

탈지미세조류로부터 폴리페놀 생산 증대를 위한 열수추출 조건 최적화

최강훈 · 이지현 · 조재민 · 신슬기 · 김진우[†]

선문대학교 식품과학과
31460 충남 아산시 탕정면 선문로 221번길 70
(2016년 1월 22일 접수, 2016년 2월 1일 수정본 접수, 2016년 2월 5일 채택)

Optimization of Hot-water Extraction Conditions of Polyphenolic Compounds from Lipid Extracted Microalgae

Choi Kanghoon, Lee Jihyun, Jo Jaemin, Shin Seulgi and Kim JinWoo[†]

Department of Food Science, Sunmoon University, 70, Sunmoon-ro 221beon-gil, Tangjeong-myeon, Asan, Chungnam, 31460, Korea
(Received 22 January 2016; Received in revised form 1 February 2016; accepted 5 February 2016)

요 약

합성 항산화제에 대한 대체제로 천연 항산화제에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으며 미세조류는 천연 항산화제의 원료로 많은 관심을 받고 있다. 본 연구에서는 탈지미세조류에서 총 폴리페놀(TPC) 추출증대를 위해 추출용매, 온도, 시간, 고액비율과 에탄올 첨가 농도 최적화를 수행하였다. 열수와 유기용매 추출성능을 비교했을 때, 열수추출이 유기용매 보다 우수한 성능을 보였으며 온도 증가에 따라 추출성능도 비례하여 증가함을 보였다. 열수에 의한 추출이 에탄올 용액 추출(>98%)에 비해 우수한 성능을 보였으며 40% 에탄올 용액을 이용한 열수 추출이 가장 우수한 추출 효과를 보였다. 추출조건 10 min, 100 °C, 40% 에탄올 열수추출에서 최대 폴리페놀 농도인 3.35 mg GAE (gallic acid equivalent)/g DM을 얻을 수 있었다. 지질 추출을 위한 유기용매 전처리 공정이 선행 되었음에도 불구하고 탈지미세조류(*Tetraselmis* KCTC 12236BP)의 폴리페놀 농도가 다른 탈지미세조류와 동등한 수준임을 확인할 수 있어 탈지미세조류가 천연 폴리페놀의 원료로서 적합함을 확인할 수 있었다. 또한, 고액추출을 모사하기 위해 Peleg 모델을 이용해 예측한 폴리페놀 농도가 실험에 의해 얻어진 값과 높은 일치도를 보임으로 모델을 이용한 모사가 폴리페놀 추출 모사에 유용함을 증명할 수 있었다.

Abstract – The search for natural antioxidants as alternatives to synthetic products is growing. Microalgae have emerged as a source of natural antioxidants with significant and diverse health-promoting properties. In this study, the effects of hot-water extraction conditions on total polyphenol compounds (TPC) production were investigated for lipid extracted microalgae (LEA). In order to enhance the polyphenol productivity, the extraction variables including solvents, temperature, time and ethanol concentration were optimized. The results showed hot-water extraction provided a higher extraction efficiency than the organic solvents and extraction at high temperatures showed a better extraction efficiency. While hot-water extract showed a higher extraction efficiency compared to 98% ethanol extraction, the mixture of water and ethanol (40:60 v/v) showed the highest production of polyphenols. The maximum polyphenols of 3.35 mg GAE (gallic acid equivalent)/g DM were obtained at the optimized extraction time of 10 min, 100 °C and 40% ethanol, respectively. Although *Tetraselmis* KCTC 12236BP was preprocessed by hexane to remove lipid for bio-diesel production, the results showed LEA contains relatively high level of polyphenols compared to untreated microalgae which can be used in the production of value-added materials. The predictions obtained from the developed Peleg's model were compared with the experimental data under the same operating conditions. The predicted and experimental data were consistent, indicating the reliability of the model.

Key words: Microalgae, byproduct, Polyphenol, Extraction, Optimization

[†]To whom correspondence should be addressed.

E-mail: kimjw1028@sunmoon.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.

