



Deciphering Combined Interactions of Algae-Bacteria Co-Culture for Green Sustainable Applications

Minhao Chang, Chungchuan Hsueh, Jiahui Liao, Boryann Chen *

Department of Chemical and Materials Engineering, National I-Lan University, I-Lan, Taiwan

Email address:

spurs20406@gmail.com (Minhao Chang), lisa22684047@gmail.com (Jiahui Liao), cchsueh88@gmail.com (Chungchuan Hsueh), boryannchen@yahoo.com.tw (Boryann Chen)

*Corresponding author

To cite this article:

Minhao Chang, Chungchuan Hsueh, Jiahui Liao, Boryann Chen. Deciphering Combined Interactions of Algae-Bacteria Co-Culture for Green Sustainable Applications. *Science Discovery*. Vol. 6, No. 3, 2018, pp. 155-163. doi: 10.11648/j.sd.20180603.13

Received: March 14, 2018; Accepted: June 6, 2018; Published: June 23, 2018

Abstract: Microalgae contained abundant value compositions (e.g., antioxidant polyphenolics and flavonoids, proteins) and owned significant bioelectrochemical characteristics for sustainable applications. This study tended to decipher strategy to maximize generation of value-added products through testing of electrochemical capabilities (e.g., total polyphenolics content, DPPH antioxidant activities, cyclic voltammetry). Although extracellular metabolites of microalgae might express significant electrochemical activity as electron shuttles, such metabolites apparently still inhibited microbial activities, leading to significant reduction of power generation in microbial fuel cells with metabolite supplementation. This result clearly explained why slow-growing microalgae could propagate ubiquitously even microbes were grown in much faster rates. That is, combined interactions of microalgae-bacteria co-cultures evidently provided ecologically favorable conditions for microalgal persistence due to inhibitory metabolites expressed by microalgae in co-cultures.

Keywords: Algae-Bacteria Symbiosis, *Chlorella* sp., Antioxidant, Electrochemical Activity, Electron Shuttle

藻菌共培養交互作用關係應用於綠色永續發展之評估研究

張旻皓, 廖家輝, 薛仲娟, 陳博彥*

化學工程與材料工程學系, 宜蘭大學, 宜蘭市, 台灣

邮箱:

spurs20406@gmail.com (張旻皓), lisa22684047@gmail.com (廖家輝), cchsueh88@gmail.com (薛仲娟), boryannchen@yahoo.com.tw (陳博彥)

摘要: 微藻具有許多有可提煉之有價值的成份, 例如: 多酚與類黃酮的抗氧化成分、蛋白質、醣類等等, 而且在其文獻中發現其具有抗氧化成分亦具有生物電化學特性, 本研究基於永續經營之理念, 首先就微藻藻體可提煉高價值產物開發外, 獲取微藻後的培養液體(胞外代謝物), 是否含有抗氧化物質, 轉換成具可逆性之電子梭成分活性, 更符合綠色永續循環應用之價值。由電化學循環伏安法、抗氧化DPPH和總酚分析中發現為藻胞外代謝物具有電化學之作用, 並添加入微生物燃料電池(MFC)平台做為評估, 發現了在物理上有電化學活性的胞外代謝物液體, 卻抑制了細菌的產電活性, 本研究表明了微藻代謝物中含有抗氧化物質可做為ES外, 亦含有抑制細菌活性之產物。顯然藻菌共生培養過程所產生藻代謝物之抑制活性, 提供生態上更有利的交互作用條件, 以利其維持其永續共存, 不致滅絕。

关键词: 小球藻, 藻菌共生, 抗氧化物, 電化學活性, 電子梭

1. 引言

由於微藻開放式天然培養系統需被有效運用於目標物生產產程上。因此藻菌共生系統[1]，勢必是一種不可避免之操作模式。然而本研究更深入探究，微藻及共生菌所產生之代謝物是否是啟動藻菌共生交互作用的原因？因此本研究首先分析評估是否具有電化學生物環境特性差異。過去文獻[2]指出微藻含有多酚、類黃酮抗氧化成分與蛋白質、油脂[3,4]與醣類[5]等多種成份，因此在此試圖瞭解就以代謝物添加方式來刺激微藻生長及生產活性，並了解抑制菌體生長之可能性。由於微藻可生長於隨處可見之自然水體中，因此可合理推測藻菌共存共生現象，於自然界中是一種相當常見之生態行為。雖然微藻生長速率遠比細菌為慢，但是基於互利共生共存之基本原則，因此生態中各物種能在生態系統各自同時存在，並表現出低度競爭共生生態之可能結果，亦即是「兩種物種均可相安無事般地於生態系統中共存」。尤其是微藻可輕易存在於天然水體中，因此，藻菌共生趨於相互合作，或由競爭行為轉變成協同合作的相互關係，可能有其在生態學上之必然機制調控。更直接影響到各物種間微生物生理與代謝活性速率。更貼切地說，生態系統所產生之交互作用，可以是引導共生系統中主要生產之原動力。而且於自然環境中，一般細菌之存在，常誤認為由於其生長上之優勢，對其他物種而言，可能是「有害無益」的。此點似乎是一種誤導迷失。事實上，因為細菌之存在，甚至於有助於微藻生長及絮凝(flocculation)之作用[6]，而且此兩個關鍵作用，在發展微藻生物技術上皆是重要操作行為模式。因此就演化及生態觀點來系統化解析此交互作用對工業應用操作優化，針對

