전기융합효모를 이용한 초과생산기술

조 문 구
〈우석대학교 이공대학 생명공학부〉

세포융합은 1935년 Kuester에 의해서 도입되었으며, 생산균주를 이용하는 대부분의 생물공정에서는 돌연변이보다 월등한 확률로서, 또한 클로닝에 비해서는 훨씬 빠르고 쉽게 유전자의 도입을 통한 균주개량 방법으로 이용하고 있다. 특히 사용하는 시약과 처리조건에서는 가장 안전한 방법이라는 장점도 있다. 세포의 융합을 거쳐 만들어지는 세포를 융합세포 또는 잡종세포라 하며, 같은 종끼리 실시하는 동종융합과 서로 다른 종에 적용하는 이종융합으로 나눌 수 있다.

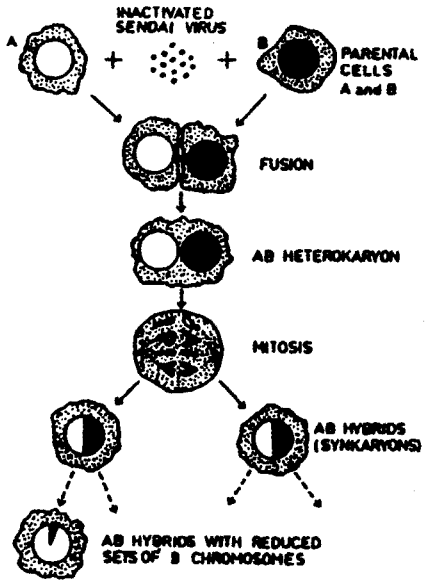
자연계에서 이루어지고 있는 수정이나 식물과 토양미생물의 공생관계와 같이 자연적인 융합현상 외에 인위적으로 실시하는 융합은 이론적으로 어떤 종류의 생물에서든지 잡종세포를 만들 수 있다. 이미 식물과 곤충, 동물과 인간세포, 미생물과 식물 등등 다양한 형태의 잡종세포들이 불과 60여년 사이에 성공적으로 만들어져 왔다.

융합세포의 특징은 융합이전의 세포에 포함된 유전자 또는 핵을 모두 갖고 있는 다핵상태에 있다. 즉, 융합과정에서 한 세포의 유전자만을 갖고 있는 단일핵상태는 진정한 의미에서 융합세포라 할 수 없다[그림 1].

인위적 세포융합 방법은 크게 바이러스의 이용, 무기염류의 이용, 수용성 고분자, 계면활성제의 이용과 전기적 방법 등으로 분류된다. 바이러스는 초창기 인터페론 생산에서 잡종세포를 만드는데 이용한 센다이 바이러스의 용균력을 이용하여 융합대상 세포의 표면을 처리하는 방법이다.

무기염류는 주로 2가 양이온과 pH를 조정하여 융합대상 세포의 표면에 일종의 킬레이션 반응을 이용한다. 수용성 고분자는 폴리에칠렌 글리콜(PEG)이 대표적인 예이고, 계면활성제는 주로 폴리비닐 알콜계열의 물질을 이용하고 있다. 전기적인 방법은 융합대상세포를 전기장에서 인위적으로 세포를 접촉시키는 방법이다.

[그림 1] 세포융합



그러나 현재까지 보편적으로 이용되어진 융합방법은 세 가지로서 첫째는 칼슘이온, 둘째는 Lysolecithin이며 세 번째는 PEG를 이용하는 방법이다. Lysolecithin은 레시틴을 Phospholipase A로 분해하여 생성되는 계면활성 지질유도체의 일종이다. 이 물질은 생태계의 수정과정에 상당한 관련성으로 주목을 받고 있으며, 일부 지방산계열 물질들의 막융합 활성도 검토되고 있다. PEG는 일반 세포보다는 세포막을 제거한 Protoplast에 대한 융합시약으로 식물과 동물세포에 적용되고 있다[그림 2].

