

## 리보핵산을 다량으로 함유하는 *Saccharomyces cerevisiae* 균주의 개발

김재식 · 김진욱\* · 심 원\* · 민병철\*\*\* · 김정완\*\* · 박관화\*\*\* · 백운화\*

영동대학교 식품공학전공, \*두산인재기술개발원

\*\*인천대학교 자연과학대학 생물학과

\*\*\*서울대학교 식품공학과 및 농업생물신소재연구센터

### Development of *Saccharomyces cerevisiae* Strains with High RNA Content

Jae-Sik Kim, Jin-Wook Kim\*, Won Shim\*, Byoung-Cheol Min\*\*\*,

Jung-Wan Kim\*\*, Kwan-Hwa Park\*\*\* and Un-Hua Pek\*

Department of Food Science and Technology, Youngdong University

\*Doosan Training & Technology Center, \*\*Department of Biology, Incheon University

\*\*\*Department of Food Science and Technology and Research Center for  
New Bio-Materials in Agriculture, Seoul National University

#### Abstract

RNase activity of *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 7754 was investigated to obtain strains with high ribonucleic acid (RNA) content. The yeast strain contained two RNase activities; an acidic RNase with a optima of pH 3~4 and an alkaline RNase with a optima pH 9. The acidic RNase activity was inhibited by 0.08 M HgCl<sub>2</sub> most drastically. The alkaline RNase activity was inhibited by 2.0 M NaCl or KCl, while enhanced by addition of 0.05 M CaCl<sub>2</sub>, 0.02 M ZnSO<sub>4</sub>, or 0.008 M HgCl<sub>2</sub>. Various mutants of *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 7754 were isolated by ethylmethane sulfonate (EMS) treatment or  $\gamma$ -ray/ultra violet irradiation. Among the mutants that were sensitive to high concentration of KCl which inhibits alkaline RNase, B24 was selected for high RNA content per culture volume. Growth characteristics of the mutant were comparable to those of the mother strain with optimum growth at pH 4.5~5.5. The mutant accumulated higher content of RNA than the mother strain when glucose was used as the carbon source. However, both growth rate and total RNA content of the mutant were higher in molasses medium than in glucose medium. RNA content of the mutant increased rapidly during the early stage of growth, and then decreased gradually until the culture reached stationary phase by a fed-batch culture in a 5 L jar fermenter. Maximal cell harvest and the final RNA content using the mutant B24 were 69.6 g/L culture broth and 19.8 g/100 g of the dry cell while those using the mother strain were 68 g/L culture broth and 16.1 g/100 g of dry cell, respectively.

Key words: *Saccharomyces cerevisiae*, mutation, RNA content

#### 서 론

효모 추출물은 천연 조미 성분으로 식품 산업에 널리 사용되고 있는데 다른 조미 소재에 비해 가격이 저렴하고 풍미가 강하며 복합적인 맛을 내기 때문이다<sup>1)</sup>. 최근에는 구아노신-5'-일인산(guanosine-5'-monophosphate, 5'-

GMP)와 이노신-5'-일인산(inosine-5'-monophosphate, 5'-IMP) 등 정미성 뉴클레오티드가 많이 함유된 효모 추출물이 개발되었는데, 기존의 효모 추출물보다 정미력이 월등히 뛰어나고 쇠고기 추출물의 대체 효과를 갖는 등 고부가가치 정미 성분의 제품으로 기대가 되고 있다<sup>2)</sup>. 효모는 배양하기 쉽고 리보핵산 함량이 상대적으로 높은 관계로 리보핵산을 순수 분리한 후 GMP, IMP 등 정미성 뉴클레오티드를 제조하거나 혹은 효소를 이용하여 IMP와 GMP가 풍부한 효모 추출물을 제조하는데 이용한다.

Corresponding author: Kwan-Hwa Park, Department of Food Science and Technology, College of Agriculture and Life Science, Seoul National University, 103 Seodoo-dong, Kwunsun-gu, Suwon 441-744, Korea

효모 내의 리보핵산은 직접 세포 밖으로 빠져 나오지 않고 90~100°C에서 1~3시간 효모 현탁액을 가열할 때 세포로부터 추출되며 여기에 *Penicillium citrinum*이나 *Streptomyces aureus*, 맥아의 잔뿌리 등에서 유래한 5'-phosphodiesterase (nuclease P1)를 작용시키면 리보핵산은 5'-노노뉴클레오티드로 분해되어 5'-GMP, 아데노신-5'-일인산(adenocine-5'-monophosphate, 5'-AMP), 유리딘-5'-일인산(uridine-5'-monophosphate, 5'-UMP), 시티딘-5'-일인산(cytidine-5'-monophosphate, 5'-CMP)의 4가지 종류의 뉴클레오티드로 된다. 이 중 5'-GMP만이 정미성을 나타내며 5'-AMP는 adenylic deaminase에 의해 정미성 5'-IMP로 전환이 가능하다<sup>(1)</sup>. 이렇게 제조된 효모 추출물은 IMP나 GMP로 인해 맛난 맛을 가지며 아미노산 및 펩티드 형태로 존재하는 글루탐산과의 상승 작용으로 인해 정미력이 매우 뛰어나다. 이런 이유로 효모 유래의 정미성 뉴클레오티드가 풍부한 추출물은 순수 IMP나 GMP와 차별성을 갖게 된다. 이 때 정미 성분이 아닌 5'-UMP, 5'-CMP는 항 비루스성 약품의 제조에 이용될 수 있으며 기타 핵산 관련 물질들도 의약품의 원료 물질로서 사용되는 등 그 유용성이 크다<sup>(2)</sup>.

예전에는 음식물에서 섭취되는 핵산과 뉴클레오티드는 흡수되지 않고 배설되며 핵산은 간장과 심장에서 아미노산을 원료로 합성(de novo 합성)되기 때문에 음식물로 공급할 필요가 없다고 생각되었으나, 최근 연구 결과 간장 이외의 골수, 소장, 뇌, 피부 등의 조직은 de novo 합성 능력이 약하여 음식물에서 오는 핵산을 이용하여 합성(salvage 합성) 하는 경향이 있다는 사실이 밝혀졌다<sup>(3)</sup>. 또한 음식을 통하여 리보핵산을 섭취할 경우 임파구, 마크로파지, 소장 세포의 증식과 기능 발현에 효과적이며<sup>(5)</sup> 핵산 결핍식으로 사육한 쥐는 세포성 면역능이 저하되지만 리보핵산이 풍부한 효모나 유라실(uracil)을 첨가하면 면역능이 저하되는 것을 방지할 수 있다고 보고된 바 있다<sup>(6,7)</sup>. 또한 신생아기의 성장이나 철 흡수, 지질 대사에도 효과적인 것으로 보고하였다<sup>(8)</sup>. 위와 같이 핵산이 DNA 합성이나 단백질 합성을 활발하게 함과 더불어 여러 생리적인 의의를 갖고 있는 것이 밝혀져 핵산이 반필수의 제6영양소로 간주되고 있다<sup>(9)</sup>. 이런 이유로 효모 리보핵산이 건강 식품 용도로 이용되고 있으며 분유, 우유, 유산균 음료, 분말 조미료, 간장, 소스, 드레싱, 시리얼, 과자 등에도 효모 핵산 제품이 이용되고 있다<sup>(10)</sup>.

