

## 다시마의 산 가수분해와 에탄올 발효 특성

나춘기<sup>†</sup> · 송명기

목포대학교 환경공학과  
534-729 전남 무안군 청계면 영산로 1666  
(2011년 6월 3일 접수, 2011년 7월 6일 채택)

### Characteristics of Acid-hydrolysis and Ethanol Fermentation of *Laminaria japonica*

Choon-Ki Na<sup>†</sup> and Myoung-Ki Song

Department of Environmental Engineering, Mokpo National University,  
1666 Youngsan-ro, Cheonggye-myeon, Mu-an-gun, Jeonnam 534-729, Korea  
(Received 3 June 2011; accepted 6 July 2011)

#### 요 약

바이오에탄올 생산을 위한 대체 바이오매스 자원으로 갈조류인 다시마의 활용 가능성을 평가하기 위하여 산 가수분해와 에탄올 발효 특성을 검토하였다. 산 가수분해는 발효 가능한 당류의 생산량을 증가시켜 에탄올 생산량을 크게 증가시켰다. 최대 환원당 생산량은 묽은 황산(1.0 N)을 이용하여 130 °C에서 6시간 가수분해하는 조건에서 다시마 건조무게 기준 135 mg/g이었다. *Saccharomyces cerevisiae*(ATCC 24858)는 글루코오스, 갈락토오스 및 만노오스와 같은 C<sub>6</sub>-당을 에탄올로 발효시킬 수 있지만 아라비노오스나 자일로오스와 같은 C<sub>5</sub>-당은 에탄올 발효기질로 이용하지 못하였다. 최적 발효시간은 글루코오스 48시간, 갈락토오스 72시간, 만노오스 96시간으로 단당류에 따라 달랐다. 그럼에도 불구하고 *S. cerevisiae*를 이용하여 35 °C에서 96시간 발효를 통해 가수분해물로부터 얻을 수 있는 에탄올 생산량은 가수분해물 중의 총환원당으로부터 얻을 수 있는 이론적 생산량에 비해 4배 정도 높은 다시마 건조무게 기준 242 mg/g에 달하였다. 이는 가수분해물에 용존되어 있는 비환원당과 올리고당류들이 에탄올 발효에서 중요한 역할을 하고 있음을 나타낸다. 가수분해 용액 대비 다시마의 주입비율을 1에서 5%(w/v)로 증가시키에 따라 에탄올 농도는 2.4에서 9.2 g/L로 증가하는 반면 단위무게당 에탄올 생산량은 242에서 185 mg/g으로 감소하였다. 다시마의 에탄올 생산성은 대략 7,400~9,600 kg/ha/year 정도로 평가되어 다시마가 바이오에탄올 생산을 위한 바이오매스 자원으로 매우 유용함을 알 수 있었다.

**Abstract** – In order to study the utilization of brown seaweed *Laminaria japonica* as an alternative renewable feedstock for bioethanol production, the properties of acid hydrolysis and ethanol fermentation were investigated. The acid hydrolysis enhanced the final yield of fermentable sugars, which led great increase of ethanol productivity. The maximum yield of reducing sugars reached 135 mg/g-dry *Laminaria japonica* after 1.0N sulfuric acid-hydrolysis at 130 °C for 6 h. The *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 24858) could ferment C<sub>6</sub>-sugars like glucose, galactose and mannose into ethanol, but not C<sub>5</sub>-sugars like arabinose and xylose. Optimal fermentation time varied with sugars; 48 h for glucose, 72 h for galactose, and 96 h for mannose. Nevertheless, the ethanol yield from the hydrolysate reached 242 mg/g-dry *Laminaria japonica* after fermentation by the *S. cerevisiae* at 35 °C for 96 h, which corresponds to approximately 4 times more than the theoretical yield from total reducing sugars in the hydrolysates. It indicates that the non-reducing sugars or oligosaccharides dissolved in the hydrolysate played an important role in producing bioethanol. The ethanol concentration linearly increased from 2.4 to 9.2 g/L, while the ethanol yield per dry weight of biomass decreased from 242 to 185 mg/g, with increasing the ratio of biomass to acid solution from 1 to 5% (w/v). The bioethanol yield estimated was approximately 7,400~9,600 kg/ha/year, and indicated that *Laminaria japonica* is a promising feedstock for bioethanol production.

Key words: Bioethanol, Acid Hydrolysis, Reducing Sugar, Fermentation, *Laminaria Japonica*

#### 1. 서 론

화석연료의 고갈과 지구 온난화가 점차 심화됨에 따라 화석연료를 대체할 수 있는 신재생 에너지의 개발 및 확보는 국가적으로는 물론

지구환경적인 차원에서 매우 중요한 이슈가 되고 있다. 신재생 에너지 중 바이오연료는 가장 폭넓게 사용되고 있다. 특히 바이오에탄올은 석유자원과 달리 재생 가능한 원료부터 얻을 수 있으며, 그 기술 역시 잘 정립되어 있기 때문에 화석연료를 대체할 수 있는 수송용 연료로 인식되면서 대량 생산이 이루어질 정도로 폭넓게 활용되고 있다. 현재 공업적 에탄올 생산은 옥수수, 수수 등의 전분질

<sup>†</sup>To whom correspondence should be addressed.  
E-mail: nack@mokpo.ac.kr

계와 사탕수수, 사탕무 등의 당질계를 사용하는 제1세대 바이오에탄올이 주를 이루고 있다[1]. 그러나 당질계나 전분질계를 원료로 하는 제1세대 바이오에탄올은 식품 또는 사료 산업과 직접적인 경쟁 관계에 있기 때문에 제1세대 바이오에탄올의 대량생산은 농산물 원료에 대한 수요 증가로 이어져 원료가격이 급등하는 등 다양한 문제를 초래하였다[2,3]. 이에 따라 재생 가능하면서 저가로 활용 가능한 리그노셀룰로오스계 바이오매스가 바이오에탄올 생산을 위한 대체 바이오매스 자원으로 새로운 관심을 끌고 있다[4-7]. 그러나 리그노셀룰로오스계 바이오매스를 원료로 하는 제2세대 바이오에탄올 공정 역시 낮은 생산성과 높은 가수분해 비용 등으로 제한을 받고 있다[8]. 따라서 바이오에너지 산업의 지속적인 성장을 위해서는 새로운 유기자원과 이를 효율적으로 에너지화할 수 있는 기술의 개발이 요구되고 있다.

이러한 관점에서 대형조류(macroalgae)인 해조류와 미세조류(microalgae)인 식물성플랑크톤을 포함한 조류(algae) 바이오매스가 기존의 육상식물을 대체할 수 있는 제3세대 바이오에탄올 생산 원료로 많은 주목을 받고 있다[9-11]. 육상식물과 마찬가지로 대부분의 조류들은 셀룰로오스계 세포벽과 전분을 주된 탄수화물 저장 화합물로 축적하고 있지만 매우 넓은 범위의 복합다당류를 포함하고 있다. 즉, 세포벽 다당류로 셀룰로오스, 헤미셀룰로오스, 자일렌(xylan) 및 만난(mannan), 세포간 다당류로 sulfated glucuronoxylorhamnan, alginate, agar 및 carrageenin, 저장성 다당류로 amino pectin, laminaran과 floridean starch 등을 포함하며 어떤 해양 조류들은 70% 이상의 다당류를 포함하기도 한다[12-14]. 이들 다당류들은 대부분 발효기질로 이용 가능한 당류로 전환될 수 있어 에탄올 발효가 가능하다. 조류를 이용한 바이오연료에 관한 연구는 주로 미세조류에 초점을 두고 있으나, 해조류 역시 육상식물에 비해 생산성이 높고 이산화탄소의 저감 효과가 높을 뿐만 아니라 환경친화적이고 지속가능한 방법으로 대량 생산이 용이하다는 점에서 매우 유망한 바이오에너지 자원으로 인식되고 있다[15]. 특히 국토면적이 좁은 우리나라의 경우 육상식물을 이용하는 바이오에탄올 생산공정은 환경적, 경제적 측면에서 실용화하기 어려운 방법이지만, 삼면이 바다이고, 해조류 생산량이 세계 4위를 차지할 정도로 해조류 양식산업이 잘 발달되어 있는 점을 고려할 때, 해조류는 바이오에탄올 생산을 위한 바이오매스 공급원으로 가장 유리하고 적합하다고 할 수 있다.

