

알콜증류폐액을 이용한 빵효모배양에서 Glucose와 Ammonium의 자동첨가에 의한 증균 : pH-stat 방법에 의한 Ammonium의 자동첨가

†이 형 춘

서원대학교 식품영양학과

(접수 : 2000. 2. 29., 게재승인 : 2000. 4. 10.)

Increase of Cell Concentration by the Automatic Addition of Glucose and Ammonium to an Alcohol Distillery Wastewater Reutilized for Cultivating a Baker's Yeast : Automatic Addition of Ammonium with pH-stat

Hyeong Choon Lee†

Department of Food and Nutrition, Seowon University, Cheongju 361-742, Korea

(Received : 2000. 2. 29., Accepted : 2000. 4. 10.)

Addition of carbon and nitrogen source to an alcohol distillery wastewater was tried to increase the cell concentration of a baker's yeast cultivated in that wastewater. Carbon was found to be primary limiting nutrient and nitrogen secondary limiting one. Glucose addition increased the cell concentration 1.3 times higher than no addition, and both glucose and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ addition did 5.8 times. A fed-batch cultivation by the automatic addition of glucose and ammonium was executed. Added glucose was automatically controlled to low concentration by a method using DO as control parameter. Ammonium was automatically added as NH_4OH used as pH control agent after initiating glucose addition. By this simple cultivation method the cell concentration could be efficiently increased from 2.6g/L to 12.0g/L, and maximum specific growth rate and biomass yield to glucose were 0.18hr^{-1} and about 0.54g/g respectively. By increasing cell concentration, COD of the wastewater media could be additionally reduced by about 22%.

Key Words : Baker's yeast, alcohol distillery wastewater, nutrient addition, pH-stat

서 론

알콜증류폐액은 당과 함께 미생물의 영양성분이 되는 여러 가지 물질을 함유하므로 이 폐액을 효모의 배양기질로 재이용하는 연구가 수행되었다(1-4). 그러나, 알콜증류폐액에는 탄소원이나 질소원처럼 미생물의 증식에 많이 필요한 영양성분이 적게 함유되어 있어서 배양말기의 효모의 균체농도가 낮기 때문에 재이용연구의 실용화가 어려우며, 다양한 물질의 생산에 적극적으로 재이용되기 어렵다. 이러한 문제점을 해결하기 위해서는 탄소원이나 질소원을 알콜증류폐액에 첨가

하여 균체농도를 필요한 만큼 높여주어야 하며, 균체농도를 높이기 위해서는 특히 탄소원의 첨가가 필수적이다. 본 연구에서는 알콜증류폐액에 빵효모를 배양할 경우 탄소원으로서 glucose를 첨가하고자 하였다.

Glucose를 첨가할 경우 원료비가 많이 증가하게 되므로 폐액재이용의 경제성을 확보하기 위해서는 필요한 양만큼만 첨가하여 주어야 한다. 또한, 효모배양중의 어떤 시점에서 배양액의 glucose 농도가 일정수준이상 높아지면 Crabtree effect(5)에 의해서 균체수율이 떨어지기 때문에 배양기간 내내 낮은 농도로 유지시켜야 한다. 따라서 피이드백 제어가 요구된다. 빵효모배양과 같은 호기성배양의 경우에는 용존산소농도(DO)를 제어파라미터로 하는 방법, 즉, 탄소원인 glucose가 고갈될 경우 상승하는 배양액의 DO를 신호로 하여 glucose를 배양액에 공급하여 주는 제어방법(6-13)을 사용하면 간단하게 배양액의 glucose농도를 낮은 수준으로 유지하면서 자동첨가할 수 있다.

