J. Fd Hyg. Safety 10(4), 231 - 237(1995)

해양에서 분리한 용균세균인 *Bacillus subtilis* SH-1의 배양특성

류병호 · 진성현*
*경성대학교 식품공학과 , 부산광역시 보건환경연구원**

Cultural Characterization of Bacteriolytic *Bacillus subtilis* SH-1 Isolated from Pusan Coastal Sea

Beung-Ho Ryu and Sung-Hyun Jin*
Department of Food Microbiology and Technology, Kyung Sung University, Pusan, 608-736, Korea
**Public Health and Environment Institute of Pusan, 613-104, Korea*

ABSTRACT — *Bacillus subtilis* SH-1 have been isolated and identified from coastal sea, in Pusan. The optimal cultural characterization of *Bacillus subtilis* SH-1 for the production of bacteriolytic enzyme was determined. *Bacillus subtilis* SH-1 produced the bacteriolytic enzyme well in the medium consist of 1.0% glucose, 1.0% yeast extract, 1.0% NaCl, 0.02% K_2HPO_4, 0.002% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.001% $MnSO_4 \cdot 5H_2O$, and 0.0001% $FeSO_4 \cdot 7H_2O$. The optimal medium pH, incubation temperature, and shaking time for the highest production of the enzyme were 8.0, 30 °C and 28 hours respectively.

Key words □ Bacteriolytic enzyme, *Bacillus subtilis*

서 론

용균효소(Bacteriolytic enzyme)는 세포벽이나 세포 표층 구조에 작용하여 최종적으로 세포를 용해하는 작용이 있는 효소를 말한다. 용균효소는 동식물과 미생물에 의하여 분비되며 그 작용부위에 따라 종류가 다양하다. 이러한 용균효소의 작용 메카니즘에 대하여는 주로 gram양성균인 *Micrococcus lysodeikticus*와 *Staphylococcus aureus* 등 lysozyme에 대하여 감수성이 높은 균을 대상으로 하여 연구하였다.[1] 용균효소는 그 작용 부위에 따라peptidoglycan의 glycan 부분에 작용하는 endo β-1, 4 N-acetyl hex-osamidase, glycan부분과 peptide부분을 연결하는 N-acetyl muraminyl L-alanine amidase 및 peptidoglycan의 peptide결합에 작용하는 endopeptidase등이 있다.[1] 이중 endo β-1, 4 N-acetyl hexosamidase는 달걀의 난백에서 분리된 lysozyme으로 이 효소는 세균 세포벽의 peptidoglycan의 N-acetyl muramic acid와 N-acetylglucosamine 간의 β-1, 4결합을 절단하는 특성을 가지고 있다. Lysozyme에 용균되지 않는 *Staphylococcus*을 분해하는 균주는 *Streptomyces rutgersensis*,[2] *Streptomyces griseus*[3], *Streptomyces albus* G,[4] *Streptomyces erythraeus*[5]등이 있고 그외에도 *Staphylococcus aureus*,[6] *Bacillus subtilis*,[7] *Myxococcus xanthus*,[8] *Pseudomonas aeruginosa*,[9] *Achromobacter lunatus*[10] 및 *Chalaropsis* sp.[11]등도 있다.

해양의 용균효소 생산 세균으로는 해수중의 *Pseudomonas, Vibrio* 및 *Flavobacterium*등이 있고 해저 퇴적물 중에는 *Bacillus* sp.가 많다. 해안 연안 및 외양의 해저 퇴적물에서 분리한 용균효소 생산균 482주의 약 77~94%가 *Pseudomonas aeruginsa, Vibrio parahaemolyticus, Staphylococcus enteritidis, Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis*의 가열사세포(加熱死細胞)를 용해하고 약 5~20%는 *Vibrio parahemolyticus, Bacillus subtilis* 그리고 해양성 탈질세균(脫窒細菌)인 *Pseudomonas* sp. 등의 생세포(生細胞)를 용해하는 능력이 있어, 광범위한 세균세포에 작용 하는 것으로 알려져 있다.[12]

한편 해양환경에 있어서 용균효소 생산세균은 다른 미생물의 균체 및 세포벽을 분해하여 생산균주의 자기증식을 위한 영양원을 얻고, 다른 미생물의 증식을 억제하는 역할을 하고 있다. 용균효소는 세포벽의 구조인 peptidgolycan

* To whom correspondence should be addressed.

