

PRODUKSI POLI- Γ -ASAM GLUTAMAT DARI *Bacillus subtilis* B112 DENGAN VARIASI KONSENTRASI AMONIUM SULFAT SEBAGAI SUMBER NITROGEN DALAM MEDIA FERMENTASI

Production of Poly- γ -Glutamic Acid from *Bacillus subtilis* B112 with Ammonium Sulphate Concentration Variation as Nitrogen Source in Fermentation Medium

Abubakar Sidik¹, Linar Z. Udin² dan Safri Ishmayana¹

¹Jurusan Kimia, FMIPA Universitas Padjadjaran, Jln. Raya Bandung-Sumedang km. 21 Jatinangor 45363

²Puslit Kimia Terapan LIPI Bandung, Jln. Cisitua-Sangkuriang Bandung 40135

ABSTRAK

*Poli- γ -asam glutamat (PGA) dan hasil degradasinya aman bagi manusia sehingga dapat dimanfaatkan sebagai bahan pengental, pelembab, pelepas berjangka atau sebagai pembawa obat. Meskipun banyak digunakan pada berbagai bidang industri, bahan ini masih diimpor dari luar negeri. Oleh karena itu, perlu dikembangkan suatu proses untuk memproduksi PGA secara efektif dan efisien. Penelitian ini dilakukan untuk menentukan konsentrasi optimum amonium sulfat sebagai sumber nitrogen untuk menghasilkan PGA dalam jumlah yang banyak. Produksi PGA dilakukan dengan fermentasi menggunakan bakteri *Bacillus subtilis* B112. Analisis yang dilakukan selama proses fermentasi meliputi pengukuran pH, derajat kekeruhan, berat kering sel dan viskositas media. Isolasi PGA dilakukan dengan tahapan sentrifugasi, pengendapan dengan metanol, dialisis dan liofilisasi. PGA yang telah diisolasi kemudian ditentukan berat molekulnya dengan menggunakan SDS-PAGE, sedangkan komposisi asam amino PGA ditentukan dengan menggunakan metode KLT. Hasil penelitian menunjukkan bahwa konsentrasi amonium sulfat yang optimum untuk menghasilkan PGA adalah 0,75% b/v. PGA yang diperoleh dengan variasi 0,75% amonium sulfat sebanyak 61,6 mg. Penentuan berat molekul dengan menggunakan SDS-PAGE menunjukkan bahwa PGA yang diproduksi oleh *B. Subtilis* B112 memiliki berat molekul sekitar 205 kDa.*

Kata Kunci: Asam L-glutamat, amonium sulfat, *B. Subtilis* B112, PGA

ABSTRACT

*Poly- γ -glutamic acid (PGA) and its degradation products are save for human, so it can be used as thickener, moisturizer, sustained release or drug carrier. Even though widely used in industries, this material is still imported. Therefore processes for effective and efficient PGA production need to be developed. The objective of this research is to determine the optimum concentration of ammonium sulfate as nitrogen source, resulting high amount of PGA. PGA production was conducted by fermentation method using *B. subtilis* B112. Analyses conducted during the fermentation were pH measurement, turbidity, dry cell mass, and viscosity. The PGA was isolated by centrifugation, precipitation with methanol, dialysis, and lyophilization. The molecular mass of the isolated PGA was determined using SDS-PAGE, whilst the amino acid composition was determined using TLC. The results of our research showed that 0.75% w/v was the optimum ammonium sulfate concentration for PGA production. Isolated PGA with 0.75% ammonium sulfate in fermentation media was 61.6 mg. Molecular weight determination using SDS-PAGE showed that the PGA has a molecular weight about 205 kDa.*

Keywords: L-glutamic acid, ammonium sulfate, *B. Subtilis* B112, PGA

PENDAHULUAN

Poli- γ -asam L-glutamat (PGA) merupakan biopolimer yang mudah diuraikan secara alami, terutama diproduksi oleh galur *B. subtilis* (Kubota *et al.*, 1993) Polimer ini diklasifikasikan sebagai pseudo-poli asam amino yang hanya mengandung glutamat sebagai monomernya, baik asam D-glutamat maupun asam L-glutamat (Cromwick & Gross, 1995). PGA terbentuk dari monomer glutamat melalui ikatan α -amino dan γ -asam karboksilat (Troy, 1973).

PGA dapat larut dalam air dan bersifat dapat diuraikan secara oleh aktivitas hayati (*biodegradable*) dengan berat molekul yang relatif tinggi, yaitu sekitar 100.000-1.000.000. PGA dapat digunakan sebagai bahan pengental, pelepas berjangka (*sustained release*), pembawa obat (*drug carier*) serta dalam industri makanan, kosmetik dan obat-obatan (Kunioka & Goto, 1994).

