

Lipase gene의 도입에 의한 유류분해세균 *Klebsiella* sp. KCL-1의 표면활성과 유화력 향상

정 수 열*

동주대학 식품과학계열

Received August 15, 2004 / Accepted September 22, 2004

The Improvement of surface activity and Emulsification Activity by Transformation of Lipase Gene in *Klebsiella* sp. KCL-1, Oil-Degrading Bacterium. Soo-Yeol Chung*. *School of Food Science, Dongju College, Busan 604-715, Korea* – To improve and oil degrading activity, the lipase gene from *Pseudomonas* sp. was transformed into *Klebsiella* sp. KCL-1, an oil degrading bacterium. The selected transformant was named as a KCL-1/pET-Lip. The surface tension of culture broth of KCL-1/pET-Lip was decreased to 33 dyne/cm from 55 dyne/cm using 4% (v/v) soybean oil as sole carbon source. The surface tension were 44 and 37.5 dyne/cm, to 2% (w/v) glucose and 4% (v/v) kerosene medium, respectively. The emulsification activity of the biosurfactant solution containing lipase of KCL-1/pET-Lip improved better than wild type KCL-1. The soybean oil was most efficient carbon source and substrate for surface activity and emulsification activity of KCL-1/pET-Lip. The expression of lipase was confirmed by SDS-PAGE.

Key words – *Klebsiella* sp. KCL-1, pET-Lip, surface tension, surface activity, emulsification activity

전 세계적으로 유류수송은 대부분 해양수송에 의존하고 있으며 유조선의 사고 등에 의한 유류 유출 및 각종 폐유 방출 등으로 해양오염이 늘어나면서 해양 생태계에 커다란 피해를 유발시키고 있다. 또한, 우리나라에서도 해양 유류 오염사고가 수시로 발생되어 해양오염에 의한 항만 오염 및 자연생태계의 파괴와 연안 해역에서의 양식업에도 중대한 피해를 입히고 있다. 유류 오염 제거를 위하여 화학적 유화제에 전적으로 의존하여 2차 오염이 우려되므로 우수한 생물유화제 및 미생물 처리제 개발이 절실히 필요하다.

해양의 유류 오염물질인 *n*-, *iso*-, *cyclo*-alkane 계열의 탄화수소원과 원유(crude oil) 및 경유, 중유 등의 석유제품과 연관된 탄화수소원이 해양오염의 주원인이며 이 유기물은 일반 미생물에 의하여 쉽게 분해되지 않고 자연계에 축적된다 [12]. 그러나 현재 이러한 난분해성 유류 성분을 분해하는 해양 미생물인 *Aeromonas*, *Arthrobacter*, *Corollospora*, *Dendryphiella*, *Pseudomonas* 등이 보고되어 있으며 [11,13,16], 또한 이들 균주가 생산하는 유화제 등이 분리 정제되어 실제로 이용되고 있다. 미생물 유래의 계면활성제는 화학적 계면활성제와 비교하여 유화력 및 유화안정도, 세정력, 기포력, 침투력, 분산력, 거품발생능력 그리고 표면장력 저하능 등의 활성이 우수하며 이외에도 저 독성, 더 높은 생분해성, 더 좋은 환경친화성, 그리고 극단적인 온도, pH, 및 염도에서의 특이적 활성과 같은 이점을 가지고 있다 [2,7,9,18].

Lipase (glycerol ester hydrolases, E.C. 3.1.1.3)는 촉매반응의 다양성과 특수성(hydrolysis, alcoholysis, acidolysis,

esterification, aminolysis 등과 같은 다양한 반응에 관여), 수용액 상태에서 뿐 아니라 유기 용매에서도 활성을 나타낸다. 또한, 별도의 cofactor를 필요로 하지 않은 촉매반응의 용이 및 편리성, 넓은 범위의 기질특이성, 이성질체 선택성 등의 특성으로 인해 기존의 식품 및 세제산업에 이용되어오고 있다. 현재에는 생의약, 농약 그리고 화장품뿐만 아니라 폐기물처리 분야, 해양 유류오염 정화 등의 산업에 응용이 되고 있다 [8, 17]. Lipase를 이용한 해양 유류오염 정화 분야의 연구는 아직 초기 단계이므로, 보다 체계적인 연구가 필요한 실정이다.

