

Gas Chromatograph-Mass Spectrometer를 이용한 γ -Linolenic Acid(GLA) 생성 균주탐색 및 확인

김정봉^{1*} · 김경환¹ · 홍승범¹ · 박종석¹ · 이종렬¹ · 김삼선¹ · 배신철¹ · 조강진¹ · 이동진²

¹농촌진흥청 농업생명공학연구원, ²단국대학교 식량자원학과

Screening of GLA (γ -Linolenic Acid) from Fungi by Gas Chromatography and Mass Spectroscopy

Jung-Bong Kim^{1*}, Kyung-Hwan Kim¹, Seung-Beom Hong¹, Jong-Sug Park¹, Jong-Yeoul Lee¹,
Sam-Sun Kim¹, Shin-Chul Bae¹, Kang-Jin Cho¹ and Dong-Jin Lee²

¹National Institute of Agricultural Biotechnology, Rural Development Administration

²College of Bio-resources Science, Dankook University

(Received September 7, 2007)

In order to select γ -Linolenic acid (GLA)-producing fungi, a total of forty-four strains of 4 genera such as *Phytophthora*, *Pythium*, *Mucor* and *Rhizopus* were obtained from Koran Agricultural Culture Collection (KACC) and then analysed by using GC-FID and GC-MS. GLA was detected on 39 fungal strains, and the highest rate of GLA was found as 24.8% of total fatty acids on *Mucor hiemalis* f. sp. *hiemalis* KACC 40264. Total GLA content of Zygomycota was comparatively high - *Mucor* (14.2%) and *Rhizopus* (14.3%), whereas that of *Oomycetes* was low - *Phytophthora* (3.3%) and *Pythium* (3.0%). Moreover, total fatty acids of the Zygomycota fungi such as *Mucor* (15.4 mg/100 ml) and *Rhizopus* (7.1 mg/100 ml) were higher compared with the *Oomycetes* such as *Phytophthora* (2.6 mg/100 ml) and *Pythium* (4.5 mg/100 ml). Thus, two genera such as *Mucor* and *Rhizopus* have higher potential as an useful microbial resource. The total fatty acid content varies even within the strains of the same genus e.g. *Mucor*. *M. blumbeus* KACC 40935 showed the highest values on productivity (18.2%) of GLA and total fatty acid contents (50.8 mg/100 ml liquid medium).

KEYWORDS: γ -Linolenic acid, *Mucor*, *Phytophthora*, *Pythium*, *Rhizopus*

지방산은 체내에서 주로 triglyceride 형태로 존재하면서 생체막의 구조나 에너지대사에 관여하는 것이 기본기능이다. 특히 고도불포화지방산(polyunsaturated fatty acid)은 진핵세포에 필수성분이며 유동성(flexibility)이나 점도(fluidity) 그리고 선택적 침투성(selective permeability) 등 특이한 성질이 생체막에서 중요한 역할을 한다(Bayley *et al.*, 1972; Certik *et al.*, 1977; Owen and Ajay, 2005). 그 중에서도 지방산이 암세포의 인지질 부분에 중요한 대사물질로 밝혀지면서 γ -Linolenic acid: all-cis-6,9,12-octadecatrienoic acid(GLA)가 docosahexaenoic acid(DHA), α -linolenic acid(ALA) 등과 함께 관심이 높아지고 있다(Ronald, 2006). Prostaglandin의 전구체이자 노화와 당뇨병 등의 환자에게 필수영양소로 이용되고 있는 GLA는 비슷한 구조를 가진 ALA와는 달리 자연계에 흔하지 않은 특이지방산이다(Hinman, 1972; Kim *et al.*, 2001). 달맞이꽃(*Oenothera biennis*)과 지치(*Borrigo officinalis*),

black currant(*Ribes nigrum*) 그리고 대마(*Cannabis sativa*) 등의 식물체와 조류(algae), 곰팡이 등 일부에만 분포하는 GLA는 국내에서도 컴프리, 지치, 달맞이꽃 등에 분포 자원임을 확인 한 바 있고 지치세포배양에 의한 기내생산 연구보고가 있다(Kim *et al.*, 1995).

