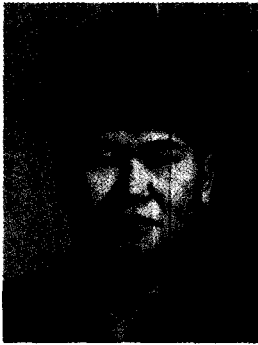


세포융합균주를 이용한 알콜발효의 성능개선



조 문 구

〈우석대학교 이공대학 생물공학과 교수〉

■ 목 차 ■

1. 서 론
2. 세포융합
3. 발효특성개선
4. 균체성분의 조정
5. 향미성분
6. 연료용 알콜생산

1. 서 론

일반적으로 알콜발효는 전분질에 맥아, 곰팡이, 효모나 세균을 가하여 겔화, 액화, 당화, 발효와 같은 네 가지 단계를 거쳐 이루어진다. 지금까지 많은 연구가 이루어져오고 있는 알콜발효는 크게 세 가지로 나누어지며, 음료용, 연료용 및 유기용제 등이다. 즉, 알콜생산은 식용과 비식용으로 나눌 수 있으며, 발효의 성능개선은 결국 각각의 용도에 따라 목적과 방법에서 약간의 차이가 있다. 공통적인 것으로는 곡물을 위주로 한 전분질 원료의 범위를 확대하는 연구분야로서 지구상에 가장 많이 존재하는 섬유질을 활용하는 것과, 발효과정에서 발생하는 잡균의 오염을 차단하는 오염방지분야를 들 수 있다.

본문에서는 식용알콜을 대상으로 발효의 성능개선과 관련하여 풍미, 생산성, 발효특성 및 균체성분 조정을 목적으로 활발한 연구가 이루어지고 있는 세포융합기술을 소개하고자 한다.

2 세포융합

세포융합은 같은 종류 또는 서로 다른 종류의 세포를 하나의 세포로 만드는 기술로서 생태계에서 광범위하게 이루어지고 있는 수정과 비슷한 개념이다. 자연계에서는 환경조건에 따

라 저절로 세포간의 융합이 이루어지는 경우도 있으나, 이것은 대단히 빈도가 낮고 대부분은 인위적인 수단을 통해 세포의 융합이 이루어진다(2, 4). 인위적인 세포융합은 지금까지 대부분이 화학적인 방법을 이용하여 왔으나, 이것은 융합과정에서 발생하는 유전물질과 세포물질의 교환 외에 첨가하는 화학물질의 영향으로 인해 유전물질의 교란과 세포물질의 변화를 초래하여 일차적으로는 융합세포의 생존성에 영향을 미치고, 이 외에도 돌연변이에서 발생 가능한 무작위성으로 인해 융합세포의 안정성에 치명적인 장애가 되고 있다. 즉, 세포융합은 기존의 유전적인 방법에 비해 사용하는 장비,약품, 분석, 숙련도 등에 있어서 월등한 장점을 갖고 있음에도 활용이 낮은 것은 바로 화학적인 융합기술의 단점과 관련이 있다.

전기를 이용한 융합기술은 물리적인 수단으로서 융합과정에 첨가되는 화학물질의 도움없이 전류와 전기장을 이용하여 세포의 융합이 이루어진다. 즉, 정확하게 융합에 적용되는 세포의 유전물질과 세포물질의 교환을 통해 화학적인 방법에 비해 월등한 생존성, 안정성과 함께 융합세포의 유전분석이 가능하다. 특히 최근에 광범위하게 이용하고 있는 RAPD-PCR방법을 이용하면 융합시킨 세포의 유전분석을 24시간 내에 완료할 수 있다.

전기적 세포융합은 화학적인 융합의 장점을 포함하여, 이들의 단점을 극복한 기술로서 Sexual mating, 돌연변이와 유전공학적 방법을 이용한 균주개량이 어려운 미생물의 개량(7)에 대단히 효과적인 기술이다.

