

Bacillus subtilis CH-10에 의한 폴리감마글루탐산의 생산에 관한 연구

구나연 · 김춘희¹ · 김병우² · 남수완 · 권현주² · 김동은 · 김영만³ · 전송중*

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

Received September 15, 2005 / Accepted December 16, 2005

Study on Production of Poly- γ -Glutamic Acid by *Bacillus subtilis* CH-10. Na-Yeon Gu, Choon-Hee Kim¹, Byung-Woo Kim², Soo-Wan Nam, Hyun-Ju Kwon², Dong-Eun Kim, Young-Man Kim³ and Sung-Jong Jeon*. Department of Biotechnology and Bioengineering, ¹Department of Biomaterial Control, ²Department of Life Science and Biotechnology, ³Department of Food and Nutrition/Oriental Biotech. Co., Dong-Eui University, Busan 614-714, Korea – A bacterium that produced a large amount of poly- γ -glutamate (PGA) was isolated from the compost and designated as *Bacillus subtilis* CH-10. The optimum temperature and pH for PGA production were at 37°C and 7.5, respectively. The maximum amount of PGA production (18.84 mg/ml) was obtained when it was grown in a medium containing 3% L-glutamate and 5% sucrose at 37°C with shaking. The result that the L-glutamate significantly induced PGA production indicates that it produces a PGA by the glutamate dependent manner. Some properties of the PGA obtained at different times of cultivation were investigated by SDS-PAGE and ninhydrin analysis. The PGA production was elongated along with cultivation time and maximum amount was achieved at 96 h. Average molecular weight of PGA was estimated to be 1100 kDa by FDNB method.

Key words – *Bacillus subtilis*, poly- γ -glutamic acid, glutamate, 16s rRNA

폴리감마글루탐산(poly- γ -glutamic Acid, PGA)은 글루탐산의 γ -카르복실기와 글루탐산의 α -아미노기가 아마이드 결합[3]한 아미노산 고분자 소재로서 고도의 수용성 및 생분해성을 가진 음이온성 폴리머이다. 폴리감마글루탐산은 전기 점성 유체, 전해질 수용액, 수분 흡수제, 수분-흡수 수지, fiber 또는 film의 재료, 미세탈 흡수 촉진제, 칼슘이온 용해제, 칼슘흡수 촉진제, 의약품반응 담체, 사료첨가물, 식품의 선도 유지제 등의 그 이용범위가 다양하기 때문에[10], 식품, 의약, 환경, 화장품, 공업용의 고부가가치 소재로서 다양한 분야에 응용할 수 있다[19].

미생물이 생산하는 폴리감마글루탐산은 지금까지 *Natrialba aegyptiaca*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus mesentericus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis* 등의 균주가 생산하는 것으로 보고 되어 있으며[1,2,11,18], 미생물에 따라서 조금씩 다른 성질을 나타낸다. 폴리감마글루탐산 생산균주는 glutamic acid 의존성에 따라 크게 두 종류로 구분되는데, 첫 번째는 폴리감마글루탐산 생산을 위하여 L-glutamic acid를 첨가해야 하는 glutamic acid 의존성 균주 (*B. subtilis* chungkookjang, *B. anthracis*, *B. licheniformis* ACTC 9945A, *B. subtilis* IFO 3335, *B. subtilis* F-2-01)[9,15], 두 번째는 배지 내에 L-glutamic acid의 첨가가 필요 없는 glutamic acid 비의존성 균주(*B. subtilis* 5E, *B. subtilis* TAM-4, *B. subtilis*

A35)[8,13]로 구분된다. 현재, 폴리감마글루탐산의 생산은 주로 *Bacillus*속 균주인 *B. subtilis* chungkookjang, *B. subtilis* natto 및 *B. licheniformis* 등의 미생물의 배양액으로부터 제조하는 공정이 대부분을 차지하고 있다. 최근 폴리감마글루탐산의 활용범위가 다양해짐에 따라, 폴리감마글루탐산의 생산성이 뛰어난 균주 개발의 연구가 활발히 진행되고 있으며, 폴리감마글루탐산의 물성은 분자량에 크게 의존하기 때문에 다양한 분자량의 바이오 폴리머 생산이 요구되고 있다 [7,14, 16,22-24].

