

*Saccharina japonica*를 이용한 전처리 및 분리당화발효와 동시당화발효로부터 에탄올 생산

김민지, 김성구*

Ethanol Production by Separate Hydrolysis and Fermentation and Simultaneous Saccharification and Fermentation Using *Saccharina japonica*

Min-Ji Kim and Sung-Koo Kim*

접수: 2012년 4월 5일 / 게재승인: 2012년 4월 25일

© 2012 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

Abstract: Ethanol fermentations were carried out using simultaneous saccharification and fermentation (SSF) and separated hydrolysis and fermentation (SHF) processes with monosaccharides from seaweed, *Saccharina japonica* (sea tangle, *Dasima*) as the biomass. The pretreatment was carried out by thermal acid hydrolysis with H₂SO₄ or HCl. Optimal pretreatment condition was determined at 10% (w/v) seaweed slurry with 37.5 mM H₂SO₄ at 121 °C for 60 min. To increase the yield of saccharification, isolated marine bacteria *Bacillus* sp. JS-1 was used and 48 g/L of reducing sugar were produced. Ethanol fermentation was performed using SSF and SHF process with *Pachysolen tannophilus* KCTC 7937. The ethanol concentration was 6.5 g/L by SSF and 6.0 g/L by SHF.

Keywords: Ethanol, *Saccharina japonica*, *Pachysolen tannophilus*, thermal acid hydrolysis

1. 서론

화석연료의 과다 사용으로 지구 온난화 및 환경오염 등의

문제가 발생하여 세계 각국은 새로운 재생 가능한 에너지원 개발에 많은 노력을 기울이고 있다 [1]. 이러한 상황에서 바이오 에너지 (bioenergy)는 급등하는 유가로 인한 경제문제와 화석연료의 사용으로부터 발생하는 환경문제를 줄일 수 있는 대안으로 대두되고 있다 [2]. 특히, 바이오 에탄올은 화석연료와 혼합하거나 대체하여 사용할 수 있으며, 이산화탄소의 순환으로 친환경적이고 지속 가능한 에너지 생산이 가능하다 [3,4]. 바이오 에탄올을 생산하기 위해 곡류, 목재 등 다양한 바이오 매스가 사용 되고 있는데, 곡류는 단가가 비싸고 식량이라는 도덕적 측면에서 문제가 되고 있고, 목재는 아직도 리그닌에 의한 셀룰로스의 분해 저해 및 바이오 매스 확보에 문제가 있다. 제 3세대 바이오 매스로서 해조류는 삼면이 바다인 우리나라에서 적합한 바이오 매스이다. 그 중 갈조류인 다시마는 성장이 빠르며, 홍조류나 녹조류에 비해 단위 면적당 생산량이 많다는 장점이 있다 [5]. 또한 66%의 높은 탄수화물을 포함하며 주로 alginate, laminaran 그리고 mannitol 등의 당을 가지며 전체 탄수화물의 50%가 alginate이다 [6]. Alginate는 세포벽을 이루는 구조성 다당류이며 D-mannuronate와 L-guluronate으로 구성되어 있고 β-1,4-glycosidic 결합으로 형성되어 있다 [7,8]. Laminaran은 저장성 다당류로 주로 선형의 β-1,3-D-glucose로 결합을 형성하고 있으나 일부는 β-1,6-glycosidic 결합으로 되어 있다 [7,9]. Mannitol은 Mannose의 환원형인 당알코올로 갈조류의 주 구성성분이며 비환원당이다. 갈조류에는 앞서 언급한 당 뿐만 아니라 L-fucose, D-galactose, D-xylose도 가지고 있다 [7]. 갈조류를 이용한 에탄올 발효를 위해서는 전처리 과정은 필

부경대학교 수산과학대학 생물공학과
Department of Biotechnology, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea
Tel: +82-51-629-5868, Fax: +82-51-629-5863
e-mail: skkim@pknu.ac.kr

수적이며, 전처리에는 다양한 물리적, 화학적, 생물학적인 처리로 당화 효율을 증가시킬 수 있다. 그 중 화학적 전처리 방법인 황산의 사용은 바이오 매스의 구조를 가수분해에 용이하게 전환시키고 또한 효소 전처리에 비해 공정비용이 적게 들고 빠르게 가수분해를 시킬 수 있어 당을 효율적으로 회수 가능하다는 장점이 있다 [10].

