

배양조건에 따른 *Schizochytrium mangrovei*의 성장 및 Docosahexaenoic acid의 생산특성

정우철, 최병대¹, 강석중*

경상대학교 해양생명과학과/해양산업연구소, ¹경상대학교 해양식품공학과

Effect of Culture Conditions on Characteristics of Growth and Production of Docosahexaenoic acid (DHA) by *Schizochytrium mangrovei*

U-Cheol Jeong, Byeong-Dae Choi¹ and Seok-Joong Kang*

Department of Marine Biology and Aquaculture/Institute of Marine Industry, Gyeongsang National University, Tongyeong 650-160, Korea

¹Department of Seafood Science and Technology, Gyeongsang National University, Tongyeong 650-160, Korea

Both docosahexaenoic acid (DHA, 22:6n-3) and eicosapentaenoic acid (EPA, 20:5n-3) have attracted increasing attention since the first epidemiological report on the importance of n-3 essential fatty acids. Lipids in microbial cells play various biological roles and, consequently, much research has been carried out on their role in cell physiology. The lipid composition of microorganisms can exhibit considerable variations depending on environment. The effects of culture conditions, temperature (15, 20, 24, 28, 32 and 36 °C), salinity (10, 20, 30, 40 and 50 psu), pH (pH5, 6, 7, 8 and 9), rotation speeds (50, 100, 150 and 200 rpm), carbon sources, nitrogen sources and C/N ratio on the production of docosahexaenoic acid, fatty-acid profiles, and acids secreted to the broth culture by the oleaginous microorganism, *Schizochytrium mangrovei* (KCTC 11117BP), were studied. Temperature (initially 28 °C), salinity (20 psu), pH (pH7), rotation speeds (100 rpm), organism fatty acids, and secreted acids in the broth were varied during cultivation of *S. mangrovei*. At pH 7.0, *S. mangrovei* was able to accumulate lipids up to 40% of its biomass, with 13% (w/w) DHA content. The monosaccharides glucose and fructose, and yeast extract were suitable carbon and nitrogen sources, respectively. The primary omega-3 polyunsaturated fatty acid produced was docosahexaenoic acid.

Key words: *Schizochytrium mangrovei*, Docosahexaenoic acid, Omega-3 fatty acid, Marine Microorganism

서론

Docosahexaenoic acid (DHA)는 eicosapentaenoic acid (EPA), α -linolenic acid와 함께 오메가-3계 지방산에 속하며, serum triacylglycerides 및 LDL-cholesterol의 함량을 낮추고 HDL-cholesterol 수치를 높임으로써 동맥경화 및 혈전증 등과 같은 심혈관계 질환의 예방에 효과가 있는 것으로 보고되고 있다(Lee and Kim, 2001; Ohr, 2003). 또한 두뇌, 신경계 및 안구 조직의 필수지방산으로 특히, 유아의 시력 및 운동능력 개발 등에 중요한 요소이며 뇌의 구조적 지질에 가장 풍부한 구성요소 중의 하나이다(Horrocks and Yeo, 1999). 이러한 DHA의 중요

성이 제기됨과 동시에 그것을 무엇으로부터 어떻게 확보하느냐 하는 것도 중요한 과제가 되었다. DHA는 특이하게도 화학 합성이 용이하지 못하여 천연물에서 얻어져야 되는데, 지금까지 산업적으로 DHA의 주요 공급원은 고등어, 꽂치, 참치, 전갱이, 정어리, 청어 등과 같은 등 푸른 생선의 기름에서 추출되어 왔다(Haglund et al., 1991). 그러나 어유의 품질은 어종, 계절, 어획 위치에 따라서 다양하며 안정적인 생산도 어려울 뿐 아니라, 어유로부터 생산한 DHA는 비린내와 같은 특유의 냄새와 맛으로 인하여 미생물로부터 생산이 시도되고 있다(Zu and Ward, 1994; Abril et al., 2003; Kim and Lee, 2005). DHA를 생산하는 미생물로는 해양식물성 플랑크톤과 *Entromoph thorrals*속,

<http://dx.doi.org/10.5657/KFAS.2014.0144>



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.

Kor J Fish Aquat Sci 47(2) 144-153, April 2014

Received 18 February 2013; Revised 20 November 2013; Accepted 25 November 2013

*Corresponding author: Tel: +82. 55. 772. 9154 Fax: +82. 55. 644. 4202

E-mail address: sjkang@gnu.ac.kr

*Thraustochytrid*속, *Mucoreles*속 그리고 *Ascomycetes*속 등이 잘 알려져 있다(Bajpai et al., 1991; Sathe et al., 1993; Sharma et al., 1994). 특히, *Thraustochytrid*에 속하는 미생물인 *Schizochytrium*은 DHA 함량이 매우 높으며 DHA와 지방산구조가 유사한 다른 종류의 오메가-3 고도불포화지방산의 함량이 낮기 때문에 순수한 DHA를 분리하는데 상대적으로 유리하다고 보고되고 있다(Yokochi et al., 1998). 이러한 *Schizochytrium*과 같은 해양미생물에서 효과적으로 DHA를 생산하기 위해서는 높은 균체농도를 얻어야 함과 동시에 생체내에 DHA 함량을 높여야 한다. 미생물의 경우, 기본적인 생리 특성에 적합한 성장조건과 지질 생산에 적합한 조건은 다소 차이가 있기 때문에 생육환경조건, 즉 배양온도, 염분농도, pH 등의 환경적인 요인(Fan et al., 2001; Hur et al., 2002; Wu et al., 2005; Zhu et al., 2007)과 더불어 영양학적인 요인인 탄소원과 질소원의 종류, 탄소원과 질소원의 비율에 따라 성장, 지질함량, 지방산 조성에 많은 영향을 준다고 보고되고 있다(Bowles et al., 1999; Fan et al., 2002; Unagul et al., 2007). 여러 환경인자 중 어떤 인자가 생산성에 가장 큰 영향을 미치는가에 대한 명확한 연구결과는 아직 보고되어 있지 않다(Singh and Ward, 1996). 따라서 이번 연구에서는 DHA의 대체 공급원으로서 *Schizochytrium mangrovei* (KCTC 11117BP)를 이용하여 배양조건과 영양조건에 따른 DHA 생산성 변화를 알아보려고 한다.

