

해조류 바이오매스로부터 바이오슈거 생산 - 열수 및 냉동 전처리의 영향

유한나, 박미라, 정귀택*

Production of Biosugar from Macroalgae Biomass - Effects of Hot-water and Freezing Pretreatments

Hanna Yu, Mi-Ra Park, and Gwi-Taek Jeong*

Received: 16 January 2018 / Revised: 20 February 2018 / Accepted: 21 February 2018

© 2018 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

Abstract: In this study, the production of reducing sugar from red-algae *Gracilaria verrucosa* was investigated using hot-water and freezing pretreatments and subsequent enzymatic hydrolysis. In hot-water pretreatment, 2.16% total reducing sugar (TRS) yield (3.62% based on carbohydrate) was obtained under the condition of 130°C and 120 min. By subsequent enzymatic hydrolysis, 27.9% TRS yield (46.8% based on carbohydrate) was achieved. In the freezing pretreatment, about 20% TRS yields were similarly obtained in the range of -70°C to -20°C. Also, solid-to-liquid ratio of 1:10-1:15 presented the similar TRS yield. Moreover, freezing time did not affect TRS yield within tested range of 48 hr. In freezing pretreatment, 3.15% TRS yield (5.28% based on carbohydrate) was obtained under the condition of -70°C and 48 hr. By subsequent enzymatic hydrolysis, 19.5% TRS yield (32.7% based on carbohydrate) was achieved. From these results, hot-water and freezing pretreatments are available to produce biosugar from *G. verrucosa* for bio-refinery process.

Keywords: red-algae, *Gracilaria verrucosa*, hot-water pretreatment, freezing pretreatment, biosugar

1. INTRODUCTION

기후변화와 화석에너지의 고갈, 그리고 친환경적 대체 자원 및 에너지의 필요성 증대로 인하여 다양한 신규 에너지원에 대한 연구 및 개발이 이루어지고 있다 [1,2]. 또한 다양한 바이오매스 자원 중 최근 해양자원에 대한 관심이 증가하고 있다. 이 중 해양 거대조류 (marine macro-algae)를 자원으로 이용하고자하는 연구가 주목받고 있다 [2-6]. 해양에 존재하는 해양조류는 크게 거대조류와 미세조류로 나뉘는데, 현재 미세조류는 주로 기름을 이용하기 위한 연구가 주로 이루어지고 있다 [7,8]. 그와는 다르게 거대조류는 세포의 구성 물질 중 당류 (carbohydrates)를 이용하여 바이오연료 (에탄올, 부탄올 등)와 화학소재 (5-HMF, 유기산 등)의 생산에 관한 연구개발이 이루어지고 있다 [3-6,9-11]. 해양조류는 탄수화물, 지방 등의 조성 및 함량이 종류, 장소, 채취 시기 등에 따라 다양하고, 2,400종 이상의 해양조류 유래의 천연물질이 사용되고 있다 [2-6,10,12].

본 연구의 재료로 사용한 꼬시레기 (*Gracilaria verrucosa*)는 해양 거대조류 중 홍조류 (red algae)로 꼬시레기과에 속한다. 속명인 *Gracilaria*는 가늘다 (*gracilis*)라는 뜻과 종명인 *verrucosa*는 혹 모양 돌기 (*verrucosus*)라는 뜻을 가지고 있다 [13]. 몸체는 관상근에서 모여 나오고 실 모양 또는 원주모양을 가지고 있다. 동속에는 각시꼬시레기, 깨꼬시레기, 잎꼬시레기, 꼬불꼬시레기 등이 있다 [13]. 일본, 사할린, 타이완, 동남아 등 세계 각지에 널리 분포 서식하고 있다. 국내에서는 자연채취 및 양식을 통하여 주로 식용이나 한천 제조에 사용되고 있다. 최근 해조류를 이용한 바이오연료 및 화학원료 생산에 홍조류인 꼬시레기가 사용되어 바이오에탄올, 유기산

부경대학교 생물공학과
Department of Biotechnology, Pukyong National University, Busan
48513, Republic of Korea
Tel: +82-51-629-5869, Fax: +82-51-629-5863
e-mail: gtjeong@pknu.ac.kr

등의 생산에 사용되고 있다 [6,14-16].