†Corresponding Author : Department of Food and Nutrition, Seowon University, 231, Mochung-dong, Cheongju 361-742, Korea
Tel & Fax : 0431-261-8744
E-mail : hclee@dragon.seowon.ac.kr

본 연구의 배양과정에서는 탄소원이 가장 먼저 결핍되기 때문에 glucose가 먼저 첨가되었다. 그리고, glucose를 첨가하기 전에는 배양액의 pH가 증가하므로 배양액의 pH를 4.5로 유지하기 위하여 산이 첨가되었다. 그러나, 일단 glucose가 첨가되기 시작하면 배양액의 pH는 감소하므로 반대로 알칼리가 첨가되었는데, 이 때 pH조정용 알칼리로서 NH₄OH를 사용하면 pH제어기에 의해 효모의 질소원인 ammonium이 glucose첨가와 함께 자동첨가될 수 있기 때문에 간단한 방법으로 탄소원과 질소원을 자동첨가함으로써 폐액의 균체농도를 높일 수가 있다고 생각되었다.

이러한 관점에서 본 연구에서는 알콜증류폐액에 빵효모를 배양하면서 먼저 탄소원과 질소원이 실제로 결핍되는가를 확인하였으며, 탄소원으로는 glucose를, 질소원으로는 ammonium을 자동첨가함으로써 균체농도를 증가시키고 균체생산성 및 폐액의 재이용성을 향상시킬 수 있는가를 검토하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 폐액

균주는 J사(서울시 영등포구 소재)의 건조이스트제품으로부터 YM평판배지를 사용하여 순수분리한 빵효모를 사용하였다. 알콜증류폐액은 S사(전북 전주시 소재)에서 걸보리와 타피오카를 1:1로 섞은 것을 원료로 사용하여 주정을 생산하고 폐기되는 폐액을 수집하여 No. 5C 여과지로 여과하여 사용하였다. 폐액의 pH는 4.1이었으며, 여과폐액의 COD는 11000ppm이었다.

배양방법

5 L 용량의 jar-fermenter(한국발효기, KFC-5L)에 여과폐액 2.7 L를 넣고 121℃, 15분 멸균한 다음 균을 접종하여 배양하였다. 접종액은 250mL 삼각플라스크에 여과폐액 50mL을 넣고 121℃, 15분 멸균한 다음 보존균 1백균이를 접종하여 180 rpm, 30℃의 조건으로 24시간 진탕배양(양복식)한 것을 사용하였으며, 접종량은 10%(V/V)였다. 배양온도는 30℃로 유지하였으며, pH는 pH전극(Ingold, 4480)과 pH제어기(한국발효기, mk-250pH)로 4.5로 유지하였는데, 한계영양원의 확인을 위한 배양실험에서는 1.0N HCl과 2.0N NaOH를 pH조정제로 사용하였으며, glucose와 ammonium의 자동첨가에 의한 배양 실험에서는 1.0N HCl과 2.0N NH₄OH를 pH조정제로 사용하였다. 배양액의 용존산소농도는 통기량과 교반속도를 수동으로 조절함으로써 용존산소포화백분율(DO%)을 20%이상으로 유지하였다. 소포제는 실리콘소포제(럭키디씨실리콘, LS-300)를 사용하였다.

영양성분의 첨가방법

Glucose는 수동으로 첨가하거나 자동으로 첨가하였다. 수동으로 첨가할 경우에는 필요에 따라 일정량의 멸균 glucose 용액을 피펫을 사용하여 배양액에 첨가하여 주었다. 자동첨가의 경우에는 이 등(14)이 사용한 장치와 소프트웨어에 근거하여 제작한 배양시스템을 사용하였다. Figure 1에 glucose 자동첨가시스템을 포함한 배양시스템의 구성을 나타내었으며, Figure 2에 glucose자동첨가의 흐름도를 나타내었다. 그림에서와

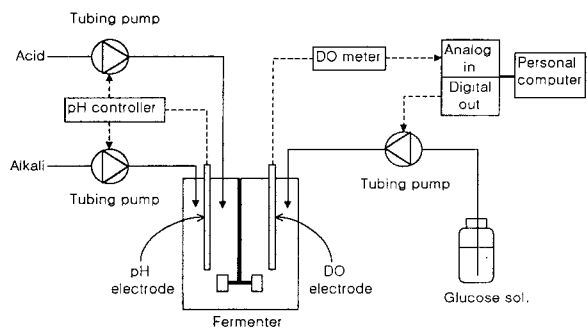


Figure 1. Schematic diagram of cultivation system.

