

포도주용 Killer Yeast의 개발

최언호 · 정은영 · 정원철

서울여자대학 식품과학과

Construction of Killer Yeasts by Spheroplast Fusion

Eon-Ho Choi, Eun-Young Chung and Won-Chul Chung

Department of Food Science, Seoul Woman's University, Seoul, Korea

Abstract

This study was performed to construct killer wine yeasts which might suppress the growth of wild yeasts, reduce the consumption of starter and condense the fermentation period. *Saccharomyces cerevisiae* M524, a commercial wine yeast, was treated with N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine to induce auxotrophic mutants, i.e., CHM 2(thr⁻), CHM 3(asp⁻) and CHM 6(tyr⁻). These auxotrophs were fused successfully with a killer yeast, *S. cerevisiae* 1368R(α his 4 kar 1-1(kil-k) (k_0), respiratory deficient) using spheroplast techniques and the fusants were designated as CHF 21(thr⁻ kil⁺), CHF 22(thr⁻ kil⁺), CHF 31(asp⁻ kil⁺) and CHF 61(tyr⁻ kil⁺). Combined cultivation of CHF 31 with 1368R or *S. cerevisiae* 5 \times 47 (killer sensitive) proved out that CHF 31 had the characteristic of killing and produced the same amount of ethanol as the prototroph, M524.

서 론

Killer system은 진핵 세포에서 널리 알려진 현상중의 하나로 *Saccharomyces cerevisiae*의 killer system에 관한 연구는 1960년대 초 Makower와 Bevan에 의해 시작되었다.¹⁾ *Saccharomyces cerevisiae* killer가 갖는 특색은 killer의 독성물질 분비능과 이물질에 대한 저항성을 함께 지닌 것으로 이것은 Mendel의 유전 법칙에 따르지 않고 세포질에 있는 double stranded RNA에 의하여 전달된다.²⁾ *Saccharomyces cerevisiae*는 killer 작용과 저항성 여부에 따라 그 표현형을 killer(K⁺R⁺), neutral(K⁻R⁺), sensitive(K⁻R⁻)로 구분하고 killer 균주를 그들의 교차반응에 근거하여 4군(K₁-K₄)으로 분류하는데 그중 K₁이 가장 강한 독성을 나

타낸다.³⁾ K₁은 22°C 이내에서만 안정하고, pH 4.2~4.6에서 독성을 나타내며 11,470 dalton의 분자량을 갖는 단백질로서 활성형이 monomeric인 109개의 아미노산 잔기를 갖는 single polypeptide로 되어 있다.⁴⁾ 이러한 독성 단백질이 세포의 원형질막에 결합되면 K⁺ion과 ATP를 누출하고 proton gradient에 영향을 주어 세포의 생육을 저해한다.⁵⁾

이런 killer mechanism을 갖는 야생 효모의 killer를 공업적으로 실제 사용하는 포도주 발효 효모에 도입시키면, 이 효모는 야생의 killer 효모에 의해 죽지 않고 오히려 killer 작용이 약한 다른 야생 효모의 생육을 억제하므로, starter의 사용량을 절감시키고, 발효 기간을 단축시키는 효과적인 발효 공정을 기대할 수 있을 것이다. 그런데, 공업적으로 사용하는 포도주 효모는 mating hybridization에 적합하지 않은 diploid 또는 polyloid이고, nuclear hybridization은 포도주 효모의 중요 특성을 유지하는데 결합이 있으므로 야생 효모에 있는 killer plasmid를 포도주 효모에 도입시키는 방법

1987년 12월 13일 수리

Corresponding author: E.H. Choi

이 논문은 1986년도 문교부 학술연구조성비에 의하여 연구되었음.

으로는 세포융합법⁶⁾이 좋은 것으로 알려졌다.

세포융합을 확인하기 위해서는 먼저 포도주 효모를 항생물질에 대한 저항성 또는 영양요구성 균주(auxotroph)⁷⁾로 변이시켜 세포융합의 표식으로 이용하여야 한다.

