

## Biosurfactant 생산균주 *Bacillus* sp. TBM 911-5의 분리 및 특성

김선희 · 정연주 · 이상철 · 유주순 · 주우홍<sup>1</sup> · 정수열<sup>2</sup> · 최시림 · 최용락\*

동아대학교 응용생명공학부, <sup>1</sup>창원대학교 생물학과, <sup>2</sup>동주대학 식품과학계열

Received November 27, 2003 / Accepted February 21, 2004

**Isolation and Characteristics of Biosurfactant Producing Bacterium, *Bacillus* sp. TBM 911-5.** Kim Sun-Hee, Youn-Ju Jung, Sang-Cheol Lee, Ju-Soon Yoo, Woo-Hong Joo<sup>1</sup>, Soo-Yeol Chung<sup>2</sup>, Si-Rim Chok and Yong-Lark Choi\*. Department of Biotechnology, Faculty of Natural Resources and Life Science, Dong-A University, Busan 604-714, Korea, <sup>1</sup>Dept. of Biology, Chang-Won University, Chang-Won, Korea, <sup>2</sup>Dept. of Food Science, Dong-Ju College, Busan 604-715, Korea – The objective of this study was investigate the characteristic of biosurfactant produced from the isolated strain. The strain was isolated from soil samples and identified as *Bacillus* sp. TBM 911-5 by physiological characteristics and the partial nucleotide sequence analysis of 16S rDNA. We measured the surface tension every 6 hours for 80 hours. The surface tension of the culture filtrate of *Bacillus* sp. TBM 911-5 was decreased to 29 mN/m. Biosurfactant concentration was determined by diluting the culture filtrate until the critical micelle concentration (CMC). The biosurfactant emulsified hydrocarbons, vegetable oil and crude oil. Using soybean oil as substrate, the maximum emulsification activity and stability was obtained from the biosurfactant. The biosurfactant produced from *Bacillus* sp. TBM 911-5 had strong properties as an emulsifying agent and an emulsion-stabilizing agent.

**Key words** – *Bacillus* sp. TBM 911-5, biosurfactant, emulsifying activity, emulsifying stability

각종 생물이 생산하는 생분해성 계면활성제는 biosurfactant라고 불리며 미생물의 경우에는 균주에 따라 세포의 또는 세포내에서도 생성하는 것으로 알려져 있다[12]. Biosurfactant가 화학합성 계면활성제에 대해 가지는 장점은 첫째, 무독성이며 생분해가 용이하며 따라서 이를 사용한 경우 이차오염원이 안 된다는 것이다. 둘째, 기존의 방법으로는 합성하기 어려운 복잡한 화학구조로 인해서 특수한 목적으로 사용될 수 있다는 점이다. 셋째, 표면장력 저하능력, 온도, pH에 대한 안정성 등 계면활성제의 물리·화학적 성능 면에서 기존의 화학합성 계면활성제와 거의 대등한 결과를 보인다는 점이다[13]. 이러한 미생물 계면활성제의 소수성부분은 대개 선형 포화 탄산수소로 이루어지며 친수성부분은 당 또는 아미노산으로 구성되며, glycolipids, lipopeptides, lipoproteins, neutral lipids, phospholipids, substituted fatty acids와 lipopolysaccharides 같은 종류들이 있다. 매우 효과적인 lipopeptide type의 biosurfactant와 surfactin이 *Bacillus subtilis* 종에서 최초로 보고 되었으며, 그 후로 여러 종류의 표면활성성과 항균활성을 가지는 lipopeptide가 *Bacillus* 속에서 발견되고 있다[4,5].

화학합성 계면활성제들 대부분이 자체적으로 생분해가 안 되어 환경오염의 원인이 되는 것으로 보고되고 있다. 따라서 이러한 문제점을 무독성이며 생분해가 용이한 환경친화적 biosurfactant로 대체함으로써 환경오염을 감소시킬 수 있고,

