

## 내당 내알콜성 *Saccharomyces cerevisiae*의 알콜 발효에 미치는 calcium의 영향

노민정\* · 양지영<sup>1</sup> · 백운화<sup>1</sup> · 유주현

연세대학교 식품공학과, <sup>1</sup>동양맥주 두산연구소

**초록:** 내당 내알콜성 균주인 *S. cerevisiae* D1을 이용하여 알콜 발효를 할 때 ethanol 생산성을 증대시키기 위하여 발효시  $Ca^{2+}$ 을 첨가하여 발효에 미치는 영향에 관해서 연구한 결과 다음의 결론을 얻었다. 초기 glucose 농도를 400 g/l로 하였을 때  $Ca^{2+}$ 에 의해 ethanol 생산성이 증가하였고 생균수도 증가하였으며 최적 첨가 농도는 0.8 mM이었다. 초기 glucose 농도를 달리 하고 발효하였을 때는  $Ca^{2+}$ 의 영향이 초기 glucose 농도가 높을수록 컸다. Ethanol 첨가에 의해 비증식 속도가 감소하였지만  $Ca^{2+}$ 을 0.8 mM 첨가시 비증식 속도의 저해가 감소되었다. 또한 ethanol을 첨가하지 않았을 때는  $Ca^{2+}$ 을 첨가한 경우와 첨가하지 않은 경우의 비증식 속도가 같았다. Ethanol 첨가 농도에 의해 사멸 속도가 증가하였으나  $Ca^{2+}$ 을 0.8 mM 첨가시 비사멸 속도가 감소하였다. Acidification curve에서도 ethanol 첨가시 final pH가 증가하였으나  $Ca^{2+}$ 을 0.8 mM 첨가하면 final pH가 감소하였다. 따라서  $Ca^{2+}$  첨가시 ethanol에 대한 내성이 더 증가된다는 것을 알 수 있었다(1991년 3월 11일 접수, 1991년 3월 25일 수리).

효모를 이용하여 알콜 발효를 할 때 배양액중에 알콜이 축적됨에 따라 ethanol 생산 속도가 감소하게 된다<sup>1,2</sup>. 초기 기질 농도가 높을 때는 삼투압이 높아지고 수분 활성도가 낮아지며 ethanol도 고농도가 생산되므로 효모의 생육과 알콜 발효가 저해받는다<sup>3</sup>.

효모의 내알콜성에 관한 연구는 1970년대 중반까지 주목을 받지 못하였으며 근래에 와서 효모는 고유의 내알콜성이외에 배지 조성과 발효 조건에 의해서 내알콜성이 영향을 받는다는 사실이 밝혀졌다<sup>4,5</sup>. 알콜 발효시 불포화 지방산과 sterol, 단백질, 아미노산, 비타민 그리고 금속 이온등에 의해 생산성이 증가된다고 한다<sup>4</sup>. Jerusalem artichoke juice<sup>6,7</sup> 또는 soyflour<sup>8-10</sup>, peptone<sup>11</sup>을 첨가하면 발효시 알콜 생산이 증가된다고 하며 oryzenin, albumin<sup>12</sup>과 koji mold mycelia<sup>13-15</sup>등도 같은 영향을 나타내었다고 한다. 완전히 밝혀지지 않는 않지만 이러한 생산성의 증가는 효모의 내알콜성이 증가하였기 때문이라고 하며 이것은 세포막의 지방산 조성이 *Saccharomyces cerevisiae*<sup>16-18</sup>와 *E. coli*<sup>19</sup>에서의 내알콜성에 중요한 역할을 한다는 사실과 일치한다. 불포화 지방산과 sterol이 세포막에 삽입되면 *Saccharomyces cerevisiae*에서 발효중의 ethanol에 의한 저해를 제거해준다고 한다<sup>16,20</sup>.

효모는 생육과 발효에 미량의 금속 이온을 필요로 한다<sup>21</sup>. Peptone과 yeast extract와 같은 첨가물이 ethanol생성에 미치는 영향은  $Mg^{2+}$ 와 같은 금속 이온의 결핍과 관계가 있다고 한다<sup>11</sup>. *Zymomonas mobilis*에서 ethanol에 의한 발효저해가  $Mg^{2+}$ 의 첨가로 제거되었다고 하며<sup>22</sup>  $Ca^{2+}$ 이 적당한 농도로 존재하면 *Bacillus stearothermophilus*의 열 안정성을 증가시키며<sup>23,24</sup> *Streptococcus mutans*의 생육을 좋게하고<sup>25</sup> *Saccharomyces carlsbergensis*에서는 glucose에 의한 아미노산의 유출을 크게 감소시킨다<sup>26</sup>는 보고가 있으며 또한 *Saccharomyces bayanus*에서 내알콜성을 증가시킨다고 한다<sup>27</sup>.

