The Korean Journal of Mycology
© The Korean Society of Mycology
DOI:10.4489/KJM.2010.39.3.243

한국균학회지
Kor. J. Mycol. 39(3) : 243-248 (2011)

효모 *Pichia stipitis*를 이용한 구멍갈파래 가수분해 추출물로 부터 바이오 에탄올 생산

이지은[1†] · 이상은[1†] · 최운용[2] · 강도형[3] · 이현용[2] · 정경환[1*]
[1]충주대학교 생명공학과, [2]강원대학교 생물소재공학전공, [3]한국해양연구원

Bioethanol Production using a Yeast *Pichia stipitis* from the Hydrolysate of *Ulva pertusa* Kjellman

Ji-Eun Lee[1†], Sang-Eun Lee[1†], Woon Yong Choi[2], Do Hyung Kang[3], Hyeon-Yong Lee[2] and Kyung-Hwan Jung[1*]

[1]*Department of Biotechnology, Chungju National University, Jeungpyung, Chungbuk 368-701, Republic of Korea*
[2]*Division of Biomaterials Engineering, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Republic of Korea*
[3]*Korea Ocean Research & Development Institute, Ansan, Gyeonggi-do 426-744, Republic of Korea*

(Received 2, September 2011., 1st Revised 19, September 2011., Accepted 17, October 2011)

ABSTRACT : We studied the repeated-batch process for the bioethanol production from the hydrolysate of *Ulva pertusa* Kjellman using yeast *Pichia stipitis,* which is able to assimilate C6- and C5-monosaccharides. During 180-hour operations, the repeated-batch process was carried out stably, and the average bioethanol concentration reached 11.9 g/L from about 30 g/L of reducing sugar in the hydrolysate. Meanwhile, the bioethanol yields, based on the reducing sugar and the quantitative TLC analysis, were 0.40 and 0.37, respectively, which corresponded to 78.4% and 72.5% of theoretical value, respectively. Throughout the quantitative process analysis, it was also demonstrated that 39.67 g-bioethanol could be produced from 1 kg of dried *Ulva pertusa* Kjellman. In this study, we verified that the bioethanol production from the hydrolysate of *Ulva pertusa* Kjellman was feasible using a yeast *Pichia stipitis*, particularly during the repeated-batch operation.

KEYWORDS : Bioethanol, *Pichia stipitis*, Repeated-batch, *Ulva pertusa* Kjellman

구멍갈파래 (*Ulva pertusa* Kjellman)는 한국 전연안에서 가장 흔하게 볼 수 있는 녹조류 갈파래과의 해조류이다. 최근 구멍갈파래 유래의 물질로부터 다양한 생리활성이 발견되어 이에 대한 연구가 국내외적으로 활발히 이루어 지고 있다 (배 등, 2000; 한 등, 2009; Akakabe *et al*., 1999; Qi *et al*., 2005a, 2005b, 2006; Pengzhan *et al*., 2003a, 2003b). 한편, 구멍갈파래는 근연안의 부영양화에 의한 녹조현상을 발생시켜서 환경적으로 큰 문제를 유발하기도 하여, 이로 인한 구멍갈파래의 수거 및 폐기에 많은 인력과 비용이 소비되고 있는 실정이다. 이에 대한 대안으로 구멍갈파래를 바이오 에탄올을 생산하기 위한 자원으로 활용하기 위한 시도가 이루지고 있다. 최근에 본 연구팀은 구멍갈파래에서 당을 추출하고, 그로부터 바이오 에탄올의 생산 가능성을 연구하였다 (한 등, 2010).

본 논문에서는 6탄당과 5탄당을 동시에 이용할 수 있는 효모 *Pichia stipitis* (*P. stipitis*)를 이용하여 구멍갈파래의 가수분해물에서 얻어진 추출물의 단당류로부터 바이오 에탄올을 생산하는 반복 회분식 (repeated-batch) 공정 개발에 관한 연구를 수행하였다. 그런데 구멍갈파래의 가수분해물에서 얻어진 추출물의 단당류 성분을 분석한 본 연구팀의 선행연구에서 주요 단당류로서 glucose가 83.5 (%, w/v) 그리고 xylose가 15.4 (%, w/v) 포함되어있는 것으로 밝혀졌다 (한 등, 2010).

