

해양 미세조류 *Isochrysis galbana* Parke 성장에 대한 환경 및 영양 조건의 영향

오 유 관 · † 박 성 훈
부산대학교 공과대학 화학공학과

Effect of the Environmental and Nutritional Conditions on the Growth of Marine Microalga *Isochrysis Galbana* Parke

You-Kwan Oh and Sung-Hoon Park †

Department of Chemical Engineering, College of Engineering,
Pusan National University, Pusan 609-735, Korea

ABSTRACT

The marine microalga *Isochrysis galbana* Parke was studied to optimize its growth conditions in flask culture. Important medium components studied include nitrogen source, buffer, trace elements and vitamins. Environmental conditions include pH, temperature, light intensity, mixing extent and working volume. The medium prepared from natural sea-water gave a higher final cell density than the medium prepared from synthetic sea-water. Nitrate was a better source than ammonium. In the range of 0.4~2mM, the final cell density was proportional to the initial nitrate concentration and the cell yield was estimated to be 8.5g dry cell wt/g N. For phosphate, optimal growth was observed in 0.1~1.0mM but a considerable variation in pH was resulted. The addition of Tris at 5mM or 7mM could stabilize the medium pH, but this significantly reduced both growth rate and final cell density. The effect of trace elements and vitamins was negligible. Optimal temperature and initial pH were 20°C and 8. When the intensity of incident light was varied in the range of 400~2100 lux, the growth rate increased from 10mL to 70mL, the final cell density decreased although the initial growth rate did not change. Optimal agitation speed was 100rpm when working volume was 30mL. With optimal conditions, the maximum specific growth rate obtained was 0.021hr⁻¹ and the final cell density was 1.1g/L.

서 론

미세조류는 지구온난화의 주범인 이산화탄소를 생물학적으로 고정화할 수 있을 뿐 아니라(1) 비타민, 색소, 고도불포화지방산(polyunsaturated fatty acids,

PUFAs) 등 다양한 유용물질을 생산할 수 있으므로 식품산업, 수양식, 그리고 의료산업 등에 걸쳐 폭넓은 응용이 기대되고 있다(2-4). 특히 PUFAs인 docosahexaenoic acid(DHA)와 eico-sapentaenoic acid(EPA)는 이중결합이 많아 세포막의 유동성을 높여 신경정보가 원활하게 전달되게 하므로 노인성 치매의 치료나 심장과 순환계 질병의 예방에 효과가

† Corresponding Author

있다고 알려져 있다. 현재 공업적으로는 이들 지방산을 생선기름에서 추출한 후 분리·정제하여 사용하고 있으나 순도가 낮고 생선 비린내가 나는 단점이 있으므로 박테리아나 조류에서 생물공학 기술을 사용하여 대량으로 생산하고자 하는 연구가 진행되고 있다(5-7). 이를 위해 DHA와 EPA의 함량이 높은 조류들이 다수 분리되었는데(8-12), 특히 *Chryso-phyceae*(golden algae)에 속하는 *Isochrysis galbana*와 Diatom (*Bacillariophyceae*)에 속하는 *Phaeodactylum tricoratum*이 우수한 것으로 보고되고 있다(13).

미세조류로부터 효과적으로 EPA와 DHA를 생산하기 위해서는 첫째 높은 균체농도를 얻어야 하고, 동시에 생체내 원하는 지방산의 함량을 높여야 한다. Grima 등은 *I. galbana*의 경우 최적 성장조건과 최적 지방산 생산조건이 동일하지 않다는 것을 발견하였고(15, 16), 여러 연구자들 또한 DHA나 EPA의 생성량은 영양원의 제한, 질소원/인원 비의 변화, 질소원의 종류, 환경조건(pH, 온도, light intensity, aeration), 성장시기 등에 영향을 받는다는 것을 발견하였다(8, 10, 14-17). 따라서 이들 지방산의 생산에 항생제나 스테로이드 같은 2차대사산물의 공업적 생산에 일반적으로 이용되는 균체성장과 유용물질 생산 단계의 분리, 즉 이단배양방법(two-step cultivation method)의 적용을 고려할 수 있다.

본 연구에서는 *I. galbana* Parke를 대상으로 PUFAs 생산의 최적화를 위해 이단배양의 개념을 염두에 두고 먼저 소규모 플라스크 실험을 통해 첫 번째 단계인 균체성장을 연구하였다. 첫단계에서는 빠른 성장속도와 고농도의 균체를 얻는 것이 선결과제이므로 pH, 온도, light intensity 등 환경요인과 질소원, 비타민 등 배지성분이 균체의 성장에 미치는 영향을 조사하고 최적배양조건을 구하였다.

