

효모 *Phaffia rhodozyma*의 융합체와 Carotenoid 생성

장기명 · 김문휘 · 송명희 · 김상문¹ · 전순배*

전남대학교 자연과학대학 미생물학과

광주보건 전문대학교 안경학과**

Fusion Hybrid and Carotenoid Formation from the Yeast, *Phaffia rhodozyma*

Kee-Myung Chang, Moon-Hee Kim, Myung-Hee Song,

Sang-Moon Kim¹ and Soon-Bai Chun*

Department of Microbiology, Chonnam National University,

Department of Optics, Kwang-ju Junior College**

Kwang-ju, 500-757, Korea

ABSTRACT: The cell fusants were constructed from complementary auxotrophic mutants of *Phaffia rhodozyma*. The nuclear fusion of the fusants was demonstrated by several techniques including comparison of cell volume, estimation of DNA content and nuclear staining. The cell fusants were very stable for succeeding transfer culture on complex medium for more than one year. Malt extract (1%, w/v) and abscisic acid (1 mM) increased the carotenoid formation whereas gibberellic acid (5 mM) and riboflavin (0.1 mM) decreased the corresponding content.

KEYWORDS: *Phaffia rhodozyma*, protoplast fusion, carotenoid formation

序 論

Carotenoid 색소의 일종인 astaxanthin은 양식 어업에 있어서 색소 풍미원으로서 중요할 뿐만 아니라 (Johnson, 1989) 항 환원 산소라디칼제로서 관심의 대상이 되고있다(Miki, 1991). 담자균 효모인 *Phaffia rhodozyma*는 astaxanthin 함량이 높은 carotenoid 색소를 생산한다. 또한 astaxanthin을 생산하는 조류나 곰팡이에 비해 배양하기가 용이하며 풍부한 단백질과 색소 흡수를 촉진하는 불포화지방산, 비타민 그리고 독특한 풍미를 가지고 있어서 색소원 뿐만 아니라 동물 생육에 필수적인 영양 공급원으로서 이용가치가 높다(Okagbue and Lewis, 1985).

그러나 균체의 색소 함량은 색소원으로 이용할 만큼 높지 않다. 이런 이유에서 색소 함량이 증진된 돌연변이 균주를 분리한바 있지만(An 등, 1989) 유

전적으로 불안정한 단점이 있기에, 이를 보완하기 위해 Chun 등(1992)은 원형질체 융합방법으로 carotenoid 함량이 증진된 융합체를 얻은 바 있다.

원형질 융합 방법은 단상형으로만 존재하는 *Ph. rhodozyma*로부터 다배체 융합체를 얻을 수 있고 (Chun 등, 1992) 또 parasexual cycle에 의한 융합체의 유전연구가 가능하다(Poulter 등, 1982). 또 융합체들과 이들 양친형에 있어서 색소 종류의 변화 양상을 추적함으로써 색소 생합성 경로 연구에 이용될 수 있다(Chun 등, 1992).

본 연구는 *Ph. rhodozyma*에서 상보적 돌연변이 균주들을 얻어 이들간의 원형질체 융합을 통하여 얻어진 융합체의 안전성과 색소함량을 조사하였으며, 색소증진 첨가물(malt extract) 및 색소합성 중간체와 유사한 몇가지 화학첨가물(gibberellic acid, abscisic acid, riboflavin)이 carotenoid 색소 형성에 미치는 영향을 조사하였다.

*Corresponding author

材料 및 方法

사용균주 및 보존 : 사용균주는 *Phffia rhodozyma* CBS 5905, CBS 6938 이었고 균주보관은 YM (0.3% yeast extract, Difco ; 0.3% malt extract, Difco ; 0.5% bacto peptone, Difco ; 1% glucose ; 2% bacto-agar, Difco) 평판배지에서 균체가 형성될 때까지 22°C 에서 7일간 배양한 후 YM 사면배지에 옮겨 4°C 에서 보관하였으며 4주마다 계대배양하였다. 장기보관용은 40% glycerol(-20°C)에서 보관하였다.

