

Killer 효모 *Saccharomyces cerevisiae* B15-1의 에탄올 발효특성

이창호 · 우철주 · 이종수¹ · 정기택 · 박희동*
경북대학교 식품공학과, ¹신일전문대학 식품가공과

Characteristics of Ethanol Fermentation by a Killer Yeast, *Saccharomyces cerevisiae* B15-1. Chang-Ho Rhee, Cheol-Joo Woo, Jong-Soo Lee¹, Ki-Taek Chung and Heui-Dong Park*. Department of Food Science and Technology, Kyungpook National University, Taegu 702-701, Korea, and ¹Department of Food Science and Technology, Shinill Junior College, Taegu 706-022, Korea. — Characteristics of ethanol fermentation were investigated during the stationary culture of a killer yeast, *Saccharomyces cerevisiae* B15-1. Specific ethanol production rate reached the maximum level, 1.203 g-EtOH/g-cell·hr, at 150 g/l of the initial glucose concentration. No big differences were obtained in ethanol fermentability based on the initial sugar concentration below 150 g/l. When 200 g/l of sugar was used, fermentability dropped significantly. Although the final cell mass and the amount of ethanol produced were increased, their increase rates were declined according to the increase of initial sugar concentration. It was found that most of the sugar used below 150 g/l of concentration could be changed to ethanol. However, when 200 g/l of sugar was used, some of them remained in the media even after increase of cell mass and fermentation stopped. The ethanol yield was decreased when initial sugar concentration was high, and were increased when the amount of ethanol produced was increased and finally reached the plateau over 60 g/l of ethanol concentration.

발효에 의한 에탄올의 생산에 있어서 원료 물질의 비용과 증류과정중의 스팀비용이 제품의 값에 가장 큰 비중을 차지한다(1). 따라서 에탄올 발효에 있어서 높은 수율을 얻는 것이 매우 중요한 요인중의 하나로서 효모균은 이에 아주 적절한 특성을 가지고 있다. 특히, 연료용 에탄올을 생산하기 위해서는 고농도의 에탄올을 단시간내에 발효할 수 있는 이른바 고생산성 발효를 할 수 있는 효모균을 사용하는 것이 유리하다. 또한 우수한 발효공정 기술의 확립 등의 문제가 해결되어야 한다. 에탄올 생산성 향상을 위하여 발효에 미치는 여러 요인에 관하여는 많은 기초 연구 보고가 있다(2, 3). 그러나 에탄올 발효에서 생산성을 증가시키는데는 어느 정도의 한계가 있으며 이는 기질과 생성된 에탄올에 의한 발효의 저해 현상에 의해 일어난다(4, 5). 따라서 에탄올 발효에 미치는 제반조건을 정확히 분석하는 것이 필요하다. 이러한 목적으로 미생물의 성장속도에 관한 최초의 연구로는 1946년 Monod가 흡착이론에 근거하여 수식화한 것이 있으나 이 식은 생성물의 농도가 희박한 환경에서만 잘 적용된다는 단점을 가지고 있다. 이런 단점을 보완하기 위해 생성물의 농도가 미생물의 성장속도에 미치는 영향을 고려한 식들이 여러 연구자에 의해 보고되었다(6, 7). 이외에도 초기 기질의 영향, 생성물의 영향, 초기 에탄올 농도의 영향, 배양 온도, 초기 pH, 통기 조건 등을 고려한 식을 이용한

에탄올 발효특성을 규명하고자 하는 연구들이 시도되었다(8, 9). 한편 killer 효모에 관하여는 Makower와 Bevan(10)에 의해 1963년 처음으로 보고된 후 killer 독소의 정제 및 특성에 관한 많은 연구가 진행되어 왔다(11, 12). Killer 효모는 독소를 분비하여 이 독소에 감수성인 효모들의 생육을 억제할 수 있기 때문에 killer 효모를 사용하여 알코올 발효를 행할 경우 killer 독소에 저항성이 없는 다른 효모의 오염으로 인한 이상발효를 감소시킬 수 있는 장점이 있다(13). 따라서 원형질체 융합이나 cytoduction에 의한 청주 및 포도주의 제조에 적합한 killer 효모를 개량하기 위한 많은 연구들이 시도되어 왔다(14-17). 본 연구실에서는 에탄올 발효에 적합한 killer 효모의 분리를 목적으로 이미 에탄올 발효력 및 killer 독소의 생산력이 매우 강한 *Saccharomyces cerevisiae* B15-1을 분리하여 그 특성을 조사한 바 있다(18, 19). 그러나 현재까지 killer 효모를 사용한 에탄올 발효시 초기 당농도, 균체량 및 에탄올의 생성량의 상관관계에 관한 보고는 거의 없는 실정이다. 따라서 본 연구에서는 killer 효모 *S. cerevisiae* B15-1을 사용하여 정치배양에 의한 에탄올 발효를 행하면서 발효에 미치는 각종 인자들의 영향을 조사하였으며, 발효액중의 생성된 에탄올 농도, 균체 농도 및 당 농도와의 관계를 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

*Corresponding author.

