

물리화학적 가수분해에 의한 갈조류 바이오 에탄올 생산

이성목 · 김재혁 · 조화영* · 주 현** · 이재화†

신라대학교 의생명과학대 생명공학과, *삼성종합기술원
(2009년 5월 28일 접수, 2009년 7월 29일 채택)

Production of Bio-ethanol from Brown Algae by Physicochemical Hydrolysis

Sung-Mok Lee, Jae-Hyeok Kim, Hwa-Young Cho*, Hyun Joo**, and Jae-Hwa Lee†

Department of Bioscience and Biotechnology, College of Medical and Life Science, Silla University, Busan 617-736, Korea

*Bio & Health Group, Emerging Center, Samsung Advanced Institute of Technology, Kyunggi-Do 446-712, Korea

**Department of Physiology and Biophysics, Inje University, Busan 614-735, Korea

(Received May 28, 2009; accepted July 29, 2009)

본 연구는 다양한 갈조류를 이용한 바이오 에탄올 생산을 실험하였다. 갈조류 다당류는 alginate와 laminaran으로 구성 되어 있으며, 이를 단당류로 가수분해하면 바이오 에탄올을 생산 할 수 있는 가능성이 높다. 본 연구에서는 열처리와 산 처리 이용하여 갈조류를 당화하고 이를 통한 바이오 에탄올 생산을 확인하고자 한다. 에탄올 발효에는 *Saccharomyces cerevisiae* KCCM1129와 *Pachysolen tannophilus* KCTC 7937를 이용하였으며, 에탄올 발효효율은 모자반이나 톳보다 다 시마에서 월등히 높았다. 다시마를 이용한 최적 전처리 조건에서의 발효 결과 *Saccharomyces cerevisiae* KCCM1129와 *Pachysolen tannophilus* KCTC 7937에서 각각 1.83 g/L, 1.96 g/L의 에탄올 생산을 확인 할 수 있었다. 반면, 모자반과 톳에서의 최대 생산량은 0.22 g/L로 매우 낮았다.

In this study, the productivity of bio-ethanol obtained from various brown-algae raw materials was examined. Brown-algae polysaccharide, consisting of alginate and laminaran, is usable for the effective production of bio-ethanol if it is hydrolyzed to monomer unit. The objective of this study is the production of bio-ethanol from brown-algae using a heat-treatment and acid-treatment. Bio-ethanol was produced by *Saccharomyces cerevisiae* KCCM1129 and *Pachysolen tannophilus* KCTC 7937 strains. *Laminaran japonica* was higher than *Sargassum fulvellum* and *Hizikia fusiformis*, *Laminaran japonica* optimum pre-treatment is used to derive the ethanol production of *Saccharomyces cerevisiae* KCCM1129 and *Pachysolen tannophilus* KCTC 7937 respectively 9.16 g/L, 9.80 g/L. The maximum output of *Sargassum fulvellum* and *Hizikia fusiformis* was very low as 0.22 g/L.

Keywords: brown-algae, bio-ethanol, alginate, laminaran, pretreatment

1. 서 론

산업혁명 이후 화석연료의 사용량은 급속도로 증가하여 현재 전세계 에너지 사용량의 약 86%에 달하고 있으며, 이러한 화석연료의 사용으로 인해 지구온난화 등의 환경 문제가 범세계적으로 부각되고 있다. 이산화탄소의 농도는 빙하기 시대에 180 ppm이었던 것이 최근 370 ppm까지 급격히 증가했다[1]. 온난화로 인해 지구의 연 평균 기온은 0.74 °C 증가하였다. 이러한 온도 상승은 1900~1960년까지 60년 동안 0.14 °C 상승에 불과하였으나, 1960년 이후 45년 동안은 0.6 °C 상승하여 예전에 비해 온난화 속도가 가속화되고 있는 것으로 확인 되었다. 따라서 이러한 범지구적 온난화 현상을 막기 위해 재생 가능한 바이오 연료에 대한 관심이 증가하고 있으며, 이 중 바이오 에탄올은 액체연료인 휘발유를 대체할 수 있는 유력한 대체 연료로서 세계적으로 그 생산량이 급증하고 있다[2]. 바이오 에탄올은 현재 미국

