

Thraustochytrium aureum ATCC 34304의 지질 및 지방산 조성 변화

¹제 은 진 · ¹송 상 규 · ²서 정 우 · ¹† 허 병 기
¹인하대학교 공과대학 생물공학과, ²한국생명공학연구원
(접수 : 2007. 2. 2., 게재승인 : 2007. 2. 20.)

Variation in the Lipid Class and Fatty Acid Composition of *Thraustochytrium aureum* ATCC 34304

Eun-Jin Jeh¹, Sang-Kyu Song¹, Jeong-Woo Seo², and Byung-Ki Hur¹†

¹Department of Biological and Chemical Engineering, College of Engineering, Inha University, Incheon 402-751, Korea

²Molecular Bioprocess Research Center, KRIBB, Daejeon 305-806, Korea

(Received : 2007. 2. 2., Accepted : 2007. 2. 20.)

The heterotrophic marine algae *Thraustochytrium aureum* ATCC 34304 produces substantial amount of polyunsaturated fatty acids (PUFAs), especially docosahexaenoic acid (DHA). In this study, changes in the lipid and fatty acid compositions of *Thraustochytrium aureum* ATCC 34304 were investigated according to the growth stage. The major lipids of *Thraustochytrium aureum* ATCC 34304 were found to be composed of triacylglyceride (TAG), phospholipid (PL), and sterol (ST). The content of triacylglyceride increased during the exponential phase of cell growth, but the content of phospholipid decreased. The composition of total polyunsaturated fatty acids decreased from 60.3% to 45.3% and that of docosahexaenoic acid from 42.1% to 33.9% in the triacylglyceride. The composition of total saturated fatty acids, however, increased from 24.9% to 27.8%. The content of total polyunsaturated fatty acids decreased greatly from 48.0% to 17.5% but the decrease in the content of saturated fatty acids was slight in phospholipid.

Key Words : *Thraustochytrium aureum*, growth stage, polyunsaturated fatty acid, triacylglyceride, docosahexaenoic acid (DHA)

서 론

탄소수와 이중결합수가 많은 docosahexaenoic acid (DHA; C_{22:6})와 eicosapentaenoic acid (EPA; C_{20:5})는 동맥경화증(1), 혈전증(2) 및 고혈압(3) 등 순환기 질병에 대한 예방 및 치료에 효과적일 뿐만 아니라 천식(4), 관절염(5), 편두통(6), 건선(6) 및 신장염(7)과 같은 염증성 치료에도 가능성이 높다고 보고되어 있다. 또한 DHA는 포유류의 대뇌피질, 눈의 망막 및 정액 등의 주요 구성성분으로도 알려져 있다(8, 9). 그러나 인류를 포함한 포유류는 DHA 및 EPA와 같은 다중불포화지방산을 자체로는 합성할 수 없어 다른 생명체가 합성한 이들 다중불포화지방산을 섭취하여야 한다.

현재까지 DHA와 EPA의 주요 공급원은 물고기 기름이었다. 그러나 물고기 기름 가공공정에 의한 이중결합의 산

화문제나, 물고기 기름이 내포하고 있는 특유한 비린내 문제 및 공급량의 제한성 문제 등을 내포하고 있어서, 다중불포화지방산의 대체자원에 대한 필요성이 대두되어 왔다(10). 최근에는 낚, 카드늄, 수은 등의 중금속으로 인한 물고기 기름의 중금속 오염 문제도 대체자원의 필요성을 부각시키고 있다. 일반적으로 해양미생물과 조류 등의 진핵생물이 ω-3 다중불포화지방산을 생합성한다고 보고되어 있다. Mucorale 목에 속하는 미생물은 균주에 따라 균체단위 질량당 높은 함량의 DHA와 EPA를 생산하는 것으로 보고되어 있다. *Cryptocodinium cohnii* 균주의 경우에는 배지의 산소장력이 증가하면 불포화지방산의 농도가 증가하며, *Euglena gracilis* 균주는 혐기적 조건에서 성장할 때 포화지방산의 합성을 유도하는 것으로 알려져 있다(11). *Thraustochytrid* 속의 미생물은 특히 DHA와 EPA를 생합성하는 능력이 우수하다고 보고되어 있다(10, 12). 이런 특성으로 인하여 최근에는 *Thraustochytrid* 속의 미생물을 이용한 DHA 및 EPA의 상업적 생산에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있다(10, 12-15). 당농도, pH, 온도 및 배양시간 등의 조성인자와 환경인자가 *Thraustochytrium aureum*의 성장속도, 균체수율, 지질생성을, DHA와 EPA의 생합성율에

† Corresponding Author : Department of Biological and Chemical Engineering, College of Engineering, Inha University, Incheon 402-751, Republic of Korea

Tel : +82-32-860-7512, Fax : +82-32-872-4046

E-mail : biosys@inha.ac.kr

영향을 미칠 뿐만 아니라 에너지 저장원인 지질의 조성 과 균체막을 형성하는 지질의 조성에도 영향을 미치는 것으로 보고되어 있다(16-22). 본 연구에서는 *Thraustochytrium aureum*이 균체 내부에 저장하는 지질의 지방산 조성 과 균체막에 축적하는 지질 내의 지방산 조성을 배양시간의 함수로 규명하고자 하였다. 특히 배양시간에 따른 균체막의 다중불포화지방산의 변화 과정을 정량적으로 규명하였다.

재료 및 방법

미생물

본 연구에서 사용한 균주는 *Thraustochytrium aureum* ATCC 34304이다. 균주의 활성을 유지하기 위하여 2주일 단위로 평판배지에 계대배양한 후 4°C에서 냉장보관하면서 접종용 균주 배양에 사용하였다.

배지조성

본 연구에서 사용한 기본배지는 인공해수로 용액 1 L를 기준으로 했을 때 NaCl 24 g, MgSO₄ · 7H₂O 12 g, KCl 0.75 g, K₂HPO₄ 10 mg, CaCl₂ · 2H₂O 1 g, Tris 1 g, Na₂EDTA 12 mg, ZnSO₄ · 7H₂O 2 mg, Na₂MoO₄ · 2H₂O 1 mg, NaNO₃ 40 mg, thiamine-HCl 10 µg, NaHCO₃ 0.1 g, vitamine B₁₂ 1 µg, aminobenzoate 20 µg, calcium pantothenate 10 µg, cyanobalamin 4 µg, FeCl₃ · 6H₂O 0.5 mg, MnCl₂ · 4H₂O 0.2 mg 및 CoCl₂ · 6H₂O 2 µg이다. 탄소원으로는 포도당 10 g/L를, 질소원으로는 yeast extract와 peptone을 각각 1 g/L씩 사용하였다.