해조류로부터 당을 추출하기 위해서는 물리적, 화학적, 생물학적인 방법들을 단독 또는 조합하여 적용하고 있으며, 각각의 장단점을 가지고 있다. 효소 당화를 수행할 경우에는 선택성은 우수하나 특정 효소를 사용함으로써 가격 면에서 단점을 지닌다. 열화학적 방법의 경우에는 비용 면에서는 우수하나 독성 부산물의 생성이라는 단점을 가지고 있다 [2-4,6,11,14]. 동결 전처리 (freeze pretreatment)는 물이 동결되면서 밀도는 감소하고 부피가 증가하는 기본 물성을 이용한 물리적 전처리 방법이다 [17]. 이러한 전처리 방법은 일부 목질계 바이오매스의 전처리에 사용되었다 [17-19].

본 연구에서는 해양조류 중 홍조류에 속하는 꼬시레기 (*G. verrucosa*)로부터 열수 전처리, 냉동 전처리, 그리고 효소당화방법을 이용하여 바이오에너지 자원으로 전환 가능한 바이오슈거 (환원당)로 전환하는데 요구되는 반응조건을 탐색하고자 하였다.

2. MATERIALS AND METHOD

2.1. 실험재료

실험에 재료로 사용한 꼬시레기 (*G. verrucosa*, 전남 완도, 2012년 수확)는 60°C에서 2일간 건조한 후 분쇄한 후 체를 이용하여 200 μm 이하로 분체하여 실험에 사용하였다 [16]. 실험에 사용한 꼬시레기는 바이오매스 중량 기준으로 59.64±0.71%의 탄수화물 (환원당)을 포함하고 있다 [20]. 실험에 사용한 효소는 Novozyme 사 (Denmark)의 Cellic[®] CTec2, Cellic[®] HTec2와 Viscozyme[®] L을 사용하였다. 실험에 사용한 상용효소의 특성은 다음과 같다. Cellic[®] CTec2는 주로 cellulase와 β -glucosidase, 그리고 hemicellulase로 구성되어 있다. Cellic[®] HTec2는 주로 β -glucosidase와 endo-xylanase로 구성되어 있다. 그리고 Viscozyme[®] L은 cellulase, β -glucanase, arabinase, hemicellulase, xylanase와 같은 다양한 탄수화물 분해 효소로 구성되어 있다 [13,21].

2.2. 꼬시레기 전처리

2.2.1. 열수 전처리 (Hot-water pretreatment)

꼬시레기의 가수분해에 미치는 열수 전처리의 영향을 조사하기 위하여 다음과 같이 실험을 실시하였다. 전처리 실험은 뚜껑이 있는 유리 용기에 설정한 양 (2 g)의 바이오매스와 증류수 (30 mL)를 첨가하여 autoclave를 이용하여 설정한 온도와 반응시간 동안 열수 전처리를 실시하였다. 전처리 반응시간 0분의 조건은 반응물을 autoclave에서 130°C에 도달하였을 때의 시간을 0분으로 설정하였다. 전처리 후 생성물을 pH 5로 조절하여 효소가수 분해의 시료로 사용하였다. 반응온도의 영향은 100~130°C의 조건으로 60분 동안 전처리하였다. 반응시간의 영향은 130°C의 조건에서 반응시간을 0~120분의 조건에서 전처리하였다.

2.2.2. 동결 전처리

꼬시레기의 가수분해에 미치는 동결 전처리 (freezing pretreatment)의 영향은 다음과 같은 방법으로 실시하였다. 전처리 실험은 뚜껑이 있는 유리 용기를 사용하여 실험에서 설정한 양의 바이오매스와 증류수를 첨가한 후 냉동고를 이용하여 설정한 온도와 반응시간 동안 전처리를 수행하였다. 전처리 후 생성물을 pH 5로 조절하여 효소가수 분해의 시료로 사용하였다. 냉동온도의 영향은 설정한 양 (2 g)의 바이오매스와 증류수를 첨가한 후, -70, -40, -20, 4, 20°C의 조건으로 2일 동안 전처리하였다. 고액비의 영향은 1:6, 1:8, 1:10, 1:12.5, 1:15로 설정하여 2일 동안 전처리하였다.

