

## 지질과 phycobiliproteins 고생산성 *Arthrospira platensis* 변이주 분리

김영화, 이재화\*

### Isolation of *Arthrospira platensis* Mutants Producing High Lipid and Phycobiliproteins

Young-Hwa Kim and Jae-Hwa Lee\*

접수: 2012년 5월 9일 / 게재승인: 2012년 6월 26일

© 2012 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

**Abstract:** In this study, microalgae *Arthrospira platensis* (*A. platensis*) mutants induced by ethyl methane sulfonate (EMS) and further selection for resistance of cerulenin, a potent inhibitor of fatty acid synthase, were characterized. The mutants selected by 2  $\mu$ M, 5  $\mu$ M and 10  $\mu$ M of cerulenin were designated EC2, EC5 and EC10, respectively. Under normal growth conditions, the mutants and parental strain exhibited similar growth pattern. The mutants of *A. platensis* showed enhanced lipid accumulation and phycobiliproteins (phycoerythrin, phycocyanin). The lipid content of mutants EC2 and EC5 was about 4.4 and 4.8-fold higher than wild type. The phycoerythrin and phycocyanin content of mutants EC2 and EC5 was increased about 1.5 and 6.9-fold and 1.4 and 3.8-fold, respectively, compared to the wild type. The chlorophyll and carotenoid content of mutants was slightly increased. The high lipid and pigment contents exhibited by *A. platensis* mutants would make an excellent candidate for the production of commercially interesting biologically active compounds.

**Keywords:** microalgae, *Arthrospira platensis*, mutants, lipid, phycobiliproteins

#### 1. 서론

*Arthrospira* 속은 남조류에 속하는 미세조류로서 광합성을 통해 이산화탄소를 고정할 수 있으며, 차세대 에너지 및 식량원으로서 주목받고 있다 [1]. 다른 미세조류에 비해 크기가 크고 생장이 빠르며, 식품 첨가물이나 건강식품으로 이용되고 있어 산업적으로 유용하다 [2]. *Arthrospira*는 polyunsaturated fatty acid (PUFA)와 같은 지질 [3], 색소 성분인 phycobiliproteins, carotenoid 등의 항산화 효능을 가지고 있는 여러 생리활성 물질을 함유하고 있다 [4,5]. PUFA 중 docosahexaenoic acid (DHA)나 eicosapentaenoic acid (EPA) 등과 같은 필수 지방산이 미세조류로부터 상업적으로 생산되고 있다. 또한, 지질은 바이오디젤로도 이용 가능하여 미세조류를 이용한 지질의 이용이 점차 증가하고 있는 추세이다. 미세조류의 지질 함량은 배양조건에 따라 조절이 가능하며, 적정 배양 조건을 목적으로 하는 연구가 많이 시행되었다 [6,7]. 대표적인 미세조류 색소는 carotenoid로, 그 중 지용성 색소이며 산업적으로 인정받고 있는  $\beta$ -carotene은 항암, 항산화, 노화 방지 등으로써 그 가치가 충분히 검증되어 있다. 또한, 남조류는 chlorophyll과 지용성 색소 외에 청색의 phycocyanin과 적색의 phycoerythrin과 같은 광합성 보조 색소인 phycobiliprotein을 추가적으로 생산한다. Phycobiliprotein은 색감이 진하며 수용성의 단백질성 물질이기 때문에 식품, 화장품, 의약 분야에서 천연 착색제로 사용되는 부가가치가 높은 색소이다 [8]. 하지만, 미세조류의 지질과 광합성 색소는 산업적인 규모로 생산하기 위해서는 생산성이 낮아 경제적으로 유용하지 않으므로, 지질과 색소가 많이 축적된 변이주의 개발로 생산성을 높이는 것이 필요하다.