GLA를 함유하는 흑조 종자유는 아토피성 질환에 치료 효과가 있는 것으로 알려져 있으며 이를 복용할 경우 피부질환 예방에도 도움이 되는 것으로 알려져 있다. 결핍 시에는 피부질환을 일으키는데 이를 치료하는데 역시 GLA를 필요로 한다. 오랫동안 GLA의 주요 공급원으로 식물성인 달맞이꽃 종자유가 사용되었는데 전체 지방산 중에서 GLA를 9~15% 정도 함유하고 있지만 식물체로서의 재배기간과 정제 등 기술적인 한계를 극복하지 못하고 있을 뿐만 아니라 생산에 소요되는 시간 등의 제한적인 요소 때문에 산업화되고 있지 못하는 실정이다(Wolf *et al.*, 1983; Hiruta *et al.*, 1996). 따라서 영국에서 1993년부터 *Mucor circinelloides* 균주를 이용한 GLA의 생산연구가 시작된 이래 일본 연구자들에 의해서 *Mortierella*

*Corresponding author <E-mail: jungbkim@rda.go.kr>

ramanniana 돌연변이체를 활용한 세포배양방법으로 성공적인 연구결과를 발표한바 있다(Hiruta *et al.*, 1996). 최근에는 GLA를 생성하는 *Rhizopus*속 곰팡이 균을 양조균주로 개발하여 사람이 식품에서 직접 GLA를 섭취하는 방법이 개발되고 있는 등 미생물에 의한 대량생산 및 응용연구가 증가하고 있다(Elena *et al.*, 2001; Xian *et al.*, 2003).

본 연구에서는 GLA를 생성하는 유망한 미생물자원을 확보하기 위하여 먼저 문헌 등의 기초조사를 통해서 선발된 *Pythium*속, *Mucor*속, *Rhizopus*속, *Phytophthora*속에 속하는 44종의 균주를 한국농업미생물자원센터(Korean Agricultural Culture Collection, 이하 KACC)에서 분양받아 GC-FID로 탐색하고 질량분석기를 이용하여 동정한 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

실험재료

KACC로부터 분양받은 균주(Table 1)는 potato dextrose broth(PDB), malt extract broth(MEB) 배지를 사용하였고, *Phytophthora*, *Pythium* 등의 난균류는 별도로 V8 juice (163 ml/l)를 추가하여 배양하였다. 액체배지상에서 180 rpm으로 진탕배양 방법으로 1주일 동안 배양하였으며 이들 시료 100 ml를 액체질소에 의해서 급속 동결시킨 다음 2일 동안 동결건조 하였다(Jessup *et al.*, 1976).

추출

추출용매(chloroform : methanol = 2 : 1) 5 ml와 내부표준물질 0.5 mg PDA(pentadecanoic acid in MeOH)를 시료(배양액 100 ml 상당)와 함께 실온에서 초음파로 30분간 추출하였으며, 0.58% NaCl 용액 5 ml를 넣어 희석한 후에 원심분리(2,000 rpm, 10 min)하여 상등액을 제거하고 부유물과 잔사가 남은 상태로 nitrogen flow로 건조시켜 유도체합성시료로 사용하였다. 건조된 시료에 toluene 0.5 ml, NaOH용액(0.5 N in MeOH) 2 ml를 가하여 끓은 물에 3분간 반응시킨 후 방냉하여 BF₃용액(2 N in MeOH) 2 ml를 넣고 다시 같은 조건에서 5분간 반응시킨 후에 10 ml의 물과 10 ml의 petroleum ether를 넣어 층분리한 다음 상등액에 분리된 지방산유도체를 수거하여 습기를 제거한 다음 GC-MS 분석을 실시하였다(Metcalf *et al.*, 1966).