해조류의 탄수화물 성분은 대부분 헤미셀룰로오스 계열로 가수분해시 글루코오스보다는 갈락토오스, 자일로스, 아라비노오스 등이 주를 이룬다. 따라서 해조류를 바이오매스로 활용하는 제3세대 바이오에탄올 공정은 당질계, 전분질계 및 리그노셀룰로오스계 육상식물을 이용하는 제1세대 및 제2세대 바이오에탄올 공정과는 전혀 다른 화학조성을 바탕으로 한다. Horn 등은 갈조류인 *Laminaria hyperborea*로부터 추출한 mannitol을 에탄올 발효기질로 활용하여 mannitol 1 g당 0.38 g의 에탄올을 얻었다[16]. 이성목과 이재화는 *Laminaria japonica*의 산-가수분해와 염농도가 에탄올 발효에 미치는 영향을 검토하는 연구에서 비환원당인 mannitol만이 에탄올 전환이 가능하였고, 가수분해물의 에탄올 발효가 진행됨에 따라 오히려 환원당의 농도가 증가하는 특이성과 함께 환원당의 증가가 에탄올 발효에 영향을 미치지 않음을 확인하였다[17]. 한편 Wang 등은 묽은 황산과 효소를 이용한 2단계 가수분해를 통해서 *Gracilaria salicornia*로부터 13.8 g/kg의 글루코오스를 얻었고 이를 발효시켜 이론값보다 훨씬 많은 79.1 g/kg의 에탄올을 생산할 수 있음을 제

시하였다[18]. 그러나 에탄올 발효를 위한 해조류의 가수분해 특성은 물론 가수분해물의 에탄올 발효특성, 에탄올 생산성 및 경제성에 대한 평가는 아직 부족한 실정이다.

본 연구에서는 해조류의 가수분해와 가수분해물의 에탄올발효 특성을 확인하기 위하여 갈조류인 다시마를 대상으로 산 가수분해 특성과 *Saccharomyces cerevisiae*에 의한 가수분해물의 에탄올 발효 특성을 검토하였다. 이를 통해 해조류의 가수분해 및 에탄올 발효 조건, 가수분해조건이 환원당 생성과 에탄올 생산수율에 미치는 영향, 에탄올 발효에 미치는 환원당과 비환원당의 역할 등에 대한 정보를 얻고자 하였다. 또한 다시마의 에탄올 생산성을 추산하고, 이를 현재 상용화되어 있는 당질계와 전분질계 1세대 바이오에탄올 생산수율과 비교하여 바이오에탄올 생산을 위한 바이오매스 자원으로 다시마의 활용 가능성을 평가하였다.

## 2. 실험재료 및 방법

### 2-1. 실험재료

다시마(*Laminaria japonica*)는 지역 시장에서 건조물 형태로 구입한 다음 커터밀을 이용하여 분쇄하였다. 입도는 10~100 mesh의 체를 이용하여  $\leq 0.15\sim 2.0$  mm의 범위에서 다양하게 조절하였다. 다시마 분말은 80 °C에서 24시간 건조시킨 후 PE백에 밀봉하여 보관하였다. 에탄올 발효를 위한 효모로는 *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 24858)를 한국미생물보존센터에서 분양받아 사용하였다. *S. cerevisiae* 균주는 YM 배지를 사용하여 냉동 보관하였다.

### 2-2. 산 가수분해

다시마의 산 가수분해는 250 mL 가압분해병(Duran group, Germany)에 다시마 분말 1~5 g과 증류수, 0.5 N 황산 또는 0.1 N 황산 용액 100 mL를 넣어 잘 혼합하고, 전기오븐을 이용하여 130 °C에서 2~8시간 가열하는 방법으로 실시하였다. 가수분해 후 유리된 당류를 포함하는 액상과 잔류 고형물은 GF-C 여과지를 이용하여 분리하였다. 여지상의 고형물은 온수로 세척한 후 80 °C에서 완전 건조하고 무게를 칭량하여 가수분해 조건에 의한 유기물의 분해율을 산출하는데 이용하였다. 여액은 일부를 분취하여 총환원당 농도를 분석하였으며, 나머지는 5 N NaOH 용액을 가하여 pH를 4.3으로 조절한 다음 에탄올 발효를 위한 시료로 사용하였다. 모든 가수분해 실험은 3회 이상 반복하여 실시하였다.

### 2-3. 에탄올 발효

에탄올 발효는 250 mL 삼각플라스크에 100 mL의 가수분해액(pH 4.3)을 넣고 배양된 *S. cerevisiae* 균주를 접종한 다음 교반속도 120 rpm, 발효온도 35 °C의 조건의 인큐베이터에서 1~5일간 실시하였다. 삼각플라스크는 주사바늘이 꽂힌 테프론 뚜껑으로 밀봉하여 공기의 유입을 최대한 제한함과 동시에 발효시 발생하는 이산화탄소를 배출하였다. 접종원인 *S. cerevisiae* 균주는 영양염으로 glucose 10 g/L, yeast extract 0.5 g/L, urea 1 g/L,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.5 g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2.5 g/L,  $\text{MgSO}_4$  1 g/L,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1 g/L,  $\text{FeSO}_4$  0.001 g/L를 포함하는 배양액에 100 mL에 YM 배지상의 *S. cerevisiae* 균주 소량을 접종하고 35 °C에서 48시간 동안 배양하였다. 이 배양액 10 mL씩을 분취하여 1,000 rpm에서 3분간 원심분리하여 균주를 농축한 후 상등액을 버리고 잔류 영양염을 제거하기 위해 증류수로 3회 반복 세

척하였다. 농축된 균주(건조중량 25~30 mg)를 가수분해액 100 mL에 분산시켰다. 발효기간 동안 주기적으로 발효액 5 mL씩을 분취하여 4,000 rpm에 5분간 원심분리한 후 상등액 중의 에탄올 농도와 잔류 환원당 농도를 분석하였다.

