

응집성 *Saccharomyces cerevisiae* CA-1의 분리와 에탄올 발효

이용범* · 심상국¹ · 한면수 · 정동효

중앙대학교 산업대학 식품가공학과, ¹동남보건전문대학 식품가공과

Screening and Ethanol Fermentation of Flocculent *Saccharomyces cerevisiae* CA-1

Yong-Bum Lee* Sang-Kook Shim¹, Myun-Soo Han and Dong-Hyo Chung

Department of Food Science and Technology, College of Industrial Science,
Chung-Ang University, Ansong 456-714, Korea

¹Department of Food Technology, Dongnam Health Junior College, Suwon 440-714, Korea

Abstract — A flocculating sugar tolerant yeast strain was isolated from fermenting Takju. This strain was identified as *Saccharomyces cerevisiae* CA-1 according to the Lodder's yeast taxonomic studies. The isolated yeast could grow in 50% glucose and in 7% ethanol in the YPD medium. It's optimal growth temperature, initial pH, shaking rate and initial glucose concentration for ethanol fermentation showed 35°C, 4.5, 150 rpm, 15%, respectively. Ethanol concentration was 63 g/l in 20% glucose after 24 hours, fermentation yield was 0.49 g-ethanol/g-glucose in 10% glucose after 24 hours and ethanol productivity was 3.09 g/l·h in 10% glucose after 12 hours in batch fermentation. Repeated batch fermentation was possible for over 50 days and ethanol yield, ethanol productivity and substrate conversion rate were 0.39~0.50 g/g, 1.63~2.08 g/l·h and more than 99%, respectively during these periods.

에탄올 생산에 관련된 연구는 오래 전부터 세계 여러 나라에서 연구되어 왔다(1). 에탄올 발효의 생산성을 높이기 위한 방법으로 내당성 및 내알콜성(2), 고응집성(3), 내열성(4) 등의 우수한 형질을 갖는 효모의 분리, 효모 대신에 세균 및 곰팡이 종류를 사용하는 방법(5, 6), 발효중 내알콜성 인자의 탐색(7, 8), 세포융합 및 유전자 조작을 사용해 기존에 탐색된 균주의 특성을 한 균주에 집약하는 방법에 의한 균주의 개발(9) 등이 에탄올 발효의 생산성을 높이는 방법으로 주로 연구되고 있다. 또한 앞의 방법을 응용하여 당화와 에탄올 발효를 한 과정에서 완료하는 균주의 개발(10)이 있다. 발효공정의 원가절감을 위한 연구로는 무증자 발효(11), 고농도 발효(12), 고온 발효(13), 연속발효(14), 혼합발효, 고정화 발효(15), 감압 발효(16) 등의 고수율 발효공정이 있으며 발효 후 발효산물에서 에탄올 회수를 위한 증류공정의 개선이 연구되고 있다.

단위용적당 에탄올 생산성 향상을 위하여 반응기

내부의 균체를 고농도로 유지하는 방법으로는 균체를 담체에 고정화시키거나 물리적 방법을 사용하여 균체를 분리한 후 재순환하는 방법이 사용되고 있다. 공업적으로 균체를 분리하는 방법으로는 원심분리나 한외여과법이 사용되고 있다. 원심분리의 경우 균체가 물리적 충격을 받아 사멸될 가능성이 있으며 재사용시 오염될 가능성이 높다. 또한 한외여과법의 경우 한외여과막과 기타 부대시설 비용이 많이 소요되므로 모두 공업적 규모의 발효시 생산성을 높히는데 단점이 된다(17). 그러나 발효시 응집성 균주를 사용하면 이와 같은 한계성을 극복할 수 있으며 여러가지 이점이 있다. 별도의 고정화과정이 필요하지 않으므로 고정화 비용과 설비가 요구되지 않는다. 발효 후 배양액을 2~3분간 정치하면 균체가 응집되어 침전하므로 균체의 분리가 용이하고 균체를 제거하는데 소요되는 에너지를 절약할 수 있어 생산원가를 절감할 수가 있다. 본 연구에서는 공업적인 면에서 유리한 응집성 효모를 술덧으로부터 분리하였고 이 균주를 회분발효와 반복회분발효(repeated batch fermentation)에 적용하여 에탄올 발효 특성 등을 조사하였다.

Key words: Ethanol fermentation, flocculent *Saccharomyces cerevisiae* CA-1, screening

*Corresponding author

재료 및 방법

배지

보존배지는 glucose 20 g, yeast extract 10 g, peptone 20 g, agar 20 g을 증류수 1 l에 녹여 살균(121°C, 15 min)하여 사용하였다(18). 발효배지는 yeast extract 10 g, peptone 20 g과 소정농도의 glucose를 tap water에 녹여 1 l로 한 후 살균하여 사용하였다.

응집성 효모의 선발 및 동정

경기도 각 지역 막걸리 양조장의 술덧을 dilution pour plate법(19)에 따라 보존배지에서 30°C로 2일간 배양하여 생성된 colony로부터 효모를 1차 분리하였다. 1차 분리된 효모를 10% glucose 발효배지에서 배양하여 대수기에 이르렀을 때 vortex mixer를 사용하여 강하게 진탕시킨 후 일정시간 경과된 상등액의 탁도를 측정하여 가장 빨리 응집 침전되는 균주를 최종적으로 선발하였다.

선발된 응집성 효모의 동정은 The Yeasts(24)와 Yeasts: characteristics and identification(25)에 근거하여 행하였으며 VITEX SYSTEMS의 Yeast diagnostic kit을 이용하여 생화학적 성질을 조사하였다.

분석

균체량의 측정은 균체의 흡광도와 건조균체량으로부터 계산하였다. 균체의 농도는 spectrophotometer (GBC914, Australia)를 사용하여 600 nm에서 흡광도를 측정하였다(20). 잔당량은 DNS법(21)으로 측정하였다. 에탄올의 정량은 isopropanol을 internal standard로 하여 gas chromatography(Delsi 700, Germany)로 분석하였다(20).