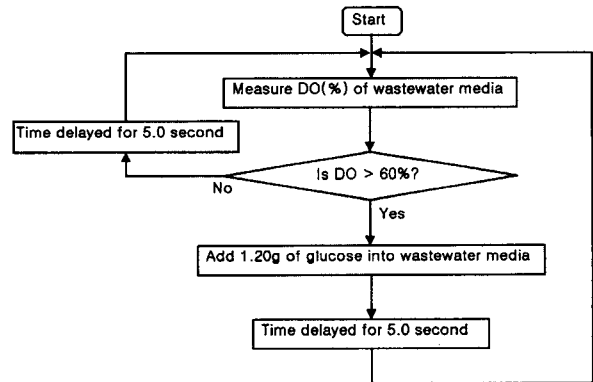


Figure 2. Flowchart for the automatic addition of glucose into alcohol distillery wastewater reutilized for cultivating a baker's yeast.

같이 DO전극(Ingold, 3046), DO미터(한국발효기, mk-250DO), multifunction card(Advantech, PCL-812)의 A/D converter 및 컴퓨터(PC486급)로 이루어진 시스템을 이용하여 5초간격으로 배양액의 DO를 자동측정하다가 DO가 60%이상으로 증가할 때마다 컴퓨터와 multifunction card의 digital출력부로 구성된 시스템으로 tubing pump(Eyela, SMP-23S)를 일정시간 가동시켜 멸균 glucose용액(400.0 g/L) 3.0 mL(glucose 1.2 g상당)를 첨가하여 주었다. Glucose의 매회공급량을 1.20 g으로 한 것은 배양액의 양을 3.0 L로 가정할 경우 배양액의 glucose농도가 약 300 mg/L가 넘지 못하도록 함으로써 Crabtree effect(5)를 방지하여 균증식속도 및 균체수율을 적정수준으로 유지하기 위함이었다.

Ammonium의 자동첨가는 glucose 첨가후에 pH조정제로 NH₄OH를 사용함으로써 수행하였다(Figure 1). (NH₄)₂SO₄는 멸균 (NH₄)₂SO₄용액(295.0 g/L) 30.0 mL를 피펫으로 첨가하였다. KH₂PO₄는 멸균 KH₂PO₄용액(250.0 g/L) 30.0 mL를 피펫으로 첨가하였다

기타 분석방법

건조균체량은 배양액 10 mL을 5000 rpm으로 15분간 원심 분리후 세척하는 과정을 2회 반복하고 105℃로 항량이 될 때까지 건조시킨 후 칭량하여 측정하였다.

Glucose첨가량은 배양중 glucose용액을 담은 병을 전자저울(Shimadzu, EL-1200H)위에 올려놓고 측정된 무게감소량으로부터 산출하였다.

배양액의 COD는 원심분리한 여액에 대하여 알칼리성과망간산법(15)으로 정량하였다.

결과 및 고찰

한계영양원의 확인을 위한 배양

영양원들중 탄소원이 가장 먼저 결핍될 것이라 생각되었으므로, 폐액에 빵효모를 배양하여 균이 정상기(stationary phase)에 도달한 후 glucose의 첨가로 균의 증식이 재개되는가의 여부를 알아보기 위하여 실험한 결과를 Figure 3에 나타내었다. 그림에서와 같이 건조균체량이 0.2 g/L에서 13시간 만에 최대 2.1 g/L까지 도달후 감소하였으므로, 폐액 1리터로부터 얻을 수 있는 최대균체량은 2.1 g이었다. 그러나, 균이 완전히 정상기에 도달하였다고 생각되는 15.0시간, 15.5시간 및 16.0시간에 각각 1.2 g씩 총 3.6 g의 glucose를 첨가하였을 때, 균의 증식이 재개되었으므로 탄소원이 가장 먼저 결핍되는 영양원임을 알 수 있었다.