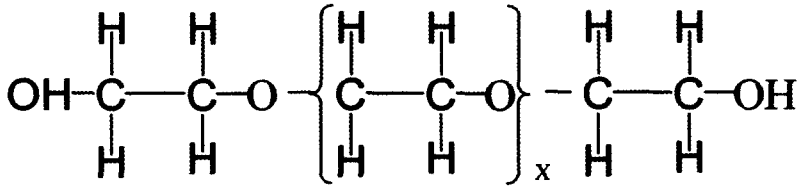
생물막의 특성

세포융합은 일차적으로 막의 구조에 엄청난 변화를 초래한다. 생물의 막은 평균적으로 60-80%의 단백질과 40-20%의 지질로 이루어져 있으며 1950년대에 Davson-Danielli-Robertson의 모델로부터 Singer와 Nicolson의 Fluid mosaic모델로 발전 되어왔다[그림 3]. 그러나 아직까지도 대부분의 생화학, 생물물리학, 생물학의 이론을 모두 만족시키는 생물막 구조는 정리되지 않았으며, 따라서 세포융합은 어떤 특정한 막 이론을 근거로 실시되고 있지 않다는 점에 주목할 필요가 있다.

그림 3의 (A)는 단백질을 중심으로 지질이 겹쳐있는 이중막개념이며, (B)는 구형단백질이 포함된 이중막구조에 지질이 분포되어 있는 상태를, (C)는 현재 가장 일반적인 개념으로 인정받고 있는 유동막구조로서 단백질과 지질이 혼합되어 있는 막구조를 그림으로 요약한 것이다.

세포융합 과정은 세포가 밀접하게 접근하는 응집현상으로 시작되며, 세포막지질에서 보호성분이 제거되면서 막구성 지질의 배열이 변화되면 원형질간의 응착이 진행되고, 마지막으로 원형질의 교환과 안정화과정으로 정리된다. 즉 인접한 세포의 간격은 불과 몇 옹스트롱 정도이며, 이때는 소수성 결합이 중요한 역할을 담당하므로 융합촉진제 또는 융합시약은 기본적으로 세포간의 소수성 결합과 관련이

[그림 2] Polyethylene glycol의 일반구조식



MW ≃ 1,500 ~ 7,500 daltons(x ≅ 170)

있다. 결국 자연상태의 세포들이 일반적으로 나타내는 현상인 브라운 운동, 정전반발력, 능동이동 등을 통해 서로 떨어지려는 경향을 차단해주면 일차적인 세포간 응착이 이루어지게 된다.

막구성물질의 변화 - 탄수화물과 지질

세포표면의 주요 구성요소인 탄수화물은 지금까지 융합과정에서 거의 무시해 왔으며, 막에는 주로 중성 당류인 Galactose, Mannose와 Fractose가 대부분이고 Acetyl amino sugar와 Sialic acid로서 주로 지질 및 단백질과 공유결합을 이루고 있다. 막구성 탄수화물의 대표적인 기능은 첫째 세포항원의 결정, 둘째는 정상적인 pH조건에서 음전하 발생, 셋째 세포간 인식 및 접착, 넷째는 Endocytosis, 응집과 바이러스 및 세균의 결합부위를 결정하며, 끝으로 투과성을 조절하므로 세포융합의 전과정과 관련이 있다.

막지질은 평면구조의 마이셀로 변화되면서 막 융합에 도움이 된다는 Lysolecithin효과 또는 Micellization이론으로 설명되며, 높은 칼슘 농도가 융합에 효과적이란 것은 막지질이 쉽게 마이셀을 형성하기 때문이다. 결국 효소를 이용한 융합에서는 첫째 고칼슘 고 pH(8.0-10.5)조건과, 두 번째 2가 양이온을 첨가하여 지질분자의 Phosphoryl 그룹과 마이셀사이의 연결이 필요하다.

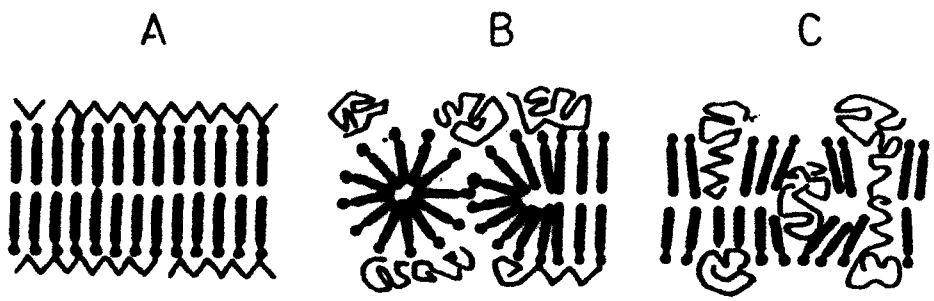
원형질체 세포의 분리

원형질체 세포(Protoplast)는 세포벽 성분이 완전히 제거되어 삼투압에 대단히 민감한 상태를 말하며, 삼투압 안정용액 조건에서 거의 완전한 구형을 나타낸다. Spheroplast는 세포벽이 있는 상태에서 삼투압조건의 변화로 나타나는 가역적인 세포의 상태로서 주변의 삼투압 조건이 정상화되면 원래의 세포형태로 회복된다.

