

Biosurfactant를 생산하는 *Bacillus subtilis* TBM 3101의 생리학적 특성

김선아 · 이영근¹ · 최용락² · 황철원³ · 정영기² · 주우홍*

창원대학교 생물학과, ¹부산대학교 생명응용과학부, ²동아대학교 응용생명공학부,
³한동대학교 생명과학기술부

Physiological Characteristics of Biosurfactant-Producing *Bacillus subtilis* TBM 3101

Seon-A Kim, Young Guen Lee¹, Yong Lark Choi², Cher Won Hwang³,
Yong Kee Jeong² and Woo Hong Joo*

Department of Biology, Changwon National University, Changwon 641-773, Korea

¹School of Applied Life Science, Pusan National University, Gyeongnam 627-706, Korea

²Department of Biotechnology, Faculty of Natural Resources and Life Science, Dong-A University, Busan 604-714, Korea

³Institute of Bioscience and Technology, Handong University, Gyeongbuk 791-708, Korea

Received November 17, 2006; Accepted February 1, 2007

A biosurfactant-producing strain, *Bacillus subtilis* TBM 3101 was isolated from the soil sample at Tae-Baek Mountain through an antifungal test and emulsification assessment. The strain was assessed, regarding to the microbial growth, by physical and chemical test, surface tension, emulsification activity and stability. The surface tension of the isolate sharply decreased to the minimum 29 mN/m at 48 h growth. Of note, its emulsification was stabilized to the highest degree when tributyrin was utilized as a substrate, indicating that in comparison to a variety of synthetic surfactants, the biosurfactant produced by the isolate was significantly similar to synthetic surfactant, tween 20. In addition, the biosurfactant showed high emulsification activity when soybean oil, crude oil and tetradecane were used as a substrate. Thus, these studies could contribute to the detection and development of biosurfactant beneficial to the environment and humans.

Key words: *Bacillus subtilis*, biosurfactant, emulsifying activity, emulsifying stability

서 론

급속한 산업화와 도시화에 따른 인류의 문제점 중에서 가장 심각하게 대두되어 있는 것이 환경오염 문제이다. 환경오염은 인간 생활의 편리함을 추구하는 과정에 부수적으로 수반되는 환경오염물질의 과도한 사용에 따른 필연적 결과이다. 환경오염물질은 유기물에서 중금속 등 무기물까지 다양하다. 이러한 물질은 많은 부분이 난분해성이므로, 그 처리를 위하여 끊임없는 기술개발이 요구되는 분야이다.¹⁾

Biosurfactant란 미생물에 의해 세포 표면에 생성되거나 세포 외로 분비되는 화합물로서, 친수성인 부분(hydrophilic moieties)과 소수성인 부분(hydrophobic moieties)을 동시에 가지는 양친매성(amphiphiles) 물질이다. 이러한 biosurfactant는 공기-물 사이의 수용액 속에서 표면장력(surface tension)과 liquid-liquid

(oil-water), liquid-solid(wetting phenomena)간 계면장력(interfacial tension)을 감소시키며 유화 안정성도 우수하다.²⁾ Biosurfactant는 기존의 화학 유화제에 비하여 독성이 낮고, 미생물에 의해 다양하게 합성되어지며, 온도 및 pH에 대한 안정성이 클 뿐 아니라, 폐유나 식물성 유지 등 재생 가능한 원료로도 생산이 가능하고, 생분해능이 우수하기 때문에 매우 환경 친화적인 물질이다.³⁾

이러한 미생물의 계면활성제의 소수성 부분은 당 또는 아미노산 등으로 구성되며, glycolipids, lipopeptides, lipoproteins, neutral lipids, phospholipids, substituted fatty acids와 lipopolysaccharides 같은 종류들이 있다. 매우 효과적인 lipopeptide type의 biosurfactant인 surfactin이 *Bacillus subtilis* 종에서 최초로 보고되었으며, 그 후로 여러 종류의 표면활성과 항균활성을 가지는 lipopeptide가 *Bacillus*속에서 발견되고 있다.⁴⁾ *Bacillus*속에서 생산되는 biosurfactant는 단순 peptide 형태인 gramicidin S⁵⁾와 tyrocidine,⁶⁾ 7개의 amino acid cyclic peptide에 β -hydroxy fatty acid가 ester 결합을 하고 있는 surfactin,^{7,8,9)} 7개의 α -amino acid와 한 개의 β -amino acid 잔

