

[단보, Short communication]

재조합 대장균으로 제조된 δ -aminolevulinic acid첨가에 따른 미세조류 *Isochrysis galbana*, *Chlorella* sp.의 성장 특성

이시우, 설보경, 김춘섭¹, 김위식²

국립수산과학원 남동해수산연구소, ¹(주)엔바이로젠, ²전남대학교 수산해양대학 수산생명의학과

Characteristics of growth about addition of δ -aminolevulinic acid with recombinant *Escherichia coli* at *Isochrysis galbana* and *Chlorella* sp.

Si-Woo Lee, Bo Gyeong Seol, Choon-Sup Kim¹ and Wi-Sik Kim²

Southeast Sea Fisheries Research Institute, NIFS, Tongyeong 53085, Korea

¹EnbioGene, Yeosu 59771, Korea

²Department of Aquaculture Medicine, Chonnam National University, Yeosu 59626, Korea

ABSTRACT

In this study, δ -aminolevulinic acid (δ -ALA), a plant growth promoter, production with *E. coli* recombined with microalgae *Isochrysis galbana* and *Chlorella* sp. was added without (control), f/2 medium, δ -ALA 20 ppm, f/2 medium + δ -ALA 1, 10, 20 ppm was added and cultured for 12 days to investigate the number of cells and the specific growth rate (SGR). In *I. galbana*, a haptophytes, both the cell number and SGR were significantly higher in the experimental group cultured with f/2 medium at 2, 3, 5 day ($P < 0.05$). In the δ -ALA added group, f/2A10 with 10 ppm of δ -ALA added to f/2 medium was significantly higher than in all groups expect f/2A20 at 5 day ($P < 0.05$). In *Chlorella* sp., a chlorophyta, the cell number and SGR of f/2A1 were significantly higher than those of all groups except f/2A20 (it was excluded from the culture due to a test error) at 1 day ($P < 0.05$). At 2, 3 and 5 day, all of the δ -ALA added groups showed significantly higher cell numbers and SGR than the control and f/2 groups ($P < 0.05$). At 8 day, f/2A1 was significantly higher than that of all the groups including the δ -ALA-added group ($P < 0.05$), and continued until the 12th day. Therefore, δ -ALA production with recombinant *E. coli* had little growth promoting effect in *I. galbana*, but showed a growth promoting effect in *Chlorella* sp..

Keywords: Microalgae, δ -aminolevulinic acid, Specific growth rate, *Isochrysis galbana*, *Chlorella* sp.

서 론

양식에 있어 먹이생물은 종자의 성장과 생존율에 직접적인 영향을 미치는 요인이며, 특히 미세조류는 수생 먹이사슬 에너

지 흐름에서 생물학적 출발점이 되므로 이매패류의 먹이생물로서 미세조류의 배양관리는 패류인공증자생산에서 필수적이다 (De Pauw and Pruder, 1986; Coutteau and Sorgeloos, 1992). 미세조류 (Microalgae) 는 김, 미역, 다시마 등의 육안으로 관찰되는 대형조류 (Macroalgae) 와 달리 현미경적으로 관찰할 수 있는 조류로서 종류만 수십만 종이 알려져 있으며, 양식현장에서는 약 40여종이 순수 분리되어 이용되고 있다 (Web, 1983; Benemann, 1992; Hur, 2004).

먹이생물로 활용되는 미세조류는 종류와 배지 (Brown *et al.*, 1997), 수확시기 (Min *et al.*, 1995) 및 배양 환경조건 (Min and Hur, 2015) 에 따라 달라진다. 특히, 사육대상 생물에 따라 먹이생물로서 적절한 종을 선택하는 것은 생존율과

Received: December 12, 2021; Revised: December 22, 2021;
Accepted: December 31, 2021

Corresponding author: Seol, Bo Gyeong

Tel: +82 (55) 640-4776, e-mail: bgs1124@naver.com

1225-3480/24800

This is an Open Access Article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License with permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproducibility in any medium, provided the original work is properly cited.

성장을 향상시키는데 있어 매우 중요하다 (Ballantine *et al.*, 1979; Brown *et al.*, 1997; Hur, 2004; Min and Hur, 2015).