진핵미생물은 대부분 효소를 사용하여 원형질체 세포를 만든다. 그러나 모든 종류의 미생물에 적합한 효소의 종류와 처리방법은 세포벽의 구성성분을 근거로 예비실험을 거쳐 결정해야 한다. 특히 효모와 곰팡이의 세포벽을 제거하기 위해 사용하는 대표적인 효소는 대부분이 다당 분해효소이고 섬유소분해능력이 우수한 Trichoderma sp.가 생산하는 α 및 β glucanase와 Chitinase를 주로 이용하고 있다. 이 외에 달팽이의 소화액 성분도 사용하고 있다. 이것은 Lipase, Phospholipase, Glucanase와 Mannanase가 혼합된 천연효소 복합체이다.

효모와 곰팡이의 세포벽 조성은 성장주기에 따라 생화학적인 변화가 나타나므로 세포벽을 효과적으로 제거하려면 여러 가지 고려사항을 검토해야 한다. 가장 일반적인 변화는 대수증

[그림 3] 세포막 이론



식기에서 정상기로 진입하면서 세포벽이 가장 안정하며 저항성이 큰 상태가 되므로 대수증식기 이하의 상태를 선택해야 한다. 또한 세포벽에서 형성되는 이황결합을 차단하기 위해 Dithiothreitol 또는 β-mercapto ethanol같은 Sulphydryl화합물의 첨가도 효과적이다. 한편 세포벽의 제거로 분리되는 원형질체 세포를 삼투압이 안정된 상태로 유지하기 위해 Solbitol이나 Mannitol, 또는 KCl같은 성분을 첨가하며, 이 때 반응용액의 점도가 너무 높거나 낮은면 원형질체 세포의 분리효율이 감소된다.

대부분의 효모와 곰팡이는 한천이나 젤라틴을 사용한 고체배지에서 특별한 조건없이 스스로 세포벽을 합성하지만 특이한 경우는 삼투압을 조정한 배지에서만 세포벽이 재생되는 경우도 있다. 한편 재생된 세포벽은 대부분 재생 후 1세대에서는 원래의 세포형태를 나타내지 못하지만 2세대에서는 원래의 형태를 회복한다.

진핵미생물의 원형질체 융합

원형질체 세포는 완전한 세포와 달리 전기나 화학적인 방법으로 융합이 이루어진다. 화학적인 방법은 기존의 화학적 융합과 같은 원리이므로 여기서는 더 이상의 설명을 생략한다. 전기를 이용한 원형질체 세포의 융합은 1979년에 Senda가 식물세포를 이용하여 성공하였고, 이어서 Zimmermann그룹이 1981년에 효모의 융합에 성공하였다.

전기장에서 원형질막은 막구성물질의 하전상태에 따라 하전성 물질과 비하전성 물질 사이의 순간적이면서 부분적인 재배열이 이루어지고 짧은 시간이지만 전기장이 유지되는 동안에 일정한 공간이 생성된다. 아직 많은 논란의 여지는 있으나, 이 때 생성되는 전기적 공극을 통해 세포내 물질이 하전이동 또는 전기적 장력에 의해 전기장의 방향과 같은 방향으로 융합이 이루어진다. 이동이 완료된 세포는 부피의 감소에 따른 압력변화를 초래하며 이 힘이 원형질막의 전하구조에 변화를 일으키면서 전기적 공극이 닫히게 된다. 한편 원형질의 이동으로 비어있는 쪽의 막은 이중 및 다중거품구조를 거쳐 구형의 융합세포를 형성하게 된다.

원형질체 세포는 교류장에서 마치 Dipole과 같은 특성을 나타내므로 전기장을 따라 배열되면서 마치 구슬이 일렬로 정렬되어 있는 상태에 도달한다. 이 상태에서 직류로 전환하고 짧은 전기적 펄스를 가하면 융합이 이루어진다. 이 때 세포에 가하는 전기장의 세기와 충격시간을 변화시키면 적어도 2개 이상의 세포가 융합된 융합세포를 얻을 수 있다.

