

*Halobacterium halobium*의 생육 조건 및 Protease에 관한 연구

민 윤 식

충주산업대학교 식품공학과

A Study on Growth Condition and Proteolytic Enzyme of *Halobacterium halobium*

Yun-Sik Min

Dept. of Food Engineering, Chungju National University, Chungju 383-879, Korea

Abstract

In salt-preserved foods of every kind, it was examined the growth condition of halophilic bacteria that induced a change of colour, taste, nutritive substance, a production condition of enzyme and a character of crude enzyme. Used bacteria is *H. halobium* a kind of extremely halophilic bacteria, and the required of optimum culture needed a quite long time of crude enzyme production is 168 hours. Optimum pH is about 7~7.5, so the traditional food of such neutrality pH as soybean paste and soy sauce particularly come into trouble because the growth can flourish in neutrality or alkalescence, and the crude enzyme also appeared the best activation between pH 6 and pH 8. The optimum temperature is about 37° C, the optimum temperature of enzyme is about 40° C and the temperature stability is settled for 15 minutes and it is completely inactivated at 10 minutes. In the influence of each metal ion, Fe⁺⁺ and Mn⁺⁺ stimulated the growth of *H. halobium* and the activation of enzyme, Cu⁺⁺ and Zn⁺⁺ were identified that made the growth and the activation of enzyme inhibit.

Key words : halophilic bacteria, *halobacterium halobium*, growth condition, proteolytic enzyme

서 론

호염성 세균은 일반적으로 그 생육과 세포의 생화학적 안정성에 필수적으로 NaCl을 요구하는 세균을 말하며 이것은 비호염균과 뚜렷한 생육상의 차이로 나타나 있다¹⁾. NaCl은 각종 호염균이 생산하는 효소에서역시 활성제 또는 부활제로 작용하고 있다. 이 외에도 호염균 생육 및 효소 생산의 활성 증가성분으로 Sehgal과 Gibbons²⁾는 Fe⁺⁺, Mn⁺⁺의 적정량 첨가는 호염균의 생육과 효소 활성촉진에 효과가 있다고 보고하였고 Gochhauer와 Kushner³⁾는 K⁺과 Cyanocobalamine(B₁₂), thiamine, folic acid, biotin 등 vitamin mixture의 적정량 첨가 역시 이들에 효과가 있다고 보고하였다.

이러한 호염성 세균은 NaCl 요구량에 따라 대략 3~4 종류^{4~6)}로 분류하는데 고도 호염균은 NaCl 농도가 15~30%에서 생존이 가능한 균을 말하였다. 이들 호염균의 분포는 대부분 다소의 염이 함유되어 있는 곳에서 찾아 볼 수 있는데 특히 미국의 대염호(The great salt lake)나

Israrel의 사해(Dead sea) 등의 고염도의 NaCl 이 함유된 곳에서도 생육한다는 보고⁵⁾가 있으며 식품중에서 염장된 생선류에 번식하여 변색 또는 변패의 주요인이 되며^{7,8)} 각종 젓갈류⁹⁾와 된장 간장 고추장의 장류와 같은 우리의 식생활에 밀접한 식품 중에 생존하여 정미성과 저장성, 색, 영양가 등에 영향을 미친다^{10,11)}. 이러한 호염성 세균이 생산하는 효소는 약 20여종에 이르며 이러한 각종 효소 또한 염장식품의 품질에 관여한다는 보고가 있다²⁾. 이들 효소는 그 기질 특이성으로 인하여 각종 염의 존재에 따라 그 활성이 저하하든가 또는 불가역적으로 실활한다고 한다^{12,13)}. 이러한 기질 특이성 때문에 효소 정제 과정에 많은 어려움이 있으나 Kato 등¹⁴⁾과 Holmes와 Halvorson¹⁵⁾, Hiroshi와 Hidaku¹⁶⁾, Masahiro와 Onishi¹⁷⁾, Holmes와 Halvorson¹⁸⁾의 효소 정제에 대한 보고가 있다. 염장 식품의 주요성분인 단백질 분해 효소에 관한 보고로는 Norberg와 Hofsten¹⁹⁾의 고도 호염균인 *Halobacterium salinarium*이 분비하는 단백질 분해균 정제에 대한 것과 Masahiro와 Onishi¹⁷⁾ 및

