UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA

Facultad de Ingeniería, Ciencias y Administración

IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS DEL **ORDEN THRAUSTOCHYTRIALES** PROVENIENTES DE LA ZONA COSTERA DE PUERTO MONTT, CHILE Y DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD DE PRODUCCIÓN DE ÁCIDO DOCOSAHEXAENOICO

TESIS PARA OPTAR AL GRADO ACADÉMICO
DE DOCTOR EN CIENCIAS DE RECURSOS NATURALES

IVONNE HINZPETER GONZÁLEZ

TEMUCO-CHILE
2008

RESUMEN

En las últimas décadas se ha comprendido la importancia de los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) y cómo éstos aportan beneficios nutricionales y/o fisiopatológicos al funcionamiento del organismo humano y animal. El aceite de pescado es la principal materia prima para la obtención de AGPI del tipo ω3 de 20 o más carbonos como el ácido eicosapentanoico (20:5 ω3; EPA) y el ácido docosahexaenoico (22:6 ω3; DHA).

La carencia de los AGPI de cadena larga en la dieta puede generar una serie de deficiencias y problemas de salud contribuyendo al desarrollo de enfermedades cardiovasculares, enfermedades de origen inflamatorio como asma, artritis, reumatismo, entre otras. Se estima que en los próximos años la demanda por AGPI ω3 aumentará en gran parte, debido al crecimiento de la industria acuícola y además por incrementos en la demanda de AGPI específicos para la elaboración de suplementos alimenticios. Surge entonces la necesidad de investigar nuevas fuentes para la obtención AGPI ω3. Una de estas nuevas alternativas son los llamados "Single Cell Oils" (SCO), aceites microbianos similares en tipo y composición a aquellos encontrados en los aceites y grasas obtenidos de plantas y animales. Los protistas marinos llamados thraustochytridos son considerados desde el punto de vista biotecnológico como potenciales productores heterotróficos de DHA.

El objetivo de esta investigación fue aislar e identificar microorganismos del orden Thraustochytriales provenientes de la zona costera de Puerto Montt, Chile con capacidad de ser cultivados heterotróficamente y de producir DHA.

Para la identificación se utilizó una estrategia basada en tres métodos complementarios: morfología, estrategia de PCR (polymerasa chain reaction) utilizando tres pares de partidores basados en la secuencia del 18S rDNA y capacidad para producir DHA. De 46 cepas que presentaron las características morfológicas del orden Thraustochytriales, 16 cepas presentaron el perfil de los productos de PCR buscado (tres bandas con tamaños entre 520 y 650 bp). Sin embargo, seis de las 16 cepas tuvieron la capacidad de producir DHA. El ADN de las seis cepas fue secuenciado confirmándose que estos microorganismos pertenecían al orden Thraustochytriales.

La cepa de *Thraustochytrium* M12-X fue evaluada con respecto a su capacidad de crecimiento heterotrófico y producción de DHA en cultivos en matraces. La cantidad de DHA producida por la cepa es altamente dependiente de la composición del medio de cultivo con valores entre 14,6 a 57,0 % de DHA en los ácidos grasos totales.

Los efectos de los parámetros físicos: temperatura, salinidad, pH, tiempo de crecimiento en matraces fue estudiada. También se estableció el efecto de la concentración de la fuente de carbono (glucosa) y nitrógeno (glutamato monosódico; GMS) sobre la concentración celular y producción de DHA. La biomasa producida por esta cepa, en el medio basal B2, fue de 1,1 g L^{-1} y contenido de DHA en la biomasa de 103 mg g^{-1}. Además, mostró amplia tolerancia a la salinidad (2 - 40 ‰) presentando una mayor concentración celular a una salinidad de 29 ‰ y mayor producción de DHA a salinidad 10‰. En el rango de pH inicial 5 a 8, la máxima concentración de biomasa se obtuvo a pH inicial 7. La cepa M12-X fue cultivada en cinco medios de cultivo (modificaciones del medio basal B2); solo la adición de fosfato (KH_2PO_4) permitió duplicar la concentración de biomasa sin incrementar el contenido de DHA en la biomasa, los otros cinco medios no mostraron diferencias significativas ($p>0,05$) en cuanto a la concentración celular en las condiciones estudiadas.

En los cultivos realizados en fermentador (pH 7,0, aireación-agitación) se determinó que estos factores no influían en la producción de biomasa en comparación a los resultados obtenidos en matraces a las mismas condiciones.

El microorganismo bajo estudio presentó bajas velocidades de crecimiento (0,08 h^{-1}) en matraces, aún cuando éstas son comparables a las de otras cepas (Jiang et al., 2004; Ganuza e Izquierdo, 2007). Por otra parte, la concentración de biomasa obtenida, bajo las condiciones de crecimiento estudiadas, no superó (2,2 g L^{-1}). Las bajas concentraciones de biomasa se explican debido a que la cepa no consume glucosa, la fuente de carbono utilizada en los estudios. Se probaron otras fuentes de carbono (fructosa, glicerol, citrato, piruvato) sin obtener mejores resultados.

Explicaciones para este comportamiento son la posible inhibición de las enzimas involucradas en la glicólisis o defectos en el sistema de transporte de azúcar. Ya que en esta cepa, un alto porcentaje de los ácidos grasos totales corresponde a DHA y su perfil de AGPI solo incluye al ácido eicosapentanoico (C20:5, EPA) además del DHA, se hace necesario realizar estudios para establecer cual es la fuente de carbono más apropiada.

SUMMARY

In the last few decades we have come to understand the importance of the polyunsaturated fatty acids (PUFA's) and their nutritional and/or physiologically contribution to the human and animal organism. Marine fish-oil is the major source of PUFA's (20 or more carbon) such eicosapentaenoic acid (20:5 ω3; EPA) and docosahexaenoic acid (22:6 ω3; DHA).

The lack of the long-chain PUFA's in the diet can generate a series of disorders and health problems which contribute to the development of cardiovascular disease, diseases of inflammatory origin like asthma, arthritis, rheumatism, among others. It is estimated that in the coming years the demand of PUFA's ω3 will increase to a great extent due to the growth of the fish industry and increase in the demand of PUFA's used in nutritional supplements.

Therefore, the need arises to investigate new sources for PUFA's ω3. One of these new alternatives is the "Single Cell Oils" (SCO). These are microbial oils similar in type and composition to those found in plant and animal fat. The marine protist known as thraustochytrids are considered, from the biotechnological point of view as potential heterotrophic producers of DHA.

The aims of the present study was to isolate and to identify microorganisms of the Thraustochytriales order in the coastal zone of Puerto Montt, Chile, with capacity to heterotrophic grown and to produce DHA.

For the identification a strategy based on three complementary methods was used: morphology, the strategy of PCR (polymerase chain reaction) using three pairs of primers based on the sequence of 18S rDNA, and a capacity to produce DHA. Of 46 strains that presented/displayed the morphologic characteristics of the Thraustochytriales order, 16 strains

presented/displayed the profile of products of the desired PCR (three bands with sizes between 520 and 650 bp). Nevertheless, six of the 16 strains had the capacity to produce DHA. The DNA of the six strains was sequenced, confirming that these microorganisms belonged to the Thraustochytriales order.

The strain of *Thraustochytrium* M12-X was evaluated with respect to its capacity of heterotrophic growth and production of DHA in flasks cultures. The amount of DHA produced by the strain is highly dependent of the cultures composition, with values between 14.6 to 57.0% of DHA in total fatty acids.

The effects of the physical parameters: temperature, salinity, pH, time of growth in flasks were studied. Also the effect of the concentration of the source of carbon (glucose) and nitrogen (monosodium glutamate; MSG) on the cellular concentration and production of DHA was established. The biomass produced by this strain, in basal medium B2, was of 1.1 g L-1 and the content of DHA in the biomass was 103 mg g-1. In addition, it showed ample tolerance the salinity (2 - 40 ‰) displaying a greater cellular concentration at a salinity of 29 ‰ and greater production of DHA at 10 salinity ‰. In the initial range of pH 5 to 8, the maximum biomass concentration was obtained at an initial ph 7. The M12-X strain was cultivated in five culture medium (modifications in basal medium B2); only the addition of phosphate (KH_2PO_4) could duplicate the concentration of biomass without increasing the content of DHA in the biomass. The other five medium did not show significant differences ($p > 0.05$) as far as the cellular concentration under the studied conditions is concerned.

In the bioreactor fermentation (pH 7.0, aeration-agitation) it was determined that these factors did not influence in the production of biomass in comparison to the results obtained in Erlenmeyer flasks under the same conditions.

The microorganism showed specific growth rate (0.08 h^{-1}) in flasks, even though these are comparable to those of other strains (Jiang et al., 2004; Ganuza & Izquierdo, 2007). On the other hand, the biomass concentration, under the studied growth conditions, did not surpass (2.2 g L^{-1}). The low concentrations of biomass are explained because the strain do not consume glucose, which is the carbon source used in the studies. Other carbon sources (fructose, glycerol, citrate, piruvate) were tested without obtaining better results.

An explanation for this behavior is the possible inhibition of enzymes involved in the glycolisis or defects in the system of sugar transport. Since in this strain, a high percentage of total fatty acids corresponds to DHA and its profile of AGPI only includes the EPA in addition to the DHA, it becomes necessary to formulate studies to establish which is the most appropriate carbon source.

PUBLICACIONES

Capítulo 1:

Alternativas biotecnológicas para la producción de ácidos grasos poliinsaturados omega-3
I. Hinzpeter[1], C. Shene[2]* and L. Masson[3]
GRASAS Y ACEITES, 57 (3),
JULIO-SEPTIEMBRE, 336-342, 2006,
ISSN: 0017-3495

Capítulo 2:

Isolation of Thraustochytriales from phylum Labyrinthulomycota from the Reloncaví estuary, Chile
Ivonne Hinzpeter, Benita Quilodrán , Robert Stead ,Lilian Trujillo, Jorge Vidal, Carolina Shene.

Capítulo 3:

Effect of growth conditions on the production of Docosahexaenoic acid by *Thraustochytrium* M12-X
I Hinzpeter, B Quilodran, A Quiroz, C Shene.

ÍNDICE GENERAL

Título
Agradecimientos
Publicaciones
Índice General
Índice de Figuras
Índice de Tablas

Capítulo 1

Alternativas biotecnológicas para la producción de ácidos grasos poliinsaturados ω3.

Revisión bibliográfica e investigación propuesta
1.1 Introducción 1
1.2 Bioquímica de la acumulación de lípidos 5
1.3 Biosíntesis de los ácidos grasos poliinsaturados 10
1.4 Fuentes de obtención 14
1.4.1 Fuentes convencionales 14
1.4.2 Aceites microbianos (SCO, Single cell oils) 22
1.4.2.1 Bacterias 23
1.4.2.2 Microalgas 24
1.4.2.3 Hongos 27
1.4.3 Mercado para aceites microbianos 29
1.4.4 Thraustochytridos como productores de DHA 37
1.4.4.1 Ecología 37
1.4.4.2 Taxonomía 39
1.4.4.3 Morfología 41
1.4.4.4 Producción de Ácidos grasos 46
1.4.4.5 Producción heterotrófica 49
1.5 Discusión 52
1.6 Conclusión e Investigación Propuesta 55
1.6.1 Hipótesis 56
1.6.2 Objetivo general 56
1.6.3 Objetivos específicos 56

Capítulo 2

Aislamiento e identificación de nuevos microorganismos marinos, orden Thraustochytriales desde el estuario de Reloncaví, Puerto Montt Chile.

2.1 Resumen 58
2.2 Introducción 58
2.3 Material y métodos 61
2.3.1 Toma de muestras y aislamiento de microorganismos 61
2.3.2 Extracción de ADN 62
2.3.3 Ensayo PCR 62
2.3.4 Secuenciación 63
2.3.5 Análisis filogenético molecular 63
2.3.6 Preparación de inóculos y cultivo 63
2.3.7 Análisis de composición de DHA 64
2.4 Resultados 65
2.4.1 Aislamiento y descripción morfológica de los aislados 65
2.4.2 Productos de PCR 68
2.4.3 Producción de biomasa y DHA 69
2.4.4 Secuenciación productos de PCR y análisis filogenético 71
2.5 Discusión y Conclusiones 73

Capítulo 3

Efecto de las condiciones de cultivo sobre el crecimiento y producción de ácido docosahexaenoico (DHA; 22:6 ω3), por *Thraustochytrium.* M12-X

3.1 Resumen 77
3.2 Introducción 79
3.3 Material y Métodos 80
3.3.1 Microorganismo y Medio de Cultivo 80
3.3.2 Condiciones de cultivo 81
3.3.3 Concentración de biomasa 81
3.3.4 Contenido de DHA 81
3.3.5 Determinación concentración de glucosa 82
3.3.6 Efecto control pH y oxígeno disuelto 82
3.4 Resultados 83
3.4.1 Tiempo de crecimiento 83
3.4.2 Efecto de pH Inicial 85
3.4.3 Efecto de Temperatura 86
3.4.4 Efecto de la salinidad 86
3.4.5 Efecto de la composición del medio 87

3.4.6 Efecto control pH y oxígeno disuelto 93
3.5 Discusión 94

Capítulo 4

4.1Proyecciones del Estudio 102

Capítulo 5

Conclusiones 104

Bibliografía 108

INDICE DE FIGURAS

Figura	Contenido	Página
1.1	Biosíntesis de eicosanoides a partir de ácidos grasos ω3, ω6.	2
1.2	Representación acumulación de lípidos en microorganismos oleaginosos.	6
1.3	Esquema del ciclo citrato/malato y ciclo Citosólico "transhidrogenasa."	9
1.4	Diagrama organización de un metabolón lipogénico hipotético.	10
1.5	Biosíntesis de ácidos grasos poliinsaturados.	13
1.6	Producción Mundial de harina de pescado.	17
1.7	Producción de aceite mundial.	18
1.8	Uso del aceite de pescado.	18
1.9	Producción de aceite de pescado en Chile.	19
1.10	Consumo interno de aceite de pescado en Chile.	19
1.11	Esquema de *Thraustochytrium* (talo y zoospora).	42
1.12	Estados de desarrollo de especies de *Thraustochytrium*.	45
2.1	Sitios de colecta de cepas nativas	62
2.2	Diferentes cepas nativas aisladas.	67
2.3	Productos de PCR de muestras de ADN de cepas aisladas.	68
2.4	Cromatógrama de los FAMEs de seis cepas nativas.	70
2.5	Árbol filogenético basado en la secuencia de ADN del gen ribosomal 18S	72
3.1	Sitio colecta cepa de *Thraustochytrium* M12-X.	80
3.2	Curva de concentración de biomasa y pH final del medio de cultivo en fermentaciones de *Thraustochytrium* M12-X.	83

3.3 Concentración de biomasa, contenido de DHA en la biomasa (mg g^{-1}) como función del pH inicial en el cultivo de *Thraustochytrium* M12-X. 85

3.4 Efecto de la salinidad en la producción de biomasa y AG. 87

3.5 Biomasa y AGT para diferentes razones glutamato monosódico y extracto de levadura 92

3.6 Producción de biomasa en fermentaciones de *Thraustochytrium* M12-X 93

INDICE DE TABLAS

Tabla	Contenido	Página
1.1	Composición de AG ω3 en diferentes fuentes alimenticias.	15
1.2	Empresas productores de SCO.	31
1.3	Producción microbiana de GLA.	32
1.4	Producción microbiana de ARA.	33
1.5	Producción microbiana de DHA.	34
1.6	Producción microbiana de EPA.	35
1.7	AGPI y sus fuentes.	36
2.1	Concentración. biomasa y producción. de DHA de seis cepas nativas.	69
2.2	Composición de ácidos grasos de cinco cepas nativas aisladas.	70
2.3	Lista de secuencias del gen 18S rDNA de Labyrinthulomycota.	73
3.1	Velocidad de crecimiento, producción de biomasa, AGT y DHA en cultivos de *Thraustochytrium* M12-X.	84
3.2	Composición de ácidos grasos (%) en la biomasa de *Thraustochytrium* M12-X.	84
3.3	Efecto de la temperatura sobre la producción. de biomasa y DHA por *Thraustochytrium* M12-X.	86
3.4	Composición del medio de cultivo, biomasa, AGT, AG principales producidos por *Thraustochytrium* M12-X.	88
3.5	Efecto de la concentración de glucosa.	89
3.6	Efecto de la concentración del extracto de levadura.	90
3.7	Efecto de la concentración de glutamato monosódico.	91

3.8 Efecto de la fuente de carbono. 93

3.9 Capacidad de crecimiento en diferentes salinidades por Thraustochytridos 97

CAPÍTULO 1

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA E INVESTIGACIÓN PROPUESTA

ALTERNATIVAS BIOTECNOLÓGICAS PARA LA PRODUCCIÓN DE ACIDOS GRASOS POLIINSATURADOS ω3.

1.1 Introducción

Los ácidos grasos (AG), constituyentes de los triacilgliceroles (TAG), son necesarios para todos los seres vivos, pues son fundamentales para su crecimiento, desarrollo y reproducción. Los AG saturados son aquellos en los que los átomos de carbono se unen a través de enlaces simples. A diferencia de éstos, en las moléculas de los AG insaturados existen uno o más dobles enlaces, éstos últimos denominados AG poliinsaturados (AGPI).

Entre los AGPIs, dos son esenciales en la nutrición de animales y del ser humano, el ácido linoleico (C18:2 ω6, LA) y ácido α-linolénico (C18:3 ω3, ALA). Estos ácidos son precursores de la síntesis de otros AG de cadena larga y sólo son sintetizados por vegetales; de ellos derivan dos familias llamadas ω3 y ω6.

Los AGPIs son constituyentes de las membranas celulares y forman parte de los sistemas de señales celulares. La deficiencia de éstos puede asociarse a defectos en la función celular y eventualmente puede conducir a la muerte. En particular los AGPIs de cadena larga de la serie ω3, ácido eicosapentanoico (C20:5, EPA) y ácido docosahexaenoico (22:6, DHA), han sido objeto de diversas investigaciones debido a los efectos beneficiosos observados en el tratamiento de la arterioesclerosis, cáncer y artritis reumatoide (Valenzuela et al. ,1995).

Desde el punto de vista médico una de las funciones más importantes de los AGPIs es la de ser precursores de compuestos de veinte carbonos (C20) llamados eicosanoides, los que sirven a

su vez de precursores de moléculas regulatorias de gran importancia en seres humanos y animales. Los eicosanoides corresponden a compuestos como prostaglandinas, prostaciclinas, leukotrienos (Simopoulos, 1991). Los eicosanoides derivados de los AGPI ω6 tienen diferentes propiedades metabólicas que aquellos derivados de los AGPI ω3 (Fig. 1.1). Las prostaglandinas se sintetizan por medio de la oxidación de los AG γ-linolénico (18:3 ω6, GLA), araquidónico (20:4 ω6, AA) y EPA y regulan funciones secretorias, digestivas, reproductivas, procesos inmunológicos y de circulación. Aquellos derivados de los AGPI ω3 como EPA presentan efectos beneficiosos a la salud sobre todo en dolencias de origen inflamatorio. La síntesis de estas moléculas C20 es mediada por las mismas enzimas, las que parecen no tener una particular preferencia por el sustrato, por lo tanto el balance en la ingestión de ω3 y ω6 determinará el tipo y cantidad de eicosanoides en el organismo (Sayanova et al., 2004).

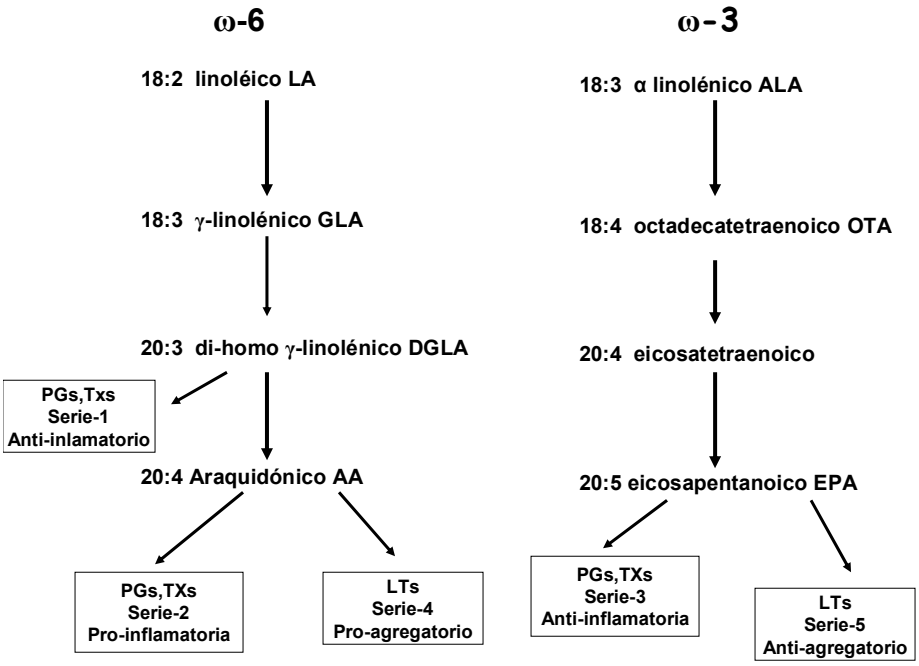

Figura 1.1 Biosíntesis de eicosanoides a partir de ácidos grasos de las familias ω3 y ω6.
Adoptado de: Sayanova & Napier (2004).

El ser humano acepta fisiológicamente cualquier tipo de lípidos; sin embargo, es importante mantener un adecuado equilibrio entre éstos. Una dieta balanceada contiene un 15% de proteína, 55% de carbohidratos y 30% de lípidos. En la dieta de sociedades occidentales, la proporción de lípidos es superior al 43% (Mataix, 2002). La calidad de estos lípidos no es la mejor y se estima que la relación ω6/ω3 en la dieta de esta población se encuentra en el rango de 11:1 a 20:1. Esta relación es significativamente diferente de los valores recomendados, 1:1 a 4:1, correspondientes a la proporción encontrada en la leche materna (Saglik e Imre, 2001; Mataix, 2002).

En los años 70, investigadores daneses observaron que los esquimales tenían una bajísima incidencia en enfermedades cardiovasculares lo que se relacionó a su dieta rica en AGPIs, básicamente compuesta de pescado, focas, carne de ballena. Además, se ha comprobado que poblaciones con alto consumos de estos productos, como España Portugal, Asia, Groenlandia y Canadá presentan menos patologías relacionadas con enfermedades cardiacas.

Los efectos benéficos asociados al consumo de AG ω3 han sido demostrados en la prevención o el tratamiento de varios desórdenes y enfermedades humanas, en áreas relacionadas con el sistema circulatorio y el corazón, arteriosclerosis, trombosis, hipertrigliceridemia, presión arterial alta (Bajpai & Bajpai, 1993). Un consumo equilibrado de AG contribuye a estabilizar el metabolismo de los lípidos en el organismo. Particularmente la cantidad y transporte del colesterol puede regularse, se reduce el transporte de colesterol en las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y facilita el aumento de lipoproteínas de alta densidad (HDL) que limpia las arterias.

Los AG ω3 se encuentran especialmente en los tejidos, formando parte de otros compuestos. Estos compuestos se encuentran en alta concentración en la retina, en la corteza cerebral, en los testículos y el líquido espermático. El DHA es esencial para el desarrollo del cerebro y la función mental. En la corteza cerebral se encuentra especialmente en los sinaptosomas y en las vesículas sinápticas de la corteza cerebral; representa el 60% de los AG (Uauy, 1996). El DHA ha sido reconocido como un componente importante de la leche materna (Nettleton, 1993; Uauy, 1996; Sinclair et al., 2001). La Organización Mundial de la Salud ha recomendado adicionar DHA en las fórmulas de leche materna para asegurar el desarrollo del cerebro y la visión en los infantes en el año 1975; en el año 1995 y 1996 un panel de expertos en EEUU concluyó que los suplementos con ARA (de *Mortierella alpina*) y DHA (de *Crypthecodinium cohnii*) podían ser considerados como GRAS (Generally recognized as safe) para el uso de infantes y adultos (Ward & Singh, 2005). La Asociación Americana del Corazón recomienda valores de consumo entre 900 y 1000 mgdía^{-1} de EPA y DHA para individuos con alguna enfermedad cardíaca y 650 mgdía $^{-1}$ para individuos sanos (Mai Le et al., 2007).

Los procesos bioquímicos de los AG dependen de la presencia de algunas vitaminas, siendo las más relevantes B3, B6, Biotina, A, C y E, de algunos minerales como el zinc, magnesio y de enzimas llamadas Δ4, Δ5, Δ6 desaturasa y elongasa. El reino animal puede satisfacer toda la cadena bioquímica a partir de ALA y LA. Este proceso puede ser interferido por la presencia de algunas medicinas como analgésicos, antiinflamatorios, cortisona, alcohol, nicotina, altos niveles de insulina o glucosa, excesiva cantidad de grasas saturadas y de moléculas trans. También puede ser bloqueado por la existencia de factores genéticos o diabetes. En estos casos es

necesario proporcionar alimentos que contengan todos los AG que estén carentes o disminuidos tales como LA, GLA y AA (AG ω6) y ALA, DHA y EPA (AG ω3).

1.2 Bioquímica de la acumulación de lípidos

Todos los organismos vivos deben sintetizar una cantidad mínima de lípidos para sus membranas y también otros lípidos que forman parte de estructuras más complejas o que participan en funciones celulares. Sin embargo, solo algunos pueden acumular lípidos sobre el 20% de su biomasa como material de reserva; a estos organismos eucariontes se les llama "oleaginosos". Estudios realizados en levaduras y hongos han mostrado que para que estos microorganismos oleaginosos produzcan lípidos de reserva deben cultivarse en medios con exceso de fuente de carbono y un nutriente limitante, generalmente el nitrógeno. Al crecer el microorganismo agota la fuente de nitrógeno, pero sigue utilizando la fuente de carbono, lo que gatilla la síntesis de lípidos como triacilgliceroles dentro de la célula. Estos lípidos se pueden visualizar como gotas de aceite. Este comportamiento podría no aplicarse a algas fotosintéticas, algas heterotróficas ni thraustochytridos; posiblemente en estos microorganismos la velocidad de crecimiento es más baja que la velocidad de biosíntesis de lípidos, las células asimilan el carbono más rápidamente que la velocidad de producción de nuevas células. Por lo tanto el mecanismo para almacenar el exceso de carbono sería canalizándolo a lípidos; estos microorganismos presentan un patrón de acumulación de lípidos asociado al crecimiento (Ratledge & Wynn, 2002). (Figura 1.2)

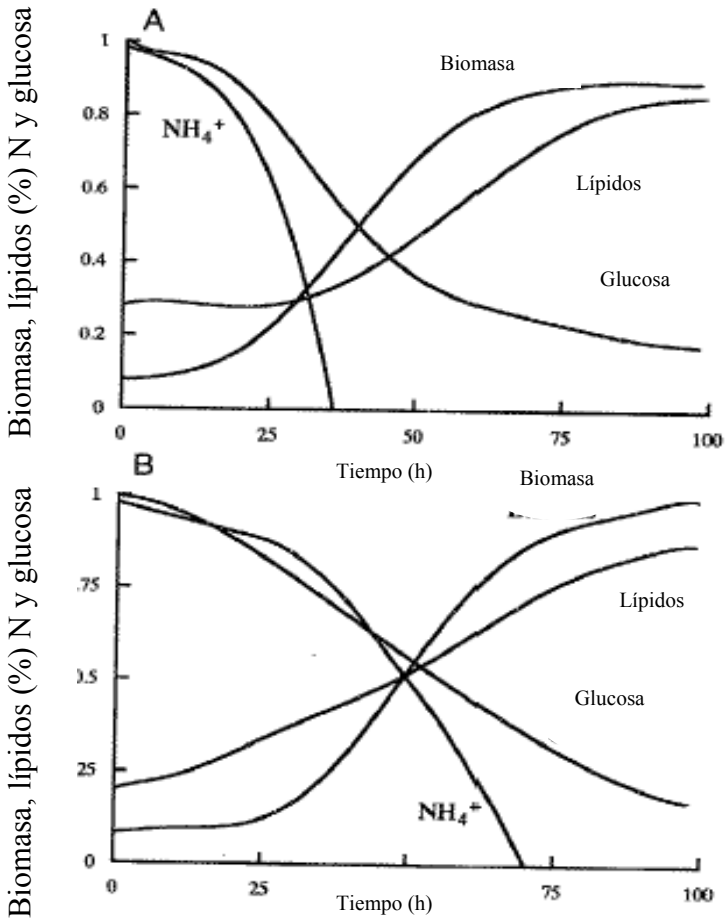

Figura 1.2 Representación esquemática del curso de acumulación de lípidos en microorganismos oleaginosos. (A) Acumulación de lípidos en cultivo por lotes, típico en levaduras y hongos filamentosos donde la acumulación de lípidos no comienza hasta que se agota el nitrógeno del medio. (B)Patrón de acumulación de lípidos en algas heterotróficas o thraustochytridos, los lípidos se acumulan durante la fase de crecimiento y no dependen del término de suministro de nitrógeno. **Adoptado de**: Ratledge & Wynn (2002).

Los principales estudios sobre oleogenicidad han sido realizados en levaduras oleaginosas y hongos filamentosos, según Ratledge (2004) la razón de la oleoginicidad podría explicarse por dos razones:

a) habilidad para producir un suministro continuo de acetil- CoA directamente en el citosol de la célula, como precursor necesario para la ácido graso sintetasa (FAS) y

b) habilidad para producir suficiente suministro de NADPH como reductor esencial utilizado en la biosíntesis de los AG.

La formación de acetil- CoA en microorganismos oleaginosos puede deberse a la presencia de la ATP: citrato liasa (ACL) la que cataliza la siguiente reacción.

Citrato + CoA + ATP $\longrightarrow$ acetil-CoA + oxaloacetato + ADP +Pi

Para operar eficientemente su sustrato, el ácido cítrico debe estar rápidamente disponible en el citosol donde ocurre la biosíntesis de los AG. Un aspecto único en los microorganismos oleaginosos que permite la acumulación de citrato es que la actividad de la isocitrato dehidrogenasa, es dependiente de la presencia de AMP (Adenosín monofosfato); esta dependencia no ocurre en los microorganismos no-oleaginosos. La concentración de AMP es a su vez regulada por la AMP deaminasa (EC 3.5.4.6).

$$\textbf{AMP} \xrightarrow{\text{AMP deaminasa}} \textbf{inosina 5´-monofosfato + } NH_4$$

La concentración de AMP en las células cae abruptamente cuando se termina el suministro de nitrógeno y esta limitación inicia una serie de eventos bioquímicos en cascada las que permiten la formación de acetil- CoA.

- Al iniciarse el agotamiento del nitrógeno en el cultivo, las células muestran un incremento en la actividad de la AMP deaminasa, la que es cinco veces mayor que en las células sin limitación de nitrógeno.

- El incremento en la actividad de la AMP deaminasa decrece el contenido celular del AMP incluyendo el contenido en las mitocondrias.
- La disminución del contenido de AMP en la mitocondria afecta a la isocitrato dehidrogenasa (ICDH), que en microorganismos oleaginosos es totalmente dependiente del contenido de AMP para su actividad
- Como resultado el isocitrato que no puede ser metabolizado, se acumula y se equilibra rápidamente con el acido cítrico (vía aconitasa)
- El citrato así se acumula en la mitocondria
- Existe un sistema eficiente de transporte a través de en la membrana que exporta al citrato por intercambio con malato
- El citrato en el citosol es convertido en acetil-CoA y oxaloacetato por la (ATP:citrato liasa) ACL. Esta enzima es clave y debe estar en eucariontes para poder acumular lípidos en forma de TAG.
- La acetil- CoA es utilizada para la síntesis de AG
- El oxalacetato es convertido vía malato dehidrogenasa a malato, el cual es usado como contraión en el sistema de intercambio del citrato.(Figura 1.3)

Los AG son materiales altamente reducidos (la síntesis de un mol de AG C18 requiere 16 moles de NADPH) y el suministro de NADPH es esencial. La enzima málica (ME; EC 1.1.1.40) es actualmente considerada el principal suministro de NADPH para la biosíntesis de AG (Ratledge, 2004).