탄소원을 공급할 경우 균증식을 연장할 수 있었으므로 glucose의 첨가에 의하여 어느정도까지 균체량을 증가시킬 수 있는지를 알아보기 위하여 자동첨가시스템으로 glucose를 첨가하면서 배양한 결과는 Figure 4와 같다. 그림에서와 같이 배양 8.5시간후부터 glucose를 계속 첨가할 경우 건조균체량이 13.6시간만에 2.8 g/L에 도달후 더 이상 증가하지 않았다. 즉, glucose의 공급으로 균증식이 연장되었으나, 회복배양에 비하여 건조균체량의 증가가 0.7 g/L에 불과하였다. 균이 더

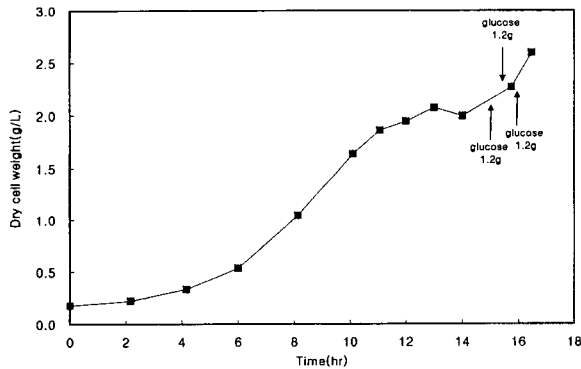


Figure 3. Batch cultivation of a baker's yeast in an alcohol distillery wastewater (Glucose was added three times at 15hr, 15.5hr and 16hr after initiating cultivation, respectively).

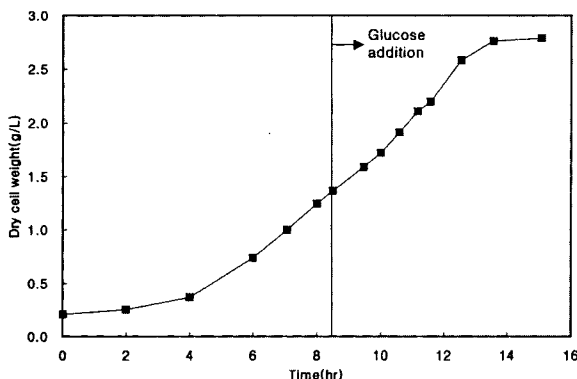


Figure 4. Fed-batch cultivation by glucose addition(Glucose was added automatically from 8.5hr to the end whenever the DO of wastewater media rose over 60%).

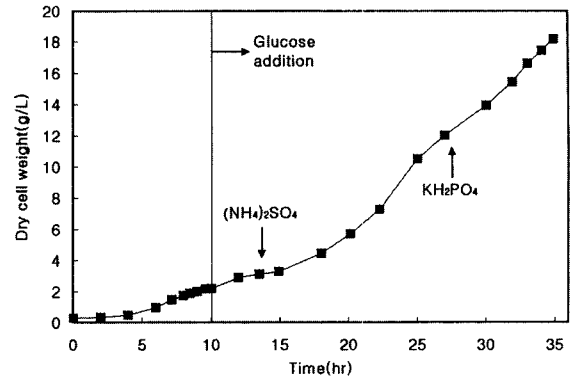


Figure 5. Fed-batch cultivation by the addition of glucose, $(NH_4)_2SO_4$ and KH_2PO_4 (Glucose was automatically added from 10.1hr to the end. $(NH_4)_2SO_4$ and KH_2PO_4 were added at 13.7hr and 27.4hr, respectively).