Holmes와 Halvorson¹⁶⁾의 효소 정제에 대한 보고가 있다. 염장식품의 주요 성분인 단백질 분해 효소에 관한 보고로는 Norberg와 Hofsten¹⁹⁾의 고도 호염균인 *Halobacterium salinarum* sp.에서의 단백질 분해 효소의 NaCl과 KCl의 농도에 의한 비교 활성 측정과 Masahiro와 Onrshi¹⁷⁾과 Masahiro와 Onishi²⁰⁾의 중도 호염균 *Bacillus* sp.에서의 단백질 분해 효소 활성 측정 보고가 있으며 Kato 등²¹⁾의 해양 세균으로부터 단백질 분해 효소 생산에 관한 연구와 Joseph 등²²⁾에 의한 해양세균 *Aeromonas proteolytica*. sp. N의 일반적 특성과 단백질 분해 효소의 생산과 염도에 의한 활성 측정을 검사 보고하였다. 이²³⁾는 조기, 조개, 오징어, 굴 젓갈에 있어서 호염성 세균을 분리하고 분리된 단백질 분해 활성을 측정하여 염장식품의 숙성에 미치는 효소의 영향을 검토 하였고 Annoymous²⁴⁾는 멸치, 젓갈숙성 중에 단백질 분해 효소의 작용을 비교 실험한 보고가 있다. 본 연구에서는 이러한 특이한 성질을 가지는 호염세균중 고도 호염균의 일종에 속하는 *Halobacterium halobium* (*H. halobium*)을 사용하여 생육 특성을 검토하였고 염장 식품중 단백질의 변화는 식품의 정미성분, 저장성, 영양가, 숙성 등에 큰 영향을 미치게 되므로 호염균이 생산하는 단백질 분해 효소의 역할의 중요성에 착안하여 NaCl 존재하에서의 protease의 생산 조건 및 조효소의 일반적인 성질을 검사하여 그 결과를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

사용균주 및 배지

본 연구에 사용된 균주는 고도 호염균의 일종인 *H. halobium*으로 동경대학 농에화학교실에서 분양받아 사용하였고 배지는 Norberg와 Hofsten¹⁹⁾의 것을 사용하였다.

전배양 및 본배양

L자형 시험관에 배지를 10ml 분주하여 15Lb에서 10분간 가압 살균하여 균주를 1 백금니씩 접종하고 37°C에서 3일간 진탕(100stroke/min) 배양하였고 본 배양은 250ml의 shaking flask에 배지를 50ml씩 분주하고 전 배양액 0.2ml를 추가하여 전기와 동일한 방법으로 배양하였다. 단 배양시간에 관한 실험이외에는 168시간 배양하였다.

균의 생육도 측정

본 배양용 배지에 전 배양액 0.2ml를 추가한 것을

blank로 하여 액체 배양액중의 균체의 탁도를 Spectrophotometer (Shimadzu-dv-180) 660mm에서 측정하여 O.D로 표시하였다.

균의 생육조건

균의 생육 조건을 조사하기 위하여 24~168hr 배양하면서 배양시간에 따른 균의 생육도를 측정하였으며 배지의 초기 pH, 배양온도, 금속ion의 영향을 조사하였다.

조효소액의 조제

본 배양된 배양액을 10,000rpm으로 10분간 냉동원심분리 (Hitachi-55p-72)하여 그 상정액을 조효소액으로 사용하였다.

Protease 역가 측정

Norberg와 Hofsten¹⁹⁾의 방법에 의해 측정하였다. 즉 15%의 NaCl이 함유된 0.1M tris buffer를 HCl로 pH 8로 조정하고 여기에 casein을 1% 농도로 용해한 기질 1ml와 25%의 NaCl이 함유된 효소용액 1ml를 37°C에서 60분간 반응시킨 후 5% TCA 3ml를 첨가하여 효소 반응을 정지시킨 후 여과하여 UV-spectrophotometer (Shimadzu-dv-180) 280mm에서 여액 O.D를 측정하여 relative activity로 표시하였다. 그리고 효소 단위는 상기 조건하에서 1분간에 1μg의 tyrosine을 생성하는 효소의 양을 1unit로 하였다.

효소의 생산

공시 균주의 최적 배양조건으로 배양시간에 의한 효소활성의 변화를 조사하기 위하여 24~168시간 까지 배양시간을 달리하여 배양하였다. 효소 생산에 미치는 각종 금속 ion의 영향을 조사하기 위하여 Fe⁺⁺(10~50 ppm), Mn⁺⁺(0.05~2ppm), Cu⁺⁺(5~100ppm), Zn⁺⁺(0.05~2ppm)을 기본 배지에 첨가하여 그 영향을 검토하였다.