*Corresponding author
Phone: +82-55-279-7443; Fax: +82-55-279-7449
E-mail: whjoo@changwon.ac.kr

기를 갖은 iturin[®]으로 대별할 수 있다. 이 중 surfactin은 혈전 용해제로 알려져 있다. 현재, surfactin과 iturin을 포함하는 *Bacillus*속 유래의 lipopeptides는 biosurfactant로서 뿐만 아니라 항균 활성과 식물방제의 측면에서 상당한 연구가 진행되고 있다.^{8,10,11}) 그러나 그 효과의 기작에 대해서는 명확히 밝혀진 바가 없어 더 많은 연구가 시도되고 있다.

본 연구에서는 태백산 토양에서 분리한 *Bacillus subtilis* TBM 3101를 동정하고, biosurfactant 생산균주로서의 이용을 위해 분리균주의 생육도, 표면장력, 유화안정성 등의 특성을 검토하였다. 또한 이미 생산되고 있는 다른 합성계면활성제들과 비교하여 이 균주가 생성하는 biosurfactant의 상대적 물성을 조사하였다.

재료 및 방법

Biosurfactant 생성 미생물의 분리. 탄소원이 결핍된 배지(carbon-minimal medium)를 사용하여 biosurfactant를 생산하는 미생물을 분리하였으며, 사용된 배지의 조성은, NaCl 0.1 g/l, (NH₄)₂SO₄ 5 g/l, K₂HPO₄ 2 g/l, KH₂PO₄ 1 g/l, MgSO₄ · 7H₂O 0.2 g/l, yeast extract 0.2 g/l, CaCl₂ 10 mg/l, FeSO₄ · 7H₂O 10 mg/l 및 trace element 용액 2 ml (7H₂O 7 mg/l, CoCl₂ · 6H₂O 6 mg/l, MoO₃ 1 mg/l, H₃BO₃ 1 mg/l, NiSO₄ · 6H₂O 1 mg/l, ZnSO₄ · 7H₂O 0.5 mg/l, CuSO₄ · 5H₂O 0.5 mg/l)으로, 배지의 pH를 7.0으로 조정하여 사용하였다. 위와 같은 조성의 배지에, 탄소원으로 crude oil 또는 soybean oil을 1% 첨가한 다음, 채취한 샘플 희석액, 즉 멸균수에 토양 시료 3g을 넣고 10배씩 희석한 10-2액을 1% 첨가하여 7일간 진탕 배양하였다. 이때 생육된 균을 새로운 탄소원배지에 균주 및 원유를 각각 1%로 첨가하여 다시 배양하였으며, 이와 같은 방식으로 3회 반복하여 생육한 균주를 Luria-Bertani(LB) 고체배지에 도말하여 37°C에서 배양하였다. 선별된 단일 콜로니를 LB 액체배지에서 각각 전배양시킨 후, tributyrin이 2% 첨가된 배지에 배양한 후 투명환이 생성되고, 표면 장력 저하능이 우수한 것을 biosurfactant 생성능이 우수한 균주로 판정하여 선별하였다.

균주의 동정, 염색체 DNA 분리 및 계통관계 규명. 분리된 균주를 동정하기 위하여 형태학적, 생리학적 및 생화학적 특성을 조사하여 Bergey's manual of systematic bacteriology¹²⁾에 준하여 비교 확인하였다. 또한 정확한 동정을 위하여 TBM3101의 염색체 DNA를 다음과 같이 분리하였다. 염색체 DNA를 얻기 위하여 전배양한 균주를 LB배지 3 ml에 접종하여 37°C에서 4~6시간 동안 진탕 배양하였다. 배양된 균주를 집균하여 IX TEN buffer(Tris-HCl, EDTA, NaCl)로 세정하였다. 500 μl SET buffer(20% sucrose, 50 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl (pH 7.6, 1 mg/ml lysozyme)로 현탁하고, 37°C에서 10분 동안 배양 후에 protease K(20 mg/ml)를 소량 첨가한다. 동시에 SDS를 최종 1% 되도록 첨가하여 37°C에서 30분간 용균시켜 1 M NaCl을 첨가하여 phenol 처리하였다. Phenol 처리한 시료는 99% Et-OH로 침전시켜(-70°C, 10분), 염색체 DNA를 회수하였다. 이렇게 분리된 염색체 DNA를 주형으로 하여 PCR을 수행하였으며, TBM3101의 16S rDNA를 획득한 다음 16S