재료 및 방법

균주 및 배양조건

본 실험에서 사용된 *I. galbana* Parke는 *Chryso-phyceae*(golden algae)에 속하는 미세조류로 영국의 Dunstaffnage Marine Laboratory(The culture collection of Algae and Protozoa)로부터 구입하였다. 균체배양에 사용된 배지는 송정해수욕장에서 떠온 천연바닷물(natural sea-water) 또는 실험실에서 제조한 인공바닷물(artificial pacific sea-water, APSW)(Table 1)을 기본배지(basal medium)로

Table 1. Composition of Artificial Pacific Sea-Water(APSW)(18)

Basic mix*		Trace-element solution	
NaCl	23.47g	Na ₂ SiO ₃	4.3g
Na ₂ SO ₄	3.92g	NaF	3.0g
MgCl ₂	4.98g	LiCl	1.2g
CaCl ₂	1.10g	MnCl ₂	0.2g
KCl	0.66g	FeC ₆ H ₅ O ₇	540mg
KBr	0.096g	RbCl	340mg
H ₃ BO ₃	0.026g	Al ₂ (SO ₄)(NH ₄) ₂ SO ₄ ·24H ₂ O	90mg
SrCl ₂	0.024g	Ba(OH) ₂	77mg
Trace-element solution	1.0mL	KI	60mg
NaHCO ₃	2.0mM	CuSO ₄	36mg
Add distilled water to 1L		Al ₂ O ₃	30mg
		ZnSO ₄	5mg
		Add distilled water to 1L	

* Adjust pH to 8.2

Table 2. Composition of modified Grima's medium(14)

NaNO ₃	17g
NaH ₂ PO ₄	1.2g
ZnCl ₂	0.0136g
MnCl ₂	0.0126g
Na ₂ MoO ₄	0.0206g
CoCl ₂	0.0013g
CuSO ₄	0.0016g
ferric citrate	0.4898g
thiamin	3.5mg
biotin	0.5mg
B ₁₂	0.3mg
EDTA	0.9886g
Add distilled water to 1L	

하여 Grima(14)가 제안한 첨가배지(Table 2)를 더해 준 것이었다. 이때 Grima 배지 첨가량은 천연 혹은 인공바닷물 990mL 당 10mL이었다. 자연바닷물은 Whatman filter paper no. 1으로 여과한 후, 121℃에서 30분간 증기살균하였다. 또한 최종 배양 배지는 pH를 8로 맞춘 후 0.45μm membrane으로 여과하여 사용하였다. 플라스크배양은 일정한 조도를 공급하는 5개의 형광등이 달린 진탕배양기(Model VS-8480SR, Vision 과학, 서울)에서 시행하였다. 플라스크로는 porous silicon-sponge 마개를 가진 250mL 용량의 삼각플라스크가 사용되었다.

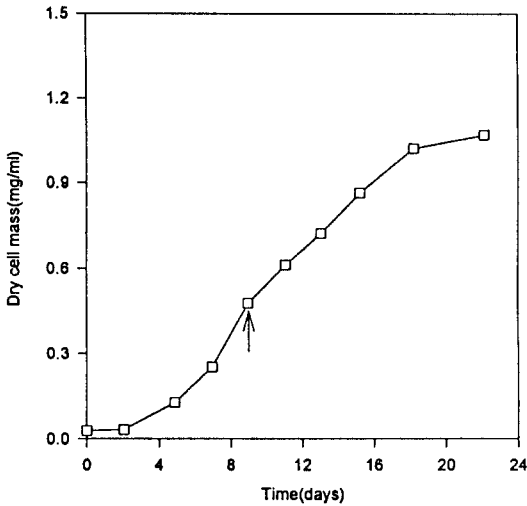


Fig. 1. Growth curve of microalga *Isochrysis galbana* Parke in natural sea-water medium. Arrow indicate the end of exponential growth.

표준조건으로 교반속도는 100rpm, 온도는 20℃였고, 배양액 부피와 균체의 접종량은 특별한 경우를 제외하고 각각 30mL 및 1mL이었다. 공급되는 빛의 세기는 특별한 경우를 제외하고 1850lux이었다.