조효소의 일반적 성질

본 효소에 대한 pH의 영향, pH 안정성, 온도의 영향, 온도 안정성을 검토하였다.

결과 및 고찰

균의 생육조건

배양시간의 영향

기본 배지를 사용하여 배양시간별로 균의 생육도를

측정한 결과는 Fig. 1과 같이 37°C에서 144시간 배양시에 최고에 달하였으며 그 이후에는 더 이상의 생육을 보이지 않았다. Gochnauer와 Kushner¹¹ 및 Sehgal와 Gibbons¹²의 complex medium과 Onishi 등¹³의 synthetic medium에 K⁺, glycerol, vitamin을 첨가하여 고도 호염균의 일종인 *H. cutirubrum*, *H. salinarium* 등을 배양하여 최고 생육시간을 조사하여 대략 144시간이라 보고하였고 Sehgal와 Gibbons¹²은 complex medium에 각종 금속 ion을 첨가하여 고도 호염균인 *H. cutirubrum*을 배양하였을 때 최고 생육 시간을 140시간이라 보고하였다. 본 균주도 이러한 결과와 거의 유사한 경향을 보였으나 약간의 상이한 결과는 균종의 차이와 배지 조성의 차이 등에 기인한 것이라 생각하며 비호염성 세균의 최고 생육시간과 비교하여 보면 상당히 긴 배양시간을 나타낸다.

pH의 영향

기본 배지의 초기 pH를 2~11 까지로 조절하여 배양

한 결과는 Fig. 2와 같이 pH 7.5에서 최고의 생육도를 나타내었으며 pH 5 이하의 산성이나 pH 10 이상의 알칼리성에서는 심한 생육 저해 현상을 보였다. 대부분의 열장식품의 pH가 미산성~중성인데 비해 본 균류의 최대 생육 pH는 중성~미알칼리성이었다.

배양온도의 영향

배양온도를 10~70°C 까지 조정하여 배양한 결과는 Fig. 3과 같이 37°C에서 최고의 생육을 나타내었고 50°C 부근에서 상당한 생육저해 현상을 나타내어 60°C에서는 거의 생육이 정지되었고 20°C 이하에서도 생육이 현저하게 저하되어 10°C에서는 완전히 생육이 억제되었다. 호염성 세균의 온도에 의한 생육 영향에 관한 연구를 보면 Christian와 Phil은 고도 호염성 세균은 37~45°C 사이에서 가장 왕성하게 생육 된다고 보고하였고 Gibbons와 Payne¹⁰은 호기적 배양시 30~55°C에서 고도 호염균의 생육에 관하여 보고하였다.

본 균주에서는 약간의 차이가 인정되나 이러한 보고

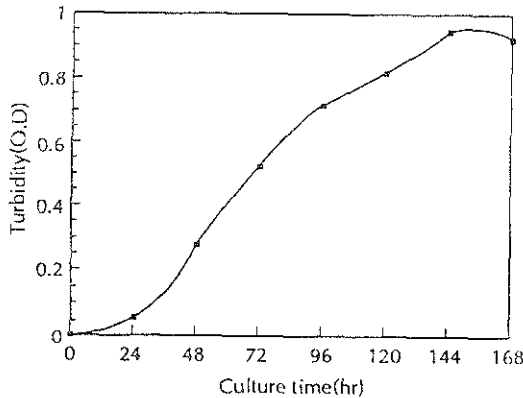


Fig. 1. Effects of culture time on the growth.

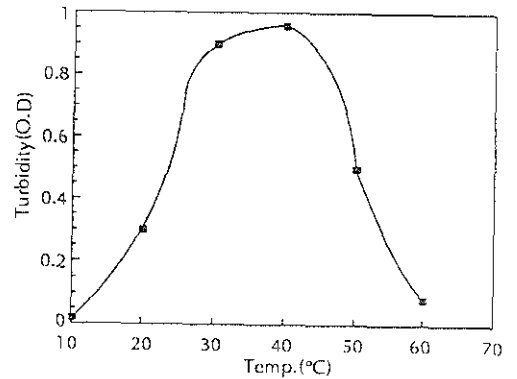


Fig. 3. Effects of temperature on the growth.

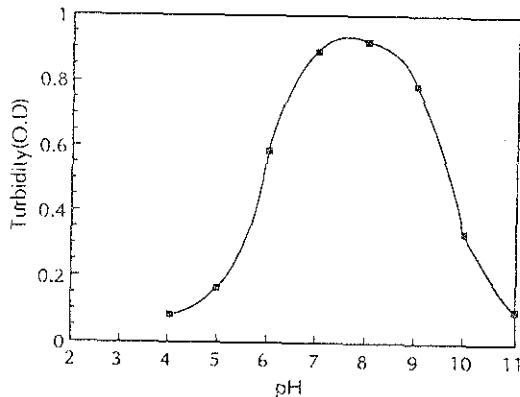


Fig. 2. Effects of pH on the growth.