에 대한 기질 특이성이 있으므로 미생물의 분류에 큰 역할을 하였다. 또, 미생물의 오염을 방지하는 식품의 보존제로 사용되고 있고 dextran등의 다당체와 포합시켜 유화제로서 식품 및 의약품에 널리 이용되고 있다.[13-15]

따라서 본 연구에서는 용균효소를 분비하는 해양유래 균주인 *Bacillus subtilis* SH-1을 이용하여 용균 효소를 대량 생산할 목적으로 우선 *Bacillus subtilis* SH-1의 생육특성을 검토하였다.

재료 및 방법

용균 균주

본 실험실에서 보관중인 용균효소 활성이 우수한 해양유래 균주인 *Bacillus subtilis* SH-1을 사용하였다.

Bacteriolytic enzyme 생산을 위한 배양조건 조사

*Bacillus*균의 생육에 필요한 공통적인 배지조성 (PM : polypeptone 5.0, yeast extract 5.0, glucose 5.0, K_2HPO_4 0.2, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.02, NaCl 0.02, $MnSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.01, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.001 g/*l*, pH 7.0)을 선정한 후 *Bacillus subitilis* SH-1에 의한 bacteriolytic enzyme 생산을 위한 배양조건에 관하여 검토하였다.

Nutrient agar slant에 보관중인 *Bacillus subtilis* SH-1을 30 °C에서 18시간 진탕배양한 균액 1%(v/v)를 본 배양용 PM 배지 100 m*l* 들어있는 500 m*l*용 진탕 플라스크에 접종하여 30 °에서 24시간 진탕 배양한 후 균의 증식과 bacteriolytic enzyme활성을 측정하였다. Cell growth의 측정은 배양후 배양액을 5 °C로 급냉하고 배양액 5 m*l*를 취하여 동량의 증류수로 희석한 다음 spectrophotometer로 660 nm에서 흡광도를 측정하였으며 bacteriolytic enzyme의 활성을 측정하기 위한 조효소액은 균 배양액을 12,000 xg에서 10분간 저온 원심분리하여 균체를 완전히 제거한 상등액을 사용하였다.

세포벽 용해 활성의 측정

세포벽 용해 활성 측정을 위한 기질은 동결건조된 *Micrococcus lysodeikticus* ATCC 4698 (Sigma Co.)을 사용하였으며 세포벽 용해효소의 활성 측정은 Sugahara등[16]의 방법을 따랐다. 즉, 기질로 사용된 동결건조 균체액(0.2 g dry cells/100 m*l* D.W)을 100 °C에서 10분간 처리한 균액 1 m*l*와 0.05 M Tris-HCl buffer (pH 7.0) 1m*l* 및 bacteriolytic enzyme 1 m*l*를 혼합하여 35 °C 항온조에서 30분간 반응시킨 후 흡광도 감소를 570 nm에서 측정하였으며 이때 효소 활성도 1 unit는 다음과 같은 식에 의해

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

30분간 570 nm에서의 흡광도를 1.0% 감소를 일으키게 하는 효소의 양으로 하였다.

결과 및 고찰

배양온도의 영향

Bacillus subtilis SH-1균주의 배양온도에 따른 생육도와 효소생산의 영향을 검토하기 위하여 PM배지에 종배양액을 1%(v/v) 접종하여 15 °C~50 °C로 배양온도를 변화시켜 24시간동안 진탕배양하여 효소활성을 측정해본 결과를 Fig. 1에 나타내었다. 생육온도 범위는 15 °C~50 °C, 생육최적온도는 30 °C였으며 25 °C~40 °C의 범위에서 균의 생육도 및 효소활성도가 비교적 높아 30 °C가 최적온도로 나타났다.

