

고온내성 에탄올 생산 효모균주의 개발을 위한 *Saccharomyces*와 *Kluyveromyces*의 원형질체 융합

김민수¹ · 김 근*

수원대학교 유전공학과, ¹서울대학교 농업생물신소재 연구센터

Protoplast Fusion of *Saccharomyces* and *Kluyveromyces* to Develop Thermotolerant Ethanol-Producing Yeast Strains. Kim, Min-Soo¹ and Keun Kim*. Department of Genetic Engineering, The University of Suwon, Suwon, 445-743, Korea, ¹The Research Center for New Bio-Materials in Agriculture, Seoul National University, Suwon, 441-744, Korea - To develop thermotolerant ethanol producing yeast strains, the protoplasts of *Saccharomyces carlsbergensis* having good fermentability at 30°C and *Kluyveromyces marxianus* able to grow at 42°C were fused. Under the optimal conditions for protoplast formation, the frequency of protoplast formation of *S. carlsbergensis* was 92 - 94% and that of *K. marxianus* was 98%. Fusion frequency between *S. carlsbergensis* and *K. marxianus* was $1.4 \times 10^{-6} - 4.8 \times 10^{-7}$. Among the 27 fusants obtained, 6 fusants were able to grow at 42°C. While the parental strains produced 3.2-3.4%(w/v) ethanol after 3 days from the fermentation medium containing glucose, fusants SK41-4 and SK53-22 produced 5.2%(w/v) ethanol in the same condition. The thermotolerance of SK53-22 was not high, but that of SK41-4 was quite high.

Key words: protoplast fusion, *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, thermotolerant, ethanol

일반적으로 에탄올 발효는 30-33°C 에서 행하여지며, 35°C 이상에서는 발효력이 급속히 떨어지므로, 이 경우에는 발효조의 냉각을 필요로 한다. 그러므로, 고온에서도 발효력이 우수한 효모 균주를 사용한다면, 발효조의 냉각비 절감, 집균 오염 방지, 활발한 대사 활동에 의한 생산성 증가, 에탄올 종류의 연속화 등의 효과를 얻을 수 있다 [21]. *Saccharomyces* 에 속하는 균주들은 최적 성장 온도가 28-35°C의 범주에 있으며, 최대 성장 온도는 균주에 따라 다르지만, 40°C 이상을 좀처럼 넘지 않으며 [6], 일반적으로 *Kluyveromyces* 균주들이 *Saccharomyces*보다 더 고온에 내성을 갖는다[3].

에탄올 생산을 위해서는 고온 내성을 에탄올 저해 작용과 관련지어 생각하여야 하며[20], 효모의 성장은 온도가 증가함에 따라 에탄올에 더욱 저해를 받는다[5].

효모의 발효적 특성- 고온내성, 응집성, 에탄올내성, 당내성, 발효력 등- 을 증가시키기 위해서는 원형질체 융합[7, 8, 15] 방법이 많이 이용되고 있으며, 원형질체 융합은 sexual mating에 의한 교배가 불가능할 때 매우 유용하다.

본 연구에서는 발효력이 우수한 *Saccharomyces carlsbergensis*와 고온내성이 우수한 *Kluyveromyces marxianus*의 이속간 원형질체 융합을 통하여 고온에서도 발효력이 우수한 효모 균주의 개발을 목표로 하였다.

재료 및 방법

균주

본 실험에서 사용한 균주는 30°C에서 에탄올 발효력이 우수한 *Saccharomyces carlsbergensis*와 고온 내성이 우수한 *Kluyveromyces marxianus*를 사용하였다.

배지 및 배양

효모의 성장배지로는 1%(w/v) yeast extract(Y), 2%(w/v) peptone(P), 2%(w/v) dextrose(D)를 사용하였고, 고체 배지에는 2%(w/v) agar를 첨가하여 사용하였다. 영양 요구성 돌연변이에 대한 최소배지는 0.67%(w/v) Difco yeast nitrogen base without amino acid(YNB), 2%(w/v) dextrose (D)의 synthetic minimal medium(SD) 배지에 적당한 아미노산을 첨가하여 사용하였고, 호흡결여돌연변이주에 대한 최소 배지는 SD배지에서 dextrose대신에 3%(v/v) glycerol(G)를 첨가한 SG배지를 사용하였다.

