

Saccharomyces cerevisiae의 배수성에 관한 연구

趙相昊 · 沈相國* · 鄭東孝

中央大学校 産業大学 食品加工学科

*東南保健專門大学 食品加工科

(1986년 7월 1일 수리)

Studies on the Ploidy of *Saccharomyces cerevisiae*

Sang Ho Cho, Sang Kook Shim*, Dong Hyo Chung

Dept. of Food Science and Technology, College of Industrial Science,
Chung-Ang University, Seoul, Korea

*Dept. of Food Technology, Dongnam Health Junior College, Suweon, Korea

(Received July 1, 1986)

The cell volume, cell surface, cell concentration, dry cell weight, frequency of respiratory deficient mutation, resistance against ultraviolet irradiation, fermentation power, DNA contents of haploid, diploid, triploid and tetraploid of *Saccharomyces cerevisiae* strain were investigated. Respiratory deficient mutants by spontaneous mutation were absolved more frequently in the haploid than in the diploid, triploid and tetraploid. And cell volume, cell surface, cell concentration, dry cell weight, resistance against ultraviolet irradiation, fermentation power, and DNA contents were significantly increased as the ploidy increased.

생물은 환경에 의하여 자연적인 돌연변이로 육종되는 수가 있다. 이러한 자연 돌연변이는 DNA의 복제로 핵분열이 일어나는 것이 아니고 이상세포 분열로 고차배수체화를 일으키는 수가 많다⁽¹⁾.

생물의 변이는 새로운 유전 정보의 증가가 필수 조건이지만 새로운 유전자 생성을 위해서는 유전자 중복(gene duplication)이 필요하다. 왜냐하면 유전자의 중복에 의하여 여분의 유전자 copy가 새로 생기고 본래의 유전자가 정상적인 기능을 가지는 유전자좌를 생성하기 때문이다. 만약 유전자 중복이 없으면 유전자는 자연 도태되고 정상적으로는 존재하지만 본래와 같은 작용밖에 하지 않는 유전자만 남아있게 된다.

유전자 중복의 기구⁽²⁾는 같은 염기배열간에서의 재조합에 의하여 부등교차를 일으켜 genome 전체에 영향을 미치는 등 생물의 변이(고차 배수체화)에 대하여 중요한 요인의 하나가 된다.

고차 배수체⁽³⁾는 식물이나 동물에서도 나타나지

만 그 의미는 명확하지 않고, 미생물중 특히 많은 연구대상이 되고 있는 효모, 곰팡이와 같은 진핵생물에서는 확실하게 존재한다고 한다.

山口와 古屋⁽⁴⁾는 12개국에서 수집한 빵효모를 동정하여 pseudomycelia의 형성, 세포의 크기 및 포자형성력 등의 차이를 밝혔고, Gunge⁽⁵⁾는 일반 발효식품에서 효모를 분리하고 세포의 크기로 보아 3배체 이상을 고차 배수체라고 한 바 있다. 또한 Mortimer⁽⁶⁾는 방사선에 의한 효모의 배수성을 조사하였고, Schweizer와 Halvorson⁽⁷⁾은 1, 2, 3, 4배체의 핵산 함량이 배수성에 따라 일정한 값을 나타낸다고 보고하였고, 郡家 등⁽⁸⁾은 빵효모의 배수성에 의한 세포의 크기, 중량 및 자외선 저항성 등을 연구 보고하였다.

고차 배수체가 맥주^(3,9), 제빵^(6,7) 및 알코올발효공업에서 사용되는 *Saccharomyces*속 효모에서 자주 나타난다. 이것은 자연계에 생식하는 2배체 효모보다 고차 배수체 효모가 공업적으로 널리 사용

되고 있다는 것을 암시해주고 있다. 이것은 물리적인 요인에 의하여 고차 배수체가 유발되고 그로 인하여 세포 체적 (cell volume)이 커지면서 세포내 소기관이 보다 많아져서 다양한 유전 정보를 함유하고 있기 때문인 것으로 생각되어지며, 따라서 고차 배수체 일수록 발효력이 높고 DNA 함량이 많아지는 것으로 해석된다.