Gas Chromatograph-Mass Spectrometer

사용한 기기는 Hewlett Packard 5890 series(Hewlett Packard, Houston, TX 77070 USA)로서 검출기는 FID를 사용하여 정량하였으며 컬럼은 HP 20 M(0.2 mm, 25 m, 0.25 μ m film thickness; Hewlett Packard, Houston, TX 77070 USA) capillary column을 사용하였다. 시료 주입기 온도는 200°C, 컬럼 온도는 180°C, 그리고 검출기의

온도는 200°C였다. GLA의 정성분석은 GC-MS(HP GCD plus, Hewlett Packard, Houston, TX 77070 USA)를 활용하였으며 GC-FID와 같은 조건에서 200°C interface 온도 조건에서 분석하였다. 지방산의 정량은 내부표준물질 pentadecanoic acid의 면적에 기준하여 반응지수(response factor)를 보정하지 않고 환산하였으며 retention time과 질량스펙트럼이 일치하는 6개 peak와 미지 지방산(U₁~U₃) 3개의 면적을 합하여 지방산총량으로 하였다(Kim and Janick, 1991).

결과 및 고찰

분자량과 이중결합의 갯수가 같은 GLA와 ALA는 methyl ester 형태로 GC분석에서는 retention time이 각각 29분과 26분으로서 뚜렷이 구분되었으나, 시료에 포함된 다른 지방산과의 구분을 위해서 질량분석을 실시하여 질량스펙트럼을 얻었다(Fig. 1). 두 물질의 분자이온(m/z 292)과 base peak(m/z 79)가 일치하였으나, 주요 이온 경향에서는 차이를 보였다. GLA의 주요 fragment ion은 m/z 93, 107, 121, 135, 150, 163, 175, 194인 반면에, ALA의 주요 fragment ion은 m/z 95, 108, 121, 135, 149, 161, 175, 191 등이었다. 주요 fragment 이온에서 약간씩 차이를 보이는 것은 이중결합의 위치가 9번과 6탄소로 다

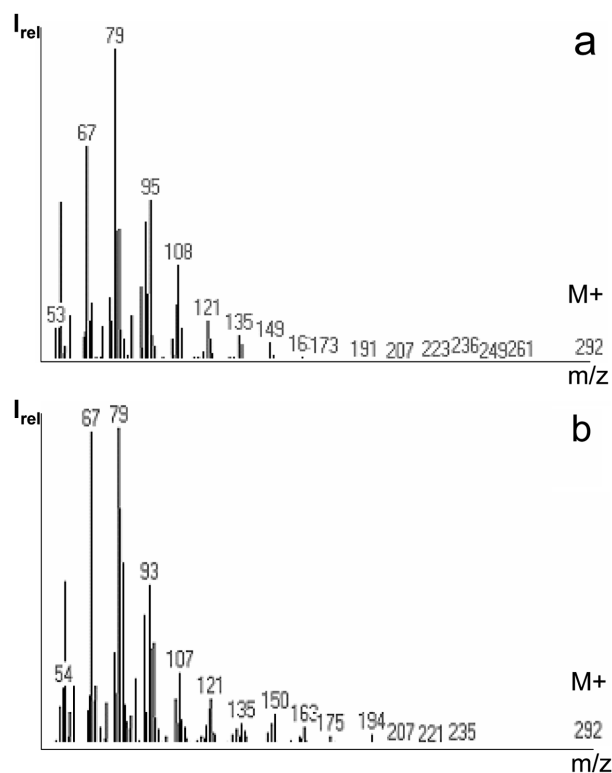


Fig. 1. GC/EI-MS full scan spectra of the methylesters of (a) α -linolenic acid (ALA/18:3n-3) and (b) γ -linolenic acid (GLA/18:3n-6).