원형질체 형성을 위한 세포배양은 YPD를 사용하였고, 원형질체 재생 배지로는 YPD에 1.2 M KCl, 3%(w/v) agar를 첨가하였으며, 원형질체 융합에 사용된 융합체 선별 배지로는 SG배지에 1.2 M KCl, 3%(w/v) agar를 첨가한 배지를 사용하였다. 에탄올 발효용 배지는 1%(w/v) yeast extract, 2%(w/v) peptone, 4%(w/v) dextrose를 사용하였다. 효모의 배양에 있어서 *S. carlsbergensis*는 30°C, *K. marxianus*는 42°C에서 배양하였고, 액체 배양의 경우 각각 30°C와

*Corresponding author

Tel. 82-331-220-2344, Fax. 82-331-220-2344
E-mail: kkim@mail.suwon.ac.kr

42°C 진탕 배양기에서 200 rpm의 회전속도로 배양하였다.

에탄올 정량

발효액내의 에탄올 정량은 Bernet and Gutman[4]의 방법을 변형하여 효소적으로 정량하였다.

고온 내성 측정

각각의 균주를 YPD고체 배지에 Pepper-replica inoculator를 사용하여 접종한 후 42°C 항온기에서 2일간 배양하여 성장을 잘하는 균주를 고온내성이 우수한 균주로 간주하였다.

생존능 측정

발효과정중에 효모 세포의 생존능은 methylene blue 염색법을 이용하여 haematocytometer로 측정하였다[10].

영양요구 돌연변이 표지의 도입

*K. marxianus*에 영양요구돌연변이표지를 도입하기 위해 95%의 사멸율을 나타내는 정도로 UV(254 nm)를 조사하여 영양요구돌연변이주를 선별하였다. 여기에서 UV의 경우 처리 시간은 2분 30초-2분 45초였고, 강도는 119.4-123.2 erg/mm²의 세기로 노출하였다. UV 조사 후 생존한 콜로니들을 SD agar plate와 YPD agar plate에서 10회 계대 배양하여 안정한 영양요구성 표지를 갖는 클론들을 선별하였고 영양요구성 표지를 분석하였다[16].

호흡결여돌연변이주의 획득

본 실험에서는 acriflavine을 사용하여 호흡결여돌연변이주를 얻었다[16,18]. 얻어진 호흡결여돌연변이주의 colony를 YPD 와 SG 고체배지에 동시에 접종하여 2일간 배양한 후 YPD에서는 성장하지만, SG에서는 성장하지 못하는 colony를 호흡결여돌연변이주로 간주하였다. 이 호흡결여돌연변이주가 revertant로 변하지 않았음을 확실하게 하기 위해 YPD 와 SG배지에서 10회 계대 배양하여 안정성을 확인하였다.

원형질체 형성

삼투 안정제는 0.1 M phosphate buffer(pH 6.8)에 0.8 M-1.2 M의 KCl을 첨가하여 사용하였다. 세포벽 분해효소로는 lyticase(Sigma, No. L-8137)를 0.7-1.05 mg/ml 되게끔 삼투안정제에 녹이고, 0.01 M EDTA를 넣어 사용하였다. *S. carlsbergensis*의 호흡결여돌연변이주와 *K. marxianus*의 영양요구돌연변이주를 YPD broth에 각각 접종하여 진탕 배양기에서 각각 30°C와 42°C로 mid-log phase까지 배양한 후 세포수가 5 × 10⁸/ml 되도록 채취하였다. 각각의 세포를 원심분리하여 멸균수로 세 번 세척한 후, 멸균한 0.1 M sodium phosphate buffer(pH 6.8), mercaptoethanol(10 µg/ml), 0.01 M EDTA를 포함한 pretreatment buffer에 각각의 세포를 현탁시켜 30°C에서 30분간 처리한 후, 다시 멸균수로

두 번 세척하였다. 이 현탁액을 5분간 원심 분리한 세포를 삼투 안정제로 두 번 세척한 다음 여기에 세포벽 분해 효소를 가한 뒤 30°C에서 1시간 진탕 배양(75 rpm)시켜 원형질체를 형성시켰다. 원형질체의 형성율은 증류수로 희석할 때 원형질체가 삼투압에 의해 용해되는 사실에 근거하여 계산하였다[23].

원형질체 융합

분자량 4000의 PEG를 10 mM CaCl₂와 1.2 M KCl이 들어 있는 0.1 M phosphate buffer(pH 6.8)에 녹여 40% (w/v)의 PEG용액을 원형질체 융합에 사용하였다. 각 균주의 원형질체를 원심분리하여 모은 후, 삼투 안정제로 세 번 세척하고, 각각의 원형질체를 삼투 안정제에 2-3 × 10⁸ cell/ml 되도록 현탁하였다. 각각의 세포 현탁액 1 ml를 취하여 혼합한 후 원심분리하여 상등액을 제거하고, 침전물에 PEG 용액을 첨가하여 천천히 진탕하면서 30°C에서 20분간 반응시켰다. 융합 반응 후 5 ml의 삼투 안정제를 가하여 반응을 정지시키고, 다시 원심 분리한 후 삼투 안정제를 넣고 희석하여 재생 배지에 도말하였다. 원형질체 융합 후 콜로니가 나타날 때까지 5-7일 동안 30°C에서 배양한 후, 최소 재생 배지에 나타난 colony수와 완전 재생배지에 나타난 colony수를 세어 융합빈도를 구하였다.

