

Biosurfactant의 세제 및 화장품의로의 응용 - *Norcardia*속 한 균주가 생산하는 Bioemulsifier에 대한 연구

애경산업(주) 화장품연구부
이 기 무

목 차

- I. 서 론
- II. 화장품용 계면활성제
- III. Biosurfactant의 분류 및 개발사례
- IV. *Norcardia*속 한 균주가 생산하는 Bioemulsifier
 - 1. 균주 및 배지조성
 - 2. 세포 성장곡선
 - 3. 정제과정
 - 4. 유화활성에 pH및 온도의 영향
 - 5. 표면장력 및 CMC
 - 6. 기본처방에서의 유화 안정성
- V. 결 언

I. 서 론

계면활성제 (detergent, surfactant, emulsifier)는 소수성 부분과 친수성 부분을 함께 가지는 화학구조적 특징이 있어, 계면의 표면장력을 낮추는 능력을 소유하는 물질이다. 이러한 계면은 예를들면 물-공기(액체-기체), 기름-물(액체-액체), 물-고체(Wetting과 정)등을 들 수있다. 이러한 성질때문에 계면활성제는 계면에서의 반응과 물질의 이동을 촉진시킬 수가 있다. 따라서 계면활성제가 쓰이는 용도는 의약품, 식음료, 화장품, 농약, 세제등의 산업분야에서 뿐만 아니라 일상 생필품에 이르기까지 실로 다양하다. (표1) [1, 2, 3, 4]

그러나 현재 많이 사용되고 있는 계면활성제는 생분해 및 독성 측면에서 보다 안전하고 환경에 부담을 경감할 수 있는 측면에서 새로운 성분의 연구가 계속 진행되어 오고 있으며, 대체물질중에서도, 특히 미생물 유래의 계면활성제(Biosurfactant, Bioemulsifier)는 합성제물에 비해 여러가지 장점을 가지고 있어 관심의 대상이 되고 있다. 즉, 미생물에 의해 대량생산이 가능하며, 독성이 적다는 점, 생분해가 잘되고, 화학구조에 따른 다양한 특이성을 가지고 있어 적용범위가 넓다는 점 등이 미생물 유래 계면활성제의 유리한 점이라고 할 수있다. [5]

이미 계면활성제로의 성질이 알려진 식물유래의 gum, lecithin, polysaccharides, 콩단백질 등은 식품산업에 광범위하게 사용되어 왔으며, 동물유래의 혈액이나 허파 등에서 추출한 계면활성제 역시 화장품, 세제, 치약, 껌 등에 사용되어 왔다. 이러한 많은 응용성과 장점을 가진 미생물 계면활성제 중 상품화가 되어있는 대표적인 것으로는 미국의 Petroleum 회사에서 생산하는 Emulsan으로서 기름에 오염된 탱커의 처리, 전자기판의 3차 세척용 등으로 사용되고 있다. 그외에 약 20여종의 미생물계면활성제가 특허화되어서 상품개발의 수준까지 와 있으나, 산업체사이의 경쟁 및 보완관계로 극히 일부만이 보고되고 있다. [28]

1947년 Zobell에 의해 미생물 유래의 계면활성제의 존재가 확인된 후, 많은 종류의 미생물들에서 이러한 물질의 생산이 확인되었다. Biosurfactant 혹은 bioemulsifier를 생산하는 미생물은 alkane화합물의 이용성과 생산능에 따라 아래의 3 group으로 나뉜다.

Table I : Biosurfactant Functions Most Likely to be Needed by Potential Industrial Users

Functions	Industrial Users										
	Agriculture	Building and Construction	Elastomers and Plastics	Foods and Beverages	Industrial Cleaning	Leather	Metals	Paper	Paint and Protective Coatings	Petroleum and Petrochemical Production	Textiles
Emulsification	X		X	X		X	X		X	X	X
De-emulsification										X	
Wetting, Spreading, Penetration	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Solubilization, Solids Dispersal	X		X	X						X	X
Air Entrainment, Foaming		X	X	X			X			X	
Defoaming				X				X			
Detergency				X	X	X		X		X	X
Antistatic			X						X		X
Corrosion Inhibition					X					X	

1) Alkane화합물을 기질로 이용할 경우에만 계면활성제를 생산하는 미생물 [10, 11]

Corynebacterium sp., *Arthrobacter sp.*, *Nocardia sp.* 등

2) Alkane화합물 및 수용성 화합물을 기질로 사용하였을 경우 모두 계면활성제를 생산하는 미생물. [18, 19 20, 21]

