

청국장의 우량균주 분리와 물리적 특성에 관한 연구

강석원

(유성농업고등학교 교사)

The Study on Excellent Bacillus Isolation and the Physical Characteristics of Chungkookjang

Suck-Won Kang

Yuseong Agricultural Highschool, Taejon 305-311 Korea

적 요

냄새가 불쾌하면서도 맛은 구수하고 감칠맛 나는 청국장은 흰콩을 고초균으로 발효시켜 점성과 풍미성분의 r-PGA(r-glutamic acid. r-Polyglutamate PGA)를 많이 생성 되도록 하여야 한다. 자연의 고초균 중에서 이 PGA 물질을 많이 생성시키는 우량 균주를 분리하고 그 균의 물리적 특성을 실험하여 우수한 청국장이 만들어지는 조건을 제시하고자 충청지역에서 수집한 청국장과 자가 제조한 청국장에서 Colony의 크기와 형태가 상이한 수개의 균주를 분리, 선발하여 PGA 생성량이 많은 K13, K94, K42, K54를 선발하였다. 이 균들은 배양 18~24시간에 10⁸Cell/g의 균 수를 보였다. 특히 K54는 r-PGA를 42시간에 86.7mg/g으로 선발 균주중 가장 우수하였고 K94는 점성도가 높아 분자량이 크다고 판단되었다. 주요 효소에서는 protease, γ -GTP, levansucrase의 활성도는 12시간 후부터 검출되었다. protease는 K13이 48시간에 최고 (72.9 units/g)이었고 γ -GTP는 K54가 42시간후 1980.8mU/g로서 가장 높았다. levansucrase는 모두 12시간에서 최고에 이르렀다. CET 침전법에 의한 PGA 수율은 K54가 가장 높아 320.9mg/100ml을 나타내었다.

1. 서론

청국장(淸國醬)은 두과(leguminose)에 속하는 두류(legumes)의 대두(soybean)중 흰콩으로 만든다. 이 흰콩을 삶아 고초균에 속하는 *Bacillus natto*, *Bacillus subtilis* 등을 번식하게 하여 발효시켜 만든 한국 전통 식품으로 가는 실처럼 죽죽 늘어지는 점성을 갖는 물질을 생산하며 독특한 맛과 냄새를 가지는 것이 특징이다.

콩의 식품적 가치는 탄수화물은 적고 단백질과 지방함량이 많다. 구조를 보면 종피 6~8%, 배아 2%,

자엽 90~92%로 구성되어 있고 종피의 외부는 cuticle층으로 구성되어 있으며 주로 자엽에 영양성분을 함유하고 있다.

단백질은 보통 곡류에는 5~14%인데 콩에는 30~45% 정도 함유하고 있으며 구성은 globulin의 glycinin이 84%, albumin류의 일종인 legumelin 5%, protease 4%와 기타 6%로 되어 있다. glycinin에는 필수amino산이 골고루 들어 있으며 곡류에 부족하기 쉬운 lysine과 leucine이 많으며 함유 amino산에 속하는 methionine이 부족하다. 단백질은 쌀70, 밀47에 비하여 콩은 73으로 곡류보다 약간 높다⁶⁷⁾. 콩중의 단백질은 보수성, 결합성, 유화성, 기포성의 기능적 특성을 가

진다.

지방은 12-22% 정도 함유하고 있으며 조성을 보면 포화지방산인 palmitic acid 6-10%, stearic acid 2.4-6% 등이고 불포화지방산인 oleic acid 22-35%, linoleic acid 50-60%, linolenic acid 2-10% 정도 함유하고 있다. 지방의 조성상 특이한 것은 필수지방산에 속하는 linoleic acid($C_{17}H_{31}COOH$)와 linolenic acid($C_{17}H_{29}COOH$)를 많이 함유하고 있어 육류보다 좋은 식품이라 할 수 있다. 대두유 중의 인지질인 lecithin, cephalin은 분리하여 유화제로 사용된다^{11,12)}.

탄수화물로서는 sucrose 7%, starchyose 4%, araban 4%, galactan 6%, 조섬유 0.1% 등이 분포하고 있으며 전분은 성숙콩에는 없고 미숙콩에는 2~4% 존재한다. 종피에는 조섬유가 30~35% 차지하고 세포막은 hemicellulose로 되어 있어 소화율이 떨어진다.

회분은 potassium이 많고 phosphorus, sodium이 들어 있으며, calcium, magnesium의 함량은 낮다. Phosphorus는 phytin의 형태로 존재한다. Vitamin B₁, B₂, niacin등의 비타민은 곡류보다 많이 함유하며, vitamin A, C, D는 함유하지 않으나 콩나물 중에는 C가 상당량 들어있다. 생콩에는 globulin태의 trypsin inhibitor와 적혈구 응집소인 hematoglutin, 기타성분 urease, saponin, tannin등이 들어있어서 가공하지 않고 바로 식용하는 것은 바람직하지 않으며, 100°C에서 10~20분간 가열처리로 변성시켜 저해요인을 없앨 수 있다^{6,7,11)}. 콩은 소화율이 나빠 삶거나 볶아도 70% 이하이며 된장, 청국장 등으로 가공하면 85% 이상의 소화율을 높일 수 있다^{3,4,10)}.

콩은 생명유지 기능과 식품의 전통적 기능 이외에 고차원적 생명활동에 대한 조절기능 즉 병의 예방과 치료기능을 가지고 있다. 식품의 기능성에 관심이 높아지면서 콩의 기능과 가공품중 청국장의 기능에 대하여 관심을 가지게 되었다.

콩은 혈전을 용해시켜 혈액을 맑게 해주는 역할을 하며 근래에 고혈압, 당뇨등 성인병의 예방과 항암작용에 효능이 있는 것으로 밝혀지고 있으며 최근 들어 노인성 치매에도 예방효과가 크다는 발표도 나왔다. 외국에서는 콩을 성인병의 예방뿐만 아니라 치료에까지 이용하려는 움직임이 시도되고 있다. 콩의

isoflavonoid 및 saponin 등의 배당체의 성분은 항산화, 항지혈, 항콜레스테롤, 항동맥경화 작용과 맛에 영향을 준다. 이와 같이 콩은 영양면에서 단백질의 질이 우수하고 양도 많으며 또한 지방조성도 불포화지방산이 월등히 많아 육류를 기피하는 성인에게 전망이 기대되는 식품이라 할 수 있다. 청국장 발효에 관계하는 *Bacillus natto* 균의 기능도 우수하여 정장작용, 간장 보호작용과 티프스균, 콜레라균에 대한 살균 항균작용, 암을 억제하는 효과가 있다는 보고가 있으며 또 청국장의 발효과정 중에 생성되는 단백질 분해효소 중에는 혈전증을 예방 및 치료할 수 있는 nattokinase가 함유되어 있다는 보고도 있다.

