

## 간장덧에서 선별한 *Zygosaccharomyces rouxii*와 *Saccharomyces cerevisiae*와의 Protoplast 융합

이병호·류병호\*\*·최성희  
김광현\*·김혜성\*\*·채영주\*\*\*  
부산 동덕대학교 식품영양학과, \*생물학과  
\*\* 부산 산업대학교 식품공학과  
\*\*\* 부산 오성 식품(주)

### Protoplast Fusion between *Zygosaccharomyces rouxii* and *Saccharomyces cerevisiae* Selected from Soy Sauce Mash

Byeong-Ho Lee, Beung-Ho Ryu\*\*, Sung-Hee Choi, Kwang-Hyeon Kim\*  
Hae-Sung Kim\*\* and Young-Zu Chae\*\*\*

\*Department of Food and Nutrition, \*Department of Biology, Donggeui University, Pusan

\*\*Department of Food Science and Technology, Pusan Sanub University, Pusan

\*\*\*Oh Sung Food Co., Pusan

#### Abstract

Protoplast fusion between *Zygosaccharomyces rouxii* M-12 and *Saccharomyces cerevisiae* M-43 were investigated for breeding of a new brewing yeast strain for soy sauce. Auxotrophic mutants of *Zygosaccharomyces rouxii* ZRM-83 (*Met*<sup>-</sup>, *Thr*<sup>-</sup>) and *Saccharomyces cerevisiae* SCM-46 (*Lys*<sup>-</sup>, *Arg*<sup>-</sup>) were selected by treatment of 3.0% ethylmethane sulfonate and nutritional complementary method. Protoplast of both strains were more effective by treatment of 0.05mg/ml zymolase 20T for 60min. Fusion efficiency was much higher by treatment of 30% PEG 6,000 for 30min and fusion frequencies were 10<sup>-4</sup>~10<sup>-5</sup>. These fusants originated from two protoplasts had properties of big cell size and much DNA content.

Key words: protoplast fusion, auxotrophic mutant, *Zygosaccharomyces rouxii*, *Saccharomyces cerevisiae*, soy sauce mash

#### 서 론

세포융합은 핵치환 및 유전자조작 기법과 더불어 새로운 기술로서 생물, 식품, 의학 등의 분야에서 많은 연구가 진행되고 있다. 세포융합에 있어서 중요한 부분을 차지하고 있는 원형질체의 형성은 Eddy 등<sup>(1)</sup>이 처음으로 시도한 이후 Kao 등<sup>(2)</sup>이 polyethyleneglycol (PEG)을 이용하여 원형질체 융합이 이루어지면서부터 곰팡이<sup>(3,4)</sup> 세균<sup>(5,6)</sup> 방선균<sup>(7)</sup> 등의 원형질체 융합에도 사용되고 있다. 효모의 원형질체 융합은 Sipiczki와 Ferenczy<sup>(8)</sup>에 의하여 *Schizosaccharomyces pombe*에 대하여 보고한 이후 동종간<sup>(9~14)</sup> 이종간<sup>(15)</sup> 및 이속간<sup>(16)</sup>에서도 실시하여

효모의 유전학적, 세포학적 해석뿐만 아니라 우수균주의 육종개량에 이용되고 있다. 효모의 원형질체 융합에 의한 균주의 개량으로서는 알콜발효<sup>(17-19)</sup> 구연산발효<sup>(20)</sup> 단백질생산<sup>(21)</sup> 등 다소 있으나 간장효모의 원형질체 융합에 의한 균주개량에 대한 보고는 찾아 볼수 없다. 본 연구는 간장의 숙성 발효에 큰 구실을 하고 특히 간장의 맛과 향에 영향을 주는 효모를 개량 육성할 목적으로 우선 간장에서 분리한 *Zygosaccharomyces rouxii*와 *Saccharomyces cerevisiae*에 대하여 영양요구성 변이주를 구하고 이들의 원형질체의 생성조건과 융합조건 등을 검토 하였다.

