

## **Efecto de las condiciones de cultivo sobre el crecimiento y la producción de ácido docosahexaenoico por *Aurantiochytrium limacinum* cepa 85**

Effect of culture conditions on the growth and docosahexaenoic acid production from *Aurantiochytrium limacinum* strain 85.

Efraín Cayra<sup>1</sup>, Klarer F. Sabas<sup>1</sup>, Yovani L. Rosales<sup>1</sup>, Eric Mialhe<sup>2</sup>

### **Resumen**

El efecto de la velocidad de rotación, pH, temperatura y salinidad sobre el crecimiento y producción de ácido docosahexaenoico (DHA) en una cepa de traustoquitridio con 99% de similaridad a *Aurantiochytrium limacinum* fueron investigados con ensayos a tres niveles: 50, 100 y 150 rpm; 4, 7 y 9 pH; 20, 25 y 30°C; 10, 20 y 30 ppm, respectivamente. La biomasa se estimó por el peso seco de las células, y el DHA por cromatografía de gases expresados como AGT en porcentaje. Se encontró que la velocidad de rotación afectó más al crecimiento, en donde una excesiva agitación afecta el crecimiento y una deficiente agitación disminuye su tasa de crecimiento. Iguales resultados se obtuvieron en relación al pH, en donde a pH más alcalino (pH9) afecta el crecimiento más que a la producción de DHA. En cambio cuando se evaluó la temperatura, este parámetro afectó el crecimiento y la producción de DHA de manera inversa, observando que a temperaturas altas hay mayor crecimiento, pero a temperaturas bajas hay un mayor porcentaje de DHA, similares resultados se obtuvieron al evaluar diferentes niveles de la salinidad, en donde mejores crecimiento fueron a salinidades más altas, pero la producción de DHA fue ligeramente más alta a la salinidad más baja. Los resultados demuestran que el crecimiento en función de la biomasa y el porcentaje de DHA en relación los ácidos grasos totales, están estrechamente relacionados a las variaciones de los parámetros evaluados.

**Palabras clave:** Condiciones de cultivo, crecimiento, DHA, Traustoquitridio, *Aurantiochytrium limacinum*,

### **Abstract**

The effect of the rotation speed, pH, temperature and salinity on the growth and production of docosahexaenoic acid (DHA) in a thraustochytrids strain with 99% similarity to *Aurantiochytrium limacinum* were researched with tests at three levels: 50, 100 and 150 rpm; 4, 7 and 9 pH; 20, 25 and 30°C; 10, 20 and 30 ppm, respectively. The biomass is estimated by dry weight of cells, and DHA by gas chromatography expressed as a percentage AGT. It was found that the speed of rotation affects growth, whereby excessive shaking affects the growth and inadequate shaking decreases its rate of growth. Similar results were obtained in relation to the pH, whereby the more alkaline the (pH9), the more it affects growth rather than DHA production. On the other hand, when temperature was assessed, this parameter inversely affected the growth and production of DHA, noting that the higher the temperatures the higher the growth, but the lower the temperatures the higher the DHA percentage. Similar results were obtained when assessing different levels of salinity, whereby better rates of growth were measured at higher degrees of salinity; however, DHA production was slightly higher at lowest salinity. The results show that the growth based on the biomass and the DHA percentage in relation to total fatty acids are closely related to the variations of the parameters assessed.

**Key words:** Culture conditions, growth, DHA, Thraustochytrids, *Aurantiochytrium limacinum*.

---

1 Marinazul S.A., Tumbes, Perú; ecayra@marinazul.com  
2 Incabiotec SAC., Tumbes, Perú.

## Introducción

El ácido docosahexaenoico (DHA, c22:6 n-3) es un ácido graso poliinsaturado (AGPI) esencial de cadena larga del tipo omega 3, de gran interés por su efecto beneficioso en la salud humana (Zen et al. 2011), como en la prevención y tratamiento en varias enfermedades cardiovasculares tales como cardiopatía coronaria, enfermedad cerebrovascular, hipertensión, trastornos neuronales como la demencia, enfermedad de Alzheimer y la depresión (Das 2008), la artritis, la aterosclerosis, y algunos tipos de cáncer (Shene et al. 2010). Además el DHA representa aproximadamente el 60% de los lípidos de la materia gris del cerebro y es un componente esencial de las membranas celulares, especialmente del cerebro y la retina, desempeñando un papel importante durante la etapa fetal y la infancia (Ruxton et al. 2004) siendo considerado un nutraceutico en el mercado de alimentos y recomendados en la dieta para adultos y niños.

La principal fuente comercial del DHA, son los peces grasos marinos de agua fría como arenque, caballa, sardina, salmón y ancholeta, así como sus aceites procesados, pero es una fuente limitada, que no puede satisfacer la creciente demanda del DHA, además este aceite es muy variable en composición y calidad (De Swaaf, Sijtsma and Pronk 2003), pudiendo estar contaminado con metales pesados, bifenilos policlorados y dioxinas, (Hooper et al. 2006, Pauly et al. 2002, Ratledge, 2004), estando restringido en formulas infantiles (Kumon et al. 2006), pudiendo agregar que tiene problemas asociados con su olor característico, sabor desagradable, y la mala estabilidad oxidativa (Spolaore et al. 2006).

