

## 고정화 시스템을 이용한 용균효소의 생산

류병호\* · 박종옥<sup>1</sup> · 진성현<sup>2</sup>

경성대학교 식품공학과, <sup>1</sup>화학과, <sup>2</sup>부산광역시 보건환경연구원

**Production of Bacteriolytic Enzyme by Using Immobilized System. Beung-Ho Ryu\*, Jong-Ok Park<sup>1</sup> and Sung-Hyun Jin<sup>2</sup>.** Department of Food Microbiology and Technology, <sup>1</sup>Department of Chemistry, Kyung Sung University, Pusan 608-736, Korea, <sup>2</sup>Public Health and Environment Institute, Pusan 613-104, Korea - *Bacillus subtilis* SH-1 screened from coastal sea water of South Korea was used to produce bacteriolytic enzyme. The production of bacteriolytic enzyme by immobilized cells was investigated. The optimum conditions for the continuous production of the bacteriolytic enzyme using immobilized cells were 2.4 mm diameter of 0.3% alginate beads, 20 ml/h of substrate feeding rate and 20 l/min of aeration rate. A productivity of 76.5 to 88.0 units/ml could be obtained for 25 days by continuous column reactor under the optimum conditions.

용균효소(bacteriolytic enzyme)는 세균 세포벽의 peptidoglycan을 분해하는 효소로서 그 작용부위에 따라 종류가 다양하다. 모든 세균에 공통적인 세포벽의 기본 구조는 peptidoglycan으로 gram 양성세균에서는 세포벽의 중요한 성분이며 gram 음성세균에서는 5~10% 정도이다.

Peptidoglycan은 N-acetyl-glucosamine과 N-acetylmuramic acid로 된 2당 단위가 연속된 것과 DL-alanine, D-glutamic acid, lysine(또는 diaminopimelic acid) 등으로 된 peptide가 muramic acid의 lactic acid 잔기와 peptide 결합을 하고 그 peptide 사슬 사이에 peptide 가교가 되어 있어 매우 강한 결합을 하고 있다(1). 세포벽 중의 peptidoglycan층은 여러 종류의 polysaccharide와 teichoic acid라 일컫는 polyphosphate로 된 고분자물질과 공유결합하고 있으며, peptidoglycan의 함량은 적으나 lipopolysaccharide, phospholipid 및 lipoprotein으로 구성되어 있다(2, 3). 용균효소를 분비하는 균주로는 *Streptomyces rutgersensis*(4), *Streptomyces griseus*(5), *Streptomyces albus* G(6), *Streptomyces erythraeus*(7) 등이 있고 그외에도 *Staphylococcus aureus*(8), *Bacillus subtilis*(9), *Myxococcus xanthus*(10), *Pseudomonas aeruginosa*(11), *Achromobacter lunatus*(12) 및 *Chalaropsis* sp.(13) 등이 보고 되었다. 연안 해수 중의 용균효소 생산균은 종속 영양세균 중의 24~50% 정도 존재하며, 동물 프랑크톤에서 분리한 종속 영양세균 중의 63~75% 정도가 용균효소 생산능력이 있는 것으로 알려져 있다(14). 해양의 용균효소 생산 세균으로는 해수중의 *Pseudomonas*, *Vibrio* 및 *Flavobacterium* 등이 있고 해저 퇴적물 중에는 *Bacillus* sp.가 많다(15).

*Bacillus* sp.에서 생산되는 용균효소는 *Vibrio parahaemolyticus*, *Micrococcus luteus* 등의 생세포 및 가열사 세포(加熱死細胞)의 세포벽을 용해한다고 보고 하였다(16). 또 해양에서 분리한 *Bacillus subtilis*에서 세포벽을 분해하는 효소를 정제하고(17), 배양특성을 보고한 바 있다(18).

현재 용균효소로 알려져 있는 lysozyme은 달걀의 난백과 사람의 타액, 점질, 눈물 및 백혈구 등에 존재하며 외부로부터 미생물의 침입을 방지하는 생체방어의 역할을 하고 있다. 해양환경에 있어서 용균효소 생산 세균은 다른 미생물의 균체 및 세포벽을 분해하여 생산균주의 자기증식을 위한 영양원을 얻고, 다른 미생물의 증식을 억제하는 역할을 하고 있다. 이와같이 용균효소는 미생물의 오염을 방지하는 식품의 보존제로 사용되고 있고 dextran 등의 다당체와 포합시켜 유화제로서 식품 및 의약품에 널리 이용되고 있다(19-21).

한편, 발효기술의 발달로 균체 고정화 기술이 개발되어 bioreactor를 이용한 식품관련산업인 간장(22, 23), 알코올(24-26), 맥주(25), 식초(26), 아미노산(27) 및 비타민(29) 등의 생산에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다. 이러한 발효기법은 고정화 균체를 장기간 사용할 수 있으며 연속 발효가 가능하여 제조공정을 단축시키고 생산성을 높일 수 있고 오염을 방지할 수 있는 특징이 있다(21). 현재 미생물에 의한 식품의 부패나 변질을 방지하기 위하여 화학 합성품인 보존료가 사용되고 있으나 보존료에 대한 식품 위생상 안전성이 문제되고 있다. 본 연구자들은 해양세균이 분비하는 용균효소를 분비하는 *Bacillus subtilis* SH-1를 분리 동정하고 그 효소적 특성 및 배양 특성을 보고한 바 있다(17, 18). 따라서 본 연구는 *Bacillus subtilis* SH-1을 이용하여 균체를 고정화하여 용균효소의 연속적 생산에 대하여 보고하고자 한다.

\*Corresponding author.