대부분의 미세조류는 형태에 따라, 하나의 세포인 단세포 (unicell), 하나 이상의 세포들이 영성하게 배열되어 있거나 조직화된 군체 (colony), 세포의 한쪽 끝이 세포벽을 공유하며 다른 한쪽 끝과 이어지면서 길게 배열하는 유형의 사상체 (filament) 등으로 구분할 수 있고, 육안으로는 관찰이 어려워 현미경을 이용해야 한다.

미세조류의 활용은 우수한 바이오디젤 생산원료로 에너지 분야에서 사용되고 있고 (Oh and Na, 2015), 화학분야에서는 다양한 유용물질을 생산하고 있으며 (Kim *et al.*, 2017), 환경분야에서는 수질 오염원과 이산화탄소를 함께 제거하는 장점을 이용해 이산화탄소를 고정하거나, 폐수처리에 이용하는 등 환경문제 해결에도 활용되고 있다 (Jeon *et al.*, 2008).

그러나 미세조류의 다양한 활용과 수요에 비해 대량배양은 낮은 경제성과 비생산적인 배양기간을 단점으로 가지고 있어 충분한 생산과 공급이 이루어지지 않고 있다. 특히 이매패류 양식장에서는 주 먹이공급원인 미세조류의 공급부족으로 이매패류 실내양식에서는 초기 유생 단계 이후로 공급이 어렵다. 또한 현재 배양기술로는 미세조류를 대량배양을 하기 위해 넓은 면적을 갖춘 대량 배양시설이 필요하고, 높은 시설비용과 장기간 배양과정이 소요된다 (허, 2002).

δ -aminolevulinic acid (δ -ALA)는 C-5의 지방족 화합물로서 각종 유기체의 tetrapyrrole 생합성 (porphyrin, chlorophyll, hem, vitamin B12) 과정에서 발견되는 중간물질의 하나로, hem구조를 가진 각종 효소나 prophyrin중간물질, 비타민 등의 제조와 chlorophyll-a의 전구물질로 알려져 있으며, 주로 광합성세균이나 조류, 그리고 식물에서 분리된다 (Beale and Castelfranco, 1974; Ferreira and Gong, 1995). δ -ALA의 합성은 화학적 합성과 생물학적 합성을 통한 방법으로 이루어지나 화학적 방법으로 δ -ALA를 합성하는 경우, 합성단계가 복잡하고 생산비용이 비싸며 생산 수율이 낮은 문제점이 있다 (Yang *et al.*, 2009).

δ -ALA혼합물들은 저농도에서도 식물성장을 빠르게 촉진시키며 (Hotta *et al.*, 1997; An *et al.*, 2006), 고농도에서는 제초제로 활용되고 있다 (Rebeiz *et al.*, 1984; An *et al.*, 2006b; Kim *et al.*, 2006). 또한 δ -ALA혼합물은 식물의 색상 향상과 저온, 고염분에 대한 내성 유도에도 활용된다 (Sasaki *et al.*, 2002).

따라서 본 연구에서는 이매패류 등 먹이생물로 활용되는 미세조류인 *Isochrysis galbana*와 *Chlorella* sp.에 δ -ALA첨가에 따른 성장효과를 조사하였다.

재료 및 방법

실험에 사용된 미세조류는 이매패류용 먹이생물로 활용되는 착편모조류인 *Isochrysis galbana*, 녹조류인 *Chlorella* sp.를 한국미세조류배양은행 (Korea Marine Microalgae Culture Center, KMMCC, 현 KIOST 시료도서관)에서 분양받아 사용하였다. 실험구는 대조구 (Control), f/2 1 mL/L 농도 배지 (f/2), δ -ALA 20 ppm 단독첨가 (A20-only), f/2 배지+ δ -ALA 1 ppm (f/2A1) 와 f/2 배지 + δ -ALA 10 ppm (f/2A10), f/2 배지 + δ -ALA 20 ppm (f/2A20) 으로 설정하여 3반복으로 실시하였다. 실험구 배양수는 1 μ m이하로 여과하여 고압멸균된 해수를 사용하였으며, 각 실험구는 250 mL 삼각 유리 플라스크에 대조구와 A20-only를 제외하고 f/2배지 농도는 1 mL/L로 하여, δ -ALA를 각 실험구별로 설정된 농도로 첨가하였다. 각 실험구별로 준비된 삼각 플라스크에는 실험에 사용될 미세조류인 *I. galbana*, *Chlorella* sp.를 각각 9,320 cell/mL, 17,600 cell/mL를 접종하였다. 접종된 플라스크는 배양 온도 20-24 $^{\circ}$ C, 조도 약 3,000 lux로 12일간 배양하면서, 1, 2, 3, 5, 8, 12일에 세포수와 성장률을 측정하였다. 세포수는 hematocytometer로 계수하였으며, 성장률은 Guillard (1973)의 방법으로 일간성장률 (specific growth rate, SGR)을 다음과 같은 식으로 측정하였다.

