

고함량 RNA 효모 변이주의 선별 및 고농도세포 유가배양

김재범 · 권미정 · 남희섭¹ · 김재훈¹ · 남수완*

동의대학교 생명공학과, ¹(주)농심 기술개발연구소

Selection of Yeast Mutant Strain with High RNA Content and Its High Cell-Density Fed-Batch Culture.
Kim, Jae-Bum, Mi-Jung Kwon, Hee-Sop Nam¹, Jai-Hoon Kim¹, and Soo-Wan Nam*. Department of Biotechnology and Bioengineering, Dong-Eui University, Pusan 614-714, Korea, ¹Research and Development Center, Nong Shim Co., Ltd. Kyungki-do 435-030 Korea - To obtain a yeast mutant with high RNA content and high growth rate, *Saccharomyces cerevisiae* MTY62 was mutated with ethylmethane sulfonate. Among the selected mutants that were sensitive to the high concentration of KCl, M40-10 strain was finally selected due to its rapid cell growth and high RNA content in the tube and baffled-flask cultures. In the batch culture of M40-10 mutant, the maximum specific growth rate (μ_{max}) of 0.38 h⁻¹, RNA concentration of 3210 mg-RNA/l, and RNA content of 183 mg-RNA/g-DCW were obtained, which were 23%, 15%, and 12% increased levels, respectively, compared to those of MTY62 parent strain. The intermittent fed-batch culture of M40-10 strain resulted in the maximum cell concentration of 35.6 g-DCW/l, RNA concentration of 5677 mg/l, and RNA content of 160 mg-RNA/g-DCW. Through the constant fed-batch culture, the maximum cell concentration of 46.4 g-DCW/l, RNA concentration of 6270 mg-RNA/l, and RNA content of 135 mg-RNA/g-DCW were obtained. At the 20 h culture time in the fed-batch cultures of M40-10 strain, the cell and RNA concentrations were increased by 30% and 10%, respectively, over the parent strain MTY62. In addition, it was also found that the accumulated RNA within the mutant cell was not degraded until the end of fed-batch cultivation, indicating that the M40-10 cell is a mutant with weak acidic RNase activity.

Key words: Ethylmethane sulfonate, Fed-batch culture, High-content RNA yeast

미생물 세포를 천연 향미소재로 이용하려면 RNA 함량이 높아야 하며, 특히 효모의 경우에는 세포내 총 핵산량의 약 95% 이상을 RNA가 차지하기 때문에 풍미소재로 개발 가치가 매우 높다[14]. 효모 세포 내 RNA:DNA 비율은 50:1이며, 총 RNA의 80%가 ribosomal RNAs(rRNA)로 알려져 있다[20]. 천연풍미소재용 효모를 얻기 위해서는 우선적으로 RNA 함량이 높은 효모주를 선별하거나 세포내에 rRNA를 많이 축적하도록 배양전략을 개선할 필요가 있다.

효모 *Saccharomyces cerevisiae* 세포내 RNA 함량은 탄소원, 증식기, mRNA의 processing, RNA 합성효소(RNA polymerase)의 활성 및 RNA 분해효소(RNase)의 활성 등에 크게 좌우된다. 즉, 에탄올과 같은 나쁜 탄소원에서 포도당과 같은 좋은 탄소원으로 바꾸었을 경우, rRNA 전사 및 ribosomal proteins의 양이 급격히 증가한다[4,6,8,21]. 또한, 탄소원 및 질소원에 상관없이 대수증식기에서 ribosome 함량과 RNA 함량은 증식속도에 비례하여 증가하

지만[8,11,22], 대수기 초기에서 대수기 말기로 이동시 rRNA 함량은 크게 감소한다[7].

rRNA는 35S의 6588 nucleotide로 전사된 후 3종의 성숙형(18S, 25S, 5.8S)으로 processing되며[20], rRNA가 부적절하게 processing 되면 급격히 분해된다고 알려져 있다[5]. 대수기 초기에서 RNA 축적이 멈추는 이유는 rRNA 전사가 감소 또는 rRNA 전사산물의 적절한 processing의 실패 때문으로 알려졌지만, 실제로는 rRNA 전사속도의 감소 때문인 것으로 밝혀졌다[7]. 대수기 후기의 효모 세포 추출물을 사용했을 때 RNA polymerase I에 의한 *in vitro* 전사는 지극히 비효율적으로 일어나 감소하지만[15,17], RNA polymerase III에 의한 *in vitro* 전사는 세포 추출물을 만들 때의 증식기와는 무관하다고 알려져 있다[1,12], 대수기 말기에서의 rRNA 함량 감소는 RNA polymerase I의 활성에 크게 좌우됨을 알 수 있다.