Ethanol과 고온은 세포막의 구조를 변화시켜서 이온과 저분자 대사산물의 투과성을 증가시키고<sup>19,28</sup> 영양분의 전달을 저해한다<sup>29</sup>. 그러므로 적당한 농도의  $Ca^{2+}$ 이 존재하면 열안정성이 증가된다는 사실로부터 발효 효모의 내알콜성도 증가되리라고 추측되어 본 연구에서는 우리나라 토양에서 분리한 알콜 발효 수율이 높고 내당 내알콜성 균주인 *Saccharomyces cerevisiae* D1<sup>30</sup>을 이용하여 알콜 발효를 할 때  $Ca^{2+}$ 의 첨가가 내알콜성에 미치는 영향에 대하여 알아보았다.

### 재료 및 방법

#### 사용한 균주와 배지

본 연구에서 사용한 균주는 Yu등<sup>30)</sup>이 우리나라 토양으로부터 분리한 내당 내알콜성 균주인 *Saccharomyces cerevisiae* D1을 사용하였다.

발효 배지로는 yeast extract 0.5 %,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.1 %,  $(NH_4)_2SO_4$  0.5 %,  $KH_2PO_4$  0.5 %에 glucose를 첨가하여 사용하였으며 생균수 측정에는 glucose 2 %, peptone 0.1 %, yeast extract 0.5 %, agar 2 %를 함유한 배지를 사용하였다.

#### 접종균의 전배양 및 접종

모든 실험에서 접종균은 48시간 배양한 사면 배지로부터 1백곡이를 3 % glucose를 포함하는 발효 배지 50 ml가 든 250 ml 삼각 플라스크에 접종한 뒤 30 °C에서 대수증식기 말기 시간인 15시간 배양한 후 원심분리하여 상등액을 제거하고 살균 증류수에 2번 washing하여 전배양액의 glucose를 제거한 후 3 % (v/v)를 접종하였다.

#### 알콜 발효

500 ml 삼각 플라스크에서 working volume을 200 ml로 하였으며 교반 속도는 120 rpm, 배양 온도는 30 °C로 조절하고 glucose 농도를 변화시키면서 알콜 발효를 행하였다.

#### Ethanol에 의한 생육 저해

비증식 속도는 생육 곡선에서 구하였다<sup>31)</sup>.

3 % glucose를 포함하고 0~11 % (v/v)의 ethanol을 첨가한 발효 배지에서 30 °C, 120 rpm으로 30시간동안 배양하였다.

#### Ethanol에 의한 사멸 속도

사멸 속도는 생존 곡선으로부터 구하였다<sup>32)</sup>.

3 % glucose를 포함하고 14~17 % (v/v)의 ethanol을 첨가한 발효 배지에서 30 °C, 120 rpm으로 배양하였다. 초기 생균수는  $10^4$ /ml로 하였으며 적당한 시간 간격으로 생균수를 측정하였다.

#### Acidification curve

Ethanol을 0~17 % (v/v) 첨가한 glucose 용액(20 g/l)을 50ml conical tube에 10 ml 넣고 균체를 200 mg dry cell/1가 되도록 현탁시킨다. 30 °C shaking incu-

bator에서 5시간 배양한 후에 배양한 후에 원심분리하여 균체를 제거하고 상등액의 pH를 측정하였다<sup>33)</sup>.

#### 균체량 측정

건조 균체량은 Spectrophotometer(Shimadzu Co.)로 640 nm에서 흡광도를 측정한 후 미리 작성하여 둔 검량곡선으로부터 구하였다.

생균수는 평판도주 배양법<sup>34)</sup>에 의하여 측정하였다. 배양액을 적당히 희석한 후에 평판배지에 도말하고 30 °C에서 48시간 배양하여 생성된 colony수를 세어서 생균수를 구하였다.

#### Glucose와 ethanol 정량

Glucose와 ethanol의 농도는 Industrial analyzer(YSI model 27, Yellow Spring Instrument Co.)로 측정하였다. Glucose 농도 측정에서는 YSI 2365 glucose membrane kit를 사용하였고 ethanol 농도 측정에는 YSI 2386 alcohol membrane kit를 사용하였다.

