

알칼리 내성 *Bacillus* sp.가 생산하는 생물 고분자의 정제 및 특성

†이 신 영·원 숙·강 태 수¹·이 명 열²·류 인 덕²·김 진 영³

강원대학교 환경·생물공학부, ¹강원도 농촌진흥원, ²충주산업대학교 식품공학과, ³(주) 김정문 알로에 연구소
(접수 : 1998. 6. 5., 게재승인 : 1998. 9. 2.)

Purification and Characteristics of New Biopolymer Produced by Alkaline-Tolerant *Bacillus* sp.

Shin-Young Lee†, Suk Won, Tae-Su Kang¹, Myong-Yurl Lee², In-Deok Lew², and Jin-Young Kim³

Division of Environmental and Biological Engineering, Kangwon National University

¹Kangwon Provincial RDA, Chuncheon 200-150, Korea

²Department of Food Science and Technology, Chungju National University

³Kim Jung Moon Aloe Co, Ltd

(Received : 1998. 6. 5., Accepted : 1998. 9. 2.)

Biopolymer from alkaline-tolerant *Bacillus* sp. was purified, and its physico-chemical and structural properties were investigated. Crude biopolymer, precipitated by acetone from culture broth was fractionated into two fractions by gel chromatography on Sephadex G-200. Among two fractions, one fraction(PS I), which an acidic biopolymer precipitated by the CPC(cetylpyridinium chloride) treatment was studied further. PS I fraction had carboxyl groups and was positive at color reaction of sugar. PS I fraction also showed UV absorbance at 190-225nm. The purified acidic biopolymer was composed of 4% glucose, 8% glucosamine and 88% glutamic acid. Sugar components of the purified acidic biopolymer seemed to be linked to PGA(polyglutamic acid) which existed in the form of γ -peptide bond. By the results of Smith degradation of sugar components, glucose and glucosamine was bound by 1,3 glucosidic linkage. Therefore, this biopolymer was a glycopeptide, oligosaccharide γ -PGA. We concluded that the equivalent weight and the molecular weight of this biopolymer were estimated as about 171 and 5×10^5 dalton, respectively.

Key Words : Biopolymer, *Bacillus* sp., purification, physico-chemical property

서 론

당단백질(glycoprotein)은 올리고당과 단백질이 공유결합한 당 접합체(glycoconjugate)의 하나로, 동·식물의 장거나 조직 및 미생물의 세포막, 세포벽 등에 널리 분포되어 있다(1, 2). 당단백질에 대한 연구는 1960년 Spro 등(3, 4)이 태아의 장액과 동물 및 인체 세포의 thyroid로부터 각각 fetuin 및 thyrogloblin의 당단백질을 분리, 정제하면서부터 시작 되었으며, 1970년대에 들어와서는 당단백질의 생물학적 및 생화학적인 중요성도 점차 알려져서 구조, 생합성 경로 및 생물체 내에서의 각종 역할도 규명 되었다(5). 그동안 당단백질 내의 당사슬은 당단백질의 peptide chain의 보호, 활성형 단백질 구조의 유도 및 유지에 관여하며, 효소, 호르몬 및 virus 등의 수용체 부위로서 생물학적인 중요

역할을 담당하는 것으로 알려져 왔다(6-8). 미생물이 생산하는 당단백질의 GTase(glucosyl-transferase) 저해작용이나 면역 증강 작용 등도 알려져 있으며, 특히 최근에 생체 내 중요 정보 및 인식물질로 인식되어 의약품 소재로서의 용도가 기대되고 있어 이에 대한 관심은 매우 고조되고 있는 실정이다(9-11).

그동안 저자들은 미생물에 의한 유용 생물 고분자의 생산 및 의 용도 개발 연구의 일환으로 토양으로부터 생물 고분자 생성 균주로서 알칼리 내성 *Bacillus* sp의 한 균주를 분리, 동정 하였고(12), 이 균주의 알칼리 발효 생성 물질로서 고점성의 생물 고분자를 얻어 생산 조건을 최적화한 바 있다(13).

본 연구에서는 이 *Bacillus* sp.가 생산하는 고점성의 생물 고분자를 분리 정제하여 이의 화학적 및 구조적 특성을 조사 검토하였으며, 아울러 고점성의 정제 물질이 당단백질을 규명하였다.

재료 및 방법

균주 및 배양

본 연구에 사용한 생물 고분자의 생산 균주는 토양에서 분리

† Corresponding author : Division of Environmental and Biological Engineering, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea
Tel : 0361-250-6273, Fax : 0361-243-6350
e-mail: sylee@cc.kangwon.ac.kr

하였던 알카리 내성의 *Bacillus* sp.이다(12). 호알카리성 미생물 분리용의 환천 사면 배지(12,14)에서 30°C로 12시간 배양한 후 4°C에서 보존하였으며, 4주마다 계대 배양하면서 실험에 사용하였다.