$$SGR = 3.322 \times (N_2/N_1) / (t_2-t_1)$$

여기서, t_2 , t_1 은 접종 후 배양일 수, N_2 , N_1 은 t_2 , t_1 일 때의 세포밀도 이다.

통계처리

각 실험구 간 일별 성장 결과에 대한 평균간 통계는 SPSS PASW Statistics (ver. 18, IBM co. ltd., 2009, USA) 프로그램을 이용하여 일원분산분석 (one way analysis of variance, ANOVA)을 실시하여 유의성을 $P < 0.05$ 수준에서 실시하였으며, 유의성의 나타난 결과에 대해서는 사후분석을 Duncan's multiple range test (Duncan, 1955)를 이용하여 유의성을 나타내었다.

결과 및 고찰

먹이생물로 사용되는 미세조류는 배양에 조도 등 사육 환경이 중요한 요인으로 작용하지만 (Min and Hur, 2015), 미세조류 생산과 개발에는 안정적인 영양을 공급하는 배지 선택이 중요하며 (Montserrat *et al.*, 1993; Gong and Chen, 1997) 배지의 화학적 조성을 포함한 몇가지 요인에 의존한다

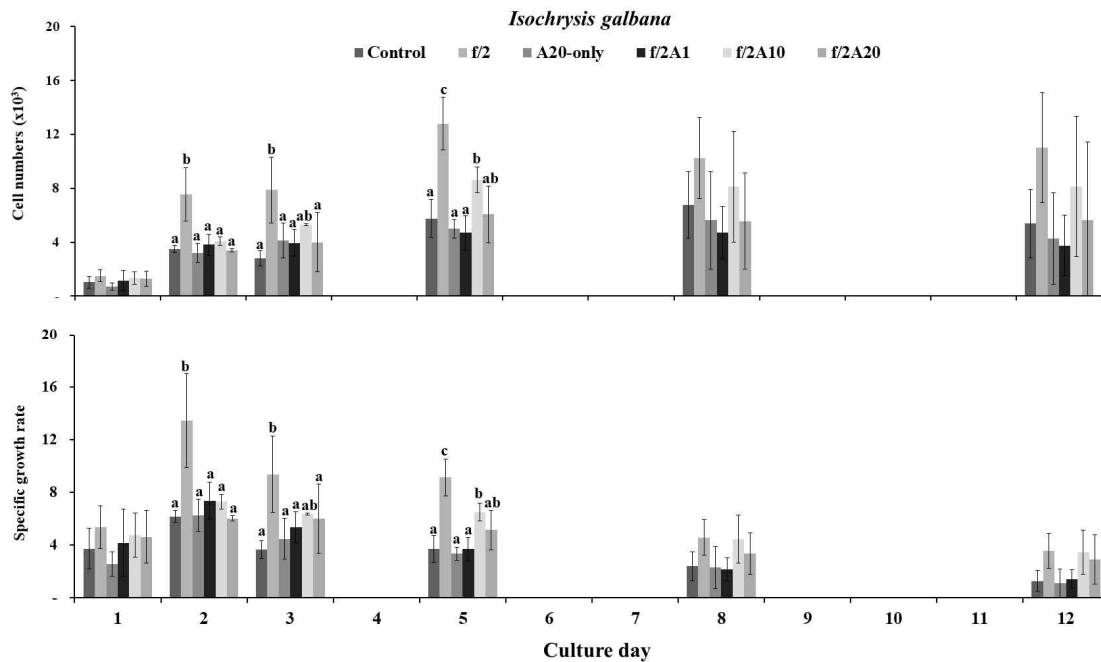


Fig. 1. Changes in cell number and specific growth rate (SGR) by culture day of *Isochrysis galbana* for the addition δ -aminolevulinic acid (δ -ALA) prepared to recombinant *E. coli* in f/2 medium. Different letters on the bar means significantly difference ($P < 0.05$).

