

Malonic acid를 이용한 전처리가 꼬시레기의 가수분해에 미치는 영향

박미라 · 정귀택[†]

부경대학교 생물공학과
48513 부산광역시 남구 용소로 45
(2018년 5월 25일 접수, 2018년 6월 25일 수정본 접수, 2018년 6월 29일 채택)

Effect of Malonic Acid-Catalyzed Pretreatment on the Hydrolysis of *Gracilaria verrucosa*

Mi-Ra Park and Gwi-Taek Jeong[†]

Department of Biotechnology, Pukyong National University, 45 Yongso-ro, Nam-gu, Busan, 48513, Korea
(Received 25 May 2018; Received in revised form 25 June 2018; accepted 29 June 2018)

요 약

본 연구에서는 해양 거대조류 중 홍조류에 속하는 꼬시레기(*Gracilaria verrucosa*)로부터 malonic acid를 사용하여 열수 전처리 조건(전처리 온도, 촉매 농도, 고액비, 전처리 시간)에 따른 전처리와 효소가수분해를 통한 바이오슈거(환원당) 생산 가능성을 조사하였다. 300 mM malonic acid, 1:20 고액비 조건에서 130 °C에서 60분간 전처리를 수행하여 49.2%의 환원당 수율을 얻었다. 전처리 반응 후 이어진 효소 가수분해를 통하여 64.5%의 수율을 확보하였다.

Abstract – In this study, the effects of malonic acid-catalyzed pretreatment on the subsequent enzymatic hydrolysis of red macro-algae *Gracilaria verrucosa* for production of biosugar (total reducing sugar) were investigated. In the hydrothermal pretreatment condition of 300 mM malonic acid, 1:20 solid-to-liquid ratio at 130 °C for 60 min, a 49.2% bio-sugar yield was achieved. Moreover, by subsequent enzymatic hydrolysis after pretreatment, maximum yield of 64.5% was achieved.

Key words: *Gracilaria verrucosa*, Malonic acid-catalyzed pretreatment, Subsequent enzymatic hydrolysis, Biosugar, Total reducing sugar

1. 서 론

해양자원 중 하나인 해조류는 거대조류(macro-algae)와 미세조류(micro-algae)로 구분한다[1-4]. 미세조류는 최근 바이오연료 및 건강식품의 원료로서 사용하기 위하여 많은 연구가 수행되어 일부 상용화가 이루어지고 있다[5,6]. 거대조류는 한국을 포함한 일부 나라에서 그 자체로 식용으로 사용되고 있으며, agar, carrageenan, alginate 등과 같은 거대조류 유래의 폴리머들이 식용 및 산업용으로 사용되고 있다[7-9]. 최근에는 거대조류 유래의 탄수화물을 이용하여 바이오에탄올, 바이오부탄올과 같은 바이오연료 및 화학소재를 생산하는 연구가 수행되고 있다[1,8,10-12]. 거대조류는 일반적으로 녹조류(green-algae), 홍조류(red-algae), 갈조류(brown-algae)로 분류하고 있으며[4,10,11,13], 거대조류의 종(species), 서식장소, 기후, 채취시기 등에 따라 탄수화물, 지질, 단백질, 미량원소 등의 구성성분의 종류와 함량이 다르다[4,10,11,13].

본 연구에 사용한 꼬시레기(*Gracilaria verrucosa*)는 agarophyte의 홍조류(Rhodophyta) 중 하나로 한국을 포함한 여러 아시아 지역에서 자생하고 양식되고 있다[8,9,12,14]. 꼬시레기는 우뚝가사리와 같이 식품과 agar 생산에 산업적으로 널리 이용되고 있다[8,9,12,14]. 꼬시레기의 주요 저장 탄수화물은 agar로 D-galactose와 3,6-anhydro-L-galactopyranose로 구성되어 있다. 최근 꼬시레기를 이용한 바이오에탄올 생산 연구가 수행되고 있다[8,14].