본 실험에서는 다시마를 황산과 염산의 농도별로 처리하여 당화수율과 점도 변화를 비교하였으며, 당화수율을 증가시키기 위해 당화균주 *Bacillus* sp. JS-1을 처리를 하였다. 당화한 시료를 이용하여 분리당화발효 (SHF) 및 동시당화발효 (SSF)로서 *Pachysolen tannophilus* KCTC 7937을 효모로 사용하여 에탄올 생산 효율 비교 및 발효 공정 최적화를 실시하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 재료

본 실험에서는 에탄올 발효를 위한 기질로 *Saccharina japonica* (다시마)를 사용하였으며, 부산의 기업인 (주)기장물산에서 상품으로 가공하고 남은 부산물을 수거하여 사용하였다. 다시마는 자연 건조된 다시마를 사용하였으며, 분쇄기로 갈아서 입자 크기가 200 μm 이하의 다시마를 사용하였다.

2.2. 다시마 산 촉매 열 가수분해

다시마 산 촉매 열 가수분해 최적조건을 설정하기 위해 100 mL flask에서 working volume 30 mL로 하여 다시마 농도 범위를 10%-20%로 설정하였다. 그리고 황산과 염산 농도 범위는 37.5 mM-187.5 mM로 설정하고 121 $^{\circ}\text{C}$ 에서 60분간 열처리를 실시한 후 점도를 측정하였고, 시료를 12,000 rpm에서 10분동안 원심분리 하였다. 분리된 상층액을 사용하여 환원당을 측정하였다.

2.3. *Bacillus* sp. JS-1을 이용한 당화

당화는 해수에서 분리한 당화균주 *Bacillus* sp. JS-1을 사용하였으며 [6], 500 mL flask에서 working volume 250 mL로 하여 10% (w/v) 다시마와 37.5 mM 황산을 첨가하여 121 $^{\circ}\text{C}$ 에서 60분간 열처리한 다시마 배지에 5 N NaOH를 처리하여 pH 5.5로 중화하고 0.19 g dcw/L의 *Bacillus* sp. JS-1을 접종하였다. 접종 후 30 $^{\circ}\text{C}$ 에서 190 rpm으로 7일동안 배양하였으며, 시료를 12,000 rpm에서 10분 동안 원심분리 하였다. 분리된 상층액을 사용하여 환원당을 측정하였다.

2.4. 효모 균주 및 배양

에탄올 발효 균주는 yeast인 *Pachysolen tannophilus* KCTC 7937를 사용하였다. 배지는 100 mL flask에서 working volume 30 mL로 하여 121 $^{\circ}\text{C}$ 에서 15분간 멸균 한 YPD broth (yeast extract 10.0 g/L, peptone 20.0 g/L, dextrose 20.0 g/L)를 사용하였다. 균 접종 후 30 $^{\circ}\text{C}$ 에서 190 rpm으로 18시간 배양하였다.

2.5. 분리당화발효 (SHF)

분리당화발효는 500 mL flask에서 working volume 250 mL로 하여 10% (w/v) 다시마에 37.5 mM 황산을 첨가하여 121 $^{\circ}\text{C}$ 에서 60분간 열처리한 후 5 N NaOH를 사용하여 pH 5.5로 중화시켰다. 발효 시 세포성장을 위해 yeast extract 5 g/L, $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$ 7.5 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.75 g/L, K_2HPO_4 3.5 g/L, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1 g/L를 첨가하였다 [11]. 그리고 *Bacillus* sp. JS-1를 0.19 g dcw/L 첨가하여 7일간 당화시킨 후 0.45 g dcw/L의 *P. tannophilus*를 접종하여 발효를 실시하였다. 접종 후 30 $^{\circ}\text{C}$, 190 rpm으로 84시간 배양하였으며, 시료를 12,000 rpm에서 10분동안 원심분리를 한 후 상층액을 HPLC (Agilent 1100 Series, Agilent. Inc., USA)로 에탄올 농도를 분석하였다.

