

## *Bacillus lentimorbus* B-6 균주로부터 생산된 $\alpha$ -Glucosidase 억제제의 생물 유화제로서의 특성

양용준 · 김경자\*#

상명대학교 식물산업 공학과, \*순천향대학교 생명공학과  
(Received February 20, 2009; Revised April 2, 2009; Accepted May 15, 2009)

### Emulsifying Character of $\alpha$ -Glucosidase Inhibitor Produced from *Bacillus lentimorbus* B-6

Young-Joon Yang and Kyoung-Ja Kim\*#

Department of Horticultural Science, Sangmyung University, Cheonan 330-180, Korea  
\*Department of Biotechnology, Soonchunhyang University, Asan 336-745, Korea

**Abstract** — Bioemulsifiers are those chemicals which are produced from microorganisms but which have both hydrophilic and hydrophobic groups.  $\alpha$ -Glucosidase inhibitor ( $\alpha$ -GI) produced from *Bacillus lentimorbus* B-6 (B-6) showed bioemulsifying activity. But  $\beta$ -glucosidase inhibitor produced from B-6 didn't show emulsifying activity.  $\alpha$ -GI was purified from supernatant of B-6 grown in minimal culture medium containing glucose and sodium glutamate by Sephadex G-100 column chromatography and isolated from  $\beta$ -GI by dialysis against water. Toluene was determined as the best substrate for emulsifying activity of  $\alpha$ -GI.  $\alpha$ -GI showed thermostability at 100°C for 15 min, high salt tolerance up to 32% NaCl and wide range of pH-stability at pH 4~10. Emulsifying character of  $\alpha$ -GI can be useful for the liposome formation for the treatment of diabetes mellitus.

**Keywords** □  $\alpha$ -glucosidase inhibitor, *Bacillus lentimorbus*, bioemulsifier

생물유화제(Bioemulsifier)<sup>1,2)</sup>는 주로 미생물이 생성하는 일종의 계면 활성제로서 무독성 유화제의 장점을 지니고 있다. 계면 활성제<sup>3,4)</sup>는 한 분자 내에 친수성과 소수성을 동시에 가지고 있는 분자로서 표면이나 계면의 성질을 변화시켜 표면 장력을 감소시키는 물질이다. 화학 합성 계면 활성제는 제조 과정이 복잡하고 대부분 난분해성으로 생 분해도가 극히 낮아 생태계에 축적되어 강한 독성을 나타내므로 심각한 환경 문제를 야기시킨다. 이에 반해 미생물 균주에 따라 세포외 또는 세포내에 생산되는 생물계면 활성제<sup>5)</sup>는 화학합성 계면 활성제에 비해 무독성으로 친환경적인 물질<sup>6,7)</sup>이다. 또한 기존의 방법으로는 합성하기 어려운 복잡한 화학 구조를 가지고 있어 특수한 목적으로 사용될 수 있어 사용 가치가 매우 높은 물질<sup>8-10)</sup>이다. 현재 생물계면 활성제<sup>11)</sup>는 의약품, 식품, 화장품, 세제, 해상의 유류 오염 정화 등 다양한 산업 분야<sup>12,13)</sup>에서 사용되고 있다. 생물계면 활성제에 대한 연구가 세계적으로 활발하게 진행되어 많은 종류의 생물계면

활성제가 보고되었다. 생물계면 활성제의 4가지 형으로는 당지질 류, 인지질 류, 지질단백질 류 와 중합체가 있다. 이들 계면 활성제중 *Pseudomonas* sp.<sup>15-17)</sup>가 생산하는 rhamnolipid<sup>18,19)</sup> 계열의 계면 활성제, *Bacillus subtilis*<sup>20)</sup>가 생산하는 cyclic lipopeptide, *Acinetobacter*종<sup>21)</sup>이 생산하는 지방산, glyceride, emulsan, *Candida*종<sup>22,23)</sup>이 생산하는 mannosyl erythritol lipid<sup>24)</sup> 등이 잘 알려져 있다. 본 연구에서는 전보<sup>25)</sup>에서  $\alpha$ -,  $\beta$ -glucosidase 억제제를 생산하는 것으로 보고된 *Bacillus lentimorbus* B-6균주의 탄소 원 이용에 관한 실험을 하던 중 olive oil, dibutyl phthalate, toluene 등을 이용하는 것으로 나타나, 이 균주로부터 생산된  $\alpha$ -,  $\beta$ -glucosidase 억제제의 유화 활성을 조사한 결과,  $\alpha$ -glucosidase 억제제는 유화 활성을 가졌으나  $\beta$ -glucosidase 억제제는 유화 활성이 없는 것으로 나타나,  $\alpha$ -glucosidase 억제제의 유화제로서의 특성을 파악하여 추후 산업적으로 활용하고자 하였다.