목질계 자원과 더불어 거대조류 및 거대조류 유래의 고분자 탄수화물로부터 발효 가능한 단당(바이오슈거)을 얻기 위해서는 적절한 전처리 방법을 통하여 효소 당화가 용이하도록 하여야 하고, 전처리 공정에 이은 적절한 효소 당화공정이 최적화되어야 한다[4,8,9,12,15]. 이를 위한 전처리 방법에는 물리적, 화학적, 생물학적인 방법이 단독 또는 복합적으로 이용되고 있다[4,8,9,12,15]. 기존의 거대조류의 전처리에는 주로 황산, 염산 등의 강산을 사용하여 고온 조건에서 직접 산 당화를 하거나 낮은 온도에서 전처리한 경우가 보고되었다[1,7,8,10-12,14]. 강산을 사용하는 경우에는 당의 과분해가 일어나 생성물의 사용가능성의 제한 및 정제과정을 수반해야 하는 문제점이 있다[7,8,12,14].

본 연구에 사용한 malonic acid (propanedioic acid; CH₂(COOH)₂;

[†]To whom correspondence should be addressed.

E-mail: gtjeong@pknu.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

$pK_{a1}=2.83$, $pK_{a2}=5.69$ 는 두 번째로 작은 aliphatic dicarboxylic acid이다. Malonic acid는 물에 높은 용해도를 가지며, specialty polyesters의 전구체, 그리고 barbiturates, coatings, biodegradable containers의 제조에 사용된다. 최근에는 재조합 yeast를 이용하여 당으로부터 malonic acid의 생산을 진행중에 있다[16]. Hu [17]등은 choline chloride와 malonic acid 기반의 deep eutectic solvent (DES)를 이용하여 기능성 pyrroles을 제조하는데 효율적이고 재사용가능한 촉매시스템으로 적용하였다. 그러나, 아직 malonic acid를 촉매로 사용하여 바이오매스를 전처리와 관련된 연구는 아직 보고되고 있지 않다. 강한 산성을 나타내는 산촉매 시스템을 사용할 경우에는 고분자 탄수화물의 과분해가 일어나 생성 당의 수율 감소 및 부산물의 생성 증가 등의 문제점이 발생한다[7,8,12,14]. 본 연구에서는 malonic acid의 두 개의 카르복실기가 나타내는 pH 범위의 산성도를 이용하여 꼬시레기의 전처리에 적용하고자 하였다.

본 연구에서는 해양 거대조류 중 홍조류에 속하는 꼬시레기(*G. verrucosa*)를 대상으로 malonic acid를 촉매로 사용한 열수 전처리와 이어지는 효소 가수분해를 통하여 바이오슈거(환원당)의 생성에 미치는 전처리 조건의 영향을 조사하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2-1. 실험재료

실험에 사용한 꼬시레기(*G. verrucosa*)는 전남 완도에서 수확하여 건조한 것을 증류수로 3회 세척하여 염 등의 이물질을 제거한 후 동결건조하여 분쇄한 후, 체를 이용하여 200 μm 이하의 분말만을 수집하여 실험에 사용하였다. Malonic acid (Alfa Aesar, England), citric acid, sodium hydroxide (Junsei Chemical Co., Ltd., Japan) 등은 특급시약을 사용하였다. 실험에 사용한 효소는 상용효소인 Cellic CTec II (cellulase, β -glucosidase; Novozyme 사, 덴마크), Viscozyme L (cellulase, amylase, xylanase 등; Novozyme 사, 덴마크), 그리고 Cellic HTec II (hemicellulase; Novozyme 사, 덴마크)를 사용하였다.

2-2. 바이오매스 전처리

Malonic acid를 이용한 꼬시레기 전처리를 위하여 다음과 같이 실시하였다. 100 mL 용기에 꼬시레기 분말 2 g과 일정 농도의 전처리용 촉매로 malonic acid 용액을 설정한 고액비(solid-to-liquid ratio)로 첨가하였다. 충분한 침지를 위하여 상온에서 30분간 교반한 후 밀폐하여 autoclave (MaXterile 60, DAIHAN Scientific Co., Ltd., Korea)을 사용하여 설정한 온도로 가열하면서 전처리하였다. 전처리 시간은 autoclave의 온도가 설정온도에 도달한 시간을 0분으로 하여 설정하였다. 전처리 후 생성물은 효소가수분해에 사용하였다.

2-2-1. 전처리 온도의 영향

전처리에 미치는 전처리 온도의 영향을 조사하기 위하여 바이오매스와 malonic acid 용액(200 mM)의 비를 1:10으로 설정하여 90~130 °C에서 60분 동안 autoclave를 사용하여 전처리한 후, 효소가수분해를 수행하여 얻은 환원당의 양을 비교하였다.