$$\text{융합 빈도 (\%)} = \frac{\text{최소 배지에 나타난 colony 수}}{\text{완전 배지에 나타난 colony 수}} \times 100$$

융합주의 고온내성에 대한 안정성

선별된 융합주들의 고온 내성에 대한 안정성을 조사하기 위해 각각의 융합주들을 YPD broth 50 ml에 접종하여 42°C, 왕복형 진탕 수조에서 100 stroke/min으로 진탕 배양하였다.

하나의 세포가 2¹⁰ 세포가 될 때까지 배양(2일)한 것을 10세대로 하였고이 과정을 30 세대동안 반복하였다. 각 10 세대마다 배양액을 0.1 ml을 YPD 50 ml에 다시 접종하여 계대 배양하였고, 배양액을 채취하여 적당한 배수(10⁴-10⁵)로 희석하여 YPD 고체배지에 도말한 후, 30°C와 42°C에서 배양하여 나타난 콜로니수의 비율로써 융합주들의 고온 내성에 대한 안정성을 조사하였다.

$$\text{고온내성에 대한 안정성 (\%)} = \frac{42^\circ\text{C에서 나타난 colony의 수}}{30^\circ\text{C에서 나타난 colony의 수}} \times 100$$

결과 및 고찰

사용 균주의 특성

원형질체 융합에 사용된 *S. carlsbergensis* 와 *K. marxianus*의 발효적 특성을 조사하였다(Table 1). *S. carlsbergensis*는 30°C에서 우수한 발효력을 나타내었고, 42°C에서는 전

혀 성장하지 못하였다. *K. marxianus*는 30°C에서 성장하였지만 42°C에서 더 성장력이 우수한 고온 내성을 갖고 있으나, 30°C에서의 발효력에 있어서는 *S. carlsbergensis*에 비해 현저히 떨어졌다. 따라서 *S. carlsbergensis*는 30°C에서

높은 에탄올생성능을 그리고 *K. marxianus*는 42°C에서 높은 성장능을 각각 가졌다고 할 수 있다.

선택표지의 도입

*S. carlsbergensis*에 선택표지로서 호흡결여돌연변이를 도입하여 안정한 6 clone을 선별하였고, 그 중에서 발효력이 우수한 S-4, S-5을 융합에 사용하였다. 한편 *K. marxianus*에서는 단일 표지를 갖는 영양요구돌연변이의 6 clone중에서 모균주와 같이 고온 내성이 우수한 K-1(*thy*), K-3(*leu*)를 원형질체 융합에 사용하였다. 호흡결여돌연변이는 주로 미토콘드리아의 돌연변이에 의한 손상에 의해 발생된다 [16]. 고온내성은 세포내의 미토콘드리아와 관련한다는 보고가 있기 때문에 [13], 고온내성균주인 *K. marxianus*의 선택표지로서는 미토콘드리아와 관계없는 영양요구돌연변이주를 사용하

Table 1. Growth and ethanol production at different temperatures by *S. carlsbergensis* and *K. marxianus*

Yeast strain	Growth ^a		Ethanol production (% w/v)	
	30°C	42°C	30°C	42°C
<i>S. carlsbergensis</i>	+ ^b	-	1.60	0.65
<i>K. marxianus</i>	+	+++	0.65	0.85

^a The rate of growth was evaluated after 2 days with each culture grown on YP agar plate containing 4% glucose.

^b +++ represents very good growth, + good, - no growth.

