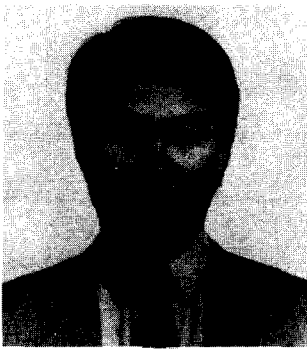


I. 緒 言

酒類工業에서의 遺傳工學技術의 活用



李 尚 基

KAIST遺傳工學센터 前任研究員·理博

目 次

- I. 緒 言
- II. 突然變異法 (mutagenesis)
- III. 交雜法 (mating, hybridization)
- IV. 細胞融合法 (cell fusion)
- V. 細胞質因子導入法 (cytoduction)
- VI. 形質轉換法 (transformation)
- VII. 遺傳子再組合法
(gene manipulation)
- VIII. 結 論
- IX. 參考文獻

最近에 전개되고 있는 遺傳工學技術의 눈부신 發展은 멀지않은 將來에 第3의 産業革命을 豫告해 주고 있다. 특히 分子生物學이나 遺傳工學分野에 있어서의 새로운 지식의 蓄積이나 技術의 進歩는 生物工業 전반에 걸쳐서 막대한 영향을 미쳐 과거 醫藥品製造등 일부 保健分野에 局限되었던 遺傳工學技術이 이제는 食糧, 에너지, 環境등 人類生存에 직접적으로 관계되는 모든 分野에 擴散, 應用되기 시작했다. 이는 酒類工業에서도 例外가 아니어서 이제 遺傳工學的인 技法을 利用하여 그동안 釀造技術發展의 장애요소로 간주되고 있던 여러가지 問題點들을 解決하고자 하는 努力이 절대적으로 필요하게 되었다.

酒類工業에서의 遺傳工學技術의 利用은 良質의 酒類를 生産하기 위한 目的하에 1次的으로 알코올醱酵菌株인 酵母의 育種에 焦點이 맞추어져야 할 것이다. 一般的으로 酵母가 優秀한 알코올醱酵菌株로서의 理想的인 자격을 갖추기 위해서는 廉價의 原料물질을 사용할 수 있어야 하며, 사용한 基質당 알코올의 生成效率이 높아야 하고, 高濃度의 에타놀이나 基質에 대한 抵抗性이 크고 耐킬러(killer)性, 耐鹽性, 高温性, 好酸性, 凝集性등의 特性을 지녀야 한다.^(1,2) 그러나 既存의 알코올醱酵菌株로서 이러한 特性을 모두 지닌 菌株은 存在하지 않으므로 酵母菌株의 育種은 위에 열거한 特性을 可及의 많이 구비한 菌株을 開發하는 方向으로 추진되고 있다. 그 동안 酵母의 遺傳學에 대한 많은 研究가 이루어져, 細胞分裂, 核分裂, 遺傳子發現, DNA 複製 및 修理, 각종 物質代謝關聯 遺傳子의 構造, 膜透過 메카니즘등이 상세히 밝혀졌으나⁽³⁾ 一般的으로 産業的 價値가 있는 釀造用 酵母는 染色體의 구조가 高次倍數體(polyloid)이거나 異數體(aneuploid)이므로 交雜(mating)이나 胞子의 形成이 잘 일어나지 않아서⁽¹⁾ 이들에 대한 遺傳學的 研究가 거의 이루어져 있지 않은 形편이다. 따라서 産