배양조건

본 연구에서는 배양액 200 mL를 500 mL Erlenmeyer flask 내에 주입한 후 회전식 진탕배양기를 사용하여 실험을 수행하였다. 접종용 균주는 25°C에서 회전속도 180 rpm으로 24시간 배양하여 사용하였으며, 접종량은 본 실험을 위한 작동부피의 5% (v/v)로 하였다. 본 실험을 위한 배양 온도와 회전속도는 접종용 균주 배양시의 조건과 동일하게 하였다. 본 실험을 위한 총 배양시간은 5일로 하였으며 배양초기의 pH는 1 N HCl 용액과 1 N NaOH 용액을 사용하여 6.0이 되도록 조절하였다. 1일 1회씩 20 mL의 시료를 두개의 시험관에 채취하여 당농도, 건조균체량, 지방산 및 지질의 분석에 사용하였다.

시료분석

시료 채취 후, 시료가 담긴 시험관을 3000 rpm에서 15분간 원심분리 하였다. 상등액은 잔당분석에 사용하였으며 침전물은 균체농도, 지질 및 지방산 분석에 사용하였다. 시험관 내에 침전된 균체는 2, 3회 증류수로 세척하여 무게를 알고 있는 vial에 옮긴 후, 60°C에서 10시간 이상 건조하면서 함량이 될 때의 무게를 건조균체의 무게로 하였다. 잔당의 농도는 포도당 분석기 (YSI 2700, UK)를 사용하여 측정하였다. 지질량은 건조시킨 균체에 3 mL의 메탄올을 첨가한 후 100°C에서 1시간 동안 추출한 추출액의

무게로 측정하였다. 지방산의 조성은 Lepage(23) 방법을 변형하여 분석하였다. 기준 물질을 heptadecaenoic acid (C_{17:0})로 하고, gas chromatography (HP 6890, USA)를 사용하여 지질을 구성하고 있는 지방산의 조성을 분석하였다. Detector로는 FID를 사용하였으며 column으로는 DB23 (30m × 0.25mm × 0.26m) capillary column을 사용하였다.

균체 내에 축적된 지질 triacylglyceride (TAG)와 세포막을 구성하고 있는 phospholipid (PL)는 다음의 과정에 따라 분석하였다. 사용기기는 IATROSCAN TLC/FID이었다. Thin layer chromatography (TLC)에 사용된 분석용 전개용매는 benzene : chloroform : acetic acid의 부피비가 70 : 30 : 2가 되도록 제조하였다. TAG와 PL의 조성 분석을 위하여 추출된 지질시료를 분석용 silica rod 하단에 점적하였다. 점적된 silica rod를 전개통에 주입한 후 30분 정도 전개하여 80 mm까지 도달하도록 하였다. 건조시킨 후 TLC/FID에 올려 놓고 normal scanning으로 시료를 분석하였다. TAG 및 PL을 구성하고 있는 지방산의 조성은 다음 절차에 따라 분석하였다. 추출된 지질을 TLC plate (Merck) 하단에 점적한 후 plate를 전개용매로 포화된 전개통에 삽입한 후 20분 동안 전개시켰다. 3내지 5분 동안 plate를 건조시킨 후 254 nm 파장의 UV lamp로 전개된 띠를 확인하였다. 확인된 띠를 부위 별로 긁어서 시험관에 주입하고 3 mL의 황산-메탄올 (5 : 100 v/v)을 첨가한 후 질소로 충전하고 밀봉한 후, 100°C의 오븐에서 1시간 동안 에스테르반응을 진행시켰다. 반응액에 hexan 400 µL와 증류수 800 µL를 첨가하고 섞은 후 3000 rpm에서 5분간 원심분리하였다. 상층액을 사용하여 각 띠를 구성하고 있는 지방산의 조성을 분석하였다.

결과 및 고찰

배양시간에 따른 건조균체량과 지질량의 변화 경향

Fig. 1은 배양시간에 따른 건조균체량과 균체를 구성하고 있는 지질 함량의 변화 경향을 나타내고 있다. 건조균체량은 배양시간에 따라 증가하여 배양 5일째에는 3.94 g/L까지 증가하였다. 그러나 균체를 구성하고 있는 지질량은 배양 3일까지는 그 양이 증가하였으나 그 이후에는 감소하는 경향을 나타내었다. 단위 균체량당 지질함량 역시 배양 3일까지는 증가하다가 그 이후에는 감소 경향을 나타내었다. 균체당의 지질함량이 가장 높은 배양일은 3일이었으며 이 경우 그 함량이 25.0%를 나타내었다. 균주의 종류에 따라 건조균체당의 지질함량은 적게는 3~5%에서 많게는 60% 내외까지의 범위에 분포되어 있다(22). 본 연구의 균주인 경우 지질내의 DHA 함량은 높으나 균체당의 지질함량은 여러 균주의 평균대에 속하는 특성을 나타내고 있다.

배양시간에 따른 triacylglyceride (TAG)와 phospholipid (PL) 양의 변화

미생물은 TAG를 생합성하여 에너지원으로 균체 내에 보관할 뿐만 아니라 물질이동과 균체의 구조유지를 위하여 균체막의 구성성분으로 PL을 생합성한다. 따라서 TAG

와 PL을 구성하는 지방산의 조성은 물론 TAG와 PL의 비 또한 균체의 종류와 환경조건에 따라서 변한다고 보고되어 있다(24). Fig. 2는 배양시간에 따른 TAG와 PL의 변화 경향을 나타내고 있다. 배양시간 3일까지는 균체내부에 축적되는 TAG의 양은 증가하나 3일부터 5일까지는 거의 일정한 값을 유지하였다. 반면 세포막을 구성하는 PL의 함량은 3일까지 감소하나 그 이후에는 일정한 값을 나타내었다. Hodgson 등(25)의 연구 결과에 의하면 *Nannochloropsis oculata* 균주인 경우 배양시간에 따라 TAG 함량은 배양 초기 함량의 2배까지 증가한다고 보고되었다. *N. oculata* 균주인 경우 배양 초기에는 TAG와 PL 함량비가 1 : 2.5 정도로 PL의 함량이 많았으나 배양 18시간 후에는 1 : 1까지 TAG의 함량이 증가하였다.

본 연구의 *T. aureum* ATCC 34304 균주인 경우 배양 초기에는 TAG와 PL의 함량비가 1 : 2로 PL의 함량이 많았으나 배양 3일에는 그 함량비가 3 : 1로 TAG의 함량 비율

이 크게 증가하는 반면 PL의 함량비는 상대적으로 낮아지는 경향을 나타내었다.