Cerulenin은 곰팡이의 일종인 *Cephalosporium caerulens*

신라대학교 제약공학과  
Department of Pharmaceutical Engineering, Silla University, Busan 617-736, Korea  
Tel: +82-51-999-5748, Fax: +82-51-999-5636  
e-mail: jhalee@silla.ac.kr

로부터 분리된 물질로, yeast, fungi, bacteria 등 다양한 미생물에 항균활성을 갖고 있다. 이는 지방산 합성 효소 저해제 (fatty acid synthase inhibitor)로서, condensing enzyme domain의 활성부위인 cysteine에 공유결합함으로써  $\beta$ -ketoacyl-ACP synthase의 활성부위에 결합하여 지방산 합성 효소 (ACC; acetyl CoA carboxylase, FAS; fatty acid synthase)를 억제한다 [9,10] (Fig. 1). 기존에 보고된 N-methyl-N-nitrosourea, ethyl methane sulfonate (EMS)와 같은 화학적 돌연변이원과 *r*-irradiation, 자외선과 같은 물리적 돌연변이원을 이용한 random mutagenesis는 정확도가 낮아 돌연변이 균주의 선별을 위해 많은 노력과 비용이 소요된다 [11]. 하지만, 지질 생합성에 특이적인 저해제에 저항성을 가진 변이주를 선별하는 것은 고지질을 함유하는 균주를 얻는데 유용한 방법이다 [12]. Wang *et al.*은 [13] 방사선 조사 후, 지질 함량이 높은 효모 균주를 얻기 위해 cerulenin을 이용하여 선별하였다. 미세조류의 경우에도, cerulenin을 selection marker로 이용하여 EMS로 돌연변이를 유도한 *Nannochloropsis oculata*에서 EPA의 함량이 증가되었음이 보고되었다 [14]. 또한, 자외선으로 유도된 *Pavlova lutheri* 돌연변이주에서 지방산 대사가 변화되어, EPA, DHA 등의 함량이 증가되었다 [15]. 본 연구에서는 *A. platensis* 균주에 EMS로 돌연변이를 유도하였고, cerulenin에 저항성을 가진 균주를 선별하여 그 특성을 분석하였다.

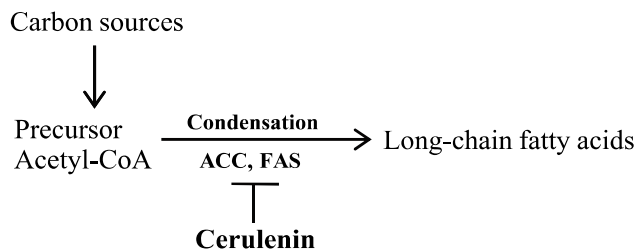


Fig. 1. Inhibition of fatty acid synthesis by cerulenin. ACC; acetyl-CoA carboxylase, FAS; fatty acid synthase.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1. 균주 및 배양조건

남조류인 *Arthrospira platensis* NIES39 (KCTC AG30033)를 한국생명공학연구원 생물자원센터로부터 분양받아 사용하였다. SOT 배지를 이용하여 500 mL flask에 200 mL 부피로 온도 35°C, 교반 속도 120 rpm, 광도 6,000 lux의 조건 하에서 배양하였다. 실험 환경은 온도와 조도가 적절히 조절되는 배양기 내부에서 실시하였으며, 광주기는 12시간 : 12시간 (명 : 암)으로 명반응시 형광등을 이용하여 조사하였다. 상기 SOT 배지는 1 L의 증류수에 NaHCO<sub>3</sub> 16.8 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5g, NaNO<sub>3</sub> 2.5 g, K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 g, NaCl 1 g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.2 g, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.04 g, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.01 g, Na<sub>2</sub>EDTA 0.08 g, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 0.03 mg, MnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.025 mg, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.002 mg, CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 0.0079 mg 및 Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.0021 mg을 첨가하여 제조하였다.

### 2.2. 돌연변이 유도 및 선별

대수 증식기의 *A. platensis* 세포를 2,000 g에서 10분간 원심 분리하여 세포를 수확하였다. 인산 완충액으로 2회 세척하고, 새로운 SOT 배지를 넣은 다음 0.5% EMS (Sigma, USA)를 처리하여 1시간 동안 정상 조건에서 암배양하였다. EMS를 처리한 세포는 적절히 희석하여 2 μM, 5 μM, 10 μM의 cerulenin이 첨가된 SOT 배지에 도말하여 콜로니가 나올 때까지 배양하였다. 약 3주 후 생성된 각각의 콜로니는 SOT 배지에서 액체 배양하였다.

### 2.3. 균체량 분석

*A. platensis*의 세포 생장은 분광 광도계 (Optizen 2120 UV/Visible Spectrophotometer, Mecacys, Korea)를 이용하여 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 건조 균체량 (dry cell weight, DCW)은 항량된 Whatman 필터를 이용하여 세포 배양액 10 mL을 여과한 뒤, 여과된 균체를 드라이 오븐에서 105°C로 3시간 동안 건조시켜 그 무게를 측정하였다.