### 실험방법

#### 시약

배지 및  $\alpha$ -,  $\beta$ -glucosidase 등의 효소와 n-hexadecan, 2-

#본 논문에 관한 문의는 저자에게로  
(전화) 041-530-1352 (팩스) 041-530-1256  
(E-mail) kyoungjakim@hotmail.com

methylnaphthalene을 비롯한 기타 실험에 사용된 시약들은 Sigma-Aldrich사에서 구입하였으며, 흡광도 측정은 Jasco V550 UV-visible spectrophotometer를 이용하였다.

#### 생물계면 활성제 생산 균주 및 배양 조건

실험 균주는 전보<sup>25)</sup>에서  $\alpha$ -glucosidase 억제제 및  $\beta$ -glucosidase 억제제를 생산하는 것으로 보고 된 *Bacillus lentimorbus* B-6(B-6)균주를 사용하였으며, 배양조건 및 배지 조건도 전보에서 보고 된 것과 같은 조건을 사용하였다. B-6균을 PGI 배지(polygalacturonase inhibitor 생산 배지; glucose 0.5%, sodium glutamate 0.25%,  $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$  0.1%,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.05%,  $CuSO_4 \cdot 4H_2O$ ,  $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ ,  $ZnSO_4 \cdot 4H_2O$  혼합액 0.0002%)에서 2~3일간 30°C에서 배양한 상등 액을 동결 건조 후 물에 녹여 Sephadex G-100 column chromatography를 2번 수행하여  $\alpha$ -glucosidase 억제 활성이 있는 분획을 모아 다시 동결 건조하여 증류수에 녹여 투석막(cellulose dialysis tubing, Sigma, MW cut off- 10 kDa)에 넣고 100배 부피의 증류수로 4°C에서 18시간 동안 증류수를 2번 교환시키면서 투석하여 유화 활성 시료로 이용하였다.

#### 유화 활성의 측정

유화 활성의 측정은 E. Rosenberg등의 방법<sup>21)</sup>을 변형하여 사용하였다. 즉 0.01 M  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 를 함유한 0.05 M Tris·HCl buffer(pH 8.0) 7.0 ml에 유화 기질인 n-hexadecane과 2-methylnaphthalene의 1 : 1(v/v) 혼합액 0.1 ml를 섞은 후, 1.0 ml의 시료를 첨가하고 2분간 vortexing하여 유화시킨 다음 10분 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. control로는 시료 대신 시료를 녹인 용매를 첨가하여 반응시킨 후 시료의 흡광도에서 control의 흡광도를 뺀 값을 유화 활성 값으로 정하였다.

#### $\alpha$ -Glucosidase 억제제의 발색 반응

$\alpha$ -Glucosidase 억제제의 구성 성분의 특성 분석을 위하여 여러 가지 발색 반응을 행하였다. phosphomolybdic acid(PMA), antimony(III) chloride, dragendorff's reagent, borntreger reagent, Ninhydrin, Ehrlich reagent, Bial's reagent, Rhodamine B reagent, ferric chloride를 사용하여 발색 여부를 조사하였다.

#### $\alpha$ -Glucosidase 억제제의 특성 조사

$\alpha$ -Glucosidase 억제제( $\alpha$ -GI)의 특성을 조사하기 위하여 200~700 nm까지 UV scanning을 실시하였으며, ethyl acetate : methanol(2 : 1), chloroform : methanol(2 : 1)을 전개 용매로 silica gel TLC를 이용하여 Rf치를 조사하였다. 각종 유기용매 및 물에 대한 용해도를 조사하기 위하여 부분 정제된  $\alpha$ -GI에 각종 유기 용매 및 물을 소량씩 첨가하여 300 rpm으로 5분간 강하게 교반한 후 용해된 정도를 육안으로 확인하여 결정하였다.