본 연구에서는 실제 포도주 제조에 사용되는 *S. cerevisiae* 524를 N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine을 사용하여 아미노산 요구 변이주로 만들었고, 이를 killer 작용이 강한 *S. cerevisiae* 1368R 효모와 융합시켜 새로운 균주를 얻었으며 아울러 이 균주의 alcohol 생성능과 killer 작용을 조사하였기에 그 결과를 보고한다.

재료 및 방법

균 주

본 연구에 사용한 균주로 포도주 발효효모인 *Saccharomyces cerevisiae* M524는 H산업(주) 연구소로부터, killer 효모인 *S. cerevisiae* 1368R(α his 4 kar 1-1[kil-k][k_o], respiratory deficient)과 *S. cerevisiae* 5×47(prototroph, diploid, killer sensitive)은 University of California-Davis의 Dewey Ryu 교수 연구실로부터 분양 받은 것으로 본 연구실에서 YPD(1,000ml 수용액중 yeast extract 10g, peptone 20g, dextrose 20g, agar 20g) 배지에 계대 배양하여 사용하였다.

균주의 변이 유발

Saccharomyces cerevisiae M524 균주를 30ml의 YPD 액체 배지에 접종하여 하룻밤 진탕배양(30°C)하고, 이 액 0.5ml을 새 YPD 액체 배지 30ml에 다시 배양하였다. 중간 대수기(5×10^8 cell/ml)의 현탁액 10ml를 취하여 원심분리(5,000×g, 5분)하고 침전에 10ml의 tris-maleic acid 완충액(pH 6.0)을 가하여 2회 세척, 원심분리하였다. 침전에 다시 0.05M tris-maleic acid 완충액(pH 7.8) 10ml와 돌연변이 유기제인 MNTG(N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine)⁸⁾ 200 μ g을 가하여 37°C에서 10분간 진탕(30 rev/min) 시킨 후, 원심분리하여 침전을 10ml의 M56⁹⁾ 용액으로 세척하고, 10ml의 M56 용액으로 다시 현탁시켰다. 이 현탁액(mutagenized culture) 1ml에 MM¹⁰⁾을 9ml 넣어 희석하고 30°C에서 2일 동안 진탕시켰다. 이중 1ml을 취하여 멸균수로 2회 세척 원심분리하고, MM 1ml

에 현탁시켜서 다시 30°C에서 하루 진탕시켰다. 이 액을 다시 원심분리하여 침전에 MM 0.9ml를 가하고, 30°C에서 6시간 진탕하였다.⁹⁾ 여기에 nystation 용액(100 μ g/ml)을 0.1ml 가하고 1시간 배양한 후에 2회 원심분리, 세척하고 침전에 MM을 1ml 가하여 nystatin 처리를 반복하였다.^{10,11,12)} 이 현탁액을 적절히 희석하여 YPO 한천 평판 배지에 spreading 하고, 30°C에서 2일 동안 배양하였다. YPD 평판배지에 생육된 colony는 tooth picking¹³⁾으로 새로운 YPD 평판배지에 이식하고 하룻밤 배양한 뒤 velvet-replica-plating 방법으로 YPD 평판배지와 SD¹⁴⁾ 평판배지에 이식하였다. YPD 평판배지에서 자라고 SD 평판배지에서 자라지 않는 colony를 순수분리하여 아미노산 영양요구성 변이주(auxotroph)로 가정하고 계대 보관하였다.

YPD 배지에서 생육하고 SD 배지에서 생육하지 않는 앞의 순수분리된 영양요구성 변이주를 표 1과 같은 아미노산을 조합¹⁵⁾하여 첨가한 SD 평판배지에 이식하여 배양하였다. 9개의 아미노산 조합중 생육된 colony를 선별하여 영양요구 물질을 확인하였다.

