

Snail Lytic Enzyme에 의한 澱粉利用性 酵母 및 *Saccharomyces cerevisiae*의 原形質體 形成

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

(1985년 6월 7일 수리)

Protoplast Formation of the Amylolytic Yeast and *Saccharomyces cerevisiae* by Snail Lytic Enzyme from *Helix pomatia*

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

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

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

(Received June 7, 1985)

Studies were conducted on the conditions for preparation of yeast protoplasts utilizing *Hansenula anomala* var. *anomala* FRI YO-32 as well as *Saccharomyces cerevisiae* KFCC 32356 and a lytic enzyme from the snail *Helix pomatia*.

The cell walls of the strain FRI YO-32 and *S. cerevisiae* were found to be resistant to activity of the snail lytic enzyme if they were not treated with thiol compounds. Dithiothreitol was found to be more effective than 2-mercaptoethanol, but the latter was considered to be practical. As factors influencing the formation of yeast protoplast, it was considered to be concentration and incubation time of 2-mercaptoethanol or the lytic enzyme, growth stages in yeast cultivation, initial number of yeast cells, and concentration of osmotic stabilizer (KCl). Optimum conditions for the preparation of yeast protoplasts were determined.

유전적 균주개량방법은 과거에 있어서 주로 교배 및 변이유발에 의존하였다. 그러나 최근에 유전적 조작을 위한 여러가지 방법들이 효모를 비롯한 진핵생물에 적용되고 있으며, 이러한 방법들중의 하나가 세포융합이다.

Van Solingen등⁽¹⁾은 *Saccharomyces*속을 이용하여 세포융합에 성공하였으며, 그 이후 이러한 세포융합이 동종^(1~16) 및 이종간^(17~24) 혹은 이속간에^(13, 25~30) 시도되었다.

효모세포벽의 효소적 가수분해에 대한 연구는 이러한 세포융합 뿐만아니라 효모의 형질전환,^(17, 21, 32) 효모세포의 생리적인 연구,^(23~27) 세포막^(26, 29) 및 세포벽^(40, 41) 구조에 관한 연구, 세포내 물질의 회수⁽⁴²⁾를 위하여 많은 관심의 대상이 되어 왔으며 효모의 분류학적 연구⁽⁴³⁾에도 응용될 가능성이 있다. 본 연구

에서는 전보⁽⁴⁴⁾에서 보고한 전분이용성 효모, *Hansenula anomala* var. *anomala* FRI YO-32와 *Saccharomyces cerevisiae*의 원형질체 형성을 위한 기본적인 조건들을 검토하였으므로 그 결과를 보고하는 바이다.

실험재료 및 방법

사용균주 및 기본배지

본 연구에서 사용한 균주는 저자등⁽⁴⁴⁾이 분리 정한 *Hansenula anomala* var. *anomala* FRI YO-32를 비롯한 전분이용성효모와 *Saccharomyces cerevisiae* KFCC 32356등의 일반효모였다. 본 균주들의 배양을 위해 기본배지로 YPD medium⁽⁴⁵⁾을 사용하였으며, 배양온도는 모든 실험에서

30℃로 하여 250ml 삼각플라스크에 50ml의 YPD medium을 넣어 왕복식 진탕기로 stroke 120, 진폭 3.5cm에서 수행하였다.

원형질체 형성실험

공시균주의 원형질체 형성을 위한 기본 처리방법은 J. J. Wilson 등⁽²⁸⁾의 방법에 따라 다음과 같이 수행하였다.

YPD 배지에서 15~18시간 진탕배양한 효모배양액 10ml을 Tris-HCl 완충용액(0.05M, pH 7.4)으로 두번 세척한 후, 10ml의 원형질체 완충용액(0.6 M KCl을 함유한 Tris-HCl 완충용액)에 현탁시켰다. 여기에 무균여과한 1M, 2-mercaptoethanol을 0.2 ml 첨가하여 75RPM으로 교반하면서 30℃, 15분간 전처리한 다음, 10ml 원형질체 완충용액으로 세척 후 효모세포벽 분해효소인 달팽이조효소용액(β -glucuronidase from *Helix pomatia*, type H-2, product No. G-0876, Sigma Chem. Co.)을 0.5ml 첨가하여 75RPM으로 교반하면서 30℃, 90분간 효소처리를 하였다. 이와같이 효소처리한 효모세포현탁액을 원형질체 완충용액으로 2번 세척한 액을 원형질체 현탁액으로 하여 여러가지 실험에 사용하였다.

또한 원형질체 형성을 위한 여러가지 조건별 실험에서는 위의 방법을 기초로 변형시켜 수행하였다.