배양조건

발효온도에 따른 영향은 10% glucose 발효배지 100 ml에 전 배양한 seed를 1%(v/v) 되게 접종하여 25, 30, 35, 40°C의 배양온도에서 진탕배양(100 rpm, 24 hr, shaking incubator, Vision, Korea)한 후 에탄올 생성량을 측정하였다. 초기 pH에 따른 영향은 10% glucose 발효배지를 pH 3.5~6.5로 변화시켜 진탕배양한 후 잔당량, 균체량, 에탄올 생성량을 측정하여 최적 초기 pH를 구하였다(22). 균주의 내당성은 glucose가 10~60%(w/v) 함유된 발효배지를 35°C에서 2일간 100 rpm으로 진탕배양한 후 균체량을 측정하였다. 내알콜성은 에탄올이 0~15%(v/v) 함유된 10% glucose 발효배지를 진탕배양한 후 균체량을 측정하였다. 진탕효과가 발효에 미치는 영향은 10% glucose 발효

배지를 35°C에서 정지, 100 rpm, 150 rpm, 200 rpm으로 진탕배양한 후 잔당량, 에탄올량, 균체량을 측정하였다.

회분발효는 발효배지의 glucose 농도를 5~25%(w/v)로 변화하여 초기 pH 4.5, 35°C에서 150 rpm으로 36 시간 진탕배양 하였다(23). 반복회분발효는 10% glucose 발효배지(pH 4.5)를 35°C에서 150 rpm으로 진탕배양 하면서 24시간마다 새로운 배지로 교환하여 반복회분발효를 하였다. 배지의 교환은 발효 후 배양액을 5분간 정지하여 균체를 침전시킨 후 상등액을 제거하고 새로운 배지를 가하는 방법을 사용 하였다. 배지 교환 전에 시료를 채취하여 잔당량, 균체량, 에탄올량을 측정하였다(20).

반응상수의 계산

회분발효에서 계산한 반응상수는 에탄올 생산성(P_E), 에탄올 수율($Y_{p/s}$), 비기질 소모속도(q_s), 비에탄올 생산성(q_p), 기질전환율(%C), 비증식속도(μ_n), 그리고 총괄 에탄올 생산성(Q)으로 한과 정(20)의 방법에 따라 계산하였다.

결과 및 고찰

균주의 동정 및 응집성 확인

분리된 균주는 구형이고 응집성과 침강성이 우수하였으며 출아법에 의하여 증식하였다. 또한 0.01% cyclohexamide 첨가 배지에서 성장하지 못하였으며 melibiose를 발효하지 못하고 lactose와 질산염을 자화하지 못하는 특성과 urea를 가수분해하지 못하는 특성으로 보아 *Saccharomyces cerevisiae*로 동정되었다(Table 1, 2). 한편 분리된 균주의 생화학적 성질을 VITEX SYSTEMS의 Yeast diagnostic kit로 조사한 결과 Table 3과 같은 탄소원 자화능력 및 생리적 특성을 나타내어 *Saccharomyces cerevisiae*로 재확인되었다. 이 분리균주는 응집성 *Saccharomyces cerevisiae* CA-1로 명명하였다.

본 실험실에서 보유하고 있는 일반 *Saccharomyces*

Table 1. Morphological characteristics of the isolated *Saccharomyces cerevisiae* CA-1

Shape	Oval
Size	2.5~6.5 μ m
Flocculation	+
Formation of ascospore	+
Formation of pseudomycelium	-
Mode of vegetative reproducing	budding

Table 2. Physiological characteristics of the isolated *Saccharomyces cerevisiae* CA-1

Carbon source	Assimilation	Fermentation
Glucose	+	+
Melibiose	-	-
Galactose	+	ND
Raffinose	+	+
Sucrose	+	+
Melezitiose	+	-
Maltose	-	ND
Cellobiose	ND	
Trehalose	-	
Lactose	-	
Glycerol	-	
Erythritol	-	

+: Positive, -: Negative, ND: Not Detected

Table 3. Result of diagnosis for isolated *Saccharomyces cerevisiae* CA-1 by VITEX kit

Carbon source	Assimilation
Galactose	-
Lactose	+
Sucrose	+
Maltose	-
Cellobiose	-
α -Methyl-D-glucoside	-
Xylose	-
Arabinose	-
Trehalose	-
Melezitiose	-
Raffinose	+
N-acetyl-D-glucosamine	+
Xylitol	-
Dulcitol	-
Adonitol	-
Palatinose	-
Glycerol	-
Sorbitol	-
Erythritol	-
Melibiose	-
Cyclohexamide	-
Glucose	+
Inositol	-
Nitrate	-
2-keto-D-gluconate	-
Urea	-