재료 및 방법

실험재료 및 배지조성

본 연구에 사용된 균주는 *Schizochytrium mangrovei* (KCTC 11117BP)로 국립경상대학교 해양생물사료공학 연구실에서 직접 해양으로부터 분리한 균주를 사용하였다. 균주의 활성을 유지하기 위하여 일주일 간격으로 사면배지에 계대배양한 후 4℃에서 냉장보관하면서 접종용 균주배양에 사용하였다. 균주배양을 위한 배지는 GYEP medium (Wong et al., 2005)을 사용하였다(Table 1). 배지 조성은 Glucose 10 g, Yeast extract 1 g, Peptone 1 g, H₃BO₃ 4.09 mg, MnCl₂ 2.59 mg, ZnSO₄·7H₂O 0.31 mg, CuSO₄ 0.11 mg, NaMo₄·2H₂O 0.03 mg, CoSO₄ 0.03 mg, Sea salt 20 g에 final volume 1 L, final pH 6.5로 조정하여 사용하였다.

배양조건에 따른 영향

배양조건은 배양온도, 염분농도, pH, 교반속도와 배양시간을 각각 달리하여 실험하였다. 배양온도에 따른 실험은 진탕배양기(KSI-200L, Koencon Co., Ltd)를 이용하여 15, 20, 24, 28, 32, 그리고 36℃로 실시하였으며, 염분농도에 따른 실험은 Sea salts (S9883, Sigma Chemical Co., St, Louis, USA)를 이용하여 10, 20, 30, 40 그리고 50 psu로 실시하였다. pH에 따른 실험은 0.1 N HCl과 0.1 N NaOH를 이용하여 pH 5, 6, 7, 8 그리

고 9로 실험을 실시하였으며, 교반속도에 따른 실험은 50, 100, 150 그리고 200 rpm로 실시하였다. 배양시간에 따른 실험은 접종 후, 24 시간마다 균체를 회수 측정하였다.

영양조건에 따른 영향

영양조건에 따른 실험은 탄소원의 종류, 질소원의 종류 그리고 C/N 비율에 따른 실험을 실시하였다. 탄소원에 따른 성장은 GYEP배지(Table 1)에서 탄소원을 제외한 나머지 배지 조성에서 탄소원으로 Glucose, Fructose, Lactose, Maltose, Sucrose, Starch, 그리고 Glycerol을 사용하였으며 실험은 25℃에서 72 시간 각각 배양한 후, 소모된 탄소원의 양을 조사하여 영양 요구성을 결정하고, 균체수율, 지질함량과 DHA함량 변화를 알아보고자 하였다. 균체수율과 탄소원의 잔류농도 측정은 시료 채취 후, 즉시 시료가 담긴 시험관을 원심분리기(HA1000, HANIL, KOREA)를 통해 5,000 rpm에서 15분간 원심 분리하여 상층액은 잔류 탄소원의 측정에 사용하였으며, 침전물은 균체량 수율, 지질함량 및 지방산분석에 사용하였다. 탄소원의 소모량 측정은 YSI 2700 SELECT (Biochemistry Analyzer YSI 2700 SELECT™, YSI Co., USA)를 이용하였다.

질소원에 따른 성장은 GYEP 배지(Table 1)에서 질소원을 제외한 조성에서 질소원으로 Tryptone, Peptone, Yeast extract, Urea, Monosodium glutamate, Sodium nitrate 그리고 Ammonium chloride를 이용하여 이들을 각각 0.1% (w/v) 첨가하여 25℃에서 72시간 배양한 후, 균체량 수율, 지질함량과 DHA함량 변화를 측정하였다.

C/N 비율에 따른 실험은 탄소원으로 glucose와 질소원으로 yeast extract를 이용하였다. 질소원인 yeast extract 1 g/L으로 고정시키고, 탄소원인 glucose 농도를 변화시키며 C/N 비율이 1, 5, 10, 15, 20 그리고 25 비율로 조정하였으며 실험은 25℃에서 72시간 각각 배양한 후, 균체량 수율, 지질함량과 DHA함량 변화를 측정하였다.

분석방법

총 지질 추출은 Bligh and Dyer (1959)에 준하였다. 비커에 균체 5 g을 취하여 세포분쇄기(homogenizer AM-12, Nihonseiki Kaisha Co. Ltd., Tokyo, Japan)에서 15,000 rpm로 5분간 분쇄한 후, Chloroform과 Methanol을 2:1로 혼합한 추출 용매를 시료의 2배량 넣어 하루 동안 방치한 다음 chloroform 층만을 분리하기 위하여 둥근 플라스크 위에 깔때기를 놓고, 그 위에 Na₂SO₄를 넣어 서서히 chloroform층만 흘러내리게 하였다. 분리된 chloroform 층은 진공회전농축기(Rotavapor R-114, BUCHI)를 사용하여 40℃이하에서 용매를 완전히 증발시킨 후, 추출된 총 지질의 무게를 측정하였다. 모든 작업은 질소 기류 하에서 행하였다.

지방산 methyl ester 유도체화는 시료 일정량과 내부표준물질(C_{23:0} methyl ester) 1 mL (1 mg)를 cap tube에 취하고, 0.5 N NaOH-methanol 용액 1.5 mL를 가하여 질소를 충전한 다

Table 1. Composition of GYEP¹ medium

Component	Concentration
Glucose	10 g
Yeast extract ²	1 g
Peptone ³	1 g
H ₃ BO ₃	4.09 mg
MnCl ₂	2.59 mg
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.31 mg
CuSO ₄	0.11 mg
NaMo ₄ ·2H ₂ O	0.03 mg
CoSO ₄	0.03 mg
Sea salt ⁴	20 g
Distilled water final volume	1 L
Final pH	pH 6.5

¹GYEP medium (Wong et al., 2005). ²Yeast Extract: Bacto™ Yeast Extract (Becton, Dickinson and Company perks, MD21152, USA).

³Peptone: Pancreatic Digest of Gelatin (Acumedia Manufacturers, Inc. Lansing, MI, USA). ⁴Sea salt: S9883, Sigma.

음, 100℃에서 8분간 가열하여 검화하였다. 방냉 후 12% BF₃-methanol 2 mL를 가한 후 tube의 뚜껑을 닫고, 100℃에서 11분간 가열하여 methyl화 하였다. 약 30℃로 냉각한 후 Iso-octane 1 mL를 첨가하고 30초간 vortex mixer로 혼합하였다. 즉시 3 mL의 포화식염수를 가한 다음 흔들어 방치하여 iso-octane층이 분리되도록 하였다. Iso-octane층을 시료 병(4 mL)에 옮긴 후, 다시 Iso-octane 1 mL를 첨가한 다음 흔들어 재추출하여 시료 병에 모으고 이를 지방산 methyl ester 시료로 하였다.