원형질체 형성수율(protoplast yield)

원형질체 형성수율은 원형질체현탁액을 광학현미경하에서 haemocytometer를 사용하여 직접 계수하거나, 형성된 원형질체를 증류수로 osmotic lysis시킨 후^(6, 18, 37, 38, 46 ~ 49) spectrophotometer (B. & L., Spectronic 21)를 사용하여 525nm에서 흡광도를 측정하여 효소처리전의 흡광도에 대한 감소율로부터 다음과 같이 계산하였다.

$$PY(\%) = \frac{Ab_o - Ab_t}{Ab_o} \times 100$$

Ab_o: 효소처리전 세포현탁액의 흡광도

Ab_t: 효소처리후 osmotic lysis시킨후 흡광도

환원당 정량

환원당은 dinitrosalicylic acid method⁽⁵⁰⁾에 의하여 측정하였으며 glucose의 양으로 표시하였다.

결과 및 고찰

Snail enzyme에 의한 효모종속간의 원형질체 형성율 비교

일반적으로 효모세포벽을 분해시킬 수 있는 세포

Table 1. Comparison of protoplast formation among the yeasts by lytic enzyme from the snail, *Helix pomatia*.

Strains (color)	protoplast formation by snail enzyme
YO-6 (white)	87.16%
YO-8 (red)	11.11%
YO-15 (red)	3.63%
<i>H. anomala</i> var. <i>anomala</i> FRI	
YO-32 (white)	87.44%
YP-40 (white)	89.88%
YP-46 (red)	9.16%
<i>S. cerevisiae</i> KFCC 32356 (white)	77.84%
<i>Sp. holsaticus</i> FRI Y-5 (red)	28 %
<i>C. utilis</i> (white)	79.14%
<i>Sch. pombe</i> NRRL-Y-164 (white)	50 %
<i>Rh. toruloides</i> IFO 8766 (red)	14.41%

벽분해효소를 선택하는 것은 효모의 종류에 따라 다르며, 이러한 연유는 효모에 따라 세포벽 구성성분이 다르기 때문이다.

Ascomycetous yeast의 원형질체 형성을 위해 사용되는 효소원으로 *Bacillus circulans*⁽¹³⁾ *Oerskovia* sp.^(14, 15) *Arthrobacter luteus*^(16, 21) *Corticium centrifugum*^(22, 23) *Trichoderma* sp.^(24, 25) 등과 대부분의 연구자들에 의하여 사용되었던 *Helix pomatia*란 달팽이 효소원들이 보고되었는데, 이러한 효모들의 세포벽 주요성분^(26, 27)은 glucan, mannan, chitin으로 알려져 있다.

반면 Basidiomycetous yeast의 세포벽 구성성분은 Ascomycetous yeast와 다르다고 알려져 있으며^(28, 29) Ascomycetous yeast에 거의 존재하지 않는 galactose나 fucose가 존재한다.

또한 효모의 이러한 세포벽구성성분은 균주의 종류^(30, 31)뿐만아니라 growth stage^(32, 33) 배양조건⁽³⁴⁾ 등에 따라서도 달라진다.

세포벽분해효소로서 snail enzyme을 사용하여 저자등⁽⁴⁴⁾이 분리동정한 *H. anomala* var. *anomala* FRI YO-32와 *S. cerevisiae* KFCC 32356을 비롯한 여러 효모들에 있어서 원형질체 형성율을 비교해 본 결과는 Table 1과 같다.

일정한 조건하에서 white yeast의 대부분은 약 80%이상의 원형질체형성율을 보여 주었지만 red yeast의 대부분은 약 15%이하의 형성율을 보였다.

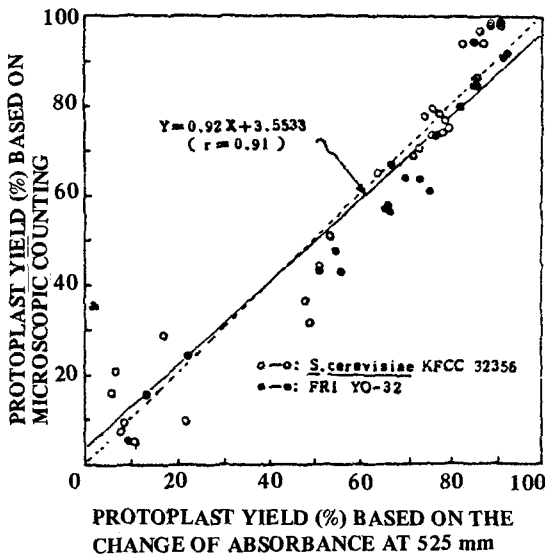


Fig. 1. Correlation between protoplast yields based on microscopic counting and change of absorbance at 525 nm

이러한 결과로 볼 때 FRI YO-32 균주와 *S. cerevisiae* 을 포함한 white yeast 의 원형질체 제조를 위해 snail enzyme 을 사용할 수 있을 것으로 사료되었다.