이외에도 세포 내 RNA 함량은 RNA 합성속도와 분해속도의 평형에 의해 결정되며, RNA의 분해를 억제하면 RNA 함량이 증가한다. RNA 분해 관련 주된 효소는 산성 및 알칼리 RNases 두 종류이다[18]. *S. cerevisiae* ATCC 7754 균주의 경우, 알칼리성 RNase는 1.5 M의 Na⁺ 또는 K⁺ 이온에 의해 활성의 약 35% 정도가 억제되며 Hg에 의

*Corresponding author

Tel. 82-51-890-2276, Fax. 82-51-891-7740

E-mail: swnam@dongeui.ac.kr

해 활성이 상승하였다. 반면에 산성 RNase는 Na^+ 또는 K^+ 이온 농도에 무관하며 Hg에 의해 활성이 감소하였다 [10]. 산성 및 알칼리 RNases가 억제된 변이주는 치사 변이주이며, 일반배지에서는 자라나 알칼리성 RNase 억제 배지(KCl 함유 배지)에서 자라지 못하는 치사변이주는 산성 RNase 활성이 억제 또는 핵산분해 대사에 이상이 생긴 변이주이다. 따라서, 이러한 변이주는 효모의 정상 생육 pH인 산성에서 RNA를 세포내 다량 축적할 수 있음을 예상할 수 있고, 실제로 모균주의 RNA 함량(16.1%, w/w) 보다 증가된 고함량(19.8%, w/w) RNA 변이주를 성공적으로 선별하였다[10].

본 연구에서는 RNA 함량이 높은 *S. cerevisiae* MTY62 균주를 변이제인 ethylmethane sulfonate로 처리하여 세포 증식이 더 빠르고 RNA 함량이 더 높은 변이주 M40-10을 선별하고, 당밀 배지를 이용한 유가 배양을 통해 균체농도와 RNA 농도(또는 함량)를 증대시키고자 하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 고함량 RNA 변이주 선별

본 연구에서 사용한 모균주는 (주) 농심에서 분리한 *S. cerevisiae* MTY62 균주이었다. 증식속도(균체농도) 및 RNA 함량을 증대시키기 위해 MTY62 균주를 ethylmethane sulfonate(EMS)로 처리하여 돌연변이시켰다[2]. 즉, YPD 배지에서 24시간 배양한 배양액(2×10^8 cells/ml)을 5000 rpm에서 5분 원심분리 한 후 균체를 1.0 ml 50 mM 인산 완충액(pH 7.0)로 두 번 세척하였다. 균체를 4.0 ml 50 mM 인산완충액(pH 7.0)에 현탁한 후 0.3% 농도로 EMS 처리하여 30°C에서 교반·반응시키면서 10분 간격으로 시료를 채취하였다. 동량의 5% sodium thiosulfate를 처리하여 돌연변이를 멈춘 후 약 200개의 colony가 생성하도록 희석 후 YPD 평판배지에 도말하여 생존율이 40%가 될 때의 변이주들을 선별하였다. 그리고 YPD 평판배지 및 YPD에 1.5 M KCl이 첨가된 배지에 각각 tooth picking 하여 YPD에서는 잘 자라고 KCl이 첨가된 배지에서는 잘 자라지 않는 변이주를 선별하였다. 선별한 변이주를 YPD 시험관 배양, 당밀배지 플라스크 배양을 통해 고함량 RNA 변이주와 모균주의 배양결과(균체증식, RNA함량)를 비교하였다.

배지 및 배양 조건

모균주 MTY62 및 변이주의 일반적인 배양 배지로는 YPD를, 본 배양 배지는 당밀배지를 사용하였다[9]. 당밀과 corn steep liquor(CSL)의 전처리는 전보에서와 같은 방법으로 실시하였다[9]. 또한 시험관(2.5 × 19 cm), 플라스크(500 ml baffled-flask) 및 발효조 회분 배양(배양부피는 1.0 l) 등도 전보와 동일한 조건으로 행하였다[9].