영양요구성 돌연변이균주 제조 : 돌연변이균주 유도는 Poulter 등(1981)와 Fink 등(1970)의 방법을 변형하여 이용하였다. 돌연변이균주의 선별은 YEPD (3% yeast extract, 3% peptone, 2% glucose) 평판배지에서 7-8일간 배양한 후 나타난 균체를 최소배지 (0.67% yeast nitrogen base w/o amino acid, Difco ; 2% glucose ; 2% bacto-agar, Difco: MM)에 replica plating 하여 4-5일간 배양한 후, YEPD 완전배지에서는 성장하고 최소배지에서는 성장하지 못한 균체를 선별하여 Sherman 등(1982)의 방법에 따라 아미노산 및 핵산요구성을 조사하였다.

각각의 영양요구성 돌연변이균주들은 아미노산과 핵산이 첨가된 최소배지에서 3일간 배양한 균액 0.1 ml를 50 ml YEPD 액체배지에 접종하여 정지기까지 배양한 다음 균체수를 ml당 1.5×10^9 이 되게 농축한 후 이를 멸균수로 2회 세척한 다음 다시 멸균수에 현탁하여 그 중 0.2 ml씩을 최소배지에 도말하였고, 이 균액을 희석하여 200-300개의 균체가 나올 수 있도록 YEPD 평판배지에도 도말하였다. 이를 22°C 에서 7일간 배양한 다음 최소배지에서 자란 균체를 완전배지에서 자란 균체수로 나누어 복귀율을 계산하였다.

원형질체의 형성과 융합 : 원형질체 형성은 Sara-check 등(1981)과 Bai 등(1990)의 방법을 따라 실시하였으며, 원형질체 형성유무는 증류수에 희석하여 원형질체 분해물로서 현미경하에 확인하였고 형성된 원형질체 수율은 효소 처리전의 세포수에 대해 형성된 원형질체 수의 백분율로 표시하였다.

영양요구성 돌연변이균주의 원형질체를 삼투안정제인 0.3 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ +0.2 M KCl이 함유된 0.1 M Na-succinate 완충용액(pH 6.0)으로 2회 세척후 원형질체수를 각각 $1-2 \times 10^8$ ml 되게 조정된 다음

상보적인 조합을 만들어 1:1로 혼합하였다. 그 혼합된 균액은 1,000X g로 원심분리하여 상등액은 버리고 35% PEG(MW: 4,000, Sigma)+0.1 M CaCl_2 이 함유된 0.1M Na-succinate 완충용액(pH 6.0)에 현탁한 후 22°C 에서 45분간 반응시켜 융합을 유도하였다. 반응후 1,000X g로 원심분리후 상등액은 버리고 0.3 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ +0.2 M CaCl_2 이 함유된 0.1 M Na-succinate 완충용액(pH 6.0)에 재 현탁한 후 삼투안정제가 함유된 재생배지에 0.1 ml씩을 조심스럽게 도말하였으며 그 위에 삼투안정제가 들어있는 최소배지를 덧부었다. 그 후 22°C 에서 8-10일간 배양하여 최소배지상에서 자란 균체수를 완전배지상에서 자란 균체수를 나누어 융합율을 얻었다.

융합체 분석 : 세포당 DNA 함량과 세포체적의 측정에는 생리적 연령이 비슷한 정지기 세포를 사용하였다. DNA의 추출은 Stewart(1976)의 방법으로 그리고 DNA의 정량은 Burton(1968)의 diphenylamine 법으로 실시 하였으며, 세포체적은 Sipiczki와 Ferenczy(1977)등이 기술한 공식에 의하여 계산하였다. 핵 염색은 Fournier(1977)의 방법에 따라 대수기의 세포를 Giemsa 염색하였다. 자연 형질분리는 융합체를 YEPD에서 48시간 배양하여 유도한 다음 이를 YEPD 한천배지에 접종하여 배양 7일 후 형성된 균체를 최소배지에 레프리카하여 영양요구성 분리형을 선별 하였다. 한편 유도형질 분리분석은 교잡형들을 p-fluorophenylalanine 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이 함유된 YEPD 평판배지에 도말하여 배양한 다음 자연형질 분리분석과 동일한 방법으로 처리하여 분리형을 얻었다. 얻어진 분리형은 양친의 영양요구성 물질을 조합으로된 최소배지에서 4-5일간 배양하여 분리형의 아미노산 요구성을 조사하였다.