그래서 본 논문에서는 이러한 두 종류의 단당류를 모두 이용하여 바이오 에탄올을 생산하기 위하여 효모 *P. stipitis*를 사용하였다. 효모 *P. stipitis*에서 glucose와 같은 6탄당은 *Saccharomycess cerevisiae*와 같은 대사 경로로 탄소원과 에너지원으로 이용되지만, 5탄당인 xylose의 경우에는 xylose reductase, xylitol dehydrogenase 두 효소가 관여하는 경로를 통하여 탄소원과 에너지원으로 이용된다. 특히 xylose가 xylitol로 바뀔 때 tricarboxylic acid cycle로 부터의 환원력 공급이 반드시 필요하기 때문에 (Jeffries, 2006), 5탄당인 xylose를 *P. stipitis*가 이용할 경우에는 배양 중 공기가 적당량 공급되어야 한다. 그런데 이때 너무 많은 공기를 첨가하면 xylose는 완전한 산화과정을 통하여 탄소원과 에너지원으로 이용되며, 반면에 공기를 충분히 공급하지 못하면 xylose는 *P. stipitis*에 의해서 전혀 이용 되지 못한다. 이러한 이유로 그 동안 많은 연구자들이 xylose를 이용한 바이오 에탄올 생산 시, xylose가 탄소원과 에너지원으로

*Corresponding author <E-mail : khjung@cjnu.ac.kr>
[†]These two authors contributed equally to this work and should be considered as equal first authors.

사용될 때 공기첨가 효과가 바이오 에탄올생산에 어떠한 영향을 미치는지에 대하여 연구 하였고, 또한 바이오 에탄올을 가장 많이 만들 수 있는 최적의 공기첨가 조건에 대하여서도 연구를 수행하여왔다 (Grootjen *et al.*, 1990; Ligthelm *et al.*, 1988; Skoog *et al.*, 1990; Watson *et al.*, 1984).

본 연구 논문에서는 이러한 공기첨가 문제를 최적화 하기 위한 본 연구팀의 surface aeration 방법을 통한 미량의 공기첨가 방법에 대한 선행연구 결과 (연 등, 2010; Yeon *et al.*, 2011b)를 기반으로 *P. stipitis*가 최적의 조건에서 바이오 에탄올을 생산할 수 있는 조건에서 공기를 첨가하였다. 본 연구의 최종 목표는 효모 *P. stipitis*를 이용하여 구멍갈파래 추출물로부터 바이오 에탄올의 상업적인 생산이 가능한 공정을 개발하는데 있다. 이를 위해서 바이오 에탄올 생산 공정으로 반복 회분식 배양 방법을 사용하였고, corn-steep liquor (CSL)가 포함된 경제적인 배지를 사용하였다.

본 연구에서는 6탄당과 5탄당을 이용할 수 있는 효모 *P. stipitis* CBS 7126을 사용하였다. 구멍갈파래는 제주도에서 수확하여 열풍건조기로 40°C에서 48시간 건조한 후, 볼밀로 미세하게 분쇄하여 사용하였다. 그 후, 고압액화 장치를 이용하여 가수분해 추출물을 제조하였다. 추출장치의 반응기에 100 g의 구멍갈파래 건조분말과 증류수 1.0 L를 넣고 195°C에서 15분간 가수분해를 위한 추출을 진행하였다. 추출장치의 모식도 및 기타 작동조건에 대하여서는 선행연구에 자세히 기술하였다 (한 등, 2010). 바이오 에탄올 생산을 위한 효모 배양 시, 회전진공농축기 (EYELA, Japan)를 이용하여 환원당 농도가 30 g/L가 되도록 추출물을 농축하였다.

효모 *P. stipitis*를 이용한 바이오 에탄올 생산 연구 시 발효조에서 반복 회분식 운전을 수행하였는다. 이 때 CSH 배지 (CSL; 20 mL/L, $(NH_4)_2SO_4$; 1.2 g/L, KH_2PO_4; 2.4 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 1.2 g/L)를 사용하였고, 2.5-L jar fermentor (Korea Fermetor Co, Republic of Korea)를 사용하였으며, 배양부피는 880 mL 였다. 반복 회분식 운전을 위하여, 36시간 동안 회분 분양을 수행한 후 800 mL의 배지를 수확하고, 새 CSH 배지를 멸균하여 발효조에 주입하였다. 이러한 방법을 3회 연이어 수행하였다. 배양 온도는 30°C, pH는 5.0 그리고 교반 속도는 200 rpm을 유지하였고, pH는 phosphoric acid solution [10 (%, v/v)]와 ammonia water로 조절하였다. Surface aeration을 통한 공기 공급은 silicon tubing (길이 = 6.7 cm, 내부지름 = 3.1 mm)을 이용하였으며, 이를 위하여 발효조 용기 (내부 지름 = 14.2 cm)의 위 뚜껑을 통하여 silicon tubing를 발효조 내부 공간으로 삽입시켰다.