二元或多元物種間競爭或合作關係來整合歸納未來在工業應用上，將面臨的相關問題，確實是相當重要的。本研究首度嘗試於反應機制上，以電化學知觀點切入破解物種間共存之相互關係。更將操作成效反應在此種關係上(例如：生物多樣性及相關機制，以及相互影響族群大小尺寸、豐富度及生長或生產代謝行為上)。因此藻菌共生相互影響之代謝物濃度消長變化以及相對抑制毒性演化情形等皆是必須面對破解之主要議題。因此目前首要理解的是，究竟微藻及細菌之代謝物分別對其對應之細菌及微藻是否起了拮抗、協同抑制或刺激作用，此皆是需要優先查明清楚的研究內容。然而經由微生物燃料電池(MFC)做為生物電化學評估平台，並通過添加外援式電子梭(ES)電化學上評價其是否具有促進電子轉移(ET)進而輔助有機物生物降解作用，並且能具有能量提取之能力，以持續促進生物質能提取作為可再生能源開發之可能依據[7-11]。並假設微藻代謝物是否具促進產電之電子梭或是抑制細菌生長之效果，以利於有效調控操作優化後續實際開發應用上。

2. 材料與方法

2.1. 微藻藻株

本研究使用兩株模式小球藻(*Chlorella* sp. AN3、*Chlorella* sp. AN6, 藻株自成功大學化工系張嘉修教授取得)，藻株保存於平板(BG-11培養基於15g/Lagar;表1)，經前培養三週後殖入於BG-11培養基中。本研究使用的培養基為BG-11，培養基的成份如表1。

表1 BG-11培養基成份組成。

化學組成分	BG-11(gL ⁻¹)
Na ₂ Mg EDTA	0.001
Ferric ammonium citrate	0.006
Citric acid. 1H ₂ O	0.006
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.036
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.075
K ₂ HPO ₄	0.04
H ₃ BO ₃	0.00286
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.00181
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.000222
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.000079
Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	0.000049
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.000391

2.2. 微藻培養及藻胞外代謝物提取

微藻培養於滅菌之BG-11培養基中，培養於500ml的玻璃血清瓶中(瓶身高度17.5cm，直徑7.5cm)，培養液500ml。光源為日光燈管白光，光源強度為2400Lux。曝氣為空氣(空氣中CO₂濃度約佔0.04%)，曝氣流速為液體容量10%cc/min。為瞭解微藻胞外代謝物是否具有電化學相關之生物活性，首先使用高速離心機(10,000rpm，10分鐘)分離藻泥與胞外代謝液體，再高速離心後，取上清液，以利於後續測試評估。

2.3. 循環伏安法測定

循環伏安測定採三極法，工作電極，反電極和參考電極分別是玻碳電極(0.07cm²)，鉑電極(6.08cm²)和充滿飽和KCl(水溶液)的Ag/AgCl電極。研究前，玻璃碳電極(GCE, ID=3mm;型號CHI104, CH Instruments Inc., USA)用0.05μm氧化鋁拋光劑拋光，將微藻胞外液體以氮氣曝氣去氧15分鐘後，再使用電化學工作站(Jiehan 5600, Taiwan)，掃描範圍1.5V到-1.5V(或其他電壓)，速率為10mV·s⁻¹。由於微藻胞外液體含有多元複雜之混合物，因

此先以六次掃描觀察是否具有穩定氧化還原峰，再將具有此特性之樣品，進行循環伏安掃描100圈，以觀察圖譜隨時間循環掃描之可逆性穩定變化趨勢分析。

2.4. 總酚含量測試

將分離取得微藻胞外液取0.25mL與0.25mL Folin&Ciocalteu's phenol reagent, 0.5mL飽和 Na_2CO_3 溶液和4mL雙蒸餾水混合，以分光光度計在吸收波長 $\lambda=725\text{nm}$ 下測試，並以Gallic acid (GA)當作標準品作校正評估，得校正方程式 $\text{OD}_{\text{GA}}=3.6748 C_{\text{GA}}-0.0475$; $r^2=0.9993$, OD_{GA} 為胞外代謝物樣品吸光度， C_{GA} 是相當於GA濃度(g L^{-1})。

2.5. DPPH抗氧化測試

DPPH清除測試，使用2,2-二苯基-2-苦基肼(DPPH•; $\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{N}_6\text{O}_5$) 自由基作為評估抗氧化活性的標準。DPPH自由基清除率的自由基清除能力以下列方程式判定DPPH自由基清除 $= (1 - (\text{Abs}_{\text{sample}} - \text{Abs}_{\text{blank}}) / \text{Abs}_{\text{control}}) \times 100\%$ ，其中 $\text{Abs}_{\text{sample}}$ 是30分鐘後DPPH與樣品(或標準品)間反應的吸光度， $\text{Abs}_{\text{blank}}$ 是空白值(即2mL ethanol溶劑和1mL樣品或標準溶液)的吸光度， $\text{Abs}_{\text{control}}$ 是對照(1mL DPPH溶液和2mL溶劑)的吸光度。2mL不同稀釋度的1mM DPPH(溶於95%乙醇)瓶與不同濃度的1mL測試藥草或茶提取物混合，在室溫下進行反應30分鐘。然後再通過515nm的分光光度分析[12]換算效率。

2.6. 生物電化學評估平台-微生物燃料電池

針對電子梭研究，本研究使用空氣陰極單槽式微生物燃料電池(聚甲基丙烯酸甲酯(Poly(methyl methacrylate), PMMA)(single-chamber MFCs, SC-MFCs)，來作為微生物燃料電池。首先取定長95mm，厚3mm，內徑54mm圓管一支，一端作為陽極閉口端，另一開端作為空氣陰極開口，以此段槽體做為微生物反應槽。陽極生物反應槽之工作體積為231.3mL。邊緣以矽利康(silicone)固定玻璃管，並在槽正中央鑽出直徑11mm的孔洞，以作為後續可置參考電極與輔助電極之位置，利於電化學分析儀對電池測量。構造上，圓管兩端的陽極閉口端與空氣陰極開口端分別接上直徑54mm圓洞的壓克力圓盤，距圓盤中心42mm處鑽出直徑8mm之孔洞六個，並製作相同規格的墊片以防止漏液，墊片及電極碳布(陽極碳布直徑54mm的圓形親水多孔碳布，陰極碳布以四氟乙烯塗布，其直徑54mm的圓形疏水多孔碳布，其一端延伸60mm的碳布)放於圓管與圓盤間並以矽利康(silicone)黏合，再以螺栓將圓管與圓盤緊連。

