

澱粉利用性 *Hansenula*의 分離同定 및 變異株 開發

具英祖 · 朴完洙 · 申東禾 · 劉太鍾*

農漁村開發公社 綜合食品研究院

*高麗大學校 食品工學科

(1984년 6월 7일 수리)

Isolation and Identification of the Amylolytic Yeast *Hansenula* and its Haploid Mutant

Young Jo Koo, Wan Soo Park, Dong Hwa Shin and Tae Jong Yu*

Food Research Institute/AFDC, Kyunggi-Do, 170-31

*Dept. of Food Technology, Korea University, Seoul, 132

(Received June 7, 1985)

The amylolytic yeasts were isolated from natural sources. Among them, a strain FRI YO-32 was selected as one of the genetically potential microorganisms and was identified as a strain of *Hansenula anomala* var. *anomala*. Genetic markers were introduced into the isolated haploid strains of the strain FRI YO-32 and *Saccharomyces cerevisiae* by conventional mutagenic procedures with EMS or MNNG.

*Hansenula*속을 비롯한 전분이용성 효모는 최근에 국내외적으로 빠르게 진행되고 있는 새로운 유전적 조작에 관한 연구와 더불어 그에 대한 관심이 고조되고 있다.

과거 많은 연구자들은 *Hansenula*을 이용하여 단세포단백질,⁽¹⁻⁶⁾ 유기산,⁽⁷⁾ 아미노산,⁽⁷⁻⁹⁾ 방향성 물질⁽¹⁰⁻¹⁴⁾ 등과 같은 식량자원의 개발을 시도하였으며 식용효모로서 확인하였다. 그러므로 본 연구에서는 국내에서 증산이 가능하고 값싼 전분원료의 효율적 이용을 위하여 당화공정을 거치지 않고 직접 균체를 생산할 수 있는 장점이 있는 전분이용성 *Hansenula*속 효모를 분리 동정하였고, 이 효모를 이용하여 *Saccharomyces cerevisiae*와 같은 일반효모와의 유전적 조작에 필요한 영양요구성 변이주의 개발을 시도하였던 바, 기초자료를 얻었기에 그 결과를 보고하는 바이다.

실험재료 및 방법

사용균주 및 기본배지

균분리원으로 사료, 토양, 과일포면등을 사용하여 순수 분리한⁽¹⁵⁾ 전분이용성 효모 17균주와 당연구원에 보관중인 *Saccharomyces cerevisiae* Haken No. 1 균주를 사용하였으며 균주보관은 YPD slant⁽¹⁶⁾에서 2일간 배양한 후 냉장고에서 보관하였고 균주계대는 1개월마다 행하였다.

전분이용성 효모의 선발을 위한 전분배지는 저자들이^(17,18) 설정하였던 것을 약간 변화시켜 건조원 농도를 2.14g/l로 한 배지를 사용하였다. 또한 변이주 개발을 위하여 사용한 포자형성배지, 완전배지, 최소배지 및 영양요구성 배지는 Sherman등⁽¹⁹⁾이 제시한 방법에 따라서 사용하였으며, 이러한 배지의 살균은 121°C에서 15분간 행하였다.

배양방법

배양온도는 온도별 실험등의 특별한 경우를 제외 한 모든 실험에서 30°C로 하였다. 전분이용성 효모의 선발을 위한 배양실험은 250ml 삼각플라스크에

50ml의 전분배지를 넣고 회전식 진탕기로 250RPM에서 수행하였다.

선발된 전분이용성 효모의 동정

선발된 전분이용성 효모의 배양적 및 형태학적 특성과 생리학적 특성을 상법에 의하여 추구하여 Barnett등⁽¹⁹⁾의 key로서 동정하였으며, Rij⁽²⁰⁾와 Loder⁽²¹⁾의 방법으로 확인하였다.