배지내의 잔여 총환원당 함량은 dinitrosalicylic acid (DNS) 방법을 사용하여 측정하였으며 (Chaplin and Kennedy, 1986), 배양액 중의 에탄올 함량은 gas chromatography (8610C, SRI, USA)를 이용하여 분석하였다. 이때 컬럼은 Chromosomb 101 [L = 6 ft, ID = 1/8 inch, 80/100 mesh, stainless steel tubing (Alltech, USA)]을 사용하였고, 자세한 운전 조건은 선행 논문에 설명하였다 (연 등, 2010; Yeon *et al.*, 2011a, 2011b). 단당류의 양은 thin-layer chromatography (TLC)를 이용하여 분석하였으며, TLC Plate (Partisil K5F, Whatman)는 20 × 10 cm로 잘라서 사용하였고, 시료는 1 μL를 loading 하였으며, 전개용매는 acetonitrile과 증류수를 85 : 15 비율로 혼합하여 사용하였다. 전개가 끝난 후, TLC plate를 발색시약 (0.5% α-naphtol, 5% H_2SO_4 in ethanol)에 담갔다 꺼낸 후, dry oven에 넣고 80°C에서 15분간 말려서 발색시켰다. Glucose, isomaltodextrin와 maltodextrin이 TLC plate 상에서 나타내는 spot의 강도와 그들 농도와의 관계가 선형적으로 비례하였다는 Robyt와 Mukerjea의 논문 (1994)에서의 이론을 근간으로 glucose와 xylose의 양은 TLC를 통하여 정량분석 하였으며, 이 때 단당류의 정량 분석을 위해서 단당류의 spot을 AlphaEase FC softwere (Alpha Innotech, U.S.A)를 이용하여 일차원상의 peak로 전환한 후, 농도를 알고 있는 표준물질과 비교하여 단당류의 함량을 계산하였다.

구멍갈파래 가수분해 추출물이 포함된 CSH 배지는 경제성을 고려하여 CSL과 염류가 포함된 실용적인 배지이다. 그런데 CSL에 약간의 단당류가 포함되어 있다는 연구보고가 있다 (Hull *et al.*, 1996). 본 연구에서 사용한 CSL은 경기도 이천에 위치한 Corn Product Korea에서 부산물로 나오는 것이다. 구멍갈파래 가수분해 추출물의 TLC에서는 본 연구팀의 선행 연구처럼 glucsoe와 xylose만이 확인되었으나 (한 등, 2010), CSL이 포함된 CSH 배지에서는 fructose로 추정되는 단당류가 확인이 되었다 (Fig. 1). CSL만을 TLC로 분석하였을 경우에는 이미 문헌에 보고된 것처럼 fructose로 추정되는 단당류가 확인되었다. 그래서 앞으로 진행되는 연구결과에서 구멍갈파래 가수분해 추출물이 포함된 CSH 배지에서의 *P. stipitis*의 배양은 glucose, xylose, fructose가 포함된 배지에서 바이오 에탄올을 생산하는 과정이라 할 수 있다. 그러나 비록 TLC상에서는 fructose의

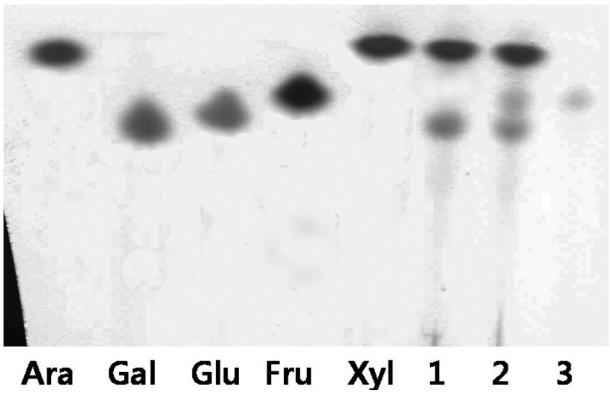

Fig. 1. TLCs of the hydrolysate of *Ulva pertusa* Kjellman (lane 1), the mixture of the hydrolysate and CSL (lane 2), and CSL (lane 3). Ara, Gal, Glu, Fru, and Xyl indicate arabinose, galactose, glucose, fructose, and xylose, as the standards, respectively.

흔적이 확인되지만, fructose의 양은 매우 적어서 연구결과에 미치는 영향이 크지 않기 때문에 앞으로 나오는 모든 결과에서 fructose에 대하여서는 논의 하지 않도록 하였다.