En la actualidad la mejor alternativa al aceite de pescado son un grupo de protistas marinos llamados traustocitridios debido a que al menos 50% de su biomasa seca es lípidos (Li, Zhao and Bai 2007), siendo la mayor parte AGPI de cadena larga, además otra ventaja respecto al aceite de pescado es que acumulan grandes cantidades de DHA y ácido docosapentanoico (DPA, c22:5n-6) con poca cantidad de EPA o ácido araquidónico (c20:4n-6) lo cual hace más valioso este aceite; siendo de importancia para la salud humana, así como en la acuicultura (Leaño and Liao 2004, Raghukumar 2008); por estas razones son muy estudiados en la actualidad (Fan and Chen 2006).

Uno de los primeros estudios referente a un cultivo de interés, es optimizar sus parámetros de cultivo para incrementar la producción de DHA. Varios autores han realizado estudios, referente a fuentes de Carbono y Nitrógeno, velocidad de rotación, temperatura, salinidad, pH y edad del cultivo (Byung-ki et al 2002, Huey-Lang et al 2010, Perveen et al. 2006, Kai-Chaung et al. 2012, Fan, Vrijmoed and Jones 2002, Arafiles et al. 2011, Huang et al. 2001, Won-Kyung et al. 2011, Zeng et al. 2011, Lu-Jing et al. 2010, Nagano et al. 2009).

Teniendo importancia económica, en este estudio se evaluó el efecto de la velocidad de rotación, pH, temperatura y salinidad sobre el crecimiento y producción de DHA de un traustocitridio tipo *Aurantiochytrium limacinum* (cepa 85). El estudio es pionero en Perú, de estos microorganismos que fueron aislados de los manglares de Tumbes.

## Materiales y Métodos

**Microorganismo y condiciones de cultivo**  
La cepa 85, identificado como *Aurantiochytrium limacinum* OUC 175, (99% de similitud) fue aislado de los manglares de Tumbes por Jiménez (2014). El microorganismo fue conservado en medio YPG (Hinzpeter et al 2009) preparada con agua de mar

artificial (Nagano et al. 2009). El cultivo de la cepa 85 se realizó a temperatura ambiente durante 48 h. con agitación orbital a 120 rpm. Posteriormente fue utilizada como inóculo al 5% (vol:vol) en matraces Erlenmeyer de 250 ml con 100 ml de medio YPG durante 5 días.

### Optimización de parámetros

Se estudiaron cuatro parámetros de cultivo: el pH fue evaluado en tres niveles (5, 7 y 9), utilizando HCl para disminuir el pH y NaOH para aumentar el pH; para la medición se utilizó un pHmetro de mesa UB-5 (Denver Instrument, USA). La Salinidad fue evaluada en tres concentraciones (10, 20 y 30‰), con refractómetro BOE 30106 (Boeco, Alemania). La velocidad de rotación fue evaluada en agitador orbital MaxQ 2000 (Thermo Scientific, EEUU) a tres niveles de rotación (50, 100 y 150 rpm). La temperatura fue evaluada en tres niveles (20, 25 y 30 °C), la medición se realizó con un oxímetro 550A (YSI, EEUU). Cada parámetro fue evaluado por separado y en triplicado, manteniendo los otros parámetros constantes (Temperatura 30 °C, pH 7, Salinidad 30‰, velocidad de rotación 100 rpm). Se realizaron muestreos cada 24 horas en condiciones estériles, para analizar la biomasa y el porcentaje de DHA.

### Determinación de la biomasa

La biomasa se estimó por el peso seco de las células. La muestra recogida se centrifugó a 1300 rpm descartando el sobrenadante, se lavó con agua destilada volviendo a centrifugar, luego se procedió a secar a 105°C durante 3 horas y posteriormente se pesó en una balanza analítica Pioneer PA214 (Ohaus). La biomasa seca también se utilizó para la extracción de lípidos.

### Extracción de lípidos y análisis de DHA mediante cromatografía de gases

Se realizó la extracción de lípidos totales de acuerdo al método de Bligh and Dyer a 50 °C por 90 min, inmediatamente se añadió 1 ml de cloroformo y se colocó en agitación orbital a 100 rpm por 5 h, al finalizar se dejó en reposo hasta la formación de dos fases, descartando la fase superior acuosa, luego se añadió 1 ml de una mezcla de cloroformo: metanol (vol:vol) y otra vez se colocó en agitación orbital a 100 rpm por 90 min, se centrifugó a 13000 rpm por 10 min, descartando la fase sólida, los lípidos

disueltos en la fase clorofórmica se saturaron con nitrógeno y se guardaron a 4°C.