원형질체 융합

Arima, Takano 등¹⁴⁾의 방법에 준하여 *S. cerevisiae* M524 변이주와 killer 효모인 1368R 균주를 각각 대수기 후기까지 배양시킨 후 2회 원심분리 세척하였다. 이 균체를 4ml의 zymolase 용액을 가하여 30°C에서 2~3시간 처리하여 원형질체 형성을 현미경으로 확인한 후 원심분리하고 0.6M KCl로 세척하였다. 각각의 침전에 0.6M KCl 4ml를 가하여 현탁시키고 섞어서 원심분리한 다음 20% PEG-CaCl₂ 용액 8ml를 가하여 실온에서 30분 방치하였다. 이것을 원심분리하고 침전에 0.6M KCl로서 현탁시킨 후 이 현탁액을 희석하여 45°C로 녹인 YPD, SD배지에 넣고 petri dish에 부어 30°C에서 4~7일 배양하여 세포벽을 재생시킨 다음 SD배지에서는 생육하지 않으나 YPD 배지에서는 생육하는 colony를 선별하여 MB배지에서 killer 활성을 보이는 균주를 융합체로 선택하여 보관하고 그 융합빈도를 계산하였다.

전기영동에 의한 killer plasmid 확인

각각의 균주를 30°C에서 대수기 후기까지 배양한 다음 0.05M EDTA(pH 7.0) 용액으로 세척한

후 2.5% 2-mercaptoethanol-0.05M tris-H₂SO₄(pH 9.3) 용액으로 1시간 전처리하고 원심분리 하였다 여기에 zymolase 용액(100µg/ml)을 가하여 원형 질체를 만들고 1% sodium dodecyl sulfate 용액 (0.1M NaCl-0.01M tris-HCl-0.01M Na₂EDTA) 으로 용균시킨 다음 동량의 재증류 phenol을 가하여 37°C에서 2시간 처리한 후 1500rpm에서 5분간 원심분리하였다. 상등액에 2배량의 95% ethanol을 가하고 -20°C에서 하루밤 방치한 후 원심분리 하고 2M LiCl-0.15M NaCl-0.015M Na₃ Citrate 용액에 용해시킨 다음 4°C에서 8시간 이상 정온시킨 후 원심분리하여 상등액에 2배량의 ethanol을 가하여 원심분리하고 그 침전을 40µl의 TES buffer (30mM tris-HCl-10mM NaCl-5mM Na₂EDTA)에 용해시키고 10µl의 gel loading buffer(0.25% bromophenol blue-0.25% xylene cyanol-40% sucrose, pH 8.0)를 넣고 0.7% agarose gel에서 전기영동을 실시하였다. 전기영동이 끝난 gel은 0.5µg/ml ethidium bromide 용액에서 15분 염색시킨 후 물로 15분 탈색시키고 260nm UV illuminator로 plasmid를 확인하였다.^{15,16)}

융합균주의 ethanol 발효시험과 발효액의 분석

융합균의 ethanol 발효능력과 killer 능력을 조사하기 위하여 200ml의 FM 배지(1000ml 수용액 중 yeast extract 10g, peptone 5g, KH₂PO₄ 1g, Mg-SO₄·7H₂O 1g, NH₄H₂PO₄ 12g, glucose 200g, pH 5.6)에 변이주와 융합체를 10⁶ cells/ml 되도록 접종하고 이 접종량의 5%에 해당하는 *S. cerevisiae* 1368R 및 *S. cerevisiae* 5X47을 각각 접종한 다음 4일 동안 30°C에서 정치배양 하면서 pH, 적정산도, 증식속도, 잔당함량,¹⁷⁾ ethanol 함량 및 생균수를 측정하였다.