이와 같이 핵산 함유 건강 보조 식품으로 효모 리보핵산을 이용하거나, IMP나 GMP 등 정미성 뉴클레오

티드가 풍부한 천연 조미료를 만들기 위해선 우선 리보핵산 함량이 높은 효모 균주를 선발하거나 세포 내에 리보핵산을 많이 축적하도록 개량할 필요가 있다. Lee 등<sup>(11)</sup>은 절간 고구마의 산 당화액에 *S. cerevisiae*, *Cryptococcus laurentii* 등 여러 종류의 효모를 접종하여 pH, 배양 시간, 배지 조성 등 배양 조건을 최적화하여 약 30.2%의 리보핵산 함량 증가를 관찰한 바 있으며 최종 리보핵산 함량은 16.8%였음을 보고한 바 있다. 또한 Kim 등<sup>(12)</sup>은 연속 배양시 배양 조건의 변화가 효모내 리보핵산 축적과 자기소화 효율에 미치는 영향을 연구하여, 효모 균체내 리보핵산 함량이 dilution rate가 증가함에 따라 대수적으로 증가하는 양상을 나타내어, dilution rate 0.1 h<sup>-1</sup>에서 8.9% (w/w) 이었던 리보핵산 함량이 dilution rate가 0.35 h<sup>-1</sup>에서는 14.8%가 되어 1.6배 증가하였다고 보고하였다. Doi 등<sup>(13)</sup>은 *Candida lipolytica* TA-540 균주를 이용하여 유전적으로 리보핵산 함량이 높은 효모 균주를 육종하고, 리보핵산 축적 기작과 대사 조절 기작을 규명하였다. 공업 원료로 리보핵산을 생산할 때는 *Candida*속 효모가 배양이 쉽고, 리보핵산에 대한 데옥시리보핵산의 양적 비율이 낮은 관계로 장점이 많으나, 발효 배지로 주로 이용되는 탄화수소나 제지 공업의 폐액이 식품과는 잘 부합되지 않아 식용으로는 *Candida*속 보다는 식품용 효모를 사용하려는 경향이 있다.

본 연구에서는 식용 단백질 생산 균주로 널리 알려진 *Saccharomyces cerevisiae* (AT CC 7754) 균주를 ethylmethane sulfonate (EMS)를 사용하거나 자외선 혹은 감마선을 조사하여 돌연변이를 일으킨 후, 성장 속도가 빠르고 핵산 함량이 높아진 효모 균주를 선발하고, 이를 당밀 배지에서 배양하여 핵산 함량이 풍부한 효모를 개발하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 균주 및 배지

본 실험에 사용한 효모는 빵효모 중에서 리보핵산 함량이 비교적 높고 식용 단백질 생산에 응용되고 있는 *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 7754를 American Type Culture Collection (ATCC)에서 구입하였다. 맥주 효모 *Saccharomyces uvarum*은 두산 인제 기술 개발원에서 제공받았다. 효모 배양에 사용한 배지는 YPD 배지 {glucose 2% (w/v), yeast extract 1% (w/v), peptone 1% (w/v), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1% (w/v)}로 전배양 및 균주 보존에 사용하였다.

### 건조 균체량 측정

효모 배양은 Yamamura 등<sup>(14)</sup>의 방법을 변형하여 사용하였다. 전배양은 YPD 배지에 효모를 접종한 후 30°C에서 18시간 진탕 배양하였고 본배양은 500 mL 삼각 플라스크에 전배양액 2%를 첨가하여 30°C에서 정지기에 도달할 때까지 배양하였다. 배양이 끝난 후 균체를 회수하여 증류수로 두 번 세척하고 적당량의 증류수로 희석한 다음 분광 광도계(Philips PYE UNICAM PU8600)를 이용하여 610 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이러한 방법으로 서로 흡광도가 다른 균체 현탁액을 각각 100 mL씩 만들어 0.2 µm pore size의 여과지(Gelman Sciences, U.S.A.)로 거른 후 여과지를 105°C에서 건조하고 함량을 측정하여 건조 균체량을 계산하였다. 이 결과로부터 흡광도와 건조 균체량 사이에 표준 곡선을 작성하였다.

### 균체내 리보핵산 추출 및 함량 측정

배양 도중 혹은 배양이 끝난 후의 균체내 리보핵산 함량은 Ogur와 Rosen의 방법<sup>(15)</sup>을 변형한 방법으로 측정하였다. 본배양액을 10,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 균체를 회수하고 이를 증류수로 세척하여 70% (v/v) 에탄올 5 mL에 현탁한 다음 다시 10,000 rpm에서 5분간 원심분리하였다. 회수한 균체를 0.1% (v/v) 과염소산(perchloric acid, PCA)을 함유한 70% 에탄올 용액 5 mL로 세척하여 위의 조건으로 원심분리하였다. 이 후 침전물을 에탄올과 에테르의 혼합 용액(3:1) 5 mL에 현탁한 후 3분간 끓는 물에 중탕하고 12,000 rpm에서 5분간 원심분리하는 과정을 2번 반복하였다. 침전물을 2% (v/v) PCA 용액 5 mL에 현탁한 후 곧바로 10,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 회수하였다. 그리고 되도록 빨리 이 과정을 다시 한 번 반복한 뒤 침전물을 10% (v/v) PCA 용액 5 mL에 현탁하여 4°C에서 18시간 방치하였다. 다시 12,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액을 취하고 침전물은 10% PCA 용액 5 mL에 현탁하여 4°C에서 18시간 방치한 후 같은 조건으로 원심분리하여 상등액을 취하였다. 침전물에 10% PCA 용액 5 mL을 가하여 현탁하고 4°C에서 18시간 방치한 후 같은 조건으로 원심분리하여 상등액을 취하였다. 최종적으로 얻은 15 mL의 PCA 용액을 리보핵산 분획으로 하였다.

리보핵산 함량은 분광 광도계(Pharmacia LKB Ultrospec III)를 사용하여 260 nm에서 리보핵산 분획의 흡광도를 측정하여 계산하였으며 이 때 대조구로는 10% PCA 용액을 사용하였다. 리보핵산의 표준 검량 곡선은 *S. cerevisiae*의 리보핵산(Sigma Chemical Co.,

U.S.A.)을 표준 물질로 삼아 10% PCA 용액으로 농도 별로 희석하여 4°C에서 18시간 방치한 후 260 nm에서 흡광도를 측정하여 작성하였다. 리보핵산 측정의 정확성 및 재현성을 높이기 위하여 Schneider의 방법<sup>(16,17)</sup>에 의해서도 리보핵산 함량을 측정하였다.

