

Amylase 분비효모와 alcohol 발효효모의 세포융합에 의한 균주의 개발

제 1 보. *S. cerevisiae*와 *S. diastaticus*간의 세포융합 및 융합체의 성질

서정훈 · 김영호 · 전도연 · 이종태

경북대학교 자연과학대학 미생물학과
(1986년 7월 19일 수리)

A study on strain improvement by protoplast fusion between amylase secreting yeast and alcohol fermenting yeast

I. Isolation and characterization of fusant between *S. cerevisiae* and *S. diastaticus*

Jung Hwn Seu, Young Ho Kim, Do Youn Jun and Jong Tae Lee

Department of Microbiology, Kyungpook National University, Taegu, Korea
(Received July 19, 1986)

To improve the starch fermentation ability of yeast, hybrids were introduced by protoplast fusion of *S. cerevisiae* and *S. diastaticus*. The protoplasts of parental auxotrophic cells were fused in the presence of 10 mM CaCl₂ and 30% of polyethyleneglycol (M.W 4,000). The frequencies of fusant formation varied depending upon the strains used and were 3.51×10^{-4} to 5.04×10^{-4} for the regenerated protoplasts. The strains capable of extensive starch hydrolysis produce only 10% to total fusants. The 4 strains were finally selected by the results of starch fermentation and genetic stability test. The DNA content and cell volume of the fusants were greater than those of the parental strains.

Alcohol 발효공업에 사용하는 효모의 균주 개발을 몇년 전만 해도 mutation이나 단순한 선별에 의존하였다. 그러나 최근에는 당화와 발효 두 공정의 단일화를 위하여 유전자 재조합과 세포융합 기술을 도입하여 전분 분해성 알코올 발효효모 개발에 주안을 두고 있다. 1983년 Fukui 등⁽¹⁾은 alcohol 발효 효모인 *S. cerevisiae* 내에 *S. diastaticus*의 gluco-amylase gene을 YEp vector를 사용하여 gene cloning한 바 있으며 또 1985년 사 등⁽²⁻³⁾에 의해서 yeast shuttle vector에 세균성 amylase gene을 cloning하여 yeast에 발현시킨 보고가 있다. 또 1986년

Sakai 등⁽⁴⁾ *S. diastaticus*의 intraspecific fusion에 의해서 전분을 발효하는 효모 개발을 시도한 연구가 있으며 그 외의 여러 연구자들에 의한 이 방면의 연구가 발표되어 있으나 그 성적이 공업적 이용 가능성을 보이지 못하고 있다.

본 연구에서는 *S. cerevisiae*와 *S. diastaticus*의 protoplast를 fusion시켜 얻은 융합세포 중 유전 안정성이 우수하며 또 amylase 생성력이 우수한 균주를 선별하여 전분 발효성 효모 개발에 필요하다고 생각되는 기본 성질을 조사하였다.

재료 및 방법

공시균주

본 실험에 사용한 균주는 Table 1과 같다. *Saccharomyces cerevisiae* 균주는 동경 대학으로 부터 분양받았으며, *S. diastaticus*의 영양요구주는 본 실험실에서 N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine 처리로 분리한 균주이다.

배지

Yeast 완전 배지로는 YPD (Yeast extract 0.5%, Polypeptone 0.5%, Dextrose 2%)를 사용하였으며, 최소배지는 Glucose 2%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.2%, KH_2PO_4 0.1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%, KCl 0.05%, Yeast nitrogen base without amino acids (Difco) 0.2% 조성의 배지를 사용하였다. 이때 필요에 따라 한천을 2% 첨가하였다. Protoplast 생성용 배지는 PM (Glucose 4%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.3%, KH_2PO_4 0.1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%, KCl 0.05%, Yeast extract 0.2%)을 사용하였으며, protoplast 재생배지로는 완전배지와 최소배지에 KCl 을 0.6 M 되게 첨가하여 사용하였다. 그리고 starch 발효능 조사는 yeast extract 1%, polypeptone 1%, soluble starch 3%의 YPS로써 하였다.

Protoplast 형성

PM 상에서 키운 대수증식기의 세포를 회수하여 saline 용액으로 2회 세척한 후 zymolyase (2 mg/ml)와 2-mercaptoethanol을 함유한 1 M sorbitol 용액 (pH 8.0)에 현탁하여 30°C에서 60분간 반응시켜 protoplast를 얻었으며 생성된 protoplast는 0.6 M KCl (pH 8.0) 용액으로 1회 세척한 후 보관 사용

하였다.

