

효소적 가수분해에 의한 갈조류 바이오 에탄올 생산

이성목 · 최인순¹ · 김성구² · 이재화*

신라대학교 생명공학과, ¹신라대학교 생물과학과, ²부경대학교 생물공학과

Production of Bio-ethanol from Brown algae by Enzymic Hydrolysis

Sung-Mok Lee, In-Soon Choi¹, Sung-Koo Kim², and Jae-Hwa Lee*

Department of Bioscience and Biotechnology, Silla University, Busan 617-736, Korea

¹Department of Biological Science, Silla University, Busan 617-736, Korea

²Department of Biotechnology, Pukyong National University, Busan, 608-737, Korea

Abstract The Brown-algae polysaccharide consisting of alginate and laminaran is usable as high bio-ethanol production if hydrolyzed to monomer unit. The objective of this study is to produce bio-ethanol from brown-algae using enzymatic saccharification. Bio-ethanol was produced by *Saccharomyces cerevisiae* KCCM 1129 and *Pachysolen tannophilus* KCTC 7937 strains. The substrate used *Laminaria japonica*, *Sargassum fulvellum* and *Hizikia fusiformis*. We isolated a new alginate lyase and laminaran lyase producing microorganism for hydrolysis of brown-algae from southern sea of Gijang. The reducing sugar was obtained 1.90 g/L from *Laminaria japonica* 20 g/L that used enzyme from *Bacterium antarctica*. In pretreatment of the most suitable brown-algae for ethanol production, ethanol concentration of 0.93 g/L and yield of 4.65% were obtained in condition of *Laminaria japonica* in medium.

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

서 론

현재 전 세계는 화석연료의 과다 사용으로 인해 지구온난화와 자원 고갈 문제에 직면해 있다. 산업혁명 이후 시작된 화석연료의 과다 사용으로 최근 100년간 이산화탄소의 농도는 100 ppm 가까이 증가했고, 이로 인해 지구의 연평균 기온은 0.74°C 증가했으며, 평균 해수면 또한 연간 1.8 mm 씩 상승하고 있다. 따라서 이를 해결하기 위해 재생 가능한 바이오 연료에 대한 관심이 증가하고 있으며, 그 중 바이오 에탄올은 액체연료인 휘발유를 대체할 수 있는 유력한 대체 연료로서 세계적으로 그 생산량이 급증하고 있다 [1]. 바이오 에탄올은 현재 미국과 브라질을 중심으로 옥수수와 사탕 수수를 이용하여 생산되고 있으나 [2-4], 식량자원과의 경쟁과 이에 따른 가격상승으로 새로운 바이오매스의 개발이 필요한 실정이다. 해조류는 이러한 식량과의 경쟁을 피할

수 있으며, 성장속도가 육상 식물보다 빠르고 CO₂ 흡수 효율이 더 우수하여 환경문제와 에너지 고갈 문제를 동시에 해결할 수 있을 것으로 기대된다. 특히 해조류 바이오매스 중 갈조류는 성장이 빠르고 단위 면적당 생산성이 매우 높다는 장점을 가지고 있다.

갈조류는 건조중량의 약 30-67%의 탄수화물을 함유하고 있다 [5,6]. 이러한 탄수화물의 주요 구성 성분으로는 alginate와 laminaran 그리고 당 알코올인 mannitol이 있으며 [5,7], 이들의 성분 비율은 채취 시기 및 종에 따라 달라진다 [8]. 이러한 갈조류 탄수화물들은 발효과정의 유용한 기질로 이용이 가능하다 [9-11].