Initial pH의 영향

분리주 *Bacillus subtilis* SH-1의 생육도와 bacteriolytic enzyme 생산에 적합한 initial pH의 영향을 검토하기 위하여 PM배지를 0.5 M NaOH 또는 0.5 M HCl로 pH를 조정하여 종배양액을 각각 1% (v/v)접종하여 30 °C에서 24시간 진탕배양한 후 균의 생육도와 효소활성을 측정하여 Fig. 2에서 나타낸 바와 같이 이 균은 pH 7.0~10.0의 알칼리 영역에서

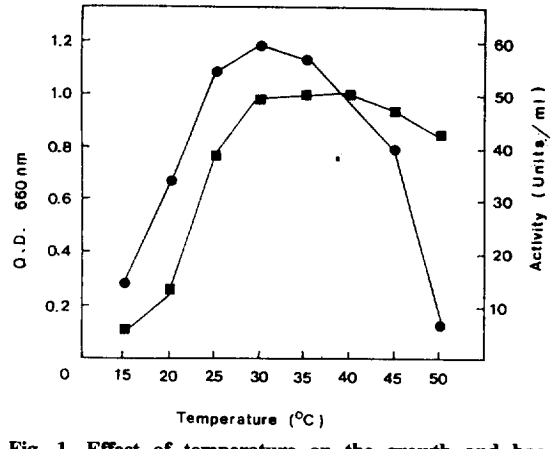

Fig. 1. Effect of temperature on the growth and bacteriolytic enzyme production of the *Bacillus subtilis* SH-1 cultured in PM medium at 30 °C for 24hours.

■—■ : Cell growth

●—● : Activity (units/m*l*)

높은 생육도를 나타내어, pH 8.0에서는 가장 높은 생육도와 효소활성을 나타내었다. 그러나 이 pH의 범위를 벗어나면 생육도와 효소활성도가 감소하여 pH 5.0이하의 영역에서는 생육이 곤란하여 효소활성이 나타나지 않았으며 또한 초기 pH가 8.0일 때가 7.0에 비하여 약 40% 이상의 효소활성 증가 차이를 보였는데, 이는 해양환경에서 분리되었기 때문에 알칼리 영역인 pH 8.0 부근의 pH범위에서 활발한 균증식 및 활성을 나타내는 것으로 생각된다.

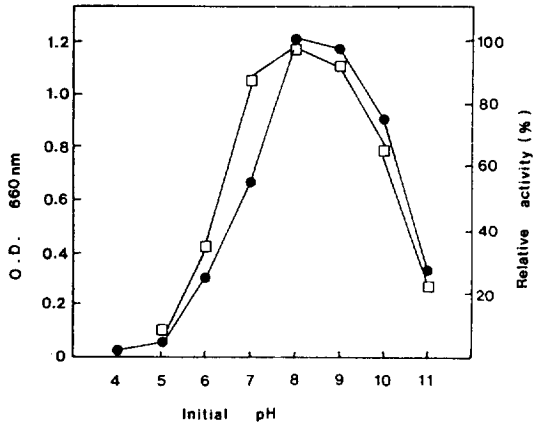

Fig. 2. Effect of initial pH on the growth and bacteriolytic enzyme production of the *Bacillus subtilis* SH-1 cultured in PM medium at 30 °C for 24hours.
□—□ : Cell growth
●—● : Relative activity

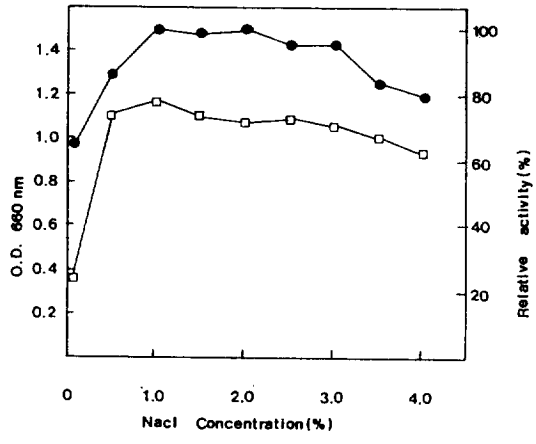

Fig. 3. Effect of NaCl concentration on the growth and bacteriolytic enzyme production of the *Bacillus subtilis* SH-1.
□—□ : Cell growth
●—● : Relative activity