#### 2-4. 분석방법

총 환원당 농도는 DNS 법[19]을 이용하여 분석하였다. DNS 시약은 2 N NaOH 용액 100 mL에 5 g의 3,5-dinitrosalicylic acid와 150 g의 Rochelle salt를 순차적으로 용해시킨 다음 총부피가 500 mL가 되도록 증류수를 가하는 방법으로 제조하였다. 환원당 분석을 위한 표준시약으로는 글루코오스 40~1,000 mg/L를 사용하였다. 환원당 농도 분석용액은 적절한 농도로 희석된 전처리 시료 1 mL에 DNS 시약 1 mL를 첨가하고 끓는 물에 넣고 15분간 반응시킨 다음 20 °C로 15분간 냉각시키고 3 mL의 증류수를 가하여 제조하였다. 환원당 농도의 정량은 UV-분광계(UV-2401PC, Shimadzu)를 이용하여 DNS 시약으로 발색시킨 분석용액의 흡광도를 파장 546 nm에서 측정하고 이를 표준용액의 흡광도와 비교하는 방법으로 분석하였다. 환원당 생성량은 환원당 농도를 이용하여 다음 식으로 계산하였다.

$$\text{Reducing sugar yield (mg/g-DS)} = \frac{(C_R \times V_H)}{W_{dry}} \times D_f \quad (1)$$

여기서  $C_R$ 은 시료용액 중의 환원당 농도(mg/L),  $V_H$ 는 가수분해 용액의 부피(L),  $W_{dry}$ 는 가수분해에 사용된 다시마의 건조무게(g),  $D_f$ 는 희석비이다. 당당류 조성은 refractive index detector(RID)와 ZORBAX 탄수화물 분석 컬럼(4.6 mm×250 mm, Agilent Technologies, USA)이 장착된 HPLC(Agilent 1100)를 이용하여 분석하였다. 용리액은 acetonitrile과 증류수(80:20) 혼합액을 1 mL/min으로 흘렸으며, 시료액은 30 °C에서 10 µL 주입하였다.

가수분해 조건별 다시마의 분해율은 가수분해 후 잔존하는 고형물질의 무게를 바탕으로 다음 식을 이용하여 Weight loss(%)로 산출하였다.

$$\text{Weight loss(\%)} = \frac{W_{dry} - W_{residue}}{W_{dry}} \times 100 \quad (2)$$

여기서  $W_{dry}$ 는 다시마의 건조무게,  $W_{residue}$ 는 가수분해용액에 잔존하는 고형물질의 건조무게이다.

효모발효 후 생산된 에탄올 농도는 GC(Model 250A, Shimadzu)를 이용하여 정량 분석하였다. GC는 flame ion detector(FID)와 DB-WAX column, 30 m×0.25 mm ID(Agilent Technologies, USA)으로 구성된다. Injector, detector와 column oven의 온도는 각각 200, 230와 80 °C로 설정하였으며, 헬륨을 carrier gas로 사용하였다. 에탄올 정량분석을 위한 표준시료는 증류수에 에탄올 0.01~10%(v/v)를 함유한 시료를 사용하였다. 에탄올 생산량은 발효용액 중의 에탄올 농도를 이용하여 다음 식으로 계산하였다.

$$\text{Ethanol yield(mg/g-DS)} = \frac{(C_{Et} \times V_F)}{W_{dry}} \times f \quad (3)$$

여기서  $C_{Et}$ 은 발효용액 중의 에탄올 농도(mg/L),  $V_F$ 는 발효용액의 부피(L),  $W_{dry}$ 는 가수분해에 사용된 다시마의 건조무게(g),  $f$ 는 분취율로  $V_H/V_F$ 이다.

효모의 성장률은 UV-분광계(UV-2401PC, Shimadzu)를 이용하여 배양용액의 흡광도를 파장 600 nm( $OD_{600}$ )에서 측정하고, 이를 효모 배양액의  $OD_{600}$ 과 함유 효모 건조무게를 바탕으로 작성한 검량선과 비교하는 방법으로 분석하였다.

### 3. 실험결과 및 고찰

#### 3-1. 전처리 및 가수분해

바이오매스의 전처리는 고분자상의 세포구성물을 분해하여 발효 가능한 환원당을 유리시키고, 이를 발효과정에서 활용 가능하게 만들기 때문에 매우 중요한 과정이다. 바이오매스의 전처리 방법은 보통 세가지 방법으로 분류할 수 있다. 즉, 물리적, 생물학적 및 화학적 방법으로 나눌 수 있다. 물리적 전처리 방법은 조쇄, 분쇄 등을 통한 미립화와 열분해를 포함한다. Macroalgae인 해조류의 경우 이를 에탄올 발효를 위한 원료물질로 활용하기 위해서는 분쇄와 같은 미립화 과정은 필수적이다. 해조류의 미립화는 반응표면적을 증가시켜 생물학적 또는 화학적 가수분해 효율을 개선하기 때문이다[20]. 다양한 효소를 이용하는 생물학적 전처리는 환원당을 유리시키는 가수분해 속도가 낮기 때문에 일반적으로 화학적 가수분해와 연계하는 공정으로 활용되고 있다. 화학적 전처리 과정은 corn, switchgrass, sugar cane 및 straw 등 다양한 바이오매스의 가수분해에서 그 효과가 입증되어 있다[21-24]. 보통 묽은 황산이 셀룰로오스 물질의 환원당 전환률이 높기 때문에 보다 선호되는 추세이다[25].

산-가수분해에 미치는 입도의 영향을 살펴보기 위해서 입도 0.15 mm 이하, 0.15~0.25 mm, 0.25~0.425 mm, 0.425~0.85 mm, 0.85~1.4 mm, 1.4~2.0 mm로 분쇄된 다시마를 대상으로 0.5 N 황산을 이용한 산-가수분해반응을 실시하고 각 입도별 환원당 생성량을 비교하였다. 산-가수분해는 0.5 N 황산 100 mL에 다시마 1 g을 넣고 130 °C에서 8시간 가열하는 조건에서 실시하였다. 그 결과 산-가수분해에 의한 다시마의 용해율(무게감소)은 입도 0.85 mm 이하에서는 88.4~88.6%로 입도와 관계없이 거의 일정한 반면, 입도 0.85~1.4 mm인 경우 87.2%, 입도 1.4~2.0 mm인 경우 83.7%로 약간 감소하는 경향을 보였다. 한편 환원당 생성량은 147 mg/g에서 96 mg/g으로 입도가 증가할수록 감소하는 경향이 뚜렷하였다. 이상의 결과는 다시마의 가수분해를 위한 적정 입도가 0.25 mm 이하임을 시사한다.

다시마의 산-가수분해 효과를 알아보기 위해 증류수, 0.5 N과 1.0 N 황산 100 mL에 다시마 1 g을 넣고 130 °C에서 2~8시간 반응시켰다. Fig. 1은 산의 농도별 가수분해 시간에 따른 무게감소율(용해율)을 비교하여 나타낸 것으로 산 농도에 따라 다시마의 용해율이 달라짐을 보여주고 있다. 증류수의 경우 가수분해시간이 2시간에서 4시간으로 증가함에 따라 용해율은 77%에서 84%로 증가하였으나 그 이상 가수분해시간이 증가하여도 용해율은 증가하지 않는 특성을 보여 대부분의 가용성 물질이 4시간의 가수분해에 의해 액상으로 유리되었음을 알 수 있다. 이와 유사한 특성이 1.0 N의 황산에서도 관찰되었다. 다만 1.0 N 황산에서의 다시마 용해율은 증류수에 비해 약 4% 정도 낮게 나타나 유기물의 가용화라는 측면에서는 오히려 비효율적이었다. 한편 0.5 N 황산의 경우 대체로 분해시간이 증가함에 따라 용해율도 증가하는 경향을 보였다. 이는 첨가된 황산이 다시마의 용해를 저감시킴을 나타내는 것으로 첨가된 산에 의해 다시마가 수축되었기 때문으로 판단된다.

