

Streptomyces albulus 배양액으로부터 ϵ -poly-L-lysine의 분리 Separation of ϵ -poly-L-lysine from the fermentation broth of *Streptomyces albulus*

<Abstract>

Grown in the secondary broth of production media, the strain *Streptomyces albulus* has increased more the production of its metabolite ϵ -poly-L-lysine, one of poly(amino acid)s used as disinfecting food additives, than the strain in the primary culture of growth nutrients. Having the strain removed, the large concentrate obtained by ultrafiltrating the secondary culture broth. The concentrated production broth exchanged into followed by detecting in UV flowcell at 220nm the peptide bond of the components eluting the adsorbed proteins and polylysine with NaCl salt of gradient concentration, and has separated into five components. Among them the component in the fourth peak fraction has proved to be the pure ϵ -poly-L-lysine after the portion being hydrolyzed the fraction with HCl into amino acid followed by being the composing amino acid analysis.

**Key words : separation, ϵ -poly-L-lysine, fermentation
*Streptomyces albulus***

* 정회원, 전남대학교 Post-doc, 工博
전남대학교 공업화학과 졸업

- * Faculty of Applied chemistry,
Chonnam National University

* *정회원, 전남대학교 응용화학부 교수, 工博
고려대학교 화학공학과 졸업

* * Faculty of Applied chemistry,
Chonnam National University

500-757 광주광역시 북구 용봉동 300번지
E-mail cypark@chonnam.ac.kr

Chonnam National University 300
Yongbongdong, Bukku, Kwangju, Korea

1. 서 론

일반적으로 대부분의 항생물질은 미생물 감염에 대한 치료용으로 사용되지만 항 종양 항생물질(antitumor antibiotics), 식물 병원균을 제어하기 위하여 혹은 식품 첨가제나 동물생장 촉진제등의 특수한 목적으로 사용되기도 한다¹⁾.

이들중 식품 첨가제로 사용되는 항생물질은 식품의 표면에 직접 사용하거나 통조림 등 식품의 저장유통에 사용된다. 또는 생선, 육류, 가금류의 신선도를 유지하기 위하여 열음이나 침적통에 넣어 사용하기도 한다.

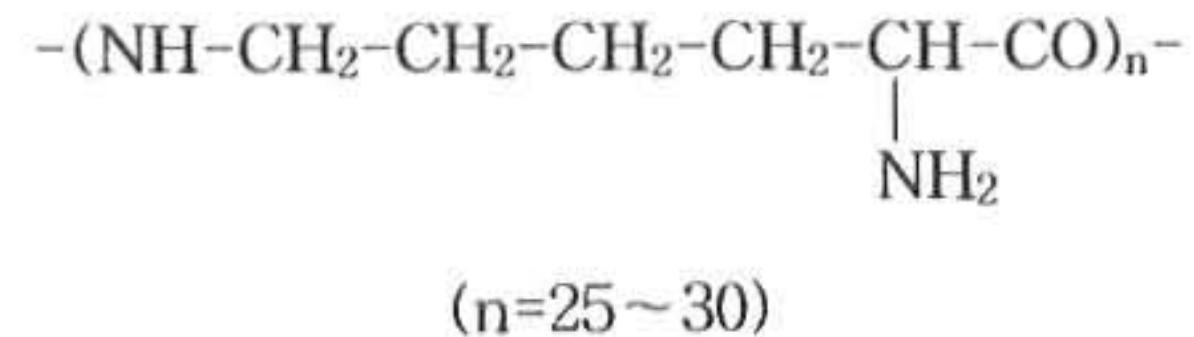
인구의 급격한 증가와 생활양식의 변화로 인하여 식품의 상품화와 이의 대량유통으로 인하여 식품의 변폐는 많은 문제를 야기하였고 최근에는 많은 양의 항균물질이 식품분야에서 사용되는 실정이다. 식품분야에서 미생물에 의한 변질을 방지하기 위한 항균작용은 살균작용(Bactericidal action)과 정균작용(Bacteriostatic action)으로 크게 나눌 수 있다. 살균방법은 경제성과 안전성을 고려하여 열처리 방법이 가장 널리 채택되고 있으나 열에 의한 조직, 풍미 변화 때문에 신선도와 맛을 중요시하는 식품의 특성상 열처리 량을 감소시키면서 저장기간을 연장하고자 각종 보존제를 사용하여 미생물의 생장중지 혹은 살균을 시도하고 있다²⁾.

그러나 대부분의 보존제는 화학적 합성품으로 그 안전성이 경우에 따라 문제되고 있으며 근래 소비자의 화학 합성품에 대한 기피현상으로 천연계 항생물질에 대한 관심이 고조되고 있다. 특히 식품분야에서는 천연소재가 안전성이나 기호도에서 선호되고 있으며 생물공학적 기술에 의해 생산된 식품소재는 "천연물"로 인정되고 있기 때문에 값이 비싸다는 이유로 사용되지 못하던 여러 천연 첨가물의 생산성이 새로운 기술로 높아진다면 대부분의 화학합성품을 대치할 수 있다고 전망되고 있다³⁾.

ϵ -poly-L-lysine은 자연계의 필수 아미노산인 L-리신(L-lysine) 단량체로 이루어진 균질한 선형 고분자(linear homopolymer)이다. 이 ϵ -poly-L-lysine은 pH가 중성인 수용액에서는 강한 양이온을 띠게 되어 알긴산과 같은 음이온을 띠는 화합물과 결합시켜 약물 전달용 미소구체(microcapsule)⁴⁾를 제조하거나 동물 세포 접착제

(cell adhesive)⁵⁾를 만드는데 이용되기도 한다. 또한 친수성과 친유성을 함께 갖는 아미노산의 특성으로 화장품용 유화제나 의약용으로도 사용된다^{6,7)}. 이러한 특별한 용도가 있는 폴리리신은 1977년 Shima등이 처음으로 토양에서 *Streptomyces albulus*를 선별하고 배양액중의 ϵ -poly-L-lysine을 분리한 이후로 이에 관한 많은 연구가 이루어졌다⁸⁻¹¹⁾.