#### 재료 및 방법

##### 공시균주

본 실험에 사용한 균주는 부산시내 오성식품의 간장 덧

Corresponding author: Byeong-Ho Lee, Department of Food and Nutrition, Donggeui University, 24, Gaya-dong, Pusanjin-gu, Pusan 614-010

에서 분리 동정한 *Zygosaccharomyces rouxii* M-12와 *Saccharomyces cerevisiae* M-43을 사용하였다.

#### 시약 및 배지

본 실험에 사용된 Zymolase 20T는 Seikagoku Kogyoko Co., Nystatin과 ethylmethane sulfonate (EMS)는 Sigma Co. 에서 PEG는 Wako Co.에서 각각 구입하였고 그외 시약은 시약 특급을 사용하였다.

완전배지 (complete medium, CM), 최소배지 (minimal medium, MM), 재생완전배지 (regeneration complete medium, RCM) 및 재생최소배지 (regeneration minimal medium, RMM)의 배지 조성은 Table 1과 같으며 고체 배지는 agar를 2.0% 농도로 첨가 하였다.

Table 1. Chemical composition of complete medium(CM), minimal medium(MM), regeneration complete medium(RCM) and regeneration minimal medium(RMM)

Ingredients	CM	MM	RCM	RMM
Glucose	2	1	2	1
Yeast extract	1		1	
Peptone	1		1	
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>		0.1		0.1
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>		0.1		0.1
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O		0.05		0.05
NaCl	0.5	0.5	0.5	0.5
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O		0.01		0.01
KCl			4.5	4.5

#### 영양요구성 변이주의 분리

돌연변이의 유발은 Lindergeren 등<sup>(22)</sup>의 방법에 준하였으며 영양요구성 변이주는 Lederberg<sup>(23)</sup>과 Holiday 등<sup>(24)</sup>의 방법에 준하여 실험하였다. *Zygosaccharomyces rouxii* M-12와 *Saccharomyces cerevisiae* M-43을 Akiyama 배지<sup>(25)</sup>에서 16시간 진탕배양후 원심분리 (4000rpm, 10min)하여 얻어진 균체를 증류수로 3회 씻은후 Tris-HCl buffer, (pH7.0)로서 ml당 10<sup>7</sup>~10<sup>8</sup>개의 효모를 함유하는 현탁액을 만들어 EMS의 최종농도가 3.0%되도록 첨가하여 30°C에서 60min간 반응시킨후 5.0% sodium thiosulfate 5ml를 가하여 반응을 정지시켰다. 이를 원심분리하여 얻은 균체를 멸균 증류수로서 2회 씻은후 무질소 최소배지에 현탁시켜 ml당 1.0×10<sup>8</sup> cell로 조절한후 변이주를 농축하기 위하여 1

ml당 100μg의 Nystatin<sup>(26)</sup>을 2시간 동안 30°C에서 희석한 후 완전고체배지에 평판 배양한 다음 최소배지에 replica시켜 최소배지에서 생육하지 않는 colony를 완전배지에서 변이주로 선별하였으며 이를 3회 반복확인하였다. 이렇게 분리된 영양요구성 변이주를 여러가지 아미노산과 핵산염기등이 일정량 혼합된 최소배지에 이식하여 영양요구 물질을 확인 하였다.

#### 원형질체의 생성과 재생

원형질체 생성은 Fournier 등<sup>(14)</sup>의 방법을 사용하였다. 즉 원심분리 (4,000rpm, 10min)하여 회수한 균체를 20mM CaCl<sub>2</sub>, 0.7M KCl, 100mM Tris, HCl이 함유된 완충용액 (pH 8.0)으로 세척한 후 900mM EDTA, 20mM β-mercaptoethanol, 100mM Tris HCl이 든 완충용액 (pH8.0)으로 현탁하여 30°C에서 10분간 방치한 다음 다시 원심분리하여 얻은 균체에 0.9M KCl 2ml, 50mM β-mercaptoethanol 1ml 및 zymolase 20T (0.5 mg/ml) 1ml를 가하여 현탁한후 30°C에서 60분간 반응시켰다. 원형질체 재생은 Yamamura 등<sup>(27)</sup>의 방법에 따라 용균률 (lysis ratio)로 나타내었으며 공식은 다음과 같다.

$$\text{Lysis ratio}(\%) = \frac{O.D(t_0) - O.D(t)}{O.D(t_0)} \times 100$$

O.D(t<sub>0</sub>) : 최초의 세포현탁액을 증류수로 희석하여 570nm에서 측정된 흡광도.

