

카라기난 분해효소 생산균의 분리, 동정 및 효소생산 최적 조건

양승택¹ · 주동식 · 박중제 · 이정석 · 김명식¹ · 이응호*

¹부경대학교 식품공학과, ¹경성대학교 식품공학과

Isolation and Identification of Carrageenan Degrading Bacteria and Optimization of Enzyme Production. Sung-Tack Yang¹, Dong-Sik Joo, Jung-Je Park, Jung-Suck Lee, Myung-Sik Kim¹ and Eung-Ho Lee*

¹Department of Food Science & Technology, National Pukyong University, Pusan 608-737, ¹Department of Food Science & Technology, Kyungsoong University, Pusan 608-736, Korea - The 80 strains which produce carrageenan degrading enzyme were isolated from soils, mud, seaweed, marine mollusc and echinodermata samples. Among them, one isolated strain, which showed the highest activity to produce carrageenan degrading enzyme, was used for this study. The isolated strain was identified as *Pseudomonas alcaligenes* through its morphological, biochemical, and physiological characteristics. The best conditions for enzyme production were 0.7% nutrient broth and 0.2% carrageenan as nitrogen and carbon source, respectively. The optimal pH, NaCl, temperature and culture time for carrageenan degrading enzyme were 7.0, 1.5%, 30* and 96hrs, respectively.

최근 당질의 생체내 기능이 새롭게 재조명되면서 식품 또는 의학분야에서 당질에 대한 관심이 고조되고 있는데, 그 중에서 주목을 받고 있는 것이 황산기 함유 당질이다. 지금까지 알려져 있는 대개의 황산기 함유 당질은 천연 물질에서 추출하여 얻고 있으나, 최근에는 황산기를 특정 당 잔기에 인위적으로 붙여서 특정 기능을 유도하는 합성 함황당류를 만들수도 있는 것으로 알려지고 있다(1).

카라기난은 홍조류중 돌가사리목에 속하는 많은 종류의 해조류에서 생산되는 대표적인 해조 다당류로서 황산기를 다량 함유하고 있는 당질로서, 그 물성적 특성으로 인해 겔화제, 증점제 등 주로 식품 첨가물로 이용되어 왔다. 이러한 카라기난은 가락토스에 황산기가 결합한 구조이고, 황산기의 결합위치에 따라 κ -, λ -, ι -카라기난 등으로 분류하며, 각각 다른 물성을 지니고 있으며, 목적에 따라 달리 이용되고 있으며, 국내에서도 제조되고 있다(2-5).

한편, 최근에 주목 받고 있는 올리고당에 대한 연구는 식물 다당류를 원료로한 여러 형태의 올리고당이 연구, 생산되어 식품분야 등에서 이용되고 있으나(6,7), 해조 다당류를 원료로한 올리고당의 연구는 국외에서 한천과 알긴산에 대해 보고된 바 있고(8-11), 함황 다당류 분해에 대한 연구는 fucoidan 분해균에 대한 보고가 있다(12,13). 그러나 국내에서는 해조 다당류를 이용한 올리고당 제조에 대한 연구는 거의 없는 실정이고, 최근에 알긴산을 이용한 올리고당의 제조에 대한 보고가 있을 뿐이고(14-16). 카라기난에 대한 보고는 없다.

따라서 황산기를 함유하는 당질이 생리적 기능을 갖고 있다는 것이 밝혀져 있으므로 이를 토대로 카라

기난을 특징적으로 분해하는 미생물 효소를 이용하여 특정 기능을 갖는 올리고당을 생산하는데 최종 목적을 두고 본 연구를 행하였고, 그 중에서도 가장 중요한 카라기난 분해균을 분리하여 동정하였고, 이 균의 카라기난 분해 효소생산 최적조건을 규명하였기에 보고하고자 한다.

재료 및 방법

카라기난 분해균 분리원

홍조류를 포함한 해조류 8종, 고등류 6종, 조개류 6종, 극피 또는 연체동물 5종, 토양 22종, 해수 5종 등 총 47종을 수회 반복하여 채취 또는 구입하여 분리원으로 하였다.

분리 배지

카라기난 분해 균주 분리용 배지는 1.0% carrageenan, 0.1% peptone, 0.1% yeast extract, 0.5% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.0002% $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.5~2.5% NaCl, 0.1% KCl, 0.01% $CaCl_2$, 1.5% agar, pH 7.5를 고체배지로 이용하였고, 고체배지에서 분리된 균은 0.3% carrageenan, 0.0005% peptone, 0.0005% yeast extract, 0.1% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.0002% $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.5~2.5% NaCl, 0.005% $CaCl_2$, pH 7.5의 액체배지를 이용하여 카라기난 분해균을 분리하였다.

환원당 측정

환원당 측정은 Somogyi-Nelson법(17)으로 행하였다. 즉 시료용액 1 ml와 동(銅)시약 1 ml를 시험관에 각각 취하고, water bath에서 20분간 가열하여 산화제1동(Cu_2O)을 생성시킨 후 여기서 몰리브덴 용액 1 ml를 가하여 발색시킨 다음 520 nm에서 흡광도를 측정하여

*Corresponding author.

Key words: Carrageenan degrading enzyme, *Pseudomonas alcaligenes*.

표준 검량선으로부터 환원당을 정량하였다.