검경에 의한 측정과 흡광도변화측정에 의한 원형질체 형성수율의 측정비교

원형질체 형성을 정량적으로 확인하는 방법에는 검경, 평판배양, 또는 흡광도변화등에 의한 방법등을 고려할 수 있으나 이중, Indge⁽⁴⁾에 의하여 연구

된 osmotic lysis 방법을 응용한 흡광도변화를 측정하는 방법을 사용하는 것이 편리하다고 사료된다.

이러한 방법을 검토하기 위하여 검경으로 원형질체를 직접 세어 계산한 원형질체 형성수율과 증류수에서 osmotic lysis 후 흡광도의 변화를 측정하여 계산된 원형질체 형성수율과의 관계를 나타낸 것은 Fig. 1 과 같다.

즉 FRI YO-32 균주와 *S. cerevisiae* 균주에 있어서 양호한 상관관계 ($r=0.91$) 을 볼 수 있었으며, 원형질체 형성수율은 이와 같이 osmotic lysis 후 흡광도변화에 의하여 계산하는 것이 편리하다고 사료되었다.

원형질체 형성을 위한 전처리물질의 영향

일반적으로 효모세포의 원형질체를 제조하기 위하여 세포벽분해효소를 첨가 반응시키기 전에 환원제, 특히 SH기 함유 화합물로 전처리하는 것이 세포벽을 용이하게 분해시킨다고 보고되었다.⁽⁵¹⁻⁵³⁾ 이러한 화합물중 2-mercaptoethanol, sodium thioglycolate, dithiothreitol 을 선택하여, 원형질체 형성을 위한 이들 화합물의 영향을 검토한 결과는 Table 2 와 같다. 이때 전처리물질을 첨가하지 않고 달팽이 세포벽분해효소만을 첨가한 경우를 대조구로 하였다.

비교실험한 세화합물 가운데 dithiothreitol 이 가장 우수하였으며, 다음으로 2-mercaptoethanol 이 좋은 효과를 보였으나 sodium thioglycolate 의 경우 사용농도를 10배 증가시켰어도 대조구와 거의 같았다. Dithiothreitol 이나 2-mercaptoethanol 과 같은

Table 2. Effect of pretreatment compounds and their concentration on protoplast formation

pretreatment compounds	concentration (M)	protoplast yield (%)	
		FRI YO-32	<i>S. cerevisiae</i>
2-mercaptoethanol	0.01	50.60	48.60
	0.02	73.20	78.14
	0.05	85.44	83.11
	0.10	85.88	88.74
sodium thioglycolate	0.25	14.82	8.37
	0.50	8.83	11.40
dithiothreitol	0.01	85.29	86.71
	0.02	84.99	88.96
	0.05	92.51	91.40
	0.10	91.77	91.40
control	--	8.08	7.67

Table 3. Comparison of pretreatment and enzymatic treatment methods for the protoplast formation

pretreatment and enzymatic treatment methods	protoplast yield (%)	
	FRI YO-32	<i>S. cerevisiae</i>
A. Simultaneous treatment of 2-mercaptoethanol and lytic enzyme for 90 min.	4.02	6.99
B. Serial treatment of lytic enzyme without washing pretreated yeast cells	75.54	77.87
C. Serial treatment of lytic enzyme with washing pretreated yeast cells	70.28	76.71
D. Serial and stationary treatment of lytic enzyme with washing pretreated yeast cells	70.43	75.54
E. Serial and stationary treatment of lytic enzyme without washing pretreated yeast cells	55.73	74.71

thiol화합물은 세포벽단백질에 존재하는 disulphide 결합을 파괴하여 세포벽분해효소의 작용을 용이하게 하는 것으로 추측하고 있으며, 농도가 증가할수록 원형질체 형성수율이 증가하는 경향을 보였다.

그밖에 Lobyreba⁽⁵⁸⁾는 *C. utilis*에 관한 실험에서 L-cysteine이 우수한 전처리물질임을 보고하였고, Kaneko등⁽⁵⁷⁾의 *S. lipolytica*에 대한 실험에서는 2-mercaptoethanol 사용시 표면활성제인 sodium dodecyl sulfate(SDS)을 첨가하여 좋은 효과를 얻었으며 Foury등⁽⁴⁷⁾은 세포벽 분해효소처리시 2-deoxy glucose를 병행하였을 경우 높은 원형질체 형성수율을 얻었다.

