

***Porphyridium cruentum* (Rhodophyceae) Yağ Asitleri Kompozisyonuna Kurutma Yöntemlerinin Etkisi**

Yaşar Durmaz¹, Oya Işık², Narcisa M. Bandarra³, Semra Cirik¹,
Gamze Turan¹, Şevket Gökpınar¹

¹ Ege Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi, 35100, Bornova, İzmir, Türkiye.

² Çukurova Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi, Balcalı, Adana, Türkiye.

³ Dept. of Fish Upgrading and Quality. National Research Institute on Agriculture and Fisheries/IPIMAR.
Lisboa, Portugal.

Abstract: *The effects of the drying methods on the fatty acids composition of Porphyridium cruentum (Rhodophyceae).* The marine Rhodophyte *Porphyridium cruentum* (S. F. Gray) Naegeli was cultured in thin glass panel bioreactors in outdoor. The algal biomass was dried using different methods and their effects on the fatty acids compositions of *P. cruentum* was investigated. The results of the present study showed that the sample which were dried in etuve contain 31.01% total saturated fatty acids (TSAT), 14.83% total polyunsaturated fatty acids (PUFA) and 54.16% total monounsaturated fatty acids (MUFA), the samples dried in room temperature contain 36.61% TSAT, 17.41 % PUFA and 45.98% MUFA. Although the content of PUFA and TSAT were found to be higher in the samples dried in room temperature, Alphinoleic acid (18:3w3, ALA), gammalinoleic acid(18:3w6, GLA) and eicosapentaenoic acid (20:5w3, EPA) were found to be higher in the samples dried in oven and they were 1.76%, 0.51% and 7.42%, respectively. There was a significant decrease in EPA from group of PUFA which is obtained from algal pasta dried in room and oven temperature. In all samples, arachidonic asit (20:4w6, ARA) wasn't determined. In the study it was reported that the drying methods used for *P. cruentum* caused low PUFA content.

Key words: Microalgae, fatty acids, *Porphyridium cruentum*.

Özet: *Porphyridium cruentum* (S.F.Gray) Naegeli'un dış ortamda ince cam panel biyoreaktörlerde yığın kültürleri yapıldı. Elde edilen algal biyomas farklı kurutma işlemlerinden geçirildikten sonra yağ asitleri içerikleri bakımından karşılaştırıldı. Etüvde kurutulan örneklerde toplam doymuş yağ asitleri (TSAT) %31.01, toplam çok doymamış yağ asitleri (PUFA) %14.83, toplam tek doymamış yağ asitleri (MUFA) %54.16 idi. Oda sıcaklığında kurutulanlarda TSAT %36.61, PUFA %17.41, MUFA %45.98 olarak saptandı. PUFA ve TSAT oda sıcaklığında kurutulan örneklerde daha yüksek değerler vermesine rağmen, etüvde kurutma ile PUFA grubundan alphinoleik asit (18:3w3,ALA) %1.76, gammalinoleik asit (18:3w6,GLA) %0.51, eicosapentatenoik asit (20:5w3, EPA) %7.42 ile daha yüksek değerler verdi. Oda sıcaklığında ve etüvde kurutularak elde edilen algal pastanın PUFA grubundan EPA içeriğinde önemli bir azalmanın meydana geldiği ve örneklerde ARA'ın ise hiç tespit edilemediği görüldü. Bu çalışmada *P. cruentum* için denenmiş olan kurutma işlemlerinin, PUFA grubu yağ asitleri kaybına neden olduğu görüldü.

Anahtar Kelimeler: Mikroalg, yağ asitleri, *Porphyridium cruentum*

Giriş

Mikroalglerin büyük ölçekli yığın kültürlerinden elde edilen algal biyomas

ile bundan elde edilen proteinler, lipitler, nişasta, gliserol, doğal pigmentler ve biyopolimerler gibi metabolitlere olan ticari ilgi giderek artmaktadır.