카라기난 분해균의 분리

카라기난 분해균의 분리는 상기의 고체배지를 멸균한 후 petri dish에서 완전히 굳힌 후, 단계별로 희석된 시료를 0.1 ml씩 취하고 conradi stick으로 도말하여 30 ± 2°C에서 5~7일간 배양하여 형성된 독립 colony를 분리하고, 다시 동일한 고체배지에서 streak culture하여 독립 colony를 분해균 활성 시험 균주로 이용하였다. 고체배지에서 분리된 균을 액체배지에 접종하여 동일한 배양조건에서 5~7일간 정치배양한 후 배양액 속의 환원당을 측정하여 카라기난 분해균을 판별하였다.

카라기난 분해 효소의 생산조건 및 활성 측정

상기 액체배지를 기본배지로 하고 탄소원, 질소원의 종류 및 농도, NaCl 농도, 배양온도, 초기 pH, 무기염 종류 및 농도, 배양시간 등을 달리하면서 96시간 배양한 후 원심분리하여(12,000×g, 10 min) 상층액을 조효소액으로 하고, 0.3% carrageenan (30 mM Tris-HCl buffer, pH 7.0, 2.0% NaCl) 4.0 ml와 조효소액 1.0 ml를 37°C 항온수조에서 60분간 반응시킨 후 그 중에서 1 ml를 취하여 Somogyi-Nelson법으로 환원당을 측정하여 효소의 최적 생산조건을 설정하였다. 이 때 각 배양조건에서의 효소활성은 환원당 값으로 나타내었다.

분리균의 동정

분리된 균주의 동정은 각종 생리, 생화학적 특성을 실험하고, 추가로 ID 32 GN 시스템을 이용하여 당의 이용성 등 생화학적 특징들을 조사하였고, 얻어진 실험 결과들을 토대로 Bergey's Manual Systematic Bacteriology(18), Gibbs와 Skinner(19)의 분류 방법에 따라 동정을 행하였다.

결과 및 고찰

Table 1. The ability of reducing sugar formation from carrageenan of the isolated strain from each samples.

Strain No.	Reducing sugar (mg/ml)	Strain No.	Reducing sugar (mg/ml)
4	0.448	145	0.348
14	0.362	158	0.427
25	0.319	163	0.345
41	0.370	166	0.381
42	0.447	189	0.309
43	0.564	197	0.440
44	0.355	199	0.333
55	0.396	224	0.331
61	0.320	240	0.438
99	0.384	253	0.331
128	0.347	255	0.321

균주의 분리

47종의 각종 분리원으로부터 260여 균이 분리되었는데, 토양과 갯벌에서 35균주, 조개류와 고둥류에서 50균주, 해조류에서 55균주, 연체 및 극피동물에서 100여 균주가 분리되었다. 이중에서도 고둥, 군부 및 해조류에서 많이 분리되었으며, 이들 대부분은 고체 평판을 함몰시키는 특성을 가지고 있었으며, 그외의 균은 옅은 clear zone을 형성하였다. 아울러 육상 토양에서는 거의 분리되지 않았고, 해양환경에서 생육하는 동식물, 해양토양에서 분리되었는데 이는 카라기난이 특이한 구조를 가진 당류로 육상식물에서는 찾아볼 수 없는 구조인 것에서 그 이유를 알 수 있다.

분리균의 카라기난 분해능

환원당 생성능으로부터 분리된 균의 카라기난 분해능을 측정한 결과, 미약한 활성을 가진 균까지 약 80여종의 균주가 카라기난을 분해하는 활성이 있는 것으로 판단되었고, 그 중에서 환원당 생성능으로 판단해 볼 때 분해 활성이 높은 것으로 생각되는 22종의 균을 Table 1에 나타내었다. Strain no. 4, 42, 43, 197 등이 환원당 생성능이 큼을 확인할 수 있고, 그 중에서도 strain no. 43 균주가 0.564 mg/ml로 가장 높은 환원당 생성능을 보였다. 그러나 점도 저하능(자료 나타내지 않았음)은 strain no. 4가 가장 높았던 것으로 나타나 초기에는 두 균주의 복합 배양을 시도하였으나, 배양 조건 등의 몇가지 문제점이 대두되어 strain no. 43 균주를 카라기난 분해 효소 생산균으로 최종 결정하였고, 이 균주의 효소생산 조건 등에 대해 계속 실험하였다. 분리된 균주의 전자현미경상의 형태를 Fig. 1에 나타내었다.