PGA yang diisolasi dari *B. subtilis* mengandung asam-D-glutamat dan asam-L-glutamat, tetapi komposisinya belum dapat diketahui secara pasti (Thorne *et al.*, 1953; Thorne *et al.*, 1954).

Produksi PGA dari bakteri mempunyai perbedaan kebutuhan nutrisi sebagai persyaratan dalam memproduksi PGA. Bakteri-bakteri tersebut dikelompokkan ke dalam dua tipe, yaitu bakteri yang membutuhkan dan tidak membutuhkan asam L-glutamat untuk memproduksi

PGA. Kebanyakan bakteri memerlukan asam L-glutamat untuk memproduksi PGA (Thorne *et al.*, 1953; Thorne *et al.*, 1954). Jumlah produksi PGA dari media pemeliharaan rendah kecuali jika asam L-glutamat ditambahkan pada media untuk memproduksi PGA.

Goto & Kunioka (1992) melaporkan bahwa komposisi nutrisi media fermentasi sangat berpengaruh terhadap jumlah PGA yang dihasilkan oleh *B. subtilis* IFO 3335. Asam sitrat merupakan sumber karbon terbaik untuk digunakan pada media fermentasi. Selain itu, asam L-glutamat dan amonium sulfat diperlukan sebagai komponen nutrisi dalam media fermentasi (Goto & Kunioka, 1992)

Tujuan penelitian ini adalah untuk menentukan pengaruh variasi konsentrasi ammonium sulfat sebagai sumber nitrogen dalam media fermentasi terhadap pembentukan PGA oleh bakteri *B. subtilis* B112 pada media fermentasi glutamat-sitrat.

METODOLOGI

Pemeliharaan kultur

B. subtilis B112 ditumbuhkan pada media agar miring yang mengandung 0,5 g natrium klorida, 0,5 g bakto pepton, 0,3 g ekstrak daging, dan 2,7 g agar bakto. Semua bahan dicampur dalam 100 mL air suling, dipanaskan sampai larut. Kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi sebanyak \pm 5 mL dan ditutup

dengan kapas, disterilisasi dengan autoclave selama 20 menit pada suhu 121°C dengan tekanan 15 psi.

Tabung reaksi dimiringkan dan didiamkan sampai padat. Media agar miring selanjutnya ditanami *B. subtilis* B112 dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah dibiakan dalam media agar miring, *B. subtilis* B112 disuspensikan dengan air suling steril sebelum ditumbuhkan dalam media inokulum.

Aktivasi kultur

Media inokulum mengandung 0,3 g polipepton, 0,06 g ekstrak ragi, 0,03 g magnesium sulfat heptahidrat dilarutkan dalam 30 mL air suling kemudian disterilisasi dalam autoclave selama 20 menit pada suhu 121°C dengan tekanan 15 psi. Ke dalam media inokulum yang telah steril ditambahkan 3 mL suspensi *B. subtilis* B112 dan dikocok selama 24 jam dengan kecepatan 150 rpm dan suhu 37°C. Media inokulum yang telah teraktivasi ini kemudian ditambahkan 30 mL larutan gliserol 20% (b/v) dan dipanaskan pada suhu 60°C selama 10 menit. Untuk penyimpanan dalam waktu yang cukup lama kultur bakteri dalam media inokulum ini dapat disimpan pada suhu -20°C.

Fermentasi

Media yang telah diaktivasi disubkultur ke dalam media fermentasi yang mengandung glutamat-sitrat dengan variasi ammonium sulfat yaitu 0; 0,25;

0,50 dan 0,75% (b/v). Zat lain yang ditambahkan pada masing-masing konsentrasi tersebut adalah 3 g asam L-glutamat, 2 g asam sitrat, 0,1 g kalium dihidrogen fosfat, 0,05 g natrium dihidrogen fosfat dihidrat, 0,05 g magnesium sulfat heptahidrat, 0,002 g mangan sulfat monohidrat, 0,05 g besi (III) klorida heksahidrat, 0,02 kalsium klorida dan 50 µg biotin dan dilarutkan dalam 100 mL air suling.

Media fermentasi diatur pH-nya sampai 7,5 dengan menggunakan natrium hidroksida dan disterilisasi selama 20 menit pada suhu 121°C dengan tekanan 15 psi. Media fermentasi yang telah steril ditambah kultur bakteri yang telah diaktivasi dalam media inokulum dan kemudian dikocok pada kecepatan 150 rpm dan suhu 37°C. Pengambilan sampel dilakukan setiap 12 jam mulai dari jam ke-0 sampai jam ke-96.