rDNA의 염기서열을 결정하였다. 이때 PCR에 사용된 primer는 *E. coli* 16S rDNA의 upstream 9-27 bp와 downstream 1,542-1,525 bp의 영역을 oligonucleotide로 작성하여 사용하였다(primer 1: 5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', primer 2: 5'-AGAAAGGAGGTGATCCAGCC-3') TBM3101의 16S rDNA의 염기서열을 결정한 다음 GeneBank Database에서 상동성을 비교하였으며, *Bacillus* sp. TBM3101과 유사한 *Bacillus*종들과의 유연관계를 알아보기 위하여, ClustalX program¹³⁾을 이용하여 phylogenetic tree를 제작하였다.

균주의 생육도 측정. 선별된 균주의 생육정도를 조사하기 위하여, LB액체배지 500 ml에 전배양시킨 균주를 접종하여 37°C에서 90시간 동안 200 rpm으로 진탕배양하였다. 배양시간에 따른 균체의 성장의 확인을 위해, 진탕배양한 배양액을 6시간 간격으로 일정량(1 ml) 취하고 UV-VIS Spectrophotometer(U-1601, Shimadzu, Japan)를 사용하여 600 nm에서 흡광도(optical density)를 측정하였다.

표면장력 측정. LB 액체배지에서 배양한 균주의 배양액을 6시간 간격으로 취하여 원심분리하였다. 균체를 제거한 배양 상층액을 millipore 0.2 μm을 이용하여 여과한 후, Surface Tensiometer(Tensiomat 21, Fisher Scientific, USA)의 ring method를 이용하여 표면장력을 3회 반복하여 측정하고 그 평균값을 계산하였다.¹⁴⁾

유화활성 및 안정성 측정. 일반적으로 사용되는 화학합성 계면활성제와 선별균주에 의해 생산된 biosurfactant의 다양한 소수성 탄화수소들과 oils 성분에 대한 유화활성 및 유화안정성 시험은 Cirigliano와 Carman의 방법^{14,15)}에 따라서 실시하였다. 균주 배양액을 millipore 0.2 μm 여과막을 통과시켜 멸균하여 이를 crude biosurfactant 용액으로 사용하였다. 여과액 2 ml를 마개 있는 시험관에 넣고, pH 3.0의 0.1 M sodium acetate 완충액 2 ml와 혼합한 용액에 1 ml의 다양한 기질을 넣고 2분간 강하게 혼합한 후, 10분간 정치하여 540 nm에서의 현탁도를 측정하였다. 사용된 기질은 soybean oil, crude oil, kerosene 등을 포함한 8가지 종류의 탄화수소 화합물을 사용하였으며, 화학합성 계면활성제는 tween류, span 85, triton X-100, SDS를 사용하였다. 유화안정성은 유화활성 측정 시와 동일한 방법^{14,15)}으로 처리한 후에, 실온에 방치하면서 60분 동안 10분간으로 540 nm에서의 현탁도를 측정하여 로그값으로 환산하여 나타내고, 그 때의 기울기를 유화활성의 안정도 상수 K_t (시간당 붕괴되는 유화력의 기울기 값)으로 나타내었다.