TAG를 구성하고 있는 지방산의 조성 변화

Fig. 3은 배양시간에 따른 TAG 내의 불포화지방산과 포화지방산의 조성변화를 나타내고 있다. 불포화지방산의 조성은 oleic acid (OA, C_{18:1}), arachidonic acid (AA, C_{20:4}), EPA, docosapentaenoic acid (DPA, C_{22:5})와 DHA 조성의 합으로 나타내었으며, 포화지방산의 조성은 myristic acid (MA, C_{14:0}), palmitic acid (PA, C_{16:0})와 stearic acid (SA, C_{18:0}) 조성의 합으로 나타내었다. 이 결과에 의하면 TAG 내의 다중불포화지방산의 함량은 배양 초기 60.3%이었으나 배양 5일 후에는 45.6%까지 감소하였다. 이에 비하여 포화지방산의 함량은 배양시간에 따라 소량 증가하는 경향을 나타내어 배양초기에는 포화지방산의 함량이 24.9%이었으나 배양 5일 후에는 27.8%이었다. *Schizochytrium*

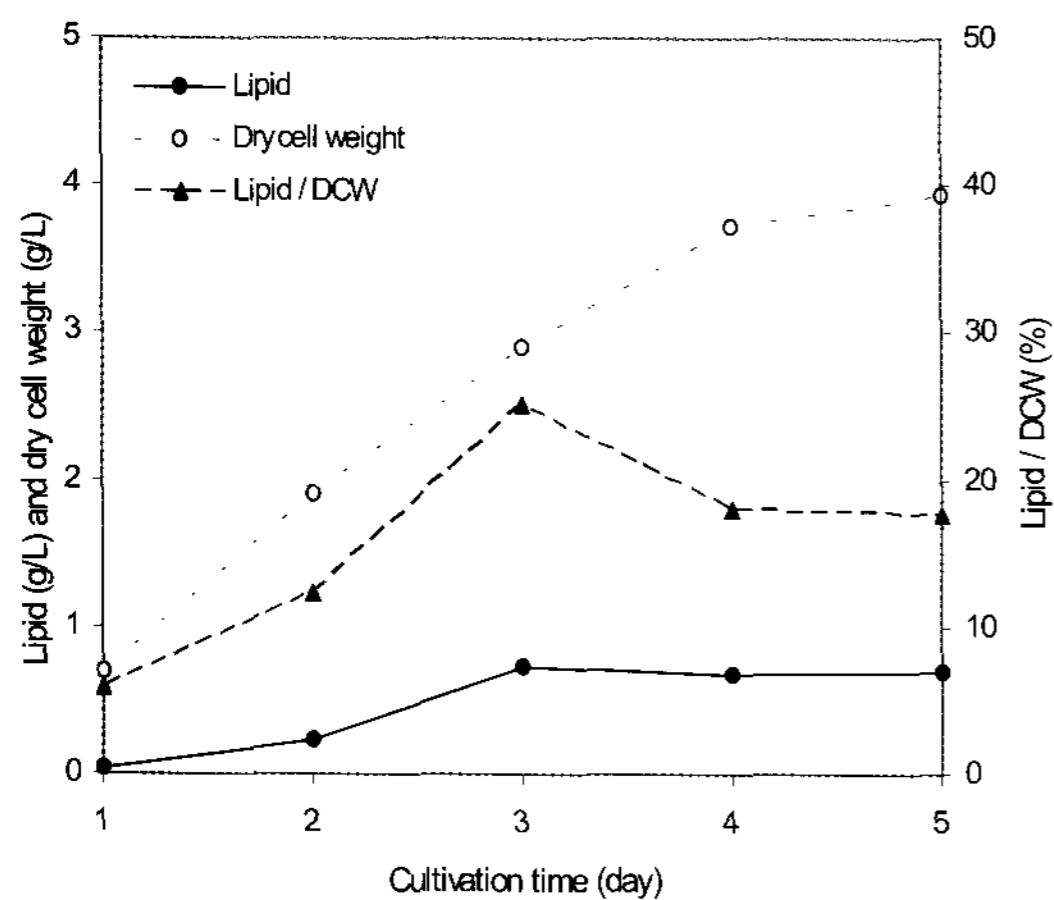


Figure 1. Change of dry cell weight and lipid content according to cultivation time.

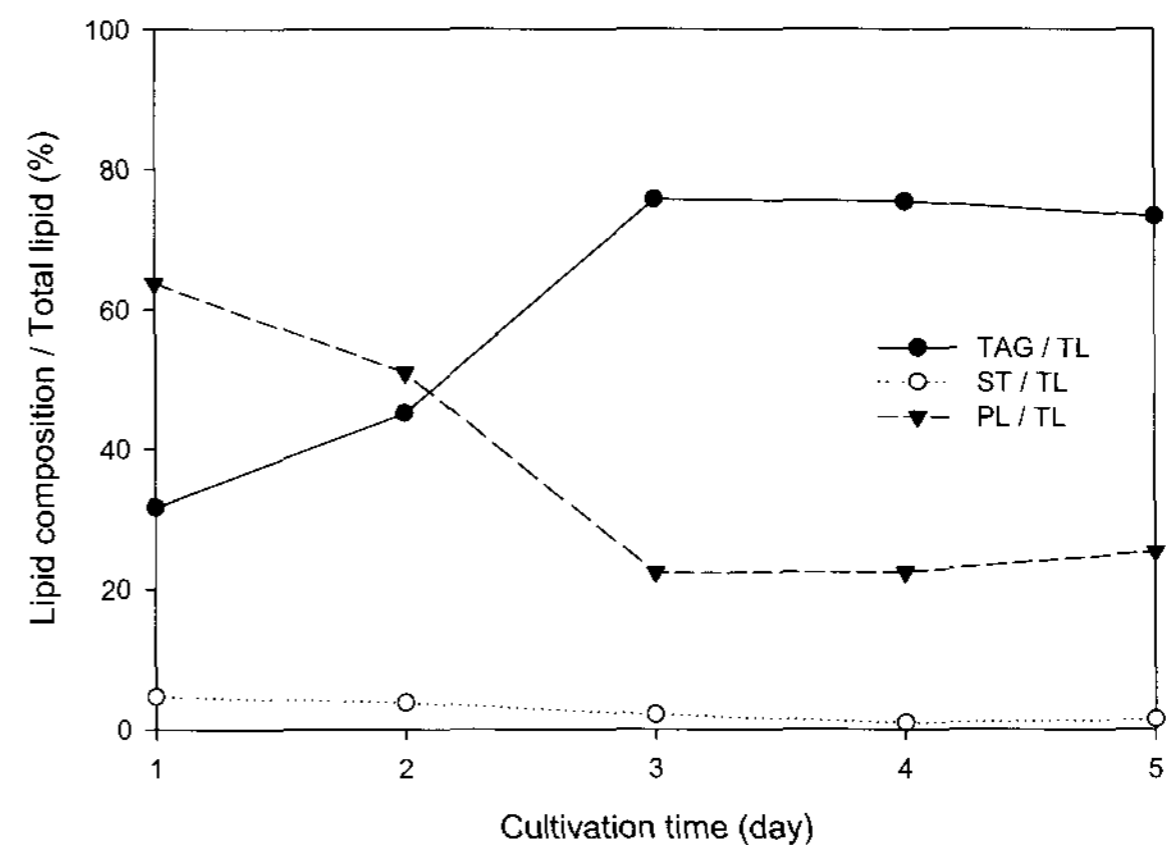


Figure 2. Change of the ratio of triacylglyceride (TAG), sterol (ST) and phospholipid (PL) according to cultivation time to the total lipid of the cell.