Table 1. The fatty acid composition and total fatty acid amounts of 44 fungal strains belonging to *Mucor*, *Phytophthora*, *Pythium* and *Rhizopus* species

Scientific name	KACC no.	Fatty acid composition (%) ^a									Total (mg)
		U ₁	U ₂	U ₃	16:0	18:0	18:1	18:2	GLA	18:3	
<i>Mucor ambigus</i>	40286	0.3	0.1	1.4	2.1	14.3	50.4	26.9	4.5		8.2
<i>M. blumbeus</i>	40935	0.3	0.5	3.9	4.5	4.4	47.6	20.6	18.2		50.8
<i>M. circinelloides</i>	41329	— ^b		1.7	13.2	5.6	49.9	11.1	18.5		5.4
<i>M. circinelloides</i>	40295	—		1.3	2.7	20.0	47.0	15.5	13.5		9.5
<i>M. hiemalis</i>	40228	—		0.7	1.7	21.4	47.8	17.7	10.7		13.9
<i>M. hiemalis</i>	40288	—	0.2	2.2	1.1	8.0	53.5	16.6	18.4		14.7
<i>M. hiemalis</i> f. <i>hiemalis</i>	40271	0.4	0.6	4.0	22.6		48.8	12.1	11.5		49.6
<i>M. hiemalis</i> f. <i>hiemalis</i>	40264	—	0.8	1.8	14.6	3.5	39.6	14.9	24.8		5.8
<i>M. hiemalis</i> f. <i>silvaticus</i>	40260	0.3	0.4	2.9	3.6		60.4	15.2	17.2		32.9
<i>M. miehei</i>	40290			2.9	29.8	3.4	36.4	17.6	9.9		4.4
<i>M. mucedo</i>	41768			4.8	28.5	10.6	15.6	24.1	16.1	0.3	8.0
<i>M. mucedo</i>	41769			7.1	27.2	5.6	15.9	23.3	20.9		4.1
<i>M. plumbeus</i>	41331	0.4	0.9	4.6	23.5	5.8	39.7	10.1	15.0		30.5
<i>M. pyriformis</i>	41010			4.4	21.1	5.1	31.3	21.1	17.0		4.8
<i>M. racemosus</i>	41012	1.3	1.0	4.4	20.6	11.6	39.9	10.9	10.3		10.8
<i>M. racemosus</i>	40287			2.7	35.5	5.8	34.2	11.0	10.8		1.4
<i>M. racemosus</i>	41332	0.4	0.1	4.0	2.9		59.3	18.3	15.0		20.5
<i>Mucor</i> sp.	40262		1.2	3.1	25.8	2.8	38.2	12.3	16.6		2.0
<i>Phytophthora cambivora</i>	40159	0.2		10.9	41.5	0.4	22.8	23.1	1.1		4.5
<i>P. cinnamomi</i>	40182			11.9	33.9		22.1	26.6	5.5		2.0
<i>P. citricola</i>	40184			10.7	28.3	3.2	17.6	40.2			2.6
<i>P. citrophthora</i>	40188			13.1	39.8	1.6	25.7	18.3	1.5		3.9
<i>P. cryptogea</i>	40469	0.8	0.9	26.8	26.5	1.0	22.8	17.6	3.6		1.7
<i>P. cryptogea</i>	40702	0.3	0.2	20.3	0.9	1.1	39.1	32.8	5.3		5.5
<i>P. drechsleri</i>	40190	0.5	1.2	20.5	30.6		25.3	17.4	4.5		2.5
<i>P. erythroseptica</i>	40200			16.5	31.3		15.5	36.7			0.5
<i>P. nicotianae</i>	40402			20.3	32.4	3.8	21.5	22.0			0.6
<i>Pythium debaryanum</i>	41052			16.3	2.8	2.7	38.1	37.8	2.3		9.8
<i>Pyt. inflatum</i>	41055			1.6	27.4	9.7	37.4	13.3	10.6		3.9
<i>Pyt. irregulare</i>	41075			9.6	41.9	7.0	35.8	3.8	1.9		1.6
<i>Pyt. irregulare</i>	41075			9.2	6.2	5.3	42.4	35.2	1.7		6.0
<i>Pyt. paroecandrum</i>	41059			10.0	30	3.2	31.6	23.5	1.3	0.4	6.9
<i>Pyt. sylvaticum</i>	41061			11.9	31.9	4.1	18.3	31.5	2.3		3.6
<i>Pyt. ultimum</i>	41062			11.8	29.4	2.9	22.7	31.0	2.2		1.8
<i>Pyt. mamillatum</i>	41076	1.2		10.3	30.9	3.3	25.2	27.0	2.1		2.7
<i>Rhizopus acidus</i>	40535			0.8	2.7	11.4	47.1	20.5	17.5	100	10.4
<i>R. delemar</i>	40296				6.1	19.0	38.6	12.6	23.7		5.5
<i>R. formosaensis</i>	40533			1.6	2.9	28.7	11.3	44.9	10.6		6.8
<i>R. japonicus</i>	40536			0.7	0.6		64.9	17.8	16.0		20.0
<i>R. microsporus</i>	41363	1.4		1.1	29.1	15.0	26.3	11.4	15.7		4.4
<i>R. oryzae</i>	40297	0.1	0.4	0.8	22.4	10.1	33.5	21.6	11.1		4.6
<i>R. shanghaiensis</i>	40534			0.5	23.6	10.2	36.2	15.6	13.9		5.8
<i>R. stolonifer</i> var. <i>stolonifer</i>	41364		0.3	0.8	30.2	7.6	33.4	13.0	14.7		3.2
<i>R. oryzae</i>	40936			0.5	19.9	12.6	36.7	15.4	14.9		3.9

