

유류누출 지역에서 유래한 토착세균, *Pseudoalteromonas* sp. HK-3 배양에서 생물계면활성제의 최적 생산

조수희¹, 마채우², 오계현^{1*}

Optimized Production of Biosurfactant by the Indigenous Bacterium, *Pseudoalteromonas* sp. HK-3 Originating from Oil-Spilled Areas

Su-Hee Cho¹, Chae-Woo Ma², and Kye-Heon Oh^{1*}

접수: 2011년 1월 21일 / 게재승인: 2011년 2월 23일
© 2011 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

Abstract: The principal objective of this study was to determine the optimal conditions for the production of biosurfactant by the indigenous bacterium, *Pseudoalteromonas* sp. HK-3, originating from oil-spilled areas. The relationship between total biosurfactant production and the factors affecting biosurfactant production were evaluated by statistical analysis using SPSS software. The effects of various supplemental carbon sources (*e.g.*, glucose, dextrose, mannitol, citrate, acetate) on the maximal production of biosurfactant by the test culture of *Pseudoalteromonas* sp. HK-3 was then evaluated. As a result, mannitol was found in this study to be the best supplemental carbon source for the production of biosurfactant. A spot inoculation of crude cultural liquid containing the HK-3 cells generated the largest clear zone, whereas only small clear zones appeared around the spots inoculated with either supernatant only or cell pellets following centrifugation. Our results demonstrated that the HK-3 test culture supplemented with 2% mannitol at an initial pH of 6 generated the maximal amount of biosurfactant within 72 h of incubation.

Keywords: biosurfactant, *Pseudoalteromonas* sp. HK-3,

indigenous bacterium, oil-spillage

1. 서론

일반적으로 누출된 원유를 제거하는 방법으로는 흡착포를 이용하거나, 고압수로 오염지역을 세척하거나, 오염된 지역의 토양을 제거하는 등의 물리적방법과 화학물질에 의한 제거방법 등이 알려져 있다. 그러나 이러한 물리화학적 방법에서 수반되는 이차 또는 삼차 오염으로 인하여, 그 대안으로 미생물학적 제거방법이 선진국에서 제기된 바 있다 [1]. 미생물학적 방법은 미소 환경생태계의 변화에 근거하여 문제가 제기되고 있지만, 이 제거방법은 여전히 오염지역에 미량으로 존재하는 원유의 제거에 효과적이며, Exxon Valdez 사건 이후에 미생물에 의한 누출된 원유제거에 대한 제반사항들이 많은 주목을 받아오고 있다 [2,3]. 원유를 자신의 에너지원으로 사용하여 분해하는 특별한 미생물들은 자연적으로 존재하며 그들의 활성과 광범위한 기질 이용능은 뛰어나다. 원유 분해 미생물은 원유를 에너지원으로 이용하는 과정에서 생분해하며, 생물계면활성제를 생산한다. 생물계면활성제 (biosurfactant)란 살아있는 세포에서 만들어지는 양친매성 (amphiphilicity)물질을 말하는데 미생물이 이용하기 용이하도록 원유를 유화시키며, 이 과정에서 오염된 지역의 정화가 가능하다. 미생물이 생산하는 생물계면활성제는 여러 이점을 가지는데 생분해가 화학적 계면활성제보다 우수하고, 독성이 낮으며, 다양한 구조를 가지고, 발효에 의하여 대량생산 가능하며 유통회수에 우수하다. 또한 항진균성과 항균 활성을 나타낸다 [4]. 미생물의 종류에 따라 생산하는 생물계면활성

¹순천향대학교 생명공학과

¹Department of Biotechnology, Soonchunhyang University, P.O.Box 97, Asan, Chung-Nam 336-600, Korea.
Tel: +82-41-530-1353, Fax: +82-41-530-1350
e-mail: kyeheon@sch.ac.kr