분석방법

세포농도는 분광광도계(Spectronic 20, Milton Roy Inc., U.S.A.)를 이용, 파장 530nm에서 흡광도(Absorbance, A_{530})로 측정하였다. 이때 흡광도와 건조균체중량(dry cell weight, DCW)간의 관계를 미리 구하여 검량선을 얻었고, 이 검량선을 이용하여 시료의 흡광도를 DCW로 환산하였다. DCW는 배양액 시료를 2번 증류수로 세척하고 100℃에서 12시간 이상 건조시켜 측정하였다. 흡광도는 배양액을 적절히 희석하여 10-mm curvette으로 측정하였다. 흡광도와 DCW의 상관관계는 다음과 같았다.

$$C(g\ litre^{-1}) = 0.312 \times A_{530} [r^2 = 0.99]$$

빛의 세기는 조도측정기(룩스DM-28, 竹村電機製作所, 東京)를 사용하여 측정하였다.

결과 및 고찰

I. galbana Parke의 성장특성 및 바닷물의 영향

Fig. 1은 *I. galbana* Parke의 전형적인 성장곡선

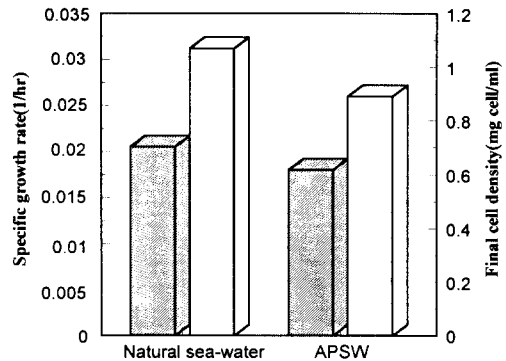


Fig. 2. Effect of basal medium on specific growth rate (■) and final cell density(□). APSW stands for artificial pacific sea-water.

을 보여준다. 배양초기 9일까지 지수성장을 보이며 그 이후 약 10일 동안 선형성장을 보여준다. 지수성장기에 최대 비성장속도는 약 $0.021hr^{-1}$ 이고, 선형성장기의 선형성장 속도상수는 $0.059mg \cdot mL^{-1} \cdot day^{-1}$ 이었다. 일반 세균과 비교할 때 이러한 성장곡선의 특성은 전체 성장기간 중 지수성장기가 매우 짧다는 것이다. 이것은 균체농도의 증가에 따라 광합성의 필수요소인 빛과 이산화탄소 전달이 충분치 못한 것과 관계가 있는 것으로 보인다.

Fig. 2는 두 가지 기초배지 즉, 자연바닷물과 인공바닷물의 영향을 보여준다. 이 경우 첨가배지인 Grima's medium은 동일하게 넣어 주었다. 비성장속도를 비교하면 자연바닷물의 경우 $0.021hr^{-1}$ 이었고 인공바닷물의 경우 $0.018hr^{-1}$ 로 자연바닷물의 경우가 다소 높았다. 또한 최종 균체농도도 자연바닷물의 경우가 다소 높았다. 이러한 결과는 자연바닷물속에 인공바닷물이 갖지 못한 필수미량원소가 들어 있기 때문이라고 추정된다(5). 혹은 자연바닷물속에 존재하는 미량의 질소와 인 성분이 영향을 주었을 가능성도 생각할 수 있으나 Grima 배지에 들어있는 이들 성분에 비해 농도가 매우 낮으므로 무시할 수 있다(26). 추후의 모든 실험은 자연바닷물을 기본배지로 하여 행하였다.

질소원의 영향

질소원의 영향은 질산염과 암모늄염을 대상으로 조사하였다. Fig. 3은 질산염 농도에 따른 균체성장과 pH 변화를 보여준다. 질산염 사용량이 아주 낮은 0.4mM의 경우를 제외하고 모두 pH가 지수성장기에

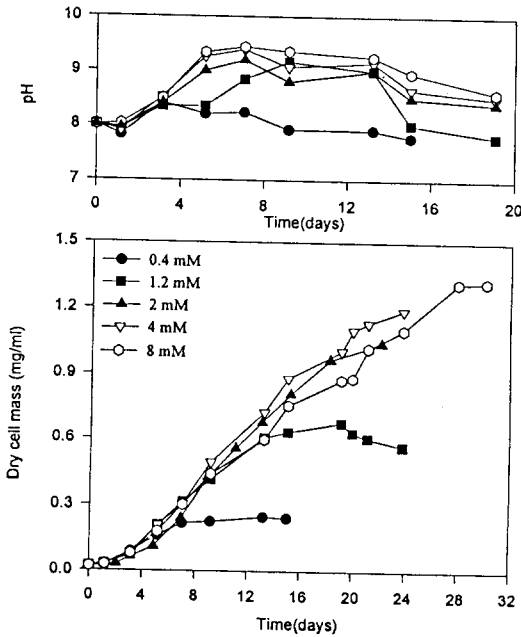


Fig. 3. Effect of nitrate(NaNO_3) concentration on cell growth and pH change.