### 균체내 RNase활성의 측정

pH별로 완충용액에 균체를 방치한 다음 Doi 등<sup>(13)</sup>의 방법을 변형하여 RNase 활성을 측정하였다. 배양한 균체를 10,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 회수한 후 증류수로 두 번 세척하였으며, 얻어진 균체를 pH 2~11사이의 완충용액 5 mL에 현탁하여 시험관에 넣은 후 마개로 막고 45°C에서 진탕하면서 방치하였다. 30분 이상 방치후 시간별로 균체 용액 0.5 mL를 취하여 4% (v/v) PCA 용액 0.5 mL와 혼합한 뒤 0°C에서 10분간 방치하였다. 다시 4°C, 10,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액을 취하고 Pharmacia LKB Ultrospec III로 260 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이 때 완충용액은 citric acid, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, boric acid, diethylbarbituric acid를 각각 143 mM이 되게끔 혼합하여 사용하였으며 pH를 2~11사이로 조정하였다.

또한 금속염에 의한 균체내 RNase 활성 변화도 위와 동일한 방법으로 측정하였다. 완충용액은 일정 농도의 금속염을 함유한 50 mM citric acid buffer (pH 4.0)나 50 mM glycine buffer (pH 9.0)를 사용하였고, 균체를 45°C에서 24시간 방치하면서 시간별로 시료를 채취하여 RNase의 활성을 측정하였다.

### 고핵산 돌연변이주의 선별

돌연변이는 ethylmethane sulfonate (EMS) 처리, 자외선 및 감마선 조사 등 3가지 방법으로 유도하였다. EMS (Sigma Chemical Co., U.S.A.) 처리를 통한 화학적 돌연변이는 Christopher<sup>(18)</sup>에 의한 방법을 따랐다. 1차 화학적 돌연변이가 일어난 균주에 자외선 조사를 하여 2차 돌연변이를 유도하였는데, 254 nm 파장에서 1.9 W/m<sup>2</sup>의 광량으로 각각 0초(대조구), 5초, 10초, 15초, 20초, 25초, 30초, 40초 동안 조사하였다. 감마선 조사는 그린피아 기술 주식회사(경기도 여주 소재)에 설치되어 있는 Cobalt-60 (650,000Ci) 감마선 조사기를 이용하여 실온 상태에서 감마선을 조사하였다. 감마선 흡수선량율이 900 Gy/hr인 지점에서 각 구간 별로 15, 45, 150, 225, 300, 450, 900 Gy의 흡수선량을 얻도록 하였다. 흡수선량은 Ceric Cerus Dosimeter의 Gammachrom YR (Harwell, England)을 사용하여 측정하였고, 그 오차는 5% 이내였다. 이상의 세가지 방법

모두 효모를 처리했을 때 40%의 생존율을 갖도록 처리 시간을 조절하였다.

돌연변이가 일어난 세포를 단계 회석하여 YPD 평면 배지상에 약 100~200개의 콜로니가 형성되도록 도말한 뒤 30°C에서 48시간 배양하여 형성된 콜로니를 YPD 평면 배지와 1.5 M KCl이 첨가된 YPD 평면 배지에 tooth picking하여 다시 30°C에서 48시간 동안 배양하였다. 1.5 M KCl이 첨가된 배지에서 자라지 않은 콜로니를 선별하여 YPD 액체 배지 5 mL에 접종하고 30°C에서 18시간 동안 배양하였다. 이중 4 mL은 Ogur와 Rosen<sup>(15)</sup>의 방법에 의해 리보핵산 함량을 측정하는데 사용되었고, 나머지 배양액은 건조 균체량 측정에 사용하였으며 단위 배양액당 리보핵산 수득량이 가장 많은 균주를 고택산 돌연변이주로 선발하였다.

### 고핵산 돌연변이주의 발효 조건 결정

고핵산 돌연변이주 배양을 위한 최적 온도 및 최적 pH를 결정하기 위하여 삼각 플라스크를 사용하여 YPD 배지에서 전술한 전배양과 본배양 방법에 준하여 배양을 실시하였으며, 이 때 본배양은 최고 48시간까지 실시하였다. 또한 효모 배양 및 핵산의 측정에 적합한 탄소원을 결정하기 위하여 효모 추출물, 펩톤,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 를 각각 1% (w/v)씩 첨가한 배지에 glucose, sucrose, maltose, glycerol, 당밀, 에탄올을 각각 1.5% (w/v)씩 첨가한 후 균체를 접종하여 25°C에서 약 48시간 동안 배양하면서 시간별로 배양액을 취하여 균체량 및 리보핵산의 함량을 측정하였다. 또한 질소원과의 최적 비율을 결정하기 위해 당밀 20 g/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5 g/L,  $\text{K}_3\text{PO}_4$  0.26 g/L, thiamine · HCl 120 mg/L,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  140 mg/L을 각각 넣어 만든 배지에 질소원으로  $\text{NH}_4\text{Cl}$  6.3 g/L,  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  2.4 g/L을 1, 1.5, 2 그리고 3배만큼 사용하여 돌연변이주를 배양하였다. 그리고 비타민을 첨가하였을 때의 영향을 관찰하기 위하여 Choi<sup>(19)</sup>의 경우에 따라 비타민의 농도를 결정하여 첨가하였다. 위의 배지에 당밀 대신 글루코오스를 2 g/L 첨가하고 비오틴 0.3 mg/L, 판토텐산 36 mg/L, 이노시톨 18 mg/L 그리고 피리독신 3.6 mg/L를 각각 혹은 전부를 첨가하여 배지를 제조하고 균주를 접종한 후 30°C에서 48시간 동안 배양하였다.

### 발효기를 이용한 고택산 돌연변이주의 유가식 배양

돌연변이를 통하여 선별된 고택산 축적 균주의 유가식 배양(fed-batch culture)은 5 L 발효조(NBS Bioflo III, U.S.A.)를 이용하였으며 위의 배지 2.5 L에 YPD 액체 배지에서 약 18시간 동안 전배양한 종균을 배양

액의 5% (v/v)가 되도록 접종한 후 30°C, 500 rpm, 1 volume/volume/min (vvm)으로 약 10시간 배양하였으며 pH는 4.5로 유지하였다. 약 10시간 배양 후 동량의 최소 배지로 희석한 60% (w/v) 당밀을 시간당 약 60~100 mL의 속도로 공급하였다. 배양 도중 용존 산소의 농도는 교반 속도 500 rpm, aeration 1 vvm일 때를 100으로 보정한 후 절반 수준인 50으로 일정하게 유지하도록 교반 속도를 200~800 rpm까지 변화시키면서 배양을 지속하였다. 비타민과 아연은 당밀이 연속적으로 공급되는 시점에서 추가로 첨가하였다. 총 배양 시간은 당밀의 공급이 완전히 끝난 후 10시간 더 배양을 지속하여 30시간으로 하였다. 배양 도중 생성되는 알코올은 Boehringer Mannheim사 (Germany)의 키트를 사용하여 측정하였다.

### 결과 및 고찰

#### *S. cerevisiae* ATCC 7754의 리보핵산 함량

효모 배양액의 흡광도와 건조 균체량의 표준 곡선에 근거한 배양액 mL 당 건조 균 체량(dry cell weight, DCW)과 흡광도와의 관계식은 *S. cerevisiae* ATCC 7754의 경우,

$$\text{DCW (mg/ml)} = 0.2324 \times A_{610\text{nm}} - 0.1193$$

이었고, *S. uvarum*의 경우는,

$$\text{DCW (mg/ml)} = 0.3250 \times A_{610\text{nm}} - 0.003845$$

이었다.