산농도별로 가수분해 시간에 따른 환원당 생성량을 Fig. 2에 비

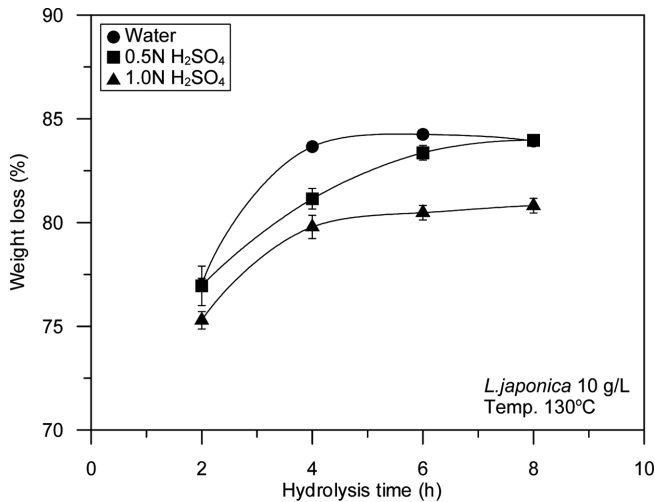


Fig. 1. Effect of hydrolysis medium and time on weight loss of *Laminaria japonica*.

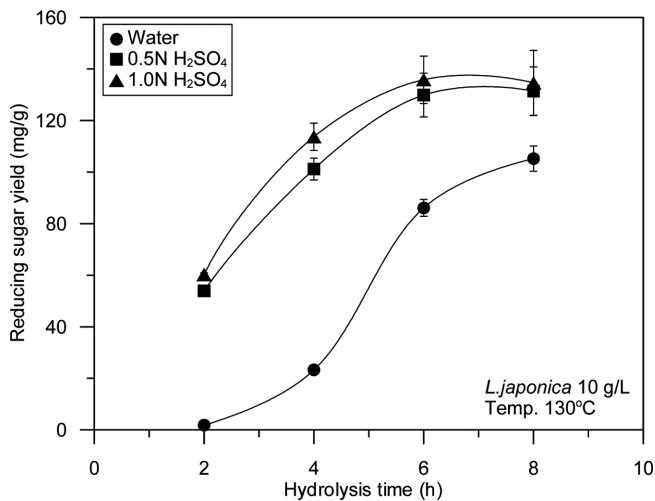


Fig. 2. Effect of hydrolysis medium and time on reducing sugar yield from *Laminaria japonica*.

교하여 나타내었다. 환원당 생성량은 증류수의 경우 1.8~105 mg/g으로 가열시간이 길어짐에 따라 증가하는 추세를 보였다. 한편 0.5 N 황산의 경우 54~131 mg/g, 1.0 N 황산의 경우 60~135 mg/g으로 거의 비슷한 환원당 생성량을 보임과 동시에 산 농도에 관계없이 가열시간 6시간에 최대값에 이른 후 약간 감소하는 경향을 나타내었다. 바이오매스의 산-가수분해시 3% 이하의 황산용액이 가장 효율적이라고 알려져 있다[26-28]. Fig. 2의 가수분해물을 여과한 후 그 여액을 대상으로 에탄올 발효공정을 적용하였다. 에탄올 발효는 여액의 pH를 4.3으로 조절한 후 사전에 배양된 *S. cerevisiae* 균주를 일정량씩 접종한 다음 발효온도 35 °C에서 96시간 동안 실시하였다. 그 결과 에탄올 생산량은 산의 농도에 관계없이 가수분해 4시간 이후 6시간까지 급격히 증가한 후 서서히 증가하는 경향을 나타내었으며, 환원당 생성량과 마찬가지로 1.0 N 황산>0.5 N 황산 > 증류수 순으로 높았다. 이상의 결과와 함께 가수분해공정의 비용과 환경성을 고려할 때 다시마의 산-가수분해를 위한 적정 조건은 가수분해 온도 130 °C에서 황산농도 0.5 N, 가수분해시간 6 시간임을 알 수 있다.

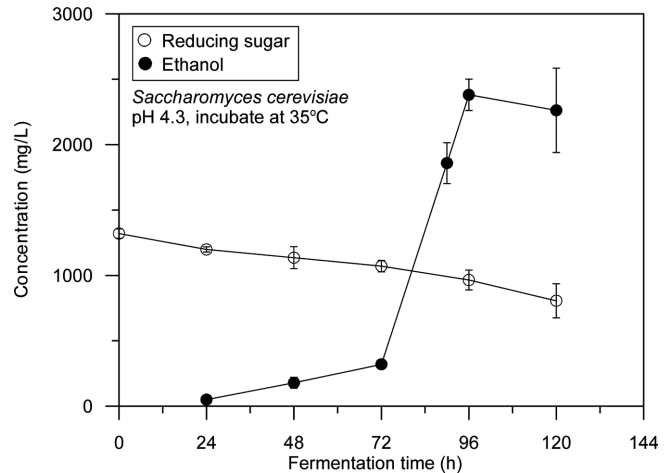


Fig. 3. Ethanol production and consumption of reducing sugar from hydrolysate of *Laminaria japonica* using *Saccharomyces cerevisiae* as a function of fermentation time.

### 3-2. 가수분해물의 에탄올 발효

Fig. 3은 다시마 산-가수분해액의 발효시간별 에탄올 생산량과 환원당 농도변화를 보여주고 있다. 에탄올 발효는 다시마 산-가수분해액의 pH를 4.3으로 조절한 후 사전에 배양된 *S. cerevisiae* 균주를 일정량씩 접종한 다음 교반속도 120 rpm, 발효온도 35 °C 조건의 인큐베이터에서 120시간(5일) 동안 실시하며 24시간 간격으로 시료를 채취하여 에탄올과 환원당 농도를 분석하였다. 다시마 가수분해액은 0.5 N 황산 100 mL에 다시마 분말 1 g을 넣고 130 °C에서 6시간 분해한 다음 여과한 시료를 사용하였다. 다시마 가수분해액의 에탄올 농도는 발효시간 72시간까지 소량씩 증가하다가 72시간 이후 96시간까지 320±28 mg/L에서 2,380±120 mg/L로 급격히 증감한 후 다시 감소하는 경향을 보였다. 이상의 결과는 다시마 가수분해액의 최적 에탄올 발효시간이 96시간임을 나타내는 것으로, 보통 48시간 이내에 에탄올 발효가 완료되는 당질계나 셀룰로오스계의 가수분해물에 비해 발효시간이 상당히 지연되었음을 보인다. 이는 순수한 글루코오스 수용액과 달리 다시마 가수분해물에는 발효효모의 활성을 억제하는 성분이 다량 존재하거나 가수분해물에 존재하는 환원당이 글루코오스만으로 구성되어있지 않기 때문으로 판단된다. 다시마 가수분해물의 환원당 조성은 갈락토오스 620 mg/L, 글루코오스 309 mg/L, 자일로오스 298 mg/L, 만노오스 120 mg/L, 아라비노오스 40 mg/L의 순으로 대부분 헤미셀룰로오스 계열이 주를 이루었다. 류정곤 등은 우뚝가사리를 이용한 에탄올 생산에서 *S. cerevisiae*에 의한 갈락토오스의 에탄올 발효가 글루코오스에 비해 상당히 느리다고 보고한 바 있다[29]. 이를 확인하기 위하여 초기농도 5,000 mg/L인 각 단당류 용액(pH 4.3)을 대상으로 *S. cerevisiae*에 의한 에탄올 발효시간을 검토하였다(Fig. 4). 글루코오스 수용액의 에탄올 농도는 발효시간 24시간이후 48시간까지 급격히 증가한 후 거의 일정해지는 경향을 보였다. 이는 Ge 등이 제시한 글루코오스 발효 결과와 일치한다[30]. 이에 반해 갈락토오스와 만노오스는 각각 72시간과 96시간에서 에탄올 농도가 최대가 되어 글루코오스에 비해 에탄올 발효가 24~48시간 정도 지연되는 특성을 보였다. 한편 C<sub>5</sub>-당인 아라비노오스와 자일로오스는 혐기성 조건에서 *S. cerevisiae*에 의해 거의 발효되지 않음을 확인할 수 있다. Fig. 5는 각 단당류 용액의 에탄올 발효에서 *S. cerevisiae*의 성장률로, 발효용액 내 *S.*