서 약간 증가하다가 선형성장기 이후에는 조금씩 감소하는 경향을 보여준다. 균체성장을 살펴보면 질산염 농도 0.4mM의 경우 지수성장기가 매우 짧아 정확한 비성장속도를 구하기에 어려움이 있었으나 그 이상의 농도에서는 질산염 농도에 관계없이 비성장속도는 거의 일정하였다. 그러나 최종 균체농도는 질산염 농도의 증가에 따라 증가하는 경향을 보여주었다. 특히 질산염 농도 0.4mM~2.0mM의 범위에서 최종 균체농도는 초기 질산염 농도에 거의 비례하는데 여기에서 질소원에 대한 균체수율($Y_{X/N}$)을 구하면 대략 8.5g dry cell wt/g N 이 얻어진다. 이 값은 다른 미생물에 대해 알려진 7.5~12g dry cell wt/g N의 범위 속에 들어간다(19). 한편 4mM 이상에서도 질산염 농도 증가에 따라 조류의 최종농도가 계속 증가하는 경향을 보여주나 질소원의 농도와 비례관계는 더 이상 성립되지 않으며 이는 주어진 배지조성에서 질소원은 제한요인이 아님을 뜻한다.

암모늄염을 질소원으로 쓰는 경우에 대해서도 실험하였다(Fig. 4). 배지의 pH는 균체가 성장함에 따라 감소하였고, 최적 암모늄염의 농도는 1mM이었다. 이 때의 최대 비성장속도는 질산염의 경우보다 다소 낮았다($\mu=0.019\text{hr}^{-1}$). 특히 최종 균체농도

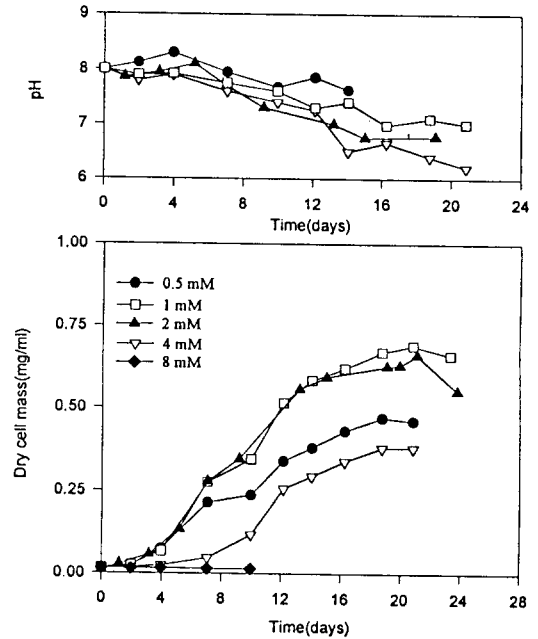


Fig. 4. Effect of ammonium salt(NH_4Cl) concentration on cell growth and pH change.

는 질산염의 경우보다 상당히 낮았는데 이는 pH의 하락 및 암모늄염 자체의 독성과 관계가 있는 것으로 여겨진다. 실제로 암모늄염 8mM의 경우 균체의 성장이 관찰되지 않았다.

위의 결과로부터 *I. galbana* Parke 배양의 경우 질소원으로는 질산염이 좋고 농도는 2mM 이상이 필요함을 알 수 있다. 그러나, Fig. 3에서 나타난 것처럼 2mM 이상의 질산염 농도에서의 최종 균체량이 비례적으로 증가하지 않으므로, 최종 균체농도의 증가를 위해 질산염만을 과도하게 사용하는 것은 별로 효과적이지 않다.

완충용액의 영향

완충용액이 *I. galbana* Parke의 성장에 미치는 영향을 인산염과 Tris[tris (hydroxymethyl)amino-methane]에 대해 조사하였다. 먼저 Tris의 영향을 조류배양에서 가장 흔히 사용되는 농도인(14, 15) 5mM과 7mM에서 조사하였다(Fig. 5). 이때 인산염은 pH 완충효과를 주는 동시에 세포구성 성분임을 감안하여 세 경우 모두 100 μ M로 고정하였다. 배양기간 동안 Tris가 첨가된 경우 pH가 보다 일정하게 유지되었으나 비성장속도나 최종 균체농도는 인산염만 사용한 경우가 높았다. 또한 Tris 5mM과