Algal biyoteknolojide ki gelişmelere rağmen mikroalg türlerinin dış ortamda yapılan kültürlerinde çeşitli güçlüklerle karşılaşmaktadır. Işık şiddeti ve sıcaklık gibi parametrelerde günlük değişimler göz önüne alındığında, özellikle dar tolerans sınırlarına sahip olan mikroalg türleri ile dış ortamda yapılan uygulamalar, çevresel faktörlerin kontrolündeki güçlükler nedeniyle ticari üretimi güçleşmektedir. Mikroalg üretiminde çevresel koşulları kontrol etmenin zorluğunun yanı sıra, dışarıda yapılan kültürlerde sık karşılaşılan kontaminasyon problemleri, kültürün yapıldığı su kolonunda ışık tabakalaşmasının algal büyüme üzerinde oluşturduğu ışık sınırlaması, ışık yoğunluğundaki günlük değişimlerin yanısıra mevsimsel ve coğrafik farklılıklar karşılaşılan güçlüklerdendir.

Kırmızı alglerden *Porphyridium cruentum* (Rhodophyta), tek müsilağlı düzensiz koloniler halinde birleşmiş halde bulunabilir (Vonshak, 1988). Hücreler yüksek düzeyde sülfatlı şekerleri üretirler (Sing ve diğ., 2000; Vonshak, 1988). Şekerler özellikle büyümenin durgunluk fazında ve azotun sınırlı olduğu ortamda daha yüksek miktarda üretilmektedir (Ramus ve Groves, 1972).

Zengin bir polisakkarit kaynağı olarak *P. cruentum*'un ticari potansiyeline ilk olarak Golueke ve Oswald (1961) tarafından değinilmiş, ancak o yıllarda algin yığın kültürü üzerinde çalışmalar olmadığından değerlendirilmemiştir. Son yıllarda *P. cruentum*'un dışarıda tubular fotobiyoreaktörlerde, açık havuzlarda, polietilen ince borularda üretim denemeleri yapılmaktadır.

P. cruentum çok doymamış yağ asitlerinden (PUFA), EPA (eicosapentaenoic asit, 20:5w3) ve ARA (arachidonic asit, 20:4w6) bakımından zengindir. EPA son zamanlarda kalp hastalıklarında ve yüksek kolesterol tedavisinde, kandaki kolesterolü düşürmede, romatizma riskinin

azaltılmasında kullanılmaktadır (Dyerberg 1986; Simopoulos, 1991). Ayrıca EPA ve ARA gibi bazı çok doymamış yağ asitleri insan vücudunda prostaglandinlerin precursor'udur ve prostaglandinler yağ metabolizması, kalp atış hızı, kan basıncı üzerinde etkin olduğu bulunmuştur. Astım, romatid artrit gibi alevlenme dönemleri olan ateşli hastalıkların tedavisinde, peptik ülserlerde, yüksek tansiyonun kontrolünde, kan basıncı ve yağ metabolizmasının düzenlenmesinde etkilidir.

GLA (gammalinoic asit, 18:3w6) bazı deri hastalıklarının, diabetin ve üreme bozukluklarının önlenmesinde rol oynadığı saptanmıştır (Gunstone, 1992, 1998; Horrobin, 1992). ARA ve DHA (decaheksanoic asit, 22:6w3) sinir sisteminin gelişimini desteklediği (Innis, 1991; Nettleton, 1993; Singh ve Chandra, 1988) ve buna ek olarak retina gelişimi ile ilişkisi rapor edildi (Brown ve diğ., 1997). Çeşitli sağlık kuruluşları (FDA), bebek gelişimi üzerinde olumlu etkileri nedeniyle bebek maması formüllerini DHA ve ARA ile güçlendirilmesini tavsiye etmektedirler (Gill ve Valivety, 1997). Sonuç olarak insan sağlığına yararlı etkileri nedeniyle yağ asitlerine karşı gittikçe artan bir talep vardır.

Mikroalg kültürlerinde biyomasın biyokimyasal kompozisyonu ve yağ asitleri değerleri çevresel faktörler, besin ortamı ve aydınlatma ile değişmektedir (Brown ve diğ., 1993). Hasat işleminden sonra elde edilen biyomasın ışık, sıcaklık, oksijen, nem ve özellikle metal iyonları gibi katalizörler ile oksidasyon işlemi başlamaktadır. Oksidasyon işlemi en az seviyeye indirmek için biyomasın azot gazı ile şoklanarak dondurulduktan sonra -40°C ile -80°C arasında depolanması gerektiği açıklanmaktadır. Aynı şekilde -40°C yada -60°C de vakum altında kurutma işlemi olan dondurarak kurutma yöntemini tercih ettiklerini bildirmişlerdir (Vonshak, 1988).

