

*Eucheuma cottonii*로부터 산 가수분해를 통한 biosugar 생산

이상범, 정귀택*
부경대학교 생물공학과

Received: December 16, 2015 / Revised: January 22, 2016 / Accepted: January 23, 2016

Production of Biosugar from Red Macro-algae *Eucheuma cottonii* using Acid-hydrolysis

Sang-Bum Lee and Gwi-Taek Jeong*

Department of Biotechnology, Pukyong National University, Busan 48513, Republic of Korea

In this study, biosugar production by the red-algae *Eucheuma cottonii* was investigated using dilute sulfuric acid-catalyzed hydrolysis and data analysis by response surface methodology. This approach yielded 25.8 g/l total reducing sugar under the conditions of 160.1°C, 1% (v/v) sulfuric acid, and 13.1 min. The sugar concentration showed a linear inverse correlation with the combined severity factor (CSF) of the reaction conditions. CSF was calculated as $\log(t \cdot \exp[(T_H - T_R)/14.75]) - pH$, where t is the coupling reaction time, T_H is the target temperature, and T_R is the reference temperature (100°C). In addition, levulinic acid production showed a linear positive correlation with CSF. *E. cottonii* may represent a useful feedstock for sugar production in the field of bioenergy.

Keywords: *Eucheuma cottonii*, red-macro algae, biosugar, acid hydrolysis

서론

화석에너지의 고갈과 환경 친화적인 에너지원 요구의 증가로 인하여 다양한 에너지원에 대한 연구가 진행되고 있고, 최근 해양자원인 거대조류(macro-algae)를 이용한 바이오에너지 관련 연구가 주목받고 있다[5, 8, 9, 12].

본 연구에 사용한 *Eucheuma cottonii*는 해양 거대조류 중 홍조류로서 동남아시아에서 널리 서식하고 양식하고 있다. *E. cottonii*에는 kappa-carageenan이 다량 함유되어 있어 식품산업에 널리 사용되고 있다[3]. 최근에는 홍조류를 이용한 바이오에탄올 생산을 비롯한 바이오에너지 분야로의 적용 연구가 많이 이루어지고 있다[5, 6, 9, 10].

Carrageenan은 *Chondrus* 속, *Eucheuma* 속, *Gigartina* 속, *Hypnea* 속, *Iridaea* 속 등의 홍조류의 세포벽을 구성하는 성분으로 D-갈락토오스와 3,6-안하이드로-D-갈락토오스로 구성된 고분자 다당류에 황산기가 결합된 산성다당체이

다[10]. Carrageenan은 크게 3종류로 구분하는데, kappa-carrageenan은 2개의 당에 하나의 황산기가 결합되어 있고, iota-carrageenan은 2개의 당에 2개의 황산기가 결합되어 있다. Lambda carrageenan은 2개의 당에 3개의 황산기가 결합되어 있다[3]. 이러한 carrageenan은 식품산업에 겔화제, 증점제, 안정제 등으로 널리 사용되고 있다[10].

본 연구에서는 거대조류 중 홍조류인 *E. cottonii*로부터 산 가수분해방법과 실험계획법을 이용하여 바이오연료 및 화학 원료로 전환가능한 잠재적인 자원으로서의 biosugar(환원당)를 생산하는데 요구되는 반응조건을 탐색하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료

*E. cottonii*는 인도네시아에서 수확하여 건조한 것을 분쇄하여 200 μ m 이하로 분체한 시료를 실험에 사용하였다. *E. cottonii*는 65.8% 탄수화물, 5.9% 조섬유, 4.6% 조단백질, 0.8% 조지질 그리고 22.9%의 조회분으로 구성되어 있다. 황산, 탄산칼슘, 글루코오스, 갈락토오스, 5-히드록시메틸푸르푸랄(5-HMF), 레블린산 및 기타 시약은 시약급을 사용하였다.

