The Korean Journal of Microbiology, Vol. 37, No. 4, December 2001, p. 312-316
Copyright©2001, The Microbiological Society of Korea

효모의 에탄올 생산능 및 세포 생존능의 증진을 위한 Rare-mating과 원형질체 융합

강태영 · 김 근*
수원대학교 유전공학과

에탄올 발효능이 우수한 *Saccharomyces*에 속하는 4 균주를 가지고 여러 조합의 mating-pair 또는 fusion-pair를 만들고 이들 pair들로부터 만들어진 hybrid주들의 에탄올 생성능과 생존능을 통계적으로 분석한 결과, 에탄올 생성능에서는 차이가 없었으나, 생존능의 경우는 [*S. kluveri* kh1×*S. cerevisiae* cp3]의 균주조합이 가장 우수한 hybrid를 낼 수 있는 것으로 나타났다. 실제로 에탄올 생성능과 잔당, 효율, 생존능에서 두루 우수한 균주는 [*S. kluveri* kh1×*S. cerevisiae* cp3] 조합에서 얻어진 융합주 clone No. 3가 에탄올 생성능 10.11%(w/v) 또는 12.81%(v/v), 잔당 3.53%(w/v), 생존능 62.65%, 발효 효율 92.2%로서 가장 발효능과 생존능이 우수한 균주로 선정되었다.

Key words □ **ethanol, fusion-pair, rare-mating-pair, statistical analysis, yeast**

에탄올(에틸 알코올)은 타 대체에너지로 대체하기 곤란한 수송용 액체에너지로서 석유를 대신하는 에너지 중 가장 적합한 연료 형태이며, 공해배출이 적어 청정에너지로서도 관심을 받아왔다.

현재 국내 에탄올 생산업체에서의 에탄올 생산은 회분식 발효로서 33°C에서 3일간 발효시 에탄올 10%(v/v)을 생산하고 있으며, 4일간 발효시 11%(v/v)까지 가능하나 더 오랫동안 발효시켜도 더 이상 에탄올 농도가 증가하지 않고, 잔당이 남게 된다. 따라서 본 연구에서는 짧은 발효 시간에 잔당이 적고 고농도의 에탄올을 생산하는 균주를 개발하고자 하였다.

또한 균체를 여러 번 재순환하여 사용할 수 있도록 고생존능의 효모 균주도 개발하고자 하였다. 보통 효모균체를 재사용하기 위해 3-4번 recycle한 후에는 효모세포의 생존능 저하로 효모균체를 보충하여 주어야 하지만(3), 고생존능 효모세포가 개발된다면 사멸세포수가 감소하여 recycle회수를 훨씬 연장할 수가 있게 되어 효모균체 생산비를 절감할 수 있게된다.

효모균주의 발효적 특성을 개량하기 위해서는 여러가지 유전적 방법이 사용되는데 이에는 선택(selection) (7), 돌연변이(mutation) (8), hybridization (18), rare-mating (10), 원형질체 융합(protoplast fusion) (9), 형질전환(transformation) (10) 등의 방법들이 있다. Hybridization은 haploid 효모 a와 α로 표시되는 두 mating-type중, 한 mating-type의 효모를 다른 mating-type의 효모와 혼합하면 두 세포가 결합하여 diploid zygote가 형성된다. 이리하여 형성된 zygote는 원래 두 단수체 효모의 특성을 동시에 나타내어 균주개량을 할 수 있다(13). Rare-mating은 정상적인 a와 α haploid 균주의 자연적인 융합에 의한 hybridization방법이 아니고, haploid와 polyploid의 잡종형성이나 동일한 mating-type의 균주들간의 잡종형성 방법인데, non-mating type 두 종의 균주를 높은 농도의 세포수로 혼합하면 아주 낮은 비율로 잡종이 형성(rare-mating)되는 경우가 드물게 자연적으로 발생되는데, 이 방법을 사용하여 능률이 떨어지는 두 균주를 교배시켜 능률이 좋은 hybrid 균주를 얻을 수가 있다. 원형질체 융합은 효모의 세포벽을 제거시킨 후 두 원형질체를 polyethylene glycol이나 전기적인 힘으로 융합시키는 방법인데, 이 방법은 ploidy나 mating type 등에 관계없이 모든 효모 균주에서 이용될 수 있는 방법이다(14). 효모의 발효적 특성을 증진시키기 위해서는 이 원형질체 융합(9,16) 방법이 많이 이용되고 있다.