Pseudomonas aeruginosa, *Corynebacterium hydrocarboclastus*, *Torulopsis sp* 등

3) 수용성 화합물을 기질로 이용하였을 경우에만 계면활성제를 생산하는 미생물. [22, 23]

Rhodotorula sp., *Hansenula sp.*, *Bacillus sp.* 등

미생물에 의해서 생산되는 계면활성제의 대부분은 lipids이다. 이들은 지방산과 같은 탄화수소로 구성된 소수성 부분과 ester, alcohol, phosphate, sugar등과 같은 친수성 부분의 조합에 의해서 계면활성제로서의 기능을 갖는다. 미생물 계면활성제는 친수성기의 종류에 따라 다음 5가지로 분류될 수 있다.

1) Carbohydrate-containing surfactants (Glycolipids)

trehalose lipids, rhamnolipids, sophorose lipids,
diglycosyl diglycerides 등

2) Amino acid-containing surfactants

lipopeptides (subtilisin, surfactin), ornithin lipids,
proteins

3) Phospholipids

4) Fatty acids and Neutral lipids

mycolic acids 등

5) Polysaccharide-lipid complex

emulsan 등

대부분의 미생물 계면활성제는 exolipid로서 이들의 분비는 세포의 metabolic state에 의존하여 life cycle중 특정시기(대수증식기 말기, 정지기)에 이루어지며, 합성기작은 잘 알려져있지 않으나 secondary metabolite와 overflow-metabolism, intermediates가 관여하는 것으로 알려져 있고, 배지상의 C:N, C:P비에 의존하는 것으로 알려져 있다. [2]

n-alkane을 탄소원으로 하여 생육하는 미생물의 경우 이들에 의해 생산된 계면활성제는 배지중의 alkane 화합물을 미세한 기름입자로 유화시켜 cell과 기질과의 접촉면을

넓힘으로서 보다 쉽게 분해될 수 있도록 하며, 이러한 사실은 유류 유출에 의한 해양 오염의 경우에 응용될 수 있음을 시사한다. [24, 25]

따라서 계면활성제 중 그 응용성이 가장 큰 이러한 bioemulsifier는 현재까지 문제시 되어온 합성제품의 대체물질로서 그 사용이 확대될 것으로 생각되며, 또한 폐수처리, 토양의 재활성화, 유류 유출에 의한 해양의 오염문제, oil-recovery등에도 그 응용성이 크게 기대된다고 할 수 있다. [24, 25, 26]

본 내용에서는 화장품에서 사용되고 있는 유화제 및 미생물계 계면활성제의 개발등에 대해 간단히 알아보고 *Nocardia*속 한 균주부터 분리된 bioemulsifier의 화장품으로의 응용을 위한 기초연구 내용을 간단히 소개하고자 한다.

II. 화장품용 계면활성제

화장품에 있어서 계면활성제는 화장품의 제형형성을 위해 꼭 필요한 성분으로서 특히 유화제와 가용화 및 분산 제품과 같은 화장품 제형에서는 이의 역할이 매우 중요하다.

Table III. 대표적인 비이온 유화제와 HLB

Common Name	HLB
폴리옥시 에틸렌 20 솔비탄 모노 라우레이트	16.7
폴리옥시 에틸렌 20 솔비탄 모노 올레이트	15.0
폴리옥시 에틸렌 20 솔비탄 모노 스테아레이트	14.9
폴리옥시 에틸렌 5 솔비탄 모노 올레이트	10
폴리옥시 에틸렌 4 라우릴 에테르	9.7
솔비탄 모노 라우레이트	8.6
솔비탄 모노 스테아레이트	4.7
솔비탄 모노 올레이트	4.3
솔비탄 세스키올레이트	3.7
솔비탄 트리올레이트	1.8

인체의 피부를 대상으로 하는 화장품용 계면활성제는 피부의 각질층과 직접 작용할 수 있으므로 이들의 기능 못지않게 이들의 안전성과 생리학적 영향 역시 중요하다. 화장품에서 비이온계면활성제가 널리 사용되어 오고 있는 이유중의 하나는 이들이 피부나 눈에 부작용이 적으며 안전성이 우수하다는 데 있다. 표2는 화장품에서 주로 사용하고 있는 비이온계면활성제와 HLB 값을 나타내었다.