### 2.4. 지질 분석

미세조류의 총 지질함량은 Chen *et al.* [16]의 방법에 따라 측정하였다. 축적된 지질의 함량을 측정하기 위해서 *A. platensis* 세포를 15일 간 배양하였다. 520 nm에서의 흡광도를 0.5로 조정된 세포 10 μL를 50 μL의 DMSO와 혼합한 다음 microwave로 1분간 처리하였다. 930 μL의 증류수와 10 μL의 Nile red (Sigma, 100 μg/mL in acetone)를 첨가한 후 다시 microwave를 1분간 처리하였다. Nile red로 염색한 세포는 형광 광도계 (fluorescence spectrophotometer FS-2, SCINCO, USA)를 이용하여 excitation 490 nm, emission 580 nm로 측정하였다. 형광값 (fluorescence intensity)은 미세조류 자체의 형광값 (autofluorescence)을 뺀 값으로 나타내었다.

### 2.5. 색소 함량 분석

광합성 색소 함량을 분석하기 위하여 15일 동안 배양한 미세조류 균주의 chlorophyll, carotenoid, phycoerythrin 및 phycocyanin 함량을 분석하였다. 세포의 색소를 methanol로 용출시킨 후 650 nm, 665 nm에서 흡광도를 측정하여 chlorophyll 함량을 측정하였고, carotenoid 함량은 461 nm, 664 nm에서 흡광도를 측정하였다 [17]. Phycoerythrin과 phycocyanin는 세포를 homogenizer로 균질화하고 0.5 M sodium phosphate buffer (pH 6.8)로 용출시킨 후 565 nm, 615 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 색소의 양은 아래 식에 따라 계산하였다 [18].

$$\text{Chlorophyll (mg/L)} = (A_{650} \times 25.5) + (A_{665} \times 4)$$

$$\text{Carotenoid (}\mu\text{g/mL)} = [A_{461} - (0.046 \times A_{664})] \times 4$$

$$\text{Phycoerythrin (mg/L)} = (A_{565} \times 124.3) - (A_{615} \times 62.4)$$

$$\text{Phycocyanin (mg/L)} = (A_{615} \times 171.2) - (A_{565} \times 2.25)$$

### 2.6. 통계 분석

모든 data는 Sigmaplot 통계 프로그램을 이용하여 평균 ± 표준편차 (Mean ± standard deviation)로 나타내었으며, 통계

적 유의성은 p값이 0.05 미만인 경우로 하였다.

### 3. 결과 및 고찰

#### 3.1. 돌연변이 균주 선별

Cerulenin은 지방산 합성 효소의 활성부위에 complex를 형성하여 지방산 합성을 억제하므로, cerulenin이 함유되어 있는 배지에서 성장할 수 있는 균주는 지방산 합성에 관여하는 유전자에 돌연변이를 일으켜 높은 지방산 합성 효소 활성을 가지고 있는 균주로 간주된다 [13]. *A. platensis* 세포에 돌연변이원으로 0.5% EMS를 처리하고 selection pressure인 cerulenin을 2  $\mu$ M, 5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M으로 각각 처리한 후, 세포 생존율을 확인한 결과 cerulenin에 의한 영향은 나타나지 않았고, EMS에 의한 세포 생존율은 약 16%였다 (Fig. 2). EMS에 노출시켜 돌연변이를 유도한 후, 지질 대사는 조절하면서 세포 사멸을 유도하지 않는 농도 범위의 cerulenin에 대한 저항성을 가진 균주를 선별하고자 하였다.

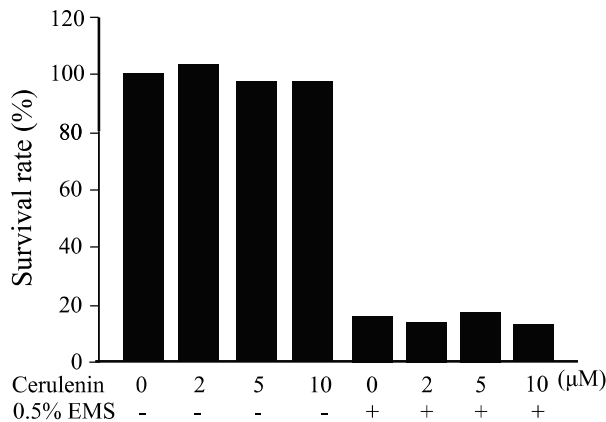


Fig. 2. Effect of EMS and cerulenin treatment on survival of *A. platensis* cells.

