

## Peptide계 생분해성 고분자 생산균주의 분리 및 생성 고분자의 특성

이 신 영·강 태 수·김 갑 수\*·유 주 현\*\*

강원대학교 공과대학 발효공학과

\*샘표식품(주) 기술 개발부

\*\*연세대학교 공과대학 식품공학과

## Isolation of the Biodegradable Peptide Polymer-Producing Bacterial Strain and Characterization of the Polymer Produced by This Strain

Lee Shin-Young, Kang Tae-Su, Kim Kap-Soo\* and Yu Ju-Hyun\*\*

Department of Fermentation Engineering,

Kangwon National University, Chunchon 200-701, Korea.

\*Research Lab., Sampyo Foods Co. Ltd., Seoul 132-040, Korea

\*\*Yonsei University, Seoul 120-749, Korea

### ABSTRACT

For the production of biodegradable polymers from microorganisms, a bacterial strain producing a biopolymer was isolated from soil. The bacteriological characteristics of this strain and physicochemical properties of the biopolymer produced were investigated. The bacterial strain was identified as an alkalophilic *Alcaligenes* sp. The purified biopolymer treated with cetylpyridinium chloride and acetone was identified as an acidic biopolymer having carboxyl groups and showed strong UV absorbance (at 210nm). The biopolymer was composed of 100% glutamic acid and glutamic acid existed as  $\gamma$ -polyglutamic acid( $\gamma$ -PGA) in the form of the  $\gamma$ -peptide bond. The equivalent weight of this  $\gamma$ -PGA was estimated about 350, indicating that one acidic fraction per 2.7 residue of  $\gamma$ -polyglutamic acid existed. The molecular weight was  $6.5 \times 10^5$  Daltons.

### 서 론

최근 자연 환경 속의 미생물에 의해 분해되는 생분해성 고분자(biodegradable polymer)가 환경에 부하(load)를 주지 않는 새로운 고분자 재료로서 크게 주목받게 되었다(1-4).

현재 연구대상이 되는 주요 생분해성 고분자는 합성 고분자, 동식물 유래의 천연 고분자 및 미생물에 의한 생물고분자 등 3종으로 나눌 수 있지만, 합성 고분자는 효소 분해가 어렵고, 천연 고분자의 경우는 생분해는 쉽지만 품질이 균일하지 않으며, 자연

의 제한성을 갖는 단점이 있다. 그러므로 미생물에 의한 생분해성 고분자가 특히 주목되고 있는데, 주요 연구대상이 되고 있는 미생물에 의한 생분해성 고분자에는 폴리에스터계의 poly- $\beta$ -hydroxybutyrate(PHB), 다당류계의 pullulan 및 폴리펩타이드계의 polyglutamic acid 등이 있다(1, 5-9).

이중 polyglutamic acid(PGA)는 주로 합성제품으로서 1906년 Leuchs(10)에 의한 중합법의 발견 이래 아미노산에 phosgen( $\text{COCl}_2$ )을 작용시켜서 얻어지는 N-carboxyl- $\alpha$ -amino acid 무수물의 개환 중합에 의해 합성되었으며, 생체 고분자모델로서 구

조, 물성, 합성 및 생화학적 기초연구도 널리 수행되어 왔다(10, 11). 이 두 물질은 주로 pepsin 등 가수분해 효소의 기질로 이용되고 있으며, PGA와 tyrosine 등의 copolymer는 면역원성을 증가시키고 산성과 소수성의 효과로 ribonuclease에 대한 저항성을 가지며, 또, 고분자 의약에 있어서는 약물의 지속성을 높이는 보호제로서의 가능성이 밝혀져 의료면에서의 용도도 기대되고 있다(10, 12). 특히, 80년대에 들어와서는 활발히 진행중인 기능성 고분자의 연구개발 조류에 힘입어 생체재료, 기능성 담체, 막재료, 전기재료 등으로서 주목되어 활발한 연구가 전개되고 있는 실정이다(10, 12, 13).

이와 같이 polyglutamic acid는 합성법으로 얻고 있으나 미생물에 의해서도 polyglutamic acid가 생합성되는 것이 알려졌고, 특히, 미생물에 의한 polyglutamic acid는 합성법으로 얻어진 것과는 달리  $\gamma$  위치의 carboxylic acid가 amide 결합을 한  $\gamma$ -polyglutamic acid( $\gamma$ -PGA)를 생산하는 것으로 밝혀졌다(14-17).

지금까지  $\gamma$ -PGA의 생산균으로서 알려진 균주는 모두 *Bacillus* 속 균주이다(15, 18-28). 이 중 *Bacillus subtilis* var. *polyglutamicum*만이 glucose 등의 탄소원과 무기염류만으로 된 배지에서 성장하면서  $\gamma$ -PGA를 생산하고, 그 외의 균은  $\gamma$ -PGA 생산에 L-glutamic acid를 필요로 함이 알려지고 있다(15, 18-28).