더 나아가 biosurfactant는 화장품, 의약품, 식품, 세제, 펄프 및 제지, 원유의 2차 회수 및 환경정화 등 다양한 분야에서 광범위하게 응용될 수 있다. 최근, 황 등[6,11,12,19]은 *P. aeruginosa*, *Nocardia* sp. 균에서 생산된 biosurfactant의 계면활성능 측정, 분리 및 구조분석 등의 산업적 이용을 위한 기초연구가 이루어지고 있다. 토양 및 해양의 유류오염 제어에 위한 처리 방법 중의 하나인 생물학적 방법으로는 해양의 유류 오염물질인 cyclo-alkane 계열의 탄화수소원과 원유(crude oil) 및 경유, 중유 등의 석유제품에 대한 다양한 탄화수소원의 기질을 분해 시키는 균주를 분리, 동정하여 실제로 오염현장에 적용되고 있다[8,9,14,19]. 이러한 유류 분해의 해양 미생물로서는 *Aeromonas*, *Arthrobacter*, *Corollospora*, *Dendryphiella*, *Pseudomonas* 등이 대부분을 차지하고 있으며[9,19], 또한 이들 균주가 생산하는 유화제 등이 분리 정제되어 실제로 이용되고 있다.

본 연구에서는 해양 원유 분해용 등의 다양한 용도에 사용할 생물유화제 개발을 위한 기초 자료를 얻는 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

Biosurfactant 생성 미생물을 분리하기 위한 배지는 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,

#### \*Corresponding author

Tel : +82-51-200-7585, Fax : +82-51-200-6536

E-mail : ylchoi@daunet.donga.ac.kr

MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.2 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1g/L, CaCl<sub>2</sub> 10 mg/L, FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 10 mg/L, NaCl 30g/L, yeast extract 0.2g/L 및 trace element 용액 2 mL (MoO<sub>3</sub> 1 mg/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 7.0으로 조정하여 사용하였다. 탄소원은 원유 또는 식용유를 1% 첨가한 C-배지에 채취한 시료의 회석 액을 1% 첨가하여 7일간 진탕 배양하여 생육된 균을 새로운 C-배지에 균주 및 원유를 각각 1%로 첨가하여 다시 배양하였다. 이렇게 3회 반복하여 생육시킨 단일콜로니를 LB-고체배지에 도말하여 37°C에서 배양하였다. 선별된 단일 균주를 LB 액체배지에서 각각 전 배양시킨 후, tributyrin이 첨가된 배지에 배양한 후 투명한이 생성된 것을 우수한 균주로 보아 단일 콜로니를 선별하였다.

### 선별된 균주의 동정

분리된 균주를 선별하기 위하여 형태학적, 생리학적 및 생화학적 특성을 조사하여 Bergey's manual 의 systematic bacteriology [7]에 준하여 동정하였다. 정확한 동정을 위하여 PCR 실험으로 얻어낸 선별된 균주의 16S rDNA의 염기서열을 결정하여 비교분석하였다. PCR 반응에서는 다음과 같은 2개의 oligonucleotide primer를 작성하여 표준적인 PCR 반응으로 증폭된 DNA를 얻었다.

5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' (*E. coli* 16S rDNA의 9-27), 5'-AGAAAGGAGGTGATCCAGCC-3' (*E. coli* 16S rDNA의 1,542-1,525)

### 균주의 생육

선별된 균주의 생육정도를 조사하기 위하여, 500 ml 삼각 플라스크에 각종 탄소원이 함유된 C-배지를 200 ml 넣고, LB 배지에서 전 배양시킨 균주를 접종하여 25°C, 32°C, 37°C 및 42°C에서 각각 200 rpm으로 진탕 배양한 배양액을 일정량 취하여 UV-VIS spectrophotometer를 사용하여 600 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 표면장력 측정

LB 또는 C-배지에 균주를 액체 배양하여 배양시간에 따라 경시적으로 채취한 시료를 원심분리 하여 균체를 제거한 배양 상등액을 여과한 후, 생성된 biosurfactant에 의해 변화된 표면장력의 값을 DeNouy Tensiometer (Itoh Seisakusho, Japan)의 ring method를 이용하여 3회 반복하여 측정된 평균값을 표시하였다[2].

### Biosurfactant의 추출

*Bacillus* sp. TBM 911-5을 전 배양한 용액을 2 L의 배양배지에 재접종하여 37°C에서 4일간 진탕배양 하였다. 배양용액

은 10,000 rpm, 4°C에서 원심분리하여 균체를 제거한 상등액에 진한 염산을 서서히 가하면서 pH가 2.0이 되게 조정하여 4°C에 하룻밤 방치시켜 두면서 biosurfactant를 침전시켰다. 원심분리하여 침전물을 회수하고, 알칼리성 수용액(pH 8.0 with 0.1N NaOH)에 용해하여 동결건조 시켰다. 건조된 물질을 methanol로 추출하여 농축한 것을 부분 정제한 biosurfactant로 사용하였다[6].