### 결과 및 고찰

#### 최적 $Ca^{2+}$ 첨가 농도

알콜 발효에 미치는 최적  $Ca^{2+}$ 의 농도를 알아보기 위해 초기 glucose 농도를 400 g/l로 하고 발효하였을 때 72시간 후의 glucose 소비량과 ethanol 생산량을 측정하였다(Fig. 1).  $Ca^{2+}$  첨가 농도가 0.8 mM이었을 때 glucose의 소비량과 ethanol 생산량이 가장 많았다. Jones 등<sup>21)</sup>은 *S. carlsbergensis*에서는 생육에 가장 좋은  $Ca^{2+}$  농도가 4.5 mM이지만 *S. cerevisiae*는 훨씬 낮은 농도를 필요로 하며 1 mM이상이면 아미노산의 흡수가 저해되고 25 mM이상에서는 생육이 저해되어 ethanol 생산 속도도 현저히 감소된다고 보고하였다. 본 연구에서는  $Ca^{2+}$  첨가 농도가 0.8 mM이었을 때 glucose의 소비와 ethanol 생산이 최대였고 0.8 mM에서 1.6 mM까지의 첨가 농도가 증가함에 따라 glucose의 소비와 ethanol 생산이 줄어들었지만 첨가하지 않는 경우보다는 더 높은 값을 나타내었다.

#### Ethanol 발효에 미치는 $Ca^{2+}$ 의 영향

초기 glucose 농도를 400 g/l로 하고 알콜 발효를 했을 때 시간에 따른 glucose 소비량과 ethanol 생산량을 측정하였다. Fig. 2에서 보는 바와 같이  $Ca^{2+}$ 을 0.8 mM 첨가하였을 경우 glucose의 소비량과 ethanol

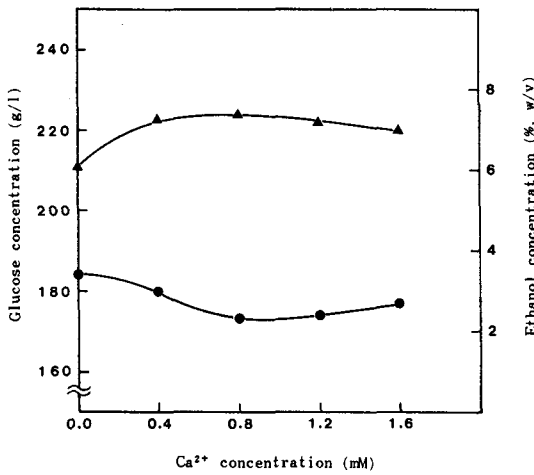


Fig. 1. Effect of the  $\text{Ca}^{2+}$  concentration on the ethanol production and glucose utilization.

Glucose(400 g/l) was added to the fermentation medium. Cultivation was performed as described in Material and Method. ● : Glucose, ▲ : Ethanol.

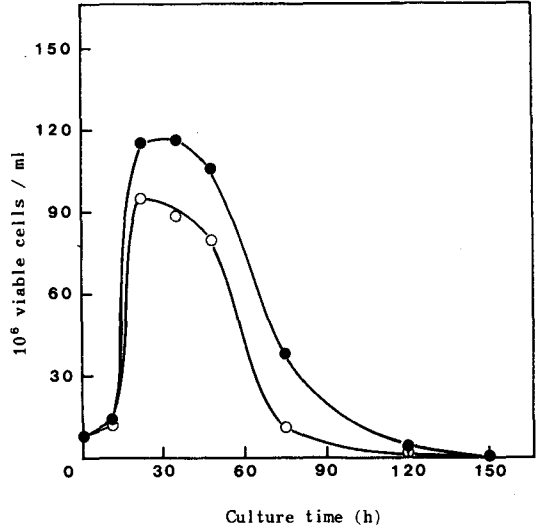


Fig. 3. Concentration of the viable cells in the fermentation media in the absence and presence of  $\text{Ca}^{2+}$  during cultivation.

● : 0.8 mM  $\text{Ca}^{2+}$  ○ : None.

ethanol에 의한 생육과 발효의 저해, 그리고 생균수의 감소를 고려해 볼 때  $\text{Ca}^{2+}$  첨가시 ethanol에 대한 내성이 더 증가된다는 것을 알 수 있었다.

**Glucose 농도에 따른  $\text{Ca}^{2+}$ 의 영향**

초기 glucose 농도를 달리(100 g/l, 200 g/l, 300 g/l)하고 발효하였을 때 시간에 따른 glucose 소비량과 ethanol 생산량을 측정하였다. Fig. 4에서 보는 바와 같이  $\text{Ca}^{2+}$ 을 0.8 mM 첨가시 glucose 소비량이 증가하였으며  $\text{Ca}^{2+}$ 의 영향은 초기 glucose 농도가 높을수록 컸다. 또한 ethanol 생산량도  $\text{Ca}^{2+}$ 을 0.8 mM 첨가시 더 증가하였고  $\text{Ca}^{2+}$ 의 영향은 초기 glucose 농도가 높을수록 컸다(Fig. 5). 그러므로 더 높은 농도의 ethanol이 생산될 수 있을 때 혹은 발효가 완전히 일어나지 못하고 중단되는 발효 조건일 때  $\text{Ca}^{2+}$ 의 영향이 더 크다는 것을 알 수 있었다.