Key words: Bacteriolytic enzyme, *Bacillus subtilis*, immobilization

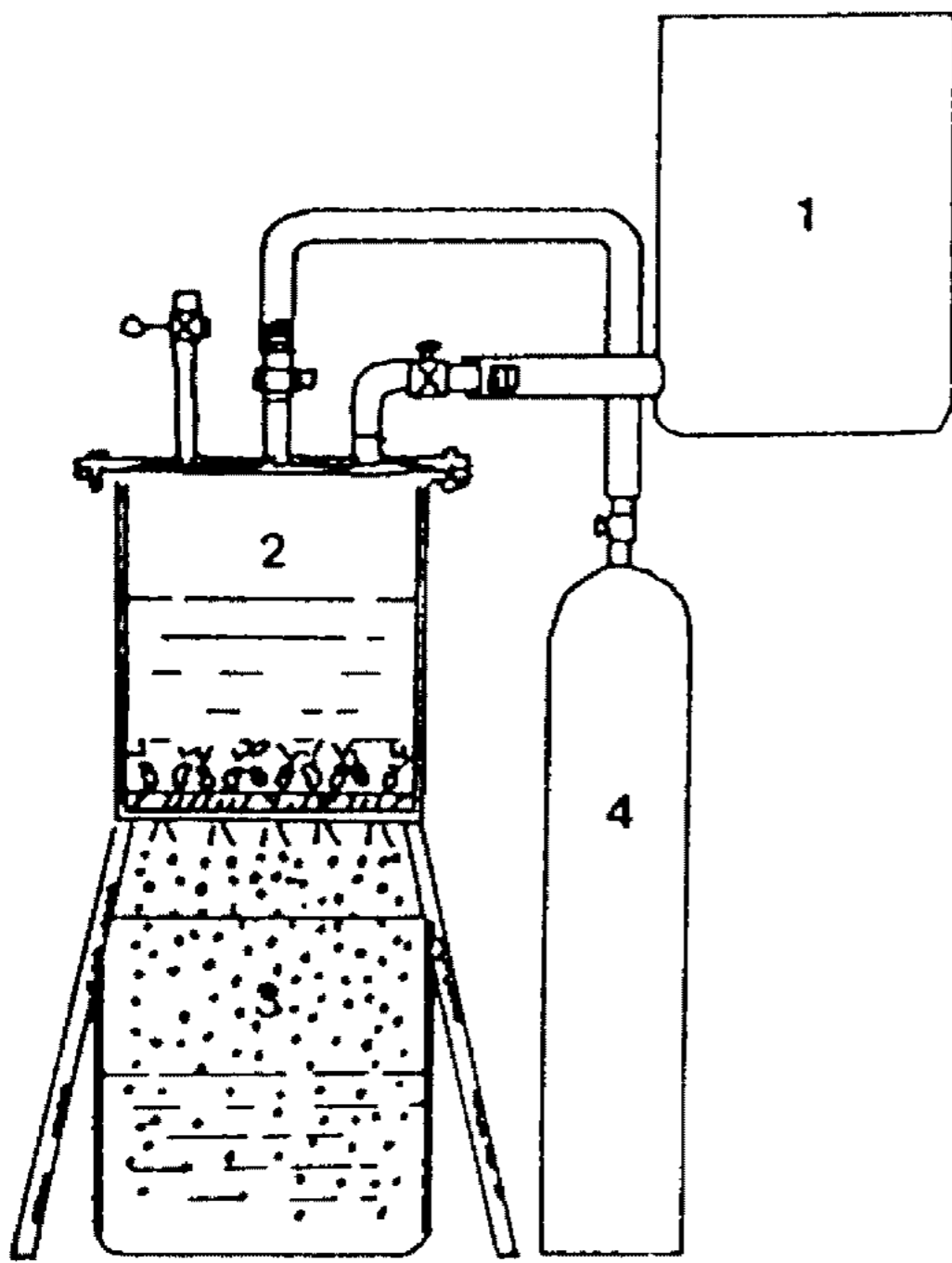


Fig. 1. Immobilization apparatus of microbial cells.

1. Mixture tank of cells and sodium alginate
2. Molding tank
3. Received tank with  $\text{CaCl}_2$  solution
4. Oxygen tank

## 재료 및 방법

### 균주

*Bacillus subtilis* SH-1을 사용하였다(17).

### 균체의 고정화 방법

*Bacillus subtilis* SH-1을 효소 생산용 배지(1.0% glucose, 1.0% yeast extract, 1.0% NaCl, 0.02%  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0.02%  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.001%  $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 0.0001%  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , pH 8.0)로 jar fermentor(5L, Marubushi Co., Japan)에서 30°C에서 24시간 배양시킨 다음 원심 분리하고 균체를 멸균증류수로 2회 씻은 후 각종의 고정화 담체와 균체를 1:1로 희석한 멸균된 0.1M 염화칼슘용액에 적하하여 생성된 겔을 2회 멸균 증류수로 씻은 다음 0.025M 염화칼슘용액에 침지하여 4°C에서 24시간 보관 사용하였다(22, 23). 균체 고정화에 사용된 기구는 Fig. 1과 같다(31). 그 외 agar, K-carageenan 및 polyacrylamide는 일정한 방법에 따라 고정화하여 사용하였다(32, 33).

### 균체 농도의 측정방법

담체내의 생균수를 측정은 인산완충용액(pH 7.2)에 용해시킨 후 생균수를 측정하였다.

### Column형 reactor의 장치

세포용균 효소의 연속적 생산을 하기 위하여 아크

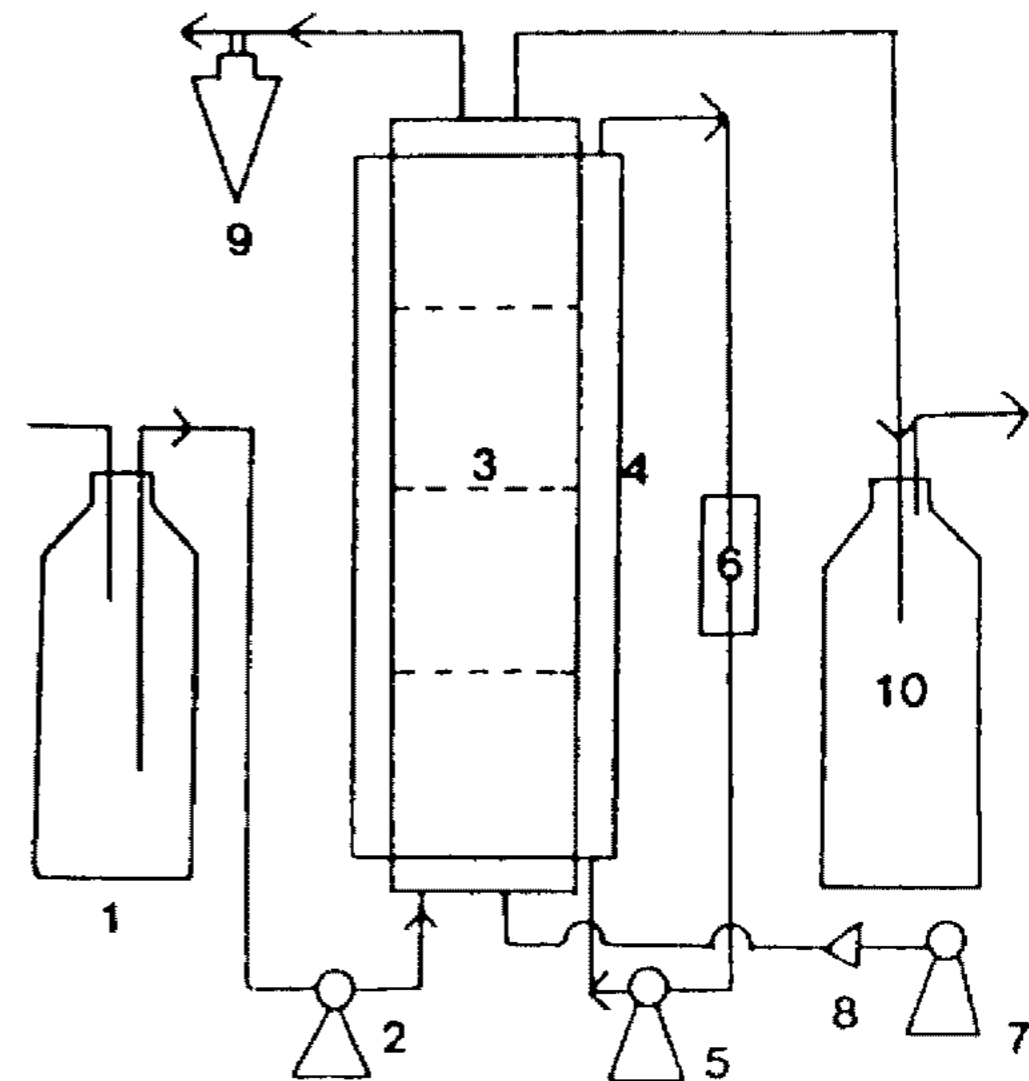


Fig. 2. Schematic diagram of the air bubble column reactor for production of bacteriolytic enzyme.