과 브라질을 중심으로 옥수수과 사탕수수를 이용하여 생산되고 있으나[3-6], 식량자원과의 경쟁과 이에 따른 가격상승으로 새로운 바이오 매스의 개발이 필요한 실정이며, 이에 따라 해조류를 바이오 매스로 이용한 바이오 에탄올 생산이 유력한 대안으로 떠오르고 있다. 해조류 바이오 매스 중 갈조류는 성장이 빠르고 단위 면적당 생산성이 매우 높으며, 홍조류나 녹조류에 비해 그 생산량이 많다는 장점을 가지고 있어 새로운 바이오 매스로의 개발에 유리할 것으로 생각된다[1].

갈조류는 건조중량의 약 30~67%의 탄수화물을 함유하고 있다[7,8]. 이러한 탄수화물의 주요 구성 성분으로는 alginate와 laminaran 그리고 당 알코올인 mannitol이 있으며[7,9], 이들의 성분 비율은 채취 시기 및 종에 따라 달라진다[10].

Alginate는 갈조류의 세포벽을 이루는 구조성 다당류로 β -D-mannuronate와 α -L-guluronate로 이루어져 있으며, α -1,4 또는 β -1,4 결합으로 형성되어 있다. 이 두 성분은 각각 homopolymer 형태로 결합된 polymannuronate 또는 polyguluronate 형태로 존재하거나, 두 성분이 혼합된 heteropolymer 형태로 존재한다[11-13]. Alginate는 polymannuronate와 polyguluronate의 구성비율에 따라 젤 형성의 특성이

† 교신저자(e-mail: jhalee@silla.ac.kr)

달라지는데 polyguluronate의 함량이 많으면 젤의 강도가 높고 poly-mannuronate 함량이 높을수록 유연성이 높은 젤이 형성된다[14]. Alginate의 용해성은 금속이온과의 결합 및 성분 구성에 따라 가용성 및 난용성 그리고 알칼리가용성, 산·알칼리 가용성으로 나뉜다[2, 9, 15]. 이러한 alginate의 함량은 1~3월에 가장 높으며 8~10월에 그 함량이 가장 낮다.

또 다른 고분자 다당류인 laminaran은 갈조류 중에서도 특히 *Laminaria* 속의 저장성 다당류로 줄기 등의 생장이 왕성한 부분에서는 그 함량이 낮으나 성숙기에는 건조 중량의 약 20%를 차지하기도 한다[1]. 계절에 따른 성분 함량의 변화는 alginate와는 반대로 8~10월에 함량이 가장 많다. 주로 β -1,3 결합으로 구성된 glucan으로 되어 있으며, 약간의 β -1,6 결합 분자가 있으며 D-glucose 이외에 미량(2~5%)의 D-mannitol을 함유하고 있다[16, 17].

이러한 갈조류의 alginate와 laminaran 같은 고분자 다당류들은 효소 [18-20] 또는 물리화학적[21-24] 가수분해를 통해 다당류로 전환 할 수 있다. 물리화학적 가수분해는 원하는 중합도의 올리고당의 생산에는 어려움이 있으나 효소에 비해 처리 시간이 짧고 간단하다는 장점이 있다. 따라서 본 연구에서는 전처리를 통해 갈조류인 다시마, 모자반, 톳을 물리화학적으로 가수분해하고, 이 분해 산물을 기질로 이용하여 에탄올 발효균주인 *Saccharomyces cerevisiae* KCCM1129와 *Pachysolen tannophilus* KCTC 7937에서 발효에 의한 바이오 에탄올 생산 수율을 비교하고자 한다.