**Ethanol에 의한 생육 저해**

$\text{Ca}^{2+}$ 을 0.8 mM 첨가시 ethanol에 의한 비증식 속도의 저해가 감소되었다. Ethanol을 첨가하지 않은 경우에는  $\text{Ca}^{2+}$ 을 첨가한 경우와 첨가하지 않은 경우의 비증식 속도가 같았다(Fig. 6). 따라서  $\text{Ca}^{2+}$ 이 ethanol의 영향을 감소시켜 준다는 것을 알 수 있었다.

Lee등<sup>31)</sup>에 의하면 ethanol에 의한 생육 저해를 나타

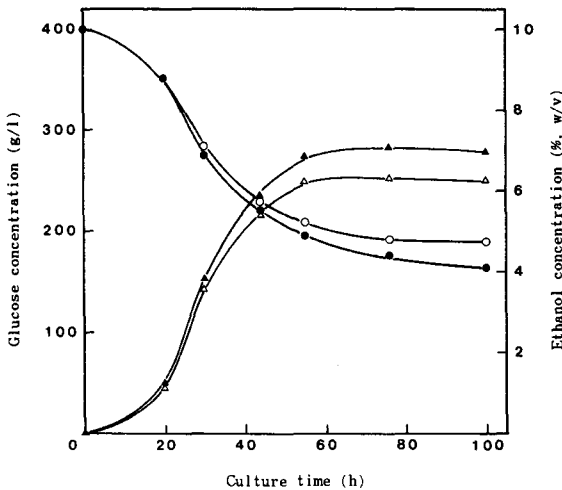


Fig. 2. Fermentation profiles of fermentation media with 400 g of glucose per liter supplemented with  $\text{Ca}^{2+}$  (0.8M) and unsupplemented.

● : Glucose, supplemented with  $\text{Ca}^{2+}$ ,  
○ : Glucose, unsupplemented,  
▲ : Ethanol, supplemented with  $\text{Ca}^{2+}$ ,  
△ : Ethanol, unsupplemented.

생산량이  $\text{Ca}^{2+}$ 을 첨가하지 않은 경우보다 더 많았다. 또한 ethanol이 더 고농도로 생산됨에도 불구하고  $\text{Ca}^{2+}$ 을 첨가하지 않은 경우보다  $\text{Ca}^{2+}$ 을 첨가한 경우 생균수가 더 높은 농도를 유지하였다.(Fig. 3).따라서

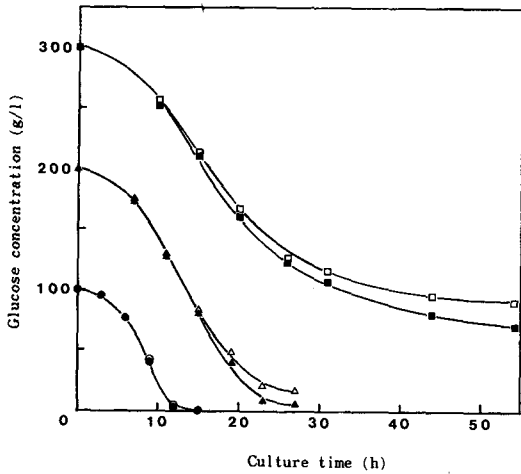


Fig. 4. Glucose utilization in the fermentation media with different initial glucose concentrations supplemented with Ca<sup>2+</sup> (0.8 mM) and unsupplemented.

- : 300 g/l glucose, supplemented,
- : 300 g/l glucose, unsupplemented,
- ▲ : 200 g/l glucose, supplemented,
- △ : 200 g/l glucose, unsupplemented,
- : 100 g/l glucose, supplemented,
- : 100 g/l glucose, unsupplemented.

내주는 kinetic은 다음과 같다.

$$\mu_n = \mu_{n0} [1 - (X/X_{max})]^n \quad (1)$$

여기서  $\mu_{n0}$ 와  $\mu_n$ 는 ethanol이 존재하지 않을 경우와 X 농도로 존재할 경우의 비증식 속도,  $X_{max}$ 는 생육이 가능한 최대 ethanol 농도, n은 ethanol toxic power이다.

Ca<sup>2+</sup> 첨가시 toxic power(n)가 더 작은 값을 나타내었다(Fig. 7. Table 1).

#### Ethanol에 의한 사멸

Ca<sup>2+</sup>을 0.8 mM 첨가한 경우와 첨가하지 않은 경우 모두 시간이 지남에 따라 생존 균수가 감소하였지만(Fig. 8) Ca<sup>2+</sup> 첨가시 비사멸 속도가 감소하였다(Fig. 9. Table 1).