배지는 이 등(13)이 생물 고분자의 최적 배지로 보고한 배지로 121°C에서 15분간 가압 살균하여 사용하였다. 또 접종균의 전배양은 종균 배양 배지 50mL를 함유한 250mL 삼각 flask에 환천 사면 배지에서 보존하였던 균주를 백급이로 2-3회 접종하고, 30°C에서 48시간 진탕하여 행하였다. 본배양은 2.6L의 jar fermenter(Marubishi MD-250)를 사용하여 배지용량 1L에 전배양액을 3%(v/v) 접종한 다음, 30°C, pH 10, 통기 속도 2vvm 및 교반 속도 120rpm 으로 36시간 동안 회분배양하였다

생물 고분자의 분리 및 정제

배양액을 9,000×g의 원심력으로 60분간 원심분리하여 균체를 제거하였고, 상등액에 동량 부피의 acetone을 첨가하여 교반용으로 회전하면서 고점성의 섬유상 집합체를 얻었다. 이를 증류수에 녹여 농결시킨후 0.05torr에서 24시간 동결 건조하고 crude biopolymer로 하였다. Crude biopolymer는 0.4M NaCl 용액에 녹인 후 원심분리하여 불순물을 제거하였고, Sephadex G-200 column(2.5×80cm)에서 0.4M NaCl용액으로 25mL/hr 속도로 용출하여 정제하였다. 또 gel chromatography하여 얻은 시료(PS I 및 PS II)는 0.01M phosphate buffer(pH 6)에 녹여서 전처리한 DEAE-cellulose column(2×50cm)에서 0.01 M phosphate buffer를 사용하여 16mL/hr의 속도로 단계 용출하여 정제하였다. Fraction collector(ISCO model Petriever III)

로 5ml씩 분획하였으며, 당은 phenol-sulfuric acid법(15), 단백질은 spectrophotometer(Perkin-Elmer 552S)를 사용하여 UV 측정법(16)(210nm)으로 측정하였다.

한편, CPC(cetylpyridinium chloride) 침전법에 의한 분리, 정제는 crude biopolymer를 0.2%(w/v)가 되도록 증류수에 녹여 80°C에서 30분간 가열한 후 9,000×g에서 30분간 원심분리하고 불용성 물질을 제거시켰으며, 상등액에 최종 농도가 0.4%(w/v)가 되도록 CPC를 첨가하여 complex를 생성시켰다. 30°C에서 30분간 방치시킨 다음 원심분리하였고, 이로부터 Na⁻형 및 H⁺형 시르를 분리, 정제하였다(Figure 1)(17, 18).

임계 염농도(critical salt concentration)의 결정

임계 염농도는 Scott의 방법(19,20)에 따라 구하였다. 즉 농도(0.1-0.5 M)를 달리한 3종의 염(KCl, NaCl 및 CaCl₂) 용액 5mL에 CPC 10mg과 시료 0.5mg을 넣고 혼합한 후 30°C에서 30분간 방치하여 CPC complex가 충분히 이루어지도록 하였다. 원심분리후 상등액에 남아있는 CPC 농도를 spectrophotometer로 260nm에서의 흡광도를 측정하였으며, 용액 중의 생물 고분자의 농도를 70%로 유지하는데 필요한 염용액의 농도(normality)를 임계 염농도로 하였다.

생물 고분자의 이화학적 분석

UV/VIS 흡수 spectrum은 정제 시료(Na⁻형과 H⁻형)를 증류수에 25µg/mL되게 용해시켜 UV/VIS spectrophotometer로 190-500nm 범위에서 주사하여 측정하였다. IR spectrum은 IR spectro-photometer(Perkin-Elmer 783)를 사용하여 4000-200cm⁻¹의 범위에서 측정하였으며, 시료는 KBr 정제법으로 조제하였다. 한편, 원소분석은 Element analyzer(Perkin-Elmer 240-C)를 사용하여 분석하였다.

구성 성분의 분석

정제 시료를 상법에 따라 가수분해하고, 각종 이온 교환 수지에 의해 중성당, 아미노당 및 아미노산 성분을 분획하였다. 미 가수분해 시료 및 가수분해 조건을 달리한 가수분해물 시료에 대하여 0.1%(W/V) 농도로 하여 Ninhydrin, Biuret, Anthrone, Fehling, Elson- Morgan, Diphenylamine, Naphtoresocinol, Ferric-orcinol 반응 등의 각종 정색 반응을 관찰하였고(21-23), 구성 성분을 HPLC로 동정 및 정량하였다. 이 때, 당 및 아미노당의 HPLC는 µ-sugar pak column을 사용하여, solvent로 물, flow rate는 0.5ml/min의 조건에서 RI detector로 실시하였다. 또 유리 아미노산은 시료액을 pH 7.0으로 조절하여 Whatman filter paper No 4로 여과하고 계속해서 cartridge C₁₈로 여과하였다. 이 여액을 HPLC(Waters) 분석용 시료로 하였으며, 분석 조건은 column: AccQ Tag(3.9×150mm), mobile phase: effluent A(sodium acetate buffer, pH 5.02), effluent B(acetonitrile water, 60:40, v/v), flow rate: 1 mL/min, injection volume: 50µl, detector: Waters 474 scanning fluorescence detector이었다.