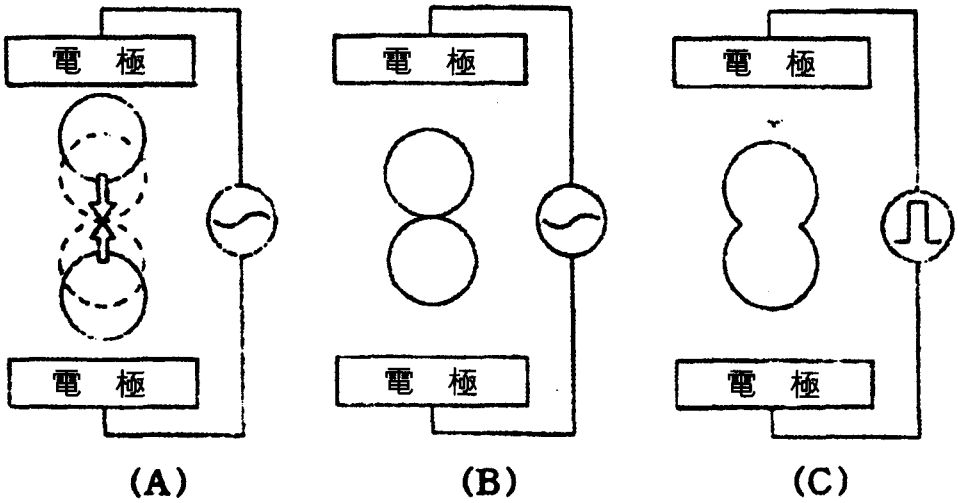
전기융합

전기융합, 정확하게는 전기장을 이용한 세포융합은 지금까지 이용해온 융합방법 즉 바이러스, 리포솜, 무기염류, 수용성 고분자 등과 확연하게 대비되는 방법이다. 기존의 융합방법에서 요구되는 비생리적인 조건을 피할 수 있는 장점이 있다. 결국 융합 비율은 획기적으로 향상시키면서 동시에 다핵상태에서 전기적 펄스에 의한 핵융합이 촉진되므로 융합세포의 안정성과 재생비율이 향상된다.

전기융합은 세포현탁액을 전기장에서 전압과 전류를 변화시키면서 크게 2단계로 이루어진다. 1단계는 전기영동과정으로 전기장을 따라 세포의 정렬접착을 일으킨다. 1.5V, 1㎒를 〈10-5 sec/cm정도를 가한다. 두 번째는 고도의 전기적 펄스를 순간적으로 주사하여 정렬접착된 막에 순간적인 파괴와 융합을 유도하는 과정으로서 700 -1,000V/cm와 20 ~ 50㎲sec조건이 적용된다[그림. 4].

그림 4에서 (A)는 교류장에 노출된 융합대상 세포들이 전기장력과 세포의 하전에 의해

[그림 4] 전기융합



이동되는 전기영동단계이며, 세포간의 밀착과 접착이 완료된 (B) 상태(Pearl chain)에 도달된 다음 직류로 바꾸고 고주파 펄스를 가하면 (C)와 같이 융합이 완료된다.

이 방법의 특징은 기존의 다른 기술이 갖고 있는 장점 외에 융합빈도가 높고, 융합조건의 수정과 변화가 쉬우며, 융합과정에서 세포내 물질의 손실을 최소화시켜 융합세포의 생존율이 높으면서 전과정을 현미경으로 관찰하면서 실시할 수 있는 장점이 있다[그림 5].

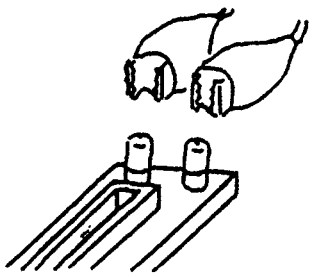
융합이 완료된 원형질체 세포는 효모와 곰팡이의 생리주기에서 나타나는 접합과 동일한 과정을 거쳐 융합세포를 형성한다. 즉, 일시적으로는 다핵상태를 나타내지만 원형질, 원형질내 기관과 핵물질의 교환과정을 거쳐 융합세포를 형성하게 된다. 그러나 전기융합은 아직까지 정밀한 장비의 보급이 늦고, 전기장에 배열된 세포사이에서만 융합이 이루어지므로 기존의 방법에서 형성되는 것과 같이 다핵융합체(Multinucleated cells)의 형성이 어렵다. 즉 전기융합은 주로 2핵융합체(Dinucleated cell)을 형성하게 된다. 그러나 2핵융합체는 생물공정에서 흔히 요구되는 생산균주의 개량목적으로 가장 적합한 기술이라 할 수 있다.