1. 서 론

화석에너지 고갈과 지구온난화 문제 해결을 위해 바이오매스 기반의 신재생에너지 개발이 활발히 진행돼왔으며, 이 중에서 식량자원과 충돌이 없고 이산화탄소 저감이 가능한 농부산물물을 이용한 2세대 목질계 바이오에탄올 연구개발이 꾸준히 이뤄져 왔다[1]. 하지만 목질계 바이오에탄올은 주성분인 셀룰로오스, 헤미셀룰로오스, 리그닌을 분해하는 전처리에 비용이 많이 들고 전분계 에탄올 공정 대비 전처리/당화공정과 같은 추가 공정이 필요함에 따라 설비투자비가 3~5배 높아 화석연료 대비 경쟁력 확보가 어렵다는 단점이 있어 보다 경제적으로 바이오연료를 생산을 위한 3세대 바이오매스인 미세조류가 주목 받기 시작했다[2]. 미세조류가 연간 1에이커(약 1220평)에서 생산 가능한 바이오디젤의 양은 2500갤런으로 기존 식용작물 유래 바이오디젤의 48갤런에 비해 생산성이 월등히 높으며 식용작물을 원료로 사용하지 않아 식량문제와 결부되지 않으며 탄소고정능이 매우 우수하고 지질 분리를 위한 추가설비가 최소화 된다는 장점을 지닌다[3,4]. 미세조류로부터 바이오디젤 생산은 여러 장점에도 불구하고 생산가가 예측치는 2.5 US\$/kg로 식물유래 디젤에 비해 3배 가량 높아 미세조류 디젤의 시장진입과 확대에 큰 걸림돌로 작용하고 있다. 이러한 미세조류 디젤의 경제성 문제 극복을 위해 부산물로부터 고부가가치 산물 생산을 통해 부산물 credit을 확보하여 생산가를 낮추는 경제성 확보 방안이 필요하다.

바이오디젤 생산을 위해 지질이 제거되고 남은 미세조류 부산물을 탈지미세조류라고 하며 탄수화물, 단백질과 여분의 잔류 지질이 주요성분으로 구성되어 있다. 이와 더불어 식물계에 널리 존재하는 폴리페놀과 같은 생리활성물질도 함께 존재한다고 알려져 있다. 식물체 유래의 폴리페놀은 지방의 산화과정에서 생성되는 유리 라디칼과 결합하여 산패를 억제해주고 생체 내에서는 자외선, 스트레스 또는 급격한 운동에 의해서 생성되는 활성산소(O_2 , O_2^- , H_2O_2 , $OH^\cdot$)에 의한 지질막 산화반응을 억제하여 암, 동맥경화증, 고혈압, 당뇨, 염증 및 노화를 예방에 효능이 있다고 알려진 생리활성물질로 많은 연구가 진행되고 있다[5]. 특히, 식물유래의 폴리페놀은 천연 항산화제로 분류되어 합성 항산화제의 독성 및 발암성 문제를 해결할 수 있는 합성 항산화제에 비해 보다 안전한 항산화제라 할 수 있다[6].

미세조류로부터 지질 추출 후, 부산물로 남은 미세조류는 버려지거나 동물의 사료로 사용 되는 등 활용도가 낮은 부산물로 취급되고 있는 현실이다. 미세조류 부산물인 탈지미세조류로부터 고부가가치 물질 생산을 통한 부산물 credit을 확보하기 위해 탈지미세조류로부터 고부가가치 물질인 폴리페놀 추출조건을 최적화하고 탈지미세조류에 특화 된 추출공정을 개발하는 것이 필요하다. 이에 따라 본 연구에서는 탈지미세조류 열수추출에서 폴리페놀 추출에 영향을 미치는 주요 인자인 용매, 추출시간, 온도, 에탄올 용액 농도 최적화를 통해 보다 효과적인 폴리페놀 추출공정을 제안하고자 한다.

2. 실험

2-1. 미세조류

본 연구에서는 인하대학교 해양바이오연구센터에서 실내배양기에서

배양 후 탈지과정을 마친 미세조류 *Tetraselmis* KCTC 12236BP를 제공받아 60 °C 오븐에서 12시간 건조하여 사용하였다. 건조 탈지미세조류는 실험에 사용할 때까지 5 °C 냉동보관 하였다. 추출용매로 사용한 유기용매는 Sigma-Aldrich 사(Sigma, St. Louis, MO, USA)와 Samchun Pure Chemical 사(Seoul, Korea)의 순도 95% 이상 시약을 사용하였으며 분석에 사용된 시약은 Sigma-Aldrich사의 일급 이상 시약을 사용하였다.