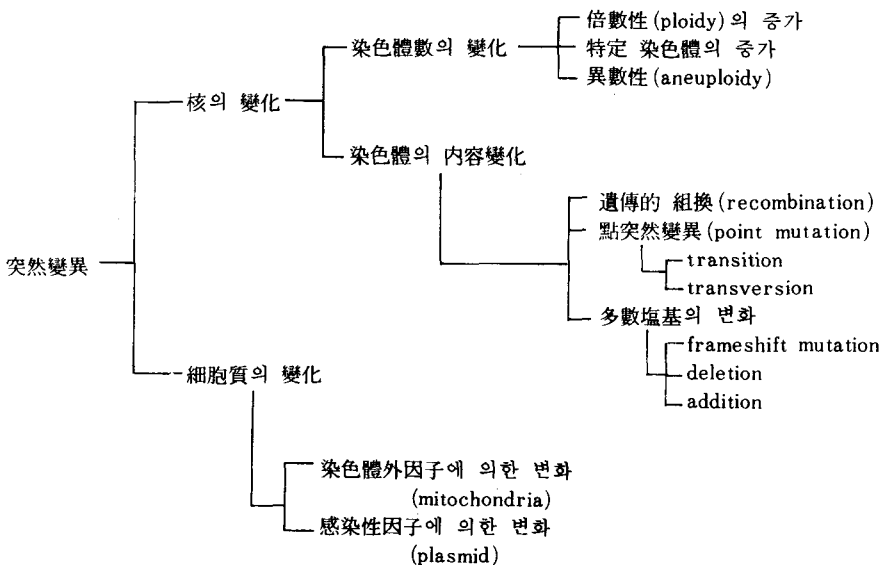
業酵母의 遺傳工學的 育種에는 아직까지 많은 제약이 따르고 있는 것이 事實이다.

本稿에서는 實際로 酒類工業에서 活用되고 있는 産業酵母의 遺傳工學的 育種方法을 살펴보고 이 過程에서 提起되고 있는 몇가지 問題點에 관하여 考察해 보고자 한다.

II. 突然變異法 (Mutagenesis)

突然變異란 自發的이거나 人工的인 誘發에 의해 父母와는 다른 遺傳形質을 갖는 子孫이 出現하는 現象을 의미하며 <表 1>에 表示한대로 核內的 染色體數가 變化하거나 遺傳的 組換(recombination) 또는 鹽基配列狀態의 變化등 染色體內容의 變化에 의해 주로 일어나며 또한 細胞質內的 미토콘드리아(mitochondria)등 染色體外因子의 變化나 플라스미드(plasmid) 등 感染性因子에 의한 感染에 의해서도 일어날 수 있다.⁽⁴⁾ 酵母로 부터 突然變異를 誘發시키기 위해서는 다른 生物體의 突然變異劑로 通常的으로 使用하

는 EMS나 nitrous acid, nitrosoguanidine(NTG), ICR이나 UV 또는 X-ray등의 物理的 處理를 행하며 營養要求性이나 抗生物質에 대한 抵抗性등을 利用하여 원하는 特性을 지닌 突然變異株를 選別한다. 그러나 대부분의 경우 有用變異株의 직접적인 選別은 不可能하므로 레프리카법(replica plating)을 利用한 間接적인 選別法을 使用한다. 가장 대표적인 方法으로 培地에 抗生物質의 一種인 니스타틴(nystatin)을 첨가함으로써 왕성하게 增殖 中인 細胞에만 選別的으로 작용시켜 願하는 突然變異株를 選別하는 니스타틴 集積培養法(nystatin enrichment)이 있다.⁽⁵⁾ 産業菌株를 育種하거나 遺傳學 研究에 있어서 突然變異法이 가장 흔히 使用되는 方法이고 특히 酵母는 半數性(haploidy)를 安定하게 유지할 수 있으므로 高等動物이나 植物같은 다른 眞核生物과 比較하여 이 方法에 의해 菌株를 育種하는 것이 수월하지만 이미 설명한 대로 有用變異株의 選別이 쉽지 않고 釀造用 産業酵母의 경우 대부분 高次倍數體인 관계로 突然變異의 成功率은 더욱 낮아 진다는 短點이 있다.⁽⁶⁾