+: Positive, -: Negative

cerevisiae ATCC 9763과 분리된 응집성 *Saccharomyces cerevisiae* CA-1을 같은 조건으로 배양한 후 정

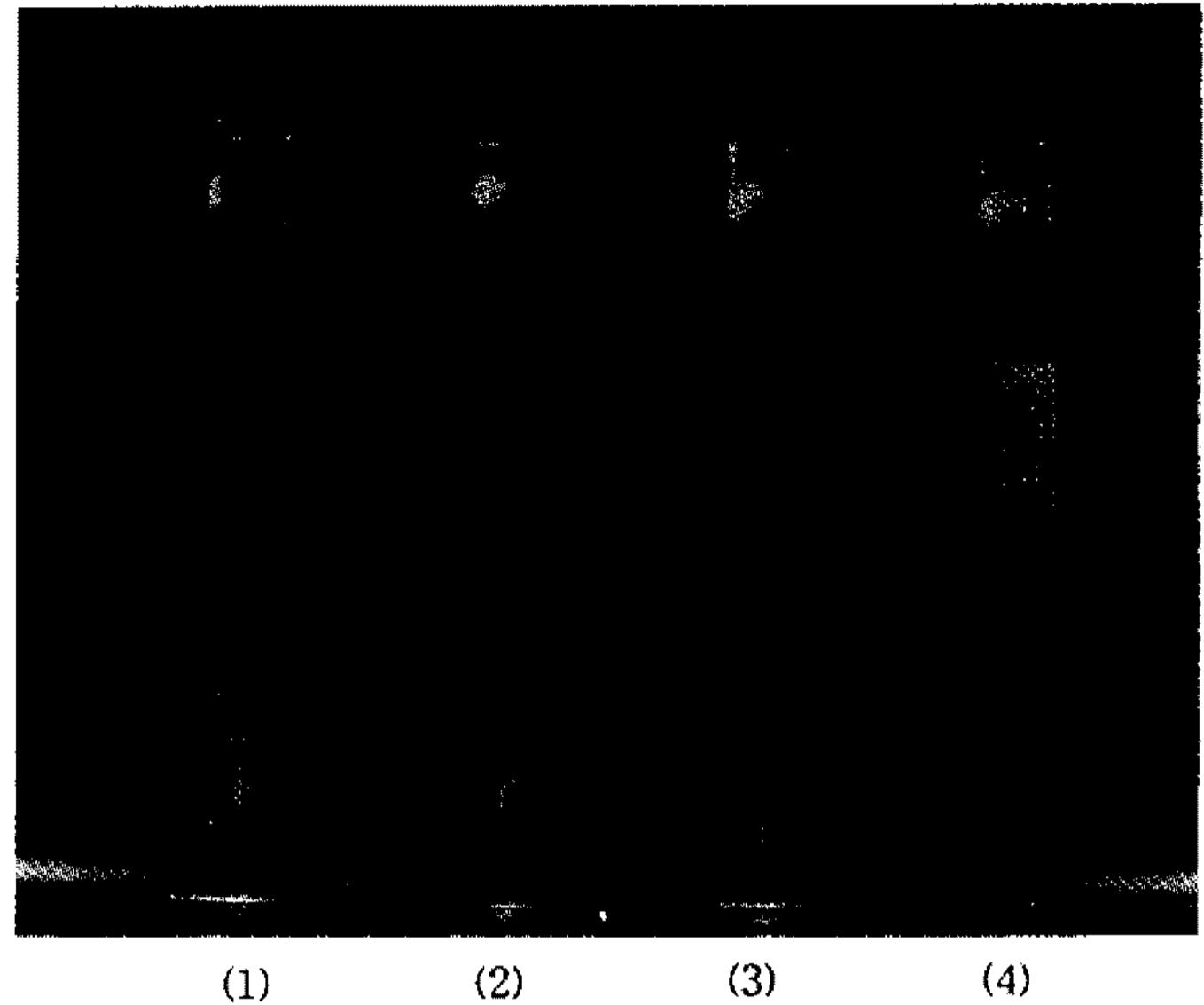


Fig. 1. Photograph of flocculent *Saccharomyces cerevisiae* CA-1 and non flocculent *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763.

(1) Flocculent *Saccharomyces cerevisiae* CA-1 set for 1 min after shaking.

(2) Flocculent *Saccharomyces cerevisiae* CA-1 set for 3 min after shaking.

(3) Flocculent *Saccharomyces cerevisiae* CA-1 set for 5 min after shaking.

(4) Non flocculent *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763 set for 5 min after shaking.

치시켰을 때 응집 침전되는 모습을 Fig. 1에 나타내었다. 일반 효모는 5분간 정치하여도 균체가 침전되지 않았으나 분리된 응집성 효모는 3분 이내에 대부분이 응집 침전되어 우수한 응집성을 나타내었다.

분리균주의 특성

분리균주의 내당성 배지중의 glucose를 10~60%로 변화시켜 발효한 후 균체량을 측정된 결과는 Fig. 2와 같았다. 당농도 30%까지는 균체량이 완만히 감소하는 경향을 보였으나 40% 이상의 농도에서는 급격히 감소하는 경향을 나타내었다. 50% 당농도에서도 발효시간은 지체되었으나 에탄올 발효가 이루어졌으며, 60% 당농도에서는 발효시간이 지속됨에 따라 균체량은 증가하였으나 에탄올은 거의 생성되지 않았다. 이는 Yang 등(26)의 실험에서 새로 분리된 균주인 *Saccharomyces cerevisiae* D-1과 주정생산에 공업적으로 이용되고 있는 *Saccharomyces cerevisiae*의 중간정도 수준을 나타내었다.

분리균주의 내알콜성 10% glucose 발효배지에 에탄올을 0~15%(v/v) 농도로 가하여 발효한 후 균체량을 Fig. 3에 나타내었다. 배지중 초기 에탄올 농도가 증가함에 따라 생육이 급격히 저해되었으며 9%