Bu çalışmanın amacı *P. cruentum*'un dış ortamda ince cam panel biyoreaktörde yığın kültürleri yapılarak algal biyomas üretim performansı ve hasat edilen ürünün farklı kurutma işlemlerindeki yağ asitleri kompozisyonu tespit etmektir.

Materyal ve Yöntem

Porphyridium cruentum İsrail'deki Ben Gurion Üniversitesi Mikroalgal Biyoteknoloji laboratuvarından temin edildi.

P. cruentum kültürleri için dış ortamda kurulan 100x50x20 cm boyutlarında 80 lt toplam hacme sahip ince cam panel biyoreaktörler 60 lt doldurularak kültüre hazırlandı. Havalandırma biyoreaktörlerin alt kısmından plastik hortumlar uzatılarak yapıldı. Biyoreaktörlerin üst kısımları bakteriyel kontaminasyon riskini azaltmak için cam kapaklar ile kapatıldı.

Denemenin yapıldığı dönemde 12 saat aydınlık 12 saat karanlık olan güneş ışığı periyodu vardı. Sıcaklık gündüz ortalama 20°C iken gece 9°C'ye kadar düşti. Denemeler boyunca pH 7,5 ± 1.0 aralığında değişti.

Kültür ortamları %27 tuzlulukta filtre edilmiş ve otoklavlanmış deniz suyuna inorganik kimyasallar (MgSO₄ (6.6g.l⁻¹), MgCl₂ (5.6 6g.l⁻¹), CaCl₂ (1.56g.l⁻¹), KNO₃ (1.06g.l⁻¹), KH₂PO₄(0.076g.l⁻¹), NaHCO₃ (0.046g.l⁻¹), Fe-EDTA ve Microelementler) eklenerek hazırlandı (Vonshak, 1988).

Kültürlerde hücre sayımları iki günde bir reaktörlerden alınan kültür örneklerinin Naubaer (0,1 mm) hemositometresi ile en az iki kez sayılmasıyla yapıldı.

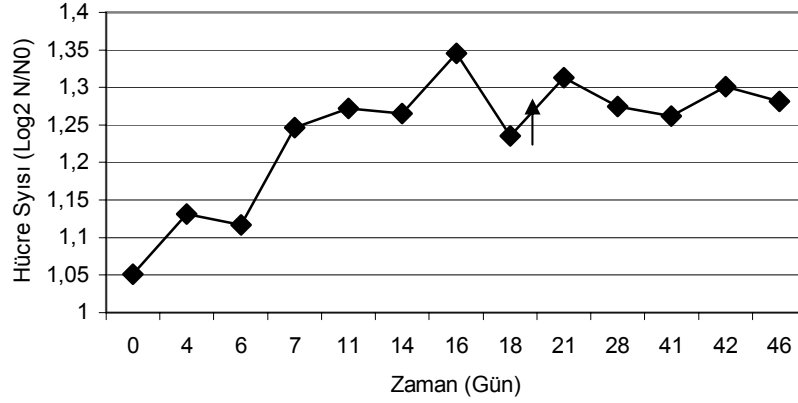
Algal biyomasın hasadında 80 lt/saat süzme kapasitesine sahip separatör kullanıldı. Elde edilen algal biyomas iki ayrı yöntem ile kurutuldu. İlk deney grubunda biyomas 37°C'de etüvde 48 saat

bekletildi. İkinci grupta ise biyomas 25°C'de oda sıcaklığında bir desikatörde 72 saat bekletilerek kurutuldu ve örnekler -18°C de dondurularak analizler için saklandı.