2-2-2. Malonic acid 농도의 영향

전처리에 미치는 malonic acid 농도의 영향을 조사하기 위하여

바이오매스와 malonic acid 용액의 비를 1:10으로 설정하여 malonic acid의 농도를 100~400 mM의 범위에서 autoclave를 이용하여 130 °C에서 60분 동안 전처리한 후, 효소가수분해를 수행하여 얻은 환원당의 양을 비교하였다.

2-2-3. 고액비의 영향

전처리에 미치는 고액비(solid-to-liquid ratio)의 영향을 조사하기 위하여 바이오매스와 malonic acid 용액의 비를 1:6에서 1:20의 범위로 설정하여 autoclave를 사용하여 130 °C에서 60분 동안 전처리한 후, 효소가수분해를 수행하여 얻은 환원당의 양을 비교하였다.

2-2-4. 전처리 시간의 영향

전처리에 미치는 전처리 시간의 영향을 조사하기 위하여 바이오매스와 malonic acid 용액(300 mM)의 비를 1:20으로 설정하여 autoclave를 이용하여 130 °C에서 0~120분 동안 전처리한 후, 효소가수분해를 수행하여 얻은 환원당의 양을 비교하였다. 전처리 0분은 autoclave의 온도가 130 °C에 도달한 시간을 의미한다.

2-3. 효소 가수분해

해조류의 탄수화물 구조 및 구성은 목질계 자원보다 알려져 있지 않고 복잡하기 때문에 다양한 탄수화물 분해 효소를 사용하였다. 본 연구에서 가수분해에 사용한 혼합 효소는 김 등[4]의 연구에서 높은 수율을 나타낸 혼합 효소인 Viscozyme L과 Cellic CTec II, 그리고 Cellic HTec II를 1:1:0.1의 비율로 혼합하여 사용하였다. 효소가수분해는 전처리된 꼬시레기 용액을 sodium hydroxide 용액으로 pH를 5.0으로 조절한 후, 혼합효소액(Cellic CTec II: Viscozyme L: Cellic HTec II = 1:1:0.1 (v/v/v); 바이오매스 기준 20%)을 첨가하여 shaking incubator에서 50 °C에서 180 rpm으로 교반하면서 48시간 동안 효소반응을 수행하였다.

2-4. 분석방법

전처리 및 효소당화 후 생성된 환원당은 DNS법과 분광광도계 (Spekol 1300, Analytik Jena, Germany)를 이용하여 580 nm에서 측정하였다[18].

3. 결과 및 고찰

꼬시레기를 대상으로 malonic acid를 촉매로 사용한 열수 전처리법이 효소가수분해와 환원당 생성에 미치는 영향을 조사하였다. 열수 전처리 조건으로 전처리 온도, 촉매 농도, 고액비, 전처리 시간에 대한 영향을 조사하였다.

3-1. 반응온도의 영향

전처리 온도의 영향을 조사하기 위하여 200 mM malonic acid를 사용하여 고액비를 1:10으로 설정하여 90~130 °C의 조건에서 60분 동안 전처리한 후, 48시간 동안 효소가수분해하여 얻은 환원당 생성 수율을 비교한 결과를 Fig. 1에 나타내었다. 전처리 후 환원당의 생산은 전처리 온도가 높아질수록 환원당의 생성 수율이 증가하는 경향을 나타내었다. 130 °C에서 가장 높은 36.6%의 수율을 나타내었다. 또한 전처리 반응 후 효소가수분해에 의한 환원당 생성 수율은 전처리 결과와 유사하게 전처리 온도가 높아질수록 환원당의 생성