Carotenoid 추출과 분석 : 균체의 건조량은 배양액으로부터 수확한 균체를 멸균수로 2 회 세척한 다음 nitrocellulose막(0.45 μm , Millipore)으로 여과하여 이를 60°C 에서 일주야 건조시킨 다음 평량하여 측정하였다. 색소 추출에서는 세척된 세포에 55°C dimethylsulfoxide(Sigma)용액 5 ml를 넣고 5분간 vortexing한 다음 petroleum ether(A.C.S. grade, Tedia co. U.S.A.) 3 ml를 넣어 색소를 petroleum ether 층으로 옮겼다. 상기 에테르층에 존재한 물은 20% NaCl으로 제거하였다. 추출된 색소액은 474 nm에서 UV-Visible Spectrometer(Hitachi)에서 측

정한 흡광도를 가지고 Davies(1976)공식을 사용하여 carotenoid를 정량하였다. 각 색소성분의 분석은 박층 크로마토그래피(thin layer chromatography; TLC)와 흡수스펙트럼(electronic adsorption spectra)에 의하여 수행하였다(An 등, 1989; Davies, 1976). 색소를 분리하기 전에 TLC판(Art. 5553, Merck)은 100°C에서 30분간 건조시켜 완전히 수분을 제거하여 사용하였고, 전개용매는 petroleum ether(Aldrich, U.S.A.)와 acetone(Aldrich, U.S.A.)을 90:10, 80:20, 70:30 비율로 혼합하여 충분히 포화시켜 사용하였다. 농축된 색소 시료를 접착한 TLC는 상기 용매에서 1-1.5시간동안 빛이 차단된 곳에서 전개하여 색소를 분리하였다.

분리된 각 색소의 확인에는 시료의 Rf값(An 등, 1989)과 표준시료의 Rf값을 참고하였으며, TLC 판에서 분리한 각 색소의 띠를 칼로 긁어모아 acetone, hexane, chloroform, petroleum ether 등으로 용출하였다. 용출된 색소는 UV-Visible Spectrometer (Hitachi, 557)를 이용해 300-600 nm로 spectra를 작성해 이로부터 얻어진 색소의 주 peak의 흡광도로 Davies(1976) 공식에 의하여 carotenoid의 각 성분의 색소량을 측정하였다. 3R, 3R'-astaxanthin등을 포함한 표준색소는 Dr. E. Widmer(Hoffman La Roche&co., Swiss)로부터 기증받은 것을 사용했다.

Malt extract, gibberellic acid(GA), abscisic acid(ABA), riboflavin등이 carotenoid 생성에 미치는 영향 : 화학첨가물에 대한 색소 증진 여부를 조사하기 위한 균종은 CBS 5905와 CBS 6938 야생형과 이들로부터 제조한 융합체 F12와 F21이었다. 균의 배양은 YNB 배지에 0-0.3%의 malt extract(Difco), 0-5 mM의 gibberellic acid(G.A, Sigma), 10-20 mM의 abscisic acid(ABA, Sigma) 및 1-100 µg 의riboflavin(Sigma)을 첨가하여 4-14일까지 진탕배양(120 strokes/min, 22°C)하였으며, 각 첨가물에 따른 carotenoid의 정량은 일정한 시기에 채취한 세포로부터 전술한 색소 추출 분석항에서 기술한데로 실시하였다.

結果 및 考察

돌연변이 균주 제조 및 복귀율 : *Ph. rhodozyma* CBS 5905 및 CBS 6938로 부터 돌연변이원 ethyl-

methane sulphonic acid(EMS, Sigma) N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine(NTG, Sigma)를 처리하여 영양요구성 돌연변이 3균주를 얻었는데 그 중 methionine threonine(met thr)과 lysine methionine (lys met)는 CBS 5905로 부터 tryptophan leucine(trp leu)는 CBS 6938로 부터 제조된 것이며 이들의 복귀율은 3.5×10^{-8} - 1.2×10^{-9} 이었다.