Yağ asitleri metil esterleri hazırlanması Lepage ve Roy (1986)'e göre yapıldı. Bu yöntemde göre; 0,3g kuru örnek alınarak 5 ml asetil klorür: metanol (karışım 1:19 v/v) eklendi. Karışım 80°C'de bir saat bekletildikten sonra soğultularak üzerine 1 ml su ve 2 ml n-heptan eklenip tüp karıştırma cihazı (vorteks) ile karıştırıldı. 2150 g'de 10 dakika santrifujlendikten sonra organik faz alınarak hazırlanan sodyum sülfatlı filtreden geçirildi. Sıvı kısım azot gazı yardımıyla uzaklaştırıldıktan sonra metil esterleri tekrar çözünmesi için 0,1 ml n-heptan eklendi. Analiz Varian Star 3400 Cx (USA) gaz kromatografi cihazı ile yapıldı. Dedektörün sıcaklığı, 250°C sabitlendi. Ayırma işlemi 50 m boyunda 0,32 mm çapında 0,2 µm film kalınlığında Chrompack (Hollanda) CP-Sil 88 kapillar kolonu ile yapıldı. Sıcaklık 180°C'den 200°C'ye 4 dakikada, 200°C'de 10 dakika bekledikten sonra 210°C ye 4 dakikada ve 210°C'den 250°C'ye 14,5 dakikada yükselecek şekilde programlandı. İğne (enjektör) otomatik olup sıcaklığı 250°C olarak ayarlandı.

Bulgular

P. cruentum'un laboratuvarında 10 ml'lik tüplerden başlayarak 4 litrelik balonlara kadar arttırılarak kültürleri yapıldı. Cam balonlarda biyomas maksimum hücre sayısına 4.0x10⁶ hücre sayısına ulaştığında dış ortama aşılama yapıldı. Dış ortamda 60 lt kültür hacmine sahip ince cam panel biyoreaktörlerde yapılan kültür 48 gün devam ettirildi. Kültürler 16. güne kadar logaritmik olarak artış gösterdi ve 17.günden sonra durgunluk fazına geçti. Kültür durgunluk fazında 20.günde 20 litre hasat edildi (Şekil 1).



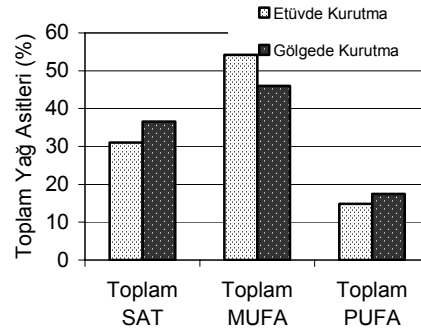
Şekil 1. *P. cruentum*'un dış ortamda ince cam panel biyoreaktörlerde yapılan kültürün hücre sayısı (Log₂ N/N₀) (↑ işaretli hasat zamanını belirtir)

Yapılan yağ asitleri analizlerinde her iki kurutma yöntemine göre toplam biyomasın yüzde yağ asitleri değerleri Tablo 1'de verildi. Toplam biyomastaki yüzde miktarı olarak toplam doymuş yağ asitleri (TSAT), tek doymamış yağ asitler (MUFA) ve çok doymamış yağ asitleri (PUFA) tespit edildi. TSAT etüvde %31.01 oda sıcaklığında %36.61 olarak artış hesaplanırken, MUFA etüvde kurutma yönteminde %54.16, oda sıcaklığında kurutulanlarda ise %45.98 olarak düşüş hesaplandı. PUFA oda sıcaklığında kurutma yöntemi (%17.41), etüvde kurutma (%14.83) yöntemine göre daha iyi sonuç vermiştir (Şekil2).

Doymuş yağ asitlerinde laurik asit (12:0), myristik asit (14:0), pentadenoid asit (15:0), palmitik asit (16:0) ve stearik asit (18:0) oda sıcaklığında kurutulduğu zaman değerleri daha iyi tespit edildi. Fakat trideconoid asit (13:0) ve arachidik asit (20:0) değerleri etüvde kurutma ile daha iyi sonuç verdi.

Çok doymamış yağ asitlerinden ALA (alpha linoleik asit, 18:3w3,) %1.76, GLA %0.51 ve EPA %7.42 en yüksek değer etüvde işleminde elde edildi.

16:4w3 %4.51 ve ODA (octadecatetraenoik asit, 18:4w3) %0.64 değerleri oda sıcaklığında kurutma işleminde daha yüksek hesaplandı. Çok doymamış yağ asitlerinden 20:2w6 sadece oda sıcaklığında kurutma işleminde %0.74 tespit edildi (Şekil 3).