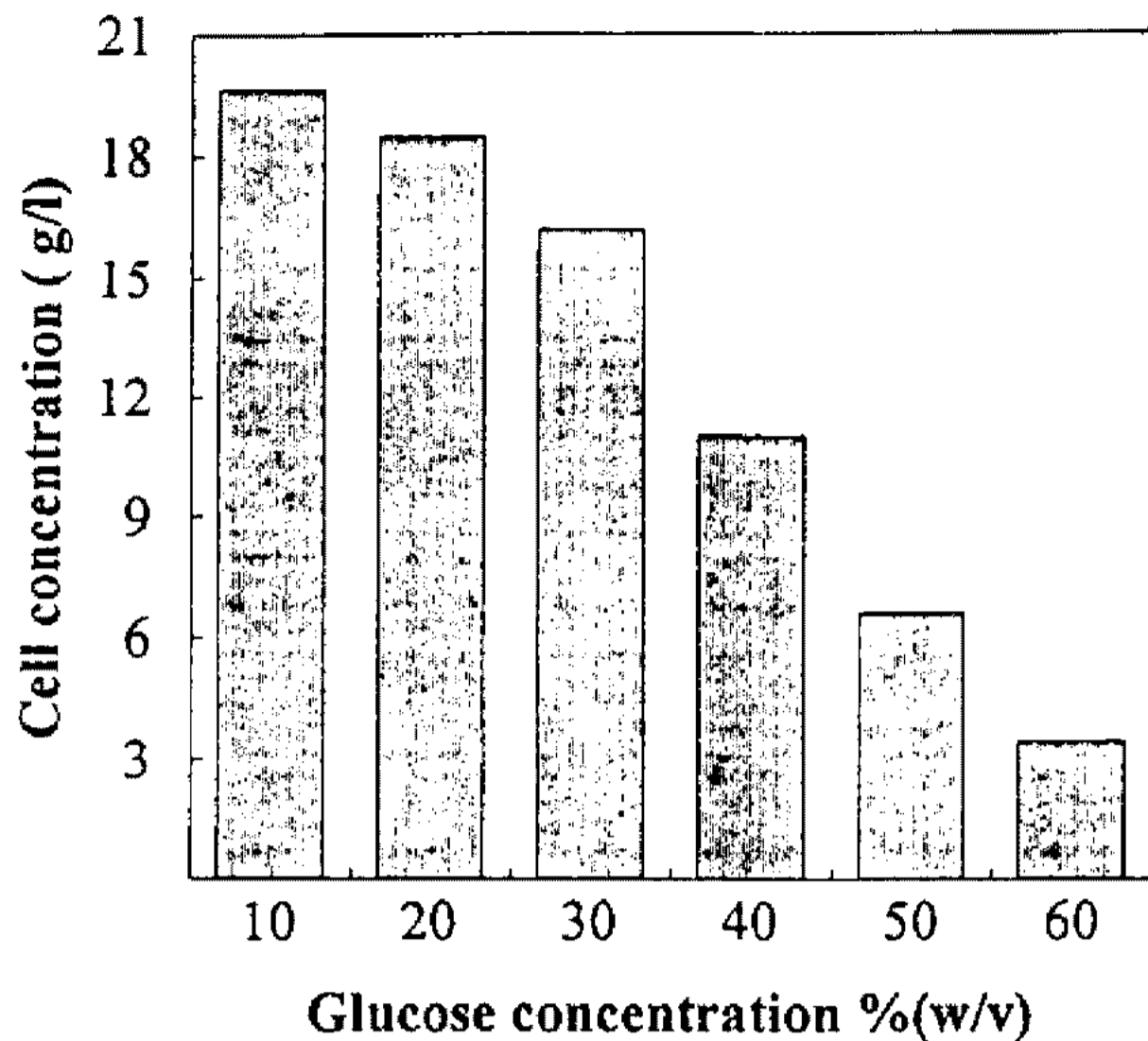


Fig. 2. Effect of glucose concentration on the cell growth of flocculent *Saccharomyces cerevisiae* CA-1.

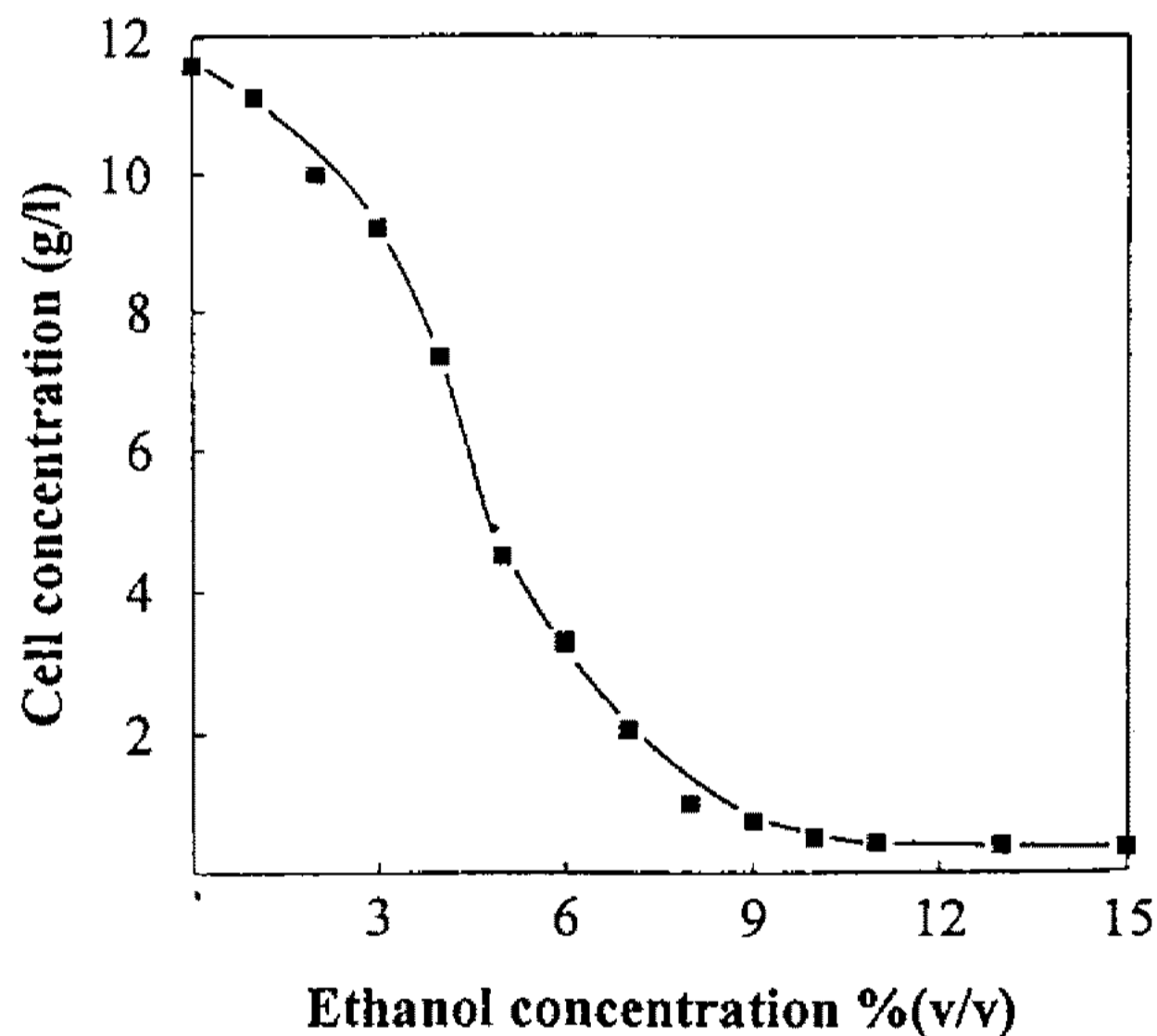


Fig. 3. Effect of ethanol concentration on the growth of flocculent *Saccharomyces cerevisiae* CA-1.