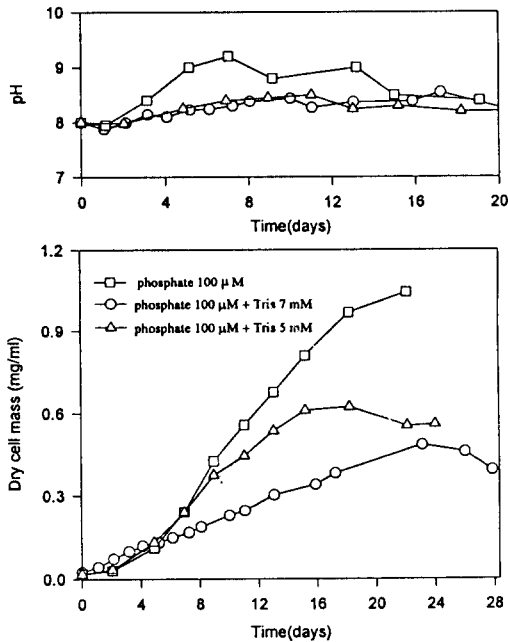


Fig. 5. Effect of buffer solution on cell growth and pH change.

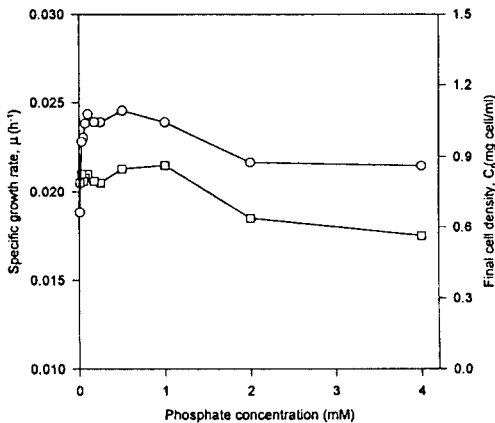


Fig. 6. Effect of phosphate concentration on the specific growth rate(□) and final cell density(○).

7mM을 비교하면 5mM의 경우가 보다 좋은 결과를 보였다. Tris 7mM의 경우에는 지수성장기가 거의 관찰되지 않았는데, 이는 Tris가 조류의 성장에 독성을 갖기 때문으로 여겨진다(25).

인산염 농도의 영향은 Fig. 6에 정리하였다. 인산염 농도 0.1mM~1mM의 범위에서 비성장속도 및

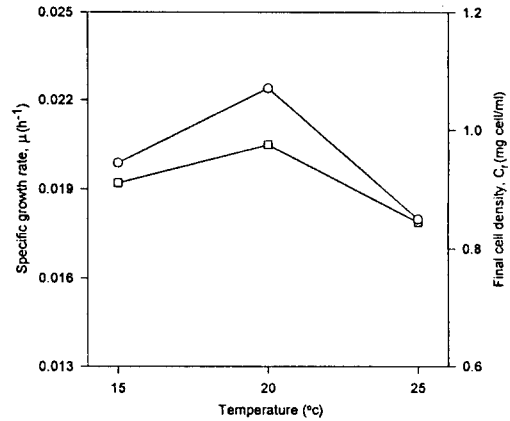


Fig. 7. Effect of temperature on specific growth rate(□) and final cell density(○).

최종 균체농도는 가장 높았고 각각 0.021hr⁻¹ 및 1.1mg/mL였다. 인산염의 농도가 0.07mM 이하로 지나치게 낮은 경우 최종 균체농도는 인산염 부족으로 감소하였고, 2mM 이상으로 지나치게 높은 경우 비성장속도 및 최종 균체농도 모두 감소하였다. 고농도 인산염액에서의 성장저해는 대부분의 미생물 배양에서 일반적으로 관찰되는 현상이나 조류의 경우 성장저해가 시작되는 농도가 다른 세균에 비해 매우 낮은 것이 특징이라 하겠다.

비타민과 미량원소(micronutrient)들의 영향

Table 2에 나오는 Grima medium 중 질산염, 인산염, EDTA를 제외한 전체 미량원소와 비타민의 양을 표준사용량에 대해 각각 0.1, 0.5, 2 배로 변화시키면서 영향을 조사하였다. 실험한 미량원소와 비타민의 범위 내에서 최대 비성장속도와 최종 균체농도에는 변화가 없었다.

온도와 초기 pH의 효과

Fig. 7은 온도가 비성장속도와 최종 세포농도에 미치는 영향을 보여준다. 최대 비성장속도는 20°C에서 얻어졌고, 15°C와 25°C에서는 약간의 비성장속도 감소가 나타났다. 최대 최종균체량도 역시 20°C에서 얻어졌다. 30°C에서는 균체의 성장이 관찰되지 않았다. 이 결과는 Grima 등(16)과 Kain & Fogg(20)에 의해 얻어진 결과와 동일하다.