#### $\alpha$ -Glucosidase 억제제의 유화 활성에 대한 열안정성과 pH 안정성

분리된 억제제를 100°C에서 15분간 가온한 후 얼음에서 식힌 다음 유화 활성을 측정하여 열안정성을 조사하였다. pH 안정성은 NaOH 용액과 HCl 용액으로 pH를 조정한 pH 3~11까지의 물에 1% 농도로 시료를 녹여 4°C에서 15시간 보관 후 중화시켜 유화 활성을 측정하여 조사하였다. 결과는 3번씩 실험하여 평균  $\pm$ 표준 편차로 나타내었다.

#### 생물 유화제의 기질 특이성

$\alpha$ -Glucosidase 억제제( $\alpha$ -GI)의 생물 유화제로서의 기질 특이성을 조사하기 위하여 kerosene, hexane, benzene, crude oil, toluene등을 유화시키는 정도를 비교하였다. 시험관에 기질 2 ml을 넣고 동량의  $\alpha$ -GI(1% 용액)를 첨가하고 2분간 vortex 후 24 시간 정체시킨 다음 유화된 층의 높이를 전체 액의 높이로 나누어 %로 계산하여 유화 지수(emulsion index, E24)로 비교하였다.

#### NaCl 농도에 따른 유화 지수의 변화

NaCl을 0~32% 농도로 첨가한  $\alpha$ -glucosidase 억제제(1% 용액) 2 ml과 기질로 toluene 2 ml을 섞은 후 2분간 vortex 후 24시간 정체시킨 다음 유화된 층의 높이를 전체 액의 높이로 나누어 %로 유화 지수(E24)를 비교하여 NaCl 농도에 따른 변화를 조사하였다. 결과는 3번씩 실험하여 평균  $\pm$ 표준 편차로 나타내었다.

### 실험결과 및 고찰

#### $\alpha$ -Glucosidase 억제제의 유화 활성

$\alpha$ -Glucosidase 억제 활성과  $\beta$ -glucosidase 억제 활성을 모두 가진 B-6 균주 상등액을 동결 건조 후 전보<sup>13)</sup>에서와 같이

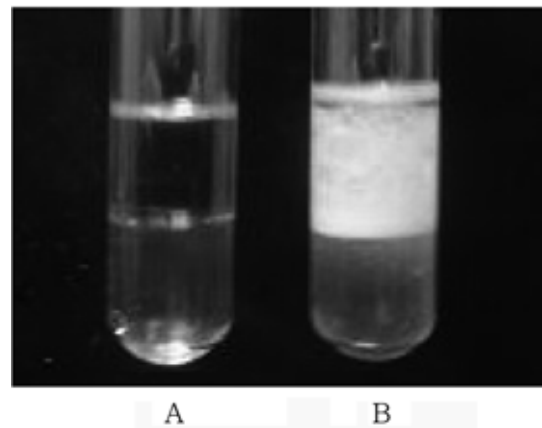


Fig. 1 – Emulsifying activity of glucosidase inhibitor purified from *Bacillus lentimorbus* B-6 (B-6). A:  $\beta$ -glucosidase inhibitor purified from B-6; B:  $\alpha$ -glucosidase inhibitor purified from B-6.

Sephadex G-100 column chromatography를 실시하여  $\alpha$ -glucosidase 억제 활성 분획을 모아 동결 건조 후 cellulose 투석 막 (MW cut off, 10 kDa)으로 투석 후  $\beta$ -glucosidase 억제 활성이 완전히 제거된  $\alpha$ -glucosidase 억제제를 유화 활성 측정 시료로 사용하였다.