Alginate는 갈조류의 세포벽을 이루는 구조성 다당류로 1-3월에 성분함량이 가장 높으며 8-10월 사이에 그 함량이 가장 낮다. β-D-mannuronate와 C5 epimer 구조인 α-L-guluronate로 구성되어 있으며, 이 성분들이 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 [12,13]. Alginate는 polymannuronate와

*Corresponding author

Tel: +82-51-999-5831, Fax: +82-51-999-5636

e-mail: jhalee@silla.ac.kr

polyguluronate의 구성 비율에 따라 젤 형성의 특성이 달라 지는데 polyguluronate의 함량이 높으면 젤이 강도가 높아 지고 polymannuronate 함량이 높을수록 유연성이 높은 젤이 형성된다 [14]. 또한 alginate의 용해성은 금속이온과의 결합에 따라 달라지는데, Na-alginate는 가용성으로 물에 용해되지만 Ca-alginate는 난용성으로 물에 용해되지 않는다 [7].

또 다른 고분자 다당류인 laminaran은 갈조류 중에서도 특히 *Laminaria*속의 저장성 다당류로 계절에 따른 성분함량의 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 [10,11].

다당류인 mannitol을 제외한 고분자 다당류들은 효소를 이용하거나 [15,16] 물리적 [17,18] 또는 화학적 [19,20] 방법을 이용하여 분해될 수 있으며, 생성된 당 성분은 에탄올 발효에 필요한 직접적인 기질로 이용이 가능하다. 따라서 본 연구에서는 전처리를 통해 갈조류인 다시마, 모자반, 툯을 가수분해하고, 이 분해 산물을 기질로 이용하여 에탄올 발효 균주인 *Saccharomyces cerevisiae* KCCM 1129와 *Pachysolen tannophilus* KCTC 7937을 이용하여 발효에 의한 바이오 에탄올 생산 수율을 비교 하고자 한다.

재료 및 방법

균주 분리 및 배양

갈조류 가수분해 균주 분리를 위한 시료는 부산 기장 지역의 해수 및 갈조류를 이용하였다. 이 때 사용한 분리배지는 다층평판 배지를 사용하였으며 하층은 NaCl 25 g/L, KH_2PO_4 1.0 g/L, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g/L, KCl 0.5 g/L, NH_4Cl 1.0 g/L, agar 20 g/L, pH 7.0이며, 상층은 sodium alginate 10 g/L, agar 20 g/L, pH 7.0로 구성하였다. 다층 평판 배지에 100배 희석한 시료용액 100 μL 를 도말 하였으며, 30°C 배양기에서 항온 배양하여 clear zone이 큰 colony를 분리하였다.

효소 가수분해 및 효소활성 측정

분리한 갈조류 분해 균주는 AL-1으로 명명하였다. 갈조류의 주요 다당류인 sodium alginate 8.0 g/L, laminaran 8.0 g/L, peptone 5.0 g/L를 첨가한 배지에서 배양하였으며, 배지 100 mL이 들어 있는 300 mL 삼각 플라스크에 AL-1을 접종 진탕 배양 후 사용하였다.

배양 기간에 따른 갈조류 분해효소 활성은 sodium alginate 8.0 g/L와 laminaran 8.0 g/L 를 각각 기질로 사용하여 측정하였으며, 조효소는 배양액을 12,000 rpm에서 10 min간 원심분리하여 상층액을 사용하였다. 조효소 500 μL 과 각각의 기질 1.0 mL을 혼합하여 30°C에서 30 min 반응시킨 다음 DNS 법을 이용하여 환원당을 측정하였다. 즉 시료 500 μL

에 DNS용액 2.0 mL을 가한 후 10 min간 가열 하고 540 nm에서 흡광도를 측정하여 확인하였으며, alginate와 laminaran의 표준검량선은 각각 maltose와 glucose를 이용하여 생성된 환원당을 정량화하여 작성하였다. 효소 1 unit는 1분간에 1 μmol 의 환원당을 생산하는 효소량으로 하였다.

