

고효율 Poly- γ -Glutamic Acid 생산 균주의 분리 및 생산 특성

유경옥¹ · 오유나¹ · 김병우¹ · 남수완² · 전송중² · 김동은² · 김영만² · 권현주^{1*}

¹동의대학교 생명응용과학과, ²동의대학교 생명공학과, ³동의대학교 식품영양학과 및 (주)오리엔탈바이오텍

Isolation of *Bacillus* sp. Producing Poly- γ -glutamic Acid with High Efficiency and Its Characterization. You, Kyung-Ok¹, You-Na Oh¹, Byung-Woo Kim¹, Soo-Wan Nam², Sung-Jong Jeon², Dong-Eun Kim², Young-Man Kim³, and Hyun-Ju Kwon^{1*}. ¹Department of Life Science and Biotechnology, ²Department of Biotechnology and Bioengineering, ³Department of Food and Nutrition/Oriental Biotech. Co., Dong-Eui University, Busan 614-714, Korea – A bacterium with high productivity of poly- γ -glutamic acid (PGA) was isolated from the traditional Korean seasoning, ChungKookJang. The 16s ribosomal RNA sequence of isolated strain showed 97.6, 98.9 and 90.3% of similarity to those of *Bacillus* sp. WL-3, *Bacillus subtilis*; ENV1 and *B. amyloliquefaciens* (T), respectively. Accordingly, this bacterium was identified as a *Bacillus* sp. However, some biochemical characteristics of this strain were different from those of *B. subtilis*: D-xylose fermentation and glycogen utility were negative. Maximum production of PGA was achieved when it was grown aerobically in a culture medium containing glutamic acid (3%) and fructose (4%) as carbon sources. The volumetric yield of PGA reached up to 27 g/l in the optimum culture medium. These results suggest that the present strain can be applicable for industrial purposes such as a prototype strain for food or cosmetics industry.

Key words: *Bacillus* sp., poly- γ -glutamic acid, fructose, 16s rRNA, ChungKookJang

최근 환경문제의 심각성과 각종 환경 규제로 인해 친환경 생분해성 고분자에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다. 이 중 많은 연구와 관심이 집중되어 있는 생분해성 고분자에는 미생물이 생산하는 폴리에스테르계의 polyhydroxyalkanoates (PHA), pullulan, microbial cellulose 등의 다당류와 폴리펩타이드계의 poly- γ -glutamic acid(PGA) 등이 있다. 이 중 PGA는 일본 전통식품 natto, 한국 청국장 등의 점액물질로 잘 알려져 있으며 glutamic acid의 γ -carboxylic acid와 α -amino기가 amide linkages에 의해 연결되어 있는 거대한 polymer로 그 분자량은 생산균에 의해 100~1000 kDa 정도이다[1, 7, 9, 22]. PGA의 주요 생산 균주는 *Bacillus* 속으로 *B. anthracis*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. subtilis* (natto), *B. subtilis* (chungkookjang) 등이 보고되어 있다[3, 5]. PGA는 *B. subtilis* 를 포함하는 몇몇 *Bacillus* 속의 발효 생산물으로써 배양 시에 세포 밖으로 분비되며 사람과 환경에 독성이 없고, 수용성이며 생분해 가능한 고분자이다[7, 9]. 이런 특징 때문에 PGA는 침전농축장치, 흡윤제, 동결방지제, drug carrier, 생분해성 섬유, 사료첨가제 등의 다양한 분야에서 이용가능하기 때문에 몇 년 전부터 식품, 화장품, 의약 등의 산업에서 많은 관심을 가지고 있는 바이오소재이다[8, 19].

PGA생산 균주는 두 가지 형태로 나뉘어 진다. 한 가지는

배지 내에 L-glutamic acid의 존재 하에서만 PGA를 생산하는 것과 다른 가지는 L-glutamic acid의 존재 유무에 상관없이 PGA를 생산하는 것이다. L-glutamic acid 의존성 균주는 *B. subtilis*[6], *B. subtilis* ATCC9945[21], *B. subtilis* IFO3335[9]와 *B. subtilis* F-2-01[13] 등이 보고되어 있다. L-glutamic acid 비의존성 균주로는 *B. subtilis* TAM-4[12]와 *B. licheniformis* A35[7]가 보고되어 있다. 현재까지 보고된 PGA에 대한 연구는 주로 합성경로와 유전자 등에 관한 것으로, 산업화에 직접 적용할 수 있는 대량 생산 균주 및 대량 생산 방법에 대한 연구는 거의 이루어지지 않았다. 따라서 본 연구에서는 PGA 대량 생산을 위한 선행 연구로써 청국장에서 PGA를 대량 생산하는 균주를 분리하였으며 그 생화학적 특성에 대해 보고하고자 한다.