La actividad de la enzima málica se ha encontrado en muchos microorganismos oleaginosos en los que se cree forma un complejo metabolón integrado, que combina la ACL y la ácido graso sintetasa (FAS) para asegurar la canalización directa del acetil-CoA a AG, los cuales son finalmente esterificados con glicerol en triacilgliceroles e incorporados vía retículo endoplasmático en las gotas de aceite. (Fig. 1.4)

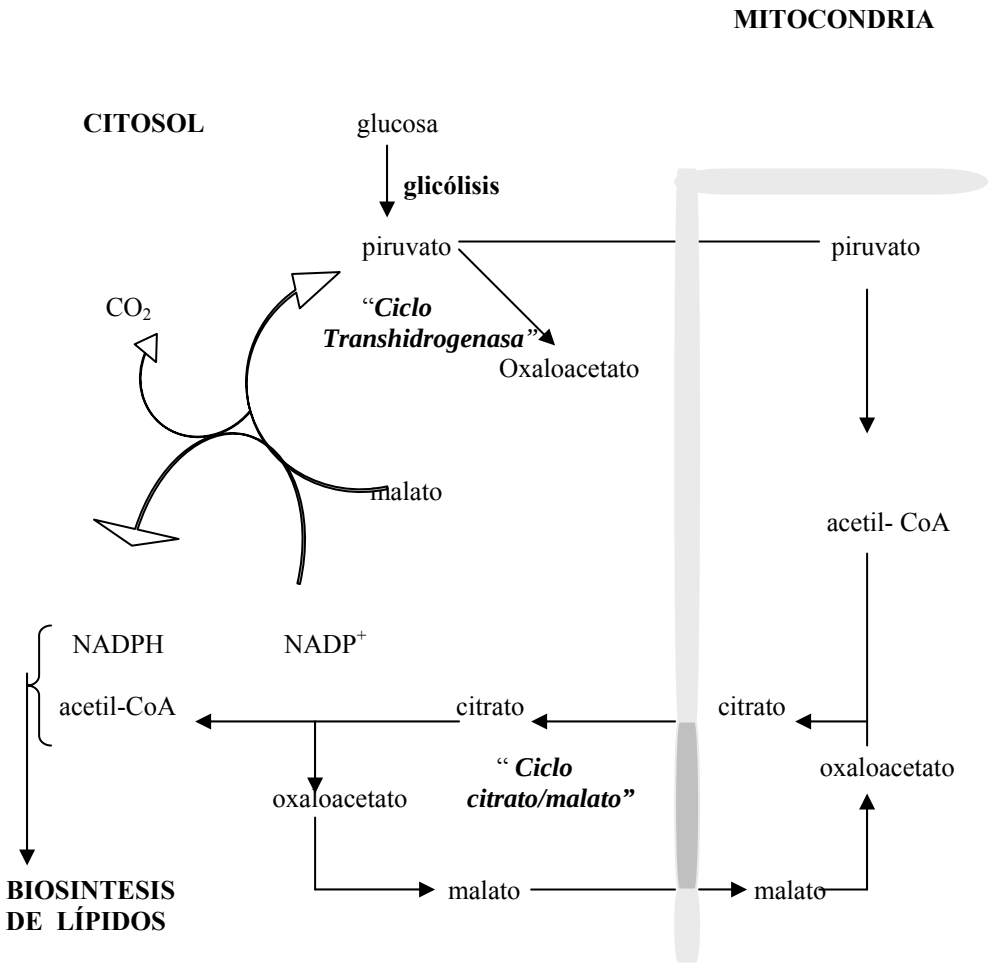

Figura 1.3 Esquema de cómo el ciclo citrato/malato y el ciclo citosólico "transhidrogenasa" pueden proveer precursores suficientes de acetil- coA y NADPH para la lipogénesis en microorganismos oleaginosos. El ciclo "transhidrogenasa" puede operar independientemente del flujo de carbono desde el citrato en la mitocondria a acetil –coA en el citosol y consecuentemente puede proveer todo el NADPH necesario para la biosíntesis de los ácidos grasos y las reacciones de desaturación y elongación de ácidos grasos. **Adoptada de**: Ratledge (2004).

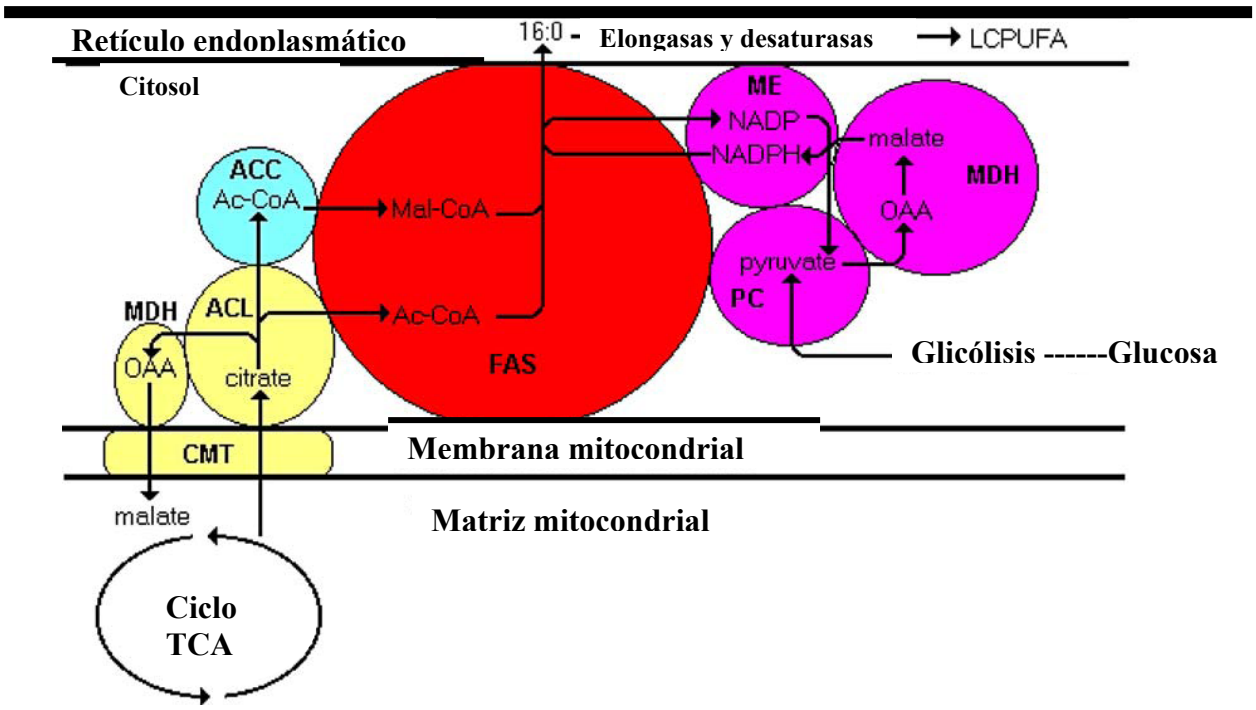

Figura 1.4 Diagrama de la organización de un metabolón hipogénico hipotético. El flujo de carbono desde la mitocondria, vía flujo de citrato y formación de acetil- coA en el citoplasma terminando en ácidos grasos y finalmente en ácidos grasos de cadena larga formados en las membranas del retículo endoplasmático. OAA: Oxaloacetato;Ac CoA: acetil- CoA; Mal-CoA: malonil coA;FAS:acido graso sintetasa; ACL: ATP:citrato liasa; ACC: acetil CoA carboxilasa; CMT: citrato/malato translocasa, ME: enzima málica; PC:piruvato carboxilasa;MDH: malato deshidrogenasa **Adoptada de:** Ratledge (2004).

1.3 **Biosíntesis de AGPIs**.

Diferentes rutas para la síntesis de AGPI se han desarrollado en la naturaleza. La información disponible permite señalar que existen dos mecanismos, uno aeróbico que ocurre en animales, y algunos microorganismos eucarióticos como thraustochytridos y otro anaeróbico el cual ocurre en bacterias y microorganismos eucarióticos como *Schizochytrium sp* (Qiu et al., 2001).

Es sabido que el DHA se sintetiza en el retículo endoplasmático en el citosol utilizando AGPIs como precursores mediante el primer mecanismo mencionado de desaturación /elongación. Ya que este proceso requiere oxígeno molecular se lo denomina el paso aeróbico en la biosíntesis del DHA. La biosíntesis involucra la desaturación y elongación de la cadena

hidrocarbonada que utiliza los sistemas enzimáticos Δ6, Δ5, Δ4 para llegar a DHA. Investigaciones realizadas en los últimos años han identificado una serie de enzimas desaturasas y elongasas especialmente aquellas que participan en la primera etapa de síntesis de EPA. Esta identificación ha permitido corroborar el mecanismo de la biosíntesis en mamíferos y diferentes microorganismos (Metz et al., 2001; Qiu, 2003). Actualmente existe abundante evidencia que corrobora el mecanismo de la biosíntesis aeróbica en la mayoría de los organismos hasta la síntesis de EPA. Se ha sugerido una ruta independiente, propuesta por Sprecher y colaboradores (2000) para explicar la síntesis DHA en mamíferos. En ésta, la síntesis de DHA es independiente de la Δ4 desaturasa y ocurre por una retroconversión de C-24 vía una ß oxidación (Qiu, 2003).

En general, los AGPIs se sintetizan a partir de modificaciones de AG saturados precursores en donde enzimas desaturasas insertan dobles enlaces en carbonos específicos en el AG y los sistemas de elongación extienden la cadena en incrementos de dos carbonos, comenzando por un AG monoinsaturado, el ácido oleico (18:1). La elongación de la cadena tiene lugar cuando dos átomos de carbono pasan desde el donador (acetil coA o malonil coA) a la cadena del AG. En la ruta ω3 la desaturación produce LA y ALA. El primer doble enlace es introducido entre el carbono 12 y 13 del ácido oleico, dando origen al LA. El segundo doble enlace se introduce entre los carbonos 15 y 16 formándose el ALA. Secuencias de pasos de elongación y desaturación de estas moléculas permiten la síntesis de DHA. Este mecanismo ha sido encontrado en la alga roja *Porphyridium yezoensis narawaensi* y en, *Mortierella alpina*, *Chlorella stigmatophora*, *Nannochloropsis salina*, *Chlorella sp*. y *Cryptheconidium cohnii* (Bajpai & Bajpai, 1993).

En el caso de los AGPIs ω6, la biosíntesis se basa en dos reacciones que producen ARA. En la Cryptomona *Orchromonas danica* y en la alga roja *Porphyridium cruentum* ocurre la desaturación de LA a GLA y es seguido por la elongación de la cadena a ARA. Las algas *Euglena gracilis* y *Astaria longa* sintetizan ARA elongando la cadena de LA seguida por la desaturación directa. Sin embargo, en hongos se ha señalado que la biosíntesis puede ser una combinación de ambas rutas (desaturación- elongación o elongación- desaturación mencionadas previamente (Bajpai y Bajpai, 1993).

En estudios *in vivo* realizados utilizando sustratos marcados se ha comprobado que *Thraustochytrium* sp. puede producir DHA a partir de ácido docosapentanoico (DPA, C22:5 ω3) utilizando una Δ4 desaturasa (Meyer et al., 2003).

Otro paso biosintético de AGPIs que no depende del anteriormente mencionado "sistema de elongasa y desaturasa", ha sido caracterizado en algunos organismos eucariontes y procariontes. Este segundo mecanismo es el denominado mecanismo anaeróbico de la poliketido sintetasa (PKS), que incluye un gran número de enzimas. Difiere de las secuencias de elongación/ desaturación porque no requiere una desaturación aeróbica para introducir el doble enlace en la cadena. En éste, los dobles enlaces se introducen durante el proceso de síntesis. El nombre anaeróbico es utilizado ya que el proceso no requiere oxígeno molecular, pero puede ocurrir en condiciones aeróbicas. Este mecanismo de síntesis del DHA ha sido reportado en *Schizochytrium sp*. (Meyer et al., 2003). Todo este proceso se muestra en la Figura 1.5.

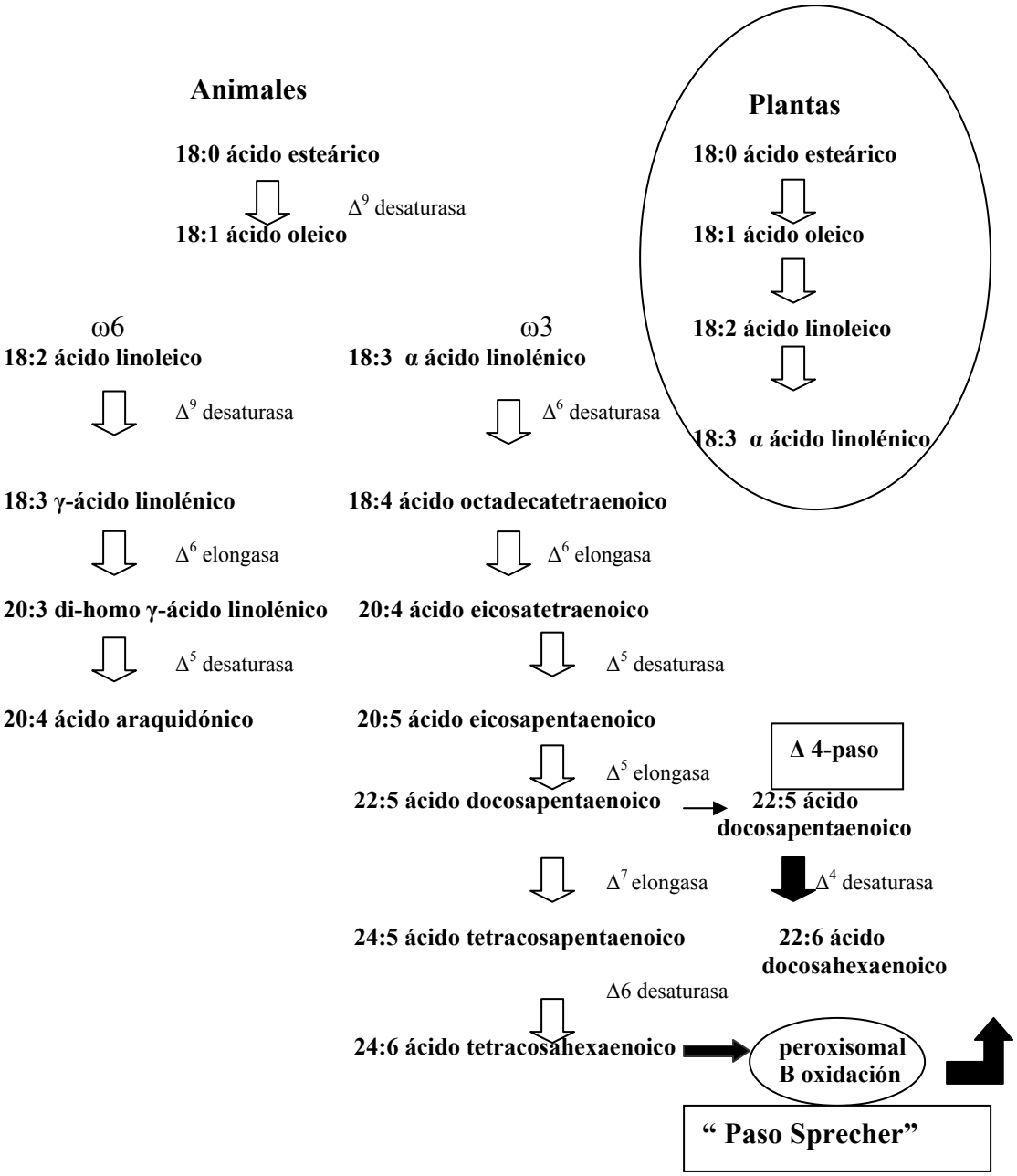

Figura 1.5 Biosíntesis de AGPIs. Se muestran varias rutas para la biosíntesis aeróbica. El acido linoleico y α–linolénico son los principales ácidos grasos sintetizados por plantas. Estos entran en la cadena alimenticia de los mamíferos y subsecuentemente son metabolizados a ácidos grasos de C20 y más. **Adoptado de:** Sayanova & Napier (2004).

1.4 Fuentes de Obtención

1.4.1 Fuentes convencionales

Los AGPI ω6 como el LA se encuentran en semillas de cártamo, girasol, poroto de soja, maíz, ajonjolí; el ácido γ-linolénico está presente en la prímula, borraja, enotera; el ARA se encuentra en carnes animales, huevos y leche. Entre los AGPI ω3 el ALA está presente en la linaza, chía y cantidades moderadas en soja, nuez, pepita de calabaza. Tanto EPA como DHA no están presentes en los vegetales superiores.

Los organismos marinos obtienen los AGPIs ω3 desde los vegetales inferiores que integran el fitoplancton y desde bacterias autotróficas marinas y protozoos componentes del zooplancton (Iwamoto et al., 1986). El fitoplancton es la mayor fuente alimentaria de los herbívoros filtradores marinos y el principal portador de LA y ALA. No todos los grupos fitoplanctónicos contienen las mismas proporciones de AG. Las diatomeas poseen altas concentraciones de EPA, bajas concentraciones de DHA y ausencia de AG insaturados de 18 carbonos, mientras que los dinoflagelados son ricos en DHA.

En los últimos años se ha intensificado la búsqueda de diferentes recursos con alto contenido de AG ω3. Se ha indicado que la principal fuente se encuentra en peces y mariscos. Sin embargo, éstos no son capaces de sintetizar *de novo,* y los adquieren a través del alimento proveniente de la cadena trófica. En la última década CSIRO (Departamento de Investigación marina, Australia) ha realizado estudios sobre los niveles y caracterización de AG en más de 200 especies marinas provenientes de Australia. Se incluyen peces, mariscos, crustáceos los que

poseen entre 10 y 100 veces los niveles encontrados en alimentos tales vacuno, cerdo aves y además bajos niveles de colesterol (Nichols, 2003). La Tabla 1.1 muestra la composición de AG ω3 en diferentes fuentes alimenticias.

Tabla 1.1 Composición de AG ω3 en diferentes fuentes alimenticias (mg de ω3/ 100 g)

Pescado 210	Camarón 120	Pavo 35	Pollo 19	Cerdo 0
Ostras 150	Langosta 105	Vacuno 22	Cordero 18	Ternera 0

Fuente: **CSIRO**

Los bivalvos mitílidos específicamente *Perna canaliculus* de Nueva Zelandia y Australia son ricos en AGPIs ω3 (Sinclair et al., 2000). El contenido promedio de AGPIs ω3 en chorito labio verde (*Perna canaliculus*) es de 0,5 g/ 100 de carne, Chorito azul (*Mytilus edulis*) 0,4 g/ 100 g de carne y chorito (*Mytilus chilensis*) 0,65 g/100 g de carne. El chorito labio verde es utilizado en Nueva Zelandia y Australia para obtener un producto usado como suplemento alimenticio rico en AGPIs ω3, el cual es comercializado en Europa desde 1975. Desde 1996 la industria neocelandesa destinó el polvo de mitílido como materia prima para la extracción de AGPIs ω3 el cual es procesado en Alemania por extracción super crítica comercializándose el producto final como lyprinol ® (Sinclair et al., 2000). En el mercado se encuentran varios compuestos lipídicos ricos en AG de este origen.

En la actualidad la principal fuente de AGPIs es el aceite de pescado. Los peces incorporan los AGPI como parte de su dieta (algas, zooplancton) y pueden concentrar EPA y

DHA en el tejido adiposo, grasa muscular, vísceras y gónadas en forma de triacilgliceroles. La composición y cantidad de AGPI ω3 en los aceites de pescado dependerá de la especie, de la época del año y lugar geográfico donde se capture.

En la producción de harina y aceite de pescado se utiliza pescado silvestre no comestible. Este es un pescado pequeño aceitoso y óseo. Anualmente se ocupan 30 millones de toneladas de esta materia prima. También se utilizan desechos de la industria procesadora para consumo humano (salmón, sardina), logrando que entre en la cadena alimentaria humana. (IFFO, 2001). La captura del pescado destinado a la alimentación animal está sujeta a estrictas cuotas gubernamentales sobre todo en países latinoamericanos. El principal productor de harina y aceite de pescado es Perú y Chile es uno de los cinco países que lidera la producción de aceite de pescado para lo cual utiliza anualmente 180 mil toneladas de materia prima.

A partir de la producción acuícola se ha estimado la cantidad de harina y aceite de pescado que se necesitará al final de la década sobre la base del crecimiento acuícola anual esperado. Los niveles de producción mundial esperados son de 6,5 millones de toneladas de harina de pescado y 1,3 millones de toneladas de aceite de pescado, necesarias para cubrir los requerimientos de la industria de alimentos de peces.

Para el 2010 la demanda de harina de pescado por la acuicultura se ha estimado en 5 millones de ton, lo que representa el 80% de la producción mundial mencionada anteriormente. El aceite necesario para suplir las necesidades de la industria representa alrededor de 1,2 millones de toneladas o sea aproximadamente un 92% de la producción mundial. Se debe señalar que además se prevé una demanda de cerca del 10% de la producción mundial de aceite para otro tipo de productos (farmacéuticos / nutricionales) (Miller et al., 2007).

El mercado de harina y aceite de pescado en los próximos años con precios sin grandes oscilaciones se pronostica estable, las variaciones en la producción se debe principalmente a que los países pesqueros más importantes (Unión Europea, Perú y Chile) definen las cuotas de captura para prevenir el exceso de pesca, y los efectos climáticos como "El Niño" hacen que disminuya la producción, a pesar de ello la producción permanece razonablemente estable.

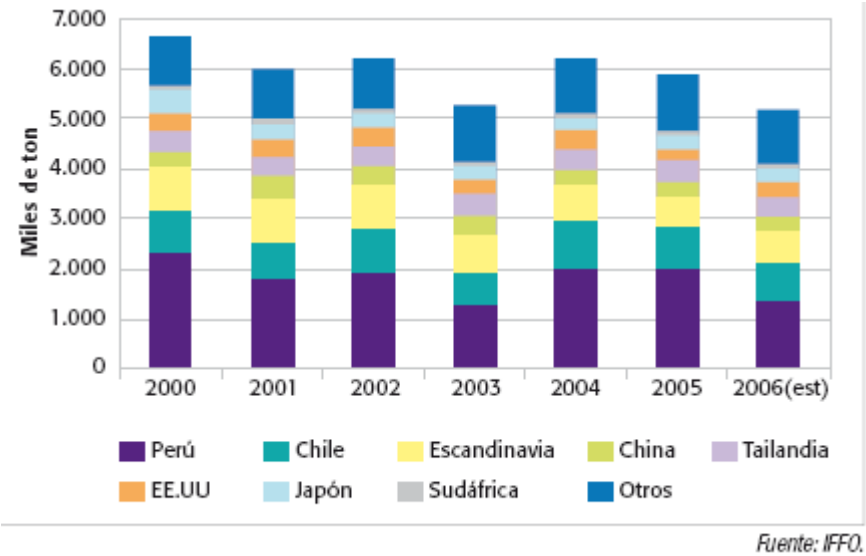

Figura 1.6 Producción Mundial de harina de pescado

La producción mundial en el año 2006 fue cerca de 5,3 millones de toneladas de harina de pescado (similar al 2003) (Figura 1.6), el consumo debe adecuarse a esa oferta restringida lo que genera un aumento de precios (US$1400/ton FOB). Esto hace que los usuarios adapten las dietas de los animales, por ejemplo bajando los consumos en las dietas de pollos y cerdos, pero manteniéndolos en la acuicultura. En el caso del aceite la situación es parecida, en el año 2006 el

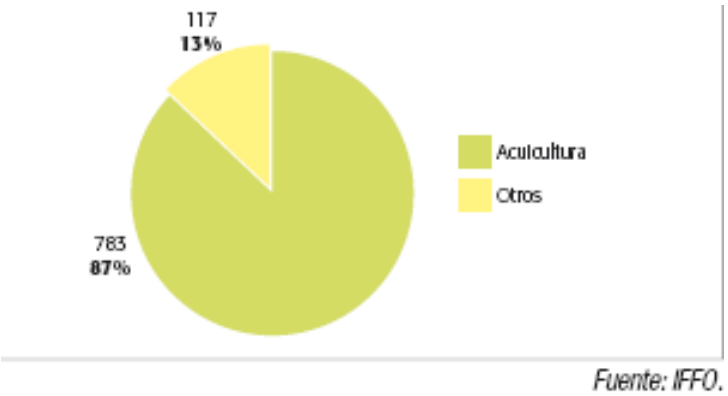

Figura 1.7. Producción de aceite Mundial

87% del total del aceite producido a nivel mundial (Figura 1.7) fue consumido por la industria acuícola, de donde el 56% de ese aceite fue usado en la producción de salmónidos. (Figura 1.8) Además, se suma el uso creciente del aceite en la elaboración de productos concentrados de ω3 (100 mil Ton el 2006)

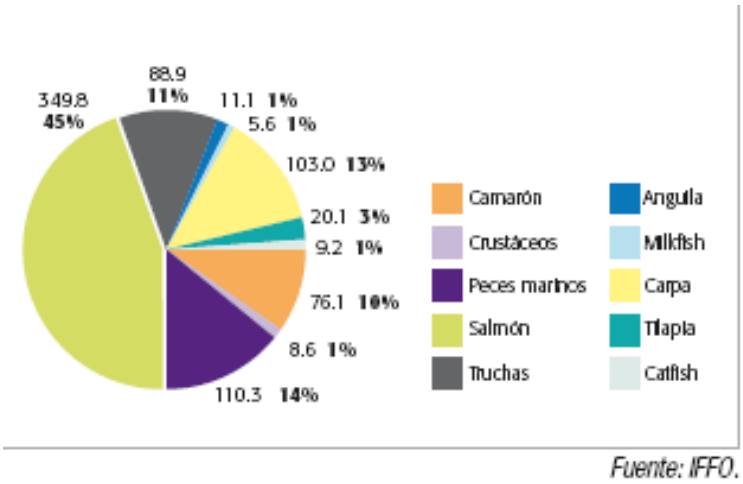

Figura 1.8. Uso del Aceite de pescado.

En Chile la producción de aceite y harina de pescado depende de la captura de anchoveta de la zona Norte. La producción de aceite es aproximadamente 122 mil toneladas (Figura 9) y no se produce todo el aceite que requiere la salmonicultura importando la diferencia desde Perú y Estados Unidos. (Figura 10). Todo esto demuestra que se espera un déficit en el suministro de aceite de pescado necesario en los próximos años.

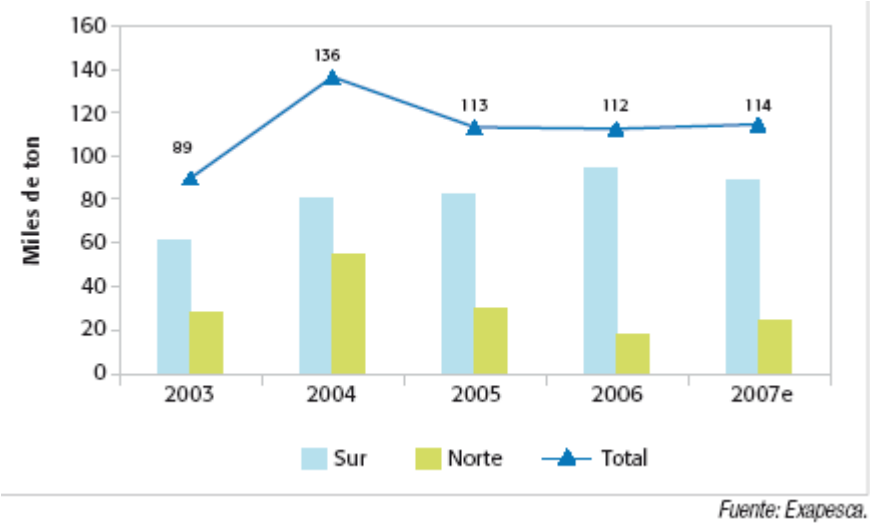

Figura 1.9 Producción de aceite de pescado en Chile

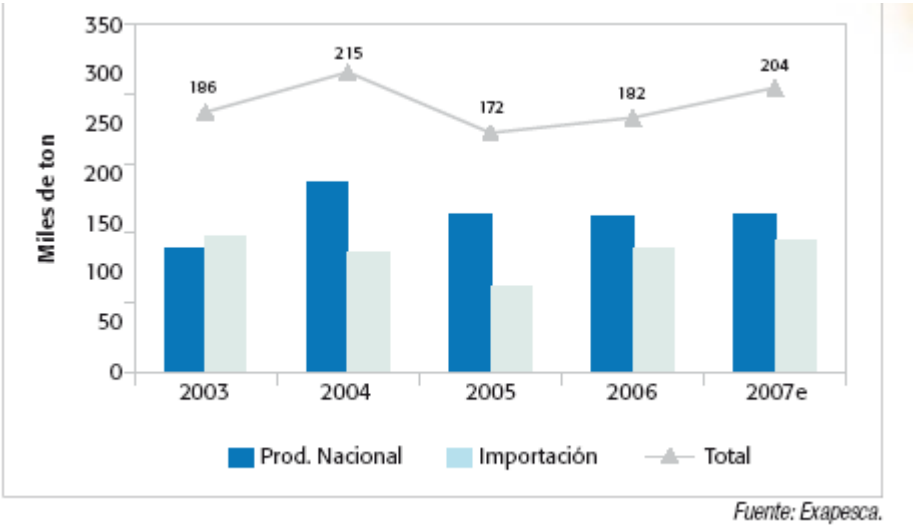

Figura 1.10 Consumo Interno de aceite en Chile

La producción de aceite de pescado a nivel industrial requiere equipamiento e instalaciones de alto costo, pero es técnicamente simple. Existen varias alternativas de extracción, como por ejemplo el fraccionamiento por centrifugación a alta velocidad, extracción por solvente a baja temperatura, extracción super crítica (Aidos, 2002). El producto de la pesca se cuece en equipos de gran volumen con o sin presencia de agua; el material cocido se prensa y centrífuga y/o filtra para recuperar el aceite. En esta cocción se denaturan las proteínas lo que permite el prensado posterior. Se centrifuga el líquido formado por aceite, agua y proteínas solubles y posteriormente se separa el aceite. Existen diferentes variaciones al proceso original para optimizar la calidad y disminuir el deterioro causado por la oxidación del aceite.

El aceite crudo es sometido a procesos de refinación que consisten en etapas de clarificación y blanqueo, desgomado y neutralización. El aceite obtenido siempre posee el "característico olor a pescado". Este aceite también se utiliza en la industria en procesos de fabricación de pinturas, barnices, pegamentos, productos fotográficos, cuero cosmética además de alimentación animal. No es adecuado para el consumo humano salvo que se someta a desodorización e hidrogenación.

La desodorización se realiza mediante arrastre de vapor a alta temperatura (200° C) y alto vacío produciéndose un deterioro químico, especialmente en los AGPI´s ω3. En la hidrogenación prácticamente desaparecen todos los EPA y DHA. Se han desarrollado otros sistemas de desodorización a bajas temperaturas y presiones menores.

Alfa Laval posee el proceso Conkix registrado que utiliza para extraer aceite proveniente de desechos de la industria procesadora del salmón. En este proceso se utiliza un decantador de

tres fases en el que se produce y separa el aceite. Finalmente el aceite es enfriado y almacenado, este aceite es llamado "**aceite crudo de pescado**" (Aidos I, 2001).

El alto contenido de AG en los aceites de pescado influyen en la estabilidad y calidad del aceite. El proceso de oxidación es una reacción en cadena que ocurre a través de varias etapas. La susceptibilidad y velocidad de oxidación se relaciona proporcionalmente al grado de insaturación (Aidos, 2002). La deterioración oxidativa involucra una autooxidación acompañada de otras reacciones. Los productos de autooxidación son hidroperóxidos lípidos generalmente llamados peróxidos los que se descomponen rápidamente en productos de oxidación secundarios tales como ketonas y alcoholes que pueden causar sabores fuertes, indeseables en el aceite. Los lípidos se vuelven rancios como resultado de la oxidación y se traduce en que el producto posea poca estabilidad. Se deben aplicar tratamientos especiales para reducir a niveles aceptables los productos de la oxidación.

Las altas temperaturas, largos tiempos de cocción y contaminación con metales de transición producen oxidación. Los actuales procesos no siempre cumplen los requisitos para la obtención de productos que conserven las propiedades beneficiosas para la salud. El aceite de pescado contiene una mezcla de AG que su purificación para aplicaciones clínicas requiere de muchas etapas, en algunos casos se utiliza cromatografía líquida (HPLC) que sube el costo de producción (Wen & Chen, 2005). El mejoramiento de las técnicas de separación y el uso de condiciones de operación más suaves de procesamiento jugarán un rol importante en la industria de alimentos y fármacos. Esto hace necesario considerar nuevas tecnologías y fuentes alternativas para la obtención de AGPIs (Yokochi et al., 1998; Lewis et al., 1999; IFFO, 2001).