발효균주 및 배지

에탄올 발효균주로는 효모인 *Saccharomyces cerevisiae* KCCM 1129와 *Pachysolen tannophilus* KCTC 7937 두종을 이용하였으며, 균주의 보관은 20% glycerol을 첨가하여, -70°C에서 보관 하였다. 에탄올 발효에는 냉동 보관된 균주들을 YPD배지 (glucose 20 g/L, peptone 20 g/L, yeast extract 10 g/L)를 이용하여, 300 mL flask에서 working volume을 100 mL로 하고, 30°C, 150 rpm에서 48 h 동안 진탕 배양 시킨 후 사용하였다. 알코올 발효에는 전 배양한 효모 3 mL을 접종하였으며, pH는 배양 전 과정에서 인위적으로 조절 하지 않았다.

갈조류를 이용한 에탄올 생산에는 다시마, 모자반, 툯을 이용하였으며, 배지는 조효소를 첨가하여 가수분해한 갈조류만을 이용하였으며, 추가적인 기질의 첨가는 없었다.

에탄올 함량 측정

생성된 에탄올의 정량을 위해 발효된 시료를 12,000 rpm에서 10 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 μL)을 사용하였다. 이동상은 N_2 를 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)) X 100으로 계산 하였다.

결과 및 고찰

배양기간에 따른 효소활성 측정

갈조류 가수분해를 위해 다층평판 배지에서 분리한 균주 중 활성이 높은 균주를 선별하여 AL-1으로 명명하였으며, 16S rDNA 염기서열 분석 결과 *Pseudoalteromonas sp.*로 확인 되었다. AL-1 균주의 배양 기간에 따른 조효소 활성 변화를 확인하기 위해 sodium alginate 8.0 g/L, laminaran 8.0 g/L, peptone 5.0 g/L를 첨가한 액체배지에 균을 배양 하였다. 24 h 간격으로 세포성장 및 alginate, laminaran에

대한 분해 활성을 측정하였다 (Fig. 1).

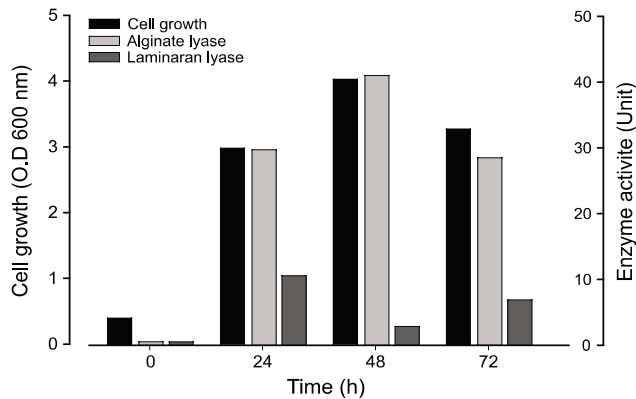


Fig. 1. Effect of culture time on cell concentration, Alginate lyase and Laminaran lyase enzyme activity.

실험결과 세포의 성장은 48 h까지 증가하였으며, 그 이후에 성장이 감소하였다. Alginate lyase에 의한 가수분해 활성은 세포성장과 유사한 경향을 나타냈으며, 48 h에서 41.0 unit로 최대 활성을 보였다. Laminaran에 대한 효소활성도 일부 나타났는데 alginate에 비해 활성이 낮았고 24 h에 활성이 10.6 unit로 최대였다가 이후 감소하였으며, alginate와 laminaran에서 효소 활성의 증가와 감소는 서로 상반되는 경향을 보였다.

효소활성 측정을 통하여 갈조류의 주요 다당류인 alginate와 laminaran에 대한 가수분해 활성이 있는 것으로 확인되었으며, 특히 alginate에 대한 활성이 높은 것으로 확인되었다.