당의 산 가수분해 양상

가수분해 양상은 시료를 각각 1N H₂SO₄와 4N HCl로 100°C에서 가수분해하면서 2시간 간격으로 1mL씩 취하고 pH를 중성

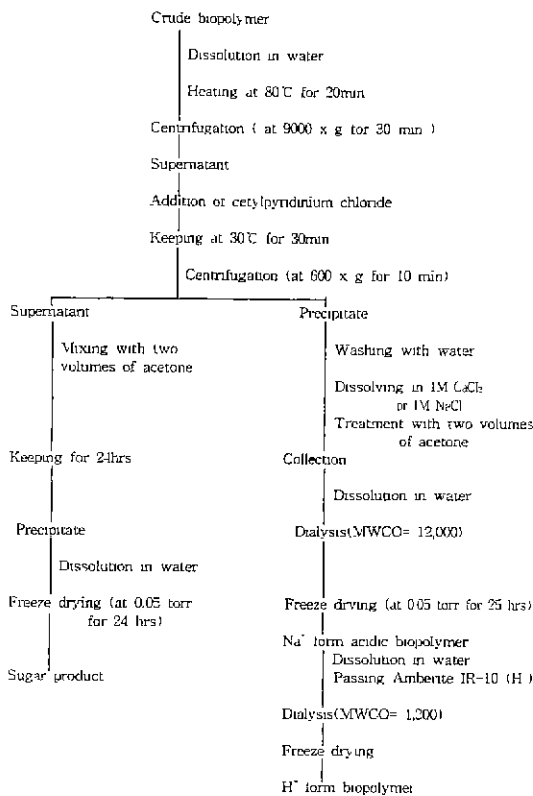


Figure 1. A Procedure for purification of crude biopolymer by CPC precipitation.

으로 조정된 후, 가수분해 시간에 따른 유리 glucose와 glucos-amine을 각각 glucose-oxidase법(24) 및 Elson-Morgan법(21)으로 정량하여 구하였다.

Smith 분해에 의한 당결합 양상의 결정

시료 0.1g을 0.01M sodium metaperiodate 용액 100mL에 녹여 4°C의 암실에서 4일간 산화시켰다(25) 산화 및 환원물의 분석은 1N H₂SO₄ 또는 4N HCl로 100°C에서 8시간 가수분해하고, gas chromatography로 확인하였다. GC(Varian Star 3400CX)는 SE-30 packed column(25m×0.32mm×0.5µm)을 사용하여, column temp. 200°C, chart speed 0.1cm/min의 조건에서 FID detector로 실시하였다.

중화 당량(neutralization equivalent)의 결정

중화 당량은 Scott의 spectrophotometry법(26)에 따라 구하였으며, 시료 1mg과 결합하는 cetylpyridinium의 양(mg), X를 다음 식으로 계산하였다.

$$X = (1/C) (O.D_{control} - O.D_{sample}) / (O.D_{control})$$

여기서 C는 1mL에 존재하는 시료의 양(mg)이다

시료의 중화 당량은 cetylpyridinium의 당량(304)을 위에서 구한 X값으로 나누어 구하였다.

분자량의 측정

분자량은 gel chromatography에 의한 Constantopoulos 등의 방법(27)에 준하여 측정하였다. 0.4M NaCl 용액으로 평형시킨 Sephadex G-200 column(25×80 cm)에 시료 생물 고분자 및 표준 당용액을 증진하고 0.4M NaCl 용액으로 25mL/hr의 속도로 용출하여 5mL씩 분획하였다 Phenol-sulfuric acid법(15)으로 당을 측정하여 용출물 부피(eluate volume)를 구하였으며, 분자량은 표준당 분자량의 대수값과 용출부피를 도시하여 얻어지는 표준직선으로부터 결정 하였다. 이때 표준당으로는 분자량이 서로 다른 3종의 dextran과 sucrose를 사용하였다

결과 및 고찰

생물고분자의 분획 및 정제

Sephadex G-200을 분리용 column으로 하여 crude biopolymer를 gel chromatography한 결과는 Figure 2와 같다.

그림에서 보는 바와 같이, crude biopolymer는 분자 크기가 서로 다른 PS I과 PS II의 두 peak 성분으로 분획되었다. PS I은 blue dextran 2,000의 void volume 위치에서 용출하는 고분자 물질로, 당반응에서 양성이고 peptide bond에 유래하는 210nm의 자외선을 강하게 흡수하는 자외 흡수 성분이었다 반면, PS II는 sucrose와 비슷한 용출 부피 위치에서 용출하는 저분자 물질로서 당반응에서 양성인 성분이었는 데, 이는 아세트톤 침전시 제거되지 않은 불순물로 생각되었다. PS I 분획에 대하여 Figure 3에서와 같이 DEAE-cellulose 이온 교환 chromatography한 결과, 흡착구 분획에서 용출되어 이 분획의 구성 성분은 음이온 작용기를 갖는 산성의 고분자인 것으로 생각되었다

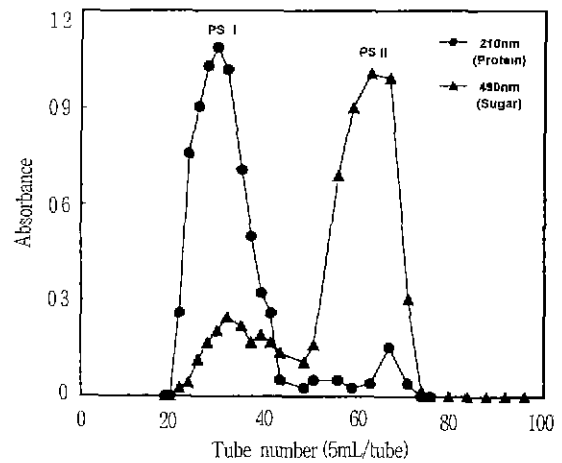


Figure 2 Fractionation of crude biopolymer by gel chromatography on Sephadex G-200.

