 37°C 및 42°C에서 각각 200 rpm으로 진탕 배양하였다. 이때 배양시간에 따른 균체의 성장은 1, 3, 5일에 진탕 배양한 배양액을 일정량 취하여 UV-VIS spectrophotometer (U-1100, Hitachi, Japan)를 사용하여 600 nm에서 흡광도(optimal density)를 측정하였다.

### 표면장력 측정

표면장력의 측정은 배양시간에 따라 배양한 용액을 원심분리 하여 균체를 제거한 배양 상등액에 대해 DeNouy Tensiometer (Itoh Seisakusho, Japan)의 ring method를 이용하여 3회 반복하여 측정한 평균값을 표시하였다[3].

### Biosurfactant의 추출

*Bacillus* sp. LSC11을 전 배양한 용액을 2 L의 배양배지에 재접종하여 37°C에서 4일간 진탕배양 하였다. 배양용액을 원심분리 (10,000 rpm, 4°C)하여 균체를 제거한 상등액에 진한 염산을 서서히 가하면서 pH가 2.0이 되게 조정하여 4°C에 하룻밤 방치하면서 biosurfactant를 침전시켰다. 원심분리하여 침전물을 회수하고, 알칼리성 수용액 (pH 8.0 with NaOH)에 용해하여 동결건조 시켰다. 건조된 물질을 methanol로 추출하여 농축한 것을 부분 정제한 biosurfactant로 사용하였다[6].

### CMC(critical micelle concentration) 측정

Biosurfactant의 CMC는 부분 정제된 biosurfactant 용액을 연속적으로 2배의 농도씩 희석하면서 표면장력을 측정하였다. 이때, 희석비율 vs. 표면장력을 plotting하여 표면장력이 갑자기 증가하는 지점의 희석비율로부터 농도를 계산하였다[18].

유화활성 및 안정성 측정

일반적으로 사용되는 화학계면활성제와 소수성 탄화수소의 oil성분에 대해 biosurfactant 용액시료의 유화활성 및 유화안정성 시험은 Cirigliano와 Carman의 방법[4,5]에 따라서 실시하였다. 배양용액을 Millipore 0.2 μm 여과막을 통과시켜 멸균시킨 것을 biosurfactant 용액으로 하였다. 여과액 2ml를 마개 있는 시험관에 넣고, pH 3.0의 0.1 M sodium acetate 완충액 2 ml와 혼합한 용액(CMC의 농도)에 1 ml의 기질을 넣고 2분간 최고속도로 vortex mixing 한 후 10분 간 정지한 후 540 nm에서의 현탁도를 측정하였다. 유화안정성은 유화활성 측정 시와 동일한 방법으로 처리한 후에, 실온에 방치하면서 매 10분마다 540 nm에서의 현탁도를 측정하여 Log 값으로 환산하여 나타내고, 그때의 기울기를 유화활성의 안정도는 상수  $K_d$ (시간당 붕괴되는 유화력의 기울기 값)으로 나타내었다.

결과 및 고찰

균주의 분리 및 동정

부산시 남항의 선착장과 인근의 유류오염 지역으로부터 해수를 채취하여, biosurfactant 생성이 우수한 미생물을 분리하기 위하여 탄소원이 결핍된 C-배지 200 ml에 탄소원으로 crude oil 및 식용 oil이 1% 되게 첨가하여 37°C, 200 rpm으로 7일간 진탕 배양한 후, crude oil 분해능 및 유화제 생성능을 가진 세균이 생육하는 것을 확인하였다. 이렇게 3회 반복하여 생육한 균주를 LB-고체배지에 도말하여 37°C에서 배양하였다. 선별된 단일 균주를 LB 액체배지에서 각각 전 배양시킨 후, tributyrin이 첨가된 배지에 배양한 후 투명환이 생성된 것을 우수한 균주로 보아 단일 콜로니를 선별하였다. 이 단일 콜로니들을 LB 액체배지에 접종하여 37°C에서 전 배양시킨 후, crude oil 분해능 및 tributyrin 분해능을 가진 수십 종의 균주를 분리하였으며, 이중에서 분해능이 강력한 LSC11 균주에 대하여 계속하여 실험하였다.

