

# Heterothallic *Saccharomycopsis lipolytica*의 有性生活環의 遺傳的 解釋

曹 碩 錦 · 鄭 東 孝\*

大阪大學 工學部 醱酵工學科, \*中央大學校 産業大學 食品加工學科  
(1985년 6월 4일 수리)

## Genetic Analysis of Sexual Life Cycle in Heterothallic *Saccharomycopsis lipolytica*

Seok-Gum Cho and Dong-Hyo Chung\*

Dept. of Fermentation Technology, Faculty of Engineering, Osaka, Japan  
\*Dept. of Food Science and Technology, Chung-ang University, Seoul, Korea

### Abstract

A yeast strains, CJ 2, CJ 7 and CJ 8, isolated from soil and contaminated cheese, mated with authentic strains of *Saccharomycopsis lipolytica* and were identified as *Saccharomycopsis lipolytica* with mating A, B and B, respectively. The strain CJ 7 produced large amount of isocitric acid in glucose and *n*-hexadecane medium as compared with another strains. All strains produced larger amount of citric acid in *n*-hexadecane medium as compared with glucose medium, and citric acid production of diploids was greater than that of the parental haploid strains. The specific activity of isocitrate lyase in *n*-hexadecane grown cells was 15~20 times greater than that in glucose-grown cells, but the specific activity of citrate synthetase was not so influenced by carbon source. Little correlation between citric acid production and the specific acitivity of these enzymes was noticed irrespective of strains and ploidy.

### 서 론

*Candida lipolytica*는 Wickerham등<sup>1)</sup>에 의하여 A와 B 2개의 交配型을 가진다고 알려진 二型性 酵母로서 자낭포자를 형성하고 性的 異型接合性的 생활환을 가지고 있으므로 *Saccharomycopsis lipolytica*로 재분류되었다<sup>1,2)</sup>. 그러나 이

효모의 유전적 연구는 교잡빈도가 낮고 자낭포자의 생존률이 낮기 때문에 지연되어 왔으나, 최근에는 反復交配에 의한 유전적 유용 균주들이 육종에 의하여 random spore분석과 四分子分析이 진행되고 있다<sup>3-5)</sup>.

한편 탄소원으로 당질만이 아니라 유지, 초산 그리고 적쇄상 탄화수소를 이용할 수 있으므로 single cell protein<sup>3,6,7)</sup>의 생산에도 특별한 관심

을 모으고 있고 특히 이 효모는 citric acid와 함께 three-Ds-isocitric acid를 다량 생산한다<sup>8)</sup>. 구연산 생산에 관한 연구로서 田淵 등<sup>8-10)</sup>은 생리학상의 배양효과에 관한 검토, Hattori 등<sup>11)</sup>은 pH 조절제로 NaOH를 사용함으로써 생산수율을 향상시킬 수 있다는 보고가 있다. 이외에 생산의 대사경로에 관한 효소학적 연구<sup>12-14)</sup>로는 glyoxylic acid 회로가 anaplerotic반응의 주체를 이루고 있다는 것이 일반적으로 인정되고 있다.

성에 의한 接合子의 형성에 관한 연구로는 *Schizosacch. pombe*, *Sacch. cerevisiae*, *Hansenula wingei* 등의 효모가 주로 연구되어 왔지만<sup>15)</sup>, *Saccharomycopsis lipolytica*에서는 和合性 균주들 사이에서의 接合子 형성조건에 관한 연구<sup>16)</sup>, 2중으로 異型接合性的의 2倍體를 형성한 균주의 분리<sup>3)</sup> 등이 있으며 특히 Bassel 등<sup>6)</sup>은 減數分裂 분리로 再組합과 相補性的의 가능성을 최초로 보고하였다.

본 연구에서는 *Saccharomycopsis lipolytica* 1倍體와 2倍體의 구연산 생산성을 비교하기 위하여 토양과 오염된 치즈에서 citric acid 생성이 높은 균주를 분리하여 동정하고 영양요구 mark를 부여한 후 異型遺傳子의 交雜을 행하고 이를 확인하였다. 아울러 대사경로의 효소 활성을 조사하여 몇 가지 새로운 사실을 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

실험재료 및 방법

사용균주

CJ2, CJ7 및 CJ8 균주는 토양과 오염된 치즈에서 분리한 것이고 IFO 1209와 IFO 1551 균주는 Wickerham이 분리한 것으로 IFO(Institute for Fermentation Osaka)에서 분양받은 것을 사용하였다.