효모 *P. stipitis*를 이용한 구멍갈파래 가수분해 추출물에서의 바이오 에탄올 생산을 위하여 미량의 공기를 배양조 표면으로 첨가하는 반복 회분식 배양을 실시 하였다. 이때 100 mL/min의 공기를 배양조 표면으로 넣어 주었고, 효모 *P. stipitis*는 구멍갈파래 가수분해 추출물의 단당류를 탄소원으로 사용하였으며, CSL과 염류가 첨가된 경제성 있는 배지에서 바이오 에탄올을 생산하게 되었다. Fig. 2에서는 효모 *P. stipitis*의 성장 (Fig. 2A), 총 환원당의 소비 양상 (Fig. 2B), glucose와 xylose의 소비 양상 (Fig. 2C), 그리고 바이오 에탄올의 생산 패턴 (Fig. 2D)을 관찰 할 수 있었다. 이때 36시간 마다 전체 배지를 교체 하였는데, 이는 본 연구팀의 선행연구 결과를 근거로 정하였다 (Yeon *et al*., 2011a). 본 연구 결과에서도 Fig. 2C와 같이 glucose와 xylose의 소비가 완전히 이루어지고 있는 것을 확인 할 수 있었으며, 특히 TLC 결과 상에서도 단당류 glucose와 xylose의 소비 양상을 확인 할 수 있었다 (Fig. 3). 다시 말하면 glucose가 먼저 소비되고, 이후에 xylose가 완전히 소비되는 단당류 소비 양상을 보였다. 또한, 이미 언급한 fructose의 흔적도 TLC상에서 관찰되었다. 이러한 반복 회분식 배양은 180시간

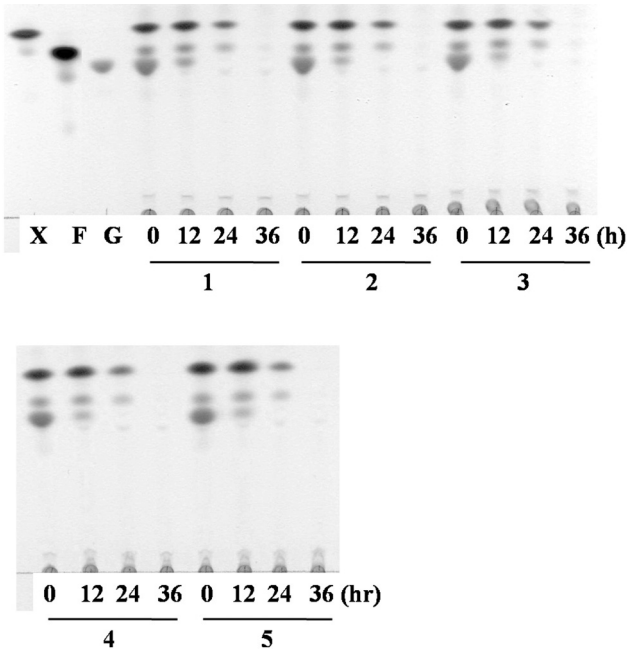

Fig. 3. TLCs of the culture supernatant of repeated-batch culture. X, F, and G indicate xylose, fructose, and glucose, as the standards, respectively. Numbers below the elapsed times indicate the consecutive run numbers in the repeated-batch culture.