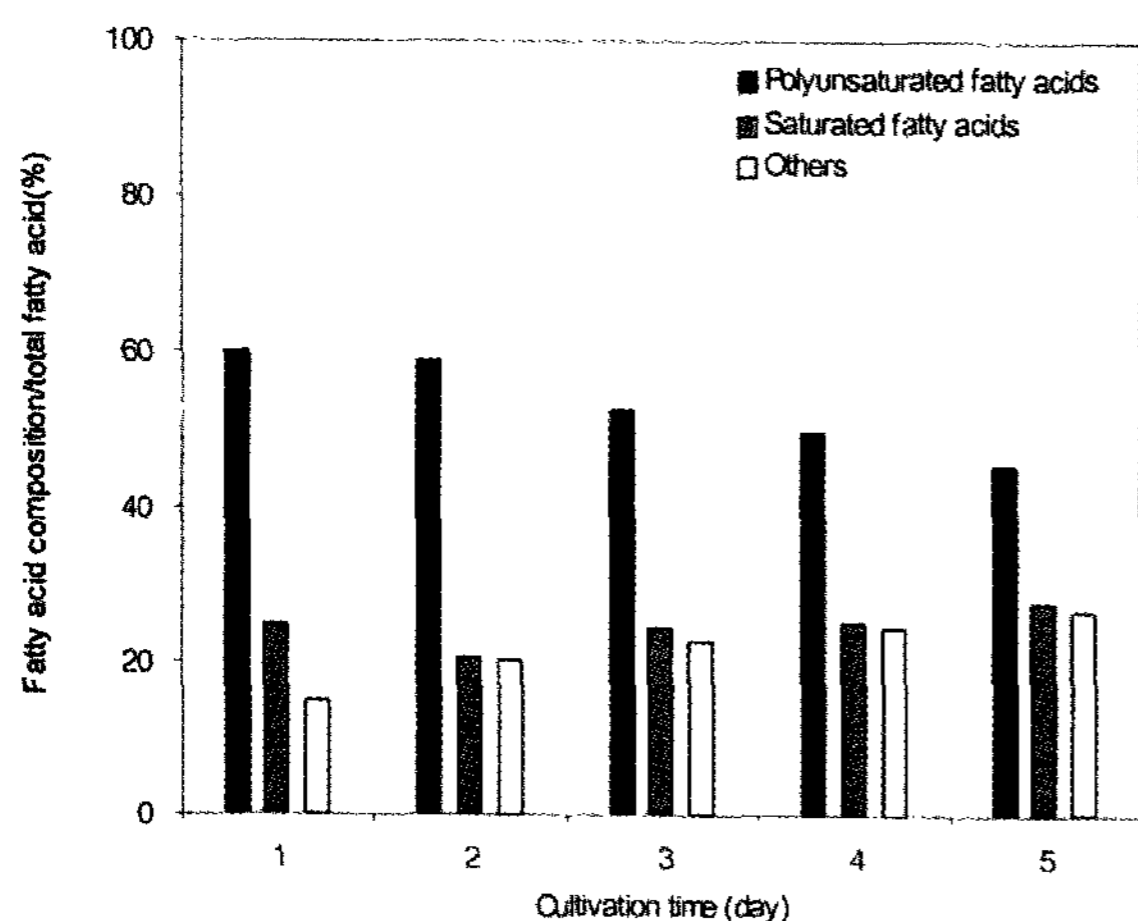


Figure 3. Change of the ratio of polyunsaturated, saturated and other fatty acids to the triacylglyceride of the cell according to cultivation time.