Shima등은 토양에서 알칼로이드 생산균주를 분리하던 중 알칼로이드 지시약인 Dragendorff 시약에 반응하는 물질을 생산하는 균주를 분리하였는데 이를 배양해 보니 배양액중에 ϵ -poly-L-lysine이 다량 함유된 것을 확인하여 이 균주를 ϵ -poly-L-lysine을 생산하는 균주라는 의미에서 그 균주명을 *Streptomyces albulus spp. lysinopolymerus*라 명명하였다^{8,9)}.



(n=25~30)

Fig. 1 Structure of ϵ -Poly-L-lysine from the *Streptomyces albulus lysinopolymerus*.

*Streptomyces albulus spp. lysinopolymerus*에서 생산되는 입시론 폴리리신은 화학적으로 합성되는 알파 폴리리신과는 달리 Fig.1과 같이 아미노산의 알파 카복실기(α -carboxylic group)와 입시론 아미노기(ϵ -amino group) 사이에 펩타이드 결합(peptide bond)을 하고 있는 특별한 구조를 갖고 있다. ϵ -poly-L-lysine은 L-lysine이 선형으로 25개 내지 30개 정도가 결합된 선형 균질 고분자 물질로, 강한 항균력을 지니고 있다고 알려진 균질 폴리 아미노산(Homo poly amino acid)들과 마찬가지로 그램 양성과 그램 음성의 미생물에 ml당 약 1~8 μg 의 적은 양으로도 충분한 항균력을 갖고 있는 것으로 조사되었다^{10,11)}. 현재 발효에 의하여 생산되는 ϵ -poly-L-lysine은 인체 적합성을 갖고 있으면서도 세균과 바이러스에 대한 강한 항균적인 특성으로 인하여 식품 첨가제로 대량 생산 이용되고 있으며 많은 장점들을 갖춘 ϵ -poly-L-lysine의 용도는 더욱 확대될 것으로 생각된다.

생체 고분자 물질인 폴리리신은 일반 단백질 분해효소에 의해 생분해되면서도 강한 항균력을 갖고 있으며 친수성과 친유성을 함께 띠는 특성을 갖고 있어 환경적인 측면에서도 인간과 매우 친근한 물질이다⁷⁾. 따라서 발효를 통한 폴리리신의 생합성과 생산된 폴리리신의 분리는 천연 물계 항생물질의 실용화를 위하여 매우 필요하고도 중요한 연구라 생각된다.

2. 실험재료 및 방법

2.1 ϵ -poly-L-lysine 생합성

2.1.1 균주

본 실험에 사용한 균주는 폴리리신을 생산하는 *Streptomyces albulus* spp. *lysinopolymerus*로써 일본 생명공학연구소 (NIBH, National Institute of Bioscience and Human Technology, Tsukuba, Japan)에서 분양 받아 사용하였다. 분양 받은 균주는 Shoji Shima등이 사용한 Glycerol-Yeast extract - Ammonium sulfate배지(GYA medium) 5mℓ를 넣은 마개 달린 시험관에 균주 일부를 접종하여 24시간동안 배양하여 균을 활성화시킨 다음 이를 한천 1.8%를 함유한 고형배지에 다시 도말하였다. 고형배지에서 육안으로 확인하여 분리된 한 개의 균집을 백금이로 떼어내서 24시간동안 배양한 균액을 플라스크배양에 사용하였다.

평상시의 균주는 고체배지에 도말하여 4°C 냉장보관하고 2주에 한번씩 계대배양 하였으며, 일부는 1.5mℓ 용량의 에펜도르프튜브에 균액 0.5mℓ와 멸균한 글리세린 0.5mℓ를 넣고 영하 70°C 이하에서 보관하였다.

2.1.2 배지(medium)

플라스크와 발효기 배양에서 사용한 배지는 Shoji Shima등이 제시한 GYA배지를 사용하였다⁸⁾⁻¹¹⁾. 배양은 2단계 배양을 실시하고 이때 사용한 균체 생장용 GYA배지의 성분조성은 Table 1에 나타내었다. 생장용 배지에서 24시간 배양하여 대수기에 이른 균체만을 수거하여 폴리리신을 생산하는 2차 배지에서 폴리리신을 대량생산하였는데 이때 사용한 2차 배지의 탄소원은 1차 배지의 Glycerol 50g대신 Glucose 20g를 사용하였고, 부족한 탄소원을 아미노산 전구물질

인 구연산 20g으로 대체하여 폴리리신 생합성을 유도하도록 하였다. 또한 폴리리신 합성을 지속시키기 위해 0.1N NaOH로 pH를 4.2로 조정하였다.

Table 1. Composition of the culture growth medium for *Streptomyces albulus* (GYA medium)

Components	Concentration(g/L)
Glycerol	50g
(NH ₄) ₂ SO ₄	10g
Yeast extract	5g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.5g
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.03g
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.04g
0.02M KH ₂ PO ₄ -Na ₂ HPO ₄ (pH 6.8)	

2.1.3 세정균체(washed mycelium)

1차 배지에서 24시간 진탕 배양하여 대수기에 도달한 균주 *Streptomyces albulus*는 직경이 약 1내지 2mm인 구형의 균사체를 형성하며, 이 균체를 8000rpm으로 10분간 원심분리하여 균체만을 회수하고 배양액 절반양의 멸균증류수로 두 차례 세척하여 균체 외벽에 있는 불순물을 완전히 제거하여 세정균체를 마련하였다.

