

*Phaffia rhodozyma*의 원형질체 융합

배 석 · *김 문 휘 · *박 중 천 · **김 재 형 · 전 순 배
전남대학교 미생물학과, *생물학과, **공업화학과

Protoplast Fusion of *Phaffia rhodozyma*

Suk Bai, Moon-Whee Kim,* Jong-Chun Park,* Jae-Hyung Kim** and Soon-Bai Chun
Dept. of Microbiology, *Biology and **Chemical Technology,
Chonnam National University, Kwang-ju, Korea

ABSTRACT

Cell fusion between complementary mutants isolated from astaxanthin-producing yeast, *Phaffia rhodozyma*, was carried out to obtain astaxanthin-overproducing strains by protoplast fusion technique. The frequency of protoplast fusion was ranged from 2.3×10^{-5} to 6.0×10^{-5} , and nuclear fusion in the cells of hybrids was demonstrated by several techniques such as isolation of recombinants after mitotic segregation of parental genetic markers, estimation of DNA content, direct observation of nuclei with nuclear staining, and comparison of survival rate to UV exposure. One of several hybrids, F1, showed approximately 3-fold increase in astaxanthin content when compared with wild parent.

서 론

*Phaffia rhodozyma*는 Phaff등(1)에 의하여 일본 북부와 알래스카 지역의 낙엽수 수액에서 분리된 담자균성 불완전균류에 속하는 효모로 붉은 색소인 astaxanthin (3,3-didehydroxy- β,β -carotene-4,4-dione)을 생산한다(2). 이 색소는 다른 carotenoid처럼 동물의 장점막에서 흡수되어 무색의 비타민 A로 전환되지 않으므로 프로비타민으로서의 활성은 낮으나 연어, 송어, 새우, 게 등의 양식에 있어서 색소원으로 이용가치가 높다(3). 자연에서 분리한 *Ph. rhodozyma*의 astaxanthin 함유량은 균주 또는 배양조건에 따라 다르지만 g 건조중량당 202-450 μ g이며 총 carotenoid 색소의 58-87%가 trans-astaxanthin 이다(2, 4). 또한 세포 자체에 풍부한 단백질, 색소 흡수를 촉진하는 불포화지방, 비타민 등이

함유되어 있어 색소원 외에도 동물의 생육에 필수적인 영양원으로서 이용될 수 있다(5). 그런데 색소원으로 공급시 다량의 세포가 요구되므로 이에 따라 불필요한 세포벽 성분이 첨가되는 문제점이 있는데 이를 극소화하는 방안으로 An등(4)은 Antimycin A와 N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine 같은 돌연변이원을 이용하여 색소가 증진된 균주를 분리한 바 있다. 이 방법 외에도 돌연변이원을 사용하여 색소가 증진된 영양요구성 균주를 제조하고 이들의 원형질체 융합으로 색소가 더욱 증진된 균주를 얻을 수 있을 것이다. 산업적 측면에서 볼 때 융합기술을 이용하여 효소 생산이나 발효능력이 향상된 균주개발에 관한 연구사례는 많으나(6-9) 색소 생성균주 개발에 관해서는 시도된 바 적다. 따라서 본인 등은 원형질체융합기술을 이용하여 astaxanthin의 생산능력이 향상된 *P. rhodozyma*를 얻고자 시도하

었던 바, 그 결과를 여기 보고하고자 한다.

재료 및 방법

균주 및 보관

사용균주는 *Phaffia rhodozyma* CBS 5905(Centraalbuureau Voor Schimmelcultures, Netherlands) 이었고 균주보관은 YEPD (1% yeast extract, Difco; 2% peptone, Difco; 2% glucose; 2% Bacto agar, Difco) 평판배지에서 균체가 형성될 때까지 22°C에서 7일간 배양한 후 YEPD 사면배지에 옮겨 4°C에서 보관하였으며 4주마다 계대배양하였다. 장기간 보관용은 50% glycerol(-20°C)에서 보관하였다.

돌연변이 균주의 유도 및 선발

Poulter등 (10), Fink (11) 그리고 Wilson등 (12)의 방법에 따라 N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine(NTG, Sigma), Ethyl methane sulfonic acid(EMS, Sigma) 그리고 자외선을 이용하여 영양요구성 돌연변이 균주 및 색소 돌연변이균주를 유도하고 선발하였다.