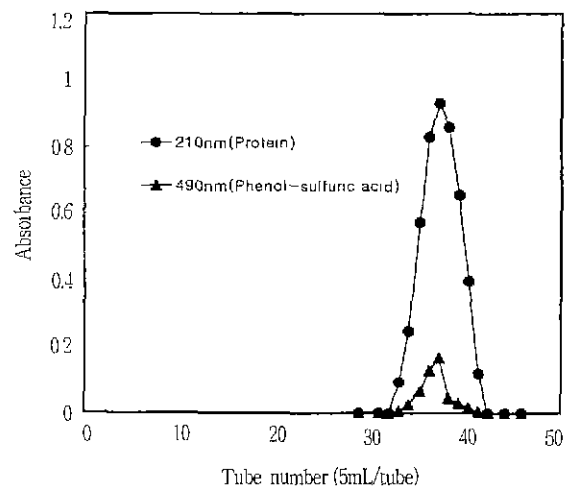


Figure 3 Ion-exchange chromatogram of PS I on DEAE cellulose.

한편, 다가 음이온적 특성을 갖는 산성 고분자는 일반적으로 여러가지 4가 암모늄염, 특히 CPC(cetylpyridinium chloride)와 물에 불용성인 착화합물을 형성하는 성질을 보이므로(20), crude biopolymer를 CPC로 처리하였다. 그 결과, crude polymer는 CPC와 착물을 형성하여서 침전물과 상등액으로 분리되므로서 본 고분자가 다가 음이온적 특성을 갖는 산성 고분자임을 확인할 수 있었다. 또 침전물은 상등액과는 달리 높은 점성을 보여서 본 Bacillus sp.에 의해 생산되는 생물 고분자의 고집성에 대한 성분은 CPC 침전물인 것으로 생각되었다. 일반적으로 CPC와 산성 고분자의 착물은 높은 무기염 농도에서는 분해되어 다시 용해되는데, 용해에 필요한 염의 임계 농도는 산성 고분자의 밀도가 클수록 높다(20) 이 임계농도는 산성 고분자의 CPC에 의한 분리나 정제의 최적 조건을 결정하는 중요 인자이며, 또 음이온 전하의 작용기를 판단하는 중요 기준이 된다(28). 따라서, 분리 정제 조건의 결정 및 음이온 작용기를 판단하기 위해 KCl, NaCl 및 CaCl₂를 사용하여 각 염의 임계 농도를 검토하였으며, 그 결과는 Figure 4와 같다.

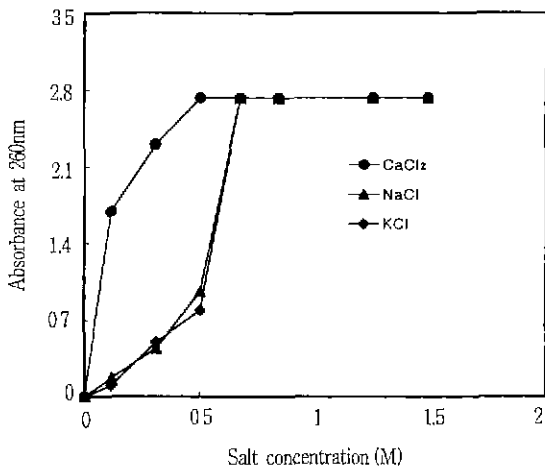


Figure 4. Determination of critical salt concentration.

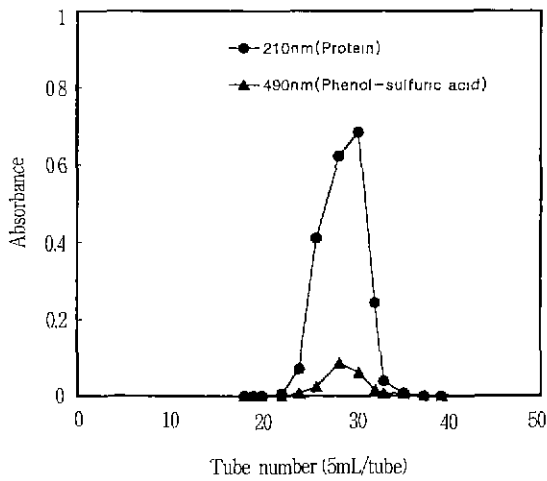


Figure 5. Gel chromatogram of cetylpyridinium chloride precipitate on Sephadex G-200.