결과 및 고찰

균주의 분리. 태백산에서 채취한 토양시료에서 biosurfactant를 생산하는 우수 균주를 분리하기 위하여 탄소원이 결핍된 배지에 탄소원으로 crude oil 또는 soybean oil을 1% 첨가한 다음 채취한 샘플 희석액을 1% 첨가하여 7일간 진탕 배양하였으며, 이때 생육된 균을 원유를 1% 첨가한 새로운 탄소원배지에 다시 배양하였다. 이렇게 3회 반복하여 생육한 균주를 LB 고체배지에 도말하여 37°C에서 배양하였으며, 전배양한 후, tributyrin이 2% 첨가된 배지에서 배양하여 투명환을 생성하고,

Table 1. Biochemical and physiological characteristics of an isolated strain *B. subtilis* TBM 3101

Characteristics	<i>B. subtilis</i> TBM 3101
Gram stain	+
Fermentation of Glycerol	+
Erythritol	-
D-arabinose	-
L-arabinose	+
D-Ribose	+
D-xylose	-
L-xylose	-
D-Adonitol	-
Methy-βD-xylopyranoside-	
D-Galactose	-
D-glucose	+
D-fructose	+
D-mannose	+
L-sorbose	-
L-Rhamnose	-
Dulcitol	-
Inositol	+
D-Mannitol	+
D-Sorbitol	-
Methyl-αD-mannopyranoside	-
Methyl-αD-glucopyranoside	+
N-Acetylglucosamine	-
Amygdalin	+
Arbutin	+
Esculin	+
Ferric citrate	-
Salicin	-
D-Cellobiose	+
D-Maltose	+
D-Lactose	-
D-Melibiose	+
D-Sucrose	+
D-Trehalose	+
Inulin	+
D-Melezitose	-
D-raffinose	-
Starch	+
Glycogen	+
Xylitol	+
Gentiobiose	-
D-Turanose	+
D-Lyxose-	
D-Tagatose	-
D-Fucose	-
D-Arabitol	-
L-Arabitol	-
Potassium gluconate	-
Potassium 2-ketogluconate	-
Potassium 5-ketogluconate	-

표면 장력 저하능이 우수한 균주를 다수 확보하였으며, 이들 중에서 우수 균주인 TBM3101에 대하여 지속적인 실험을 실시하였다.

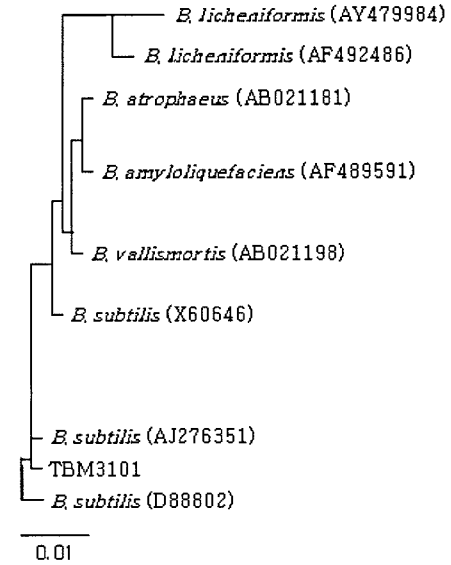


Fig. 1. Unrooted phylogenetic tree showing the position of strain TBM3101 amongst other species of the genus *Bacillus*. Numbers in parentheses are GenBank accession numbers. Bar, 1% sequence divergence.

균주의 동정 및 계통관계 분석. 선별된 TBM3101은 그람 염색법에 의해 그람양성균으로 확인되었으며, 미생물 동정에 널리 사용되는 API Kit를 이용하여 생리 생화학적인 성질을 조사한 결과 TBM3101은 *Bacillus*의 주요 특징을 가지고 있음을 확인할 수 있으며(Table 1), 전체적인 생리 생화학적 성질은 95.5% 정도 *B. subtilis*와 상동성이 있었다. 선별된 균주를 보다 자세히 동정하기 위하여 균주의 염색체 DNA를 분리하였으며, 이를 주형으로 한 PCR을 수행하여 약 1.5 kb의 단편을 얻었다. 얻어진 16S rDNA 일부영역단편은 pGEM T-easy vector (promega)를 사용하여 클로닝한 후 양방향으로 염기서열을 결정하였다.

TBM3101의 16S rDNA 염기서열은 NCBI BLAST를 통해 상동성을 조사하였으며, ClustalX program¹³⁾을 이용하여 유사한 *Bacillus*종과의 유전학적인 연관성을 조사하였다. 그 결과 *Bacillus* sp. TBM3101의 16S rDNA 염기서열은 *Bacillus subtilis*와 98% 이상 높은 상동성을 나타내어 *B. subtilis* TBM 3101로 동정되었다(Fig. 1). 국내외에서 biosurfactant 생산균주는 다수 보고되고 있으며, 특히 biosurfactant인 surfactin을 생산하는 *B. subtilis*종에 대한 보고가 많이 이루어지고 있다.