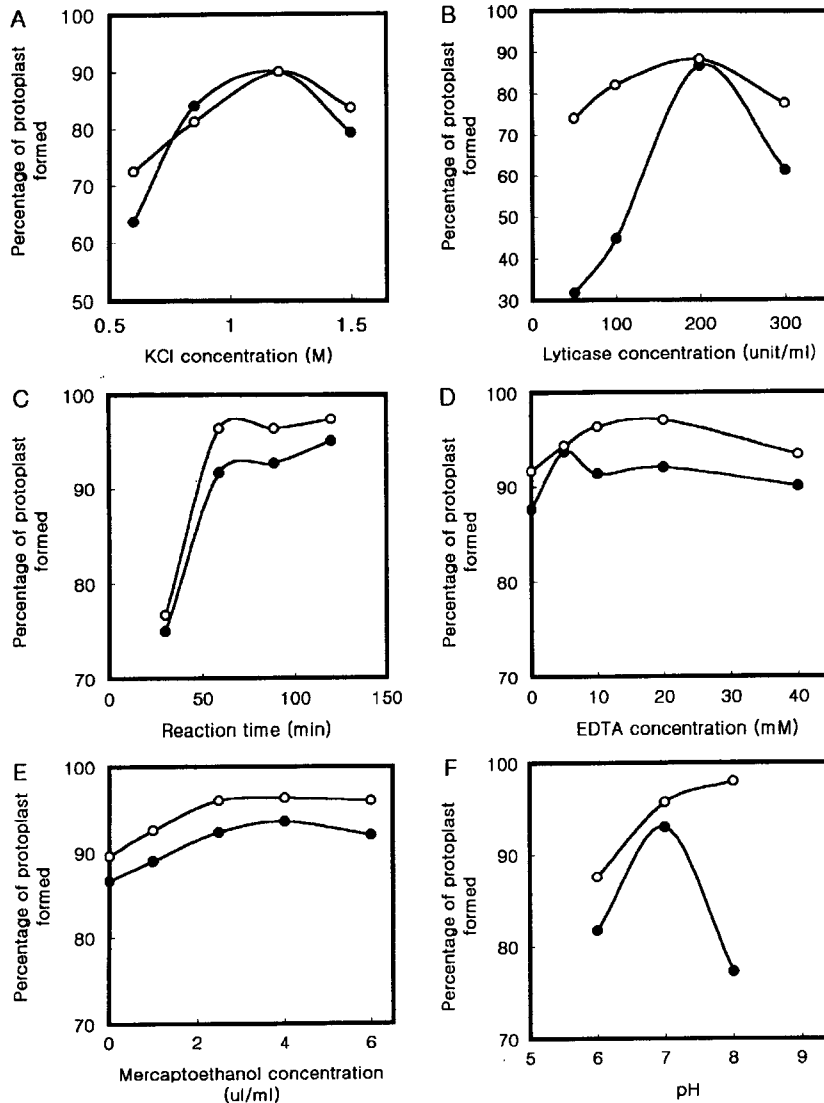


Fig. 1. Effect of various factors on the protoplast formation of *S. carlsbergensis* and *K. marxianus* by lyticase treatment. Symbols: *S. carlsbergensis*; —○—, *K. marxianus*; —●—

는 것이 바람직하다.

원형질체 형성에 대한 삼투 안정제의 영향

원형질체 융합을 수행하기 위해서는 우선 모균주의 원형질체를 형성시켜야 하기 때문에 원형질체 형성을 위해 중요한 여러 요인인 삼투 안정제의 농도, 세포벽 분해 효소의 농도와 처리 시간, 전처리 물질인 EDTA와 mercaptoethanol의 농도, pH의 영향을 조사하였다.

원형질체의 형성은 등장액 내에서만 가능하며, 이보다 낮은 농도의 삼투 안정제에서는 원형질체가 파괴되기 때문에 원형질체 형성을 위한 조건으로 먼저 여러 농도의 삼투 안정제 KCl에 대한 원형질체 형성율을 조사하였다(Fig. 1A). *S. carlsbergensis*와 *K. marxianus* 두 균주 모두 삼투안정제 1.2M의 KCl에서 90%의 최대 원형질체 형성율을 나타냈다. 이러한 결과는 *S. rouxii*의 경우 최대 원형질체 형성율을 나타내는 KCl 농도는 2.0M[2]와 *S. diastaticus*의 경우 0.6M [17]과는 다르게 나타났는데, 이는 원형질체 형성에 사용된 균주의 차이에 따라 삼투 안정제의 농도에도 차이가 있는 것으로 사료된다.

원형질체의 형성에 대한 세포벽 분해 효소의 농도와 처리 시간의 영향

세포벽 분해 효소 lyticase를 각각의 농도별로 처리하여 두 균주의 원형질체 형성율을 조사하였다(Fig. 1B). 두 균주 모두 200 unit/ml의 세포벽 분해 효소를 처리했을 때 최대 원형질체형성율을 나타내었는데, 이 때 *S. carlsbergensis*는 86.7%, *K. marxianus*는 88.3% 원형질체 형성율을 나타냈다. 한편 lyticase 처리농도에 따른 원형질체형성 변화의 양상을 보면 *S. carlsbergensis*의 경우 200 unit에서 뚜렷한 최대 원형질체 형성율을 보였으나, *K. marxianus*의 경우는 완만한 원형질체 형성율의 변화를 보였다. 다시 200 unit/ml에서 lyticase의 반응 시간에 따른 원형질체 형성율을 조사하였고, 그 결과는 Fig. 1C에 나타나 있다. 여기에서 *S. carlsbergensis*는 60분 처리 후 91.6%의 원형질체 형성율에 이른 후 서서히 증가하여 120분간 처리했을 때 최대 95%의 원형질체 형성율을 나타냈고 *K. marxianus*도 60분 처리 후 96.3% 원형질체 형성율에 이른 후 시간 경과에 따른 증가가 거의 없다가 120분 처리 후 약간의 증가를 보였다.