간헐적 유가배양에서 농축 배지(40% molasses, 20% CSL)를 50 ml씩 다섯 번 공급하였으며, 연속적 유가배양에서는 농축배지를 48 ml/h(9~13시간 사이), 24 ml/h(13~21시간 사이), 18 ml/h(21시간 이후) 등의 속도로 감소시키면서 공급하였다. 배양조건은 교반속도 300~1000 rpm ($\text{DO} \geq 20\%$), 통기속도 3 vvm로 하고 나머지 조건은 회분배양과 동일하게 행하였다.

균체 농도 측정

균체 농도는 일정시간 마다 채취한 배양액을 적당한 비율로 희석하여 분광 광도계(Shimadzu UV-160A, Japan)를 사용하여 600 nm에서 탁도(OD_{600})로 측정하였으며 보정곡선에 의해 건조 균체량 (g-DCW/l)으로 환산하였다.

포도당, RNA추출 및 정량

배양액 내 잔존 환원당 농도는 dinitrosalicylic acid 방법 [13] 사용하여 측정하였으며, 균체내 RNA 추출 및 정량은 perchloric acid 및 orcinol 법[16]으로 정량하였다.

결과 및 고찰

고핵산 효모 변이주의 선별

RNA 분해에 관여하는 효모의 산성 혹은 알칼리성 RNase의 활성을 억제하는 염(salt)을 돌연변이주 선별 방법으로 이용하였다. 즉, Na^+ 와 K^+ 이온의 경우 RNase의 활성을 특이적으로 저해하며[3,19], 같은 농도에서 K^+ 이온의 저해효과가 더 뛰어나기 때문에[10], YPD 배지에서는 잘 자라고 알칼리성 RNase를 저해하는 1.5 M KCl이 함유된 배지에서는 자라지 않는 변이주를 선별하고자 하였다.

여러 가지 돌연변이제 중 EMS를 MTY62 균주에 처리하여 EMS 처리시간에 따른 생존곡선을 작성한 뒤, 40% 생존율을 보이는 80분 동안 EMS를 처리하였다. EMS 처리 후 YPD 배지와 KCl 함유 YPD 배지에 도말하였다. KCl 함유 YPD 배지에서 자라지 않는 변이주들 중 10개의 변이주를 선별하여 시험관 배양을 통해 균체 농도 및 RNA 함량을 측정하였다. 그 결과, 모균주에 비해 세포 농도는 1.5배, RNA 함량은 1.3배 증가된 M40-10 변이주와 세포 농도는 1.4배, RNA 함량은 1.2배 증가한 M80-1 변이주 등 두 균주를 선별하였다(Fig. 1). 선별된 두 변이주를 플라스크 배양한 결과(Fig. 2), 최대비증식속도($\mu_{\max} = 0.310 \text{ h}^{-1}$), 최종 균체농도 (24.2 g-DCW/l), 최대 RNA 농도(2090 mg/l) 및 30시간째 RNA 함량(93 mg-RNA/g-DCW) 면에서 M80-1 변이주보다 우수한 M40-10 변이주를 최종적으로 선별하였다.

고함량 RNA 변이주 M40-10의 발효조 회분배양

최종 선별된 변이주 M40-10로 발효조 회분배양을 실시

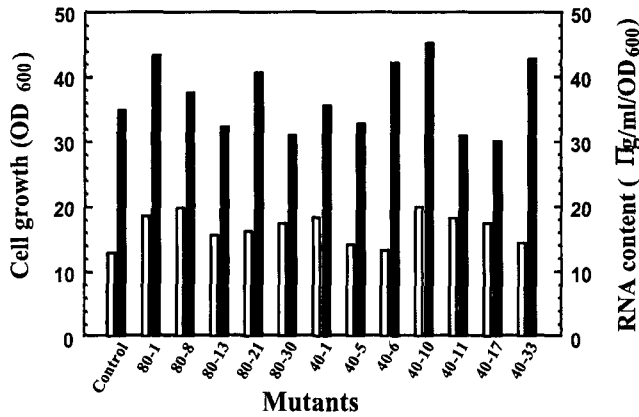


Fig. 1. Comparison of cell concentrations and RNA contents of *S. cerevisiae* MTY62 and its mutant strains grown on YPD medium for 36 hr. Control is *S. cerevisiae* MTY62 strain. Open bar, cell growth; closed bar, RNA content.