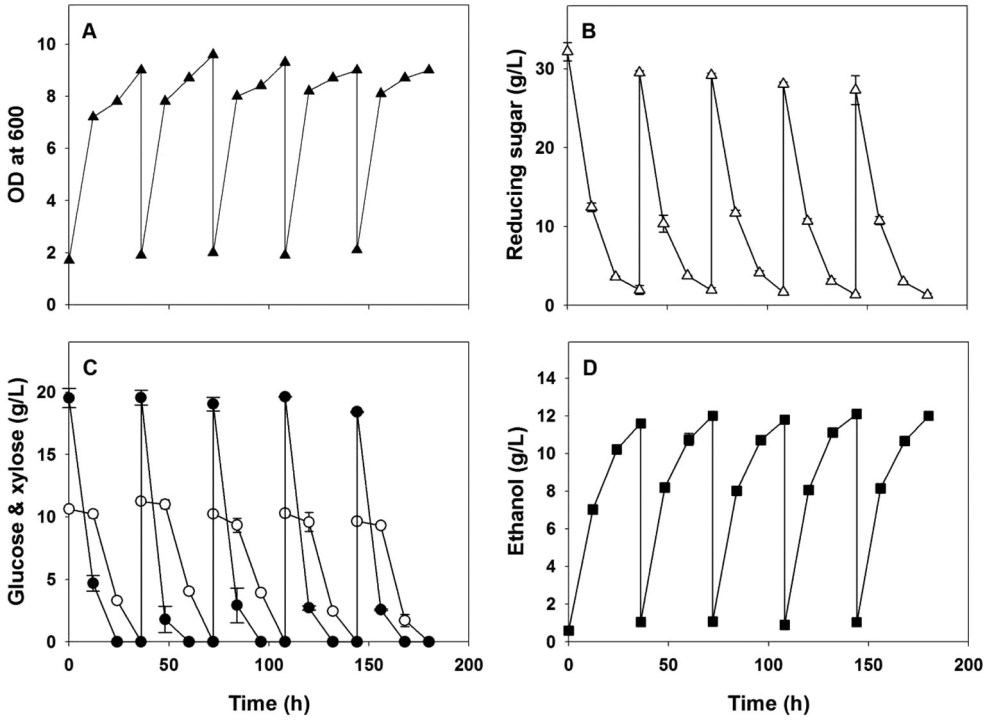

Fig. 2. Repeated-batch culture using a surface-aerated fermentor for bioethanol production from the hydrolysate of *Ulva pertusa* Kjellman. The yeast strain used in this study was *P. stipitis* CBS 7126. The medium was replaced every 36 hr, and air was supplied into headspace of fermentor at a rate of 100 mL/min. A; cell growth, B; reducing sugar concentration in culture supernatant, C; glucose (●) and xylose (○) concentration in culture supernatant, D; bioethanol production. All measurements were performed three times (n = 3) using the same sample, and the average and standard deviation were calculated.

동안 다섯번의 회분배양으로 진행되었으며, 특별한 문제가 없다면 그 이상의 시간 동안도 진행이 가능하였을 것으로 생각된다. 이때 약 30 g/L의 총 환원당으로부터 생산된 반복 회분공정 상의 최고 바이오 에탄올 농도는 평균 11.9 g/L 정도 이었으며, 이는 본 연구 팀의 선행 결과와 유사한 값이다 (연 등, 2010; Yeon *et al.*, 2011a).

본 연구에서 효모 *P. stipitis*를 이용한 구멍갈파래 가수분해 추출물에서의 바이오 에탄올 생산 시, Fig. 2와 같이 반복 회분식 운전을 통하여 일관되게 바이오 에탄올을 생산할 수 있다는 것을 실증 할 수 있었다. 이때의 바이오 에탄올 생산량을 누적 바이오 에탄올 생산량 (CEP, cumulative ethanol production)으로 표시하여 보면, Fig. 4A와 같이 배양 시간에 따라서 비례적으로 증가하는 것을 확인 할 수 있었다. 이는 반복 회분식 공정의 일관된 바이오 에탄올의 생산을 의미하는 것이며, 반복 회분배양을 통하여 구멍갈파래 가수분해 추출물에서부터 최고 약 50 g 가까운 누적 바이오 에탄올 생산량을 보여 주었다. 또한 누적 단당류 소비량 (CSC, cumulative sugar consumption)에 대하여 CEP를 그려보면, Fig. 4B 처럼 직선의 상관관계를 보여 주었다. 이 결과는 구멍갈파래 가수분해 추출물의 단당류 소비가 바이오 에탄올 생산과 직접 관련이 있다는 것을 보여 주는 것이며, 이 관계 그래프의 기울기로 부터 단당류 소비에 대한 바이오 에탄올 수율 (bioethanol yield)을 계산 할 수 있었다. Table 1에는 이로부터 얻어진 바이오 에탄올 수율을 정리하여 놓았다. 두 가지 분석 방법에 의한 단당류 소비에 대한 바이오 에탄올 수율은 0.40 (DNS 방법 기준)과 0.37 (TLC 방법 기준) 이었다. 이는 이론치의 78.4%와 72.5%에 해당하는 바이오 에탄올 수율에 해당한다. 이 때 두 가지 단당류 분석방법을 사용하여 분석하였기 때문에 약간의 바이오 에탄올 수율의 차이가 실험적인 오차의 범위에서 발생하였다. 해조류 추출물에서의 바이오 에탄올 생산에 대한 몇 가지 보고가 있어왔는데, 그 중에서 microalgal biomass (Harun *et al.*, 2010), *Saccharina latissima* (Adams *et al.*, 2009), *Laminaria hyperborean* (Horn *et al.*, 2000) 그리고 brown algae (이 등, 2009a, 2009b)가 대표적인 예이다. 그러나 정량적인 분석과 생산공정에 개발에 관한 보고는 매우 드물며, 바이오 에탄올 수율도 *Laminaria hyperborean* 가수분해물에서 0.18-0.43 (Horn *et al.*, 2000) 그리고 본 연구팀의 모자반 가수분해물의 결과인 0.297-0.353 (연 등, 2010)와 0.386-0.431 (Yeon *et al.*, 2011a) 정도로 보고되고 있다. 그러므로 본 연구에서의 바이오 에탄올 수율은 선행 연구 결과에 비추어 볼 때, 의미 있는 결과라고 할 수 있다. 한편 바이오 에탄올 수율을 보다 정량적으로 분석하기 위하여 건조 구멍갈파래로부터 가수분해 추출물을 거쳐서 바이오 에탄올 생산에 이르는 공정을 정량적으로 분석하여, 건조 구멍갈파래로 부터 얻어지는 바이오 에탄올 수율을 계산하여 보았다 (Table 2). 100 g의 구멍갈파래 분말로부터 가수분해 추출물을 얻어 세배 농축한 용액의 환원당 함량은 30 g/L 이었다. 이로부터 Fig. 2의 결과처럼, 반복 유가식 배양을 통하여 각 batch 마다 평균 11.9 g/L의 바이오 에탄올을 생산할 수 있었다. 그 결과를 분석하여, 1 kg의 건조 구멍갈파래로 부터 39.67 g의 바이오 에탄올을 생산 할 수 있다는 계산 결과를 얻을 수 있었다. 이는 본 연구팀이 선행연구 (연 등, 2010)인 건조 모자반으로부터 얻을 수 있는 바이오 에탄올