2.2.3. 효소가수분해

효소가수분해는 각각의 조건에서 전처리된 기질용액 10 mL에 citrate buffer (0.05 M, pH 5)와 효소 복합물 (Cellic[®] CTec2: Viscozyme[®] L : Cellic[®] HTec2, 1:1:0.1, v/v/v)을 기질 중량의 20%가 되도록 첨가하여 효소 당화반응을 실시하였다. Sodium azide를 첨가하여 효소당화 반응 중 미생물의 성장을 억제하였다. 효소가수분해 반응은 50°C, 150 rpm의 조건에서 48시간 동안 수행한 후 시료를 취하여 15,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 얻은 상등액을 이용하여 환원당의 양을 측정하는데 사용하였다.

2.3. 분석방법

시료 중의 환원당은 3,5-dinitrosalicylic acid법을 이용하여 분광광도계 (Spekol 1300, Analytik Jena, Germany)를 이용하여 흡광도 (580 nm)를 측정하여 환원당 농도를 환산하였다. 환원당의 표준시료로는 glucose를 사용하였다 [22]. 환원당 수율은 바이오매스 중량을 기준으로 생산된 환원당의 양의 수율로 계산하였다.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. 열수 전처리 (Hot-water pretreatment)의 영향

꼬시레기의 가수분해에 미치는 열수 전처리의 영향을 알아 보기 위하여 반응온도와 반응시간의 영향을 조사하였다. 반응온도의 영향은 100~130°C의 조건으로 60분 동안 전처리하였다. 또한 전처리한 꼬시레기 전처리 액의 pH를 5로 조절한 후에 효소를 첨가하여 전처리 반응온도가 효소 당화에 미치는 영향을 조사하였다 (Fig. 1). 꼬시레기를 열수 전처리한 후 생성된 환원당의 양은 반응온도에 따라 1.73~2.16%의 환원당 수율을 나타내었다. 가장 높은 환원당 수율은 130°C의 조건에서 2.16%를 나타내어 열수 전처리 자체만으로는 높은 농도의 환원당을 얻지 못하였다.

열수 전처리를 수행한 꼬시레기 전처리 물에 효소를 첨가하여 효소당화를 수행한 결과, 반응온도에 따라 환원당 수율이 각각 100°C에서는 25.8%, 110°C에서는 25.9%, 120°C에서는 25.6%, 그리고 130°C는 27.9%의 당화 수율을 얻었다. 결

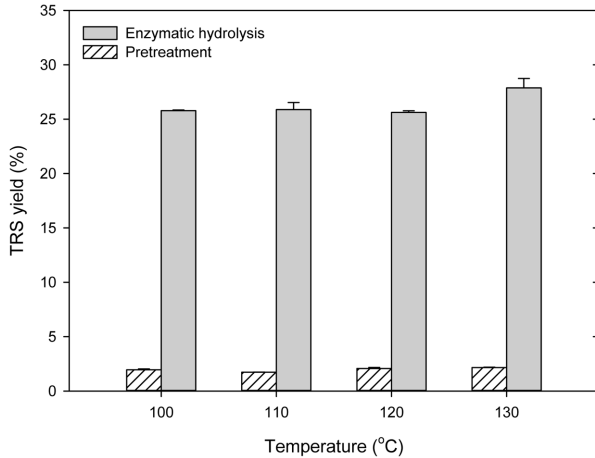


Fig. 1. Effect of reaction temperature on TRS production by hot-water pretreatment and subsequent enzymatic hydrolysis of *G. verrucosa*.

론적으로 실험에서 사용한 가장 높은 온도인 130°C에서 가장 높은 환원당 수율을 얻을 수 있었다. 이후의 실험을 위해서는 반응온도를 130°C로 설정하여 진행하였다. 비교할 만한 보고로는 Kwon 등 [20]은 꼬시레기의 열수가수분해에 고액비 1:10, 오븐온도 120°C에서 60분의 전처리 조건으로 전처리 후 효소당화를 실시한 결과, 전처리 과정에서는 환원당 수율이 매우 낮았으며, 효소당화 후에는 약 12%의 환원당 수율을 보고하였다. Kim 등 [2]은 창자파래 (*Enteromorpha intestinalis*)의 열수 전처리와 이어지는 효소 가수분해를 통한 환원당 생산을 보고하였다. 130°C, 1:10 고액비의 전처리 조건에서 각각 30분과 60분의 반응시간 동안 약 2% 내외의 환원당 수율을 보고하였다. 이후 효소당화를 통하여 약 18~19% 내외의 수율을 보고하였다.