본 연구에서는 rare-mating과 원형질체융합에 의한 두 균주간의 교배 또는 융합으로 에탄올 고생산능과 생존능이 우수한 균주를 개발하고자 하였다. 또한 여러 다른 교배 또는 융합의 조합 가운데에서 통계적 처리에 의해 가장 좋은 parental strain들의 조합을 찾아보려 하였다.

실험 재료 및 방법

효모균주

에탄올 발효능이 우수한 4 균주를 사용하였는데 이들의 특성과 source는 Table 1에 나타내었다.

배지 및 배양

효모의 성장배지로는 YPD로서 1% (w/v) yeast extract, 2% (w/v) peptone, 2% (w/v) glucose로 구성하였고, 고체배지에는 2% (w/v) agar를 첨가하여 30°C에서 48시간 동안 배양하여 사용하였으며, 호흡결여돌연변이주에 대한 최소배지는 SG배지[yeast

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 031-220-2344, Fax: 031-220-2344
E-mail: kkim@mail.suwon.ac.kr

Table 1. Yeast strains used and their sources

Yeast strain	Characteristics	Source
kh1	α *his*$^-$, *S.*[a] *kluveri*, haploid	Laboratory collection
kp2	*S. kluveri*, polyploid	Domestic distillery's industrial strain
cp3	*S. cerevisiae*, polyploid	Isolate from a distillery's soil
cp4	*S. cerevisiae*, polyploid	"

[a]*S.*, *Saccharomyces*

nitrogen base 0.67% (w/v), glycerol 3% (v/v), agar 2% (w/v)]를 사용하였다.

호흡결여 돌연변이주의 획득

교배 또는 융합 후 hybrid의 선택과 확인을 위한 선택표지로서 acriflavine을 사용하여 호흡결여 돌연변이주(respiratory deficient mutant)를 얻었다(17,20). 얻어진 호흡결여 돌연변이주를 YPD와 SG배지에 옮겨 접종하여 30°C에서 2일간 배양한 다음 YPD 배지에서는 자라지만 SG 배지에서는 자라지 않는 colony를 호흡결여 돌연변이주로서 분리하였고, 이 호흡결여 돌연변이주가 revertant로 변하지 않음을 확인하기 위해 YPD와 SG 배지에서 5회 계대배양 하며 안정성을 확인하였다.

Rare-mating

his$^-$인 kh1 균주와 배수체인 호흡결여 돌연변이주와의 교배(rare-mating)는 YPD agar plate에서 crossing plate method에 의해 이루어졌다(17). 교배된 균체는 SG plate에서 30°C에서 3일간 배양 후 형성된 colony를 hybrid로서 분리하였다.

원형질체 형성

효모의 세포벽을 세포벽 분해 효소인 lyticase로 제거하여 원형질체를 형성하였다(9). 삼투 안정제는 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.6)에 1.2 M 의 KCl을 첨가하여 제조하였고, lyticase (Sigma. No. L-8318)는 5 unit/*l* 되게 deionized water로 용액을 만들어 millipore membrane filter (pore size, 0.2 μm)로 멸균하여 사용하였다.

열처리에 의한 균주의 불활성화(heat inactivation)

원형질체가 형성되었지만 selection marker가 없는 kp2 균주의 원형질체를 삼투안정제에 1×10^8 cells/*ml* 되도록 현탁한 후 0.1 *ml*씩 취하여 Eppendorf tube에 넣고 50°C water bath에서 30분간 처리하여 균주를 불활성화시켰다. 불활성화된 것을 확인하기 위해 YPD에 1.2 M KCl을 첨가한 재생배지에 도말하여 colony 형성이 안됨을 확인하였다.