III. Biosurfactant의 분류 및 개발사례

표2는 biosurfactant의 분류에 따른 균주 및 HLB값을 표로 나타 내었으며, 표5와 6은 biosurfactant와 연구에 관련된 특허 및 연구현황을 나타내었다. ^[28]

IV. *Norcardia*속 한 균주가 생산하는 Bioemulsifier

4-1. 균주 및 배지조성

Table IV. The optimum culture condition for the bioemulsifier production

Medium(g/l)	n-Hexadecane	40ml
	NaNO ₃	2.0
	KH ₂ PO ₄	0.1
	K ₂ HPO ₄	0.2
	MgSO ₄ 7H ₂ O	0.1
	CaCl ₂	0.1
	Yeast Extract	0.2
	Tryptone	0.2
	pH	6.8-7.0
	Other conditions	Temperature
Culture time		5days
Agitation		120 rev, x 6cm stroke
		100ml of medium per 500ml flask

Table II : The Hydrophile-Lipophile Balance (HLB) Scale and the Calculated HLB for Some Biosurfactant Classes

Biosurfactant Class	HLB Values		Representative Producing Microbes
	W/O	O/W emulsifier	
Trehalose dimycolate and diacyl trehaloses	32	18	<i>Arthrobacter, Corynebacterium, Mycobacterium, Nocardia</i>
Diglycerides	16	14	<i>Acinetobacter, Mycobacterium</i>
Diglycosyl diglycerides	18	16 14	<i>Lactobacillus</i>
Mycolic and carboxylic acids (ionized)	60	45 18 14	<i>Acinetobacter, Corynebacterium, Micrococcus, Nocardia, Pseudomonas, Acinetobacter, Mycobacterium</i>
Monoglycerides	18 14	14	
Sophorose lipids	21	16	<i>Torulopsis yeasts</i>
Rhamnolipids		R1 R2	<i>Arthrobacter, Pseudomonas</i>
Diacyl phosphatidic acids		20 18	<i>Corynebacterium</i>



* Numbers for each class indicate carbon chain length of the hydrophobic moiety
 * Typical producing organisms are shown : see COOPER ZAJIC (1980) for other producing species and biosurfactant structures

Table IV. : Patents Related to Biosurfactants

Product	Microorganism	Patent
Emulsan	<i>Arthrobacter sp.</i> ATCC31012	Biotechnol. Aktienges., US 4,276,094(1981)
Biosurfactant	<i>Corynebacterium hydroblastus</i> NRRL-B-5631	CPDL, US3,997,398(1976)
Biosurfactant	<i>Arthrobacter, Bacillus,</i> <i>Corynebacterium, Nocardia,</i> <i>Pseudomonas</i>	CPDL, CA1,114,759(1981)
Biosurfactant	<i>Arthrobacter RAG 1</i>	Gutnick, D.,Rosenberg,E.DE 2,415,897(1987)
Lipopeptide	<i>Methylomonas clara</i> ATCC 31226	Hoescht AG,DE3,312,166(1984)
Biosurfactant	<i>Penicillium spiculispurum</i>	Inoue-Japax Research Inc.,Jpn Kokai 7837,189(1987)
Sophorose lipid	<i>Torulopsis bombicola</i>	Kao Soap Ltd.,DE2,834,118 (1979),DE2,938,383(1980), Jpn, Kokai Tokyo Koho 8192,786(1981),EP 0005004 (1983)
Glycolipids (trehalose lipids)	<i>Arthrobacter paraffineus</i> ATCC 15591 <i>Corynebacterium</i> <i>hydroblastus</i> ATCC 15592	Kyowa Hakko Kogyo Co.,Ltd. DE 1,905,472(1970),US 3,637,461(1972)
Fructose lipid	<i>Arthrobacter paraffineus</i> ATCC 15591	Kyowa Hakko Kogyo Co.,Ltd, DE2,445,472(1975)
Spiculisporic acid	<i>Penicillium spiculispurum</i> ATCC16071	Kobayashi, T., Tabuchi, T., US 3,625,826(1971)
Biosurfactant	<i>Thiobacillus, Bacillus,</i> <i>Nocardia, Pseudomonas</i>	Phillips Petroleum Co. US 2,907,389(1959)US 3,185,216(1965)
Emulsan	<i>Acinetobacter sp.</i> ATCC 31012	Petroleum Fermentation N.V US 4,311,829(1982),US 4,311,832(1982)
Sophorose lipid	<i>Torulopsis magnoliae,</i> <i>Torulopsis apicola</i>	Spencer, J.F.T., Tullich, A.P., Gorin P.A.J., US3,205.150 (1965)
Surfactin	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC21331	Takeda Chemical Ind.Ltd, US 3,687,926(1972)
Biosurfactant	<i>Candida</i>	VEB Petrol-chemisches Kombinant Schedt, DD 139,069(1979)
Biosurfactant	<i>Candida, Pichia, Nocardia,</i> <i>Mycobacterium,</i> <i>Pseudomonas</i>	Wintershall AG, DE2,401,267 (1975),DE2,843,685(1980), DE2,911,016(1980)
Trehalose lipid	<i>Rhodococcus erythropolis</i> DSM43215	Wintershall AG, DE3,248,167 (1984)
Biosurfactant	<i>Corynebacterium salvinum</i>	Zajic, J.E., Gerson, R. K. US 4,355,109(1982)