재료 및 방법

PGA 생산 균주 분리 및 동정

PGA 생산 균주를 분리할 목적으로 전국 각 지역의 청국장을 채집하여 각각 1 g을 멸균수 10 mL에 현탁한 후, 100 °C에서 5분간 열처리하였다. LB-agar배지(0.5% yeast extract, 0.5% NaCl, 1% Bacto-tryptone, 1.5% Agar)에 100°C, 5분간 열처리한 청국장을 평판 희석하고 37 °C에서 배양하여 균주를 분리하였다. 분리된 균주는 PGA 생산배지를 사용하여 PGA 생산을 SDS-PAGE로 확인하였다. 분리된 PGA 생산 균주는 16s rRNA sequence 분석(Macrogen,

*Corresponding author

Tel: 82-51-890-1519, Fax: 82-51-890-1532

E-mail: hjkwon@deu.ac.kr

Korea), API test(BioMetrieux, Korea) 및 Bergey's manual 상에 준하여 동정하였다.

PGA 분리 및 정제

LB 배지에 배양한 균주를 complete medium(0.5% polypeptone, 0.25% yeast extract, 0.5% NaCl, 0.05% MgSO₄·7H₂O, pH 7.0)에 접종하여 세포농도가 OD660 nm=2.1이 되도록 배양한 뒤 원심분리하여 균체를 수거하였다. 수거한 균체는 0.85% NaCl 용액으로 현탁하고 원심분리하여 다시 균체를 수거하였다. NaCl로 현탁된 균체를 10%가 되도록 PGA 기초 생산 배지에 옮기고 37°C, 72시간 배양하였다. PGA 기초 생산 배지(2% glutamic acid, 1% (NH₄)₂SO₄, 1% citric acid, 0.1% K₂HPO₄, 0.1% Na₂HPO₄, 0.05% MgSO₄, 0.005% FeCl₃, 0.02% CaCl₂, 0.002% MnSO₄)에 50 µg/ml biotin을 첨가하였으며 생산된 PGA는 배지로 분리되었다. 배양액은 12,000×g, 10분간 원심분리하여 균체를 제거하고 상등액을 모았다. 상등액의 4배 부피의 메탄올을 첨가하여 PGA를 침전시키고 침전된 PGA는 멸균수 2 ml에 녹인 후 멸균수를 이용하여 투석하여 순수한 PGA만 남도록 하였다. 분리 정제된 PGA는 SDS-PAGE를 행하여 확인하였다.

PGA의 확인 및 분자량 측정

투석한 PGA가 용해된 멸균수 10 µl를 SDS-PAGE(5% acrylamide)로 분석하였으며, PGA는 methylene blue 염색으로 확인하였다[12]. PGA 정량은 FluorchemTM 5500 Image Analyzer(Alpha Innotech, USA)를 사용하여 정량하였다.

PGA 생산 최적 조건 검토

PGA 생산 최적 조건을 검토하기 위하여 탄소원, 질소원을 결정하였다. 먼저, 탄소원은 maltose, fructose, lactose, glucose, glycerol, xylose, saccharose 등을 최종 농도 2%가 되도록 PGA 기초 생산배지에 첨가하였다. 각각 탄소원이 첨가된 배지로 *Bacillus* sp. YN-1을 배양하여 생성된 PGA는 SDS-PAGE로 확인하였으며 가장 많은 양의 PGA가 생성된 탄소원을 PGA 생산 최적 탄소원으로 결정하였다. 질소원은 NaNO₃, NH₄NO₃, NH₄Cl, (NH₄)₂SO₄, peptone, yeast extract를 1%가 되도록 PGA 기초 생산배지에 첨가하여 PGA 생산량을 검토하여 PGA 생산 최적 질소원을 결정하였다.

결과 및 고찰

청국장에서 PGA 대량 생산 균주의 분리 및 동정

전국에서 재래식으로 조제된 청국장 수확 종으로부터 호기성, 포자형성 세균을 분리하기 위하여 먼저 청국장을 열처리하여 포자를 형성하지 않는 세균들은 제거하였다. 열처리를 거쳐 순수 분리된 세균 콜로니 약 30여 종류는 각각

complete medium에서 전 배양을 하고 PGA생산 배지에서 72시간 본 배양하여 PGA생산 정도를 검토하였다. 순수 분리된 30여 종류의 세균 중에서 12종의 세균만이 PGA생산이 확인되었다. PGA를 생산하는 12종의 세균 중 가장 생산성이 높은 세균을 선택하여 생화학적 특성을 검토하였다. 최종 선발된 균주는 그람 양성의 간균이며 운동성이 없으며 내열성의 포자를 형성하였다. 또한 starch hydrolysis, lipase hydrolysis 음성이며 45°C의 온도에서도 활발하게 성장하는 생화학적인 특성을 나타내었다.