그림 5의 좌측은 현미경용 슬라이드에 설치된 융합공간, 전극 및 전극의 연결방식이고, 우측의 (A)는 교류장에서 형성된 Pearl chain 상태, (B)와 (C)는 접착된 융합대상 세포가 거품구조를 거쳐 융합되는 과정을 400배로 촬영한 Sac. cerevisiae의 원형질체 세포이다.

융합세포의 유전분석

원형질체 세포를 융합시킨 융합세포의 유전자는 동등한 비율로 교환이 이루어지지 않는다. 전기영동을 이용한 유전자 분석을 실시하는 경우 대부분은 융합대상 세포의 유전자들이 불특정한 비율로 섞여 있는 것을 알 수 있다. 특히 유전자의 혼합상태는 경우에 따라 다르지만 대부분 시간이 경과되면서 재편성이 된다. 즉, 융합세포의 유전적 안정성은 현재의 기술로는 조정이 불가능하며, 비교적 낮다. Saccharomyces cerevisiae의 동종융합과 Sac.

[그림 5] 전기융합과정



(A)

(B)

(C)

cerevisiae와 Shizosaccharomyces rouxii를 융합시키는 경우에 있어서도 Sac. cerevisiae의 빠른 성장속도와 Shi. rouxii의 내삼투압성을 동시에 나타내는 융합세포의 특성은 약 6개월 정도밖에 유지되지 않는다.

융합세포의 유전분석은 일반적으로 전기영동을 이용한다. 그러나 원핵미생물과 달리 유전학적인 분석수단의 개발이 늦은 진핵미생물은 유전자 분석에 제약이 있다. 현 단계에서는 RAPD-PCR방법을 이용하는 것이 가장 효과적이라고 평가된다. RAPD-PCR은 Random Amplified Polymorphic DNA법과 Polymerase Chain Reaction법을 결합시킨 비특이적인 유전분석방법으로서 이전의 RFLP(Restriction Fragment Length Polymorphism)방법에 비하여 과정이 간단하며, 방사성 동위원소를 사용하지 않는 등의 여러 가지 장점이 있다.

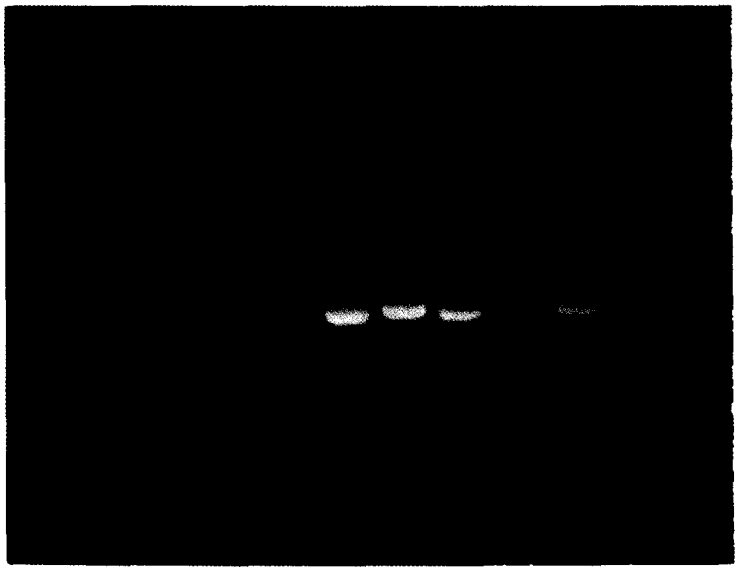
RAPD-PCR법은 합성한 RAPD용 Primer를 사용하며, 이들은 미생물, 식물은 물론 동물의 유전자도 결합이 가능하며, Genomic DNA를 주형으로 9-12bp의 작은 Primer로 DNA를 증폭시킨 것을 일반적인 전기영동방법으로 분석하는 기술이다[그림 6].