### 유화활성 및 안정성 측정

일반적으로 사용되는 화학 계면활성제와 소수성 탄화수소의 oil 성분에 대해 biosurfactant 용액시료의 유화활성 및 유화안정성 시험은 Cirigliano와 Carman의 방법[2,3]에 따라서 실시하였다. 배양용액을 Millipore 0.2 µm 여과 막을 통과시켜 멸균시킨 것을 biosurfactant 용액으로 하였다. 여과액 2 ml를 마개 있는 시험관에 넣고, pH 3.0의 0.1 M sodium acetate 완충액 2 ml와 혼합한 용액에 1 ml의 기질을 넣고 2 분간 최고속도로 vortex mixing 한 후 10분 간 정지한 후 540 nm에서 현탁도를 측정하였다. 유화안정성은 유화활성 측정 시와 동일한 방법으로 처리한 후에, 실온에 방치하면서 변화된 활성을 매 10분마다 1시간 동안 540 nm에서 현탁도를 측정 후 Log 값으로 환산하여 나타내고, 그 때의 기울기를 유화활성의 안정도는 상수  $K_d$  (시간당 붕괴되는 유화력의 기울기 값)으로 나타내었다.

## 결과 및 고찰

### 균주의 분리

태백산에서 채취한 토양 sample로부터 biosurfactant 생성이 우수한 미생물을 분리하기 위하여 탄소원이 결핍된 C-배지 200 ml에 탄소원으로 원유 및 식용유를 1% 되게 첨가하여 37°C, 200 rpm으로 7일간 진탕 배양한 후, 원유 분해능 및 유화제 생성 능을 가진 세균이 생육하는 것을 확인하였다. 이렇게 3회 반복하여 생육한 균주를 LB-고체배지에 도말하여 37°C에서 배양하여 수십 종의 단일 콜로니를 선별하였다. 선별된 단일 균주를 LB 액체배지에서 각각 전 배양시킨 후, tributyrin이 첨가된 배지에 배양한 후 투명한이 생성능이 우수한 균주를 계속하여 단일콜로니를 선별하였다. 이 단일 콜로니들을 LB 액체배지에 접종하여 37°C에서 전 배양시킨 후, 원유 분해능 및 tributyrin 분해능을 가진 수십 종의 균주를 분리하였으며, 이 중에서 분해능이 강력한 TBM 911-5 균주에 대하여 계속하여 실험하였다.

### 균주의 동정

선별된 TBM 911-5는 그램 염색법에 의해서 그램 양성균으로 확인되었으며, 주사전자현미경(SEM; Scanning electron microscopy) 관찰에 의하여 형태가 간균으로 관찰되었다. 분리 균은 포자형성 능을 가졌으며, 당과 아미노산의 이용성

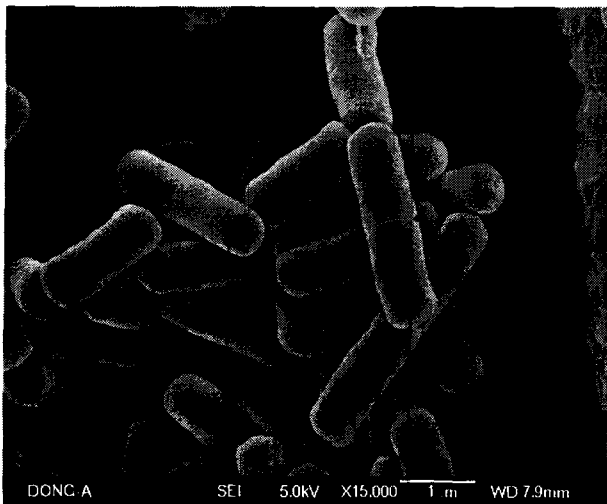


Fig. 1. Scanning electron micrograph of the isolated strain, *Bacillus* sp. TBM 911-5 ( $\times 15,000$ ).