결과 및 고찰

영양요구성 변이주의 분리

돌연변이 유기제(mutagen)로서는 EMS(ethylmethane sulfonate), diethylsulfate, MNTG(N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine) 등이 있는데 그 중 EMS를 Prakash¹⁸⁾ 등의 방법에 따라 50µ/ml 농도로 균주에 처리하였지만 변이가 유발되지 않았다. 그리하여 변이율을 강화시키는 변이주의 농축 방법으로 MNTG 처리 후에 nystatin¹⁹⁾을 첨가하였다. MM 액체 배지에서 배양할 때 변이주(auxotroph)는 증식되지 않고, 모균주만 증식되므로 첨가한 nystatin이 생성중인 모균주 세포막의 sterol과 선택적으로 결합 세포벽 합성을 억제하여 세포를 분해시키므로 상대적으로 변이주의 농도가 높아지게 된다.¹¹⁾ 실제 MNTG 처리 후에 nystatin으로 처리하면 변이율이 8~46%로 증가하였다고 보고되고 있다.²⁰⁾

MNTG와 nystatin을 처리한 모균주 현탁액을 YPD 완전배지와 아미노산이 전혀 함유되지 않은 SD 최소배지에 spreading 한 바, YPD 배지에서 생성된 264개의 colony 중 7개가 SD 배지에서 성장하지 않아 이들을 아미노산 영양요구주로 보았을 때, 2.65%의 변이율을 나타냈다. 이들 변이주는 순수분리하여 각각 CHM1-CHM7이라 명명하였다. 각 변이주의 colony 형태를 보면 CHM1, CHM4, CHM5는 유백색이고, CHM2는 유백색으로 약간 표면이 우툴두툴하였으며, CHM3는 표면에 약간 적색을 띤 유백색이고, CHM6, CHM7은 분홍색의 매끈한 형태를 나타내었다.

CHM1-CHM7의 영양요구성 물질을 알기 위하여 이들을 표 1과 같은 아미노산을 조합한 배지에 이식한 바 표 2와 같은 반응을 나타내었다. Reaume과 Tatum이 *S. cerevisiae*의 adenine 영양요구주로 적색과 분홍색의 균주를 얻었다는 보고²¹⁾가 있

Table 1. Composition of amino acid pool

| | # 1 | # 2 | # 3 | # 4 | # 5 |
|-----|---------------|----------------|------------|---------------|-----------|
| # 6 | glycine | asparagine | cysteine | methionine | glutamine |
| # 7 | histidine | leucine | isoleucine | valine | lysine |
| # 8 | phenylalanine | tyrosine | tryptophan | threonine | proline |
| # 9 | glutamic acid | adenin(serine) | alanine | aspartic acid | arginine |

Table 2. Growth pattern of isolated auxotrophic mutants of *S. cerevisiae* on minimal medium containing pools of various amino acids

| Auxotrophs | No of amino acid pool | | | | | | | | |
|------------|-----------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
| CHM 1 | + | - | - | + | - | + | - | + | - |
| CHM 2 | - | - | - | + | - | - | - | + | + |
| CHM 3 | - | - | - | - | - | - | - | - | + |
| CHM 4 | - | + | - | + | - | - | - | + | + |
| CHM 5 | + | - | - | - | - | - | - | - | - |
| CHM 6 | - | + | - | - | - | - | - | - | - |
| CHM 7 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

Table 3. Confirmation of isolated auxotrophic mutants of *S. cerevisiae*

| Auxotrophs | Combination of amino acids | Growth or not |
|------------|--|---------------|
| CHM 2 | Tyrosine+Threonine+Adenine | + |
| | Tyrosine+Adenine+Aspartic acid | + |
| | Tyrosine+Threonine+Aspartic acid | + |
| | Threonine+Adenine+Aspartic acid | + |
| CHM 3 | Glutamic acid+Adenine+Alanine+Aspartic acid | + |
| | Adenine+Alanine+Aspartic acid+Arginine | + |
| | Glutamic acid+Alanine+Aspartic acid+Arginine | + |
| | Glutamic acid+Adenine+Aspartic acid+Arginine | + |
| CHM 6 | Glutamic acid+Arginine+Alanine+Adenine | - |
| | Asparagine+Leucine+Tyrosine | + |
| | Asparagine+Leucine+Adenine | - |
| | Asparagine+Tyrosine+Adenine | + |
| | Leucine+Tyrosine+Adenine | + |

였기에 표 1의 아미노산 pool 조성에서 serine 대신에 염기인 adenine에 대해서도 조사하였다.