2.6. 동시당화발효 (SSF)

다시마를 이용하여 당화와 발효를 동시에 진행하기 위해 당화균주 *Bacillus* sp. JS-1과 발효균주 *P. tannophilus*를 동시에 접종하였다. 10% (w/v) 다시마에 37.5 mM 황산을 첨가하여 121 $^{\circ}\text{C}$ 에서 60분간 열처리한 후 5 N NaOH로 pH 5.5로 중화시켰다. 발효 시 세포성장을 위해 yeast extract 5 g/L, $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$ 7.5 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.75 g/L, K_2HPO_4 3.5 g/L, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1 g/L를 첨가하였다. 그리고 *Bacillus* sp. JS-1과 *P. tannophilus*는 각각 0.45 g dcw/L, 0.4 g dcw/L로 접종하였다. 발효는 30 $^{\circ}\text{C}$, 190 rpm으로 84시간 배양하였으며, 시료를 12,000 rpm에서 10분동안 원심분리를 한 후 상층액을 분리하여 HPLC (Agilent 1100 Series, Agilent. Inc., USA)로 에탄올 농도를 분석하였다.

2.7. 분석방법

세포의 성장은 UV-Vis spectrophotometer (Ultrospec™6300 pro UV/Visible Spectrophotometer, Amersham Biosciences Inc., Sweden)를 사용하여 600 nm에서 흡광도를 측정 하였으며, dry cell weight로 전환하였다. 다시마 당화액 내 환원당은 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS)법으로 575 nm에서 흡광도를 측정 하였다 [12]. 다시마 당화액의 점도는 Brookfield viscometer (BROOKFIELD DV-III Rheometer v3.1, Brookfield Eng. Inc., USA)를 사용하여 30 $^{\circ}\text{C}$ 에서 spindle NO. ULA, SC4-18과 SC4-34로 측정하였다. 에탄올 및 유기산 측정은 HPLC (Agilent 1100 Series, Agilent. Inc., USA)을 이용하였다. HPLC의 검출기는 Agilent G1362A refractive index detector (RID)를 사용하였으며 column은 Biorad Aminex HPX-87H column (300 \times 7.8 mm)을 사용하였다. Column의 온도는 65 $^{\circ}\text{C}$ 로 하였고 이동상은 5 mM 황산을 사용하였으며, 유속 0.6 mL/min로 하여 각 시료를 40분간 분석하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 다시마 산 촉매 열가수분해

다시마를 이용하여 에탄올을 생산하기 위해 전처리를 실시하였다. 다시마의 최적 전처리 조건을 설정하기 위해 다시마

농도 범위를 10%-20%로 설정하고, 황산과 염산 농도 범위를 37.5 mM-187.5 mM로 설정하여 121°C에서 60분간 열처리를 하였다. Fig. 1(a)와 Fig. 1(b)는 다시마에 황산과 염산으로 산 촉매 열처리를 하고 환원당 수율을 나타낸 그래프이다. 황산은 평균 42.2%의 수율을 얻을 수 있었고 최고 50%의 수율을 나타내는데 비해, 염산은 평균 26%의 수율을 획득하였고 최고 35%의 수율을 얻을 수 있었다. 황산이 염산보다 16% 높은 당화율을 나타내는데, 바이오 매스의 구조특성상 염산보다는 황산으로 분해가 잘 되는 것으로 판단된다. 다른 해조류인 우뚝가사리를 황산과 염산으로 처리를 하였을 때 환원당 생성은 염산이 높았지만, 염산의 농도가 높아지고 열처리 시간이 길어지면 유기산 생성이 증가되기 때문에 황산이 염산보다 효율적인 것을 확인하였다 [13]. 또한 Fig. 1(a)와 Fig. 1(b)에서 황산과 염산 처리 후 점도를 측정하였다. 10% (w/v) 다시마에 산을 처리했을 경우 황산과 염산 모두 50 cP 미만의 점도를 보이며, 15% (w/v) 다시마에 황산을 첨가 하였을 때 점도는 10% (w/v) 다시마와 큰 차이는 없었지만 20% (w/v) 다시마에서는 점도가 급격히 증가하였다. 그리고 15% 다시마에 염산을 첨가한 다시마는 황산을 첨가했을 때 보다 점도가 훨씬 높았다. 다시마를 이용한 발효에서 가장 고려해야 할 점은 점도이다. 다시마에 alginate의 높은 점도 때문에 발효시 교반 저해로 인한 에탄올 생산에 영향을 끼칠 수 있기 때문에 가능한 점도는 낮으면서 환원당