NaCl의 영향

본 분리균주는 해양환경에서 분리되었기에 NaCl의 농도에 따른 균의 증식과 bacteriolytic enzyme 생산에 영향을 미칠 것으로 생각되어, NaCl농도를 변화시키면서 배양된 균의 생육도와 효소활성을 측정한 결과를 Fig. 3에 나타내었다.

예상했던 바와 같이 NaCl 농도 1.0~3.0%에서 가장 높은 효소활성을 보였으며 NaCl을 첨가하지 않은 PM 배지와 NaCl 농도 1% 첨가한 PM 배지와 비교해 볼 때 NaCl 1% 첨가한 배지에서 약 35%의 효소 활성 증가를 보였으며 균의 생육에 있어서도 현저한 균의 증식이 있었으므로 NaCl은 균의 증식과 bacteriolytic enzyme 생산에 필요한 인자로

Table 1. Effect of various carbon sources on the production of bacteriolytic enzyme by *Bacillus subtilis* SH-1 cultured in PM medium at 30 °C for

Catrbon sources (1.0%, w/v)	Cell growth (O.D., 660nm)	Relative enzyme activity (%)
None	0.80	19.2
Glucose	1.18	100.0
L-Arabionse	1.20	93.6
D-XYlose	0.83	9.0
Rhamnose	0.94	32.1
D-Mannose	1.07	91.0
Galactose	0.85	21.3
Fructose	0.94	76.9
Salicine	1.10	79.9
D-Trehalose	0.98	67.8
Cellobiose	1.20	78.5
Sucrose	1.08	70.5
D-Melibiose	1.05	92.3
Dextrin	0.72	17.3
Lactose	0.79	13.0
Maltose	0.94	76.5
Adonitol	0.82	41.0
Mannitol	0.95	66.6
Inositol	1.23	96.8
Sorbitol	0.88	43.5
Glycerol	0.90	62.8
Inuline	0.79	50.5
D-Raffinose	0.87	52.5
Starch	0.96	43.5
Sodium citrate	0.82	60.2
Acetic acid	0.69	67.9

생각되었다.

이러한 결과는 Sugahara 등[17]이 연안해수에서 분리한 *Bacillus* sp.V37이 NaCl첨가배지에서 현저한 효소활성 증가를 보였다고 하는 결과와 일치하였다.

탄소원의 영향

탄소원의 종류에 따라 bacteriolytic enzyme 생산량에 미치는 영향을 검토하였다. PM 배지(glucose는 제외함)의 조성에 각종 탄소원 1% (w/v)를 첨가하여 30℃에서 24시간 진탕배양한 다음 균의 생육도와 효소활성도를 조사한 결과는 Table 1에 나타난 바와 같이 glucose, L-arabinose, D-mannose 등과 같은 단당류와 D-mellibiose 및 inositol 등이 효소생산에 비교적 양호한 탄소원이었으나 D-xylose, dextrin, lactose 등은 억제하는 현상을 나타내었다. 유기산류는 *Bacillus subtilis* SH-1이 이용가능한 탄소원으로 나타났으며 다당류인 inuline, D-raffinose, starch 등은 비교적 효소 활성을 낮게하는 것으로 나타났다. Bacteriolytic enzyme 활성이 양호한 탄소원인 glucose를 선정하여 그 최적농도를 조사하기 위하여 첨가 농도를 단계별로 조정하여 각 농도에 따라 효소생산에 미치는 영향을 검토한 결과는 Fig. 4 에서와 같이 1.0%이상의 농도에서는 효소활성 변화가 거의 없었다.