전체적으로 볼 때 *K. marxianus*가 *S. carlsbergensis*보다 더 높은 원형질체 형성율을 나타낸 이유는 두 균주의 세포벽 구성 성분의 차이 때문인 것으로 추측된다. Peberdy 등 [11]은 원형질체의 효과적인 형성을 위해 중요 조건은 세포벽 분해 효소라고 보고하였다. 또한 효모의 세포벽 구성 성분을 파악하는 것은 무엇보다도 중요하며, 세포벽의 주요한 구성 성분은 glucan, mannan, chitin이며 세포벽 구성 성분과 구조는 효모의 종류, 배양 조건, 생육 상태 등에 따라 다르다. 원형질체 융합에 사용되는 균주의 배양 상태는 일

반적으로 mid-log-exponential phase 상태에 있는 세포를 선택해야 한다. 그 이유는 이 시기의 세포는 세포벽의 물리·화학적 성질이 세포벽 분해 효소에 민감하게 반응하기 때문에 최대의 원형질체 형성량을 얻을 수 있기 때문이다[11].

원형질체의 형성에 대한 전처리 물질의 영향

효모 세포의 원형질체의 형성을 위해서는 세포벽 분해 효소를 처리하기 전에 EDTA가 세포벽에 존재하는 Ca^{2+} , Mg^{2+} 를 제거하고, mercaptoethanol이 disulfide 결합을 절단한다는 Schwenke 등[14]의 보고에 따라 전처리 물질로서 EDTA와 mercaptoethanol 처리에 의한 원형질체 형성율을 조사하였다(Fig. 1D, Fig. 1E).

전처리 물질로서 EDTA를 처리했을 때 *S. carlsbergensis*는 5 mM에서 93.6%로 가장 높은 원형질체 형성율을 나타냈고, *K. marxianus*는 20 mM일 때 모두 97.0%의 높은 원형질체 형성율을 보였다.

전처리 물질로서 mercaptoethanol을 처리했을 경우는 *S. carlsbergensis*는 mercaptoethanol 4 μ l/ml을 처리했을 때 93.6%의 최대 원형질체 형성율을 나타냈다. *K. marxianus*는 mercaptoethanol 2.5 μ l/ml을 처리했을 때 96.0%로 가장 높은 원형질체 형성율을 나타낸 후 mercaptoethanol증가에 따른 원형질체 형성의 변함이 없었다. 전처리 물질로서 EDTA와 mercaptoethanol을 처리하지 않은 경우와 비교했을 때 이들 전처리 물질을 처리했을 때 훨씬 더 많은 원형질체를 얻을 수 있었다.

원형질체의 형성에 대한 pH의 영향

원형질체 형성 조건 실험시 pH의 영향에 대한 실험 결과는 Fig. 1F에 나타내었다. *S. carlsbergensis*는 중성인 pH 7에서 93.0%로 최대 원형질체 형성율을 나타냈고, *K. marxianus*는 pH 8의 알칼리 상태에서 98.0%로 최고의 원형질체 형성율을 나타냈다.

원형질체의 융합율

*S. carlsbergensis*의 호흡결여돌연변이주 S-4, S-5과 *K. marxianus*의 영양요구돌연변이주 K-1, K-2를 원형질체 융합시킨 후, 재생 배지에 접종하여 30°C와 42°C에서 배양하였다. 30°C에서는 *S. carlsbergensis* S-4와 *K. marxianus* K-1의 융합빈도는 4.8×10^{-7} 이었고, 4주의 융합체 (SK41)를 얻었고, *S. carlsbergensis* S-5와 *K. marxianus* K-3의 융합결과 융합빈도는 1.4×10^{-6} 로 23주의 융합주 (SK53)를 획득하였다. 한편, 42°C에서는 융합주를 전혀 얻을 수가 없었는데 그 이유는 재생 시 세포벽이 없어 불안정한 상태의 원형질체가 높은 온도(42°C)에서는 정상적으로 재생되지 못한 것으로 추측된다. 본 실험결과에 나타난 융합율은 *S. cerevisiae*와 *Zygosaccharomyces fermentati*에서의 융합율 2×10^{-7} [1]과 *S. cerevisiae*와 *Schwanniomyces alluvius*의 융합율

6.2×10^{-7} [22], *S. cerevisiae*와 *Kluyveromyces fragilis*의 융합율 3×10^{-7} [9]과 유사하게 나타났다.