3. 발효특성개선

일반적으로 알콜발효는 35°C 이상에서는 발효능력이 급격하게 감소되므로 대부분의 발효는 30-33°C에서 진행된다. 반면에 발효과정은 발열에 의해 온도가 상승하므로 발효종결 시까지 냉각이 필수적이다(3). 즉, 고온에서 정상적인 발효가 가능한 균주를 개발한다면 잡균오염방지, 대사량 증가에 따른 생산성 증가와 함께 냉각비용을 획기적으로 감소할 수 있다. 특히 킬리호모의 도입으로 인한 풍미감소의 문제도 해결이 가능하다는 장점이 있다.

발효온도는 *Saccharomyces*속 효모인 경우에 더욱 심각하다. 이들 효모는 최적 성장온도가 대부분 30°C 정도로서 발효온도 상승으로 인한 알콜생산 저해가 특히 심하게 나타난다(12, 6). 주정효모로 가장 널리 이용되는 *Saccharomyces*속 효모의 온도특성을 개량하기 위해 많은 연구가 이루어졌고, 특히 효모 중에서 가장 고온인 42°C 에서도 성장이 가능한 *Kluyveromyces*속과 융합시켜 37-42 °C에서 알콜발효능

<Table 1> Ethanol production and thermo-tolerance of yeasts and their fusant.

Strain	42°C			Stability at 42°C after the generation, %		
	Ethanol formed after the day, % (w/v)					
	1	3	5	10	20	30
<i>S. carlsbergensis</i>	1.2	3.2	3.2	0	0	0
<i>K. marxianus</i>	2.0	3.4	3.4	100	100	100
Fusant	2.7	5.2	5.3	99.5	98.5	87.7

력이 최대 150%정도 향상된 결과가 있다 (Table 1). 즉, 지금까지 알려진 것과 달리 *Saccharomyces*속과 *Kluyveromyces*속 효모의 융합세포의 안정성이 낮다는 연구(10, 11)에 비하여 42 °C에서 성장과 알콜생산이 모두 양호한 결과(5)에 비추어 볼 때 42 °C 이상에서도 세포성장과 알콜생산이 가능한 새로운 융합세포의 개발이 가능할 것으로 예상된다.

한편, *Saccharomyces*속과 *Zygosaccharomyces*속 효모를 융합시켜 30%이상의 고농도의 당용액과 40°C에서 알콜발효를 시도한 연구(1, 8, 9)도 있으나, 50%의 당용액에서 성장이 가능한 융합세포는 얻었으나, 40°C에서의 발효능력은 30 °C에 비하여 35%밖에 나타나지 않았다.

지구상에 가장 흔한 유기성 당질로서 목재와 농산폐기물은 Hemicellulose이며, 이들의 주성분은 Arabinose가 축쇄결합된 Xylan이 가장 일반적이다. 즉, 발효가능한 전분질로서 이들을 사용하기 위한 많은 연구결과 Xylanase 생산균주(21-23), Xylan 발효세균(24-26), 융합세포를 이용하여 Xylan에서 직접 알콜을 생산(20)하는 연구가 이루어졌다. 그러나 2% Xylan을 원료로 융합세포의 알콜발효능력을 30°C에서 15일간 배양하여 측정한 결과 원균주가 0.0 및 0.008%인데 비하여 0.214 -0.280%를 생산하였다. 그러나 완전배지에서는 Xylanase활성이 전혀 나타나지 않는다는 단점이 있다. 이것은 Xylan의 분해가 세포의 구성효소 계열보다는 유도효소 계열에 의해 이루어진다는 것과, 정상적인 발효과정에서 발효액에 용출되는 Isoleucine에 의해서 Xylanase의 생합성이 억제되기 때문이다. 즉, Xylanase를 구성효소로 생성하는 균주와 융합을 시도한다면 일반적인 발효배지에서 효소활성을 통해 전분질에 포함된 미활용 부분을 활용하게 되어 전체적인 발효수율의 향상, 또는 지금까지

발효원료로 사용하지 못하였던 Xylan성분을 이용할 수 있는 기술의 개발이 기대된다.