*Corresponding author

Tel: +82-51-629-5869, Fax: +82-51-629-5863

E-mail: gtjeong@pknu.ac.kr

© 2016, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

실험방법

산 가수분해법을 이용하여 *E. cottonii*로부터 환원당을 생산하기 위하여 스테인리스 스틸 재질의 반응기를 사용하였다. 고/액비(solid-to-liquid ratio, w:v)를 1:15로 설정하였다. 반응기 내부의 온도가 설정온도에 도달하는 시점을 0분으로 설정하여 반응을 시작하였으며, 설정온도에 도달하는 시간은 약 5분 정도가 소요되었다. 반응기의 온도는 oil bath를 이용하여 설정한 온도조건이 되도록 PID 온도컨트롤러로 조절하여 설정한 반응시간 동안 반응하였다. 반응물의 혼합은 마그네틱 바를 약 200 rpm으로 교반하였다. 설정된 반응시간에 도달하면, 반응기를 수돗물로 실온으로 빠르게 냉각한 후 시료를 취하였다. 시료는 탄산칼슘을 이용하여 pH를 6으로 조절하여 원심분리(8,800 g-force, 20분) 후 얻은 상등액을 생산물 분석에 사용하였다[6].

실험계획 및 통계분석

Design-Expert 9 프로그램(Stat-Ease, Inc., USA)을 이용하여 5-수준-3-인자의 중심합성회전 설계법을 적용하여 반응 온도, 촉매농도, 반응시간을 변수로 하여 실험계획을 디자인하였다. 실험 결과는 회귀분석하여 모델식을 구성하였으며, 모델의 질(quality)은 변이분석(ANOVA)으로 평가하였다[5].

Combined severity factor의 정의

Combined severity factor(CSF)는 반응의 가혹도(severity)를 나타내며, 반응온도, 반응시간, 그리고 반응액의 pH로 구성된 함수이다. $CSF = \log [t \exp(T - T_{ref})/14.75] - pH$, 여기서, t 는 반응시간(min), $T(t)$ 는 반응온도(°C), 기준 반응온도(T_{ref})는 100, 그리고 14.75는 임의상수 값이다. pH는 실온에서의 반응 전의 반응액의 pH 값을 사용하였다[1, 6].

분석방법

시료 중의 환원당은 글루코오스를 표준물질로 사용하여 DNS법으로 분석하였다[11]. 글루코오스, 갈락토오스, 5-HMF 그리고 레블린산의 농도는 Agilent 1100 HPLC 시스템(USA)을 사용하였으며, Aminex 87H 컬럼(Bio-rad사, USA)과 컬럼온도 65°C, 5 mM 황산(0.6 ml/min)의 조건에서 굴절을 검출기로 검출하였다[6, 9].

결과 및 고찰

*E. cottonii*로부터 발효기능당의 생성조건의 최적화

본 연구에서는 산 촉매를 사용하여 거대해조류 중 홍조류 중 하나인 *E. cottonii*로부터 발효기능당을 생산하고자 하였

Table 1. Experimental design and results for response surface analysis of dilute sulfuric acid-catalyzed hydrolysis of *E. cottonii*.

Reaction temperature(°C), A	Catalyst amount (wt %), B	Reaction time (min), C	Products concentration (g/l)				
			Total reducing sugar	Glucose	Galactose	5-HMF	Levulinic acid
149.8	2	35	19.6	3.39	16.41	1.01	4.67
160	1	20	20.63	2.85	16.86	1.96	3.44
160	1	50	15.98	2.42	13.27	1.18	5.07
160	3	20	16.7	3.25	12.82	0.57	6.06
160	3	50	9.12	2.13	6.73	0.47	8.37
175	0.32	35	14.1	2.32	10.68	3.6	2.86
175	2	9.8	14.45	3.01	10.65	0.4	1.47
175	2	35	5.23	1.62	3	0.45	9.46
175	2	35	3.66	1.15	2.04	0.54	9.37
175	2	35	4.26	1.49	2.68	0.43	9.59
175	2	35	5.12	1.56	2.91	0.43	9.59
175	2	35	4.82	1.38	2.41	0.44	9.62
175	2	35	4.48	1.25	2.21	0.5	9.49
175	2	60.2	1.55	0.42	0.45	ND	9.91
175	3.68	35	1.5	0.44	0.61	ND	11.48
190	1	20	3.78	0.96	1.57	0.87	8.39
190	1	50	0.92	ND	ND	ND	9.32
190	3	20	0.92	ND	ND	ND	11.02
190	3	50	1.84	ND	ND	ND	9.83
200.2	2	35	1.26	ND	ND	ND	9.36

ND : Not detected.