Table V. : Patents Related to Biosurfactants

Product	Microorganism	Patent
Emulsan	<i>Arthrobacter sp.</i> ATCC31012	Biotechnol. Aktienges., US 4,276,094(1981)
Biosurfactant	<i>Corynebacterium hydroblastus</i> NRRL-B-5631	CPDL, US3,997,398(1976)
Biosurfactant	<i>Arthrobacter, Bacillus,</i> <i>Corynebacterium, Nocardia,</i> <i>Pseudomonas</i>	CPDL, CA1,114,759(1981)
Biosurfactant	<i>Arthrobacter RAG 1</i>	Gutnick, D.,Rosenberg,E.DE 2,415,897(1987)
Lipopeptide	<i>Methylomonas clara</i> ATCC 31226	Hoescht AG,DE3,312,166(1984)
Biosurfactant	<i>Penicillium spiculisporum</i>	Inoue-Japax Research Inc.,Jpn Kokai 7837,189(1987)
Sophorose lipid	<i>Torulopsis bombicola</i>	Kao Soap Ltd.,DE2,834,118 (1979),DE2,938,383(1980), Jpn, Kokai Tokkyo Koho 8192,786(1981),EP 0005004 (1983)
Glycolipids (trehalose lipids)	<i>Arthrobacter paraffineus</i> ATCC 15591 <i>Corynebacterium</i> <i>hydroblastus</i> ATCC 15592	Kyowa Hakko Kogyo Co.,Ltd. DE 1,905,472(1970),US 3,637,461(1972)
Fructose lipid	<i>Arthrobacter paraffineus</i> ATCC 15591	Kyowa Hakko Kogyo Co.,Ltd, DE2,445,472(1975)
Spiculisporic acid	<i>Penicillium spiculisporum</i> ATCC16071	Kobayashi, T., Tabuchi, T., US 3,625,826(1971)
Biosurfactant	<i>Thiobacillus, Bacillus,</i> <i>Nocardia, Pseudomonas</i>	Phillips Petroleum Co. US 2,907,389(1959)US 3,185216(1965)
Emulsan	<i>Acinetobacter sp.</i> ATCC 31012	Petroleum Fermentation N.V US 4,311,829(1982),US 4,311,832(1982)
Sophorose lipid	<i>Torulopsis magnoliae,</i> <i>Torulopsis apicola</i>	Spencer, J.F.T., Tullich, A.P., Gorin P.A.J., US3,205.150 (1965)
Surfactin	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC21331	Takeda Chemical Ind.Ltd, US 3,687,926(1972)
Biosurfactant	<i>Candida</i>	VEB Petrol-chemisches Kombinant Schedt, DD 139,069(1979)
Biosurfactant	<i>Candida, Pichia, Nocardia,</i> <i>Mycobacterium,</i> <i>Pseudomonas</i>	Wintershall AG, DE2,401,267 (1975),DE2,843,685(1980), DE2,911,016(1980)
Trehalose lipid	<i>Rhodococcus erythropolis</i> DSM43215	Wintershall AG, DE3,248,167 (1984)
Biosurfactant	<i>Corynebacterium salvinum</i>	Zajic, J.E., Gerson, R. K. US 4,355,109(1982)

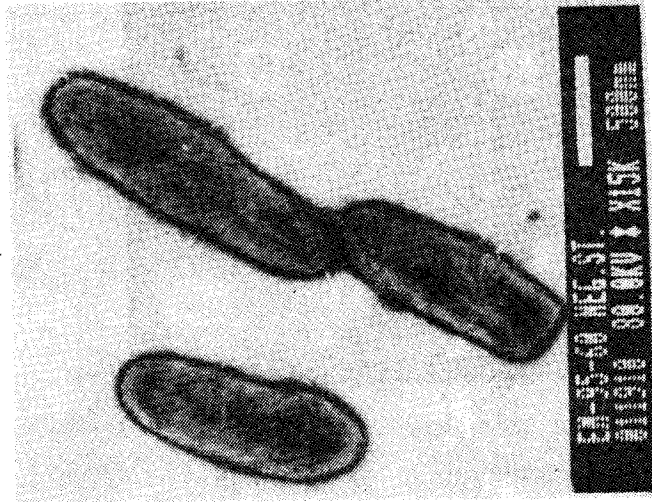


Figure 2. Electron micrograph of negatively stained *Nocardia* sp. BE-294. (x 15,000)