이와 같이 *Bacillus* 속에 한하여 생산되는 것으로 알려진  $\gamma$ -PGA는 생분해성을 가질 뿐 아니라 인체에 대한 독성이 낮고, 비교적 싼 가격으로 생산할 수 있는 등 고분자로서의 우수한 특성을 지니므로 앞으로 생분해성 고분자 소재연구에 적합한 재료인 것으로 생각되고 있다. 따라서 일본에서는 최근  $\gamma$ -PGA의 효율적인 발효 합성법이 검토되고 있으며, 현재 일본 武田 약품에서 이미 식품품질개량제로서 시판하기에 이르렀고, Ajinomoto(株)에서도 화장품에의 용도개발을 행하고 있는 실정이다(10, 29).

그러나  $\gamma$ -PGA의 성질은 아직도 불분명한 점이 많고, 또, 생산균은 *Bacillus* 속 균주에만 한정되어 *Bacillus* 속 균주 이외의  $\gamma$ -PGA 생산균주 탐색을 포함한 이들의 특성 및 소재로서의 가능성을 밝히는 응용연구 등 충분한 검토가 필요하다.

본 연구에서는 신규 생물고분자의 생산과 이의 기능성 탐색 및 용도개발을 목표로 한 일련의 연구로서 고점성의 생분해성 고분자를 생산하는 호알카리성의 균주를 분리, 동정하였으며, 생성 고분자를 분

리정제하고, 그 물리화학적 성질을 구명하여  $\gamma$ -PGA임을 밝혔다.

## 재료 및 방법

### 균주의 분리 및 보존

호알카리성 미생물의 분리용 배지로 보고된 Akiba 등(30)의 배지를 사용하여 춘천시 근교에서 채취한 토양으로부터 호알카리성 균주를 분리하였다. 이 중 고체배양에서 점조성의 점질물을 생성하는 3균주를 1차 선별하였고, 다시 액체배양에서 배양액의 점성이 매우 높은 한 개의 균주를 선별하여 생물고분자 생산 균주로 하였다. 분리 균주는 Akiba 등(30)의 한천 사면배지에서 30°C로 12시간 배양한 후, 4°C에서 보존하였으며, 4주마다 계대배양하였다.

### 배지조성 및 조제

본 실험에 사용한 플라스크 배양 및 발효용 배지는 glucose 10g/l, polypeptone 5g/l, yeast extract 5g/l,  $K_2HPO_4$  1g/l,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.2g/l, 그리고  $Na_2CO_3$  10g/l의 조성을 갖는 배지(pH=10)이며, 121°C에서 15분간 가압 멸균하여 사용하였다. 이때 포도당과  $Na_2CO_3$ 는 각각 분리 살균하여 상온으로 냉각시킨 다음 첨가 혼합하였으며, 모든 배지의 pH는 멸균 후 2N  $Na_2CO_3$  또는 2N HCl을 사용하여 조절하였다.

### 배양방법

접종균의 플라스크 배양은 균주를 배지 20ml를 함유한 100ml 삼각 플라스크에 백금으로 1회 접종하고, 30°C에서 12시간 진탕배양하였고, 배지 50ml를 함유한 250ml 삼각 플라스크에 3%(V/V) 접종한 후, 30°C에서 120rpm으로 2일간 진탕 배양하였다. 플라스크 배양액을 2.6l의 jar fermentor (Maru-bishi MD-250)에 접종하여 회분배양하였다.

### 분리균주의 균학적 성질관찰

형태적 성상은 Gram 염색, 포자염색을 각각 상법(31)에 따라 행하고 현미경으로 검경하여 관찰하였다. 한편, 배양특성은 살균한 각 배지에 분리 균주의 배양액을 접종하고, colony 형태, 성장도 및 배면의 색등 배양상의 특성을 5일간 배양하면서 관찰하였고, 생리적 특성은 상법에 따라 각종 생화학적 시험 및 생육 pH와 온도범위를 측정하여 실시하였다(31).

### 분석방법

균체량은 배양액을 5 또는 10배로 희석하고 spectrophotometer(Spectronic 20, Milson Roy Co.)로 660nm에서의 흡광도를 측정하여 구하였다.

배양액 중의 포도당의 농도는 DNS(dinitrosalicilic acid)법 및 glucose-oxidase법, 그리고 전당은 phenol-sulfuric acid법으로 각각 정량하였다(32, 33).