O.D(t) : t시간 동안 반응시킨후의 세포현탁액의 흡광도.

생성된 원형질체는 0.7M KCl, 20mM CaCl<sub>2</sub>, 100mM Tris HCl이 함유된 완충액 (pH8.0)으로 세척한 후 재생배지에 증중도말하여 재생시킨후 교반하면서 30°C에서 20분간 반응시켰다. 여기에 0.7M KCl을 넣어 세척한 후 재생배지에 증중도말하였다. 세포융합빈도 (fusion frequency)는 최소배지에 나타난 융합세포의 colony 수를 완전배지에서 생성된 colony 수로 나눈 값으로 나타내었다<sup>(28)</sup>.

#### 세포크기의 측정

융합균주와 친주의 세포크기 및 부피측정은 Sipiczki 등<sup>(28)</sup>의 방법에 준했다.

#### DNA의 함량 측정

DNA의 함량은 Wilson 등<sup>(29)</sup>의 방법에 따라 실험하였

다. 완전배지에서 3일간 배양한후 10ml perchloric acid에 현탁시켜 70°C에서 20분간 처리를 2회 반복하여 상등액을 모은다. 상등액 3ml에 6ml의 diphenylamine 용액 (5g의 diphenylamine에 13.75ml의 진한 황산을 넣고 빙초산으로 500ml가 되도록 조정)을 첨가한 끓는 물에 10분간 방치한 다음 냉각시켜 600nm에서 흡광도를 측정하여 다음식으로 부터 DNA 함량을 계산하였고 이때 검량곡선은 calf thymus DNA를 사용하여 작성하였다.

$$DNA (fg/cell) = \frac{600 nm}{a} \times D \times \frac{10^{12}}{Cell No}$$

a : slope of standard curve.  
D : dilution rate

결과 및 고찰

영양요구성변이주의 분리

원형질체 융합에 필요한 표지 유전인자를 얻기 위하여 영양요구성 변이주를 얻은 결과는 Table 2와 같다. 간장덧에서 분리 동정한 *Zygosaccharomyces rouxii* M-12와 *Saccharomyces cerevisiae* M-43을 각각 EMS로 처리하여 돌연변이를 유발시키고 Nystatin 농축에 의하여 분리한 단일표지 유전인자와 이중표지 유전인자의 영양요구성은 모두 아미노산이었고 얻어지는 빈도는 10<sup>-6</sup>이었다. 일반적으로 융합실험에는 단일표지 유전자보다는 이중표지 유전자의 변이주를 많이 이용하고 있으며 또 복귀변이율도 10<sup>-8</sup>보다 높고 효소의 융합빈도가 10<sup>-6</sup>이므로 단일영양요구성 변이주보다는 이중영양요구성 변이주가 유리하므로 우선적으로 *Zygosaccharomyces rouxii*

Table 2. List of auxotrophic mutant strains selected for protoplast fusion

Strain	Phenotype
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i> M-12	
ZRM-27	Lys <sup>-</sup>
ZRM-68	Leu <sup>-</sup>
ZRM-83	Met <sup>-</sup> , Thr <sup>-</sup>
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> M-43	
SCM-18	Lys <sup>-</sup>
SCM-46	Lys <sup>-</sup> , Arg <sup>-</sup>
SCM-87	Leu <sup>-</sup> , Try <sup>-</sup>
SCM-112	Met <sup>-</sup>

ZRM-83과 *Saccharomyces cerevisiae* SCM-46을 융합실험에 사용하였다.

원형질체의 형성과 재생조건

*Zygosaccharomyces rouxii* ZRM-83과 *Saccharomyces cerevisiae* SCM-46의 원형질체의 형성에 있어 세포벽 분해효소인 zymolase 20T의 농도와 이에 따른 처리시간에 대한 실험결과는 Fig. 1과 같다.