그림 6의 결과와 같이 RAPD-PCR방법으로 효모의 융합세포에서 융합대상세포 두 가지의 유전자가 모두 확인되는 것을 알 수 있다. 즉, 이 방법은 분석결과의 재현성에 상당한 문제가 지적되었음에도 불구하고 형질전환 식물체의 유전자 분석을 위해 개발되었으나 식물 외에 미생물과 동물에서도 클로닝 이전에 유전적인 확인실험 방법으로 활용가치가 대단히 높을 것으로 평가된다.

전기융합기술을 이용한 알콜발효의 초과생산기술

전기융합기술은 생물공학분야에서 주로 균주개량의 수단으로 이용하고 있다. 균주의 개량은 크게 계대배양을 통한 우량균주 선발, 돌연변이, 세포융합, 유전자 도입의 네 가지로 나누어지며, 이 중에서 세포융합법은 돌연변이법에 비하여 균주개량의 확률이 높고, 안전하며, 유전자 도입방법에 비하면 훨씬 적은 비용과 간편한 분석방법을 이용할 수 있다. 또한 접합, 형질도입, 형질전환은 유전자의 일부만이 전이되지만 융합은 전체 유전자가 전이되는 특징이 있다.

[그림 6] RAPD-PCR방법의 유전자 분석결과
(1열: 분자량 표지, 2열: Sac. cerevisiae, 3열: Schi. rouxii,
4, 6-8, 10-12열: 융합세포, 5, 9열: blank)



특히 유전물질의 교환기술이 완성되지 않았으나 산업적으로 활용가치가 높은 고등 세포에 적합한 개량방법으로 평가되고 있다. 즉, 현재 활용가치가 점차 증가하고 있는 효모, 곰팡이와 조류 등의 발효생리와 배양특성을 개선할 수 있는 고효율의 새로운 잡종세포를 만들 수 있다는 점이 장점이다.

전기융합기술의 응용은 결국 세균과 방선균 위주의 생물촉매개념을 활용가치가 더욱 증가하고 있는 효모, 곰팡이, 고등균류와 조류에 대한 가장 적극적이면서 실용가치가 높은 기술이라 할 수 있다. 즉, 고농도 기질과 생산물질에 대한 발효능력의 저하와 상대적으로 낮은 성장속도, 세포외 분비물과 균사형성에 따르는 대규모 탱크배양상의 여러 가지 단점을 극복할 수 있는 현실적인 균주개량 방법이라 할 수 있다. 특히 Xylose를 포함한 5탄당, 메탄올과 탄화수소와 같이 지금까지 발효성이 떨어지거나 없는 화합물과 특이적인 균주를 이용한 특수한 대사물질의 생산분야에 있어서 원형질체 세포의 전기융합기술은 상당한 기여를 할 것으로 예상된다.

한편, 효모의 알콜발효성은 염색체수와 관련이 있으므로 발효능력과 알콜에 대한 내성을 갖는 융합균주의 개발, 또한 생리활성이 알려진 무기물질인 아연, 셀레늄, 크로미움, 게르마늄같은 금속이온을 효모와 균류를 이용하여 생리활성 유기금속 물질을 생합성하는 분야에서 산업적인 활용가치가 높다. 이외에 필수아미노산의 조성을 조정한 새로운 개념의 균체를 이용하여 전혀 새로운 발효풍미를 생산하는 기술의 개발도 실용화가 기대되는 분야이다. 특히 전분의 알콜발효는 발효단계 이전에 전분의 겔화, 당화와 액화과정을 반드시 거치게 되어 있으나, Sac. diascus와 Sac. uvarum을 융합시킨 융합세포에서는 전처리과정 없이 발효가 가능하며, 이 때 필요한 효소의 사용량도 획기적으로 감소시킬 수 있다.

효모와 곰팡이의 원형질체 세포의 전기적 융합기술은 지금까지 진핵미생물 이용기술의

한계를 극복할 수 있는 새로운 돌파구를 제공할 수 있다. 또한 아직 활용하지 않고 있는 새로운 균주들을 대상으로 융합을 통해 기존의 균주가 갖고 있는 여러 가지 한계에 대한 해답을 마련해 줄 것으로 기대한다.

참고문헌

도 서

Fowke, L. C. 1985. Plant Protoplasts, CRC Press, Boca Raton.

Gleva, Y. Y. & Sytnik, K. M. 1984. Protoplast Fusion, Springer-Verlag, Berlin.