또한 이 균주는 고 농도의 NaCl(7%)에서도 활발한 성장을 나타내었다. 탄소원의 이용성(Table 1)을 조사한 결과 *Bacillus* 속으로 나타났다. 16s rRNA sequencing을 이용하여 확인, 동정한 결과 *Bacillus subtilis* ENV1[16]와 98.9%, *Bacillus* sp. WL-3[17]와 97.6%, *Bacillus amyloliquefaciens*

Table 1. Biochemical characteristics of the isolated strain.

Characteristics	Results
Morphological characterization	
Shape	rod
Gram stain	+
Mobility	-
Spore formation	+
Physiological characterization	
Catalase	+
VP-test	+
Starch hydrolysis	-
Casein hydrolysis	-
NaCl 2%	+
NaCl 5%	+
NaCl 7%	+
Growth at 45°C	+
Carbohydrate degradation	
Glycerol	+
Erythritol	-
D-Arabinose	-
L-Arabinose	+
D-Ribose	+
D-Xylose	-
L-Xylose	-
D-Adonitol	-
Methyl-β,D-Xylopyranside	-
D-Galactose	-
D-Glucose	-
D-Fructose	+
D-Mannose	+
L-Sorbose	-
L-Rhamnose	-
Dulcitol	-
Inositol	+
D-Mannitol	+

Table 1. Continued.

Characteristics	Results
D-Sorbitol	+
Methyl- α ,D-Mannopyranside	-
Methyl- α ,D-Glucoside	-
N-Acethyl-Glucosamine	-
Amygdalin	-
Arbutin	-
Esculin	-
Salicin	-
D-Celioblose	+
D-Maltose	+
D-Lactose	+
D-Melibiose	-
D-Sucrose	-
D-Trehalose	+
Inulin	-
D-Melezitose	-
D-Raffinose	+
Starch	-
Glycogen	-
Xylitol	-
Gentiobiose	-
D-Turanose	-
D-Lyxose	-
D-Tagatose	-
D-Fucose	-
L-Fucose	-
D-Arabitol	-
L-Arabitol	-
potassium gluconate	-
2-Keto-gluconate	-
5-Keto-gluconate	-
16s rRNA sequence	<i>Bacillus</i> sp.

(T)[2]와 90.3%, *B. licheniformis* DSM 13[15]과 88.6%의 상동성을 나타내었다. 따라서 본 최종 선발 균주는 *Bacillus* sp. YN-1로 명명하였다.

***Bacillus* sp. YN-1의 PGA 생산 최적 pH와 온도**

pH에 따른 PGA 생산량 변화를 검토해 보았다. 산성 환경인 경우에는 PGA 생산량이 현저히 약하게 나타나는 것을 확인 할 수 있었으며 알칼리성 환경에서 PGA 생산량이 증가하는 것을 알 수 있었다. PGA 생산 최적 pH는 8.0으로 결정하였다(Fig. 1A). 온도에 따른 PGA 생산량의 차이도 확인 할 수 있었으며 37°C에서 *Bacillus* sp. YN-1은 높은 량의 PGA를 생산하였다(Fig. 1B).

PGA 생산에 미치는 탄소원의 영향

Bacillus sp. YN-1의 PGA 대량 생산 조건을 검토하였다. 일반적으로, PGA 생산 균주는 크게 두 가지로 분류할 수 있

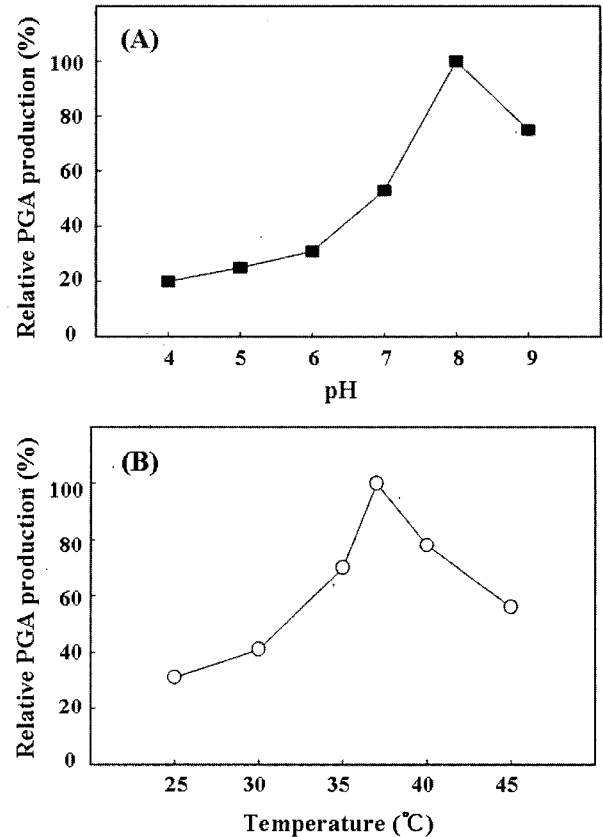


Fig. 1. Effects of pH and temperature on the production of PGA from *Bacillus* sp. YN-1. The strain was cultured in the medium containing 1% citric acid and 1% ammonium sulfate at each temperature for 72h with shaking at 150 rpm.