微生物燃料電池之培養液為培養基LB(Luria-Bertani medium)，組成之成分為 10g L^{-1} 的胰蛋白酶(tryptone)、 5g L^{-1} 的酵母提取物(yeast extract)及 10g L^{-1} 的氯化鈉(NaCl)所組成，培養基本身pH值微調確定在 7.0 ± 0.2 之間；培養基主要提供作為菌體生長及電池電流生產所需之能量。

MFCs所殖種之希瓦氏菌(*Shewanella haliotis*)取自生物工程研究所篩選出來具有生物脫色與產電菌株，首先殖種於 30°C 、125rpm條件下殖入菌液1%(v/v)在含有50ml

的LB培養基進行前培養12hr，並取其菌液2.2ml殖入含有220mlLB培養基微生物燃料電池槽體內，MFCs之工作環境為 25°C ，為提供有效能量營養基質，並以48hr為週期為脈衝注入5mL高溫殺菌濃縮新鮮基質8.8倍濃度LB培養液次使MFCs內依然維持0.2倍LB基質。

2.7. MFC電化學測試

(a)電化學阻抗譜(EIS)(日本HIOKI 3522-50)測量是在幅度為10mV的穩態開路電勢下進行的。頻率範圍是 $104 \sim 5 \times 10^{-2}\text{Hz}$ 。收集的數據使用奈奎斯特圖的軟件(Zview 2.6b, Jiehan Tech Corp.)進行分析。以二極法MFCs陽極為工作電極，陰極為參考電極與輔助電極，在穩定電壓，擾動振幅為10.0mV，頻率範圍為 $104 \sim 5 \times 10^{-2}\text{Hz}$ 。阻抗圖(EIS曲線)與x軸的截距(阻抗， Z_{re})，可作為電解質電阻(electrolyte resistance, R_{ele})；而阻抗圖中的曲線在x軸交點後的曲線投影長度是反應動力電阻(kinetic resistance)與質傳電阻(擴散電阻)之和($R_{\text{kin}} + R_{\text{diff}}$)將三者總和值則為電池內阻 R_{in} ($R_{\text{elec}} + R_{\text{kin}} + R_{\text{diff}}$)，使用奈奎斯特圖軟件(Zview 2.6b, Jiehan Tech)收集數據和分析估算電化學特[13]。

(b)產電測量：使用數據採集系統(DAS 5020; Jiehan Tech Corp.)通過外部電阻 $R_{\text{out}}=1\text{K}\Omega$ 自動測量電池電壓(每分鐘設定一個數據點)。請注意，為了與之前的結果進行比較，故意使用較高的電阻(1000歐姆)。使用線性掃描伏安法(LSV)測量 $P=(V \times C)/A$ 和 $I=C/A$ 來確定MFC的功率密度(P)和電流密度(I)，並且使用萬用表V和C分別表示電壓和電流)。MFC操作平台模組在 25°C 下在無膜單室方式下操作。

3. 結果與討論

3.1. 微藻胞外代謝液之電化學特性分析

由於文獻[2]提出微藻具有豐富生物產物可供利用，而且藻菌共生培養亦具有實際應用上的工程價值。探討相關生物表現是極為重要的課題。因此針對微藻胞外液體首先對於可能具有可逆電子轉移能力進行循環伏安分析的量化評估，以直接表徵其電化學活性是否可用作電子中介體(ES)或抗氧化物或其他可能表徵行為。掃描所得之“閉環”氧化還原電位曲線的區域，可將來自不同天然生物資源的ES或抗氧化物的能力進行量化分級。本研究將兩株小球藻(*Chlorella* sp. AN3、*Chlorella* sp. AN6)之培養天數設為5日、10日、15日、20日、25日、30日之胞外代謝物，分別進行循環伏安電化學分析(圖1與圖2)，就壁還面積來定義其電化學上之潛能活性參數。小球藻AN3培養10日胞外液體之面積與小球藻AN6培養10日、15日的循環伏安測試之封閉曲線面積明顯大於其他培養天數(表2)，如依結果之現象，可能小球藻AN3在培養10天這段區間與小球藻AN6培養10天、15天這段區間，微藻細胞極可能代謝釋出可用作電子中介體(ES)或抗氧化物之活性物質。