배양 도중 혹은 배양이 끝난 후의 균체내 리보핵산 함량은 Ogur와 Rosen의 방법<sup>(15)</sup>과 Schneider의 방법<sup>(16,17)</sup>을 수정하여 측정하였는데, Table 1에서 보는 바와 같이 두가지 방법으로 추출한 리보핵산량은 비슷하였다. *S. cerevisiae* ATCC 7754의 경우 평균 14.6%로서 일반적으로 알려져 있는 효모의 리보핵산 함량 보다 높은

**Table 1. RNA content of *S. cerevisiae* ATCC 7754 and *S. uvarum*<sup>1)</sup>**

Strain	Extraction method	Dry cell (mg)	Total RNA (mg)	RNA content (%)
<i>S. cerevisiae</i> ATCC 7754	Ogur & Rosen	34.3	5.13	14.9
	Schneider	32.1	4.55	14.2
<i>S. uvarum</i>	Ogur & Rosen	37.5	3.47	9.2
	Schneider	40.0	3.37	8.4

<sup>1)</sup>RNA content after incubation at pH 4.5 and 30°C by shaking with 300 rpm for 18 hr.

수치를 보이고 있고, *S. cerevisiae* ATCC 7754가 *S. uvarum*보다 6%가량 높은 수치를 보였다.

*S. cerevisiae* ATCC 7754 RNase의 pH별 활성 변화

*S. cerevisiae* ATCC 7754의 생육 중에 RNase가 pH 별로 어떠한 활성을 보이는지 측정하였다. 세정 균체를 완충 용액(pH 2~11)에 현탁하여 45°C에서 방치하면서 시간별로 시료를 취하여 냉산 가용성 성분을 분석한 결과를 Fig. 1에 나타내었다. 이 때 추출되는 냉산 가용성 성분은 뉴클레오티드로 RNase에 의한 리보핵산 분해 산물이다. 시간이 지나면서 pH 3, 4와 pH 9, 10에서 리보핵산의 분해 산물이 증가한 것으로 보아 *S. cerevisiae* ATCC 7754에는 산성 쪽에서 활성을 갖는 RNase (산성 RNase)와 알칼리 쪽에서 활성을 보이는 RNase (알칼리성 RNase) 등 적어도 두 가지 endonuclease RNase 들이 존재하는 것으로 나타났다.

Doi 등<sup>(13)</sup>은 *C. lipolytica*에서 산성 RNase와 알칼리성 RNase를 확인한 바 있으며 산성 RNase는 금속 요구성이 없고, 열에 안정하며, 최적 pH가 6.5인 40 kD 크기의 단백질이며 리보핵산을 3'-뉴클레오티드로 분해한다고 그 특성을 밝혔다. 한편, 알칼리성 RNase는 Mg<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>와 같은 금속 이온을 필요로 하고, 60°C에서 5분간 가열하면 활성을 완전히 잃게 되며, 최적 pH가 7.5인 90 kD 크기의 효소로 리보핵산 혹은 데옥시리보핵산을 5'-올리고뉴클레오티드로 분해한다고 보고하였다.

Shetty 등<sup>(20,21)</sup>은 맥주 효모인 *S. carlsbergensis*의

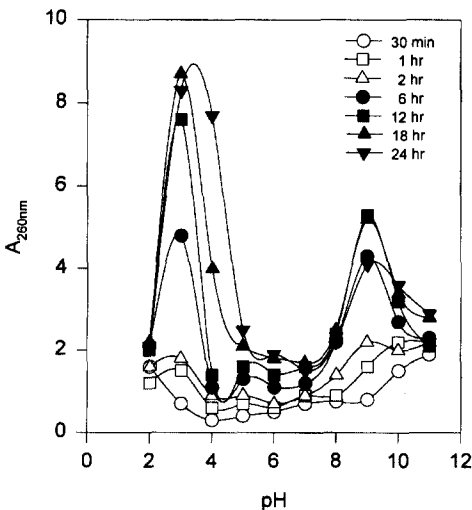


Fig. 1. RNase activity in *S. cerevisiae* ATCC 7754 at various incubation time and pH.

RNase를 순수 정제하여 그 특성을 조사하여 보고한 바 있는데, 최적 pH와 온도는 각각 6.0과 52°C이었으며, 특정 염기에 대하여 특이성을 갖지 않고 3'-뉴클레오티드로 리보핵산을 분해하였다. 또한 70°C에서 2분간 열처리에 의해 효소는 완전히 불활성화되는 것으로 보고하였다. *S. cerevisiae*의 산성 RNase도 이와 매우 유사하며 비특이적 RNase인 것으로 사료된다.

*S. cerevisiae* ATCC 7754 RNase의 금속염에 의한 영향

균체의 리보핵산 함량은 합성 속도와 분해 속도의 평형에 의해 결정될 수 있으며 분해를 억제한다면 균체내 리보핵산 함량은 자연적으로 증가하게 된다. 리보핵산의 분해에 관여하는 효소의 산성 혹은 알칼리성 RNase의 활성을 억제하는 금속염을 찾아 돌연변이 균주 선발 방법으로 이용하고자 하였다. 즉 산성과 알칼리성 RNase 모두 다 억제된 효모 변이주는 치사 변이주였는데, 일반 배지에서 생육이 가능하나 알칼리성 RNase를 억제하는 배지에서 자라지 못하는 치사 변이주는 산성 RNase 활성이 억제되거나 핵산 분해 대사에 이상이 생겨 효모의 정상 생육 pH인 산성에서 리보핵산을 세포내에 다량 축적할 수 있을 것으로 예측되었다.

금속 이온이 *S. cerevisiae* ATCC 7754 균체 내의 산성 RNase와 알칼리성 RNase의 활성에 미치는 영향을 분석하여 그 결과를 Table 2에 요약하였다. K<sup>+</sup>와 Na<sup>+</sup>의 경우 알칼리성 RNase의 활성을 특이적으로 저해하였는데 각 염의 농도가 증가할수록 그 저해 정도 또한 증가하였다. 금속염을 첨가하지 않은 균체내 리보핵산 분해율을 100%로 하였을 때, Na<sup>+</sup>의 경우 염의 농도 1.5 M과 2.0 M에서 알칼리성 RNase를 억제하여 리보핵산의 분해율을 각각 33.0%, 11.7%로 저하시켰고, K<sup>+</sup>의 경우는 염의 농도 1.5 M과 2.0 M에서 분해율을 각각 36.4%, 23.1%로 저해시켰다. Li<sup>+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Ba<sup>2+</sup>과 Ni<sup>2+</sup>도 알칼리성 RNase의 활성을 50%정도 저해시켰다. Hg<sup>2+</sup>를 첨가한 경우 산성 RNase의 활성이 저해되었으나 알칼리성 RNase의 활성은 상승된 결과를 나타내었다. 또한 산성 RNase와 알칼리성 RNase의 활성을 모두 저해하는 조건을 찾기 위하여 산성 RNase를 저해하는 Hg<sup>2+</sup>와 알칼리성 RNase의 활성을 저해하는 K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>를 각각 섞어서 첨가하였는데, 이 경우에도 뚜렷한 저해 효과가 나타나지 않았다.