2. 실험

2.1. 물리화학적 전처리

갈조류 다당류의 화학적 전처리 조건을 확인하기 위해 주요 다당류인 alginate, laminaran을 이용하였다. 각각의 다당류 2 g에 0.1 N의 HCl, H₂SO₄, NaOH, Na₂CO₃을 80 mL 처리하였다. 산 및 알칼리 처리 후 분해 효율을 높이기 위해 120 °C에서 30 min 동안 고압 멸균하였다. 전처리한 갈조류 배양액은 HCl과 NaOH을 이용하여 pH 6.8~7.2로 조절하였으며, 중화 후 최종 부피를 100 mL로 동일하게 조절하였다. 전처리에 따른 환원당 생성량 측정은 DNS법을 이용하였다. 즉 시료 500 μ L에 DNS용액 2 mL을 가한 후 10 min 간 가열한 후 540 nm에서 흡광도를 측정하여 확인하였으며, alginate와 Laminaran의 표준검량선은 각각 maltose와 glucose를 이용하여 생성된 환원당을 정량화하여 작성하였다.

2.2. 발효균주 및 배지

에탄올 발효균주로는 효모인 *Saccharomyces cerevisiae* KCCM1129와 *Pachysolen tannophilus* KCTC 7937 두 종을 이용하였으며, 균주의 보관은 20% glycerol을 첨가하여, -70 °C에서 보관하였다. 에탄올 발효를 위해 냉동 보관된 균주들은 YPD배지(glucose 20.0 g/L, peptone 20.0 g/L, yeast extract 10.0 g/L)를 이용하여, 300 mL flask에서 working volume을 100 mL로 하여, 30 °C, 150 rpm에서 48 h 동안 진탕 배양시킨 후 사용하였다. 알코올 발효에는 전 배양한 효모 3 mL을 접종하였으며 pH는 배양 전 과정에서 인위적으로 조절하지 않았다.

갈조류를 이용한 에탄올 생산에는 다시마, 모자반, 톳을 각각 2 g/100 mL 이용하였으며, 배지는 추가적인 기질의 첨가는 없이 열처리 및 산전처리 한 갈조류만을 이용하였다.

2.3. 에탄올 함량 측정

생성된 에탄올의 정량을 위해 발효된 시료를 12000 rpm에서 10

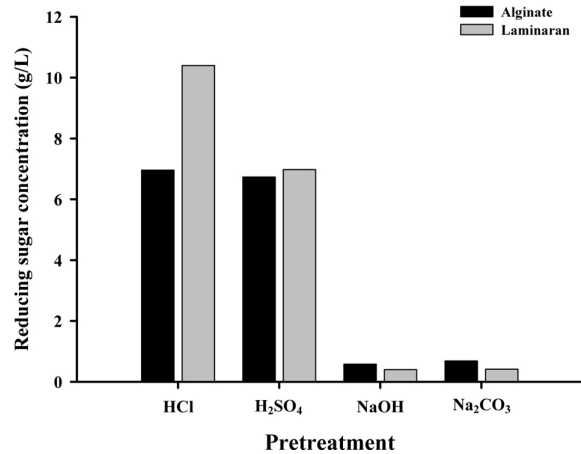


Figure 1. Effect of culture time on cell concentration, Alginate lyase and Laminaran lyase enzyme activity.

min 동안 원심분리 후 상층액을 GC를 이용하여 분석하였다. GC는 HP 5890 series II를 사용하였고, 칼럼은 HP-FFAP (Cross-Linked PEG-TPA 30 m / 0.25 mm / 0.25 μ L)을 사용하였다. 이동상은 N₂를 0.6 mL/min로 사용하였으며, injection temperature 100 °C, detector temperature 200 °C, 승온 조건은 50 °C (1.4 min)/(10 °C/min) / 60 °C (1 min)/(25 °C/min)/100 °C (1 min)/(50 °C/min)/150 °C (1 min)이었다. 분리비는 70 : 1로 했으며 내부 표준물질로 1%의 isopropanol을 이용하였다. 에탄올 생산 수율은(에탄올 생산량(g/L)/첨가한 해조류(20 g/L)) \times 100으로 계산하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 물리화학적 가수분해