2-2. 추출 조건

냉장보관 된 탈지미세조류는 추출실험에 앞서 60 °C 오븐에서 건조무게의 변화가 없을 때까지 건조하여 실험에 사용하였다. 용매를 이용한 폴리페놀 추출을 위해 밀폐형 유리튜브에 건조 시료 1 g과 용매 20 ml를 첨가하여 진탕배양기(KMC-1205SW1, Vision, Daejeon, Korea)에서 추출조건에 따라 온도와 시간을 조절하여 추출을 진행하였다. 추출 후, 1 ml의 추출액을 마이크로 튜브에 넣고 원심분리하여 상등액을 회수하여 필요에 따라 희석하여 폴리페놀 측정에 사용하였다.

2-3. 총 폴리페놀(total polyphenol compound) 함량 분석

총 폴리페놀 함량은 Milutinović 등의 방법에 따라 수행하였다[7]. Folin-Ciocalteu's 페놀용액을 희석 추출물에 첨가하여 폴리페놀 화합물에 의해 청색으로 환원 발색하는 원리에 근거하여 흡광도 변화로 폴리페놀 농도를 측정하였다. 각 추출물을 1 mg/mL로 희석한 후, 이 시료액 0.25 mL에 증류수 0.75 mL를 첨가하고 Folin & Ciocalteu's 페놀용액 0.25 mL를 첨가하고 5분 후 $NaCO_3$ 용액 0.25 mL첨가하여 실온에서 1시간 반응을 진행시킨 후 640 nm에서 분광광도계(UV-1650PC, Shimadzu, Kyoto, Japan)로 흡광도를 측정하였다. Gallic acid (Sigma, St. Louis, MO, USA)를 표준물질로 사용하였으며, 총 폴리페놀 함량은 흡광도와 gallic acid간의 표준곡선을 작성한 후 건조 시료 kg dry material (DM)당 g gallic acid equivalents (GAE)로 나타내었다.

2-4. 고-액 추출 kinetics

추출 시간에 따른 고-액 추출곡선은 Peleg 등이 제안하고 Kojic등의 포도씨로부터 폴리페놀 추출실험 의해 검증 된 모델을 사용하였으며 LEA로부터 폴리페놀 추출은 아래와 같은 식을 따른다[8].

$$C(t) = C_0 + \frac{t}{K_1 + K_2 \times t} \quad (1)$$

$C(t)$ 는 추출시간 t 에서 폴리페놀의 농도(mg GAE/g DM); t 는 추출시간(min); C_0 는 $t=0$ 에서 초기 폴리페놀 농도(mg GAE/g DM); K_1 는 Peleg's rate constant (min·g DM/mg GAE); K_2 는 Peleg's capacity constant (mg DM/g GAE).

위 식 (1)에서 추출시간 0분에서 초기농도는 0 mg GAE/g DM이므로 초기조건에 따라 아래와 같이 표현될 수 있다.

$$C(t) = \frac{t}{K_1 + K_2 \cdot t} \quad (2)$$

K_1 은 Peleg rate constant로 initial extraction rate (h)의 역수로 표현된다.

$$h = \frac{1}{K_1} \text{ (mg GAE/g-min)} \quad (3)$$

$$C(t \rightarrow \infty) = C_e = \frac{1}{K_2} \text{ (mg GAE/g DM)} \quad (4)$$

K_2 는 Peleg capacity constant로 추출 후반의($t \rightarrow \infty$) 폴리페놀 농도(C_e)와 관련이 있으며 C_e 와 역수관계이다.

3. 결과 및 고찰

3-1. LEA 폴리페놀 추출조건 최적화

LEA로부터 폴리페놀을 추출을 위한 최적의 용매를 선정하기 위해 물과 여러 유기용매를 사용하여 60 °C에서 30분간 폴리페놀 추출실험을 진행하였다. Fig. 1에 보는 바와 같이 총 폴리페놀 추출에 있어 열수를 이용한 추출이 다른 유기용매(>98%)에 비해 우수한 것을 확인할 수 있었다. 일반적으로 식물체로부터 폴리페놀 추출 시, 에탄올 또는 메탄올과 같은 유기용매를 이용하는 것이 열수추출에 비해 우수한 효과를 보인다고 알려져 있으나 탈지미세조류의 경우 수확된 미세조류로부터 지질을 추출하기 위해 소수성 유기용매(헥산)를 이용한 지질 추출로 소수성 폴리페놀이 우선 제거되어 탈지미세조류에서 유기용매를 이용한 추출이 열수추출에 비해 추출성능이 낮은 것으로 해석할 수 있다[9].