Los ésteres metílicos de los ácidos grasos (FAMES) fueron preparados de acuerdo al método AOCS Ce 1b-89. Una muestra de 25 mg. de lípidos extraídos de la cepa, se le agregó 1.5 ml de 0.5N NaOH (disuelto en metanol), se saturó con nitrógeno y calentó a 100°C por 5 min., se enfrió a temperatura ambiente y se añadió 2 ml de una mezcla de BF<sub>3</sub> (Boron trifluoride) y metanol, se saturó con nitrógeno y calentó a 100°C por 30 min., se enfrió a 40°C y se añadió 1 ml de isoctano, se saturó con nitrógeno y se agitó vigorosamente por 1 min.; una solución saturada de NaCl se le agregó y se saturó con nitrógeno y se agitó vigorosamente, se enfrió a temperatura ambiente y se separó la capa de isoctano de la fase acuosa. De la capa de isoctano, 0.5 µl se recolectó en un vial para la inyección en un cromatógrafo de gases (CG).

El análisis de los FAMES fue realizado usando un CG 7890B (Agilent Technologies, USA) equipado con un FID y una columna capilar DB-23 (Agilent Technologies), 60 m, 0.25 mm ID, df 0.2 µm. Helio fue usado como gas transportador y la velocidad de flujo se mantuvo en 1 mL min<sup>-1</sup>, la temperatura inicial de la columna fue 170 °C, temperatura del puerto de inyección 250°C, la temperatura del detector FID 300°C, con un incremento de la temperatura de 1°C min<sup>-1</sup>, la temperatura final de 210°C. El DHA presente en la cepa, se identificó mediante la correlación de su tiempo de retención con una muestra patrón de estándares de ácidos grasos Nro. 47033 (Supelco, USA). La información fue procesada usando el software Open Lab CDS Chemstation Edition (Agilent). Los datos se presentan como ácidos grasos totales (AGT) en porcentaje.

### Método estadístico

Los datos de los experimentos se procesaron con Microsoft Excel, determinándose la media y desviación estándar, y también en porcentaje.

## Resultados

### Efecto de la velocidad de Rotación

La concentración de la biomasa para las di

ferentes velocidades de rotación, aumenta conforme transcurren los días, a excepción del ensayo a 150 rpm, que en el tercer día llegó a su fase estacionaria con una biomasa de 5,2 g/L, siendo la máxima concentración de biomasa (6 g/L), obtenido con el ensayo, a 100 rpm que llegó a la fase estacionaria al

culminar el cultivo, mientras que a 50 rpm estaba aún en su fase exponencial, lo cual se vio reflejado en su contenido de DHA siendo el de menor porcentaje en relación a los ácidos grasos totales (38% AGT), mientras que el DHA en porcentaje, en los otros dos ensayos fueron similares (Figura 1).

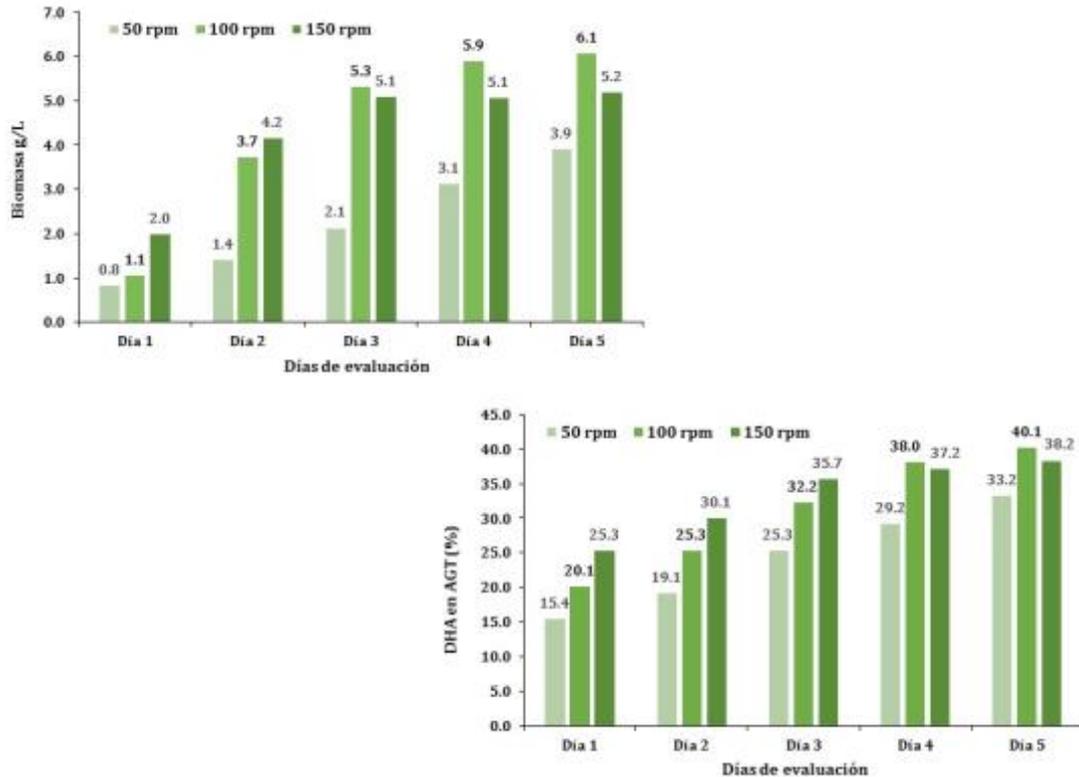


Figura 1. Efecto de la velocidad de rotación sobre la producción de biomasa A) y de DHA en AGT B) durante los días de cultivo.