또 다른 미활용 당질원료로서 유당을 들 수 있다. 유당은 1974년을 기준으로 미국에서만 7.3×10^8 kg(whey로서 14.7×10^8 kg)이 발생하며, 전분질에 비해 값이 싸며 알콜발효가 가능한 원료이지만 주정효모인 *Saccharomyces*속 효모는 유당의 발효능력이 없다. 유당발효능력이 있는 효모로서 *Kluyveromyces*속 역시 알콜에 의한 저해로 인해 알콜생산능력이 낮은 것이 문제이다(13). 즉, 유당에서 알콜발효능력이 없는 주정효모와 유당에서 알콜을 조금밖에 생산하지 못하는 효모를 융합시켜 유당에서 고농도로 알콜을 생산하려는 연구도 활발하게 이루어지고 있다(14-17). 특히 β -galactosidase의 생산능력을 갖고 있는 *K. lactis*와 주정효모를 융합시키는 경우는 유당을 경쟁력 있는 알콜발효원료로 이용할 수 있는 기술적인 돌파구를 마련할 것으로 예상된다. *Kluyveromyces*속 효모는 유당에서 평균적으로 약 10%(v/v)의 알콜을 생산하지만, 융합세포는 동일한 조건에서 13%(v/v)의 알콜을 생산한다(18).

이 분야의 연구는 우리나라의 주류산업에서 원료인 농작물의 가격이 국제시세보다 월등하게 비싸 근본적인 경쟁력 약화의 원인을 개선하기 위한 노력으로 집중되고 있으나 아직까지도 확실한 해결의 실마리는 개발되지 않고 있다. 특히 한국의 대표적인 주류인 맥주, 청주와 막걸리의 경우도 보다 값싼 원료의 확보, 또는 원료의 활용비율을 향상시키는 것은 주류산업의 수익성향상을 위해 대단히 중요한 연구과제라 할 수 있다.

전분질을 알콜로 전환시키는 발효과정은 젤화, 액화, 당화와 발효 같은 복잡한 단계를 거쳐 이루어진다. 또한 곰팡이 유래의 Glucoamylase를 첨가하여 포도당과 Maltose sugars의

생성을 촉진시켜 발효효율을 향상시키는 단계도 필요하다. *S. diascus*와 *S. uvarum*을 융합시킨 경우는 Glucoamylase를 생성하므로 전분에서 알콜발효시에 일반적인 효소의 첨가량을 절반으로 감소시켜도 동일한 발효효율을 나타낸다(19).

4. 균체성분의 조정

세포융합은 알콜발효에서 단순하게 생산성의 향상 또는 미활용 기질의 이용가능성을 확장시키는 것 이외에도 생산균주에서 특정 아미노산의 함량을 증가시키거나 효소를 생산하는 용도로도 적용된다.

*Saccharomyces cerevisiae*와 *S. uvarum*을 융합시킨 결과 L-methionine의 함량을 증가시킨 효모균체의 회수가 가능하다는 보고가 있다(27, 28). 이 기술은 아직까지 많은 개발의 여지를 두고 있으나, L-lysine을 제외하고는 아직도 상업적인 규모의 아미노산발효가 어렵다는 것을 상기한다면 알콜발효의 부산물로 발생하는 효모균체에서 고가의 아미노산을 생산하거나, 함유하고 있는 균체는 대단한 부가가치의 창조를 의미한다.

또한 *S. cerevisiae*와 *Z. rouxii*를 융합시켜 고농도 당용액에서의 발효성장과 함께 무기상태의 게르마늄을 생물학적으로 유기화시키는 연구도 보고되어 있다(1, 8). 일반적인 건조한 효모균체에 비하여 유기게르마늄을 함유하는 경

우는 최소한 1,000 배 이상의 부가가치가 발생한다. 특히 주정효모가 식용인 점에 착안하여 셀레늄, 크로미움, 아연 등을 함유한 건조효모균체의 생산기술은 알콜발효와 또 다른 응용분야의 개척을 의미하는 중요한 발견이다. 이러한 금속물질들을 Organo-metalloid라고 하며, 여러 나라에서 다양한 연구가 이루어지고 있다.