등의 생리 및 생화학적 특성을 조사한 결과 Bergey's manual 에 따라 *Bacillus* 속으로 추정되었다. 분리균주의 정확한 동정을 위하여 염색체 DNA 재료 및 방법에 나타낸 2개의 oligo-nucleotide primer를 사용하여 PCR을 수행하고 16S rDNA 를 획득하여 부분적인 염기서열을 결정하였다.

그 결과 TBM 911-5의 염기서열은 *Bacillus subtilis* 와 99%의 상동성을 나타내었고, *Bacillus valismortis*와도 99%의 상동성을 나타내었으므로 *Bacillus* sp. TBM 911-5로 명명하였다. 우리나라 및 외국의 경우 유류 분해 및 유화제생성 균으로 주로 분리되고 있는 균주로는 *Pseudomonas* sp., *Aeromonas* sp., *Acinetobacter* sp., *Klebsiella* sp., *Bacillus* sp. 및 *Arthrobacter* sp. 등이 보고 되고 있으며, TBM 911-5는 본 연구에서 보고한 *Bacillus* sp.와는 형태학적 및 생화학적 특성이 약간 상이하여 신규의 biosurfactant 생성 가능성을 보여 생산 및 유화 특성을 조사하였다[1,8,12,17].

**Biosurfactants의 유화력**

분리균주의 배양학적 특성을 조사한 결과, 탄소원으로는 원유, 식용유 및 포도당 등을 잘 이용하였으며, 생육도는 30 ℃ 및 37℃에서 생육이 왕성한 편이었다(자료 미제시). *Bacillus* sp. TBM 911-5가 생육하여 생성하는 biosurfactant의 특성을 알아보기 위하여 배양시간대에 따라 경시적으로 표면장력을 측정된 결과 배양 후 균주의 생육이 대수증식기 정도에 이르는 18 시간대부터 급격히 감소하다가 48시간 후에 배지의 표면장력이 최대 29 mN/m 정도까지 저하되었으며, 저하된 표면장력은 48시간대 이후 장시간 계속 유지되었다(Fig. 2). 이러한 결과는 해양 유류 분해 세균인 *Pseudomonas* sp. 으로부터의 계면활성제의 생산이 배양 2일 후인 정지기 초기에 가장 많이 생산되는 결과와 유사하였으며, *Bacillus* sp. LSC11의 경우인 24 시간대보다 약간 늦은 경향 이었다[12,15]. 따라

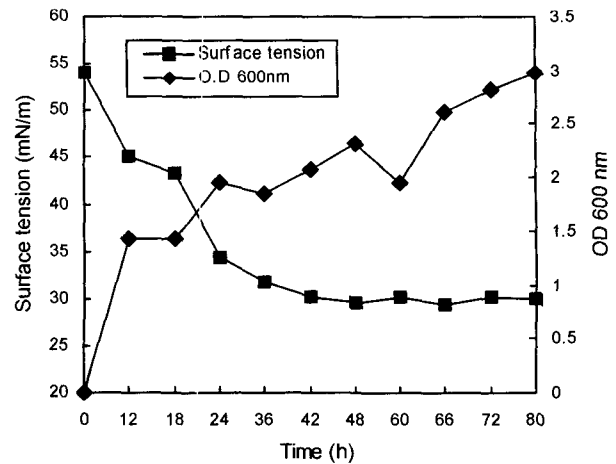


Fig. 2. Patterns of biosurfactant production from *Bacillus* sp. TBM 911-5. The cell was cultured in LB medium at 30℃.

서 표면장력이 최대로 감소된 48시간 배양한 용액에 생성된 biosurfactant를 다양한 소수성 탄화수소 류와 oil을 기질을 유화시키는 특성을 보고자 유화활성을 측정된 결과를 Fig. 3 에 나타내었다. 그 결과 TBM 911-5가 생산하는 biosurfactant는 crude oil에 상당한 유화력을 보였으며, 대두유에서는 유화활성이 약 2.65로서 가장 높은 활성을 보였다. Tributyrin, hexadecane에서도 비교적 높은 활성을 보인 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[4]. 최소 표면장력은 배양 상등액으로 측정된 값과 거의 비슷하게 29 mN/m 였으