본 연구는 생물 유화제의 대량생산의 어려움을 보완하고자 유류 분해능을 보유한 해양 유래의 미생물인 *Klebsiella* sp. KCL-1 균주에 여러 가지 지질의 분해능이 강한 lipase 유전자를 도입하여 다양한 탄소화합물에 대한 유화 활성을 조사하였다.

재료 및 방법

사용균주

본 연구에서 사용된 균주는 유류로 오염된 해양으로부터 분리 동정된 *Klebsiella* sp. KCL-1 [4]이었다. PCR을 통하여 획득된 *Pseudomonas* sp. SW-3 유래의 lipase 유전자가 포함되어 있는 plasmid pET-Lip [1] (Fig. 1)을 KCL-1에 형질전환하여 실험에 사용하였다.

배지 및 배양방법

표면활성을 측정하기 위해 실험 균주를 LB 액체배지에서 16시간 전배양한 후 1/100의 양으로 본 배양용 배지 500 ml에 접종하여 배양하였다. 본 배양 배지로는 탄소원이 결핍된 C-배지(Carbon-minimal medium)에 탄소원으로 glucose,

*Corresponding author

Tel : +82-51-200-3437, Fax : +82-51-200-3223

E-mail : sychung@dongju.ac.kr

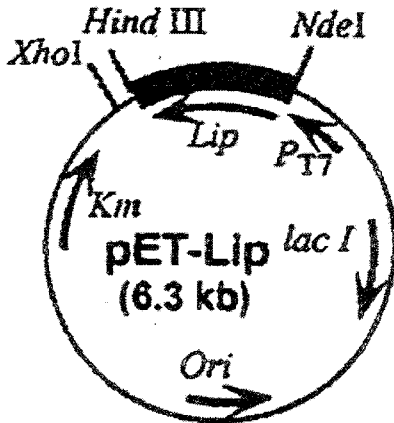


Fig. 1. Physical map of recombinant plasmid pET-Lip.
Km; resistance to kanamycin, MCS; multi cloning site, Lip; lipase gene.

soybean oil, kerosene을 각각 첨가한 후 사용하였으며, 각 배지에서 37°C, 180 rpm으로 진탕하면서 96시간 동안 배양하였다. C-배지의 조성은 (NH₄)₂SO₄ 5 g, K₂HPO₄ 2 g, MgSO₄ · 7H₂O 0.2 g, KH₂PO₄ 1 g, CaCl₂ 10 mg, FeSO₄ · 7H₂O 10 mg, NaCl 30 g, yeast extract 0.2 g per liter and trace element solution 2 ml (MoO₃ 1 mg, ZnSO₄ · 7H₂O 7 mg, CuSO₄ · 5H₂O 0.5 mg, H₃BO₃ 1 mg, CoCl₂ · 6H₂O 6 mg, NiSO₄ · 6H₂O 1 mg per liter)를 함유하고 있으며, pH 7.0으로 조정하여 사용하였다[4].

형질전환

pET-Lip을 *Klebsiella* sp. KCL-1에 형질전환시킬 때 electroporation 방법을 사용하였다(Bio-Rad Lab.). 형질전환된 균주는 50 µg/ml의 kanamycin을 포함한 LB 한천 배지에서 자라는 흰색 콜로니로 선별하였다. 형질전환된 plasmid DNA는 Takara 사(Takara Korea Biomedical Inc.)의 plasmid 추출 kit를 사용하여 분리하고 제한효소 처리에 의해 얻어진 DNA 단편의 pattern을 통해 플라스미드를 확인하였다. 선별된 균주의 lipase 활성 유무를 확인하기 위하여 Huang *et. al.*의 방법을 약간 변형하여 TB 고체 배지 [LB+1.3% (w/w) agar+2% (v/v) Tributyrin]를 제조하여 사용하였다[10]. 제조된 TB 고체 배지에 형질전환된 균주와 parental strain인 KCL-1을 접종하고 24시간 배양하여 투명대 형성을 비교 분석하였다.