원형질체 조제

원형질체는 Sarachek등(13)과 Rhodes와 Chung(14)의 방법을 약간 수정하여 다음과 같이 조제하였다. YEPD 액체 배지에서 초기 대수기까지 균을 배양한 후 osmotic stabilizer로 0.7M(NH₄)₂SO₄가 들어있는 0.1M Na-succinate 완충용액(pH 4.5)에 세포농도를 1-2×10⁷/ml되게 조절하고 2-mercaptoethanol을 최종농도가 0.1M되게 첨가하여 60분간 전처리 하였다. 전처리가 끝나면 Novozym 234(Novo Industrias, Denmark)의 농도를 0.3-2.0mg/ml되게 첨가하여 22°C에서 0.5-3시간 정치반응시켜 만들어진 원형질체를 1,000×g에서 5분간 원심분리하여 수집하였다.

원형질체 융합

원형질체의 융합은 Bai(15)의 방법에 따라 영양요구성 돌연변이균주의 원형질체를 1-2×10⁸/ml로 1:1의 상보적 조합을 만들어 35% Polyethylene glycol (PEG, M.W. 4,000, Sigma)과 0.1M CaCl₂가 들어있는 0.1M Na-succinate 완충용액(pH 6.0)에서 45분간, 22°C에서 유지시켜 융합을 유도하였다.

융합체의 분석

융합체의 분석은 DNA정량 (16, 17), 핵염색(18), UV조사에 따른 생존력 비교(19), 세포제적측정과 형질

분리분석(12)으로 확인하였다.

Astaxanthin 생성량 측정

Astaxanthin생성을 위한 배지로 YM(0.3% yeast extract, Difco; 0.3% malt extract, Difco; 0.5% peptone, Difco; 1% glucose)액체배지에서 균을 5일간 배양하면서 생장율에 따른 astaxanthin 생성량을 측정하였다. 색소추출은 배양한 균을 5ml씩 수확하여 증류수로 2회 세척한 다음 세포수를 5×10⁸/ml되게 0.1M Na-succinate 완충용액(pH 4.5) 2ml에 현탁하고 Novozym 234를 3mg/ml되게 첨가하여 30°C에서 60분간 진탕시키면서 세포벽을 분해시켰다. 분해된 세포용액에 4ml acetone을 첨가하여 2-3분간 vortex 한뒤, 8,000×g로 원심분리한 다음 색소를 재추출하였다. 추출된 색소의 농도는 478nm에서 흡광도로 측정하였으며 astaxanthin의 농도는 3R, 3R'-astaxanthin의 표준 곡선에 의해 측정하였고 g 건조 증량당 astaxanthin 함량으로 표시하였다. 총 carotenoid 함량은 Davis(20) 공식에 의해 산출하였으며 3R, 3R'-astaxanthin은 Dr. E. Widmer (E. Hoffman La Roche Co., Swiss)로부터 기증 받아 사용하였다.

결과 및 고찰

돌연변이 균주의 제조 및 역돌연변이율

Phaffia rhodozyma CBS 5905로부터 융합에 필요한 상보적인 영양요구성 균주를 포함한 색소 돌연변이균주 8가지를 유도하였으며 이중 생장률이 양호하고 원형질체 조제 수용이 좋은 methionine과 threonine요구성 균주(*met thr*), lysine과 methionine 요구성 균주(*lys met*), uracil과 arginine요구성 균주(*ura arg*) 그리고 arginine요구성과 carotenoid⁻균주(*arg car*)를 선발하였다. 이들의 역돌연변이율은 4.0×10⁻⁸-1.2×10⁻⁹으로 원형질체 융합과 유전적 분석에 적합하였다(Table 1). *car* 와 같은

Table 1. Spontaneous reversion frequency of auxotrophic and carotenoid mutants

Genotype	Mutagen	Reversion frequency
<i>lys met</i>	NTG · EMS	5.2×10 ⁻⁹
<i>met thr</i>	NTG · EMS	3.2×10 ⁻⁸
<i>ura arg</i>	NTG · NTG	4.0×10 ⁻⁸
<i>arg car</i> ⁻	NTG · UV	1.2×10 ⁻⁹

⁻Car mutant is white in color and accumulates a considerable amount of phytoene.

색소돌연변이 균주가 NTG나 EMS 처리구에서는 0.05% 빈도로, UV조사에서는 0.1%의 빈도로 분리되었는데 이와같은 결과는 UV 조사로 대부분 astaxanthin 생성이 감소되었다고 보고한 An 등(4)의 결과와 유사하였다.