생물고분자의 정색반응은 Anthrone반응, Fehling 반응, Seliwanoff반응, Elson-Morgan반응, Carbazole-황산반응, 요오드-전분 반응 및 Ninhydrin반응을 상법(38, 39)에 따라 발색시켜 관찰하였다. Glucosamine은 Elson-Morgan방법(38, 39)에 의하여 그리고 glutamic acid는 paper chromatography법(41)으로 정량하였다. 아울러 가수분해 후 이온교환수지에 의해 분리한 각종 성분은 Whatman No.1 여지를 사용하여 여러 유기혼합물 용매에서 상승법으로 16~18시간 전개시켰으며, 중성당과 아미노당은 n-butanol-pyridine-H<sub>2</sub>O(6:4:3, v/v) 용매계에서 전개한 후, 풍건하여 알칼리성 silver nitrate시약을 분무 발색시켜 확인하였다. 아미노산은 isopropanol-acetic acid-H<sub>2</sub>O(75:15:10, v/v) 용매계에서 전개한 후, 0.25% ninhydrin시약을 분무하여 150°C에서 수분간 발색시켜 확인하였다.

한편, UV/VIS 흡수 spectrum은 정제시료(Na<sup>+</sup>형과 H<sup>+</sup>형)를 증류수에 24μg/ml되게 용해시켜 UV/VIS spectrophotometer(Perkin-Elmer 552S)로 190~500nm 범위에서 주사하여 측정하였다. IR spectrum은 IR spectrophotometer(일본 분광공업제 JASCO A-3)를 사용하여 200~4000cm<sup>-1</sup>의 범위에서 측정하였으며, 시료는 KBr정제법으로 조제하였다. 한편, 원소분석은 element analyzer(Perkin-Elmer 240-C), 그리고 PMR은 시료를 DMSO에 용해시켜 JOEL FX-100 NMR을 사용하여 측정하였다.

중화 당량은 Scott의 spectrophotometry법(42) 그리고 분자량은 gel chromatography(Sephadex G-200 column: 2.5×80cm)에 의한 Constantopoulos(43) 등의 방법에 준하여 측정하였다. 분자량 측정시 표준당으로는 분자량이 서로 다른 3종의 dextran과 sucrose를 사용하였다.

### 생물고분자의 분리 및 정제

배양액을 2배 희석하고 9,000×g의 원심력으로 60분간 원심분리하여 균체를 제거하였다. 상등액에

동량 부피의 acetone을 첨가하여 교반용으로 휘저으면서 고점성의 섬유상 집합체를 얻었다. 이를 증류수에 녹여 진공발기에서 용매를 제거한 후, 0.05torr에서 24시간 동결건조하여 crude biopolymer를 얻었다.

Crude biopolymer는 gel chromatography(Sephadex G-200, column: 2.5×80cm) 및 ion-exchange chromatography(DEAE-cellulose, column: 2×50cm)로 분획하였고, Fig. 1에서와 같이 CPC(cetylpyridinium chloride)와 acetone으로 처리한 후, 동결건조하여 정제시료로 하였다(34-37).

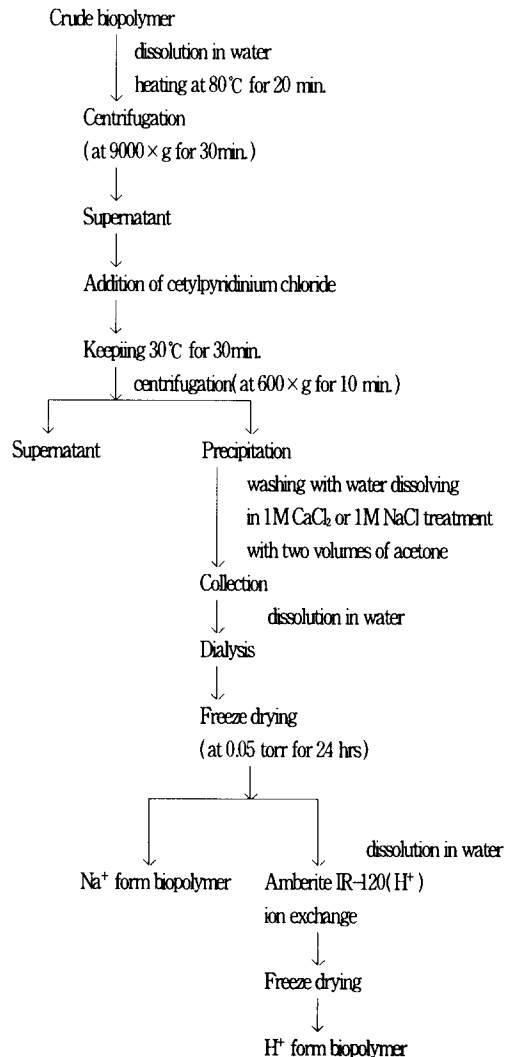


Fig. 1. A purification procedure of biopolymer.