1.4.2 Aceites microbianos (SCO, Single cell oils)

Los SCO son definidos como aceites comestibles obtenidos de microorganismos que pueden ser similares en tipo y composición a los obtenidos de plantas y animales (Ratledge, 2005). Actualmente los SCO son ampliamente aceptados en el mercado y su producción se está expandiendo y diversificando cada día. El avance de la biología molecular y las técnicas de ADN recombinante ayudan al desarrollo y optimización de los procesos de producción a nivel comercial

Estudios preliminares con microorganismos productores de lípidos, como ciertas levaduras fueron utilizados para explorar los mecanismos utilizados por el microorganismo en la formación de estos lípidos y determinar los factores que influían en su acumulación. Aun así no se presentaban como una alternativa comercial debido a varias causas. En los microorganismos oleaginosos (más de 20% de lípidos en su biomasa) los lípidos presentes no diferían mucho de los encontrados en animales y plantas (Ratledge, 2005), ineficiencia en la conversión de la fuente de carbono (5T azúcar por 1T de aceite) y alto valor en las fuentes de carbono utilizada. Los SCO comienzan a ser atractivos solo cuando los aceites producidos exceden el precio de los aceites provenientes de vegetales y animales o cuando los aceites producidos son ricos en ácidos grasos no encontrados en otras fuentes o que posean características especiales frente a sus similares.. Los aceites más importantes en la actualidad son GLA, ARA, DHA y EPA.

A continuación se exponen los microorganismos capaces de producir aceites microbianos.

1.4.2.1 Bacterias

Es sabido que la producción de AG ω3 por bacterias es afectada por las condiciones ambientales y parámetros como temperatura, composición del medio, aireación, ciclos de luz. La producción heterotrófica tiene ventajas sobre la fotosintética porque ofrece mayores posibilidades para el control del proceso, lo que permite obtener productos consistentes y reproducibles; además a través de la manipulación de las condiciones de cultivo es posible alcanzar altas densidades celulares. El producto obtenido puede corresponder a la biomasa que contiene los lípidos o ser purificados desde ésta dependiendo del uso final.

La ventaja de la producción bacteriana de AGPIs se debe a que algunas especies tienen la capacidad de producir solamente un AG, a diferencia de la compleja mezcla producida por microalgas o acumulada en los peces (Rusell & Nichols, 1999). La desventaja radica en que muchas veces sus concentraciones lipídicas son bajas (Nichols et al., 2002). Las bacterias de mayor producción de AGPIs, entre los que se encuentran EPA y DHA, pertenecen a los géneros *Shewanella, Colwelia* y *Moritella* de la división Proteobacteria. Estas especies marinas se encuentran asociadas a ambientes extremos donde prevalecen altas presiones y bajas temperaturas. Se piensa que la síntesis de estos AG es la respuesta de la adaptación para contrarrestar las variables adversas sobre la fluidez de la membrana (Nichols et al., 1993; 2002).

Dos miembros del género *Shewanella* se han aislado desde estuarios templados y utilizan ácido tánico y derivados como única fuente de carbono. A temperaturas relativamente altas de crecimiento (24 ° C) se ha observado que el contenido de EPA se encuentra en un rango de 10 – 23,6% de los AG totales producidos (Skerratt et al., 2002).

Una especie cercana a *Shewanella putrefaciens*, productora de EPA (24 – 40% de los AG totales) ha sido aislada del contenido intestinal de sardina del Pacífico. Un fragmento de genoma

de esta cepa SCRC-2738 fue clonado en *Escherichia coli* lográndose la producción de EPA. La secuencia de 38 kbp de ADN mostró homología con enzimas involucradas en la síntesis de AG (Yazawa, 1996). La misma secuencia fue clonada en una cianobacteria *Synechoccus sp* obteniéndose EPA y ARA (Yu et al., 2000).

Ya que en términos generales las productividades alcanzadas en cultivos de bacterias son muy bajas para ser consideradas en la producción industrial, la investigación está siendo enfocada hacia el estudio del genoma y bioquímica de las bacterias productoras de AGPIs.

1.4.2.2 Microalgas

Las microalgas comprenden un grupo de microorganismos diverso que incluye al fitoplancton, el cual provee la fuente primaria en la cadena alimenticia del océano. Las microalgas constituyen un reservorio de compuestos bioactivos (AG, pigmentos y vitaminas). De las aproximadamente 30.000 especies sólo un número limitado ha sido estudiado y analizado para la producción de lípidos (Pomponi, 1999).

Muchas microalgas son foto-autotróficas, o sea requieren luz, CO_2 y algunos minerales para su crecimiento. En acuicultura, las microalgas fototróficas se utilizan como alimento vivo y como suplementos en la alimentación de larvas y animales juveniles como ostras, abalón juvenil, larvas de pez espada y rotíferos. El desarrollo de rotíferos, los que posteriormente se utilizan para la alimentación de larvas de peces y crustáceos, está directamente relacionado con la calidad de las microalgas utilizadas para su alimentación (Ben- Amotz, 1987).

Varios AG de cadena larga de la familia de $\omega 3$ son abundantes en microalgas por ejemplo *Porphyridium cruentum, Nannochloropsis sp., Phaeodactylum tricornutum, Monodus subterraneus* son productores de EPA. *Cryptocodinium cohnii y Chroomonas* salina contienen DHA.

En la producción de AG a partir de algas se obtiene un producto libre del olor y sabor característico del aceite de pescado. El principal obstáculo de la producción comercial de algas se debe a la necesidad de procesar altos volúmenes de agua por lo que los costos de la cosecha pueden representar hasta el 33% del costo total de producción (Barclay et al., 1994). Se ha comunicado la producción a gran escala de EPA a partir de la microalga *Prophyridium cruentum* en una piscina de 1 m^3. Los resultados estuvieron marcadamente influidos por la estacionalidad variando la productividad en biomasa de 12 g (m^3 día)$^{-1}$ a 24 g (m^3 día)$^{-1}$ en verano (Cohen, 1988).

En el cultivo de microalgas fototróficas para la producción de AG se obtienen bajas productividades principalmente debido a dos problemas no resueltos aun, la limitación de luz y la acumulación de oxígeno (Barbosa, 2003). También las densidades algales son bajas haciendo los procesos de producción a costos elevados.

La alternativa a los fotobioreactores es utilizar algas con capacidad de crecer heterotróficamente en fermentadores convencionales. Se ha estimado que el costo de producción de biomasa heterotrófica puede ser menor a US$5/kg mientras que producir un kg de alga fototróficamente fue estimado un costo de 1 -2 órdenes de magnitud superior (Gladue y Maxey, 1994).

Utilizando cepas de *Nitzschia alba* se han señalado densidades celulares de 45 - 48 g L^{-1} en 64 h en tanque agitado. El contenido de aceite en la biomasa puede ser superior al 50% del peso seco, lo que representa una productividad de 0,25 g (L día)$^{-1}$. Para el dinoflagelado marino heterotrófico *Crypthecodinium cohnii* productor de DHA se han reportado densidades superiores a 40 g L^{-1} en tiempos de fermentación de 60 - 90 h, con un 15 - 30% de aceite del cual el 20 - 35% es DHA. Esto representa una productividad de 1,2 g (L día)$^{-1}$ (Barclay, 1994; Swaaf et al., 2003). En cultivos de *C. Cohnii* en los cuales se usa glucosa como sustrato, los principales

AG producidos son ácido palmítico (C16:0, PA) y DHA (Jiang et al., 1999). Otras fuentes de carbono como ácido acético y etanol han sido estudiadas en operaciones de fermentación por lote alimentado. Al usar ácido acético se obtuvo una productividad de 45 mg $(L\ h)^{-1}$, mientras que con etanol la productividad alcanzó los 53 mg $(L\ h)^{-1}$ en cultivos de 210 y 220 h, respectivamente (Swaaf et al., 1999; Ratledge et al., 2001).

Las nuevas estrategias de cultivo están dirigidas a incrementar la producción de biomasa utilizando procedimientos de aireación forzada, ya que se ha comprobado que el microorganismo requiere oxígeno para la desaturación durante el proceso de biosíntesis de AGPIs (Jiang et al., 1999).

En estudios de optimización del medio de cultivo en los cuales se ha suprimido la fuente de nitrógeno, se han obtenido aumentos del contenido de AG de hasta tres veces en conjunto con aumentos en peso y tamaño celular (Roessler, 1990).

La acumulación de triacilgliceroles (TAG) en *C. cohnii* no ocurre durante la fase activa de crecimiento en un medio con todos los nutrientes, este ocurre en la idiofase, después que algún nutriente, diferente a la fuente de carbono, es limitante. (generalmente nitrógeno), debido a esto la fermentación se realiza en dos etapas y por lote-alimentado, en la primera cuando el crecimiento es activo el contenido de lípidos en la biomasa es aproximadamente 20% del peso seco de biomasa y las células son móviles. Una vez que el nitrógeno se agota y se continúa alimentado el fermentador con la fuente de carbono, comienza a producir material de reserva, ahí pierde el flagelo y se transforma en células empacadas con cuerpos lipídicos (Wynn et al., 2005).

La calidad de los aceites producidos por microalgas tiene ventajas sobre el aceite proveniente de pescado, contiene una mayor proporción de DHA y EPA, en caso de una

producción a gran escala para uso farmacéutico puede controlarse más fácilmente su calidad, son más estables a la degradación oxidativa. (Barclay, 1998).

1.4.2.3 Hongos

Diversos hongos se han estudiado para la producción de AG de cadena larga. Destaca entre éstos aquellos pertenecientes al orden Mucorales, género *Mortierella* que pertenecen a la clase Phycomycetes. El género *Mortierella* ha mostrado ser una promisoria fuente de aceites microbianos rica en varios tipos de AGPIs C20. Entre éstos *Mortierella ramannianna*, *Mortierella Isabellina*, *Mucor circinelloides* son productores de GLA, pueden producir GLA a concentraciones entre 15-25% de los AG totales. *Mortierella alpina* y *Mortierella elongata* se caracterizan por ser productores de EPA (Certik y Shimizu, 1999) y la cepa *Pythium acanthicum* produce de DPA (Gandhi, 1991).

La producción de AG en hongos presenta productividades 1 o 2 órdenes de magnitud menores que las obtenidas en algas. Los sistemas fúngicos basados en *Mortierella* o *Pythium* tienen tiempos de fermentación 2 y 3 veces mayores que las microalgas, producto de la baja velocidad de crecimiento de los hongos o la necesidad de producir algún tipo de estrés en el microorganismo para inducir la síntesis del metabolito deseado. Aunque es posible conseguir sobre 50 g L^{-1} en cultivos sumergidos los periodos para estos cultivos son de 10 días con productividades cercanas a 0,6 g(Ldía)$^{-1}$

Las características del producto y rendimiento dependen de las condiciones de cultivo y del sustrato utilizado (Bajpai y Bajpai, 1993; Jang et al., 2000). Los estudios para la producción biotecnológica han estado principalmente enfocados a definir estrategias de fermentación sumergida cuyo principal problema, más allá del escalamiento ha sido su comercialización. En el

caso de la fermentación sólida se presentan problemas de transferencia de masa y calor por la naturaleza misma del tipo de sustrato utilizado (Certik y Shimizu, 1999).

Los hongos de la especie *Mortierella alpina* se utilizan en la actualidad para producir industrialmente ARA. Con el fin de optimizar la producción a nivel de laboratorio se ha utilizado aceite de linaza de alto contenido de ALA (58%) quien es precursor de la síntesis de EPA (Bajpai y Bajpai ,1993). Otros sustratos que han sido estudiados son glucosa y aceite de soya. En cultivos de las cepas *Mortierella hygrophila* y *Mortierella alpina* se obtienen rendimientos similares en EPA al usar glucosa, glycerol, maltosa y fructosa (Shimizu et al., 1988).

En fermentación sólida utilizando *Mortierella alpina* se han utilizado una serie de residuos agroindustriales como residuos de arroz, maíz, maní y remolacha en forma individual y en mezclas; los AG producidos son LA, AA, EPA. Al utilizar los residuos de arroz se alcanzaron los mejores rendimiento para los tres AG (Jiang et al., 2000). Otras variables que afectan el crecimiento de hongos son la humedad inicial, pH, temperatura, tiempo de incubación, suplemento de nitrógeno y de aceite (Bajpai y Bajpai, 1993).

El contenido de nitrógeno afecta la relación entre los AG saturados e insaturados. En el caso de los hongos, una alta relación C/N en el medio de cultivo aumenta la concentración de lípidos en la biomasa de *Mortierella ramanniana* (Hansson y Dostalek, 1988). Para esta cepa el suplemento de nitrógeno estimula la producción de AGPI ω3, en tanto la incubación a bajas temperaturas también favorece la producción de AGPIs e incrementa el grado de instauración.

La cepa *M. alpina* 1S-4 además de producir ARA, ha servido de modelo para estudios del metabolismo de los lípidos. Esta cepa es altamente oleaginosa, su biosíntesis de lípidos es simple y regulada, también puede incorporar AG exógenos y transformarlos, es útil en estudios de genética molecular y además es usada a escala industrial. Una amplia variedad de mutantes

carentes de ciertas desaturasas o elongasas o con actividades desaturasas se han derivado de *M. alpina* 1S-4, tratando las esporas parentales con N-methtyl –N´-nitro-N-nitrosoguanidine (Sakuradani et al., 2005).

1.4.3 Mercado para los aceites microbianos

El mercado para las fórmulas infantiles se estima en US$ 10.000 millones /año. El ARA y DHA han sido usados para fortificar fórmulas infantiles en muchas partes del mundo entre 30 y 60 países. Fuera de EEUU las fórmulas contienen DHA que proviene de aceite de pescado.

Martek Biosciences S. A. ha desarrollado dos productos, DHASCO ® proveniente de la microalga *Crypthecodinium cohnii* que contiene 40-50% de DHA y no contiene EPA ni otro AGPI y el producto ARA (ARASCO ®) se obtiene de *Mortierella alpina* y contiene 50% de ARA.

Los altos rendimientos y productividades con especies de thraustochytridos del género *Schyzochytrium* resultan en aceites de más bajo costo los cuales se pueden utilizar en suplementos de dieta de adulto en bebidas y alimentos, alimentos saludables, alimentos animales y acuicultura. Otro mercado es el de productos para el consumo de embarazadas y para prevención de enfermedades cardiovasculares. Este mercado es más amplio que el de fórmulas infantiles.

En el sector acuícola pocos estudios se han publicado con respecto al reemplazo del aceite de pescado. (Miller et al., 2007) han estudiado el reemplazo del aceite de pescado con DHA proveniente de aceite microbiano de *Schizochytrium sp*. en dietas para salmón Atlántico. Estos autores no encontraron diferencias significativas en el consumo ni en la digestibilidad de los AGPI ω3 y ω6 por los peces y tampoco se encontraron diferencias en el crecimiento de los peces con la nueva dieta. Además los peces exibieron en el perfil de AG en los tejidos

mostrando mayor porcentaje de DHA en el tejido del músculo comparado con la dieta con aceite de pescado.

Los thraustochytridos han sido utilizados como alimento vivo para rotíferos (*Brachionus* spp.) y camarones (Artemia) como fuente de DHA en la fase crítica en el ciclo de producción (Nichols et al., 1996). *Schizochytrium limacinum* OUC88 ha sido utilizado para alimentar rotíferos *Brachionus plicatilis y Artemia franciscana* y el contenido de DHA aumentó en ambas especies. Cuando se alimentó juveniles de turbot *Scophthalmus maximus* con artemia y rotíferos enriquecidos disminuyó el pseudoalbinismo en ellos (Song et al., 2007)

En el proceso de separación, la extracción del aceite de la biomasa microbiana incrementa los costos de producción y eso limita su uso especialmente en acuicultura, se ha propuesto utilizar la biomasa completa como alimento que además es una fuente de proteína y otros nutrientes naturales (esteroles, vitaminas y elementos traza) junto al aceite marino (Miller et al., 2007)

Las empresas mencionadas más adelantes (Tabla 1.2) están investigando, desarrollando, produciendo y comercializando aceites microbianos que contienen diferentes AGPI.

Tabla 1.2 Empresas productoras de SCO.

Aventis S.A
BASF A.G
Friesland Brands A.G
Gist –brocades
Heinz-Wattie´s
Hoffmann-La Roche A.G
Jamieson
Laboratorios Ordesa
Maarbarot
Martek.Inc.
Mead Jonson Nutritionals
Nagase and Co.
Nestle S.A.
Novartis
Nutricia
Nutrinova Celanese A.G
Pronota
Ross Products (División de Abbott)
Suntory Ltd.
Walmart
Wyeth

Adoptado de: Ward y Singh (2005).

A continuación se muestra un extracto con algunas investigaciones que se han realizado para la producción de los AGPI más importantes. GLA, ARA, DHA, EPA (Tablas 1.3; 1.4; 1.5; 1.6 respectivamente), todas ellas enfocadas a la optimización de los procesos de producción, como también la búsqueda o mejoramiento de nuevas cepas.

Estrategia	organismo	Tiempo de cultivo (h)	biomasa (g/L)	GLA (g/L)	GLA biomasa (%)	GLA aceite (%)	productividad	observaciones	referencia
Desarrollo de mutante con resistencia a baja temperatura y estudio de condiciones óptima para producción de GLA	*Mortierella ramannia* (MM15-1	216	62	5,18		18,1	0,58	Mutante desarrollado de cepa parental IFO8187	Hiruta et al.,1996
Optimización de GLA en hexadecanol	*Mortierella isabellina*	24 8+15 días)			27,1		0,054 g/día	Condiciones optimas:2% hexadecanol,1% EL,23° C almacenamiento micelio 15 días a 5° C	Xian et al., 2003
investigación de disrupción de micelio incubando a baja temperatura	*Mortierella isabellina*				22,4		0,224g/g cel /día	micelio incubado en buffer fosfato conteniendo Mg+ y malato, pH 7 a 5° C por 24 h	Xian et al., 2001
screening 48 mucorales para alta producción de GLA	*Mucor mucedo*			0,38				8 cepas producen más de 200mg/l de gla en aceite de girasol	Certik et al.,1997
estudio de cultivo en estado sólido	*Cunninghamella echinulata* *Cunninghamella elegans* CCF1318	11 días		0,37		15,6		medio de cebada, granos de malta, aceite de maní 14,2 gGLA/kg de sustrato	Conti et al.,2001

Tabla 1.3 Producción microbiana de ácido gama-linolénico (GLA).**Adoptado de:** Ward & Singh (2005).

Estrategia	organismo	tiempo cultivo (h)	biomasa (g/l)	ARA (g/L)	%ARA biomasa	%ARA aceite	Prod g(L día)	observaciones	referencia
Estudio de producción de ARA con algas foto autotróficas	*Porphyridium cruentum*		29		1,9			máximo en condiciones de depleción de nitrógeno en estado estacionario	Cohen et al., 1995
Estudio de producción de ARA por alga verde	*Parietochloris incise*	38 días		2,67				últimos 17 días en medio libre de nitrógeno:90% de ARA en TG	Cheng-Wu et al., 2002
Producción de ARA en fermentador industrial de 80 l	*Pithium insidiosum* ATCC 28251 *Mortierella schmuckeri*	50 65,5	15 20-22	0,3 2,3		30-35	0,15 0,84	24 gL^{-1} glucosa,4,8 gL^{-1} EL,125 rpm	Kyle (1994) Barclay (1997)
estudio del medio y efecto de temperatura en producción de ARA	*M. alpina* 25° C ATCC 32222 15° C	192 264	52,4	9,1			1,14 1,01	medio: harina soya, aceite vegetal $NaNO_3$ en glucosa fed batch	Singh & Ward (1997)
Desarrollo de medio y condiciones para producción de ARA	*Mortierella alpina*	144	34,4	4,3		32,9	0,72	medio: glucosa, harina de soya, YE, pH 5,5 durante fase log, manutención 6,5-7,3 por adición de acido 28° C O2 >40% saturación	Kyle (1997)
Estudio del efecto de crecimiento sobre la velocidad de producción de lípidos y síntesis de DHA	*Mortierella alpina*	189		4,5	18,9	60,4	0,56	la síntesis de lípido se duplica cunado la velocidad especifica de crecimiento de incrementa de 0,03 a 0,05/h	Eroshin et al.,(2000)
Efecto de C/N sobre la morfología del pellet y producción de ARA	*Mortierella alpina* CBS 745.68	240	30-40					C/N > 20 tamaño pellet se incrementa en proporción a la razón C/N C/N <20 no hay efecto en la morfología	Koike et al., 2001
151 cepas aisladas para AGPI de cadena larga	thraustochytridos cepas 43B,46B					18,6			Barclay (1997)

Tabla 1.4 Producción microbiana de ácido araquidónico (ARA). **Adoptado de:** Ward & Singh (2005).

Estrategia	organismo	tiempo cultivo (h)	Biomasa /g/L)	DHA (g/L)	DHA biomasa %	DHA aceite %	Productividad g/Ldía	observaciones	referencia
Optimización de cultivo para producción de DHA	*C. cohnii*	72-120	20-40	2.0	20-30	~ 35	0,5	medio de glucosa deficiente en N, pH 7-7.8	Kyle.1994
Estudios en medios con glucosa ,EL, sales marinas	*C.cohnii*	91		1,6		43,6	0,52	produjo alto contenido de DHA en lípidos	de Swaaf et al., 1999
Estrategia C-fed-batch	*C.cohnii* acetato glucosa, etanol	400 400 220	109	19,0 11,7		 33	1,15 0,34 1,27	alta densidad de biomasa/DHA con acetato y etanol	de Swaaf et al., 2003
Thraustochytrium como potencial productor de DHA, desarrollo de cultivo	*T.aureum* ATCC34304	144	4,9	0,51	10,4	57	0,09	identificación inicial de T como productor de DHA	Bajpai et al., 1991
Estudios batch y fed-batch para aumentar la densidad celular y DHA	*T.roseum* ATCC 28210	B FB	10 17,1	0,1 0,12	10,2 11,7	53 48	0,21 0,17	mejoramiento de producción de biomasa y DHA	Singh & Ward.1997 Singh & Ward.1996
Estudios de optimización para producción de DHA	*S. limacinum* SR 21	120		>4			>0,8	incremento en rendimiento debido a tolerancia de Glucosa	Yokochi et al., 1998
Selección de 57 cepas para la producción de DHA	thraustochytridos	107	14	2,17	78	25	0,48	producción DHA estimulada por alta relación C/N,>1% glucosa inhibe a *T. aureum*	Bowles et al.,1999
Aislamiento de cepas de mangroves subtropicales	*S. mangrovei*	52					1,27	identificar sobreproductoras	Fan et al., 2001
crecimiento en medio sin NaCl selección de 151 nuevas cepas	cepas de *Thraustochytrium, Schyzochytrium*						1,08	sulfato de sodio redujo tamaño de agregados aislar sobreproductoras	Kyle.1997
Desarrollo de cultivos de alta densidad	cepas de *Schyzochytrium*	90-100	200	40-45	20-22	40	~10.0	alta producción biomasa/DHA controlando O2 y glucosa a <7 gL^{-1} pH y alimentación de N con NH_4OH	Baily et al., 2001

Tabla 1.5 Producción microbiana de ácido docosahexaenoico.(DHA).**Adoptado de:** Ward & Singh (2005).

Estrategia	organismo	tiempo cultivo h	biomasa g/l	EPA g/l	EPA biomasa %	EPA Aceite %	Productividad g/ldía	Observaciones	Referencia
Optimización producción EPA en cultivo batch, efecto razón S/V de reactor y Dilución sobre crecimiento yDHA.	*P. tricornutum*		4-6	0,08-0,13	~ 3,3	28-35	0,025	la unidad de cultivo más pequeña dio mayor velocidad de crecimiento	Yongmanitchai et al.,1992 Yongmanitchai & Ward. 1992
Efecto de la velocidad de dilución en fotobioreactor tubular de 50 l	cepas de thraustochytridos						0,047	maxima productividad a D de 0,36/día	Grima et al.,1994
Evaluación de ingeniería del fotorreactor en la producción de EPA	*P. tricornutum*						0,04	2 g/día de biomasa suponiendo que contiene 2% EPA	Mirón et al.,1999
caracterización y optimización de los parámetros de producción	*N.alba* ATCC 40775	100	40-50	0,5-1,25	1-3	3-5	0,1-0,3	fed-batch glucosa, control de glucosa/silicato tiempo duplicación celular 4-8 horas	Boswell et al., 1992
desarrollo de métodos de cultivo continuo	*N. laevis*						0,073	alimentado con glucosa	Wen & Chen. 2002
Desarrollo de sistema de "perfusion" para alimentar glucosa y remover productos tóxicos	*N.laevis*			1,1			bajo	alimentado con 50 gL^{-1} de glucosa	Wen & Chen.2002
Incremento en productividad de EPA en sistema de perfusion y reducción de efluente de glucosa	N.laevis						0,175	alimentación de 15 gL^{-1} de glucosa baja glucosa en efluente	Wen & Chen. 2002
Estudio sobre producción de EPA y caracterización de los medios de cultivo	*M. alpina* 1S-4	240		0,30	2,7		0,03	producción EPA a bajas T° lo que activa enzimas productoras de EPA	Shimizu et al.,1988
Estudios a bajas temperaturas utilizando aceite de linaza	*M.alpina*	240	43	0,6			0,06	incubación a 11°C, incremento de aceite a a 4%,incrementó rendimiento biomsasa /EPA	Bajpai et al., 1991 Bajpai et al., 1992 Bajpai et al., 1991
estudios de producción de EPA desde alfa linolénico por mutante deficiente en Δ-12 desaturasa	mutante deficiente en Δ-12 desaturasa de *M.alpina* 1S-4	240		1.0	6,4	20	0,1	condiciones:20° C,1% EL,3% aceite linaza,1% glucosa,90% EPA como TG	Jareonkitmongkol et al. ,1993

Tabla 1.6 Producción microbiana de acido eicosapentanoico.(EPA)**. Adoptado de:** Ward & Singh (2005).

La Tabla 1.7 muestra el ácido graso componente de ciertos productos comerciales y la fuente de origen.

Tabla 1. 7 AG poliinsaturados y sus fuentes

Producto	AGPI	Planta	Pescado	Microorganismo
Formula infantil	DHA, ARA			x
Formula infantil	GLA	x		
Embarazadas	DHA			x
Suplementos dietéticos adulto	DHA, EPA DHA ARA		x	x x
Aditivo alimento: queso, yogurt Cereales, aliños	DHA			x
Huevos	DHA		x	
Acuicultura	DHA EPA DHA DPA		x	x
Salud cardiovascular	DHA, EPA DHA		x	x
Aterosclerosis, hiperlipemia	EPA		x	
Eczema atópica, reumatismo Artritis, esclerosis múltiple, Esquizofrenia	GLA	x		
Esquizofrenia y ciertos canceres	EPA		x	

Adoptado de: Ward & Singh (2005).

1.4.4 Thraustochytridos como productores de DHA

Numerosos investigadores han reconocido el potencial biotecnológico de un grupo de microorganismos (thraustochytridos) para producir AGPIs específicamente DHA. La determinación de los perfiles de AG realizada con el objeto de aportar a su clasificación taxonómica, permitió considerar la posibilidad de su utilización en la producción microbiológica de AGPIs (Huang et al., 2003).

1.4.4.1 Ecología

Los thraustochytridos se desarrollan normalmente en estuarios y habitats marinos; poseen una amplia distribución geográfica (Antártida, Mar del Norte, India, Micronesia, Japón y Australia) (Raghukumar, 1988,1979; Lewis et al., 1999). Diferentes cepas se han aislado desde superficies de algas, detritus marino, fitoplancton, columna de agua oceánica, en los sedimentos incluyendo las profundidades del mar (Porter, 1990; Raghukumar et al., 2000; Raghukumar, 2002). Aunque se encuentran invariablemente en todos los ambientes marinos hasta ahora estudiados, rara vez se han aislado desde muestras de fitoplancton producto de su débil pigmentación. Sin embargo, pueden alcanzar niveles de hasta un 30% de la biomasa presente en una muestra de agua (Raghukumar et al., 2000), por lo que su incidencia en la trama trófica marina es significativa.

Una técnica rápida de detección directa utilizando microscopía de epifluorescencia y acriflavina ayudó a la cuantificación de thraustochytridos. La técnica de acriflavina fluorescente se basa en la excitación de la luz azul y el thraustochytrido fluórese en forma diferente, la pared (rojo) y el núcleo (verde-azul), esto hace posible diferenciarlos de otros microorganismos y del detritus (Kimura & Nagamuna, 2001)

Estos microorganismos muestran cambios estaciónales; su presencia, aumenta hacia la primavera (22 ° C alcanzados al comienzo de Junio, hemisferio norte) desde un promedio de

44 hasta 175 células cm^{-3}. Las altas temperaturas del verano parecieran tener un efecto negativo en el crecimiento (Bongiorni, 1998). En aguas costeras de Japón se encontraron densidades de $2,5 \cdot 10^3$ a $4,5 \cdot 10^4$ células L^{-1} (Kimura et al., 1999).

La abundancia de thraustochytridos planctónico fue estimada utilizando microscopía de epifluorescencia en 10^2-10^5 células L^{-1} comparada con 10^8-10^9 células L^{-1} de bacterioplancton. Tanto los thraustochytridos como las bacterias juegan un rol clave en la degradación y utilización de la materia orgánica en los ecosistemas marinos y están diferencialmente asociados con los blooms fitoplanctónicos. Estudios estacionales revelan que la biomasa de thraustochytridos es más abundante cuando este bloom decae, lo que sugiere un importante rol en la mineralización del detritus del fitoplancton y zooplancton en el mar (Raghukumar, 2002).

Los thraustochytridos y bacterias planctónicas también juegan un rol en la etapa inicial de la cadena alimenticia microbiana convirtiendo materia orgánica disuelta (submicrón) en partículas supra-micrón (células) las que son ingeridas por muchos microorganismos, tales como flagelados y ciliados, e incluso se ha sugerido que las bacterias son ingeridas por thraustochytridos (Raghukumar, 1992); ascendiendo en la cadena trófica una amplia gama de invertebrados (bivalvos, cangrejos, zooplancton) consumen thraustochytridos (Hammond et al., 2001).

Las bacterias podrían ser más importantes que los thraustochytridos en el comienzo de la cadena alimenticia en número y velocidad específica de crecimiento. Sin embargo, la célula de thraustochytrido de 4-20 µm es 85-21.400 veces más grande que una bacteria típica (Nagamuna et al., 2006) y su contenido de carbono es mayor por lo que su impacto es mayor que el de las bacterias en el reciclo de carbono. Con respecto a esto la relación C/N celular en thraustochytridos es 10,5 y en bacterias (5,9 -6,8) (Kimura et al., 1999).

Thraustochytrium kinnei, *T. rudimentale* y *S. aggregatum* se encuentran en aguas litorales y son habitantes regulares de sitios contaminados. Los thraustochytridos rara vez se observan sobre algas o fitoplancton vivo, tampoco pueden proliferar en algas pardas F*ucus serratus, Sargassum sinereum, Padina tetrostomatica,* posiblemente por los compuestos fenólicos que éstas poseen. La probabilidad de encontrar thraustochytridos en hojas vivas del alga verde *Thalassia testudinum*, son bajas probablemente debido a que los extractos de sus hojas contienen un antibiótico que inhibe el crecimiento de *Schyzochytrium aggregatum* (Raghukumar, 2002).

En relación con los sustratos animales, se ha reportado que muchos thraustochytridos crecen eficientemente sobre larvas de camarón. Además, se han encontrado como parásitos en pulpo, ostras, moluscos. Especies de *Schizochytrium*, se han encontrado asociadas a animales marinos, presumiblemente en una relación mutualista o de huésped ya que no hay evidencia de capacidad de producción de toxinas (Hammond et al., 2001).