에서는 생육이 거의 불가능하였다. 한편 Kida 등(27)의 보고에 의하면 발효온도 33°C, 기질농도 20%의 molasses를 이용하여 초기 에탄올 농도를 0~100 g/l로 조정하여 발효시킨 결과 배지중 에탄올 함량과 균체의 비증식속도는 반비례하였으며 50 g/l 이상에서는 균체의 비증식속도가 급격히 감소하였고 90 g/l 이상에서는 생육이 불가능하였다고 보고하였다. 이와 비교하여 본 실험에서는 배지중 에탄올 농도가 40 g/l 이상에서는 균체량이 급속히 감소하였고 70 g/l 이상에서는 생육이 불가능하였다. 그러나 본 실험중 glucose 35%, 35°C, 150 rpm 초기 에탄올 농도 0%로 3일간 진탕발효시킨 결과 에탄올 축적농도가 14.2% (w/v)에 달하는 실험 결과에서 발효시 초기 배지중

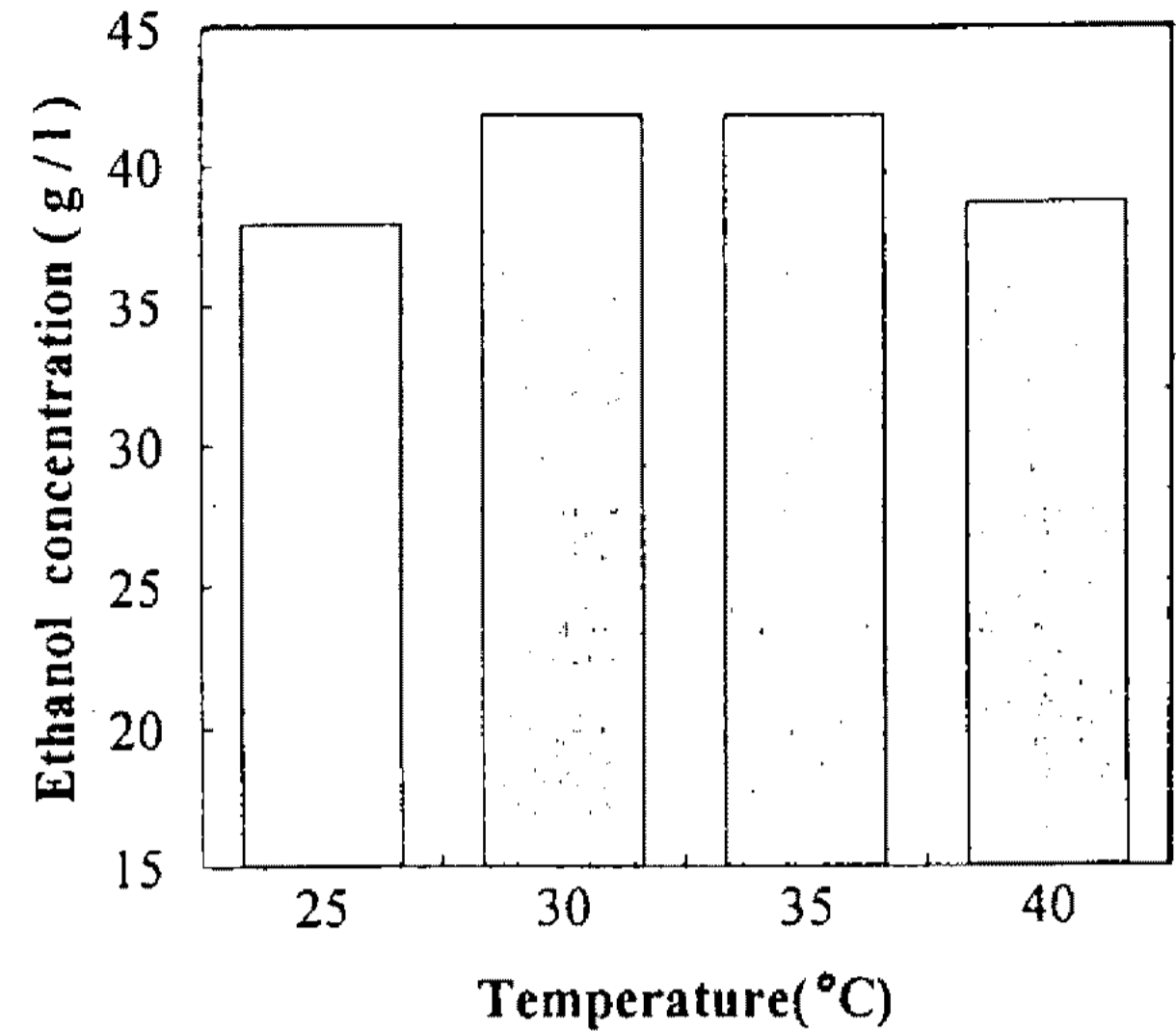


Fig. 4. Effect of temperature on ethanol fermentation by flocculent *Saccharomyces cerevisiae* CA-1.

에탄올 농도와 발효에 따라 배지중 에탄올이 축적될 때의 내알콜성이 일치되지 않는다는 결과가 나타났다. 이는 균체의 증식없이 에탄올발효가 수행되는 경우와 발효초기에 첨가되는 에탄올이 발효중 축적되는 에탄올 보다 균체 생육 저해가 강한 경우로 생각될 수 있으며 발효중의 내알콜기작과 내알콜성인자에 관하여 보다 연구할 필요가 있다.

분리균주의 알콜발효 특성

배양온도 발효중의 온도가 에탄올 생성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 10% glucose 발효배지를 25, 30, 35, 40°C의 온도에서 24시간 진탕배양한 후 잔당량, 에탄올 생성량을 측정하여 결과 잔당량은 모두 1 g/l 이하였으며 에탄올 생성량은 35°C일 때 41.9 g/l로 최대값을 나타내었다(Fig. 4). 따라서 본 실험에서는 최적 발효온도를 35°C로 설정하여 이하의 실험을 행하였다.

초기 pH 배지의 초기 pH가 발효에 미치는 영향을 조사하기 위하여 10% glucose 발효배지의 pH를 3.5~6.5로 조정하여 배양한 후 균체량, 잔당량과 에탄올 생성량은 Fig. 5와 같았다. 이는 일반적으로 알려진 효모의 생육 최적 pH와 일치하였으며 본 균주의 최적 초기 pH는 4.5이었다. 이때 잔당량은 모두 1 g/l 이하였으며 pH 4.5에서 에탄올 생성량이 가장 높았다. 배지의 초기 pH에 따른 에탄올 생성량과 균체량을 비교하면 에탄올 생성량은 pH 4.5에서 최고값을 나타낸 반면 균체 생성량은 pH 4.0에서 최고값을 나타냈으며 감소하다가 증가하는 경향을 나타내었다.