한편, 정제시료는 IN H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 100°C에서 8시간 가수분해 하고 BaCO<sub>3</sub>로 중화하여 원심분리하였고, Amberlite IR-120(H<sup>+</sup>)로 탈염한 다음 진공 농축하여 가수분해 시료로 하였다.

### 결과 및 고찰

생분해성 고분자 생산 균주의 분리 및 분리균의 균학적 성질

분리균의 배양특성 및 형태적 성질은 Table 1과 같다.

중성(pH 7)에서는 생육이 관찰되지 않았으나 알칼리성(pH 10)의 조건에서는 모두 생육하였고, 특히, pH 10의 Glucose-nutrient 한천 배지에서의 생육이 가장 양호하였으며, 배양시간의 경과에 따라 점질물을 형성하였다. 또, 형태학적 특성으로는 간균이었고, 편성 호기성으로 운동성을 가지며, 내생포자는 형성하지 않았고, 비항산성으로 Gram 음성이었다.

한편, 생리적 성질은 Table 2에서와 같이 온도 15-48°C 및 pH8-13에서 생육이 가능하여 중온의 호알칼리성 균주의 특성을 나타내었고, 7% NaCl의 육즙 배지에서도 생육할 수 있었으며, Litmus milk 반응에서 alkaline반응을 나타내었다. 또한, oxidase 및 catalase 반응에서 양성반응을 보였고, 당발효에

Table 1. Morphological and cultural characteristics of the isolated strain.

Test	Results
Gram staining	Negative
Shape	Coccal rod
Motility	Motile
Nutrient agar(at 30°C for 24-48hrs)	
Pigmentation	White color
Form	Irregular
Margin	Lobate
Elevation of growth	Raised
Nutrient broth	Sediment
	pH 7    pH 10
Glucose-nutrient agar	-        +++
Glucose-nitrate agar	+        ++
Glucose-asparagine agar	-        +

+++ : Good growth, ++ : Moderate growth,

+: Poor growth, -: No growth

Table 2. Physiological characteristics of the isolated strain.

Test	Results
Catalase activity	Positive
Oxidase activity	Positive
Oxygen requirement	Positive
Voges-Proskauer test	Negative
Carbohydrate fermentation	
No acid and no gas :	Amylopectin, dextrin, fructose, glyc- erine, glucose, galactose, inulin, maltose, sucrose, mannitol, starch, sorbitol, xylose, lactose, mannose, raffinose
Casein hydrolysis	Negative
Gelatin liquifaction	Negative
Starch hydrolysis	Negative
Citrate utilization	Negative
Nitrate reduction	Negative
Indole production	Negative
H <sub>2</sub> S production	Negative
Methyl red reaction	Negative
Polysaccharide production from sucrose	Negative
Tween 80 hydrolysis	Negative
Litmus milk reaction	Negative
NaCl tolerance	< 7%
Urease production	Negative
Oxidation-Fermentation test	No action
Growth temperature(°C)	15-48
Growth pH	8-13

서는 대부분의 당에서 산의 생성 및 gas 생성은 관찰되지 않았다.

이러한 특성은 Bergey's manual(44)에 의하여 검색한 결과, *Alcaligenes*속 균주의 특성과 매우 유사하였다. 따라서 본 균주를 *Alcaligenes*속의 한 균주로 동정하였으며, 또, 중성 pH에서의 생육이 없고, 알칼리성 pH에서의 생육이 양호한 점으로 보아 호알칼리성 균주인 것으로 판단하였다.

### 생물고분자의 분리 정제

Sephadex G-200을 이용하여 crude biopolymer의 gel chromatography를 행한 결과는 Fig. 2와 같다.

Fig. 2에서 보는 바와 같이 Fr-I 과 Fr-II의 두 peak 성분으로 분획되어 crude biopolymer는 분자

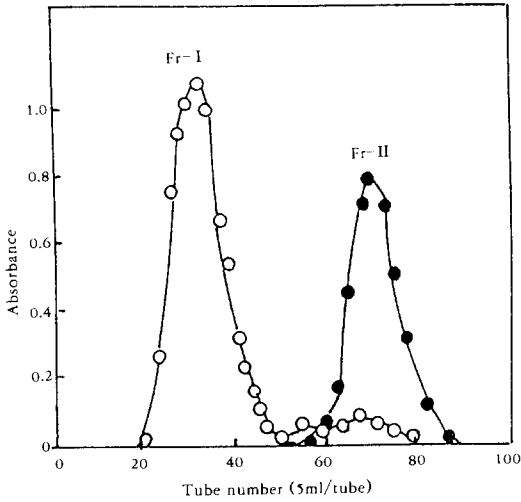


Fig. 2. Fractionation of crude biopolymer by gel chromatography on Sephadex G-200(column size:2.5×80cm).  
○:210nm ●:490nm