Şekil 2. *P. cruentum*'un dış ortamda ince cam panel biyoreaktörlerde yapılan kültürdeki biyomastaki doymuş yağ asitleri (Saturated, TSAT), tek doymamış yağ asitler (Monounsaturated, MUFA) ve çok doymamış yağ asitleri (Polyunsaturated, PUFA) etüvde ve oda sıcaklığında kurutma yöntemlerine göre toplam yüzde miktarları.

Tablo 1. *Porphyridium cruentum*'un dış ortamda ince cam panel biyoreaktörlerde yapılan kültürdeki biyomastaki etüvde ve oda sıcaklığında kurutma yöntemlerine göre kurutulmuş örneklerin yüzde (%) yağ asitleri kompozisyonları

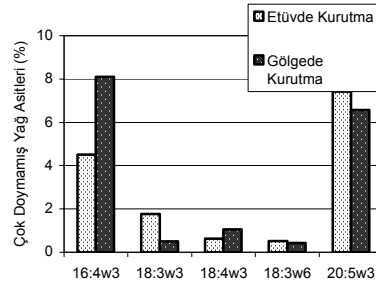
Yağ Asitleri	Etüvde (%)	Oda sıcaklığında (%)
12:0	0,93	3,33
13:0	3,87	2,28
14:0	5,83	10,17
14:0 isobr.	3,73	1,22
15:0	1,59	1,84
16:0	4,71	6,32
16:0 anteiso	0,00	0,28
16:0 isobr.	0,00	0,65
Fitanico	0,89	1,84
18:0	7,83	8,09
20:0	1,63	0,59
Toplam saturated	31,01	36,61
16:1w7	26,96	35,45
17:1	2,60	2,64
18:1w7	18,14	7,46
18:1w9-c	6,47	0,44
22:1w9	0,00	0,00
Toplam MUFA	54,16	45,98
16:4w3	4,51	8,11
18:3w3	1,76	0,50
18:4w3	0,64	1,07
18:3w6	0,51	0,42
20:2w6	0,00	0,74
20:4w6	0,00	0,00
20:5w3	7,42	6,57
22:5w6	0,00	0,00
22:5w3	0,00	0,00
22:6w3	0,00	0,00
Toplam PUFA	14,83	17,41
Toplam w3	14,32	16,25
Toplam w6	0,51	1,16

Toplam w-3 (omega 3) bakımından etüvde kurutulmuş örnekte % 14.32 iken oda sıcaklığında kurutulmuş örnekte %17.41 olarak hesaplandı. w-6 (omega 6) değerleri etüvde ve oda sıcaklığında kurutulmuş örneklerde sırasıyla yüzde değerleri %0.51, %1.16 olarak hesaplandı (Şekil 4).

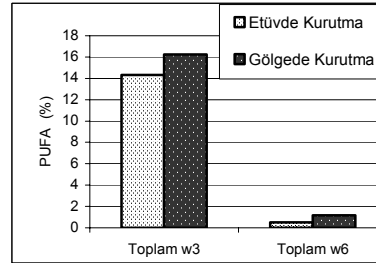
Sonuç ve Tartışma

İnsan sağlığına olumlu etkileri yanı sıra akuakültürde daha sağlıklı larvalar elde

etmek için, çok doymamış yağ asitleri ve çok doymamış yağ asitleri bazı ürünlere dünyadaki talep giderek artmaktadır. Bazı çok doymamış yağ asitlerinin üretim yöntemleri iyi bilinmekte, diğerleri için ticari olarak verimli üretim yöntemleri üzerine araştırmalar yapılmaktadır.



Şekil 3. *P. cruentum*'un dış ortamda ince cam panel biyoreaktörlerde yapılan kültürdeki biyomastaki çok doymamış yağ asitlerinin etüvde ve oda sıcaklığında kurutma yöntemine göre yüzde miktarları.



Şekil 4. *P. cruentum*'un dış ortamda ince cam panel biyoreaktörlerde yapılan kültürdeki biyomastaki çok doymamış yağ asitlerinde toplam w3 ve w6 yüzde miktarları.