지방산 분석에 사용하는 GLC는 Omegawax™-320 fused-silica capillary column (30 m × 0.32 mm × 0.25 μm, i.d., Supelco Co., Bellefonte, PA, USA)를 장착한 Clarus 600 (Perkin Elmer Co. Ltd., USA)를 이용하였다. 분석조건으로 Column은 185℃에서 8분간 유지하고 3℃/min씩 230℃까지 상승시킨 후, 10분간 유지하였다. 이 때 주입기는 250℃, 검출기는 270℃ 그리고 carrier gas는 He (1.0 kg/cm²)을 사용하였다. 지방산의 분석은 동일조건에서 분석한 표준품의 ECL과 비교하여 동정하였고, 지방산 표준품은 14:0, 16:0, 18:1, 18:2, 18:3, 20:0, 22:1, 24:0 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)과 GC-MS로 동정된 menhaden oil을 사용하였다.

통계처리

모든 자료는 SPSS (12.0) 프로그램을 이용하여 분산분석(one-way ANOVA)과 회귀분석(Regression Analysis)을 실시하여 Duncan's multiple range test (Duncan, 1955)로 평균간의 유의성($P < 0.05$)을 검정하였다.

결과 및 고찰

배양온도에 의한 영향

배양온도 15, 20, 24, 28, 32 그리고 36℃에서 배양한 결과는 Table 2에 나타난 바와 같이 배양온도에 따른 균체량 수율은 각각 2.23, 5.45, 9.06, 10.50, 9.80 그리고 4.06 g/L로 28℃에서 10.50 g/L로 가장 높은 균체수율을 가졌다($P < 0.05$). 또한 이때의 지질함량은 각각 46.24, 42.79, 36.87, 32.02, 30.91 그리고 28.58%로 배양온도가 높아짐에 따라 지질함량이 줄어들었으며($P < 0.05$), DHA함량도 각각 50.11, 48.84, 45.76, 44.31, 38.90 그리고 34.87%로 배양온도가 높아짐에 따라 줄어드는 것으로 나타났다($P < 0.05$). 배양온도에 따른 지방산 조성은 Table 3에 나타난 바와 같이 배양온도가 높음에 따라 포화지방산의 비율이 현저히 증가되었고($P < 0.05$), 불포화지방산의 비율은 감소되었다($P < 0.05$). 특히, 오메가-3 고도불포화지방산의 경우는 15℃에서 53.71%였지만 20, 24, 28, 32 그리고 36℃에서는 각각 50.80, 47.84, 46.25, 41.03 그리고 37.14%로 배양온도가 높아짐에 따라 낮아지는 경향을 보였다($P < 0.05$). 이상의 결과에서 성장은 28℃에서 가장 높게 나타났지만 지질과 DHA 함량의 경우는 낮은 온도일수록 높게 나타남에 따라 DHA의 생산에 가장 적합한 배양온도는 24℃와 28℃로 나타났다. 이전에 보고된 Thraustochytrids 과의 종에 따른 적정 배양 온도는 다양하게 나타났는데 *Thraustochytrium antarcticum*, *T. kerguelensis*, *T. rossii*의 3종은 최적배양온도가 4-9℃로 나타났으며(Bahnweg, 1979), *T. aureum*과 *T. roseum*의 경우는 각각 20-25℃와 25-30℃로 보고되고 있다(Goldstein, 1963). 또한 *Schizochytrium limacinum*와 *Schizochytrium* sp.의 최적배양온도는 각각 25℃와 28℃이며(Bajpai and Bajpai, 1993), *Schizochytrium* sp.와 *S. mangrove*는 모두 25℃로 보고하였다(Fan et al., 2001; Fan et al., 2002). 이 외의 여러 해양미생물의 경우에도 배양온도가 균체의 성장에 영향을 미치나 최적온도는 균주에 따라 서로 다르다는 연구결과가 보고되었다(Owen and Ajay, 2005).

인지질과 sterol 지방산의 함량과 조성은 온도에 따른 영향을 받는데 식물 조직세포에서 고도불포화지방산은 12℃에서 80%가 형성되나 20℃와 30℃에서는 각각 51%와 30%의 불포화지방산이 합성되며(Browse and Slack, 1993). 온도가 낮으면 불포화 지방산의 양이 많아지는 반면 배양 온도가 높으면 포화 지방산의 양이 많아진다고 보고되고 있다(Neidelman, 1987). 이번 연구에서도 온도가 높아짐에 따라 포화지방산의 비율이 높아지는 것과 일치하는 것으로 나타났다.

염분농도에 의한 영향

염분농도 10, 20, 30, 40 그리고 50 psu에서 배양한 결과는 Table 4, 5에 나타난 바와 같다. 염분농도 10, 20, 30, 40 그리고 50 psu에서 배양한 균체량 수율은 각각 6.00, 10.10, 10.30, 8.25 그리고 5.10 g/L로 염분농도가 20과 30 psu일 때 가장 높게 나타났으며($P < 0.05$), 이 때 지질함량은 각각 42.17, 41.78, 37.18, 38.30 그리고 31.18%로 염분농도가 높아짐에 따라 지질

Table 2. Effect of culture temperature on biomass, lipid and DHA production

Temperature (°C)	Biomass (g/L)	Lipid (g/L)	Lipid in biomass (% w/w)	DHA in biomass (% w/w)	DHA in lipid (% w/w)	DHA yield (g/L)
15	2.23 ^e	1.03	46.24 ^a	23.17	50.11 ^a	0.52 ^c
20	5.45 ^c	2.33	42.79 ^b	20.90	48.84 ^a	1.09 ^b
24	9.06 ^b	3.34	36.87 ^c	16.87	45.76 ^b	1.53 ^a
28	10.50 ^a	3.36	32.02 ^d	14.19	44.31 ^c	1.49 ^a
32	9.80 ^{ab}	3.03	30.91 ^e	12.02	38.90 ^d	1.18 ^b
36	4.06 ^d	1.16	28.58 ^f	9.97	34.87 ^e	0.40 ^c

The values are mean±S.D. (n=3). ^{a-f}Different superscript letters within rows represent significant differences between treatments ($P<0.05$).

Table 3. Fatty acid compositions of *Schizochytrium mangrovei* grown in different temperature (% of total fatty acids)