Table 2에서와 같이 전처리하지 않은 효모세포의 원형질체 형성수율은 8%내외로 세포벽 분해효소에 대하여 저항성이 높은 것으로 사료되었고, dithiothreitol은 2-mercaptoethanol보다 약간 더 좋은 효과를 보여 주었으나 경제적인 면에서 볼 때 dithiothreitol은 가격이 너무 비싼 편이므로 전처리 효과가 거의 같은 2-mercaptoethanol을 선택하는 것이 타당하다고 사료되었으며 이때 처리농도를 0.1 M로 하는 것이 좋다고 판단되었다.

이와같이 2-mercaptoethanol을 사용하여 0.1M로 전처리하였을 경우 처리시간에 따른 원형질체 형성수율을 검토하여 본 결과 전처리시간이 길어 질수록 원형질체 형성수율은 증가하였다.

원형질체 형성을 위한 전처리 및 효소처리방법의 비교

효모세포의 원형질체 형성에 관한 여러 보고에 의하면 원형질체 형성수율을 높이기 위하여 여러 가지 전처리 및 효소처리 방법이 제안되어 있다.

FRI YO-32 및 *S. cerevisiae*균주의 원형질체 형성수율을 높이기 위하여 전처리 및 효소처리방법별로 원형질체 형성수율을 측정된 결과는 Table 3과 같다.

기본적인 원형질체 형성방법을 대조구(C)로 하였을 경우, 전처리와 효소처리를 동시에 한 경우(A)에는 대조구에 비하여 원형질체 형성수율이 매우 낮았다. 그러나 일단 전처리한 효모세포를 완충용액으로 세척하지 않고 계속하여 효소처리하였을 경우(B)에는 대조구에 비하여 더 좋은 효과를 얻었다.

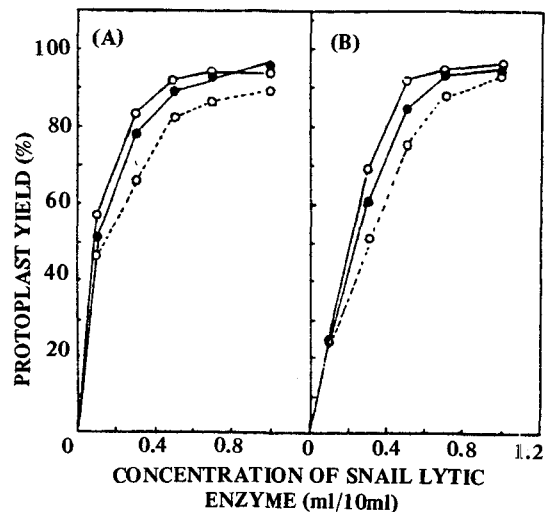


Fig. 2 Effect of concentration of snail lytic enzyme on protoplast formation in *S. cerevisiae* KFCC 32356 (A) and the strain FRI YO-32(B) with varying enzymatic treatment time (o - - - o; 30 min., ●-●; 60 min. o—o; 90 min.)

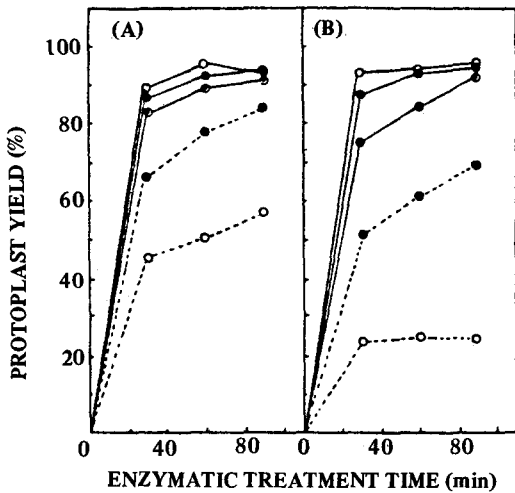


Fig. 3 Effect of enzymatic treatment time on protoplast formation in *S. cerevisiae* KFCC32356(A) and the strain FRI YO-32(B) with varying concentration of snail lytic enzyme (○---○; 0.01 ml/ml, ●---●; 0.03 ml/ml, ○—○; 0.05 ml/ml, ●—●; 0.07 ml/ml, ○—○; 0.1 ml/ml)

이러한 결과는 효소처리전에 전처리가 필수적이며 세척하지 않고 계속 효소처리함으로써 전처리시간을 연장할 수 있다고 사료되었다. 반면에 동시처리의 경우 세포벽에 대하여 전처리물질과 세포벽분해효소사이의 경쟁관계가 성립함으로써 전처리물질의 처리없이 효소처리만을 하였을 경우와 거의 같은 결과를 나타내는 것으로 사료되었다. 또한 전처리 및 효소처리시 진탕하지 않고 정지상태로 반응시켰을 경우(D, E), 좋은 효과를 보여주지 않았다.