청국장은 콩을 삶아 납두(納豆)를 만들고 여기에 조미료, 향신료 등을 넣어 다시 숙성발효시킨 것인데 淸國醬 혹은 淸麴醬으로 표기되고 있으나 원래 청나라 때 우리나라에 전래 되었다고 예측하므로 淸國醬으로 표기하는 경우가 많다. 1715년 홍만선의 산림경제 중의 조선두장법에 의하면 전시에 부식으로 단기간내 제조하여 이용할 수 있는 장이라는 의미에서 전국장(戰國醬)이라고 기록되어 있다⁸⁾. 또한 지방에 따라 담복장, 납두장, 뽕복장, 통통장, 집장등으로 다양한 명칭으로 불려지고 있다.

청국장의 특징은 제조시간이 1-3일 정도로 짧고 40-50°C의 고온에서 만들어지며 콩중의 단백질 성분이 불용성에서 수용성으로 변하며 발효중에 만들어지는 끈적끈적한 점성물질이 독특한 풍미와 냄새를 가진다. 청국장을 요리할 때 이 특이한 냄새 때문에 사람에게 따라 거부감을 느끼지만 냄새에 비하여 맛이 좋기 때문에 소비는 계속되고 있다.

지역에 따라 청국장 제조시 고초균이 많이 번식하도록 볏짚을 사용하는 경우가 많이 있다. 이때 protease의 활성이 강한 고초균이 많으면 청국장의 맛이 좋아지고 protease의 활성이 약하면 맛이 떨어지고 부패 변질하게 된다. 또한 볏짚 특유의 향이 청국장 과 어우러져 나쁜냄새의 원인인 암모니아가 볏짚에 흡수하게 되어 불쾌취가 적어진다. 일본에서는 우리나라 청국장과 비슷한 낫또에 대하여 많은 연구를 실시 하였다. 順田과 澤村은 미생물을 분리 동정하여 natto 발효균에 관여하는 균을 *Bacillus natto*라 명명한

이래 이균을 사용하여 단백질 분해 효소력을 비롯한 여러 가지 연구가 진행되었다. 원료 대두의 침지시간 및 침지액의 pH에 따른 납두(納豆)품질의 영향과 발효실의 온도와 습도를 달리하여 제조한 납두제품의 amino acid태 질소와 ammonia태의 질소를 경시적으로 분석하여 최적 조건을 설정하는 등의 광범위한 조사연구를 실시하였다.

점질물에 대한 연구도 진행되어 점질물은 D,L-glutamic acid를 포함한 levan으로 구성되어 있고 r-PGA(r-glutamic acid)가 실처럼 죽죽 늘어지는 성분의 주체라는 것이 밝혀졌다. 또한 *Bacillus natto*를 대상으로 r-PGA와 levan의 생성에 관여하는 r-glutamyltransferase(5-glutamyl-peptide, amino acid 5-glutamyltransferase, r-GTP) 및 levansucrose(sucrose, 2,6-β-D-fructan 6-β-D-fructosyltransferase)에 대한 연구도 많이 하고 있다. 이와 같이 청국장의 점성 및 풍미성분은 D,L-glutamic acid가 중합되어진 poly(γ-glutamic acid) 즉 γ-polyglutamate(PGA)^{21,41}와 fructose의 중합체인 levan⁴²이며, 그 중 PGA가 제품의 점성에 영향을 주는 것으로 알려져 있다.

점질물을 구성하는 PGA는 산성용액에서 α-helix(螺旋)구조가 되며 중성에서는 분자가 길게 늘어진 random coil(불규칙적인 코일)구조로 변화되어 점성이 높아진다³. 이는 일종의 polypeptide이지만 단일 아미노산의 중합체이며 γ-결합으로 이루어진다는 점에서 polypeptide와 구별하고 있다.

PGA는 1937년 Ivanovics²⁸ 등에 의하여 *Bacillus anthracis*의 혐막성분으로서 발견되었다. 그후 Bovarnick¹⁹가 *Bacillus subtilis*의 배양액 중에 발효 생산물로서 축적된다는 것을 확인한 이래 다수의 연구가 이루어져 왔으며 1963년 Fujii²³는 natto의 점질물질의 주성분이 바로 PGA라는 것을 보고한 바 있다. 분자량은 균주에 따라 차이가 커서 수만으로부터 수백만(MW 100,000~1,000,000)에 이른다. 이러한 기반연구에 추가하여 PGA는 자연계에 존재하는 미생물^{39,40}에 의하여 생분해될 수 있으므로 식품, 의약 및 화장품 분야에서 생분해성 증점제, 보습제, 서방성담체의 새로운 소재로서 응용이 기대되며^{20,25}, 식품공업에 널리 사용할 수 있는 안전한 식품첨가물의 개발은 의의가

크다고 하겠다.

최근 PGA의 새로운 기능성화를 목표로 하여 몇 가지 반응이 검토되어 왔다. 예를 들면 PGA의 carboxyl기를 ester화 함으로서 용점을 갖는 폴리머가 되므로^{24,33} benzylester화한 PGA는 습식방사후 연신처리에 의하여 섬유화하는 것도 가능하다³⁰. 또 carboxyl기를 hexamethylene diisocyanate등의 가교제(crosslinking reagent)로 처리하거나 γ-irradiation에 의하여 가교 반응을 유도함으로써 PGA 가교체를 형성할 수 있으며^{15,16} 이는 물속에서 gel을 형성하므로 고흡수성 재료로서 활용될 수 있다. 이것을 흔히 hydrogel이라 하여 원료 물질과 비교하여 보면 물성 및 이화학적 성질에 큰 변화가 있으므로 신소재로서의 기능성에 관한 응용연구가 활발하다^{22,29}. 이러한 소재연구는 구미 각국에서보다도 일본에서 진전을 보이고 있다.

국내에서의 연구는 미진한 실정이며 청국장의 성분에 관한 문헌에서는 PGA에 대한 연구 보고는 흔치 않다. 1991년 박³⁵은 PGA의 생성효소인 γ-GTP를 부분 정제하여 특성을 조사한 바 있고, 이어서 1994년 PGA 생산균주 *Bacillus subtilis* CHL62에 관한 보고^{36,37} 1997년 학회 보고로서 생분해성 PGA의 생산과 물성,² *Bacillus amyloliquifaciens*로 부터 생분해성 응집고분자의 분리 및 응용연구⁹가 있었다.