표면 장력과 균의 생육도

표면장력과 세포의 성장을 측정하기 위하여 LB 액체 배지에 전 배양한 KCL-1과 형질 전환된 KCL-1/pET-Lip을 탄소 원으로 2%(w/v) glucose, 4%(v/v) soybean oil, 4%(v/v) kerosene 그리고 0.2%(w/v) glucose와 2%(v/v) soybean oil을 각각 첨가한 C-배지에 1% 씩 접종하여 1일 단위로 4일간

측정하였다.

표면장력의 측정은 배양액을 원심분리하여 균체를 제거한 배양 상등액에 대해 DeNouy Tensiometer (Itoh Seisakusho, Japan)의 ring method [15]를 이용하여 3회 반복하여 평균값을 표시하였다. 균의 생육도는 배양액을 1 ml 취하여 UV-VIS spectrophotometer (U-1100, Hitachi, Japan)를 사용하여 610 nm에서 흡광도를 측정하였으며 3회 반복 측정된 결과의 평균값을 사용하였다.

유화활성

일반적으로 사용되는 소수성 탄화수소의 oil 성분에 대해 biosurfactant 용액시료의 유화활성 측정은 Cirigliano와 Carman의 방법[5,6]을 약간 변형하여 실시하였다. KCL-1과 KCL-1/pET-Lip을 4% soybean oil이 함유된 C-배지에서 96시간 배양한 배양용액을 0.2 µm 여과막(Millipore)을 통과시켜 제균된 배양액을 biosurfactant 용액으로 하였다. 여과액 2 ml를 마개가 있는 시험관에 넣고, pH 3.0의 0.1 M sodium acetate 완충액 2 ml와 혼합한 용액에 1 ml의 기질을 넣고 2분간 최고속도로 vortex mixing 하고, 10분간 정지한 후 540 nm에서의 현탁도를 측정하여 유화활성으로 나타내었다.

형질전환 균주의 Lipase 발현확인

KCL-1과 KCL-1/pET-Lip은 4% soybean oil이 함유된 C-배지에 48, 72, 96시간 배양한 후 세포를 파쇄하여 Barford 방법[3]에 따라 세포 추출물의 단백질총량을 측정하였으며, Laemmli 방법[14]을 이용하여 단백질을 전기영동 하였다. 단백질의 분자량은 표준 단백질 BSA (66 kDa; albumin, 45 kDa; ovalbumin, 36 kDa; glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, 29 kDa; carbonic anhydrase, 24 kDa; trypsinogen, 20 kDa; trypsin inhibitor, 14 kDa; α-lactalbumin, Sigma Co.)를 사용하였다.

결과 및 고찰

형질전환

Lipase 유전자 도입을 위해 pET-Lip plasmid DNA [1] (Fig. 1)를 electroporation 방법으로 KCL-1에 도입하여 Km-LB media에서 선별결과 200 개의 colony가 발생하였다. 200 개의 colony 중 20 개를 선택하여 plasmid DNA를 분리하여 확인한 결과 모든 colony에서 재조합 plasmid DNA를 가지고 있는 것을 확인하였다. 확인된 균주 중에서 임의로 5개 colony를 선택하여 제한 효소를 처리하여 삽입된 lipase 유전자를 확인하였다. Lipase 활성 유무를 확인하기 위하여, 재료 및 방법에 언급된 TB 고체 배지에서 5개의 형질전환된 균주가 야생형인 KCL-1에 비하여 48시간 이후 투명대의 형성이 뚜렷한 차이를 보이는 것을 확인하였다. 그 중 투명대가 가장 큰 하나의 균주를 선택하여 -70°C에 저장하고, 계속적

으로 실험을 수행하였다.