LEA로부터 열수추출을 이용하여 폴리페놀을 추출할 때, 추출시간이 폴리페놀추출에 미치는 영향을 파악하고자 각 추출시간에서 폴리페놀 농도를 비교하였다(Fig. 2). 열수추출 초기 2.5분까지 폴리페놀 추출농도가 1.49 mg GAE/g DM까지 증가하나 이후에 추출시간 증가에 따른 폴리페놀 농도 증가는 관찰되지 않았다. 본 실험에서 비교적 낮은 추출온도인 60 °C에서 짧은 열수접촉에 의해 폴리페놀을 효과적으로 추출할 수 있었고 초기 2.5분의 초기추출상수(h)가

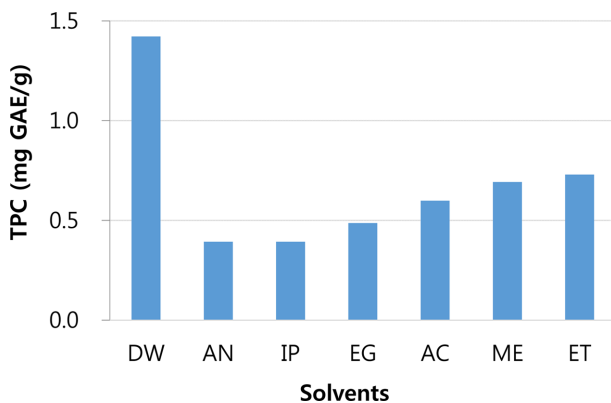


Fig. 1. Effect of solvents on extraction of LEA total polyphenolic compounds. DW=distilled water; AN=Acetonitrile; IP=Isopropyl alcohol; EG=Ethylene glycol; AC=Acetone; ME=methanol; ET=ethanol. Extraction condition: 60 °C, 30 min, 200 rpm.

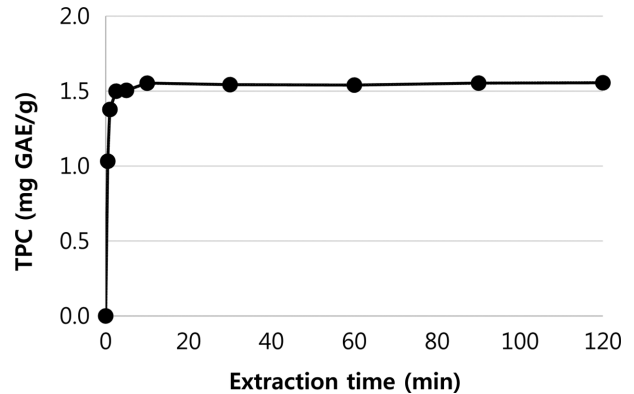


Fig. 2. Effect of process time on extraction of LEA total polyphenolic compounds. Extraction conditions: hot-water extraction, 60 °C, 200 rpm.

13.1 mg GAE/g-min 로 높은 것으로 보아 열수추출을 이용한 LEA 폴리페놀 추출은 매우 효과적인 공정임을 알 수 있다(Table 1).

열수추출 온도가 LEA 폴리페놀 추출에 미치는 영향을 평가하기 위해 25~100 °C 추출온도에서 폴리페놀 농도를 비교하였다(Fig. 3). 열수추출의 온도가 증가함에 따라 폴리페놀 농도가 비례하여 증가하는 것을 확인할 수 있었으며 100 °C 열수추출에서 가장 높은 1.88 mg GAE/g DM 폴리페놀을 얻을 수 있었다. 열수를 이용한 추출공정에서 100 °C에서 열수추출이 20 °C에 비해 폴리페놀 농도에 있어 1.3 배 증가함을 볼 수 있다. 이는 기존연구에서 보고 된 포도와 사과 부산물로부터 폴리페놀 추출 시 추출온도가 증가할수록 총 폴리페놀 함량이 비례하여 증가하며 120 °C 이상에서는 총 폴리페놀 함량이 증가하는 것으로 보아 식물체 유래 폴리페놀은 열안정성이 있으며 폴리페놀 최대 추출을 위해 보다 높은 온도를 적용해도 될 것으로 판단된다[5,10].