### Efecto del pH

La biomasa se incrementó, registrándose en el último día los valores más altos con valores de pH 7 (6,3 g/L), y pH 4 (5,3 g/L); a pH 9 el incremento fue muy bajo (3,1 g/L). En el caso del DHA en porcentaje, los tres niveles de pH presentaron resultados muy similares, 42,1% AGT, 41,1 % AGT, 40,2% AGT a pH 7, 4 y 9, respectivamente (Figura 2).

### Efecto de la temperatura

La concentración de la biomasa fue aumentando hasta el último día del experimento, presentándose los incrementos a medida que aumenta la temperatura, alcanzándose biomasa de 6.1 g/L, 5.4 g/L y 4,8g/L, a las temperaturas de 20°C, 25°C y 30°C, respectivamente.

En relación al DHA en porcentaje, el efecto no fue apreciable en el cultivo al final de los ensayos, pues los incrementos en porcentaje fueron similares: 41,4%, 40,5% AGT y 38,5% AGT, a las temperaturas de 30°C, 20°C y 25°C, respectivamente (Figura 3).

### Efecto de la salinidad

La salinidad tuvo un comportamiento similar a la temperatura. Así la biomasa se incrementó hacia el último día del ensayo, siendo similares en las salinidades 20 ppt (5,9 g/L) y 30 ppt (5,7 g/L), pero menor a 10 ppt (3,3 g/L). También en el DHA en porcentaje se incrementó hacia el final de los ensayos alcanzando valores de 41,1% AGT

a 10 ppt, en tanto que se obtuvo 37,1% a 20 y 30 ppt (Figura 4).

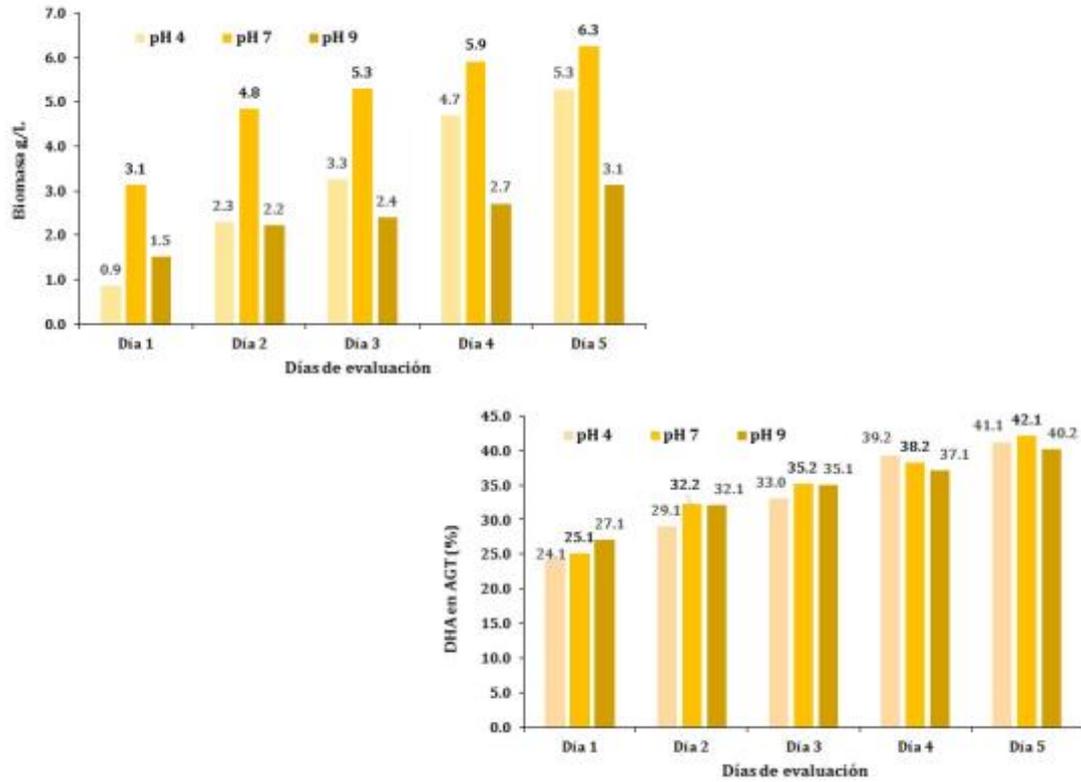


Figura 2. Efecto del pH sobre la producción de biomasa A) y de DHA en AGT B) durante los días de cultivo.