다. 한 그룹은 PGA 생산 및 균주 성장에 glutamic acid를 필요로 하여 이 그룹은 glutamic acid 의존성 그룹이라 한다. 다른 그룹은 glutamic acid를 요구하지 않기 때문에 glutamic acid 비의존성 그룹이라 한다.

본 균주의 glutamic acid의 요구성을 검토하기 위하여 PGA 기초 생산 배지에서 glutamic acid를 제외하고 *Bacillus* sp. YN-1을 배양해 보았다. 그 결과, 본 균주의 성장 glutamic acid를 요구하지 않았으며 PGA 생산도 원활하게 일어나는 것을 확인 할 수 있었다. 따라서 *Bacillus* sp. YN-1은 glutamic acid 비의존성 그룹에 속하는 것으로 사료된다. PGA생산 균주는 배양조건에 따라 PGA 생산량이 크게 차이를 보이며 PGA 생산량의 약 2~20배의 탄소원과 질소원을 필요로 하는 등의 PGA 생산에 배양조건이 아주 중요하다[14].

먼저, PGA 생산에 필요한 탄소원을 검토해 보았다. 탄소원의 최종 농도는 2%로 하였으며 fructose를 포함한 10종의 탄소원을 이용하여 본 균주의 PGA 생산량 변화를 확인하였다(Fig. 2). 그 결과, 탄소원의 첨가에 따라 PGA의 생산량은 크게 변화하였다.

Maltose, xylose, glucose, saccharose 등을 탄소원으로 한 경우에는 탄소원을 첨가하지 경우에 비교하여 PGA 생산량

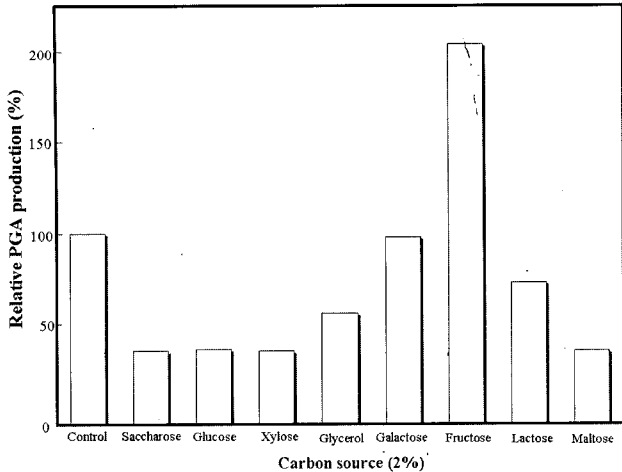


Fig. 2. Effect of carbon sources on the production of PGA from *Bacillus* sp. YN-1. The strain was cultured in the medium containing 2% each carbon source and 1% ammonium sulfate at 37°C for 72h with shaking at 150 rpm.

에는 차이점이 나타나지 않았다. Lactose, galactose, glycerol을 탄소원으로 첨가한 경우에는 1.5~2.5배 정도의 PGA 생산량이 증가하였다. 그러나 fructose를 탄소원으로 첨가한 경우에는 4배 이상의 PGA 생산량이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. Fructose를 탄소원으로 결정하고 농도별에 따른 PGA 생산량을 검토하였다(Fig. 3).

1~4%까지는 fructose의 첨가량에 따라 점차적으로 PGA의 생산량이 증가하였으며 4% 이상의 첨가에는 생산량의 변화가 없었다. 따라서 *Bacillus* sp. YN-1의 탄소원인 fructose의 첨가량은 4%로 결정하였다.