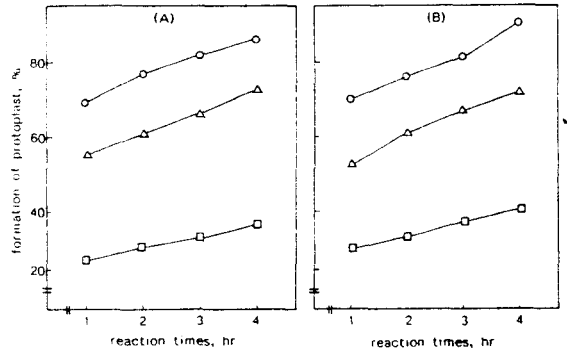


Fig. 1. Effect of concentration and treatment times of zymolase 20T on protoplast formation.

A: *Zygosaccharomyces rouxii* ZRM-83, B: *Saccharomyces cerevisiae* SCM-46, ○—○: zymolase 0.5mg/ml, △—△: 0.25mg/ml, □—□: 0.1mg/ml

zymolase 20T의 농도가 ml당 0.5mg일때가 형성율이 가장 높았으며 ml당 0.1mg일때는 분해율이 낮았다. 이 결과는 *Candida tropicalis*의 원형질체 형성시 사용된 경우와 비슷한 경향이었다<sup>(20)</sup>. 원형질체 형성과 세포벽 재생에 있어서 영향을 미치는 세포벽 효소인 zymolase 20T의 최적처리시간을 검토한 결과는 Fig. 2와 같다. 세포벽 분해효소의 처리시간이 길어질수록 원형질체 형성율은 증가하였으나 세포벽의 재생율은 떨어졌으며 zymolase 20T로 60분간 처리했을때가 원형질체의 형성과 재생율이 비교적 양호하였다. Gunge등<sup>(10)</sup>의 연구 보고와 비교할때 원형질체의 형성률은 높았으나 재생율은 좋지 못하였다. 이것은 세포벽의 분해가 너무 심하여 상대적으로 재생률이 떨어졌다고 생각된다. zymolase 20T는 *Arthobacter leteus*의 배양액을 냉동건조시킨 것으로 여러가지 효소가 복합적으로 들어 있어<sup>(31)</sup> 처리시간이 길어질수록 용해효소의 활성이 높아 세포벽의 파괴가 심하여 재생율이 나빠질 것이라고 생각된다.

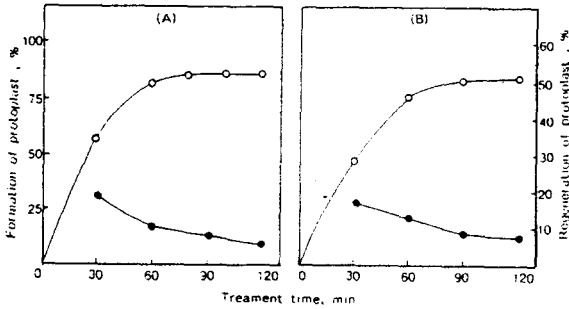


Fig. 2. Effect of Zymolase (0.5mg/ml) treatment times on formation and regeneration of protoplast  
○—○: protoplast formation, ●—●: protoplast regeneration.

원형질체의 융합조건

*Zygosaccharomyces rouxii* ZRM-83과 *Saccharomyces cerevisiae* SCM-46간의 원형질체 융합시 PEG의 종류와 농도에 미치는 영향을 조사한 결과는 Fig. 3에서 보는 바와 같다. PEG의 최적농도는 PEG 4,000의 경우에는 40% (w/v)가 가장 좋았으며 PEG 6,000의 경우는 30% (w/v)가 가장 좋았다. 효모의 원형질체 융합시 PEG 4,000과 PEG 6,000이 주로 많이 사용되고 있다.<sup>(30)</sup> Solingen등<sup>(11)</sup>은 *Saccharomyces cerevisiae*의 *Sphaeroplast* 융합에서 PEG 6,000이 PEG 4,000보다 좋은 것으로 보고하고 있으며, 성<sup>(20)</sup>등은 *Candida lipolytica*의 융합에서 PEG 6,000이 좋은 것으로 보고하고 있으나 본 실험에서는 농도에 따라 다르나, 종류에