Fatty acid	Temperature (°C)					
	15	20	24	28	32	36
14:0	0.24±0.02	3.48±0.30	3.69±0.20	4.42±0.05	4.85±0.42	5.17±0.25
15:0	2.19±0.14	2.04±0.08	2.16±0.03	3.94±0.20	4.32±0.08	4.61±0.22
16:0	29.42±1.05	28.28±0.50	29.98±0.87	29.36±1.03	32.22±0.55	34.34±2.15
17:0	0.62±0.03	0.70±0.02	0.74±0.03	1.41±0.23	1.55±0.02	1.65±0.18
18:0	1.68±0.11	1.51±0.20	1.60±0.18	1.57±0.02	1.72±0.02	1.84±0.09
ΣSaturates ¹	34.15 ^f	36.00 ^e	38.17 ^d	40.70 ^c	44.66 ^b	47.60 ^a
20:4n-6	1.30±0.08	2.70±0.43	2.86±0.10	2.90±0.04	3.18±0.04	3.39±0.35
20:4n-3	0.00±0.00	0.69±0.02	0.73±0.02	0.86±0.02	0.94±0.01	1.00±0.08
20:5n-3	2.81±0.30	1.04±0.03	1.10±0.02	0.93±0.01	1.02±0.05	1.09±0.10
22:5n-6	10.84±0.81	10.50±0.44	11.13±0.36	10.14±0.50	11.13±0.25	11.86±0.68
22:5n-3	0.79±0.03	0.24±0.01	0.25±0.01	0.15±0.01	0.17±0.01	0.18±0.01
22:6n-3 ²	50.11±1.53	48.84±0.85	45.76±0.73	44.31±0.56	38.90±0.40	34.87±0.62
ΣPolyenes	65.85 ^a	64.00 ^b	61.83 ^c	59.30 ^d	55.34 ^e	52.40 ^f
Σn-3 HUFA ³	53.71 ^a	50.80 ^b	47.84 ^c	46.25 ^d	41.03 ^e	37.14 ^f
Σn-6 HUFA	12.14	13.19	13.99	13.04	14.31	15.25

¹SFA: Saturated fatty acid, ²22:6n-3: Docosahexaenoic acid (DHA) ³HUFA: Highly unsaturated fatty acid. The values are mean±S.D. (n=3).

^{a-f}Different superscript letters within rows represent significant differences between treatments ($P<0.05$).

함량이 낮아지는 것으로 나타났다($P<0.05$). 또한 DHA생산량은 염분농도 10, 20, 30, 40 그리고 50 psu에서 각각 1.16, 1.91, 1.72, 1.43 그리고 0.71 g/L로 20 psu구에서 1.91 g/L로 가장 높게 나타났으며($P<0.05$), DHA함량은 각각 45.70, 45.30, 44.90, 45.10 그리고 44.90%로 염분농도에 따른 차이는 보이지 않았다($P<0.05$). 이상의 결과로 DHA생산에 따른 가장 적합한 염분농도는 20 psu로 나타났다. 이전에 보고된 *Thraustochytrids*과 의 종에 따른 적정 염분농도는 다양하게 나타났는데 *T. antarcticum*, *T. kerguelensis* 그리고 *T. rossii* 3종의 적정 염분농도는 각각 15-30, 20-30 그리고 15-20 psu로 보고되었으며(Bahnweg, 1979), *T. aureum*과 *T. roseum*의 경우 각각 20-35 psu와 25-35 psu였다(Goldstein, 1963). 또한 *S. limacinum*는 15-30 psu였으며(Honda et al., 1998), *Schizochytrium* sp.와 *S. mangrove*

는 각각 7.5-22.5 psu 와 22.5-30 psu로 보고하였다(Fan et al., 2002).

pH에 의한 영향

pH 5, 6, 7, 8 그리고 9에서 배양한 결과는 Table 6에 나타난 바와 같이 pH에 따른 균체량 수율은 pH 5, 6, 7, 8 그리고 9에서 각각 9.28, 10.37, 10.75, 9.82 그리고 8.91 g/L로 pH 6, 7에서 가장 높게 나타났으며($P<0.05$). 지질함량은 각각 35.47, 39.17, 41.88, 35.34 그리고 33.89%로 pH 7에서 가장 높게 나타났으며($P<0.05$). 또한 DHA함량은 각각 1.45, 1.90, 2.13, 1.55 그리고 1.27 g/L로 나타나 pH 7에서 가장 높게 나타났으며($P<0.05$). pH에 따른 지방산조성은 Table 7에 나타난 바와 같이 pH 5, 6, 7, 8 그리고 9에서 배양한 결과 DHA함량은 각각 44.10, 46.73,

Table 4. Effect of culture salinity on biomass, lipid and DHA production

Salinity (psu)	Biomass (g/L)	Lipid (g/L)	Lipid in biomass (% w/w)	DHA in biomass (% w/w)	DHA in lipid (% w/w)	DHA yield (g/L)
10	6.00 ^c	2.53	42.17 ^a	19.27	45.70 ^a	1.16 ^d
20	10.10 ^a	4.22	41.78 ^a	18.93	45.30 ^{ab}	1.91 ^a
30	10.30 ^a	3.83	37.18 ^b	16.69	44.90 ^b	1.72 ^b
40	8.25 ^b	3.16	38.30 ^b	17.27	45.10 ^{ab}	1.43 ^c
50	5.10 ^c	1.59	31.18 ^c	14.00	44.90 ^b	0.71 ^e

The values are mean±S.D. (n=3). ^{a-c}Different superscript letters within rows represent significant differences between treatments ($P<0.05$).

Table 5. Fatty acid compositions of *Schizochytrium mangrovei* grown in different salinity (% of total fatty acids)

Fatty acid	Salinity (psu)				
	10	20	30	40	50
14:0	3.82±0.17	2.10±0.10	3.77±0.21	3.68±0.11	3.22±0.09
15:0	3.90±0.23	2.07±0.09	2.20±0.11	2.15±0.09	3.75±0.21
16:0	29.09±0.80	27.74±1.21	30.58±0.56	30.97±1.22	31.85±0.91
17:0	1.40±0.02	6.80±0.30	0.76±0.02	0.74±0.02	1.34±0.10
18:0	1.55±0.10	1.59±0.03	1.63±0.04	1.38±0.03	1.09±0.07
ΣSaturates ¹	39.76 ^b	40.30 ^{ab}	38.94 ^b	38.92 ^b	41.25 ^a
20:4n-6	2.57±0.11	2.17±0.08	2.92±0.08	2.81±0.02	2.56±0.11
20:4n-3	0.85±0.02	0.31±0.01	0.52±0.02	0.73±0.01	0.62±0.08
20:5n-3	0.92±0.02	0.96±0.02	1.12±0.03	1.09±0.01	0.88±0.04
22:5n-6	10.05±0.45	10.22±0.56	11.35±0.22	11.10±0.55	9.64±0.31
22:5n-3	0.15±0.01	0.74±0.02	0.26±0.01	0.25±0.01	0.14±0.01
22:6n-3 ²	45.70±1.26 ^a	45.30±0.88 ^{ab}	44.90±0.65 ^b	45.10±0.66 ^{ab}	44.90±0.78 ^b
ΣPolyenes	60.24 ^{ab}	59.70 ^b	61.06 ^a	61.08 ^a	58.75 ^b
Σn-3 HUFA ³	47.62 ^a	47.31 ^{ab}	46.80 ^b	47.17 ^{ab}	46.55 ^b
Σn-6 HUFA	12.61	12.39	14.27	13.91	12.20

¹SFA: Saturated fatty acid, ²22:6n-3: Docosahexaenoic acid (DHA), ³HUFA: Highly unsaturated fatty acid. The values are mean±SD (n=3).