다. 산 가수분해 반응조건을 최적화하기 위하여 실험계획법 중 반응표면분석법을 이용하여 반응조건 최적화 연구를 수행하였다. 디자인한 실험변수의 조건과 얻은 실험결과를 Table 1에 나타내었다. 160°C, 1% 황산, 20분의 조건에서 가장 높은 20.63 g/l의 환원당이 생성되었다. 이 조건에서는 단

당으로서 2.85 g/l 글루코오스와 16.86 g/l 갈락토오스가 생성되었으며, 1.96 g/l의 5-HMF와 3.14 g/l의 레블린산이 과분해물로서 생성되었다.

반응조건 변수(반응온도, 촉매량, 반응시간)를 독립변수로 설정하고, 당(환원당, 글루코오스, 갈락토오스)과 부산물

Table 2. ANOVA results for response surface analysis of dilute sulfuric acid-catalyzed hydrolysis of *E. cottonii*.

Source	Sum of squares	DF	Mean square	F-value	Prob. > F ^{a,b}
Total reducing sugar					
Model	846.7	9	94.07	22.40	< 0.0001
A-Temperature	557.5	1	557.48	132.77	< 0.0001
B-Catalyst	84.2	1	84.21	20.05	0.0012
C-Time	94.2	1	94.17	22.43	0.0008
AB	9.8	1	9.81	2.34	0.1575
AC	13.3	1	13.25	3.16	0.1060
BC	0.1	1	0.09	0.02	0.8878
A ²	68.2	1	68.18	16.24	0.0024
B ²	15.4	1	15.42	3.67	0.0843
C ²	17.6	1	17.58	4.19	0.0679
Residual	42.0	10	4.20		
Lack of Fit	40.3	5	8.05	23.24	0.0018
Pure Error	1.7	5	0.35		
Cor Total	888.7	19			
Galactose					
Model	631.7	9	70.18	30.02	< 0.0001
A-Temperature	419.8	1	419.77	179.52	< 0.0001
B-Catalyst	62.0	1	61.97	26.50	0.0004
C-Time	59.1	1	59.10	25.27	0.0005
AB	10.1	1	10.13	4.33	0.0641
AC	8.2	1	8.20	3.51	0.0906
BC	0.1	1	0.11	0.05	0.8338
A ²	54.2	1	54.21	23.19	0.0007
B ²	15.4	1	15.43	6.60	0.0280
C ²	14.4	1	14.41	6.16	0.0324
Residual	23.4	10	2.34		
Lack of Fit	22.6	5	4.53	30.37	0.0010
Pure Error	0.7	5	0.15		
Cor Total	655.0	19			
Glucose					
Model	22.0	3	7.32	47.45	< 0.0001
A-Temperature	17.3	1	17.34	112.36	< 0.0001
B-Catalyst	1.2	1	1.18	7.64	0.0138
C-Time	3.4	1	3.45	22.33	0.0002
Residual	2.5	16	0.15		
Lack of Fit	2.3	11	0.21	6.27	0.0276
Pure Error	0.2	5	0.03		
Cor Total	24.4	19			

(5-HMF, 레블린산)의 생성량을 종속변수로 설정하여 다중 회귀분석으로부터 다음과 같이 환원당, 글루코오스, 갈락토오스에 대한 모델식을 얻었다(A는 반응온도(°C), B는 촉매 농도(wt %), 그리고 C는 반응시간(min)).

$$\begin{aligned} \text{환원당} = & 457.803 - 4.157A - 19.782B - 1.534C \\ & + 0.074AB + 0.006AC + 0.007BC + 0.010A^2 \\ & + 1.034B^2 + 0.005C^2 \quad (R^2 = 0.953) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{갈락토오스} = & 403.196 - 3.694A - 19.123B - 1.222C \\ & + 0.075AB + 0.005AC - 0.008BC + 0.009A^2 \\ & + 1.035B^2 + 0.004C^2 \quad (R^2 = 0.963) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{글루코오스} = & 16.388 - 0.075A - 0.294B - 0.033C \\ & (R^2 = 0.899) \end{aligned}$$

환원당, 글루코오스, 갈락토오스는 90% 이상의 높은 적합도의 모델식을 얻을 수 있었다. 반면에 5-HMF는 86.2%의 적합도를 보였으나, 전반적인 농도가 낮았다. 레블린산은 65.7%의 낮은 적합도를 나타내어 모델식으로부터 최적값을 추정하는데 어려움이 있었다.