Key words: *Saccharomyces cerevisiae* B15-1, killer yeast, kinetic analysis, ethanol fermentation

사용 균주

본 연구에 사용한 균주는 본 연구실에서 분리, 동정하여 보관중인 killer 효모, *Saccharomyces cerevisiae* B 15-1(18, 19)로서 YPD(yeast extract 1%, peptone 2%, dextrose 2%) 고체 사면 배지에 접종하여 30°C에서 2일간 배양한 후 4°C에서 냉장 보관 하면서, 2주마다 새로운 배지에 계대 배양하여 사용하였다.

배지 조성

효모의 배양을 위해서는 pH를 5.0으로 조절한 YPD 액체배지를 사용하였으며, 종배양은 30°C에서 100 rpm으로 24시간 진탕하면서 행하였다. 발효 배지는 1/에 glucose 100 g, yeast extract 10 g, peptone 20 g, MgSO₄·7H₂O 0.25 g, KCl 1.3 g, (NH₄)₂SO₄ 4.5 g을 함유하는 배지를 pH 5.0으로 조절하여 사용하였으며, 발효에 사용한 종배양액의 초기 접종량은 5%(v/v)이었다. 당은 살균시 갈변을 방지하기 위하여 다른 성분과 분리 살균하여 사용하였다.

에탄올 발효

에탄올 발효는 초기 pH 5.0, 기질농도 150 g/l의 배지를 사용하여 30°C에서 정치배양을 실시하였다. 각 배양조건을 검토하기 위하여는 배양 온도, 초기 pH, 초기 기질 농도 변화에 따라 에탄올 발효를 수행하면서 일정한 시간 간격으로 발효 특성을 조사하였다.

분석 방법

균체량 측정은 배양액을 원심 분리하여 증류수로 2회 세척한 후 동일량의 증류수에 현탁하여 Spectrophotometer(CE-393, Cecil Co.)를 사용하여 660 nm에서 흡광도를 측정 후 건조 균체량(g/l)으로 환산하여 구하였다. 발효 후 잔당의 농도는 DNS(dinitrosalicylic acid) 법(20)으로, 에탄올 농도는 산화법(rapid oxidation method)(21)으로 측정하였다.

Kinetic parameter의 계산

Table 1. Effect of temperature on the ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* B15-1.

Temperature (°C)	μ	q_p	$Y_{x/s}$	$Y_{p/s}$	F ¹⁾	Q ²⁾
25	0.104	0.656	0.047	0.450	98.33	1.568
28	0.114	0.881	0.049	0.460	98.00	1.688
30	0.179	1.203	0.034	0.473	98.67	1.850
32	0.152	1.108	0.030	0.464	98.13	1.700
35	0.110	0.931	0.026	0.452	98.00	1.638

¹⁾F represents ethanol fermentability (g-sugar consumed/g-total sugar).

²⁾Q represents overall ethanol yield productivity (g-EtOH/hr).

본 연구에서 고찰한 kinetic parameter는 균체의 비성장 속도(μ : hr⁻¹), 에탄올 비생성 속도(Q_p : g-EtOH/g-cell·hr), 균체 수율($Y_{x/s}$: g-cell/g-sugar consumed), 에탄올 수율($Y_{p/s}$: g-EtOH/g-sugar consumed), 에탄올 발효능(F : g-sugar consumed/g-total sugar) 및 총괄 에탄올 생산성(Q : g-EtOH/hr) 등이었다. 균체의 비성장 속도 및 에탄올 비생성 속도는 대수기 상태에서의 단위 시간당 균체 및 에탄올 증가량으로, 균체 수율 및 에탄올 수율은 발효가 완전히 끝난 후 기질의 소모량에 대한 균체 및 에탄올의 생성량으로, 또한 에탄올 발효능 및 총괄 에탄올 생산성은 첨가한 총 당농도에 대한 당의 소모량 % 및 단위 시간당 에탄올의 최대 생성량으로 환산하여 구하였다.

결과 및 고찰

배양조건에 따른 *S. cerevisiae* B15-1의 에탄올 발효 특성

에탄올 발효배지의 초기 pH 5.0, 기질농도를 150 g/l으로 하고 25~35°C 범위의 온도에서 에탄올 발효를 행하면서 발효 특성을 조사한 결과는 Table 1과 같다. 균체의 비성장 속도, 에탄올 비생성 속도, 에탄올 발효능 및 총괄 에탄올 생산성은 30°C에서 가장 높았으며, 그 이하 또는 이상의 온도에서는 감소하는 경향을 나타내었다.

초기 pH를 4.5, 5.0, 5.5로 조절한 배지를 사용하여 30°C에서 에탄올 발효를 행한 후 발효 특성을 조사한 결과는 Table 2와 같다. 균체의 최대 비성장 속도, 에탄올 비생성 속도, 기질 소비량에 대한 에탄올 수율, 그리고 총괄 에탄올 생산성 모두 pH 5.0에서 가장 높게 나타났으며, pH가 5.0보다 감소하거나 증가하는 경우에는 감소하였다.