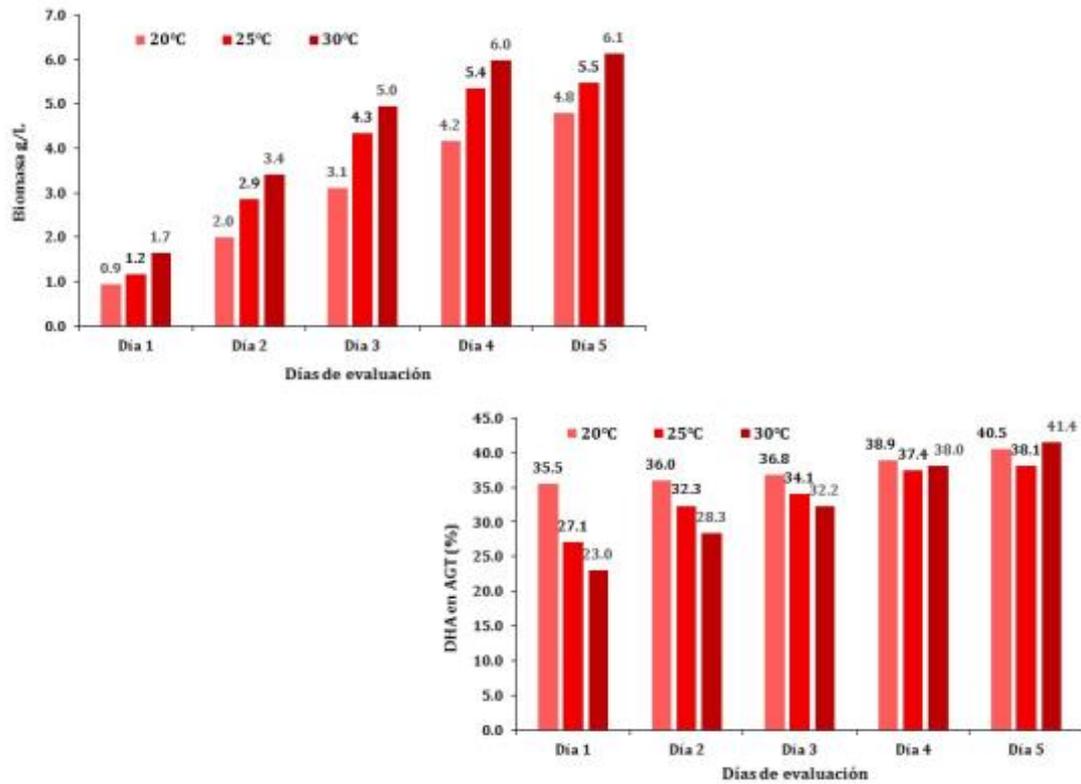


Figura 3. Efecto de la temperatura sobre la producción de biomasa A) y de DHA en AGT B) durante los días de cultivo.

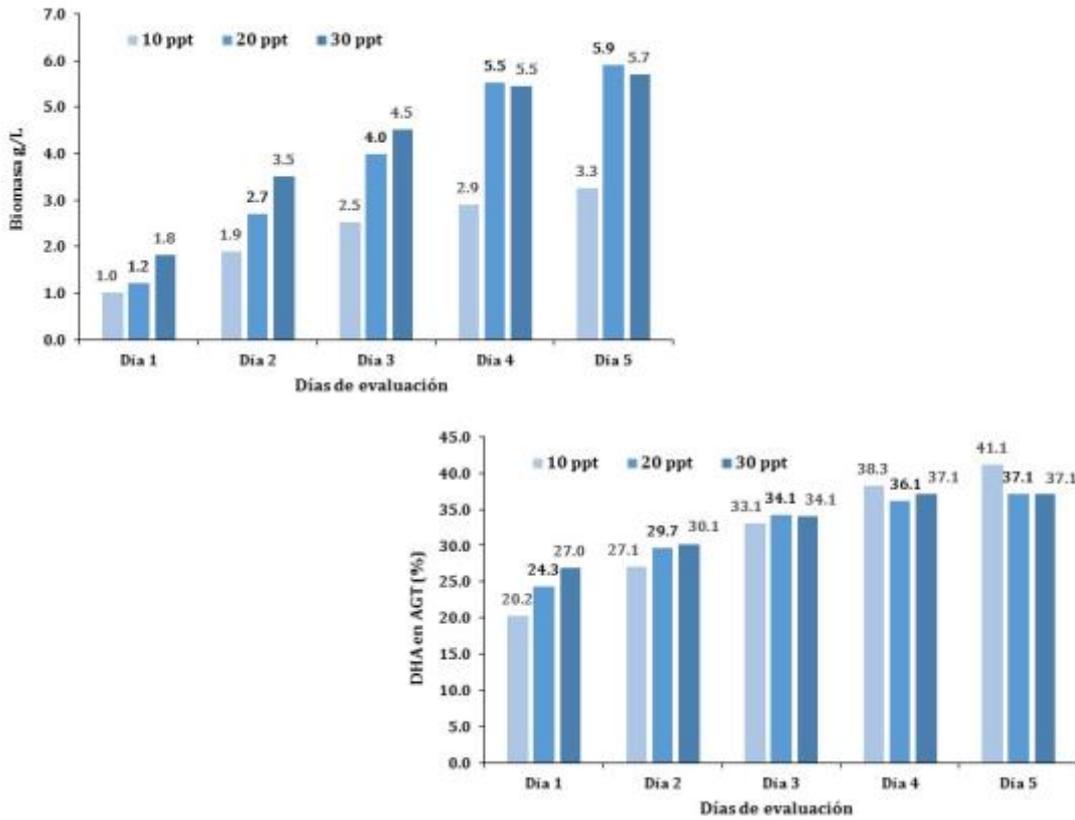


Figura 4. Efecto de la velocidad de rotación sobre la producción de biomasa A) y de DHA en AGT B) durante los días de cultivo.