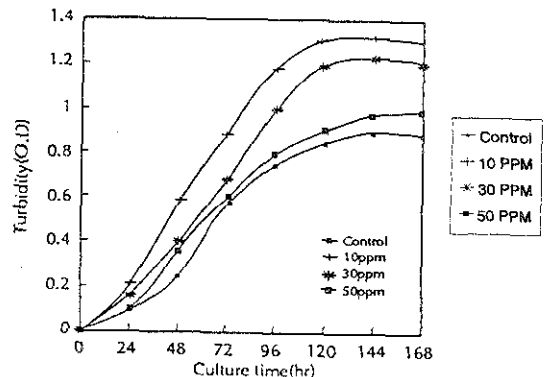


Fig. 4. Effects of Fe⁺⁺ added on the growth.

와 대략 일치하고 있다.

금속ion의 영향

Fe^{++} ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 10~50ppm), Mn^{++} ($MnSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.05~2ppm), Cu^{++} ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 5~100ppm), Zn^{++} ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.05~2ppm) 등의 2가 금속 ion을 소정 농도 별로 기본 배지에 첨가하여 배양한 결과는 Fig. 4~7과 같다. 전배양기간을 통해서 Fig. 4에서는 Fe^{++} 10ppm 첨가시 대조구와 비교해 일정한 생육의 증가를 나타냈고 30ppm 첨가시에도 상당한 효과가 인정되었으나 50 ppm 첨가시에는 다소 미약한 효과만을 나타냈다. 전반적으로 Fe^{++} 의 첨가는 다소의 생육증가의 효과가 인정되어 호염균의 생육을 촉진시키는 성분으로 생각된다. Sehgal와 Gibbons²⁾은 *H. cutirubrum*에 Fe^{++} 50ppm 첨가시 가장 생육증가의 효과를 보였고 다음이 10ppm, 30ppm의 순으로 효과가 인정되어 역시 호염균의 생육 촉진 성분으로 보고하였다. Fig. 5에서는 Mn^{++} 0.05 ppm 첨가시 대조구와 비교해 가장 우수한 생육의 증가를 나타내어 거의 Fe^{++} 10ppm 첨가시와 비슷한 생육도

를 나타내었고 0.5ppm, 1ppm의 순으로 다소의 생육증가 성분으로 인정되어 Sehgal와 Gibbons²⁾의 보고와도 역시 일치하였다. Fig. 6에서는 Cu^{++} 5ppm 첨가에서 약간의 생육증가만을 나타내었고 50ppm, 100ppm 첨가 시에는 오히려 control구와 비교하여 생육 저해 성분으로 작용하였고 Fig. 7에서는 Zn^{++} 은 전 농도에서 생육 저해성분으로 작용하였다. Sehgal와 Gibbons²⁾은 Cu^{++} 와 Zn^{++} 의 적정량 첨가시 전혀 효과가 나타나지 않는다고 보고하였으나 본 균주에서는 Cu^{++} 5ppm 첨가시에는 다소 상이한 결과를 나타내었다. 이러한 차이점은 균주, 배지, 배양조건 등의 차이에서 오는 것이라 사료된다.

효소의 생산

배양시간의 영향

공시 균주의 최적 생육 조건으로 기본 배지를 사용하여 배양시간별로 효소 활성을 측정할 결과는 Fig. 8과 같이 효소의 초기 생산은 72시간 부터 미약하게 나타나 144~168시간 배양시에 최고의 효소활성을 나타내었으며 그 이상의 배양에서는 활성 증가가 나타나지 않았으며 균의 최대 생육시간과 비교하여 효소생산도 같은 경향을 보였다. Kato 등²¹⁾은 해양세균에서 생산되는 protease의 활성은 대략 120~144시간에서 최고의 활성을 나타낸다고 하여 본 효소와 유사한 경향을 나타내었으나 Norberg와 Hofsten¹⁹⁾은 40~80시간 부근에서 최대 활성을 나타낸다고 보고하여 본 효소와 차이점이 인정되나 이것은 균주의 차이, 배양조건 등의 상이에서 기인된 것이라 생각된다.