따라서 본 연구에서는 PGA의 생산성이 높은 청국장균을 분리할 목적으로, 1) 자가제조한 청국장 시료와 대전 충남북에서 수집한 청국장으로부터 *Bacillus*속 세균을 분리하고, 2) 액체배양에 의한 점질물의 침전 습증량과 건조증량을 비교하여, 3) 우량균주를 선발하고, 이들의 증자대두 배양 즉 청국장 발효중 생육과 포자 형성율, PGA의 생산과 점도, protease, γ-GTP, levansucrase등 관련 효소의 활성도를 측정하며, 4) 아울러 액체배양에 의한 PGA의 생산성과 회수 정제를 위한 침전조건을 조사하였다.

II. 재료 및 방법

1. 재료 및 시약

본실험에 사용한 원료대두는 1997년산 황금콩을 충

남 청양군에서 구입하여 청국장을 제조하여 사용하였으며 일반성분은 수분 9.2%, 조단백질 41.3%, 조지방 17.6% 탄수화물 21.6%, 조섬유 3.5%, 회분 5.8%이었다. 충남대학교 농과대학 생화학 연구실에서 계대 배양되고 있는 우량균주를 분양받아 참고하였다

Beef extract를 비롯한 미생물 배지용 시약은 Difco회사 제품을 사용하였으며 분석용 시약은 Sigma 및 Junsei사의 특급(GR grade)을, γ -glutamyl-transpeptidase 활성도 측정에는 (주)인화제약의 γ -GTP kit를 구입하여 사용하였다.

2. 배지 및 배양조건

2.1. 배지

1) 육즙배지(Bouillon broth or agar): Beef extract 10, peptone 10, NaCl 5g/L pH 7.0: 고체배지의 경우에는 agar 15g/L.

2) 점질물 생성용 배지<1>: Monosodium glutamate 70, glucose 80, yeast extract 5, peptone 15, urea 3, K_2HPO_4 2g/L, pH 7.0

3) 점질물생성용 배지<2>^{34,41}: Monosodium glutamate 30, citric acid 20, $(NH_4)_2SO_4$ 10, KH_2PO_4 1, $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 1, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5, $MnSO_4 \cdot nH_2O$ 0.02, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 0.05, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.2g/L, biotin 500 μ g, pH 7.5

4) Biotin 요구성 시험용 배지: Salt A 25, salt B 25, sucrose 25g(in 150mL dH₂O), trp 25mg(in 10mL), with or without biotin 50 μ g(in 5mL)

각각 별도로 조제하여 살균한 다음 혼합하여 분주하며 stock salt solution A와 B의 조성은 아래와 같음.

Salt A: KH_2PO_4 27, $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 42g/500mL, pH 6.4

Salt B: NaCl 5, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 5, monosodium glutamate 150g/500mL, pH 6.4

5) 증자대두 배지: 원료대두를 수세하여 24시간 동안 우물물에 침지한 후 체에 받쳐서 탈수한 것을 250mL 삼각플라스크에 42g씩 넣고 면전한 다음 121°C에서 30분간 증자 살균함.

2.2. 배양

1) 전배양: 전배양을 위해서는 육즙 또는 육즙한천 배지를 5mL씩 screw-cap 시험관에 분주하고 121°C에서 15분간 가압살균한 다음, 한천배지의 경우에는 사면으로 냉각 응고시킨후 균체를 한 백금을 접종하여 37°C에서 24시간 배양하였다.

2) 본배양: 증자대두 배지와 점질물생성용 배지<1> 및 <2>를 사용하였다.

증자대두 배지에는 육즙배지에서 24시간 진탕배양한 전배양액을 0.5mL씩 접종하고 37°C에서 정치배양하였다.

점질물생성용 배지 <1> 및 <2>는 50mL씩 250mL 삼각플라스크에 분주하여 살균한 다음 육즙한천에서의 전배양물을 한백금이 접종하고 37°C에서 진탕(at 240rpm with a stroke diameter of 5cm; 비전과학 KMC-8480SF) 배양하였다.

2.3. 생육의 측정

1) 생균수: 희석 평판법에 따라 육즙한천 평판에서 생균수(viable counts)를 측정하였으며, 경우에 따라서는 610nm에서의 탁도로서 비교하였다.

2) 포자수: 배양액을 100°C에서 10분간 가열처리한 다음 생균수 측정법과 동일한 방법으로 측정하였다.

3. 세균의 순수분리

충청지역을 비롯한 각지역에서 자가제조한 청국장을 수집하고, 0.5g씩을 시험관내에서 5mL의 육즙배지에 현탁시켜 10분간 끓인 다음 한 백금을 육즙한천 평판상에 펼쳐서 접종하고 37°C에서 배양하면서 생육하는 콜로니를 분리하였으며 몇차례 계대 배양하여 순수한 균주를 얻었다.

4. 일반성분의 분석방법

4.1. 수분 함량 및 pH

수분 함량은 105°C 건조법으로, pH는 청국장 시료의 경우에는 같은량의 증류수를 가하여 조직파쇄기(Ace Homogenizer; 12,000rpm, 3분)로 마쇄한 후 원

심분리(3,500rpm, 10분)하여 얻은 상정액을 pH 미터(Beckman Φ^{TM} 34)로 측정하였다¹⁷⁾.

4.2. 당 함량

Phenol-H₂SO₄법에 따라 시료 1mL (1~100 μ g)를 16×160mm 시험관에 취하고 5% phenol용액 1mL를 가한 다음 진한 황산 5mL를 기벽에 닿지 않도록 적가하여 10분간 방치한 후 혼합시키고 30분후에 파장 490nm에서 비색 정량하였다.

5. 점질물의 분석방법

5.1. 점질물의 회수 및 정량

1) 침전습중량: 액체 배양액을 원심분리(16,000×g, 30분)하여 얻은 침전물의 젖은 무게를 측정 비교하였다.

2) Ethanol 침전물의 냉동건조 중량: 액체 배양액을 원심분리(9,200×g)하여 얻은 상정액의 pH를 10으로 조정하고 여기에 빙냉시킨 ethanol 3배량을 가하여 4°C에서 하루밤 둔 다음 다시 원심분리하여 침전물을 회수하고 이를 냉동 건조하였으며, 건조후의 무게를 측정 비교하였다.