## Discusión

La velocidad de rotación hasta unos 150 rpm incrementa la producción de biomasa; sin embargo, la excesiva rotación la afecta como fue reportado por Nagano et al. (2009) en una prueba a 400 rpm, lo mismo sucede con una mínima velocidad de rotación, en que la biomasa se encuentra en una fase exponencial, obteniendo porcentajes mínimos de DHA; resultados similares fueron reportados por Byung-Ki et al. (2002).

La velocidad excesiva de rotación afecta la producción de biomasa y el contenido de DHA en los lípidos (Kai-Chaung et al. 2012). Una velocidad de rotación superior a 250 rpm afecta la morfología severamente (Bajpai, Bajpai and Ward 1991). También la velocidad de rotación se relaciona con el transporte de oxígeno, siendo un factor limitante para la producción de biomasa y DHA (Yaguchi et al. 1997).

El pH también afecta la biomasa, obteniéndose mejores resultados con pH menores a 7; resultados similares fueron obtenidos por Arafiles et al. (2011), Wu, Yu and Lin (2005), reportando que a pH 8 la biomasa es mínima o nula. Con la cepa 85, *Aurantichytrium limacinum* OUC 175 a pH 9 se obtuvo menos de la mitad de biomasa que a pH menores, aunque Peerven et al. (2006) mencionó mejores resultados a pH 8. El nivel de pH parece no afectar la producción de DHA, pues ésta fue muy similar en los tres ensayos; resultados similares fueron reportados por Fan, Vrijmoed and Jones (2002). La influencia del pH se debería al metabolismo de la fuente de nitrógeno que contiene grupo amino, contribuyendo a la alcalinización del medio y aumentando así el pH del caldo (Lu-Jing et al. 2010).

La temperatura a medida que se incrementa así como los días de cultivo, produce un incremento de la biomasa, alcanzando su fase estacionaria al cuarto día de los ensayos. Resultados similares es reportado por Arafiles et al. (2011) al tercer día de cultivo a temperatura de 30°C; a pesar que estos microorganismos pueden tolerar una amplia gama de temperaturas (Nakazawa et al. 2012; Taoka et al. 2009; Fan, Vrijmoed and Jones 2002). La temperatura óptima para cultivo de este microorganismo está en el rango de 25 a 30°C (Bajpai, Bajpai and Ward 1991, Yokochi et al 1998; Byung-Ki et al. 2002, Leaña et al. 2003; Perveen et al. 2006; Chochoey y Verduyn 2012). La temperatura no afectó la producción de DHA, sin embargo con la menor temperatura (25°C) se tuvo alto porcentaje desde el inicio del experimento; esto es reportado por Perveen et al (2006) y Taoka et al (2009), quienes refieren que la optimización de DHA se obtiene bajando la temperatura del cultivo, y por el contrario afecta la biomasa, por eso una estrategia de cambio óptimo de temperatura en el transcurso del cultivo, ayudaría a optimizar la producción de DHA (Zeng et al 2011, Singh and Ward, 1996), o el almacenamiento a temperaturas bajas (Jain, Raghukumar and Chandramohan 2004).

La salinidad tiene un comportamiento similar a la de temperatura en la producción de biomasa, los mejores resultados se obtuvieron en los ensayos mayores a 20 ppt, resultados similares fueron reportados por Fan, Vrijmoed and Jones (2002), Kai-Chuang et al. (2012); pero en relación a las salinidades evaluadas, difiere de otros estudios pues no encontraron diferencias significativas entre las concentraciones de salinidad (Nakazawa et al. 2012; Won-Kyung et al. 2011; Huey-Lang et al. 2010; Zhu et al. 2007; Leaña et al. 2003; Yaguchi et al. 1997). Además, Nagano et al. (2009); lida et al (1996) reportaron que a cero salinidad no hay crecimiento, mientras que Arafiles et al. (2011) y Huang et al. 2001 encontraron que a 23 ppt obtuvieron la mayor concentración de biomasa, y a 15 ppt por Nagano et al. (2009) y Perveen et al. (2006). En tanto que para el DHA en porcentaje es similar en las tres concentraciones de sales, pero en los dos últimos días mayor porcentaje de DHA se obtuvo con la menor concentración de sales, similar a lo reportado por Kai-Chuang et al. (2012) y Yokochi et al. (1998), quienes sugieren que al disminuir la concentración de sales, hay un incremento de DHA.

### Conclusiones

La variación de las condiciones de cultivo afecta el crecimiento celular y la producción de DHA en *Aurantiochytrium limacinum*

cepa 85, encontrando algunos parámetros ideales para la optimización de su cultivo: 100 rpm, pH 7, 30°C, 20 ppt.

### Agradecimientos

La ejecución del estudio fue financiado por el Centro de Investigaciones y Desarrollo de Post Larvas (CDIPL) de la empresa Marinazul S.A. y el Programa Nacional de Innovación para la Competitividad y Productividad - Innóvate Perú.