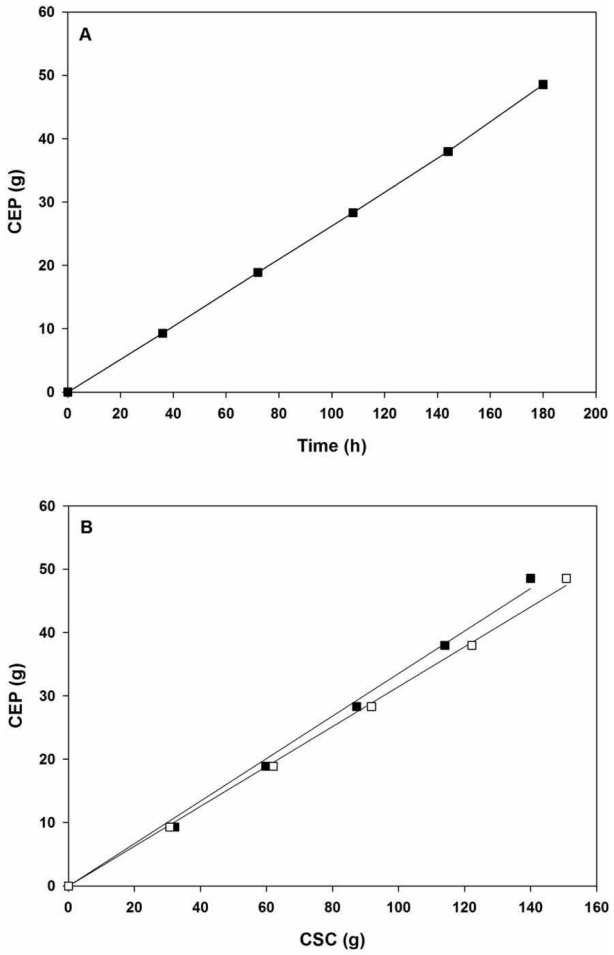

Fig. 4. Cumulative bioethanol production (CEP) from Fig. 2. Bioethanol production and sugar consumption (by DNS assay and quantitative TLC analysis) in the withdrawn culture broths in the repeated-batch culture were cumulated consecutively. A; time-course of CEP, B; CEP vs. CSC (cumulative sugar consumption). In panel B, closed (■) and open square (□) indicate the data from DNS assay, and quantitative TLC, respectively. All the data were calculated from the average values of Fig. 2.

Table 1. Bioethanol yield from the hydrolysate of *U. pertusa* Kjellman

Bioethanol yield (g-ethanol/g-reducing sugar)	
0.40 (DNS[1])	0.37 (TLC[2])

[1]Bioethanol yield based on DNS assay.
[2]Bioethanol yield based on quantitativeTLC analyses of glucose and xylose.