Table 2에 실험 결과를 ANOVA 분석을 통하여 얻은 결과를 나타내었다. 분석 결과의 *p*-values가 0.05 이하일 때, 중요성이 있다고 판단하였다. 환원당 생성의 경우에는 모델식의 *F*-value가 22.40으로 모델의 신뢰도가 높았으며, 또한 3개의 1차식의 계수(A, B, C)와 1개의 2차식의 계수(A²)가 중요한 인자로 확인되었다. 갈락토오스의 경우에는 모델식의 *F*-value가 30.02로 중요하였고, 분석하여 얻은 모델식은 3개의 1차식의 계수(A, B, C)와 3개의 2차식의 계수(A², B²,

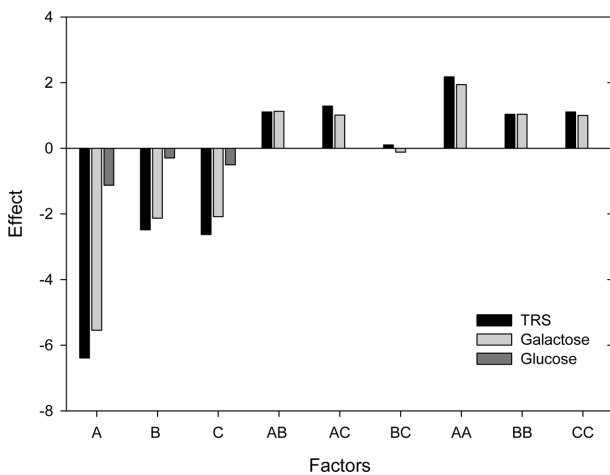


Fig. 1. Effect of explanatory factors on sugar formations from *E. cottonii* by dilute sulfuric acid-catalyzed hydrolysis. (A) Reaction temperature, (B) Catalyst concentration, (C) Reaction time.