배지조성

최소배지와 완전배지는 Matsuoka 등<sup>17)</sup>이 사용한 배지, YM(yeast extract - malt extract)배지와 생육제한배지는 Ogridziak 등<sup>4)</sup>이 사용한 배지를 각각 사용하였다.

V8 포자형성배지는 시판 V8 주우스(Campbell Co.) 1l에 dry yeast(Oriental Yeast Co.) 20g을 가하여 N KOH로써 pH 6.8로 조정하였다. 끓는 water bath상에서 10분 동안 가열하여 부유물을 여과한 후 2% agar로서 고화하였다. 산 생산배지의

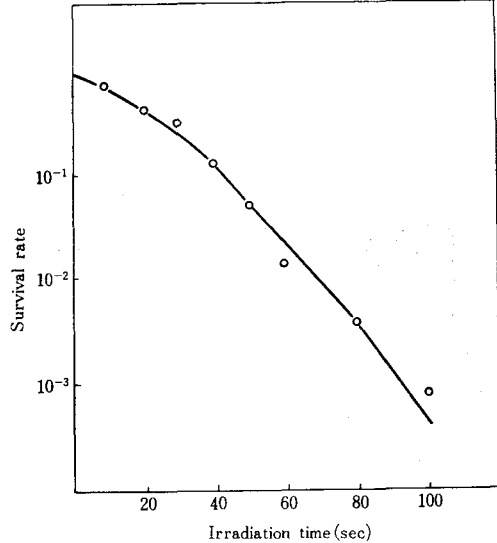


Fig. 1. Killing curve by UV irradiation in CJ2 strain

탄소원으로는 glucose 50g 또는 n-hexadecane 50ml 그리고 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5g, Mg-SO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5g, yeast extract 0.5g, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1mg, MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O 2mg, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 2mg, Cu-SO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 0.05mg을 탈이온수 1l에 녹여 사용하였다. 모든 배지는 120°C에서 15분간 살균하였다.

변이균주 분리

야생형 분리균주를 액체완전배지에서 1일간 배양하여 자외선[240nm(240μ/cm<sup>2</sup>)]을 40초간 조사하였다. 이때 생존율은 약 10%이었다(Fig. 1). 균체를 선택하여 세포의 농도가 10<sup>7</sup>cells/ml되게 하여 무질소 최소배지에 옮기고 질소기가 상태에서 1일간 진탕배양한 후 Snow<sup>18)</sup>의 방법에 따라 nystatin으로 농축을 하였다. 그 결과 영양요구성 돌연변이 균주 38균주를 분리하였다.

교잡과 random spore 분석

교잡型的의 확인 및 2倍體를 얻기 위하여 교잡을 Ogridziak 등<sup>4)</sup>의 방법에 따라서 행하였다. 즉 YM 평판배지에서 배양한 1倍體 균주를 생육제한 평판배지에 옮겨 30°C에서 2일간 배양한 뒤 서로 相補하는 영양요구성 마야크를 가진 균주끼리를 새로운 생육제한 평판배지에서 혼합하고 다시 2일간 배양한 후 최소평판배지에 옮겼다. 생육된 단일 colony를 분리한 후 최소평판배지에서 순화하였다. 交配型的의 확인은 Fukura 등<sup>23)</sup>에 의하여 交

配型이 확인된 IFO 1209(A)와 IFO 1551(B) 균주로서 교잡시켰을 때 최소평판배지에서의 colony의 생육으로 판정하였다.

포자형성과 random spore 분석은 Gaillardin 등<sup>3)</sup>의 방법에 준하여 23°C에서 V8배지에서 포자를 형성시켰다. 약 2주일 후 선택하여 자낭을 함유하는 균사를 농축하고  $\beta$ -glucuronidase(Sigma Co.)를 함유하는 멸균수에 넣어 30°C에서 30분간 보존하였다. 이 현탁액을 ice bath에서 30분간 초음파(19.5 kHz) 처리한 후 살균 paraffin oil을 1:1(V/V)의 비율로 혼합하여 교반하고 자낭을 함유하는 paraffin oil층을 완전평판배지에 옮겼다.