꼬시레기 열수 전처리에 미치는 반응시간의 영향은 반응온도 130°C의 조건에서 반응시간을 0~120분의 조건으로 변화시키면서 전처리를 수행하였다. 전처리 후 꼬시레기 전처리액의 pH를 조절한 후에 효소를 첨가하여 전처리 시간이 효소당화에 미치는 영향을 조사하였다 (Fig. 2). 반응시간에 따른 전처리 후의 환원당의 생성 수율은 2% 이내의 낮은 값을 나타내었다 (data not shown). 효소 당화의 결과에서는 반응시간 0분에서 24.0%, 30분에서 23.0%, 45분에서 25.0%, 60분에서 24.3%, 90분에서 25.7%, 그리고 120분의 전처리 조건에서 26.5%의 당화수율을 얻었다. 전처리 반응시간 0분의 조건은 반응물을 autoclave에서 130°C에 도달하였을 때의 시간을 0분으로 설정하였다. 결과적으로 열수 전처리 조건에서는 130°C에서 120분간 전처리 반응을 수행한 후 효소당화를 한 경우에 가장 높은 당화수율을 얻었다. Kim 등의 보고 [2]에 의하면 창자파래 (*E. intestinalis*)의 열수 전처리와 이어지는 효소가수분해 과정에서 130°C, 1:10 고액비의 조건에서 반응시간이 각각 30분과 60분의 경우에서는 반응시간에 따라 전처리 후 1% 이내의 수율과 효소당화 후 2% 내외의 낮은 환원당

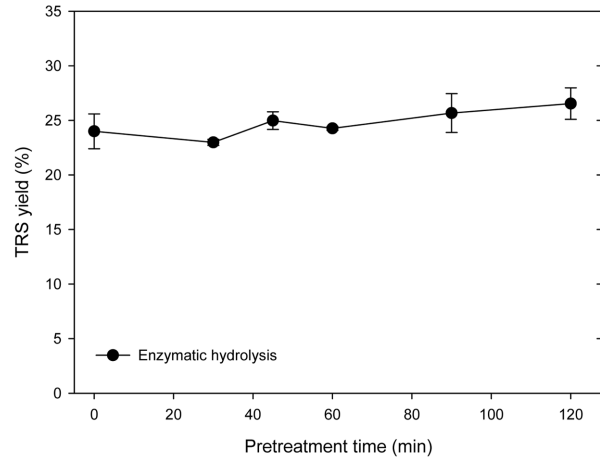


Fig. 2. Effect of reaction time on TRS production by hot-water pretreatment and subsequent enzymatic hydrolysis of *G. verrucosa*.

수율 변화를 보고하였다. 본 연구 결과에서는 전처리를 수행한 경우와 하지 않은 경우에서는 효소 당화를 수행한 후의 당화수율은 전처리를 수행함으로써 약 10.87%의 환원당 수율이 증가하였다.

3.2. 냉동 전처리의 영향

꼬시레기의 가수분해에 미치는 냉동 전처리 (freezing pretreatment)의 영향을 알아보기 위하여 냉동 온도, 냉동 시간, 고액비 (solid-to-liquid ratio)를 변수로 하여 환원당 생성 (당화) 수율을 조사하였다. 냉동 (또는 냉장) 온도의 영향은 -70, -40, -20, 4, 그리고 20°C의 조건으로 2일 동안 냉동하여 전처리를 수행하였다 (Fig. 3). 냉동 (또는 냉장) 온도에 따른 전처리 후의 환원당의 생성 수율은 3% 이내의 낮은 값을 나타내었다. 냉동 온도가 낮을수록 상대적으로 높은 환원당 수율을 얻었다. 효소 당화의 결과에서는 -70°C에서는 19.5%, -40°C에서는 18.6%, -20°C에서는 17.9%, 4°C에서는 16.3%, 20°C에서는 14.4%의 당화수율을 나타내었다. -70°C에서 -20°C의 동결조건에서는 비슷한 당화수율을 나타내었으나, 전처리 온도가 높을수록 당화수율은 낮아지는 것으로 나타났다. 이는 바이오매스 중의 물이 동결하면서 부피팽창으로 인하여 바이오매스의 결합구조의 일부가 파괴되어 효소의 접근성이 증가한 결과로 판단된다 [18].