^{a-b}Different superscript letters within rows represent significant differences between treatments ($P<0.05$).

47.31, 44.77 그리고 42.14% 로서 pH 6과 pH 7에서 가장 높게 나타났다($P<0.05$). 이상의 결과로 DHA생산에 따른 가장 적합한 pH는 pH 7로 나타났다. 또한 대부분의 미생물들은 pH 6.5-7.5의 중성적인 환경에서 잘 생육하는 것과 비슷한 결과를 보이지만 다른 미생물에 비하여 *S. mangrovei*의 성장에는 pH에 의한 영향을 크게 받지 않는 것으로 나타났다.

교반속도에 의한 영향

교반속도 50, 100, 150 그리고 200 rpm에서 배양한 균체량의 수율, 지질함량과 DHA함량에 관한 결과는 Table 8에 나타내었다. 교반속도에 따른 균체량 수율은 교반 속도 50, 100, 150 그리고 200 rpm에서 각각 3.11, 9.38, 10.17 그리고 9.10 g/L로 150 rpm에서 10.17 g/L로 가장 높게 나타났으며($P<0.05$), 지질의 함량은 각각 39.87, 41.49, 37.19 그리고 35.51%로 50와

100 rpm 구에서 가장 높게 나타났다($P<0.05$). DHA 함량은 교반 속도 50, 100, 150 그리고 200 rpm에서 각각 43.31, 44.10, 44.23 그리고 44.31% 로 교반속도에 따른 차이는 나타나지 않았으며($P<0.05$), DHA생산량은 각각 0.54, 1.72, 1.67 그리고 1.40으로 교반속도 100과 150 rpm 구에서 가장 높게 나타났다($P<0.05$). 이상의 결과로 DHA생산에 따른 가장 적합한 교반속도는 100과 150 rpm 로 나타났다.

배양시간에 의한 영향

배양시간에 따른 균체량 수율, 지질함량 및 DHA함량은 접종 후 24, 48, 72, 96, 120 그리고 144시간 동안 배양하여 측정하였다. 균체량은 접종 후 24, 48 그리고 72 시간동안 배양하였을 때 각각 2.80, 6.80 그리고 10.60 g/L로 급격한 균체성장을 보였지만, 72 시간 이후부터는 성장이 둔화되면서 96, 120 그리고 144

Table 6. Effect of culture pH on biomass, lipid and DHA production

pH	Biomass (g/L)	Lipid (g/L)	Lipid in biomass (% w/w)	DHA in biomass (% w/w)	DHA in lipid (% w/w)	DHA yield (g/L)
5	9.28 ^{bc}	3.29	35.47 ^c	15.64	44.10 ^b	1.45 ^{cd}
6	10.37 ^a	4.06	39.17 ^b	18.30	46.73 ^a	1.90 ^b
7	10.75 ^a	4.50	41.88 ^a	19.81	47.31 ^a	2.13 ^a
8	9.82 ^b	3.47	35.34 ^c	15.82	44.77 ^b	1.55 ^c
9	8.91 ^c	3.02	33.89 ^{cd}	14.28	42.14 ^{cd}	1.27 ^d

The values are mean±S.D. (n=3). ^{a-d}Different superscript letters within rows represent significant differences between treatments ($P<0.05$).

Table 7. The effect of cultivation pH on the fatty acid compositions of *Schizochytrium mangrovei* (% of total fatty acids)

Fatty acid	pH				
	5	6	7	8	9
14:0	3.94±0.20	2.28±0.06	3.60±0.07	3.70±0.12	3.38±0.31
15:0	4.02±0.08	2.24±0.03	2.11±0.02	2.17±0.09	3.93±0.18
16:0	29.95±0.75	30.12±1.06	29.23±0.68	31.15±2.05	33.45±1.23
17:0	1.44±0.07	1.26±0.06	0.72±0.02	0.75±0.03	1.41±0.05
18:0	1.60±0.03	1.72±0.04	1.56±0.03	1.39±0.06	1.15±0.02
ΣSaturates	40.95 ^b	37.62 ^d	37.22 ^d	39.16 ^c	43.32 ^a
20:4n-6	2.64±0.06	2.35±0.11	2.79±0.03	2.82±0.15	2.69±0.05
20:4n-3	0.88±0.02	0.34±0.01	0.50±0.01	0.73±0.02	0.65±0.01
20:5n-3	0.95±0.01	1.05±0.12	1.07±0.03	1.10±0.04	0.93±0.02
22:5n-6	10.34±0.57	11.10±0.47	10.86±0.31	11.16±0.74	10.12±0.55
22:5n-3	0.16±0.01	0.81±0.02	0.25±0.01	0.25±0.01	0.15±0.01
22:6n-3	44.10±0.96	46.73±0.65	47.31±1.09	44.77±0.80	42.14±1.43
ΣPolyenes	59.05 ^c	62.38 ^a	62.78 ^a	60.84 ^b	56.68 ^d
Σn-3 HUFA ³	46.07 ^b	48.92 ^a	49.13 ^a	46.86 ^b	43.87 ^c
Σn-6 HUFA	12.98	13.45	13.64	13.99	12.81

¹SFA: Saturated fatty acid, ²22:6n-3: Docosahexaenoic acid (DHA), ³HUFA: Highly unsaturated fatty acid. The values are mean±SD (n=3).

^{a-d}Different superscript letters within rows represent significant differences between treatments ($P<0.05$).

시간제 각각 11.30, 10.90 그리고 10.65 g/L으로 균체량의 증가는 없었다($P<0.05$). 배양시간이 24, 48, 72, 96, 120 그리고 144 시간 배양하는 동안 지질함량 변화는 각각 41.43, 39.41, 33.58, 33.27, 30.83 그리고 31.92%로 배양시간이 길어짐에 따라 지질 함량은 낮아지는 경향을 보였으며($P<0.05$), DHA 함량은 각각 58.70, 56.10, 47.90, 45.30, 44.10 그리고 42.20%로 접종 후 24 시간 일 때 가장 높았으며($P<0.05$), 배양시간이 길어짐에 따라 DHA 함량은 낮아지는 것으로 나타났다($P<0.05$). 또한 DHA 생산량은 배양시간이 24, 48, 72, 96, 120 그리고 144시간 배양시간 동안 각각 0.68, 1.50, 1.71, 1.70, 1.48 그리고 1.43 g/L로 72 시간과 96시간 배양에서 가장 많은 DHA를 생산하는 것으로 나타났다($P<0.05$). 이상의 결과로 DHA 생산에 가장 적합한 배양 시간은 72시간으로 나타났다.