²순천향대학교 해양생명공학과

²Department of Biotechnology

제의 종류 또한 다양한데, 다당류와 포화 또는 불포화 지방산에 따라 glycolipid, lipopeptide, lipoprotein, phospholipid, fatty acid, polymeric surfactant, particulate surfactant로 분류된다. 그 중 glycolipid의 종류인 rhamnose가 가장 많이 알려져 있으며 *Pseudomonas aeruginosa*에서 최초 보고되었다 [5]. 또한 Polymeric biosurfactant 종류인 emulsan은 매우 효과적인 유화제로 *Acinetobacter calcoaceticus* 등이 생산하며 매우 낮은 농도로도 물속의 탄화수소를 유화시킨다고 알려져 있다 [6,7,8]. 이밖에도 생물계면활성제를 생산하는 균주로는 *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Micrococcus*, *Norcadia*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus* 등이 알려져 있으며 실제로 유화제 등은 생산되어 이용되고 있고, 기름의 유화 뿐만 아니라 암석의 기름막 분리에도 도움을 준다 [9]. Banat 등 [10]은 Kuwait Oil Company의 시험에서 생물계면활성제를 이용하여 기름 저장 탱크를 정화시켰고, 유화된 슬러지로부터 탄화수소를 회수하였다고 보고한 바 있다. 현재 생물계면활성제는 환경정화, 미생물 원유회수 촉진, 의료분야, 농업분야, 화장품 산업분야, 식품분야 등 다양하게 이용되고 있다. 본 연구실에서는 태안의 원유유출지역에서 분리한 원유분해능이 우수한 *Burkholderia* sp. HK-1, *Arthrobacter* sp. HK-2, *Pseudoalteromonas* sp. HK-3 등을 분리하였으며, 본 연구에서는 이들 3가지 균주 가운데, *Pseudoalteromonas* sp. HK-3의 배양에서 생물계면활성제 생산에 영향을 미치는 부가탄소원의 종류, 선택된 부가탄소원 농도, 성장시간, 그리고 초기 배양액의 pH 등에 대한 최적 조건을 조사하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 미생물컨소시엄으로부터 순수배양분리

본 연구에 사용된 생물계면활성제 생산세균은 충남 태안의 원유오염지역에서 채취한 해토시료로부터 농화배양기법으로 분리된 *Pseudoalteromonas* sp. HK-3를 사용하였다. 수차례 계대배양을 통하여 최적화하였으며, 생물계면활성제 생산을 위한 최적조건을 조사하였다.

2.2. 부가탄소원 첨가에 따른 영향

부가탄소원으로 glucose, dextrose, mannitol, citrate, acetate 등을 최종 농도 2% (w/v)가 되도록 액체무기배지에 첨가하여 HK-3 균주의 부가탄소원의 종류에 따른 생물계면활성제 생산에 미치는 영향을 조사하였다. 사용된 액체무기배지는 Bushnell-Haas 배지로 해수 1 L당 0.2 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.02 g $CaCl_2$, 1.0 g K_2PO_4 , 1.0 g $(NH_4)_3PO_4$, 1.0 g KNO_3 , 0.05 g $FeCl_3$ 을 포함한다. 배양온도는 20°C로 150 rpm의 속도로 진탕배양기에서 배양하였다.

2.3. Mannitol 농도에 따른 계면활성변화

BH 액체무기배지에 부가탄소원으로 mannitol을 농도별로 첨가하여 mannitol의 농도가 생물계면활성제 생산에 미치는 영향을 조사하였다. Mannitol의 농도를 0~5%로 조절하여

각각 BH 액체무기배지에 첨가한 후, HK-3 균주를 접종하여 20°C 진탕배양기에서 150 rpm의 속도로 전배양 (pre-culture) 하였으며, 이를 1% 원유가 도말되어 있는 BH 고체평판배지에 10 μ L 접종하였다. 접종한 배지는 20°C의 배양기에서 24시간 배양하고, 생산된 생물계면활성을 조사하였다.