생성이 많은 조건을 최적으로 설정하였다. 환원당 생성과 점도를 고려해 보았을 때 10% (w/v) 다시마에 37.5 mM 황산을 사용하여 121°C에서 60분간 열처리한 조건을 최적 조건으로 설정 하였으며, 이 때 환원당은 수율은 44% (w/v) 이고 점도는 17 cP이다 (Table 1).

Table 1. Summary of reducing sugar yield and viscosity by thermal acid hydrolysis

| Acid | Concentration (mM) | Reducing sugar yield (%) | | | Viscosity (cP) | | |
|--------------------------------|--------------------|--------------------------|------|------|----------------|--------|---------|
| | | 10% | 15% | 20% | 10% | 15% | 20% |
| H ₂ SO ₄ | 37.5 | 44.5 | 37.3 | 31.7 | 17.6 | 117.4 | 23994.8 |
| | 75 | 41.3 | 43.8 | 43.8 | 17.6 | 58.8 | 1052.7 |
| | 112.5 | 37.9 | 42.2 | 44.6 | 8.1 | 190.7 | 4631.1 |
| | 150 | 34.8 | 34.1 | 50.0 | 4.8 | 23.0 | 1166.0 |
| | 187.5 | 40.8 | 41.5 | 43.6 | 8.3 | 260.9 | 1196.0 |
| HCl | 37.5 | 28.1 | 11.5 | 17.8 | 24.9 | 1979.5 | 5506.8 |
| | 75 | 26.5 | 27.8 | 25.9 | 740.2 | 189.9 | 83502.1 |
| | 112.5 | 34.8 | 22.4 | 26.1 | 77.0 | 4439.0 | 761.8 |
| | 150 | 34.1 | 30.3 | 28.2 | 18.87 | 4007.1 | 1166.7 |
| | 187.5 | 35.3 | 25.7 | 27.1 | 27.8 | 162.9 | 1196.7 |

3.2 *Bacillus* sp. JS-1 의한 다시마 당화

다시마 전처리를 실시한 후 당화 효율을 높이기 위해 해수에서 분리된 당화균주 *Bacillus* sp. JS-1을 이용하였다 [6].