갈조류 다당류의 물리화학적 가수분해를 확인하기 하기 위해 0.1 N의 HCl, H₂SO₄, NaOH, Na₂CO₃을 이용하였다. Alginate와 laminaran 각각 2 g에 0.1 N 산 또는 알칼리를 80 mL 넣고 30 min 동안 고압 멸균하였다. 반응 후 HCl 및 NaOH를 사용하여 pH를 6.8~7.2로 조절하였다. 중화 후 최종 부피는 100 mL로 조절하였다.

환원당 측정 결과 alginate와 laminaran 모두 산을 이용했을 때 가수분해 효율이 높은 것으로 확인되었다(Figure 1). Alginate는 HCl을 이용했을 때 6.96 g/L로 환원당 생성이 가장 높게 나타났으며, 알칼리를 이용한 전처리에서는 NaOH과 Na₂CO₃에서 각각 0.58, 0.68 g/L로 산 처리에 비해 1/10 정도로 낮았다. 전처리 결과 산 처리한 용액은 고형 물질의 존재가 확인되었으나 알칼리 처리한 용액에서는 고형물을 확인할 수 없었다. 아마도 알칼리에 존재한 Na⁺ 이온에 의해 alginate의 가용성이 증가한 것으로 보인다. 반면에 산을 이용한 전처리는 alginate의 가용화를 방해하지만 alginate의 가수분해는 증가시킨 것으로 생각된다.

Laminaran의 물리화학적 가수분해 역시 산을 이용했을 때 효과가 더욱 높았으며 alginate 보다 그 차이가 더욱 뚜렷하게 나타났다. 산 전처리 결과 alginate와 같이 HCl에서 10.40 g/L로 높게 나타났으며, alginate에서는 HCl, H₂SO₄의 결과가 크게 차이가 없었으나 laminaran은 H₂SO₄에서 6.98 g/L로 10.40 g/L인 HCl을 이용한 결과와 차이가 크게 났다.

3.2. 갈조류 전처리

에탄올 발효를 위한 갈조류 전처리에는 다시마, 모자반, 톳을 이용

Table 1. Ethanol Production from Various Brown-algae

Algae	<i>Laminaria japonica</i>				<i>Sargassum fulvellum</i>				<i>Hizikia fusiformis</i>			
	<i>S. cerevisiae</i>		<i>P. tannophilus</i>		<i>S. cerevisiae</i>		<i>P. tannophilus</i>		<i>S. cerevisiae</i>		<i>P. tannophilus</i>	
Enzyme	Heat	Acid	Heat	Acid	Heat	Acid	Heat	Acid	Heat	Acid	Heat	Acid
Optimal time (h)	84	84	24	12	48	48	-	12	-	48	-	12
Ethanol (g/L)	1.83	1.18	0.37	1.96	0.18	0.22	-	0.03	-	0.09	-	0.14
Ethanol Yield (%)	9.15	5.90	1.85	9.80	0.90	1.10	-	0.15	-	0.45	-	0.70

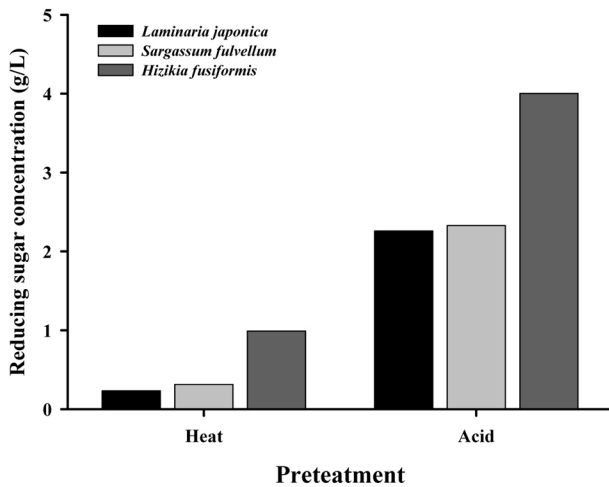


Figure 2. Hydrolysis of brown algae with heat and acid pretreatment: Heat) 121 °C, 30 min with autoclave, Acid) 0.1 N HCl, 121 °C, 30 min with autoclave.