4-2. 세포성장곡선

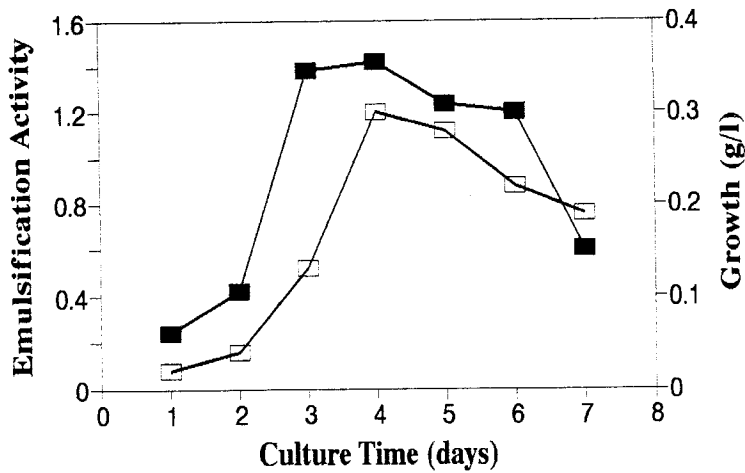


Figure 3. Time course of growth and emulsification activity.

2ml seed culture was inoculated to shaking flask containing 100ml of the optimum medium and cultivated at 30°C on a reciprocal shaker.

■ : Emulsification activity, □ : Growth (g/l)

4-3. 정제과정

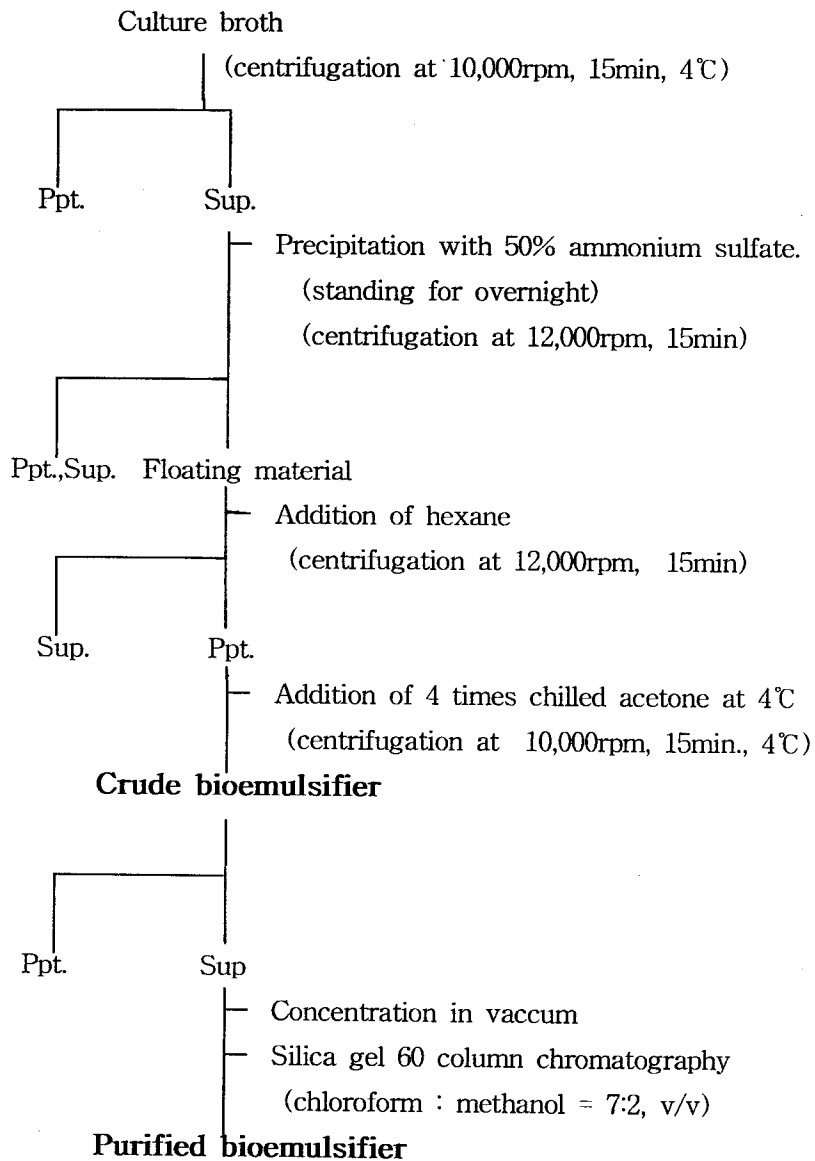


Figure 4. Purification scheme of the bioemulsifier produced by *Nocardia* sp. BE-294.