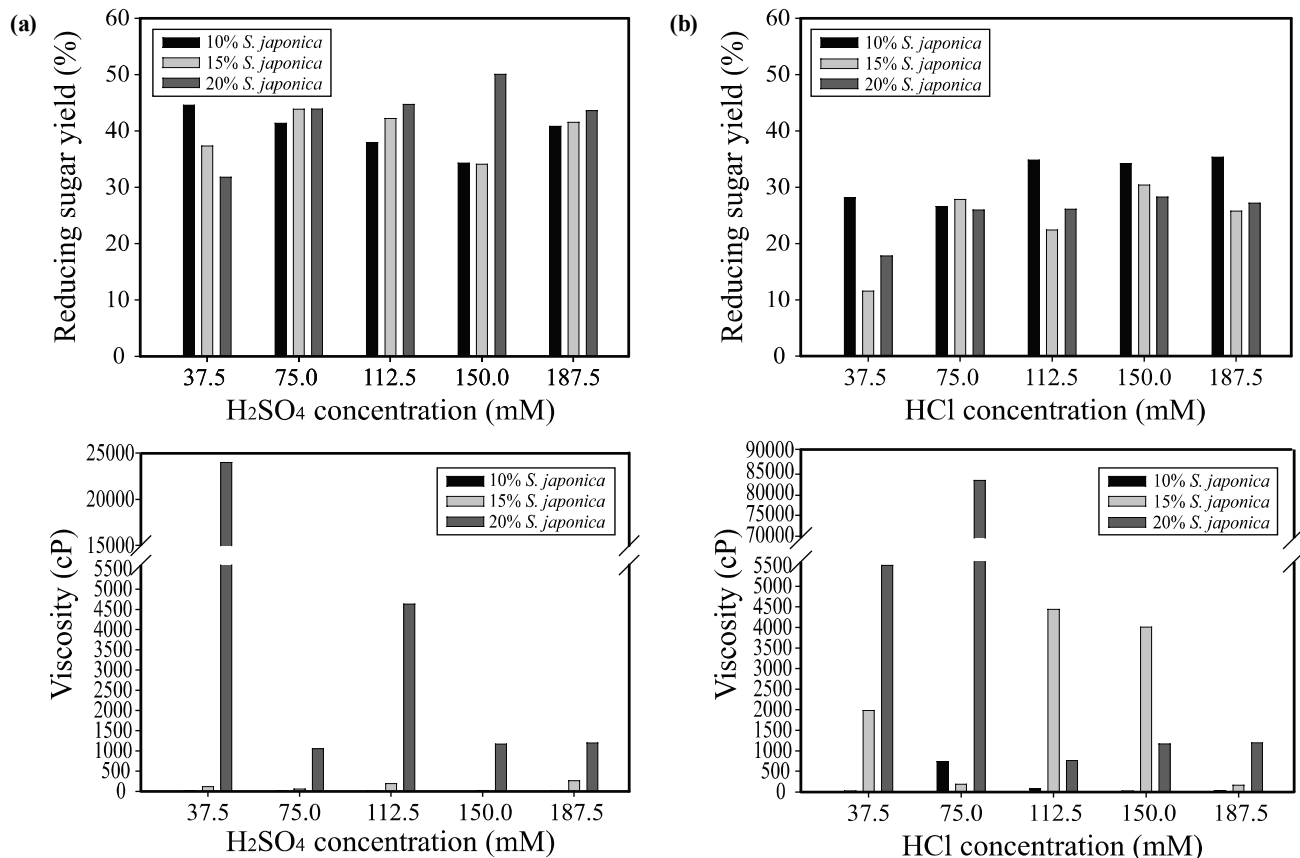


Fig. 1. Effect of sulfuric acid and hydrochloric acid concentrations and slurry contents on reducing sugar yields and viscosities after thermal acid hydrolysis: (a) reducing sugar yields and viscosities treated by H₂SO₄ (b), reducing sugar yields and viscosities treated by HCl.

해수에서 분리된 *Bacillus* sp.는 호기성 및 통성혐기성 세균으로 배양이 간편하고 토양, 담수, 해양에서도 많이 발견이 되고 있는 미생물로서 cellulase, protease, amylase 등의 다양한 효소를 포함하고 있다 [14]. Fig. 2의 그래프와 같이 황산으로 전처리만 실시했을 경우 27 g/L의 환원당이 생성되어 42%의 당화수율을 나타내었지만, *Bacillus* sp. JS-1으로 당화를 7일간 실시한 결과 48 g/L의 환원당이 생성이 되었고 73%의 당화 수율을 나타내었다. 그리고 7일 이상 당화했을 경우 환원당이 감소하였는데, 이는 미생물이 더 이상 다시마를 분해하지 못하고 분해한 당을 미생물이 섭취하는 것으로 판단된다. 그러므로, 최대로 당이 생성되는 7일까지 당화를 실시하고 그 후 yeast를 접종하여 발효 (SHF)를 실시하였다.