^aU = unidentified fatty acid, 16:0 =, 18:0 =, GLA = γ -linoleic acid.^b— = not detected.

르기 때문에 나타난 결과로 추정할 수 있으며 이와 같은 결과는 Saskia and Walter(2005)의 보고내용과 일치하였다.

Table 1과 2에서 나타난 바와 같이 총지방산에 대한 4 속의 전체적인 GLA함량은 *Mucor* 속(14.2%)과 *Rhizopus* 속(14.3%)이 상대적으로 높은 함량을, 그리고 *Phytophthora*

속(3.3%)과 *Pythium* 속(3.0%)은 낮은 함량을 나타냄으로써 Zygomycota와 Oomycota 간에 뚜렷한 양분현상을 나타냈으며 지방산총량에서도 *Phytophthora* 속과 *Pythium* 속은 각각 2.6 mg/100 ml과 4.5 mg/100 ml으로 낮게 나타나서 지방산 관련 균주자원으로는 적당하지 않은 것으로 판단되었다. *Mucor* 속의 경우는 그보다 평균 3~4배

Table 2. The means of fatty acid composition and total fatty acid amounts of 4 genera of *Mucor*, *Phytophthora*, *Pythium* and *Rhizopus*

Scientific name	Fatty acid composition (%)									Total (mg/100 ml LM ^a)
	U ₁ ^a	U ₂ ^a	U ₃ ^a	16:0	18:0	18:1	18:2	GLA	18:3	
<i>Mucor</i>	0.4	0.5	3.2	15.5	8.1	41.5	16.3	14.2	0.3	15.40
<i>Phytophthora</i>	0.4	0.7	16.2	28.4	1.8	23.1	26.1	3.3		2.64
<i>Pythium</i>	1.2		10.0	25.0	4.3	31.1	25.0	3.0	0.4	4.54
<i>Rhizopus</i>	0.7	0.3	0.8	15.2	14.3	35.2	19.2	14.3		7.18

^aU = unidentified fatty acid.^aLM = liquid medium.