Protoplast fusion

각각의 parental protoplast (5×10^8 cells/ml)를 1:1비로 혼합한 후 원심분리하여 재 회수하였다. 회수한 protoplast를 vortexing으로 고르게 현탁한 후 CaCl_2 를 10 mM 함유한 분자량 4,000의 30% 농도였으며, PEG 처리 시간은 30°C에서 15분간 하였다. PEG 처리 후 0.6 M KCl 로 2배 희석하여 원심분리하고 다시 같은 용액으로 1회 세척한 다음 최종 1 ml에 현탁하여 각각 hypertonic 완전 배지와 최소 배지에 중층 도말하였다. 한편 융합체는 양 친주의 아미노산 요구가 상호 보완되어 최소 배지에 나타나는 prototroph로 하였다.

Starch fermenting 융합체의 선별

Hypertonic 최소 배지에 나타나는 융합체를 2차례의 새로운 최소 배지상에서 subculture 한 후 액체 YPS 배지에서 durham 관으로 alcohol 발효능을 조사함과 동시에 다른 YPS 배지상에 접종한 융합체를 30°C에서 4일간 진탕배양하여 그때의 배양원액의 glucoamylase 활성을 측정하였다. 이리하여 glucoamylase 효소활성도 높을 뿐 아니라 starch에서의 alcohol 발효능이 강한 fusant를 선별하였다.

Glucoamylase 효소 활성 측정

Somogyi-Nelson 방법⁽⁷⁾으로 0.1 M acetate buffer (pH 5.3) 내에 기질로서 soluble starch를 0.3% 농도로 첨가하고 여기에 배양액을 효소액으로 가하여 총 반응액을 1.5 ml로 하고 50°C에서 1시간 동안 반응한 후 100°C에서 boiling함으로써 반응을 정지시켰다. 이 반응액 0.5 ml를 Somogyi-Nelson 방법으로 D-glucose를 standard로 하여 환원당을 정량하였다. 이때 효소활성 1 unit는 위의 반응 조건하에서 1분당 반응액 1 ml당 1 μg 의 glucose를 생성하는 양으로 정하였다.

Fusant의 생리적 특성 조사

① 유전 안정성

최소 배지상에 나타난 융합체의 유전 안정성을 최소 배지와 YPS 배지상에서 subculture함으로써 조사하였다. 일정기간 보존된 균주와 계속 계대 배양한 균주를 새로운 완전 배지에 접종하여 30°C에서 2일간 배양한 후 살균된 saline 용액에 현탁 (5×10^7 cells/ml), 희석하여 80~100 colonies/petri dish 정도 되게 완전 배지에 도말 배양하였다. 완전 배지상에 나타난 colony를 다시 완전 배지와 최소 배지에 replica하여 완전 배지상의 colony에 대한 최소 배지에 나타난 colony비로서 이들의 유전 안정성을 검토하였다. 이때 auxotrophs의 비는 다음의 식으로 구하였다.

Table 1. List of strains used.

Strain	Marker Genotype	Origin
<i>S. cerevisiae</i> D13-1A	a his3, trp1, gal2	
<i>S. cerevisiae</i> MC 16	a leu2, his4, ade2, lys2	
<i>S. diastaticus</i> IFO1046	wild type	
<i>S. diastaticus</i> A4	thr	Mutant induced in <i>S. diastaticus</i> IFO 1046
HSDD* -105	wild type	Fusant
HSDD -170	"	"
HSDM** -96	"	"
HSDM -119	"	"

*Fusion Products between *S. cerevisiae* D 13-1A and *S. diastaticus* A 4

**Fusion Products between *S. cerevisiae* MC 16 and *S. diastaticus* A 4

$$\text{Auxotrophs (\%)} = \left(1 - \frac{\text{colonies on MM}}{\text{colonies on CM}}\right) \times 100$$