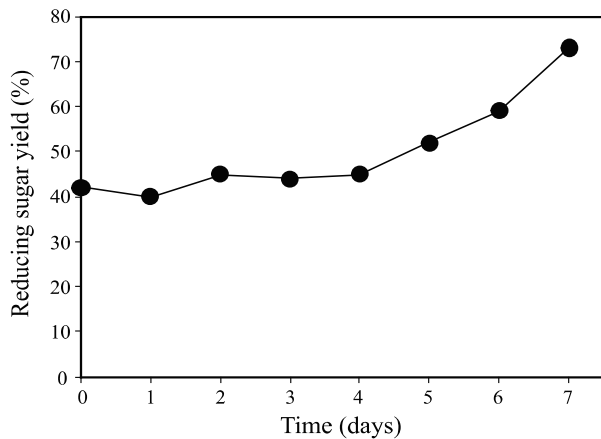


Fig. 2. Changes of reducing sugar concentration of *Saccharina japonica* slurry (10%, w/v) by the treatment of *Bacillus* sp. JS-1 after the thermal acid hydrolysis.

3.3. 발효 및 에탄올 생산

최적 조건으로 전처리한 다시마에 발효균주 *Pachysolen tannophilus*를 이용하여 분리당화발효와 동시당화발효를 실시 하였다. 분리당화발효는 당화균주 *Bacillus* sp. JS-1으로 7일간 당화를 하고 발효균주 *P. tannophilus*를 이용하여 84시간 발효를 하였다. 그 결과 발효 24시간에 6.0 g/L의 에탄올이 생산이 되었다 (Fig. 3(a)). 동시당화발효의 경우 당화균주 *Bacillus* sp. JS-1과 발효균주 *P. tannophilus*를 동시에 접종하여 4일 동안 발효를 하였다. 48시간에 6.5 g/L의 에탄올이 생산이 되었다 (Fig. 3(b)). 분리당화발효와 동시당화발효를 실시한 결과 동시당화발효에서 분리당화발효시 보다 약간 많은 에탄올이 생산이 되었고, 동시당화발효는 2일째 에탄올을 생산하고 분리당화발효는 7일간 당화와 1일간 발효 한 후 에탄올을 6.0 g/L가 생산이 되었다. 이를 통해 동시당화발효가 분리당화발효보다 더 효율적인 것을 알 수 있었다. 또한 *Pichia angophorae*를 사용하여 에탄올 발효를 하였을 때 36시간에 가장 높은 농도의 에탄올이 생산되고 이후에 에탄올 농도는 감소하였지만 [6], 본 실험에서는 6 g/L의 에탄올 농도로서, 선행 논문의 에탄올 생산과 비교하였을 때 빠른 시간에 에탄올이 생산이 되고 유지되는 것을 볼 수 있었다. 다시마를 이용하여 *P. tannophilus*의 에탄올 생산을 비교해 보면, 앞선 연구에서는 pH 7에서 발효를 하여 에탄올

생산을 하지 못하였지만 [6], 본 연구에서는 pH 5.5에서 발효를 하여 6.0 g/L와 6.5 g/L의 에탄올을 생산하였다. 선행 논문에서 *P. tannophilus* 배양 시 pH 3-7까지 변화를 주었을 때 pH 5에서 가장 높은 에탄올을 생산하였고, pH 6 이상 일 때는 에탄올이 감소하였다. *P. tannophilus*가 에탄올을 생산할 때 pH에 영향을 받고, pH 5가 *P. tannophilus*의 최적 pH임을 알 수 있었으며 이를 본 실험으로 다시 한번 확인 할 수 있었다 [15,16]. 분리당화발효시 *Bacillus* sp. JS-1으로 당화를 하였을 때 당화율이 63%이고 43 g/L의 환원당이 생성되어도 동시당화발효와 비슷한 양의 에탄올이 생산이 되었다. 이론적으로는 분리당화발효에서 더 많은 에탄올이 생산이 되어야 하지만 당화균 *Bacillus* sp. JS-1으로 당화를 하고 멸균 하지 않고 바로 에탄올 발효를 실시하였기 때문에 균이 계속 잔존하게 되어 당을 소비하는 것으로 판단되었다.