Table 2. Quantitative process analysis and bioethanol yield

Step	Process	Remarks
1	Hydrolysis of the dried powder of *U. pertusa* Kjellman	100 g-powder in 1 liter distilled water
2	Concentration of the hydrolysate	30 g-reducing sugar/L in three-fold concentrated hydrolysate
3	Bioethanol in repeated-batch culture	11.9 ± 0.2^{a} g-bioethanol/L
Bioethanol yield based on dry weight of *U. pertusa* Kjellman		39.67 ± 0.66^{b} g/kg

[a,b]The average of five runs during the repeated-batch culture.

수율인 12.51~23.84 g/kg 보다 약간 높은 값이며, Horn *et al.* (2000)이 *Laminaria hyperborean*의 가수분해물에서 얻은 바이오 에탄올 수율인 3.6~8.6 g/kg 보다는 훨씬 높은 값이라고 할 수 있다.

본 연구에는 배양조 표면으로 미량의 공기를 넣는 방식으로 공기의 공급을 조절한 효모 *P. stipitis* 배양을 통하여 구멍갈파래 가수분해 추출물의 glucose와 xylose를 반복 회분식 방법으로 바이오 에탄올로 전환시킬 수 있다는 것을 보여 주었다고 할 수 있다. 특히 CSL을 배지 성분으로 사용하여, 실용적이고 경제적인 공정 확립이 가능하도록 하였다. 본 연구를 통하여 해조류 구멍갈파래가 바이오 에탄올을 생산하는데 있어서 중요한 단당류의 공급원이 될 수 있음을 증명하여 보여 주었고, 이 때 효모 *P. stipitis*가 구멍갈파래 가수분해 추출물 속의 6탄당인 glucose와 5탄당인 xylose를 효과적으로 바이오 에탄올로 전환시킬 수 있다는 것을 보여 주었다고 할 수 있겠다.

적요

6탄당과 5탄당을 이용할 수 있는 효모 *Picha stipitis*를 이용하여 해조류인 구멍갈파래 가수분해 추출물의 단당류로부터 바이오 에탄올을 생산하는 반복 회분식 공정에 대하여 연구하였다. 이러한 공정이 180시간 까지 반복적으로 이루어질 수 있었으며, 약 30 g/L의 총환원당으로 부터 최고 평균 11.9 g/L의 바이오 에탄올이 생산됨을 확인하였다. 이 때 바이오 에탄올 수율은 0.40 (DNS 방법 기준)과 0.37 (TLC 방법 기준)이었으며, 이는 이론치의 78.4%와 72.5%에 해당하는 바이오 에탄올 수율에 해당한다. 이 결과를 다른 측면에서 분석하면, 본 연구 결과로 얻어진 반복 회분식 공정에서 건조 구멍갈파래 1 kg에서 39.67 g의 바이오 에탄올을 생산 할 수 있다는 결론을 얻게 되었다. 본 연구를 통하여 구멍갈파래의 가수분해 추출물로부터 바이오 에탄올을 생산할 수 있다는 것을 실험적으로 증명하였고, 상업적인 대량생산이 가능한 공정기술로서 반복 회분식 방법이 적합하다는 것을 확인할 수 있었다.

감사의 글

이 연구는 한국해양연구원 (Korea Ocean Research & Development Institute)의 연구비 지원 (Project No. PP00740)에 의하여 이루어졌으며, 이에 심심한 감사를 드립니다.

참고문헌

배태진, 강동수, 최옥수. 2000. 구멍갈파래(*Ulva pertusa*)로부터 Dimethylβpropiothetin 최적추출조건. 한국식품영양과학회지. 29:783-789.

연지현, 서현범, 오성호, 최원석, 강도형, 이현용, 정경환. 2010. 모자반 가수분해물을 이용한 바이오 에탄올 생산. 한국생물공학회지. 25:283-288.

이성목, 김재혁, 조화영, 주현, 이재화. 2009a. 물리화학적 가수분해에 의한 갈조류 바이오 에탄올 생산. 공업화학. 20:517-521.

이성목, 최인순, 김성구, 이재화. 2009b. 효소적 가수분해에 의한 갈조류 바이오 에탄올 생산. 한국생물공학회지. 24:483-488.

한재건, 오성호, 최운용, 권정웅, 서현범, 정경환, 강도형, 이현용. 2010. 고압액화공정을 이용한 구멍갈파래의 발효용 알코올 당화수율 증진. 한국생물공학회지. 25:357-362.

한재건, 하지혜, 이현용, 최영범, 고정임, 강도형. 2009. 구멍갈파래의 면역활성 증진을 위한 추출방법 비교. 한국식품과학회지. 41:380-385.

Adams, J. M., Gallagher, J. A. and Donnison, I. S. 2009. Fermentation study on *Saccharina latissima* for bioethanol production considering variable pre-treatments. *J. Appl. Phycol.* 21:569-574.