원형질체 형성 : Novozym 234 효소 처리에 의한 원형질체 형성 조건은 초기 대수기(36-48hr) 세포 연령이었고 삼투압 안정제는 0.2 M KCl이 함유된 0.3 M(NH₄)₂SO₄, 효소 농도는 5 mg/ml, 반응시간은 150-180 분이였다. *Ph. rhodozyma* 영양요구성 돌연변이주의 원형질 형성수율은 CBS 5905에서 제조된 met thr은 반응시간 2시간 30분만에 81%, lys met는 반응시간 2시간만에 55%로 나타났고 CBS 6938에서 제조된 trp leu는 반응시간 3시간만에 70%로 나타났다. Rost와 Venner(1965)는 *Saccharomyces*에서 strain 마다 원형질 형성 수율이 1-100%의 변화폭이 있다고 보고한 바 있고, 영양요구성 돌연변이주의 원형질체 형성 수율을 보면 Saracheck 등(1981)은 *Candida albicans*에서 80-99%, Bai 등(1987)은 *Candida pseudotropicalis*에서 48-98%, Kim(1988)은 *Filobasidium capsuligenum*에서 76-96%의 수율을 얻었다고 보고한 바 있다. 따라서 *Ph. rhodozyma*로 부터 제조한 돌연변이주의 원형질 형성수율이 다른 균주에 비해 낮고 또 변화폭도 심한 것을 알 수 있었다.

원형질체 융합과 융합체의 분석 : CBS 5905에서 제조한 met thr와 CBS 6938에서 제조한 trp leu 영양요구성 돌연변이 균주에서 융합체 F12를, CBS 5905에서 제조한 lys met와 CBS 6938에서 제조한 trp leu 영양요구성 돌연변이 균주에서 융합체인 F21을 얻었다. 원형질체 융합율은 met thr와 trp leu는 1.3×10^{-5} , lys met와 trp leu는 1.7×10^{-5} 이었다.

제조된 융합체 F12와 F21그리고 이들의 야생형 양친형의 세포의 크기, DNA 함량은 Table 1에 표시되어 있다. 융합체의 세포 체적은 그들의 양친형에 비해 체적이 2배 이상 증가되었고 세포당 DNA 함량(fg/cell)은 융합체가 137.7-144.0(fg/cell)로써 양친형의 DNA 함량 74-75(fg/cell)보다 약 2배였다 (Table 1). 또 융합체의 핵은 단일핵으로 존재하였고

Table 1. Cell volume and DNA contents of *Ph. rhodozyma* CBS 5905, 6938, parentals and fusants.

Strains	mean volume (μm^3)	DNA/cell (fg/cell)	ploidy (n)
wild			
CBS 5905	217.5 \pm 11.7	74.6 \pm 0.4	1
CBS 6938	148.2 \pm 9.7	78.0 \pm 0.3	1
parentals			
CBS 5905			
met thr	223.1 \pm 11.9	74.2 \pm 0.2	1
lys met	7179.0 \pm 7.9	75.1 \pm 0.1	1
CBS 6938			
trp leu	232.5 \pm 12.3	77.8 \pm 0.2	1
fusants			
F12			
(met thr+trp leu)	470.0 \pm 22.2	143.9 \pm 0.3	1.93
F21			
(lys met+trp leu)	450.4 \pm 25.9	137.9 \pm 0.8	1.83

For F12 ploidy (n) value based on the average of parents met thr+trp leu (74.7 \pm 0.2)

For F21 ploidy (n) value based on the average of parents lys met+trp leu (75.2 \pm 0.2)

양친형의 핵에 비해 크기도 상당히 큼을 알 수 있었다(Plate 1). 융합체들의 보다 확실한 융합상태를 검토하기 위해 형질 분석을 한 결과 융합체의 자연형질 분리 빈도가 $1.0-2.9 \times 10^{-4}$ 이었고, 유도형질 분리빈도는 $2.1-9.8 \times 10^{-3}$ 이었다. *Shwanniomycetes alluvius* (Willson 등, 1982)의 융합체의 형질분리빈도는 자연형질 분리빈도가 $2.4-8.4 \times 10^{-4}$ 이었고, 유도형질 분리빈도는 $1.7-2.3 \times 10^{-3}$ 이었다고 보고 한 바 있으며, *Candida pseudotropicalis* (Chun 등, 1988)의 경우는 자연형질 분리빈도가 $3.0-8.1 \times 10^{-4}$, 유도형질 분리빈도는 $1.4-1.7 \times 10^{-3}$ 으로 보고 된 바 있다. 본 실험에서 제조한 융합체들의 자연형질 분리빈도와 유도형질 분리빈도가 상기 두 종과 비슷하였으나, Chun 등(1992)이 *Ph. rhodozyma* CBS 5905 및 CBS 6938으로부터 얻었던 분리빈도 보다는 낮았다. 그들은 상기 종으로부터 얻었던 융합체들의 자연형질 분리빈도와 유도형질 분리빈도가 각각 1.4×10^{-4} - 6.2×10^{-5} , 1.2×10^{-3} - 3.1×10^{-4} 이었다고 보고 한 바 있다.