그러므로 전처리 및 효소처리시 75rpm으로 완만하게 진탕하면서 2-mercaptoethanol로 15분간 처리 후 세척하지 않고 계속 세포벽분해효소를 첨가하여 효소처리하는 방법을 채택하여 다음 실험에 적용하였다.

원형질체 형성을 위한 세포벽분해효소의 농도 및 처리시간별 영향

본 실험에서 사용한 세포벽분해효소는 Giaja⁽⁶⁹⁾ 가 시도한 이래 가장 많이 사용하고 있는 달팽이의 일종인 *Helix pomatia*에서 추출한 조효소용액을 사용하였으며, 전분이용성 효모 FRI YO-32와 *S. cerevisiae*의 원형질체 형성을 위하여 이 효소 용액의 처리농도 및 처리시간별 영향을 검토한 결과는 각각 Fig. 2, Fig. 3 과 같다.

전체적으로 세포벽분해효소의 농도가 증가함에 따라 원형질체 형성수율은 급격히 증가하다가 0.05 ml/ml 이상의 농도에서는 약간 완만하게 증가하였다.

낮은 농도에서는 FRI YO-32균주보다 *S. cerevisiae*균주의 세포벽이 더 잘 분해되었으며, 특히 FRI YO-32균주는 효소농도 0.01ml/ml일 때 처리시간이 증가함에 따라 별 영향이 없었다.

이상의 결과로 볼 때 전분이용성 효모 FRI YO-32균주와 *S. cerevisiae*균주의 세포벽 분해효소의 최적농도 및 처리시간은 각각 0.7ml/10ml, 90분이 라고 사료되었다.

원형질체 형성을 위한 세포성장시기별 영향

일반적으로 효모의 세포벽 구성성분의 비율은 성장시기,^(60,61) 균체성장조건⁽⁶⁰⁾에 따라서 달라 지므로 세포벽분해효소에 의한 세포벽분해농도 성장시기에 영향을 많이 받는 것으로 판단된다.

이러한 영향을 검토하기 위하여, 기설정된 YPD 배지에서 FRI YO-32균주와 *S. cerevisiae* 균주를 배양하면서 성장시기별 원형질체 형성수율을 관찰한 결과는 Fig. 4 와 같다. 이때 배양초기의 결과는 약 30일정도 냉장고에 보관된 보관용사면배지에서 균주를 직접 채취하여 효소처리한 결과로서 *S. cerevisiae* 및 FRI YO-32균주의 원형질체 형성수율은 35%정도였다.

전체적으로 배양이 시작되어 대수기로 접어들면서 부터 원형질체 형성수율이 급격히 증가하다 대수기 후기인 배양 12시간에 두 균주 모두 약 96%

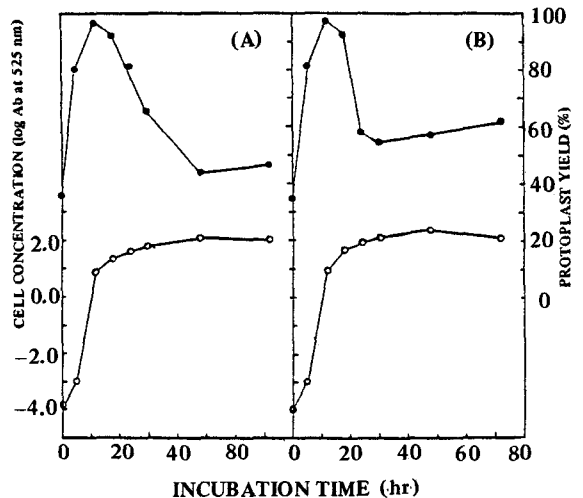


Fig. 4 Effect of growth stage in *S. cerevisiae* KFCC 32356 (A) and the strain FRI YO-32 (B) on the protoplast formation

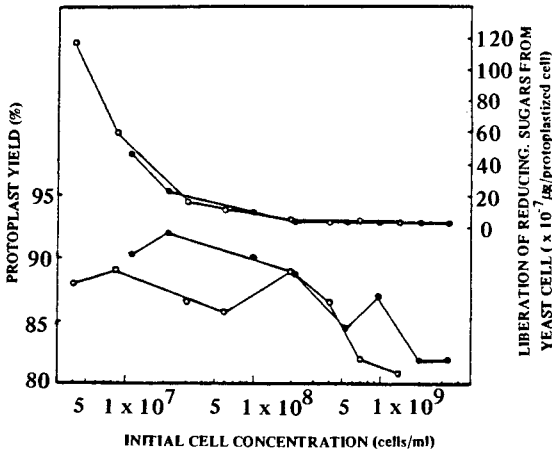


Fig. 5 Effect of cell concentration in *S. cerevisiae* KFCC32356 (o—o) and the strain FRI YO-32 (●—●) on the protoplast formation and the liberation of reducing sugars from protoplastized cells.