갈조류 효소 가수분해

AL-1을 이용한 직접적인 갈조류 가수분해 효과를 확인하기 위해 121°C에서 15 min간 고압멸균한 다시마, 모자반, 툯을 이용하였다. 조효소의 배양은 sodium alginate 8.0 g/L, laminaran 8.0 g/L, peptone 5.0 g/L을 포함한 배양액에서 AL-1 균주를 전 배양 후 동일한 배지에 전 배양한 균주를 3 mL 접종하여 다시 48 h 배양하였다. 조효소는 배양액을 12,000 rpm에서 10 min동안 원심분리 후 상층액을 이용하였다. 다시마, 모자반, 툯이 각각 20 g/L 들어 있는 플라스크에 분리한 조효소 5 mL를 접종하여 84 h 동안 시간에 따른 가수분해 여부를 환원당 정량을 통해 측정하였다 (Fig. 2). 121°C에서 30 min간 고압멸균한 후 다시마, 모자반, 툯에서 환원당 생성량은 각각 0.039 g/L, 0.055 g/L, 0.450 g/L로 다시마나 모자반에 비해 툯에서 특히 높게 나타났다. 조효소를 첨가하여 시간에 따른 가수분해를 확인한 결과 모자반과 툯에서는 12 h 반응 후 환원당의 변화가 거의 없었다. 환원당 생성량을 비교해보면, 툯의 경우 초기 0.450 g/L에서 12 h에 0.916 g/L로 대략 2배 정도 증가하였다. 그러나 다시마의 환원당 변화는 다른 두 갈조류와 다르게 72 h까지 지속적으로 증가하였다. 최대 환원당 생성량은 1.90 g/L

로 첨가한 기질의 9.5%가 전환된 것으로 확인되었다. 따라서 AL-1에서 생성되는 효소는 갈조류 가수분해 활성이 있는 것으로 확인 되었으며, 특히 다시마에 대한 활성이 높은 것으로 확인되었다.

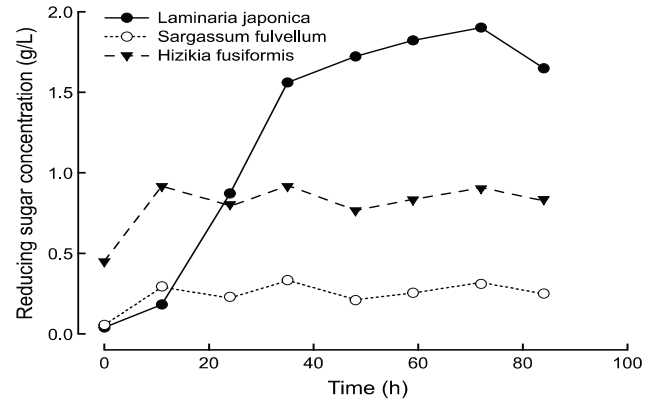


Fig. 2. Enzymatic Hydrolysis of various brown algae: *Laminaria japonica*, *Sargassum fulvellum*, *Hizikia fusiformis*.

발효 및 에탄올 생산

에탄올 발효균주는 *Saccharomyces cerevisiae*와 *Pachysolen tannophilus*를 YPD 배지에 진탕 배양한 균을 이용하였으며, 해조류는 다시마, 모자반 그리고 툯을 이용하였다. 효소처리 는 외분비효소와 전체 조효소 두 가지를 이용하였다. 즉, AL-1을 48 h 배양한 배지를 12,000 rpm에서 10 min 동안 원심분리한 상층액을 외분비효소로 이용하고 균을 포함한 배지를 초음파 파쇄한 것을 전체 조효소로 이용하였으며, 이를 열처리한 갈조류에 각각 5 mL 첨가하여 30°C, 150 rpm에서 30 min 동안 반응시켰다.

전처리 결과 환원당 생성량은 갈조류 중 툯에서 특히 높은 것으로 확인 되었다 (Fig. 3). 효소에 의한 전처리는 외분비 효소 보다는 전체 조효소에서 환원당 생성이 약간 더 높은 것으로 확인 되었으나 큰 차이는 보이지 않았다. 따라서 AL-1에서 생산되는 효소는 외분비효소 인 것으로 생각된다.