Carotenoid 생성 : *Ph. rhodozyma* CBS 5905, CBS 6938 야생형과 이들로 부터 제조된 met thr, lys met, trp leu 영양요구성 돌연변이 균주 및 융합체 F12, F21의 총 carotenoid 함량은 F12, F21에서 각각

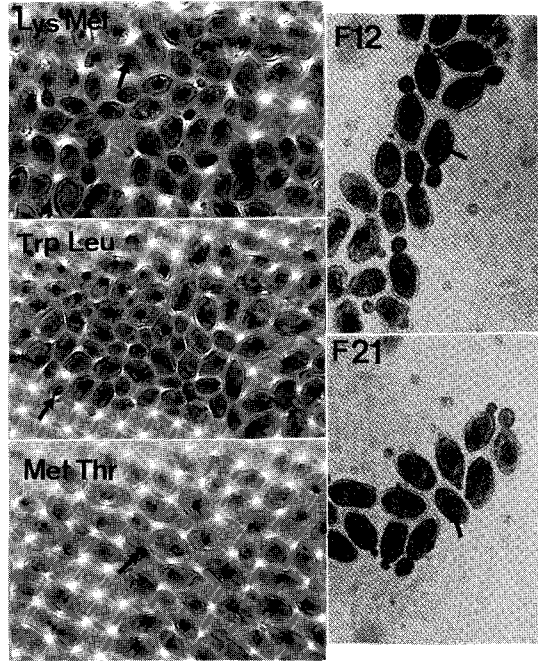


Plate 1. Photomicroscopy of nuclei of fusion hybrids and their parents. Nuclei were stained with Giemsa solution. Arrow indicates nucleus. F12 : met thr+trp leu; F21 : lysmet+trp leu

700과 933 $\mu\text{g/g}$ yeast로써 야생형 균주 CBS 5905의 370 $\mu\text{g/g}$ yeast와 CBS 6938의 536 $\mu\text{g/g}$ yeast에 비해 2-2.5배 이었다. 또한 야생형, 양친형 및 융합체의 색소 분석 결과 융합체들의 astaxanthin 함량은 375-500 $\mu\text{g/g}$ yeast 이었는데 이는 야생형의 206-266 $\mu\text{g/g}$ yeast 보다 약 1.8-2.5배나 증가되었지만 양친형인 trp leu의 1,066($\mu\text{g/g}$ yeast)보다는 2-5배 낮았는데 그 이유에 대해서는 분명치 않다.

Malt extract, G.A, ABA 그리고 riboflavin이 carotenoid 생성에 미치는 영향 : Malt extract(0-3%, w/v), G.A.(0-5 mM), ABA(0-2 mM), riboflavin(1-100 μM) 을 첨가한 YNB 배지에서 융합체(F12과 F21)와 이들의 야생형 모균주 (CBS 5905와 CBS 6938)를 4일간 배양한 후 이들의 carotenoid량을 조사하였다 (Table 2). Malt extract 첨가구에서 균체의 생장은 모두가 약 2배, 그리고 총 carotenoid량은 약 20-35%가 각각 증진되었고, 1 mM ABA 첨가구에서는 균체량은 증가되지 않았으나 총 carotenoid은 미첨가구에 비해 약 11%가 증진되었다. 이와는 반대로

Table 2. Effect of various chemical compounds on carotenogenesis of *Ph. rhodozyma* and its fusion hybrids.