이러한 가능성을 연구하기 위해서 Takano⁽¹⁰⁾ 등은 1 배체에서 4 배체까지의 동질의 유전적 배경을 가지는 배수체 계열균주를 육성하였다. 이 원리는 효모에는 a형, α형이라 부르는 접합형이 있는데, 이것은 제Ⅲ번 염색체상의 접합형 유전자좌 MAT에 의하여 지배되며, 이의 접합형 a형에서 α형, 혹은 α형에서 a형의 변환상이 알려지고 있다^(10~18).

배수체 작성 방법으로는 보통 접합할 수 없는 접합형 균주간에도 강제적으로 접합시켜 영양요구성을 상보하는 원영양요구체를 회수하는 방법 (forced mating method)⁽⁶⁾ 및 교잡 균주의 호흡결손 균주에 의한 respiratory deficient auxotroph mating법⁽¹⁹⁾이 있고, 현재에는 세포 융합법⁽²⁰⁾이 효모에 있어서도 확립되어 접합형에 관계없이 세포 융합체가 얻어진다. 또한 특수하게 das 균주를 이용하는 방법 및 hmra 돌연변이 균주를 이용하는 방법이 있다.

본 연구에서는 高野에 의해 제의된 homothallism 유전자 작용에 의해 접합형 변환을 이용하는 방법⁽¹⁰⁾으로 작성한 균주 (동질 유전적 배경을 가지는 배수체 계열균주 1, 2, 3, 4 배체 균주)를 가지고 실험하여 효모 배수체에 관한 특성을 종합 검토한바, 체계화 할 수 있는 결과를 얻었으므로 이에 보고한다.

재료 및 방법

사용균주

大阪大学 工学部 醸酵工学科 大嶋 研究室에서 Tu₂ 균주로부터 유도한 동질의 유전적 배경을 가지는 1, 2, 3, 4 배체 효모 4 균주를 사용하였다 (Table 1).

Table 1. List of *Saccharomyces cerevisiae* strains used.

Strain	Ploidy	Mating type	Abbreviation
T-1023-23B-U16-70-5A	n	a	T ₁
T-1023-23b-U16-7D-U1-7B-1D-1D-7D	2n	a/a	Tu ₂
T-2000	3n	a/a/a	Tu ₃
T-1023-23B-U16-7D-U1	4n	a/a/a/a	Tu ₄

*T Line (hq type) Ho HM La adel arg4 his4 leu2 lys2 trp1

배지

Malt extract배지

상법에 따라 만들고 15° Blg로 조정하여 사용하였다.

YEPD배지

Dextrose 20 g, polypeptone 20 g, yeast extract 10 g, adenine 0.4 g, KH₂PO₄ 2 g을 증류수 1 l 에 녹여 pH 5로 조정하였다.

TTC상층배지

Glucose 5 g, agar 10 g을 증류수 1 l에 녹여 살균하고 70℃가 되었을 때 2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride(TTC) 500 mg을 무균적으로 가하여 혼합하고 50℃가 되었을때 사용하였다.

포자형성배지

Potassium acetate 9.8 g, dextrose 1g, yeast extract 2.5 g, agar 30 g을 증류수 1 l에 녹여 pH 5로 조정하였다.

세포 체적 및 표면적

세포 체적과 표면적은 24시간 YEPD액체 배양한 균체액을 적당히 희석한 후 micrometer로 세포의 장축과 단축을 측정하여 아래와 같은 식으로 계산하였다. 단, 세포의 표면적 공식에서 반지름은 장축과 단축의 평균을 2로 나눈 값이다.

$$\text{세포 체적} = \pi/6 (\text{장축}) \cdot (\text{단축})^2$$

$$\text{세포 표면적} = 4 \pi r^2 (\text{단, } r \text{은 반지름})$$

균체농도

균체 농도는 파장 660 nm에서 흡광도 1로 조정하여 Thoma Hematometer를 사용하여 1 ml당 세포수로 나타내었다.

건조 균체량

건조 균체량은 파장 660 nm에서 흡광도 1로 조정하여 균액을 원심분리 (3,500 rpm, 5분) 하여 105℃에서 건조하고 칭량하여 1 ml당 건조 균체량을 구하였다.

4 분자분석

상법에 따라 달팽이 내장의 효소로 자낭벽을 용해하고 4 포자 형성 자낭을 찾아 micromanipulator로 분리하였다⁽²⁴⁾.