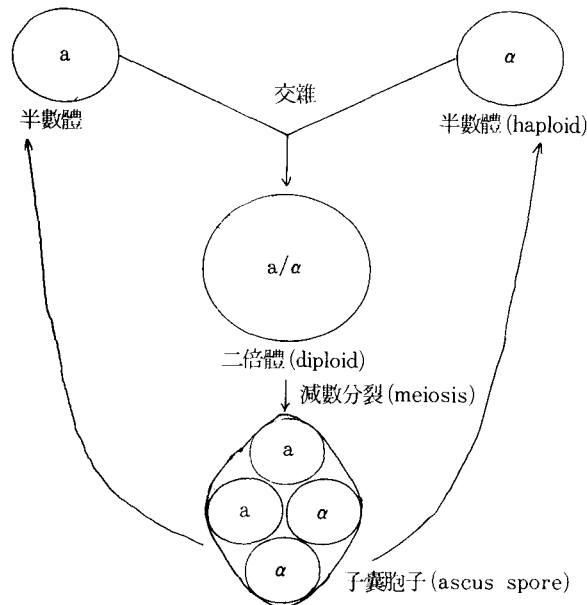
<표 1> 突然變異의 種類

Ⅲ. 交雜法(Mating, Hybridization)

一般的으로 自然界에서 分離한 酵母菌株은 二倍體(diploid)로서, 分裂하게 되면 半數體(haploid)의 子囊胞子를 形成한다. 이 子囊胞子が 發芽하여 a 또는 α 型的 接合能力을 갖는 半數體의 營養細胞가 되고 株에 따라 이 營養細胞가 增殖을 계속하거나 胞子끼리 交雜하여 二倍體를 形成한다. 즉 서로 다른 接合型을 갖는 菌주를 混合培養을 통해 交雜시키면 쉽게 接合子(zygote)를 形成하고 이것이 發芽함으로써 二倍體의 雜種株(hybrid)를 얻을 수 있다. 이를 酵母菌株의 heterothallic life cycle이라고 하는데 <그림 1> 釀造酵母인 *Saccharomyces cerevisiae*의 경우는 보통 이와같은 生活環을 따른다. 酵母의 育種은 이러한 生活環을 利用하여 두 菌株을 交雜시키거나 形

質의 分離를 행하지만 실제로 産業菌株의 경우 高次倍數體이고 a型的 接合型이 없으며 胞子를 形成하지 않거나 形成하더라도 發芽率이 매우 낮아 交雜法만으로는 菌株의 育種이 쉽지 않다. 그러나 細胞融合등 다른 遺傳工學的 技術과 併行하여 産業酵母의 凝集性 研究⁽⁸⁾나 麥芽種의 吸收, 分解에 대한 遺傳的 制禦研究⁽⁹⁾에 活用되고 있다. 특히 麥酒 釀造時 原料物質인 麥芽의 構成分은 50~55%가 麥芽糖이고 10~15%가 3탄당인 maltotriose이므로 麥酒酵母의 이 두가지 糖分解能은 必須的이다. 麥酒酵母에서 이들 糖을 吸收, 分解하는 能力은 MAL 遺傳子에 의해 調節되고 있는데 실제로 交雜法을 利用하여 麥芽의 糖化 및 醱酵速度가 빠른 三倍體(triploid) 酵母菌株의 育種이 成功되바 있다.⁽⁹⁾

<그림 1> *Saccharomyces cerevisiae*의 heterothallic life cycle



Ⅳ. 細胞融合法 (Cell fusion)

細胞融合法은 각각 다른 遺傳形質을 갖는 두 種의 微生物이나 植物體의 細胞壁을 달팽이나 微生物로 부터 分離한 細胞壁溶解酵素로 處理하여 제거시킨 다음 細胞膜만으로 둘러싸인 原形

質體(protoplast)를 製造하여 融合시키는 方法⁽¹⁰⁾으로서 특히 酵母의 경우 倍數性이나 接合型과 無關하게 育種이 可能하므로 釀造酵母의 育種에 있어서 가장 有望한 方法으로 알려져 있다. 그러나 原形質體는 滲透壓에 대해 예민하므로 0.8~1.2M의 Sorbitol緩衝溶液內에서 유지시켜야 한다.