임계농도는 0.5-0.7M로 1가 염의 경우는 약 0.7M이고, 2가 염의 경우는 0.5M이었으며, 이 값은 carboxyl기의 결합 세기와 비슷하였다. 통상 거대 음이온의 CPC와의 결합 세기는 $\text{COO}^- < \text{PO}_4^- < \text{SO}_4^-$ 의 순이며, sulfate기를 갖는 해조류의 산성 다당류와 같은 경우는 2-3M의 높은 임계 농도를 갖는다(28). 따라서 산성 고분자를 정제할 때(Figure 1) 염농도는 1M로 하였다 이와같은 조건에서 CPC처리로 정제한 산성 고분자는 Sephadex G-200에 의한 gel-chromatography의 결과(Figure 5), PS I의 용출분획과 같은 위치에서 균일한 분자량 분포의 단일 peak 분획을 나타내고 gel 여과에 의한 균일성을 보였다. 따라서 crude polymer를 gel chromatography(Figure 2)하였을 때 나타났던 저분자 불순물은 CPC 처리로 제거됨을 알 수 있었다.

구성 성분

CPC 침전물을 그대로 또는 가수분해한 다음, 정색 반응을 살펴 본 결과, 자료로서 나타내지는 않았으나 시료 모두 당의 일반 정색 반응인 Anthrone 반응에서 양성을 나타내어 당이 존재함을 보였다. 산성당(uronic acid)과 ketose는 존재하지 않았으나 가수분해후 환원성을 나타내었으며, hexosamine과 glucose가 유리됨을 보였다. 또 Ninhydrin과 Biuret 반응도 가수분해

전에는 음성으로 단백질에 대한 정색 반응은 나타나지 않았으나, Ninhydrin 반응은 가수분해후 양성으로 나타나 가수분해로 아미노산이나 peptide 성분이 유리됨을 보였다.

한편, CPC 침전물의 각 구성 성분을 알아보기 위하여 가수분해물을 이온 교환 수지로 분리하고 HPLC로 검출한 결과는 Figure 6과 같다. Glucose, glucosamine 및 glutamic acid가 검출되었으며, 구성 성분을 정량한 결과, glucose가 약 4%, glucosamine이 약 8%이었고, glutamic acid는 약 88%의 함량을 나타내었다. 일반적으로 식물, 동물 및 미생물에서 분리한 당단백질의 경우, 당함량은 매우 다양하며 0.5%의 몇몇 collagen에서 부터 혈액형을 결정하는 당단백질의 85%까지 크게 변하는 것으로 알려져 있다(29)

한편, CPC 침전물을 일정 시간 간격으로 가수분해하면서

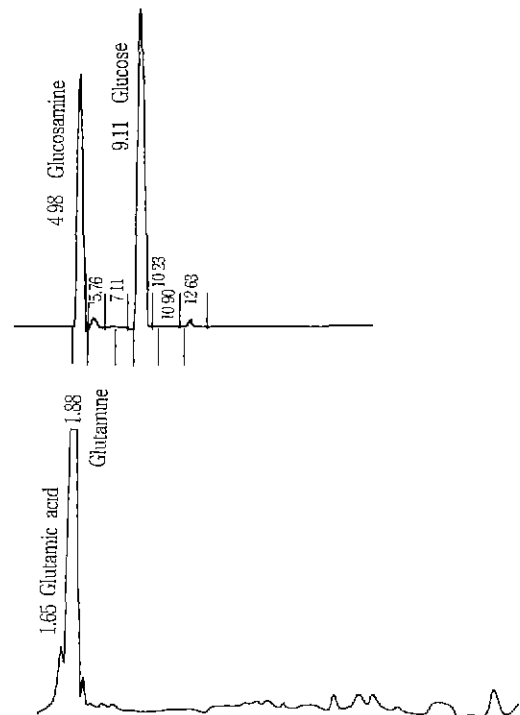


Figure 6 HPLC analysis for components of hydrolysate of CPC precipitate.

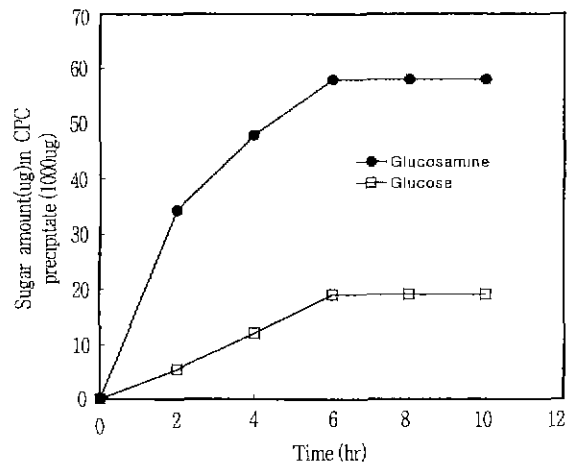


Figure 7. Time course of acid hydrolysis of CPC precipitate.

glucose와 glucosamine의 유리 양상을 조사한 결과는 Figure 7과 같다. Glucose와 glucosamine은 가수분해 시간이 경과함에 따라 점차 유리되어 6시간 후 각각 최대값에 도달하였다. 또 최대값은 구성 성분의 정량 결과와도 잘 일치하여 결국 본 고분자에 존재하는 당성분은 유리 성분이 아닌 glutamic acid 성분과 결합되어 있는 것으로 판단되었다.