Una de las razones para la capacidad de degradar diferentes sustratos es la producción de una amplia variedad de enzimas ya sean ecto o exo-enzimas. (Bongiorni et al., 2005) estudian las actividades enzimáticas involucradas en el rompimiento de proteínas, carbohidratos, lípidos y compuestos refractarios para entender su comportamiento en el hábitat marino de thraustochytridos. De las once cepas estudiadas el pool enzimático es bastante similar entre ellas y muestran una buena producción de lipasas, proteasas y un pobre pool de enzimas hidrolíticas de carbohidratos

1.4.4.2 Taxonomía

El género *Thraustochytrium* se observó por Sparrow en 1936 y en 1943; este investigador estableció que Thraustochytriaceae pertenecía a los Saprolegniales (Oomicytes) debido a su forma similar a los Chytridos. En el año 1975 Olive los clasificó como

Thraustochytriidae (= a Thraustochytriaceae) en un subphylum Labyrinthulina con Labyrinthulidae (=Labyrinthulaceae) basándose en su composición química, formación de pared celular y aspectos ultraestructurales de la red ectoplasmática. Este subphylum ha sido denominado de diferentes formas por otros taxonomistas (Honda et al., 1998). La mitad de las especies de la familia Thraustochytriidae informadas pertenecen al género *Thraustochytrium* (Mo, 2002). Actualmente la caracterización molecular, que utiliza el gen que codifica para la subunidad menor del RNA ribosomal (SSU rDNA o 18S rDNA) (Mo et al., 2001; 2002) ha sido usada para dilucidar la relación evolutiva y taxonómica de estos microorganismos (Huang et al., 2003). Los análisis de biología molecular han demostrado que no son hongos y que están relacionados con las algas heterokontas (Cavalier–Smith et al., 1994). Son miembros del **Reino Chromista** (Cavalier- Smith, 1993; Cavalier Smith ,1994) o **Straminipila** (Dick, 2001; Raghukumar, 2002). Fueron ubicados en Straminipila después del análisis de las secuencias del gen 18S rDNA, que mostró que los thraustochytridos junto a los Oomycetes son "hongos straminipila" y están relacionados con algas heterokontas tales como crisófitas y diatomeas (Bongiorni et al., 2005). Pertenecen al **phylum Heterokonta (Labyrinthulomycota)**, **clase Thraustochytridae (Labyrinthulomycetes)**, orden **Thraustochytriales**, familia **Thraustochytriaceae**, y se consideran actualmente seis géneros: ***Althornia, Schizochytrium*, *Thraustochytrium*, *Ulkenia*, *Japonochytrium, Aplanochytrium*.** (Yokohama & Honda, 2007)

Para aislarlos se utilizan medios con extracto de levadura, peptona micológica y agar. Se incuban a temperaturas generalmente cercanas a los 30° C y tiempos que van de 2 a 5 días. Las colonias presentan diferentes colores y rugosidades dependiendo de la especie. Otra técnica comúnmente utilizada es la inducción de la esporulación sobre polen de pino en agua de mar (Fan et al., 2002). Sin embargo, esta técnica no entrega los mismos resultados para todas las especies (Porter, 1990). Gaertner (1970) nota una variación morfológica en estos

microorganismos como consecuencia de las condiciones de cultivo. Menciona que en cultivo líquido y en agar se producen diferencias e inducen a anormalidades por exceso de nutrientes y por lo tanto propone el cultivo en agua de mar con polen como método estándar para el aislamiento de estos microorganismos (Goldstein, 1973).

Las paredes de los thraustochytridos son altamente adhesivas (Raghukumar et al., 2000) esta capacidad se ha utilizado para su separación. Los thraustochytridos penetran el polen de pino cuya pared está impregnada con esporopolenina la cual es muy recalcitrante y la degradan. Esta capacidad de degradar este tipo de compuestos fue utilizada por un ancestro común a muchas algas actuales y ha sido retenida por algunos microorganismos. En el caso de los thraustochytridos se sugiere que puede deberse a una larga historia evolutiva o a una adaptación muy especializada (Chamberlein y Moss, 1988).

1.4.4.3 Morfología

El Phylum Heterokonta (Labyrinthulomycota), clase Labyrinthulomycetes está compuesta de dos familias; Thraustochytriaceae y Labyrinthulaceae (labyrinthulidos). Los últimos pertenecen a un género Labyrinthula y se caracterizan porque sus células están rodeadas por una red ectoplasmática inmóvil en la cual ellos se mueven. Los Thraustochytriaceae (thraustochytridos) son células globosas aisladas o aglomeradas, no están interconectadas como los labyrinthulidos, poseen redes ectoplasmáticas inmóviles que anclan cada talo al sustrato. En los thraustochytridos la red no rodea las células y nace desde la base; son inmóviles, excepto las esporas que son biflageladas (Leander et al., 2004). (Fig. 1.11)

Los thraustochytridos se reproducen por medio de zoosporas heterocontas biflageladas (Fig 1.11) las cuales se depositan en sustratos que ofrecen nutrientes orgánicos. Las células vegetativas se desarrollan a partir de las zoosporas enquistadas en el esporangio (llamado sori). Morfológicamente pueden diferenciarse por el tamaño de los esporangios, la forma y el

número de zoosporas por cada esporangio (Mo, 2001). El género *Schizochytrium* se reproduce por división binaria formando díadas, tétradas y clusters. Los miembros del género *Ulkenia* desarrollan células ameboides (Fan, 2002; Raghukumar, 2002). Se ha comprobado que la caracterización morfológica es inestable y depende de las condiciones de cultivo por lo que debe acompañarse de otro tipo de caracterización, como biología molecular, perfil de AG, producción de pigmentos (carotenoides) (Mo, 2002; Huang et al., 2003;Yokohama y Honda, 2007).

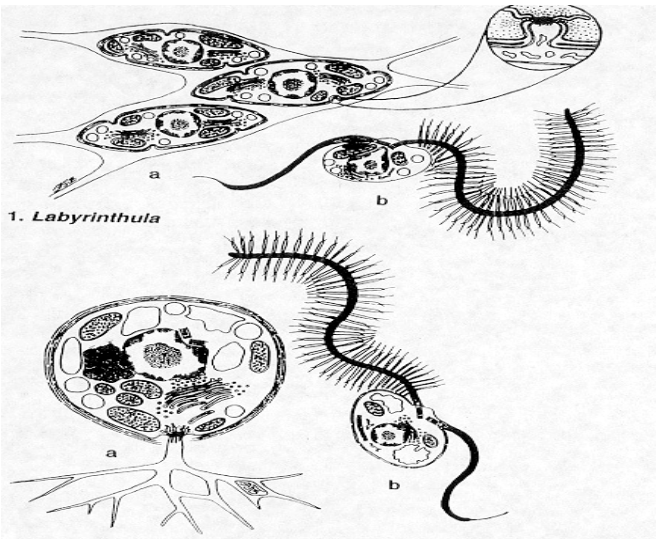

Figura 1.11. Abajo (a) talo joven de *thraustochytrium*;
(b) zoospora de *thraustochytrium.* **Adoptado de** Porter (1990)

Los thraustochytridos no pueden ser clasificados en el del Reino Fungi por poseer paredes celulares multilaminares, las que están formadas por escamas circulares derivadas del dictiosoma dispuestas en varias capas de polisacáridos sulfatados (galactosa y mucosa) en vez de quitina y proteínas (Chamberlain & Moss, 1988).

Estos organismos producen estructuras globosas asociadas con las redes ectoplasmáticas. La red ectoplasmática se compone de rizoides que son extensiones de la

membrana plasmática y están relacionadas a un organelo llamado sagenogenetosoma (Porter, 1990).

El citoplasma consiste de un retículo endoplasmático típico como también ribosomas y regiones membranosas que se segregan unas de otras. El retículo endoplasmático contribuye a aumentar el área superficial de la célula. Otro aspecto poco común es la presencia de mitocondrias con crestas tubulares. A continuación se muestran los géneros de thraustochytridos descritos:

1. ***Schizochytrium*** (Goldstein y Belski 1964) se caracteriza por un método diferente de reproducción asexual en la cual ocurren biparticiones sucesivas del talo.

2. ***Althornia*** (Jones y Alderman 1971) es caracterizada por ausencia de red ectoplasmática.

3. ***Ulkenia*** (Gaertner 1977) se distingue por la transformación de su célula vegetativa madura en una célula ameboide previamente a la división en zoosporas.

4. ***Japonochytrium*** (Kobayishi y Ookubo 1953) posee una estructura como apófisis no encontrada en otro género.

5. ***Aplanochytrium*** (Bahnweg & Sparrow 1972) se caracteriza por liberación de aplanosporas y movilidad de sus células vegetativas.

6. ***Thraustochytrium*** (Sparrow 1960) su contenido citoplasmático se divide directamente en zoosporas biflageladas. Las especies de este género se distinguen unas de otra por la presencia o ausencia de cuerpos de proliferación (rudimentos), forma y tamaño de las células y el modo de división en zoosporas. Se considera que el género *Thraustochytrium* puede dividirse en tres tipos dependiendo de su desarrollo:

a) especies que retienen uno o más cuerpos de proliferación. *T. proliferum, T. motivum, T. aureum, T. multirudimentale y T. kinnei.*

b) aquellas que carecen de cuerpos de proliferación *T. globosum, T. pachydermum, T. roseum, T. aggregatum y T. striatum.*

c) el tercer tipo cuenta con una especie *T. visurgense* en la cual la disolución de la pared del esporangio libera un protoplasto ameboide (Goldstein, 1973).

Banweg y Sparrow (1974) describen cuatro especies de *Thraustochytrium* colectadas de aguas antárticas (-2 a +4° C) y subantárticas (3 a 10° C) (Fig.1.12):

Thraustochytrium antarcticum sp. nov, *Thraustochytrium rossi* sp. nov., *Thraustochytrium kerguelensis* sp. nov y *Thraustochytrium ameboidum* sp. nov.

Thraustochytrium antarcticum sp. nov, desarrolla su esporangio el cual prolifera a partir de un rudimento basal, sus zoosporas son flageladas y se liberan del esporangio ocurriendo una desintegración completa de la pared.

T. rosii sp. nov. y *T. kerguelensis* sp. nov son similares y desarrollan su esporangio a partir de más de un rudimento basal. Estas especie liberan zoosporas flageladas, pero además liberan una masa de esporas individuales desde el esporangio las que permanecen inmóviles por unas horas.

El protoplasto de *T. amoeboidum* sp. nov deja el esporangio a través de un poro como un cuerpo ameboide, este a su vez produce amoeboesporas no flageladas, producidas por divisiones sucesivas. También se observan zoosporas lateralmente biflageladas.

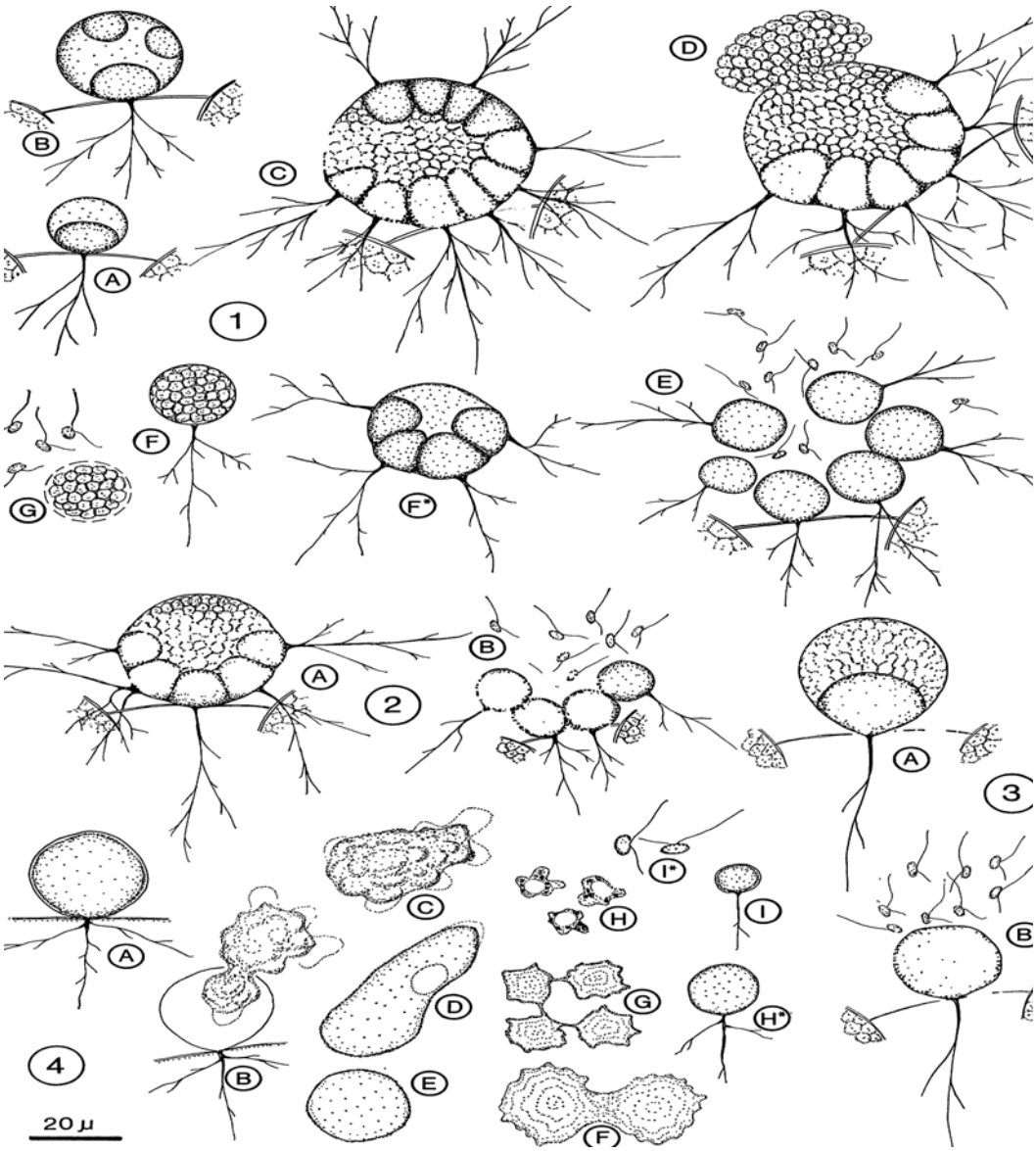

Figura 1.12…**Estados de desarrollo** de ***Thraustochytrium rossii*** (A) esporangio joven con un rudimento basal; (más rudimentos basales; (C) esporangio maduro que contiene un gran número de rudimentos el citoplasma se divide en esporas;(D) esporas no flageladas emergen a través de una porción apical en la pared del esporangio(E) zoosporas flageladas dispersándose después de la completa desintegración de la pared del esporangio(F) rudimento basal agrandado con todo el citoplasma dividido en esporas;(F´) agrandamiento del rudimento basal conteniendo nuevos rudimentos divididos del citoplasma;(G) masa de esporas inmóviles donde se ha desintegrado la pared.**2**. ***Thraustochytrium kerguelensis*** (A) esporangio maduro que contiene varios rudimentos basales, el citoplasma restante se divide en esporas;(B) zoosporas flageladas nadan hasta después de completa la desintegración de la pared del citoplasma; **3.** ***Thraustochytrium antarcticum*** (A) esporangio maduro;(B) zoosporas flageladas dejando el rudimento basal después de la completa desintegración de la pared del esporangio. **4**.***Thraustochytrium amoeboidum*** (A) esporangio maduro con el proptoplasto retraído desde la pared del esporangio;(B) protoplasto emergiendo desde el esporangio a traves de un poro en la pared;(C) protoplasto ameboie;(D) protoplasto euglenoide; (E) protoplasto redondeado;(F) protoplasto dividiéndose;(G) protoplasto dividido después de la segunda división; (H) amoeboesporas; (H*) esporangio joven desarrollado de célula hija sin formación previa de amoeboesporas o zoosporas;(I) esporangio joven desarrollado de amoeboesporas enquistadas; (I*) zoosporas. **Adaptado de**: Bahnweg & Sparrow (1974).

Un nuevo representante del género *Thraustochytrium*, *T.gaertnerium* se caracteriza por poseer un gran esporangio con dos ciclos de desarrollo diferente: uno con talo típico con elementos de red ectoplasmática en un zoosporangio que se divide en forma de zoosporas heterokontas biflageladas dejando un cuerpo de proliferación y un segundo tipo donde el talo que se desarrolla en forma de células ameboides, esto recuerda al género de *Ulkenia* Gaertner (Bongiorni et al., 2005). La caracterización molecular del gen 18S rDNA y el análisis filogenético indican que es una nueva especie y que se encuentra cercana a *Schizochytrium aggregatum* Goldstein y Belski y *Thraustochytrium kinnei* Gaertner.

Yokohama y Honda (2007) informan con respecto al género *Schyzochytrium* sensu lato, el cual se caracteriza por divisiones binarias sucesivas de sus células vegetativas, que la filogenia molecular sugiere fuertemente que este género no es un taxón natural ya que las cepas caracterizadas inicialmente forman tres grupos monofiléticos en el árbol generado por el gen 18S rDNA. Estos tres grupos se distinguen combinando sus características morfológicas, perfil de AG y pigmentos carotenoides. Por esta razón estos autores proponen tres nuevos géneros: *Schyzochytrium* sensu stricto, *Auriantiochytrium* y *Oblongichytrium* gen. novo (Yokohama & Honda, 2007).

1.4.4.4 Producción de AG

En los thraustochytridos la mitad del peso de su cuerpo corresponde a AGPIs ω3. Se encuentra en las paredes y membranas celulares del organismo y se almacena como material de reserva en forma de triacilgliceroles (Nichols, 2002). Los lípidos totales producidos están compuestos principalmente de lípidos neutros, que son los componentes principales del material de reserva y, los lípidos polares, que contienen fosfolípidos componentes primarios de las membranas celulares. En el caso de *Schyzochytrium* (Zeller et al., 2001) los lípidos

neutros comprenden: triacilgliceroles (90-92%), ésteres de esteroles (0,4%), diacilglicerol (1,0%), esteroles libres (1,0%), AG libres (0,1%). Con respecto a los lípidos polares, contienen un 5% de la composición de lípidos totales obtenidos en el fraccionamiento en columna de sílica gel. En *Thraustochytrium* sp. ATCC 26185, los fosfolípidos representan el 8% de los lípidos totales y el principal fosfolípido presente es la fosfatidilcolina (PC) (76% de los fosfolípidos). (Weete et al., 1997). En *Thraustochytrium* sp. KK17-3 el contenido de lípidos neutros, glicolípidos y lípidos polares como porcentaje de la biomasa es de 14,2; 1,3 y 4,4%, respectivamente (Huang et al., 2001). No se ha reportado el efecto del crecimiento en la distribución de los lípidos en estos microorganismos, sin embargo, en la última parte de la fase de crecimiento exponencial los lípidos de *S. mangrovei* FB3 son principalmente lípidos neutros (95,89%) de los cuales los triacilgliceroles corresponden a un 97,19%. El monoacilglicerol, diacilglicerol, AG libres y esteroles están presentes en los lípidos neutros, pero en pequeña proporción al igual que en los otros microorganismos previamente mencionados. Los fosfolípidos de *S. mangrovei* FB3 constituyen el 83,75% de los lípidos polares y el 3,45% de los lípidos totales. La fosfatidilcolina es el principal fosfolípido (47,78% de los fosfolípidos) seguido por la fosfatidiletanolamina; ambos se encuentran en diferentes proporciones en los microorganismos eucariontes marinos (Fan et al., 2007). Las diferentes formas en las cuales se encuentran estos lípidos obedece a las funciones que desempeñan en el microorganismo como por ejemplo el DPG o cardiolipin (difosfatidilacilglicerol) son importantes constituyentes de los lípidos de la mitocondria. Sabido es que la alteración en la composición de lípidos es en respuesta al estímulo del ambiente y es crítico para la sobrevivencia y la producción de compuestos basados en lípidos. Variaciones en la edad del cultivo, la temperatura y oxígeno disuelto hacen que ciertos thraustochytridos produzcan diferentes esteroles y escualeno. (Lewis et al., 2001; Jiang et al., 2004).

El DHA es el principal AGPIs producido por los thraustochytridos. La razón fundamental de la producción de DHA como lípidos de almacenamiento en estos protistas no está clara, aunque se cree que es crucial para la supervivencia. Jain et al., (2007) sugieren que los lípidos sirven como fuente de energía durante el movimiento de las células y la producción de la red ectoplasmática. El DHA almacenado en los lípidos se distribuye en la membrana del plasma cuando se forma la red ectoplasmática; el DHA es preferentemente utilizado como reserva de energía durante la privación de nutrientes, estos AGPis por sus características antioxidantes protegerían del stress oxidativo cuando no existen nutrientes en el medio; y por un mecanismo desconocido que da como resultado una fuerza de flotación negativa hace que se desplacen hacia ambientes favorables ricos en nutrientes.

Las células vegetativas maduras ricas en cuerpos lipídicos cuando están a punto de transformarse en ameboide. En algunas especies se ha verificado que cuando la ameba se moviliza, esta posee menos cuerpos lipídicos o no son detectables, sugiriendo que los lípidos se utilizan en la fase móvil (Jain et al., 2007). Cohen et al., (2000), postulan que los lípidos que son fuente de AG en las células frente a cambios ambientales rápidos necesitan formar membranas, una de ellas, la red ectoplasmática que es una extensión de la red membrana plasmática, bajo condiciones deficitarias de nutrientes es necesario su producción en forma rápida, lo que no ocurre en medios de cultivo ricos en nutrientes. Jain et al. (2007) sugieren que el DHA juega un importante rol en el almacenaje de lípidos de las células de thraustochytridos. Esta sería una fuente de energía más rápidamente disponible comparada con el otro ácido abundante, el ácido palmítico, y sirve de reserva cuando los lípidos de almacenamiento deben movilizarse a lípidos de membrana.

En cuanto al tipo de AGPIs en thraustochytridos, se han determinado seis categorías de perfiles DPA/DHA, EPA/DHA, EPA/DPA/DHA, AA/EPA/DHA, LA/AA/DPA/DHA, LA/AA/EPA/DHA (Jiang et al., 2004). Otra clasificación corresponde a DHA/DPA;

DHA/DPA/EPA; DHA/DPA/EPA; DHA/DPA/EPA/AA, DHA/DPA/EPA/AA más ácido docosatetraenoico (C22:4 ω6) (Huang et al., 2003).

1.4.4.5. Producción heterotrófica

Para que los microorganismos sean una alternativa biotecnológica técnicamente factible de producción de aceites microbianos, las cepas aisladas con potencial de producción de aceites ricos en AGPI con alto contenido de ω3 deben cumplir con algunas exigencias las cuales se pueden resumir en lo siguiente: ser capaces de crecer heterotróficamente, no filamentosas, termotolerantes, eurialinas, estas características son importantes para la producción en fermentadores a esto se suma la optimización de la producción de AGPI manipulando las condiciones y el medio de cultivo junto al mejoramiento del perfil de AGPI utilizando técnicas moleculares finalizando con técnicas eficientes de extracción y determinación de las condiciones apropiadas para el almacenaje de las células microbianas y/o sus productos. (Lewis et al., 1999; Barclay et al., 2005).

Muchos estudios han demostrado la habilidad de algunas cepas de thraustochytridos para producir gran cantidad de biomasa, una gran proporción de lípidos y dentro de éstos una gran proporción de AGPI, en especial los miembros de los géneros *Schizochytrium y Thraustochytrium* (Bowles et al., 1999).

La glucosa ha sido reportada como la fuente de carbono más utilizada por thraustochytridos aunque estos microorganismos pueden utilizar un amplio rango de fuentes de carbono y nitrógeno para su crecimiento. Existen trabajos en los que se ha seleccionado sustratos que permiten aumentar la cantidad de biomasa producida y el rendimiento de AG, especialmente DHA. Entre las fuentes de carbono evaluadas se encuentran fructosa, sacarosa, lactosa, maltosa, almidón, glicerol, aceite de oliva y linaza y como fuentes de nitrógeno

extracto de levadura, licor de maíz, polipeptona, sulfato de amonio, acetato de amonio, nitrato de amonio, nitrato de sodio y urea (Yokochi et al., 1998).

Yaguchi et al., (1997) en cultivos de *Schizochytrium* sp. SR21 alcanzaron 48 gL^{-1} de biomasa seca y 13 gL^{-1} de DHA en cuatro días de cultivo con 12% de glucosa; el contenido de lípidos fue un 77,5 % de la biomasa mientras que el contenido de DHA fue 36,5% de los AG totales. Yokochi et al., (1998) investigaron la producción de DHA por *Schizochytrium limacinum* SR21, la que mostró un buen crecimiento y rendimiento de DHA en glucosa, fructosa y glicerol. Además, se utilizó licor de maíz como fuente de nitrógeno y se verificó que una disminución en la concentración de nitrógeno aumentaba la concentración de AG en más de un 50%.

El uso de residuos para el crecimiento de estos microorganismos ha sido estudiado por Fan et al. (2001), ellos comunican el uso de desechos provenientes de una industria productora de leche de soja (medio Okara), este subproducto es rico en carbohidratos (52%), proteínas (27%) y grasas (12%). Todas las cepas de thraustochytridos estudiadas que utilizaron el medio Okara produjeron DHA en distintas proporciones, sobre todo las cepas de *Schizochytrium mangrovei*.

La producción de AG puede ser afectada por varias variables incluyendo la composición del medio y factores ambientales como agitación, aireación, pH y temperatura.

La salinidad condiciona el crecimiento y producción de lípidos. Yokochi et al. (1998) investigaron la producción de DHA por *Schizochytrium limacinum* SR21, la que mostró una amplia tolerancia a la salinidad entre 50‰ y 200‰ en agua de mar.

Baily et al., (2003) describen las condiciones para obtener alta productividad de DHA en cultivos de alta densidad. En estos la producción de una gran cantidad de biomasa se realiza en una primera etapa, la cual es seguida de la producción de lípidos en una segunda

etapa. Las fermentaciones duran entre 90 y 100 h, lográndose obtener concentraciones de biomasa sobre 200 g L^{-1}.

En diversas patentes (Barclay, 1992; 1994; 2001; Tanaka et al., 2003) se detalla el cultivo de cepas de *Thraustochytrium y Schizochytrium* y *Ulkenia* para la producción de aceites que son incorporados en alimentos que contienen AGPI ω3, utilizados en la acuicultura y como aditivos en la producción de huevos y en la formulación de alimentos infantiles.

En los últimos años las actividades de escalamiento de las fermentaciones para el desarrollo de tecnologías para producir DHA a partir de *Schizochytrium sp*. fueron realizadas por varias empresas, Biopolímeros Kelko de San Diego, una división farmacéutica de MERK y más tarde una división de Monsanto. Ellos comenzaron con fermentadores de laboratorio de 14 L con niveles de productividad de aproximadamente 22 g L^{-1} de biomasa en cultivos de 48 h utilizando 40 g L^{-1} de glucosa. Mediante programas de optimización de los medios de cultivo explotaron las fuentes alternativas de nitrógeno, mejoraron la producción de lípidos disminuyendo la salinidad , logrando concentraciones celulares de 65-70 g L^{-1} con DHA de 8 g L^{-1}. Posteriormente en el escalamiento se modificó la estrategia de alimentación por una de lote alimentado y utilizaron bajos niveles de oxígeno, esto estimuló la producción de DHA. Con respecto a la cosecha de la biomasa se recuperó directamente en tambores de secado evitando la centrifugación. Todo esto logró un rendimiento de biomasa mayor a 200 g L^{-1}.

Desde los fermentadores de 14 L a fermentadores comerciales de 150 m^3 se logró incrementar la concentración de biomasa desde 21 hasta 170-210 g L^{-1}, la concentración de aceite desde 26 hasta 35-45% del total de AGT, la concentración de DHA como porcentaje en la biomasa seca desde 10 hasta 22-25% y la productividad desde 0,05 hasta 0,45-0,55 g $(L\ h)^{-1}$ (Barclay et al., 2005).

Los thraustochytridos también son una fuente potencial de otros compuestos de interés comercial: carotenoides tales como β-caroteno, canthaxantina, astaxantina y equinenona. Cepas como KH105 perteneciente al género *Schizochytrium* aislada como productora de DHA acumulan niveles importantes de betacaroteno y xantofilas (canthaxantina y astaxantina). Esto ocurre en un medio que contiene 10% de glucosa y aproximadamente 0,3% de una fuente de nitrógeno en agua de mar después de 4 días de cultivo. Como producto se obtiene 6,1 mg L^{-1} de astaxantina y cuando se aumentó la concentración de nitrógeno a 6% la producción de canthaxantina aumentó a 10 mg L^{-1} (Aki et al., 2003). Carmona et al. (2003) también han identificado carotenoides en cultivos de la cepa CHN-1 perteneciente a *Thraustochytrium,* esta cepa presenta pigmentación anaranjada y contiene como principal carotenoide la astaxantina. Estos investigadores encontraron que la cantidad extraída de carotenoides aumenta con la edad del cultivo y que además es función de variables físicas como pH, temperatura y factores nutricionales.

Estudios recientes han demostrado que cepas de thraustochytridos también pueden sintetizar esteroles, escualeno y polisacáridos extracelulares (EPS). (Lewis et al., 2001; Jiang et al., 2004; Jain et al., 2005).

1.5 Discusión

Diversos estudios clínicos han demostrado la importancia del consumo de AGPIs ω3 por sus efectos en la salud humana y animal. Actualmente la principal fuente de obtención de estos AG son los peces marinos y sus aceites. La demanda por aceite de pescado está determinada por el crecimiento continuo de la acuicultura (FAO 2004). El aceite de pescado es un recurso finito y para el año 2010 se estima que más del 90% del suministro del aceite será usado como aditivo en el alimento para el sector acuícola. Un número de

investigaciones ha demostrado que los AGPIs son componentes esenciales en la formulación de alimentos empleados en acuicultura, dirigida tanto en alimentos para peces como para larvas de crustáceos. Normalmente la dieta para el cultivo de muchas especies marinas requiere alrededor de 1 a 2% p/p de AGPIs de cadena larga (Rees et al., 1994; Salhi et al., 1994). Además se ha establecido que el aceite de pescado no puede ser reemplazado por aceites vegetales ya que éstos carecen de DHA y EPA. Dados los volúmenes que este sector demanda, la única fuente sustentable de obtención son aceites vegetales, para lo cual deben desarrollarse vegetales capaces de acumular AGPI de cadena larga. Otro sector que demanda AGPIs de cadena larga es la industria de los nutraceúticos y de aplicaciones biomédicas. Dados los especiales requerimientos de este sector (un solo ácido graso) alternativas diferentes a los vegetales deben ser identificadas.

Los esfuerzos realizados en los últimos años se han dirigido hacia el desarrollo de tecnologías para producir aceites microbianos (Single Cell Oils). Los esfuerzos se han realizado en la producción de ARA, EPA y DHA Las tecnologías desarrolladas con microorganismos heterotróficos los cuales sintetizan *de novo* AGPIs ω3 y ω6 son una alternativa comercial posible para producir biomasa rica en AGPIs y aceites. Los thraustochytridos, microorganismos marinos ampliamente distribuidos en diferentes habitats son capaces de producir AGPI especialmente DHA (Lewis et al., 2001; Jiang et al., 2004).

Estos microorganismos poco conocidos y estudiados principalmente desde la perspectiva ecológica producen AG con perfiles relativamente simples (1 hasta 3 AGPI), y es posible su cultivo heterotrófico, principalmente las cepas del género *Thraustochytrium* y *Schizochytrium*.

En los últimos 15 años el desarrollo de tecnologías ha tenido un avance notable, se han encontrado cepas con potencial comercial (Vazhappilly & Chen, 1998; Bowles et al., 1999; Burja et al., 2006) y se ha reportado la optimización de las técnicas de cultivo (Yokochi et al.,

1998); Wu et al., 2005); Yaguchi et al., 1997). A pesar de ello se desconocen diversos aspectos de su metabolismo, regulación de la síntesis y acumulación de AGPI, producción de otros metabolitos de interés comercial (Qiu, 2002; Sayanova & Napier, 2004; Ratledge, 2002; 2004; Morita et al. 2005; Jain et al., 2007).