#### 배양과 발효조건 및 분석방법

Citric acid와 isocitric acid의 생산은 생산배지(100 ml/500 ml용 진탕 flask)에서 배양온도 30°C, 진탕속도 120 strokes/min, 진폭 7 cm의 조건에서 진탕배양하였다. 1 ml의 완전배지에서 1일간 배양한 seed culture는 glucose 생산배지에 접종하였다. 한편 2%(V/V) *n*-hexadecane, 2% peptone, 1% yeast extract 조성의 배지에서 배양한 seed culture는 *n*-hexadecane 생산배지에 접종하여 배양하고 pH 4 이하로 내려갈때 살균한 CaCO<sub>3</sub> 1g을 첨가하였다.

배양액은 먼저 N HCl용액으로 2배로 희석하여 잔존 CaCO<sub>3</sub>를 용해한 후 균의 생육도는 탄소원이 glucose 배지일때는 탈이온수로써 희석하고, 그리고 *n*-hexadecane 배지는 혼합 유기용매(*n*-butanol : ethanol : chloroform = 10 : 10 : 1, V/V)로써 적당히 희석하여 660 nm에서 흡광도를 측정하여 균의 생육도로 하였다. Citric acid와 threo-Ds-isocitric acid는 N HCl용액으로써 산성으로 한 배양액을 4,000×g에서 10분간 원심분리하고 glass paper (GS 25 Toyo Roshi Co.)로서 여과한 후 각각 Stern<sup>19)</sup>의 pentabromoacetone방법과 isocitrate dehydrogenase를 사용한 방법에 따라서 측정하였다.

#### DNA 측정

균체의 DNA함량 측정은 최소배지에서 30°C, 18시간 진탕배양한 대수증식기의 균체를 Schneider<sup>20)</sup>의 방법에 따라 추출한 DNA를 diphenylamine 시약과 복합체를 형성시켜 595 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질은 2-deoxyadenosine을 사용하였다. 시료의 세포수는 Coulter Counter

Model EBI(100 $\mu$ l Aperture tube)로써 측정하였다.

#### 효소활성 측정

Glucose 생산배지에서는 2일간, *n*-hexadecane 생산배지에서는 3일간 산 생성과 같은 조건에서 진탕배양한 뒤 집균하였다. 탈이온수로써 1회 세척하고 나서 50 mM imidazole-HCl buffer(pH 7.0) 용액(50 mM imidazole, 12.5 mM KCl, 5mM Mg-Cl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA, dithiothreitol, pH 7.0)으로 2회 세척하여 소량의 50 mM imidazole-HCl buffer [3%(V/V) glycerol함유, pH 7.0] 용액에 현탁한 뒤 French press (Ohtaka Co., 400~600 kg/cm<sup>2</sup>)에서 세포를 2회 파쇄하였다. 파쇄한 세포현탁액을 10,000×g에서 20분간 2회 원심분리하여 분리된 상등액을 조(粗)효소액으로하여 효소활성을 측정하였다.

Isocitrate lyase(EC 4.1.3.1)는 Dixon과 Kornberg<sup>23)</sup>의 방법에 따라 행하고 citrate synthetase (EC 4.1.3.7)는 Srere등<sup>24)</sup>의 방법에 따라서 효소활성을 측정하였다. 효소활성 단위는 실온에서 1분간 생산물 1  $\mu$ mol을 형성할 수 있는 양을 1 unit로 표시하였다. 단백질량은 표준물질로써 bovine serum albumin을 사용하여 Lowry등<sup>25)</sup>의 방법에 따라서 측정하였다.

### 결과 및 고찰

#### 균의 분리 및 동정

集積用배지(액체 최소배지의 2% glucose를 5% *n*-hexadecane으로 대체)에서 생육한 균주를 완전평판배지에서 배양하여 생육한 효모의 colony가운데 구연산 생산능력이 있는 CJ2, CJ7, CJ8 3균주를 분리하고 Lodder의 The yeasts, a taxonomic study<sup>26)</sup>와 Barnett와 Pankhurst의 A new key to the yeast<sup>27)</sup>를 참고하여 균주의 특성을 검토한 결과는 Table 1과 같다.