원형질체 조제

Novozym 234를 사용하여 *Ph. rhodozyma*와 이들의 돌연변이 균주에 대한 원형질체 조제 수율을 조사한 결과 돌연변이 균주에 따라 19-81%로 변화폭이 심하게 나타났다. Rost와 Venner(21)는 *Saccharomyces*에서 strains에 따라 원형질체 조제 수율이 1-100%의 변화폭을 보인다고 보고한 바 있다. 한편 영양요구성 돌연변이 균주에 따른 원형질체 조제 수율을 보면 Sarachek 등(13)은 *Candida albicans*에서 80-95%, Bai(15)는 *Candida pseudotropicalis*에서 48-98%, Kim(22)은 *Filobasidium capsuligenum*에서 76-96%의 원형질체 조제 수율을 얻었다고 보고한 바 있다. *Ph. rhodozyma*로 부터 제조한 돌연변이 균주의 원형질체 조제 수율이 다른 효모에 비해 낮고 변화폭이 심한 것은 *Ph. rhodozyma* 세포벽 성분의 다양성(14), 본 실험에 사용한 Novozym 234에는 β -(1→6)-glucanase 활성이 없는 점(15), 이 효소의 장시간(2-3시간)처리 결과로 먼저 형성된 원형질체가 효소에 소량 존재하는 단백질 분해효소에 의해 분해될 수 있음, 그리고 삼투장력의 변화 등에 의해서도 생성된 원형질체가 파괴될 수 있기 때문으로 보인다.

원형질체 융합

*Ph. rhodozyma*의 상보적 영양요구성 균주들간의 융합률은 Table 2에서 보여주는 바와 같이 2.3×10^{-5} - 6.0×10^{-5} 이었다. 이는 *C. pseudotropicalis*의 7.0×10^{-4} - 1.5×10^{-3} (15), *C. albicans*의 1.3×10^{-4} - 9.1×10^{-3} (23), *F. capsuligenum*의 2.9×10^{-3} - 8.5×10^{-3} (22)에 비하면 10-100배 낮아 종내 융합율로서는 매우 낮은 것이었다. 한편, 이는 *S. cerevisiae*와 *Zygosaccharomyces fermentati*

간의 속간 융합빈도인 6.7×10^{-5} (7)와 비슷한 결과이다.

융합체의 특성

*Ph. rhodozyma*의 돌연변이 균주들간의 융합체 104개 중 생장율이 양호한 융합체와 색소생성이 좋은 융합체에 대한 세포학적 특성을 조사하였다. Table 3에서 보여준 바와 같이 융합체의 세포체적은 양친형에 비해 2배 또는 그 이상으로 증가되었다. 또한 세포당 DNA량 (fg/cell)은 융합체 F5를 제외한 융합체 모두 133.8-167.3 fg/cell로 양친의 73.6-79.8 fg/cell과 비교해 보았을 때 DNA함량이 약 2배 증가하여 상보적 돌연변이 균주 사이에 융합이 일어났음을 입증해주고 있으며 융합체 F5의 세포체적은 양친의 평균체적의 약3배이고 DNA함량도 양친의 DNA량에 비해 3배로 증가하여 (Table 4) triploid로 추정되었다. Fournier 등(18)의 방법에 의한 Giemsa 염색으로 융합체의 핵이 세포 당 하나이며 양친의 핵보다 큰 것을 관찰하였는 바, 이는 융합체에서 핵융합이 일어났음을 보여주는 자료이다(Fig. 1). 한편 UV조사에 대한 *S. cerevisiae* strains간의 생존력은 배수성과 관련이 있다고 보고된 바 있어(19) 융합체들의 UV에 대한 생존력을 기히 알려져 있는 이배체인 *S. cerevisiae*와 반수체인 *S. diastaticus*를 대조구로 하여 비교하여 보았다(Fig. 2). 그 결과 이배체인 융합체들간의 생존력은 차이가 다소 있지만 양친형들에 비해 증가된 양상을 보여 주었다. 이같은 양상은 이배체인 *S. cerevisiae*나 반수체인 *S. diastaticus*에서도 볼 수 있었다. UV 생존곡선의 비교자료로서 여러 종들간의 배수성을 결정하는 것이 절대적인 것은 아니나 *S. cerevisiae* strains을 포함한 단상형인 *C. pseudotropicalis*(9)와 *F. capsuligenum*(22)의 융합체에서도 *Ph. rhodozyma*에서와 유사한 결과를 얻은 바 있다. 이 같은 결과는 적어도 종내에서 이배체와 반수체를 구별하는데 UV 생존곡선이 활용될 수 있음을 시사해 주고 있다. 융합체들의 보다 확실한 융합상태를 검토하기 위해 형질 분리분석을 하였다(Table 5). 형질분리분석 결과 융합체로부터 분리된 분리형의 균체크기는 균일하였으며 양친형을 포함한 재조합형이 분리되었다. F5에서 분리된 재조합형 *lys car*⁻의 경우 DNA함량이 236.5fg/cell로 양친형에 비해 거의 3배이었고 UV에 대한 생존력도 단상형보다 감소되어 UV에 대해 감수성이 높은 것은 UV조사후 형성된 DNA pyrimidine dimer의 repair 과정에서 aneuploid가 euploid보다 비효율적인 것(24)과 관련된 것으로 사료된다. F9와 F13에서 분리된 *met car*⁻, *car*⁻의 경우 DNA함량은 각각 136.6, 142.6 fg/cell으로 이배체임을 알 수 있었다.