단상체균주의 분리 및 변이유발시험

포자형성배지에서 일정한 기간 배양한 후 59°C에서 6분간 열처리함으로써 포자를 형성하지 않은 영양세포를 사멸시키고,^(22~24)액체파라핀층분리방법^(22,23)을 사용하여 포자가 형성된 세포를 수집하였다. 이러한 포자형성세포를 snail enzyme을 사용하여 세포벽을 제거하고 sonication으로 포자를 분리시킨 후 random spore plating method에 의하여 작은 코로니를 선발하여^(22~26) DNA 함량과 세포크기 및 용량을 모균주와 비교하여 단상체균주로서 확인하였다.

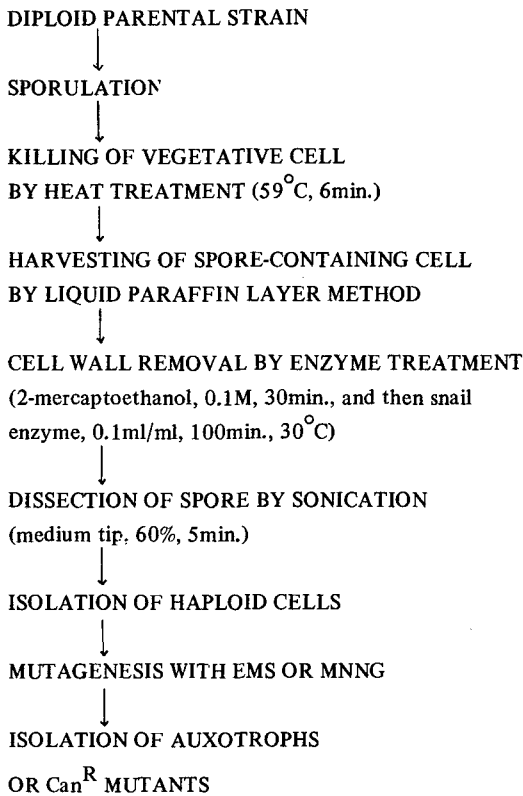


Fig. 1 Flow diagram for haploidization by random spore plating method and mutagenesis of yeast haploid cells.

이와 같이 분리확인된 단상체균주를 상법에^(18,22) 따라 변이유기제로서 Ethyl Methane Sulfonate (EMS)나 N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (M-NNG)을 각각 0.3ml/10ml, 0.15mg/ml 사용하여 90분간 처리로 변이유발실험을 수행하였으며 여러가지 조합의 아미노산 pool을 사용하여 영양요구성을 확인하였으며, canavanine 저항성 균주의 선발을 위해서는 변이유기제 처리후 80 µg/ml의 canavanine을 사용하였다. 이상과 같은 단상체균주의 분리 및 변이유발 실험에 대한 전체적인 실험과정은 Fig. 1과 같다.

포자형성율의 측정

상법^(18,24)에 의하여 각 균주의 포자를 형성시킨 후 일정한 기간마다 carbolic fuchsin 시약으로 포자를 염색하여 Wilson 등⁽²⁵⁾이 사용한 방법에 의하여 현미경적으로 포자형성율을 측정하였다.

DNA 함량과 세포크기 및 용적의 측정

단상체균주를 확인하기 위하여, perchloric acid 추출법을 이용한 DNA 측정과 세포크기 및 용적의 측정은 Wilson⁽²⁵⁾의 방법에 준하여 측정하였다.

선발균주의 발효생성물 분석

선발균주의 포도당 및 전분배지에서의 발효생성물의 정성적 분석을 위하여 얻은 배양상등액에 대

Table 1 The specific growth rate (hr⁻¹) and the maximum cell concentration (g/liter) of the selected starch-utilizing yeasts at various growth temperature.

Strain	Growth temperature (°C)			
	20	25	30	35
YO-6	0.1041 (4.22)	0.1604 (6.36)	0.1963 (5.16)	0.1568 (3.98)
YO-17	0.1027 (6.18)	0.1678 (7.03)	0.1894 (6.22)	0.1687 (4.42)
YO-18	0.1074 (4.46)	0.1567 (6.36)	0.1935 (6.80)	0.1695 (4.04)
YO-22	0.099 (4.72)	0.1683 (7.77)	0.1897 (4.86)	0.1780 (3.98)
YO-32	0.1021 (5.22)	0.1612 (8.17)	0.1965 (5.36)	0.1677 (4.72)
YP-40	0.0252 (0.25)	0.0647 -	0.0469 (0.39)	0.0162 (0.33)
YY	0.0966 (2.63)	0.1199 -	0.1253 -	0.050 -