하였다. 각각의 갈조류는 열처리와 산 처리를 통하여 가수분해하였다. 열처리는 증류수 100 mL에 갈조류를 각각 2 g 첨가하여 120 °C, 30 min 동안 고압 멸균하였으며, 산 처리는 갈조류 2 g을 0.1 N HCl을 이용하여 120 °C, 30 min 동안 반응시켰다.

열처리를 이용한 전처리는 툿에서 최대 0.99 g/L의 환원당이 확인되었으며, 이 때 전환율은 약 4.95%로 나타났다. 그리고 다시마와 모자반에서는 툿에 비해 1/3 정도 환원당의 생성이 거의 없는 것으로 확인되었다(Figure 2).

산을 첨가한 전처리에서도 열처리와 동일하게 툿에서 환원당의 생성량이 가장 높은 것으로 확인되었다. 툿에서의 환원당 생성량은 4.00 g/L로 약 20%가 가수분해 되었다. 이는 갈조류에 포함된 탄수화물이 건조중량의 약 30~67%를 차지하는 것으로 볼 때 탄수화물의 약 50% 정도가 가수분해 된 것으로 생각된다. 산 첨가에 따른 가수분해 효율의 증가는 다시마에서 가장 높았으며, 열처리에서 0.23 g/L에서 산처리를 통해 2.26 g/L로 환원당 생성량이 약 9.68배 증가하였다.

3.3. 발효 및 에탄올 생산

에탄올 발효균주는 *Saccharomyces cerevisiae*와 *Pachysolen tannophilus*를 YPD 배지에 진탕 배양한 균을 이용하였으며, 해조류는 다시마, 모자반 그리고 툿을 이용하였다.

전처리 갈조류의 에탄올 발효 결과 다시마에서 에탄올 생산량이 가장 높은 것으로 확인되었다. 다시마를 이용한 발효에서 에탄올 생산은 열처리와 산 처리 모두 96 h에서 가장 높은 에탄올 생산량을 보였다(Figure 3). 발효균주에 따라 *Saccharomyces cerevisiae*와 *Pachysolen tannophilus*에서 각각 1.83 g/L, 1.96 g/L로 *Pachysolen tannophilus*가

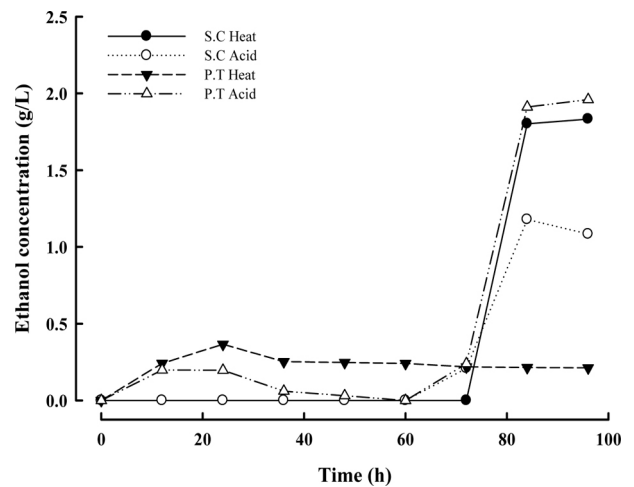


Figure 3. Ethanol production from *Laminaria japonica* of *Saccharomyces cerevisiae* and *Pachysolen tannophilus*: S.C) *Saccharomyces cerevisiae*, P.T) *Pachysolen tannophilus*.