(Borowitzka, 2005). 미세조류 배양에서는 여러 배지를 사용할 수 있지만 최대 성장을 위해 어떤 배지가 최적인지 아는 것이 필수적이다 (Ilavarasi *et al.*, 2011). 특히 미세조류를 최대 성장까지 빠르게 도달할 수 있는 배지 조건 또는 화학적 조성물은 상업적 이매패류 종자생산 원가의 15-85%를 차지하는 배양비용을 낮추고 (Coutteau and Sorgeloos, 1992; Min and Hur, 2015) 배양 시간적인 면에서 유리하게 작용할 수 있다.

δ -ALA는 식물에게 빠른 성장 촉진 효과를 나타내는 것으로 보고되고 있지만 (An *et al.*, 2006a) 고농도로 사용 시 제초 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다 (An *et al.*, 2006a, Kim *et al.*, 2006). 본 연구에서는 이러한 δ -ALA를 먹이생물로 활용되는 착편모조류인 *I. galbana*에 농도별로 첨가하여 12일간 배양한 결과, 1일을 제외한 2, 3, 5일까지 f/2배지로 배양된 실험구가 세포수와 SGR 모두 유의적으로 높게 나타났다 ($P < 0.05$). δ -ALA 첨가구에서는 배양 5일에 f/2배지에 δ -ALA 10 ppm을 첨가한 f/2A10가 f/2A20을 제외하고 유의적으로 높았다 ($P < 0.05$). 이러한 결과는 착편모조류인 *I. galbana*에서는 단기적인 성장촉진 효과는 나타나지 않는 것으로 판단된다. δ -ALA를 저농도로 식물에게 투여할 경우, 식물의 성장을 촉진시키지만 (Nishihara *et al.*, 2003; An *et al.*, 2006a; Yonezawa *et al.*, 2015) 고농도로 투여할 경우 제초제로 작용하여 식물에게 치명적일 수 있다고 보고되어 있

다 (Guk, 2003; Zhang *et al.*, 2008). 본 연구에서는 δ -ALA 첨가가 미세조류의 증식이 오히려 저해되는데 이는 δ -ALA가 *I. galbana*에 제초제로서 작용되었을 가능성도 있다. 그러나 본 연구와 관련하여 발표되지 않은 예비연구의 미자료에서는 f/2배지에 δ -ALA 5 ppm을 첨가하여 배양 시, 15일 이후부터 급격한 세포수 증가가 확인되었으나 (unpublished) 장기간 배양 시에는 효과를 볼 수 있지만, 비용과 시간적인 면에서는 비효율적이다. 반면에 녹조류인 *Chlorella sp.*에서는 배양 1일부터 f/2A1이 세포수와 SGR이 시험오류로 배양에서 제외한 f/2A20을 제외한 모든 실험구보다 유의적으로 높게 나타났으며 ($P < 0.05$), 배양 2일부터는 모든 δ -ALA 첨가구가 데조구, f/2실험구보다 세포수와 SGR이 모두 유의적으로 높게 나타났다 ($P < 0.05$). 이후 배양 5일까지 같은 패턴을 유지하였으며, 8일에는 f/2A1가 δ -ALA 첨가구를 포함한 모든 실험구보다 유의적으로 높게 나타나 ($P < 0.05$) 12일까지 지속되었다. 본 연구에서 사용된 δ -ALA가 *Chlorella sp.* 농도와 성장촉진 시간 유지에는 차이를 보였으나, 세포 수와 성장률을 향상시키며, 특히 f/2배지에 δ -ALA 1 ppm첨가가 성장촉진에 적합한 농도인 것으로 확인되었다 (Jaiio *et al.*, 2017). 식물호르몬에 의한 성장 향상은 세포 활성산소종 (cellular reactive oxygen species, ROS) 감소에 의한 것일 수 있다고 하였다. 본 연구의 결과 역시, 이러한 ROS 감소에 의한 것으로 추측할 수 있으나, 관련 연구는 추가적으로 수행되어야 할