- |                                |                    |
|--------------------------------|--------------------|
| 1. Culture medium stock vessel | 6. Warm water pool |
| 2. Peristaltic pump            | 7. Air pump        |
| 3. Continuous column reactor   | 8. Air filter      |
| 4. Water jacket                | 9. Gas filter      |
| 5. Water jacket pump           | 10. Harvest tank   |

릴제로 만든 column형(높이 100 cm, 직경 6 cm, 4단식 용량 2.8 l)의 기포탑식 반응조에 고정화된 균체를 총 용량의 50%를 무균적으로 충전한 다음 peristaltic pump로 하부에서 상부로 배양액을 공급하고 별도로 멸균공기를 주입하면서 연속발효한 후 효소의 활성을 측정하였으며 column형 reactor의 장치는 Fig. 2와 같다.

### 세포벽 용해 활성의 측정

세포벽 용해 활성 측정을 위한 기질은 동결건조된 *Micrococcus lysodeikticus* ATCC 4698(Sigma Co.)을 사용하였으며 세포벽 용해효소의 활성 측정은 Sugahara 등(32)의 방법을 따랐다. 즉, 기질로 사용된 동결건조 균체액(0.2 g dry cells/100 ml D.W)을 100°C에서 10분간 처리한 균액 1 ml와 0.05M Tris-HCl buffer(pH 7.0) 1 ml 및 bacteriolytic enzyme 1 ml를 혼합하여 35°C 항온조에서 30분간 반응시킨후 흡광도 감소를 570 nm에서 측정하였으며 이때 효소 활성도 1 unit는 다음과 같은 식에 의해 30분간 570 nm에서의 흡광도를 1.0% 감소를 일으키게 하는 효소의 양으로 하였다.

$$\text{Bacteriolytic activity} = \frac{\text{OD}_{570}(\text{initial}) - \text{OD}_{570}(\text{final})}{\text{OD}_{570}(\text{initial})} \times 100$$

## 결과 및 고찰

### 고정화 담체의 선택

미생물의 고정화 담체의 선택은 목적하는 발효생산

**Table 1. Bacteriolytic enzyme activity of immobilized whole cells by various polymer matrices.**

Matrices	Wet cells (g)	Concentration of matrices (%)	Bacteriolytic enzyme (relative activity, %)
Agar	1.0	2.5	76.1
Sodium alginate	1.0	3.0	100.0
$\kappa$ -carrageenan	1.0	3.5	78.2
Polyacrylamide	1.0	6.5	95.7

물의 수율을 높이는데 큰 영향이 있다(33, 34). 균체 고정화 발효 시스템의 고정화에 이용되는 담체로는 agar, sodium alginate,  $\kappa$ -carrageenan 및 polyacrylamide 등이 사용되고 있으므로 본 실험에서 고정화의 담체 종류에 따른 효소의 생산성 활성을 검토하였다.

Table 1에서 보는 바와 같이 3.0% sodium alginate에 의한 고정화 균체를 이용할 때 세포벽 용균효소 생산의 상대활성도를 100%로 하였을 때 가장 높았으며, polyacrylamide는 95.7%,  $\kappa$ -carrageenan은 78.2% 및 agar는 76.1%로 다소 낮았다. 담체중  $\kappa$ -carrageenan은 gel의 상태가 sodium alginate에 비하여 쉽게 붕괴되기 쉽고 고온에서는 녹는 현상이 일어나므로 gel의 형성능이 약하였다(35, 36). Agar와 polyacrylamide의 고정화 gel은 형태와 크기가 고르지 못하여 일정한 활성을 갖지 못하며, 장시간 발효시는 gel이 붕괴되기 쉬운 단점(37)이 있으나 Ca-alginate는 산성 또는 알칼리성에서는 안정하고 고온에서 발효하여도 gel의 붕괴가 쉽게 일어나지 않고 일정한 압력에도 견디므로(36) 본 실험에서는 균체고정화 담체로 sodium alginate를 사용하였다.