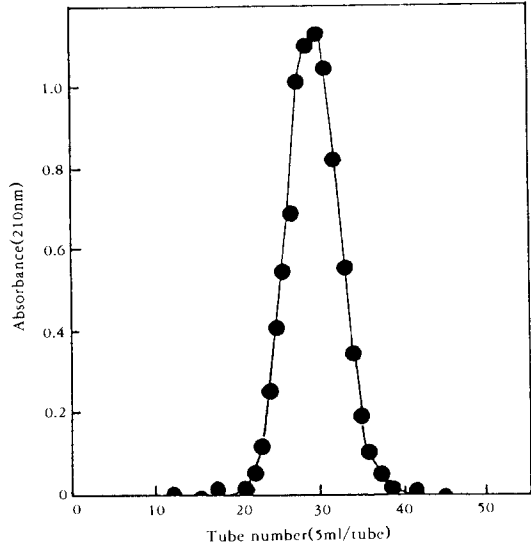


Fig.4. Gel chromatography of cetylpyridinium chloride precipitate on Sephadex G-200 (column size:2.5×80cm).

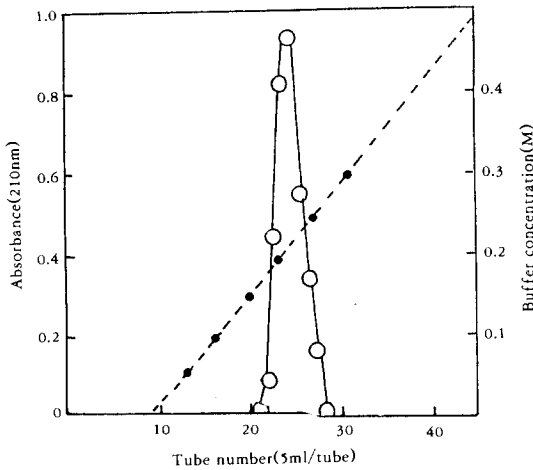


Fig. 3. Ion-exchange chromatography of Fr-I on DEAE-cellulose(column size:2×50cm).

크기가 서로 다른 2종의 혼합물인 것으로 판단되었다. Fr-I 은 blue dextran 2,000의 void volume 위치에서 용출하여 고분자 물질로 생각되었으며, 당반응에서 양성이고 peptide bond에 유래하는 210nm의 자외선을 강하게 흡수하는 성질을 나타내었다. 반면, Fr-II는 sucrose와 비슷한 용출부피 위치에서 용출하는 저분자 물질로 당반응의 양성 성분이었다.

한편, Fr-I의 DEAE-cellulose이온 교환 chromatography를 행한 결과는 Fig. 3에서와 같이 흡착구 분획에서 나타나 이 분획의 구성 성분은 음이온 작용기를 갖는 산성의 고분자인 것으로 생각되었다.

Fr-I 분획 성분은 산성 작용기를 갖는 것으로 생각되었으므로 이를 확인하기 위해서 crude biopolymer를 CPC(cetylpyridinium chloride)로 처리하였으며, 그 결과 crude polymer는 침전물과 상등액으로 분리되고, CPC와의 착물형성을 보여서 이 고분자는 다가 음이온적 특성을 갖는 산성 고분자임을 확인할 수 있었다. 아울러 CPC 침전물과 상등액을 각각 DEAE-cellulose 이온교환 chromatography한 결과 CPC 침전물은 Fr-I 분획구 그리고 CPC 상등액은 Fr-II 분획구 성분과 서로 일치하여서 Fr-I 분획 성분이 다가 음이온을 갖는 산성 고분자 즉, 다가 고분자 전해질임을 알 수 있었다. 또, 침전물은 높은 점도를 갖는 반면, 상등액은 점성이 매우 낮아서 본 균주에 의해 생산되는 생물고분자의 점성에 대한 주요인 성분은 CPC 침전물 또는 Fr-I 성분인 것으로 생각되었다.

이와 같이 CPC처리로 정제한 산성고분자는 Sephadex G-200에 의한 gel chromatography의 결과 (Fig. 4), 균일한 분자량 분포의 단일 peak분획을 나타내어 gel 여과에 의한 균일성을 보였다. 따라서

crude biopolymer를 CPC(cetylpyridinium chloride)와 acetone으로 처리한 후, 동결건조하여 정제 시료로 하였다(Fig. 1 참조).

#### 생성 생물고분자의 이화학적 성상

정제시료 및 이의 가수분해 시료에 대한 정색 반응의 결과는 Table 3과 같다.