Isolasi PGA

Pengendapan dengan pelarut organik

Supernatan ditambahkan empat volume metanol, kemudian dibiarkan semalam, selanjutnya disentrifugasi selama 15 menit pada 4000 rpm untuk mengumpulkan endapan. Endapan ini dilarutkan dalam air suling (0,5 gram/ 100 mL) kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 4500 rpm selama 15 menit.

Dialisis

Supernatan yang diperoleh dimasukkan ke dalam membran selofan

dan dialisis dalam air suling sampai semua garam-garam pengotornya keluar.

Liofilisasi

Ekstrak hasil dialisis kemudian diliofilisasi dengan menggunakan alat beku cair dan diperoleh ekstrak PGA.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Perubahan pH Media dengan Variasi Konsentrasi Amonium Sulfat

Pada media fermentasi tanpa amonium sulfat, pH media cenderung turun. Rentang perubahan pH selama 96 jam adalah sebesar 6,79 sampai 8,32. Ketika ke dalam media ditambahkan amonium sulfat, maka penurunan pH media berada pada rentang perubahan pH 6,43 sampai 7,52 pada awal proses fermentasi (Gambar 1).

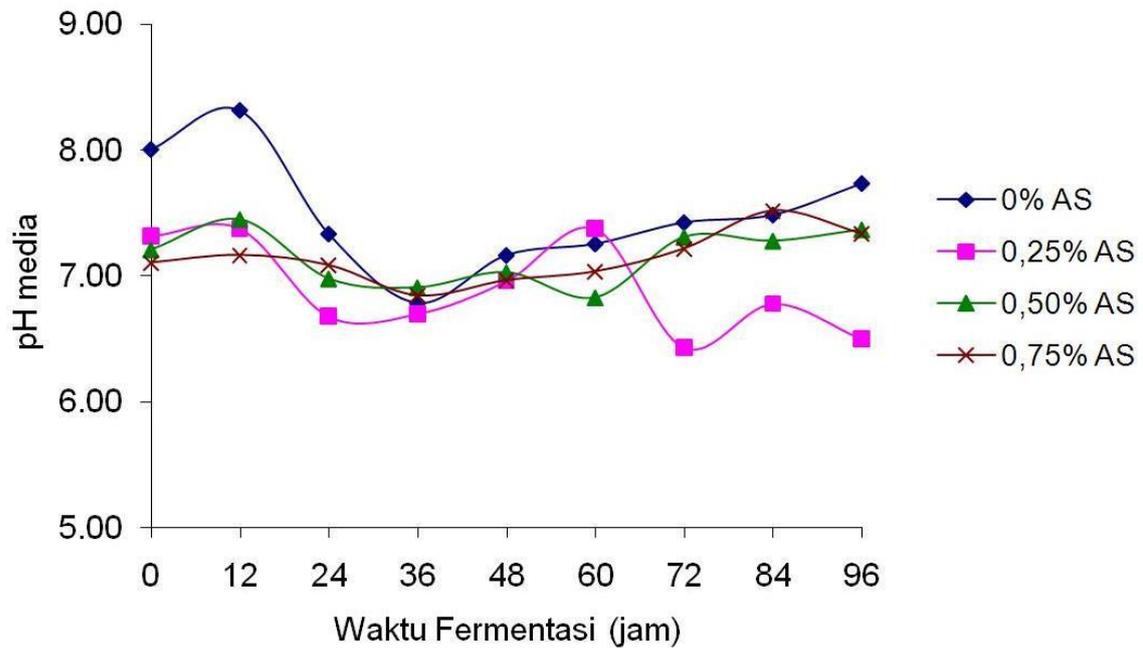
Terlihat juga bahwa pada jam ke-0 dan jam ke-12 pH media fermentasi turun cukup tinggi. Penurunan pH media ini disebabkan oleh bakteri *B. subtilis* B112 hasil aktivasi mengalami proses adaptasi dalam media fermentasi. Hal ini dapat dilihat dari kurva pertumbuhan bakteri (Gambar 2), dimana bakteri langsung memasuki fase eksponensial tanpa mengalami fase adaptasi yang panjang. Fase adaptasi dipersingkat karena bakteri ini terlebih dahulu diaktivasi pada media inokulum.