PGA 생산에 미치는 질소원의 영향

탄소원과 더불어 질소원도 PGA 생산에 큰 영향을 미친

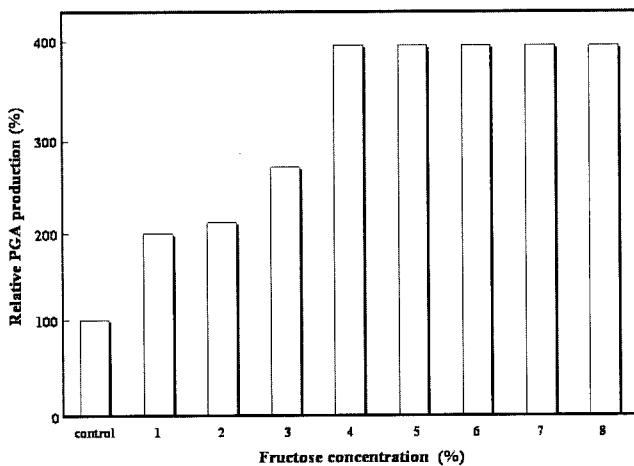


Fig. 3. Effect of fructose concentration on the production of PGA from *Bacillus* sp. YN-1.

다. 그러므로 여러 가지 질소원을 사용하여 본 균주의 PGA 생산량의 변화를 검토해 보았다(Fig. 4).

질소원은 각각 1%의 농도로 첨가하였으며 peptone을 비롯한 여러 가지 질소원들은 PGA 생산량을 증가시키지 못하였다. 그러나 NH₄Cl을 첨가한 경우에는 5배 이상의 PGA 생산량이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 본 균주의 질소원은 NH₄Cl로 결정하였으며 PGA의 대량 생산을 위한 NH₄Cl의 농도는 1%로 하였다.

PGA생산균 중 L-glutamic acid 비의존성인 경우에는 균체내의 대사 과정에서 L-glutamic acid가 생성되면 L-glutamic acid는 tricarboxylic acid cycle에 의해 2-oxoglutaric acid와 isocitric acid를 통한 citric acid로부터 생산되는 것으로 추정된다[12]. 여기서 2-oxoglutaric acid에서 L-glutamic acid로 전환되는 경로는 2가지로 알려져 있다. 한 가지 경로는 glutamate dehydrogenase 경로에 의한 것으로 TCA cycle의 한 물질인 α -Ketoglutaric acid에 NH₃가 함께 작용하여 L-glutamic acid를 생산하는 경우이다[18]. 또 다른 경로는 glutamine synthetase(GS)와 glutamine:2-oxoglutarate aminotransferase(GOGAT)에 의해 생성되는 반응이다[11]. 본 균주는 PGA대량 생산을 위하여 citric acid와 소량의 glutamic acid를 필요로 하기 때문에 L-glutamic acid로 전환되는 2가지 경로 모두를 경유하는 것으로 사료된다.

또한, 본 균주는 fructose와 ammonium chloride를 PGA 생산에 필요로 한다. Fructose는 여러 효소에 의해 glyceraldehyde-D-phosphate로 되면 해당과정을 거쳐 TCA cycle로 들어가게 되고 citric acid 등을 거쳐 glutamic acid를 생산하도록 하며 NH₄Cl은 glutamate dehydrogenase나 glutamine synthetase에 NH₃를 제공하는 것으로 생각되어 진

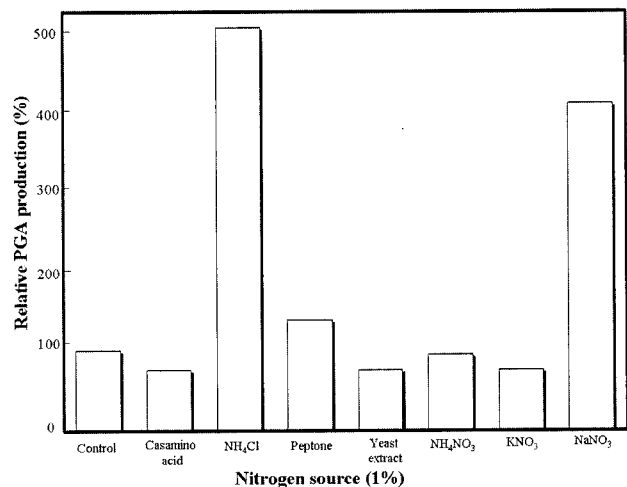


Fig. 4. Effect of nitrogen sources on the production of PGA from *Bacillus* sp. YN-1. The strain was cultured in the medium containing 1% each nitrogen sources and 4% fructose at 37°C for 72h with shaking at 150 rpm.

다. PGA 생산 균주 중 하나인 *B. subtilis* IFO3335는 glutamic acid L/D형의 isomer가 17/83의 비율로 존재하여 PGA를 생성하고 있는 것으로 보고하고 있다[14]. D-glutamic acid는 보통 직접적으로 L-glutamic acid에서 변형되기 보다는 간접적으로 생성되는 미생물들이 많다. 일본 청국장인 *notto* 미생물인 *B. subtilis* (natto)와 *B. anthracis*의 D-glutamic acid 생성 경로를 보면 2-oxoglutaric acid와 L-alanine은 L-glutamic acid와 pyruvic acid에 의해 생성되며 D-alanine은 L-alanine에서 racemization을 통하여 생성하게 된다. 또한, 생성된 D-alanine과 2-oxoglutaric acid로부터 D-glutamic acid와 pyruvic acid가 합성되는 것으로 보고되어 있다[10, 20]. 이와 같은 과정을 종합하여 간략하게 본 균주의 PGA 생산과정을 도표로 나타내 보면 Fig. 5와 같다.