원형질체의 융합

본 실험에서 사용한 원형질체 융합은 Fournier 등(5)의 방법을 기초로 하여 40% PEG (MW 4000)와 10 mM $CaCl_2$를 첨가한 용액을 제조하여 원형질체 융합에 사용하였다. 융합 반응 후 원심분리하여 상등액을 제거하고 삼투안정제로 세척한 후 삼투안정제 1.5 *ml*로 희석하여 재생배지에 도말하였다. 재생배지 SG에 나타난 colony를 1.2 M KCl을 첨가하지 않은 SG 최소 배지에 다시 이식하여 성장함을 확인하여 융합주로 분리하였다.

에탄올 발효 및 분석

발효배지는 YPD25 (glucose 25%, w/v)를 사용하였는데, 활성화된 균주 1 백금이분을 YPD25가 10 *ml* 들어있는 15 *ml* cap tube에 접종하여 33°C에서 3일간 발효한 후 에탄올 정량, 잔당(residual glucose), 생존능을 측정하였다.

에탄올 정량은 Bernet과 Gutman의 방법(1)을 변형하여 alcohol dehydrogenase를 이용 하였다. 발효실험 후 에탄올 생성량에 대한 당의 소비량을 발효 효율(efficiency)로 계산하였다.

$$\text{Efficiency (\%)} = \frac{\text{Ethanol content equivalent } (g)}{\text{Sugar utilized } (g)} \times 100$$

단, 여기서 1 *g*의 glucose에서 이론치로 0.511 *g*의 에탄올이 생성되기 때문에 ethanol content equivalent는 ethanol (*g*) ÷0.511 이다.

발효액내의 잔당은 DNS 시약를 이용한 환원당 정량법(2)에 근거하였고, glucose를 standard로 사용하였다. 세포 생존능은 meth-ylene blue 염색법을 이용하여 haemacytometer로 측정하였는데, 발효 후 생세포 수의 전체 세포 수에 대한 백분율을 생존능(%)으로 나타내었다(11).

측정결과의 통계처리

조사되어진 각 교배 또는 융합 조합간의 유의성을 검정하기 위하여 SAS의 version 6.03 (SAS, 1988)을 이용하여 분산분석(analysis of variance: AVOVA)을 실시하였다. 분산분석은 백분율로 표현되는 실험자료의 경우 Arcsine으로 전환하여 분석하였는데 이항분포를하는 백분율의 자료를 정규분포로 변형하여 분산분석의 가정에 부합되게 하기 위함이다(12).

결과 및 고찰

Selection marker의 도입

원형질체 융합에 의해 형성된 융합주들을 선별하기 위해서는 parental strain에 selection marker의 도입이 선행되어져야 한다.

Parental strain의 선택표지로서는 영양요구 돌연변이(auxotrophic mutation), 호흡결여 돌연변이(19) 그리고 parental strain의 생리적 특성 등이 이용될 수 있으며 본 실험에서는 열 불활성화와 호흡결여 돌연변이를 야기시켜 교배 또는 융합 후 선별에 사용하였다. 일반적으로 호흡결여 돌연변이는 약 1% 정도의 자연돌연변이율을 나타내며 acriflavine이나 ethidium bromide 등과 같은 intercalating agent를 처리함으로써 돌연변이율을 높일 수 있으며 이렇게 형성된 호흡결여 돌연변이주는 mitochondrial DNA (mtDNA)의 일부 또는 전체가 파괴된 결과이기 때문에 그