식물체로부터 폴리페놀 추출 시, 에탄올 또는 메탄올과 같은 유기

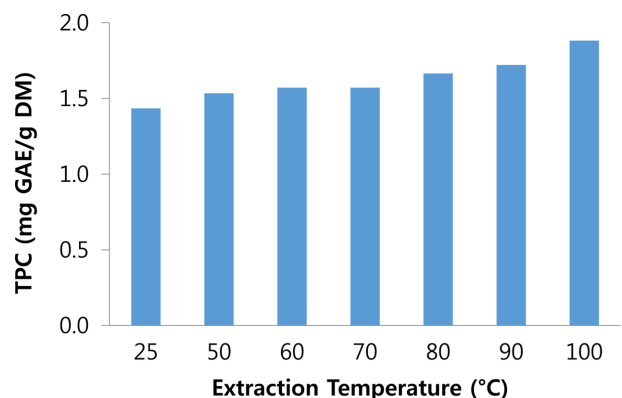


Fig. 3. Effect of process temperature on extraction of LEA total polyphenolic compounds. Extraction conditions: hot-water extraction, 200 rpm, 10 min.

Table 1. Values of Peleg's constants (K_1 and K_2) and initial extraction rate for solid-liquid extraction of LEA polyphenols

Solvent	Temp. (°C)	Eq. conc. (mg GAE/g DM)	K_1 (min·g DM/mg GAE)	K_2 (g DM/mg GAE)	h (mg GAE/g-min)
Hot water	60	1.55	0.076	0.643	13.1
Hot water	100	1.96	0.056	0.509	17.8
Ethanol (40%)	100	3.35	0.044	0.298	22.9

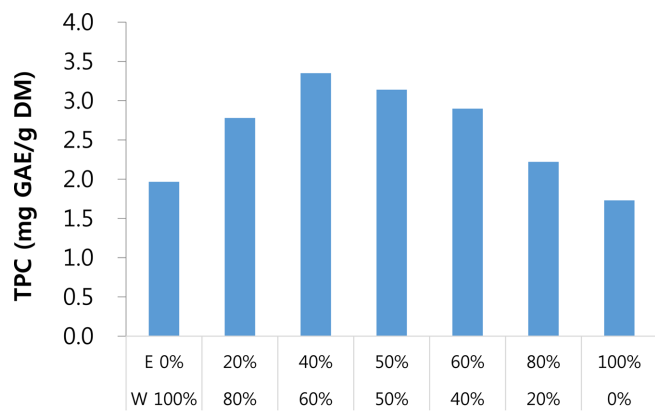


Fig. 4. Effect of concentration of ethanol on extraction of LEA total polyphenolic compounds. Extraction conditions: hot-water extraction, 100 °C, 200 rpm, 10 min.

용매를 이용하는 것이 열수추출에 비해 우수한 효과를 보인다고 밝혀져 있다[10]. 본 실험에서는 식품 또는 화장품 소재용 폴리페놀 추출을 위해 용매로 널리 사용되는 에탄올 첨가의 효과를 평가하기 위해 에탄올 용액 농도를 0~100% (v/v)로 변화시켜 폴리페놀 추출농도를 비교하였다(Fig. 4). 에탄올 농도가 40%로 증가함에 따라 폴리페놀 함량이 비례하여 증가하는 경향을 보였으며 40% 이후 에탄올 농도가 증가함에 따라 폴리페놀 농도가 다시 감소함을 확인할 수 있었다. 에탄올 용액 40%를 이용한 열수 추출이 동일 조건에서 열수추출에 폴리페놀 생산이 1.7배 높음을 확인할 수 있었다. 이는 머위잎으로부터 폴리페놀 추출에 있어 에탄올과 물의 혼합용액에서 추출효과가 가장 컸다는 결과와 일치한다. 40% 에탄올 용액을 이용한 폴리페놀 추출 시 추출능이 향상된 것은 유기용매와 열수에 의해 추출되는 폴리페놀의 종류가 다르기 때문이라 예상되며 열수에 의한 추출과 에탄올에 의한 추출이 상승효과를 보인 것으로 판단된다[11].