Nabais등<sup>27)</sup>은 Ca<sup>2+</sup>을 첨가한 경우와 첨가하지 않은 경우 모두 비사멸 속도(specific death rate)는 ethanol 농도에 의한 함수로 나타내어진다고 하였다.

$$\ln \mu_d^s = \ln \mu_d^{sm} + K_d X \quad (2)$$

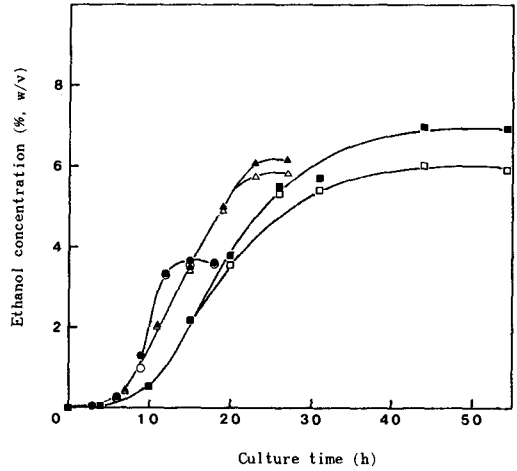


Fig. 5. Ethanol production in the fermentation media with different initial glucose concentrations supplemented with Ca<sup>2+</sup> (0.8 mM) and unsupplemented.

- : 300 g/l glucose, supplemented,
- : 300 g/l glucose, unsupplemented,
- ▲ : 200 g/l glucose, supplemented,
- △ : 200 g/l glucose, unsupplemented,
- : 100 g/l glucose, supplemented,
- : 100 g/l glucose, unsupplemented.

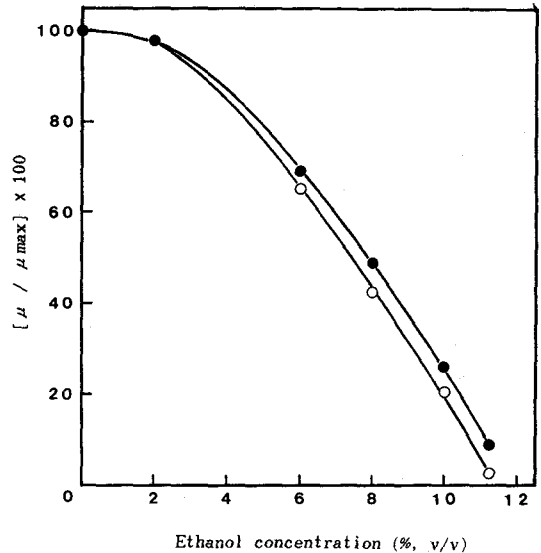


Fig. 6. Inhibition of the specific growth rate by ethanol in the fermentation media with or without Ca<sup>2+</sup>.

- : 0.8 mM Ca<sup>2+</sup>, ○ : None.

Table 1. Ethanol toxicity to several ethanol-sensitive rate processes

Condition	n	$\mu_d$ (h <sup>-1</sup> ) (14 %,v/v)	K <sub>d</sub> (M <sup>-1</sup> )	pH <sub>f</sub> (11 %,v/v)	K <sub>pH</sub> (M <sup>-1</sup> ) with ethanol at	
					0 to 11 % (v/v)	14 to 17 % (v/v)
A	0.69	0.13	6.6	4.39	0.25	1.00
B	0.63	0.10	6.4	4.01	0.16	0.97

A : Unsupplemented with Ca<sup>2+</sup>, B : Supplemented with Ca<sup>2+</sup>.

여기서  $\mu_d$ 는 비사멸 속도, X<sub>m</sub>은 최소 치사 농도, K<sub>d</sub>는 stimulation 상수이다. Ca<sup>2+</sup>을 0.8 mM 첨가시 K<sub>d</sub> 값이 감소하였다(Table 1).

**Extracellular acidification**

효모 균체를 2 % glucose 용액에 현탁시키면 proton의 active extrusion이 일어난다. 따라서 extracellular pH가 final pH(pH<sub>f</sub>)까지 떨어지게 되는데 final pH에

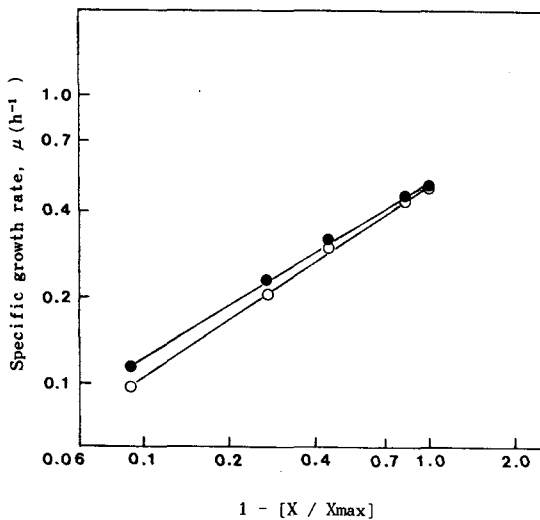


Fig. 7. Growth inhibition by ethanol in the fermentation media, with or without Ca<sup>2+</sup>.