2.4. 배양시간에 따른 계면활성변화

1% 원유를 포함하는 BH 액체배지에 HK-3 균주를 접종한 후, 20°C의 진탕배양기에 배양하면서 12시간마다 시료를 채취하여 배양시간에 따른 계면활성 변화를 조사하였다. 부가탄소원으로 2% mannitol을 첨가하고 12시간마다 배양액을 채취하여 1% 원유를 포함하는 BH 고체평판배지에 배양액 10 μ L를 접종하고 20°C 배양기에서 24시간 배양하여 생산된 생물계면활성을 조사하였다.

2.5. pH에 따른 계면활성변화

초기 배양액의 pH에 따라 균주 HK-3가 생산하는 생물계면활성제 생산량을 조사하기 위해 1% 원유가 첨가된 BH 액체배지의 초기 pH를 1 N HCl과 1 N NaOH를 사용하여 각각 5, 6, 7, 8, 9로 맞춘 후, 생물계면활성제 생산세균을 접종한 후, 20°C에서 150 rpm으로 교반되는 진탕배양기에서 배양하고 1% 원유가 도말되어 있는 BH 고체평판배지에 배양액을 10 μ L 접종하여, 24시간 경과 후 생산된 생물계면활성을 조사하였다.

2.6. 균체 및 상등액에서 계면활성 차이

250 mL 삼각플라스크에 BH 액체배지를 제조하여 멸균한 후, 1% 원유를 넣은 후 동일한 조건에서 계대배양이 이루어지고 있는 HK-3 균주를 10% 접종하고 72시간 배양 후에 13,000 rpm의 속도로 원심분리하여 균체 및 상등액의 두 층을 확보하였다. 1% 원유를 포함하는 BH 고체 평판배지에 각각 균체와 상등액, 그리고 배양액 등을 각각 접종하여 24시간 배양 후 생성된 투명대를 비교 관찰하였다.

2.7. 통계분석

탄소원의 농도, 초기 배양액의 pH, 성장시간에 따른 생물계면활성에 의한 투명대의 면적과 생산량의 차이를 분산분석 One-way ANOVA를 사용하여 통계학적 검증을 실시하였다. 조건별 생물계면활성에 의한 투명대 면적과 생산량 간 상관관계는 Pearson's correlation를 사용하여 실시하였다. 최적 생물계면활성 조건은 각 요인별 통계분석 결과에 따라 유의수준을 분석하고 요인별 최대 생물계면활성에 의한 투명대의 면적에 해당하는 조건으로 선정하였다. 통계분석은 SPSS (ver. 12)를 사용하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 생물계면활성제 생산세균의 분리

충남 태안의 원유오염지역에서 채취한 토양시료로부터 농화배양기법으로 생물계면활성제를 생산하는 세가지 단일 균

주로서 *Burkholderia* sp. HK-1, *Arthrobacter* sp. HK-2, *Pseudoalteromonas* sp. HK-3를 분리하였으며, 분리세균들은 원유를 포함하는 액체배지에 접종하여 배양온도 20°C에서 150 rpm으로 회전하는 진탕배양기에서 배양하고 생물계면활성제 생산을 위한 최적조건을 조사하였다. 생물계면활성제는 orcinol method를 사용하였을 때 우수한 수치를 보여준 rhamnolipid의 정량적 측정을 실시하였다 [11,12]. 이들 단일 균주 가운데, 본 연구에서는 *Pseudoalteromonas* sp. HK-3를 사용하였으며, 분리와 특성에 대하여 보고한 바 있다 [13].