균주의 동정

선별된 LSC 11의 동정을 위하여 그램 염색법, 형태학적 관찰 및 생화학적 실험을 수행한 결과를 Table 1에 나타냈

Table 1. Morphological and physiological characteristics of crude oil degrading bacterium *Bacillus* sp. LSC11

Characteristics	<i>Bacillus</i> sp. LSC11
<b>Morphological</b>	rod
Gram stain	+
Mobility	+
Optimum temperature	37°C
Growth in air	+
<b>Physiological</b>	
Ortho-nitrophenyl β-D-galactopyranoside	+
Arginine dihydrolase	-
Lysine decarboxylase	-
Ornithine decarboxylase	-
Simmons citrate	-
Production of H <sub>2</sub> S	-
Urease	-
Tryptophane deaminase	-
Indole	-
Proteolysis of gelatin	+
Glucose	+
Maltose	+
Lactose	+
Ribose	+
Glycerol	+
Erythritol	-
Mannitol	+
Inositol	+
Sorbitol	+
Xylitol	-
Cellobiose	+
Rhamnose	-
Saccharose	+
Melibiose	+
Amygdalin	+
L(T)arabinose	+
2-Ketogluconate	-
5-Ketogluconate	-

+: Positive reaction, -: Negative reaction.

다. 그램 염색법에 의해서는 그램 양성균으로 확인되었으며, 현미경 관찰에서는 활발한 운동성을 가진 균주로 확인되었다. 생화학적 실험은 미생물 동정 kit인 API 20 NE

Kit를 이용하여 Bergey's manual of systematic bacteriology[7]에 준하여 동정한 결과, *Bacillus* sp.으로 판명되어 *Bacillus* sp. LSC11로 명명하였다. 우리나라 및 외국의 경우 유류 분해 및 유화제 생성 균으로 주로 분리되고 있는 균주로는 *Pseudomonas* sp., *Aeromonas* sp., *Acinetobacter* sp., *Klebsiella* sp. 및 *Arthrobacter* sp. 등이 보고되고 있다[1,8,19].

### 균주의 생육특성

분리균 *Bacillus* sp. LSC11의 생육에 미치는 온도의 영향을 검토한 결과 25°C, 32°C, 37°C 및 42°C에서 비슷한 양상으로 왕성한 생육상태를 보여주었다. 분리균의 생육을 조사하기 위해 C-배지에 탄소원을 crude oil 및 수종의 기름을 1%를 첨가하여 *Bacillus* sp. LSC11를 진탕배양 하면서 시간별로 시료를 채취하여 균주의 성장을 조사하였다. 그 결과, 본 실험에 사용된 LSC11 균은 다양한 oil의 탄소원과 염분농도 3% 배지에서 성장이 비교적 양호하였으며, 3일 정도의 배양에서 최대성장을 보였다 (자료 미제시). 이러한 결과는 유류분해 해양세균인 *Klebsiella pneumoniae* L25는 염분농도 3.0 및 3.5%에서 최대의 성장을 보여주었으며, *Acinetobacter* sp.의 염분농도는 3%, *Xanthomonas campestris* M12 및 *Pseudomonas maltophilia* N246은 3.0~3.5%로 Lee 등[13]이 보고한 연구결과와 비슷하였다.

### Biosurfactants의 유화력

*Bacillus* sp. LSC11의 배양용액에 생성된 biosurfactant의 특성을 알아보기 위하여 경시적으로 표면장력을 측정된 결과 배양 후 6 시간대 부터 급격히 감소하다가 24시간 후에 배지의 표면장력이 57 mN/m에서 최대 32 mN/m 정도까지 저하되었으며, 이러한 현상은 생육이 정지된 66 시간 후까지 계속 되었다 (Fig. 1). 이러한 결과는 해양 유류 분해 세균인 *Pseudomonas* sp. 으로부터의 계면활성제의 생산이 배양 2일 후인 정지기 초기에 가장 많이 생산되는 결과와 유사하였다[16]. 따라서, 표면장력이 최대로 감소된 24시간 배양한 용액에 생성된 biosurfactant를 다양한 소수성 탄화수소류 와 oil을 기질로 사용하여 유화활성을 측정된 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 그 결과 LSC11이 생산하는 biosurfactant는 crude oil에 상당한 유화력을 보였으며, 대두유에서는 가장 높은 유화활성을 보였으며 kerosene,