● : 0.8 mM Ca<sup>2+</sup>, ○ : None.

서는 proton의 active extrusion과 passive influx가 균형을 이루게 된다.

Leao 등<sup>35)</sup>은 ethanol에 의해서 proton influx의 diffusion 상수가 증가하기 때문에 ethanol 농도가 증가함에 따라 pH가 증가하며 pH<sub>f</sub>의 증가는 ethanol 농도가 증가와 정비례한다고 보고하였다.

여기서 pH<sub>f</sub>는 final pH, X는 ethanol의 농도, C는 상수, K<sub>pH</sub>는 pH stimulation 상수이다.

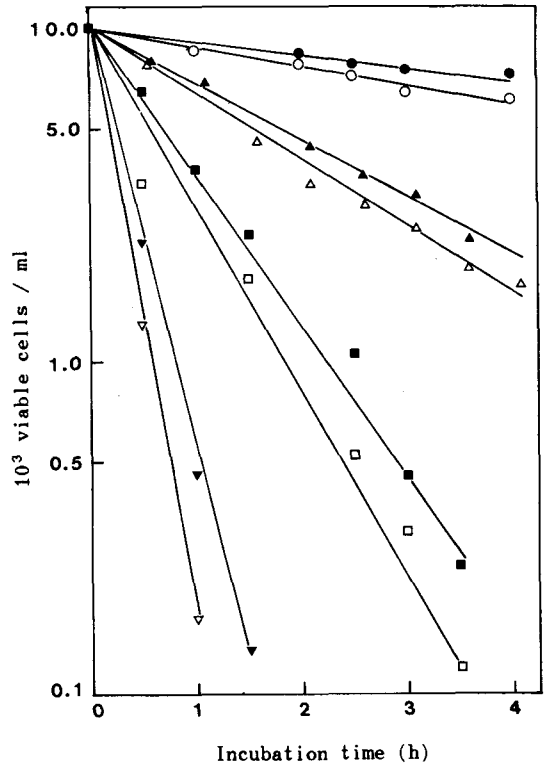


Fig. 8. Viability plots of cells of *S. cerevisiae* D1 incubated with lethal concentrations of ethanol in Ca<sup>2+</sup>-supplemented(0.8 mM) and -unsupplemented media.

● : 14 % (v/v) ethanol, supplemented,  
○ : 14 % (v/v) ethanol, unsupplemented,  
▲ : 15 % (v/v) ethanol, supplemented,  
△ : 15 % (v/v) ethanol, unsupplemented,  
■ : 16 % (v/v) ethanol, supplemented,  
□ : 16 % (v/v) ethanol, unsupplemented,  
▼ : 17 % (v/v) ethanol, supplemented,  
▽ : 17 % (v/v) ethanol, unsupplemented,

$$pH_f = C + K_{pH}X \tag{3}$$

Jimenez 등<sup>33)</sup>은 ethanol에 의한 proton influx 상수가 비증식 속도를 50 % 감소시키는 ethanol 농도와 상관이 있으며 따라서 extracellular acidification의 증가로 효모의 ethanol에 대한 내성을 간단히 측정할 수 있

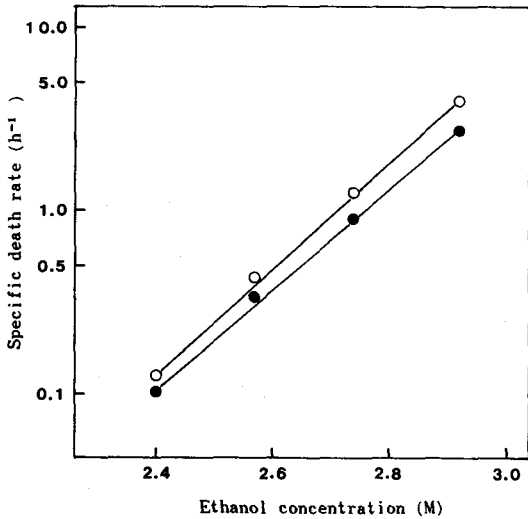


Fig. 9. Specific death rates induced by lethal concentrations of ethanol in *S. cerevisiae* D1 incubated with ethanol in Ca<sup>2+</sup>-supplemented(0.8mM) and -unsupplemented media.