2회에 걸친 아미노산 pool 반응에서 안정한 CHM 2, CHM3, CHM6을 선택하여 각각의 아미노산 반응을 조사한 결과는 표 3와 같다. 표 3의 결과로서 각 변이주의 표현형은 CHM2가 thr⁻, CHM3가 sap⁻, CHM6가 tyr⁻임을 확인하였다. CHM2의 경우 No. 4의 pool과 No. 9의 교차 아미노산인 aspartic acid에서도 +반응을 보였는데, 표 3의 결과를 보면 threonine, aspartic acid는 같은 아미노산 합성 대사 계열로서 threonine이 aspartic acid에 앞서기 때문²²⁾에 thr⁻ 변이주로 결론지었다.

증식속도

효모의 원형질체(protoplast) 형성은 대수기에 효

율적이고, 대수기에서 정지기로 진행될수록 원형질체 형성에 대한 저항성이 급격하게 증가되는때다가 두 원형질체 융합은 대수기 후반에 잘 이루어지기 때문²³⁾에 융합에 앞서 포도주 효모 변이주인 CHM2, CHM3, CHM6과 killer 효모인 1368R의 생육속도를 조사한바 원형질체 융합시 적절한 최적 배양시간은 각각 21, 19, 19, 16시간으로 판단되었다.

융합의 빈도와 명명

*Saccharomyces cerevisiae*의 변이주인 CHM2, CHM3, CHM6과 killer 효모 1368R 사이에서 표 4과 같이 4개의 융합주(fusant)를 얻었으며 빈도는 CHM2가 6×10^{-9} , CHM3가 4×10^{-9} , CHM6가 1×10^{-9} 로 나타났다. 이들 융합주를 killer sensitive

Table 4. Screen and confirmation of fusants between amino auxotrophs had a killer 1368R.

| Type of colonies | Growth on | | | | | MB | Number of Colony |
|---|-----------|--------|--------|--------|--------|----|------------------|
| | SD | SD+his | SD+thr | SD+asp | SD+tyr | | |
| Parent | | | | | | | |
| M2 Thr ⁻ Kil ⁻ | | | + | | | | 102 |
| 1368R His ⁻ Kil ⁺ | | + | | | | + | 1 |
| Cytoductant | | | | | | | |
| M2 Thr ⁻ Kil ⁺ | | | + | | | + | 2 |
| Hybrid | | | | | | | |
| M2+1368R Thr ⁺ His ⁺ Kil ⁺ | + | + | + | | | + | 4 |
| Parent | | | | | | | |
| M3 Asp ⁻ Kil ⁻ | | | | + | | | 68 |
| 1368R His ⁻ Kil ⁺ | | + | | | | + | 1 |
| Cytoductant | | | | | | | |
| M3 Asp ⁻ Kil ⁺ | | | | + | | + | 1 |
| Hybrid | | | | | | | |
| M3+1368R Asp ⁺ His ⁺ Kil ⁺ | + | + | | + | | + | 2 |
| Parent | | | | | | | |
| M6 Tyr ⁻ Kil ⁻ | | | | | + | | 83 |
| 1368R His ⁻ Kil ⁺ | | + | | | | + | 24 |
| Cytoductant | | | | | | | |
| M6 Tyr ⁻ Kil ⁺ | | | | | + | + | 1 |
| Hybrid | | | | | | | |
| M6+1368R Tyr ⁺ His ⁺ Kil ⁺ | + | + | | | + | + | 0 |

효모인 5×47과 함께 MB 한천 평판배지에서 배양한 바 killing 작용을 보이는 inhibitory zone을 나타냈다. 이렇게 하여 확인된 융합주를 각각 CHF 21(thr⁻, kil⁺), CHF22(thr⁻, kil⁺), CHF31(asp⁻, kil⁺), CHF61(tyr⁻, kil⁺)로 명명하였다. 이들 융합주중 Woods와 Bevan의 방법에²⁴⁾ 따라 inhibitory zone이 크고 뚜렷한 CHF31을 선택하여 ethanol 발효 실험에 사용하였다.