분리균주의 交配형을 IFO 1209(A)와 IFO 1551(B) 표준균주로서 확인한 결과는 Table 2와 같다.

CJ 2 균주는 IFO 1551균주, CJ 7과 CJ 8 균주는 IFO 1209 균주와 각각 생육제한배지에서 相互混合 배양하여 최소평판배지에 옮겼을 때 최소평판배지에서 原營養體를 회수하였다. 또한 이들 교잡균주는 V8 배지에서 포자를 형성하였다. 따라서 CJ 2균주는 交配型 A, CJ7과 CJ8 균주는 交配型 B로

**Table 1.** Description of yeasts isolated

Carbon compounds	Yeasts isolated		
	CJ2	CJ7	CJ8
Assimilation of carbon compounds			
Trehalose	—	—	—
Sucrose	—	—	—
Maltose	—	—	—
Cellobiose	—	—	—
Lactose	—	—	—
D-Xylose	—	—	—
D-Arabinose	—	—	—
Erythritol	+	+	+
D-Manitol	±	±	±
Inositol	—	—	—
D-Glucose	—	—	—
L-Sorbose	—	—	—
Melibiose	—	—	—
Raffinose	—	—	—
L-Ramnose	—	—	+
Glycerol	+	+	+
n-Alkane(broth)	±	±	±
D-Galactose	±	+	+
Inulin	—	—	—
D-Ribose	+	+	+
Salicin	—	—	—
Succinate	+	+	+

Growth in YM broth: After 3 days at 30°C, CJ2 and CJ7 cells are circular to oval. CJ8 cell is short oval to long oval. All three strains formed pseudomycelia and propagated by budding.

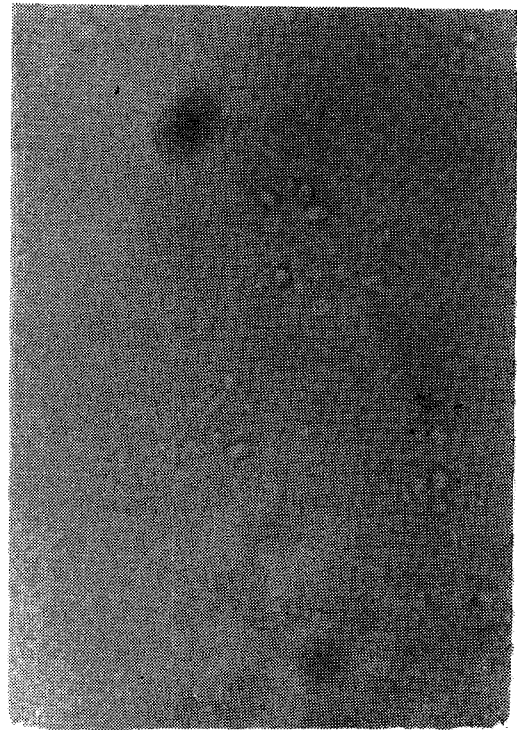
Growth on YM agar: After 10 days at 30°C, CJ2 is light brownish white and wrinkled, CJ7 is orange to dark orange and wrinkled, CJ8 is slightly ocher and wrinkled.

동정되었다.

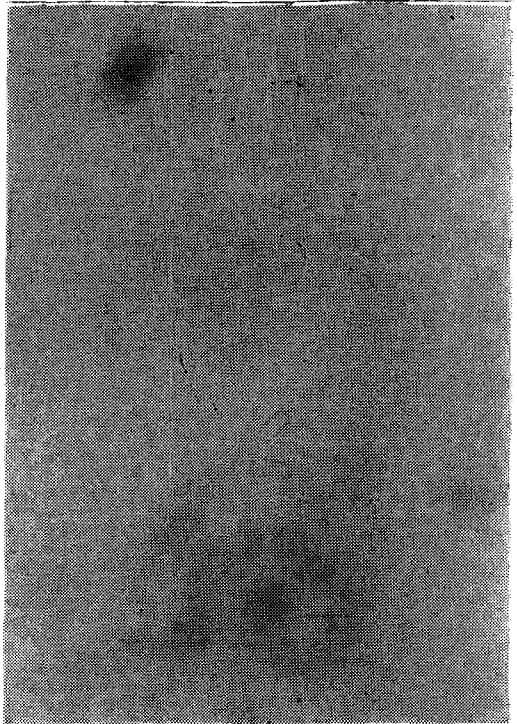
**유전적 분석**

최소평판배지에서 회수한 原營養體가 2倍體인 것을 확인하기 위하여 포자를 형성시킨 결과 모두 자낭포자를 형성하였으며, 자낭의 수는 2, 3, 4개 등의 여러가지 형태로 존재하였다.