최종 분리균주의 생육조건에 따른 조효소의 활성 질소원의 종류와 농도 질소원을 달리하면서 배양한

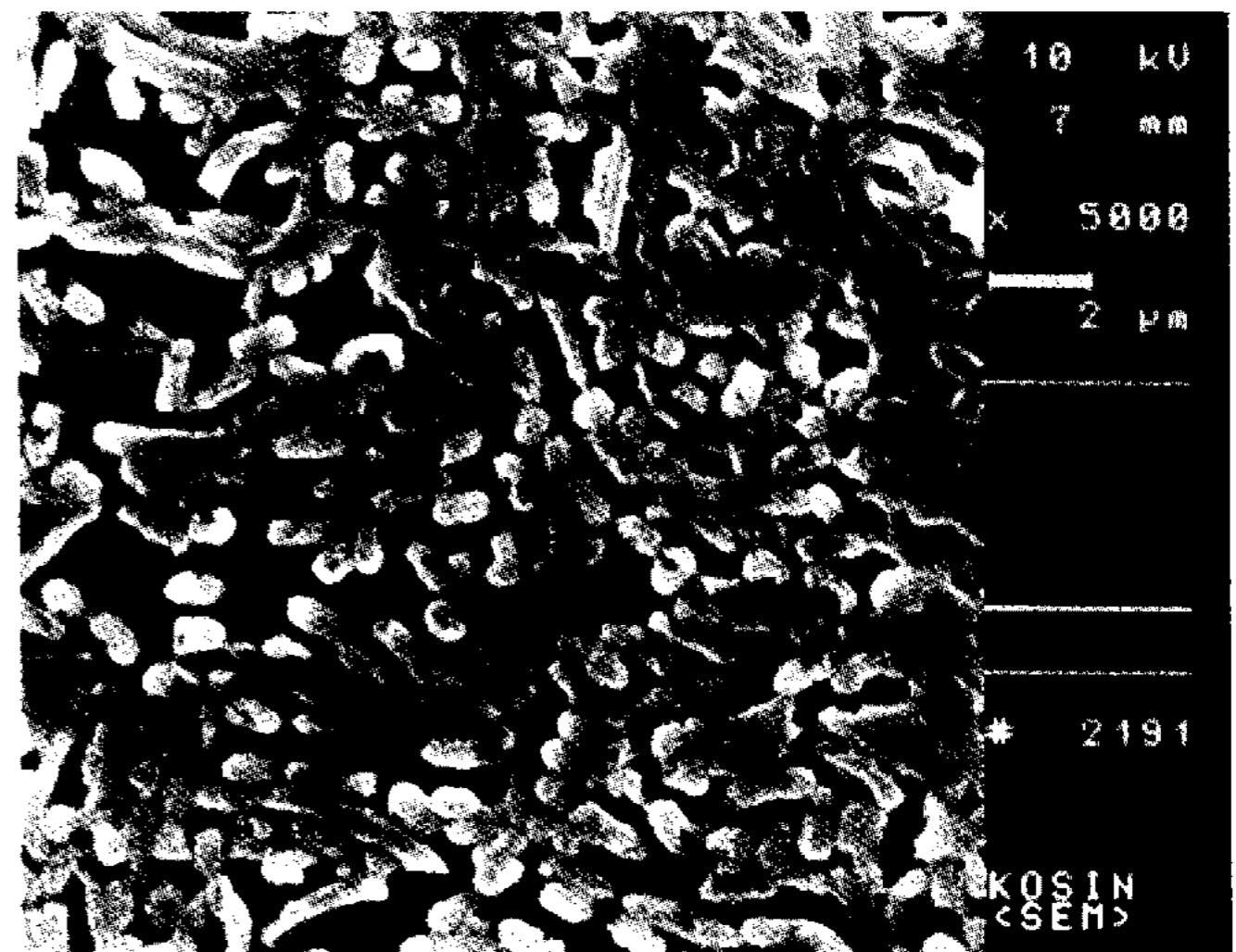


Fig. 1. Scanning electron micrograph of isolated strain C-43 grown in liquid medium at 30°C for 4 days.

후 얻어진 조효소액의 환원당 생성능을 측정한 결과 (Table 2), 무기 질소원을 사용한 배지에서는 효소활성이 전혀 나타나지 않았으며, 유기 질소원인 peptone의 경우 미생물 성장은 정상적이거나 카라기난 분해능은 전혀 나타나지 않은 것이 특징적이었고, 무기질소원인 NH_4Cl , KNO_3 도 효소 생산에 필요한 질소원이 아님이 확인되었다. 한편 1.0%의 casamino acid가 첨가되면 nutrient broth에 비해서는 낮은 활성이지만 어느 정도 활성을 나타내었다. 그러나 복합 질소원인 yeast extract나 nutrient broth를 질소원으로 한 조효소는 환원당 생성능이 높았으며, 그 중에서도 nutrient broth를 사용하여 얻어진 조효소의 환원당 생성능은 0.722 mg/ml로 가장 높은 활성을 나타내어 질소원으로는 nutrient broth를 이용하였고, nutrient broth의 농도에 따른 조효소의 분해 활성을 실험한 결과는 Table 3과 같다. 질소원의 농도 0.7%까지는 얻어진 조효소의 활성은 증가하였으나 그 이상의 농도에서는 오히려 활성이 다소 저하되는 것으로 나타나서 질소원의 농도는 0.7%로 결정하였다.

Table 2. Effect of nitrogen source on bacterial growth and the crude enzyme activity.

Nitrogen source (0.5%)	Reducing sugar (mg/ml)	Bacterial growth (620 nm O.D.)
Pepton	—	0.845
Yeast extract	0.623	1.328
Yeast extract + Pepton	0.525	1.442
Casamino acid*	0.401	1.092
Nutrient broth	0.722	1.298
NH_4Cl	—	—
$\text{NH}_4\text{Cl} + \text{KNO}_3$	—	—

*Casamino acid conc: 1.0%.

Base Medium and growth condition: 0.1% carrageenan, 1.0% NaCl, 0.5% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.0002% $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01% CaCl_2 , pH 7.5, temp. $30 \pm 2^\circ\text{C}$, incubation time 72 hr.

Table 3. Effect of nutrient broth concentration on bacterial growth and the crude enzyme activity.

Concentration (%)	Reducing sugar (mg/ml)	Bacterial growth (620 nm O.D.)
0	—	—
0.1	0.483	0.879
0.3	0.612	1.118
0.5	0.741	1.324
0.7	0.744	1.422
1.0	0.723	1.442
1.5	0.731	1.392
2.0	0.702	1.440

Base Medium and growth condition: 0.1% carrageenan, 1.0% NaCl, 0.5% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.0002% $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01% CaCl_2 , pH 7.5, temp. $30 \pm 2^\circ\text{C}$, incubation time 72 hr.