초기 기질농도에 따른 *S. cerevisiae* B15-1의 에탄올 발효 특성

초기 기질농도를 1/당 50 g에서 200 g이 되게 조절된 배지에서 에탄올 발효를 행한 후 에탄올 발효특성을 조사한 결과는 Table 3과 같다. 에탄올 비생성 속도, 에탄올 발효능은 기질농도가 150 g/l일 때 가장 높았으며 기질농도가 그 이하일 때나 이상일 때는 감소하는 경향을 보였다. 균체의 비성장 속도는 초기 당농도가

Table 2. Effect of initial pH of media on the ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* B15-1.

pH	μ	q_p	$Y_{x/s}$	$Y_{p/s}$	F	Q
4.5	0.153	0.989	0.035	0.453	98.67	1.847
5.0	0.179	1.203	0.034	0.473	98.67	1.850
5.5	0.153	1.198	0.033	0.454	98.67	1.806

Table 3. Effect of initial concentration of sugar on the ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* B15-1.

Initial sugar concentration (g/l)	μ	q_p	$Y_{x/s}$	$Y_{p/s}$	F	Q
50	0.242	1.019	0.078	0.537	98.40	1.270
100	0.202	1.164	0.060	0.505	98.20	1.750
150	0.179	1.203	0.034	0.473	98.67	1.850
200	0.162	1.101	0.030	0.466	95.00	2.000

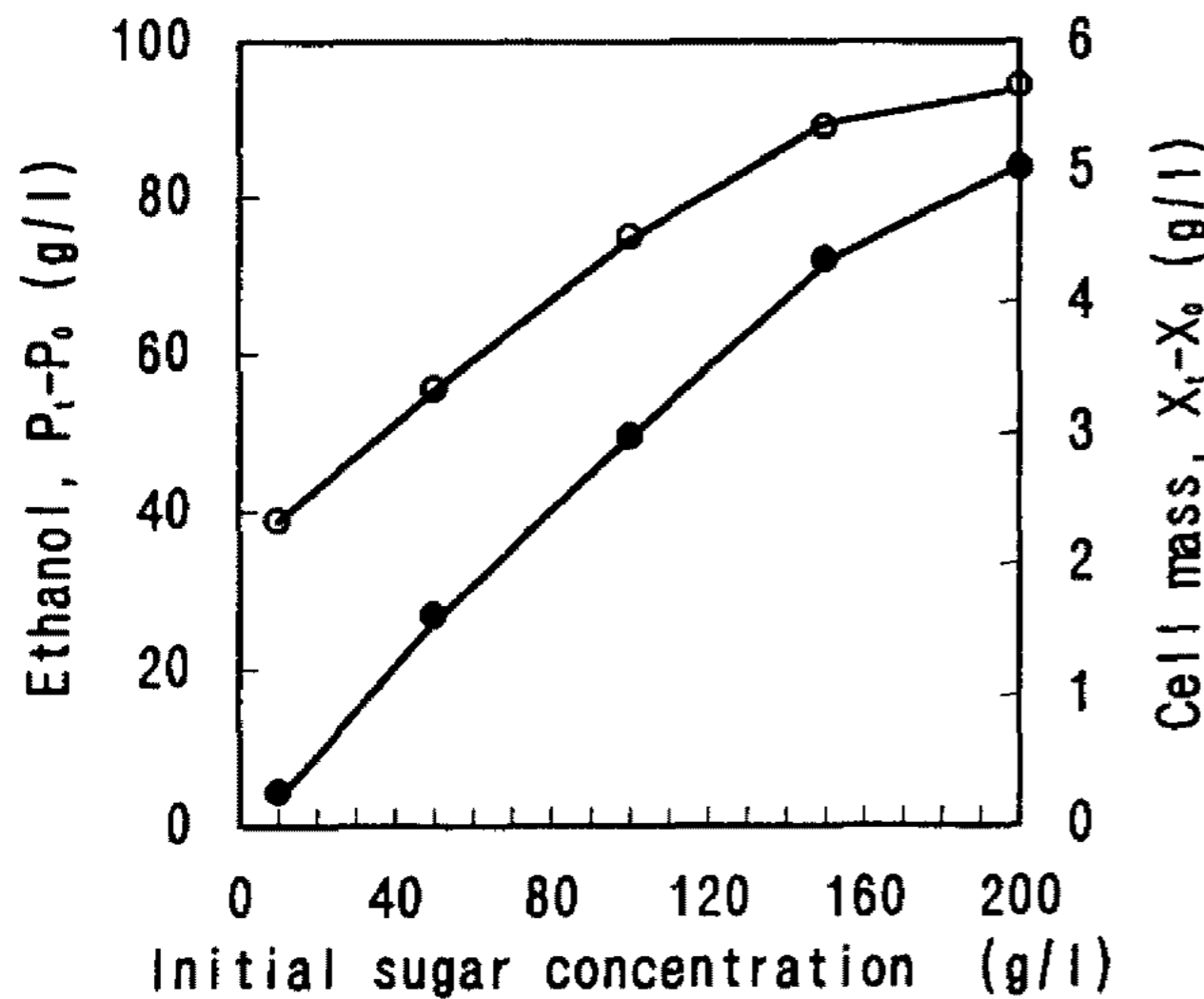


Fig. 1. Effect of initial sugar concentration on the net increase of cell mass and ethanol produced in the ethanol fermentation by stationary culture of a killer yeast, *Saccharomyces cerevisiae* B15-1.