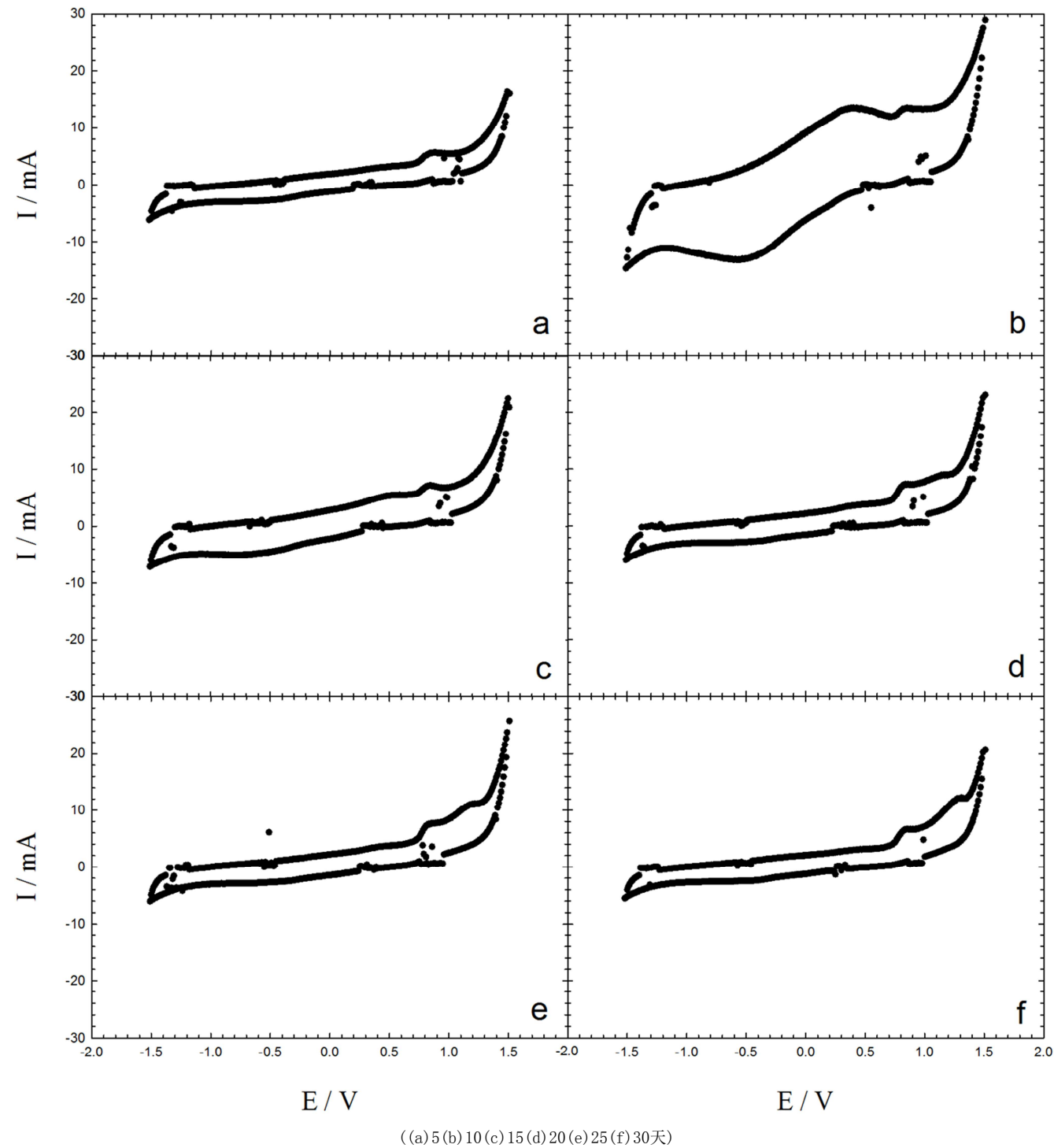
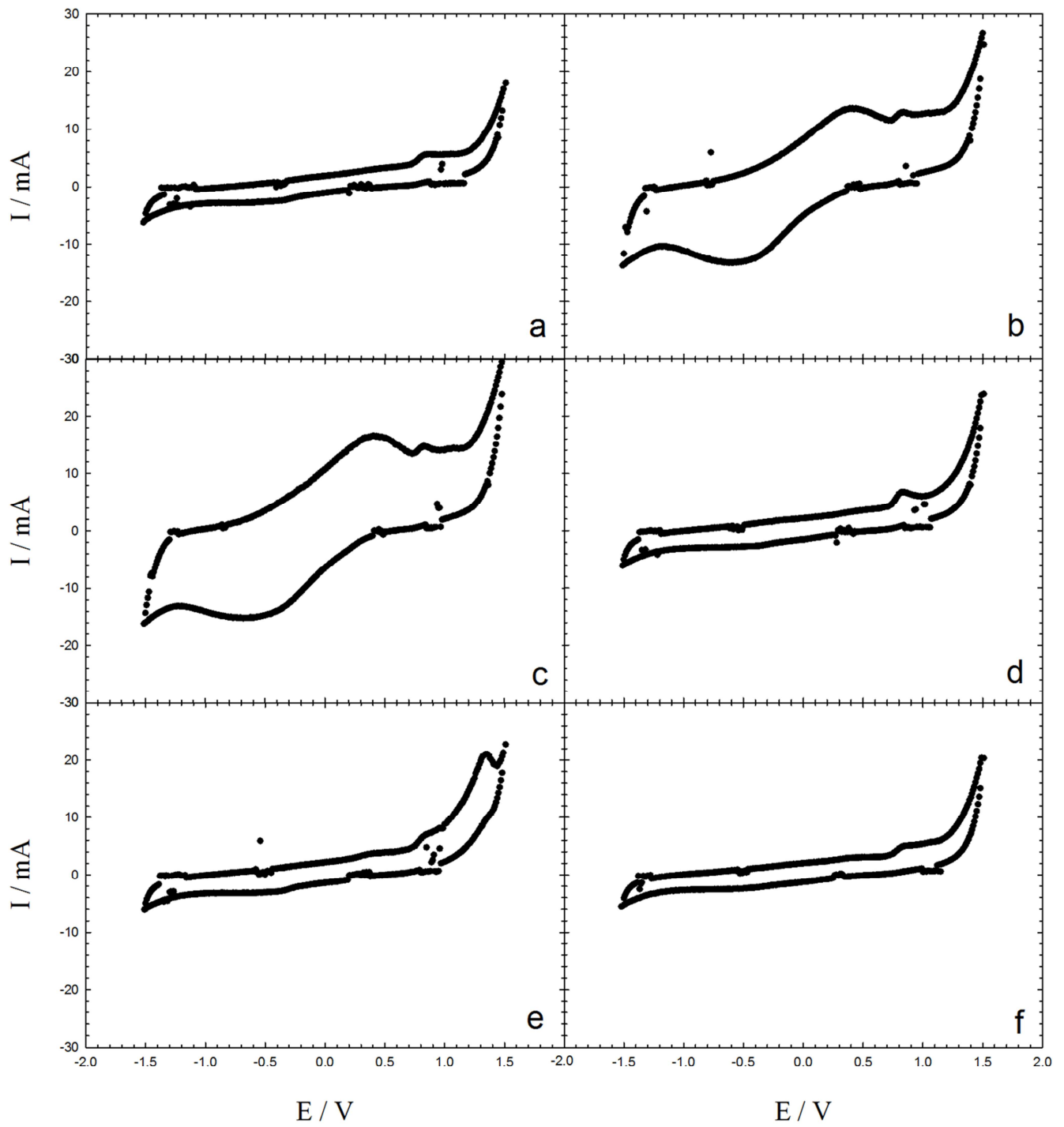