탄소원 카라기난과 NaCl의 농도

카라기난 이외에 알긴산, 한천, 전분 등의 다당류와 glucose, galactose, maltose 등의 당류를 탄소원으로 얻어진 조효소액의 카라기난 분해 활성은 거의 나타나지 않아(data not shown), 분리된 균주는 카라기난의 첨가로 효소가 생산되는 유도효소의 일종으로 판단되었다(20). 따라서 카라기난의 농도를 달리하면서 조효소액의 분해활성을 측정한 결과(Table 4), 카라기난 무첨가시에는 활성이 매우 낮음 알 수 있고, 0.2%까지는 활성이 증가되다가 그 이상의 농도에서는 조효소의 분해능이 저하됨을 알 수 있다. 실제로 0.2% 이상의 카라기난 농도에서는 균의 성장이 감소하는 것으로 보아, 카라기난이 가지는 물리적 성질로 균의 성장이 오히려 억제되는 것으로 판단되었다. 한편, NaCl 농도를 달리 하면서 균의 성장과 효소활성은 측정한 결과는 Fig. 2와 같다. NaCl이 첨가되지 않은 구간에서는 균의 성장이 제대로 되지 않음을 알 수 있는데, 이는 해양에서 생

Table 4. Effect of carrageenan concentration on bacterial growth and the crude enzyme activity.

Concentration (%)	Reducing sugar (mg/ml)	Bacterial growth (620 nm O.D.)
0	0.380	0.972
0.05	0.750	1.091
0.1	0.774	1.397
0.15	0.791	1.455
0.2	0.810	1.449
0.25	0.764	1.146
0.3	0.756	1.048

Base Medium and growth condition: 0.7% nutrient broth, 1.0% NaCl, 0.5% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.0002% $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01% CaCl_2 , pH 7.5, temp. $30 \pm 2^\circ\text{C}$, incubation time 72 hr.

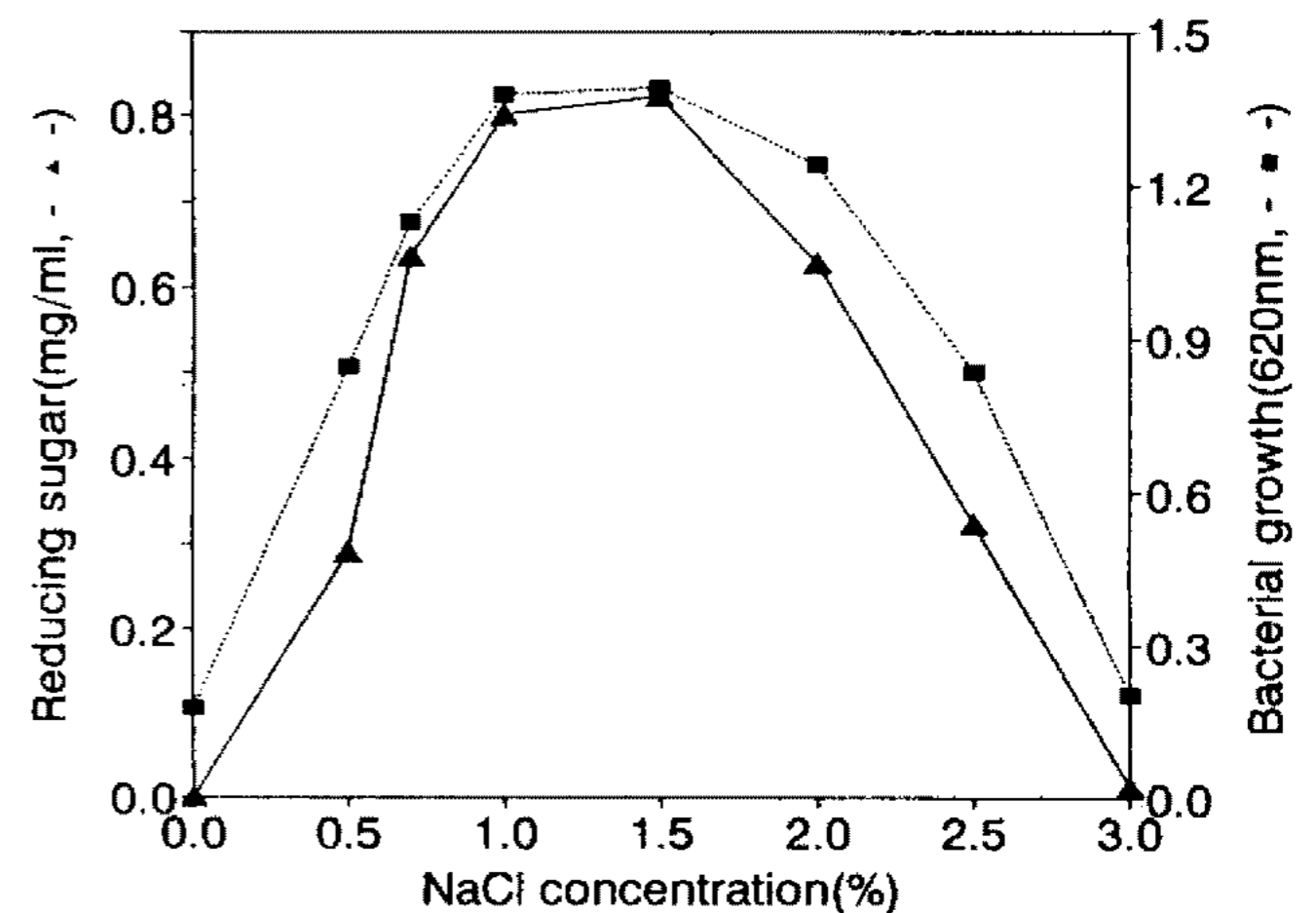


Fig. 2. Effect of NaCl concentration on bacterial growth and the crude enzyme activity.