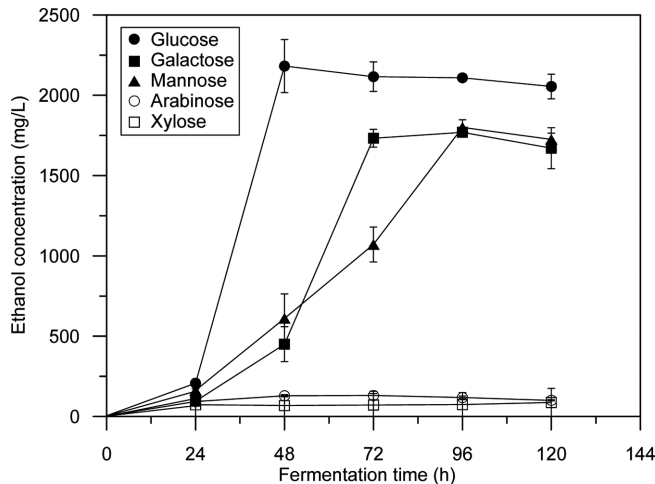


Fig. 4. Ethanol production from monosaccharides using *Saccharomyces cerevisiae* as a function of fermentation time.

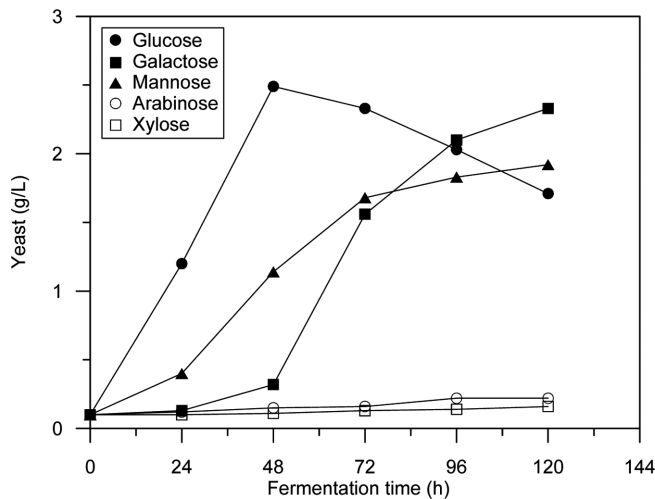
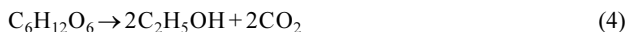


Fig. 5. Cell growth of *Saccharomyces cerevisiae* in fermentation of monosaccharide solution.

*cerevisiae* 농도가 에탄올 생산량과 매우 높은 상관성이 있음을 보여주고 있다.

에탄올 발효에 따른 환원당 농도변화는 초기 1,320 mg/L에서 120 시간 발효 후 806 mg/L로 점차 감소하는 경향을 보였으나 많은 양의 에탄올이 생성되었음에도 불구하고 그 소모율이 40% 이하로 매우 낮았다(Fig. 3). 글루코오스, 갈락토오스, 만노오스 등과 같은 C<sub>6</sub>-당은 효모에 의해 발효되어 다음 반응식과 같이 에탄올로 전환된다.



위 반응식에 따라서 이론적인 최대 생산량은 C<sub>6</sub>-당 1 kg당 바이오에탄올 0.51 kg임을 고려할 때, 다시마 가수분해물의 에탄올 생산량은 가수분해 용액 중의 환원당이 모두 C<sub>6</sub>-당이고 완전히 에탄올로 전환되었다고 가정한다 할지라도 환원당 농도 대비 3배 이상 높았으며, 환원당 실제 소모량 대비 25배 이상 높았다. 이는 다시마 가수분해물의 발효과정에서 환원당 이외의 고분자 다당류 성분이 에탄올로 전환되었음을 의미한다. 환원당에 비해 높은 에탄올 생산성은 해양조류인 *Gracilaria salicornia*의 에탄올 발효에 관한 Wang 등 [18]의 연구에서도 제시된 바 있다. 갈조류인 다시마는 건조무게의

약 30~67%의 탄수화물을 함유하고 있으며, alginate, laminaran 및 mannitol이 탄수화물의 주요 구성 성분을 이룬다. Alginate는 다시마의 세포벽을 이루는 구조성 다당류로 β-D-mannuronate와 α-L-guluronate로 이루어져 있고, 이들 두 성분이 homopolymer형태로 결합하여 polymannuronate 또는 polyguluronate 형태로 존재하거나 두 성분이 혼합된 heteropolymer 형태로 존재하는 등[31,32] 매우 복잡한 구조로 이루어져 있어 에탄올 생산을 위한 기질로 직접 이용되기는 어렵다. 이에 반해, 또 다른 고분자인 laminaran은 주로 β-1,3 결합으로 구성된 glucan으로 되어 있으며, 미량의 D-mannitol을 함유하고 있다. 따라서 직접 에탄올 전환이 가능한 mannitol과 함께 laminaran 역시 에탄올 생산을 위한 기질로 이용 가능하다고 알려져 있다[16,33]. 따라서 가수분해에 의해 고분자 다당류로부터 전환된 환원당을 기질로 활용하여 생산할 수 있는 에탄올보다 훨씬 많은 에탄올이 생산되었다는 사실은 환원당뿐만 아니라 가수분해액에 용해되어 있는 비환원당이나 oligomer 성분 역시 에탄올 생산을 위한 기질로 이용되었음을 의미한다. 이성목과 이재화는 *S. cerevisiae* 효모를 이용한 다시마 산-가수분해물의 발효과정에서 오히려 환원당의 농도가 증가하였고, 이는 *S. cerevisiae* 효모가 자체적으로 alginate를 가수분해할 수 있는 활성을 가지고 있기 때문이라고 보고한 바 있다[17].