圖1 小球藻AN3在不同培養天數胞外代謝液循環伏安掃描比較圖。

表2 不同培養天數小球藻胞外液體循環伏安之封閉曲線面積比較表列(單位:μA•V)。

Sample Day	AN3	AN6
5	9.847	9.772
10	38.073	36.382
15	15.224	43.715
20	11.855	11.376
25	11.755	13.118
30	11.115	10.094



((a) 5 (b) 10 (c) 15 (d) 20 (e) 25 (f) 30天)

圖2 小球藻AN6在不同培養天數胞外代謝液循環伏安掃描比較圖。

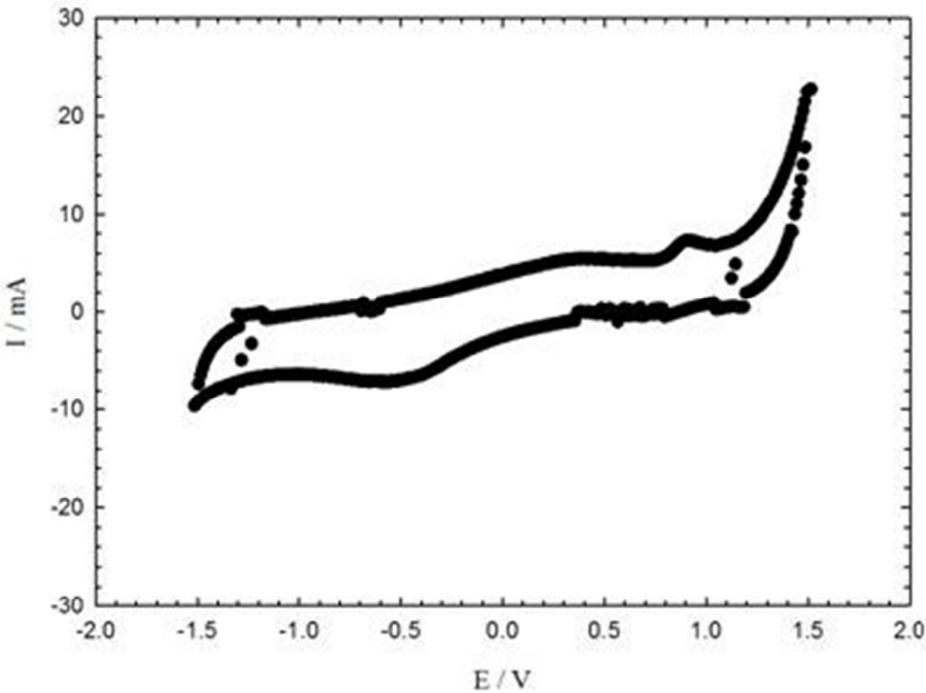


圖3 BG-11培養基循環伏安圖。

針對藻胞外代謝液以作為ES之可行性分析(如圖1及2與表2所示)，在CV掃描過程中，測試樣品的不可逆抗氧化成份可完全被利用，消耗衰減。只有具可逆的ES可穩定持續地保留其有效催化作用，可持續使用。經過多次循環伏安掃描後，可看出小球藻AN3第10天培養胞外液體與小球藻AN6第10天、第15天培養胞外液體的CV圖，正電部分的氧化峰與負電部分的氧化還原峰依然穩定顯現。由此可得，所得的電化學活性中間體或ES化合物仍可有效地表現出氧化還原中介的電化學作用能力。

3.2. 微藻代謝物添加MFC之交流阻抗與極化曲線分析

針對希瓦氏菌WLP72為殖種之微生物燃料電池(MFC)作為評估平台，來確認小球藻的胞外液體成份具有電子中介作用能力之可能性。表2的結果看出，*Chlorella* sp. AN6電化學活性較為優異，因此取定AN6微藻不同天數培養之胞外代謝物樣品，來進行電化學交流阻抗與極化曲線分析評估。