따라서 본 연구에서는 퇴비에서 폴리감마글루탐산을 대량 생산하는 *Bacillus subtilis* CH-10을 분리하고 폴리감마글루탐산의 생산조건 및 생산된 폴리감마글루탐산의 생화학적 특성에 관하여 조사하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 배양조건

폴리감마글루탐산(PGA)을 생산하는 미생물은 경상남도 남해 일대의 축분퇴비에서 분리하였다. 퇴비는 멸균수에 현탁하고 10분간 끓인 후에 LB agar 배지에 접종하여 37°C, 2~3일 배양하였다. 배지 위에 형성된 콜로니 중에서 점액성의 콜로니를 LB 액체배지에 접종하고 1일 전 배양한 후 PGA 생산용 배지(2% sucrose, 3% L-glutamic acid, 1% (NH₄)₂SO₄, 0.27% KH₂PO₄, 0.42% Na₂HPO₄, 0.5% MgSO₄ · 7H₂O, and 0.5 μ g/ml biotin, pH 7.5)에 1%(v/v) 접종하여 37°C, 5일간 배양하였다.

*Corresponding author

Tel : +82-51-890-2278, Fax : +82-51-890-1619

E-mail : jeon.sj@deu.ac.kr

균주의 동정

분리균주는 16s rRNA 염기서열을 분석하였고 API 50CH 동정 kit (Biomereux, France)를 이용하여 생리 및 생화학적 특성을 조사한 뒤, 그 결과들을 Bergy's Manual of Systematic Bacteriology[20]에 준하여 동정하였다.

PGA 생산조건 검토

PGA 생산을 위한 최적조건을 검토하기 위하여 탄소원, 질소원을 결정하였다. 먼저, 탄소원은 glucose, fructose, galactose, sucrose, maltose, glycerol; xylose, citric acid를 최종 농도 5%가 되도록 PGA 생산배지에 첨가하였다. 각각 탄소원이 첨가된 배지로 *Bacillus subtilis* CH-10을 배양하고 생성된 PGA의 양은 ninhydrin 반응을 통하여 결정하였다. 질소원은 L-glutamate, L-glutamine, NaNO₃, NH₄NO₃, NH₄Cl, (NH₄)₂SO₄, casamino acid, peptone을 1%가 되도록 PGA 생산배지에 첨가하여 PGA의 생산량을 검토하였다.

PGA의 분리 및 정제

50 ml의 균체 배양액은 원심분리(12,000×g, 30분)하여 균체를 제거하고 상등액을 회수하였다. 상등액에는 4배량의 메탄올을 첨가하고 생김 침전을 회수하여 10 ml의 10 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0)에 녹인 후, 2 liter의 동 buffer로 3번 투석하였다. 투석액은 동결건조한 후, 1 ml의 10 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0)에 용해하고 α-polypeptide의 제거를 위해 proteinase K (100 µg/ml)를 37°C, 12시간 처리하였다. 처리액은 10 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0)로 투석한 후 동결 건조하여 사용하였다. PGA의 정량을 위해 동일한 양의 6M HCl과 함께 105°C, 24시간 가수분해하였고 6M NaOH로 중화한 후에 용액중의 glutamate의 양을 측정하였다. 중화한 glutamate 용액은 에탄올에 녹인 0.35% ninhydrin (w/v) 용액과 37°C, 10분간 반응하고 A₅₇₀에서 흡광도를 측정하였고 L-glutamate로 표준곡선을 작성하여 정량하였다.

PGA의 분자량 측정

PGA의 분자량은 SDS-PAGE와 FDNB법을 사용하여 측정하였다. 정제한 PGA는 10% acrylamide 농도의 SDS-PAGE 상에서 high molecular weight marker (Amersham Biosciences)와 함께 전기영동 하였다. 전기영동 후 gel은 Coomassie Brilliant Blue (R-250)로 염색한 후 7% acetic acid/10% methanol 용액으로 탈색하였고 0.5% methylene blue/3% acetic acid로 다시 염색한 후 증류수를 사용하여 탈색하였다. PGA의 평균 분자량은 FDNB법[6]에 따라 측정하였다.