* () indicates the maximum cell concentration (g/l)

Table 2. Assimilation of carbohydrate by starch-utilizing yeasts

Strain	Maltose	Erythritol	Cellobiose	Raffinose	Sucrose	Mannitol
YO-6	+	+	+	+	+	+
YO-17	+	+	+	+	+	+
YO-18	+	+	+	+	+	+
YO-22	+	+	+	+	+	+
YO-32	+	+	+	+	+	+

+ : positive, - : negative

하여 gas chromatography을 이용하여 유등⁽²⁶⁾이 사용한 것과 같은 조건으로 chromatogram을 얻었다.

균체량 및 비성장속도의 측정

저자들⁽²⁷⁾이 사용했던 방법에 준하였다.

결과 및 고찰

전분배지에서의 성장률이 높은 균주선발

1982년도에 저자⁽²⁸⁾등이 사료, 토양, 과일 표면등에서 순수 분리한 전분 이용성 효모 17균주에 대하여 예비실험을 통하여 1차로 7 균주를 선발하였으며, 전분액배지에서 성장률이 높은 균주를 선발하기 위하여 온도별로 배양하면서 경시적으로 세포 농도를 측정하여 산출한 성장속도와 최대균체량은 Table 1 과 같다.

Table 1에서 보는 바와같이 이들 효모들의 비정상 속도, μ 는 0.0647~0.1965 이었고, 균체량은 0.39~8.17g/l 이었다. 이중 비성장속도와 균체량이 가장 큰 것은 YO-32균주로, 비성장속도는 30℃에서 0.1965 hr⁻¹, 균체량은 25℃에서 8.17g/l 였다.

이상의 효모들 중 YO, 5 균주는 감귤 과피에서 분리하였으며, YP균주는 감자의 표면, YY균주는 토양으로부터 유래한 것이었다.

선발균주의 동정

YO, 5 균주는 전분배지에서의 성장률이 유사한 점을 감안하여 이들 선발균주의 근연성 여부와 생리적 특성을 비교하기 위하여 1차적으로 탄소화합물의 자화성 및 발효성을 검토한 결과는 Table 2 와 Table 3 과 같다.

Table 2와 Table 3에서 보는 바와같이 감귤 과피에서 유래한 YO균주들은 탄소화합물의 자화성 및 발효성이 동일하였으며 이상의 결과로 YO균주들은 근연군으로 사료되었다.

그러므로 이들 균주 가운데 대표적으로 YO-32 균주를 최우수효모로 선발하여 형태학적 특성을 관

Table 3. Fermentation of carbon compounds by starch-utilizing yeasts

Carbon compounds	YO-6	YO-17	YO-18	YO-22	YO-32
glucose	+	+	+	+	+
galactose	-	-	-	-	-
sucrose	+	+	+	+	+
maltose	+	+	+	+	+
cellobiose	+	+	+	+	+
trehalose	-	+	-	-	-
lactose	-	-	-	-	-
melibiose	-	-	-	-	-
raffinose	+	+	+	+	+
inulin	-	-	-	-	-
soluble starch	+	+	+	+	+

* +; positive, -; negative

Table 4 The morphological characteristics of the isolate FRI YO-32

Classification	Strain FRI YO-32	<i>H. anomala</i> var. <i>anomala</i>
Shape of cell	ellipsoidal	spheroidal, ellipsoidal
Cell size	(0.65-3.2)x (0.65-3.2) μ m	(2.0-4.8)x (2.6-5.2) μ m
Reproduction	by budding multilaterally	by budding
Ascospore	present (blastospore)	present (blastospore)
Shape of spore	hat shape	hat shape
Pseudomycellium	present	present

찰한 결과는 Table 4 와 같았다.