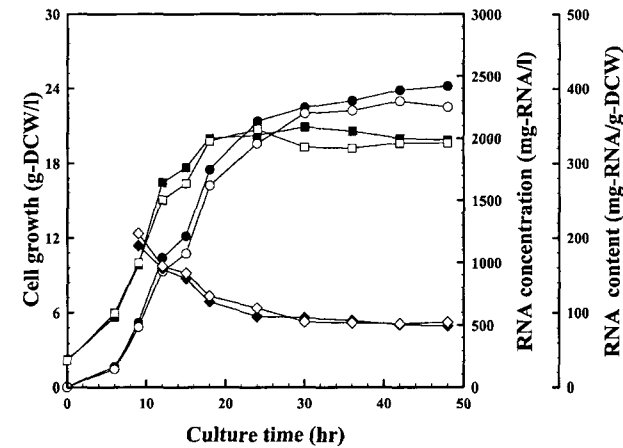


Fig. 2. Time profiles of cell growth and RNA accumulation in the flask cultures of *S. cerevisiae* M40-10 and M80-1 mutant strains. Symbols: (○, ●), cell growth; (△, ▲), RNA concentration; (◇, ◆), RNA content. Open symbols, M80-1; closed symbols, M40-10.

하였다. Fig. 3에서와 같이 배양 9시간까지 M40-10 균주의 최대비증식속도($\mu_{max} = 0.38 \text{ h}^{-1}$)가 모균주 (0.31 h^{-1})보다 빠르고, 특히 배양 20시간 이후의 세포농도가 높게 나타났다. 이에 따라 RNA 농도도 배양 15시간 이후부터 큰 차이를 보이며, RNA 분해도 거의 일어나지 않음을 알 수 있었다. 즉, M40-10 균주는 모균주보다 산성 RNase의 활성이 크게 감소한 변이주로 예상되었다. 균체증식수율($Y_{X/S}$)은 $0.38 \sim 0.53 \text{ g-DCW/g-sugar}$ 범위의 값을 보여 평균적인 값 ($Y_{X/S}^{ave}$)은 모균주와 비슷한 $0.47 \text{ g-DCW/g-sugar}$ 였다. 최대균체농도는 19.0 g-DCW/l 을 보여 모균주보다 약 9% 정도 증가되었다. 배양 15시간 때를 기준으로 모균주 MTY62의 균체농도는 17.1 g-DCW/l , RNA 농도는 2792 mg-RNA/l ,

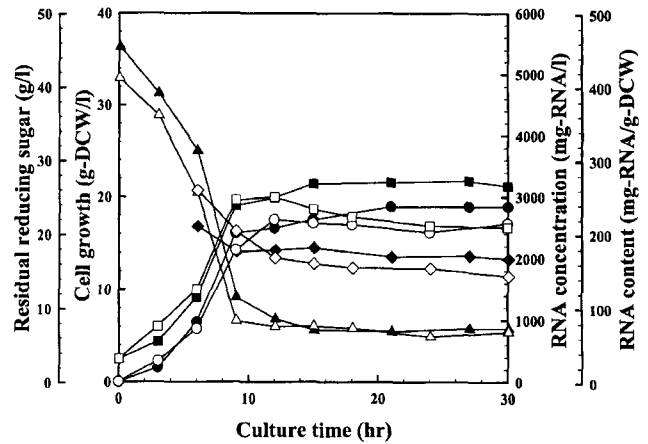


Fig. 3. Time profiles of cell growth sugar consumption, and RNA accumulation in the batch fermentation of *S. cerevisiae* M40-10 mutant. Symbols: (○, ●), cell growth; (△, ▲), residual reducing sugar; (□, ■), RNA concentration; (◇, ◆), RNA content. Open symbols, *S. cerevisiae* MTY62; closed symbols, M40-10.

RNA 함량은 163 mg-RNA/g-DCW 였지만, M40-10 변이주의 균체농도는 17.5 g-DCW/l , RNA 농도는 3210 mg-RNA/l , RNA 함량은 183 mg-RNA/g-DCW 에 달하였다. 즉, 모균주와 변이주 간 세포농도 차이는 크지 않지만, 모균주에 비해 M40-10 변이주는 RNA 농도는 15%, RNA 함량은 12% 증가된 값을 보였다.