### Referencias Bibliográficas

- Arafiles K.H.V., J.C.O. Alcantara, P.R.F. Cordero, J.A.L. Batoon, F.S. Galura, E.M. Leaña and G.R. Dedeles. 2011. "Cultural Optimization of Thraustochytrids for Biomass and Fatty Acid Production." *Mycosphere* 2(5):521-531.
- Bajpai, PK, P. Bajpai, and O.P. Ward. 1991. "Optimization of production of docosahexaenoic acid (DHA) by *Thraustochytrium aureum* ATCC 34304." *Journal of the American Oil Chemists Society*. Canada, 68: 509 - 514
- Bligh, E.G, and W.J. Dyer. 1959. "A rapid method of total lipid extraction and purification." *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37: 911 - 917

- Byung-Ki, H., Ch. Dae-Won, K. Ho-Jung, P. Chun-Ik and S. Hyuung-Joon. 2002. "Effect of Culture Conditions on Growth and Production of Docosahexaenoic Acid (DHA) using *Thraustochytrium aureum* ATCC 34304." *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 7:10-15
- Chochoey, K and Verduyn C. 2012. "Growth, fatty acid profile in major lipid classes and lipid fluidity of *aurantiochytrium mangrovei* sk-02 as a function of growth temperature." *Brazilian Journal of Microbiology.* 187-200.
- Das, U.N. 2008. "Folic acid and polyunsaturated fatty acids improve cognitive function and prevent depression, dementia, and Alzheimer's disease-but how and why?" *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 78:11-19.
- De Swaaf, ME, L. Sijtsma, and J.T.Pronk. 2003. "High-cell-density fed-batch cultivation of the docosahexaenoic acid producing marine alga *Cryptocodinium cohnii*". *Biotechnol Bioeng*, 81:666-672
- Fan, K.W., L.J. Vrijmoed, and E.B.G. Jones. 2002. "Physiological studies of subtropical mangrove *Thraustochytrids*." *Botanica Marina. China*, 45: 50 - 57.
- Fan, KW and Chen F. 2006. Production of high-value products by the marine microalgae *thraustochytrids*. In *Bioprocessing for Value added products from renewable resources*; Yang, S. T., Ed.; Elsevier Science: New York.
- Hooper, L, R.L. Thompson, R.A. Harrison, C.D. Summerbell, A.R. Ness, and H.J. Moore. 2006. "Risks and benefits of omega 3 fats for mortality, cardiovascular disease, and cancer: *Systematic Review. BMJ*; 332:752-60
- Huang, J., T. Aki, K. Hachida, T. Yokochi, S. Kawamoto, S. Shigeta, K. Ono and O. Suzuki. 2001. "Profile of Polyunsaturated Fatty Acids Produced by *Thraustochytrium* sp. KK17-3." *JAOCS*, 78:605-610.
- Huey-Lang, Y, L. Chung-Kuang, Chen Shu-Fen, Ch. Young-Mao and Ch. Yi-Ming. 2010. "Isolation and Characterization of Taiwanese Heterotrophic Microalgae: Screening of Strains for Docosahexaenoic Acid (DHA)" *Production*, 12:173-185.
- Iida, I., T. Nakahara, T. Yokochi, Y. Kamisaka, H. Yagi, M. Yamaoka, and O. Suzuki. 1996. "Improvement of docosahexaenoic acid production in a culture of *Thraustochytrium aureum* by medium optimization." *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 81: 76-78
- Jain, R., S. Raghukumar and D. Chandramohan. 2004. "Enhancement of the production of the polyunsaturated fatty acid, docosahexaenoic acid in *thraustochytrid* protists." *Mar Biotechnol*, 6:S59-S65
- Jiménez, A. 2014. *Aislamiento y caracterización molecular de microorganismos del orden Thraustochytriales provenientes de los manglares de Tumbes*. Tesis Título profesional Bióloga Genetista Biotecnología. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas, Escuela Genética y Biotecnología. Lima, Perú.
- Kai-Chaung, Ch., Ch. Chun-Yao, S. Yu-Ming and Ch. Yi-Min. 2012. "Effect of culture conditions on growth, lipid content, and fatty acid composition of *Aurantiochytrium mangrovei* strain BL10." *AMB Express*. 2:42
- Kumon, Y., R. Yokohama, Z. Haque, T. Yokochi, D. Honda and T. Nakahara. 2006. "A New Labyrinthulid Isolate That Produces Only Docosahexaenoic Acid." *Marine Biotechnology*, 8:170-177
- Leaño, EM and IC. Liao. 2004. "Thraustochytrids: potential DHA source for marine fish nutrition." *Global Aquaculture Advocate* 7:87-88.
- Leaño, E.M., R.S.J. Gapsin, B. Polohan and L.L.P. Vrijmoed. 2003. Growth and fatty acid production of *thraustochytrids* from Panay mangroves, Philippines. *Fungal Diversity*, 12:111-122
- Li, Y, Z. Zhao and F. Bai. 2007. "High-density cultivation of oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* Y4 in fed-batch culture." *Enz. Microbial Tech*, 41:312-317.
- Lu-Jing, R., J. Xiao-Jun, H. He, Q. Liang, F. Yun, T. Quian-Quian and O. Ping-Kai. 2010. "Development of a stepwise aeration control strategy for efficient docosahexaenoic acid production by *Schizochytrium* sp. Appl. Microbiol." *Biotechnol*, 87:1649-1656
- Nagano, N., Y. Taoka, D. Honda and M. Hayashi. 2009. "Optimization of culture conditions for growth and docosahexaenoic acid production by a marine *Thraustochytrid*, *Aurantiochytrium limacinum* mh 0186." *Journal of Oleo Science. Japan*, 58 (12): 623-628.
- Nakazawa, A., H. Matsuura, R. Kose, S. Kato, D. Honda, I. Inouye, K. Kaya and M. Watanabe. 2012. "Optimization of culture conditions of the *thraustochytrid* *Aurantiochytrium* sp. strain 18W-13a for squalene production." *Bioresource Technology*, 109:287-291.
- Pauly, D, V. Christensen, S. Guenette, T.J. Pitcher, U.R. Sumaila, C.J. Walters, R. Watson and D. Zeller. 2002. "Towards sustainability in