### 3-3. 다시마 주입량별 에탄올 생산효율

가수분해 용액 대비 바이오매스의 주입량비(Solid-to-liquid ratio)는 환원당 전환수율은 물론 에탄올 발효에 중요한 요소로 작용한다. Harun and Danquah는 미세조류 *Chlorococcum humicola*를 대상으로 3%(v/v) 황산-가수분해(140~160 °C)와 *S. cerevisiae* 효모를 이용한 에탄올 발효에서 바이오매스 주입량이 1~2%(w/v)일 때 가장 높은 에탄올 생산수율을 얻을 수 있었다고 보고한 바 있다[26]. 또한 김정수는 우뚝가사리를 대상으로 다양한 주입량비에서 1% 황산-가수분해(120 °C) 실험을 실시한 결과 주입량 5.5%에서 환원당 전환수율이 가장 높았음을 밝히고, 주입량이 높을 경우 기질과 촉매의 반응 충돌 가능성이 낮기 때문에 가수분해가 원활히 이루어지지 않는다고 보고하였다[34]. 적정 다시마 주입량 조건을 규명하기 위해 다시마 주입량을 용매 대비 1~5%(w/v)로 변화시키는 조건에서 가수분해효율과 에탄올 생산효율을 비교하여 보았다. 산-가수분해는 0.5 N 황산을 촉매로 130 °C에서 6시간 가열하는 조건에서, 에탄올 발효는 가수분해 여액에 배양된 *S. cerevisiae* 균주 일정량을 주입하고 35 °C에서 96시간 발효시키는 조건에서 각각 실시하였다. 그 결과 가수분해시 다시마의 용해율을 나타내는 무게감소율은 주입량 1~3%(w/v)에서는 83.0±0.1%로 거의 일정하였으나 주입량을 5%(w/v)로 증가시킬 경우 81.0%로 약간 감소하는 경향을 보였다(데이터 표시하지 않음). 한편 환원당 농도는 다시마 주입량을 1%(w/v)에서 5%(w/v)로 증가시키기에 따라 1,286 mg/L에서 4,213 mg/L로 증가하였다(Fig. 6). 그러나 이들 환원당의 농도를 주입된 다시마의 단위 무게당으로 환산할 경우 Fig. 7에 나타난 바와 같이 주입량이 증가할수록 환원당 전환수율은 감소하는 경향을 보였다. 즉, 주입량 1%(w/v)일 때 환원당 전환수율은 128 mg/g으로 가장 높았으며 주입량을 2, 3 및 5%(w/v)로 증가시키기에 따라 환원당 전환수율은 116 mg/g, 86 mg/g 및 84 mg/g으로 감소하였다. 특히 주입량 3%(w/v)에서 환원당 생성수율이 급격히 감소하는 특성을 보여 미세조류 실험결과[26]와 유사하였다. 산-가수분해에 의해 가용화된 다시마 성

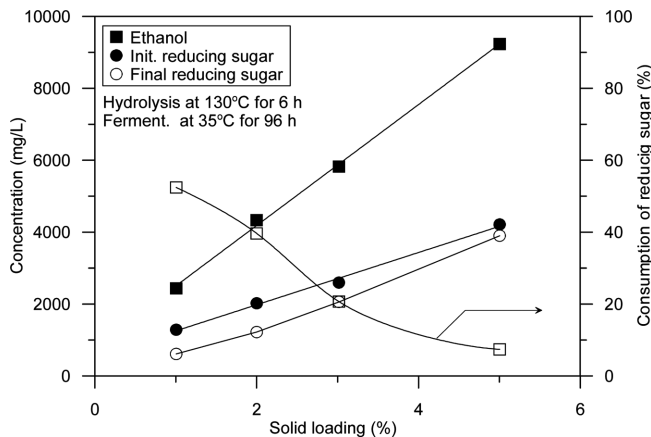


Fig. 6. Effect of solid-to-liquid ratio on reducing sugar and ethanol productions from *Laminaria japonica*, and consumption ratio of reducing sugar at fermentation.

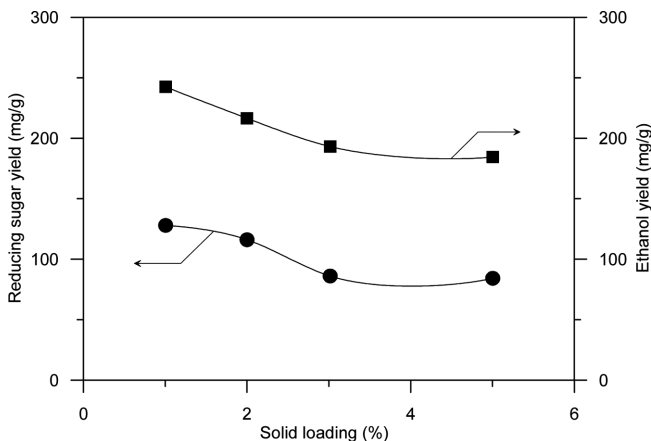


Fig. 7. Reducing sugar and ethanol yields depending on solid-to-liquid ratio.

본은 81~83%에 이르는데 반해 환원당 전환수율은 8.4~12.8%에 불과할 정도로 큰 차이를 보이는 것은 다시마에서 용해된 성분들이 대부분 가용성 당류 형태로 유리되며, 이들 중 일부만이 환원당으로 전환되었음을 나타낸다. 발효액 중의 에탄올 농도 역시 다시마 주입량을 1%(w/v)에서 5%(w/v)로 증가시키에 따라 2,437 mg/L에서 9,232 mg/L로 증가하였으나(Fig. 6) 단위무게당 에탄올 생산량은 242 mg/g에서 185 mg/g으로 감소하였다(Fig. 7). 환원당의 잔류농도는 다시마 주입량이 높을수록 더 높게 나타나 더 많은 양의 에탄올이 생성되었는데도 불구하고 환원당 소모율은 더 낮아지는 특이성을 나타내었다(Fig. 6). 이는 전술한 바와 같이 환원당 이외의 성분이 에탄올로 전환되었음을 의미하며, 다시마 주입량이 증가할수록 용존상의 비환원당류(non-reducing sugars) 또는 부분적으로 가수분해된 올리고당류(oligosaccharides) 함량이 증가한다는 점을 고려할 때, 이들 성분 중 일부가 직접 에탄올 발효에 이용되었거나 발효과정에서 *S. cerevisiae* 효모에 의해 당류로 가수분해된 후 에탄올 발효에 이용되었음을 시사한다. Fig. 8은 다시마 주입량별 초기 환원당 농도와 에탄올 농도를 각각 물농도로 변환하여 비교한 것으로, 여기서 환원당의 물농도는 모든 환원당이 글루코오스라고 가정하고 계산하였다. 환원당의 이론적 에탄올 전환량은 식 (4)에 의거 환원당 대 에탄올 몰비 1:2로 계산하여 Fig. 8에 에탄올 실측값과 함께 나타내었다. Fig. 8에서 비교한 바와 같이 다시마의 에탄올 생

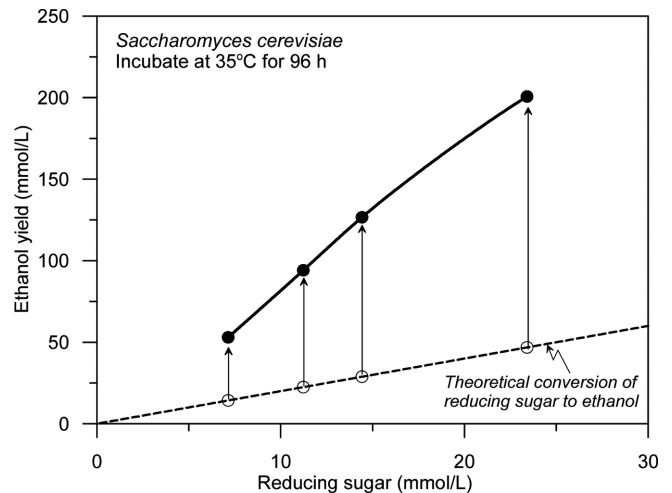


Fig. 8. Relationship between actual ethanol yield and theoretical ethanol yield at various solid-to-liquid ratios. Theoretical ethanol yield was calculated with reducing sugar content based on conversion of glucose to ethanol.