UV 및 IR 흡수 특성

그림으로 나타내지는 않았으나 산성 고분자(H⁻형)의 UV 흡수 spectrum은 peptide bond 유래의 말단기 흡수를 보였고, Figure 8의 IR spectrum에서는 Na⁺형과 H⁻형이 다른 양상을 보여서 Na⁺형인 경우는 당류의 특이적인 3,400cm⁻¹에서의 강한 흡수 및 carboxyl기가 염 상태로 존재할 때 관찰되는 1,600cm⁻¹부근에서 흡수를 나타내었다. Carboxyl기 (이온성) 유래의 1,500cm⁻¹ 부근에서의 흡수도 보였으나 carbon 산 2량체의 C=O 신축 진동으로 고려되는 1,700cm⁻¹부근의 흡수는 관찰되지 않아 ionic acid가 검출되지 않은 것과 잘 일치하였다. H⁻형인 경우는 carboxyl기 유래의 1,725cm⁻¹부근에서의 흡수와 amide I의 강한 흡수인 1,630cm⁻¹ 및 amide II의 1,530cm⁻¹의 강한 흡수를 나타내었다. 이러한 IR 흡수 특성은 Sawa 등(16,30)의 *Bacillus subtilis* No.5E가 생산하는 γ -PGA에 대해 보고한 특성과 매우 유사하였으며, UV 흡수 특성에서도 흡사하였다. 특히, 정색반응에서는 Ninhydrin과 Biuret 반응에서 모두 음성을 보여서 본 시료 고분자의 glutamic acid는 γ -PGA 형태로 존재할 것으로 추측되었다.

한편, H⁻형 PS I의 원소분석 결과, C,H 및 N은 각각 41.60, 4.13 및 9.64%로, 이들 값은 본 시료 고분자가 γ -PGA로만 존재한다고 생각하고 glutamic acid (C₅H₇O₃N)_n 잔기 분자량을 129로 하여 계산하면, 각 C, H 및 N은 약 90%에 해당하였다. 일반적으로 *Bacillus subtilis* ATCC 9945, *Bacillus subtilis* NRRLB-2612, *Bacillus anthracis* HN, *Bacillus anthracis*, *Bacillus subtilis* No.5E 등은 pH 6.5-7범위 및 glutamic acid를 함유한 배지 조건에서 분자량이 서로 다른 PGA를 생산하는 것으로 보고되었다(30-34). 그러나 본 균주로 부터 분리한 생물 고분자의 경우는 pH 10의 알칼리 조건에서 soluble starch를 함유한 배지로 부터 생산되며, 정색 반응, 산 가수분해 양상 및 IR spectrum에서 당의 존재가 확인되었으므로 지금까지 보고된 *Bacillus* sp의 γ -PGA와는 다른 당 접합체 고분자 물질인 것으로 생각되었다.

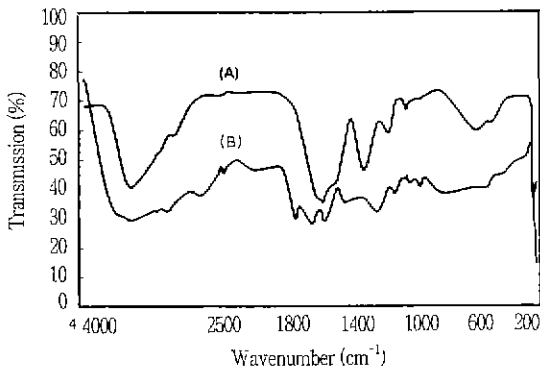


Figure 8. IR spectra of Na⁺ salt form(A) and H⁻ form(B) of PS I.

당결합 양상

정제 생물 고분자의 당성분에 대한 당결합 양상을 살펴보기 위하여 Smith 분해하고 GC로 분석한 결과는 Figure 9와 같다. 그림에서 볼 수 있는 바와 같이, glucose와 glucosamine이 최종 산화 환원물로 검출되었다. 일반적으로 Smith 분해시 glucose가 1,6 또는 1,4 결합으로 이루어져 있을 때는 최종 산화 환원물로 각각 glycerol 및 erythritol이 생성되고 1,2결합 및 1,3 결합일 때는 각각 glyceraldehyde와 glucose가 생성된다. 또한 1,6 및 1,4결합의 chain에 2번이나 3번 탄소위치에서 side chain이 존재하게 되면 side chain 연결 결합 부위인 glucose는 산화되지 않고, 최종 산화 환원물로 glycerol이나 erythritol이 함께 생성된다(35) 따라서 정제 시료인 CPC 점침물은 glucose와 glucosamine의 1,3결합으로 구성되어 있는 oligo당과 PGA가 결합하여 존재하는 것으로 추정되었다

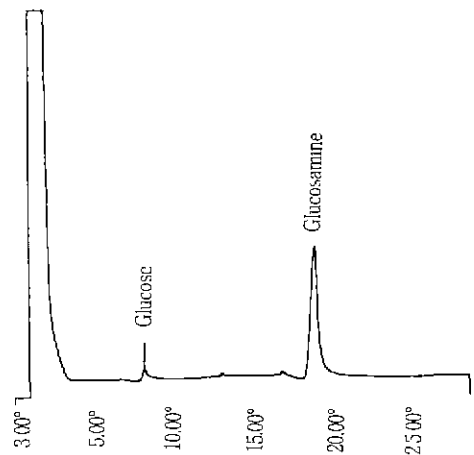


Figure 9. GC chromatogram of Smith degradation product.