Untuk media fermentasi yang mengandung amonium sulfat penurunan pH terjadi setelah 24 jam proses fermentasi berlangsung. Penurunan pH

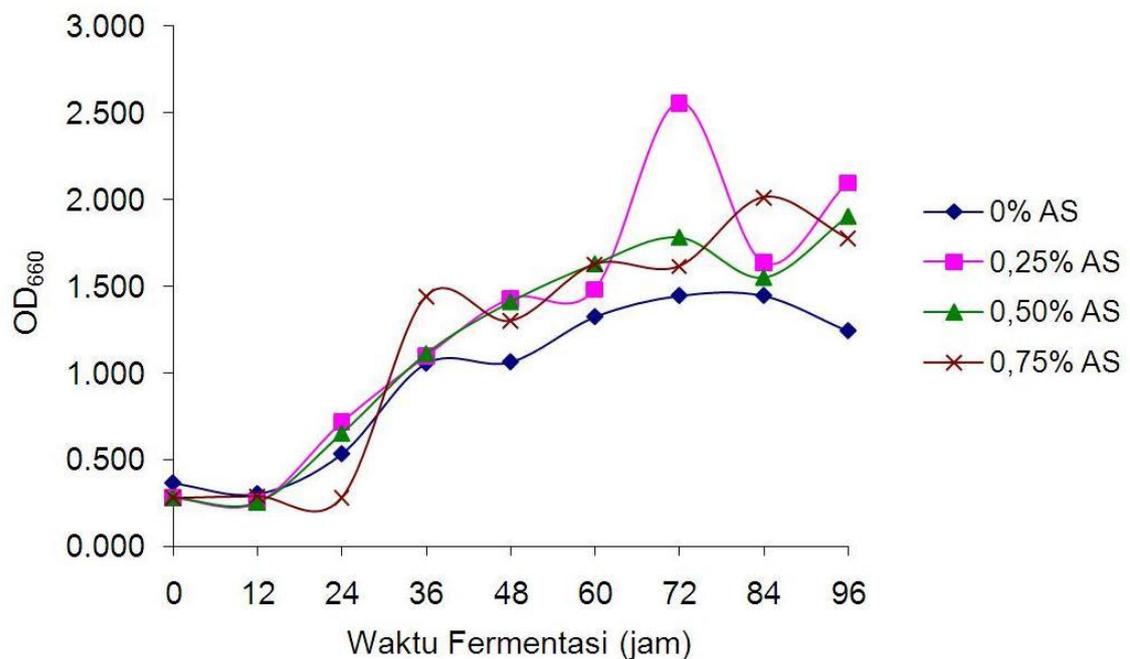
juga dipengaruhi oleh metabolisme bakteri diantaranya dihasilkannya senyawa-senyawa nitrogen. Setelah 48 jam proses fermentasi, pH media cenderung stabil dan pada jam ke-72 mulai terjadi fase kematian (Gambar 2). Pada fase ini nutrisi media telah habis dikonsumsi oleh bakteri.

Pertumbuhan Bakteri *B. subtilis* dengan Variasi Konsentrasi Amonium Sulfat

Pertumbuhan bakteri pada media fermentasi yang tidak mengandung amonium sulfat memperlihatkan peningkatan setelah 24 jam fermentasi, sedangkan peningkatan pertumbuhan bakteri dalam media fermentasi yang mengandung amonium sulfat terjadi setelah 12 jam fermentasi, dan hal yang sama berlaku bagi semua konsentrasi amonium sulfat yang ditambahkan (Gambar 2). Peningkatan pertumbuhan ini disebabkan karena bakteri mengalami pembelahan sel. Pada jam-jam berikutnya terjadi peningkatan pertumbuhan secara gradual dan pada jam ke-60 sampai ke-96 terjadi laju pertumbuhan yang konstan. Keadaan ini disebabkan karena bakteri berada pada fase stasioner dan mengarah ke fase kematian. Hal ini terjadi karena nutrisi yang berada pada media fermentasi mulai habis dikonsumsi *B. subtilis* mengalami pembelahan sel tanpa diikuti penambahan volume sel.



Gambar 1 Perubahan pH media dengan berbagai konsentrasi amonium sulfat selama proses fermentasi produksi PGA dengan *B. subtilis* B112



Gambar 2 Kurva pertumbuhan *B. subtilis* B112 dalam media dengan berbagai konsentrasi amonium sulfat berdasarkan pengukuran kekeruhan pada 660 nm

Pertumbuhan bakteri berlangsung dengan mengkonsumsi nutrisi sekaligus mengeluarkan produk-produk metabolisme yang terbentuk, maka setelah waktu tertentu laju pertumbuhan akan menurun dan akhirnya pertumbuhan berhenti sama sekali.