고함량 RNA 변이주 M40-10의 유가배양

이상의 우수한 균체증식과 RNA 축적 특성이 유가배양에서도 잘 유지되는지를 확인하기 위해, MTY62 균주의 유가배양에서 가장 높은 균체농도를 보인 간헐적 기질공급방식과 일정속도의 기질공급방식과 동일한 조건 [9]으로 M40-10 변이주를 유가배양하였다. Fig. 4에서 처럼, 배양 9시간 이후부터 M40-10 변이주의 증식이 현저하게 우수하며 (9~18 시간 동안 MTY62의 $\mu = 0.085 \text{ hr}^{-1}$, M40-10의 $\mu = 0.096 \text{ hr}^{-1}$), 최대 균체농도는 35.6 g-DCW/l 을 나타내어 모균주의 균체농도 33.8 g-DCW/l 보다 증가하였다. RNA 농도도 균체증식과 비례하여 증가함을 보여, 최대 RNA 농도는 5677 mg-RNA/l 을, RNA 함량은 160 mg-RNA/g-DCW 을 나타내었다. MTY62 모균주의 최대 RNA 농도는 5221 mg-RNA/l 을, RNA 함량은 154 mg-RNA/g-DCW 을 보였다.

일정속도의 유가배양에서도 9시간 이후 M40-10 균주의 균체증식은 모균주보다 훨씬 빠르게 일어나며 (배양 9~18 시간 동안 MTY62의 $\mu = 0.070 \text{ hr}^{-1}$, M40-10의 $\mu = 0.114 \text{ hr}^{-1}$), 배양 41시간 때 최대 균체농도는 46.4 g-DCW/l , RNA 농도는 6270 mg-RNA/l 에 달해, RNA 함량은 135 mg-RNA/g-DCW 을 보였다(Fig. 5). 배양 12시간 후부터 배양 말기까지도 RNA 분해는 거의 일어나지 않아 RNA 함량은 일

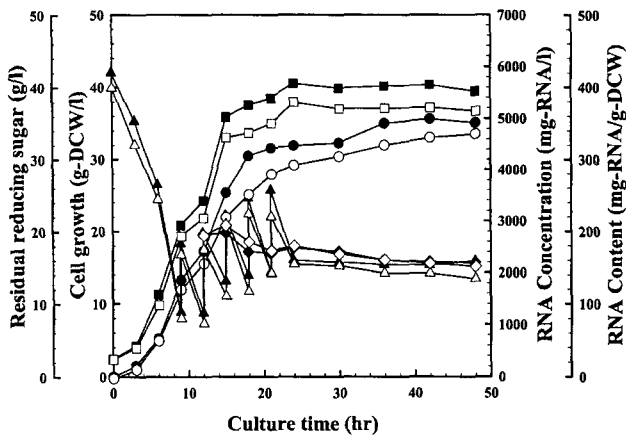


Fig. 4. Time profiles of cell growth, sugar consumption, and RNA accumulation in the intermittent fed-batch fermentation of *S. cerevisiae* M40-10 mutant. Each feeding medium (50 ml) was consisted of 40% molasses and 20% CSL. Symbols are the same as Fig. 3.

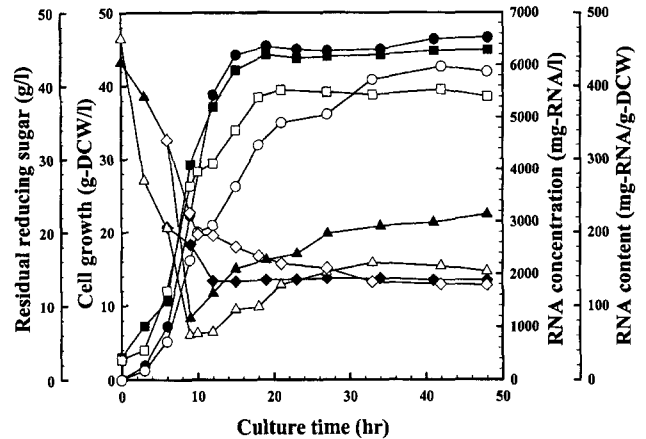


Fig. 5. Time profiles of cell growth, sugar consumption, and RNA accumulation in the constant fed-batch fermentation of *S. cerevisiae* M40-10 mutant. Feeding medium was consisted of 40% molasses and 20% CSL. Feeding rates were 48 ml/hr during 9~13 hr, 24 ml/hr during 13~21 hr, and 18 ml/hr after 21 hr. Symbols are the same as Fig. 3.