● : Supplemented, ○ : Unsupplemented.

다고 보고하였다. Cartwright등<sup>36)</sup>은 이 *S. cerevisiae*의 세포막의 ATPase의 활성을 비경쟁적으로 저해한다고 보고하였다. 따라서 ethanol에 의한 pH<sub>i</sub>의 증가는 ATPase 활성 저해와 proton influx의 증가로 설명될 수 있다<sup>27)</sup>.

Fig. 10에서 보는 바와 같이 ethanol의 농도가 11% (v/v)이상일 때는 pH<sub>f</sub>가 initial pH보다 높았으며 Nabais등<sup>27)</sup>은 passive influx가 proton pump의 활성보다 커졌기 때문이라고 설명하였다. Ethanol 농도 11% (v/v)까지의 K<sub>pHf</sub>는 더 높은 농도에서의 K<sub>pHf</sub>보다 낮은 값을 나타내었으며 Ca<sup>2+</sup> 첨가시 pH<sub>f</sub>와 K<sub>pHf</sub>값이 감소하였다(Table 1).

Jones등<sup>21)</sup>에 의하면 효모내에서 Ca<sup>2+</sup>은 음이온을 띤 세포막의 phospholipid들을 감싸주는 역할을 한다고 하며 Sa-Correia등<sup>30)</sup>과 Thomas등<sup>16)</sup>은 ethanol에 의한 사멸이 일어나는 위치는 세포막에 있다고 보고하였다. Ingram등<sup>19)</sup>은 ethanol이 세포막에 작용하여 세

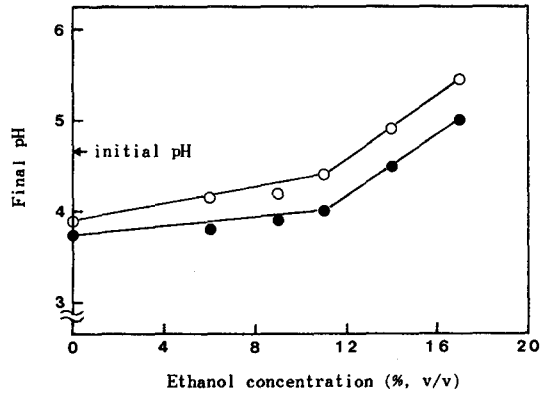


Fig. 10. Final extracellular pH as a function of the concentration of ethanol addition for *S. cerevisiae* D1 incubated with ethanol in the fermentation medium with 20 g of glucose per liter supplemented with Ca<sup>2+</sup> (0.8 mM) and unsupplemented.

● : Supplemented, ○ : Unsupplemented.

포막의 소수성을 약화시키고 극성을 증가시키며 따라서 세포가 세포막 안팎의 농도 구배를 유지시키지 못하여 solute transport에 관련된 system등이 영향을 받는다고 보고하였다.

효모에 Ca<sup>2+</sup>이 미치는 영향을 보면 균체를 glucose 용액에 현탁시켰을 때 아미노산이 유출되는 것을 방지해 주며<sup>26)</sup> ethanol에 의한 유출도 방지해 준다<sup>28)</sup>는 보고가 있다. 따라서 Nabais등<sup>27)</sup>은 Ca<sup>2+</sup>의 보호 작용은 ethanol에 의한 세포내 성분의 유출을 감소시키는데 있으며 acidification curve에서 그런 결과를 일부 관찰할 수 있다고 설명하였는데 이것은 본 연구 결과와 유사하였다.

### 감사의 말씀

본 연구는 동력자원부 대체에너지 개발과제의 지원연구비로 이루어졌으며 이에 대하여 감사드립니다.

### 참 고 문 헌

1. Rahn, O. : J. Bacteriol., 18 : 207(1929)
2. Moulin, G., H. Boze, and P. Galzy : Biotechnol. Genet. Eng. Rev., 2 : 365(1984)
3. Panchal, C.J., and G.G. Stewart : J. Inst. Brew. 86 : 207(1980)