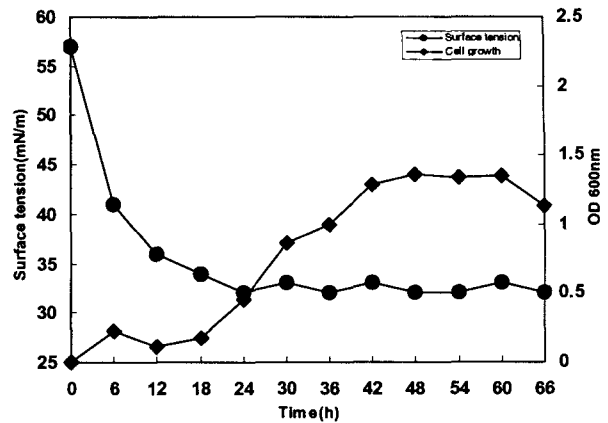


Fig. 1. Patterns of biosurfactant production by *Bacillus* sp. LSC11.

The cultivation was performed in a C-medium containing soybean oil(10g/L) as the sole carbon source at 37°C.

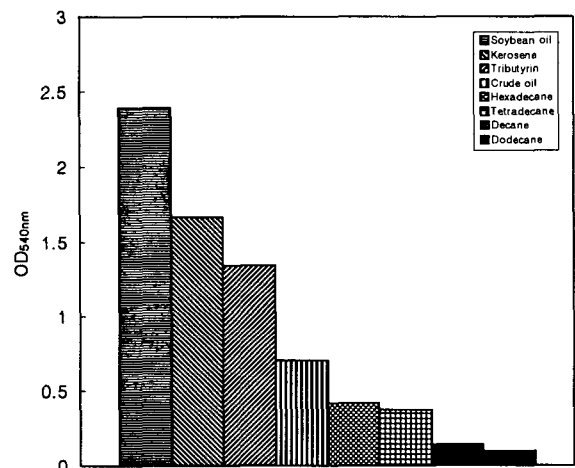


Fig. 2. Emulsification activity of various substrates by the biosurfactant solution.

The sample mixture was shaken vigorously in a vortex mix. The absorbance( $A_{540nm}$ ) of the emulsion was determined after the 10 min.

tributyrin, crude oil도 비교적 높은 활성을 보인다. 반면에, dodecane, decane 등의 소수성 탄화수소를 기질로 사용한 경우는 전반적으로 낮은 편이었고, 탄소수가 증가함에 따라 활성이 증가하는 경향 이었다. 이와 같은 탄화수소류를 기질로 사용한 결과는 *Pseudomonas aeruginosa*가 생산하는 계면활성제의 경우와는 상반되는 활성도를 보였다 [6]. 배양액에서 산 침전 및 용매추출을 통해 부분 정제한 biosurfactant의 CMC는 Fig. 3에서와 같이 35 mg/L인 것

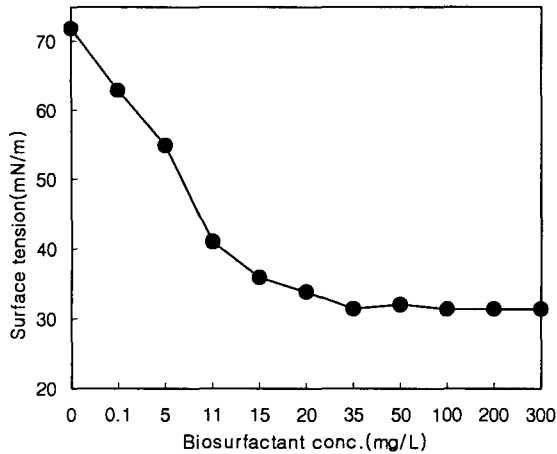


Fig. 3. Surface tension of the partially purified biosurfactant.