3-2. 고액 추출시스템 모사

Fig. 2~5에서 보는 바와 같이 열수와 40% 에탄올 열수추출의 각 시간별 폴리페놀 농도를 비교했을 때 40% 에탄올 열수추출의 초기 추출속도와 평형농도가 열수추출에 비해 모두 높음을 확인할 수 있다. 열수와 에탄올 용매의 추출 kinetics를 비교하기 위해 위해 Peleg 등이 제안한 수학적 모델을 적용하여 초기추출속도(h)를 비교하였다(Table 1). 100 °C에서 모사를 통해 열수와 에탄올 추출을 진행했을 때 초기추출속도는 각각 13.1과 22.9 g GAE/g·min로 40% 에탄올 용액에서 초기추출속도가 1.7배 높음을 알 수 있다. Fig. 5는 추출실험에서 얻은 값과 Peleg 모델을 적용하여 예측한 값의 비교 시, 두 실험 결과 모두 Peleg 제시 모델과 잘 일치함을 확인할 수 있다. LEA로부터 폴리페놀 추출에 있어 Peleg의 second-order kinetic model이 두 용매 모두에서 효과적인 예측이 방법임을 증명할 수 있어 향후 열수를 이용한 폴리페놀 추출에 있어 추출경향 예측이 가능하리라 판단된다.

4. 결 론

본 연구에서는 미세조류를 이용한 바이오디젤 생산 부산물인 LEA로부터 화장품 등에 향산화 물질로 사용될 수 있는 고부가가치

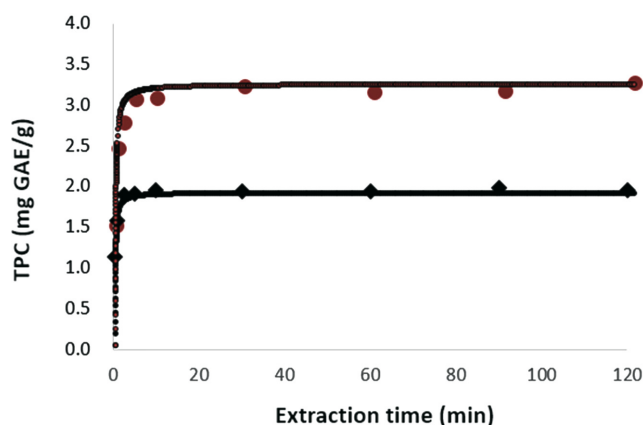


Fig. 5. Simulation of hot-water and hot-water with 40% ethanol using Peleg's model. ●: Experimental data from hot-water extraction with 40% ethanol ◆: Experimental data from hot-water extraction, —: Simulation using Peleg's model.

산물인 폴리페놀 생산에 열수추출 용매와 공정변수가 주요한 영향을 미침을 확인할 수 있었고 주요 공정변수의 최적추출 조건을 도출하였다. 탈지미세조류로부터 폴리페놀 추출에 있어 유기용매에 의한 지질 추출공정이 선행되어 열수추출 적용 시 40% 알코올을 용매 사용하는 것이 보다 효과적임을 확인할 수 있었다. LEA의 열수 및 에탄올 첨가 열수 추출로 1.61과 3.02 mg GAE/g DM의 폴리페놀을 얻을 수 있었다. 이를 수학적 모델로 모사했을 때, 모델에 의한 예측치가 실험으로부터 구한 추출량과 잘 일치함을 알 수 있었다. 40% 에탄올 용액 열수추출에서 최대 3.35 mg GAE/g DM를 얻을 수 있었다. Goiris 등은 탈지이전 32종의 미세조류의 폴리페놀 함량에 대해 보고한 바가 있다. 탈지 이전의 해양 미세조류가 포함한 폴리페놀은 1.47~4.57 mg GAE/g DM 범위에 분포하며 *Tetraselmis* sp.와 *suecica*의 폴리페놀 함량이 3.74와 1.71 mg GAE/g DM임을 감안하면 본 실험의 탈지과정을 거친 *Tetraselmis* KCTC 12236BP는 탈지 이전의 일반 미세조류와 동등 수준의 폴리페놀을 포함함을 알 수 있었다[12]. 본 실험은 바이오디젤 생산을 위해 유기용매 전처리된 LEA로부터 폴리페놀 추출에 대한 초기 연구 논문으로 LEA로부터 고부가가치물질인 폴리페놀 생산에 대한 가능성을 제시한 연구로 그 의의가 있다고 하겠다. 일반적으로 유기용매 또는 물의 pH 조절에 의해 폴리페놀 추출이 향상될 수 있다고 알려진 바, 향후 산 또는 알칼리 첨가 용매를 이용한 폴리페놀 추출 증대 방안에 대한 연구가 필요하다고 하겠다.