균주의 생육도 및 표면장력. *B. subtilis* TBM 3101가 생육하여 생성하는 biosurfactant의 특성을 알아보기 위해, 배양시간대에 따라 경시적으로 표면장력을 측정된 결과 배양 후 균주의 생육이 대수증식기 정도에 이르는 18시간대 부터 급격히 감소하였다. 48시간 후에 배지의 표면장력이 최고 60.9 mN/m에서 최저 29 mN/m 정도까지 저하되었으며, 저하된 표면장력은 48 시간 이후 장시간 계속 유지되었다(Fig. 2). 이러한 결과는 *Bacillus* sp.^{2,3)}와 *Pseudomonas* sp.¹⁶⁾으로 부터의 계면활성제의 생산이 배양 2일 후인 정지기 초기에 가장 많이 생산되는 결과와 유사하였고 이미 보고된 데이터들과 비교분석하였을 때 표면장력의 수치가 유사하다는 점으로 미루어 유효력이 있음이

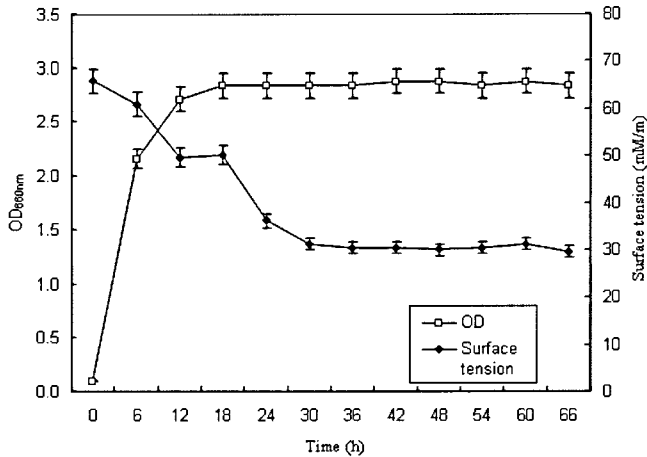


Fig. 2. Change of cell growth and patterns of biosurfactant production by cultivation times. The *Bacillus subtilis* TBM 3101 was cultured in a LB medium containing 2% crude oil as the sole carbon source at 37°C.

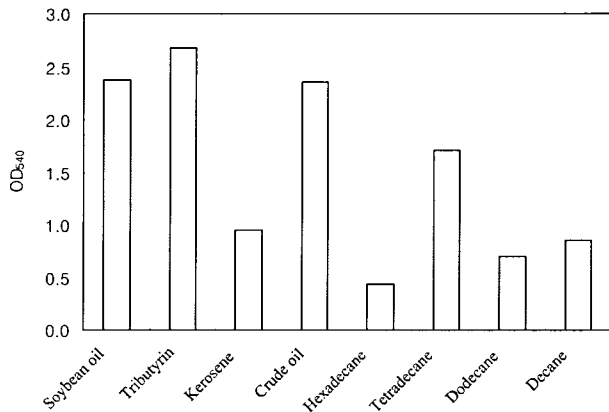


Fig. 3. Emulsification activity of various substrates by biosurfactant solution. The sample mixture was shaken vigorously in a vortex mix. The absorbance (A_{540nm}) of the emulsion was determined after the 10 min.

추출되어 진다.

Biosurfactant의 유화력. 표면장력이 최대로 감소된 약 48시간 까지 배양한 균액에 함유된 biosurfactant가 다양한 소수성 탄화수소류와 oil류 기질을 유화시키는 특성을 알아 보고자 유화활성을 측정 한 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 그 결과 *B. subtilis* TBM 3101가 생산하는 biosurfactant는 tributyrin을 기질로 사용했을 때 약 2.68로서 가장 높은 유화력을 보였고, 그 밖에도 soybean oil, crude oil, tetradecane에서도 높은 활성을 보인 반면에, kerosene, hexadecane, dodecane, decane의 소수성 탄화수소를 기질로 사용한 경우는 전반적으로 낮은 편으로, 김 등²¹에 의해 보고된 *Bacillus* sp. TBM40-3의 보고와는 다소 상이한 결과가 제시되었다.