고액비 (solid-to-liquid ratio)의 영향은 1:6, 1:8, 1:10, 1:12.5, 1:15로 설정하여 -40°C의 조건에서 48시간 동안 냉동하여 전처리를 수행하였다 (Fig. 5). 고액비에 따른 전처리 후의 환원당의 생성 수율은 3% 이내의 낮은 값을 나타내었다. 고액비가 높아져도 환원당 수율의 변화는 크지 않았다. 효소 당화의 결과에서는 고액비 1:6에서는 15.4%, 1:8에서는 16.6%, 1:10에서는 18.1%, 1:12.5에서는 18.6%, 그리고 1:15에서는 18.4%를 나타내었다. 1:10~1:15의 범위에서 비슷한 결과를 나타내었다. 이와 비교할 만한 보고로는, 김 등 [2]이 녹조류인 창자파래 (*E. intestinalis*)의 열가수분해에서 고액비 1:10에서 가

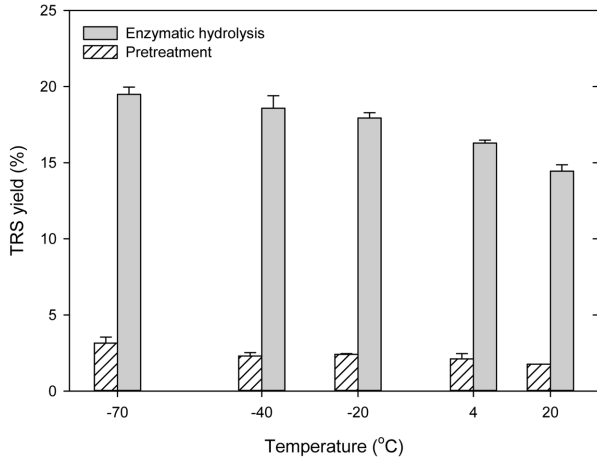


Fig. 3. Effect of reaction temperature on TRS production by freezing pretreatment and subsequent enzymatic hydrolysis of *G. verrucosa*.

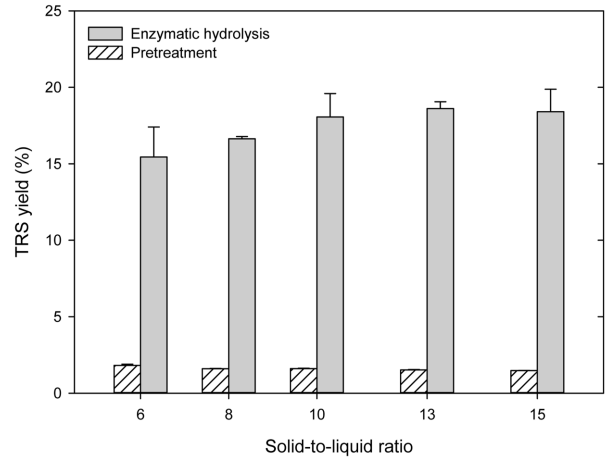


Fig. 4. Effect of solid-to-liquid ratio on TRS production by freezing pretreatment and subsequent enzymatic hydrolysis of *G. verrucosa*.

장 높은 환원당 수율을 보고하였다. 또한 Kwon 등 [20]은 꼬시레기의 열수가수분해에 구연산을 촉매로 사용한 경우에 고액비 1:10에서 최고의 수율과 고액비 1:8 이하의 조건에서는 반응물의 점도가 높았다고 보고하였다. Chang 등 [18]은 rice straw를 대상으로 냉동 전처리 후 효소당화 수율을 비교한 결과, 48%에서 84%로 효소당화 수율이 증가하였다고 보고하였다. 이와 관련하여 물이 동결될 때 일어나는 물리적인 변화인 부피 팽창에 의해 바이오매스 내부의 결합구조의 일부가 파괴됨으로써 효소가 접근할 수 있는 표면적이 증가하고 pore의 부피가 증가한 결과로 판단하고 있다 [18]. Smichi 등 [19]은 글꼴류 *Juncus maritimus*를 대상으로 냉동과 해동을 이용한 바이오매스 전처리 결과, 냉동/해동 전처리 후 Cellic[®] CTec2를 사용한 효소당화에서 묽은 산 전처리의 경우에서 보다 높은 glucose 수율을 얻어 냉동/해동 전처리법을 목질계 바이오매스의 유망한 전처리 방법이라고 보고하였다.