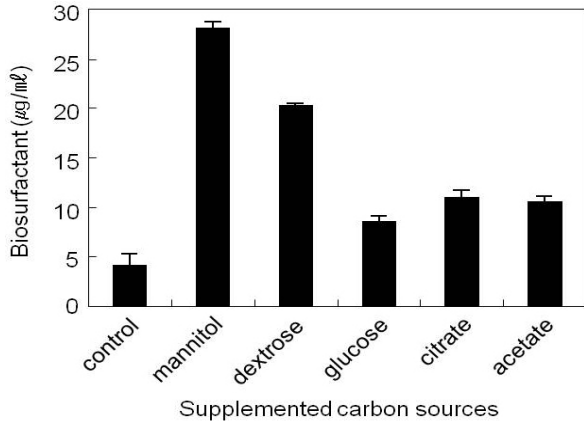


Fig. 1. Effect of various supplemented carbon sources on the production of biosurfactant in the culture of *Pseudoalteromonas* sp. HK-3.

3.2. 부가탄소원 첨가에 따른 영향

부가탄소원으로 glucose, dextrose, mannitol, citrate, acetate를 선택하여 최종 농도 2% (w/v)가 되도록 액체무기배지에 첨가하여 HK-3의 생물계면활성제 생산에 미치는 영향을 조사하였다. 부가 탄소원으로 mannitol이 첨가된 경우 생산된 생물계면활성제는 28.04 µg/mL로, 부가탄소원이 첨가되지 않은 상태보다 4.15 µg/mL로 약 7배 많이 생산하였다. 또 dextrose를 부가 탄소원으로 첨가하였을 경우, 부가탄소원이 첨가되지 않은 상태보다 20.19 µg/mL로 약 4배 많이 생산하였다. 부가탄소원으로 glucose, citrate, acetate를 첨가하였을 때는 부가탄소원을 첨가하지 않았을 때보다 각각 2배 이상을 생산하였다. 본 연구에서는 부가탄소원이 첨가 되었을 때 공통된 현상으로 생물계면활성제 생산능력이 증가하며 mannitol이 최적 부가탄소원임을 확인하였다. Mutalik 등 [14]은 *Rhodococcus* 종이 생물계면활성제를 생산하기 위한 최적 부가탄소원을 알아보는 시험에서 glucose, sucrose, sorbitol, mannitol, glycerol을 사용하였는데 이중 부가탄소원으로 mannitol을 사용하였을 때 가장우수하였다고 보고하였으며, Coelho 등 [15]도 *Pseudomonas* 종의 배양에서 부가탄소원으로 glucose, sucrose 또는 mannitol을 첨가하였을 때 이중 mannitol을 첨가하였을 경우에 계면활성제 생산량이 가장 우수하다고 보고하였다. 따라서 이러한 보고 등을 통해 미생물이 생물계면활성제를 생산하기 위한 최적의 탄소원은 mannitol인 것으로 입증되었다.

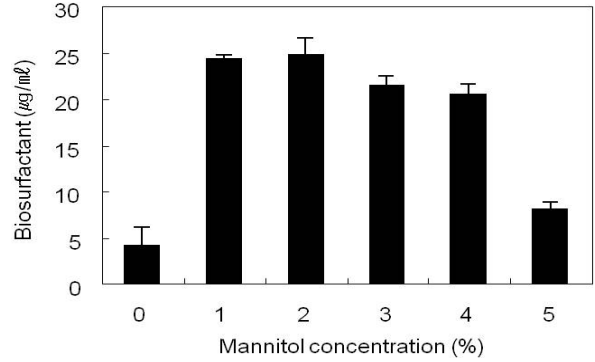


Fig. 2. Effect of mannitol concentration on the production of biosurfactant in the culture of *Pseudoalteromonas* sp. HK-3.