탄소원에 의한 영향

탄소원에 의한 영향으로 Glucose, Fructose, Lactose, Maltose, Sucrose, Starch 그리고 Glycerol을 이용하여 배양한 후 균체량 수율, 지질함량과 DHA 함량을 측정할 결과는 Table 10에 나타낸 바와 같다. 그 결과 균체량은 glucose 구에서 10.75 g/L로 가장 높게 나타났으며, 다음으로 fructose구에서는 9.25 g/L로 단당류에서 높은 균체량을 보였으며($P<0.05$), glycerol구와 starch구에서는 각각 7.61 g/L와 7.10 g/L로 나타났다. 탄소원에 따른 지질함량은 glucose구에서 44.65%로 가장 높게 나타났다($P<0.05$), 다음으로는 glycerol구에서 41.00%로 나타났다. DHA는 starch 구에서 45.08%로 가장 높게 나타났으며($P<0.05$), 다음으로 glucose, maltose 그리고 glycerol구에서 각각 43.66, 43.07 그리고 43.05%로 높게 나타났다. 탄소원에 따른 DHA생산량은 glucose 구에서 2.10 g/L으로 가장 높게 나타났으며($P<0.05$), fructose와 glycerol 구에서 각각 1.41 g/L와

Table 8. Effect of culture rotation speeds on biomass, lipid and DHA production

Rotation speeds (rpm)	Biomass (g/L)	Lipid (g/L)	Lipid in biomass (% w/w)	DHA in biomass (% w/w)	DHA in lipid (% w/w)	DHA yield (g/L)
50	3.11 ^c	1.24	39.87 ^{ab}	17.27	43.31 ^a	0.54 ^c
100	9.38 ^b	3.89	41.49 ^a	18.30	44.10 ^a	1.72 ^a
150	10.17 ^a	3.78	37.19 ^b	16.45	44.23 ^a	1.67 ^a
200	9.10 ^b	3.23	35.51 ^c	15.38	43.31 ^a	1.40 ^b

The values are mean±S.D. (n=3). ^{a-d}Different superscript letters within rows represent significant differences between treatments ($P<0.05$).

1.34 g/L로 나타났다. 이상의 결과로 DHA를 생산하기 위한 가장 적당한 탄소원은 glucose로 나타났다.

질소원에 의한 영향

질소원에 의한 영향으로는 Tryptone, Peptone, Yeast extract, Urea, Monosodium glutamate, Sodium nitrate 그리고 Ammonium chloride를 이용하여 각각 배양한 후 균체량 수율, 지질함량과 DHA함량을 측정하였으며 그 결과는 Table 11에 나타내었다. 질소원에 따른 균체량은 yeast extract구에서 8.40 g/L으로 가장 높게 나타났으며($P<0.05$), 다음으로 tryptone구와 sodium nitrate구에서 각각 7.30과 7.00 g/L로 나타났다. 지질함량은 sodium nitrate구와 yeast extract구에서 각각 45.29%와 45.00%로 가장 높게 나타났으며($P<0.05$), 다음으로 urea구에서 44.07%로 나타났다. 그러나 DHA함량은 peptone구에서 49.33%로 가장 높게 나타났으며($P<0.05$), 다음으로 yeast extract 구와 ammonium chloride구에서 각각 45.03와 44.05%로 나타났다. DHA생산량은 yeast extract를 사용하였을 때 1.70 g/L로 가장 높게 나타났으며($P<0.05$), sodium nitrate구와 peptone 구에서 각각 1.24 g/L와 1.19 g/L로 나타났다. 이상의 결과로 DHA를 생산하기 위한 가장 적당한 질소원은 yeast extract로 나타났다.

C/N 비율에 따른 영향

탄소원(C)과 질소원(N)의 비율에 따른 영향은 C/N 비율 1,

5, 10, 15, 20, 그리고 25로 각각 배양한 후 균체량 수율, 지질함량과 DHA함량에 관한 결과를 Table 12에 나타내었다. 균체량은 C/N 비율이 1, 5, 10, 15, 20, 그리고 25에서 각각 1.10, 5.75, 10.62, 12.44, 13.82 그리고 15.80 g/L로 C/N 비율이 증가됨에 따라 균체량도 증가되었지만($P<0.05$), C/N 비율이 10이상일 때, 균체량 수율의 증가비율이 낮아지는 것으로 나타났다. 지질함량은 C/N 비율이 20일 때 44.66%로 가장 높게 나타났고($P<0.05$), 다음으로 15일 때 43.17%로 나타났다. C/N 비율에 따른 DHA 함량은 C/N 비율이 1일 때 48.82%로 가장 높게 나타났으며($P<0.05$), C/N 비율 5, 10, 15, 20, 그리고 25에서 각각 47.10, 45.41, 44.33, 41.17 그리고 42.44%로 C/N 비율이 높아짐에 따라 DHA는 감소하는 것으로 나타났다($P<0.05$). 이상의 결과로 C/N 비율이 높아짐에 따라 생산되는 균체량은 증가하였지만, C/N 비율이 10이상에서 성장이 현저히 둔화되기 때문에 C/N 비율은 10일 때 가장 적합한 것으로 나타났다. 배지의 질소량은 녹조류, 세균, 곰팡이의 포화지방산과 불포화지방산의 비율에 영향을 준다고 알려져 있다(Yokochi et al., 1998). 해양미세조류인 *Dunaliella bardawii*와 *D. salina* 등은 질소원이 고갈된 상태에서 높은 비율로 EPA를 생산한다고 보고되어 있지만(Ben et al., 1985), 담수미세조류인 *Scenedesmus*와 *Chlorella*에서는 불포화지방산의 비율은 질소원의 농도가 높을 때 증가하는 것으로 보고되고 있다(Piorreck et al., 1984). 곰팡이와 같은 타가영양(heterotrophic) 미생물은 질소원뿐만 아니라 탄소원의 농도도 지질생성을 조절하는 것으로 보고되어

Table 9. Effect of culture rotation speeds on biomass, lipid and DHA production

Culture time (h)	Biomass (g/L)	Lipid (g/L)	Lipid in biomass (% w/w)	DHA in biomass (% w/w)	DHA in lipid (% w/w)	DHA yield (g/L)
24	2.80 ^d	1.16	41.43 ^a	24.32	58.70 ^a	0.68 ^c
48	6.80 ^c	2.68	39.41 ^a	22.11	56.10 ^b	1.50 ^b
72	10.60 ^{ab}	3.56	33.58 ^b	16.08	47.90 ^c	1.71 ^a
96	11.30 ^a	3.76	33.27 ^{bc}	15.07	45.30 ^{cd}	1.70 ^a
120	10.90 ^a	3.36	30.83 ^d	13.60	44.10 ^d	1.48 ^b
144	10.65 ^{ab}	3.40	31.92 ^c	13.47	42.20	1.43 ^b

The values are mean ± S.D. (n=3). ^{a-d}Different superscript letters within rows represent significant differences between treatments ($P<0.05$).