금속이온의 영향

기본 배지에 Fe^{++} (10~50ppm), Mn^{++} (0.05~1ppm),

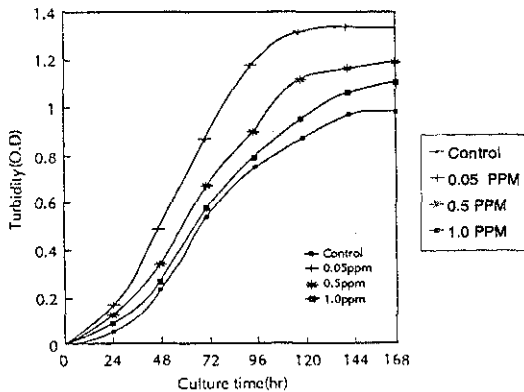


Fig. 5. Effects of Mn^{++} added on the growth.

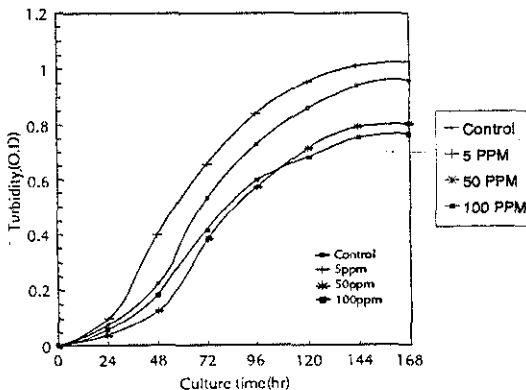


Fig. 6. Effects of Cu^{++} added on the growth.

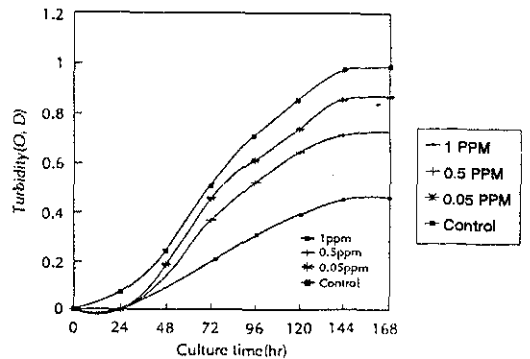


Fig. 7. Effects of Zn^{++} added on the growth.

Cu⁺⁺(5~100ppm), Zn⁺⁺(0.05~1ppm)을 각각 첨가하여 효소활성을 측정 한 결과는 Fig. 9~12와 같이 Fig. 9에서 Fe⁺⁺ 10ppm, Fig. 10에서 Mn⁺⁺ 0.05ppm의 첨가시 가장 뚜렷한 효소활성의 증가가 인정 되었으며 Fe⁺⁺ 30ppm (O.D, 0.6), 50ppm (O.D, 0.58)순으로 역시 미약하나마 효소활성의 효과를 나타냈다. Fig. 11의 Cu⁺⁺와 Fig. 12의 Zn⁺⁺은 전 농도에서 대조구와 비교해 효소활성을

저하시켜 효소활성의 저해 성분으로 인정되었다.

조효소의 특성

효소활성에 미치는 pH의 영향

최적 pH를 검사하기 위하여 NaCl 15%가 함유된 0.1M tris buffer (pH 8), acetate buffer (pH 3~5) tris-maleic acid buffer (pH 6~7), palitzsch borate buffer (pH 9)와 borate-NaOH buffer (pH 10~11)를 사용하여 기질 용액의 pH를 조절하고 활성을 측정 한 결과는 Fig. 13과 같이 효소활성의 최적 pH는 7.5이었다. 고도 호염균 protease에 관한 최적 pH를 보면 Norberg와 Hofsten¹⁹⁾의 *H. Salinarium*에서 생산되는 protease의 최적 pH는 8 부근 이라 보고하였고 Kato 등¹⁸⁾은 해양세균에서 생산되는 protease의 최적 pH를 검토한 결과 pH 7.5~8이라 보고 하였는데 본 효소와 거의 유사한 경향을 나타내었다.

효소 안정성에 미치는 pH의 영향

효소액에 소정 pH의 완충액을 동량 넣고 30°C에서 24시간 방치 후 0.1M tris-buffer로 pH를 7.5로 조정하고

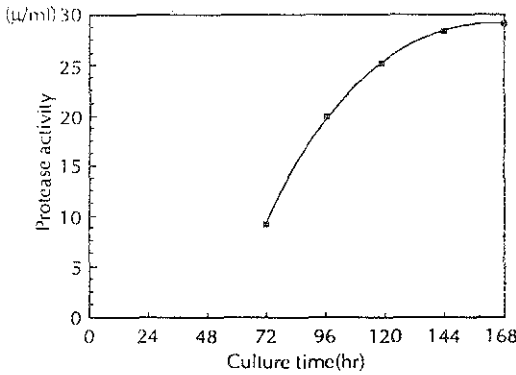


Fig. 8. Effects of culture time on the protease production.