표면 장력과 균의 생육도 변화

Lipase 유전자 도입에 따른 표면활성 변화를 확인하기 위하여 여러 가지 탄소원(glucose, soybean oil, kerosene)을 사용하여 배양시간에 따른 표면 장력을 확인하였다.

KCL-1과 KCL-1/pET-Lip을 2%로 glucose를 탄소원으로 하여 96시간 배양하였을 때, 야생형인 KCL-1의 생육이 조금 빠른 것을 확인하였다(Fig. 2). 야생형 KCL-1이 24시간 배양에서 생육 정지기로 도달하는 반면 KCL-1/pET-Lip은 48시간이 되어야 정지기에 도달하였다. 그러나 표면장력에 있어서 72시간까지 비슷하게 유지되다가 생육을 정지시킨 96시간째, KCL-1/pET-Lip은 KCL-1에 비하여 표면장력이 더욱 감소하는 것을 확인하였다(Fig. 2).

4% soybean oil을 탄소원으로 사용한 경우, 생육 형태와 표면장력이 2% glucose를 사용한 경우에 비하여 차이를 보여주고 있다(Fig. 2, Fig. 3). 생육에 있어서 lipase 유전자가 도입된 KCL-1/pET-Lip과 야생형 KCL-1은 대수 증식기가 늘어나고 세포의 최고 성장이 2% glucose를 사용한 것보다 낮아졌다. 그러나 표면장력에 있어서 야생형 KCL-1은 조금 떨어졌고, KCL-1/pET-Lip은 배양 초기부터 급격히 떨어지다가 72시간에 와서 임계표면장력에 이르는 것을 확인 할 수 있다.

4% kerosene을 탄소원으로 사용하여 생육도와 표면장력을 나타낸 것을 Fig. 4에 나타내었다. 야생형 KCL-1의 성장은 24시간 때에 정지기에 들어가는 것은 2% glucose의 경우와 비슷하지만 생육도에 있어서 4% soybean oil 보다 낮게

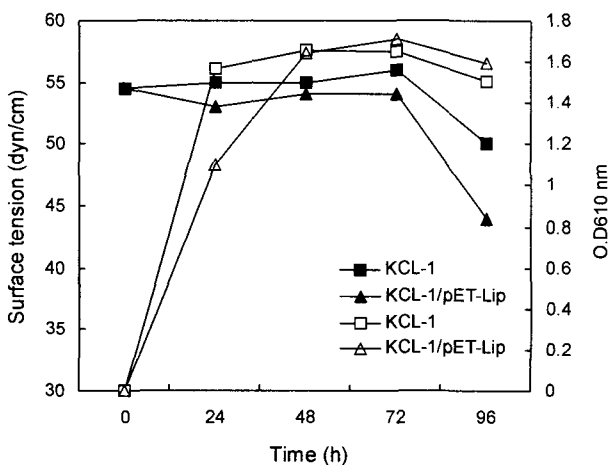


Fig. 2. Surface tensions and cell growth curves of KCL-1 and KCL-1/pET-Lip in 2% glucose as C-source. The strains were grown at 37°C in C-medium supplemented with 2% (v/v) glucose. —■— and —▲— indicated surface tension with KCL-1 and KCL-1/pET-Lip, respectively. —□— and —△— marked cell growth curves by KCL-1 and KCL-1/pET-Lip, respectively.

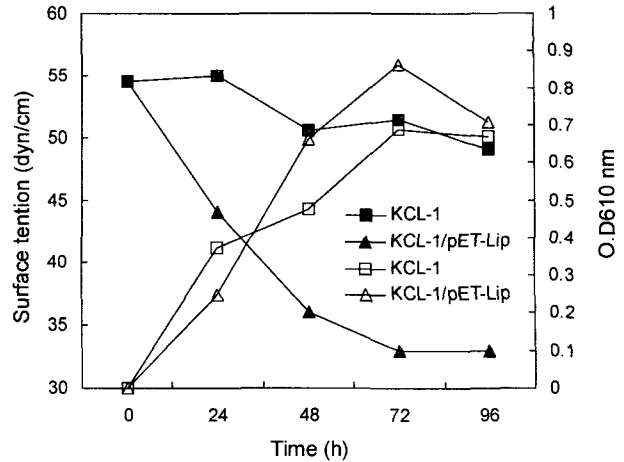


Fig. 3. Surface tension and cell growth curves of KCL-1 and KCL-1/pET-Lip in 4% soybean oil as C-source. The strains were grown at 37°C in C-medium containing 4% soybean oil. The marks is the same as indicated in Fig. 2.