Table 10. Effect of culture carbon sources on biomass, lipid and DHA production

Carbon sources	Biomass (g/L)	Lipid (g/L)	Lipid in biomass (% w/w)	DHA in biomass (% w/w)	DHA in lipid (% w/w)	DHA yield (g/L)
Glucose	10.75 ^a	4.80	44.65 ^a	19.49	43.66 ^b	2.10 ^a
Fructose	9.25 ^b	3.30	35.68 ^d	15.24	42.72 ^{bc}	1.41 ^b
Lactose	4.62 ^d	1.76	38.14 ^c	15.97	41.86 ^c	0.74 ^d
Maltose	3.17 ^e	0.86	27.13 ^e	11.68	43.07 ^b	0.37 ^e
Sucrose	1.67 ^f	0.64	38.32 ^c	15.79	41.21 ^c	0.26 ^e
Starch	7.10 ^c	2.45	34.51 ^d	15.56	45.08 ^a	1.10 ^c
Glycerol	7.61 ^c	3.12	41.00 ^b	17.65	43.05 ^b	1.34 ^b

The values are mean±S.D. (n=3). ^{a-f}Different superscript letters within rows represent significant differences between treatments ($P<0.05$).

Table 11. Effect of culture nitrogen sources on biomass, lipid and DHA production

Nitrogen sources	Biomass (g/L)	Lipid (g/L)	Lipid in biomass (% w/w)	DHA in biomass (% w/w)	DHA in lipid (% w/w)	DHA yield (g/L)
Tryptone	7.30 ^b	2.56	35.07 ^e	13.99	39.88 ^d	1.02 ^c
Peptone	5.65 ^d	2.11	37.35 ^d	18.42	49.33 ^a	1.19 ^b
Yeast extract	8.40 ^a	3.78	45.00 ^a	20.26	45.03 ^b	1.70 ^a
Urea	5.40 ^d	2.38	44.07 ^b	18.61	42.23 ^c	1.01 ^c
Monosodium glutamate	4.93 ^e	2.11	42.80 ^c	17.88	41.77 ^c	0.88 ^d
Sodium nitrate	7.00 ^b	3.17	45.29 ^a	18.24	40.28 ^d	1.24 ^b
Ammonium chloride	6.40 ^c	2.43	37.97 ^d	16.73	44.05 ^b	1.07 ^c

The values are mean±S.D. (n=3). ^{a-e}Different superscript letters within rows represent significant differences between treatments ($P<0.05$).

Table 12. Effect of culture C/N ratio on biomass, lipid and DHA production

C/N ratio	Biomass (g/L)	Lipid (g/L)	Lipid in biomass (% w/w)	DHA in biomass (% w/w)	DHA in lipid (% w/w)	DHA yield (g/L)
1	1.10 ^f	0.43	39.09 ^e	19.08	48.82 ^a	0.21 ^f
5	5.75 ^e	2.36	41.08 ^d	19.35	47.10 ^b	1.11 ^e
10	10.62 ^d	4.45	41.92 ^c	19.04	45.41 ^c	2.02 ^d
15	12.44 ^c	5.37	43.17 ^b	19.14	44.33 ^d	2.38 ^c
20	13.82 ^b	6.17	44.66 ^a	18.39	41.17	2.54 ^b
25	15.80 ^a	6.60	41.77 ^c	17.73	42.44	2.80 ^a

The values are mean±S.D. (n=3). ^{a-f}Different superscript letters within rows represent significant differences between treatments ($P<0.05$).

있다(Watanabe et al., 1997; Kim et al., 2005a,b). *Motierella ramanniana* 균체인 경우 C/N비율이 높으면 균체의 총 지질량이 증가할 뿐만 아니라 고도불포화지방산의 수율도 증가되는 것으로 보고되어 있다(Sajbitor et al., 1990). 영양성분의 농도 이외에 질소원의 종류도 지질생산에 영향을 미치는 것으로 알려져 있으며, *M. ramanniana*는 potassium nitrate가 포함된 배지를 사용할 경우 ammonium salts가 포함된 배지를 사용하는 경우보다 생성되는 지질의 농도가 높다고 보고되어 있다(Sajbitor et al., 1990). 또한 유지(油脂)미생물의 지질축적은 배지

의 영양소 중에서 질소 성분이 부족할 경우에 축적이 된다고 알려져 있다(Honda et al., 1998). DHA 생산에 미치는 glucose 영향을 검토한 결과 glucose 농도가 낮으면 지방산과 DHA 생성을 촉진하였는데 이것은 성장률이 낮았기 때문이라고 보고되고 있다(Kim et al., 2005a). 지질의 농도는 대수증식기에는 감소되었지만, 미지의 배지성분이 제한되어 생육이 지연되면 지질의 생산은 계속 증가되었다고 한다(Honda et al., 1998). 따라서 지질 생산도 생육과 같이 생육제한 조건 즉, 세포의 성장이 이루어지고 정체기 시기에 영양성분이 제한되어 스트레스를

받게 되면 지질함량이 증가되었으며, DHA의 품질도 성장률과 지질농도에 영향을 받는다고 한다. DHA의 농도는 지질농도가 증가하면 역으로 감소된다는 연구(Yazawa and Yamada, 1995; Yazawa, 1996)와 일치되는 결과가 나타났다. 탄소원을 기질로 이용하여 지질을 생산한다는 사실은 오래 전부터 알려져 왔다 (Gill and Valiverty, 1997). 균종에 따른 지질 생산량과 그 지방질의 조성 등이 많은 연구자에 의하여 밝혀지고 있다(Fan et al., 2002; Wu et al., 2005; Zhu et al., 2007). 이상의 결과에서 해양 미생물의 종에 따른 고도불포화지방산 생성 능력이 우수한 종을 찾아내는 것도 중요하지만, 배양 환경에 따른 물리적인 환경 조건과 영양성분에 따른 생리적인 조건을 적절하게 조절하는 것이 무엇보다 중요하다고 생각된다. 이러한 점을 고려하여 더 많은 연구가 이루어진다면 더욱 우수한 양질의 지질과 보다 많은 양의 DHA를 생산할 수 있을 것으로 사료된다.