결국 효모를 적극적으로 활용한다는 측면에서 고려할 때, 가장 바람직한 것은 1차적으로 알콜발효를 거쳐 기호품을 생산하고, 잔류되는 균체성분으로서 다양한 의약품과 생리활성물질을 생산하는 분야라고 예상한다. 특히 효모는 현재의 기술로도 대규모 배양에 아무런 장애가 없으므로 적은 비용으로 고품질의 물질생산이 가능하다는 장점과 함께, 인류의 기원까지 거슬러 올라가는 긴 활용의 역사를 갖고 있는 가장 안전한 미생물의 하나라는 것이 효모관련기술의 특징이다. 한 예로서 효모가 생성하는 Glycoproteins은 동물이 생성하는 것과 동일한 과정과 활성을 가지므로 다양한 생리활성을 발휘하는 물질생산이 가능하다.

세포융합을 포함한 유전공학적으로 개량한 효모를 이용하여 Human interferon(30-33)의 생산시도가 가장 대표적인 예라고 할 수 있을 것이다. 이 외에도 효모가 생성하는 단백질들이 가장 인간의 것과 유사하다는 점에서 다양한 물질생산이 검토되고 있다(34-37). 가장 활발하게 검토되고 있는 대상물질들은 Table 2와 같다.

<Table 2> The most interesting human biologically-active proteins from yeasts

human interferon human serum albumin human growth hormone	epidermal growth factors insulin-like growth factors the surface antigen of Hepatitis B virus
---	---

5. 향미성분

알콜발효는 주로 효모에 의해 진행되는 여러 단계의 전환과정이며, 전체반응은 EMP회로를 거쳐 $C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2 C_2H_5OH + 2 CO_2$ 로 요약된다(29). 이론적으로는 중량기준으로 51.1%의 알콜과 48.9%의 CO_2 가 생성되지만 다양한 부산물이 발생하며 약 1%의 당분이 효모에 의해 소비되고, 일부 알콜은 증발과 이산화탄소생성에 이용된다.

알콜발효에서 발생가능한 부산물의 생성비율을 정확하게 계산하는 것은 대단히 복잡하고 어려운 작업이지만 포도주의 경우에 일반적으로 소비되는 당분을 기준으로 주요 부산물은 Glycerol 2.5-3.0%, Acetic acid 0.05-0.65%, Acetaldehyde 0.01-0.04%, 2,3-butanediol 0.06-0.10%, Succinic acid 0.02-0.05%, Lactic acid 0.02-0.05% 및 고급알콜류가 0.01-0.04% 정도 생성되며, 총량은 효모의 종류와 발효온도에 직접적인 영향을 받는다(30). 이 중에서 glycerol은 향과는 관련이 적으나 주로 발효초기에 생성되고 최종적으로는 Glycerol과 Phosphate로 전환된다. Lactic acid는 Pyruvate의 환원에 의해 생성되며, Acetaldehyde는 알콜로 환원되지 못한 대사중간물질들로부터 생성되어 Acetoin($CH_3COCHOHCH_3$)을 거쳐 최종적으로 환원되면서 2,3-butanediol을 생성하게 된다.

Succinic acid는 이산화탄소와 Pyruvate가 축합되면서 Oxaloacetic acid를 생성하는 과정에서 발생하며, 혐기적 발효의 초기에 발생하는 Acetic acid는 Acetaldehyde로부터 생성된다. 고급 알콜류는 주로 배양액에 생성되어 있는 아미노산들의 Deamination, Decarboxylation 및 환원과 Keto-acids들이 Decarboxylation되면서 생성된다. 대표적으로는 1-propanol, 2-methyl-1-propanol(isobutyl), 3-methyl-1-butanol(isoamyl alcohol)과 2-methyl-1-butanol 등이다.

미량이 존재하는 부산물로서 향미성분에 영향을 미치는 화합물들은 Hydrogen sulfide, Methyl mercaptan과 Ethyl mercaptan 등이며 이들은 효모균주와 직접적인 관련이 있다. 특히 Hydrogen sulfide과 Mercaptoethanol은 항진균제로 살포하는 농약에 포함된 황 성분이 발효과정에서 환원되면서 발생하므로 원료에서 황 성분을 1-5ppm 이하로 조절하는 것이 효과적이다.