Si el interés por los SCO en los años 60 era principalmente académico, actualmente el sector de la población informado de los beneficio del consumo de AGPIs genera la demanda que podría hacer económicamente factible la producción de aceites microbianos. Entre estos productos se encuentran el DHA de *Crypthecodinium,* ARA de *Mortierella* y DHA de *Schyzochytrium.*

1.6 Conclusión e Investigación propuesta

En los últimos años se ha obtenido evidencia científica de la importancia en la dieta humana y animal de los AGPI ω3 tales como EPA y DHA. Su consumo contribuye al desarrollo del cerebro infantil y la mantención del funcionamiento normal del cerebro adulto, podrían prevenir enfermedades cardiacas y de origen inflamatorio. Actualmente la principal fuente de obtención industrial de AGPI es el aceite de pescado. La producción de AGPI de cadena larga a partir de aceite de pescado presenta desventajas, baja concentración, contenido de vitaminas solubles en aceite que pueden originar problemas de salud y contenidos de AGPI ω6. Esta variada composición influye en la recuperación y purificación de DHA u otro AG esencial. Además, presenta problemas de calidad, estabilidad y posee ese peculiar sabor y olor que limita su uso como fuente de AGPI ω3 de uso farmacológico, principalmente EPA y DHA.

Se ha estimado que para el año 2010 el aceite de pescado necesario para suplir las necesidades de la industria acuícola representarán alrededor de 1,2 millones de toneladas o sea aproximadamente un 92% de la producción mundial. Se debe señalar que además se prevé una demanda de cerca del 10% de la producción mundial de aceite para otro tipo de productos (farmacéuticos / nutricionales) (Miller et al., 2007). Surge por lo tanto la necesidad de evaluar fuentes alternativas para la obtención de AGPI ω3 y desarrollar tecnologías para una producción a gran escala que cumplan con las exigencias de calidad necesaria para cada uno de los productos.

Los microorganismos heterotróficos del orden Thraustochytriales, familia Thraustochytriidae se presentan como una nueva fuente atractiva de AGPI ω3. Estos microorganismos poseen la capacidad de acumular grandes proporciones de DHA y EPA en sus lípidos. Aunque el cultivo de thraustochytridos a escala industrial parece tener un gran potencial, es necesario disponer de cepas con mayor capacidad de producir cantidades

importantes de biomasa, optimizar los procesos de producción de aceite y ajustar las características del producto a las especificaciones de mercado.

1.6.1Hipótesis

Los microorganismos eucariontes pertenecientes al Orden Thraustochytriales se encuentran ampliamente distribuidos en diversos ambientes marinos y dado que diferentes especies se caracterizan por producir DHA

Entonces, es posible encontrar cepas de estos microorganismos que produzcan DHA en la zona costera de Puerto Montt. Además, a través de la manipulación de las condiciones de cultivo incrementar los rendimientos de biomasa y DHA.

1.6.2 Objetivo general

Identificar microorganismos del orden Thraustochytriales provenientes de la zona costera de Puerto Montt, Chile que posean capacidad de crecer heterotróficamente en cultivo y producir DHA.

1.6.3 Objetivos específicos

1.- Recolectar, aislar e identificar microorganismos heterotróficos del orden Thraustochytriales provenientes de zona costera de Puerto Montt, Chile.

2.- Determinar el potencial de producción de DHA en un medio basal, en los microorganismos aislados y seleccionar la cepa que presente la mayor concentración de DHA.

3.- Determinar el efecto de los parámetros: temperatura, salinidad y pH; concentración de la fuente de carbono (glucosa) y la fuente de nitrógeno (glutamato monosódico), en la producción de biomasa y DHA en la cepa nativa seleccionada.

CAPÍTULO 2

AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE NUEVOS MICROORGANISMOS MARINOS, ORDEN THRAUSTOCHYTRIALES DESDE EL ESTUARIO DE RELONCAVÍ, PUERTO MONTT, CHILE.

2.1 Resumen

Los protistas heterotróficos del phylum Heterokonta (Labyrinthulomycota), orden Thraustochytriales se encuentran distribuidos ampliamente en diferentes ambientes marinos y se encontraron en la zona costera de Puerto Montt, Estuario de Reloncaví, Chile. Se utilizó la metodología de aislamiento en polen de pino y una estrategia de identificación basada en tres métodos complementarios: morfología, amplificación de la subunidad menor del ARN ribosomal (18S rDNA) y capacidad para producir ácido docosahexaenoico (22:6 ω3, DHA). De 46 cepas que presentaron las características morfológicas de Thraustochytriales (phylum Heterokonta), 16 cepas presentaron el perfil de producto de PCR característico (tres bandas con tamaños entre 520 y 650 bp). Sin embargo, 6 de las 16 cepas, tuvieron la capacidad de producir DHA (0,09 -33,8 mg L^{-1}) bajo condiciones no optimizadas de crecimiento en medio basal (1% de glucosa, 0,4% extracto de levadura, agua de mar al 70%).

2.2 Introducción

Los microorganismos heterotróficos pertenecientes al phylum Heterokonta (Labyrinthulomycota), orden Thraustochytriales, se encuentran en ambientes marinos y estuarios. Se han reportado en numerosos hábitats, incluyendo la superficie de algas vivas, detritus marino, fitoplancton, columna de agua, sedimentos, e invertebrados, aunque tienden a concentrarse principalmente en sedimentos y en la columna de agua (Raghukumar et al., 2000). Distintas cepas han sido aisladas desde la Antártica, Mar del Norte, India, Micronesia, Japón y Australia (Lewis et al., 1999).

Las células de Labyrinthulomycota son de forma aguzada o globosa. Estos microorganismos producen una red ectoplasmática cuya finalidad es absorber nutrientes desde los sustratos (Porter, 1989). La clase Labyrinthulomycetes está compuesta de dos familias; Thraustochytriaceae (thraustochytridos) y Labyrinthulaceae (labyrinthulidos) estos últimos pertenecen a un género Labyrinthula, los que se caracterizan por células rodeadas por una red ectoplasmática inmóvil en la cual ellos se mueven. Los Thraustochytriaceae son células globosas aisladas o aglomeradas, no están interconectadas como los labyrinthulidos, poseen redes ectoplasmáticas inmóviles que anclan cada talo al sustrato. En los thraustochytridos la red no rodea las células y nace desde la base; son inmóviles, excepto las esporas que son biflageladas (Leander et al., 2004).

Los thraustochytridos tienen diversos cuerpos de proliferación en el esporangio los cuales permanecen después de la salida de las esporas. Las células están rodeadas por paredes multilaminadas compuestas de delgadas escamas las cuales son sintetizadas dentro del dictiosoma del Golgi (Chamberlain & Moss, 1988). Hasta ahora, seis géneros de thraustochytridos han sido descritos: *Schyzochytrium, Althornia, Ulkenia, Japonochytrium, Aplanochytrium* y *Thraustochytrium*. En el último género, 13 especies han sido identificadas (Bongiorni et al., 2005). El género *Althornia* se caracteriza por especies que carecen de un sistema de red ectoplasmática. Los miembros del género *Schyzochytrium* se multiplican por bipartición de una célula vegetativa formando díadas, tétradas y cluster, mientras que el citoplasma escapa como una masa ameboide previa a la liberación de zoosporas en miembros del género *Ulkenia* (Fan et al., 2002). Las especies pertenecientes al género *Japonochytrium* se caracterizan porque poseen una estructura como apófisis no encontrada en otros géneros (Sparrow, 1960). *Aplanochytrium* posee un esporangio globular y paredes multilaminadas, se caracteriza por liberar aplanosporas y tener movilidad las células vegetativas (Leander y Porter, 2000). Las células no están interconectadas, pero se unen en forma de amebas.

Algunos miembros del phylum Heterokonta son capaces de producir ácidos grasos poliinsaturados (AGPIs) (Nichols, 2002, Kumon et al., 2003; Kumon et al., 2005). Entre ellos los thraustochytridos son los más estudiados debido a su capacidad para producir DHA. El contenido de DHA en algunas especies de *Thraustochytrium* y *Schyzochytrium* representa entre el 25 al 60% de los ácidos grasos totales (AGT) (Yaguchi et al., 1997). Sin embargo, la biomasa y producción de DHA dependen significativamente de las condiciones de crecimiento. Bajo condiciones de crecimiento optimizada las concentraciones de biomasa se encuentran entre 170 y 210 g L^{-1} con 40 a 50 g L^{-1} de DHA (Bailey et al., 2003).

En la búsqueda de nuevas cepas, la caracterización morfológica es la primera etapa. Sin embargo, debido a la plasticidad morfológica del género causada sobre todo por las condiciones de cultivo, esta caracterización morfológica generalmente no es suficiente. (Mo et al., 2002). La caracterización molecular utilizada para explicar relaciones evolutivas y taxonómicas de estos microorganismos es una técnica que puede ayudar en la identificación y clasificación de nuevas cepas. El gen que codifica la subunidad menor ribosomal RNA es el estándar utilizado para este propósito. En la búsqueda de cepas productoras de DHA, el perfil de ácidos grasos es la característica más importante y se ha comprobado que este perfil permite agrupar estos microorganismos con una aproximación muy cercana a la que se obtiene en términos de su secuencia 18S rDNA (Huang et al., 2003).

El objetivo de este capítulo es mostrar los resultados obtenidos en el proceso de aislamiento e identificación de nuevas cepas de thraustochytridos (phylum Heterokonta) orden Thraustochytriales desde el Estuario de Reloncaví (Zona costera de Puerto Montt, Chile). Para su identificación se utilizó en forma secuencial la observación morfológica, amplificación de la subunidad menor ribosomal RNA y capacidad de producir DHA. Este trabajo tiene relevancia como una primera etapa en la búsqueda de cepas nativas y en el

conocimiento de su comportamiento heterotrófico en sistemas cerrados con el objetivo final de disponer de cepas con potencial de producción comercial de AGPI, específicamente DHA.

2.3 Material y Métodos

2.3.1 Toma de muestras y aislamiento de microorganismos

Muestras de agua y sedimento fueron colectadas desde 5 sitios de muestreo en el seno de Reloncaví (Coihuin, Chinquihue, Panitao, Huito y Cochamó) Figura 2.1, zona costera de Puerto Montt, sur de Chile (41º28'18"S y 72º56'24"W). La salinidad y temperatura promedio del agua en la época de muestreo fueron de 30‰ y 12,89 ± 2,70 º C respectivamente.

El aislamiento fue realizado por la técnica de polen de pino (Raghukumar, 1992); a una muestra (10 mL) de agua de mar se agregó un loop de polen de pino. La incubación fue realizada durante un periodo de 3 a 10 días a 20º C. La presencia de microorganismos adheridos al polen fue comprobada en microscopio de luz (Zeiss, Estándar 20, Germany). Los granos de polen con microorganismos fueron recuperados por filtración (filtro de nylon, 20 μm de mesh). El polen colectado fue sembrado sobre agar - medio B [extracto de levadura (Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, England) 2g L^{-1}, peptona (Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, England) 2 g L^{-1}, agar (Becton, Dickinson and Company Sparks, MD 21152 USA) 10 g L^{-1}] preparado en agua de mar al 70 % (promedio salinidad de agua de mar local como referencia 30 ‰). Estreptomicina y penicilina G (SIGMA-ALDRICH Co. Chemie GMBH P O .1120, 98552 Steinheim, Germany) fueron adicionados (300 mg L^{-1} de cada uno) para eliminar la flora bacteriana acompañante. La incubación se realizó a 25º C.

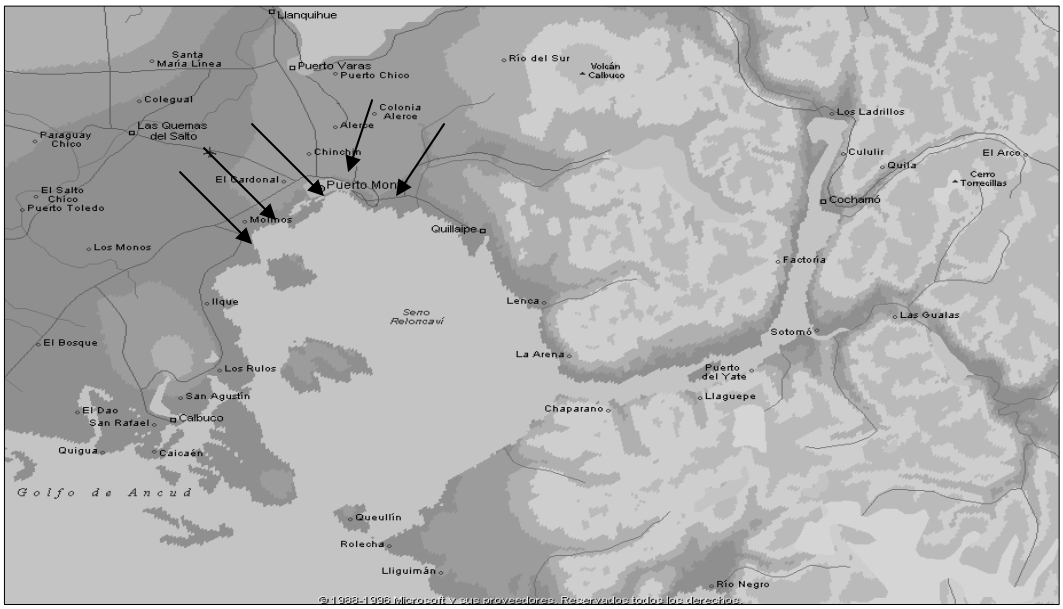

Figura 2.1 Sitios de colecta de cepas nativas . Estuario de Reloncaví, Puerto Montt, Chile. Las flechas indican la localización de Cochamó, Coihuin, Chinquihue, Huito, Panitao.

2.3.2 Extracción de ADN

Colonias tomadas desde los cultivos crecidos sobre agar-medio B fueron suspendidas en 200 µL de agua destilada. Para la extracción del ADN la muestra fue calentada (80 º C, por 10 min) y sonicada por 10 min (Transsonic T 460, Elma, Germany). La solución fue centrifugada (3500 g, 10 min) descartándose el precipitado.

2.3.3Ensayo PCR

5 µL de la solución de ADN se mezcló con una solución 5 mM de deoxynucleosido trifosfato (dATP, dCTP, dGTP y dTTP, Biotools deoxynucleotido mix B&M Labs SA Spain) (2,5µL), 5U de DNA polymerasa (Biotools B&M Labs SA Spain) y 1,25 µM de cada partidor (FA1RA1, FA2RA2, FA3RA3; Mo et al., 2002) en buffer de reacción. Para la amplificación (Termo electron Corporation, USA) se utilizó el siguiente programa cíclico: denaturación 3 min, 95º C, 35 ciclos de amplificación (1 min a 94º C, 1 min a 50º C y 1 min a 72º C), con una etapa de elongación de 10 min. Los productos de PCR fueron corridos en gel de agarosa a 120 V y visualizados (UV- transilluminator UVP, USA).

2.3.4 Secuenciación

Los productos de PCR fueron purificados utilizando el Kit de extracción V-Gene (Biochtecnology Limited, Zhejiang China) y posteriormente secuenciados (ABI- 3100, Applied Biosystem, California, USA). Las secuencias fueron usadas para identificar los microorganismos, comparándolas con secuencias de microorganismos disponibles en la base de datos del banco de genes (Tabla 2.2) (GenBank database) (Nacional Center for Biotechnology Information, USA: NCBI Home page http://www.ncbi) La búsqueda para las secuencias homólogas más cercanas fue realizada utilizando el programa BLAST (Altschul et al., 1990) disponible en NCBI web servidor.

2.3.5 Análisis filogenético molecular

Secuencias del 18S rDNA de microorganismos relacionados fueron obtenidos desde el GenBank database (Nacional Center for Biotechnology Information, USA: NCBI Home page http://www.ncbi). Las secuencias nuevas fueron alineadas contra secuencias conocidas mediante el programa computacional Clustal W. 1.74 (Thompson et al., 1994). Las posiciones de las bases faltantes ó ambiguas fueron removidas de la secuencia.

El árbol filogenético fue generado utilizando los métodos descritos por Saitou (NJ) (Saitou and Nei, 1987) y Felsenstein (ML), de máxima verosimilitud (Felsenstein, 1984), y contrastado con *P.micans.*

2.3.6 Preparación de inóculos y cultivo

Para la producción de biomasa se usó medio basal B1 [10% de glucosa (Oxoid Ltd, Basingstoke, Hampshire, England y 0,4% extracto de levadura (Oxoid Ltd, Basingstoke Hampshire, England] en agua de mar al 70%. El cultivo fue crecido en matraces con 50 mL

de medio B1 (pH 7,0) a 25 º C por 72 h, en triplicado. Para la preparación del preinóculo se tomaron dos bandas de agar de aproximadamente (1cm x 2 cm) las que fueron transferidas al medio de cultivo. Estreptomicina y penicilina G [SIGMA-ALDRICH Co. Chemie GMBH P O.1120,98552 Steinheim, Germany (300 mg L^{-1} de cada uno)] se utilizaron para prevenir crecimiento bacteriano. El cultivo fue incubado por 48 h a 25º C y 180 rpm. El inóculo fue preparado en un matraz erlenmeyer de 250 mL conteniendo 50 mL de medio B1. Este cultivo fue crecido a 25° C y 180 rpm (Labtech, modelo LSI -3016R) por 48 h. Un 5%(v/v) aprox. de este cultivo (OD_{600} = 0,4) fue utilizado para inocular los matraces que contenían 50 mL de medio basal B1. Los resultados se informan como valores promedios basados en tres réplicas de cultivos simultáneos ± desviación estándar.

Crecimiento celular

El volumen de cultivo fue asépticamente centrifugado (4000g, 10 min). El pellet fue lavado dos veces con agua destilada y centrifugado. La biomasa recuperada fue liofilizada, pesada y almacenada a – 20° C hasta su análisis.

2.3.7 Análisis de composición de DHA

Muestras (20 a 50 mg) de biomasa liofilizada fueron usadas para transesterificación directa (Lewis et al, 2000). Los esteres FAMES en la capa de hexano fueron centrifugados y colectados a 4º C. El análisis de DHA se realizó en cromatógrafo de gases (FOCUS-Finnigan) acoplado a detector de masas (DSQ-Finnigan), equipado con una columna capilar ultra 1 de 30 m de longitud y 0,25 mm de diámetro interno. La temperatura inicial fue de 40º C ram 5º C/ min temperatura final 300. El gas transportador fue helio.

2.4 Resultados

2.4.1 Aislamiento y Descripción morfológica de los aislados

En la etapa de aislamiento los microorganismos que se adhirieron al polen de pino después de 3 - 10 días; se cultivaron en placas con medio B sin glucosa para evitar la proliferación de levaduras. Después de 4 -7 días se presentaron colonias aisladas y colonias en forma de crecimiento continuo. Las colonias presentaron diversas coloraciones: rosa (cepa H4) amarilla (cepa G4), blanca (cepas A4, M12-X), crema opaca (cepa C4, B4). El crecimiento en estado sólido se caracterizó además por la textura de las colonias desde cremosas (cepa M12-X) hasta una apariencia dura y de forma esférica muy definida (cepas C4, G4). Algunas de ellas fueron capaces de penetrar el agar como es el caso de las cepas A4 y B4. La eliminación de la flora bacteriana fue bastante difícil y en el caso de la cepa B4 no fue posible obtener un cultivo puro.

La cepa C4 presentó morfología con esporangios globosos de aspecto granular con 2, 3 y 4 divisiones en las diferentes etapas de desarrollo. En la periferia de los cluster se visualizaron zoosporas móviles y el sori alcanzó tamaños de hasta 20 µm. Se visualizaron células vegetativas de paredes delgadas con inclusiones. En medio líquido esta cepa presentó esporangios de gran tamaño y el citoplasma se observó claramente dividido en futuras zoosporas. Otra característica fue la tendencia a formar aglomerados durante el crecimiento en el medio basal los que sedimentaban al no haber agitación.

La cepa M12-X presentó esporangios de diferentes tamaños alcanzando valores de hasta 40 µm. El esporangio presentó varias formas y en algunos casos se observó material desigualmente distribuido, con aspecto granular y con divisiones. Se observó claramente esporangios piriforme a ovalados como lo describen Bongiorni et al. (2005) para *T. kinnei*

La cepa H4 presentó esporangios con aspecto granular, células vegetativas pequeñas y formación de tétradas. La cepa B4 presentó especies de mallas con células pequeñas

diferentes. En la cepa A4 junto a esta especie de malla se concentraban células de aspecto globoso más pequeñas que las encontradas en otras cepas. La cepa G4 se presentó en agrupamientos con formas poco regulares en las placas de agar. En ninguna de las especies descritas se observó la formación de red ectoplasmática. En la Figura 2.2 se muestra algunas fotos de las cepas nativas aisladas en distintas etapas de desarrollo.

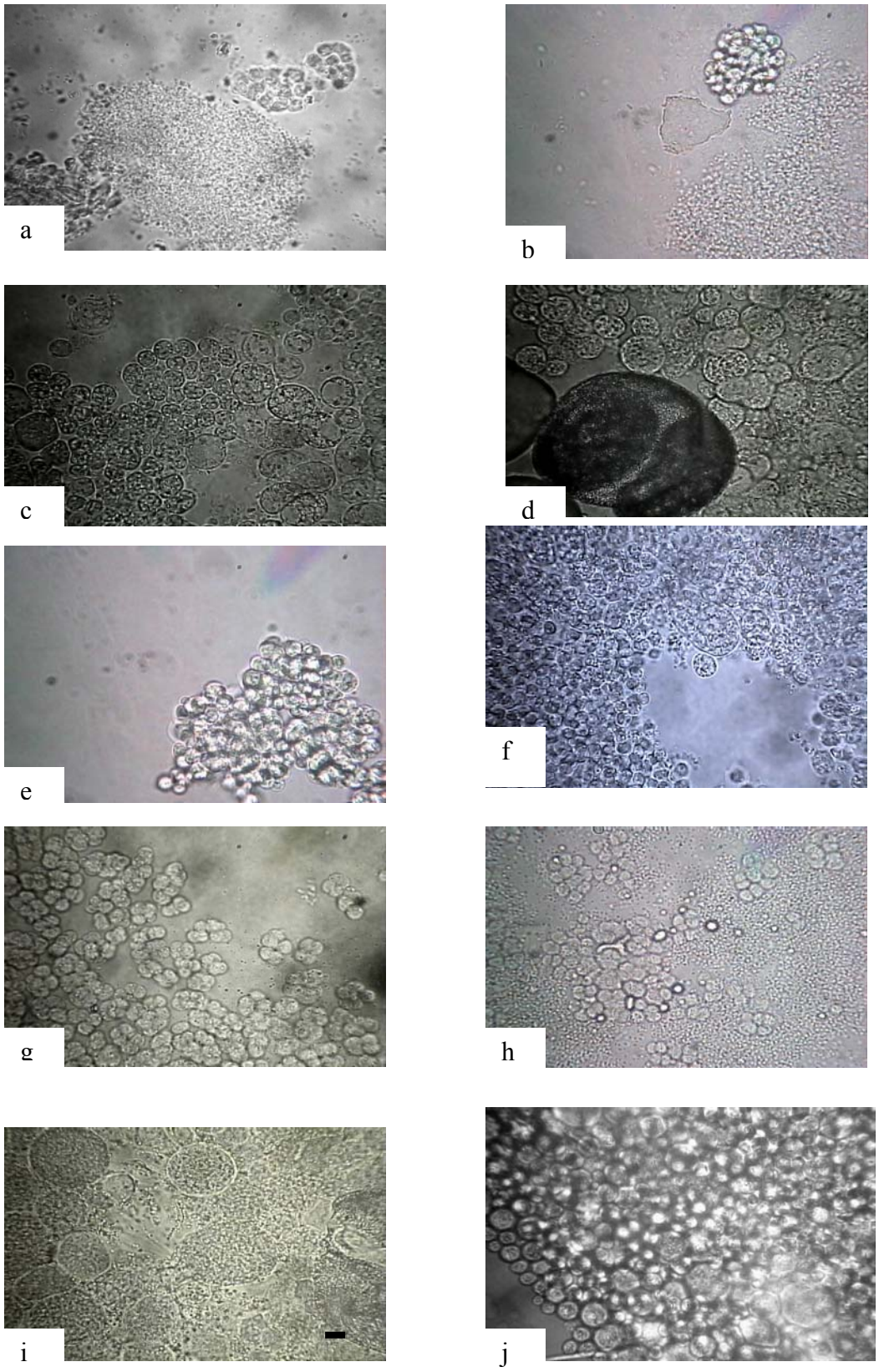

Figura 2.2 . cepa A4 (a), cepa B4 (b), cepa C4 (c) ,C4 en polen de pino (d), C4 medio líquido(e), cepa G4 (f), cepa H4 (g), H4 medio líquido(h), M12-X placa agar (i) ,M12-X médio líquido (j) (▬ barra 10µm)

2.4.2 Productos de PCR

Para las 46 cepas aisladas que presentaron las características morfológicas reportadas para thraustochytridos, se utilizó la amplificación del gen 18S rADN usando un conjunto de tres pares de partidores (FA1RA1, FA2RA2, FA3RA3) diseñados sobre el alineamiento de la secuencia de 18S rADN de cepas conocidas (Mo et al., 2002). La Figura 2.3 muestra los resultados obtenidos para algunas de las 16 cepas que presentaron el perfil de tres bandas entre 520 y 650 bp aproximadamente. En esta figura se muestran algunos de los casos en que los resultados obtenidos fueron considerados negativos.

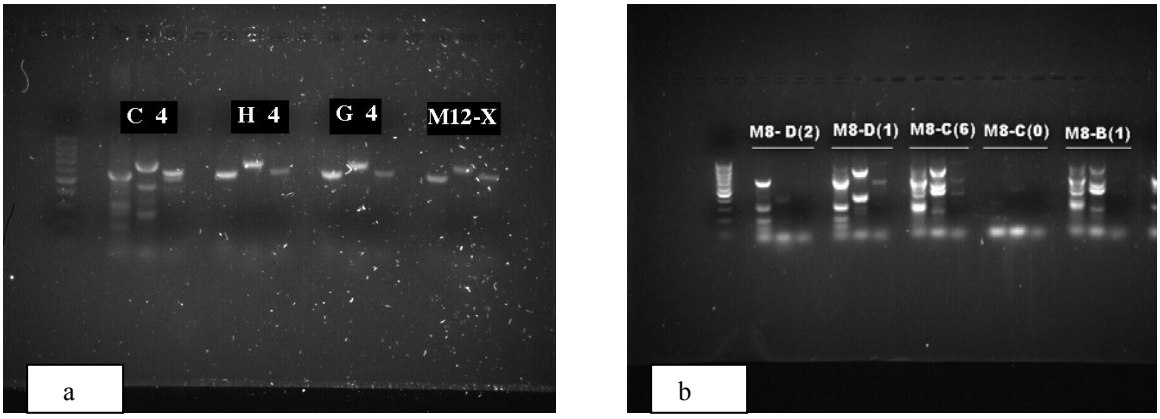

Figura 2.3. Productos de PCR de muestras de ADN de cepas aisladas a) cepas positivas (3 bandas) y b) cepas negativas (bandas múltiples)

2.4.3 Producción de biomasa y DHA

Las concentraciones de biomasa obtenidas en el cultivo en medio líquido de las seis cepas seleccionadas se muestran en la Tabla 2.1. En la Tabla 2.2 se muestran los principales ácidos grasos presentes en las cepas nativas. En la Figura 2.4 se muestran los perfiles de AGPI en la biomasa en los cuales se indica la presencia de DHA.

Todas las cepas crecieron en medio líquido basal con excepción de la cepa A4. La cepa M12-X produjo mayor cantidad de biomasa y un mayor porcentaje de DHA (44%) en los ácidos grasos totales (AGT). Todas las cepas presentaron ácido palmítico (16:0, PA) y DHA.

La cepa B4 y M12-X presentan el ácido graso C14:0, las cepas B4, H4 y M12-X producen C15:0, y la cepa H4 produce C17:0. Solo la cepa C4 presenta ácido araquidónico (20:4 ω6, ARA) y EPA es producido por la cepa C4 y M12-X.

Tabla 2.1. Concentración celular y producción de DHA en medio Basal (glucosa 1%, extracto de levadura (EL) 0,4% en agua de mar al 70%.Condiciones de fermentación: pH 7.0, 25° C,180 rpm (los valores representan el promedio de tres determinaciones)

Cepas	Biomasa gL^{-1}	% DHA en los AGT	DHA en biomasa mgg^{-1}	DHA mgL^{-1}
A4	-	N.D	N.D	N.D
B4	0,03 ± 0,05	10.2	3,21 ± 0,46	0,10 ± 0,06
C4	0,57 ± 0,04	24,8	28,40 ± 2,00	16,14 ± 1,30
G4	0,08 ± 0,01	16,3	7,11 ± 0,17	0,56 ± 0,06
H4	0,11 ± 0,03	10,2	11,62 ± 1,34	1,32 ± 0,48
M12-X	0,89 ± 0,03	44,3	36,20 ± 0,46	31,05 ± 0,74

N.D no creció en medio líquido

Tabla 2.2 Composición de ácidos grasos de 5 cepas aisladas y cultivadas en medio Basal (glucosa 1%, extracto de levadura 0,4% en agua de mar al 70%.Condiciones de fermentación: pH 7.0, 25° C, 180 rpm .

Cepas	**Ácidos grasos(% AGT)**								
	14:00	15:00	16:00	17:00	18:00	20:04	20:05	22:06	otros
B4	5,1	19,7	28,1		4,2			10,2	32,7
C4			24,4			18,2*		24,8	32,6
H4		9,2	6	6				46,4	32,4
G4			9,4					16,3	74,3
M12-X	4,3	7,7	20,9				12,8	44,0	10,3

* EPA y ARA

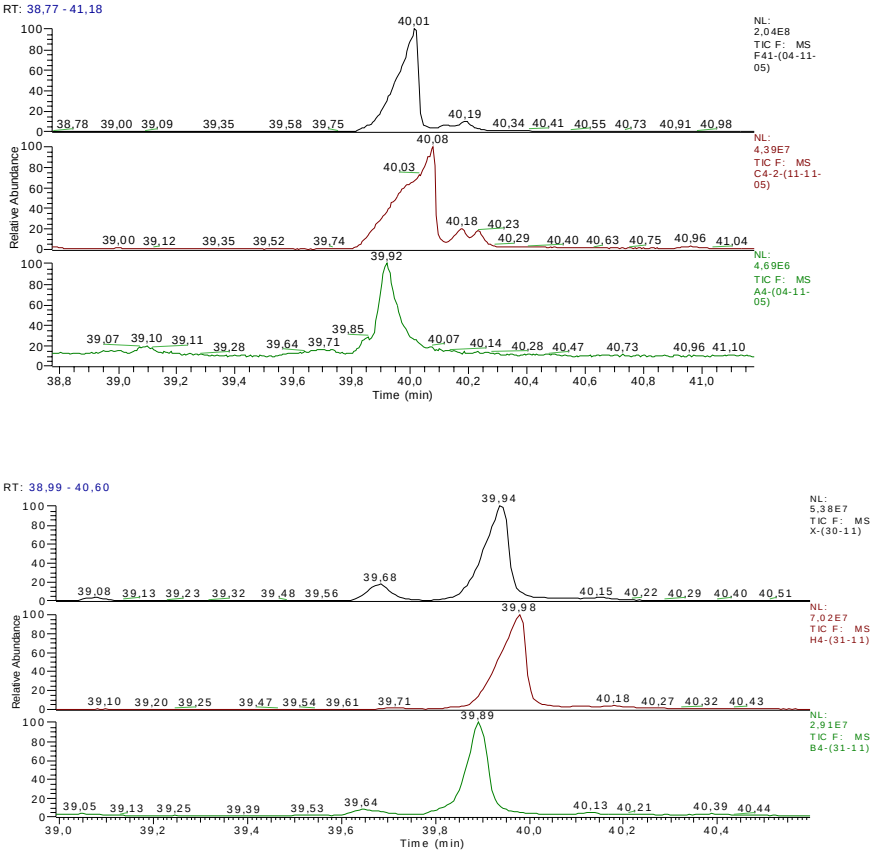

Figura 2.4 Cromatograma de los FAME s de seis cepas aisladas
a) cepa G4, b) cepa C4, c) cepa A4, d) cepa M12-X, e) cepa H4,
f) cepa B4.