냉동 시간의 영향은 -70, -40, -20, 4, 그리고 20°C의 조건에서 6~48시간 동안 냉동하여 전처리를 수행한 결과 (Fig. 4), 각각의 반응온도에 따라 동결 시간이 변화해도 환원당 수율의 변화에는 크게 미치지 않았다. 이와 비교할 만한 결과로는, Jeong 등 [18]이 Mongolian oak을 묽은 산 전처리와 효소당화에 앞서 냉동 보관 (freezing storage)의 영향을 조사한 결과, 냉동 시간 120분까지는 환원당의 양이 조금씩 증가하다가 그 이후에는 큰 변화가 없다고 보고하였다.

4. CONCLUSION

본 연구에서는 거대 해조류 중 홍조류인 꼬시레기 (*G. verrucosa*)를 이용하여 환원당을 생산하기 위하여 열수 전처리법과 냉동 전처리법이 효소 당화에 미치는 영향을 조사하였다.

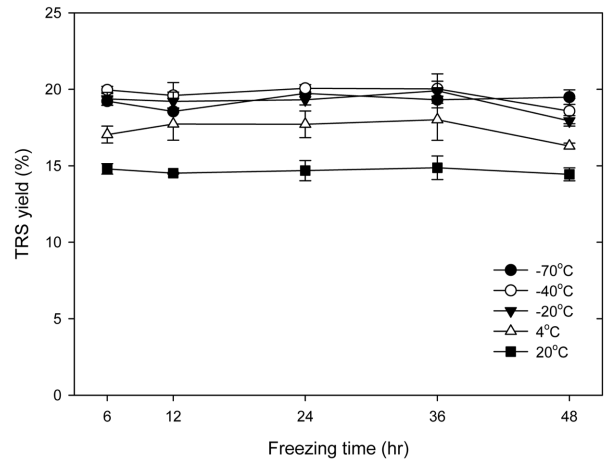


Fig. 5. Effect of freezing time on TRS production by freezing pretreatment and subsequent enzymatic hydrolysis of *G. verrucosa*.

130°C와 120분의 조건에서 열수 전처리를 수행한 결과 2.16% (3.62%, carbohydrate 함량 기준)의 수율을 얻었으며, 전처리 후 효소당화를 수행하여 27.9% (46.8%, carbohydrate 함량 기준)의 당화 수율을 얻었다. 냉동 전처리의 결과, -70에서 -20°C의 동결조건에서 비슷한 당화수율을 나타내었고, 고액비 1:10~1:15의 범위에서 비슷한 결과를 나타내었다. 또한 냉동 시간이 증가해도 환원당 수율의 변화에는 크게 미치지 않았다. -70°C와 48시간의 조건에서 동결 전처리를 수행한 결과 3.15% (5.28%, carbohydrate 함량 기준)의 수율을 얻었으며, 전처리 후 효소당화를 수행하여 19.5% (32.7%, carbohydrate 함량 기준)의 당화 수율을 얻었다. 열수 전처리와 냉동 전처리를 이용하여 꼬시레기로부터 생산된 당은 향후 바이오리파이너리 공정의 원료로 사용가능하리라 판단된다.

Acknowledgements

This work was supported by a Research Grant of Pukyong National University (2016 Year).