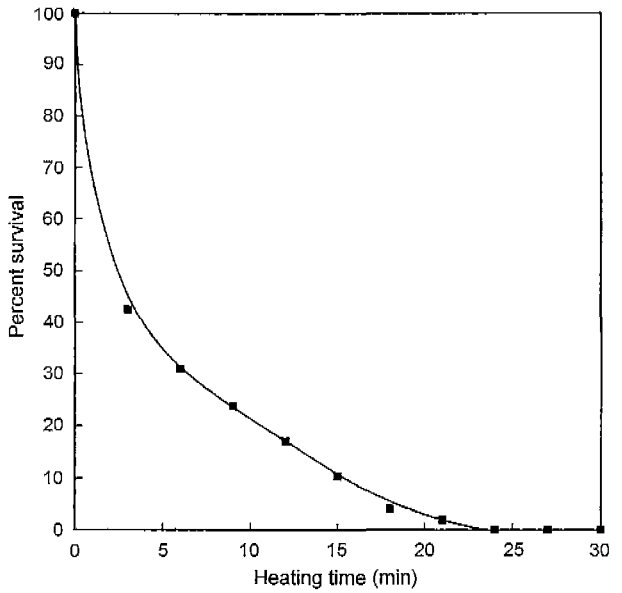

Fig. 1. Survival curve of the cells of *S. kluveri* kp2 during the heat-inactivation at 50°C.

호흡결여 돌연변이 표지가 안정한 상태를 유지할 수 있다(17). 이에 따라 발효능이 우수하여 선별된 polyploid 균주에 유전적 선택표지를 도입하기 위해 acriflavine을 처리하여 호흡결여 돌연변이주를 분리해냈다. 1차 선별된 호흡결여 돌연변이주들을 SG agar plate와 YPD agar plate에서 5회 계대배양하여 revertant로 변하지 않음을 확인하였다.

열 불활성화

열 불활성화 방법은 두 polyploid 효모 균주를 융합시킬 때 호흡결여돌연변이 이외의 다른 selection marker를 도입키 어려운 경우에 사용하는 방법이다(4). 일반적으로 같은 유전자를 한 쌍 이상 가진 배수체 균주 경우 영양요구 돌연변이 marker를 도입키 매우 어렵기 때문에, 영양요구 돌연변이 marker로 도입시키는 대신에, 열 불활성화시켜 원형질체 융합을 시키고자 하였다. 열 불활성화된 세포는 선택배지에서 성장할 수 없지만 다른 세포와 융합은 가능하기 때문이다(4).

원형질체를 형성시킨 후 삼투안정제에 현탁하여 50°C에서 열처리한 후 생존율을 조사한 결과 5, 15, 25분 후의 생존율이 각각 33, 11, 0%로 나타났다(Fig 1.). 따라서 원형질체를 불활성화시키기 위하여 30분간 열처리한 후 융합에 사용하였다.

Rare-mating에 의한 균주개량

본 실험에서는 영양요구 marker (his$^-$)를 가진 haploid 균주인 kh1와 polyploid인 kp2, cp3, cp4 균주들의 호흡결여 돌연변이주를 교배시켜 얻은 각각의 균주중 10주씩을 무작위로 선택하여 에탄올 생성량, 잔당, 생존능을 측정한 결과를 Table 2에 나타내었다.

Rare-mating에 의한 교배 결과 kh1×cp4 균주의 교배 잡종주 중 clone No. 8가 3일간 25% (w/v)의 glucose로부터 10.13% (w/v)의 에탄올 즉 12.84%(v/v)의 에탄올을 생성하여 parent kh1의 7.38% (w/v), parent cp4 9.50% (w/v)보다 우수함을 나타내었다. 그러나 생존능에서는 이 clone No. 8은 47.02%로서 parental strain들 보다 오히려 낮았다.

생존능의 경우 [kh1×cp3]의 교배잡종주의 clone들이 대부분 우수한 생존능을 보였고 이들 잡종주중 clone No. 9가 82.35%의 생존능으로서 parent kh1 균주의 51.87%와 parent cp3주의 67.25% 보다 훨씬 높은 생존능을 보였다. 그러나 이 clone No. 9는 에탄올 생성량이 7.90% (w/v)로서 그다지 높지 않은 에탄올 생산량을 보였다.