Table 2. Fusion frequency between complementary auxotrophs of *P. rhodozyma*

Auxotrophic strain	Fusion frequency
<i>met thr+arg car</i>	6.0×10^{-5}
<i>lys met+ura arg</i>	4.5×10^{-5}
<i>lys met+ary car</i>	2.3×10^{-5}
<i>met thr+ura arg</i>	3.7×10^{-5}

Table 3. Cell size and volume of *P. rhodozyma* parental strains and fusants

Strain	Mean length (μm)	Mean width (μm)	Mean volume (μm^3)
Parentals:			
<i>met thr</i>	8.2 \pm 0.4	7.5 \pm 0.2	242.8 \pm 25.5
<i>lys met</i>	8.0 \pm 0.8	6.5 \pm 0.1	176.9 \pm 23.7
<i>arg car</i> ⁻	8.8 \pm 0.1	7.5 \pm 0.2	259.0 \pm 17.2
<i>ura arg</i>	9.6 \pm 0.1	6.5 \pm 0.4	212.3 \pm 29.4
Fusants:			
<i>lys met</i> + <i>ura arg</i>			
F 1	12.5 \pm 0.4	8.5 \pm 0.1	472.6 \pm 26.7
F 8	12.2 \pm 0.1	7.9 \pm 0.2	398.5 \pm 23.8
<i>lys met</i> + <i>arg car</i> ⁻			
F 5	12.5 \pm 0.1	10.0 \pm 0.2	654.2 \pm 31.8
F 9	10.8 \pm 0.2	10.0 \pm 0.2	565.2 \pm 33.7
F13	11.8 \pm 0.1	8.4 \pm 0.1	435.7 \pm 14.9
<i>met thr</i> + <i>ura arg</i>			
F 6	13.0 \pm 0.4	8.5 \pm 0.1	491.5 \pm 11.7
F 7	13.8 \pm 0.4	8.5 \pm 0.4	521.8 \pm 37.8
<i>met thr</i> + <i>arg car</i> ⁻			
F19	11.8 \pm 0.2	9.0 \pm 0.3	500.2 \pm 43.2
F20	11.6 \pm 0.4	9.2 \pm 0.1	578.0 \pm 33.1

Table 4. DNA contents of *P. rhodozyma* parental strains and fusants

Strain	DNA / cell (fg)	Ploidy (n)
Parentals:		
<i>met thr</i>	73.6 \pm 0.2	1
<i>lys met</i>	74.0 \pm 0.4	1
<i>arg car</i> ⁻	75.0 \pm 0.2	1
<i>ura arg</i>	75.5 \pm 0.1	1
Fusants:		
<i>lys met</i> + <i>ura arg</i>		
F 1	150.4 \pm 0.4	2.0
F 8	146.0 \pm 0.8	1.95
<i>lys met</i> + <i>arg car</i> ⁻		
F 5	222.0 \pm 0.4	2.97
F 9	146.0 \pm 2.4	1.96
F13	167.3 \pm 2.0	2.25
<i>met thr</i> + <i>ura arg</i>		
F 6	140.0 \pm 4.0	1.88
F 7	144.0 \pm 0.4	1.93
<i>met thr</i> + <i>arg car</i> ⁻		
F19	145.0 \pm 0.4	1.95
F20	138.4 \pm 0.8	1.86