Fig. 1에서 보는 바와 같이 B-6 균주 상등액에서 분리한  $\alpha$ -glucosidase 억제제( $\alpha$ -GI, B)와  $\beta$ -glucosidase 억제제( $\beta$ -GI, A)의 유화 활성을 비교한 결과, 전자(B)는 유화 활성을 가졌으나 후자(A)는 전혀 없는 것으로 나타났다.  $\alpha$ -Glucosidase는 식이중의 탄수화물을 분해하여 포도당으로 전환시키는 효소이므로 이 효소의 저해제는 탄수화물의 소화와 흡수를 지연시켜 식후 혈당증가를 완화시킨다.  $\alpha$ -GI는 인슐린 분비를 촉진시키며, 소장에서 글루카곤 분비를 억제하는 glucagon-like peptide-1의 분비를 촉진하는 것으로 알려져 있다. 현재 acarbose, voglibose와 miglitol 등의  $\alpha$ -glucosidase 억제제가 시판되고 있으며,  $\alpha$ -GI의 유화 활성을 활용하면 당뇨병 치료제 개발의 일환으로 연구되고 있는  $\alpha$ -GI의 리포솜 제제 개발에도 도움이 될 것으로 사료된다. 리포솜 형성으로 약물 방출이 지연되도록 하여 약물의 효과를 오래 지속시킬 수 있을 것이다.

#### $\alpha$ -Glucosidase 억제제의 발색 반응

Table I에서 보는 바와 같이 B-6 균으로부터 분리된  $\alpha$ -glucosidase 억제제( $\alpha$ -GI)의 발색 반응은  $\alpha$ -GI와 각각의 시약이 반응하여 나타나는 색을 육안 관찰로 조사한 결과, terpene류와 반응하는 phosphomolybdic acid(PMA)반응, diterpene, flavonoid와 반응하는 antimony(III) chloride 반응, alkaloid와 반응하는 dragendorff's reagent 반응, indole과 반응하는 Ehrlich reagent 반응, 당과 반응하는 Bial's reagent 반응, 페놀성 화합물과 hydroxamic acid와 반응하는 ferric chloride 반응에 대해서는 음성 반응을 나타내었다. 그러나 아미노산, 아민류, 단백질과 반응하는 ninhydrin 반응, 지방과 반응하는 rhodamine B 반응과 coumarin, anthraquinone과 반응하는 borntrager reagent에서는 양성 반응을 보였다. 유화 활성을 가진  $\alpha$ -GI의 발색 반응 결과

**Table I** – Visualization results of bioemulsifier purified from *Bacillus lentimorbus* B-6

Reagent	Result
Phosphomolybdic acid	negative
Antimony(III) chloride	negative
Dragendorff's reagent	negative
Ehrlich reagent	negative
Bial's reagent	negative
Ferric chloride	negative
Ninhydrin	positive
Borntrager reagent	positive
Rhodamine B	positive

지방과 단백질로 이루어진 물질로 추정된다. 이와 유사한 발색 반응을 하는 것으로는 *Bacillus subtilis*<sup>21)</sup>가 생산하는 cyclic lipopeptide와 *Bacillus amyloliquefaciens* LP03이 생산하는 bamylocin A<sup>18)</sup>가 lipopeptide계 생물 유화제로 보고되었다.

#### $\alpha$ -Glucosidase 억제제의 특성

$\alpha$ -Glucosidase 억제제의 최대 흡광도는 272 nm에서 나타났으며 silica gel TLC에서 ethyl acetate : methanol(2 : 1)과 chloroform : methanol(2 : 1)을 전개 용매로 전개한 결과 각 Rf 치가 0.55와 0.89로 나타났다. 여러 가지 용매에 대한 용해도는 물, ethanol과 methanol에서는 용해되었으나 acetone, chloroform, ethyl acetate, hexane 등에서는 용해되지 않는 것으로 나타났다(Table II).

#### $\alpha$ -Glucosidase 억제제의 유화 활성의 기질 특이성

Table III에서 보는 바와 같이  $\alpha$ -glucosidase 억제제의 유화 활성에 대한 여러 가지 기질들을 조사한 결과, Toluene이 가장 좋은 기질로 나타났으며, *n*-Hexane이 가장 활성이 낮은 기질로 나타났다.