Akakabe, Y., Matsui, K. and Kajiwara, T. 1999. Enantioselective α-hydroperoxylation of long-chain fatty acids with crude enzyme of marine green alga *Ulva pertusa. Tetrahedron Lett.* 40:1137-1140.

Chaplin, M. F. and Kennedy, J. F. 1986. Carbohydrate analysis; A practical approach, pp. 3. IRL Press, Oxford, UK.

Grootjen, D. R. J., van der Lans, R. G. J. M. and Luyben, K. Ch. A. M. 1990. Effects of the aeration rate on the fermentation of glucose and xylose by *Pichia stipitis* CBS 5773. *Enzyme Microb. Technol*. 12:20-23.

Harun, R., Danquah, M. K. and Forde, G. M. 2010. Microalgal biomass as a fermentation feedstock for bioethanol production. *J. Chem. Technol. Biotechnol*. 85:199-203.

Horn, S. J., Aasen, I. M. and Østgaard, K. 2000. Ethanol production from seaweed extract. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 25:249-254.

Hull, S. R. Yang, B. Y. Venzke, D., Kulhavy, K. and Montgomery, R. 1996. Composition of corn steep water during steeping *J. Agric. Food Chem.* 44:1857-1863.

Jeffries, T. W. 2006. Engineering yeasts for xylose metabolism. *Curr. Opin. Biotechnol*. 17:320-326.

Ligthelm, M. E., Prior, B. A. and du Preez, J. C. 1988. The oxygen requirements of yeasts for the fermentation of D-xylose and D-glucose to ethanol. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 28:63-68.

Pengzhan, Y., Ning, L., Xiguang, L., Gefei, Z., Quanbin, Z. and Pengcheng, L. 2003a. Antihyperlipidemic effects of different molecular weight sulfated polysaccharides from *Ulva pertusa* (Chlorophyta). *Pharmacol. Res.* 48:543-549.

Pengzhan, Y., Quanbin, Z., Ning, L., Zuhong, X. Yanmei, W. and Li Zhi'en, L. 2003b. Polysaccharides from *Ulva pertusa* (Chlorophyta) and preliminary studies on their antihyperlipidemia activity. *J. Appl. Phycol*. 15:121-127.

Qi, H., Zhang, Q., Zhao, T., Chen, R., Zhang, H., Niu, X. and Li, Z. 2005a. Antioxidant activity of different sulfate content derivatives of polysaccharide extracted from *Ulva pertusa* (Chlorophyta) in vitro. *Int. J. Biol. Macromol*. 37:4195-199.

Qi, H., Zhang, Q., Zhao, T., Hu, R., Zhang, K. and Li, Z. 2006. In vitro antioxidant activity of acetylated and benzoylated derivatives of polysaccharide extracted from *Ulva pertusa* (Chlorophyta). *Bioorg. Med. Chem. Lett*. 16:2441-2445.

Qi, H., Zhao, T., Zhang, Q., Li, Z., Zhao Z. and Xing, R. 2005b. Antioxidant activity of different molecular weight sulfated polysaccharides from *Ulva pertusa* Kjellm (Chlorophyta). *J. Appl. Phycol*. 17:527-534.

Robyt, J. F. and Mukerjea, R. 1994. Separation and quantitative determination of nanogram quantities of maltodextrins and isomaltodextrins by thin-layer chromatography. *Carbohydr. Res.* 251:187-202.

Skoog, K., and Hahn-Hagerdal, B. 1990. Effect of oxygenation on xylose fermentation by *Pichia stipitis. Appl. Environ. Microbiol*. 56:3389-3394.

Watson, N. E., Prior, B. A., du Preez, J. C. and Lategan, P. M. 1984. Oxygen requirements for D-xylose fermentation to ethanol and polyols by *Pachysolen tannophilus*. *Enzyme Microb. Technol*. 6:447-450.

Yeon, J.-H., Lee, S.-E., Choi, W. Y., Kang, D. H., Lee, H.-Y and Jung, K.-H. 2011a. Repeated-batch operation of surface-aerated fermentor for bioethanol production from the hydrolysate of seaweed *Sargassum sagamianum*. *J. Microbiol. Biotechnol*. 21:323-331.

Yeon, J.-H., Lee, S.-E., Choi, W. Y., Choi, W.-S., Kim, I.-C., Lee, H.-Y. and Jung, K.-H. 2011b. Bioethanol production from the hydrolysate of rape stem in a surface-aerated fermentor. *J. Microbiol. Biotechnol*. 21:109-114.