Strains	YNB	malt extract	G · A	ABA	riboflavin
CBS 5905	363	436	297	389	329
CBS 6938	523	650	432	573	467
F12	681	887	570	782	607
F21	928	1,253	772	1,021	824

Yeast were grown for 4 days in YNB broth supplemented with 1% malt extract, 5 mM G. A, 1 mM ABA and 100 µm riboflavin at 22°C on orbital shaker at 120 rpm.

GA와 riboflavin 첨가시는 균체의 생장은 거의 변화가 없었으나 총 carotenoid 함량은 5 mM GA 첨가구에서는 16-19%가, 그리고 100 mM riboflavin 첨가구에서는 2-12%가 각각 감소되었다(Table 1). An등(1991)은 0.5% malt extract 첨가가 *Ph. rhodozyma*의 성장 및 carotenoid 생산을 촉진 하였다고 보고한 바 있다. 또 그는 malt extract에 의한 carotenoid 증진효과는 malt extract에 다량 함유된 maltodextrin이 서서히 분해되면서 생성된 소량의 당류 때문에 다량의 당에 의한 이화억제 작용이 없었기 때문이라고 시사한 바 있으나 malt extract 내의 어떤 성분이 carotenoid 생산을 촉진 하였는가에 대해서는 분명치 않다. 한편 Dandekar 등(1980)은 ABA가 trisporic acid 다음으로 *Blakeslea trispora*의 carotene 생성을 촉진한다고 보고한 바

있다. 그러나 *Ph. rhodozyma*에서는 *B. trispora*에서처럼 현저한 carotenoid 생성은 없었지만 약간 증진됨을 볼 수 있었다. 이와는 달리 GA는 carotenoid 생성을 억제하였다. 이같은 억제 작용은 현재로는 알 수 없지만 이들 화합물에 의한 색소 성분 조성의 변화나 동위원소 표식에 의한 중간 산물의 전환 경로의 추적 등을 통해서 밝혀질 수 있을 것이다.

Goodwin 과 Lijinsky 등 (1950)은 riboflavin이 carotenoid 생성에 효과적이라고 시사한 바 있으나 *Ph. rhodozyma*에서는 오히려 색소 생성을 억제하였다. 이같은 억제 작용은 아마도 색소 합성 중간체들의 dehydrogenation에 대한 riboflavin의 작용 때문일 수 있다.(Sandmann 등, 1980; Valadon 등, 1979) 그러나 이에 관한 정확한 기작은 현재로서는 분명치 않다.

1% malt extract의 첨가가 균체 성장 및 carotenoid 량을 촉진 하였기 때문에 융합체 및 야생형 모균주를 1% malt extract 함유한 YNB 배지에서 14일까지 배양하면서 균체량 및 carotenoid 량을 조사하였다(Fig. 1). Fig. 1에서 보여준 바와 같이 융합체는 4일째에 그리고 야생형 모균주는 10일째에 정지기에 도달하였다. 그러나 carotenoid량은 4일째에 급속히 증가하였으며 그 이후에는 증가가 둔화되었다. carotenoid량은 14일째에 최대치가 되었는데 이는 An등 (1991)의 결과와 비슷하였다.