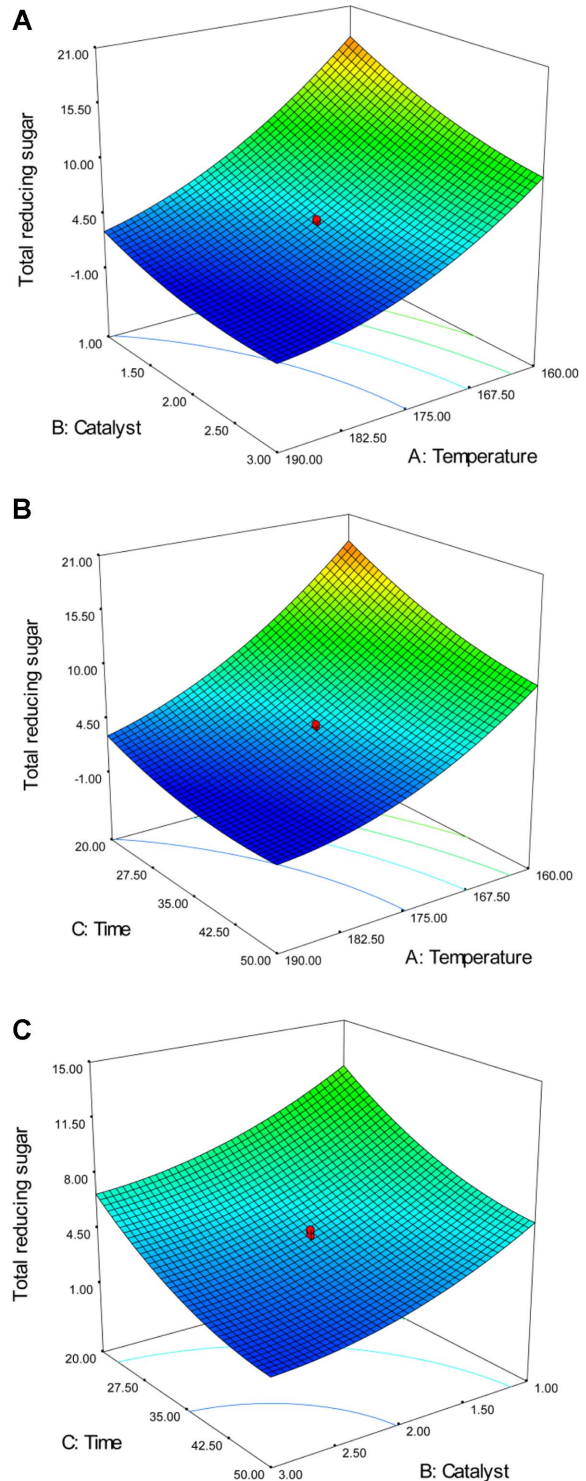


Fig. 2. Response surface plot representing the effect of reaction temperature, catalyst concentration, reaction time, and their reciprocal interaction on the formation of total reducing sugar from *E. cottonii* at a constant reaction condition. (A) At a constant 35 min, (B) At a constant 2% sulfuric acid, (C) At a constant 175°C.

C²)가 중요한 인자로 확인되었다. 글루코오스의 경우에는 모델 식의 *F*-value가 47.45이었으며, 모델 식은 3개의 1차식의 계수(A, B, C)가 중요 인자였다.

Fig. 1에 *E. cottonii*의 산 가수분해에 모델에 미치는 적용된 반응인자의 영향을 나타내었다. 산 가수분해를 통한 당(환원당, 글루코오스, 갈락토오스)의 생성 모델에서 반응온도(A), 촉매농도(B), 그리고 반응시간(C)이 부정적인 영향을 미쳤다. 특히 반응온도가 미치는 영향이 크게 나왔다. 이는 갈조류인 모자반을 대상으로 한 연구 결과[6]와도 유사한 결과이다. 반면에, AB, AC, A², B², C²는 긍정적인 영향을 미쳤다.

Fig. 2에 *E. cottonii*로부터 산 가수분해에 의한 환원당 생성에 미치는 반응인자들의 상호관계를 나타내었다. Fig. 2A에 일정한 시간에서 환원당 생성에 미치는 반응온도와 촉매농도의 상호관계를 나타내었다. 일정 반응온도에서 산 촉매농도의 증가에 따라 환원당 생성이 감소하는 경향을 보였다. 높은 반응온도보다 낮은 반응온도에서 촉매농도 증가에 따른 환원당 생성율의 감소가 크게 나타났다. 이는 낮은 온도에서 높은 촉매농도에 의해 해조류의 탄수화물이 단당으로 전환된 이후 단당이 가용가능한 촉매의 수소이온에 의해 과분해반응(탈수반응 등)이 일어난 것으로 판단된다[6, 7]. 높은 반응온도에서는 촉매 농도에 상관없이 낮은 환원당을 생성하였는데, 이 역시 고온반응에 의해 생성된 환원당이 과분해반응을 일으킨 것으로 판단된다[6, 7, 9]. 일정한 촉매 농도에서는 반응온도가 증가할수록 환원당의 생성이 감소하였다. 이러한 조건에서는 반응온도와 촉매농도가 낮은 조건에서 환원당이 가장 많이 생성되었다. 이러한 결과와 비교할 만한 것으로는 모자반으로부터 산 가수분해를 통한 환원당 생성 연구에서도 비슷한 결과가 보고되었다[6].

Fig. 2B는 일정 농도의 촉매 조건에서 반응온도와 반응시간이 환원당의 생성에 미치는 영향을 나타낸 것이다. 일정한 반응시간에서 반응온도가 감소할수록 환원당 생성이 증가하였다. 이는 높은 반응온도에서 생성된 환원당이 과분해되었기 때문에 판단된다. 일정 반응온도에서의 환원당 생성은 반응시간이 길어질수록 낮아지는 경향을 나타내었다. 전체적으로 낮은 반응온도와 짧은 반응시간의 조건에서 환원당의 생성이 증가하였다. 이러한 결과는 모자반으로부터 산 가수분해를 통한 환원당 생성에서도 비슷한 결과가 보고되었다[6].