P. cruentum Ege Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi (Urla-İskele) laboratuvarı serasında ince cam panel reaktörde kültürü yapıldı. Bu çalışmada sıcaklık gece 9°C'ye kadar düşerken gündüz sıcaklık 18-20°C arasında değişti. Bu aralıkta oluşan sıcaklık

değişimlerinin algal büyümede üzerinde bir sınırlama yaratmadı. Besin ortamı ile tuzluluk %27 diğer araştırmacılar ile aynı olacak şekilde hazırlanırken ortalama pH 7.5 ± 1.0 aralığında değişti. Sing ve diğ. (2000) 1.3 cm ile 30 cm arasında değişen ışık yolu uzunluğa sahip cam panel reaktörlerde *P. cruentum* ile yaptıkları çalışmalarında optimum sıcaklık 26 ± 1 C° ve tuzluluğu %27 olarak rapor etmişlerdir. Ayrıca Golueke ve Oswald (1961), *P. cruentum* kültürü ile yaptıkları çalışmalarında en düşük 13°C ve en yüksek 31°C sıcaklık aralığında kültürünün yapılabildiğini ve optimum sıcaklık olarak ise 21-26 °C olarak bildirmişlerdir. Jones ve diğ. (1963) pH aralığı olarak 5,2 ile 8,3 arasında ve optimum tuzluluğu %35 ile 45 arasında olduğunu saptamışlardır.

P. cruentum hücrelerinin düşük pH'da çöktürme işlemi ile kolay bir şekilde hasat edilebileceği belirtilmektedir (Vonshak, 1988; Guil-Guerreco ve diğ., 2001). Bu çalışmada ise hasat işlemi separatör ile başarılı bir şekilde yapıldı. Bir çok araştırmacı oksidasyon işlemi en az seviyeye indirmek için biyomas azot gazı altında şoklanarak dondurulduktan sonra -40°C ile -80°C arasında depoladıklarını ve kurutma işlemi ise -40°C yada -60°C de vakum altında kurutma işlemi olan dondurarak kurutma yöntemi ile yaptıklarını bildirmişlerdir (Vonshak, 1988; Guil-Guerreco ve diğ., 2001 ; Sing ve diğ., 1988; Gimenez ve diğ., 1998). Böylelikle algal pasta ısısal bir işleme tabi tutulmadan kurutulmuş olmaktadır.

Guil-Guerreco ve diğ., (2001) *P. cruentum*'un 10 saat sulandırma oranı ile sürekli kültürünü 20°C sabit sıcaklıkta ve CO₂ kontrolü ile sabit pH'ta (pH 7,60) tubular fotobiyoreaktörde yapmışlardır. Biyomas 3500 rpm'de santrifuj yaparak hasat edildikten sonra dondurulup kurutulmuş örneklerde dondurarak kurutulmuş örneklerde TSAT %31.2, toplam w-3 %18.3, toplam w-6 % 42.9 ve PUFA arasında ARA (%)

34.7) ve EPA (%18.3) olarak rapor etmişler. Bu çalışmada Guil-Guerreco ve diğ., (2001) bulgularına oranla PUFA değerlerinde önemli bir düşüş kaydedilmiş iken TSAT değerleri bakımından sonuçlar birbirine yakın çıkmıştır.

Bir çok araştırmacı tarafından *P. cruentum*'un kültürünü yapılmış, baskın yağ asidi olarak çok doymamış yağ asitlerini rapor etmişler ve EPA ve ARA'nın %18 ile %23 arasında değiştiğini bildirmişlerdir (Vonshak, 1988; Sing ve diğ., 1988; Gimenez ve diğ., 1998; Guil-Guerreco ve diğ., 2001). Bu çalışmada, etüvde kurutulan örneklerin %7.42 EPA içeriğine, oda sıcaklığında kurutulanların ise %6.57 EPA içeriğine sahip oldukları ve etüvde kurutma işleminin daha iyi sonuç verdiği görüldü. Fakat yapılan bu çalışmadan elde edilen algal pastanın EPA içeriği kurutma işlemleri sonucunda azalma meydana geldiği tespit edilmiştir. Bu çalışmada kullanılan kurutma işlemlerinde çok doymamış yağ asitlerinden EPA açısından etüvde kurutma, kurutma süresinin daha kısa olması nedeniyle daha iyi değer vermiştir. Fakat ARA bakımından zengin olan *P. cruentum*'da denediğimiz her iki kurutma işlemlerinde tespit edilemedi. *P. cruentum* için denenmiş olan bu kurutma yöntemlerinin uygun olmadığı tespit edildi. Bu çalışmadan elde edilen verilere göre algal pastanın ısısal bir işleme tabi tutulmadan dondurarak kurutma yöntemi kullanılarak kurutulması önerilir.