References

- Abril R, Garrett J, Zeller SG, Sander WJ and Mast RW. 2003. Safety assessment of DHA-rich microalgae from *Schizochytrium* sp. V. Target animal safety/toxicity study in growing swine. *Regue Toxicol Pharmacol* 37, 73-82. [http://dx.doi.org/10.1016/S0273-2300\(02\)00030-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0273-2300(02)00030-2).
- Bahnweg G. 1979. Studies on the physiology of Thraustochytriales I. Growth requirements and nitrogen nutrition of *Thraustochytrium* spp., *Schizochytrium* sp., *Japonochytrium* sp., *Ulkenia* spp. and *Labyrinthuloides* spp. *Veroff Inst Meeresforsch Bremerh* 17, 245-268.
- Bajpai PK, Bajpai P and Ward OP. 1991. Production of docosahexaenoic acid by *Thraustochytrium aureum*. *Appl Microbiol Biotechnol* 35, 706-710.
- Bajpai P and Bajpai PK. 1993. Eicosapentaenoic acid (EPA) production from microorganisms: a review. *J Biotech* 30, 161-183.
- Bligh EG and Dyer WJ. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 37, 911-917.
- Bowles RD, Hunt AE, Bremer GB, Duchars MG and Eaton RA. 1999. Long-chain *n*-3 polyunsaturated fatty acid production by members of the marine protistan group the thraustochytrids: screening of isolates and optimisation of docosahexaenoic acid production. *J Biotech* 70, 193-202.
- Duncan DB. 1955. Multiple range and multiple F test. *Biometric* 11, 1-42.
- Fan KW, Chen F, Jones EBG and Vrijmoed LLP. 2001. Eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids production by and okara-utilizing potential of thraustochytrid. *J Industrial Microbiol Biotech* 27, 199-202. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.jim.7000169>.
- Fan KW, Vrijmoed LLP and Jones EBG. 2002. Physiological studies of subtropical mangrove Thraustochytrids. *Botanica Marina* 45, 50-57.
- Gill I and Valiverty R. 1997. Polyunsaturated fatty acids: occurrence, biological activities and application. *Trends Biotechnol* 15, 401-409.
- Goldstein S. 1963. Development and nutrition of new species of *Thraustochytrium*. *Amer J Bot* 50, 271-179.
- Haglund O, Luostarinen R, Wallin R, Wibell L and Saldeen T. 1991. The effects of fish oil on triglycerides, cholesterol, fibrinogen and malondialdehyde in humans supplemented with vitamin E. *J Nutr* 121, 165-169.
- Honda D, Yokochi T, Nakahara T, Erata M and Higashihara T. 1998. *Schizochytrium limacinum* sp. nov., a new thraustochytrid from a mangrove area in West Pacific Ocean. *Mycol Res* 102, 439-448.
- Horrocks, LA and Yeo YK. 1999. Health benefits of docosahexaenoic acid (DHA). *Pharmacol Res* 40, 211-225.
- Hur BK, Cho DW, Kim HJ, Park CI and Suh HJ. 2002. Effect of culture conditions on growth and production of docosahexaenoic acid (DHA) using *Thraustochytrium aureum* ATCC 3404. *Biotech Bioprocess Eng* 7, 10-15.
- Kim WH, Jeong YS, Park CI and Hur BK. 2005a. The effect of concentration of glucose and salts on both the growth and the production of lipid and DHA of *Thraustochytrium aureum* ATCC 34304. *Kor J Biotech Bioeng* 20, 271-277.
- Kim WH, Park SH, Song SK, Bae KD and Hur BK. 2005b. 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. *Kor J Biotech Bioeng* 20, 266-270.
- Lee JH and Kim HS. 2001. Effects of dietary docosahexaenoic acid levels on the brain phospholipids and serum and liver lipid compositions in rats. *Kor J Nutr* 34, 132-140.
- Neidelman SL. 1987. Effect of temperature on lipid unsaturation. *Biotech Genetic Eng Rev* 5, 245-268.
- Ohr LM. 2003. Fats for healthy living. *Food Technol* 57, 91-96.
- Owen PW and Ajay S. 2005. Omega-3/6 fatty acids: Alternative sources of production. *Process Biochemistry* 40, 3627-3652. <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2005.02.020>.
- Piorreck M, Baasch KH and Pohl P. 1984. Biomass production, total protein, chlorophylls, lipids and fatty acids of freshwater green and blue-green algae under different nitrogen regimes. *Phytochemistry* 23, 207-216.
- Sajbidor J, Dobronova S and Certik M. 1990. Arachidonic acid production by *Mortierella* sp. S-17: influence of C/N ratio. *Biotechnol Lett* 12, 455-456.
- Sathe PV, Raghukumar S, Raghukumar C and Sharma S. 1993. Thraustochytrid and fungal component of marine detritus. I. Field studies on decomposition of brown alga *Sargassum cinereum*. *J Ag Indian J Mar Sci* 22, 159-167.
- Sharma S, Raghukumar C, Raghukumar S, Sathe PV and Chandramohan D. 1994. Thraustochytrid and fungal component of marine detritus II. Laboratory studies on decomposition of the brown alga *Sargassum cinereum*. *J Ag J Exp Mar Biol*

- Ecol 175, 227-242.
- Singh A and Ward OP. 1996. Production of high yields of docosahexaenoic acid by *Thraustochytrium roseum* ATCC 28210. J Ind Microbiol 12, 370-373.
- Unagul P, Assantachai C, Phadungruengluij S, Suphantharika M, Tanticharoen M and Verduyn C. 2007. Coconut water as a medium additive for the production of docosahexaenoic acid(C22:6n-3) by *Schizochytrium mangrovei* Sk-02. Biore-source Technology 98, 281-287.
- Watanabe K, Ishikawa C, Ohtsuka I, Kamata M, Tomita M, Yazawa K and Muramatsu H. 1997. Lipid and fatty acid composition of a novel docosahexaenoic acid producing marine bacterium. Lipids 32, 975-978.
- Wong MKM, Vrijmoed LLP and Au DWT. 2005. Abundance of thraustochytrids on fallen decaying leaves of *Kandelia candel* and mangrove sediments in Futian National Nature Reserve. Botanica Marina 48, 374-378.
- Wu ST, Yu ST and Lin LP. 2005. Effect of culture conditions on docosahexaenoic acid production by *Schizochytrium* sp. S31. Process Biochemistry 40, 3103-3108.
- Yazawa K and Yamada A. 1995. Production of eicosapentaenoic acid from marine bacteria and its genetic engineering. Biochemistry 44, 787-793.
- Yazawa K. 1996. Production of eicosapentaenoic acid from marine bacteria. Lipids 31, 297-300.
- Yokochi T, Honda D, Higashihara T and Nakahara T. 1998. Optimization of docosahexaenoic acid production by *Schizochytrium limacium* SR21. Appl Microbiol Biotechnol 49, 72-76.
- Zu YL and Ward OP. 1994. Production of docosahexaenoic acid by *Thraustochytrium roseum*. J Industrial Microbiol 13, 238-241.
- Zhu L, Zhang X, Ji L, Song X and Kuang C. 2007. Changes of lipid content and fatty acid composition of *Schizochytrium limacinum* in response to different temperatures and salinities. Process Biochemistry 42, 210-214.