자외선 저항성

하룻밤 YEPD액체 배양한 균체액을 100배 희석하여 그 희석 균체액 10 ml를 petri dish에 부은 다음, 15 watt 자외선등 30~35 cm 아래에서 각 시간별로 조사하고 다시 10배 희석한 다음, 소량을 YEPD 평판배지에 도말하여 30℃에서 2~3일간 배양한 후 colony 수를 계수하였다.

호흡결손 출현빈도

호흡결손 출현빈도는 2, 3, 5-triphenyltetrazoli-

um chloride (TTC) 한천 상승법⁽²⁵⁾으로 TTC의 변색여부에 따라 나타내었다.

발효력 측정

발효력은 15° Bg로 조정된 malt extract액체배지 100ml를 250 ml들이 삼각플라스크에 넣고 Alwood 발효관을 장치하여 발효에 의한 CO₂감량을 측정하였다.

핵산의 분획과 정량

핵산의 분획은 Ogur-Rosen법⁽²⁶⁾에 따라 RNA, DNA, 단백질로 분획하였다.

RNA 정량은 Ceriotti법⁽²⁷⁾, DNA 정량은 Schneider법⁽²⁸⁾, 단백질 정량은 Lowry법^(29, 30)에 준하였다.

현미경 사진

하룻밤 액체배양한 균체를 현미경 (Olympus BH-2)으로 관찰하고 Camera (Olympus C-35AD)로 촬영하였다.

결과 및 고찰

세포 체적 및 표면적

배수성이 다른 효모의 세포 체적과 표면적을 측정된 결과 Table 2와 같다.

Table 2에서와 같이 평균 세포 체적은 배수성에 따라 36.63, 95.93, 116.99, 151.16 (μ^3)으로 증대되고 평균 세포 표면적은 57.0, 104.96, 116.21, 141.87 (μ^2)으로 역시 증대되었으며 또한 세포 체적에 대한 세포 표면적의 비(surface/volume)는 배수성에 따라 1.56, 1.09, 1.02, 0.94로 감소하였다.

이러한 사실은 Hennaut⁽²¹⁾등의 보고와 같이 배수성에 따라 세포 체적과 세포 표면적이 증가하고 surface/volume가 배수성에 따라 감소되는 결과와 일치 하였고 배수성에 대한 세포 체적의 비율(cell volume/ploidy)은 Table 2에서와 같이 배수성에 상

Table 2. Cell volume and cell surface of isogenic series of strains having various ploidy.

Strain	Ploidy	Dimension (μ)		Volume (μ^3)	Cell Volume		
		long axis	short axis		Ploidy (μ^3)	Surface (μ^2)	Surface volume
T ₁	n	4.65	3.88	36.63	36.63	57.0	1.56
T ₂	2n	6.06	5.50	95.93	47.97	104.96	1.09
T ₃	3n	6.40	5.91	116.99	38.99	119.21	1.02
T ₄	4n	7.03	6.41	151.16	37.79	141.87	0.94

Volume (μ^3) = $\pi/6$ (long axis) · (short axis)²
 Surface (μ^2) = $4\pi r^2$

Table 3. The cell number per ml of various strains giving turbidity 1.0 at OD₆₀₀.

Strain	Mating type	Ploidy	Cell/ml ($\times 10^6$)
T ₁	a	n	17.65
T ₂	a/a	2n	12.4
T ₃	a/a/a	3n	8.05
T ₄	a/a/a/a	4n	5.08

Table 4. The dry cell weight per ml of various strains giving turbidity 1.0 at OD₆₀₀.

Strain	Mating type	Ploidy	Dry cell weight/ml (mg)
T ₁	a	n	0.52
T ₂	a/a	2n	0.56
T ₃	a/a/a	3n	0.57
T ₄	a/a/a/a	4n	0.64

관없이 36.63, 47.97, 38.99, 37.79 (μ^3)의 불규칙한 수치를 나타냈고 이는 Sakai 등⁽³⁾의 보고와 일치 하였다.

균체 농도

배수성에 따라 균체 농도를 측정된 결과는 Table 3과 같이 고차일수록 1 ml당 세포수는 적어졌다.