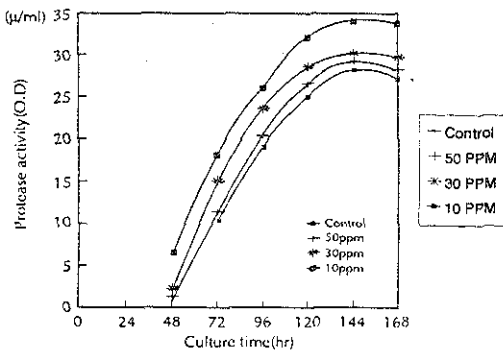


Fig. 9. Effects of Fe⁺⁺ added on the protease production.

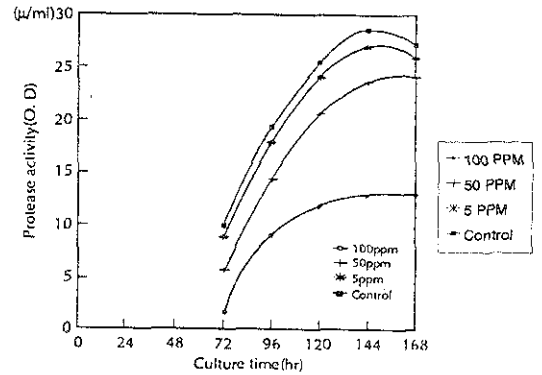


Fig. 11. Effects of C⁺⁺ added on the protease production.

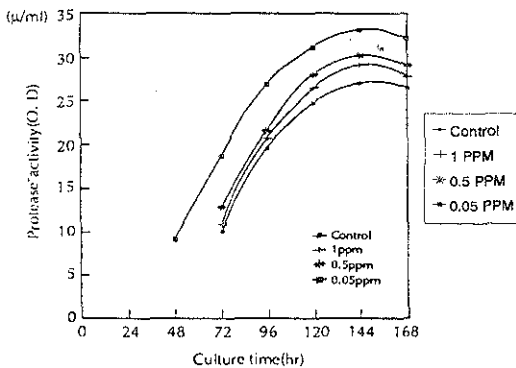


Fig. 10. Effects of Mn⁺⁺ added on the protease production.

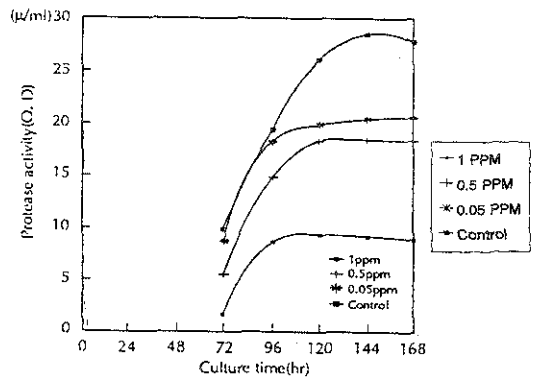


Fig. 12. Effects of Zn⁺⁺ added on the protease production.

효소의 잔존활성을 측정한 결과는 Fig. 14와 같이 본 효소는 pH 6~8에서 안정하였다. Kato 등¹⁴⁾은 해양 세균으로부터 생산되는 protease는 pH 6~10에서 안정하다고 하였는데 본 효소와는 약간 상이한 결과로 인정되었다.

효소활성에 미치는 온도의 영향

기질의 pH를 7.5로 조정하고 10~60°C에서 효소활성을 측정한 결과는 Fig. 15와 같이 최적온도가 40°C이었다. 호염성 세균이 생산하는 protease의 최적 온도에 관한 연구를 보면 Kato 등²¹⁾은 해양세균에 생산되는 protease는 5~10°C, Kato 등¹⁴⁾의 정제된 해양세균 *Pseudomonas* sp. No. 548에서는 40°C로 보고 하였는데 본 효소도 *Pseudomonas* sp. No. 548과 같은 경향을 나타냈다.