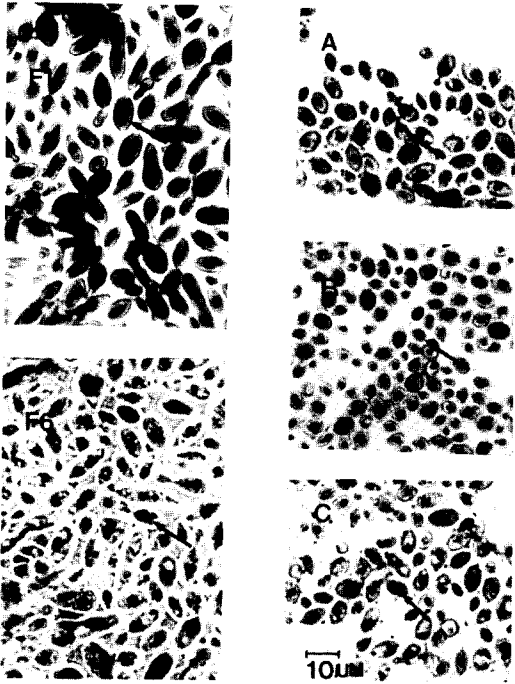


Fig. 1. Photomicroscopy of nuclei of fusants and their parents. Arrow indicates nucleus ($\times 1,000$).

F 1: A (*lys met*) + B (*ura arg*)
 F 6: B (*ura agr*) + C (*met thr*)

이와 같은 재조합형의 분리는 핵융합후 상동 염색체 간의 교차나 염색체의 재분배에 기인된 것 같다. *Schwanniomyces alluvius*(20)의 융합체 들에서 형질분리 빈도를 보면 자연형질 분리빈도의 경우 $2.4-8.4 \times 10^{-4}$, 유도형질 분리빈도는 $1.7-2.3 \times 10^{-3}$ 이었고 *C. pseudotropicalis* (9)의 경우에서는 자연형질 분리빈도가 $3.0-8.1 \times 10^{-4}$, 유도형질 분리빈도는 $1.4-1.7 \times 10^{-3}$ 이었는데 *Ph. rhodozyma*에서는 각각 $1.0 \times 10^{-4}-2.1 \times 10^{-3}$ 과 $1.8 \times 10^{-4}-4.3 \times 10^{-3}$ 으로 자연형질 분리빈도는 상기 두종의 경우보다 약간 높은 편이었으나 유도형질 분리빈도는 두 균종에서 비슷하였다.

균주간의 astaxathin 생성량 비교

야생형 및 돌연변이 균주와 색소생성능이 양호한 F1과 F6을 YM 액체 배지에 5일간 배양한 후 색소생성량을 비교하였다(Table 6). NTG와 EMS로 유도된 돌연

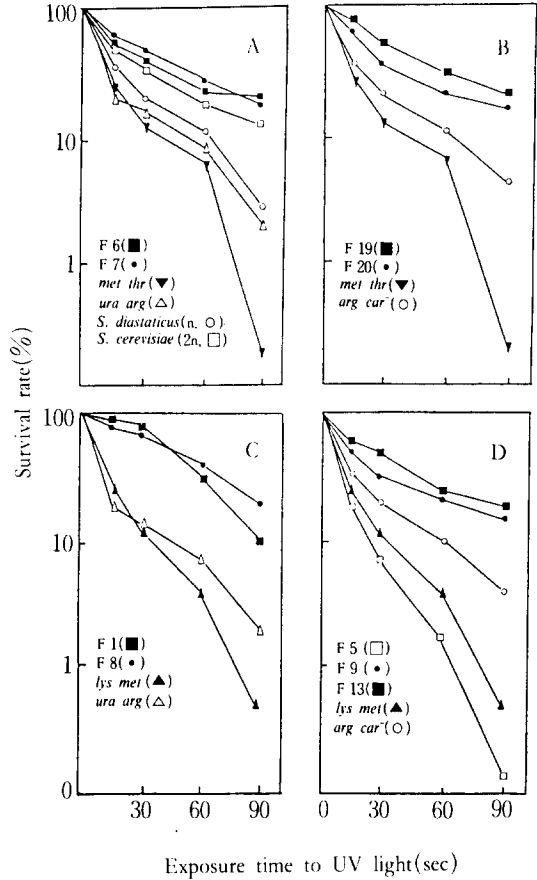


Fig. 2. Survival rate of fusants compared with parental strains after exposure to UV light.