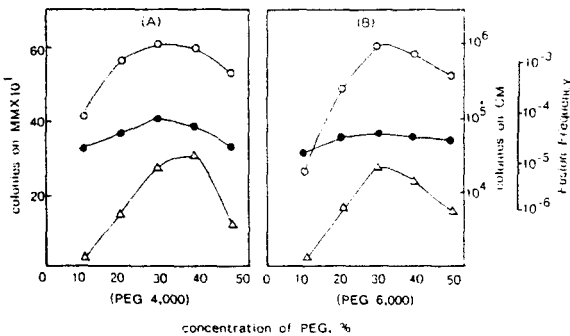


Fig. 3. Effect of PEG concentration on the regeneration and fusion frequency between ZRM-83 and SCM-46.  
(A): PEG 4,000, (B): PEG 6,000, ○—○: colonies on CM, ●—●: fusion frequency, △—△: colonies regenerated on MM.

따른 큰 차이는 찾아 볼수 없었다. 그리고 ZRM-83과 SCM-46간의 원형질체와 융합주의 현미경 사진은 Fig. 4에서 나타낸 바와 같이 원형질체 보다는 융합주가 큰것으로 보이고 있다.

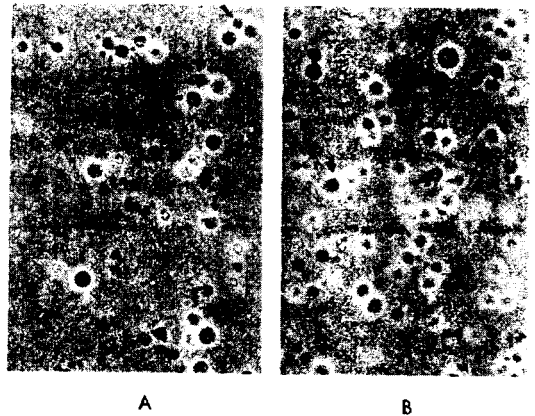


Fig. 4. Photomicrographs of protoplasts of ZRM-83 and fusants between ZRM-83 and SCM-46 (×600)  
(A): Protoplasts(→) (B): Fusants(→).

원형질체의 융합빈도

*Zygosaccharomyces rouxii* ZRM-83과 *Saccharomyces cerevisiae* SCM-46의 이속간의 원형질체의 빈도를 조사한 결과는 Fig. 3에서 보는 바와 같은 융합빈도는 10<sup>-4</sup>~10<sup>-5</sup>이었다. Sipiczki등<sup>(8)</sup>은 *Schizosaccharomyces pombe*의 영양요구성 변이주의 동종간의 융합빈도는 1.7×10<sup>-3</sup>이었다고 하였고 성<sup>(20)</sup>등은 *Candida lipolytica*의 동종간의 융합빈도는 4~5×10<sup>-4</sup>라고 하였다. 서 등<sup>(32)</sup>은 *Saccharomyces diastaticus*와 *Candida tropicalis* 간의 융합빈도를 10<sup>-5</sup>~10<sup>-6</sup>이라고 보고한 결과와 비교하면 본 실험 결과는 융합빈도가 비교적 높은 것으로 사료된다.