정하게 유지되었다. 배양 20시간 전후에서는 모균주에 비해 M40-10 변이주의 세포농도는 30%, RNA 농도는 10% 정도의 증가된 값을 보였다.

이상의 MTY62 모균주와 M40-10 변이주의 각종 배양 결과를 Table 1에 요약하였다. 회분배양에서 변이주의 RNA 농도와 RNA 함량은 모균주에 비해 각각 15%와 12% 증가하였다. 간헐적 유가배양에서는 균체농도, RNA 농도, RNA 함량이 각각 5%, 9%, 4% 증가하였고, 일정속도 유가배양에서는 각각 9%, 12%, 4% 증가하였다. 이상의 결과에서 간헐적 유가배양보다 일정속도 유가배양으로 높은 균체농도를 얻을 수 있었지만, RNA 함량은 낮았다. 따라서, M40-10 변이주의 유가배양을 더욱 정밀하게 수행할 경우, 특히 농축배지 공급 후 비증식속도를 좀 더 높게

연장·유지시킬 경우, 70 g-DCW/l 이상의 고농도 균체를 얻을 수 있을 것으로 예상된다.

요 약

RNA 함량이 증가되고, 증식속도가 더 빠른 효모 변이주를 선별하기 위해, 모균주 *Saccharomyces cerevisiae* MTY62 세포에 화학적 돌연변이제인 ethylmethane sulfonate를 처리하여, YPD 배지에서는 잘 자라고 KCl 함유 배지에서는 자라지 않는 변이주들을 선별하였다. 이 변이주들 중 시험관 및 플라스크 배양을 통해 균체농도와 RNA 함량이 모균주 MTY62에 비해 각각 1.5배, 1.3배 증가한 M40-10 변이주를 최종적으로 선별하였다. 변이주 M40-10을 발효조 회

Table 1. Comparison of cell concentration, RNA concentration, and RNA content in the various cultures of *S. cerevisiae* MTY62 and M80-1 or M40-10 mutant

Culture Mode	Strain	Cell Conc. (g-DCW/l)	RNA Conc. (mg-RNA/l)	RNA Content (mg-RNA/g-DCW)	
Batch (Flask) ¹⁾	MTY62	21.6	1951	90	
	M40-10	22.5	2090	93	
	M80-1	22.0	1928	88	
Batch (Fermentor) ²⁾	MTY62	17.1	2792	163	
	M40-10	17.5	3210	183	
Fed-Bacth	Intermittent ³⁾	MTY62	33.8	5221	154
	M40-10	35.6	5677	160	
Constant ³⁾	MTY62	42.7	5545	130	
	M40-10	46.4	6270	135	

¹⁾Results at 30 hr cultivation

²⁾Results at 15 hr cultivation

³⁾Results at the highest cell concentration

분배양한 결과, 최대비증식속도는 0.38 h^{-1} , RNA 농도는 3210 mg-RNA/l , RNA 함량은 183 mg-RNA/g-DCW 값을 보여, 모균주에 비해 각각 23%, 15%, 12%씩 증가하였다. M40-10 변이주를 간헐적 유가배양한 결과, 최대 균체농도는 35.6 g-DCW/l 을, 최대 RNA 농도는 5677 mg-RNA/l 을, RNA 함량은 160 mg-RNA/g-DCW 을 나타내어 모균주보다 우수하였다. 일정속도의 유가배양에서도 M40-10 변이주의 최대 균체농도는 46.4 g-DCW/l , RNA 농도는 6270 mg-RNA/l , RNA 함량은 135 mg-RNA/g-DCW 을 보였다. 이들 유가배양에서 배양 중반기인 20시간 전후에서는 모균주에 비해 변이주의 세포농도는 30%, RNA 농도는 10% 정도 증가되었다. 또한 유가배양 말기까지도 RNA 분해는 거의 일어나지 않아, M40-10 변이주는 산성 RNase 활성이 크게 감소한 변이주임을 알 수 있었다.