Base Medium and growth condition: 0.7% nutrient broth 0.2% carrageenan, 0.5% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.0002% $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.01% CaCl_2 , pH 7.0, temp. $30 \pm 2^\circ\text{C}$, incubation time 72 hr.

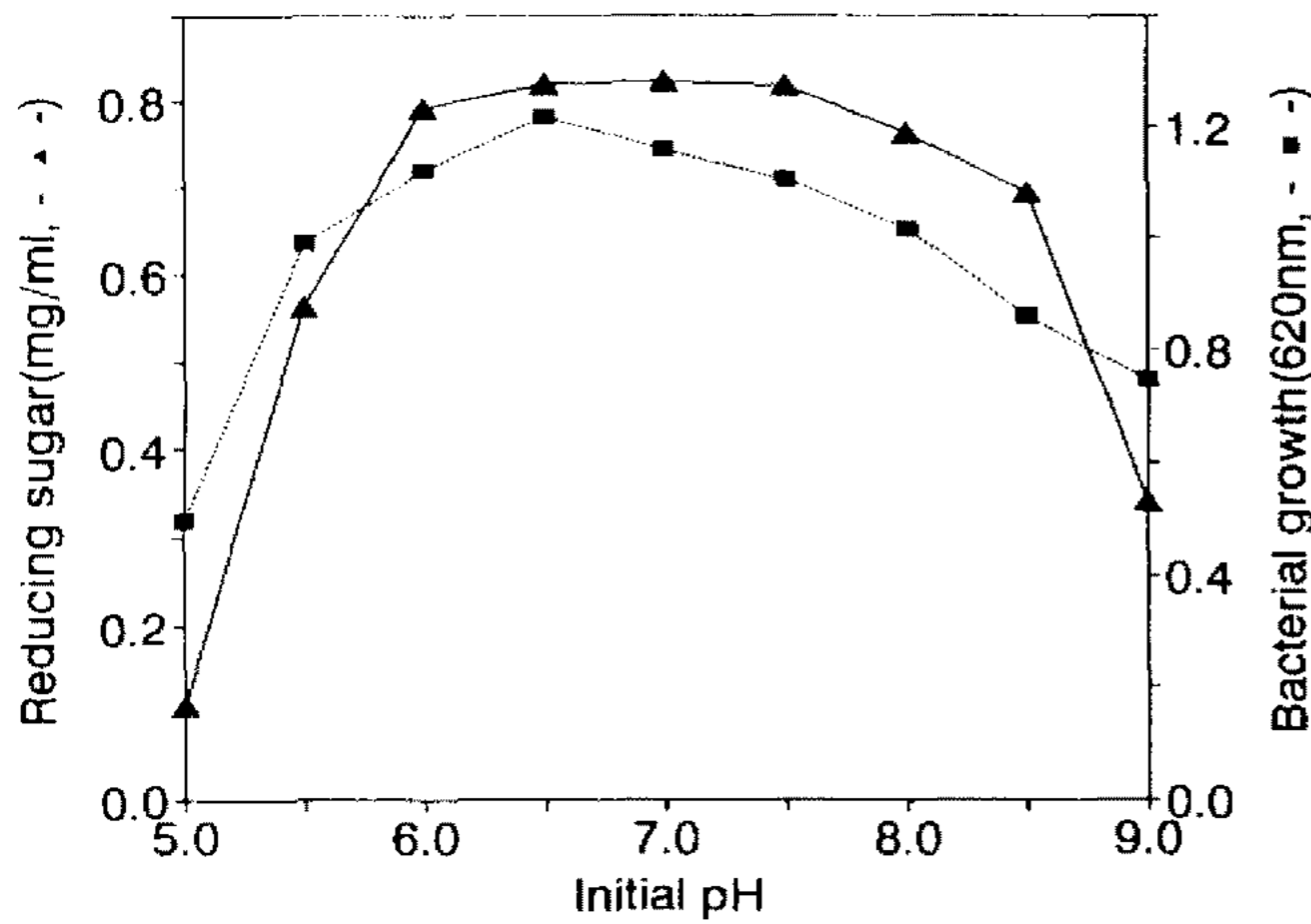


Fig. 3. Effect of pH on bacterial growth and the crude enzyme activity.

Base Medium and growth condition: 0.7% nutrient broth, 0.2% carrageenan, 1.5% NaCl, 0.5% MgSO₄·7H₂O, 0.0002% FeSO₄·7H₂O, 0.01% CaCl₂, temp. 30±2°C, incubation time 72 hr.