결과 및 고찰

PGA 생산 균주의 분리 및 동정

퇴비에서 호기성, 포자형성 세균을 분리하기 위하여 먼저

퇴비를 가열처리하여 포자를 형성하지 않는 세균들은 제거하였다. 순수 분리된 세균 콜로니 약 50여 종류는 각각 LB medium에서 전 배양을 하고 PGA 생산용 배지에서 72시간 본 배양하여 PGA 생산 정도를 검토하였다. 순수 분리된 50여 종류의 균주 중에서 10종의 균주만이 PGA 생산이 확인되었다. PGA를 생산하는 10종의 균주 중 가장 생산성이 높은 균주를 선택하여 생화학적 특성을 검토하였다. 최종 선발된 균주는 그람 양성의 간균이고 운동성이 없으며 내열성의 포자를 형성하였고 그 외 생리·생화학적인 특성은 Table 1과 같다. 이 균주를 동정하기 위하여 *Bacillus* sp. 동정 kit (API 50CH)를 이용하여 분석한 결과 *Bacillus subtilis*로 판명되었다. 또한 16s rRNA 염기서열을 분석하여 다른 균주와의 상동성을 검색한 결과, *Bacillus subtilis* BFAS와 99.4%, *Bacillus vallismortis*와 99.1%, *Bacillus licheniformis*와 98.8%의 상동성을 나타내었다. 따라서 본 최종 선발 균주는 *Bacillus subtilis*로 동정하고 *Bacillus subtilis* CH-10로 명명하였다.

***B. subtilis* CH-10의 PGA 생산을 위한 최적 pH와 온도**

B. subtilis CH-10의 PGA 생산에 대한 최적 pH와 온도를 알기 위하여 PGA 생산용 배지의 pH를 sodium hydroxide로 조정하고 PGA 생산량 변화를 검토해 보았다. 산성 환경인 경우에는 PGA 생산량이 현저히 감소하였고 알칼리성의 환경에서는 PGA 생산량이 증가하는 것을 알 수 있었다. PGA 생산을 위한 최적 pH는 7.5 으로 결정하였다(Fig. 1). 온도에 따른 PGA 생산량의 차이도 확인 할 수 있었으며 37°C에서 *Bacillus subtilis* CH-10은 가장 많은 양의 PGA를 생산하였다(Fig. 1).

PGA 생산에 대한 탄소원·질소원의 효과

B. subtilis CH-10의 PGA 대량생산조건을 검토하기 위하

Table 1. Physiological properties of strain CH-10

Characteristics	Strain CH-10
Gram stain	+
Sporulation	+
Motility	+
Voges-Proskauer test	+
Starch and casein hydrolysis	+
Nitrate reduction	-
Catalase test	+
Oxidase test	-
Growth on pH 5.7	+
Growth at 50°C	+
Growth at 55°C	-
Carbon utilization	
D-Glucose	+
D-Fructose	+
D-Mannose	+
D-Xylose	+
Glycerol	+

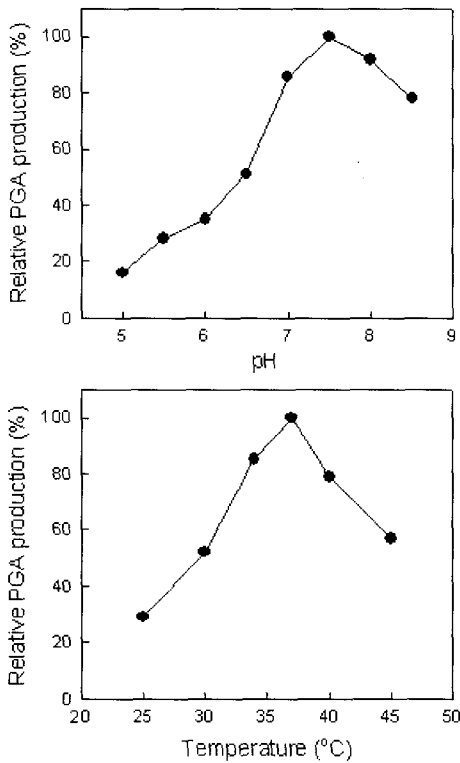


Fig. 1. Effects of pH and temperature on the production of PGA from *Bacillus subtilis* CH-10.