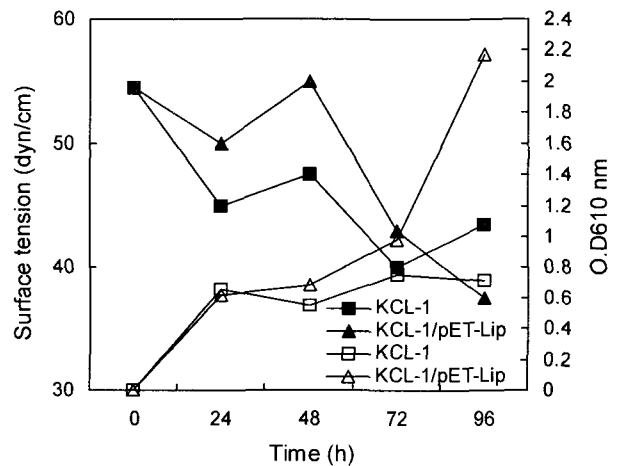


Fig. 4. Surface tension and cell growth curves of KCL-1 and KCL-1/pET-Lip in 4% kerosene as C-source. The strains were grown at 37°C in C-medium containing 4% kerosene. The marks is the same as indicated in Fig. 2.

나타나고, KCL-1/pET-Lip은 계속 증가하는 패턴을 보여 준다. 표면 장력의 경우 다른 탄소원 결과와는 달리 72시간까지 대조구인 야생형 균주 KCL-1이 낮게 나타나며, 선의 모양은 W형을 보인다. 그러나 KCL-1/pET-Lip의 경우 72시간에서 96시간 사이에 KCL-1의 경우 보다 표면 장력이 낮아지는 것을 보여준다.

모든 경우에 있어서 최저 표면장력을 나타내는 것은 lipase 유전자가 삽입된 KCL-1/pET-Lip 이었다. 이것은 lipase 유전자의 도입으로 인한 탄소원으로 oil류 공급에 의한 oil의 분해를 포함하기 때문에 표면 활성이 증가한다는 것을 보여주는 결과다. 그리고 4% soybean oil을 사용한 경우 표면장력

이 다른 탄소원을 사용한 경우에 비하여 가장 낮은 32 dyne/cm를 나타내었으며, 균생육은 2% glucose가 탄소원을 사용하였을 때 가장 높았다.

탄소원에 따른 표면활성 변화비교

KCL-1/pET-Lip을 배양시 탄소원으로 0.2% glucose와 2% soybean oil을 사용하여 96시간까지 배양하고 표면활성의 변화와 균 생육도를 Fig. 5에 나타내었다. 2% glucose와 4% soybean oil의 경우와 비교하면, 탄소원으로 0.2% glucose와 2% soybean oil을 복합적으로 사용한 경우 표면장력은 2% glucose를 사용한 경우보다 시간대 별로 표면장력이 낮게 나타났으며, 최저 표면장력도 큰 차이가 났다. 4% soybean oil의 경우와 비교하면 시간대별 저하정도는 4% soybean oil이 더 낮았으며 탄소원을 복합적으로 사용하여 배양 96시간째에는 2 dyne/cm정도의 차이만 보였다. 이것으로서 glucose를 탄소원으로 사용한 경우 균의 생육도에는 좋은 결과를 얻을 수 있으나, 표면활성에는 별 영향을 줄 수 없다는 것을 예상할 수 있으며 soybean oil이 탄소원일 경우 표면활성의 변화에는 탁월한 효과를 가지고 있으나, 균 생육도에 있어서는 큰 효과를 볼 수 없다. 균 생육도와 표면활성 모두 좋은 효과를 보기 위해서는 glucose와 soybean oil을 적당한 농도로 첨가하는 것이 좋을 것으로 추정된다.