Fig. 2C는 일정한 반응온도에서 촉매농도와 반응시간이 환원당의 생성에 미치는 영향을 나타낸 것이다. 촉매농도가 증가할수록, 반응시간이 증가할수록 환원당의 생성이 감소하였다. 이는 높은 촉매 농도하에서 반응시간이 지남에 따라 *E. cottonii*로부터 생성된 환원당이 여분의 촉매(H⁺)에 의해 과분해반응(탈수반응(dehydration) 또는 재수화반응

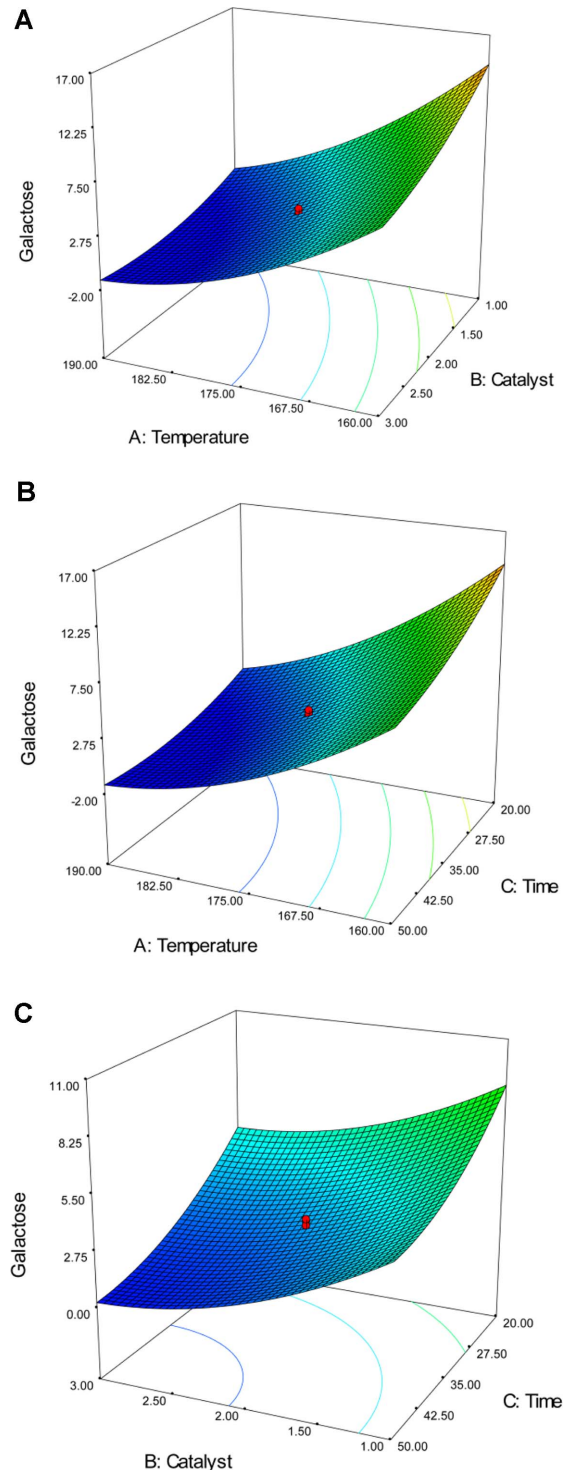


Fig. 3. Response surface plot representing the effect of reaction temperature, catalyst concentration, reaction time, and their reciprocal interaction on the formation of galactose from *E. cottonii* at a constant reaction condition. (A) At a constant 35 min, (B) At a constant 2% sulfuric acid, (C) At a constant 175°C.

(rehydration))을 일으켜 5-HMF 또는 레블린산으로 전환됨에 따라 환원당 생성량이 감소한 것으로 판단된다[4, 6, 7, 10].

*E. cottonii*로부터 산 가수분해 반응을 통한 반응인자들이 환원당 생성에 미치는 영향을 종합하여 보면, 실험범위 내에서 낮은 반응온도, 낮은 촉매농도, 짧은 반응시간의 조건에서 많은 양의 환원당이 생성되었다. 이는 Table 2의 결과에서 나타난 것과 같이 160°C, 1% 황산, 20분의 조건에서 가장 높은 20.63 g/l의 환원당이 생성되었으나, 190°C, 3% 황산, 50분의 가혹한 조건에서는 1.84 g/l의 환원당만이 생성된 반면에, 과분해산물인 레블린산이 9.83 g/l 생성되었다. 이는 가혹한 조건에서는 생성된 당이 레블린산과 같은 과분해산물로 전환된 결과로 판단된다[4, 6, 7, 10].