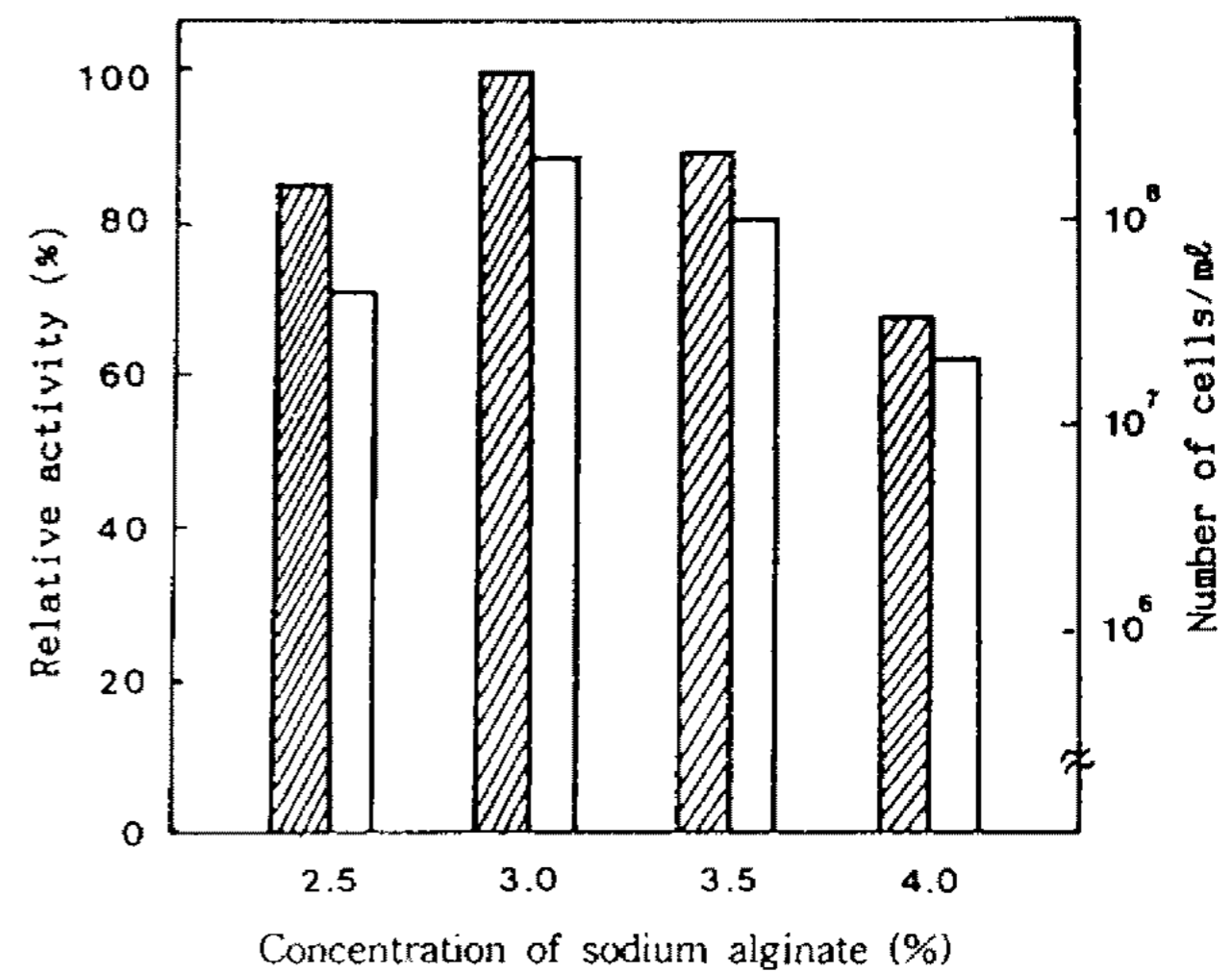
#### 담체인 sodium alginate의 농도

고정화 담체로서 균체를 고정화할 때 담체의 농도에 따라 gel의 형성이 달라지며 균체의 고정화 및 발효의 효율에도 영향을 미치게 된다.

Fig. 3에 나타낸 바와 같이 sodium alginate를 3.0%로 했을 때 균체의 증식이 좋았고 세포벽 용균효소의 생산이 높았으나 sodium alginate 농도가 3.0% 이상으로 높거나 또는 낮을 때에도 균체증식이 느렸고 세포벽 용균효소의 상대활성도 낮았으므로 본 실험에서는 3.0%의 sodium alginate로서 균체를 고정화하여 사용하였다.

한편 목적하는 발효생성물에 따라 다르지만 균체를 고정화할 때 담체의 농도가 발효시 크게 작용하므로(38) 본 연구에서 사용되는 3.0% sodium alginate는 이미 보고된 *Aspergillus niger*(39)와 *Streptomyces aureofaciens*(40)의 담체의 농도와 비슷하였다.

#### 가압법으로 만든 sodium alginate의 균체 고정화

**Fig. 3. Effect of various sodium alginate concentrations on the production of bacteriolytic enzyme in culture broth.**

▨: relative activity (%)

□: number of cells per ml

**Table 2. Preparation of Ca-alginate beads with various particle size.**

Flow rate of blow off stream (l/min)	0	3	5	7
Diameter of undried beads (mm)	3.0	2.4	2.1	1.4
Numbers of particles achieved from 1,000 ml alginate	700	1100	1600	4100
Bacteriolytic enzyme productivity (units/ml)	78	92	93	83

*Bacillus subtilis* SH-1 균체를 sodium alginate와 혼합하여 가압법(31)으로 고정화시킨 결과는 Table 2와 같다. 균체 고정화시 beads의 입자 표면이나 크기가 균체의 활성에 큰 영향을 미치는 것으로 알려져 있으며 발효의 효율적인 생산에 크게 관계가 있다고 보고한 바 있다(25, 29). 균체의 고정화 담체에 의한 bioreactor에 의한 발효 기술은 간장(22, 23), 알코올(25) 및 비타민(27) 등에 관한 연구에서 담체의 크기는 2.2~2.5 mm가 효과적이라고 보고 한 바 있다. 본 실험은 Horitsu 등(37) 및 Eikmcier 등(39)이 보고한 담체의 크기와 2.2~2.4 mm에서 생산성이 높다는 보고에 따라 *Bacillus subtilis* SH-1의 균체를 0.3% sodium alginate로 고정화시켜 실험한 결과 2.4 mm의 bead가 효과적이었다. 따라서 본 실험에서는 beads 직경이 평균 2.4 mm를 사

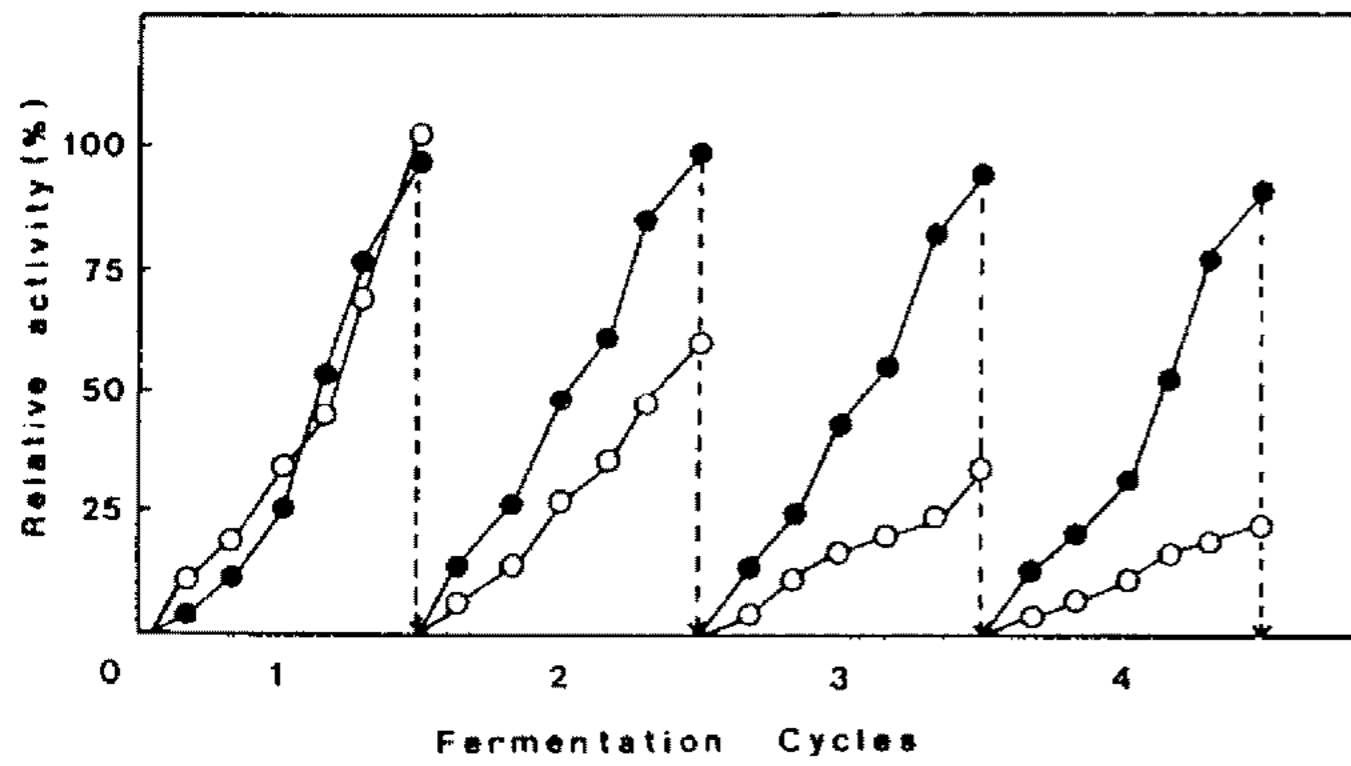


Fig. 4. Semicontinuous production of bacteriolytic enzyme by free and immobilized cells of *Bacillus subtilis* SH-1 in column reactor.