#### $\alpha$ -Glucosidase 억제제의 생물 유화제로서의 열안정성과 pH 안정성

$\alpha$ -Glucosidase 억제제( $\alpha$ -GI)의 생물 유화제로서의 열안정성을

**Table II** – Physico-chemical properties of bioemulsifier purified from *Bacillus lentimorbus* B-6

Nature	White powder
UV $\lambda$ max	272 nm
TLC Rf value*	(A) 0.55, (B) 0.89
solubility:	
Soluble:	water, ethanol methanol
Insoluble:	hexane acetone chloroform ethyl acetate

\*Precoated silica gel plate (Merck)

Developing solvent:

(A) ethyl acetate : methanol (2 : 1)

(B) chloroform : methanol (2 : 1)

**Table III** – Substrate specificity of the bioemulsifier purified from *Bacillus lentimorbus* B-6

Substrate	Emulsion index $E_{24}$
Crude oil	51
Kerosene	42
Hexadecane	40
<i>n</i> -Hexane	33
<i>n</i> -Decane	45
Cyclohexane	48
Benzene	50
Toluene	56

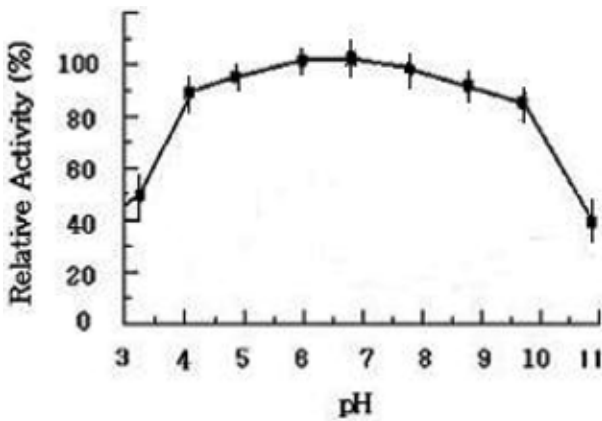


Fig. 2 - pH stability of  $\alpha$ -glucosidase inhibitor purified from *Bacillus lentimorbus* B-6. Results are means $\pm$ SD from 3 separate experiments.

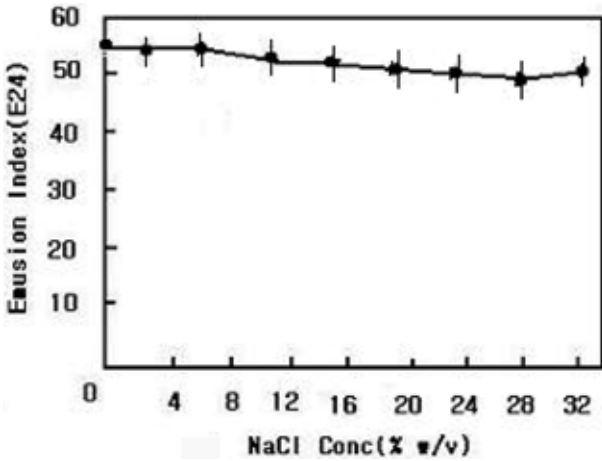


Fig. 3 - Effect of NaCl concentration on the emulsion index of  $\alpha$ -glucosidase inhibitor purified from *Bacillus lentimorbus* B-6. Results are means $\pm$ SD from 3 separate experiments.

조사하기 위하여 100°C에서 15분간 가온한 후 얼음에서 식힌 다음 유화 활성을 측정하여 가온전의 활성과 비교한 결과, 약 95% 정도의 활성을 그대로 지니고 있는 것으로 열에 안정한 것으로 나타났다. pH 안정성을 조사하기 위하여 pH 3~11까지의 물에 녹여 15시간 후 중화하여 유화 활성을 비교한 결과 pH 4~10까지 넓은 범위의 pH에서 안정된 것으로 나타났다(Fig. 2).  $\alpha$ -GI는 높은 열 안정성과 넓은 범위의 pH에 안정한 물질로 산업적 응용에 유용한 물질로 활용도가 높을 것으로 사료된다.

**NaCl 농도에 따른 유화 지수의 변화**

NaCl의 농도(0~32%)에 따른  $\alpha$ -glucosidase 억제제( $\alpha$ -GI)의 toluene에 대한 유화 지수를 비교한 결과 32% NaCl을 함유한 경우에도 거의 변화가 없었으며, 그 보다 높은 농도에서는 NaCl이 녹지 않아 유화 지수를 잴 수가 없었다(Fig. 3).  $\alpha$ -GI는 높은

염 농도에서 사용할 수 있는 생물유화제로 산업적 가치가 높을 것으로 사료된다. 이러한 결과는 5% 이상의 NaCl 농도에서는 유화지수가 감소되는 *Aeromonas* spp.<sup>11)</sup>가 생산하는 유화제와는 다른 것으로 추정된다.