*Candida lipolytica*의 RNase 활성에 금속염이 미치는 영향에 대한 Doi 등<sup>(13)</sup>의 연구에서도 알칼리성 RNase의 활성이 Na<sup>+</sup>와 K<sup>+</sup>에 의해 저해되었으며,

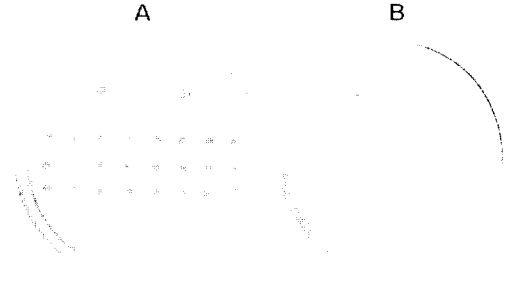
**Table 2. Effect of metal ions on intracellular RNase activity of *S. cerevisiae* ATCC 7754**

Metal salt	Concentration (M)	Relative degradation of intracellular RNA (%)	
		pH 4.0	pH 9.0
LiCl	0.2	90.5	56.9
KCl	1.5	98.6	36.4
	2.0	101.4	23.1
NaCl	1.5	99.0	33.0
	2.0	94.7	11.7
BaCl <sub>2</sub>	0.01	104.2	56.5
CaCl <sub>2</sub>	0.05	103.9	155.5
CuSO <sub>4</sub>	0.02	86.2	53.2
MgSO <sub>4</sub>	0.1	100.3	92.8
NiCl <sub>2</sub>	0.02	96.7	54.2
ZnSO <sub>4</sub>	0.02	100.7	246.2
	0.004	25.1	155.9
HgCl <sub>2</sub>	0.008	18.2	256.7
	0.002	88.4	151.0
(+KCl 2.0M)	0.004	94.5	208.0
	0.002	109.6	98.0
Control	-	100.0	100.0

Shetty 등<sup>(21)</sup>은 *S. carlsbergensis*의 정제된 산성 RNase 활성이 0.5 M NaCl이나 KCl에 의하여 상승되고 0.01 M의 MgCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>, FeCl<sub>2</sub>, CuCl<sub>2</sub>에 의하여 0~77%로 저해된다고 보고한 바 있다. 위의 결과를 토대로, 산성 RNase 혹은 리보핵산 대사에 변화가 생겨 리보핵산 함량이 증가될 수 있는 변이균주를 다음과 같이 선발하였다.

#### 고핵산 돌연변이주의 선발

Ethylmethane sulfonate (EMS) 처리, 자외선 혹은 감마선 조사를 통하여 얻은 콜로니 20,000여개를 YPD 고체 배지와 1.5 M KCl이 첨가된 YPD 고체 배지에 접종하여 KCl 감수성 균주를 선발하였으며 Fig. 2에 나타내었다. 이러한 변이균주들은 건조 균체량당 리보핵산 함량이 모균주에 비하여 매우 높아 50% 혹은 그 이상이 증가된 것들이 상당수 있었다. 그러나 이러한 균주 대부분이 시험 조건 하에서 잘 배양되지 않아 배양액 단위 부피당 리보핵산 생산량에서는 모균주와 비슷하거나 다소 낮은 양상을 보였으며 이런 경향은 특히 자외선 조사 변이주에서 더욱 심하게 나타났다. 한 예로 EMS로 처리한 변이균주 B250과 자외선 조사 변이균주 U1은 건조 균체량당 리보핵산 함량이 각각 24.6% (w/w), 19.8% (w/w)로 모균주 14.9% (w/w)에 비해 높았으나 성장이 느려 배양액 1 mL 당 리보핵산



**Fig. 2. Growth of *S. cerevisiae* ATCC 7754 and its mutants on a YPD agar plate containing 1.5 M KCl. Plate A; YPD agar medium, plate B; YPD agar medium with 1.5 M KCl. Two colonies in the top row represent the wild type strain and the rest of them the mutants.**

생산량은 각각 0.753 mg, 0.816 mg으로 모균주 0.840 mg에 비해 오히려 낮았다. 이와 반대로 감마선 조사 변이균주  $\gamma 3$ 는 성장이 빨라 배양액 1 mL 당 건조 균체량이 6.27 mg으로 모균주 5.35 mg에 비해 17% 증가하였으나 균체내 리보핵산 함량이 13% (w/w)로 낮아 결과적으로 배양액 1 mL 당 리보핵산 생산량이 0.814 mg으로 모균주보다 낮았다. 그러므로 본 연구에서는 배양액 1 mL 당 생산된 리보핵산량이 가장 많으면서 (0.964 mg RNA/mL culture broth) 성장이 빠른 EMS 돌연변이 균주 B24를 고핵산 변이주로 선정하였으며, 모균주와 비교하여 여러 가지 증식 특성을 살펴 보았다.

#### 고핵산 축적 변이주의 발효 조건

변이주를 YPD 배지가 담긴 플라스크에 접종하여 진탕 배양하면서 pH가 생육에 미치는 영향을 검사한 결과, Fig. 3A에서 보는 바와 같이 25°C, pH 4.0~5.5 구간에서 B24의 생육에 큰 차이가 없는 것을 알 수 있었다. 시간별로 변화하는 리보핵산 함량을 분석해 보면 Fig. 3B와 같이 균체당 리보핵산의 함량은 생육 초기에 급격히 증가하다 정지기로 접어들면서 급격히 감소하였는데, 이는 Waldron과 Lacroute<sup>(22)</sup>가 보고한 바와 경향이 유사하였다. 배양 종료 후의 리보핵산 함량은 pH 4.5와 5.0에서 배양했을 때 가장 높게 나타났으며 pH 4.0과 5.5에서는 정지기에 도달한 후 리보핵산의 함량이 급격히 감소하였다. 결과적으로 배양액 당 리보핵산은 pH 4.5와 5.0에서 배양하였을 때 가장 많이 수득할 수 있었다.