융합주 CHF31의 killer 효모에 대한 저항성과 killing 작용

융합주인 CHF31의 저항성을 보기 위하여 CHF31에 1368 R. killing 작용을 보기 위하여 CHF31에 5×47을 혼합, 진탕배양하고 배양중 생균수를 측정 한 바 그림 1, 2과 같은 결과를 얻었다.

그림 1를 보면 CHF31+1368R의 혼합 배양구가 CHM+1368R의 혼합 배양구보다 많은 생균수를 보였는데 이는 CHM3가 killer 효모인 1368R에 의하여 생육이 저해 받았는데 반하여, CHF31은

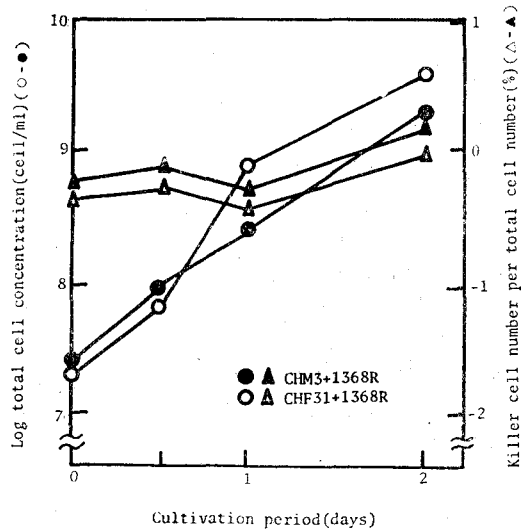


Fig. 1. Total cell number and fraction of killer in mixed cultures of *S. cerevisiae* strains

1368R에 저항성을 갖고 있어서 상대적으로 생균수가 많았다고 생각된다. 이는 생균수 측정에서

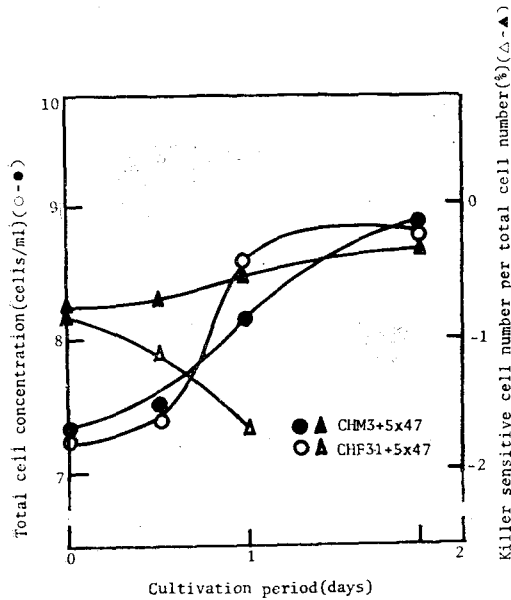


Fig. 2. Total cell number and fraction of killer sensitive in mixed cultures of *S. cerevisiae* strains

1368R/(CHF31+1368R)의 비보다 1368R/(CHM3+1368R)의 비가 높은 것을 보면 입증된다.

그림 2과 같이 CHM3+5x47 혼합 배양구에서는 5x47의 생균수가 배양 2일 후에 30%로 증가하여 오히려 CHM3가 저해를 받았으나, CHF31+5x47 혼합 배양구에서는 5x47의 비율이 현저하게 떨어져, 배양 하루만에 0.5%의 감소를 보였다는 5x47 균주가 CHF31이 분비한 toxin에 의하여 치사되었기 때문으로 본다.