유화활성 측정

표면장력이 최대로 감소된 96시간 배양한 용액에 생성된 lipase와 biosurfactant를 포함하는 biosurfactant 용액은 다양한 소수성 탄화수소류와 oil을 기질로 사용하여 유화활성을 측정한 결과를 Fig. 6에 나타내었다. 그 결과 KCL-1/pET-Lip의 biosurfactant 용액은 soybean oil을 기질로 사용하였을

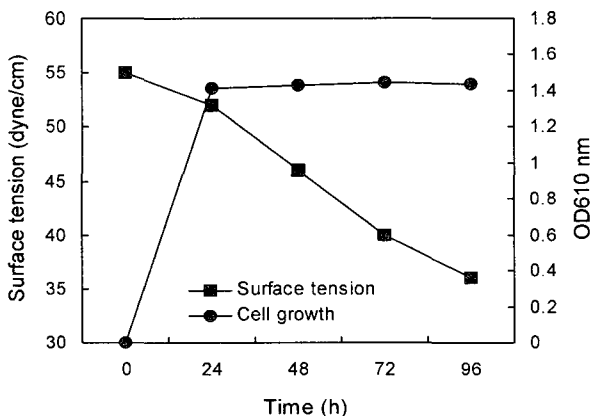


Fig. 5. Cell growth and surface tension of KCL-1/pET-Lip in 0.2% glucose+2% soybean oil medium. The C-sources were used by 0.2% glucose+2% soybean oil. The surface tension were measured by using the ring method on a DeNouy Tensiometer at room temperature.

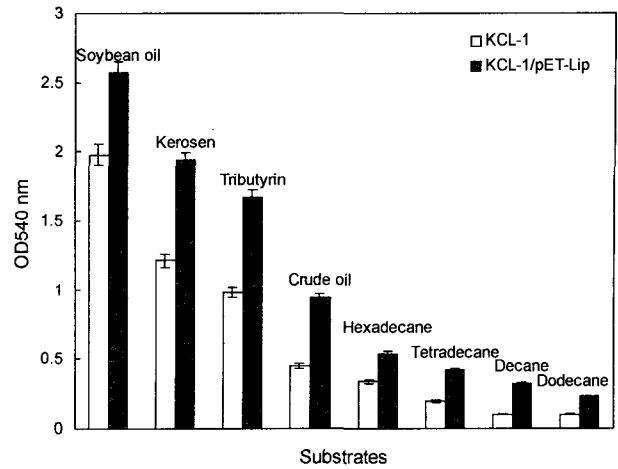


Fig. 6. The comparison of emulsification activity by the bio-surfactant solution KCL-1 and KCL-1/pET-Lip. The sample mixture was shaken vigorously by vortexing. After standing for 10 min, measurement of the emulsification activity was determined by absorbance (A 540).

때 2.57로 가장 높은 활성을 나타내었고, kerosene, tributyrin 그리고 crude oil 도 1.94, 1.67, 그리고 0.94로 상당한 유화력을 보였다. 야생형 KCL-1과 비교하여 사용된 모든 기질에 대해서 활성이 최고 0.73에서 최저 0.13으로 향상되었고, 상대적으로 soybean oil, kerosene, tributyrin 그리고 crude oil에서 활성의 증가 두드러지는 경향을 보였다. 이것은 lipase gene의 도입에 의한 영향으로 oil류의 분해력이 향상된 것이라 생각된다.

형질전환 균주의 Lipase 발현확인

KCL-1과 KCL-1/pET-Lip은 4% soybean oil이 함유된 C-배지에 48, 72, 96시간 배양하여 lipase의 발현을 확인하기 위하여 SDS-PAGE를 수행한 결과로 lane 1은 단백질의 분자량을 확인하기 위한 표준 단백질 BSA이고, lane 2, 3, 4는 KCL-1과 lane 5, 6, 7은 KCL-1/pET-Lip의 4% 대두유가 함유된 C-배지에서 배양한 세포의 총 단백질을 보여준다(Fig. 7).