중화 당량(neutralization equivalent) 및 분자량

Scott의 spectrophotometry법(26)에 의하여 시료와 증류수에 대한 흡광도를 측정하여 중화 당량을 구한 결과, 그 값은 약 171이었다. 이는 본 시료를 polypeptide로만 결합되어 있는 glutamic acid의 중합체로 가정하여 단위체의 평균 분자량을

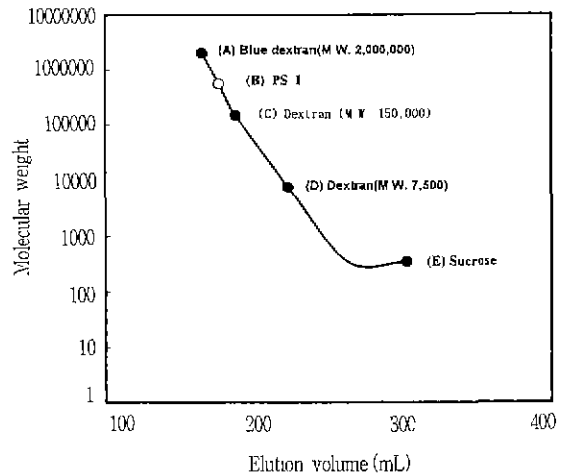


Figure 10. Determination of molecular weight of PS I by gel chromatography

129로 할 때, 약 1.3잔기당 음이온이 1개 존재함을 의미하는 것으로 볼 수 있다.

한편, 각 standard dextran 및 정제 시료를 gel chromatography 하고 용출 부피를 구한 후, 분자량의 대수값과 용출 부피를 도사한 결과는 Figure 10과 같다. 정제 고분자의 용출 부피는 분자량 15×10^4 의 dextran과 분자량 2×10^6 인 blue dextran 2,000 사이로 본 생물 고분자의 분자량은 약 5×10^5 정도이었다.

요 약

미생물에 의한 유용 생물 고분자의 생산 및 이의 이용성에 대한 연구의 일환으로 알칼리 내성 *Bacillus* sp.가 생산하는 고점성의 생물 고분자를 분리 정제하고, 이의 물리·화학적 성질 및 구조 특성을 조사하였다. 배양액의 아세톤 침전으로 얻은 crude biopolymer부터 Sephadex G-200에 의한 gel chromatography에 의해 분자 크기가 서로 다른 두 분획으로 분리되었으며, CPC 처리에 의해서 분획되는 산성 고분자 물질(PS D)을 정제하여 조사하였다. 이 산성 고분자 물질은 carboxyl기를 갖는 당반용 양성의 지외 흡수가 강한 성분이었으며, 4%의 glucose, 8%의 glucosamine 및 88% glutamic acid를 함유하였고, 당성분은 glutamic acid와 결합된 상태로 존재하는 것으로 추정되었다. Glutamic acid는 r-PGA로 존재하였으며, glucose와 glucosamine은 1,3결합의 oligo당으로 존재하였다. 따라서 본 *Bacillus* sp의 생물 고분자는 r-PGA와 oligo당이 결합한 일종의 glycopeptide인 것으로 추정 되었다. 중화 당량은 약 171로 r-PGA의 13 잔기당 1개의 음이온이 존재 하였으며, 분자량은 약 5×10^5 이었다.