풍미성분을 개량하기 위한 융합세포의 필요성은 알콜발효의 주요 공정인자들이 거의 대부분 효모와 직접적인 관련이 있기 때문이며, 요약하면 Table 3과 같다.

결국 주류의 향미성분을 조절하는 것은 1차적으로 발효원료의 선별이 중요하겠으나, 발효균주의 대사회로와 발효조건으로서 온도관리가 가장 핵심이라 할 수 있다. 즉, 안정된 유전적 성질의 고온발효 또는 저온발효 능력을

<Table 3> Factors affecting the alcohol fermentation of yeast cells.

Yeast cell characteristics	Conditions within the bioreactor
yeast strain	pH
age of yeast cells	temperature
charge on cell surface	feed flow rate
cell wall composition	composition of culture medium
cell size	

갖춘 융합세포를 이용하면 획기적인 품질의 주류를 생산할 수 있다. 특히 단순발효주에 다량 존재하는 유리 당분들로 인해 대부분의 성인병환자나 성인들의 기호도가 감소되는 것을 고려하여 당발효성능이 우수한 융합세포의 개발도 기대되는 분야이다.

6. 연료용 알콜생산

1970년대에 발생한 두 번의 오일위기와, 최근의 원유부족사태로 인해 화석연료에 대한 재평가작업이 이루어 졌고, 특히 환경문제와 관련하여 Ethanol을 비롯한 Bioenergy에 대한

관심이 증가되고 있다(38, 39). Ethanol은 재생이 가능하며, 완벽한 연소효율로 인해 가장 매력적인 연료이나 35°C 이상에서는 발효효율이 급격하게 감소되며, 효모의 성장이 억제되는 현상이 나타난다.

그러나 40°C 이상의 온도에서 알콜발효를 진행하면, 기존의 공정에 비해 냉각비용의 절감, 당화와 발효시간의 단축, 오염감소로 인해 상당한 경제적 효과가 발생하고(40), 연속공정으로 쉽게 전환할 수 있는 장점이 있다(41, 42). 43°C에서 성장이 가능한 *Kluyveromyces*속 효모를 대상으로 세포융합을 통해 얻은 다양한 융합세포를 18시간동안 진탕배양하여 지금

<Table 4> Characteristics of fusants

	Assimilation of sugars		
	Lactose	Maltose	Trehalose
Fusants			
Group 1	+	+	+
Group 2	+	+	+
Group 3	+	-	-
Parent strains			
A	+	-	+
B	-	+	

<Table 5> Effect of temperature on growth of parent strains and fusants

Strain	Growth(OD at 660 nm)	
	30°C	43°C
Parent strains		
A	0.95	0.80
B	1.10	0.05
Parent strains		
Group 1	0.85	0.83
Group 2	0.93	0.55
Group 3	ND*	0.23

ND* : Not determined.

까지의 연구결과와 달리 몇 가지 희망적인 결과가 보고되었다(Table 4, 5)(43-45).

한편 고온 알콜발효의 기술적인 장애로서 Ethanol의 증발온도가 30°C 이고, 비등점이 70°C 이므로 40°C 이상의 고온발효는 특별한 장치의 도움이 없는 한 이론상 일반적인 30°C 부근의 발효에 비해 낮을 수밖에 없다(41, 44). 즉, 세포융합을 통한 균주개량과 배양공학적인 연구를 통해 증발되는 알콜을 배양계에서 분리하면서 배양을 유지하는 기술개발이 요구된다.