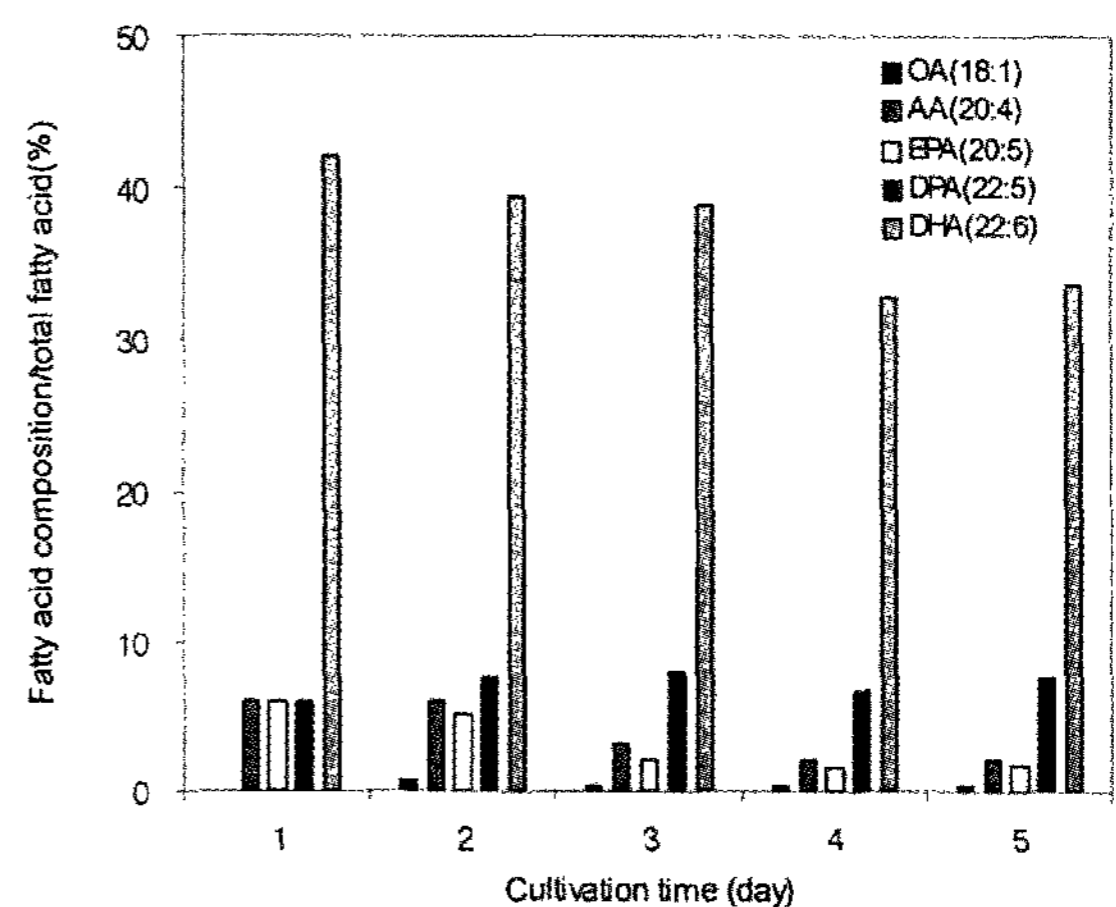


Figure 4. Change of composition of polyunsaturated fatty acids in the triacylglyceride according to cultivation time.

limacinum SR21인 경우에도 DPA와 DHA와 같은 다중불포화지방산은 배양시간에 따라 그 함량이 감소하는 반면 포화지방산인 PA의 함량은 배양시간에 따라 그 함량이 증가한다고 보고되어 있다(26). *N. oculata* 균주인 경우에도 배양시간에 따라 포화지방산인 PA의 함량은 15.9%에서 24.2%까지 크게 증가하는 반면 다중불포화지방산인 EPA는 30.8%에서 27.8%까지 감소한다고 보고되어 있다(25). 위의 연구 결과는 TAG 내의 다중불포화지방산 함량은 배양시간에 따라 감소하고, 포화지방산의 함량은 배양시간에 따라서 증가한다는 본 연구의 실험결과(Fig. 3)와 일치하는 경향을 나타내었다.

Fig. 4는 TAG를 구성하고 있는 다중불포화지방산 OA, AA, EPA 및 DHA의 함량과 배양시간과의 함수관계를 나타내고 있다. 이 결과에 의하면 DPA를 제외한 다중불포화지방산은 배양시간이 경과할수록 그 함량이 감소하는 경향을 나타내고 있다. 시간에 따른 감소경향은 배양 3일 내지 4일 사이에서 가장 뚜렷하였으며 불포화지방산 중 EPA의 감소율이 가장 크게 나타났다. EPA인 경우 초기함량이

6.1%이었으나 배양 5일 후에는 1.7%까지 감소하였으며, AA의 경우에는 6.0%에서 2.2%로, DHA의 경우에는 42.1%에서 33.9%까지 감소하였다. 반면 DPA의 경우 초기함량이 6.1%이었으나, 배양 5일 후에는 7.6%로 미세한 증가현상을 나타내었다. 이와 같은 경향은 불포화지방산을 생합성하는 다른 균주에서도 찾아볼 수 있다. *Schizochytrium limacinum* SR21인 경우 배양시간에 따라 다중불포화지방산 DPA와 DHA의 함량이 모두 감소하는 것으로, *N. oculata* 균주인 경우에는 EPA의 함량이 30.8%에 27.8%까지 감소하는 것으로 보고되어 있다(25-26).

Fig. 5는 TAG 내의 포화지방산 MA, PA 및 SA의 배양시간에 따른 조성변화를 나타내고 있다. 이 결과에 의하면 MA는 시간에 따라 함량이 감소하는 반면 PA와 SA는 증가하였다. 균주 *Schizochytrium limacinum* SR21과 *N. oculata* 모두 배양시간에 따라 PA의 함량이 증가하는 것으로 보고되어 있다(25, 26). 이들 결과는 본 연구의 결과와 일치하는 경향을 나타내고 있음을 알 수 있다.

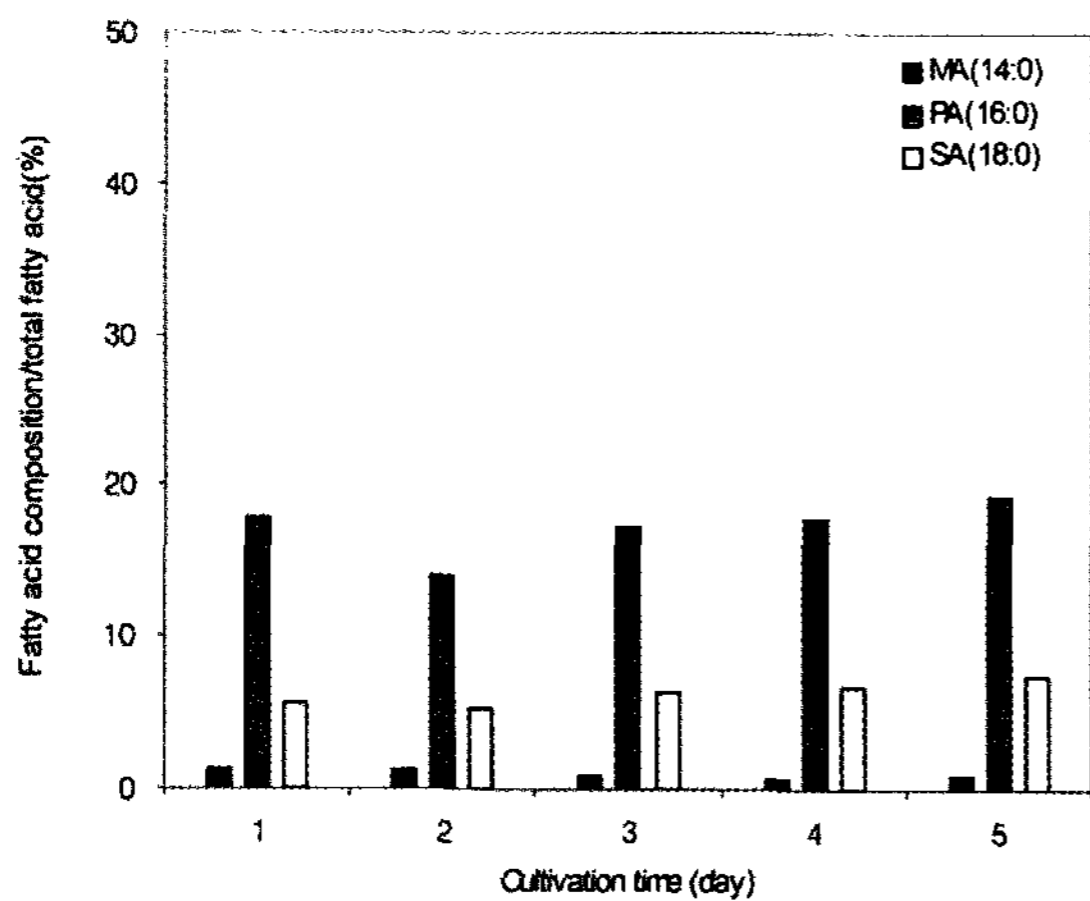


Figure 5. Change of composition of saturated fatty acids in the triacylglyceride according to cultivation time.