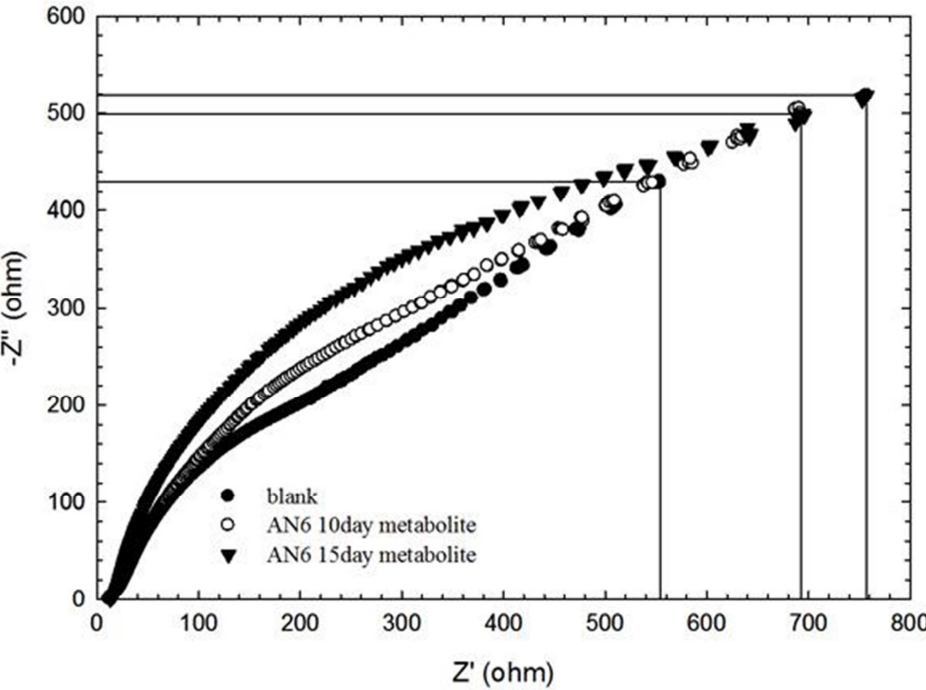


圖4 MFC加入微藻胞外液之交流阻抗比較圖。

表3 小球藻AN6不同培養培養天數胞外代謝液體添加至MFC之EIS阻抗比較表。

待測物樣品	$R_{elec}(\Omega)$	$R_{kin}+R_{diff}(\Omega)$	Total $R_{in}(\Omega)$
<i>Chlorella</i> sp. AN6 10 day metabolite	11.93	680.46	692.39
<i>Chlorella</i> sp. AN6 15 day metabolite	12.86	744.39	757.25
Blank	11.90	541.87	553.77

表4 小球藻AN6不同培養培養天數胞外代謝液體添加至MFC之產電功率密度比較表。

待測物樣品	$mW m^{-2}$
<i>Chlorella</i> sp. AN6 10 day metabolite	5.866
<i>Chlorella</i> sp. AN6 15 day metabolite	4.821
Blank	8.203

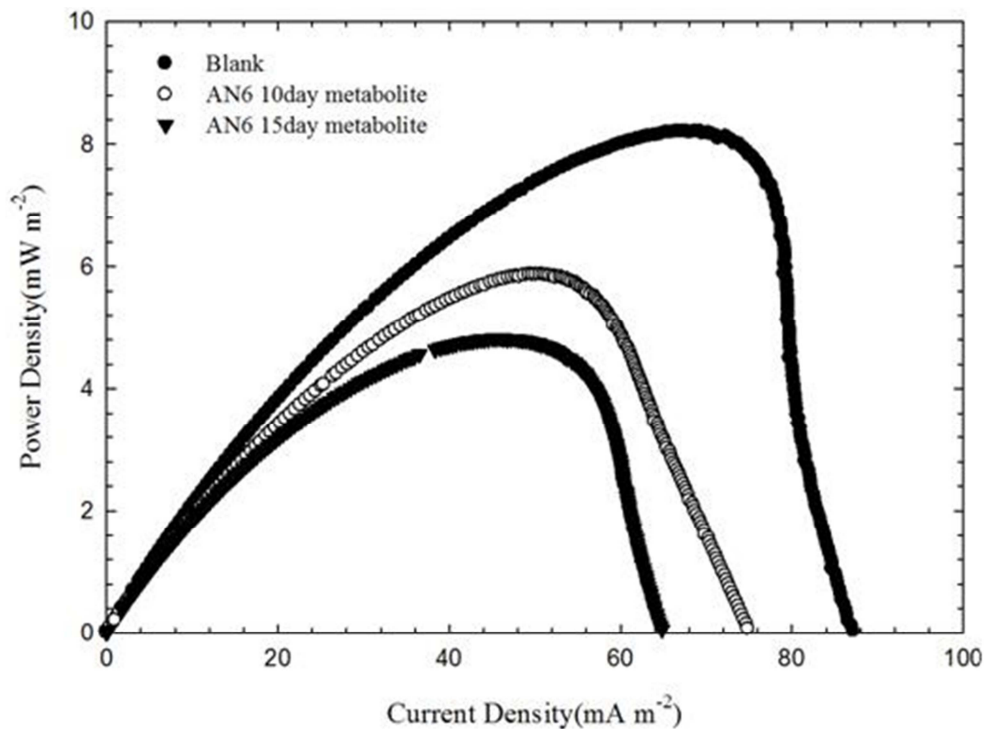


圖5 MFC加入具高電化學活性微藻AN6胞外液之產電功率比較圖。

依照胞外代謝物以MFC為測試平台的功率密度排序為Blank ($8.203 mW m^{-2}$)>*Chlorella* sp. AN6胞外代謝液 10day($5.866 mW m^{-2}$)>*Chlorella* sp. AN6胞外代謝液 15day($4.821 mW m^{-2}$)，MFC平台之EIS測試結果為*Chlorella* sp AN6胞外代謝液15 day>*Chlorella* sp AN6胞外代謝液 10 day>Blank。*Chlorella* sp. AN6之胞外代謝物在本研究之CV掃描中有出現具有可逆的ES可穩定持續地保留其有效催化作用，且該*Chlorella* sp. AN6之胞外液體的CV圖，的氧化峰與氧化還原峰穩定顯現，卻影響了MFC的EIS阻抗與工率密度，說明此現象*Chlorella* sp. AN6胞外液體在電化學上是具有具可逆的ES作用，但胞外液體卻有可抑制細菌活性的活性物質存在，在此系統中即使是無法有效鑑定出具有電化學中介物質物種，但是此物質確實會

抑制到微生物生長，因此藻菌共生現象為普世的一種現象，確實是有所依據的。

3.3. 小球藻胞外液體抗氧化能力分析

先前研究[11]指出，抗氧化活性(DPPH清除能力)與多酚含量和電子中介活性都是彼此電化學上相關的。若以測試抗氧化物的能力轉換成有效濃度(EC_x)來量化表徵，取30分鐘內用1%DPPH去除x%來做評估分析，可知對於富含多酚的物種而言，DPPH自由基清除活性在電化學上，相當於是等價的關係，於ESs在MFC中生物發電的氧化還原中介能力[14]。比較不同天數培養之代謝物總酚含量與抗氧化活性可知與CV電化學表現並不平行，總酚含量則可能是逐漸代謝累積。CV電化學表現可能是生長相關的生物特性。