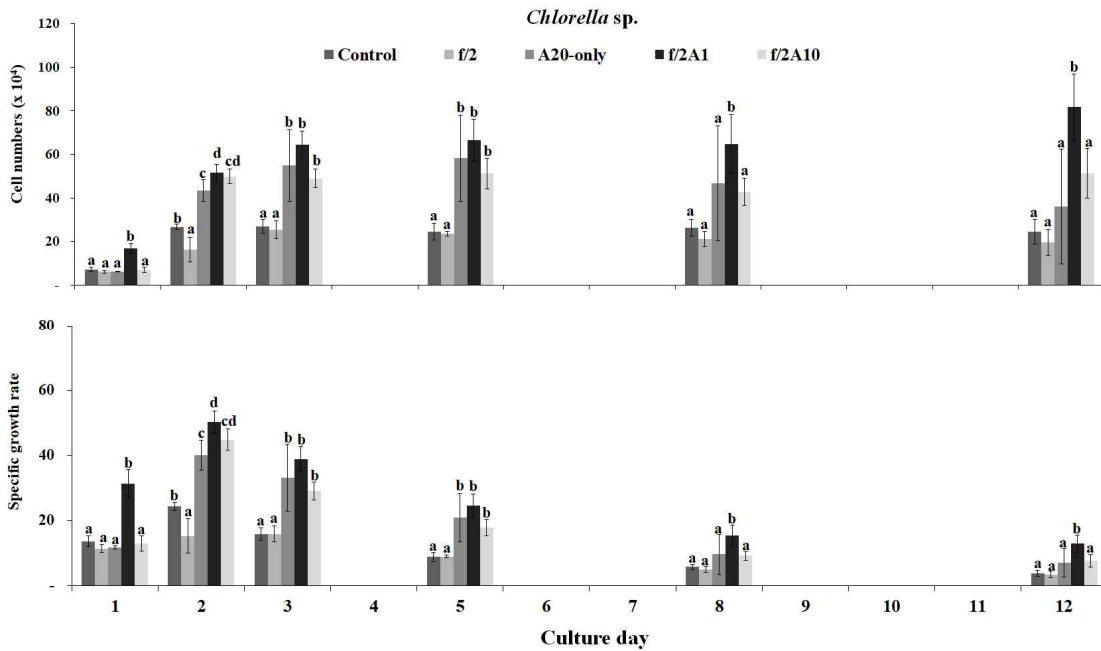


Fig. 2. Changes in cell number and specific growth rate (SGR) by culture day of *Chlorella* sp. for the addition δ -aminolevulinic acid (δ -ALA) prepared to recombinant *E. coli* in f/2 medium. Different letters on the bar means significantly difference ($P < 0.05$).

것으로 보인다. 결론적으로 재조합 유전자에 의해 조제된 δ -ALA는 착편모조류인 *I. galbana*에서는 성장촉진 효과는 미비하였으나, 녹조류인 *Chlorella* sp.에서는 성장촉진 효과를 나타내었으며, 이러한 δ -ALA에 대한 규조류 등 주요 먹이생물로 활용되는 미세조류에도 적용 가능 여부에 관한 연구도 수행되어야 할 것으로 판단된다.

요 약

본 연구는 미세조류인 *Isochrysis galbana*와 *Chlorella* sp. 에 재조합된 대장균으로 조제한 식물성장촉진제인 δ -aminolevulinic acid (δ -ALA) 를 무첨가 (control), f/2배지, δ -ALA 20 ppm, f/2배지 + δ -ALA 1, 10, 20 ppm 첨가하여 12일간 배양하여 세포수 및 일간성장율 (specific growth rate, SGR) 을 조사하였다. 착편모조류인 *I. galbana*에서는 1일을 제외한 5일까지 f/2배지로 배양된 실험구가 세포수와 SGR 모두 유의적으로 높게 나타났다 ($P < 0.05$). δ -ALA 첨가구에서는 배양 5일에 f/2배지에 δ -ALA 10 ppm을 첨가한 f/2A10가 f/2A20을 제외하고 유의적으로 높았다 ($P < 0.05$). 녹조류인 *Chlorella* sp.에서는 배양 1일부터 f/2A1이 세포수와 SGR이 시험오류로 배양에서 제외한 f/2A20을 제외한 모든 실험구보다 유의적으로 높게 나타났으며 ($P < 0.05$), 배양 2일부터는 모든 δ -ALA 첨가구가 대조

구, f/2 실험구보다 세포수와 SGR이 모두 유의적으로 높게 나타났다 ($P < 0.05$). 이후 배양 5일까지 같은 패턴을 유지하였으며, 8일에는 f/2A1가 δ -ALA 첨가구를 포함한 모든 실험구보다 유의적으로 높게 나타나 ($P < 0.05$) 12일까지 지속되었다. 따라서 재조합 대장균으로 제조된 δ -ALA는 착편모조류인 *I. galbana*에서는 성장촉진 효과는 미비하였으나, 녹조류인 *Chlorella* sp.에서는 성장촉진 효과를 나타내었다.