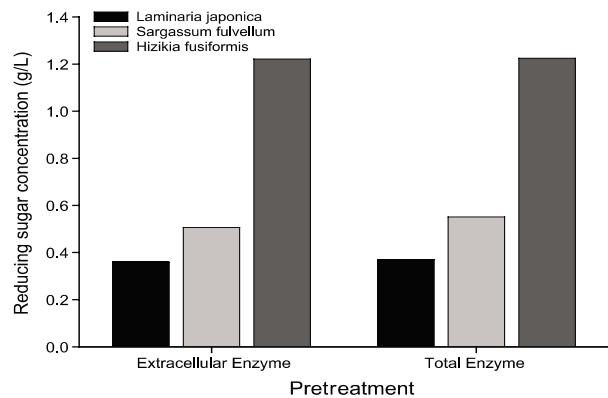


Fig. 3. Production of reducing sugar from Brown algae by Enzymic Hydrolysis.

전처리 갈조류의 에탄올 발효 결과 다시마에서 에탄올 생산량이 가장 높은 것으로 확인되었다. 다시마를 이용한 발효에서 에탄올 생산은 효소를 이용한 전처리에서는 36 h에 에탄올 생산이 최대인 것으로 확인되었다 (Fig. 4). 발효 균주에 따라 *Saccharomyces cerevisiae*와 *Pachysolen tannophilus*에서 각각 0.90 g/L, 0.93 g/L로 *Pachysolen tannophilus*가 조금 더 높게 나타났다 (Table 1). 두 발효균주 모두 전체효소를 이용한 가수분해에서 에탄올 생산량이 더 높게 측정되었다. 효소에 의한 갈조류 가수분해가 84 h까지 지속적으로 반응하는 것으로 확인되었으나 (Fig. 2), 장시간 반응에 의한 오염문제로 인해 반응시간을 30 min으로 하였다. 그러나 효소활성을 제거과정을 거치지 않고 발효균주를 접종하여 배양하였기 때문에 배지 내에서 발효기간 동안에도 일정시간 효소가 반응을 한 것으로 생각된다.

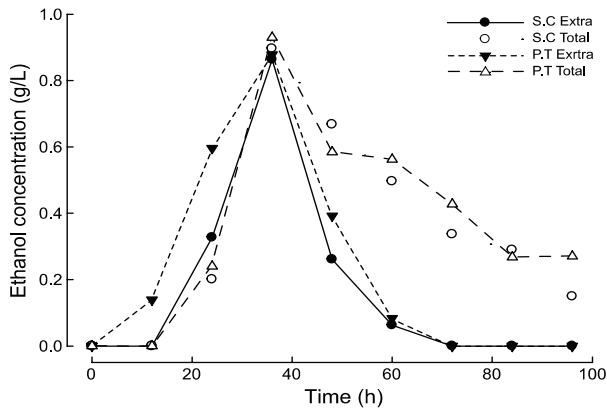


Fig. 4. Ethanol production from *Laminaran japonica* of *Saccharomyces cerevisiae* and *Pachysolen tannophilus*: S.C) *Saccharomyces cerevisiae*, P.T) *Pachysolen tannophilus*.

모자반을 이용한 에탄올 발효는 다시마에 비해 에탄올 생산량이 극히 적은 것으로 나타났다. 외분비효소를 이용한 전처리에서 *Pachysolen tannophilus*을 발효균주로 하였을 때 0.07 g/L로 나타났고, 전체효소에서는 에탄올 생산이 극히 미량만 확인 되었다 (Fig. 5). 반면에 *Saccharomyces cerevisiae*을 이용한 에탄올 발효에서는 모든 전처리에서 에탄올 생산이 확인 되었다. 에탄올 발효시간은 다시마에서와 마찬가지로 36 h에서 가장 높게 나타났다. 에탄올 생산은 *Saccharomyces cerevisiae*에서 0.14 g/L로 가장 높게 나타났으며, 이 때 발효 수율은 0.7%였다 (Table 1).