2.2 ϵ -poly-L-lysine의 분리

2.2.1 분리과정

Streptomyces albulus 배양액중 폴리리신 분리는 Fig.2에 나타낸 바와 같은 과정으로 진행하였다.

먼저 배양액은 세정균체를 9일간 배양하고 메틸오렌지 분석법으로 폴리리신을 정량하여 배양액 1리터에 폴리리신 3.6g이 포함된 배양액 3리터를 얻었다. 배양액 3리터는 고속 원심분리기를 사용 8000rpm에서 15분간 원심분리하여 배양액으로부터 균체를 제거하였다. 균체를 제거한 배양액 3리터중 2.5리터를 한외여과지(Ultrafiltration membranes YM1, M.W cutoff=1000, Amicon Inc., Beverly, MA, USA)를 장착한 여과셀을 사용하여 배양액을 농축하였다. 농축한

배양액은 약 85㎖였고 0.1N NaOH를 사용하여 8.5로 pH를 조정한 후 부피는 약 100㎖로 처음의 배양액을 25배로 농축하였다. 위 과정에서 시료의 농축은 불필요한 과정일 수 있으며 희박한 원시료를 그대로 사용할 수 있으나 크로마토그래피 실험시 시료주입기의 주입용량이 한계로 단백질 분리과정 관찰이 어려워질 수 있어 농축을 시행하였다.

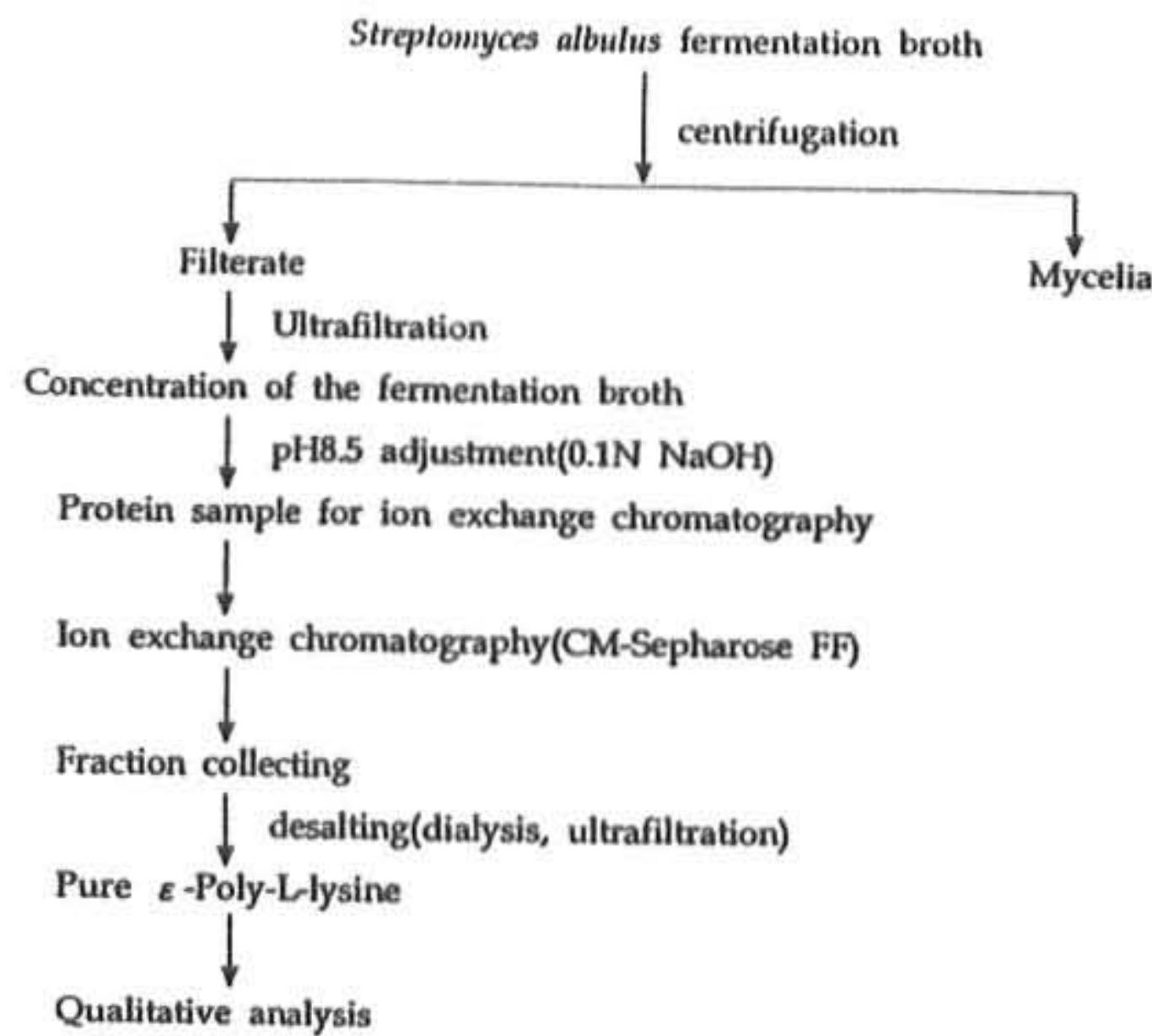


Fig.2 Isolation and purification Flow-sheet of ϵ -poly-L-lysine from the *St. albulus* fermentation

2.2.2 폴리리신의 정량분석

배양액중의 폴리리신은 Itzhaki의 방법¹²⁾을 이용하였다. Itzhaki의 분석방법은 균체를 제거한 배양액 2㎖에 1mM 메틸오렌지 2㎖를 넣고 약 30분간 실온에 방치한다. 이때 폴리리신은 메틸오렌지와 복합체가 되어 석출되며 복합체는 3000rpm으로 15분간 원심분리하여 제거하고 상동액을 취하여 465nm 파장의 흡광도 변화로부터 Sigma사의 표준시료(polylysine hydro chloride, P2658)로 작성한 보정곡선과 비교하여 배양액내의 폴리리신양을 계산하였다.