가량 높은 15.4 mg/100 ml까지로서 높게 나타났다. *Mucor* 속내에서도 균주별로 큰 차이를 나타내었는데 18.2%의 GLA를 생성함으로 지방산총량이 50.8 mg/100 ml까지 이른 *Mucor blumbeus* KACC 40935이 실제적으로 가장 활력이 좋은 균주로 평가되었다. 지방산 총량을 제외한 GLA의 상대적 함량비율이 높은 균주로는 같은 속의 KACC 40264(*M. hiemalis* f. sp. *hiemalis*)가 24.8%(5.8 mg/100 ml)로서 가장 높았으며 KACC 40286(*M. ambigus*)은 4.5%로서 큰 차이를 나타냈다. KACC 40264는 순도는 좋으나 지방산총량(5.8 mg/100 ml)이 KACC 40935에 비해서 극히 적은 양이 생산되는 것으로 평가되었다. 이런 결과는 Hiruta *et al.*(1996)이 *Mortierella ramanniana*의 돌연변이체를 이용하여 보고한 27.1% 순도와 근소한 차이를 보였으나 Elena *et al.*(2001)이 *Cunninghamella elegans* 균주를 이용한 연구결과(순도 15.6%)에 비하면 크게 높은 순도를 나타냈다(Whipkey *et al.*, 1998; Tan and Jones, 1991).

전체적인 지방산의 종류 분포면에서도 탄소수가 14 이하로서 미확인 지방산으로 추정되는 U₁, U₂, U₃가 분포되어 있는 *Mucor* 속이 비교적 다양한 지방산분포를 나타냈는데, 특히 이번 탐색에 사용된 균주에는 분자량과 불포화도가 GLA와 같은 ALA가 거의 없거나 극히 미량(*Pythium paroecandrum* 등 2점)이 확인되어 식물체의 일반적인 지방산조성과 비교해볼 때 크게 다른 양상을 나타냈으며 그중에서도 *Phytophthora* 속이나 *Rhizopus* 속에서는 ALA가 전혀 확인되지 않았다. 한편 *Phytophthora* 속 중에서 *Phytophthora citricola* 등 3가지 균주에서는 예상과 달리 GLA가 전혀 생성되지 않아서 계통간에도 GLA 생성능력의 차이를 크게 나타냈다(Kennedy *et al.*, 1993). 선발된 균주는 지방산조성 품질개선을 위한 유지자원의 GLA 형질전환용 유전자소재로 활용할 수 있을 것으로 판단된다.

적 요

가스크로마토그래프와 질량분석기(GC-MS)를 이용하여 감마리놀렌산(GLA) 생산 균주를 선발하였다. KACC에 보존 중인 *Phytophthora* 속, *Pythium* 속, *Mucor* 속 및

Rhizopus 속 등 4속에 속하는 44개 균주를 GC-FID를 통하여 GLA를 분석하였다. 4속 39종의 곰팡이 균주에서 GLA를 확인하였으며, *M. hiemalis* f. sp. *hiemalis* KACC 40264 균주에서는 GLA의 조성비가 전체 지방산의 24.8%로서 가장 높은 비율을 나타냈다. 속간에 전체적인 GLA 함량은 *Mucor* 속(14.2%)과 *Rhizopus* 속(14.3%)의 Zygomycota가 상대적으로 높은 함량을, 그리고 *Phytophthora* 속(3.3%)과 *Pythium* 속(3.0%)의 Oomycota는 낮은 함량을 나타냄으로서 뚜렷한 양분현상을 나타냈다. 지방산총량에서도 *Mucor* 속(15.4 mg/100 ml)과 *Rhizopus* 속(7.1 mg/100 ml)가 *Phytophthora* 속(2.6 mg/100 ml)와 *Pythium* 속(4.5 mg/100 ml)보다 높게 나타나서 전체적으로 지방산을 생산하는 유용한 균류자원으로 평가되었다. *Mucor* 속내에서도 계통별로 큰 차이를 나타냈는데 18.2%의 GLA를 생성함으로 지방산총량이 50.8 mg/100 ml까지 이른 *Mucor blumbeus* KACC 40935가 실제적으로 가장 활력이 좋은 균주로 평가되었다.