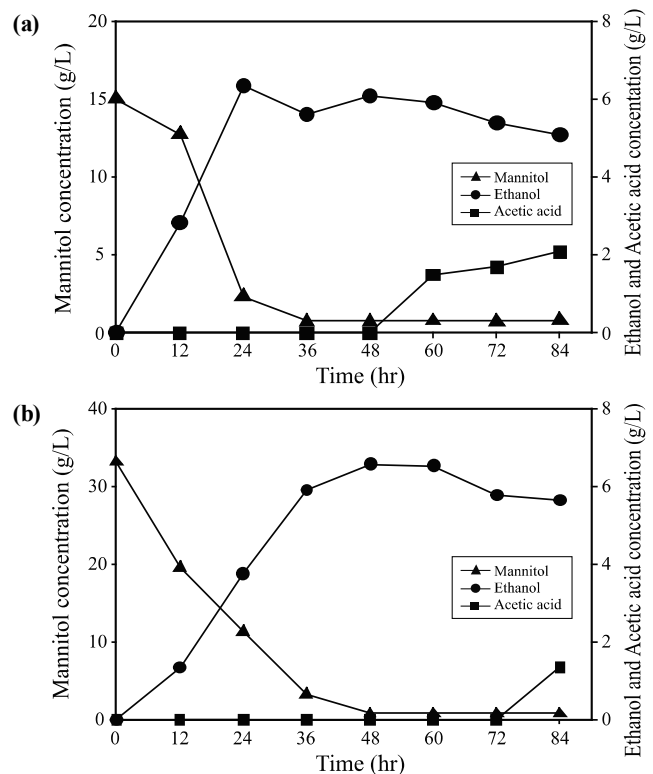


Fig. 3. Concentrations of ethanol produced from *Saccharina japonica*. (a) Saccharification was carried out by the thermal acid hydrolysis and *Bacillus* sp. JS-1 treatment. Ethanol fermentation was carried out separately with *Pachysolen tannophilus* KCTC 7937. (b) SSF was carried out after the thermal acid hydrolysis. The saccharification with *Bacillus* sp. JS-1 and fermentation with *Pachysolen tannophilus* KCTC 7937 were carried out simultaneously. (▲ Mannitol, ● Ethanol, ■ Acetic acid)

4. 결론

본 연구에서는 다시마를 이용한 최적 전처리 조건 설정과 에탄올 생산에 대해 연구하였다. 다시마의 최적의 전처리 조건을 설정하기 위해 다시마 농도 범위와 황산과 염산의

농도 범위를 설정 하여 121°C에서 60분간 열처리를 하였다. 실험 결과 다시마 최적 전처리 조건은 10% (w/v) 다시마에 37.5 mM 황산을 첨가하여 121°C에서 60분간 열처리한 조건이었다. 최적조건에서 다시마 slurry의 점도는 17 cP를 나타내었고, 환원당 수율은 44%로 나타났다. 당화균주 *Bacillus* sp. JS-1을 이용하여 7일간 당화를 실시한 결과 환원당이 27 g/L에서 1.7배 증가된 48 g/L가 생성 되었다. 또한 7일간 당화를 실시하고 발효균주 *P. tannophilus*를 이용하여 분리당화발효와 동시당화발효를 실시하였다. 동시당화발효의 경우 당화균주 *Bacillus* sp. JS-1와 발효균주 *P. tannophilus*를 동시에 첨가하여 발효를 하였다. 에탄올 발효 결과, 동시당화발효와 분리당화발효에서 6.5 g/L와 6.0 g/L의 에탄올이 생산이 되었고 다시마의 탄수화물로부터 이론적 수율로 계산했을 때 19%와 18%로 나타났다. 이 결과로써 동시당화발효가 분리당화발효보다 시간적으로나 에탄올 생산에서 효율적인 것으로 판단된다.