시료 모두 당의 일반 정색 반응인 Anthrone반응에서 음성을 나타내어 당이 존재하지 않음을 보였고, 산성당(uronic acid), ketose 및 hexosamine도 존재하지 않는 것으로 관찰되었다. 그러나 미가수분해 정제시료는 Ninhydrin과 Biuret반응에서 모두 음성으로 단백질에 대한 정색반응을 나타내지 않은 반면, 가수분해 시료는 Ninhydrin반응에서 양성으로 나타나 가수분해로 아미노산이나 peptide성분이 유리됨을 보였다.

따라서 CPC침전물의 구성성분을 알아보기 위하여 가수분해물을 이온교환수지로 분리하고 paper chromatography한 결과, 그림으로 나타내지는 않았지만 glutamic acid만이 검출되었으며, 그 함량은 약 98%이었다.

한편, H<sup>+</sup> 형의 정제시료에 대한 원소분석의 결과에서는 C, H 및 N함량이 각각 46.60, 5.45 및 10.7%이었다. 이들 값으로부터 계산한 C:H:O:N의 비율은 5:7:3:1(46.6/12:5.45/1:37.16/16:10.79/14)로서 glutamic acid(C<sub>5</sub>H<sub>7</sub>O<sub>3</sub>N)<sub>n</sub> 잔기 분자량을 129로 하여 계산하면, 각 C, H 및 N의 실측값은 이론값의 약 99%에 해당하였다. 따라서 시료 고분자는 glutamyl polypeptide 또는 PGA(polyglutamic acid)로 존재한다고 생각되었다.

한편, Fig. 5에서 보는 바와 같이 정제시료 고분자는 H<sup>+</sup> 및 Na<sup>+</sup> 형 모두 UV흡수 spectrum에서 peptide bond유래의 말단기 흡수를 보였다. 그러나 Fig.

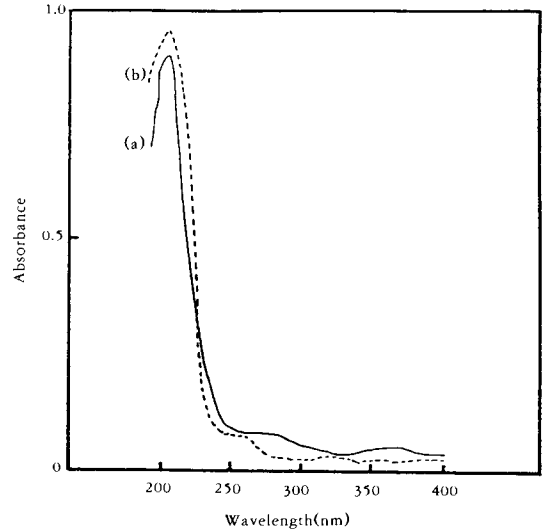


Fig. 5. UV-VIS absorption spectra of Na<sup>+</sup> form (a) and H<sup>+</sup> form(b) of Fr-I.

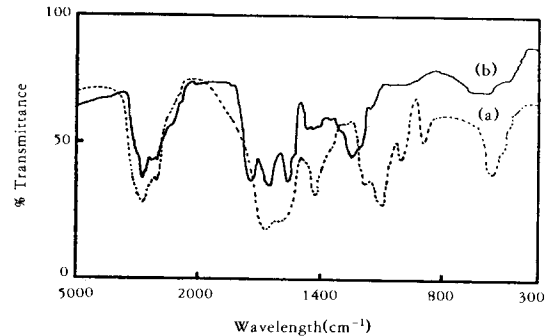


Fig. 6. IR spectra of Na<sup>+</sup> salt form(a) and H<sup>+</sup> form(b) of Fr-I.

Table 3. Color reactions of the produced biopolymer.

Test	Purified biopolymer	Hydrolysate
Anthrone reaction	Negative	Negative
Fehling reaction	Negative	Positive
Seliwanoff reaction	Negative	Negative
Elson-Morgan reaction	Positive	Positive
Carbazole-Sulfate reaction	Negative	Negative
Iodine reaction	Negative	Negative
Ninhydrin reaction	Negative	Positive

6의 IR spectrum에서는 Na<sup>+</sup> 형과 H<sup>+</sup> 형이 다른 양상을 보여서 H<sup>+</sup> 형인 경우는 OH 혹은 NH의 특이적인 3,400cm<sup>-1</sup>에서의 강한 흡수, caroxyl기 유래의 1,725cm<sup>-1</sup> 부근에서의 흡수와 amide I의 강한 흡수인 1,630cm<sup>-1</sup> 및 amide II의 1,530cm<sup>-1</sup>의 강한 흡수를 나타내었다. 반면, Na<sup>+</sup> 형인 경우는 carboxyl기 유래의 1,725cm<sup>-1</sup> 부근에서의 흡수가 없고, carboxyl기가 염상태로 존재할 때 관찰되는 1,600, 1,400cm<sup>-1</sup> 부근에서 흡수를 나타내었다. 즉, Na<sup>+</sup> 형의 경우는 COONa→COO<sup>-</sup>의 공명에 의해 1,725cm<sup>-1</sup>의 흡수가 소비되고, 1,600 및 1,400cm<sup>-1</sup>로 분열되어 불규칙한 형태를 나타내는 것으로 생각되었다. 이러한 UV 및 IR 흡수 특성은 Sawa들