진탕효과 회분발효시 진탕효과가 에탄올 생성량에

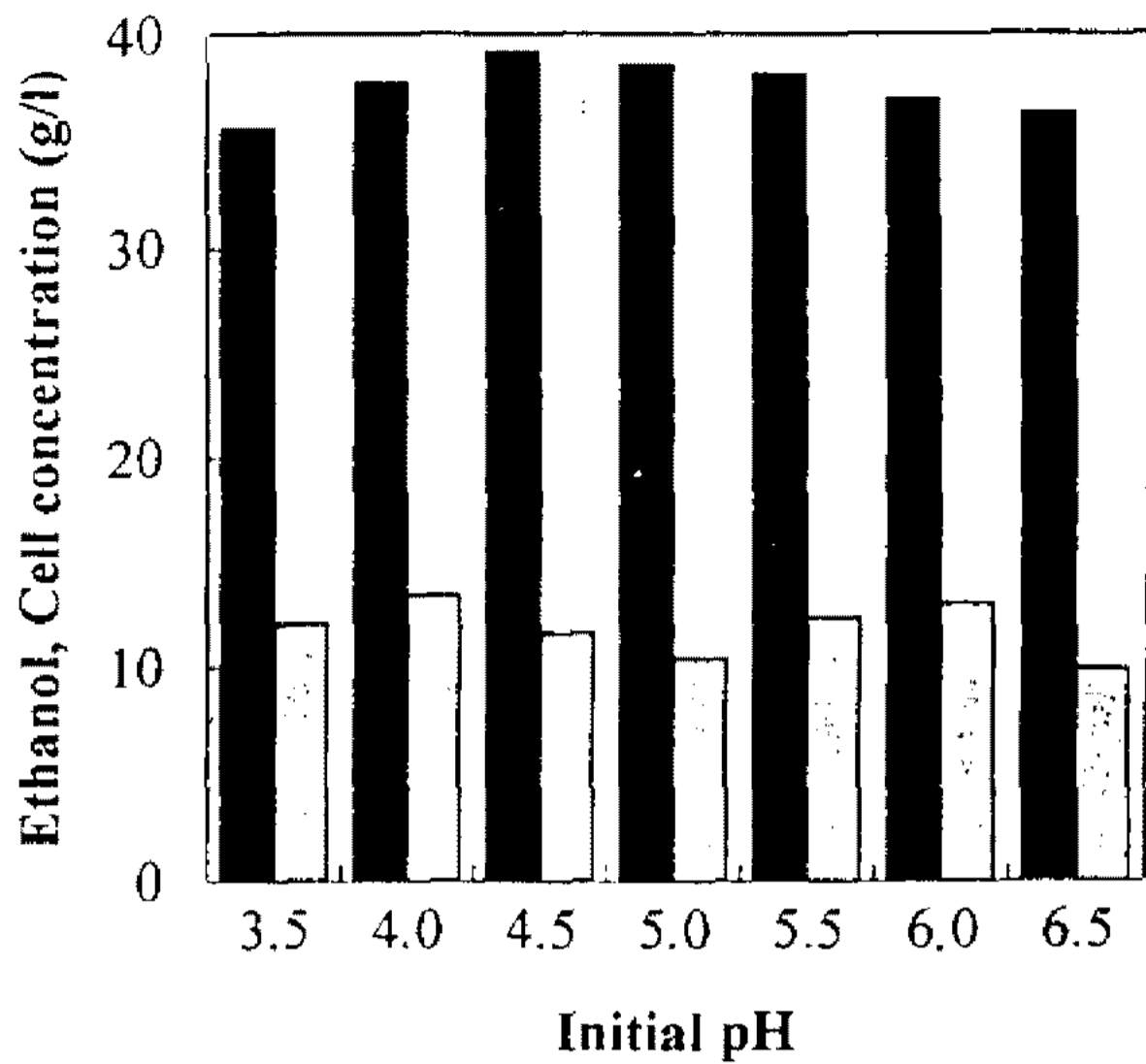


Fig. 5. Effect of initial pH on ethanol fermentation by flocculent *Saccharomyces cerevisiae* CA-1.

■: Ethanol concentration (g/l), □: Cell concentration (g/l)

Table 4. Effect of shaking rates on ethanol fermentation by flocculent *Saccharomyces cerevisiae* CA-1

	Fermentation Time	No shaking	100 rpm	150 rpm	200 rpm
Residual sugar (g/l)	12 hr	65.2	20.8	1.6	32.3
	24 hr	23.6	—	—	—
Ethanol (g/l)	12 hr	11.7	40.2	49.9	34.5
	24 hr	38.3	48.7	45.7	47.2
Cell (g/l)	12 hr	1.8	11.4	14.4	9.2
	24 hr	5.8	15.7	14.2	12.3

미치는 영향을 조사하여 기질량과 발효온도를 고정하고 shaking rate를 변수로 하여 잔당량, 균체량, 에탄올 생성량을 Table 4에 나타내었다.

Shaking rate가 증가함에 따라 150 rpm까지는 에탄올 생산량이 증가하였으나 그 이상의 경우는 오히려 감소하는 경향을 보였다. 이 결과는 진탕함으로써 균체가 응집되지 않고 분산되어 기질과 반응면적이 넓어지므로 에탄올 생성량이 많아지는 것으로 생각할 수 있으며 과도한 진탕은 균체의 생육을 저해하는 것으로 생각되며 응집성 효모로 에탄올 발효시에는 shaking rate를 적절히 조절할 필요가 있었다. 본 실험에서는 회분발효시 최적 shaking rate를 150 rpm으로 설정하였다.

회분발효에 의한 에탄올 생산

Table 5. Kinetic parameters of flocculent *Saccharomyces cerevisiae* CA-1 as affected by the initial glucose concentrations

Glucose concentration (%)	μ_n	q_p	q_s	$Y_{p/s}$	P_E	%C	T
5	0.799	38.7	94.5	0.41	0.57	99.5	12
10	0.481	85.4	181.0	0.45	1.26	99.5	12
15	0.462	126.9	283.4	0.45	1.87	99.5	12
20	0.445	127.1	283.4	0.45	1.87	99.5	24
25	0.436	126.2	283.4	0.45	1.86	99.5	36

μ_n : Specific growth rate (h^{-1})

q_p : Specific ethanol productivity (g ethanol/l cell·h)

q_s : Specific substrate uptake rate (g consumed substrate/l cell·h)

$Y_{p/s}$: Ethanol yield coefficient (g/g)

P_E : Ethanol productivity (g/l·h)

%C: Substrate conversion rate

T: Time period for calculation (h)

5%~25%(w/v)로 초기 기질농도를 조정 한 후 60 시간동안 회분발효시켰을 때 얻어지는 발효특성치는 Table 5와 같았다. 균체의 비증식속도는 초기 glucose 농도가 5%에서 0.799 h^{-1} 로 최대값을 나타내었으며 glucose의 농도가 증가함에 따라 비증식속도는 감소되었고 균체량이 최대값과 정지기에 도달하는 시간도 기질의 농도가 증가함에 따라 지연되는 경향이였다. 따라서 20% 이상의 glucose 농도에서는 기질저해의 영향을 받음을 알 수 있었다.