조금 더 높게 나타났다(Table 1). 최적 전처리는 두 균주가 서로 다르게 나타났는데 *Saccharomyces cerevisiae*는 열처리에서 에탄올 생산량이 높았으며, 반면 *Pachysolen tannophilus*는 열처리에서 에탄올 생산량이 낮았고, 산 처리에서 가장 높은 생산량을 보였다.

모자반을 이용한 에탄올 발효는 다시마에 비해 에탄올 생산량이 극히 적은 것으로 나타났으며, 또한 균주에 따라 에탄올 생산량이 크게 차이가 났다. *Pachysolen tannophilus*을 이용한 발효에서는 열처리에서는 에탄올 생산이 전혀 없었고, 산 처리에서 극히 미량의 에탄올 생산이 확인되었다(Figure 4). 그러나 *Saccharomyces cerevisiae*을 이용한 에탄올 발효에서는 두 전처리 모두 에탄올 생산이 확인되었다. 에탄올 발효 시간은 48 h로 다시마에 비해 약 1/2 정도로 단축되었다. 에탄올 생산은 산 처리에서 0.22 g/L로 가장 높게 나타났으며 발효 수율은 1.1%로 나타났다(Table 1).

환원당 생산량이 가장 높았던 툿에서는 에탄올 생산이 가장 작게 확인되었다. *Saccharomyces cerevisiae*를 이용한 발효에서는 산 전처리에서 0.09 g/L밖에 에탄올 생산이 확인되지 않았다(Figure 5). *Pachysolen tannophilus*에서도 열처리에서는 에탄올 생산이 확인되지 않았으며, 산 전처리에서 0.14 g/L로 에탄올 생산이 확인되었다(Figure 5).

에탄올 발효에 따른 전처리의 효율은 갈조류에 따라 각각 다르게 나타났다. 이는 각 전처리에 따라 가수분해 할 수 있는 당 성분이 조금씩 차이가 나기 때문인 것으로 보이며, 전처리 과정에서 생성되는 부산물에 의한 영향도 있을 것으로 생각된다. 환원당의 생성을 측정 한 결과 alginate와 laminaran 모두 산 처리에서의 가수분해가 확인되었으며, alginate보다는 laminaran에 대한 가수분해 효율이 조금 더 높았다. 따라서 갈조류 탄수화물의 구성성분 비율이 전처리 및 에탄올

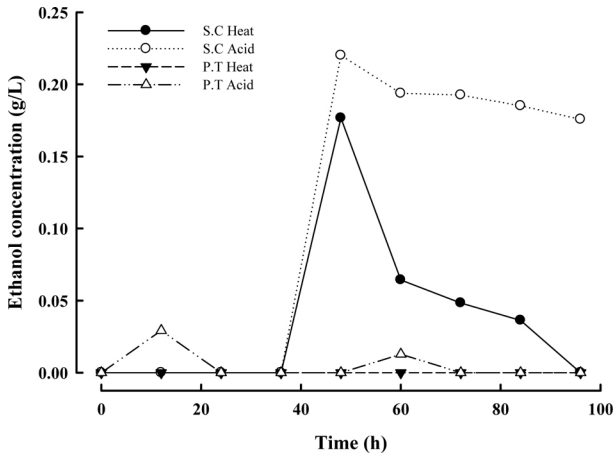


Figure 4. Ethanol production from *Sargassum fulvellum* of *Saccharomyces cerevisiae* and *Pachysolen tannophilus*: S.C) *Saccharomyces cerevisiae*, P.C) *Pachysolen tannophilus*.