감사

본 연구는 국토해양부 소관 해양생명공학기술개발사업의 연구비 지원에 의해 수행되었습니다.

References

- Sabourin-Provost, G. and P. C. Hallenbeck (2009) High yield conversion of a crude glycerol fraction from biodiesel production to hydrogen by photofermentation. *Bioresour. Technol.* 100: 3513-3517.
- Yazdani, S. S. and R. Gonzalez (2007) Anaerobic fermentation of glycerol: a path to economic viability for the biofuels industry. *Curr. Opin. Biotech.* 18: 213-219.
- Cazetta, M. L., M. A. P. C. Celligoi, J. B. Buzato, and I. S. Scarmino (2007) Fermentation of molasses by *Zymomonas mobilis*: Effects of temperature and sugar concentration on ethanol production. *Bioresour. Technol.* 98: 2824-2828.
- Davis, L., Y. Jeon, C. Svenson, P. Rogers, J. Pearce, and P. Peiris (2005) Evaluation of wheat stillage for ethanol production by recombinant *Zymomonas mobilis*. *Biom. Bioen.* 29: 49-59.
- Lee, S. M., I. S. Choi, S. K. Kim, and J. H. Lee (2009) Production of bio-ethanol from brown algae by enzymic hydrolysis. *Bioresour. Technol.* 24: 483-488.
- Jang, J. S., Y. K. Cho, G. T. Jeong, and S. K. Kim (2012) Optimization of saccharification and ethanol production by simultaneous saccharification and fermentation (SSF) from seaweed, *Saccharina japonica*. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 35: 11-18.
- Horn, S., I. Aasen, and K. Østgaard (2000) Production of ethanol from mannitol by *Zymobacter palmae*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 24: 51-57.
- Tang, J. C., H. Taniguchi, H. Chu, Q. Zhou, and S. Nagata (2009) Isolation and characterization of alginate-degrading bacteria for disposal of seaweed wastes. *Lett. Appl. Microbiol.* 48: 38-43.
- Myklestad, S. (1978) Beta-1, 3-glucans in diatoms and brown seaweeds, Handbook of phycological methods, Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Won, K. (2010) Optimization of dilute acid pretreatment of barley straw for bioethanol production, M.S. Thesis. Dankuk University, Yongin, Korea.
- Karimi, K., G. Emtiazi, and M. J. Taherzadeh (2006) Ethanol production from dilute-acid pretreated rice straw by simultaneous saccharification and fermentation with *Mucor indicus*, *Rhizopus oryzae*, and *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme Microb. Technol.* 40: 138-144.
- Tomás-Pejó, E., J. M. Oliva, A. González, I. Ballesteros, and M. Ballesteros (2009) Bioethanol production from wheat straw by the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875 in a simultaneous saccharification and fermentation fed-batch process. *Fuel.* 88: 2142-2147.
- Jung, T. S. (2011) Kinetic Study on the Acid Hydrolysis of Pretreated *Gelidium amansii* with Dilute Acid, M.S. Thesis. Dankook University, Yongin, Korea.
- Chi, W. J., D. Y. Park, U. Temuujin, J. Y. Lee, Y. K. Chang, and S. K. Hong (2011) Identification of a cellulase producing marine *Bacillus* sp. GC-1 and GC-4 isolated from coastal seawater of Jeju island. *J. Microbiol. Biotechnol.* 39: 97-103.
- Liu, X., P. R. Jensen, and M. Workman (2012) Bioconversion of crude glycerol feedstocks into ethanol by *Pachysolen tannophilus*. *Bioresour. Technol.* 104: 579-586.
- Roebuck, K., A. Brundin, and M. Johns (1995) Response surface optimization of temperature and pH for the growth of *Pachysolen tannophilus*. *Enzyme Microb. Technol.* 17: 75-78.