3) 증자대두 배양물중의 PGA: Kanno 등³⁰⁾의 cetyltrimethylammonium bromide (CET) 침전법에 의하였다. 증자대두 배양물 즉 청국장 25g을 250mL 플라스크에 취하고 여기에 2.5% trichloroacetic acid (TCA)용액 75mL를 가하여 50°C에서 15분간 진탕시켜 점질물을 녹여냈고, 이를 스텐레스제 녹차여과망으로 여과하였으며 이과정에서 TCA용액으로 대두를 씻어 내리고 증류수로 채워 100mL로 정용하였다. 그 일부를 원심분리(9,200×g, 10분)하여 상정액 25mL를 취하고 pH를 7.2로 조정(1N NaOH 사용)하여 50mL로 채운 다음, 5mL만을 50mL 원심튜브에 옮기고 ethanol 20mL를 첨가하여 10분간 방치후 원심분리하였다. 침전을 20mL의 80% ethanol로 세척하고 증류수에 용해하여 25mL로 정용하였으며, 그 1mL를 시험관에서 5mL의 증류수로 희석하고 CET용액(0.1M CET in 1M NaCl) 1mL를 혼합한(vortex mixing) 다음 20분간 정치후 400nm에서의 흡광도를 측정하였

다. Kanno 등의 표준곡선을 적용하여 함량을 계산하였다.

5.2. PGA의 정제

1) EtOH 침전법: 액체 배양액을 원심분리 (9,200×g)하여 균체를 제거하고 얻은 상정액의 pH를 10으로 조정하고 여기에 빙냉시킨 ethanol 3배량을 가하여 4°C에서 하루밤 둔 다음 다시 원심분리하여 침전물을 회수하고 이를 냉동건조(Ilshin FD5512 Freeze dryer)하였다. 건조 시료를 증류수에 용해하고 불용성 성분을 제외시키기 위하여 원심분리하였으며 상정액을 Spectra/Por[®]membrane tubing(29mm in diameter; MWCO 12-14,000)으로 4°C에서 증류수를 사용하여 3일간 투석하여 저분자 물질을 제거한 다음 다시 냉동건조하였다.

2) CET 침전법: 액체 배양액을 위와 같은 방법으로 균체를 제거하여 ethanol 침전시킨 것을 증류수에 용해하고 여기에 CET용액 (0.1M CET in 1M NaCl)을 더이상 침전이 생기지 않을 때까지 첨가하여 4°C에서 하루밤 둔 다음 원심분리하였다. 침전물을 회수하여 2M NaCl에 용해하고 ethanol로 침전 및 세척한 것 (빙냉시킨 ethanol 3배량을 가하여 4°C에서 하루밤 두어 충분히 침전을 유도하고 원심분리하여 얻은 침전물을 80% ethanol로 3회 세척함)을 증류수에 용해하여 냉동건조하였다³⁰⁾.

5.3. 상대점도

1) 시료의 조제: 증자대두 배양물 즉 청국장 시료 5g에 증류수 30mL를 가하고 5분간 진탕시켜 점질물을 녹여낸 다음 원심분리하여 상정액을 시료로 사용하였다.

2) 상대점도의 측정: Cannon-Fenske 모세관점도계 (Scott-Gerate, $t_0=13$ sec)에 10mL의 시료를 넣고 3°C 항온수조에서 온도평형에 이르게한 후에 액을 빨아 올려 눈금사이의 유속(초)을 측정하였다. 이와 같은 조작을 용매와 용액에 대해서 몇차례 되풀이하고 그 평균치를 구하여 상대점도(relative vis-cosity) η_r 로 나타내었다¹⁷⁾.

$$\eta_r = \frac{\rho_t (\text{용액의 밀도} \times \text{용액의 유속} \langle \text{초} \rangle)}{\rho_{to} (\text{용매의 밀도} \times \text{용매의 유속} \langle \text{초} \rangle)}$$

6. 효소의 활성도 측정방법

6.1. 조효소액의 조제

증자대두 배양물 즉 청국장 시료 5g에 증류수를 가하여 조직파쇄기(Ace Homogenizer: 12,000rpm, 3분)로 마쇄하고 원심분리하여 얻은 상정액을 조효소액으로 하였으며 효소의 종류에 따라 더욱 희석하여 사용하였다.

6.2. Protease

Milk casein용액 (0.6% in 50mM phosphate buffer) 2.5mL를 시험관에 넣고 30°C로 예열한 다음 조효소액 0.5mL를 가하여 10분간 반응시켰다. TCA 용액 (0.11M in 0.22M sodium acetate+0.33M acetic acid) 2.5mL를 가하고 30°C에서 30분간 정치후 여과하였으며 그 여액 1mL에 0.55M Na₂CO₃ 2.5mL와 3배 희석한 Folin-Ciocalteu 시약 0.5mL를 가하고 30°C에서 30분간 발색시킨 후 550nm에서 흡광도를 측정하였다. Protease의 활성도 단위는 조효소액 1mL에 의하여 1분간에 1 μ g의 tyrosine에 해당하는 Folin 발색성의 단백질분해물이 생성되는 것을 1단위로 정의하였으며 청국장 1g을 기준으로 나타내었다.

6.3. γ -Glutamyltranspeptidase

γ -L-glutamyl-3-carboxy-4-hydroxyaniline을 기질로 하는 (주)인화제약의 임상진단용 γ -GTP kit를 사용하여 측정하였다. 즉 Producer's Manual에 따라 기질용액 1mL를 시험관에 취하고 37°C의 항온수조에서 3분간 예열한 다음 여기에 조효소액 20 μ L를 넣고 15분간 반응시켰으며 이어서 정색시약(p-xylenol 및 sodium metaperiodate의 혼액) 2mL를 혼합하고 실온에서 10분간 방치한 다음 640nm에서의 흡광도를 측정하였다. Kit의 효소 표준액으로 표준곡선을 작성하여 활성도를 환산하였으며, 그 단위는 1분간에 1 μ mol의 5-aminosalicylic acid를 유리하는 효소량으로 정의하였다³⁵⁾.

6.4. Levansucrase

Tanaka 등³⁹⁾이 기술한 방법에 따라 pH 7.0의 100 mM 인산완충액에 용해한 20% sucrose용액 0.5mL를 30°C에서 5분간 예열하고 여기에 조효소액 0.5mL를 가하여 30분간 반응시켰다. Somogyi-Nelson법으로 glucose를 표준으로 하여 환원당을 측정하였으며 활성도의 단위는 1분간에 1 μ mol의 glucose에 상당하는 환원당을 유리하는데 필요한 효소량으로 정의하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 청국장 세균의 분리 및 우량균주의 선발

충청지역의 재래시장에서 시판하거나 가정에서 자가제조한 청국장 시료를 수집하고, 청국장균인 *Bacillus*속 세균은 포자를 형성하여 내열성을 가지고 있으므로 전항의 실험재료 및 방법에서 기술한 바와 같이 시료를 가열처리한 다음 생존하는 포자로부터 청국장 세균을 분리하였다. Nutrient agar 평판에서 몇차례 계대하여 순수정제하여, 콜로니의 크기와 형태를 달리하는 27개 균주를 분리하였으며, biotin 요구성과 점질물 형성여부를 비교용 한천 평판상에서 관찰하였다. 또한 분리균주는 점질물 생성용 배지<1>에서 48시간 액체 배양한 후 생성된 점질물을 침전습중량과 그 ethanol 침전물의 건조중량을 측정하여 그 결과를 모두 Table 1에 정리하였으며 점질물 비교용 균주로서 *Bacillus subtilis* BS62와 F2-01의 결과를 함께 나타내었다. 분리균주 27개중 14개 균주가 생육인자로서 biotin을 요구하였으며 그중 균주번호 K13, K22, K31, K53, K61, K94 등이 biotin시험용 한천평판상에서 점질물 생성량이 많았고, 한편 요구성이 없는 균주는 대체로 점질물량이 적었으나 K42와 K54의 2균주는 예외적으로 생성량이 많았다.