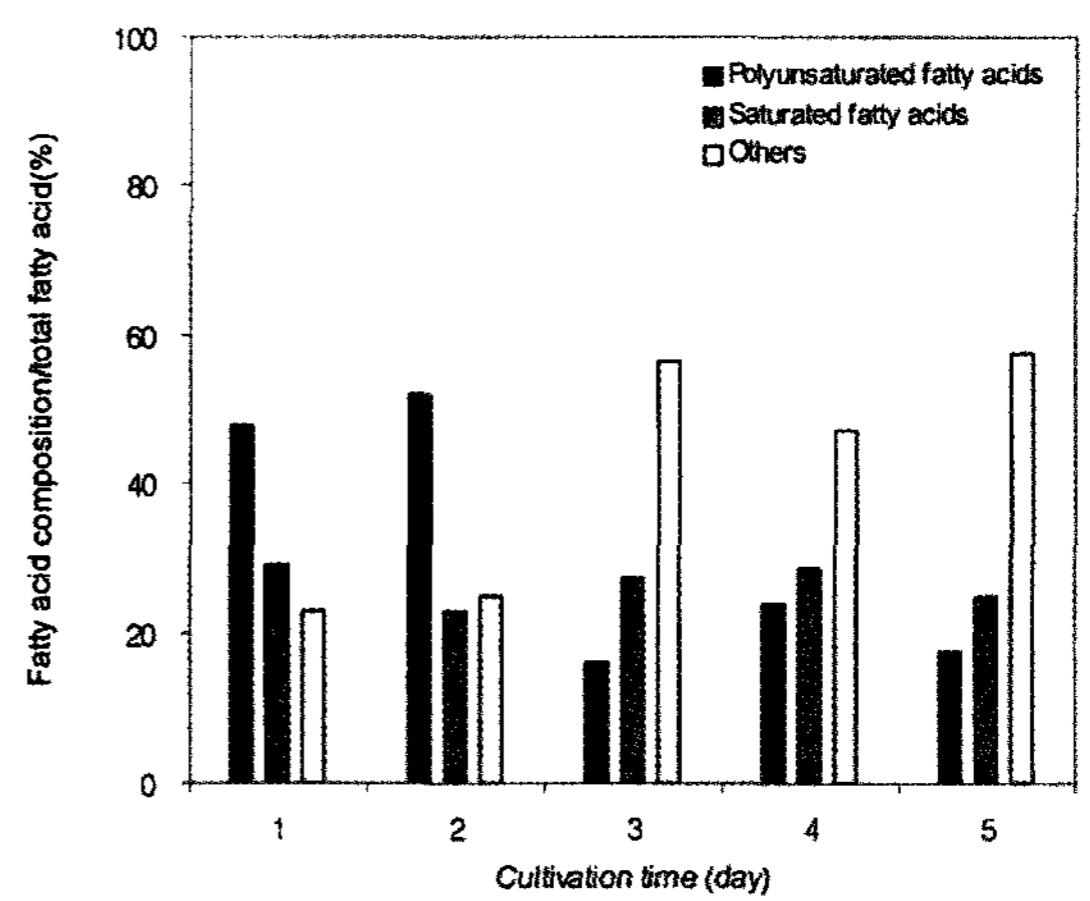


Figure 6. Change of the ratio of polyunsaturated, saturated and other fatty acids to phospholipid in the cell according to cultivation time.

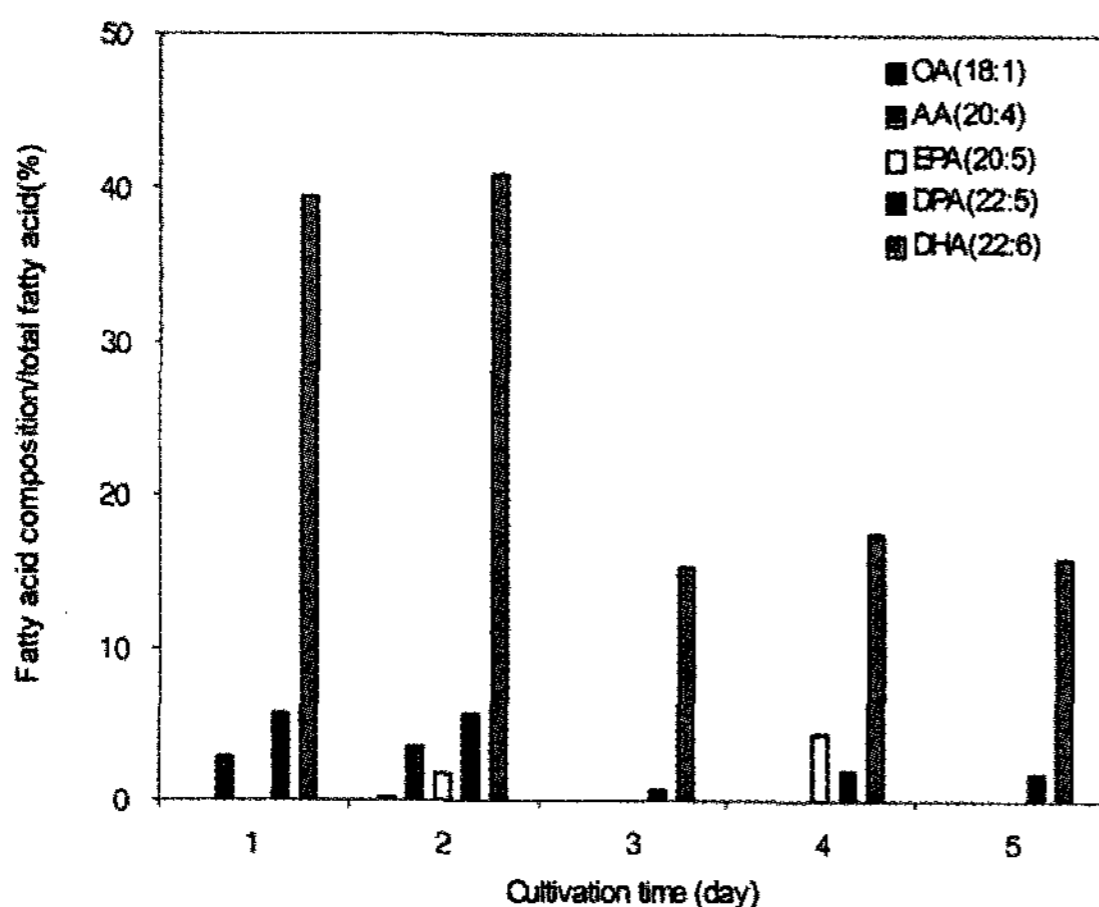


Figure 7. Change of composition of polyunsaturated fatty acids in the phospholipid according to cultivation time.