The surface tension was measured by using the Ring method on a DeNouy Tensiometer at room temperature.

으로 나타났다. 이 때의 최소 표면장력은 배양상등액으로 측정된 값과 거의 비슷하게 31.5 mN/m 였다. 이 결과는 지금까지 알려진 *Bacillus* sp. 및 *Norcardia* sp. 등의 균주들의 표면장력 저하능이 25~40 mN/m 정도의 범위로 보고된 [11,12] 내용과 비슷한 경향을 나타낸 것이다.

기질에 따른 유화 안정성

분리균주의 생산 biosurfactant의 소수성 탄화수소계 및

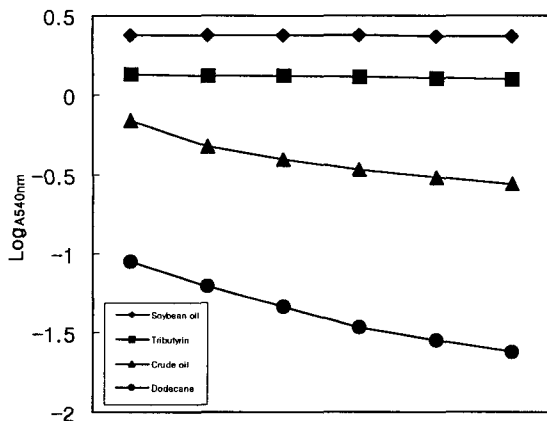


Fig. 4. Emulsification stability of various substrates by biosurfactant solution.

The absorbance( $A_{540nm}$ ) of the emulsion was determined at the indicated times. After the initial 10 min. holding period, absorbance readings were taken every 10 min. The log of the absorbance was then plotted versus time.

각종 oil을 기질로 한 유화활성 및 유화안정성을 Fig. 4와 Table 2에 나타내었다. 또, 현재 상용되고 있는 유화제 및 안정제를 대두유를 기질로 사용하여 측정된 유화활성의 안정도를 비교 조사한 결과를 Fig. 5와 Table 3에 나타냈다. 유화활성의 안정도는 상수  $K_d$ 로 나타냈으며, 여러 가지의 유화기질을 사용하여 측정하였다. 유화안정도를 분리균주

Table 2. Emulsification activity and stabilization of various substrates by biosurfactant solution

Substrates	Emulsification activity ( $OD_{540nm}$ ) <sup>a</sup>	Decay constant ( $K_d, 10^{-3}$ ) <sup>b</sup>
Soybean oil	2.39	-0.13
Kerosene	1.67	-2.26
Tributyryn(C <sub>40</sub> )	1.34	-0.63
Crude oil	0.71	-7.67
Hexadecane(C <sub>16</sub> )	0.42	-5.28
Tetradecane(C <sub>14</sub> )	0.38	-6.61
Dodecane(C <sub>12</sub> )	0.14	-4.30
Decane(C <sub>10</sub> )	0.10	-11.53

<sup>a</sup>The emulsification assay was performed in the presence of biosurfactant as described in the text. After the initial 10 min. holding period, absorbance readings were taken every 10 min. for 60 min.

<sup>b</sup>The log of the absorbance was then plotted versus time and the slope (decay constant,  $K_d$ ) of the line was calculated.

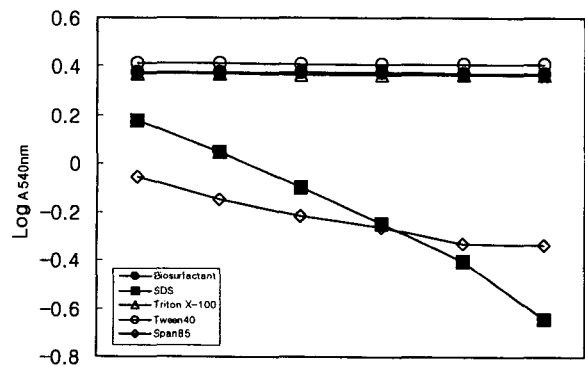


Fig. 5. Stabilization of emulsion by the biosurfactant solution.