이러한 결과는 같은 파장 660 nm의 균체 농도 값이라도 배수성이 높아질수록 세포 표면적에 대한 세포 체적의 비가 작아지기 때문인 것으로 생각된다⁽³⁶⁾.

건조 균체량

배수성에 따라 건조 균체량을 측정된 결과는 Table 4와 같이 고차일수록 1 ml당 건조 균체량은 증대되는 것으로 나타났다.

이러한 결과는 각기 다른 배수체마다 생리, 환경 등의 차등영향으로 세포 크기와 세포 체적이 커짐으로 균체량이 증대된다고 생각된다^(8, 9).

자외선 저항성

1 배체에서 4 배체까지의 다양한 배수성 효모의 자외선 저항성을 Fig. 1과 같다.

조사하지 않았을 때를 100% 생존한 것으로 기준하여 생존율을 비교하면, 20초 조사후의 1, 2, 3, 4 배체는 28.4%, 32.0%, 44.2%, 45.0% 등으로 나타났으며 또한 80초 조사후의 1 배체가 4.5%를 나타낸 반면, 2, 3, 4 배체는 12.5%, 16.0%, 21.3% 등으로 나타났다.

이와 같은 결과에 비추어 배수성에 대한 자외선 조사의 영향은 2 배체 이상에서는 역으로 치사 돌연변이가 증가될 가능성을 시사하고 있다⁽³⁾. 이러한

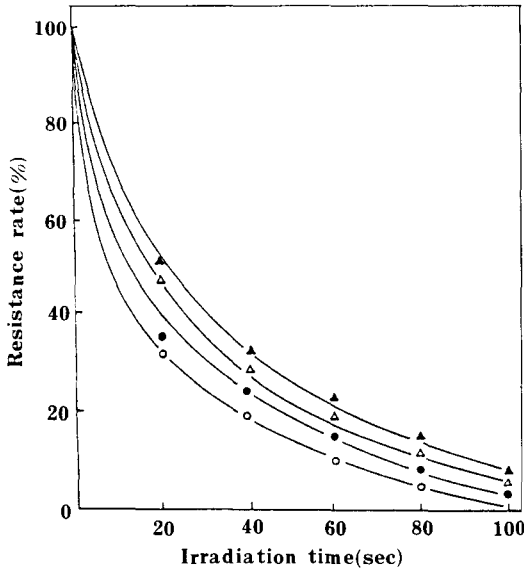


Fig. 1. Resistance of isogenic strains of having various ploidy against ultraviolet irradiation.

○—○— : T₁ (Haploid) ●—●— : T_{u2} (Diploid)
 △—△— : T_{u3} (Triploid) ▲—▲— : T_{u4} (Tetraploid)

자외선 조사의 배수성 영향은 배수성의 어떠한 생물학적 작용기구에 따라 이상 염색체의 빈도의 증가에 기인한다고 생각된다^(34,35).

호흡결손 출현빈도

2, 3, 5-Triphenyltetrazolium chloride (TTC) 한천 상층법⁽²⁵⁾으로 배수성이 다른 효모의 호흡결손 출현 빈도를 계산하여 측정된 결과는 Table 6 과 같다.

1 배체 T₁은 1.09를 나타냈으며 2, 3 배체 T_{u2} T_{u3}는 0.88, 0.89로 별 차이가 없었으며 4배체 T_{u4}는 0.15로 현저한 차이를 나타내었다.

이상의 결과에 비추어 1 배체가 2, 3, 4 배체의 고차배수체에 비하여 자연 돌연변이에 의한 호흡결손 출현빈도가 높다고 생각된다⁽³⁶⁾.

발효력 측정

배수성이 다른 효모의 발효력은 Fig. 2 와 같다.

Table 5. Resistance of isogenic series of strains having various ploidy against ultraviolet irradiation. (Unit: %)

Strain	Mating type	Ploidy	Time (sec)					
			0	20	40	60	80	100
T ₁	a	n	100	28.4	24.2	15.4	4.5	-
T _{u2}	a/a	2n	100	32.0	31.5	21.6	12.5	2.9
T _{u3}	a/a/a	3n	100	44.2	36.5	24.7	16.0	6.1
T _{u4}	a/a/a/a	4n	100	45.0	37.9	29.1	21.3	6.3

Table 6. Frequency of respiratory deficient mutant (RD) of isogenic series of strains having various ploidy.