Pilet, Paul-Emile, 1985. The Physiological Properties of Plant Protoplasts, Springer-Verlad, Berlin.

Peberdy, J.F. & Ferenczy, L. eds. 1985. Fungal Protoplasts: Applications in Biochemistry and Genetics, Marcel Dekker, New York.

Ringertz, N. R. & Savage, R. E. 1976. Cell hybrids, Academic Press, New York.

Peberdy, J.F., Rose, A.H., Rogers, H.J. & Cocking, E.C. eds. 1976. Microbial and Plant Protoplasts, Academic Press, London.

학위논문

Curran, B.P. 1984. Protoplast Fusion in yeast, Ph.D. Thesis, University of Dublin, Ireland.

이종수. 1988. 고온발효성 효모와 내삼투압성 효모의 세포융합에 의한 균주육성, 충남대학교 대학원 박사학위논문.

방광웅. 1989. 원형질체 융합에 의한 killer효모 균주의 육성, 경북대학교 대학원 박사학위논문.

박인성. 1999. 효모균주의 개량을 위한 protoplast 형성과 electrofusion에 관한 연구, 우석대학교, 공학석사 학위논문.

김 승. 2000. 전기융합시킨 효모융합세포의 유전자분석과 안정성에 관한 연구, 우석대학교, 공학석사 학위논문.

논문

정호권, 서원택, 구교임. 세포융합에 의한 양조효모의 개량. HG. J. Gen. Eng. 1984, 1, 37

구영조, 박완수, 신동화, 유태종. Snail lytic enzyme에 의한 전분이용성 효모 및 S. cerevisiae의 원형질체 형성. 한국산업미생물학회지 1985, 13(2), 137.

서정훈, 김영호, 전도현, 이종태. Amylase 분비효모와 alcohol발효효모의 세포융합에 의한 균주개발(제 1보). 한국미생물학회지 1986, 14(4), 305

서정훈, 김영호, 전도현, 이종우. Amylase 분비효모와 alcohol발효효모의 세포융합에 의한 균주개발(제 2보). 한국미생물학회지 1986, 14(4), 311

Anderson, F.B. & Millbank, J.W. Protoplast formation and yeast cell wall structure. Biochem. J. 1966, 99, 682-687.

Ahkong, Q.F., Fisher, D., Tampion, W. & Lucy, J.A. A mechanisms of cell fusion. Nature 1975, 253, 194-195.

Brigi야, P., Matteuzzi, D. & Fava, F. Use of protoplast fusion to introduce methionine oveerproduction into Saccharomyces cerevisiae. Appl. Microbiol. Biotechnol., 1988, 28, 268-271.

Dowhanick, T.M., Panchal, C.J. & Stewart, G.G. Effects of pretreatments with sulphydryls and alkylating agents on spheroplast formation from Schwanniomyces species. Can. J. Microbiol., 1984, 30, 368-374.

Eddy, A.A. & Williamson, D.H. A method of isolating protoplasts from yeasts. Nature 1957. 179, 1252-1253.

Farabaak, F., Seki, T., Ryu, D.D.R. & Ogrydziak, D. Construction of lactose assimilating and high ethanol producing yeasts by protopplast fusion. Appl. Environ. Microbiol., 1986, 51, 362-367.

Ferenczy, L. & Maraz, A. Transfer of mitochondria by protoplast fusion in Saccharomyces cerevisiae. Nature 1977, 253, 46-47.

Fournier, P., Provost, A., Bourguignon, C. & Heslot, H. Recombination after protoplast fusion in the yeast Candida tropicalis. Arch. Microbiol., 1977, 115, 143-149.

Guphar, A.S. Construction of a series of Pichia stipitis strains with increased DNA contents. Curr. Genet., 1987, 12, 605-610.

Hamlyn, P.F. et al. Efficient protoplast isolation from fungi using commercial enzymes. Enzyme Microbiol. Technol. 1981, 3, 321-323.

Halfmann, H.J., Emeis, C.C. & Zimmermann, U. Electro-fusion and genetic analysis of fusion products of haploid and polyploid Saccharomyces yeast cells. FEMS Microbiol. Lett., 1993, 20, 13-16.

Kao, K.N. & Michayluk, M.R. A method for high frequency intergeneric fusion of plant protoplasts. Planta 1974, 115, 355-367.