우수 융합주의 선별

얻어진 융합주들의 고온내성과 알콜 발효력을 비교하여 우수 융합주를 선별하고자 하였다.

먼저 고온내성을 보면, 융합주들 중에서 42°C에서도 성장력이 있는 융합주는 4주의 SK41 융합주들 중에서 SK41-4 한 주 그리고 23주의 SK53 융합주들 중에서 SK53-3, 14, 20, 22, 23의 다섯 주이었고 나머지는 42°C에서 성장하지 못하였다.

42°C에서 성장력이 있는 6주의 융합주들을 여러 온도 (30°C - 42°C)에서 에탄올 발효력을 비교, 조사한 결과를 Table 2에 나타내었다. 4%(w/v) 포도당이 포함된 YP 배지에서 *S. carlsbergensis*는 30°C에서 1.60% (w/v)의 에탄올을 생산하였고, 온도가 증가함에 따라 급격히 감소하여 42°C에서는 0.65% (w/v)의 에탄올을 생성하였다. *K. marxianus*는 30°C - 42°C에 걸쳐 전체적으로 비슷한 경향의 에탄올 생성능을 보였고 오히려 42°C로 올라감에 따라 에탄올 생성능이 조금씩 증가하였다.

융합주들은 30°C의 경우, 다양한 에탄올 생성능을 보였

는데 모균주 *S. carlsbergensis* 보다는 낮은 에탄올 생성능을 나타냈다. 융합주들은 42°C의 경우에서도 30°C에서의 경우와 마찬가지로 다양한 에탄올 생성능을 나타내었으며, 모균주 *K. marxianus*보다 더 우수한 발효력을 보이는 융합주로서 SK41-4, SK53-22를 얻을 수 있었다. 이 중에서 융합주 SK53-22는 34°C에서 SK53-22는 1.65%(w/v)의 에탄올을 생산하였고, 37°C에서 1.65%(w/v)의 에탄올 생성능을 보임으로써 융합에 의해 42°C에서도 모균주들 보다 발효력이 증가되었지만 34°C나 37°C가 최적 발효 온도임을 알 수 있다.

42°C에서 발효력이 우수한 이들 2 융합주를 다시 포도당이 16% (w/v) 함유된 YP 배지에서 30°C와 42°C로 5일간 발효시키면서 2일 간격으로 에탄올 발효력 (Table 3)와 생존능 (Table 4)을 측정하였다. 30°C에서 발효력의 경우 Table 3과 같이 5일 발효 후 융합주 SK53-22는 모균주 *S. carlsbergensis*보다 낮은 *K. marxianus*보다 높은 에탄올 생성을 보였다. 반면, 42°C에서의 발효력은 두 융합주 모두 3일 발효 후 모두 5.2% (w/v)로 모균주의 3.2-3.5% (w/v) 보다 우수하게 나타났다. 생존능에서는 (Table 4) 30°C 경우 *S. carlsbergensis*보다 두 융합주 모두 낮은 생존능을 보였고 42°C에서의 생존능은 융합주들이 모두 두 모균주보다 높은 생존능을 보였다.

Table 2. Ethanol production by various yeast strains and their fusants at different temperatures^a

Yeast strain	Ethanol(% w/v) formed at various temperature(°C)			
	30	34	37	42
<i>S. carlsbergensis</i>	1.60	1.45	0.75	0.65
<i>K. marxianus</i>	0.65	0.70	0.70	0.85
Fusant SK41-4	1.05	ND ^b	ND	1.45
Fusant SK53-3	1.00	ND	ND	0.15
Fusant SK53-14	1.20	ND	ND	0.40
Fusant SK53-20	1.40	ND	ND	0.40
Fusant SK53-22	1.30	1.65	1.55	1.35
Fusant SK53-23	1.25	ND	ND	0.30

^a One loopful of each activated culture was inoculated into 10 ml YPD4 and the ethanol formed was determined after 2 days of fermentation at different temperatures.

^b ND, not determined.

Table 3. Ethanol production by parental yeast strains and their fusants at different temperatures^a

Yeast strain	30°C			42°C		
	Ethanol(% w/v) formed after each days			Ethanol(% w/v) formed after each days		
	1	3	5	1	3	5
<i>S. carlsbergensis</i>	4.0	6.6	6.8	1.2	3.2	3.2
<i>K. marxianus</i>	1.2	2.8	2.8	2.0	3.4	3.4
Fusant SK41-4	2.0	2.8	2.8	2.8	5.2	5.2
Fusant SK53-22	2.4	4.8	4.8	2.6	5.2	5.4

^a One loopful of each strain was inoculated into YP broth containing 16% (w/v) glucose and incubated either at 30°C or 40°C, and the ethanol produced was determined.