이러한 결과는 5x47이 융합주인 CH123과의 혼합 배양으로 생육이 현저하게 억제되어 배양 후 36시간에는 5x47이 검출되지 않았다는 Tetsuji 등²⁵⁾의 보고와 일치하고 있다.

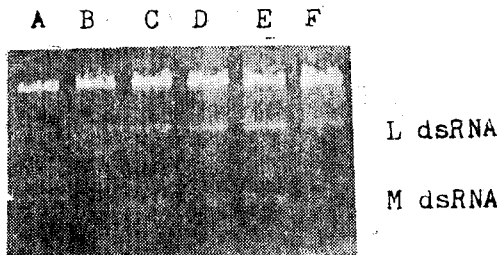


Fig. 3. Electrophoresis of yeast plasmid
 lane A : *S. cerevisiae* 1368
 lane B-E : Fusant CHF21, CHF22, CHF31, CHF61
 lane F : *S. cerevisiae* 524

killer plasmid의 확인

모균주인 *S. cerevisiae* 524와 *S. cerevisiae* 1368과 융합주인 CHF21, CHF22, CHF31 및 CHF61의 전기영동 결과는 Fig. 3과 같다. *S. cerevisiae* 524(lane A)는 L ds RNA band 만이 나타났으며 *S. cerevisiae* 1368 및 융합체(lane B-F)들은 L ds RNA와 M ds RNA band가 모두 나타나 세포융합을 통하여 *S. cerevisiae* 1368의 M ds RNA가 융합체에 도입되었다는 것을 확인하였다. 또한 non-killer 균주인 *S. cerevisiae* 524가 L ds RNA band만 나타낸 것은 *S. cerevisiae*의 killer activity가 M ds RNA에 coding되어 있다는 기존의 보고들과 일치하였다.^{26,27)}

융합주 CHF31의 ethanol 생성

융합주인 CHF31이 killer 효모인 1368R에 대해 저항성을 갖고, 5x47에 대한 killing 능력이 있다고 확인되었기에 실제 FM 배지에서 발효시험을 수행하고 ethanol 생성능을 조사하였다. 즉 CHF31 배양액에 오염균으로 killing 작용이 있는 1368R과 killing sensitive 균주인 5x47을 접종하여 4일 동

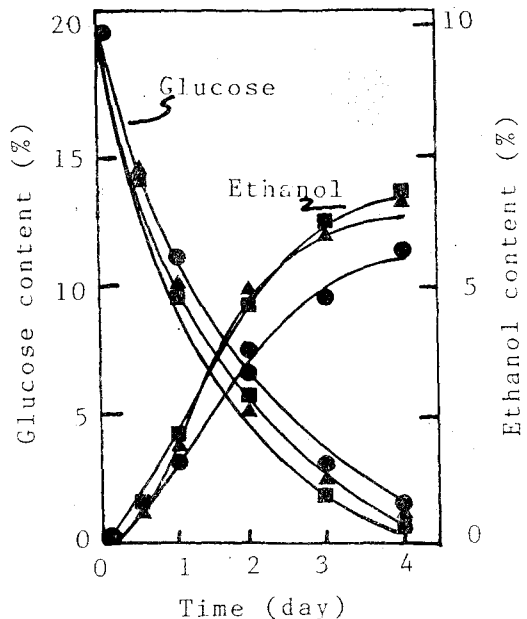


Fig. 4. Glucose consumption and ethanol production of a fusant during mixed culture with a contaminant

- : CHM3+1368R
- ▲— : CHM3+5x47
- : CHF31+5x47

안 혼합 배양하여 잔당과 ethanol 함량을 정량한 바 그림 4과 같이 CHF31 융합주가 CHM3에 비하여 발효력이 높게 나타나, 배양 4일 후에 CHF31+5×47 혼합 배양에서는 ethanol 함량이 7.2% CHM3+1368R 혼합 배양에서는 6.4%을 보였다. 이로써 CHF31 융합주는 ethanol 생성능이 모균주와 비슷한 균주임이 확인되었다.