변이균주들을 *met thr*를 제외하고는 야생형이 비해 1.8-1.98배의 색소생성이 증진되었다. 그러나 UV조사에 의해 유도된 돌연변이 균주에서는 astaxanthin 함량이 감소되거나 색소가 전혀 생성되지 않는 흰색 돌연변이 균주가 자주 분리되었다. An등(4)은 NTG를 연속 처리하여 얻은 돌연변이균주들이 색소생성증진은 물론 유전적으로 안정하였으며 UV조사로 얻은 돌연변이 균주는 색소생성량이 감소되었다고 보고하였다. 이는 NTG가 UV보다 유전적으로 안정된 색소 증진 돌연변이 유발에 효과적임을 시사해주고 있다.

한편 융합체 F6은 양친형에 비해 색소생성이 증가되지 못하였으나 F1에서는 양친형에 비해서는 물론 야생

Table 5. Mitotic segregation analysis of fusants

Parental strains	Fusants	Segregants		Frequency of segregation	
		SMS ^a	IMS ^b	SMS	IMS
<i>lys met + ura arg</i>	F 1	<i>lys</i> (3) ^c	<i>ura lys</i> (4) <i>lys</i> (10)	2.9×10 ⁻⁴ (10,290) ^d	9.8×10 ⁻⁴ (14,296)
	F 8	<i>lys</i> (2)	<i>ura lys</i> (1) <i>lys</i> (12)	2.0×10 ⁻⁴ (10,140)	8.0×10 ⁻⁴ (16,177)
<i>lys met + arg car</i>	F 5	<i>arg car</i> (2) <i>lys</i> (3) <i>met</i> (1) <i>arg</i> (1) <i>lys arg</i> (1) <i>car</i> ⁻ (4) <i>lys car</i> (1)	<i>arg car</i> (1) <i>lys</i> (27) <i>car</i> (9) <i>met car</i> ⁻ (1) <i>met arg car</i> ⁻ (1)	2.1×10 ⁻³ (6,178)	4.3×10 ⁻³ (8,990)
	F 9	<i>arg car</i> ⁻ (1) <i>lys</i> (1) <i>car</i> (7)	<i>lys</i> (7) <i>met</i> (1) <i>car</i> ⁻ (8) <i>met car</i> ⁻ (2)	1.2×10 ⁻³ (7,747)	2.0×10 ⁻³ (8,945)
	F 13	<i>lys</i> (9) <i>car</i> (2)	<i>arg</i> (1) <i>car</i> ⁻ (7) <i>lys car</i> ⁻ (5)	1.0×10 ⁻³ (10,698)	1.4×10 ⁻³ (9,593)
	F 6	0	<i>met arg</i> (1) ^c <i>thr</i> (2)	1.0×10 ⁻⁴ (9,733) ^d	2.1×10 ⁻⁴ (14,474)
	F 7	0	<i>thr</i> (1) <i>ura</i> (1)	1.4×10 ⁻⁴ (7,180)	1.8×10 ⁻⁴ (10,917)
<i>met thr + arg car</i> ⁻	F19	0	0	1.5×10 ⁻⁴ (6,604)	3.2×10 ⁻⁴ (15,536)
	F20	<i>met thr</i> (1) <i>arg</i> (1) <i>car</i> ⁻ (3)	<i>met thr</i> (2) <i>car</i> ⁻ (3)	2.0×10 ⁻⁴ (5,090)	8.4×10 ⁻⁴ (5,967)

a Spontaneous mitotic segregation c Numbers in parentheses indicate auxotrophic segregants appeared

b Induced mitotic segregation d Numbers in parentheses indicate total colonies screened

Table 6. Comparison of carotenoid content in *P. rhodozyma* parental strains and fusants

Strain	Growth (mg / ml)	Astaxanthin (μg / g dry yeast)	Total carotenoid (mg / g dry yeast)	Flod (astaxanthin)
wild type	7.0	260	2.71	1
<i>lys met</i>	4.8	469	3.25	1.8
<i>met thr</i>	4.6	256	1.95	0.98
<i>ura arg</i>	3.1	516	3.79	1.98
F1(<i>lys met + ura arg</i>)	4.2	719	5.28	2.8
F6(<i>met thr + ura arg</i>)	5.0	368	3.53	1.4

형인 모균주에 비해 astaxanthin 생성량이 2.8배 증가되었다. 현재 *P. rhodozyma*의 여러 strains으로 부터 돌연변이원을 처리하여 색소증진 균주를 분리중이며 이들에 원형질체 융합을 통해 색소생성이 보다 증진된 균주 개발을 진행하고 있다.