Table 4. Viability of parental strains and fusants at different temperatures^a

Yeast strain	30°C			42°C		
	Viability(%) after each days			Viability(%) after each days		
	1	3	5	1	3	5
<i>S. carlsbergensis</i>	98	97	77	36	25	8
<i>K. marxianus</i>	97	72	61	65	57	27
Fusant SK41-4	98	90	55	88	68	39
Fusant SK53-22	93	88	40	72	68	36

^a One loopful of each strain was inoculated into YP broth containing 16% (w/v) glucose and incubated either at 30°C or 40°C, and the viability was determined.

Table 5. Stability of thermo-tolerance of parental strains and their fusants

Parental strain	Stability(%) of thermo-tolerance after each generations		
	10	20	30
<i>S. carlsbergensis</i>	0.0	0.0	0.0
<i>K. marxianus</i>	100.0	100.0	100.0
Fusant SK41-4	100.0	100.0	100.0
Fusant SK53-22	99.5	98.7	87.7

융합주의 고온내성의 안정성

융합주의 안정성은 42°C에서 에탄올생성능이 우수한 SK41-4와 SK53-22의 두 융합주들의 고온내성에 대한 안정성을 조사하였다(Table 5). 이 때, *K. marxianus*는 30 세대의 세포 분열 후, 100%의 안정성을 보였고, *S. carlsbergensis* 균주는 42°C에서 전혀 성장하지 못하였다. 융합주의 경우, SK53-22는 세대가 거듭됨에 따라 안정성이 점점 낮아졌으나 SK41-4는 30 세대 세포분열 후에도 안정성이 100.0%로서 고온내성이 매우 안정함을 보여주었다.

Provost 등[12]은 *Candida tropicalis*와 *Saccharomycopsis fibuligera*의 이속간 원형질체 융합에서 그 융합체는 안정성이 낮았고, 계대 배양하는 동안 모균주와 비슷한 segregant가 된다고 보고하였고, Stewart[19]는 *S. cerevisiae*과 *K. lactis*의 융합에서 융합주들은 매우 불안정하였고, 양친형으로 복귀된다고 보고하였다. 이와 같은 연구보고들의 경우에 비하면 SK41-4는 안정성이 매우 우수한 균주이며, *S. carlsbergensis*와 *K. marxianus*의 이속간 원형질체 융합결과 더 많은 융합주를 탐색한다면 42°C의 고온에서 에탄올 생성능과 안정성이 더욱 뛰어난 융합주를 많이 찾을 수 있다고 여겨진다.

요 약

30°C에서 에탄올 발효력이 우수한 *Saccharomyces carlsbergensis*와 42°C에서 성장력이 우수한 *Kluyveromyces marxianus*를 원형질체 융합을 통하여 고온에서도 발효력이 우수한 효모 균주를 개발하고자 하였다. 원형질체 융합을 위해 원형질체 형성율의 최적 조건을 조사하였는데, 두 균주 모두 삼투안정제는 1.2 M KCl, 세포벽 분해 효소의 농도와 처리 시간은 각각 200 (unit/ml)와 90분으로 동일하였고, 전처리용액으로서 EDTA와 mercaptoethanol의 농도, 그리고 최적 pH는 두 균주가 차이를 보여 *S. carlsbergensis*가 각각 10-20 mM/ml, 4.0 µl/ml, 그리고 7.0이었고, *K. marxianus*의 경우 20 mM/ml, 2.5-4 µl/ml, 그리고 8.0이었다. 원형질체 형성을 위한 최적 조건하에서 원형질체 형성율은 *S. carlsbergensis*의 경우 92-94%, *K. marxianus*는 98%였으

며, 두 균주의 원형질체 융합율은 1.4×10^{-6} - 4.8×10^{-7} 으로 나타났다. 두 균주를 융합시킨 결과 SG배지 30°C에서 6-8일 배양 후에 27주의 융합주들을 획득하였고, 이 중에서 42°C에서 성장을 보인 융합주는 6주이었다. 42°C 그리고 16%(w/v) 포도당이 함유된 배지에서 3일 발효 후 모균주들이 3.2-3.4%(w/v)의 에탄올을 생산하였는데 비해 융합주 SK41-4와 SK53-22는 같은 조건에서 모두 5.2%(w/v)의 에탄올을 생산하였다. 고온내성에 대한 안정성을 조사한 결과, SK53-22 경우 세포 분열이 거듭됨에 따라 안정성이 감소하였으나, SK41-4는 30세대 세포분열 후 100.0%로서 안정성이 매우 높았다.