② DNA 함량 측정

Yeast total DNA 추출법 (A. A. Potter et al., 1981)⁽⁸⁾에 따라 측정하였다. YPD 배지상에서 2일간 키운 대수증식기의 cell을 원심 집균하여 saline 용액으로 2회 세척하고 zymolyase와 2-mercapto-ethanol이 함유된 1 M sorbitol (pH 8.0)에 현탁하여 30°C에서 60분간 protoplast화 하였다. 생성된 protoplast를 다시 회수하여 50 mM EDTA 용액 (containing SDS; final conc 1%)에 재 현탁한 다음 70°C에서 15분간 열처리하고 냉각하였다. 여기에 1.5 volume의 5 M KAc를 가하여 0°C에서 1시간 방치한 후 10,000 rpm으로 원심분리하였다. 이때 얻은 상등액에 2배량의 냉 alcohol를 가해 yeast DNA를 회수하였다. 회수한 DNA를 다시 TE buffer (pH 8.0)에 재 용해시켜 RNase (10 µg/ml)를 처리한 후 buffer saturated phenol, chloroform, water saturated ether로 각각 3회씩 추출한 다음 EtOH로 재 회수하였으며 O. D. 260 nm로서 각 균주의 DNA 함량을 측정하였다.

③ 형태적 특성 및 세포 체적 측정

YPD 한천 사면 배지에 보존된 각각의 균주를 액체 YPD에 옮겨 30°C에서 24시간 배양한 뒤 다시 새로운 YPD 배지 상에 접종하여 30°C에서 48시간 배양하여 이들의 cell 'size'를 micrometer로 측정하였다. 이때 세포 세척은 $V = \frac{4}{3}\pi \cdot \frac{a}{2} \cdot \left(\frac{b}{2}\right)^2$ (a: length of cells, b: width of cells) 식으로 구하였다.

④ Spore 염색

YPD 한천 사면 배지상의 각 균주를 Yeast extract 0.8%, Bacto-peptone 0.3%, Dextrose 10.0%, Agar 2.0%의 presporulating 배지에서 희석하여 30°C에서 3일간 배양한 후 다시 균체를 sporulating medium (Potassium acetate 1.0%, Yeast extract 0.1%, Glucose 0.05%, Agar 2.0%)에 이식하여 30°C에서 3일간 배양한 후 basic carbolic

fuschin으로 염색하였다. 이때 대비 염색으로는 methylene blue를 사용하였다.

결 과

원형질체 융합

*Saccharomyces cerevisiae*와 *diastaticus*의 영양 요구주를 PEG로 처리하여 얻은 fusion frequency는 Table 2와 같다. 이때 이종간 fusion에 있어서 비교적 fusion marker가 단순한 *S. cerevisiae* D13-1A와의 fusion이 MC16 균주보다 fusion이 용이하게 일어남을 알 수 있었다. *S. diastaticus* A4와 *S. cerevisiae* D13-1A와의 fusion으로 부터 얻은 fusant를 HSDD로, *S. diastaticus* A4와 *S. cerevisiae* MC16과의 fusant를 HSDM으로 표기하였다.

또한 이들 fusant를 glucose대신 soluble starch를 2% 첨가한 최소 배지에서 키움과 동시에 YPS 배지에 durham 관으로서 alcohol 발효능을 조사하였으며, 2회 subculture함으로써 원 친주로의 segregation 여부도 검토하였다. Table 3에서와 같이 HSDD의 경우 총 fusant 244주 중 2회 subculture로 fusant의 약 24%가 본래의 영양요구주로 segregation된데 반해 HSDM은 36%였다. 따라서 fusion marker가 많을수록 fusant가 불안정함을 알 수 있었으며, 알코올 발효 및 glucoamylase 생성에 있어서도 같은 경향임을 알았다.

융합체에 의한 glucoamylase의 생성

YPS 배지에서 4일간 배양한 culture broth의 gl-

Table 2. Frequency of interspecific protoplast fusion.

Parental strains		Fusion frequency
A	B	
<i>S. diastaticus</i> A4	<i>S. cerevisiae</i> D13-1A	3.51×10^{-4}
<i>S. diastaticus</i> A4	<i>S. cerevisiae</i> MC 16	5.04×10^{-5}

Table 3. Physiological pattern of fusion products.

Fusant	Total colonies	1st* subculture	2nd subculture	Starch fermenting colonies**	Growing on SMM colonies
1. HSDD	number	244	5***	54	174
	%	100	2.0	22.1	71.3
2. HSDM	number	125	11	35	67
	%	100	8.8	28	53.6

*Interval between subculture was 7 days.

**The starch fermenting colonies were determined by means of durham tube as described in Materials and Methods.

***The number of segregants.

Table 4. Glucoamylase productivity of fusion products.