○: Net increase of cell mass, ●: Net increase of ethanol produced

낮을 수록 가장 높은 값을 나타내었으며 당 농도가 증가함에 따라 감소하여 에탄올 비생성 속도가 최대일 때의 기질 농도와 일치하지 않았다. 최적조건인 초기 당농도 150 g/l, 최적 pH인 5.0의 배지를 사용하여 최적온도인 30°C에서 발효 중의 균체의 비성장 속도, 에탄올 비생성 속도는 각각 0.179 hr⁻¹와 1.203 g-EtOH/g-cell·hr을 나타내었으며, 기질 소비량에 대한 에탄올 수율, 그리고 총괄 에탄올 생산성은 각각 0.472 g-EtOH/g-sugar, 1.85 g-EtOH/hr이었다.

초기 기질농도가 최종 균체량과 최종 에탄올 생성량에 미치는 영향을 조사한 결과는 Fig. 1과 같다. 150 g/l 이하의 농도에서는 기질의 농도가 증가함에 따라 균체량이 비례적으로 증가하였으나 그 이상의 농도에서는 완만하게 증가하였다. 최종 에탄올 생성량 역시 150 g/l까지는 기질의 농도가 증가함에 따라 거의 비례적으로 증가하다가 그 이상의 농도에서는 완만하게 증가하는 현상을 보였다. 그 원인을 규명하기 위하여 각각의

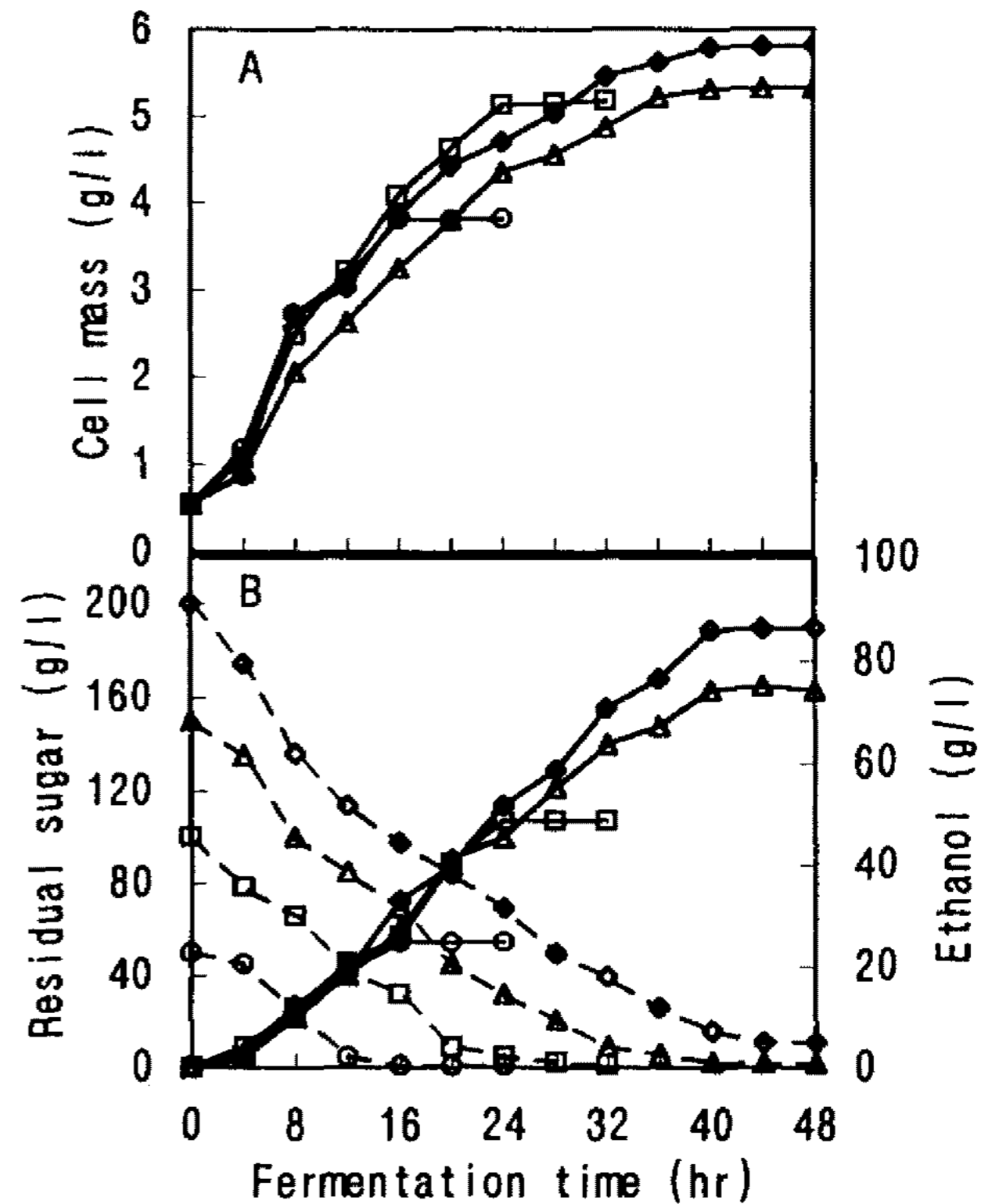


Fig. 2. Change of cell mass (A), concentration of residual sugar and ethanol produced (B) under the condition of various initial sugar concentrations during the ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* B15-1.