였고 대수기말기부터 정지기로 접어들면서 원형질체 형성수율이 급격히 감소하였으며 그 이후 거의 일정한 경향을 보였다.

Brown⁽⁶⁾은 *Helix pomatia*의 세포벽분해 효소를 사용하여, *Torulopsis globrata*, *C. albicans*, *S. cerevisiae*의 성장시기에 따른 세포벽분해능을 조사하였는데, 대수기에서 정지기로 넘어가는 전이기 (transition phase)에서의 급격한 세포벽분해능의 감소는 배지중의 대사물질고갈로 인한 세포벽의 화학적 구성의 변화에 기인하는 것으로 가정하였으며, 이러한 변화중에서 세포벽의 phosphomannan 함량의 증가나 기존의 glucan과 mannan에 있어서 cross linking의 증가를 언급하였다.

실제로 본 실험에서 원형질체 형성수율이 높은 성장시기는 대수기후기로 사료되었으며, 이러한 결과는 대부분의 연구결과와 일치하였다.

원형질체 형성을 위한 세포농도의 영향

전분이용성 효모 FRI YO-32 균주와 *S. cerevisiae*의 원형질체 형성시, 세포벽분해효소의 농도가 일정할 때 (0.5ml/10ml), 처리균주의 세포수의 영향을 검토하기 위하여, YPD 배지에서 18시간 배양후 수거한 세포를 원형질체용 완충용액으로 10⁷~10⁹ cells/ml 범위의 세포현탁액을 만든후 원형질체형성 실험을 실시하였다. 이때 세포벽분해시 생성되는 환원당의 양을 측정하여 세포 하나당 생성되는 환원당의 양으로 계산하여 검토한 결과는 Fig. 5와 같다.

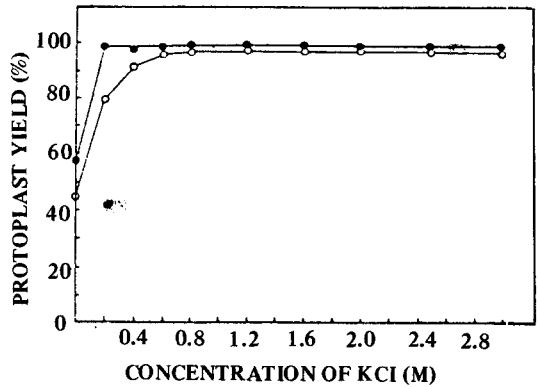


Fig. 6 Effect of concentration of osmotic stabilizer (KCl) on protoplast formation in the strain FRI YO-32 (●—●) and *S. cerevisiae* (o—o).

전체적으로 세포수가 증가할수록 원형질체 형성수율은 감소하는 경향을 보였으며, 세포 하나당 생성되는 환원당의 양은 급격히 감소하다 3 x 10⁸ cells/ml 이상에서는 거의 일정한 3 x 10⁻⁷ μg/cell 으로 계산되었다. 이상의 결과로 볼 때 세포벽 분해효소가 세포벽을 공격하여 "protoplast"나 "spheroplast"의 형태로 되기 위한 최소한의 환원당생성을 보이는 효모세포의 임계농도가 있을 것으로 추정되며 이에 대한 더 깊은 연구가 필요하다고 사료된다.

원형질체형성을 위한 삼투압안정제 농도의 영향

앞의 여러 실험에서 설정된 최적조건하에서 FRI YO-32와 *S. cerevisiae*의 원형질체 형성에 대한 본 실험에서 사용한 삼투압안정제 KCl농도의 영향을 검토한 결과는 Fig. 6 과 같다.

Fig. 6에서 보는 바와같이 효모의 원형질체 형성은 일정한 KCl 농도 이상에서는 KCl 농도에 영향을 받지 않는 것으로 사료되었으며, FRI YO-32 균주는 0.2M *S. cerevisiae*는 0.4M KCl 이상에서 원형질체형성수율이 일정하였다. 이와같은 결과로 원형질체 제조시 사용되는 원형질체용 완충용액의 KCl 농도는 최소한 0.4M KCl 이상이어야 한다고 사료되었다.

요 약

전분자원의 효율적 이용을 위한 방법의 일환으로 분리동정된 *H. anomala var. anomala* FRI YO-32와 *S. cerevisiae*와의 세포융합가능성을 검토하기 위하여 원형질체형성을 위한 기본적인 제반조건에 대하여 실험하였다.