DNA 함량과 세포의 크기

친주와 융합균주의 세포크기 및 세포당 DNA 함량을 비교한 결과는 Table. 3에 나타내었다. 융합균주의 세포는 크기가 6.58±0.4μm로서 ZRM-83의 5.8±0.3μm, SCM-46의 5.2±0.1μm보다 큰것으로 나타났다. 융합균주의 DNA의 함량은 13.8fg/cell인데 비해 ZRM-83의 96.7, SCM-46의 101.3fg/cell이므로 융합균주의 DNA 함량이 증대됨을 확인 할수 있었으며 이는

Table 3. Cell sizes and DNA contents of parents and fusant

Strain	Cell			DNA content (fg DNA/cell)
	Length( $\mu\text{m}$ )	Width( $\mu\text{m}$ )	Volume( $\mu\text{m}^3$ )	
Zygo . rouxii SRM-83	5.8±0.3	4.6±0.2	68.40±2.5	96.7
S. cerevisiae SCM-46	5.2±0.1	4.7±0.1	59.20±3.4	101.3
Fusant	6.5±0.4	4.8±0.3	67.25±4.2	138.2

Taya 와 Honda<sup>(33)</sup>, 서등<sup>(32)</sup> 및 정등<sup>(21)</sup>의 보고에서와 같이 DNA 함량은 친주보다도 융합주의 함량이 증대됨을 확인할 수 있었다.

### 요 약

간장덧에 분리 동정한 *Zygosaccharomyces rouxii* M-12와 *Saccharomyces cerevisiae* M-43 간의 원형질체 융합에 의한 새로운 간장효모균주를 개량할 목적으로 영양 요구성 돌연변이주인 *Zygosaccharomyces rouxii* ZRM-83 (*Met*<sup>-</sup>, *Thr*<sup>-</sup>)과 *Saccharomyces cerevisiae* SCM-465 (*Lys*<sup>-</sup>, *Arg*<sup>-</sup>)을 얻었다. 양 균주의 원형질체 형성의 조건은 Zymolase 20T 을 0.5mg/ml, 60분에서 많이 생성하였고 원형질체 융합조건은 30% PEG 6,000을 30분간 처리했을때 융합빈도는 10<sup>-4</sup>~10<sup>-5</sup>이었다. 융합체의 세포크기는 친주보다 컸으며 DNA 함량도 많았다.

### 사 의

본 논문은 산학 협동 재단의 연구비 지원에 의하여 이루어진 연구이므로 감사드립니다.

### 문 헌

- Eddy, A.A. and Williamson, D.H. : A method for isolation protoplast from yeast. *Nature*(London) **179**, 1252 (1957)
- Kao, K.N., Michayluk, M.R. : A method of high frequency intergeneric fusion of plant protoplasts. *Plant.*, **115**, 355(1974)
- Ohunki, T., Etoh, Y. and Beppu, T. : Interspecific and interspecific hybridization of *Mucor pusillus* and *Mucor miehei* by protoplast fusion, *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 451 (1982)
- Genthner, F.J. and Borgia, P.T. : Sphaeroplast fusion and heterokaryon formation in *Mucor racemosus*. *J. Bacteriol.*, **134**, 349 (1978)
- Fodor, K. and Alfoldi, L. : Polyethylene glycol induced fusion of bacterial protoplasts. *Molec. Gen. Genet.*, **168**, 55(1979)
- Foder, K. and Alfoldi, L. : Fusion of protoplasts of *Bacillus megaterium*, *Proc. Natl. Sci.*, U.S.A. **73**, 2147(1976)
- Hopwood, D.A. and Wright, H.M. : Bacterial protoplast fusion; Ricombination in fused protoplast of *Streptomyces coelicolor*. *Molec. Gen. Genet.*, **162**, 307(1978)
- Sipiczki, M. and Ferenczy, L. : Protoplast fusion of *Schizosaccharomyces pombe* auxotrophic mutants of identical mating type. *Molec. Gen. Genet.*, **151**, 77(1977)
- Yamamoto, and Fukui, S., : Fusion of yeast protoplasts. *Agric. Biol. Chem.*, **41**, 1829(1977)
- Gunge, N. and Tamaru, A. : Genetic analysis of products of protoplast fusion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Jap. J. Genet.*, **53**, 41(1978).
- Solingen, P. Van and Plaats, J.B. Van der : Fusion of yeast sehaeroplasts. *J. Bacteriol.*, **130**, 946(1977)
- Stahl, U. : Zygote formation and recombination between like mating-type in the yeast *Saccharomyces lipolytica* by protoplast fusion. *Molec. Gen. Genet.*, **160**, 111(1976)
- Allmark, B.M., Morgan, A.J. and Whittaker, P.A. : The use of protoplast fusion in demonstrating chromosomal and mitochondrial inheritance of respiratory deficiency in *Kluveromyces lactis*, a peptite-negative yeast. *Molec. Gen. Genet.*, **159**, 297(1978)
- Fournier, P., Provost, A., Bourguignon, C., and Heslot, H. : Ricombination after protoplast fusion in