기질에 따른 유화 안정성. 분리균주가 생산하는 biosurfactant의 소수성 탄화수소계 및 각종 oil류를 기질로 한 유화활성 및 유화안정성을 Fig. 4와 Table 2에 각각 나타내었다. 또, 유화활성이 가장 좋았던 tributyrin을 기질로 하여 유화 안정도를 비교 조사한 결과를 Fig. 5와 Table 3에 나타내었다. 유화활성의 안

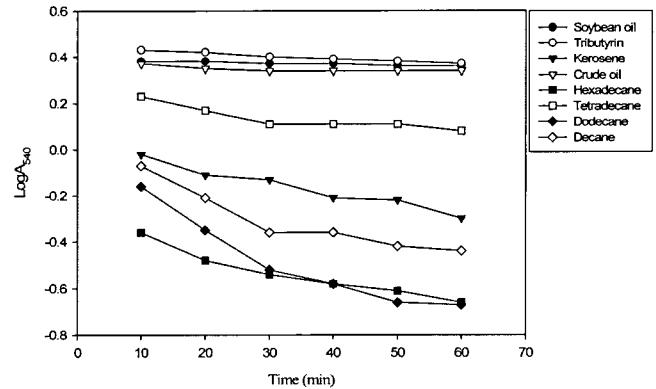


Fig. 4. Emulsification stability of various substrates by biosurfactant solution. The absorbance (A_{540nm}) of the emulsion was determined at the indicated times. After the initial 10 min holding period, absorbance readings were taken every 10 min. The log of the absorbance was then plotted versus time.

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

Substrate	Emulsification activity (OD _{540nm}) ¹	Decay constant ($K_d \cdot 10^{-3}$) ²
Soybean oil	2.38	-0.46
Tributyrin (C _{4:0})	2.68	-1.23
Kerosene	0.95	-5.17
Crude oil	2.36	-0.51
Hexadecane (C ₁₆)	0.44	-5.51
Tetradecane (C ₁₄)	1.71	-2.66
Dodecane (C ₁₂)	0.70	-10.11
Decane (C ₁₀)	0.85	-7.09

¹The emulsification assay was performed in the presence of the biosurfactant, as described in the text. After an initial 10-min holding period, the absorbance readings were taken every 10 min for 60 min.

²The log of the absorbance was plotted versus time and the slope (decay constant, K_d) was calculated.

정도는 상수 K_d (시간당 붕괴되는 유화력의 기울기 값)로 나타내었으며, 기울기가 수평에 가까울수록 유화도의 변화가 적고 안정도는 높다고 볼 수 있다. *B. subtilis* TBM 3101이 생산하는 biosurfactant는 tributyrin에서 2.68로 유화활성이 가장 높게 나왔으나, 유화 안정성은 soybean oil에서 -0.46의 K_d 값으로 안정도가 높음을 확인하였다. 그밖에 crude oil에서도 유화 안정성이 다소 높았다. 현재 상용되고 있는 합성계면활성제와 유화활성과 안정성을 비교해 보면 tween 류와 span 85와 유화활성이 비슷하다고 할 수 있으나 안정성에서는 tween 80과 triton X-100과 유사함을 확인할 수 있었다. 한편 강¹⁷의 발표된 논문에서 *Bacillus subtilis* KL-57의 표면장력이 29 dyne/cm로 본 실험의 *B. subtilis* TBM 3101의 표면장력과 같은 수치였다. 그리고 이 등,^{18,19} 김 등^{16,20,21}의 유화 활성도 및 유화 안정도가 *Bacillus subtilis* A8-8에서는 각각 2.75, -0.00와 *Bacillus subtilis* LSC11는 2.39, -0.13, *Bacillus atrophaeus* DYL-130는 2.10, -0.00, *Bacillus* sp. TBM 911-5는 2.65, -0.00, *Bacillus* sp. TBM40-3는 2.65, -0.00이었는데 이는 본 실험에서의 *B. subtilis* TBM 3101이 생산하는 biosurfactant의 유화활성이 2.68로 유사한 활성이 있음을 알 수 있었다. 그러나 유화 안정도는