Strain	Mating type	Ploidy	Number of colonies scored(No.)	RD colonies (No.)	Frequency of RD colonies (%)
T ₁	a	n	5579	61	1.09
T _{u2}	a/a	2n	1371	12	0.88
T _{u3}	a/a/a	3n	2257	20	0.89
T _{u4}	a/a/a/a	4n	4606	7	0.15

1, 2배체가 36시간 후부터, 3배체는 24시간 후부터 발효력이 왕성하였고, 또한 4 배체는 12시간 후부터 발효력이 왕성함을 알 수 있다. 그리고 72 시간 동안의 발효를 마친후 T₁, T_{u2}, T_{u3}, T_{u4} 각 균주의 CO₂ 감량은 1.38, 1.49, 2.08, 3.07 g 등으로 배수성에 따라 현저하게 증대됨을 나타내었다.

이상의 결과에 비추어 고차 배수체일수록 발효력이 뛰어난다는 보고와 상응하였다^(31,32).

핵산 함량

배수성이 다른 한 세포당 RNA 함량은 Table 8 과 같이 T₁, T_{u2}, T_{u3}, T_{u4} 균주에서 각각 34.08, 45.33, 64.81, 69.90 (× 10⁻⁸) μg을 나타내어 배수성에 따라 증가하였고, 배수성에 대한 RNA 함량비 (RNA/ploidy)는 34.08, 22.67, 21.60, 17.48 (× 10⁻⁸) μg으로써 고차일수록 낮아짐을 나타내었다.

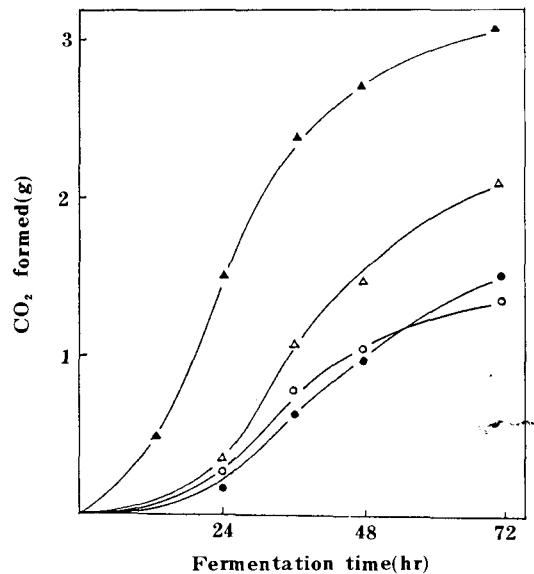


Fig. 2. Fermentation power of isogenic strains having various ploidy.

○—○— : T₁ (Haploid) ●—●— : T_{u2} (Diploid)
 △—△— : T_{u3} (Triploid) ▲—▲— : T_{u4} (Tetraploid)

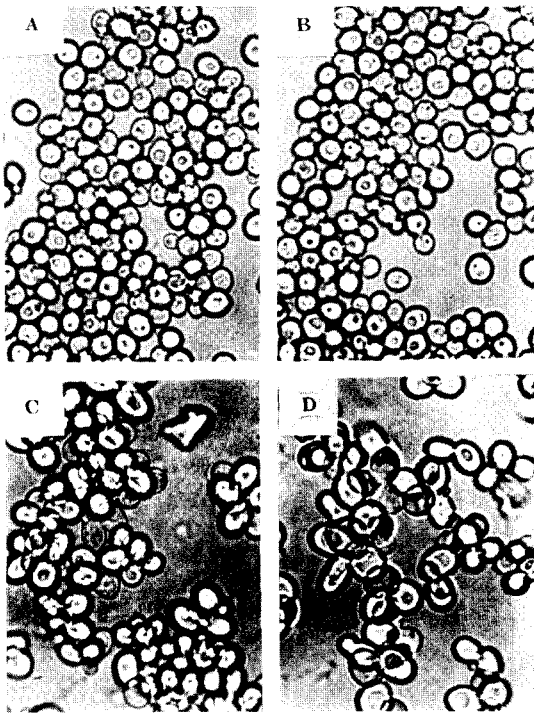


Fig. 3. Photomicrographs of yeast cells of isogenic series strains.