KCL-1/pET-Lip의 총 단백질 중에서 배양 시간에 따라서 42 kDa 위치의 lipase라고 추정되는 단백질의 발현이 증가하는 것을 확인 할 수 있었다. 반면에 대조구인 야생형 균주의 총 단백질에서는 화살표시가 된 42 kDa 위치에 단백질 밴드가 보이지 않았다. 우리가 도입한 *Pseudomonas* sp. SW-3 lipase gene 이 성공적으로 *Klebsiella* sp. KCL-1에서 발현을 하고 그것으로 표면활성의 증가 와 유화활성이 향상된 것으로 추정된다.

요 약

원유 분해능이 강력한 해양균주 *Klebsiella* sp. KCL-1의 표

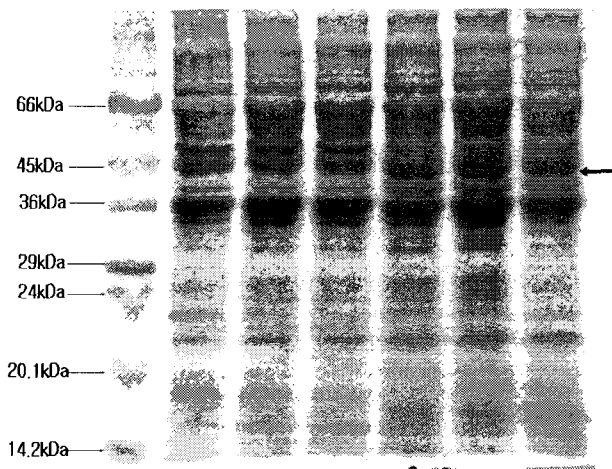


Fig. 7. Analysis to SDS-PAGE of lipase gene expression in KCL-1/pET-Lip.
 The total protein was loaded 10 μ l (1 μ g/ μ l) and standard markers (BSA, 66 kDa; albumin, 45 kDa; ovalbumin, 36 kDa; glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, 29 kDa; carbonic anhydrase, 24 kDa; trypsinogen, 20.1 kDa; trypsin inhibitor, 14.2 kDa; α -lactalbumin) was 5 μ l. Lane 1, BSA(standard markers); Lane 2, 3, 4, total protein of KCL-1; Lane 5, 6, 7, total protein of KCL-1/pET-Lip.

면활성 능력과 유화활성의 향상을 위하여 An et. al.이 보고한 *Pseudomonas* sp. SW-3균주로부터 cloning된 pET-Lip을 KCL-1에 도입하였다. KCL-1/pET-Lip은 2% glucose, 4% soybean oil, 4% kerosene 각각의 탄소원에 대하여 야생형 균주 KCL-1과 비교하여 우수한 표면장력 저하 능력을 가지게 된 것을 알 수 있다. KCL-1/pET-Lip은 4% soybean oil를 유일한 탄소원으로 배지에 첨가한 경우 표면장력이 55 dyne/cm에서 32 dyne/cm로 줄어들었다. 세포의 성장은 2% glucose가 탄소원으로 사용된 경우 성장이 최대로 확인되었다. 0.2% glucose와 2% soybean oil를 복합적으로 첨가한 경우 2% glucose를 탄소원으로 사용한 경우에 비해 균의 생육도는 별 차이를 보이지 않으나 표면 장력에는 뚜렷한 차이를 보였다. 4% soybean oil를 사용한 경우와 비교할 경우 균의 생육도는 월등히 높으며, 표면장력의 저하능은 96시간째에 차이가 2 dyne/cm로 비슷해진다. 따라서 탄소원으로서 glucose는 세포의 성장과 관련이 있고, soybean oil 경우는 표면장력 저하와 관계가 있는 것으로 예상된다. 또한 유화활성의 경우 사용된 모든 기질에 대하여 유화활성이 증가하는 것을 확인하였다. 특히 대두유를 기질로 사용한 경우 유화활성이 가장 높았다. 대두유를 탄소원으로 사용하여 KCL-1/pET-Lip을 48, 72, 96시간 배양한 세포 추출물에서 42 kDa의 lipase로 추정되는 단백질이 발현됨을 확인하였다. 결과적으로 lipase를 도입한 KCL-1/pET-Lip의 표면활성 변화 능력이 월등히 향상된 것으로 추정된다.