Waldron<sup>(23)</sup>은 영양분이 부족한 배지에서 영양분이 풍부한 배지로 균체를 옮겼을 때(shift-up) 수 분 동안

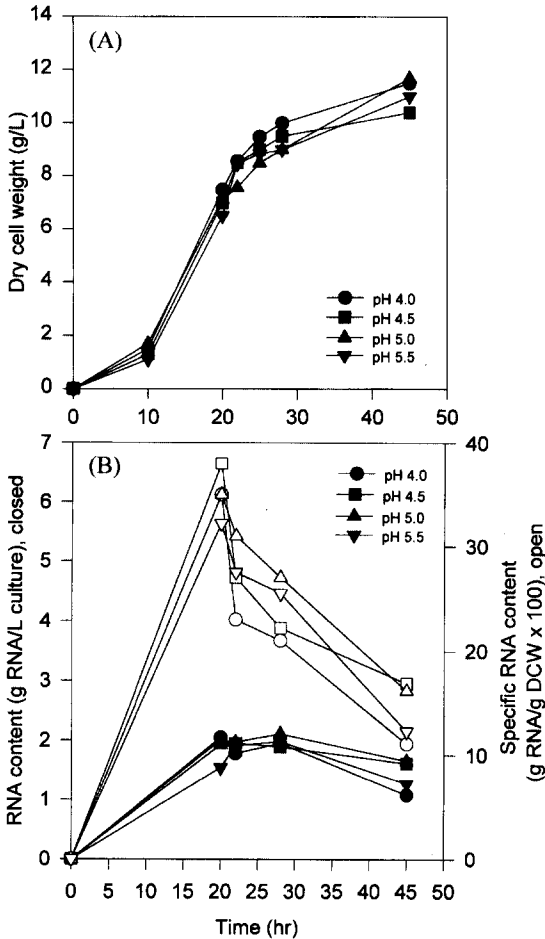


Fig. 3. Changes of dry cell weight (A) and RNA content (B) during the growth of B24 at various pHs. B24 was incubated at a pH range of 4.0~5.5 and 25°C by shaking with 300 rpm for 45 hr. DCW represents dry cell weight.

의 잠재기 후에 전체 리보핵산 합성이 갑작스럽게 증가함을 밝혔다. 또한 에탄올을 탄소원으로 이용하여 배양한 효모는 glucose를 탄소원으로 이용하여 배양한 효모에 비해 절반 정도의 리보솜을 함유하고 있으며 여기에 다시 glucose를 첨가해 줌으로써 리보솜 구조물의 합성이 급작스럽게 증가함을 밝혀 냈다. 또한 rRNA의 합성은 아미노산이 부족하면 저해되는데 Wehr와 Parks<sup>(24)</sup>는 메티오닌이 부족할 때 리보핵산의 축적이 감소됨을 밝혀냈다.

탄소원, 성장 속도, 아미노산 등 균체내 리보핵산 함량에 영향을 미치는 인자 중 탄소원에 대한 B24의 배양 특성 및 리보핵산의 생성을 Fig. 4A, 4B에 나타내었다. glucose, sucrose, maltose, 당밀을 탄소원으로 사

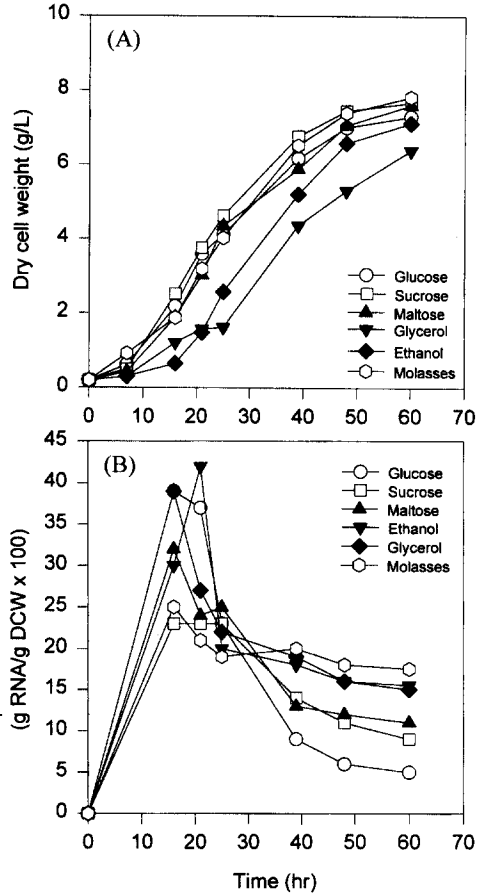


Fig. 4. Changes of dry cell weight (A) and RNA content (B) during the growth of B24 in the media containing various carbon sources. B24 was incubated at pH 4.5 and 25°C by shaking with 300 rpm for 48 hr. DCW represents dry cell weight.

용하였을 때 성장에는 큰 차이가 없는 것으로 나타났으며 근소하나마 당밀을 사용한 경우 성장이 가장 빨랐다. 에탄올의 경우는 다른 탄소원에 비하여 적응기 (lag time)가 길었으나 적응기를 지난 후부터는 다른 탄소원과 비슷한 성장 속도를 나타냈다. 그렇지만 최종 균체량에서는 다른 탄소원에 비해 약간 떨어졌다. Glycerol의 경우는 전체적인 성장 속도가 가장 느려 완만한 성장을 보였다.

각 탄소원별 리보핵산의 생성을 조사한 결과 Fig. 4B에서 보는 바와 같이 glucose를 사용한 경우 초기 대수 증식기에 리보핵산의 함량이 가장 급격히 상승 (약 39%)하였으나 시간이 경과함에 따라 리보핵산의 함량이 급격히 감소하기 시작하여 정지기에 들어간 이후에는 6% 정도로 감소하였다. 반면에 에탄올의 경

우는 최종적으로 약 15%까지 리보핵산의 함량이 유지됨을 볼 수 있었다. Sucrose와 당밀을 탄소원으로 하여 배양했을 때 초기 대수 증식기에 다른 탄소원과 같이 리보핵산 함량이 급격히 증가하였고, 성장 도중 급격히 감소하는 양상도 보이지 않아 최종 약 18% (w/w) 정도로 리보핵산 함량이 유지되어 가장 리보핵산이 많이 축적됨을 볼 수 있었다. Maltose와 glycerol의 경우는 초기 대수증식기에 각각 32%, 39% 정도의 리보핵산 함량을 나타내었고 대수기 말기에는 약 11%, 12% 정도까지 감소하여 에탄올, sucrose, 당밀에 비해 다소 낮은 리보핵산 함량을 나타내었다. 이상의 결과에서 생육과 리보핵산 축적을 고려할 때 B24 배양의 탄소원으로 당밀이 가장 적합함을 알 수 있었으며 이는 당밀을 통하여 효모 생육에 필요한 비오틴과 같은 영양분이 충분히 공급된 때문인 것으로 생각되어진다.

또한 탄소원과 질소원의 비를 달리하여 B24를 진탕 배양하였다. Fig. 5에서 보는 바와 같이 탄소원으로 당밀을 사용할 때 농도가 높을수록 성장은 점차 빨라져 20% (w/w) 첨가하였을 때 성장이 가장 좋음을 알 수 있었다. 질소원은 Fig. 6에서 보는 바와 같이 기본 조성(NH<sub>4</sub>Cl 6.3 g/L, NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2.4 g/L)의 2배 만큼 첨가하였을 때가 가장 성장이 좋았고 3배 만큼 첨가하였을 때부터는 성장이 저해됨을 알 수 있었다.