EMS 처리된 세포들을 2  $\mu$ M, 5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M의 cerulenin이 포함된 SOT 선별 고체배지에 도말하여 약 3주간 배양하여 자란 콜로니들을 각각 선별하였다. 얻어진 콜로니들은 selection pressure없이 액체 배양하면서 약 8회 정도 계대 배양 후 지질 함량을 측정하여 wild type (WT)보다 함량이 증가된 균주를 선별하였다. 2  $\mu$ M, 5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M cerulenin 포함 배지에서 얻은 돌연변이주를 각각 EC2, EC5, EC10으로 명명하였다.

#### 3.2. 세포 성장 특성

돌연변이주의 성장 특성을 알아보기 위해, WT과 변이주를 3일 간격으로 15일 동안 흡광도를 측정한 결과, 돌연변이주 EC2, EC5, EC10의 성장패턴은 WT과 유사하였다 (Fig. 3(a)). 또한, 배양 15일 후 세포를 수확하여 세포 건조 중량을 측정한 결과 WT은 1.56 g/L, EC2는 1.52 g/L, EC5는 1.44g/L, EC10은 1.52 g/L로 바이오매스 양은 큰 변화가 없었다 (Fig. 3(b)).

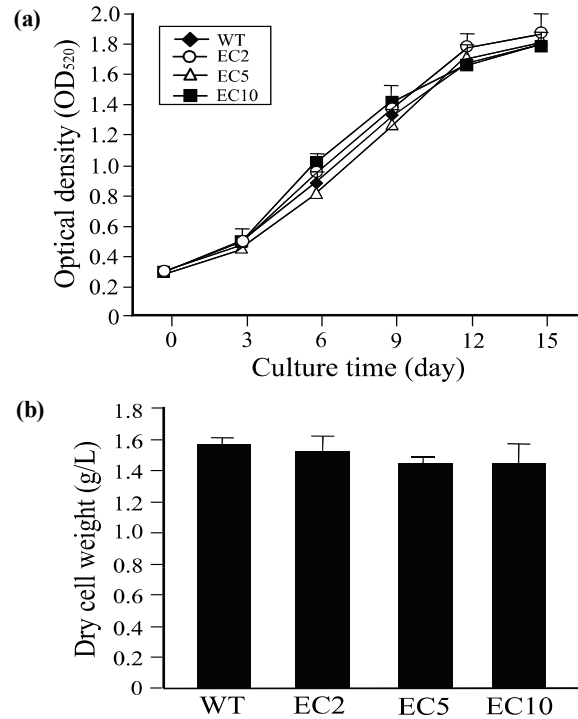


Fig. 3. Cell growth and biomass of wild type and mutants of *A. platensis*. (a) Growth pattern. Cell density (OD<sub>520</sub>) was determined by spectrophotometry at 3-day intervals. (b) Biomass productivity. After 15 days of culture, the cells were harvested and measured dry cell weight (DCW). Data are expressed as mean  $\pm$  SD.

#### 3.3. 지질 함량 변화

WT과 돌연변이주 EC2, EC5, EC10을 15일간 배양한 다음, 세포 내의 총 지질 함량을 Nile red를 이용하여 형광 측정하였다. 미세조류의 세포벽이 단단하기 때문에 Nile red의 효과적인 염색을 하기 위해 microwave를 처리하여 온도를 올려주고 DMSO를 사용하였다. EC2와 EC5 변이주의 지질 함량은 WT에 비해 각각 약 4.4, 4.8배로 크게 증가하였다. 하지만, 10  $\mu$ M의 cerulenin에 저항성을 가진 변이주인 EC10의 경우는 WT에 비해 약 1.3배 정도 증가함을 보여, 비교적 높은 농도 (10  $\mu$ M)의 cerulenin에 노출된 미세조류의 경우 낮은 농도 (2, 5  $\mu$ M)의 cerulenin에 비해 지질의 함량이 감소하였다 (Fig. 4).