즉, 세포의 모양은 길지 않은 타원형이었으며 번식모양은 다극성 출아법이었다. 세포내에 위치한 자낭포자(blastospore)는 높은 모자형(hat shape)으로 1~4 개의 자낭포자가 한개의 자낭세포내에 존재하고 있었다. 가성균사는 mycocandida 형으로 심하게 분기되어 있었으며 진정균사는 형성하지 않았다.

또한 YO-32 균주의 배양적 특성을 맥아즙 및 맥아즙한천 평판배지에서 배양하면서 관찰한 결과는 Table 5 와 같다.

즉 colony의 끝이 undulate하고 크기는 조금 작은 편이었으나 맥아즙시험판 배양시 pellicle 및 ring과 침전하는 성질이 전형적이었으며 색깔은 연한 유백색인 cream색이었고 mat형의 colony의 표면이 약간 rough하였다.

선발균주 FRI YO-32의 생리학적 특성을 검토한 결과는 Table 3 과 Table 6 에서 보는 바와 같다.

탄수화물의 발효능은 앞에서 언급한 Table 3과 같이, glucose, sucrose, maltose, cellobiose, raffinose, 및 soluble starch를 발효하였으나 galactose, trehalose, lactose, melibiose 및 inulin은 발효하지 못하였다.

또한 Table 6에서와 같이 대부분의 탄소화합물을 자화하여 성장하였으나 D-sorbose, lactose, melibiose, L-arabinose, L-rhamnose, ribitol, galactitol 및 inositol을 자화하지 못하였다. Nitrate를 자화하고 무

Table 5 The cultural characteristics of the isolate FRI YO-32

Classification	Strain FRI YO-32	<i>Hanomala</i> var. <i>anomala</i>
Malt extract culture		
pellicle	present	variable
ring	present	usually present
Growth on malt agar		
colony form	irregular	convoluted and curled
colony edge	undulate	filamentous and crenate (erose)
elevation	rised	mat type
surface	slightly rough	smoothly glistening
color	cream color	chalky white
colony size	2.1 - 4.5 mm	

비타민배지에서 성장하였으며 ester를 형성하는 것은 전형적이었다.

이상의 선발균주 FRI YO-32의 균학적 특성을 검토한 결과, 다극성 출아방법으로 번식하며 높은 모자형의 자낭포자를 형성하고 자낭포자수가 1~

Table 6. The physiological characteristics of the isolate FRI YO-32

Assimilation of carbon compounds					
glucose	+	inulin	+	ribitol	-
galactose	+	soluble starch	+	galactitol	-
D-sorbose	-	D-xylose	+	D-mannitol	+
sucrose	+	L-arabinose	-	methyl- α -D-glucoside	+
maltose	+	D-ribose	-	salicin	+
cellobiose	+	L-rhamnose	-	DL-lactic acid	+
lactose	-	ethanol	+	citric acid	+
melibiose	-	glycerol	+	inositol	-
raffinose	+	erythritol	+		
Assimilation of potassium nitrate ; positive					
Growth in vitamin - free medium ; positive					
Growth in 10% sodium chloride plus 5% glucose in yeast nitrogen base ; good growth					
Growth in 60% glucose in yeast nitrogen base ; positive					
Growth at 37°C ; positive					
Gelatin liquefaction ; positive					
Production of esters ; positive					

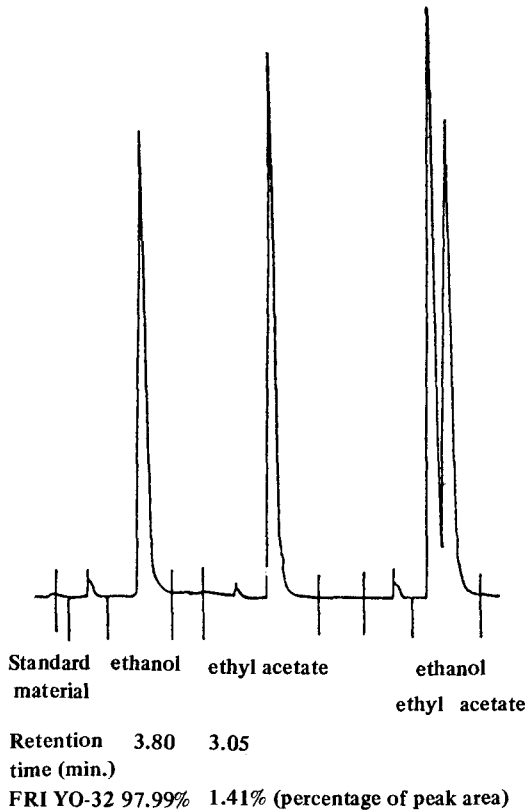


Fig. 2 Gas chromatogram of qualitative fermentation products of the strain FRI YO-32, with ethanol and ethyl acetate as standard materials.