Emulsifying substrate was soybean oil. The absorbance ( $A_{540nm}$ ) of the emulsion was determined at the indicated times. After the initial 10 min. holding period, absorbance readings were taken every 10 min. The log of the absorbance was then plotted versus time.

Table 3. Comparison of emulsification and stabilization properties of biosurfactant solution and commercial surfactants

Surfactant	Emulsification activity (OD <sub>540nm</sub> )	Decay constant (K <sub>d</sub> , 10 <sup>-3</sup> )
Biosurfactant	2.39	-0.13
Tween 20	2.71	-0.14
Tween 40	2.63	-0.12
Tween 80	2.60	-0.14
Span 40	1.80	-0.43
Span 85	0.88	-5.68
Triton X-100	2.36	-0.18
SDS	1.51	-16.05

The indicated stabilizer was analyzed for emulsification activity by using soybean oil as described in the text. The decay constant (K<sub>d</sub>) was calculated as described in footnote a, Table 2.

의 생성물질과 현재 상용되고 있는 유화제 및 안정제를 비교한 결과, Tween 류와 Triton X-100, surfactant와 비슷한 활성과 안정성을 유지했으며, Span 류와 SDS에 비해서는 유화활성 및 안정성이 월등히 높은 것을 확인하였다. 이 결과는 *Norcardia* sp. L-417이 생산하는 biosurfactant와 매우 유사한 결과를 보여준 것이다[12]. 따라서, *Bacillus* sp. LSC11이 생산하는 biosurfactant는 현재 상용되고 있는 유화제 및 안정제와의 비교에서 매우 우수한 활성도와 안정도를 보여 주었다. 산업적으로 이 물질을 이용하기 위해서 물리 화학적 특성, 생분해도 및 환경독성 등의 조사를 수행하여야 할 것으로 생각된다.

## 요 약

원유 분해능이 강력한 해양균주를 얻고자 유류오염 지역으로부터 crude oil을 탄소원으로 이용하는 수십 종을 분리하였다. 분리된 균주중 원유분해능 및 biosurfactant 생성능이 우수한 균주를 선별하여, 형태학적, 생화학적 및 생리학적 특성을 조사한 후 *Bacillus* sp. LSC11로 동정하였다. *Bacillus* sp. LSC11 균주 배양액의 표면장력은 최저 32 mN/m까지 감소되었다. Biosurfactant의 CMC값은 0.0035% (w/v) 인 것으로 나타났다. *Bacillus* sp. LSC11가 생산하는 biosurfactant의 유화활성은 대두유에서 최대였으며, 원유

에서도 높은 편이었다. 유화안정성은 합성계면활성제와 비슷하거나 우수하였다.

## 감사의 글

본 연구는 한국과학재단 지정 동아대학교 지능형 통합항만관리 연구센터 및 대우약품공업주식회사의 지원에 의하여 이루어진 연구결과의 일부로서 이에 감사 드립니다.

## 참 고 문 헌

1. Cha, J. Y., B. G. Kim, S. Y. Chung, Y. S. Cho, Y. L. Choi and Y. C. Lee. 1999. Characterization of crude oil degradation by *Klebsiella* sp. KCL-1 isolated from sea water. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **27**, 452-457.
2. Choi, S. Y., C. S. Kim, M. H. Lee, M. O. Hwang and K. H. Min. 1991. Octane biodegradability by crude oil-utilizing bacteria carrying OCT plasmid. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **19**, 82-87.
3. Chopineau, J., F. D. Muccafferty, M. Therisod and A. M. Klivanov. 1988. production of biosurfactant from sugar alcohol and vegetable oils catalized by lipase in a nonaqueous medium. *Biotechnol. Bioeng.* **31**, 208-214.
4. Cirigliano, M. C. and G. M. Carman. 1984. Isolation of a bioemulsifier from *Candida lipolytica*. *Appl. Environ. Microbiol.* **48**, 747-750.
5. Cirigliano, M. C. and G. M. Carman. 1985. Purification and Characterization of Liposan, a bioemulsifier from *Candida lipolytica*. *Appl. Environ. Microbiol.* **50**, 846-850.
6. Hwang, K. A, J. R. Lee, S. J. Kim, Y. S. Kim and H. J. Ahn. 1999. Surface activity and enviromental characteristics of biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* JRT-4. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **27**, 159-165.
7. John, G. H., N. R. Krieg and P. H. A. Sneath. 1994. *Bergey's manual of systematic bacteriology* (9 th ed.) Williams and Wilkins, Baltimore.
8. Kim, H. J., B. J. Kim, S. D. Ha, S. H. Hwang and J. Y. Kong. 1999. Degradation of crude oil and purification of biosurfactant from marine bacterium *Pseudomonas* sp. CHCS-2 *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **14**, 192-197.