REFERENCES

- Demibras, A. (2007) Progress and recent trends in biofuels. *Prog. Energy Combust. Sci.* 33: 1-18.
- Kim, D. H., S. B. Lee, and G. T. Jeong (2014) Production of reducing sugar from *Enteromorpha intestinalis* by hydrothermal and enzymatic hydrolysis. *Bioresour. Technol.* 161: 348-353.
- Jeong, G. T. (2014) Production of total reducing sugar and levulinic acid from brown macro-algae *Sargassum fulvellum*. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* 42: 177-183.
- Ra, C. H., H. J. Lee, M. K. Shin, and S. K. Kim (2013) Bioethanol production from seaweed *Gelidium amansii* for separated hydrolysis and fermentation (SHF). *KSBB J.* 28(5): 282-286.
- Khambhaty, Y., K. Mody, M. R. Gandhi, S. Thampy, P. Maiti, H. Brahmabhatt, K. Eswaran, and P. K. Ghosh (2012) *Kappaphycus alvarezii* as a source of bioethanol. *Bioresour. Technol.* 103: 180-185.
- Meinita, M. D. N., B. Marhaeni, T. Winanto, G. T. Jeong, M. N. A. Khan, and Y. K. Hong (2013) Comparison of agarophytes (*Gelidium*, *Gracilaria*, and *Gracilariopsis*), as potential resources for bioethanol production. *J. Appl. Phycol.* 25: 1957-1961.
- Amer, L., B. Adhikari, and J. Pellegrino (2011) Technoeconomic analysis of five microalgae-to-biofuels processes of varying complexity. *Bioresour. Technol.* 102: 9350-9359.
- Ra, C. H., C. H. Kang, J. H. Jung, G. T. Jeong, and S. K. Kim (2016) Effects of light-emitting diodes (LEDs) on the accumulation of lipid content using a two-phase culture process with three microalgae. *Bioresour. Technol.* 212: 254-261.
- Lee, S. B. and G. T. Jeong (2016) Production of biosugar from red macro-algae *Euclima cottonii* using acid-hydrolysis. *Microbiol. Biotechnol. Lett.* 44(1): 48-54.
- Sunwoo, I. Y., J. E. Kwon, T. H. Nguyen, C. H. Ra, G. T. Jeong, and S. K. Kim (2017) Bioethanol production using waste seaweed obtained from gwangalli beach, Busan, Korea by co-culture of yeasts with adaptive evolution. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 183: 966-979.
- Ra, C. H., G. T. Jeong, and S. K. Kim (2017) Hyper-thermal acid hydrolysis and adsorption treatment of red seaweed, *Gelidium amansii* for butyric acid production with pH control. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 40: 403-411.
- Chandini, S. K., P. Ganesan, P. V. Suresh, and N. Bhaskar (2008) Seaweeds as source of nutritionally beneficial compounds - A review. *J. Food Sci. Technol.* 45: 1-13.
- Han, Y. B. (2010) Edible Seaweed I - Components and biological activity. pp. 168-177. Korea University Pres, Korea.
- Nguyen, T. H., C. H. Ra, I. Y. Sunwoo, G. T. Jeong, and S. K. Kim (2017) Bioethanol production from *Gracilaria verrucosa* using *Saccharomyces cerevisiae* adapted to NaCl or galactose. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 40: 529-536.
- Ra, C. H., Y. J. Kim, S. Y. Lee, G. T. Jeong, and S. K. Kim (2015) Effects of galactose adaptation in yeast for ethanol fermentation from red seaweed, *Gracilaria verrucosa*. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 38: 1715-1722.
- Jeong, G. T., C. H. Ra, Y. K. Hong, J. K. Kim, I. S. Kong, S. K. Kim, and D. H. Park (2015) Conversion of red-algae *Gracilaria verrucosa* to sugars, levulinic acid and 5-hydroxymethylfurfural. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 38: 207-217.
- Jeong, H. S., S. K. Jang, H. Y. Kim, H. Yeo, J. W. Choi, and I. G. Choi (2016) Effect of freeze storage on hemicellulose degradation and enzymatic hydrolysis by dilute-acid pretreatment of Mongolian oak. *Fuel* 165: 145-151.
- Chang, K. L., J. Thitikorn-amorn, J. F. Hsieh, B. M. Ou, S. H. Chen, K. Ratanakhanokchai, P. J. Huang, and S. T. Chen (2011) Enhanced enzymatic conversion with freeze pretreatment of rice straw. *Biomass Bioenerg.* 35: 90-95.
- Smichi, N., Y. Messaoudi, N. Moujahed, and M. Gargouri (2016) Ethanol production from halophyte *Juncus maritimus* using freezing and thawing biomass pretreatment. *Renew. Energ.* 85: 1357-1361.
- Park, M. R., S. K. Kim, and G. T. Jeong (2018) Optimization of the levulinic acid production from the red macroalgae, *Gracilaria verrucosa* using methanesulfonic acid. *Algal Res.* 31: 116-121.
- Kwon, O. M., D. H. Kim, S. K. Kim, and G. T. Jeong (2015) Production of sugars from macro-algae *Gracilaria verrucosa* using combined process of citric acid-catalyzed pretreatment and enzymatic hydrolysis. *Algal Res.* 13: 293-297.
- Miller, G. L. (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31: 426-428.