- (A) : a haploid strain T_1
- (B) : a/a diploid strain T_{u2}
- (C) : a/a/a triploid strain T_{u3}
- (D) : a/a/a/a tetraploid strain T_{u4}

이의 결과에 비추어 RNA 함량은 고차일수록 높게 나타난다는 Schweizer의 보고에서도 지적되었다²¹⁾.

배수성이 다른 한 세포당 DNA 함량은 Table 8과 같이 T_1 , T_{u2} , T_{u3} , T_{u4} 균주에서 각각 2.12, 3.65, 5.49, $6.84 (\times 10^{-8}) \mu\text{g}$ 을 나타내어 배수성에 따라 증가하였고, 배수성에 대한 DNA 함량비 (DNA/ploidy)는 2.12, 1.83, $1.71 (\times 10^{-8}) \mu\text{g}$ 으로 고차일수록 낮아짐을 알 수 있었다.

이의 결과에 비추어 DNA 함량은 고차일수록 높게 나타난다는 것은 Sakali²³⁾, Schweizer¹⁷⁾, Taka-

Table 7. Fermentation power of isogenic strains having various ploidy.

(Unit : g)

Strain	Mating type	Time(hr) Ploidy						
			12	24	36	48	60	72
T_1	a	n	0.03	0.28	0.75	1.03	1.23	1.38
T_{u2}	a/a	2n	0.04	0.15	0.56	0.96	1.27	1.49
T_{u3}	a/a/a	3n	0.06	0.34	0.94	1.47	1.82	2.08
T_{u4}	a/a/a/a	4n	0.53	1.48	2.22	2.69	2.92	3.07

no²¹⁾, Gunge¹⁹⁾, Oshima²⁷⁾등의 보고에서도 찾아볼 수 있었다.

배수성이 다른 한 세포당 단백질 함량은 Table 8과 같이 T_1 , T_{u2} , T_{u3} , T_{u4} 균주에서 각각 6.39, 9.65, 12.00, $15.80 (\times 10^{-6}) \mu\text{g}$ 으로 배수성에 따라 증가하였고, 배수성에 대한 단백질 함량비 (단백질/ploidy)는 6.39, 4.83, 4.00, $3.95 (\times 10^{-6}) \mu\text{g}$ 으로 고차일수록 낮아짐을 나타냈다.

이의 결과에 비추어 단백질 함량은 고차일수록 높게 나타난다는 高木の 보고와 일치하였다²²⁾.

또한 T_1 , T_{u2} , T_{u3} , T_{u4} 각각의 DNA 함량에 대한 RNA의 함량비 (RNA/DNA)는 16.08, 12.40, 11.08, 10.22로써 고차일수록 낮게 나타났고, 단백질에 대한 RNA의 함량비 (RNA/protein)는 5.33, 4.70, 5.40, $4.64 (\times 10^{-2}) \mu\text{g}$ 으로 배수성에 따른 영향은 나타내지 않았으며, 또한 DNA에 대한 단백질의 함량비 (protein/DNA)는 301, 264, 218, 219 등으로서 배수성에 따른 영향은 나타내지 않는다고 생각된다^{22,23)}.

현미경 사진

세포의 크기는 Fig. 3와 같이 각 배수성에 따라 현저한 차이를 보였고 고차배수체일수록 큰 것을 알 수 있다.

요 약

동질의 유전적 배경을 가지는 1, 2, 3, 4 배체의

Table 8. RNA, DNA and protein contents of isogenic series of strains having various ploidy.

Strain	Mating type	Ploidy	RNA/Cell ($\times 10^{-8} \mu\text{g}$)	DNA/Cell ($\times 10^{-8} \mu\text{g}$)	Protein/Cell ($\times 10^{-6} \mu\text{g}$)	RNA/ DNA	RNA/Protein ($\times 10^{-2}$)	Protein/ DNA
T_1	a	n	34.08	2.12	6.39	16.08	5.33	301
T_{u2}	a/a	2n	45.33	3.65	9.65	12.40	4.70	264
T_{u3}	a/a/a	3n	64.81	5.49	12.0	11.08	5.40	218
T_{u4}	a/a/a/a	4n	69.90	6.84	15.8	10.22	4.64	219

효모에 있어서 세포 체적, 세포 표면적, 균체농도, 건조 균체량, 자외선 저항성, 호흡결손 출현빈도, 발효력, 핵산 함량을 조사하였다.