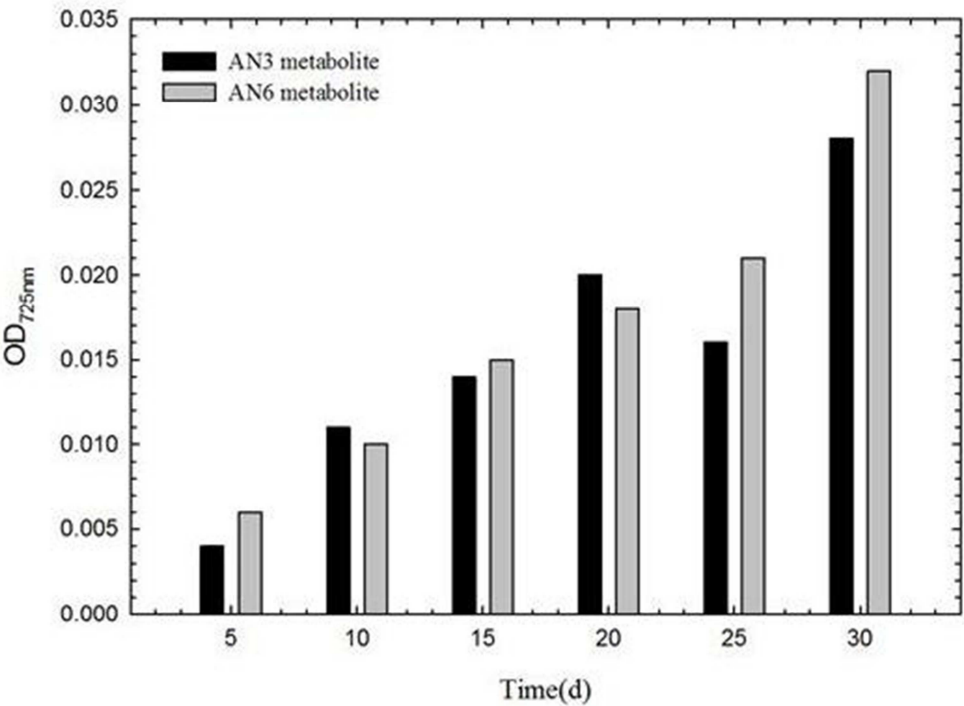


圖6 小球藻胞外液體總酚含量測定。

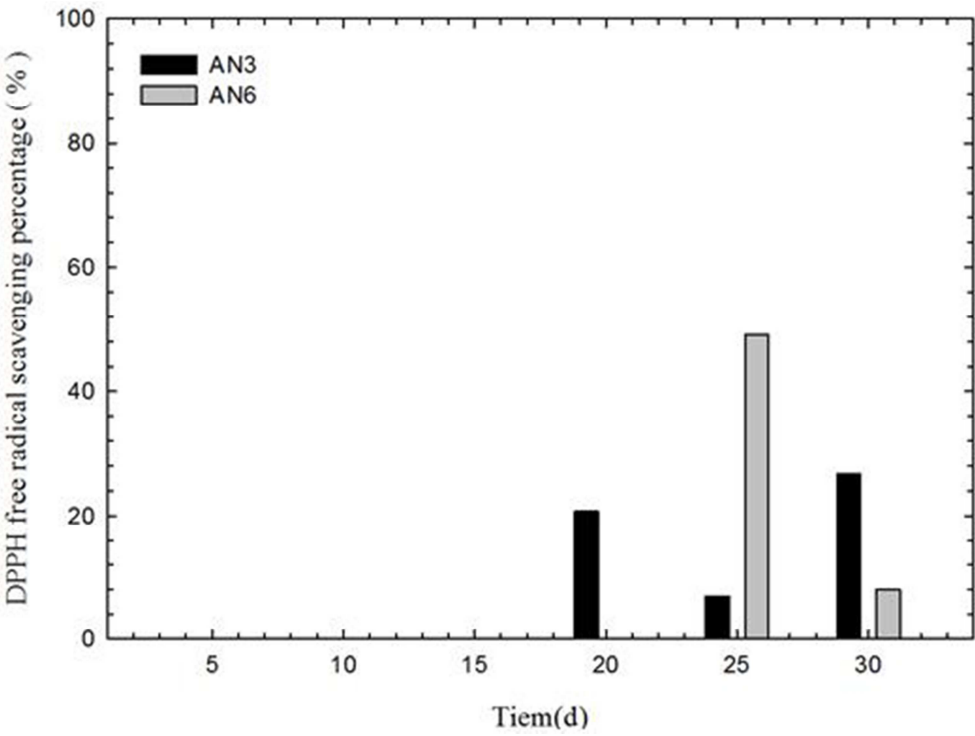


圖7 不同天數為藻培養代謝物DPPH自由基清除率比較圖。

4. 結論

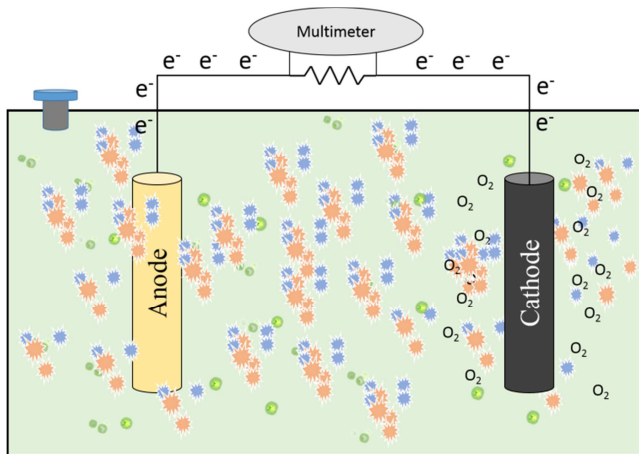


圖8 微藻代謝物於菌MFC電池示意圖。

電化學特性分析指出 *Chlorella* sp. AN3 與 *Chlorella* sp. AN6 胞外代謝物具有還原和氧化電位峰，而且可能在指數生長前期有最大的釋出，具有可做為ES的能力，亦表示其生產與生長相具有相關性，於藻活性較大時釋出較多。使用MFC測試結果更指出，雖然在非生物電化學上可做為ES，但胞外代謝物仍含有可抑制細菌活性之物質，因此無法有效在MFC產電表徵出來。本研究更證明小球藻胞外代謝物具含有抑制細菌之電化學活性產物，在一般之藻菌共生培養系統中，小球藻雖不具有快速生長之優越特性，卻得以繁衍生長且與細菌和平共存，生態消長成非競爭之交互作用關係。微藻生長在開放系統生長，原則上並不需要外援式的優勢篩選調控，仍可以有效於生態中永續繁衍存在。後續藻菌共生單槽MFC系統將如圖8所示，進行電化學導引高價產物生產的評價分析優化。

致謝

由衷感謝台灣科技部（計畫編號：MOST 106-2621-M-197 -001 -）之經費補助。

參考文獻

- [1] R. Ramanan, B. H. Kim, D. H. Cho, H. M. Oh, and H. S. Kim, "Algae-bacteria interactions: Evolution, ecology and emerging applications," *Biotechnol Adv*, vol. 34, no. 1, pp. 14-29, Jan-Feb, 2016.
- [2] K. W. Chew, J. Y. Yap, P. L. Show, N. H. Suan, J. C. Juan, T. C. Ling, D. J. Lee, and J. S. Chang, "Microalgae biorefinery: High value products perspectives," *Bioresour Technol*, vol. 229, pp. 53-62, Apr, 2017.
- [3] J. M. Marjakangas, C. Y. Chen, A. M. Lakaniemi, J. A. Puhakka, L. M. Whang, and J. S. Chang, "Selecting an indigenous microalgal strain for lipid production in anaerobically treated piggery wastewater," *Bioresour Technol*, vol. 191, pp. 369-76, Sep, 2015.
- [4] A. K. Minhas, P. Hodgson, C. J. Barrow, and A. Adholeya, "A Review on the Assessment of Stress Conditions for Simultaneous Production of Microalgal Lipids and Carotenoids," *Front Microbiol*, vol. 7, pp. 546, 2016.
- [5] K. Watanabe, M. Imase, K. Sasaki, N. Ohmura, H. Saiki, and H. Tanaka, "Composition of the sheath produced by the green alga *Chlorella sorokiniana*," *Lett Appl Microbiol*, vol. 42, no. 5, pp. 538-43, May, 2006.
- [6] J. Lee, D. H. Cho, R. Ramanan, B. H. Kim, H. M. Oh, and H. S. Kim, "Microalgae-associated bacteria play a key role in the flocculation of *Chlorella vulgaris*," *Bioresour Technol*, vol. 131, pp. 195-201, Mar, 2013.