4. Casey, G.P., and W.M. Ingledew : Crit. Rev. Microbiol., 13 : 219(1986)
5. Kalmokoff, M.L., and W.M. Ingledew : J. Am. Soc. Brew. Chem., 43 : 189(1985)
6. Rosa, M.F., I. Sa-Correia, and J.M. Novais : Biotechnol. Bioeng., 31 : 705(1988)
7. Rosa, M.F., I. Sa-Correia, and J.M. Novais : Biotechnol. Lett., 9 : 441(1987)
8. Ju, N., D. Damiano, C. Shin, N. Kim, and S.S. Wang : Biotechnol. Lett., 5 : 837(1983)
9. Damiano, D., and S.S. Wang : Biotechnol. Lett., 7 : 135(1985).
10. Viegas, C.A., I. Sa-Correia, and J.M. Novais : Appl. Environ. Microbiol., 50 : 1333(1985)
11. Dombek, K.M., and L.O. Ingram : Appl. Environ. Microbiol., 52 : 975(1986)
12. Hayashida, S., D.D. Feng, and M. Hongo : Agr. Biol. Chem., 38 : 2001(1974)
13. Hayashida, S., D.D. Feng, and M. Hongo : Agr. Biol. Chem., 39 : 1025(1975)
14. Hayashida, S., D.D. Feng, K. Ohta, S. Chaitiumvong, and M. Hongo : Agr. Biol. Chem., 40 : 73(1976)
15. Hayashida, S., and K. Ohta : Agr. Biol. Chem., 42 : 1139(1978)
16. Thomas, D.S., J.A. Hossack, and A.H. Rose : Arch. Microbiol., 117 : 239(1978)
17. Thomas, D.S., and A.H. Rose : Arch. Microbiol., 122 : 49(1979)
18. Jimenez, J., and T. Benitez : Appl. Environ. Microbiol., 53 : 1196(1987)
19. Ingram, L.O., and T.M. Bukkle : Adv. Microb. Physiol., 25 : 253(1984)
20. Watson, K. : Biotechnol. Lett., 4 : 397(1976)
21. Jones, R.P., and P.F. Greenfield : Process Biochem., 19 : 48(1984)
22. Osman, Y.A., and L.O. Ingram : J. Bacteriol., 164 : 173(1985)
23. Mosley, G.A., G.L. Card, and W.L. Koostra : Can. J. Microbiol., 22 : 468(1976)
24. Jurado, A.S., A.C. Santana, M.S. da Costa, and V.M. C. Madeira : J. Gen. Microbiol., 133 : 507(1987)
25. Aranha, H., S.L. Evans, J.E.L. Arceneaux, and B.R. Byers : J. Gen. Microbiol., 132 : 2661(1986)
26. Lewis, M.J., and D. Stephanopoulos : J. Bacteriol., 93 : 976(1967)
27. Nabais, R.C., I. Sa-Correia, C.A. Viegas, and J.M. Novais : Appl. Environ. Microbiol., 54 : 2439(1988)
28. Salgueiro, S.P., I. Sa-Correia, and J.M. Novais : Appl. Environ. Microbiol., 54 : 903(1988)
29. van Uden, N. : Ann. Rep. Ferm. Process, 8 : 11 (1985)
30. 양지영, 박경호, 백운화, 유주현 : 산업미생물학회지, 18 : 511(1990)
31. Lee, J.M., J.F. Pollard, and G.A. Coulman : Biotechnol. Bioeng., 25 : 497(1983)
32. Sa - Correia, I., and N. van Udan : Biotechnol. Bioeng., 28 : 301(1986)
33. Jimenez, J., and N. van Udan : Biotechnol. Bioeng., 27 : 1596(1985)
35. 유주현, 양용, 정동효, 양한철 : 식품공학실험 탐구당, p.363(1977)
35. Leao, C., and N. van Udan : Biochim. Biophys. Acta, 774 : 43(1984)
36. Cartwright, C.P., F.J. Veazey, and A.H. Rose : J. Gen. Microbiol., 133 : 857(1987)

Effect of calcium on the alcohol fermentation of sugar-alcohol-tolerant *Saccharomyces cerevisiae*

Min-Jeong Rho, Ji-Young Yang<sup>1</sup>, Un-Hwa Paik<sup>1</sup> and Ju-Hyun Yu(Department of Food Engineering, Yonsei University, Seoul 120-749, Korea<sup>1</sup>, Doosan Research Laboratories, Oriental Brewery

Co., Yoido 80, Seoul, Korea)

**Abstract :** In order to improve the productivity of ethanol by sugar-alcohol-tolerant *Saccharomyces cerevisiae* D1, the effect of addition of  $\text{Ca}^{2+}$  on the alcohol fermentation was investigated. The addition of  $\text{Ca}^{2+}$  led to both the improvement of ethanol productivity and the increase of viable cell concentration. The optimal concentration of  $\text{Ca}^{2+}$  was 0.8 mM. The higher was initial concentration of glucose, the greater effect of  $\text{Ca}^{2+}$  was observed. Ethanol inhibition of growth, specific death rate in lethal concentration of ethanol, and extracellular final pH decreased by the addition of  $\text{Ca}^{2+}$ . The effect of  $\text{Ca}^{2+}$  supplementation was explained by the increase of its ethanol tolerance.