One fermentation cycle took on every 24 hrs.

○-○: free cells

●-●: immobilized cells

-----: exchange of fresh production medium

용하였으며 이와 같은 직경에서 air bubbled column에서 거품의 형성도 적어지고 발효기간 동안 beads에서 분리되는 유리 균체가 일정하게 유지되는 이점이 있었다. 이와 같이 본 실험결과에서는 bead의 크기가 2.4 mm에서 효과적이었으며 이는 beads의 크기가 2.2~2.4 mm를 사용하였을 때 균체의 생육 및 발효에 효율적이라는 보고(35, 39)와 비슷한 경향이었다.

#### 유리 및 고정화 균체에 의한 용균효소의 활성비교

유리 균체에 의한 발효는 24시간마다 새로 만든 배양액을 공급해 주면서 관찰하였으며 고정화 균체에 의한 발효는 column형 반응조에 고정화 균체를 충전하여 발효를 행하였을 때의 결과는 Fig. 4에 나타난 바와 같다. 유리균체에 의한 발효와 고정화 균체에 의한 발효를 비교시 1차 발효시기인 24시간까지는 생산된 용균효소의 상대활성은 유리균체가 약간 높았다. 2차 발효에서는 고정화균의 용균효소의 생산은 초기활성을 유지한 반면 유리균체의 경우는 용균효소의 활성이 40%로 떨어졌으며 3차 및 4차 발효시 고정화 균체에 의한 용균효소의 활성은 변화가 거의 없었으나 유리균체에 의한 용균효소의 활성은 급격히 저하하였다. 이는 유리균체를 4회 계속 사용함으로써 균주의 활성이 떨어지기 때문이다. 따라서 고정화 균체에 의한 용균효소의 생산은 4차 발효까지도 그대로 유지된 것으로 보아 고정화 균체에 의한 연속적 발효가 효율적이라고 생각되지만 4차 발효이후 장기간의 발효시 고정화균체의 효소생산활성이 조금씩 떨어지는 것은 고정화 담체인 sodium alginate에 균체 및 기질이 붙어 층을 이루어 산소의 확산을 제한시키기 때문이며 또한 현탁된 균체의 자기소화에 의하여 생기는 발효억제 현상으로 사료되며 연속발효시 이와 같은 단점은 고정화 균체의 세

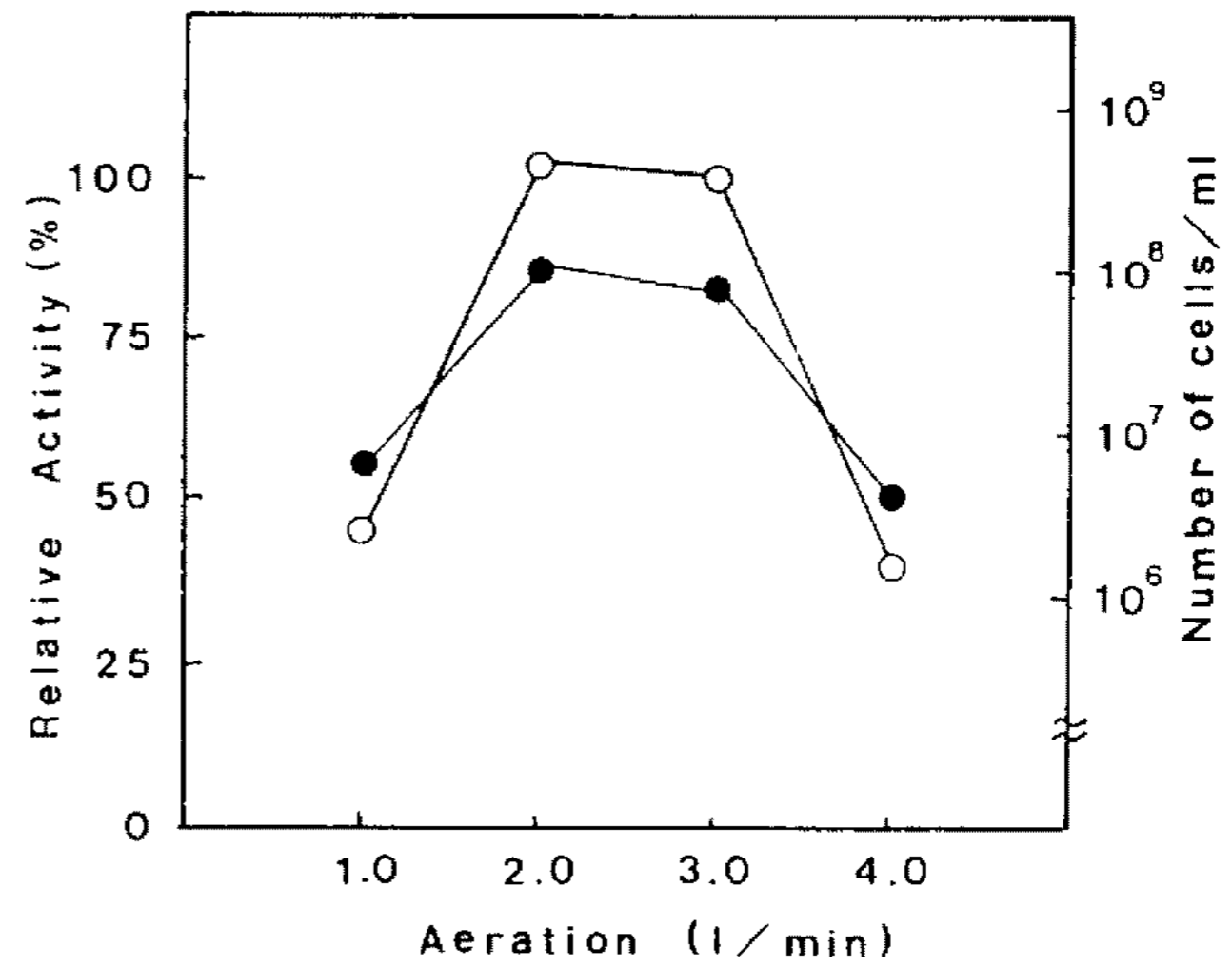


Fig. 5. Effect of air flow rate on the production of bacteriolytic enzyme by Ca-alginate immobilized cells of *Bacillus subtilis* SH-1 in continuous culture.

○-○: relative activity

●-●: number of cells per ml

척작업으로 해결될 수 있을 것으로 사료되었다.

#### Aeration의 효과

용균효소의 생산균인 *Bacillus subtilis* SH-1이 호기성균이기 때문에 aeration이 필요하므로 본 실험에서도 aeration의 효과를 알아보기 위하여 1.0 l/min, 2.0 l/min, 3.0 l/min 및 4.0 l/min의 조건으로 공기를 공급하여 실험한 결과를 Fig. 5에 나타내었다. 공기유속은 2.0 l/min에서 가장 용균효소의 활성이 가장 높았으며 3.0 l/min에서도 상당히 높았으나 1.0 l/min 및 4.0 l/min에서는 활성이 낮았는데, 공기유속이 증가하면 고정화균체의 bead gels의 표면에 손상이 가기 때문인 것으로 사료되었다.