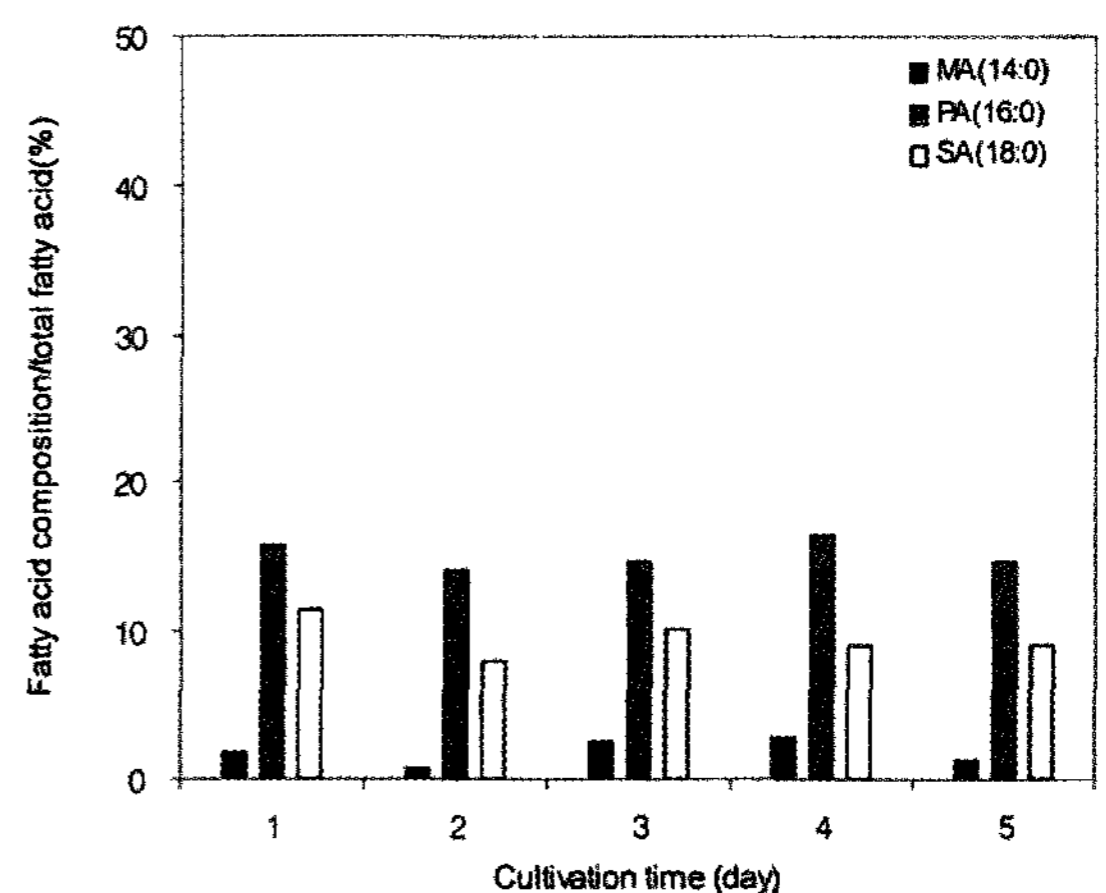


Figure 8. Change of composition of saturated fatty acids in the phospholipid according to cultivation time.

PL을 구성하고 있는 지방산의 조성 변화

Fig. 6은 배양시간과 PL을 구성하고 있는 불포화지방산 및 포화지방산 함량 사이의 함수관계를 나타내고 있다. 배양시간에 따라 불포화지방산의 함량은 초기함량의 50% 이상 감소하는 경향을 나타내었으나, 포화지방산의 함량은 오차 범위 내에서 감소하는 경향을 나타내었다. 배양시간이 경과하여 배양액 내의 영양 환경이 열악하게 되는 경우 본 연구의 균주는 포화지방산보다 불포화지방산을 에너지원으로 사용하고 있다고 해석할 수 있다.

Fig. 7은 PL을 구성하고 있는 불포화지방산 OA, AA, EPA, DPA 및 DHA의 배양시간에 따른 조성변화를 나타내고 있다. OA는 배양 초기부터 PL에는 거의 존재하지 않았으며, AA, DPA 및 DHA는 모두 배양시간에 따라 큰 폭으로 그 함량이 감소되었다. 불포화지방산을 생합성하는 균주인 *Schizochytrium limacinum* SR21, *N. oculata* 및 *Euglena gracilis* 모두 불포화지방산의 함량이 배양시간에 따라 감소하는 것으로 보고되어 있다(24-26).

Fig. 8은 PL을 구성하고 있는 포화지방산 MA, PA, SA의 배양시간에 따른 조성변화를 나타내고 있다. 이 세 종류 포화지방산의 조성은 배양시간에 따라 뚜렷한 증감의 경향을 나타내지 아니 하였다. *N. oculata*인 경우 PA의 조성은 배양시간에 따라 증가하였고, MA는 변화가 없었으며, SA는 감소하였다는 보고가 있었다(25).

요 약

본 연구에서는 배양시간에 따른 *Thraustochytrium aureum* ATCC 34304 균체 내부에 저장하는 지질의 지방산조성 및 균체 막에 축적하는 지질 내의 지방산조성의 변화 과정을 정량적으로 규명하였다. 건조균체량은 배양 5일째에 3.94 g/L를 나타내었으며, 균체당의 지질 함량은 배양 3일째에 최대값 25.0%를 나타내었다. 균체 내의 triacylglyceride (TAG)량은 배양 3일까지는 증가하였으나 그 이후에는 거의 일정한 값을 유지하였다. 반면 세포막을 구성하는 phospholipid (PL)의 함량은 3일까지는 감소하나 그 이후에는 일정한 값을 나타내었다. TAG를 구성하고 있는 다중불포화지방산의 함량은 배양 초기 60.3%이었으나 배양 5일 후에는 45.3%까지 감소하였으며, DHA는 42.1%에서 33.9%까지 감소하였다. 포화지방산의 함량은 배양 초기에는 24.9%이었으나 배양 5일 후에는 27.8%까지 증가하였다. PL 내의 불포화지방산의 함량은 배양시간에 따라 48.0%에서 17.5%까지 크게 감소하는 경향을 나타내었으나, 포화지방산의 함량은 오차범위 내에서의 감소 경향을 나타내었다. 본 연구 결과에 의하면 배양시간이 경과하여 배양액 내의 영양 환경이 열악하게 되는 경우 균주는 포화지방산보다 불포화지방산을 에너지원으로 우선 사용한다고 해석할 수 있다.