In figure B, solid and dotted lines represent ethanol and residual sugar concentration, respectively.

○: 50 g/l, ●: 100 g/l, △: 150 g/l, ▲: 200 g/l

당농도로 발효를 행하면서 당농도의 변화, 균체량, 에탄올 생성량 및 에탄올 수율 등을 조사하였다.

초기 기질 농도를 달리 했을 때 발효시간에 따른 에탄올 발효의 특성

각각의 당농도에서 발효시간에 따른 에탄올 발효의 특성을 알아보기 위하여 초기 기질농도를 달리하여 발효를 진행시키면서 경시적으로 균체량, 에탄올 생성량 및 남아있는 환원당의 양을 조사한 결과는 Fig. 2와 같다. 발효가 진행됨에 따라 균체의 양이 증가하고 첨가한 당의 소비가 이루어 지면서 동시에 에탄올의 농도가 점차 증가하였다. 초기 당농도가 150 g/l 이하로 낮은 경우에는 초기 당농도 50, 100, 150 g/l에서 생성된 발효 종료 후 최종 에탄올의 농도가 비례적으로 증가하는 현상을 보였다. 또한 발효 종료 후 배지에 당이 거의 남아있지 않아 거의 대부분의 당이 에탄올로 전환됨을 알 수 있었다. 초기 기질농도를 150 g/l로 조절한 경우에도 에탄올 생성량이 74.1 g/l로 되면서 잔존 기질 농도는 1.9 g/l에 도달하였으나 기질농도가 200 g/l의 경우에는 균체의 증식과 발효가 종료된 후에도 10.7 g/l의 당이 잔존하였다. 이러한 현상은 과량의 초기 기질을 함유하는 배지에서 발효에 의해 생성된 과량의