2.4.4 Secuenciación de los productos de PCR y análisis filogenético

Los productos de PCR de las seis cepas fueron secuenciados y posteriormente alineados con la información del GenBank data. El fragmento secuenciado para la cepa A4 fue de 561 bp, el que presentó una similitud a *Thraustochytrium sp* de un 88 %. Para la cepa B4 se secuenció el fragmento de 561 bp; el fragmento parcial alineado se encuentra cercano a muestras de eucariontes marinos no cultivados. El fragmento analizado para la cepa C4 fue de 566 bp mostrando una similitud del 97% con *Thraustochytrium multirudimentale.* El fragmento para la cepa M12-X fue de 582 bp y presentó similitud del 97% a *Thraustochytrium kinnei*. El fragmento para la cepa G4 fue de tamaño 573 bp presentando una similitud de 98% a *Aplanochytrium stocchinoi.* La cepa H4 (fragmento de 639 bp) presentó un 91% similitud con *Thraustochytriidae* sp. En la Tabla 2.3 se muestran los números de acceso al Gen-Bank de cepas nativas y cepas utilizadas en el árbol filogenético

Para la construcción del árbol filogenético se utilizó la información de las seis cepas productoras de DHA las secuencias fueron alineadas con microorganismos representantes de thraustochytridos, aplanochytridos y labyrinthulidos (base de datos GenBank) utilizando *P. micans* como outgroup. En la Figura 2.5 se muestra el árbol filogenético de máxima verosimilitud basado en las secuencias del 18S rDNA. Las cepas aisladas se ubican entre microorganismos pertenecientes al phylum Labyrinthulomycota agrupándose en diferentes cluster. La cepa C4 se agrupa con thraustochytridos y cercano a *T. multirudimentale*. La cepa G4 se agrupa con microorganismos representantes tanto de aplanochytridos como labyrinthulidos formando un cluster diferente. La cepa H4 forma parte de otro grupo en el que también se encuentran representantes de thraustochytridos. La cepa A4 forma un grupo con *Thraustochytrium sp* y la cepa M12-X se agrupa con *T. kinnei* La cepa B4 se agrupa con microorganismos de este grupo, pero muestra mayores diferencias.

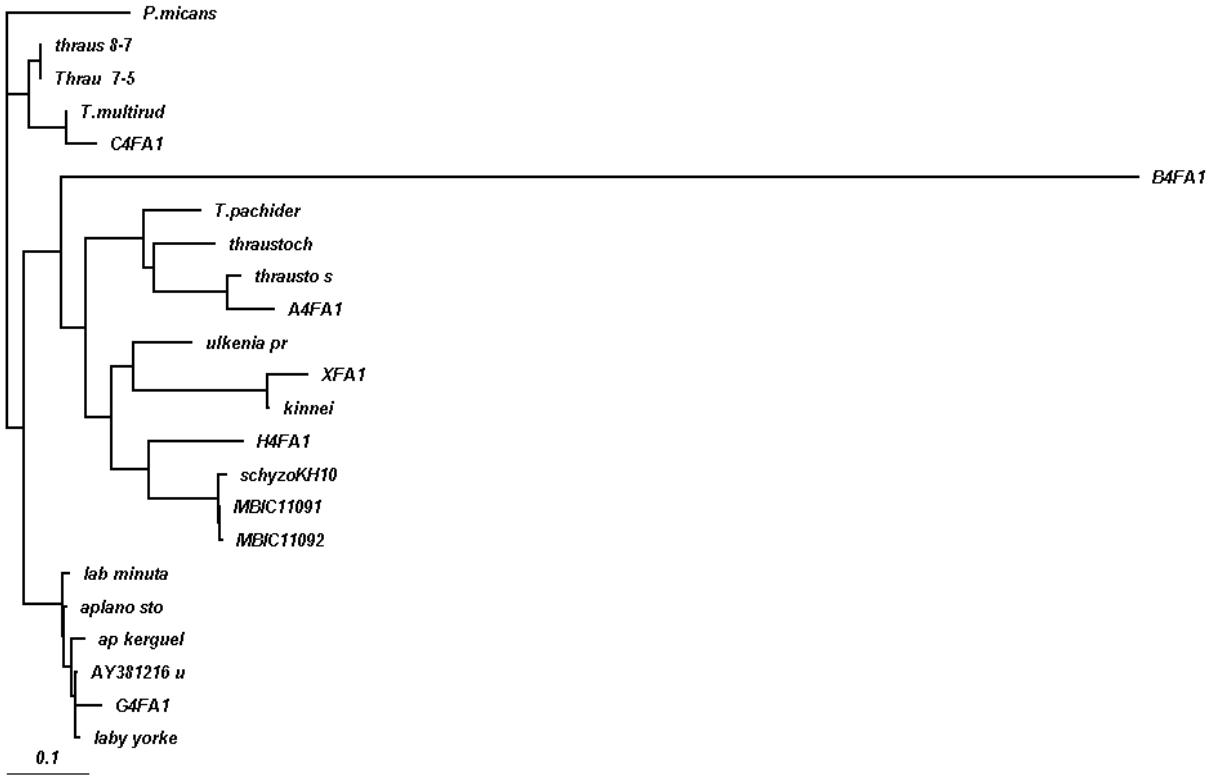

Figura 2.5. Árbol filogénetico basado en la secuencia de ADN del gen ribosomal 18S y contrastado con *P. micans.* Esta construcción fue hecha con las distancias estimadas por el método de la máxima verosimilitud (Modelo F84, (Felsenstein, 1984)).

Table 2.3 Lista de las secuencias del gen 18S rDNA de las especies Labyrinthulomycota relacionadas con las nuevas especies aisladas en este trabajo

Organismo	GenBank Número Ascensión
Prorocentrum micans	M14649
Thraustochytrium kinnei	L34668
Ulkenia profunda	L34054
Thraustochytriidae sp. MBIC11092	ABI83663
Schizochytrium sp. KH105	ABO52555
Thraustochytriidae sp. MBIC11091	ABI83662
Aplanochytrium stocchinoi	AJ519935
Aplanochytium kerguelense	ABO22103
Thraustochytrium sp.	AF202974
Labyrinthuloides yorkensis	AF265333
Labyrinthuloides minuta	AFL65339
Unculture eukaryot	AY381216
Thraustochytrium multirudimentale	ABO22111
Thraustochytriidae sp. 7-5	AF257316
Thraustochytriidae sp. 8-7	AF257317
Thrautochytrium pachydermun	ABO22113
Thraustochytriidae sp. C9G	AF474172
A4 (A4FA1)	DQ455777
B4 (B4FA1)	DQ455778
C4 (C4FA1)	DQ459550
G4 (G4FA1)	DQ459554
H4 (H4FA1)	DQ459556
M12-X (XFA1)	DQ459552

2.5 Discusión y Conclusiones

El phylum Heterokonta (Labyrinthulomycota) está formado por dos grupos thraustochytridos y labyrinthulidos siendo los thraustochytridos los más estudiados por su capacidad para producir DHA. Para la identificación de las cepas aisladas se utilizaron criterios taxonómicos basados en las características morfológicas y la secuencia del 18S rDNA permitió su clasificación. La estrategia propuesta por Mo et al. (2002) que utiliza los productos de PCR producidos por la amplificación del gen 18S rDNA utilizando tres pares de partidores diseñados a partir de secuencias del phylum Labyrinthulomycota permitió clasificar microorganismos aislados y 16 de ellos presentaron el perfil de producto de PCR característico (tres bandas con tamaños entre 520 y 650 bp). Además los resultados obtenidos permitieron establecer que los partidores diseñados por Mo et al., (2002) no son específicos

para Labyrinthulomycota ya que amplifican para otros microorganismos (datos no mostrados).

De acuerdo a las características morfológicas las cepas C4, M12-X y H4 presentan gran similitud al género *Thraustochytrium*. Todas ellas muestran la morfología característica con esporangio de diferentes formas, globoso, subgloboso elíptico e inmóvil, con tamaños entre 8 a 40 µm (RaghuKumar, 1980). También se observó un aspecto granular previo a la formación de esporas, un esporangio maduro con divisiones del citoplasma en esporas y muchas células vegetativas. Se requiere más estudio sobre su ciclo de vida o etapas de desarrollo para poder determinar mayores semejanzas.

Los cultivos de las cepas aisladas en medio basal permitieron obtener concentraciones de biomasa en el rango entre 29 - 890 mg L^{-1}. Estos valores son similares a los reportados por Bowles et al. (1999) quienes reportan concentraciones de biomasa para thraustochytridos entre 30 y 1.587 mg L^{-1} utilizando medio basal con 5 g L^{-1} de glucosa, para cepas aisladas desde ambientes fríos y temperado frío semejante a los de los lugares de muestreo seleccionados en este trabajo.

La cepa A4 a pesar de que morfológicamente no presenta tan claramente características de thraustochytridos se encuentra cercano a T*hraustochytrium sp* (ver Figura 2.5). La cepa G4 se agrupa con aplanochytridos y labyrinthulidos, más cercana a *Aplanochytrium*. (Leander et al., 2004; Moro et al., 2003). Sus células son de forma irregular presentando pocas inclusiones, característica de varias especies de este género. La cepa B4 aunque se ubica en Labyrinthulomycota, su similitud fue cercana a especies aún no descritas y que en el banco de datos son identificadas como muestras de agua. Para esta cepa el crecimiento sobre agar forma una especie de malla y siempre con presencia de bacterias. En cultivo líquido con glucosa como fuente de carbono produce bajas cantidades de biomasa aunque también acusa presencia de DHA. Existen pocos estudios relacionados a la

producción de AGPIs y particularmente DHA por cepas de labyrinthulidos. Esto puede explicarse debido a que el crecimiento en medios con agar es limitado y que probablemente requieran alimentarse de bacterias o levaduras (Kumon et al., 2005).

La cepa H4 desarrolla díadas, tétradas y cluster de esporangios semejante a lo observado para *Schyzochytrium* (Bahnweg et al., 1974) (Figura 2.2). Estas observaciones se correlacionan con la ubicación de esta cepa en el árbol filogenético (Figura 2.5) muy cercana a *Schyzochytrium.*

El uso de herramientas complementarias para la identificación de thraustochytridos ha incrementado la eficiencia en la clasificación de nuevas cepas con potencial uso industrial en la producción de DHA. Las seis cepas productoras de DHA aisladas en este trabajo se agrupan en diferentes clusters en el árbol filogenético construido con microorganismos pertenecientes al phylum Labyrinthulomycota. A pesar de que morfológicamente pueden parecer similares estás se ubican en diferentes cluster filogenéticos.

Todas las cepas producen PA y el DHA es el principal AGPI; otros ácidos de más de 20 carbonos o más e insaturados son ARA y EPA. De acuerdo al criterio de agrupación de thraustochytridos propuesto por Huang et al., (2003), la cepa M12-X, cuyo perfil solo considera EPA/DHA se encontraría en el grupo C junto a la cepa M4-103 (número de ascensión AB073307) la que forma un cluster con *Aplanochytrium haliotidis*. Por su parte la cepa nativa C4 cuyo perfil considera EPA/DHA/ARA, se encontraría en el grupo D en un cluster que incluye a *S. aggregatum*.

La colección, aislamiento y selección de cepas nativas ha sido el punto de partida para el conocimiento a nivel nacional de estos microorganismos heterótrofos considerados como una fuente alternativa al aceite de pescado para obtención de DHA. Si bien es cierto que tanto la composición de los ácidos grasos como la producción de biomasa de estos microorganismos dependen en gran parte de las condiciones ambientales (composición del

medio de cultivo, temperatura, pH, oxígeno disuelto), la capacidad de producir AG depende primeramente de la selección de cepas las cuales potencialmente puedan crecer heterotróficamente con buena composición de AG.

CAPÍTULO 3

EFECTO DE LAS CONDICIONES DE CULTIVO SOBRE EL CRECIMIENTO Y PRODUCCIÓN DE ÁCIDO DOCOSAHEXAENOICO (DHA; 22:6 ω3) POR *Thraustochytrium* M12-X

3.1 Resumen

Thraustochytrium M12-X fue evaluada con respecto a su capacidad de crecer heterotróficamente y producir ácido docosahexaenoico (DHA; 22:6 ω3). Para ello se condujeron experimentos en matraces. La producción de DHA por la cepa es altamente dependiente de la composición del medio de cultivo; el contenido de DHA en los ácidos grasos totales (AGT) se encuentra entre 14,6 y 57 %.

La cepa fue cultivada en medio basal B2 [20 g L^{-1} de glucosa, 2 g L^{-1} de glutamato monosódico (GMS) y 2 g L^{-1} de extracto de levadura (EL)], agitación 180 rpm, por 72 h, 25° C, pH inicial 7 y sometida a estudios para establecer los efectos de la temperatura, pH y tiempo de crecimiento. Se estudió el efecto de la salinidad y algunos componentes en el medio de cultivo así como también la concentración de la fuente de carbono (glucosa) y nitrógeno (GMS) sobre la concentración de biomasa y producción de DHA. La cepa presentó un crecimiento celular en medio B2 de 1,1 g L^{-1} y una concentración de DHA de 113 mg L^{-1}. En el rango de temperaturas estudiado (10 - 30° C) la máxima concentración celular y DHA se obtuvieron a 25° C. Además, la cepa estudiada mostró crecimiento en un amplio rango de salinidad (2 - 40 ‰) presentando la mayor concentración de biomasa a 29 ‰ y mayor contenido de DHA en la biomasa a salinidad de 10 ‰ (115 mgg^{-1}). En los experimentos realizados a distintos valores iniciales del pH (5 a 8) del medio de cultivo, la máxima concentración de biomasa se obtuvo a pH inicial de 7 con un contenido de DHA en la biomasa (103 mgg^{-1}). La modificación del medio basal B2 permitió aumentar la producción

de biomasa en un 100% con la adición de fosfato (KH_2PO_4, 1 g L^{-1}), un 48% aumentando la concentración de extracto de levadura a 4 g L^{-1} y 18 % con el suplemento de vitaminas y elementos traza. La mayor concentración de DHA se obtuvo en el medio suplementado con vitaminas y elementos traza (147,7 mg L^{-1}).

Los resultados obtenidos en fermentaciones por lote con control de pH y aireación, permitieron establecer que estos dos parámetros no limitarían el crecimiento de los cultivo en matraces bajo estas condiciones.

El microorganismo bajo estudio presentó una baja velocidad de crecimiento (0,08 h^{-1}), la que sin embargo es comparable a las de otras cepas (Jiang et al., 2004; Ganuza e Izquierdo, 2007) en medio de composición similar. Por otra parte, la concentración de biomasa obtenida, bajo las condiciones de crecimiento estudiadas, no superó (2,2 g L^{-1}). Esto se explicaría por el hecho de que la cepa en estudio no consume la glucosa bajo las condiciones de crecimiento utilizadas, probablemente por la inhibición de las enzimas involucradas en la glicólisis o defectos en el sistema de transporte de azúcar. Se realizaron estudios preliminares para evaluar la permeabilidad de la membrana y la actividad de hexoquinasa (EC.2.7.1.1) una de las enzimas que ejercen control de flujo en la glicólisis. El homogenizado no tuvo efecto sobre la concentración de glucosa lo que demuestra una muy baja actividad, bajo las condiciones de crecimiento utilizadas (datos no mostrados).

3.2 Introducción

Los microorganismos protistas heterotróficos del phylum Heterokonta (Labyrinthulomycota) han llamado la atención de diversos grupos de investigadores por la capacidad para producir ácidos grasos poliinsaturados (AGPIs) específicamente DHA y ácido eicosapentanoico (EPA; 20:5 ω3). Estos aceites poseen una amplia demanda para la elaboración de leches maternizadas, suplementos para adultos, fármacos y suplemento para alimentos del sector acuícola. Se ha establecido que algunas cepas del phylum Heterokonta pueden acumular AGPI ω-3 en cantidades cercanas a la mitad del peso de su cuerpo (Nichols, 2002).

La producción de DHA por cepas del phylum Heterokonta puede ser afectada por un número de variables dependiendo de la cepa, entre las que se consideran la modalidad y composición del medio de cultivo, además de parámetros físicos tales como el pH, temperatura y agitación. Para poder desarrollar procesos que puedan ser utilizados desde la perspectiva comercial cada cepa debe ser estudiada en forma individual y detallada (Vazhappilly & Chen, 1998).

La cepa de *Thraustochytrium* M12-X (N ° de acceso DQ459552), aislada desde la zona costera de Puerto Montt, Chile, aún no ha sido estudiada ni caracterizada en cuanto a su capacidad de crecimiento y producción de DHA, por lo tanto el objetivo de esta etapa fue estudiar el efecto de los parámetros físicos: temperatura y pH, y la composición del medio de cultivo sobre la producción de biomasa y DHA

Se modificó el medio B2 para evaluar el efecto de la adición de vitaminas, elementos trazas, fosfato y ácido bórico y de la fuente de carbono sobre el crecimiento de la cepa de *Thraustochytrium* M12-X. También se realizaron experimentos de fermentación bajo condiciones de aireación y pH controlados. Pruebas preliminares para establecer si las condiciones de crecimiento afectan el flujo de carbono a través de las reacciones de la

glicólisis fueron realizadas. La cepa M12-X, fue seleccionada de entre otras cepas nativas ya que se considera una buena productora de DHA (57% DHA en AGT) si se compara con thraustochytridos de los géneros *Thraustochytrium y Schyzochytrium*. El rango de contenido de DHA en los AGT fluctúa entre 25 y 60 % y produce un perfil de AGPIs bastante simple (solo EPA y DHA).

3.3 Material y Métodos

3.3.1 Microorganismo y medio de cultivo

La cepa *Thraustochytrium* M12-X fue colectada en la zona costera de Puerto Montt, Océano Pacífico, sur de Chile (41º 28'18"S y 72º56'24"W).

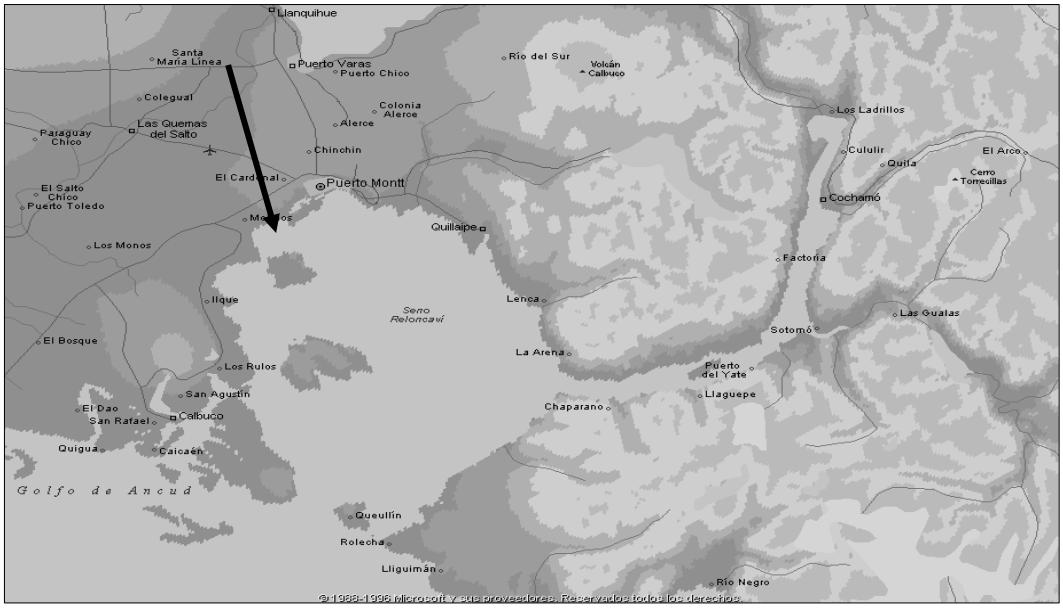

Figura 3.1 Sitio en el que fue colectada la cepa de *Thraustochytrium* M12-X. Estuario de Reloncaví, Puerto Montt, Chile. La fecha indica la localización de Chinquihue.

La cepa fue mantenida en medio sólido [extracto de levadura (Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, England) 2 g L^{-1}, peptona (Oxoid) 2 g L^{-1}, y agar (Becton, Dickinson and Company Sparks, MD, USA) 10 g L^{-1}] preparado en agua de mar al 70%

(como referencia, el agua de mar local posee una salinidad promedio de 30 ‰). Estreptomicina y penicilina G (Sigma-Aldrich Co., Steinheim, Alemania) fueron agregados (300 mg L^{-1} de cada uno) para eliminar la flora bacteriana. La incubación se realizó a 25° C. Subcultivos fueron realizados cada dos meses.

3.3.2 Condiciones de cultivo

Para la producción de biomasa se utilizó medio basal B2 [2% de glucosa (Oxoid), 0,2% extracto de levadura (Oxoid) y 0,2% glutamato monosódico (GMS)] en agua de mar artificial al 70%. Los preinóculos fueron preparados tomando colonias desde las placas; dos tiras de agar (1cm x 2cm) fueron cortadas y transferidas a 50 mL de medio de cultivo. Estreptomicina y penicilina G (300 mg L^{-1} de cada una) fueron utilizadas. El preinóculo fue cultivado por 48 h a 25° C y 180 rpm. El inóculo fue preparado en un matraz erlenmeyer de 250 mL conteniendo 100 mL de medio B2, 5 mL de cultivo preinóculo (OD_{600} = 0,4) fue utilizado. La incubación se realizó por 48 h a 25° C y 180 rpm (Labtech, modelo LSI - 3016R). Los resultados se informan como valores promedios basados en tres réplicas de cultivos simultáneos ± desviación estándar.

3.3.3 Concentración de biomasa

El volumen de cultivo crecido fue asépticamente centrifugado (4000g por 10 min). El pellet fue lavado dos veces con agua destilada y centrifugado. La biomasa recuperada fue liofilizada, pesada y almacenada a -20° C hasta su análisis.

3.3.4 Contenido de DHA

Muestras de biomasa liofilizada (20 a 50 mg) fueron transesterificadas directamente (Lewis et al., 2000). Los metil ésteres de ácidos grasos (FAMEs) en la capa de hexano fueron centrífugados y colectados a 4° C. Los FAMEs obtenidos fueron analizados en cromatógrafo

GC (FOCUS-Finnigan)/MS (DSQ- Finnigan), equipado con columna capilar HP Ultra 1 (30 m largo y 0,25 mm diámetro interno). La temperatura de la columna fue programada desde 40 a 300° C con un incremento de 5º C /min. Detector de ionización con helio como gas transportador (200º C) fue utilizado. El inyector fue mantenido a 250° C y el volumen de inyección fue de 1 µL. Los picos de los FAMEs fueron identificados y cuantificados utilizando un estándar de ácidos grasos (Mix L209, FAME 156C20:0, C20:1, C20:4, C22:1, C22:6) suministrado por Alltech (USA).

3.3.5 Determinación concentración de glucosa

La concentración de glucosa en el medio de cultivo fue determinada por HPLC. La columna utilizada fue Shodex KS-800 mantenida a 80° C. La fase móvil fue agua desionizada a 1 mL min^{-1}. La detección se realizó por IR.

3.3.6 Efecto control pH y oxígeno disuelto

El cultivo por lotes fue realizado en un fermentador de 5 L (BIOFLO -2000, New Brunswick Scientific, USA), con 2 L de Medio 6 (ver Tabla 3.5) que incluye KH_2PO_4 (1 g L^{-1}). El medio fue esterilizado a 121° C por 20 min. La solución de glucosa fue esterilizada en forma separada. El pH del medio de cultivo fue mantenido en 7 a través de la adición de HCl o NaOH 2M. El inóculo fue preparado según lo indicado en el punto 3.3.2 usándose un volumen del 10%. La agitación se mantuvo en 150 rpm la temperatura fue controlada a 25° C. Aire estéril (filtrado bajo 0,2 µm) fue suministrado al cultivo a un flujo de 300 mL min^{-1} La concentración de oxígeno disuelto fue monitoreada a través de electrodo de oxígeno disuelto.

3.4 Resultados

3.4.1. Tiempo de crecimiento.

La producción de biomasa por *Thraustochytrium* M12-X en la fermentación del medio B2 se muestra en la Figura 3.2. La concentración de biomasa se incrementa hasta alcanzar un máximo de 1,1 g L^{-1} al cabo 72 h. Todos los experimentos posteriores se realizaron por 72 h.

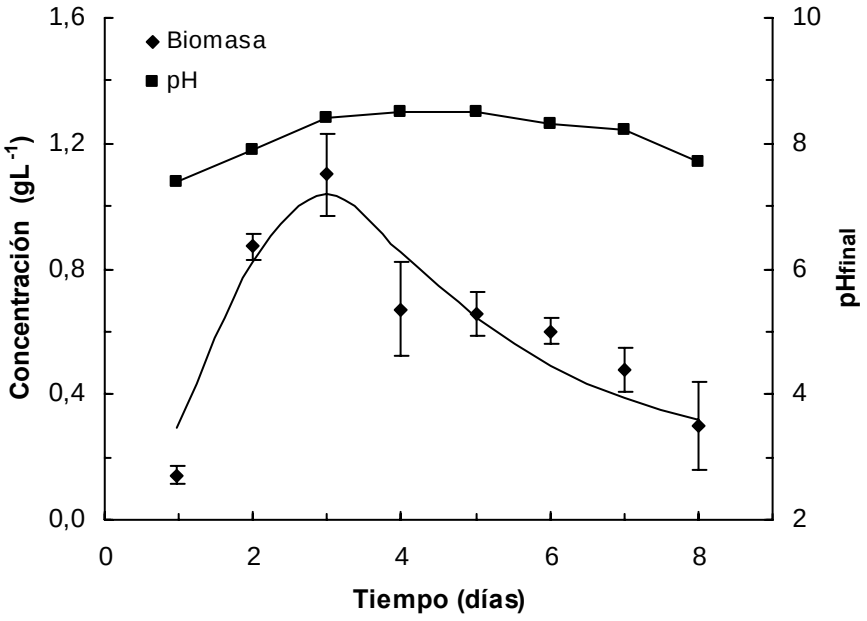

Figura. 3.2. Curva de concentración de biomasa y pH del medio de cultivo en fermentaciones de *Thraustochytrium* M12-X. Composición del medio de cultivo: glucosa, 20 g L^{-1}, EL, 2 g L^{-1}, GMS, 2 g L^{-1}. pH inicial 7, agitación 180 rpm, temperatura 25° C. Los datos corresponden al promedio de dos réplicas.

Tabla.3.1 Velocidad de crecimiento, producción de biomasa, AGT y DHA en cultivos de *Thraustochytrium* M12-X. [a,b]

μ (h^{-1})	0,08
Biomasa (gL^{-1}) (72 h)	1,1 ± 0,03
DHA en la biomasa (mgg^{-1})	103 ± 5,00
Concentración de DHA (mgL^{-1})	113 ± 10,70
Productividad de DHA $(mg(Lh)^{-1}$	1,6
DHA (% w/w) en AGT	47,00%
AGT en biomasa (% w/w)	21,90%

[a] El medio basal contiene 20 g L^{-1} de glucosa, 2 g L^{-1} de GMS, 2 g L^{-1} de EL, crecido a 25º C a 180 rpm. pH inicial 7, ajustado cada día.
[b] Datos expresados como promedio ± desviación estándar de dos réplicas

La concentración de DHA a las 72 h fue de 116 mgL^{-1} y el contenido de DHA en la biomasa igual a 103 mgg^{-1}; el porcentaje de DHA el los AGT fue de 47,6%. El perfil de ácidos grasos (AG) en la biomasa de *Thraustochytrium* M12-X obtenida a esas condiciones se muestra en la Tabla 3.2. Además del DHA, están presente como AG principales el ácido palmítico (C16:0) 25,00% y ácido eicosapentaenoico (C20:5 ω3, EPA) 11,15%, los que en total representan el 83,75% del total de AG.

Tabla 3.2 Composición de ácidos grasos (%) en la biomasa de *Thraustochytrium* M12-X crecida en medio B2 a 25° C, pH inicial de 7, 29‰ de salinidad, 180 rpm, 72 h.

	Ácidos grasos										
	C12:0	**C14:0**	**C15:0**	**C16:0**	**C18:0**	**C18:1**	**C18:2**	**C18:3**	**C20:5**	**C22:6**	**otros**
%	0,43	4,13	7,00	25,1	1,42	0,93	1,12	0,15	11,15	47,6	0,97

3.4.2 Efecto del pH inicial sobre la producción de biomasa y DHA por *Thraustochytrium* M12-X.

Los experimentos para determinar el efecto del pH inicial del medio de cultivo fueron realizados ajustando el pH del medio B2 en valores de 5; 5,5; 6; 7; 8 respectivamente, después de esterilizar e inocular. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 3.3.

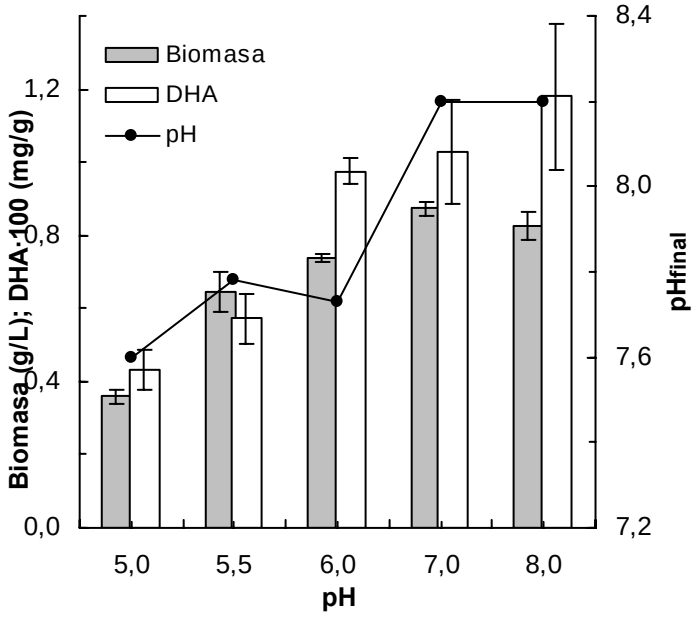

Fig.3.3.Concentración de biomasa, contenido DHA en la biomasa como función del pH inicial en el cultivo de *Thraustochytrium* M12-X . Medio basal contiene 20 g L^{-1} de glucosa, 2 g L^{-1} de GMS, 2 g L^{-1} de EL, 29 ‰, crecido 72 h a 180 rpm.

De acuerdo a los resultados mostrados en la Figura 3.3, la mayor concentración de biomasa se obtuvo para un pH inicial de 7 (1,1 g L^{-1}) aun cuando no se observaron diferencias significativas ($p>0,05$) para valores de pH inicial en el rango 6 a 8. El contenido de DHA en la biomasa presenta valores mayores en el rango de 6 a 8.

3.4.3 Efecto de la temperatura sobre la producción de biomasa y DHA por *Thraustochytrium* M12-X

El efecto de la temperatura sobre la producción de biomasa y DHA en el medio basal B2 fue estudiada en el rango de 10 a 30° C. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 3.3. La mayor producción de biomasa (1,1 g L^{-1}) y contenido de DHA en la biomasa (103,0 mg g^{-1}) se obtuvo a 25°C; el mayor porcentaje de DHA en los AGT (53,6%) se obtuvo a 30° C

Tabla 3.3 Efecto de la temperatura sobre la producción de biomasa y AGT y contenido de DHA en las fermentaciones de *Thraustochytrium* M12-X

T (º C)	Biomasa (g L^{-1})	AGT (%)[1]	PA (%)[2]	EPA (%)[2]	DHA (%)[2]	DHA (mg g^{-1})	DHA (mg L^{-1})
10	0,05 ± 0,02	n.d			n.d	n.d	n.d
25	1,10 ± 0,03	21,9	27,9	10,7	47,0	103,0 ± 6,60	116,0 ± 10,7
30	0,54 ± 0,01	15,5	22	12,4	53,6	83,3 ± 11,35	43,5 ± 16,6

[1]% en la biomasa
[2]% en AGT

3.4.4. Efecto de la salinidad sobre la producción de biomasa y DHA por *Thraustochytrium* M12-X.

El efecto de la salinidad sobre la producción de biomasa y DHA fue evaluado a salinidades de 2- 10- 29- 40‰. Los resultados se muestran en la Figura 3.4. La concentración de biomasa (1,1 g L^{-1}) no presentó diferencias significativas ($p>0,05$) cuando las salinidades del medio de cultivo fueron de 29 y 40 ‰. Para una salinidad de 2‰, la concentración de biomasa fue despreciable. La mayor cantidad de DHA (115 mg g^{-1}) se obtuvo cuando salinidad fue de 10 ‰ correspondiendo a un 54,4% de los AGT.