사 사

본 연구는 국립수산물과학원 수산과학연구소사업인 ‘지속가능한 남해안 패류양식 안정화 연구 (R2021018)’ 사업의 일환으로 수행하였으며, 지원에 감사드립니다.

REFERENCES

An, S.H., Kim, S.E., Lee, G.H., Choe, J.S., Hwang, G.J., Jeon, J.C. and Jo, G.M. (2006a) Promotion action of 5-aminolevulinic acid on growth of various plant species. *Korean Journal of Weed Science*, **26**(2): 180-186. [in Korean]

An, S.H., Kim, S.E., Lee, J.H., Choe, J.S., Hwang, G.J., Jeon, J.C. and Jo, G.M. (2006b) Growth inhibiting mode of action of 5-aminolevulinic acid in various crops. *Korean Journal of Weed Science*, **26**(2):

- 187-194. [in Korean]
- Ballantine, J.A., Lavis, A. and Morris, R.J. (1979) Sterols of the phytoplankton-effects of illumination and growth stage. *Phytochemistry*, **18**(9): 1459-1466.
- Beale, S.I. and Castelfranco, P.A. (1974) The biosynthesis of δ -aminolevulinic acid in higher plants: II. Formation of ^{14}C - δ -aminolevulinic acid from labeled precursors in greening plant tissues. *Plant Physiology*, **53**(2): 297-303.
- Benemann, J.R. (1992) Microalgae aquaculture feeds. *Journal of Applied Phycology*, **4**(3): 233-245.
- Brown, M.R., Jeffrey, S.W., Volkman, J.K. and Dunstan, G.A. (1997) Nutritional properties of microalgae for mariculture. *Aquaculture*, **151**(1-4): 315-331.
- Borowitzka, M.A. (2005) Culturing microalgae in outdoor ponds. *In*; Algal Culturing Techniques. (ed. by Andersen, R.A.). pp. 205-218. Academic Press, Boston.
- Coutteau, P. and Sorgeloos, P. (1992) The use of algal substitutes and the requirement for live algae in the hatchery and nursery rearing of bivalve mollusks : an international survey. *Journal of Shellfish Research*, **11**: 467-476.
- De Pauw, N. and Pruder, G. (1986) Use and production of microalgae as food in aquaculture: practices, problems and research needs. *In*; Realism in Aquaculture: Achievements, Constraints, Perspectives. (ed. by Bilio, M., Rosenthal, H. and Sinderman, C.J.) pp. 77-106. European Aquaculture Society, Bredene.
- Duncan, D.B. (1995) Multiple range and multiple F tests. *Biometrics*, **11**(1): 1-42.
- Ferreira, G.C. and Gong, J. (1995) 5-Aminolevulinic synthase and the first step of heme biosynthesis. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, **27**(2): 151-159.
- Gong, X. and Chen, F. (1997) Optimization of culture medium for growth of haematococcus pluvialis. *Journal of Applied Phycology*, **9**(5): 437-444.
- Guillard, R.R.L. (1973) Division rates. *In*; Handbook of Phycological Methods-Culture Methods and Growth Measurements. (ed. by Stein, J.R.) pp. 289-311. Cambridge University Press, Cambridge.
- Guk, Y.I. (2003) Mechanism of promotive effect and herbicidal action of 5-aminolevulinic acid on barley and wheat. *Korean Journal of Weed Science*, **23**(3): 285-293. [in Korean]
- Hotta, Y., Tanaka, T., Takaoka, H., Takeuchi, Y. and Konnai, M. (1997) Promotive effects of 5-aminolevulinic acid on the yield of several crops. *Plant Growth Regulation*, **22**(2): 109-114.
- Hur, Y.B. (2004) Dietary value of microalgae for larvae culture of Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Ph.D. thesis, Pukyong National University, 133pp. [in Korean]
- Ilavarasi, A., MubarakAli, D., Ramasamy, P., Baldev, E. and Thajuddin, N. (2011) Optimization of various growth media to freshwater microalgae for biomass production. *Biotechnology*, **10**(6): 540-545.