4 개이며 질산염 동화성이 있으며 피막을 형성하고 ester를 생성하는점 등으로보아 *Hansenula*속에 속한다는 것을 알 수 있었다.

D-glucose, sucrose 및 maltose를 발효하고 maltose, erythritol 및 raffinose를 자화하나 melibiose와 L-rhamnose를 자화하지 못하며 외부영양원으로 비타민을 요구하지 않는 점으로 보아 *Hansenula*

*anomala var. anomala*로 잠정적으로 동정하였다. 이를 Lodder (1971)⁽²¹⁾의 자료와 비교하여 본 결과 세포의 크기가 조금 작고 colony의 표면이 약간 rough하며 inulin을 자화하여 성장하였으나 그 외의 균학적 성질이 동일하였다.

이런 점으로 미루어 선발균주 FRI YO-32는 *H. anomala var. anomala*이거나 근연균으로 판단되었다.

이와 같이 분리 동정된 FRI YO-32균주의 발효 생성물을 정상적으로 확인하기 위하여, 표준물질로 ethanol과 ethyl acetate을 사용하여 두 물질이 잘 분리될 수 있는 가동조건하에서 실시한 gas chromatogram의 결과는 Fig. 2와 같다.

Fig. 2에서 보는 바와같이 *H. anomala var. anomala* FRI YO-32균주의 주발효생성물은 알코올 및 ester 관련물질임을 확인하였다.

FRI YO-32균주의 단상체 분리 및 확인

유전학 및 산업적으로 응용성이 있을것으로 판단된 *H. anomala var. anomala*을 이용하여, 세보용합 등과 같은 유전적 조작을 수행하기 위하여 영양요구성 및 약제내성변이주의 개발을 시도하였다.

*H. anomala var. anomala*의 분리 및 동정시 생리학적, 배양학적, 형태학적 특성을 검토하였으며 이러한 사항을 기초로 이 균주의 haploidization을 수행하기 위하여 *S. cerevisiae*와 병행하여 포자형성을 유도한 결과는 Table 7과 같다. Table 7에서 보는 바와 같이 포자형성배지에서 배양하면서 배양기간에 따른 FRI YO-32균주와 *S. cerevisiae*의 포자형성율을 측정하였던바, 전체적으로 효모포자의 형성은 한천사면배지에서 더 잘 일어났으며, *S. cerevisiae*는 배양 9일 후 95%이상의 포자형성율을 보여준 반면에 FRI YO-32균주는 24일후에도 15%정도의 빈약한 포자형성율을 보여주었다. 이상의 결과로 FRI YO-32균주의 포자를 농축시킬 필요가 있다고 판단되었다. 예비실험 결과에 따르면 FRI YO-32균주의 영양

Table 7. Comparison of sporulation rate of yeast strains during sporulation induction

Strain	culture	incubation time (day)				
		4	7	9	14	24
<i>S. cerevisiae</i> Hakken no. 1	broth	50 (%)	50 (%)	50 (%)	NT** (%)	NT (%)
	agar slant	80	90	95	95	95
FRI YO-32	broth	0	0.1	0.1	NT	NT
	agar slant	1	5.5	10	10	15

* sporulation medium : 1% potassium acetate, 0.1% Bacto-yeast extract, 0.05% dextrose.