그리고 B24의 성장 및 리보핵산 축적에 상승 효과를 주는 비타민 조성을 결정하기 위하여 Choi<sup>(19)</sup>의 경우처럼 비타민의 농도를 결정하고 B24의 성장에 미치는 영향을 조사한 결과 Table 3에서 나타난 바와 같이

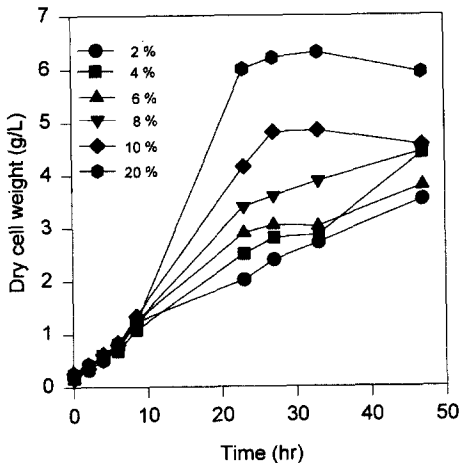


Fig. 5. Growth of B24 at various concentrations of molasses. B24 was incubated at pH 4.5 and 25°C by shaking with 300 rpm for 48 hr.

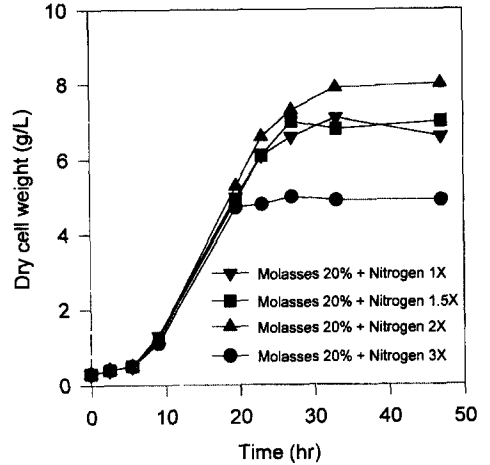


Fig. 6. Changes of dry cell weight during the growth of B24 in cane molasses media with various carbon to nitrogen ratios. 'Nitrogen 1X' means basal composition (NH<sub>4</sub>Cl 6.3 g/L, NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2.4 g/L) and 'Nitrogen 2X' means twice as much as basal composition. B24 was incubated at pH 4.5 and 25°C by shaking with 300 rpm for 48 hr.

Table 3. Effect of vitamins on the growth of B24 strain

Composition of medium <sup>1)</sup>	Dry cell weight (g/L) <sup>2)</sup>
(1)	0.401
(1)+Inositol	0.747
(1)+Ca · Pantothenate	0.538
(1)+Pyridoxine · HCl	0.371
(1)+Biotin	0.497
(1)+Vitamin complex <sup>3)</sup>	1.48

<sup>1)</sup>Composition (1) is as follows: glucose 2 g/L, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.5 g/L, K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.26 g/L, thiamine · HCl 120 mg/L, ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 140 mg/L, NH<sub>4</sub>Cl 6.3 g/L, NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2.4 g/L.

<sup>2)</sup>Dry cell weight after cultivation for 26 hr.

<sup>3)</sup>Vitamin complex means all of the four vitamins.

4가지 비타민을 모두 첨가하여 줄 때만 정상적인 성장을 나타냄을 알 수 있었다.

### 유가식 배양에 의한 돌연변이주의 증식 및 리보핵산 축적

5 L 용량의 발효기를 이용하여 B24 돌연변이주를 유가식으로 배양할 때 접종후 대수증식기에 들어서기 시작한 시점에서 당밀을 시간당 60 mL의 속도로 연속적으로 첨가하면서 약 55시간 배양하였다. 이 때 첨가된 당밀의 총량은 1.5 kg이었고 산소 공급 속도는 1~2 vvm, 교반 속도는 800 rpm이었다. 배양 초기 알코올은 2.7% (v/v)까지 증가하였으나 급격히 감소하여 대수기 말기에는 검출되지 않았다. 핵산 축적이 뛰어나



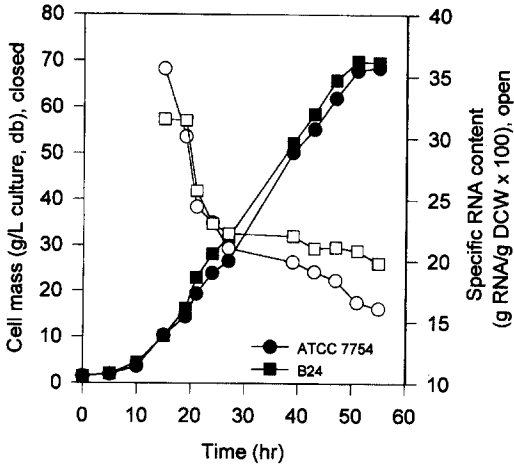


Fig. 7. Changes of cell mass and RNA content of *S. cerevisiae* ATCC 7754 and B24 during the fed-batch culture using a 5 L jar fermenter. DCW represents dry cell weight. Fermentation conditions: pH 4.5, 30°C, aeration 1~2 vvm (volume/volume/min), agitation 800 rpm.

난 돌연변이주 B24를 5 L 용량의 발효기로 배양하는 동안 균체 수득량, 균체내 리보핵산 함량, 배양 액당 리보핵산 함량의 변화를 모균주인 *S. cerevisiae* ATCC 7754와 비교하여 Fig. 7에 나타내었다. ATCC 7754와 B24 두 균주는 성장이 비슷하여 최종적으로 약 70 g/L(건물량)의 균체를 얻을 수 있었다. 유가식 배양을 이용한 산업적인 효모 생산에서는 40~60 g/L(건물량)의 효모를 수득하고 있으며 본 실험에서는 이 보다 많은 효모를 수득하였다.

균체내 리보핵산 함량은 두 균주 모두 초기 대수증식기에 급격히 증가하고 이 후 정지기에 들어갈 때까지 서서히 감소하여 건물량 기준으로 ATCC 7754는 16.1%, B24는 19.8%의 리보핵산 함량을 나타내었으며, 이를 배양액 1 L당 리보핵산 양으로 환산하여 5회 반복한 평균값을 Table 4에 제시하였다. 배양 후의 건조 균체량에 있어서 B24와 ATCC 7754 사이에는 유

의차가 없었으며, 리보핵산 함량을 비교한 결과에서는 B24가 ATCC 7754보다 약 3.7% 많았으며 유의차가 있었다. 결론적으로 B24 균주가 당밀을 이용한 유가식 배양에서 균체 수득 69.6 g/L(건물 기준), 건물기준 세포내 RNA함량 19.8% (w/w), 배양액 1 L 당 RNA 수득 13.8 g으로 나타나 모균주인 ATCC 7754에 비해 RNA 축적이 우수하였다.