실제로 原形質體가 만들어 지면 Ca^{+1} 이온이나 polyethylene glycol(PEG) 등의 融合促進劑를 첨가하여 融合體를 만든 다음 細胞壁을 갖는 完全한 融合細胞로서 再生시켜야만 다시 細胞分裂을 통해 새로운 形質을 갖는 個體가 만들어 진다. 이

方法을 통하여 底面醱酵麥酒(lager beer) 菌株인 *Saccharomyces uvarum(calsbergensis)*과 表面醱酵麥酒(ale)菌株인 *Saccharomyces cerevisiae*를 融合시켜 두가지 母菌의 特性을 同時에 갖는 새로운 融合體 酵母의 製造에 성공하였다.⁽¹⁾ <表 2>. 그

<표 2> *Saccharomyces cerevisial* 細胞融合體의 特性

融 合 方 法	融合體의 特性	醱酵 및 麥酒의 特性
非凝集性 ale ×	凝集性, 高次倍數體	교반시 醱酵能 보유
1) 凝集性, 半數體 麥芽糖 ⁺ / maltotriose ⁻	麥芽糖 ⁻ / maltotriose ⁺	停置培養시 凝集性
2) 凝集性 lager ×	凝集性, 高次倍數體	不快한 phenol 香
非凝集性 半數體		
3) 非凝集性 ale ×	완만한 凝集性, 高次倍數體	醱酵能 否足 ale型 麥酒 ester 香
凝集性 lager		
4) 非凝集性 ale ×	강한 凝集性 高次倍數體	醱酵能 否足 lager型 麥酒 sulfur 香
凝集性 lager		

한가지 例로서 營養要求성이 없는 非凝集性 lager 株와 營養要求성이 있고 *FLOL* 遺傳子를 갖는 凝集性 ale 株를 融合시켜 凝集성은 가지나 營養要求성이 없는 새로운 融合體를 얻을 수 있었다. 이러한 細胞融合은 種間에만 可能한 것이 아니라 屬間에도 可能한 것으로서 *Saccharomyces* 屬과 *kluyveromyces* 屬의 特性을 同時에 지니는 細胞融合體가 實驗實의으로 얻어진바 있으나⁽⁶⁾ 이러한 融合體들은 一般的으로 매우 不安定하여 원래의 形質로 되돌아 가기 쉬운 것이 缺點이다. 또한 細胞融合을 통해 各個體의 染色體가 重合(integration)됨으로써 母體의 각기 다른 特性이 子孫에 同時에 나타나므로 어느 特定形質만을 選擇的으로 導入시키기가 어렵고 融合의 成功頻度も 10^{-5} 정도로 매우 낮은 편이다. 또한 操作이 번잡하고 細胞壁이 再生되어 完全한 콜로니가 形成될 때

까지 長時間이 所要되므로 이러한 問題點을 解決하기 위해 Li^{+} 등의 알칼리 金屬處理法(Ku法) 등 새로운 細胞融合法도 開發되었다.⁽¹¹⁾

V. 細胞質因子導入法(Cytoduction)

酵母菌株을 融合시키면 一般的으로는 a 및 α 接合型 間에 1:1의 有性的인 細胞融合이 일어난 후 核融合이 일어나 二倍體가 形成된다. 그러나 일부 균주는 細胞融合이 일어나더라도 核融合은 일어나지 않는 경우가 있는데 이와 같이 交配에 의해 供與菌의 細胞質遺傳子가 自發的으로 受容菌에 전달되어 細胞融合은 일어나지만 核融合은 일어나지 않는 現象을 細胞質因子導入이라 부른다. 特히 核融合缺損變異株(kar株)를 交配시킬 경우 高頻도로 이러한 現象이 나타나는데⁽¹²⁾ 미