위의 최적 탄소원 및 질소원의 결과를 종합하여 *Bacillus* sp. YN-1의 최적 PGA대량 생산 조건은 3% glutamic acid, 4% fructose, 1% citric acid, 1% NH₄Cl, 0.1% K₂HPO₄, 0.05% MgSO₄, 0.005% FeCl₃, 0.02% CaCl₂, 0.002% MnSO₄, 50 µg/ml Biotine으로 결정하였다. 이 최적 PGA 대량 생산 조건으로 본 균주의 PGA 생산량을 검토한 결과 27 g/l의 생산량을 나타내어 PGA 대량 생산에 아주 적합한 균주임을 확인할 수 있었다.

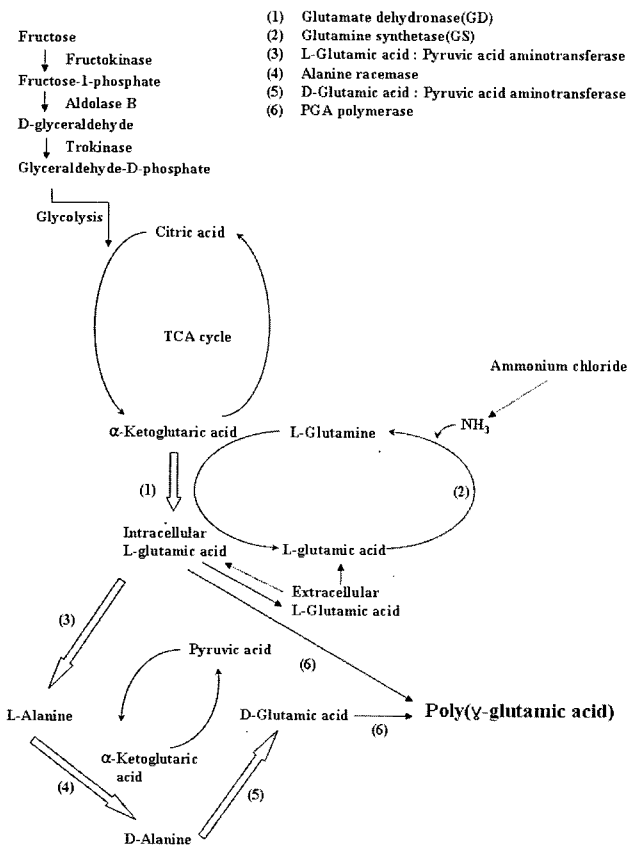


Fig. 5. A proposed pathway of PGA synthesis in *Bacillus* sp. YN-1.

Bacillus sp. YN-1의 성장곡선에 따른 PGA 생산

본 균주의 성장곡선과 성장 시간에 따른 PGA 생산량과 PGA의 분자량을 검토해 보았다. PGA 생성은 대량 PGA 생산 배지에 접종하여 12시간 이후부터 생산되었으며 크기는 4,000~6,000 kDa 정도로 생산 초기부터 큰 분자량의 PGA를 생산하였다. *B. subtilis* TAM-4은 glutamic acid 비의존성 PGA 생산균주이다. 이 균주의 성장곡선에 따른 PGA 생산 양상을 보면 균주의 배양 시간이 36시간 정도가 되면 분자량이 200 kDa 이하의 PGA를 생산하고 54시간 이상 배양하게 되면 200 kDa 이상의 PGA를 생산하는 것으로 보고하고 있다[12]. 또한 성장에 따른 pH 변화도 크게 중성의 범위에서 벗어나지 않는다. 하지만, 본 실험 균주는 균주의 배양 시간에 관계없이 배양 12시간부터 PGA를 생산하기 시작하여 시간에 따른 생산량은 증가하였다. 배양에 따른 pH의 변화는 점차 산성쪽으로 pH가 변화하는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 6). SDS-PAGE에 의해 생성되는 PGA의 분자량을 확인해 본 결과 Fig. 7와 같이 12시간 때부터 4000-6000 kDa의 분자량 이상의 PGA가 생성되는 것을 확인할 수 있었다.