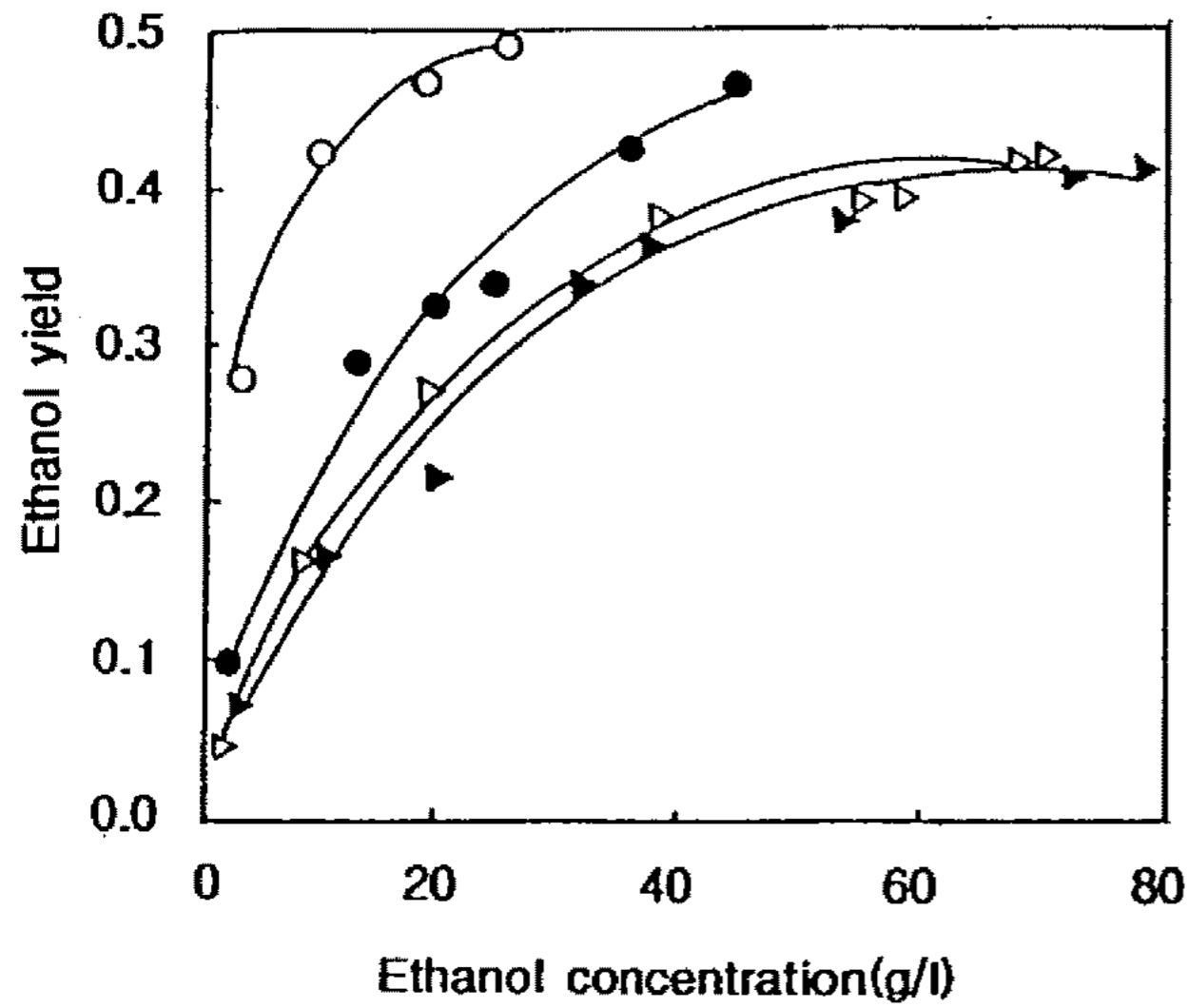


Fig. 3. Correlation between concentration of ethanol produced and ethanol yield under the condition of various sugar concentrations in the ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* B15-1.

○: 50 g/l, ●: 100 g/l, △: 150 g/l, ▲: 200 g/l

에탄올이 효모의 생육을 저해하여 상당량의 기질이 남아 있음에도 불구하고 효모의 생육이 정지되기 때문인 것으로 추정할 수 있다.

초기 기질농도 및 에탄올 생성량과 에탄올 수율과의 관계

초기 기질농도가 높을 경우 상당량의 당이 남아 있음에도 불구하고 발효가 정지되는 이유를 구체적으로 조사하기 위하여 초기 기질농도를 매개 변수로 생성된 에탄올의 농도와 에탄올 수율 사이의 관계를 조사한 결과는 Fig. 3과 같다. 초기 기질농도가 높을 수록 에탄올 수율은 급격히 감소하는 현상을 보였으나 초기 당농도가 150 g/l 및 200 g/l인 경우에는 거의 유사한 경향을 나타내었다. 또한 에탄올 생성량이 소량일 경우에는 에탄올 생성량이 증가함에 따라 에탄올 수율은 급격히 증가하였으며, 에탄올 생성량이 증가함에 따라 점차 완만한 증가현상을 보이다가 에탄올 생성량이 60 g/l 이상의 농도에서는 거의 일정한 값을 나타내었다. 따라서 초기 기질농도가 높은 경우에는 생성된 에탄올의 증가로 인하여 발효가 저해됨을 알 수 있었다.

에탄올 생성량이 60 g/l 이상으로 증가함에 따라 에탄올 수율이 거의 일정한 현상(Fig. 3)은 생성된 에탄올이 효모의 생육을 저해하기 때문일 가능성이 있다. 이러한 현상을 확인하기 위하여 생성된 에탄올의 농도와 균체 수율과의 관계를 조사한 결과는 Fig. 4와 같다. 균체 수율 역시 초기 기질농도가 높을 수록 급격히 감소하였으며 초기 당농도가 150 g/l 및 200 g/l인 경우에는 거의 유사한 경향을 나타내었다. 또한 에탄올 생성량이 초기의 10 g/l까지 증가함에 따라 균체 수율은