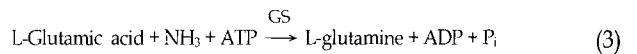
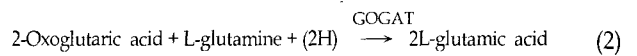
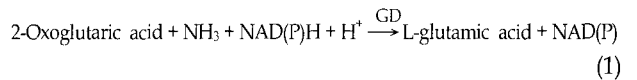
여 배지성분에서 여러 가지 탄소원을 사용하여 PGA 생산량을 조사하였다(Table 2). 탄소원으로 xylose, citric acid를 첨가한 경우에는 *B. subtilis* CH-10은 거의 성장하지 않았고 따라서 PGA도 생산하지 않았다. 이것은 다른 PGA 생산균주들이 탄소원으로 citric acid를 이용하는 것[9]과는 대조적인 결과로, 본 균주는 citric acid를 이용하지 않는 것으로 나타났다. Glycerol을 첨가한 경우에 균주는 성장하였으나 PGA는 거의 생산하지 않았다. 탄소원으로 glucose, fructose, galactose, sucrose, maltose을 첨가한 경우에는 PGA 생산량이 크게 증가하였고 sucrose는 *B. subtilis* CH-10의 PGA 생산을

Table 2. Effects of various Carbon Sources on Growth and PGA Production of *B. subtilis* CH-10

Carbon Source	OD ₆₆₀	PGA(mg/ml)
Glucose	1.94	6.02
Fructose	1.91	9.11
Galactose	1.74	2.21
Sucrose	1.74	18.84
Maltose	1.87	4.02
Glycerol	1.40	0.71
Xylose	0.45	0
Citric acid	0.01	0

The media contain 5% each carbon source and 3% L-glutamate as a nitrogen source. The cultivation was done at 37°C for 96 h.

위한 가장 유용한 탄소원으로서 18.84 mg/ml의 PGA를 생산하였다(Table 2). Sucrose의 농도에 따른 PGA 생산량을 검토한 결과 5%에서 최고 생산량을 나타내었고 5% 이상에서는 생산량에 변화가 없었다(data not shown). 탄소원인 sucrose과 더불어 여러 가지 질소원을 사용하여 본 균주의 PGA 생산량의 변화를 검토하였다(Table 3). 질소원으로 NaNO₃, NH₄NO₃, NH₄Cl, (NH₄)₂SO₄를 첨가한 경우에는 본 균주가 성장하지 않았고 PGA도 생산하지 않았다. 반면, L-glutamate, L-glutamine은 각각 13과 6.43 mg/ml의 PGA 생산량을 나타내었다. 따라서 본 균주는 PGA 생산 및 균주 성장에 glutamate를 반드시 필요로 하는 glutamate 의존성 균주로 판명되었다. PGA 생산을 위한 L-glutamate의 최적 농도는 3%로 확인되었다. 일반적으로 PGA 합성을 위해서는 많은 양의 glutamate를 필요로 하고 이것은 citric acid와 ammonium sulfate로부터 생산된다. L-glutamate는 다음과 같은 2가지의 다른 경로로 합성된다. 한 가지 경로는 glutamate dehydrogenase pathway (GD)[20]로 (1)와 같은 반응식으로 진행되고 또 다른 경로는 glutamine synthetase (GS)와 glutamine 2-oxoglutarate aminotransferase (GOGAT)[12]를 사용하여 (2), (3)와 같은 반응식으로 진행된다.



본 균주는 PGA 생산을 위해서 L-glutamate를 반드시 필요로 하고, 또한 L-glutamine도 PGA 합성을 활성화하기 때문에(Table 3) *B. subtilis* CH-10는 (2)과 (3)의 반응식에 따라 L-glutamate를 생산하는 것으로 사료된다.

B. subtilis CH-10의 배양시간에 따른 PGA 생산변화

본 균주의 배양시간에 따른 PGA 생산량과 분자량을 검토해 보았다. 본 균주는 배양 12시간부터 PGA를 생산하기 시

Table 3. Effects of various Nitrogen Sources on Growth and PGA Production of *B. subtilis* CH-10

Nitrogen Source	OD ₆₆₀	PGA(mg/ml)
NH ₄ Cl	0.04	0
NH ₄ NO ₃	0.16	0
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.01	0
NaNO ₃	0.14	0
Peptone	2.37	3.77
Casamino acid	2.08	5.23
L-Glutamate	2.08	13.14
L-Glutamine	1.66	6.43

The media contain 1% each nitrogen source and 5% sucrose as a carbon source. The cultivation was done at 37°C for 96 h.