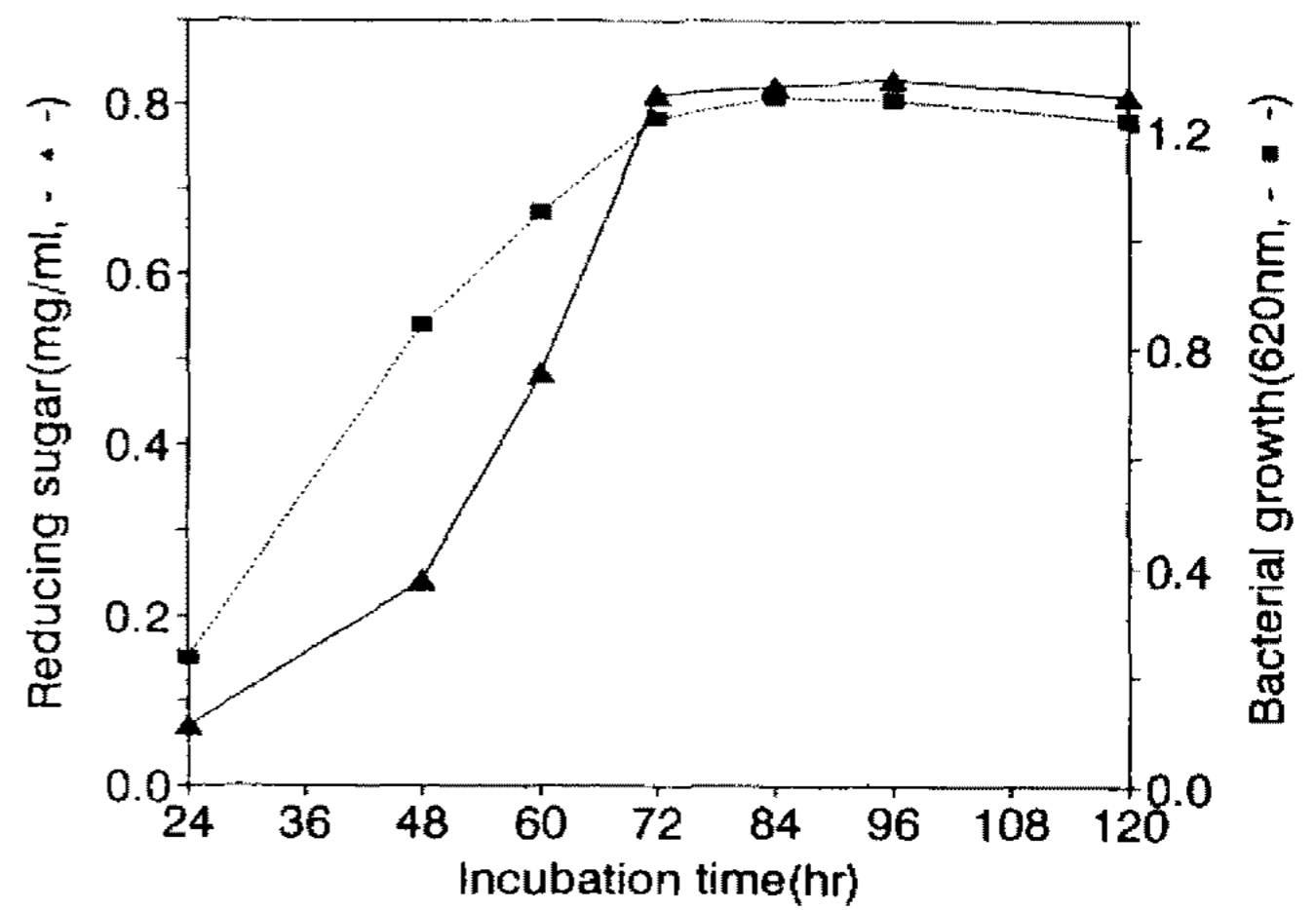


Fig. 5. Effect of incubation time on bacterial growth and the crude enzyme activity.

Base Medium and growth condition: 0.7% nutrient broth, 0.2% carrageenan, 1.5% NaCl, 0.5% MgSO₄·7H₂O, 0.0002% FeSO₄·7H₂O, 0.01% CaCl₂, pH 7.0, temp. 30±2°C.