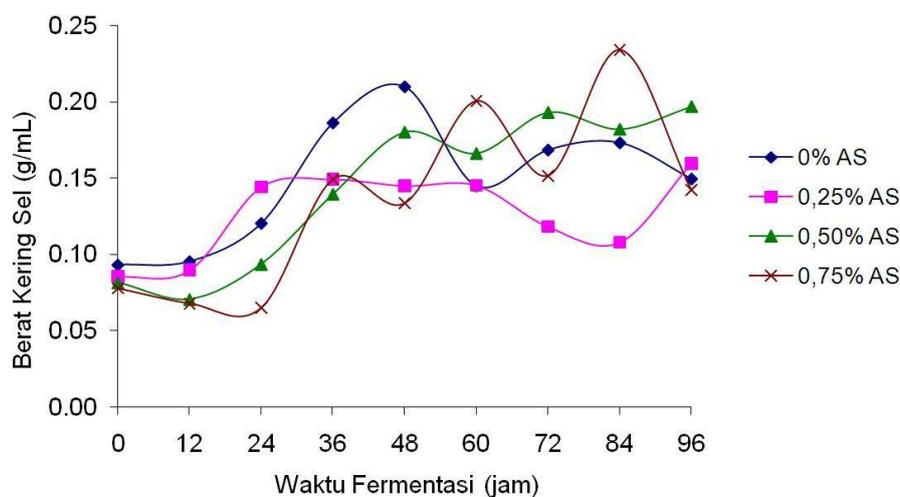
Perubahan Berat Kering Sel dengan Variasi Konsentrasi Amonium Sulfat

Berat kering sel yang dihasilkan dari semua perlakuan media fermentasi menunjukkan pola yang hampir sama (Gambar 3). Peningkatan berat kering sel dimulai pada jam ke-24, dan meningkat sampai jam ke-48. Keadaan ini sesuai dengan pola pertumbuhan bakteri, dimana pada jam ke-24 sampai jam ke-48 berada pada fase eksponensial. Berat kering sel maksimum dihasilkan pada media fermentasi yang mengandung amonium sulfat 0,75%, yaitu dapat mencapai kisaran 0,23 g/mL media. Setelah 48 jam fermentasi, terjadi penurunan berat kering sel dan setelah 60 jam berat kering sel menjadi konstan. Hal ini disebabkan karena bakteri mengalami pembelahan sel tanpa diikuti penambahan volume sel akibat nutrisi media fermentasi mulai habis.

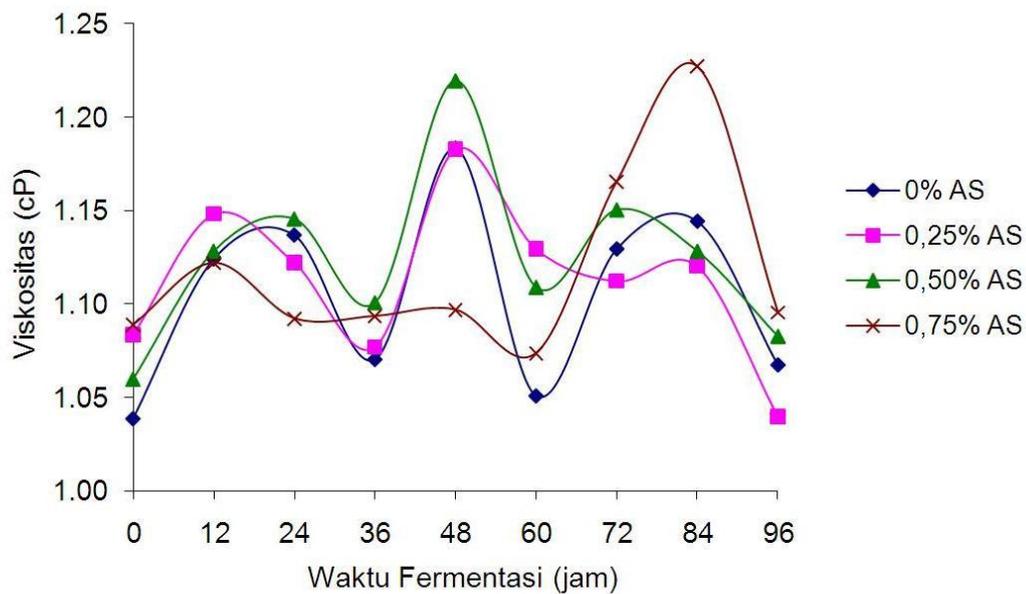
Pada media dengan penambahan amonium sulfat 0,75%, pola perubahan berat kering sel sesuai dengan pola pertumbuhan bakteri yang terus meningkat mulai dari jam ke-36 sampai jam ke-84. Berat kering sel tidak tergantung dari konsentrasi asam L-glutamat, tetapi tergantung pada konsentrasi asam sitrat dan amonium sulfat. Berat kering sel meningkat jika konsumsi asam sitrat di dalam media meningkat dan berat kering sel akan turun jika konsentrasi amonium sulfat dalam media meningkat (Goto & Kunioka, 1992).