Fig. 3은 *E. cottonii*로부터 산 가수분해에 의한 갈락토오스 생성에 미치는 반응인자들의 영향을 나타낸 것이다. Fig. 2의 환원당 생성과 같은 갈락토오스의 생성 경향을 나타내었다. 실험범위 내에서 낮은 반응온도, 낮은 촉매농도, 짧은 반응시간의 조건에서 많은 양의 갈락토오스가 생성되었다. 실험조건 범위 내에서 반응표면분석법을 통한 모델식으로부터 *E. cottonii*로부터 산 가수분해에 의해 환원당의 생성을 위한 반응변수 최적화 결과 다음과 같은 반응조건을 얻었다. 반응온도 160.1°C, 1.0% 황산, 13.1분의 조건에서 25.8 g/l의 환원당의 생산이 예측되었다. 이는 갈조류인 모자반의 산 가수분해 최적화 조건(160°C, 1.0% 황산, 20.2분의 조건에서 15.28 g/l 환원당 생산)과 유사하나 환원당의 생성량이 보다 높았다[6]. 또한 김 등[9]은 녹조류인 창자파래(*Enteromorpha intestinalis*)를 열수 전처리(170°C에서 30분) 후 효소 가수분해를 거쳐 20.1 g/l의 환원당을 얻었다. 이는 해조류의 구성성분 중 탄수화물의 종류, 결합구조, 함량 등의 차이에 기인한 결과로 판단된다. 이러한 결과로부터 해조류 종류에 따른 직접적인 비교는 쉽지 않다고 판단된다[6, 9, 10].

Combined severity factor가 환원당 생성에 미치는 영향

Combined severity factor는 반응의 가혹도를 나타내는 것으로 반응온도, 반응시간, 그리고 반응액의 pH로 구성된 함수이다. 주로 목질계 바이오매스의 전처리 공정에 적용되어 전처리 조건을 평가하는데 사용되고 있으나[2], 최근에는 일부 해조류 연구에서도 적용되고 있다[6, 9]. Fig. 4는 combined severity factor가 *E. cottonii*로부터 환원당과 과분해산물(5-HMF, 레블린산)의 생성과의 관계를 나타낸 것이다. 환원당과 글루코오스, 갈락토오스의 경우에는 CSF의 증가에 따른 선형적인 감소 경향이 나타났다. CSF 3.2 이상의 조건에서는 당의 생성이 매우 낮게 나타났다. 당의 과분해산물인 5-HMF의 생성은 초기에 CSF 2.4 조건까지는 증가하다가 이후에서는 매우 낮게 유지되었다. 이는 당으로부터 생성된 5-HMF가 고온 조건에서 산 촉매에 의해 재수화(rehydration)

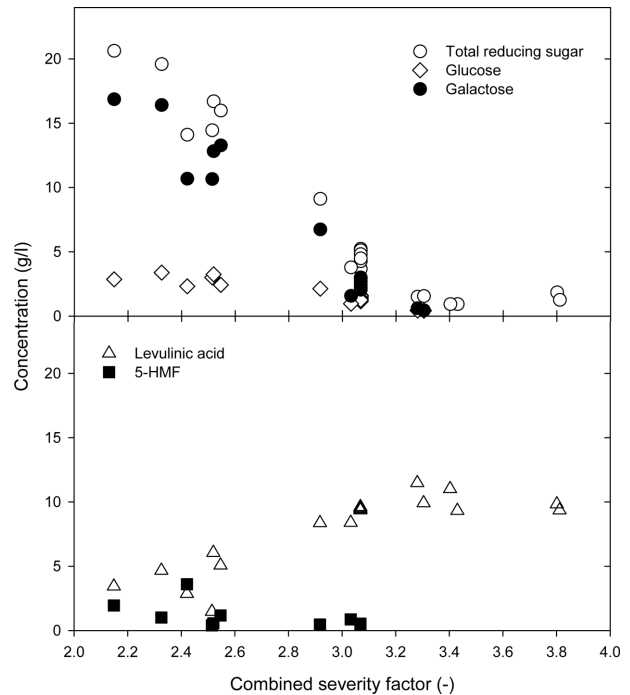


Fig. 4. Relationships of combined severity factor with the production of sugars and by-products by dilute sulfuric acid-catalyzed hydrolysis of *E. cottonii*.