#### 기질의 주입속도

본 실험에서는 담체의 종류, sodium alginate의 농도 및 aeration 등의 최적조건하에서 column형 reactor에서 기질의 주입속도를 시간당 10 ml, 20 ml, 30 ml 및 40 ml씩 각각 주입하여 효소활성과 유출액의 균수를 측정된 결과를 Fig. 6에 나타내었으며, 시간당 20 ml의 유속으로 기질을 주입 했을 때 용균효소의 생산성이 가장 높았고 시간당 15 ml 및 25 ml에서는 94%이었다. 그러나 기질의 주입 유량이 시간당 30 ml에서는 효소 활성이 80%로 나타났으나 시간당 40 ml에서는 용균효소의 활성이 56% 정도로 낮았다. 유출되는 생균수는 기질의 주입 유량에는 크게 영향을 받지 않으나 시간당 40 ml에서는 약간 감소하였다.

#### Column형 reactor에 의한 연속발효

세포벽 용균효소를 생산하기 위하여 회분법으로 구한

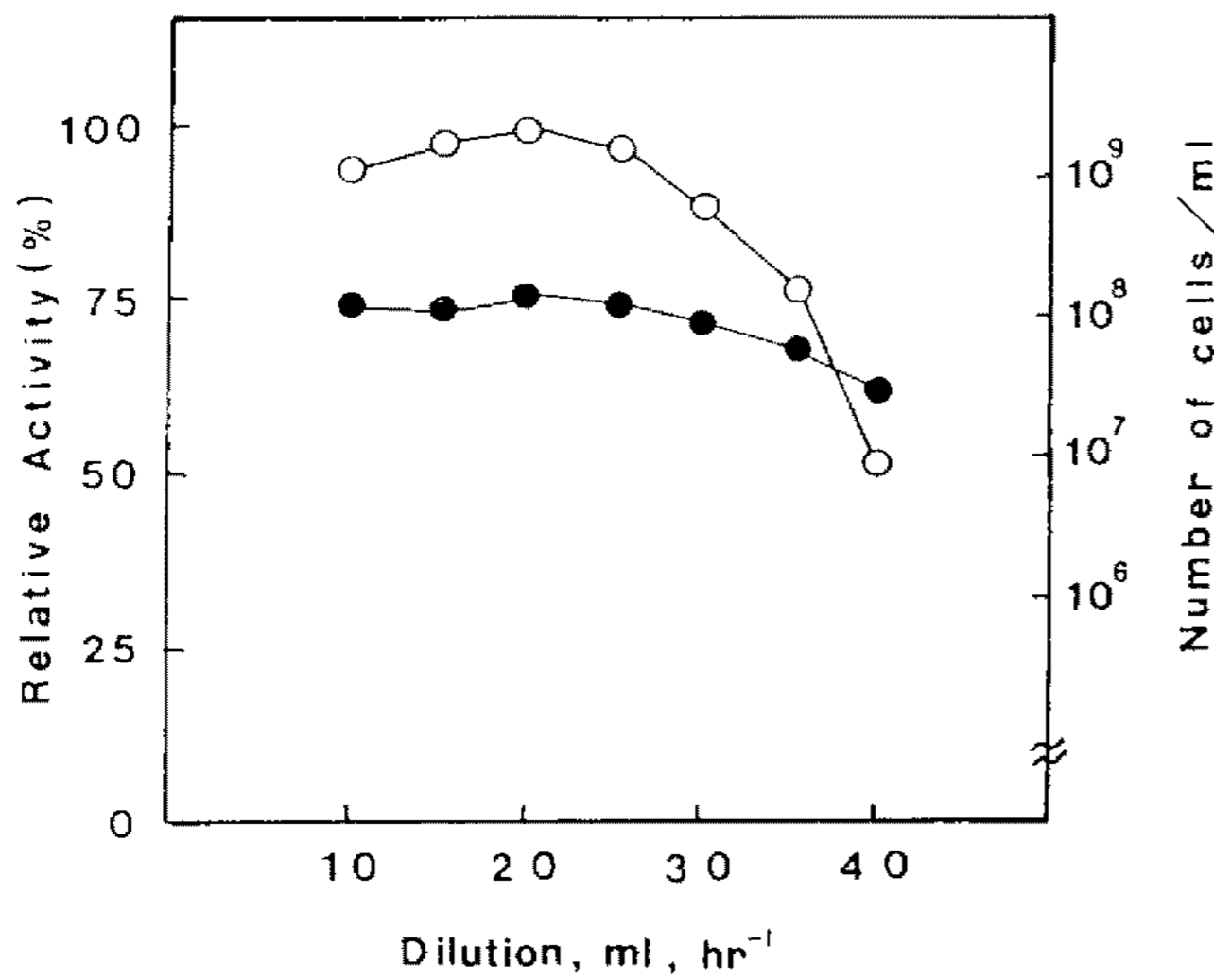


Fig. 6. Effect of flow rate of substrate on the production of bacteriolytic enzyme by Ca-alginate immobilized cells of *Bacillus subtilis* SH-1 in continuous culture.

○-○: relative activity  
●-●: number of cells per ml

적정 발효조건 및 발효속도를 기초로 하여 column형 reactor를 사용하여 연속발효를 실시하였다. *Bacillus subtilis* SH-1을 3.0% sodium alginate로 고정화하여 column형 reactor에 고정화 균체를 700 g씩 충전한 후 하부에서 peristaltic pump로 기질을 시간당 20 ml씩 주입하여 공급하면서 30일간 발효하였을 때의 발효액 중의 용균효소의 활성, pH의 변화 및 생균수를 측정하였다(Fig. 7). 발효 2~3일 경과시에 생산된 용균효소의 활성이 약 50 unit/ml 정도로 나타났으며, 5일째에는 75 unit/ml였으며 8일째에서는 용균효소의 활성이 92 unit/ml로 발효 20일까지 효소활성이 유지되다가 25일 경과시에는 83 unit/ml로 떨어지기 시작하여 30일 경과시에는 74 unit/ml의 효소활성을 나타내었다. 발효시 gel의 생균수는 발효경과 5일부터는  $1.2 \times 10^8$ /ml 정도로 발효경과 25일까지 일정한 생균수를 유지하다가 30일 경과시에는  $2.8 \times 10^7$ /ml로 약간 감소하였다. 그리고 유출액의 생균수는  $4.2 \times 10^6$ /ml에서  $1.0 \times 10^7$ /ml 정도로 발효경과 5일부터 발효 30일까지 일정량의 생균수를 유지하였으며 발효시 pH는 6.5~7.2 정도로 큰 변화를 찾아볼 수 없었다. 용균효소의 활성은 발효를 시작하여 25일까지는 일정수준을 유지하다가 27일 경과시에 활성이 떨어지는 것은 column형 반응조에서 장기간의 발효과정중 gel내의 균체가 감소되고 장기간의 공기의 공급으로 인하여 고정화 균체의 활성이 떨어지기 때문이다. 균체를 담체에 고정화하여 장기간 발효가 가능한 균주로는 *Aspergillus niger*가 104일 이었다고 보고(39)한 바와는 상이 하였으나, *Zygosaccharomyces*가 30일(41), *Streptomyces californicus*는 25일까지 발효에 의하여 생산할 수 있었다고 보고한 바(42)와는 비슷한 경향을 나타내고 있었다.