초기 pH의 영향은 pH 6.0~9.0의 범위에서 살펴 보았다(Fig. 8). 질소원으로는 2mM의 질산염을 사용하였다. Fig. 8에서 나타난 것처럼 pH 8에서 비

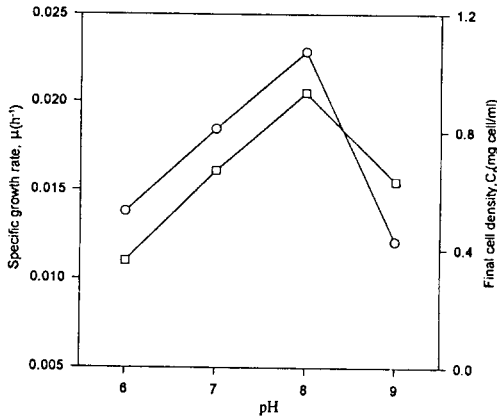


Fig. 8. Effect of initial pH on specific growth rate(□) and final cell density (○).

성장속도가 가장 높았고 또한 최종 균체농도도 높았다. 그리고 pH 8 보다 낮은 영역에서는 균체성장으로서 감소하였으나 8 보다 높아질 때는 급격히 감소하는 경향을 보였다. Grima 등(15)과 Fabregas 등(21)은 pH 9에서 성장방해(growth inhibition) 때문에 *I. galbana*가 성장하지 않는다고 보고하였으나 본 연구에서는 낮은 속도이지만 성장이 관찰되었다. 균체 성장에 따른 pH 변화 경향은 1.2mM 이상의 질산염을 질소원으로 사용했을 때와 유사하였다 (Fig. 3 참조).

빛 세기의 영향

Fig. 9는 빛의 세기(incident light intensity, I_0)가 최종 균체농도에 미치는 영향을 보여준다. I_0 가 400에서 2100lux까지 변화되었을 때 비성장속도의 증가는 1850lux까지 관찰되었고 그 이후는 포화되어 일정하였다. 이때 얻어진 최대 비성장속도는 0.021hr⁻¹이었다. I_0 에 대한 μ 의 변화는 기존 알려진 모델 중에서 다음과 같은 Oorschot's exponential model(22)을 가장 잘 만족하였다.

$$\mu = \mu_m(1 - e^{-I_0/I_k})$$

이식에서 μ_m 은 최대 비성장속도를 나타내고 I_k 는 μ vs. I_0 곡선의 $t=0$ 에서의 접선이 최대 비성장속도를 나타내는 선과 만나는 점에서의 빛 세기를 나타낸다. 비선형회귀에 의해 μ_m 및 I_k 는 각각 0.0207hr⁻¹, 726lux로 얻어졌고 이때 r^2 은 0.986이었다.

I_0 에 대한 최종 균체농도(C_f) 변화도 I_0 에 대한 μ

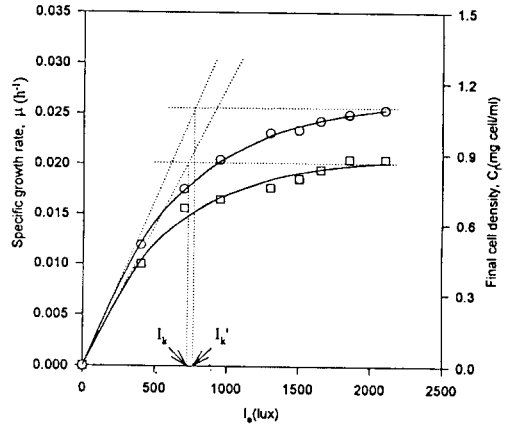


Fig. 9. Effect of the intensity of incident light on specific growth rate(□) and final cell density(○). For I_k and I_k' , see the text.

의 변화와 동일한 경향을 나타내었다. I_0 와 μ 의 관계와 같이 C_f 와 I_0 의 관계도 다음과 같은 지수형태의 식을 적용할 수 있었다.

$$C_f = C_{f_m}(1 - e^{-I_0/I_k'})$$

이때 C_{f_m} 는 최대 최종 균체농도이고 I_k' 은 C_f vs. I_0 곡선의 $t=0$ 에서의 접선이 최대 최종 균체농도를 나타내는 선과 만나는 점에서의 빛의 세기를 나타낸다. 비선형회귀에 의해 C_{f_m} 및 I_k' 은 각각 1.132mg cell/mL, 775lux로 얻어졌고 이때 r^2 은 0.996이었다.