비에탄올 생산성은 20%에서 최대값을, 비기질소모 속도는 15%~25%에서 동일한 값을, 에탄올생산율은 20%, 에탄올 생산성은 15%에서 최대값을 나타내었으며 초기 glucose 농도가 증가함에 따라 증가되는 경향을 보였으며 20% 이상의 농도부터는 감소되었다.

반복회분발효에 의한 에탄올 생산

50일 이상 반복회분발효시키며 측정 한 발효특성은 Fig. 5와 같았다. 발효특성을 보면 반복회분발효 기간 동안 에탄올 생성량은 38~49 g/l, 잔당량은 1 g/l 이하, 균체 생성량은 실험 기간중 증가하는 경향을 나타내었으나 발효의 적절한 유지를 위하여 7~15 g/l를 유지하도록 조절하였다. 한편 Maragritis 등(28)은 효모 *Debaryomyces polymorphus*를 고정화하여 약 11회 반복발효가 가능하였으며, 한 등(20)은 약 30회 반복 발효가 가능하였으나 그 이상의 경우는 담체가 파괴되어 내부의 균체가 유실되었다고 보고하였다. 본 실험에서는 50회 이상의 반복회분발효 과정중 에탄올

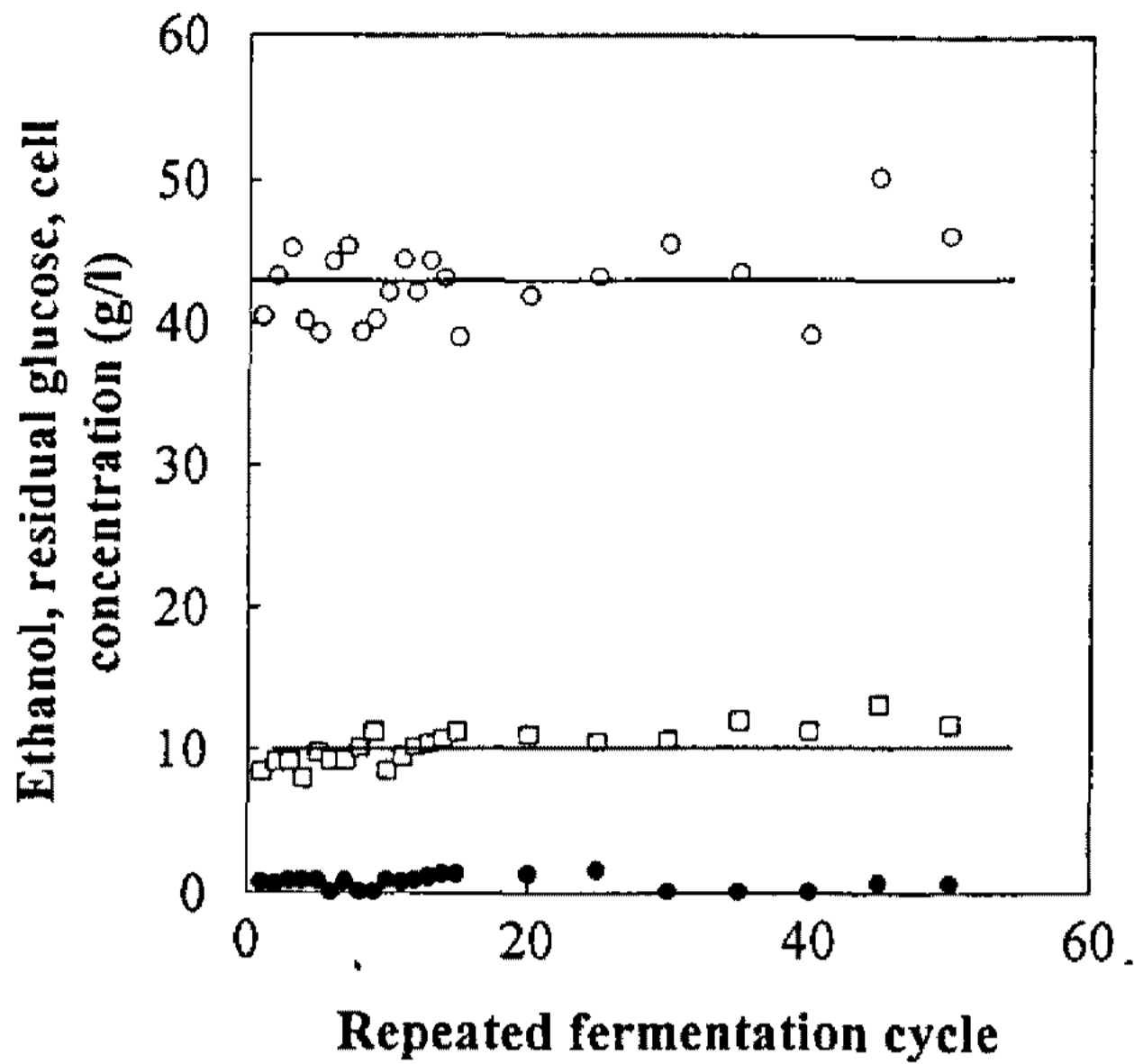


Fig. 6. Repeated batch fermentation with flocculent *Saccharomyces cerevisiae* CA-1.

-○-: Ethanol, -●-: Residual glucose, -□-: Cell

발효활력과 고응집성을 잃지 않았다. 따라서 응집성 효모를 발효에 사용하면 고정화 균체에 의한 에탄올 발효시 담체의 파괴에 따른 균체의 유실에 따른 발효액의 혼탁과 발효 중단없이 장기간 안정적으로 균체의 재순환에 의한 반복회분발효가 가능하였다.