1倍體 CJ2균주와 交雜菌株 DM1(IFO 1209×CJ 7)의 현미경 사진은 Fig. 2와 같다.



(A)



(B)

**Fig. 2.** Photomicrographs of haploid and diploid (×900)

또한 이 交雜菌株는 완전배지에서 營養的 再生産(反復培養)을 하는 동안 營養요구성 표현형은 거의 분리되지 않고 안정한 상태를 유지하였으며

이들 營養요구성 표현형은 random spore 분석에 나타난 것처럼 劣性을 유지하였다. 그러므로 이들 異型接合 交雜菌株는 2倍體 또는 異數體로 생각된다.

**Table 2.** The growth of prototrophic colonies on MM agar medium after mixed cultures with authentic strains of *Saccharomycopsis lipolytica*

Strains	IFO 1209 Met <sup>-</sup>	IFO 1551 Lys <sup>-</sup>
·CJ2 Ade <sup>-</sup>	-	+
·CJ7 His <sup>-</sup>	+	-
·CJ8 Arg <sup>-</sup>	+	-
IFO 1209 Met <sup>-</sup>	-	+
IFO 1551 Lys <sup>-</sup>	+	-

자낭포자를 형성한 2倍體 IFO 1209 Ile<sup>-</sup>×CJ7 His<sup>-</sup>를 random spore 분석으로 有性的 生活環을 하는 동안 減數分裂 분리를 한 결과는 Table 3에 나타난 바와같이 兩親型은 Ile<sup>-</sup> 6%와 His<sup>-</sup> 9%로 모두 분리되었지만 再組合型은 2倍體 營養系와 구별이 불가능한 原營養體인 1倍體 再組合型을 제외하고 5종류 중 4종류만 나타났다. 이와같은 사실은 이들 효모에 있어서 유전자의 轉移를 입증하고 있다.

**1倍體와 2倍體의 酸 生産性**

탄소원으로써 glucose와 *n*-hexadecane배지에서 1倍體와 2倍體의 citric acid와 isocitric acid의 생산성을 조사한 결과를 Table 4에 나타내었다.

**Table 3.** Meiotic segregation pattern from ascospore of diploid having the phenotype(Ile<sup>-</sup>×His<sup>-</sup>).

Ascospore Phenotypes	Number of progeny	Percentage of sample	
Parental	Ile <sup>-</sup>	4	6
	His <sup>-</sup>	6	9
Recombinant	Ile <sup>-</sup> His <sup>-</sup>	18	26
	Ile	16	24
	Val	24	35

Table 4에 나타난 바와같이 citric acid생산량은 CJ7 균주가 두가지 배지에서 가장 많았다. 그러나 isocitric acid의 생산량은 일반적으로 citric acid의 20~30%정도 생산한다고 알려져 있지만<sup>9)</sup> CJ7 균주는 citric acid의 생산량과 거의 비슷하였다.

1倍體의 citric acid 생산량에 따라 交雜하여 얻은 2倍體는 citric acid 생산량이 높은 균주 사이의 交雜 順으로 citric acid를 생산하였으며 이들

**Table 4.** Comparison of DNA content, and citric acid production from glucose and *n*-hexadecane medium as carbon source.

Strain	Ploidy	DNA content (μg/10 <sup>8</sup> cell)	Acid production in the following media:					
			Glucose			<i>n</i> -Hexadecane		
			Citric acid (g/l)	Isocitric acid(g/l)	Growth (OD)	Citric acid (g/l)	Isocitric acid(g/l)	Growth (OD)
IFO 1209	<i>n</i>	2.15	17.8	3.2	7.3	22.3	17.4	8.1
CJ2	<i>n</i>	2.87	9.6	2.8	15.6	12.7	3.1	11.2
CJ7	<i>n</i>	2.26	20.6	4.4	8.8	24.1	4.7	9.7
CJ8	<i>n</i>	2.04	3.7	2.8	12.0	11.3	11.8	12.6
DM1	2 <i>n</i>	3.49	16.3	3.0	9.4	26.8	5.3	11.8
DM3	2 <i>n</i>	3.02	13.8	3.1	8.9	23.1	5.2	11.2
DM7	2 <i>n</i>	3.47	8.3	3.0	6.3	20.3	4.9	10.9

DNA was extracted from cells shaken at 30°C for 20 h in 100 ml of the liquid MM medium.