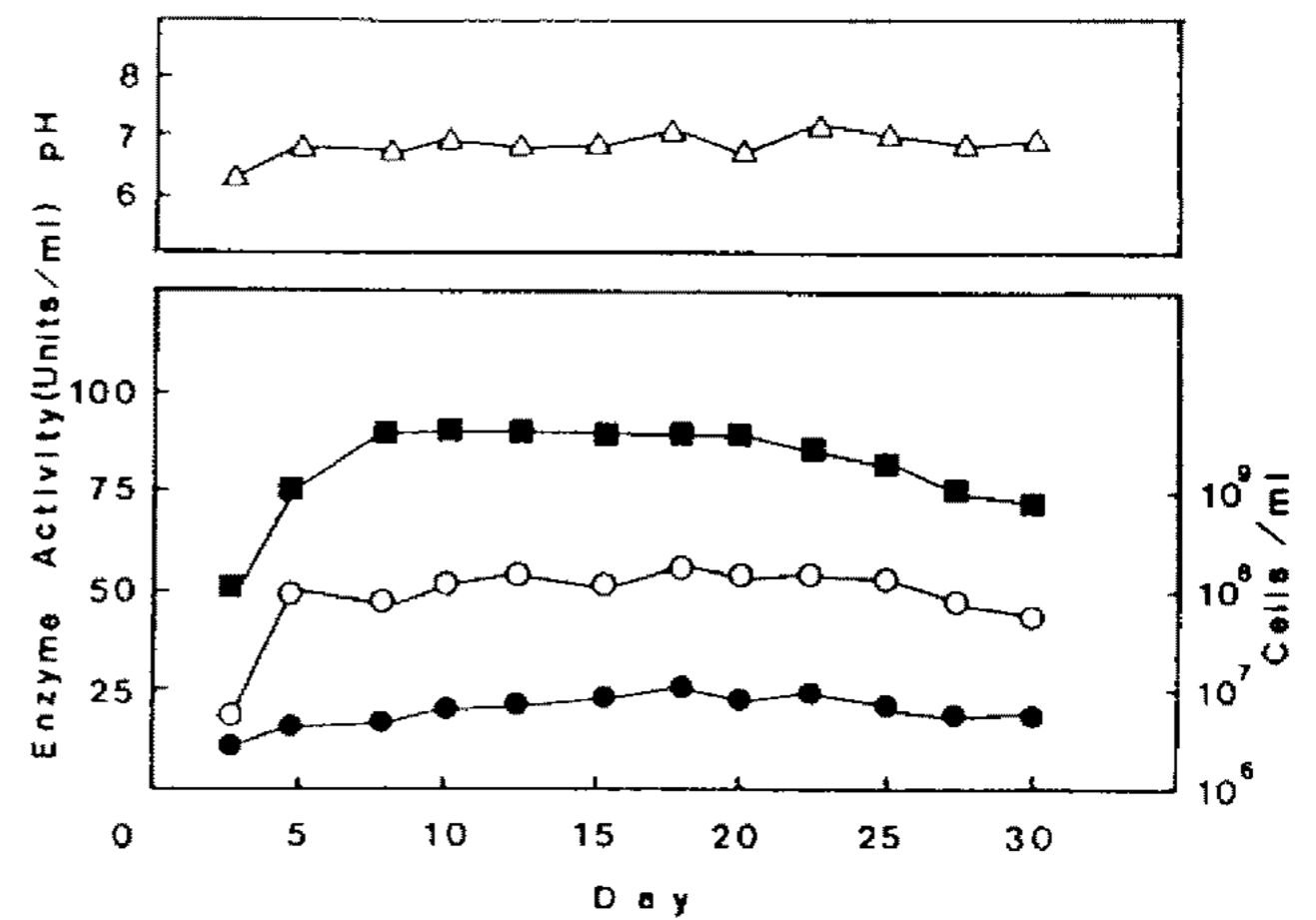


Fig. 7. Continuous fermentation for production of bacteriolytic enzyme by immobilized cells of *Bacillus subtilis* SH-1 in column reactor.

■-■: bacteriolytic enzyme activity  
○-○: number of gel cells/ml  
●-●: number of effluent cells/ml  
△-△: pH

## 요 약

해양에서 분리된 용균활성이 우수한 균주의 균체고정화에 의한 연속생산을 위한 조건을 검토하였다. *Bacillus subtilis* SH-1의 균체를 고정화하여 column형 reactor에 의하여 연속적으로 효소생산을 실험하였다. 연속 발효의 최적조건은 담체는 3.0% sodium alginate로 직경 2.4 mm의 bead를 제조하여 기질의 주입속도는 20 ml/h 공기의 주입속도는 2.0 l/min이었다. Column형 reactor(용량 2.8 l)에 의한 연속발효시 25일까지 76.5~88.0 units/ml의 최적의 효소활성을 갖는 용균효소를 생산할 수 있었다.

## 참고문헌

1. Ghuysen, J.M. 1968. Use of bacteriolytic enzymes in determination of wall structure and their role in cell metabolism. *Bacteriol. Rev.* **32**: 425-464.
2. Roger, Y.S., J.L. Ingraham and M.L. Wheelis. 1986. *The Microbial World* 5th ed., Prentice-Hall, Englewood Cliffs, New Jersey. Pp. 145-151.
3. Brock T.D., D.W. Smith and M.T. Madian. 1984. *Biology of Microorganism* (4th), Prentice-Hall, Englewood Cliffs, New Jersey.
4. Hayashi, K., T.N. Kasumi, I. Kubo and N. Tsumura. 1981. Purification and characterization of the lytic enzyme produced by *Streptomyces rutgersensis* H-46. *Agric. Biol. Chem.* **45**: 2289-2300.
5. Yoshimoto, T. and L. Tsuru. 1972. Studies on bacteriolytic enzyme II. Purification and some properties of two types of staphylolytic enzymes from *Streptomyces griseus*. *J. Biochem.* **72**: 379-390.
6. Petit, J.F., E. Munoz, and J.M. Ghuysen. 1966. Peptide