- the yeast, *Candida tropicalis*. *Arch. Microbiol.*, 115, 143(1977)
15. Whitaker, P.A. Leach, S.M. : Interspecific hybrid production between the yeasts, *Kluveromyces lactis* and *Kluveromyces fragilis* by protoplast fusion. *FEMS. Microbiol. Letters.*, 4, 31(1977)
  16. Provost, A., Bourguignon, C., Fournier, P., Rioet, A. M. and Heslot, H. : Intergeneric hybridization in yeasts through protoplast fusion. *FEMS. Microbiol. Letters.*, 3, 309(1978)
  17. Morgan, A.J. : International protoplast symposium - I (potrykused), Bir Khauser Verlag, Basel. Boston, Stuttgart., 115(1983)
  18. Sakai, T., Koo, K.I., Saitoh, K. and Katsugagi, T. : Use of protoplast fusion for the development of rapid starch fermentation of *Saccharomyces distaticus*. *Agric. Biol. Chem.*, 50, 297(1986)
  19. Figueroa, L.I.C., Richard, M.S., Broock, M. devan : Transfer of the flocculation property to the Baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae* by conventional genetic manipulation. *Biotechnol. Lett.*, 6, 171(1984)
  20. 성낙계, 심기환, 전효근, 강신권, 박석규 : 구연산 생성 *Candida lipolytica* 의 원형질체 융합, 산업미생물학회지, 13, 391(1985)
  21. 정건섭, 구영조, 신동화 : *Hansenula anomala* var. *anomala* 와 *Saccharomyces cerevisiae* 의 이속간 원형질체 융합, 산업미생물학회지, 15, 145(1987)
  22. Linderger, G., Hwang, Y.L., Oshima, Y. and Linderger, C.C. : Genetical mutants induced by ethylmethane sulfate in *Saccharomyces*. *Can. J. Genet. Cytol.*, 7, 491(1965)
  23. Lederberg, J. and Lederberg, E.M. : Replica plating and indirect selection of bacterial mutants., *J. Bacteriol.*, 63, 399(1952)
  24. Holiday, R. : *Nature*, 178, 989(1956)
  25. Akiyama, H., Sugawa, N. : *J. Fer. Tech.* (Japan), 45, 1093(1967)
  26. Snow, D.R. : An enrichment method for auxotrophic mutants using the antibiotic "nystatin". *Nature*(London), 211, 206(1966)
  27. Yamamura, M., Teranishi, Y., Tanaka, A. and Fukui, S. : *Agric. Biol. Chem.*, 39, 13(1975)
  28. Sipiczki, M. and Ferenczy, L. : Protoplast fusion of *Shizosaccharomyces pombe* auxotrophic mutants of identical mating-type. *Molec. Gen. Genet.*, 151, 77(1977)
  29. Wilson, J.J., Khachatourians, G.G., Ingledew, W.W. : *Molec. Gen. Genet.*, 186, 95(1982)
  30. 有馬賢治, 高野勇 : 微生物のプロトプラスト 融合, 日本醸造工業學會誌, 37, 380(1979)
  31. Kitamura, K. and Tanabe, K. : Effect of culture medium on susceptibility of yeast cells to zymolase. *Agric. Bio. Chem.*, 46, 553(1982)
  32. 서정훈, 권택규, 홍순덕 : *S. distaticus* 와 *C. tropicalis* 간의 세포융합 및 융합체의 성질, 산업미생물학회지, 14, 359(1986)
  33. Taya, M. H. and Kobayashi, T. : *Agric. Biol. Chem.*, 48, 2239(1984)

(1987년 9월 17일 접수)