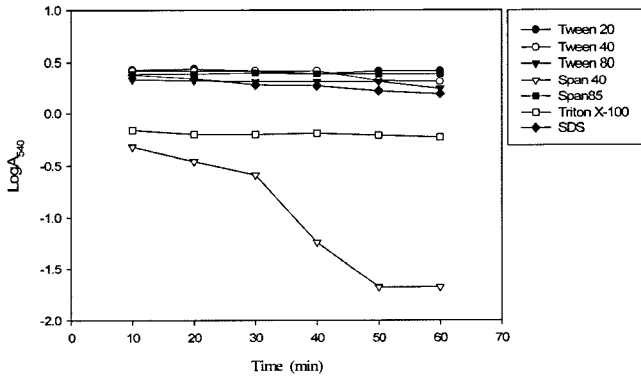


Fig. 5. Stabilization comparison of the emulsion from the biosurfactant solution with various chemical surfactants. An emulsifying substrate was soybean oil. The absorbance (A_{540nm}) of the emulsion was determined at the indicated times. After the initial 10 min holding period, absorbance readings were taken every 10 min. The log of the absorbance was then plotted versus time.

Table 3. Comparison of emulsification and stabilization properties of a biosurfactant solution

Substrate	Emulsification activity (OD_{540nm}) ¹	Decay constant ($K_d, 10^{-3}$) ²
Biosurfactant	2.68	-1.23
Tributyrin (C_{40})	2.68	-1.23
Kerosene	0.95	-5.17
Crude oil	2.36	-0.51
Hexadecane (C_{16})	0.44	-5.51
Tetradecane (C_{14})	1.71	-2.66
Dodecane (C_{12})	0.70	-10.11
Decane (C_{10})	0.85	-7.09

¹The indicated stabilizer was analyzed for emulsification activity by using tributyrin, as described in the text.

²The log of the absorbance was plotted versus time and the slope (decay constant, K_d) was calculated.

-1.23으로 다소 떨어지는 결과를 보이고 있다. 이상의 결과에서 다른 *Bacillus* sp.들과 *B. subtilis* TBM 3101가 생산하는 biosurfactant는 유화활성 및 안정성 면에서 뒤떨어지지 않는 우수한 결과를 보여주었으므로, 사용균주 생산 biosurfactant에 의한 유류 분해, biosurfactant 관련 유전자에 대한 연구 등 다양한 측면에서 좀더 심층적인 실험들이 진행되어야 할 것이다. 또한 이러한 물질을 산업적으로 활용하거나 유류에 의해 오염된 곳의 환경정화 등에 유용하게 적용하는 실용적인 연구가 추진되어야 할 것으로 사료된다.

초 록

태백산 토양에서 유화활성과 안정도가 높은 biosurfactant 생산균주 TBM 3101를 분리하여 동정한 결과 *B. subtilis*로 판명되었다. *B. subtilis* TBM 3101의 배양액에서 표면장력은 최저 29 mN/m까지 감소되었고, 이후 장시간 계속 유지되었다. 또한, tributyrin을 기질로 사용하였을 때 2.68로 가장 큰 유화력을 보였고, 그 외에 soybean oil, crude oil, tetradecane 에서도 비슷한 활성을 보였다. 각종 다른 합성계면활성제의 유화활성 및 안

정성을 고려하여 비교 분석한 결과 *B. subtilis* TBM 3101 생산하는 biosurfactant는 tween류와 span 85와 유사한 유화활성을 나타내었고, tween 80과 triton X-100과 비슷한 유화 안정도를 보여주었다.