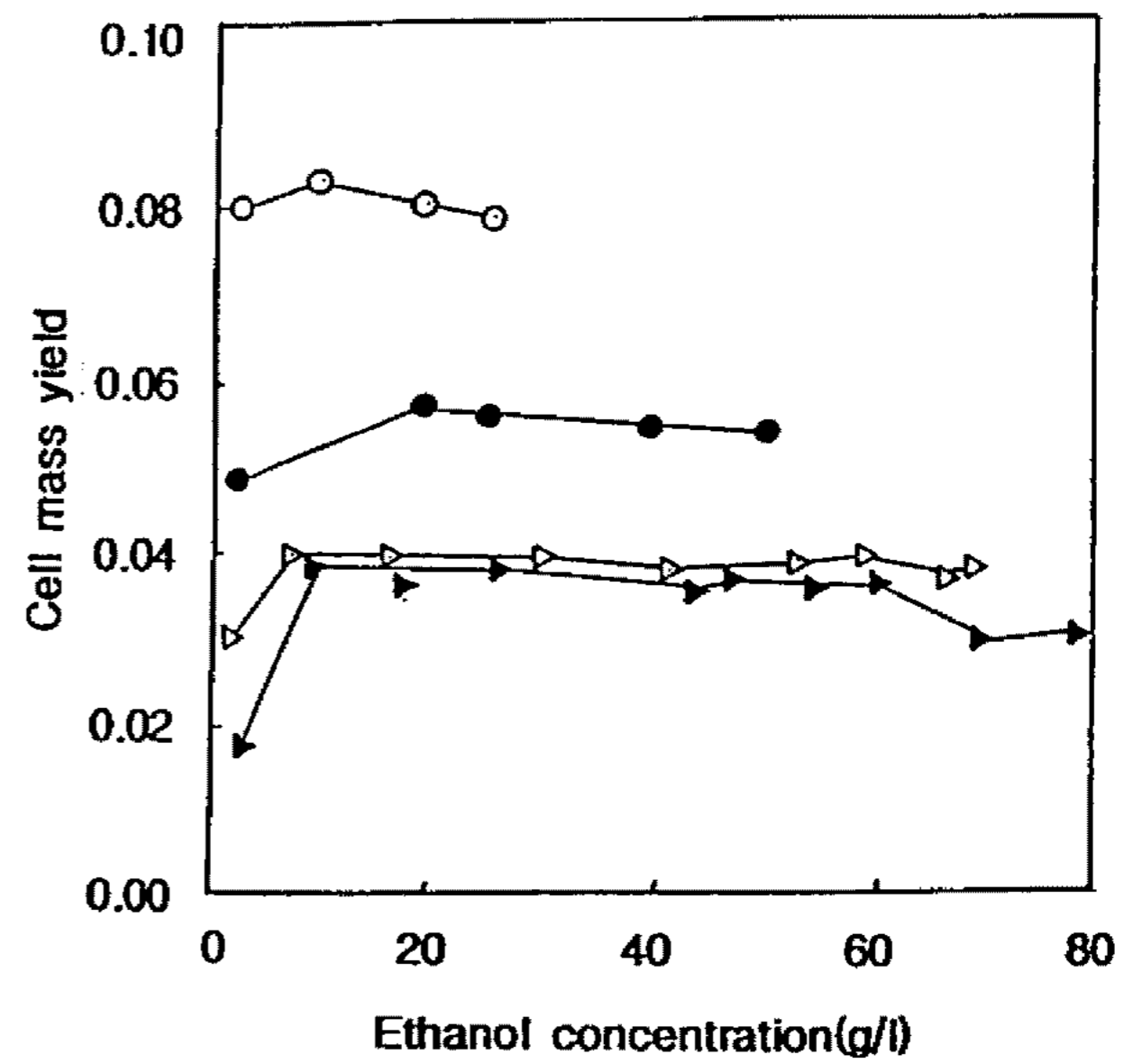


Fig. 4. Correlation between concentration of ethanol produced and cell mass yield under the condition of various sugar concentrations in the ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* B15-1.

○: 50 g/l, ●: 100 g/l, △: 150 g/l, ▲: 200 g/l

급격히 증가하였으며 그 이상에서는 다소 감소하다가 에탄올 농도가 60 g/l 이상에서는 더욱 감소하는 경향을 보였다. 따라서 초기 당농도가 높을 수록 에탄올 수율이 감소하는 현상은 기질에 의해 균체의 증식이 저해되기 때문이며(4) 에탄올의 생성량이 증가함에 따라 에탄올 수율이 감소하는 현상은 생성된 최종산물인 에탄올에 의한 저해현상 때문임을 알 수 있었다. 에탄올에 의한 균체의 증식이 저해되는 현상은 최종산물 저해현상으로 알려져 있으며 특히 배지에 첨가한 에탄올 보다는 발효 중에 당으로부터 생성된 에탄올이 효모의 생육을 더욱 강하게 저해하는 것으로 알려져 있다(22). 또한 에탄올 발효에 대한 기질 저해현상으로서 Thatipamala(4)에 의하면 *S. cerevisiae* NRRL Y132에 의한 에탄올 발효시 초기 당농도가 150 g/l에서 280 g/l로 증가할 때 에탄올의 수율은 0.45 g-EtOH/g-sugar에서 0.30 g-EtOH/g-sugar로 크게 감소하였다고 한다. 그러나 본 실험의 경우 150 g/l의 초기 당농도에서 얻어진 에탄올 수율은 0.473 g-EtOH/g-sugar으로서 다소 높은 값을 보였으며 저농도의 범위에서 초기 당농도가 증가함에 따라 에탄올 수율이 급격히 감소하였으나 150 g/l에서 200 g/l로 초기 당농도를 증가시킨 경우에는 에탄올 수율이 0.473 g-EtOH/g-sugar에서 0.466 g-EtOH/g-sugar으로 감소하여 거의 유사한 값을 나타내었다. 이는 본 실험에 사용한 효모가 균주 NRRL Y132보다 에탄올 발효력이 강할 뿐 아니라 기질저해에 대하여 다소 강한 저항성을 나타내기 때문인 것으로 추정된다.

요 약

정치배양에 의한 *Saccharomyces cerevisiae* B15-1의 에탄올 발효에 미치는 영양 인자와 초기 기질농도에 따른 발효 특성을 연구, 검토하여 에탄올 생성 최적 조건하에서 발효액중의 생성된 에탄올 농도, 균체 농도 및 당농도와의 관계를 규명하고자 하였다. 에탄올 생성의 최적 조건은 배양 온도 30°C, 초기 pH 5.0이었으며, 에탄올 비생성 속도는 초기 기질농도가 150 g/l일 때 1.203 g-EtOH/g-cell·hr로서 가장 높게 나타났다. 에탄올 발효능은 기질농도가 150 g/l 이하에서는 거의 일정하였으나 200 g/l에서는 급격히 감소하였다. 최종 균체량과 최종 에탄올 생성량은 초기 기질의 농도가 증가함에 따라 증가하는 현상을 보였으나 그 증가율은 기질의 농도가 높을 수록 다소 감소하는 경향을 나타내었다. 초기 기질농도가 150 g/l 이하에서는 대부분이 발효에 의해 에탄올로 전환되었으나 200 g/l의 당을 사용한 경우에는 균체의 증식과 발효가 완료된 후에도 약 10.7 g/l의 기질이 에탄올로 전환되지 못하고 배지에 남아 있었다. 초기 기질 농도를 매개변수로 생성된 에탄올과 에탄올 수율을 조사한 결과 에탄올 수율은 초기 당농도가 증가할수록 급격히 감소하였으며, 초기 당농도가 일정한 경우 에탄올 생성량이 소량일 때는 에탄올의 생성량이 증가할수록 에탄올의 수율은 급격히 증가하다가 점차 완만한 증가현상을 보였으며 에탄올 생성량이 60 g/l 이상에서는 거의 일정하였다.