또한 컬럼으로부터 해리된 폴리리신은 일반적인 단백질의 흡광파장인 254nm나 280nm에서 흡광하지 않기에 민감도가 충분한 220nm의 흡광도로 정량분석 하였다.

2.2.3 크로마토그래피 컬럼

실험에 사용한 컬럼은 파마시아사(Pharmacia

Biotech, Uppsala, Sweden)의 C10/20(D=10mm, L=20cm)컬럼으로 칼럼내부가 코팅되어 단백질의 부착이 방지되도록 설계된 유리컬럼으로 이온교환 크로마토그래피용 컬럼이다. 이 유리 컬럼에 어댑터를 사용하여 컬럼의 길이를 최대 3cm까지 줄일 수 있도록 하였다. 펌프와 컬럼사이, 컬럼과 분광광도계사이는 외경 1mm의 투명한 폴리에틸렌튜브로 사용하여 연결하였다.

이온교환수지는 제조업체에서 미리 팽윤시킨 상태(preswelled)로 제공되어 일정량을 비이커에 부어 완충액에 풀어 컬럼에 균일하게 충진시켰다. 수지를 충진한 컬럼은 실험중 수지가 채워진 컬럼베드의 부피변화를 방지하며, 수지를 조밀하게 하기 위하여 실험에서 수행하게 될 최대유속의 1.5배정도로 높여 충분한 시간동안 완충액을 흘린후 실험에 사용하였다.

2.3.4 컬럼 크로마토그래피 장치

배양액에서 폴리리신을 분리하기 위하여 이온교환 크로마토그래피를 수행하였다. 정확한 경사전개를 위하여 사용한 고압 크로마토그래피 장치(HPLC, Vintage 2000 series, Orom Tech, Korea)는 두 개의 헤드가 있는 한 개의 고압펌프와 컬럼에서 분리된 단백질을 감지할 수 있는 자외선 분광광도계(UV detector)로 구성되어 있다. 또한 대량의 시료주입을 위한 시료주입기(sample injector)를 크로마토그래피 장치 외부에 설치하였고, 분광광도계의 출력을 기록하는 컴퓨터로 구성되어 있다.

크로마토그래피 장치중 자외선 분광광도계 내부에는 9μl 용량의 흐름셀(flowcell)이 장착되어 짧은 시간동안 컬럼으로부터 용출된 단백질 흐름도 감지할 수 있도록 설계되어 있다. 분당 0에서 10㎖범위에서 유량을 가변할 수 있는 펌프는 완충액과 염(salt)을 담은 두 개의 병으로부터 크로마토그래피용 소프트웨어에 의하여 등농도 전개와 경사전개를 수행하여 염의 농도를 자유로이 조절할 수 있으며, 병 내부의 완충액과 염 용액은 헬륨기체를 계속 방출하여 용액중의 공기를 제거하였다.

이온교환 크로마토그래피 시행중 컬럼으로부터 용출된 단백질은 필요에 따라 분획 분취기(Fraction collector, KMC-2000, K.M.C., Seoul, Korea)를 사용하여 시료를 모은 다음 소량의 시

료는 벤조산이 처리된 투석막(Dialysis tube)으로 대량의 시료는 한외여과지를 사용하여 탈염(Desalting)하였다. 순수정제한 폴리리신의 정성분석은 젤 크로마토그래피에 의한 분자량과 강산으로 가수분해한 산 가수분해물의 아미노산분석을 조사하여 분석하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. ϵ -poly-L-lysine 생합성

항균물질과 같은 2차 대사물질의 대량생산방법에는 생합성하고자 하는 물질의 전구물질을첨가하거나, pH나 온도 등의 요인을 변화시킴으로써 미생물의 생리를 조절하여 최종 대사물질양을 증가시키는 방법을 많이 사용한다. 따라서 ϵ -poly-L-lysine 대량생산을 유도하기 위하여 ϵ -poly-L-lysine 생산용 2차 배지에 구연산을 2% 첨가하고 pH를 조정하여 생장용 배지에서 배양한 균체를 세정하고 ϵ -poly-L-lysine 생산용 2차 배지에 접종하였다. Fig.3은 배양시작 후 9일 동안 배양액의 pH변화와 ϵ -poly-L-lysine 축적량을 관찰한 결과이다. 배양액의 pH는 구연산의 완충력에 의해 4.2에서 4.5사이를 유지하였으며 ϵ -poly-L-lysine 축적량은 9일째 최고 3.6g/L을 보였다. 이후에는 배양액 내에 다량 축적된 ϵ -poly-L-lysine으로 인하여 균액의 빛깔이 옅은 청색으로 변화되며 균체는 급격히 사멸하였다.