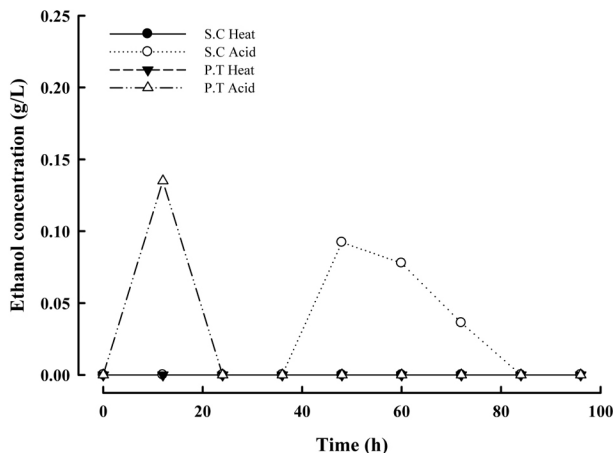


Figure 5. Ethanol production from *Hizikia fusiformis* of *Saccharomyces cerevisiae* and *Pachysolen tannophilus*: S.C) *Saccharomyces cerevisiae*, P.C) *Pachysolen tannophilus*.

발효에 영향을 미쳤을 것으로 생각된다. 다시마에는 다른 두 종의 갈조류에 비해 laminaran의 함량이 더 높은 것으로 알려져 있다. 다시마에서 에탄올 생산 수율이 최대 9.8%로 높은 것으로 보아 다른 갈조류보다 풍부하게 존재하는 laminaran에 의한 영향인 것으로 생각된다.

현재 *Laminaria hyperborea*에서 추출한 laminaran과 mannitol을 이용한 에탄올 발효에 대한 연구에서, *Pichia angophorae*를 발효 균주로 접종했을 때 추출물 1 g에서 에탄올을 최대 0.43 g을 얻은 것으로 보고되어 있다[9]. 본 실험결과에서는 *Pachysolen tannophilus*를 이용하여 다시마 1.0 g에서 98 mg의 에탄올을 얻었다. 이는 *Laminaria hyperborea* 추출물을 이용한 것의 대략 22.79% 정도이다. 그러나 갈조류 당 성분 추출과정에서 손실되는 갈조류의 양을 생각할 때 낮은 수율이 아니며, 효율적인 전처리 기술의 개발을 통해 수율을 더욱 향상시킬 수 있을 것으로 생각된다.

4. 결 론

본 연구는 해양 바이오 매스인 해조류를 기질로 이용한 바이오 에탄올 생산 가능성을 확인하고자 하였다. 갈조류는 주로 alginate와

laminaran 같은 다당류로 구성되어 있으며, 이러한 다당류는 열처리와 산 처리 같은 물리화학적 가수분해를 통해 단당류로 전환이 가능하다. 따라서 이러한 전처리를 통해 갈조류를 가수분해하고 이를 이용해 에탄올 발효 실험을 행하였다.

갈조류의 전처리에서 환원당의 생성은 열처리에 비해 산 처리에서 월등히 높게 나타났으며, 특히 툿에서 최대 4.00 g/L로 확인되었으며, 이 때 전환율은 첨가한 기질의 약 20%였다. 열처리에서도 툿에서의 환원당 생성량이 가장 높았으나 최대 0.99 g/L로 산 처리에 비해 전처리 수율이 낮았으며, 이러한 차이는 다시마와 모자반에서 더욱 크게 나타났다.

발효를 통한 에탄올 생산은 다시마를 기질로 이용하였을 때 가장 높게 나타났다. *Saccharomyces cerevisiae*와 *Pachysolen tannophilus*에서 에탄올 생산 최적 전처리 조건은 각각 열처리와 산 처리로 서로 다르게 나타났다. *Saccharomyces cerevisiae*를 이용한 발효는 산 처리한 다시마에서 1.83 g/L의 에탄올이 생산되었으며, 모자반과 툿을 이용한 기질에서는 다시마의 약 1/10 정도로 매우 낮았다. *Pachysolen tannophilus*는 열처리 다시마에서 에탄올 생산량이 1.96 g/L로 확인되었으며, 이 때 에탄올 생산 수율은 9.80%로 나타났다. *Pachysolen tannophilus*는 산 처리한 모자반과 툿에서는 에탄올 생산이 전혀 확인되지 않았다. 갈조류에 따른 에탄올 발효 생산량의 차이는 갈조류 중에 따른 탄수화물의 성분 구성 비율에 의한 것을 생각된다.