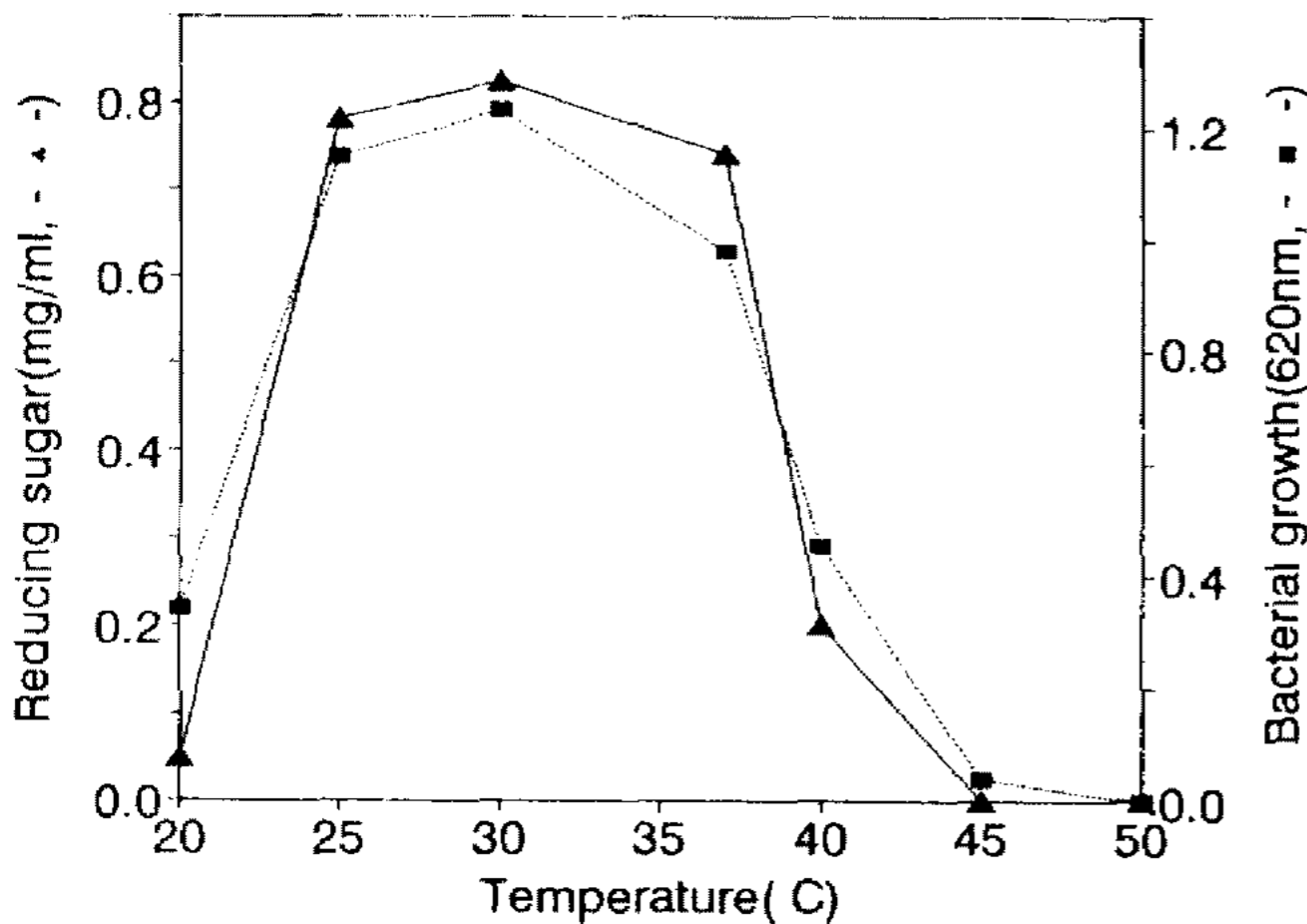


Fig. 4. Effect of temperature on bacterial growth and the crude enzyme activity.

Base Medium and growth condition: 0.7% nutrient broth, 0.2% carrageenan, 1.5% NaCl, 0.5% MgSO₄·7H₂O, 0.0002% FeSO₄·7H₂O, 0.01% CaCl₂, pH 7.0, incubation time 72 hr.

육하는 미생물의 경우 성장 및 효소 생산에 적정 농도의 1,2가 이온이 필요하다고 하였는데, 이는 미생물의 삼투 조절에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(21). NaCl 1.5%까지는 균의 성장과 활성이 높아졌고, 그 이상의 농도에서는 성장과 활성이 급격히 저하함을 확인할 수 있었고, 이 농도는 해양환경의 3.0% 농도보다는 다소 낮은 농도였다.

초기 pH, 배양온도 및 배양시간

상기의 결정된 질소원, 탄소원의 농도 및 NaCl 농도에서 pH 및 온도를 달리하면서 얻어진 조효소의 분해능은 Fig. 3과 Fig. 4에 나타내었다. pH의 경우 6.5~7.5 사이에서는 거의 비슷한 효소활성을 나타내었고,

Table 5. Physiological and biochemical characteristics of isolated strain 43.

Gram staining	-	Cell shape & color	rod, yellow
Opt. temp.	30°C	Motility	+
Oxidase	+	Catalase	+
Utilization of citrate	+	D,L-Lactate	+
Malonate	-	Acetate	+
Propionate	+	Itaconate	+
2-ketoglutarate	-	5-ketoglutarate	-
p-hydroxybenzoate	+	m-hydroxybenzoate	-
o-hydroxybutyrate	+	Salin	-
L-proline	+	Serine	+
Histidine	-	Mannitol	+
L-alanine	+	Maltose	-
Arginine	+	Ribose	-
Rhamnose	-	D-glucose	-
Sucrose	-	Fructose	-
D-sorbose	-	L-fucose	-
Melibiose	-	Mannose	-
N-acetyl glucosamine	-	Glycogen	-
Indole production	-	Glycerol	-
Gelatin	+	Starch	-

pH 6.0, 8.0에서도 상당히 높은 활성을 나타내어 약산성과 약알칼리성 영역에서는 생육과 효소 생산에 큰 영향을 받지 않는 것으로 나타나, 배지의 초기 pH는 7.0으로 하였다. 배양온도는 해양에서 분리되어 다소 낮은 온도영역에서 성장할 것으로 예측되었고, 실제 실험결과 30°C 부근에서 가장 성장과 활성이 높았던 것으로 확인되어 30°C를 배양온도로 결정하였다. 한편 배양시간은 배양 72시간부터 거의 급격한 활성의 증가를 보였고, 배양 96시간때에 최대 생육과 활성을 나타내었다. 그러나 72시간과 96시간의 효소의 환원당

생성능에서는 큰 차이를 보이지 않았지만, 실제 배지 중의 카라기난 잔존량 즉, 조효소 분리시 침전하는 카라기난에 큰 차이를 보여 효소의 농도와 관련이 있을 것으로 판단되어 96시간을 최적 배양시간으로 결정하였다.

균주의 동정

분리된 균은 Table 5에 나타낸 것 처럼, 그람 음성 간균으로 oxidase, catalase 생성의 호기성균으로 색소를 생성하는 *Pseudomonas*속임을 알 수 있었고, indole 비생성, citrate, proline, arginine, alanine, serine, lactate, acetate 이용성, gelatin 액화, glucose, fructose, mannose, maltose 비이용, mannitol 이용 등의 특성으로부터 판단해 볼 때, *Pseudomonas alcaligenes*로 동정할 수 있었다.