- world fisheries." *Nature*, 418(6898): 689–695
- Perveen, Z., H. Ando, A. Ueno, Y. Ito, Y. Yamamoto, Y. Yamada, T. Takagi, T. Kaneko, K. Kogame and H. Okuyama. 2006. "Isolation and characterization of a novel *thraustochytrid*-like microorganism that efficiently produces docosahexaenoic acid." *Biotechnology Letters*, 28 (3):197- 202.
- Raghukumar, S. 2008. "Thraustochytrid marine protists: production of PUFAs and other emerging technologies." *Marine Biotechnology*, 10:631-640
- Ratledge, C. 2004. "Fatty acid biosynthesis in microorganisms being use for single cell oil production." *Biochimie*, 86 (11):807–815
- Ruxton, C.H.S., S.C. Reed, M.J.A. Simpson and K.J. Millington. 2004. "The health benefits of omega-3 polyunsaturated fatty acids: a review of the evidence." *J. Hum. Nutr. Diet*, 17:449-459.
- Singh, A and Ward OP. 1996. "Production of high yields of docosahexaenoic acid by *Thraustochytrium aureum* ATCC 28210." *Journal of Industrial Microbiology*, 16:370–373
- Shene, C., A. Leyton, Y. Esparza, L. Flores, B. Quilodran, I. Hinzpeter and M. Rubilar. 2010. "Microbial oils and fatty acids: effect of carbon source on docosahexaenoic acid (C22:6 n-3, DHA) production by thraustochytrid strains" *J. Soil Sci. Plant. Nutre*, 10 (3):207–216
- Spolaore P, C. Joannis-Cassan, E. Duran and A. Isambert. 2006. "Commercial applications of microalgae." *J Biosci Bioeng* 101:87–96.
- Taoka Y, N. Nagano, Y. Okita, H. Izumida, S. Sugimoto and M. Hayashi. 2009. Influences of culture temperature on the growth, lipid content and fatty acid composition of *Aurantiochytrium* sp. Strain mh0186." *Mar Biotechnol*, 11 (3):368–374.
- Won-Kyung, H., R. Dina, S. Pil-Soo, P. Sung-Yong, H. Byung-Ki, K. Chul and S. Jeong-woo. 2011. "Production of Lipids Containing High Levels of Docosahexaenoic Acid by a Newly Isolated Microalga, *Aurantiochytrium* sp. KRS101" *Appl. Biochem. Biotechnol*, 164:1468-1480.
- Wu. ST, S.T. Yu, and L.P. Lin. 2005. "Effect of culture conditions on docosahexaenoic acid production by *Schizochytrium* sp. S31." *Process Biochem*, 40:3103-3108.
- Yaguchi, T., S. Tanaka, T. Yokochi, T. Nakahara and T. Higashihara. 1997. "Production of high yields of docosahexaenoic acid by *Schizochytrium* sp. strain SR21". *J. Am. Oil. Chem. Soc. Japan*, 74: 1431-1434.
- Yokochi, T.D., T. Honda, T. Higashihara, and T. Nakahara. 1998. "Optimization of docosahexanoic acid production by *Schizochytrium limacinum* SR21." *Appl Microbiol Biotechnol. Japan* 49: 72-76.
- Zeng, Y., J. Xiao-Jun, L. Min, R. Lu-Jing, J. Li-Jing, O. Ping-Kai and H. He. 2011. "Development of a Temperature Shift Strategy for Efficient Docosahexaenoic Acid Production by a Marine Fungoid Protist, *Schizochytrium* sp. HX-308." *Appl. Biochem. Biotechnol*, 164: 249-255.
- Zhu, L.Y., X.C. Zhang, L. Ji, X.J. Song and Ch. Kuang 2007. "Changes of lipid content and fatty acid composition of *Schizochytrium limacinum* response to different temperatures and salinities." *Proc Biochem*, 42(2):210–214.