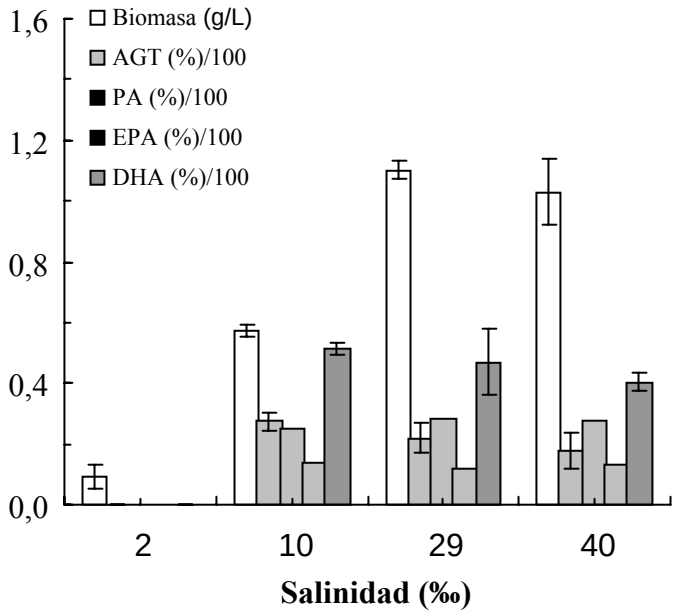

Fig. 3.4 Efecto de la salinidad en la producción de biomasa, AGT en la biomasa y PA, EPA y DHA en AGT en fermentaciones en medio B2 de *Thraustochytrium* M12-X

3.4.5 Efecto de la composición del medio de cultivo

Cinco medios de cultivo fueron evaluados para la producción de biomasa y DHA por *Thraustochytrium* M12-X a 25º C, agitación 180 rpm, pH inicial de 7 en cultivos de 72 h. La composición de los medios de cultivo evaluados y los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 3.4.

El medio 1 representa el medio basal B2. Al crecer en este medio la biomasa presentó un contenido de DHA de 103 mg g^{-1} y una proporción de DHA en los AGT del 47 %. La concentración de biomasa fue de 1,1 g L^{-1}. Los medios 2 y 3 fueron seleccionados para el estudio del efecto de vitaminas y elementos traza. En ambos medios la concentración de biomasa fue igual a 1,24 g L^{-1}. El mayor contenido de DHA en la biomasa fue de 118,9 mg g^{-1} que se obtuvo con el medio de cultivo suplementado simultáneamente con vitaminas y elementos traza.

En los medios 4 y 5 se estudió el efecto de minerales tales como ácido bórico y fosfato (KH_2PO_4). La adición de ácido bórico no mostró efecto sobre la concentración de

biomasa y demostró tener un efecto negativo en el contenido de DHA en la biomasa (54 mg g^{-1}). El fosfato si bien es cierto permite aumentar la concentración de biomasa (2,19 g L^{-1}) tiene un efecto negativo en la producción de DHA (30,4 g L^{-1}), aún cuando el porcentaje de DHA en los AGT tanto en el medio suplementado con ácido bórico como con fosfato (34% y 30% respectivamente) no se ve afectado.

Tabla 3.4. Composición de Medio de cultivo, biomasa, AGT, AG principales, contenido de DHA en la biomasa y concentración de DHA.

	MEDIO				
Componente (1 L)	1	2	3	4	5
KH_2PO_4 (g)	-	-	-	-	1
H_3BO_3 (g)	-	-	-	0,6	-
$FeCl_3$ x 6 H_2O (mg)	-	-	2,9	-	-
$CuSO_4$ x $5H_2O$ (mg)	-	-	0,02	-	-
$MnCl_2$ x $4H_2O$ (mg)	-	-	8,6	-	-
$CoCl_2$ x $4H_2O$ (mg)	-	-	0,26	-	-
$ZnCl_2$ (mg)	-	-	0,6	-	-
Tiamina (mg)	-	100	100	-	-
Vitamina B12 (mg)	-	0,5	0,5	-	-
Biotina (mg)	-	0,5	0,5	-	-
Biomasa (g L-1)	1,10 ± 0,03	1,24 ± 0,01	1,24 ± 0,07	0,81 ± 0,11	2,19 ± 0,11
AGT (%)	21,9	17,6	26,4	18,3	10
PA (%)	28	31,4	35,7	26,2	36,5
EPA (%)	12	8,2	11,1	12,3	4,1
DHA (%)	47,0	57,0	44,9	34,3	30,3
DHA en biomasa (mg/g)	103,0± 5,0	100,1 ± 0,6	118,9 ± 0,5	54,1 ± 2,4	30,4 ± 1,4
DHA (mg/L)	116,0± 10,7	120,1 ± 4,4	147,7 ± 8,2	67,8 ± 5,5	66,3 ± 0,3

Efecto de la concentración de glucosa sobre la producción de biomasa y DHA por *Thraustochytrium* M12-X.

Los resultados obtenidos en los experimentos realizados para establecer el efecto de la concentración de la glucosa en el medio basal B2, se muestran en la Tabla 3.5 Cuando no se adiciona glucosa al medio de cultivo, se obtiene la menor la producción de biomasa (0.51 g L^{-1}). Para esta condición el contenido de DHA en la biomasa resulta superior (120 mgg^{-1}), no así

el porcentaje de AGT en la biomasa (19%). La concentración de biomasa aumenta al aumentar la concentración de glucosa. Este efecto no es significativo (p>0,05) para concentraciones de glucosa en el rango 5- 40 g L^{-1}. Por otra parte, concentraciones de glucosa superiores a los 40 g L^{-1} tiene un efecto inhibitorio en la producción de biomasa.

Para concentraciones de glucosa en el rango 0 a 20 g L^{-1}, el porcentaje de AGT en la biomasa se mantiene aproximadamente constante en un 20%; una mayor concentración de glucosa resulta en un menor porcentaje de AGT en la biomasa. La proporción de DHA en los AGT y DHA en la biomasa no presentaron diferencias significativas (p>0,05) para concentraciones de glucosa superiores a 40 g L^{-1}. Los análisis de glucosa residual mostraron disminuciones menores que el 1% de la glucosa inicial en todos los experimentos realizados. (datos no mostrados).

Tabla 3.5. Efecto de concentración de glucosa en la producción de biomasa y AGT y contenido de DHA en las fermentaciones de *Thraustochytrium* M12-X.

Glucosa (g L^{-1})	Biomasa (g L^{-1})	AGT (%)[1]	PA (%)[2]	EPA (%)[2]	DHA (%)[2]	DHA en Biomasa (mg g^{-1})	DHA (mg L^{-1})
0	0,51 ± 0,02	19,5	19, 4	12,2	62	120,20 ± 18,1	61,20 ± 7,8
20	1,10 ± 0,02	21, 9	28,0	12,0	47	103,00 ± 5,0	116,00 ± 10,7
40	1,05 ± 0,12	15,0	38,2	10,7	32	48,04 ± 12,7	50,13 ± 12,4
60	0,76 ± 0,10	12,5	46,4	10,2	29	36,26 ± 2,1	28,49 ± 6,4
80	0,66 ± 0,18	10,3	37,6	84	33	34,07 ± 0,5	18,89 ± 2,2
100	0,34 ± 0,05	14,7	45,9	91	27	39,70 ± 2,0	12,50 ± 0,7

[1]en la biomasa [2]en AGT

Efecto de la concentración del extracto de levadura sobre producción de biomasa y DHA por *Thraustochytrium* M12-X

Para evaluar el efecto de la concentración de extracto de levadura sobre la producción de biomasa y DHA por *Thraustochytrium*. M12-X se realizaron fermentaciones en el medio B2, modificándose la concentración de extracto de levadura entre 0 y 20 g L^{-1}. Estos resultados se presentan en la Tabla 3.6.

Tabla 3.6. Efecto de la concentración del extracto de levadura (EL) en la producción de biomasa y AGT y DHA por *Thraustochytrium* M12-X en medio basal B2.

EL ($g\ L^{-1}$)	Biomasa ($g\ L^{-1}$)	AGT (%)[1]	PA (%)[2]	EPA (%)[2]	DHA (%)[2]	DHA ($mg\ g^{-1}$)	DHA ($mg\ L^{-1}$)
0	0,25 ± 0,08	25,20	31,3	10,4	36,60	92,17 ± 8,87	19,08 ± 1,97
2	1,10 ± 0,03	21,90	28, 0	12,0	47,00	103,00 ± 5,00	116,00 ± 10,70
4	1,63 ± 0,10	19,30	42,9	6,0	20,00	38,50 ± 0,03	64, 48 ± 2,70
8	0,98 ± 0,09	18,20	36,4	8,7	21,00	38,06 ± 8,60	37,74 ± 5,10
10	0,56 ± 0,09	13,20	39,9	8,0	19,30	25,48 ± 8,10	25,25 ± 7,55
20	0,21 ± 0,02	15,10	36,9	7,2	14,60	22,00 ± 4,18	4,54 ± 1,35

[1]en la biomasa
[2]en AGT

El extracto de levadura tiene un efecto positivo en la producción de biomasa, para concentraciones de 4 $g\ L^{-1}$ o menores. La concentración de biomasa aumenta 5,5 veces con una concentración de EL de 4 $g\ L^{-1}$ (1,63 $g\ L^{-1}$), con respecto a la obtenida en el medio sin EL. El porcentaje de DHA en los AGT presenta un máximo (47 %) a una concentración de extracto de levadura de 2 $g\ L^{-1}$. Tanto los AGT como el porcentaje de DHA en los AGT disminuye al aumentar la concentración del extracto de levadura en el medio de cultivo.

Efecto de la concentración de glutamato monosódico sobre la producción de biomasa y DHA por *Thraustochytrium* M12-X

El efecto de la concentración de glutamato monosódico en el medio de cultivo fue analizado entre 2 y 20 $g\ L^{-1}$. En la Tabla 3.7 se muestra los resultados obtenidos.

Tabla 3.7 Efecto de la concentración del glutamato monosódico (GMS) en la producción de biomasa y AGT y AG por *Thraustochytrium* M12-X.

GMS ($g\ L^{-1}$)	Biomasa ($g\ L^{-1}$)	AGT (%)[1]	PA (%)[2]	EPA (%)[2]	DHA (%)[2]	DHA ($g\ mg^{-1}$)	DHA ($g\ L^{-1}$)
2	1,63 ± 0,10	19,3	42,9	6,0	20,02	38,50 ± 0,03	64,48 ± 2,70
4	1,44 ± 0,02	29,1	32,4	8,3	21,41	62,38 ± 10,5	88 ,71 ± 2,55
10	1,20 ± 0,09	36,4	28,8	13,2	25,18	91,55 ± 7,50	116,27 ± 2,15
20	0,42 ± 0,09	34,3	29,6	11,6	2,21	86,55 ± 4,20	35,93 ± 6,40

[1]en la biomasa
[2]en AGT

La concentración de GMS de 2 $g\ L^{-1}$ permitió obtener la mayor producción de biomasa (1,63 $g\ L^{-1}$). Sin embargo, el contenido de AGT en la biomasa aumentó al aumentar la concentración de GMS en el rango 2 a 20 $g\ L^{-1}$. El mismo comportamiento se observó para el contenido de DHA en la biomasa y concentración de DHA.

Al graficar la relación entre la concentración de GMS y EL en el medio de cultivo (Figura 3.5) se observa que la máxima concentración de biomasa ocurre a una razón de GMS: EL igual a 1 y la mayor variación para el aumento de los AGT ocurre a relaciones menores que 1.

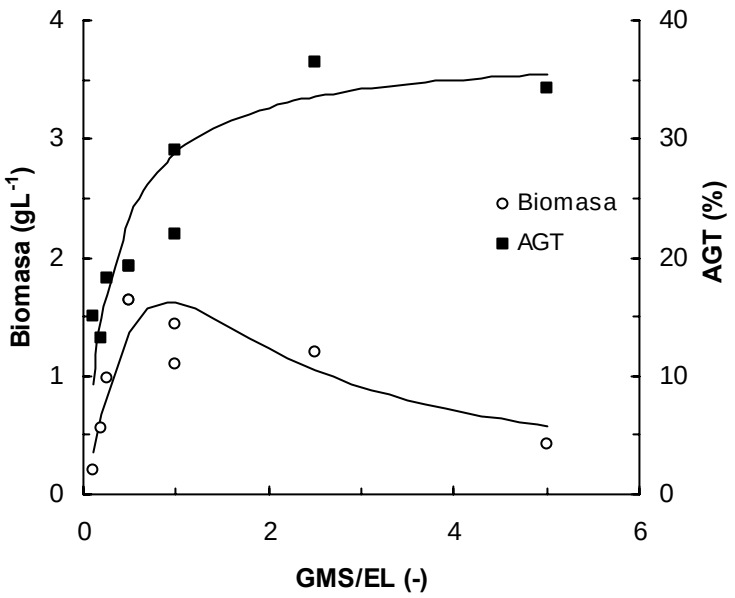

Figura 3.5.Biomasa y AGT en la biomasa para diferentes razones entre glutamato de sodio (GMS) y extracto de levadura (EL) en fermentaciones de *Thraustochytrium* M12-X

Efecto de la fuente de carbono

Otras fuentes de carbono fueron probadas para establecer este efecto en la producción de biomasa por *Thraustochytrium* M12-X. En la Tabla 3.8 se muestra el resultado al utilizar fructosa, piruvato, glicerol a una concentración de 20 g L^{-1}. Las dos primeras fuentes de carbono no mostraron diferencias en la producción de biomasa con respecto al cultivo en glucosa a esa misma concentración. En el caso del glicerol cae la producción de biomasa a 0,28 gL^{-1}. Al utilizar piruvato y citrato a una concentración de 5 g L^{-1} la biomasa producida es exactamente igual a la producida con glucosa en concentración de 5 g L^{-1}.

Tabla 3.8 Efecto de la fuente de carbono en la producción de biomasa y DHA por *Thraustochytrium* M12-X.

Fuente de Carbono	Biomasa (g L^{-1})	DHA En biomasa (mg g^{-1})	DHA (mg L^{-1})
Fructosa (20 gL^{-1})	0,93± 0,01	65,80 ± 8,8	61,39 ± 8,9
Piruvato (20 gL^{-1})	1,21 ± 0,14	65,00 ± 1,2	83,07 ± 3,7
Glicerol (20 gL^{-1})	0,28 ± 0,09	94,66 ± 4,9	32,2 ± 9,4
Piruvato (5 gL^{-1})	0,63 ± 0,06	-	-
Citrato (5 gL^{-1})	0,79 ± 0,07	-	-

Efecto de Control de pH y oxígeno.

El cultivo por lote de *Thraustochytrium* M12-X fue realizado para establecer si la falta de control del pH y adecuada aireación en los experimentos en matraces podría afectar el crecimiento de la cepa bajo estudio. En estos experimentos el pH de la fermentación fue mantenido en 7 y se hizo circular aire estéril a través del medio de cultivo. Se utilizó el medio con sal de fosfato (KH_2PO_4) ya que este medio permitió un aumento significativo de la concentración de biomasa (2,19 g L^{-1}). Bajo estas condiciones la concentración de biomasa obtenida a los ocho días fue de 1,45 g L^{-1}. (Figura 3.6). Al igual que en los experimentos en matraces el consumo de glucosa fue despreciable.

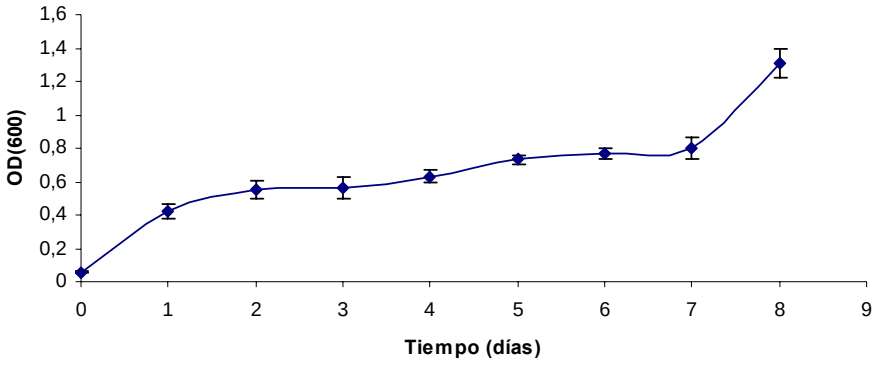

Figura.3.6 producción de biomasa medio en fermentaciones de *Thraustochytrium* M12-X. Composición del medio de cultivo: glucosa, 20 g L^{-1}, extracto de levadura, 2 g L^{-1}, glutamato de sodio 2 g L^{-1}. KH_2PO_4 1 g L^{-1}. pH 7, agitación 150 rpm, temperatura 25° C. Los datos corresponden al promedio de dos réplicas.

3.5 Discusión

Una nueva alternativa tecnológica de interés comercial aceptada actualmente en el mercado, producto del incremento de la demanda, son los cultivos de microorganismos oleaginosos para producir AGPIs de cadena larga (aceites microbianos, SCO). El desarrollo de estos procesos a nivel comercial es posible ya que un número de organismos, principalmente de origen marino, puede acumular altos contenidos de aceite en la biomasa (50% p/p) y producir un alto porcentaje del total de lípidos como DHA (30-70%) (Yongmanitchai & Ward, 1989; Ward & Singh, 2005). En la actualidad los microorganismos utilizados en los procesos comerciales para la producción heterotrófica de DHA son *Schyzochytrium spp*. y *Crypthecodinium cohnii* (Barclay et al. , 2005); para ácido γ-linolénico (18:3 ω6, GLA) de *Mortierella isabellina y Mucor circilloides* y para ácido araquidónico (20:4 ω6, ARA) *Mortierella alpina.*

Los SCO podrían constituirse en alternativas al aceite de pescado ya que la demanda por AGPIs específicos como el DHA por la industria de alimentos, nutracéuticos y farmacéutica se ha incrementado producto del volumen de evidencia clínica que avala efectos positivos en diversas funciones biológicas en seres humanos. Además, los niveles de producción de aceite de pescado parecen haber alcanzado sus niveles máximos. En la actualidad la producción de SCO es despreciable, pero muestra un potencial desarrollo en el futuro si: aumenta el número limitado de especies disponibles, la producción puede realizarse con materias primas de bajo costo, aumenta el conocimiento de los procesos bioquímicos y genéticos en la biosíntesis y acumulación de AGPIs y, se desarrollan procesos óptimos para la producción y extracción de estos aceites.

El propósito de este estudio fue la caracterización del crecimiento heterotrófico de la cepa nativa *Thraustochytrium* M12-X, aislada de la zona costera de Puerto Montt, Chile, cuya temperatura media es de 12,9 ± 2,7. Esta cepa fue seleccionada entre otras cepas nativas

aisladas en este trabajo (Capítulo 2), por presentar mayor contenido de DHA en la biomasa (33,8 mgg^{-1}) y mayor producción de DHA en medio basal B1 (10 gL^{-1} de glucosa, 4 g L^{-1} extracto de levadura en agua de mar al 70%) a 25° C y agitación de 180 rpm, en 72 h.

Se comprobó que la producción de biomasa y DHA es altamente afectada por las condiciones de cultivo, comportamiento que ha sido reportado para otras cepas de *Thraustochytrium* (Lewis et al., 1999; Bowles et al., 1999; Wu et al., 2005).

El principal AGPIs en los lípidos de esta cepa fue DHA además de ácido palmítico (C16:0) y EPA. Cuando el crecimiento ocurre en medio B2, la temperatura óptima de crecimiento (25 ° C) la cepa *Thraustochytrium* M12-X alcanza su máxima concentración de biomasa a las 72 h, lo que coincide con un pH final cercano a 8. Sin embargo, este solo hecho no explica la detención del crecimiento (Fig. 3.2) ya que no se observaron diferencias significativas en la concentración de biomasa obtenida en los ensayos realizados con medios de cultivo con pH en el rango 6 a 8. Por otra parte, la significativa disminución de la concentración de biomasa posterior a las 72 h no es inusual y se ha reportado para otras cepas por Bahnweg (1979) en su estudio de especies pertenecientes a thraustochytridos y labyrinthulidos. Esta autora clasificó las distintas cepas en tres categorías:

a) la primera se caracteriza por presentar su máxima concentración después de 6 días de cultivo, a los cuales seguía una rápida disminución de la turbidez debido a la lisis celular. Especies tales como *T. kinnei*, *T. motivum, Labyrinthuloides minuta y L. yorkensis* eran parte de este grupo.
b) la segunda categoría presentaba el mayor crecimiento después de los 20 días de incubación sin mostrar una disminución celular.
c) en el tercer grupo el mayor rendimiento se obtenía entre los 8 y 12 días, seguido por un leve decrecimiento.

Thraustochytrium M12-X podría clasificarse en el primer grupo ya que su comportamiento es similar, cesando el crecimiento después del cuarto día cuando en experimentos realizados sin control de pH, éste alcanza un valor de 8,4. Estos resultados coinciden con la identificación realizada para esta cepa la cual se clasifica cercana a *T. kinnei* (Capítulo 2).

Thraustochytrium M12-X posee una baja velocidad específica de crecimiento en fermentaciones del medio B2 (0.08 h^{-1}) similar al de *Schyzochytrium mangrovei* FB1, *S. mangrovei* FB3, *S. mangrovei* FB5 con 0,08; 0,073; 0,072 h^{-1} (Jiang et al., 2004) y 0,01; 0,0045; 0,0011 h^{-1} para *Thraustochytrium* ATCC 18906, ATCC 18907 y ATCC 26185 respectivamente (Yap, 2001) en medios basales.

La cepa de *Thraustochytrium* M12-X presenta una amplia tolerancia a la salinidad y la salinidad óptima es 29‰ que coincide con el de su ambiente natural (30‰). La menor producción de biomasa a bajas salinidades (0,09 g L^{-1} a salinidad 2‰) indicaría que en esta cepa el Na^+ es requerido para el transporte de nutrientes. Estudios nutricionales realizados con phycomycetes han demostrado que el requerimiento de NaCl no solo tiene una función osmótica, sino que el Na^+ es requerido para el transporte del sustrato. En bacterias marinas el Na^+ y K^+ son necesarios para la oxidación de sustratos exógenos en *Pseudomonas*. Siegenthaler et al. (1967) sugieren que el NaCl estimula la respiración de *Thraustochytrium roseum* y es requerido para la absorción de fosfato. Otras cepas, como *T. roseum* no presentan diferencias significativas en el rendimiento de DHA ni la biomasa producida al disminuir la salinidad (Singh, 1996). *T. aureum* (ATCC 34304) no crece a salinidad cero y su crecimiento es inhibido a concentraciones de agua de mar del 200% obteniéndose la mayor cantidad de biomasa a una concentración de agua de mar del 50% (1,11 gL^{-1}) (Iida et al., 1996).

Se ha sugerido que el cultivo de distintas cepas de thraustochytridos en medio de cultivo a baja salinidad disminuye el contenido de ácidos grasos saturados debido a la estimulación de la desaturación (Kang et al., 2007). En la cepa M12-X la disminución de la salinidad del medio de cultivo reduce la proporción de PA en los AGT en tanto aumenta el del DHA. Para el cultivo de *Thraustochytrium* M12-X, el fosfato es un componente fundamental ya que permite aumentar la concentración de biomasa en un 100% (2,2 g L^{-1}). Sin embargo, bajo esta condición la cepa privilegia la formación de biomasa a expensas de la acumulación de reserva de energía.

La Tabla 3.9 resume los resultados reportados por diferentes autores para diferentes especies; en ésta se especifican los rangos de salinidad entre los cuales esas especies pueden crecer y la salinidad óptima de crecimiento. En general los rangos son dependientes de los lugares de los cuales fueron aisladas.

Tabla 3.9 Capacidad de crecimientos a diferentes salinidades por especies de thraustochytridos

Especies	rango de salinidad ‰	salinidad optima ‰	referencia
Especies antárticas			
Thraustochytrium antarcticum Bahnweg et Sparrow	5- 35	15-30	Banweg
Thraustochytrium kerguelensis Bahnweg et Sparrow	15-35	20-30	Banweg 1979
Thraustochytrium rossii Bahnweb et Sparrow	15-35	15-20	Banweg 1979
Especies temperadas			
Thraustochytrium aureum S.Goldstein	5-35	20-35	Goldstein 1963
Thraustochytium roseum S. Goldstein	10-35	25-35	Goldstein 1963
Especies subtropicales			
Schizochytrium limacinum Honda y Yokochi	0-30	15-30	Honda et al 1998
Schizochytrium sp N-1	5-30	15-25	Kamlangdee &Fan 2003
Schizochytrium sp.N-2	0-30	20-30	
***Thraustochytrium* M12-X**	2-40	29	en este estudio

Thraustochytrium M12-X muestra un muy bajo consumo de glucosa (<1%, datos no mostrados). Se ha señalado que algunos microorganismos marinos muestran una capacidad limitada para usar carbohidratos como única fuente de carbono y energía (Ivanova et al., 2000). Iida et al. (1996) reportan que durante la fermentación de medio basal (glucosa 0,5%, EL 0,1%, GMS 0,2%) por *Thraustochytrium aureum* el consumo de glucosa fue de solo un 17%. El escaso crecimiento observado en la fermentación del medio sin glucosa se explicaría por el consumo de GMS tal como ha sido reportado por *Schyzochytrium* G13/2S (Ganuza e Izquierdo (2007). Iida et al. (1996) sugieren que el GMS es el componente del medio de cultivo más importante y en general es la fuente de nitrógeno orgánico más aceptada por distintas cepas de thraustochytridos. Al igual que el GMS, el extracto de levadura, promueve la formación de biomasa; sin embargo este efecto ocurre para bajas concentraciones mostrando un efecto negativo para concentraciones mayores a 4 g L^{-1}. El incremento del pH del medio de cultivo durante el crecimiento se explica por la fermentación de aminoácidos. En su ambiente natural los thraustochytridos se encuentran generalmente asociados a material en descomposición para cuya degradación cuentan con la capacidad de producir proteasas (Bongiorni et al., 2005). Estas proteasas le proveerían con aminoácidos y péptidos que son metabolizados y usados para la síntesis de AG.

En microorganismos oleaginosos la producción de lípidos se favorece por altas relaciones C/N. La limitación por N desencadena una serie de reacciones que resultan en la acumulación de lípidos y la detención del crecimiento (Ratledge, 2004). Este mecanismo no queda tan claro en thraustochytridos que presentan ambos comportamientos. En diferentes cepas de Schizochytrium la síntesis de lípidos está asociada al crecimiento (Ganuza & Izquierdo, 2007; Ganuza et al., 2008).

La relación entre el GMS y el EL en el medio de cultivo determina la producción de biomasa y el contenido de AGT en la cepa M12-X. En la Figura 3.5 se observa que al

aumentar la razón GMS: EL la máxima concentración de biomasa se obtiene para una razón igual a 1. Por otra parte el porcentaje de AGT aumenta al aumentar esta razón con un aumento mayor para razones GMS: EL menores a 1. Estos resultados se explican si la cepa utiliza el GMS como fuente de C.

La modificación en el medio de cultivo B2 produjo también efecto sobre la producción de lípidos y DHA por la cepa bajo estudio. El mejor resultado, en cuanto a la producción de DHA (147 mg L^{-1}), se obtuvo al suplementar el medio de cultivo con vitaminas y elementos traza. Las vitaminas tienen un efecto positivo en la acumulación de DHA en los lípidos, pero negativo en la acumulación de lípidos. Por otra parte, los elementos como Mn^{+2} y Co^{+2} promueven la síntesis de lípidos participando como cofactores en la biosíntesis de AG, lo que explica el incremento de AG (principalmente no saturados) con una disminución de porcentaje de DHA en los AGT.

Ya que el cultivo en matraces no permite el control del pH y donde la transferencia de masa de oxígeno podría ser limitante, además de ser posible evaluar el contenido de oxígeno disuelto, se procedió a realizar cultivos en fermentador para evaluar si esos parámetros influían en la producción de biomasa y/o utilización de glucosa. Para las condiciones estudiadas se obtuvo una menor concentración biomasa con respecto a la obtenida en cultivos en matraces a los 3 días. De acuerdo a los resultados obtenidos es posible concluir que la incidencia de esos factores no influye mayormente en la producción de biomasa en matraces por *Thraustochytrium* M12-X.

Las cepas de thraustochytridos utilizan una amplia variedad de fuentes de carbono (Li & Ward, 1994; Yokochi et al., 1998; Fan et al., 2001; Yamasaki et al., 2006; Unagul et al., 2007). Basados en estos resultados se realizaron ensayos utilizando distintas fuentes de carbono (fructosa, glicerol, piruvato, citrato) (Tabla 3.9) y (almidón, maltosa) (comunicación

oral con B.Quilodrán). En todos estos ensayos la concentración de biomasa se encontró entre 0,28 y 1,2 g L^{-1}, similares o inferiores a los obtenidos con glucosa.

Particularmente, el uso de piruvato y citrato como fuentes de C que podrían aportar directamente al ciclo de Krebs, no permitieron incrementar la concentración de biomasa. Al mismo tiempo, el uso de piruvato resultó en una menor acumulación de DHA en la biomasa.

Como se mencionó anteriormente, un aspecto importante de destacar es que el microorganismo consume en forma poco eficiente la glucosa. Explicaciones para este comportamiento son la posible inhibición de las enzimas involucradas en la glicólisis, defectos o ausencia en el sistema de transporte de azúcar. Se realizaron algunos estudios preliminares para evaluar la permeabilidad de la membrana y presencia de hexoquinasa (EC.2.7.11) una de las enzimas presentes en la glicólisis. En los estudios de permeabilidad de la membrana y posterior incubación con glucosa, no mostraron un efecto en la concentración de glucosa residual.

La cepa se considera una buena productora de DHA, con un 57% DHA en AGT (adición de vitaminas) si se compara con thraustochytridos de los géneros *Thraustochytrium y Schyzochytrium* cuyo rango de contenido de DHA en los AGT fluctúa entre 25 y 60 %. Además, su perfil de AGPIs bastante simple y se clasificaría en el grupo 3 (DHA/EPA) propuesto por Huang et al., (2003).

Se hace necesario conducir nuevos estudios para optimizar la composición del medio cultivo para incrementar la producción de biomasa. Los resultados obtenidos han permitido definir la temperatura, pH y salinidad que permiten la mayor producción de biomasa. Además, se ha logrado establecer la importancia del GMS y la necesidad de suplementar el medio de cultivo con vitaminas, fosfato para el cultivo de la cepa M12-X. La capacidad de producción de DHA por nuevas cepas es de vital importancia ya que esto entrega mayores

conocimientos en el comportamiento de estos microorganismos los cuales son una alternativa a la obtención de AGPI ω3 específicamente DHA.

CAPITULO 4

4.1 Proyecciones del estudio

La producción heterotrófica de aceites ricos en AGPIs específicamente DHA, por microorganismos marinos del orden Thraustochytriales puede ser una alternativa técnica y económica a la actual fuente de estos aceites, el aceite de pescado.

Las proyecciones de este estudio se dividen en dos líneas, la primera dice relación al trabajo en Chile de colectar, aislar e identificar cepas nativas del orden Thraustochytriales. Para ello se requiere:

- Mejoramiento en el proceso de aislamiento, incluyendo una etapa que permita seleccionar cepas capaces de usar fuentes de carbono de bajo costo.
- Mantención de cepas. Evaluar técnicas para la mantención de las cepas aisladas de forma de contar con material que asegure la reproducibilidad en fermentaciones, disminuyendo los riesgos de variaciones producto de mutaciones después de propagaciones sucesivas.
- Realizar estudios fisiológicos para identificar las enzimas claves y el control de éstas de las rutas utilizadas por estos microorganismos en la producción de biomasa y otros metabolitos.
- Realizar estudios para mejoramiento de cepas mediante mutaciones inespecíficas e ingeniería genética.

En forma particular lo que se refiere al estudio de la cepa *Thraustochytrium* M12-X:

- Optimizar medios de cultivos.

- Optimizar proceso de fermentación (por lote alimentado, por lotes sucesivos, cultivo continuo u otro)

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES

- Se ha estimado que para el año 2010 el aceite de pescado necesario para suplir las necesidades de la industria acuícola representarán alrededor de 1,2 millones de toneladas, lo que corresponde a un 92% de la producción mundial. Se debe señalar que además se prevé una demanda equivalente al 10% de la producción mundial de aceite de pescado para otro tipo de productos (farmacéuticos / nutricionales).

- Aceites microbianos son una alternativa al aceite de pescado y muchos microorganismos tiene la capacidad de producir AG, los que producen más de 20% de lípidos en su biomasa son llamados microorganismos oleaginosos. Bacterias, hongos ,microalgas y thraustochytridos producen AG en diferentes proporciones y muchos de ellos producen AGPI de cadena larga.