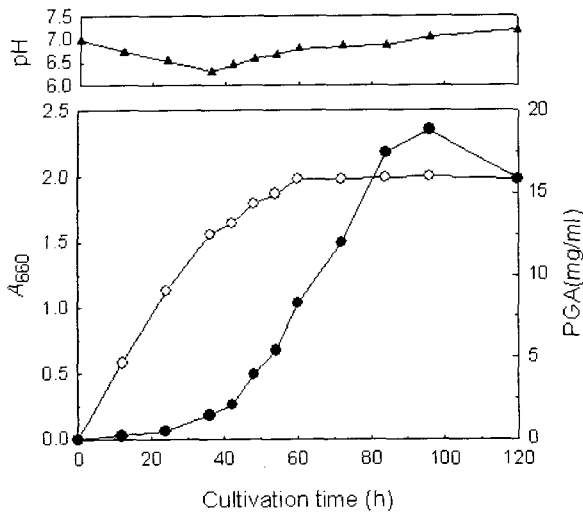


Fig. 2. Cell growth and PGA production by *Bacillus subtilis* CH-10. Culture was grown as described in the materials and methods. ○, absorbance at 660 nm; ●, yield of PGA.

작하여 시간이 경과함에 따라 PGA 생산량이 증가하였고 96 시간 배양 했을 때 PGA의 최대 생산량(18 mg/ml)을 나타내었다(Fig. 2). PGA 생산량은 *B. licheniformis* ATCC9945 (17-23 g/l)[24], *B. subtilis* IFO3335 (10-20 g/l)[17], *B. subtilis* TAM-4 (20 g/l)[13]과는 비슷한 생산수준을 보였고 *B. licheniformis* A35 (8-12 g/l)[8]의 PGA 생산량보다는 더 많았다. 배양에 따른 pH의 변화는 배양 36시간까지 점차 산성 쪽으로 변화하다가 그 이후 다시 중성으로 바뀌었지만 커다란 pH 변화는 없었다(Fig. 2). SDS-PAGE를 이용하여 배양시간에 따라 생성된 PGA의 분자량을 확인해 본 결과, 배양한 후 84 시간 이후부터는 200 kDa 이하의 저분자량의 PGA가 증가하였고, 120시간 배양한 후에는 생산된 PGA의 양이 감소하였다(Fig. 3). 이런 결과는 배양시간이 경과함에 따라 PGA 분해효소(PGA depolymerase)[5]가 세포외로 분비되어 생산된 PGA를 분해하기 때문인 것으로 사료된다. FDNB법에 의해 96시간 배양 후에 PGA의 평균분자량을 조사한 결과, 1,100 kDa의 평균분자량을 나타내었다. *Bacillus subtilis* (chungkookjang)과 *Natrialba aegyptiaca*는 분자량 10⁶ Da 이상의 PGA를 생산하는 것으로 보고되었고 본 균주는 *B. subtilis* (natto), *B. licheniformis*, *B. subtilis* IFO 3335와 비슷한 10⁵~10⁶ Da의 분자량을 나타내었다[4].

최근 Zhao *et al.*은 PGA를 생산하는 *Bacillus mesentericus* MJM1을 분리하였고 이 균주는 PGA 생산에 관여하는 γ -glutamyltranspeptidase의 유전자가 plasmid pMMH1상에 존재하는 것으로 보고 하였다[25]. 본 균주는 plasmid의 존재 유무를 검토한 결과, plasmid를 보유하지 않는 것으로 밝혀졌고, 따라서, PGA 생산에 관련된 유전자는 염색체상에 존재할 것으로 사료된다. 이후, *Bacillus subtilis* CH-10이 생산