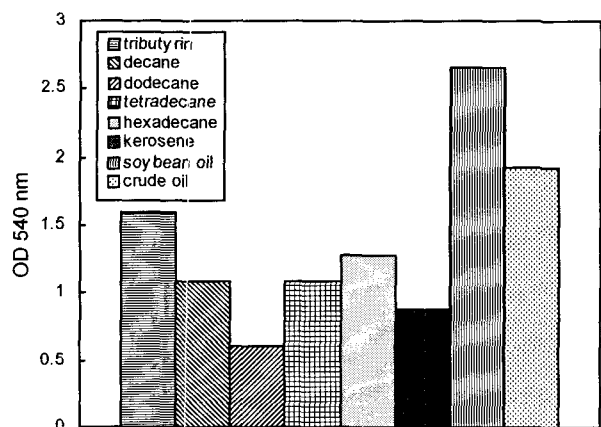


Fig. 3. Emulsification activity of various substrates by the biosurfactant solution. The sample mixture was mixed vigorously. The absorbance ( $A_{540nm}$ ) of the emulsion was determined after the 10 min.

며, 이 결과는 지금까지 알려진 *Bacillus* sp. 및 *Nocardia* sp. 등의 균주들의 표면장력 저하능이 25~40 mN/m 정도의 범위로 보고 된[1,10,11] 내용과 비교하여 높은 표면장력 저하 활성 경향을 나타낸 것이다.

**기질에 따른 유화 안정성**

분리균주가 생산하는 biosurfactant의 소수성 탄화수소계 화학 계면활성제 및 각종 oil을 기질로 사용하였을 경우 유화 활성 및 유화안정성을 Fig. 4와 Table 1에 나타내었다. 또, 현재 상용되고 있는 유화제 및 안정제를 분리된 TBM 911-5가

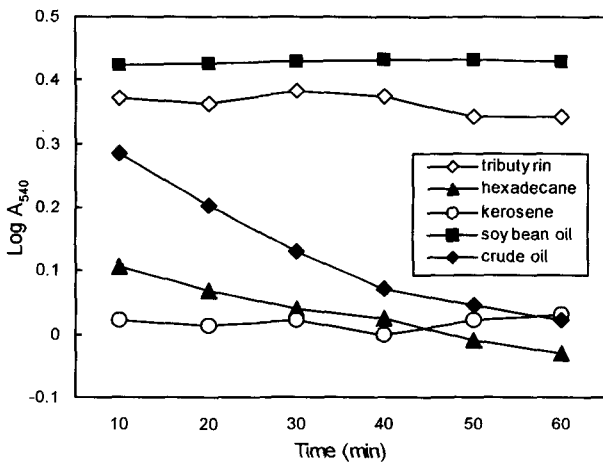


Fig. 4. Emulsification stability of various substrates from bio-surfactant solution.

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 1. 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	2.65	-0.00
Kerosene	0.87	-0.00
Tributyrin ( $C_{40}$ )	1.59	-0.58
Crude oil	1.93	-5.31
Hexadecane ( $C_{16}$ )	1.28	-2.69
Tetradecane ( $C_{14}$ )	1.08	-5.46
Dodecane ( $C_{12}$ )	0.60	-4.56
Decane ( $C_{10}$ )	1.08	-5.00

<sup>a</sup>The emulsification assay was performed in the presence of biosurfactant as described in the material and methods. 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.

생산하는 biosurfactant와 비교하고자 대두유를 기질로 사용하여 측정된 유화활성의 안정도를 비교 조사한 결과를 Fig. 5와 Table 2에 나타냈다. 유화활성의 안정도는 상수  $K_d$  (시간당 붕괴되는 유화력의 기울기 값)로 나타냈으며, 여러 가지의 유화기질을 사용하여 측정하였다. 유화안정도를 분리균주의 생성과 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 *Nocardia* sp. L-417이 생산하는 biosurfactant와 매우 유사한 결과를 보여준 것이다[11]. 따라서 *Bacillus* sp. TBM 911-5가 생산하는 biosurfactant는 현재 상용되고 있는 유화제 및 안정제와의