** NT = No Test.

Table 8. Comparison of DNA content, cell size and volume between parental strains and their haploid strains

Strain	DNA content (fg/cell)	cell size (μm)	cell volume (μm^3)	estimated ploidy
FRI YO-32	57.32 + 0.50	(3.48 + 0.59) x (1.99 + 0.54)	127.73	2n
HYO-56	33.31 + 0.0	(2.27 + 0.76) x (1.71 + 0.44)	65.38	n
HYO-59	42.41 + 0.22	(2.53 + 0.73) x (1.80 + 0.47)	76.33	n
<i>S. cerevisiae</i>				
Hakken no. 1	53.18 + 0.14	(5.15 + 1.13) x (2.54 + 1.52)	268.28	2n
Hak 1-5	33.47 + 0.30	(3.49 + 0.99) x (1.90 + 0.50)	115.69	n
Hak 1-8	36.65 + 0.0	(3.04 + 1.06) x (1.81 + 0.47)	93.72	n

세포는 59°C에서 8분간 열처리시 생존균수가 1% 이하로 감소하였던 바, 이와같은 조건하에서 열처리함으로써 세포현탁액내의 포자함유세포를 증가시킬 수 있었다. Fig. 1에서 표시한 방법에 따라서 1차적으로 얻어진 반수체균주의 ploidy를 확인하기 위하여, 모균주와 그의 단상체 균주사이에 DNA함량과 세포크기 및 용적을 측정하여 비교검토 하였다.

Table 8에서 보는 바와같이 모균주인 FRI YO-32와 *S. cerevisiae* Hakken No. 1의 DNA함량은 각각 57.32 fg/cell, 53.18 fg/cell으로 측정되었고, 세포용적도 각각 127.73 μm^3 , 268.28 μm^3 이었다. 이에 비하여 FRI YO-32의 대표적인 단상체 균주인 HYO-56과 HYO-59의 DNA함량과 세포크기 및 용적이 모균주에 비하여 훨씬 적었으며, *S. cerevisiae*의 단상체 균주 Hak 1-5와 Hak 1-8의 경우에도 마찬가지였다.

이상의 결과로 볼 때, HYO-56, HYO-59와 Hak 1-5, Hak 1-8은 각각 *H. anomala* var. *anomala* FRI YO-32와 *S. cerevisiae* Hakken No. 1의 단상체균주로 사료되었다.

단상체균주의 변이유발

분리 확인된 단상체균주로부터 영양요구성 균주 및 canavanine내성균주를 개발하기 위하여 변이유기제로 EMS나MNNG를 사용, 상법^(16,19)에 따라 변이유발실험을 실시하였다. 1% 이하의 생존율을 보여주는 변이유기제 처리조건하에서 선발된 변이주에 대하여 아미노산요구성이나 canavanine내성을 확인한 결과는 Table 9와 같다.

Table 9에 표시한 것은 대표적인 변이주들로, HYO-59-2 균주는 proline요구주였고 그것을 다시 변이처리하여 proline과 uracil을 요구하는 HYO-59-2-

Table 9. Wild type strain and their mutants

Strains	Relevant genotype
<i>H. anomala</i> var. <i>anomala</i>	STA ⁺
FRI YO-32	
HYO-59-2	pro, STA ⁺
HYO-59-2-N2	ura, pro, STA ⁺
<i>S. cerevisiae</i>	STA ⁻
Hakken no.1	
Hak-1-5	trp, STA ⁻
Hak-1-5-1	trp, Can ^R , STA ⁻

N2을 얻었으며, Hak 1-5는 tryptophan요구주, Hak 1-5-1은 canavanine내성을 갖는 tryptophan요구주였다.

H. anomala var. *anomala* FRI YO-32와 *S. cerevisiae*사이에 유전적 조작등을 시도하기 위해서는 Table 9에 나타난 각 균주의 변이주를 모균주로 하여 우수한 변이주를 더 많이 개발할 필요가 있다고 사료되었다.

요 약

전분자원의 효율적 이용을 위한 방법의 일환으로 자연으로부터 전분이용성 효모를 분리동정하였고, 이 효모와 *S. cerevisiae*의 단상체 영양요구성 변이주의 개발을 시도하였다.

분리선발된 전분이용성 효모는 형태학적, 배양적 및 생리학적 특성을 구명한 결과 *Hansenula anomala* var. *anomala*로 동정되었다.