초 록

본 연구는 효모의 killer toxin을 포도주 발효효모에 도입시켜 발효중 다른 야생효모의 생육을 억제함으로써 starter를 절감하고 발효기간을 단축시키는 보다 효율적인 발효균주를 개발하기 위하여 수행되었다. 포도주 효모 *Saccharomyces cerevisiae* M524 균주에 N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine을 처리하여 3종의 영양요구 변이주 CHM2(thr⁻), CHM3(asp⁻), CHM6(tyr⁻)를 만들었고, 이 변이주 각각을 killer 효모인 *S. cerevisiae* 1368R (α his 4 kar 1-1[kil-K]₁[K₀], respiratory deficient)과 세포융합시켜 4종의 융합주 CHF21(thr⁻ kil⁺) CHF22(thr⁻ kil⁺) CHF31(asp⁻ kil⁺) CHF61(tyr⁻ kil⁺)을 만들었다. 이중 CHF31 융합주를 killer 효모 1368R과 killer 감수성 효모 *S. cerevisiae* 5×47에 각각 혼합 배양한 바 CHF31이 killer로서의 특성과 모균주에 못지 않은 ethanol 생성능을 지녔음이 확인되었다.

참 고 문 헌

1. Bevan, E.A. and Makower, M.: Pro. Int. Cong. 11th., 1, 203(1963)
2. Tipper, D.J. and Bostian, K.A.: Microbiol. Reviews., 48, 125(1984)
3. Bevan, E.A. and Rogers, J.E.: J. General Microbiol., 105, 199(1978)
4. Spencer, J.F.T.: Yeast Genetics., Springer-Verlag, New York, 389(1983)
5. Spencer, J.F.T.: Yeast Yeast Genetics., Springer-Verlag, New York, 437(1983)
6. Solingen, P.V.: J. Bacteriol., 130, 946(1977)

7. Sherman, F. and Fink, G.R. and Hicks, J.B.: Methods in Yeast Genetics., CSH(1982)
8. Carderon, I.L.: Mutation Res., 108(1-3), 133(1983)
9. Tabor, H. and Tabor, C.W.: Method in Enzymology., 17, 59(1970)
10. Moat, A.G. and Peters Norman.: J. Bacteriol., 77, 637(1953)
11. Lampen, J.O. and Marow, P.: J. Bacteriol., 84, 1152(1962)
12. Mortimer, R.K. and Strömnaes östein.: J. Bacteriol., 95(1), 197(1968)
13. Gerhardt and Murray and Costilow.: Manual of Methods for Gen. Bacteriol., 233(1981)
14. Arima, K. and Takano, I.: Genetics, 93, 1(1979)
15. Gunge, N., and Tamaru, A.: J. Bact., 145, 382~386(1981)
16. Fried, H., and Fink, G.R.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 75, 4224~4228(1978)
17. Miller, G.L.: Anal. Chem., 31, 426(1959)
18. Prakash, L. and Sherman, F.: J. Mol. Biol., 79, 65(1973)
19. Anthony, H.R. and Harrison, J.S.: The Yeasts., 1, 393(1969)
20. Gerhardt, Murray and Costilow.: Manual of Methods for Gen. Bacteriol., 234(1981)
21. Stanier, R.Y. and Adelberg, E.: The Microbial World., 4, 205(1976)
22. Prescott, D.M.: Methods in Cell Biol., 11, 171(1975)
23. Woods, D.R. and Bevan, E.A.: J. Gen. Microbiol. 51, 115(1968)
24. 유진영, 석호문, 신동철, 민병용: Kor. J. Appl. Microbiol, Bieong., 12(3), 185(1984)
25. Tetsuji Seki and Choi, E.H. and Ryu, D.: Appl. Environ. Microbiol., 49(5), 1211(1985)
26. Somers, J.M., and Bevan, E.A.: Genet. Res. 13, 71~83(1969)
27. Bevan, E.A., Herring, A.J., and Mitchell, D.J.: Natuer(London) 245, 81~86(1973)