이들의 점질물생성용 배지<1>에서의 액체배양 결과를 Table 1에서 비교하여 보면 biotin⁻균주중에서는 K13과 K94, biotin⁺균주로서는 K42와 K54 등이 침전습중량과 건조중량 모두 우수하였고 보고된 바있는 BS62²⁵⁾와 F2-01^{32,13)}균주와 비견할만한 수준이었으므로 이들을 점질물 생성용 균주로 선발하여 다음 실

험을 진행하였다.

2. 증자대두 배지에서의 점질물 생산

청국장지의 발효 과정 중 점질물의 생산과 이에 관련된 자료를 얻고자, 전향에서 선발한 균주 K13, K94 (biotin⁻), K32, K54 (biotin⁺)와 비교균주로서 BS62, F2-01 (biotin⁻) 등의 전배양액을 증자대두 배지에 접

Table 1. Comparison of slime productivities among *Bacillus* sp. isolates.

Isolates	Plate culture*			Broth culture**	
	Biotin requirement	Slime productivity	Stringness	Wet slime (g/100mL)	Dry slime (g/100mL)
K12	+	+	-	3.27	0.93
K13	-	+++	+++	9.65	3.63
K14	+	+	-	6.48	2.68
K21	-	++	+++	7.13	2.85
K22	-	+++	++	7.52	2.05
K23	+	++	-	5.18	1.55
K31	-	+++	-	6.23	2.23
K32	+	++	++	7.53	3.12
K33	-	+	-	5.52	2.10
K41	-	+	++	5.95	2.59
K42	+	+++	+++	7.13	2.90
K43	+	+	++	6.50	2.54
K51	+	+	-	8.05	2.51
K52	+	+	+	8.45	3.08
K53	-	+++	+++	8.10	3.21
K54	+	+++	-	8.60	3.35
K61	-	+++	++	7.90	2.62
K62	+	+	-	5.18	1.88
K72	-	+	-	6.40	2.87
K73	-	++	+++	7.32	2.44
K74	+	+	-	8.23	3.54
K81	-	+	++	8.48	2.75
K82	+	+	-	8.25	2.60
K91	-	++	-	7.98	3.52
K92	+	+	+	5.90	2.60
K93	-	+	+	9.38	2.63
K94	-	+++	+++	7.37	3.00
BS62 ^{c)}	-	+++	++	7.08	2.78
F2-01 ^{d)}	-	+++	+++	9.42	2.93

^{a)}Biotin requirement and slime productivity on agar plate were tested on the media (2) consisted of salt solution A and B 50mL each, sucrose 50g, tryptophan 50mg, Biotin 100 μ g (with or without), agar 16g/L, after incubation for 24hr at 37°C.

^{b)}Cultures were grown in 250-mL shake flasks containing 40 mL broth, the medium (1) for 48hr at 37°C.

^{c)}The strain studied by Park.³⁵⁾

^{d)}The strain previously reported by Kubota et al.^{32,13)}

중하고 37°C에서 48시간 정치 배양하면서 6시간 간격으로 시료를 채취하여 생육과 포자 형성율, 점질물의 생산과 점도, 관련 효소의 활성화도 변화를 비교하였다.

1) 생육과 포자 형성율

증자대두 배양물 즉 청국장 시료 5g에 증류수 30 mL를 가하고 5분간 진탕하여 균체를 현탁시킨 다음 생균수와 포자수를 측정한 결과 균주 K13, K42, KK3 등은 배양초기의 $\sim 10^5$ cells/g 수준으로부터 배양 18~24 시간에 $\sim 10^6$ cells/g으로 생육하였고, 균주 K94는 완만하게 자랐으나 42시간이후에는 $\sim 10^9$ cells/g으로서 타균주보다 높은 균수를 나타내었다. 그림에서 보는 바와 같이 포자형성율은 K13이 가장 낮고 K94가 가장 높았으며 K94의 경우 대수생장기 초기에 해당하는 18~24시간에 지수 1이하의 높은 포자 형성율을 나타내어 타균주와는 차이가 있었다.

2) 점질물의 생산

Kanno 등³⁰⁾의 CET침전법에 따라 증자대두 배양물 중의 γ -PGA 함량을 측정하고, 아울러 그 상대점도 (η_r)를 구하였다. 배양물 중 PGA의 함량과 상대점도의 변화 경향은 대체로 일치하였으나 정비례하지는 않아 PGA의 평균 분자량에 차이가 있음을 알 수 있

었다. 균주 K42, K54 등의 경우에는 PGA의 함량에 대한 점성도의 비율이 낮는데 비하여 K94의 경우에는 그 반대의 경향을 나타냄으로써, 균주 K94에 의하여 생성된 PGA의 평균 분자량이 타균주의 것에 비하여 더 높다고 볼 수 있다.

Table 2에서는 각 균주의 생육, PGA의 생성량, 상대점도의 최고치와 이에 도달하는데 소요되는 배양시간을 비교하여 보았다. 균주 K54에 의한 PGA의 수량은 42시간 후 86.7mg/g으로서 선발균주 중 가장 많았으나, *Bacillus subtilis* F2-01의 105.1mg/g 보다는 낮은 수준이었다. 한편 K13은 24시간후 1.8×10^9 cells/g, 18시간 후 PGA 70.0mg/g의 최고치에 이르렀으며, K94의 경우에는 42시간 이후에 각각 최고치에 도달하여, 균체의 생육속도와 점질물의 생성과도 대체적으로 비례하는 경향을 보였다.