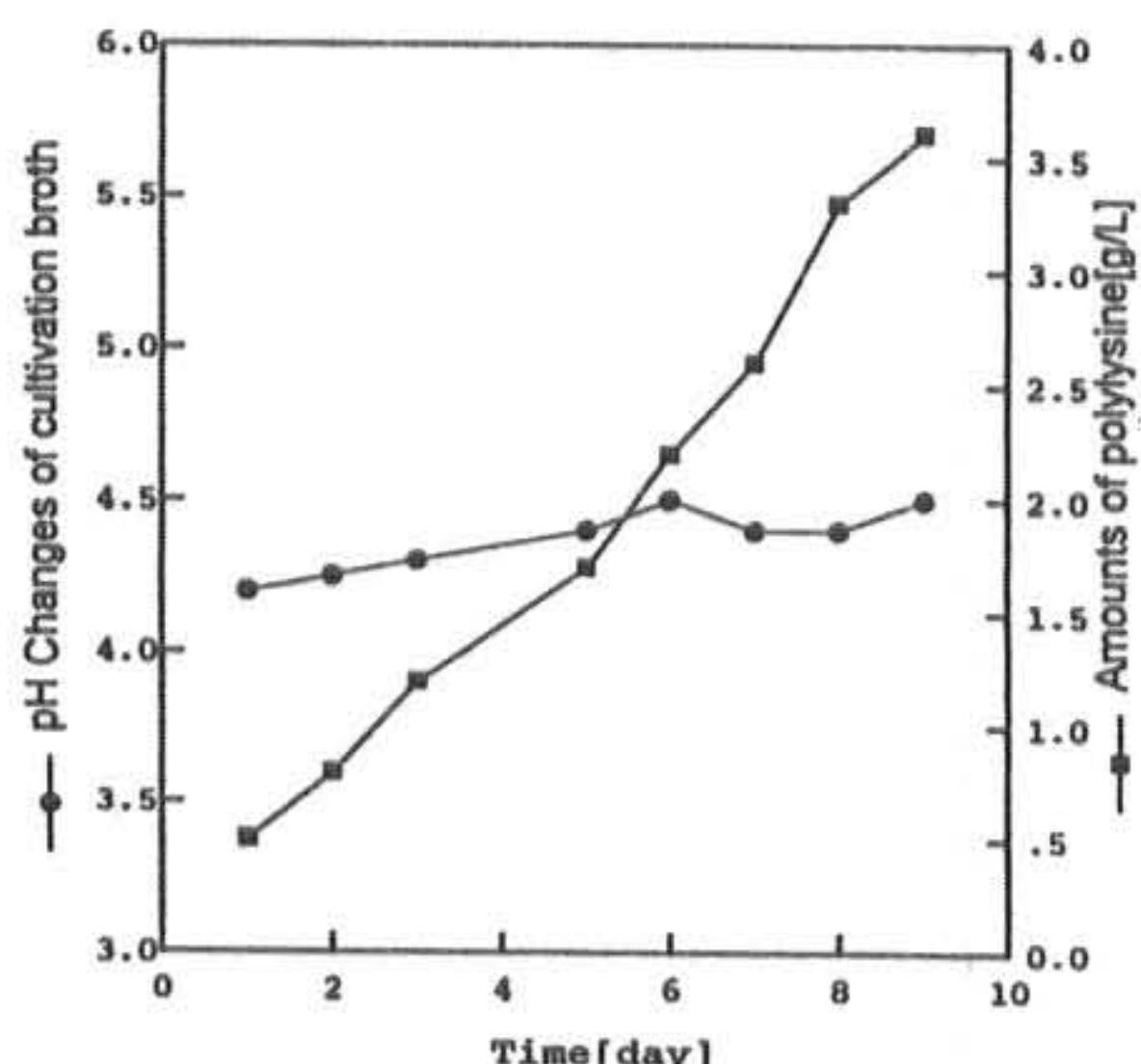


Fig.3 Production of ϵ -poly-L-lysine by washed mycelium at pH in a medium with 2% citric acid.

이 결과는 세정균체를 이용하여 배양할 때 배지의 pH를 조정하고 생합성 유도물질인 구연산을 첨가하면 1단계의 발효기 배양에 비해 ϵ -poly-L-lysine을 6배 이상 생산이 가능하였다. 이는 Shoji Shima의 결과인 리터당 5g의 생합성 양에 비해 적은 양이었으나 균체 접종량과 반복된 실험으로 향상시킬 수 있는 차이로 생각되었다.

3.2 ϵ -poly-L-lysine의 분리

이온교환 크로마토그래피를 사용하여 단백질을 분리할 때 고려하여야 할 변수는 완충액의 pH, 염의 세기와 염 전개방식 등이 있다.

여러 pH와 염 세기를 조절하여 예비실험을 실시하여 완충액의 pH를 8.5로 결정하였다. 여기서 가능하면 낮은 농도의 염을 사용하여 이온교환된 단백질을 해리시킬 수 있는 pH가 최적이나 원하는 ϵ -poly-L-lysine의 수율을 고려하여 약간의 불순성분이 함께 흡착되더라도 분리하고자 하는 ϵ -poly-L-lysine이 모두 이온교환시키기에 충분한 pH를 결정하였다. 또한 완충액은 pH8.5에서의 충분한 완충력을 고려하여 Tris-HCl로 선정하였으며 단백질의 이온교환을 방해하지 않는 낮은 농도인 20mM로 염세기를 결정하였다.

CM-Sepharose FF 수지를 채운 베드의 길이(Bed length)는 6.8cm로 베드부피(Bed volume)는 5.34ml이었다. 이 칼럼에 준비한 배양액 시료 20 μ l를 주입하고 이온 교환 크로마토그래피를 실시하였다. 칼럼내부를 평형화시킨 후 완충액을 흘리면서 시료를 주입하고 최초 15분간 세척하여 흡착되지 않은 성분들을 완전히 제거하고 2M의 NaCl을 이용하여 선형 경사전개를 실시하였다. 결과는 보이지 않았으나 선형 경사전개 결과 확실한 분리가 이루어지지 않아 분리되지 않은 성분들과 주피크와의 분리를 위해 경사전개 기울기를 낮추고 마지막 단계에서는 급격히 염의 기울기를 높인 비선형 경사전개를 실시하였다. Fig.4의 결과에서 알 수 있듯이 주피크 이전에 성분이 3개로 분리되며 이온교환된 전체 단백질 성분이 5개로 확인되었다. 이때 분리된 성분을 분획 분취기를 사용하여 시료를 모은 다음 젤 크로마토그래피와 산 가수분해물의 아미노산분석을 실시하여 칼럼으로부터 용출되어 나타나

는 네 번째 피크가 ϵ -poly-L-lysine임을 확인하였다. 경사전개시 측정한 220nm 파장의 흡광도를 고려할 때 ϵ -poly-L-lysine은 전체 성분의 약 81.2%로 배양액의 대부분이 ϵ -poly-L-lysine임을 알 수 있었다.