인용문헌

- Bayley, J. M., King, J. and Gamborg, O. L. 1972. The effect of the source of inorganic nitrogen on growth and enzymes of nitrogen assimilation in soybean and wheat cells in suspension cultures. *Planta* **105**: 15-20.
- Certik, M., Balteszova, L. and Sajbidor, J. 1977. Lipid formation and gamma-linolenic acid production by Mucorales fungi grown on sunflower oil. *Lett. Appl. Microbiol.* **25**: 101-105.
- Elena, C., Miroslav, S., Silvia, S. and Flavio, Z. 2001. γ -linolenic acid production by solid-state fermentation of Mucorales strains on cereals. *Biores. Tech.* **76**: 283-286.
- Hinman, J. W. 1972. Prostaglandins. *Annu. Rev. Biochem.* **41**: 161-178.
- Hiruta, O., Kamisaka, Y., Yokochi, T., Futamura, T., Takebe, H. and Satoh, A. *et al.* 1996. Gamma-linoleic acid production by a low temperature-resistant mutant of *Mortierella ramanniana*. *J. Ferment. Bioeng.* **82**: 119-123.
- Jessup, W. and Fowler, M. W. 1976. Interrelationship between carbohydrate metabolism and nitrogen assimilation in cultured plant cells. I. Effect of glutamate and nitrate as alternative nitrogen sources on cell growth. *Planta* **132**: 119-125.
- Kennedy, M. J., Reader, S. L. and Davies, R. J. 1993. Fatty acid production characteristics of fungi with particular emphasis in gamma-linolenic acid production. *Biotech. Bioeng.* **42**: 625-

- 634.
- Kim, J. B., Kim, K. H., Hwang, S. K., Kim, Y. H., Cho, K. J., Hwang, Y. S. and Park, R. D. 2001. The Composition of useful medium chain fatty acid in eight plant species. *J. Kor. Soc. Agric. Chem. Biotechnol.* **44**: 20-23.
- Kim, J. B., Kim, Y. H., Lee, C. H., Hwang, Y. S. and Park, R. D. 1995. Screening of γ -linolenic acid resources and fatty acid composition in Korean native medicinal plants. *Kor. J. Med. Crop. Science* **3**: 107-110.
- Kim, Y. H. and Janick, J. 1991. Absciscic acid and proline improve desiccation tolerance and increase fatty acid content of celery somatic embryos. *Plant Cell Tissue Organ Culture* **24**: 83-89.
- Metcalf, L. D., Schmitz, A. A. and Pelka, J. R. 1966. Rapid preparation of fatty acid esters from lipids for gas chromatographic analysis. *Anal. Chem.* **38**: 514-515.
- Owen, P. W. and Ajay, S. 2005. Omega-3/6 fatty acids: Alternative sources of production. *Process Biochem.* **40**: 3627-3652.
- Ronald, S. P. 2006. Nutritional intervention with omega-3 fatty acids enhances tumor response to anti-neoplastic agents. *Chem. Biol. Interact.* **162**: 89-105.
- Saskia, T. and Walter, V. 2005. A gas chromatography/electron ionization-mass spectrometry-selected ion monitoring method for determining the fatty acid pattern in food after formation of fatty acid methyl esters. *J. Agric. Food Chem.* **53**: 8896-8903.
- Tan, C. K. and Johns, M. R. 1991. Fatty acid production by heterotrophic *Chlorolla sacchanophilas*. *Hydrobiologia* **215**: 13-19.
- Whipkey, A., Simon, J. E. and Janick, J. 1998. *In vivo* and *in vitro* lipid accumulation in *Borago officinalis* L. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **65**: 979-984.
- Wolf, R. B., Kleiman, R. and England, R. E. 1983. New sources of γ -linolenic acid. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **60**: 1858-1860.
- Xian, M., Nie, J., Meng, Q., Liu, J., Zhou, C., Kang, Y. *et al.* 2003. Production of gamma-linolenic acid by disrupted mycelia of *Mortierella isabellina*. *Lett. Appl. Microbiol.* **36**: 182-185.