3) 효소의 생성

증자대두 배양 즉 청국장 발효기간 중 단백질의 분해 및 점질물의 생성에 관련된 protease, γ -GTP, levansucrase 등의 효소 활성화도의 변화를 조사하였다. Protease는 공시균주 모두 배양 12시간 후부터 검출되기 시작하여 배양기간 중 계속적으로 점차 증가하였고, 그중 K13 접종구의 활성화도 수준이 가장 높아

Table 2. Maximal levels of growth of the selected strains and their slime productivities in the steamed soybean culture.

Bacillus subtilis	Growth ^{a)} (viable cells/g)	Slimed ^{b)} (CET mg/g)	Viscosity ^{c)} (η_r)
K13	1.8×10^9 (24h) ^{d)}	70.0 (18h)	7.47 (18h)
K94	4.3×10^9 (48h)	84.4 (42h)	10.81 (36h)
K42	6.6×10^8 (30h)	71.1 (36h)	5.92 (30h)
K54	6.0×10^8 (36h)	86.7 (42h)	5.63 (36h)
BS62	7.2×10^8 (36h)	75.2 (30h)	10.94 (24h)
F2-01	2.4×10^9 (30h)	105.1 (42h)	32.57 (36h)

^{a)}Growth was presented as viable number of cells per gram of the steam-ed soybean culture

^{b)}Slime was determined as poly(γ -glutamic acid) by the CET precipitation method.³⁰⁾

^{c)}Viscosity was presented by the relative viscosity, η_r .¹⁷⁾

^{d)}Numbers in parenthesis indicate the time required to reach the highest value.

48시간후 72.9 units/g에 도달하였다. 공시균주 모두 γ -GTP의 활성도는 배양 12시간 후부터 검출되기 시작하여 30~42시간에 정점에 도달하였다가 감소하는 경향을 보였다. 선발균주 중에서는 K54가 가장 높아 42시간 후 1980.8 mU/g의 활성도를 나타내었으나 *Bacillus subtilis* BS62의 3148.3 및 F2-01의 3911.4 mU/g 보다는 낮은 수준이었다.

Levansucrase는 protease나 γ -GTP의 경우와는 달리 배양초기에 생성되어 12시간후 모든 균주에서 3.11~4.00 units/g으로 정점에 달하였으며 그 후 점차 감소하였다. Table 3에서 각 효소 활성도의 최고치와 이에 도달하는데 소요되는 배양시간을 비교하였다. Protease는 배양 말기까지 계속하여, levansucrase는 초기에, 그리고 γ -GTP는 후기에 각각 최고의 활성도를 나타내었고, 또한 protease는 균주 K13, levansucrase는 K42, γ -GTP는 *Bacillus subtilis* F2-01가 생성 수준이 가장 높았다. 이와 같이 공시균주는 효소의 생성량 및 생성시기에 큰 차이를 보임으로써 같은 *Bacillus*속 균주라도 개체 차이가 심하다는 것을 알수 있었고, 따라서 한가지 효소를 목표로 우수한 균주를 지속적으로 분리하거나 선발한 균주를 육종해 나가야 할 것으로 생각한다. 한편 γ -GTP의 활성도를 점질물의 생성 수준 및 시기와 비교해 보면 대체적으로 비례적인 관계라고 볼 수 있으나 반드시 일치하지는

않았다.

3. 액체 배지에서의 점질물 생산

전항의 증자대두 배양에 이어서 액체배양을 통한 점질물의 생산성을 알아 보고, 또한 배양액으로부터 PGA를 회수하기 위한 ethanol 침전 조건에 관하여 실험하였다.

1) 점질물의 수율

선발균주를 점질물생성용 배지〈1〉 및 〈2〉에서 37°C로 48시간 진탕배양한 다음, 실험재료 및 방법 5.2.의 2항에 기술한 CET 침전법에 따라 PGA를 회수하고 탄수화물의 함량을 분석하여, 수율과 당함량을 비교하였으며, 결과를 Table 4에 정리하였다. 점질물생성용 배지 〈1〉에서의 PGA의 생성수준은 균주 K94의 가장 낮은 252.2mg/100mL로부터 K54의 최고 320.9 mg/100mL 사이였으며, 당함량은 2.34~10.95%이었다. 배지 〈1〉에는 탄소원으로 glucose를 8% 함유하므로 Kunioka 등³⁰⁾이 *Bacillus subtilis* IFO3335의 배양에 2%의 citric acid를 탄소원으로 사용하여 점질물중 당함량을 저감시키고자 시도한 바 있다. 본 실험에서도 citric acid를 탄소원으로 한 배지 〈2〉에서 선발균주를 배양해본 결과 Table 4에서 보는 바와 같이 담

Table 3. Maximal levels of enzyme in the steamed soybean culture of the selected strains.

<i>Bacillus subtilis</i>	Protease ^{a)} (units/g)	Levansucrase ^{d)} (units/g)	γ -Glutamyltrans-peptidase ^{c)} (mU/g)
K13	72.9 (48h) ^{d)}	3.63 (12h)	1626.8 (30h)
K94	44.9 (48h)	3.33 (12h)	1645.9 (30h)
K42	25.7 (48h)	4.00 (12h)	1033.4 (36h)
K54	43.2 (48h)	3.78 (12h)	1980.8 (42h)
BS62	37.4 (48h)	3.11 (12h)	3148.3 (30h)
F2-01	49.9 (48h)	3.59 (12h)	3911.4 (36h)

^{a)}One unit of protease activity defined as an amount of enzyme equivalent to produce 1 μ g of tyrosine per minute from milk casein.

^{b)}One unit of levansucrase activity defined as an amount of enzyme equi-valent to liberate 1 μ mol of glucose per minute.

^{c)}One unit of γ -GTP activity defined as an amount of enzyme equivalent to produce 1 μ mol of 5-aminosalicylic acid per minute from γ -L-glutamyl-3-carboxy-4-hydroxyanilide using a commercial γ -GTP kit (Inwha Pharm. Co. Ltd., Whasung Kyungi).

^{d)}Numbers in parenthesis indicate the time required to reach the highestlevel of enzyme activity.

함량은 현저하게 감소하였으나 PGA의 수율도 배지 <1>에서 보다 19~53% 수준으로 떨어져 균주 K94 및 F2-01을 제외한 타균주에 있어서는 배지 <2>의 조성이 점질물 생성에 전혀 적합하지 않다는 것을 보여주고 있다.