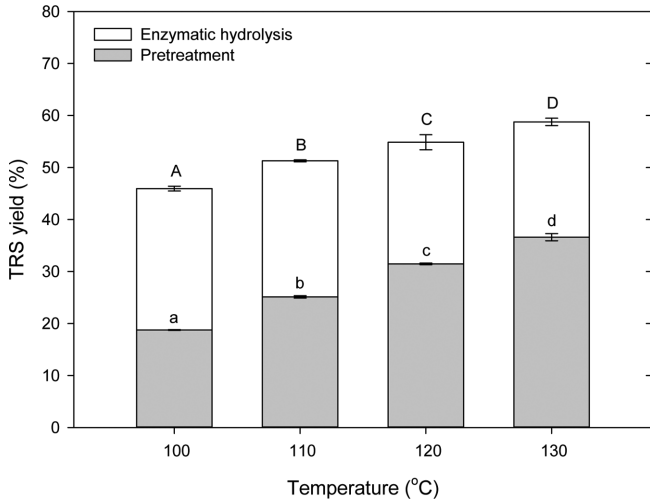


Fig. 1. Effect of pretreatment temperature on pretreatment and subsequent enzymatic hydrolysis of *G. verrucosa*. Different large and small letters indicate significant differences ($P < 0.05$, Duncan's test).

수율이 증가하는 경향을 나타내었다. 130 °C에서 가장 높은 58.78%의 수율을 나타내었다. 그러나 전처리 후 순수하게 효소당화에 의해 증가된 수율은 100 °C의 조건에서 27.21%로 다른 전처리 온도 조건에 비하여 최대 5% 정도 높게 나타났다. 이와 비교할 만한 결과로 Kwan 등[9]은 citric acid를 촉매로 사용한 전처리 및 효소당화 연구에서 반응온도가 증가함에 따라 환원당 수율도 증가하여 130 °C, 60분의 조건에서 전처리에 의해 31.95%, 그리고 이어진 효소당화에 의해 45.04%의 결과를 보고하였다. 이러한 결과는 malonic acid를 촉매로 사용하여 높은 전처리 온도 조건에서 반응을 수행함으로써 효소활성을 구성하고 있는 탄수화물 고분자들의 결합이 전처리 과정에서 상당부분 저분자화되었고, 이로 인한 효소와 기질의 표면적이 증가한 결과라고 판단된다[13,15].

3-2. Malonic acid 농도의 영향

전처리에 미치는 촉매(malonic acid) 농도의 영향을 조사하기 위하여 고액비를 1:10으로 설정하고 malonic acid의 농도를 100~400 mM의 범위로 조절하여 130 °C의 조건에서 60분 동안 전처리한 후, 48시간 동안 효소 가수분해하여 얻은 환원당 생성 수율을 비교한 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 전처리 후 환원당의 생성은 촉매 농도가 높아 질수록 환원당의 생성 수율이 증가하는 경향을 나타내었다. 300 mM에서 가장 높은 40.3%의 수율을 나타내었다. 반면 증류수만을 사용한 경우에는 1.03%의 낮은 수율을 나타내었다. 또한 전처리 반응 후 효소가수분해에 의한 환원당 생성 수율은 증류수만을 사용한 경우에 있어서 35.8%의 환원당 수율을 나타내었다. 반면에 100 mM의 malonic acid를 사용한 경우에는 5.78%의 수율을 나타내었다. 150 mM에서 400 mM의 범위에서 효소가수분해에 의해 비슷한 환원당 수율을 나타내었다. 촉매 농도에 따른 전처리된 바이오매스 용액에 대한 효소가수분해에 의해 증가된 환원당의 수율은 전처리에 사용한 malonic acid 농도에 따라 18.6~23.4%로 나타났다. 이와 비교할만한 결과로는 Kwon 등[9]은 citric acid를 촉매로 사용한 열수 전처리(120 °C, 60분)에서 촉매 농도가 증가할수록 환원당 수율도 증가하다가 0.5 M citric acid 조건에서 42.7%의 수율을 보고하였다.

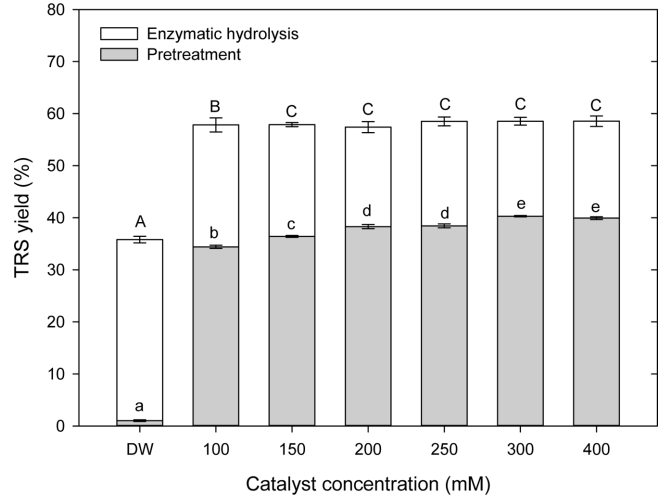


Fig. 2. Effect of malonic acid concentration on pretreatment and subsequent enzymatic hydrolysis of *G. verrucosa*. Different large and small letters indicate significant differences ($P < 0.05$, Duncan's test).