세포벽분해효소로서 달팽이(*Helix pomatia*) 추출 효소를 사용하여 원형질체의 형성시수율에 영향을 미치는 중요한 인자로서, 함유황화합물에 의한 전처리유무 및 이러한 화합물의 처리농도 및 처리방법, 세포벽분해효소의 농도 및 처리시간, 공시효모의 성장시기 및 효모세포의 수와 삼투압안정제(KCl)의 농도등이 고려되었으며, 원형질체형성을 위한 이러한 인자들의 최적처리조건이 검토되었다.

참고문헌

1. Van Solingen, P. and J.B. Van Der Plaet : *J. Bacteriol.*, **130**, 946 (1977)
2. Fournier, P., A. Provost, C. Bourguignon and H. Heslot : *Arch. Microbiol.*, **115**, 143 (1977)
3. Sipiczki, M. and L. Ferenczy : *Molec. Gen. Genet.*, **151**, 77 (1977)
4. Sipiczki, M. and L. Ferenczy : *FEMS Microbiol. Letters*, **2**, 203 (1977)
5. Yamamoto, M. and S. Fukui : *Agric. Biol. Chem.*, **41**, 1829 (1977)
6. Allmark, B.M., A.J. Morgan, and P.A. Whittaker : *Molec. Gen. Genet.*, **159**, 297 (1978)
7. Morgan, A.J., J. Heritage and P.A. Whittaker : *Microbios Letters*, **4**, 103 (1978)
8. Stahl, U. : *Molec. Gen. Genet.*, **160**, 113 (1978)
9. Maraz, A., M. Kiss and L. Ferenczy : *FEMS Microbiol. Letters*, **3**, 319 (1978)
10. Thuriaux, P., M. Sipiczki and P.A. Fantès : *J. Gen. Microbiol.*, **116**, 525 (1980)
11. Sarachek, A., D.D. Rhoads and R.H. Schwarzhoff : *Arch. Microbiol.*, **129**, 1 (1981)
12. Klinner, U., F. Böttcher and I.A. Samsonova : "Advances in Protoplast Research" ed. by L. Ferenczy and G.L. Farkas, Pergamon Press Ltd., Oxford, p. 113 (1980)
13. Weber, H. and L. Spata : "Current Development in Yeast Research" ed. by G.G. Stewart and I. Russell, Pergamon Press LTD., Canada, P. 213 (1981)
14. Morgan, A.J., J.L. Hall, A. Brunner and P.A. Whittaker : "Advances in Protoplast Research" ed. by L. Ferenczy and G.L. Farkas, Pergamon Press Ltd., Oxford, P.93 (1980)
15. Becher, D. and Böttcher, F. : *ibid.*, p. 105 (1980)
16. Böttcher, F., D. Becher, U. Klinner, I.A. Samsonova and B. Schlöwa : *ibid.*, p. 99 (1980)
17. Barney, M.C., G.P. Jansen and J.R. Helbert : *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, **38**, 1 (1980)
18. Russell, I. and G.G. Stewart : *J. Inst. Brew.*, **85**, 95 (1979)
19. Snow, R. : *Am. J. Enol. Vitic.*, **30**, 33 (1979)
20. Skatrud, P.L., D.M. Jaeck, E.J. Kot and J.R. Helbert : *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, **38**, 49 (1980)
21. Tubb, R.S., A.J.P. Brown, B.A. Searle and A.R. Goodey : "Current Development in Yeast Research" ed. by G.G. Stewart and I. Russell, Pergamon Press Ltd., Canada, p. 75 (1981)
22. Spencer, J.F.T., P. Land and D.M. Spencer : "Advances in Protoplast Research" ed. by L. Ferenczy and G.L. Farkas, Pergamon Press Ltd., Oxford, p. 54 (1980)
23. Hockney, R.C. and R.F. Freeman : *ibid.*, p. 139 (1980)
24. Savchenko, G.V. and Yu. G. Kapultsevich : *ibid.*, p. 125 (1980)
25. Provost, A., C. Bourguignon, P. Fournier, A.M. Ribet and H. Heslot : *FEMS Microbiol. Letters*, **3**, 309 (1978)
26. Svoboda, A. : *J. Gen. Microbiol.*, **109**, 169 (1978)
27. De Van Brook, M.R., M. Sierra and L. De Figueroa : "Current Development in Yeast Research" ed. by G.G. Stewart and I. Russell, Pergamon Press Ltd., Canada, p. 171 (1981)
28. Wilson, J.J., G.G. Khachatourians and W.M. Ingledew : *Molec. Gen. Genet.*, **186**, 95 (1982)
29. Spata, L. and H. Weber : "Advances in Protoplast Research" ed. by L. Ferenczy and G.L. Farkas, Pergamon Press Ltd., Oxford, p. 131 (1980)
30. Svoboda, A. : *ibid.*, p. 119 (1980)
31. Hinnen, A., J.B. Hicks and G.R. Fink : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 1929 (1978)
32. Fournier, F., C. Gerbaud, H. Blanc, M. Aigle, T. Heslot and M. Guerin : "Advances in Protoplast Research" ed. by L. Ferenczy and G.L. Farkas, Pergamon Press Ltd., Oxford, p. 105 (1980)
33. Svihla, G., F. Schlenk and J.L. Dainko : *J. Bacteriol.*, **82**, 808 (1961)
34. Kobayashi, G.S., L. Friedman and J.F. Kofroth : *J. Bacteriol.*, **88**, 795 (1964)
35. Cicmanec, J.F. and H.C. Lichstein : *J. Bacteriol.*