- cross-links in bacterial cell wall peptidoglycans studied with specific endopeptidases from *Streptomyces albus* G. *Biochem.* **5**: 2764-2776.
7. Morita, T., S. Hara, and Y. Matsushima. 1978. Purification and characterization of lysozyme produced by *Streptomyces erythraeus*. *J. Biochem.* **83**: 893-903.
  8. Wadstrom, T. and K. Hisatsunc. 1970. Bacteriolytic enzyme from *Staphylococcus aureus* purification of an endo- $\beta$ -N-acetyl-glucosaminidase. *Biochem. J.* **120**: 725-734.
  9. Tsujisaka, Y., Y. Tominaga, and M. Iwai. 1973. Taxonomic characters and culture conditions of a bacterium which produces a lytic enzyme on *Rhizopus* cell wall. *Agr. Biol. Chem.* **37**: 2517-2525.
  10. Sudo, S. and M. Dworkin. 1972. Bacteriolytic enzymes produced by *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* **110**: 236-245.
  11. Sawada, H., M. Azegami, and S. Ishii. 1981. Lytic enzyme produced by *Pseudomonas aeruginosa* concomitantly with bacteriophage PS 17. Purification, characterization, and comparison with PR 1-lysozyme. *J. Biochem.* **89**: 275-284.
  12. Watanabe, H. and T. Sato. 1981. Properties and lytic Action of the P2-2 enzyme capable of lysing cells of *Micrococcus radiodurans*. *Agric. Biol. Chem.* **45**: 1215-1221.
  13. Felch, J.W., T. Inagami, and J.H. Hash. 1975. The N, O-Diacetyl-muramidase of *Chalaropsis* species. *J. Biol. Chem.* **250**: 3713-3720.
  - 14.菅原 庸. 1992. 海洋環境における溶菌酵素生産菌. 化学と生物 **28**: 771-773.
  15. Sugahara, I., T. Kimura, K. Hayashi, and I. Nakajima. 1988. Distribution and generic composition of lytic enzyme-producing bacteria in costal and oceanic bottom sediments. *Nippon Suisan Gakkaishi* **54**: 1011-1015.
  16. Sugahara, I., T. Kimura, Y. Nakagawa, H. Kojima, M. Usuda, and M. Tanak. 1990. Lytic enzyme-producing bacteria in marine bottom sediments. *Nippon Suisan Gakkaishi* **56**: 511-518.
  17. 진성현, 류병호. 1995. 해양에서 용균효소를 분비하는 균주의 분리와 동정. 산업미생물학회지 **23**: 580-587.
  18. 류병호, 진성현. 1995. 해양에서 분리한 용균세균인 *Bacillus Subtilis* SH-1의 배양특성. 한국식품위생안전성학회지 **10**: 231-237.
  19. 赤司 景. 1970. サラミソ-セジの 保存性に 對する 卵白リゾチムの効果. 日畜會報 **41**: 143-150.
  20. Nakamura, S., A. Kato, and K. Kobayashi. 1990. Novel bifunctional lysozyme-dextran conjugate that acts on both Gram-negative and Gram-positive bacteria. *Agric. Biol. Chem.* **54**: 3057-3059.
  21. Kato, A., Y. Sasaki, R. Furuka, and K. Kobayashi. 1990. Functional protein-polysaccharide conjugate prepared by controlled dry-heating of ovalbumin-dextran mixtures high frequency transformation of *Bacillus subtilis* protoplast by plasmid DNA. *Agric. Biol. Chem.* **54**: 107-112.
  22. 野田義治, 大場和徳, 楠野秀喜, 中野正路. 1989. バイオリアクター-な利用したし ようゆ の研究. 日本醬油研究 **15**: 177-182.
  23. Horisu, M., Y. Maseda, and K. Kawai. 1990. A new process for soy sauce fermentation by immobilized yeasts. *Agric. Biol. Chem.* **54**: 295-324.
  24. K.D. Nam, M.H. Chio, W.S. Kim, H.S. Kim and B.H. Ryu. 1988. Simultaneous saccharification and alcohol fermentation of unheated starch by free, immobilized and coimmobilized systems of glycoamylase and *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Ferment. Technol. (Japan)* **66**: 427-432.
  25. Onaka, K., Y. Okamoto, T. Inoue, and S. Kubo. 1985. Beer brewing with immobilized whole cells. *J. Food Sci.* **50**: 1289-1224.
  26. Mori, A. 1985. Production of vinegar by immobilized cells. *Process Biochem.* **20**: 67.
  27. 류병호, 김혜성, 노명훈, 박법규, 정종순, 배기철. 1989. 세포융합과 고정화 시스템을 이용한 L-lysine의 생산성 향상. 한국식품과학회지 **21**: 154-164.
  28. Yongsmith, B. and K. Chutima. 1983. Production of vitamin B<sub>12</sub> by living bacterial cells immobilized in calcium alginate gels. *J. Ferment. Technol.* **64**: 593-602.
  29. Osaki, K., Y. Okamoto, T. Akao, S. Nagata, and H. Takamatsu. 1985. Fermentation of soy sauce with immobilized whole cells. *J. Food Sci.* **50**: 1289-1292.
  30. 윤종원, 정경훈, 유승중, 백운기, 이재홍. 1980. 고정화 세포장치. 특허공보제 1970호, 69-72.
  31. Linko, P. and Y.Y. Linko. 1984. Industrial application of immobilized cells. *CRC Critical Reviews in Biotechnology*, Vol. 1. Stewart G.G. Russel 1(eds.), **4**: 289-339.
  32. Freeman, A. and Y. Aharonowitz. 1981. Immobilization of microbial cells in crosslinked prepolymerized, linear polyacrylamide gels: antibiotic production by immobilized *Streptomyces clavuligerus*. *Cells. Biotechnol. Bioeng.* **23**: 2747-2759.
  33. Chibata, I. and L.B. Wingard. 1983. Immobilized microbial cells. In: L.B. B Wingard, E. Katchalski-Katzir, L. Goldstein, (ed.). Applied. Bioengengring. Vol 4. Academic Press, New York, London.
  34. Birnbaum, S., R. Pendleton, P.O. Larsson, and K. Mosbach. 1981. Covalent stabilization of alginate gel for the entrapment of whole cells. *Biotechnol. Lett.* **3**: 393-400.
  35. Tanaka, H., M. Matsumura, and I.A. Veliky. 1984. Diffusion characteristics of substrates in Ca-alginate beads. *Biotechnol. Bioeng.* **26**: 53-58.
  36. Horitsu, M., Y. Takahashi, K. Kawi, and Y. Kawano. 1985. Production of citric acid by *Aspergillus niger* immobilized in polyacrylamide gel. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **22**: 8-12.
  37. Klein, J., J. Stock, and K.D. Vorlop. 1983. Pore and properties of spherical Ca-alginate biocatalysts. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **18**: 86-91.
  38. Eikmeier, H. and H.J. Rehm. 1987. Stability of Ca-alginate during citric acid production of immobilized *Aspergillus niger*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **26**: 105-111.
  39. Mahmond, W. and H.J. Rehm. 1987. Chlorotetracycline production with immobilized *Streptomyces aureo-*

- faciens*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **26**: 333-337.
40. Hamada, T., T. Ishiyama, and H. Motai. 1989. Continuous fermentation of soy sauce by immobilized cells of *Zygosaccharomyces rouxii* in an air lift reactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **31**: 346-352.
41. 池英愛. 1990. *Streptomyces californicus* KS-89에 의한 靑紫色素의 生産과 色素의 特性. 慶星大學校 大學院 博士學位論文, Pp. 1-92.

(Received 1 March 1996)