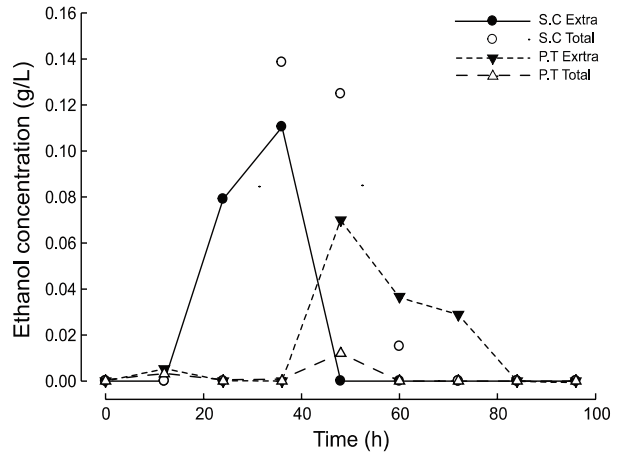


Fig. 5. Ethanol production from *Sargassum fulvellum* of *Saccharomyces cerevisiae* and *Pachysolen tannophilus*: S.C) *Saccharomyces cerevisiae*, P.T) *Pachysolen tannophilus*.

환원당 생산량이 가장 높았던 톳에서는 에탄올 생산이 가장 낮게 확인되었다. *Saccharomyces cerevisiae*를 이용한 발효에서는 96 h 동안의 발효과정에서 에탄올 생산이 전혀 확인 되지 않았다 (Fig. 6). *Pachysolen tannophilus*는 두 전처리 모두 에탄올 생산이 거의 동일하게 나왔으나, 모자반에서와 같이 외분비효소를 이용한 전처리에서 조금 더 높게 나타났다.

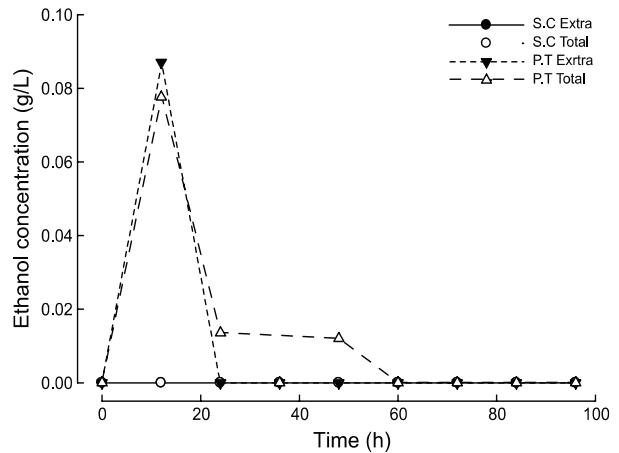


Fig. 6. Ethanol production from *Hizikia fusiformis* of *Saccharomyces cerevisiae* and *Pachysolen tannophilus*: S.C) *Saccharomyces cerevisiae*, P.T) *Pachysolen tannophilus*.

Table 1. Ethanol production from various brown-algae

Algae	<i>Laminaria japonica</i>				<i>Sargassum fulvellum</i>				<i>Hizikia fusiformis</i>			
	S. cerevisiae		P. tannophilus		S. cerevisiae		P. tannophilus		S. cerevisiae		P. tannophilus	
	Extra	Total	Extra	Total	Extra	Total	Extra	Total	Extra	Total	Extra	Total
Optimal time (h)	36	36	36	36	36	36	48	48	-	-	12	12
Ethanol (g/L)	0.86	0.90	0.88	0.93	0.11	0.14	0.07	0.01	-	-	0.09	0.08
Ethanol Yield (%)	4.30	4.50	4.40	4.65	0.55	0.70	0.35	0.05	-	-	0.45	0.40

에탄올 발효에 따른 전처리 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 있는 것으로 생각된다. 환원당의 생성을 측정할 결과 효소처리에서는 alginate에 대한 분해 활성이 높았다. 갈조류에 존재하는 algiante는 상대적인 구성 비율 및 금속이온의 결합 등에 따라 여러 종류로 나뉘며, 이러한 구성성분은 갈조류 종에 따라서도 차이가 난다. 따라서 각각의 갈조류에 존재하는 alginate의 서로 다른 특성이 가수분해에 영향을 미쳤을 것으로 생각된다. 또한 갈조류에 존재하는 다당류 성분의 구성도 에탄올 발효에 많은 영향을 미치는 것으로 생각되는데 특히 다시마에서 에탄올 생산 수율이 최대 4.65%로 높은 것으로 보아 다른 갈조류보다 풍부하게 존재하는 laminaran이 영향을 미친 것으로 생각된다.