Citric acid and isocitric acid were produced in glucose and *n*-hexadecane medium as carbon source. The cultivations were carried out at 30°C for 6 days.

DM1, DM3, DM7, are abbreviation of IFO 1209 Met<sup>-</sup>×CJ7 His<sup>-</sup>, IFO 1209 Met<sup>-</sup>×CJ8 Arg<sup>-</sup> and ·CJ2 Ade<sup>-</sup>×CJ8 Arg<sup>-</sup>, respectively.

**Table 5.** Specific activities of isocitrate lyase and citrate synthase in extracts of cells grown in glucose or *n*-hexadecane medium.

Strain	Specific activities <sup>a)</sup>			
	Isocitrate lyase		Citrate synthase	
	Glucose <sup>b)</sup>	<i>n</i> -Hexadecane <sup>b)</sup>	Glucose	<i>n</i> -Hexadecane
IFO 1209	22	344	410	1507
CJ2	18	266	322	1403
CJ7	11	289	398	2173
CJ8	16	312	356	1390
DM1	24	385	334	1860
DM3	16	310	382	1429
DM7	21	388	396	1410

<sup>a)</sup> Specific activities are expressed in milliunits per milligram of protein.

<sup>b)</sup> Carbon sources for growth of cells.

2배體는 *n*-hexadecane 배地에서 1배體의 兩親菌株보다 citric acid 생산량이 높았다. 이 사실은 *Sacch. cerevisiae*에서 배數性이 높을수록 발효율이 높다는 Takagi 등<sup>29)</sup>의 보고와 일치하였다.

*Saccharomycopsis lipolytica*가 alkane 효모로 알려진 바와 같이 탄소원이 *n*-hexadecane 배지 일때 산의 생산이 많았다.

**효소 활성**

Glucose와 *n*-hexadecane 배지에서 생육한 1배體와 2배體의 효소 비활성을 Table 5에 나타내었다.

Table 5에 나타난 바와 같이 isocitrate lyase 활성은 두가지 배지에서 1배體중 citric acid 생산량이 가장 많은 CJ7 균주(Table 4)가 가장 낮았다. 그러므로 glucose 배지에서 단백질 1 mg 당 11 mμ의 효소 활성은 basal level로 생각된다. 한편 *n*-hexadecane 배지에서는 citric acid의 생산이 가장 적은 CJ8 균주가 CJ2와 CJ7 균주보다 활성이 높았다. 그러므로 citric acid 생산과 isocitrate lyase 활성과의 사이에는 상관관계를 인정하기가 어렵다고 생각된다.

한편 isocitrate lyase의 활성은 *n*-hexadecane 배지가 glucose 배지보다 15~20배 높았다. 이 사실은 glyoxylic acid 회로의 효소 합성이 glucose에 의하여 현저히 저해된다는 Tobuchi 등<sup>14)</sup>의 보고와 일치한다. 또한 oxaloacetate의 補充的 재합성이

glucose를 대사하는 동안 이 효소는 합성되지 않는다는 것을 나타낸다. 그러나 citrate synthetase 활성은 glucose 배지보다 약 4배 높았다. 따라서 이 효소는 구성 효소로 생각된다.

**요 약**

Alkane 효모의 有性 生活環을 이용한 유전적 해석과 代謝經路에 관한 기초자료를 얻고자 토양과 오염된 치즈에서 citric acid의 생산성이 높은 균주를 분리하여 동정하고 交雜에 의하여 2배體體化하였으며, 이들의 유전적, 생화학적 및 효소학적 특성을 검토하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

Citric acid와 isocitric acid를 생산하는 CJ2, CJ7과 CJ8 균주는 *Saccharomycopsis lipolytica*의 交配型 A, B와 B로 각각 동정되어 交雜과 胞子形成에 의하여 얻은 배數體의 減數分裂 분리를 행한바 再組合型 자손이 얻어졌다.