또한 Kim 등[4]은 창자파래(*Enteromorpha intestinalis*)를 대상으로 0.25 M의 citrate buffer에서 전처리와 효소 가수분해를 통하여 각각 5.40%와 18.68%의 수율을 보고하였다.

3-3. 고액비의 영향

전처리에 미치는 고액비의 영향을 조사하기 위하여 고액비를 1:6, 1:8, 1:10, 1:12.5, 1:15 그리고 1:20의 비율로 설정하고 300 mM의 malonic acid를 이용하여 130 °C의 조건에서 60분 동안 전처리한 후, 48시간 동안 효소 가수분해하여 얻은 환원당 생성 수율을 비교한 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 전처리 후 고액비에 따른 환원당의 생성 수율은 고액비가 증가할수록 42.6%에서 50.2%로 증가하는 경향을 나타내었다. 고액비 1:20에서 가장 높은 50.2%의 수율을 나타내었다. 전처리 후 효소가수분해에 의한 환원당 생성 수율은 고

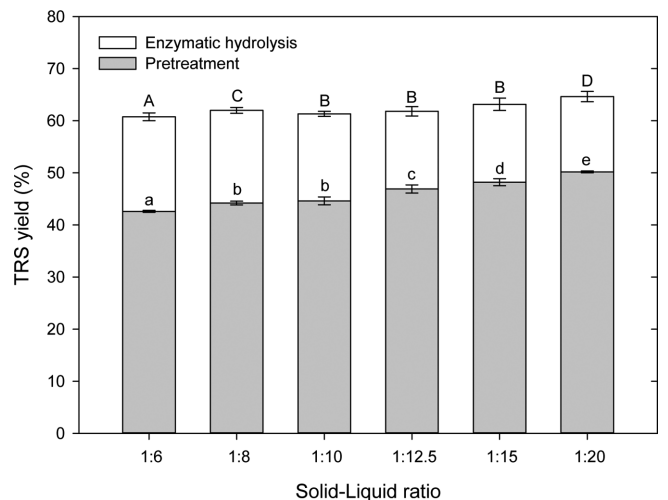


Fig. 3. Effect of solid-to-liquid ratio on pretreatment and subsequent enzymatic hydrolysis of *G. verrucosa*. Different large and small letters indicate significant differences ($P < 0.05$, Duncan's test).

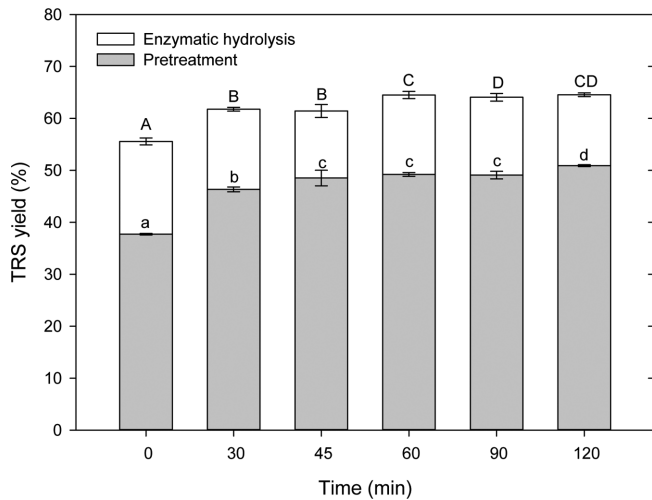


Fig. 4. Effect of pretreatment time on pretreatment and subsequent enzymatic hydrolysis of *G. verrucosa*. Different large and small letters indicate significant differences ($P < 0.05$, Duncan's test).