현재 *Laminaria hyperborea*에서 추출한 laminaran과 mannitol을 이용한 에탄올 발효에 대한 연구에서, *Pichia angophorae*를 발효 균주로 접종했을 때 추출물 1.0 g에서 에탄올을 최대 0.43 g을 얻은 것으로 보고되어 있다 [10]. 본 실험결과에서는 *Pachysolen tannophilus*를 이용하여 다시마 1.0 g에서 최대 46.5 mg의 에탄올을 얻었다. 이는 *Laminaria hyperborean* 추출물을 이용한 것의 대략 10.81% 정도이다. 그러나 갈조류 당 성분 추출과정에서 손실되는 갈조류의 양을 생각할 때 낮은 수율이 아니며, 효율적인 전처리 기술개발을 통해 수율을 더욱 더 향상시킬 수 있을 것으로 생각된다.

요 약

본 연구는 갈조류인 다시마, 모자반, 툯을 효소적 방법으로 가수분해하여 이를 이용한 바이오 에탄올 생산 가능성을 확인하고자 하였다. 가수분해 효소 분리 및 바이오 에탄올 생산 실험 결과는 다음과 같이 요약할 수 있다.

효소는 해수 및 채취한 갈조류 시료에서 분리하였으며, 갈조류의 주요 다당류인 alginate와 laminaran에 대한 효소 활성을 측정하였다. 또한 다시마, 모자반, 툯에 대한 직접적인 갈조류 가수분해 효과를 확인 하였다. 조효소에 의한 가수분해는 alginate에서 특히 높게 나타났으며, laminaran에서도 일부 활성을 보였다.

갈조류의 전처리에서 환원당의 생성은 외분비 효소와 전체 조효소에서 크게 차이가 없었으며, 기질로는 다시마에서 최대 1.90 g/L로 가장 높게 확인되었다. 모자반과 툯에서의 가수분해가 12 h 안에 완료되는 것에 비해 다시마는 72 h 동안 반응이 지속적으로 일어났다. 에탄올 발효는 환원당 생성량과는 무관하게 나타났는데 이는 전처리 방법에 따라 갈조류 다당류의 가수분해에 미치는 영향이 다르기 때문으로 생각되며, 또한 전처리 과정에서 생성되는 부산물이 영향을 미치기 때문인 것으로 생각된다.

갈조류 에탄올 발효에서 기질로 다시마를 이용했을 때 에

탄올 생산 수율이 가장 높았다. 다시마를 이용한 발효에서는 발효균주 및 효소처리에 따른 에탄올 생산량이 대략 0.90 g/L로 유사하게 나왔다. 모자반에서의 에탄올 생산은 발효균주를 *Saccharomyces cerevisiae*로 하였을 때 최대 0.14 g/L로 확인 되었으며, 툯에서는 *Saccharomyces cerevisiae*를 이용한 발효에서 에탄올생산이 전혀 확인되지 않았으며, *Pachysolen tannophilus* 에서만 0.09 g/L의 에탄올 생산이 생산되었다.