감사의 글

본 연구는 농림부 농림기술개발사업의 지원에 의하여 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Kasarić, N. and Carins, W. L. (1987) Biosurfactant and biotechnology. Marcel Dekker Inc., New York.
- Fiechter, A. (1992) Biosurfactant: moving towards industrial application. *Trends Biotechnol.* **10**, 208-217.
- Deziel, E., Paquette, G., Villemur, R., Lepine, F. and Bisaillon, F. G. (1996) Biosurfactant production by a soil *Pseudomonas* strain growing on polycyclic aromatic hydrocarbons. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 1908-1912.
- Cooper, D. G. and Zajic, J. E. (1980) Surface-active compounds from microorganism. *Adv. Appl. Microbiol.* **26**, 229-256.
- Kratzschmar, J., Krause, M. and Marahiel, M. A. (1980) Gramicidin S biosynthesis operon containing the structural genes *grsA* and *arsB* has an openreading frame encoding a protein homologous to fatty acid thioesterases. *J. Bacteriol.* **171**, 5422-5429.
- Mittenhuber, G., Weckermann, R. and Marahiel, M. A. (1989) Gene cluster containing the genes for tyrocidine synthetase 1 and 2 from *Bacillus brevis*; evidence for an operon. *J. Bacteriol.* **171**, 1881-1887.
- Arima, K., Kakimura, A. and Tamura, G. (1967) Surfactin, a crystalline peptidolipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **31**, 488-494.
- Hiraoka, A., Ano, T. and Shoda, M. (1992) Molecular cloning of a gene responsible for the biosynthesis of the lipopeptide antibiotics iturin and surfactin. *J. Ferment. Bioeng.* **74**, 323-326.
- Kameda, Y., Ohira, S., Matsui, K., Kanatomo, S., Hase, T. and Atsushaka, T. (1974) Antitumor activity of *Bacillus natto*. V. Isolation and characterization of surfactin in the culture medium of *Bacillus natto* KMD2311. *Chem. Pharm. Bull.* **22**, 938-944.
- Phae, C. G., Shoda, M. and Kubota, H. (1990) Suppressive effect of *Bacillus subtilis* and its products on phytopathogenic microorganisms. *J. Ferment. Bioeng.* **69**, 1-7.
- Yukinori, T., Takashi, A. and Makoto, S. (1993) Survival of *Bacillus subtilis* NB22, an antifungal-antibiotic iturin producer, and its transformation in soil-system. *J. Ferment. Bioeng.* **74**, 255-261.
- John, G. H., Krieg, N. R. and Sneath, P. H. A. (1994) Bergey's manual of systematic bacteriology (9th ed.). Williams and Wilkins, Baltimore.
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F.

- and Higgins, D. G. (1997) The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* **24**, 4876-4882.
14. Cirigliano, M. C. and Carman, G. M. (1984) Isolation of a bioemulsifier from *Candida lipolytica*. *Appl. Environ. Microbiol.* **48**, 747-750.
15. Cirigliano, M. C. and Carman, G. M. (1985) Purification and characterization of liposan, a bioemulsifier from *Candida lipolytica*. *Appl. Environ. Microbiol.* **50**, 846-850.
16. Kim, S. H., Jung, Y. J., Lee, S. C., Yoo, J. S., Joo, W. H., Chung, S. Y., Chok, S. R. and Choi, Y. L. (2004) Isolation and characteristics of biosurfactant producing bacterium, *Bacillus* sp. TBM 911-5. *Kor. J. Sci.* **14**, 320-324.
17. Kang, S. M., Lee, B. O. and Lee, C. S. (1994) Cloning of biosurfactant-producing gene from *Bacillus subtilis* KL-57. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **22**, 593-598.
18. Lee, S. C., Yoo, J. S., Kim, S. H., Chung, S. Y., Hwang, C. W., Joo, W. H. and Choi, Y. L. (2006) Production and characterization of lipopeptide biosurfactant from *Bacillus subtilis* A8-8. *J. Microbiol. Biotechnol.* **16**, 716-723.
19. Lee, S. C., Jung, Y. J., Yoo, J. S., Cho, Y. S., Cha, I. H. and Choi, Y. L. (2002) Characteristics of biosurfactants produced by *Bacillus* sp. LSC11. *Korean J. Sci.* **12**, 745-751.
20. Kim, S. H., Lee, S. C., Park, I. H., Yoo, J. S., Joo, W. H., Hwang, C. W. and Choi, Y. L. (2005) Isolation and characterization of biosurfactant from *Bacillus atropheus* DYI-130. *Korean J. Sci.* **15**, 679-684.
21. Kim, S. H., Lee, S. C., Yoo, J. S., Joo, W. H., Chung, S. Y. and Choi, Y. L. (2004) Characterization of oil-degradation biosurfactant produced by *Bacillus* sp. TBM40-3. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* **47**, 170-175.