참 고 문 헌

1. J.-I. Park, H.-C. Woo, and J.-H. Lee, *Korean Chem. Eng. Res.*, **46**, 833 (2008).
2. J. H. Chung, G.-S. Kwon, and H.-S. Jang, *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.*, **36**, 1 (2008).
3. A. Hirano, R. Ueda, S. Hirayama, and Y. Ogushi, *Energy*, **22**, 137 (1997).
4. B. C. Saha and M. A. Cotta, *Enzyme Microb. Technol.*, **41**, 528 (2007).
5. B. Hahn-Hagerdal, M. Galbe, M. F. Gorwa-Grauslund, G. Liden, and G. Zacchi, *Trends Biotechnol.*, **24**, 549 (2006).
6. H.-J. Han and S.-J. Kim, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, **21**, 267 (2006).
7. D.-S. Lee, H.-R. Kim, D.-M. Cho, T.-J. Nam, and J.-H. Pyeun, *J. Kor. Fish. Soc.*, **31**, 1 (1998).
8. M.-O. Yoon, S.-C. Lee, J.-W. Rhim, and J.-M. Kim, *J. Kor. Fish. Sci. Nutr.*, **33**, 747 (2004).
9. T. Korenaga and S.-I. Fujii, *J. Food Compos. Anal.*, **13**, 865 (2000).
10. Y.-H. Park, *Bull. Kor. Fish. Soc.*, **2**, 71 (1969).
11. Y.-O. Kim, G.-T. Kim, H.-K. Kim, D.-K. Kim, S.-H. Huh, and I.-S. Kong, *J. Kor. Fish. Soc.*, **29**, 637 (1996).
12. H.-Y. Kim, K.-H. Hong, J.-D. Choi, S.-K. Park, S.-S. Jung, W.-J. Choi, Y.-S. Ahn, Y.-P. Hong, O.-J. Song, D.-C. Moon, S.-H. Lee, and I.-S. Shin, *Korean J. Food. Sci. Technol.*, **38**, 1 (2006).
13. D.-S. Joo, J.-S. Lee, J.-J. Park, S.-Y. Cho, C.-B. Ahn, and E.-H. Lee, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **23**, 432 (1995).
14. J.-H. Lee and E.-Y. Lee, *Kor. J. Life Sci.*, **13**, 718 (2003).
15. S.-Y. Cho, H.-J. Kang, D.-S. Joo, J.-S. Lee, and S. M. Kim, *J. Kor. Fish. Soc.*, **32**, 774 (1999).
16. S. J. Horn, I. M. Aasen, and K. Østgaard, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **25**, 249 (2000).
17. S. J. Horn, I. M. Aasen, and K. Østgaard, *J. Ind. Microbiol.*

- Biotechnol.*, **24**, 51 (2000).
18. D.-S. Joo, J.-S. Lee, J.-J. Park, S.-Y. Cho, H.-K. Kim, and E.-H. Lee, *Korean J. Food. Sci. Technol.*, **28**, 146 (1996).
19. H. K. Kim, J. C. Lee, N. H. Kang, S. H. Kim, J. G. Kim, and K. C. Chung, *J. Life Science.*, **17**, 625 (2007).
20. H.-S. Kim and T.-J. Bae, *J. Kor. Fish. Soc.*, **35**, 438 (2002).
21. Y.-S. Lim and B.-J. You, *J. Kor. Fish. Soc.*, **40**, 187 (2007).
22. N. Q. Hien, N. Nagasawa, L. X. Tham, F. Yoshii, V. H. Dang, H. Mitomo, K. Makuuchi, and T. Kume, *Radiat. Phys. Chem.*, **59**, 97 (2000).
23. Y.-S. Lim and B.-J. You, *J. Kor. Fish. Soc.*, **39**, 313 (2006).
24. D.-S. Joo, Y.-S. Choi, and S.-Y. Cho, *J. Kor. Fish. Soc.*, **36**, 1 (2003).