되어 레블린산과 포름산으로 전환되었기 때문으로 알려져 있다[3, 5, 8, 9]. 레블린산은 반응의 CSF가 증가함에 따라 증가하다가 CSF 3.2 이상에서는 일정하게 유지되었으며, 이는 레블린산으로 전환될 수 있는 당이 고갈되었음을 나타낸 것이다[6].

요 약

본 연구에서는 홍조류 중 하나인 *E. cottonii*로부터 환원당을 생산하기 위하여 산 가수분해법을 수행하였다. 반응표면분석법을 이용한 반응조건 최적화를 통하여 환원당 생성에 미치는 반응인자들의 상호작용을 조사한 결과, 낮은 반응온도, 낮은 촉매농도, 그리고 짧은 반응시간의 조건에서 많은 양의 환원당이 생성되었고, 반면에 가혹한 반응조건일수록 당의 과분해산물인 5-HMF와 레블린산의 생성이 증가하였다. 환원당 생성의 최적 반응조건은 160.1°C, 1.0% 황산, 그리고 13.1분의 반응시간 조건에서 25.8 g/l의 환원당 생성을 예측하였다. 이러한 결과로부터 해조류로부터 바이오연료 및 화학원료로 전환가능한 당의 확보 가능성을 제시하였고, 이상과 같이 얻어진 정보들은 향후 화석 자원을 대체하기 위한 기본 정보로 활용될 수 있다는 점에서 의의가 있다고 하겠다.

Acknowledgments

This research was supported by Basic Science Research Program through the National Research Foundation of Korea (NRF) funded by the Ministry of Education (NRF-2015R1D1A3A01015882).

References

1. Banerji A, Balakrishnan M, Kishore VVN. 2013. Low severity dilute-acid hydrolysis of sweet sorghum bagasse. *Appl. Energy* **104**: 197–206.
2. Demibras A. 2007. Progress and recent trends in biofuels. *Progress in Energy Combustion Science* **33**: 1–18.
3. Doopedia. 2016. Carrageenan. Available from <http://www.doopedia.co.kr/doopedia/master/>. Accessed Mar. 9, 2016.
4. Hayes DJ, Fitzpatrick S, Hayes MHB, Ross JRH. 2006. *The biofine process - Production of levulinic acid, furfural, and formic acid from lignocellulosic feedstocks*, pp. 139–164. In: B. Kamm, P. R. Gruber, M. Kamm (eds.). *Biorefineries - Industrial Processes and Products*, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
5. Jeong GT, Park DH. 2014. Effect of pretreatment method on lipid extraction from *Enteromorpha intestinalis*. *KSBB J.* **29**: 22–28.
6. Jeong GT. 2014. Production of total reducing sugar and levulinic acid from brown macro-algae *Sargassum fulvellum*. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* **42**: 177–183.
7. Jeong GT, Kim SK, Park DH. 2015. Application of solid-acid catalyst and marine macro-algae *Gracilaria verrucosa* to production of fermentable sugars. *Bioresour. Technol.* **181**: 1–6.
8. Jeong GT, Park DH. 2015. Optimization of lipid extraction from marine green macro-algae as biofuel resources. *Korean J. Chem. Eng.* **32**: 2463–2467.
9. Kim DH, Lee SB, Jeong GT. 2014. Production of reducing sugar from *Enteromorpha intestinalis* by hydrothermal and enzymatic hydrolysis. *Bioresour. Technol.* **161**: 348–353.
10. Meinita MDN, Kang JY, Jeong GT, Koo HM, Park SM, Hong YK. 2012. Bioethanol production from the acid hydrolysate of the carrageenophyte *Kappaphycus alvarezii* (cottonii). *J. Appl. Phycol.* **24**: 857–862.
11. Miller GL. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**: 426–428.
12. Park SH, Park JH, Gobikrishnan S, Jeong GT, Park DH. 2015. Biodiesel production from palm oil using a non-catalyzed supercritical process. *Korean J. Chem. Eng.* **32**: 2290–2294.