모든 균주는 glucose 배지보다 *n*-hexadecane 배지에서 再親 1배體보다 2배體가 citric acid를 많이 생산하였고 isocitrate lyase의 比活性은 *n*-hexadecane 배지에서 생육한 세포가 glucose 배지에서 생육한 세포보다 15~20배 높았지만 citrate synthetase의 比活性은 탄소원에 의하여는 거의 영향을 받지 않았다. 또한 이들 효소의 比活性과 citric acid의 생산 사이에는 균주와 배수성에 관계없이 상관관계가 적었다.

**사 사**

本研究를 수행함에 있어 처음부터 끝까지 많은 지도와 편의를 제공해준 大阪大學 工學部 醱酵工學科 合葉修一교수와 松岡正佳助手에게 깊은 감사를 드립니다.

**참 고 문 헌**

1. Wickerham, L.J., Kurtzman, C.D., Herman, A.I.: Recent trends in yeast research, Miner Institute, Chazy New York(1969).
2. Wickerham, L.J., Kurtzman, C.D., Herman, A.I.: Science, 167 : 1141(1970).
3. Gaillardin, C.M., Charoy, V., Heslot, H.: Arch. Microbiol., 92 : 69(1973).

4. Ogridziak, D., Bassel, J., Contropoulou, R., Mortimer, R.: Molec. Gen. Genet., 163 : 229 (1978).
5. Bassel, J.B. and R.K. Mortimer: Current Genetics, 5 : 77(1982).
6. Bassel, J., Warbel, J., Mortimer, R.: J. Bacteriol., 108(1) : 609(1971).
7. Esser, K., Stahl, U.: Mol. Gen. Genet., 146 : 101(1976).
8. Abe, M., Tabuchi, T.: Agri. Biol. Chem., 33 : 440(1968).
9. 田淵武士, 田中優行, 田原慶孝, 阿部又三 : 日農化, 44 : 562(1970).
10. 田淵武士, 原誠五 : 日農化, 47 : 485(1973).
11. Hattori, K., Yokoo, S., Imado, O.: J. Jerm. Technol., 52 : 542(1974).
12. Akiyama, S., Suzuki T., Nako Y. and Fukuda H.: Agri. Biol. Chem., 37 : 885(1973).
13. 田淵武士, 原誠五 : 日農化, 48(7) : 417(1974).
14. Tabuchi, T., Keizi, I.: Agric. Biol. Chem., 42(12) : 2381(1978).
15. 柳島直彦, 大嶋泰治, 大隅正子 : 酵母の解剖, 講談社(1981).
16. Herman, A.I.: J. Bact., 107 : 371(1971).
17. Matsuoka, M., Ueda, Y., Aiba, S.: J. Bacteriol., 144 : 692(1980).
18. Snow, R.: Nature(London), 211 : 206(1966).
19. Stern, J. R.: Method in Enzymology, 3, p.425, S.P. Colowick, N.O. Kaplan, eds., Academic Press, New York(1967).
20. Scheider, W.C.: J. Biol. Chem., 161 : 293 (1945).
21. Burton, K.: Biochem. J., 62 : 315(1956).
22. Giles, K.W., Myers, A.: Nature, 206 : 93 (1965).
23. Dixon, G.H., Kornberg, H.L.: Biochem. J., 72 : 3(1959).
24. Srere, P.A., Brazil, H., Gonen, L.: Acta Chemica Scandinavica, 17 : S129~S134(1963).
25. Lowery, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A. L., Randall, R.J.: J. Biol. Chem., 193 : 265 (1951).
26. Lodder, J.(ed.): The Yeasts, a Taxonomic study, North-Holland Publishing Co., Amsterdam, London(1970).
27. Barnett, J.A., Pankhurst, R.J.: A New Key to the Yeasts, North-Holland Publishing Co., Amsterdam, London(1974).
28. Furukaiva, T., Ogino, T., Matsuyoshi, T.: J. Ferment. Technol., 60 : 281(1982).
29. Takagi, A., Harashima, S. Oshima, Y.: Appl. Environ. Microbiol., 45(3) : 1034(1983).