성량은 환원당 생성량으로부터 계산한 이론적 에탄올 생성량에 비해 3.7~4.4배 정도 높았으며, 그 배율은 다시마 주입량이 증가할수록 증가하는 경향을 나타내었다. 당질계와 전분질계와 같은 제1세대 바이오에탄올 공정은 물론 리그노셀룰로오스계를 이용하는 제2세대 바이오에탄올 공정의 경우 환원당 대비 에탄올 생산량은 이론값과 거의 일치한다는 사실은 이미 수많은 연구를 통해 입증되어 있다[5,26,30,35,36]. 그러나 본 연구의 결과들은 다시마의 가수분해를 통해 얻어진 환원당보다는 에탄올 생산 기질로 이용 가능한 수준으로 가수분해된 올리고당류나 만니톨 등과 같은 비환원당류에 의해 에탄올 생산량이 지배됨을 나타내고 있다.

#### 4. 다시마 바이오에탄올의 경제성

황산 촉매 가수분해와 에탄올 발효공정을 통해 얻을 수 있는 다시마의 바이오에탄올 생산량은 건조물 1톤당 대략 240 kg(276 L)으로 제1세대 바이오에탄올 원료인 사탕수수(70 L/ton)에 비해 높고 옥수수(410 L/ton)에 비해 낮았으나 제2세대 바이오에탄올 원료인 리그노셀룰로오스계(220~280 L/ton)와 비슷한 수준이었다[1,24,37,38]. 국내 해조류 생산성은 아직 체계적인 연구가 이루어지지 않아 정확히 평가하기는 어렵다. 최근 류정곤 등[29]의 보고서에 따르면, 다시마의 추정 생산량과 생산비용은 건조량 기준으로 4.5톤/ha로 10~20원/톤(전복사료용 기준), 연간 생산성은 40톤/ha/년이었다. 이를 기준으로 다시마의 바이오에탄올 생산성을 추산하고, 이를 현재 상용화되어 있는 제1세대 바이오에탄올 원료인 사탕수수, 옥수수 및 밀의 바이오에탄올 생산성[1]과 비교하여 Table 1에 나타내었다. 다시마의 바이오에탄올 생산성은 9,600 kg/ha/년으로 브라질의 사탕수수(4,900 kg/ha/년)나 미국의 옥수수(2,050 kg/ha/년)와 비교하여 상당히 높았다. 더구나 갈조류는 1 m 이상 자라는 거대조류로 수확하기 쉽고 생산비용이 저렴하다는 점 역시 장점이 될 수 있다. 특히 다시마는 부가가치와 공업적 활용도가 높은 알긴산이 풍부하기 때문에 알긴산 추출과 같은 바이오 화학산업 등 해조류 관련 산업들과 바이오에탄올 산업을 연계할 경우 충분히 부가가치를 창출할 수 있을 것으로 판단된다.

**Table 1. Comparison of bioethanol yield from different energy crops**

Type	Yield (t/ha/year)	Conversion rate to sugar or starch (%)	Conversion rate to bioethanol (L/ton)	Bioethanol yield (kg/ha/year)
Sugar cane	70	12.5	70	4900
Corn	5	69	410	2050
Wheat	4	66	390	1560
<i>Laminaria japonica</i>	40*	13	240	9600

\*Dry weight, Balat *et al.*<sup>1)</sup>

결론적으로 해조류를 이용하는 제3세대 바이오에탄올은 육상식물에 비해 해조류의 생산성이 높을 뿐만 아니고 이산화탄소의 저감 효과가 높다는 점[9-11,39]을 고려할 때 제1세대와 제2세대 바이오에탄올을 대체할 수 있는 바이오매스 에너지 자원으로 그 활용 가능성이 충분하다고 판단된다.

#### 4. 결 론

바이오에탄올 생산을 위한 바이오매스 자원으로 해조류의 활용 가능성을 평가하기 위해 갈조류인 다시마를 대상으로 가수분해공정과 효모발효공정을 검토한 결과, 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다.

(1) 가수분해(130 °C)에 의한 다시마의 용해율은 80~83%의 범위에서 증류수>0.5N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>>1.0N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 순으로 높았으나 환원당 생성수율은 105~135 mg/g의 범위에서 1.0N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>=0.5N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>>증류수 순으로 높았다.

(2) 최대의 환원당 생성량을 얻을 수 있는 산-가수분해시간은 6시간이었으나 최대 바이오에탄올 생산량을 얻을 수 있는 산-가수분해시간은 8시간이었다.

(3) *Saccharomyces cerevisiae*를 효모로 이용한 다시마 가수분해물의 에탄올 발효는 글루코오스에 비해 48시간, 갈락토오스에 비해 24시간 지연되는 96시간에서 최대가 되었다. 이는 만노오스의 에탄올 발효시간과 동일하였다. C<sub>5</sub>-당인 아라비노오스와 자일로오스는 에탄올 생산 기질로 활용되지 못하였다.

(4) 다시마 가수분해물의 에탄올 생산량은 환원당으로부터 전환될 수 있는 이론적 생산량에 비해 4배 이상 많아 환원당 생산량만으로 다시마의 에탄올 생산성을 평가할 수 없었다. 이는 가수분해에 의해 다시마의 다당류로부터 전환된 환원당 이외에 가용성 비환원당 성분 역시 에탄올 생산 기질로 이용될 수 있기 때문이다.

(5) 가수분해시 다시마 주입량 1%(w/v) 조건에서 건조무게 기준 240 kg/ton 이상의 바이오에탄올을 생산할 수 있었다. 다시마 주입량을 5%(w/v)로 증가시킴에 따라 발효액 중의 에탄올 농도는 9 g/L 이상으로 증가되었으나 단위무게당 생산성은 185 kg/ton으로 감소하였다.

(6) 다시마의 바이오에탄올 생산성은 7,400~9,600 kg/ha/년으로 브라질의 사탕수수(4,900 kg/ha/년)나 미국의 옥수수(2,050 kg/ha/년)에 비해 높아 이들을 대체할 수 있는 바이오매스 자원으로 다시마의 활용 가능성은 충분하였다.

#### 감 사

본 과제(결과물)는 교육과학기술부의 재원으로 한국연구재단의

지원을 받아 수행된 광역경제권 선도산업 인재양성사업의 연구결과입니다.