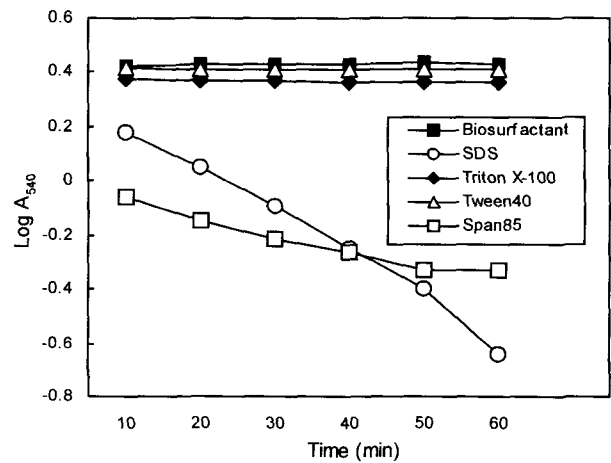


Fig. 5. Stabilization of emulsion from the biosurfactant solution. Emulsifying substrate was soybean oil. The absorbance ( $A_{540nm}$ ) of the emulsion was determined at the indicated times. After the initial 10 min. holding period, absorbance readings were taken every 10 min. The log of the absorbance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

Table 2. Comparison of emulsification and stabilization properties of biosurfactant solution and commercial surfactants

Surfactant	Emulsification activity ( $OD_{540nm}$ )	Decay constant ( $K_d, 10^{-3}$ ) <sup>a</sup>
Biosurfactant	2.65	-0.00
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 stabilizers were analyzed for emulsification activity by using soybean oil as described in the text. The decay constant ( $K_d$ ) was calculated as described in footnote<sup>a</sup>, Table 1.

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

본 연구는 biosurfactant를 생산하는 우수한 균주를 얻고자 산지 토양에서 생산능이 우수한 균주 수십 종을 분리하였다. 분리된 균주 중 원유분해능 및 biosurfactant 생성능이 우수한 균주를 선별하여, 형태학적 특성 및 생리 화학적 특성을 조사하고, 16S rDNA의 부분적 염기서열 결정을 통하여 *Bacillus* sp. TBM911-5로 동정하였다. 동정된 균주 배양액에 생산된 biosurfactant에 의해 48시간 정도에서 표면장력이 최저 29 mN/m까지 감소되었다. *Bacillus* sp. TBM 911-5가 생산하는 biosurfactant의 유화활성은 대두유를 기질로 사용하였을 때 최대였으며, 원유에서도 높은 편이었다. 유화안정성은 합성 계면활성제의 Tween 류나 Triton X-100등과 비슷하거나 우수 하였으며, 이는 분리된 균이 생산하는 biosurfactant의 계면활성제로서의 산업적 이용 가능성을 보여준다.

## 감사의 글

본 연구는 경상남도 생명공학 산업화 과제의 지원에 의하여 이루어진 연구결과의 일부로서 이에 감사드립니다.

## 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. Cirigliano, M. C. and G. M. Carman. 1984. Isolation of a bioemulsifier from *Candida lipolytica*. *Appl. Environ. Microbiol.* **48**, 747-750.
3. Cirigliano, M. C. and G. M. Carman. 1985. Purification and Characterization of Liposan, a bioemulsifier from *Candida lipolytica*. *Appl. Environ. Microbiol.* **50**, 846-850.
4. Cooper, D. G. and J. E. Zajic, 1980. Surface-active compounds from microorganism. *Adv. Appl. Microbiol.* **26**, 229-256.
5. Fiechter, A. 1992. Biosurfactant: moving towards industrial application. *Trends Biotechnol.* **10**, 208-217.
6. 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.
7. John, G. H., N. R. Krieg and P. H. A. Sneath. 1994. *Bergey's manual of systematic bacteriology* (9th 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, 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. Ferment. and Bioengin.* **28**, 71-75.
11. 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.
12. Lee, S. C., Y. J. Jung, J. S. Yoo, Y. S. Cho, I. H. Cha and Y. L. Choi. 2002. Characteristics of Biosurfactants produced by *Bacillus* sp. LSC11. *Kor. J. Life Science.* **6**, 745-751.
13. MacFaddin, J. F. 1984. *Biochemical Tests for Identification for Medical Bacteria*, 2nd ed. Williams and Wilkins Co., Baltimore, USA.
14. 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.
15. 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.
16. 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.
17. 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.
18. Shaw, A. 1994. Surfactants-94. *Soap Cosmet. Chem. Specialities* **70**, 24-30.
19. 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.