3.3. Mannitol 농도에 따른 계면활성변화

부가탄소원으로 mannitol을 첨가하였을 경우에 가장 많은 생물계면활성제가 생산되었으므로 다음으로 mannitol의 농도에 따른 생물계면활성제 생산을 실험하였다. 농도별로 mannitol을 첨가하지 않았을 때 생물계면활성제 생산량이 4.15 µg/mL로 가장 낮았으며, 2% 첨가하였을 때 24.7 µg/mL로 가장 우수하였다. 이후 mannitol의 첨가량이 증가할수록 오히려 생물계면활성제의 생산량이 감소하였으며, 5%로 첨가하였을 때 8.07 µg/mL 정도 생산되었다. Mutalik 등 [14]의 연구 결과에 따르면 *Rhodococcus* 종의 생물계면활성제 생산을 위한 최적 mannitol의 농도는 1.6 % (w/v)로 본 실험과 다른 결과를 보였으나, Coelho 등 [15]은 mannitol을 2% (w/v)로 첨가하였을 때 가장 활성이 우수하다고 보고하였으며, Anand 등 [4]과 Deziel 등 [11]은 생물계면활성제 최적농도가 2%였다고 보고한 바 있다. 이러한 보고들은 본 연구에서 얻어진 결과인 *Pseudoalteromonas* sp. HK-3의 배양에서 첨가된 mannitol의 농도가 2%에서 생물계면활성제의 생산이 최대였다는 결과와 일치하였다.

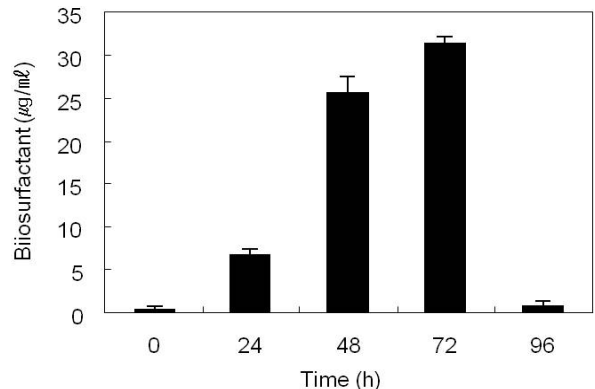


Fig. 3. Effect of cultivation period on the production of biosurfactant in the culture of *Pseudoalteromonas* sp. HK-3.

3.4. 배양시간에 따른 계면활성변화

분리세균 HK-3를 BH 액체배지에 접종하여 배양시간에 따른 생물계면활성제의 생산을 관찰하였다. 생물계면활성제의 양은 HK-3의 생균수의 증가와 함께 빠른 속도로 증가하여 배양 72시간 경과 후 32.56 µg/mL를 생산하였으며 이후 생

장이 감소함에 따라 생물계면활성제의 양이 급격하게 감소하는 것이 관찰되었다. Anand 등 [4]은 *Pseudoxanthomonas* sp. PNK-04를 사용하여 생물계면활성제 생산량 측정 실험을 수행하였는데 40시간의 긴유도기를 보였다. 이에 비하여 HK-3는 12시간으로 비교적 짧은 유도기를 보임으로써 더 효율이 좋은 것으로 사료된다. 또한 Koch 등 [12]은 *Pseudomonas aeruginosa*가 생산한 생물계면활성제 생산량을 10 µg/mL로 보고하였는데 이는 HK-3의 생산량과 비교하였을 때 HK-3가 더 우수한 것으로 사료된다.

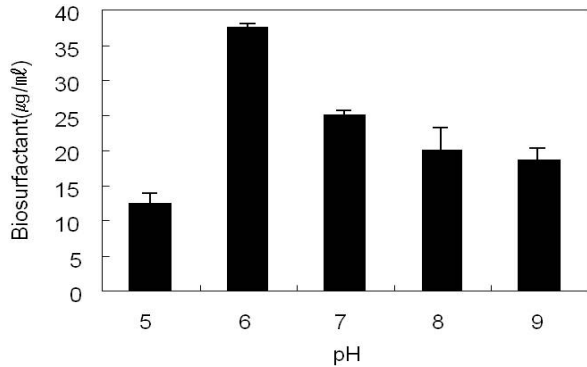


Fig. 4. Effect of initial pH of the test culture on the production of biosurfactant in the culture of *Pseudoalteromonas* sp. HK-3.