미세조류에서 지질함량은 환경적인 스트레스에 의해 영향을 많이 받는데, 특히 영양성분 중 질소원의 결핍에서 지방 축적이 유도되고 배양조건에 따라 그 함량이 크게 달라진다 [19]. 하지만, 영양분이 결핍되면 세포 생장이 저해되므로 생산성이 낮아지게 된다. 본 연구결과에 따르면, 변이주 EC2, EC5는 WT과 비교했을 때 지질 함량이 크게 증가했음에도 불구하고 세포 생장의 변화는 없어 (Fig. 3) 바이오매스 생산성에 변화가 없을 것이다. 또한, 남조류는 여러 산화 스트레스에 의해 지질을 축적시킴으로써 ROS와 같은 산화 스트레스에 대한 내성을 증가시키는데 [20]. 변이주 EC2, EC5, EC10은 정상적인 성장 조건에서도 증가된 지질 함량으로 인해 세포 내에서 스트레스에 대한 내성을 나타내는 항산화능을 나타낼 것으로 보여진다.

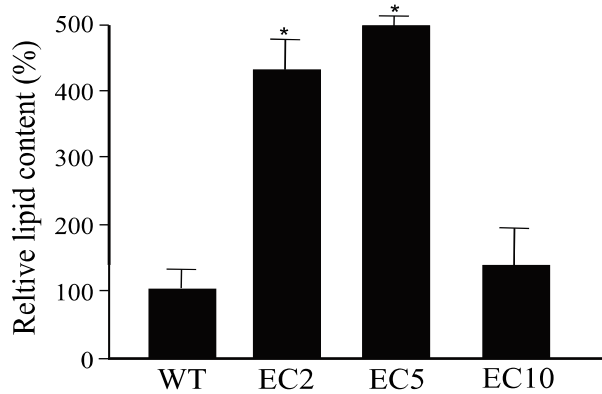


Fig. 4. Relative lipid content of wild type and mutants of *A. platensis*. The cells were stained with Nile red and measured the fluorescence. Data are expressed as mean  $\pm$  SD. \*  $p < 0.05$  vs. wild type.

### 3.4. 광합성 색소 함량 변화

*A. platensis*는 주요 광합성 색소로서 chlorophyll, phycobiliproteins (phycoerythrin, phycocyanin), carotenoid 등을 가지고 있다. Phycobiliproteins은 *Arthrospira*에서 가장 강력한 항산화물질로써, 자유 라디칼을 효율적으로 소거하며 ROS에 의해 매개되는 지질 과산화를 억제한다. Carotenoid도 천연색소이며 항산화물질로, 자유 라디칼의 생성을 억제하는 역할을 한다.

돌연변이주의 세포 건조 중량당 chlorophyll의 함량은 WT에 비해 변화가 미미하지만, cerulenin의 농도가 높을수록 약간 증가하는 추세를 보였다 (Fig. 5(a)). 또한, carotenoid 함량도 10  $\mu$ M의 cerulenin 처리로부터 유도된 변이주에서 가장 높게 나타났다 (Fig. 5(b)).

*A. platensis* 세포 내의 phycoerythrin의 함량은 phycocyanin에 비해 적은 양이 존재하는 것으로 나타났다. Phycoerythrin 함량은 EC2가 0.5 mg/g, EC5가 2.5 mg/g, EC10은 0.7 mg/g으로 WT의 0.4 mg/g 보다 각각 1.5배, 6.9배, 2.1배 증가하였다. Phycocyanin 함량은 EC2가 2.3 mg/g, EC5가 6.2 mg/g, EC10은 2.6 mg/g으로 WT의 1.6 mg/g에 비해 각각 1.4배, 3.8배, 1.6배 증가하였다 (Fig. 5(a)). Phycobiliprotein 색소의 경우, chlorophyll과 carotenoid와 달리 cerulenin 농도에 의존하지 않고 EC5 변이주에서 가장 높았다. 이 결과는, Fig. 4의 지질의 함량과 비슷한 경향을 보여주었다.