단상체 영양요구성 변이주를 개발하기 위하여, *H. anomala* var. *anomala* FRI YO-32와 *S. cerevisiae*

을 sporulation시켜 단포자분리에 의하여 단상체 균주를 분리하였으며, EMS나 MNNG을 사용하여 영양 요구성 및 canavanine내성 변이주를 선발하였다.

참고문헌

1. 박명삼 : 한국미생물학회지 , 11 (4) 157- 166 (1973)
2. Quinn, J.P., T.W. Barker and R. Marchant: *J. Appl. Bacteriol.*, 51 (1), 149 (1981)
3. Yoshizawa, Kiyoshi: *Nippon Nogei Kagaku Kaishi*, 55 (8), 705 (1981)
4. Barker, T.W., J.P. Quinn and R. Marchant: *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 14 (4), 247 (1982)
5. Barker, T.W., A.M. Patton and R. Marchant: *J. Sci. Food Agric.*, 34 (6), 638 (1983)
6. 오만진, 박윤중, 이석건 : 한국식품과학회지, 5 (4), 215 (1973)
7. Niitsu, Hisashi, Masanori Fujita and Gyozo Terui: *Hakko Kogaku Zasshi*, 47 (3), 194 (1969)
8. Lobyrev, L.B. : *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.*, 2 (6), 632 (1966) (Russ.)
9. Terui, Gyozo, and Hisashi Niizu: *Int. Conf. Global Impacts Appl. Microbiol.*, 2nd, 33-52 (1967), edited by Garden, Elmer L., Jr., Intersci. Publ., New York.
10. Takeo Koizumi : *Nippon Jozo Kyokai Zasshi*, 63 (11), 1187, (1968)
11. Seppo Laurema and Jorma Erkama: *Acta Chem. Scand.*, 22 (5), 1482 (1968) (Finland)
12. Takeo Koizumi : *Nippon Jozo Kyokai Zasshi*, 63 (4), 446 (1968)
13. Takao Kida, Yoshitaka Ebihara, Toshio Enatsu and Gyozo Terui : *Hakko Kogaku Zasshi*, 49 (5), 390 (1971)
14. Takeo Koizumi : *Nippon Jozo Kyokai Zasshi*, 69 (10), 685 (1974)
15. 박완수, 구영조, 신동화, 서기봉 : 한국식품과학회지, 15, 46 (1983)
16. Sherman, F., G.R. Fink, and J.B. Hicks : *Methods in Yeast Genetics, Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, New York (1982)
17. 박완수, 구영조, 신동화, 민병용 : 한국식품과학회지, 15, 56 (1983)
18. 박완수, 구영조, 신동화, 민병용 : 한국식품과학회지, 15, 56, 77 (1983)
19. Barnett, J.A. and R.J. Pankhurst: "A New Key to the Yeasts" North-Holland Publ. Co., p.74, 119 (1974)
20. Kreger-van Rij, N.J.W.: *Taxonomy and Systematics of Yeasts" in the Yeast" ed. by A.H. Rose and J.S. Harrison, Academic Press, Vol. 1, p. 42-61 (1969)*
21. Lodder, J. : *The Yeasts, a taxonomic study*, North-Holland Publ. Co., Amsterdam-London, p. 226 (1971)
22. Fowell, R.R. : Chapter 7, *Sporulation and Hybridization of Yeasts in "The Yeast"*, ed. by A.H. Rose and J.S. Harrison, Academic Press p. 303-386 (1969)
23. Mortimer, R.K. and D. Schild : *Genetic Mapping in Saccharomyces cerevisiae in the Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces*, ed. by J.N. Strathern, E.W. Jones and J.R. Braoch, Cold Spring Harbor Laboratory, p. 11-26 (1981)
24. Fink, G.R. : *The Biochemical Genetics of Yeast in Methods in Enzymology* 17A, 59-78 (1970)
25. Wilson, J.J., G.G. Khachatourians and W.M. Ingledew : *Molec. Gen. Genet.*, 186, 95 (1982)
26. 유진영, 신동화 : 농개공 식품연구소, 식품연구 사업보고서, 제10호, 122 (1983)