접수 : 2009년 6월 11일, 게재승인 : 2009년 9월 17일

REFERENCES

1. Chung, J. H., G.-S. Kwon, and H.-S. Jang (2008) Development of transportaion bio-energy and its future. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 36: 1-5.
2. Saha, B. C. and M. A. Cotta (2007) Enzymatic saccharification and fermentation of alkaline peroxide pretreated rice hulls to ethanol. *Enzyme Microb. Technol.* 41: 528-532.
3. Hahn-Hagerdal, B., M. Galbe, M. F. Gorwa-Grauslund, G. Liden, and G. Zacchi (2006) The fuel of tomorrow from the residues of today. *Trends. Biotechnol.* 24: 549-556.
4. Hirano, A., R. Ueda., S. Hirayama., and Y. Ogushi, (1997) CO₂ fixation and ethanol production with microalgal photosynthesis and intracellular anaerobic fermentation. *Energy.* 22: 137-142.
5. Lee, D.-S., H.-R. Kim, D.-M. Cho, T.-J. Nam, and J.-H. Pyeun (1998) Uronate compositions of alginate from the edible brown algae. *J. Kor. Fish. Soc.* 31: 1-7.
6. Yoon, M.-O., S.-C. Lee, J.-W. Rhim, and J.-M. Kim (2004) Comparison of alginic acid yields and viscosity by different extraction conditions from various seaweeds. *J. Kor. Fish. Sci. Nutr.* 33: 747-752.
7. Korenaga, T., and S.-I. Fujii (2000) Separation and enzymatic saccharification of cellulose from wakame. *J. Food Compos. Anal.* 13: 865-871.
8. Park, Y.-H. (1969) Seasonal variation in the chemical composition of Brown algae with special reference to alginic acid. *Bull. Kor. Fish. Soc.* 2: 71-82.
9. Horn, S. J., and K. Østgaard (2001) Algiante lyase activity and acidogenesis during fermentation of *Laminaria hyperborea*. *J. Appl. Phycol.* 13: 143-152.
10. Horn, S. J., I. M. Aasen, and K. Østgaard (2000) Ethanol production from seaweed extract. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 25: 249-254.
11. Horn, S. J., I. M. Aasen, and K. Østgaard (2000) Production of ethanol from mannitol by *Zymobacter*

- palmae*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 24: 51-57.
12. Joo, D.-S., J.-S. Lee, J.-J. Park, S.-Y. Cho, C.-B. Ahn, and E.-H. Lee (1995) Purification and characterization of the intracellular alginase from *Vibrio* sp. AL-145. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 23: 432-438.
 13. Kim, H.-Y., 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 (2006) Development of analytical method for sodium alginate in feed. *Korean J. Food. Sci. Technol.* 38: 1-4.
 14. Lee, J.-H. and E.-Y. Lee (2003) Isolation of Alginate-Degrading Marine Bacteria and Characterization of Alginate. *Kor. J. Life Sci.* 13: 718-722.
 15. Joo, D.-S., J.-S. Lee, J.-J. Park, S.-Y. Cho, H.-K. Kim, and E.-H. Lee (1995) Preparation of oligosaccharides from alginic acid by enzymic hydrolysis. *Korean J. Food. Sci. Technol.* 28: 146-151.
 16. Kim, H. K., J. C. Lee, N. H. Kang, S. H. Kim, J. G. Kim, and K. C. Chung (2007) Purification and characterization of the extracellular alginate lyase from *Streptomyces* sp. MET 0515. *J. Life Science.* 17: 625-633.
 17. Hien, N. Q., N. Nagasawa, L. X. Tham, F. Yoshii, V. H. Dang, H. Mitomo, K. Makuuchi, and T. Kume (2000) Growth-promotion of plants with depolymerized alginates by irradiation. *Radiat. Phys. Chem.* 59: 97-101.
 18. Lim, Y.-S. and B.-J. You (2007) Effects of hydrolysis temperature on the distribution of the molecular weights of alginates prepared from sea tangle. *Laminaria japonica. J. Kor. Fish. Soc.* 40: 187-192.
 19. Joo, D.-S., Y.-S. Choi, and S.-Y. Cho (2003) Preparation of the depolymerized alginates by physical treatment processing with organic acids. *J. Kor. Fish. Soc.* 36: 1-5.
 20. Lim, Y.-S. and B.-J. You (2006) Effects of hydrolysis pH on distribution of molecular weights of alginates of sea tangle *laminaria japonica*. *J. Kor. Fish. Soc.* 39: 313-317.