Phycocyanin 결핍으로 unsaturated fatty acid의 감소가 동반된다는 것이 알려져 있으며 [21], 지질 함량의 변화는 일반적으로 색소 함량과 평행적으로 이루어진다고 보고되었다 [22]. 고휘도의 빛이나, 질소 결핍 상태의 스트레스 하에서 지질과 carotenoid의 증가가 미세조류 *Dunaliella salina*, *Haematococcus pluvialis* 등에서 일어나는 것이 알려졌다 [23]. 생성된 지질은 세포질의 oil body에 위치하여 carotenoid 등이 축적할 수 있게 된다. Oil body 내에서 carotenoid는 지질 과산화를 억제하는 등의 항산화 작용을 나타내게 되어, 색소의 성분과 지질함량은 서로 긴밀하게 연결되어 있음을 암시한다. 본 연구 결과도 마찬가지로, 앞서 지질 함량이 가장 높았던 EC5의 변이주에서 phycoerythrin과 phycocyanin 함량이 크게 증가함을 확인하였다.

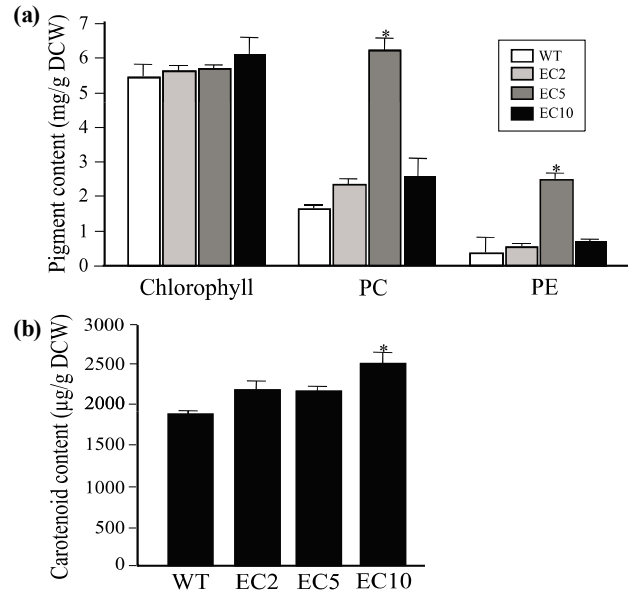


Fig. 5. Pigment content of wild type and mutants of *A. platensis*. (a) Chlorophyll, phycocyanin (PC) and phycoerythrin (PE) content. (b) Carotenoid content. Data are expressed as mean  $\pm$  SD. \*  $p < 0.05$  vs. wild type.

### 4. 결론

본 연구에서는 미세조류 *Arthrospira platensis* (*A. platensis*)에 EMS를 처리하여 돌연변이를 유도하였고, 지방산 생합성 억제제인 cerulenin을 2  $\mu$ M, 5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M 처리한 후 각 농도에 저항성을 나타내는 변이주 EC2, EC5, EC10을 확보하였다. 정상적인 배양 조건하에서, WT과 변이주의 성장 패턴은 유사하였다. EC2, EC5, EC10의 지질 함량은 WT에 비해 각각 4.4배, 4.8배, 1.3배 증가하였고, phycoerythrins은 각각 1.5배, 6.9배, 2.1배, phycocyanin은 각각 1.4배, 3.8배, 1.6배 증가하여, 지질과 phycobiliprotein은 EC5 변이주에서 가장 높게 나타났다. 세포 생장에 영향을 미치지 않으면서, 지질, phycobiliprotein 등과 같은 항산화 효과를 나타내는 기능성 유효 성분이 증대된 *A. platensis* 변이주는 산업적으로 유용한 고부가가치 소재로 이용될 수 있을 것이다.

### References

- Kim, Y. M., M. R. Kim, T. H. Kwon, J. M. Ha, and J. H. Lee (2009) Optimum culture conditions for the growth of *Spirulina platensis* NIES 39. *J. Kor. Ind. Eng. Chem.* 20: 285-289.
- Gantar, M. and Z. Swircev (2008) Microalgae and cyanobacteria: food for thought. *J. of Phycol.* 44: 260-268.
- Gill, I. and R. Valivaty (2001) Polyunsaturated fatty acid: occurrence, biological applications. *Trends Biotechnol.* 15: 401-409.
- Bhat, V. B. and K. M. Madyastha (2000) C-Phycocyanin: a potent peroxy radical scavenger *in vivo* and *in vitro*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 275: 20-25.