Perubahan Viskositas dengan Variasi Konsentrasi Amonium Sulfat

PGA ditemukan dalam kultur sel sebagai cairan kental yang diproduksi secara ekstraselular (Kubota *et al.*, 1993). Pengukuran viskositas dilakukan terhadap supernatan media fermentasi setelah disentrifugasi.



Gambar 3 Berat kering sel pada media fermentasi dengan berbagai konsentrasi ammonium sulfat



Gambar 4 Nilai viskositas media fermentasi dengan berbagai konsentrasi amonium sulfat yang ditentukan dengan metode Otswald

Nilai viskositas tertinggi pada media fermentasi tanpa amonium sulfat diperoleh pada jam ke-48 yaitu sebesar 1,1833 cP (Gambar 4). Asam L-glutamat pada media fermentasi ini merupakan monomer dari PGA yang diperoleh secara intraseluler dari bakteri *B. subtilis* B112 melalui siklus asam trikarboksilat. Asam L-glutamat ini terbentuk karena keberadaan asam sitrat dan amonium sulfat di dalam media fermentasi (Kunioka & Goto, 1994).

Perubahan viskositas media yang mengandung 0,25% dan 0,50% ammonium sulfat menunjukkan pola yang hampir sama dengan pola pertumbuhan bakteri tanpa ammonium sulfat. Pada jam ke-12 terlihat bahwa nilai viskositas meningkat dan pada jam ke-48 mencapai nilai maksimum, kemudian nilai viskositas

mulai menurun setelah jam ke-60 (Gambar 4).

Media fermentasi dengan amonium sulfat 0,75% ternyata memberikan nilai viskositas tertinggi yang dicapai pada jam ke-84, yaitu sebesar 1,2270 cP (Gambar 4), dan memberikan PGA paling banyak (Tabel 1). Keadaan ini menunjukkan bahwa produksi PGA sebanding dengan perubahan viskositas.

Viskositas media menjadi tinggi diduga karena tingginya konsentrasi PGA dan pertumbuhan sel (Kunioka & Goto, 1994). Hal ini menunjukkan bahwa adanya amonium sulfat dalam media dapat meningkatkan pertumbuhan sel bakteri, sehingga dengan adanya peningkatan pertumbuhan ini dapat menyebabkan meningkatnya biosintesis PGA. Keadaan ini juga ditunjukkan oleh data perolehan

PGA seperti terlihat pada Tabel 1 yang menunjukkan ekstrak PGA tertinggi diperoleh pada media dengan penambahan 0,75% amonium sulfat.

Isolasi PGA hasil Fermentasi dengan Variasi Konsentrasi Amonium Sulfat

Pengambilan sampel untuk isolasi PGA didasarkan pada nilai viskositas paling tinggi dari masing-masing variasi konsentrasi amonium sulfat. Hasil isolasi PGA menggunakan metanol dapat dilihat pada Tabel 1.

Terlihat bahwa ekstrak PGA yang diperoleh cenderung meningkat dengan meningkatnya konsentrasi amonium sulfat yang ditambahkan ke dalam media fermentasi. Pada media fermentasi tanpa penambahan amonium sulfat, ekstrak PGA yang diperoleh relatif kecil (20,9 mg), hal ini disebabkan karena bakteri hanya memperoleh sumber nitrogen dari asam sitrat sehingga PGA sulit untuk diproduksi. Pada media fermentasi dengan

penambahan amonium sulfat terjadi peningkatan jumlah ekstrak PGA.

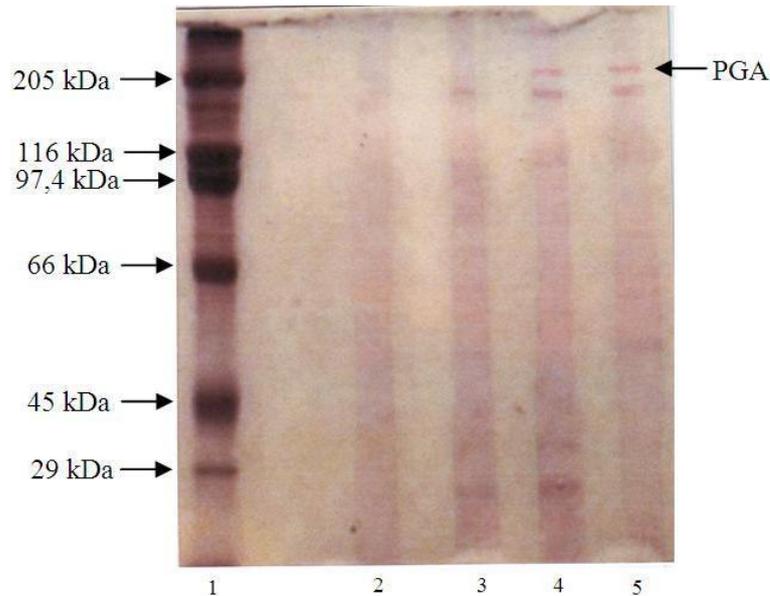
Penambahan amonium sulfat ini ternyata mengakibatkan pertumbuhan bakteri dan keadaan ini dapat meningkatkan aktivitas enzim-enzim glutamat dehidrogenase, glutamat sintetase, glutamat polymerase dan γ -glutamil transpeptidase yang sangat berperan dalam biosintesis PGA (Goto & Kunioka, 1992). Ekstrak PGA paling tinggi diperoleh pada media fermentasi yang mengandung amonium sulfat 0,75% (61,6 mg).