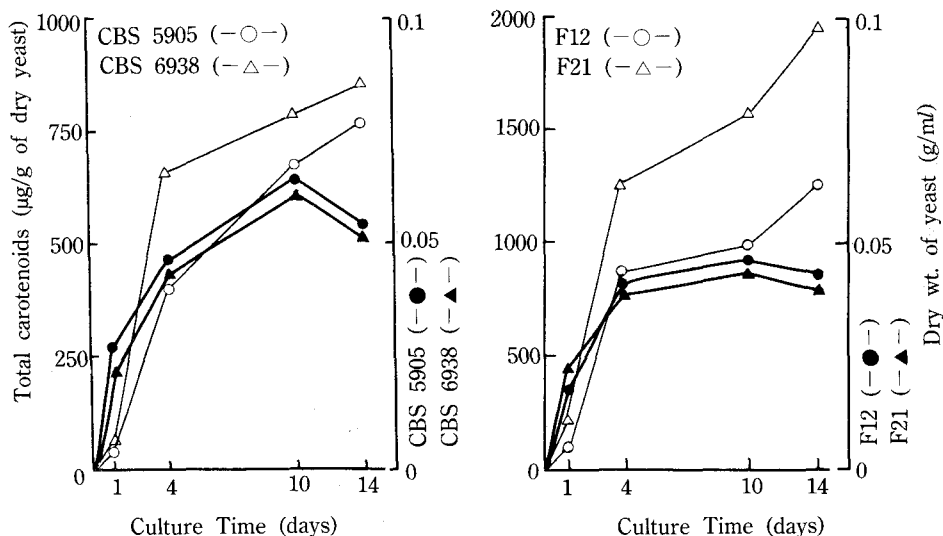


Fig. 1. Effect of 1%(w/v) of malt extract on yeast growth and carotenogenesis

摘 要

Astaxanthin을 생산하는 효모 *Phaffia rhodozyma* 로부터 제조된 상보적 돌연변이 균주사이의 융합체에 대한 carotenoid 함량 및 성분을 분석하였으며, 몇가지 화학첨가물에 의한 이들의 색소 증진 효과를 조사하였다. 핵 융합이 확인된 융합체들은 완전배지에서 1년 또는 그 이상 계대 후에도 매우 안정하였다. 그리고 이들의 astaxanthin 함량은 야생형 모균주의 그것에 비해 약 2.0~3.0배 이었다. 또한 화학첨가물(malt extract, abscisic acid, gibberellic acid, riboflavin)에 의한 색소 증진 효과는 1% malt extract와 1 mM abscisic acid 첨가시 대조구에 비해 총 caretenoid 함량이 35%와 11%가 각각 증진되었고, 이와 반대로 5 mM gibberellic acid와 0.1 mM riboflavin첨가시 19%와 12%가 각각 감소되었다.

謝 辭

본 연구는 CSB에게 수여된 1988년도 한국 과학재단의 목적기초연구비 및 1992년도 문교부 유전공학 학술연구비의 일부분으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

参考文献

- An, G. H., D. B. Schuman and E. A. Johnson. 1989. Isolation of *Ph. rhodozyma* mutants with increased astaxanthin contents. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 116-124.
- An, G. H. and E. A. Johnson. 1990. Influence of light on growth and pigmentation of yeast *Ph. rhodozyma*. *Antonie van Leeuwenhoek. J. Microbiol.* **57**: 1990.
- Bai, S., M. W. Kim, J. C. Park, J. H. Kim and S. B. Chun. 1990. Protoplast fusion of *Ph. rhodozyma*. *Kor. J. Biotech. Bioeng.* **5**: 255-261.
- Burton, K. 1968. Determination of DNA concentration with diphenylamine. In: *Method in Enzymology*. Colowick, S.P. and N. D. Kaplan(ed), Academic press Inc., New York. **12**: 163-166.
- Chun, S. B. and S. Bai. 1988. Genetic analysis of protoplast fusants of *Candida pseudotropicalis*. *Kor. J. Microbiol.* **26**: 82-87.
- Chun, S. B., G. E. Chin, S. Bai and G. H. An. 1992. Strain improvement of *Phaffia rhodozyma* by protoplast fusion. *FEMS. Microbiol. Lett.* **93**: 221-226.
- Dandekar, S., V. V. Modi and U. K. Jani. 1980. Chemical regulators of carotenogenesis by *Blakeslea trispora*. *Phytochemistry.* **19**: 795-798.
- Davies, B. H. 1976. Carotenoids. In: *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*. T. W. Goodwin (ed), Academic Press Inc., New York, **12**: 163-166.
- Ferenczy, L. and A. Maraz. 1977. Transfer of mitochondria by protoplast fusion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature. London.* **248**: 793-794.
- Fink, G. R. 1970. The biochemical genetics of yeast. In: *Method in Enzymology*. Tabor, H. and C. W. Tabor(ed), Academic press Inc., New York. **17A**: 59-78.
- Fournier, P., A. Provost, C. Bourguignon and H. Heslot. 1977. Recombination after protoplast fusion in the yeast *candida tropicalis*. *Arch. Microbiol.* **115**: 143-149.
- Graebe, J., D. T. Dennis, C. D. Upper and C. A. West. 1965. Biosynthesis of Gibberellins. *J. Biol. Chem.* **4**: 240.
- Goodwin, T. W. and W. Lijinsky. 1952. Studies in carotenogenesis. 2. carotene production by *Phycomyces blakesleeanus*: The effect of different amino acids when used in media containing low concentrations of glucose. *Biochem. J.* **50**: 268-273.
- Goodwin, T. W. 1972. Carotenoid. In: *The filamentous fungi*. **2**, 423-440.
- Goodwin, T. W. 1972. Carotenoids fungi and nonphotosynthetic bacteria progress. In: *Industrial Microbiology*. **11**: 29-89.
- Johnson, E. A. and M. J. Lewis. 1979. Astaxanthin formation by yeast *Ph. rhodozyma*. *J. Gen. Microbiol.* **115**: 173-183.
- Johnson, E. A., T. G. Villa, M. J. Lewis and H. J. Phaff. 1979. Lysis of the cell wall of the yeast *Ph. rhodozyma* by a lytic enzyme complex from *Bacillus circulans* WL-12. *J. Appl. Biochem.* **1**: 273-282.
- Johnson, E. A. 1989. A pigment source in salmoid feed. *Yeast.* **18**: 21.
- Khachik, F., G. R. Beecherand, M. B. Goil. 1991. Separation, identification and quantitation of carotenoids in fruits, vegetables and human plasma by HPLC. *Pure and Appl. Chem.* **63**: 71-80.
- Lewis, M. J., N. Ragot, M. C. Berlant and M. Miranda. 1990. Selection of astaxanthin - overproducing mu-