- [7] B. Y. Chen, M. M. Zhang, C. T. Chang, Y. Ding, K. L. Lin, C. S. Chiou, C. C. Hsueh, and H. Xu, "Assessment upon azo dye decolorization and bioelectricity generation by *Proteus hauseri*," *Bioresour Technol*, vol. 101, no. 12, pp. 4737-41, Jun, 2010.
- [8] B. Xu, B. Y. Chen, C. C. Hsueh, L. J. Qin, and C. T. Chang, "Deciphering characteristics of bicyclic aromatics--mediators for reductive decolorization and bioelectricity generation," *Bioresour Technol*, vol. 163, pp. 280-6, Jul, 2014.
- [9] K. Han, P. L. Yueh, L. J. Qin, C. C. Hsueh, and B. Y. Chen, "Deciphering synergistic characteristics of microbial fuel cell-assisted dye decolorization," *Bioresour Technol*, vol. 196, pp. 746-51, Nov, 2015.
- [10] B. Y. Chen, C. M. Ma, K. Han, P. L. Yueh, L. J. Qin, and C. C. Hsueh, "Influence of textile dye and decolorized metabolites on microbial fuel cell-assisted bioremediation," *Bioresour Technol*, vol. 200, pp. 1033-8, Jan, 2016.
- [11] B. Y. Chen, J. H. Liao, A. W. Hsu, P. W. Tsai, and C. C. Hsueh, "Exploring optimal supplement strategy of medicinal herbs and tea extracts for bioelectricity generation in microbial fuel cells," *Bioresour Technol*, vol. 256, pp. 95-101, Feb 2, 2018.
- [12] G. K. Oliveira, T. F. Tormin, R. M. Sousa, A. de Oliveira, S. A. de Moraes, E. M. Richter, and R. A. Munoz, "Batch-injection analysis with amperometric detection of the DPPH radical for evaluation of antioxidant capacity," *Food Chem*, vol. 192, pp. 691-7, Feb 1, 2016.
- [13] R. Xiao, and Y. Zheng, "Overview of microalgal extracellular polymeric substances (EPS) and their applications," *Biotechnol Adv*, vol. 34, no. 7, pp. 1225-1244, Nov 15, 2016.
- [14] A. Masek, M. Zaborski, and E. Chrzescijanska, "Electrooxidation of flavonoids at platinum electrode studied by cyclic voltammetry," *Food Chem*, vol. 127, no. 2, pp. 699-704, Jul 15, 2011.
- [15] J. M. Marjakangas, C.-Y. Chen, A.-M. Lakaniemi, J. A. Puhakka, L.-M. Whang, and J.-S. Chang, "Simultaneous nutrient removal and lipid production with *Chlorella vulgaris* on sterilized and non-sterilized anaerobically pretreated piggery wastewater," *Biochemical Engineering Journal*, vol. 103, pp. 177-184, 2015.