Strain	Total colonies	Amylase productivity (as <i>S. diastaticus</i> A4 100%)					
		1-25	26-50	51-75	76-100	101-	
1. HSDD	number	185	65	45	32	25	18
	%	100	35.1	24.3	17.3	13.5	9.7
	No. of starch fermenting strains	174	54	45	32	25	18
2. HSDM	number	79	24	15	21	9	10
	%	100	30.4	20.0	26.6	11.4	12.7
	No. of starch fermenting strains	67	13	14	21	9	10

S. diastaticus IFO 1046 171.04, *S. cerevisiae* D 13-1A 0, *S. cerevisiae* MC 16 0

*The starch fermenting strains were determined by durham tube method as described in Materials and Methods.

ucoamylase activity를 친주인 *S. diastaticus* 영양요구주 및 wild type 과 비교하여 조사하였다 (Table 4). 이때 HSDD 의 경우 glucoamylase 활성을 가지는 fusant 185주 중 starch fermenting 균주는 174주, HSDM 은 79주 중 67주였다. Fusant 의 glucoamylase 생성능은 친주인 *S. diastaticus* A4와 비교해 볼때 약 80~90%가 *S. diastaticus* A4 수준 내지 그 이하였으며, HSDD 의 경우 9.7%, HSDM 은 12.7% 만이 그 이상의 효소 활성을 보였다. Control인 *S. cerevisiae* D13-1A와 MC16에서는 glucoamylase 활성을 볼 수 없었으며 *S. diastaticus* 양생주는 A4를 100으로 할 때 171의 활성을 보였다.

융합체의 일반적 성질 조사

① 유전 안정성

완전 배지와 최소 배지에서 각각 1개월간 보존한 후 이들의 유전안정성을 재료 및 방법에 따라 조사해 본 바 Table 5-1에서와 같이 최소 배지에

Table 5. Genetic stability of finally selected fusants.

5-1. After 1 month cultivation on CM and MM.

Strain	Percentage of auxotrophs	
	on CM	on MM
HSDD-105	1.0	0
HSDD-170	19.1	13.0
HSDM-96	24.0	3.1
HSDM-119	10.7	5.3

Percentage of auxotrophic cells from interspecific fusion product between *S. cerevisiae* and *S. diastaticus* after cultivation on CM and MM.

보존하는 것이 selective effect로 보다 유전적인 안정을 기할 수 있음을 알았다. 또한 최소 배지상에서 안정화된 융합체를 10일 간격으로 최소 배지상에서 4회 subculture한 결과 HSDM-119균주를 제외하고는 매우 안정화된 융합체였다. Table 5-3은 일년간 계속 사용한 fusant의 유전안정성을 조사한 것으로 역시 HSDM-119에서 약 1.2%의 auxotrophic type (segregant)가 보였을 뿐 매우 안정화된 균주임을 알았다.

② DNA 함량

A. A Petter 방법⁽⁸⁾에 따라 fusant의 DNA 함량을 조사하였다. Table 6에서와 같이 haploid인 *S.*

5-2. Effect of 4 successive subculture on genetic stability of fusants.

Strain	Colonies on		% of auxotrophs
	CM	MM	
HSDD-105	2.55×10^6	2.56×10^6	0.4
HSDD-170	6.12×10^6	6.12×10^6	0
HSDM-96	2.12×10^6	2.34×10^6	0
HSDM-119	8.02×10^7	7.90×10^7	1.5

Interval between subculture was 10 days.

5-3. Genetic stability of fusants.

Strain	Colonies on		% of auxotrophs
	CM	MM	
HSDD-170	1.12×10^7	1.12×10^7	0
HSDM-119	1.59×10^7	1.61×10^7	1.2

The genetic stability of finally selected fusants was determined after 12 months cultivation on CM.

Table 6. DNA content in cells of parents and fusants.

Strain	Content of DNA (fg/cell)
<i>S. cerevisiae</i> D13-1A (n)	31.4
<i>S. diastaticus</i> A4 (2n)	85.5
HSDD-105	107.2
HSDD-170	99.4
HSDM-96	89.1
HSDM-119	104.8

The parental auxotrophs and fusants were cultured in YPD medium at 30°C for 2 days with shaking and the DNA contents were expressed as fg/cell.

*cerevisiae*와 diploid인 *S. diastaticus*보다 fusant에 있어서 DNA 함량이 많았으며 특히 HSDD-105와 HSDM-119의 경우에는 polyploid임을 알 수 있었다.