감사의 글

본 논문은 2001년도 동주대학 교내 학술 연구비 지원에 의한 연구결과이며, 이에 감사드립니다. 또한, 이 논문의 실험을 적극 도와준 동아대학교 응용생명공학부 미생물유전학 실험실 최용락 교수님과 실험실 가족에게 진심으로 감사드립니다.

참고 문헌

1. An, S. Y., S. W. Kim, Y. L. Choi, Y. S. Cho, C. H. Kim and Y. C. Lee, 2003. Cloning, expression in *Escherichia coli*, and enzymatic properties of a lipase from *Pseudomonas* sp. SW-3. *J. Microbiol.* **41**, 95-101.
2. Banat, I. M., 1995. Characterization of biosurfactants and their use in pollution removal-state of the art. *Acta Biotechnol.* **15**, 251-267.
3. Barford, M. M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
4. Cha, J. Y., 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.
5. Cirigliano, M. C. and G. M. Carman, 1984. Isolation of a bioemulsifier from *Candida lipolytica*. *Appl. Environ. Microbiol.* **48**, 747-750.
6. Cirigliano, M. C. and G. M. Carman, 1985. Purification and Characterization of Liposan, a bioemulsifier from *Candida lipolytica*. *Appl. Environ. Microbiol.* **50**, 846-850.
7. Desai, J. D. and I. M. Banat, 1997. Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**, 47-64.
8. Fojan, P., P. H. Jonson, M. t. Petersen and S. B. Petersen, 2000. What distinguishes an esterase from a lipase: A novel structural approach. *Biochimie.* **82**, 1033-1041.
9. Georgiou, G., S. C. Lim, and M. M. Sharma, 1992. Surface-active compounds from microorganisms. *Bio/technol.* **10**, 60-65.
10. Huang, C. C., A. Takashi, and S. Makoto, 1993. Nucleotide sequence and characteristics of the gene, lpa-14, responsible for biosynthesis of the lipopeptide antibiotics iturin A and surfactin from *Bacillus subtilis* RB14. *J. Ferment. Bioengin.* **76**, 445-450.
11. Hwang, K. A, J. R. Lee, S. J. Kim, Y. S. Kim, and H. J. Ahn, 1999. Surface activity and environmental characteristics of biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* JRT-4. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **27**, 159-165.
12. Jeong, J. K., W. K. Lim, and H. J. Shin, 1999. Microbial degradation of hydrocarbons in the waste oil. *Kor. J. Life Science.* **9**, 84-91
13. 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 puri-

- fication of biosurfactant from marine bacterium *Aeromonas* sp. BES-741. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **24**, 443-448.
14. Laemmli, U. K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**, 680-685.
 15. Magaritis A., K. Kennedy, J. E. Zajic, D. F. Gerson, 1979. Biosurfactant production by *Nocardia erythropolis*. *Dev. Ind. Microbiol.* **20**, 623-630.
 16. Rheinheimer, G., 1981. *Microbiologic der gewalsser*. 3rd. ed. p. 251. gustav Fischer Verlag Stuttgart.
 17. Schmidt-Dannert, C., 1999. Recombinant microbial lipase for biotechnological applications, *Bioorg. Med. Chem.* **7**, 2123-2130.
 18. Zajic, J. E., H. Guignard, and D. F. Gerson, 1977. Properties and biodegradation of a bioemulsifier from *Corynebacterium hydrocarboclatus*. *Biotechnol. Bioeng.* **19**, 1303-1320.