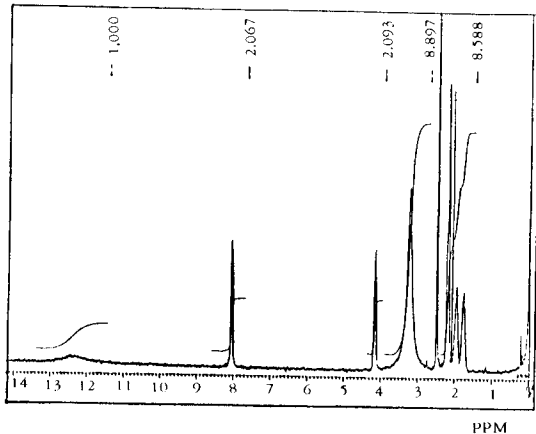


Fig. 7. NMR spectrum of H<sup>+</sup>-form of Fr-I.

The peaks were assigned as follows:

$\delta$ 2.2(d 2H,  $\beta$ -CH<sub>2</sub>)     $\delta$ 3.2(s 2H,  $\gamma$ -CH<sub>2</sub>)  
 $\delta$ 4.2(s 1H,  $\alpha$ -CH)     $\delta$ 8.2(s 1H, N-H)

(45, 46)의 *Bacillus subtilis* No.5E가 생산하는  $\gamma$ -PGA에 대해 보고한 특성과 매우 유사하였다. 특히, 정색반응에서는 유리 아미노기의 정색반응인 Ninhydrin반응이 음성이고, amide의 정색반응인 Biuret반응이 음성인 것으로부터 본 시료 고분자는  $\gamma$ 결합을 갖는 polyglutamic acid인 것으로 추측되었다. 아울러 <sup>1</sup>H-NMR의 관측결과에서는 Fig. 7에 나타난 바와 같이  $\delta$ 2.20에서(d 2H,  $\beta$ -CH<sub>2</sub>),  $\delta$ 3.2에서(s 2H,  $\gamma$ -CH<sub>2</sub>),  $\delta$ 4.2에서(s 1H,  $\alpha$ -CH) 그리고  $\delta$ 8.2에서(s 1H, N-H)를 확인할 수 있었고, 따라서  $\gamma$ -PGA로 확인되었다. 또, 생성된  $\gamma$ -PGA에 대하여 Scott의 spectrophotometer법(42)에 의하여 구한 중화 당량은 약 350으로  $\gamma$ -PGA 2.7잔기당 1개의 음이온이 존재하였으며 gel chromatography법(43)으로 구한 분자량은 약  $6.5 \times 10^5$  Daltons이었다.

## 요 약

미생물을 이용한 생분해성 고분자 생산연구의 일환으로 토양으로부터 고점성의 생물고분자 생산균주를 분리하고, 이 분리균에 대한 분류학적 성질 및 생성 생물고분자의 이화학적 성상을 검토, 규명하였다. 분리균주는 *Alcaligenes*속의 한 균종으로 동정하였으며, 호알카리성 균주의 특성을 나타내었다. CPC(cetylpridinium chloride)침전 및 acetone처리하여 정제한 산성 고분자 물질은 carboxyl기를 갖고 자의

흡수가 강한 glutamic acid만을 구성성분으로 하였고, glutamic acid는  $\gamma$ -peptide 결합의  $\gamma$ -polyglutamic acid로 존재하였다. 중화당량은 약 350으로  $\gamma$ -PGA 2.7잔기당 1개의 음이온이 존재하였으며, 분자량은 약  $6.5 \times 10^5$  Daltons이었다.