〈표 3〉 세포질因子導入법의 種類

種 類	遺傳子傳達方法	受 容 菌	供 與 菌
1) 接合 - cytoduction	接合	産業酵母의 胞子클론 ^a	kar 1 ^b 變異株
2) 偶發接合 - cytoduction	接合	産業酵母 ^c	kar 1 變異株
3) protoplast fusion - cytoduction	protoplast fusion	"	"
4) miniprotoplast fusion - cytoduction	"	"	野生株
5) UV致死 protoplast fusion - cytoduction	"	"	rad 1 變異株 ^d

a : 胞子clone 중 接合能인 있는 것, b : 核融合欠損變異 c : 淸酒酵母, 포도주酵母, d : UV感受性變異

토콘드리아(mitochondria)⁽¹³⁾나 킬러플라스미드(killer plasmid)⁽¹⁴⁾ 등의 세포질因자의 導入이 可能하므로 酵母菌株의 育種改良에 있어서 새로운 技法으로 活用되고 있다. <表 3>에 세포질因子導入技法의 種類를 表示하였다. 育種技法으로서의 세포질因子導入법의 特徵은 菌株의 雜種化를 피할 수 있으면서 遺傳子의 傳達이 可能하다는 點이다. 이는 특히 釀造酵母의 育種改良에 있어서 重要的인 사항인데 세포질遺傳子가 導入됨에 따라 본래의 菌株에는 없던 有用性이 함께 導入되지만 雜種이 되는 것을 피함으로써 産業酵母가 원래 갖고 있던 優良性을 잃지 않게 하는 長點이 있다. 실제로 이 方法을 利用하여 釀造酵母의 菌株育種을 행한 例로서 日本에서는 淸酒酵母의 代表的인 優良株인 協會7號에 세포질 內에 存在하는 킬러遺傳子를 導入시킴으로써 釀造時 野生酵母에 의한 汚染防止를 기할 수 있게 되었다.⁽¹⁵⁾ 그러나 이 方法에 따른 菌株育種은 세포질遺傳子나 세포질內 플라스미드에 存在하는 遺傳子의 導入에 限定되어 있으므로 다양한 有用遺傳子의 導入에는 問題點이 많다. 따라서 이 方法은 適當한 宿主-벡터를 利用하는 遺傳子再組合法과 併行하여 使用하는 것이 有利하다.

VI. 形質轉換法(Transformation)

形質轉換法의 基本原理 및 方法은 細胞融合法

과 같아서 受容體의 酵母菌株를 일단 原形質體로 만든 후 遺傳子 DNA를 導入시킨다. 細胞融合法에서는 遺傳子를 非選擇的(non-specificity)으로 傳達시키는 데 반하여 形質轉換法을 使用하면 特定遺傳子를 選擇적으로 傳達시킬 수 있다는 長點이 있다. 그러나 이 경우 形質轉換體를 쉽게 選別할 수 있는 選別標識(selective marker)가 반드시 존재해야 한다는 難點이 있다. 形質轉換體를 分離하는 方法으로 酵母의 경우 흔히 LEU2, TRP1, URA3 등의 營養要求性 選別標識를 사용하고 있으나 이러한 營養要求性 變異株들은 통상적으로 劣性株이므로 레프리카法을 사용해야 하는 陰性的 選別(negative selection)方法을 통해야만 하므로 操作이 번거롭다. 따라서 抗生物質에 대한 抵抗性 與否로써 選別이 가능한 陽性的 選別(positive selection)方法을 利用하는 것이 여러모로 便利하다. 大腸菌을 使用하여 形質轉換體를 選別할 경우에는 엠펜실린이나 테트라사이클린등 여러 抗生物質에 대한 抵抗性 選別標識가 存在하므로 選別이 비교적 容易하지만 酵母의 경우에는 使用할 수 있는 抗生物質의 種類가 數種으로 制限되어 있다. 現在 酵母의 形質轉換體 選別에 有效한 藥劑로서 transposon인 Tn903의 kanamycin phosphotransferase를 不活性化시키는 抗生物質인 G418이나 hygromycin B등이 알려져 있으나 <表 4>, 이 物質들을 使用하여도 대부분 形質轉換率이 대단히 낮으며 또한 藥劑의