포화효과가 나타나는 빛의 세기는 조류의 종류, 배지조성, 부피 등 각종 배양조건에 따라 달라지는데 Grima 등은 배양용기로써 1L cylindrical flask를 사용하여 *I. galbana* Parke를 배양할 때 포화효과가 2000lux에서 나타난다고 보고하였으며(15), Zlotnik와 Dubinsky는 20mL의 배양부피를 가진 100mL 삼각플라스크를 사용하여 *I. aff. galbana* clone T-ISO를 배양할 때 포화효과가 3000lux에서 나타난다고 보고하였다(23).

Working volume의 영향

250mL 삼각 플라스크의 Working volume을 10, 30, 50, 70mL로 변화시키면서 균체의 성장을 조사하였다(Fig. 10). Working volume에 관계없이 초기 지수성장기에서의 비성장속도는 0.021h⁻¹로 일정하였다. 그러나 Working volume이 줄어들수록 지수성장기가 보다 오랜 시간동안까지 유지되어, 동일한 시간에 높은 균체농도를 얻을 수 있었다. 이는

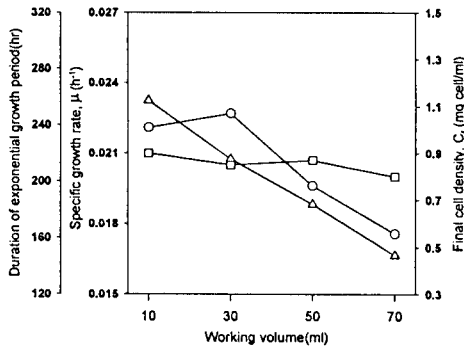


Fig. 10. Effect of working volume on specific growth rate(□), duration of exponential growth period(△), and final cell density (○).

Working volume이 작을수록 빛이나 CO₂의 전달이 원활하기 때문에 추정된다. 그러나 Working volume 10mL의 경우 부피가 너무 작아 시료채취에 문제가 있었으므로 다른 모든 실험은 Working volume을 30mL로 하였다.

교반속도 영향

조류배양시 빛이나 물질전달을 촉진하기 위해서는 기계적인 교반이 필요하다. 그러나 세포벽이 없는 *I. galbana*와 같은 미세조류는 기계적 교반이나 전단응력에 매우 취약하므로 무제한적인 교반속도의 증가는 오히려 세포성장을 방해한다(24).

본 실험에서는 교반속도를 50rpm에서 150rpm으로 증가시키면서 균체의 성장을 관찰하였다. Fig. 11에서 보여지듯이 50rpm에 비해서는 100rpm에서 균체성장이 증가하였으나 150rpm에서는 뚜렷한 최종 균체농도의 감소가 나타났다. 이러한 경향은 과도한 교반에 의한 세포손상에 기인한 것으로 판단되며, 추후 scale-up시 세심한 주의가 필요할 것으로 예상된다.

요 약

해양 미세조류인 *Isochrysis galbana* Parke의 성장에 미치는 여러 환경요인과 배지요인의 영향을 조사하고 최적 배양조건을 구하였다. 그 결과를 요약하면 다음과 같다.

1. 인공바닷물은 자연바닷물보다 다소 낮은 비성

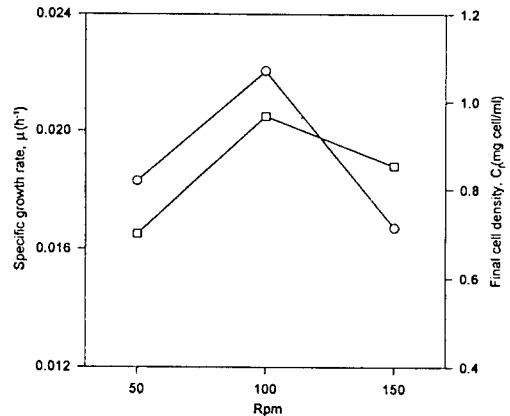


Fig. 11. Effect of mixing on specific growth rate (□) and final cell density(○).

장속도와 최종 균체농도를 나타내었다.

2. 자연바닷물이 기초배지로 사용되었을 때 2mM 이상의 충분한 질산염 농도가 필요하였다. 그러나 미량원소와 비타민의 영향은 관찰되지 않았다.

3. 완충용액으로 Tris를 첨가한 경우 pH는 일정하게 유지가 가능하나 비성장속도와 최종 균체농도가 감소하였다.