감 사

이 논문은 해양수산부의 재원으로 해양생명공학기술개발사업(PJT200255, 해양미세조류 이용 바이오디젤 생산기술 개발) 연구개발비 지원에 의해 수행되었습니다.

References

- Jang, S. Y. and Kim, J. S., "Effect of SAA Pretreatment on SSF at Low Temperature to Bioethanol Production from Rice Straw," *Korean Chem. Eng. Res.*, **52**, 430-435(2014).
- Sindhu, R., Binod, P. and Pandey, A., "Biological Pretreatment *Korean Chem. Eng. Res.*, Vol. 54, No. 3, June, 2016

- of Lignocellulosic Biomass - An Overview," *Bioresource Technol.*, **199**, 76-82(2016).
3. Ryu, Y. J., Seong, D. H., Lim, S. M. and Lee, C. G., "Optimization of Lipid Extraction Methods and Biodiesel Production from *Dunaliella tertiolecta*," *Korean Soc. New Renewable Energy*, **5**, 96-96(2013).
 4. Kang, S. K., Kim, S. W. and Lee, J. W., "Optimization of Cross Flow Filtration System for *Dunaliella tertiolecta* and *Tetraselmis* sp. Microalgae Harvest," *Korean J. Chem. Eng.*, **32**, 1377-1380(2015).
 5. Park, J. N., Ali-Nehari, A., Woo, H. C. and Chun, B. S., "Thermal Stabilities of Polyphenols and Fatty Acids in *Laminaria japonica* Hydrolysates Produced Using Subcritical Water," *Korean J. Chem. Eng.*, **29**, 1604-1609(2012).
 6. Chon, S. U., Kim, D. K. and Kim, Y. M., "Phenolics Content and Antioxidant Activity of Sprouts in Several Legume Crops," *Korean J. Plant Resour.*, **26**, 159-168(2013).
 7. Milutinović, M., Radovanović, N., Ćorović, M., Šiler-Marinković, S., Rajilić-Stojanović, M. and Dimitrijević-Branković, S., "Optimisation of Microwave-assisted Extraction Parameters for Antioxidants from Waste *Achillea millefolium* Dust," *Ind. Crops Prod.*, **77**, 333-341(2015).
 8. Bucić-Kojić, A., Planinić, M., Tomas, S., Bilić, M. and Velić D., "Study of Solid-liquid Extraction Kinetics of Total Polyphenols from Grape Seeds," *J. Food Eng.*, **81**, 236-242(2007).
 9. Jung, J. K., Jung, B. R., Shin, B. Y. and Bang, M. A., "Polyphenol Analysis of the Extracts from *Allium hookeri* by Different Pre-treatment," *Plant Resour. Soc. Korea.*, **5**, 148-141(2013).
 10. Kim, Y. S., Kim, R., Moon, J. H., Ji, J. R., Choi, H. D. and Park, Y. K., "Optimization of Extraction Conditions of Polyphenolic Compounds from Apple Pomace by Response Surface Methodology," *Korean J. Food Sci. Technol.*, **41**, 245-250(2009).
 11. Lee, D. W., Lee, S. Y., Chung, H. S., Choi, Y. H., Im, D. S. and Lee, Y. G., "Optimization of a Process for Extraction of Petasin from *Petasites japonicus* Leaves by Response Surface Methodology," *J. Life Sci.*, **23**, 1360-1364(2013).
 12. Goiris, K., Muylaert, K., Fracze, I., Foubert, I., Brabanter, J. and Cooman, L., "Antioxidant Potential of Microalgae in Relation to Their Phenolic and Carotenoid Content," *J. Appl. Phycol.*, **24**, 1477-1486(2012).