〈표 4〉 酵母의 形質轉換體 選別에 사용하는 抗生物質 및 選別標識

抗生物質 (작용점)	藥劑不活性化酵素 또는 標的酵素
1) G 418 (단백질合成)	Tn903에 의해 code되는 G 418 phosphotransferase
2) methotrexate + sulfanilamide (folic acid cycle)	R 388에 의해 code되는 dihydrofolate reductase II
3) Hygromycin B	pJR225에 의해 code되는 hygromycin B phosphotransferase
4) Tunicamycin (N결합형 oligosaccharide 합성)	UDP-N-aurylglucosamine-I-P-transferase
5) Ethionine (S-adenosyl methionine 합성)	S-adenosylmethionine synthetase

濃도를 高濃도로 유지시켜야 한다는 短點이 있다. 이러한 問題點을 解決하기 위해 chloramphenicol acetyl transferase(CAT)遺傳子를 酵母벡터에 클로닝시켜 chloramphenicol 耐性を 選別標識로 利用하고자 하는 시도도 행해지고 있다.⁽¹⁶⁾

Ⅶ. 遺傳子再組合法 (Gene manipulation)

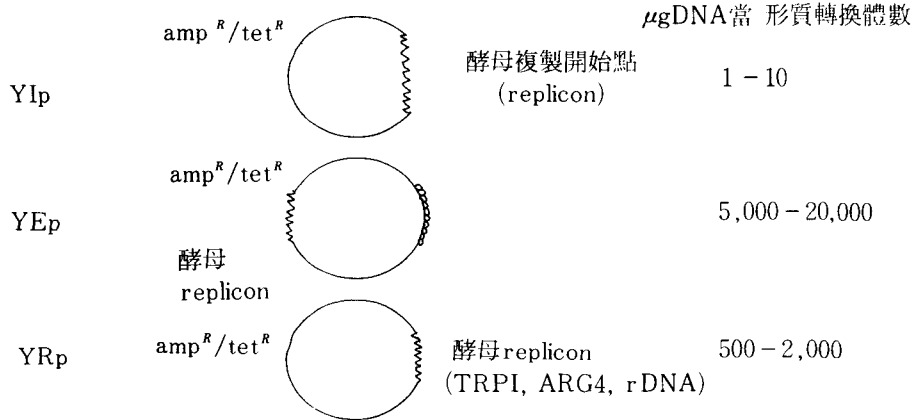
이제까지 敍述한 바와 같이 産業酵母의 育種에는 突然變異, 交雜, 細胞融合, 細胞質因子導入, 形質轉換 등 다양한 技法이 利用되고 있으나 이 方法들은 주로 細胞水準에서의 育種法으로서 成功의 頻度가 높지 않다. 특히 釀造用 酵母의 경우에는 孢子形成能, 接合能이 없고 減數分裂分離體인 半數體의 分離가 어려우므로 다른 菌株間的 자유로운 交雜이 쉽지 않고, 細胞融合法에 의해 無性的으로 交雜을 행하더라도 效果的인 選別標識이 없어서 形質轉換體를 選別하기가 어렵고 設상 突然變異處理에 의해 적당한 選別標識을 부여하더라도 대부분의 釀造酵母는 二倍體 또는 高次倍數體이므로 突然變異株의 分離自體가 쉽지 않으며 강한 突然變異劑를 處理할 경우 母株가 원래 갖고 있던 有用形質이 損傷당할 可能性이 높다.⁽¹⁷⁾ 또한 이러한 方法을 통해서는 特定遺傳子의 導入이 수월하지 않으므로 이와 같은