참 고 문 헌

- Hughes, R. C. (1983) : *Glycoprotein*, p. 7, Chapman and Hall, London.
- Montreuil, J. (1980) : *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*(M. L. Wolfrom and R. S. Tipson eds.), Vol. 8, p. 157, Academic Press, New York.
- Spiro, R. G. (1960) : Studies on Futuin, a Glycoprotein of Fetal Serum *J Biol. Chem.*, 235, 2860-2869
- Spiro, R. G. (1961) : Evaluation of the Homogeneity of Several Thyroglobulin Preparations. *J. Biol. Chem.*, 236, 2901-2907.
- Montreuil, J. (1980) : *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*(M.L.Wolfrom and R S Tipson eds.) Vol. 8, p. 160, Academic press, New York.
- Montreuil, J., S. Bouquelet, H. Debray, B. Fournet, G. Spik and G. Strecker (1986) *Carbohydrate Analysis*(M. F. Chaplin and J.F. Kennedy eds.), p.143. IRL Press, Oxford
- 山本, 竹川, 門脇, 熊谷, 枘倉 (1987) . Flavobacterium 屬 細菌による 糖 タンパク 分解酵素의 生産と 利用. *醸酵と工業*, 45, 364-365
- Kang, K. S. and I. W. Cottell (1979) : *Microbial Technology*, 2nd ed.(D. Perlman ed.), Vol. 1, p. 417, Academic Press, Inc., New York.
- Endo, A., D. Hayashida, and S. Murakawa (1983) : Mutastein, a New Inhibitor of Adhesive-Insoluble Glucan Synthesis by Glucosyltransferases of *Streptococcus mutans*. *The Journal of Antibiotics*, 36, 203-207.
- Fukushima, K., R. Motoda, K. Takada, and T. Ikeda (1981) : Resolution of *Streptococcus mutans* Glucosyltransferases into Two Components Essential to Water-Insoluble Glucan Synthesis. *FEBS Letter*, 128(2), 213-216.
- Yalpani, M. (1987) : *Industrial Polysaccharide*(M. Yalpani ed.), Vol. 3, p. 311, Elsevier Pub., New York
- 이신영, 이범수, 신원철, 권익부, 유주현 (1991) : 생물고분자 생산 알칼리 내성균주의 분리 및 특성, *한국식품과학회지*, 23, 161-166
- 이신영, 이범수, 이근익 (1991) : 알칼리 내성 *Bacillus* sp.의 생물고분자 생산조건에의 최적화. *한국식품과학회지*, 23, 167-174.
- Horikoshi, K. and T. Akiba (1982) : *Alkalophilic Microorganisms: A New Microbial World*, p. 9. Japan Scientific Soc. Press, Tokyo.
- Dubois, M. (1956) : Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Anal. Chem.*, 28, 350-356.
- 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.
- 松田和雄. 生物化學實驗法多 20, 糖の分離・精製法 (1989), p. 62, 學會出版センター, 東京.
- 澤純彦, 村川武雄, 村尾澤夫, 大赤正次郎 (1973) : *Bacillus subtilis* No 5E 菌株により 生産 される ポリグルタミン酸の 分離精製ならびに その化學的 諸性質について. *農化*, 47, 159-165
- Scott, J. E. (1955) : The Solubility of Cetylpyridinium Complexes of Biological Poly-anions in Solution of Salts. *Biochem. Biophys. ACTA*, 18, 428-429.
- Scott, J. E. and D. Glick (1960) : *Methods of Biochemical Analysis*, Vol. 8, p. 146, International Pub., New York.
- Gonall, A. G., C. S. Bardawill, and M. M. David (1949) : Determination of Serum Proteins by Means of the Biuret Reaction. *J. Biol. Chem.*, 117, 751-766.
- 日本生化學會編 (1976) . 生化學實驗講座, 4, 糖質の化學 (F), p. 367, (株) 東京化學同人, 東京.
- Chaplin, M. F. (1986) . *Carbohydrate Analysis*(M. F. Chaplin and J. F. Kennedy eds.), p. 3, IRL Press, Oxford.
- Bergmeyer, H. U. and E. Berni (1974) : Determination of Glucose with Glucose-Oxidase and Peroxidase. *Method of Enzymatic Analysis*(H.U. Bergmeyer ed.), Vol. 3, pp. 1205-1215. Academic Press, New York.
- Lavavitch, J. M. and P. M. Ray (1974) . Turnover of Cell Wall Polysaccharides in Elongating Pea Stem Segments. *Plant Physiol.* 53, 669-673.
- Scott, J. E. (1960) . *Method of Biochemical Analysis*, Vol. 8, p. 162. International Pub., New York

27. Constantopoulos, G., A. S. Dekaban and W.R. Carroll (1969) : Determination of Molecular Weight Distribution of Acid Mucopolysaccharides by Sephadex Gel Filtration. *Anal. Biochem.*, **31**, 59-70.
28. Anno, K, H. Terahata, Y. Hayashi, and N. Seno (1968) · *Agr. Biol. Chem.*, **30**, 495
29. Spiro, R. G. (1966) : *Method in Enzymology*(E.F. Neufeld and V. Ginsbury eds.), Vol. 8, p. 3, Academic Press, New York.
30. 澤純彦, 村尾澤夫, 村用武雄, 大亦正次郎 (1973) : *Bacillus subtilis* No.5E により生産されるポリグルタミン酸の物理化学的諸性質の解明. *農化*, **47**, 167-175.
31. Bovarnick, M. (1942) · The Formation of Extracellular d(-) Glutamic Acid Polypeptide by *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.*, **145**, 415-424.
32. Abe, S, K. Takayama, and S. Kinoshita (1967) : Taxonomical Studies on Glutamic Acid-Producing Bacteria. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **13**, 279-301.
33. Ward, R. M., R. F. Anderson, and F. K. Dean (1963) : Polyglutamic Acid Production by *Bacillus subtilis* NRRL B-2612 Grown on Wheat Gluten. *Biotechnology and Bioengineering*, **5**, 41-48.
34. Hara, T and S. Ueda (1982) : Regulation of Polyglutamate Production in *Bacillus subtilis*(natto) : Transformation of High PGA Productivity. *Agric. Biol. Chem.*, **46** (9), 2275-2281
35. Brett, C. T. (1981) : The Characterization of β -glucans. *Techniques in Carbohydrate Metabolism*, Vol. B3, B307, 1-11, Elsevier/North-Holland, New York