이상 증식하지 않은 것은 탄소원외의 다른 영양원이 결핍되었기 때문이라고 생각되었다. 결핍가능한 영양원은 탄소원 다음으로 많이 필요한 질소원일 것으로 가정하고 탄소원인 glucose는 자동첨가시스템으로 계속 공급하면서 질소원으로서 $(NH_4)_2SO_4$ 를 첨가한 실험의 결과는 Figure 5와 같다. 그림에서와 같이 배양 10.1시간부터 glucose를 계속 첨가하면서 배양하다가 균의 증식이 완전히 정지하였다고 생각되는 13.7시간에 $(NH_4)_2SO_4$ 를 첨가하였을 때, 예상대로 증식이 재개되어 계속 증식하다가 25.0시간부터 증식이 둔화되기 시작하여 27.0시간후에 12.0 g/L에 도달 후 증식이 거의 정지되었다. Glucose는 계속적으로 공급되고 있고 한번 첨가한 $(NH_4)_2SO_4$ 의 양은 O'Connor(16)의 배지조성에 의하면 약30 g/L정도의 균체를 합성할 수 있는 양이므로 27.0시간후에 증식이 멈춘 것은 탄소원과 질소원외의 다른 영양성분의 결핍에 의한 것이라 생각되었다. 따라서 탄소원인 glucose와 질소원인 $(NH_4)_2SO_4$ 를 공급할 경우 균체량이 최대 12.0 g/L까지 도달할 수 있음을 알았다. 27.0시간후에 결핍될 가능성이 높은 영양성분은 탄소원과 질소원 다음으로 많이 요구되는 인성분일 것이라 가정하고 27.4시간에 KH_2PO_4 를 첨가하였을 때 그림에서와 같이 증식이 재개되어 34.9시간까지 증식이 멈추지 않고 18.2 g/L까지 증식하는 양상을 보였다. 결국 폐액에 전혀 영양성분을 첨가하지 않는 경우에 비해 glucose공급으로 1.3배, glucose와 $(NH_4)_2SO_4$ 의 공급으로 5.8배 더 높은 균체량을 얻을 수 있었다.

Glucose와 Ammonium의 자동첨가에 의한 배양

여과폐액의 pH는 4.1이며, 여과폐액을 삼각플래스크에 넣고 균을 접종하여 24시간 배양한 후 폐액배양액의 pH는 8.0으로 증가하였다. 이 등(2)도 절간고구마를 원료로 사용한 주정폐액에 *Saccharomyces cerevisiae*를 배양할 경우 폐액의 pH가 3.9에서 6.3까지 증가한다고 보고하였다. 이것은 효모가 폐액중의 기질을 대사하고 생성한 알칼리성 물질에 의하여 pH가 상승하였기 때문이다. 따라서 배양액의 pH를 제어하는 발효조배양시 glucose를 공급하지 않는 초기에는 배양액의 pH를 4.5로 유지하기 위하여 산이 공급되는 것을 관찰할 수 있었다. 그러나, glucose가 공급되기 시작하면 pH를 4.5로 유지하기 위하여 알칼리가

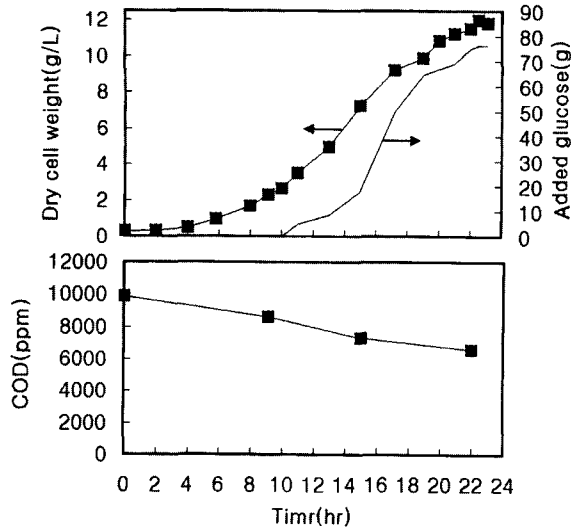


Figure 6. Fed-batch cultivation by the automatic addition of glucose and ammonium(Glucose was added from 9.8hr. Ammonium was added as ammonia water used as pH control agent after initiating glucose addition).