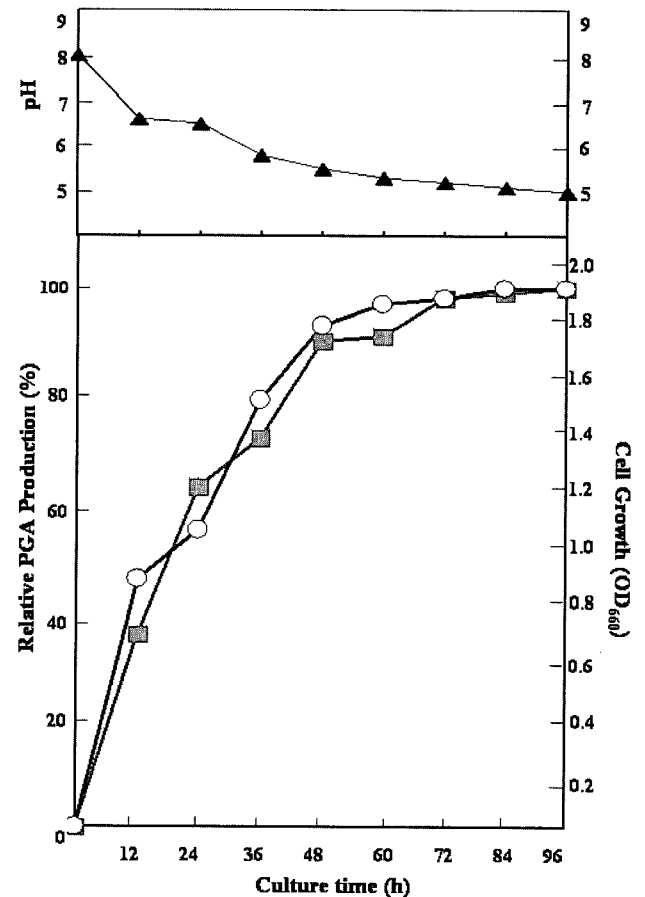


Fig. 6. Time courses of PGA production associated with cell growth and pH. The cultivation was done in the medium containing 1% ammonium chloride and 4% fructose at 37°C for 72h with shaking at 150 rpm. Symbols: ○, PGA production (%); ■, Cell growth (OD₆₆₀).

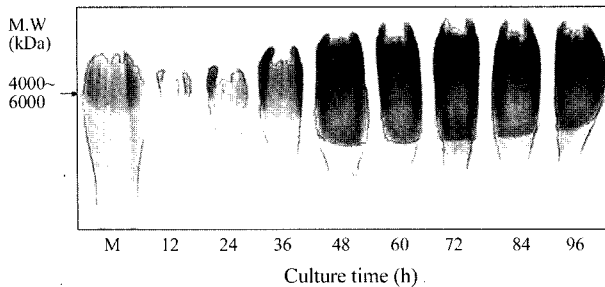


Fig. 7. Physical properties (molecular weight) of PGA produced by *Bacillus* sp. YN-1 at different culture times. The purified PGA was electrophoreted as described in materials and methods. Lanes 12-96 indicate the cultivation time. Lane M contains standard PGA (4000-6000 kDa).

본 PGA 생산 균주인 *Bacillus* sp. YN-1은 1리터당 27 g이라는 높은 양의 PGA를 생산할 뿐만 아니라 고 분자량의 PGA를 생산하기 때문에 산업적으로 이용하기에 매우 효율적인 균주로 여겨진다.