**결 론**

Glucosidase 억제제를 생산하는 *Bacillus lentimorbus* B-6(B-6)균주의  $\alpha$ -glucosidase 억제제( $\alpha$ -GI)와  $\beta$ -glucosidase 억제제( $\beta$ -GI)의 유화 활성을 조사한 결과, 전자는 유화 활성을 나타내었으나 후자는 나타내지 않는 것으로 조사되었다. 유화 활성을 가지는  $\alpha$ -GI는 sodium glutamate와 glucose를 함유한 최소배지에서 배양한 B-6균의 상등 액을 동결 건조 후 Sephadex G-100 column chromatography를 이용하여  $\alpha$ -glucosidase 억제 활성 분획을 모아 물로 투석하여  $\beta$ -glucosidase 억제 활성을 완전히 제거 후 정제하였다.  $\alpha$ -GI의 유화 활성에 대한 기질 특이성을 조사한 결과, toluene이 가장 유화 지수가 높은 좋은 기질로 나타났으며, *n*-Hexane이 가장 유화 지수가 낮은 것으로 나타났다.  $\alpha$ -GI의 열안정성을 조사한 결과 100°C에서 15분 가온한 후에도 유화 활성에 변화가 없어 열에 안정한 것으로 판단되었으며, pH 안정성은 pH 4~10까지 넓은 범위에서 안정된 것으로 나타났으며 고농도(32%)의 NaCl 하에서도 유화 지수가 변화 없었다.

**감사의 말씀**

본 논문은 2008년도 농촌진흥청의 수확 후 관리연구사업단의 연구비 지원에 의하여 연구되었으며 이에 감사드립니다.

**참고문헌**

- Lang, S. : Biological amphiphiles (microbial biosurfactants). *Curr Opin. Colloid. Interface. Sci.* **7**, 12 (2002).
- Lang, S. : Surfactants produced by microorganisms. In: K. Holmberg, Editor, *Novel surfactants preparation, applications, and biodegradability*, Dekker, New York, 279 (2003).
- Makkar, R. S. and Cameotra, S. S. : An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **58**, 428 (2002).
- Rodrigues, L., Teixeira, J., Oliveira, R. and van der Mei, H. C. : Response surface optimization of the medium components for the production of biosurfactants by probiotic bacteria. *Process. Biochem.* **41**, 1 (2006).
- Batista, S. B., Mounteer, A. H., Amorim, F. R. and Totola, M. R. : Isolation and characterization of biosurfactant/bioemulsifier-producing bacteria from petroleum contaminated