問題點을 解決하기 위해 産業酵母菌株의 育種에서도 遺傳子의 人爲的인 操作에 따른 遺傳子水準에서의 菌株育種의 可能性이 模索되어 왔다. 遺傳子를 再組合시키기 위해서 우선적으로 必要한 事項은 有用遺傳子를 運般할 수 있는 벡터(vector)의 開發이다. 벡터로서 가장 적당한 것은 酵母內에 自然的으로 存在하며 複製開始點(replication origin, replicon)을 갖는 벡터이지만 酵母의 自然벡터로 存在하는 2u 플라스미드는 그 正確한 機能이 알려져 있지 않고 카피(copy)數가 적으며 選別標識가 存在하지 않으므로 有用遺傳子의 運般道具로서는 不適當하다.⁽¹⁸⁾ 따라서 大腸菌과 酵母에 함께 利用할 수 있는 人工플라스미드의 製造가 필요하게 되었다. 이들 셔틀벡터(shuttle vector)가 有用성을 지니기 위해서는 酵母의 複製開始點 뿐만 아니라 大腸菌의 複製開始點 및 選別標識등을 아울러 所有해야 한다. 이러한 측면에서 이제 까지 開發된 酵母벡터는 特性에 따라 YIp, YEp 및 YRp 등 세 종류로 分類되는데⁽¹⁹⁾ 酵母의 複製開始點은 갖고 있지만 大腸菌의 複製開始點 및 選別標識를 갖고 있으며 宿主細胞 內로 形質轉換되면 相同性(homology)이 있는 酵母의 染色體 內로 吸收(integration)되므로 獨立的으로 複製될 수 없는 벡터를 YIp 벡터라 부른다. 이 벡터는 形質轉換率이 매우 낮아서 1 μ g 플라스미드 DNA 당 1~10

個 정도의 形質轉換體가 얻어진다. 이에 反하여 YEp 벡터는 2 μ 플라스미드 起源의 複製開始點과 大腸菌의 複製開始點, 酵母 및 大腸菌 由來의 選別標識을 가지며 宿主酵母 內에서 自發적으로 複製增殖하므로 Copy數가 많고 形質轉換率도 1,000~2,000배 높아 진다. 한편 YRp 벡터는 2 μ 플

라스미드 複製開始點 대신 染色體 由來의 複製開始點을 갖고 있는 點이 YEp와 의 차이점이나 形質轉換率은 YEp의 1/10정도로 비교적 낮은 편이다. 이들 벡터는 研究의 目的에 따라 適切히 選定하여 使用한다. <그림 2>에 각 벡터의 구조적인 特徵을 表示하였다. 이와 같이 벡터의 選

<그림 2> 酵母벡터의 構造



定이 끝나면 通常의인 클로닝 戰略에 따라 有用 遺傳子를 宿主細胞 內로 導入시켜 效果적으로 發現되도록 해야 하는데 酵母菌株의 경우 眞核細胞라는 特性때문에 高等動·植物 起源의 有用 遺傳子를 클로닝 할 때의 宿主細胞로서 特히 各 광을 받고 있다. 그 理由는 大腸菌을 宿主細胞로 使用할 경우 흔히 問題點으로 등장하는 原核細胞와 眞核細胞간의 轉寫(transcription) 및 翻譯(translation) 체계의 차이점, 高等生物 起源 遺傳子의 경우 인트론(intron)의 存在, 發現된 遺傳子 産物의 分泌問題등을 酵母를 宿主細胞로 使用함으로써 解決할 수 있기 때문이다. 이와 같이 酵母菌株을 對象으로 한 宿主-벡터계의 開發과 遺傳子再組合技術의 活用으로 그 동안 肝炎表面 抗原,⁽²⁰⁻²²⁾ 인터페론⁽²³⁾ 등 有用生體活性物質이 酵母菌株에서 效果적으로 發現된바 있고 酒類工業에서도 澱粉分解酵素인 글루코아밀레이즈(glucoamylase) 遺傳子 (STA)나⁽²⁴⁾ 텍스트린 分解酵素遺傳子(DEX)^(25,26)의 클로닝 研究에 活用되고 있다.

VIII. 結 論

이상으로 부터 주로 醱酵菌酒의 育種方法에 焦點을 맞추어 酒類工業에서 活用될 수 있는 遺傳工學技術에 대하여 살펴 보았다. 緒言에서 이미 敘述한 바와 같이 酒類工業에서 推進해야 할 酵母菌株의 궁극적인 育種方向은 産業적으로 有用한 모든 遺傳形質을 갖춘 “슈퍼酵母”의 開發에 있겠지만 現在 어느 정도의 成功 可能性을 갖고 실제로 應用되고 있는 分野는 凝集性등 釀造酵母의 特性을 調節하는 遺傳子의 分離, 麥芽糖, maltotriose, 텍스트린등 糖類의 吸收, 分解에 관계하는 遺傳的 調節機作的 究明, 알코올耐性이 增大된 菌酒의 開發등에 局限되어 있는 형편이다. 따라서 酵母의 育種에 있어서 실제로는 당장 産業적으로 利用할 수 있는 획기적인 菌酒의 出現은 이루어지지 않고 있으나 現在 遺傳工學技術의 發展 추세와 酵母遺傳學의 괄목할 만한 研究成果로 미루어 보건데 멀지 않은 將來에 좋은 結果를 맺을 수 있으리라 믿는다. 마지막으로 바