- tants of *Ph. rhodozyma* with μ -ionone. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 2944-2945.
- Miki, W. 1991. Biological function and activities of animal carotenoids. *Pure and Appl. Chem.* **63**: 141-146.
- Okagbue, R. N. and M. J. Lewis. 1985. Autolysis of the red yeast *Phaffia rhodozyma*: a potential tool to facilitate extraction of astaxanthin. *Biotechnol. Letters.* **6**, 243-250.
- Okagbue, R. N. and M. J. Lewis. 1985. Influence of mixed culture conditions on yeast-wall hydrolytic activity of *Bacillus circulans* WL-12 and on extractability of astaxanthin from the yeast *Ph. rhodozyma*. *J. Appl. Bacteriol.* **59**: 243-255.
- Parry, A. D. and R. Horgan. 1991. Carotenoid metabolism and the biosynthesis of abscisic acid. *Phytochemistry.* **30**: 815-821.
- Poulter, R., K. Jeffery, M. J. Hubbard, H. G. Shepherd and P. A. Sullivan. 1981. Parasexual genetic analysis of *Candida albicans* by spheroplast fusion. *J. Bacteriol.* **146**: 833-840.
- Rost, K. and H. Venner. 1965. Enzymatische Zellwand Verdaung bei Hefen durch Schneckenenzym. *Arch. Microbiol.* **51**: 122-129.
- Sandmann, G., P. M. Brambles and P. Bôger. 1980. The inhibitory method of action of the pyridazinone herbicide norflurazon on cell-free carotenogenic enzyme system. *Pestic. Biochem. Physiol.* **14**: 185-191.
- Sarachek, A., D. D. Rhoads and R. R. Schwarzhoff. 1981. Hybridization of *Candida albicans* through fusion of protoplast. *Arch. Microbiol.* **129**: 1-8.
- Sherman, F., G. R. Fink and J. B. Hicks. 1982. Methods in yeast genetics. Box 100, Cold Spring Harbor, New York. **11724**: 61-63.
- Sipiczki, M. and L. Ferenczy. 1977. Fusion of *Rhodospiridium (Rhodotorula)* protoplast. *FEMS Microbiol. Lett.* **2**: 203-205.
- Stewart, P. R. 1975. Analytical methods for yeast. In: Methods in Cell biology. Prescott, D. M(ed). Academic Press, New York. **12**: 22-123.
- Stahl, U. 1978. Zygote formation and recombination between mating types in the yeast *Saccharomyopsis lipolytica* by protoplast fusion. *Mol. Gen. Genet.* **160**: 111-113.
- Valadon, L. R. G. and R. S. Mummery. 1979. The effect of 9-fluorenone on protein synthesis and carotenogenesis in *Verticillium agaricinum*. *Microbios. Lett.* **6**: 129-135.

Accepted February 7, 1993