질소원의 영향

효소생산에 미치는 질소원의 영향을 검토하기 위해 PM 배지 조성(polypeptone과 yeast extract는 제외함)에 각종 유기 및 무기질소원을 1% (w/v)씩을 첨가하여 30℃에서 24시간 진탕배양한 후 균의 생육도와 효소활성을 측정한 결과, Table 2에서 나타난 바와 같이 무기질소원을 첨가한 배지에서는 균의 증식도 불량하고 효소생산 효과도 거의 볼 수 없었으나 $(NH_4)_2HPO_4$를 첨가한 배지에서는 효소 활성이 현저하게 나타났다.

한편 복합 유기태 질소원을 첨가한 배지에서는 yeast extract, casitone, polypeptone (0.5%) + yeast extract(0.5%)의 순으로 bacteriolytic enzyme 생산에 효과적이었으며 질소원으로 가장 효과적인 yeast extract의 최적 농도를 조사한 결과는 Fig. 5와 같다.

Yeast extract의 농도가 증가함에 따라 균체증식의 변화는

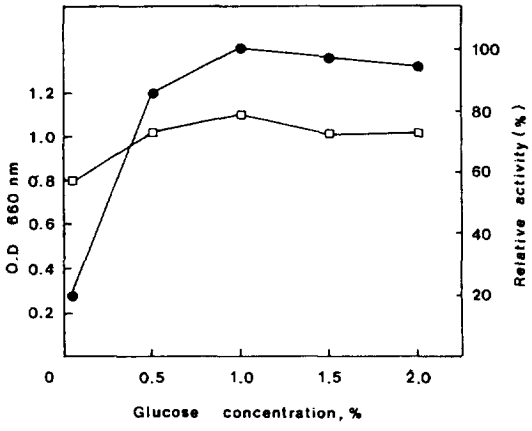

Fig. 4. Effect of glucose concentration on the growth and bacteriolytic enzyme production of the *Bacillus subtilis* SH-1 cultured in PM medium at 30℃ for 24hours.

□—□ : Cell growth

●—● : Relative activity

Table 2. Effect of various nitrogen sources on the production of bacteriolitic enzyme by *Bacillus subtilis* SH-1 cultured in PM medium at 30℃ for 24hours.

Nitrogen sources (1.0%, w/v)	Cell growth (O.D., 660nm)	Relative enzyme activity (%)
None	0.16	24.0
organic nitrogen source		
Beef extract	0.98	51.6
Peptone	0.82	81.6
Yeast extract	2.09	100.0
SoyTone	0.41	73.3
Polypeptone	1.13	35.3
Neopetone	0.21	20.0
Proteosepeptone	0.46	73.6
Casitone	1.35	85.1
TryTone	1.87	53.3
Malt extract	0.33	23.9
Casein	0.28	24.8
Casamino acid	0.24	23.5
Urea	0.36	25.0
polypeptone (0.5%) + Yeast extract (0.5%)	1.97	83.4
In organic nitrogen source		
$(NH_4)_2SO_4$	0.09	25.1
NH_4NO_3	0.13	22.8
$(NH_4)_2CO_3$	0.17	23.6
KNO_3	0.23	24.7
$NaNO_3$	0.25	24.9
NH_4Cl	0.18	18.6
$(NH_4)_2HPO_4$	1.43	78.3
$NaNO_2$	0.15	30.7

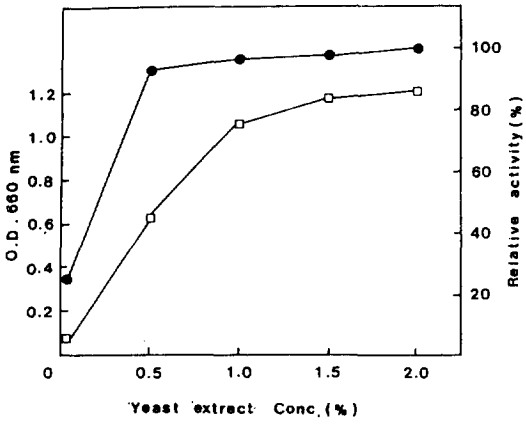

Fig. 5. Effect of yeast extract concentration on the growth and bacteriolytic enzyme production of the *Bacillus subtilis* SH-1 cultured in PM medium at 30°C for 24hours.