감사의 말

본 연구는 과학기술부의 선도기술개발사업의 연구비 지원에 의해 이루어 졌으며, 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Braun, B. R., D. L. Riggs, G. A. Kassavetis, and E. P. Geiduschek. 1989. Multiple stages of protein-DNA interaction in the assembly of transcription complexes on *Saccharomyces cerevisiae* 5S ribosomal RNA genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **86**: 2530-2534.
- Christopher, W. L. 1991. Classical mutagenesis techniques. *Method. Enzymol.* **194**: 273-281.
- Doi, S., S. Akiyama, and G. Nakao. 1983. Development of yeast strain with high ribonucleic acid. *Kakkai Chuppan Center*, Tokyo, 159-169.
- Donovan, D. M. and N. J. Pearson. 1986. Transcriptional regulation of ribosomal proteins during a nutritional upshift in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **6**: 2429-2435.
- Gorenstein, C. and J. R. Warner. 1977. Synthesis and turnover of ribosomal proteins in the absence of 60S subunit assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* **157**: 327-332.
- Herruer, M. H., W. H. Mager, L. P. Woudt, R. T. Nieuwint, G. M. Wassenaar, P. Groeneveld, and R. J. Planta. 1987. Transcriptional control of yeast ribosomal protein synthesis during carbon-source upshift. *Nucleic Acids Res.* **15**: 10133-10144.
- Ju, Q. and J. R. Warner. 1994. Ribosome synthesis during the growth cycle of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. **10**: 151-157.
- Kief, D. R. and J. R. Warner. 1981. Coordinate control of syntheses of ribosomal ribonucleic acid and ribosomal proteins during nutritional shift-up in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* **1**: 1007-1015.
- Kim, J. B., M. J. Kwon, H. S. Nam, J. H. Kim, and S. W. Nam. 2001. Fed-batch fermentation of high-content RNA yeast by using molasses medium. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **29**: 234-239.
- Kim, J. S., J. W. Kim, W. Shim, B. C. Min, J. W. Kim, K. H. Park, and U. H. Pek. 1999. Development of *Saccharomyces cerevisiae* strains with high RNA content. *Kor. J. Food. Sci. Technol.* **31**: 465-474.
- Kim, S. Y., H. S. Nam, and H. J. Lee. 1996. Change of yeast growth and its RNA content in fed-batch fermentation. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **28**: 122-126.
- Klekamp, M. S. and P. A. Weil. 1982. Specific transcription of homologous class III genes in yeast-soluble cell-free extracts. *J. Biol. Chem.* **257**: 8432-8441.
- Miller, G. L., R. Blum, W. E. Glennon, and A. L. Burton. 1960. Measurement of carboxymethyl cellulase activity. *Anal. Biochem.* **2**: 127-132.
- Nagodawithana, T. 1992. Yeast derived flavors and flavor enhancers and their probable mode of action. *Food Technol.* **11**: 139-144.
- Riggs, D. L. and M. Nomura. 1990. Specific transcription of *Saccharomyces cerevisiae* 35 S rRNA by RNA polymerase I *in vitro*. *J. Biol. Chem.* **265**: 7596-7603.
- Schneider, W. C. 1957. Determination of nucleic acids in tissues by pentose analysis. *Methods Enzymol.* **3**: 680-684.
- Schultz, M. C., S. Y. Choe, and R. H. Reeder. 1991. Specific initiation by RNA polymerase I in a whole-cell extract from yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **88**: 1004-1008.
- Shetty, J. K., R. C. Weaver, and J. E. Kinsella. 1980. A rapid method for the isolation of ribonuclease from yeast (*Saccharomyces carlsbergensis*). *Biochem. J.* **189**: 363-366.
- Shetty, J. K., R. C. Weaver, and J. E. Kinsella. 1980. Ribonuclease isolated from yeast (*Saccharomyces carlsbergensis*): characterization and properties. *Biotechnol. Bioeng.* **23**: 953-964.
- Udem, S. A. and J. R. Warner. 1972. Ribosomal RNA synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Mol. Biol.* **65**: 227-242.
- Waldron, C. 1977. Synthesis of ribosomal and transfer ribonucleic acids in yeast during a nutritional shift-up. *J. Gen. Microbiol.* **98**: 215-221.
- Waldron, C. and F. Lacroute. 1975. Effect of growth rate on the amounts of ribosomal and transfer ribonucleic acids in yeast. *J. Bacteriol.* **122**: 855-865.

(Received Sep. 26, 2001/Accepted Dec. 3, 2001)