2) 점질물의 ethanol 침전조건

CET법³⁰⁾의 ethanol 침전 과정에서 불규칙한 결과를 얻기 쉬운데 이러한 현상이 ethanol의 pH에 크게 좌우된다는 것을 예비실험을 통하여 알게 되었다. 따라서 보다 정량적인 결과를 얻고자, 균주 K13을 점질물생성용 배지 <1>에서 배양시켜 얻은 배양액을 시료

로 하고 여기에 pH를 달리 조정하여 ethanol를 사용하여 CET법으로 회수율을 비교하였으며 그 결과를 Table 5에 나타내었다. pH 10에서 PGA의 수율이 많고 당함량도 적어 가장 좋은 결과를 나타내었으며, 중성 또는 산성 영역에서는 수율도 낮고 당함량이 높아 바람직하지 않은 조건임을 확인하였다.

IV. 결론

청국장균을 분리하여 점질물의 생산성이 높은 균주를 선발하고, 고체 및 액체 배지에서 배양하면서 poly (γ -glutamic acid) 즉 PGA 수율과 관련효소의

Table 4. Purification of γ -polyglutamate by cetyltrimethylammonium bromide precipitation.

B. subtilis	Medium <1>		Medium <2>	
	PGA (% sugar) (mg/100mL)	Final pH	PGA (% sugar) (mg/100mL)	Final pH
K13	315.1 (8.75)	6.27	68.5 (0.84)	9.10
K94	252.2 (3.38)	7.97	102.7 (0.92)	8.90
K42	263.4(10.95)	6.82	82.2 (2.45)	9.16
K54	320.9 (8.14)	7.32	70.4 (1.22)	8.99
BS62	286.5 (5.37)	6.35	55.1 (0.54)	9.07
F2-01	318.2 (2.34)	6.08	167.6 (0.69)	9.06

*The cultures were grown on the media <1> and <2> for 48 hr at 37°C with shaking.

Table 5. Effect of pH on ethanol the precipitation of γ -polyglutamate.

pH of the culture broth and ethanol*	Crude slime (g/100mL)	PGA (g/100mL)	Total sugar(%)
10.0	4.02	0.34	15.5
7.0	2.33	0.19	29.3
2.0	1.69	0.20	41.1
Control	3.20	0.26	15.8

*pH of the culture filtrate and ethanol were adjusted by adding NaOH or HCl solutions. The culture was obtained by growing the strain K13 on the medium <1>.

변화를 규명하고자 실험하였으며, 결과를 요약하면 아래와 같다.

1. 충청지역의 재래시장에서 시판하거나 가정에서 자가 제조한 청국장 시료로부터 콜로니의 크기와 형태를 달리하는 27개의 *Bacillus*속 세균을 분리하였으며, 점질물 생성용 배지(1)에서의 액체배양 결과를 비교하여 침전습증량과 건조증량이 우수한 biotin⁻균주 K13과 K94, biotin⁺균주 K42와 K54 등을 선발하였다.

2. 선발 균주의 전배양액을 증자대두 배지에 접종하고 37°C에서 48시간 정치배양하면서 6시간 간격으로 시료를 채취하여 생육과 포자 형성율, 점질물의 생산과 점도, 관련 효소의 활성도 변화를 비교하였다.

1) 균주 K13, K42, K54등은 배양 18~24 시간에 ~10⁶cells/g으로 생육하였고, 균주 K94는 완만하게 자랐으나 42시간이후에는 ~10⁶cells/g으로서 타균주보다 높은 균수를 나타내었다. 포자형성율은 K13이 가장 낮고 K94가 가장 높았으며 K94의 경우 대수생장기 초기에 해당하는 18~24 시간에 지수 1이하의 높은 포자형성율을 나타내었다.

2) 균주 K54에 의한 PGA의 수량은 42시간후 86.7 mg/g으로서 선발균주중 가장 많았으나, *Bacillus subtilis* F2-01의 105.1mg/g 보다는 낮은 수준이었다. 또한 K94의 경우에는 PGA의 함량에 대한 점성도의 비율이 타균주에 비하여 상대적으로 높아 평균 분자량이 큼을 알 수 있었다.

3) 증자대두 배양 즉 청국장 발효기간 중 단백질의 분해 및 점질물의 생성에 관련된 protease, γ -GTP, levansucrase 등의 효소 활성도의 변화를 조사하였다. Protease는 공시균주 모두 배양 12시간 후부터 검출되기 시작하여 배양기간중 계속적으로 점차 증가하였고, 그중 K13의 활성도가 가장 높아 48시간후 72.9 units/g에 도달하였다. γ -GTP의 활성도는 배양 30~42시간에 정점에 도달하였다가 감소하는 경향을 보였으며 K54가 42시간후 1980.8mU/g로서 가장 높았다. Levansucrase는 배양초기에 생성되어 12시간후 모든 균주에서 3.11~4.00units/g으로 정점에 달하였으며 그후 점차 감소하였다. γ -GTP의 활성과 점질물의 생

성 수준 및 시기와는 대체적으로 비례적이었다.

3. 액체배지에서의 점질물의 생산성을 조사하기 위하여 선발균주를 점질물생성용 배지 <1> 및 <2>에서 37°C로 48시간 진탕배양한 다음 CET 침전법에 의한 PGA의 수율과 당함량을 비교하였다.

1) 배지 <1>에서의 PGA 생성수준은 균주 KK3가 가장 높아 320.9 mg/100mL, 당함량은 8.14%이었다. Citric acid를 탄소원으로 하는 배지 <2>에서는 당함량은 현저하게 감소하였으나 PGA의 수율도 크게 떨어져서 균주 K94 및 F2-01을 제외한 타균주에 대하여 적합하지 않았다.

2) CET법의 ethanol 침전과정에서 pH의 영향이 커서 pH 10에서 PGA의 수율이 많고 당함량이 적어 가장 좋은 결과를 나타내었으며, 중성 또는 산성 영역은 바람직하지 않은 조건임을 확인하였다.

참고문헌

1. 김길환, 1982, 콩 두부 콩나물과학, 한국과학기술원, pp.21~22.
2. 김은희, 배무, 1997, *Bacillus sp.*에 의한 생분해성 poly(γ -glutamic acid)의 생산과 물성, 한국산업미생물학회추계발표 p.220.
3. 김재욱, 조성환, 1993, 농산식품가공학, 문운당, pp.256-257.
4. 김진구, 1985, 농산물가공전서, 명문당, pp.212-214.
5. 김호식, 김재욱, 김동연, 1962, 농산가공학, 향문사, pp.176-177.
6. 문범수, 이갑상, 1985, 식품재료학, 수학사, p.62.
7. 송재철, 1992, 식품재료과학, 교문사, pp.245-247.
8. 송재철, 박현정, 1997, 최신식품가공학, 유림문화사, pp.505-507.
9. 윤상홍, 송재경, 고승주, 구분성, 류진창, 1997, *Bacillus amyloliquifaciens*로부터 생분해성 응집고분자의 분리 및 응용, 한국산업미생물학회추계발표, p.211.
10. 이규환, 1994, 식품화학, 형설출판사, p.103.