### 요 약

식용 단백질 생산 균주인 *S. cerevisiae* ATCC 7754에 돌연변이를 유도하고, 핵산 함량이 높으면서도 성장 속도가 빠른 고흡산 축적 균주를 선별하였고 배양 특성을 조사하였다. *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 7754는 pH 3~4에서 최대 활성을 보이는 산성 RNase와 pH 9에서 최대 활성을 보이는 알칼리성 RNase를 가지고 있는 것이 확인되었으며 산성 RNase의 활성이 훨씬 높았다. *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 7754의 RNase는 금속염에 의하여 영향을 받는데 산성 RNase의 경우는 0.08 M HgCl<sub>2</sub>에 의하여 활성이 크게 저하되었고, 알칼리성 RNase 경우는 2.0 M NaCl이나 KCl에 의하여 활성이 크게 저하되었다. 반면 알칼리성 RNase는 0.05 M CaCl<sub>2</sub>, 0.02 M ZnSO<sub>4</sub>, 0.008 M HgCl<sub>2</sub>에 의하여 활성이 증가되었다. Ethylmethane sulfonate, 자외선, 감마선을 이용한 돌연변이를 통하여 핵산 축적능이 뛰어난 KCl 감수성 균주를 선발하고 YPD 배지에서 배양하면서 건조 균체량과 리보핵산 함량을 측정하여 건조 균체 단위 무게당 리보핵산의 함량이 가장 높은 B24 균주를 고흡산 변이주로 선택하였다. B24 균주는 모균주와 비슷한 증식 특성을 나타내었는데, pH 4.5~5.5에서 성장이 잘 되었고 리보핵산 축적은 pH 4.5와 5.0에서 가장 잘 일어났으며, 또한 탄소원으로 당밀을 사용한 경우가 세포 내에 리보핵산이 가장 많이 축적되었고 균의 생육도 빠름을 알 수 있었다. 발효기를 이용한 유가식 배양에서는 배양

Table 4. Cell mass and RNA content accumulated during fed-batch culture using a 5 L jar fermenter

Strains	Cell mass (g/L culture broth) <sup>1)</sup>	RNA Content in		Relative RNA content in culture (%)
		Cell (g/g DCW × 100) <sup>2)</sup>	Culture (g/L culture)	
<i>S. cerevisiae</i> ATCC	68.6 ± 2.84 <sup>3)</sup>	16.1 ± 1.37*	11.0	100
B24	69.6 ± 2.89	19.8 ± 1.30	13.8	125

<sup>1)</sup> dry base.

<sup>2)</sup> DCW represents dry cell weight.

<sup>3)</sup> Values are mean standard deviation (n=5).

\*Significant at p<0.05.

초기에 균체내 리보핵산 함량이 급격히 증가하고 이 후 정지기까지 서서히 감소하여 최종적으로 리보핵산 함량이 균체 건물량의 19.8% (w/w)로 모균주의 16.1% (w/w)에 비해 우수하였으며, 이때 최대 69.6 g/L(건물량)의 균체를 수득하였다.

## 문 헌

1. Nagodawithana, T.: Yeast derived flavors and flavor enhancers and their probable mode of action. *Food Technol.*, **11**, 139-144 (1992)
2. Aoyagi, Y.: Yeast extract with high 5'-IG, Aromild (in Japanese). *Food chemical*, **6**(6), 99-103 (1990)
3. Nakao, Y.: Microbial production of nucleosides and nucleotides. In *Microbial Technology*, 2nd ed., Academic Press, New York, 311-354 (1979)
4. He, Y., Chu, S.W. and Walker, W.A.: Nucleotide supplements alter proliferation and differentiation of cultured human (Caco-2) and rat (IEC-6) intestinal epithelial cells. *J. Nutr.*, **123**, 1017-1019 (1993)
5. Frederick, B.: *Nutrition*, **6**(1), 45-52 (1990)
6. Van Buren, C.T., Kulkarni, A.D., Fanslow, W.C. and Rudolph, F.B.: Dietary nucleotides, a requirement for helper/inducer T lymphocytes. *Transplantation*, **40**(6), 694-697 (1985)
7. Cohen, A., Barankiewicz, J., Lederman, H.M. and Gelfand, E.W.: Purine metabolism in human T lymphocytes: role of the purine nucleoside cycle. *Can. J. Biochem. Cell Biol.*, **62**, 577-583 (1984)
8. Uauy, R., Stringel, G., Thomas, R. and Quan, R.: Effect of dietary nucleosides on growth and maturation of the developing gut in the rat. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, **10**, 497-503 (1990)
9. Matsunaga, S.: Physiological function of nucleic acid and its application (in Japanese). *Food processing*, **29**(3), 15-17 (1994)
10. Matsunaga, S.: Properties and application of edible nucleic acid (in Japanese). *Food processing*, **39**(1), 92-94 (1997)
11. Lee, J.I., Song, J.C., Cho, W.D. and Yang, H.C.: RNA production from the hydrolyzate of sliced and dried sweet potatoes (in Korean). *Korean J. Appl. Microbial. Bioeng.*, **8**(1), 9-18 (1980)
12. Kim, S.R., Kwon, O.S., Nam, H.S. and Lee, H.J.: Effect of growth rate and cultivation temperature on the yeast RNA accumulation and autolysis efficiency (in Korean). *Korean J. Food Sci. Technol.*, **27**(1), 129-133 (1995)
13. Doi, S., Akiyama, S. and Nakao, G.: Development of yeast strain with high ribonucleic acid (in Japanese). Kakkai Chuppan Center, Tokyo, 159-169 (1983)
14. Yamamura, M., Takeo, K. and Kamihara, T.: *Saccharomyces* yeast cells grown at elevated temperatures are susceptible to autolysis. *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 2861-2864 (1991)
15. Ogur, M. and Rosen, G.: The nucleic acids of plant tissues. I. The extraction and estimation of deoxyribose nucleic acid and pentose nucleic acid. *Arch. Biochem.*, **25**, 262-276 (1950)
16. Schneider, W.C.: Phosphorus compounds in animal tissues. III. A comparison of methods for the estimation of nucleic acids. *J. Biol. Chem.*, **164**, 747-749 (1946)
17. Schneider, W.C.: Determination of nucleic acids in tissues by pentose analysis. *Methods Enzymol.*, **3**, 680-684 (1957)
18. Christopher, W.L.: Classical mutagenesis techniques. *Methods. Enzymol.*, **194**, 273-281 (1991)
19. Choi, C.M.: Production of anticoagulant hirudin in a continuous cell recycle fermenter using recombinant *Saccharomyces cerevisiae* (in Korean). *M.S. Thesis*, Seoul National Univ., Seoul, Korea (1996)
20. Shetty, J.K., Weaver, R.C. and Kinsella, J.E.: A rapid method for the isolation of ribonuclease from yeast (*Saccharomyces carlsbergensis*). *Biochem. J.*, **189**, 363-366 (1980)
21. Shetty, J.K., Weaver, R.C. and Kinsella, J.E.: Ribonuclease isolated from yeast (*Saccharomyces carlsbergensis*): Characterization and Properties. *Biotech. Bioeng.*, **23**, 953-964 (1981)
22. Waldron, C. and Lacroute, F.: Effect of growth rate on the amounts of ribosomal and transfer ribonucleic acids in yeast. *J. Bacteriol.*, **122**(3), 855-865 (1975)
23. Waldron, C.: Synthesis of ribosomal and transfer ribonucleic acids in yeast during a nutritional shift-up. *J. Gen. Microbiol.*, **98**, 215-221 (1977)
24. Wehr, C.T. and Parks, L.W.: Macromolecular synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* in different growth media. *J. Bacteriol.*, **98**(2), 458-466 (1969)

(1997년 10월 23일 접수)