□—□ : Cell growth

●—● : Relative activity

Table 3. Effect of concentraction of glucose and yeast extract on the production of bacteriolytic enzyme by *Bacillus subtilis* SH-1.

Glucose (%, w/v)	Yeast extract (%, w/v)	Relative enzyme activity (%)
	1.0	100
1.0	1.5	98
	2.0	90
	1.0	84
1.5	1.5	88
	2.0	72
	1.0	72
2.0	1.5	70
	2.0	64

증가하는 경향을 나타내었으나 효소생산의 변화는 거의 없이 일정한 수준을 나타내었으므로 yeast extract의 첨가수준은 1%가 가장 적합한 것으로 생각된다.

배지의 C/N율

배지의 C/N율은 효소 생산의 중요한 인자로 작용한다.[18] 따라서 *Bacillus subtilis* SH-1을 이용한 bacteriolytic enzyme 생산에 있어서 가장 양호한 효과를 나타내었던 탄소원과 질소원인 glucose와 yeast extract의 양 농도를 변화시켜

Table 4. Effect of inorganic salts on the production of bacteriolytic enzyme by *Bacillus stubtilis* SH-1.

Salts	Conc. (%, w/v)	Relative enzyme activity (%)
None		62.3
$CaCO_3$	0.1	64.9
Na_2CO_3	0.1	64.9
K_2HPO_4	0.02	100.0
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.01	62.8
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.002	73.3
$MnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.001	84.3
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.0001	75.8
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.0001	58.2
$ZnSO_4 \cdot 5H_2O$	0.0001	59.0

효소생산에 대한 C/N율의 영향을 검토한 결과는 Table 3에 나타난 바와 같이 양 농도가 높을수록 효소생산이 저하되는 경향을 나타내었으며 C/N율이 1 : 1 일 때 효소생산이 최대치를 나타내었다.

무기염류의 영향

PM배지에 함유된 무기염류는 일반적으로 *Bacillus* sp.균의 증균과 분리에 쓰여지는 염류들로서, 이들 염류가 효소생산에 필요한가를 검토하였다. 무기염류의 선정은 효소의 활성화에 주로 기여하는 Mg^{2+}, Fe^{2+}, K^+, Ca^{2+}등의 양이온과 Cl^-, SO_4^{2-}, PO_4^{2-}등의 음이온등 불가결한 이온들을 중심으로 하여 *Bacillus* sp.의 증균.분리용 배지에 공통적으로 나타나는 무기염류를 대상으로 하여 각종염류 1종씩을 PM배지(무기염류는 제외)조성에 첨가하여 bacteriolytic enzyme생산에 미치는 영향을 조사한 결과는 Table 4에서 나타난 바와 같이 K_2HPO_4 0.02%를 첨가하였을 때 대조구에 비하여 효소활성이 약 37% 증가하였으며 $MnSO_4 \cdot 7H_2O$, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 및 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$의 첨가도 효과적이었다. Ca^{2+}이온은 본 효소생산에 크게 영향을 미치지 않는 것으로 나타났으며 $CuSO_4 \cdot 5H_2O$와 $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$에 의하여서는 효소생산이 저하되는 것으로 나타났다.

통기량의 영향

본 분리균주는 호기성균이므로 용존산소가 균생육에 영향을 미치게 되므로 효소생산에도 유관할 것으로 판단되어 500 ml 진탕 flask에 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200 ml씩 PM배지를 분주하여 멸균한 후 전배양한 배양액을 각 비율별로 접종하여 30°C에서 70 oscil./min (Kukje Scientific instrument/Eng Co.LTD, Model SH-919)으로 24시간 진탕

Table 5. Effect of aeration on production of bacteriolytic enzyme by *Bacillus subtilis* SH-1.