9. Kim, H. J., B. J. Kim, S. H. Hwang, D. J. Kim, H. W. Lee, and J. Y. Kong. 1997. Degradation of crude oil and purification of biosurfactant from marine bacterium *Aeromonas* sp. BES-741. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **24**, 443-448.
10. Kim, H. J., B. J. Kim, J. Y. Kong, and H. S. Koo. 2000. Isolation and characterization of oil degrading bacteria from south sea of korea. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **15**, 27-34.
11. Kim, S. H., B. D. Yoon, C. H. Lee, H. Y. Seo, H. M. Oh, T. Katsuragi, and Y. Tani. 1997. Production and properties of a lipopeptide biosurfactant from *Bacillus subtilis* C9. *J. of Ferment. and Bioengin.* **28**, 71-75.
12. Kim, S. H., E. J. Lim, S. O. Lee, J. D. Lee and T. H. Lee. 2000. Purification and characterization of biosurfactants from *Nocardia* sp. L-417. *Biotech. Appl. Biochem.* **31**, 249-253.
13. Lee, C. H., H. S. Kim, H. H. Suh, S. H. Choi, H. M. Oh, and B. D. Yoon. 1997. Microbial degradation of arabian light crude by *Acinetobacter* sp. A54. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **25**, 520-526.
14. MacFaddin, J. F. 1984. *Biochemical Tests for Identification for Medical Bacteria*, 2nd ed. Williams and Wilkins Co., Baltimore, USA.
15. Mibas, W. and D. L. Gutnick. 1993. Isolation, characterization, and sequences analysis of cryptic plasmid from *Acinetobacter calcoaceticus* and their use in the construction of *Escherichia coli* shuttle plasmids. *Appl. Environ Microbiol.* **59**, 2807-2816.
16. Mulligan, C. N., G. Mahmoudides, and B. F. Giggs. 1989. The influence of phosphate metabolism on biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biotech.* **12**, 199-210.
17. Rheinheimer, G. 1981. *Microbiologic der gewalsser*. 3rd. ed. p. 251. gustav Fischer Verlag Stuttgart.
18. Santos, L. G., O. Kappeli, and A. Fiechter. 1982. *Pseudomonas aeruginosa* biosurfactant production in continuous culture with glucose as a sole carbon source. *Appl. Environ. Microbiol.* **48**, 864-870.
19. Schulz, D., A. Passeri, M. Schmidt, S. Lang, F. Wagner, V. Wray, and W. Gunkel. 1991. Marine biosurfactants, I. Screening for biosurfactants among crude oil degrading marine microorganism from the North Sea. *Z. Naturforsch.* **46**, 167-203.
20. Shaw, A. 1994. Surfactants-94. *Soap Cosmet. Chem. Specialities* **70**, 24-30
21. Son, H. J., S. H. Go, G. Lee, and S. J. Lee. 1996. Emulsification of crude oil by *Acinetobacter* sp. SH-14. *Kor. J. Microbiol.* **34**, 363-369.
22. Suk, W. S., H. J. Son, G. Lee, and S. J. Lee. 1999. Purification and characterization of biosurfactants produced by *Pseudomonas* sp. SW 1. *J. Microbiol. Biotechnol.* **9**, 56-61.

(Received November 12, 2002; Accepted December 21, 2002)