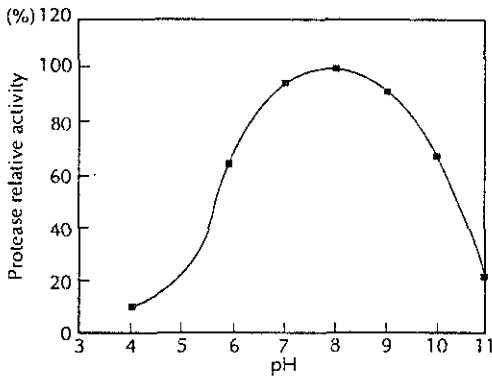


Fig. 13. Effects of pH on the protease activity.
Acetate buffer (pH 3~5)
Tris-maleic acid buffer (pH 6~7)
Tris-buffer (pH 8)
Palitzsch borate buffer (pH 9)
Borate-NaOH buffer (pH 10~11)

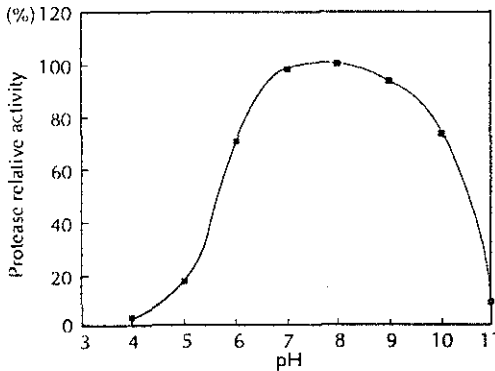


Fig. 14. pH stability on the protease activity.

효소의 안정성에 미치는 온도의 영향

효소액을 소정 온도에서 5~10분간 유지한 후 잔존활성을 측정한 결과는 Fig. 16과 같이 40°C에서는 15분 후에도 대체로 안정하였고 50°C에서는 10분 이후 급격히 실활을 나타내었으며 60°C에서는 5분에서 부터 활성이 급격히 저하되어 10분에서는 완전히 실활되었다. Kato 등¹⁴⁾은 정제된 해양세균이 생산하는 protease는 대략 40°C에서 급격히 실활하여 60~70°C에서 완전 실활한다고 하였는데 본 효소와는 상이한 결과를 보고하였는데 이것은 균주의 차이에서 오는 특성이라 사료된다.

요 약

각종 염장식품에서 색, 맛, 영양성분의 변화 등을 유발하는 호염성 세균의 생육조건과 효소의 생육조건 및 조효소의 특성을 검토하였다. 사용한 균주는 고도 호염균의 일종인 *H. halobium*으로서 최적 배양에 소요되는 시간은 144시간으로 비호염성균과 비교하여 상당히 긴 시간이 요구되었고 조효소 생산의 최적 시간은 168

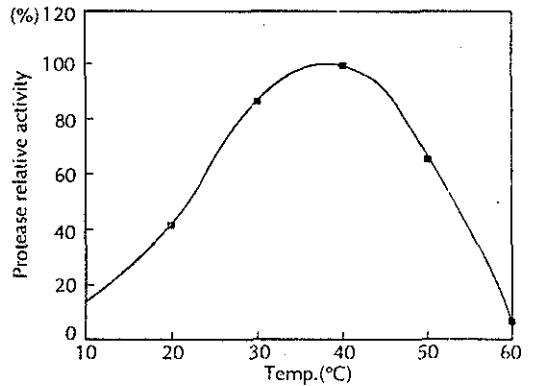


Fig. 15. Effects of temperature on the protease activity.

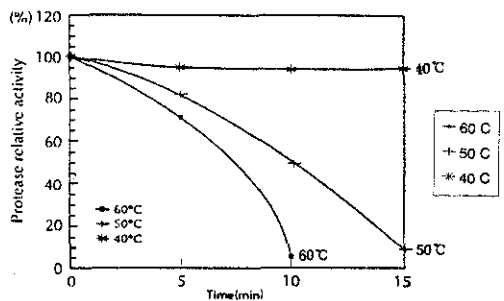


Fig. 16. Thermal stability on the protease activity.

시간이었다. 생육 최적 pH는 7~7.5로 중성대지는 약알카리성에서 왕성한 생육을 할 수 있어 된장, 간장 등의 중성 pH의 전통식품에서 특히 문제가 예상되며 효소역시 pH 7.5에서 최고 활성을 나타내었으며 pH의 안정성은 pH 6~8 사이였다. 생육 최적 온도는 37°C 부근이며 또한 효소의 최적 온도는 40°C이고 온도 안정성은 40°C에서 15분간 안정하였고 60°C에서는 10분에 완전히 실활되었다. 각종 금속 이온의 영향에서는 Fe^{++} , Mn^{++} 은 균의 생육과 효소 활성을 촉진시키고 Cu^{++} , Zn^{++} 은 생육 및 효소활성을 저해시키는 것으로 확인되었다.