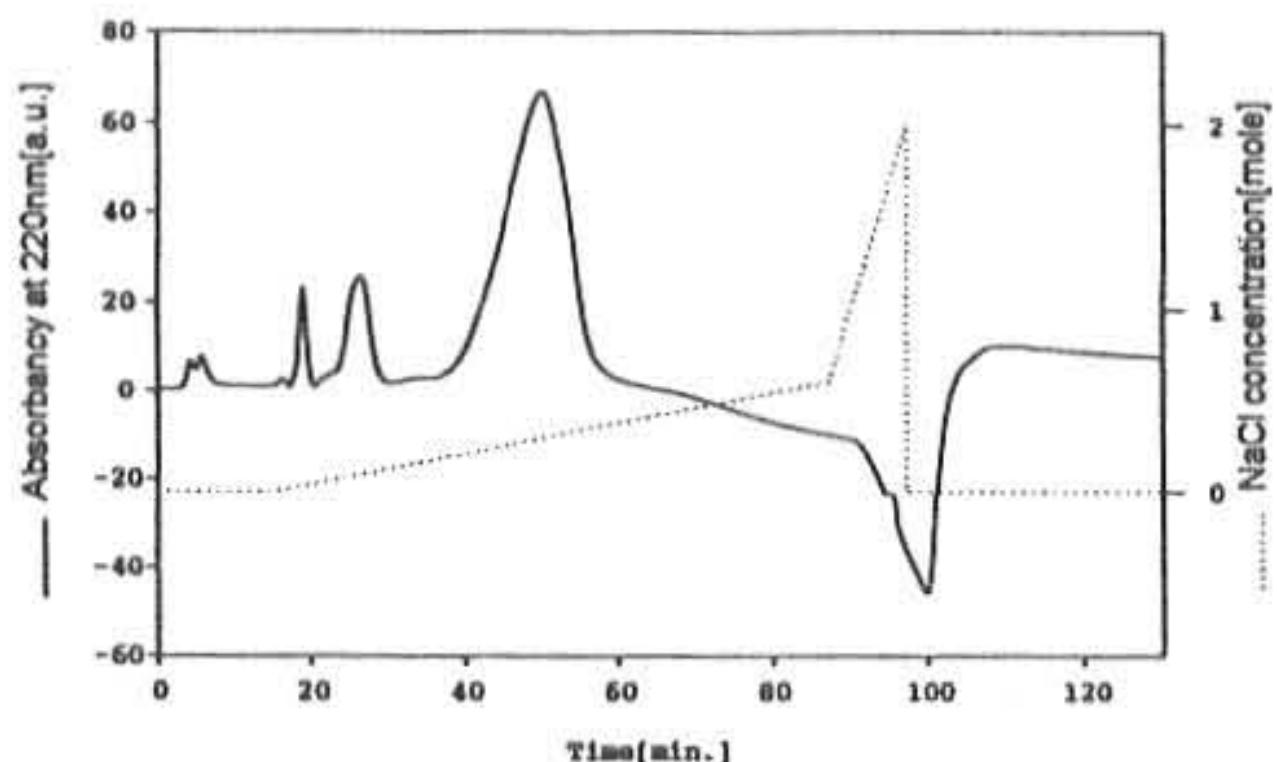


Fig.4 Chromatogram of fermentation broth of *Streptomyces albulus* with a nonlinear salt gradient elution

위의 결과로부터 pH 8.5 20mM Tris-HCl 완충액을 사용하여 시료를 크로마토그래피한 결과 염 농도는 최대 1.5M로도 칼럼에 흡착된 전 단백질의 해리가 가능하며 주피크인 ϵ -poly-L-lysine을 순수하게 분리할 수 있었다.

3.3 ϵ -poly-L-lysine의 정성분석

칼럼으로부터 해리된 분획을 모아 탈염한 후 각 분획에 대한 분자량 측정과 산 가수분해물의 유리 아미노산 분석을 실시하였다.

배양액을 이온교환 크로마토그래피를 실시하여 모은 시료를 겔 크로마토그래피 칼럼을 이용하여 분자량을 측정하였다. Fig.5에 sigma사의 표준시료들과 비교한 결과를 표시하였다. 겔 크로마토그래피는 0.5M NaCl이 포함된 완충액을 사용하여 분당 1mL의 유속으로 전개하여 나온 피크를 분석하였으며 ϵ -poly-L-lysine은 분자량 12700인 cytochrome c와 같은 시간에 용출되어 ϵ -poly-L-lysine 분자량은 약 12000 부근이었고 이는 Shima 등이 측정한 결과와 일치하여 그들이 *Streptomyces albulus*에서 분리한 동일