## 참고문헌

1. 土肥 義治(1990), 生分解性 高分子材料, P. 11, 工業調査會, 東京.
2. 諸貫 秀樹(1990), 工業材料, **38**, 26.
3. 中根 和博(1990), 高分子, **39**, 284.
4. 土肥 義治(1990), 高分子, **39**, 272.
5. D. Brown(1991), *Biotechnology: The Science and Business*, V. Moses and R. E. Cape eds, P. 341, Harwood Academic Press, London.
6. P. A. Holmes(1985), *Phys. Technol.*, **16**, 32.
7. T. Suzuki, T. Yamane and S. Shimizu(1986), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **23**, 322.
8. C. L. Brierley, D. P. Kelly, K. J. Seal and D. J. Best(1985), *Materials and Biotechnology. Biotechnology. Principles and Applications*, J. Higgins et al eds, P. 163, Blackwell Sci. Pub., Oxford.
9. M. Yalpani and P. A. Sanford(1987), *Commercial Polysaccharides: Recent Trends and Developments. Industrial Polysaccharides*, M. Yalpani ed, P. 311, Elsevier, New York.
10. 遠藤 剛(1988), 아미노산 폴리머-合成 と 應用, P. 55, シーエムシー, 東京.
11. R. B. Woodward and C. H. Schram(1947), *J. Am. Chem. Soc.*, **69**, 1552.
12. 今堀 和友, 山川 民夫(1975), 生化學辭典, P. 1205, (株)東京化學同人, 東京.
13. 藤本 康夫(1974), 폴리머아미노산-應用 と 展望, 講談社サイエンティフィック, 東京.
14. G. Ivanovics and V. Bruckner(1937): *Z. Immunitätsforsch.*, **90**, 304.
15. M. bovarnick(1945), *J. Biol. Chem.*, **145**, 415.
16. J. Kovace and V. Bruckner(1952), *J. Chem. Soc.*, **42**, 55.
17. 藤井 久雄(1986): 化學と 生物, **24**, 67.
18. C. B. Thorne, C. G. Gomez, H. E. Nocys and R. D. Housewrite(1942), *J. Bacteriol.*, **168**, 307.

19. C. G. Leonard, R. D. Housewrite and C. B. Thorne(1957), *J. Bacteriol.*, **76**, 499.
20. C. B. Thorne, D. M. Molner and C. G. Gomez (1956), *Bacteriol. Proce. Soci. Am. Bacteriologist*, **10**, 7.
21. R. M. Ward, R. F. Anderson and F. K. Dean (1963), *Biotechnol. and Bioengineering*, **5**, 41.
22. G. P. Giadstone(1939), *Brit. J. Expt. Path.*, **20**, 189.
23. C. R. Brewer and W. G. Mcvillough(1945), *Arch. Biochem.*, **10**, 65.
24. C. B. Thorne, G. R. Blind and R. D. Hosewrite(1953), *J. Bacteriol.*, **65**, 472.
25. 谷口 誠(1989), 特開平 1-174397.
26. 喜田 節子, 橋田 渡, 寺本 四郎(1956), 醸工, **34**, 542.
27. 藤井 久雄(1962), 日農化, **36**, 1000.
28. 村尾 尺夫(1969), 高分子, **16**, 1204.
29. 伊東 祐四(1990), 月刊 フードケミカル, **2**, 33.
30. K. Horikoshi and T. Akiba(1982), *Alkalophilic Microorganisms: A New Microbial World*, P. 1, Japan Scientific Co. Press, Tokyo
31. 長谷川 武治(1984), 微生物の分類と同定, 上 P. 203, 學會出版センター, 東京
32. M. F. Chaplin and J. F. Kennedy(1986), *Carbohydrate Analysis: A Practical Approach*, P. 3, IRL Press, Oxford.
33. 中村 道德, 鈴木 繁男(1980), 澱粉科學ハンドブック, P. 190, 朝倉書店, 東京
34. 副島 正美, 菅原 潔(1975), 蛋白質の定量法, P. 109, 東京大學出版會, 東京
35. C. Zweig and J. Sherma(1989), *Handbook of Chromatography*, P. 301, CRC Press, Inc., Boca Ration.
36. 田幸 正邦, 米柄 伴紀, 野村 男次(1977), 農化, **51**, 389.
37. 澤純 彦, 村川 武雄, 村尾 澤夫, 大亦正 次郎(1973), 農化, **47**, 159.
38. 水野 卓, 西澤 一俊(1971), 糖質化學編覽, P. 312, 共立出版, 東京
39. 日本生化學會編(1976), 生化學實驗講座, 4, 糖質の化學(下), P. 367, (株)東京化學同人, 東京
40. D. Keilin and E. F. Hatree(1948), *Biochem. J.*, **49**, 230.
41. S. Abe, J. Jakyama, S. Kinoshita(1967), *J. Gen. Appl. Microbial.*, **13**, 279.
42. J. E. Scott(1960), *Method of Biochemical Analysis*, Vol. 8, P. 162, International Pub., New York.
43. G. Constantopoulos and A. S. Dekaban (1969), *Anal. Chem.*, **31**, 59.
44. N. R. Krieg and J. G. Holt(1984), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 1, Williams & Wilkins, London.
45. 澤純 彦, 村尾 澤夫, 村川 武雄, 大亦正 次郎(1973), 農化, **47**, 167.
46. 澤純 彦, 村川 武雄, 村尾 澤夫, 大亦正 次郎(1973), 農化, **47**, 159.