- Jiao, K., Chang, J., Zeng, X., Ng, I.S., Xiao, Z., Sun, Y., Tang, X. and Lin, L. (2017) 5-Aminolevulinic acid promotes arachidonic acid biosynthesis in the red microalga porphyridium purpureum. *Biotechnology for Biofuels*, **10**(1): 1-10.
- Jeon, S.M., Kim, I.H., Ha, J.M. and Lee, J.H. (2008) Overview of technology for fixation of carbon dioxide using microalgae. *Applied Chemistry for Engineering*, **19**(2): 145-150. [in Korean]
- Kim, A.R., Park, M.R., Kim, H.S., Kim, S.K. and Jeong, G.T. (2017) Optimization of *Chlorella saccharophila* cultivation and useful materials production. *Korean Chemical Engineering Research*, **55**(1): 74-79. [in Korean]
- Kim, H.G. (2006) Herbicidal effect of 5-aminolevulinic acid, a biodegradable natural substance, on barley and water foxtail (*Alopecurus aequalis*). *Korean Journal of Weed Science*, **26**(3): 254-261. [in Korean]
- Min, B.H. and Hur, S.B. (2015) Optimum culture condition on four species of microalgae used as live food for seedling production of bivalve. *The Korean Journal of Malacology*, **31**(1): 35-41. [in Korean]
- Min, K.S. Chang, Y.J., Park, D.W., Jung, C.G., Kim, D.H. and Kim, G.H. (1995) Studies on Rearing conditions for mass seedling production in Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Bulletin of National Fisheries Research and Development Agency*, **49**: 91-111. [in Korean]
- Montserrat, S., Iñaki, R., François, O., Francesc, G., and Carles, C. (1993) Application of factorial design to the optimization of medium composition in batch cultures of *Streptomyces lividans* TK21 producing a hybrid antibiotic. *Biotechnology letters*, **15**(6): 559-564.
- Nishihara, E., Kondo, K., Parvez, M. M., Takahashi, K., Watanabe, K., and Tanaka, K. (2003) Role of 5-aminolevulinic acid (ALA) on active oxygen-scavenging system in NaCl-treated spinach (*Spinacia oleracea*). *Journal of plant physiology*, **160**(9): 1085-1091.
- Oh, Y.G., and Na, J.G. (2015) Microalgal Biodiesel Production Process. *KIC News*, **18**(3): 1-14. [in Korean]
- Rebeiz, C.A., Reddy, K.N., Nandihalli, U.B., and Velu, J. (1990) Tetrapyrrole-dependent photodynamic herbicides. *Photochemistry and photobiology*, **52**(6): 1099-1117.
- Sasaki, K., Watanabe, M., and Tanaka, T. (2002) Biosynthesis, biotechnological production and applications of 5-aminolevulinic acid. *Applied microbiology and biotechnology*, **58**(1): 23-29.
- Webb, K.L. (1983) Phytoplankton as a food source for bivalve larvae. *In*; Proceedings of the Second International Conference on Aquaculture Nutrition: Biochemical and Physiological Approaches to Shellfish Nutrition. (ed. by Pruder, G.D., Langdon, C.J. and Conklin, D.E.) pp. 272-291. Louisiana State University, Baton Rouge.
- Yang, D.S., Park, M.W., Lim, S.J., Kim, M.J., Shin, Y.R., Park, C.S. and Kang, D.K. (2009) Optimizing the production of 5-aminolevulinic acid by

- recombinant *Escherichia coli* containing the rhodobacter capsulatus hemA Gene. *Microbiology and Biotechnology Letters*, **37**(2): 153-159.
- Yonezawa, T., Sunohara, Y., and Matsumoto, H. (2015) Involvement of heme synthesis in the growth stimulation of maize seedlings by 5-aminolevulinic acid. *Weed Biology and Management*, **15**(1): 53-60.
- Zhang, W.F., Zhang, F., Raziuddin, R., Gong, H.J., Yang, Z.M., Lu, L., and Zhou, W.J. (2008) Effects of 5-aminolevulinic acid on oilseed rape seedling growth under herbicide toxicity stress. *Journal of Plant Growth Regulation*, **27**(2): 159-169.
- 허성범. (2002) 먹이생물 미세조류. *한국양식*, **14**(2): 4-20.