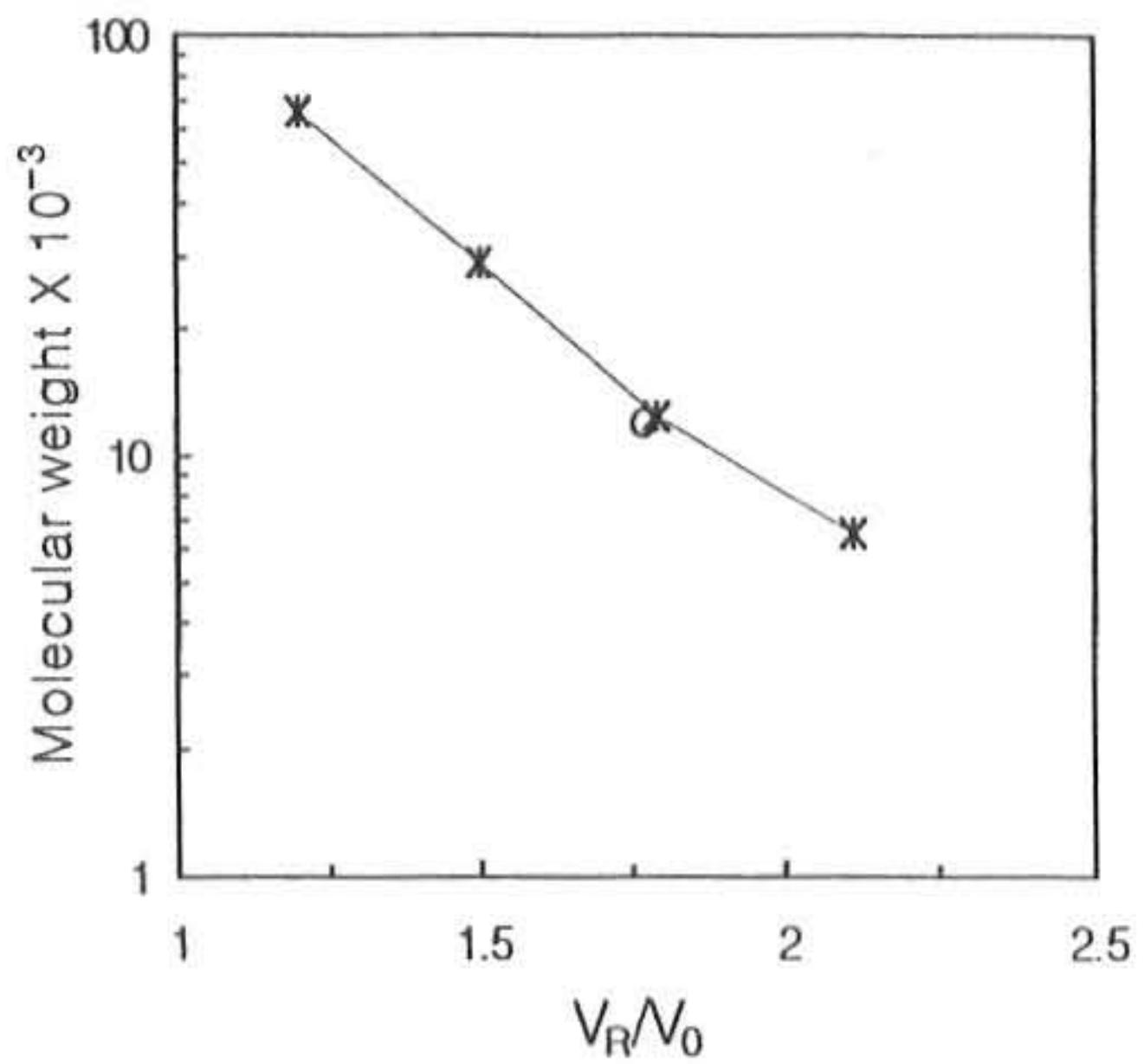


Fig.5 Molecular weight of purified ϵ -PL on a gel filtration column. The column was developed with 0.5M sodium chloride at flow rate 1mL/min. A. Bovine serum albumin(M.W.66000), B. Carbonic anhydrase(29000), C. Cytochrome c(12400), D. Bovine lung Aprotinin(6500). The ϵ -PL was eluted at the position marked by 'O'(same molecular weight as cytochrome c).