Volume of the medium per 500 m*l* flask	Cell growth (O.D., 660nm)	Relative enzyme activity (%)
50	3.25	41.4
75	3.48	97.6
100	2.20	98.9
125	2.25	100.0
150	1.95	96.1
175	1.27	83.6
200	0.89	73.8

Table 6. Optimum cultural conditions for the production of bacteriolytic enzyme by *Bacillus subtilis* SH-1.

Composition of culturing medium for shake culture	
Glucose	1.0%
Yeast extract	1.0%
NaCl	1.0%
K_2HPO_4	0.02%
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.002%
$MnSO_4 \cdot 5H_2O$	0.001%
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.0001%

Culture conditions were initial pH 8.0, temperature 30°C, 125 m*l* medium/500m*l* Vol. Shaking flask 70 Oscil./min.

배양한 결과 125 m*l*의 배지를 넣은 것이 가장 좋은 효소활성을 나타내었다(Table 5).

최적 배양 조건에서의 배양경과

지금까지의 배양조건들을 종합검토하여 Table 6에 나타난 바와 같은 최적 배양조건을 설정하고 이 조건에 따라 효소생산 최적배지 (OCM) 125 m*l*를 500 m*l*의 진탕용 flask에 분주하여 상법에 따라 멸균한 후, 전배양한 종균 1%를 접종하여 30°C에서 40시간 진탕배양하였다. 배양경과에 따른 효소생산, 균체증식 및 pH변화를 검토한 결과 Fig. 6에 나타난 바와 같이 bacteriolytic enzyme의 생산은 28시간 전후에서

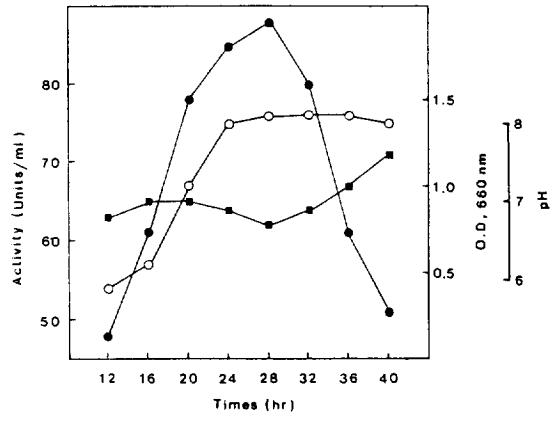

Fig. 6. Changes of cell growth, pH and bacteriolytic activity of *Bacillus subtilis* SH-1 during the sha-king culture under optimum conditions indicated in Table 6.
■—■ : pH
○—○ : Cell growth
●—● : Enzyme activity

Table 7. Comparision of the bacteriolytic enzyme activity produced by *Bacillus subtilis* SH-1 cultured in OCM and PM medium.

Medium	Activity(units/m*l*)
PM	59.1
OCM	88.0

PM : bacteriolytic enzyme productive media
OCM : optimum culture media

최고에 달하였으며 그 배양액의 효소활성은 88 units/m*l*로서 PM배지에서 24시간 배양한 것과 대비하여 약 49%의 활성증가를 보였다(Table 7).

한편 균체증식은 접종 후 급격히 증식하여 24시간 전후에서 최대증식율을 나타내었으며 pH는 효소활성이 최대로 나타나는 28시간 이후로부터는 증가하는 경향을 나타내었다.

국문요약

해양에서 분리한 용균활성이 우수한 균주인 *Bacillus subtilis* SH-1의 배양특성을 조사하여 다음과 같은 결과를 얻었다. *Bacillus subtilis* SH-1에 의한 용균효소 생산을 위한 최적조건인 1.0% glucose, 1.0% yeast extract, 1.0% NaCl, 0.02% K_2HPO_4, 0.002% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.001% $MnSO_4 \cdot 5H_2O$, 0.0001% $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (pH 8.0)의 배지로 30°C에서 진탕배양하여 배양 28시간일 때 효소활성이 가장 높았다.