계속 공급되는 것이 관찰되었다. 이 것은 효모가 glucose를 호기적으로 대사하여 생성된 CO₂가 배양액중에 용해하여 탄산을 형성(17)하기 때문이라 생각되었다. 따라서 glucose공급 후의 알칼리공급은 glucose공급과 연결되어 있고, glucose의 공급은 균증식과 연결되어 있으므로 pH조정용 알칼리제로서 NH₄OH를 사용하면 glucose공급후에 결핍되는 질소원까지도 ammonium의 형태로 자동공급할 수 있다고 생각되었다. 이러한 관점에서 glucose는 glucose자동첨가시스템으로 공급하는 동시에 질소원인 ammonium은 pH-stat 방법에 의하여 자동첨가하는 실험을 수행한 결과를 Figure 6에 나타내었다.

그럼에서와 같이 건조균체량은 배양초기 0.3 g/L에서 22.5 시간후에 최대 12.0 g/L에 도달후 감소하였다. 최대균체량에 도달하기 전에 증식의 정체가 나타나지 않았으므로 배양도중에는 영양성분의 결핍이 없었다고 생각되었으며, 증식의 정체가 일어난 후에 glucose와 (NH₄)₂SO₄를 첨가한 경우(Figure 5)에 비해 4.5시간 더 빠르게 최대균체량에 도달하였다. 최대균체량이 12.0 g/L로 얻어진 것은 glucose와 (NH₄)₂SO₄를 공급한 경우(Figure 5)와 일치하였다. (NH₄)₂SO₄에는 질소성분외에 황성분도 포함되어 있으나, NH₄OH에는 질소성분만 존재함에도 불구하고 두가지 경우에 얻어지는 최대균체량이 일치하므로 탄소원 다음으로 부족한 영양성분은 질소원임이 확실하게 밝혀졌다. 대수증식기에서의 최대비증식속도는 0.18 hr⁻¹였다. 배양 10.1시간부터 첨가되기 시작하여 최대균체량(12.0g/L)에 도달하기까지 첨가된 glucose공급량은 76.2 g이고, glucose공급후에 증가한 균체량은 9.4 g/L이며, 배양기간동안 첨가된 glucose용액과 NH₄OH용액을 고려한 최종 배양액의 양은 약 3.4 L이므로 대당균체수율은 약 0.42 g/g이었다. 이 값은 *Saccharomyces cerevisiae*의 일반적인 균체수율치인 0.5 g/g(18)에는 미치지 못하지만 공급된 glucose가 균에 의해 비교적 유효하게 이용되었음을 알 수 있었으며, glucose의 제어방법을 개선한다면 더 높일 수 있다고 생각되었다. 또한, 총 균체량을 고려하여 산출한 대당균체수율은 약 0.54 g/로서