③ 형태적 특성 및 세포 체적

제대 6개월일때와 12개월의 세포 형태 및 size를 측정해 보았다. Haploid인 *S. cerevisiae*의 세포 체적이 75.16~74.93인데 반해 *S. diastaticus*는 100.50였으며 fusant는 170 범위 내외로 비교적 각각의 parent cell보다 크음을 알 수 있었고 균주를 사용하는 기간동안 거의 cell size에 변화가 없는 것으로 보아 유전안정성과 관련지어 매우 안정화된 융합체임을 다시 확인하였다.

④ Spore 염색

Basic carbolic fuchsin과 methylene blue로 염색해 본 바 *S. cerevisiae*는 haploid로써 spore형성을 전혀 볼 수 없었으며 *S. diastaticus*의 경우 야생주

Table 7. Morphology of interspecific fusion products.

Strain	1st(after 6 months)		2nd(after 12months)	
	Cell size (μm)	Cell volume (μm ³)	Cell size (μm)	Cell volume (μm ³)
<i>S. diastaticus</i> A4	5.37×6.66	100.50	5.62×6.56	105.72
<i>S. cerevisiae</i> D13-1A	5.04×5.75	75.16	5.04×5.75	69.47
<i>S. cerevisiae</i> MC16	4.97×5.80	74.93	4.98×5.79	73.14
HSDD-105	6.43×7.84	169.29	6.43×7.86	166.07
HSDD-170	6.53×7.74	172.41	6.60×7.81	173.81
HSDM-96	6.62×7.20	164.93	6.58×7.19	158.62
HSDM-119	6.37×8.09	171.87	6.38×8.17	169.89

The parental auxotrophs and fusants were cultured in YPD medium at 30°C for 2 days with shaking. The cell size was measured with micrometer.

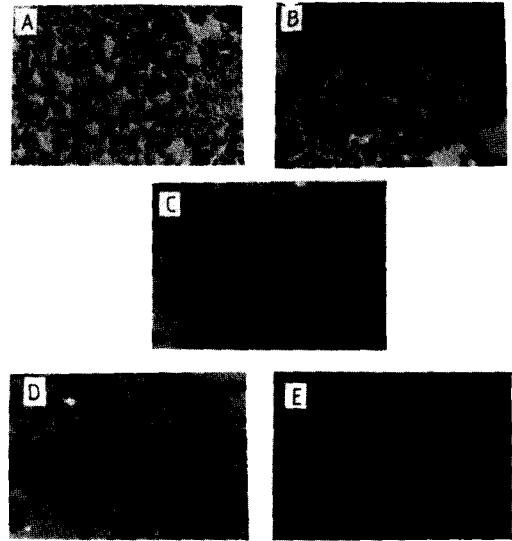


Fig. 1. Spore staining of the fusion products.

- A. *S. diastaticus* IFO 1046
- B. *S. diastaticus* A4
- C. *S. cerevisiae* D13-1A
- D. HSDD-170
- E. HSDM-119

는 spore 형성능이 강한데 반해 영양 요구주는 다소 떨어졌었다. 이때 융합체의 경우는 비교적 spore 형성능이 좋았는데 HSDM-119 균주보다 HSDD-170이 훨씬 잘 형성하였다(Fig. 1).

고찰

Yeast 중 extracellular glucoamylase 생성능이 강한 *S. diastaticus*는 starch biomass로부터의 에타놀 생성과 더불어 주목받는 균주이나 *S. diastaticus* 자체의 당으로부터의 알코올 발효능이 *S. cerevisiae*보다 떨어지므로 이의 개발이 필요하다고 생각된다. 따라서 본 연구에서는 당화와 발효 과정의 단일화를 목적으로 *S. cerevisiae*와 *S. diastaticus* 간의 이종간 세포 융합을 하였다.

PEG와 CaCl₂로 protoplast 융합을 시도한 결과 융합 빈도가 10⁻⁴~10⁻⁵이었으며, starch 최소 배지에서 생육이 가능한 균주는 HSDD의 경우 75.8%, HSDM은 63.2%였다(Table 3). 최소 배지상에 나타난 융합체의 안정성은 총 융합체의 약 25%가 2회의 subculture로 원 친주 유래의 auxotrophic cell로 segregation하여 Fourier⁽⁹⁾의 *C. tropicalis*의 동종간 융합체가 1개월 배양으로 30.7%가 segregation되는 것과 비슷한 경향을 보였다.

이들 fusant의 효소 생성(Table 4)에서는 *S. di-*

astaticus 야생주수준의 균주가 HSDD의 경우 9.7%, HSDM은 12.7%로 효소 생성에 있어서는 fusant 간에 다소간의 차이를 보였다. 이와 같은 결과는 Tamaki와 Yamashita의 보고^(10,11)에서와 같이 *S. diastaticus* 내의 STA gene과 *S. cerevisiae* 내에 존재하는 glucoamylase inhibition gene의 상호 작용 때문이라고 사료된다.