SDS-PAGE PGA Hasil Fermentasi dengan Variasi Konsentrasi Amonium Sulfat

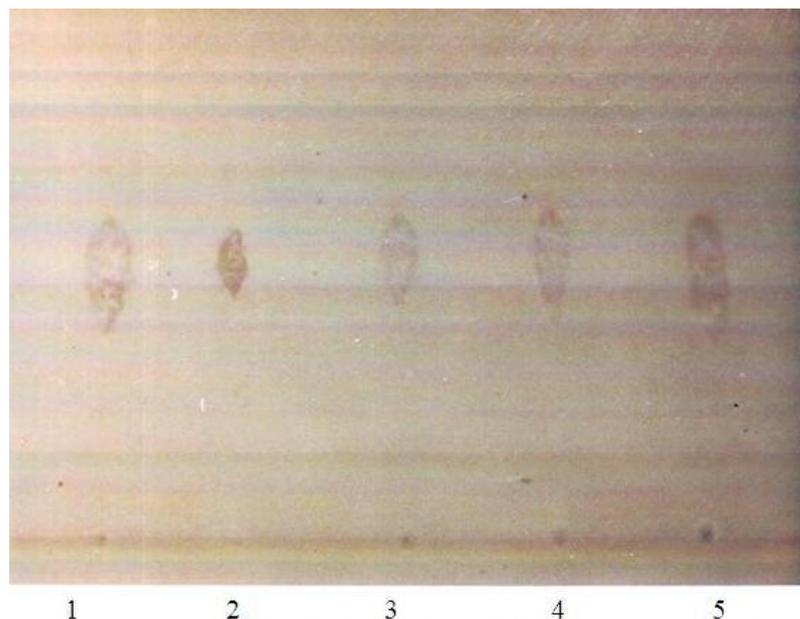
Hasil pengamatan elektroforesis menunjukkan bahwa pita PGA berada di atas marker miosin (205 kDa) dan mendekati hasil yang diperoleh Ito *et al.* (1996), yang diperkirakan mempunyai berat molekul sekitar 275 kDa (Gambar 5).

Tabel 1 Nilai viskositas dan perolehan ekstrak PGA pada berbagai konsentrasi amonium sulfat

Konsentrasi amonium sulfat (%)	Waktu Fermentasi (Jam)	Viskositas (cP)	Ekstrak PGA (mg)
0,00	48	1,1833	20,9
0,25	48	1,1826	39,6
0,50	48	1,2194	43,7
0,75	84	1,2270	61,6



Gambar 5 SDS PAGE hasil pembentukan PGA pada berbagai konsentrasi amonium sulfat. Lajur 1 protein standar; lajur 2=0% amonium sulfat; lajur 3=0,25% amonium sulfat; lajur 4=0,50% amonium sulfat; lajur 5=0,75% amonium sulfat



Gambar 6 Kromatogram hasil hidrolisis PGA produk fermentasi dengan variasi konsentrasi amonium sulfat. Eluen yang digunakan butanol:asam asetat:air suling (4:1:1). Lajur 1= standar asam L-glutamat; lajur 2= 0% amonium sulfat; lajur 3= 0,25% amonium sulfat; Lajur 4= 0,50% amonium sulfat; Lajur 5= 0,75% amonium sulfat.

Dari Gambar 5 dapat terlihat bahwa PGA terdeteksi baik pada media fermentasi tanpa ataupun dengan amonium sulfat (Gambar 5 lajur 2, 3, 4 dan 5). Pada media fermentasi tanpa amonium sulfat,

pita di atas marker myosin relatif tipis (Gambar 5 lajur 2), menunjukkan jumlah PGA yang dihasilkan sedikit.