폐지제어에 의해 균체수율을 향상시킨 Park 등(19)의 결과보다도 더 높았으므로 glucose와 ammonium의 자동첨가에 의한 증균방법이 간단하고 경제성이 있는 방법이라고 생각되었다. 본 연구에서는 알콜증류폐액과 빵효모를 재료로 실험하였으나, 본 연구의 방법론은 탄소원이 부족한 폐액과 탄소원과 질소원이 부족하되 질소원은 pH-stat방법으로 자동첨가가 가능한 모든 폐액을 미생물을 배양기질로 재이용하고자 할 경우에 공통적으로 적용될 수 있다고 생각된다. COD는 배양초기, 9.1시간, 15.0시간 및 22.0시간에 각각 9900 ppm, 8600 ppm, 7300 ppm 및 6600 ppm으로 나타났다. 따라서 최대균체량에 도달한 배양22시간까지의 COD감소는 약 33%이다. 10.1시간부터 glucose를 첨가하기 시작하였으므로 증균배양이전에 도달할 수 있는 최대균체량은 10.1시간까지의 균체량이고 이 시점까지의 COD감소가 glucose와 ammonium을 자동첨가하지 않을 경우의 최대 COD감소라고 할 수 있다. 이 값은 9.1시간과 15.0시간사이의 COD감소가 linear하다고 가정하고 10.1시간의 COD를 내삽하여 구하면 약 8800ppm으로 얻어진다. 따라서 10.1시간까지의 COD감소는 약 11%로 얻어졌으며, 증균배양으로 약 22%의 COD가 더 감소한 것으로 나타났다. 배양중에 첨가된 NH₄OH량은 총 196 mL였다. 문헌(20)에 의하면 효모균체의 질소함량은 5.9 ~ 8.9%범위이다. 이 값에 근거하고 본 실험의 효모가 첨가된 NH₄OH만을 질소원으로 사용하였다고 가정할 경우 최종배양액의 ammonium의 농도는 약 700 ~ 1200 mg/L범위로 산출되어 비교적 낮은 농도를 나타내었다. 그러나, NH₄OH를 첨가하기 전에 폐액배양액중에 함유된 질소원이 이용된 것을 고려하면 실제 ammonium농도는 더 높을 것으로 생각되었다. 만약, ammonium까지 낮은 농도로 제어하면서 첨가할 경우 증식속도와 대당균체수율이 더욱 향상(21)될 것이다.

요 약

알콜증류폐액에 빵효모를 배양하는 중에 glucose와 ammonium을 자동첨가함으로써 폐액배양액의 균체농도를 높여서 알콜증류폐액의 이용성을 증가시키고자 하였다. 배양중에 glucose를 공급하여 줌으로서 공급하지 않은 경우보다 1.3배 더 높은 균체농도를 얻었으며, glucose와 (NH₄)₂SO₄를 공급하여 줌으로써 5.8배 더 높은 균체농도를 얻었다. Glucose의 경우에는 배양액의 DO를 제어파라미터로 하는 제어방법을 사용하여 자동첨가하고, ammonium의 경우에는 pH조정제로서 NH₄OH를 사용함으로써 pH제어기에 의하여 자동으로 공급되도록 배양하였다. 배양결과 증식의 정체없이 배양 22.5시간후에 최대 12.0 g/L의 건조균체량에 도달하였으며, 균의 최대비증식속도는 0.18 hr⁻¹였고, 대당균체수율이 약 0.54g/g이었으므로 glucose의 첨가가 경제적이라고 생각되었다. 증균배양으로 폐액배양액의 COD를 약 22% 더 감소시킬 수 있었다.

REFERENCES

1. Lee, K. S., K. H. Lee, and S. O. Park (1980), Elimination and Utilization of Pollutants- Part I. Microbiological Clarification of Industrial Wastes and Its Utilization as Feed