4. 최적 초기 pH와 온도는 각각 pH 8, 20℃였다.

5. 빛세기를 400~2100lux의 범위에서 변화시켰을 때 비성장속도는 1850lux까지 증가하였고 그 이후로는 일정하였다.

6. 10mL에서 70mL로 Working volume을 증가시켰을 때 초기 성장속도는 비슷하였으나 최종 균체농도가 감소하는 경향을 보였다.

7. Working volume이 30mL일 때 최적 교반속도는 100rpm정도이고, 더 높은 교반속도에서는 최종 균체농도의 감소가 관찰되었다.

8. 플라스크배양의 최적조건에서 최대 비성장속도와 최종 균체농도는 각각 0.021hr⁻¹과 1.1g/L로 얻어졌다.

감 사

본 논문은 1994년도 한국학술진흥재단의 대학부설연구소 연구과제 연구비에 의하여 연구되었음.

참 고 문 헌

1. H. Saiki(1993), 제 1회 지구온난화 제어기술

- 워크숍, 127, 한국화학연구소.
2. C. G. Lee(1994), *Ph. D. Thesis*, Dept. of Chem. Eng., Michigan University.
 3. J. R. Benemann(1989), *Algal and Cyanobacterial Biotechnology*(R. C. Cresswell, T. A. V. Rees and N. Shah, eds), 320, Longman Scientific & Technical, U. K.
 4. A. Vonshak(1990), *Biotech. Adv.*, **8**, 709.
 5. W. Yongmanitchai and O. P. Ward(1989), *Process Biochemistry*, **24**, 117.
 6. D. L. Regan(1988), *Micro-Algal Biotechnology* (M. A. Borowitzka and L. J. Borowitzka, eds), 135, Cambridge University Press, Cambridge.
 7. 김지현(1995), 생물공학이야기(유영제, 서진호, 변상요 외, eds), 221, 고려원미디어, 서울.
 8. P. Bajpai and P. K. Bajpai(1993), *J. of Biotech.*, **30**, 161.
 9. M. A. Borowitzka(1988), *Micro-Algal Biotechnology*(M. A. Borowitzka and L. J. Borowitzka, eds), 257, Cambridge University Press, Cambridge.
 10. W. Yongmanitchai and O. P. Ward(1991), *Phytochemistry*, **30**, 2963.
 11. M. O. Servel, C. Claire, A. Derrien, and L. Coiffard(1994), *Phytochemistry*, **36**(3), 691.
 12. A. C. Viso and J. C. Marty(1993), *Phytochemistry*, **34**(6), 1521.
 13. L. Alonso, E. M. Grima, J. A. S. Perez, J. L. G. Sanchez, and F. G. Camacho(1992), *Phytochemistry*, **31**, 3901.
 14. E. M. Grima, F. G. Camacho, J. A. S. Perez, and J. L. G. Sanchez(1994), *Process Biochemistry*, **29**, 119.
 15. E. Molina Grima, J. A. Sanchez Perez, J. L. Garcia Sanchez, F. Garcia Camacho, and D. Lopez Alonso(1992), *Process Biochemistry*, **27**, 299.
 16. E. Molina, M. E. Martinez, S. Sanchez, F. Garcia, and A. Contreras(1991), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **36**, 21.
 17. T. Chrismadha and M. A. Borowitzka(1994), *J. of App. Phycology*, **6**, 67.
 18. M. A. Borowitzka and A. W. D. Larkum(1988), *Micro-Algal Biotechnology*(M. A. Borowitzka and L. J. Borowitzka, eds), 464, Cambridge University Press, Cambridge.
 19. M. L. Shuler and F. Kargi(1992), *Bioprocessing Engineering*(Michael and K. Fikret, eds), 99, Prentice, Englewood Cliff, New Jersey.
 20. J. M. Kain and G. E. Fogg(1958), *J. Mar. Biol. Ass. UK.*, **37**, 781.
 21. J. Fabregas, C. Herrero, J. Abalde, and B. Cabezas(1985), *Aquaculture*, **50**, 1.
 22. V. Oorschot(1955), *Med. van. Lund. Wang. Nederland*, **55**, 225.
 23. I. Zlotnik and Z. Dubinsky(1981), *Limnol. Oceanogr.*, **34**, 831.
 24. C. Grudin and D. Chanmont(1991), *Bioresource Technol.*, **38**, 145.
 25. J. Mclachlan and P. R. Gorham(1962), *Canadian J. Microbiol.*, **8**, 1.
 26. E. D. Goldberg(1963), *The sea*(M. N. Hill, ed), 4, Interscience Publishers, London.