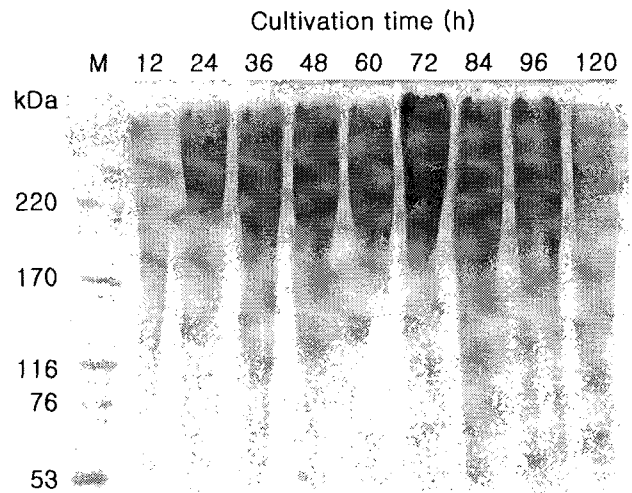


Fig. 3. SDS-PAGE profiles of PGA obtained at different times of cultivation. Lane M, high molecular weight markers (myosin, 220,000; α -2-macroglobulin, 170,000; β -galactosidase, 116,000; transferrin, 76,000; glutamate dehydrogenase, 53,000). Lane 12-120 indicate the cultivation time.

하는 PGA의 자세한 물성연구와 PGA 분해효소에 의한 PGA의 절단기작을 이해하면 다양한 크기의 PGA 생산이 가능할 것으로 기대된다.

요 약

폴리감마글루탐산(PGA)을 대량생산하는 균주를 축분토비에서 분리하고 생리·생화학적 특징 및 16s rRNA 염기서열을 분석한 결과, *Bacillus subtilis*로 동정하고 strain CH-10으로 명명하였다. PGA 생산을 위한 배지의 최적 온도와 pH는 각각 37°C, 7.5 이었다. 또한 배지성분 중에서 PGA 생산에 최적인 탄소원과 질소원은 각각 5% sucrose와 3% L-glutamate인 것으로 나타났다. 이 균주는 L-glutamate에 의해 PGA 생산이 대량으로 유도되었고 따라서 질소원으로 L-glutamate를 반드시 필요로 하는 glutamate 의존성 균주인 것으로 사료되었다. 배양시간에 따라 생산된 PGA의 생화학적 특징을 SDS-PAGE와 ninhydrin 분석을 통하여 검토하였다. PGA의 생산량은 배양시간에 따라 증가하였고 배양 후 96시간에서 최고 생산량을 나타내었다. 생산된 PGA의 평균분자량을 FDNB법으로 분석한 결과, 1,100 kDa인 것으로 나타났다.