4-4. 유화활성에 pH 및 온도의 영향

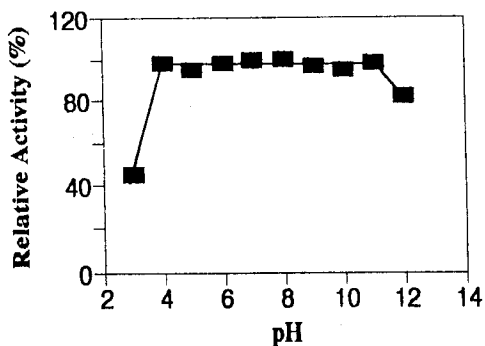


Figure 6. Effect of pH on the emulsification activity.

The emulsification activity was measured at pHs ranging from 3 to 12 at room temperature.

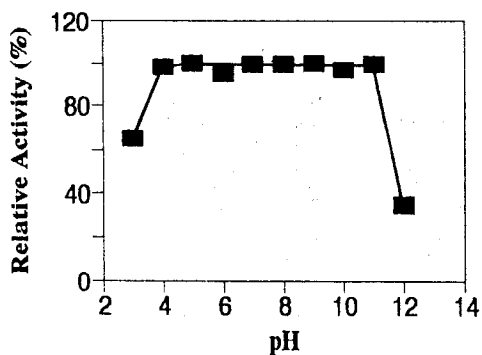


Figure 7. Effect of pH on the bioemulsifier stability.

After the bioemulsifier solution (0.02%, w/v) was adjusted to different pHs ranging from 3 to 12 at room temperature and standed during 48hrs, the remaining emulsification activity was measured.

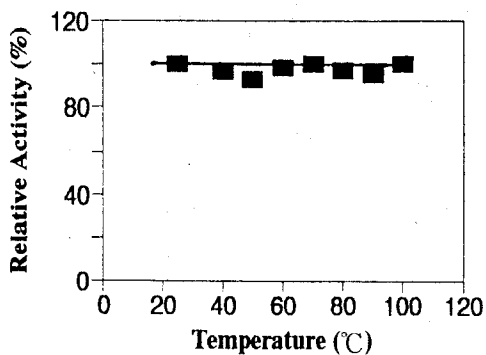


Figure 8. Effect of temperature on the bioemulsifier stability.

After the bioemulsifier solution (0.02%, w/v) was adjusted to different temperature ranging from 20°C to 100°C at pH 7 and standed during 30 min, the remaining emulsification activity was measured.

4-5. 표면장력 및 CMC

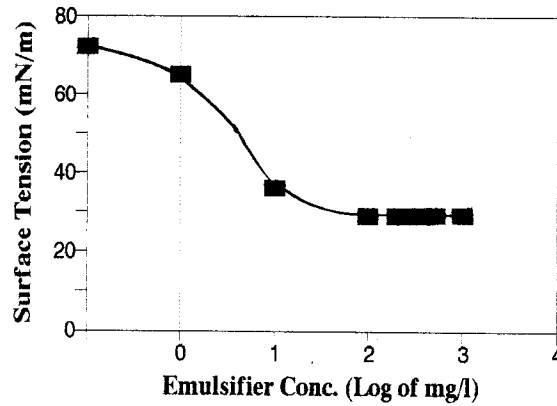


Figure 9. Semilogarithmic plot of surface tension of the solution against the bioemulsifier concentration.

4-6. 기본처방에서의 유화안정성

Table VII. : Formula of O/W emulsion (wt %)

Ingredients \ Formula	I	II	III
Liquid paraffin	40.0	60.0	80.0
Emulsifier*	1.0	1.0	1.0
Distilled water	To 100	To 100	To 100

Emulsifier * 1 : Bioemulsifier

2 : Polysorbate 85 (ICI, U.S.A)

3 : Polysorbate 60/Sorbitan Sesquioxide (60:40)

4 : Polysorbate 60/Sorbitan Sesquioxide (50:50)

5 : Polysorbate 60/Sorbitan Sesquioxide (40:60)

Table VII. Results of emulsion stability test

Emulsifiers \ Formula	Emulsion Stability(%)		
	I	II	III
1. Bioemulsifier	100	100	100
2. Polysorbate 85 (ICI, U.S.A)	100	100	-*
3. Polysorbate 60/Sorbitan Sesquioleate(60:40)	-	-	-
4. Polysorbate 60/Sorbitan Sesquioleate(50:50)	-	-	-
5. Polysorbate 60/Sorbitan Sesquioleate(40:60)	-	-	-

-* : No stable emulsion was formed.