요 약

술덧으로부터 응집성 효모를 분리하여 동정한 결과 응집성 *Saccharomyces cerevisiae* CA-1로 판명되었다. 이 균주는 50% glucose에서도 생육이 가능한 내당성이며 에탄올 7%까지 첨가된 YPD 배지중에서도 생육이 가능하였다. 그리고 발효특성은 최적 발효온도 35°C, 최적 초기 pH 4.5와 최적 shaking rate는 150 rpm을 나타내었다. 20% glucose 농도에서 24시간 회분발효시 에탄올 생성량 63 g/l을 나타냈으며, 10% glucose 농도에서는 24시간 발효시 에탄올 수율은 0.49 g/g, 12시간 발효시 에탄올 생산성은 3.09 g/l·h로 각각 최고값을 나타내었다. 10% glucose 발효배지를 24시간마다 교환하여 발효를 계속한 반복회분 발효에서는 에탄올 수율은 0.39~0.50 g/g, 에탄올 생산성은 1.63~2.08 g/l·h, 기질전환율은 99% 이상으로 50일간 활력을 유지하며 발효를 지속하였다.

참고문헌

1. Hubbert Verachtet and Ren De Mot. 1990. *Yeast Biotechnology and Biocatalysis*, Pp. 57, Marcel De-

- kker Inc. New York.
- Ernades J.R., M. Matulionis, S.H. Cruz, M.C. Bertolini, and C. Lalue. 1990. Isolation of new ethanol-tolerant yeast for fuel ethanol production from sucrose. *Biotechnol. Lett.* **12**: 463-468.
 - Kuriyama H., Y. Seiko, T. Murakami, H. Kobayashi, and Y. Sonoda. 1985. Continuous ethanol fermentation with cell recycling using flocculating yeast. *J. Ferment. Technol.* **63**: 159-165.
 - Sato, K., S.I. Myazaki, N. Masumoto, K. Yoshizawa, and K. Nakamura. 1988. Pilot scale solid state ethanol fermentation by inert gas circulation using moderately thermophilic yeast. *J. Ferment. Technol.* **66**: 173-179.
 - Fatiou Toukorou, L. Donadazzi, A. Milco, and P. Germain. 1989. Ethanol production by anaerobic thermophilic bacteria: kinetic in fed batch cultures of *Clostridium thermohydro-sulfuricum*. *Biotechnol. Lett.* **11**: 443-447.
 - Rogers, D.L., A.E. Goodman, and R.H. Heyes. 1984. *Zymomonas* ethanol fermentation. *Microbiol Science.* **1**: 133-138.
 - Kim, H.J. and Y.W. Ryu. 1988. The condition affecting ethanol tolerance of yeast strain in alcohol fermentation temperature and substrate type. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **4**: 167-171.
 - Kim, H.J., H.W. Jang, and Y.W. Ryu. 1989. The condition affecting ethanol tolerance of yeast strain in alcohol fermentation-Study on the aeration and lipid addition. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **4**: 172-176.
 - Seki, T., S. Myoga, S. Limtong, and S. Uedno. 1983. Genetic construction of yeast strain for high ethanol production. *Biotechnol. Lett.* **5**: 351-356.
 - Caleja, G.B., S. Levy-Risk, C.V. Lusena, A. Nasim, and G. Moranell. 1982. Direct and quantitative conversion of starch to ethanol by the yeast *Saccharomyces alluvinus*. *Biotechnol. Lett.* **4**: 593-601.
 - Ueda, S., C.T. Zenin, D.A. Monterio, and Y.K. Park. 1981. Production of ethanol from raw cassava starch by a non conventional fermentation method. *Biotechnol. Bioeng.* **6**: 85-91.
 - Hur, B.K., H.C. Kim, J.W. Yang, and Y.I. Mok. 1989. Characteristics of alcohol fermentation by the culture of high cell density. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **4**: 253-258.
 - Kamihara, T.K., V. Vongsuvanlert, and J. Kumanuanta. 1981. Ethanol fermentation at high temperature. *Annual Report of ICME* **4**: 359-364.
 - Margaritis, A. and P. Bajpai. 1982. Continuous ethanol production from *Jerusalem artichoke* tubers. *Biotechnol. Bioeng.* **24**: 1473-1479.
 - Navarro, J.M. and G. Durand. 1977. Modification of yeast metabolism by immobilization onto porous glass. *Eur. J. Appl. Microbiol.* **4**: 243-251.

16. Ramalingham, A. and R.K. Finn. 1977. The vacuform process new approach to fermentation alcohol. *Biotechnol. Bioeng.* **19**: 583-591.
17. Del Rosario. E.J., K.Y. Lee, and P.L. Rogers. 1979. Kinetics of alcoholic fermentation at high levels. *Biotechnol. Bioeng.* **21**: 1477-1484.
18. Kida, K., H. Yamadaki, S.H. Asano, T. Nakata, and Y. Sonoda. 1989. The effect of aeration on stability of continuous ethanol fermentation by a flocculating yeast. *J. Ferment. Bioeng.* **68**: 107-111.
19. Harold J. Benson. 1990. *Microbiological application: A laboratory manual in general microbiology*. Pp. 80. WBC publisher, USA.
20. Han, M.S. and D.H. Chung. 1992. Ethanol production using alginate immobilized cell of *Zyomonas mobilis*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **20**: 588-596.
21. Miler, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**: 426-431.
22. Buzàs, Zs, K. Dallmann, and B. Szajáni. 1989. Influence of pH on the growth and ethanol production of free and immobilized *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Biotechnol. Bioeng.* **34**: 882-864.
23. Sheda, R.K., G. Verma, R.P. Gupta, and H.K. Tewaki. 1984. Ethanol production from molasses using cell recycling. *J. Ferment. Technol.* **62**: 471-476.
24. Lodder, J. 1971. *The Yeast A taxonomic study*. North-Holland publishing Co., New York.
25. Barnett, J.A., R.W. Payne, and D. Yarrow. 1983. *Yeasts Characteristics and identification*. Cambridge Univ. press, USA.
26. Yang, J.Y., K.H. Park, U.H. Pek, and J.H. Yu. 1990. Screening and characterization of high-alcohol producing *Saccharomyces cerevisiae* D1. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotech.* **18**: 511-516.
27. Kida, K., S. Moriyama, K. Kume, K. Suruga, and Y. Sonoda. 1991. Repeated Batch Ethanol Fermentation by a Flocculating Yeast, *Saccharomyces cerevisiae* IR-2. *J. Ferment. Bioeng.* **71**: 340-344.
28. Margaritis, A., P. Bajpai, and M.A. Lachance. 1983. The use of free and immobilized cells of *Debaryomyces polymorphus* to produce ethanol from *Jerusalem artichoke* tubers. *J. Ferment. Technol.* **61**: 533-541.

(Received 20 May 1995)