3.5. 초기 배양액의 pH에 따른 계면활성변화

초기 배양액의 pH의 변화에 따른 균주 HK-3의 생물 계면활성제 생산에 미치는 영향을 조사하였다. 1% 원유를 포함하는 BH 고체배지의 pH를 5~9로 다르게 조절하여 HK-3 배양액 10 µL를 접종한 후 24시간 배양 후에 관찰한 결과, pH 6에서 빠르게 성장하였고 생물계면활성제의 생산도 37.54 µg/mL로 가장 많은 양을 생산하였다. pH 5에서는 12.26 µg/mL를 생산하였으며, pH 9에서는 18.57 µg/mL를 생산하였다. 비교적 낮은 pH인 5와 높은 pH인 9에서는 pH 6과 비교하였을 때 비교적 적은 양이 생성되었으나 모두에서 생물계면활성제를 생산하는 것은 미생물이 생산하는 생물계면활성제가 pH의 영향을 적게 받는다는 보고들과 유사하였다. 또한 Tabatabaee 등 [16]은 pH에 따른 생물계면활성제 생산량에 대해 조사하였는데 pH 4.2~9.2까지 초기 배양 pH 조절 후 생산량을 조사한 결과 모든 pH에서 생물계면활성제를 생산하지만 pH 6.2에서 가장 우수한 생산량을 보였다. 이는 HK-3와의 결과와 유사하였다.

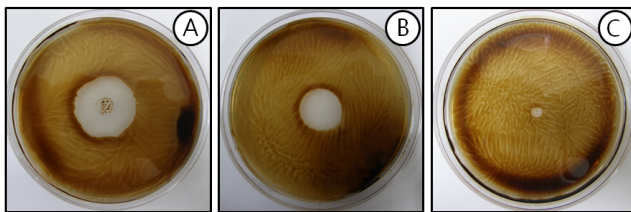


Fig. 5. Effect of different inocula of the test culture, *Pseudoalteromonas* sp. HK-3 on the production of biosurfactant; (A) crude cultural fluid, (B) supernatant and (C) *Pseudoalteromonas* sp. HK-3 after centrifugation.

3.6. 균체 및 상등액에서 계면활성 차이

1% 원유가 도말되어있는 BH 고체 평판배지에 HK-3 배양액과 상등액, 균체를 각각 10 µL 접종하고 24시간 배양하여 계면활성에 미치는 영향을 비교 평가하였다. 그 결과 HK-3 배양액과 상등액에서만 투명대를 나타내었다. 균체를 포함하는 배양액에서는 6.58 cm²을 나타내었으며 균체가 제거된 상등액에서는 3.05 cm²의 면적을 나타내어 균체를 포함하는 배양액이 균체를 포함하지 않은 상등액에서 보다 두 배 이상 큰 면적차이를 보였다. 그러나 균체만 분리하여 따로 접종하였을 경우 투명대는 거의 형성되지 않았다. Kim 등 [17]과 Hwang 등 [18]은 원심분리한 뒤의 상등액으로부터 생물계면활성제를 추출하여, 생산과 응용에 대하여 보고한 바 있다. 본 연구에서 사용된 HK-3는 성장하면서 기존의 보고들과는 달리 생물계면활성 물질을 분비하며 배양액에 잔존함을 알 수 있다.

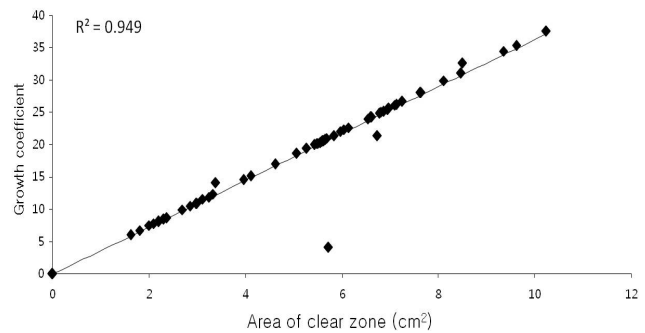


Fig. 6. Graph of relationship between the area and the growth coefficient of factors affecting production of biosurfactant. The graph was prepared by statistical analysis using SPSS.