액비가 증가할수록 60.8%에서 64.6%로 증가하는 경향을 나타내었다. 고액비에 따라 전처리된 바이오매스 용액에 대한 효소가수분해에 의해 증가된 환원당의 수율은 고액비가 증가함에 따라 18.2-14.4%로 감소하는 경향을 나타내었다. 이는 낮은 고액비 조건에서 malonic acid를 촉매로 사용한 열수 전처리 과정에서 상대적으로 높은 고액비 조건과 달리 촉매와 바이오매스 간의 접촉이 상대적으로 낮아 전처리에 의한 환원당 생성이 낮았고, 이후 전처리 과정에서 남은 고분자 물질들이 효소당화에서는 보다 많은 농도의 기질로 작용하여 효소에 의해 보다 높은 환원당 생성 수율이 나타난 것으로 판단된다[9,19,20].

3-4. 전처리 시간의 영향

전처리에 미치는 전처리 시간의 영향을 조사하기 위하여 고액비를 1:20의 비율로 설정하고 300 mM의 malonic acid를 이용하여 130 °C의 조건에서 0~120분 동안 전처리한 후, 48시간 동안 효소가수분해하여 얻은 환원당 생성 수율을 비교한 결과를 Fig. 4에 나타내었다. 전처리 반응시간에 따른 환원당의 생성 수율은 반응시간에 따라 37.7%에서 50.9%까지 증가하는 경향을 나타내었다. 전처리 시간 0분은 autoclave의 온도가 130 °C에 도달한 직후 전처리를 끝낸 경우로 37.7%의 수율을 나타내었다. 전처리 120분에서 가장 높은 50.9%의 수율을 나타내었지만, 45분 이후에서 48.5% 이상의 수율을 유지하였다. 전처리 후 효소가수분해에 의한 환원당 생성 수율 또한 전처리 시간이 증가할수록 증가하는 경향을 나타내었으나, 60분 이후에 64.5% 정도의 수율을 유지하였다. Malonic acid를 촉매로 사용한 열수 전처리와 이어진 효소당화로 꼬시레기의 가수분해에 60분 정도의 전처리 시간이 적절하다고 판단된다.

4. 결 론

본 연구에서는 꼬시레기(*G. verrucosa*)로부터 바이오슈거(환원당)를 생산하기 위하여 malonic acid를 촉매로 사용한 열수 전처리 조건의 영향과 전처리에 이은 효소가수분해를 통한 바이오슈거(환원당) 생산을 조사한 결과, 300 mM malonic acid, 1:20 고액비, 그리고

130 °C에서 60분간 전처리하여 49.2%의 환원당 수율을 얻었으며, 후속의 효소가수분해를 통하여 64.5%의 수율을 얻었다. 이상의 연구 결과로부터 꼬시레기로부터 바이오리파이너리 공정에 원료로 사용될 수 있는 바이오슈거를 생산하는데 malonic acid와 열수 전처리 공정의 적용가능성을 확인하였다.

감 사

This work was supported by a Research Grant of Pukyong National University (2017 Year).