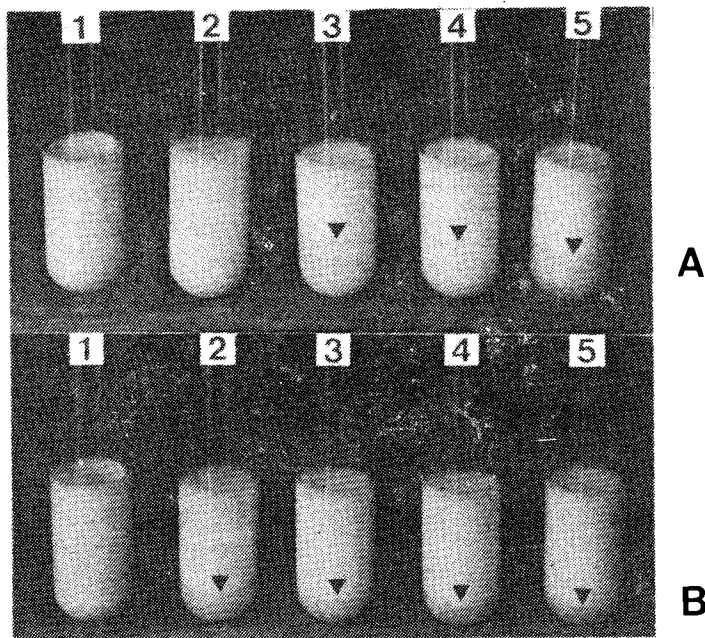


Figure 10. Photograph of liquid paraffin-in-water emulsions formed by the bioemulsifier(1) and commercialized emulsifiers (2,3,4,5). ▼ indicates a boundary between the stable phase and the separated phase of the O/W emulsion. A : Formula-II, B : Formula-III

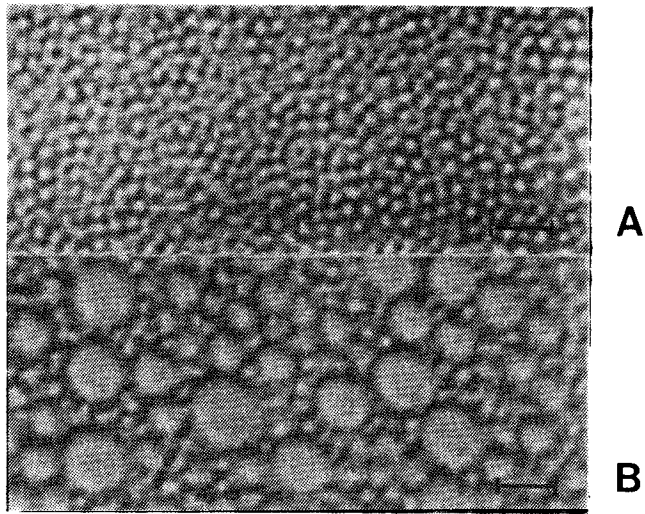


Figure 11. Light micrograph of the droplets of liquid paraffin-in-water emulsions formed by the bioemulsifier (A) and Polysorbate 85 (B). (indicator bar : $5\mu\text{m}$)

V. 결 언

이상으로 biosurfactant의 개발사례에 대해 간단히 알아보았으며, 토양으로부터 분리한 *Norcardia*속 한 균주로부터 bioemulsifier 생산을 위한 배양조건과 생성물질의 분리 및 정제를 행하여 이물질의 작용특성 및 화장품에서 그 응용 가능성을 검토하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 분리 정제된 bioemulsifier는 glycolipid로 추정되었으며,
2. 본 bioemulsifier의 CMC는 20mg/l 이었고 이점에서 표면장력은 29mN/m 이었다.
3. 또한 본 bioemulsifier는 간단한 기본처방에서 좋은 유화상태 및 안정성을 보였다.