요 약

한국 청국장에서 poly- γ -glutamic acid (PGA)를 대량 생산하는 세균을 분리하였다. 이 세균의 16s ribosomal RNA 서열을 분석한 결과 *Bacillus subtilis* BFAS, *B. subtilis* MO4와 *B. amyloliquefaciens* B128과 99.0, 97.7 그리고 97.3%의 상동성을 각각 나타내었다. 따라서 본 분리 균주를 *Bacillus* sp.로 동정하고 *Bacillus* sp. YN-1로 명명하였다. PGA 대량생산을 위해 생산 조건을 검토한 결과 3% glutamic acid, 4% fructose를 탄소원으로 첨가하였을 때 최대량의 PGA를 생산하는 것을 알 수 있었다. 또한 PGA 최대 생산량은 최적 배양 조건에서 27 g/l의 양으로 생산되어 본 균주는 PGA 대량 생산에 적합한 세균임을 확인할 수 있었으며 식품 및 화장품 산업에 유용하게 사용할 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 산업자원부의 지원(과제번호:10015679)에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Abe, K., Y. Ito, T. Ohmachi, and Y. Asada. 1997. Purification and properties of two isozymes of gamma-glutamyltranspeptidase from *Bacillus subtilis* TAM-4. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **61**: 1621-1625.
- Ash, C., J. A. E. Farrow, S. Wallbanks, and M. D. Collins. 1991. Phylogenetic heterogeneity of the genus bacillus revealed by comparative analysis of small subunit ribosomal RNA sequences. *Lett. Appl. Microbiol.* **13**: 202-206.
- Ashiuchi, M., K. Tani, K. Soda, and H. Misono. 1998. Properties of glutamate racemase from *Bacillus subtilis* IFO 3336 producing poly-gamma-glutamate. *J. Biochem.* **123**: 1156-1163.
- Ashiuchi, M., C. Nawa, T. Kamei, J. J. Song, S. P. Hong, M. H. Sung, K. Soda, T. Yagi, and H. Misono. 2001. Physiological and biochemical characteristics of poly gamma-glutamate synthetase complex of *Bacillus subtilis*. *Eur. J. Biochem.* **268**: 5321-5328.
- Ashiuchi, M., T. Kamei, D.-H. Baek, S.-Y. Shin, M.-H. Sung, K. Soda, T. Yagi, and H. Misono. 2001. Isolation of *Bacillus subtilis* (*chungkookjang*), a poly- γ -glutamate producer with high genetic competence. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **57**: 764-769.
- Bovarnick, M. 1942. The formation of extracellular D(-) glutamic acid polypeptide by *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* **145**: 415-424.
- Cheng, C., Y. Asada, and T. Asida. 1989. Production of γ -polyglutamic acid by *Bacillus subtilis* A35 under denitrifying conditions. *Agric. Biol. Chem.* **53**: 2369-2375.
- Choi, H. J. and M. Kunioka. 1995. Preparation conditions and swelling equilibria of hydrogel prepared by (γ -irradiation from microbial poly(γ -glutamic acid). *Radiat. Phys. Chem.* **46**: 175-179.
- Gota, A. and M. Kunioka. 1992. Biosynthesis and hydrolysis of poly(γ -glutamic acid) from *Bacillus subtilis* IFO3335. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **56**: 1031-1035.
- Hara, T., Y. Fujio, and S. Ueda. 1982. Polyglutamate production by *Bacillus subtilis* (*natto*). *J. Appl. Biochem.* **4**: 112-120.
- Holzer, H. 1969. Regulation of enzymes by enzyme-catalyzed chemical modification. *Adv. Enzymol.* **32**: 297-326.
- Ito, Y., T. Tanaka, T. Ohmachi, and Y. Asada. 1996. Glutamic acid independent production of poly (γ -glutamic acid) by *Bacillus subtilis* TAM-4. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **60**: 1239-1242.
- Kubota, H., T. Matsunobu, K. Uotani, H. Takabe, A. Satoh, T. Tanaka, and M. Taniguchi. 1993. Production of poly(γ -glutamic acid) by *Bacillus subtilis* F-2-01. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **57**: 1212-1213.
- Kunioka, M. 1997. Biosynthesis and chemical reactions of poly(amino acid)s from microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **47**: 467-475.
- Ludwig, W., G. Kirchof, N. Klugbauer, M. Weizenegger, D. Betzl, M. Ehrmann, C. Hertel, S. Jilg, R. Tatzel, H. Zitzelsberger, S. Liebl, M. Hochberger, J. Shah, D. Lane, and P. R. Wallnoef. 1992. Complete 23S ribosomal RNA sequences of Gram-positive Bacteria with a low DNA G+C content. *Syst. Appl. Microbiol.* **15**: 487-501.
- Mamane-Gravetz, H. and K. G. Linden. 2005. Relationship between physicochemical properties, aggregation and u.v. inactivation of isolated indigenous spores in water. *J. Appl. Microbiol.* **98**: 351-363.
- Oh, Y. P., J. M. Lee, K. H. Cho, and K. H. Yoon. 2002.

- Isolation and enzyme production of a mannanase-producing strain, *Bacillus* sp. WL-3. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **30**: 247-252.
18. Stadtman, E. R. 1966. Allosteric regulation of enzyme activity. *Adv. Enzymol.* **28**: 41-154.
19. Shih, I. L. and Y. T. Van. 2001. The production of poly-(γ -glutamic acid) from microorganisms and its various applications. *Bioresour. Technol.* **79**: 207-225
20. Thorne, C. B. and D. M. Molnar. 1955. D-Amino acid transamination in *Bacillus anthracis*. *J. Bacteriol.* **70**: 420-426.
21. Thorne, C. B., C. G. Gomez, H. E. Noyes, and R. D. Housewright. 1954. Production of glutamyl polypeptide by *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **68**: 307-315.
22. Yahata, K., J. Sadanobu, and T. Endo, 1992. Preparation of poly- α -benzyl- γ -glutamate fiber. *Polym. Prepr. Jpn.* **41**: 1077.

(Received Aug. 17, 2005/Accepted Sep. 15, 2005)