- 119, 718 (1974)
36. Housset, P., M. Nagy, and J. Schwenke: *J. Gen. Microbiol.*, **90**, 206 (1975)
 37. Yamamura, N.Y. Teranishi, A. Tanaka and S. Fukui: *Agr. Biol. Chem.*, **39**, 13 (1975)
 38. Diamond, R.J. and A.H. Rose: *J. Bacteriol.*, **102**, 311 (1970)
 39. Villaneuva, J.R., M. Gacto, and A. Duran: "Advances in Protoplast Research" ed. by L. Ferenczy and G.L. Farkas, Pergamon Press Ltd., Oxford, P. 183 (1980)
 40. Longley, R.P., A.H. Rose and B.A. Knights: *Biochem. J.*, **108**, 401 (1968)
 41. Hirano, T. and A. Tanaka: "Advances in Protoplast Research" ed. by L. Ferenczy and G.L. Farkas, Pergamon Press Ltd., Oxford, p. 163 (1980)
 42. Thonson, E.A., T.G. Villa, M.J. Lewis and H.J. Phaff: *J. Appl. Biochem.*, **1**, 273 (1979)
 43. Bastide, J.M., D. Scheiber, E. Hadibi, S. Jouvert and M. Bastide: "Advance in Protoplast Research" Ed. by L. Ferenczy and G.L. Farkas, Pergamon Press Ltd., Oxford, p. 221 (1980)
 44. 구영조, 박완수, 신동화, 유태중: 한국산업미생물학회지, **13**(2), 129-135 (1985)
 45. Sherman, F., G.R. Fink and J.B. Hicks: "Methods in Yeast Genetics, Laboratory manual," Cold Spring Harbor, New York, p. 61-64 (1982)
 46. Lebeault, J.M., B. Roche, Z. Duvnjak, and E. Azoulay: *J. Bacteriol.*, **100**, 1218 (1969)
 47. Foury, F. and A. Goffeau: *J. Gen. Microbiol.*, **75**, 227 (1973)
 48. Indge, K.L. : *J. Gen. Microbiol.*, **51**, 425 (1968)
 49. Uehara, S., K. Hasegawa and K. Iwai: *Agric. Biol. Chem.*, **43**, 1991 (1979)
 50. Miller, G.L. : *Anal. Chem.*, **31**, 426, (1959)
 51. Bacon, J.S.D., B.d. Milne, I.F. Taylor and D.M. Webley: *Biochem. J.*, **95**, 28c (1965)
 52. Bacon, J.S.D., A.H. Gordon, D. Jones, I.F. Taylor and D.M. Webley: *ibid.* **120**, 67 (1970)
 53. Kuroda A., Y. Tokumaru and N. Tawada: *J. Ferment. Technol.*, **46**, 926 (1980)
 54. Davies, R. and P.A. Elvin: *Biochem. J.*, **93**, 89 (1964)
 55. Nagasaki, S., N.P. Neumann, P. Arnow, L.D. Schnabe and J.O. Lampen: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **25**, 158 (1966)
 56. Yamamoto, S., S. Nagasaki and J.O. Lampen: *J. Ferment. Technol.*, **49**, 339 (1971)
 57. Kaneko, T., K. Kitamura and Y. Yamamoto: *Agric. Biol. Chem.*, **37**, 2295 (1973)
 58. Lobyreva, L.B.: *Microbiology*, **44**, 255 (1975)
 59. Giaja, J.: *Compt. Rend. Soc. Biol.*, **77**, 2 (1914)
 60. Brown, J.P.: *Can J. Microbiol.*, **17**, 205 (1971)
 61. Cabib, E. and B. Bowers: *J. Biol. Chem.*, **246**, 152 (1971)
 62. McMurrough, I. and A.H. Rose: *Biochem. J.*, **105**, 189 (1967)