〈참고문헌〉

1. 박인성. 1999. 효모균주의 개량을 위한 protoplast 형성과 electro-fusion에 관한 연구. 우석대학교 대학원 생물공학과 석사논문.
2. Peberdy, J. E. 1976. Factors affecting protoplast release in some filamentous fungi, *Transact. Brit. Myco. Soc.* 67: 21-39.
3. Van Uden, N. 1984. Effects of ethanol on the temperature relations of viability growth in yeast. *CRC Crit. Rev. Biotechnol.* 1: 263-272.
4. Schwenke, J. 1969. A rapid and reducible method for obtaining yeast protoplast, *J. Inst. Brew.* 75: 15-19.
5. 김민수, 김근. 2000. 고온내성 에탄올 생산 효모균주의 개발을 위한 *Saccharomyces*와 *Kluyveromyces*의 원형질체 융합. *산업미생물학회지* 28(2): 80-86.
6. John, R. P., N. Pammnent and P. F. Greenfield: 1981. Alcohol fermentation by yeast-the effect of environmental and other variables. *Process Biochem.* 16: 42-49.
7. Russell, I. and G. G. Stewart. 1979. Spheroplast fusion of brewer's yeast strain, *J. Inst. Brew. London* 85: 95-98.
8. 김승. 2000. 전기융합시킨 효모융합세포의 유전자분석과 안정성에 관한 연구. 우석대학교 대학원 생물공학과 석사논문.
9. 이종수 김찬조. 1988. *Saccharomyces cerevisiae* D-71과 *Zygosaccharomyces rouxii* SR-S의 세포융합으로 육성한 융합주의 특성. *한국산업미생물학회지* 16(4): 297-302.
10. Provost, A., C. Bourguignon, P. F. Fouriner, A. M. Ribet and H. Heslot. 1978. Intergeneric hybridization in yeasts through protoplast fusion. *FEMS. Microbiol. Lett.* 3: 309-312.
11. Stewart, G. G. 1981. The genetic manipulatin of industrial yeast strains. *Can. J. Microbiol.* 27: 973-990.
12. 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.
13. Farahnak, F., T. Seki, Dewey D. Y. Ryu and D. Ogrydziak. 1986. Construction of lactose-assimilating and high-ethanol-producing yeasts and protoplast fusion. *Appl. Environ. Microbiol.* 51(2): 362-367.
14. Anne, J., H. Eyssen and P. Desomer. 1976. Somatic hybridization of *Penicillium requefortii* with *P. chrysogenum* after protoplast fusion. *Nature(London)* 262: 719-721.
15. Anne, J. and J. F. Peberdy. 1975. Condition for induced fusion of fungal

- protoplast in polyethyleneglycol. Arch. Microbiol, 105: 201-205.
16. Ferenczy, L., F. Kevei and M. Szyege. 1975. High frequency fusion of fungal protoplasts. *Experientia* 31: 1028-1030.
 17. Ferenczy, L., F. Kevei and J. Zsolt, 1974. Fusion of fungal protoplasts. *Nature (London)* 248: 793-794.
 18. O'Leary, V. S., R. Green, B. C. Sullivan and V. H. Halsinger. 1977. Alcohol production by selected yeast strains in lactose-hydrolysed acid whey. *Biotech. Bioeng.* 19: 319-322.
 19. Russell, I., Crumplen, C. M., Jones, R. M. and Stewart, G. G. 1986. Efficiency of genetically engineered yeast in the production of ethanol from dextrinized cassava starch. *Biotech. Lett.* 8: 169-174.
 20. 김남순, 배명애, 서정훈. 1989. Xylanase 분비효모와 xylose 발효 효모의 protoplast fusion. *한국산업미생물학회지.* 17(2): 88-93.
 21. Ernest, K. C., T. Larry, K. C. Maris and J. N. Saddler. 1987. *Enzyme Microb. Technol.*, 9: 19.
 22. Biely, P., M. Vrsahska and Z. Kratky. 1980. *Eur. J. Biochem.* 108: 313.
 23. Notario, V., T. G. Villa and J. R. Villanueva. 1976. *Can. J. Microbiol.* 22: 312.
 24. Bryant, M. P. and N. Smith. 1956. *J. Bacteriol.* 72: 16.
 25. Hobson, P. N. and M. R. Purden. 1961. *J. Appl. Bacteriol.* 24: 188.
 26. Robert, B. H., R. Wolf and R. J. Bothast. 1987. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 2849.
 27. Brigidi, P., Matteuzzi, D. and Fava, F. 1988. Use of protoplast fusion to introduce methionine overproduction into *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 28: 268-271.
 28. Kavanagh, K. and P. A. Whittaker. 1996. Application of protoplast fusion to the nonconventional yeast. *Enzyme Microbiol. Technol.* 18: 45-51.
 29. Sols, A., Gancedo, C. and DelaFuente, G. 1971. In "The Yeasts: Physiology and Biochemistry of Yeasts" (A. H. Rose and J. S. Harrison, eds.), Vol. 2, pp. 271-307. Academic Press, New York.
 30. Pepper, H. J. and Perlman, D. 1979. *Microbial Technology*, Vol. 2, Academic Press, New York.
 31. Hitzeman, R. A., Hagie, F. E., Levine, H. L., Goeddel, D. V., Ammerer, G. and Hall, B. D. 1981. Expression of a human gene for interferon in yeast. *Nature (London)*. 293: 717-722.
 32. Ahmad, F., J. Schultz, E. E. Smith and W. J. Whelan. 1982. From Gene to Protein: Transaction into Biotechnology. Academic Press, Vol. 19, pp. 249-262.
 33. Derynck, R., Singh, A. and Goeddel, D. V. 1983. Expression of the human interferon- γ cDNA in yeast. *Nucl. Acids Res.* 11: 1819-1854.
 34. Hitzeman, R. A., Leung, D. W., Perry, L. G., Kohn, W. J., Levine, H. L. and Goeddel, D. V. 1983. Secretion of human interferons by yeast. *Science* 219: 620-625.
 35. Genetic Engineering News. 1983. Mary Ann Liebert Publishers, New York, p. 16(July/August).