3.7. 통계분석

One-way ANOVA를 사용하여 생물계면활성에 의한 투명대의 면적과 성장계수 간에는 양 (+)의 상관관계 (Pearson correlation $r^2 = 0.95$, $p\text{-value} < 0.01$)가 있는 것으로 나타났으며 둘간의 상관관계 수치는 정비례하는 것으로 나타났다. 탄소원으로 mannitol을 첨가할 경우 면적이 6.59 이상 (성장계수 24.2 이상)으로 다른 탄소원에 비해 상대적으로 넓은 것으로 나타났다. Mannitol 농도에 따른 면적 및 성장계수의 차이가 있는 것을 확인하였으며 ($df = 3$, $f = 159.54$, $p\text{-value} < 0.01$), pH에 따른 투명대의 면적 및 성장계수의 차이가 있는 것을 확인하였다 ($df = 4$, $f = 37.9$, $p\text{-value} < 0.01$). 또한 성장시간에 따른 면적 및 성장계수의 차이가 있는 것을 확인하였다 ($df = 3$, $f = 159.54$, $p\text{-value} < 0.01$). 본 통계 분석을 통해서 얻어진 생물계면활성제의 최적 생산 요인들의 결과를 통하여 *Pseudoalteromonas* sp. HK-3는 탄소원으로 mannitol을 2%로 첨가하고 초기 배양액의 pH를 6으로 조절하여 배양하였을 경우에 배양 72시간에서 생물계면활성제를 37.54 µg/mL로 가장 많이 생산되는 것을 확인하였다.

생물계면활성제는 화학적 계면활성제에 비하여 친환경적이지만 아직 연구가 미비하여 이에 대한 실제 응용은 상당히 저조한 실정이다. 본 연구를 통하여 생물계면활성제를 생산하는 균주 HK-3의 생물계면활성제 생산을 위한 최적 조건을

플라스크 수준에서 조사하였으며, 향후 배양기 수준에서의 생물계면활성제의 최적 조건을 조사하여 대량생산의 가능성을 알아보고, 생물계면활성제의 분리 정제를 통하여 현장적용을 위한 연구가 진행될 것이다.

4. 결론

본 연구의 목적은 유류누출 지역에서 유래한 토착세균인 *Pseudoalteromonas* sp. HK-3 배양에서 생물계면활성제의 최적 생산을 위한 조건을 조사하기 위하여 실시되었다. 생물계면활성제의 생산량과 생물계면활성제의 생산에 영향을 미치는 요인들간의 상관관계는 SPSS를 사용한 통계분석에 의해 실행되었다. *Pseudoalteromonas* sp. HK-3의 배양에 의한 생물계면활성제의 최대 생산에 다양한 부가탄소원 (예, glucose, dextrose, mannitol, citrate, acetate)이 미치는 영향에 대하여 조사하였으며, 그 결과 mannitol은 이 실험에서 생물계면활성제를 가장 많이 생성하는 최상의 부가탄소원이었다. HK-3를 포함하는 배양원액의 점 접종은 최대크기의 투명대를 형성한데 비하여 원심분리한 후의 상등액이나 펠릿만을 접종하였을 경우에는 작은 투명대를 생성하였다. 이들 결과는 초기 pH 6에서 2% mannitol을 넣은 HK-3 배양은 72시간 배양기간 이내에 최대의 생물계면활성제를 생산하는 것으로 나타났다.