PGA yang dihasilkan masih belum murni, hal ini dapat terlihat dari adanya

pita-pita protein dengan berat molekul 45 kDa sampai 66 kDa. Diduga pita-pita protein tersebut merupakan enzim-enzim yang berperan dalam pembentukan PGA yang turut terdeteksi pada pewarnaan SDS-PAGE.

Salah satu enzim yang terdeteksi adalah PGA hidrolase yang mempunyai berat molekul 68 kDa. Enzim ini dapat mendegradasi PGA menjadi asam L-glutamat pada waktu pertumbuhan sel (Tanaka *et al.*, 1993).

Kromatografi Lapis Tipis Hasil Fermentasi

Hasil yang diperoleh pada kromatografi lapis tipis adalah deteksi unit monomer pembentuk PGA, yaitu asam L-glutamat. Ekstrak PGA terlebih dahulu dihidrolisis dengan HCl 6 N untuk memecah ikatan peptida pada PGA. Pada hasil KLT (Gambar 6) terlihat bahwa semua variasi konsentrasi mengandung asam L-glutamat sebagai monomer pembentuk PGA.

KESIMPULAN DAN SARAN

Dari hasil penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan dengan menggunakan konsentrasi amonium sulfat sebesar 0,75%, diperoleh kondisi optimum produksi PGA. Pada kondisi ini diperoleh nilai viskositas tertinggi, yaitu 1,2270 cP dan ekstrak PGA sebanyak 61,6 mg.

Hasil SDS-PAGE menunjukkan bahwa *B. subtilis* B112 dapat memproduksi PGA dengan berat molekul sekitar 205 kDa

dengan penambahan ammonium sulfat pada media fermentasi.

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk menentukan kondisi optimum lainnya, sehingga diperoleh suatu kondisi optimum yang dapat menghasilkan PGA dengan jumlah dan kualitas yang lebih baik.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penelitian ini didanai oleh Dirjen Dikti Departemen Pendidikan Nasional dengan surat perjanjian pelaksanaan penelitian 031/SP2H/PP/DP2M/III/2007 tanggal 29 Maret 2007. Oleh karena itu kami mengucapkan terimakasih kepada Dirjen Dikti yang telah menyediakan dana tersebut sehingga penelitian ini dapat terlaksana.

DAFTAR PUSTAKA

- Cromwick, A.M. & Gross, R.A. 1995. Effects of manganese (II) on *Bacillus licheniformis* ATCC 9945A physiology and γ -poly(glutamic acid) formation. *Int. J. Macromol.* 17. 259-267.
- Goto, K. & Kunioka, M. 1992. Biosynthesis and hydrolysis of poly (γ -glutamic acid) from *Bacillus subtilis* IFO 3335. *Biosci. Biotech. Biochem.* 56: 1031-1036
- Ito, T., Tanaka, T., Ohmachi, T., Asada, Y. 1996. Glutamic acid independent production of poly-(γ -glutamic acid) by *B. subtilis* TAM-4. *Biosci. Biotech. Biochem.* 60(8): 1239-1242.
- Kunioka, M. & Goto, A. 1994. Biosynthesis of poly (γ -glutamic acid) from L-glutamic acid, citric acid and ammonium sulphate in *B. subtilis* IFO3335. *Appl. Microbiol. Biotech.* 40. 867-872.
- Kubota, H., Matsunobu, T., Uotani, K., Takebe, H., Satoh, A., Tanaka, T. &

- Taniguchi, M. 1993. Production of poly (γ -glutamic acid) by *B. subtilis* F-2-01. *Biosci. Biotech. Biochem.* 57. 1212-1213.
- Tanaka, T., Yaguchi, T., Hiruta, O., Futamura, T., Uotani K., Satoh A., Taniguchi, M. & Oi, S. 1993. Screening for microorganisms having poly(γ -glutamic acid) endohydrolase activity and the enzyme production by *Myrothecium* sp. TM42222. *Biosci. Biotech. Biochem.* 57: 1808-1810.
- Thorne, C.B., Gomez, C.G., Blind, G.R. & Housewright, R.D. 1953. Synthesis of glutamic acid and glutamyl polypeptide by *Bacillus anthracis* III. Factors affecting peptide production in synthetic liquid media. *J. Bacteriology.* 65. 472-478.
- Thorne, C.B., Gomez, C.G., Noyes, H.E. & Housewright, R.D.. 1954. Production of glutamyl polypeptide by *B. subtilis*. *J. Bacteriology.* 68.307-315.
- Troy, F.A. 1973. Chemistry and biosynthesis of the poly (γ -D-glutamyl) capsule in *B. subtilis*. 1. Properties of the Membrane-mediated biosynthesis reaction. *J. Biol. Chem.* 248. 305-315.