REFERENCES

- Alfonso, P., I. L. Calderon, and T. Benitez. 1986. Intergeneric hybrids of *Saccharomyces cerevisiae* and *Zygosaccharomyces fermentati* obtained by protoplast fusion. *Appl. Environ. Microbiol.* **51**: 995-1003.
- Arnold, W. N. and R. C. Garrison. 1984. Isolation and characterization of protoplasts from *Saccharomyces rouxii*. *J. Bacteriol.* **137**: 1386-1394.
- Banat, I. M. and R. Marchant. 1995. Characterization and potential industrial applications of five novel, thermotolerant, fermentative, yeast strains, *World. J. Microbiol. Biotechnol.* **11**: 304-306.
- Bernet, T., and I. Gutman. 1974. Ethanol determination with alcohol dehydrogenase and β-NAD, pp. 1499-1502. In H. U. Bergmeyer (ed.), *Method of enzymatic analysis*, vol. 3. Academic Press, Inc., New York.
- Brown, S. W. and S. G. Oliver. 1982. The effect of temperature on the ethanol tolerant of the yeast, *Saccharomyces uvarum*. *Biotechnol. Lett.* **4**: 269-273.
- John, R. P., N. Pamment, and P. F. Greenfield. 1981. Alcohol fermentation by yeast - the effect of environmental and other variables. *Process Biochem.* **16**: 42-49.
- Junji, W., M. Kudo, and N. Nishikama. 1990. Construction of flocculent yeast cells (*S. cerevisiae*) by mating and protoplast fusion using a yeast cell containing the flocculation gene FLO5. *Agric. Biol. Chem.* **54**: 1776-1681.
- Kavanagh, K., M. Walsh, and P. A. Whittaker. 1991. Enhanced intraspecific protoplast fusion in yeast. *FEMS Microbiol. Lett.* **81**: 283-286.
- Lee, H. S., H. W. Jang, and Y. W. Ryu. 1991. Enhancement of ethanol tolerance of lactose assimilating yeast strains by protoplast fusion, *J. Microbiol. Biotechnol.* **1**: 151-156.
- Lee, S. S., F. M. Robinson, and H. Y. Wan. 1981. Rapid determination of yeast viability. *Biotechnol. Bioeng. Symp.* **11**: 641-649.
- Peberdy, J. F. 1976. Factors affecting protoplast release in some filamentous fungi, *Transact. Brit. Mycol. Soc.* **67**: 21-39.
- Provost, A., C. Bourguignon, P. Fouriner, A. M. Ribet, and H. Heslot. 1978. Intergeneric hybridization in yeasts through

- protoplast fusion. *FEMS. Microbiol. Lett.* **3**: 309–312.
13. Sakanaka, K., W. Yan, M. Kishida, and T. Sakai. 1996. Introduction of mitochondria into respiratory-deficient mutant of yeast and improvement of thermostability. *J. Ferment. Bioeng.* **81**: 109–114.
 14. Schwenke, J. 1969. A rapid and reducible method for obtaining yeast protoplast. *J. Inst. Brew.* **75**: 15–19.
 15. Seki, T., S. Myoga, S. Limtong, S. Uedono, J. Kumnuanta, and H. Taguchi. 1983. Genetic construction of yeast strains for high ethanol production. *Biotechnol. Lett.* **5**: 351–365.
 16. Sherman, F., G. Fink, and J. B. Hicks. 1986. *Method in genetics; Laboratory course manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
 17. Spencer, J. F. T., C. Bizeau, N. Reynolds, and D. M. spencer. 1985. The use of mitochondrial mutant in hybridization of industrial yeast strains. *Curr. Genet.* **9**: 649–652.
 18. Spencer, J. F. T., D. M. Spencer, and A. R. W. Smith. 1988. Yeast genetics. pp. 65-106. In I. Campbell and J. H. Duffus (eds.), *Yeast; A practical approach*. IRL Press, Oxford.
 19. Stewart, G. G. 1981. The genetic manipulation of industrial yeast strains. *Can. J. Microbiol.* **27**: 973–990.
 20. Van Uden, N. 1984. Effects of ethanol on the temperature relations of viability growth in yeast. *CRC. Crit. Rev. Biotechnol.* **1**: 263–272.
 21. Wiegel, J. 1984. Formation of ethanol by bacteria: A pledge for the use of extreme thermophilic anaerobic bacteria in industrial ethanol fermentation processes. *Experientia.* **36**: 1434–1439.
 22. Wilson, J., J. George, G. Khachatourians, and M. Ingledew. 1982. Protoplast fusion in the yeast *Schwanniomyces alluvius*. *Mol. Gen. Genet.* **186**: 95–100.
 23. Yamamura, M. 1975. Preparation of protoplasts of hydrocarbonutilizing yeast cells and their respiratory activities. *Agric. Biol. Chem.* **39**: 13–20.

(Received March 15, 2000)