11. 이서래, 신희선, 1977, 최신식품화학, 서광출판사, pp.465-469.
12. 주현규, 신현영, 황적인, 허태련, 1990, 식품가공학, 유림문화사, pp.209-210.
13. 明治製藥(株) 武部英日外 3人, 1989, 폴리글루탐산의 제조법, 日本特許 平1-174396.
14. 白石信夫, 谷吉樹, 工藤謙一, 福田和彦, 1994, 第4章 微生物がつくるプラスチック, 바이오プラスチックのすべて, 工業調査會出版.
15. 柿木權章, 岸田晶夫, 明石滿, 遠藤剛, 1993, 日本化學會第65春季年會講演豫稿集 II : p.258.
16. 八幡一雄, 定延治郎, 遠藤剛, 1992, 高分子學會豫稿集 41: p.1077.
17. 納豆試驗法研究會, 1990, 納豆試驗法, 日本農林水産省食品總合研究所, pp.1-97.
18. Andrea, A., T. Hara, and S. Ueda, 1981, Transformation of *Bacillus subtilis* in polyglutamate production by deoxyribonucleic acid from *B. natto*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 27: pp.115-123.
19. Bovarnick, M., 1942, The formation of extracellular D(-)glutamic acid polypeptide by *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* 145: pp.415-424.
20. Carezza, M., 1992, Recent achievements in the use of radiation polymerization and grafting for biomedical applications. *Radiat. Phys. Chem.* 8: p.481.
21. Cheng, C., T. Asada, and T. Aida, 1989, Production of γ -polyglutamic acid by *Bacillus subtilis* A35 under denitrifying conditions. *Agric. Biol. Chem.* 53: pp.2369-2375.
22. 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(2): pp.175-179.
23. Fujii, H., 1963, On the formation of mucilage in natto (1). *Nippon Nogei-kagaku Kaishi* 37: pp.407-411.
24. Giannos, S., D. Shah., R. A. Gross., D. L. Kaplan, and J. M. Mayer, 1990, The biosynthesis of unusual polyamides containing glutamic acid. *ACS Polym. Prepr.* 31: p.209.
25. Goto, A., and M. Kunioka, 1992, Biosynthesis and hydrolysis of poly(γ -glutamic acid) from *Bacillus subtilis* IFO3335. *Biosci. Biotech. Biochem.* 56: pp.1031-1035.
26. Hara, T., A. Aumayr, Y. Fujio, and S. Ueda, 1982, Elimination of plasmid-linked polyglutamate production by *Bacillus subtilis* (natto) with acridine orange. *Appl. Environ. Microbiol.* 44: pp.1456-1458.
27. Inagaki, M., N. Tubokawa, and T. Endo, 1991, Reaction of poly(γ -glutamic acid) with polyethyleneimine. *Polym. Prepr. Japan.* 40: p.411.
28. Ivanovics, G. and V. Bruckner, 1937, Chemische und immunologische Studien über den Mechanismus der Milzbrandinfektion und Immunität: die chemische Struktur der Kapselsubstanz des Milzbrandbazillus und der serologisch identischen spezifischen Substanz des *Bacillus mesentericus*. *Z. Immunitätsforsch.* 90: pp.304-318.
29. Kakinoki, K., A. Kishida, M. Akashi, and T. Endo, 1993, Synthesis of poly(γ -glutamic acid) hydrogel. *Chem. Soc. Japan, Prepr.* 65(2): p.258.
30. Kanno, A., and H. Takamatsu, 1995, Determination of γ -polyglutamic acid in "Natto" using cetyltrimethylammonium bromide (Studies on "Natto" part V). *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi* 42(11): pp.878-886.
31. Kishi, R., H. Ichijo, and O. Hirasa, 1993, Thermoresponsive devices using poly(vinylmethylether) hydrogels. *J. Intell. Mater. Syst. Struct.* 4: p.533.
32. Kubota, H., T. Matusunobu, K. Uotani, H. Takebe, A. Satoh, T. Tanaka, and M. Taniguchi, 1993, Production of poly(γ -glutamic acid) by *Bacillus subtilis* F-2-01. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 57: p.1212.

33. Kubota, H., Y. Nambu, and T. Endo, 1993, Convenient and quantitative esterification of poly(γ -glutamic acid) produced by microorganism. *J. Polym. Sci. Part A, Polym. Chem.* 31: p.2877.
34. Kunioka, M., and A. Goto, 1994, Biosynthesis of poly(γ -glutamic acid) from L-glutamic acid, citric acid, and ammonium sulfate in *Bacillus subtilis* IFO3335. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 40: p.867.
35. Park, M. O., 1991, Characterization of the strain *Bacillus subtilis* BS62 isolated from chungkookjang and its extracellular γ -glutamyltranspeptidase. Thesis for Master of Agri. Sci., Chungnam National University.
36. Park, M. O., and W. Y. Choi, 1993, Characterization of extracellular γ -GTP from the chungkookjang strain *Bacillus subtilis* BS62. *RCNBMA93*: p.22 (B-18).
37. Park, M. O., J. Y. Lim., T. Hara, and W. Y. Choi, 1994, Isolation and characterization of PGA-producing bacterium *Bacillus* sp. CLH 62. *Proc.Kor. Soc. Agri.* 66: FM-9.
38. Sawa, S., Murao, T. Murakawa, and S. Omata, 1971, Polyglutamic acid fermentation Part III. Culture conditions for the production of polyglutamic acid by *Bacillus subtilis* no. 5E. (2) Investigations on the synthetic media. *Nippon Nogeikagaku Kaishi* 45: pp.124-129.
39. 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. Biotech. Biochem.* 57: p.2148.
40. Tanaka, T., T. Yaguchi, O. Hiruta, T. Futamura, K. Uotani, A. Satoh, M. Taniguchi and S. Oi, 1993, Screening for microorganisms having poly(γ -glutamic acid) endohydrolase activity and the enzyme production by *Myrothecium* sp. TM-4222. *Biosci. Biochem.* 57: pp.1809-1810.
41. Thorne, C. B., C. G. Gomez, G. R. Blind, and R. D. Housewright, 1953, Synthesis of glutamic acid and glutamyl polypeptide by *Bacillus anthracis* III. Factors affecting peptide production in synthetic liquid media. *J. Bacteriol.* 65: pp.472-478.
42. Yamamoto, S., M. Iizuka, T. Tanaka, and T. Yamamoto, 1985, The mode of synthesis of levan by *Bacillus subtilis* levansucrase. *Agric. Biol. Chem.* 49: pp.343-349.