Table 2. The ethanol fermentation by various rare-mated hybrid clones[a]

Parental strain	Hybrid clone No.	Ethanol production (%, w/v)	Residual glucose (%, w/v)	Viability (%)	Efficiency (%)
kh1		7.38	9.08	51.87	90.7
kp2		8.50	6.27	53.71	88.8
	1	8.13	6.80	51.35	87.4
	2	9.06	5.52	37.23	91.0
	3	9.04	5.90	55.88	92.6
	4	8.81	6.10	42.11	91.1
	5	5.51	13.08	56.00	90.4
	6	9.53	4.25	34.69	89.9
	7	8.09	7.73	56.52	91.6
	8	6.21	10.57	65.71	84.2
	9	9.97	3.05	40.37	88.9
	10	8.98	5.44	35.38	89.8
kh1		7.38	9.08	51.87	90.7
cp3		7.55	8.40	67.25	89.0
	1	7.08	9.41	64.52	88.9
	2	7.54	8.44	66.18	89.1
	3	10.11	3.53	62.65	92.2
	4	9.27	4.37	60.44	87.9
	5	7.70	7.58	71.43	86.5
	6	8.80	5.81	67.86	89.7
	7	8.27	6.80	74.38	88.9
	8	7.09	9.41	71.11	88.9
	9	7.90	8.19	82.35	91.9
	10	8.23	6.71	59.38	88.0
kh1		7.38	9.08	51.87	90.7
cp4		9.50	4.15	53.14	89.1
	1	8.89	6.18	48.44	92.4
	2	7.13	9.30	56.52	88.9
	3	9.60	4.24	60.00	90.5
	4	5.15	4.84	36.59	88.8
	5	9.37	5.01	52.33	91.7
	6	7.40	6.23	40.00	77.2
	7	7.01	9.56	36.36	88.8
	8	10.13	3.45	47.02	92.0
	9	9.27	4.90	45.45	90.3
	10	7.23	9.18	59.09	89.4

[a]One loopful of each activated cells was inoculated into a 15 *ml* captube containing 10 *ml* YPD25 glucose and fermented at 33°C for 3 days.

Table 3. Ethanol fermentation by various fusant clones[a]

Parental Strain	Fusant clone No.	Ethanol production (%, w/v)	Residual glucose (%, w/v)	Viability (%)	Efficiency (%)
kp2		8.50	6.27	53.71	88.8
cp3		7.55	8.40	67.25	89.0
	1	9.03	5.26	48.28	89.5
	2	9.01	5.33	43.75	89.6
	3	8.53	6.40	61.29	89.8
	4	10.00	3.27	57.45	90.0
	5	10.18	3.06	33.98	90.8
	6	7.17	9.42	62.90	90.0
kp2		8.50	6.27	53.71	88.8
cp4		9.50	4.15	53.14	89.1
	1	8.44	6.50	50.00	89.3
	2	9.57	4.79	43.90	92.6
	3	9.85	4.24	36.71	92.8
	4	7.88	8.00	53.25	90.7
	5	10.83	2.19	43.33	92.9
	6	7.95	6.54	42.86	84.3

[a]One loopful of each activated cells was inoculated into a 15 *ml* cap-tube containing 10 *ml* YPD25 and fermented at 33°C for 3 days.

원형질체 융합에 의한 균주개량

cp3, cp4 균주는 호흡결여 돌연 변이주로 만들고 kp2 균주는 열 불활성화시켜 원형질체 융합에 사용하였다. 이들 [kp2×cp3]와 [kp2×cp4]의 원형질체 융합 결과 6×10^{-6} (%)의 융합율로 각각 6주의 융합주를 얻었다.

융합주들과 그들의 parent주들의 YPD25에서 3일간 발효 후 에탄올 생성량, 잔당, 생존능, 발효효율을 측정한 결과를 Table 3에 나타내었다.