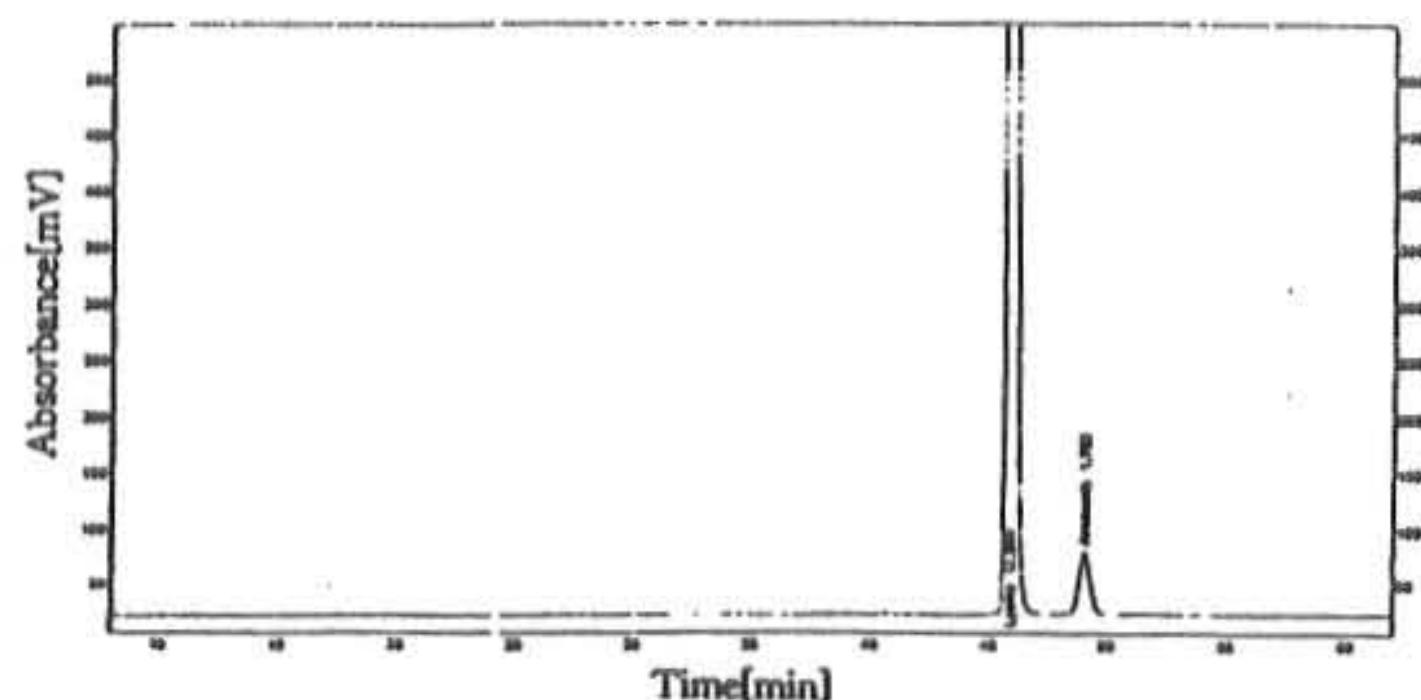


Fig.6 Amino acid analysis of acid hydrolysated of ϵ -polylysine which was collected fraction on the ion exchange chromatography.

한 ϵ -poly-L-lysine임을 알 수 있었다. 또한 ϵ -poly-L-lysine은 동일한 위치에서 3개의 피크를 보여 리신이 25개에서 30개 정도라는 Shima

의 결과가 정확하였음을 알 수 있었다¹⁰⁾. ϵ -poly-L-lysine은 리신(Lysine)의 균질 중합체로 강산으로 가수분해할 경우 그 산 가수분해물의 아미노산은 리신만이 감지되어야 하고 이는 ϵ -poly-L-lysine의 직접적 정성분석이 될 수 있다. 강산인 6N 염산으로 가수분해한 산 가수분해물 유리 아미노산 분석 결과인 Fig.6에서 와 같이 리신만이 감지되어 네 번째 피크가 순수한 ϵ -poly-L-lysine임을 확인할 수 있었다.

4. 결론

항균물질인 ϵ -Poly-L-lysine을 생합성하는 *Streptomyces albulus* 세정균체를 사용하여 2단계 발효를 실시하고 ϵ -poly-L-lysine을 대량으로 생합성하였다. 또한 발효액으로부터 ϵ -Poly-L-lysine을 양이온 교환수지인 CM-Sepharose FF를 이용하여 분리하였다.

1) 탄소원으로 1차 배지의 글리세린 50g을 글루코스 20g으로 줄여 대체한 2차 배지에 7일간 배양하여 1차 배지만을 사용한 경우보다 최고 6배 이상 ϵ -poly-L-lysine을 생합성 하였고 이때 배양액에 축적된 ϵ -poly-L-lysine 양은 최대 3.6g/L이었다.

2) 균주 *Streptomyces albulus*의 세정균체를 2단계 배양한 배양액을 한외여과하여 25배 농축한 농축배양액을 약산성 양이온 교환수지인 CM-Sepharose FF에 이온교환시킨후 염용액으로 경사전개를 실시하여 배양액중 포함된 ϵ -poly-L-lysine을 순수하게 분리할 수 있었다.

3) 염용액으로 수지에 흡착된 성분을 탈리시킨후 각 분획의 분자량 측정과 산 가수분해물의 아미노산 분석결과로부터 4번째 용출성분이 ϵ -poly-L-lysine임을 확인하였다.

감 사

본 연구는 전남대학교 연구년 교수연구비 연구에 의해 이루어진 연구결과물입니다

참고문헌

1. 성낙계외 28인, 미생물 공학, 형설출판사, (1991)
2. 신동화, 식품과학과 산업, 천연 항균성 물질의 연구현황과 식품가공에의 이용, 23(4), 68-77 (1990)
3. 이형주, 식품첨가물의 개발과 전망, 식품과학과 산업, 25(2), 106-111 (1992)
4. Franklin Lim, Microencapsulated islets as bioartificial endocrine pancreas, *Science*, 21, 210, 908-910 (1980)
5. B. S. Jacobson and D. Branton, Plasma membranes : rapid isolation and exposure of the cytoplasmic surface by use of positively charged beads, *Science*, 195, 302 (1977)
6. 藤井正弘, ポリリジンによる加工食品の保存とその効果, ジャパンフードサイエンス, 32(4), 67 (1993)
7. M. Kunioka, Biosynthesis and chemical reactions of poly(amino acid)s from microorganisms, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 47, 469-475 (1997)
8. Shoji Shima, and Sakai H., Polylysine produced by *Streptomyces*, *Agri. Biol. Chem.*, 41(9), 1807-1809 (1977)
9. Shoji Shima, and Sakai H., Poly-L-lysine produced by Streptomyces. Part III. Chemical studies, *Agri. Biol. Chem.*, 45, 2503- 2508 (1981)
10. Shoji Shima, Fukuhara Y., and Sakai H., Inactivation of bacteriophages by ϵ -poly-L-lysine produced by *Streptomyces*, *Agri. Biol. Chem.*, 46(7), 1917-1919 (1982)
11. Shoji Shima, Ohshima S., and Sakai H., Biosynthesis of ϵ -Poly-L-lysine by washed mycelium of *Streptomyces albulus* No-346, *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, 57, 221-226 (1983)
12. R. F. Itzhaki, Colorimetric method for estimating polylysine and polyarginine, *Anal. Biochem.*, 50, 569 (1972)

(1999년 2월 20일 접수, 1999년 4월 15일 채택)