#### 참고문헌

- Balata, M., Balata, H. and Öz, C., "Progress in Bioethanol Processing," *Prog. Energy Combustion Sci.*, **34**, 551-573(2008).
- Nigam, P. and Singh, A., "Production of Liquid Biofuels from Renewable Resources," *Prog. Energy Combust. Sci.*, **37**, 52-58 (2011).
- Sims, R. E. H., Mabee, W., Saddler, J. N. and Taylor, M., "An Overview of Second Generation Biofuel Technologies," *Biore-sour. Technol.*, **101**, 1570-1580(2011).
- Delgenes, J. P., Moletta, R. and Navarro, J. M., "Acid-hydrolysis of Wheat Straw and Process Considerations for Ethanol Fermentation by *Pichia Stipitis* Y7124," *Process Biochem.*, **25**, 132-135(1990).
- Ahring, B. K., Jensen, K., Nielsen, P., Bjerre, A. B. and Schmidt, A. S., "Pretreatment of Wheat Straw and Conversion of Xylose and Xylan to Ethanol by Thermophilic Anaerobic Bacteria," *Biore-sour. Technol.*, **58**, 107-113(1996).
- Nigam, J. N., "Ethanol Production from Wheat Straw Hemicellulose Hydrolysate by *Pichia Stipitis*," *J. Biotechnol.*, **87**, 17-27(2001).
- Saha, B. C., Iten, L. B., Cotta, M. A. and Wu, Y. V., "Dilute Acid Pretreatment, Enzymatic Saccharification and Fermentation of Wheat Straw to Ethanol," *Process Biochem.*, **40**, 3693-3700(2005).
- John, R. P., Anisha, G. S., Nampoothiri, K. M. and Pandey, A., "Micro and Macroalgal Biomass: a Renewable Source for Bioethanol," *Biore-sour. Technol.*, **102**, 186-193(2011).
- Hu, Q., Sommerfeld, M., Jarvis, E., Ghirardi, M., Posewitz, M. and Seibert, M., "Microalgal Triacylglycerols as Feedstocks for Biofuel Production: Perspectives and Advances," *Plant J.*, **54**, 621-639(2008).
- Zhang, X., Hu, Q., Sommerfeld, M., Puruhito, E. and Chen, Y., "Harvesting Algal Biomass for Biofuels Using Ultrafiltration Membranes," *Biore-sour. Technol.*, **101**, 5297-5304(2010).
- Singh, A., Nigam, P. S. and Murphy, J. D., "Renewable Fuels from Algae: An Answer to Debatable Land Based Fuels," *Biore-sour. Technol.*, **102**, 10-16(2011).
- Goh, C. S. and Lee, K. T., "Conceptual Macroalgae-based Third-generation Bioethanol (TGB. Biorefinery in Sabah, Malaysia as an Underlay for Renewable and Sustainable Development," *Renew. Sustain. Energy Rev.*, **14**, 842-848(2010).
- Guerriero, G., Fugelstad, J. and Bulone, V., "What do we Really Know about Cellulose Biosynthesis in Higher Plant?," *J. Integr. Plant Biol.*, **52**, 161-175(2010).
- Okuda, K., Oka, K., Onda, A., Kajiyoshi, K., Hiraoka, M. and Yanagisawa, K., "Hydrothermal Fractional Pretreatment of Sea

- Algae and Its Enhanced Enzymatic Hydrolysis," *J. Chem. Technol. Biot.*, **83**, 836-841(2008).
15. Aresta, M., Dibenedetto, A. and Barbeiro, G., "Utilization of Macroalgae for Enhanced CO<sub>2</sub> Fixation and Biofuels Production: Development of a Computing Software for an LCA Study," *Fuel. Process. Technol.*, **86**, 1679-1693(2005).
  16. Horn, S. J., Aasen, I. M. and Østgaard, K., "Production of Ethanol from Mannitol by *Zymobacter Palmae*," *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **24**, 51-57(2000).
  17. Lee, S.M. and Lee, J.H., "Influence of Acid and Salt Content on the Ethanol Production from *Laminaria japonica*," *Appl. Chem. Eng.*, **21**, 154-161(2010).
  18. Wang, X., Liu, X. and Wang, G., "Two-stage Hydrolysis of Invasive Algal Feedstock for Ethanol Fermentation," *J. Integrative Plant Biology*, **53**(3), 246-252(2011).
  19. Miller, G. L., "Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for the Determination of Reducing Sugars," *Anal. Chem.*, **31**, 426-428(1959).
  20. Cadoche, L. and Lopez, G. D., "Assessment of Size Reduction as a Preliminary Step in the Production of Ethanol from Lignocellulosic Wastes," *Biol. Wastes*, **30**, 153-157(2009).
  21. Chen, M., Zhao, J. and Xia, L., "Comparison of Four Different Chemical Pretreatments of Corn Stover for Enhancing Enzymatic Digestibility," *Biomass Bioenergy*, **33**, 1381-1385(2009).
  22. Van Groenestijn, J., Hazewinkel, O. and Bakker, R., "Pretreatment of Lignocellulose with Biological Acid Recycling (Biosulfur process)," *Zuckerindustrie*, **131**, 639-641(2006).
  23. Dawson, L. and Boopathy, R., "Cellulosic Ethanol Production from Sugarcane Bagasse without Enzymatic Saccharification," *Bio. Resour.*, **3**, 452-460(2008).
  24. Abedinifar, S., Karimi, K., Khanahmadi, M. and Taherzadeh M. J., "Ethanol Production by *Mucor Indicus* and *Rhizopus Oryzae* from Rice Straw by Separate Hydrolysis and Fermentation," *Biomass Bioenergy*, **33**, 828-833(2009).
  25. Rabelo, S. C., Filho, R. M. and Costa, A. C., "Lime Pretreatment of Sugarcane Bagasse for Ethanol Production," *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **153**, 139-150(2009).
  26. Harun, R. and Danquah, M. K., "Influence of Acid Pre-treatment on Microalgal Biomass for Bioethanol Production," *Process Biochem.*, **46**, 304-309(2011).
  27. Jeffries, T. W. and Jin, Y. S., "Ethanol and Thermotolerance in the Bioconversion of Xylose by Yeasts," *Adv. Appl. Microbiol.*, **47**, 221-268(2000).
  28. Torget, R., Hatzis, C., Hayward, T. K., Hsu, T. A. and Philippidis, G.P., "Optimization of Reverse-flow, 2-temperature, Dilute-acid Pretreatment to Enhance Biomass Conversion to Ethanol," *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **58**, 85-101(1996).
  29. Ryu, J. G., Cho, J. H. and Kim, D. Y., Strategy and Policy Direction for Bio-industrialization of Marine Algae," *Korea Maritime Institute, Policy Study Data* (2009).
  30. Ge, L., Wang, P. and Mou, H., "Study on Saccharification Techniques of Seaweed Wastes for the Transformation of Ethanol," *Renewable Energy*, **36**, 84-89(2011).
  31. Kloareg, B. and Quatrano, R. S., "Structure of the Cell Walls of Marine Algae and Ecophysiological Functions of the Matrix Polysaccharides," *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.*, **26**, 259-315(1998).
  32. Percival, E., "The Polysaccharides of Green, Red and Brown Seaweeds: Their Basic Structure, Biosynthesis and Function," *British Phycological Journal*, **14**, 103-117(1979).
  33. Park, J. I., Woo, H. C. and Lee, J. H., "Production of Bio-energy from Marine Algae: Status and Perspectives," *Korean Chem. Eng. Res.*, **46**, 833-844(2008).
  34. Kim, G. S., "Study on Suitability of Bio-energy Production using Marine Algae," GOVP1200819997, Ministry of Knowledge Economy(2007).
  35. Delgenes, J. P., Moletta, R. and Navarro, J. M., "Acid-hydrolysis of Wheat Straw and Process Considerations for Ethanol Fermentation by *Pichia Stipitis* Y7124," *Process Biochemistry*, **25**, 132-135(1990).
  36. Polycarpou, P., "Bioethanol Production from *Asphodelus Aestivus*," *Renewable Energy*, **34**, 2525-2527(2009).
  37. Linoj Kumar, N. V., Dhavala, P., Goswami, A. and Maithel, S., "Liquid Biofuels in South Asia: Resources and Technologies," *Asian Biotechnol. Develop. Rev.*, **8**, 31-49(2006).
  38. Demirbas, A., "Bioethanol from Cellulosic Materials: a Renewable Motor Fuel from Biomass," *Energy Sources*, **27**, 327-337(2005).
  39. Schenk, P. M., Thomas-Hall, S. R., Stephens, E., Marx, U. C., Mussgnug, J. H. and Posten, C., "Second Generation Biofuels: High-efficiency Microalgae for Biodiesel Production," *Bioenergy Res.*, **1**, 20-43(2008).