Kaynakça

- Brown, M. R., Garland, C. D., Jeffrey, S.W., Jameson, I.D., Leroi, J.M., 1993. The gross and amino acid compositions of batch and semi-continuous culture of *Isochrysis* sp. (Clone T.ISO), *Pavlova lutheri* and *Nannochloropsis oculata*, J. Appl. Phycol. 5; 285-296.
- Brown, M. R., Jeffrey, S. W., Volkman, J. K., Dunstan, G. A., 1997. Nutritional

- properties of microalgae for mariculture. *Aquaculture* 151: 315-331.
- Dyerberg, J., 1986. Linolenate-derived polyunsaturated fatty acids and prevention of arteriosclerosis. *Nutr. Rev.* ; 44:125-34.
- Gill, I., Valivety., R., 1997. Polyunsaturated fatty acids, part 1: occurrence, biological activities and applications. *Trends Biotechnol*; 15:401-9.
- Gimenez Gimenez, A., Ibanez Gonzalez, M. J., Robles Medina, A., Molina Grima, E., Garcia Salas, S. & Esteban Cerdan, L., 1998, Downstream processing and purification of eicosapentaenoic (20:5n-3) and arachidonic (20:4n-6) acids from the microalgae *Porphyridium cruentum*, *Bioseparation* 7: 89-99.
- Golueke, C. G., and Oswald, W.J., 1961, *The mass culture of Porphyridium cruentum*, University of California Press, Berkeley.
- Guil-Guerreco, J. L., Belarbi, E. H., Rebollosa-Fuentes, M.M., 2001, Eicosapentaenoic and arachidonic acids purification from the red microalga *Porphyridium cruentum*. *Bioseparation* 9: 299-306.
- Gunstone, F. D., 1992. Gamma linolenic acid- occurrence and physical and chemical properties. *Prog Lipid Res.* ; 31:145-61.
- Gunstone, F. D., 1998. Movement towards tailor-made fats. *Prog. Lipid Res.* 37: 277-305.
- Horrobin, D. F., 1992. Nutritional and medical importance of gamma-linoleic acid. *Prog. Lipid Res.* ;31:163-94.
- Innis, S. M., 1991. Essential fatty acid in growth and development. *Prog. Lipid Reseach* 30:39-103.
- Jones, R. F., Speer, H. L., and Kury, W., 1963, Studies on the growth of the red algae *Porphyridium cruentum*, *Phy. Plant.*, 16;636
- Lepage, G., Roy, C. C., 1986. Direct transesterification of all clases of lipids in a onestep reaction. *J. Lipid Research*, 27: 114-119.
- Nettleton, J. A., 1993. Are n-3 fatty acids essential nutrients for fetal and infant development? *J. Am Diet Assoc.* 93:58-64.
- Ramus, J. & Groves, S. T., 1972. Incorporation of sulfate into the capsular polysaccharide of red alga *Porphyridium*. *Journal of Cell Biology*, 54; 399-407.
- Simonopoulos, A. P., 1991. Omega-3 fatty acids in health and disease and in growth and development. *Am. J. Clin. Nutr*:54:438-63.
- Sing, S., Aiad, S., Richmond, A., 2000, Extracellular polysaccharide production in outdoor mass cultures of *Porpyridium* sp. In flat plate glass reactors. *J. appl. Phycol.* 12;269-275
- Singh, G., Chandra, R. K., 1988. Biochemical and cellular effects offish and fish oils. *Prog. Food Nutr*, 12: 371-419.
- Vonshak, a., (1988). *Porphyridium*. In Borowitzka M. A., Borowitzka L.J., (ED.). *Microalgal Biotechnology*. Cambridge University Press. Pp: 122-134.