5. Abd, El-Baky H., K. Farouk, and S. Gamal (2007) Production of carotenoids from marine microalgae and its evaluation as safe food colorant and lowering cholesterol agent. *American-Eurasian J. of Agricult. Environ. Sci.* 2: 792-800.
6. Carvalho, A. P. and F. X. Malcata (2000) Effect of culture media on production of polyunsaturated fatty acids by *Pavlova lutheri*. *Cryptogram Algal.* 21: 59-71.
7. Harun, R., M. Singh, G. M. Forde, and M. K. Danquah (2010) Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products. *Renew. Sustain. Energy Reviews* 14: 1037-1047.
8. Roman, R. B., J. M. Alvarez-PeZ, F. G. A. Fernandez, and E. M. Grima (2002) Recovery of pure B-phycoerythrin from microalgae *Porphyridium cruentum*. *J. Biotechnol.* 93: 73-85.
9. Saitoh, S., K. Takahashi, K. Nabeshima, Y. Yamashita, Y. Nakaseko, A. Hirata, and M. Yanagida (1996) Aberrant mitosis in fission yeast mutants defective in fatty acid synthetase and acetyl CoA carboxylase. *J. Cell Biol.* 134: 949-961.
10. Heath, R. J., S. W. White, and C. O. Rock (2001) Lipid biosynthesis as a target for antibacterial agents. *Prog. Lipid Res.* 40: 467-497.
11. Carlton, B. C. and B. J. Brown (1981) Gene mutation. In Gerhardt, P. (Ed.) *Manual of Methods for General Bacteriology*. pp. 85-96. American Society for Microbiology, Washington, DC, USA.
12. Fischer, R. (1998) Isolation of mutants, a key for the analysis of complex pathways and for strain improvement. In *Microbes for Health, Wealth and Sustainable Environment*. pp. 739-751. Verma, A., Ed. Malhotra Publishing House, New Delhi, India.
13. Wang, J., R. Li, D. Lu, S. Ma, Y. Yan, and W. Li (2009) A quick isolation method for mutants with high lipid yield in oleaginous yeast. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 25: 921-925.
14. Chaturvedi, R. and Y. Fujita (2006) Isolation of enhanced eicosapentaenoic acid producing mutants of *Nannochloropsis oculata* ST-6 using ethyl methane sulfonate induced mutagenesis techniques and their characterization at mRNA transcript level. *Phycol. Res.* 54: 208-219.
15. Meireles, L. A., A. C. Guedes, and F. X. Malcata (2003) Increase of the yields of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids by the microalga *Pavlova lutheri* following random mutagenesis. *Biotechnol. Bioeng.* 81: 50-55.
16. Chen, W., M. Sommerfeld, and Q. Hu (2011) Microwave-assisted Nile red method for *in vivo* quantification of neutral lipids in microalgae. *Biores. Technol.* 102: 135-141.
17. Shukla, S. P. and A. K. Kashyap (2003) An assessment of biopotential of three cyanobacterial isolates from antarctic for carotenoid production. *Indian J. of Biochem. Biophys.* 40: 362-366.
18. Joo, D. S. and S. Y. Cho (2000) Stability of phycocyanin and spectral characteristic of phycobilins from *Spirulina platensis*. *J. Kor. Fish. Soc.* 33: 482-488.
19. Mata, T. M., A. A. Martins, and N. S. Caetano (2010) Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. *Renew. Sustain. Energy Reviews.* 14: 217-232.
20. Singh, S. C., R. P. Sinha, and D. P. Häder (2002) Role of lipids and fatty acids in stress tolerance in cyanobacteria. *Acta. Protozool.* 41: 297-308.
21. Datz, G. and G. Dohler (1981) Light dependent changes in the lipid and fatty acid composition of phycocyanin free photosynthetic lamellae of *Synechococcus*. *Z. Naturforsch.* 36: 856-862.
22. Schoefs, B., N. E. Rmiki, J. Rachadi, and Y. Lemoine (2001) Astaxanthin accumulation in *Haematococcus* requires a cytochrome P450 hydroxylase and an active synthesis of fatty acids. *FEBS Letters* 500: 125-128.
23. Solovchenko, A. E., I. Khozin-Goldberg, S. Didi-Cohen, Z. Cohen, and M. N. Merzlyak (2008) Effects of light and nitrogen starvation on the content and composition of carotenoids of the green microalga *Parietochlorella incisa*. *Russ. J. Plant Physiol.* 53: 455-462.