여기에서도 교배의 경우와 같이 같은 parent에서 나온 융합주일지라도 에탄올 생산과 생존능 등에서 차이를 보였다. 두 fusion-pair조합에서 모두 parental strain보다 에탄올 생성량이 많은 융합주들이 나타났는데, 특히 10% (w/v) 이상의 에탄올 생성 균주는 [kp2×cp3]의 융합주에서 2주 그리고 [kp2×cp4]의 융합주에서 1주 나타났다. 그러나 세포융합결과 parent들 보다 더 높은 생존능을 나타낸 융합주는 없었다. 에탄올 발효능이 가장 좋은 균주는 [kp2×cp4]조합의 융합주인 clone No. 5로서 10.83% (w/v)의 에탄올 즉 13.7% (v/v)의 에탄올을 생산 함으로서 가장 높은 에탄올 생성량과 가장 적은 잔당을 나타내었다. 그러나 이 clone No. 5는 생존능에 있어서는 43.33%로서 오히려 parent인 kp2나 cp4보다 낮은 생존능을 나타냈다.

우수 mating- 혹은 fusion-pair의 선정

에탄올, 잔당, 효율, 생존능 중 분산분석에 의하면 각 교배 또는 융합 pair조합간의 차이가 없다는 귀무가설을 기각할 수 없어서 교배 또는 융합의 pair조합 처리에 따른 에탄올, 잔당, 효율의 차이가 없다는 결론을 얻었다. 그러나 생존능의 경우 F-test에 의하면(α=0.01) 각각 조합간의 차이가 발견되는 바 이중 [kh1×cp3]이 다른 pair 조합과 비교할 때(0.467~0.542) 가장 차이가 있었고 나머지 4개의 pair 조합간에는 차이가 없었다.

실제로 에탄올 생성능과 잔당, 효율, 생존능에서 두루 우수한 균주는 [kh1×cp3]pair조합에서 얻어진 잡종주 clone No. 3가 에탄올 생성능 10.11% (w/v), 잔당 3.53% (w/v), 생존능 62.65%, 효율 92.2%로서 가장 발효능과 생존능이 우수한 균주라 할 수 있다. 최근에 Kang 등(7)은 120주의 에탄올 생성 효모균주들 중에서 가장 에탄올 생성능이 우수한 균주 *S. cerevisiae* 20-1을 선정하였는데, 이 균주는 25% (w/v)의 glucose로부터 33°C에서 3일 동안 9.54% (w/v)의 에탄올을 생산하였으나, 생존능은 불과 25.47%에 지나지 않은 것으로 보아, 본 연구에서 획득한 [kh1×cp3]pair 조합의 잡종주 clone No. 3은 에탄올 생성능에서나 생존능에서 훨씬 우수한 균주라 할 수 있다.

에탄올 내성을 갖는 효모 균주들을 유전적으로 분석한 결과 에탄올존재하에서 많은 유전자들이 세포 성장을 저해하고 있음이 알려졌다(6). 이 유전자들은 nonisogenic hybridization 혹은 mating (genetic complementation)에 의해 모균주보다 에탄올 내성이 더 높은 hybrid들이 생길 수가 있으며, 실제로 에탄올 내성이 증진된 hybrid들이 발견되었다(6,16).

이상의 통계분석에 의하면 에탄올 생성능에서는 뚜렷한 차이가 없었으나 생존능의 경우는 [kh1×cp3]의 mating-pair가 genetic complementation에 의하여 가장 우수한 hybrids를 낼 수 있다 하겠다.