자연 돌연변이에 의한 호흡결손 변이의 출현빈도는 2, 3, 4 배체보다 1 배체에서 현저히 높게 나타났다. 세포 체적, 세포 표면적, 균체농도, 건조 균체량, 자외선 저항성, 발효력, DNA 함량등은 고차 배수성에 따라 현저히 높아지는 경향을 나타냈다.

참고문헌

1. 高木敦子 : 博士学位 論文, 大阪大学 (1985)
2. 永井進 : 酵母菌의 生活, 「酵母의 遺伝学」 p. 80 ~94 学会出版社 東京 (1982)
3. Sakai, K. and T. Takahashi: *Bull. Brew. Sci.*, **18**, 29 (1972)
4. 山口辰良, 古屋 晃 : 日農化, **33**, 406 (1959)
5. Gunge, N.: *Japan. J. Genetics*, **41**(3), 203 (1966)
6. Mortimer, R.K.: *Rad. Res.*, **9**, 312 (1958)
7. Scheizer, E. and H.O. Halvorson: *Exp. Cell. Res.*, **56**, 239 (1969)
8. 郡家徳郎 : 日農化, **38**(3), 158 (1964)
9. 高野 勇, 吉柄 肇, 寺島 豊 : 日醸工, **44**(4), 150 (1966)
10. Takano, I., T. Oshima, S. Harashima, and Y. Oshima: *J. Ferment. Technol.*, **55**(1), 1 (1977)
11. Takano, I. and Y. Oshima: *Genetics*, **57**, 875 (1967)
12. Takano, I. and Y. Oshima: *Genetics*, **67**, 229 (1970)
13. Takano, I. and Y. Oshima: *Genetics*, **67**, 327 (1970)
14. Harashima, S., Y. Nogi, and Y. Oshima: *Genetics*, **77**, 639 (1974)
15. Harashima, S. and Y. Oshima: *Genetics*, **84**, 437 (1976)
16. Harashima, S. and Y. Oshima: *Genetics*, **86**, 535 (1977)
17. 原島 後, 管本和志, 大嶋泰治 : 日遺伝学雜誌, **52**, 441 (1977)
18. Hicks, J.B. and I. Herskowitz: *Genetics*, **85**, 373 (1977)
19. Gunge, N. and Y. Nakatomi: *Genetics*, **70**, 11 (1972)
20. Tagaki, A., S. Harashima, and Y. Oshima: *Appl. Environ. Microbiol.*, **49**(1), 244 (1985)
21. Takano, I. and Y. Oshima: *J. Ferment. Technol.*, **51**(2), 71 (1973)
22. Kassir, Y. and G. Simchen: *Genetics*, **82**, 187 (1976)
23. Klar, A.J.S. and S. Fogel: *Genetics*, **92**, 759 (1979)
24. Johnston, J.R. and R.K. Mortimer: *J. Bacteriol.*, **78**, 292 (1959)
25. Ogur, M., R.S. John and S. Nagai: *Science*, **125**, 928 (1957)
26. Ogur, M. and G. Rosen: *Arch. Biochem.*, **25**, 262 (1950)
27. Ceriotti, G.: *J. Biol. Chem.*, **214**, 59 (1955)
28. Schneider, B.C.: *J. Biol. Chem.*, **161**, 293 (1945)
29. Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A. Lewis Farr, and R.J. Randall: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951)
30. 정동효, 유주현, 양한철, 양 룡 : 식품공학 실험 (I) p. 346, 탐구당(1980)
31. Hennaut, C., F. Hilger, and M. Grenson: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **39**(4), 666 (1970)
32. 高木敦子 : 修士学位 論文, 大阪大学, (1983)
33. Owen, M.E. and R.K. Mortimer: *Nature*, **177**, 625 (1956)
34. Conger, A.D. and A.H. Johnston: *Nature*, **178**, 271 (1956)
35. Swaminathan, M.S. and A.T. Natarajan: *Nature*, **179**, 479 (1957)
36. Ogur, M. and R. John: *J. Bacteriol.*, **72**, 500 (1956)
37. Yamazaki, T., and Y. Oshima: *J. Gen. Microbiol.*, **111**, 271 (1979)