참고문헌

1. Maiorella, B.L., H.W. Blanch and C.R. Wilke. 1984. Economic evaluation of ethanol fermentation process. *Biotechnol. Bioeng.* **26**: 1003-1025.
2. Legman, R. and P. Maragalith. 1986. Ethanol formation by hybrid yeasts. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **23**: 198-202.
3. Jimenez, J. and T. Benitez. 1988. Selection of ethanol-tolerant yeast hybrids in pH-regulated continuous culture. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**: 917-922.
4. Thatipamala, R., S. Rohani and G.A. Hill. 1992. Effects of high product and substrate inhibitions on the kinetics and biomass and product yields during ethanol fermentation. *Biotechnol. Bioeng.* **40**: 289-297.
5. Ghose, T.K. and R.D. Tyagi. 1979. Rapid ethanol fermentation of cellulose hydrolysate. II. Product and substrate inhibition and optimization of fermentor design. *Biotechnol. Bioeng.* **21**: 1401-1420.
6. Aiba, S., M. Shoda and M. Nagatani. 1968. Kinetics of product inhibition in alcohol fermentation. *Biotechnol. Bioeng.* **10**: 845-864.
7. Levenspiel, O. 1980. The Monod equation: a revisit and a generalization to product inhibition situations. *Biotechnol. Bioeng.* **22**: 1671-1687.
8. Luong, J.H.T. 1985. Kinetics of ethanol inhibition in alcohol fermentation. *Biotechnol. Bioeng.* **27**: 280-285.
9. Sa-correia, I. and N.V. Uden. 1986. Ethanol-induced death of *Saccharomyces cerevisiae* at low and intermediate growth temperatures. *Biotechnol. Bioeng.* **28**: 301-303.
10. Makower, M. and E.A. Bevan. 1963. The inheritance of a killer character in yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). *Proc. Int. Congr. Genet. VI.* **1**: 202.
11. Palfree, R. and H. Bussey. 1979. Yeast killer toxin: Purification and characterization of the protein toxin from *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* **93**: 437-451.
12. Pfeiffer, P. and F. Radler. 1982. Purification and characterization of extracellular and intracellular killer toxin of *Saccharomyces cerevisiae* strain 28. *J. Gen. Microbiol.* **128**: 2699-2706.
13. Bostian, K.A., J.E. Hopper, D.T. Rogers and D.J. Tipper. 1980. Translational analysis of the killer-associated virus-like particle dsRNA genome of *S. cerevisiae*: M dsRNA encodes toxin. *Cell.* **19**: 403-414.
14. Imamura, T., N. Kawamoto and Y. Takaoka. 1974. Characteristics of main mash infected by killer yeast in sake brewing and the nature of its killer factor. *J. Ferment. Technol.* **52**: 293-299.
15. Ouchi, K., R.B. Wickner, A. Toh-E and H. Akiyama. 1979. Breeding of killer yeasts for Sake brewing by cytoduction. *J. Ferment. Technol.* **57**: 483-487.
16. Seki, T., E.H. Choi and D. Ryu. 1985. Construction of killer wine yeast strain. *Appl. Environ. Microbiol.* **49**: 1211-1215.
17. Shimoda, M., H. Mizoguchi and E. Fuzita. 1984. Breeding of killer-resistant sake yeasts (neutral) using the miniprotoplast fusion method. *J. Brew. Soc. Japan.* **79**: 349-354.
18. Chung, K.T., K.W. Bang, S.K. Chung, H.I. Song, and J.K. Kim. 1989. Isolation of the killer yeasts and its characteristics. *Kor. J. Microbiol.* **27**: 415-421.
19. Chung, K.T., K.W. Bang, H.I. Song, J.K. Kim, and Y.J. Jung. 1989. Conditions for protoplast formation and fusion of the killer yeast. *Kor. J. Microbiol.* **27**: 422-429.
20. Summer, J.B. 1925. Dinitrosalicylic method for glucose. *J. Biol. Chem.* **60**: 393-398.
21. Amerine, M.A. and C.S. Ough. 1980. Methods for analysis of musts and wines. Pp. 94-96. John Wiley and Sons, New York, USA.
22. Novak, M. 1981. Alcoholic fermentation: on the inhibitory effect of ethanol. *Biotechnol. Bioeng.* **23**: 201-211.

(Received 24 January 1996)