참고문헌

1. Ghuysen, J. M.: Use of bacteriolytic enzymes in determination of wall structurl and their role in cell metabolism. *Bacteriol. Rev.*, **32**, 425(1968).
2. Hayashi, K., Kasumi, T., Kubo, N. and Tsumura, N.: Purification and characterization of the lytic enzyme produced by *Streptomyces rutgersensis* H-46. *Agric. Biol. Chem.*, **45**, 2289(1981).
3. Yoshimoto, T. and Tsuru: Studies on bacteriolytic enzyme II, Purification and some properties of two types of staphylolytic enzymes from *Streptomyces griseus*. *J. Biochem.*, **72**, 379(1972).
4. Petit, J. F., Munoz, E. and Ghuysen, J. M.: Peptide cross-links in bacterial cell wall peptidoglycans studied with specific endopeptidases from *Streptomyces albus G. Biochem.*, **5**, 2764(1966).
5. Morita, T., Hara, S. and Matsushima, Y.: Purification and characterization of lysozyme produced by *Streptomyces erythraeus*. *J. Biochem.*, **83**, 893(1978).
6. Wadstrom, T. and Hisatsune, K.: Bacteriolytic enzyme from *Staphyloccus aureus* purification of an endo-β-N-acetyl-glucosaminidase. *Biochem. J.*, **120**, 725(1970).
7. Tsujisaka, Y., Tominaga, Y. and Iwai, M.: Taxonomic characters and culture conditions of a bacterium which produces a lytic enzyme on *Rhizopus cell wall. Agr. Biol. chem.*, **37**, 2517(1973).
8. Sudo, S. and Dworkin, M.: Bacteriolytic enzymes produced by *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.*, **110**, 236(1972).
9. Sawada, H., Azegami, M. and Ishii, S.: Lytic enzyme produced by *Pseudomonas aeruginosa* concomitantly with bacteriophage PS 17. Purification, characterization, and comparison with PR 1-lysozyme. *J. Biochem.*, **89**, 275(1981).
10. Watanabe, H. and Sato, T.: Properties and lytic Action of the P2-2 enzyme capable of lysing cells of *Micrococcus radiodurans. Agric. Biol. chem.*, **45**, 1215(1981).
11. Felch, J. W., Inagami, T. and Hash, J. H.: The N, O-Diacetyl-muramidase of *Chalaropsis species*. *J. Biol. Chem.*, **250**, 3713(1975).
12. 菅原 庸: 海洋環境に おける 溶菌酵素 生産菌. 化學と 生物, **28**, 771(1992).
13. 赤司 景: サラミソ-セジの 保存性に 對する 卵白 リゾチ-ムの 效果. 日畜會報, **41**, 143(1970).
14. Nakamura, S., Kato, A. and Kobayashi, K.: Novel bifunctional lysozyme-dextran conjugate that acts on both gram-negative and gram-positive bacteria. *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 3057(1990).
15. Kato, A., Sasaki, Y. Furuka, R. and Kobayashi, K.: 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(1990).
16. Sugahara, I., Berger, L. R., Kimura, T. and Hayashi, K.: Effect of Temperature and pressure on the lytic and autolytic activities of *Bacillus* sp. V37 isolated from coastal regions. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **54**, 861(1988).
17. Sugahara, I., Hayashi, K., Kimura, T., Toyoda, H., Matsuoka, A. and Yamanaka, S.: Effect of NaCl on the production of lytic enzyme by a bacterium isolated from coastal waters, *Bull. Fac. Jap. Soc. Sci. Fish.*, **50**, 1051(1984).
18. Sakamato, S. and Shuzue, K.: Studies on the enzyme produced by microorganisms and their utilization. XII, The production of protease and amylase in the genus *Streptomyces*. *J. Ferment. Technol.*, **35**, 381(1957).