이오매스(biomass)로 부터 飲酒 및 工業用 酒精 生産을 目的으로 한 酵母 및 기타 에타놀 生産 微生物의 遺傳工學的 育種에 關係서는 前稿⁽²⁷⁾를 參照해 주기 바란다.

IX. 參考文獻

1. Stewart, G. G., Can. J. Microbiol. 27:973(1981)
2. 別府輝彦, 바이오매스에みる 燃料, 化學原料의 開發技術資料集成, p. 297 當土 チタノシステム社(1984)
3. Hicks, J., Yeast cell Biology, Alan R. Liss, Inc. New York(1986)
4. 石川長夫, 微生物遺傳學實驗法, p. 3 共立出版株式會社(1982)
5. Snow, R., Nature 211:206(1966)
6. Stewart, G. G., I. Russel and C. Panchal, Current Developments in Yeast Research, p. 17 pergamon Press Canada, Ltd. Toronto(1981)
7. Roman, H. The molecular Biology of the yeast *Saccharomyces*, Life cycle and Inheritance, p. 1, Cold Spring Harbor Laboratory, New York(1981)
8. Stewart, G. G., J. A. Erratt, I. Garrison, T. Goring and I. Hancock. MBAA Tech. Quart. 16:1(1979)
9. Russel, I., G. G. Stewart, H. P. Reader, J. R. Johnston and P. a. martin. J. Inst. Brew. 86: 120(1980)
10. Hinnen, A., J. B. Hicks and G. R. Fink. Proc. Natl. Acad. Sli. U. S. A. 75:1929(1978)
11. Kimura, A. and M. Morita. Agric. Biol. Chem., 39:1469(1975)
12. Conde, J. and G. R. Fink. Proc. Natl. Acad. Sli. U. S. A. 73:3651(1976)
13. Zakharov, I. A. and B. P. Yarovoy, nol. Cell. Biochem. 14:15(1977)
14. Lancashire, W. E. and J. R. matton. nol. Gen. Genet. 170:333(1979)
15. Ouchi, K., R. B. Wickner, A. Toh-e and H. Akiyama. J. Ferment. Technol. 57:483(1979)
16. 朴璋緒, 遺傳工學 19:33(1987)
17. 原島俊, 高木敦子, 須田幹夫, 大嶋泰治. 酵母의 細胞工學と育種 p. 55 學會出版センター(1986)
18. Old, R. W. and S. B. Primrose. Principles of Gene manipulation p. 63 Blackwell Suintific Publications London(1981)
19. Greer, H. Current Developments in Yeast Research p. 217 Pergamon Press, Toronto (1981)
20. Hitzeman, R. A., F. e. Hagie, H. L. Levine, D. V. Goedel, G. Ammerer and B. D. Hall. Nature 293:712(1981)
21. Valentuela, P., A. medina, W. J. Ruter, G. Ammerer, and B. D. Hall. Nature 298:347 (1982)
22. Kim, K. T., K. B. Song, Y. C. Choi, S. K. Rhee and M. H. Han. Korean Biochem. J. 2:122 (1985)
23. Hitzeman, R. A., F. E. Hagie., H. L. Levine and D. V. Goedel. Slience 219:620(1980)
24. Yamashita, I., and S. Fukui. Agric. Biol. Chem. 48:137(1984)
25. 日本經濟新聞記事(1986)
26. Meaden, P., K. Ogden, H. Bussey and R. S. Tull. Gene 34:325(1985)
27. 李尚基. 酒類工業 10:36(1986)