References

- de Lorenzo, V. (2006) Blueprint of an oil-eating bacterium. *Nat. Biotechnol.* 24: 952-953.
- Bragg, J. R., R. C. Prince, E. J. Harner, and R. M. Atlas (1994) Effectiveness of bioremediation for the Exxon Valdez oil spill. *Nature* 368: 413-418.
- Swannell, P. J., K. Lee, and M. McDonagh (1996) Field evaluation of marine oil spill bioremediation. *Microbiol. Rev.* 60: 342-365.
- Anand, S. Nayak, M. H. Vijaykumar, and T. B. Karegoudar (2009) Characterization of biosurfactant produced by *Pseudoxanthomonas* sp. PNK-04 and its application in bioremediation. *Int. Biodeterior. Biodegr.* 63: 73-79.
- Jarvis, F. G. and M. J. Johnson (1949) A glycolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Am. Chem. Soc.* 71: 4124-4126.
- Zosim, Z., D. L. Gutnick, and E. Rosenberg (1982) Properties of hydrocarbon in water emulsions stabilized by *Acinetobacter* RAG-1 emulsan. *Biotechnol. Bioeng.* 24: 281-292.
- Belsky, I., D. L. Gutnick, and E. Rosenberg (1979) Emulsifier of *Arthrobacter* RAG-1: determination of emulsifier bound fatty acids. *FEBS Lett.* 101: 175-178.
- Chakrabarty, A. M. (1985) Genetically manipulated microorganisms and their products in the oil service industries. *Trends Biotechnol.* 3: 32-38.
- Kim, S. H., S. C. Lee, J. S. Yoo, W. H. Joo, S. Y. Chung, and Y. L. Choi (2004) Characterization of oil-degradation biosurfactant produced by *Bacillus* sp. TBM40-3. *J. Kor. Soc. Appl. Biol. Chem.* 47: 170-175.
- Banat, I. M., N. Samarath, M. Murad, R. Horne, and S. Banerjee (1991) Biosurfactant production and use in oil tank clean up. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 7: 80-84.
- Deziel E., G. Paquette, R. Villemur, F. Lepine, and J.G. Bisailon (1996) Biosurfactant production by a soil *Pseudomonas* strain growing on polycyclic aromatic hydrocarbons. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 1908-1912, 1996.
- Koch, A. K., O. Kappeli, A. Fiechter, and J. Reiser (1991) Hydrocarbon assimilation and biosurfactant production in *Pseudomonas aeruginosa* mutants. *J. Bacteriol.* 173: 4212-4219.
- Cho, S. H. and K. H. Oh (2010) Characterization of the biosurfactant-producing bacterium, *Pseudoalteromonas* sp. HK-3 isolated from the crude-oil. *Kor. J. Microbiol.* 46: 346-351.
- Mutalik, S. R., B.K. Vaidya, R. M. Joshi, K. M. Desai, and S. N. Nene (2008) Use of response surface optimization for the production of biosurfactant from *Rhodococcus* spp. MTCC 2574. *Biores. Technol.* 99: 7875-7880.
- Coelho, J., C. U. Rivonkar, N. S. Bhavesh, M. Jothi, and U. M. X. Sangodkar (2003) Biosurfactants production by the quinoline degrading marine bacterium *Pseudomonas* sp. strain GU 104, and its effect on the metabolism of green mussel *Perna viridis* L. *Indian J. Mar. Sci.* 32: 202-207.
- Tabatabaee, A., M. M. Assadi, A. A. Noohi, and V. A. Sajadian (2005) Isolation of biosurfactant producing bacteria from oil reservoirs. *Iranian J. Env. Health Sci. Eng.* 2: 6-12.
- Kim, S. H., S. C. Lee, J. S. Yoo, W. H. Joo, S. Y. Chung, and Y. L. Choi (2004) Characterization of oil-degradation biosurfactant produced by *Bacillus* sp. TBM40-3. *J. Kor. Soc. Appl. Biol. Chem.* 47: 170-175.
- Hwang, K. A., Y. S. Kim, H. J. Ahn, and K. S. Choi (1995) Isolation of biosurfactant-producing *Acinebacter calcoaceticus* CL and the biosurfactant production and the application. *J. Kor. Ind. Eng. Chem.* 6: 562-570.