- Resources, *J. Korean Agricultural chemical Society*, **23**(1), 64-72.
2. Lee, H. C., Y. J. Koo, B. Y. Min, and H. K. Lee (1982), Growth of Yeasts in Alcohol Distiller's Waste of Dried Sweet Potato for Single-cell Protein Production and BOD Reduction, *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **10**(2), 95-100.
 3. Kim, Y. K., K. Y. Lee, C. H. Lee, Y. I. Lee, K. H. Lee, and M. K. Lee (1993), Application of Thermotolerant Yeast, *Candida rugosa* for the production of Yeast Protein Rye Stillages, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **21**(3), 281-287.
 4. Lee C. Y., C. K. Kim, and K. H. Lee (1993), Production of Single Cell Lipid and Treatment of Wastewater from Alcohol Manufactory, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.*, **8**(2), 172-177.
 5. Bellgardt, K. H. and J. Yuan (1991), Process Models: Optimization of Yeast Production- A Case Study, In *Biotechnology*, Vol. 4, H. J. Rhem and G. Reed, Eds., p388, VCH, Weinheim.
 6. Miskiewicz, T., W. Lesniak, and J. Ziobrowski (1975), Control of Nutrient Supply in Yeast Propagation, *Biotech. Bioeng.*, **17**, 1829-1832.
 7. Yano, T., T. Kobayashi, and S. Shimizu (1978), Fed-batch Culture of Methanol-utilizing Bacterium with DO-stat, *J. Ferment. Technol.*, **56**(4), 416-420.
 8. Mori, H., T. Yano, T. Kobayashi, and S. Shimizu (1979), High Density Cultivation of Biomass in Fed-batch system with DO-stat, *J. Chem. Eng. Japan*, **12**(4), 313-319.
 9. Miskiewicz, T. (1981), Control of Substrate Concentration in Baker's Yeast Process with Dissolved Oxygen as Nutrient Feed Indicator, *J. Ferment. Technol.*, **59**(5), 411-413.
 10. Hopkins, T. R. (1981), Feed-on-Demand Control of Fermentation by Cyclic Changes in Dissolved Oxygen Tensions, *Biotech. Bioeng.*, **23**, 2137-2143
 11. Yamauchi, H., H. Mori, T. Kobayashi, and S. Shimizu (1983), Mass Production of Lipids by *Lipomyces starkeyi* in Microcomputer-aided Fed-Batch Culture, *J. Ferment. Technol.*, **61**(3), 275-280.
 12. Yano, T., T. Endo, T. Tuji, and Y. Nishizawa (1991), Fed-batch Culture with a Modified DO-stat Method, *J. Ferment. Bioeng.*, **71**(1), 35-38.
 13. Yano, T., M. Kurokawa, and Y. Nishizawa (1991), Optimum Substrate Feed Rate in Fed-batch Culture with the DO-stat Method, *J. Ferment. Bioeng.*, **71**(5), 345-349.
 14. Lee, H. C., K. H. Lee, and Y. H. Hur (1990), Microcomputer-aided Fermentation System for High Density Fed-batch Cultivation, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.*, **5**(3), 307-313.
 15. Pharmaceutical Society of Japan (1990), Standards Methods of Analysis for Hygienic Chemists - With Commentary -, p.1063, Kanehara Press, Tokyo.
 16. O'Conner, G. M., F. Sanchez-Riera, and C. L. Cooney (1992), Design and Evaluation of Control Strategies for High Cell Density Fermentations, *Biotech. Bioeng.*, **39**, 293-304.
 17. Pharmaceutical Society of Japan (1990), Standards Methods of Analysis for Hygienic Chemists - With Commentary -, p.938, Kanehara Press, Tokyo.
 18. Bailey E. J. and D. F. Ollis (1986), *Biochemical Engineering Fundamentals*, 2nd ed., p284, McGraw-Hill, New York.
 19. Park, Y. S., Z. P. Shi, S. Shiba, C. Chantal, S. Iijima, and T. Kobayashi (1993), Application of Fuzzy reasoning to Control of Glucose and Ethanol Concentrations in Baker's Yeast Culture, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **38**, 649-655
 20. Atkinson, B and F. Mavituna (1983), *Biochemical Engineering and Biotechnology Handbook*, p127, The Nature Press, New York.
 21. Kole, M. M., B. G. Thompson, and D. F. Gerson (1985), Ammonium Concentration Control in Fed-Batch Fermentations of *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Ferment. Technol.*, **63**(2), 121-125.