References

1. Ra, C. H., Lee, H. J., Shin, M. K. and Kim, S. K., "Bioethanol Production from Seaweed *Gelidium amansii* for Separated Hydrolysis and Fermentation (SHF)," *KSBB J.*, **28**(5), 282-286(2013).
2. Jeong, G. T. and Park, D. H., "Effect of Reaction Factor on Reducing Sugar Production from *Enteromorpha intestinalis* Using Solid Acid Catalyst," *Korean Chem. Eng. Res.*, **53**, 1-4(2015).
3. Kim, A. R., Kim, D. H. and Jeong, G. T., "Optimum Reaction Condition of Enzymatic Hydrolysis for Production of Reducing Sugar from *Enteromorpha Intestinalis*," *KSBB J.*, **30**, 53-57(2015).
4. Kim, D. H., Kim, A. R., Park, D. H. and Jeong, G. T., "Production of Total Reducing Sugar from *Enteromorpha intestinalis* Using Citrate Buffer Pretreatment and Subsequent Enzymatic Hydrolysis," *Korean Chem. Eng. Res.*, **54**, 70-74(2016).
5. Pierobon, S. C., Cheng, X., Graham, P. J., Nguyen, B., Karakolis, E. G. and Sinton, D., "Emerging Microalgae Technology: a Review," *Sustainable Energy Fuels*, **2**, 13-38(2018).
6. Odjajare, E. C., Mutanda, T. and Olaniran, A. O., "Potential Biotechnological Application of Microalgae: a Critical Review," *Critical Reviews in Biotechnology*, **37**, 37-52(2015).
7. Meinita, M. D. N., Hong, Y. K. and Jeong, G. T., "Comparison of Sulfuric and Hydrochloric Acids as Catalysts in Hydrolysis of *Kappaphycus alvarezii* (cottonii)," *Bioprocess Biosyst. Eng.*, **35**, 123-128(2012).
8. Ra, C. H., Choi, J. G., Kang, C. H., Sunwoo, I. Y., Jeong G. T. and Kim, S. K., "Thermal Acid Hydrolysis Pretreatment, Enzymatic Saccharification and Ethanol Fermentation from Red Seaweed, *Gracilaria verrucosa*," *Micobiol. Biotechnol. Lett.*, **43**, 9-15(2015).
9. Kwon, O. M., Kim, D. H., Kim, S. K. and Jeong, G. T., "Production of Sugars from Macro-algae *Gracilaria verrucosa* Using Combined Process of Citric Acid-catalyzed Pretreatment and Enzymatic Hydrolysis," *Algal Res.*, **13**, 293-297(2016).
10. Cho, Y. K., Kim, M. J. and Kim, S. K., "Ethanol Production from Seaweed, *Enteromorpha intestinalis*, by Separate Hydrolysis and Fermentation (SHF) and Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF) with *Saccharomyces cerevisiae*," *KSBB J.*, **28**(6), 366-371(2013).
11. Jeong, G. T. and Park, D. H., "Production of Sugars and Levulinic Acid from Marine Biomass *Gelidium amansi*," *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **161**, 41-52(2010).
12. Jeong, G. T., Ra, C. H., Hong, Y. K., Kim, J. K., Kong, I. S., Kim, S. K. and Park, D. H., "Conversion of Red-algae *Gracilaria verrucosa* to Sugars, Levulinic Acid and 5-hydroxymethylfurfural," *Bioprocess Biosyst. Eng.*, **38**, 207-217(2015).

13. Kim, D. H., Lee, S. B. and Jeong, G. T., "Production of Reducing Sugar from *Enteromorpha intestinalis* by Hydrothermal and Enzymatic Hydrolysis," *Bioresour. Technol.*, **161**, 348-353(2014).
14. Ra, C. H., Kim, Y. J., Lee, S. Y., Jeong, G. T. and Kim, S. K., "Effects of Galactose Adaptation in Yeast for Ethanol Fermentation from Red Seaweed, *Gracilaria verrucosa*," *Bioprocess Biosyst. Eng.*, **38**, 1715-1722(2015).
15. Ayeni, A. O., Omoleye, J. A., Mudliar, S., Hymore, F. K. and Pandey, R. A., "Utilization of Lignocellulosic Waste for Ethanol Production: Enzymatic Digestibility and Fermentation of Pretreated Shea Tree Sawdust," *Korean J. Chem. Eng.*, **31**, 1180-1186(2014).
16. American Chemical Society, "Molecule of the Week Archive : Malonic acid," <https://www.acs.org/content/acs/en/molecule-of-the-week/archive/m/malonic-acid.html>, March 21, 2017.
17. Hu, H. C., Liu, Y. H., Li, B. L., Cui, Z. S. and Zhang, Z. H., "Deep Eutectic Solvent Based on Choline Chloride and Malonic Acid as an Efficient and Reusable Catalytic System for One-pot Synthesis of Functionalized Pyrroles," *RSC Adv.*, **5**, 7720-7728(2015).
18. Miller, G. L., "Using Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar," *Anal. Chem.*, **31**, 426-428(1959).
19. Jeong, G. T., Kim, S. K. and Park, D. H., "Application of Solid-acid Catalyst and Marine Macroalgae *Gracilaria verrucosa* to Production of Fermentable Sugars," *Bioresour. Technol.*, **181**, 1-6 (2015).
20. Tan, I. S., Lam, M. K. and Lee, K. T., "Hydrolysis of Macroalgae Using Heterogeneous Catalyst for Bioethanol Production," *Carbohydr. Polym.*, **94**, 561-566(2013).