감 사

본 연구는 해양수산부의 수산특정연구개발사업 (과제번호: 20020075)에 의해 수행되었으며, 연구비 지원에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Mehta, J., L. M. Lopez, and T. Wargovich (1987), Eicosapentaenoic acid: its relevance in atherosclerosis and coronary artery disease, *Am. J. Cardiol.* **59**, 155-159.
2. Urakaze, M., T. Hamazaki, V. Soda, M. Miyamoto, F. Iloki, F. Yano, and A. Kumagai (1986), Infusion of emulsified triicosapentaenoyl-glycerol into rabbits - the effects on platelet aggregation, polymorphonuclear leukocyte adhesion, and fatty acid composition in plasma and platelet phospholipids, *Thrombo. Res.* **44**, 673-682.
3. Mortensen, J. Z., E. B. Schmidt, A. H. Nielsen, and J. Dyerberg (1983), The effect of N-6 and N-3 polyunsaturated fatty acids on hemostasis, blood lipids and blood pressure, *Thromb. Haemose.* **50**, 543-546
4. Lands, W. E. (1986), In: Kifer, R. R. and Martin, R. E., editors, Health effects of polyunsaturated fatty acids in seafoods. FL: Academic Press, Orlando, 319.
5. Kremer, J. M., J. Biguette, and A. U. Michalek (1985), Effects of manipulating dietary fatty acids on clinical manifestations of rheumatoid arthritis, *Lancet.* **1**, 184-187.
6. Ziboh, V. A., K. A. Cohen, C. N. Ellis, C. Miller, T. A. Hamilton, K. Kragballe, C. R. Hydrick, and J. J. Voorhees (1986), Effects of dietary supplementation of fish oil on neutrophil and epidermal fatty acids. Modulation of clinical course of psoriatic subjects, *Arch. Dermatol.* **122**, 1277-1282.
7. Robinson, D. R., J. D. Prickett, G. T. Makoul, A. D. Steinberg, and R. B. Colvin (1986), Dietary fish oil reduces progression of established renal disease in (NZB x NZW) F1 mice and delays renal disease in BXDB and MRL/1 strains, *Arthritis Rheum.* **29**, 539-546.
8. Dratz, E. A. and A. J. Deese (1986), Health effects of polyunsaturated fatty acid in seafoods. Academic press Inc., USA. 319-330.
9. Gason, A., H. Jacques, S. Moorjani, Y. Deshaies, L. D. Brun, and P. Julien (1996), Plasma lipoprotein profile and lipolytic activities in response to the substitution of learn white fish for other animal protein sources in premenopausal women, *Am. J. Clin. Nutr.* **63**, 315-321.
10. Yongmanitchai, W. and O. P. Ward (1989), Omega-3 fatty acids: alternative sources of production, *Process Biochem.* **24**, 117-125.
11. Henderson, R. J., J. W. Leftley, and J. R. Sargent (1988), Lipid composition and biosynthesis in the marine dinoflagellate *Cryptocodinium cohnii*, *Phytochemistry*, **27**, 1679-1683
12. Gunstone, F. D. (2001), Structure and modified lipids. New York: Marcel Dekker.
13. Davies, R. J. (1992) In: Kyle, D. J., and C. Ratledge, editors. Industrial applications of single cell oils. Champaign, IL: American Oil Chemists' Society, 196-218.
14. Ward, O. P. (1989), Fermentation biotechnology. UL: Open University Press.
15. Ratledge, C. and J. P. Wynn (2001), The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. *Adv. Appl. Microbiol.* **51**, 1-51.
16. Bajpai, P. K., P. Bajpai, and O. P. Ward (1991), Optimization of production of docosahexaenoic acid (DHA) by *Thraustochytrium*

- aureum* ATCC 34304, *J. Amer. Oil Chem. Soc.* **68**, 509-514.
17. Cohen, Z., A. Vonshak, and A. Richmond (1987), Fatty acid composition of spirulina grown under various conditions, *Phytochemistry* **26**, 2255-2258.
 18. Singh, A. and O. P. Ward (1996), Production of high yields of docosahexaenoic acid by *Thraustochytrium reseau* ATCC 28210, *J. Ind. Microbiol.* **16**, 370-373.
 19. Stinson, E. E., R. Kwoczak, and M. Kurants (1991), Effect of cultural conditions on production of eicosapentaenoic acid by *Pythium irregulare*, *J. Ind. Microbiol.* **8**, 171-178.
 20. Jiang, Y. and F. Chen (2000), Effect of medium glucose concentration and pH on docosahexaenoic acid content of heterotrophic *Cryptocodinium cohnii*, *Process Biochem.* **35**, 1205-1209.
 21. Kim, W. H., S. H. Park, S. K. Song, K. D. Bae, and B. K. Hur (2005), The effect of weight ratio of carbon source to nitrogen source on the growth and the composition of fatty acid of *Thraustochytrium aureum* ATCC 34304, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **20**, 266-270.
 22. Ward, O. P. and A. Singh (2005), Omega-3/6 fatty acids: Alternative sources of production, *Process Biochemistry*, **40**, 3627-3652.
 23. Lepage, G., and C. C. Roy (1984), Improved recovery of fatty and through direct transesterification without prior extraction or purification, *J. Lipid Res.* **25**, 1391-1396
 24. Regnault, A., D. Chervin, A. Chammal, F. Piton, R. Calvayrac, and P. Mazliak (1995), Lipid composition of *Euglena gracilis* in relation to carbon-nitrogen balance, *Phytochemistry* **40**, 725-733
 25. Hodgson, P. A., R. J. Henderson, J. R. Sargent, and J. W. Leftley (1991) Patterns of variation in the lipid class and fatty acid composition of *Nannochloropsis oculata* (Eustigmatophyceae) during batch culture, *J. Appl. Phycology* **3**, 169-181.
 26. Morita, E., Y. Kumon, T. Nakahara, S. Kagiwada, and T. Noguchi (2006) Docosahexaenoic acid production and lipid-body formation in *Schizochytrium limacinum* SR21, *Marine Biotechnology* **8**, 319-327.