- sites. *Bioresour. Technol.* **97**, 868 (2006).
- 6) Banat, I. M., Makkar, R. S. and Cameotra, S. S. : Potential commercial applications of microbial surfactants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **53**, 495 (2000).
  - 7) Cunha, C. D., do Rosario, M., Rosado, A. S. and Leite, S. G. F. : *Serratia* sp. SVGG16: a promising biosurfactant producer isolated from tropical soil during growth with ethanol-blended gasoline. *Process. Biochem.* **39**, 2277 (2004).
  - 8) Doong, R. A. and Lei, W. G. : Solubilization and mineralization of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Pseudomonas putida* in the presence of surfactant. *J. Hazard. Mater.* **96**, 15 (2003).
  - 9) Kim, S. H., Lim, E. J., Lee, S. O., Lee, J. D. and Lee, T. H. : Purification and characterization of biosurfactants from *Nocardia* sp. L-417. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **31**, 249 (2000).
  - 10) Kitamoto, D., Isoda, H. and Nakahara, T. : Functions and potential applications of glycolipid biosurfactants-from energy-saving materials to gene delivery carriers. *J. Biosci. Bioeng.* **94**, 187 (2002).
  - 11) Nitschke, M., Costa, S. G. and Contiero, J. : Rhamnolipid surfactants: an update on the general aspects of these remarkable biomolecules. *Biotechnol. Prog.* **21**, 1593 (2005).
  - 12) Chen, P., Pickard, M. A. and Gray, M. R. : Surfactant inhibition of bacterial growth on solid anthracene. *Biodegradation* **11**, 341 (2000).
  - 13) Mata-Sandoval, J. C., Karns, J. and Torrents, A. : Influence of rhamnolipids and triton X-100 on the desorption of pesticides from soils. *Environ. Sci. Technol.* **36**, 4669 (2002).
  - 14) Mulligan, C. N., Yong, R. N. and Gibbs, B. F. : Surfactant-enhanced remediation of contaminated soil: a review. *Eng. Geol.* **60**, 37 (2001).
  - 15) Benincasa, M., Abalos, A., Oliveira, I. and Manresa, A. : Chemical structure, surface properties and biological activities of the biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* LBI from soapstock. *Antonie van Leeuwenhoek* **85**, 1 (2004).
  - 16) Bonilla, M., Olivaro, C., Corona, M., Vazquez, A. and Soubes, M. : Production and characterization of a new bioemulsifier from *Pseudomonas putida* ML2. *J. Appl. Microbiol.* **98**, 456 (2005).
  - 17) Nitschke, M., Costa, S. G., Haddad, R., Goncalves, L. A., Eberlin, M. N. and Contiero, J. : Oil wastes as unconventional substrates for rhamnolipid biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI. *Biotechnol. Prog.* **21**, 1562 (2005).
  - 18) Costa, S. G., Nitschke, M., Haddad, R., Eberlin, M. N. and Contiero, J. : Production of *Pseudomonas aeruginosa* LBI rhamnolipids following growth on Brazilian native oils. *Process. Biochem.* **41**, 483 (2006).
  - 19) Rau, U., Nguyen, L. A., Schulz, S., Wray, V., Nimtz, M. and Roeper, H. : Formation and analysis of mannosylerythritol lipids secreted by *Pseudozyma aphidis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **66**, 551 (2005).
  - 20) Morn, A. C., Olivera, N., Commendatore, M., Esteves, J. L. and Sieriz, F. : Enhancement of hydrocarbon waste biodegradation by addition of a biosurfactant from *Bacillus subtilis* O9. *Biodegradation* **11**, 65 (2000).
  - 21) Rosenberg, E., Rubinovitz, C., Legmann, R. and Ron, E. Z. : Purification and chemical properties of *Acinetobacter calcoaceticus* A2 biodispersant. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 323 (1987).
  - 22) Adamczak, M. and Bednarski, W. : Influence of medium composition and aeration on the synthesis of biosurfactants produced by *Candida antarctica*. *Biotechnol. Lett.* **22**, 313 (2000).
  - 23) Cavaleiro, D. A. and Cooper, D. G. : The effect of medium composition on the structure and physical state of sophorolipids produced by *Candida bombicola* ATCC 22214. *J. Biotechnol.* **103**, 31 (2003).
  - 24) Kim, H. S., Jeon, J. W., Lee, H. W., Park, Y. I., Seo, W. T. and Oh, H. M. : Extracellular production of a glycolipid biosurfactant, mannosylerythritol lipid, from *Candida antarctica*. *Biotechnol. Lett.* **24**, 225 (2002).
  - 25) Kim, K. J., Yang, Y. J. and Kim, J. K. : Production of  $\alpha$ -Glucosidase inhibitor by  $\beta$ -glucosidase inhibitor-producing *Bacillus lentimorbus*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **12**, 895 (2002).
  - 26) Lee, S. C., Kim, S. H., Park, I. H., Chung, S. Y. and Choi, Y. L. : Isolation and structural analysis of bamylocin A, novel lipopeptide from *Bacillus amyloliquefaciens* LP03 having antagonistic and crude oil-emulsifying activity. *Arch. Microbiol.* **188**, 307 (2007).
  - 27) Ilori, M. O., Amobi, C. J. and Odocha, A. C. : Factors affecting biosurfactant production by oil degrading *Aeromonas* spp. isolated from a tropical environment. *Chemosphere.* **61**, 985 (2005).