36. Valanzuela, P., Medina, A., Rutter, W. J., Ammerer, G. and Hall, B. D. 1982. Synthesis and assembly of Hepatitis B virus surface antigen particles in yeast. *Nature* (London), 298: 347-350.
37. Hitzaman, R. A., Chen, C. Y., Hagie, F. E., Patzer, E. J., Liu, C. C., Estell, D. A., Miller, J. V., Yaffe, A., Kleid, D. G., Levinson, A. D. and Opperman, H. 1982. Expression of Hepatitis B surface antigen in yeast. *Nucl. Acids Res.* 11: 2745-2764.
38. de Figaeroa, L. I., de Richard, M. F. and de van Brook, M. R. 1984. Interspecific protoplast fusion of the baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces diascus*. *Biotechnol. Lett.* 6: 269-274.
39. Nojima, S. 1983. The development of continuous alcohol fermentation by immobilized living cells. *Chemical Economy & Engineering Review.* 15: 17-22.
40. Nishida, R. 1985. Characteristics of fusant yeast for ethanol fermentation. *Chemical Economy & Engineering Review.* 17: 16-21.
41. Lee, K. J., Skomicki, M. I., Tribe, D. E. and Rogers, P. L. 1981. The effect of temperature on the kinetics of ethanol production by strains of *Zymomonas mobilis*. *Biotechnol. Lett.* 3: 291-296.
42. Kosaric, N., Duvnjak, Z. and Stewart, G. G. 1981. Fuel ethanol from biomass: production, economics, and energy, p. 126-178. In Fiechter, A. (ed.), *Advances in biochemical engineering.* Vol. 20, Springer-Verlag.
43. Seki, T., Myoga, S., Limtong, S., Uedono, S., Kumusata, J. and Taguchi, H. 1983. Genetic construction of yeast strains for high ethanol production. *Biotechnol. Lett.* 5: 351-356.
44. Hughes, D. B., Tudrosgen, N. J. and Moye, C. J. 1984. The effect of temperature on the kinetics of ethanol production by a thermotolerant strain of *Kluyveromyces marxianus*. *Biotechnol. Lett.* 16: 1-6.
45. Hawke, S. J., Panter, C., Hayes, M. and Nguyes, M. H. 1983. Selection of yeast for fermentation of sweet sorghum juice to alcohol. *Food Technol., Australia.* 35:123-125.