- Surge la necesidad de evaluar fuentes alternativas para la obtención de AGPI ω3 y desarrollar tecnologías para una producción a gran escala que cumplan con las exigencias de calidad necesaria para cada uno de los productos.

- La información disponible demuestra que los microorganismos marinos del orden Thraustochytriales específicamente del género *Thraustochytrium, Schizochytrium* y *Ulkenia* tienen la capacidad de sintetizar *de novo* AGPIs específicamente DHA y pueden producirlos como un alto porcentaje en los

AGT en la biomasa. Para constituirse en alternativas al aceite de pescado debe.

- Los protistas heterotróficos del phylum Heterokonta (Labyrinthulomycota), orden Thraustochytriales se encuentran distribuidos ampliamente en diferentes ambientes marinos y también en la zona costera de Puerto Montt, Estuario de Reloncaví, Chile. De 46 cepas que presentaron las características morfológicas de Thraustochytriales, 16 cepas presentaron el perfil de producto de PCR característico (tres bandas con tamaños entre 520 y 650 bp). Sin embargo, seis de las 16 cepas, tuvieron la capacidad de producir DHA (0,09 -33,8 mg L^{-1}) bajo condiciones no optimizadas de crecimiento en medio basal (1% de glucosa, 0,4% extracto de levadura en agua de mar al 70%).

- Las seis cepas secuenciadas pertenecen al Phylum Labyrinthulomycota (Heterokonta) y se agrupan en diferentes cluster en el árbol generado.

- La cepa de *Thraustochytrium* M12-X fue la seleccionada para estudiar su capacidad de crecer heterotróficamente en cultivo en matraces ya que fue la cepa que presentó la mayor cantidad de biomasa y DHA. El rendimiento de DHA es considerado como: Concentración de biomasa o concentración celular, contenido de AGTs en la biomasa y la proporción de DHA en estos AGT. La cantidad de DHA producida por la cepa es altamente dependiente del medio. Fluctúa entre el 14,6 al 57 % de DHA en los ácidos grasos totales (AGT).

- En los estudios del efecto de los parámetros: tiempo de crecimiento, salinidad, temperatura, pH, sobre la concentración de biomasa y DHA, la cepa presentó

el máximo crecimiento celular en medio basal de 1,1 g L^{-1} a las 72 h con una velocidad específica de crecimiento de 0,08 h^{-1}. La concentración de DHA fue de 113 mg L^{-1}. En el rango de temperaturas estudiado (10 -30° C) la máxima concentración de biomasa y DHA se obtuvo a 25° C. Además, mostró amplia tolerancia al rango de salinidad estudiada (2 - 40 ‰) presentando la mayor concentración de biomasa a una salinidad de 29 ‰ y mayor contenido de DHA en la biomasa a salinidad 10 ‰. La máxima concentración de biomasa se obtuvo en cultivos cuyo pH inicial es 7 con un contenido de DHA en la biomasa (103 mgg^{-1}).

- Los resultados obtenidos en fermentaciones por lote con control de pH, y aireación permitieron establecer que el control de pH y la aireación no son factores que limiten el crecimiento de la cepa por lo que los cultivo en matraces son una opción para la optimización de las condiciones de crecimiento.

- La adición vitaminas y elementos traza no afectó la concentración de biomasa. Sin embargo, mostraron un efecto positivo en el contenido de DHA en la biomasa (118,9 mg g^{-1}).

- Bajo las condiciones de crecimiento estudiadas *Thraustochytrium* M12-X la glucosa no es la fuente de carbono usada por esta cepa. En el medio de cultivo sin glucosa se obtienen 0,51 g L^{-1} de biomasa, 120 mg g^{-1} de DHA y 61,7% de DHA en los AGT; al aumentar la concentración de glucosa a 20 g L^{-1} manteniendo constante los otros nutrientes la biomasa obtenida aumenta a 1,1 g L^{-1}, y el contenido de DHA en la biomasa y porcentaje de DHA en los AGT

disminuyen a 103 mg g^{-1} y 47%, respectivamente. Para concentraciones de glucosa entre 20 y 40 g L^{-1} la concentración de biomasa se mantiene constante no así el contenido de DHA en la biomasa, el que cae dramáticamente cuando la concentración de glucosa es de 40 g L^{-1}. Sobre 40 g L^{-1} la concentración de glucosa tiene un efecto inhibitorio en el crecimiento de *Thraustochytrium* M12-X.

- El efecto del extracto de levadura y el GMS influyen en el crecimiento y producción de AGT y DHA por *Thraustochytrium* M12-X. El primero contribuye con factores de crecimiento y su incremento disminuye los AGT y DHA en la biomasa. En lo que respecta al GMS, éste tiene un efecto significativo en la producción de biomasa coincidiendo con lo propuesto por otros autores que indican que es el componente en el medio más importante y en general es la fuente de nitrógeno orgánico más aceptada por los thraustochytridos. Además, podría explicar la producción de biomasa al ser utilizado como fuente de carbono y de nitrógeno por *Thraustochytrium* M12-X.

- La cepa M12-X no se incrementa al usar fructosa, glicerol, citrato, piruvato como fuentes de carbono.

- Para el cultivo de *Thraustochytrium* M12-X, el fosfato es un componente fundamental ya que permite aumentar la concentración de biomasa en un 100% (2,2 g L^{-1}). Sin embargo, bajo esta condición la cepa privilegia la formación de biomasa a expensas de la acumulación de reserva de energía.

BIBLIOGRAFÍA

Aidos I. (2001). Upgrading of maatjes herring byproducts: production of crude fish oil. J. Agric. Food. Chem. 49.

Aidos I. (2002). Production of High-Quality Fish Oil From Herring Byproducts. Ph. D. Thesis . Wageningen University. Wageningen. The Netherlands.

Aki AU, Hachida T, Yoshinaga K, Katai M, YamasakiY, Kawamoto T, Kakizono S, Maoka T, Shigeta T, Susuki S, Oono K. (2003). Thraustochytrids as a potential source of carotenoids. J Am Oil Chem Soc. 80: 789-794.

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ.(1990).Basic local alignment search tool. J Mol Biol. 215:403-410.

Bailey RB, DiMasi D, Hansen JM, Mirrasoul PJ, Ruecker CM, Veeder GM, Kaneko T, Barclay WR. (2003). Enhanced production of lipids containing polyenoic fatty acid by very high density cultures of eukaryotic microbes in fermentors. USPatent 6,607,900

Bajpai P, Bajpai PK, Ward OP. (1991). Production of docosahexaenoic acid (DHA) by *Thraustochytrium aureum*. Appl Microbiol Biotechnol. 35: 706-710.

Bajpai P, Bajpai, PK. (1993). Eicosapentanoic acid (EPA) production from microorganisms: a review. J Biotechnol. 30: 161-183.

Bahnweg G; Sparrow FK (1974) Four new species of Thraustochytrium from Antarctic regions, with notes on the distribution of zoosporic fungi in the antarctic marine ecosystems. American Journal of Botany. 61(7): 754-766

Bahnweg G. (1979). Studies on the physiology of Thraustochytriales. Veroff. Inst. Meeresforsch. Bremerh. 17: 245-268.

Barbosa MJGV.(2003). Microalgal photobioreactors: scale–up and optimization. Ph.D. Thesis. Wageningen University. Wageningen. The Netherlands.

Barclay WR, Meager KM, Abril, JR. (1994). Heterotrophic production of long chain omega – 3 fatty acids utilizing algae and algae-like microorganisms. J Appl Phycol. 6**:** 123-129.

Barclay WR. (1992). Process for the heterotrophic production of microbial oils with high concentrations of omega – 3 highly unsaturated fatty acids. U.S Patent no.5, 130, 242.

Barclay WR. (1994). Process for growing *Thraustochytrium* and *Schizochytrium* using non–chloride salts to produce a micro-floral biomass having omega-3 highly unsaturated fatty acids. U.S Patent no. 5,340,742.

Barclay WR. (2001). Eggs containing high concentrations of omega–3 highly unsaturated fatty acids and methods for producing the same. US Patent 20010000151.

Barclay W, Abril R, Abril P, Weaver C, Ashford A. (1998). Production of docosahexaenoic acid microalgae and its benefits for use in animal feeds. World Rev Nutr Diet. 83: 61-76.

Barclay W, Weaver C, Metz J. (2005).Development of a docosahexaenoic acid production technology using *Schizochytrium*: a historical perspective. In Cohen & Ratledge Eds. Single Cell Oil. AOCS PRESS.36-52

Ben–Amotz A. Fishler R. Schneller A. (1987). Chemical composition of dietary species of marine unicellular algae and rotifers with emphasis on fatty acids. Marine Biology. 95: 31-36.

Bowles RD, Hunt AE, Bremer GB, Duchars MG, 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 docosahexanoic acid production. J Biotechnol. 70**:**193-202.

Bongiorni L. (1998). Seasonal changes and species assemblage of a mediterranean thraustochytrid community in The Journal of Eukaryotic Microbiology.19 th Annual Meeting, October. 27-28.

Bongiorni L, Pignataro L, Santangelo G. (2004).Thraustochytrids (fungoid protists): an unexplored component of marine sediment microbiota. Scientia Marina. 68:43-48.

Bongiorni L, Jain R, Raghukumar S, Aggarwal RK . (2005). *Thraustochytrium gaertnerium sp*. nov.: a new Thraustochytrid Stramenopilan protist from mangroves of Goa, India. Protist. 156: 303-315

Bongiorni L, Pusceddu A, Danovaro R. (2005). Enzymatic activities of epiphytic and benthic thraustochytridos involved in organic matter degradation. Aquatic Microbial Ecology. 41:299-305

Burja AM, Radianingtyas H, Windust A, Barrow CJ. (2006). Isolation and characterization of polyunsaturated fatty acid producing Thraustochytrium species: screening of strains and optimization of omega-3 production. Appl Microbiol Biotechnol.72:1161-1169.

Carmona ML, Naganuma T, Yamaoka Y. (2003). Identification by HPLC-MS of carotenoids of the Thraustochytrium CHN–1 strain isolated from the Seto Inland Sea. Bios Biotechnol Biochem. 67 (4): 884-888.

Cavalier- Smith T. (1993). Kingdom Protozoa and its 18 phyla. Microbiol. Rev. 57: 953-994.

Cavalier–Smith T, Allsopp MTEP, Chao EE. (1994). Thraustochytrids are chromist, not fungi: 18S rRNA signatures of heterokonta. Biol Sci. 346: 387-397.

Certik M, Shimizu S. (1999). Biosynthesis and regulation of microbial polyunsaturated fatty acid production. J Biosci Bioeng. 87:1-14.

Chamberlain A, Moss S. (1988). The thraustochytrids: a protist group with mixed affinities. Biosystems. 21: 341- 349.

Cohen Z, Khozin-GoldbergD, Adlerstein D,Bigogno C.(2000).The role of triacylglicerol as a reservoir of polyunsaturated fatty acids for the rapid production of chloroplastic lipids in certain microalgae. Biochem Soc Trans. 28:740-743.

Dick MW. (2001). Straminipilous fungi. Kluwer Academic Publishers. Doldrecht. Netherlands.670pp.

Fan KW, Chen F, Vrjimoed LLP. (2001). Eicosapentanoic and docosahexaenoic acid production by and Okara-utilizing potential of thraustochytridos. J Ind Microbial and Biotechnol. 27: 199- 202.

Fan KW, Vrijmoed LLP, Jones EBG. (2002). Physiological studies of subtropical mangrove Thraustochytrids. Mar Bot. 45: 50 -57.

Fan KW, Jiang Y,Faan YW,Chen F. (2007). Lipid characerization of mangrove Thraustochytrid-*Schizochytrium mangrovei.* J.Agric.Food Chem.55(8):2906-2910.

FAO. (2004). The state of the world fisheries and aquaculture. In (Ed.). vol .Rome. 1-115.

Ganuza E, Izquierdo MS. (2007).Lipid accumulation in Schizochytrium G13/2S produced in continues culture. Appl Microbiol Biotechnol. DOI 10.1007/s00253-07-1019-4.

Ganuza E, Anderson AJ, Ratledge C*. (2008). High-cell-density cultivation of* Schizochytrium *sp. in an ammonium/pH-auxostat fed-batch system . Biotechnology Letters. 0141-5492 (Print) 1573-6776 (Online).*

Gandhi SR, Weete JD. (1991). Production of the polyunsaturated fatty acids arachidonic acid and eicosapentaenoic acid by the fungus *Pythium ultimum*. J Gen Microbiol. 137: 1825-1830.

Gladue RM, Maxey JE. (1994). Microalgal feeds for aquaculture.J.Appl.Phycol.6:131-41.

Goldstein S. (1973). Zoosporic marine fungi (thraustochytriaceae and Dermocystidiaceae).Annu.Rev.Microbiol.27:13-25.

Hammond BG, Mayhew DA, Naylor MW, Ruecker FA, Mast RW, Sander WJ. (2001). Safety assessment of DHA-rich microalgae from *Schizochytrium sp.* Reg Tox Pharm. 33: 192-204.

Hansson L, Dostalek M. (1988). Effect of culture conditions on mycelial growth and production of gamma linolenic acid by *Mortierella ramanniana*. Appl Microbiol Biotechnol 28**:** 240-246.

Honda D, Yokochi Y, Nakahara T, Erata M, Higashihara T. (1998). *Schizochytrium limacinum* sp. Nov., a new thraustochytrid from a mangrove area in the west Pacific Ocean. Mycol. Res.102 (4):439-448.

Huang J, Aki T, Hachida K, Yokochi T, Kawamoto S, Shigeta S, Ono K, Suzuki O. (2001). Profile of polyunsaturated fatty acids produced by Thraustochytrium sp. KK17-3. JAOCS.78 (6): 605-610.

Huang J, Aki T, Yokochi T, Nakahara T, Honda D, Kawamoto S, Shigeta S, Ono K, Suzuki O. (2003). Grouping newly isolated docosahexaenoic acid-producing Thraustochytrids based on their polyunsaturated fatty acid profiles and comparative analysis of 18S rRNA genes. Mar Biotechnol. 5: 450-457.

Iwamoto H, Sato G. (1986). Production of EPA by freshwater unicellular algae. J Am Oil Chem Soc. 63: 434-438.

Iida Iwao, Nakahara T, Yokochi T, Kamisaka Y, Yagi H, Yamaoaka M, Suzuki O. (1996). Improvement of docosahexaenoic acid production in a culture of *Thraustochytrium aureum* by medium optimization. J Fermentation and Bioeng. (1): 76-78.

IFFO. (2001). Sostenibilidad de la oferta de harina y aceite de pescado. Documento presentado en la Conferencia Escocesa-Noruega sobre el futuro sostenible para la crianza de Pescado en Granjas. http://www.iffo.org.

Jang HD, Lin YY, Yang SS. (2000). Polyunsaturated fatty acid production with *Mortierella alpina* by solid substrate. Bot Bull Acad Sin. 41**:** 41-48.

Jain R, Raghukumar S, Tharanathan R, Bhosle NB. (2005).Extracellular polysaccharide production by thraustochytrid protists. Marine Biotechnology .7(3):184-192.

Jain R, Raghukumar S, Sambaiah K, Kumon Y, Nakahara K. (2007). Docosahexaenoic acid accumulation in thraustochytrids: search for rationale. Mar Biol. **151:**1657-1664.

Jiang Y, Chen F, Liang S. (1999). Production potential of docosahexaenoic acid by the heterotrophic marine dinoflagellate *Crypthecodinium cohnii*. Process Biochem. 34: 633-637.

Jiang Y, Fan KW, Wong RTY, Chen F. (2004). Fatty acid composition and squalene content of the marine microalga *Schizochytrium mangrovei.* J Agric Food Chem. 52: 1196-1200.

Jiang Y, Chen F. (2000). Effects of temperature and temperature shift on docoshexaenoic acid production by marine microalga *Crypthecodinium cohnii* .Jam.Oil Chem.Soc.77:613-617.

Kimura H, Fukuba T, Naganuma T. (1999). Biomass of Thraustochytrids protoctists in coastal water. Mar Ecol Prog Ser. 189**:** 27-33.

Kimura H, Sato M, Sugiyama C, Nagamuna T. (2001). Coupling of thraustochytrids and POM and of bacterio-and phytoplankton in a semi-enclosed coastal area: implication for different substrate preference by the planktonic descomposers. Aquatic Microbial Ecol. 25:293-300.

Kumon Y, Yokoyama R, Yokochi T, Nakahara T, Yamaoka M, Mito K.(2002). Production of long chain polyunsaturated fatty acids by monoxenic growth of labyrinthulids on oil-dispersed agar medium. Appl Microbiol Biotechnol. 60: 275-280.

Kumon Y, Yokoyama R, Yokochi T, Honda D, Nakahara T. (2003). A new labyrinthulid isolate, which solely produces n-6 docosapentanoic acid. Appl Microbiol Biotechnol. 63: 22-28.

Kumon Y, Yokoyama R, Haque Z, Yokochi T, Honda D, Nakahara T. (2005). A new labyrinthulid isolate that produces only docosahexaenoic acid. Mar Biotechnol 0:1-8.

Leander C A, Porter D. (2000). Redefining the genus Aplanochytrium (phylum Labyrinthulomycota). Mycotaxon. 76**:** 439-444.

Leander C A, Porter D, Leander BS. (2004). Comparative morphology and molecular phylogeny of aplanochytrids (Labyrinthulomycota). Eur J Protistology. 40: 317-328.

Lewis TE, Nichols PD, Mc Meekin TA. (1999). The biotechnological potential of Thraustochytrids. Mar Biotechnol. 1: 580-587.

Lewis TE, Nichols PD, McMeekin Ta. (2000). Evaluation of extraction methods for recovery of fatty acids from lipid-producing microheterotrophs. J Microbiol Methods.43:107-116.

Lewis TE, Nichols PD, Mc Meekin TA. (2001). Sterol and squaleno content of a docosahexaenoic-acid-producing thraustochytrid: influence of culture age, temperature and dissolved oxygen. Mar. Biotechnol.3:439-447.

Li Zy, Ward OP. (1994). Production of docosahexaenoico acid by *Thraustochytrium roseum*. J Ind Microbiol. 13: 238-241.

Mai Le P, Fraser C, Gardner G.(2007).Biosynthetic production of universally ^{13}C-labelled polyunsaturated fatty acids as refernce materials for natural health product research. Anal Bioanal Chem 389:241-249.

Mataix J. (2002). Los ácidos grasos omega-3. Mundo científico. 235: 46-51.

Meyer A, Cirpus P, Ott C, Schlecker R, Zähringer U, Heiz E. (2003). Biosynthesis of docosahexaenoic acid in *Euglena gracilis*: biochemical and molecular evidence for the involvement of a Δ4-fatty acyl group desaturase. Biochem 42: 9779-9788.

Metz JG, Roessler P, Facciotti D, Levering C, Dittrich F, Lassner M, Valentine R, Lardizabal K, Domergue F, Yamada A, Yazawa K, Knauf V, Browse J. (2001). Production of polyunsaturated fatty acids by polyketide synthases in both prokaryotes and eukaryotes. Science. 293: 291-293.

Miller MR, Nichols PD, Carter CG. (2007). Replacement of fish oil with thraustochytrid *Schizochytrium sp*. L oil in Atlantic salmon parr (*Salmo salar* L) diets. Comp. Biochem. and Physiol.doi:10.1016/j.cbp.2007.05.018.

Mo C, Rinkevich B. (2001). A simple, reliable, and fast protocol for Thraustochytrid DNA extraction. Mar Biotechnol. 3**:** 100-102.

Mo C, Douek J, Rinkevich B. (2002). Development of a PCR strategy for thraustochytrid identification based on 18S r DNA sequence. Mar Biol. 140: 883 -889.

Mitrano V. (2007) Estabilidad para la harina y aceite de pescado en revista AQUA. 38-43.

Morita E, Kumon Y, Nakahara T, Kagiwada S, Noguchi T.(2006).Docosahexaenoic acid production and lipid-body formation in *Schizochytrium limacinum* SR21. Marine Biotechnology. 8:319-327.

Moro I, Negrisolo E, Callegaro A, Andreoli C. (2003). *Aplanochytrium stochinnoi*: a new Labyrinthulomycota from the Southern Ocean (Ross Sea, Antarctica). Protist. 154: 331-340.

Nagamuna T, Kimura H, Karimoto R. Pimenov NV. (2006). Abundance of planktonic thraustochytridos and bacteria and the concentration of particulate ATP in the Greenland and Norwegian Seas. Polar BIosci. 20**:** 37-45.

Naylor RL, Goldburg RJ, Primavera JH, Kautsky N, Begeridge MCM, Clay J, Folke C, Lubchenco J, Mooney H, Troell M. (2000). Effect of aquaculture on world fish supplies. Nature. 405: 1017-1024.

Nettleton JA. (1993). Are n-3 fatty acids essential nutrients for fetal and infant development ?. J Am Dietetic Assoc. 93:58-64.

Nichols DS, Nichols PD, McMeekin TA. (1993). Polyunsaturated fatty acids in antarctic bacteria. Antarct Sci. 5: 149-160.

Nichols DS, Hart P, McMeekin TA. (1996).Enrichment of the rotifer *Brachionu*s *plicatilis* fed an Antarctic bacterium containing polyunsaturated fatty acids. Aquaculture. 147:115-125.

Nichols DS, Sanderson K, Buia A, Van de Kamp J, Holloway P,. Bowman JP, Smith M, Cancuso C, Nichols P, Nichols D, McMeekin TA. (2002). Jabour-Green, J. & Haward, M. (Eds). 'en Bioprospecting and Biotechnology in Antarctica" in *The Antarctic: Past, Present and Future*. Antarctic CRC Research Report #28. Hobart. 85-103.

Nichols, P. (2003). Omega-3 Oils-Past, Present and Future. Pacific Lipids Conference Auckland, New Zealand, November 17-18.

Pomponi SA. (1999). The bioprocess–technological potential of the sea. J Biotechnol. 70:5–13.

Porter D. (1989). Phylum Labyrinthulomycota. In Margulis et al. eds: Handbook of Protoctists, Boston: Jones & Bartlett Publishers, 338-398.

Qiu X, Hong HP, Mackenzie SL. (2001). Identification of a Δ4 fatty acid desaturase from *Thraustochytrium sp.* involved in biosynthesis of docosahexaenoic acid by heterologous expression in *Saccharomyces cerevisiae* and *Brassica juncea*. J Biol Chem. 276**:** 31561-31566.

Qiu X. (2003). Biosynthesis of docosahexaenoic acid (DHA, 22:6-4, 7, 10, 13, 16, 19): two distinct pathways. Prost Leuk and Es Fat acids. 68**:** 181-186.

Raghukumar S. (1988). *Schizochytrium octosporum* sp. nov.- and other thraustochytrids from the North Sea (Rosfjord, Norway). Trans. Br. Mycol. Soc. 90 (2): 273-278.

Raghukumar S. (1979). Observations of the life cycle and movement of the Thraustochytrid *Ulkenia amoeboidea* (Bahnweg & Sparrow) from the North Sea. J Protozool. 26 (4): 564-566.

Raghukumar S. (1980). *Thraustochytrium benthicola* sp. nov: a new marine protist from the North Sea. Trans. Br. Mycol. Soc. 74(3):607-614.

Raghukumar S. (1992). Bacterivory: a novel dual role for thraustochytrids in the sea. Mar Biol. 113: 165-169.

Raghukumar S, Anil AC, Khandeparker L, Patil JS. (2000). Thraustochytrids protists as a component of marine microbial films. Mar Biol. 136: 603-609.

Raghukumar S. (2002). Ecology of the marine protists, the Labyrinthulomycetes (Thraustochytrids and Labyrinthulids). Europ J Protistol. 38: 127-145.

Ratledge C, Kanagachandran K, Anderson AJ, Grantham DJ, Stephenson JC. (2001). Production of docosahexaenoic acid (DHA) by *Crypthecodinium cohnii* grown in a pH-auxostat culture with acetic acid as principal carbon source. Lipids. 36: 1241-1246.

Ratledge C. (2002). Regulation of lipid accumulation in oleaginous micro-organisms. Biochem Soc Trans..30(6):1047-1050.

Ratledge C. (2004). Fatty Acid biosynthesis in microorganisms being used for Single Cell Oil production. Biochemie. 86:807-815.

Ratledge C. (2005).Single Cell Oils for the 21st Century. In Cohen & Ratledge Eds. Single Cell Oil. AOCS PRESS. 1-20.

Rees JF, Cure K, Piyatiratitivorakul S, Sorgeloos P, Menasveta P. (1994). Highly unsaturated fatty acid requirements of *Penaeus monodon* postlarvae-an experimental approach based on *Artemia* enrichment. Aquaculture. 122**:** 193-207.

Roessler PG. (1990). Environmental control of glycerolipid metabolism in microalgae: commercial implications and future research directions. J Phycol. 26: 393-399.

Russel NJ, Nichols DS. (1999). Polyunsatured fatty acids in marine bacteria - a dogma rewritten. Microbiol. 145: 767-779.

Saglik S, Imre S. (2001). ω3-fatty acids in some fish species from Turkey. J Food Sci. 66 (2): 210-212.

Sakuradani E, Takeno S, Abe T, Shimizu S. (2005). Arachidonic acid-producing *Mortierella alpina* creation of mutants and molecular breeding. In Cohen & Ratledge Eds. Single Cell Oil. AOCS PRESS. 21-35.

Saitou N, Nei M. (1987).The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol Biol Evol.4:406-425.

Salhi M, Izquierdo MS, Hernandez-Cruz CM, González M, Fernandez-Palacios H. (1994). Effect of lipid and n-3 HUFA levels in microdiets on growth, survival and fatty acid composition of larval Gilthead seabream (*Sparus aurata*). Aquaculture. 124: 275-282.

Sayanova OV, Napier JA. (2004). Eicosapentaenoic acid: biosynthetic routes and the potential for synthesis in transgenic plants. Phytochem. 65: 147-158.

Shimizu S, Kawashima H, Akimoto K, Shinmen Y, Yamada H. (1988). Conversion of linseed oil to an eicosapentanoic acid containing oil by *Mortierella alpina* at low temperature. Appl Microbiol Biotechnol. 43: 1-4.

Simopoulos AP. (1991). Omega-3 fatty acids in health and disease and in growth and development. Am J Clin Nutr. 54**:** 438-463.

Skerratt JH, Bowmann JP, Nichols PD. (2002). *Shewanella olleyana* sp. nov., a marine species isolated from a temperate estuary which produces high levels of polyunsaturated fatty acids. Int J System Evol Microbiol. 52: 2101-2106.

Sinclair AJ, Abedin L. (2001).The effect of alpha-linolenic acid on retinal function in mammals. Chapter 7, eds Shahidi F & Finley JW Omega 3 fatty acids: Chemistry, Nutrition & Health, 79-90. American Chemical Society Washington, DC.

Sinclair AJ, Murphy KJ, Li D. (2000). Marine lipids: Overview, new insights and lipid composition of lyprinol. Allerg Immunol. 32: 261-271.

Singh A, Ward OP. (1996). Production of high yields of docosahexaenoico acid by *Thraustochytrium roseum* ATCC 28210.J Ind Microbiol. 16: 370-373.

Song X , Zhang X, Guo N, Zhu l, Kuang Ch.(2007).Assessment of marine thraustochytrid *Schizochytrium limacinum* OUC88 for mariculture by enriched feeds. Fisheries Science. 73: 565-573.

Sparrow FK. (1960). Aquatic Phycomycetes. The University of Michigan Press, Ann Arbor

Sprecher H. (2000). Metabolism of highly unsaturated -3 and n-6 fatty acids. Biochim. Biophys. Acta. 1486:219-231.

Swaaf ME, Rijk TC, Eggink G, Sijtsma L. (1999). Optimization of docosahexaenoic acid production in batch cultivation by *Crypthecodinium cohnii*. J Biotechnol. 70:185-192.

Swaaf ME, Pronk JP, Sijtsma L. (2003). Fed-batch cultivation of the docosahexaenoic-acid-producing marine alga *Crypthecodinium cohnii* on ethanol. Appl Microbiol Biotechnol. 61: 40-43.

Tanaka S, Yaguchi T, Shimizu S, Sogo T, Fujikawa S. (2003). Process for preparing docosahexaenoic acid and docosapentaenoic acid with ulkenia. U.S Patent no.6,509,178.

Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position - specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res. 22: 4673-4680

Uauy R, Peirano P, Hoffmann D, Mena P, Birch D, Birch E.(1996). Role of essential fatty acids in the function of the developing nervous system. Lipids. 31**:** 167-176.

Unagul P, Assantachai C, Phadungruengluij S, Suphantharika M, Tanticharoen M, Verduyn C.(2007).Coconut water as a medium additive for the production of docosahexaenoico acid(C22:6 n3) by *Schizochytrium mangrovei* Sk-02.Bioresource Technology. 98:281-287.

Valenzuela A, Romo C, Nieto S. (1995). Tecnologías aplicables a la industrialización de aceites marinos para permitir su aplicación a la alimentación. Alimentos. 20: 1-14.

Yaguchi T, Tanaka S, Yokochi T, Nakahara T, Higashihara T. (1997). Production of high yields of docosahexaenoic acid production by *Schizochytrium limacinum* SR21. J Am Oil Chem Soc. 74: 1431-1434.

Yamasaki T, Aki T, Shinozaki M, Taguchi M, Kawamoto S, Ono Kazuhisa. (2006). Utilization of Sochu distillery wastewater for production of polyunsaturated fatty acids and xanthophylls using thraustochytrid. J Biosci and Bioenging. 102 (4): 323-327.

Yap Ch Y. (2001). Production of Docosahexaenoic Acid by Thraustochytrium sp. Under heterothrophic conditions of growth.BSc Thesis.University of Hong Kong. 80- 98.

Yazawa K. (1996). Production of eicosapentanoic acid from marine bacteria. Lipids. 31 Suppl: S297-300.

Yokochi TD, Honda T, Higashihara, Nakahara T. (1998). Optimization of docosahexanoic acid production by *Schizochytrium limacinum* SR21. Appl Microbiol Biotechnol. 49: 72-76.

Yongmanitchai W. & Ward OP. (1989).Omega-3 fatty acids: Alternative sources of production.Proc.Biochem.24:117-125.

Yokohama R, Honda D. (2007).Taxonomic rearrangement of the genus *Schyzochytrium* sensu lato base don morphology, chemotaxonomic characteristics, and 18S rRNA gene phylogeny (Thraustochytriaceae, Labyrinthulomycetes):emendation for *Schyzochytrium* and erection of *Aurantiochytrium* and *Oblongichytrium* gen. nov. Mycoscience. 48:199-211.

Yu R, Yamada A, Watanabe K, Yazawa K, Takeyama H, Matsunaga T, Kurane R. (2000). Production of eicosapentanoic acid by a recombinant marine cyanobacterium, *Synechococcus sp*. Lipids. 35 (10): 1061-1064.

Vazhappilly R, Chen F. (1998). Eicosapentanoic acid and docosahexaenoic acid production potencial of microalgae and their heterotrophic growth. JAOCS. 75(3): 393-397.

Ward OP, Singh A. (2005) .Omega -3/6 fatty acids: Alternative sources of production. Process Biochemistry**.** 40:3627-3652.

Wen Z, Chen F. (2005). Prospects for eicosapentanoic acid production using microorganisms. In Cohen & Ratledge Eds. Single Cell Oil. AOCS PRESS. 1138-160.

Wynn J, Behrens P, Sundararajan A,Hansen J, Apt K.(2005). Production of Single Cell Oils by Dinoflagellates. In Cohen & Ratledge Eds.Single Cell Oil. AOCS PRESS. 86-98.

Weete JD, Kim H, Gandhi SR, Wang Y, Dute R. (1997). Lipids and ultraestructure of *Thraustochytrium* sp. ATCC 26185. Lipids. 32 (8):839-845.

Weete JD. (1980). Lipid biochemistry of fungi and other organism. Plenum.Press, New York: 9-48.

Wu ST, Yu ST, Lin LP.(2005). Effect of culture conditions on docosahexaenoico acid production by *Schyzochytrium* sp. S31.Proc. Biochem. 40: 3103-3108.

Zeller S, Barclay W, Abril R. (2001). Production of DHA from Microalgae. ACS Symposium Series 788, cap 9: 108-124.