융합체로서의 특징을 유전안정성 (Table 5), DNA 함량 (Table 6), 및 cell size (Table 7)을 조사해 본 바 DNA 함량에 있어 Brook⁽¹²⁾과 Weber⁽¹³⁾의 보고서와 같이 fusant는 polyploid로서 parent cell보다 DNA 함량이 많았으며 유전 안정성은 최종 선별된 융합체에 있어서는 매우 안정화된 균주임을 알았다.

세포의 크기 역시 융합체가 parent보다 크고 형태는 대부분 전형적인 ovoid형이었다. Yamashita의 보고⁽¹⁰⁾에 따르면 *S. diastaticus*와 *S. cerevisiae*는 서로 sexually mating이 가능하다고 하였으므로 융합체인 HSDD-170과 HSDM-119의 spore형성능을 조사해 본 바 잘 형성함을 알았다.

요 약

본 연구의 목적은 yeast중 glucoamylase를 분비하는 *S. diastaticus*와 발효성 효모인 *S. cerevisiae*간의 세포융합을 하여 당화와 발효의 두 공정을 단일화 하는데 있다.

각각의 parental protoplast를 1:1로 섞은 후 P-EG (M. W. 4,000) 30%와 10mM CaCl₂ 용액으로 fusion시킨 결과 10⁻⁴~10⁻⁵빈도였으며, 총 fusant중 HSDD의 경우 24%, HSDM은 36.8%가 2회의 subculture로 친주 유리의 auxotrophic cell로 segregation하였고, glucoamylase 생성 균주 중 HSDD는 9.7%, HSDM은 12.7%만이 *S. diastaticus* 야생주 수준의 효소 생성을 보였다.

이들 fusant의 특징을 조사해 본 바 원 parent보다 세포의 크기가 클 뿐 아니라 DNA 함량도 많았으며 *S. cerevisiae*가 spore을 전혀 형성하지 못한데 반해 융합체들은 spore을 잘 형성하였다.

이들의 fusant중 유전안정성이 높고 glucoamylase 생성능도 강한 HSDD-170과 HSDM-119를 최종적으로 선별하였다.

사 사

본 연구는 1985년도 문교부 지원의 유전공학 연구를 위한 학술 연구 조성비에 의하여 수행되었으며 관계하신 여러분께 감사함을 드립니다.

참고문헌

1. Fukui, S. and I. Yamashita.: *Agric. Biol. Chem.*, **47**, 2689 (1983).
2. Seu, J.H., Y.H. Kim, D.Y. Jun, S.D. Hong and Y.L. Jo: *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **14**, 161 (1986).
3. Seu, J.H., Y.H. Kim, D.Y. Jun, S.D. Hong and J.T. Lee: *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, in press
4. Seu, J.H. and C.H. Yi: *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **14**, 155 (1986).
5. Seu, J.H. and G.P. Kim: *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, in press
6. Sakai, T., K.I. Koo and K. Saitoh.: *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 297 (1986).
7. Ando, E., H. Terayama, K. Nishizawa and T. Yamalawa: *Biochemical research methods*. Asakura press, Tokyo, Vol. 1, 126 (1967).
8. Potter, A.A., A. Nasim, R.S. Zitomer and C.P. Hollenberg: *Gene cloning in Saccharomyces cerevisiae* Recombinant DNA methodology (Dillon, J.A.R. ed.) Wiley press, 127 (1985).
9. Fournier, R., A. Provost, C. Bourguignon and H. Heslot: *Arch. Microbiol.*, **115**, 143 (1977).
10. Yamashita, I. and S. Fukui: *Agric. Biol. Chem.*, **48**, 137 (1984).
11. Yamashita, I., T. Tamura, T. Hatano and S. Fukui: *J. or Bacteriol.*, **161**, 574 (1985)
12. de van Brook, M.R., M. Sierra and L. de Figueroa: *Intergeneric fusion of yeast protoplasts-Current developments in yeast research* (Stewart, G.G. and I. Rusell ed.), Pergamon press, 171 (1981).
13. Weber, H. and L. Spata: *Charaterization of yeast protoplast-fusion products-Current developments in the yeast research* (Stewart, G.G. and I. Rusell ed.), Pergamon press, 171 (1981)