문 헌

1. Albert, L. and Lehninger, L. : Principles of biochemistry. Worth publishers, INC, New York, p.674 (1982)
2. Sehgal, S. N. and Gibbons, N. E. : Effect of some metal ions on the growth of *Halobacterium Salinarium*. *Can. J. Microbiol.*, **6**, 165 (1976)
3. Gochnauer, M. B. and Kushner, D. J. : Effect of some vitamins in the growth of halobacteria. *Can. J. Microbiol.*, **15**, 1157 (1969)
4. Gibbons, N. E. : Method in microbial. Academic press, New York., Vol. 7, p.169 (1978)
5. 龜倉正博 : 蛋白質分解酵素. 敗, 野田産業科學研究所, **278**, 35 (1980)
6. Lasen, H. : The bacteria. Academic press, INC, New York, p.115 (1962)
7. Kushner, H. D. J. : Halophilic bacteria. Department of Biology University of Ottawa, Ontario, Canada, p.73 (1972)
8. Gonzaltz, C. and Gutierrez, C. : Presence of lipase among species of extremely halophilic bacteria. *Can. J. Microbiol.*, **6**, 1165 (1970)
9. 이종갑, 최위경 : 멸치 젓갈 숙성에 따른 미생물의 변화에 대하여. 한국수산학회지, **7**, 105 (1970)
10. 차원섭 : 된장의 변질 방지에 관한 연구. 산업미생물학회지, **6**, 81 (1977)
11. 鏡容武平 : “鹽率中のどろじご”. 日本水産學會誌, **12**, 280 (1955)
12. Gibbons, N. E. : In the microbiology of fish and meat curing brines. B, P, eddy proc and interm symp. *Food Microbiology.*, H. M. Sait office London, p.69 (1953)
13. Hoimes, P. K., Dundas, I. D. and Halvorson, H. O. : Halophilic enzymes in cell free extracts of *Halobacterium Salinarium*. *J. Bacteriol.*, **90**, 1159 (1965)
14. Nobuo, K., Toru, N., Shoji, A. and Yashiki, K. : Purification and properties of protease from a marine psychrophilic. *J. Microbiol.*, **17**, 1185 (1972)
15. Holmes, P. K. and Halvorson, H. O. : Purification of a salt requiring enzymes from an obligately halophilic bacterium. *J. Bacteriology*, **21**, 312 (1965)
16. Hiroshi, O. and Osamu, H. : Purification and properties of amylase produced by a moderately halophilic *actinetobacter sp.* *Canadian. J. Microbiol.*, **24**, 1017 (1978)
17. Masahiro, K. and Hirosh, O. : Properties of the halophilic nuclease of a moderates *halophilic micrococcus varians subsp halophilus*. *J. Bacteriology.*, **20**, 59 (1978)
18. Holmes, P. K. and Orin, H. : Properties of a purified halophilic malic dehydrogenase. *J. Bacteriol.*, **90**, 316 (1965)
19. Norberg, P. and Hofsten, B. V. : Proteolytic enzymes from extremely halophilic bacteria. *J. Gen. Microbiol.*, **55**, 251 (1969)
20. Masahiro, K. and Hiroshi, O. : Protease formation by a moderately halophilic *Bacillus* strain. *Applied Microbiol.*, **6**, 809 (1974)
21. Nobuo, K., Toru, N., Yoshiki, T. and Koichi, O. : Protease formation by a marine psychrophilic bacterium. *Agr. Biochem.*, **36**, 1177 (1972)
22. Joseph, R., Markel, E., Traganza, B., Mukherjee, B. and Prescott, J. M. : Proteolytic acting and general characteristics of a marine bacterium *aeromonas pretcoltica, sp. N. J. Bacteriol.*, **87**, 1227 (1964)
23. 이계호 : 젓갈등숙의 풍미성분에 관한 미생물학적 및 효소화학적 연구. 한국농화학회지, **11**, 1 (1969)
24. Anonymous : The ripening process of anchovy. *Sweden. Sik. Report.*, **71**, 116 (1972)
25. Onish, H., Mccance, M. E. and Gibbons, N. E. : A synthetic medium for extremely halophilic bacteria. *Can. J. Microbiol.*, **11**, 365 (1952)
26. Gibbons, N. E. and Payne, J. I. : The growth of halophilic bacteria. *Can. J. Microbiol.*, **7**, 483 (1961)

(1994년 8월 4일 접수)