감사의 글

본 연구는 산업자원부 지역산업진흥사업(과제번호:10015679)의 지원에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. Abe, K., Y. Ito, T. Ohmachi and Y. Asada. 1997. Purification and properties of two isozymes of γ -glutamyltranspeptidase from *Bacillus subtilis* TAM-4. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **61**, 1621-1625.
2. Aono, R. 1987. Characterization of structural component of cell walls of alkalophilic strain of *Bacillus* sp. C-125. *Biochem. J.* **245**, 467-472.
3. Ashiuchi, M. and H. Misono. 2002. Biopolymers, vol. 7, Chapter 6, pp. 123. in: Fahnstock, S. R. and A. Steinbchel (Eds.), Wiley-VCH, Weinheim.
4. Ashiuchi, M. and H. Misono. 2002. Biochemistry and molecular genetics of poly- γ -glutamate synthesis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **59**, 9-14.
5. Ashiuchi, M., H. Nakamura, T. Yamamoto, T. Kamei, K. Soda, C. Park, M. H. Sung, T. Yagi and H. Misono. 2003. Poly- γ -glutamate depolymerase of *Bacillus subtilis*: production, simple purification and substrate selectivity. *J. Mol. Catalysis B: Enzymatic* **23**, 249-255.
6. Ashiuchi M, K. Shimanouchi, H. Nakamura, T. Kamei, K. Soda, C. Park, M. H. Sung and H. Misono. 2004. Enzymatic synthesis of high-molecular-mass poly- γ -glutamate and regulation of its stereochemistry. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 4249-4255.
7. Birrer, G. A., A. M. Cromwick and R. A. Gross. 1994. Poly- γ -glutamic acid formation by *Bacillus licheniformis* 9945A: physiological and biochemical studies. *Int. J. Biol. Macromol.* **16**, 265-275.
8. Cheng, C., Y. Asada and T. Aaida. 1989. Production of poly- γ -glutamic acid by *Bacillus subtilis* A35 under denitrifying conditions. *Agric. Biol. Chem.* **53**, 2369-2375.
9. Goto, A. and M. Kunioka. 1992. Biosynthesis and hydrolysis of poly- γ -glutamic acid from *Bacillus subtilis* IFO3335. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **56**, 1031-1035.
10. Hara, T. 2000. Desert greening. Greening by utilization of microbial macromolecules. *Kobunshi* **49**, 367-370.
11. Hezayen, F. F., B. H. A. Rehm, B. J. Tindall and A. Steinbchel. 2001. Transfer of *Natrialba asiatica* B1T to *Natrialba taiwanensis* sp. nov., a novel extremely halophilic, aerobic, non-pigmented member of the Archaea from Egypt that produces extracellular poly(γ -glutamic acid). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**, 1133-1142.
12. Holzer, H. 1969. Regulation of enzymes by enzyme-catalyzed chemical modification. *Adv. Enzymol.* **32**, 297-326.
13. 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.
14. King, E. C., A. J. Blacker, and T. D. M. Bugg. 2000. Enzymatic breakdown of poly- γ -D-glutamic acid in *Bacillus licheniformis*: identification of a polyglutamyl- γ -hydrolase enzyme. *Biomacromolecules* **1**, 75-83.
15. Kubota, H., T. Matsunobu, K. Uotani, H. Takebe, A. Satoh, T. Tanaka and M. Tanguchi. 1993. Production of poly- γ -glutamic acid by *Bacillus subtilis* F-2-01. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **57**, 1212-1213.
16. Kubota, H., Y. Nambu and T. Endo. 1996. Alkaline hydrolysis of poly- γ -glutamic acid produced by microorganism. *J. Poly. Sci. Chem.* **34**, 1347-1351.
17. Kunioka, M. and Goto, A. 1994. Biosynthesis of poly(γ -glutamic acid) from L-glutamic acid, citric acid, and ammonium sulfate in *Bacillus subtilis* IFO3335. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **40**, 867-872.
18. Prez-Camero, G., F. Congregado, J. J. Bou and S. Muoz-Guerra. 1999. Biosynthesis and ultrasonic degradation of bacterial poly- γ -glutamic acid. *Biotechnol. Bioeng.* **63**, 110-115.
19. Shih, I. L. and Y. T. Van. 2001. The production of poly- γ -glutamic acid from microorganisms and its various applications. *Bioresource Technology* **79**, 207-225.
20. Stadtman, E. R. 1966. Allosteric regulation of enzyme activity. *Adv. Enzymol.* **28**, 41-154.
21. Sveath, P. H. A., N. S. Mair, M. E. Sharpe and J. G. Holt. 1984. Bergy's Manual of Ayatematic Bacteriology. Vol. 2, Williams and Wilkins, Baltimore.
22. Tanaka, T., O. Hiruta, T. Futamura, K. Uotani, A. Satoh, M. Taniguchi and S. Oi. 1993. Purification and characterization of poly- γ -glutamic acid hydrolase from a filamentous fungus, *Myrothecium* sp. TM-4222. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **57**, 2148-2153.
23. Tanaka, T., T. Yaguchi, O. Hiruta, T. Futamura, K. Uotani, A. Satoh, M. Taniguchi and S. Oi. 1993. Screening for microorganism having poly- γ -glutamic acid endohydrolase activity and the enzyme production by *Myrothecium* sp. TM-4222. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **57**, 1809-1810.
24. Troy, F. A. 1973. Chemistry and biosynthesis of the poly (γ -D-glutamyl) capsule in *Bacillus licheniformis*. 1. Properties of the membrane-mediated biosynthetic reaction. *J. Biol. Chem.* **248**, 305-316.
25. Zhao, X. Q., K. H. Park, Y. Y. Jin, I. H. Lee, Y. Y. Yang and J. W. Suh. 2005. Isolation and characterization of a new γ -polyglutamic acid producer, *Bacillus mesentericus* MJM1, from korean domestic chungkukjang bean paste. *J. Microbiol. Biotechnol.* **15**, 59-65.