요 약

해양 동식물, 토양 등으로부터 분리한 카라기난 분해능이 확인되었던 80여 균중에서 환원당 생성능이 가장 높았던 strain no.43 균주를 최종 시험균주로 선택하여 이 균주의 최적 효소 생산 조건을 실험하였다. 질소원으로는 nutrient broth 0.7% 농도가 가장 적절한 조건이었고, 탄소원의 농도는 카라기난 0.2%가 가장 높은 효소활성을 나타내었다. NaCl 농도는 1.5%, pH, 온도는 각각 7.0, 30°C로 이 조건에서 96시간 배양하는 것이 가장 적절한 효소 생산 조건이었음이 확인되었다. 각종 생화학 실험을 통해 동정을 행한 결과 그람음성 간균으로 oxidase, catalase 생성의 호기성균, indole 비생성, proline, arginine, serine, citrate, lactate 이용성, gelatin 액화, glucose, fructose, maltose 비이용, mannitol 이용 등의 특성으로부터 *Pseudomonas alcaligenes*로 동정할 수 있었고, *Pseudomonas alcaligenes* JCL-43으로 명명하였다.

감사의 말

본 연구는 1994년 한국과학재단 연구비 지원(과제번호 : 94-0402-07-01-3)으로 수행된 연구 결과의 일부이며 이에 깊이 감사드립니다.

참고문헌

1. De Clercq, E. 1993. in "Carbohydrate and Carbohydrate Polymers." Edited by M. Yalpani, pp. 609-613.
2. Stanley, N.F. 1990. Food gels. edited by P.Harris. Elsevier Applied Science. London & New York. pp.79 -120.
3. 岩瀬 弘士郎. 1990. ケル化劑, 増粘劑としてのカラギナン

の特性とその商品への應用例について. *New Food Industry*. **32**(5): 17-24.

4. 西澤一俊, 村杉幸子. 1991. 海藻の本. 研成社. pp. 38-44.
5. 小林賢一. 1986. カラギナンとそのバイオリアクターへの利用. *New Food Industry*. **28**(4): 23-26.
6. 富田旁男, 横田 馬. 1992. 微生物による天然多糖からの有用オリゴ糖の生産. *化學と生物*. **30**(3): 170-175.
7. 酒井重男. 1993. オリゴ糖の開発の現状と展望. *月刊フドケミカル*. **2**: 21-29.
8. Tseng, C.H., K. Yamaguchi and M. Kitamikado. 1992. Isolation and some properties of alginate lyase from a marine bacterium *Vibrio* sp. AL-128. *Nippon Suisan Gakkaishi*. **58**(3): 523-538.
9. 北御門學, 西村光弘, 山口邦子, 曾 照煌. 1993. アルギン酸から酵素分解によつて調劑したオリゴ糖の靜菌作用. *日本水産學會誌*. **59**(2): 315-320.
10. Groleau, D. and W. Yaphe. 1977. Enzymatic hydrolysis of agar: purification and characterization of β -neoagarotetraose hydrolase from *Pseudomonas atlantica*. *Can. J. Microbiol.* **23**: 672-679.
11. Morrice, L.M., M.W. Mclean, W.F.Long and F.B. Williamson. 1983. β -Agarases I and II from *Pseudomonas atlantica*: substrate specificities. *Eur. J. Biochem.* **137**: 149-154.
12. Furukawa, S., T. Fujikawa, D. Koga and A. Ide. 1992. Production of fucoidan degrading enzyme, fucoidanase, and fucoidan sulfatase by *Vibrio* sp. N-5. *Nippon suisan Gakkaishi*. **58**(8): 1499-1503.
13. Furukawa, S., T. Fujikawa, D. Koga and A. Ide. 1992. Purification and some properties of exo-type fucoidanase from *Vibrio* sp. N-5. *Biotech. Biochem.* **55**(11): 1829-1834.
14. 周東植, 李鷹昊. 1993. *Vibrio* sp. AI-145가 生産하는 菌體外酵素의 精製(I). *韓國營養食糧學會誌*. **22**(2): 234-239.
15. 주동식, 이정석, 박중제, 조순영, 안창범, 이응호. 1995. 알긴산 분해균 *Vibrio* sp. AI-145가 생산하는 균체내 효소의 정제 및 특성. *한국산업미생물학회지*. **23**(4): 432-438.
16. 주동식, 이정석, 박중제, 조순영, 김희경, 이응호. 1996. 효소분해에 의한 알긴산올리고당류의 제조. *한국식품과학회* **28**(1): 146-151.
17. Somogyi, M. and N. Nelson. 1952. Notes on sugar determination. *J. Biol. Chem.* **195**: 19-23.
18. Baumann, P., A.L. Furniss and J.V. Lee. 1984. in "Bergey's Manual of systematic Bacteriology." Vol. 1. Williams & Wilkins. Baltimore. pp. 140-199.
19. Gibbs, B.M. and F.A. Shinner. 1966. Identification methods for microbiologist. Academic press.
20. Yonemoto, Y., K. Murata, A. Kimura, H. Yamaguchi and K. Okayama. 1991. Bacterial alginate lyase: characterization of alginate lyase producing bacteria and purification of the enzyme. *J. of Ferm. & Bioengineering*. **72**(3): 152-157.
21. Baxter, R.M. 1959. An interpretation of the effects of salts on the lactic dehydrogenase of *Halobacterium salinarium*. *Can. J. Microbiol.* **5**: 47-57.

(Received 20 August 1996)