참고문헌

1. Bernet, T. and I. Gutman. 1974. Ethanol determination with alcohol dehydrogenase and β-NAD. p 1499-1502. *In* H. U. Bergmeyer (ed.). Method of enzymatic analysis. Vol 3. Academic Press, Inc., New York.
2. Bernfeld, P. 1955. Amylases α and β. *Methods Enzymol.* 1, 149 - 158.
3. Espinosa, R., V. Cojulun, and F. Marroguin. 1978. Alternatives for energy savings at plant level for the production of alcohol for use as automotive fuel. *Biotechnol. Bioeng. Symp.* 8, 69-74.
4. Fordor, K. and E. Dimiri, 1978. Polyethylene Glycol-induceed fusion of heat-inactivated and living protoplast of *Bacillus megaterium. J. Bacteriol.* 135, 68-70.
5. Fouriner, P., A. Provost, C. Bourguignon, and H. Heslot. 1977. Recombination after protoplast fusion in the yeast *Candidia tropicalis. Arch. Microbiol.* 115, 143-149.
6. Jiménez J. and T. Benítez 1987. Genetic analysis of highly ethanol-tolerant wine yeast. *Curr. Genet.* 12, 421-48.
7. Kang, T.Y., G.H. Oh, and K. Kim. 2000. Isolation and identification of yeast strains producing high concentraion of ethanol with high viability. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 28, 309-315.
8. Kim, K. and J.Y. Lee. 1998. Strain improvement of yeast for ethanol production using a combined treatment of electric field and chemical mutagen N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. *J. Microbiol. Biotechnol.* 8, 119-123.
9. Kim, M-S and K. Kim. 2000. Protoplast fusion of *Saccharomyces* and *Kluyveromyces* to develop thermotolerant ethanol-producing yeast strains. *Kor. J. Appl. Microbial. Biotechnol.* 28, 80-86.
10. Kim, T-G. and K. Kim. 1996. The construction of a stable starch-fermenting yeast strain using genetic engineering and rare-

mating. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 59, 39-51.
11. Lee, S.S., F. M. Robinson, and H.Y. Wang. 1981. Rapid determination of yeast viability. *Biotechnol & Bioengin. Symp.* 11, 641 - 649.
12. Little, T.M. and F.J. Hills, 1978. Agricultural experimentation design and analysis. John wiley and Sons, NewYork, Chichester, Brisbane, Toronto.
13. Park, S-Y., K. Kim, and C-H. Lee. 1996. Improvement of starch-fermentability of recombinant haploid yeast strain by hybridization. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 24, 726-732
14. Russell, L. and G.G. Stewart. 1985. Valuable techniques in the genetic manipulation of industrial strains. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 43, 84-90.
15. SAS insitute Inc. 1988. SAS/STAT guide for personal computers, ver 6.03. SAS insitute Inc., Cary, North Carolina.
16. 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, 351-356.
17. Sherman, F., G. Fink, and J.B. Hicks, 1986 Method in genetics; laboratory course manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
18. Song, S.H., K. Kim, and M.W. Lee. 1994. Improvement of ethanol-tolerance of haploid *Saccharomyces diastaticus. Kor. J. Appl. Microbiol. biotechnol.* 22, 584-592.
19. 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.
20. Spencer, J.F.T., D.M. Spencer, and A.R.W. Smith. 1988. Yeast genetics. p 65-106. *In* I. Campbell and J. H. Duffus (ed.). Yeast; A practical approach. IRL Press, Oxford, England.

(Received October 25, 2001/Accepted December 1, 2001)

ABSTRACT: Rare-Mating and Protoplast Fusion for the Improvement of Ethanol Producibility and Cell-Viability of Yeast

Tae-Young Kang and Keun Kim* (Department of Genetic Engineering, The University of Suwon, P.O. Box 77, Suwon 445-743, Korea)

To improve the ethanol fermentability, four *Saccharomyces* yeast strains with efficient ethanol fermentability were subjected to rare-mating and protoplast fusion. Using these 4 strains, 5 different combinations of mating-pair or fusion-pair were constructed and their hybrids or fusants were obtained. From the statistical analysis of the results of the ethanol fermentation by the hybrids of the different mating-pair or fusion-pair, no difference was found in ethanol production, but [*S. kluveri* kh1×*S. cerevisiae* cp3] pair was shown to be the best combination which can produce high cell-viability. In fact, the clone No. 3 of the [*S. kluveri* kh1×*S. cerevisiae* cp3] pair was selected as the best strain which produced ethanol of 10.11% (w/v) or 12.81% (v/v) from 25% (w/v) glucose at 33°C for 3 days with the residual sugar of 3.53% (w/v), viability of 62.65%, fermentation efficiency of 92.2%.