요 약

Astaxanthin을 생산하는 효모 *Phaffia rhodozyma*로부터 제조된 상보적 돌연변이 균주간의 세포융합을 통하여 astaxanthin을 대량 생산하는 균주를 얻고자 시도하였다. 이들의 원형질체 융합빈도는 1.3×10^{-5} — 6.0×10^{-5} 이었고 DNA 함량, 핵염색, UV조사에 대한 생존력 비교 그리고 형질분리분석 등으로 핵융합을 확인하였다. 융합체 중 F1은 야생형의 모 균주와 비교했을때 astaxanthin 생성량이 약 3배 증가하였다.

감 사

본 연구는 1988—1990년도 전남대학교 학술연구비에 의하여 수행되었으며 연구비 지원에 감사드립니다.

참 고 문 헌

- Phaff, H. J., M. W. Miller, M. Yoneyama and M. Soneda (1972), Proceedings of 4th IFS: Fermentation Technology today. (G. Terui, ed), 759, Kyoto Society of Fermentation Technology, Osaka.
- Andrews, A. G. and M. P. Starr (1976), Phytochemistry, **15**, 1009.
- Johnson, E. A. and M. J. Lewis (1979), J. Gen. Microbiol., **115**, 173.
- An, G. H., D. B. Schuman and E. A. Johnson (1989), Appl. Environ. Microbiol., **55**, 116.
- Okagbue, R. N. and M. J. Lewis (1985), J. Appl. Bacteriol., **59**, 243.
- De Figueroa, L. L., M. F. de Richard and M. R. de Van Brook (1984), Biotechnol. Lett., **6**, 269.
- Farahnak, F., T. Seki, D. Y. Ryu and D. Ogrzydziak (1986), Appl. Environ. Microbiol., **51**, 362.
- Pina, A., I. L. Calderon and T. Benitz (1986), Appl. Environ. Microbiol., **51**, 995.
- Chun, S. B. and S. Bai (1988), Kor. J. Microbiol., **26**, 82.
- Poulter, R., K. Jeffery, M. J. Hubbard, H. G. Shepherd and P. A. Sullivan (1981), J. Bacteriol., **146**, 833.
- Fink, G. R. (1970), Methods in Enzymology, (Tabor, H. and C. W. Tabor, ed), Vol. 17A, 59, Academic Press, New York.
- Wilson, J. J., G. G. Khachatourians and W. Ingledew (1982), Mol. Gen. Genet., **186**, 95.
- Sarachek, A., D. D. Rhoads and R. R. Schwarzhoff (1981), Arch. Microbiol., **129**, 1.
- Rhodes, J. C. and K. J. Kwong-Chung (1985), J. Med. Veter. Mycol., **23**, 77.
- Bai, S. (1987), Ph. D. Thesis, Chonnam Nat. Univ., Kwang-ju, Korea.
- Stewart, P. R. (1975), Methods in Cell Biology, (Prescott, D. M., ed), Vol. 12, 122, Academic Press, New York.
- Burton, K. (1968), Methods in Enzymology, (Colowick, S. P. and N. D. Kaplan, ed), Vol. 12, 163, Academic Press, New York.
- Fournier, P., A. Provost, C. Bourguignon and H. Heslot (1977), Arch. Microbiol., **115**, 143.
- Olaiya, A. F. and S. J. Sogin (1979), J. Bacteriol., **140**, 1043.
- Davies, B. H. (1976), Chemistry and Biochemistry of plant pigments, (T. w. Goodwin, ed), Vol. 2, 38, Academic Press, London.
- Rost, K. and H. Venner (1965), Arch. Microbiol., **51**, 122.
- Kim, S. H. (1988), M. S. Thesis, Chonnam Nat. Univ., Kwangju, Korea.
- Pesti, M. and L. Ferenczy (1982), J. Gen. Microbiol., **128**, 123.
- Rhoads, D. D. and A. Sarachek (1984), Mycopathologia, **87**, 35.

(Received; October 10, 1990, Accepted; November 16, 1990)