Kavanagh, K. & Whittaker, P.A. Formation of spheroplasts and protoplasts in the xylose-fermenting yeast Parchysolen tampophilus. Biotech. Appl. Biochem., 1990, 12, 57-62.

Kavanagh, K., Walsh. M. & Whittaker, P.A. Enhanced intraspecific protoplast fusion in yeast. FEMS Microbiol. Lett., 1991, 31, 283-286.

Kavanagh, K. & Whittaker, P.A. Effect of buffer viscosity on the rate of protoplast formation in yeasts. Biomed. Lett., 1993, 5, 313-316.

Klinner, U. & Bottcher, F. Chromosomal rearrangements after protoplast fusion in the yeast Candida maltosa. Curr. Genet., 1985, 9, 619-621.

Law, C., Kavanagh, K. and Whittaker, P.A. Analysis of hybrids of Candida albicans formed by protoplast fusion. FEMS Microbiol. Lett., 1994, 115, 77-82.

Maraz, A. & Ferenczy, L. Selective transfer of fungal cytoplasmic genetic elements by protoplast fusion. Curr. Microbiol., 1980, 4, 343-345.

Necas, O. Regeneration of yeast cells from naked protoplasts. Nature 1956. 177, 898-899.

Necas, O. Physical conditions as important factors for the regeneration of naked yeast protoplasts. Nature 1961, 184, 1664-1665.

Necas, O. Cell wall synthesis in yeast protoplasts, Bacteriol. Rev., 1971, 35, 149-170.

Ogawa, K., Toyama, H. & Toyama, N. Degradation of fungal cell walls and protoplast formation by mycolytic enzyme produced by Trichoderma viride. Bull. Far. Agri., Miyazaki Univ., 1979, 26, 387-398.

Perez, C., Vailm, C. & Benitez, J. Hybridisation of Saccharomyces cerevisiae with Candida utilis through protoplast fusion. Curr. Genet., 1985, 9, 623-625.

Pina, C., Calderon, I.L. & Benitez, T. Intergeneric hybrids of Saccharomyces cerevisiae and Zygosaccharomyces fermentati obtained by protoplast fusion. Appl. Environ. Microbiol., 1986, 51, 995-1003.

Puite, K.J., van Wiksealer, P. & Verhoeven, H. Electrofusion, a simple and reproducible

technique in somatic hybridisation of Nicotiana plambagimfolia mutants. Plant Cell Rep., 1985, 4, 274-276.

Russell, I., Crumplen, C.M., Jones, R.M. & Stewart, G.G. Efficiency of genetically engineered yeast in the production of ethanol from dextranised cassava starch. Biotech. Lett., 1986, 8, 169-174.

Senda, M., Takeda, J., Abe, S. & Nakamura, T. Induction of cell fusion of plant protoplasts by electrical stimulation. Plant Cell Physiol., 1979, 20, 1441-1443.

Schnetter, R., Zimmermann, U. & Emeis, C.C. Large scale production of yeast hybrids by electrofusion. FEMS Microbiol. Lett., 1984, 24, 81-85.

Skala, J., Luty, J. & Kotylak, Z. Interspecific protoplast fusion between the yeasts Saccharomyces cerevisiae and Saccharomyces fermentati. Curr. Genet., 1988, 13, 101-104.

Svoboda, A. & Piedra, D. Reversion of yeast protoplasts in media containing polyethylene glycol. J. Gen. Microbiol., 1983, 129, 3371-3377.

Svoboda, A. & Necas, O. Regeneration of yeast protoplasts prepared by snail enzyme. Nature 1966, 210, 169-175.

Van Solingen, P. & Van der Plaat, J. Fusion of yeast spheroplasts. J. Bacteriol., 1977, 265, 257-258.

Villanuev, J.R. & Garcia-Acha, I. Production and use of fungal protoplasts, In: Methods in Microbiology, vol. 4(Booth, C., ed.), Academic Press, New York, 1971. 665-718.

Zimmermann, U. & Scheurich, P. High frequency fusion of plant protoplasts by electric fields. Planta 1981, 151, 26-32.

Losers spend time explaining why they lost. Losers spend their lives thinking about what thery're going to do. They rarely enjoy doing what they're doing.

패자는 그들이 왜 패했는지를 설명하느라 시간을 보내고, 무엇을 할 것인가를 생각하느라고 인생을 허비한다. 그들은 현재하고 있는 일을 즐기는 법이 거의 없다.

- Dr.Eric Berne -