VI. 참고문헌

1. Kosaric, N., N.C.C Gray and W.L. Cairn, Microbial Emulsifiers and De-emulsifiers, *Biotechnology*, Vol 3, 575, Verlag Chemie(1983).
2. Haferburg, D., R. Hommel, etc., Extracellular Microbial Lipids as Biosurfactants, *Advan Biochem Engineer. Biotechnol.*, 33, 53-93
3. Kim, W.K. and E.K. Kim, Effects of Culturing Parameters on the Production of Microbial Biosurfactant from *Candida bombiocola*, *Kor.J.Biotechnol.Bioeng.*,7(2), 102(1992)
4. Kim, W.K. and E.K. Kim, Application of Biosurfactant (Sophorolipid) Produced from *Candida bombiocola*, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.*,7(2), 107(1992)
5. Parkinson, M., Biosurfactants, *Biotech Adv.*, 3, 65 (1985).
6. Zajic, J.E. and C.J. Panchal, Bio-emulsifiers, *CRC Crit. Rev. Microbiol.*, Nov., 39 (1976)
7. Magaritis, A., J.E. Zajic and D.F. Gerson, Production and Surface-Active Properties of Microbial Surfactants, *Biotech Bioeng.*, 21, 1151-1162 (1979)
8. Yoon, Y.K. and K.S. Choi, Studies on Physical Behavior of Alkyl Polyglucosides (I)-Interfacial Activities and Detergency-, *J. Korean Ind. Eng. Chem.*, 5(3), 451-456 (1994).
9. Findlay, J.B.C and W.H. Evans, *Biological membranes*, IRLpress (1987).
10. Cooper, D.G., J.E. Zajic and D.F. Gerson Production of Surface Active Lipids by *Corynebacterium lepus*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 37, 4 (1979)
11. Powalla, M., S. Long and V. Wary, Penta- and disaccharide lipid formation by *Nocardia corynebacterioids* grown on n-alkanes, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 31, 472 (1989).
12. Cirigliano, M.C. and G.M. Carman, Isolation of a Bioemulsifier from *Candida lipolytica*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 46(4), 747-750 (1984).

13. Cirigliano, M.C. and G.M. Carman, Purification and Characterization of Liposan, a Bioemulsifier from *Candida lipolytica*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 50(4), 847-850 (1985).
14. Sheppard, J.D. and C.N. Mulligan, The production of surfactin by *Bacillus subtilis* grown on peat hydrolysate, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 27 110-116 (1987).
15. Chaplin, M.F. and J.F. Kennedy, Carbohydrate analysis, IRL press. (1986).
16. Lissant, K.J., Emulsions and Emulsion Technology, vol.6, Dekker. (1974).
17. Zosim, Z., D. Gutnick and E. Rosenberg, Properties of Hydrocarbon-in-Water Emulsions Stabilized by *Acinetobacter* RAG-1 Emulsan, *Biotech. Bioeng.*, 26, 281-292 (1982)
18. Reddy, P.G., H.D. Singh, etc., Isolation and Functional Characterization of Hydrocarbon Emulsifying Solubilizing Factors Produced by a *Pseudomonas* Species, *Biotech. Bioeng.*, 25, 387 (1983).
19. Persson, A., E. Osterberg and M. Dostalek, Biosurfactant Production by *Pseudomonas fluorescens* 378 : growth and product characteristics, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 29, 1 (1988).
20. Copper, D.G. and D.A. Paddock, Production of a biosurfactant from *Tolulopsis bombicola*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 46, 1426 (1984).
21. Hommel, R., O. Stüwer, etc, Production of water-soluble surface-active exolipids by *Tolulopsis apicola*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 26, 199 (1987).
22. Copper, D.G., C.R. Macdonald, etc, Enhanced Production of Surfactin from *Bacillus subtilis* by Continuous Product Removal and Metal Cation additions, *Appl. Environ. Microbiol.*, 42(3), 408 (1981)
23. Javaheri, M., Jenneman, G.E., etc, Anaerobic Production of a Biosurfactant by *Bacillus licheniformis* JF-2, *Appl. Environ. Microbiol. Bioeng.*, 16(5), 698(1985)
24. Park, J.Y., I.S. Park, etc, Emulsification of Bunker-C Oil by a Marine Bacterium *Achromobacter* sp. M-1220, *Kor.J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, 16(5), 384 (1988).

25. Gutnick, D.L. and E. Rosenberg, Oil tankers and pollution : a microbiological approach, *Ann. Rev. Microbiol.*, 31, 379. (1977).
26. Ahearn, G.P., Surfactants for oil recovery, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 46, 540A-580A (1969).
27. Findlay, J.B.C, W.H. Evans, Biological membranes, IRL press. (1987).
28. Klekner, V., Kosaric, N., Biosurfactant for Cosmetics, Surfactant Science Series, Vol. 48, Marcell Dekker, New York, 1993, PP 373-389

